



T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**2450 MHz DALGA FREKANSLI ELEKTROMANYETİK  
ALANIN SIÇANLARIN TESTİSLERİNDE OLUŞTURDUĞU  
FİZYOPATOLOJİK VE YAPISAL DEĞİŞİKLİKLERİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MUSTAFA SAYGIN**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. SADETTİN ÇALIŞKAN**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
tarafından YL- 1743-08 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**Tez. No: 55**

**ISPARTA - 2009**

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını yapmaktaki amacımız, teknoloji çağında bilgiyi ayaklarımıza kadar getiren internet ve bunu daha kolay ve kullanılabilir hale getiren kablosuz ağlardır. Kullanıcıların çalışmamızdaki hedef dokumuz testise yakın bir düzeyde dizüstü bilgisayarlarda bunu kullanmalarındır.

Bu tez çalışmamda; danışmanım Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN, Yrd. Doç Dr. Nurhan GÜMRAL, Doç. Dr. Nermin KARAHAN ve tez jüri hocalarım Prof. Dr. M. Fehmi ÖZGÜNER, Prof.Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN'e teşekkür ederim.

Çalışmanın bir kısmının yapıldığı Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ'a ve Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına, Yrd. Doç Dr. Ahmet KOÇAK'a, Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarı teknikeri Vasfi BARAN'a, teşekkür ederim.

Bu zamana kadar beni yetiştirip bu günlere getiren aileme, yakın dostlarıma bana desteğini esirgemeyen herkese sonsuz sevgilerimle ...

Arş. Gör. Mustafa SAYGIN

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>KABUL ve ONAY</b>	ii
<b>ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR</b>	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iv
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	vi
<b>TABLolar, ŞEKİLLER ve GRAFİKLER DİZİNİ</b>	vii
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
<b>2.1. Radyasyon Sınıflandırılması</b>	3
2.1.1. İyonlaştırmayan Radyasyon (Elektromanyetik Radyasyon)	3
2.1.1.1. Elektromanyetik Radyasyonun Dalga Özelliği	3
2.1.1.2. Elektromanyetik Radyasyonun Tanecik Özelliği	4
<b>2.2. Elektromanyetik Radyasyonun Canlılarla Etkileşimi</b>	5
<b>2.3. Elektromanyetik Alanların Biyolojik Etkileri</b>	7
<b>2.4. ERKEKTE ÜREME VE HORMONAL FONKSİYONLAR</b>	8
2.4.1 Erkekte Üreme ve Hormonal Fonksiyonlar	8
2.4.2. Erkek Cinsel Organlarının Fizyolojik Anatomisi	8
2.4.3. Spermatogenez	9
2.4.4. Spermatogenezi Uyarıcı Hormonal Faktörler:	12
2.4.5. Epididimde Sperm Olgunlaşması	12
2.4.6. Seminal Vesiküllerin Fonksiyonu	13
2.4.7. Anormal Spermatogenez ve Erkekte Fertilite	14
2.4.8. Testosteron ve Diğer Erkek Cinsel Hormonları	15
2.4.8.1. Erkek Seks Hormonlarının Sekresyon, Metabolizma ve Kimyası	15
2.4.8.2. Testosteronun Fonksiyonları	17
2.4.8.3. Testosteronun Erişkinde Primer ve Sekonder Seks Karakterlerinin Gelişmesine Etkisi	17
2.4.8.4. Erkek Cinsel Fonksiyonlarının Hipotalamus Ve Ön Hipofiz Bezinden Salgılanan Hormonlarla Kontrolü	18
2.4.8.4.1. Gonadotropik Hormonlar: LH ve FSH	18
2.4.8.4.2. Testosteron Yapımının LH İle Düzenlenmesi.	18
2.4.8.4.3. Spermatogenezin FSH ve Testosteron İle Düzenlenmesi	19
<b>2.5. APOPTOZİS</b>	20
2.5.1. Apoptozis Terminolojisi	20
2.5.2. Hücre Ölümü:	20
2.5.3. Apoptozis ve Nekrozis	21
2.5.4. Apoptozisin İndüklenmesi:	24

2.5.5. Apoptozisde Mitokondrinin Rolü:	27
2.5.6. Bcl-2 Ailesi	28
2.5.6.1 Bcl-2 Ailesinin Mitokondri Üzerindeki Etkileri:	29
2.5.7 Kaspazlar:	30
2.5.7.1 Kaspazların Aktivasyonu:	31
2.5.7.2 Kaspazların Substratları:	33
2.5.7.4 Kaspazlardan Bağımsız Apoptozis	33
2.5.8 Apoptozisin İndüksiyonu	34
2.5.9 Apoptozisin İnhibisyonu	35
<b>3. MATERYAL VE METOD</b>	<b>37</b>
3.1. Deneyde Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	37
3.2. Hormon Kitleri	37
3.3. Apoptozis Kitleri	37
3.4. Deney Düzeneği	38
3.5. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Gruplandırılması	42
3.6. Ratların Dekapitasyonu ve Serumun ve Testis Dokusunun Ayrılması	43
3.7. Histopatolojik Çalışma	43
3.8. İmmünohistokimyasal Çalışmalar	45
3.9. İstatistiksel Değerlendirmeler	46
<b>4. BULGULAR</b>	<b>47</b>
4.1. Kontrol Grubu İle Manyetik Alan Gruplarının FSH Değerlerinin Karşılaştırılması	48
4.2. Kontrol Grubu İle Manyetik Alan Gruplarının LH Değerlerinin Karşılaştırılması	49
4.3. Kontrol Grubu İle Manyetik Alan Gruplarının Total Testesteron Değerlerinin Karşılaştırılması	49
4.4. Histopatolojik Bulgular	50
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular	52
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>56</b>
<b>6. ÖZET</b>	<b>65</b>
<b>7. SUMMARY</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>67</b>

## SİMGE VE KISALTMALAR

LH	Lüteinleştirici hormon
FSH	Folikül stimulan hormon
SHBG	Seks hormonunu bağlayıcı globulin
DHT	Dihidrotestosteron
ATP	Adenozin trifosfat
Tes	Testosteron
EMA	Elektromanyetik alan
RF	Radyofrekans
EM	Elektromanyetik
SAR	Bağıl soğurulma hızı
MHz	Megahertz
GHz	Gigahertz
Hz	Hertz
W	Watt
mW/Cm <sup>2</sup>	Miliwatt/santimetrekare
V/M	Volt/kilogram
W/Kg	Watt/kilogram
Kv/m	Kilovolt/kilogram
μT	Mikrotesla
ng/mL	Nanogram/mililitre
mIU/mL	miliinternasyonelünite/mililitre
WLAN, Wireless	Kablosuz yerel alan ağları
Local Area, Network	Kablosuz yerel alan ağları
Radio LAN	Telsiz yerel alan ağları
Cowper	Bulboüretal bezler
TNFR-1	Tümör nekroz faktör reseptörü-1
FasL	Fasligand
TRADD	TNFR-1 associated death domain
FADD	Fas associated death domain
Apaf-1	Antiapoptoik faktör-1
AIF	Apoptosis indükleyici faktör
PARP	Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
DNA-PK	DNA bağımlı bir protein kinazdır
β-Aktin	Hücre iskeletinde yer alan yapısal bir proteindir
CREB	Transkripsiyon faktörleri
Stat1, Stat2	Transkripsiyon faktörleri
IAP	Apoptozis inhibitör protein

## TABLO ŞEKİLLER ve GRAFİKLER DİZİNİ

<b>TABLolar</b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1: Nekrozis ve Apoptozisin karşılaştırılması. TNRF-1, tumor nekrozis factor reseptörü-1	22
Tablo 2: Deneyde Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	37
Tablo 3: Histolojik takip serileri	44
Tablo 4: İmmünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun derecesi	46
Tablo 5: Kafes kontrol Grubuna Ait Serum Hormon Düzeyleri	47
Tablo 6: Sham kontrol Grubuna Ait Serum Hormon Düzeyleri	47
Tablo7: 2.45 GHz EMA maruz kalan Gruba Ait Serum Hormon Düzeyleri	48
Tablo 8: Kontrol ve Manyetik Alan Gruplarına Ait Ortalama Serum Hormon Düzeyleri ve Standart Sapmaları	48
Tablo 9: Kafes kontrol grubuna ait apoptozis markır sonuçları.	52
Tablo 10: Sham Grubuna ait apoptozis markır sonuçları.	52
Tablo 11: 2.45 GHz EMA maruz kalan Gruba ait apoptozis markır sonuçları.	53
<b>ŞEKİLLER:</b>	
Şekil 1: Elektromanyetik Spektrum	4
Şekil 2: Testisin yapısı	9
Şekil 3:Spermatogonyumdan sperm gelişim aşamaları	11
Şekil 4: Sperm Morfolojisi	15
Şekil 5: Seminifer tübüller arasında interstisyuma yerleşik, testosteron salgılayan Leydig hücreleri	16
Şekil 6: Testosteron ve dihidrotestosteron	17
Şekil 7: Leydig hücrelerinden testosteronun sentezi	19
Şekil 8: Apoptozisin genel mekanizması	24
Şekil 9: Ölüm reseptör sinyali	26
Şekil 10: Apoptozisin mitokondriyal kontrolü.	27
Şekil 11: Bcl-2 Ailesi	29
Şekil 12: AIF'le indüklenen nükleer apoptozis	32
Şekil 13: Apoptozis sinyali	34
Şekil 14: Apoptozis yolakları	35
Şekil 15: Apoptozisin inhibisyonu	36
Şekil 16: Deney düzeneği	40
Şekil 17: 2.45 GHz elektromanyetik alana maruz kalma deney düzeneği	41

**GRAFİKLER:**

Grafik 1: Kontrol ve Manyetik Alan Grubunun Total Testosteron Düzeyleri 49

Grafik 2: Tüm gruplara ait Leydig hücre sayıları (\*  $p < 0,001$ , diğer gruplar ile karşılaştırıldığında). 51

**RESİMLER:**

Resim 1: Manyetik Alanın Uygulanması 41

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde teknolojik gelişmelerin geldiği bu noktada, iletişim araçları çeşitli ve yaygın kullanım alanlarına sahip olarak günlük yaşantımıza çeşitli kolaylıklar getirmiştir.

İletişim çağı olarak nitelendirilen günümüzde iletişimin önemi ve bunu kolaylaştıran cihazların hayatımızdaki yeri büyüktür. Bizimle yaşamımızın her anını paylaşmaya başlayan bu cihazların bilinçli kullanımı gerekmektedir.

Gittikçe büyüyen sanayileşme, ekonomik koşulların iyileşmesi, insanların çok sayıda elektrikli alet ve teçhizata sahip olmalarını sağlamıştır. Son yıllarında iletişim çağının inanılmaz bir hızla gelişimine paralel olarak yaşamımıza giren bu cihazlar; telsiz, cep telefonu, internet ağları gibi teknoloji ürünleridir. Kullanılan bu cihazlar, yaşantımıza kolaylıklar sağlarken birtakım olumsuzlukları da beraberinde getirmiştir. Bu etkiler, birçok kişi tarafından bilinmeyen ve etkisini uzun zaman sonunda gösteren elektromanyetik alan (EMA) zararlarıdır.

Kablosuz yerel alan ağları (WLAN, Wireless Local Area Networks), iki yönlü geniş bant veri iletişimi sağlayan, iletim ortamı olarak fiber optik veya bakır kablo yerine telsiz frekansı (RF, Radio Frequency) veya kızılötesi ışınları kullanan ve salon, bina veya kampüs gibi sınırlı bir alanda çalışan iletişim ağlarıdır (1). Kurulum kolaylığı ve hareket serbestliği gibi önemli avantajlar sağlayan WLAN sistemleri kablolu ağların yerini alabilmekte hatta bu ağlara göre daha fazla fonksiyonlar içerebilmektedir. Kablosuz yerel alan ağları Avrupa düzenlemelerinde Telsiz Yerel Alan Ağları, Radio Local Area Networks (Radio LAN) olarak adlandırılmasına karşın başta ABD olmak üzere birçok ülkede Wi-Fi, Wireless Local Area Networks, Wireless LAN, WLAN olarak adlandırılmaktadır (1). WLAN sistemleri iş adamları, yöneticiler, çalışanlar, küçük işletmeler, orta ölçekli işletmeler ve bireysel kullanıcılar gibi büyük bir kesime internet ve üyesi oldukları kurumsal ağa (intranet) mobil olarak bağlanma olanağı sağlamaktadır. Ayrıca, WLAN sistemleri kullanıcılara mekândan bağımsız olarak kolay bir kablosuz ağ kurulumu ve



geniş bant veri iletimi imkânı sunmaktadır (1,2). Kablolu Local Area Networks'ların tüm özelliklerine sahip olan WLAN sistemleri bu ağların devamı ya da alternatifi olarak kullanılmaktadırlar.

Günümüzde bu dalgaların insan sağlığına zararları olduğunu bildiren yayınlar ışığında bu konunun önemli bir sağlık problemi haline gelebileceğini göstermektedir. Nöronal elektriksel aktivite, enerji metabolizması, genomik cevaplar, nörotransmitter dengesi, kan beyin bariyer geçirgenliği, kognitif fonksiyon, uyku ve çeşitli beyin ile ilgili hastalıkları içine alan etkileri ile ilgili birçok yayınlar yapılmıştır (3, 4, 5).

EMA'lara maruz kalma ile ilgili pek çok çalışmada; EMA'nın vücut ağırlıkları, organların morfolojisi ve histolojisi, hematolojik parametreler, biyokimyasal parametreler, hormonlar, bağışıklık sistemi ve kan elektrolit düzeyleri üzerine etkileri incelenmiş ve farklı sonuçlar bulunmuştur (6, 7). Son yıllarda tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kablosuz ağ kullanımı çok hızlı bir şekilde artmış ve hayatın ev ve iş olmak üzere her alanında diz üstü bilgisayarlar yoğun bir kullanıma sahip olmuştur. Her ne kadar WLAN sistemleri neredeyse günlük yaşamımızın hayatsal bir bölümünü teşkil etse ve sağlığımız üzerinde zararlı etkileri olduğuna dair açık bir delil bulunmasa da gittikçe yaygınlaşmaktadır. Bu yüzden çalışmamızda 2.45 GHz EMA dalgalarının deney hayvanlarında, erkek üreme hormonları ve testis dokusunda apoptozis üzerine bir etkisinin olup olmadığını araştırmayı planladık. Bu amaçla 2.45 GHz dalga frekanslı manyetik alana maruz bırakılan sıçanlarda; Testosteron (T), Folikül Stimulan Hormon (FSH), Luteinizan Hormon (LH) seviyelerini ve testis dokusundan alınan kesitlerden histopatolojik değerlendirme ile birlikte immünohistokimyasal yöntemlerle BCL-2, BAX genleri ve TNF- $\alpha$  KASPAZ-3, KASPAZ-8 enzimleri incelendi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Radyasyon Sınıflandırılması

Radyasyon sözcüğü madde içine nüfuz edebilen ışınlar anlamında kullanılmıştır. Cinsleri ve kaynakları farklı olan ışınların tek ortak yönü maddeye, bu arada insan vücuduna nüfuz edebilmeleridir. Çeşitli radyasyonların giricilikleri farklıdır. Fakat belli bir radyasyon türü için giricilik enerji ile ilgili bir özelliktir. Radyasyonlar madde içine nüfuz edip cismi oluşturan atomları iyonlaştırması veya iyonlaştırmaması itibariyle iki sınıfta incelenir. Bunlar:

- a. İyonlaştırmayan Radyasyon (Elektromanyetik Radyasyonlar)
- b. İyonlaştırıcı Radyasyon (nötron, proton, alfa, beta tanecikleri, x ve gamma ışınları) (8).

#### 2.1.1. İyonlaştırmayan Radyasyon (Elektromanyetik Radyasyon)

İyonlaştırmayan radyasyon olarak da tanımlanan elektromanyetik (EM) radyasyon, enerjinin boşlukta elektrik ve magnetik alanlar biçiminde yayılmasıdır. Bu grup içerisinde; radyo dalgaları, ısı, ışık, kızıl ve mor ötesi ışınlar sayılabilir. EM ışınların oldukça karmaşık ve değişken özelliklerini tanımlayabilmek için EM radyasyon dalga ve tanecik özellikleri şeklinde iki ayrı görüşle açıklanır (8).

##### 2.1.1.1. Elektromanyetik Radyasyonun Dalga Özelliği

EM radyasyon, boşlukta dalgalar biçiminde yayılırlar. Yakından bildiğimiz pek çok dalgalı yayılım için (ses dalgalarının hava, su ya da vücut dokuları içindeki yayılımları) mutlak bir ortama gerek vardır. Oysa EM dalgalar, boşlukta yayılabilirler ve bir ortama gereksinimleri yoktur. Her tür dalga bir dalga boyu ve frekansı vardır. Sinüs ritmi şeklindeki dalga

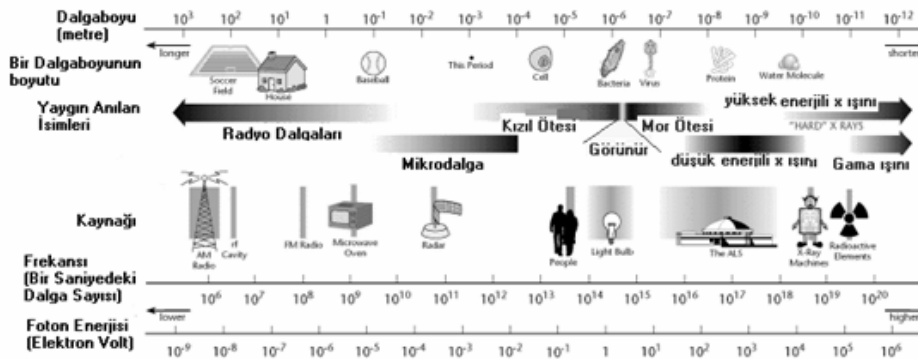
konvoyunda birbirini izleyen iki tepe noktası arasındaki uzaklık, dalga boyu olarak tanımlanır ve yunanca uzunluk sözcüğünün ilk harfi olan lamda ( $\lambda$ ) ile gösterilir. Bir noktadan belli sürede geçen dalga sayısı ise frekansı gösterir. Hız ile frekans arasındaki ilişki  $Hız = Frekans \times Dalga \ Boyu$  ile ifade edilir. Tüm EM dalgalar boşlukta aynı hızla yayılırlar, bu hız ışığın hızına eşit olup saniyede 300 000 km'dir. EM radyasyon tiplerinde hız aynı olduğundan bu ışınların frekansları dalga boyları ile ters orantılıdır.

EM ışınların dalgalar biçimindeki yayılımları pek çok fiziki olayı açıklarsa da, bu dalgaların özelliklerinin tümünü ortaya koymaz. Bu nedenle tanecik özelliği üzerinde de durmak gereklidir (8).

### 2.1.1.2. Elektromanyetik Radyasyonun Tanecik Özelliği

Kısa dalga boylu EM dalgalar madde ile karşılaştırdıklarında, dalga olmaktan çok partikülmüş gibi tepki görür ve gösterirler. Gerçekte bu dalgalar enerji demetleri olup "kuantum" veya "foton" adını alırlar. Fotonlar ışık hızı ile hareket ederler. Her bir foton tarafından taşınan enerji, bu radyasyonun frekansına bağlıdır. Örneğin frekans iki katına yükselttilirse foton enerjisi de iki katı kadar artacaktır. EM spektrumu oluşturan tüm radyasyonlar (x ve  $\gamma$  ışınları hariç) iyonlaştırmayan radyasyon türüne girer (8).

## ELEKTROMANYETİK SPEKTRUM



Şekil 1: Elektromanyetik Spektrum

## 2.2. Elektromanyetik Radyasyonun Canlılarla Etkileşimi

EM dalgaların etkilerinin ortak mekanizması için net bir açıklama yoktur. EM dalgalarının termal ve termal olmayan olmak üzere iki tip etkisi vardır. EM dalga ile ışınlanan cisimde, gelen dalganın alan şiddeti yeterince küçükse ısı oluşmaz. Termal etkiler, cismin EM dalga ile etkileşmesinde, artan moleküler hareket ve sürtünmeden dolayıdır. Biyolojik ortamda ısı artışı oluşur. İyon, moleküler dipol veya kolloid parçacıklar gibi yükler elektriksel alanlarda daima hareket halindedir. Uygun şartlarda (iletkenlik, dielektrik sabiti, frekans, alan şiddeti) organizmanın özelliklerine bağlı olarak; termal olmayan etkiler, termal etkilerden daha aktif olabilir (9).

EM enerjisi doku yüzeyine çarptığında bir kısmı yansır bir kısmı vücut içine girerek soğurulur. EM dalga dokudan geçtikçe ortamın elektriksel özelliklerine bağlı olarak hızı değişir. Bu da dalga boyunda değişmeye neden olur.

