

Gebelik Döneminde Elektromanyetik Alana Maruz Bırakılan Ratlarda ve Yavrularda Melatonin'in Tiroid Bezi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Bu çalışmada, günlük yaşamda sık karşılaşılan 50 Hz titreşimli elektromanyetik alanın (EMA), gebelik döneminde anne ve yavru sıçan tiroid bezi üzerine etkilerine ve bu etkilere melatoninin koruyucu etkisi olup olmadığı araştırıldı. Çalışmamızda östrus siklus takibi ardından, gebe kalması sağlanan 28 Wistar albino rat rasgele seçilerek 4 gruba (her grup 7 denek) ayrıldı. Grup I: kontrol, Grup II: sham EMA cihazı çalıştırılmadan denekler 4 saat boyunca bu cihazın içinde tutuldu + Melatonin verildi, Grup III: EMA'a maruz kalan, Grup IV: EMA'a maruz kalan + Melatonin verilen grup. Sıçanlar gebeliğin 8. gününden doğum yapana kadar her gün 4 saat boyunca EMA'a (3 mikT, 50Hz) maruz bırakıldı. Melatonin gebeliğin 8'inci gününden itibaren her gün (grup II ve IV) gündüz saat 10'da 4 mg/kg (0.1 ml/100 g) intraperitoneal (IP) olarak verildi. Melatonin verilmeyen gruplara ise aynı zamanda fizyolojik salin (0.1 ml/100 g) %5 etanol ip olarak verildi. Doğum sonrası, anne sıçanlar ve yeni doğan yavruların rutin histolojik takipten sonra tiroid dokuları alınarak H&E, Mallory anilin Blue, PAS ve immunhistokimya (TUNEL ve Caspase 3) ile boyanarak histolojik değerlendirme ve morfometrik ölçümler yapıldı. Ayrıca ultrastruktürel düzeydeki değişiklikler, transmissiyon elektron mikroskobu ile değerlendirildi. İmmunhistokimya (TUNEL ve Caspase 3) değerlendirmeye göre EMA'a maruz kalan anne ve yavru sıçanlarda hücresel hasarın ve apoptozun artmış olduğu gözlemlendi. Histopatolojik ve morfometrik değerlendirmeye göre, EMA'a maruz kalan sıçanların, kontrol, sham ve EMA'a maruz kalan + Melatonin verilen gruplara göre TUNEL pozitif ve hasarlı hücre sayısının artması, tiroid follikül çap ölçümünde follikül çapların azalması, intrafoliküller kollidin azalması, , interfolliküler bağ dokusunun hacminin artması gibi bulgular saptandı. Tiroid follikül hücrelerin ultrastruktürel analizinde EMA'a maruz kalan grupta, yoğun heterokromatin ve düzensiz çekirdek, sitoplazmada kolloid damlacıkların oluşumu, rER'mda dilatasyon ve silindirikli mitokondriler gibi değişiklikler gözlemlendi. Bu değişiklikler EMA'a maruz kalan + Melatonin alan grupta az olarak saptandı. Statiksel sonuçların değerlendirmesinde EMA'a maruz kalan + Melatonin verilen grup ile EMA'a maruz kalan grubun arasında tamamen anne ratlarda ve kısmen yavru ratlarda belirgin bir fark olduğu bulundu. Sonuç olarak EMA'a bağlı oluşan hasara karşı melatonin'in antioksidan etkisinin, tiroid bezi üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelime: Elektromanyetik Alan, Tiroid bez, Melatonin, İmmunhistokimya

Investigation on the Effects of Melatonin on the Thyroid Gland in Pregnant and Infant Rats Subjects to Electromagnetic Radiation.

In this study, we investigated protective effect of melatonin on thyroid glands in pregnancy period and infant rats subjects to 50 Hz frequents electromagnetic radiation that is frequently encounter in daily life. After monitoring estrous cycle the rats were mated and tested for gestation then 28 Wistar pregnant rats randomly selected and put into 4 groups (each group n = 7): Group I control, Group II sham (keeping rats in EMF apparatus for 4 hours without any exposure to EMF + Melatonin), Group III EMF exposed and group IV EMF exposed + Melatonin. The EMF exposed and sham groups (II and IV groups) had intraperitoneal single dose of a 4 mg/kg melatonin (0.1 ml/100 g) at 10:00 o'clock daily up to the end of gestation. For EMF exposed and control groups had daily intraperitoneal injections of physiologic saline (0.1 ml/100 g) containing 5% ethanol. After birth of rats, mother rats and their infants of thyroid tissues were submitted for histological examination under light microscopy by immunohistochem (TUNEL ve Caspase 3), H&E, Mallory anilin Blue, PAS staining methods and morphometric assays. Also ultrastructural changes were assessed by transmission electron microscope. According to immunohistochem examinations (TUNEL and Caspase 3) in EMF exposed animals were observed cellular damage and apoptosis. Histopathological and morphometric analysis showed a significantly increased number cellular damage and apoptotic cells, decreased diameter assay of thyroid follicles, decreased intrafollicular colloid content in lumen, increased volume of interfollicular connective tissue and in EMF exposed animals compared to EMF exposed + Melatonin, control and sham non-exposed groups. Ultrastructural analysis of thyroid follicular cells in the EMF exposed group showed alterations in mitochondria as slender form, dilatation of granular endoplasmic reticulum, numerous apical lysosomes, finds of several colloid droplets dentate form of cell nuclei with incisions and a higher density of heterochromatin compared to the other groups were also observed. There were statistically significant differences between EMF exposed animals compared to EMF exposed + Melatonin animals groups. Finally results demonstrate that melatonin antioxidant benefits may have a preventive effect against EMF exposed injury on thyroid glands.

Key words: Electromagnetic Fields, Thyroid gland, Melatonin, Immunohistochemistry

2.Giriş:

Modern hayatın bir gerçeği olarak canlılar daima elektrik ve manyetik alanlara (EMA) maruz kalmaktadır. Bu elektrik ve manyetik alanlar, elektriğin üretimi, iletimi ve kullanımı ile meydana gelmektedir. Elektrik ve manyetik alanlar herhangi bir elektrikli aleti çevreleyen görünmez kuvvet çizgileridir. Manyetik alanlar, teller ya da kablolardan akım geçmesi sonucu oluşup, gücü akım arttıkça artmaktadır. Manyetik kirlenme yüksek gerilim hatları, cep telefonları, baz istasyonları, televizyonlar, radyolar, elektrikli battaniyeler ve çeşitli elektrikli ev aletleri gibi kaynakların oluşturduğu manyetik alanlardan kaynaklanır. Manyetik alan oluşturan bu kaynaklar yaşamımızın bir parçası durumundadır ve gittikçe artan miktarlarda kullanılmaktadır. Manyetik kirlenme başta insanlar olmak üzere tüm canlıları etkilemektedir.

EMA'ların kanser, davranış değişiklikleri, hafıza zayıflaması, Parkinson ve Alzheimer hastalıklarını artırmasının yanı sıra, depresyon ve intihar görülme sıklığında artışa neden olduğu bildirilmektedir. Bunlara ek olarak göz, deri ve kas-iskelet sistemi üzerine olumsuz etkileri olduğu bildirilmektedir (1)

Hayvan hücresi üzerinde yapılan deneylerde zayıf manyetik alanın hormon ve enzim seviyesini değiştirmek, dokulardaki kimyasalların hareketini engelleme gibi biyolojik etkenlere sebep olduğu kararına varılmıştır.(2)

Danimarka'da yapılan araştırmalar çocukluk çağında görülen kanserler ile özellikle de lösemiyle iletişim hatlarına yakın yaşama arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (3,4). Elektromanyetik alanların genelde iki etkisinden bahsedilir. Birisi ısı etkisidir diğeri ise kimyasal etkidir. Çünkü yaydığı enerji, insan vücudundan geçerken bir miktar emilir, tutulur ve içerde bir ısı birikimi oluşur. Bu ısı istenmeyen sonuçlara sebep olabilir. İkincinin etkisi ise canlı organizma içindeki birbirine bağlanmış olan molekülleri, atomları etkiler ve bozar (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Organizma kendini tamir eder, düzeltir, ama bir an kontrolden çıkabilir. Kontrolden çıktığında ise basit bir iki hücrenin ölümüne veya kanser gibi ölümcül bir hastalığa neden olabileceğinden şüphelenilmektedir (12, 13, 14, 15, 16, 17). Birkaç araştırmada ortalama değerden yüksek manyetik alanın bulunduğu bölgede uzun süre kalan hamile kadınların zor doğum yaptıkları gözlenmiştir. EMA dalgaların dokular üzerinde iki temel etkisi olan termal etki ve termal olmayan ya da diğer adıyla kimyasal etki bundan sorumlu tutulmaktadır. 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 (18, 19, 20). Yapılan çalışmalarda düşük şiddette EM alanlara maruz kalmanın; biyomoleküllerin (DNA, RNA ve protein) sentezi, hücre bölünmesi, kanser oluşumu, hücre yüzeyine ait özellikler, membrandan kalsiyum giriş-çıkışı ve bağlanması üzerine etkili olduğu gözlenmiştir (21). Biyokimyasal ve fizyolojik olarak yine hücre ve dokularda, hormonların etkilendiği, doku ve hücrelerin hormonal cevabının değiştiği, karbonhidrat, nükleik asit ve protein metabolizmasının değiştiği, yapısal değişiklikler gözlendiği, farklı antijenlere karşı immun cevabın etkilendiği gözlenmiştir (22, 23, 24).

Hassas bir yapıya sahip olan embriyo hücreleri manyetik alandan daha fazla etkilenebilmektedir (25). Araştırmalarda 27.12 mHz radyo frekans dalgalarının sıçanlarda teratojenik etki yaptığını göstermiştir (26). Aynı şekilde bir başka araştırmada embriyonel dönemde EMA'ya maruz kalmanın beynin en fazla manyetik alana maruz kalan temporal ve oksipital bölgelerinde tümör riskini artırdığı ortaya konmuştur (27). Bir başka çalışmada, EMA'ya maruz kalan sıçanlarda, tiroid hormonlarının (T3,T4) seviyesi düşük olarak bulunmuştur (28,29,30) Tiroid bezi üzerine çok az sayıda araştırma yapılmıştır. Bu bezin, gelişimde önemli rol oynaması ve embriyonel dönemde teratojen etkenlere duyarlılık göstermesinden dolayı biz de çalışmamızda EMA'nın gebelik ve yeni doğan dönemindeki etkilerini incelemeyi amaçladık. Tiroid bezi dokuların normal fonksiyonları için gerekli olan optimal metabolizma düzeyini sürdürür. Tiroid hormonları vücutta çoğu hücrelerin hücrenin oksijen tüketimini uyarır, lipid ve karbonhidrat metabolizmalarının düzenlenmesine yardım eder, normal büyüme ve gelişme için gereklidir. Hipofonksiyonunda mental ve fiziksel yavaşlamaya, soğuğa direncin azalmasına, çocuklarda zekâ geriliği ve cüceliğe neden olur (31, 32).

Melatonin yağda ve suda eridiğinden kolaylıkla hücre içine girerek, hidroksil ve lipid radikallerini uzaklaştırır ve böylelikle hem lipid peroksidasyonunun başlamasını hem de ilerlemesini önler (33,34). Melatonin bu iki etkiye sahip olduğu bilinen tek antioksidandır. Melatonin DNA ve proteinleri de serbest radikal hasarına karşı korur. Yüksek derecede toksik etkiye sahip olduğu bilinen hidroksil ve peroksil radikalleri güçlü bir şekilde detoksifiye eder (35,36). Direkt olarak radikal uzaklaştırıcı özelliğine ek olarak melatonin SOD, GPx gibi endojen antioksidan enzim aktivasyonunu da uyardığı ve beynin GPx düzeyini arttırdığı bildirilmiştir (37). Melatoninin Fe, lipopolisakkarid, NO ve kâinat ile oluşan lipid peroksidasyonu baskıladığı bildirilmiştir. Plazma yarılma ömrünün yaklaşık 40 dakika olduğu, serbest radikal varlığında bu değer anlamlı derecede azaldığı ve bu nedenle yüksek

doz uygulamalarda bile olumsuz bir yan etkiye yol açmadığı bildirilmiştir (38). Çalışmamızda, günlük yaşamda çok sık karşılaştığımız 50 Hz titreşimli elektromanyetik alanın, gebelik döneminde sıçan tiroid bezi üzerine etkilerine ve bu etkilere melatoninin olası koruyucu etkisinin histoloji, immunhistokimyasal ve ultrastrüktürel olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için de hem anne ratların hem de doğduktan sonra yavru ratların tiroid dokuları alınarak histolojik, immunhistokimyasal ve ultrastrüktürel analizler yapılmıştır.

3. GENEL BİLGİLER

2.1. Tiroid Bezinin Embriyolojisi

İnsanda embryonik gelişim sırasında brankial arkus ve faringeal poşlar gelişirken, yaklaşık 24. günde primitif farinksin tabanında orta hatta birinci ve ikinci poşlar arasında kalan bölgede, tiroit bezi bir divertikül şeklinde başlar ve ventrale doğru büyür. Divertikülün ağzı dil köküne açıktır ve foramen caecum adını alır. Embriyolojik olarak primitif mide barsak sisteminin bir uzantısıdır. Divertikülün distal lümeni hücrelerin hızla çoğalmasıyla kapanırken hem ventrale hem de her iki laterale doğru büyümeye devam ederek iki loblu tiroid haline döner ve boyun orta hattında hiyoid kemik ve larinksi oluşturacak yapıların önünden aşağıya doğru inmeye başlar (39). Altıncı haftadan itibaren; üçüncü faringeal poşun dorsal bölgeleri alt paratiroidlere, ventral bölgeleri ise primitif timusa döner. Dördüncü faringeal poş da dorsal ve ventral olarak iki kısma ayrılır. Dorsal kısım üst paratiroidleri, ventral kısımlar nöral kristadan gelen hücrelerle beraber ultimobrankial cismi oluşturur. Tiroid aşağı doğru inerken dördüncü ve beşinci faringeal poşların ultimobrankial cisimlerinden köken alan lateral komponentler katılır. Bu lateral komponentler tiroidin kalsitonin salgılayan C hücrelerini (parafoliküler) oluşturur (39, 40). Alt paratiroidler timusla beraber farinks duvarından ayrılıp; kaudal ve medial bölgelere doğru gider ve daha sonra timustan ayrılarak tiroidin alt bölgesi civarına yerleşir. Timus ise alt boyun ve mediastene iner (39, 40, 41). Tiroid kaudale doğru inerken, divertikülün açık kalan kısmı uzayarak tiroglossal kanal adını alır. Kanal, çoğunlukla dejenerasyona uğrayarak kaybolur ve yedinci hafta sonunda tiroid son şeklini alır. Tiroid gelişimindeki kritik devre yedinci hafta sonuna kadar olan devre olup, gelişim anomalilerinin çoğu bu sıralarda ortaya çıkar (40,41). Gebeliğin onuncu haftasının sonunda tiroide foliküller oluşur, on ikinci haftanın sonunda da tiroid iyot tutmaya ve kolloid üretmeye başlar. Onüçüncü haftadan itibaren hipofiz ve serumda tiroid stimulan hormon (TSH) belirlenebilir. Onsekizinci haftadan itibaren TSH ve tiroksin (T4) paralel olarak artmaya başlar ve tiroideki iyot konsantrasyonu yüksek düzeylere ulaşır. Yaklaşık otuzbeşinci haftalardan itibaren hipotalamus, hipofiz ve tiroit eksenli fonksiyonel olarak olgun hale gelir. TSH, triiodotironin (T3) ve T4 doğumdan sonra, birkaç hafta içinde erişkindeki normal düzeye ulaşır.

2.2. Tiroid Bezinin Anatomisi

Normal erişkin tiroid bezi, açık kahverengi, sert, 15–20 gram ağırlığındadır. Ortada istmus ile birleşen iki lobdan oluşur. Loblar ortalama 4 cm uzunluğunda, 2 cm eninde ve 2 cm kalınlığındadır. Üstte tiroid kıkırdağına kadar uzanırlar. İnsanların %80'inde bu yapılara ilave olarak; istmustan yukarıya doğru uzanan ve tiroglossal kanalın kalıntısı olan piramidal lob bulunur. Genellikle orta hattın biraz solunda ve tiroid kıkırdağına kadar uzanır. Her bir lob trakea lateralinde yer alıp; superiorunda tiroid kıkırdağı, lateralinde karotis kılıfı ve sternokleidomastoid kası, anteriorunda strep kaslar (sternotiroid ve sternohiyoid) bulunur. Arka medialde, özefagus ve trakea tarafından sınırlanmıştır. Tiroid, normalde komşu organlardan rahatlıkla ayrılabilir konumdadır. Ancak posterior süspansuar ligaman (Berry ligamanı), aracılığı ile krikoid kıkırdak ve üst trakeal halkalara sıkıca yapışıktır ve rekürren laringeal sinirin en çok hasara uğradığı bölgedir (41, 42).

Zuckerland tüberkülü, tiroid bezinin lateral lobunun posterior uzantısı olup, Berry ligamanına komşudur. Tiroidektomi vakalarının %14-55'inde görülmüştür. Cerrahideki önemi; rekürren laringeal sinirin Zuckerland tüberkülünün posteromedialinden seyretmesidir. Ayrıca; total tiroidektomi yapılan vakalarda her iki lobun posteriorunda aranması gerektiği hatırd tutulmalıdır (42). Tiroid bezi, derin servikal fasyanın ön ve arka yaprakları arasında gevşek bir bağ dokusu tarafından sarılır. Tiroid larinkse asılıdır ve trakeaya tutunur. Yutkunma sırasında larinkle birlikte yukarı hareket eder. Tiroidin gerçek kapsülü, tiroide yapışık ve doku içinde de yalancı lobüller oluşturan septaları olan, ince fibröz bir tabakadır. Mikroskopik olarak tiroid; 20–40 folikülden oluşan lobüllere bölünmüştür. Erişkin erkekte, tiroid bezinde yaklaşık olarak 3×10^3 folikül vardır. Foliküller, sferik şekillidir ve ortalama 30µm çapındadır. Her bir folikül, küboidal epitel ile çevrilidir ve merkezinde epitelyal hücrelerden salınan kolloid içerir. Epitelyal hücreler, hipofiz hormonu olan TSH etkisi altında salgılama yaparlar. Tiroidin, ikinci bir sekretuar hücre grubu da C hücreleri ya da parafoliküler hücrelerdir. Bu hücreler; kalsitonin içerirler ve salgırlar. Aynı ayrı hücrelerdir veya interfoliküler stromada, küçük gruplar halinde foliküler hücreler arasında bulunurlar. Tiroid loblarının, üst kutbunda yerleşmişlerdir ve nöroektodermal hücre kökenlidirler. Ultimobrankial gövdeden orijin alır ve Pearse tarafından tarif edilen amin prekürsör uptake ve dekarboksilasyon (APUD) sisteminin bir parçasıdır (40, 42).

2.3. Tiroid Bezinin Histolojisi

Tiroid bezi fibröz bir kapsül ile sarılıdır. Kapsülden ayrılan ince bağ doku uzantıları bezin içerisine girer ve organı lopçuklara ayırır. Birbiriyle bağlantılı olan lopçukların içindeki parankima foliküler düzende organize olmuş, yükseklikleri fonksiyonel aktivite ve içerdiği kolloid miktarına bağlı olarak değişen tek katlı kübik epitelden oluşur. Folikül epitel hücrelerinin bazal yüzeyleri bazal lamina ile sarılıdır (43). Bu bölgede çok sayıda fenestratlı kapiller yer alır (44). Birim zaman içinde bir gram doku ağırlığı için bezden akan kan miktarı, vücuttaki diğer dokulardan fazladır (4-6 ml/gr/dakika) (45). Epitel aktif olmayan dinlenme fazında yassı, hatta endotel görünümündedir. Aktif hücrelerde ise yüksek prizmatikliğe kadar değişir. Foliküldeki bütün hücreler aynı aktivitede olmayabilir. Sitoplazma aktif hücrelerde bazofili gösterir (44). Foliküllerin çapları türlere göre 20 ile 250µm arasında değişiklik gösterir. Bu hücreler lümen kolloid adı verilen koyu kıvamlı yapışkan bir sıvı salgılar ve folikülün içi bu kolloidle dolar (46). Tiroidin innervasyonu; otonom sinir sisteminin sempatik ve parasempatik dalları tarafından sağlanır. Sempatik lifler süperior, orta ve inferior servikal gangliondan gelir ve tiroidi besleyen damarlarla tiroide ulaşırlar. Parasempatik lifler, vagus kaynaklı olup kardiak ve laringeal dalları ile tiroide ulaşırlar (47). Abdel-Magied ve arkadaşları (2000) yaptıkları çalışmada develerde tiroid bezi foliküllerinin genellikle yazın geniş (600–900 µm çapında) kışın ise küçük çaplı (100-400µm çapında) olduklarını gözlemlemişlerdir. Büyük foliküller genellikle kübik epitellidir, göze çarpan vakuoller yoktur ve lümenin tamamı kolloidle doludur. Küçük foliküller ise kısa prizmatik epitel ile karakteristiktir ve kolloidleri soluktur. Aynı zamanda birçok peripheral vakuol de gözlenmektedir. Her bir folikülü, kan kapilleri ve retiküler iplikler sarar. Tiroid lobları benzer miktarda folikül kapsar fakat kolloidleri bazen fibrile benzer şekilde parçalıdır. Elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalarda kübik hücrelerin organellerinin az olduğu ve hipoaktif olduğu gözlenmiştir. Alçak prizmatik folikül hücrelerinde ise organeller boldur. Bunlar; mitokondri, granüllü endoplazmik retikulum sisernaleri, salgı vezikülleri, kolloid damlacıkları, heterozomlar ve otofajik vakuollerdir (48). Folikül epitel hücrelerinin, çok iyi gelişmiş olan granüllü endoplazmik retikulumları bazen vakuoller yapacak şekilde genişlemeler gösterir. Mitokondriyonlar kısa çubuk şekilli ve apikal sitoplazmada yayılmıştır. Sentrik yerleşimli ve birkaç nukleolus bulundurabilen bir nukleusa sahiptir. Apikal sitoplazma lipid ve kolloid tanecikleriyle doludur. Apikal yüz kısa mikrovilluslar taşır. Folikülü çevreleyen hücreler lateral yüzlerinde bağlantı kompleksleri bulundurur (43, 44). Develerde

yapılan çalışmada folikül epitel hücrelerinde sıklıkla apokrin sekresyon gözlemiştir. Foliküler lümen içindeki birçok düzgün yüzeyle apokrin çıkıntı kubbe ya da balon şeklindedir. Yine aynı çalışmada tiroid bezindeki apokrin çıkıntılarının ince yapısının meme derisindeki apokrin ter bezlerine çok benzer olduğu, folikül epitel hücrelerinin kolloidin absorpsiyonu için yalancı ayaklar çıkardıkları görülmüştür (43). Kolloidin başlıca ana maddesi, içinde tiroid hormonları da (Free T3 ve Free T4) içeren ve glikoprotein yapısında olan tiroglobulindir. Tiroid hormonları tiroglobulin molekülüne bağlı olarak kolloid içerisinde depo edilir (46)

2.4.Tiroid Bezinin Fizyolojisi

Tiroid hormonları, hipotalamusdan salgılanan Tiroid Releasing Hormonun (TRH) etkisi doğrultusunda yapılırlar. TRH, hipofiz ön lobundan TSH'nın kana bırakılışını uyarır. TSH tiroid bezinin hücreleri üzerindeki spesifik reseptörlere bağlanarak folikül epitel hücrelerini tiroid hormonlarının üretimi için uyarır. Takiben tiroksin ve triiodotironin seri enzimatik reaksiyonlarla sentez edilirler (49). TSH, tiroidin morfolojisini ve fonksiyonunu etkileyen bir hormondur. Bir yandan folikül epitel hücrelerinin gelişmesini kontrol ederken; diğer yandan tiroid peroksidaz ve tiroglobulin yapımını, tiroglobulin proteolizisini, iyodun tutulmasını ve organifikasyonunu, iyodotirozinlerin yapımını, FT3 ve FT4 hormonlarının yapım ve salınmasını kontrol eder. Tüm bu fonksiyonlar TSH'nin folikül epitel hücrelerinin membranındaki TSH reseptörüne bağlanması sonucu ortaya çıkar (50). Bu hormonlar belirli bir düzeye geldikten sonra hipotalamus ve hipofiz üzerine inhibe edici etki yapar ve TRH ile TSH' nın salgılanmasını durdurur. Kullanım sonucu hormonlar azalınca bu etki ortadan kalkar TRH ve TSH tekrar salgılanır ve aynı şekilde tiroid hormonları yeniden vücut ihtiyacına göre üretilir (51).

Tiroid Hormonunun Sentez Aşamaları:

1. Plazmadan inorganik iyodidin (iyodun vücuda alındıktan sonra indirgenmiş formu) tiroid hücrelerine aktif transportu
2. Tirozin içeren tiroglobulin sentezi
3. Serbest iyodun iyodotirozine organifikasyonu
4. Monoiyodotirozin (MIT) ve diiyodotirozinlerin (DIT) birleşerek T4 ve T3 oluşturması
5. Kolloid tiroglobulinin endositozu ve proteolizisi ile MIT, DIT, T3 ve T4 serbestlenmesi

6. İyodun tekrar kullanımı için tiroid hücrelerinde iyodotirozinlerin deiyodinizasyonu.

İyodid, peroksidaz enzim sistemiyle tiroglobulinle iyodinasyon için aktif hale çevrilir. Tiroglobulin foliküler hücrelerin ribozomlarında sentezlenen bir glikoproteindir (52) tiroid hormonlarının sentez ve depolanması için iskeleti oluşturur. Okside olmuş iyot tiroglobulin üzerindeki bir tirozine, tiroid peroksidaz enzimi ile bağlanarak MIT, MIT'in bir iyot ile daha reaksiyona girmesiyle DIT oluşur. Buna "organifikasyon" denir. İki DIT birleşerek T4'ü, bir molekül MIT ile bir molekül DIT birleşerek de T3'ü oluşturur. Bu birleşme işlemine "coupling" adı verilir. Tüm bu işlemler oksidatif olup, peroksidaz enzimi ile katalize edilir (53). TSH birleşme sürecini hızlandırır. İyodinasyon ve coupling işlemlerinden sonra üzerinde tiroid hormonlarını taşıyan tiroglobulin kolloid içinde depolanır (54).

2.5. Tiroid Hormonlarının Dolaşıma Verilmesi ve Yıkımı

Tiroid hormonlarının dolaşıma geçerek hedef dokulara ulaşabilmesi için tiroglobulinden ayrılması gerekir. Hormonun dolaşıma verilmesi için önce tiroglobulin, TSH etkisiyle folikül hücrelerine girer. Hücre içine alınan kolloid damlacıklarının proteolitik enzim içeren lizozomlarla birleşmesi ile fagolizozomlar oluşur. Tiroglobulin fagolizozomların içinde proteolize uğrar. Serbest duruma geçen T3 ve T4 hücre sitoplazmasına bırakılır ve buradan kana geçer. Fagolizozomlardan T3 ve T4 yanında MIT ve DIT de serbestlenir. Ancak tiroid dokusunun dış bölgelerinde bulunan Tip 1 5'- deiyodinaz enzimi etkisi ile MIT ve DIT'in büyük bir bölümü deiyodinize olur, açığa çıkan iyot intraselüler iyot havuzuna girer ve tiroid bezinde yeniden hormon sentezi için kullanılır (intratiroidal siklus) (55). Normalde MIT ve DIT'in küçük bir bölümü dolaşıma geçer. İyodotirozin deiyodinaz eksikliği durumunda MIT ve DIT'ler dolaşıma geçerek idrarla atılırlar. Bu durum organizmadan önemli oranda iyot kaybına yol açar (56).

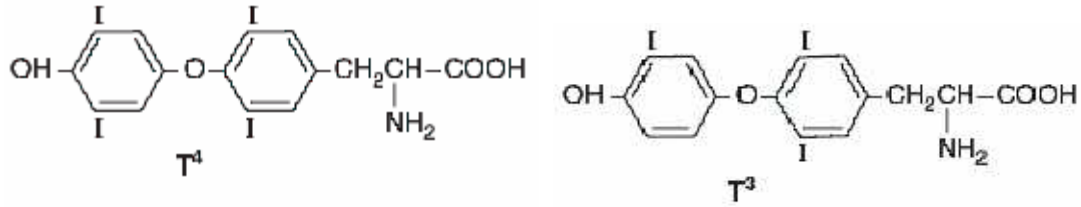
2.6. TİROİD HORMONU

Tiroid bezi kan damarlarınca çok zengindir. Birim zaman içinde ve bir gram doku ağırlığı için bezden akan kan miktarı, vücuttaki diğer bütün dokulardan fazladır (4-6 ml/g/dakika). Histolojik yapısı incelendiğinde birçok küremsi (sferik) foliküllerden oluştuğu görülür. Foliküllerin çeperi tek sıralı epitel hücreleri ile çevrilmiştir. Folikülün ortasındaki boşluk yarı sıvı ve protein yapısında kolloid adı verilen bir madde ile doludur. Bez istirahat halinde iken folikülü çevreleyen epitel hücreleri yassı ve folikül boşluğu geniştir. Bez aktif

iken foliküller küçülür ve epitel hücreleri kübik bir biçim alırlar. Foliküler hücreler tiroglobülin adı verilen globüler bir protein sentezlerler ve onu tiroid foliküllerinin kolloidine salgırlar. Her bir tiroglobülin molekülü tiroid hormonlarının yapıtaşı olan tirozin aminoasidini içerirler. Tiroid bezi dokuların normal fonksiyonu için gerekli olan metabolizma hızını ayarlar. Vücut doku hücrelerinin oksijen kullanımını arttırır, karbonhidrat ve lipid metabolizmasının ayarlanmasına yardım eder.(45)

2.6.1. Tiroid Hormonu Yapımı Ve Salınımı

Tiroid bezinin başlıca hormonları, triiyodotironin (T3) ve tiroksin (T4)'dır. Tiroksin 4, triiyodotironin 3 iyot taşıyan amin asididirler (şekil 1).

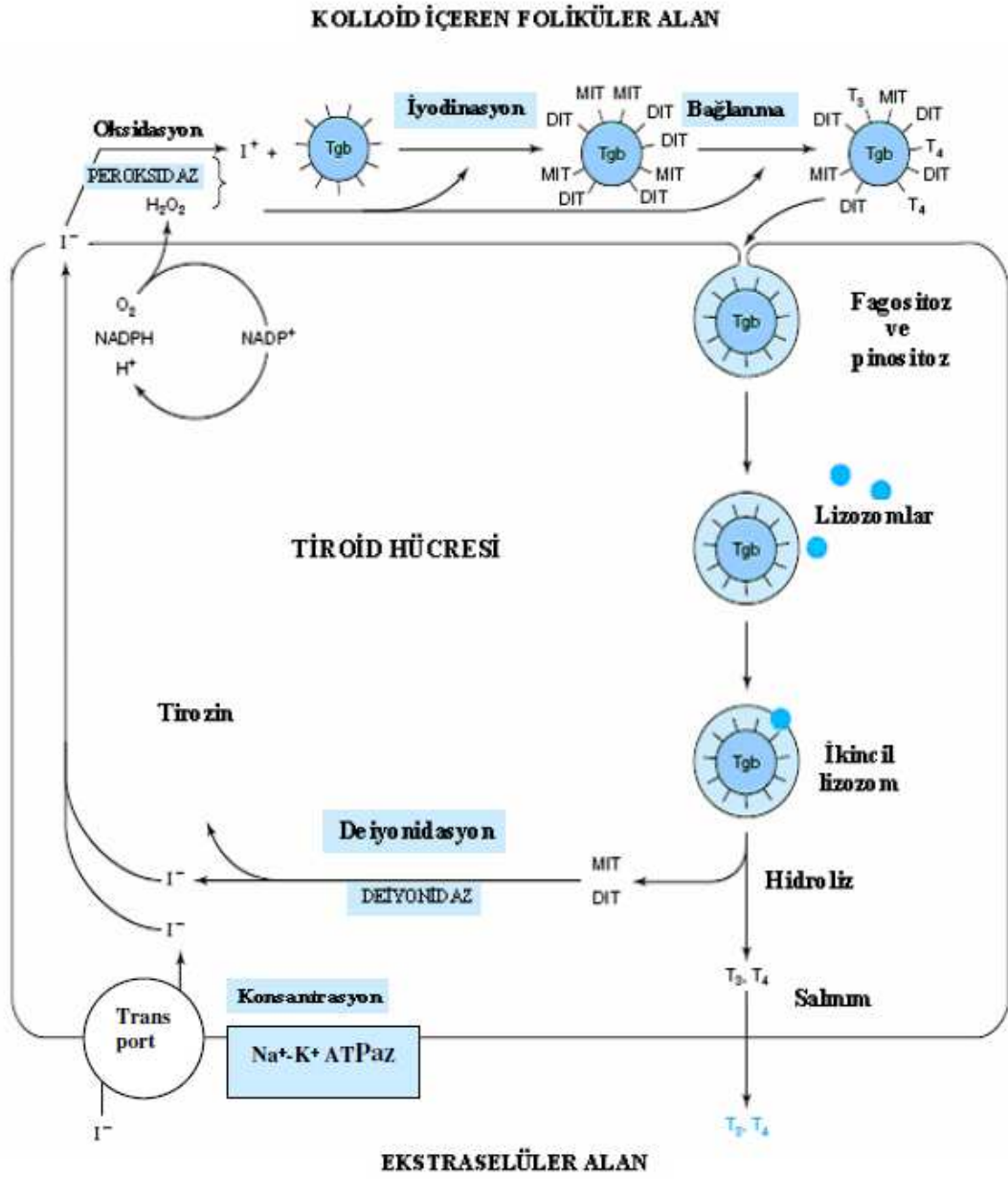


Resim 1. Tiroid Hormonları (T3 ve T4) (44)

İyot, iyon halinde iyodid (indirgenmiş formda, I⁻), okside olmuş formda iyot (I₂), ya da organik bileşik halinde iyot olarak besinlerle alınır. Organik ve element halindeki iyot, sindirim ve emilim esnasında iyodide (I⁻) indirgenir ve plazmada bu şekilde bulunur. Tiroid bezi hücreleri, iyodidi aktif transport yoluyla dolaşımdan hücre içine alırlar. Bez içinde, plazma ya da serumda bulunandan çok daha fazla iyodid bulunur. İyodid aktif transportu, tiroid stimüle edici hormone (TSH, tirotropin) tarafından hızlandırılır. İyodid hücreye girince tiroid peroksidaz ile iyot (I₂) haline dönüştürülür. İyot, tiroglobüline bağlı tirozin moleküllerine bağlanır. Bu şekilde monoiyodotirozin (MIT) ve diiyodotirozin (DIT) meydana gelir. Bu iyotlu tirozinler bir araya gelerek tiroid bezinin aktif hormonları oluşur. İki molekül diiyodotirozinin birleşmesi ile tetraiyodotironin (T₄), bir diiyodotirozin ile bir monoiyodotirozinden de triiyodotironin meydana gelir. Bu reaksiyonların oluşmasında enzim sistemlerinin önemli rolü vardır.(45)

T₃ ve T₄ hormonları, tiroid hücrelerinin folikül içine salgıladığı proteolitik ve peptidaz enzimleri ile tiroglobülünden ayrılarak serbestleşir. T₃ ve T₄ sistemik dolaşıma geçer.

