

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI**

**CEP TELEFONU (900 MHz VE 1800 MHz) VE KABLOSUZ  
İNTERNETİN (2450 MHz) NEDEN OLDUĞU  
ELEKTROMANYETİK ALANA MARUZ BIRAKILAN KANSER  
HÜCRELERİNDE KALSİYUM SİNYALİ, APOPTOZİS VE  
OKSİDATİF STRES DEĞERLERİ ÜZERİNE MESAFENİN  
ETKİLERİ**

**Bilal ÇİĞ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU**

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim  
Birimi tarafından 3167-YL2-12 proje numarası ile desteklenmiştir  
Tez No:116**

**ISPARTA-2014**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik **Anabilim Dalı** Yüksek Lisans **Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Savunma Tarihi: 15 / 01 / 2014**

**Tez Danışmanı:** Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU  
Süleyman Demirel Üniversitesi



**Üye:** Prof. Dr. Ahmet KOYU  
Süleyman Demirel Üniversitesi



**Üye:** Yrd. Doç. Dr. A. Cihangir UĞUZ  
Süleyman Demirel Üniversitesi



**ONAY:** Bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu' nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Nejdet ADANIR  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Hayata bakış penceremi daima güzele, hayra açan; kulağıma her zaman umut fısıldayan, hayat yolculuğunun onlarla daha da anlamlı hale geldiği, yaşama sevincim, hayattaki en kıymetlilerim anneme, babama, sevgi dolu kardeşlerime;

İdealleri ile adeta önümde ışık olup, sadece bilimsel hayatıyla değil; aynı zamanda kaliteli hayat tarzıyla da, yaşanacaksa bu hayatta böyle yaşanır demekten kendimi alamadığım pek değerli hocam tez danışmanım S.D.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik A.D. Başkanı Sn. Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na;

S.D.Ü. Mühendislik Fakültesi Elektronik ve Haberleşme Mühendisliği bölümü öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. Selçuk ÇÖMLEKÇİ'ye, S.D.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik A. D. değerli öğretim üyeleri Sn. Yrd. Doç. Dr. A. Cihangir UĞUZ'a ve Sn. Yrd. Doç. Dr. Ömer ÇELİK'e; samimi muhabbetleriyle daima içimi ferahlatan, kederlerimi unutturan değerli çalışma arkadaşlarıma; bu tez çalışmamda desteklerinden dolayı Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'a, S.D.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne ve üzerimde emeği olan tüm insanlara,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

**Bilal ÇİĞ, 2014**

## İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY SAYFASI</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>5</b>
2.1. Kalsiyum (Ca <sup>+2</sup> ).....	5
2.1.1. Kalsiyum ve Apoptozis.....	5
2.1.1.1. Hücre Ölümündeki Morfolojik Değişiklikler.....	6
2.1.1.2. Apoptozis .....	6
2.1.2. Kalsiyum ve Mitokondri.....	10
2.1.3. Kalsiyum (Ca <sup>+2</sup> ) Sinyali.....	12
2.1.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Depoları .....	13
2.1.3.2. Plazma zarından giren dış kalsiyum.....	13
2.2. Hücre İçi Depolardan Kalsiyum Çıkışını Sağlayan Yapılar.....	14
2.2.1. Ryanodin Reseptörü.....	14
2.2.2. Inositol 1,4,5-trisfosfat Reseptörleri .....	14
2.3. Hücre içi Ca <sup>+2</sup> Sinyalinin Oluşumu .....	15
2.3.1. Hücre Dışından Hücre içine Kalsiyum Girişi.....	15
2.3.2. Hücre içi Kalsiyum Depolarından Kalsiyumun Salınması.....	16
2.3.3. Hücre Dışından Sitoplazmaya Ca <sup>+2</sup> Girişini Sağlayan Kanal Tipleri Şunlardır: .....	16
2.3.3.1. Voltaj Bağımlı Ca <sup>+2</sup> Kanalları.....	16
2.3.3.2. Ligand Bağımlı Ca <sup>+2</sup> Kanalları .....	16
2.3.3.3. Ca <sup>+2</sup> Sızma Kanalları.....	17
2.3.3.4. Na-Ca Exchange (Değiş-Tokuş) .....	17
2.3.4. Hücre içi Ca <sup>+2</sup> Depolarından Ca <sup>+2</sup> Çıkışını Sağlayan Yapılar ise Şunlardır .....	17
2.4. Hücre içi depolara Ca <sup>+2</sup> 'un Alınması Başka Bir Değişle Sitozolden Ca <sup>+2</sup> 'un Uzaklaştırılması Üç Yolla Gerçekleşir .....	18

2.5. Oksidatif Stres .....	19
2.5.1. Serbest Radikaller .....	20
2.5.2. Membran Lipitlerinin Peroksidasyonu .....	22
2.5.3. Disülfid Bağı Oluşumu .....	22
2.5.4. DNA Hasarı .....	22
2.5.5. Süperoksit Radikalleri (O <sub>2</sub> <sup>-·</sup> ) .....	23
2.5.6. Hidroksil Radikalleri (OH <sup>-</sup> ).....	24
2.5.7. Nitrik Oksit (NO <sup>•</sup> ) .....	24
2.6. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri .....	24
2.6.1. Membran Lipitleri Üzerinde Etkileri .....	24
2.6.2. Proteinler Üzerinde Etkileri .....	25
2.6.3. Karbonhidratlar Üzerinde Etkileri .....	25
2.6.4. DNA Üzerinde Etkileri .....	26
2.7. Antioksidanlar .....	27
2.7.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları.....	28
2.8. Wi-Fi Kablosuz İnternet (2450 MHz) EMR ve Sağlık .....	28
2.9. Cep Telefonu (900 MHz ve 1800 MHz) EMR ve Sağlık.....	29
2.9.1. Cep Telefonu Radyasyonu (900 MHz ve 1800 MHz).....	30
2.9.2. Cep Telefonları ve Baz İstasyonları .....	30
2.9.3. Cep Telefonları, Baz İstasyonları ve Kanser .....	31
2.10. Radyasyonun Zararları .....	33
2.10.1. EMF Maruziyeti İçin Temel Sınırlamalar ve Referans Seviyeleri .....	35
2.10.2. Elektromanyetik Kirlilik ve Kaynakları .....	37
2.10.2.1. Doğal Elektromanyetik Kaynaklar.....	37
2.10.2.2. Elektromanyetik Kirlilik ve Standartlar .....	38
2.10.3. Düşük Frekanslı Radyasyon Etkileri ve Standartları.....	39
2.10.4. İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyon.....	41
2.10.4.1. İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyon Çeşitleri .....	42
<b>3. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>43</b>
3.1. Materyal.....	43
A. Deney Düzeneği-I (900 MHz ve 1800 MHz).....	44
B. Deney Düzeneği-II (2450 MHz).....	45
C. Deney Düzeneği-III .....	47
D. Hücre Kültürü Laboratuvarı .....	48

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler .....	49
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	50
3.1.3. Deney Grupları .....	51
3.2. Yöntem .....	51
3.2.1. Hücre Kültürü .....	51
3.2.1.1. MCF-7 Hücre Hattı: .....	51
3.2.1.2. Hücrelerin Sayılması .....	53
3.2.1.3. Hücre İçi Kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) Sinyali Analizi .....	53
3.2.1.4. Metiltiazoltetrazolium (MTT) Canlılık Metodu.....	54
3.2.1.5. Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Aktiviteleri .....	55
3.2.1.6. Apoptosis Süreci .....	58
3.2.1.7. Hücre içi ROT (Reaktif Oksijen Türleri) Analizi .....	59
3.2.1.8. İstatistiksel Analiz.....	60
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>61</b>
4.1. Hücre Ölümü (APOPTOZİS) Sonuçları.....	61
4.1.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde, 900, 1800 ve 2450 MHz EMR Frekanslarının ve Mesafenin Apoptosis Üzerine Etkileri .....	61
4.2. KASPAZ-3 Aktivitesi .....	62
4.2.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde, 900, 1800 ve 2450 MHz EMR Frekanslarının ve Mesafenin Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkileri .....	62
4.3. KASPAZ-9 Aktivitesi .....	64
4.3.1. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900, 1800 ve 2450 MHz EMR frekanslarının ve mesafenin Kaspaz-9 aktiviteleri üzerine etkileri .....	64
4.4. Hücre İçi Serbest Oksijen Radikalleri (ROT) Üretimi .....	66
4.4.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde, 900, 1800 ve 2450 MHz EMR Frekanslarının ve Mesafenin Hücre İçi Serbest Oksijen Radikalleri Üretimi Üzerine Etkileri.....	66
4.5. MTT (Hücre Canlılığı) .....	68
4.5.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde, 900, 1800 ve 2450 MHz EMR Frekanslarının ve Mesafenin MTT Hücre Canlılığı Değerleri Üzerine Etkileri. 68	
4.6. Kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) Sinyali .....	69
4.6.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde, 900, 1800 ve 2450 MHz EMR Frekanslarının ve Mesafenin, Kalsiyumlu Solüsyonlarda Kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) Sinyali Değerleri Üzerine Etkileri .....	69
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>72</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>78</b>

<b>ÖZET</b> .....	<b>79</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>80</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>81</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>91</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ADP</b>	Adenozin di-fosfat
<b>ADPR</b>	Adenozin di-fosfat riboz
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Kalsiyum İyonu
<b>[Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub></b>	Hücre içi Kalsiyum İyonu
<b>DAG</b>	Diaçilgliserol
<b>DTNB</b>	5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)
<b>EMR</b>	Elektromanyetik Radyasyon
<b>ET</b>	Endotel
<b>ER</b>	Endoplazmik Retikulum
<b>FBS</b>	Fötal Buzağı Serumu (Fetal Bovine Serum)
<b>GSH</b>	Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	Glutasyon peroksidaz
<b>GSSG</b>	Okside Glutasyon
<b>GSM</b>	Global System for Mobile Communications kısaca (Mobil İletişim İçin Küresel Sistem), bir cep telefonu iletişim protokolü.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksit
<b>InsP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfat
<b>InsP<sub>4</sub></b>	Inositol tetrakisfosfat
<b>KAT</b>	Katalaz
<b>LPO</b>	Lipid Peroksidasyonu
<b>MTT</b>	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid]
<b>NADP</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NAADP</b>	Nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NCX</b>	Na <sup>+</sup> -Ca <sup>+2</sup> değiş tokuş pompası
<b>O<sub>2</sub></b>	Moleküler oksijen
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Singlet Oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Süper Oksit Radikali
<b>·OH</b>	Hidroksil Radikali
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfotidilinositol difosfat
<b>PKA</b>	Protein Kinaz A



<b>PKC</b>	Protein Kinaz C
<b>PLC</b>	Fosfolipaz C
<b>PM</b>	Plazma membranı
<b>PMCA</b>	Plazma membranı Kalsiyum ATPaz pompası
<b>RyRs</b>	Ryanodine Reseptörü
<b>ROCCs</b>	Reseptöre Duyarlı Kalsiyum Kanalları
<b>ROT</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>SAR</b>	Specific Absorbation Rate) özgül soğurma oranı, kilogram doku başına yutulan elektromanyetik gücü gösterir.
<b>SERCA</b>	Sarko Endoplazmik Retikulum Kalsiyum ATPaz
<b>SMOCs</b>	Second Messenger Operated Channels (İkincil Haberci Aracılı Kanallar)
<b>SOCCs</b>	Store-operated calcium channels
<b>SOD</b>	Süper Oksit Dismutaz
<b>SR</b>	Sarkoplazmik Retikulum
<b>TRP</b>	Transient receptor potential
<b>TRPC</b>	Transient receptor potential phospholipase C
<b>TRPM</b>	Transient receptor potential melastatin
<b>TRPV</b>	Transient receptor potential vanilloid
<b>VOC</b>	Voltage Operated Channels (Voltaja Duyarlı Kanallar)
<b>Wi-Fi</b>	Wireless Fidelity, Kablosuz Bağlantı Alanı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Apoptozise giden hücrenin deformasyon aşamaları .....	6
Şekil 2. Apoptozis ve hücre hayatı reaksiyonları.....	7
Şekil 3. Ölüm algılayıcılarından olan TNFR1 ve ona bağlanan yapılar .....	8
Şekil 4. Kaspaz aktivasyonu .....	9
Şekil 5. Mitokondri organeli .....	10
Şekil 6. Mitokondri ve Apoptozis reaksiyonları .....	11
Şekil 7. Hücre içi Kalsiyum sinyali .....	12
Şekil 8. Kalsiyum iyonunun hücre zarından geçişi.....	13
Şekil 9. Kalsiyum salınımının IP3 reseptörü tarafından uyarılması .....	17
Şekil 10. Hücre içi kalsiyum salınımı .....	18
Şekil 11. Normal sağlıklı bir hücre DNA'sına serbest radikallerin ve oksidatif stresin zararı .....	19
Şekil 12. Son yörüngedeki elektronun kaybedilmesi ve serbest radikal oluşumu.....	20
Şekil 13. Basit bir şekilde oksidan veya radikal olarak tanımlanan reaktif oksijen, reaktif nitrojen ve klorlanmış türlerin potansiyel olarak açığa çıkarılmış etkileri, yaşlanma sürecinde etkili olabilir.....	23
Şekil 14. Oksidatif stres ve çeşitli hastalıklar ile ilişkisi .....	26
Şekil 15. Antioksidanlar ve Serbest Radikaller .....	27
Şekil 16. EMR'nin Tümör gelişimine sebep olması.....	34
Şekil 17. İyonize ve iyonize olmayan radyasyonun ana kaynakları genel hatlarıyla tüm elektromanyetik spektrum olarak farklı frekanslarda gösterimi .....	38
Şekil 18. Elektromanyetik spektrum ve ayrıntılı gösterimi .....	39
Şekil 19. 900 MHz, 1800 MHz Transmitter ile birlikte farklı mesafelerde EMR'a maruz bıraktığımız (37 °C ve %5 CO <sub>2</sub> ) Deney düzeneğimiz .....	44
Şekil 20. 2450 MHz Transmitter ile birlikte farklı mesafelerde EMR'a maruz bıraktığımız (37 °C ve %5 CO <sub>2</sub> ) deney düzeneğimiz .....	45
Şekil 21. Apoptotik bir hücrenin hücre zarı reaksiyonları. (Biocolor, APO Percentage apoptozis kiti) .....	59

## GRAFİKLER DİZİNİ

<b>Grafik 1.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol, 0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) Apoptozis aktiviteleri üzerine etkileri.....	61
<b>Grafik 2.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 1800 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol, 0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) Apoptozis aktiviteleri üzerine etkileri .....	62
<b>Grafik 3.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 2450 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol,0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) Apoptozis aktiviteleri üzerine etkileri. ....	62
<b>Grafik 4.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol,0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kaspaz-3 aktiviteleri üzerine etkileri .....	63
<b>Grafik 5.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 1800 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kaspaz-3 aktiviteleri üzerine etkileri.....	63
<b>Grafik 6.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 2450 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol,0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kaspaz-3 aktiviteleri üzerine etkileri. ....	64
<b>Grafik 7.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol,0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kaspaz-9 aktiviteleri üzerine etkileri .....	65
<b>Grafik 8.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 1800 MHz EMR ve farklı mesafelerin (0 cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kaspaz-9 aktiviteleri üzerine etkileri.....	65
<b>Grafik 9.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 2450 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kaspaz-9 aktiviteleri üzerine etkileri.....	66
<b>Grafik 10.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) ROT (Reaktif Oksijen Türleri) aktiviteleri üzerine etkileri.....	67
<b>Grafik 11.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 1800 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) ROT aktiviteleri üzerine etkileri .....	67
<b>Grafik 12.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 2450 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol, 0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) ROT aktiviteleri üzerine etkileri.....	67
<b>Grafik 13.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) MTT Hücre Canlılığı üzerine etkileri.....	68

<b>Grafik 14.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 1800 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) MTT Hücre Canlılığı üzerine etkileri.....	69
<b>Grafik 15:</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 2450 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) MTT Hücre Canlılığı üzerine etkileri.....	69
<b>Grafik 16.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kalsiyum buffer ile $Ca^{+2}$ sinyali değerleri üzerine etkileri.....	70
<b>Grafik 17.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 1800 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kalsiyum buffer ile $Ca^{+2}$ sinyali üzerine etkileri .....	71
<b>Grafik 18.</b> MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 2450 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm ) kalsiyum buffer ile $Ca^{+2}$ sinyali üzerine etkileri .....	71

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Kanser hücresi .....	35
<b>Resim 2.</b> Doğal elektromanyetik kaynaklar .....	37
<b>Resim 3.</b> 900 MHz, 1800 MHz ve 2450 MHz Elektromanyetik Radyasyon cihazları, EMR odası ve 37 °C su banyosu .....	46
<b>Resim 4.</b> Otomatik kuyucuk okuyucu cihazı.....	47
<b>Resim 5.</b> Hücre Kültüründeki LAminer flow cihazı ve Steril, Non-Steril İnkübatörler .....	48
<b>Resim 6.</b> Hücre kültürü laboratuvarındaki inverted mikroskoplar ve santrifüj cihazı .....	48
<b>Resim 7.</b> (-196 °C) sıvı azot tankı ve çalkalamalı su banyosu.....	48
<b>Resim 8.</b> Biyofizik Laboratuvarında kullandığımız Casy TT system hücre sayım cihazı (Almanya) .....	53

## 1. GİRİŞ

Günümüzde elektromanyetik radyasyon alanlarına maruz kalma ve radyasyon kaynakları gün geçtikçe artmaktadır. Ev, iş yeri ve okullara yakın bölgelerde yer alan GSM ve baz istasyonları önemli bir elektromanyetik radyasyona (EMR) maruz kalma riski oluşturmaktadırlar. Biz kendimiz kablosuz internet (Wi-Fi) kullanmıyor olsak bile komşumuz kullanıyor olabilir. Dolayısıyla bu durum kullanmadığımız halde maruz kaldığımız anlamına gelmektedir ve netice itibariyle olay içinden çıkılmaz bir hale dönüşebilmektedir. EMR maruziyetinin vücutta nasıl zararlar oluşturduğu ve bu maruz kalma durumunun hangi mesafelerde olursa zararlı etkilerinden korunulacağı konusunda yeterince bilgi olmayıp, mevcut bilgi sonuçları da tartışmalıdır.

Hücre içi serbest oksijen radikalleri (ROT) hidroksil, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi radikalleri içermektedir. Mitokondriyal fonksiyon ve fagositoz gibi birçok fizyolojik olay sırasında bu ROT ürünleri fizyolojik olarak oluşmaktadırlar. Bu ROT ürünlerinin kontrol edilmesinde enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmaları önemli rol oynamaktadır. Örneğin, yapısında bakır, çinko ve mangan içeren süperoksit dismutaz (SOD) enzimi süperoksit radikalini hidrojen peroksit e dönüştürmektedir. Hidrojen peroksit, yapısında selenyum içeren glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve yapısında bakır ve çinko içeren katalaz enzimleri tarafından suya kadar parçalanmaktadır. Yakın zamanda yapılan birçok çalışmada hem kablosuz internet (2.45 GHz), hem de cep telefonu frekanslarına (900 ve 1800 MHz) bir saat maruz kalmanın serbest oksijen radikallerini artırarak zarar verdiğine dair bildirimler mevcut olmasına rağmen bu bildirimlerin sonuçları zıtlık arz etmektedir.

Sayırsız deneysel bulgular bizlere gösteriyor ki; düşük frekanslı elektromanyetik alana aşırı derecede maruz kalan hücrelerde, hücresel fonksiyonların sayesinde gerçekleştiği iyon kanalları, membran reseptörleri ve enzimleri de içine alan hücre içi proteinleri ve membran proteinleri zarar görürler (Polk et al., 1996, Hubert et al., 1998).

Epidemiyolojik çalışmalar, düşük frekanslı elektromanyetik alanlarda yaşayan veya böylesi ortamlarda çalışan insanlarda, elektromanyetik alan maruziyeti ile neoplastik hastalıklar arasındaki muhtemel korelasyonları ortaya çıkarmıştır (Polk et al., 1996, Hubert et al., 1998). Fakat bu maruziyet ve bu hastalığın multifaktöriyel tabiatı ile ilişkili çok çakışan ve şaşırtıcı değişkenliklerden dolayı bu çalışmaların sonuçlarını yorumlamak herkesin bildiği gibi zordur. Çeşitli *in vitro* çalışmalar gösterdi ki temel mekanizması tam olarak tanımlanmamış olmasına rağmen düşük frekanslı elektromanyetik alanlar DNA sentezi, RNA transkripsiyonu ve hücre çoğalmasına zarar verebilir (Liburdy et al., 1993, Fanelli et al., 1999). Bu zararlı etkilere  $Ca^{+2}$  iyon dengesindeki değişikliklerin de dâhil olduğu düşünülmektedir ve elektromanyetik radyasyonun uyarılmamış hücre membranı boyunca hücre içi  $Ca^{+2}$  iyon geçişi üzerine olası etkisi tanımlanmıştır. Elektromanyetik alana maruz bırakılan ratların timus lenfosit hücrelerinde, insanların T-lenfosit hücrelerinde ve Jurkat hücrelerinde (lösemili akut T hücrelerini incelemek için kullanılan T lenfosit hücrelerini ölümsüzleştirmek için kullanılır) ve ratların hipofiz hücrelerinde hücre içi  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonunda değişiklik rapor edilmiştir (Wallezcek et al., 1990, Barbier et al., 1996). Fakat hücre içi  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonunun artış mekanizmasını hangi yolla sağladığını ortaya koyan uygun deneysel bir delil yoktur. Aynı zamanda rapor edilen veriler 2,0 mT yoğunluğa kadar düşük frekanslı elektromanyetik alanların, sığır kromafin hücrelerinde hücre içi  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonu artışı üzerine herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir (Craviso et al., 2002).

Transient Receptör Potential (TRP) kanalları alt aileleri çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda önemli rol oynayan çeşitli iyon kanallarından biridir (Toledo et al., 2011). TRP kanalları çeşitli uyarılar tarafından aktive edilir bunlar; sıcaklık, mekanik uyarılar, osmotik basınç, ağrı, feromonlar, pH, oksidatif stres ve kimyasallar sensör ve sinyal iletimi aracı olarak vazife görürler (Toledo et al., 2011). Transient Receptör Potential Melastatin Type 2 (TRPM2), nonselektif katyon kanalıdır ve Adenin 5'-difosforiboz (ADPR),  $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) , oksidatif stres ve sıcaklık ( $>35$  °C) tarafından aktive edilir ve aktif hale gelmesi neticesinde de intrasellüler kalsiyum iyon konsantrasyonunda artış gözlemlenir (Toledo et al., 2011, Takahashi et al., 2011).

Diğer taraftan, Transient Receptör Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) da nonselektif katyon kanalı olmakla birlikte kapsaisin (CAP), sıcaklık (>43 °C), hipertonsite ve oksidatif stres tarafından aktive edilir ve ağrı reseptörü olduğu iyi bilinmektedir (Montiel et al., 2012, Nazıroğlu et al., 2012).

İlginçtir ki, inflamatuvar mediyatörlerinin varlığında (örneğin ATP ve Prostaglandin E2 ) TRPV1 aktivasyon eşik sıcaklığı düşer, vücut sıcaklığına eşit hale gelir (Montiel et al., 2012). Böylece, TRPM2 ve TRPV1 nonselektif katyon kanallarının oksidatif stresi de içeren çeşitli uyaranları vardır. Fakat TRP kanallarının iyonize radyasyonun biyolojik etkileri etkilerine aracı olup olmadığı kanıtlanmamıştır. Kaynağı gama ışını olan DNA hasarı, Poli (ADP-ribose) polymerase (PARP)'ın aktivasyonuna sebep olduğu, sırasıyla Poli-ADPR' nin üretilmesi, bunu takiben de NAD azalması rapor edilmiştir (Vodenicharov et al., 2000). Poli-ADPR tarafından üretilen ADPR 'un artmasından dolayı TRPM2 kanalları aktif hale gelir, iyonize radyasyonun tetiklemeyle DNA hasarı sonrasında üretilen ADPR yoluyla TRPM2 kanalları aktive edilir, aynı zamanda DNA hasarına hücrel yanıtı içeren bir TRPM2 kanal aktivasyonu gerçekleştiği değerlendirilebilir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda EMR'nin başta rektal ısı olmak üzere vücutta ısı artışlarına neden olduğu rapor edilmiştir (Akoev et al., 1995).

Yukarıda bahsedildiği gibi TRPV1 kanalları da yüksek ısı ile aktive olmaktadır. Bu nedenle EMR nin neden olduğu vücut ısısı artışı, TRPV1 kanallarını aktive ederek, Sitolde  $Ca^{+2}$  artışına bağlı olarak bazı zararlı etkilere (kanser hücrelerinin aşırı çoğalması ve apoptozis vb.) neden olabilir. Araştırılması gerekli olan bu konu bu tez çalışmasının amaçlarından bir tanesidir. Sitolde  $Ca^{+2}$  akışı, mitokondriyal depolarizasyon, ROT, apoptozise neden olur. Hücre içine dışarıdan  $Ca^{+2}$  iyon akışı, oksidatif stres, kapsaisin ve ısı ile fiziksel olarak aktive edilen TRPV1 katyon kanalları ile sağlanabilmektedir. Aşırı  $Ca^{+2}$  iyon akışı hücrelerde apoptozise kadar giden bir süreci başlatmış olur.



**Bu tez çalışmasında daha çok aşağıda belirtilen konular üzerinde durulmuştur;**

**A- Mesafenin etkisi:** MCF-7 meme kanser hücre hatları, cep telefonu frekanslarında (1800 MHz, 900 MHz ve 2450 MHz): kontrol grubuna ilaveten 0 cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm ve 25 cm farklı 6 mesafelerde Elektromanyetik Radyasyona (EMR) 1 saat maruz bırakılmak suretiyle gerekli kalsiyum sinyali ve apoptozis analizleri yapılarak değerlendirildi.

**B- Isı ile TRPV1 aktivasyonu:** Kapsaisin reseptörü TRPV1, etkisinin hassas niteliği tartışmalı olmasına rağmen, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate(PIP<sub>2</sub>) tarafından regüle edilir. Bunun yanı sıra, TRPV1 kanalları ısı (43 °C), düşük pH, oksidatif stres ve kırmızıbiberde yaygın olarak bulunan kapsaisin (CAP) ile aktive olabilmektedir. EMR nin rektal ve fütal ısılar artırdığına dair bildirimler mevcuttur (Akoev et al., 1995). Sitozole Ca<sup>+2</sup> akışının artışının da kanser hücrelerinde proliferasyonu artırdığı ve apoptotik yolları tetiklediği de iyi bilinmektedir. Bu nedenle, EMR ısı artırıcı (thermal) etki ile TRPV1 kanallarını açarak, Ca<sup>+2</sup> girişini MCF-7 kanser hücrelerinde artırabilir. Bu konunun araştırılması gereklidir.

**C- MCF-7 kanser hücrelerinde oksidatif stresin rolü:** Sitozolde Ca<sup>+2</sup> artışı mitokondriyal depolarize eder ve ROT (Reaktif Oksijen Türleri) üretimi artar. Ayrıca, hücre zarlarındaki yağlar, proteinler ve nükleik asitlerin oksidasyonu ile EMR'nin serbest oksijen radikallerinin üretimini artırdığı da iyi bilinmektedir (Nazıroğlu et al., 2013). Bu projenin, bir diğer amacı cep telefonu ve kablosuz internet frekanslarının MCF-7 kanser hücrelerinde hücrel kalsiyum sinyali, hücre içi ROT düzeyleri, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ile apoptozis aktivitelerinin belirlenmesidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kalsiyum (Ca<sup>+2</sup>)

Kalsiyum, toprak alkalileri grubundan metalik bir elementtir. Sembolü “Ca<sup>+2</sup>”dır. İsmi Latince “kireç” anlamına gelen “calx” sözcüğünden gelmektedir. İlk defa 1808’de Humphry Davy tarafından kalsiyum hidroksitten elektroliz yoluyla elde edilmiştir. Metalik kalsiyum gümüş gibi parlaktır. Özgül ağırlığı 1,55 g/cm<sup>3</sup>tür. 851 °C’de erir. 1439 °C’de kaynar. Vücudumuzda makro yapıda bulunur. Elektriği iyi iletir. Gevrek (kırılgan) olmasına rağmen yumuşaktır. Sertliği sodyum ile alüminyum arasındadır. Haddelenebilir ve dövülebilir. Çekme mukavemeti 438 kg/cm<sup>2</sup>dir. Oksidasyon değeri ‘+2’dir. Atom numarası 20, atom ağırlığı 40,078’dir. Yeryüzünde altı fitri izotopu bulunmaktadır: Ca<sub>40</sub>, Ca<sub>42</sub>, Ca<sub>44</sub>, Ca<sub>46</sub> ve Ca<sub>48</sub>.

Dünya üzerindeki kalsiyum elementinin % 97’si Ca<sub>40</sub> izotopudur. Sun’i olarak pek çok radyoaktif izotopları elde edilmektedir. Bunlardan birisi Ca<sub>45</sub> olup, kemikte kalsiyum kalıntısı üzerinde yapılan araştırmalarda, su tasfiye işlemlerinde, deterjan aktivitesi için ve yüzey ıslanması hâdiseleri üzerindeki çalışmalarda kullanılmaktadır.

#### 2.1.1. Kalsiyum ve Apoptozis

Programlı hücre ölümünün moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktive olmasıyla başlamaktadır (Nazıroğlu et al., 2013). Ayrıca apoptozis mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir. Apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar genel olarak: büyüme faktörleri, kanserojenler, tümör baskılayıcı genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir (Vaux et al., 1994).

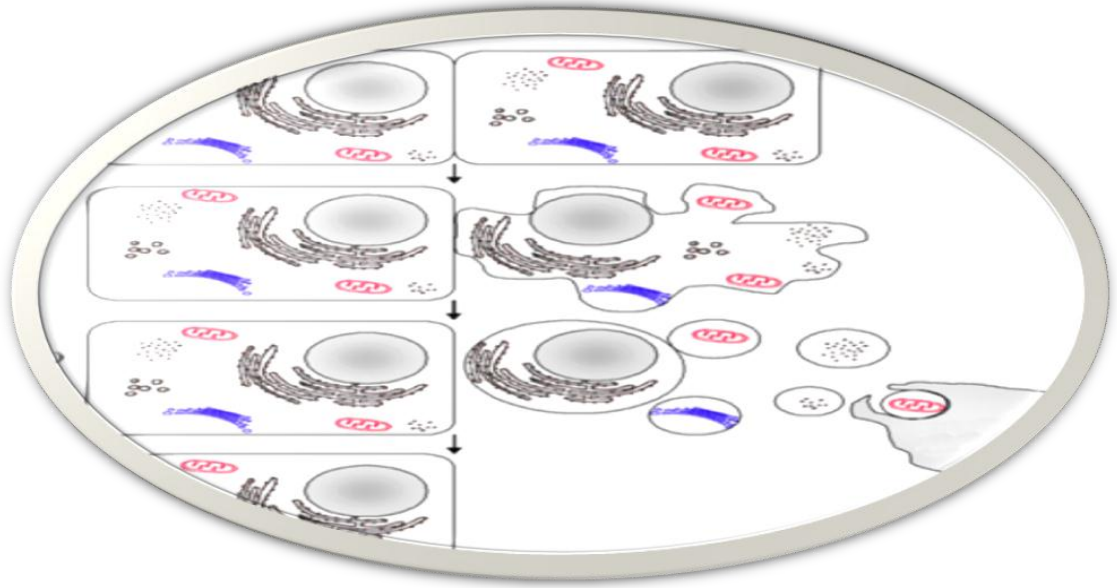
Apoptozisi etkileyen uyaranların bazıları şu şekilde sıralanabilir:

1. Büyüme faktörlerinin geri çekilmesi,
2. Hücre içi kalsiyum miktarındaki artış
3. TGF-B (Transforming Growth Factor), Fas/FasL sisteminin aktive olması

4. DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan p53'ün aktive olması
5. Viral-bakteriyal enfeksiyonlar ve glukokortikoidler
6. Tümör nekroz faktör (TNF)
7. Sitokinler

#### 2.1.1.1. Hücre Ölümündeki Morfolojik Değişiklikler

#### 2.1.1.2. Apoptozis

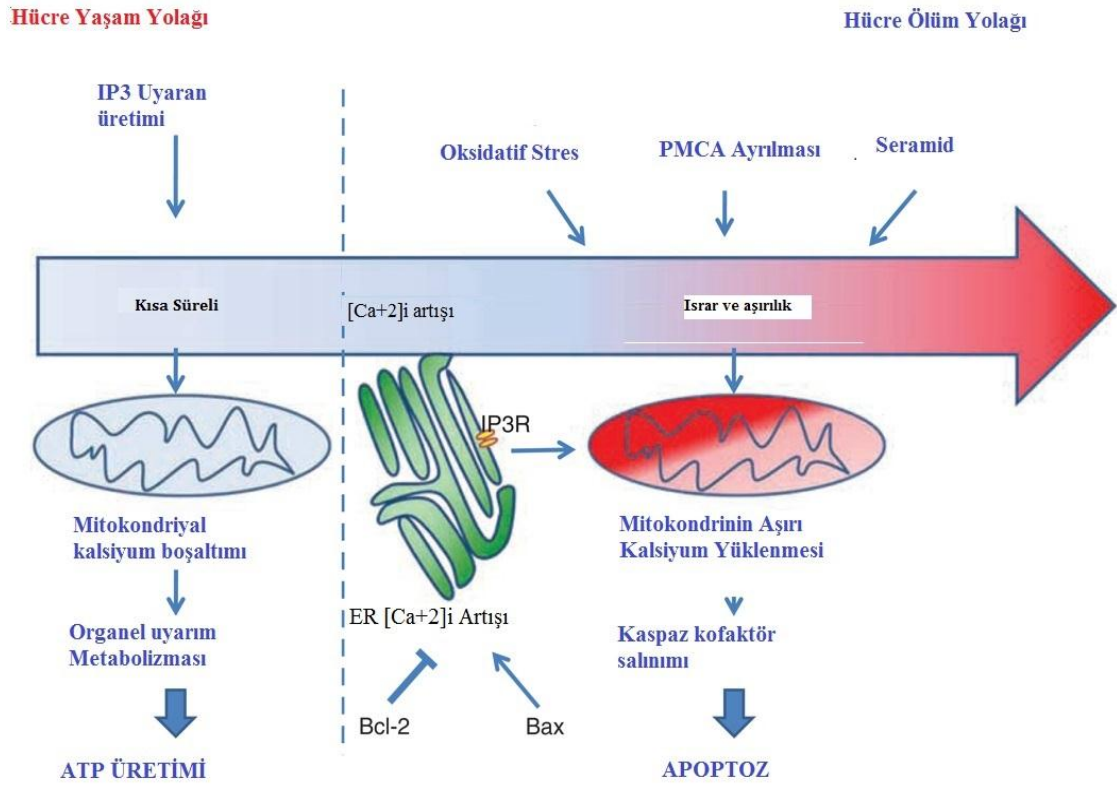


Şekil 1. Apoptozise giden hücrenin deformasyon aşamaları

Apoptozis, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hüresel büzüşmenin nedeni, Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır (Lipponen et al., 1999). Apoptotik uyarım alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur; bu yapı "zeiozis" olarak tanımlanır.

