

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SUBKRONİK 1800 MHz ELEKTROMANYETİK ALAN
UYGULANMIŞ SIÇANLARIN TESTİS DOKUSUNDA
PARİKALSİTOL'UN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Burcu DEMİRBAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Savaş AKTAŞ

MERSİN-2016

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SUBKRONİK 1800 MHz ELEKTROMANYETİK ALAN
UYGULANMIŞ SIÇANLARIN TESTİS DOKUSUNDA
PARİKALSİTOL'UN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Burcu DEMİRBAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Savaş AKTAŞ

Tez No: 308

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016-1-TP2-1406
no'lu proje olarak desteklenmiştir.

MERSİN-2016

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tez programı çerçevesinde yürütülmüş olan "Subkronik 1800 MHz Elektromanyetik Alan Uygulanmış Sıçanların Testis Dokusunda Parikalsitol'un Etkisinin İncelenmesi" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi
25/07/2016



Doç. Dr. Savaş AKTAŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Ebru BALLI
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Özgür ÇINAR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim kurulunun 08.08.2016.....tarih ve 2016/297.....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Banu COŞKUN MAZ
Enstitü Başkanı



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini her daim hissettiğim, bilimselliğin ve çalışmanın ne demek olduğunu öğrendiğim, bilimselliğini ve akılcılığını her zaman örnek aldığım ve alacağım, tezimin hazırlanmasında büyük desteğini ve emeğini gördüğüm çok değerli ve saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Savaş AKTAŞ'a, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ'a, Prof. Dr. Ebru BALLI'ya, Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ'a, Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na, Prof. Dr. Serap YALIN'a ayrıca emekli hocam Prof. Dr. Tülin BAYKAL'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Erkan ÖZBAY'a, Erkin ÖZDEMİR'e, Yılmaz DEMİR'e, Fatma SÖĞÜT'e, Didem DERİCİ'ye, Metin YILDIRIM'a ve Anabilim Dalımızda görev yapan çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Bugünlere gelmemde her zaman bana destek olan aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Histolojisi	3
2.2. Spermatogenez.....	5
2.2.1. Spermatositogenez	5
2.2.2. Spermiyogenez	7
2.2.3. Spermatogenik Hücreler	8
2.3. EMA ve Biyolojik Etkileri	10
2.4. EMA'nın Testis Üzerine Etkisi ve İnfertilite ile İlişkisi.....	13
2.5. Ki67 ve P63 Testisteki Fonksiyonel Etkisi	16
2.5.1. Ki67.....	16
2.5.2. P63.....	17
2.6. Elektromanyetik Alana Bağlı Hücre Hasarında Antioksidanların Etkileri	18
2.6.1. D Vitamininin Antioksidan Etkisi.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Deney Planı	22
3.2. Deneysel Gruplarının Oluşturulması	22
3.3. Deneklere Elektromanyetik Alan Uygulaması ve SAR Hesaplaması.....	23
3.4. Dokuların Elde Edilmesi.....	24

3.5. Işık Mikroskopik Doku Takip İşlemi	24
3.6. İmmünohistokimya İşaretleme Protokolü	26
3.7. Işık Mikroskopik Değerlendirme.....	27
3.7.1. Johnsen Skorlama Sistemi	28
3.7.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler	28
3.8. İstatistiksel Analiz	29
3.9. Biyokimyasal İncelemeler ve Kullanılan Yöntemler	29
3.9.1. Protein Ölçümü (Lowry Metodu)	30
3.9.2. Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini	31
3.9.3. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini.....	32
3.9.4. Malondialdehit Ölçümü	33
4. BULGULAR	35
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	35
4.1.1. Morfolojik Değerlendirme	35
4.1.2. Germinal Epitel Kalınlıkları ve Seminifer Tübül Çapları	41
4.1.3. Johnsen Skorlamaları	41
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	43
4.2.1. p63 İmmun İşaretlenmesi	43
4.2.2. Ki67	45
4.3. Antioksidan Enzim Bulguları.....	49
4.3.1. MDA Düzeyleri	49
4.3.2. SOD Düzeyleri	51
4.3.3. CAT Düzeyleri	52
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
7. KAYNAKLAR.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Spermatogenez aşamaları	6
Şekil 2.2.	Normal spermatogenez ve oksidatif stres altında spermatosit ve sperm kromatin yapısı	15
Şekil 2.3.	Spermatogenez için önemli başlıca antioksidan ürünleri	19
Şekil 2.4.	D vitamini metabolik yolağı.....	21
Şekil 3.1.	Elektromanyetik dalga düzeneği	24
Şekil 3.2.	H ₂ O ₂ substratının katalaz ile enzimatik yıkılması	31
Şekil 4.1.	Kontrol grubunda normal yapıda seminifer tübüller	36
Şekil 4.2.	P grubuna ait normal seminifer tübül yapıları.....	37
Şekil 4.3.	EMA grubunda seminifer tübüller	38
Şekil 4.4.	EMA+P grubunda seminifer tübüller	39
Şekil 4.5.	K, P ve EMA+P gruplarında seminifer tübüller	40
Şekil 4.6.	Johnsen skorlamalarının gruplar arasında karşılaştırılması.. Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Şekil 4.7.	p63 ve Ki67 immünohistokimyasal negatif kontrol kesitleri	44
Şekil 4.8.	p63 immün işaretlenme yoğunluğu	45
Şekil 4.9.	Ki67 immün işaretlenme yoğunluğu	47
Şekil 4.10.	Ki67 immün işaretlenme yoğunluğu.....	48
Şekil 4.11.	Grupların Ki67 ve IRS p63 IRS 'lerinin karşılaştırılması.....	49
Şekil 4.12.	Grupların testis MDA miktarlarının karşılaştırılması	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.13.	Grupların testis SOD ve CAT düzeylerinin karşılaştırılması.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	SAR değeri hesaplanması.....	23
Çizelge 3.2.	Johnsen skorlaması.....	28
Çizelge 3.3.	İmmünoreaktive skorlama (IRS) yöntemi	29
Çizelge 3.4.	Protein ölçümünde kullanılan reaktifler	30
Çizelge 3.5.	MDA ölçümünde kullanılan reaktifler	34
Çizelge 4.1.	Grupların germinal epitel kalınlıkları ve seminifer tübül çapları.....	41
Çizelge 4.2.	Grupların Johnsen skorları	42
Çizelge 4.3.	Grupların p63 immunoreaktivite skorları.....	44
Çizelge 4.4.	Grupların Ki67 immunoreaktivite skorları.....	46
Çizelge 4.5.	Gruplarda testis dokusu SOD, CAT ve MDA düzeyleri	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A/m	Amper/metre
AKAP3	Kinaz-A bağlayıcı protein 3
AMH	Anti müllerian hormonu
AR	Androjen reseptör
Bcl2	B hücre lenfoma 2
BMP4	Kemik morfogenetik faktör 4
cAMP	Adenozin monofosfat
CAPZA3	Kas Z hattı alfa alt birimi aktin 3 proteini
CAT	Katalaz
CSF1	Koloni stimüle edici faktör 1
Cu, Zn SOD	Bakır, çinko süperoksit dismutaz
DAB	Diaminobenzidin
DAZL	Silinen azospermi ilişkili protein
DNA	Deoksiribonükleik asit
EM	Elektromanyetik
EMA	Elektromanyetik alan
ER	Östrojen reseptör
Fas	Yağ asit sentaz
FasL	Yağ asit sentaz ligandı
FSH	Folikül stimüle edici hormon
G	Gauss
GNDF	Glia kökenli nörotrofik faktör
GHz	Gigahertz
GPX	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutation S-transferaz
H&E	Hematoksilen eozin

H₂O₂	Hidrojen peroksit
HOOK1	Mikrotübül bağlanma proteini 1
Hz	Hertz
IFT	İntraflagellar transport
IMT	İntramanşet transport
IRS	İmmunoreaktivite skor
KET	Keratinosit transkripsiyon faktör
Khz	Kilohertz
AKAP3	Kinaz-A bağlayıcı protein 3
mG	Miligauss
mg	Miligram
MHz	Megahertz
ml	Mililitre
μT	Mikrotesla
Mn SOD	Manganez süperoksit dismutaz
NBT	Nitroblue tetrazolium
NRF2	Antioksidan sorumlu element
NOS	Nitrik oksit sentaz
O₂	Oksijen
PRX	Peroksiredoksin
PTH	Paratiroid hormon
Puma	p53 regülasyon apoptozis modülatör proteini
RIM-BP3	Manşet ilişkili protein-bağlanma proteini 3
ROS	Reaktif oksijen ürünü
SBK	Siklin bağımlı kinaz
SAR	Özgül soğurma oranı
SAM	Steril alfa motif
SOD	Süperoksit dismutaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SPAG6	Sperm ilişkili antijen 6

SCF	Kök hücre faktör
STRA8	Retinoik asit stimüle 8
T	Tesla birimi
T3	Triiyodotronin
T4	Tiroksin
TA	Transkripsiyonel aktif
TAKAP	Testis spesifik kinaz-A bağlayıcı protein
Tap63α	Transaktivasyon p63 alfa
Tap63β	Transaktivasyon p63 beta
Tap63γ	Transaktivasyon p63 gama
TGB1	İntegrin β 1
TBA	Tiyobarbitürik asit
Tnp1	Transport proteini 1
TPX	Tioredoksin
TPs	Transport proteinleri
U/mg	Unit/miligram
V/m	Volt/metre
VDR	Vitamin D reseptörü
W/kg	Watt/kilogram

ÖZET

Subkronik 1800 Mhz Elektromanyetik Alan Uygulanmış Sıçanların Testis Dokusunda Parikalsitol'un Etkisinin İncelenmesi

Elektromanyetik alan (EMA) maruziyetinin testiste morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler yaparak erkek infertilitesine neden olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda 1800 MHz EM dalgaların testiküler morfoloji ve fonksiyonundaki değişiklikler üzerine parikalsitolun etkisinin gösterilmesi planlandı.

Çalışmamızda 28 adet 8-10 haftalık Wistar Albino erkek sıçan kullanıldı. Denekler; kontrol (K), parikalsitol (P), elektromanyetik alan (EMA) ve elektromanyetik alan+parikalsitol (EMA+P) grupları olmak üzere 4 gruba ayrıldı. K grubuna (n=7) hiç bir işlem yapılmadı. P grubuna, 0,2 µg/kg parikalsitol (haftada 3 kez/30 gün) subkutan (s.c.) olarak enjekte edildi. EMA grubuna, 1800 MHz EMA (günde 1 saat/30 gün) uygulandı. EMA+P grubuna, 1800 MHz EMA (30 gün boyunca günde 1 saat) ve 0,2 µg/kg parikalsitol (haftada 3 kez/30 gün) verildi. Deney sonunda kurban edilen deneklerden elde edilen testis dokularında, seminifer tübül çapları, germinal epitel kalınlığı ve Johnsen skorlaması, Ki67, p63 immün işaretlenmesi, malondialdehit (MDA) düzeyi, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitesi gösterildi.

Johnsen skorlamalarının EMA+P grubunda K grubuna benzer olduğu ve EMA grubuna göre anlamlı bir artış ($p<0,001$) gösterdiği belirlendi. EMA+P grubunda Ki67 ve p63 immünoreaktivite skorları (IRS) birbirine benzerdi ve EMA grubuna göre anlamlı olarak artış göstermekteydi (sırasıyla $p<0,001$ ve $p=0,002$), bu artış K grubuna göre de farklılık gösterdi (sırasıyla $p=0,013$ ve $p=0,005$). MDA düzeyi, EMA+P grubunda K grubundan anlamlı bir farklılık göstermemekteyken ($p=0,593$), EMA grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p=0,002$). CAT aktivitesi ise

EMA+P grubunda, EMA grubuna göre anlamlı bir artma ($p<0,001$) gösterirken, K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0,120$).

Sonuçlar parikalsitolun, EMA'nın spermatogenezdeki olumsuz etkilerine karşı p63, Ki67 ve antioksidan kapasite mekanizmaları aracılığıyla koruyucu olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Elektromanyetik alan, testis, Ki67, p63, parikalsitol, antioksidan kapasite.



ABSTRACT

The Investigation of Paricalcitol Effects on Testicular Tissue Exposed to by Subchronic 1800 MHz Electromagnetic Field

It is well-known that exposure to electromagnetic field (EMF) may lead to male in fertility by causing changes in the testicular morphology and function. The present study aimed to investigate the effect of paricalcitol on the testicular morphology and function after exposure to 1800 MHz electromagnetic field.

In our study we used twenty eight male Wistar Albino rats (8 to 10 weeks of age) and they were divided into four groups; as control (C), paricalcitol (P), electromagnetic field (EMF) and electromagnetic field+paricalcitol (EMF+P). No treatment was applied to control group (n=7). P group was injected with 0,2 µg/kg paricalcitol (three times in thirty days) subcutaneously. EMF group was exposed to electromagnetic field of 1800 MHz one hours daily for thirty days. EMF+P group was both exposed to electromagnetic field of 1800 MHz (one hour in a day for thirty days) and injected with 0,2 µg/kg paricalcitol (three times in thirty days). At the end of the experiment, testicular sections was evaluated by measuring the diameter of seminiferous tubular, thickness of germinal epithelium thickness and they were correlated with both Johnsen scoring and immunohistochemical staining for Ki67 and p63. The enzyme levels of malondialdehyde, superoxide dismutase and catalase was also assayed biochemically.

Johnsen's scoring of EMF+P and control groups were similar while there was a significant increase compared to EMF group ($p<0,001$).The immunoreactivity scoring of Ki67 and p63 in EMF+P group were similar to each other whereas a significant increase was found compared to EMF (sırasıyla $p<0,001$ ve $p=0,002$)and it was found different from control group ($p=0,013$ and $p=0,005$ accordingly). While the difference in the level of MDA was insignificant for the EMF+P and C groups ($p=0,593$), there was a significant decrease for the MDA level for EMF+P group compared to EMF

group ($p=0,002$). The difference in the CAT activity was also insignificant for the EMF+P and C groups ($p<0,001$), there was a significant increase for the CAT activity for EMF+P group compared to EMF group ($p=0,120$).

These results suggest that paricalcitol may be protective against the detrimental effects of electromagnetic field on spermatogenesis via p63, Ki67 and antioxidant capacity mechanisms.

Key words: Electromagnetic fields, testis, p63, Ki67, paricalcitol, antioxidant capacity.

1. GİRİŞ

Günümüzde ilerleyen teknolojiyle ilişkili olarak elektronik cihazların kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu cihazlardan; kullanım sıklığı ve süresi göz önüne alındığında, ilk sırayı alan cep telefonları, çevreye ortalama olarak 900-1800 MHz elektromanyetik (EM) dalgalar yaymaktadır (1). EM dalgaların dokular üzerindeki termal ve termal olmayan (kimyasal) etkileri ile biyolojik fonksiyonlarda değişiklikler yaptığı bilinmektedir. Yapılan birçok çalışmada elektronik cihazların çevreye yaydığı EMA'nın biyolojik sistemlerdeki etkileri raporlanmıştır (2). EMA hücrenin plazma membran fonksiyonunda ve gen ekspresyonunda değişiklikler yaparak hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve apoptotik sürecini etkilemektedir. Farklı çalışmalarda EMA'nın testiste morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler yaptığı, spermatogenez sürecini olumsuz etkilediği ve apoptozisi artırdığı bildirilmiştir (2, 3). Bunlara ek olarak son yıllarda yapılan çalışmalarda, cep telefonu kullanımının erkek infertilitesine yol açabileceği bildirilmiştir (4). Özellikle cep telefonlarının oluşturduğu EMA'nın testiste Leydig ve Sertoli hücrelerinin dejenerasyonuna neden olduğu, testosteron biyosentezini azalttığı, spermatozoonlarda DNA hasarına yol açtığı ve seminifer tübül çapında azalmaya sebep olduğu raporlanmıştır (4, 5). EMA'nın serbest oksijen radikallerinin üretimiyle ROS oluşumuna ve lipid peroksidasyonuna yol açtığı, biyomoleküllerin yapısının, enzim aktivitesinin bozulmasına, hücre hasarlanması ve hücre ölümüne sebep olduğu ortaya konmuştur (6). ROS oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için bir savunma mekanizması olan antioksidanların kullanıldığı literatürde görülmüştür (7). Ancak EMA'ya bağlı doku hasarını azaltmaya yönelik antiapoptotik ve antioksidan bir ajan olan D vitamini ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Parikalsitol, klinik tedavilerde kullanılan sentetik D vitamini analogudur. Literatürde çeşitli iskemi-reperfüzyon çalışmaları ve kanser çalışmaları ile parikalsitolun antioksidan ve antiapoptotik etkisi raporlanmıştır (8, 9). Hücre proliferasyonunda ve apoptotik yollarda rol alan çok sayıda molekül bulunmaktadır. Bunlardan hücre proliferasyon belirteci olan Ki67, hücre döngüsünün G0 hariç tüm fazları boyunca eksprese olan nükleer ve nükleolar proteindir (10). Yapılan çalışmalarda hipospermatogenez ve

çeşitli spermatogenez bozukluklarında, farklı tiplerdeki spermatogenik seri hücrelerinde Ki67 ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (11). EMA'nın testis üzerine olan etkileri ortaya koyan farklı çalışmalar bulunmakla birlikte son yıllarda yapılan bir çalışmada puberte döneminde EMA uygulanmış sıçanlarda spermatogenik seri hücrelerinde Ki67 ekspresyonunun değişmediği gösterilmiştir (12). Supresör tümör protein p63 geni ise p53 gen ailesinden bir transkripsiyon faktörü olup hücre büyümesi, proliferasyonu ve apoptozis gibi önemli hücresel süreçlerde görev almaktadır (13). p63 geni yapısal olarak farklı transkripsiyonel aktiviteye sahip izoformlara sahiptir. Testiküler gelişim ve spermatogenez sürecinde p63 ekspresyonunun incelendiği çalışmalarda; özellikle postnatal dönemde 10. günden sonra spermatosit ve erken spermatidlerde ekspresyonunun artmaya başladığı gösterilmiştir (14, 15). Bu nedenle çalışmamızda, EMA uygulanmış sıçanlarda parikalsitolun spermatogenezdeki koruyucu etkinliğini histolojik ve biyokimyasal olarak (MDA düzeyi, SOD ve CAT enzim aktivitesi) göstermeyi planladık.

GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Histolojisi

Testis, vücut boşluğu dışında skrotum içinde yer alan bir çift üreme organıdır. İnsanlarda yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm eninde ve 20-30 g ağırlığındadır. Testisler; testis kapsülü adı verilen 3 tabaka ile çevrilidir. Bunlar tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vaskülosadır. Testis kapsülünün dış tabakası tunika vaginalistir; dışta pariyetal, içte visseral bir tabakadan oluşur. Pariyetal ve visseral tabaka arasında bir boşluk bulunur ve bu boşluk içinde seröz bir sıvı bulunur. Tunika albuginea düzenli sıkı bağ dokudan oluşan bir tabakadır (3, 16). Bu tabaka testisin içine girerek mediastinum testisi oluşturur. Tunika vaskülosa, gevşek bağ dokusu yapısında, kan ve lenf damarları ve sinir lifleri içeren bir tabakadır. Tunika albugineanın iç yüzünden septumlar çıkar ve testisi yaklaşık 250 lobüle böler ve oluşan her bir lobüle lobuli testis denir. Her bir lobülde 1-4 arasında değişen sayıda seminifer tübül yer alır. Kıvrımlı bir yapıya sahip olan tübüller kıvrımlarını kaybedip düzelirler tübülü rektiye (düz tübül) oluştururlar. Düz tübüller seminifer tübülü rete testise bağlarlar. Mediastinumun içinde anastomoz halinde bulunan rete testis duktuli efferentes ile epididimin baş kısmına bağlanır. Rete testis, seminifer epitelin ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır (16, 17).

Her seminifer tübüllerin boyu 30-70 cm, çapı yaklaşık 150-250 mikrometre ve bir testiste tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Seminifer tübül, tunika propria, bazal lamina ve germinal ya da seminifer epitelten oluşur (16). Seminifer tübül epitelinin altında bazal membran yer alır ve bu bölge Sertoli hücreleri tarafından sentezlenen laminin, kollajen tip I, kollajen tip IV içerir. Peritübüler doku olarak da adlandırılan tunika propria, interstisyel dokudan köken alır ve fibröz bağ dokudan oluşur. Peritübüler dokunun infertil erkeklerin büyük bir kısmında kalınlaştığı bilinmektedir. Seminifer tübülün en iç katmanında düz kas özelliğinde ve tek tabaka şeklinde yerleşim gösteren yassılaştırmış miyoid hücreleri bulunur. Miyoid hücreler, aktin filamentleri ve miyozin, desmin, vimentin gibi hücre iskeleti proteinleri içermektedir. Miyoid hücreleri hareketsiz spermlerin rete testise ilettilmesini sağlayan kasılma görevine sahiptir (18, 19).

Seminifer tübülün arasındaki boŖluęa interstisyel alan denmektedir. İnterstisyel alanda Leydig (interstisyel) hücreleri, sınırlar, pencerele kapillerler, lenf damarları, makrofajlar ve mast hücreleri yer alır. Seminifer tübül testisin ekzokrin kısmını, Leydig hücreleri ise endokrin kısmını oluŖturur. Leydig hücreleri interstisyel bağ dokusu içinde lenfatik kanal veya sinüzoidler yakınında yer alırlar. Ŗekilleri, yuvarlak ya da poligonaldır ve merkezde bir ya da iki çekirdeğe sahiplerdir. Lipid damlalarından zengin asidofilik sitoplazmaya sahiptir. Leydig hücreleri testosteron sentez ve salınımda görevlidir. Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron, pubertal dönemde sperm üretimi, eriŖkinlerde spermatogenezin, sekonder cinsiyet karakterlerinin ve cinsel salgı bezlerinin fonksiyonlarının devam ettirilmesinden sorumludur (16, 19).

Seminifer tübülde germinal epitel tabakasını oluŖturan spermatogonik hücreler ve Sertoli hücreleri bulunmaktadır. Sertoli hücreleri, seminifer tübülün bazal kısmından lümene doğru uzanan prizmatik hücrelerdir. Sertoli hücreleri; spermatogonik hücrelerin desteklenmesinde ve olgunlaŖmasında önemli rol oynadıkları için destek hücreleri ya da sustentakler hücreler olarak da bilinirler. YaklaŖık 9-12 µm boyutundadır. Sertoli hücreleri ıŖık mikroskopu ile bakıldığında ökromatik bir çekirdeğe, 3 parçalı bir yapıya sahip olan belirgin büyük bir ekirdeięe sahip olduğu görülür. Sertoli hücreleri puberteden sonra postmitotik özellik kazanır. YetiŖkin sıçanlarda Sertoli hücre sayısı her bir testis için 20-46 milyon arasındayken bu sayı insanlarda 41 milyon kadardır. Sertoli hücreleri birbirine sıkı bağlantı kompleksi olan zonula okludens ile bağlanırlar. Bazolateral okludens bağlantıları seminifer epiteli bazal (ekstratbler) ve adlüminal (intratübüler) kompartmana böler. Bazal membranla zonula okludensler arasındaki alana bazal kompartman, zonula okludenslerden itibaren seminifer tübül lümeni tarafındaki alana ise adlüminal kompartman denir. Bazal bölümde spermatogonyumlar ve primer spermatozitler yer alırken, adlüminal bölümde sekonder spermatozitler ve spermatidler yer alırlar (16). Sertoli hücreleri arasında oluŖan sıkı bağlantı kompleksleri kan-testis bariyerini oluŖturur. Kan testis bariyeri kandan gelen maddelerin lümen içerisine geiŖini önler. Sertoli hücrelerinin spermatogenezde önemli görevli bulunmaktadır. GeliŖmekte olan spermatogonik hücreleri destekler, korur ve besler. Spermiyogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan artık (rezidüel) cisimcikleri fagosite eder. İnhibin ve aktivin adı verilen peptidleri, glikoprotein yapısında olan

antimüllerian hormonu (MIH veya AMH) üretir ve salgılar. Folikül uyarıcı hormon (FSH) ve androjen bağlayıcı proteinleri (ABP) sentezler (19, 20).