Hormon haline gelmemiş MIT ve DIT' lar serbest kalır, ancak kan akımına karışmazlar. Bunlardaki iyot, tiroid bezinde bulunan deiyodinaz enzimleri ile deiyonize edilir, serbestleşmiş bu iyot yeniden hormon sentezinde kullanılır. (57,58).



Resim 7 (2). Tiroid Hormonlarının Yapım ve Salınımı (59)

2.6.2. Tiroid Hormonlarının Vücutta Taşınmaları

T4 moleküllerinin yaklaşık %75'i, T3 moleküllerinin yaklaşık %70'i tiroid bağlayıcı globülinler (TBGs) adı verilen taşıyıcı proteinlere bağlı olarak dolaşıma girerler. Dolaşımda

T3 veya T4'ün kalanının çoğu tiroid-bağlayıcı prealbumine (TBPA) ya da plazma proteinlerinden biri olan albümine bağlanırlar.

Tiroid bezi, TSH tarafından uyarılınca tiroglobulin proteolitik bir enzim tarafından parçalanır, tiroksin ve triiyodotronin serbest kalarak kana geçer. Kana geçen bu hormonlardan çoğu (%90) tiroksin, az bir kısmı (%10) triiyodotronindir. Fakat gerek tiroid bezinde gerekse diğer doku hücrelerinde tiroksinden (T4) bir iyot enzimatik bir reaksiyonla ayrılarak triiyodotronin (T3) meydana getirilir. Esasen T4'ün metabolik yönden etkisiz olduğu, asıl hormon etkisi yaratanın T3 olduğu kabul edilmektedir (45).

Tiroid hormonunun çoğunu alan dokular karaciger, böbrek ve kaslardır. Beyin, dalak ve gonadlar çok az tiroid hormonu alırlar. Bu farklı alımların nedeni T4'ün oksijen kullanımı üzerine metabolik etkileri ile ilgilidir. Tiroid hormonlarının periferik dokulara nasıl girdiği kesinlik kazanmamakla birlikte pasif difüzyon ile gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Yine olasılıkla, periferik dokularda hücre yüzeyinde tiroid hormonuna spesifik reseptörler olduğu düşünülmektedir. Hücre içinde tiroid hormonları ya sitoplazmada serbest halde kalırlar ya da düşük afiniteli sitozolik reseptörler ya da yüksek afiniteli nükleer mitokondriyal reseptörlere bağlanırlar (60).

2.6.3. Tiroid Hormonlarının Etkileri

Tiroid hormonları hedef hücrelerdeki etkilerinin büyük bir kısmını, hücre çekirdeği içindeki reseptörler aracılığı ile ve bir kısmını da mitokondriler içindeki reseptörler aracılığı ile gösterirler. Nükleustaki reseptörlerin doğal ligandının T3 olduğu ve T4'ün onun prekürsörü olarak görev yaptığı bilinmektedir (61).

Nükleus içine giren tiroid hormonu tarafından bu reseptörlerin aktivasyonu, bazı genlerin transkripsiyonunu hızlandırarak özel mRNA'lar aracılığı ile yapısal ve fonksiyonel bazı hücre proteinlerinin sentezini artırır. Tiroid hormonu reseptörlerinin ikinci yerleşme yeri mitokondrilerin iç membranıdır. Buradaki reseptörler lipoprotein yapısındadır. Bu hormonlar, bazı hücre türlerinde, mitokondrilerin oksidatif metabolizmasını, oksijen tüketimini ve dolayısıyla oksidatif fosforilasyon olayını (ATP oluşumunu) arttırlar. Hücrede oksidasyonun artmasında, mitokondrilerin sayısının artması ve her bir mitokondri içindeki oksidasyon yapan birimlerin sayısının artması rol oynar. Tiroid hormonları bazı organlarda (beyin, testis ve dalak gibi) oksidasyon ve oksijen tüketimini arttırmazlar.(62). Hücre membranında Na⁺ ve K⁺ döngüsünden sorumlu bir aktif transport mekanizmasının esasını oluşturan Na⁺, K⁺-ATPaz' ın, tiroid hormonları tarafından indüklenerek, etkinliği artırılır ve hücrenin ATP kullanımını artar.(61).

2.6.3.1. Tiroid Hormonunun Protein Metabolizmasına Etkileri

Tiroid hormonlarının protein metabolizması üzerine olan etkileri, hormonun genel metabolizma üzerine olan etkilerinin temelini oluşturur. Protein sentezini artırması nedeniyle, özgül enzimlerin sentezini de artırır; bunlar da diğer metabolik olayları hızlandırır (45).

Tiroid hormonlarının protein metabolizmasına etkisi, hormon verilen hayvanın ya da bireyin metabolik durumuna ve hormon dozuna göre değişir. mRNA, tRNA ve rRNA sentezini artırarak, azot dengesi üzerinde pozitif etki gösterir. Bu etki ile büyüme hormonu uyarılarak sentezi artırılır (63).

2.6.3.2. Tiroid Hormonunun Karbohidrat Metabolizmasına Etkileri

Tiroid hormonları karbonhidrat metabolizmasının hemen hemen bütün evrelerini etkiler. Hormon miktarı arttıkça bağırsaklardan glikoz Emilimi, buna paralel olarak artar. Dokular tarafından glikoz kullanımını artırır. Karaciğer, iskelet kası ve kalp kasında glikojenolizi artırır ve kan glikoz düzeyini yükseltir. Bu yükseliş başlangıçta glikozüriye bile neden olabilir. Ancak sonradan katabolizmanın ve epinefrin salınmasının artması nedeniyle, karaciğer glikojeni tükenir ve kan glikoz düzeyi düşer. Tiroid hormonlarının karbonhidrat metabolizması üzerinde doza bağımlı ters bir etkisi mevcuttur. Örneğin, sıçanlarda küçük dozda ve insülin varlığında glikojen sentezini artırırken, yüksek dozda tiroid hormon karaciğer glikojeninin glikoza parçalanmasını hızlandırır. (45).

Tiroid hormonları glikozun intestinal absorpsiyon hızını, yağ dokusu ve kaslar tarafından, alınımlarını artırır. İnsülinin yıkımı üzerinde de etkilidirler ve yüksek dozda, insülin yıkımını artırır. Tiroid hormon preparatları, diabetiklerde insülin gereksimini artırır. Hipotiroidizm halinde insülin yıkımı azalır. Hipertiroidili hastalarda insüline duyarlılık genellikle azalır, hipotiroidizmde ise duyarlılık artar.(61)

2.6.3.3. Tiroid Hormonunun Lipid Metabolizmasına Etkileri

Tiroid hormonu fazlalığında lipid depoları azalır ve kanda lipid düzeyi düşer. Yağ dokuda lipolizi artırır. Bu etkisini adenilet siklaz-cAMP mekanizmasını uyarmakla ve dokuları diğer lipolitik maddelere karşı (örneğin, katesolaminler, büyüme hormonu, glukagon) duyarlı hale getirmekle yapar. Lipoliz sonucu meydana gelen ve kanda derişimi artan serbest yağ asitlerinin okside olmalarını hızlandırır. Tiroid hormonunun lipid metabolizmasına olan klasik etkisi, kolesterolün kan plazmasındaki derişimini düşürmesidir.

Kolesterolün dışkı ile atılmasını ve safra asitlerine dönüşmesini artırır. Ayrıca hücrelerin apoprotein reseptörlerinin yapımını artırarak, kolesterol taşıyan LDL'nin hücrelere girişini ve yıkımını da hızlandırırlar (64).

2.6.3.4. Tiroid Hormonunun Vitamin Metabolizmasına Etkileri

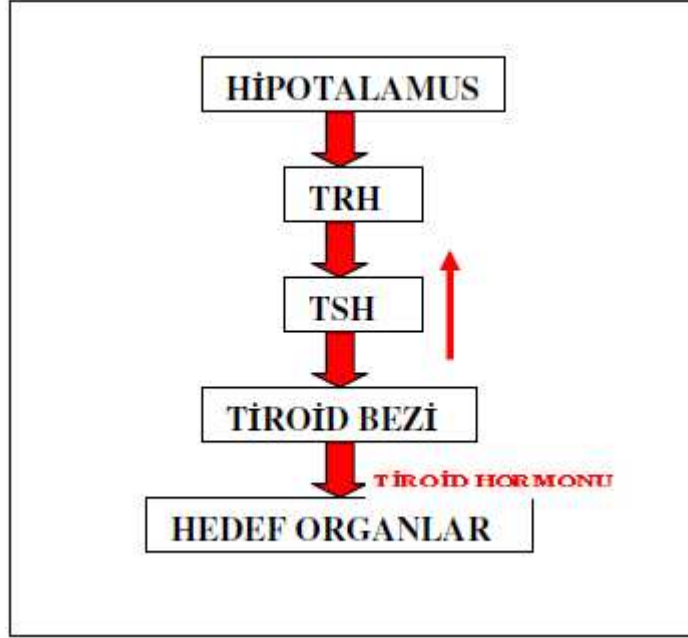
Tiroid hormonları enzim sentezini arttırmaları ve metabolik olayları hızlandırmaları nedeniyle, hücrelerin koenzimler ve bunları oluşturan vitaminlere olan gereksimini artırır (61). Hipertiroidizmde, suda eriyen vitaminlerden tiyamin, riboflavin, B12 ve C vitaminlerine ihtiyaç artar. Hipertiroidili hayvanlarda nikotinamid'den piridin nükleotidlerin (NAD ve NADP'nin) sentezi aksar. Vitaminlerden bazı koenzimlerin sentezi için tiroid hormonu gereklidir. Örneğin, karotenden vitamin A sentezi ve vitamin A'nın retinen'e dönüştürülmesi için tiroid hormonuna ihtiyaç vardır (45).

2.6.3.5. Tiroid Hormonu Etki Mekanizması

Tiroid hormonlarının birçok enzimler ve hemen hemen bütün organ sistemleri üzerine büyük etkileri vardır. Tiroid hormonu nükleer reseptörlerinin T3'e karşı affinitesi T4'den daha fazladır (65). Bu reseptör, histon özellik göstermeyen asidik bir proteindir (66) ve T3'ün hücre düzeyindeki etkisi reseptörle birleşmesi ile başlar. Hormon-reseptör birleşmesi, hormon tarafından sentezi başlatılacak proteine ait mRNA dizisinin meydana gelmesini hızla arttırmaktadır. Bu olay nükleer reseptörlerin transkripsiyonu hızlandığı gösterir. T3 ile nükleer reseptör kompleksinin transkripsiyon yönünden aktif kromatin ile ilişki kurduğu tahmin edilmektedir (67).

T3 etkisinin meydana gelmesinde bazı hormonlar ve faktörler ise karışmaktadır. Metabolik faktörler tiroid hormonu tarafından ilgili genin harekete geçirilmesini etkileyebilir. Örneğin açlıkta nükleer T3 reseptörleri azalmaktadır (68,69). Kanda tiroid hormone belli bir düzeyi aşınca TSH salınması inhibe edilir. Bu inhibisyon, kanda hormon miktarının ayarlanmasında negatif-feedback mekanizması ile olmaktadır. Tiroid hormonu bu etkisini, diğer etkileri gibi, adenohipofizde TSH salgılayan hücrelerin nükleer reseptörleri ile etkileserek yapmaktadır. Adenohipofizin TSH sentezleyen hücrelerinin nükleer reseptörleri T3 tarafından işgal edilince TSH salınması durur. Kanda tiroid hormonu düzeyi düşünce, nükleer reseptörlerin T3 ile işgal edilemeyen miktarı artar ve TSH salınması, dolayısıyla T4 salınması artar. T4 diğer doku hücrelerinde olduğu gibi, tirotrof (TSH salgılayan) hücrelerde

de deiyodinasyon yoluyla T3'e dönüştürülmektedir. T3'ün TSH salgılayan hücrelerin nükleer reseptörleri ile birleşmeleri, negatif-feedback yoluyla, TSH salınımını inhibe eder (70).



Resim 8 (3). Tiroid hormonlarının salınımının negatif-feedback ile kontrolü

2. 7. Elektromanyetik Alan (EMA)

2.7.1. Elektrik

Elektrik, durağan ya da devingen yüklü parçacıkların yol açtığı fiziksel bir olgudur. Elektrik yükü, maddenin ana niteliklerinden biridir ve temel parçacıklardan kaynaklanır. Elektrik olgusunda rol oynayan temel parçacık yükü, negatif işaretli olan elektrondur. Elektriksel olgular çok sayıda elektronun bir yerde birikmesiyle ya da bir yerden başka yere hareket etmesiyle ortaya çıkar. Elektrik olgusunda rol oynayan diğer parçacık yükü, pozitif işaretli olan protondur. Atomların dış yörüngelerindeki elektronlar, bir atomdan diğer komşu bir atoma rastgele hareket edebilir. İletkenlerde bu rastgele ve serbestçe hareket eden elektronların sayısı son derece fazladır. Elektrik akımı, elektrik yüklerinin bir noktadan başka bir noktaya hareket etmesine verilen isimdir. Elektrik yükünün elektronlarca taşındığı bir iletken içindeki akım, birim zamanda iletkenin herhangi bir noktasından geçen yük miktarının

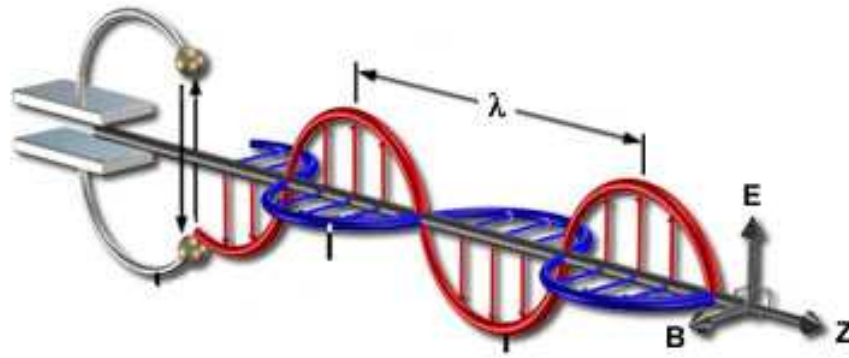
ölçüsüdür. Eski Yunanlılar, kehribarın bir kürk parçasına sürtülmesi sonucunda kuştüyü gibi hafif cisimleri çekme özelliği kazandığını gözlemlemişlerdi. Elektrik sözcüğünün kaynağı “kehribar” anlamına gelen Yunanca elektron sözcüğüdür. Elektriği ilk olarak ciddi anlamda inceleyen bilim adamı William Gilbert, 16. yüzyılın sonlarında, statik elektrikle manyetizma arasındaki ilişki üzerinde araştırmalar yaptı. Benjamin Franklin 1752’de gerçekleştirdiği ünlü uçurtma deneyiyle yıldırımın bir elektrik olgusu olduğunu gösterdi. Ayrıca Franklin, elektrik yüklerinin eksi ve artı olarak belirleyip adlandırdı. 1767’de Joseph Priestley, elektrik yüklerinin birbirlerini, aralarındaki uzaklığın karesiyle ters orantılı olarak çektiklerini buldu. Yüzyılın basında Alessandro Volta, elektrik pilini icat etti. Davy, 1808’de elektrik akımı taşıyan iki kömür elektrotu birbirinden ayırarak bir ark oluşturmayı basardı, böylece elektriğin ışık ya da ısı enerjisine dönüşebileceğini gösterdi. 1820’de Hans Christian Orsted, içinden elektrik akımı geçen bir iletkenin yakınındaki bir mıknatıs iğnesinin saptığını gözlemleyerek, elektrik akımının iletken çevresinde bir manyetik alan oluşturduğu sonucuna vardı. 1873’te Zénobe- Théopline Gramme, elektrik enerjisinin havai hatlar aracılığıyla etkin bir biçimde iletilebileceğini gösterdi. A. Edison’ın 1881’de ilk elektrik üretim merkeziyle dağıtım şebekesini New York’ta kurması ve 1895’de N. Tesla’nın alternatif akım ile elektriği çok uzak mesafelere taşınması elektrik enerjisinin evlerde ve sanayide yaygın olarak kullanılmasının başlangıcı oldu.(71,72,73)

2.7.2. Elektromanyetik Alan

Bir elektrik yükünün hareketi sonucunda uzayda oluşan değişikliklere elektromanyetik alan denir. Bileşenleri elektrik ve manyetik alandır. Durgun elektrik yükleri çevresinde elektrik alanları oluşur. Yük hareketliyse ayrıca elektrik yüklerinin çevresinde bir manyetik alan oluşur. Manyetik alan olmaksızın uzayda elektrik alan oluşabilir, ancak; uzayda manyetik alan oluşabilmesi için buna eşlik eden, uzayda değişiklik gösteren elektrik alana ihtiyaç vardır. Bu değişim sinüzoidal (sinüs fonksiyonunun şekli) bir eğri şeklindedir. Bir ortamda elektrik alanı değiştirmek için yüklü cisimleri ivmeli hareket ettirmek gerekir. Dolayısıyla ivmeli hareket eden yükler elektromanyetik dalga yayar. İlişkili olduğu yüklerden ve akımlardan ayrı olarak kendi başına düşünülen elektromanyetik alan, elektrik alanı ile manyetik alanın karşılıklı etkileşimi sonucu oluşur. Bir elektromanyetik alan, belirli koşullar altında, elektromanyetik enerji taşıyan bir dalga hareketi olarak da tanımlanabilir.

Elektromanyetik dalgalar biçiminde yayılan enerjiye elektromanyetik radyasyon (ışınım) denir.

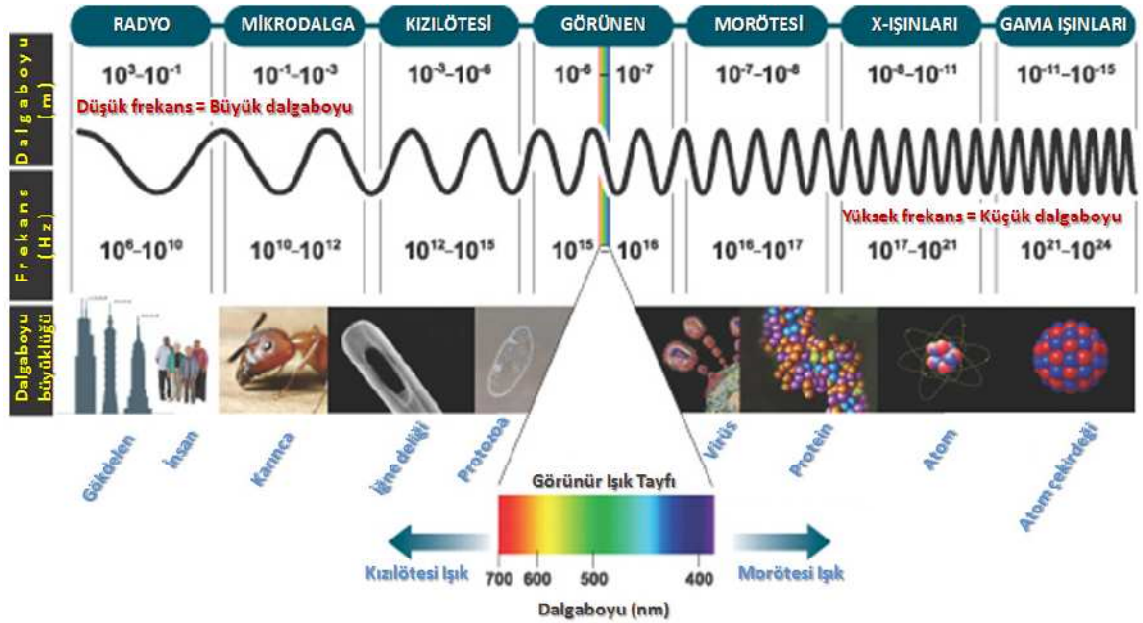
Boşlukta elektrik ve manyetik alan vektörleri birbirine diktir ve elektromanyetik dalga biçiminde, doğrultusu her iki alana da dik olarak yayılır (Resim 4). Elektrik alan vektörlerinin değişimi ile manyetik alan vektörlerinin değişimi sinüzoidal eğri biçimindedir. Aşağıdaki şekilde iki kondansatörün uçlarındaki elektrik alan değiştirilerek etrafa elektromanyetik dalga yayması görülmektedir.



Resim 4: Elektrik (E), Manyetik (B) ve Elektromanyetik (Z) alan dalgaları ve vektör yönleri (74)

Elektromanyetik dalgaların ideal (hiçbir madde içermeyen, başka alanların ya da kuvvetlerin bulunmadığı) boşluktaki yayılma hızı (c) evrensel bir sabittir ve değeri saniyede 299729,458 km'ye eşittir (ışık hızı). Elektromanyetik dalgalar, bütün dalga hareketleri gibi, yansıma, kırılma, kırınım ve girişim özellikleri gösterir; enine bir dalga olduğu için de kutuplanma özelliği gösterir. Elektromanyetik dalga bir ortamdan başka bir maddesel ortama geçtiği zaman, dalgayı oluşturan elektrik ve manyetik alanlar yayılma doğrultusuna tam dik olmaktan çıkar, bir başka deyişle yayılma doğrultusunda bileşenlere sahip olur. Bu bileşenler, dalganın yayılması sırasında enerji yitirmesine yol açar. Elektromanyetik dalgaların frekansları (saniyedeki titreşim sayısı) çok geniş bir frekans bölgesini kaplar. Elektromanyetik dalgalar gibi periyodik dalgaların yayılmasında, art arda iki periyotta birbirine karşılık gelen noktalar (örn. Genliğin maksimum olduğu noktalar) arasındaki uzaklık dalga boyudur. Dalganın ortamda yayılma hızı (v), frekansı (f) ve dalga boyu arasında bağıntısı geçerlidir. SI birimler sisteminde frekans hertz (Hz), dalga boyu metre, hız da m/s birimleriyle ölçülür.

Elektromanyetik dalganın frekansını dalgayı oluşturan kaynak belirler. Dalganın hızı ise yayıldığı ortama ve dalga boyuna bağlıdır. Boşluktaki yayılma hızı c'ye eşit olan elektromanyetik dalgaların maddesel bir ortamdaki hızları ise c'den küçüktür. Belirli bir ortamdaki hızın c'ye oranı, o ortamın kırma indeksi olarak bilinir. Örneğin dalga boyu 589×10^{-9} m olan sarı ışık için havanın kırma indeksi 1,0002, suyun 1,333, camın ise yaklaşık 1,5'tir. Farklı dalga boylarındaki dalgalardan oluşan bir ışımaya, bu ortamlarda yayılacak olursa dalgalar bileşenlerine ayrılır. Elektromanyetik dalgalar, frekanslarına göre, özel adlarla anılan gruplara ayrılır, buna elektromanyetik tayf denir (Sekil 5). Bu gruplar arasındaki frekans sınırları kesin bir biçimde belirlenmiş değildir. En düşük frekanslı dalgalar radyo dalgalarıdır. Bunlar, frekansları yaklaşık 3×10^3 Hz'den 30×10^9 Hz'ye kadar (dalga boyları 100 km'den 1 cm'ye kadar) değişen ve uzun dalga, orta dalga, kısa dalga, VHF(çok yüksek frekans), UHF(ultra yüksek frekans) gibi frekans bantlarına ayrılan dalgalardır. Mikrodalgaların frekansları yaklaşık 3×10^8 Hz'den 3×10^{11} Hz'e kadar (dalga boyları 1 m'den 1mm'ye kadar) değişir. Görünür ışığı, $7,8 \times 10^{-5}$ cm (kırmızı ışık) ile 4×10^{-5} cm'lik (mor ışık) dalga boyları arasındaki çok dar bir bandı kaplayan elektromanyetik dalgalar oluşturur.



Resim 5: Elektromanyetik tayf (75)

Elektromanyetik ışımaya, dalga niteliğinin yanı sıra parçacık niteliği de gösterir. Kısa dalga boylu elektromanyetik dalgalar madde ile karşılaştırıldıklarında, 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 tasınan enerji, bu radyasyonun frekansına bağlıdır. Örneğin frekans iki katına yükseltirirse foton enerjisi de iki katı kadar artacaktır. Radyo dalgaları gibi düşük frekanslı elektromanyetik ışımada türlerinde foton enerjisi çok küçüktür (örn. 1 MHz için $6,6 \times 10^{-28} \text{ J} = 4 \times 10^{-9} \text{ eV}$), bu nedenle ışımada enerjisi belirgin değildir. Ama X ışınları (foton enerjisi 1.000- 200.000 eV) ve özellikle gamma ışınları (birkaç yüz bin eV'nin üstünde) ile kozmik fotonlar (milyarlarca, hatta trilyonlarca eV) için durum tersinedir; bu durumlarda ışımada parçacık niteliği önem kazanır. Değişik frekanslardaki elektromanyetik ışımada türleri madde ile çok farklı biçimlerde etkileşime girer. Elektromanyetik dalgalara tümüyle saydam olan tek ortam boşluktur. Maddesel ortamlar kimi frekans bölgelerindeki dalgaları kuvvetli bir biçimde soğurur. Yerin atmosferi görünür ışığı, kısa dalga boylu kızılötesi ışınları ve radyo dalgalarını hemen tümüyle geçirir, geri kalan bütün frekansları ise soğurur (çok yüksek enerjili kozmik ışın fotonları da atmosferden geçebilirler). (74,76,77)

2.7.3. Elektromanyetik Büyüklükler ve Birimler

Elektrik alan oluşumu ortamda yüklerin varlığına bağlıdır. Manyetik alan ise yüklerin hareketli olmasıyla (akım akmasıyla) oluşur. Ortamda bulunan diğer bir yüke uygulanan kuvvet şeklinde de açıklanan elektrik alan birimi “V/m” dir. Benzer şekilde manyetik alanlar da ortamdaki yüklere kuvvet uygularlar, ancak tek koşul yüklerin hareketli olmasıdır. Elektrik ve manyetik alanların hem şiddeti hem de yönü söz konusudur, yani vektörel büyüklüklerdir. Manyetik alandan iki şekilde söz edilebilir. Birincisi manyetik akı yoğunluğu (B) olup birimi “Tesla” dir (1 Tesla(T)=10.000 Gauss(G)’dur). İkincisi ise manyetik alan şiddeti (H) olup birimi “A/m” dir. Bu iki büyüklük ortam manyetik geçirgenliği ile birbirine $B=\mu H$ ilişkisi ile bağlıdır. (Bos uzayda, havada ve canlı dokularda $\mu=4 \times 10^{-7}$ [Henry/m] olarak alınır.) (78)

2.7.4. Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alan

Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alan (Extremetely Low Frequency – Electromagnetic Field, ELF-EMF), elektromanyetik tayfın 0 ile 300 Hz frekansları arasındaki radyasyon bölgesini tanımlar. ELF-EMF, parçacık özelliği göstermeyen, iyonlaştırmayan radyasyon türüne girer. Elektrik dağıtım istasyonlarından evlerimize gelen şebeke elektriğinin frekansı 50 Hz’dir ve neden olduğu elektromanyetik alan bu bölgededir. 50 Hz cihazların kullanımının sık olması nedeniyle günlük hayatta daha çok ELF-EMF ile karşılaşmaktayız. Bu nedenle ELF-EMF maruziyeti bilimsel olduğu kadar toplumsal bir tartışma konusudur.

Yerkürenin geomanyetik alan büyüklüğü 10-6 mT, vücut manyetik alan değeri 10-7 mT civarındadır. Günlük hayatta ev ve işyerlerinde kullandığımız buzdolabı, bulaşık makinesi, kurutma

makinesi, TV, bilgisayar, elektrikli ısıtıcı, ütü, mikser, mutfak robotu, flüoresan lamba, elektrikli tras makinesi, saç kurutma makinesi, elektrikli battaniye gibi aletlerin manyetik alanları 0,1 mT ile 2,5 mT arasında değişmektedir. En fazla manyetik alana 2,5 mT ile saç kurutma makinesi, 0,5-1 mT ile elektrikli traş makinesi ile flüoresan lamba sahiptir. Renkli televizyon ve bilgisayar monitörünün manyetik alanı 0,1 0,5 mT arasındadır. Vücudumuzun manyetik alanı çevremizdeki doğal alan olan yerkürenin manyetik alanı ile uyumludur, ancak yüksek elektromanyetik alanlara neden olan elektrikli aletler bu uyumu bozmaktadır. (79)

2.7.5. Elektromanyetik Alanların Biyolojik Etkileri

Elektromanyetik dalgaların oluşturduğu biyolojik etkilerin canlı organizma üstünde güvenilir bir sınırdan kalması için, insan hücre ve dokularını temsil eden matematiksel modeller ile çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda gösterilen ortaya çıkabilecek olası biyolojik etkiler şunlardır;

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) (76)

2.7.6. ELF-EMF'nin biyolojik etkileri

Daha önce yapılan in vivo çalımsalar, artmış tümör insidansı, üreme ve olgunlaşma, nöral ve davranış değişiklikleri olduğu konusunda fikir birliğindedir (80,81,82,83). Bazı epidemiyolojik çalışmalar yerleşim yeri ve mesleki ELF-EMF kalmaya bağlı artmış kanser riskini, özellikle çocukluk çağı lösemisi ve beyin kanseri rapor etmiştir, ancak diğer çalışmalar bu sonuçları doğrulamamıştır (84,85,86,87,88,89,90). Dokuma fabrikalarında

yürütülen bir çalışmada, ELF EMF maruziyetinde kalmış çalışanlarda artmış Alzheimer's hastalığından bahsedilmiştir (91). Bazı çalışmalar ELF-EMF'nin melatonin sirkadiyen sekresyon profilini değiştirdiğini göstermiştir (92,93,94,95). Buna ilaveten EMF maruziyeti altındaki hayvanların beyinlerinde yapılmış santral sinir sistemi üzerindeki çalışmalarda nörotransmitter sistem (asetilkolin, dopamin, serotonin veya aminoasitler) aktivitesinin baskılanmış olduğunu göstermiştir (80,96,97,98,99,100,101). Bazı araştırmalar ELF-EMF'in dolaşım ve sinir sistemini etkileyeceğini teorik olarak varsaymışlardır ve 1960'dan beri birçok ülkede enerji hatları frekansında EMF etkisi üzerine biyolojik çalışmalar yapılmıştır. 1999'da Dünya Sağlık Örgütü elektrikli lokomotif sürücülerinde kronik kalp hastalığı riskinin arttığını rapor etmiştir. Bazı çalışmalar ELF-EMF'nin kalp hızını artırıcı etkisini göstermişken bazı çalışmalar ELF-EMF'nin elektrik santrali işçilerinde ve sıçanlarda kalp hızı yavaşlamasına neden olduğunu rapor etmiştir (102,103,104,105). Bununla beraber bazı çalışmalarda da anlamlı fizyolojik değişiklik bulunmadığı bildirmiştir (106,107). Yine bazı çalışmalarda, EMA maruziyeti sonucu nörovegetatif düzensizliklerin ortaya çıktığını rapor etmişlerdir (95,107,108). Hem kan basıncı regülasyonunda (hipotansiyon veya hipertansiyon) hemde kardiyak ritimde (bradikardi veya tasikardi) düzensizlikler görüldüğünü bildiren çalışmalar da vardır (109,110). Kalbi kontrol eden sempatik ve vagal sinir sistemin non-invaziv göstergesi olan heart rate variability (kalp hızı değişkenliği, HRV) kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır. Genç erkeklerde yapılan bir mesleki maruziyet çalışmasında, düşük frekansta EMA'a maruz kalınmasıyla HRV'de azalmıştır, benzer şekilde kadınlarda yapılan bir çalışmada ise ilginç olarak yüksek yoğunlukta EMA' a maruz kaldığında bile HRV etkilenmemiştir (111,112). Bu sonuçlar ELF-EMF'in kardiyovasküler cevaptaki sempatik sinir sistemi aktivitesini etkileyebileceğini ileri sürmektedir. Son yapılan bir başka çalışmada 1 günlük ELF-EMF maruziyeti kalp hızında yavaşlama ve EKG'de bazı değişikliklere neden olmuşken 5 günlük ELF EMF maruziyetinde hiçbir değişikliğe rastlanılmamıştır (113). Bu çalışmalara rağmen, deneklerin EMA alan maruziyeti altındayken kalp aktivitesinde nasıl bir etkilenme olduğu konusunda literatürde yeterli bilgi yoktur.