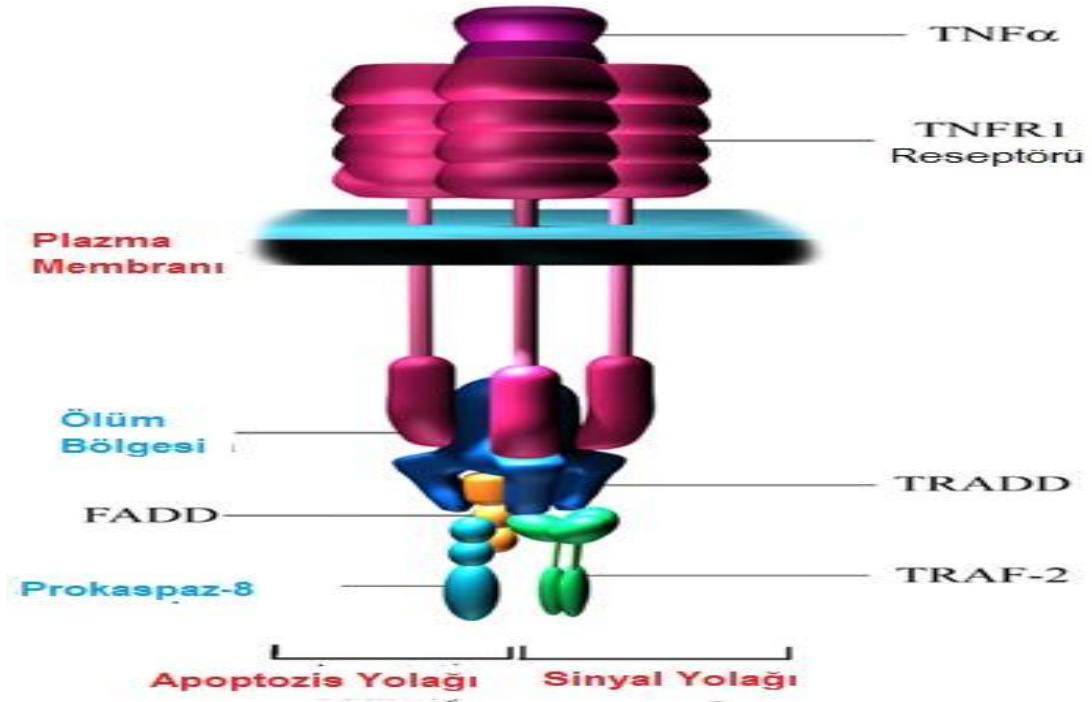
Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır. Hücre zarında iç yüzeyden dışarıya fosfatidilserin translokasyonu olur. Plazma ve çekirdek kondenzasyonu takiben kromatinin kümelenmesi şekillenir. Kromatindeki değişikliklerin başlamasının hemen öncesinde

sitozolik  $Ca^{+2}$  düzeyinde önemli bir artış olmaktadır. Kromatin kondenzasyonu, nukleozomlar arasındaki bağlantı bölgelerinin ayrılması ile karakterizedir. 180-200 baz çiftinden oluşan parçalar, elektroforezde ip merdiven (*ladder*) görüntüsü oluşturur (Malagoli et al., 2010). İnternükleozomal DNA parçalanmasının kalsiyum artışına duyarlı Endonükleazlar ile olduğu ileri sürülmektedir.



Şekil 2. Apoptozis ve hücre hayatı reaksiyonları

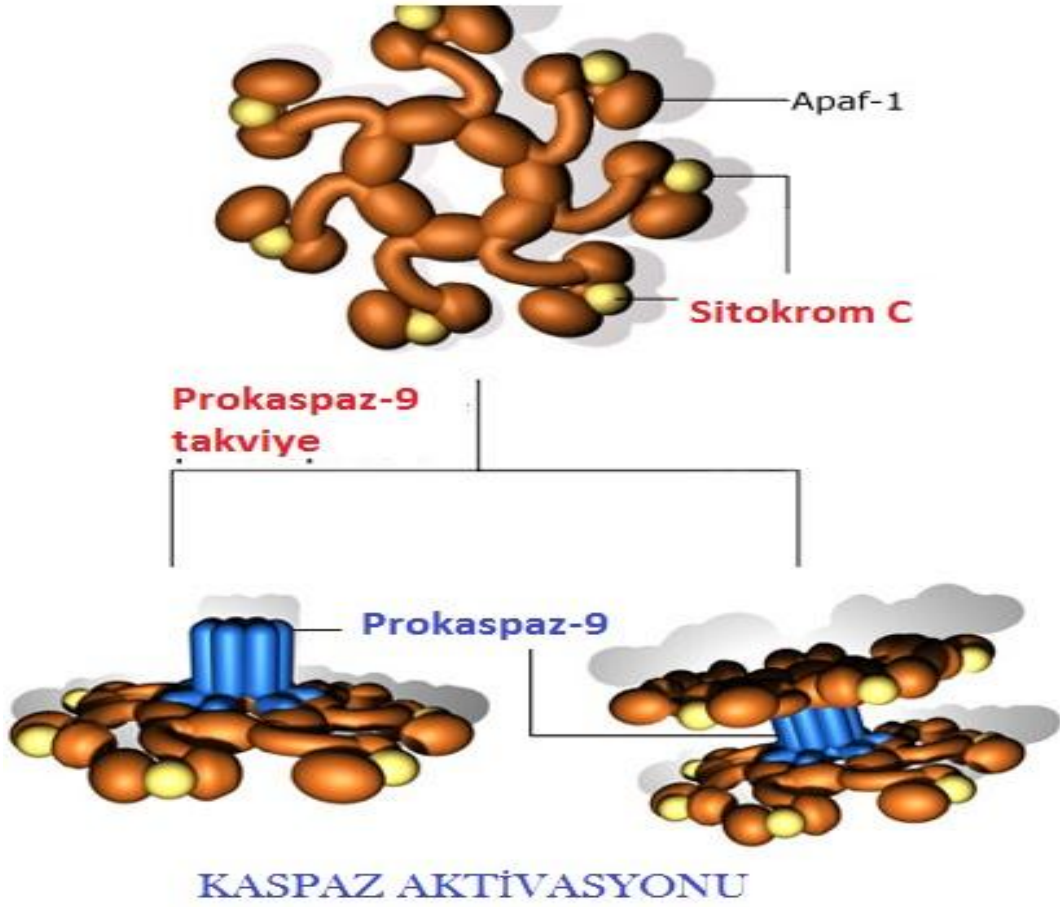
Endonükleazlar timositler gibi bazı hücrelerde yapısal olarak bulunur, bazı hücrelerde ise apoptozis başlamasından önce transkripsiyon ile oluşturulur. Hücrenin parçalanmasıyla nükleer materyal içeren zarla çevrili "apoptotik cisimcikler" oluşur. İki katlı lipit tabakada fosfolipit asimetrisi, hücre zarının bir özelliğidir.



Şekil 3. Ölüm algılayıcılarından olan TNFR1 ve ona bağlanan yapılar

Fosfolipidler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin (PE) ve dış tabakada bulunan fosfatidilkolin (PC) asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptozis sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu PS'nin dış yüzey tabakaya yerleşmesi ile sonuçlanır. Bu durum, apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır (Wyllie et al., 1980). Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptozis 30-60 dakika gibi bir sürede tamamlanır (Lipponen et al., 1999). Hücre iskeleti apoptozisde önemli bir role sahiptir ve stabilizasyonu apoptozisi engellemektedir. Apoptotik hücrelerin dokudan uzaklaştırılması ve yerine yenilerinin konması ise günlük  $1 \times 10^{11}$  hücre olarak tahmin edilmektedir ve bu yetişkin bir bireyin total vücut ağırlığının her 18- 24 ayda bir değişimine eşittir (Takahashi et al., 2011).

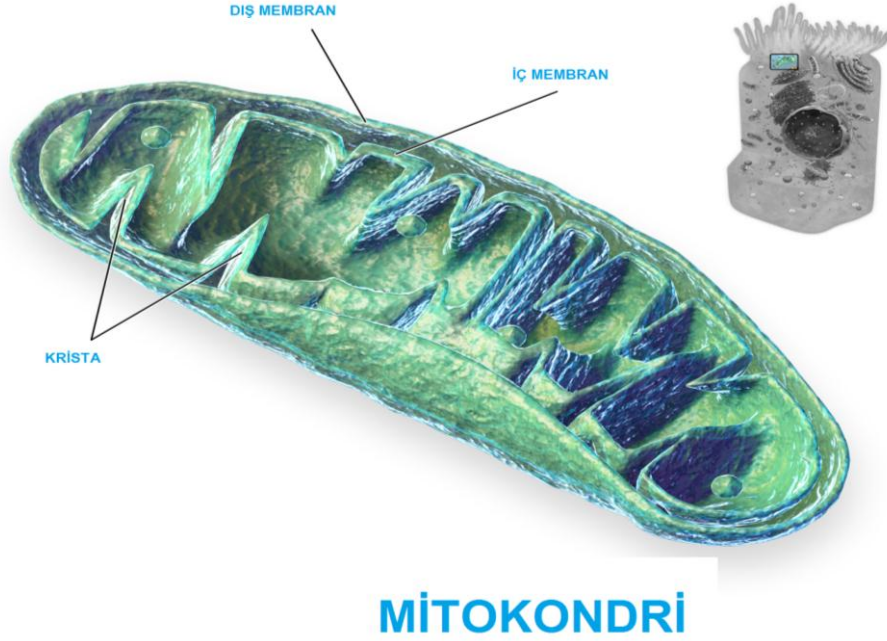
## Apoptozom Formasyonunun İlk Aşaması



Şekil 4. Kaspaz aktivasyonu

Reaktif oksijen türleri neticesinde oluşan iç hasarlar hücrenin içindeki özel bir sistem ile algılanır. Bu da mitokondrinin yüzeyinde bulunan BCL-2 proteini, Bax adlı bir başka protein ile etkileşime girmesine sebep olur. Bunun neticesinde ise mitokondrinin yüzeyinde delikler oluşur. Bu deliklerden ise Sitokrom C adlı moleküller salınır. Sitokrom C molekülleri Apaf-1 adlı başka proteinlerle etkileşir ve apoptozom adlı özel bir molekül meydana gelir. Apoptozom görevi ise Kaspaz-9 adlı inaktif molekülü aktif hale çevirmektir. Kaspaz-9'un aktif hale geçmesi ile zincirleme bir reaksiyon meydana gelir ve diğer başka bazı kaspazlar aktif olur ve hücrenin ölümü adım adım gerçekleşir (Hay et al., 2004).

### 2.1.2. Kalsiyum ve Mitokondri

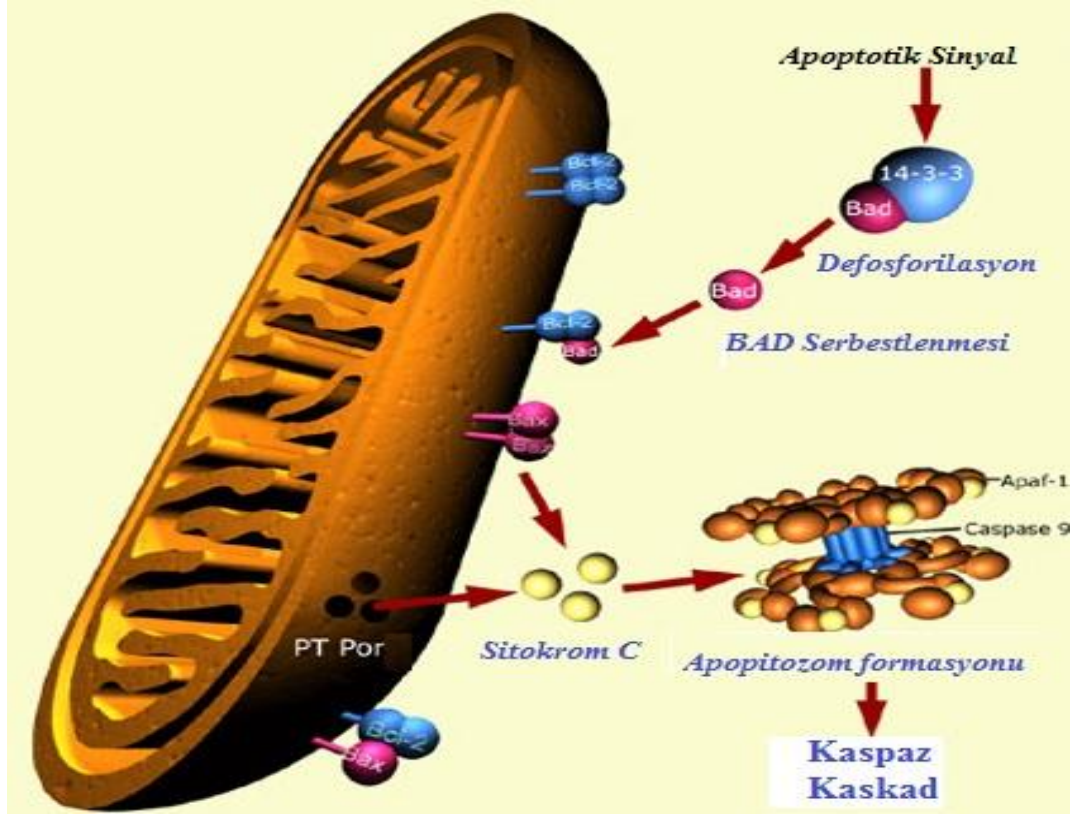


## MİTOKONDRI

Şekil 5. Mitokondri organeli

Mitokondri çift katlı zarla çevrilmiştir. İki katlı zar mitokondriyi matrix adı verilen bir iç bölüme ve zarlar arası bölge (intermembranöz aralık) denilen ikinci bir bölüm olmak üzere ikiye ayırır. Bu zarlardan her biri lipid çift tabakasından oluşur. Dış zar organelin korunmasıyla ilgilidir. İç zar ise kıvrımlar (krista), borular (tübüli) ve kesecikler (sakkuli) şeklinde çıkıntılar oluşturarak yüzeyini genişletir. İç zarda solunum enzimleri yer alır. Örneğin bunlardan "ATP sentetaz" matrix'e bakan yüzeyde bulunmaktadır. Mitokondrinin iç kısmında çeşitli maddeleri yıkan enzimler yerleşmiştir. Sitrik asit döngüsü enzimleri ve B-oksidasyon gibi yağ asiti katabolizmasını sağlayan enzimler burada bulunur. Mitokondrinin bir diğer görevi kalsiyum iyonlarını depolamaktır. Kalsiyum mitokondrilerin içinde kalsiyum fosfat olarak tutulur. Mitokondrilerde bulunmasının nedeni, sitoplazma içinde kalsiyumun bulunması karmaşıklığa yol açmasıdır. Mitokondri zarları endomembranöz sistemin dinamiğine katılmaz. Mitokondriler otonomdur, diğer bir deyişle kendi başlarına çalışırlar. Bunların kendilerine özel DNA ları vardır. Memelilerde hücre DNA sının yaklaşık %1'i mitokondrilerde bulunur.



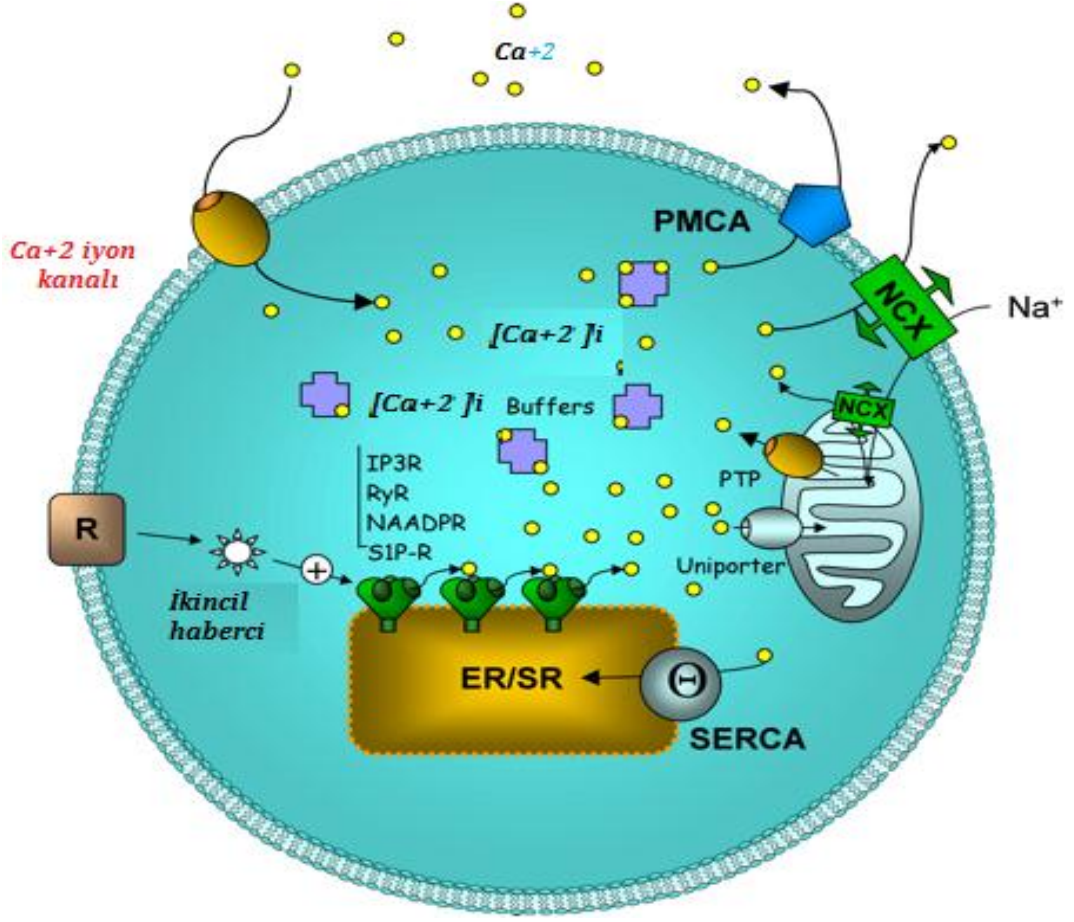


Şekil 6. Mitokondri ve Apoptozis reaksiyonları

Mitokondriyal DNA, dairesel halde iç zara bağlıdır. Mitokondriye ait özel ribozomlar, transfer ribonükleik asit (tRNA) ve enzimler mitokondriyal DNA da kodlanmış proteinlerin ifade edilmesinde yardımcı olurlar. Mitokondriyal enzimlerin büyük bir kısmı çekirdek tarafından kodlanır, sitozolün ribozomlarında sentezlenir ve sonra mitokondri içine taşınırlar. Proteinlerin ve nükleik asitlerin mitokondriden sitozole taşınması söz konusu değildir. Mitokondrilerin çoğalması daima, var olan organellerin büyümesi ve bölünmesi şeklinde olur. Bu çoğalma hücrenin interfaz evresi boyunca sürebilir. Buna bağlı olarak organel DNA sentezinde otonomdur. Hücre siklusunun S-fazı ile bağlantılı değildir. Mitokondriler hücre bölünmesi esnasında sitoplazmayla birlikte yavru hücrelere gelişigüzel dağılırlar. Bu nedenle mitokondriyal genlerin kalıtları Mendel yasalarına uymaz. Burada sitoplazmik kalıtım söz konusudur.



### 2.1.3. Kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) Sinyali



Şekil 7. Hücre içi Kalsiyum sinyali

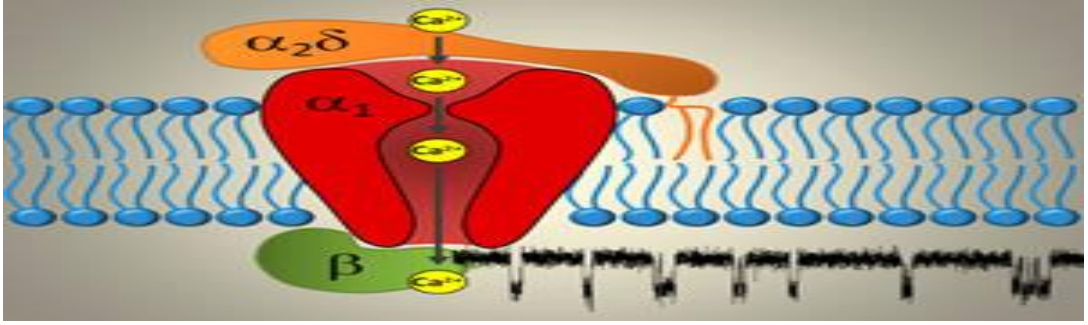
Bir dizi moleküler ve biyofiziksel olaylar ihtiva eden kalsiyum sinyali süreci, bir sinyal olarak dış uyanlarla bağlantılı sitoplazmik kalsiyum iyon konsantrasyonundaki artış yoluyla bazı hücre içi uygun yanıtlardır. Harici uyanların en yaygını nörotransmitter, hormon ya da büyüme faktörüdür; fakat uyarılabilir hücrelerde, başlangıçtaki kimyasal uyarıcı membran eksitasyonuna sebep olabilir ve böylece kalsiyum yolağı aktifleşmiş olur. Hücre içi  $Ca^{+2}$  iyon salınımı öncelikle Inositol 1,4,5-trisphosphate reseptörleri ve Ryanodine reseptörleri yoluyla aracılık eder. Hücre içi  $[Ca^{+2}]_i$  sinyaline sebep olan kalsiyum iyonları bir veya iki kaynaktan gelebilir.

**Bunlar:**

### 2.1.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Depoları

### 2.1.3.2. Plazma zarından giren dış kalsiyum

Tipik olarak her iki kaynaktan kullanılmaktadır. En sık karşılaşılan hücre içi kalsiyum salınım mekanizması ikincil haberci  $IP_3$ 'ten türetilmiş fosfoinozitid spesifik Fosfolipaz C (PI-PLC) içerir, bu, Endoplazmik Retikulum üzerindeki özel bir reseptöre bağlanarak ya da Endoplazmik Retikulumun özel bir bileşeni olarak çalışır. Fonksiyonel  $IP_3$  reseptörü/kanalı  $IP_3$  için dört bağlanma bölgesi içeren bir homotetramer olarak gözükmektedir. Reseptörün farklı alt tiplerinin var olması, en az üç ayrı gen ürünlerini temsil eder ve sonuç olarak mRNA'nın alternatif birleştiği ek formlar ortaya çıkmıştır.



Şekil 8. Kalsiyum iyonunun hücre zarından geçişi

$IP_3$ 'ün kendi reseptörü ile etkileşimi komplekstir ve reseptör arasındaki etkileşimlerin düzenlenmesi az anlaşılmıştır,  $IP_3$  ve  $Ca^{+2}$ , reseptörün hem sitoplazmik hem de luminal yönlerden ikinci etki uygulanır. ER lümenindeki  $Ca^{+2}$ ,  $IP_3$  reseptörüne karşı duyarlı görünür. Sitoplazmik yüzeydeki reseptörler yüksek  $Ca^{+2}$  konsantrasyonuna inhibitör iken düşük  $Ca^{+2}$  konsantrasyonuna duyarlıdır. Bu olaylar, aynı tip hücrelerde görülen 'ya hep ya hiç' yasasına göre çalışan  $[Ca^{+2}]_i$  salınım davranış sinyallerine katkıda bulunabilirler. Bir diğer önemli bir  $Ca^{+2}$  reseptör tipi olan hareketli bir reseptör olan Ryanodine reseptörüdür. Ryanodine ismini yüksek afinite ile moleküle bağlanan ve onun saflaştırılması ve karakterizasyonuna sebep olan bir toksinden alır. Aynı zamanda o bir homotetramerdir ve  $IP_3$  ile Ryanodine reseptörleri kayda değer yapısal türdeşlik gösterirler.

## 2.2. Hücre İçi Depolardan Kalsiyum Çıkışı Sağlayan Yapılar

### 2.2.1. Ryanodin Reseptörü

Kas hücrelerindeki ER 'nin modifiye olmuş şekline Sarkoplazmik Retikulum (SR) ismi verilmektedir (Melzer et al., 2006). SR'dan  $Ca^{+2}$  salınımını sağlayan kanal ise, Ryanodine reseptörüdür (RyR). RyR'lerin aktivasyonu öncelikle voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanallarından hücre içine giren tarafından olmakta, bu reseptörler  $Ca^{+2}$  ile zaman içerisinde önce aktive, ardından inhibe olmakta, aktif halde iken  $Ca^{+2}$  kanalı özelliği göstermektedirler. İnhibisyon durumu [ $Ca^{2+}$ ] biraz daha arttırıldığı zaman aşıldığı için, adaptasyon olarak adlandırılmaktadır (Keizer ve Levine, 1996). Reseptörlerin  $Ca^{+2}$  ile aktivasyonu,  $Ca^{+2}$ - $Ca^{+2}$  etkili salımı olarak (CICR) adlandırılmaktadır. Bu mekanizma, kas kasılmasını sağlayan temel unsurlardan biridir. RyR' ler, bu etkinin daha belirgin görülebilmesi için, kas hücrelerinde t-tübülleri çevresinde kümelenmişlerdir. Reseptörleri  $Ca^{+2}$  dışında kafein de aktive etmekte, Ryanodine ise reseptörlere yüksek afinite ile bağlanıp, reseptörleri düşük geçirgenli bir duruma getirmektedir (Shapiro et al., 2001). Bunun dışında Adenozin trifosfat (ATP), magnezyum (Mg) ve protein protein ilişkilerinde bu reseptörün düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu reseptörün memelilerde üç alt tipi bulunmaktadır ve kas hücreleri dışında özellikle sinir hücrelerinde de  $Ca^{+2}$  sinyalinde görev almaktadırlar (Laver et al., 2006).

### 2.2.2. Inositol 1,4,5-trisfosfat Reseptörleri

Hücre içi sinyal iletiminde en yaygın ikincil habercilerden biri olan Inositol 1,4,5-trisfosfat ( $IP_3$ ) etkisi ile aktive olup kanal özellikleri ile ER' den  $Ca^{+2}$  salımına yol açan reseptörler, Inositol 1,4,5-trisfosfat reseptörü ( $IP_3R$ ) olarak adlandırılmaktadır. Reseptörlerin protein yapısı, RyR'ler ile dört belirgin şekilde benzerlik taşımaktadır.  $IP_3R$ 'ler,  $IP_3$  ve RyR' ler gibi  $Ca^{+2}$  ile aktive olmakta, yine RyR benzeri şekilde, fakat özellikle yüksek derişimdeki  $Ca^{+2}$  ile inaktif hale gelmektedir (Averill et al., 1999). Reseptörün  $IP_3$ 'e adaptasyon gösterdiğine dair de bulgular vardır (Dufour et al., 1997) Reseptörün ayrıca ATP, fosforilasyon ve FKBP12 ve kalmodülün gibi proteinler ile de etkileştiği ve bu proteinlerin reseptör fonksiyonunu düzenlediği bilinmektedir (Averill et al., 1999).

Uyarılabilir olmayan hücrelerde,  $Ca^{+2}$  sinyalini oluşturan temel mekanizma,  $IP_3$  etkili  $Ca^{+2}$  salımıdır. Bu salımı sağlayan  $IP_3$  molekülü, hücre zarında bulunan Fosfaditil Inositol 4,5-bifosfatın (PIP2), Fosfolipaz C (PLC) tarafından  $IP_3$  ve Diaçilgliserol (DAG) parçalanması ile oluşur. Başka bir sinyal molekülü olan DAG, hücrede önemli fonksiyonları olan Protein Kinaz C'yi (PKC) ve bazı TRP kanallarını aktive ederken,  $IP_3$ ,  $IP_3R$ 'lerden  $Ca^{+2}$  salınımına yol açar.  $IP_3$  oluşumunu sağlayan PLC'nin çeşitli alt tipleri arasında en önemlilerden birisi PLC- $\beta$ 'dir. Bu protein, G protein kenetli reseptörlerin (GPKR), dış ortamdan gelen ligandlarla etkileşmesi sonucu aktive olur. Çeşitli G proteini alt tiplerinden biri olan Gq proteinleri ile kenet oluşturan reseptörler, ligandlar vasıtası ile uyarıldığında, heterotrimerik yapıda olan,  $G\alpha$  ve  $G\beta\gamma$  alt ünitelerinden oluşan Gq proteinlerinde, uyarılmamış durumda guanozin difosfat (GDP) bağlı olan  $G\alpha$  alt ünitesinde, GDP/guanozin trifosfat (GTP) değiş tokuşu yaşanır.

Aktive olan  $G\alpha$ , PLC- $\beta$ 'yi aktive ederek  $IP_3$  oluşumunu sağlamış olur. Bu süreçte GTP'nin GDP'ye hidrolizi,  $G\alpha$ 'nın tekrar  $G\beta\gamma$  ile bir araya gelmesine yol açar, bu sayede sinyal bir sonraki döngüye dek sonlanmış olur (Alberts et al., 2002). Aynı fonksiyona sahip, fakat farklı uyarılarla aktive olan başka PLC alt tipleri de vardır. Bunlar, PLC- $\gamma$ , PLC- $\delta$  ve PLC- $\epsilon$  proteinleridir. Bunlar arasında fonksiyonu en iyi açıklığa kavuşturulan PLC- $\gamma$ , reseptör tyrosin kinazların dış ortamdan gelen uyarılarla aktivasyonu sonucu aktive olmaktadır, PLC- $\delta$ 'nin Gh kenetli reseptör aktivasyonu ve CCE ile aktive olduğu düşünülmektedir. PLC- $\epsilon$ 'un ise, G12 ve Gs kenetli reseptörleri de içeren, birden fazla sinyal yolağını kullandığına dair bulgular vardır (Evellin et al., 2002).

## **2.3. Hücre içi $Ca^{+2}$ Sinyalinin Oluşumu**

### **2.3.1. Hücre Dışından Hücre içine Kalsiyum Girişi**

Endotel kaynaklı maddelerin sentezi veya salınımında  $Ca^{+2}$  iyonunun gerekliliği indirekt araştırma yöntemleri ile belirlenmesine karşın, moleküler işlemler genelde mikro spektrofluorometrik, elektrofizyolojik ve moleküler araştırma tekniklerin geliştirilmesi ile kısmen de olsa aydınlığa kavuşturulmuştur. Son yıllarda geliştirilen patch-clamp ve mikro spektrofluorometric araştırma teknikleri ile beraber

floresan ışığına duyarlı çeşitli boyalar hücre içerisindeki iyonik akımları ve hücre içi serbest iyon seviyelerinin ölçülmesini mümkün hale getirmiştir (Berridge et al., 1998).