EM radyasyon dokular üzerinde yüzey başına watt birimiyle ifade edilen güç yoğunluğunun canlı vücudunda soğurulmasına ve oradan doku ısınması yoluyla hasar oluşmasına neden olurlar. Soğurulan bu güç, (özellik oranı) gelen dalganın frekansına, geliş açısına, canlı dokunun su içeriğine ve biyolojik malzemenin elektriksel özelliklerine (iletkenlik, dielektrik sabitleri) bağlıdır. Söz konusu etkileşme canlı vücudunda EM dalganın indüklediği iç alanların doku malzemeleri içinde aşağıda ifade edilen şekilde enerji transferinden kaynaklanır.

1. Elektriksel alanlar herhangi bir atomun serbest elektronlarına kinetik enerji verir.

2. Elektriksel alanlar, atom ve moleküllerdeki elektrik dipollerine etki ederler. Polarizasyon olarak isimlendirilen bu olaya ilişkin sürtünme nedeniyle doku malzemelerinde ısı oluşur.

3. Elektriksel alanlar, malzemedeki daha önce mevcut dipolleri bir araya getirir. Bununla birlikte oluşan sürtünme malzemeye enerji transfer eder (10).

EM radyasyona maruz kalma limitleri, çalışanlar için mesleki maruz kalma, genel halk için bireysel maruz kalma olarak iki bölümde incelenir. Bunlara bir de kişisel amaçlı kullanılan haberleşme cihazlarından oluşan maruz kalmalar eklenebilir. Çevresel kaynaklarda çalışan işçiler, RF enerji kullanan cihaz operatörleri mesleki maruz kalmaya örnek olarak verilebilir. Çevresel kaynakların etkili olduğu bölgelerde, halkın rasgele bulunması nedeni ile ortaya çıkan risk, genel halk maruz kalması olarak tanımlanır. Özellikle verici kuleleri, cep telefonu baz istasyonları, okullar, alışveriş merkezleri ve evlerde kullanılan kablosuz ağlar bu sınıfa giren kaynaklardır (9).

Söz konusu maruz kalma durumları için ortalama maruz kalma süresi önemli bir kriterdir. Denklem ile kabul edilen maruz kalma süresinde verilen bir güç yoğunluğunda, izin verilebilecek süre hesaplanabilir. Oluşacak maruz kalma seviyesi kabul edilen standart güç limiti ve izin verilen süreye eşit değerde olmalıdır. Aşağıdaki eşitlikte standartların kabul ettiği ısı artışı için maruziyet süresi hesaplanabilir;

$$\sum S_m \times t_m = S_{limit} \times t_{ort}$$

Burada;  $S_m$  maruz kalınan güç yoğunluğu seviyesi ( $mW/cm^2$ ),  $S_{limit}$  izin verilen maksimum güç yoğunluğu ( $mW/cm^2$ ),  $t_m$ ,  $S_m$  maruz kalması için izin verilebilecek süre (dak.) ve  $t_{ort}$  (dak.) izin verilen maksimum güç yoğunluğu için ortalama süredir. Uluslararası standartlarda  $t_{ort}$  6 dakika olarak belirlenmiştir (11).

EM dalgaların dokuda oluşturabileceği zarar, onun enerjisine, doku ile yaptığı etkileşmenin türüne, dokuda soğurulan enerji miktarına ve maruz kalma süresine bağlıdır. Bu şekilde dokunun birim kütlelerinde soğurulan enerji "doz" olarak tanımlanır. Özellikle canlı dokularda soğurulan enerji miktarından çok, enerjinin soğurulma hızı önemlidir (12). Bu durumu içeren bir "Bağıl Soğurulma Hızı" birimi;  $SAR = \text{Enerji} / (\text{Kütle} \times \text{Zaman}) = \text{Joule/Kg.s} = \text{Watt/kg}$  olarak tanımlanmıştır.

İnsan vücudu soğurulma karakteristiği dikkate alındığında, EM frekans bandı üç alt bölgeye ayrılabilir (13).

1. 30 MHz'den daha küçük alt rezonans bölgesinde insan gövdesi için yüzey soğurma belirgindir, fakat boyun ve bacaklarda enerji soğurulması hızla artar.

2. Tüm vücut için 30–300 MHz rezonans bölgesinde ve hatta vücudun bir kısmının rezonansı için daha yüksek frekanslarda, özellikle kafa için, çok dikkatli olunmalıdır.

3. 400 MHz'den 3 GHz'e kadar olan aralıkta ısı etkisi mevcuttur. Bu bölgede özellikle 100 W/m<sup>2</sup>'lik güç yoğunluğunda bölgesel enerji soğurulması beklenebilir. Frekans arttıkça soğurulan enerji azalır ve ısıtma etkisi artar, örneğin 915 MHz'de çalışırken birkaç kaç santimetre ve 2.45 GHz'de ise birkaç milimetre olmaktadır.

Soğurulan enerji miktarı radyasyona maruz kalan biyolojik doku veya organın boyutlarına bağlıdır. Bir insanı bütün olarak düşünürsek standart bir kişi (boy 1.74m) eğer topraklanmışsa, yaklaşık 70 MHz civarındaki bir frekansta, enerji soğurulma rezonans frekansına sahiptir. Daha küçük boylu insanlar ve çocuklar için enerji soğurulma rezonansı 100 MHz'i aşar. En uzun boylu insanlar için soğurulma rezonans frekansı 70 MHz'in altındadır. Özellikle 2.45 GHz'de standart insan mevcut alanın %50'sini soğuracaktır (13). Bu değerler, tüm insan vücudunun maruz kalmasında frekans aralıklarının etkili olduğunu göstermektedir. Daha küçük boyutlu olan canlılar için de boy küçüldükçe rezonans frekansı artmakta, dalga boyu düşmektedir.

### **2.3. Elektromanyetik Alanların Biyolojik Etkileri**

EM dalgaların dokular üzerinde iki temel etkisi bulunmaktadır. Bunlardan ilki termal etki, ikincisi ise termal olmayan ya da diğer adıyla kimyasal etkilerdir. Isı etkisi resmen kabul edilen dozlarda veya daha yüksek değerlerde meydana gelirken, kimyasal etki tehlike sınırlarının altındaki düşük dozlarda meydana gelmektedir. Uzun süreli düşük doza maruz kalmak kısa süreli yüksek dozdan daha riskli olarak kabul edilmektedir.

EM dalgalarının oluşturduğu biyolojik etkilerin canlı organizma üstünde güvenilir bir sınırdan kalması için, insan hücre ve dokularını temsil eden

matematiksel modeller ile çalışmalar yapılmaktadır. EM dalgalarının bilinen potansiyel biyolojik etkileri şu başlıklarda toplanabilir (8, 14).

a) Tek bir hücre veya hücre sistemlerine etkiler

Moleküler etkiler

Hücre içi sistemler üzerine etkiler

Tek bir hücreye etkiler

b) Genetik düzen ve gelişme üzerine etkiler

Genetik ve mutajenik etkiler

Teratolojik etkiler

Büyüme ve gelişme etkileri

c) Gelişmiş organ, doku veya hücre sistemleri üzerine etkiler

Testisler üzerine etkiler

Kardiyak fonksiyona etkiler

Sinir sistemi ve davranış tepkileri üzerine etkiler

Hematolojik etkiler

İmmünolojik etkiler

d) Metabolizma ve düzenleme sistemleri üzerine etkiler

Klinik biyokimya ve metabolizma üzerine etkiler

Nöroendokrinolojik tepkiler

## **2.4. ERKEKTE ÜREME VE HORMONAL FONKSİYONLAR**

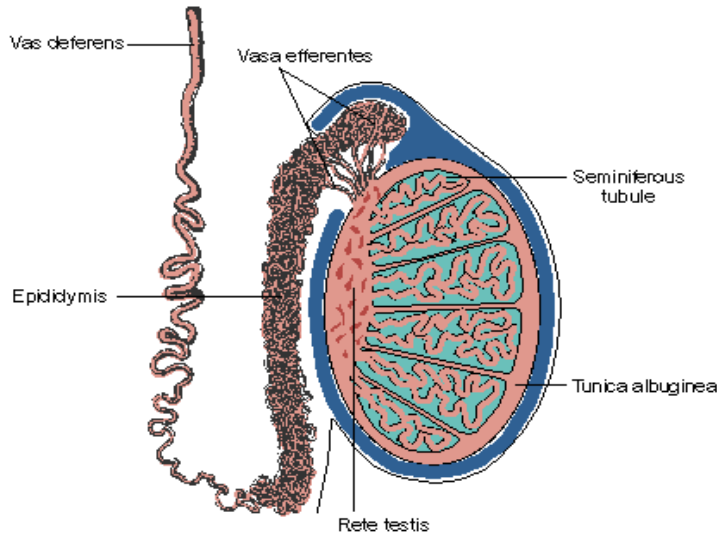
### **2.4.1 Erkek Üreme ve Hormonal Fonksiyonlar**

Erkek üreme fonksiyonları üç büyük alt gruba ayrılabilir: Spermatogenez; cinsel performans ve erkek üreme fonksiyonlarının hormonlarla düzenlenmesidir.

### **2.4.2. Erkek Cinsel Organlarının Fizyolojik Anatomisi**

Testisler, herbiri ortalama 0,5 m'den uzun, 900'den fazla kıvrımlı, seminifer tübüllerden oluşur. Bu yapılar spermlerin gelişim bölgesindedir. Spermler seminifer tübüllerden, yaklaşık 6 m boyunda bir başka kıvrımlı tüp

olan epididim'e girer. Epididim vas deferense açılır ve prostat bezine girmeden hemen önce, vas deferens ampullası adı verilen bir genişleme gösterir. Prostatın her iki tarafında yer alan seminal vesiküller, ampullanın prostat girişine açılırlar ve hem ampulla hem de seminal vesikülün içerikleri, ortak bir ejakülatör kanalla prostat gövdesinden geçerek, internal üretraya boşalır. Prostat bezinden kaynaklanan prostat kanalcıkları da ejakülatör kanala açılmaktadır. Testisleri vücut dışına bağlayan zincirin son bölümünü üretra oluşturur. Üretra, kanal boyunca çok sayıda küçük üretral bezlerden salgılanan mukusla beslenir. Ayrıca, üretranın başlangıç bölgesine çok yakın yerleşimi olan bilateral bulboüretral bezlerden (Cowper) de üretraya çok daha fazla miktarda mukus salgılanmaktadır (15, 17).



**Şekil 2: Testisin yapısı**

### 2.4.3. Spermatogenez

Spermatogenez, aktif seksüel yaşam dönemi boyunca önhipofiz gonadotropik hormonlarının uyarısı sonucunda, tümüyle seminifer tübüllerde gerçekleşir. Olay yaklaşık 13 yaşında başlar ve ileri yaşlardan belirgin şekilde azalarak yaşam boyu devam eder.



Seminifer túbüllerde spermatogonya adı verilen çok sayıda germinal epitel hücreleri bulunur. Spermatogonyumlar, túbüler yapının dış kenarında, iki-üç tabaka halinde yer almaktadır. Bu hücreler sürekli çoğalmayla kendilerini yenilerler. Hücrelerin bir bölümü, spermilerin oluşumunu sağlayan son aşamaya kadar farklılaşır.

Spermatogenezin ilk evresinde, spermatogonyumlar merkeze yönelik Sertoli hücreleri boyunca yerleşirler. Sertoli hücreleri oldukça büyük hücrelerdir. Túbül merkezinde, lümene giden tüm yollardaki spermatogonyum hücre dizilerini, sitoplazmik uzantılarıyla kuşatarak onlara destek olurlar.

**Mayoz;** Ortalama 24 günlük bir süreç içinde engeli aşarak Sertoli hücre tabakasına ulaşan her bir spermatogonium büyük bir değişim evresine girer ve büyük bir primer spermatosit oluşturmak üzere genişler. Her primer spermatosit, daha sonra 2 adet sekonder spermatosit oluşturmak üzere ikiye bölünür. Birkaç gün sonra, bu hücreler de bölünerek spermatidleri oluştururlar ve spermatidler sonunda spermatozoa (sperm) haline dönüşürler.

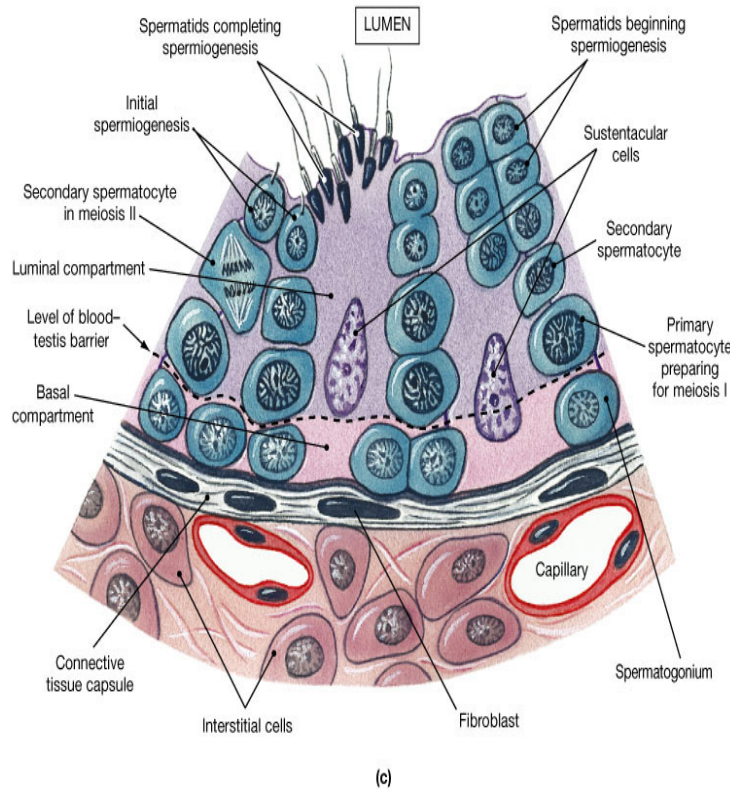
Spermatosit döneminden spermatid dönemine geçiş sırasında, spermatositteki 46 adet kromozom (23 çift) bölünür ve 23 kromozom bir spermatide diğer 23 kromozom da ikinci spermatide gider. Bu dağılım kromozomal genlerde de bölünmeye neden olur. Böylece, fetusun genetik özelliklerini birisi babadan, diğer yarısı da annenin oositinden gelir. Spermatogenez sürecinin tamamı yani germinal hücrenin sperme dönüşümü yaklaşık olarak 64 gün sürer.

**Sperm Oluşumu.** Spermatidler ilk oluşum döneminde, epiteloid hücre karakterlerini taşırlar. Ancak, kısa bir süre içinde, her bir spermatid uzamaya başlar, spermatozoona dönüştüklerinde baş ve kuyruk bölgelerinden oluşur. Baş kısmında hücrenin yoğun çekirdeği, ince bir sitolazma ve çevrelerinde hücre membranı bulunur. Başın üçte iki ön dış tarafında golgi aygıtından oluşan kaim bir başlık, akrozom bulunur. Akrozom, tipik bir hücrede lizozomlarda bulunan enzimleri içerir. Bunlar, dokuların proteoglikan filamentlerini sindirebilen hiyaluronidaz ve proteinleri sindirebilen güçlü proteolitik enzimlerdir. Bu enzimler sperm in ovuma girmesi ve onu döllemesinde önemli rol oynar.

Kuyruk bölgesinde flagellum adı verilen, üç önemli yapılanma bulunur: (1) 11 mikrotübülün oluşturduğu, merkezsiz bir iskelet, silyalara benzer bu yapıya aksonem adı verilir. 2) aksonemi kuşatan ince bir hücre membranı ve 3) kuyruğun proksimal kısmında, aksonem çevresindeki mitokondriyon topluluğu (kuyruk gövdesi) adı verilebilir.

Kuyruğun öne ve arkaya hareketleri (flagellar hareket) spermin hareketini sağlar. Bu hareket aksonemayı oluşturan ön ve arka tübüller arasındaki uzunlamasına, ritmik kayma hareketi ile sağlanır. Bu olay için gereken enerji, kuyruğun gövdesindeki mitokondriyonlarda sentezlenen adenozin trifosfattan sağlanır.

Normal bir sperm sıvı ortamda 1–4 mm/dak hızında hareket eder. Bu sayede ovuma ulaşmak üzere dişi genital kanalında yol alır.



**Şekil 3: Spermatogonyumdan sperm gelişim aşamaları**

#### 2.4.4. Spermatojenezi Uyarıcı Hormonal Faktörler:

Spermatojenezde kesin etkinliği olan hormonlardan bazılarını şöyle sıralayabiliriz:

1. Testosteron, testislerde interstisyumda yerleşim gösteren Leydig hücrelerinden salgılanır.

Sperm oluşumunda germinal hücrelerin bölünme ve gelişmeleri için gereklidir.

2. Luteinizan hormon, ön hipofiz bezinden salgılanarak, Leydig hücrelerini uyarır, testosteron salgılanmasını sağlar.

3. Folikül stimulan hormon da ön hipofiz bezinden salgılanır. Sertoli hücrelerini uyarır. Bu uyarı olmaksızın spermatidlerin spermelere dönüşümü (spermiogenezi olayı) olanaksızdır.

4. Östrojenler, folikül stimulan hormon ile uyarılan Sertoli hücrelerinde testosteron ile birlikte yapılır. Muhtemelen spermiogenezi için gereklidirler.

5. Büyüme hormonu (ve diğer pek çok hormon) testislerin temel metabolik fonksiyonlarının kontrolü için gereklidir. Büyüme hormonu, özellikle spermatogoniumların erken bölünmesini hızlandırır. Hipofizer cücelikte olduğu gibi, hormonun yokluğunda spermatojenezi ciddi boyutlarda yetmezlik gösterir veya tümüyle ortadan kalkar.

#### 2.4.5. Epididimde Sperm Olgunlaşması

Seminifer tübülde oluştuktan sonra, sperm 6m uzunluğundaki epididimden geçebilmesi için günler gerekir. Seminifer tübül ve epididimin ilk bölümlerinden geçen spermeler hareketsizdir ve ovumu döleyemezler. Spermeler 18 ila 24 saat epididimde kaldıktan sonra hareket yeteneklerini kazanırlar, ancak ejakülasyona kadar, epididim sıvısında bulunan baskın proteinlerle hareketleri engellenir.

Ejakülasyondan sonra, sperm hareket ve dölleme yeteneği kazanır. Bu olaya olgunlaşma adı verilir. Sertoli hücreleri ve epididimdeki sperm ile birlikte atılan ve besin içeren özel bir sıvı salgırlar. Bu sıvı hormonlar

(testosteron ve östrojenler), enzimler ve spermin olgunlaşması gerekli özel besinleri içerir.

**Spermin Depolanması.** Genç erişkinlerin 2 testisi günde yaklaşık 120 milyon sperm üretir. Bu spermlerin küçük bir bölümü epididimde depolanabilir, ancak çoğunluğu vasa deferensde depolanmaktadır. Bunlar, fertilizasyon özelliğini kaybetmeden en az bir ay saklanabilir. Bu zaman içinde, son derece baskılanmış olarak, inaktif durumda beklerler. Bu etki duktus sekresyon sıvılarında bulunan inhibitör maddelerle sağlanır. Diğer taraftan seksüel aktivite durumunda depolanma günden uzun olamaz.

**Olgun Spermin Fizyolojisi;** Normal olarak hareketli ve fertil spermler, flagellaların hareket yeteneği ile sıvı ortamda dakikada yaklaşık 1-4 mm hızla ilerleyebilir. Sperm aktivitesi ejakülat semeninde olduğu gibi, nötral ve hafif alkalik ortamda bir artış gösterir; ancak orta derecede asidik ortamda büyük ölçüde baskılanır. Kuvvetli asit ortam spermlerin hızla ölümüne neden olur. Sperm aktivitesi ısı artışı ile belirgin artış gösterir, ancak bu koşullarda metabolizma hızı da yükselerek spermin ömrünü önemli ölçüde kısaltır. Sperm testislerin genital kanallarında birkaç hafta canlı kalabildiği halde, kadın genital kanalında sadece 1 veya 2 gün yaşar (15,16,17).

#### **2.4.6. Seminal Vesiküllerin Fonksiyonu**

Her seminal vesikül kıvrımlı, bölümlü tübüler bir yapıya sahiptir. Tüp boyunca uzanan sekretuar epitel hücrelerinden mukoid bir sıvı salgılanır. Sıvı bol miktarda fruktoz, sitrik asit ve diğer besin maddeleri ile birlikte büyük miktarda prostaglandinler ve fibrinojen içerir. Emisyon ve ejakülasyon sırasında, vasa deferensin spermi boşaltmasından kısa bir süre sonra, her seminal vesikül içeriğini ejakülatör kanala verir. Böylece, ejaküle edilen semene büyük bir kitle eklendiği gibi, seminal sıvıda fruktoz ve diğer besleyici maddelerin artması ile ejakülattaki spermin ovumu döllemesine kadar geçen süreç içinde beslenmesi sağlanır.