2.7.7. Elektromanyetik Radyasyon Zararlarının Olası Mekanizması

Düşük frekanslı elektromanyetik dalgaların foton enerjileri, atomları ve molekülleri iyonlaştıracak düzeyde değildir. Ortamdaki iyonlaştırıcı olmayan elektromanyetik dalgaların etkisinde kalma sonucunda canlılarda olası iki tür etki oluşabilir: Isı ve ısıya bağlı olmayan

etkiler. Isı etkileri, vücut tarafından yutulan elektromanyetik enerjinin ısıya dönüşmesi ve vücut sıcaklığını arttırması olarak tanımlanır. Bu sıcaklık artışı, ısının kan dolaşımı ile atılarak dengelenmesine dek sürer. Düşük frekans bandındaki elektromanyetik dalgaların sebep olabileceği sıcaklık artışı gerçekte çok düşüktür ve büyük olasılıkla vücudun normal mekanizmaları ile kolayca etkisizleştirilebilir. Elektromanyetik dalgaların ısıya bağlı olmayan etkileri olarak iddia edilen bozukluk ve hastalıklar arasında beyin aktivitelerinde değişiklikler, uyku bozuklukları, dikkat bozuklukları, baş ağrıları bulunmaktadır. Ancak bu riskler çok yüksek deneysel dozlar ve sürelerde geçerli olabilir. Bu etkilerin kimyasal değişikliklere bağlı olduğu düşünülmektedir. Yüksek enerjili iyonlaştırıcı elektromanyetik dalgalar, DNA ve genetik malzemeyi kapsayan biyolojik dokuda hasara yol açabilen moleküler değişikliklere yol açabilirler. Bu etkinin olabilmesi için dokunun x-ışınları ve gama ışınları gibi yüksek enerjili fotonlarla etkileşmesi gerekir. (76,114)

2.8. Antioksidanlar ve Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, serbest radikallerin vücutta oluşturduğu hasarları önlemek amacıyla geliştirilmiş savunma sistemleridir. Reaktif oksijen türlerine karşı koruma, oluşan radikallerin detoksifiye edilmesi, radikal zincir reaksiyonlarının ve radikal oluşumunun engellenmesi ile sağlanmaktadır (115).

Antioksidanlar peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid preoksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanları, doğal (endojen) ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki grupta toplayabiliriz (116).

A. Doğal Antioksidanlar (Endojen)

1- Enzimler: Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon transferaz

2- Enzim olmayanlar:

- Lipid fazda bulunanlar: Alfa-tokoferol ve beta-karoten
- Sıvı fazda bulunanlar: Askorbik asit, melatonin, ürat, sistein, ferritin, albümin, bilirubin, serüloplazmin, transferrin, laktoferrin, miyogloblin, hemogloblin, glutatyon

B. Eksojen Antioksidanlar

1. Ksantin oksidaz inhibitörleri: Allopürinol, oksipürinol, folik asit
2. Soya fasülyesi inhibitörleri
3. NADPH oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar
4. Rekombinant süperoksit dismutaz
5. Diğer nonenzimatik serbest radikal toplatıcıları: Mannitol
6. Demir redoks döngüsü inhibitörleri: Desferrioksamin
7. Nötrofil adhezyon inhibitörleri

C. Gıda Antioksidanlar

1. Butylated hydroxytoluene (BHT)
2. Butylated hydroxyanisole (BHA)
3. Sodyum benzoat
4. Ethoxyquin
5. Propyl gallate
6. Demir-superoksid dismutaz

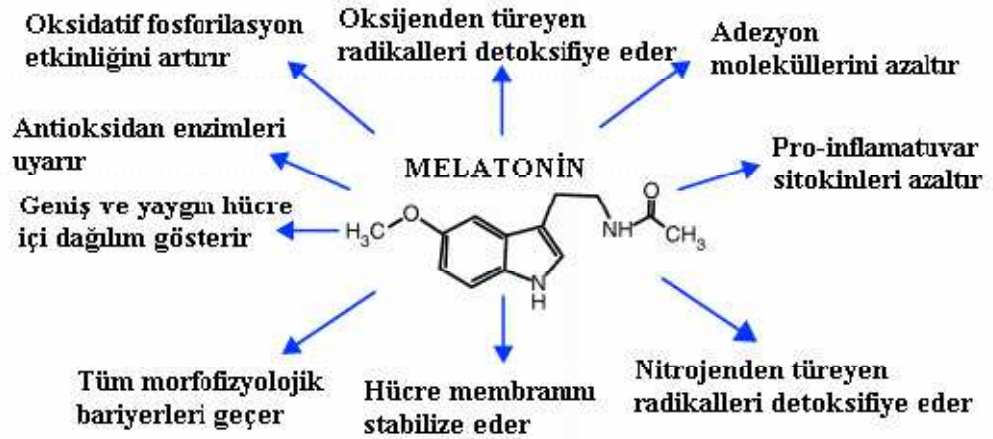
Antioksidan etki tipleri:

1. Toplayıcı (scavenging) etki: Serbest oksijen radikallerini tutma veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirme etkisidir.
2. Bastırıcı (quancher) etki: Serbest radikallerle etkileşme sonrasında, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan ya da inaktif şekle dönüştüren etki şeklindedir.
3. Zincir kırıcı (chain breaking) etki
4. Onarıcı (repair) etki (117)

2.8.1. Melatonin

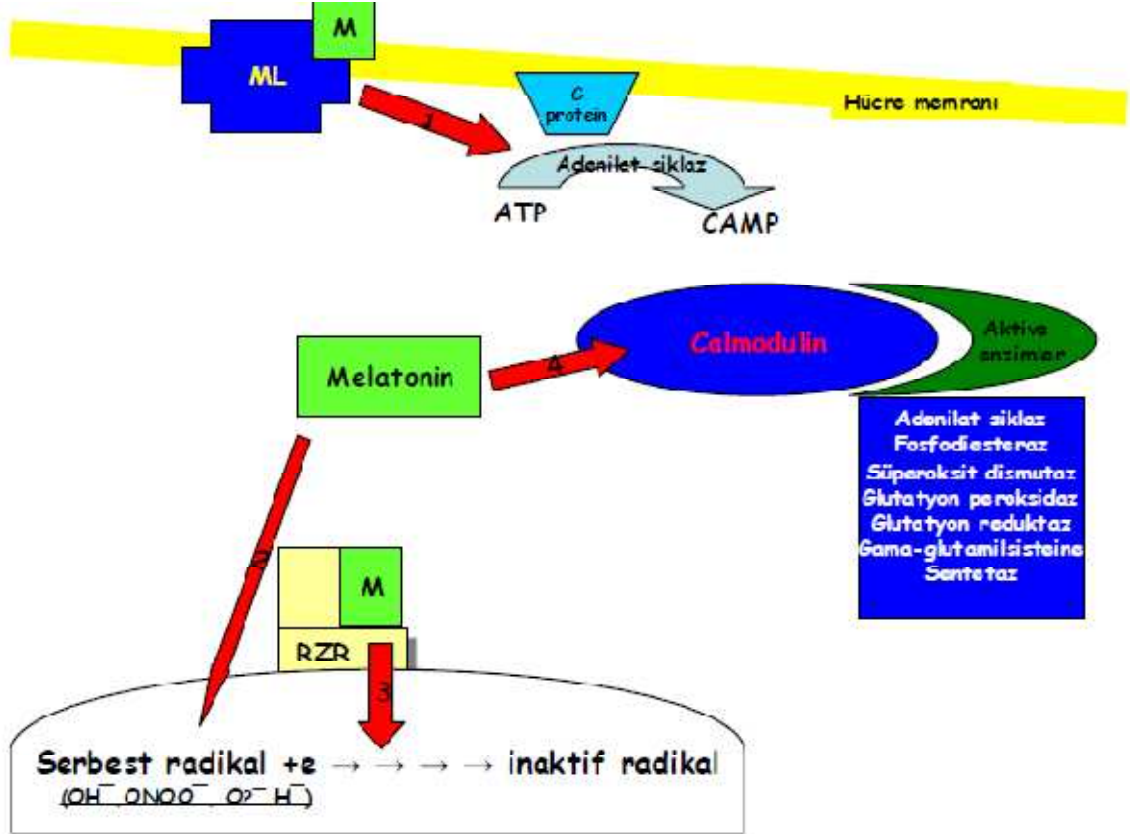
Melatonin veya N-asetil-5-metoksitriptamine (MEL) pineal glandın secrete ettiği esas maddedir. Günümüzde melatonin'in biyolojik ritmin düzenlenmesinde, uyku, mizaç, üreme, tümör büyümesi ve yaşlanma sürecinde etkili olduğu bilinmektedir (118). Pineal beze nöronal bilgiler norepinefrin ile gelir, melatonin ile çıkar. Melatonin salınımında egemen olan kontrol sistemi çevresel aydınlık-karanlık siklusudur. Gündüz saatlerinde az miktarda sentezlenir, karanlıkla birlikte salınımı ve sentezi artmaya başlar (119). Sempatik innervasyonun intakt olması melatonin ritminde önemlidir. Pinealositlerde sonlanan sempatik sinir uçlarından noradrenalin salgılanır, beta adrenerjik reseptörler uyarılır. Bu uyarı triptofan alımına neden olur, triptofandan seratonin oluşur, seratoninden de melatonin sentezlenir (120). Melatonin pasif difüzyonla kan dolaşımına geçer. Hidrofilik ve lipofilik yapısından dolayı bütün membranları kolayca geçebilir. Plazmada yaklaşık %70 dolayında albumine bağlanır (121). Sekresyon artışı gecenin başlangıcında başlar ve gece yarısı saat 1-2 arası pik değerine ulaşır, gecenin kalan saatlerinde yavaş yavaş azalır ve gündüz saatlerinde sentez ve salınımı daha da

düŒer (120,122). Karaciğerde hidroksilasyon ile metabolize olur, sülfürik asit (%60–70) veya glukuronik asitle (%20–30) konjuge olduktan sonra idrarla atılır. Melatonin'in esas metaboliti idrarla atılan sülfoksimelatonindir. Melatonin intravenöz olarak hızla dolaşımında dağılır ve elimine olur ($t_{1/2}$: 0,5–5,6 dk) (123). Oral alındığı zaman yarılanma süresi 45 dakikadır. Genel olarak endokrin aktivasyonlar üzerinde bariz bir etkisi olmamakla birlikte, farmakolojik dozlarda LH konsantrasyonunda azalma, prolaktin konsantrasyonunda artış yaptığı rapor edilmiştir (120). Melatonin intrasellüler alanda sitozolik kalmodulin yoluyla direkt kalsiyuma bağı sinyalleri etkilemekte ve adenilt siklaz-fosfodiesteraz gibi hedef enzimleri ve yapısal proteinleri etkilemektedir (Sekil 5) (124). Beynin değişik bölgelerinde (125), overlerde (126), bağırsaklarda (127), ve kan damarlarında (128) olduğu gösterilmiştir. Melatonin reseptörleri (pitüiter bezin pars tuberalisi gibi) muhtemelen üreme fonksiyonları, peripheral dokulardaki reseptörler (örneğin arterler) kardiyovasküler regülasyon ve vücut ısısının ayarlanması üzerinde etkili olabilir. Serumda melatoninin artışı uykunun başlamasını tetiklemektedir ve uykunun devamlılığı ve kalitesini etkilemektedir (129). İnvitro ve invivo (130) çalışmalarda melatonin'in yüksek toksik hidroksil radikali ve oksijen kaynaklı diğer radikalleri temizleyici etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu etkiye aracılık eden reseptörler bilinmemektedir. Bir çalışmada melatonin'in bilinen antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, vit E, vit C gibi) daha etkili olduğu gösterilmiştir (120). Antioksidan etkinin görülebilmesi muhtemelen sadece farmakolojik dozlarda olmaktadır.



Resim 5 . Melatoninin antioksidan özellikleri (120)

Melatonin'in tümör büyümesini inhibe edici, strese bağlı immunodepresyonu giderici etkisi vardır (131). Fare çalışmalarında gösterilmiştir ki melatonin kemik iliğinde T-helper hücrelerinde IL-2, IL-4 yapımını artırmakta ve stromal hücrelerde granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör yapımını artırmaktadır, bunun yanında kemik iliği hücrelerini apoptozise karşı korumaktadır (132). T lenfositlerde (CD-4), yüksek afiniteli melatonin reseptörü bulunmuştur fakat B lenfositlerde melatonin reseptörü yoktur (133).



Resim 7: Melatoninin hücre membranı ve intrasellüler düzeyde etkisi (124)

Gün içerisindeki karanlık saatlerin sayısının değişmesi melatonin sekresyonunu etkilemekte bu da üreme aktivitesini etkilemektedir. İnsanlarda mevsimsel değişim yoktur. Bununla birlikte epidemiyolojik çalışmalarda değişik coğrafi alanlarda dölleme ve doğum oranlarında mevsimsel dağılım gözlenmiştir (134). Melatonin antioksidan etkisi ve immune sistemi destekleyici etkisi ile hücreleri hasarlanmadan koruyarak yaşlanmaya karşı koruyucu etki gösteriyor olabilir (135). Deneysel çalışmalarda melatonin'in hayvanlarda tümör büyümesi üzerinde etkili olduğu görülmüştür, hayvanlara melatonin verilmesi sonrası tümör

büyümesinde inhibisyon görülmüştür (136). Östrojen reseptörü pozitif olan meme kanserli kadınlarda ve prostat kanserli erkeklerde düşük serum melatonin konsantrasyonları ve düşük üriner ekspresyon tespit edilmiştir (137).

2.8.2 Melatoninin etki mekanizması

Melatonin lipid çözünürlüğünden dolayı hücre membranını kolaylıkla geçer ve tüm hücre organellerine nüfuz edebilir. Fizyolojik etkilerini hem reseptör aracılığıyla, hem de reseptörden bağımsız olarak gösterebildiği bildirilmiştir. Beyinde ve suprakiazmatik nükleusta melatonine ait membran reseptörleri belirlenmiştir (138). Son yıllarda yapılan çalışmalarda melatonin reseptörü klonlanmış ve G proteine bağlı reseptör ailesine ait olduğu gösterilmiştir (139). Periferik immün hücrelerde melatonine ait membran reseptörlerinin varlığı saptanmıştır. Bunlar ikinci haberci olarak cAMP'i kullanırlar. Melatoninin nükleusta bağlandığı bölgeler hem merkezi sinir sisteminde hem de periferik dokuda bulunmaktadır ve klonlanmıştır. Melatoninin reseptörden bağımsız etkileri de vardır. Bu etkilerinde aracı olarak kalmodulin kullanılır ve Ca⁺² la ilişkili olan hücre içi olaylar değişikliğe uğrar (138).

2.8.3 Melatoninin Fizyolojik Önemi

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda melatonine ait olduğu gösterilen ya da düşünülen fonksiyonlar şu şekilde sıralanabilir:

✓ Melatoninin insan dışındaki memelilerde mevsimsel üreme fizyolojisi üzerinde etkin olduğu görülmüştür (140).

✓ Salgılanımındaki sirküler ritmden dolayı bu pineal hormon suprakiazmatik nükleus üzerine etki ederek 24 saatlik siklusların düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Melatoninin uyutucu etkisi ve uzun uçak yolculuklarının yarattığı fizyolojik düzensizliğin tedavisinde kullanılması biyolojik saat olarak da tanımlanan suprakiazmatik nükleusla etkileşiminin sonucudur (141).

- İmmün sistem üzerinde modülatör olarak etki yapar.
- Potansiyel antikanser bir madde olduğuna inanılmaktadır (142).
- Melatoninin antioksidan aktivitesi oldukça önemlidir.

▪ Melatoninın 1-50mg/kg dozunda nöroprotektif özelliği olmaktadır. 50-100 mg / kg ölüme kadar yol açabilen komaya sebep olabilir (143).

2.8.4 Melatoninin Antioksidan Özelliği

Melatonin fizyolojik olarak en güçlü serbest radikal temizleyicisidir. Melatonin serbest radikallere direkt etkisinin yanında, glutatyon peroksidazı aktive ederek glutatyon üzerinden de antioksidan etki göstermektedir (144). Melatoninin antioksidan kapasitesi birçok çalışma ile gösterilmiştir. Tan ve arkadaşları melatoninin en toksik oksijen türevi olan OH⁻ radikalini nötralizasyon gücünü araştırmışlardır (145). Bu çalışmada in vitro melatoninin etkisinin glutatyonun beş ve mannitolün onbeş katı olduğu görülmüştür. Bundan bir yıl sonra yapılan bir çalışmada peroksil radikalinin melatonin tarafından tutulması araştırılmış ve trolox (suda çözünebilir bir tür E vitamini), C vitamini ve GSH ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanmıştır. Bu çalışmada melatoninin en etkili antioksidanlardan E vitamininden iki kat daha etkili olduğu bildirilmiştir (146).

Pineal bezin başlıca nörohormonu olan melatonin ilk defa Lerner ve arkadaşları tarafından 1958 yılında izole edilmiştir. Melatonin (N-acetyl – 5-methoxytryptamine) pineal bezden geceleri sentezi yapılan indole amindir. Son yıllarda önemli bir antioksidan olduğu ispatlanan melatoninin antioksidan savunma sisteminde rol alan superoksit dismutaz ve nitrik oksit sentetaz gibi enzim aktivitelerini değiştirdiği rapor edilmiştir (147,148).

Son dönem hayvanlarda yapılan çalışmalar enflamasyon patofizyolojisinin kontrolünde melatonin kullanımının faydalarını göstermiştir. Aynı zamanda okside radikallerin fazla üretiminin kontrolünde etkileri açıktır.

Melatonin antioksidan aktivitesi, prekürsörleri triptofan ve 5 hydroxytryptamine ve belirli sayıda oksidize derivatıfleri ile ispatlanmıştır. Bu moleküllerin indole parçaları oksijen radikallerini tutarak daha fazla zarar verilmesini önlemektedir.

Melatonin diğer antioksidanlarla etkileşime girerek onların etkinliğini artırır. Vit C, trolox ya da GSH ile in vitro ortamda inkübe edildiğinde her üçüyle sinerjik etki gösterdiği ve in vitro radikal oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (149). Melatonin OH⁻'i nötralize ederken kendi elektronlarından birini vererek radikale dönüşür. Bu radikale indolil katyon radikali adı verilir. İndolil oluşuktan sonra ikinci basamakta O₂ radikali zehirsizlendirilir ve N-asetil 5-metoksikinüramin oluşur. Melatonin molekülü kolay oksitlenmez, otoksidasyona uğramaz, redoks döngüsüne ve hidroksi radikali üreten reaksiyonlara katılmaz. Diğer tüm düşük

molekül ağırlıklı antioksidanlardan farklı olarak bir kez okside olduktan sonra indirgenmez. Bu özelliği ile molekül otooksidatif radikal oluşumu ve toksik redoks döngüsüne karşı korunur. N-asetil 5-metoksikinüramin idrarla atılan son üründür.

Melatonin antioksidan olarak nükleer DNA, membrane lipidleri ve hücre içi proteinleri oksidatif hasarlara karşı korur. Ayrıca melatonin süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, glukoz 6 fosfat dehidrojenaz ve nitrik oksit sentaz enzim aktivitelerinde değişikliğe neden olduğu rapor edilmiştir (148). İnflamasyon ve oksidan stress koşullarında nitrik oksit ve süperoksitin birleşmesiyle oluşan peroksinitrit toksik bir oksidandır. Melatonin peroksinitrite bağlı oksidan olaylarda inhibitör etkiye de sahiptir.

Melatoninin lipid peroksidasyonunu azalttığı 1993'deki bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada Pierrefiche ve arkadaşları allopsana bağlı olarak kan glukozundaki yükselmeyi melatoninin sınırlandırdığını göstermişlerdir (150). Bir diğer çalışmada da özellikle akciğerlerde biriken böcek ilacı Paraquatla oluşan lipid peroksidasyonu melatoninle birlikte verildiğinde ortadan kalkmış bulunmuştur (151,152).

Melatoninin glutatyon peroksidaz üzerine etkisi vardır. Bu enzim antioksidan savunma sisteminin bir elemanı olarak özellikle nöral dokuda önemli rol oynar. Sığına eksojen melatonin uygulandığında beyin glutatyon peroksidaz aktivitesi 30 dakika sonra iki katına çıkar. Enzim aktivitesi ile doku melatonin konsantrasyonu arasında pozitif korrelasyon bulunmuştur (153).

Melatoninden etkilendiği gösterilen başka bir enzim ise 5-lipooksijenazdır. Bu enzim allerjik ve enflamasyon reaksiyonlarında anahtar rol oynayan lökötrienlerin sentezinde görev yapar. Melatoninin 5-lipooksijenaz aktivitesini inhibe etmesinin enflamasyonu ve sonuçta serbest radikal hasarını azaltacağı düşünülebilir (154).

Melatoninin birçok hücre fraksiyonunu oksidatif hasardan koruma özelliği onu önemli bir antioksidan haline getirir. Diğer serbest radikal tutucuların çözünürlükleri nedeniyle aktiviteleri sınırlıdır. Örneğin E vitamini membranda bulunan doymamış yağ asitlerini oksidasyondan koruyan önemli bir maddedir ancak sitozolde bulunmadığı için bu ortamda koruması çok sınırlıdır.

Antioksidan olarak etkili olan ve geniş bir intraselüler dağılım gösteren tek madde melatonin değildir, ancak yüksek toksisitesi olan serbest radikallerin direkt tutucusu olarak diğer endojen antioksidanlardan daha etkilidir. Direkt serbest radikal tutma özelliğinin

yanısıra melatonin nükleer reseptör üzerinden serbest radikalleri tutan enzimlere etkilidir (155). Bu etkilerin bir araya gelmesiyle melatonin indol içeren organizmalarda antioksidan savunma sisteminin komponenti olarak kabul edilmektedir (156).

2.8.2. EMA ve Melatonin

Manyetik alanların pineal bez aktivitesi üzerine de etkileri bulunmaktadır. Birçok çalışmada manyetik alanın, endojen anti epileptik bir bileşik olan ve pineal bezden salınan melatoninin etkisini değiştirebileceği gösterilmiştir. Bu alanlar aynı zamanda dopaminerjik, serotonerjik ve endojen opioidlerjik fonksiyonları regüle etmektedir. Labaratuvar hayvanlarında yapay olarak düzenlenen manyetik alanların, habenular komplekste bir kapı fonksiyonu olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (157). Habenular kompleksteki dopaminerjik sistemler, orta beyin / striatal yerleşimli dopaminerjik nöronlar ile etkileşime girmektedir (158). Ventrikül içine antimelatonin antikör enjeksiyonu sonrası, sadece enjeksiyon tarafında geçici epileptik anormallikler oluşmaktadır (159). Ratlarda nokturnal deneysel manyetik alan uygulamasını muhtemelen melatonin sentez ve salınımını baskılayarak, nöbetlere neden olabilmektedir (160).

Mongolian gerbillerde spontan olarak nöbetler oluşmuştur. Pinealektomi ile nöbet sıklığında belirgin artış görülmüştür ve bu sıklık subkutan melatonin uygulamasını sonrası normal aralıklara düşmüştür (161). Pinealektomi ayrıca GABA bağlanımını kolaylaştırmış ve bu bağlanımda diürinal varyasyonda azalmaya sebep olmuştur. Bu melatonin uygulamasını ile de normale dönmüştür (162). Kendi isteği ile katılan 37 gönüllü erkek üzerinde yapılan bir çalışmada, iki çeşit cep telefonunun etkileri araştırılmıştır. Gönüllüler 2 saat/gün, 5 gün/hafta süreler ile 14:00-16:00 ve 16:30-18:30 saatleri arasında 4 hafta süre ile cep telefonunun etkisine maruz bırakılmıştır. Her iki telefonun etkisi arasında belirgin anlamda melatonin salınımı üzerinde farklılık saptanmamıştır (163). Bir çocukta fenobarbitale ek olarak yüksek doz melatonin (7.5 mg/kg) uygulamasını, önceden dirençli olan miyoklonik epilepsi kontrolüne destek olmuştur (164). Uzun süreli 0.1-mT, 50 Hz.lik manyetik alana maruz kalan ratlarda, melatonin sentezi azalmıştır (165,166). Düşük frekanstaki (50-60 Hz) EMD'nin özellikle nöroendokrin sistem üzerindeki etkileri önemlidir. Örneğin, melatoninin sirkadiyen ritminin değiştiği, pineal bezin fonksiyonunda azalmanın arttığı rapor edilmiştir. Yine ratların pineailinde N-Asetil Transferaz enziminin inhibe olduğu, melatoninin nokturnal pik amplitüdünde düşme, pik oluşma zamanında ise gecikmeler olduğu bildirilmiştir (167). Gsm

900 ve DCS 1800 ti cep telefonların, 38 sağlıklı erkekte melatonin salınımı üzerindeki etkilerini araştırmak amacı ile, haftanın 5 günü (günde 2 saat) toplam 4 hafta süre ile telefonların maksimum güçleri ile uygulanma yapılmış, çalışma sonunda sirkadiyen ritm bozulmadığı gibi, her iki tip telefonun etkileri arasında da anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır (163). Melatoninin ratlarda ayrıca nöbetlerin kindling modeline antikonvulzan etkisi de bulunmaktadır. Bu da manyetik stimülasyona duyarlı olabilmektedir (168). Melatoninin ayrıca nöroprotektif etkileri de olduğu düşünölmektedir (169).

3.9. Apoptozis

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (170). Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Apoptozis köken olarak "apo-TOE-sis" 'den gelmektedir ve eski Yunancada "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir. Wyllie, 1980 yılında apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütönlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının olduğunu göstermiştir (171). Apoptozis sırasında plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekteşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğini belirler. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir. Apoptozis, hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzölme ve DNA fragmantasyonu ile karakterizedir (172).

3.9.1. Apoptozis mekanizmaları

Apoptozisin gerçekteşmesinde üç sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir.

3.9.1.1.Mitokondri/Sitokrom-C Aracılı Apoptozis Oluşturulması

Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere sitokrom-c ihtiva eder. Mitokondrial stres durumlarında serbestlenen sitokrom-c apoptotik hücre olumunde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol teşkil eder. Bu yolda mitokondri tarafından kontrol edilen apoptotik proteaz aktive edici faktor (Apaf-1) ve kaspaz-9 bulunmaktadır. Ko-faktor nukleotid trifosfat (d-ATP

ve ATP) ile aktive edilen sitokrom-c ve apaf-1 birleşerek prokaspaz-9'u aktive eder. Aktive kaspaz-9 da kaspaz-3'u aktive ederek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar . Sağlıklı bir hücre mitokondrisinin dış membranında Bcl-2 proteini yer alır. Bcl-2, Apaf-1 proteininin bir molekülünü bağlar. Bcl-2 neden olduğu internal hasarla mitokondride çatlaklar oluşturarak Apaf-1 ve Sitokrom-C salınımına yol açar. Bu iki protein kaspaz-9 moleküllerine bağlanır (173)

3.9.1.2. Dış Sinyallerle Apoptozisin Tetiklenmesi

Ölüm aktivatorleri (Fas-L ve TNF) hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplâzmaya kaspaz-8'i aktive eden sinyaller yayılır. Kaspaz-8 (kaspaz-9 gibi) diğer kaspazları uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar. SCI reseptörleri Fas ve p-75 ile bağlantılıdır. Bu reseptörler tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen ailesinin üyeleridir. Bunların apoptotik hücre ölümünü başlatan kaspaz kaskadını aktive ettiği bilinmektedir. Fas reseptörünün, Fas ligand (Fas-L) ile karşılıklı etkileşimi FADD (Fas bağımlı olum domain proteini) aracılığı ile olur ve bunun sonucunda da kaspaz-8 aktive edilerek apoptotik döngü başlar (173).

3.9.1.3. Endoplazmik Retikulum aracılı apoptozis oluşturulması

Son zamanlarda amiloid β norotoksitesine katkıda bulunan kaspaz- 12'ye bağımlı endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir. Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve olum reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. ER, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalar göstermiştir ki Ca^{++} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder. Son çalışmalar, in vivo ve in vitro olarak kaspaz-12'nin kaspaz-9'u aktive ettiğini göstermiştir (174).

3.9.2. Apoptozisin genetik kontrolü

Protoonkogenler normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir. Bu genler aktive olup mutasyona uğradıklarında onkogen adını alır. Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirir. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise adından da anlaşılacağı üzere tümör

baskılayıcı genlerdir (174). Son yapılan çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin programlı hücre olumunu kontrol ettiğini göstermektedir (175). Omurgalılarda apoptozisi düzenleyen genler c-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır (176).

Apoptozisi düzenleyen bir diğer gen, tümör baskılayıcı p-53 genidir. Hipoksi ve serbest radikal oluşumu p-53 aracılı DNA onarımı ve apoptozisi başlatır. DNA hasarı olduğu zaman S fazına geçişi bloke eder. DNA tamiri için zaman kazanılır, eğer tamir mümkün değilse hasardanmış hücreler apoptozisle yok edilir (177).

Bir transkripsiyon düzenleyici faktör olan c-myc proteini, ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin proliferasyonuna ve apoptozise uğramasına neden olur (178). C-myc protoonkogeni bir hücrenin büyümesini programlar. Eğer hücrede hem c-myc hem de uygun büyüme faktörleri yoksa büyüme durur, her ikisi de yeterli ise çoğalma olur, c-myc olduğu halde büyüme faktörleri yoksa apoptozis görülür (179).

Bcl-2 (antiapoptotik protein) ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur ve bir düzineden fazla üyesi vardır. Bunlardan bazıları apoptotik aktivitenin öncüleri iken (bax ve bad), diğerleri antiapoptotik (hücre koruyucu) proteinlerdir. Bu proteinlerin seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar verir. Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondridir ve bcl-2 güçlü bir olum inhibitörüdür. Antioksidan yolda mitokondriden sitokrom-c salınımını engellemede rol oynar. Bcl-2 mitokondri membran dışında, endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda bulunur. Bcl-2 ayrıca Raf 1 ve kalsinorine bağlanır (180). Bcl-xl mitokondri membran dışında lokalizedir. Bcl-xl ve Bcl-2 beraberce mitokondri membran geçirgenliğini korurlar. Proapoptotik proteinleri (Bax ve Bad) inhibe ederek apoptozisi engeller. Bcl-xl kaspaz aktivasyonunu, Apaf-1 üzerinden önler. Bax ve bad proteinleri etkilerini diğer bir protein ailesi; kaspazlar üzerinden gerçekleştirir. Bunların sayısı da bir düzineden fazladır. Kaspazlar sistein proteazlardır, aktiviteleri hücre olum yolunda ortaya çıkar. Kaspaz-9, bcl-2 ailesi tarafından stimule veya inhibe edilir. Kaspaz-2 ve kaspaz-8, TNF- α gibi sitokinler tarafından aktive edilir. Antiapoptotik protein ailesinden apoptozis protein inhibitörleri omurgalı ve omurgasızlarda bulunmuş olup, bunlar programlanmış hücre olumunun negatif düzenleyicileridir. Bazı memeli homologları; XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Bruce, Survivin, pIAP olarak tanımlanmıştır. Bunların çoğu hücre olumunu kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'a direkt olarak bağlanıp onları inhibe ederek gerçekleştirirler. Apoptozis protein inhibitörleri kaspazları olum reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler (181).

3.9.3. Apoptozisde hücre içi sinyal iletimi ve metabolik değişimler

Apoptotik sinyal iletimi ile ilgili bu güne kadar elde edilen bilgiler, hücre içi diğer sinyallerin iletiminden sorumlu olan bazı molekül ve enzimlerin, apoptozisteki sinyal iletiminde de rolleri olduğunu göstermektedir (182). Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan Ca^{++} apoptoziste de rol oynar. Hücre içindeki Ca^{++} iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptozise götürmektedir. Sitoplazmadaki Ca^{++} iyonu miktarındaki hafif artış, c-myc, c-fos, ısı şok proteinlerini harekete geçirir ve hücrenin apoptozise gitmesine neden olur. Ca^{++} adenilat siklazları aktive ve inhibe etme yeteneğine sahiptir. C-AMP ve protein kinazlar üzerinden sinyal iletimini etkiler. Hücre içi c-AMP konsantrasyonundaki artışın çeşitli hücre tiplerinde apoptozisi uyardığı bildirilmiştir. Ca^{++} 'dan bağımsız olarak da apoptozis olabileceği gösterilmiştir. Sitoplazmada artan Ca^{++} , inaktif durumdaki Ca^{++} bağımlı proteazları ve nukleazları aktive ederek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü internukleozomal DNA kırıklarına neden olur. Ca^{++} iyonu, inaktif durumdaki endonukleaz, proteaz, transglutamaz, fosfolipaz gibi latent enzimleri aktive ederek apoptozise neden olur (183).

Kalsiyuma bağlı endonukleazlar: Endonukleazlar sitoplazmada artan Ca^{++} tarafından aktif hale getirilir. DNA zincirini, H1 histon bölgesinden 180-200 baz çifti ve katları uzunluğunda parçalara ayırır (184).

Transglutamazlar: Apoptoziste hücreler büzülür ve küçük parçalara ayrılır. Bu parçalar; transglutamazların yaptığı protein çapraz bağlanmaları ile kimyasal maddelere karşı dayanıklı hale getirilir (182).

Proteazlar: Proteazlar histonları ve kromatin yapısını stabilize eden proteinleri parçalar. Kalsiyum bağımlı notral bir proteaz olan 'kalpin' hücrenin iskelet yapısını bozar. Lizozomal bir proteaz olan katepsin- D apoptozisin geç evresinde ortaya çıkan bir endopeptidazdır ve lizozomların proteolitik aktivitesinin oluşumunda önemlidir (185).

Lipid Modifiye Edici Enzimler: Normal hücrelerin plazma membranlarında fosfolipid asimetrisi vardır (Membran fosfolipidlerinin hücre dışında ve içinde kalan kısımları farklıdır). Bu asimetri ATP'ye bağımlı fosfolipid translokaz enzimi tarafından sağlanır. Apoptotik indüksiyon olduğunda bu enzim etkilenir ve zar asimetrisi bozulur. Makrofajlar hücreyi yabancı bir hücre olarak algırlar ve fagosite eder (186).

Protein Kinazlar: Protein fosforilasyonunda rol oynayan zar ve sitoplazma enzimlerinin apoptotik sinyallerin iletiminde önemli oldukları kanıtlanmıştır. Bu enzimlerden protein kinaz-A, apoptozisi sağlarken, protein kinaz-C apoptozisi durdurur (182).

3.9.4. Apoptotik hücrede gözlenen morfolojik değişiklikler

3.9.4.1. Yüzey Organellerinin Kaybı

Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillusler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (187).

3.9.4.2. Hücre Büzülmesi

Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur. Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (187).

3.9.4.3. Kromatin Yoğunlaşması

Önemli yapısal değişiklik çekirdekten başlayarak izlenir. Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür. Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (171).