### **2.3.2. Hücre içi Kalsiyum Depolarından Kalsiyumun Salınması**

$[Ca^{+2}]_i$ , hem hücre dışı ortama hem de hücre içinde  $Ca^{+2}$  depolayan yapılara göre çok düşük seviyededir. Bu nedenle  $Ca^{+2}$  hücre içinde sinyal molekülü görevi yapabilir. Öyle ki hücre dışındaki  $[Ca^{+2}]_o$ 'u yaklaşık olarak  $10^{-3}M$ ,  $Ca^{+2}$  depolarında, örneğin Endoplazmik Retikulum (ER)  $5 \times 10^{-4} M$  civarlarında iken,  $[Ca^{+2}]_i$  bu değerlerden binlerce kez daha düşük olan  $10^{-7}$  seviyelerindedir. Bu yüzden, hem hücre içi ile dışı arasında, hem de ER ile sitoplazma arasında, çok yüksek bir  $Ca^{+2}$  derişim farkı vardır. Bu fark,  $Ca^{+2}$  için çok büyük bir sürdürücü kuvvet oluşmasına sebep olur. Hem hücre zarı, hem de ER zarından  $Ca^{+2}$  geçişi, bu sürdürücü kuvvetin etkisi ile protein yapıdaki kanallardan olur. Bu kanallar, çoğunlukla kapalı durumda olup; voltaj, mekanik uyarı ya da Ligand bağlanması ile aktive olur ve  $Ca^{+2}$  geçirgenliğini sağlarlar (Betto et al., 1997). Hücrenin işlevini etkileyen hücre içi serbest  $Ca^{+2}$  iyon artışı iki yolla oluşmaktadır, bunlar; hücre dışından hücre içine kalsiyum girişi ve hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyumun salınmasıdır (Bejarano et al., 2007).

### **2.3.3. Hücre Dışından Sitoplazmaya $Ca^{+2}$ Girişini Sağlayan Kanal Tipleri Şunlardır:**

#### **2.3.3.1. Voltaj Bağımlı $Ca^{+2}$ Kanalları**

Membran depolarizasyonu sonucu aktive olur. Bu aktivasyon, kanalları  $Ca^{+2}$ 'a geçirgen hale getirir. Bu sayede hücre zarındaki elektriksel olaylar, hücre içindeki fizyolojik olaylarla çiftlenir (Boitano et al., 1997).

#### **2.3.3.2. Ligand Bağımlı $Ca^{+2}$ Kanalları**

Hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur ve  $Ca^{+2}$ 'a geçirgen hale gelirler.

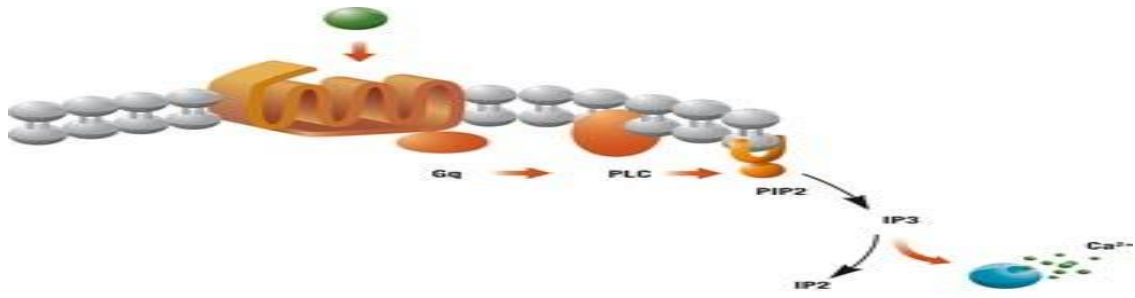
Bu kanallar aynı zamanda birer reseptör görevi görürler. Bu kanallara Nikotinik Asetilkolin (ACh) reseptörleri örnek verilebilir (Bootman et al., 2001).

### 2.3.3.3. $Ca^{+2}$ Sızma Kanalları

Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre içi  $Ca^{+2}$  depoları,  $Ca^{+2}$  sinyali sonucu, ya da daha farklı şekillerde boşaldığı zaman, bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya  $Ca^{+2}$  girişine sebep olurlar.

### 2.3.3.4. Na-Ca Exchange (Değiş-Tokuş)

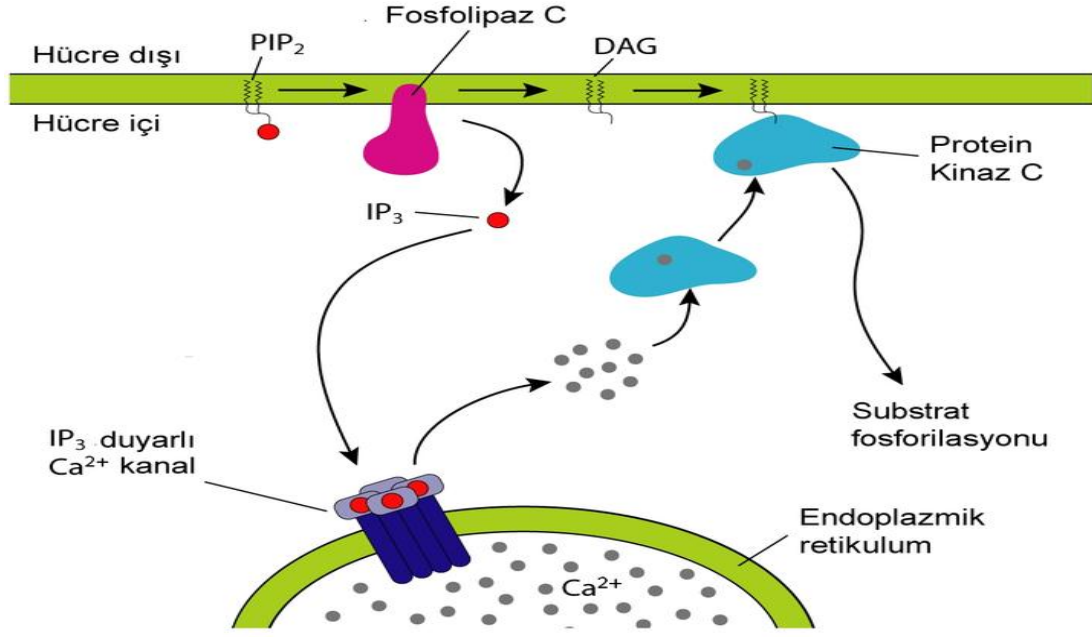
Na-Ca değiştirici (NCX) hücrelerden kalsiyum iyonunu uzaklaştıran antiporter zar proteinidir. NCX proteini bir  $Ca^{+2}$  iyonunu uzaklaştırmanın karşılığı olarak üç  $Na^{+}$  iyonunu hücre içine alır. NCX farklı birçok hücre tipinde mevcuttur.



Şekil 9. Kalsiyum salınımının IP3 reseptörü tarafından uyarılması

### 2.3.4. Hücre içi $Ca^{+2}$ Depolarından $Ca^{+2}$ Çıkışını Sağlayan Yapılar ise Şunlardır

Kalsiyumun hücre içi depolardan salınmasında kalsiyum ve Inositol trifosfat ( $IP_3$ ) ile uyarılan moleküller rol almaktadır. Hücre membranında bulunan reseptörlere agonistlerin bağlanması ile aktive olan G proteininin uyardığı Fosfolipaz C (PLC), Membran fosfolipidlerinde  $IP_3$  ve Diaçilgliserol sentezine yol açmaktadır. Fosfotidilinositol 4,5-bifosfat (PtdIns 4, 5P2) ve Diaçilgliserol (DAG), Protein Kinaz C (PKC) yi aktive ederek bir seri fosforilasyon ve bunu izleyen aktivasyon veya inaktivasyona neden olurken;  $IP_3$  hücre içi depolardan heparinle bloke edilebilen  $Ca^{+2}$  salınımını sağlamaktadır. Hücre içi serbest  $Ca^{+2}$  artışının tetiklediği kalsiyum salınımı, pozitif geri-besleme mekanizması olarak iş görmektedir.



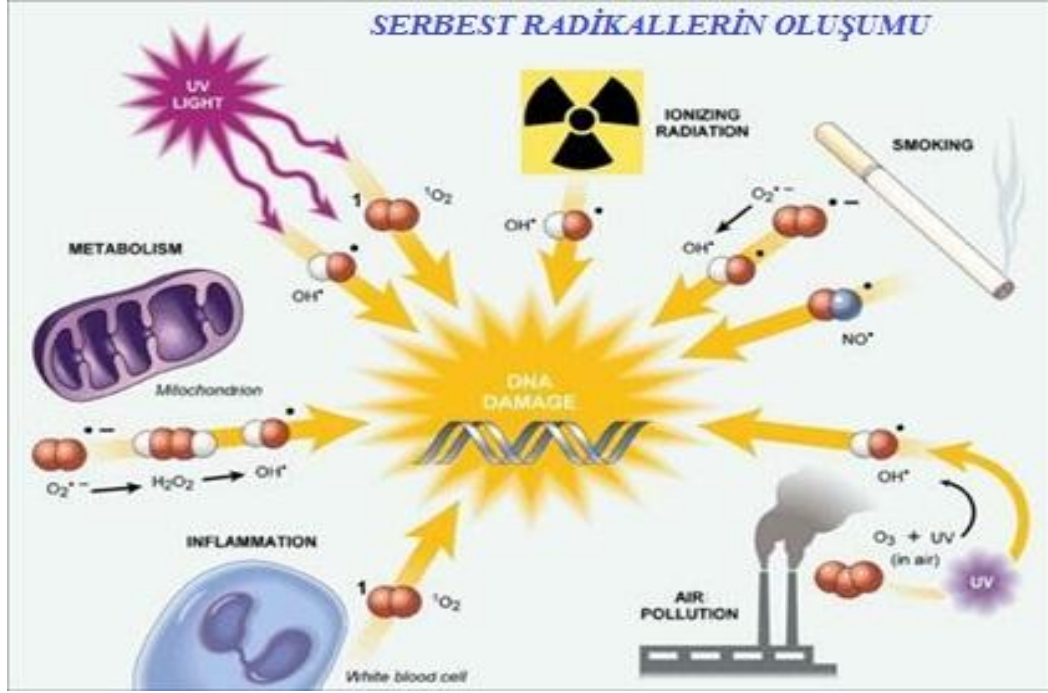
Şekil 10. Hücre içi kalsiyum salınımı

#### 2.4. Hücre içi depolara $Ca^{+2}$ 'un Alınması Başka Bir Deyişle Sitozolden $Ca^{+2}$ 'un Uzaklaştırılması Üç Yolla Gerçekleşir

- A. Endoplazmik Retikulum (ER) membranındaki  $Ca^{+2}$ -ATPaz enzim aktivitesinin artmasıyla ER' a  $Ca^{+2}$  alımının artması.
- B. Hücre membranındaki  $Ca$ -ATPaz yardımıyla hücre dışına  $Ca^{+2}$  atılması.
- C. Diğer ikisine oranla daha az olmak üzere  $Na - Ca$  "exchange" (değiş tokuş) yardımıyla olmaktadır. Dinlenme durumunda hücre dışı kalsiyum iyon yoğunluğu, hücre içine oranla 10.000- 20.000 kat daha yüksektir (Cullen et al., 1998).



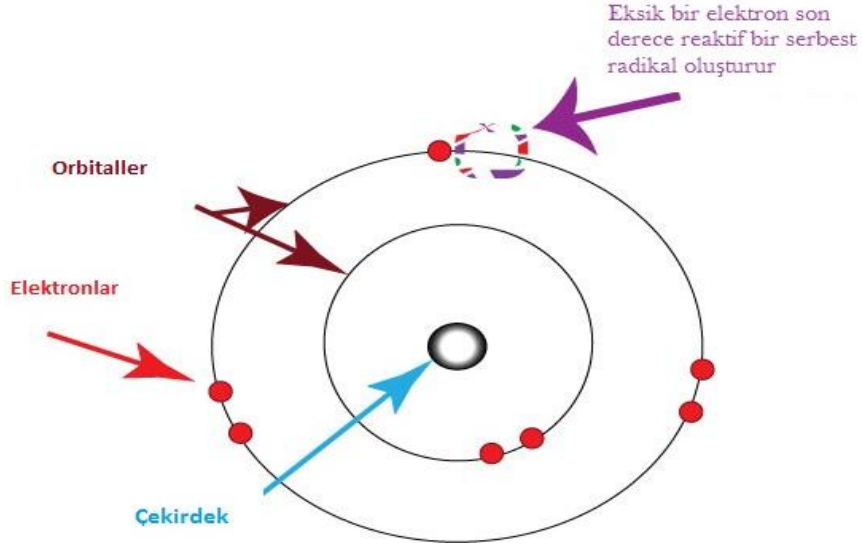
## 2.5. Oksidatif Stres



Şekil 11. Normal sağlıklı bir hücre DNA'sına serbest radikallerin ve oksidatif stresin zararı

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretilmesiyle biyolojik bir sistemin reaktif ara ürünleri kolayca detoksifiye etme (zehirsiz hale getirme) ya da oluşan hasarı onarma yeteneği arasındaki bir dengesizliği belirtir. Dokuların normal redoks (yükseltgenme indirgenme) safhasındaki bozukluklar, peroksitlerin ve serbest radikallerin üretilmesiyle toksik etkilere neden olabilir. Bunlar, proteinler, lipitler ve DNA gibi bütün hücre bileşenlerine zarar verir. Bazı reaktif oksidatif türler, redoks sinyali adı verilen bir olgu vasıtasıyla haberci görevi bile görebilir. İnsanlarda, oksidatif stres birçok hastalıkla ilişkilidir. Örneğin, orak hücre anemisi, aterosklerosis (damar sertliği), Parkinson hastalığı, kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü, Alzheimer hastalığı, şizofreni, bipolar bozukluk, kırılğan X sendromu, kronik yorgunluk sendromu. Ama kısa süreli oksidatif streste, "mitohormesis" adlı bir işlemin harekete geçmesi sayesinde yaşlanmanın önlenmesinde önemli olabilir. Reaktif oksijen türleri faydalı olabilir çünkü bunlar, bağışıklık sistemi tarafından patojenlere saldırmak ve onları yok etmek için kullanılır.





Şekil 12. Son yörüngedeki elektronun kaybedilmesi ve serbest radikal oluşumu

### 2.5.1. Serbest Radikaller

Vücudumuzda kanser ve kalp gibi hastalıklar için bir savaş veriyoruz. Kontrol edilmesi gereken düşmanlardan biri de serbest radikaller. Serbest radikaller somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran moleküllerdir. Antioksidanlar da bu serbest radikallerin etkilerini nötralize eden, kanser, kalp hastalıkları ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonlarını engelleyen moleküllerdir.

Oksidasyona neden olan serbest radikaller temel olarak oksijen kaynaklı metabolitler, (süperoksit anyonları  $\text{O}_2^-$ , hidrojen peroksit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hidroksil radikali ( $\text{OH}\cdot$ ) hipoklorik asit, klor aminler, azot dioksit, ozon ve lipit peroksitlerdir. Bunlar organizmalar tarafından hücre içinde mitokondriyal solunum zincirinde, ya da hücre dışında, özellikle de fagositler tarafından oluşturulur. Kuantum kimyasına göre ancak iki elektron bir bağın yapısına girebilir. Ayrıca iki elektronun ters dönüş doğrultusunda olması gerekir. Yani yukarıya doğru dönen bir elektronun eşi aşağıya doğru dönen bir elektrondur.

Elektron çiftleri oldukça karardır ve insan vücudunun neredeyse tüm elektronları elektron çifti halinde bulunur. Bir bağ koştığında elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma katılır) ya da ayrılırlar (biri bir atoma, diğeri diğere). Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, eğer ayrılırlarsa da serbest radikaller

oluşur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hem de kullanışlı yapar. Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron transferi enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Ama eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Bilim adamları 1954'lerden beri serbest radikallerin yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olduğunu bilmektedirler. Çoğu elektronlar çift halde bulunurken, serbest radikal bu elektronları birbirinden ayırarak reaksiyonu durdurur. Ama sonuçta serbest radikal kendine bir çift elektron alarak elektron çifti haline geçer, diğer elektron serbest radikal olur. Antioksidantlar ise serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturur. Bağlanan serbest iki serbest radikali birleştirerek nötralize edebilme özelliğine sahip bir enzime (Glutasyon peroksidaz, Katalaz, Süperoksit Dismutaz vb.) taşınana kadar radikalle stabil bir yapı oluşturur.

Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler:

- A.** Hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürmek
- B.** Membran lipit ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek
- C.** Nükleer membranını yararak nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek
- D.** Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak

Bu etkiler oksidatif stres olarak bilinen DNA mutasyonları, hücre ölümleri ve hastalıkları gibi hasarlara neden olur. Peki, serbest radikaller bu hasarları nasıl verirler? Bu sorunun cevabı çok çeşitli mekanizmalara dayandırılabilir. Beraber en temel etkileri, lipit peroksidasyonu, proteinler arasında disülfit bağı oluşumu ve DNA hasarıdır.

### **2.5.2. Membran Lipitlerinin Peroksidasyonu**

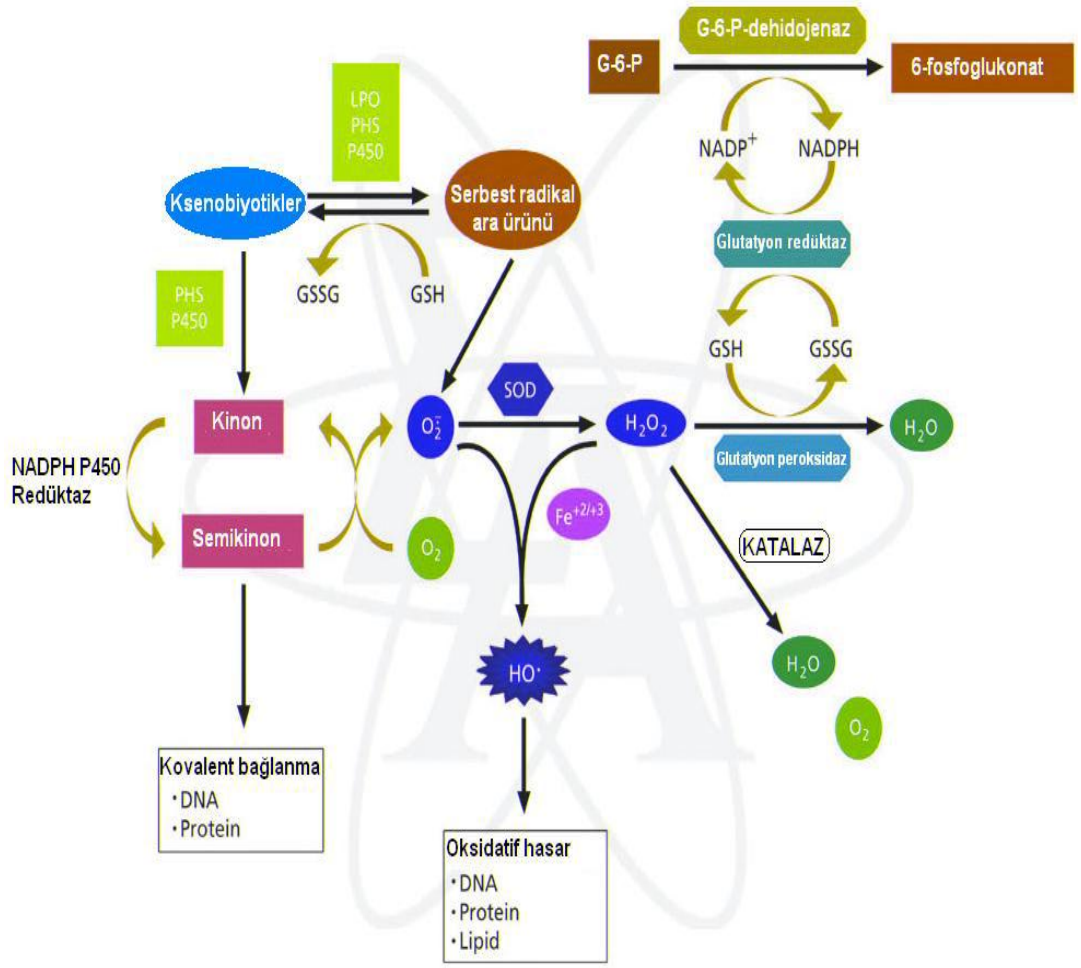
Bu, serbest radikaller hücrenin membranına saldırdıklarında gerçekleşir. Serbest radikaller, hücre membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırarak, hızlı hücre ve doku bozulmalarına neden olurlar.

### **2.5.3. Disülfit Bağı Oluşumu**

Glutatyon (GSH) gibi tiyollerin (R-SH) oksidasyonu tiyol ve oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Her ne kadar hidroksil radikallerinden daha zayıf olsalar da tiyol radikalleri bazı biyolojik sorunlara neden olurlar. Bunlar sülfür merkezli radikallerdir (RSH) ve proteinlerdeki homolitik fisyon (sülfürlerin karşılıklı bağlanması) reaksiyonları disülfit bağı oluşturur. Bu da proteinlerin konfigürasyonlarını bozarak vücuttaki metabolik aktivitelerini engeller.

### **2.5.4. DNA Hasarı**

Bir canlının elektromanyetik, ultraviyole ve X-ışınlarına maruz kaldığı sırada DNA, hidroksil radikallerinin de saldırısına uğrayabilir. Serbest radikal etkisiyle DNA'nın yapısının değişmesi mutasyonlara ve hatta canlının eşey hücrelerindeki mutasyona bağlı olarak döllerin ölmesine neden olur.



**Şekil 13.** Basit bir şekilde oksidan veya radikal olarak tanımlanan reaktif oksijen, reaktif nitrojen ve klorlanmış türlerin potansiyel olarak açığa çıkarılmış etkileri, yaşlanma sürecinde etkili olabilir.

Vücuttaki en temel serbest radikaller aşağıda verilmiştir:

### 2.5.5. Süperoksit Radikalleri (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

Süperoksit radikalleri hücrede enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşurlar. Aşağıdaki reaksiyonlar oluşumlarını açıklar: Süperoksit radikalleri süperoksit dismutaz adı verilen bir enzimle inaktive edilirler, süperoksit radikali iki mekanizmayla çalışırlar. Bu fagositlerin bakterisit etkilerinin temel mekanizmasıdır. Aynı zamanda yangı reaksiyonlarında normal dokulara bile zarar verebilecek bir araçlardır.

### **2.5.6. Hidroksil Radikalleri (OH<sup>-</sup>)**

Hidroksil radikalleri birkaç yolla oluşur. Suyun hidroliziyle ya da parçalanmasıyla hidrojen radikalleri ve hidroksil radikalleri oluşturabilir: Aynı zamanda hidrojen peroksit ve demirin birleşmesiyle oluşabilir (Fenton reaksiyonu): Diğeri de Haber-Weiss reaksiyonudur: Hidroksil radikalleri en reaktif serbest radikallerdir ve vücuttaki serbest radikal hasarının en önemli sorumlularıdır.

### **2.5.7. Nitrik Oksit (NO<sup>•</sup>)**

Nitrik oksit hücrel patofizyolojide önemli bir rol oynayan çözünebilir, serbest radikal gazıdır. Vazodilatör mesajı endotelyumdan düz kasa taşıyan bir enerji aktarıcısı olarak, sentral ve periferel sinirsel aktarımda ve bağışıklıkta aktif rol alır. Sonuçta hücrede ve hücre dışında taşınan NO<sup>•</sup> miktarı çok hassastır.

## **2.6. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri**

Antioksidan savunma mekanizması ve serbest radikaller arasındaki denge oksidanların lehine bozulduğunda serbest radikaller; lipid, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olmaktadır (Del Rio et al., 2005)

### **2.6.1. Membran Lipitleri Üzerinde Etkileri**

Serbest radikaller, hücre komponentleri ile etkileşim içine girebilmeleri için hücre membranını geçmek zorundadır. Hücre zarı, içerdiği PUFA nedeniyle oksidatif hasara oldukça duyarlıdır. Yağ asidi zincirinden, serbest radikallerin etkisi ile hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin de radikal özelliği kazanmasına neden olur. LPO, PUFA' nın radikaller ile oksidasyonu sonucu başlar, zincir reaksiyonları şeklinde devam eder ve sonucunda MDA, 4-hidroksinoneal (HNA), alkoller, etan ve pentan oluşur. LPO sonucu membran bütünlüğü bozulması ile membran proteinleri, reseptörleri ve ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar.

İkiden daha fazla çift bağ içeren linolenik ve araşidonik asit gibi PUFA'nin peroksidasyonu sırasında, tiyobarbitirik asitle ölçülebilen MDA oluşmaktadır.

MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik veya kantitatif bir belirleyicisi değildir, fakat LPO'nun derecesiyle iyi korelasyon göstermektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonunda oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da iyon geçirgenliğinin, enzim aktivitesinin ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerinin değişimiyle sonuçlanır. MDA bu özelliği nedeniyle DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri üzerinde genotoksik ve karsinojenik etkilidir. LPO ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Camello-Almaraz et al., 2006).

### **2.6.2. Proteinler Üzerinde Etkileri**

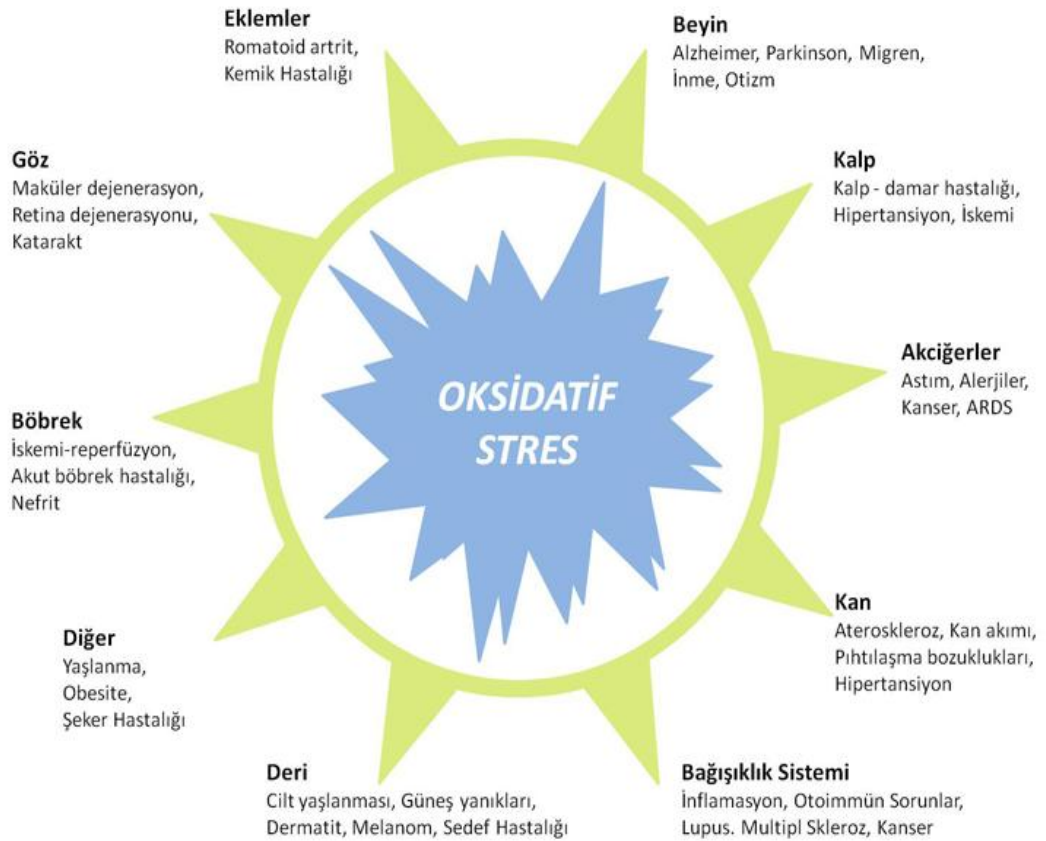
Serbest radikallerin etkilerine karşı proteinler, lipitlere göre daha az hassastırlar ve etkilenme dereceleri aminoasit içeriklerine bağlıdır. Serbest radikal atağı sonucu proteinlerde aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu ve agregasyonu veya çapraz bağlanmaları gibi yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Ayrıca bu yapısal değişiklikler, proteinin proteolize daha duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır. Serbest radikaller, membran proteinleri ile de reaksiyona girerek bu proteinlerde fragmentasyon ve çapraz bağlanmalara neden olabilirler. Böylece enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarını bozabilir, immün sistemi uyarabilecek antijenik değişikliklere de yol açabilirler (Erden et al., 1984).

### **2.6.3. Karbonhidratlar Üzerinde Etkileri**

Karbonhidratlar üzerine de ROT'nin etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler otooksidasyona uğrayarak, ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve  $H_2O_2$  radikallerini meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonu, çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır. DM ve komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, göz hastalıkları, kanser, hipertansiyon, romatoid artrit, psöriazis gibi pek çok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan mekanizmaların yetersiz olduğu gösterilmiştir (Fischer et al., 2010).

#### 2.6.4. DNA Üzerinde Etkileri

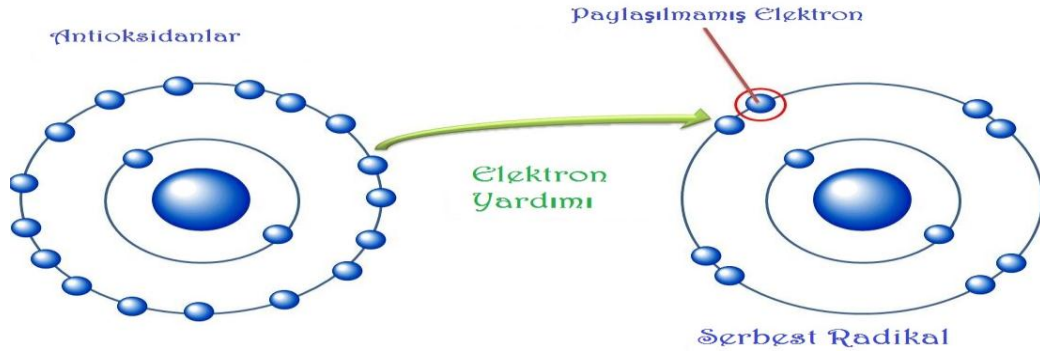
DNA üzerinde serbest radikaller, nükleik asit-baz modifikasyonlarına nokta mutasyonlara, DNA çift sarmalının açılmasına, depürinasyona, çapraz bağlanmalara neden olabilir. Bu etkilerin bir veya birden fazlasının meydana gelmesi, kromozomal mutasyonlar ve sitotoksosite ile sonuçlanır. ( $\cdot\text{OH}$ ) radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere yol açar; pürin ve pirimidin bazlarında mutasyonlara neden olur. ( $\text{O}_2^-$ ) radikalinin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır ancak güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay reaksiyona girer. ( $\text{O}_2$ )'nin, DNA hasarına yol açan  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'in geçiş metalleriyle reaksiyonu sonucu oluştuğu gösterilmiştir (Imley et al., 1988).



Şekil 14. Oksidatif stres ve çeşitli hastalıklar ile ilişkisi

## 2.7. Antioksidanlar

Nötrofil, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için serbest radikal reaksiyonları gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (Klouche et al., 2004). ROT'nin yarılanma ömürleri kısadır fakat başlattıkları serbest radikal zincir reaksiyonları ile doku hasarına sebep olmaktadır. Dolayısı ile serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer. Bunlar önleyici mekanizmalar, tamir mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalardır



Şekil 15. Antioksidanlar ve Serbest Radikaller

Antioksidan savunma; canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya geciktirilebilmesidir. Bu süreçte rol oynayan maddelere antioksidanlar denir (Kleinova et al., 2007). Enzimatik antioksidanlar SOD, CAT ve GSH-Px enzimleridir. SOD'ın yapısında bakır, çinko ve manganez, GSH-Px'da ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metalloenzim olarak da adlandırılırlar (Blokina et al., 2003). Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise E ve C vitamini, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin,  $\beta$ -karoten sorumludur. SOD, GSH-Px ve CAT enzimlerinden ayrı olarak E ve C vitamini de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptir. Her ikisi de hücre membranlarındaki LPO zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (Gutteridge et al., 2000).