Prostaglandinlerin, fertilizasyona iki yoldan yardımcı oldukları düşünülmektedir: (1) Servikal mukusla reaksiyona girerek, sperm hareketleri

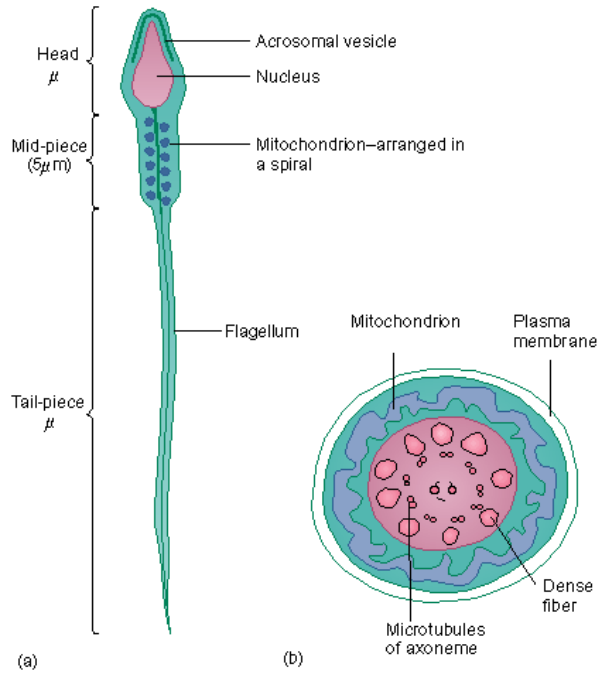
için uygun bir ortam oluştururlar ve (2) spermin ulaşması için uterus ve fallop kanallarının zıt yönde peristaltik kasılmalarını sağlarlar ( 5 dakikalık süre içinde fallop tüplerinin üst ucuna ulaşan sperm sayısı çok azdır).

#### **2.4.7. Anormal Spermatogenez ve Erkeklerde Fertilite**

Seminifer tübül epiteli, birçok hastalıkta haraplanabilir. Örneğin, kabakulak sonucu ortaya çıkan bilateral orşit, hastalığa yakalanan şanssız erkeklerde büyük oranda steriliteye neden olur. Ayrıca pekçok erkek çocuk, genital kanalın tıkanması ya da genetik anomaliler nedeniyle tübüler epitel dejenerasyonu ile doğarlar. Son olarak, sterilitenin bir başka nedeni de, genellikle geçicidir, testislerin aşırı ısıya maruz kalmalarından kaynaklanır.

**Isının Spermatogeneze Etkisi;** Testislerde ısı artışı, spermatogoniumların yakınında bulunan seminifer tübül hücrelerinin çoğunda dejenarasyona yol açarak spermatogenezi engelleyebilir.

Çoğu kez, testislerin skrotumda asılı durmasının vücut ısısına göre 2 °C daha düşük ısıda kalmaları bakımından yararlı olduğu söylenmektedir. Soğuk günlerde, skrotum kası refleks olarak kasılarak testisleri yukarı doğru çeker, testislerin vücuda yaklaştırılması ile 2 °C'lik farkın sürekliliği sağlanabilir. Bu şekilde, skrotum teorik olarak, testislere özgül soğutma mekanizması (ancak, kontrollü soğutma) olarak görev yapar. Bu nedenle, spermatogenezin sıcak havalarda yetersiz olabileceği belirtilmektedir(15,17).



**Şekil 4: Sperm Morfolojisi**

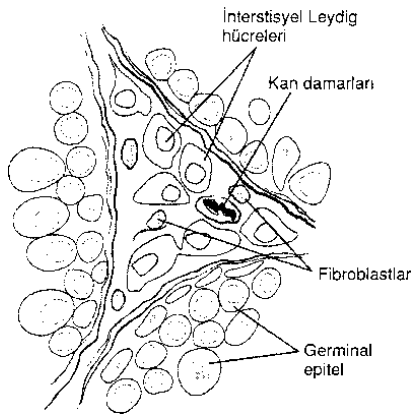
## 2.4.8. Testosteron ve Diğer Erkek Cinsel Hormonları

### 2.4.8.1. Erkek Seks Hormonlarının Sekresyon, Metabolizma ve Kimyası

**Testosteronun Testiste İnterstisyel Leydig Hücrelerinden Salgılanması;** Testisler, testosteron, dihidrotestosteron, androstenedion gibi genelde androjenler adıyla tanımlanan pekçok erkek seks hormonlarını salgırlar. Testosteron, diğer androjenlere göre daha fazla miktarda bulunduğundan en önemli testis hormonu olarak kabul edilebilir. Ancak, testosteronun çoğu olmasa bile büyük bir kısmı, hedef dokularda daha aktif olan dihidrotestosterona dönüşür.

Testosteron, interstisyel Leydig hücrelerinde oluşturulur. Bu hücreler, seminifer tübüller arasında interstisyel alanlarda yer alırlar ve erişkin testis kitlesinin %20'sini oluştururlar. Leydig hücreleri testislerin testosteron salgılamadığı çocukluk döneminde hemen hemen hiç görülmezler. Bunun yanında, yeni doğan erkek çocukta yaşamın ilk birkaç ayında ve puberte

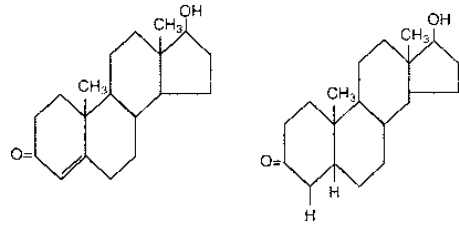
sonrası erişkin dönemde bol miktarda testosteron salgırlar. Testis tümörlerinin geliştiği durumlarda ise, interstisyel Leydig hücrelerinden çok fazla miktarda testosteron salgılanır. Son olarak testisin germinal epiteli, X-ışınlarıyla tedavi sırasında ya da aşırı sıcak nedeniyle haraplandığında, kolay haraplanmayan Leydig hücreleri testosteron üretimine devam eder.



**Şekil 5: Seminifer tübüller arasında interstisyuma yerleşik, testosteron salgılayan Leydig hücreleri**

**Testosteron Metabolizması.** Testislerden salgılandıktan sonra, testosteronun yaklaşık % 97'si zayıf bağlarla plazma albumini ya da daha sıkı bir şekilde, seks hormonu bağlayan globulin olarak adlandırılan bir  $\beta$  globulinle bağlanırlar. Bağlı hormonun dolaşım sisteminde kalış süresi 30 dakika, 1 saat bazen de daha uzun olabilir. Bu süre sonunda, testosteron ya dokularda fikse olur ya da inaktif ürünlere dönüşerek vücuttan atılır.

Dokulara fikse olan testosteronun çoğunluğu hücre içinde dihidrotestosterona dönüşür. Bu olayın gerçekleştiği hedef organlar ise erişkinlerde, özellikle prostat bezi, erkek fetusta eksternal genital organlardır. Testosteronun bazı etkileri bu dönüşüme bağlıdır; ancak diğer etkilerde değişimin rolü olmaz.

**Testosteron****Dihidrotestosteron****Şekil 6: Testosteron ve Dihidrotestosteron**

**Testosteronun Yıkımı ve Atılması;** Dokularda fikse olmayan testosteron, karaciğerde başlıca androsteron ve dehidroepiandrosterona dönüşür. Aynı anda, her iki yapı glukuronidlerle veya sülfatlarla (özellikle glukuronidlerle) birleşerek bağlı hale getirilir. Bunlar da, safra içinde sindirim kanalına ya da idrarla böbreklerden atılırlar.

#### 2.4.8.2. Testosteronun Fonksiyonları

Testosteron genel olarak, vücuttaki belirgin erkek karakterlerinin oluşumundan sorumludur. Fetal yaşam sürecinde, testisler plasentada oluşan koryonik gonadropinlerle uyarılarak, orta düzeyde testosteron salgırlar. Bu hormon fetal gelişim periyodunda ve hatta doğumdan sonra 10 ya da daha çok haftalar süresince vücutta bulunur. Sonra, çocukluk çağında yaklaşık 10–13 yaşına kadar testosteron üretilmez. Daha sonra, puberte döneminde ön hipofiz gonadotropik hormonların uyarısıyla testosteron yapımı hızla artar. 50 yaşından sonra hızla düşmeye başlar, 80 yaşında maksimum düzeyin %20-50'sine iner.

#### 2.4.8.3. Testosteronun Erişkinde Primer ve Sekonder Seks Karakterlerinin Gelişmesine Etkisi

Püberte sonrasında, testosteron salgısının yeniden başlaması ile penis, skrotum ve testislerde 20 yaşından önce yaklaşık sekiz kat kadar büyüme görülür.



Buna ek olarak, testosteron sekonder seks karakterlerini geliştirir. Bu olay, püberteden itibaren başlar ve olgunluk döneminin sonuna kadar sürer. Sekonder seks karakterleri, seksüel organlara ek olarak aşağıda belirtildiği şekilde erkekle kadının ayrımında yardımcıdır (15, 16, 17).

#### **2.4.8.4. Erkek Cinsel Fonksiyonlarının Hipotalamus Ve Ön Hipofiz Bezinden Salgılanan Hormonlarla Kontrolü:**

Erkek ve kadın her iki cinsten seksüel fonksiyonların kontrolü hipotalamustan gonadotropin-serbestletici hormon (Gn-RH) sekresyonu ile başlar. Bu hormon, önhipofiz bezini uyararak gonadotropik hormonlar adı verilen iki hormonun salgılanmasına neden olur: (1) Luteinizan hormon (LH) ve (2) Folikül Stimülant Hormon (FSH). LH testislerden testosteron salgılanması için başlıca uyarandır. FSH ise, özellikle spermatogenezini stimüle eder.

##### **2.4.8.4.1. Gonadotropik Hormonlar: LH ve FSH**

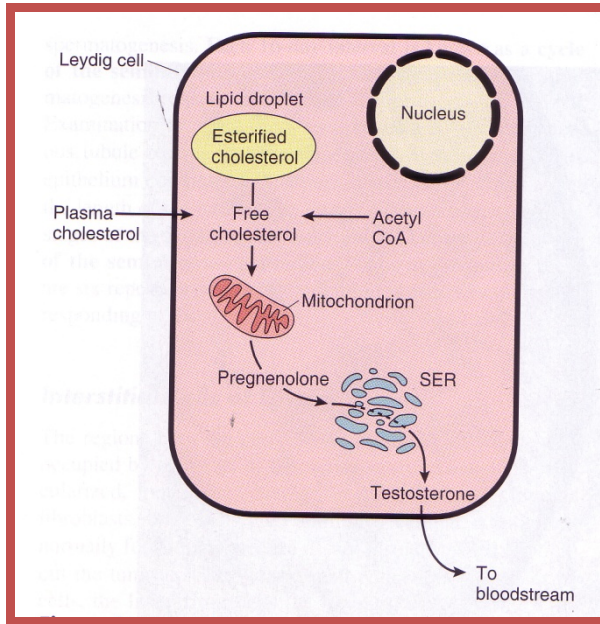
Gonadotropik hormonlar, LH ve FSH ön hipofiz bezinde gonadotrop adı verilen aynı hücrelerden salgılanırlar. Hipotalamusta GnRH bulunmadığında, hipofiz bezinden LH ya da FSH hemen hemen hiç salgılanmaz.

LH ve FSH, glikoprotein yapıda hormonlardır. LH ve FSH testislerdeki hedef dokular üzerinde siklik adozin mono fostat ikinci haberci sistemini aktive ederler. Bu sistem daha sonra hedef hücrelerdeki özgül enzim sistemlerinin aktive olmasını sağlar.

##### **2.4.8.4.2. Testosteron Yapımının LH İle Düzenlenmesi.**

Testislerin interstisyel Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması, ancak hipofiz bezinden salgılanan LH'nin uyarısı ile gerçekleşir. Bunun da ötesinde, salgılanan testosteron miktarı, uyarıcı LH miktarıyla yaklaşık doğru orantılıdır.

Testislerde olgun Leydig hücreleri normalde doğumdan sonra birkaç hafta kadar bulunur; daha sonra 10 yaşından sonrasına kadar bulunmaz. Ancak, herhangi bir yaştaki çocuğa saflaştırılmış LH enjekte edildiğinde veya püberte döneminde LH salgısının arttığı durumlarda, testislerdeki interstisyel dokuda fibroblastlar fonksiyon gören Leydig hücrelerine dönüşürler.



**Şekil 7: Leydig hücrelerinden testosteronun sentezi**

#### 2.4.8.4.3. Spermatogenezin FSH ve Testosteron İle Düzenlenmesi

FSH seminifer tübüllerde, özgül FSH reseptörleriyle Sertoli hücrelerine bağlanır. Bu olay hücrelerin büyümesine ve çeşitli spermatogenik maddelerin salgılanmasına neden olur. Aynı anda, interstisyel alanlardaki Leydig hücrelerinden tübüller içine difüze olan testosteron hormonu spermatogenez üzerinde şiddetli bir tropik etki gösterir. Bu nedenle, spermatogenezin başlaması için, FSH ve testosteron hormonlarının her ikisi de gereklidir (15, 17).

## 2.5. APOPTOZİS

### 2.5.1. Apoptozis terminolojisi:

Ökaryotik organizmadaki hücreler doğarlar, belirli bir süre yaşarlar ve sonra ölürlük (Bowen, 1998). Yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Örneğin, barsak hücreleri 3–5 günlük bir yaşam süresinden sonra ölürlükken, deri hücreleri 20–25 günlük bir süreden sonra ölmektedirler. Fakat miyokard kası hücreleri veya nöronlar ömür boyunca yaşarlar. Nöronların ölmesi ancak sinapsların tam olarak oluşmadığı dönemden önce olur. Bu dönemde doğumda aşırı sayıda olan nöronların sayısı uygun sinaptik ağın sağlanabilmesi için azalır. Bahsedilen bu hücre ölümleri apoptozisle gerçekleşir. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü (“physiological cell death”) olarak da adlandırılır. Bir şekilde DNA’sı hasarlanmış (virüs, çevresel nedenler) hücreler organizmanın zarar görmemesi için kendilerini öldürürler (“cell suicide”) ve bunu organizmanın yararı için yaparlar. Doku homeostazisi için (örneğin yara iyileşmesi veya barsak hücrelerinin “turnover”ında olduğu gibi) hücreler ortamdaki ölümlük kaybolur (“cell deletion”). Zamanı gelince ölen hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde ölürlük (“programmed cell death”). İşte, tüm bu kavramlar (fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı, programlanmış hücre ölümü) apoptozisle eş anlamlı olarak kullanılabilen ifadelerdir.

### 2.5.2. Hücre ölümü:

Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisden birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptozis terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Apoptozis veya hücre ölümü uzun süre araştırmacıların çok ilgilenmedikleri

bir alan olarak kalmıştır. Fakat apoptozisin gelişim biyolojisinde, normal doku “turnover”ında ve immun sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerdeki rolü ortaya çıktıkça önemi de hızla artmıştır.

Her saniye yaklaşık bir milyon hücremiz apoptozisle vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Bunların yerine yenileri yapılmaktadır. Yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında kontrollu bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogeneze katkıda bulunur. Görüldüğü gibi apoptozis organizmada doğru bir şekilde işlemelidir. Olmaması gerekirken gerçekleşen apoptozis veya hızlanmış ya da tam tersine yavaşlamış apoptozis organizma için tehlikelidir. Apoptozisin gereksiz yere olduğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet, hepatit C infeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklar verilebilirken; apoptozisin yavaşladığı hastalıklara örnek olarak ise otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilir.

### **2.5.3.Apoptozis ve nekrozis:**

Tablo 1’de nekrozis ile apoptozis karşılaştırılmıştır. Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Diğer bir ifadeyle apoptozis hem sağlıkta hem de hastalıkta karşımıza çıkmaktadır.

Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken “cell swelling”, apoptotik hücre tam tersine küçülür “cell shrinkage”. Nekrozisde kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır “chromatin aggregation” ve kondanse olur “chromatin condensation”. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cecikler “membrane blebs” oluşur. Bu ceciklerin oluşumundan hücre membranındaki

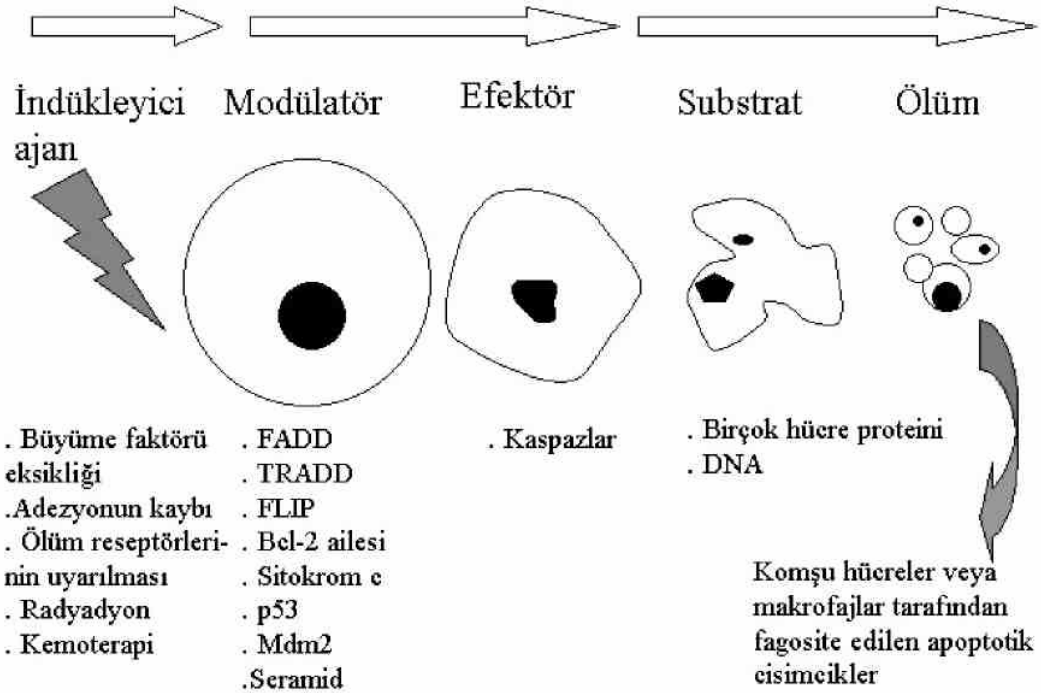
sfingomyelinin hidrolizi ve sonrasında gelişen kolesterol “efflux”u sorumlu tutulmaktadır.

Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere “apoptotik bodies” parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır değişen miktarlarda nukleus veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozisde hücre içeriği dış ortama salıverildiğinden inflamasyon reaksiyonu uyarılır ama apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz. Apoptozisin en önemli özgül yönü (“hallmark”) DNA’nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180–200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının “ladder pattern” ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo bazçifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir. DNA’yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca, DNase I ve II’de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin’in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır “phosphatidylserine translocation”. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (18, 19,20).

**Tablo 1: Nekrozis ve Apoptozisin karşılaştırılması. TNRF-1, tümör nekrozis faktör reseptörü-1**

<b>ÖZELLİK</b>	<b>NEKROZİS</b>	<b>APOPTOZİS</b>
<b>Yol açan nedenler</b>	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması "Senescence" HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
<b>Morfolojik özellikler</b>	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin "flocculation"u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu	İntakt hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücresinin intact mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
<b>Biyokimyasal özellikler</b>	Bozulmuş iyon homeostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C'de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu(=ölümün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C'de gerçekleşmez) DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirtici) Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir).
<b>Diğer özellikler</b>	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür. Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

## APOPTOTİK SÜREÇ



Şekil 8: Apoptozisin genel mekanizması

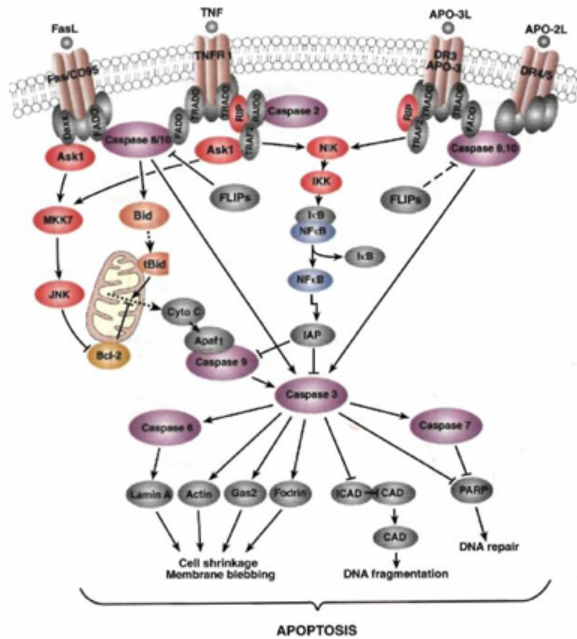
### 2.5.4. Apoptozisin indüklenmesi:

Apoptozisi başlatan nedenler çeşitlidir. Başlıca 2 ana mekanizma apoptozisi başlatabilir (indükleyebilir): a. hücre dışından kaynaklanan etkiler, b. hücre içinden kaynaklanan etkiler. Hücre dışından kaynaklanan etkiler hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri veya granzim/perforin sistemi yoluyla etki ederler. Hücre içinden kaynaklanan nedenler ise esas olarak mitokondrinin aktivasyonuna yol açarlar. Fakat mitokondri dış etkenlerle de aktive edilebilir. Bu yüzden, mitokondri apoptozisin gelişiminde merkezi bir role sahiptir. Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1), DR-3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılması) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Ölüm reseptörlerinin ligandları (aktivatörleri) reseptörlerin oligomerizasyonuna yol

açarak aktifleşmelerine yol açarlar. Reseptörlerin oligomerizasyonunu özgün adaptör proteinler (FADD, TRADD)'in reseptörlere bağlanması takip eder. Bu ise kaspaz sisteminin aktifleşmesine neden olur. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunurlar. İlgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL, tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve "natural killer" hücrelerde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein: protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri ("death domain") adı verilen TRADD ("TNFR-1 associated death domain") ve FADD ("Fas associated death domain") ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. Kaspaz 8'in aktivasyonu oligomerizasyonunu takiben otoaktivasyonla gerçekleşir. Aktifleşen kaspaz 8 iki yolla apoptotik süreci ilerletir: a. doğrudan kaspaz-3'ü kırar ve aktifleştirir, b. pro-apoptotik bir protein olan Bid'i kırar. Kırılmış Bid aktifleşir ve sitoplazmadan mitokondriye transloke olarak mitokondriden sitokrom c'nin salıverilmesine neden olur. TNFR-1 ve DR-3 de adaptör proteinler olarak FADD ve TRADD'ı kullanarak kaspaz-8'in aktivasyonuna yol açarlar. Fakat DR-4 ve DR-5'in adaptör proteinleri henüz bilinmemektedir. Hücre içinde ayrıca bu ölüm bölgelerini inhibe eden proteinler de bulunmaktadır. Örneğin, kaspaz 8 (FLICE) FLIP ("FLICE-inhibitory protein")'i inhibe eder.