3.9.4.4. Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması

Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür. Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfolipidlerin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfolipidlerin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür. (187)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Yöntem: Bu çalışmada Wistar suşu erişkin dişi sıçanlar (200–250 g) kullanıldı. DEÜ Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında Wistar suşunun bulunması ve literatürle uyumlu olması nedeniyle bu tür ve cins seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deneysel Hayvanları Laboratuvarlarında standart koşullarda bakıldı. Herhangi bir sebeple deneyi devam ettiremeyecek olan (enfeksiyon, düşük, ölü doğum) ya da deneyler bitmeden yaşamı sonlanan hayvanlar deney ve istatistik kapsamından çıkarıldı. Çalışma Gruplarında gebelik döneminde EMA'nın etkilerini araştırmak için östrus takibi yapılarak 28 adet dişi sıçanın gebe kalması sağlandıktan sonra çalışma grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

Anne grup: gebe kontrol	EMA' a maruz kalmayan (n=7)
Anne grup: gebe kontrol + melatonin	EMA' a maruz kalmayan (n=7)
Anne grup: gebe deney	EMA' ya maruz kalan (n=7)
Anne grup: deney + melatonin	EMA' ya maruz kalan (n=7)

Yukarıda oluşturduğumuz gruplardan her anneden doğan bir yavru rastgele alınarak yavru grupları oluşturuldu. Buna göre yavru grupları şu şekilde oluştu:

Yavru grup: gebe kontrol	EMA' a maruz kalmayan (n=7)
Yavru grup: gebe kontrol + melatonin	EMA' a maruz kalmayan (n=7)
Yavru grup: gebe deney	EMA' ya maruz kalan (n=7)
Yavru grup: gebe deney + melatonin	EMA' ya maruz kalan (n=7)

Östrus takibi

Çalışmada, gebelik döneminde EMA'nın etkilerini araştırmak için östrus takibi yapılarak 28 adet dişi sıçanın gebeliği sağlandı. Gebelik öncesi normal sıçanlarda östrus dönemlerini belirlemek için vajinal yayma tekniği kullanıldı. Vajinal yayma tekniği için Bronson ve arkadaşlarının kriterleri temel alındı. Östrüs evresinde olduğu tespit edilen dişi ratlar erkek ratlar ile bir gece boyunca aynı kafese konularak çiftleşti. Ertesi gün vajinal plak ve sperm testin pozitif sonuçlandığında gebeliğin birinci günü olarak kabul edildi. Deneysel gruplarından EMA'a maruz bırakılacak ve melatonin uygulanacak olanlara gebeliğin sekizinci gününden itibaren bu işlem yapıldı.

Melatonin uygulaması

Melatonin (Sigma, St. Louis, MO, USA) öncelikle saf etanol içinde çözündürülerek ve daha sonraki dilüsyonları serum fizyolojik içinde yapılarak % 1'lik etanol konsantrasyonu elde edildi. Melatonin gebeliğin 8'inci gününden itibaren her gün (grup 2 ve 4) gündüz saat 10'da 4 mg/kg ip olarak verildi. Melatonin verilmeyen gruplara ise aynı zamanlarda ve aynı dozda % 1'lik alkol verildi.

EMA oluşturulması

EMA oluşturmak için 50 Hz frekanslı alternatif akım ile 30–80 Gauss (G) EMF meydana getiren helmholtz bobin sistemi kullanıldı. EMA'nın şiddeti bir transformator ve Tesla metre aracılığıyla kontrol edildi. EMA sistemi birbirinden 50 cm aralıklı yerleştirilen 50 cm çaplı iki bakır bobinden oluştu. Deney gruplarının kafesleri bobinlerin arasına yerleştirildi. Bu sistemle aynı anda 2 kafese EMA uygulandı. Deney gruplarındaki sıçanlar, gebeliğin sekizinci günden itibaren gebeliğin sonuna kadar her gün, günde 4 saat boyunca 30 G veya 3 miliTesla EMA'ya maruz bırakıldı.

Tiroid Doku Örneklerin alması

Gebeliğin sonunda yavru ratlar doğar doğmaz chloral hydrated kullanılarak anne ve yavru ratlar anestezi yaptıktan sonra sakrefiye edildi. İnfragenioid bölgeden orta kısmından sternuma kadar insizyon yaptıktan sonra trakea üzerine yerleşmiş olan tiroid bezi görüldü. Seteriomikroskop kullanılarak tiroid bez dokusunu trakea üzerinden ayrıldı. Çıkarılan tiroid dokusunun sağ tarafı EM incelemesi için ve sol tarafı ışık mikroskop incelemesi için iki parçaya ayrıldı. Elde edilen tiroid doku örnekleri ışık mikroskopi takibi için %10 formalin fiksatif ve elektron mikroskobik incelemek için % 2.5 glutaraldehide prefiksativf alınarak doku takibine başlandı.

Işık Mikroskopik İnceleme

Parafin blok hazırlama tekniği

1. Alınan doku örnekleri düzgün şekilde trimlenerek %10'luk formaldehit solüsyonlarında, solüsyonlar değiştirilerek 48 saat süre ile tespit edildi.

2. %10'luk formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri akan musluk altında 3-4 saat süre ile yıkandı.

3. % 70'lik alkolde 20 dakika etüvde bekletildi.

4. % 80'lik alkolde 20 dakika etüvde bekletildi.

5. % 96'lık alkolde 20 dakika etüvde bekletildi.

6. % 96'lık alkolde 20 dakika etüvde bekletildi.

7. % 100'lük alkolde 20 dakika etüvde bekletildi.

8. % 100'lük alkolde 20 dakika etüvde bekletildi.

9. Ksilol I'de 20 dakika etüvde bekletildi.

10. Ksilol II'de 20 dakika etüvde bekletildi.

11. Parafin I'de 64°C de etüvde bir saat bekletildi.

12. Parafin II'de 64°C de etüvde bir saat bekletildi.

13. Takip edilen dokular kauçuk bloklama kaplarına gömülerek etiketlendi ve sertleşmesi için buzdolabına konularak parafin bloklar hazırlanmış oldu.

Buzlukta yeterince sertleşen parafin bloklardan Leica® RM 2125 RT mikrotom cihazı ve Leica® marka mikrotom bıçakları kullanılarak 5-6 µm kalınlığındaki parafin kesitler alındı. Bu kesitlere genel doku ve intrafolliküler çap ölçüm değerlendirmesi için Hematoksilen-Eozin, bağ dokusu bileşenlerini göstermek için Mallory's Aniline blue boyası ve alınan kesitlerde intrafolliküler kolloid miktarının değerlendirmesi için, Periodik asid schiff (PAS) boyası uygulandı.

Hematoksilen-Eozin Boyama

1. 5-6 µm kalınlığındaki parafin kesitler bir gece 60°C de etüvde bekletildi.

2. Ksilol I'de 10 dakika bekletildi.

3. Ksilol II'de 10 dakika bekletildi.

4. Ksilol III'de 10 dakika bekletildi.

5. İki kere %100'lük alkolde 1'er dakika bekletildi

6. İki kere %96'lık alkolde 1'er dakika bekletildi.

7. Akar suda yıkandı.
8. Hematoksilen de 3 dakika bekletildi.
9. Akar suda yıkandı.
10. %80'lık alkolde 1 dakika bekletildi.
11. Eozin'de 1 dakika bekletildi.
12. İki kere %96'lık alkolde 2'şer dakika bekletildi.
13. İki kere %100'lük alkolde 2'şer dakika bekletildi.
14. Ksilolde I 10 dakika bekletildi ve lamel ile kapatıldı.
15. Ksilolde II 10 dakika bekletildi ve lamel ile kapatıldı.
15. Ksilolde III 10 dakika bekletildi ve lamel ile kapatıldı.

Mallory'nin Anilin mavisi boyası

1. 5-6 µm kalınlığındaki parafin kesitler bir gece 60°C'de etüvde bekletildi.
2. İki kere 15'er dakika xylende bekletildi.
3. 10 dakika %100'lük alkolde bekletildi.
4. 10 dakika %96'lık alkolde bekletildi.
5. Distile su'da 3 dakika bekletildi.
6. Asid fuchin solusyonda 3 dakika bekletildi.
7. yıkamadan Anilin blue'da 45 dakia bekletildi.
8. %96'lık alkolde 2-3 kez çalkalandı.
9. %100 alkulda 2-3 kez çalkalandı.
10. Ksilol I'de 10 dakika bekletildi.
11. Ksilol II'de dakika bekletildi.
12. Ksilol II'de dakika bekletildi.
13. Lamel ile kapatıldı.

Solusyonlar:

1. Asid fuchin solusyon:

Asid fuchin 0.5g

Distele su 100cc

2. Anilin blue-orange G solüsyun.

Anilin blue 0.5g

Orange G 2g

Fosfotungstik asid 1g
Distile su 100cc

Periyodik Asid Schiff (PAS) boyama

1. 5-6 µm kalınlığındaki parafin kesitler bir gece 60°C de etüvde bekletildi.
2. Ksilol I'de 15 dakika bekletildi.
3. Ksilol II'de 15 dakika bekletildi.
4. 2 dakika %100'lük alkolde bekletildi.
5. 2 dakika %96'lık alkolde bekletildi.
6. 2 dakika %70'lik alkolde bekletildi.
7. Distile su ile yıkandı.
8. %0,5 lik periyodik asid solüsyonunda 7 dakika bekletildi.

%0,5 lik periyodik asid solüsyonu:

Periyodik asid 0,5 ml

Distile su 100 ml.

9. Distile su ile yıkandı.

10. Coleman'ın Schiff solüsyonunda 20 dakika bekletildi.

Coleman'ın Schiff solüsyonu:

Bir gr bazik fuksin, 60°C'de 200 ml distile su ile karıştırıldı ve kaynama noktasına kadar ısıtılıp soğutuldu. Sonra 2 gr potasyum metabisülfid ve 1 Normalite hidroklorik asit (1N HCl) ilave edilerek 24 saat bekletildi ve 0,5 gr aktif karbon ilave edilerek çalkalandı ve filtre edilerek buzdolabında 4°C'de saklandı.

1 N HCl

Hidroklorik asit % 37'lik(HCl) 83.5 ml ve Distile su 916.5 ml

9. 15 dakika akar suda yıkandı.

10. Mayer' in hematoksileni damlatıldı ve 1 dakika bekletildi.

11. 15 dakika akar suda yıkandı.

12. %95'lik alkolde iki dakika bekletildi.

13. %100'lük alkolde iki dakika bekletildi.

14. Ksilol I'de 10 dakika bekletildi.

15. Ksilol II'de10 dakika bekletildi.

16. Ksilol III'de10 dakika bekletildi.

17. Lamel ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal İnceleme

Işık mikroskopik inceleme için hazırlanan parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığındaki kesitler polizimli lamlara alındı. Tiroid folliküllerinde epitel hücrelerinde apoptozisi göstermek için In situ Cell Death Detection Kit, POD, TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) tekniğinden yararlanıldı ve bunun için Roche® kiti (68298 Mannheim Germany cat. No. 11 684 817 910; Roche) kullanıldı. Aynı zamanda yine tiroid follikül epitel hücrelerinde Kaspaz 3 immunreaktivitesini göstermek için kaspaz 3 (CPP32) Ab-4(Lab Vision, ABD) rabbit polyclonal antibody kullanıldı.

İmmünohistokimyasal boyama

TUNEL:

Polilizinli lamlar üzerine 5-6 mikron kalınlığında alınan dokular bir gece boyunca 37°C de sonra 1 saat 54°C’de etüvde bekletildi.

1. Üç defa beşer dakika ksilolde bekletilir kuruduktan sonra pappen ile çizildi.
2. 10 dakika %100 alkolde bekletildi.
3. 10 dakika %96 alkolde bekletildi.
5. Üç dakika distile suya kondu.
6. PBS’ te yıkandı.
7. 10-20 Mg/ml Proteinase K’de 15 dakika oda ısısında bekletildi.
8. PBS ile yıkandı.
9. Peroxide Plock (H2O2)da 10 dakika Oda sıcaklığında bekletildi. (Amaç istenmeyen zemin boyamalarını engellemek)
10. PBS ile yıkandı.
11. Her lam için 5 µl terminal deoksinukleotidil transferaz (TdT) ve 45 µl labeling safe buffer boyama reaksiyon karışımını buz üzerinde hazırlanarak damlatıldı ve 60-90 dakika bekletildi.
12. Üç defa beşer dakika PBS ile yıkandı.
13. Antikor- epitop bağlanması renklendirilerek görünür hale getirmek amacıyla DAB kromojen dokularının üzerine damlatılarak 20 dakika inkübe edildi
14. Distile suyla yıkandı.

15. Hematoksilen Harris ile 5 dakika boyandı.
16. Distile suyla yıkandı.
17. İki defa %70'lık alkol, %80'lık alkol,%96'lık alkol, absolut alkol daldırıldı.
18. Ksilenlerde I, II, III 'de 15'er dakika bekletildi.
19. Lamel ile kapatıldı.

Kaspaz 3:

Polilizinli lamalar üzerine 5-6 mikron kalınlığında alınan dokular bir gece boyunca 37°C de sonra 1 saat 60°C'de etüvde bekletildi.

1. Üç defa beşer dakika ksilolde bekletilir kuruduktan sonra pappen ile çizildi.
2. 10 dakika %100 alkolde bekletildi.
3. 10 dakika %96 alkolde bekletildi.
5. Üç dakika distile suya kondu.
6. PBS' te yıkandı.
7. 10-20 Mg/ml Proteinase K'de 15 dakika oda ısısında bekletildi.
8. PBS ile yıkandı.
9. Peroxide Plock (H₂O₂)da 5 dakika Oda sıcaklığında bekletildi. (endojen peroksidi inhibe etmek için)
10. Üç defa beşer dakika PBS ile yıkandı.
11. bloking yapılıp oda ısısında 1 saat bekletildi.
12. yıkamadan primer antikor (10 mikrolitre antikor + 990 mikrolitre PBS) damlatıp +4 C'da bir gece bekletildi.
13. bir saat oda ısısında bekletildi.
14. Üç defa beşer dakika PBS ile yıkandı.
15. biotinlenmiş (sekonder Ab) solusyonu damlatıp 10 dakika oda ısısında bekletildi.
16. Üç defa beşer dakika PBS ile yıkandı.
17. biotinlenmiş (sekonder Ab) solusyonu damlatıp 10 dakika oda ısısında bekletildi.
18. Üç defa beşer dakika PBS ile yıkandı.
19. Antikor- epitop bağlanması renklendirilerek görünür hale getirmek amacıyla DAB kromojen dokularının üzerine damlatılarak 20 dakika inkübe edildi.
20. Distile suyla yıkandı.
21. Hematoksilen Harris ile 5 dakika boyandı.

22. Distile suyla yıkandı.
23. İki defa %70'lık alkol, %80'lık alkol,%96'lık alkol, absolut alkol daldırıldı.
24. Ksilenlerde I, II, III 'de 15'er dakika bekletildi.
25. Lamel ile kapatıldı.

Elektron Mikroskopik Yöntem

Elektron mikroskopik inceleme için sağ taraf tiroid dokuları %2,5'luk fosfat tamponlu gluteraldehit içine konularak pH 7,4 ; +4°C de tespit edildiler ve daha sonra elektron mikroskop doku takibine alındılar.

Elektron Mikroskopik Doku Takibi

Sorenson'un fosfat tampon solusyonu:

Solusyon A:

Potasyum fosfat monobazik (KH₂PO₄) 0,908 g

Distile su 100 ml

Solusyon B:

Sodyum fosfat dibazik (Na₂HPO₄·4.2H₂O) .1,188 g

Distile su. 100 ml

18,2 ml solusyon A + 81,8 ml solusyon B = 100ml (pH: 7.4)

Gluteraldehit tespiti:

9,2 cc Sorenson fosfat tamponu + 0,8 cc Gluteraldehit = 10 cc

Dokular bu solüsyonda 30 dakika etkin bırakılıp sertleşmeleri sağlandıktan sonra, çift bistüri yardımıyla 1 mm³ 'lük parçalar halinde ayrıldılar. Bir saat daha gluteraldehit solüsyonunda bekletilerek ilk tespitleri sağlandı.

Osmiyum Tetroksit tespiti:

Osmiyum tetroksit (OsO₄)0,1 g

Distile su5 cc

1 kısım Sorenson fosfat tamponu + 1 kısım osmiyum tetroksit

Dokular bu şekilde hazırlanmış %1'lik osmiyum tetroksit solüsyonunda 1 saat etkin bırakıldılar. Böylece hem tespitleri hem de boyanmaları sağlanmış oldu.

Dehidratasyon ve blok oluşturulması:

Dokular osmiyumla ikinci kez tespit edildikten sonra, doku içindeki fazla suyun uzaklaştırılması için, artan derecelerdeki alkol serilerinden geçirildiler.

%50'lik alkol	15 dakika
%60'lık alkol	15 dakika
%70'lik alkol	15 dakika
%80'lik alkol	15 dakika
%90'lık alkol	15 dakika
%96'lık alkol	2 kez yıkandı ve 15 dakika bekletildi
%100'lük alkol	iki kere 30'ar dakika bekletildi
Propilen oksit	60 dakika
Propilen oksit + 1. gömme materyali	30 dakika
1. Gömme materyali	1 gece

1. Gömme materyali:

Araldit CY 212	10 cc
DDSA (Dodecenyl succinic anhydride).....	10 cc
2.Gömme materyali	2 saat oda ısısı
2.Gömme materyali	2 saat 40°C etüvde bekletildiler.

2. Gömme materyali:

Araldit CY 212	10 cc
DDSA (Dodecenyl succinic anhydride)	10 cc
BDMA (N- Benzyl dimethylamine)	0,4 cc
Dibütil fitalat	1 cc

Daha sonra dokular, içinde aynı gömme materyali bulunan 00 numara jelâtin kapsüle gömüldü. Blok içindeki havanın çıkması için 1 saat oda ısısında bekletilen kapsüller, polimerizasyon için 24 saat 45°C'de, 48 saat 60°C'de etüvde bekletildi. Süre sonunda etüv kapatılarak, dokular etüv içinde kendi hallerinde soğumaya bırakıldı.

Hazırlanan bloklardan Leica Ultramikrotom ile 1 µm kalınlığında kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyandı. Olympus BH2 ışık mikroskobu ile incelenen kalın kesitlerin resimleri çekildi ve bu bölgeler işaretlenerek formvar kaplı bakır gridler üzerine 300-700 A° '

luk ince kesitleri alındı. Kontrast sağlamak için alınan kesitler, uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak 9 Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elektron mikroskop ünitesinde Zeiss Libra 120 transmisyon elektron mikroskopunda değerlendirilerek fotoğraflandılar.

Ölçüm ve değerlendirme yöntemi:

İntrafolliküler çap ölçümü ve interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü için amaca yönelik yaptığımız boyamalarla elde edilen preparatlar ışık mikroskobuna (Olympus BH-2 Tokyo, Japan) yerleştirildi. Bu mikroskoba bağlı yüksek çözünürlükteki kamera (JVC TK-890E, Japan) aracılığı ile elde ettiğimiz görüntüler, video kamera analysis sistem (UTHSC Image software) yüklü olan bilgisayara aktarıldı. Bilgisayarda Aver TV Studio Video Capture [Version 4.21.0.0 (software), Aver Media Technologies] yardımı ile digital fotoğraflama yapıldı.

Apoptoz Değerlendirilmesi:

Elde edilen kesitlere apoptotik hücreleri göstermek için TUNEL boyaması ve bunu desteklemek için kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması yapıldı. Her gruptaki deneklerin tiroid doku kesitlerinde, x20 objektif büyütmesi ile 10 ayrı alandaki 100 epitel hücresinde TUNEL pozitif boyanan hücreler sayıldı. Ayrıca kaspaz 3 boyaması yapılan kesitlerde immün (+) boyanan epitel hücreleri değerlendirildi ve 10 ayrı alandaki 100 epitel hücresinde pozitif boyanan hücreler sayılarak ortalaması alındı. Elde ettiğimiz görüntüleri fotoğraflanarak çalışmamıza ekledi.

İstatistiksel Analiz:

Çalışmamızda elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Değerlendirmede ortalama, standart sapma, ANOVA varyans analizi, Bonferroni testi kullanıldı ve $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

3.1. Follikül çap ölçümünün değerlendirilmesi:

Anne kontrol ve sham grublarına ait H&E' ile boyanmış tiroid doku örneklerinde follikül çapları normal histolojik yapıya sahipti. Anne kontrol grubuna ait doku örnekleri incelenip follikül çap ölçümü yapıldığında ortalaması 65.26 ± 2.26 olarak saptandı (Grafik 1) (Şekil 1). Anne sham grubuna ait doku örnekleri incelenip follikül çap ölçümü yapıldığında ise ortalaması 65.41 ± 0.84 olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında çap ölçümleri sonuçları bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($P \leq 1$) Anne EMA grubuna ait doku örnekleri incelenip follikül çap ölçümü yapıldığında ortalaması 36.35 ± 0.90 olarak saptandı. Anne EMA grubunda intrafolliküler çap ölçümü, kontrol, EMA+melatonin ve sham gruplarına göre daha küçük olduğu saptandı ve bu gruplar ile yapılan istatistik karşılaştırma ile EMA grubuna ait follikül çap ortalaması ile kontrol grubuna ait follikül çap ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.0001$). Yine EMA grubuna ait follikül çap ortalaması ile sham grubuna ait follikül çap ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($P \leq 0.0001$). EMA grubuna ait follikül çap ortalaması ile EMA + melatonin grubuna ait follikül çap ortalaması arasında da anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.0001$). Anne EMA + Melatonin grubuna ait doku örnekleri incelenip follikül çap ölçümü yapıldığında ortalaması 50.18 ± 1.73 olarak saptandı. Anne ratlarda EMA artı Melatonin uygulanan grupta follikül çap ölçüm oranı EMA grubuna göre oldukça geniş olarak görünmesine rağmen kontrol ve sham grubuna göre daha küçük olarak ölçüldü. EMA + melatonin grubuna ait follikül çap ortalaması ile kontrol grubuna ait follikül çap ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptandı ($P \leq 0.001$). Aynı şekilde sham grubuna ait follikül çap ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($P \leq 0.001$) (Grafik 1)(Şekil 1).

Yavru kontrol ve sham grublarına ait H&E' ile boyanmış tiroid doku örneklerinde follikül çapları normal histolojik yapıya sahipti. Yavru kontrol grubuna ait doku örnekleri incelenip follikül çap ölçümü yapıldığında ortalaması 15.46 ± 0.36 olarak saptandı (Grafik 2) (Şekil 2). Yavru sham grubuna ait doku örnekleri incelenip follikül çap ölçümü yapıldığında ise ortalaması 15.15 ± 0.30 olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında çap ölçümleri sonuçları bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($P \leq 1$) Yavru EMA grubuna ait doku örnekleri incelenip follikül çap ölçümü yapıldığında ortalaması 12.90 ± 0.33 olarak saptandı. Yavru EMA grubunda intrafolliküler çap ölçümü, kontrol, EMA+melatonin ve sham gruplarına göre daha küçük olduğu saptandı ve bu gruplar ile yapılan istatistik karşılaştırma ile

EMA grubuna ait follikül çap ortalaması ile kontrol grubuna ait follikül çap ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.0001$). Yine EMA grubuna ait follikül çap ortalaması ile sham grubuna ait follikül çap ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($P \leq 0.0001$). EMA grubuna ait follikül çap ortalaması ile EMA + melatonin grubuna ait follikül çap ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.018$). Yavru EMA + Melatonin grubuna ait doku örnekleri incelenip follikül çap ölçümü yapıldığında ortalaması 14.46 ± 0.31 olarak saptandı. Yavru ratlarda EMA artı Melatonin uygulanan grupta follikül çap ölçüm oranı EMA grubuna göre oldukça geniş olarak görünmesine rağmen istatistiksel olarak bu iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı. Yavru ratlarda EMA artı Melatonin uygulanan grupta follikül çap ölçüm oranı kontrol ve sham grubuna göre daha küçük olarak ölçüldü. Ancak bu gruplar arasında da istatistiksel olarak fark bulunmadı. Yani EMA + melatonin grubuna ait follikül çap ortalaması ile kontrol grubuna ait follikül çap ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptanmadı. ($P \leq 0.259$). Aynı şekilde EMA + melatonin grubuna ait follikül çap ortalaması ile sham grubuna ait follikül çap ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlenmedi. ($P \leq 0.907$). (Grafik 2)(Şekil 2).

3.2 İnterfolliküler kollagen kalınlığının değerlendirilmesi:

İnterfolliküler alanlardaki kollajeni değerlendirmek için Mallory'inin Aniline mavisi boyası uygulandı. Anne kontrol grubundaki örneklerde anilin mavisi tutulumu interfolliküler alanda hafif derecede görüldü. Bunun dışındaki alanlarda boyanma izlenmedi.

Anne kontrol ve sham gruplarına ait tiroid doku örneklerinde interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü normal histolojik ölçüleri sahipti. Anne kontrol grubuna ait doku örnekleri incelenip interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü yapıldığında ortalaması 3.63 ± 0.06 olarak saptandı (Grafik 3) (Şekil 3). Anne sham grubuna ait doku örnekleri incelenip interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü yapıldığında ise ortalaması 3.54 ± 0.06 olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümleri sonuçları bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($P \leq 0.991$) Anne EMA grubuna ait doku örnekleri incelenip interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü yapıldığında ortalaması 7.52 ± 0.32 olarak saptandı. Anne EMA grubunda interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü, kontrol, EMA + melatonin ve sham gruplarına göre daha fazla olduğu saptandı ve bu gruplar ile yapılan istatistik karşılaştırma ile EMA grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması ile kontrol grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçüm ortalaması arasında

anlamli derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.0001$). Yine EMA grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması ile sham grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($P \leq 0.0001$). EMA grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması ile EMA + melatonin grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.0001$). Anne EMA + Melatonin grubuna ait doku örnekleri incelenip interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü yapıldığında ortalaması 4.80 ± 0.17 olarak saptandı. Anne ratlarda EMA artı Melatonin uygulanan grupta interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü oranı EMA grubuna göre oldukça az olarak tespit edildi. Kontrol ve sham grubuna göre ise bu oran çok fazla değildi. EMA + melatonin grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması ile kontrol grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması arasında istatistik olarak anlamlı derecede farklılık saptandı. ($P \leq 0.001$). Aynı şekilde sham grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması arasındada anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.001$). (Grafik 3)(Şekil 3).

Yavru kontrol ve sham gruplarına ait tiroid doku örneklerinde interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü normal histolojik yapıya sahipti. Yavru kontrol grubuna ait doku örnekleri incelenip interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü yapıldığında ortalaması 1.98 ± 0.07 olarak saptandı (Grafik 4) (Şekil 4). Yavru sham grubuna ait doku örnekleri incelenip interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü yapıldığında ise ortalaması 1.99 ± 0.02 olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümleri sonuçları bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($P \leq 1$) Yavru EMA grubuna ait doku örnekleri incelenip interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü yapıldığında ortalaması 2.43 ± 0.07 olarak saptandı. Yavru EMA grubunda interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü, EMA+melatonin grubu ile istatistik olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı. Ancak EMA grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması ile kontrol grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.001$). Yine EMA grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması ile sham grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($P \leq 0.001$). Yavru EMA + Melatonin grubuna ait doku örnekleri incelenip interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü yapıldığında ortalaması 2.25 ± 0.08 olarak saptandı. Yavru ratlarda EMA artı Melatonin uygulanan grupta interfolliküler kollagen kalınlığının ölçüm oranı EMA grubuna göre oldukça yakın görünmesine rağmen ($P \leq 0.49$)

kontrol ve sham grubuna göre daha fazla olduğu görüldü. EMA + melatonin grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçüm ortalaması ile kontrol grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçüm ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptanmadı ($P \leq 0.08$). EMA + melatonin grubuna ait interfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması ile sham grubuna ait İnterfolliküler kollagen kalınlığının ölçümü ortalaması arasında da anlamlı derecede farklılık gözlenmedi. ($P \leq 0.105$). (Grafik 4)(Şekil 4).

3.3 İnterfolliküler kolloid oranının değerlendirilmesi:

İnterfolliküllerdeki kolloidi değerlendirmek amacı ile PAS boyası uygulandı. Anne ve yavrularda EMA uygulanan grupta interfollikül kolloid miktarı PAS(+) boyanma şiddetinin kontrol grubuna göre daha zayıf olduğu izlenmiştir (Şekil 5, 6). EMA ile melatonin verilen grupta PAS(+) boyanmada interfollikül kolloid miktarı daha çok olarak gözlemlendi. Sham grubunda ise genel olarak kontrol grubuna benzemektedir (Şekil 5, 6).

3.4 TUNEL pozitif hücre sayımının değerlendirilmesi:

Elde edilen kesitlere apoptotik hücreleri göstermek için TUNEL boyaması ve bunu desteklemek için kaspaz 3 immunhistokimyasal boyama yapıldı. Her gruptaki deneklerin tiroid doku kesitlerinde, x20 objektif büyütmesi ile 10 ayrı alandaki 100 epitel hücresinde TUNEL pozitif boyanan hücreler sayıldı. Ayrıca kaspaz 3 boyaması yapılan kesitlerde immün (+) boyanan epitel hücreleri değerlendirildi ve 10 ayrı alandaki 100 epitel hücresinde pozitif boyanan hücrelerin sayılarak ortalaması alındı. Elde ettiğimiz görüntüleri fotoğraflayarak çalışmamıza ekledik (Şekil 7-10).

TUNEL Pozitif Hücre Sayımı

Anne kontrol grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı yapıldığında ortalaması 2.71 ± 0.56 olarak saptandı.(Grafik 5)(Şekil 7). Anne sham grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı (TUNEL) yapıldığında ortalaması 2.60 ± 0.42 olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında pozitif TUNEL hücre sayımı sonuçları bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($P \leq 1$). Anne EMA grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı (TUNEL) yapıldığında ortalaması 24.64 ± 2.72 olarak saptandı. Anne EMA grubunda TUNEL pozitif hücre sayımı, kontrol, EMA+melatonin ve sham gruplarına göre daha çok olduğu saptandı ve bu gruplar ile yapılan

istatistik karşılaştırma ile EMA grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımının ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.0001$). Yine EMA grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımının ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($P \leq 0.0001$). EMA grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile EMA + melatonin grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımının ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($P \leq 0.001$). Anne EMA + Melatonin grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı (TUNEL) yapıldığında ortalaması 13.42 ± 2.02 olarak saptandı. Anne ratlarda EMA artı Melatonin uygulanan grupta TUNEL pozitif hücre sayımı oranı EMA grubuna göre oldukça az olarak görünmesine rağmen ($P \leq 0.001$) kontrol ve sham grubuna göre yüksek olarak ölçüldü. EMA + melatonin grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptandı. ($P \leq 0.001$). EMA + melatonin grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.001$). (Grafik 5)(Şekil 7).

Yavru kontrol grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı (TUNEL) yapıldığında ortalaması 5.07 ± 0.7 olarak saptandı. (Grafik 6) (Şekil 8). Yavru sham grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımının (TUNEL) yapıldığında ortalaması 4.14 ± 0.8 olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında pozitif apoptotik hücre sayımının sonuçları bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($P \leq 1$) Yavru EMA grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı (TUNEL) yapıldığında ortalaması 16.21 ± 2.19 olarak saptandı. Yavru EMA grubunda TUNEL pozitif hücre sayımının, kontrol, EMA + melatonin ve sham gruplarına göre daha çok olduğu saptandı ve bu gruplar ile yapılan istatistik karşılaştırma ile EMA grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımının ortalaması ile kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.0001$). Yine EMA grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımının ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($P \leq 0.0001$). EMA grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımının ortalaması ile EMA + melatonin grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.026$). Yavru EMA + Melatonin grubuna ait doku örnekleri incelenip TUNEL pozitif hücre sayımı yapıldığında ortalaması 9.67 ± 1.60 olarak saptandı. Yavru ratlarda EMA artı Melatonin uygulanan grupta TUNEL

pozitif hücre sayım oranı EMA grubuna göre oldukça az olarak görünmesine rağmen kontrol ve sham grubuna göre daha çok olarak ölçüldü. Ancak EMA + melatonin grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımının ortalaması ile kontrol grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptanmadı. ($P \leq 0.215$). EMA + melatonin grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait TUNEL pozitif hücre sayım ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlenmedi. ($P \leq 0.08$). (Grafik 6)(Şekil 8).

Pozitif Apoptotik Hücre Sayımın (Kaspaz 3 immunoreaktivitesi)

Anne kontrol grubuna ait doku örnekleri incelenip pozitif apoptotik hücre sayımı (Kaspaz 3) yapıldığında ortalaması 0.60 ± 0.19 olarak saptandı. (Grafik 7) (Şekil 9). Anne sham grubuna ait doku örnekleri incelenip pozitif apoptotik hücre sayımı (Kaspaz 3) yapıldığında ise ortalaması 0.65 ± 0.16 olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında pozitif apoptotik hücre sayımının sonuçları bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($P \leq 1$) Anne EMA grubuna ait doku örnekleri incelenip pozitif apoptotik hücre sayımı (Kaspaz 3) yapıldığında ortalaması 11.08 ± 1.15 olarak saptandı. Anne EMA grubunda pozitif apoptotik hücre sayımı, kontrol, EMA+melatonin ve sham gruplarına göre daha çok olduğu saptandı ve bu gruplar ile yapılan istatistik karşılaştırma ile EMA grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.0001$). Yine EMA grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($P \leq 0.0001$). EMA grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması ile EMA + melatonin grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($P \leq 0.0001$). Anne EMA + Melatonin grubuna ait doku örnekleri incelenip pozitif apoptotik hücre sayımı (Kaspaz 3) yapıldığında ortalaması 5.71 ± 0.69 olarak saptandı. Anne ratlarda EMA artı Melatonin uygulanan grupta pozitif apoptotik hücre sayımı oranı EMA grubuna göre oldukça az olarak saptandı. EMA + melatonin grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait Pozitif Apoptotik hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede fark saptandı. ($P \leq 0.001$). EMA + melatonin grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımının ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.0001$). (Grafik 7)(Şekil 9).