### **2.7.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları**

Antioksidanlar; ROT ve nitrojen türlerinin temizlenmesi, oksidatif stresle hasarlanmış dokuların tamiri, diğer antioksidanların onarımı/yenilenmesi ve metal şelasyonu gibi farklı etki şekillerinden birini veya birkaçını ortaya koyarlar. İdeal bir antioksidan, bu etki şekillerinden çoğunu yerine getirebilir. Biyolojik sistemlerde oksidanların yıkımı ve oluşumu arasındaki denge, hücre ve dokunun biyolojik bütünlüğünün sürdürülmesinde önemlidir (Gutteridge et al., 1995).

### **2.8. Wi-Fi Kablosuz İnternet (2450 MHz) EMR ve Sağlık**

Kablosuz internet cihazlarının veri paylaşımında yaygın bir şekilde kullanımı ve uluslararası kanser araştırma ajansı (IARC) tarafından radyo frekanslarının son zamanlarda 2B ajanları olarak sınıflandırılmasıyla birlikte, elektromanyetik alana (EMF) maruziyet ile ilgili sağlık riskleri hakkındaki sorular artmaya başladı (Baan et al., 2011). Gelişmekte olan doku ve organlar, zararlı ajanlara karşı hayli hassas olmasından dolayı, çocukların potansiyel hassasiyet kaygısı, Dünya Sağlık Örgütü'nün mikro dalga'nın yaşamın erken dönemlerinde etkisi üzerine yüksek öncelikli olarak EMF üzerine ısrarlı çalışmalar yapmasına neden olduğu 2006 ve 2010 gündemlerinde vardır (Deventer et al., 2011). Bir risk değerlendirme perspektifi, sağlık risklerinin yeni olarak tanımlanma ve ortaya çıkarılma Bilimsel komitesi (Scenihr et al., 2009) tarafından elektromanyetik alan üzerinde rapor edilmiş, ayrıca çocuklarda RF-EMF olası etkileri hakkında bilgilerin hala sınırlı olduğu sonucuna varılmıştır (Scenihr et al., 2009).

Çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir ki, eğer spesifik absorpsiyon oranı (SAR) annenin vücut sıcaklığını çok artıracak kadar yeterli düzeyde ise mikro dalga elektromanyetik alanlar (Mw-EMFs) teratojeniktir (Heynick and Merritt., 2003, Juutilainen., 2005). Fakat doğum öncesi maruziyet üzerindeki çalışmalar ve ısı olmayan SAR düzeyleri ile yapılan çok nesilli bir çalışmada, hayvanlarda doğurganlık üzerine EMF (elektromanyetik radyasyon alanı) maruziyetinin büyümede ve doğurganlıkta zararsız etkiye sahip olduğu bulundu (Lee et al., 2009, Ogawa et al., 2009, Sommer et al., 2009).

Fakat diğerk çalışmalar ise serebellumda (Canan et al., 2010) ve hipokampusta (Odaci et al., 2008) ve davranışlarda (Kumlin et al., 2007) değişiklik tanımlanmıştır. İmmün hücreler üzerindeki potansiyel tehlike arzeden EMF maruziyeti termal etkilerini başlatmak için yeterli düzeylerde olmadığı yetişkin hayvanlarda ya da yetişkinlerden izole edilen hücrelerde özellikle incelenmiştir. Oysaki çoğu çalışmalar EMF maruziyetinin sağlık açısından kayda değer bir problem oluşturmadığını sadece bazı yan etkilerinin olduğu rapor edilmiştir ( Heynick et al., 2003, Gatta et al., 2003, Vijalayaxmi et al., 2004, Kheifets and Shimkhada., 2005, Nasta et al., 2006, Scarfi et al., 2006).

### **2.9. Cep Telefonu (900 MHz ve 1800 MHz) EMR ve Sağlık**

Her ne zaman güç açıldığında, cep telefonları elektromanyetik radyasyon yayan –hatta bekleme modunda bile- cepte, kimerde, ya da cüzdanda olup olmamasına bakmaksızın vücudun diğer bölgeleri de zararlı ELF radyasyona maruz kalır. İlave çalışmalar gösterdi ki, uyurken cep telefonu yatağında olan kişiler zayıf REM (Rapid Eye Movements) sahiptirler ve öğrenme ve bu durum hafızanın bozulmasına sebep olur. Bunun sebebi ise uyuyan kişinin yakınında bulunan Wi-Fi ya da cep telefonu cihazlarının yaydığı ELF radyasyonun melatonin üretimini bozmasıyla ilgilidir. Bilimsel çalışmalar gösterdi ki, elektromanyetik radyasyon ve sağlık sorunları arasındaki tam olarak olan şey, sizin cep telefonunu her kullanımınızda elektromanyetik alanların (ELF) vücudunuza ve beyninize sürekli bombardıman üretmesine izin vermenizdir.

Cep telefonun yaydığı radyasyonun yan etkileri zaman zaman baş ağrıları ve yorgunluktan enzim değişikliklerine kadar değişiklik gösterir ki bu da DNA ve hücre büyümesini etkiler ve netice de kansere sebep olabilir. Fakat hepsi bu değil. Cep telefonları antenin yanı sıra devreler ve pil de elektromanyetik radyasyon yayar ve bunların hepsi zararlı biyolojik etkilere sebep olabilir. ABD de satılan her bir cep telefonu modeli için cep telefondan beyne ne kadar mikro dalga enerji nüfuz edebileceğinin spesifik olarak bir ölçölümü vardır.

### **2.9.1. Cep Telefonu Radyasyonu (900 MHz ve 1800 MHz)**

Çalışmalar göstermiştir ki cep telefonu sinyalleri yanında tutulduğu takdirde insanların %70 inde beyin dalgalarında değişiklik görülmüştür. Bu test yaklaşık olarak  $2\text{mW/cm}^2$  düzeyinde yapıldı. Tipik mobil bir cihazdan denenmiş gerçek cep telefonu radyasyon maruziyeti sadece bir bölümdür.

### **2.9.2. Cep Telefonları ve Baz İstasyonları**

Cep telefonları son 30 yıldır günlük hayatımızın bir parçası haline gelmiştir. İlk olarak 1981 yılında kullanılmaya başlanmış, sonraki yıllarda ise kullanımı giderek artış göstermiştir. Cep telefonları kullanılmaya başlandığı günden bugüne kadar hızla farklı özellikler kazanarak gelmiştir. Analog olarak adlandırılan ilk cep telefonları 1. jenerasyon cep telefonları olarak 1981 yılında kullanılmaya başlanmış olup, bu grup mobil telefonların frekans hızları yaklaşık 450 MHz civarındadır. 1990'lı yılların başında ise 2. jenerasyon cep telefonları kullanılmaya başlanmıştır. Bu grup telefonların en önemli özelliği ise dijital sistem cep telefonları olup Global System for Mobile (GSM) özelliğindedir. 3. jenerasyon cep telefonları ise 2000'li yıllarda üretilmeye başlanmış olup bu grup cep telefonlar 800-1900 MHz frekansa sahiptirler (Habash et al., 2009). Ülkemizde yaklaşık 35 milyon kişi cep telefonu kullanmaktadır ve 104 milyonu kayıtlı toplam 113 milyon cep telefonu olduğu tahmin edilmektedir.

Tüm dünyada ise yaklaşık 4,6 milyar kişinin cep telefonu kullandığı düşünülmektedir. Bu rakamın 2012 yılında 6 milyara ulaşması beklenmektedir (Trosic et al., 2009). Genel olarak cep telefonu kullanımı 2000'li yıllardan sonra hızlı bir şekilde artmakta olup bu artışın gelişmiş ülkelerde çok daha fazla olduğu görülmektedir. Baz istasyonları cep telefonlarının daha kolay kullanılmasını sağlamaktadır. Tıpkı cep telefonları gibi baz istasyonlarının da insan sağlığı üzerine olumsuz etkisi olduğuna dair çelişkili bilgiler mevcuttur. Ülkemizde yaklaşık 45 bin baz istasyonu bulunmakta iken, bu rakam Almanya için yaklaşık 140, Fransa için ise 100 bin civarındadır.

Baz istasyonlarının kanser ve diğer sağlık sorunları yarattığına dair bilgiler yanı sıra fazla sayıdaki baz istasyonunun cep telefonu çekim alanını kolaylaştırdığını ve daha az enerji yaydıklarından da bahsedilmektedir (Moulder et al., 1999).

Çok sayıda bilimsel komite cep telefonları ve elektromanyetik alanın olası zararlı etkilerine yönelik yapılan çalışmalar sonucunda halkı bilgilendirmek adına açıklama yapma gereği duymuşlardır. Dünya Sağlık Örgütü, FDA, Health Physics Society, European Cancer Prevention Organization gibi sağlık kuruluşları kabaca radyo frekans alanlarının günümüz verilerine göre kanser riskini arttırmadığını, baş ağrısı, baş dönmesi ve hafıza kaybına neden olmadığını, saç kalım üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığını ve bu konudaki verilerin henüz yeterli olmadığını ifade etmektedirler.

### **2.9.3. Cep Telefonları, Baz İstasyonları ve Kanser**

Uzun süreli cep telefonu kullanımının veya baz istasyonlarına yakın mesafede yaşamının kanser riskini arttırdığı konusundaki bilgiler son derece çelişkilidir. Bu konudaki ilk ciddi endişe; 1993 yılında, Florida’da yaşayan bir kişinin, “cep telefonu kullanımı nedeni ile karısının beyin kanserinden öldüğünü” iddia etmesi ile başlamıştır. Bugüne kadar bu konuda olumlu ve olumsuz sonuçların bildirildiği çok sayıda yayımlanmış çalışmaya rastlamak mümkündür. Düşük frekanslı elektromanyetik alanlar The International Agency for Research on Cancer (IARC) tarafından 2002 yılında grup 2B olarak, yani “insanlar için olası karsinojenik” olarak sınıflandırılmıştır. Bugüne kadar cep telefonları ve baz istasyonları ile kanser arasındaki ilişkinin incelendiği çok sayıda çalışma yayınlanmakla birlikte bu yayınların sonuçları bir birleriyle çelişkili sonuçlar vermektedir. International study group investigating the effects of mobile phone radiation (INTERPHONE) grubunun 2010 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, 13 farklı ülkeden katılım sağlanarak vaka-kontrol şeklinde planlandı, cep telefonu kullanımı ile menenjiom ve gliom arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Cep telefonu kullanım süresi ve diğer bilgilerin anket formu doldurularak elde edildiği bu çalışmanın sonuçları cep telefonu kullanımının menenjiom ve gliom riskini arttırmadığı göstermiştir.

Sadece uzun süreli kullanım sonrasında gliom riskinde az da olsa bir artış olduğu rapor edilmiş ve bu sonuçların iyi planlanmış çalışmalarla desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır. Norveç'te yapılan bir diğer çalışmada da cep telefonu ve beyin tümörü arasındaki ilişki değerlendirilmiş olup bu çalışma sonucunda da menengioma ve gliom gibi kanser riskinde bir artma olmadığı ortaya konmuştur (Klaeboe et al., 2007). Bir diğer vaka-kontrol çalışmasında da düzenli ve düzensiz cep telefonu kullanımı ile birlikte, cep telefonu kullanım süresi göz önüne alınarak yapılmıştır (Takebayashi et al., 2008). Bu çalışmada bireylerdeki gliom, menengioma ve pitüiter adenom riski değerlendirilmiş olup bu tür kanserlerin görülme sıklığında herhangi bir artış olduğu gösterilememiştir. Benzer olarak yapılan çalışmalarda glial tümör ve parotis bezi tümörlerinde artış gözlenmemiştir (Lönn et al., 2006). Uzun süreli cep telefonu kullanımı ve beyin tümörü arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalar mevcuttur (Hardell et al., 2006). Cep telefonları ve artmış kanser riski arasında pozitif bir ilişki olduğunu gösteren en önemli çalışmalar (Lönn et al., 2006, Hardell et al., 2010) tarafından yapılmış olan çalışmalardır en az 10 yıllık cep telefonu kullanımının kanser üzerine olan etkisini anket ve Retrospektif verilerin değerlendirilmesi sonrasında incelemişlerdir. Daha önceden yayınlanmış çalışmaların Retrospektif olarak taranarak değerlendirildiği çalışmada 18 araştırmanın sonuçları analiz edilmiştir.

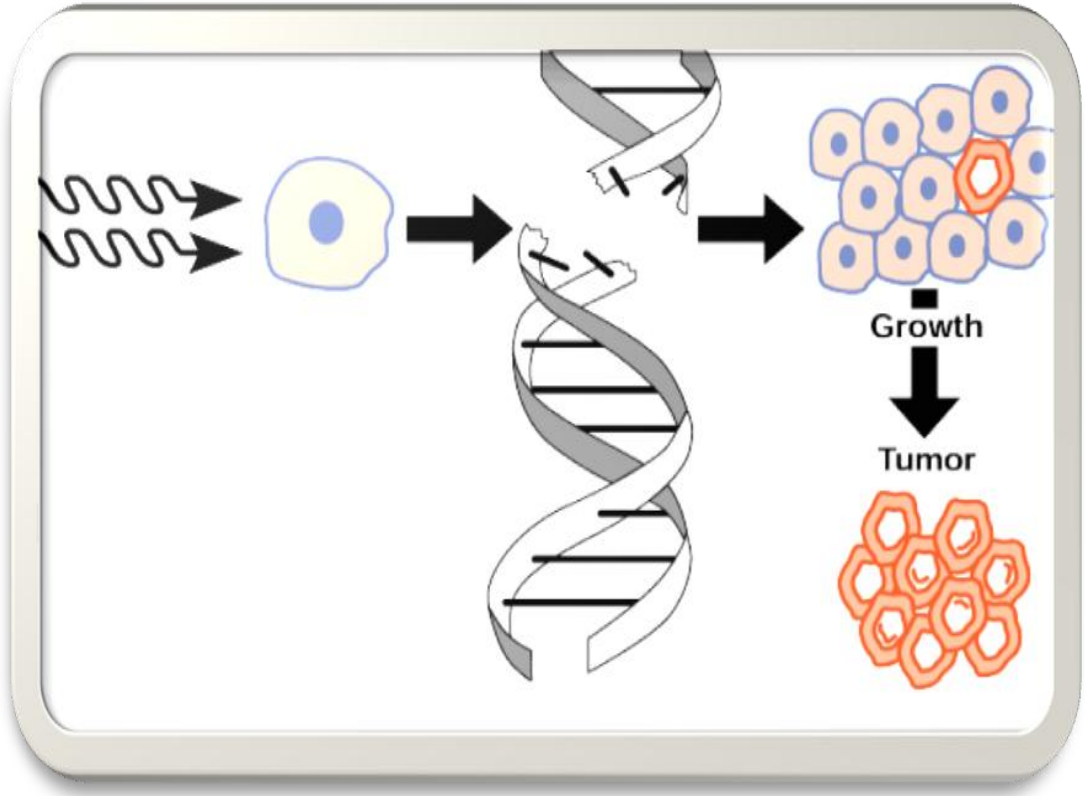
Amerika, İsveç, Danimarka, Finlandiya, İngiltere, Almanya ve Japonya'da yapılmış olan 1997-2004 yıllarını içeren çalışmaların incelenmesi sonucunda 10 yıllık cep telefonu kullanımının ipsilateral gliom ve akustik nörinom riskini arttırdığı, ancak menengioma riskinde bu artışın izlenmediğini ortaya koymaktadır. Solid tümörlerin oluşması için uzun süreli maruziyet söz konusu olduğundan uzun süreli cep telefonu kullanımının (10 yıl ve fazla) kanser oluşumu üzerine olan etkilerini inceleyen çalışmalar, gerçek etkinin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. Benzer şekilde Lönn ve diğerleri tarafından, İsveç'te yaşayan 752 kişi üzerinden yapılan bir çalışmada, en az 10 yıllık cep telefonu kullanımının akustik nöroma riskini arttırdığı belirtilmiştir (Lönn et al., 2004). Elde edilen bu sonuçlar, özellikle uzun süreli cep telefonu kullanımının kanser üzerine ciddi etkilerinin olabileceğini işaret etmektedir.

Çoğunluğunu INTERPHONE çalışmalarının oluşturduğu birçok çalışmada 10 yıl ve üzeri cep telefonu kullanımının beyin tümörleri riskini arttırmadığını göstermektedir. 2010 yılında Kuzey İtalya'da yapılan elektrik hatlarındaki manyetik alanlara maruz kalma ile ilişkili hematolojik malignite riski adlı vaka-kontrol çalışmasında elektromanyetik alan yoğunluğu hesaplanmış, sonuç olarak 14 yaş altı çocuklarda hematolojik kanser riski artmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Yine 2009 yılında yapılan popülasyon tabanlı Alman çalışmasında, ebeveynlerin mesleki nedenle düşük frekanslı radyasyona maruziyeti ve çocukluk çağı kanserleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Analize 2382 kontrol ve 2049 kanser tanılı vaka seçilmiştir. Sonuç olarak maternal mesleki maruziyet (plastik endüstrisi, laboratuvar teknikerleri, doktorlar, diş hekimleri, fizik ve kimya mühendisleri) kanser riskinde artışa neden olmadığı tespit edilmiştir (Hug et al., 2010). Mobil telefon baz istasyonları ve erken çocukluk çağı kanserleri ile yapılmış vaka kontrol çalışmasında, gebelik boyunca annenin baz istasyonu ve radyo frekans maruziyeti ile kanser riski araştırılmıştır. Bu çalışma da erken çocukluk çağı kanserleri ile gebelik boyunca maruziyet arasında bir ilişki olmadığını ortaya koymuştur (Elliott et al., 2010).

## **2.10. Radyasyonun Zararları**

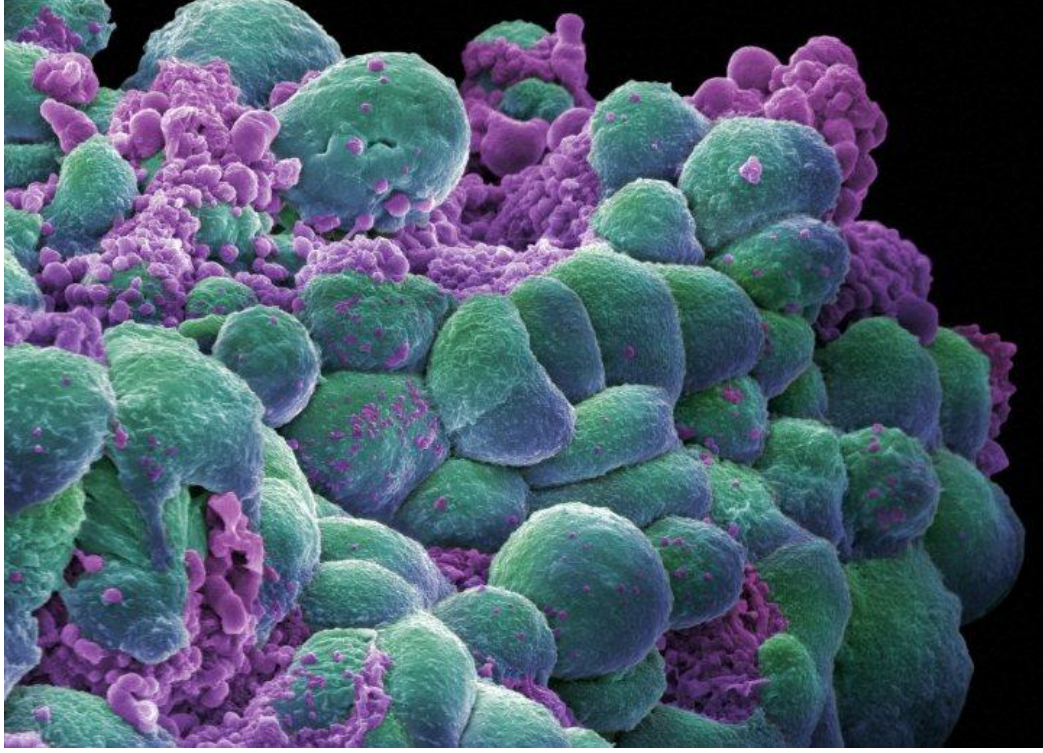
X ışınları, ultraviyole ışınlar, görülebilen ışınlar, kızıl ötesi ışınlar, mikro dalgalar, radyo dalgaları ve  $\gamma$ -ışınları elektromanyetik spektrumun farklı parçalarıdır. Elektromanyetik alanlar, frekans ve dalga boyları ile tanımlanır. X ışınları ve  $\gamma$ -ışınları çok yüksek frekanslarda olduğundan, oluşan radyasyon kimyasal bağları kırabilecek enerjiye sahiptir. Bu radyasyona iyonlaşan radyasyon denir.



Şekil 16. EMR'nin Tümör gelişimine sebep olması

İyonlaşabilen elektromanyetik radyasyonları, hücrenin materyali olan DNA'yı parçalayacak kadar enerji taşımaktadır. DNA'nın zarar görmesi ise hücreleri öldürmektedir. Bunun sonucunda doku zarar görür. DNA'da çok az bir zedelenme, kansere yol açabilecek kalıcı değişikliklere sebep olur. Radyoaktif kirleticiler özellikle insan, hayvan ve bitki sağlığına olumsuz etkiler yaparak çevreyi ve ekolojik dengeyi bozmaktadır. Ayrıca radyasyon, canlılarda genetik değişikliklere de yol açmaktadır. Radyasyonun etkisi; cins, yaş ve organlara göre değişmektedir.

Özellikle göz en fazla etkilenen organ olup, görme zayıflığı, katarakt ve göz uyumunun yavaşlamasına sebep olmaktadır. Deri ise, radyasyona karşı daha dayanıklıdır. Radyasyonun zararları genellikle zamanla ortaya çıkan bir etki olup, ani etki ancak atom bombalarının yol açtığı ölümler ve yüksek radyasyondaki yangınlar şeklinde kendini göstermektedir.



**Resim 1.** Kanser hücresi

X ışınları ya da röntgen ışınları temas ettikleri maddelerin elektron kaybetmelerine yani iyonize olmalarına neden olan yüksek enerjili radyasyondur. Bu ışınlar tanı amaçlı kullanılan filmlerin çekilmesinde kullanılırlar. Doza bağlı olarak hücre bölünmesi ve genetik yapısında bozulmalara neden olabilirler. Röntgen ışınlarının da dahil olduğu iyonize radyasyona en hassas olan hücreler hızlı bölünen hücrelerdir bu nedenle gelişmekte olan fetus ve ona ait dokular bu ışıklardan en fazla zarar görmesi beklenen yapılardır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta sadece ışın ile temas eden dokunun etkilenmesi ve bu ışınların vücut içinde seyahat etmemesidir. Örneğin çekilen bir el filminde alınan ışınlar vücut içinde ilerleyerek rahime kadar ulaşmaz.

### **2.10.1. EMF Maruziyeti İçin Temel Sınırlamalar ve Referans Seviyeleri**

Maruziyet (maruz bırakma, elektriksel alanların etkisinde kalma) sınırlamaları, doğrulanan sağlık etkileri temelinde ve uzun süreli temel sınırlamalardır. EMF'ye maruziyette temel sınırlamaları belirleyen fiziksel değerler, frekansa bağlı olarak akım yoğunluğu, SAR yoğunluğudur. Eğer ölçüm değerleri referans değerlerden daha yüksekse, aşılacak temel sınırların takip edilmesi gerekli



değildir. Fakat daha detaylı incelemeler temel sınırlamayla uyarlılığı değerlendirmek için gereklidir.

Farklı bilimsel temellerde çeşitli frekans bölgelerinde temel maruziyet sınırlamaları geliştirilmesinde:

• **1 Hz - 10 MHz arasında temel sınırlamalarda, sinir sistemi fonksiyonlarındaki etkilerini önlemek için akım yoğunluğu belirlenmiştir.**

• **100 kHz - 10 MHz arasında temel sınırlamalarda, tüm vücut ısınması ve aşırı yerel doku ısınmasını önlemek için; her iki akım yoğunluğu belirlenmiştir.**

• **10 MHz - 300 GHz arasındaki sınırlamalarda, vücut yüzeyine yakın dokuda fazla ısınmayı önlemek için güç yoğunluğu belirlenmiştir.**

Birkaç Hz'den 1 kHz'e kadar, 100 mA/m<sup>2</sup>'nin üstünde akım yoğunluğuna neden olan seviyelerde eşik değerinde, kolay uyarılmaya neden olan merkezi sinir sistemindeki akut değişimler ve diğer akut etkiler olabilir, hayal görme gibi bir ters etkiye yol açmaz. Güvenlik önlemleri dikkate alınarak, 4 Hz – 1 kHz arasındaki frekanslarda mesleki maruziyet için, 10 mA/m<sup>2</sup>'den daha az akım yoğunluğuna neden olan alanlarla sınırlandırılmış olacağından, 10 kat güvenlik katsayısı olması ve halk için ilave katsayı 5 kat uygulanması ile 2 mA/m<sup>2</sup> temel maruziyet sınırlamasına karar verilmiştir. Bu temel sınırlama, bu frekans aralığında sinir uyarılması için eşik değerindeki artışa uymaktadır. 10 MHz' den birkaç GHz'e kadar frekans bandında biyolojik ve sağlık etkilerinin ortaya konulması, 1°C'den daha fazla bir vücut sıcaklığı yükselişine verilen cevapla uyusur. Uygun çevresel şartlar altında bireylerin maruziyetinde 1°C'lik ısı artışında tüm-vücut SAR değeri, 30 dakikada yaklaşık olarak 4 W/kg'dır. Mesleki maruziyet için uygun korumayı sağlayan tüm-vücut SAR ortalaması 0,4 W/kg'dır.

İlave olarak, halk maruziyeti için 5 misli bir güvenlik faktörü alınarak, tüm-vücut ortalama SAR limiti 0.08 W/kg değeri ortaya çıkarılmıştır. Halk ve işçi maruziyeti için farklılık gösterebilen sağlık durumu ve yaşları gerçekte hesaba katılarak daha düşük temel kısıtlamalar konulabilir. Düşük frekans ve kısa süreli akımlarda sağlık etkilerini içeren birkaç veri vardır. International Commission on

Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP), bundan dolayı zaman ortalamalı olmayan, anlık değerlerle uyuşan çok kısa dönem pik alanlar ya da geçici akım yoğunluklarına neden olan alanda sınırlamaları tavsiye eder. Avrupa Birliği ve İngiltere EMF maruziyeti konusunda ICNIRP Kılavuzu'nu benimsemiştir. Ülkeler maruziyet sınırlarını zaman zaman değiştirmektedirler (Schüz et al., 2008).

ELF (oldukça alçak frekans/extremely low frequency) elektrik ve manyetik alan maruziyetin (maruz kalma) kötü etkisini önlemek için temel maruziyet sınırları belirlenmiştir. Maruziyet sınırları uygun bilimsel incelemelere dayanmalıdır. Yalnız ani ve şiddetli kısa süren (akut; acute) etki için yeterli bilimsel çalışmalar gerçekleştirildiğinden, bu etkilere karşı önlem için iki tane uluslararası kılavuz geliştirilmiştir. Ani ve şiddetli, kısa süren etki için yeterli bilimsel çalışmalar gerçekleştirildiği halde; ELF manyetik alan maruziyeti ve çocuk kanseri (lösemi) arasındaki delillerin sınırlı olmasından dolayı uzun süreli etkinin varlığında belirsizlik vardır. Bilimsel kanıtlar ortaya çıktıkça; ELF elektrik ve manyetik alan maruziyet sınır değerleri azaltılmalıdır (Coble et al., 2009).

## 2.10.2. Elektromanyetik Kirlilik ve Kaynakları

### 2.10.2.1. Doğal Elektromanyetik Kaynaklar

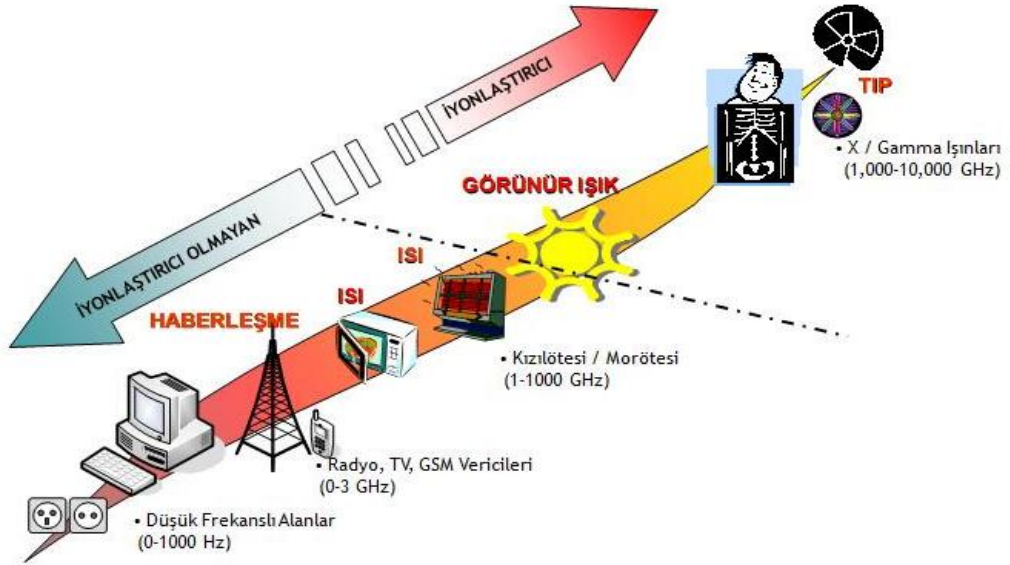
- Güneş,
- Bazı uzak yıldızlar
- Atmosferik deşarjlar. (yıldırım)



**Resim 2.** Doğal elektromanyetik kaynaklar

## 2.10.2.2. Elektromanyetik Kirlilik ve Standartlar

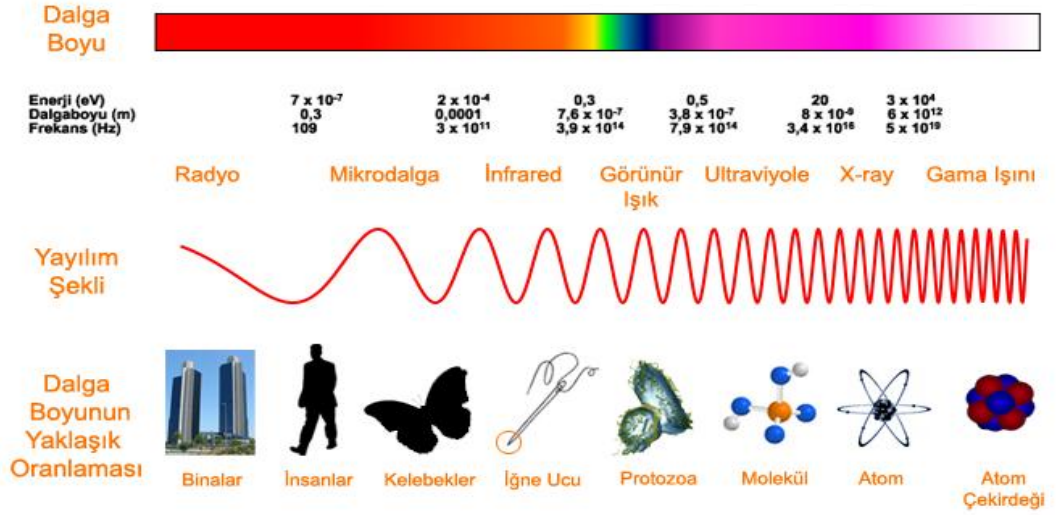
Teknolojinin gelişmesiyle birlikte günlük hayatta sıkça kullandığımız elektrikli ve pilli cihazların oluşturduğu elektromanyetik alanların insan sağlığı üzerine etkisi önem kazanmaktadır. Elektrik enerjisi ile çalışan birçok cihaz ve sistem elektromanyetik enerji yaymaktadır. Evlerde kullandığımız tıraş makinası, saç kurutma makinası, mikrodalga fırınlar, elektrik süpürgeleri, floresan lambalar, TV ve bilgisayar ekranları gibi ev aletleri ve kişisel aletler ile bunlara ek olarak enerji nakil hatları ve trafo istasyonları, elektrikli trenler, endüksiyon fırınları, radyo TV ve telsiz verici istasyonları, radar sistemleri, uydu haberleşme sistemleri, tedavide çeşitli frekanslarda kullanılan tıbbi cihazlar, sanayi ve endüstride RF frekansında çalışan sistemler, GSM haberleşme sisteminin temel yapı taşları olan radyo baz istasyonu ve cep telefonu anteni elektrik ve manyetik alan yaymakta olan kaynaklara örnek olarak gösterilebilmektedir.