### Ölüm Reseptör Sinyali



Şekil 9: Ölüm reseptör sinyali

Apoptozis hücre ölüm reseptörlerinin aktivasyonundan farklı olarak, yukarıda da belirtildiği gibi genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak gelişen p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. p53 bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilir. Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stress) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir.

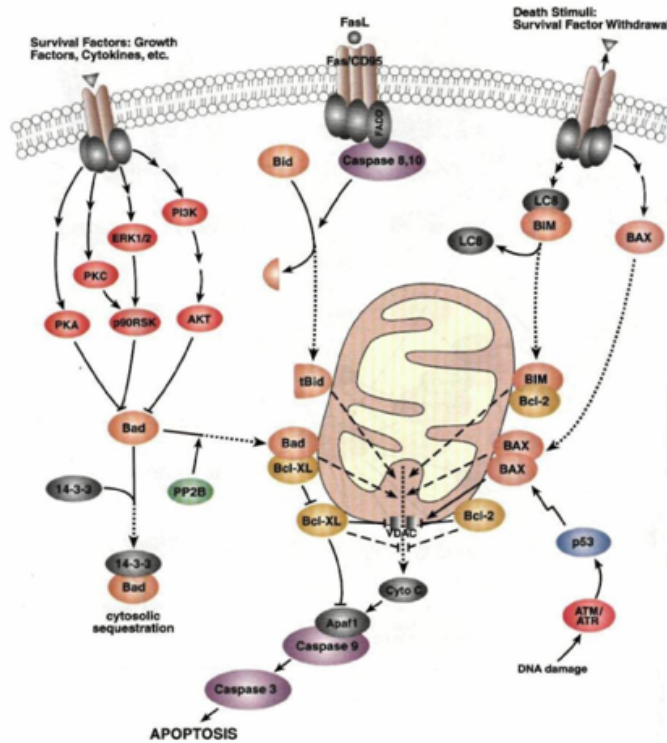
Apoptozisi büyüme faktörlerinin ortamdan eksilmesiyle de başlatılabilir. Hücre kültür ortamında büyütülen hücreler eğer serum açlığı ("serum starvation")'na maruz bırakılırlarsa apoptozisle ölürlər. Buradaki mekanizma, apoptozis indükleyici bir nükleer protein olan p53 aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Ayrıca, bir pro-apoptotik (apoptozis uyarıcı) bir bcl-2 ailesi üyesi olan Bad'ın fosforillenmemesi sonucu aktifleşmesi ve böylece mitokondriden

apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin sitoplâzmaya saliverilmesi yoluyla da gerçekleşir. Apoptozisi başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden saliverilen granzim B'lerin hedef hücrede (örn. virüsle enfekte hücre veya kanser hücresi) kaspaz sistemini aktifleştirmesidir (21, 22, 23).

### 2.5.5 Apoptozisde mitokondrinin rolü:

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Mitokondri hem hücre yüzeyi ölüm reseptörleri, hem büyüme faktörleri, sitokinler gibi yaşam ("survival") faktörleri hem de yaşam faktörlerinin ortamdaki çekilmesi gibi nedenlerle oluşan sinyal ileti yollarının kesiştiği bir organeldir. Böylece hücrenin kaderini belirleyen yaşam ve ölüm gibi iki ana süreç mitokondri üzerinde etkili olmaktadır. Bu iki zıt sürecin mitokondri üzerindeki en son hedefi sitokrom c'dir.

#### Apoptozisin Mitokondriyal Kontrolü



Şekil 10: Apoptozisin mitokondriyal kontrolü.

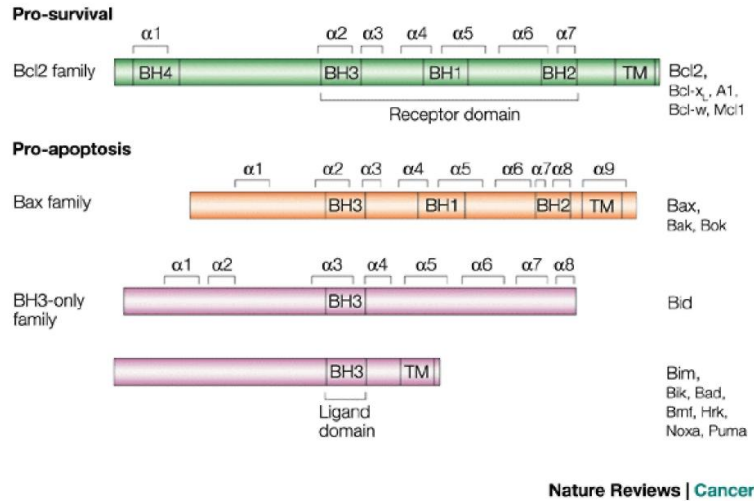
Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplâzmaya saliverilmesi) apoptotik süreçte irreversibl (geri dönülemez) noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin sitoplâzmaya saliverilmesi gerçekleşir (apoptozisin başlaması) veya sitokrom c'nin sitoplâzmaya saliverilmesi baskılanır (apoptozisin inhibisyonu) (24).

### **2.5.6 Bcl-2 Ailesi:**

Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri pro-apoptotik, apoptozisi indükleyici, etkiye sahiptir. Diğeri ise anti-apoptotik, apoptozisi baskılayıcı, etkiye sahiptir. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplâzmaya saliverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c saliverilmesini baskırlar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik a-heliks) bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cep'i oluşturur. Amfipatik a-heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğ bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesine bağlanırlar.

Pro-apoptotik üyeler kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt grublardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (örn., Bax, Bak), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur. Bu bölgenin, apoptozisin diğ hüresel yollarla "pathway" ilişkisini kurduğu düşünülmektedir. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak "intrinsic" sitokrom c'nin saliverilmesini baskılama özelliğine sahiptir. Bu durumda, pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve sitokrom c saliverilmesi gerçekleşir. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskıladığı oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir. Anti-apoptotik bcl-2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri: bcl-2,

bcl-Xl, Mcl-1 iken, pro-apoptotik olanları ise: bax, bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid'dir. Bcl-2 esas olarak sitoplazmik yerleşime sahiptir ama son yıllarda nukleusda da önemli miktarda bcl-2 bulunduğu gösterilmiştir.



**Şekil 11: Bcl-2 Ailesi**

### 2.5.6.1 Bcl-2 ailesinin mitokondri üzerindeki etkileri:

1. *Bid'in kırılması*: Bid, Bak ve Bax gibi pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyeleri normalde hücrelerde sessiz "latent" halde bulunurlar. Bu proapoptotik üyeler aktive edildiklerinde sitokrom c'nin sitoplâzmaya salıverilmesini sağlarlar. Bid'in kırılmasına, dolayısıyla aktifleşmesine, yol açan etken kaspaz-8'in aktivasyonudur. Aktif kaspaz-8, bid'i kırar; böylece, 15 kDa'luk bir karboksi terminal fragmanı oluşur. Bid ayrıca diğer hücre yüzey ölüm reseptörleri olan TNF ve TRAIL aracılığıyla da aktifleşir. Bid'i "knock out" yapılmış fare hepatositlerinde TNF veya anti-Fas ile apoptozis indüklenmeye çalışılırsa, bu farelerde apoptozis oluşmaz. Bu deney, bid'in hücre yüzey ölüm reseptörlerinden gelen apoptotik sinyalin mitokondriye iletilmesinde rol aldığını, böylece ölüm reseptörleri ile mitokondrinin bağlantısını sağladığını göstermektedir. Oluşan bid fragmanı BH3 bölgesine sahip olduğundan diğer proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerle interaksiyona girerek onların normalde buldukları sitoplâzmadan mitokondriye göç etmelerine (aktivasyonlarına)

neden olur. Bu aktivasyon sonucu, sitokrom c saliverilir. Bid karboksi terminal fragmanı ayrıca, bak-düzenlemeli sitokrom c saliverilmesini de aktifleştirir (23).

2. *Bad'ın defosforilasyonu:* Bad, birçok normal hücrede bulunmaktadır. Bad'ın diğer Bcl-2 ailesi üyeleriyle kompleks yapması fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile düzenlenir. Normal koşullarda, bad yaşam ("survival") faktörlerinin etkisiyle, serin-treonin kinaz Akt/PKB yolu aracılığıyla fosforile durumda tutulur. Fosforile durumda iken antiapoptotik üyelerle kompleks oluşturamadığından onları etkisizleştiremez. Yani, sitokrom c tutucu etkilerini antagonize edemez. Eğer defosforile olursa (örn. yaşam faktörlerinin eksikliği gibi bir nedenle) antiapoptotik üyelerle kompleks oluşturarak antiapoptotik (sitokrom c tutucu) etkilerini ortadan kaldırır. Böylece sitokrom c saliverilmesi gerçekleşir. PI3K'ın inhibe edilmesi (deneysel olarak in vitro LY294002 kullanılarak yapılabilir) de Akt/PKB'nin defosforile edilmesine yol açarak aynı sonucu doğurabilir. Bu inhibisyon mekanizmasının AML'nin tedavisinde yeni bir yöntem olabileceği önerilmiştir (26).

3. *Bim'in mikrotübüllerden saliverilmesi:* Bim, normalde mikrotübüllerle ilişki içinde olan dynein motor kompleksi ile birlikte bulunur. Apoptozis indüksiyonu esnasında mitokondriye göç eder. Pro-apoptotik aktiviteye sahiptir. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplâzmaya saliverilmesi kaspazların aktivasyonuna yol açar.

#### 4. *Bax'ın mitokondriye translokasyonu:*

Bax, diğer pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri olan Bad, Bid ve Bim gibi sitozolde yer alır. Bu 4 pro-apoptotik üye de ölüm sinyalinin alınmasını takiben mitokondriye transloke olarak sitokrom c'nin saliverilmesine neden olurlar.

### 2.5.7 Kaspazlar:

Kaspazlar ("Caspases"), sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağıncı kırarlar. Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve

proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler. Apoptozisde hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler “effectors” olarak bilinirler.

Kaspazların sınıflandırılması:

Kaspaz–1 (ICE)

Kaspaz–2 (ICH–1, Nedd–2)

Kaspaz–3 (CPP32, Apopain, Yama)

Kaspaz–4 (ICH–2, TX, ICE<sub>re,ii</sub>)

Kaspaz–5 (ICE<sub>re,iii</sub>, TY)

Kaspaz–6 (Mch2)

Kaspaz–7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)

Kaspaz–8 (FLICE, Mch5, MACH)

Kaspaz–9 (Mch6, ICE-LAP6)

Kaspaz–10 (Mch4)

Kaspaz–11 (ICH–3)

Kaspaz–12

Kaspaz–13 (ERICE)

Kaspaz–14 (MICE)

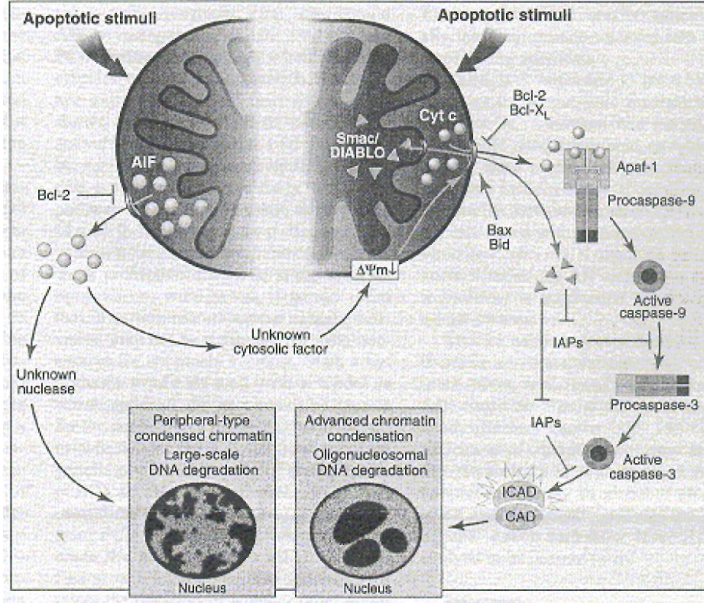
### **2.5.7.1 Kaspazların aktivasyonu:**

İnaktif (zimojen) formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu) ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz–9 bağlayıcı protein olan Apaf-1’in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir.

Apaf-1’in indüksiyonu ise sitokrom c’nin mitokondriden salıverilmesi ile gerçekleşir. Apaf-1’in oligomerizasyonu kaspaz–9 monomerlerinin biraraya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz–9, kaspaz-3’ aktifleştirir.

Mitokondriden ayrıca AIF (apoptosis indükleyici faktör)’ler salıverilir. Bunlar henüz bilinmeyen bazı nkleazları aktifleştirerek DNA degradasyonuna yol açarlar, ama bunların nükleusda yol açtığı morfoloji değişikliği apoptozisde tipik olarak görülen tipde değildir. Daha ziyade, net

olarak seçilebilen sınırlardan ziyade düzensiz sınırlı ve periferik yerleşimli dağınık nükleus parçaları şeklindedir. AIF'le indüklenen nükleer apoptozis ile apoptozom oluşumu yoluyla indüklenen nükleer apoptozis arasındaki morfolojik fark aşağıdaki şekilde görülebilmektedir.



**Şekil 12: AIF'le indüklenen nükleer apoptozis.**

Her dokunun ekspresine ettiği kaspaz tipi farklı olabilir. Fakat kaspaz-3 hemen hemen her dokuda rol alan oldukça universal konumda bir kaspazdır. Bu durumda farklı dokular için farklı kaspazların aktivasyonu yoluyla apoptozisin gerçekleştiği düşünülebilir. Örneğin, periferik T hücreleri ultraviyole ile indüklenmiş apoptozise gitmek için ne kaspaz-3'e ne de kaspaz-9'a gereksinim duyarlar. Oysa embriyonik stem hücreler bu durumda her iki kaspaza da gereksinim duyarlar. Hatta hücrelerin değişik farklılaşma derecelerinde değişik kaspazların aktivasyonuna gereksinim duyulabilir. Örneğin, periferik T hücreleri Fas'ın aktivasyonuna yanıt olarak gelişen apoptozisde kaspaz-3'e gereksinim duyarlar ama timositler kaspaz-3 eksikliğinde yine Fas'la indüklenen bir apoptozise gidebilirler.

### 2.5.7.2 Kaspazların substratları:

Kaspazların parçaladığı çok çeşitli substratları vardır. Bunlar bazen hücre içi sinyal iletiden sorumlu proteinler (örn. çeşitli kinazlar) olabilir. Bazen yapısal proteinler olabilir. Önemli olanlardan bazıları aşağıda gösterilmektedir.

PARP: Poli (ADP-Riboz) Polimeraz'dır. DNA tamir mekanizmasında rol alan bir enzimdir.

DNA-PK: DNA bağımlı bir protein kinazdır.

pRb: Retinoblastoma geninin ürünüdür. Hücre siklusunun durdurulmasında rol alır.

Lamins: Nükleus membranında yer alan yapısal proteinlerdir.

NuMA: Nükleus mitotik apparatus protein.

Fodrin: Hücre iskeletinde yer alan yapısal bir proteindir.

$\beta$ -Aktin: Hücre iskeletinde yer alan yapısal bir proteindir.

Mdm2: Tümör süpressör protein olan p53'ün inaktivasyonunu sağlayan bir proteindir.

Cyclin A2: Hücre siklusunda rol alır, ve siklusun ilerlemesini sağlar.

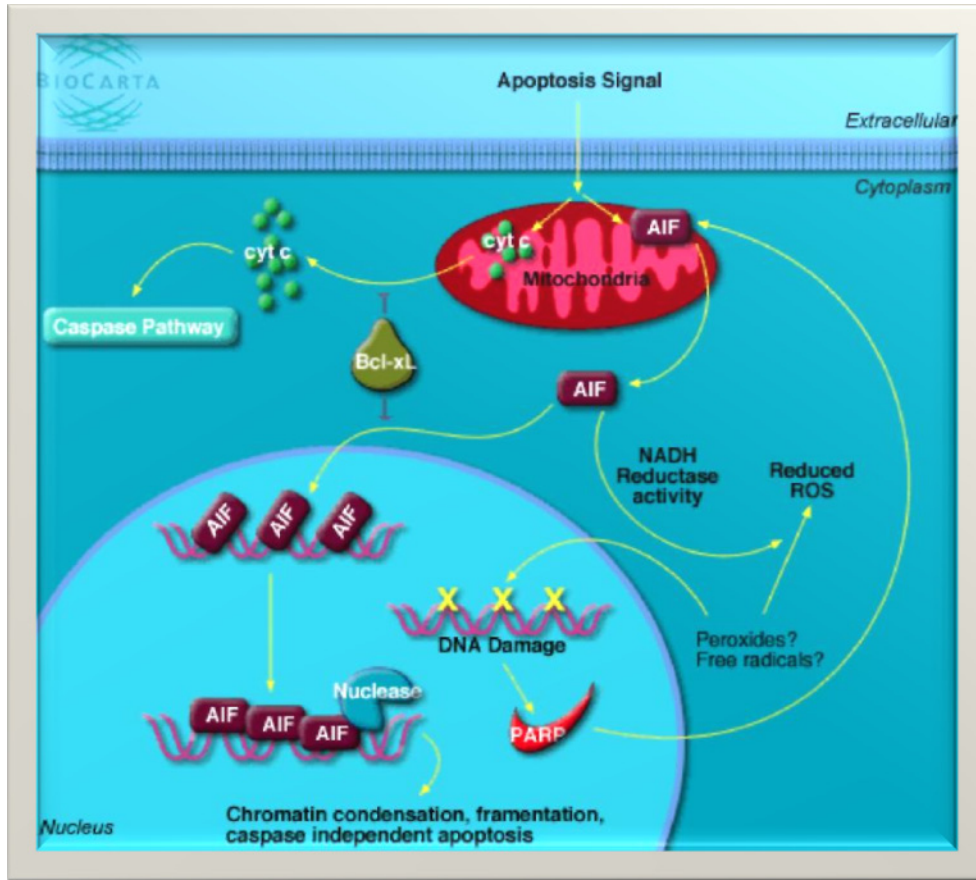
Presenilin: Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda biriktiği görülen bazı bileşiklerdir.

Others: Metabolik aktivitelerden sorumlu bazı kinazlar gibi.

### 2.5.7.3 Kaspazlardan bağımsız apoptozis:

Apoptozis kaspazlara bağımlı olabildiği gibi, bağımsız da olabilir. Yani, kaspazların rol almadığı apoptotik mekanizma da mevcuttur. Bu kaspaz-bağımsız mekanizmada AIF ("Apoptosis-inducing factor") rol oynar. AIF mitokondriden salınır ve nükleusa geçer. Nükleusda bazı henüz bilinmeyen nükleazların indüksiyonuna yol açar.





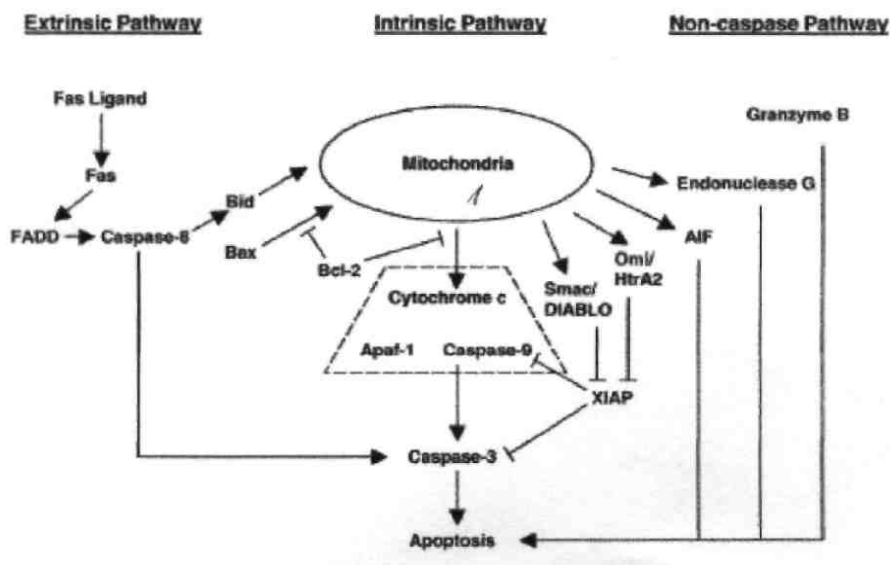
Şekil 13: Apoptozis sinyali

Sonuçta, kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu gelişir. Fakat bu mekanizma sonucu oluşan nükleer değişiklikler yukarıda da bahsedildiği gibi kaspaz bağımlı mekanizmayla (apoptozom oluşumu yoluyla) oluşan değişikliklerden morfolojik olarak farklı olabilir. Bu özellik mikroskopla apoptozis değerlendirilirken hatırlanmalıdır.

### 2.5.8 Apoptozisin İndüksiyonu:

Genel olarak söylemek gerekirse apoptozis, 3 ana yolak ("pathway") tarafından indüklenebilir. a- dışsal ("extrinsic") yolak, b- içsel ("intrinsic") yolak, c- kaspaz-bağımsız ("non-caspase") yolak. Dışsal yolak, ölüm enzimlerinin aktivasyonu sonucu gerçekleşirken, içsel yolak mitokondrinin

aktivasyonu sonucu gelişir. Fakat dışsal yolakla başlayan bir uyarı mitokondriyi de aktifleştirebilir. Bunlardan dışsal ve içsel yolakların kesiştiği nokta kaspaz aktivasyonudur. Bu yüzden, bu iki yolak da kaspazların aktivasyonuna mutlaka yol açarlar. Oysa kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği bir mekanizma da söz konusudur. Bu mekanizma kaspaz bağımsız yolak olarak bilinir. Steroidlerin kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise yol açtığı görülmüştür.

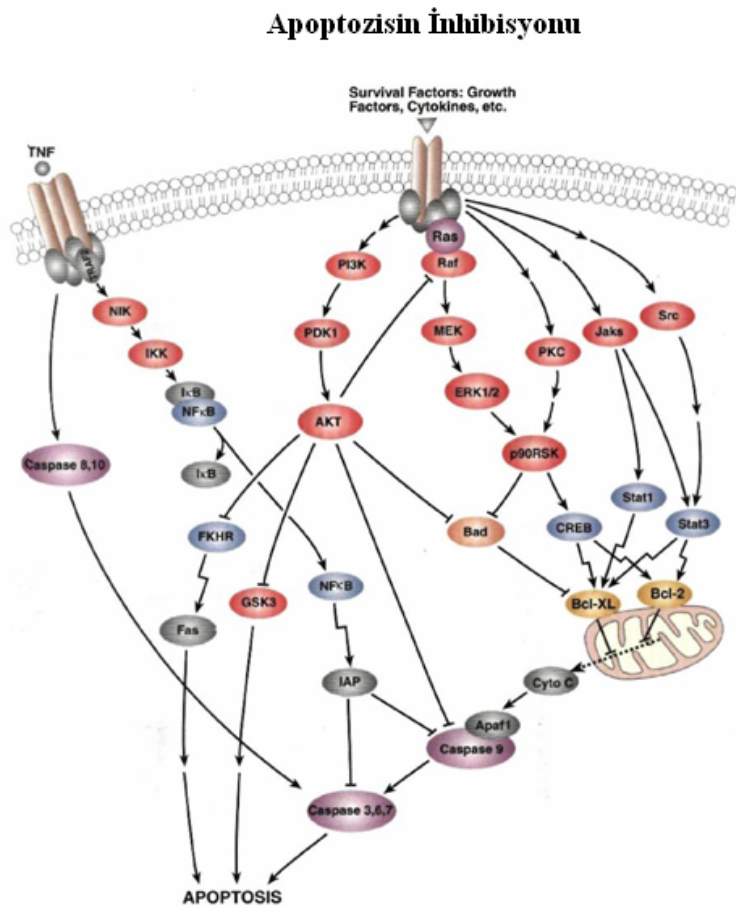


Şekil 14: Apoptozis yolları

### 2.5.9 Apoptozisin inhibisyonu:

Hücrenin yaşaması veya replikatif sürecinin devamı için apoptozisin baskılanması gerekir. Baskılanma başlıca büyüme faktörlerinin ve çeşitli sitokinlerin etkisiyle gerçekleşir. Bunların etkisi ya aktifleşmiş kaspazların inhibe edilmeleri ya da aktivasyonlarının önlenmesi yoluyla gerçekleşir. Yaşam yolağında en önemli unsur PI3K yolağıdır. PI3K, yaşam yolağında önemli bir yeri olan AKT'nin aktivasyonuna yol açar. Aktifleşen AKT pro-apoptotik Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bad'ı inhibe eder, doğrudan kaspaz-9'u inhibe eder veya FKHR ve GSK3 ile ilgili diğer apoptotik yolları inhibe eder.

Ayrıca, birçok büyüme faktörleri ve sitokinler anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini indüklerler. CREB, Stat1 ve Stat2 gibi transkripsiyon faktörleri anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin indüksiyonunda rol alırlar. İndüklenen Bcl-2 ailesi üyeleri sitokrom c'nin salıverilmesini inhibe ettiklerinde kaspaz-9'un aktivasyonu gerçekleşemez. Böylece, ardından gelecek olan kaspaz-3 aktivasyonu da gerçekleşemediğinden apoptozis baskılanır. TNF, kaspaz-8 ve 10 üzerinden sadece apoptozisi indüklemekle kalmaz, ayrıca NF-kB aracılığıyla kaspaz-3, -7 ve -9'un inhibitörü olan apoptozisin inhibitör proteinlerinin (IAP) ekspresyonunu da uyararak apoptozisi baskılayabilir.



Şekil 15: Apoptozisin inhibisyonu

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Deneyde Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Tablo 2: Deneyde Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Manyetik alan jeneratörü	0–1 Watt çıkış gücü ayarlı 2.45 GHz frekanslı manyetik alan jeneratörü (Türkiye)
Santrifüj	Heraus Labofuge 400 (Almanya)
Derin dondurucu	Facis (Fransa)
Otomatik pipetler	Gilson (Fransa)
Vorteks	Nüve NM 100(Türkiye)
BCL–2	ABCAM (Amerika)
BAX	ABCAM (Amerika)
TNF- $\alpha$	ABCAM (Amerika)
KASPAZ–3	ABCAM (Amerika)
KASPAZ–8	ABCAM (Amerika)

#### 3.2. Hormon Kitleri

Total testosteron, Folikül Stümulan Hormon (FSH), Luteinizan Hormon (LH) kemiluminesans kitleri, Beckman&Coulter firmasının üretimleri olup Süleyman Demirel Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastaneleri Hormon laboratuvarı'nda Beckman&Coulter marka Unicell DXI 800 model cihazla CHL yöntemi ile çalışılmıştır. Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Biriminin “proje destek fonu” katkılarıyla ölçümler yapılmıştır.

#### 3.3. Apoptozis kitleri

BCL-2, BAX genleri ve TNF- $\alpha$  KASPAZ-3, KASPAZ-8 enzimleri immünohistokimya kitleri ABCAM firmasının ürünleri olup, Süleyman Demirel Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastaneleri Patoloji Laboratuvarı'nda

immünohistokimyasal boyama yöntemleri kullanılarak preparatlar hazırlanmıştır.

### 3.4. Deney Düzenegi

EMA kaynağı olarak 2.45 GHz 'de çalışan ve 0–1 Watt çıkış verebilen (CW=Continues Wave) EMA jeneratörü kullanılmıştır. 2.45 GHz yarım dalga monopol anten ile ratlara RF elektromanyetik radyasyon uygulanmıştır. RF jeneratör 1 Watt güçte çalıştırılarak monopol anten yakın alanındaki güç yoğunluğunun değişimi Süleyman Demirel Üniversitesi Elektronik ve Haberleşme mühendisliği Elektromanyetik Kirlilik Araştırma laboratuvarında hassas bir şekilde ölçülmüştür. Ölçüm sonucu Şekil 18 'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi monopol anten yakın alanına maruz kalan ratlar ortalama 3.21 W/kg güç yoğunluklu radyasyona maruz bırakılmışlardır. Ratlar 5,5 cm çapındaki plastik tüplere konulmuştur. Plastik tüpün uzunluğu ortalama rat boyu ile orantılı yaklaşık 12 cm olarak seçilmiştir. Tüp içerisine konan ratlar monopol antene eşit mesafede tutulmuşlardır.

**2.45 GHz ISM Bandı (WiFi Haberleşme) frekansında çalışan monopol antenden yayılan 1 Watt enerjinin bir biyolojik dokuda soğurulma hesabı:**

Antenden eşit uzaklıkta tutulan ve aynı anda maruz bırakılan 6 adet rat için tüm vücut ve vücudun değişik dokularında absorbe edilen özgül soğurma oranı (SAR) değerlerinin hesaplanmasında antene olan mesafeler ve doku özellikleri önemlidir.

c boşlukta dalga (ışık) hızı,  $\omega$  açısal hız,  $\epsilon_r$  ortamın bağıl dielektrik sabiti ve  $\mu_r$  ortamın bağıl permeabilitesi (=1) dir. Boşluk için  $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$  ve  $\epsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12}$ .

2.45 GHz te rat dokuları için  $\epsilon_r$ , iletkenlik;  $\sigma$ , özgül ağırlık;  $\rho$  değerleri bilimsel literatürde verilen tablolardan bulunabilir (27).

Verilen doku özellikleri ile

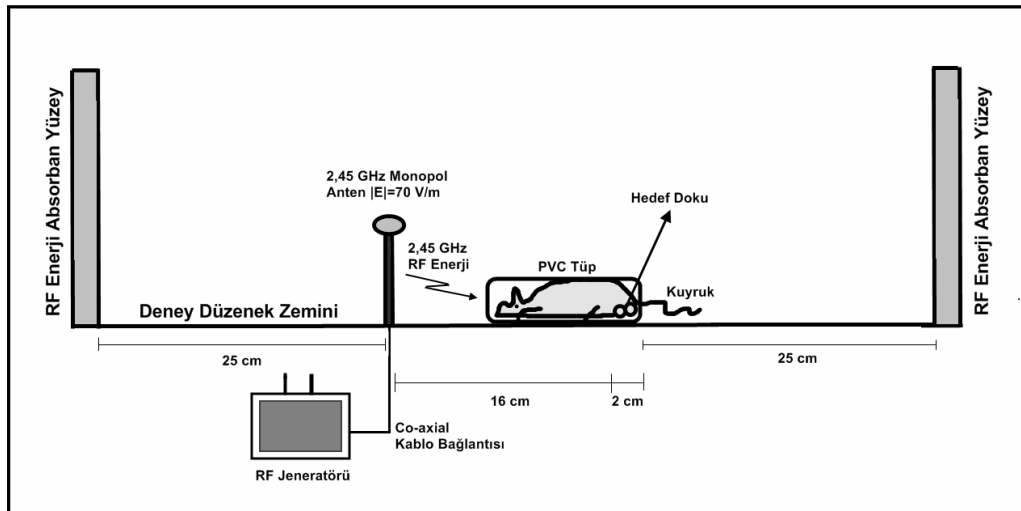
Biyolojik dokular gibi kayıplı ortamlarda radio frekans dalgaları zayıflayarak aşağıdaki yayılma denklemleri ile ilerlerler.

$$\gamma = j \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_r \mu_r} \sqrt{1 - j \frac{\sigma}{\omega \epsilon_0 \epsilon_r}}$$

Burada  $\omega$  dalgalının açısal frekansı,  $c$  ışık hızı,  $\epsilon_r$  ortamın bağıl dielektrik sabiti,  $\mu_r$  ortamın bağıl manyetik permeabilitesi,  $\sigma$  ortamın iletkenliğidir.

$\gamma = \alpha + j\beta$  olarak da yazılabilir. Burada  $\alpha$  ortamın zayıflama,  $\beta$  ise faz katsayısı olarak elde edilir. Bir boşluk ortamında  $|E_0|$  genliği ile ilerlerken, başka bir ortama ideal koşullarla giren dalga yeni ortamda  $|E|$  genliğine alanın hesaplanacak değeridir.  $\gamma_n$ ,  $n$ inci ortamda yayılma değişmezi ve  $d_n$ ,  $n$ inci ortam kalınlığıdır. Ancak bu yayılım denklemleri antenden (kaynaktan) yeterince uzak olan bölgeler için geçerlidir. Yakın alan bölgeleri için Maxwell denklemlerinin yayılım simülasyonunu yapmak gerekir. Bu simülasyonda kullanılacak fiziksel parametreler, antenden ve yansımaz katmandan olan uzaklıklardır. Deney düzeneğinde kullanılan mesafeler Şekil 16'da verilmiştir. 2450 MHz için testis dokuya ait elektriksel iletkenlik ( $\sigma$ )=50 S/m ve bağıl dielektrik sabiti ( $\epsilon_r$ )=50 olarak literatürde verilmektedir (28, 29).

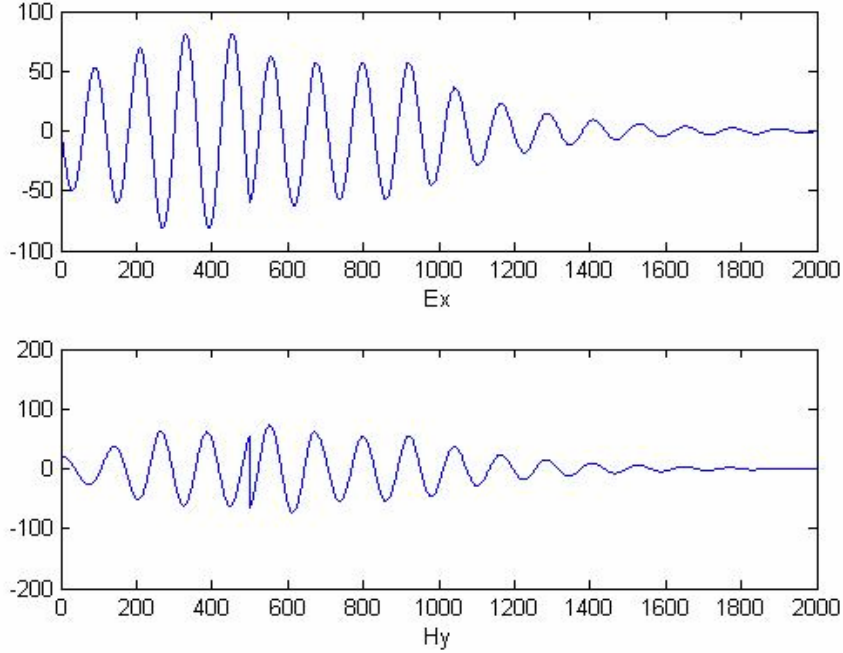
MATLAB<sub>v6.5</sub> ile yapılan 2 boyutlu simülasyonda referans aldığımız anten ve rat yerleşim planı Şekil 16'da görülmektedir.



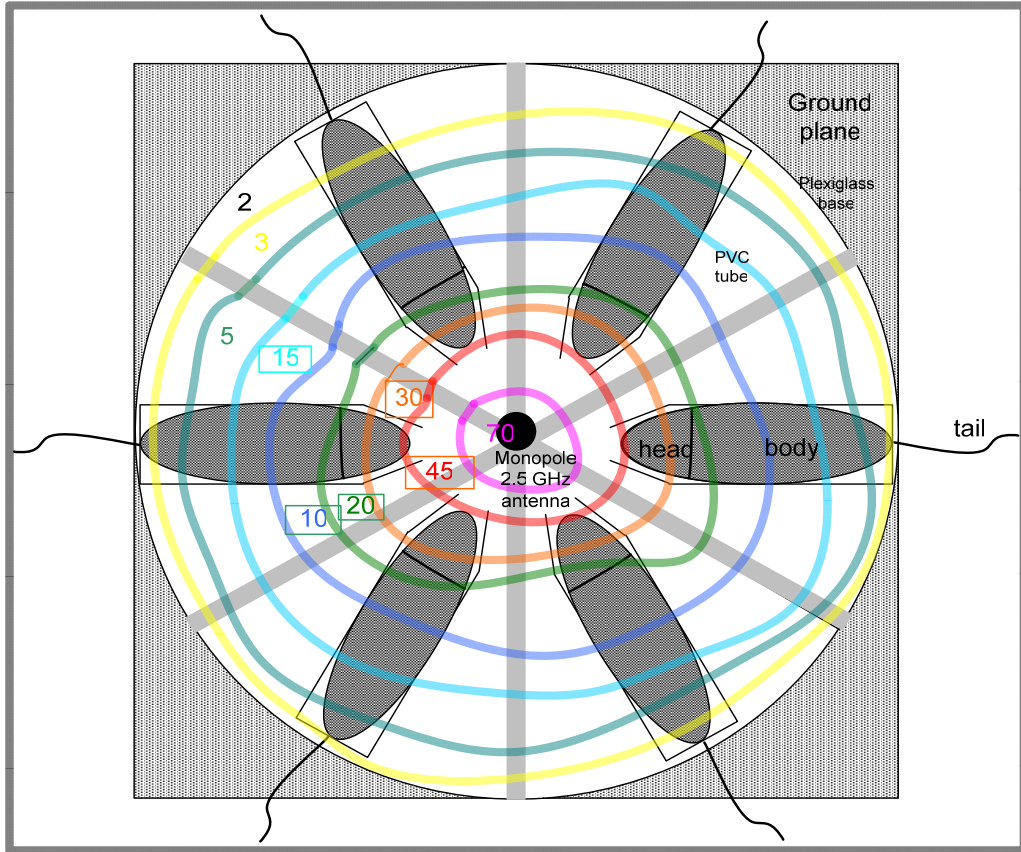
Şekil 16. Deney düzeneği

5000 iterasyon (işlem sayısı ve hızını oranlayan değer) ile yapılan simülasyonda RF enerjinin hedef dokuda oluşturduğu Özgül Soğurma Oranı (SAR) değeri 3.21 (W/kg) bulunmuştur.

Simülasyon yapılırken deney düzeneği esas alınmıştır.



500. noktada kaynak bulunmakta. Kaynaktan 160 mm mesafede testis doku başlamakta ve 180mm de son bulmaktadır. Bu fiziksel ölçümler ortalama değerlerdir. 20 mm boyunca Elektromanyetik dalga hedef dokuda zayıflayarak ilerlemektedir. Simülasyonun karmaşıklığını azaltmak için antenden hemen önce ve rattan hemen sonra ortam RF enerjisi yutucu (absorber) katman kullanılmıştır. Bilimsel literatür incelendiğinde araştırmacıların buna benzer çalışmalarda benzer modellemeleri kullandıkları görülmektedir.



Şekil 17: 2.45 GHz elektromanyetik alana maruz kalma deney düzeneği



Resim 1: Manyetik Alanın Uygulanması



### 3.5. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Gruplandırılması

Çalışmamızda 10–12 haftalık 170–200 gram (gr) ağırlığında, 18 adet Wistar Albino türü erkek rat kullanıldı. Ratlar Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi.

Ratlar;

1.grup: kafes kontrol grubu (n:6),

2. grup: sham kontrol grubu (n:6),

3.grup: 2.45 GHz EMA'ya maruz bırakılan grup (n: 6 ),

oluşturularak ve her grupta 6 hayvan bulunacak şekilde 3 gruba ayrıldı.

Gruplardaki ratların ortalama ağırlıkları, deneye başlamadan önce 170–200 gr arasında değişmekteydi. Gruplar arasında ortalama ağırlık bakımından anlamlı bir fark yoktu.

Deney; Süleyman Demirel Üniversitesi Fizyoloji Araştırma Laboratuvarı ve Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Her çalışma grubundaki ratlar standart mevsimsel ışık ve ısı koşullarında (22° C) bulunduruldu. Ratlara yeteri kadar çeşme suyu ve standart rat pellet yemi verildi.

**I. Grup:** kafes kontrol grubu (n:6):

Bu grup ratlar standart diyet (pellet yem) ile 4 hafta süresince beslendi. Diyet kısıtlaması yapılmadı. İçme suyu olarak, 4 hafta süresince musluk suyu verildi.