Yavru kontrol grubuna ait doku örnekleri incelenip pozitif apoptotik hücre sayımı (Kaspaz 3) yapıldığında ortalaması 1.18 ± 0.18 olarak saptandı. (Grafik 8) (Şekil 10). Yavru sham grubuna ait doku örnekleri incelenip pozitif apoptotik hücre sayımı (Kaspaz 3) yapıldığında da ortalaması 1.05 ± 0.19 olarak tespit edildi. Bu iki grup arasında pozitif apoptotik hücre sayımının sonuçları bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($P \leq 1$)

Yavru EMA grubuna ait doku örnekleri incelenip pozitif apoptotik hücre sayımı (Kaspaz 3) yapıldığında ortalaması 8.32 ± 1.70 olarak saptandı. Yavru EMA grubunda pozitif apoptotik hücre sayımı, kontrol ve sham gruplarına göre daha çok olduğu saptandı ve bu gruplar ile yapılan istatistik karşılaştırma ile EMA grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması ile kontrol grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi. ($P \leq 0.001$). EMA grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması ile EMA + melatonin grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlenmedi. ($P \leq 0.379$). Yavru EMA + Melatonin grubuna ait doku örnekleri incelenip pozitif apoptotik hücre sayımının (Kaspaz 3) yapıldığında ortalaması 5.20 ± 1.47 olarak saptandı. Yavru ratlarda EMA artı Melatonin uygulanan grupta pozitif apoptotik hücre sayımı oranı EMA grubuna oldukça yakın olarak görüldü yani istatistik olarak fark saptanmadı. EMA + melatonin grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayım ortalaması ile kontrol grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık saptanmadı. ($P \leq 0.115$). EMA + melatonin grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması ile sham grubuna ait pozitif apoptotik hücre sayımı ortalaması arasında anlamlı derecede farklılık gözlenmedi. ($P \leq 0.095$). (Grafik 8) (Şekil 10).

TUNEL ve Kaspaz 3 immün boyanan tiroid follikül epitel hücrelerinin gruplardaki dağılımı Grafik 3,4,7,8 ve Şekil 7,8,9,10'da gösterilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme ANOVA varyans analizi ve post test olarak Bonferroni testi kullanılarak yapılmıştır. Çizelge 1 anne gruplara ait ve çizelge 2 yavru gruplara ait TUNEL ve Kaspaz 3 immunoreaktivitesi pozitif olan hücre sayısı görülmektedir.

Elektron mikroskop değerlendirilmesi

Elektron mikroskopik değerlendirmede anne kontrol grubunda tiroid follikül epitelinde çekirdek ökromatik görünüme sahiptir, endoplazmik retikulum yapıları iyice gelişmiş, mitokonderiler yuvarlak ve birkaç Lizozom belirgin olarak seçilmektedir. İntersellular bağlantılar sağlam ve belirgin olarak görünmektedir. (Şekil 11, 12)

Anne EMA grubunda çekirdek heterkromatin olarak seçilmektedir. Endoplazmik retikulum yapıları vezikül ve sisterna şeklinde dilate olarak görünmektedir. Hücre sitoplâzmanın apikal kısmında çok sayıda Lizozom biriktiği izlenmektedir ayrıca silendirik mitokondoriler ve kolloid damlacıkları görünmektedir. (Şekil 15)

Anne EMA + melatonin grubunda çekirdek ökromatin, mitkonderiler yuvarlak, lizozomlar az olarak izlenmektedir ve endoplazmik retikulum yapılarında dilatasyon dikkati çekmektedir.

Yavru kontrol grubunda elektron mikroskopik değerlendirmede tiroid follikül epitelinde hücre çekirdekleri ökromatin, silendirik mitokonriler ve endoplazmik retikulum yapıları gözlenmektedir. Çok sayıda Lizozom bulunmaktadır. Belirgin intersellular bağlantı (plak benzeri) ve az sayıda mitokondri gözlenmektedir. (Şekil 16, 17)

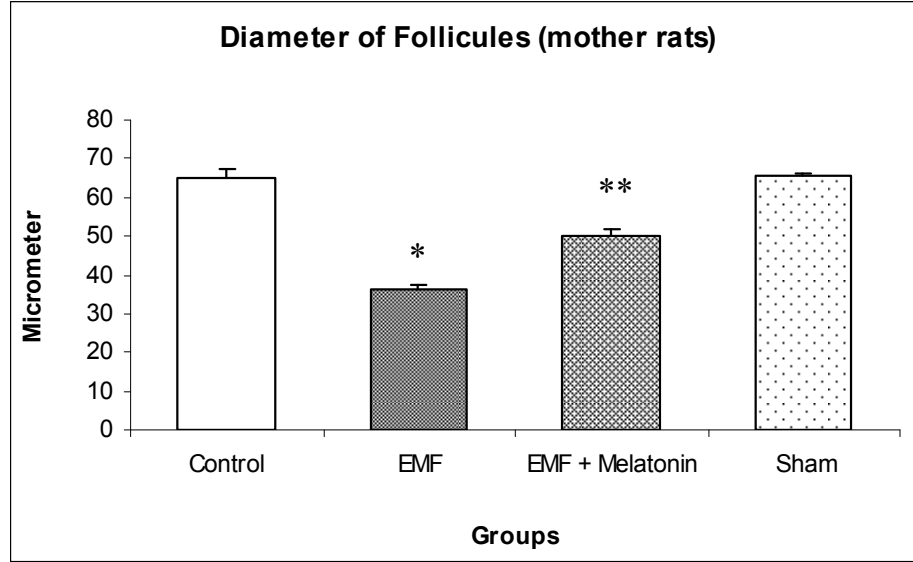
Yavru EMA grubunda epitel hücre çekirdekleri kontrol grubuna göre daha heterokromatin olarak izlenmekte ve sitoplâzmadaki kolloid damlacıklar görünmektedir. Hücre sitoplâzmalarında çok sayıda genişlemiş endoplazmik retikulum yapıları gözlenmektedir. (Şekil 18, 19)

Yavru EMA + Melatonin grubunda epitel hücre çekirdekleri kontrol grubuna benzer görünüme sahiptir ve silendirik mitokonderiler gözlenmektedir. Endoplazmik retikulum yapıları ve hücre bağlantıları kontrol grubuna benzemektedir. Sitoplâzmanın apikal kısmında kolloid damlacıklar bulunmaktadır. EMA grubuna göre Lizozom sayısı daha az olarak seçilmektedir. (Şekil 20, 21)

Grafik 1: Kontrol, EMA, EMA + Melatonin ve sham gruplarındaki anne ratların follikül çap değerleri.

* : kontrol grubuna göre anlamlı azalma gösteren grup. ($P \leq 0.0001$)

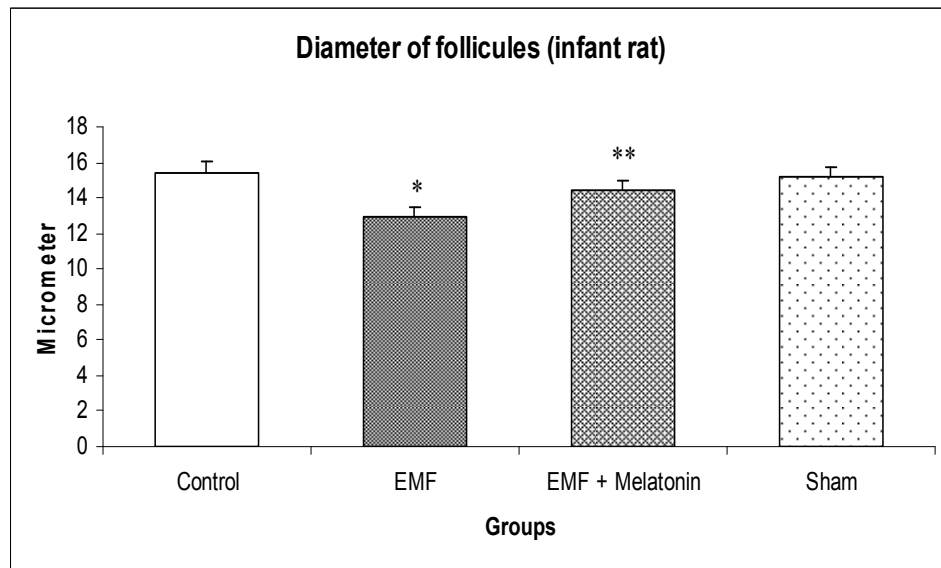
** : EMA grubuna göre anlamlı artış mevcuttur. ($P \leq 0.0001$)



Grafik 2: Kontrol, EMA, EMA + Melatonin ve sham gruplarındaki yavru ratların follikül çap değerleri.

* : kontrol grubuna göre anlamlı azalma gösteren grup. ($P \leq 0.0001$)

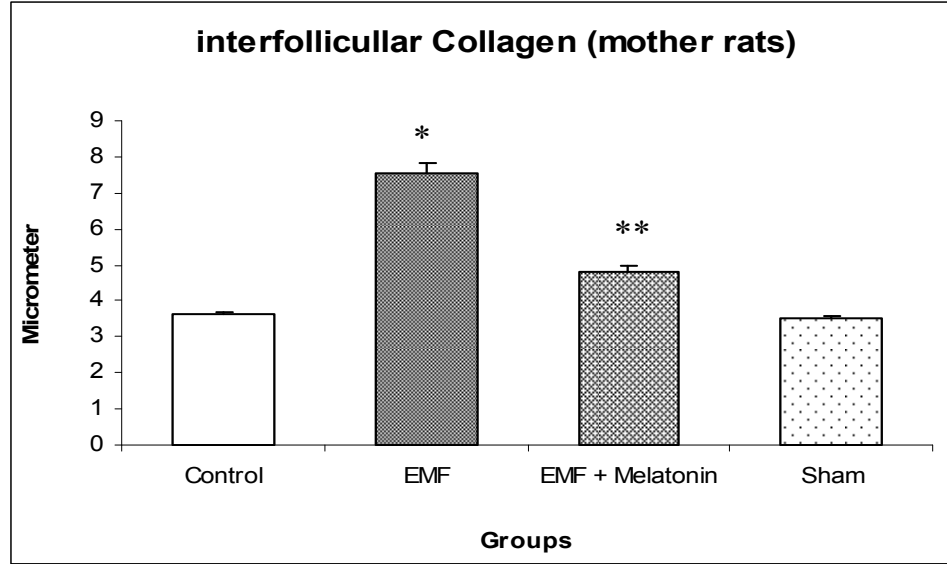
** : EMA grubuna göre anlamlı artış mevcuttur. ($P \leq 0.018$)



Grafik 3: Kontrol, EMA, EMA + Melatonin ve sham gruplardaki anne ratların interfölliküler kollagen kalınlığının değerleri.

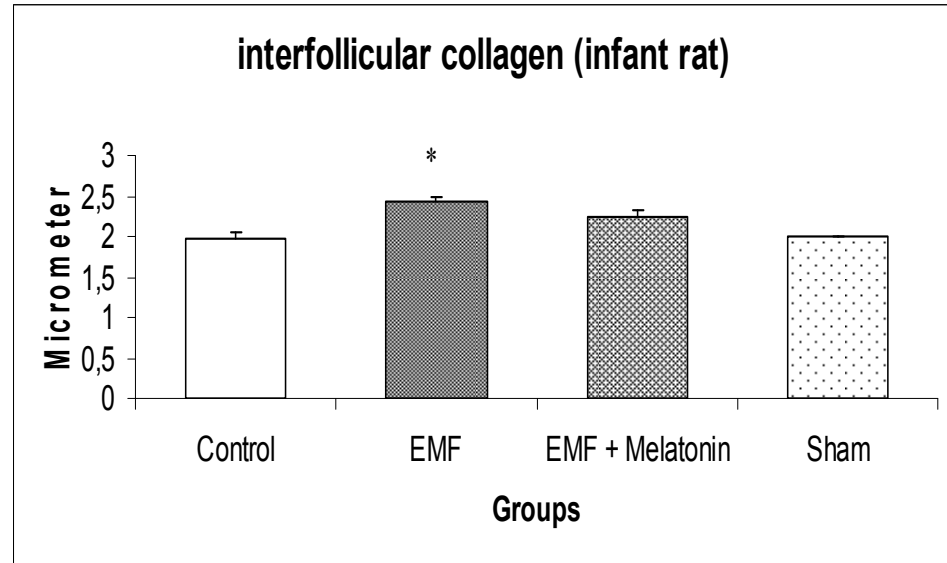
* : kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren grup. ($P \leq 0.0001$)

** : EMA grubuna göre anlamlı azalma mevcuttur. ($P \leq 0.0001$)



Grafik 4: Kontrol, EMA, EMA + Melatonin ve sham gruplardaki yavru ratların interfölliküler kollagen kalınlığının değerleri.

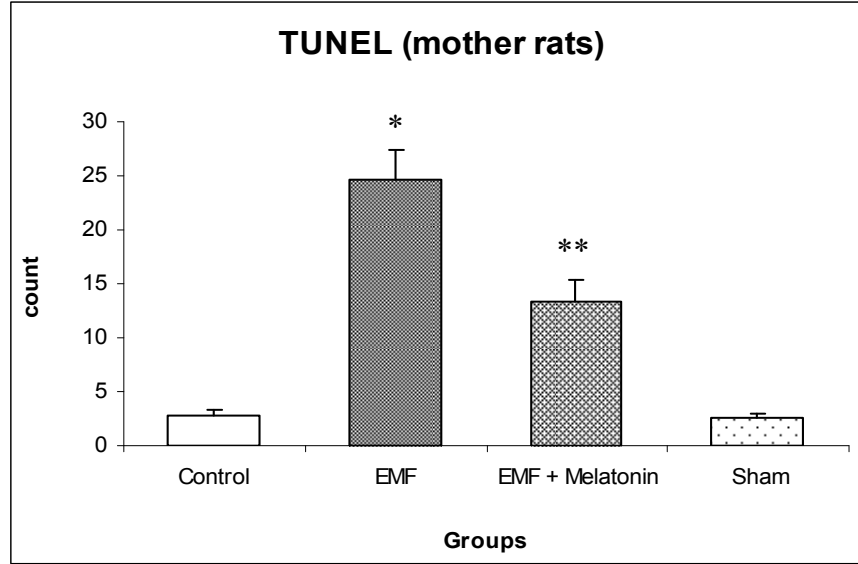
* : kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren grup. ($P \leq 0.001$)



Grafik 5: Kontrol, EMA, EMA + Melatonin ve sham gruplardaki anne ratların TUNEL pozitif boyanmış hücrelerin sayısının değerleri.

* : kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren grup. ($P \leq 0.0001$)

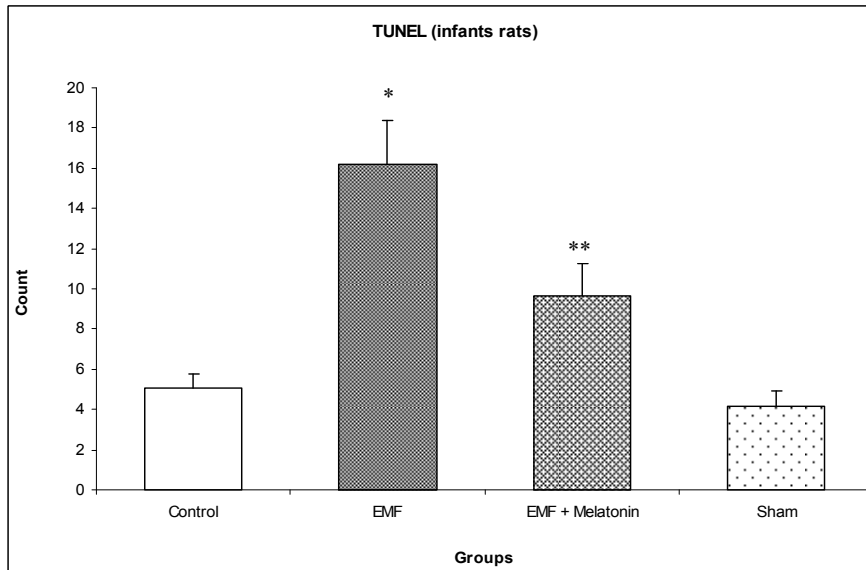
** : EMA grubuna göre anlamlı azalma mevcuttur. ($P \leq 0.0001$)



Grafik 6: Kontrol, EMA, EMA + Melatonin ve sham gruplardaki yavru ratların TUNEL pozitif boyanmış hücrelerin sayısının değerleri.

* : kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren grup. ($P \leq 0.0001$)

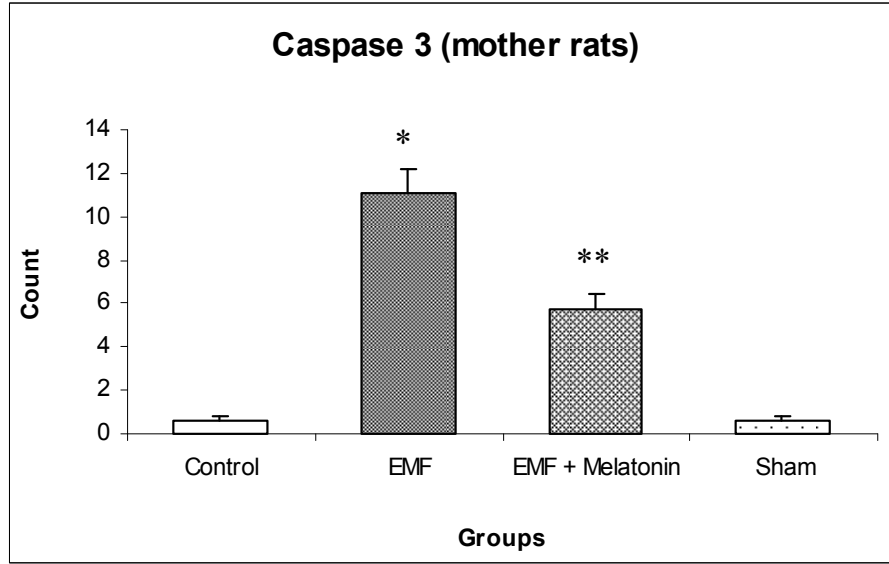
** : EMA grubuna göre anlamlı azalma mevcuttur. ($P \leq 0.026$)



Grafik 7: Kontrol, EMA, EMA + Melatonin ve sham gruplardaki anne ratların Kaspaz 3 pozitif boyanmış hücrelerin sayısının değerleri.

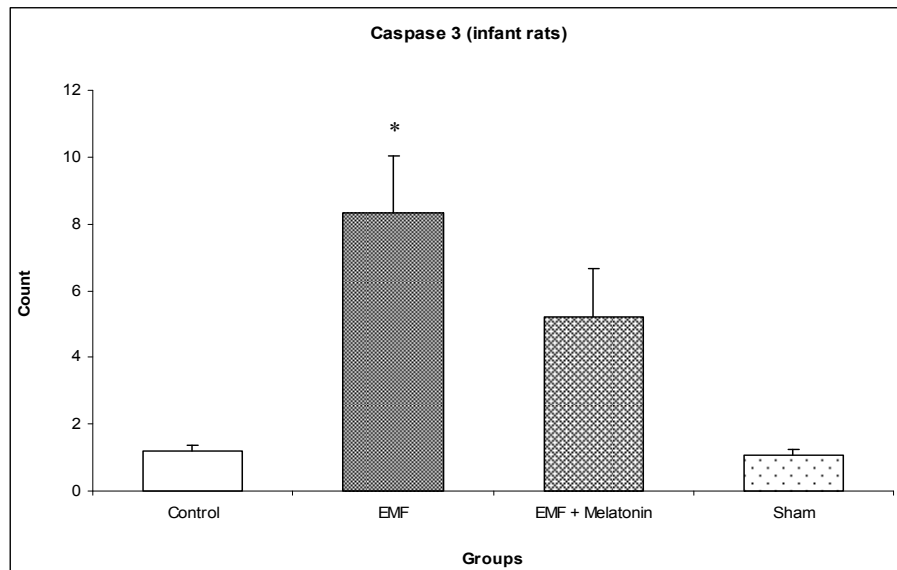
* : kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren grup. ($P \leq 0.0001$)

** : EMA grubuna göre anlamlı azalma mevcuttur. ($P \leq 0.0001$)



Grafik 8: Kontrol, EMA, EMA + Melatonin ve sham gruplardaki yavru ratların pozitif apoptotik hücrelerin sayısının değerleri.

*: kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren grup. ($P \leq 0.0001$)



Çizelge 1: Anne ratların, Kontrol, EMA, EMA + Melatonin ve sham grublarında interfolliküler kollagen dokunun kalınlığı, intrafolliküler çap ölçümü, pozitif apoptotik (TUNEL, Kaspaz 3) sayımlarının değerleri.

<i>Parametereler</i> <i>Grublar</i>	<i>Interfollicular</i> <i>kollagen (µm)</i>	<i>İntrafollikül çap</i> <i>ölçümü (µm)</i>	<i>Apoptotic hücre</i> <i>(TUNEL)</i>	<i>Apoptotic hücre</i> <i>(Caspase3)</i>
	Ortalama ±S.H	Ortalama ± S.H	Ortalama ± S.H	Ortalama ± S.H
1- Kontrol (n=7)	3.63 ± 0.06	65.26 ± 2.26	2.71 ± 0.56	0.60 ± 0.19
2- EMA (n=7)	7.52 ± 0.32	36.35 ± 0.90	24.64 ± 2.72	11.08 ± 1.15
3- EMA + Melatonin(n=7)	4.80 ± 0.17	50.18 ± 1.73	13.42 ± 2.02	5.71 ± 0.69
4- Sham(n=7)	3.54 ± 0.06	65.41 ± 0.84	2.60 ± 0.42	0.65 ± 0.16
P değerleri				
1 vs 2	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
2 vs 3	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
3 vs 4	0.001	0.0001	0.0001	0.0001
4 vs 1	n.s	n.s	n.s	n.s

Değerler: Ortamalar ± SH (N=7).

P ≤ 0.05 aralığı anlamlı olarak kabul edildi

.n.s = not significant (anlamlı değil)

S.H = standart hata

Çizelge 2: Yavru ratların, Kontrol, EMA, EMA + Melatonin ve sham gruplarında interfolliküler kollagen dokunun kalınlığı, intrafolliküler follükül çap ölçümü, pozitif apoptotik (TUNEL, Kaspaz 3) sayımlarının değerleri.

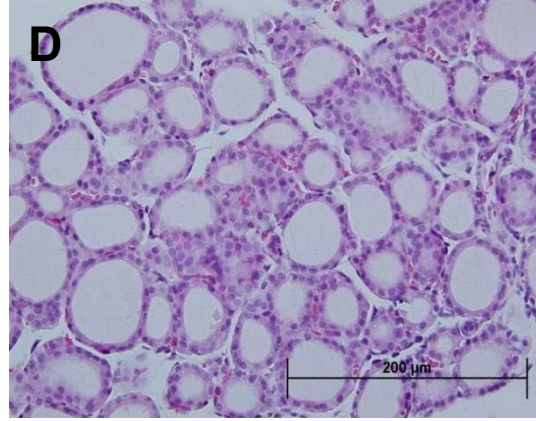
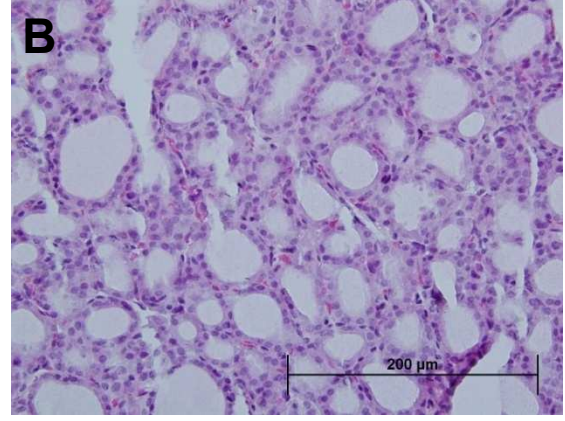
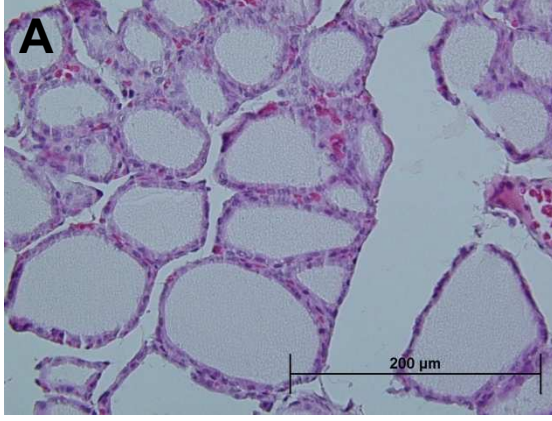
<i>Parametereler</i> <i>Gruplar</i>	<i>Interfollicular kollagen (μm)</i>	<i>İntrafollikül çap ölçümü (μm)</i>	<i>Apoptotic hücre (TUNEL)</i>	<i>Apoptotic hücre (Caspase3)</i>
	Ortalama \pm S.H	Ortalama \pm S.H	Ortalama \pm S.H	Ortalama \pm S.H
Kontrol (n=7)	1.98 \pm 0.07	15.46 \pm 0.36	5.07 \pm 0.70	1.18 \pm 0.18
EMA (n=7)	2.43 \pm 0.07	12.90 \pm 0.33	16.21 \pm 2.19	8.32 \pm 1.70
EMA + Melatonin(n=7)	2.25 \pm 0.08	14.46 \pm 0.31	9.67 \pm 1.60	5.20 \pm 1.47
Sham(n=7)	1.99 \pm 0.02	15.15 \pm 0.30	4.14 \pm 0.82	1.05 \pm 0.19
P değerleri				
1 vs 2	0.001	0.0001	0.0001	0.001
2 vs 3	0.490 (n.s)	0.018	0.026	0.379 (n.s)
3 vs 4	0.105 (n.s)	0.907 (n.s)	0.08 (n.s)	0.095 (n.s)
4 vs 1	(n.s)	n.s	n.s	n.s

Değerler: Ortamalar \pm SH (N=7).

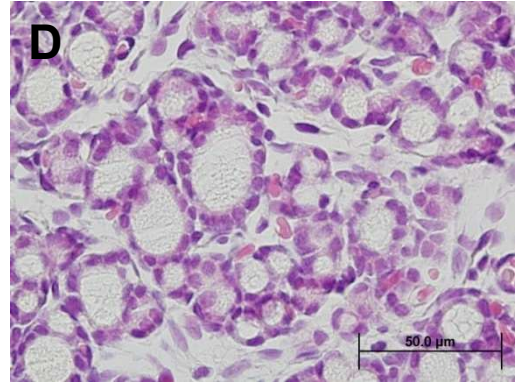
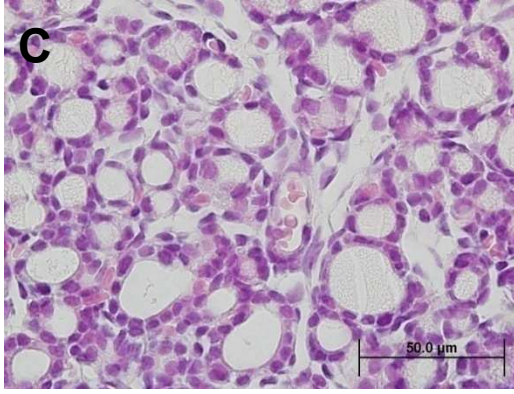
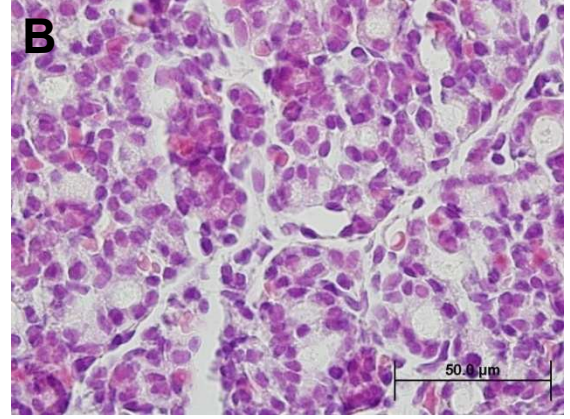
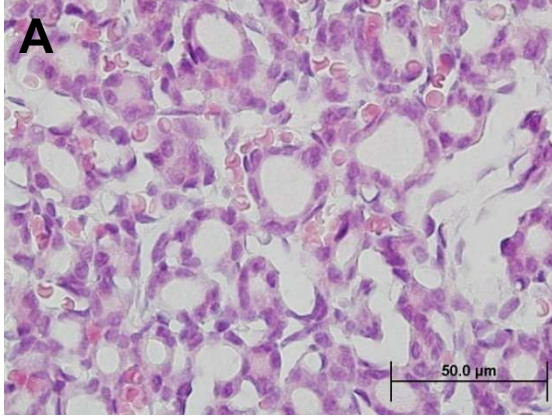
$P \leq 0.05$ aralığı anlamlı olarak kabul edildi

.n.s = not significant (anlamlı değil)

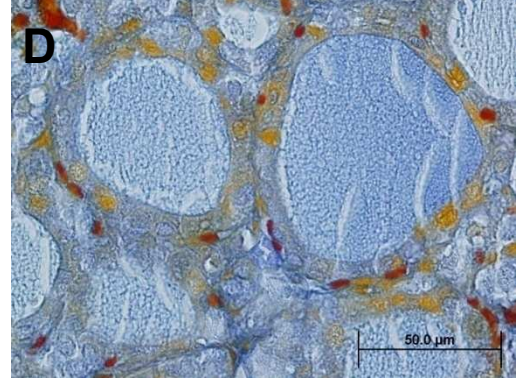
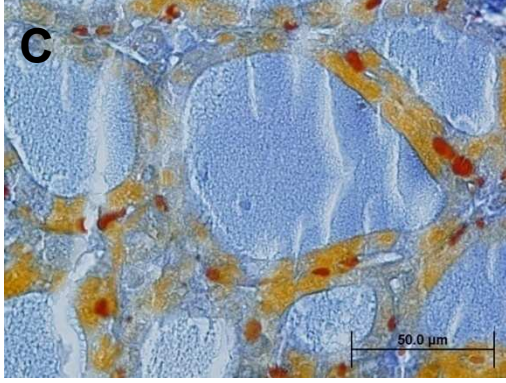
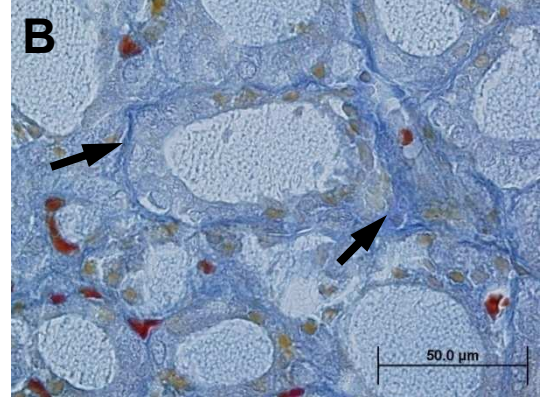
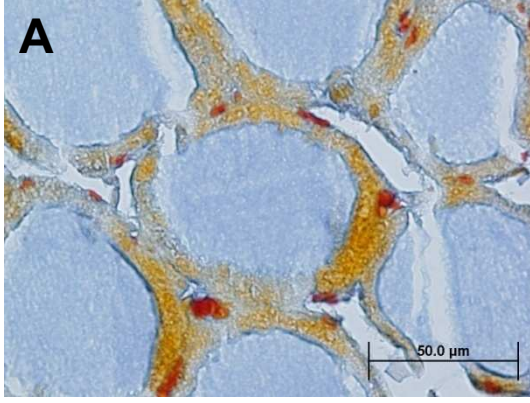
S.H = standart hata



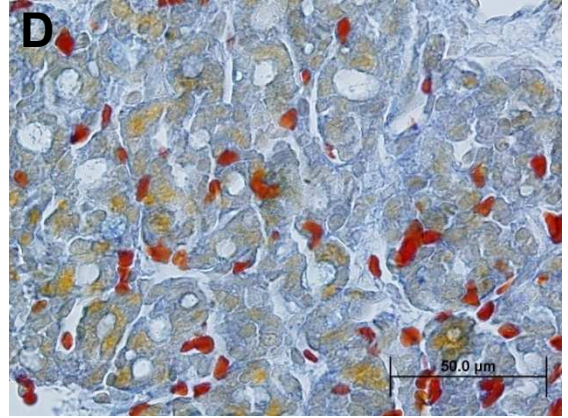
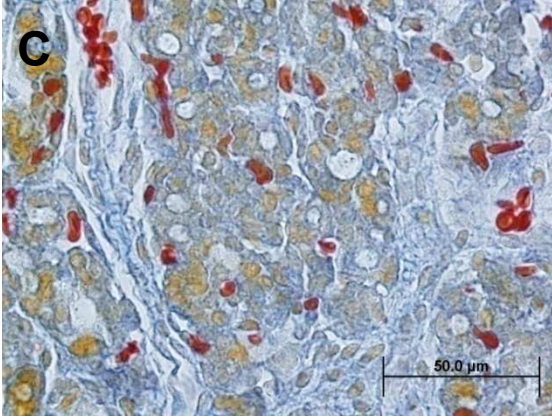
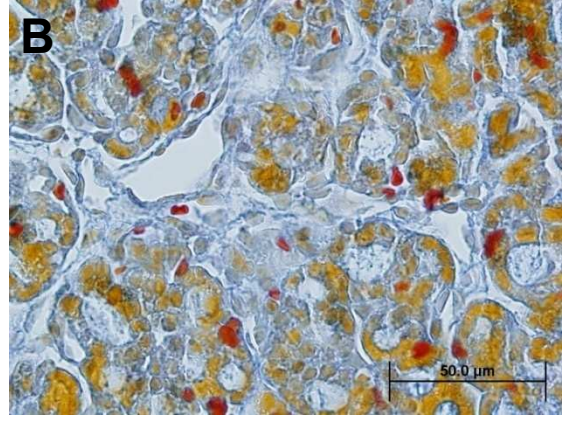
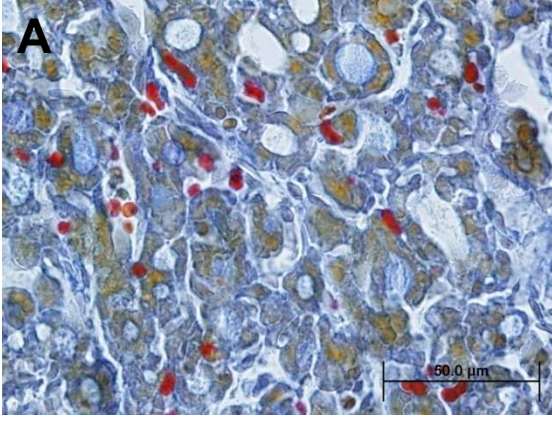
Şekil 1: Anne ratlara ait (A: Kontrol grubu, B: EMA grubu, C: EMA + Melatonin grubu, D: sham grubu) tiroid bez doku kesiti, Tiroid follikül görüntüsü, H&E boyaması, Scal bar 200 µm