Şekil 17. İyonize ve iyonize olmayan radyasyonun ana kaynakları genel hatlarıyla tüm elektromanyetik spektrum olarak farklı frekanslarda gösterimi

Elektromanyetik radyasyon, enerjinin dalga ya da parçacık şeklinde yayılması olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde özellikle haberleşmede sınırsız ortamda kullanılan elektromanyetik dalgalar elektrik ve manyetik alan bileşenleri birbirine dik olacak şekilde ve boşlukta 300.000 km/s hızla yayılmaktadır. Boşlukta söz konusu dalgaların hızı, dalga boyu ve frekansı arasındaki ilişki  $\lambda = c/f$  olarak tanımlanmakta; bağıntının yorumlanmasından anlaşılacağı gibi hız sabit olduğundan dalgaların

frekansları, dalga boyları ile ters orantılı olmaktadır. Elektromanyetik radyasyonun frekans ve dalga boyuna göre sınıflandırılması elektromanyetik spektrum olarak adlandırılmaktadır. Şekil 17 ve 18’de Elektromanyetik Spektrum ve dalga boyu ilişkisi verilmektedir.



Şekil 18. Elektromanyetik spektrum ve ayrıntılı gösterimi

### 2.10.3. Düşük Frekanslı Radyasyon Etkileri ve Standartları

(0-10 kHz) arasındaki düşük frekanslı radyasyonun insan sağlığı açısından irdelenmesi: Sıfır ile 10 kHz frekans aralığındaki statik ve düşük frekanslı elektrik ve manyetik alanlara maruz kalan insanlardaki olumsuz etkilerin önlenmesi için spektrumun bu bölgesindeki elektrik ve manyetik alanlar “doğrudan etkiler”, “dolaylı etkiler” göz önüne alınarak ayrı ayrı ele alınmaktadır. İnsan vücudunun elektrik ve manyetik alanlarla doğrudan etkileşmesi sonucu olan etkiler “**doğrudan etkiler**”; elektrik ve manyetik alan etkisinde kalmış olan metal cisimlere temas sonucu olan etkiler “**dolaylı etkiler**” olarak tanımlanmaktadır (Habash et al., 2009).

Doğrudan etkilenmede; insan vücudunda değişken elektrik veya manyetik alanın şiddetine, frekansına ve vücudun yüzey alanının büyüklüğüne bağlı olarak bir akım oluşmaktadır. Dolaylı etkilenmede; elektrik veya manyetik alan etkisinde kalmış olan metal cisimlere dokunma sonucu “**temas akımı**” oluşmaktadır. Doğrudan ya da dolaylı etkilerde insan vücuduna zarar vermeyeceği öngörülen kısıtlamalar vücutta elektromanyetik radyasyon sonucu oluşan akım yoğunluğu ve

özgül soğurulma oranı gibi biyolojik açıdan anlamı olan büyüklükler cinsinden verilmektedir.

Elektromanyetik alanlarla etkileşme sonucu, elektromanyetik alan etkisi altında kalma süresi **maruziyet şartları** olarak tanımlanmakta ve mevcut alan hareketli cisimler ve insanlar olmadığında bir başka deyişle “**değişikliğe uğramamış alan**” değeri ile karakterize edilmektedir. İnsan sağlığına zarar vermemek için tanımlanan temel sınırlamalar kontrol edilmesi gereken biyolojik etkiler ile yakından ilgili olan şartlar; belirli değer ve miktarlardır. Söz konusu sınırlamalar göz önüne alınan frekans aralığı için indüklenen akım yoğunluğu, temas akımı, elektrik ve manyetik alan terimleri cinsinden belirlenmektedir. Referans seviyeleri, temel sınırlamalardan çıkarılan alan seviyeleri gibi ölçülebilir değerler olup temel sınırlamalarla uyumluluğu kontrol etmektedir. Referans seviyeleri geniş kapsamlı maruziyet durumları da göz önüne alınarak; alanın değerinin tanımlanmış olan referans seviyelerinin altında olması durumunda dahi en kötü durumda temel sınırlamaların aşılamayacağı şekilde türetilmiştir. Dış ortamdaki değişken alana devamlı maruz kalma durumunda baş ve kalp bölgesine indüklenecek akım yoğunlukları ile temel sınırlamalar işçi ve genel halk sağlığı için Tablo-1 de verilmektedir.

**Tablo 1.** İşçi ve Genel Halk Sağlığı için İndüklenen Akım Yoğunluğu Değerleri

	<b>İşçi Sağlığı</b>	<b>Genel Halk Sağlığı</b>
Frekans(f,Hz)	İndüklenen Akım Yoğunluğu(mA/m <sup>2</sup> ,rms)	İndüklenen Akım Yoğunluğu(mA/m <sup>2</sup> ,rms)
0,1 - 1	40	16
1- 4	40 / f	16 / f
4 - 1000	10	4
1000 - 10000	f/1000	f / 250

Değişken alan içinde bulunan cisimlere dokunmak suretiyle etkili olan temas akımı ile ilgili sınırlamalar Tablo-2 de verilmektedir.

**Tablo 2.** İşçi ve Genel Halk Sağlığı için Temas Akımı Değerleri

	<b>İşçi Sağlığı</b>	<b>Genel Halk Sağlığı</b>
Frekans(f.Hz)	Temas Akımı(mA,rms)	Temas Akımı(mA,rms)
0,1-7500	3,5	1,5
7500-10000	3,5	$2 \times 10^{-4} f$

Standartlar genel olarak vücuda paralel elektrik alanla ilgili referans seviyelerini bütün vücut için 0-0,1Hz arasında 42kV/m(tepe değer) ve 0,1 Hz'in üstünde 30kV/m (rms) olarak belirlemektedir.

#### **2.10.4. İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyon**

İyonlaştırıcı olmayan radyasyonların enerjisi, iyonlaştırıcı radyasyonlara göre çok daha küçüktür ve madde içerisinden geçerken yüklü iyonlar oluşturmak yerine, molekül ve atomların döngüsel, titreşimsel veya elektronik değerliğini değiştirme yeteneğine sahiptirler. Ancak, iyonlaştırıcı olmayan radyasyonların canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkileriyle ilgili çalışmalar halen sonuçlandırılabilmiş değildir. Bununla birlikte, farklı çeşitlerdeki iyonlaştırıcı olmayan radyasyonların canlı organizmalar üzerinde farklı etkiler bıraktıkları gözlenmektedir. İyonlaştırıcı olmayan radyasyonlar, iyonizasyon enerjisi sıcaklığına çıkartacak kadar bir ısı verdiklerinde, termal-iyonizasyona bile sebep olabilirler.

Bir ateşteki alev iyonizasyonu ve kızartma tipi yemeklerdeki pişirme işlemi esnasında besin maddesindeki kızılötesi radyasyonun neden olduğu esmerleşme, termal iyonizasyona iyi birer örnek olarak gösterilebilirler. Bununla birlikte, iyonlaştırıcı olmayan radyasyonların canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkileriyle ilgili çalışmalar halen sonuçlandırılabilmiş değildir. Bununla birlikte, farklı çeşitlerdeki iyonlaştırıcı olmayan radyasyonların canlı organizmalar üzerinde farklı etkiler bıraktıkları gözlenmektedir.

#### **2.10.4.1. İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyon Çeşitleri**

1- Radyo dalgaları

2- Mikro dalgalar

3-Terahertz

4- Kıızıl ötesi

5- Görülebilir ışık

6- Mor ötesi(kısmen)

### 3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.D. araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma 3167-YL2-12 proje numarası ile desteklenmiştir.

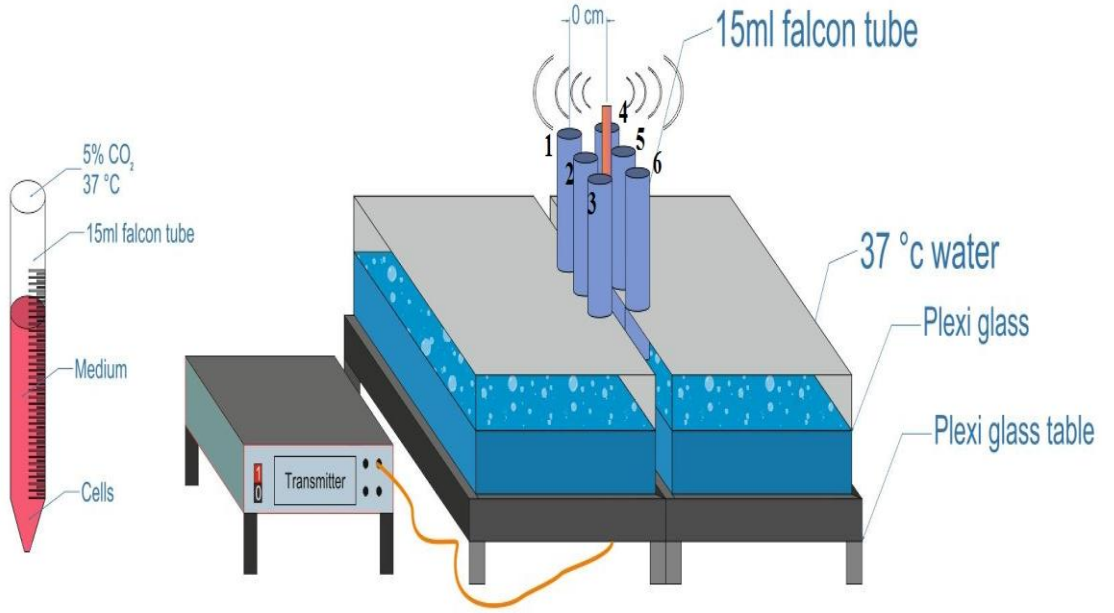
#### 3.1. Materyal

MCF-7 hücreleri American Type Cell Culture (ATCC) firmasından Dateks Teknik Sistemler, Ankara, Türkiye aracılığı ile alındı. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında RPMI-1640 medium içerisine %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 Penicillin Streptomycin ilave edilerek hazırlanan besiyeri ile steril 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> özelliklerine sahip inkübatör ortamına bırakıldılar. Her iki günde bir mediumları değiştirilerek hücre kontaminasyonlarına müsaade edilmeyerek hızlıca çoğalıp konfluent olmaları sağlandı. Flaskların yüzeyine tamamen konfluent olan hücreler pasajlama işlemleri neticesinde duruma göre ya daha büyük ve de sayıca daha çok flasklara ekildi ya da kalsiyum sinyali, Apoptozis ve de kaspaz analizlerinde kullanıldı.

Sinyal üretici tarafından yayılan RF radyo frekanslarının sürekli dalgaları (900 MHz, 1800 MHz ve 2450 MHz) başlangıçta güçlendirilmiş ve daha sonra bir anten vasıtasıyla su banyosu içerisinde bulunan kanser hücreleri içine beslenmiştir (Biçer Elektronik, Sakarya, Türkiye). Bu antenler uygun vasatlar içindeki hücreleri içeren falkon tüplerin (15 ml sterile polypropylene cnical bottom Screw cap tup 92159, Biolab, Macaristan) yerleştirildiği sisteme uygun maruz kalma koşulları için ayarlanmıştır. Radyo frekansı enerji spektrumunun tekrarlama zamanı, frekans ve amplitüdü uydu seviye ölçer tarafından izlenmiştir (PROMAX, MC-877C, Barcelona, Spain). Radyasyon yansıması ve maruz kalma işlemi taşınabilir radyo frekansı (RF) araştırma sistemi ile ölçüldü (HOLADAY, HI-4417, USA). EMR dozu elektrik alan yoğunluğu (V/m) olarak hesaplandı ve dijital anatomik modeller FDTD sayısal koduna göre ölçüldü. EMR sisteminin probu ile hücrelerin bulunduğu falkon tüpler arasındaki mesafeler 0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm olarak ayarlandı. Kontrol grubundaki hücreler 1 saat aynı ortamda EMR'sız olarak bekletildi.



## A. Deney Düzenegi-I (900 MHz ve 1800 MHz)



Şekil 19. 900 MHz, 1800 MHz Transmitter ile birlikte farklı mesafelerde EMR'a maruz bıraktığımız (37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>) Deney düzenegimiz

### SAR değerleri (0 cm):

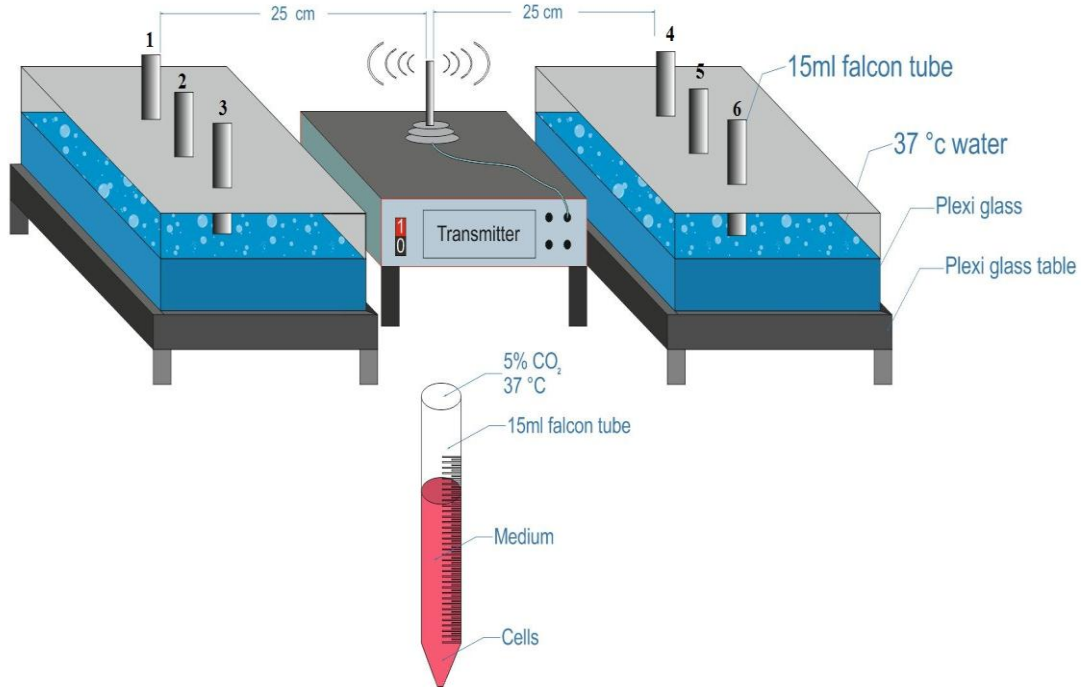
#### (900 MHz)

1:	0,46 (W/kg)	4:	0,41 (W/kg)
2:	0,66 (W/kg)	5:	0,62(W/kg)
3:	0,35 (W/kg)	6:	0,32 (W/kg)

#### (1800MHz)

1:	0,79 (W/kg)	2:	0,82 (W/kg)
3:	0,85 (W/kg)	4:	0,80 (W/kg)
5:	0,74 (W/kg)	5:	0,71(W/kg)

## B. Deney Düzenegi-II (2450 MHz)

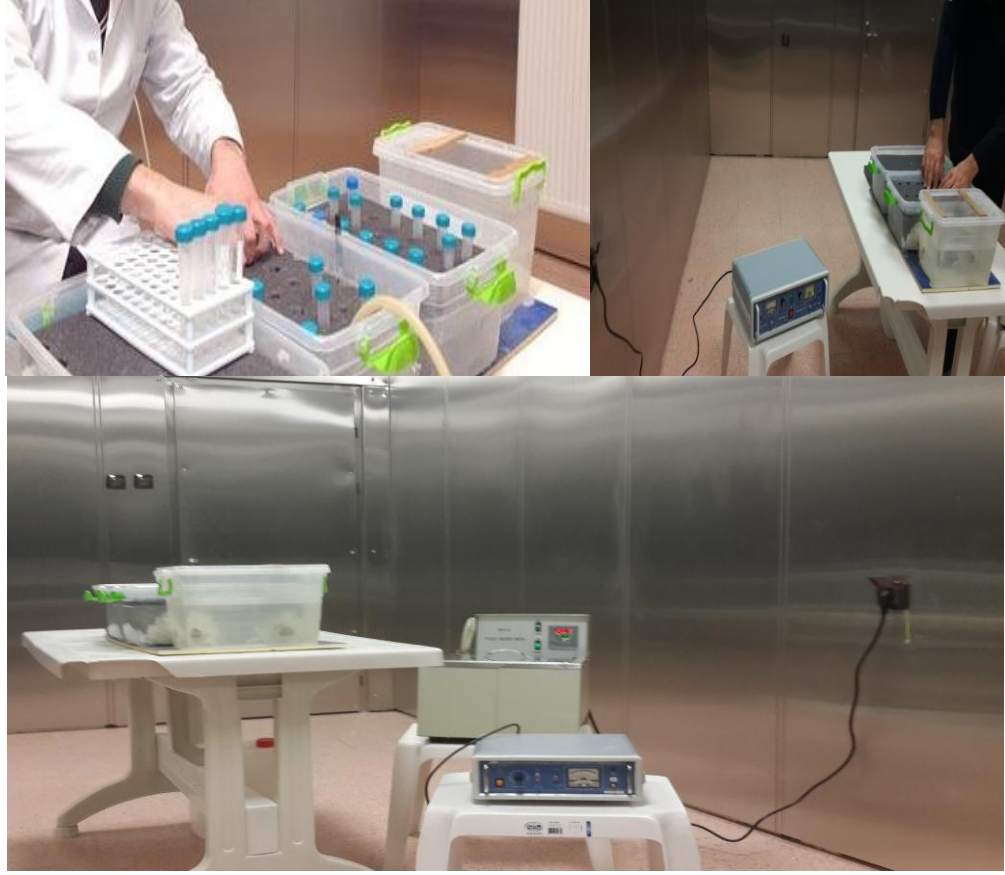


Şekil 20. 2450 MHz Transmitter ile birlikte farklı mesafelerde EMR'a maruz bıraktığımız (37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>) deney düzenegimiz

SAR değerleri (25cm) 2450 MHz:

1:	0,002	(W/kg)	4:	0,002	(W/kg)
2:	0,004	(W/kg)	5:	0,004	(W/kg)
3:	0,003	(W/kg)	6:	0,002	(W/kg)

EMR'ye maruz bırakma sisteminin detaylarına anlatacak olursak, MCF-7 meme kanseri hücreleri, yukarıda resmedildiği üzere sirkülasyon özellikli su banyosunda 37 °C'de tutulmuştur (Nazıroğlu et al., 2012c). Olası radyasyon yansımaları önlemek için özel bir oda içinde, masa ve sandalyeler de dahil tamamen plastik ekipmanlar kullanılmıştır. Dışarıdan gelebilecek harici elektromanyetik radyasyon parazitlerini engellemek için bu özel odanın duvarları 1mm kalınlığında krom-nikel alaşımli çelik ile tamamen kaplanmıştır.



**Resim 3.** 900 MHz, 1800 MHz ve 2450 MHz Elektromanyetik Radyasyon cihazları, EMR odası ve 37 °C su banyosu

EMR odası, dışarıdan gelebilecek her hangi bir radyasyon dalga parazitlerinin çalışma sonuçlarını yanlış etkilemesini önlemek için 1mm kalınlığında Nikel-Krom alaşımından oluşan çelik ile duvarları tamamen kaplanmış bir odadır. Bu EMR odası elektromanyetik radyasyona maruz bırakma deneyleri için tahsis edilmiş olup Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu (Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.D. Başkanı) tarafından bilimsel projelerden elde edilen bilimsel başarı puanları ile alınmıştır.

### C. Deney Düzenegi-III



**Resim 4.** Otomatik kuyucuk okuyucu cihazı (Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN, Avusturya)

EMR'ye maruz bıraktığımız bütün gruplarımızın Apoptoz, ROT, MTT, Kalsiyum sinyali, Kaspaz-3, Kaspaz-9 analizlerini yaptığımız otomatik kuyucuk okuma sistemimiz. Her bir kuyucuk bir defa kullanıldı ve reaksiyon esnasında renk değişimleri gözlemlendi. EMR'a maruz kalan hücrelerde gözlenen moleküler reaksiyonlar neticesinde renk değişimleri floresans okuma ile total tayin edildi.

## D. Hücre Kültürü Laboratuvarı



**Resim 5.** Hücre Kültüründeki Laminer flow cihazı ve Steril, Non-Steril İnkübatörler



**Resim 6.** Hücre kültürü laboratuvarındaki inverted mikroskoplar ve santrifüj cihazı



**Resim 7.** (-196 °C) sıvı azot tankı ve çalkalamalı su banyosu

### 3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Laminer Akım Kabini Jouan B4I (Fransa)
2. Hassas Terazî, Scaltec SPB 32 (İsviçre)
3. Soğutmalı Santrifüj, Kubota, (Japonya)
4. Derin Dondurucu, Uğur (Türkiye)
5. Inverted Floresan Mikroskop, Zeiss, Axiovert 40CFL (Almanya)
6. Otomatik Pipetler, Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7. pH metre, Hanna Instruments (Portekiz)
8. Manyetik Karıştırıcı, Nüve (Türkiye)
9. CO<sub>2</sub> İnkübatör, Heal Force, Smart Cell (Japonya)
10. Hücre Kültürü Flask, Cell Star, Greiner bio-one (Almanya)
11. 96 Kuyucuklu şeffaf mikroplate, Greiner Bio-one (Almanya)
12. 96 Kuyucuklu siyah mikroplate, Greiner Bio-one (Almanya)
13. Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN (Avusturya)
14. Vorteks, Nüve NM 100 (Türkiye)
15. Floresan Spektrofotometre: (Cary Eclipse, Varian Firması, Avustralya)
16. 2450 MHz frekansta EMR cihazı (Almanya)
17. 1800 MHz frekansta EMR cihazı (Almanya)
18. 900 MHz frekansta EMR cihazı (Almanya)

### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Fetal Bovine Serum, Merck (Almanya)
2. DMSO(Dimethyl Sulphoxide) Hybri-Max, Sigma (Almanya)
3. Falcon tüp (15 ml sterile polypropylene conical bottom Screw cap tube 92159, Biolab, Macaristan)
4. Penicillin Streptomisin
5. RPMI-1640
6. 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabı (25, 24cm<sup>2</sup>, Tissue culture flasks, TTP, İsviçre)
7. 75 cm<sup>2</sup> kültür kabı (75 cm<sup>2</sup>, Tissue culture flasks, TTP, İsviçre)
8. Penisilin-G (100 U/ml) Streptomisin (100µg/ml), (Hyclone, USA)
9. RPMI 1640 (Hyclone, USA)
10. Dihydrorhodamine-123 ( DHR-123)
11. EGTA, Merck (Almanya)
12. Triton X-100, Sigma (Almanya)
13. Fura-2 AM, Invitrogen (ABD)
14. 5,5'-Dithiobis(2-nitro-benzoic acid) (DTNB), Sigma (Almanya)
15. Caspaz-3, Sigma (Almanya)
16. Caspaz-9, Bachem (İsviçre)



### 3.1.3. Deney Grupları

**Grup I: Kontrol:** Bu gruptaki hücreler elektromanyetik alana maruz bırakılmadı. Kontrol grubundaki hücreler EMR gruplarının bulunduğu ortamda (37 °C’de 1 saat) bekletildi.

**Grup II: (900 MHz) Cep Telefonu EMR,** Bu gruptaki hücreler 0 cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm farklı mesafelerde (37 °C’de 1 saat) elektromanyetik alana maruz bırakıldı.

**Grup III: (1800 MHz) Cep Telefonu EMR:** Bu gruptaki hücreler 0 cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm farklı mesafelerde (37 °C’de 1 saat) elektromanyetik alana maruz bırakıldı.

**Grup IV: (2450 MHz) Wi-Fi EMR,** Bu gruptaki hücreler 0 cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm farklı mesafelerde (37 °C’de 1 saat) elektromanyetik alana maruz bırakıldı.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Ticari olarak Amerika Hücre Kültür Koleksiyonundan satın alınan MCF-7 insan meme kanser hücre soyları kriyovial (Cryogenic vial, Corning, ABD) kaplar içerisinde -196 °C’de sıvı nitrojen tankında saklandı. Kullanılan hücre hatlarının özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir.

#### 3.2.1.1. MCF-7 Hücre Hattı:

- İnsan meme kanseri hücre hattı
- Östrojen reseptörü (+)
- E-kaderin (+)
- Kaspaz 2: (+/-), Kaspaz 3: (-)
- Daha az oranda yayılabilen



Hücreler çoğaltılmak amacıyla sıvı nitrojen tankından alınarak 37°C'deki sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Kriyovialin içindeki hücre süspansiyonu 5 ml besiyeri içeren falkon tüpe (15 ml sterile polypropylene conical bottom Screw cap tüp 92159, Biolab, Macaristan) yavaşça aktarıldı. Tüp 800 rpm'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra (soğutmalı santrifüj cihazı, Kubota, Japonya) üstteki sıvı kısmı atıldı. Hücre pelleti 1 ml hücre besiyeri ortamı içerisinde iyice çözüldükten sonra üzerlerine 4 ml besiyeri eklendi. 5 ml'lik hücre süspansiyonları 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına (25, 24 cm<sup>2</sup>, Tissue culture flasks, TPP, İsviçre) aktarıldı. 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatör'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hücre besiyeri ortamı yenilenerek hücrelerin büyümeleri sağlandı. Kültür kabı her gün mikroskop (Inverted Floresan Mikroskop, Zeiss, Axiovert 40CFL (Almanya)) altında kontrol edildi ve hücrelerin kültür kap yüzeylerini tamamen kaplamış (konfluent) olduklarında tripsinizasyon işlemi ile daha büyük hacimli 75 cm<sup>2</sup> kültür kaplarına (75 cm<sup>2</sup>, Tissue culture flasks, TPP, Tarasadingen, İsviçre) aktarıldı. Tripsinizasyon işlemi için konfluent hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı.

Hücrelerin serumdan arındırılmak için Tuzlu Fosfat Tamponu (PBS, Dulbecco's Phosphat Buffered Saline 10x; Sigma, D1283, ABD) ile yıkandı. PBS aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere 0,5 ml tripsin solüsyonu eklenerek 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edildi. Mikroskop altında hücre kabından ayrıldığı kontrol edilen hücrelere 5 ml besiyeri ortamı eklenerek hücre süspansiyonu falkon tüpe (15 ml sterile polypropylene conical bottom blue screw

Cap, Greiner bio-one, Macaristan) aktarıldı. Tüp 800 rpm'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra üst sıvı kısmı atıldı. Elde edilen hücre pelleti 1 ml hücre besiyer ortamı içerisinde iyice çözüldükten sonra üzerlerine 9 ml besiyeri eklendi. 10 ml'lik hücre süspansiyonları 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına aktarıldı. 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda kültüre edildi. Bu şekilde hücrelerin istenilen sayıya ulaşmaya kadar çoğaltılmaları sağlandı. MCF-7 insan meme kanseri hücre soyu için %10 Fetal bovin serum (Biochrom AG, Berlin, Almanya), %1 Penisilin-G (100 U/ml) Streptomisin(100µg/ml), (Hyclone, USA) içeren RPMI 1640 (Hyclone, USA) solüsyonu kullanıldı.

### 3.2.1.2. Hücrelerin Sayılması



**Resim 8.** Biyofizik Laboratuvarında kullandığımız Casy TT system hücre sayım cihazı (Almanya)

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl CASY tüplere alındı. Bu tüpteki hücre solüsyonu üzerine ilave olarak CASY TON solüsyonu (10 ml) ilave edildi. Cihazımız ile okuma yapılmadan önce Clean düğmesine basılarak sistemin üç kez yıkanması sağlandı. Creating a new setup'tan hücremizin adı, hücre çapı, dilüsyon oranı, okuma sayısı gibi hücremize uygun gerekli prosedür uygulandı. Gerekli sistem ayarlamaları yapıldıktan sonra ikinci olarak ta Saving adjusted setup parameters'ten 0'dan 19'a kadar setup numaralarından herhangi bir numara belirlendi. Enter tuşuna basılarak her bir çalışma grubumuzda 1 ml medyumda ne kadar hücre olduğu cihazımız vesilesiyle tayin edildi.

### 3.2.1.3. Hücre İçi Kalsiyum (Ca<sup>+2</sup>) Sinyali Analizi

MCF-7 meme kanser hattı hücreleri hücre sayım cihazı (CASY Model TT System, Germany) ile sayılıp her bir kalsiyum sinyali eşit hale getirildikten sonra her bir gruptaki hücrelerin hücre içi kalsiyum salınış miktarlarının ölçümü gerçekleştirildi. Bu sebeple hücreler 37 °C'de 45 dakika boyunca (DMSO ile hazırlanmış 1mM stok solüsyondan 5µmol /L son konsantrasyona dilüe edilir) 4 µM Fura-2 AM floresan boyası ile boyandı (Min Woo Hwang and Hee jung Lee, 2013).

Bu boyanma işleminden sonra üç kez  $Ca^{+2}$ 'lu Na-HEPES (1 litre  $Ca^{+2}$ 'lu Na-HEPES solüsyonu için gram cinsinden kimyasalların miktarları, NaCl: 8.182, KCl: 0.350,  $MgCl_2$ : 0.230, HEPES: 2.383, Glukoz: 1.80 ve bunlara ilaveten  $CaCl_2$ :1ml) ile yıkandı. Yıkanan hücrelerimiz 800 rpm de 5 dakika santrifüjlendi (Nazıroğlu et al., 2012). Boyama ve ardından yıkama işlemlerinden sonra hücre yoğunluğu  $2 \times 10^6$  olacak şekilde  $Ca^{+2}$ 'lu Na-HEPES (pH 7,4) solüsyonu içerisinde otomatik çoklu kuyucuk okuyucu (Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN, Avusturya) haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, emisyon dalga boyu 505 nm olarak ayarlandıktan sonra floresan ışıklar ile uyarıldı ve kayıtlar alındı. Hücre içi serbest kalsiyum iyon değişim düzeyleri bu dalga boylarındaki eksitasyon ve emisyon değerlerinde okunarak daha önceki yayınlarda belirtildiği üzere (Uğuz et al., 2009) kaydedildi ve hesaplandı (Grynkiewicz et al., 1985).

#### **3.2.1.4. Metiltiazoltetrazolium (MTT) Canlılık Metodu**

MTT metodu ile bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Yaşayan hücrelerde mitokondride bulunan “*süksinat dehidrogenaz*” enziminin aktivitesi gözlenirken, ölen hücrelerde gözlenmemektedir. Total dehidrogenaz aktivitesi ile canlı hücre sayısı arasında doğru ilişki olduğu (Mosmann et al., 1983) tarafından gösterilmiştir. Böylece, elektromanyetik radyasyon (EMR) ortamına konulan hücreler için yanıt olarak eğer hücreler ölürse, enzim aktivitelerinin azaldığı veya kaybolduğu gözlenmektedir. Bunun için, hücreler bu enzimlerin değişime uğrattığı 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolimbromid (MTT) maddesine maruz bırakılmaktadır. Canlı hücrelerde mitokondride bulunan bu enzimin aktivitesi ile MTT boyasının tetrazolium halkası parçalanmakta, bunun sonucunda soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe (kristallerine) dönüşmektedir.

Ardından bu kristaller SDS (eritici tampon) kullanılarak suda çözünür hale getirmekte ve oluşturdukları renk şiddeti otomatik kuyucuk okuyucu (Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN, Avusturya) ile ölçülmektedir. Bu bağlamda her bir ependorf tüp içerisinde  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde hücre sayım cihazı (CASY Model TT system) ile sayılarak paylaştırıldı. Her bir tüp içerisinde

bulunan hücre solüsyonu üzerine 15 µl MTT (Metiltiazoltetrazolium) ilave edilerek bütün ependorf tüpler yavaşça çalkalanıp, 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda 90 dakika boyunca boyanmaya bırakıldı. Boyanma sonrasında bütün ependorf tüpler 800 rpm de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Her bir ependorfa 400'er µl DMSO (dimetil sülfoksit) ilave edildi. Dipteki hücre pelleti DMSO ile pipetaj yapıldı ve her bir kuyucuğa 90µl bu örnekten konuldu. Daha sonra, her bir ependorf 3'er kez olmak üzere otomatik kuyucuk okuyucu (Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN, Avusturya) cihazında 490nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki dalga boyunda okunan değerler birbirlerinden çıkartıldı.

### **3.2.1.5. Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Aktiviteleri**

Kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitelerinin tayini için, hem kontrol grubundaki hücreler hem de elektromanyetik radyasyona maruz bırakılan MCF-7 kanser hücreleri (20 mM HEPES [pH 7,4 ], 2 mM EDTA, 0,1% CHAPS, 5 mM DTT ve 8.25 µM kaspaz substratı) kimyasal maddeler ile 37 °C %5 CO<sub>2</sub> inkübatör ortamında maruz bırakıldı ve derhal okuma işlemi gerçekleştirildi. Aşağıdaki şekilde hazırlanan reaksiyon buffer'lar ve kaspaz buffer'lar kullanılarak, her bir kuyucuğa 15 µl hücre solüsyonu ve onun üzerine de 50 µl reaksiyon buffer ilave edilir. Reaksiyon buffer hazırlanırken kaspaz boyları en son ilave edildi. Kuyucuklara hücreleri paylaşırma işlemleri el çabukluğu ile ve kuyucuklara paylaştığımız hücre solüsyonlarının miktarlarına azami dikkat ederek işlem tamamlandı ve okuma işlemine geçildi. Numunelerin kuyucuklara bilinen sırasıyla yerleştirilip okuma işleminin gerçekleştirilmesi her bir çalışma için 30-45 dk. aralığında sürdü.