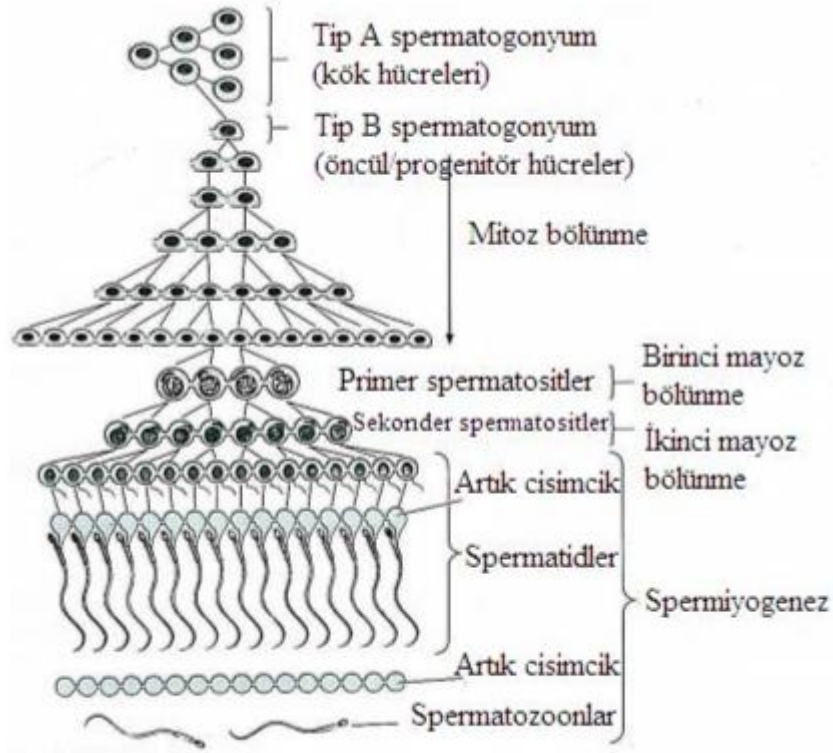
2.2. Spermatogenez

Spermatogenez, seminifer tübüllerde gerçekleşen, spermatogonyumdan olgun sperme dönüşme aşamasındaki süreci kapsamaktadır. Puberteden kısa bir süre önce, hipofizden salınan gonadotropinler sayesinde başlar ve hayat boyu devam eder. Spermatogenez, tüm seminifer tübüllerde ve her seminifer tübül içinde aynı anda gerçekleşmemekle birlikte spermatogenez süresi 64 gün olarak kabul edilmektedir. Spermatogenez; spermatositogenez ve spermioenez olmak üzere 2 evrede gerçekleşir (16, 19).

2.2.1. Spermatositogenez

Pubertede hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılayıcı hormonun etkisi ile hipofiz ön lobundan gonadotropik hormonlar (FSH ve LH) salgılanmaya başlar. Bu hormonların stimülasyonu ile A spermatogonyumların bir kısmı bir dizi mitoz bölünme geçirerek farklılaşmamış kök hücreler olarak kalır bir kısmı da B spermatogonyumlara farklılaşırlar (16, 19, 20). Glia kökenli nörotrofik faktör (GDNF), koloni stimüle edici faktör (CSF1), kök hücre faktör (SCF), aktivin A ve kemik morfojenetik faktör (BMP4) gibi büyüme faktörleri yoluyla spermatogonik kök hücrelerin kendini yenileme ve proliferasyonu arasındaki denge düzenlenmektedir. Aynı zamanda Sertoli hücreleri tarafından eksprese olan adhezyon molekülü integrin β 1 (TGB1) ve hücre adhezyonu ile ilgili proteinler (E kadherin), Leydig hücrelerinden sentezlenen koloni stimüle edici faktör (CSF1), farklılaşan spermatogonyumların göçünü belirler. Göç eden B spermatogonyumların mitoz bölünmeleri ile 46 kromozom (2n) ve 4C DNA miktarına sahip primer spermatositler meydana gelir. Primer spermatositlerin, silinen azospermi ilişkili protein (DAZL), stimüle retinoik asit 8 (STRA8) aktivasyonu ile mayotik profaz I aşamasına girer (21). Mayotik profaz I, kromatin kondensasyonun olduğu leptoten,

sinapsisin gerçekleştiği zigoten, crossingover mekanizmasının olduğu pakiten, sinoptonemal kompleksin olaylandığı aşama olan diploten olmak üzere 4 aşamada gerçekleşir ve sonuçta haploid sayıda (n) kromozoma ve 2C DNA miktarına sahip sekonder spermatositler meydana gelir. Sekonder spermatosit DNA sentezlemeden (S fazından geçmeden) hemen ikinci mayotik bölünmenin profazına girer ve 23 kromozom (n) ve C miktarında DNA içeren iki haploid yuvarlak spermatid oluşur (Şekil 2.1), (16, 21, 22).



Şekil 2.1. Spermatogenez aşamaları (22)

2.2.2. Spermiyogenez

Hücre bölünmesi gerçekleşmeden, hücre farklılaşması ile spermatidlerin spermatozoonlara dönüştüğü evredir. Spermiyogenez süresince sperm oluşum aşamaları şu şekildedir:

a. Aksonem oluşumu

HOP, sperm ilişkili antijen 6 (SPAG6) ve TEKSTIN-T proteinleri aracılığıyla aksonem oluşmaya başlar ve yuvarlak spermatidler flagellum oluşturmaya başlar. Flagellum aksonem olarak bilinen 9+2 mikrotübüler yapıdan oluşmaktadır. Baş ve kuyruk koordine bir şekilde geliştiğinden aksonem yapısının defektinin flagella motilitesi kaybı yanında baş anomalisi de oluşturmaktadır. Bu aşamada sentriyoller çekirdeğin arka kutbuna göç ederek distal ve proksimal sentriyolleri meydana getirir. Distal sentriyol sperm kuyruğunun merkezindeki aksonemi, proksimal sentriyol ise sperm boyun kısmının yapısında yer alır (21, 22).

b. Manşet Oluşumu

Manşet nükleer uzama sırasında oluşan nükleusun peritübüler bölgesinde yer alan geçici bir mikrotübüler yapıdır. Manşet mikrotübül bağlanma proteini (HOOK1) ile manşet ilişkili protein-bağlanma proteini 3 (RIM-BP3) proteinleri ve kinezin-2 motor proteini sayesinde hareket ederek sperm başının ve nükleusun şekillenmesinde rol oynar ve buna bağlı olarak spermatid uzamaya başlar (21, 23).

c. Akrozom Biyogenezi

Akrozom, fertilizasyon için gerekli olan hyaluronidaz, nörominidaz, asit fosfataz ve proteaz gibi bazı hidrolitik enzimleri içeren Golgi aygıtından köken alan granüler veziküldür. Bu süre zarfında sitoplazmada bulunan organellerde yer değişikliği gözlenir. Mitokondriyonlar intramanşet transport (IMT) ve intraflagellar transport (IFT) yolları

aracılığıyla flagellumun proksimal parçası etrafına göç ederek orta parçayı oluşturur. Bu aşamada, akrozom vezikülü çekirdeğin ön yarısından fazlasını sararak akrozomal kep oluşumu gerçekleşir (21).

d. Kromatin Kondensasyonu

Histonlar, geçiş proteinleri (TPs) aracılığıyla protaminlerle yer değiştirir ve daha sonra kromatin materyal transport proteini 1 (Tnp1) ve transport proteini 1 (Tnp2) tarafından kodlanan geçiş proteinleri 1 (TP1) ve geçiş proteinleri 2 (TP2) proteinleri ile kondanse hale dönüşür (21).

e. Spermiyasyon

Spermiyasyon gelişimine kadar sertoli hücresi ile spermatid bağlantısı, hücre adhezyon molekülü olan nektin, integrinler-laminin, kadherin-katenin sayesinde sertoli hücrelerine gömülü bir durumdayken, matür hale gelen spermatidler kas z hattı alfa alt birimi aktin proteini 3 (CAPZA3), TBC ve F-aktin sinyalizasyonu ile sitoplazmik uzaklaştırılma olarak bilinen spermiyasyon olayı gerçekleştikten sonra lümende serbest hale geçer (19, 21).

2.2.3 Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik hücreler, bazal lamina ile lümen arasında yer alırlar. Bazal laminadan lümene doğru; spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermatozoalar şeklinde sıralanırlar (16, 19).

a. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar, seminifer tübülün bazal membranının hemen üstünde yer alan diploid spermatogenik hücrelerdir. Yaklaşık 12 µm çapındadır. Spermatogonyal kök

hücrelerden köken alırlar. Seminifer epitelde çekirdeklerinin görünümüne göre üç tip spermatogonyum tanımlanır (18).

Koyu boyanan (Ad) tip A spermatogonyumlar: Yoğun bazofilik boyanan ince kromatinli hücrelerdir.

Açık boyanan (Ap) tip A spermatogonyumlar: Tip A spermatogonyumlar tip B spermatogonyumlara farklılaşan açık renk boyanan kromatine sahip hücrelerdir.

B tipi spermatogonyumlar: B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan yoğunlaşmış kromatine sahip hücrelerdir.

b. Primer ve Sekonder Spermatositler

Primer spermatositler seminifer tübüldeki en büyük hücrelerdir ve germinal epitelin orta kısmında yer alır. Primer spermatositler oluştuktan hemen sonra birinci mayoz bölünmeyi tamamlamasıyla profaz evresine girerler ve bu bölünmenin profaz aşaması yaklaşık olarak 22 gün sürdüğünden, kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu bu aşamadır. Primer spermatositlerin birinci mayoz bölünmeyi tamamlamasıyla sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositler küçük bir çekirdeğe sahiptir (19).

c. Erken ve geç dönem spermatidler

Spermatidler seminifer tübül lümenine yakın adluminal kompartmanda yerleşmiş hücrelerdir. Bu hücrelerin çekirdekleri yoğun kromatin bölgeleri içerir. Boyutları 7-8 µm çapındadır. Olgun spermatidlerin baş kısımları Sertoli hücrelerinin sitoplazmasına gömülükten, kuyruk kısımları seminifer tübülün lümenine uzanır (16).

d. Spermatozoon (olgun sperm) yapısı

Olgun bir spermatozoon yaklaşık 60 µm uzunlukta olup; baş, boyun ve kuyruktan oluşan hareketli bir hücredir.

Sperm başı: 4,5 μm uzunluğunda, 3 μm genişliğinde ve 1 μm kalınlığındadır. Nükleusun anterior 2/3'lük bölümünü akrozom sarar.

Sperm boynu: Sperm matürasyonunun son evresinde proksimal sentriyolden meydana gelir.

Sperm kuyruğu: Spermin hareketini sağlar ve fertilizasyonun gerçekleşeceği bölgeye gitmesine yardımcı olur. Orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere bölümlere ayrılır.

- **Orta parça:** Yaklaşık 7 μm uzunluğundadır ve mitokondriyonları içerir. Mitokondriyonlar, kuyruğun hareketi için gerekli enerjiyi sağlarlar. Kuyruk yapısının %50'sini oluşturan dış dens fibröz lifler yer alır.

- **Esas parça:** Yaklaşık 40 μm uzunluğundadır. Kalın fiberlerin ve aksonemal kompleksin dışındaki fibröz kılıfı içerir. Fibröz kılıf üzerinde enerji düzeni ve hücre sinyalizasyonu ile görevli olan kinaz-A bağlayıcı protein 3 (AKAP3), kinaz-A bağlayıcı protein 4 (AKAP4) ve testis spesifik kinaz-A bağlayıcı protein (TAKAP) yer almaktadır (24).

- **Son parça;** Flagellumun yaklaşık son 5 μm 'lik kısmıdır ve yalnızca aksonemal kompleksi içermektedir (18).

2.3. EMA ve Biyolojik Etkileri

EMA son yıllarda toplum sağlığını etkileyen çevre ajanları listesinde yer almaktadır. Baz istasyonlarından, radyo, televizyon, bilgisayar, cep telefonları, enerji hatları ve anten gibi birçok cihazdan çevreye EM dalga yayılmakta ve insan sağlığını olumsuz etkilemektedir (25). EMA ve biyolojik etkilerini kavrayabilmek için öncelikle bazı kavramların bilinmesi gereklidir. Yük, maddelerin birbirleri arasında elektrostatik itme veya çekme meydana getirmesi durumunda ortaya çıkan bir niceliktir. Negatif işaretli olan elektron ve pozitif işaretli olan proton yükü taşıyan temel parçacıklardır. Yüklü parçacıkların yol açtığı fiziksel olguya elektrik, elektrik yüklerinin bir noktadan başka bir noktaya hareket etmesine elektrik akımı denir. Yüklerin etrafında oluşan, yüklerin hareketine bağlı olarak değişen ve yüklerin birbirlerine olan etkilerine ise alan denir.

Elektrik alan, elektrik yüklerinin birbirini etkilemesi ile oluşan herhangi bir noktada bir birimlik pozitif elektrik yüküne etki eden kuvvettir (3, 25). Elektrik alanın birimi olarak volt/metre (V/m) kullanılır. Manyetik alan hareket eden elektrik yükleri tarafından ve elektrik akımının akışının oluşturduğu bir alandır. Manyetik alan şiddetinin (H) birimi amper/metre (A/m)'dir. Bunun dışında ABD'de kullanılan Gauss (G) ya da uluslararası kabul görmüş olan Tesla birimi (1T= 10.000 G) de kullanılmaktadır. Manyetik alan ölçümlerinde miligauss (mG); 1/1.000 Gauss, mikrottesla (μ T) ise 1/1.000.000 tesla'dır. Miligauss ve mikrottesla arasındaki bağıntı $1\mu\text{T}=10\text{mG}$ şeklindedir (12, 26). Elektrik ve manyetik alan EM dalganın iki bileşenidir ve birbirine 90 derecelik dik açıyla ilerler. Manyetik alan elektrik alandan farklı olarak nüfuz edicidir ve insan vücudu da bu alana karşı geçirgendir. Manyetik alan etkisiyle vücut içinde ve yüzeyinde akım oluşur. Hareketli yüklerin yani akımın etrafında manyetik alan oluşurken, hareketsiz yüklerin etrafında elektrik alan oluşur (5, 12, 27). Elektrik alan ve manyetik alanın birleştirilmesi ile Faraday ve Maxwell tarafından EMA oluşmuştur. EMA ise elektrik yüklerin belli bir frekansta ve birbirleri arasında belli mesafede salınan bir dizi dalgadır. Elektromanyetik dalgaların saniyede yaptığı kendilerini tekrarlama sıklığına yani salınım sayısına frekans denir. Frekansın birimi Hertz (Hz)'dir. 1 Hz saniyede bir salınım; 1 kilohertz (kHz) saniyede 1000 Hz; 1 megahertz (MHz) saniyede bir milyon Hz; 1 gigahertz (GHz) saniyede bir milyar Hz'dir. Frekans arttıkça elektrik ve manyetik alanların şiddeti de artarken doku içine nüfuz edebilme özelliği azalmaktadır. Dokulara nüfuz eden alan şiddetinin bilinmesi dokulardaki etkinin tespit edilebilmesi için gereklidir. Bu nedenle dokuların özgül soğrulma oranı (SAR) değerleri tespit edilmektedir. Vücut tarafından EMA'nın soğurulma hızına ya da vücudun birim kütlesine birim zamanda geçen enerjiye SAR denir. Ortalama SAR vücudun tüm kütlesine birim zamanda geçen toplam enerjidir. SAR birimi Watt/kilogram (W/kg)'dir. Vücudun 1 kg'ının sıcaklığını 1°C yükselten EM enerji miktarı 4 W olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle dokuda biyolojik etkinin gözlenebilecek SAR değeri 4 W/kg olarak kullanılmıştır (3, 28).

EMA'nın zararlı etkilerinin oluşması EMA'nın frekansına, mesafesine, şiddetine, vücut ölçülerine ve vücudun elektriksel özelliklerine, etki süresine bağlıdır (3). EM dalgaların dokular üzerinde iki temel etkisi bulunmaktadır. Bunlardan ilki termal etki,

ikincisi ise termal olmayan (kimyasal) etkilerdir. Termal etkide, EM dalganın elektrik ve manyetik alan vektörleri tarafından oluşturulan yüklü olan moleküllerin hareket etmesiyle ısı enerjisi ortaya çıkmasına ve dokunun ısısının artmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda termal etkinin dokuda meydana getirdiği etki biyolojik değişikliklerin oluşmasına yol açmaktadır. Termal olmayan etki ise, EMA'ya maruziyetin süresi, frekansı ve dozuna bağlı olarak, dokular üzerinde etkisini göstermektedir (3, 11, 29).

Serbest radikaller normal metabolizmanın yan ürünü olarak oluşmasının yanı sıra EMA, iyonize edici radyasyon, ısı, fotokimyasal hava kirliliği, intoksikasyon gibi çevresel toksik maddelerin etkisiyle de oluşabilmektedir (6). EMA'nın termal olmayan etkileriyle serbest radikal oluşumuna yol açtığı ve buna bağlı olarak hücrelerde fonksiyonel ve morfolojik değişikliklere yol açtığı raporlanmıştır (3). Serbest radikaller; yörüngelerinde bir ya da daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron taşıyan moleküllerdir. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içinde olup bu durum oksidatif denge olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif dengenin bozulmasıyla oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen ürünleri (ROS) meydana gelmektedir. Oksidatif stres, hücrelerin lipid, protein, enzim, DNA, karbonhidrat yapılarına etki ederek yapılarının bozulmasına, hücre hasarlanmasına ve hücre ölümüne yol açmaktadır (7, 30).

Lipid peroksidasyonu serbest radikallerin hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitleriyle reaksiyon sonucu membranların yapısal bütünlüğünü bozmaktadır. Bu durum membran geçirgenliğinin değişmesi ile total iyon homeostazisinin, hücre ve organellerin yapı ve fonksiyonunu bozmasına neden olmaktadır (6, 29). Yapılan bir çalışmada, düşük şiddette uygulanan EMA'nın kan Ca^{++} , Na^+ , K^+ , Cl^- düzeyleri üzerine etkileri olduğu, plazma Na^+ düzeyini artırdığı, K^+ ve Cl^- düzeyini düşürdüğü görülmüştür (31). Lipid peroksidasyonu sekonder yıkım ürünü MDA'dır. MDA etkisini proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidlere veya nükleik asitlere bağlanarak göstermektedir. MDA, hücre membranındaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açarak, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimine neden olur. MDA düzeyleri farklı dokulardaki oksidatif hasarın göstergesi olarak kan ve dokuda çalışılarak ortaya konabilmektedir. MDA'nın yanı sıra CAT ve SOD enzim aktivitesinin ölçümü serbest oksijen radikal kaynaklı doku hasarının bir göstergesi olarak incelenebilmektedir (3, 9). CAT hücresel bileşiklere zarar verici etkisi

olan hidrojen peroksitin (H_2O_2) su ve oksijene dönüşmesini sağlar. Süperoksit dismutaz, toksik süperoksit serbest radikalinin, H_2O_2 'nin ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunda rol alan antioksidan enzimdir. SOD'un insanlarda manganez süperoksit dismutaz (Mn SOD) ve bakır, çinko süperoksit dismutaz (Cu, Zn SOD) olmak üzere 2 izomer tipi bulunmaktadır. Süperoksit, mitokondriyonlarda Mn-SOD, sitoplazmada Cu-SOD ile H_2O_2 'ya dönüştürülür. Daha sonra ise, H_2O_2 lizozomda yer alan CAT ve mitokondriyonlarda bulunan glutatyon peroksidaz tarafından H_2O ve O_2 'e parçalanarak etkisiz hale getirilir (9, 32). Lipid peroksidasyonu dışında oksidatif dengenin bozulmasıyla oluşan reaktif oksijen radikalleri (ROS) hücre membranı ile birlikte DNA'da hasara ve gen ekspresyonunda değişikliklere sebep olmaktadır. DNA'da baz ve şekerlerde lezyonlara, tek ve çift zincir kırıklarına, abazik bölgelere neden olmaktadır (33). ROS oluşumuyla, DNA onarım mekanizmasının etkinliği azalır ve replikasyonun doğruluğu kontrol edilemez ve bunun sonucunda DNA'nın baz yapısında değişim, DNA ve protein molekülleri arasında hatalı bağlanmalar ve nükleotid kaybı ortaya çıkmaktadır. Bu durum hücre proliferasyonunda bozukluklara ve apoptotik yolların aktivasyonuna neden olmaktadır. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yüksek frekanslı EMA'nın hücrelerde DNA kırıklarına, kromozom aberasyonlarına, onkogenlerin transkripsiyonunun indüklenmesine neden olduğu gösterilmiştir (33, 34). EMA'nın çeşitli kanser tipleri ile ilişkisi olduğunu ileri süren çalışmalar bulunmaktadır. EMA ile kanser ilişkisini ortaya koyan bir çalışmada, EMA'nın lenfoma ve akut myeloid lösemi prevalansını artırdığı raporlanmıştır (35). Bunlara ek olarak 3 hafta boyunca günde en az 20 dakika ve haftada 5 gün 40 Hz EMA maruziyeti sonucu melatonin konsantrasyonunda azalma, 3 ay boyunca haftada 5 gün günde 7 saat 50 Hz EMA maruziyeti sonucunda serum T3 ve T4 konsantrasyonunda azalma ve tiroid bezinde morfolojik değişiklikler olduğu bildirilmiştir (36).