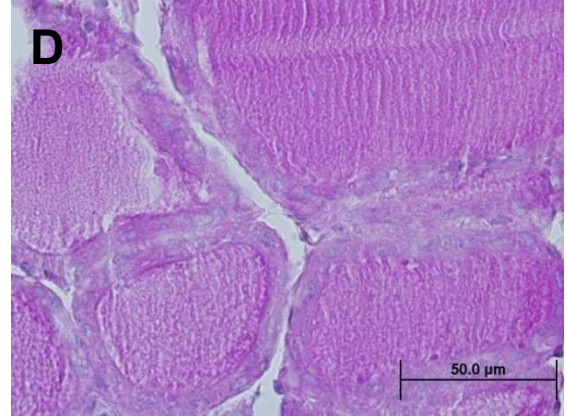
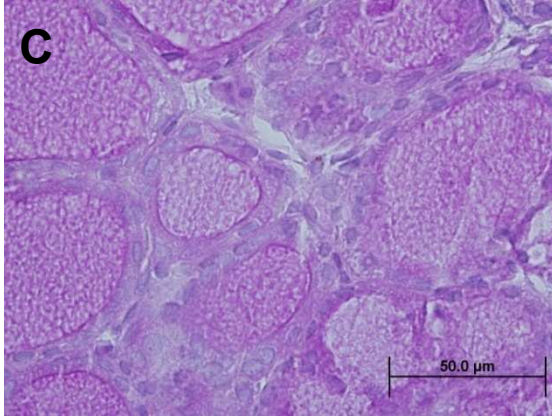
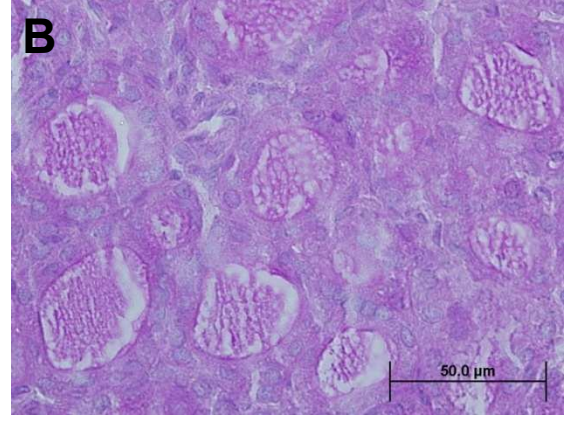
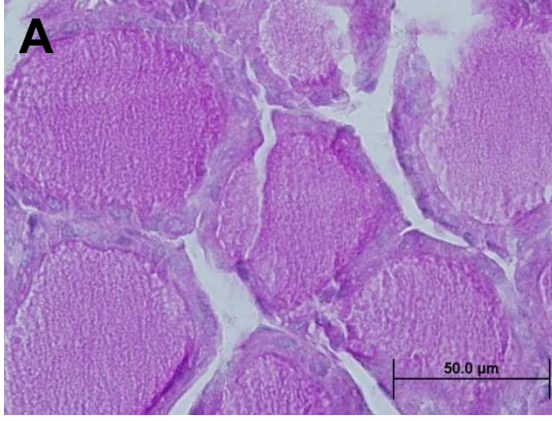
Şekil 2: Yavru ratlara ait (A: Kontrol grubu, B: EMA grubu, C: EMA + Melatonin grubu, D: sham grubu) tiroid bez doku kesiti, Tiroid follikül görüntüsü, H&E boyaması, Scal bar 50 µm



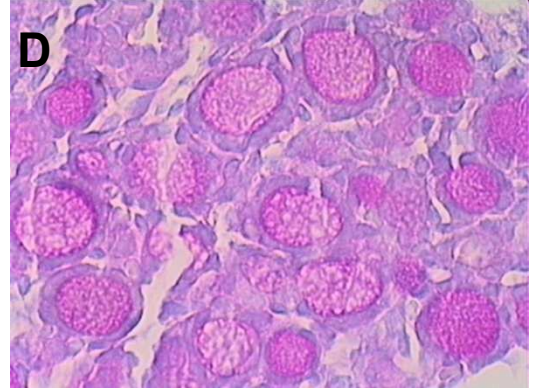
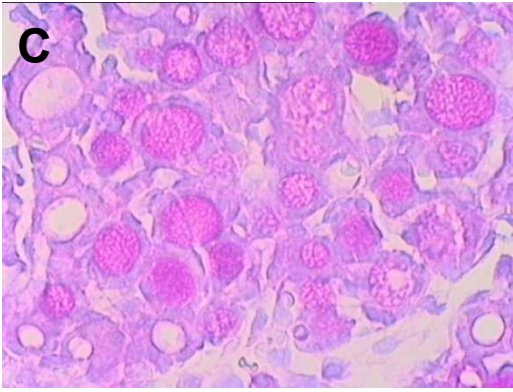
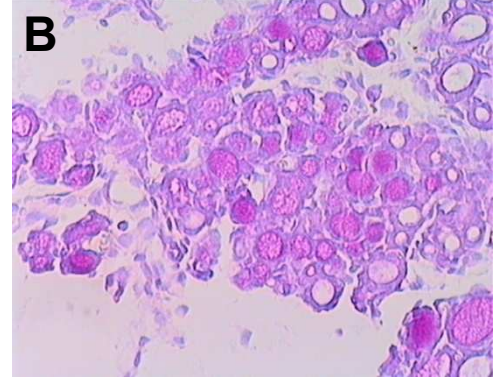
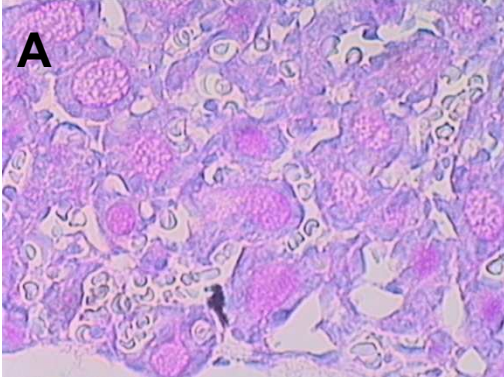
Şekil 3: Anne ratlara ait (A: Kontrol grubu, B: EMA grubu, C: EMA + Melatonin grubu, D: sham grubu) tiroid bez doku kesiti, Tiroid interfollikül kollagen görüntüsü, Mallory aniline blue boyaması, Scal bar 50 µm



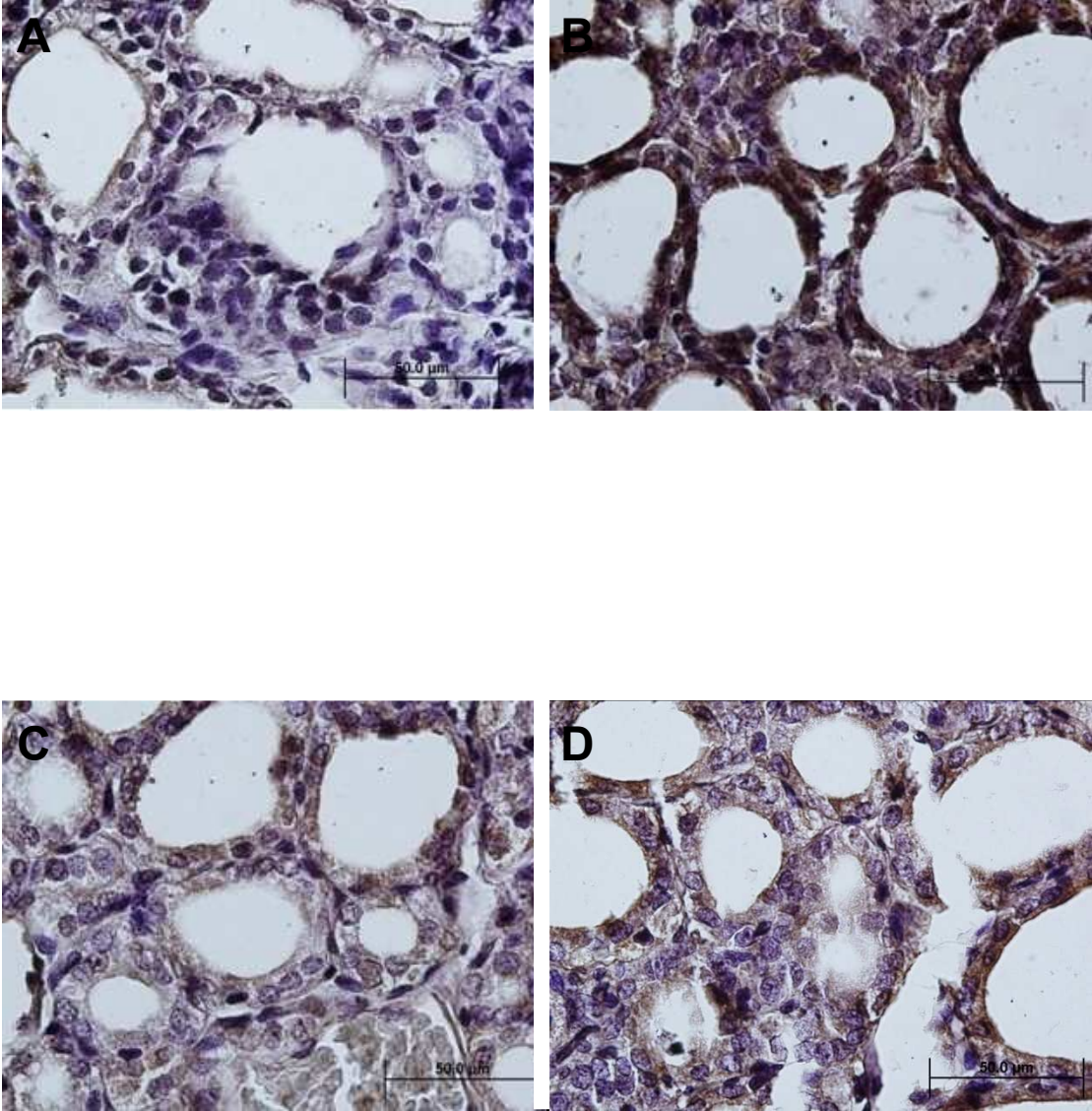
Şekil 4: Yavru ratlara ait (A: Kontrol grubu, B: EMA grubu, C: EMA + Melatonin grubu, D: sham grubu) tiroid bez doku kesiti, Tiroid interfollikül kollagen görüntüsü, Mallory aniline blue boyaması, Scal bar 50 µm



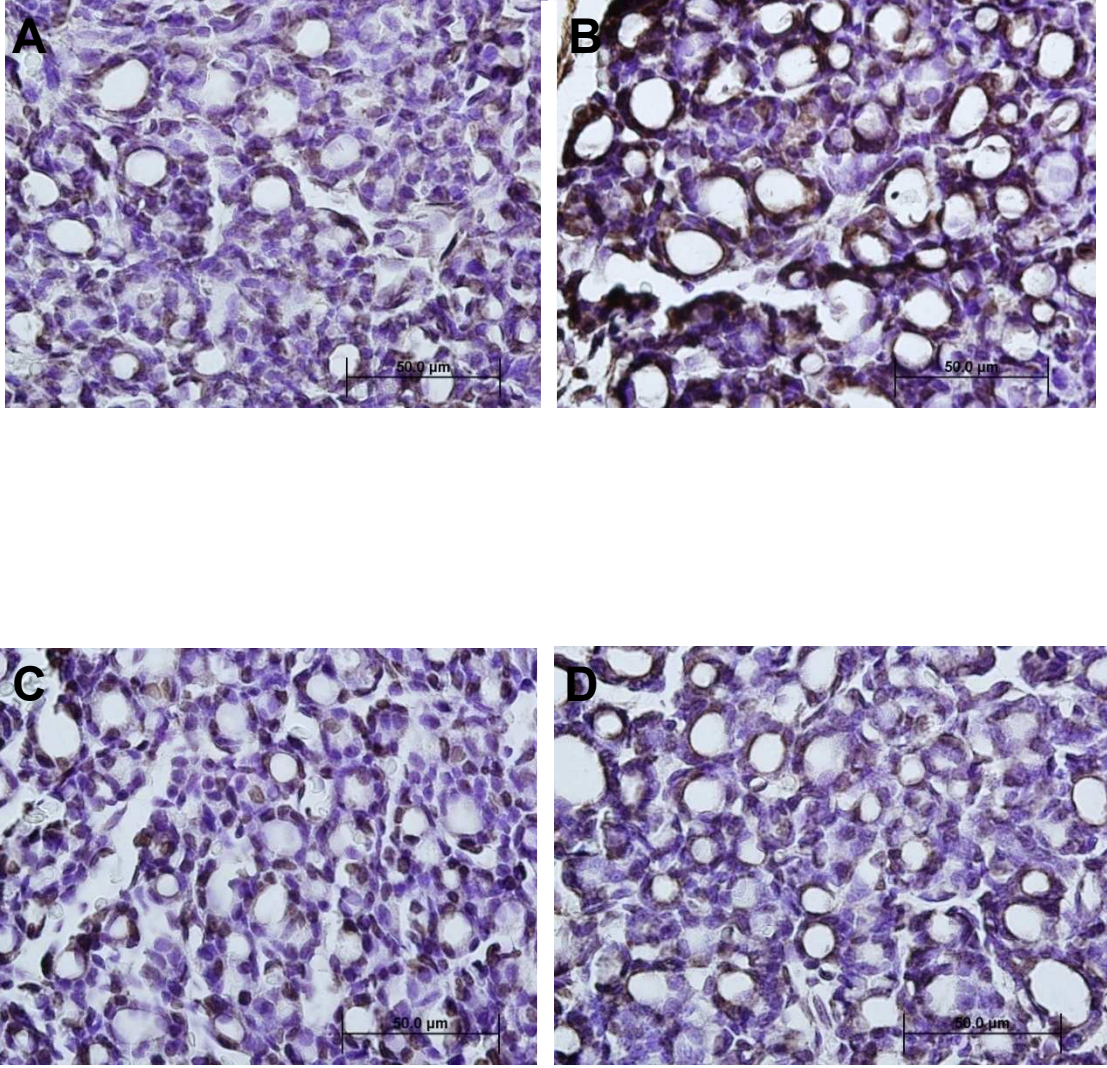
Şekil 5: Anne ratlara ait (A: Kontrol grubu, B: EMA grubu, C: EMA + Melatonin grubu, D: sham grubu) tiroid bez doku kesiti, Tiroid intrafollikül kolloid görüntüsü, PAS boyaması, Scale bar 50 µm



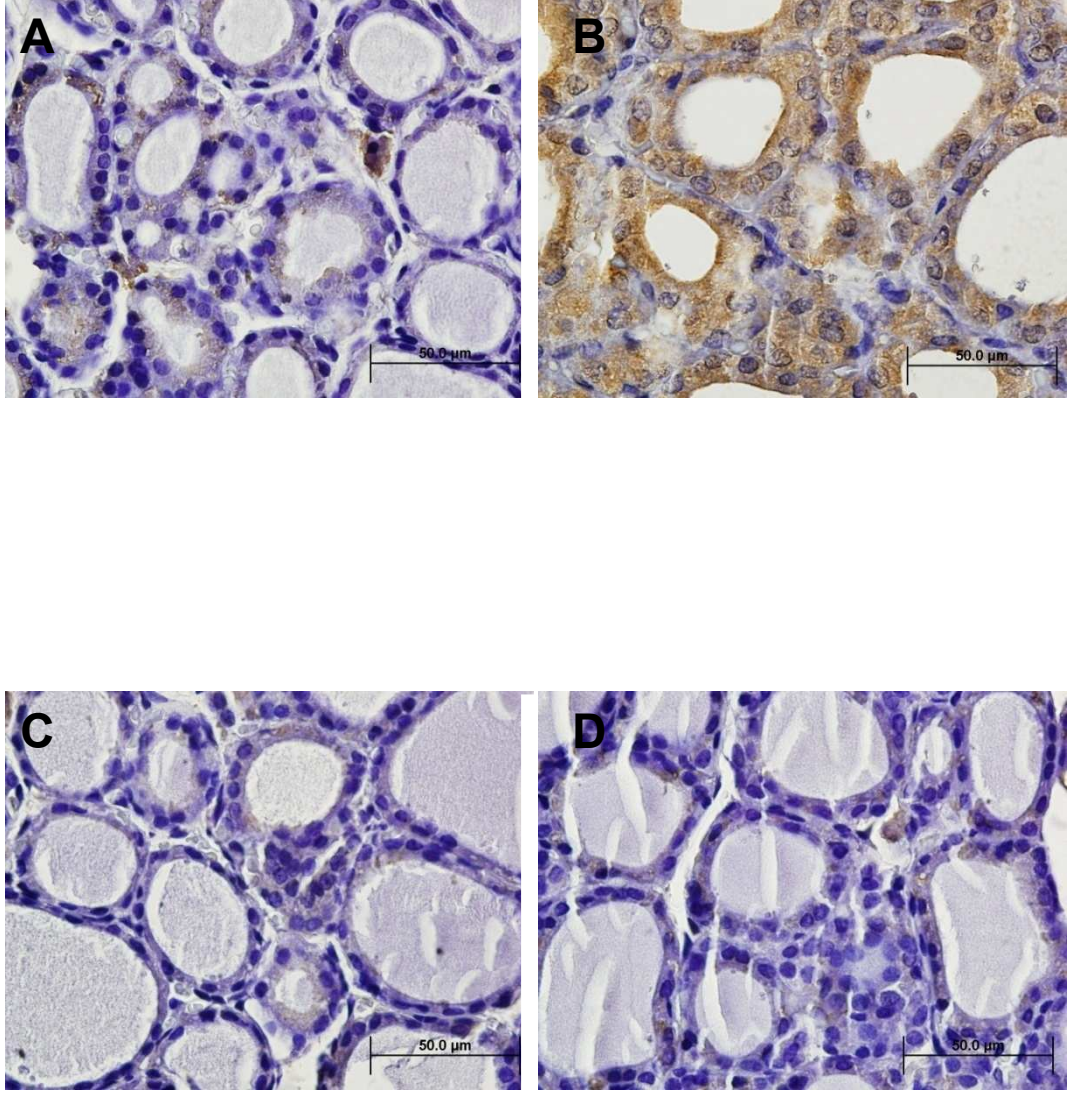
Şekil 6: Yavru ratlara ait (A: Kontrol grubu, B: EMA grubu, C: EMA + Melatonin grubu, D: sham grubu) tiroid bez doku kesiti, Tiroid intrafollikül kolloid görüntüsü, PAS boyaması, Scal bar 50 μ m



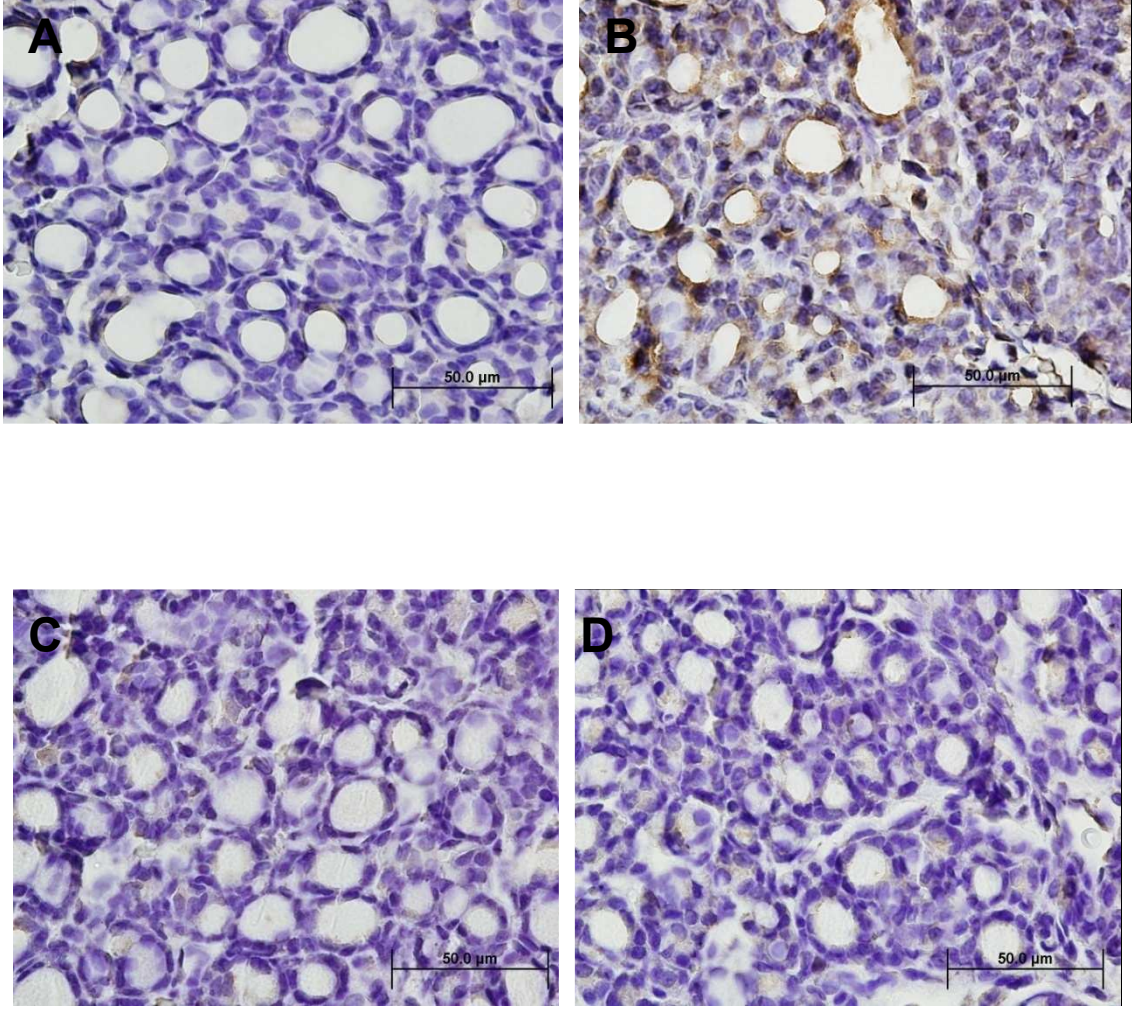
Şekil 7: Anne ratlara ait (A: Kontrol grubu, B: EMA grubu, C: EMA + Melatonin grubu, D: sham grubu) tiroid bez doku kesiti, tiroid epitelinde TUNEL pozitif boyanmış hücre görüntüleri, (TUNEL) boyaması, Scal bar 50 µm



Şekil 8: Yavru ratlara ait (A: Kontrol grubu, B: EMA grubu, C: EMA + Melatonin grubu, D: sham grubu) tiroid bez doku kesiti, tiroid epitelinde TUNEL pozitif boyanmış hücre görüntüleri, (TUNEL) boyaması, Scale bar 50 µm

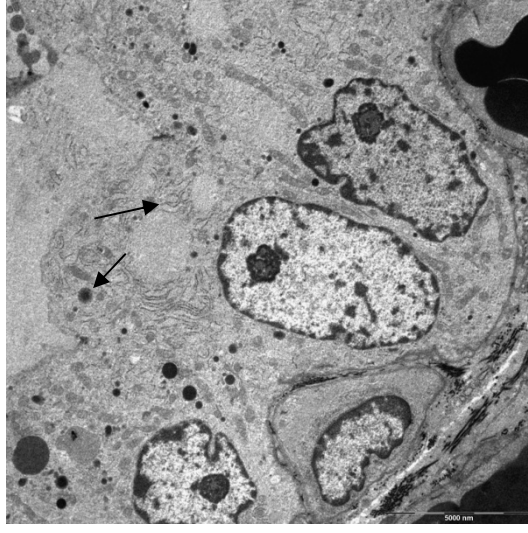


Şekil 9: Anne ratlara ait (A: Kontrol grubu, B: EMA grubu, C: EMA + Melatonin grubu, D: sham grubu) tiroid bez doku kesiti, tiroid epitelinde pozitif apoptotik hücre görüntüsü, İmmünohistokimya (Kaspaz 3 immunoreaktivitesi pozitif olan hücre sayısı) boyaması, Scale bar 50 µm

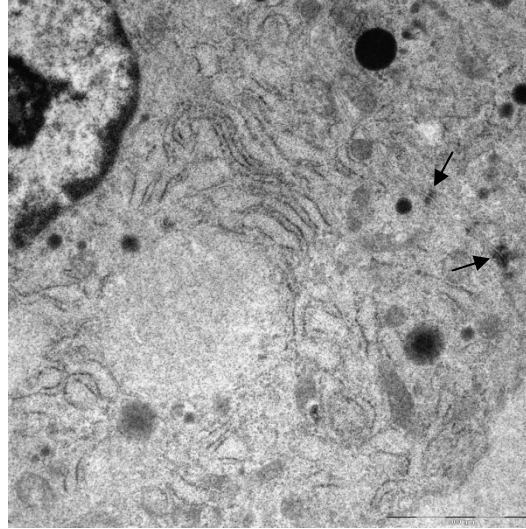


Şekil 10: Yavru ratlara ait (A: Kontrol grubu, B: EMA grubu, C: EMA + Melatonin grubu, D: sham grubu) tiroid bez doku kesiti, tiroid epitelinde pozitif apoptotik hücre görüntüsü, İmmünohistokimya (Kaspaz 3 immunoreaktivitesi pozitif olan hücre sayısı) boyaması, Scal bar 50 µm

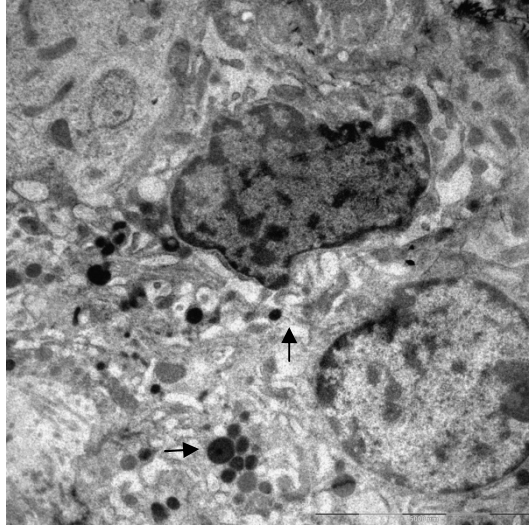
Elektron mikroskop değerlendirilmesi



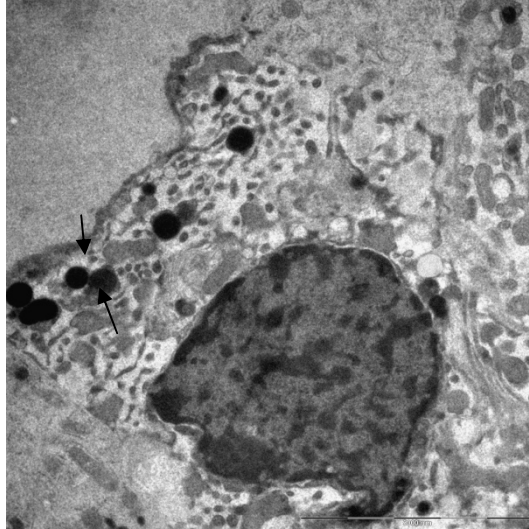
Şekil 11: Anne kontrol grubuna ait elektron mikroskopik mikrografta tiroid follikül epiteli görülmekte. Çekirdek ökromatik görünümüne sahiptir, endoplazmik retikulum yapıları iyice gelişmiş, mitokonderiler yuvarlak ve birkaç Lizozom belirgin olarak seçilmektedir



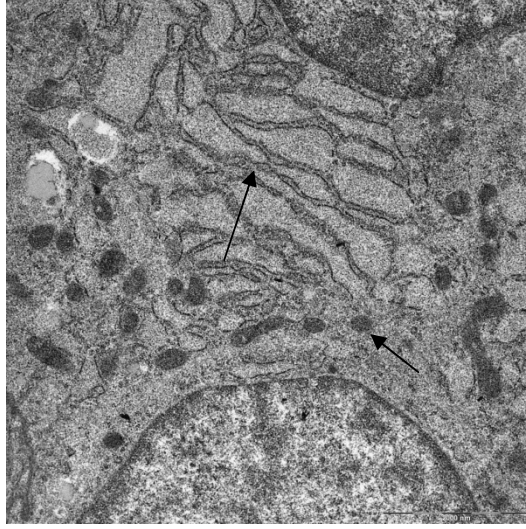
Şekil 12: Anne kontrol grubuna ait mikrografta intersellular bağlantılar sağlam ve belirgin olarak görünmektedir.



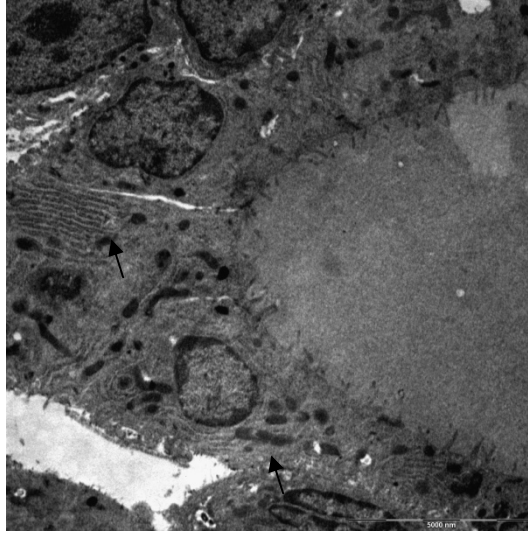
Şekil 13: Anne EMA grubuna ait mikrografta çekirdek heterkromatin olarak seçilmektedir. Endoplazmik retikulum yapıları vezikül ve sisterna şeklinde dilate olarak görünmektedir. Hücre sitoplâzmanın apikal kısmında çok sayıda Lizozom biriktiği izlenmektedir.



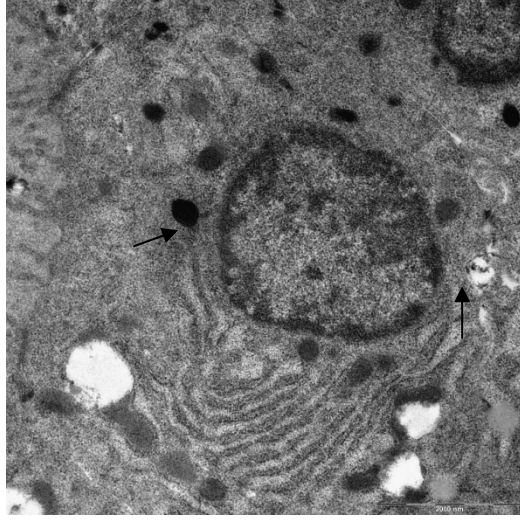
Şekil 14: Anne EMA grubuna ait mikrografta çok sayıda Lizozom, silendirik mitokondoriler ve kolloid damlacıkları görünmektedir.



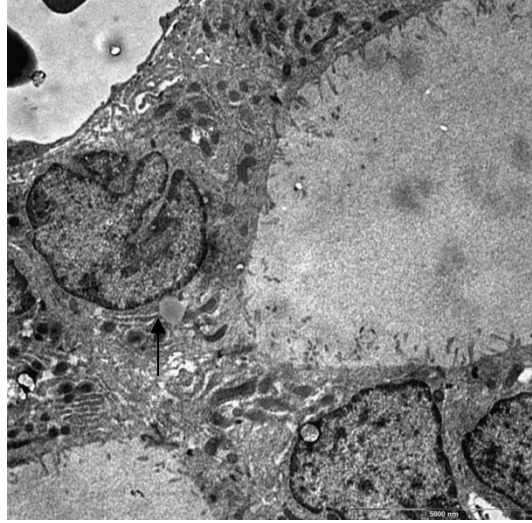
Şekil 15: Anne EMA + melatonin grubuna ait mikrografta çekirdek ökromatin, mitkonderiler yuvarlak, lizozomlar az olarak izlenmektedir ve endoplazmik retikulum yapılarında dilatasyon dikkati çekmektedir.



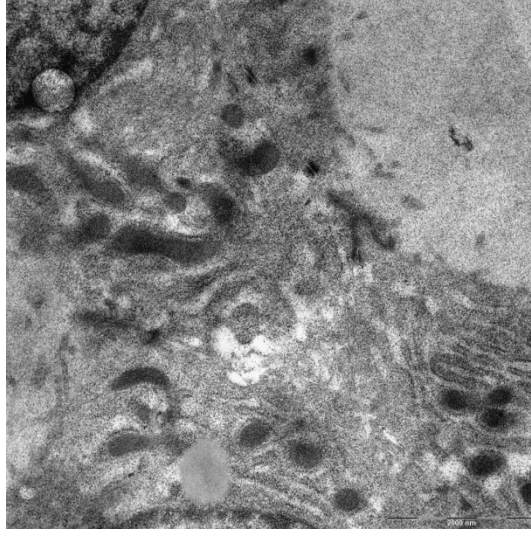
Şekil 16: Yavru kontrol grubuna ait elektron mikroskopik mikrografta tiroid follikül epiteli görülmektedir. Epitel hücre çekirdekleri ökromatin, silindirik mitokntriler ve endoplazmik retikulum yapıları gözlenmektedir.



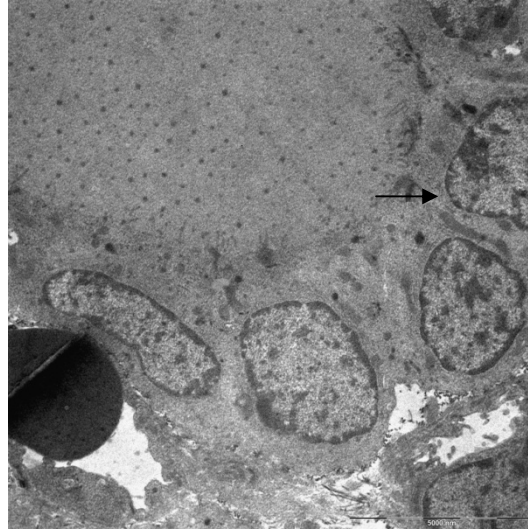
Şekil 17: Yavru kontrol grubuna ait mikrografda tiroid f llik l epiteli görülmektedir. Hücre çekirdekleri ökromatin ve çok sayıda Lizozom bulunmaktadır. Belirgin intersellular bağlantı (plak benzeri) ve az sayıda mitokondri gözlenmektedir.