Özgül florojenik substrat bölünmeye istinaden kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivite hesaplamaları yapıldı. Florojenik substrat bölünme otomatik kuyucuk okuyucu spektrofluorometre cihazından 360 nm eksitasyon, 460 emisyon dalga boylarında okundu (Uğuz et al., 2009). Her bir grupta bulunan eşit miktardaki hücrelerimiz, 100 µl kalsiyum buffer ile sulandırılarak 15 µl'er paylaştırılarak 6 kuyucuğa yerleştirilerek kuyucuk okuyucu ile okumalar yapıldı. Her bir turda 15 okuma yaptırılarak deneyimizin hassasiyeti istenilen seviyeye çıkartıldı.

Bildiğimiz gibi kaspazlar apoptozis esnasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Açılımı; "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs-CASPASE" şeklindedir. Öncelikli olarak inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilirler ve hücrel hedeflerdeki tetrapeptit motifleri tanırlar ve mevcut substratı, bir karboksil tarafından ayırır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücrel ve şekilsel değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde gelişir (Wyllie AH et al., 1980, Lipponen P et al., 1994)

Okuma işleminde kuyucuk, otomatik kuyucuk okuyucu (Infinite 200 PRO TECAN, Austria GmbH Untersbergstrasse 1A, A-5082 Grödig/Salzburg AUSTRIA/EUROPE) cihazına yerleştirildi ve cihazın kapağı kapatıldı. Dalga boyları ve cihaza uyumlu programdaki diğer işaretlemeler aşağıdaki şekilde olmaktadır:

### **Reaksiyon Buffer Hazırlanışı**

#### **Kaspaz ( 3 ) Reaksiyon Buffer hazırlanışı:**

12,5 µl 1 M DTT (final konsantrasyon, 5mM)

2,5 µl NP40 (%1'likten 2,5 µl, son yüzde: % 0,0001)

2,5 µl kaspaz-3 boya

2,5 ml kaspaz-3 buffer

#### **Kaspaz (9) Reaksiyon Buffer hazırlanışı:**

2,5 µl NP40 (%1'likten 2,5 µl, son yüzde: % 0,0001)

12,5 µl 1 M DTT (final konsantrasyon, 5mM)

2,5 µl kaspaz-9 boya

2,5 ml kaspaz-9 buffer

Kaspaz Buffer hazırlanışı:

Kaspaz-3 Buffer (100ml):

0,1 M HEPES = 2,38 g, pH 7,5; % 10 sucrose = 10 g % 0,1 CHAPS= 100g, (C 9426 Electrophoresis Reagent, CAS#: 75621-03-3, Synonyms: 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]- 1-propanesulfonate, Sigma Aldrich)

**Kaspaz-9 tamponu (100ml):**

0,1 M Mes hidrat = 10 ml (M2933, 4 - Morpholineethanesulfonic acid hydrate; 2- (N - Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate, sigma Aldrich). pH 6,5

% 10 PEG [poly (ethylene glycol)], 81240, Sigma Aldrich, (CAS - No.: 25322 - 68 - 3) = 10 g, %0,1 Chaps = 100mg , % 0,1 Chaps = 100g, (C 9426 Electrophoresis Reagent, CAS#: 75621-03-3, Synonyms: 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]- 1-propanesulfonate, Sigma Aldrich)

**Plate definition:** [BD96ft\_FluoroBlok]-BD Falcon 96 Flat Transparent/Black

**Kinetic Cycle:** Number of cycle: 15, Use kinetic interval time= 00:02:00 (hh:mm:ss)

**Shaking:** Duration= 5 sec, Amplituded: 1,5mm, Mode= Orbital, Frequency=335,8 rpm

**Fluorescence Intensity:** Wavelenth: Excitation= 360 nm, Emission=460 nm, Mode = Orbital, Frequency = 335,8 rpm

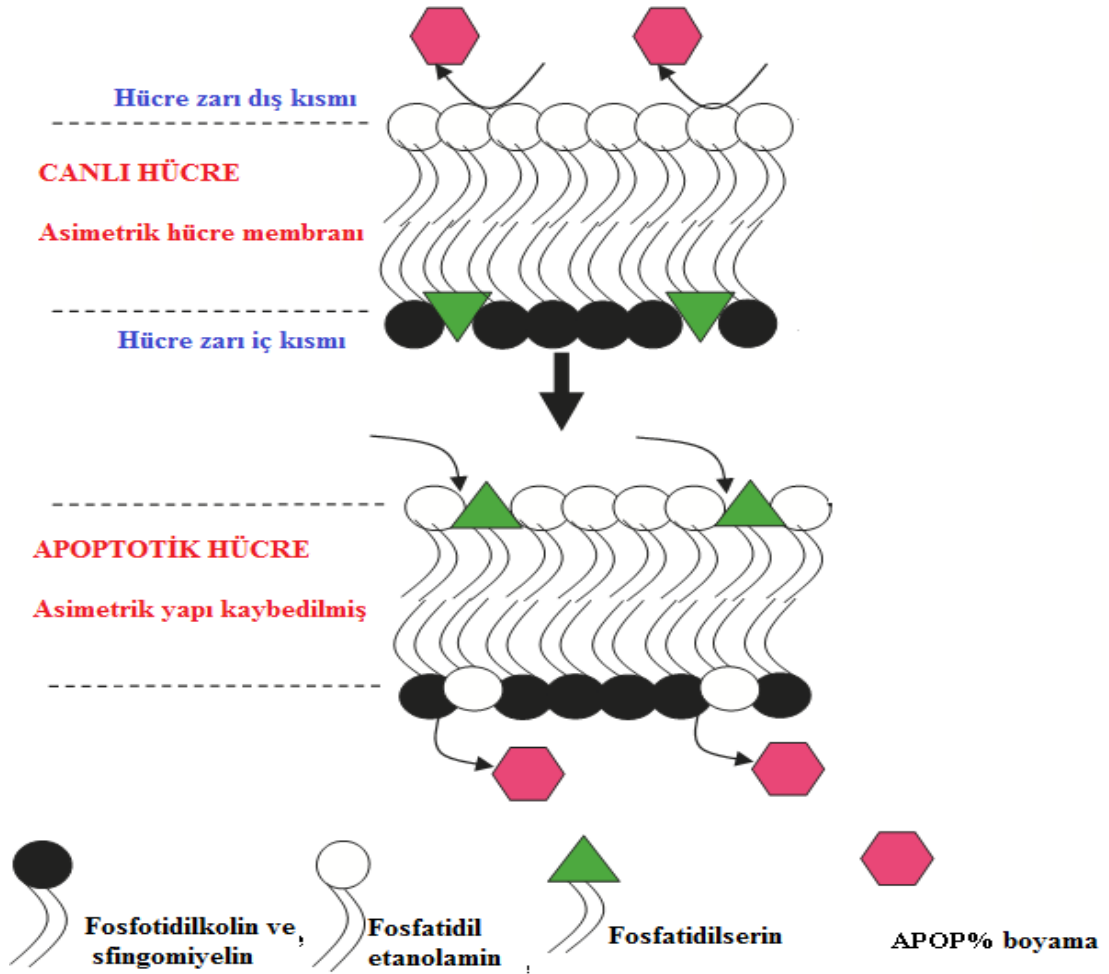
Dışardan gelen ölüm sinyallerini algılayıp içeri aktarmak için yaratılmış almaçlara ölüm almaçları denmektedir. TNFR1, CD95 ve TRAIL olarak bilinen çeşitleri vardır. Ölüm sinyalini taşıyan madde, alıcıya bağlandığında alıcılar uyarılır. Daha sonra ölüm alıcıları kümelenirler. Bu kümelenme sinyalin gücünün artırılması için önemlidir. Alıcıların hücre içine bakan yüzünde ise değişiklikler olur. Bunun neticesinde alıcının hücre içine bakan bölgesine çeşitli proteinler bağlanır ve örneğin TNFR1 almaç için DISC adlı protein kompleksini oluştururlar. İşte bu bölgelere

suskun haldeki ölüm makinelerinden kaspazlar bağlanır. Kaspazlar bu sayede aktif hale getirilir. Aktif hale gelen kaspazlar diğer kaspazları harekete geçirir ve böylece hücre ölümü başlamış olur.

### **3.2.1.6. Apoptozis Süreci**

MCF-7 meme kanseri hücreleri altı farklı mesafede (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) 1 saat boyunca elektromanyetik radyasyon'a maruz bırakıldı. APO Percentage apoptozis kiti (Biocolor, Belfast, UK) tanımına göre elde ettiğimiz hücre süpernatantı otomatik kuyucuk okuyucu (Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN, Avusturya) cihazında 550 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar grupların absorbans değerlerine göre grafik olarak ifade edildi. Kitin çalışma prensibinden bahsetmek gerekirse, sadece apoptozis sürecine giden hücreler tarafından oluşturulacak olan renk değişimi prensibine dayanmaktadır.

Apoptotik süreci başlamamış hücrelerin hücre zarından boya geçemez, apoptotik süreci başlamış, diğer bir ifade ile hücre zarı asimetrisi bozulmuş hücrelerin zarından boya rahatlıkla geçebilmektedir. Böylece kit içerisindeki boya apoptozis süreci başlatılan hücre grubunun bireylerinin sitoplazmaları içerisinde birikir ve biriken bu boya yine kitin içerisinde hazır olan boya salar madde ile inkübasyon ortamına geçmesi sağlandı. Hücrelere ilk önce apoptotik ajan ilave edildi. Daha sonra kitin içerisinde bulunan özel boya ile boyandılar, yeterli inkübasyon sürecinden sonra yine kitin içerisinde bulunan boya salıcı madde ilavesinden sonra hücreler yıkandı, taze mediumları ile homojenize edildi ve süpernatant otomatik kuyucuk okuyucu cihazında 550 nm değerinde okundu.



Şekil 21. Apoptotik bir hücrenin hücre zarı reaksiyonları. (Biocolor, APOPercentage apoptozis kiti)

### 3.2.1.7. Hücre içi ROT (Reaktif Oksijen Türleri) Analizi

Bütün gruplardaki MCF-7 hücre süspansiyonu DHR-123 (dihydrorhodamine) final konsantrasyonu 2  $\mu\text{M}$  olacak şekilde ayarlandıktan sonra 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında PBS ilave edilerek 800 rpm de 5 dakika santrifüjlenerok okuma yapılmadan önce yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu yıkama işlemini yapmamızın sebebi 30 dakika boyanma süresini aşmamak ve okuma hassasiyetini etkilememek içindir. Bütün gruplarımızdaki boyanmış ve yıkama işlemi gerçekleştirilmiş hücrelerimizi 96 kuyucuklu floresans okumalar için kullanılan mikro plate kuyucuklarına yerleştirildi. Hücre içerisine boyama süresince giren DHR-123 boyanın rhodamine-123 (Rh-123) kısmı hücre içindeki oksidasyon ile aktive edilerek floresan özellik göstermeye başlamaktadır. Rh-123 (rhodamine-123) maddesinin total miktar analizi ise 488nm eksitasyon ve 543 nm emisyon dalga



boylarında otomatik kuyucuk okuyucu (Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN, Avusturya) aracılığı ile yapıldı.

### **3.2.1.8. İstatistiksel Analiz**

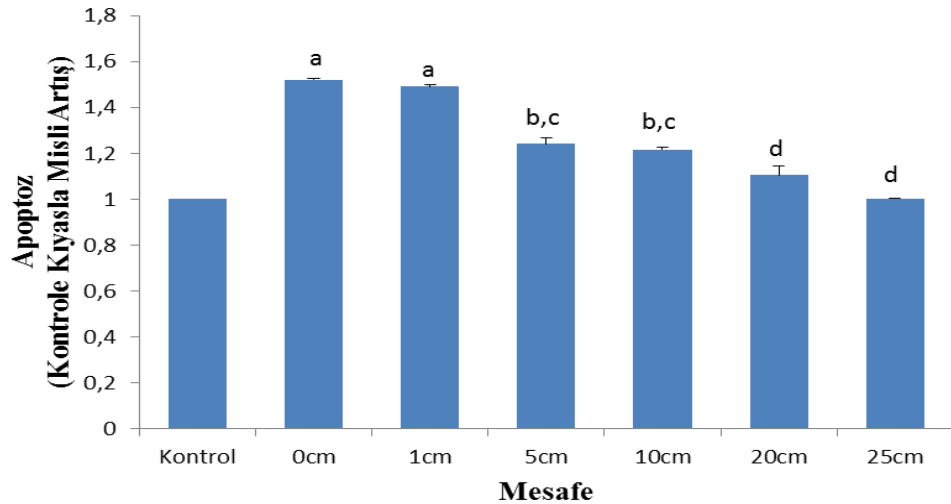
Bütün veriler ortalama  $\pm$  standart sapma [mean  $\pm$  standard deviation (SD)] olarak verildi. MCF-7 hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS lisanslı paket bilgisayar programı (version 17.0 software, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA ) kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplarda istatistiksel anlamlılık nonparametrik testlerden '2 Independent test' kullanılarak tespit edildi. Daha sonra gruplardaki istatistiksel önemler Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. İstatistiksel karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyleri ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  ve  $p < 0,05$ ) olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre Ölümü (APOPTOZİS) Sonuçları

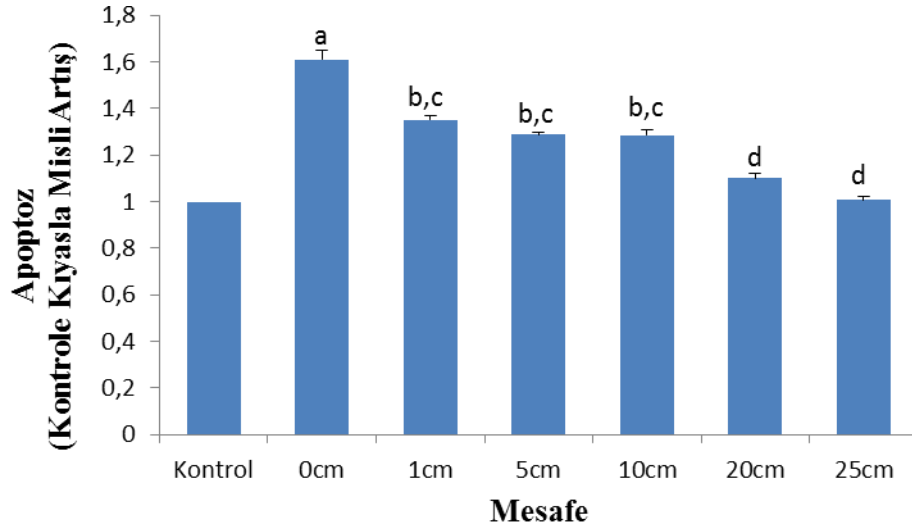
#### 4.1.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde, 900, 1800 ve 2450 MHz EMR Frekanslarının ve Mesafenin Apoptozis Üzerine Etkileri

Apoptozis değerleri (900, 1800 ve 2450 MHz EMR frekanslarının neden oldukları) sırasıyla Grafik 1, Grafik 2 ve Grafik 3'te gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, apoptozis düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla, (( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )) bütün mesafe gruplarında (0 cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm ve 25 cm) elektromanyetik radyasyon kaynağından uzaklaştıkça önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte 900 MHz ve 2450 MHz gruplarında 0 cm ve 1 cm mesafelerde apoptozis düzeyi hemen hemen eşit olmakla birlikte, değerlerde 1 cm sonrasında önemli ölçüde düşüş gözlemlendi. 1800 MHz grubunda ise 0 cm mesafede maksimum apoptozis seviyesi görülmekle birlikte 0 cm sonrasında değerlerde düşüş gözlenmektedir. Diğer bir ifadeyle, apoptozis düzeyleri kontrol grubuna kıyasla bütün gruplarda EMR kaynağından uzaklaştıkça ( $p < 0.05$ ) önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, en fazla azalma oranı en uzak mesafede (25 cm) ( $p < 0.05$ ) gözlenmiştir.

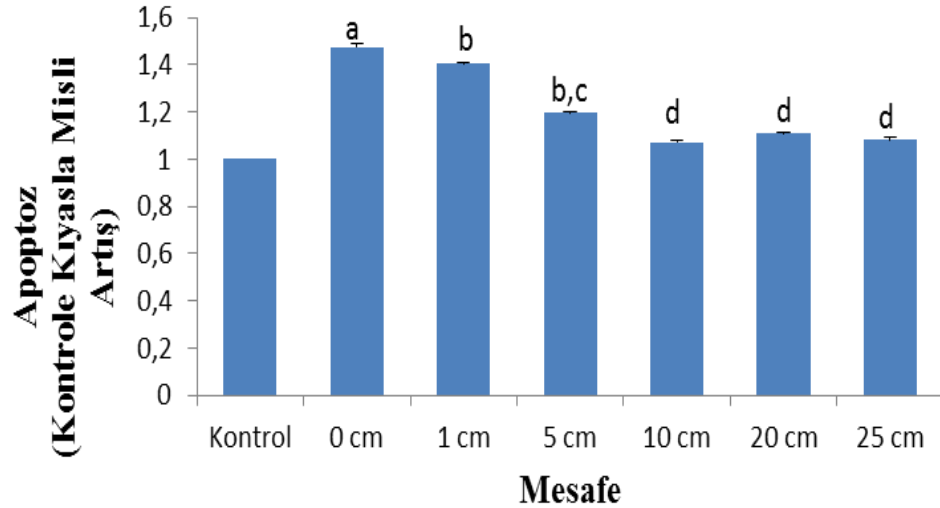


**Grafik 1.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol, 0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) Apoptozis aktiviteleri üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).

<sup>a</sup> $p < 0.001$  ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>b</sup> $p < 0.01$  ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>c</sup> $p < 0.05$  ve 0 cm grubuna kıyasla, <sup>d</sup> $p < 0.01$  ve 0 cm grubuna kıyasla.



**Grafik 2.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 1800 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol, 0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) Apoptozis aktiviteleri üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).



**Grafik 3.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 2450 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol, 0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) Apoptozis aktiviteleri üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).

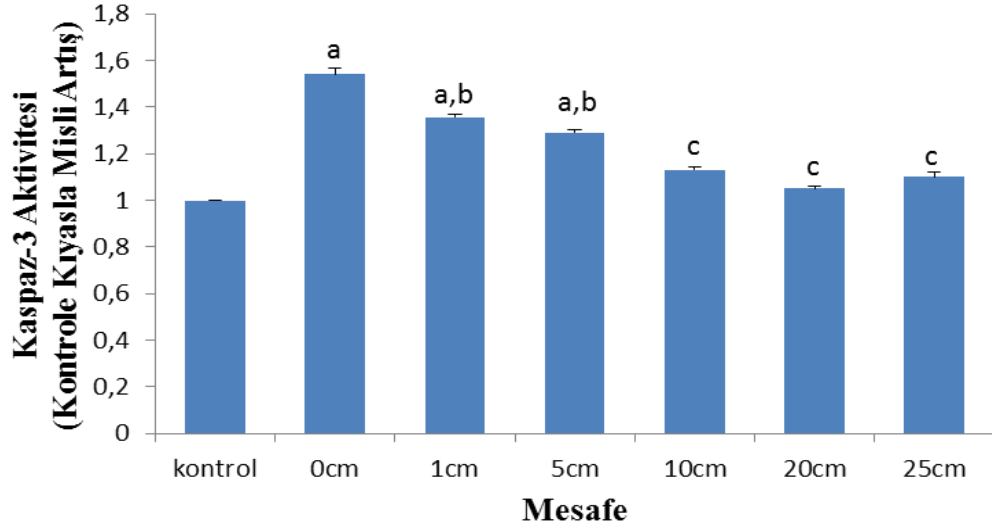
<sup>a</sup>p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>b</sup>p<0.01 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>c</sup>p<0.05 ve 0 cm grubuna kıyasla, <sup>d</sup>p<0.01 ve 0 cm grubuna kıyasla.

## 4.2. KASPAZ-3 Aktivitesi

### 4.2.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde, 900, 1800 ve 2450 MHz EMR Frekanslarının ve Mesafenin Kaspaz-3 Aktivitesi Üzerine Etkileri

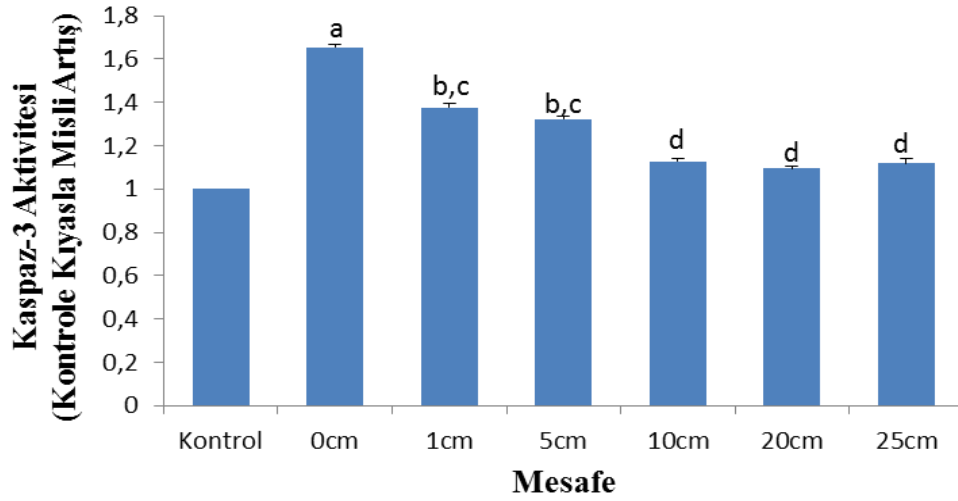
Kaspaz-3 düzeyleri Grafik 4, Grafik 5, Grafik 6'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında her üç grupta da (900 MHz, 1800 MHz ve 2450 MHz) mesafe arttıkça kaspaz-3 değerlerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde [(p<0.001, p<0.01, p<0.05)] azalma olduğu gözlemlendi. Genel olarak incelendiği zaman yakından uzağa

doğru mesafeler 5 cm'ye gelinceye kadar önemli ölçüde azalma gözlenmekle birlikte 5 cm sonrasındaki azalış sabit seyirde devam etmektedir.

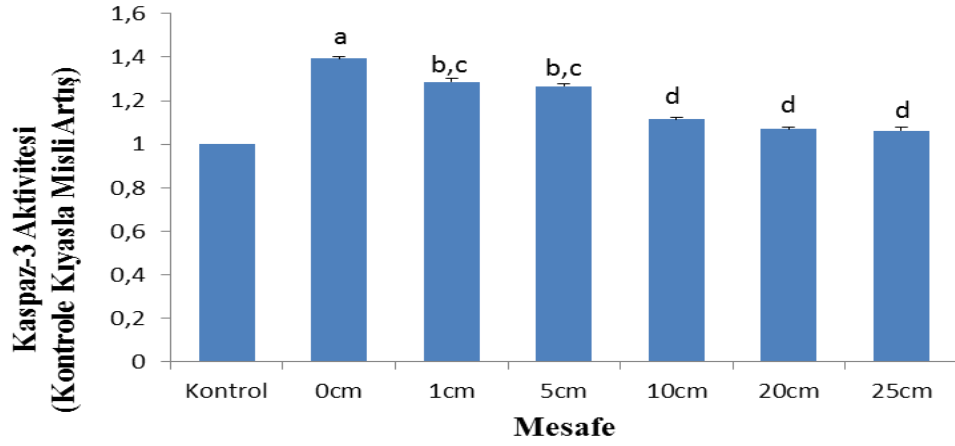


**Grafik 4.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol,0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kaspaz-3 aktiviteleri üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).

<sup>a</sup>p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>b</sup>p<0.01 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>c</sup>p<0.05 ve 0 cm grubuna kıyasla, <sup>d</sup>p<0.01 ve 0 cm grubuna kıyasla.



**Grafik 5.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 1800 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kaspaz-3 aktiviteleri üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).



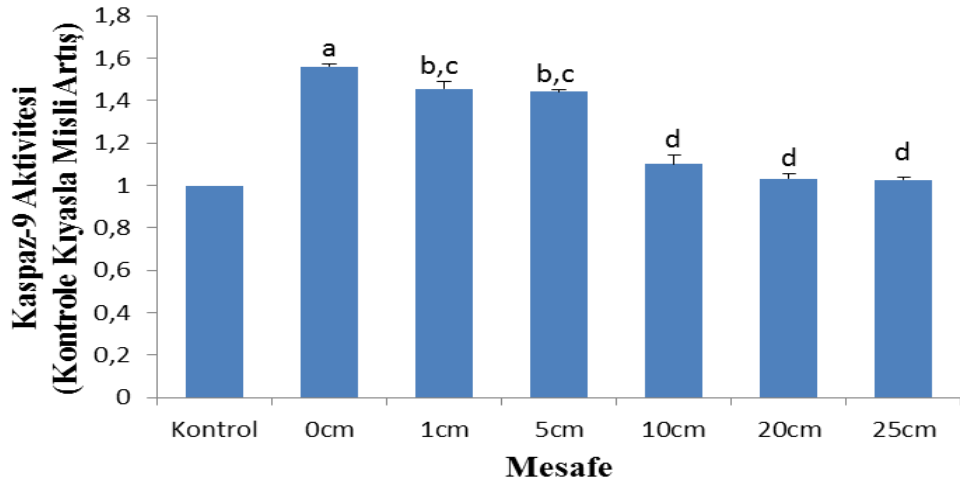
**Grafik 6.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 2450 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol, 0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kaspaz-3 aktiviteleri üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).

<sup>a</sup>p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>b</sup>p<0.01 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>c</sup>p<0.05 ve 0 cm grubuna kıyasla, <sup>d</sup>p<0.01 ve 0 cm grubuna kıyasla.

### 4.3. KASPAZ-9 Aktivitesi

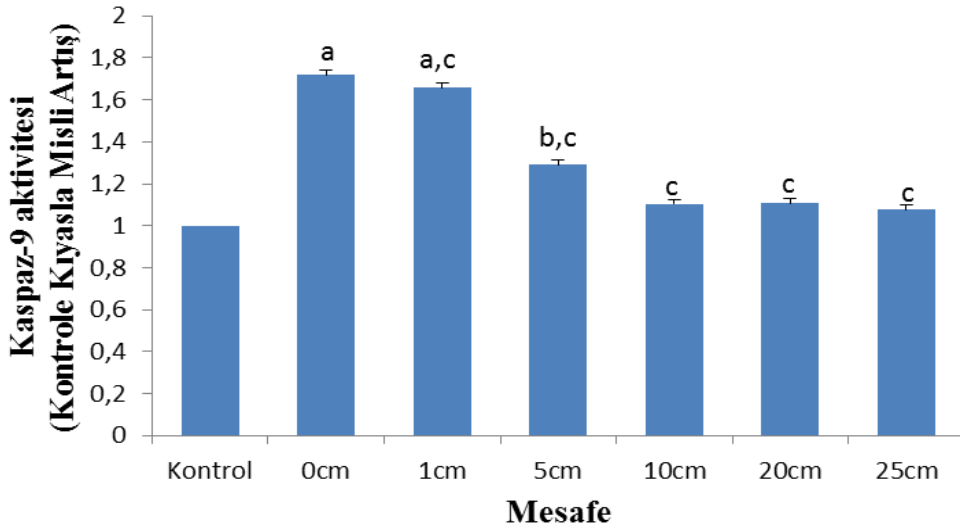
#### 4.3.1. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900, 1800 ve 2450 MHz EMR frekanslarının ve mesafenin Kaspaz-9 aktiviteleri üzerine etkileri

Kaspaz-9 düzeyleri Grafik 7, Grafik 8, Grafik 9'da gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde bütün gruplarda (900 MHz, 1800 MHz, 2450 MHz) mesafeler arttıkça yani elektromanyetik radyasyon kaynağından uzaklaştıkça kaspaz-9 seviyelerinde azalma gözlemlendi (p<0,05). Başka bir ifade ile hücrenin programlı ölümü olarak da ifade edilen apoptozisi netice verecek kademeli reaksiyonlardan önemli bir kademe olan kaspaz-9 düzeyleri mesafenin artırılmasıyla önemli ölçüde azalarak, elektromanyetik radyasyonun hücreyi apoptozise sürüklerken mesafenin buna engel olduğu gözlemlendi. Özellikle de bütün gruplarda dikkatimizi çeken şey ilk üç mesafedeki (0cm, 1cm, 5 cm) kaspaz-9 düzeylerindeki büyükten küçüğe doğru önemli seviyede değerlerde azalış oldu. 10 cm ve daha büyük mesafelerde azalma seyrinde düşüş tespit edildi.

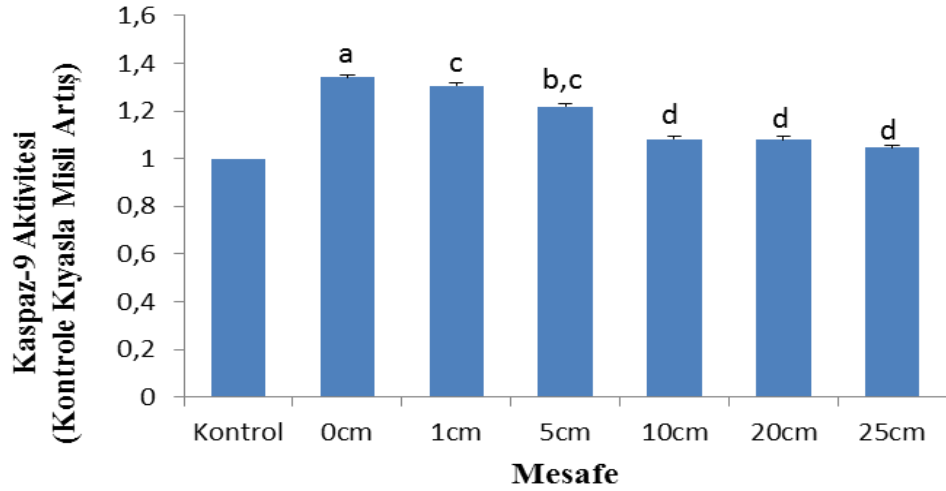


**Grafik 7.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol,0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kaspaz-9 aktiviteleri üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).

<sup>a</sup>p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>b</sup>p<0.01 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>c</sup>p<0.05 ve 0 cm grubuna kıyasla, <sup>d</sup>p<0.01 ve 0 cm grubuna kıyasla.



**Grafik 8.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 1800 MHz EMR ve farklı mesafelerin (0 cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kaspaz-9 aktiviteleri üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).



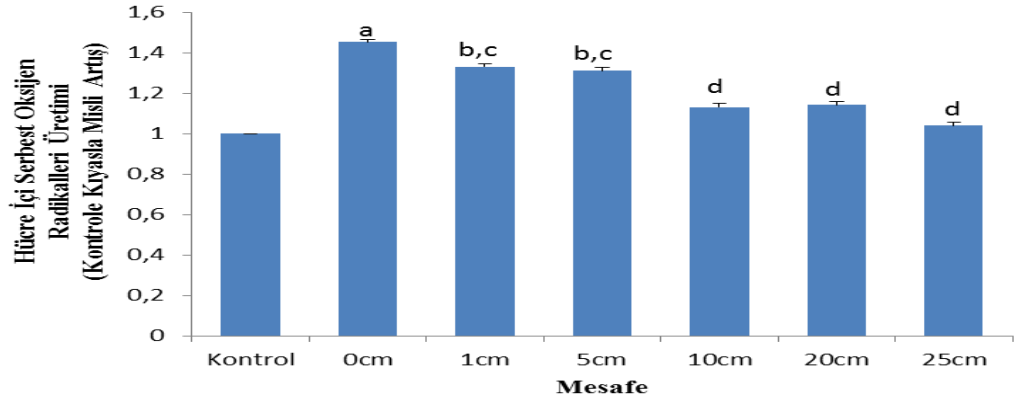
**Grafik 9.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 2450 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kaspaz-9 aktiviteleri üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).

<sup>a</sup>p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>b</sup>p<0.01 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>c</sup>p<0.05 ve 0 cm grubuna kıyasla, <sup>d</sup>p<0.01 ve 0 cm grubuna kıyasla.