Kafesin içinde manyetik alandan uzak bir ortamda bekletilmişlerdir.

**II. Grup:** Sham kontrol grubu (n:6):

Bu grup ratlar standart diyet (pellet yem) ile 4 hafta süresince beslendi. Diyet kısıtlaması yapılmadı. İçme suyu olarak, 4 hafta süresince musluk suyu verildi.

Diğer gruptaki ratların manyetik alana maruz bırakılması sırasında dar kafesin içine sokulmalarından dolayı stres yaşayacakları düşünülerek, kontrol grubundaki ratların da stresi yaşamaması amacıyla, bu gruptaki ratlar, içine ancak bir ratın sığabileceği büyüklükteki pleksiglas kafesin içerisine sokularak, aynı saat ve aynı süreyle kafesin içinde manyetik alandan uzak bir ortamda bekletilmişlerdir.

### III. Grup: 2.45 GHz'e maruz bırakılan grup (n: 6 ):

Standart rat pellet yem ile 4 hafta süresince beslenmişlerdir. İçme suyu olarak, 4 hafta süresince musluk suyu verildi. Manyetik alan maruziyetini sağlamak için yukarıdaki şekilde şeması gösterilmiş olan monopol anten ve içine ancak bir ratın sığabileceği büyüklükteki pleksiglas kafes kullanılmıştır. Bu grup ratlar, pleksiglas kafes içerisinde 3.21 W/kg gücündeki 2.45 GHz frekanslı manyetik alana eşit uzaklıkta günde 60 dakika, olmak üzere 4 hafta boyunca maruz bırakılmışlardır. 4. haftanın sonunda ratlar, 1 günlük bir dinlenme sürecinden sonra dekapite edilmiştir. Her bir ratın her gün aynı saatte manyetik alana maruz bırakılması sağlanmıştır. 4. haftanın sonunda ratlar, 1 günlük bir dinlenme sürecinden sonra dekapite edilmiştir.

### 3.6. Ratların Dekapitasyonu ve Serumun ve Testis dokusunun Ayrılması

Ratlar, deney sonunda Xylazine HCl 10 mg/kg + Ketamin HCl 90mg/kg i.p. uygulamayla anestezi edildikten sonra dekapite edildi. İntrakardiyak kan alındı. Kan örnekleri biyokimya tüplerine nakledildi. Bu örnekler 4000 devir/dk da soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 5 dk. santrifüj edilerek serumları elde edildi ve -80 °C' de çalışmaya hazır halde saklandı.

Daha sonra her bir ratın testis dokusu çıkarılarak fizyopatolojik inceleme için %10'luk formaldehit içerisinde konuldu.

### 3.7. Histopatolojik Çalışma

Her gruptan alınan testisler, Bouin solüsyonunda tespit edildi. Dehidratasyon işleminden sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo 3 ). Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Mikrotomda 5µm kesitler alınarak, Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BX-50) incelendi. Büyük büyütmede (X40) Leydig hücreleri saptandı ve her grupta 100 interstisyel alan tespit edilerek sayıldı.

Bütün gruplara ait preparatlarda Leydig hücrelerinde meydana gelen çekirdek hasarları (piknoz, karyoreksis, karyolizis) incelendi. Seminifer Tübül çaplarındaki etkilenmeyi saptamak için, mikroskoba eklenen oküler mikrometre aracılığı ile her gruba ait tubül çapları ölçüldü. Spermatogenez gelişim aşamalarındaki değişimi değerlendirebilmek için Johnsen Score skorlama yapıldı (30).

**Tablo 3: Histolojik takip serileri**

Sıra	İşlem	Süresi
1	%70 Alkol (x4)	12 saat
2	%80 Alkol	1,5 saat
3	%96 Alkol I	30 dakika
4	%96 Alkol II	30 dakika
5	%100 Alkol I	30 dakika
6	%100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	15 dakika
9	Xylol II	15 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 saat
12	Yumuşak parafin + Sert parafin	1,5 saat
13	Sert parafin	3 saat

### 3.8. İmmünohistokimyasal Çalışma.

Dekapitasyon işleminden sonra çıkarılan testis dokuları %10'luk formalin solüsyonunda tespit edildi. Rutin takiplerden sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardaki testis dokularından 5µm kalınlığında kesitler alınarak, poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine yerleştirildi. preparatlar bir gece 37 C°'lik etüvde bekletildi ve deparafinizasyon işlemi için 20 dak. ksilende bekletildi, absolü alkolde 20 dak. bekletilip distile sudan geçirildi. Antijen retrieval işlemi için kesitler P1 modülle (Labvision) cihazında citrate buffer içerisinde 98 C°'de 20 dak. ısıtıldı. İşlem sonrası 20 dak. oda ısısında citrate buffer içerisinde soğutuldu. distile sudan geçirildi. Kesitlere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen

Peroksit) damlatıldı ve 20 dak. inkübasyona bırakıldı. PBS (pH: 7,6) (Fosfat buffer Saline)'de yıkandı. Ultra V bloking yapıldı. 5 dak. inkübe edildi. kesitlerin üzerindeki bloking solüsyonu Kaspaz-3 (RB-1197-P1 Labvision Freemont, CA,USA) için 1/200 dilüsyon, 30 dak. inkübasyona bırakıldı. Kaspaz-8 (RB-1200-P1 Labvision Freemont, CA, USA) için 1/200 dilüsyon, 30 dak. inkübasyona bırakıldı. Bax Mouse monoclonal (sc- 748-Santa Cruz USA) için. Bcl-2 Rubbit monoclonal (sc-783- Santa Cruz- USA) TNF- $\alpha$  (sc- 1349- Santa Cruz- USA) için 1/100 dilüsyonda 60 dak. oda ısısında inkübasyona bırakıldı. PBS'de yıkandı. sekonder antikor olarak Biotinyloted Goat Anti-Polyvalent (TP-125-BN Labvision Freemont, CA-USA) damlatıldı. strepavidin Peroxidase (TS-125-HR Labvision Freemont, CA-USA) damlatılarak 20 dak. inkübe edildi ve PBS'de yıkandı. DAB Chromojen yapıldı. 5–15 dak. inkübe edildi ve distile suda yıkandı. Mayers hematoksilen ile zıt boyama 15 sn–1 dak. yapıldı ve distile sudan geçirildi. Alkolden geçirilip havada kurutuldu ve ksilene konuldu. Daha sonra entelen kullanılarak kapatma işlemi yapıldı.

Kesitler Olympus BX–50 araştırma mikroskobu ile değerlendirildi. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın şiddeti esas alındı. Sitoplazmik immün boyanmanın şiddeti 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 4).

**Tablo 4: İmmünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun derecesi.**

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Hafif
+2	Orta
+3	Şiddetli

### 3.9. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler, GraphPad InStat 3 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Bağımsız farklı üç grubun karşılaştırılması Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test ile yapıldı.  $p < 0.05$  anlamlı kabul edildi. Sonuçlar aritmetik ortalama  $\pm$  SD olarak verildi.

#### 4. BULGULAR

2.45 GHz Dalga frekanslı elektromanyetik alanın erkek üreme sistemi ve nöroendokrin sistem üzerine olan fizyopatolojik etkisini araştırmak amacıyla yaptığımız bu çalışmada, kontrol ve manyetik alan gruplarına ait hormon düzeyleri tablo 5, 6, 7, 8’de kontrol ve manyetik alan gruplarına ait apoptozis belirlemeleri tablo 9, 10, 11’de verilmiştir.

**Tablo 5: Kafes kontrol grubuna ait serum hormon düzeyleri**

Deney Hayvanı	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	Total Testosteron (ng/mL)
1	0,00	0,00	1,74
2	0,00	0,00	1,97
3	0,00	0,03	3.87
4	0,00	0,00	2.21
5	0,00	0,01	1.92
6	0,00	0,08	3.11

**Tablo 6: Sham kontrol grubuna ait serum hormon düzeyleri**

Deney Hayvanı	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	Total Testosteron (ng/mL)
1	0,00	0,00	1,57
2	0,00	0,00	2,88
3	0,00	0,00	1,97
4	0,00	0,10	1,39
5	0,00	0,00	3,29
6	0,05	0,09	1,89

**Tablo 7: 2.45 GHz EMA maruz kalan gruba ait serum hormon düzeyleri**

Deney Hayvanı	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	Total Testosteron (ng/mL)
1	0,00	0,00	1,82
2	0,00	0,03	1,61
3	0,00	0,00	1,04
4	0,00	0,00	0,91
5	0,00	0,00	1,26
6	0,00	0,02	0,91

Çalışmamızda oluşturulan kontrol ve manyetik alan gruplarına ait ortalama serum hormon seviyeleri ve standart sapmaları toplu halde tablo 8’de gösterilmiştir. Gruplar arası istatistikî anlamlılık (p değerleri) da bu tabloda verilmiştir.

**Tablo 8: Kontrol ve Manyetik Alan gruplarına ait ortalama serum hormon düzeyleri ve standart sapmaları**

Gruplar		Total Testosteron (ng/dL)
	n	
Kafes kontrol	6	0.8394
Sham kontrol	6	0.7543
2.45 GHz EMA	6	0.3820
*p		0.064

Değerler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma olarak gösterilmiştir.

\*  $p < 0,05$

#### **4.1. Kontrol Grupları ile Manyetik Alan Grubunun FSH Değerlerinin Karşılaştırılması**

Deney hayvanlarının serumlarında hormon seviyeleri ölçüldüğünde; manyetik alan uygulanan gruba kontrol grupları arasındaki FSH (mIU/mL)

seviyelerinin ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı olmadığı için dikkate alınmadı.

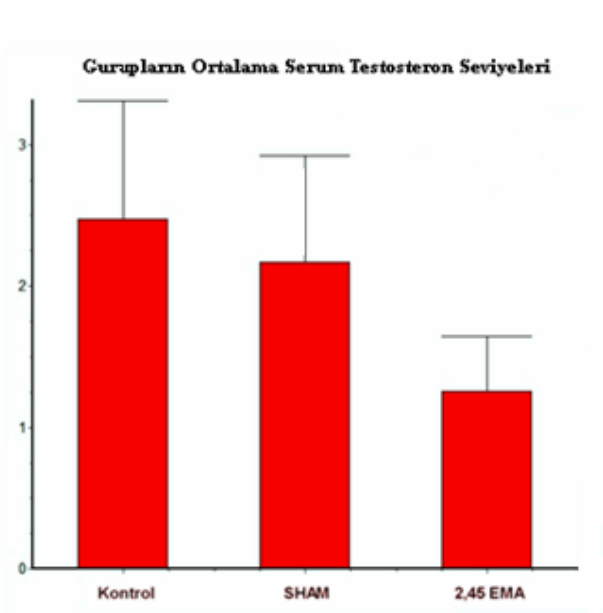
#### 4.2. Kontrol Grupları ile Manyetik Alan Grubunun LH Değerlerinin Karşılaştırılması

Deney hayvanlarının serumlarında hormon seviyeleri ölçüldüğünde; manyetik alan uygulanan gruba, kontrol grupları arasındaki LH (mIU/mL) seviyelerinin ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı olmadığı için dikkate alınmadı.

#### 4.3. Kontrol Grupları ile Manyetik Alan Grubunun Total Testosteron Değerlerinin Karşılaştırılması

Deney hayvanlarının serumlarında hormon seviyeleri ölçüldüğünde; manyetik alan uygulanan grubun Total Testosteron seviyesi (IU/mL) kontrol grupları ile (IU/mL) karşılaştırıldığında, manyetik alana maruz bırakılan grubun Total testosteron seviyesi seviyesinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ( $p < 0,05$ ).

**Grafik 1: Kontrol ve Manyetik Alan grubunun testosteron düzeyleri**

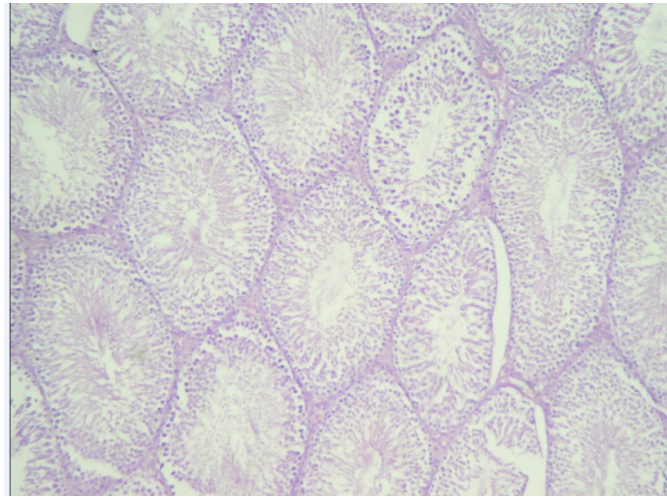




#### 4.4. Histopatolojik Bulgular:

Hematoksilen-Eozin ile boyanan preparatlar incelendiğinde, kontrol grubuna ait testis dokularının normal yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 18). Seminifer tübül çapları ölçülüp değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

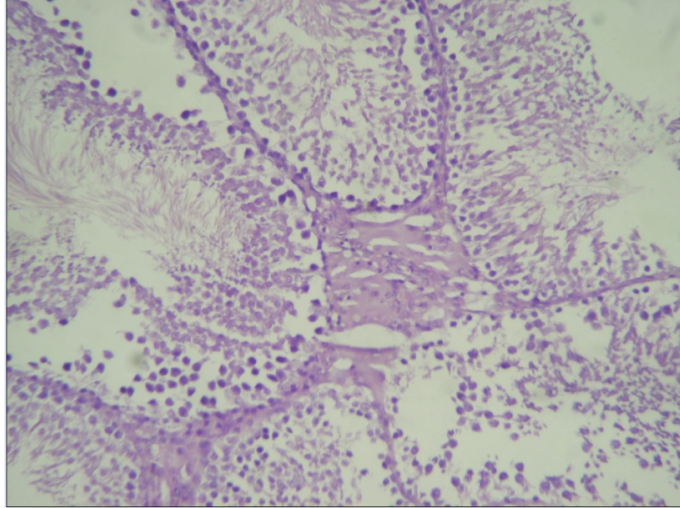
	Kontrol	SHAM	EMF	p
<b>Seminifer Tübül</b>	294,33 ± 28,35	284,91 ± 25,73	293,91 ± 20,75	0,07



**Şekil 18: Kontrol grubuna ait sıçan testisinin genel görünümü (X40,H&E).**

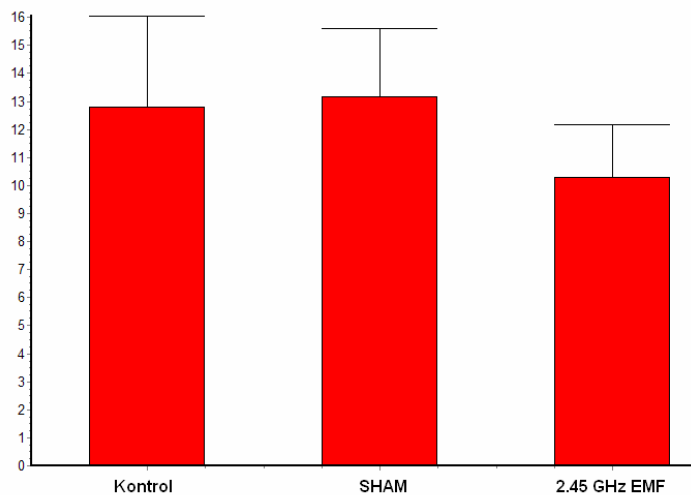
2.45 GHz EMA grubundaki sıçanlara ait testis dokularındaki Leydig hücre sayısı kontrol ve sham grubundaki sıçanlardaki Leydig hücre sayısı ile karşılaştırıldığında 2.45 GHz EMA grubundaki sıçanların Leydig hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ( $p < 0,001$ ).

	Kontrol	SHAM	EMF	p
<b>Leydig Hücre Sayısı</b>	12,78 ± 3,26	13,18 ± 2,41	10,3 ± 1,88	0,0001



**Şekil 19: 2.45 GHz EMA grubuna ait sıçan testisinde Leydig Hücreleri (X40,H&E).**

**Grafik 2: Tüm gruplara ait Leydig hücre sayıları (\*  $p < 0,001$ , diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).**



Kontrol grubundaki sıçanlardaki piknotik (çekirdeği büzölmüş), karyotik (kromatin bazofilisinin kaybolması) ve karyolektik (piknotik çekirdeğin parçalanması) hücreler 2.45 GHz EMA grubundaki hücreler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. ( $p < 0,606$ ).

Sham grubundaki sıçanlardaki piknotik karyotik ve karyolektik hücreler 2.45 GHz EMA grubundaki hücrelerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. ( $p < 0,606$ ).

Kontrol grubundaki sıçanların testis dokusunda yapılan Johnsen skorlama 2.45 GHz EMA grubundaki ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. ( $p < 0,0001$ ).

Sham grubundaki sıçanların testis dokusunda yapılan Johnsen skorlama 2.45 GHz EMA grubundaki ki ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.5. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Her gruptan alınan testis kesitleri, immünohistokimyasal olarak monoklonal Bcl-2, Bax, TNF- $\alpha$ , Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 ile boyanarak incelendi.

**Tablo 9: Kafes kontrol grubuna ait apoptozis belirleme sonuçları.**

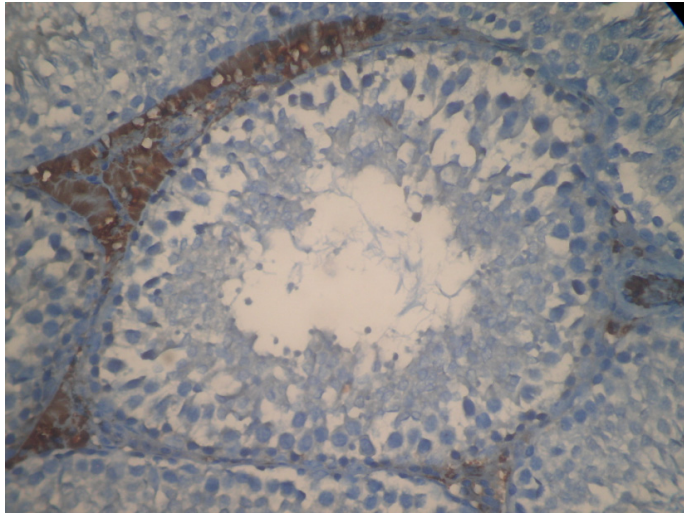
Deney Hayvanları	BCL-2	BAX	TNF- $\alpha$	KASPAZ-3	KASPAZ-8
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-

**Tablo 10: Sham Grubuna ait apoptozis belirleme sonuçları.**

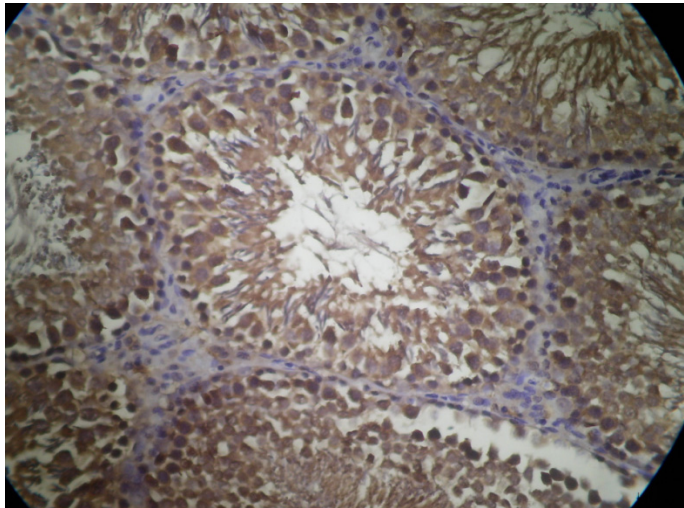
Deney Hayvanları	BCL-2	BAX	TNF- $\alpha$	KASPAZ-3	KASPAZ-8
1	-	+++	-	-	+++
2	-	+++	-	-	-
3	-	+++	-	-	-
4	-	+++	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-

Tablo 11: 2.45 GHz EMA maruz kalan gruba ait apoptozis belirleme sonuçları.

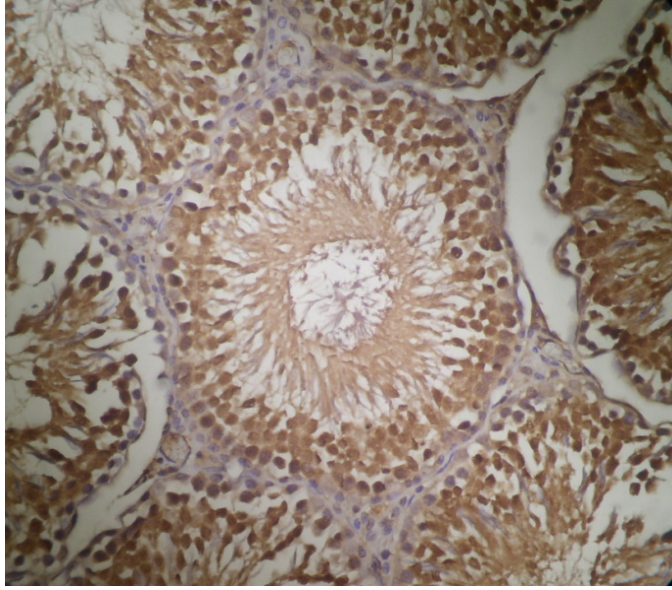
Deney Hayvanları	BCL-2	BAX	TNF- $\alpha$	KASPAZ-3	KASPAZ-8
1	+++	+++	-	+++	+++
2	-	+++	-	+++	+++
3	-	+++	-	-	+++
4	-	+++	-	-	-
5	-	+++	-	-	-
6	-	-	-	-	-



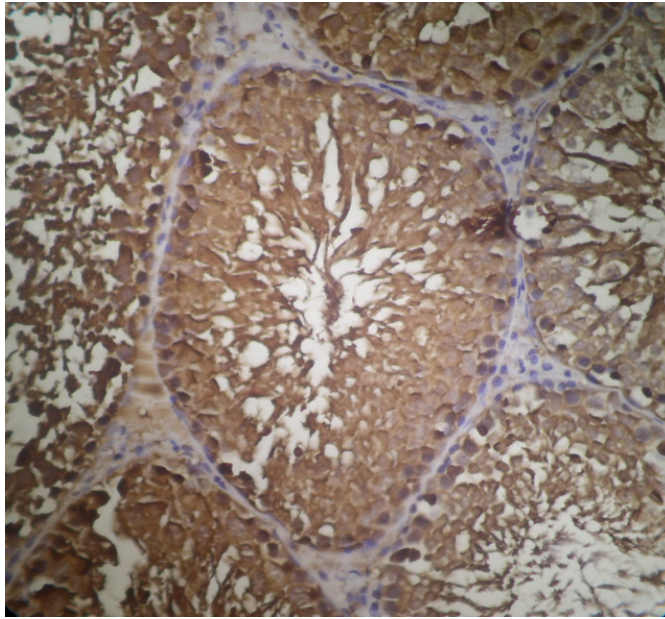
Şekil 20: Kontrol grubuna ait immünohistokimyasal boyama (X40).



Şekil 21: 2.45 GHz EMA grubuna ait Bax (+++) geni belirleme boyanması (X40).



**Şekil 22: 2.45 GHz EMA grubuna ait Kaspaz-3 (+++) enzimi boyanması (X40).**



**Şekil 23: 2.45 GHz EMA grubuna ait Kaspaz-8 (+++) enzimi boyanması (X40).**

Bcl-2 apoptozis geni kontrol grubu ve 2.45 Ghz EMA grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p < 0,2045$ ).

Bcl-2 apoptozis geni Sham grubu ve 2.45 Ghz EMA grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p < 0,1923$ ).

Bax apoptozis geni kontrol grubu ve 2.45 Ghz EMA grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,0001$ ).

Bax apoptozis geni Sham grubu ve 2.45 Ghz EMA grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p<0,4643$ ).

TNF- $\alpha$  apoptozis enzimi kontrol grubu ve 2.45 Ghz EMA grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

TNF- $\alpha$  apoptozis enzimi sham grubu ve 2.45 Ghz EMA grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Kaspaz-3 apoptozis enzimi kontrol grubu ve 2.45 Ghz EMA grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p<0,606$ ).

Kaspaz-3 apoptozis enzimi sham grubu ve 2.45 Ghz EMA grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,0097$ ).

Kaspaz-8 apoptozis enzimi kontrol grubu ve 2.45 Ghz EMA grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,0048$ ).

Kaspaz-8 apoptozis enzimi sham grubu ve 2.45 Ghz EMA grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p<0,0739$ ).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Total testosteron'un spermatogenezde görevi testis dokusunda germinal hücrelerin bölünmeleri ve spermin gelişimi üzerine etkisidir. Ön hipofiz hormonu olan FSH ve LH'in spermatogenezdeki görevi ise; FSH sertoli hücrelerini uyarır ve böylece spermatidlerden sperm oluşumunu hızlandırır. LH testiste interstisyel leydig hücrelerinden testosteron salınımını uyarır. Bu nedenlerden dolayı FSH ve LH düzeylerini ölçtük. Spermatogenezde bu üç hormonun fonksiyonları ve EMA'dan etkilenmelerini görmek için birlikte değerlendirdik. Histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler, gruplar arasında morfolojik özellikler ve apoptotik süreçte rol alan apoptotik faktörler araştırıldı.

Total Testosteron hormonu sonuçlarını değerlendirdiğimizde, Margonato ve ark. 242 erişkin rat üzerinde yapmış oldukları çalışmada, 25–100 kV/m gücünde 50 Hz frekansında elektrik alana 280, 440 ve 1240 saat süresince maruz bırakmıştır. Deney sonunda, bu üç grubun plazma LH, FSH, testosteron hormon seviyeleri ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır (31).

Navakatikian ve ark. düşük yoğunluktaki mikrodalga tarafından, testosteron ve insülin sekresyonunun inhibe edildiğini göstermişlerdir (32).

Özgüner ve ark. yaptıkları çalışmada 900 MHz manyetik alanın ratlarda oluşturduğu biyolojik ve morfolojik etkilerini incelemişlerdir. Total Testosteron seviyesinde anlamlı azalma, FSH ve LH seviyelerinde anlamlı fark saptamamışlardır. Ayrıca Johnsen skora, germinal epitelyum ağırlığı, testis dokusu ağırlığı ve Leydig hücrelerinin interstisyel doku yüzdesi değerlendirildiğinde anlamlı fark saptamamışlardır. Seminifer tübül çapında anlamlı fark saptamamışlardır (6).

Bizim yapmış olduğumuz deneyde 4 hafta boyunca haftada 7 gün ve günde 60 dakika 3.21 W/kg gücünde 2.45 GHz dalga frekansında EMA' ya maruz bırakılan ratların, serum hormon değerlerinden FSH ve LH değerlerinde bariz değişiklik gözlenmezken, testosteron değerlerinde

değişiklik saptandı. Total testosteron seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Manyetik alanın akut olarak uygulandığı bazı çalışmalarda hormon düzeylerinin değişmediğine dikkat çekilmiştir. Çünkü bu çalışmalarda akut olarak uygulanan manyetik alana maruziyet söz konusuysen bizim çalışmamızda stresle karakterize olan 4 haftalık kronik manyetik alan uygulanmıştır.

Histopatolojik değişiklikler değerlendirildiğinde; Fahim ve arkadaşları yaptıkları çalışmada testiküler sıcaklığın 15 dakika için 45°C'ye 5 dakika için 65°C'ye yükseldiği şiddette 2450 MHz mikrodalga radyasyonu farelere uygulamıştır. Her iki uygulamada en azından 10 ay infertiliteye neden olmuş, diğer taraftan 5 dakikalık 39°C testikular sıcaklık artışına neden olan düşük şiddetteki mikrodalga radyasyon uygulaması yaklaşık iki hafta kadar süren ve uygulama yapılan hayvanların %30'unda oluşan bir steriliteye neden olmuştur. Akut testiküler sıcaklığın 39°C'ye yükselmesi ile birlikte görülen kısa süreli sterilite, spermatogenik hücre populasyonlarında irreversibl fonksiyonel değişiklikler olmadığını göstermiştir. (33)

Saunders ve Kowalczyk fare testisi üzerine 2.45 GHz akut far-field mikrodalga uygulamasının etkisini araştırdıkları çalışmada erkek C3H fındık faresine bir anechoic chamber içinde 2.45 GHz mikrodalga uygulaması yapılmıştır. Yapılan uygulamanın güç yoğunluğu ve uygulama süreleri  $1000 \text{ Wm}^{-2}$  260 dakika olup testisteki doz oranları  $66 \text{ Wkg}^{-1}$  ile  $7 \text{ Wkg}^{-1}$  arasında değişmiştir. Uygulamadan 6 gün sonra fındık fareleri öldürülmüş ve testisler histolojik olarak değerlendirilmiştir. Kantitatif olarak X-ışınına duyarlı hücrelerde (spermatozidler tip B) ile ısıya duyarlı hücrelerde (erken primer spermatozidler, geç primer ve sekonder spermatozidler) ve sperm miktarında anlamlı etkiler görülmemiştir. Bu sonuçların insanlara uyarlanması için  $100 \text{ Wm}^{-2}$ 'lik maksimum müsaade edilebilir uygulama düzeyinde yapılan akut uygulamanın 1 ile 3,5 MHz aralığında ve 300 MHz ile 100 GHz aralığındaki frekansların testis üzerinde etkisinin olmadığını bu araştırmacılar ileri sürmüşlerdir. (34)

2.45 GHz (CW) mikrodalga ile ratların skrotal bölgesinin ısıtılması daha sonra 36, 38, 40 ve 42 °C'lik sıcak su immersiyonu ile karşılaştırıldığında her bir sıcaklıkta karşılaştırılabilir tahribat olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, kronik



düşük düzeydeki uygulamaların küçük hayvanların testisinde ölçülebilir sıcaklık artışı olmaksızın spermatogenez ve üreme fonksiyonunda bozulmalara neden olabileceğine dair, raporlar mevcuttur (35).

2450 Mhz manyetik alanın fertiliteye etkilerinin incelenebilmesi için mikrodalga'nın testikular fonksiyonelliği üzerindeki etkilerini ve testisin ürettiği sperm miktarı parametrelerinin dikkate alınması gerekir.

İn vivo olarak rat epididimisindeki spermatozoa'ya mikrodalga ışınlamasının etkisini araştıran Limin ve arkadaşları 300–450 gr ağırlığındaki farelerin unilateral epididimisine 2450 MHz mikrodalga radyasyonu 30 dakika uygulamıştır. Skrotal sıcaklık 30 dakika içinde 42 °C'ye yükselmiştir. Kontro-lateral testis mikrodalgayı engelleyen materyal ile kaplanarak korunmuştur. Çalışma ışınlamadan sonraki 1, 4, 7, 15 ve 28. günlerde elde edilen kauda epididimal spermier değerlendirilerek yapılmış olup sonuçlar sperm yüzdesinin ve bilateral cauda epididimisteki spermier toplam miktarının azalma eğilimi gösterdiği bulunmuştur. Işınlanan lateraldeki tüm bu değişiklikler 4, 7, 15 ve 28. günlerde oldukça belirginmiştir (Kontro-lateral ile karşılaştırıldığında) ( $P<0.05$ ). Sonuçta epididimise uygulanan mikrodalga ışınlamasının sperm olgunlaşma işlemini ve sperm depolama ortamını değiştirebildiği ileri sürülmüştür. (36)

Saunders ve arkadaşları yaptıkları çalışmada erkek C3H farelere 2.45 GHz frekansla sürekli mikrodalga radyasyonu günde 6 saat 8 hafta boyunca toplam 120 saat uygulamıştır. Çalışmada birçok organizasyonlar tarafından zararlı biyolojik etkilerin eşiği olarak kabul edilen 4 W/kg SAR değeri kullanılmıştır. 2.45 GHz frekanslı mikrodalga radyasyonunu kronik olarak erkek findik farelere uygulanmasının erkek germ hücrelerindeki mutajenik yanıtı indüklendiğine ilişkin bulgunun olmadığı ortaya konmuştur. (37)

Hail ve arkadaşları yaptıkları deneyde hindi spermierine sıcaklığı kontrol edilebilen 2.45 GHz frekanslı mikrodalga radyasyonu uygulamıştır. Sıcaklık 25 ve 40.5 °C'de sabit tutulmuştur. Spermier, 10 ve 50 mW/g SAR düzeyinde 30 dakika süreyle mikrodalga uygulanmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular, bu deneylerde kullanılan koşullarda mikrodalga radyasyonunun Hindi spermierinin fertilizasyon kapasitesinin etkilemediğini göstermiştir (38).

Özgüner ve ark. yaptıkları çalışmada; Orşiopeksiden sonra inmemiş testiste elektromanyetik alanın etkisini incelemiştir. 50 Hz manyetik alan uygulamasından sonra inmemiş testis grubunda operasyon sonrası testosteron seviyesininin azaldığını saptamıştır. Bununla birlikte inmemiş testis+manyetik alan ve kontrol grupları arasında anlamlı fark olmadığını bulmuşlardır (39).

Normal ve mikrodalgayla ışınlanmış farelerdeki germ hücre dejenerasyonunu araştıran Johnson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Spraque-Dawley farelere frekansı 1.3 GHz ve SAR: 6.3 mW/g olan pulsu modüle edilmiş (600 puls/sn, 1 usn puls genişliği) mikrodalga radyasyonu ile günde 6 saat 9 gün boyunca ışınlama yapmışlardır. Işınlamadan sonraki 6.5, 13.0, 26.0 ve 52. günlerde fareler feda edilmiştir. Plazma FSH ve LH konsantrasyonları, nuklear çekirdek, parankimdeki çekirdeğin yüzdesi, farklı hücrelerin yaşam süresi ayrıca günlük potansiyel sperm üretimi yuvarlak çekirdekli spermatidler, preleptoten veya pakiten primer spermatositler type B spermatogonia için belirlenmiştir. Test edilen parametrelerde ışınlamayı izleyen zaman periyotları arasında farklılıklar bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). Pakiten spermatositler baz alındığında testis başına sperm üretimi dışında ( $P<0.05$ ), mikrodalga ışınlamasının araştırılan diğer parametreler üzerine etkisinin olmadığı saptanmıştır (40).

Saunders ve Kowalczyk yaptıkları deneyde 2.45 GHz mikrodalga radyasyonunun ve ısının farelerin spermatogenik epitelyumuna etkisini araştırmışlar. Anestezi edilen erkek C3H fındık faresinin vücudunun arka yarısına 2.45 GHz uygulama yapılmış ve testisler üzerinde oluşan etkiler direkt ısınmayla karşılaştırılmış. Gözlenen etkilerin mikrodalga uygulamasının primer etkisinin ısı tahribatı olduğu hipotezine uygun olduğu tespit edilmiş. Uygulamadan sonraki 6. günde belirlenen tahribat spermatositlerin azalmasından germinal epitelyumun geniş bir şekilde nekrozuna varan ciddi aralıkta olduğunu göstermişlerdir.. Çalışmada spermatositlerin azalması için gerekli eşik etkinin  $39^{\circ}\text{C}$  olduğu ve  $\text{LD}_{50}^6$  (6 gün sonra hücrelerin %50'sinin öldüğü)'nin ise  $41^{\circ}\text{C}$  olduğu saptanmış. Absorbe olan mikrodalga gücü ile ilgili olarak etki eşiğinin  $20 \text{ Wkg}^{-1}$ 'e karşılık geldiği ve  $\text{LD}_{50}^6$ 'nin ise  $30 \text{ Wkg}^{-1}$  olduğu bulunmuştur (41).

Berman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 2450 MHz sürekli dalgalı mikrodalga radyasyonu ile  $5 \text{ mW/cm}^2$ 'de hamileliğin 6. gününden başlayarak sıçan

90 günlük olana dek, günde 4 saat veya 10 mW/cm<sup>2</sup>'de 90. günden başlayarak 5 gün, günde 5 saat veya 90. günden başlayarak 4 hafta, haftada 5 gün, günde 4 saat uygulama yapılmış. Mikrodalga uygulaması yapılmış erkek sıçanlardan elde edilen bulgular sham uygulaması yapılmış olanlarla karşılaştırıldığında germ hücre mutagenezi ile ilgili anlamlı bulgular dedekte edilmemiştir. (42)

Memeli germ hücreleri üzerine RF radyasyonunun direkt nontermal etkisini araştırmak için Cleary ve arkadaşları in vitro metodlar uygulamıştır. Bu araştırmacılar fare spermatozoalarına izotermal koşullar (37±0.2 °C) altında 0 ile 90 W/kg SAR aralığında 27 ve 2450 MHz sürekli (CW) RF radyasyonu bir saat in vitro olarak uygulamıştır. 50 W/kg veya daha büyük düzeyde yapılan her iki frekanstaki RF radyasyon uygulaması, ışınlanmış epididimal spermin in vitro olarak fare ovumunu fertilize etme yeteneğinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar oluşturmuştur (P<0.05). SAR'ın bu aralığının üzerindeki 27 ve 2450 MHz Frekanslı RF radyasyonunun etkilerinde belirgin farklılıklar dedekte edilmiştir. RF radyasyonu spermatozoa morfolojisi, ultrastüktürü veya kapasitasyonunda dedekte edilebilir etkiler oluşturmamış ve in vitro fertilizasyondaki azalma, indirekt ısı etkisinden daha çok spermatozoa üzerine RF radyasyonunun direkt etkisine bağlanmıştır. Bu sonuca ulaşmada spermin RF uygulaması boyunca ısınmadığı gerçeği ve fare spermatozoalarının ısıya dayanıklılık çalışmalarının sonuçları baz alınmıştır (43).

Moon ve ark. tarafından yapılan çalışmada; 2450 MHz frekansta 1.4 W/kg SAR değerinde 8 haftalık uygulama sonunda, testosteron seviyesinde ve leydig hücrelerinde anlamlı bir fark bulmuşlardır. seminifer tübül çapı, spermatid, sertoli ve spermatogonyum hücrelerinde, Johnsen skorlamada epididimal sperm sayısı ve sperm motilitesinde anlamlı fark bulamamışlardır (44).

Bizim yapmış olduğumuz deneyde 4 hafta boyunca günde 60 dakika 3.21 W/kg gücünde 2.45 GHz dalga frekansında EMA' ya maruz bırakılan sıçanların, Hematoksilen-Eozin ile boyanan testis dokuları incelendiğinde, kontrol grubuna ait testis dokularının normal yapıda olduğu gözlemlendi. Seminifer tübül çapları ölçülüp değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Kontrol gruplarındaki sıçanlarda piknotik, karyotik ve karyolektik hücreler 2.45 GHz EMA grubundaki sıçanlara ait testis dokularındaki söz konusu hücreler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

2.45 GHz EMA grubundaki sıçanlara ait testis dokularındaki Leydig hücre sayısı kontrol ve sham grubundakilerle karşılaştırıldığında, 2.45 GHz EMA grubundaki sıçanların Leydig hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma vardı.

Kontrol gruplarındaki sıçanların testis dokusunda yapılan Johnsen skorlama, 2.45 GHz EMA grubundaki sıçanların ki ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu.

Bu çalışmalarda elde edilen bulgular, Saunders ve Kowalczyk (45)'un çalışmasında ileri sürdüğü ve testislerde oluşan değişikliğin mikrodalga'nın primer etkisinden biri olan ısı tahribatı hipotezi ile uyumludur. Leydig hücre sayısının azalması bize bu hücrelerde manyetik alan etkisi ile meydana gelen tahribatı açıklamaktadır. Total Testosteron seviyesinin düşmesi de aynı şekilde testis dokusunda meydana gelen Leydig hücre hasarı nedeniyle hormon düzeyinin düşmesidir. Johnsen skorlama ile, spermatogenez gelişim aşamaları, değerlendirilmektedir. Sağlıklı kişilerde 10 olarak skorlanan bu değerlere göre, skorlama neticesinde diğer gruplarla manyetik alan grubumuz arasında bu değerlerin anlamlı bulunması bize testiküler dejenerasyon olduğunu göstermektedir.

İmmünohistokimyasal bulgular değerlendirildiğinde; Apoptozisin ATP gereksinimi olan fizyolojik bir süreç olduğu bildirilmiştir (46, 47, 48). Programlanmış hücre ölümü, memelilerde, normal spermatogenezde gereklidir. Apoptozisin, hücresel homeostazı devam ettirdiği ve Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasındaki ince dengeyi koruduğu belirtilmiştir (49). Kaspaz ailesi üyelerinin de seminifer epitelde, apoptozun regülasyonunda merkezi bir role sahip olduğu rapor edilmiştir (50). Yapılan çalışmalar testis germ hücre ölümünün apoptoz yoluyla meydana geldiğini göstermiştir (51, 52).

İn vitro koşullarda hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada ise, Ikeda ve arkadaşları 32,5°C'de inkübe ettikleri testiküler hücrelerde minimal düzeyde DNA fragmantasyonu ya da apoptoz belirlerken, bu ısıyı 43°C'ye yükselttiklerinde apoptozda progressif olarak bir artış saptamış ve 3. gün sonunda %15 daha fazla apoptoz geliştiğini izlemişlerdir. Aynı çalışmada hücre canlılıkları da % 40 oranında azalma göstermiştir (53).

Phil-Ok KOH tarafından yapılan çalışmada; rat testislerinde kontrol grubuyla diabetik grup karşılaştırıldığında diabetik grupta Bax ekspresyonu gözlenmiş. Streptozosinle indüklenmiş diabette testiste caspaz-3'ün aktivasyonu artmış olup DNA bozulmasını içeren bir kısmında, caspaz aktive DNase'in apoptotik hücre ölümüne doğru aktivasyonunu güçlendirdiği bildirilmiştir. Kaspaz-3 aktivasyonu apoptotik hücre ölümü ile morfolojik değişiklikleri indüklemiştir (54).

Çelik ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Radyasyon uygulanmayan kontrol grubundaki sıçanların seminifer tübüllerinde gözlenen spontan apoptoz ağırlıklı olarak spermatogonia ve spermatozoidlerde gözlenmiş ve ortalama Aİ oranı %1,8 olarak bulunmuştur. Yapılan tek yönlü varyans analizinde kontrol grubundaki sıçanlarda bulunan apoptotik indeks oranı diğer iki gruba göre istatistiksel anlamlı fark göstermiştir (p=0,05). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 2 Gy radyasyon alan çalışma gruplarında ortalama Aİ değerlerinde yaklaşık 20 kat bir artış gözlenmiştir. Ortalama Aİ değerleri yalnız 2 Gy radyasyon uygulanan birinci gruba ait sıçanların seminifer tübüllerinde %42, 2 Gy radyasyon ve amifostin uygulanan ikinci gruba ait seminifer tübüllerde ise %37 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, amifostin uygulanmasının apoptotik yanıt üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır (55).

Testiküler dokuda hem spontan hem de hasarlanmaya bağlı germ hücresi ölümünde esas mekanizma apoptotik hücre ölümü olarak belirlenmiştir (56, 57). Hipospermatogenezde ve spermatogenetik aktivitede duraklama olan olgularda apoptotik aktivitenin arttığı ve buna bağlı olarak semen parametrelerinde bozulma olduğu bildirilmiştir (58). Lin ve arkadaşları infertil erkeklerde testiküler doku incelemelerinde artmış apoptoz belirlemiş

ve artmış apoptozun direkt olarak infertilite ile ilişkili olduğunu vurgulamıştır (59). Apoptozda meydana gelen artma ile germ hücrelerde programlı hücre ölümü hızlanmakta ve buna bağlı olarak da hipospermatogenez oluşmaktadır (60). Apoptozun hangi tipte germ hücrelerini daha çok etkilediğini araştıran çalışmalarda primer olarak spermatogonya, erken ve geç spermatositler ile spermatidlerde apoptozun gerçekleştiği bulunmuştur (61). Beumer ve arkadaşları radyasyona bağlı testiküler hasarı germ hücre düzeyinde inceledikleri çalışmalarında spermatogonya'da orta düzeyde apoptoz saptarken, erken ile geç spermatosit ve spermatidlerde ileri derecede apoptoz belirlemiştir (62).

Bu çalışmada 4 hafta boyunca günde 60 dakika 3.21 W/kg gücünde 2.45 GHz dalga frekansında EMA'ya maruz bırakılan sıçanlarda testiküler germ hücre apoptozisi immünohistokimyasal yöntemlerle araştırıldı. Hücre içinde apoptozise yol açan 2 yolak bilinmektedir. Bunlar; intrinsik (mitokondriyal yol) ve ekstrinsik yollardır. İntrinsik yol; irradyasyon, toksine maruziyet veya oksidatif stres gibi hücrede stres oluşturan faktörlerle başlatılır. Bu stres kaynakları Bcl-2 ailesinin mitokondri membranını stabilize veya destabilize eden pro-apoptotik ve antiapoptotik (Bax ve Bcl-XL) üyelerini etkiler. Ekstrinsik yol ise; ekstrasellüler ligandların (Fas-ligand[FasL], tümör nekrozis faktör [TNF]- $\alpha$ ) hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere (Fas, TNF reseptörleri) bağlanması ile aktive olur. Bu reseptörlerin aktive olması ile intrasellüler kaspazlar aktive olarak DNAase enzimini aktive ederler ve DNA parçalanır. Germ hücre apoptozisi (GHA), normal spermatogenezde var olan önemli bir olaydır, fakat testis I/R hasarında bu durum yoğun bir şekilde artar. GHA her iki yolla da stimule edilebilir. Hangi yolun var olduğu etiyolojiye göre değişir (61). Bcl-2 antiapoptotik gen ekspresyonu immünohistokimyasal boyanma ile değerlendirildiği zaman, kontrol grupları ve manyetik alan grubu arasında anlamlı fark bulunmaması, bize bu genin testis dokusunda aktive olmadığını göstermektedir. Bax proapoptotik geni ise kontrol grupları ve manyetik alan grupları arasında karşılaştırıldığında anlamlı bulunması, bize bu oranın Bax lehine bozulduğunu göstermektedir. Apoptozisin ekstrinsik yolu ise TNF-  $\alpha$  ve Kaspaz-3, Kaspaz-8 enzimlerinin kontrol gruplarının

manyetik alan grubu ile karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir. TNF- $\alpha$  kontrol grupları ve manyetik alan grubu ile karşılaştırıldığında anlamsız bulunmuştur. Bu sonuç bize apoptozisin ekstrinsik yolunun aktive olmadığını göstermektedir. Kaspaz-3 enzimi sham grubu ve manyetik alan grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur. Kaspaz-8 enzimi kontrol grupları ve manyetik alan grubu arasında karşılaştırıldığında anlamlı bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar bize; TNF- $\alpha$ 'nın anlamlı olmamasından dolayı manyetik alana maruz kalan gruptaki testis dokusunda apoptozisin başlaması ekstrinsik yolla olmadığını göstermektedir. İntrinsik yolak ise, Mitokondri membranının bütünlüğünün bozulması ile sitokrom C'nin sitoplâzmaya çıkmasına yol açar ve Sitokrom C ise Apaf-1'e bağlanarak sitoplazmik kaspaz'ları aktive eder. Aktive kaspaz'lar ise DNAase enzimini aktive ederek DNA'nın parçalanmasına yol açar ve DNA gerçek apoptozisin bir göstergesi olan 185 bp'lik parçalara ayrılır. Manyetik alanın başlatıcı Kaspaz-8 ve efektör Kaspaz-3 aracılığında Bax geninin ekspresyonu ile testiküler germ hücrelerini apoptozise götürdüğünü göstermektedir. Testiküler germ hücrelerinden spermatozoit seviyesinde apoptozis gerçekleşmektedir. Bu hücrelerin apoptozise gitmesi infertiliteyi etkileyen faktörlerden biri olabilir.

Sonuç olarak 2450 MHz Frekanslı wireless cihazlarının yaydığı EMA'nın sıçanların nöroendokrin sistemi ve testis dokusuna etkileri termal ve stres kaynaklı olabilir. Bizim yaptığımız histopatolojik incelemeler ve apoptozis değerlendirilmesi sonucunda; Johsen skorlama ve Leydig hücre hasarının istatistiksel olarak gruplar arasında fark bulunması testiküler dejenerasyonu göstermektedir. Bax geni ve Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 enzimlerinin anlamlı bulunmasında EMA'nın sıçanların testis dokularında hücreleri apoptozise götürdüğünü kanıtlamaktadır. Bu bulgular EMA'nın testislerde dejenerasyon meydana getirdiğini ve sperm gelişim aşamalarında, özellikle spermatozoit aşamasında hücreleri apoptozise götürdüğünü ispatlamakta ve bununda fertilitiyi etkileyen bir faktör olabileceğini öngörmekteyiz. Ancak, bu konudaki fizyolojik ve morfolojik çalışmaların daha ileri düzeylerde yapılması gerekmektedir.

## 6. ÖZET

Son yıllarda elektromanyetik dalgaların insan sağlığına zararlı etkileri önemli bir tartışma konusu olmuştur. İnternetin kablosuz ağ ile kullanımı her geçen gün hızlı bir şekilde artmakla birlikte günümüzde bu dalgaların insan sağlığına zararları olduğunu bildiren yayınlar vardır. Örneğin nöroendokrin sistem üzerine bir takım yan etkilerinin olduğu tesbit edilmiştir. Bu çalışmada, 2.45 GHz dalga frekansında elektromanyetik alanın sıçan organizmasında oluşturduğu hormonal değişikliklerin ve testis dokusunda meydana gelen apoptozisin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada 18 adet Wistar Albino türü erkek rat kullanıldı. Ratlar kafes kontrol (K), sham kontrol (S), manyetik alan (MA), olmak üzere, her grupta 6 hayvan bulunacak şekilde 3 gruba ayrıldı. MA grubundaki ratlar, 4 hafta boyunca günde 60 dakika  $3,21 \text{ W/cm}^2$  gücünde 2.45 GHz dalga frekansında EMA' a maruz bırakıldı. K grubu da aynı deney ortamında tutuldu, fakat manyetik alan uygulanmadı.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre; FSH ve LH hormonlarında kontrol grupları ve manyetik alan grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). Bunun aksine total testosteron ile Leydig hücre sayısı ve Johsen skorlama açısından yapılan istatistikî değerlendirmede anlamlı farklar bulundu ( $p<0,05$ ). Bax geni ile Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 enzimlerinin karşılaştırılması ile elde edilen Apoptozis sonuçlarına göre kontrol ve manyetik alan grubu arasında anlamlı bir fark bulundu( $p<0,05$ ).

Sonuç olarak wireless cihazlarından yayılan EMA'nın sıçanların nöroendokrin sistemi ve testis dokusuna etkileri termal ve stres yoluyla olabilir. Ancak, bu konudaki fizyolojik ve morfolojik çalışmaların daha ileri düzeylerde yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Testis, Spermatogenez, Manyetik Alan, Apoptozis



## 7. SUMMARY

In recent years, the harmful effects of electromagnetic field to human health had become an important discussion subject. Internet wireless network usage has been quickly ascended with each passing day. Today there are some publication informing these harmful effects. For example detrimental side effects of this field on neuroendocrine system had been determined. The aim of this study is to investigate the hormonal changes and the apoptosis of cells belonging to testis tissue in rats exposed to electromagnetic field having 2.45 Ghz frequency.

In this study 18 male Wistar albino rats were used. Rats were divided into 3 groups (Control, Sham control and Magnetic group) each including 6 individuals. Rats in MA group were exposed to 3,21 W/kg power and 2.45 Ghz Magnetic field 60 minutes every day during 4 weeks. Group K was also exposed to same conditions however magnetic field wasn't applied.

According to the results of this experiment, FSH and LH hormone levels obtained from individuals belonging to Control and Magnetic field groups separately weren't statistically meaningful ( $p > 0,05$ ). On the contrary Total Testosteron, Leydig cell number and Johnsen score are found meaningfully ( $p < 0,05$ ). After the comparison of Bax gene and Caspase-3, Caspase-8 enzymes obtained from the groups for apoptosis evaluation, the results were statistically meaningful ( $p < 0,05$ ).

Consequently, the spreading of EMA from wireless devices may effect rat neuroendocrine system and testis tissue by the way of termal or stress. However, physiological and morphological studies on this issue needs to be done in a more advanced level.

**Key Words:** Testis, Spermatogenesis, Magnetic Field, Apoptosis

## KAYNAKLAR

1. Wlana Org, Education, What is a Wireless LAN? <http://www.wlana.org/learn/educate1.htm>
2. Öztürk E. WLAN kablosuz yerel alan ağı (wireless local area networks) teknolojisinin incelenmesi, mevcut düzenlemelerin değerlendirilmesi ve ülkemize yönelik düzenleme önerisi. Uzmanlık Tezi. Ankara: 2004
3. Hossmann KA, Hermann DM. Effects of electromagnetic radiation of mobile phones on the central nervous system. *Bioelectromagnetics* 2003; 24:49-62
4. Canseven AG, Atalay SN. Manyetik alanın dokuya etkisi. *Bilişim Toplumuna Girerken Elektromanyetik Kirlilik Etkileri Sempozyumu*1999; 89–95
5. Yılmaz H, Kablosuz yerel alan ağlarından kaynaklanan elektromanyetik alanın, işitme üzerine etkilerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul: 2007
6. Özgüner M, Koyu A, Cesur G, Ural M, Özgüner 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(3)
7. Yasser M, Randa MM, Belacy SH, Abou-El-Ela Fadel MA. Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxide and antioxidase activities in human erythrocytes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001; 26:605-608
8. Şeker S, Çerezci O. Çevremizdeki radyasyon ve koruma yöntemleri. Boğaziçi Üniv. Yayınları, İstanbul: 1997
9. Özen Ş. Mikrodalga frekanslı EM radyasyona maruz kalan biyolojik dokularda oluşan ısı etkinin teorik ve deneysel incelenmesi. Doktora Tezi. Sakarya Üniveristesi Fen Bilimleri Enstitüsü Elektronik ve Haberleşme Y Müh, 2003.
10. Şeker S, Çerezci O. Elektromanyetik alanların biyolojik etkileri güvenlik standartları ve korunma yöntemleri. Boğaziçi Üniv. Yayınları, 1991.
11. Jerry L, Ulcek Robert F, Cleveland Jr. Federal Communication Commission Office of Engineering & Technology, Information On Human Exposure To Radiofrequency Fields From Cellular And PCS Radio Transmitters.1997; 65:97-01
12. Sanalan Y. Nükleer Olmayan Radyasyonda Var. Elektromanyetik Kirlilik Etkileri Sempozyum Kitabı, 1-4, 1999.
13. IRPA. Interim Guidelines on Limits of Exposure to Radifrequency Electromagnetic Fields In The Frequency Range From 100kHz to 300 GHz. *Health Physics* 1988; 54(1), 115–123
14. Yüksöksöylemez M, Radyofrekanslı elektromanyetik alanların insan dokularına etkileri üzerine bir inceleme. Yüksek Lisans Tezi. Kayseri: 2005
15. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Dokuzuncu Baskı Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul: 1003-1015, 1996.

16. Ganong WF. Tıbbi fizyoloji. Ondokuzuncu Baskı Barış Kitabevi. İstanbul, 435-458, 1999.
17. Berne RM, Levy MN, Kooppen BM, Stanton BA, Fizyoloji. Beşinci Baskı Güneş Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul: 834-838, 920-946, 2008
18. Çırak AMY, İmir T. Apoptozis. T Klin J Med Soi1995; 15: 319–326
19. Baykal Y, Özet G, Kocabalkan F, Apoptozis ve İmmün Sistem T Klin J Med Sci.1998; 18
20. Kumar V, Catron RS, Robbins SL. Robbins Temel Patoloji. 7. Edisyon. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 11–20; 2003.
21. Kuzey GM, Özdamar OŞ, Zergeroğlu S, temel Patoloji. Güneş Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul: 21-27; 2007.
22. Ayaşlıoğlu E. Apoptoz. T Klin J Med Sci. 2001; 21:57–62
23. Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? Tıp Araştırmaları Dergisi. 2008; 6 (2) :9i -104
24. Takao Ohtsuka, Hoon Ryu, Yohji A. Minamishima, Salvador Macip, Junji Sagara, Keiichi I. Nakayama, Stuart A. Aaronson and Sam W. Lee. ASC is a Bax adaptör and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. Nature Celi Biology. 2004; 6 (2): 121–128
25. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK. Genes and development. 2000; 14,2060
26. Zhao S, Konopleva M, Cabreira-Hansen M, Xie Z, Hu W, Milella M, Estrov Z, Mills GB, Andreeff M. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase dephosphorylates BAD and promotes apoptosis in myeloid leukemias. Leukemia. 2004;18(2):267–75
27. Gabriel C, Gabriel S. Compilation of the Dielectric Properties of Body Tissues at RF and Microwave Frequencies. Brooks Air Force Technical Report. 1996; AL/OE-TR-0037
28. Keshvari J, Keshvari R, Lang S. The effect of increase in dielectric values on specific absorption rate (SAR) in eye and head tissues following 900, 1800 and 2450 MHz radio frequency (RF) exposure. Phys Med Biol. 2006; 21;51(6):1463–77
29. Chou CK, Chan KW, McDougall JA, Guy AW. Development of a rat head exposure system for simulating human exposure to RF fields from handheld wireless telephones. Bioelectromagnetics. 1999; 4.75–92
30. Johnsen SG. Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones 1970; 1: 2–25
31. Margonato V, Veicsteinas A, Conti R, Nicolini P, Cerretelli P. Biologic effects of prolonged exposure to ELF electromagnetic fields in rats.I. 50 Hz electric fields. Bioelectromagnetics 1995 ; 16:343-355
32. Navakatikian MA, Tomashevskaya. Biological effects of electric and magnetic fields. Sources and Mechanisms. 1994. Academic Press
33. Fahim M.S, Failim Z, Der R, Hail D.G, Harman J, Heat in male contraception (hot water 60 °C, infrared, microwave and ultrasound). Contraception. 1975;11: 549–62

34. Saunders R.D and 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
35. Elder J.A, Czerski P.A, Stuchly M.A, Mild K.H, Sheppard A.R. Radiofrequency Radiation in: *Nonionizing Radiation Protection*. Ed Suess M.J. Benvell-Morison, D.A Second Edition. WHO, Copenhagen 1989; 117–173,
36. Limin Y, Zigiang L. And Bangliang Y. Effect of microwave irradiation on spermatozoa of rat epididymis in vivo, *J. West. China Univ. Med. Sci* 1988; 19 (3), 257–260
37. Saunders R.D and Kowalczyk C.I, Beechey C.V, Dunford R, Studies of the induction of dominant lethals and translocations in male mice after chronic exposure to microwave radiation, *Int. J. Radiat. Biol* 1988; 53 (6), 983–92
38. Hail C.A, Mc Ree D.I, Galvin M.J, White N.B, Thaxton J.P, Christensen V.L, Influence of in vitro microwave radiation on the fertilizing capacity of turkey sperm, *Bioelectromagnetics* 1983; 4 (1), 43–54
39. Ozguner F, Dindar H, Yagmurlu A, Savas C, I. Haluk Gokcora I.H, Yucesan S. The effect of electromagnetic field on undescended testis after orchiopexy. *International Urology and Nephrology*. 2002; 33: 87–93,
40. Johnson L, Lebovitz R.M and Samson W.K, Germ cell degeneration in normal and microwave-irradiation Rats: Potential sperm production Rates at different Developmental steps in spermatogenesis. *The Anatomical Record*. 1984; 209 (4), 501–507
41. Saunders R.D and Kowalczyk C.I, Effects of 2.45 GHz microwave radiation and heat on mouse spermatogenic epithelium, *Int. J. Radiat. Biol* 1981; 40 (6), 623–632
42. Saunders R.D and Kowalczyk C.I, Beechey C.V, Dunford R, Studies of the induction of dominant lethals and translocations in male mice after chronic exposure to microwave radiation, *Int. J. Radiat. Biol* 1988; 53 (6), 983–92
43. Cleary S.F, Liu L.M, Graham R and East. J, in vitro fertilization of mouse ova by spermatozoa Exposed Isothermally to Radio-frequency Radiation, *Bioelectromagnetics* 1989; 10, 361–369
44. K.H. Moon, H.J. Shin, H.S. Ahn, J.Y. Kim, S.O. Shin, S.M. Yun, Y.D. H wang. Long-Term Exposure of Rats to 2.45 GHz Electromagnetic Field: Effects on Reproductive Function. *Korean J Urol*. 2007; 48(12):1308–1314.
45. Gasinska A, Hill S, The effect of hyperthermia on the mouse testis, *Neoplasma*. 1990; 37 (3), 357–366
46. Resendes AR, Majo´ N, Segale´s J et al. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 99: 203–213
47. Lifshitz S, Lamprechta SA, Benharroch D et al. Apoptosis (programmed cell death) in colonic cells: from normal to transformed stage. *Cancer Letters* 2001; 163: 229–238
48. Ayaşlıoğlu E. Apoptoz. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi*. 2001; 21: 57–62
49. Said TM, Paasch U, Glander HJ and Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod* 2004; 10: 39–51

50. Tres LL, Kierszenbaum AL. Cell death patterns of the rat spermatogonial cell progeny induced by Sertoli cell geometric changes and Fas (CD95) agonist. *Dev Dyn* 1999; 214:361–371
51. Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif.* 1992; 25: 241–50
52. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: Gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol.* 1993; 7: 643–50.
53. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Repr.* 1999; 61:393–399
54. Phil-Ok KOH Streptozotocin-Induced Diabetes Increases Apoptosis through JNK Phosphorylation and Bax Activation in Rat Testes. *J. Vet. Med. Sci.* 69(9): 969–971, 2007.
55. Karakoyun Ö.Ç, Aras A, Tuğan D. Hekimgil M, Yalman D, Esassolak M. Haydaroglu A. Sıçan germ hücrelerinde radyasyona bağlı apoptoz ve amifostin ile ilişkisi. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2004; 24:142–146
56. Sinha Hikim AP, Rajavashisth TB, Sinha Hikim I, et al. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod.* 1997; 57: 1193–201
57. 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
58. Lin WW, Lamb DJ, Lipshultz LI, Kim ED. Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. *Int UrolNephrol.* 1999. 31(3): 361–370
59. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Giuseppe F, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction.* 2000; 15: 4830–4839
60. Yin Y, Hawkins KL, Devvolf WC, Morgantaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl.* 1997; 18: 159–165
61. Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU, Lock MTW, Tycho KB, Kal HB, Rooij DG. Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development.* 2000; 56: 353–359
62. Görür S, Helli A, Orhan İ, Testis torsiyonu patofizyolojisi ve tedavisinde yenilikler. *İnfertilite Derleme.* 2003; 219–224