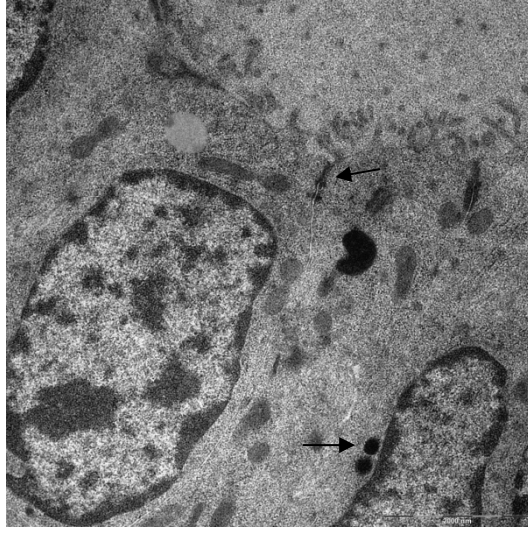
Şekil 18: Yavru EMA grubuna ait elektron mikroskopik mikrografda tiroid f llik l epiteli görülmektedir. Epitel hücre çekirdekleri kontrol grubuna göre daha heterokromatin olarak izlenmekte ve sitopl zmadaki kolloid damlacıkları görünmektedir.



Şekil 19: Yavru EMA grubunda hücre sitoplâzmalarında çok sayıda genişlemiş endoplazmik retikulum yapıları gözlenmektedir. Epitel hücre çekirdekleri kontrol grubuna göre daha heterokromatin yapıda izlenmekte ve sitoplazmada kolloid damlacıklar görünmektedir.



Şekil 20: Yavru EMA + Melatonin grubuna ait mikrografda çekirdek kontrol grubuna benzer görünüme sahiptir ve silendirik mitokonderiler gözlenmektedir.



Şekil 21: Yavru EMA + Melatonin grubuna ait mikrografda endoplazmik retikulum yapıları ve hücre bağlantıları kontrol grubuna benzemektedir. Sitoplâzmanın apikal kısmında kolloid damlacıklar bulunmaktadır. EMA grubuna göre Lizozom sayısı daha az olarak seçilmektedir.

Tartışma ve sonuç

Dünyamızda insan yaşam konforunu artırmak için günlük yaşamda kullandığımız elektronik cihazların sayısı artıkça buna paralel olarak insanların ve tüm canlıların elektromanyetik alana maruz kalma insidansı da artmaktadır. Elektromanyetik alanın sağlık üzerine etkilerini araştıran ve literatüre katkı sağlayan araştırmaların sayısı gün geçtikçe artmasına rağmen yapılan tüm bu çalışmaların literatürlerde çok az yer tuttuğunu gözlemledik. Bu çalışmalardan da doku düzeyinde özellikle tiroid bez dokusu üzerine araştırmaların sınırlı sayıda olduğu görülmüştür.

Bizde çalışmamızda 50 Hz titreşimli elektromanyetik alanın, gebelik döneminde sıçan tiroid bezi üzerine etkilerini ve bu etkilere melatoninin koruyucu etkisi olup olmadığını araştırmayı planlanmıştır. Bunun için de deney sonunda hem anne ratların hem de doğduktan sonra yavru ratların tiroid dokuları alınarak ultrasutrüktürel ve histolojik incelemeler yaptık.

Van Leeuwev ve arkadaşları hayvan hücresi üzerine yaptıkları deneyde zayıf manyetik alanın hormon ve enzim seviyesini değiştirdiğini, dokulardaki kimyasalların hareketini engellediği gibi biyolojik etkenlere sebep olduğunu rapor etmişlerdir.(2)

Rajkovic. V ve arkadaşları tarafından yapılmış olan bir çalışmada yetişkin ratlarda tiroid bezi üzerine 50 Hz elektromanyetik alan (EMA) etkisi ışık ve transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmada iki aylık erkek sıçanlar 1 ay boyunca haftada 5 gün, günde 4 saat (100-300, 54-160 V m (-1)) microT EMA maruz bırakılmıştır. Deney sonunda EMA grubuna ait tiroid doku örneklerinde kolloid içeriğin azaldığını, kan damarlarının dilate olduğunu ve follikül çaplarının küçüldüğü ve tiroid stromasında septum bağ dokularının kalınlaştığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada stereolojik sayma yöntemleri kullanarak yaptıkları ölçümlerde EMA grubuna ait doku örneklerinde kontrol grubuna göre folikül epitel kalınlığının azaldığını, interfolliküler bağ dokusunun arttığını, İnterfolliküler

kolloid miktarının azaldığını, follikül çaplarının azaldığını ve kan damarı sayısının arttığını rapor etmişlerdir. Çalışmanın devamında EMA grubuna ait tiroid dokusu ultrastrüktürel olarak incelendiğinde tiroid folikül hücrelerin apikal kısmında kontrol grubundan farklı olarak geniş çaplı birkaç kolloid damlacıkları bulduklarını bildirmişlerdir. EMA grubuna ait tiroid follikül hücrelerinin çoğunda lizozom sayısının kontrol grubuna göre daha az olduğunu, ayrıca tiroid hücrelerinde hipertrofi olmuş granüler endoplazmik retikulum ve amorfous elektron – lucent içerikleri tespit etmişlerdir. Bundan başka EMA grubunda, kontrol grubuna göre birkaç hücrede çekirdek şeklinde düzensizlik, ensizyonlu ve koromatin materyalleri hiperdens olarak bulmuşlardır. Elektron mikroskopik bulgulara kontrol grubunda folliküler epitel hücrelerinde çekirdekler ökrömatik ve eksenterik yerleşimli olarak görülürken, EMA grubunda ise epitel hücre çekirdekleri daha bazal yerleşimli ve daha koyu ökrömatinli görüldüğünü belirtmişlerdir. Apikal membran altında olan pleomorfik elektron-dense lizozomlar kontrol grubunda elektron densitesi EMA grubuna göre daha farklı bulduklarını bildirmişlerdir. Sterolojik analizlerde EMA grubunda follikül epitel hacminin artması, kolloid miktarının azalması, tiroid aktivite indeksininin çoğalmasını kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı bulduklarını bildirmişlerdir. Elektron mikroskopik ve ışık mikroskop düzeyinde yapılan bu çalışmada elde edilen bulguların EMA'na bağlı ortaya çıktığını ileri sürmüşlerdir (188).

Yapılan çalışmada intrafolliküler kolloidi değerlendirmek amacı ile PAS boyası uygulandı. Anne ve yavrularda EMA uygulanan grupta intrafollikül kolloid miktarı PAS(+) boyanma şiddetinin kontrol grubuna göre daha zayıf olduğu izlendi. EMA ile melatonin verilen grupta PAS (+) boyanmada şiddeti EMA grubuna göre daha kuvvetli olarak gözlemlendi. Sham grubunda ise genel olarak kontrol grubuna benzemektedir.

Çalışmamızda değerlendirmelerden bir tanesi de follikül çap değişimini ortaya koymaktı. Bunun için çalışmamızdan elde edilen tüm tiroid dokularında follikül çap ölçümü yapıldı. Anne EMA grubunda intrafollikular çap ölçümü, kontrol, EMA+melatonin ve sham gruplarına göre daha az olduğu saptandı. Anne EMA + Melatonin uygulanan grupta follikül çap ölçüm oranı EMA grubuna göre oldukça fazla görüldü. EMA + melatonin grupta, tiroid yapısı genel olarak kontrol ve sham grubuna benzemektedir.

Yavru EMA grubunda intrafollikular çap ölçümü, kontrol, EMA+melatonin ve sham gruplarına göre daha küçük olduğu saptandı. EMA + melatonin grupta, tiroid yapısı genel olarak kontrol ve sham grubuna benzemektedir, elde ettiğimiz bulgular Rajkovic.V ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında, kolloid miktarı, follikül çap ölçüm oranları bulguları ile paralellik göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada EMA'nın tiroid doku üzerine etkilerini elektron mikroskop ile incelediğimizde anne EMA grubuna ait tiroid epitel hücre çekirdekleri daha heterkromatin olarak seçilmiştir. Endoplazmik retikulum yapıları vezikül ve sisterna şeklinde ve daha dilate olarak görünmektedir. Hücre sitoplâzmasının apikal kısmında çok sayıda Lizozom, silendirik mitokondoriler ve kolloid damlacıkları görünmektedir. Elde ettiğimiz bulgular Rajkovic. V ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile karşılaştığımızda, EM bulgularımız ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda EMA'nın yavru tiroid doku üzerine etkilerini elektron mikroskop ile incelediğimizde yavru EMA grup hücre sitoplâzmalarında çok sayıda genişlemiş endoplazmik retikulum yapıları gözlenmektedir. Epitel hücre çekirdekleri kontrol grubuna göre daha heterokromatin yapıda izlenmekte ve sitoplazmada kolloid damlacıklar görünmektedir. Elde ettiğimiz bulgular Rajkovic. V ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile karşılaştığımızda, EM bulgularımız ile benzerlik göstermektedir.

Rajkovic. V ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada EMA'nın Mast hücreleri, deri ve tiroid bezindeki sinir liflerini üzerine etkisini incelemişlerdir (189). Denek olarak 2 aylık Wistar erkek sıçan kullanılmış ve denekleri günde 4 saat, haftada 7 gün 1 ay süreyle EMA (50 Hz, 100-300 microT, 54-160 V / m) maruz bırakmışlardır. Sıçanları sakrifiye ettikten sonra, deri ve tiroid bezi doku kesitlerin indirekt immünohistokimya ve toluidine mavi boyaması yapmışlardır. Aynı zamanda steroloji yöntemler kullanılarak Mast hücrelerin degranule olup olmadığı incelemiş ve nöropeptid Y (NPY) içeren sinir lifleri üzerine araştırma yapmışlardır. Tiroid doku kesitlerinde follikül ve kan damarlarına yakın olan çevrede sinir liflerini NPY anti serum ile boyamışlardır.. Sonuç olarak NPY – pozitif liflerin sayısını EMA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Tiroid dokusunda kısmen ve tamamen degranule olan mast hücreler iki ayrı perifollikül ve stromada yer aldığını tespit etmişler ve yaptıkları seterolojik analizlerde stromadaki mast hücrelerinin EMA grubunda daha çok etkilendiğini bildirmişlerdir (189).

Koyu ve arkadaşları çalışmasında, 900 MHz elektromanyetik alana maruz kalmanın tiroid hormon serum TSH ve triiodothronine, tiroksin (T₃ T₄) hormon düzeyleri üzerine olan etkisini incelemişlerdir (190). Bu çalışmada 30 yetişkin erkek Sprague - Dawley rat denek olarak kullanılmış ve 3 bağımsız grupta (10 tane kontrol, 10 tane EMA'a maruz kalan, 10 tane sham) oluşturulmuştur. Denek gruplarından bir tanesi 4 hafta boyunca, haftanın 5 günü, günde 30 dakika 900 MHz EMA'a maruz bırakılmıştır. Sham grubu ise hiçbir EMA'a maruz bırakılmadan çalışma grupları gibi aynı çevre koşulları altında tutulmuştur. Sıçan serum hormonlar TSH ve T₃, T₄ ölçümü için immunoradyometrik assay (IRMA) yöntemini kullanarak - (RIA) yöntemi immunoassay olarak hormon ölçümü yapılmış. TSH ve T₃ - T₄ değerleri EMA grubunda sham grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu rapor edilirken (p < 0.01) sham ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır (p < 0.05).

Bu çalışmada sonuç olarak EMA'a maruz kalmanın TSH, T3 ve T4 serum seviyelerinde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (190).

Biz çalışmamızda serum TSH, T3, T4 seviyelerini değerlendirme imkânı bulamadık. Rajvic'in başka bir çalışmasında, EMA'nın tiroid bezi Mast hücreleri üzerine olan etkisini erkek Mill Hill sıçanlarda araştırmıştır (191). Hayvanlar doğduktan 24 saat sonra , 3 ay boyunca, haftada 5 gün, günde 7 saat EMA'a (50 Hz, 500 µT, 10-50 µT V / m) maruz bırakılmış. Deneklerden bir grup EMA'a maruz kalımı bittikten hemen sonra, bir grup 1 hafta sonra, diğer grup 2 hafta sonra, diğer bir grupta 3 hafta sonra sakrifiye edilerek incelemeye alınmış. Bu gruplardan elde edilen kesitlere toluidin mavi boyası yapılarak mast hücreleri incelenmiş. EMA'a maruz kalan tiroid bezindeki mast hücrelerinde morfofonksiyonel değişiklikler olabileceğini bildirmişlerdir (191).

Soda ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 60 Hz 3mT EMA'a maruz kalmanın fare osteoblastı üzerine etkilerini incelemiştir (192). Sirius kırmızı absorban boyası ile kollajen değerlerini tespit etmişler ve EMA'a maruz kalan hücrelerin anlamlı derecede kollajen sentezini arttığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak EMA'a maruz kaldığında indüklenen bir faktörün kollajen sentezini hızlandırabildiğini ileri sürmüşlerdir (192).

Biz çalışmamızda İnterfolliküler alanlardaki kollajeni değerlendirmek için Mallory'inin Aniline blue boyası uyguladık. Anne Kontrol grubundaki örneklerde anilin mavisi tutulumu interfolliküler alanda hafif derecede görüldü. Bunun dışındaki alanlarda boyanma izlenmedi. EMA uygulanan anne grubunda ise interfolliküler bölgedeki bağ dokuda belirgin kollajen artışı olduğu saptandı. EMA+melatonin uygulanan anne grubunda ise interfolliküler alanlarda kollajen artışının EMA grubundaki kadar yoğun olmadığı dikkati çekti. Sham grubunda ise genel olarak kontrol grubuna benzemektedir. Yavru kontrol grubundaki örneklerde anilin mavisi tutulumu beklendiği gibi interfolliküler alanda hafif derecede görüldü. EMA

uygulanan yavru grubunda ise interfolliküler bölgedeki bağ dokuda belirgin kollajen artışı gözlenmedi. EMA+melatonin uygulanan yavru grubunda ise interfolliküler alanlarda kollajen artışının EMA grubundaki kadar yoğun olduğu dikkati çekti. Sham grubundaki bulgular ise genel olarak kontrol grubuna benzemektedir. Elde ettiğimiz bulgular Soda ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile karşılaştırdığımızda, anne ratlarda İnterfolliküler alanlardaki kollajen artışı oranları paralellik göstermektedir. Ama bu bulgular yavru deneklerde bizim bulgularımızı desteklememektedir.

Galat ve arkadaşları, fare ve denizkestanesi (murine ve sea urchin) embriyolarının gelişimlerini non-termal elektromanyetik radyasyon (EMR) etkisi altında araştırmışlardır (193). Bunun için MRTA-01E-03 jeneratör ile 54-78 GHz frekans ve 0,06 mWt/cm² radyasyon şiddeti kullanmışlardır. Embriyoları iki blastomer aşamasında 30 dakika boyunca ışına maruz bırakmışlardır. Blastomerlerin, blastosist aşamasına ulaşmasında EMA'nın etkili olduğunu saptamışlardır (EMA grubu % 97,3 kontrol grubu % 87.5) . Sonuç olarak elektromanyetik radyasyonun embriyoların erken gelişmelerinde, stimüle edici etkisi olduğunu göstermişlerdir. (193).

Brent yaptığı derlemede EMA'nın üreme sistemi üzerine olan risklerini değerlendirmiş. Ayrıca derlemede insan dışındaki memeli organizmalarda yapılan çalışmaları değerlendirdiğinde, EMA'nın fetal büyüme, konjenital malformasyonlar, embriyo kaybı ve sinir sistemi üzerine olan olumsuz etkilerinin yeteri kadar desteklenmediğini bildirmiştir (194).

Veterany ve arkadaşları, 0,07 T şiddette oluşturdukları manyetik alanın tavuk embriyonları üzerine olan mortalitesini araştırmışlardır (195). İnkübasyon suresinde yumurtaların manyetik alana maruz kaldığında embriyonik mortalitenin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bu oran EMA grubunda (14,28 + / -% 3,14 olarak; 18,57 + / -%

4,03 resp. 18,95 + / -% 3,77) iken kontrol grubunda ise (1,57 + / -% 0,97) olarak bildirilmiş ve bu bulgular arasında anlamlı fark olduğunu göstermişlerdir (p <0.001). Sonuç olarak EMA'a maruz kalan yumurtalardan elde edilen civcivlerin kontrol grubuna göre mortalite oranı daha yüksek olduğunu ve ağırlıklarında daha az olduğunu bildirmişlerdir (195).

Chung ve arkadaşları EMA'nın etkisini gebe Sprague Dawely sıçanlarda, embryo-fetal gelişimi incelemişlerdir (178 196). Gebeliğin 6 – 20 günleri arasındaki dönemde bir grubu manyetik alana maruz bırakmışlardır. Sonuçta manyetik alana maruz kalan grupla kontrol grupları arasında herhangi bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Anne sıçanların vücut ağırlığı, organ ağırlık ortalaması, hematolojik ve serum biyokimyasal parametreler açısından anlamlı fark bulmamışlardır. Ayrıca manyetik alana maruz kalındığında fetal ölüm, fetal vücut ağırlığı ve plasenta ağırlığı açısından da fark olmadığını bildirmişlerdir. (196).

Biz çalışmamızda tiroid dokuya odaklandığımız için fetal ölüm, fetal vücut ağırlığı ve plasenta ağırlığı gibi parametreleri değerlendirmeyi düşünmedik.

Chu KP ve arkadaşları araştırmalarında 50 Hz manyetik alanın insan amniyotik hücrelerinde mikrofilament, aktin ve epidermal büyüme faktör reseptörü üzerine etkisini incelemişlerdir (197). Elektron mikroskop aracılığı ile yaptıkları incelemede EMA'a maruz kaldıktan sonra hücre şekillerinin çok yassılaştığını tespit etmişlerdir. Sonuçlarında manyetik alana kısa bir süreli bile maruz kalınması insan amnion hücrelerinde microfilamentleri yeniden re-organizasyona indüklediğini ileri sürmüşlerdir. (197)

Cervellati ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada yüksek frekanslı elektromanyetik alanın trofoblast konneksinleri üzerine etkisini araştırmışlardır (198). Konneksinler zar proteinleri olarak trofoblastların işlevlerini etkileyebilme yeteneğe sahiptirler. Bu çalışmada konneksinlerin ekspresyonunu ve ekstrasvillus trofoblast hücre hatlarındaki lokalizasyonu

araştırılmıştır. Elektron mikroskopik bulgularda intersellular gap-junction benzeri bağlantı odaklarında bariz düşüş olduğunu bildirmişlerdir (198).

Yapılan birkaç çalışmada da EMA'nin melatonin sirkadiyen sekresyon profilini değiştirdiği gösterilmiştir (92,93,94,95).

Koyu ve arkadaşları yaptığı çalışmada, sıçanlar üzerinde 1800 MHz elektromanyetik alanın (EMA) serum TSH, T₃, T₄, kortizol ve testosteron hormon düzeylerine etkisini araştırmışlardır. Yöntem aşamasında yirmi yetişkin erkek sıçan kullanılmış ve her biri 10 hayvandan oluşan iki bağımsız grup oluşturulmuştur, 1. grup kontrol, 2. Grup EMA grubu olarak planlanmış ve EMA grubuna dört hafta boyunca haftada beş gün ve günde 30 dakika olmak üzere 1800 MHz EMA uygulanmıştır. Kontrol grubu, aynı gün ve sürede EMA uygulanmadan aynı çevresel şartlarda tutulmuştur. Çalışma sonunda tüm sıçanların serumunda TSH, T₃, T₄, kortizol ve testosteron hormon seviyeleri ölçülmüştür. EMA grubunda T₃, T₄ ve kortizol hormonlarının seviyeleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak, serum TSH ve testosteron hormon düzeylerinde kontrol ve EMA grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sonuç olarak bu bulgular, cep telefonlarından yayılan 1800 MHz EMA'nın sıçanlarda serum T₃, T₄ ve kortizol hormonlarını artırdığını, ancak TSH ve testosteron hormon düzeylerini değiştirmedğini göstermiştir (199).

Woldanska-Okonska M çalışmasında insan ve hayvanlarda EMA'nın hormon salgısı üzerine etkisini araştırmıştır. EMA'nın etkisi sonucu salgılanması bozulan hormon olarak en iyi tanımlanmış olan hormon melatonindir. Diğer hormonlar üzerinde manyetik alanların etkisi henüz yeterli kadar aydınlatılamamıştır. Bu çalışma ile EMA'nın hormon salgılanması üzerine etkileri epidmiyolojik ve deneysel çalışmalar ile araştırılması gereği vurgulanmıştır (200). Anninos PA'nın çalışmasında Manyetik alanın pineal bez aktivitesi üzerine de etkileri

olduğunu göstermiştir. Birçok çalışmada manyetik alanın, endojen antiepileptik bir bileşik olan ve pineal bezden salınan melatoninin etkisini değiştirebileceği gösterilmiştir. EMA'nın aynı zamanda dopaminerjik, serotonerjik ve endojen opioidderjik fonksiyonları regüle ettiği ve laboratuvar hayvanlarında yapay olarak oluşturulan manyetik alanların, habenular komplekste bir kapı fonksiyonu olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (157).

Persinger MA'nın çalışmasında deneysel olarak ratlarda nokturnal manyetik alan uygulanmasının muhtemelen melatonin sentez ve salınımını baskılayarak, nöbetlere neden olduğunu rapor etmiştir (160).

De Seze R'nin kendi isteği ile katılan 37 gönüllü erkek üzerinde yaptığı bir çalışmada, iki çeşit cep telefonunun etkileri araştırmıştır. Denekler 4 hafta süre ile hafta da 5 gün, günde 4 saat (14.00-16.00 ve 16.30-18.30 saatler arasında) cep telefonunun etkisine maruz bırakılmıştır. Her iki cep telefon arasında melatonin salınımı üzerine belirgin bir farklılık saptanmamıştır (163).

Melatonin üzerine bir başka çalışmayı Selmaoui B, Kato M'nin çalışmasında uzun süreli 0.1-mT, 50 Hz.lik manyetik alana maruz kalan ratlarda, melatonin sentezinin azaldığını göstermiştir (165).

Wilson BW'nin çalışmasında ise düşük frekanstaki (50-60 Hz) EMA'nın nöroendokrin sistem üzerine etkileri araştırılmıştır (167). Melatoninin sirkadiyen ritminde değişiklik olduğunu ve pineal bezin fonksiyonunda azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir. Yine rat pineal bezinde N-Asetil Transferaz enziminin inhibe olduğu, melatoninin nokturnal pik amplitüdünde düşme, pik oluşma zamanında ise gecikmeler olduğu bildirilmiştir (167).

De Seze R'nin çalışmasında Gsm 900 ve DCS 1800 ti cep telefonların, 38 sağlıklı erkekte melatonin salınımı üzerindeki etkilerini araştırmak amacı ile haftanın 5 günü (günde 2 saat) toplam 4 hafta süre ile telefonların maksimum güçleri ile uygulanma yapılmış, çalışma

sonunda sirkadiyen ritimin bozulmadığı gibi, her iki tip telefonun etkileri arasında da anlamlı bir farklılığa rastlanmadığı bildirilmiştir (163).

Albertson TE'nin çalışmasında Melatoninin ratlarda anti konvulzan etkisinin de bulunduğu rapor edilmiştir. Bu etkisinin manyetik stimülasyona duyarlı olabileceği bildirilmiştir (168).

Adriana Pedreañez'nin çalışmasında melatoninin antiapoptotik özelliğini Puromycin Aminonucleoside Nephrosis'de oluşturulan deneklerde oluşan apoptoz vardığında, melatonin engelleyici olduğunu göstermiştir (183 201). Bizim çalışmamızda da EMA'nın etkisi sonuca arttığı tespit edilen apoptozun melatonin ile engellendiğini tespit ettik. Ancak yavru ratlarda EMA'nın etkisi sonucunda apoptotik hücrelerin artmasında anlamlı olarak fark saptanmadı. Buna bağlı olarak da melatoninin apoptotik hücre üzerine engelleyici etkisini gözleyemedik.

Ömeroglu günlük yaşamda etkisi altında kalabileceğimiz bir elektromanyetik alanın, fetus kalp kası gelişimi üzerine olan etkisini incelemiştir (202). Bu amaçla yaşları ve vücut ağırlıkları birbirine yakın olan gebe fareler "Kontrol" ve "Elektromanyetik alan" olmak üzere iki gruba ayrıldı. Elektromanyetik alan grubundaki fareler günde 7 saat 120 mikro teslalık bir elektromanyetik alana maruz bırakıldılar. Farelerden gebeliklerinin 18. gününde sezeryanla fetusları çıkarıldı ve stereomikroskop altında fetusların kalp kasları alınarak rutin elektron mikroskopik takip işlemine başlanmıştır. Sonuç olarak günlük yaşamda etkisi altında kalabileceğimiz ortalama bir elektromanyetik alanın, fetus kalp kasında çizgilenmeyi bozarak ve kalp kası mitokondrilerinde krista kaybına yol açarak fetus kalp kası gelişimini etkilediğini bildirmişlerdir (202).

Gökçimen ve arkadaşları çalışmalarında karaciğer üzerine EMA'nın indükleyici etkisiyle oluşabilecek morfolojik değişikliklere melatonin etkisini araştırmışlardır. Çalışmada otuz albino genç erkek Wistar Albino rat kullanılmış. Bunlar 3 gruba ayrılmış. Kontrol (n:

10) grubuna 2 hafta boyunca günlük (0.1 ml/100 g) % 5 etanol içeren salin intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. EMA grubu (n: 10), EMA'a maruz bırakılarak (0.1 ml/100 g) % 5 etanol içeren ve fizyolojik salin intraperitoneal enjeksiyon yapılmıştır. Bir diğer grupta ise (n:10) melatonin tedavisi uygulanmıştır. Melatonin intraperitoneal tek doz (0.1 ml/100g) 4 mg olarak saat 10:00 da 2 hafta boyunca verilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen parafin kesitler hematoksilin eozin ile boyanıp ışık mikroskobu altında incelenmiştir. EMA grubunda karaciğer doku örnekleri incelendiğinde periportal alanda sinüs dilatasyonu, karışık hücre infiltrasyonları, nekroz ve dejenerasyon saptanmıştır. Ancak, Melatoninin verilen grupta kısmen bu bulguların daha az olarak saptandığı bildirilmiştir. Sonuç olarak, EMA maruz kalan sıçanlarda karaciğer dokusunda değişiklikler üzerinde melatoninin hafif bir önleyici etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir (203).

Çalışmamızda elde edilen kesitlere apoptotik hücreleri göstermek için yaptığımız TUNEL ve kaspaz 3 immunoreaktivite boyamasında anne ve yavru kontrol grubundaki doku kesitlerinin tüm alanları incelendiğinde TUNEL ve Kaspaz3 immün boyanan epitel hücrelerin az olduğu görüldü. EMA uygulanan anne grubunda epitel hücrelerinde TUNEL ve Kaspaz 3 immunoreaktivite boyanmasının belirgin olarak çok ve anlamlı olduğu saptandı. EMA + melatonin uygulanan gruplarda ise TUNEL ve Kaspaz3 immün boyamanın folliküler epitel hücrelerinde, EMA grubuna göre daha az olduğu görüldü.

Yavru EMA grubunda epitel hücrelerinde TUNEL pozitif boyanmış hücre sayısı kontrol, sham ve EMA+ melatonin gruplara göre fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlı iken Kaspaz 3 boyaması ile elde ettiğimiz sonuçlarda bu gruplar arasında anlamlı fark çıkmadı. Bunun nedeni olarak da TUNEL boyaması DNA kırıklarını göstermektedir, Yavru ratlarda P53 geni aktive olarak hücreye DNA kırıklarını düzeltme fırsatı verdiğini düşünmekteyiz. Buna bağlı olarak yavru ratlarda EMA grubundaki tiroid doku örnekleri incelendiğinde TUNEL pozitif boyanmış hücre sayısını fazla bulurken Kaspaz 3 immunhistokimya boyamasında bu farkı göremedik.

Sonuç ve öneriler:

Çalışmamızda, günlük yaşamda çok sık karşılaştığımız 50 Hz titreşimli elektromanyetik alanın, gebelik döneminde sıçan tiroid bezi üzerine etkilerini ve bu etkilere melatoninin koruyucu etkisi değerlendirildi. Bunun için de hem anne ratların hem de doğduktan sonra yavru ratların tiroid dokuları alarak ultrasutrüktürel ve histolojik analizler yapıldı.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar tartışma bölümünde de görülebileceği gibi genel olarak ulaştığımız literatürlerle uyum göstermektedir. Anne deneklerde tiroid doku üzerine EMA'nın etkisi kolloid miktarında azalma, interfolliküler kollagen miktarında artma, follikul çapında azalma, apopitotik hücre sayısında artma şeklinde olmuştur. Melatonin EMA'a bağlı tiroid dokuda ortaya çıkan olumsuz bulguları kısmen yada tamamen ortadan kaldırmıştır. Aynı şekilde yavru deneklerde EMA'a bağlı tiroid dokusunda elde ettiğimiz bulgular; kolloid miktarında azalma, follikul çapında azalma iken interfolliküler kollegen miktarında farklılığın histolojik kesitlere yansımaması ilgi çekiciydi. TUNEL boyama sonuçları bize yavru deneklerde apopitotik hücre sayısında artma şeklinde yansımaya rağmen TUNEL boyamasını desteklemek için yaptığımız Kaspaz 3 immunreaktivite boyamasında apopitotik hücre sayısında anlamlı farklılık gözlemedik. Bu bulgu bize yavru deneklerde tiroid epitel hücrelerinin EMA'dan etkilendiğini fakat hücrelerin anne tiroid dokudaki hücrelere oranla daha hızlı olumlu tepki gösterdiklerini düşündürmektedir. Yavru deneklerde EMA'nın olumsuz etkisinin daha az olduğunu tespit ettik.

Bir hayvan modeli üzerinde yaptığımız araştırmanın kriterleri ne kadar uygun olursa olsun insanlar üzerinde aktarılması mümkün değildir. Bununla birlikte EMA'nın tiroid doku üzerine yaptığı olumsuz etkileri ve oluşturduğu dokusal hasarı gösterilmesi açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak literatürlere bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara baktığımızda EMA'a maruz kalmanın birçok organda hücresel hasar oluştura bileceği görülmektedir. Kaçınılmaz olarak çevremizi saran EMA etkilerinden kontrollü ve korunmalı kullanım ile en az etkileneceğimiz açıktır.

Kaynaklar:

1. FRANK, A.L., SLESIN, N. (1998). Nonionising Radiation, Maxcy-Rosenau-Last, Public Health and Preventive Medicine, WALLACE, R.B. ed, p:526-535, Stanford.
Ahlbom A, Feychting M. Electromagnetic radiation. Br Med Bull. 2003; 68:157-65.
2. Van Leeuwen, G.M, Lagendijk J.J, Van Leersum B.J, Zwamborn A.P, Hornsleth S.N, Kotte A.N., (1999). Calculation of Change in Brain Temperatures due to Exposure to a Mobile Phone. Phys. Med. Biol. 44: 2367–2379.
3. Feychting, M. & Ahlbom, A. (1994). Magnetic Fields, Leukemia, and Central Nervous System Tumors in Swedish Adults Residing Near High-Voltage Power Lines. Epidemiology (Cambridge, Mass.), 5, 501–509.
4. Savitz, D.A. & Loomis, D.P. (1995). Magnetic Field Exposure in Relation to Leukemia and Brain Cancer Mortality among Electric Utility Workers. Am. J. Epidemiol., 141, 123–134
5. G Güler, N Atalay Seyhan, N Altan, B Gönül, C Çevik; Tissue Response to Electric Fields with Different Intensities and Directions, Progress in Biophysics & Molecular Biology, 65, Suppl.1, 215, 1996.
6. Penafiel LM, Litovitz T, Krause D, Desta A, Mullins JM. Role of Modulation on the Effect of Microwaves on Ornithine Decarboxylase Activity in L 929 Cells. Bioelectromagnetics 18: 132–141, 1997.
7. Robison JG, Pendleton AR, Monson KO, Murray BK, O’neill KL. Decreased DNA Repair Rates and Protection from Heat Induced Apoptosis Mediated by Electromagnetic Field Exposure. Bioelectromagnetics 23: 106–112, 2002.

8. Blank M, Soo L, Lin H, Henderson AS, Goodman R. Changes in Transcription in HL-60 Cells following Exposure to Alternating Currents from Electric Fields. *Bioelectrochem Bioenerg* 28: 301–309, 1992.
9. Blank M, Goodman R. Do Electromagnetic Fields Interact Directly with DNA? *18: 111–115*, 1997.
10. Zmyslony M, Jajte JM. The Role of Free Radicals in Mechanisms of Biological Function Exposed to Weak, Constant and net Magnetic Fields. *Med Pr* 49(2): 177–186, 1998.
11. Garaj–Vrhovac V, Fucic A, Horvat D. The Correlation Between the Frequency of Micronuclei and Specific Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes Exposed to Microwave Radiation In Vitro. *Mutation Res* 281(3): 181–186, 1992.
12. JE Moulder and KR Foster. Biological Effects of Power Frequency Fields as They Relate to Carcinogenesis; *Proc Soc Exper Biol Med*, 209: 309–324, 1995.
13. Garaj–Vrhovac V, Fucic A, Horvat D. The Correlation Between the Frequency of Micronuclei and Specific Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes Exposed to Microwave Radiation In Vitro. *Mutation Res* 281(3): 181–186, 1992.
14. Lary JM, Conover DL, Foley ED, Hanser PL. Teratogenic Effects of 27.12 MHz Radiofrequency Radiation in Rats. *Teratology* 26: 299–309, 1982.
15. Imaida K, Kuzutani K, Wang J, Fujiwara O, Ogiso T, Kato K, Shirai T. Lack of Promotion of 7, 12–dimethylbenz[a]anthracene–initiated Mouse Skin Carcinogenesis by 1.5 GHz Electromagnetic Near Fields. *Carcinogenesis* 22(11): 1837–1841, 2001.
16. Thériault G, Goldberg M, Miller AB, Armstrong B, Guénel P. Cancer Risks Associated With Occupational Exposure To Magnetic Fields Among Electric Utility Workers In Ontario And Quebec, Canada, And France: 1970–1989. *Am. J. Epidemiol.*, 139, 550–572.