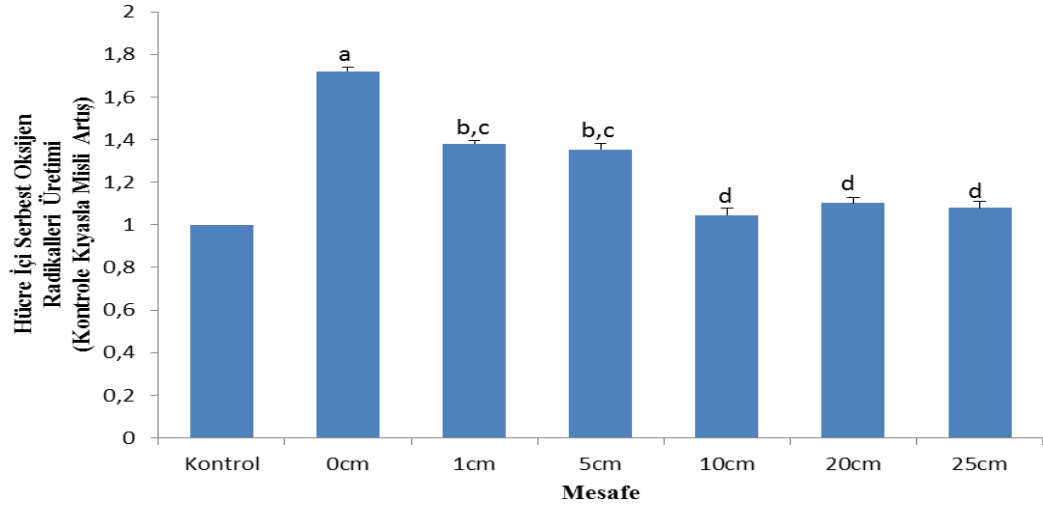
#### 4.4. Hücre İçi Serbest Oksijen Radikalleri (ROT) Üretimi

##### 4.4.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde, 900, 1800 ve 2450 MHz EMR Frekanslarının ve Mesafenin Hücre İçi Serbest Oksijen Radikalleri Üretimi Üzerine Etkileri

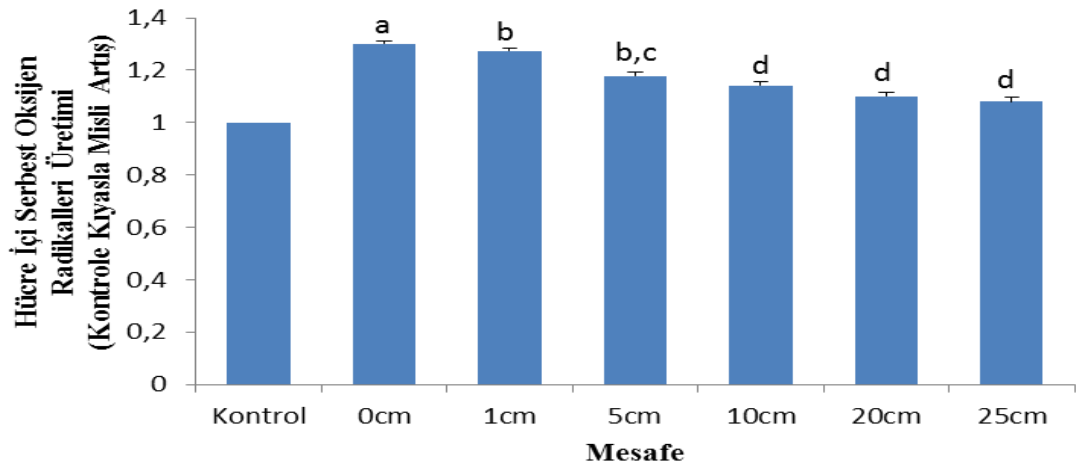
Reaktif oksijen türleri düzeyleri, Grafik 10, Grafik 11 ve Grafik 12 de gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde üç grupta da (900 MHz, 1800 MHz ve 2450 MHz) elektromanyetik kaynağa olan mesafeler azaldıkça ROT seviyeleri önemli düzeyde artış gösterdi ( $p<0.001$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ). MCF-7 hücrelerinde ROT seviyeleri mesafe arttıkça 900 MHz ve 1800 MHz gruplarında belirgin bir şekilde 2450 MHz grubunda ise kısmi bir azalma gözlemlendi. Gruplardan 900 MHz grubunda 1 cm den itibaren keskin ve anlamlı bir azalma oldu. Bunun yanı sıra 1800 MHz grubunda ise ilk üç mesafe olan 0cm, 1 cm ve 5 cm mesafelerde ciddi bir azalma söz konusu iken 10cm ve daha büyük mesafelerde kontrole kıyasla değerlerde istatistiksel olarak fark gözlenmedi fakat 0 cm'ye kıyasla anlamlı fark gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Son grubumuz olan 2450 MHz'de ise mesafe artışıyla ters orantılı bir azalış olmakla beraber bu azalış diğer iki gruba kıyasla daha hafif oldu. Genel olarak baktığımız zaman bütün gruplarda 10 cm'ye kadar hücre içi reaktif oksijen türleri değerleri, elektromanyetik radyasyon sebebiyle artış gösterdiği tespit edildi.



**Grafik 10.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) ROT (Reaktif Oksijen Türleri) aktiviteleri üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).



**Grafik 11.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 1800 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) ROT aktiviteleri üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).



**Grafik 12.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 2450 MHz EMR farklı mesafelerin (kontrol, 0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) ROT aktiviteleri üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).

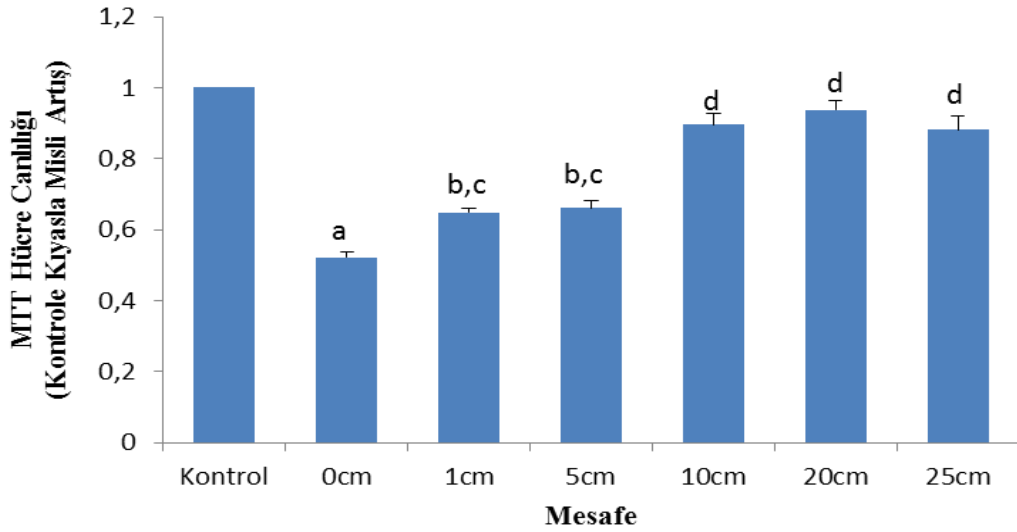
<sup>a</sup>p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>b</sup>p<0.01 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>c</sup>p<0.05 ve 0 cm grubuna kıyasla, <sup>d</sup>p<0.01 ve 0 cm grubuna kıyasla.



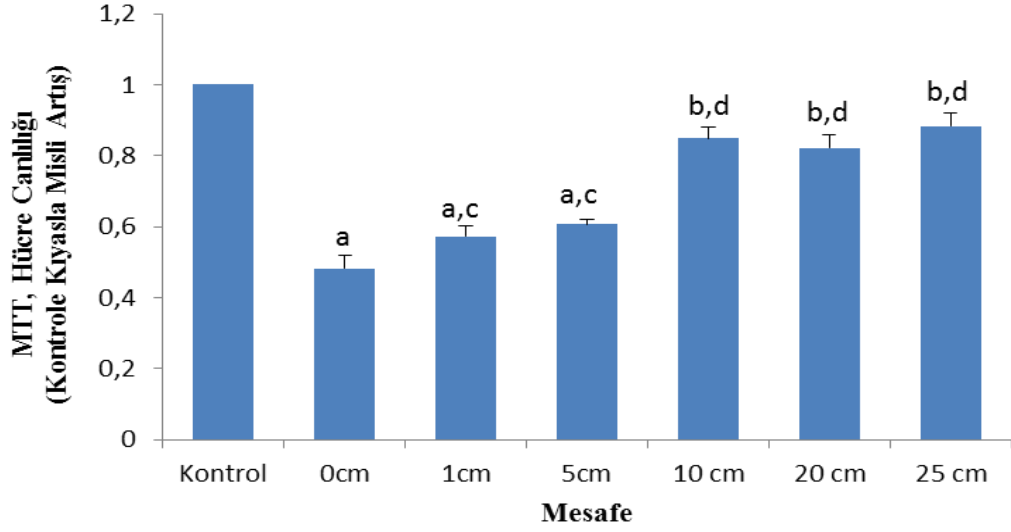
#### 4.5. MTT (Hücre Canlılığı)

##### 4.5.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde, 900, 1800 ve 2450 MHz EMR Frekanslarının ve Mesafenin MTT Hücre Canlılığı Değerleri Üzerine Etkileri

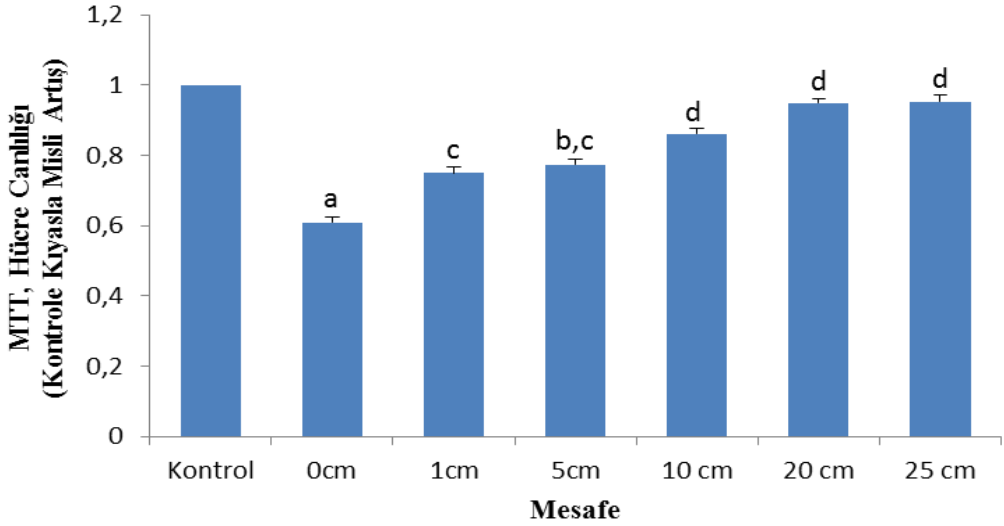
MTT değerleri Grafik 13, Grafik 14 ve Grafik 15 te gösterilmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde EMR kaynağına olan mesafeler azaldıkça yani elektromanyetik radyasyon kaynağına yaklaştıkça bütün gruplarda (900 MHz, 1800 MHz ve 2450 MHz), 0cm 1 cm ve 5 cm mesafelerde hücre canlılığı değerlerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde ( $p<0,001$ ) azalış olduğu gözlemlendi. EMR kaynağından uzaklık olarak 10 cm ve daha büyük mesafelerde kontrole kıyasla istatistiksel anlamlılıkta fark bulunamadı. Cep telefonu (900 MHz, 1800 MHz) ile en az 1 saat konuşmak veya kablosuz interneti (2450 MHz) en az 1saat kullanmak önemli ölçüde hücre canlılığını azaltmakla birlikte mesafenin artışıyla bu oran önemli ölçüde düşerek korunmada mesafenin önemli bir rolü olduğunu gösterdi.



**Grafik 13.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) MTT Hücre Canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).



**Grafik 14.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 1800 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) MTT Hücre Canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).



**Grafik 15:** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 2450 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) MTT Hücre Canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD ve n=4).

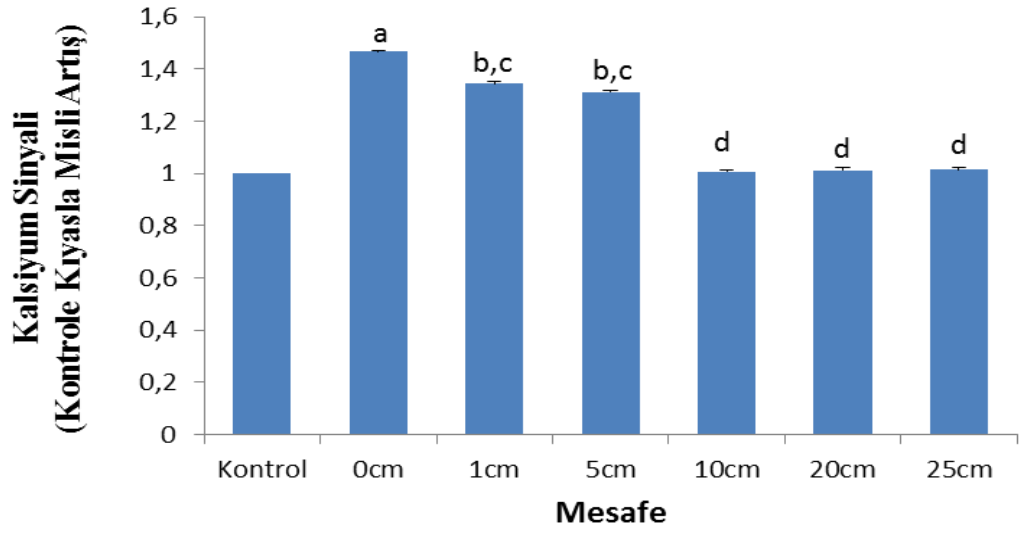
<sup>a</sup>p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>b</sup>p<0.01 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>c</sup>p<0.05 ve 0 cm grubuna kıyasla, <sup>d</sup>p<0.01 ve 0 cm grubuna kıyasla.

#### 4.6. Kalsiyum (Ca<sup>+2</sup>) Sinyali

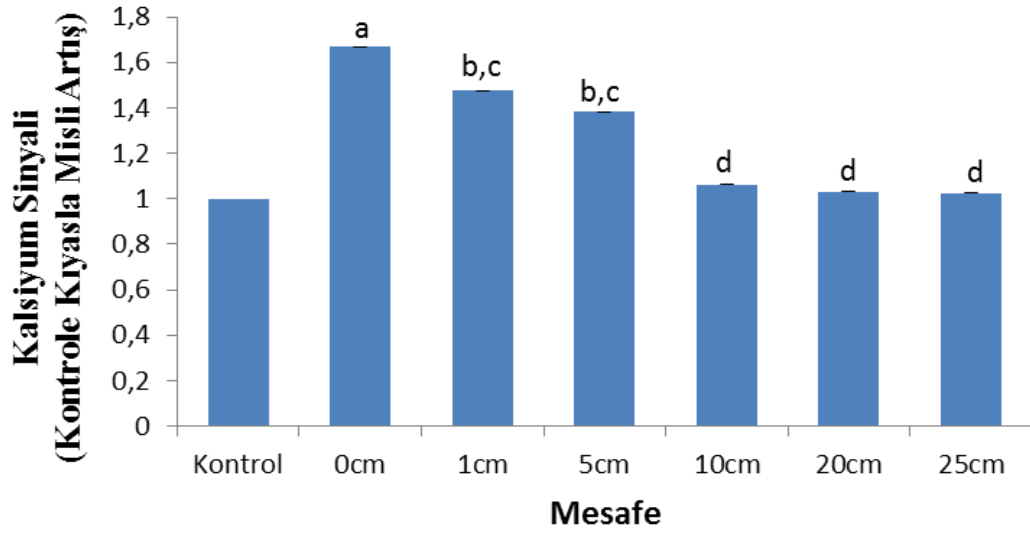
##### 4.6.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde, 900, 1800 ve 2450 MHz EMR Frekanslarının ve Mesafenin, Kalsiyumlu Solüsyonlarda Kalsiyum (Ca<sup>+2</sup>) Sinyali Değerleri Üzerine Etkileri

Hücre içi Ca<sup>+2</sup> düzeyleri, Grafik 16, Grafik 17, Grafik 18, Grafik 19, Grafik 20 ve Grafik 21 de gösterilmiştir. Hücreler Casy TT hücre sayıcı sistemle sayılıp

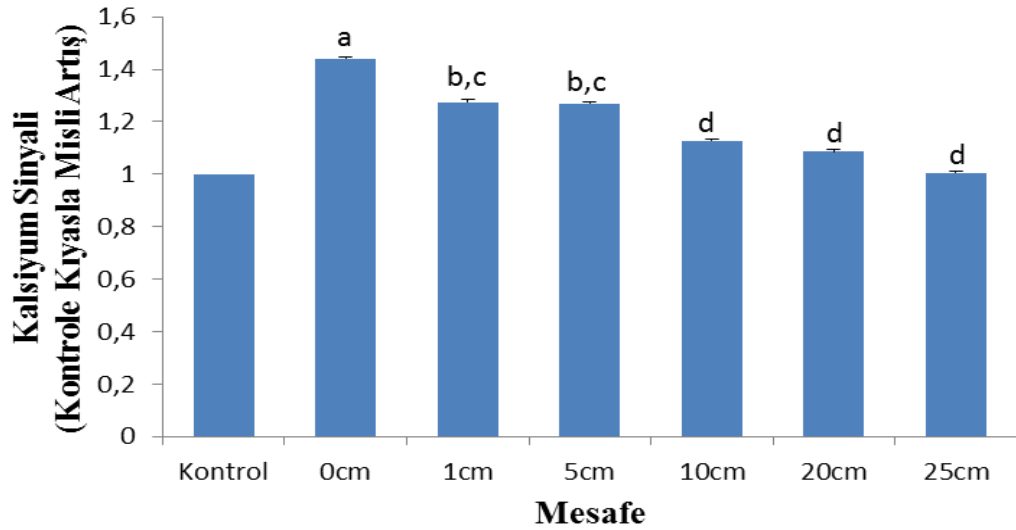
eşitlendikten sonra  $Ca^{+2}$  sinyali yapılmıştır. Hücre solüsyonu olarak hem kalsiyumlu solüsyonlar kullanılarak yapılmıştır. Bu sonuçlar incelendiğinde  $[Ca^{+2}]_i$  düzeyi bütün gruplarda (900 MHz, 1800 MHz ve 2450 MHz), 0cm, 1 cm ve 5 cm mesafelerde elektromanyetik radyasyon kaynağına yaklaştıkça kontrole kıyasla ( $p<0,001$ ) kalsiyum akışı artmaktadır. EMR kaynağından uzaklaştıkça sitozole kalsiyum iyonu akışı azalmakta olduğu belirlendi. 10 cm ve daha büyük mesafelerde ise kontrol grubuna kıyasla bütün gruplarda istatistiksel olarak fark gözlenmedi fakat bu mesafelerde ( $\geq 10$  cm), 0 cm mesafe hücre grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı (0,05) fark tespit edildi.



**Grafik 16.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 900 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kalsiyum buffer ile  $Ca^{+2}$  sinyali değerleri üzerine etkileri (ortalama $\pm$ SD ve n=4).



**Grafik 17.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 1800 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm) kalsiyum buffer ile  $Ca^{+2}$  sinyali üzerine etkileri (ortalama $\pm$ SD ve n=4).



**Grafik 18.** MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, 2450 MHz EMR farklı mesafelerin (0cm, 1 cm, 5 cm, 10 cm, 20 cm, 25 cm ) kalsiyum buffer ile  $Ca^{+2}$  sinyali üzerine etkileri (ortalama $\pm$ SD ve n=4).

<sup>a</sup>p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>b</sup>p<0.01 ve kontrol grubuna kıyasla, <sup>c</sup>p<0.05 ve 0 cm grubuna kıyasla, <sup>d</sup>p<0.01 ve 0 cm grubuna kıyasla.

## 5. TARTIŞMA

Teknolojinin her geçen gün baş döndürücü bir hızla gelişmesiyle, pek çok avantajlar sağladığı için hayatımıza giren ve olmazsa olmazımız haline gelen cep telefonlarının (900 MHz ve 1800 MHz), kablosuz internet ağlarının (2450 MHz) acaba kanserli hastaların bulunduğu ortamlarda bu cihazların yaydığı radyasyon, moleküler boyutta hücre sel apoptozis, ROT, kalsiyum sinyali, MTT, protein vb. değerlerini nasıl etkiler, oksidatif stresi tetikler mi? ve korunmak için mesafenin önemi nedir? Sorularından yola çıkarak bu yüksek lisans tez çalışmasını yapmaya karar verdik. Bu tez çalışması, kanser hücrelerinde elektromanyetik radyasyona maruziyetinin moleküler düzeyde çalışıldığı nadir çalışmalardandır. Çalışmamızda elektromanyetik radyasyonun uygulamaları hücre canlılığı testi olan MTT yöntemi sonucunda bulunan süre olan bir saat olarak uygulandı.

Kablosuz yerel alan ağ sistemleri (WLAN), iş merkezlerinde, evlerde ve kamuya mahsus alanlarda iletişim ve bilgi alışverişinde kablolu internete alternatif olmaktadır. Kablosuz yerel ağlar, gündelik yaşamımızda klinik, akademik çevrelerde insan sağlığı üzerinde olası riskler taşımaktadır (Nazıroğlu et al., 2013). Bu endişe WLAN sinyallerine maruz kalmanın olası biyolojik etkilerini daha fazla araştırmayı gerekli kılmaktadır (Mailanko et al., 2009). En son deliller hem iyonize radyasyonun hem de iyonize olmayan radyasyonun oksidatif stresi tetiklediğini göstermektedir (Gul et al., 2009, Esmekaya et al., 2011). Fakat EMR maruziyetinin serbest radikallerin ortamda artışını tetiklediğine dair sınırlı bilgiler mevcuttur (Nazıroğlu., 2013).

Kalsiyum iyonu ( $Ca^{+2}$ ) sinirsel uyarılabilme ve hücre çoğalması dahil olmak üzere çok sayıda fizyolojik olaylardan sorumlu önemli bir ikincil habercidir (Nazıroğlu, 2007; Espino et al., 2009, Espino et al., 2010, Espino et al., 2011). Epilepsinin indüksiyonunun  $Ca^{+2}$ 'a bağlı olduğu çok iyi bilinmektedir. Bazı çalışmalar göstermiştir ki hipokampal nöronlarda  $Ca^{+2}$  girişi ile oksidatif stres ve EMR maruziyeti arasında, bazı çalışmaların sonuçlarıyla uyum sağlamasalar bile (Platano et al., 2007, O'Connor et al., 2010) bir korelasyon bulunmaktadır (Manikonda et al., 2007, Ammari et al., 2008).

Hücre zarı kalsiyum kanal ailelerinden biri olan TRP katyon kanalları yedi tane alt aileden oluşur ki bunlardan sadece bir tanesi TRPV dir (Nazıroğlu., 2011, Nazıroğlu et al., 2012). TRPV1 tipi kanal ise seçici olmayan bir iyon kanalıdır, merkezi ve periferik nöronlarda bir hayli fazla bulunur (Caterina et al., 1997).

Oksidatif stres, fagosit ve mitokondriyal fonksiyonlar gibi fizyolojik olaylar sırasında meydana gelir, apoptozis, mitokondriyal depolarizasyon ve hücreye kalsiyum girişi yoluyla katyon kanalları ve sitozolik ikincil habercilerin aktivasyonuna neden olur (Kovacic et al., 2008, Nazıroğlu., 2009, Espino et al., 2012). TRPV1 yüksek ısı (43 °C), kapsaisin (CAP, kırmızı acı biberde bulunan bir maddedir) ve oksidatif stres gibi fiziksel uyaranlarla aktive olur (Susankova et al., 2006, Nazıroğlu., 2011). Son zamanlarda yapılan çalışmalarla dorsal kök gangliyon (DRG) hücrelerinde TRPV1 katyon kanalının aktivasyonun sebebiyle artan hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonu  $[Ca^{+2}]_i$ , oksidatif stres ve apoptotik hücre hasarına neden olmaktadır (Nazıroğlu et al., 2013). TRPV1 kanallarının artan ekspresyon ve fonksiyonları epileptik hastaların hipokampüslerinde yakın zamanlarda rapor edilmiştir (Sun et al., 2013). Son zamanlarda yapılan hayvan deneyleri göstermiştir ki epilepsinin indüksiyonunda TRPV1'in rolü büyüktür (Bhaskaran et al., 2010; Manna et al., 2012). Hipokampal nöronlarda epilepsinin ana sebebi hücre içi kalsiyum iyon konsantrasyonunun aşırı artması ile ortamda ROT'nin oluşmasıdır (Nazıroğlu., 2009). Hala moleküler mekanizmaları net olmamakla birlikte 900 MHz EMR 'a maruz kalan nöronal hücrelerde aşırı ROT üretimi olmuş ve hücre içine  $Ca^{+2}$  girişi gözlenmiştir (Piacentini et al., 2008).Yine başka bir çalışmada 900 MHz EMR 'nun deri ve kulak sıcaklığında artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Bortkiewicz et al., 2012).

Bu nedenlerle 900MHz, 1800 MHz ve 2450 MHz EMR maruziyeti ile ısıya duyarlı TRPV1 katyon kanalları aktive edilirse dolayısıyla hücre içine aşırı kalsiyum girişi tetiklenmiş olabilir. İşte bu yüzden oksidan bir etkiye sahip olan EMR TRPV1 kanallarında apoptozis, oksidatif stres ve kalsiyum iyonunun hücre içine akışını tetikleyebilir. Bildiğimiz kadarıyla MCF-7 meme kanser hücrelerinde EMR maruziyeti ile oluşturulan bir oksidatif stres modeli içeren çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmamızda ilk kez MCF-7 hücrelerinde 1 saat süreyle EMR maruziyeti (900 MHz, 1800 MHz ve 2450 MHz) sonucunda 0 cm, 1 cm 5 cm 10 cm 20 cm ve 25 cm mesafelerde apoptozis, kaspaz-3, kaspaz-9, MTT, kalsiyum sinyali analizleri yapılmıştır. Yapılan birçok çalışma ile biyolojik sistemlerin radyasyona karşı hassas olduğu tespit edilmiştir (Aweda, 2003, Cruozier et al., 2007). Bazı çalışmalarda da evlerde çok yaygın kullanılan mikro dalga fırın, cep telefonları, kablosuz internet (Wi-Fi) ve bilgisayarlar gibi radyasyon yayıcı cihazların kansere bile sebep olacağı gösterilmiştir (Omura et al., 1993). EMR' a maruz kalmanın sonuçlarından bir tanesi de ROT (reaktif oksijen türleri) ürünlerinden olan süperoksit anyon, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) üretimini artırır (Aweda, 2003 ve Murphy et al., 1993). Bu serbest radikaller EMR maruziyeti neticesinde artırılabilceği tahmin edilmekle birlikte mekanizması hücrel ve moleküler olarak hala tam olarak anlaşılabilmiş değildir (Irmak et al., 2002, Kim et al., 2004).

EMR'nin, endojen antioksidan savunma sisteminin koruma kapasitesine zarar vererek oksidatif stresi arttırdığını (Irmak et al., 2002) ve oluşan reaktif oksijen türlerinin hücre zarı ve lipoproteinlerindeki çoklu yağ asitleri ile etkileşime girip, lipit peroksidasyon sürecini başlattığını gösterdi (Eroğlu et al., 2006). Oluşan oksidatif strese bağlı aşırı serbest radikal üretimi başta voltaja duyarlı kalsiyum kanalları olmak üzere birçok kanalı uyararak sitozole kalsiyum akışını daha da uyarmaktadır. Bunun sonucunda, mitokondrinin daha fazla depolarize olması sonucu serbest radikallerin üretimi daha da artmaktadır. Bu olay apoptozise kadar gitmektedir (Irmak et al., 2003). Çalışmamızda, 0 cm mesafede bütün gruplarda (900 MHz, 1800 MHz ve 2450 MHz), sitozole kalsiyum iyonu  $[Ca^{+2}]_i$  salınımı kontrol, gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Ayrıca, EMR kaynağından uzaklaştıkça, sitozole  $Ca^{+2}$  akışının azaldığı, apoptozis ile Kaspaz değerlerinin azaldığı ve mitokondriyal depolarizasyon değerlerinin azaldığı gözlemlendi. Bu durum, radyasyon kaynağına yakın mesafelerde EMR maruz kalmanın sitozole  $Ca^{+2}$  akışını artırarak mitokondriyal depolarizasyon sonucu serbest oksijen radikallerinin üretimi artışı ve apoptozisin uyarıldığı sonucunu göstermektedir. EMR'nin yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak EMR'nin apoptozis yollarını tetiklediğini düşündürdü (Irmak et al., 2002).

Ca<sup>+2</sup> iyon homestazı, hücrelerin çok önemli fonksiyonlarından biridir. Hücrelerin çoğalması, apoptozise uğraması, oksidatif stresin indüksiyonu ve fizyolojik sinyal iletimi gibi çeşitli fonksiyonlar Ca<sup>+2</sup> iyon homestazının bir parçasıdır (Putney., 2009). Sitozolik serbest kalsiyum iyon konsantrasyonu [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>, membrana bağımlı olan hem plazma hem de intrasellüler membranda lokalize edilmiş birçok iyon kanalları tarafından kontrol edilmektedir. Transient Receptor Potential (TRP) ailesi bu kanallardan biridir ve bu kanallar önemli nonselektif katyon kanallarıdır (Nazıroğlu., 2011). Bu kanalların alt aile üyesinden olan TRPV1 ise kapsaisin ile aktive edilebilen ve aynı zamanda ısıya duyarlı (43 °C) bir katyon kanalıdır. Elektromanyetik radyasyonun termal etkileriyle alakalı sıcaklık değişikliklere sebep olduğu rapor edilmiştir (Adair, 1999). EMR maruziyetin sıcaklık üzerindeki etkileri 450 MHz ve 2450 MHz frekanslarda insanın çeşitli dokularında, toplam kan akışı incelemelerinde ve deride olup sıcaklık artışına sebep olduğu rapor edilmiştir (Adair et al., 1999). Bu konuda incelendiğinde birçok gelişmiş metotlar kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda genellikle farelere karosel tipinde (papatya yaprakları modeli gibi) EMR maruziyeti uygulanmış ve kan, doku vs. analizleri yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında oksidatif stresin neden olduğu apoptozisi önlemede ve hücre canlılığını devam ettirmede 1'er saat ve 0 cm, 1cm, 5cm, 10cm, 20cm ve 25 cm farklı mesafelerde elektromanyetik radyasyona maruz bırakılan hücrelerde mesafenin kontrole kıyasla koruyucu etkileri araştırıldı. Apoptotik hücre ölümü ve hücre canlılığı test sonuçlarında bu maruziyet neticesinde mesafenin arttırıldıkça istatistiksel anlamlılıkta (p<0.001, p<0.01, p<0.05) önemli düzeyde zararlı etkinin azaldığı gözlemlendi. Bizim bilgilerimize göre, MCF-7 hücrelerinde farklı frekans ve mesafelerde elektromanyetik radyasyona maruziyet ile hücrelerin apoptotik düzeyinin araştırıldığı çalışma henüz mevcut değildir. Bu sonucumuz EMR'nin oksidatif stres parametrelerinin moleküler düzeyde araştırıldığı çalışma sonuçlarıncada doğrulandı (Gul et al., 2009, Nazıroğlu, 2013).

ROT, mitokondriyal respirasyon ve fagositik immün savunma yolları gibi hücresel fizyolojik fonksiyonlar süresince meydana gelir (Nazıroğlu, 2007). EMR tarafından baskılanan antioksidanlarla da oksidatif stres oluşma ihtimali vardır (La



vignera et al., 2012). 2450 MHz EMR yayan cihazlar, biyolojik sistemlerde serbest radikalleri artırmaktadır (Nazıroğlu et al., 2012). Günümüzde endüstriyel, bilimsel, tıbbi, askeri, yerel birçok alanda bu 2450 MHz radyasyon yayan cihazlar çevresel radyasyon sızıntısı potansiyeli taşımaktadır (Cruozier et al., 2007). ROT, serbest radikal zincir reaksiyonları tarafından üretilmektedir. Bu durum bazen otomatik olarak tetiklenmektedir. Serbest oksijen radikalleri, kanser hücrelerinde yağlar, proteinler ve nükleik asitlerle tepkimeye girerek hasara yol açmalarının yanı sıra antioksidanları tüketmektedirler (Reuter et al., 2010).