2.4. EMA'nın Testis Üzerine Etkisi ve İnfertilite ile İlişkisi

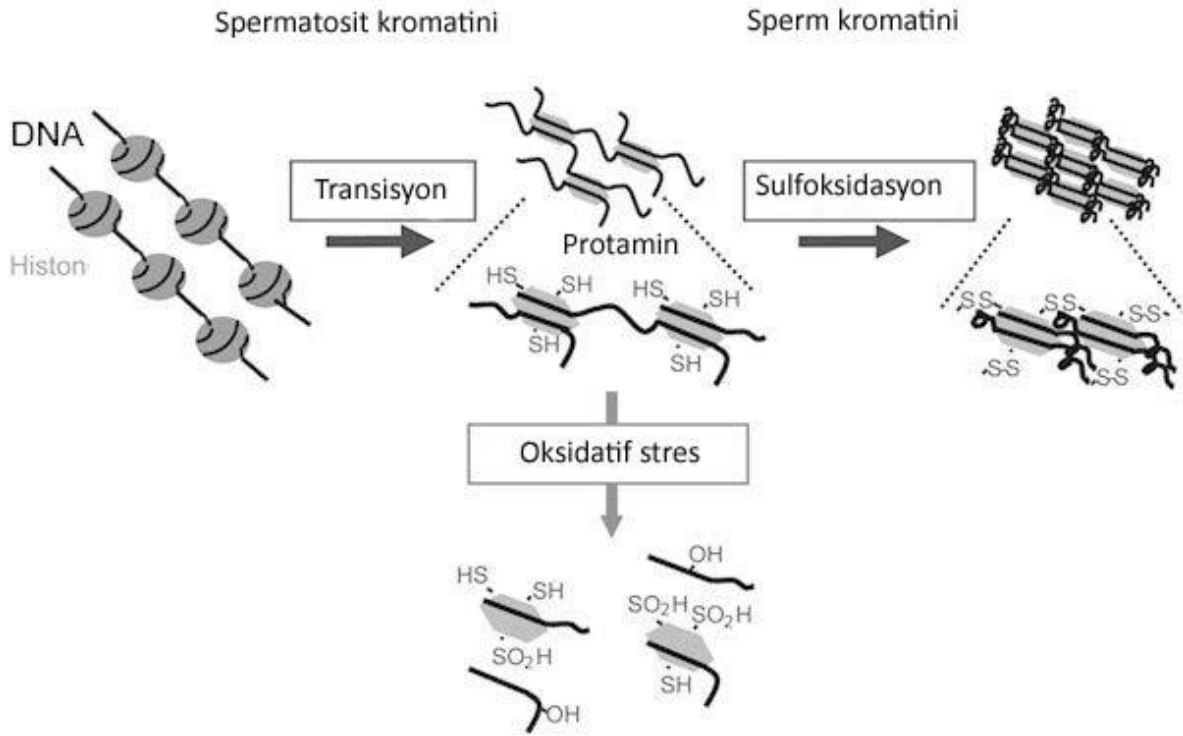
Çevresel toksik ajanlardan biri olan EMA termal etkisiyle testis dokusunda ısı artışına sebep olurken, non-termal etkisiyle pro-oksidanla antioksidan mekanizmalar

arasında bir dengesizlik oluşmasına neden olarak antioksidan aktiviteyi etkilemekte ve ROS üretimini uyardır (3, 29). Bu etkilere bağı olarak germinal hücrelerde, hücre dışı yağ asit sentaz (Fas) ve yağ asit sentaz ligandı (FasL) ve hücre içi (mitokondriyal) apoptotik yolların etkinleşmesine ve böylece apoptotik hasarın ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (37). Bununla birlikte nükleer ve mitokondriyal DNA'nın, hücre mekanizmalarda önemli fonksiyonu olan lipidlerin ve proteinlerin etkilenmesi ile spermatozoonlarda yapısal ve fonksiyonel bozukluklar ortaya çıkabilmektedir (4, 22). Normal şartlarda spermatozoon DNA zincirleri spesifik enzimler tarafından sülfoksidasyon aracılığıyla sıkıca paketlenmiş halde bulunmaktadır. Ancak oksidatif stres, bazların oksidatif modifikasyonuna, DNA zincirlerinin kırılmasına ve paternal genomda hasara yol açmaktadır (Şekil 2.2), (29, 33). Ayrıca oksidatif stresten kaynaklanan lipid peroksidasyonu, hücre membran permeabilitesinde artışa, membran bütünlüğünde bozulmaya, çeşitli enzimlerinin aktivasyonuna yol açmaktadır. Bunun yanı sıra ROS, lipid, protein ve DNA'ya bağlanmasına ek olarak androjen reseptör (AR) ve östrojen reseptör (ER) yolağıyla da interaksiyona girerek testiküler fonksiyonu bozmakta ve spermatogenezi başarısızlığa uğratmaktadır. Bu durum adenilat siklazın aktivasyonuna, adozin monofosfat (cAMP) tarafından tüm testis germ hücrelerinde intraselüler sinyal yolağını ve cAMP bağımlı protein kinazın aktivasyonuna yol açarak hormonal regülasyonda değişikliklere sebep olur (36, 37).

Yapılan bir çalışmada 900 MHz EMA maruziyetinin, lipid peroksidasyonuna ve DNA oksidasyonuna, sperm motilite ve canlılığında azalmaya ve sperm kalitesinde azalmaya yol açtığı raporlanmıştır (38). Başka bir çalışmada ise 295 gün, günde 4 dakika 9.27 GHz EMA maruziyetinin testiküler dejenerasyona sebep olduğu görülmüştür (39). 45 gün boyunca günde 2 saat 10 GHz EMA'ya maruz bırakılan sıçanların germinal hücrelerde kromozomal hasarı ve spermatozoonlarda apoptotik belirteçlerin ekspresyonunda artış olduğunu bildirmişlerdir (40). Bunun yanı sıra 3 ay boyunca 30 dakika ve 60 dakika mobil telefon radyasyonuna maruziyet sonucu testosteron seviyelerinde azalma olduğu saptanmıştır (41).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda erkek infertilitesine neden olan çevresel etkenlerin arasında EMA maruziyetinin yer aldığı görülmektedir. Epidemiyolojik ve deneysel

çalışmalar farklı frekans aralıklarına sahip EMA'ların hücre morfolojisi, proliferasyonu, hücre ölümü, hücre membranının yapısı-fonksiyonu ve DNA kırılması ile ilgili biyolojik yanıtları uyurabileceğini ortaya koymuştur (6, 29). EMA'dan kaynaklanan DNA hasarının, kanser gelişimini tetikleyebileceği, testiste meydana gelen hormonal değişikliklerin etkileri ile infertilite oranlarının artabileceği, fetal kayıp ve gelişimsel malformasyonlara neden olabileceği gösterilmiştir (42). Yapılan birçok çalışmada EMA maruziyetinin ROS'larını artırarak spermatozonların nükleer DNA'sında yapısal ve sayısal anomalilere yol açtığı ve buna bağlı olarak spermatozoonlarda morfolojik ve fonksiyonel bozukluğa neden olduğu ileri sürülmüştür (3, 33).



Şekil 2.2. Normal spermatogenez ve oksidatif stres altında spermatosit ve sperm kromatin yapısı (33)

2.5. Ki-67 ve p63 Testisteki Fonksiyonel Etkisi

2.5.1. Ki-67

Hücre proliferasyonu mitoz ile belirlenirken, belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısında apoptozis ile belirlenir. Bu şekilde apoptozis ve mitoz sürekli bir denge halindedir. Güncel çalışmalar yüksek frekanslı EMA hücre proliferasyonu üzerine etkisi olduğunu göstermektedir (2, 12). Hücre proliferasyon belirteci olan Ki67; 345 ve 395 kDa ağırlığındaki iki molekülden oluşan, 10. kromozom üzerinde yer alan nükleer non-histon bir proteindir. İlk defa 1983'te Gerdes ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve bir proliferasyon belirleyicisi olarak ortaya konmuştur. Hücre siklusunun aktif fazlarında (G1, S, G2 ve M) eksprese edilirken, G0 fazında ekspresyon paterni gözlenmemiştir. Hücre siklusunda Ki67 ekspresyonu ilk olarak G1 fazının geç dönemlerinde ortaya çıkarken ve sonraki tüm fazlarda ekspresyonu devam etmektedir. Yarılanma ömrü yaklaşık 90 dakikadır. Bu protein, tüm proliferatif hücrelerde nükleer ekspresyon göstermektedir (11, 12). Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi bir şekilde gösteren protein olup, mitotik indeks ve tümör dokusunun evrenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (10, 43). Ki67 proteinin testiküler ekspresyonuna bakıldığında; puberte dönemine kadar spermatogonyum, Leydig ve Sertoli hücrelerinde eksprese olduğu, ancak puberte döneminden sonra sadece spermatogonyum ve Leydig hücrelerinde eksprese olduğu görülmektedir (44). Yapılan çalışmalarda hipospermatogenez ve çeşitli spermatogenez bozukluklarında, farklı tiplerdeki spermatogenez seri hücrelerinde Ki67 ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (11, 12). Çeşitli hastalık modeli oluşturulmuş ve toksik ajana maruz bırakılmış deneklerde spermatogonyumlarda Ki67 ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır (45). EMA'nın testis üzerine toksik etkileri ortaya koyan farklı çalışmalar bulunmakla birlikte son yıllarda yapılan bir çalışmada, 890-915 MHz EMA uygulanmış sıçanlarda spermatogenez seri hücrelerinde Ki67 ekspresyonunun değişmediği gösterilmiştir (11).

2.5.2. P63

Testislerde germ hücreleri mitoz ile çoğalırken hücre bölünmesinin fazla olduğu durumda erkek gametlerin aşırı üretimi apoptozis ile kontrol altına alınır (13). Apoptozis hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelmelerinin yanı sıra oksidatif stres, büyüme faktörleri eksikliği, radyasyon, EMA gibi çevresel etkenlerden dolayı da meydana gelmektedir (3). Apoptotik yolda rolü olan p53 hücre döngüsünü düzenleyen tümör supresör bir gendir. p63 geni ise, p53 gen ailesinin bir üyesi olmakla birlikte yapısal ve işlevsel olarak p53'e benzer (15). p63 proteini, DNA'sı hasara uğramış hücreyi, hücre bölünmesini G1-S fazında durdurarak veya hücrenin apoptozisine neden olarak etki gösterir. P63 geni 15 ekson, 270.000 baz çiftinden oluşur ve 3q27 kromozom bölgesinde yerleşik bir gen tarafından kodlanmaktadır. P63 ayrıca KET, CUSP, p51, p40 ve p73L olarak da bilinir (13, 14). P63, transkripsiyonel aktif (TA) p63 ve dominant negatif (N) p63 olmak üzere 2 majör izoforma sahiptir. N-ucu transaktivasyon bölgesi içermeyen eksilmiş bir protein kodlanmasına neden olurken, diğer promotör normal şekilde N-ucu transaktivasyon bölgesi içeren bir protein kodlamaktadır. Transaktivasyon bölgesi içeren p63'ler TAp63 olarak adlandırılırken, bu bölgeyi içermeyen p63'ler Np63 olarak adlandırılmaktadırlar. P63 mRNA'larının C-uçlarında farklı kaynaşım mekanizması ile α , β ve γ olarak adlandırılan 3 farklı protein ürün oluşturulmaktadır ve bu ürünlerin transaktivasyon bölgesi içerip içermemelerine bağlı olarak da (Tap63 α , Tap63 β , Tap63 γ ve Δ Np63 α , Δ Np63 β ve Δ Np63 γ) toplamda 6 değişik izotipi vardır. P63; SAM (Steril Alfa Motif) diye adlandırılan ve yalnızca p63'ün α formlarında (Tap63 α , Δ Np63 α) bulunan bir bölge içermektedir. TAp63 izoformları, p53'ün hedef genlerini (p21waf1/cip1, mdm2, perp, noxa, bax), aktive ederken, tam tersi olarak Np63 izoformu ise "dominant-negatif" gibi davranarak bu transkripsiyonel aktivasyonu baskılar ve hücre proliferasyonunu tetikler (13, 14, 15).

Apoptozis, EMA gibi genotoksik ajanların etkisiyle, DNA hasarına yanıt olarak p63 uyarılmasıyla başlamaktadır. İndüklenen p63, bir proapoptotik Bcl2 ailesi üyesi olan Bax'ın ve Fas ve Dr5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılmasına yol açarak apoptozisi başlatır (14, 46). P63; Bax, p21, PUMA, IGF3 ve HSP70 gibi hücre döngüsü ve apoptozis ile ilişkili spesifik genleri modüle etmekle birlikte başka göreve de sahiptir.

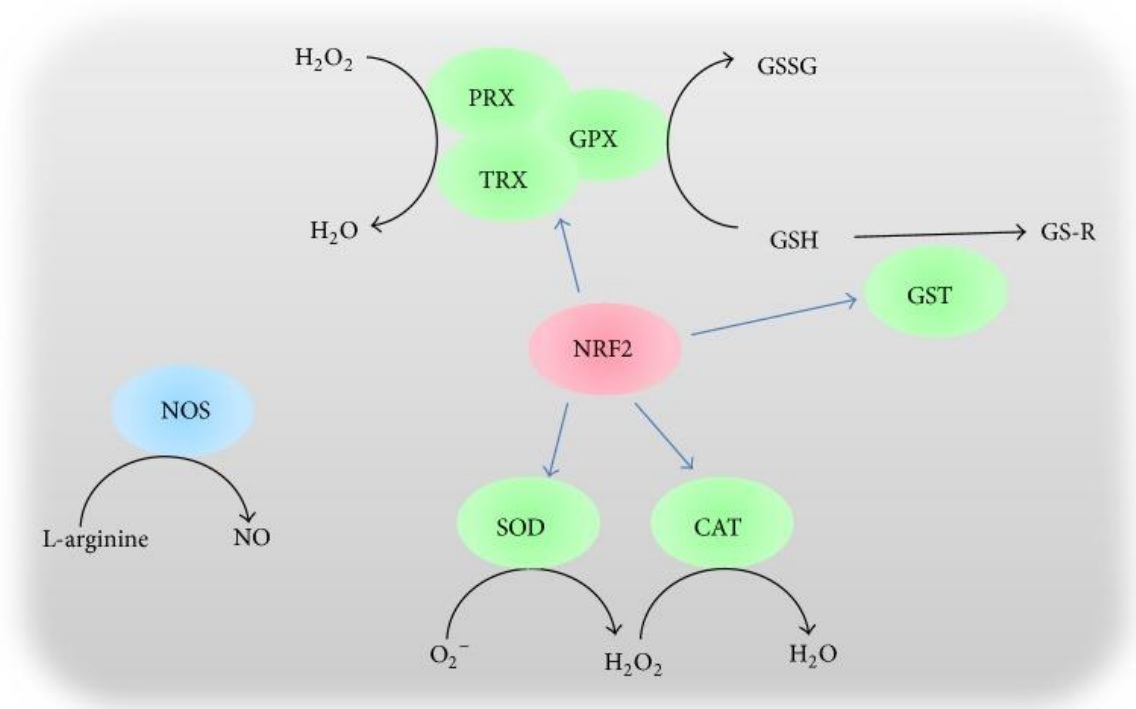
P63, spermatidlerin spermatozoonlara farklılaşma aşamasında ve germ hücrelerinin proliferasyonunda rolü olan Notch yolağının aktivasyonunda rol almaktadır. P63'ün izoformlarından biri olan TAp63gama aynı zamanda Notch proteinin ligandı olan Jagged2 proteinin regülasyonunu sağlar (47). Yapılan çalışmalarda neonatal ve yetişkin farelerde Notch proteinin ekspresyonunu saptamış ve Notch sinyal yolağının erkek infertilitesi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (48). Testiküler gelişim ve spermatogenez sürecinde p63 ekspresyonunun incelendiği çalışmalarda; özellikle postnatal dönemde 10. günden sonra spermatosit ve erken spermatidlerde ekspresyonunun artmaya başladığı gösterilmiştir (15).

2.6. Elektromanyetik Alana Bağlı Hücre Hasarında Antioksidanların Etkileri

Hava kirliliği, kimyasallara maruz kalma, organik yanık madde alımı (yanmış gıdalar, sigara dumanı gibi), iyonize edici (EMA, mikrodalga, radyo dalgaları) ve non-iyonize (alfa, gama, beta ışınları, UV ışınlar, X ışınları) edici radyasyon başlıca ekzojen serbest radikal kaynaklarıdır. Bu serbest radikal kaynakları oksijeni süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi türlere dönüştürerek radikal üretimine katkıda bulunurlar (7, 9, 22). Normal koşullarda hücre ve dokular, serbest radikal reaksiyonları ve bu reaksiyonlar sonucu oluşan ürünleri inhibe eden antioksidan bir sisteme sahiptirler (36). Hücrelerde bulunan başlıca antioksidan enzimleri katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), peroksiredoksin (PRX), tioredoksin (TPX), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon S-transferaz (GST)'dir. Bu enzimlerin ekspresyonu antioksidan sorumlu element (NRF2) tarafından düzenlenerek dokuda oluşabilecek yıkıcı ürünlerin katalizlenmesi sağlanır. SOD, süperoksit radikalini H_2O_2 'ye dönüştürür, CAT, TPX ve PRX ise H_2O_2 'yi H_2O 'ya katalizler. GST ise ksenobiyotik ürünleri glutatyona indükler. Nitrik oksit sentaz (NOS) L-argininden nitrik oksit (NO) üretimini katalize ederler (Şekil 2.3), (49). Özetle, antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu engelleyerek veya etkisiz hale getirerek etki gösterir. Bunun yanı sıra serbest radikal oluşumunu başlatıcı reaktif oksijen türevlerini ortadan kaldırarak yada engelleyerek, hücrel hasarın onarılmasını sağlarlar.

Antioksidanların EMA kaynaklı oluşmuş serbest radikaller üzerindeki etkisini inceleyen pek çok çalışma mevcuttur. Oksay ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 2.45

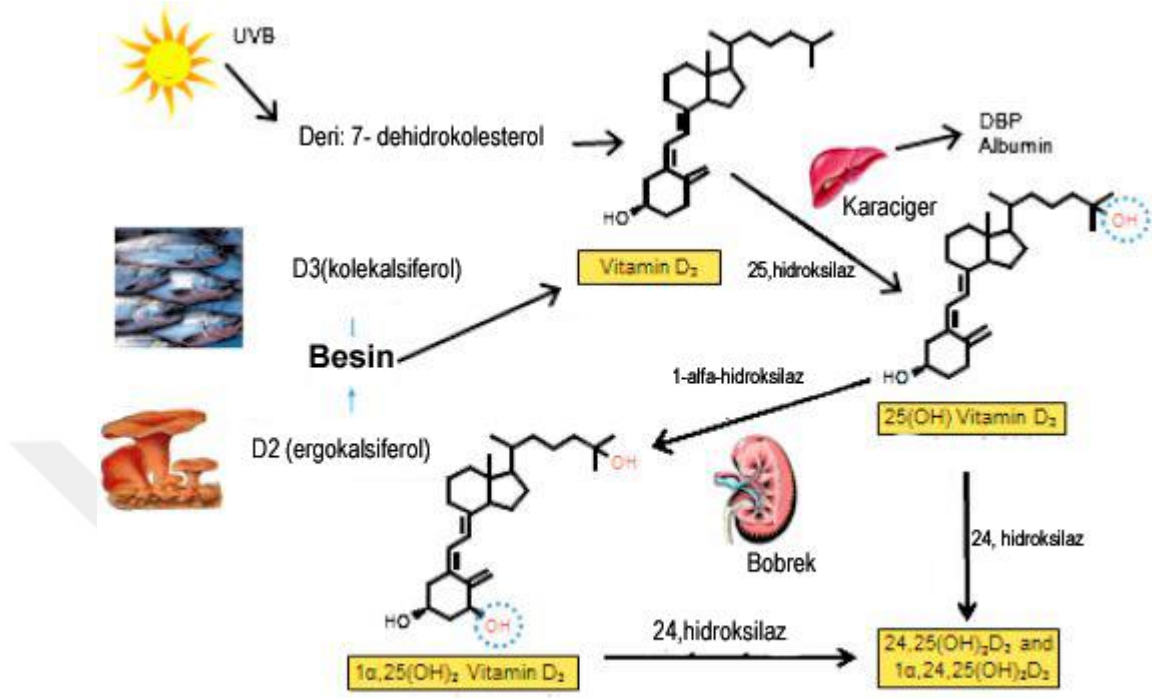
GHz EMA'ya maruz bırakılan testis dokusunda lipid peroksidasyonunun yükseldiği ve buna bağlı hasar olduğu gözlenirken antioksidan özellikte olan melatonin uygulanması ile lipid peroksidasyonunda azalmanın olduğu ve oksidatif hasara karşı melatoninin koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (36). Al-Damegh tarafından yapılan başka bir çalışmada, cep telefonundan yayılan EMA'nın rat testiküler doku ve kan üzerindeki olası zararlı etkilerine karşı vitamin C ve E uygulanmış, çeşitli antioksidan enzim konsantrasyonu incelenerek koruyucu etkisinin olduğu ortaya konmuştur (50). Ramadan ve ark. EMA'nın testiküler toksisitesine karşı kullanılan antioksidan özelliğinde olan L-karnitin ve koenzim Q10'nun sperm motilitesi, sperm üretimi ve miktarı üzerinde anlamlı derecede pozitif etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (51). EMA'nın testis üzerindeki etkisi histopatolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirildiği başka bir çalışmada ise spermatogenezde bozulma, germ hücrelerinde dejenerasyon, MDA ve glutatyon seviyelerinde azalma olduğu gözlenmiştir (52).



Şekil 2.3. Spermatogenez için önemli başlıca antioksidan ürünleri (49)

2.6.1. D Vitamininin Antioksidan Etkisi

D vitamini yağda eriyen steroid bir hormundur. İnsanlarda D vitaminin, vitamin D2 (ergokalsiferol) ve vitamin D3 (kolekalsiferol) olmak üzere iki şekli bulunur. Vitamin D3 deride güneş ışınları ile 7-dehidrokolesterol'den elde edilir ve aynı zamanda Vitamin D2 gibi besinlerle de alınır. D3 ve D2 vitaminleri karaciğerde 25-hidroksi vitamin D3 [25(OH)D3] ve 25-hidroksi vitamin D2'ye [25(OH)D2] dönüştürülür. Karaciğerde sentez edilen 25(OH)D2 vitamini, D vitamini bağlayan proteine (DBP) bağlanarak böbrek dokusuna taşınır ve 1- α -hidroksilaz enzimi ile aktif D vitamini olan 1-25(OH)2D'ye (kalsitrol) dönüştürülür (Şekil 2.4) (53, 54). Biyolojik olarak aktif olan kalsitrolün modifikasyonu ile parikalsitol (19-nor-1,25-OH₂-D₂) oluşur. Parikalsitol, vitamin D'nin analogudur ve D vitamini aktivatörleri arasında en güçlüsüdür (8). Parikalsitol hedef hücrelerde sitoplazma ve nükleus içinde bulunan vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanarak etkisini gösterir. Parikalsitol PTH sentez ve salgısını inhibe ederek parathormon seviyesini azaltmakla görevlidir (55). Farklı çalışmalarında parikalsitolun VDR'ye bağlanarak hücre proliferasyonundan sorumlu çeşitli genleri regüle ederek kanser hücrelerinin büyümesi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (9, 55). İn vitro ve in vivo çalışmalarda hücre diferansiyasyonunu artırdığı, kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, anti-inflamatuar, pro-apoptotik ve anti-anjiogenik etkili olduğu gösterilmiştir (8, 9, 53). Kemoterapik bir ajanla birlikte parikalsitol kullanıldığında akut myeloid lösemi hücrelerine karşı antiproliferatif etki göstermiştir (56). 1,25-(OH)2D, hücre proliferasyonunun, diferansiyasyonunun ve apoptozisin regülasyonunda görev alan genleri kontrol etmektedir (9). Literatürde çeşitli iskemi-reperfüzyon çalışmaları ve kanser çalışmaları ile parikalsitolun antioksidan ve antiapoptotik etkisi raporlanmıştır (57, 58).



Şekil 2.4. D vitamini metabolik yolağı (54)

Parikalsitolun pankreatik ve prostat tümör hücre hatlarının büyümesi üzerinde antiproliferatif etki gösterdiği görülmüştür (59). Bunlara ek olarak parikalsitolun üremik rat modellerinde kronik böbrek hastalıklarında kardiyo-renal koruma sağladığı görülmüştür (60). Nefropati modellerinde parikalsitolun antioksidan etkisi olduğu, apoptozisi ve proliferasyonu etkileyerek tedavi edici etkisi olduğu ortaya konmuştur (61). Hemodiyaliz hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada parikalsitol tedavisi sonucu oksidatif stresi azalttığı, anti-inflamatuvar belirteçleri yükselttiği ortaya konmuştur (62).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Deney Planı

Deney protokolü Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 01/10/2015 tarih ve 25 sayılı kararıyla onaylandı. Çalışmamızda Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından elde edilen 8-10 haftalık, 220-280 gr ağırlığında 28 adet Wistar Albino sıçan kullanıldı. Denekler deney süresince, sıcaklığı ortalama $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, nem oranı %45-65 ve 12 saat gece 12 saat gündüz ortamı sağlanan laboratuvarında, standart Tip III kafeslerinde barındırıldı, hazır pellet yem ve çeşme suyu ile beslendi. Deney süresince deneklere her sabah 09:00'da parikalsitol ve 09:30-10:30'da EMA uygulandı.

3.2. Deneysel Gruplarının Oluşturulması

Denekler kontrol (K) grubu, elektromanyetik alan (EMA) grubu, parikalsitol (P) grubu, elektromanyetik alan + parikalsitol (EMA+P) grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

1.Kontrol Grubu (n=7): Bu gruptaki deneklere hiçbir işlem uygulanmadı.

2.Parikalsitol Grubu (n=7): Bu gruptaki deneklere 30 gün boyunca haftada 3 kez aynı saatlerde 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ subkutan olarak parikalsitol uygulandı (8,59).

3.Elektromanyetik Alan Grubu (n=7): Bu gruptaki denekler deney süresi boyunca, her gün 1 saat süreyle 1800 MHz'lik EMA'ya maruz bırakıldı.

4.Elektromanyetik Alan+Parikalsitol Grubu (n=7): Bu gruptaki deneklere 30 gün boyunca haftada 3 gün 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ subkutan olarak parikalsitol uygulandı ve denekler daha sonra hergün 1 saat 1800 Mhz EMA'ya maruz bırakıldı.

3.3. Deneklere Elektromanyetik Alan Uygulaması ve SAR Hesaplaması

Bu çalışmada EMA uygulamasında, Everest GSM Simulator 1800CW2 modeli kullanıldı. Everest GSM Simulator, 1750 MHz ile 1850 MHz frekans aralığında, 0-2 W maksimum çıkış gücünde, 217 Hz modülasyonunda, sürekli veya kesikli dalga yayabilmektedir (Şekil 3.1). Anten fleksiglas malzemeden yapılmış fanusun orta bölgesine yerleştirildi. Deneklere EMA uygulanmadan önce ölçüm cihazıyla (PMM 8053 Portable Field Meter; ELA Medical Sorin, Milan, Italy) fanusun üst ve alt yüzeyinden, fanus boş durumdayken elektrik alan şiddeti ölçüldü. Elde edilen elektrik alan değeri, 6 V/m olarak saptandı. Elektrik alan değeri, Özgül Soğurma Oranı (Specific Absorbed Rate-SAR)-SAR hesaplamasında kullanıldı. SAR hesaplamasında kullanılan matematiksel formül önceki çalışmalarda aşağıdaki gibi verilmektedir (83). Hesaplanan SAR değeri ve hesaplamalarda kullanılan gerekli parametreler Çizelge 3.1'de verilmektedir. Gerekli ölçümler yapıldıktan sonra sıçanlar bu fanus içine konularak 1 saat süreyle 1800 MHz EMA'ya maruz bırakıldı.

$$SAR = \sigma \cdot \frac{E_{RMS}^2}{\rho} \quad (W / kg)$$

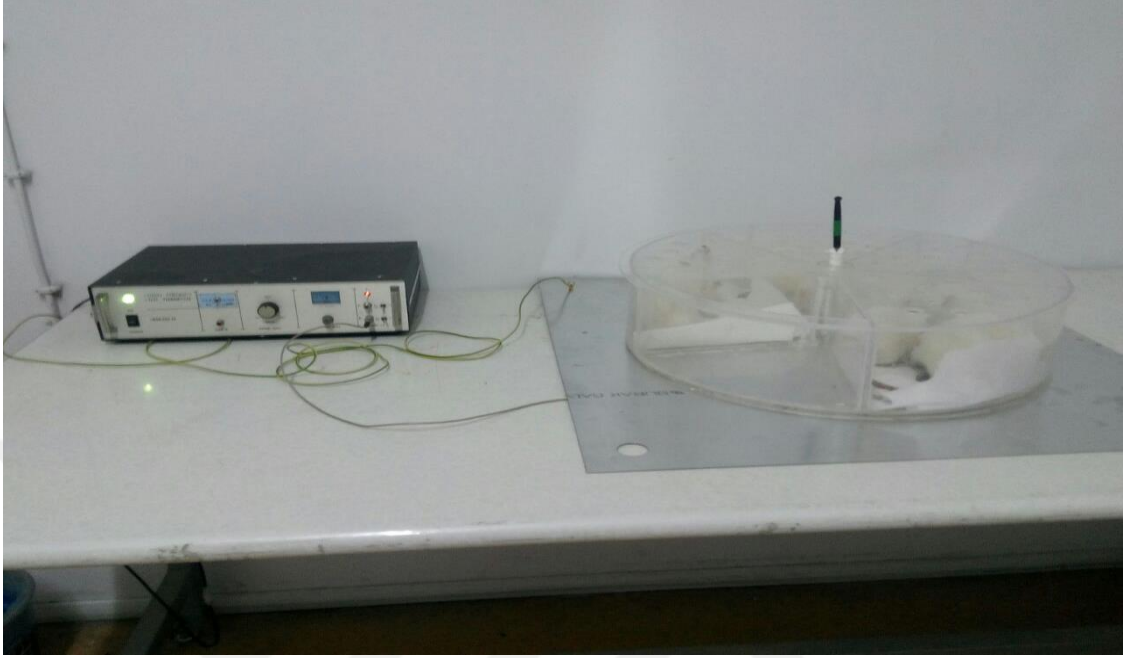
E_{RMS} : Elektrik alan (V/m)

σ : Ortalama Elektriksel iletkenlik (S/m)

ρ : Dokunun kütle yoğunluğu (kg/m^3)

Çizelge 3.1. SAR değeri hesaplanması (63)

	DokununKütle yoğunluğu (kg/m^3)	Ortalama Elektriksel İletkenlik (S/m)	Ölçülen Ortalama Elektrik Alan Değeri (V/m)	SAR (W/kg)
Tüm vücut	1040	1.389380	6	0.048



Şekil 3.1. Elektromanyetik dalga düzeneği

3.4. Dokuların Elde Elde Edilmesi

Deney süresinin bitiminde sıçanlar intraperitoneal olarak ksilazin (10 mg/kg) ve ketamin (100 mg/kg) anestezisi ile uyutuldu ve testis dokuları alındı. Deneklerin sol testisi ışık mikroskopik incelemeler için Bouin tespit solüsyonuna alınırken, sağ testisi de biyokimyasal incelemeler için -20 °C derin dondurucuya alındı.

3.5. Işık Mikroskopik Doku Takip İşlemi

Testis dokuları 1 cm³'lük parçalara bölündü ve daha sonra Bouin solüsyonunda 18 saat tespit edildi. Fikse edilen dokular % 70'lik alkolde yıkandıktan sonra aşağıdaki takip protokülüne göre takip edildi.

- | | |
|---------------------|-----------|
| 1. Etil Alkol (%80) | 30 dakika |
| 2. Etil Alkol (%95) | 2 saat |
| 3. Etil Alkol (%95) | 1 saat |

4. Etil Alkol (%100)	1 saat
5. Etil alkol (%100)	1 saat
6. Etil Alkol (%100)	1 saat
7. Ksilol	1 saat
8. Ksilol	1 saat
9. Ksilol	2 saat
10. Parafin	2 saat
11. Parafin	2 saat
12. Parafin	2 saat
13. Bloklama	

Rotary mikrotom ile parafin bloklardan alınan 3-5 µm'lik kesitler adheziv lamlara (Superior Marienfeld-HistoBond) alındı. Kesitler 30 dakika 60°C'lik etüvde bekletildikten sonra morfolojik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin ile aşağıda verilen yöntemle boyandı.

1. Ksilol	5 dakika
2. Ksilol	5 dakika
3. %100'lük etil alkol	5 dakika
4. %96'lık etil alkol	5 dakika
5. %70'lik etil alkol	5 dakika
6. Distile su	2-3 dakika
7. Mayer Hematoksilen	35 saniye
8. Musluk suyu	5 dakika
9. Asit alkol	3 saniye
10. Distile su	1 dakika
11. Amonyaklı su	10 saniye
12. Distile su	1 dakika
13. Eozin	30 saniye
14. Distile su	1 dakika
15. % 70'lik etil alkol	5 dakika

16. % 96'lık etil alkol 5 dakika
17. %100'lük etil alkol 5 dakika
18. Ksilol 5 dakika
19. Ksilol 5 dakika
20. Entellan ile kapatıldı.

Tüm deneklerden hazırlanan kesitler ışık mikroskobu (Olympus BX50 Olympus GmbH, Almanya) ile incelendi ve dijital kamera (Nikon Coolpix5000, Nikon Corp. Tokyo, JAPONYA) ile mikrografları çekildi.

3.6. İmmünohistokimya İşaretleme Protokolü

1. Parafin bloklardan mikrotomla (Mikrotom Leica, RM2125RT,) adeziv kaplı lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı.
2. Kesitler deparafinizasyon işlemi için 60 °C'lik etüvde 30 dakika bekletildikten sonra oda ısısında 3x10 dakika ksilenden geçirildi.
3. Rehidratasyon işlemi için kesitler 3'er dakika konsantrasyonu azalan alkol serilerinden (%90,%80,%70) geçirildi ve daha sonra distile suya alındı.
4. Antijen geri kazanımı için sitrat tamponu (pH=6) içinde 500 °C'de 7 dakika muamele edildikten sonra 20 dakika boyunca soğumaya bırakıldı.
5. Fosfatlı tuz tamponu (PBS) ile 3x5 dakika yıkandı.
6. Endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için distile suda %12,5'luk olarak hazırlanmış H₂O₂ ile 10 dakika beklemeye bırakıldı.
7. PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
8. Nonspesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı oluşabilecek zemin boyanmasını engellemek için protein blok (Abcam, Mouse and Rabbit Specific HRP, katalog no: ab93697, United Kingdom) ile 10 dakika inkübe edildi.
9. Kesitlerin üzerindeki protein blok uzaklaştırıldı. Daha sonra %0.1 Triton-X-100, %0.5'lik sığır serum albümini içeren PBS içinde (PBS-BSA) 1/50 (Ki67) ve 1/200 (p63) dilüsyonunda sulandırılmış primer antikorlar (Ki67 için; tavşan poliklonal

primer antikoru, Abcam, katalog no:ab15580, p63 için; tavşan poliklonal primer antikoru, Abcam, katolog no: ab53039) damlatıldı. Kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde +4 °C’de buzdolabında 16 saat inkübe edildi.

10. PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
11. Biotin ile bağlanmış polivalent sekonder antikor (Abcam, katalog no:ab93697, USA) damlatılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi.
12. PBS ile 5 dakika yıkandı.
13. Stereptavidin peroksidaz enzim solüsyonu ile 10 dakika inkübe edildi.
14. PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
15. Peroksidaz substratı olan diaminobenzidin (DAB) (Abcam 94665) damlatıldı ve 3-5 dakika inkübe edildi.
16. Distile suda 3-5 dakika yıkama yapıldı.
17. Hematoksilen ile 5 saniye zıt boyama yapıldı ve kesitler akar suda yıkandı.
18. Kesitler konsantrasyonu artan alkolden (%80-90-96) oda ısısında geçirilerek 3'er dakika dehidrate edildi.
19. Kesitler kuruduktan sonra ksilenden 3x5 dakika geçirildi.
20. Kesitler entellan ile kapatıldı.

Negatif kontrol kesitleri için, kesitler primer antikor inkübasyonu yerine primer antikor içermeyen % 0,5 PSA-BSA ile inkübe edildi ve daha sonra aynı protokolle boyandı.

3.7. Işık Mikroskopik Değerlendirme

Hematoksilen-Eozin ile boyanan kesitler X20 objektif büyütmesinde, farklı alanlardan randomize seçilen ve toplamda 25 adet seminifer tübülde seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve modifiye Johnsen skorlaması kullanıldı.

3.7.1. Johnsen Skorlama Sistemi

Randomize seçilen seminifer tübül, spermatogenik hücrelerin bulunma yoğunluğuna göre veya seminifer epitelin kalitesine göre 1-10 arası skorlar verilerek skorlama yapıldı (64). (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2. Johnsen skorlaması (64)

10: Matur sperm hücresi ile birlikte tam bir spermatogenez
9: Düzensiz germinal epitel ile birkaç sperm hücresi var
8: 10'dan az sperm hücresi var (5-10' dan az)
7: Sperm hücresi yok, spermatid var
6: Sperm hücresi yok, 10'dan az spermatid var(5-10'dan az)
5: Sperm hücresi ve spermatid yok, spermatosit var
4: Sperm hücresi ve spermatid yok, 5'den az spermatosit var
3: Germ hücresi olarak sadece spermatogonyum var
2: Germ hücreleri yok, sadece Sertoli hücresi var
1: Seminifer tübülde hiç hücre yok.

3.7.2. İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler

Işık mikroskopunda X40 objektif büyütmesinde, farklı alanlardan randomize seçilen ve toplamda 25 adet seminifer tübülde Ki67 ve p63 immün işaretli hücreler, belirtilen immünoreaktive skorlama (IRS) yöntemine göre değerlendirildi (Çizelge 3.3).

Çizelge 1.3. İmmünoreaktive skorlama (IRS) yöntemi (65)

A (Pozitif hücrelerin yüzdesi)	(B) Boyanma Yoğunluğu	İmmünoreaktivite Skoru (IRS) (A ve B çarpımı)
0= pozitif hücre yok	0= renk yok	0-1= negatif
1= pozitif hücre <%10	1= orta boyanma	2-3= orta
2= pozitif hücre %10-50	2= yoğun boyanmaya yakın	4-8= yoğun boyanmaya
3= pozitif hücre %51-80	3= yoğun boyanma	9-12= güçlü boyanma
4= pozitif hücre >%80		

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilecek verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde; değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadıkları Kolmogrov-Smirnov testiyle incelenmiş olup, normal dağılıma uygun dağılan değişkenler için grup karşılaştırılmasında ANOVA, post hoc test olarak Bonferroni testinden yararlanılmıştır. Grafik olarak hata çubuk (error bar) grafiği çizilmiştir. Normal dağılıma uygun dağılmayan değişkenler için Kruskal Wallis ve ardından gruplar ikişerli olarak Mann Whitney U testiyle karşılaştırılmıştır ve Box-Whisker grafiği çizilmiştir. Normal dağılıma uyan değişkenler ortalama±standart sapma cinsinden, uymayan değişkenler ise medyan [minimum-maksimum] şeklinde özetlenmiştir. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Analizler MedCalc v.10.3.0 ile yapılmıştır.

3.9. Biyokimyasal İncelemeler ve Kullanılan Yöntemler

Dokuların lipit peroksidasyonunu belirlemek için MDA düzeylerine, antioksidan enzim düzeylerini belirlemek için ise CAT ve SOD aktivitelere bakıldı. Tüm dokuların enzim aktivitelerini unit/miligram (U/mg) protein olarak belirtebilmek için ise protein düzeyleri ölçüldü (66, 67, 68).

3.9.1. Protein Ölçümü (Lowry Metodu) (67)

Deneyin Prensi: Bakır-protein kompleksi alkali çözeltide oluşmaktadır. Bu kompleks fosfomolibdat fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi) redüklemekte ve koyu mavi bir renk oluşmaktadır. Ortamdaki protein konsantrasyonu ile rengin koyuluğu doğru orantılıdır.

Kullanılan Reaktifler: (Çizelge 3.4)

A Reaktifi: 0,1 N NaOH çözeltisi ile %2'lik Na_2CO_3 çözeltisi hazırlandı.

B₁ Reaktifi: %1'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi hazırlandı.

B₂ Reaktifi: %2'lik Na-K-Tartarat çözeltisi hazırlandı.

B Reaktifi: B₁ ve B₂ eşit hacimde karıştırıldı.

C Reaktifi: 50 ml B reaktifine 1ml A reaktifi eklendi.

D Reaktifi: 1 ml Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi, 5 ml distile su ile karıştırıldı.

Protein standardı: 250 mg/100 ml bovine serum albümin (BSA) 20, 40, 80, 160, 320, 640 µg/ml, protein içerecek şekilde dilüe edilerek çalışma standartları hazırlandı.

Çizelge 3.2. Protein ölçümünde kullanılan reaktifler

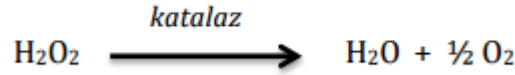
	Kör tüpü	Numune tüpü	Standart
Numune (µL)	-	300	-
Distile su (µL)	300	-	-
Standart (µL)	-	-	300
C reaktifi (µL)	3000	3000	3000
Karıştırılarak 15 dakika beklendi.			
D reaktifi(µL)	300	300	300

Tüpler vortekslendi ve 20-30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Numunenin ve standardın absorbansı spektrofotometrede 750 nm'de köre karşı okundu.

Her bir örnek için protein miktarı, BSA standart çözeltileri ile hazırlanan standart eğrisine göre ve dilüsyon faktörüyle çarpılarak hesaplandı. %10'luk doku homojenatlarında ve 10.000 g süpernatant fraksiyonlarında protein miktarı U/mg olarak bulundu.

3.9.2. Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini (68)

Deneyin Prensibi: Katalaz aktivitesi tayini Aebi tarafından tarif edilen yöntemle yapıldı. Yöntemin esası, katalaz ile H₂O₂ substratının enzimatik yıkılmasının 240 nm de izlenmesidir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. H₂O₂ substratının katalaz ile enzimatik yıkılması

Kullanılan Reaktifler:

Potasyum Dihidrojen Fosfat Çözeltisi (A): 0,681 g KH₂PO₄ bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Disodyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (B): 2,77 g Na₂HPO₄.12H₂O bidistile suda çözülerek 155 ml'ye tamamlandı.

Fosfat Tamponu (50 mM pH 7,0): A/B oranı 1/1.55 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı ve pH 7'ye ayarlandı.

Hidrojen Peroksit Çözeltisi (30 mM): 34 µl %30'luk H₂O₂ 10 ml'ye fosfat tamponu ile tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: Kuvarz spektrofotometre küvetlerine 10 µl 10.000 g süpernatant fraksiyonu ve üzerlerine 1990 µl fosfat tamponu ilave edildi. Örnek küvetine 1 ml 30 mM H₂O₂ ilave edildi ve hemen karıştırılarak örneğin absorbansındaki azalma köre karşı 1 dakika boyunca 240 nm'de izlendi. Spesifik aktivitesi U/mg protein cinsinden hesaplandı

3.9.3. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini (66)

Deneyin Prensi: Ksantin varlığında ksantin oksidazın açığa çıkardığı süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazolium (NBT) ile 560 nm'de absorblanan rengin ölçülmesine dayanır.

Kullanılan Reaktifler:

Sodyum Hidroksid Çözeltisi (0,1 N): 0,4 g NaOH bidistile suda çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı.

Stok Ksantin Çözeltisi (3 mM): 4,6 mg ksantin tartılıp, 1 ml 0,1 N NaOH çözeltisiyle birlikte hafif ısı uygulaması ile çözüldü ve bidistile su ile 10 ml'ye tamamlandı.

Ksantin Çözeltisi (0,3 mM): Stok ksantin çözeltisinden 1 ml alınarak bidistile su ile 10 ml'ye tamamlandı.

Etilendiamintetraasetik Asid Çözeltisi (0,6 mM): 22,32 mg Na₂EDTA. 2H₂O bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (400 mM): 4,24 g Na₂CO₃ bidistile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

BSA Çözeltisi (1 g/L): 10 mg BSA bidistile suda çözülerek 10 ml'ye tamamlandı.

Nitroblue Tetrazolium Klorür (NBT) Çözeltisi (0,15 mM): 1,226 mg NBT bidistile suda çözülerek 10 ml ye tamamlandı.

SOD Çalışma Reaktifi: 10 ml 0,3 mM ksantin, 5 ml 0,6 mM Na₂EDTA, 3 ml 400 mM Na₂CO₃, 1,5 ml 1 g/L BSA, 5 ml 0,15 mM NBT karıştırıldı.

Amonyum Sülfat Çözeltisi (2 M): 26,428 g (NH₄)₂SO₄ bidistile suda çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı.

Ksantin Oksidaz Çözeltisi (167 U/L): 2 mg ksantin oksidaz soğutulmuş (NH₄)₂SO₄ çözeltisinde çözüldü ve 1 ml'ye tamamlandı.

Bakır Klorür Çözeltisi (0,8 mM): 13,64 mg CuCl₂.2H₂O bidistile suda çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılı: 2,85 ml SOD reaktifi örnek tüpüne ve kör tüpüne aktarıldı. Örnek tüpüne 100 µl süpernatant ilave edildi ve her iki tüpe de 50 µl ksantin oksidaz eklendi. Tüpler 25 °C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra tüplere 100 µl CuCl₂ çözeltisi eklendi. En son aşama olarak da kör tüpüne 100 µL süpernatant eklenerek karıştırıldı. Kör

tüpünün ve örnek tüpünün 560 nm’de absorbansları ayrı ayrı ölçülüp SOD aktivitesi tespit edildi. Spesifik aktivite U/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.9.4. Malondialdehit Ölçümü (68)

Deneyin prensibi: Lipit peroksidasyon ürünlerinden biri olan MDA’nın tiobarbitirik asit ile reaksiyonu sonucu pembe kırmızı renk oluşmaktadır. Pembe kırmızı rengin absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır

Kullanılan Reaktifler: (Çizelge 3.5)

Stok tetrametoksiopropan çözeltisi: 0,92 gr tetrametoksiopropan 1 ml’de çözülür.

Günlük tetrametoksiopropan çözeltisi: 10 ml’lik stok çözelti 100 ml’ye distile su ile tamamlandı. Çalışma sırasında günlük çözelti tekrar 1/10 oranında seyreltildi.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi: 8,1 gr SDS tartıldı, 100 ml’ye distile su ile tamamlandı.

Asetik Asit çözeltisi: 20 ml asetik asit distile su ile 100 ml’ye tamamlandı ve pH’sı 3.5’ e ayarlandı.

Tiyobarbiturik asit (TBA) çözeltisi: 0,8 gr TBA tartılır ve 100 ml’ye distile su ile tamamlanıp ısıtılarak çözülür.

n-bütanol-piridin çözeltisi (15:1): Stok piridinin 1 ml’si 15 ml n-bütanol ile karıştırılmıştır.

Deneyin Yapılışı: Tüpler 95 °C’de 30 dakika süre ile inkübe edildi ve musluk suyunda soğutuldu. Daha sonra 500 µldistile su eklendi ve 2,5 ml n-bütanol-piridin eklendikten sonra karışımlar beyazlaşmaya kadar vortekslendi. 4000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant fazdan 1 ml alındı ve 532 nm’de köre karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Çizelge 3.5. MDA ölçümünde kullanılan reaktifler

	Kör	Standart	Örnek
Standart (1/10 dilüe) (μL)	-	50	-
Örnek (μL)	-	-	50
SDS çöz. (μL)	100	100	100
Asetik Asit çöz. (μL)	750	750	750
TBA çöz. (μL)	750	750	750
Distile su (μL)	400	350	350

4. BULGULAR

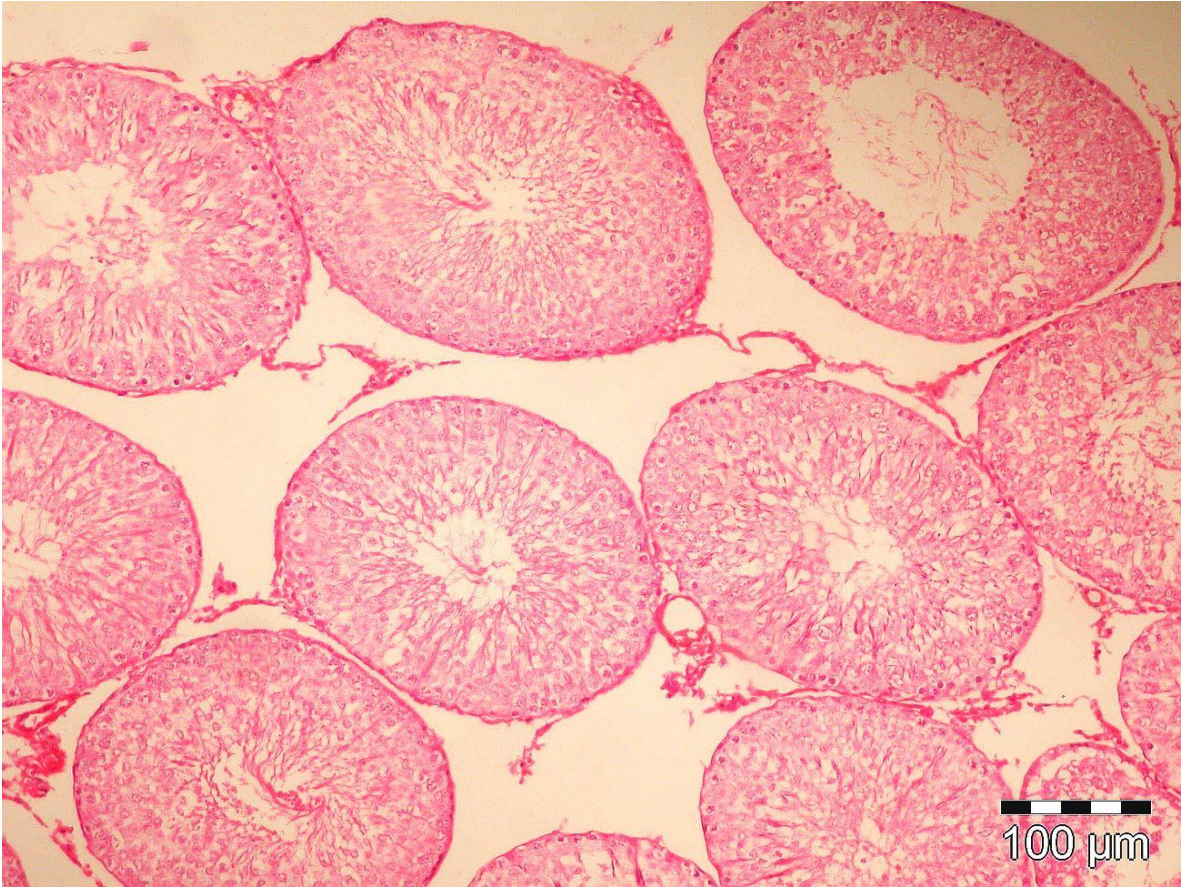
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.1.1. Morfolojik Değerlendirme

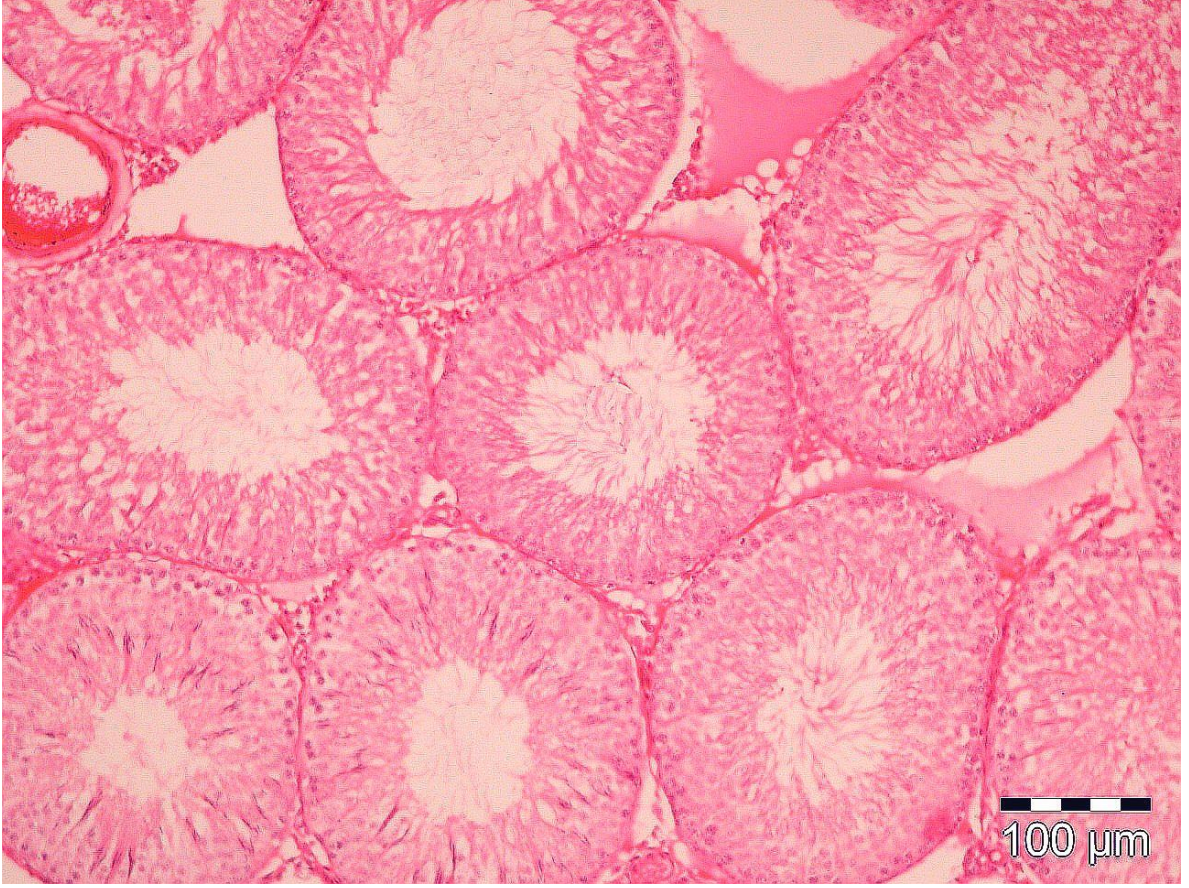
K Grubu ve P Grubu: Bu gruplarda benzer olarak seminifer tübüllerin ve interstisyel alanların normal yapıda olduğu görüldü. Seminifer tübüllerde germinal epitelin normal görünümde olduğu spermatogenez evrelerinde bulunan farklı aşamadaki spermatogenik hücrelerin normal morfolojide olduğu saptandı (Şekil 4.1, Şekil 4.5.A ve Şekil 4.2, Şekil 4.5.B).

EMA Grubu: Bu grupta normal yapıda seminifer tübüllerin arasında az sayıda dejenere germinal epitele sahip seminifer tübüller saptandı. Bazı seminifer tübüllerde ise spermatogenik hücrelerden oluşan, lümene dökülmüş hücre kümeleri saptandı. İnterstisyel alan normal görünümdeydi (Şekil 4.3. ve 4.5.C).

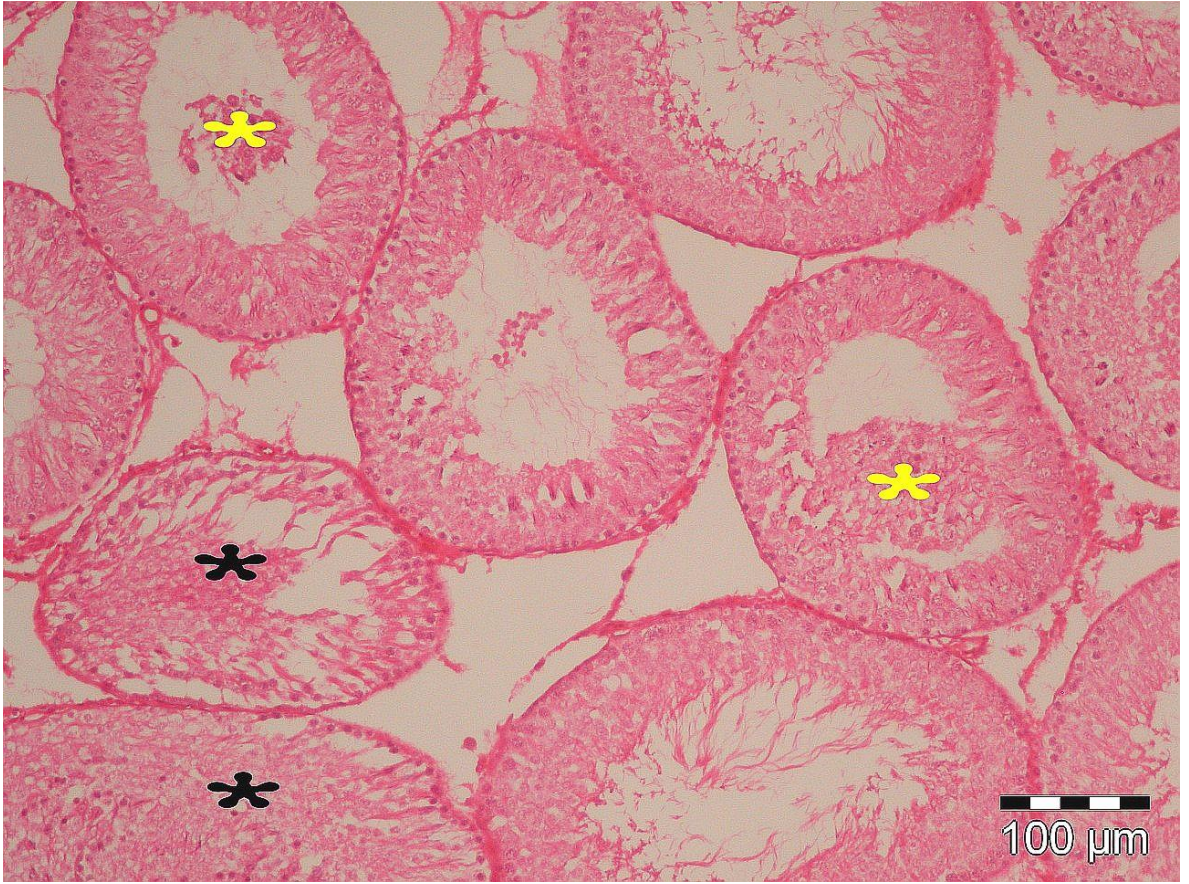
EMA+P Grubu: Bu grupta K ve P gruplarına benzer olarak çok sayıda normal yapıda seminifer tübül görüldü. Seminifer tübüllerde germinal epitelin ise normal yapıda olduğu saptandı. Az sayıda seminifer tübülde EMA grubundakine benzer olarak lümene dökülmüş spermatogenik hücreler vardı. İnterstisyel alan normal yapıdaydı (Şekil 4.4. ve 4.5.D).



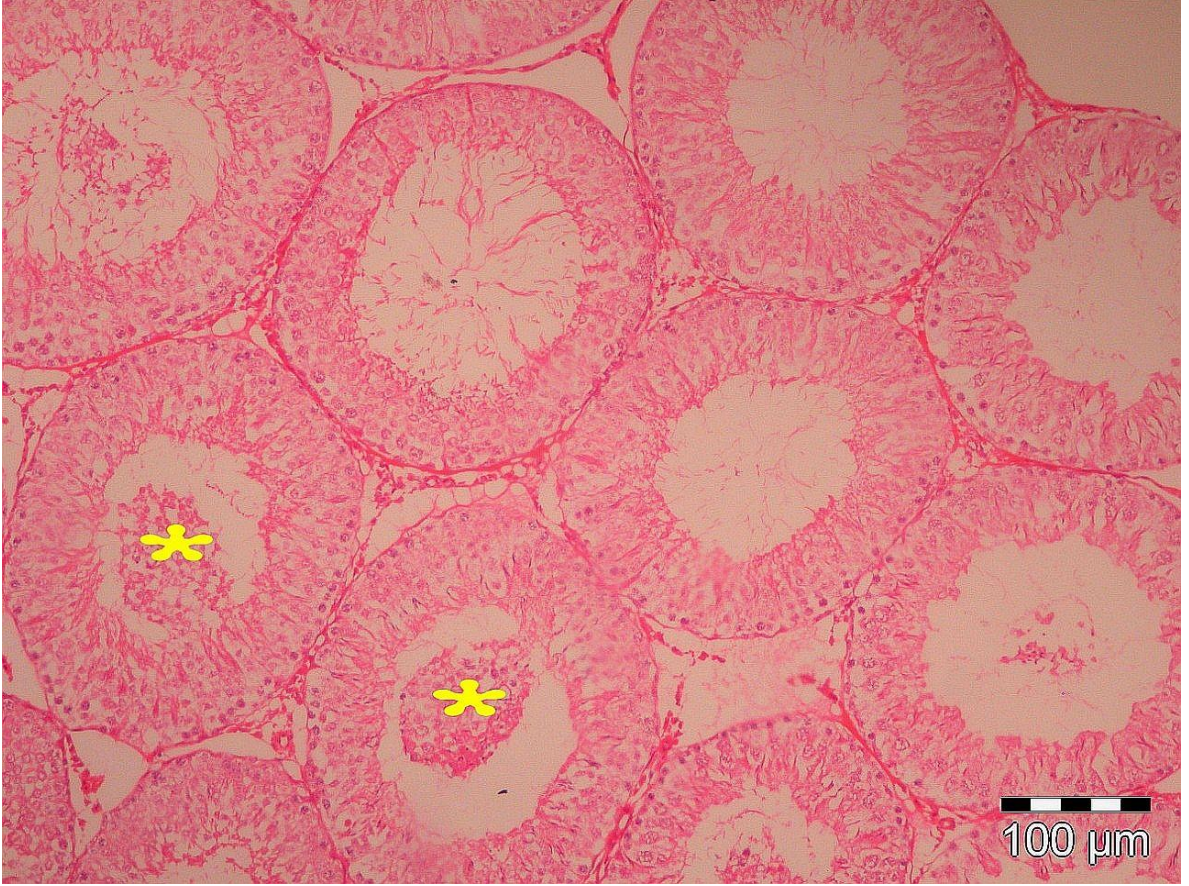
Şekil 4.1. Kontrol grubunda normal yapıda seminifer tübüller (H&E X300).



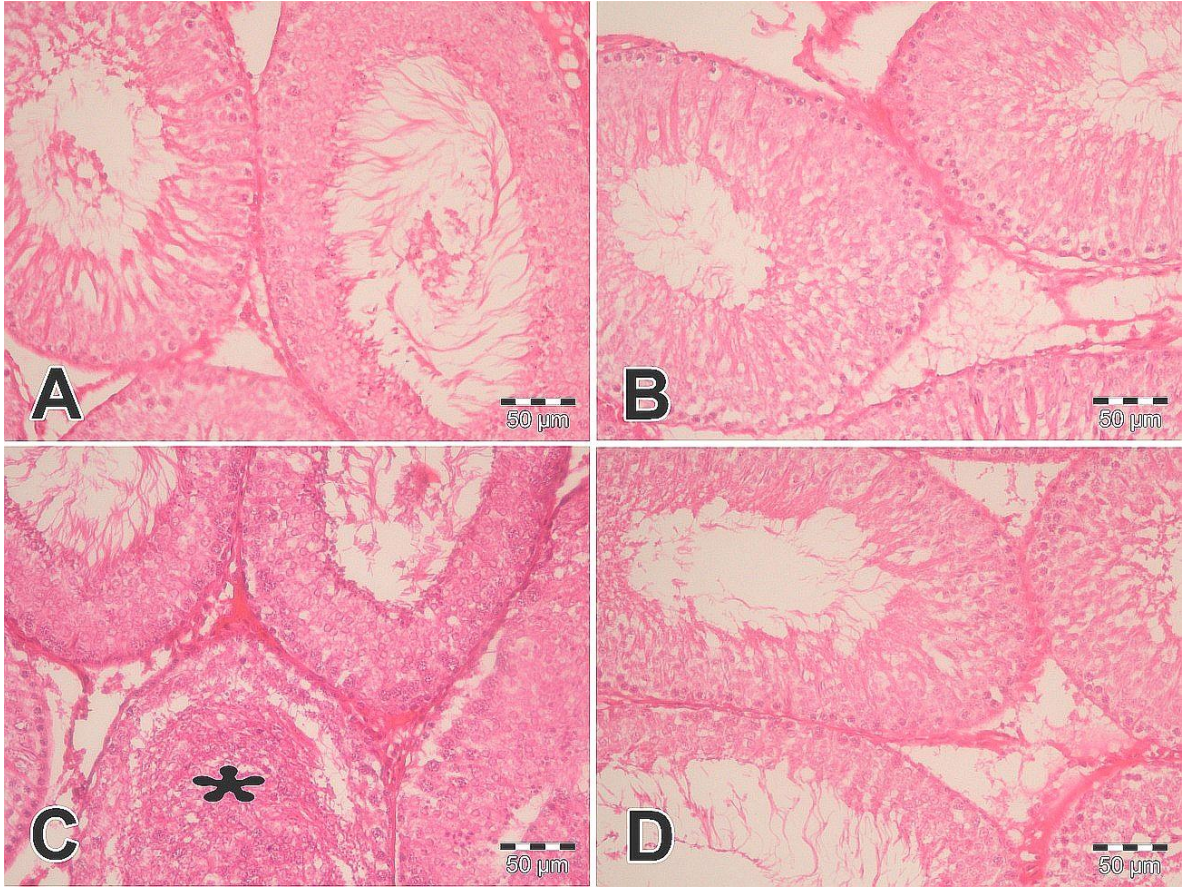
Şekil 4.2. P grubuna ait normal seminifer tübül yapıları (H&E X300).



Şekil 4.3. EMA grubunda seminifer tübüller. EMA grubunda normal yapıda seminifer tübüller arasında dejenere olmuş seminifer tübüller (siyah asteriskler) ve bazı seminifer tübül lümenlerinde deskuame olmuş spermatogenik hücreler (sarı asteriskler) (H&E X300).



Şekil 4.4. EMA+P grubunda seminifer tübüller EMA+P grubunda normal yapıda seminifer tübüller ve bazı seminifer tübüllerde lümende deskuame olmuş spermatogenik hücreler (sarı asteriskler) (H&E X300).



Şekil 4.5. K, P ve EMA+P gruplarında seminifer tübüller. K, P ve EMA+P gruplarında normal yapıda seminifer tübüller ve farklı aşamalarda spermatogenik hücrelerin oluşturduğu normal spermatogenez (sırasıyla **A**, **B** ve **D**). EMA grubunda (**C**) dejenere germinal epitele sahip seminifer tübül (siyah asterisk) (H&EX600).

4.1.2. Germinal Epitel Kalınlıkları ve Seminifer Tübül Çapları

Tüm gruplar arasında ölçülen germinal epitel kalınlıkları ve seminifer tübül çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0,289$, $p=0,081$), (Çizelge 4,1).

Çizelge 4.1. Grupların germinal epitel kalınlıkları ve seminifer tübül çapları

GRUP	EMA Median [Min.-Max.]	EMA+P Median [Min.-Max.]	K Median [Min.-Max.]	P Median [Min.-Max.]	P
Germinal Epitel Kalınlığı (μm)	76,72 [65,30-86,25]	77,83 [62,62-115,72]	78,86 [75,42-98,04]	74,50 [63,56-79,90]	0,289
Seminifer Tübül Çapı (μm)	275,72 [165,47-304,12]	275,78 [247,53-288,56]	277,50 [247,41-286,15]	247,26 [216,92-275,85]	0,0810

4.1.3. Johnsen Skorlamaları

K Grubu: Bu grubun Johnsen skorlaması ($9,552\pm 0,1886$), EMA grubu ($8,857\pm 0,1695$) ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılık gösterirken ($p<0,001$), P, EMA+P gruplarıyla (sırasıyla $9,417\pm 0,2115$, $9,434\pm 0,1896$) anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($p=1,000$), (Çizelge 4.2), (Şekil 4.6).

P Grubu: Bu grupta Johnsen skoru ($9,417\pm 0,2115$) EMA grubundakine göre ($8,857\pm 0,1695$) anlamlı derecede fazlaydı ($p<0,001$), ancak K, EMA+P gruplarınıninkine göre (sırasıyla $9,552\pm 0,1886$, $9,434\pm 0,1896$) anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=1,000$), (Çizelge 4.2), (Şekil 4.6).

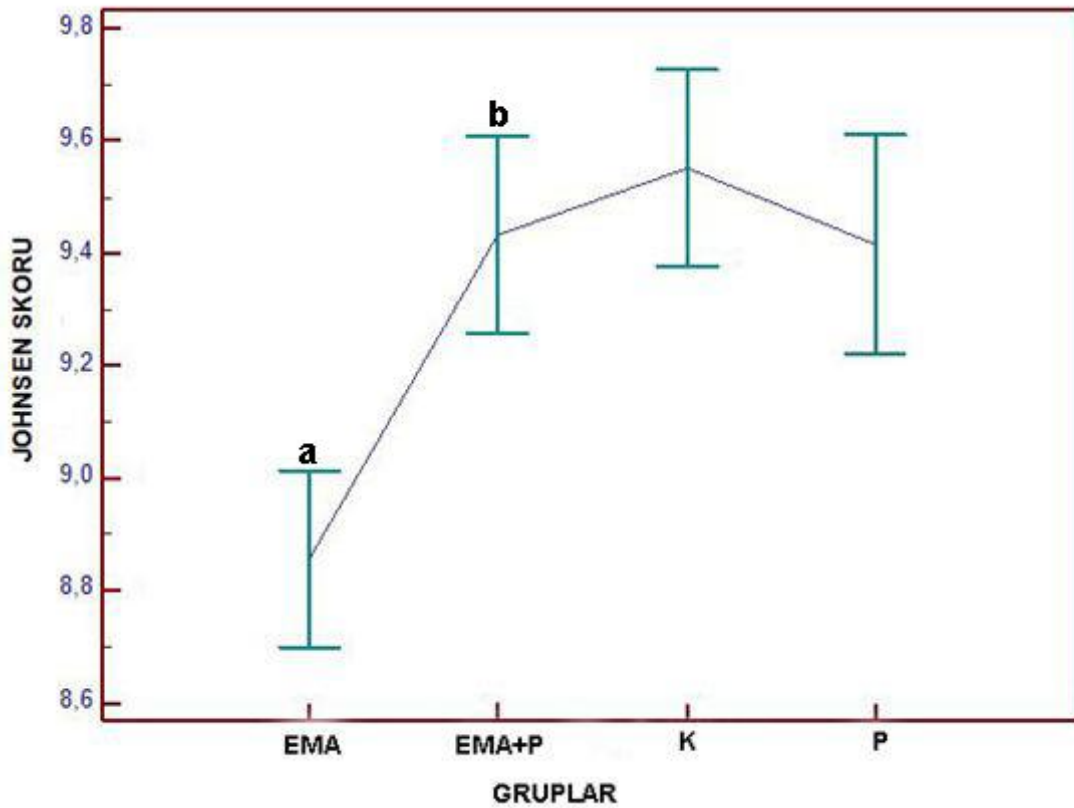
EMA Grubu: EMA grubu Johnsen skoru ($8,857\pm 0,1695$) K, P ve EMA+P gruplarının Johnsen skorlarına (sırasıyla $9,552\pm 0,1886$, $9,417\pm 0,2115$, $9,434\pm 0,1896$) göre anlamlı derecede azalma gösterdi ($p<0,001$), (Çizelge 4.2), (Şekil 4.6).

EMA+P Grubu: Bu grubun Johnsen skoru ($9,434\pm 0,1896$), EMA grubu ($8,857\pm 0,1695$) ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede artmıştı ($p<0,001$), ancak K ve P

gruplarının Johnsen skorları (sırasıyla $9,552 \pm 0,1886$, $9,417 \pm 0,2115$) ile karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($p=1,000$), (Çizelge 4.2), (Şekil 4.6).

Çizelge 4.3. Grupların Johnsen skorları

JOHNSEN SKORU				
GRUP	EMA	EMA+P	K	P
Mean	8,857	9,434	9,552	9,417
S.D.	0,1695	0,1896	0,1886	0,2115



Şekil 4.6. Johnsen skorlamalarının gruplar arasında karşılaştırılması. ^aEMA grubu skoru EMA+P ve K gruplarının skorlarına göre anlamlı olarak düşük ($p<0,001$ ve $p<0,001$). ^bEMA+P grubu skoru, K grubunununkinden anlamlı farklılık göstermemekte ($p=1,000$) ancak EMA grubunununkinden anlamlı olarak yüksekti ($p<0,001$).

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

p63 ve Ki67 negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir işaretlenme gözlenmedi (Şekil 4.7.A ve 4.7.B).

4.2.1. p63 İmmün İşaretlenmesi

Tüm gruplara ait seminifer tübüllerde, adluminal kompartmanda bulunan erken ve geç spermatidlerin nükleuslarında p63 immün işaretlenmesi görüldü (Şekil 4.8).

K Grubu: Bu gruba ait IRS'ler (ort. 11,20) P grubundakine (ort. 10,880) benzerlik göstermekteyken ($p=0,653$), EMA ve EMA+P gruplarının IRS'lerine (sırasıyla ort. 5,640, ort. 9,720) göre ise anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,005$), (Çizelge 4.3), (Şekil 4.8.A, Şekil 4.11.B).

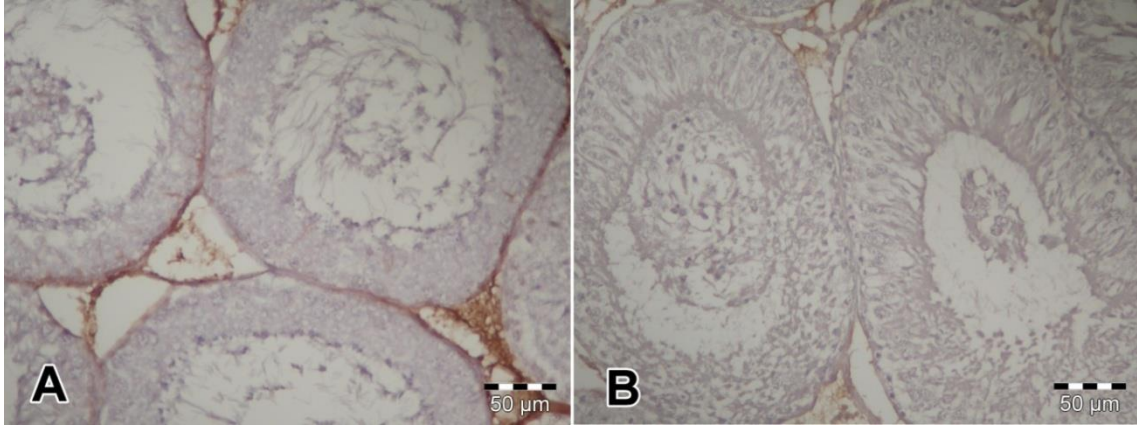
P Grubu: Bu grupta IRS (ort. 10,880) K grubunun IRS'siyle (ort. 11,20) anlamlı bir benzerlik gösterdiği görüldü ($p=0,653$), (Çizelge 4.3). Ancak EMA ve EMA+P grubu IRS'leri ile (sırasıyla ort. 5,640, ort. 9,720) karşılaştırıldığında ise artış gösterdiği gözlemlendi ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,003$), (Çizelge 4.3), (Şekil 4.8.B, Şekil 4.11.B).

EMA Grubu: Bu grubun IRS'si (ort. 5,640), K, P ve EMA+P grupların IRS'siyle (sırasıyla ort. 11,20, ort. 10,880, ort. 9,720) karşılaştırıldığında azalma vardı ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,002$, $p=0,002$), (Çizelge 4.3), (Şekil 4.8.C, Şekil 4.11.B).

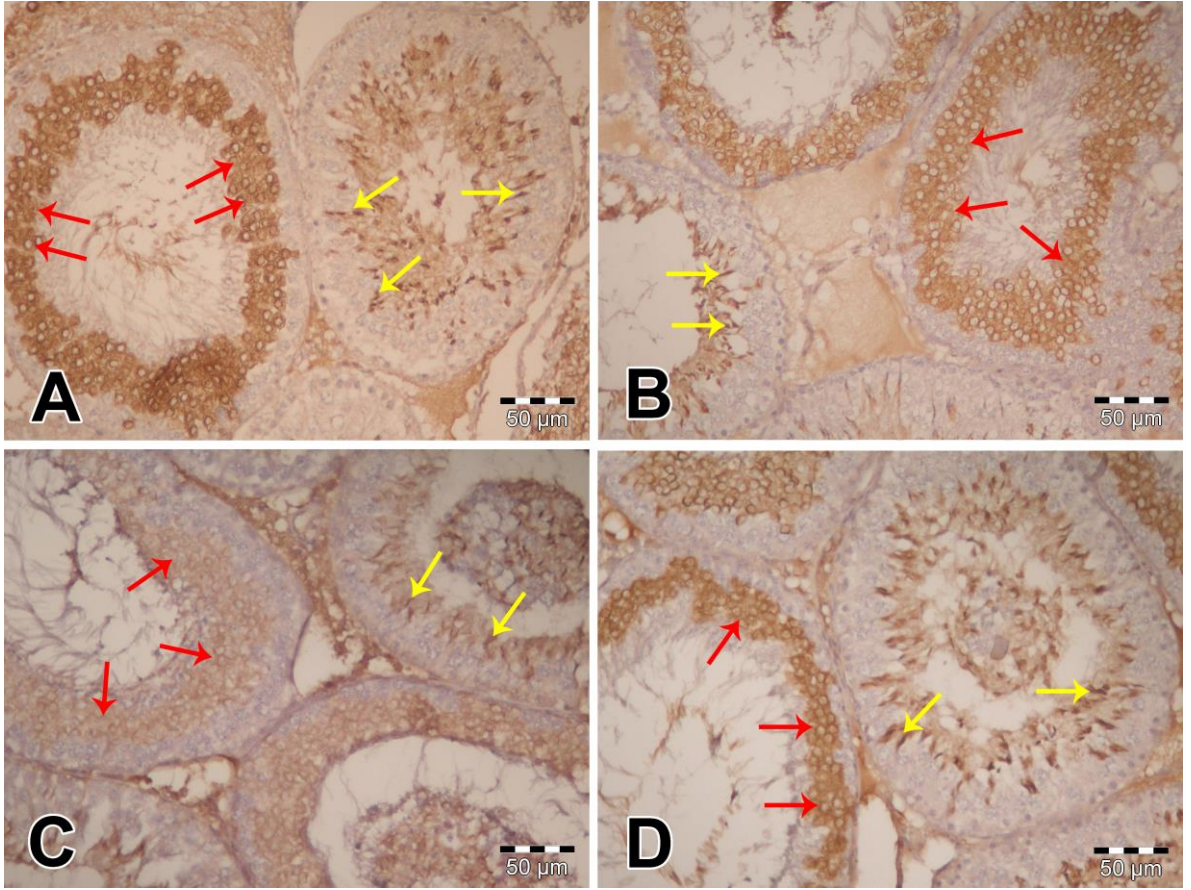
EMA+P Grubu: Bu grubun IRS'si (ort. 9,720) K ve P gruplarına (sırasıyla ort. 11,20, ort. 10,880) göre anlamlı bir azalma gösterirken (sırasıyla $p=0,005$, $p=0,003$), EMA grubuna (ort. 5,640) göre anlamlı bir artış göstermekteydi ($p=0,002$), (Çizelge 4.3), (Şekil 4.8.D, Şekil 4.11.B).

Çizelge 4.3. Grupların p63 immunoreaktivite skorları

P63				
GRUP	EMA	EMA+P	K	P
Median	5,640	9,720	11,200	10,880
Min-Max	2,960-6,640	8,680-10,800	10,00-11,28	10,240-11,440



Şekil 4.7. p63 (A) ve Ki67 (B) immünohistokimyasal negatif kontrol kesitleri (İndirekt peroksidaz X600)



Şekil 4.8. p63 immün işaretlenme yoğunluğu. Seminifer tübülde erken (kırmızı oklar) ve geç spermatidlerin (sarı oklar) nükleuslarında pozitif immün işaretlenme. **A.** K grubu, **B.** P grubu, **C.** EMA grubu, **D.** EMA+P grubu (İndirekt peroksidaz X600).

4.2.2. Ki67

Tüm gruplara ait seminifer tübüllerin bazal kompartmanında bulunan spermatogonyumların immün işaretlenmesi yoğun olarak görüldü (Şekil 4.9, Şekil 4.10).

K Grubu: Bu gruba ait IRS ($10,72 \pm 0,59$) P grubu ($10,63 \pm 0,33$) ile benzer olup anlamlı bir farklılık göstermedi ($p=1,000$), ancak EMA ve EMA+P gruplarına (sırasıyla $7,97 \pm 0,68$, $9,75 \pm 0,43$) göre IRS'nin anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü (sırasıyla $p < 0,001$, $p=0,013$), (Çizelge 4.4), (Şekil 4.9.A, Şekil 4.10.A, Şekil 4.11.A).

P Grubu: Bu gruba ait IRS ($10,63 \pm 0,33$) K grubuna ($10,72 \pm 0,59$) benzer olup anlamlı bir farklılık göstermemekteydi ($p=1,000$). Bu gruba ait IRS, EMA ve EMA+P

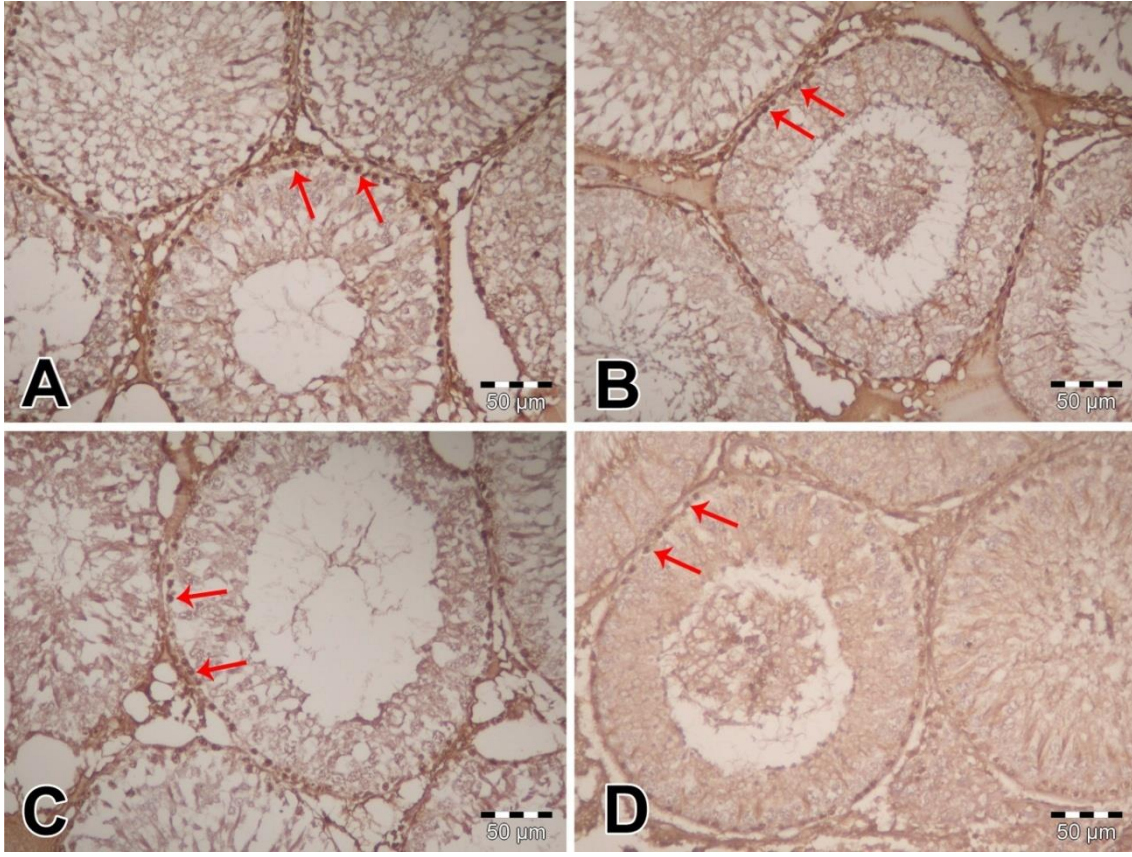
grubu IRS'leri (sırasıyla $7,97\pm 0,68$, $9,75\pm 0,43$) ile karşılaştırıldığında ise artış olduğu gözlemlendi ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (sırasıyla $p<0,001$ ve $p=0,028$), (Çizelge 4.4), (Şekil 4.9.B, Şekil 4.10.B, Şekil 4.11.A).

EMA Grubu: Bu grubun IRS'sinde ($7,97\pm 0,68$) K, P ve EMA+P gruplarının IRS'leri ile ($10,72\pm 0,59$, $10,63\pm 0,33$, $9,75\pm 0,43$) karşılaştırıldığında azalma vardı ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$), (Çizelge 4.4), (Şekil 4.9.C, Şekil 4.10.C, Şekil 4.11.A).

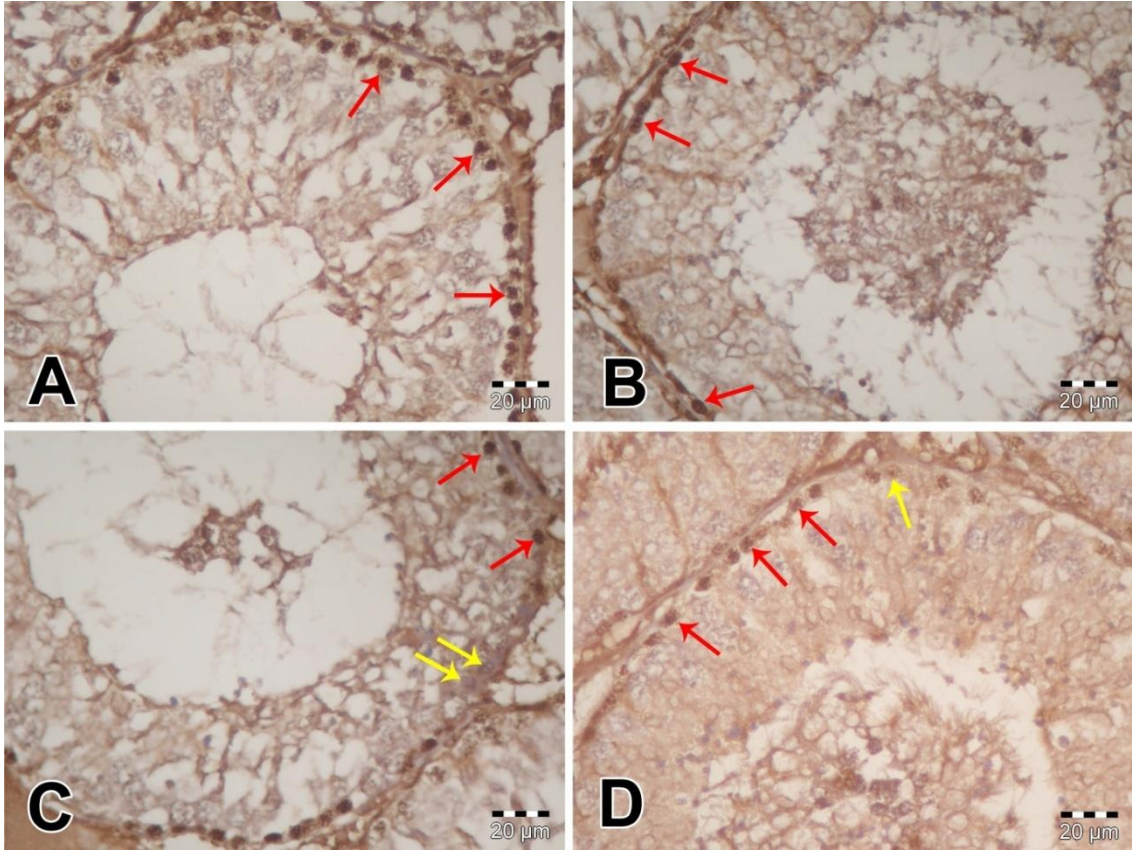
EMA+P Grubu: Bu grubun IRS'si ($10,63\pm 0,33$) EMA grubundakine ($7,97\pm 0,68$) göre anlamlı bir artış gösterirken ($p<0,001$), K ve P gruplarının IRS'leri ile ($10,72\pm 0,59$, $10,63\pm 0,33$) aralarında anlamlı bir farklılık saptandı (sırasıyla $p=0,013$, ve $p<0,028$), (Çizelge 4.4), (Şekil 4.9.D, Şekil 4.10.D, Şekil 4.11.A).

Çizelge 4.4. Grupların Ki67 immunoreaktivite skorları

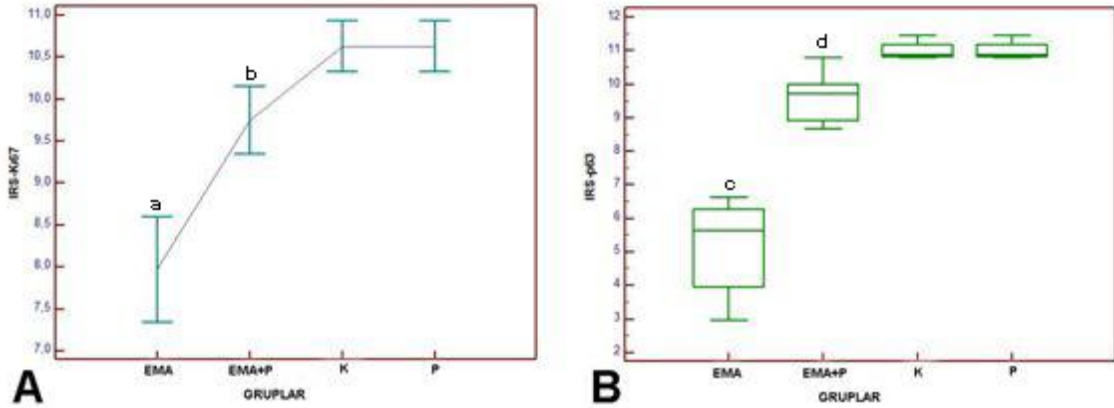
GRUP	Ki67			
	EMA	EMA+P	K	P
Mean	7,971	9,749	10,720	10,629
S.D.	0,6791	0,4319	0,59	0,3304



Şekil 4.9. Ki67 immün işaretlenme yoğunluğu. Seminifer tübüllerde spermatogonyumların nükleuslarında pozitif immün işaretlenme (kırmızı oklar). **A.** K grubu, **B.** P grubu, **C.** EMA grubu, **D.** EMA+P grubu (İndirekt peroksidaz X600).



Şekil 4.10. 1Ki67 immün işaretlenme yoğunluğu. Seminifer tübülde spermatogonyumların nükleuslarında pozitif (kırmızı oklar) ve negatif (sarı oklar) immün işaretleme. **A.** K grubu, **B.** P grubu, **C.** EMA grubu, **D.** EMA+P grubu (İndirekt peroksidaz X1200).



Şekil 4.11. Grupların Ki67 (A) ve p63 (B) IRS 'lerinin karşılaştırılması. ^aEMA grubu Ki67 IRS'si EMA+P ve K gruplarının skorlarına göre anlamlı olarak düşük ($p<0,001$ ve $p<0,001$) (A). ^bEMA+P grubu Ki67 IRS'si, K grubundakinden anlamlı olarak düşük ($p<0,013$) ancak EMA grubundakinden anlamlı olarak yüksek ($p<0,001$) (A). ^cEMA grubu p63 IRS'si EMA+P ve K gruplarının skorlarına göre anlamlı olarak düşük ($p=0,002$ ve $p=0,002$) (B). ^dEMA+P grubu p63 IRS'si, K grubundakinden anlamlı olarak düşük ($p=0,005$) ancak EMA grubununkinden anlamlı olarak yüksek ($p=0,002$) (B).

2

4.3. Antioksidan Enzim Bulguları

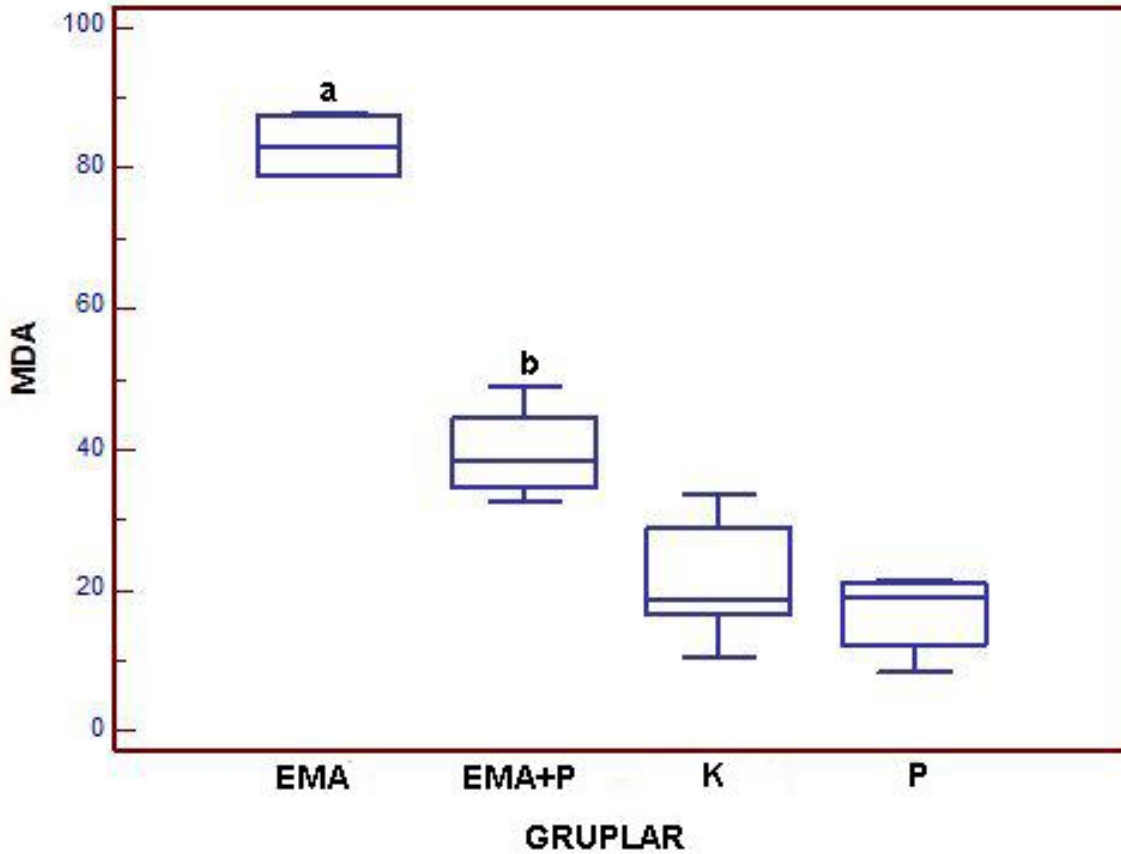
4.3.1. MDA Düzeyleri

K Grubu: Bu grupta MDA düzeyi ($21,588\pm 8,245$) P grubundakine ($27,925\pm 31,618$, $p=0,749$) benzerdi, ancak EMA grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($80,279\pm 10,202$, $p=0,002$). EMA+P grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık görülmedi ($39,456\pm 6,003$, $p=0,593$), (Çizelge 4.5), (Şekil 4.12).

P Grubu: Bu grubun MDA düzeyi ($27,925\pm 31,618$) K grubundakine benzerdi ($21,588\pm 8,245$, $p=0,749$). EMA ve EMA+P grubunundakine (sırasıyla $80,279\pm 10,202$, $39,456\pm 6,003$) göre azalma göstermekteydi. Bu azalma EMA grubunkine göre anlamlıyken ($p=0,002$), EMA+P grubunkine göre anlamlı bir farklılık göstermemekteydi ($p=0,625$), (Çizelge 4.5), (Şekil 4.12).

EMA Grubu: MDA düzeyinin ($80,279\pm 10,202$) K, P ve EMA+P gruplarının MDA düzeylerine göre anlamlı olarak arttığı (sırasıyla $21,588\pm 8,245$, $p=0,002$, $27,925\pm 31,618$, $p=0,002$ ve $39,456\pm 6,003$, $p=0,002$) saptandı (Çizelge 4.5), (Şekil 4.12).

EMA+P Grubu: Bu grupta MDA düzeyinin ($39,456 \pm 6,003$) EMA grubundakine göre anlamlı olarak azaldığı ($80,279 \pm 10,202$, $p=0,002$) görülürken, K ve P gruplarının MDA düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı (sırasıyla $21,588 \pm 8,245$, $p=0,593$ ve $27,925 \pm 31,618$, $p=0,625$), (Çizelge 4.5), (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Grupların testis MDA düzeylerinin karşılaştırılması. ^aEMA grubu MDA düzeyi EMA+P ve K gruplarının MDA düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek ($p=0,002$ ve $p=0,002$). ^bEMA+P grubu MDA düzeyi, K grubundakinden anlamlı farklılık göstermemekte ($p=0,593$) ancak EMA grubundakinden anlamlı olarak düşük ($p=0,002$).

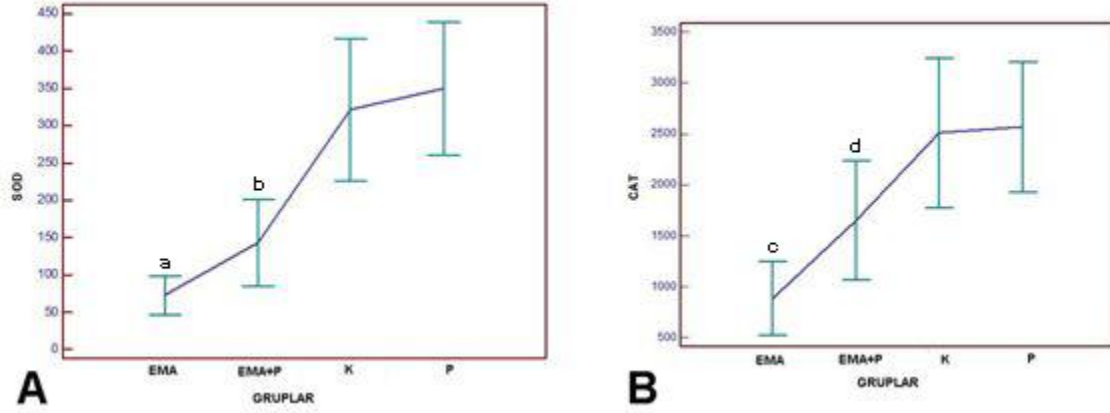
4.3.2. SOD Düzeyleri

K Grubu: Bu grubun SOD düzeyi ($321,518 \pm 102,849$) P grubundakine ($350,326 \pm 96,069$, $p=1,000$) benzerken, EMA ve EMA+P gruplarının SOD düzeylerine göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $72,546 \pm 27,9438$, $p<0,001$ ve $143,304 \pm 62,5074$, $p=0,002$). (Çizelge 4.5), (Şekil 4.13.A).

P Grubu: Bu grupta SOD düzeyi ($350,326 \pm 96,069$) K grubunununkinden ($321,518 \pm 102,849$, $p=1,000$) farklılık göstermemekteydi, ancak EMA ve EMA+P gruplarının SOD düzeylerine göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $72,546 \pm 27,943$, $p<0,001$ ve $143,304 \pm 62,507$, $p<0,001$), (Çizelge 4.5), (Şekil 4.13.A).

EMA Grubu: Bu grupta SOD düzeyi ($72,546 \pm 27,943$), K, P ve EMA+P gruplarının SOD düzeylerine göre anlamlı olarak azalmıştı (sırasıyla $321,518 \pm 102,849$, $p<0,001$, $350,326 \pm 96,069$, $p<0,001$ ve $43,304 \pm 62,507$, $p=0,622$) (Çizelge 4.5), (Şekil 4.13.A).

EMA+P Grubu: Bu grubun SOD düzeyi ($143,304 \pm 62,507$), EMA grubundakine göre artmıştı ($72,546 \pm 27,943$) ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,622$). K ve P grupları SOD düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise anlamlı olarak düşük olduğu (sırasıyla $321,518 \pm 102,849$, $p=0,002$ ve $350,326 \pm 96,069$, $p<0,001$) saptandı (Çizelge 4.5), (Şekil 4.13.A).



Şekil 4.13. Grupların testis SOD (A) ve CAT (B) düzeylerinin karşılaştırılması. ^aEMA grubu SOD düzeyi EMA+P grubundakinden düşük ancak bu düşüklük anlamlı değil ($p=0,622$), K grubundakinden anlamlı olarak düşük ($p<0,001$) (A). ^bEMA+P grubu SOD düzeyi K grubundakinden anlamlı olarak düşük ($p=0,002$) ancak EMA grubundakinden farklılık göstermemekte ($p=0,622$) (A). ^cEMA grubu CAT düzeyi EMA+P ve K gruplarındakine göre anlamlı olarak düşük ($p<0,001$ ve $p<0,001$) (B). ^dEMA+P grubu CAT düzeyi, K grubunununkinden farklılık göstermemekte ($p=0,120$) ancak EMA grubunununkinden anlamlı olarak yüksek ($p<0,001$) (B).

4.3.3. CAT Düzeyleri

K Grubu: CAT enzim düzeyinin ($2512,778 \pm 791,564$) EMA grubu CAT düzeyine göre arttığı (sırasıyla $888,190 \pm 387,028$, $p<0,001$) ancak EMA+P ve P gruplarındakine göre ise anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ($2572,871 \pm 692,211$, $p=0,120$, $1656,845 \pm 628,164$, $p=1,000$), (Çizelge 4.5), (Şekil 4.13.B).

P Grubu: Bu grupta CAT düzeyi ($2572,871 \pm 692,211$) K ve EMA+P gruplarındakine benzerdi ($2512,778 \pm 791,564$, $p=1,000$ ve $1656,845 \pm 628,164$, $p=0,081$), ancak EMA grubu CAT düzeyine göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $888,190 \pm 387,028$, $p<0,001$), (Çizelge 4.5), (Şekil 4.13.B).

EMA Grubu: Bu grubun CAT düzeyi ($888,190 \pm 387,028$), K, P ve EMA+P gruplarının CAT düzeylerine göre anlamlı olarak azalmıştı ($2512,778 \pm 791,564$, $p<0,001$, $2572,871 \pm 692,211$, $p<0,001$ ve $1656,845 \pm 628,164$, $p<0,001$), (Çizelge 4.5), (Şekil 4.13.B).

EMA+P Grubu: Bu grupta CAT seviyesi ($1656,845 \pm 628,164$), EMA grubundakine göre anlamlı olarak artmıştı ($888,190 \pm 387,0287$, $p<0,001$). K ve P gruplarının CAT

düzeyleri ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi (sırasıyla $2512,778 \pm 791,564$, $p=0,120$ ve $2572,871 \pm 692,211$, $p=0,081$), (Çizelge 4.5), (Şekil 4.13.B).

Çizelge 4.5. Gruplarda testis dokusu SOD, CAT ve MDA düzeyleri

	GRUP							
	EMA		EMA+P		K		P	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
CAT (U/ml)	888,190	387,0287	1656,845	628,1644	2512,778	791,564	2572,871	692,2111
MDA (U/ml)	80,279	10,2021	39,456	6,0036	21,588	8,245	27,925	31,6889
SOD (U/ml)	72,546	27,9438	143,304	62,5074	321,518	102,849	350,326	96,0691

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, EMA maruziyetinin, testiste morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler yaparak erkek infertilitesine neden olabileceği raporlanmış ve EMA'ya bağlı testiküler değişikliklerin önlenmesi amacıyla farklı farmakolojik ajanların etkinliği gösterilmiştir. Ancak tam olarak EMA'nın testiküler hasar mekanizmaları ve bu hasarın önlenmesinde etkili bir farmakolojik ajan henüz ortaya konamamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, EMA maruziyetine bağlı testiküler değişikliklerde antioksidan etkili parikalsitolun etkinliğinin, testis dokusunda lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim kapasiteleri ve spermatogenik hücrelerdeki Ki67 ve p63 ekspresyonu ile gösterilmesi planlanmıştır.

EM dalgaların dokular üzerindeki termal ve termal olmayan (kimyasal) etkileri ile biyolojik fonksiyonlarda değişiklikler yaptığı bilinmektedir. Enerji emiliminin dokularda meydana getirdiği değişiklikler, EMA'ya maruziyetin süresi, frekansı ve dozu ile bağlantılıdır. Yapılan çalışmalarda EMA'nın spermatogenik hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler gösterdiği, bu hücrelerde apoptozis insidansını arttırdığı, spermatogenezi bozduğu, sperm morfolojisi ve fonksiyonunu olumsuz etkilediği ileri sürülmüştür (3, 5, 6, 29). Ancak bazı çalışmalarda da EMA'nın erkek genital sisteminde morfolojik ve fonksiyonel değişikliğe neden olmadığı raporlanmıştır (11, 69). Özgüner ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, 35 gün boyunca haftada 4 kez 30 dakika 900 MHz EMA maruziyetinin, Johnsen testiküler skorlamasında, seminifer tübül germinal epitel kalınlığında, testis dokusu ağırlığında ve interstisyel dokuda kontrol grubuna göre anlamlı fark göstermediği ancak seminifer tübül çapının kontrol grubuna göre azaldığını saptamışlardır (70). Başka bir çalışmada da 30 gün boyunca günde 1 saat 2450 MHz EMA'ya maruz bırakılan sıçanlarda Johnsen testiküler skorlamasının kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı ancak seminifer tübül çapının değişmediği bildirilmiştir (71). Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizde çalışmamızda 30 gün boyunca günde 1 saat 1800 MHz EMA'ya maruz bırakılan sıçanlarda, Johnsen testiküler skorlamasının kontrol grubuna göre azaldığını saptadık. EMA+P

grubunda ise Johnsen testiküler skorlamanın EMA grubuna göre anlamlı olarak arttığını ve kontrol grubuna benzer olduğunu belirledik. Bunun parikalsitolun antioksidan aktivite göstererek seminifer tübüllerde spermatogenez evrelerinin ilerleme sürecini etkilemesi ile ilgili olabileceğini düşündük. Literatürde EMA'nın testiküler hasar oluşturmasıyla ilgili olarak tam bir konsensus olmamakla birlikte çalışmamızda gruplar arasında, seminifer tübül çapları ve germinal epitel kalınlıkları arasında farklılık olmamasında, uygulanan EMA'nın frekansı ve uygulama süresinin etkili olabileceğinin kanaatine varıldı.

Yapılan çalışmalarda EMA'nın testis dokusunda ROS'u arttırabileceğini ve ROS'tan kaynaklanan oksidatif strese neden olabileceğini göstermektedir (1, 6). Buna bağlı olarak EMA'nın, germ hücrelerinin membran yapısı, enzim regülasyonu, gen ekspresyonu ve DNA hasarı üzerinde etkili olduğu saptanmıştır (25, 29). EMA'nın ROS'u artırması DNA da yapısal değişikliklere neden olurken bu durumdan en fazla etkilenen baz guanindir. Guanine yüksek affinitesi olan Cu^{++} iyonları DNA'nın guanin bazına bağlanarak H_2O_2 ile reaksiyona girerek DNA hasarını başlatan yolakların aktivasyonuna dolayısıyla germ hücre bölünmesinde aksaklıklara ve spermatogenezde başarısızlığa neden olmaktadır (72, 73). Spermatogenezin hücre bölünmesinin G1, S, G2 fazında rol alan Ki67 proteini, spermatogonyumlarda eksprese olmaktadır. Ki67 immünohistokimyasal olarak tespit edilebilen nükleer protein olmasının yanı sıra DNA sentezi ve hücre proliferasyonu ile immun işaretlenme yoğunluğu korelasyon göstermektedir (12, 44). Kalkan ve ark. yaptıkları çalışmada, puberte döneminde olan sıçanlara, 45 gün boyunca günde 1 saat 890-915 MHz EMA uygulamışlar ve spermatogenik seri hücrelerinde Ki67 ekspresyonunun değişmediğini ileri sürmüşlerdir (12). Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda spermatogonyumlarda Ki67 ekspresyonunun EMA grubunda, kontrol grubuna göre azaldığı saptandı. Bu farklılığın çalışmamızda kullandığımız EMA frekansının (1800 MHz) Kalkan ve ark.'ın çalışmalarında kullandığı EMA frekansından (890-915 MHz) yüksek olmasıyla ilişkili olabileceğini düşündük. Berth ve ark. yaptığı bir çalışmada hipospermatogenez ve çeşitli spermatogenez bozukluklarında, farklı tiplerdeki spermatogenik seri hücrelerinde Ki67 ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir (11). Yapılan çalışmalarla uyumlu olarak EMA'nın etkisiyle hücre siklus kontrolünün bozulduğu, bazı spermatogonyumlarda, hücre bölünmesinin G1-S fazı arreste uğramış olabileceği ve mitoz fazına geçemedikleri yada

proliferatif aktivitelerinin bozulmuş olabileceği sonucuna varıldı. Literatürde çevresel toksinlere karşı testiküler hasarı düzeltmek amacıyla farklı antioksidan ajanların kullanıldığı çalışmalar olduğu görülmektedir (22, 36). Bu nedenle çalışmamızda EMA'nın spermatogenik hücrelerdeki olumsuz etkilerini engellemek veya azaltmak amacıyla EMA'ya maruziyet öncesinde deneklere parikalsitol uyguladık. Çalışmamızda EMA+P grubunda spermatogonyal Ki67 IRS'sinin K grubundakinden anlamlı olarak az olduğu ancak EMA grubundakine göre anlamlı olarak arttığı saptandı. D vitamini analogu olan parikalsitol, etkisini hedef hücrelerde sitoplazma ve nükleus içinde bulunan Vitamin D Reseptörleri (VDR) aracılığıyla göstermektedir (9, 55). Reseptöre bağlandıktan sonra sterol-reseptör kompleksi, retinoik asit X reseptörü ile beraber özgül DNA dizilerine bağlanarak gen transkripsiyonunu değiştirmektedir (53). Özellikle siklin/siklin bağımlı kinaz (SBK) 2 ve p27 yolağını etkileyerek hücre bölünmesinin G2/M aşaması geçişini kontrol ettiği gösterilmiştir (8). Bununla ilişkili olarak EMA+P grubunda parikalsitolun spermatogonyumlardaki Ki67 ekspresyonunu artırarak hücre bölünmesi aşamalarındaki geçişi düzenlemiş olabileceğini düşündük. Ancak farklı dozlarda uygulanan parikalsitolun ile spermatogenez kusurlarındaki düzeltici etkisini ortaya koyan moleküler mekanizmaların açıklanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

p63 proteini, p53 protein ailesinin bir üyesi olup DNA'sı hasara uğramış hücreyi, hücre bölünmesinin G1-S fazında durduran ve hücrenin apoptozisine neden olan önemli bir protein olarak tanımlanmıştır (13, 14). Hücre apoptozisinde önemli bir role sahip olmasının yanında testiste spermatogenez sürecinde de etkili olduğu bildirilmiştir (14). Murta ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, p63'ün Notch proteinlerinin regülasyonunda rolü olduğu ortaya konmuştur (48). Bu çalışmada p63'ün özellikle spermatogenezin spermiyogenez evresinde, Notch yolağı komponentleri (Notch 1-3, Delta1-4 ve Jagged1-2) ve efektörlerinin (Hes1, Hes2, Hes5 ve Nrarp) üzerinde pozitif regülatör olarak etkili olduğu raporlanmıştır (47, 48). Bu çalışma ile uyumlu olarak çalışmamızda da erken ve geç spermatidlerde p63 ekspresyonlarının belirgin olduğunu saptadık. Özellikle EMA grubunda erken ve geç spermatidlerde p63 ekspresyonunun diğer gruplardakine göre anlamlı olarak azaldığını ve bu azalmanın EMA'nın hücrelerde DNA hasarı ve gen ekspresyon bozukluklarına yol açması ile ilişkili olabileceğini düşündük. Literatürde spermiyogenezde

EMA'nın p63 ekspresyonu üzerine etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle spermatogenezde EMA ve p63 ekspresyonu arasındaki etkileşimi gösteren çalışmaların yapılmasının literatüre katkı sağlayacağı kanaatine varılmıştır. Çalışmamızda EMA+P grubunda erken ve geç spermatidlerde p63 ekspresyonunun EMA grubundakine göre anlamlı olarak arttığı ancak K grubundakinden anlamlı olarak az olduğu saptandı. EMA'ya maruz bırakılan deneklerde parikalsitolun uygulanmasının, hücrel antioksidan etkiler ve hücre bölünmesinde etkili yollar üzerinden p63 ekspresyonunu artırması ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Nitekim parikalsitolun SBK inhibitörü olan p21'in ekspresyonunu uyararak, hücre siklusunun G1'den S fazına geçişini engellediğini ve DNA onarımına yardımcı proteinlerin ekspresyonunu arttıran MDM2 genini aktif hale getirdiği ve bu genin p63'e bağlanarak germinal hücre farklılaşmasını uyardığı ileri sürülmüştür (8, 74, 75). Bununla ilişkili olarak EMA'ya bağlı olarak arreste uğramış spermatid farklılaşmasının parikalsitolun uygulanması ile düzelebileceği sonucuna varıldı.

EMA'nın testiste toksik etkiye sebep olan mekanizma için direkt oksidatif stres oluşturduğu ve bunun da lipid peroksidasyonuna neden olduğu ortaya konmuştur (52). Lipid peroksidasyon ürünü olan MDA, plazmaya karışır bundan dolayı membran hasarı yada oksidatif stres göstergesi olarak kullanılmaktadır (66, 68). Yapılan bir çalışmada rat testis dokusu üzerinde 30 gün boyunca günde 1 saat 900 MHz EMA maruziyetinin, kontrol grubuna göre MDA düzeyinde artışa yol açtığı bildirilmiştir (76). Bu çalışmayla uyumlu olarak çalışmamızda da EMA grubunda MDA düzeyinin diğer gruplara göre arttığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda raporlandığı gibi MDA artışının EMA'nın testis dokusunda serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu artırmasıyla ilişkili olabileceğini düşündük. EMA+P grubunda MDA düzeyi K grubundakine benzerlik göstermekteyken EMA grubundaki MDA düzeyinden anlamlı olarak azalmıştı. Farklı organlarda yapılan çalışmalarda parikalsitolun antioksidan etkinliği gösterilmiştir (8, 9, 59). Ancak diğer çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda ilk kez hasarlanmış testis dokusunda parikalsitolun düzeltici etkinliği ortaya konmaktadır. Antioksidanların lipid peroksidasyonunu engelleyerek ve serbest radikal tutucu olarak etki göstermesi nedeniyle protein-lipid yapıdaki hücre membran yapısının stabilize kalmasında etkili olduğu bilinmektedir (77, 78). Bu nedenle antioksidan etkinliği bilinen parikalsitolun, EMA

maruziyeti ile dokuda artan serbest radikallerin etkinliğini önleyip, yağ asitlerinin peroksidasyonunu azalttığı ve buna bağlı olarak bağlı testiküler MDA düzeyini azalttığı düşünüldü.

Antioksidanlar, toksik etkilere karşı organizmayı ve reaktif moleküllerin oksidatif hasarına karşı hücrel redoks homeostazisinin sağlanmasında görevlidir (7, 9). Endojen antioksidanlar olan CAT ve SOD enzim aktivitesi serbest oksijen radikalleri kaynaklı doku hasarını ortaya koymada biyokimyasal parametreler olarak kullanılmaktadır. Hidrojen peroksit ve diğer peroksitlerin yıkımını katalize eden CAT ve SOD lipid peroksidasyonunun oluşmasını engelleyen antioksidan savunma enzimleridir (49, 50). Yapılmış çalışmalarda EMA maruziyetine bağlı olarak SOD ve CAT enzim aktiviteleri ile farklı sonuçlar rapor edilmiştir (79, 80). Amara ve ark.'nın yaptığı çalışmada 128 mT 30 gün boyunca haftada 1 gün subkronik EMA maruziyet sonucu testis Cu^{++} SOD (sitozolik SOD) enzim aktivitesinin değişmediğini bildirmişlerdir (81). Kesari ve ark. yaptığı bir çalışmada, yetişkin erkek ratlara 45 gün boyunca günde 2 saat 50 GHz mikrodalga radyasyonunun deney grubunda CAT enzim aktivitesi artış gösterirken SOD enzim aktivitesinin azaldığını rapor etmişlerdir (82). Atasoy ve ark. 5 ay boyunca günde 1 saat 2.437 GHz EMA'nın uygulanmış sıçanlarda testis CAT ve SOD enzim aktivitesinin azaldığını ortaya koymuşlardır (71). Benzer olarak çalışmamızda da EMA grubunda testis SOD ve CAT enzim aktivitelerinde K grubuna göre anlamlı bir şekilde azalma olduğunu saptadık. EMA+P grubunda SOD aktivitesinde artış olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamsız olduğu görüldü. CAT aktivitesi ise EMA grubuna göre anlamlı bir artış göstermekteydi. Farklı dokularda yapılan statik ve düşük frekanslı manyetik alan ve EMA çalışmalarında, antioksidan enzim biyosentezinde görev alan Cu^{++} , Zn^{+} ve Se^{+} gibi eser elementlerin homeostazisinin bozulduğu ileri sürülmüştür (79, 80). Çalışmamızda uyguladığımız antioksidan ajanın, EMA+P grubunda CAT aktivitesini EMA grubuna göre anlamlı düzeyde artıracak etkinlikte olduğunu, ancak EMA+P grubundaki SOD aktivitesini ise EMA grubundaki SOD aktivitesine göre anlamlı olarak artırmadığını saptadık. Çalışmamızda EMA+P grubundaki Cu^{++} -SOD aktivitesininin EMA grubundakinden anlamlı farklılık göstermemesini sitozolik Cu^{++} düzeyiyle ilişkili olabileceğini düşündük. EMA+P grubunda uygulanan parikalsitol dozunun sitozolik Cu^{++} homeostazisini yeterince

düzeltilmediğini bu nedenle de Cu^{++} -SOD aktivitesini K grubundakinden anlamlı olarak azalmış olabileceği kanaatine vardık.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Yetişkin dönemde 1800 MHz EMA etkisine maruz bırakılan sıçanların testisi üzerine parikalsitolun etkisini araştırdığımız deneysel çalışmamızın sonucunda; EMA'nın seminifer tübül kalınlığında ve germinal epitel çapında bir değişikliğe neden olmadığı ve Johnsen skorlamasında azalışa yol açtığı bulunmuştur. Parikalsitol uygulanan tedavi grubunda ise EMA grubuna göre Johnsen testiküler skorlamasının arttığı görülmüştür. Bunun parikalsitolun antioksidan aktivite göstererek seminifer tübüllerde spermatogenez evrelerinin ilerleme sürecini etkilemesi ile ilgili olabileceği sonucuna varıldı. Seminifer tübül çapları ve germinal epitel kalınlıkları arasında farklılık olmamasında, uygulanan EMA'nın frekansı ve uygulama süresinin etkili olabileceğinin kanaatine varıldı.
2. EMA uygulanan grupta Ki67 ekspresyonunun azalması, hücre siklus kontrolünün bozulduğu, bazı spermatogonyumlarda, hücre bölünmesinin G1-S fazı arreste uğramış olabileceği ve mitoz fazına geçemedikleri yada proliferatif aktivitelerinin bozulmuş olabileceği sonucuna varıldı. EMA+P grubunda Ki67 ekspresyonunun artması, parikalsitolun spermatogonyumlardaki Ki67 ekspresyonunu artırarak hücre bölünmesi aşamalarındaki geçişi düzenlemiş olabileceğini düşündük.
3. EMA grubunda p63 ekspresyonunda azalma görüldü. Bu azalmanın EMA'nın hücrelerde DNA hasarı ve gen ekspresyon bozukluklarına yol açması ile ilişkili olabileceğini düşündük. EMA+P grubunda ise p63 ekspresyonunun artması, parikalsitolun uygulanmasının, hücresel antioksidan etkiler ve hücre bölünmesinde etkili yollar üzerinden p63 ekspresyonunu artırması ile ilişkili olabileceği düşünüldü.
4. Membran hasarının göstergesi olan MDA, EMA grubunda artış gösterdi. Bu artışın EMA'nın testis dokusunda serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu artırmasıyla ilişkili olabileceğini düşündük. EMA+P grubunda azalması ise, parikalsitolun, EMA maruziyeti ile dokuda artan serbest radikallerin

etkinliğini önleyip, yağ asitlerinin peroksidasyonunu azalttığı ve buna bağlı olarak testiküler MDA düzeyini azalttığı düşünüldü.

5. Serbest oksijen radikal kaynaklı doku hasarının göstergesi olan CAT ve SOD enzim aktivitesi EMA grubunda azalmış ve bu azalmanın EMA toksikasyonuna bağlı testis dokusunda serbest radikallerin arttığı ve oksidatif strese bağlı antioksidan enzim düzeylerinde azalma olduğunu gösterebileceğini düşündürmüştür. EMA+P grubunun CAT ve SOD enzim aktivitesi artmıştır. Ancak SOD'un anlamlı bir şekilde artış göstermemesi antioksidan enzim biyosentezinde görev alan sitozolik Cu^{++} eser elementlerin homeostazisinin bozulmasıyla ilişkili olabileceğini düşündük.

Yapılan bu çalışmada testis dokusunda spermatogenik germ hücrelerinde EMA'nın neden olduğu hasara karşı parikalsitolun koruyucu etkisi ilk kez gösterilmiştir. Sonuç olarak cep telefonundan yayılan EMA'nın testis histolojik yapısına, spermatogenez ve spermiyogenez düzeyinde etkili olduğu belirlenirken, parikalsitolun koruyucu özellik gösterdiği kanısına varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. **Deepinder F, Makker K, Agarwal A.** Cell phones and male infertility: dissecting the relationship. *Reproductive BioMedicine Online* 25 June 2007; Vol 15. No 3. 266-270 www.rbmonline.com/Article//2923 on web.
2. **Lin JC.** Biological aspects of mobile communication fields. *Wirel. Netw* 1997; 3,439-453.
3. **Hancı H.** Prenatal dönemde uygulanan elektromanyetik alanın yavru sıçanların testisi üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, 2013.
4. **Gül Ü.** Elektromanyetik Dalgaların Biyolojik Etkileri. Yüksek lisans tezi, Elektrik elektronik mühendisliği, Elazığ, 2006.
5. **Saunders R.D, Kowalczyk C.I.** The effect of acute far field exposure at 2.45 GHz on the mouse testis. *Int. J. Radiat. Biol* 1981; 39 (6), 587–596.
6. **Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr Agarwal A.** Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004; 19: 129-38.
7. **Hanukoglu I.** Antioxidant Protective Mechanisms against Reactive Oxygen Species (ROS) Generated by Mitochondrial P450 Systemes in Steroidogenic Cells. *Drug Metab Rev* 2006; 38: 171-196.
8. **Woo Park J, Won Cho J, Yeon Joo S, Seong Kim C, Seok Choi J, Hui Bae E, Kwon Ma S, Hee Kim S, Un Lee J, Wan Kim S.** Paricalcitol prevents cisplatin-induced renal injury by suppressing apoptosis and proliferation. *Eur J Pharmacol* 2012; May 16;683(1-3):301-9. Epub 2012 Mar 16.
9. **Arı E, Kedrah E, Alahdab Y, Bulut G, Eren Z, Baytekin O, Odabası D.** Antioxidant and renoprotective effects of paricalcitol on experimental contrast-induced nephropathy model. *The British Journal of Radiology*, 85 2012; 1038–1043.
10. **Angelopoulou R, M Balla, Lavranos G, Chalikia M, Kitsos S, Baka S, Kittas C.** Evaluation of immunohistochemical markers of germ cells' proliferation in the developing rat testis: a comparative study. *Tissue and Cell*, Volume 40, Issue 1, February 2008; Pages 43–50 doi:10.1016/j.tice.2007.09.004.

11. **Steger K, Aleithe I, Behre H, Bergmann M.** The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Molecular Human Reproduction* vol.4 no.3 pp. **1999**; 227–233.
12. **Tumkaya L, Kalkan Y, Bas O, Yilmaz A.** Mobile phone radiation during pubertal development has no effect on testicular histology in rats. *Toxicology and Industrial Health* 1–9. **2013**; DOI: 10.1177/0748233713500820.
13. **Zmijewski M, Lane P, Bourdonp J.** 53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death and Differentiation* **2006**; 13, 962–972.
14. **Amelio I, Grespi F, Petruzzelli A, Melino G.** p63 the guardian of human reproduction. *Cell Cycle* **2012**; 11:24, 4545–4551.
15. **Nakamuta N, Kobayashi S.** Developmental expression of p63 in the mouse testis. 5 november 2003; *J Vet Med Sci.* **2004**; Jun;66(6):681-7.
16. **Ross MH, Pawlina W.** *Histology A Text And Atlas.* 5th Ed., Baltimore, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, **2006**.
17. **Arenas MI, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R.** Immunocytochemical and quantitative study of the tunica albuginea testis in young and ageing men. *Histochem Cell Biol* **1997**; 107: 469–477.
18. **Maekawa M, Kamimura K, Nagano T.** Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol* **1996**; 59(1): 1-13.
19. **Şeftalioğlu A.** Genel&Özel İnsan Embriyolojisi 3. Baskı, Teknik Yayıncılık, Ankara, **1998**.
20. **Pop T, Cotoi G, Pleşea IE, Gherghiceanu M, Enache SD, Mandache E, Hortopan G, Pleşea RM.** Histological and ultrastructural analysis of the seminiferous tubule wall in ageing testis. *Rom J Morphol Embryol* **2011**; 52: 241–248.
21. **Jan S, Hamer G, Repping S, Rooij D et al.** Molecular control of rodent spermatogenesis. *Molecular Genetics of Human Reproductive Failure* Volume 1822, Issue 12, December **2012**; 1838–1850 doi:10.1016/j.bbadis.2012.02.008.
22. **Atal S.** Erişkin Erkek Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarında Kurkuminin Etkisi Yüksek lisans tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ocak, **2014**.
23. **Qian X, Mruk D, Cheng Y, Elizabeth I.** Actin binding proteins, spermatid transport and spermiation. *Semin Cell Dev Biol.* **2014**; 0: 75–85. doi:10.1016/j.semcd.2014.04.018.

24. **Xu K, Yang L, Zhao D, Wu Y, Qi H.** AKAP3 synthesis is mediated by RNA binding proteins and PKA signaling during mouse spermiogenesis. *Biol Reprod.* **2014**; 90(6):119. doi: 10.1095/biolreprod.113.116111.
25. **Simko M, Mattsson M.** Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation. *J Cell Biochem* **2004**; 93: 83-92.
26. **Stewart W.** Mobile Phones and Health. *Independent Expert Group on Mobile Phones* **2000**.
27. **Ermol C.** 900 ve 1800 MHz Mobil Telefonların Oluşturduğu Elektromanyetik Alanın Tendon İyileşmesine Etkisi: Ratlarda Deneysel Çalışma. Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Isparta **2008**.
28. **Vorst V, Rosen A, Kotsuka Y.** Rf/Microwave Interaction With Biological Tissues. *Wiley-Interscience, New Jersey.* **2006**.
29. **Saygın M.** 2450 MHz Dalga Frekanslı Elektromanyetik Alanın Sıçanların Tetstislerinde Oluşturduğu Fizyopatolojik ve Yapısal Değişikliklerin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Isparta, **2009**.
30. **Hasegawa M, Wilson G, Russell LD, Meistrich ML.** Radiation-induced cell death in the mouse testis: relationship to apoptosis. *Radiat Res.* **1997**; 147: 457–67.
31. **Eraslan G.** The Effects of an Electromagnetic Field (90 Hz and 5 mT) on Some Blood Electrolyte (Ca⁺⁺, P⁺⁺⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻) Levels in Male Mice. *Turk J Vet Anim Sci* **2002**; 26: 1233-1236.
32. **Yuluğ E, Türedi S, Kahraman C.** Effect of resveratrol on methotrexate induced testicular damage in rats. *Scientific World Journal*, **2013**; 489659.
33. **Fujii J, Tsunoda S.** Redox regulation of fertilisation and the spermatogenic process. *Asian Journal of Andrology* **2011**; 13, 420–42.
34. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Valko%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16978905.
35. **Theriault G.** Electromagnetic fields and cancer risks. *Rev Epidemiol Sante Publique.* **1992**;40 Suppl 1:S55-62.
36. **Altındağ Ö.** Cep telefonu radyasyonunda melatonin kullanılmasının testis dokusuna olası koruyucu etkisi. Yüksek lisans tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Ankara, **2013**.

37. **Mathur P, Cynthia S.** The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian Journal of Andrology* **2011**; 13, 585–591; doi:10.1038/aja.2011.40; published online 27 June.
38. **Odacı E, Hancı H, Yulu E, Türedi S, Aliyazıcıoğlu Y, Kaya H, Çolakoğlu S.** Effects of prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field on 60-day-old rat testis and epididymal sperm quality. *Biotech Histochem.* **2015**; Oct 15:1-11.
39. **Kato M, Honma K, Shigemitsu T, Shiga Y.** Circularly Polarized, Sinusoidal, 50 Hz Magnetic Field Exposure Does Not Influence Plasma Testosterone Levels Of Rats. *Bioelectromagnetics* **1994**; 15, 513-518.
40. **Dasdag S, Ketani MA, Akdag Z, Ersay AR, Sari I, Demirtas OC, Celik MS.** Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular functions of rats. *Urol Res* **1999**; 27: 219-223.
41. **Meo SA, Al-Drees AM, Husain S, Khan MM, Imran MB.** Effects of mobile phone radiation on serum testosterone in Wistar albino rats. *Saudi Med J* **2010**; 30: 869-73.
42. **Heynick LN, Merritt JH.** Radiofrequency fields an teratogenesis. *Bioelectromagnetics* **2003**; 24, S174-186.
43. **Berna Ç.** Endometriyumun Endometroid ve Seröz Karsinomlarında Östrojen, Progesteron, CERB-B2, Ki-67, p53, Galactin-3, GLUT-1 ve Heparanaz'ın Etiyopatogenez ve Karsinogenezde Rollerinin Araştırılması Uzmanlık Tezi, Ege Patoloji Anabilim Dalı, Denizli, **2009**.
44. **Mooney E, Man Y, Bratthauer L, Tavassoli FA.** Evidence that Leydig cells in Sertoli-Leydig cell tumors have a reactive rather than a neoplastic profile. *Cancer*, January 22, **1999**; Volume 86 / Number 11.
45. **Karaca T, Demirtaş S, Karaboğa İ, Ayvaz S.** Protective effects of royal jelly against testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Turkish Journal of Medical Sciences* **2015**; 45: 27-32 doi:10.3906/sag-1311-103.
46. **Kylarová D, Vrchovecký J, Holinka M, Erdšová B.** The occurrence of c-myc, p53 and Bcl-2 family proteins in the early phase of development of duodenal epithelium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **2004**; Dec;148(2):229-32.
47. **Hayashi T, Yoshinaga A, Ohno R, Ishii N, Kamata S, Yamada T.** Expression of the p63 and Notch Signaling Systems in Rat Testes During Postnatal Development: Comparison With Their Expression Levels in the Epididymis and Vas Deferens. *Journal of Andrology* ·September/October **2004**; Vol. 25, No. 5.

48. **Murta D, Batista M, Silva E, Trindade A, Henrique D.** Dynamics of Notch Pathway Expression during Mouse Testis Post-Natal Development and along the Spermatogenic Cycle *PLOS ONE* August **2013**; Volume 8 Issue 8 e72767.
49. **Bolan Y, Huang Z.** Variations in Antioxidant Genes and Male Infertility. *BioMed Research International* Volume **2015**; Article ID 513196, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/513196>.
50. **Al-Damegh M.** Rat testicular impairment induced by electromagnetic radiation from a conventional cellular telephone and the protective effects of the antioxidants vitamins C and E. *CLINICS* **2012**; 67(7):785-792.
51. **Ramadan A, Abd-allah A, Aly H, Saad-el-din A.** Testicular Toxicity Effects of Magnetic Field Exposure and Prophylactic Role of Coenzyme Q10 and L-Carnitine in Mice. *Pharmacological Research*, Vol. 46, No. 4, **2002**; doi:10.1016/S1043-6618(02)00171-8.
52. **Ozgunera F, Altinbas A, Ozaydin M, Dogan A, Vural H, Kisioglu N, Cesura G, Gumral N.** Mobile phone-induced myocardial oxidative stress: protection by a novel antioxidant agent caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology and Industrial Health* **2005**; 21: 223/230.
53. **Dursun A.** D vitamininin kemik metabolizması dışındaki etkileri. *Beslenme Yenilikler I- II, Katkı Pediatri Dergisi* **2007**; 28:225-234.
54. **Darabian S, Rattanasompattikul M, Hatamizadeh P, Bunnapradist S, Budoff M, Kovesdy C et al.** Cardiorenal syndrome and vitamin D receptor activation in chronic kidney disease. *Kidney Res Clin Pract* 31 **2012**; 12–25 doi:10.1016/j.krcp.2011.12.006.
55. **Bringhurst FR, Demoy MB, Kronenberg HM.** Vitamin D. *Williams Textbook of Endocrinology* (Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS ed). Tenth edition. Philadelphia, Saunders Elsevier **2003**; 1317-1323.
56. **Kumagai T, Yung Shih L, Hughes S, Desmond C, Kelly J, Hewison M, Koeffler P.** -Nor-1,25(OH)2D2 (a Novel, Noncalcemic Vitamin D Analogue), Combined with Arsenic Trioxide, Has Potent Antitumor Activity against Myeloid Leukemia *Cancer Research* April **2005**; 65(6):2488-97.
57. **Seok Hwang H, Jin Yang K, Park K Hwang HS¹, Yang KJ, Park C, Choi S, Kim H, Hong Y, Jeon H, Chang K, Park W, Kim Y, Lee J, Yang W.** Pretreatment with paricalcitol attenuates inflammation in ischemia–reperfusion injury via the up-regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Nephrol Dial Transplant* **2013**; 28: 1156–1166.
58. **Mantel N, Haenszel W.** Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 22: 719– 748, 1959.

59. **Schwartz G, Eads D, Naczki C, Northru S.** 19-nor-1 α , 25-Dihydroxyvitamin D2 (Paricalcitol) inhibits the proliferation of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer biology & Therapy* Volume 7, Issue 3, **2008**; 430-436 DOI: 10.4161/cbt.7.3.5418
60. **Rittera C, Zhanga S, Fincha L, Liapisa H, Suarezc E, Ferderc L Delmez J, Slatopolsky E.** Cardiac and Renal Effects of Atrasentan in Combination with Enalapril and Paricalcitol in Uremic Rats *Kidney Blood Press Res* **2014**; 39:340-352.
61. **Chokhandre Mahmoud MI, Hakami T, Jafer M, Inamdar AS.** Vitamin d its analogues in type 2 diabetic nephropathy:a systemic review. *ournal of Diabetes & Metabolic Disorders* **2015**; 14:58.
62. **Martin J, Esther A. Gellens M, Hamm L, Abboud H, Lindberg J.** 19-Nor-1-a-25-Dihydroxyvitamin D2 (Paricalcitol) Safely and Effectively Reduces the Levels of Intact Parathyroid Hormone in Patients on Hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 9: **1998**; 1427-1432.
63. Body Tissue Dielectric Parameters. Federal communications commission, **2010**. <http://www.fcc.gov/oet/rfsafety/dielectric.html>.
64. **Filho O, Souza R.S, Oliveira Azeredo, Peruquetti R.L, Cedenho A.** Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis. *Genet. Mol. Res.* 9 (3): 1405-1413 **2010**; DOI 10.4238/vol9-3gmr860.
65. **Fedchenko N, Reifenrath J.** Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis result in the bone tissue- a review. *Fedchenko and Reifenrath Diagnostic Pathology* **2014**; 9:221.
66. **Ün H.** Siçan Testisinde Oluşturulmuş İskemî/Reperfüzyon Hasarında Bir Renin İnhibitörü Olan Aliskiren'İN Etkisinin Araştırılması. *Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans, Atatürk Üniversitesi,* **2014**.
67. **Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Rondall R.** Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**; 183: 265-275.
68. **Draper H, Hadley M.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **1990**; 186: 421–30.
69. **Ryan BM, Symanski RR, Pomeranz LE, Johnson TR, Gauger JR, McCormick DL.** Multigeneration reproductive toxicity assessment of 60-Hz magnetic fields using a continuous breeding protocol in rats. *Teratology* **1999**; 59(3): 156-62.
70. **Ozguner M, Koyu A, Cesur G, Ural M, Ozguner F, Gokcimen A, Delibas N.** Biological and morphological effects on the reproductive organ of rats after exposure to electromagnetic field. *Saudi Med J* **2005**; 26: 405-10.

71. **Atasoy H, Gunal M, Atasoy P, Elgun S, Bugdayci G.** Immunohistopathologic demonstration of deleterious effects on growing rat testes of radiofrequency waves emitted from conventional Wi-Fi devices. *Journal of Pediatric Urology* **2013**; 9, 223e229.
72. **Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J.** Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J* **2003**; 17(10): 1195-214.
73. **Aruoma OI, Halliwell B, Dizdaroglu M.** Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem* **1989**; 5;264(22): 13024-8.
74. **Kadakia M, Slader C, Berberich SJ.** Regulation of p63 function by Mdm2 AND MdmX. *DNA Cell Biol.* 2001 Jun;20(6):321-30.
75. **Muller P, Kehrlöesser S.** Functional interplay between MDM2, p63/p73 and mutant p53. *Oncogene* November **2014**; DOI: 10.1038/onc.2014.359.
76. **Odacı E, Özyılmaz C.** Exposure to a 900 MHz electromagnetic field for 1 hour a day over 30 days does change the histopathology and biochemistry of the rat testis *International Journal of Radiation Biology*, July **2015**; 91(7): 547–554.
77. **Sies H.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.***1997**; Mar;82(2):291-5.
78. **Dalvit C, Cetica D, Beconi T.** Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology.* **1998**; Feb;49(3):619-27.
79. **Duda D, Grzesik J, Pawlicki K.** Changes in liver and kidney concentration of copper, manganese, cobalt and iron in rats exposed to static and low frequency (50 Hz) magnetic field. *J Trace Elem Electrolytes. Health Dis* **1991**; 5:181-186.
80. **Erken G, Küçükataş B, Turgut S, Erken H, Cömlekçi S, Divrikli U, Genç O.** The Effects of Electromagnetic Fields Generated from 1800 MHz Cell Phones on Erythrocyte Rheological Parameters and Zinc Level in Rats. *Balkan Med J.* Jun;**2012**; 29(2):139-43. doi: 10.5152/balkanmedj.2011.021.
81. **Amara S, Abdelmelek H, Garrel C, Guiraud P, Douki T, Ravanat J, Favier A, Rhouma K.** Effects of Subchronic Exposure to Static Magnetic Field on Testicular Function in Rats. *Archives of Medical Research* 37 **2006**; 947e952.
82. **Kesari K, Behari J.** Microwave Exposure Affecting Reproductive System in Male Rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology* September **2010**; Volume 162, Issue 2, pp 416-428.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Tarsus'ta doğdum. Ortaokulu 24 Kasım İlköğretim okulunda, lise eğitimimi Salim Yılmaz Lisesinde okudum.

2012 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 2012 yılı eylül ayında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek lisans eğitimime başladım. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.