17. Wertheimer, N., Savitz, D.A. & Leeper, E. (1995). Childhood Cancer In Relation To Indicators Of Magnetic Fields From Ground Current Bioelectromagnetics, 16, 96.
18. Berman E, Carter HB, House D. Observations of Syrian Hamster Foetuses after Exposure to 2450–MHz Microwaves. *J Microwave Power* 17: 107–112, 1982.
19. Berman E, Carter HB, House D. Reduced Weight in Mice of Offspring after in Utero Exposure to 2450–MHz (CW) Microwaves. *Bioelectromagnetics* 3: 285–291, 1982.
20. London, S.J., Thomas, D.C., Bowman, J.D., Sobel, E., Cheng, T.C. & Peters, J.M. (1991). Exposure To Residential Electric And Magnetic Fields And Risk Of Childhood Leukemia. *Am. J. Epidemiol.*, 134, 923–93
21. Allis JW, Sinha–Robinson BL. Temperature Specific Inhibition of Human Cell Na⁺/K⁺ ATPase by 2450 MHz Microwave Radiation. *Bioelectromagnetics* 8: 203207, 1987.
22. G Güler, N Atalay Seyhan; Collagen Synthesis in Lung and Kidney Tissues Under ELF Electric Fields, *Medical & Biological Engineering & Computing*, Suppl. 1, 4, 1997.
23. Balcer–Kubiczek EK, Harrison GH. Neoplastic Transformation of C3H/10T1/2 Cells Following Exposure to 120–Hz Modulated 2.45–GHz Microwaves and Phorbol Ester Tumor Promoter. *Radiat Res* 126(1): 65–72, 1991.
24. Maes A, Verschave L, Arroyo A, DeWagter C, Vercruyssen L. In Vitro Cytogenetic Effects of 2450 MHz Waves on Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Bioelectromagnetics* 14: 495–501, 1993.
- 25- Cameron I.W. Hardman W.E., Winters W.D., Zimmerman S., Zimmerman A.M. Environmental Magnetic Fields: Influences on Early Embryogenesis. *J. Cell. Biochem.* 1993: 51; 417 – 425

26-R. J. Lieb, W. Regelson, B. West, R. L. Jordan and D. P. DePaola. Effect of Pulsed High Frequency Electromagnetic Radiation on Embryonic Mouse Palate in Vitro. *Journal of Dental Research*,1980. Vol 59, 1649–1652

27-Adey WR, Byus CV, Cain CD, Higgins RJ, Jones RA, Kean CJ, Kuster N,MacMurray A, Stagg RB, Zimmerman G, Spontaneous and Nitro so Urea Induced Primary Tumors of the Central Nervous System in Fischer 344 Rats Exposed to Frequency-Modulated Microwave Fields. *Cancer Res* 60(7):1857-1863, 2000.

28- Koyu A,Cesur G,Ozguner F,Akdogan M,Mollaoglu H,Ozen S. Effect of 900 MHz Electromagnetic Field on TSH and Thyroid Hormones in Rats. *Toxicol Lett.*2005 Jul 4;157(3):257-62.Epub 2005 Apr 11.

29- Rajkovic V,Matavulj M,Gledic D,Lazetic B.Evaluation of Rat Thyroid Gland Morphophysiological Status after Three Months Exposure to 50 Hz Electromagnetic Field. *Tissue Cell.*2003 Jun;35(3):223-31.

30- Rajkovic V,Matavulj M,Lukac T,Gledic D,abic L,Lazetic B. Morphophysiological Status of Rat Thyroid Gland after Subchronic Exposure to Low Frequency Electromagnetic Field. *Med Pregl.*2001 Mar –Apr;54(3-4):119-27

31- Fisher DA, Odell WD, Hobel C, Garza R. Thyroid Function in the Term Fetus. *Pediatrics* 1969, 44.526–535.

32- Eric P Widmaier, Hershel Raff, Kevin T.Strang Vander's. *Human Physiology (Human Physiology Vander)* McGraw-Hill Science/Engineering/Math,25 January,2005.

33- Reiter R.J.et al. Oxidative Processes and Antioxidative Defense Mechanisms in the Aging Brain. *FASEB J* 9, 526–533, 1995.

34-Reiter R.J. et al. Antioxidant Capacity of Melatonin: A Novel Action not Requiring a Receptor. *Neuroendocrinology Letters*:15, 103–115, 1993.

35-Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R. J., Plummer B. F., Limson J., Weintraub S.T., and Qi W. Melatonin Directly Scavenges Hydrogen Peroxide: A Potentially New Metabolic Pathway of Melatonin Biotransformation. *Free Rad Biol Med* 29.11, 1177–1185, 2000.

36-Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological Action of Melatonin in Shock, Inflammation and Ischemia / Reperfusion Injury. *Eur J Pharmacol.* 2001; 426: 1–10

37-Uz T, D. Giusti, Franceschini, Kharlamov A, Manev H. Protective Effect of Melatonin Against Hippocampal DNA Damage Induced by Intraperitoneal Administration of Kainate to Rats. *Neuroscience*, 73,3, 631–639, 1996.

38-Maan-Yiuh A. And Ho LT. Melatonin Supresse Iron-Induced Neurodegeneration in Rat Brain. *Free Radical Biology and Medicine* 28:6, 904–911, 2000

39. Seymour I. Schwartz. Principles of Surgery I-II, 7th Edition, International Editions, 1999, Mc-Graw-Hill Companies,

40. Moore KL. The Neck. In: Clinically Oriented Anatomy. 3rd Ed: Moore KL, Baltimore, Williams & Wilkins. 1992: 783–852.

41. Beahrs OH, Surgical Anatomy and Technique of Radical Neck Dissection. *Surg Clin North Am*1997:57(4); 663–668

42. Skandalakis JE, Carlson GW, Colborn GL. Neck. In: Surgical Anatomy The Embryological and Anatomic Basis of Modern Surgery. Int Ed: Skandalakis JE, Greece, Paschalidis Medical Publications. 2004: 1–116.

43. Atoji Y, Yamatomo Y, Suzuki Y, Sayed R (1999), Ultrastructure of the Thyroid Gland of the one-humped Camel (*camelus dromedarius*). *Anat. Histol. Embryol.* 28: 23-26

44. Demir N (2001), Endokrin Sistem Histolojisi ve Embriyolojisi, www.akdeniz.edu.tr/tip/histoloji/Necdet/endsis Erişim Tarihi: 17.06.2008
45. Noyan A (2000), Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, Meteksan Anonim Şirketi, Ankara.
46. Yılmaz B (1999), Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji ABD. 1. Baskı, Feryal matbaacılık, Ankara.
47. İşgör A (2000)a, Anatomi, Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi 1. Baskı. Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul.
48. Abdel-Magied EM, Taha AA, Abdalla AB (2000), Light and Electron Microscopic Study of the Thyroid Gland of the Camel (*Camelus Dromedarius*), *Anat. Histol. Embryol.* 29: 331-336
49. Fidancı UR (2005), Çekirdek Düzeyinde Etkili Hormonlar, Erişim [www.veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Dersler/Hormonlar/Çekirdek.htm], Erişim Tarihi: 2.9.2008
50. Bouknight AL (2003), Thyroid physiology and thyroid function testing. *Otolaryng Clin. N. Am.*, 36: 9-15
51. Önsel Ç (2004), Tiroid bezinin yeri, yapısı ve fonksiyonları, Erişim [www.tiroit.com/default.asp?sayfa=7-19k], Erişim Tarihi: 10.05.2008
52. Rose SR (2002). Thyroid Disorders. Fanaroff AA, Martin RJ, editors. *Neonatal - Perinatal medicine 7th edition, Volume 2*, 1392- 1416.
53. Carlson BM (1981), *Pattern's Foundations of Emryology*. Depertmant of Anatomy and Biological Ssciences Universty of Michigan, USA.

54. Ergin FT (2005), Demir Eksikliği Anemisinin Tiroid Hormonları Üzerine Etkisi, Uzmanlık Tezi, TC. Sağlık Bakanlığı Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.

55. Charles GDB (1985), The Thyroid Gland. Clinical Paediatric Endocrinology 3th end, Blackwell Science ltd. Oxford

56. Günöz H (2002), Tiroid Bezi. Pediatri, Neyzi O, Ertuğrul T, 3. baskı, Nobel Tıp Kitapevi, 1229-1247, İstanbul.

57. Burtis, C.A., Ashwood E.R.: Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company. (1998)

58. Cecil, Textbook of Internal Medicine 2, 18 th. Edition, 1315-18. (1988)

59. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V,W,: Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition, 439-448. (2003)

60. Francis, S., Greenspan: Basic and Clinical Endocrinology, Third Edition. (1991)

61. Duckworth, W.C.: İnsülin Degradation: Mechanisms, Products and Significance, Endocrine Reviews, 9, 319-45. (1988)

62. Jolly, S.R., Kane, W.J., Bailie, M.B., Abrams, G.D., Lucchesi, B.R.: Canine myocardial reperfusion injury: its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase, Cric. Res., 54 (3), 277-85. (1984)

63. Esterbauer, H., Schaur, R.J.: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes, Free. Radic. Biol. Med., 11, 81-128. (1991)

64. Janoff, A., et. al.: Proteases, antiproteases and oxidants: pathways of tissue injury during inflammation. In: Cotran, R.S., Kaufman, N., Majno, G., eds. Current Topicsin inflammation and Infection, Baltimore: Williams & Wilkins Company, 62. (1982)

65. Oppenheimer, J.H.: Thyroid hormone action at the cellular level. *Science*, 203(4384), 971- 79. Review. (1979)
66. Latham, K.R., Ring, J.C., Baxter, J.D.: Solubilized nuclear “receptors” for thyroid hormones, *J. Biol. Chem.*, 251(23), 7388-97. (1976)
67. Jump, D.B., Oppenheimer, J.H.: Thyroid hormon receptor-containing fragment released from chromatin by deoxyribonuclease I and micrococcal nuclease, *Science*, 209 (4458), 811- 13. (1980)
68. Burman, K.D., Lukes, Y., Wright, F.D., Wartofsky, L.: Reduction in hepatic triiodothyronine binding capacity induced by fasting, *Endocrinology*, 101(4), 1331- 34. (1977)
69. Schussler, G.C., Orlando, J.: Fasting decreases triiodothyronine receptor capacity, *Science*, 199(4329), 686-88. (1978)
70. Silva, J.E., Larsen, P.R.: Pituitary nuclear 3,5,3'-triiodothyronine and thyrotropin secretion: an explanation for the effect of thyroxine, *Science*, 198(4317), 617-20. (1977)
71. Anabritanica Ansiklopedisi, 15.Baskı, Ana Yayıncık A.S, 1992, S.:98
72. Yeni Rehber Ansiklopedisi, Türkiye Gazetesi Yayınları, 6.Cilt, S.: 254
73. Elektrik Mühendisligi Dergisi, Temmuz-Agustos 1978, 259. Sayısı, S.:276-278
74. [Http://www.Lisefizik.Com/Lise3/Em.Htm](http://www.Lisefizik.Com/Lise3/Em.Htm),12.04.2008
75. [Http://www.Andor.Com/Library/Light/](http://www.Andor.Com/Library/Light/), 15.04.2008

76. Seker S, Çerezci O. Çevremizdeki Radyasyon Ve Koruma Yöntemleri, Bogaziçi Univ. Yayınları, İstanbul, 1997

77. Anabritanica Ansiklopedisi, 15.Baskı, Ana Yayıncık A.S, 1992, S.:112- 113

78. Sevgi L., Biyoelektromanyetik, Elektrik Mühendisleri Odası, S.:213

79. Atalay N. S., Elektromanyetik Kirlilik Ve Etkileri, Korunma Yöntemleri,Who Uluslararası Elektromanyetik Alan Projesi, Ulusal Ve Uluslararası Politikalar, Bilisim Toplumuna Giderken Elektromanyetik Kirlilik Etkileri Sempozyumu, Ankara, 1999

80. Seegal, R.F., Wolpaw, J.R. & Dowman, R. (1989). Chronic Exposure Of Primates To 60-Hz Electric And Magnetic Fields: Ii. Neurochemical Effects. Bioelectromagnetics, 10, 289–301.

81. Stuchly, M.A. & Esselle, K.P. (1992). Factors Affecting Neural Stimulation with Magnetic Fields. Bioelectromagnetics, Suppl. 1, 191–204.

82. Coelho, A.M. Jr, Rogers, W.R. & Easley, S.P. (1995). Effects of Concurrent Exposure to 60 Hz Electric and Magnetic Fields on the Social Behavior of Baboons. Bioelectromagnetics, Suppl. 3, 71–92.

83. Svedenstal, B.M. & Johanson, K.J. (1995). Fetal Loss in Mice Exposed to Magnetic Fields during Early Pregnancy. Bioelectromagnetics, 16, 284–289.

84. London, S.J., Thomas, D.C., Bowman, J.D., Sobel, E., Cheng, T.C. & Peters, J.M. (1991). Exposure to Residential Electric and Magnetic Fields and Risk of Childhood Leukemia. Am. J. Epidemiol., 134, 923–937.

85. Olsen, J.H., Nielsen, A. & Schulgen, G. (1993). Residence Near High Voltage Facilities And Risk Of Cancer in Children. Bmj (Clin. Res. Ed.), 307, 891– 895.

86. Feychting, M. & Ahlbom, A. (1994). Magnetic Fields, Leukemia, And Central Nervous System Tumors _n Swedish Adults Residing near High-Voltage Power Lines. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 5, 501–509.
87. Loomis, D.P., Savitz, D.A. & Ananth, C.V. (1994). Breast Cancer Mortality among Female Electrical Workers in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86, 921–925.
88. Theriault, G., Goldberg, M., Miller, A.B., Armstrong, B., Guenel, P., Deadman, J., Imbernon, E., To, T., Chevalier, A. & Cyr, D. (1994). Cancer Risks Associated with Occupational Exposure to Magnetic Fields among Electric Utility Workers in Ontario and Quebec, Canada, And France: 1970–1989. *Am. J. Epidemiol.*, 139, 550–572.
89. Savitz, D.A. & Loomis, D.P. (1995). Magnetic Field Exposure in Relation to Leukemia and Brain Cancer Mortality among Electric Utility Workers. *Am. J. Epidemiol.*, 141, 123–134.
90. Wertheimer, N., Savitz, D.A. & Leeper, E. (1995). Childhood Cancer in Relation To indicators Of Magnetic Fields from Ground Current Sources. *Bioelectromagnetics*, 16, 86–96.
91. Sobel, E., Davanipour, Z., Sulkava, R., Erkinjuntti, T., Wikstrom, J., Henderson, V.W., Buckwalter, G., Bowman, J.D. & Lee, P.J. (1995). Occupations with Exposure to Electromagnetic Fields: A Possible Risk Factor for Alzheimer’s disease. *Am. J. Epidemiol.*, 142, 515–524.
92. Reiter, R.J. (1993). Static and Extremely Low Frequency Electromagnetic Field Exposure: Reported Effects on the Circadian Production of Melatonin. *J. Cell. Biochem.*, 51, 394–403.
93. Kato, M., Honma, K., Shigemitsu, T. & Shiga, Y. (1994). Circularly Polarized, Sinusoidal, 50 Hz Magnetic Field Exposure does not influence Plasma Testosterone Levels of Rats. *Bioelectromagnetics*, 15, 513–518.

94. Rogers, W.R., Reiter, R.J., Smith, H.D. & Barlow-Walden, L. (1995). Rapid-Onset/Offset, Variably Scheduled 60 Hz Electric and Magnetic Field Exposure Reduces Nocturnal Serum Melatonin Concentration in Nonhuman Primates. *Bioelectromagnetics*, Suppl. 3, 119–122.
95. Graham, C., Cook, M.R., Riffle, D.W., Gerkovich, M.M. & Cohen, H.D. (1996). Nocturnal Melatonin Levels in Human Volunteers Exposed To Intermittent 60 Hz Magnetic Fields. *Bioelectromagnetics*, 17, 263–273.
96. Vasquez, B.J., Anderson, L.E., Lowery, C.I. & Adey, W.R. (1988). Diurnal Patterns in Brain Biogenic Amines Of Rats Exposed To 60-Hz Electric Fields. *Bioelectromagnetics*, 9, 229–236.
97. Dowman, R., Wolpaw, J.R., Seegal, R.F. & Satya-Murti, S. (1989). Chronic Exposure of Primates to 60-Hz Electric and Magnetic Fields: I. Neurophysiologic Effects. *Bioelectromagnetics*, 10, 303–317.
98. Zecca, L., Ferrario, P., Margonato, V., Cerretelli, P. & Zonta, N. (1991). Neurotransmitter Amino Acid Variations in Striatum of Rats Exposed to 50 Hz Electric Fields. *Biochim. Biophys. Acta*, 1075, 1–5.
99. Lai, H., Carino, M.A., Horita, A. & Guy, A.W. (1993). Effects of a 60 Hz Magnetic Field on Central Cholinergic Systems of the Rat. *Bioelectromagnetics*, 14, 5–15.
100. Yu, M.C., Gona, A.G., Gona, O., Al Rabiat, S., Von Hagen, S. & Cohen, E. (1993). Effects of 60 Hz Electric and Magnetic Fields on Maturation of The Rat Neopallium. *Bioelectromagnetics*, 14, 449–458.
101. Graham, C., Cook, M.R., Cohen, H.D., Riffle, D.W., Hoffman, S. & Gerkovich, M.M. (1999). Human Exposure To 60-Hz Magnetic Fields: Neurophysiological Effects. *Int. J. Psychophysiol.*, 33, 169–175.

102. Korpinen L, Partanen J. Influence of 50 Hz Electric and Magnetic Fields on the Human Heart. *Bioelectromagnetics*, 11:339-340 (1993)
103. Graham, C., Cook, M.R., Cohen, H.D. & Gerkovich, M.M. (1994). Dose Response Study of Human Exposure to 60 Hz Electric and Magnetic Fields. *Bioelectromagnetics*, 15, 447–463.
104. Korpinen L, Partanen J. Influence of 50 Hz Electric and Magnetic Fields on Extra systoles of Human Heart. *Rev. Environ. Health* 1994 Apr-Jun: 10(2):105-12
105. Kavet, R., Stuchly, M.A., Bailey, W.H. & Bracken, T.D. (2001). Evaluation Of Biological Effects, Dosimetric Models, And Exposure Assessment Related To Elf Electric-And Magnetic-Field Guidelines. *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, 16, 1118–1138.
106. Korpinen, L. Partanen, J. (1994). Influence of 50 Hz Electric and Magnetic Fields on the Pulse Rate Of Human Heart. *Bioelectromagnetics*, 15, 503–512.
107. Graham, C., Sastre, A., Cook, M.R., Kavet, R., Gerkovich, M.M. & Riffle, D.W. (2000). Exposure to Strong Elf Magnetic Fields Does Not Alter Cardiac Autonomic Control Mechanisms. *Bioelectromagnetics*, 21, 413–421.
108. Savitz, D.A., Checkoway, H. & Loomis, D.P. (1998). Magnetic Field Exposure and Neurodegenerative Disease Mortality among Electric Utility Workers. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 9, 398–404.
109. Sastre, A., Cook, M.R. & Graham, C. (1998). Nocturnal Exposure To intermittent 60 Hz Magnetic Fields Alters Human Cardiac Rhythm. *Bioelectromagnetics*, 19, 98–106.
110. Nakamura, Y., Yamamoto, Y. & Muraoka, I. (1993). Autonomic Control of Heart Rate during Physical Exercise and Fractal Dimension of Heart Rate Variability. *J. Appl. Physiol.*, 74, 875–881.

111. Fei, L., Anderson, M.H., Statters, D.J., Malik, M. & Camm, A.J. (1995). Effects of Passive Tilt and Submaximal Exercise on Spectral Heart Rate Variability in Ventricular Fibrillation Patients without Significant Structural Heart Disease. *Am. Heart J.*, 129, 285–290.
112. Stys, A. & Stys, T. (1998). Current Clinical Applications of Heart Rate Variability. *Clin. Cardiol.*, 21, 719–724.
113. J. H. Jeong¹, J. S. Kim¹, B. C. Lee³, Y. S. Min¹, D. S. Kim¹, J. S. Ryu, K. S. Soh³, K. M. Seo² & U. D. Sohn¹ Influence of Exposure to Electromagnetic Field on The Cardiovascular System *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, 25, 17–23
114. Elektromanyetik Dalgalar Ve insan Saglığı Sıkça Sorulan Sorular Ve Yanıtları, *Tübitak-Bilten*, 2001
115. Seven A, Candan G (1996) Antioksidan savunma sistemleri *Cerrahpaşa J.Med*; 27: 41 50
116. Cheeseman KH and Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*; 49 (3): 481-493
117. Choi D (1990) Free radicals. *Stroke*; 21: 88-89
118. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 1958; 80:2587–2590.
119. Pangerl B, Pangerl A, Reiter RJ. Circadian variation of adrenergic receptors in the mammalian gland: a review. *J Neural Transm Gen Sect* 1990; 81:17–29.
120. Ballı E. Melatoninin Fonksiyonları. *Mersin Üniversitesi Tıp Fak. Dergisi.* 2003; 4:380 385.
121. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, et al. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Newyork Acedemy of Science Annals.* 2000; 917:376–386.

122. Lynch HC, Wurtman RJ, Moskowitz MA, et al. Daily rhythm in human urinary melatonin. *Science* 1975; 187:169–171.
123. Iguchi H, Kato KI, Ibayashi Y. Melatonin serum levels and metabolic clearance in rate patients with liver cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 5:1025–1027.
124. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm. Metab. Res.* 1997; 29:363–372.
125. Stankov B, Fraschim, Reiter RJ. Melatonin bindings sites in the central nervous system. *Brain Res Brain Rev.* 1991; 16:245–256.
126. Yie SM, Niles LP, Younglai EV. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1747–1749.
127. Lee PPN, Pang SF. Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol Signals.* 1003; 2:181–193.
128. Wiswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1990; 87:6200–6204.
129. Lieberman HR, Waldhauser F, Garfield G, et al. Effects of melatonin on human mood and performance. *Brain Research.* 1984, 323:201–207.
130. Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, et al. The pineal hormone melatonin inhibits DNA adduct formation induced by the chemical carcinogen role in vivo. *Cancer Lett* 1993; 70:63–71.
131. Maestroni GJM. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res.* 1993; 14:1–10.

132. Maestroni GJM, Covacci V, Conti AA. Hemopoietic rescue via T cell-dependent endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. *Cancer Res* 1994; 5:2429–2432.
133. Gonzales-Haba MG, Garcia-Maurino S, Calvo JR, et al. High affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CDT+). *Faser J* 1995; 9:1331–1335.
134. Kauppilla A, Kivela A, Pakarinen A, et al. Inverse seasonal relationship between melatonin and ovarian activity in humans in a region with a strong seasonal contrast in luminosity. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65:823–828.
135. Van Coevorden A, Mockel J, Laurent E, et al. Neuroendocrine rhythms and sleep in aging men. *Am J Physiol* 1991; 260:651–661.
136. Tamarkin L, Cohen M, Roselle D, et al. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethyl-benz(a)anthracene-induced mammary tumors in rat. *Cancer Res.* 1981; 41:4432–4436.
137. Tamarkin L, Danforth D, Lichter A, et al. Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science* 1982; 216:1003–1005.
138. Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F, Benitez-King G (1994) Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res*;17 (2): 55-62
139. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM (1994) Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci*; 55 (24): 455-460
140. Cagnacci A, Volpe A (1996) Influence of melatonin and photoperiod on animal and human reproduction. *J Endocrinol Invest*; 19 (6): 382-411

141. Underwood H (1990) The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. *Experientia*; 46 (1): 120-128
142. Vijayalaxmi B, Thomas CRJ, Reiter RJ, Herman TS (2002) Melatonin: From Basic Research to Cancer Treatment Clinics. *J Clin Oncol*; 20: 2575-2601
143. Rogerio F de Souza L, Teixeira SA, Oliveria AL, de Nucci G, Langone F (2002) Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. *Brain Research*; 941 (1-2): 150
144. Omura T, Sano M, Omura K, Hasegawa T, Nagano A (2004) A mild acute compression induces neurapraxia in rat sciatic nerve. *Int J Neurosci*; 114 (12): 1561-1572
145. Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR (1993) The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safe role in vivo. *Cancer Lett*; 70: 65-71
146. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F (1994) Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci*; 55 (15): 271-276
147. Delagrange P, Guardiala- Lemaitre B (1997) Melatonin, its receptors, and relationship with biological rhythm disorders *Clin Neuropharmacol*; 20 (6): 482-510
148. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B (1995) A review of the evidence supporting melatonin role as an antioxidant. *J Pineal Res*; 18 (1): 1-11
149. Poeggeler B, Reiter RJ, Hardeland R, Swerynek E, Melchiorri D, Barlow-Walden LR (1993) Melatonin, a mediator of electron transfer and repair reactions, acts synergistically with the chain breaking antioxidants ascorbate, trolox and glutathione. *Neuroendocrinol Lett*; 17: 347-357

150. Pierrefiche G, Topall G, Courboin G, Henriet I, Laborit H (1993) Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*; 80 (2): 211-223
151. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D (1995) A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res*; 18 (1): 1-11
152. Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, Burgos A, Nistico G. (1995) Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sc.*; 56 (2): 83-89
153. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B (1995) Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int*; 26 (5): 497-502
154. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. (1994) Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*; 17 (3): 235-248
155. Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, Nayeri S, Schrader M, Carlberg C (1995) The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem*; 270 (13): 7037-7040
156. Mackinnon SE, Dellon AL, Hodson AR, Hunter DA (1985) Nerve regeneration through a pseudosynovial sheath in a primate model. *Plastic&Reconstructive Surgery*; 75: 833-841
157. Anninos PA, Tsagas N, Jacobson JI, Kotini A. The biological effects of magnetic stimulation epileptic patients. *Panminerva Med* 1999;41: 207-215.
158. Sandyk R, Anninos PA, Tsagas N. Magnetic fields and the habenular complex. *Int J Neurosci* 1991 ;59: 263-266.

159. Fariello RG, Bubenik GA, Brown G, Grota LJ. Epileptogenic action of intraventricularly injected antimelatonin antibody. *Neurology* 1977; 27: 567-70.
160. Persinger MA. Enhancement of limbic seizures by nocturnal application of experimental magnetic fields that stimulate the magnitude and morphology of increases in geomagnetic activity. *Int J Neurosci* 1996; 86: 271-80.
161. Rudeen PK, Philo RC, Symmes SK. Antiepileptic effects of melatonin in the pinealectomized Mongolian gerbil. *Epilepsia* 1980; 21: 149-54.
162. Castroviejo DA, Rosenstein RE, Romeo HE, Cardinali DP. Changes in gammaaminobutyric acid high affinity binding to cerebral cortex membranes after pinealectomy or melatonin administration to rats. *Neuroendocrinology* 1986; 43: 24- 31.
163. De Seze R, Ayoub J, Peray P, Miro L, Touitou. Evaluation in humans of the effects of radiocellular telephones on the circadian patterns of melatonin secretion, a chronobiological rhythm marker. *J Pineal Res* 1999; 27: 237-242.
164. Molina-Carballo A, Munoz_Hoyos A, Reiter RJ, et al. Utility of high doses of melatonin as adjunctive anticonvulsant therapy in a child with severe myoclonic epilepsy: two years experience. *J Pineal Res* 1997; 23: 97-105.
165. Selmaoui B, Touitou Y. Sinusoidal 50-Hz magnetic fields depress rat pineal NAT activity and serum melatonin: role of duration and intensity of exposure. *Life Sci* 1995; 57: 1351-8.
166. Kato M, Honma K, Shigemitsu T, Shiga Y. Effects of exposure to a circularly polarized 50-Hz magnetic field on plasma and pineal melatonin levels in rats. *Bioelectromagnetics* 1993; 14: 97-106.
167. Wilson BW, Stevens BG, Anderson LE. Neuroendocrine mediated effects of electromagnetic-field exposure: possible role of the pineal gland. *Life Sciences* 1989;45:1319-1332.

168. Albertson TE, Peterson SL, Stark LG, Lakin ML, Winters WD. The anticonvulsant properties of melatonin on kindled seizures in rats. *Neuropharmacology* 1981; 20: 61- 6.
169. Giusti P, Gusella M, Lipartiti M, et al. Melatonin protects primary cultures of cerebellar granule neurons from kainate but not from N-methyl-D-aspartate hexcitotoxicity. *Exp Neurol* 1995; 131: 39-46.
170. Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis. A basic biologicalphenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-245, 1972.
171. Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555- 556, 1980.
172. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501
173. Takahaski K, Schwarz E, Ljubetic C, Murray M, Tessler A, Saavedra RA. DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adults rats. *J Comp Neurol* 404: 159-71, 1999.
174. Nowell P C. Cytogenetics of tumor progression. *Cancer* 65: 2172-2175, 1990.
175. Caotes P J, Hales S A, Hall P A. The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha. *J Pathol* 178: 71-7, 1996.
176. Wyllie A H. The genetic regulation of apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 97-104, 1995
177. Spencer S, Cataldo N A, Jaffe R B. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstetrical and Gynecological Survey* 5: 314- 323, 1996.

178. Evan G L, Wyllie A H, Gilbert G S, Littlewood T D, Lond H, Breaks M. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69: 119-128, 1992.
179. Wagner A J, Small M B, Itoy N. Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of bcl-2. *Mol Cell Biol* 13: 2432-2440, 1993.
180. Korsmeyer S J. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes; regulators of cell death. *Blood* 80: 879-886, 1992.
181. Bao F and Liu D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptosis cell death and activates caspase-3. *Neuroscience* 116: 59-70, 2003.
- 182 Eastman A. Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. *Cancer Biology* 6: 45- 52, 1995.
183. Brinley F J J, Tiffert T, Scarpa A. Mitochondria and other calcium buffers of squid axon studied in situ. *J Gen Physiol* 72: 101-127, 1978.
184. Collins J A, Cynthia C A, Young K K, Vesely J M. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 45: 923-934, 1997.
185. Cohen J J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* 15: 35-43, 1993.
186. Bortner C D, Odernburg N B E, Crdlowski J A. The role of fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 5: 21-28, 1995.
187. Balakumran A, Champbell G A, Maslen M T. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 139: 122-127, 1996.

188. Rajkovic Vesna, Milica Matavulj and Olle Johansson. Light and electron microscopic study of the thyroid gland in rats exposed to power-frequency electromagnetic fields. *Journal of Experimental Biology* 209, 3322-3328 (2006)
189. Rajkovic.V, Matavulj M, Johansson O. The effect of extremely low-frequency electromagnetic fields on skin and thyroid amine- and peptide-containing cells in rats: an immunohistochemical and morphometrical study. *Rajkovic V, Environ Res.* 2005 Nov;99(3):369-77
190. Koyu A; Cesur G; Ozguner F; Akdogan M; Mollaoglu H ; Ozen S ; Effects of 900 MHz electromagnetic field on TSH and thyroid hormones in rats . *Toxicol Lett.* 2005 Jul 4;157(3):257-62. Epub 2005 Apr 11
191. Rajkovic Vksna ; Matavulj Milica ; Lazetic B. ; Stereological analysis of thyroid mast cells in rats after exposure to extremely low frequency electromagnetic field and the following "off" field period . *Acta Biol Hung.* 2005;56(1-2):43-51
192. Soda A, Ikehara T, Kinouchi Y, Yoshizaki K.. Effect of exposure to an extremely low frequency-electromagnetic field on the cellular collagen with respect to signaling pathways in osteoblast-like cells. . *J Med Invest.* 2008 Aug;55(3-4):267-78.
193. Galat VV, Mezhevikina LM, Zubin MN, Lepikhov KA, Khramov RN, Chaïlakhian LM. Effect of millimeter waves on the early development of the mouse and sea urchin embryo. *Biofizika.* 1999 Jan-Feb;44(1):137-40.
194. Brent RL. Reproductive and teratologic effects of low-frequency electromagnetic fields: a review of in vivo and in vitro studies using animal models. *Teratology.* 1999 Apr;59(4):261-86.
195. Veterány L, Veterányová A, Jedlicka J. Effect of magnetic fields on embryonic mortality. *Cesk Fysiol.* 2001 Aug;50(3):141-3

196. Chung MK, Kim JC, Myung SH, Lee DI. Developmental toxicity evaluation of ELF magnetic fields in Sprague-Dawley rats. *Bioelectromagnetics*. 2003 May;24(4):231-40
197. Chu KP, Cai ZY, Zhang DY, Zeng QL, Zhang YK, Chen SD, Xia RH. Effect of 50 Hz power frequency magnetic field on microfilament cytoskeleton assembly of human amnion FL cells. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2007 Sep;41(5):391-5.
198. Cervellati F, Franceschetti G, Lunghi L, Franzellitti S, Valbonesi P, Fabbri E, Biondi C, Vesce F. Effect of high-frequency electromagnetic fields on trophoblastic connexins. *Reprod Toxicol*. 2009 Jul;28(1):59-65. Epub 2009 Apr 5.
199. Koyu A, Ozguner F, Cesur G, Gokalp O, Mollaoglu H, Caliskan S, Delibas N. No effects of 900 MHz and 1800 MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on nocturnal serum melatonin levels in rats. *Toxicol Ind Health*. 2005 Mar;21(1-2):27-31
200. Woldańska-Okońska M, Czernicki J. Biological effects produced by the influence of low frequency electromagnetic fields on hormone secretion. *Przegl Lek*. 2003;60(10):657-62.
201. Adriana Pedreañez, Jaimar Rincón, Maritza Romero, Ninoska Viera and Jesús Mosquera. Melatonin decreases apoptosis and expression of apoptosis-associated proteins in acute puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 May;19(5):1098-105. Epub 2004 Feb 19.
202. Omeroglu Suna, Erdogan Deniz, Çam Meryem, Hatibolu M. Tahir. Ultrastructural Analysis of the Effects of Electromagnetic Field on Fetal Cardiac Muscle, *T Klin J Med Res* 1999, 17
203. Gökcimen A, Ozgüner F, Karaöz E, Ozen S, Aydin G. The effect of melatonin on morphological changes in liver induced by magnetic field exposure in rats. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 2002 May;79(1):25-31.