Bir manyetik alan elektronların enerji düzeylerini ve spin oryantasyonlarını değiştirebilir ve sonuç olarak serbest radikallerinin aktivasyon ve konsantrasyonunu artırır ve de ömrünü uzatır. Çeşitli raporlarda EMR'nin özellikle Fenton tepkimesi yoluyla hücre içi serbest radikalleri artırdığı tespit edilmiştir. Fenton reaksiyonu hidrojen peroksitin, mitokondrideki oksidatif solunum bir ürünü olan ve çok toksik etkiye sahip serbest hidroksil radikaline dönüştüğü katalitik bir süreçtir (Birsenki et al., 2011). Uzun süreli maruziyetler de dahil olmak üzere EMR'a maruziyet sonucunda serbest radikallerin oluşumunun artması kanser oluşumunun biyolojik mekanizması olarak değerlendirilebilir. Bu ihtimal özellikle güç hattına yakın mesafelerde yaşayanlarda çocukluk çağı kanser riski ve meslek gereği uzun süreli maruz kalan insanlarda lösemi ve beyin tümörü riskinin artmasına neden olur. Organlarda fakat özellikle de lenf düğümlelerinde ve kemik iliğinde ROT (reaktif oksijen türlerinin) artması genellikle lenfoma, lösemi ve hatta meme kanseri riskini artırabilir (Lai et al., 2004). Hücrelerdeki çeşitli antioksidan mekanizmalar ROT' nin zararlı etkilerini nötralize etmektedir. Bununla birlikte EMR'a maruziyet neticesinde antioksidan mekanizmalarının etkinliğini yitirmesi ve mitokondriyal elektron transfer zincirinin değişmesinden dolayı ROT artmaktadır (Kovacic and Somanathan, 2008). Bu tez çalışma sonuçlarında, hücre içi ROT üretim miktarlarının 900, 1800 ve 2450 MHz EMR maruz kalmanın radyasyon kaynağına yakın mesafelerde kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, MCF-7 hücrelerini EMR a maruz bırakarak oluşturduğumuz oksidatif stres modelinde, mesafenin oksidatif stresten koruyucu etkilerinin olduğu, hücre apoptozisi baskıladığı, sitozole  $Ca^{+2}$  salınışını azalttığı bulundu. Ayrıca,

Kapsaisin ile stimule ettiğimiz kanser hücrelerinde kontrole kıyasla, EMR gruplarında olduğu farz edilen oksidatif stres ve hücre içi  $Ca^{+2}$  serbestlenişi bozuklukları teşhis edildi ve bununla beraber mesafenin değişmesi nedeniyle de değerlerde ekstra bir iyileşme söz konusu olduğu gözlemlendi. Çalışmamız, kanser hücrelerinde moleküler boyutta yapılan analizler neticesinde kablosuz internet ve cep telefonlarının zararlı etkisini tespit etmiştir ve bu haliyle çalışmamız hali hazırda elektromanyetik radyasyonun zararlı etkisinin teşhis edildiğine dair birçok yayınları desteklemektedir (Nazıroğlu et al., 2013; Ozorak et al., 2013). Elektromanyetik radyasyonun kanser hücreleri üzerinde moleküler ve hücresel mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır fakat bu kapsamlı moleküler düzeydeki tez çalışmamız, ileride yapılacak uzun soluklu çalışmalara ışık tutması bakımından manidardır. Daha uzun süreli deney hayvanları çalışmalarıyla (3-5 yıllık) daha da sağlıklı ve anlamlı sonuçlar alınacağı anlaşılmaktadır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında sonuç olarak 900 MHz, 1800 MHz ve 2450 MHz farklı üç frekanslarda hücre içi serbest radikallerde artış gözlenmiş olup yapılan apoptozis testi, ROT, kaspaz-3 ve kaspaz-9 testleri, MTT ve  $Ca^{+2}$  sinyali moleküler analizleri incelendiğinde 0 cm mesafede analiz sonuçları kontrole kıyasla önemli düzeyde artmış olup bu değerler EMR kaynağından uzaklaştıkça azalmıştır. Mesafe olarak 10 cm sonrasındaki değerlerde değişme çok az olmaktadır.

Çevremizde gerek baz istasyonları gerekse kablosuz internet ağ bağlantıları mevcut bulunduğundan, istesek de istemesek de radyasyona maruz kalmaktayız. Evimizde, iş yerimizde kendimiz kullanmadığımız halde bilgisayarımızdan Wi-Fi bağlantı tuşunu açtığımız zaman onlarca farklı isimlendirilmiş kablosuz ağlar karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte kullandığımız ve artık olmazsa olmazımız haline gelen, elimizden düşmeyen cep telefonları, sağlığımızı çok ciddi olarak tehdit etmektedir. Günümüz insanların teknoloji çağı mağdurları olarak yaşlılık sürecini düşünmek bile istemiyorum. Kanseri oranının artması, stres depresyon vakalarının yaygınlaşması teknolojinin dezavantajları olarak karşımıza çıkmaktadır. Eski insanlarımız çok daha sağlıklı olduğu için genelde sebebini sorduğumuzda 'eski toprak' tabiriyle cevap verilir, sağlıklı olmalarına fitri kaynaklarla beslenmeleri ve teknolojiden uzak kalmış olmaları sebep olarak gösterilirdi.

Sonuç olarak mademki teknolojinin, kullanmak zaruri hale gelmiş cihazlarından kurtulmak mümkün değil, kablolu kulaklıklar kullanarak veya hoparlörden uzak mesafeden (çalışma sonuçlarımıza göre 10 cm mesafe ideal) konuşarak ve kablolu interneti tercih ederek zararı en asgari hale getirebiliriz.

## ÖZET

### **Cep telefonu (900 MHz ve 1800 MHz) ve Kablosuz İnternetin (2450 MHz) Neden Olduğu Elektromanyetik Radyasyona Maruz Bırakılan Kanser Hücrelerinde Kalsiyum Sinyali, Apoptozis ve Oksidatif Stres Değerleri Üzerine Mesafenin Etkileri**

Cep telefonlarının ve kablosuz internetin (Wi-Fi) neden olduğu elektromanyetik radyasyonun (EMR) kanserli hücrelerin moleküler mekanizmaları üzerine olumsuz etkileri olduğu tahmin edilmekle beraber bunu bilimsel verilerle ortaya koyan çalışma sayısı henüz yetersizdir. TRPV1 katyon kanalları oksidatif stres, yüksek ısı ( $\geq 43$  °C) ve kırmızı biberde fazla bulunan kapsaisin ile aktive olurlar. İyonize olmayan radyasyonunda dokularda ısınmaya neden olduğu iyi bilinmektedir. Hücre içi kalsiyum iyon ( $Ca^{+2}$ ) dengesi çok önemli olup, hücre içerisinde serbest  $Ca^{+2}$  iyon artışı aynı zamanda serbest oksijen radikalleri (ROT) ve apoptozis oranlarını artırmaktadır. Wi-Fi ve cep telefonu frekansları ısınma veya oksidatif stres artışıyla TRPV1 kanallarını aktive ederek, hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarı, ROT ve apoptozis değerlerini artırarak kanser hücrelerine zarar veriyor olabilir. Bu tez çalışmasında kanser hücre kültürü ortamında cep telefonu (900 MHz, 1800 MHz) ile Wi-Fi (2450 MHz) EMR'nin, hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyleri, ROT üretimi, hücre canlılığı, apoptozis, kaspaz 3 ve -9 aktiviteleri üzerinde mesafenin koruyucu rolü araştırıldı

MCF-7 insan meme kanseri hücre hattının kullanıldığı çalışmamızda hücreler sayılarak şu şekilde 4 farklı grup oluşturuldu. Tüm gruplar aynı ortamda (37 °C ve 1 saat) tutuldular.

A-Kontrol grubu: Aynı hücre kültürü ortamında tutuldular fakat EMR maruz bırakılmadılar.

B- 900 MHz grubu: 0 cm, 1cm, 5cm 10cm 20cm 25cm mesafelerde EMR maruz bırakıldı.

C- 1800 MHz grubu: 0 cm, 1cm, 5cm 10cm 20cm 25cm mesafelerde EMR maruz bırakıldı.

D- 2450 MHz grubu: 0cm, 1cm, 5cm 10cm 20cm 25cm mesafelerde EMR maruz bırakıldı.

Her mesafeden sonra hücreler alınarak analiz edildiler ve her deney 4-6 kez tekrar edildiler. Araştırma sonuçlarında, hücre içi ROT üretimi ve  $Ca^{+2}$  seviyeleri, apoptozis, kaspaz-3 ve -9 değerleri, kontrol grubuna kıyasla EMR uygulanan (B, C ve D) gruplarda 0cm, 1cm ve 5cm yüksek iken hücre canlılığı değeri ise düşük olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, bu değerlerin mesafelerin değişmesiyle giderek azaldığı ve hücre canlılığı değerinin ise arttığı gözlemlendi. 10 cm mesafeden başlayarak EMR kaynağından uzaklaştıkça kontrol (A) ve EMR grupları (B, C ve D) arasında fark olmadığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, (900 MHz, 1800 MHz, 2450 MHz) EMR'nin neden olduğu hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyleri, oksidatif stres ve apoptozis artışını önlemede radyasyon kaynağından 10 cm ve daha uzak mesafelerin koruyucu rolünün olduğu gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Cep telefonu, kablosuz internet (Wi-Fi), kalsiyum iyonu, oksidatif stres, apoptozis, meme kanseri

## ABSTRACT

### **Effect of Different Distances and Electromagnetic Radiation caused by Mobile Phones (900 MHz and 1800 MHz) and Wireless Internet (2450 MHz) on Calcium Signalling, Apoptosis and Oxidative Stress Values in Cancer Cells**

Nowadays, mobile phones (900 and 1800 MHz) and wireless internet (Wi-Fi, 2.45 GHz) are widely used although they are estimated to have a negative impact by electromagnetic radiation (EMR) is not only in healthy cells but also cancer cells and on the molecular mechanisms of these cells, the number of which demonstrating studies with scientific data is still not well clarified yet. TRPV1 is a  $\text{Ca}^{2+}$  permeable and non-selective channel, gated by noxious heat ( $\geq 43$  °C), oxidative stress and capsaicin (CAP). Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increase through TRPV1 channel activation may induce cytosolic reactive oxygen species (ROS) production and apoptosis in cancer cells. In the theses study, we aimed to investigate protective effects of EMR from mobile phones and Wi-Fi on calcium signalling, cytosolic ROS production, cell viability, apoptosis, caspase-3 and -9 values in the breast cancer cells.

In the current study MCF-7 human breast cancer cell lines were used. The cells were divided into four main groups. All cells were cultured in same culture medium (37 °C) and time (one hour).

A-Control groups: The cells were not exposed to EMR but they were incubated in same cell culture medium.

B- 900 MHz group: Cells in the groups were exposed to 900 MHz EMR at different distances (0 cm, 1cm, 5cm, 10cm, 20cm and 25cm).

C- 1800 MHz group: Cells in the groups were exposed to 1800 MHz EMR at different distances (0 cm, 1cm, 5cm, 10cm, 20cm and 25cm).

D- 2450 MHz group: Cells in the groups were exposed to 2450 MHz EMR at different distances (0 cm, 1cm, 5cm, 10cm, 20cm and 25cm).

All the analyses at different distances were repeated 4-6 times. The cytosolic ROS production and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations, and apoptosis, caspase-3 and caspase-9 values were higher in 0cm, 1cm and 5 cm EMR (B, C and D) groups than in control although cell viability values were increased. There was no statistical significance on the values among the groups.

In conclusion, EMR (900 MHz, 1800 MHz, 2450 MHz) till 10 cm of radiation source induced excess amount of oxidative stress,  $\text{Ca}^{2+}$  influx, apoptosis, caspase-3 and -9 values. Uses of cell phones and Wi-Fi radiation sources which are far from 10 cm may useful protection against oxidative stress, apoptosis and  $\text{Ca}^{2+}$  entry in breast cancer cells.

**Keywords:** Mobile phone, Wireless internet (Wi-Fi), Calcium Signalling, Oxidative stress, Apoptosis, Breast Cancer

## KAYNAKLAR

- Adey WR, Tissue interactions with nonionizing electromagnetic fields, *Physiological Reviews*, 1981; 61 (2): 435– 514.
- Akoev GN, Avelev VD, Semenjkov PG. Reception of low-intensity millimeter-wave electromagnetic radiation by the electroreceptors in skates. *Neuroscience* 1995; 66 (1):15-17.
- Ammari M, Lecomte A, Sakly M, Abdelmelek H, de-Seze R. Exposure to GSM 900 MHz electromagnetic fields affects cerebral cytochrome c oxidase activity. *Toxicology J* 2008; 250(1):70-74.
- Aynali G, Nazıroğlu M, Çelik Ö, Doğan M, Yarıktaş M, Yasan H. Modulation of wireless (2.45 GHz)-induced oxidative toxicity in laryngotracheal mucosa of rat by melatonin. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013; 270(5):1695-1700.
- Bank U, Reinhold D, Ansorge S. Measurement of cellular activity with the MTT test. Optimization of the method. *Allerg. Immunol. (Leipz)* 1991; 37:119-123.
- Bejarano I, Terrón MP. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation. *Mol Cell Biochem.* 2007; 296(2): 77-84.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature* 1998; 395(6703): 645-648.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4(7): 517-529.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science.* 2000;287(5458): 1604-1605.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(1): 11-21.
- Berridge MJ. Capacitative calcium entry. *Biochem J.* 1995; 312(Pt 1): 1-11.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 1993; 361(6410): 315-325.
- Betto R, Teresi A, Turcato F, Salviati G, Sabbadini RA, Krown K, Glembotski CC, Kindman LA, Dettbarn C, Pereon Y, Yasui K, Palade PT. Sphingosylphosphocholine modulates the ryanodine receptor/calcium-release channel of cardiac sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochem J.* 1997; 322 (Pt 1):327-333.

- Blettner M, Schlehofer B, Breckenkamp J, Kowall B, Schmiedel S, Reis U, Mobile phone base stations and adverse health effects: phase 1 of a population-based, cross-sectional study in Germany. *Occupational and Environmental Medicine*, 2009; 66: 118–123.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003;91: 179-194.
- Boitano S, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science*. 1992; 258(5080): 292-295.
- Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol*. 2002; 12(16): 563-565.
- Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol*. 2001; 12(1): 3-10.
- Boring CC, Squires TS, Tong T: Cancer statistics 1993. *C.A. Cancer J Clin* 1993; 43: 4-26.
- Bornstein BA, Cheng CW, Rhodes TM et al., Can simulation measurements be used to predict the irradiated lung volume in the tangential fields in patients treated for breast cancer? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18: 181-187.
- Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K, Birnbaumer L. Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96(26): 14955-14960.
- Canan S, Aktaş A, Ulkay MB, Colakoglu S, Ragbetli MC, Ayyildiz M, Geuna S, Kaplan S. Prenatal exposure to a non-steroidal anti-inflammatory drug or saline solution impairs sciatic nerve morphology: a stereological and histological study. *Int J Dev Neurosci*. 2008; 26(7): 733-738.
- Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* 1999; 11: 77-85.
- Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003 ; 426: 517-524.
- Claus EB, Risch N, Thompson WD: Autosomal dominant inheritance of early onset breastcancer: implications for risk prediction. *Cancer* 1994; 73(3): 643-651.
- Coble JB, Dosemeci M, Stewart PA, Blair A, Bowman J, Fine HA, Shapiro WR, Selker RG, Loeffler JS, Black PM, Linet MS, Inskip PD. Occupational exposure to magnetic fields and the risk of brain tumors. *Neuro Oncol* 2009; 11: 242-249.

- Craviso G L, Poss J, Lanctot C, Lundback S S, Chatterjee I, Publicover N G. Intracellular calcium activity in isolated bovine adrenalchromaffin cells in the presence and absence of 60 Hz magneticfields, *Bioelectromagnetics* 2002; 23: 557–567.
- Crompton M. Mitochondria and aging: a role for the permeability transition? *Aging Cell* 2004; 3: 3-6.
- Cullen PJ. Bridging the GAP in inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate signalling. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1436(2): 35-47.
- Davanipour Z, Tseng C C, Lee P J, Sobel E, A case control study of occupational magnetic field exposure and Alzheimer’s disease: results from the California Alzheimer’s Disease Diagnosis and Treatment Centers, *BMC Neurology*2007; 7(13): 35-42.
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15(4): 316-328.
- Derin D, Yazıcı A, Erkoç Ş. Şizofrenik Bozukluğu Olan Hastalarda Serbest Radikal Metabolizması ve Nonenzimatik Antioksidan Savunma Sistemi Elemanlarının incelenmesi. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2001; 11: 174-182.
- Dinçer M, Meme koruyucu cerrahi ve mastektomi sonrası adjuvan radyoterapi. Meme Kanseri, İstanbul Üniversitesi *Onkoloji Enstitüsü Yayınları* 1997;3: 262.
- Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, Schaller M, Raju U, Milas L, Chen D J, Kehlbach R, Rodemann H P. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 31182–31189.
- Dolder C, Nelson M, Deyo Z. Paliperidone for schizophrenia. *Am J Health-Syst Pharm.* 2008; 65: 403-13.
- Dufour JF, Arias IM, Turner TJ. Inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium regulate the calcium channel function of the hepatic inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem.* 1997; 272(5): 2675-81.
- E. Barbier, B. Dufy, B. Veyret, Stimulation of Ca<sup>2+</sup> influx in ratpituitary cells under exposure to a 50 Hz magnetic field, *Bioelectromagnetics* 1996; 17: 303–311.
- Elliott P, Toledano MB, Bennett J, Beale L, de Hoogh K, Best N, Briggs DJ. Mobile phone base stations and early childhood cancers: case-control study. *BMJ* 2010; 340: 3077.
- Endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation, *EMBO Rep.* 2005; 10: 942–948.



- Erden M, Bor NM. Changes of reduced glutathione, glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. *Biochemical Med.* 1984; 31: 217-27.
- Erden M. Changes of hexose monophosphate pathway and methemoglobin reductase enzyme activity after radiation guinea pigs. *Comp Biochem Physiol.* 1987; 86: 629-633.
- Erogul O, Oztas E, Yildirim I, Kir T, Aydur E, Komesli G, Irkilata HC, Irmak MK, Peker AF. Effects of electromagnetic radiation from a cellular phone on human sperm motility: an in vitro study. *Arch Med Res.* 2006; 37(7): 840-843.
- Fanelli C, Coppola S, Barone R, Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca<sup>2+</sup> influx. *FASEB J.* 1999; 13(1): 95–102.
- Fernyhough P, Calcutt NA. Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. *Cell Calcium.* 2010; 47(2): 130-139.
- Fernyhough P, Gallagher A, Averill SA, Priestley JV, Hounsom L, Patel J, Tomlinson DR. Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. *Diabetes.* 1999; 48(4): 881-889.
- Fillingham J, Keogh MC, Krogan NJ. GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochem Cell Biol.* 2006; 84(4): 568-577.
- Fischer LR, Glass JD. Oxidative stress induced by loss of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) or superoxide-generating herbicides causes axonal degeneration in mouse DRG cultures. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(2): 249-259.
- Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain.* 2004; 109(1-2): 150-161.
- Forssen UM, Rutqvist LE, Ahlbom A, Feychting M. Occupational magnetic fields and female breast cancer: a case-control study using Swedish population registers and new exposure data. *Am J Epidemiol* 2005; 161: 250-259.
- Ganther HE. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis.* 1999; 20(9): 1657-1666.
- Gover TD, Moreira TH, Weinreich D. Role of calcium in regulating primary sensory neuronal excitability. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; 194: 563-587.
- Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50: 7-33.
- Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med* 1990; 8(2): 201-209.
- Grynkiewicz C, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440-3450.

- Gumral N, Naziroglu M, Koyu A, Ongel K, Celik O, Saygin M, Kahrirman M, Caliskan S, Kayan M, Gencel O, Flores-Arce MF. Effects of selenium and L-carnitine on oxidative stress in blood of rat induced by 2.45-GHz radiation from wireless devices. *Biol Trace Elem Res.* 2009; 132(1-3): 153-163.
- Gupta P, Prywes R, ATF1 phosphorylation by the ERK MAPK pathway is required for epidermal growth factor-induced c-jun expression, *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 50550–50556.
- Gutteridge JM, Maitt L, Poyer L. Superoxide dismutase and Fenton chemistry. Reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron(II). *Biochem J* 1990; 269(1): 169-174.
- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
- H.C. Lee, S. An, H. Lee, S.H.Woo, H.O. Jin, S.K. Seo, T.B. Choe, D.H. Yoo, S.J. Lee, Y.J. Hong, M.J.Park, C.H.Rhee, I.C.Park, S.I. Hong, Activation of epidermal growth factor receptor and its downstream signaling pathway by nitric oxide in response to ionizing radiation, *Mol. Cancer Res.* 2008; 6: 996–1002.
- H.W. Lo, M.C. Hung, Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival, Habash RW, Elwood JM, Krewski D, Lotz WG, McNamee JP, Prato FS. Recent advances in research on radiofrequency fields and health: 2004-2007. *J Toxicol Environ Health* 2009; 12: 250-254.
- Halliwell B Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97: 1634–1658.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119(6): 598-620.
- Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 2002; 9: 163-173.
- Hardell L, Carlberg M, Hansson Mild K,. Pooled analysis of two case-control studies on use of cellular and cordless telephones and the risk for malignant brain tumours diagnosed in 1997-2003. *Int Arch Occup Environ Health* 2006; 79: 630-639.
- Hardell L, Carlberg M, Söderqvist F, Hansson Mild K. Meta-analysis of long-term mobile phone use and the association with brain tumours. *Int J Oncol* 2008; 32: 1097-103
- Hay, B. A., Huh, J. R., and Guo, M. The genetics of cell death: Approaches, insights and opportunities in Drosophila. *Nat.Rev.Genet.* 2004;5: 911-922.

- Haynal A, Regli F. Amyotrophic lateral sclerosis associated with accumulated electric injury, *Confinia Neurologica* 1964; 24: 189–198.
- Hug K, Grize L, Seidler A, Kaatsch P, Schüz J. Parental occupational exposure to extremely low frequency magnetic fields and childhood cancer: a German case-control study. *Am J Epidemiol* 2010; 171: 27-35.
- Hulbert A L, Metcalfe J C, Hesketh R, Biological responses to electromagnetic fields, *The FASEB Journal* 1998; 12( 6): 395–420.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Non-ionizing radiation, Part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2002; 80: 1-395.
- International Agency for Research on Cancer-(IARC), “Nonionizing radiation Part I: static and extremely low frequency (ELF) electric and magnetic fields,” *Monographs* 2002; 80: 429.
- INTERPHONE Study Group. Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. *Int J Epidemiol* 2010; 39: 675-94.
- Irmak MK, Fadillioğlu E, Güleç M, Erdoğan H, Yağmurca M, Akyol O. Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits. *Cell Biochem Funct.* 2002; 20(4): 279-283.
- Juutilainen J, Matilainen P, Saarikoski S, Läärä E, Suonio S. Early pregnancy loss and exposure to 50-Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 1993; 14(3): 229-236.
- Keizer J, Levine L. Ryanodine receptor adaptation and Ca<sup>2+</sup>(-)-induced Ca<sup>2+</sup> release-dependent Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Biophys J.* 1996; 71(6): 3477-3487.
- Klaeboe L, Blaasaas KG, Tynes T. Use of mobile phones in Norway and risk of intracranial tumours. *Eur J Cancer Prev.* 2007; 16(2): 158-64.
- Kobayashi S, Boggon T J, Dayaram T, Jänne P A, Kocher O, Meyerson M., Johnson B E, M. J. Eck, D.G. Tenen, B. Halmos, EGFR mutation and resistance of non-small-cell lungcancer to gefitinib, *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 786–792.
- Labreche F, Goldberg MS, Valois MF, Nadon L, Richardson L, Lakhani R, Latreille B. Occupational exposures to extremely low frequency magnetic fields and postmenopausal breast cancer. *Am J Ind Med* 2003; 44: 643-52.
- Lai H, Singh NP. Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 687-694.
- Laver DR. Regulation of ryanodine receptors from skeletal and cardiac muscle during rest and excitation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33(11): 1107-1113.

- Li C. Y., Sung F. C. Association between occupational exposure to power frequency electromagnetic fields and amyotrophic lateral sclerosis: a review, *American Journal of Industrial Medicine*, 2003; 43(2): 212–220.
- Liburdy R P, Callahan D E, Harland J, Dunham E, Sloma T R, Yaswen P, Experimental evidence for 60 Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade. Effects on calcium influx and c-MYC mRNA induction, *FEBS Lett.* 1993; 334: 301–308.
- Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer.* 1994; 30(14): 2068-2073.
- Loomis P, Savitz D A, Mortality from brain Cancer and leukaemia among electrical workers, *British Journal of Industrial Medicine* 1990; 47(9): 633– 638.
- Lönn S, Ahlbom A, Christensen HC, Johansen C, Schüz J, Edström S, Henriksson G, Lundgren J, Wennerberg J, Feychting M. Mobile phone use and risk of parotid gland tumor. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 637-643
- Malagoli C, Fabbi S, Teggi S, Calzari M, Poli M, Ballotti E, Notari B, Bruni M, Palazzi G, Paolucci P, Vinceti M. Risk of hematological malignancies associated with magnetic fields exposure from power lines: a case-control study in two municipalities of northern Italy. *Environ Health* 2010; 9: 16.
- Malone KE, Daling JR, Thompson JD et al., BRCA1 mutations and breast cancer in the general populations analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. *Journal of the American Medical Association* 1998; 279(12): 922-929.
- Manikonda PK, Rajendra P, Devendranath D, Gunasekaran B, Channakeshava, Aradhya RS, Sashidhar RB, Subramanyam C. Influence of extremely low frequency magnetic fields on Ca<sup>2+</sup> signaling and NMDA receptor functions in rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 2007; 413(2): 145-149.
- Melzer W, Andronache Z, Ursu D. Functional roles of the gamma subunit of the skeletal muscle DHP-receptor. *J Muscle Res Cell Motil.* 2006; 27(5-7): 307-314.
- Montiel A F, Carvajal A F, Cases R P, Ballester G F, González J M, Messeguer A, R. Muñoz G. Advances in modulating thermosensory TRP channels, *Expert Opin. Ther. Pat.* 2012; 22: 999–1017.
- Moulder JE, Foster KR. Is there a link between exposure to power-frequency electric fields and cancer? *IEEE Eng Med Biol Mag* 1999; 18: 109-16.
- Nazıroğlu M, Çelik Ö, Özgül C, Çiğ B, Doğan S, Bal R, Gümral N, Rodríguez AB, Pariente JA. Melatonin modulates wireless (2.45 GHz)-induced oxidative injury through TRPM2 and voltage gated Ca(2+) channels in brain and dorsal root ganglion in rat. *Physiol Behav.* 2012; 105(3): 683-692.

- Naziroğlu M, Yüksel M, Köse SA, Özkaya MO. Recent reports of Wi-Fi and mobile phone-induced radiation on oxidative stress and reproductive signaling pathways in females and males. *J Membr Biol.* 2013; 246(12): 869-875.
- Naziroğlu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca(2+) signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *J Recept Signal Transduct Res.* 2012; 32(3): 134-141.
- Naziroglu M, Tokat S, Demirci S. Role of melatonin on electromagnetic radiation-induced oxidative stress and Ca2+ signaling molecular pathways in breast cancer. *J Recept Signal Transduct Res.* 2012; 32(6): 290-297.
- Naziroğlu M, Gümral N. Modulator effects of L-carnitine and selenium on wireless devices (2.45 GHz)-induced oxidative stress and electroencephalography records in brain of rat. *Int J Radiat Biol.* 2009; 85(8): 680-689.
- O'Connor RP, Madison SD, Leveque P, Roderick HL, Bootman MD. Exposure to GSM RF fields does not affect calcium homeostasis in human endothelial cells, rat pheochromocytoma cells or rat hippocampal neurons. *PLoS One.* 2010; 5(7): 350-355
- Oksay T, Naziroğlu M, Doğan S, Güzel A, Gümral N, Koşar PA. Protective effects of melatonin against oxidative injury in rat testis induced by wireless of radiation-induced DNA damage, *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 6555–6560.
- Ozorak A, Naziroğlu M, Celik O, Yüksel M, Özçelik D, Ozkaya MO, Cetin H, Kahya MC, Kose SA. Wi-Fi (2.45 GHz)- and Mobile Phone (900 and 1800 MHz)-Induced Risks on Oxidative Stress and Elements in Kidney and Testis of Rats During Pregnancy and the Development of Offspring. *Biol Trace Elem Res.* 2013; 156(1-3): 221-229.
- Pao W, Miller V A, Politi K A, Riely G J, Somwar R, Zakowski M F, Kris M G, Varmus H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinibis associated with a second mutation in the EGFR kinase domain, *PLoS Med.* 2005; 2: 73.
- R.C. Harris, E. Chung, R.J. Coffey, EGF receptor ligands, *Exp. Cell Res.* 2003; 284: 2–13.
- Schoenfeld ER, O'Leary ES, Henderson K, Grimson R, Kabat GC, Ahnn S, Kaune WT, Gammon MD, Leske MC, EBCLIS Group. Electromagnetic fields and breast cancer on Long Island: a case-control study. *Am J Epidemiol* 2003; 158: 47-58.
- Schüz J,Ahlbom A. Exposure to electromagnetic fields and the risk of childhood leukaemia: a review. *Radiat Prot Dosimetry* 2008; 132: 202-211.

- Shapiro MS, Gomeza J, Hamilton SE, Hille B, Loose MD, Nathanson NM, Roche JP, Wess J. Identification of subtypes of muscarinic receptors that regulate Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channel activity in sympathetic neurons. *Life Sci.* 2001; 68(22-23): 2481-2487.
- Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y, Roles of TRPM2 in oxidative stress, *Cell Calcium* 2011; 50: 279–287.
- Takebayashi T, Varsier N, Kikuchi Y, Wake K, Taki M, Watanabe S, Akiba S, Yamaguchi N. Mobile phone use, exposure to radiofrequency electromagnetic field, and brain tumour: a case-control study. *Br J Cancer* 2008; 98: 652-659
- Toledo A S, Penner R, TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signaling, *J. Physiol.* 2011; 589: 1515–1525.
- Topuz E, Aydın A, Dinçer M. Meme Kanseri, Nobel Tıp Kitabevleri, 2003.
- Transduct. Res.* 2012; 32: 134–141.
- Trosić I, Pavčić I. Disturbance of cell proliferation in response to mobile phone frequency radiation. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2009; 60(1): 109-115.
- Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell.* 1994; 76(5): 777-779.
- Viel JF, Clerc S, Barrera C, Rymzhanova R, Moissonnier M, Hours M, Cardis E. Residential exposure to radiofrequency fields from mobile phone base stations and broadcast transmitters: a population-based survey with personal meter. *Occup Environ Med.* 2009; 66(8): 550-556.
- Walleczek J, Liburdy R P. Nonthermal 60 Hz sinusoidal magnetic field exposure enhances <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation, *FEBS Lett.* 1990; 271: 157–160.
- Wang Q, Villeneuve G, Wang Z. Control of epidermal growth factor receptor
- Wertheimer N, Leeper E. Original contributions. Electrical wiring configurations and childhood cancer, *American Journal of Epidemiology* 1979; 109(3): 273–284.
- WHO (Environmental Health Criteria), *Extremely Low Frequency Fields*, vol. 35, Geneva, Switzerland, 1984.
- WHO, “Electromagnetic fields and public health. Exposure to extremely low frequency fields,” Fact Sheet no. 322, 2007.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980; 68: 251-306.

Yang Q, Khauny MJ, Rodriguez C et al., Family history score as a predictor of breastcancer mortality: prospective data from the cancer prevention study II United States, 1982-1991. *American Journal of Epidemiology* 1998;147(7): 652-659.

Zhu SH, Stretch V, Balabanis M, Rosbrook B, Sadler G, Pierce JP. Telephone counseling for smoking cessation: effects of single-session and multiple-session interventions. *J Consult Clin Psychol.* 1996; 64(1): 202-211.

## ÖZGEÇMİŞ

**Arş. Gör. Bilal ÇİĞ**

### **Kişisel Bilgiler:**

**Doğum Tarihi:** 05.12.1984

**Doğum Yeri:** Malatya

**Yabancı Dil:** İngilizce

**Yazışma Adresi:** 1.Etap TOKİ Evleri B:5 Blok D:24 PK: TR–32260  
Çünür / Isparta

**Telefon No:** 0 554 639 36 41

**Elektronik Posta:** bilalcig@gmail.com

### **Öğrenim Durumu:**

<b>Derece</b>	<b>Fakülte/ Bölüm / Üniversite</b>	<b>Yıl</b>
Lisans	Mühendislik Fak. Kimya Müh. Fırat Üniversitesi	2009

### **Yüksek Lisans Tezi ve Danışmanı:**

“Cep telefonu (900 MHz ve 1800 MHz) ve kablosuz internetin (2450 MHz) neden olduğu elektromanyetik alana maruz bırakılan kanser hücrelerinde kalsiyum sinyali, apoptozis ve oksidatif stres değerleri üzerine mesafenin etkileri”

**Danışman:** Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU