T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMASININ (Wİ-Fİ 2.4 GHZ) İNSAN EMBRİYONİK BÖBREK HÜCRELERİNDE (HEK293) APOPTOZ VE OKSİDATİF STRES DEĞERLERİ ÜZERİNE SELENYUM VE ÇİNKONUN ETKİSİ

NURAL PASTACI ÖZSOBACI

DANIŞMAN
PROF. DR. DERVİŞ ÖZÇELİK

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BİYOFİZİK PROGRAMI

İSTANBUL-2016

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Biyofizik Programında Doktora öğrencisi Nural Pastacı Özsobacı tarafından Prof. Dr. Derviş Özçelik'in danışmanlığında hazırlanan "Elektromanyetik Alan Uygulamasının (Wi-Fi 2.4 GHz) İnsan Embriyonik Böbrek Hücrelerinde (HEK293) Apoptoz ve Oksidatif Stres Değerleri Üzerine Selenyum ve Çinkonun Etkisi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 02/08/2016 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı
Prof.Dr. Şefik DURSUN
Üsküdar Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Fakültesi

Jüri-Danışman
Prof.Dr. Derviş ÖZÇELİK
İstanbul Üniv.,Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Jüri
Doç. Dr. Matem TUNÇDEMİR
İstanbul Üniv.,Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri
Doç.Dr.Tevfik GÜLYAŞAR
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Jüri
Doç.Dr. Hülya CABADAK
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

NURAL PASTACI ÖZSOBACI

İTHAF

Annem ve Babam 'a ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimin her aşamasında benden desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle beni aydınlatan, tez çalışmamın her aşamasında çok değerli katkıları bulunan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Derviş Özçelik'e, hücre kültür laboratuvarının kurulmasını sağlayarak bize yeni ufuklar sunan Sayın Prof.Dr. Şefik Dursun'a, tez çalışmalarım sırasında özgürce çalışma ortamı sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Bora Barutçu'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansütü eğitmim sürecince tecrübe ve bilgileriyle her zaman bana yol gösteren, tez çalışmamda Tıbbı Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvar imkanlarını bana açan Sayın Doç. Dr. Matem Tuçdemir'e, çalışmalarıma değerli bilgileri ile katkıda bulunan ve Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışmama fırsat veren, Sayın Prof. Dr. Hafize Uzun'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında zaman gözetmeksizin ulaşıp sorularıma cevap bulabildiğim değerli meslektaşım Öğr. Gör. Ebru Hacıosmanoğlu'na, çalışmalarımda bana her zaman destek olan ve aile ortamı sağlayan başta Öğr. Gör. Dilek Düzgün Ergün olmak üzere değerli çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Duygu Tarhan, Dr. Fatma Ateş Alkan ve Dr. Denizhan Karış'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca maddi, manevi her anlamda yanımda olduklarını bildiğim annem İnci Pastacı ve babam Prof. Dr. Halit Pastacı' ya, ilgisini ve desteğini hiç eksik etmeyen sevgili eşim Ali Özsobacı'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: ***51182***

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT ..... Xİ V
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Elektromanyetik Dalgalar 3
2.1.1. İyonlaştırıcı Elektromanyetik Radyasyon 4
2.1.2. İyonlaştırıcı Olmayan Elektromanyetik Radyasyon 5
2.1.3. Elektromanyetik Alan 5
2.1.4. Elektromanyetik Alana Maruz Kalma Kaynakları 6
2.1.5. Kablosuz İnternet Erişimi 6
2.1.6. Elektromanyetik Alanın Canlı ile Etkileşimi 8
2.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres 10
2.2.1. Lipid Peroksidasyonu 12
2.2.1.1. Malondialdehit 13
2.3. Antioksidanlar 15
2.3.1. Süperoksit Dismutaz 16
2.3.2. Glutatyon Peroksidaz 17
2.3.3. Selenyum 18
2.3.4. Çinko 20
2.4. Apoptoz 23
2.4.1. Apoptozun Aşamaları 23
2.4.2. Apoptozun Düzenlenmesi 26

2.4.2.1. Bcl-2 ailesi: 26
2.4.2.2. Mitokondri: 27
2.4.2.3. Kaspaz Ailesi: 27
3. GEREÇ VE YÖNTEM 30
3.1. GEREÇLER 30
3.1.1. Kimyasallar ve Kitler 30
3.1.2. Cihazlar 31
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Eriyikler 32
3.1.3.1. Hücre Kültürü Örneklerinin Hazırlanmasında Kullanılan Eriyikler 32
3.1.3.2. Malondialdehit (MDA) Tayininde Kullanılan Eriyikler 32
3.1.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayininde Kullanılan Eriyikler 32
3.1.3.4. Morfolojik İncelemede Kullanılan Eriyikler 33
3.2. YÖNTEMLER 34
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları 34
3.2.1.1. Hücrelerin Çözdürülmesi 36
3.2.1.2. Hücrelerin Pasaj İşlemi 36
3.2.1.3. Hücrelerin Dondurularak Saklanması 37
3.2.1.4. Hücre Sayısının ve Canlılığınn Belirlenmesi 37
3.2.1.5. Elektromanyetik Alan Uygulaması 38
3.2.1.6. Çalışma Gruplarının Oluşturulması 41
3.2.1.7. Hücre Lizatlarının Hazırlanması 42
3.2.2. Biyokimyasal Analizler 43
3.2.2.1. Malondialdehit (MDA) Tayini 43
3.2.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini 44
3.2.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Tayini 45
3.2.3. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri 46
3.2.3.1. Hücrelerin Tespiti 46
3.2.3.2. Apoptoz Tayini 46
3.2.3.3. Apoptotik İndeks 48
3.2.3.4. İmmünhistokimya 48
3.2.4. İstatistiksel Analiz 49
4. BULGULAR 50
4.1. Hücre Canlılığı Analizi 50

4.2. Biyokimyasal Bulguar 51
4.2.1. Malondialdehit (MDA) Analizi 51
4.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi 54
4.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizi 57
4.3. Morfolojik Bulgular 60
4.3.1. Apoptoz Tayini 60
4.3.2. İmmünohistokimyasal Bulgular 63
4.3.2.1. Bcl-2 63
4.3.2.2. Kaspaz-3 66
5. TARTIŞMA 69
KAYNAKLAR 82
ÖZGEÇMİŞ 99

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Oksijen Türevi Radikaller 11
Tablo 2-2: Antioksidanların Sınıflandırılması 16
Tablo 4-1: Zn'nun farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki MDA seviyeleri üzerine etkileri 52
Tablo 4-2: Se'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki MDA seviyeleri üzerine etkileri 53
Tablo 4-3: Zn'nun farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki SOD aktiviteleri üzerine etkileri 55
Tablo 4-4: Se'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki SOD aktiviteleri üzerine etkileri 56
Tablo 4-5: Zn'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki GSH-Px aktivitelerine etkileri 58
Tablo 4-6: Se'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki GSH-Px aktivitelerine etkileri 59
Tablo 4-7: TUNEL yöntemi ile boyanan hücrelerin apoptotik indeksinin istatistiksel analizi. 60
Tablo 4-8: TUNEL yöntemi ile boyanan hücrelerin apoptotik indeksinin istatistiksel analizi. 61
Tablo 4-9: Bcl-2 immün boyaması yapılan hücrelerin pozitifliklerinin değerlendirilmesi. 63
Tablo 4-10: Bcl-2 immün boyaması yapılan hücrelerin pozitifliklerinin değerlendirilmesi. 64
Tablo 4-11: Kaspaz-3 immün boyaması yapılan hücrelerin immünpozitifliklerinin değerlendirilmesi 66
Tablo 4-12: Kaspaz-3 immün boyaması yapılan hücrelerin immünpozitifliklerinin değerlendirilmesi 67

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 : Elektromanyetik Radyasyonun Yayılımı 3
Şekil 2-2: Elektromanyetik Spektrum..... 4
Şekil 2-3: Büyüklüklerine Göre Kablosuz Ağlar..... 7
Şekil 2-4: Malondialdehit Oluşumu..... 14
Şekil 2-5: Se Metabolizması 19
Şekil 2-6:Memelilerde Zn Homeostazı..... 22
Şekil 2-7 : Reseptör Aracılı ve Mitokondri Aracılı Apoptoz Yolakları 25
Şekil 3-1: HEK293 Hücreleri 34
Şekil 3-2: Otoklav Cihazı 35
Şekil 3-3:Laminar Akım Kabini 35
Şekil 3-4: Thoma Lamı 37
Şekil: 3-5: Elektromanyetik Alan Uygulamasının Şematik Gösterimi..... 39
Şekil 3-6 : Sinyal Analizörü..... 40
Şekil 3-7 : Elektromanyetik Alan Uygulaması Yaptığımız Deney Düzeneği. 40
Şekil 4-1: Zn ve Se'un EMA uygulanan HEK293 hücrelerinde canlılık oranları 50
Şekil 4-2: Zn'nun farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki MDA seviyeleri ve karşılaştırılması..... 52
Şekil 4-3: Se'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA seviyeleri ve karşılaştırılması..... 53
Şekil 4-4: Zn'nun farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki SOD aktivite değerleri ve karşılaştırılması. 55
Şekil 4-5: Se'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki SOD aktivite değerleri ve karşılaştırılması 56
Şekil 4-6: Zn'nun farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerinde GSH-Px aktiviteleri ve karşılaştırılması..... 58
Şekil 4-7: Se'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerinde GSH-Px aktiviteleri ve karşılaştırması. 59
Şekil 4-8: TUNEL yöntemi ile boyanan hücrelerdeki apoptotik indeks ve karşılaştırılması 60
Şekil 4-9: TUNEL yöntemi ile boyanan hücrelerdeki apoptotik indeks ve karşılaştırılması 61

Şekil 4-10: HEK 293 hücrelerinde TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin gösterilmesi. 62
Şekil 4-11: İmmünohistokimyasal boyama yapılan hücrelerde bcl-2 immünpozitifliği karşılaştırılması. 63
Şekil 4-12: İmmünohistokimyasal boyama yapılan hücrelerde bcl-2 immünpozitifliği karşılaştırılması. 64
Şekil 4-13: HEK 293 hücrelerinde bcl-2 immünohistokimyasal boyaması. 65
Şekil 4-14: İmmünohistokimyasal boyama yapılan hücrelerde aktif kaspaz-3 immunpozitifliği karşılaştırılması. 66
Şekil 4-15: İmmünohistokimyasal boyama yapılan hücrelerde aktif kaspaz-3 immunpozitifliği karşılaştırılması. 67
Şekil 4-16: HEK 293 hücrelerinde aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal boyaması. 68

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AIF	Apoptoz indükleyici faktör
CAT	Katalaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EMA	Elektromanyetik Alan
EMR	Elektromanyetik Radyasyon
FBS	Fetal sığır serumu
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
HEK 293	İnsan embriyonik böbrek hücresi
LAN	Yerel alan ağları
MDA	Melondialdehit
PBS	Fosfat tuzu tamponu (Phosphate Buffer Saline)
ROT	Raktif oksijen türleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
SAR	Özgül soğurma hızı
Se	Selenyum
SOD	Süperoksid dismütaz
TBA	Tiyobarbiturik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri
TNF	Tümör nekroz faktör
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
TUNEL	Terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP nick end labeling
Wi-Fi	Kablosuz bağlantı alanı
WLAN	Kablosuz yerel alan ağları
Zn	Çinko

ÖZET

Pastacı Özsobacı, N. Elektromanyetik Alan Uygulamasının (Wi-Fi 2.4 GHz) İnsan Embriyonik Böbrek Hücrelerinde (HEK293) Apoptoz ve Oksidatif Stres Değerleri Üzerine Selenyum ve Çinkonun Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2016.

2.4 GHz frekansında elektromanyetik radyasyon yayan cihazların özellikle iletişim alanında kullanımı artmaktadır. Yapılan çalışmalar elektromanyetik alanların (EMA) biyolojik sistemlerde oksidatif stres, hücre hasarı ve apoptoz gibi olumsuz biyolojik etkiler oluşturduğunu belirtmektedir. Organizmada bulunan ve antioksidan özelliği olan çinko ve selenyum, süperoksitdismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerin yapısında bulunarak apoptoz üzerine etkili olduğu da çalışmalarda gösterilmiştir. Bu amaçla insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293) 2.4 GHz frekanslı EMA uygulanmasında selenyum ve çinkonun etkisi, apoptoz ve oksidatif stres değerleri ile araştırılmıştır.

Çalışmamızda HEK 293 hücreleri ile; kontrol, 2.4 GHz, 50µM Zn+2.4 GHz, 100µM Zn+2.4 GHz, 100nM Se+2.4 GHz, 200nM Se+2.4 GHz grupları oluşturuldu. EMA grupları 1 saat 2.4 GHz EMA'a maruz bırakıldı, element grupları ise Zn ve Se ile hazırlamış besiyerine 48 saat inkübe edildikten sonra EMA'a maruz bırakıldı. Ölçümler sonucunda yapılan istatistiksel değerlendirmelerde EMA'ın MDA'i arttırdığı ($p<0.001$), SOD ve GSH-Px aktivitelerini azalttığı ($p<0.05$) tepit edildi. Zn uygulamasının MDA seviyesini azalttığı ($p<0.05$), SOD aktivitesini attırdığı ($p<0.05$), GSH-Px aktivitesinde anlamlı bir değişim sağlamadığı belirlendi. 100 ve 200 nM Se uygulamasının MDA seviyesini azalttığı ($p<0.05$; $p<0.001$), SOD aktivitesini arttırdığı ($p<0.05$), GSH-Px aktivesini arttırdığı ($p<0.05$) tespit edildi. Morfolojik değerlendirmede EMA'ın apoptozu ve kaspaz-3'ü arttırdığı ($p<0.001$, $p<0.05$), bcl-2'yi azalttığı ($p<0.001$) gözlemlendi. EMA öncesinde Zn ve Se uygulanmasının apoptozu ve kaspaz-3'ü azalttığı ($p<0.001$) tespit edildi. EMA öncesinde 100 µM Zn, 100 ve 200 nM Se uygulamasının ise bcl-2'yi arttırdığı ($p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.01$) saptandı. Sonuç olarak 2.4 GHz EMA'ın hücrede çeşitli olumsuz etkiler meydana getirdiği, Zn ve Se takviyesi ile bu etkilerden korunabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Elektromanyetik Alan, HEK 293, Apoptoz, Çinko, Selenyum,

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: ***51182***

ABSTRACT

Pastacı Ozsobacı, N. Effects of Selenium and Zinc to the Apoptosis and Oxidative Stress Values on Electromagnetic Field Application (Wi-Fi 2.4 GHz) in Human Embryonic Kidney Cells (HEK293). Istanbul University, Institute of Health Science, Biophysics Department. PhD Thesis. Istanbul. 2016.

There is a widespread use of 2.4 GHz electromagnetic radiation emitting devices especially in education. Recent studies show the adverse effects of electromagnetic fields (EMF) on tissues. It was reported that EMF induced apoptosis through reactive oxygen species. Zinc and selenium, that are trace elements for all organisms, show antioxidant properties by inhibiting oxidative damage being within the structure of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px). Accordingly, some studies note that changes in the homeostasis of zinc and selenium effect apoptosis. Thus, the aim of this study is to investigate the effect of zinc and selenium on 2.4 GHz frequency EMF exposed human embryonic kidney cells (HEK293) by means of alterations in apoptotic and oxidative stress parameters.
Our study was planned as control, 2.4 GHz, 50µM Zn+2.4 GHz, 100µM Zn+2.4 GHz, 100nM Se+2.4 GHz, 200nM Se+2.4 GHz groups. EMF groups were exposed to 2.4 GHz EMF for 1h, element groups were incubated for 48h in cell culture medium containing different element concentrations before EMF exposure. EMF group had higher MDA ($p<0.001$) and lower SOD/GSH-Px activities ($p<0.05$). MDA decreased ($p<0.05$) and SOD activity increased ($p<0.05$) in Zn applied groups. 100 and 200 nM Se application decreased MDA ($p<0.05$; $p<0.001$), increased SOD/GSH-Px ($p<0.05$) activities. EMF increased apoptosis and caspase-3 ($p<0.001$, $p<0.05$) and decreased bcl-2 ($p<0.001$). Application of Zn and Se before EMF decreased apoptosis and caspase-3 ($p<0.001$). Application of 100 µM Zn, 100 and 200 nM Se before EMF increased bcl-2 ($p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.01$). As a result, the current study emphasizes that 2.4 GHz EMF causes various adverse effects on HEK293 cells, Zn and Se supplementation protects cells from EMF.

Key Words: Electromagnetic field, HEK 293, Apoptosis, Zinc, Selenium

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. ***51182***

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Teknolojik gelişmeye paralel olarak, endüstriyel, tıbbi, askeri, eğitim alanlarında ve özellikle iletişimde kullanılmak üzere geliştirilmiş 2.4 GHz frekansında elektomanyetik dalga yayan cihazlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle toplumlar artan bir şekilde düşük frekanslı elektromanyetik alanlara (EMA) maruz kalmaktadır. Bu gelişmelerle birlikte son yıllarda yapılan *in vivo, in vitro* ve epidemiyolojik çalışmalarda EMA'ın biyolojik etkilerinin araştırılması üzerinde durulmaktadır. Birçok çalışmada da elektromanyetik radyasyonun sağlık üzerine etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (1, 2, 3).

Çeşitli çalışmalarda EMA'ın kanser, immünolojik hastalıklar, kan-beyin bariyeri hasarı, baş ağrısı, uyku düzensizliği veya dikkat bozukluğu gibi nörolojik anormalliklere sebep olabileceği gösterilmiştir (3). EMA'ın dokularda ve hücrelerde hipertermiye sebep olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (4). EMA'ın dokularda meydana getirdiği olumsuz biyolojik etkiler reaktif oksijen parçalarının artmasıyla oluşan oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir. Bu oluşum sonucunda ise hücresel hasar meydana gelmektedir (3, 5). EMA'a maruz kalma sonucunda dokularda süperoksit anyonları, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini içeren reaktif oksijen molekülleri oluşabilmektedir, dolayısıyla EMA'ın reaktif oksijen moleküllerini etkileyerek apoptoza yol açtığı belirtilmektedir (2, 5, 6). Bu durum, bazı farklılıklar olmasına karşın, az sayıdaki literatürde farklı deneysel protokoller ile uygulanarak gösterilmiştir (2, 7).

Organizmada eser miktarda bulunan çinko ve selenyum hücresel fonksiyonların yerine getirilmesinde kritik öneme sahiptir. Çinko ve selenyum, birçok biyolojik süreçte önemli bir role sahip olup, insan sağlığı için organizmada belirli bir düzeyde bulunması gereken esansiyel minerallerdir (8, 9). Glutatyon peroksidazın (GSH-Px) önemli bir kofaktörü olan selenyum önemli bir antioksidandır. Selenyum proteinlerle birleşerek serbest radikallere karşı hücresel hasar oluşumunu engelleyen selenoproteinleri oluşturur. Farklı hücreler üzerinde yapılan çalışmalarda selenyumun hücre proliferasyonunu arttırdığı, apoptozu baskıladığı tespit edilmiş, fakat bu etkilerin oluşum mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (10). Çinkonun da serbest radikal hasarına karşı biyolojik yapıların korunmasında farklı rolleri vardır: Metalotiyonin seviyesini düzenler, süperoksit dismutazın (SOD) önemli bir bileşenidir, tiyol grupları için koruyucu bir ajandır, mitokondri ve mikrozom zarında lipid peroksidasyonunu önler ve hücre zarı yapısını stabilize eder (11). Buna bağlı olarak çinko ve selenyum

homeostazındaki değişiklilerin apoptoz üzerine etkili olduğu da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (8, 9, 11).

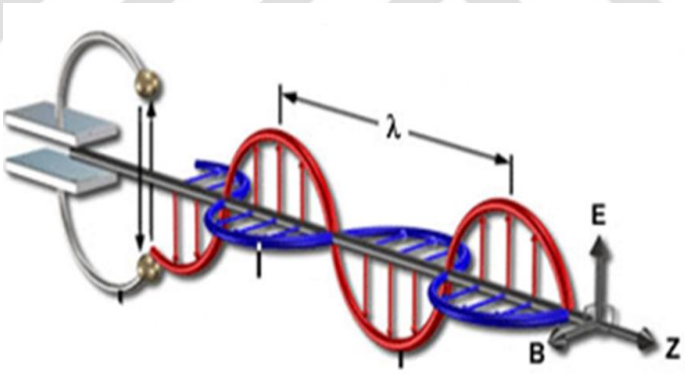
Elektromanyetik alanın doku üzerine etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmalarda beyin ve testis dokuları üzerinde sıkça durulmakla birlikte böbrek dokusu üzerindeki etkilerini araştıran yayın sayısı oldukça kısıtlıdır (1, 6, 12, 13).

Bu bilgiler ışığında tez çalışmasında, antioksidan sistemlerin yapısında bulunan çinko ve selenyumun, 2.4 GHz frekanslı elektromanyetik dalgalara maruz kalan insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK 293) oksidatif stres parametreleri ve apoptoz üzerine etkilerinin araştırılması amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

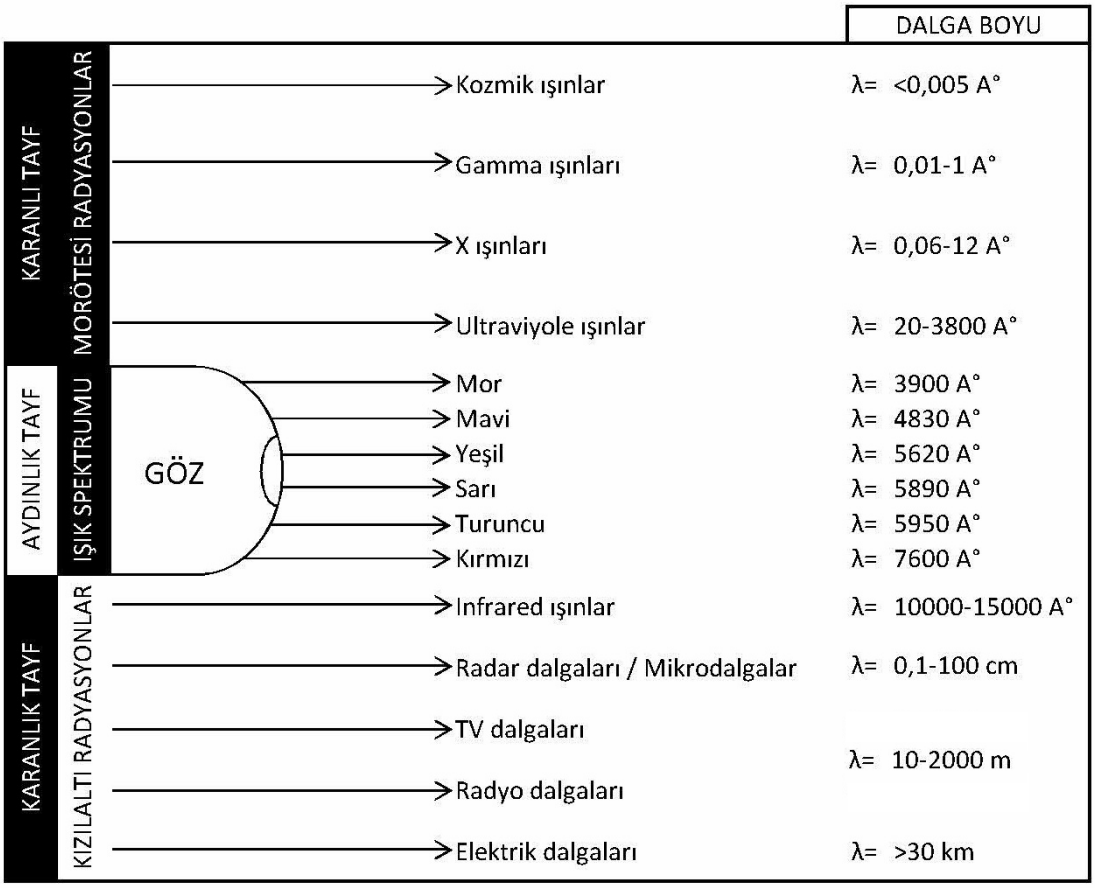
2.1. Elektromanyetik Dalgalar

1864 yılında İngiliz fizikçi James Clark Maxwell, ivmeli elektrik yüklerinin uzayda sonsuza kadar yayılan birbirleri ile bağlantılı elektrik ve manyetik değişiklikler oluşturduğunu ileri sürdü; Fakat elektromanyetik dalgaların (EMD) varlığı 1888'de Alman fizikçi Heinrich Hertz tarafından gösterildi (14). Elekromanyetik radyasyon (EMR) olarakda ifade edilen elektromanyetik dalgalar, uzayda ve bir maddesel ortamda sinüs eğrisi şeklinde enine dalgalar oluşturarak yayılmaktadır (Şekil 2-1). Elektromanyetik radyasyon bazen dalga bazen de partikül biçiminde ikili bir nitelik göstermektedir. Bütün elektromanyetik dalgalar aynı karakteristiğe sahiptir, fakat enerjileri farklıdır. Radyasyonun boyu azaldıkça (veya frekansı arttıkça) enerjisi artar fakat hızı değişmez (15, 16,17).



Şekil 2-1 : Elektromanyetik Radyasyonun Yayılımı

Elektromanyetik dalgaların frekanslarına, dalga boylarına veya enerjilerine göre sıralanmaları elekromanyetik spektrumu oluşturur (15, 16). Elektromanyetik spektrumda dalgalar kendi içlerinde kesin sınırları olmayan kategorilere ayrılmaktadır. Belirli bir kategoride yer alan bir elektromanyetik dalga, bir başka kategorinin dalga boyu aralığında bulunabilir (Şekil 2-2) (17, 18).



Şekil 2-2: Elektromanyetik Spektrum

Elektromanyetik radyasyonlar madde içine nüfuz edip maddeyi oluşturan atomları iyonlaştırması veya iyonlaştırmaması itibariyle iki sınıfta incelenir (15).

1) İyonlaştırıcı elektromanyetik radyasyon
2) İyonlaştırıcı olmayan elektromanyetik radyasyon

2.1.1. İyonlaştırıcı Elektromanyetik Radyasyon

Hücrelerdeki molekülleri bir arada tutan atomik bağları kırmaya yetecek foton enerjisine sahip yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalar, iyonlaştırıcı elektromanyetik radyasyon olarak tanımlanmaktadır. Gama ışınları, X ışınıları ve bazı kaynaklar göre Ultraviyole (UV) ışınlar da bu sınıfta değerlendirmektedir. İyonlaştırıcı elektromanyetik radyasyonun enerji değerleri minimum 12 eV'tan başlamaktadır. İyonlaştırıcı

karakterdeki radyasyon katı, sıvı ve gaz maddeleri iyonlaştırır. Ancak her iyonlaştırıcı ışının madde üzerindeki etkisi aynı değildir.

İyonlaştırıcı elektromanyetik radyasyon sağlık alanında görüntüleme ve radyoterapi amacıyla kullanılmakla birlikte canlılar üzerinde somatik ve genetik çeşitli biyolojik etkiler oluşturmaktadır (18,19).

2.1.2. İyonlaştırıcı Olmayan Elektromanyetik Radyasyon

İyonlaştırıcı olmayan elektromanyetik radyasyon atomik bağları kırmak için yeterli enerjiye sahip olmayan fotonların oluşturduğu elektromanyetik dalgalardır. Bunlar görünür ışık, kızılötesi, radyo frekans (RF), mikrodalga ışınlarıdır (19). İyonlaştırıcı olmayan elekromanyetik radyasyon atomik bağlar üzerine direkt etki edecek güce sahip olmasa bile maruz kalma kaynağına yakınlık, maruz kalınan süre, kaynağın gücü gibi faktörlere bağlı olarak canlıda belirli bir akımın indüklenmesine sebep olduğu ve buna bağlı olarak organizmayı etkilediği yapılan çalışmalarla ortaya konulmaktadır (17).

2.1.3. Elektromanyetik Alan

Elektrik alan, bir elektrik yükünün başka bir elektrik yükü üzerinde yarattığı çekme veya itme kuvveti olarak tanımlanmaktadır ve elektrik alan şiddetinin birimi metre başına volt (V/m) olarak ifade edilir. Manyetik alan ise elektrik yüklerinin ivmeli hareketi sonucunda ortaya çıkar. Manyetik alanda, manyetik akı yoğunluğu uluslararası birimi olarak Tesla (T) veya ölçü birimi olarak Gauss (G) kullanılmaktadır. Elektromanyetik alan (EMA), elektrik yüklerinin hareketinden doğan, elektrik alan ve manyetik alan bileşenlerine sahip elektromanyetik enerji içeren bir kuvvet alanıdır. Elektromanyetik alanlar bir çubuk mıknatısın kuzey-güney kutbu gibi statik olabilir veya herhangi bir frekansla salınım yapabilirler (14, 15, 20).

2.1.4. Elektromanyetik Alana Maruz Kalma Kaynakları

Elektromanyetik alana maruz kalma doğal ve yapay olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Güneş sistemimizde gezegenden gezegene değişen doğal bir elektromanyetik alan vardır. Dünya çekirdeğindeki ferromanyetik sıvı sürekli statik jeomanyetik bir alan oluştururken güneşten dünyamıza çarpan elektromanyetik radyasyon çevremizi doğal bir elektromanyetik alanla kuşatmaktadır (19, 21).

Bu doğal elektromanyetik kaynakların yanı sıra 19. yüzyıldan itibaren elektrik kullanımının giderek artmasıyla birlikte elektromanyetik alanlara maruz kalma hızla artmaktadır. Yüksek gerilim hatları, trafolar, evlerimizde kullandığımız tüm elektrikli cihazlar, TV ve radyo vericileri, bilgisayar ekranı, cep telefonu ve baz istasyonları, kablosuz internet erişimi çevremizdeki yapay elektromanyetik kaynakları oluşturmaktadır. Doğada elektrik iletim hatlarında kullanılanlar ile kıyaslanabilecek büyüklükte doğal bir alan kaynağı mevcut değildir (19, 21, 22).

Tüm canlılar da biyolojik yapılarında bulunan elektriksel yüklerin hareketinden dolayı belirli bir elektromanyetik bir alana sahiplerdir. Bu elektromanyetik alan doğa ile uyum içindeyken hızla artan yapay elektromanyetik alanlar canlıların doğa ile etkileşimine zarar vermektedir (20). Yapay elektromanyetik alanlar, düşük seviyeli de olsa uzun süreli maruz kalma sonrasında biyokimyasal mekanizmaları etkileyebilmekte ve sağlık sorunlarına neden olabilmektedir (15).

2.1.5. Kablosuz İnternet Erişimi

Yerel alan ağları (Local Area Networks, LAN) bir bina, hastane, okul, kampus gibi sınırlı alanda kurulan ve bir çok kişisel bilgisayar bu LAN'nın içerisinde yer almaktadır. Bu alanlarda ağ içerisindeki bilgisayarlar ve diğer cihazlar arasındaki iletişim kablolar üzerinden sağlanmaktadır. Kablosuz yerel alan ağlarında (Wireless Local Area Networks, WLAN) ise iletişim kablo yerine elektromanyetik dalgalar ile sağlanmakta olup, kablolu LAN'ların tüm özelliklerine sahiptirler. Kablosuz Yerel Alan Ağları Avrupa düzenlemelerinde farklı isimlerle adladırılmalarına karşın, başta ABD olmak üzere birçok ülkede Wi-Fi, Wireless Local Area Networks, Wireless LAN, WLAN olarak adlandırılmaktadır.

Kablosuz ileşim ağları, kablolu sistemlerin sunduğu tüm hizmetlerin yanında kabloya ihtiyaç duymayan bir sistem olması nedeniyle açık alanlarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Kablosuz iletişim ağlarını, hizmet verdikleri fiziksel alanların büyüklüklerine göre gruplandırmak mümkündür. Çeşitli kaynaklarda bu gruplandırma farklı şekillerde yapılsa da genel olarak kablosuz iletişim ağları, 4 grup altında toplanabilir:

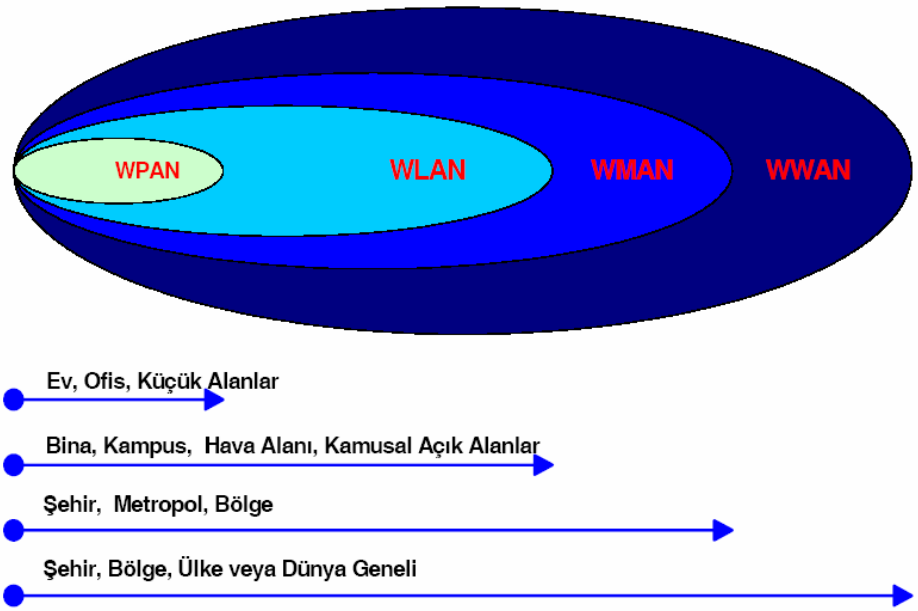
Kablosuz Geniş Alan Ağları (Wireless Wide Area Networks, WWAN),

Kablosuz Metropol Alan Ağları (Wireless Metropolitan Area Networks, WMAN),

Kablosuz Yerel Alan Ağları (Wireless Local Area Networks, WLAN),

Kablosuz Kişisel Alan Ağları (Wireless Personal Area Networks, WPAN).

Bu gruplandırma ve her bir gurubun hizmet alanları Şekil 2-3'de verilmiştir (23, 24).



Şekil 2-3: Büyüklüklerine Göre Kablosuz Ağlar

Yerel alan ağları bir okul, bina, hastane, kampüs veya sokak, cadde, park, bahçe gibi alanlarda kurulan ve bir çok sayıda kişisel bilgisayara iletişim hizmeti sağlayan ağlardır. WLAN sistemleri; kullanıcılarına kablosuz internet erişimi, sunucu üzerindeki uygulamalara ulaşım, aynı ağa bağlı kullanıcılar arasında elektronik posta hizmeti ve

dosya paylaşımı gibi çesitli imkanlar sağlamaktadır. Ayrıca veri iletiminin kablosuz olması nedeniyle park, bahçe, cadde, sokak ve benzeri açık alanlarda WLAN sistemlerinin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Ancak yerel kullanım için geliştirilmiş olan WLAN sistemlerinin mesafesi yaklaşık olarak 25-100 metredir (23).

Temel olarak WLAN sistemleri iki ana bölümden oluşmaktadır. Bunlardan biri erişim noktası (Acces Point, AP), diğeri ise cep bilgisayarı, kişisel bilgisayar, dizüstü bilgisayarı veya kablosuz ağ ünitesi ile donatılmış benzeri bir cihaz olabilir.

AP'ler bireysel olarak kullanmak için evlerde, kurumsal kullanım için de kamu vey özel iş yerlerinde karşımıza çıkar. Ayrıca internet hizmeti sağlayan çeşitli kuruluşlar halka açık kullanımı sağlamak için şehir merkezlerinde, büyük alışveriş merkezlerinde, otobüs terminali, tren istasyonu, hava alanı veya restoran gibi alanlarda AP kurup internet kullanımını yaygınlaştırmaktadırlar (25).

WLAN teknolojileri ile ilgili 1997 yılında yayınlanan ilk standart IEEE 802.11 (Elektrik ve Elektronik Mühendisleri Enstitüsü) olup, Sınai, bilimsel ve tıbbi cihaz bantı (SBT, ISM-Industrial Scientific Medical band) veri hızını saniyede 1 veya 2 megabit (Mbps) ve frekansını 2.4 GHz olarak belirlemiştir ve ilerleyen yıllarda veri aktarım hızı arttırılarak yeni standartlar oluşturulmuştur. EMA'ın canlı ile etkileşiminde ise meydana gelen olumsuz termal etkilerin sınırlandırılması için Uluslararası İyonize Olmayan Radyasyon Komisyonu (International Commission of Non-Ionizing Radiation- ICNIRP) tarafından belirli standartlar oluşturulmuştur (26).

Kablosuz internet kullanımının hızlı bir şekilde artması ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından radyo frekanslarının 2B ajanları olarak sınıflandırılması, elektromanyetik alana maruz kalma ile ilgili sağlık risklerinin araştırılmasını arttırmıştır (27, 28).

2.1.6. Elektromanyetik Alanın Canlı ile Etkileşimi

İnsan vücudu, etrafında bulunan elektromanyetik alanlara bir tepki olarak, hareket eden serbest iyonlara sahiptir. İnsan vücudundaki iyon akımlarını oluşturan işlemlere elektrik ve manyetik indüksiyon denilir. Elektromanyetik indüksiyonda herhangi bir enerji hattı ya da elektriksel alet üzerindeki yükler insan vücudu içindeki serbest iyonları ya çeker ya da iter. Böylece değişen elektrik alanlar sayesinde vücut

içerisinde akımlar oluşmaktadır. Herhangi bir elektromanyetik alan kaynağının oluşturduğu, vücudun yüzey elektrik yükleri ve vücut içi akımların büyüklüğü; kaynaktaki akımın büyüklüğüne, vücudun kaynağa olan uzaklığına, alanı perdeleyen veya yoğunlaştıran diğer objelerin varlığı gibi faktörlere bağlıdır (15). Ayrıca vücuttaki farklı dokuların elektromanyetik özellikleri birbiriyle aynı değildir. Dokular, dielektrik sabiti ve iletkenliklerine göre farklı düzeylerde güç soğurabilmektedir. Dokulardaki su miktarına bağlı olarak dokunun soğurduğu enerji değişiklik gösterir. Su oranı daha düşük olan kemik, yağ, kas, gibi dokular, su oranı yüksek olan kan veya idrar dokularına oranla daha yüksek düzeyde enerji soğurması yaparlar (17).

Dokularda 100 kHz'in altındaki düşük frekanslı elektromanyetik alanlardan kaynaklanan güç soğurulması, ihmal edilebilecek düzeyde olduğundan vücut sıcaklığında kayda değer bir artış meydana gelmez. Fakat, frekans arttıkça dokuların soğurduğu enerjinin artması, dokularda sıcaklık artışına sebep olmaktadır. Dokuların soğurdukları enerjilere bağlı olarak farklı frekans bölgelerinden söz edilebilir.

- 100 kHz -20 MHz güç soğurulması daha çok boyun ve ayaklarda görülür.
- 20 MHz-300 MHz hem vücudun tümünde hem de kısmi bölgelerde, rezonans etkisi nedeniyle, anlamlı güç soğurulması olabilir.
- 300 MHz -…GHz yerel ve farklı güç soğurulması ile karşılaşılabilir (21, 29).

Ektromanyetik alan dokulara termal ve termal olmayan etkiler meydana getirebilir. Biyolojik yapılara ısı artışına neden olabilecek seviyede EMA uygulandığında önce dokuda ısı artışı meydana gelir, sonra da ısı artışına bağlı olarak biyolojik değişimler oluşur ve termal etkiler ortaya çıkar. Dokulardaki sıcaklık artışı ile birlikte hücrelerinde kalıcı veya geçici zarar oluşturmaktadır. Uygulanan alanın ısı artırıcı etkisi olmaksızın biyolojik değişimlere neden oluyorsa bu etkiler termal olmayan etkiler olarak tanımlanır (30, 31).

Çevresel sıcaklık değişimleri altında vücut sıcaklığını sabit tutabilmek canlılar için hayati önem taşımaktadır ve bu güne kadar oluşturulan elektromanyetik radyasyon güvenlik standartları termal etkiler dikkate alınarak hazırlanmıştır. Elektromanyetik alanlardan kaynaklanan ısıl enerji doğrudan vücut içerisindeki doku ve organlarda depolanmaktadır. Bu ısı artışından kaynaklı olası zararlı sağlık etkilerini önlemek amacıyla çesitli ulusal ve uluslararası standartlar geliştirilmiştir. Bu standartlar

tarafından kabul edilen ve kullanılan dozimetrik birim Özgül Soğurma Hızı (Specific Absorption Rate, SAR)'dır (32). SAR elektromanyetik enerjinin vücut dokuları tarafından soğurulma hızı olarak tanımlanmaktadır ve birimi W/kg'dır. Vücudun 1 kg'ının sıcaklığını 1°C artıracak gücün 4 W olduğundan yola çıkılarak 4 W/kg SAR değeri insanlar için güvenlik standardı olarak temel alınmıştır. Buna bağlı olarak uluslar arası güvenlik standardı limit değerleri mesleki maruz kalma için 0.4 W/kg, genel halk için ise 0.08 W/kg olarak belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda özgül soğurma hızının doğrudan ölçülmesinin oldukça zor olmasından dolayı, sınır değerlerin belirlenmesinde kolay ölçülebilen ve/veya gözlemlenebilen parametreler kullanılmaktadır. Bu parametreler, elektrik alan şiddeti, manyetik alan şiddeti ve güç yoğunluğudur. Bu değerlere bağlı olarak özgül soğurma hızının hesaplanması aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır (33).

$$SAR = \frac{\sigma E^2}{\rho} = c^{1\frac{dT}{dt}} = \frac{j^2}{\rho\sigma}$$

E: Dokunun içine nüfuz eden elektrik alan [V/m]

σ: Hacmi V olan bir dokunun iletkenliği [S/m]

ρ : Hacmi V olan bir dokunun yoğunluğu [kg/m^3]

c: Vücudun özgül ısı kapasitesi [J/kg.K]

dT/dt :Vücut sıcaklığının zamana göre değişim hızı [K/s]

j: Vücutta ışınım sonucu oluşan akım yoğunluğu [A/m^2]

2.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Son yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektronu bulunan moleküller veya atomlar kararsız bir yapıya sahip olmalarından dolayı serbest radikal veya reaktif oksijen türleri (ROT) olarak isimlendirilmektedirler. Serbest radikaller çevrelerindeki herhangi bir molekül ile elektron alış verişi yaparak kararlı hale gelmeye çalışır ve kararlı hale gelene kadar elektron alış verişine devam ederler. Serbest radikaller bu şekilde diğer moleküller ile kolayca etkileşime girip yapılarını bozarlar. Canlı dokuda reaktif halde bulunan serbest radikaller hücre membranı, organeller ve DNA gibi birçok biyolojik materyale zarar verirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya yüksüz halde bulunarak paramagnetik özellik gösterirler (34, 35, 36, 37). Metabolizmanın

normal işleyişi sırasında veya dış etkenlerin etkisiyle meydana gelen ve etkinliği son derece yüksek olan serbest radikaller temel olarak üç şekilde oluşabilir (38):

1. Kararlı bir molekülden bir elektronun ayrılmasıyla serbest radikal oluşabilir.

$$X \rightarrow X\bullet + e^-$$

2. Kararlı bir moleküle bir elektron transferi ile sebest radikal oluşabilir.

$$X + e^- \rightarrow X\bullet$$

3. Kovalent bağın kırılması sonucu bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa yüksek oranda aktif iki adet serbest radikal oluşur.

$$R\text{----------}X \rightarrow R\bullet + X\bullet$$

Serbest radikaller, başka bir radikal ile veya radikal özellik taşımayan bir molekülle reaksiyona girerek, yeni radikaller oluşturur. Dolayısıyla serbest radikallerle tepkimeye giren moleküller zincir reaksiyon oluşturarak organizmaya zarar verir. Yaşam süreleri çok kısa fakat yapılarındaki kararsızlık nedeni ile oldukça aktif olan serbest radikaller biyolojik yapılardaki tüm hücreleri etkileyebilmektedirler. Hücrelerin temel yapı ve fonksiyonlarında değişiklik meydana getirebilen en önemli etkenlerin serbest oksijen radikalleri ve diğer reaktif oksijen türleri (Tablo2-1) olduğu kabul edilmektedir (39, 40, 41).

Tablo 2-1: Oksijen Türevi Radikaller

Radikaller	**Radikal Olmayanlar**
Süperoksit, $O_2^{\cdot -}$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, $OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit, HOCl
Peroksil, ROO	Ozon, O_3
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Singlet oksijen, $O_2 \downarrow\uparrow$
Hidroperoksil, $HO^{\cdot}{}_2$	Peroksinitrit, $ONOO^-$

Oksijen, hidrojen, kükürt ve azot, organik moleküllerin temel yapısal atomlarını oluşturur. Ayrıca aerobik organizmalarda oksijenin varlığı hayati öneme sahiptir. Organik moleküllerdeki yapısal öneminin dışında, canlılarda enerji metabolizmasındaki kilit molekül olarak yer almaktadır. Tüm canlıların oksijen gereksiniminin yanı sıra serbest formdaki oksijenin toksik etkileri nedeniyle hücresel zarara uğrayabilirler (42).

Hücreler kendileri için gerekli enerjiyi oksijenin dört elektron gerektiren bir dizi reaksiyonu sonunda indirgenmesiyle sağlar. Fakat bu süreçte oksijenin az bir kısmı (% 1-3) tam olarak suya dönüşemez ve ara ürün olarak serbest radikaller meydana gelir. Organizmada oksijen türevi serbest radikaller dışında karbon ve kükürt merkezli radikaller de meydana gelmektedir. İnsan vücudunda yüzlerce radikal oluşabildiği ifade edilirse de, hidrojen peroksit, hidroksil ve süperoksit radikalinin özel önemi vardır (43, 41).

$O_2 + H^+ + e^- \rightarrow HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksil radikali
$HO_2^{\cdot} \rightarrow H^+ + O_2^{\cdot -}$	Süperoksit radikali
$2\,H^+ + O_2^{\cdot -} + e^- \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit
$H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + OH$	Hidroksil radikali

2.2.1. Lipid Peroksidasyonu

Hücre membranındaki doymamış yağ asitleri, serbest radikallerin etkilerine karşı oldukça duyarlıdır. Membrandaki yağ asitlerinin çift bağları ve kolesterol, serbest radikallerle reaksiyona girmeye eğilimindedirler. Membranda lipid peroksidasyonunun gerçekleşmesi ile membran akışkanlığı ve geçirgenliği değişerek hücredeki metabolik olaylarda aksamalar meydana gelir.

Hücre membranında doymamış yağ asiti zincirinden serbest radikal aracılığı ile bir hidrojen atomunun koparılması ile oksidasyon başlar. Karbon atomundaki ortaklaşmamış elektron yağ asidi zincirini radikal haline getirir ve moleküler oksijeni bağlayarak lipid peroksit radikallerini oluşturur. Lipid peroksidasyonunun ilk aşaması lipid peroksitleri ile başlamış olur ve bu radikaller membrandaki diğer doymamış yağ asitleri ile etkileşerek yeni lipid radikalleri oluşturur. Lipid peroksi radikali hidrojen

atomları ile birleşerek hidroperoksidi oluşturur. Zincir reaksiyonu şeklinde ilerleyen bu olay membranda geri dönüşümsüz bir hasar meydana getirmektedir.

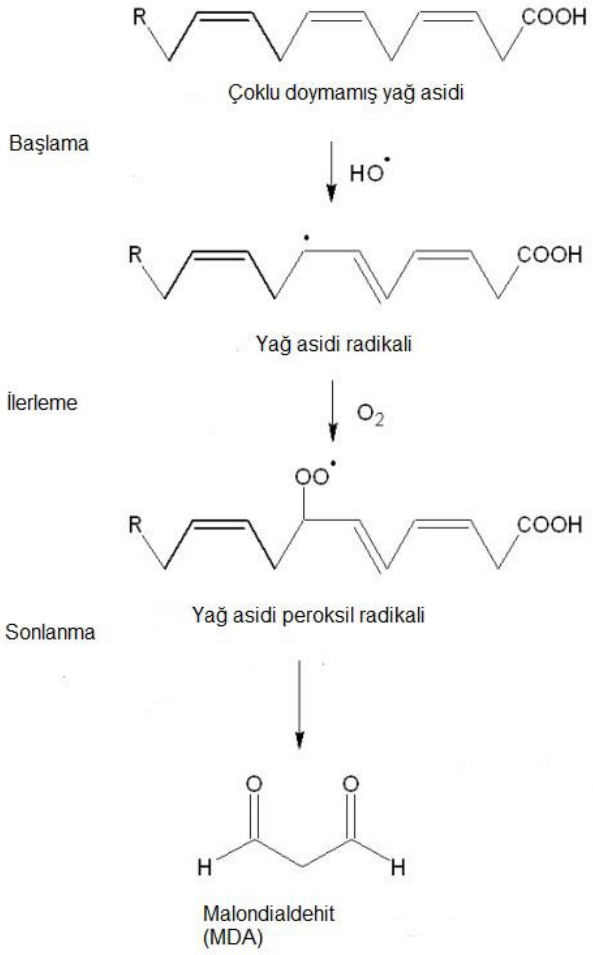
Hücre membranında ROT'un vermiş olduğu zarardan dolayı lipid peroksit radikalleri (LOO•) ve lipid serbest radikalleri (L•) oluşur. Lipid radikalinin (L•) yarı ömrü kısadır ve moleküler oksijenle (O_2) etkileşerek lipid peroksit radikallerini (LOO•) meydana getirir. Lipid peroksit radikalleri, membrandaki diğer yağ asitleri ile etkileşerek yeni lipid radikallerini oluşturur. Açığa çıkan hidrojen atomları lipid peroksit radikalleri (LOO•) ile birleşerek lipid peroksitlerine (LOOH) dönüşür. Lipid peroksidasyonu çoğu toksik olan, lipid deperoksitler, malondialdehit (MDA; $HOC\text{-}CH_2\text{-}CHO$) gibi aldehitler, lipid alkoksil radikalleri (LO^-), alkoller ve alkanlarin oluşması ile sonlanır. Tepkimenin süresi reaksiyon ortamında bulunan oksijen miktarı ve antioksidanlara bağlı olarak değişir (44).

2.2.1.1. Malondialdehit

Malondialdehit (MDA), yağ asiti zincirlerinden bir hidrojen atomunun koparılmasıyla başlayan oksitlenme reaksiyonları sonucunda meydana gelen başlıca reaktiftir. MDA ikiden fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda ve eikozanoid sentezinde serbestleşen endoperoksitlerdir (Şekil 2-4) (45).

MDA toksik etkisini fosfolipidlere, nükleik asitlere ve proteinlerin amino gruplarına bağlanarak gösterir. MDA, membranlarda polimerizasyona ve çapraz bağlanmalara neden olarak membrandan iyon taşınımını değiştirir. Membranlardan kolaylıkla difüze olabilen MDA, DNA yapısını etkileyerek karsinojen, mutajen ve genotoksik etkiler gösterir. Ayrıca kollagen gen üretimini ve ekspresyonunu artırır (37, 46).

Dokulardaki lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kabul edilen MDA miktarı doku hasarının iyi bir göstergesidir. MDA'nın miktarını belirlenmesi Tiyobarbitürik asitle reaksiyon veren maddelerin (TBARS; ''Thiobarbituric Acid Reactive Substances'') ölçümü ile gerçekleştirilmektedir (45, 47, 48, 49, 50, 51).



Şekil 2-4: Malondialdehit Oluşumu

Antioksidan savunma sistemleri, serbest radikallerin organizmaya zarar verici etkilerini engellemeye çalışmaktadır. Organizmada antioksidan sistem ve serbest radikaller arasındaki denge korunduğu müddetçe organizmada herhangi bir aksaklık meydana gelmez. Fakat dengenin serbest radikaller tarafından bozulması durumunda oksidatif stres meydana gelir (27, 37).

2.3. Antioksidanlar

Organizmada bulunan antioksidan savunma sistemleri oksidatif stresin oluşumunu engellemeye ve oksidatif stresin meydana getirdiği hasarı önlemeye çalışmaktadır. Canlılarda oksidatif stres kaynaklı oluşan çeşitli hastalıkların tespit edilmesi ile birlikte oksidatif stresi engelleyen antioksidanlar üzerine yapılan araştırmaların sayıları artmıştır. Antioksidanlar, serbest radikallerin canlılar üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için farklı etkime mekanizmalarına sahiplerdir:

1. Temizleme etkisi: Enzimler tarafından gerçekleştirilen bu etki oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde gerçekleşir.

2. Baskılama etkisi: Vitaminler ve flavonoidler ile gerçekleştirilen baskılamada oksidanlara bir hidrojen aktarılarak oksidanlar etkisiz hale getirilir.

3. Onarma etkisi: DNA tamir enzimleri ile oksidatif stresin oluşturduğu hasar engellenmeye çalışılır.

4. Zincir koparma etkisi: Hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini ile oksidanların bağlanması ve fonksiyonlarının engellenmesi şeklinde gerçekleşir (51, 52, 53).

Farkılı etki mekanizmalarına sahip birçok antioksidan vardır. Antioksidanlar enzimatik-enzimatik olmayan veya endojen-ekzojen olarak çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir (Tablo 2-2) (50).

Tablo 2-2: Antioksidanların Sınıflandırılması

Endojen		**Ekzojen**	
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	Vitamin Antioksidanlar	İlaç Olarak Kullanılan Antioksidanlar
Süperoksit dismutaz, katalaz, GSH-Px, Glutatyon redüktaz (GSH R), Glutatyon-S-transferaz	Melatonin, seruloplazmin, transferin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, albümin	α-tokoferol (vitamin E), ß-karoten, askorbik asit (vitamin C), folik asit (folat)	Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, rekombinant süperoksit dismutaz, nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar, demir redoks döngüsü inhibitörleri, demir şelatörleri, sitokinler, barbitüratlar, nötrofil adezyon inhibitörleri

2.3.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit radikalinin hidrojen perokside ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. SOD tarafından katalizlenen dismutasyon tepkimesi aşağıdaki gibidir.

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Bu tepkime ile süperoksit radikalinden daha reaktif olan hidroksil radikalinin ($OH^{\cdot}$) oluşumu engellenmektedir. Biyolojik sistemlerde tanımlanmış üç tip SOD izoenzimi bulunmaktadır. Bunlardan biri hücre sitozolünde bulunan ve dimerik yapıda olan CuZn-SOD, diğeri mitokondride bulunan ve Mn içeren tetramerik yapıdaki Mn-SOD. Ekstrasellüler sıvıda bulunan tetramerik glikoprotein yapıdaki izoenzim ise yine

Cu ve Zn içerir EC-SOD olarak isimlendirilmektedir. Hücrede genel olarak daha çok bulunan izomer, sitozolik Cu-Zn SOD' dır (41, 54, 55).

SOD enzimi fizyolojik olarak oksijen metabolize eden hücrelerin süperoksit radikallerinden kaynaklı zararlı etkilerini inhibe etmektedir. Böylece lipid peroksidasyonu oluşumu engellenir. Oksijen kullanımı fazla olan dokularda SOD aktivitesi doku oksijen basıncı artışı ile artarmaktadır. Bu şekilde yüksek oksijen basıncına bağlı olarak metabolizma sırasında süperoksit üretimi fazla olmasına rağmen SOD enzimi sayesinde hücre içi süperoksit radikalinin düzeyi düşük tutulmaktadır. Hücre dışında SOD'ın aktivitesi oldukça düşüktür. SOD'ın, süperoksit radikaline olan etkisi aşağıdaki şekildedir.

$$SOD-Cu^{+2}+O_2^{\cdot -}\longrightarrow SOD-Cu^{+}+O_2$$

$$SOD-Cu^{+}+O_2^{\cdot -}+2H^{+}\longrightarrow SOD-Cu^{+2}+H_2O_2$$

SOD, fagosite edilmiş bakterilerin sitozolde zararsız hale getirilmesi gibi çeşitli hücresel fonksiyonların yerine getirilmesine destek olmaktadır. Buna bağlı olarak lenfositler fazla miktarda SOD bulundurmaktadır. SOD enziminin katalitik aktivitesinin yüksek olması hücrelerde süperoksit birikimini engellemektedir. Fakat çeşitli patolojik durumlarda hücrelerde süperoksit radikallerinin artması ile süperoksite özgü tepkimeler görülebilmektedir (55) .

2.3.2. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), yapısında 4 adet selenyum atomu barındıran tetramerik yapıdaki bir selenoproteindir. GSH-Px, hücre içerisinde hidroperoksitlerin (ROOH) ve H_2O_2'nin indirgenmesinden sorumludur. Selenyuma bağımlı veya selenyuma bağımsız olan iki formu vardır. Selenyuma bağımlı formu H_2O_2 ve ROOH'leri, selenyumdan bağımsız formu ise yalnızca ROOH'leri metabolize eder. H_2O_2 ve ROOH'lerin indirgenmesi sırasında hidrojen verici olarak görev yapan glutatyon (GSH), okside haline (GSSG) yükseltgenir. GSSG ise glutatyon redüktaz (GSH R) enzimi tarafından tekrar GSH'a indirgenir. Glutatyonun bu şekilde yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonu nikotinamid adenin dinükleotit fosfata (NADPH) bağımlıdır.

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GSH-Px} ROH + GSSG + H_2O$$

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GSH-Px} GSSG + 2H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GSH-R} 2GSH + NADP^+$$

GSH-Px'ın farklı dokularda bulunan ve farklı görevleri olan 5 izoenzimi tanımlanmıştır. GSH-Px, solunum patlaması sırasında diğer antioksidanlarla birlikte fagositik hücrelerin serbest radikallerin etkisinden korur. E vitaminin yetersizliğinde membranların oksidadif strese karşı korunmasında GSH-Px etkin bir rol oynamaktadır. Ayrıca eritrositleri oksidatif strese karşı en etkili antioksidan GSH-Px'dır. Se eksikliği sonucu GSH-Px yetersizliği ortaya çıkar ve GSH-Px yetersizliği, hidrojen peroksidi arttırarak şiddetli hücre hasarına yol açar (51, 56, 57).

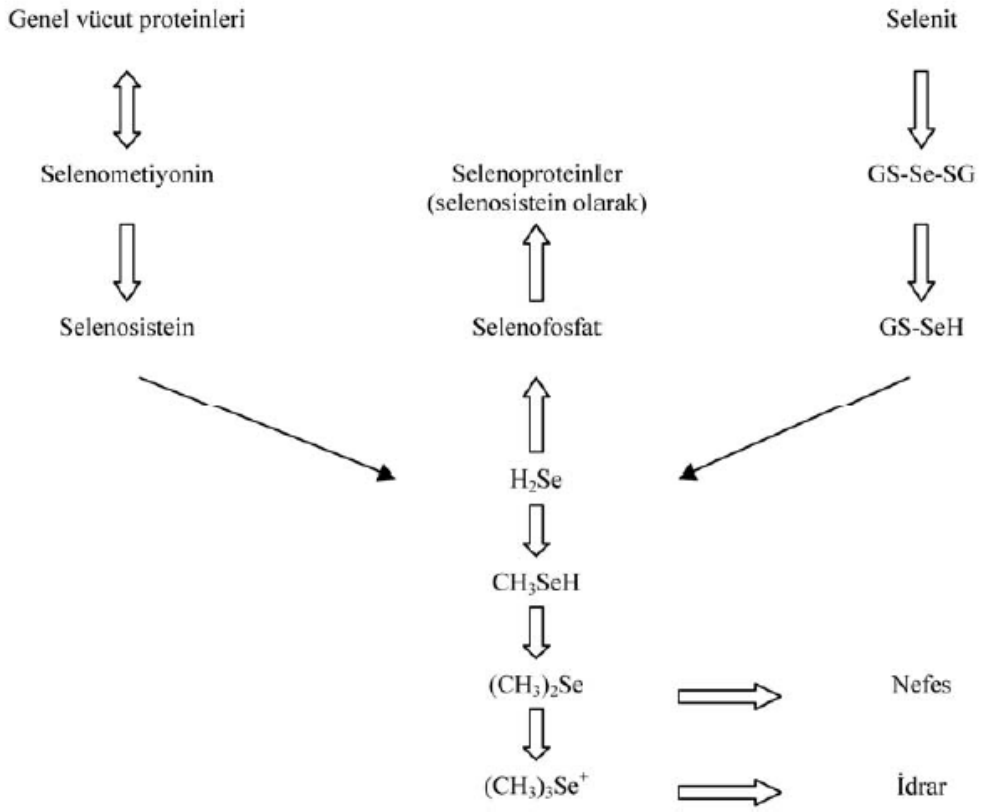
2.3.3. Selenyum

İlk kez 1817'de keşfedilen selenyum, canlılarda birçok enzimin kofaktörü olarak bilinen esansiyel bir elementtir . Doğada iki şekilde bulunmaktadır; hava ve suda erimiş halde, karada ise katı halde bulunur (58).

Canlılardaki Se önceleri toksik özelliğiyle bilinse de, 1957 yılında yapılan bir çalışmada Se'un E vitamini eksik sıçanlarda karaciğer nekrozuna karşı koruyucu etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Canlılarda normal büyüme, gelişme ve homeostatik fonksiyonların sürdürülmesinde Se'un gerekli olduğu tespit edilerek esansiyel bir element olarak tanımlanmasından sonra Se ile ilgili yapılan araştırmaların sayısı artmıştır (59).

Canlılardaki selenyumun en büyük kaynağı diyettir ve alınan miktar, besinlerdeki Se konsantrasyona bağlıdır. Yetişkinlerde Se'un tavsiye edilen günlük alımı 55µg olarak belirtilmişse de Avrupa, Asya ve Afrika toplumlarında günlük Se alımı bu değerin altında kalmaktadır. Günlük Se alımının 100-200 µg olması genetik hasarı ve kanser gelişimi baskılarken, bu değerin 400µg/gün olmasının toksik etki meydana getirdiği belirtilmektedir. İnsan vücudunda Se başlıca karaciğer, kas, böbrek dokularında ve plazmada bulunmaktadır (58, 60).

Selenyum, organik olarak selenometiyonin ve selenosistein formlarında, inorganik olarak ise selenit (+4), selenat (+6) ve selenid (-2) formlarda bulunur. Selenat ve selenit in vivo olarak selenosisteine dönüşür. Barsaktan absorbe edilen organik formdaki selenometiyonin, metiyonin ile yarışır ve metiyonin içeren vücut proteinlerinde depolanır veya transsülfürasyon ile selenosisteine çevrilir. Tüm seleno bileşikleri hidrojen selenide katabolize edildikten sonra trimetilselenonyum iyonu olarak idrarla veya dimetil selenid şeklinde solunum yoluyla atılır. Selenyum metabolizması Şekil 2-5'te gösterilmiştir (60, 61).



H_2Se: hidrojen selenid, CH_3SeH: metil selenid, $(CH_3)2Se$: dimetil selenid, $(CH_3)3Se+$: trimetilselenonyum iyonu, GS-Se-GS: selenodiglutatyon, GS-SeH: glutatyon selenid

Şekil 2-5: Se Metabolizması

Selenyumun ogranizmaya etkisi selenoproteinler ile gerçekleşmektedir. Selenoproteinlerin yapısında bulunan selenosisteinler belirli pH'larda anyonik halde bulunarak redoks reaksiyonlarının gerçekleşmesini sağlar. Selenoproteinler ayrıca yapısal ve transport fonksiyonları ile de organizmaya etki ederler.

Organizmada Se selenosistein halinde GSH-Px, tiyoredoksin redüktaz ve iyodotironin deiyodinaz enzimlerinin yapısında bulunur. GSH-Px, indirgenmiş GSH ile birlikte H_2O_2 ve lipid hidroperoksitler nedeni ile oluşan, oksidatif stresi azaltan veya önleyen antioksidan bir enzimdir. E vitamini ile sinerjik olarak çalışan GSH-Px, hücre büyümesi ve p53 tümör supresör proteinin çalışmasının düzenlenmesinde etkilidir (8, 61, 62). Selenyum yetersizliği, Se içeren enzimlerin suboptimal işlevleri ile meydana gelen azalmış antioksidan savunma, redoks regülasyonu ve enerji üretimi ile ilişkilidir (63).

2.3.4. Çinko

Çinko (Zn), yüzlerce enzim ve proteinin yapısında bulunarak önemli biyolojik fonksiyonlara sahip bir eser elementtir. Yer kabuğunda en fazla bulunan elementlerden biri olan çinko genellikle oksijen, klor ve kükürt ile bileşik halde bulunur. Çinkonun biyolojik mekanizmalardaki önemi 1869 senesinde anlaşılmıştır. Çinkonun canlılar için esansiyel olduğu uzun yıllar bilinmesine rağmen Zn eksikliği ilk kez 1961 yılında belirtilmiştir (64,65).

Organizmadaki Zn miktarı genellikle diyet ile sağlanmaktadır ve diyetteki Zn konsantrasyonu, Zn emilimini etkileyen maddeler ve gebelik gibi faktörler alınan Zn miktarını değiştirmektedir (66).

Sağlıklı yetişkin bir bireyde tavsiye edilen günlük Zn ihtiyacı için 8-11 mg/gün olarak tespit edilmiştir. Zn'nun biyolojik yarı ömrü yaklaşık 280 gün olarak belirlenmiştir ve yetişkinlerdeki tolere edilebilir maksimum günlük alım 40mg/gün kadardır (11, 65, 66).

İnsan vücudunda Zn'nun homeostazı gastrointestinal sistem epitel hücreleri tarafından düzenlenir (11, 67). Diyet ile alınan Zn'nun % 15-30 kadarı absorbe edilir (68, 69). Diyet ile alınan Zn bağlayıcı ajanlar çinkonun biyoyararlılığına etki etmektedir (11, 68, 70). Histidin, methionin gibi aminoasitler Zn emilimini arttırırken; mısır, pirinç, tahıl ve baklagillerde bulunan fitat gibi Zn ile kararlı bileşik oluşturan organik maddeler Zn biyoyararlılığını inhibe eder. Çinko iyonlarının vücuttan atılımı , çözünemeyen kompleks bileşikler ile gerçekleşir. Yiyeceklerde bulunan diğer elementler de Zn emilimini etkileyebilmektedir. Örneğin diyetteki Fe miktarı arttıkça Zn emilimi azalmaktadır (71). Ayrıca B6 vitamini, D vitamini, D-penisilamin ve prostoglandin Zn

emilimini artırırken; oksalat, kalay, toprak ve fosfatlar emilimini engelleyebilir (11, 66, 68, 70).

Plazmadaki Zn'nun yaklaşık olarak %60'ı albümine, %10'u düşük bir afinite ile transferrine ve %30'u sıkı bir şekilde α2-makroglobulin'e bağlıdır. Plazmadaki Zn düzeyi ile albümin arasında bir uyum vardır. Albümin düzeyindeki düşüş Zn düzeyini de düşürmektedir (11, 70).

Memelilerde Zn'yu hücre içine veya dışına taşıyan belirli taşıyıcı proteinler vardır. Zn'nun sitoplazmaya taşınmasında transmembran proteinler (ZIP, Zinc-Iron Related Transporter Protein) görev alırken, Zn'nun hücre dışına veya veziküllere taşınması Zn taşıyıcı proteinler (ZnT) ailesi ve tarafından gerçekleştirilmektedir.

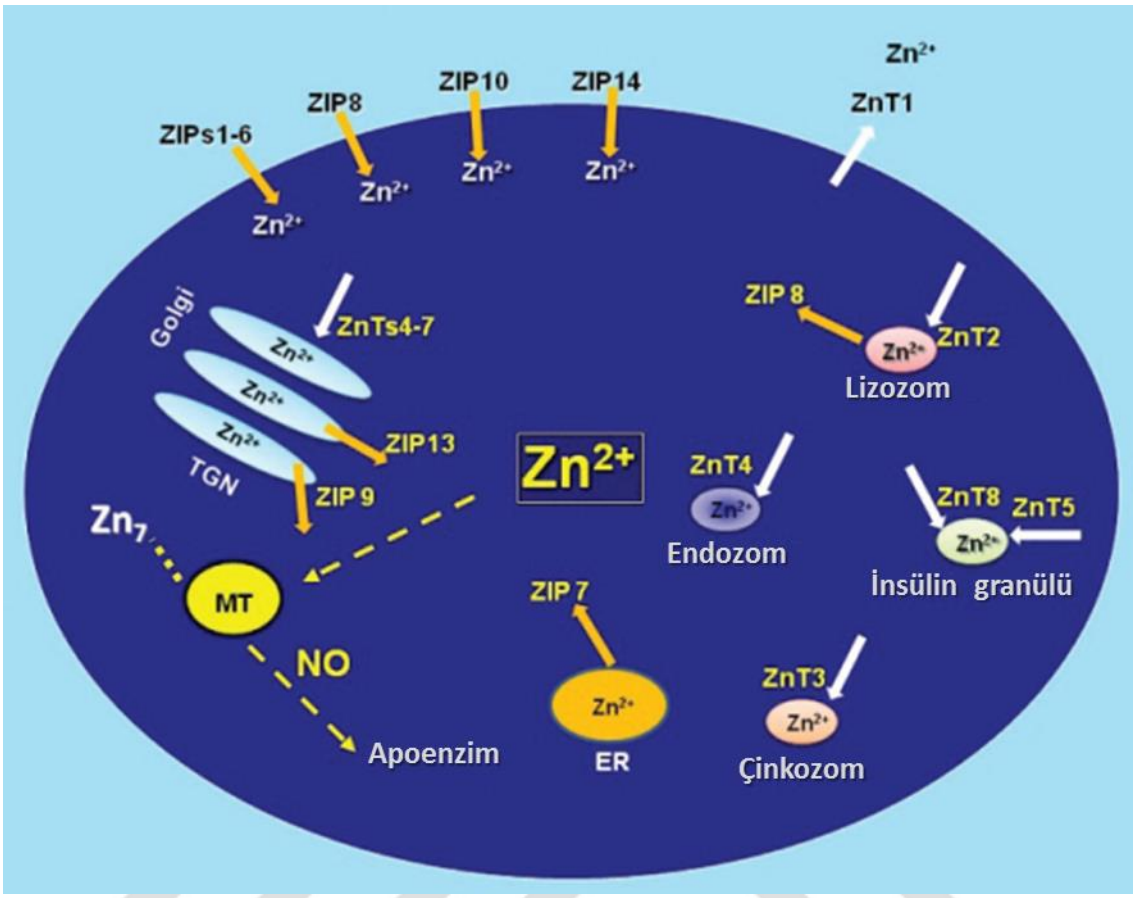
Zn çeşitli dokulara farklı taşıyıcı proteinler ile taşınmaktadır. Gastrointestinal sistemden Zn'nun absorbsiyonu ZIP-4 proteinleri ile sağlanırken, ZnT-1 ince barsak hücrelerinde, ZnT-2 barsak, böbrek ve testislerde, ZnT-3 sadece beyin ve testislerde görev almaktadır (11, 65, 70, 72).

Hücre içinde Zn'nun hareketi sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. İntraselüler sıvıdaki serbest Zn seviyesi ZIP, ZnT ve hücre içi Zn deposu olarak bilinen metallotiyonin (MT) ile oldukça düşük değerlerde tutulmaktadır (Şekil 2-6) (72,73).

MT, Zn iyonları için depo görevi yapmasının yanı sıra, oksitlenmiş glutatyon (GSSH) ile bağladığı Zn iyonlarını serbestleştirerek gerekli olan Zn'yu sağlayabilmektedir. MT'nin hücrelerdeki etkisi glutatyonla eşdeğer olarak görülmektedir (11, 74).

İnsan vücudundaki Zn'nun %85'i kemik ve kaslarda, %11'i karaciğer ve deride, %2-3'ü ise diğer dokularda bulunmaktadır. Total vücut Zn seviyesinin en iyi belirteçleri, plazma ve serum Zn seviyeleridir. Plazma seviyesi için sabahları açlık alt limiti 11,5 μmol/L (750 mg/L) olarak belirlenmiştir (66, 70).

Zn'nun vücuttan atılımının %70'i dışkı ile, bir miktarı da idrar ve ter yoluyla gerçekleşmektedir. Zn eksikliğinde dokular arasındaki Zn kaybı birbirinden farklıdır (11, 69).



Şekil 2-6:Memelilerde Zn Homeostazı

Organizma için esansiyel bir element olan Zn, intraselüler bir düzenleyicidir. Moleküler etkileşimlerde karbonhidrat ve proteinlere yapısal destek sağlar. Zn-parmak motifi ile DNA ile etkileşir. Zn, membranların bütünlüğünü koruyarak iyon kanallarının stabilitesini sağlar. Redoks reaksiyonlarına katılmayan Zn organizmada kararlı halde bulunur. Hücresel homeostazın sağlanmasında, membran onarımında, hücrenin serbest radikallere karşı korunmasında, gen ekspresyonunda, hücre çoğalmasında ve apoptozun engellenmesinde görev alırlar (11, 13, 66, 69, 72, 74).

Zn'nun dokuları serbest radikal hasarından koruması yeterli miktarda MT ile tutunmasına, SOD' un yapısında bulunmasına, tioller için koruyucu ajan olmasına bağlıdır (70).

İntestinal sistemden Zn kaybı artması veya emilimin azalmasıyla Zn eksikliği meydana gelir. Hücre aracılı immünitenin baskılanması, çocuklarda yetersiz büyüme, gelişim geriliği, yaraların geç iyileşmesi, saçların kolay kırılması, dökülmesi, renginin değişmesi Zn eksikliğinin belirtileridir. Zn sinir sisteminde de etkilidir ve eksikliğinde

ataksi, sinir iletiminde azalma, nöropsikolojik ve şaşkınlık performansında düşüş gözlenir (66, 69).

Organizmanın savunma mekanizması Zn homeostazı ile yakından ilişkilidir. Zn seviyesindeki azalma antikor oluşumunu da azaltıp bağışıklık sistemini yetersiz bırakmaktadır (74). Zn'nun oksidatif stres ile ilişkisi ve redoks reaksiyonlarına katılmıyor olması sebebiyle diyabetik hastalar için önem taşımaktadır (66).

2.4. Apoptoz

Apoptoz, organizmada gereksinim duyulmayan veya fonksiyonları bozulan hücrelerin, kendi kendine ölmesi anlamında kullanılmaktadır. Hücre ölümüyle ilgili ilk çalışmalar 1920 yılında ışık mikroskobunun keşfiyle başlamışsa da apoptoz tanımı ilk olarak 1972 yılında Kerr, Wylie ve Currie tarafından kullanılmıştır (75).

Apoptotik mekanizma, başka bir deyişle programlı hücre ölümü tüm yüksek canlılarda embriyonik dönemden itibaren yaşamları boyunca görülmektedir. Organizmada hücrelerin yaşam süreleri birbirinden farklıdır. Sinir hücreleri gibi bazı hücreler yıllarca yaşarken, deri veya gastrointestinal sistem hücrelerinin yaşam süreleri oldukça kısadır. Apoptoz dokuların kendini yenilemesinde, tamirinde ve hücresel homeostazın korunmasında organizma için yüksek öneme sahiptir (76). İnsan vücudunda saniyede yaklaşık olarak bir milyon hücre apoptoz ile vücuttan uzaklaştırılırken bu hücrelerin yerine yenileri yapılmaktadır. Sağlıklı yaşam, hücresel yapım (mitoz) ve yıkım (apoptoz) arasındaki homeostatik denge var olduğu müddetçe mümkün olmaktadır. Bu dengenin apoptoz yönüne bozulması hücre kaybı oluşturarak iskemik hasar veya dejeneretif hastalıklar gibi sonuçlar doğurabilirken, dengenin hücre yapımı tarafından bozulması otoimmün veya kanser gibi hastalıkları ortaya çıkarmaktadır (76,77).

2.4.1. Apoptozun Aşamaları

Apoptoz, hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder.

Bu aşamalar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1. Hücre içinden veya dışından gelen ölüm sinyalinin alınması,
2. Proteazların (Kaspaz) aktivasyonu,
3. Aktifleşen kaspazların hedef proteinleri yıkması, hücre içi yapısal ve biyokimyasal değişimler,
4. Apoptotik cisimlerin oluşumu,
5. Apoptotik cisimlerin fagositozu (78).

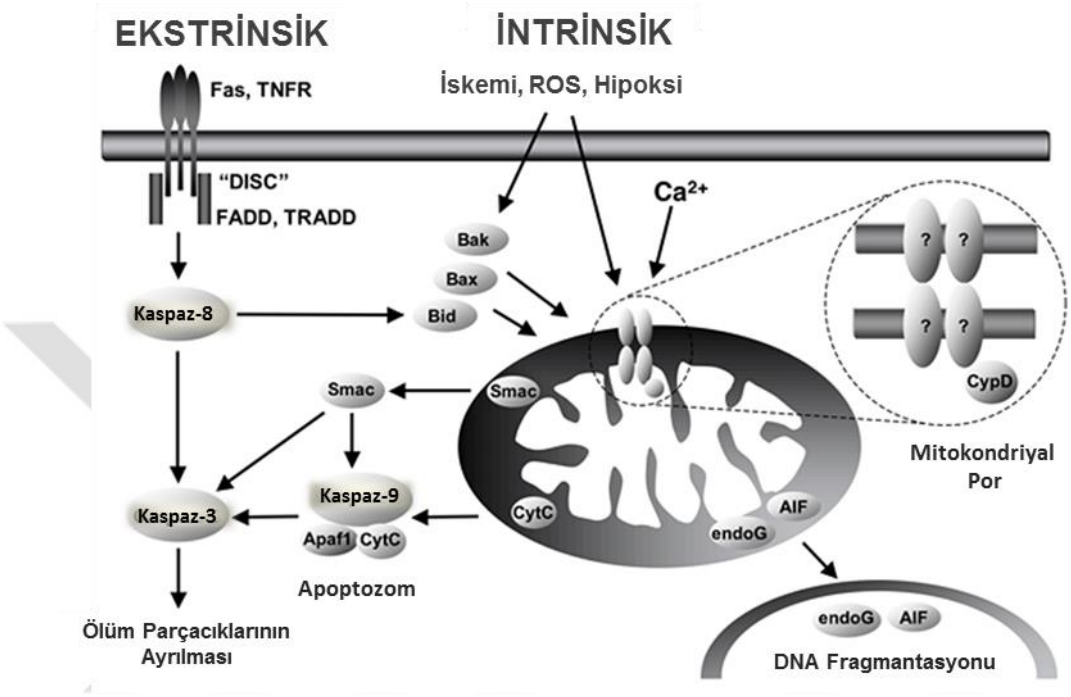
Apoptozu başlatan sinyaller çevresel uyaranlara bağlı olarak hücre dışından veya hücre içindeki değişimlerden kaynaklanabilir. Hücre dışı uyaranlar koloni uyarıcı faktörler (CSF), tümör nekroz faktörü (TNF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), nöron büyüme faktörü (NGF), ilaçlar, çeşitli antijenler, glukokortikoidler ve radyasyon gibi pozitif uyaranlar olabilmektedir (79). Apoptotik sinyaller sitoplazmada ikinci habercilerin sayısını arttırarak özelleşmiş farklı apoptotik yollarla hücreyi apoptoz götürebilmektedir (80).

Apoptozda görülen morfolojik ve biyokimyasal değişimler; çekirdek büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, sitoplazma matriksi ve organellerin yoğunlaşması, tomurcuklanma ve DNA parçalanması şeklinde gerçekleşmektedir (81, 82).

Apoptozun en önemli belirteçlerinden biri DNA'nın internukleozomal fragmantasyonudur. DNA, yaklaşık olarak 180-200 baz çifti boyutunda parçalar oluşturacak şekilde parçalanır. Bu durum jel elektroforezinde merdiven görüntüsü verdiği için DNA merdiveni (DNA ladder) olarak adladırılmaktadır (83). Komşu hücrelerin apoptotik hücre veya cisimcikleri fagosite etmesi inflamasyon oluşumunu engellemektedir.

Hücreler çevrelerine karşı bir yanıt olarak apoptozu seçerler. Belirli faktörlerin eksikliği veya ölümcül faktörlerin varlığı sonucunda apoptoz meydana gelir. Hücre canlılığı, hücrelerin çevrelerinden gelen yaşam sinyallerine bağlıdır. Hücre dışından gelen hipertermi, hipoksi veya radyasyon gibi sinyaller, hücre membranındaki ölüm reseptörlerini aktive ederek apoptozu başlatırlar.

Hücrede apoptoz iki temel yolak ile gerçekleşmektedir. Bunlardan biri çevresel uyaranlara bağlı olan reseptör aracılı apoptoz, diğeri ise hücre içi uyaranlar sonucu gerçekleşen mitokondri aracılı apoptozdur (Şekil 2-7).



Şekil 2-7 : Reseptör Aracılı ve Mitokondri Aracılı Apoptoz Yolakları

Reseptör aracılı apaoptozda rol alan en önemli membran reseptörleri TNFR (Tümör Nekroz Faktör Reseptör) ailesidir ve en az 19 üyeden oluşmaktadır. Apoptoz oluşturan TNFR'den en önemlileri TNRF1 ve Fas reseptörleridir. Bu reseptörler uyarıcı sinyali aldıkarında, hücre sitoplazmasındaki adaptör proteinlere bağlanır. Adaptör proteinlerin yapılarındaki ölüm parçaları da apoptozu başlatacak olan prokaspazları (kaspaz 8) aktif hale getirirler (84). Kaspaz 8'in aktivasyonu apoptozun ilerlemesini sağlayacak diğer kaspazları (kaspaz 3,6,7) aktive eder (81, 82, 85).

DNA hasarı, pH'daki değişim, hücre döngüsündeki bozukluklar gibi hücre içi sinyaller hücreyi apoptoza götürmektedir ve bu hücre içi sinyallerde, mitokondri önemli rol oynamaktadır. Hücre içinde ölüm sinyallerinin oluşması kaspaz aktivasyonunu (kaspaz 3) gerçekleşitirerek hücreyi geri dönüşümsüz olarak apoptoza götürür (86, 87, 88).

2.4.2. Apoptozun Düzenlenmesi

Apoptozun düzenlenmesinde genel olarak seramid, kalsiyum, bcl-2 ailesi gibi moleküller, kaspazlar, p53, sitokrom-c gibi proteinler ayrıca mitokondriyonlar rol alır. Apoptotik süreç esnasında hücre dışındaki kalsiyum iyonu hücre içine girerek gen regülasyonunu, proteaz, endonükleaz ve transglutaminaz enzimlerinin aktivasyonunu, ve hücre iskeleti organizasyonunu etkiler (89).

2.4.2.1. Bcl-2 ailesi:

Bcl-2 (B-hücre lenfoma/lösemi-2), 26 kDa ağırlığında, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum çevresine yerleşmiş proteinlerdir. Bcl-2, Caenorhabditis elegans üzerinde yapılan genetik çalışmalarda bulunan ve apoptozu engelleyen Ced-9 adlı molekülün memelilerdeki karşılığıdır (90, 91).

Bcl-2, bir çok sistemde mitokondri aracılı apoptozun ana düzenleyicileridir. Bcl-2 ailesi genleri, heterodimer veya homodimer forma sahip olmaları hücrenin apoptoza eğilimini göstermektedir. Bcl-2 ailesi birbirine zıt etki gösteren iki tip protein grubundan oluşmaktadır.

- Proapoptotik proteinler: Bad, Bax, Bid, Bak, BclXs, Bim, Noxa, Puma
- Antiapoptotik proteinler: Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1

Hücrede proapoptotik proteinlerin fazla olması hücreyi apoptoza eğilimini arttırmakta, bunun tam tersi olarakta antiapoptotik proteinlerin fazla olması hücrenin apoptoza eğilimini azaltmaktadır.

Proapoptotik proteinler sitozolde yer alırlar. Proapoptotik proteinlerden olan bax, apoptoz esnasında sitoplazmadan mitokondriye geçer ve mitokondri membranında kanalların açılmasını ve sitoplazmaya sitokrom-c serbestleşmesini sağlar. Proapoptotik proteinler AIF'ün (Apoptoz İndükleyici Faktör) salınımını arttırıp apoptozu indüklerler. Antiapoptotik proteinler ise mitokondrinin dış membranında, çekirdek membranında ve endoplazmik retikülümde yer alırlar ve apoptozu engelleyip hücre yaşamını uzatır. Antiapoptotik proteinler özellikle Ca^{++} iyonunu kontrolde tutar ve por oluşumunu sağlayarak iyon transportunu düzenlerler. Ayrıca kaspazların öncü formlarıyla sitokrom-c ve AIF sebestleşmesini bloke edip apoptozu inhibe ederler (89, 92, 93, 94).

Bcl-2 ailesi, büyüme faktör eksikliği, oksidanlar, hipoksi, radyasyon ve Ca^{++} iyon artışı ile uyaralırlar. Bcl-2 ailesinin hücre yaşamı üzerindeki etkileri proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki denge üzerine kuruludur.

Hücrelerin yaşamı bcl-2/bax oranı ile belirlenir. Bcl-2 proteinlerinin artışı hücreleri hayatta kalmasına, bax proteinlerinin artışı ise hücrelerin ölümüne sebep olmaktadır (82, 86, 95).

2.4.2.2. Mitokondri:

Mitokondri apoptozun oluşmasında kritik öneme sahiptir. Apoptoz esnasında mitokondri iç membrandan sitoplazmaya serbestleşen sitokrom-c ve AIF apoptozun ilerlemesine katkı sağlar. Bundan bağımsız olarak mitokondriyon transmembran potansiyelinin ($\Delta\Psi m$) azalması membranı geçirgen hale getirir. Mitokondride meydana gelen hasar farklı hücre ölüm yollaklarını aktifler. Mitokondriden serbestleşen sitokrom-c kaspaz aktivasyonunu kolaylaştırır (95).

2.4.2.3. Kaspaz Ailesi:

Kaspazlar (Cysteine Aspartate Specific Proteases- CASPASE) yapılarında bulunan sisteinden dolayı sistein proteazlar olarak adlandırılan ve sitoplazmada inaktif olarak bulunan (prokaspaz) bir grup preteolitik enzimdir. Kaspazlar ilk olarak Caenorhabditis elegans'ın hücre ölümünün gerçekleşmesi için gerekli olan genin ürünü olarak tanımlanmıştır. Bu ürünün memelilerdeki karşılığı olan kaspaz-1 bu ailenin ilk tanımlanan üyesidir (96).

Kaspaz ailesinin amino asit dizilimlari birbirine benzerdir ve 30-50 kD ağırlığındadır. Tüm kaspazlar proenzimler olarak üretilirler ve NH – terminali, küçük alt ünite (10kD civarı), büyük alt ünite (20kD civarı) şeklinde 3 kısımdan oluşurlar. Aktivasyona uğrayan kaspazlarda küçük ve büyük alt üniteler arasında heterodimer bir yapı oluşturacak birleşmeler ortaya çıkar (97).

Kaspazlar iç veya dış kaynaklı olarak uyarılabilir ve parçalanarak aktif enzim formuna dönüşürler. Aktifleşen kaspazlar birbirlerini uyararak proteolitik reaksiyonlar ile apoptoza neden olurlar.

Kaspaz ailesine ait memelilerde tanımlanan ve çoğu apoptozda görev alan 14 kaspazın 12 tanesi insanda tespit edilmiş. Kaspazlar benzer özelliklerine bağlı olarak 3 gruba ayrılmıştır (98) ;

1) Başlatıcı kaspazlar → Kaspaz 2,8,9,10
2) Efektör kaspazlar → Kaspaz 3,6,7
3) İnflamatuar kaspazlar → Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14

Kaspaz reaksiyonu, inaktif halde bulunan başlatıcı kaspazlar ile adaptörlerinin etkileşimi sonucunda başlar. İlk aktivasyon proapoptotoik ve antiapoptotik proteinler ile kontrol edilir ve bu apoptoz reaksiyonlarını düzenleyici adım olmaktadır. Başlatıcı kaspazların aktive olmaları diğer efektör kaspazları aktive ederler. Efektör kaspazlar, hücrede yapısal proteinleri ve enzimleri parçalayarak hücre yapısının değişimlerine yol açarlar. İnflamatuar kaspazların fonksiyonu daha az bilinmektedir fakat fonksiyonları daha fazladır.

Mitokondri aracılı apoptozun başlatıcı kaspazı kaspaz-9'dur ve sitozolik adaptör protein Apaf-1'e bağlanarak apoptozom adı verilen protein kompleksini oluşturur. Ölüm reseptörü aracılı apoptozun başlatıcı kaspazları ise kaspaz-8 ve 10'dur. Kaspaz- 2'de mitokondriyel hasar oluşturan başlatıcı kaspaz olarak bilinmektedir. Kaspazlar için tanımlanan 40'dan fazla substrat vardır. Apoptoz inhibitör proteinleri (IAP) olarak bilinen Survivin, Livin, cIAP-1/2 ve XIAP özellikle kaspaz-3,7,9'u inhibe ederek apoptozu engellerler (86, 87, 88)

Sonlandırıcı kaspazların aktive olmaları ile sitoplazmada ve çekirdekte hedef proteinlerin yıkımı gerçekleşir. Çekirdekte DNA endonükleaz ile bağ yapan protein, kaspazlar tarafından yıkılarak endonükleaz serbestleşir. Ca^{++}-Mg^{++} bağımlı endonükleaz çekirdek içine girerek DNA kırıkları oluşturur. Diğer bir yandan aktifleşen kaspazlar aktini filamanlarının yıkan bir proteini aktifleştirir ve hücrenin normal şekli kaybolur.

Kaspazların etkisiyle asimetrisi bozulan hücre membranının iç yüzündeki fosfatidilserin membranın dış yüzüne yerleşir ve oluşan membran değişiklikleri çevre fagositler tarafından fark edilerek hücre fagosite edilir (84, 99).

Apoptoza giren hücrelerin yüzeylerinde meydana gelen değişiklikler sonucunda diğer hücrelerle olan temas yüzeyleri bozulur. Hücreler su kaybederek büzüşürler ve dolayısıyla sitoplazma yoğunlaşarak organeller birbirlerine yakınlaşır. Membranların

bütünlüğü korunduğu için genel olarak organeller sağlamdır. Fakat ribozomlarda çökme ve endoplazmik retikulumda genişlemeler görülebilir. Genel olarak sitoplazmada mikrofilamanlar kümeleşirken, mitokondrilerin normal yapılarında bir değişiklik olmaz (84).

Apoptoz özellikle hücre çekirdeklerinde değişiklik meydana getirmektedir. Hücre gibi çekirdekte de büzülmeler görülür ve kromatinin çekirdek membranı yakınlarında yoğunlaşmaktadır. Işık mikroskobuyla boyanmış hücre kesitlerinde apoptoz gözlemlenebilir. Mikroskop altında hücre çekirdeği membranında yoğunlaşan kromotin şeklinde izlenebilir. İlerlemiş apoptotik süreçte hücreler “apoptotik cisim” adı verilen küçük kesecikler halinde parçalara ayrılmaktadır (84).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kimyasallar ve Kitler

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Wisent)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (Wisent)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Wisent)

Tripsin – EDTA (Wisent)

Dimetyhl Sulfoxide (DMSO)

Penicillin-Streptomicyne (Wisent)

Tripan Mavisi (Gibco)

Tiyobarbitürik Asit (TBA) (Sigma)

Trikloroasetik Asit (TCA) (Sigma)

Hidrojen Peroksit (H_2O_2) (Merck)

Paraformaldehit (Merck)

Triton X –100 (Merck)

Fenilmetanesülfonil Florid (PMSF) (Sigma)

Protease İnhibitor Coctail (Sigma)

Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (Sigma)

Tween-20 (Amresco)

Entellan (Merck)

Proteinase K (Wisent)

Tris Base Powder (Wisent)

Hematoksilen (Merck)

Çinko Sülfat (Merck)

Sodyum Selenit (Sigma)

Ksantin oksidaz (Sigma)

Ksantin (ABRC GmbH)

Sodyum Karbonat (Sigma)

Bakır Klorür (Aldrich)

Amonyum Sülfat (Merck)

Nitro Blue Tetrazolium (N.B.T) (Sigma)

Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma)

Apoptag Plus in situ Apoptosis Detection Peroksidase Kit (Millipore)

AEC Substrate Kit (Life Technologies)

Histostain-Plus Bulk Kit (Life Technologies)

Anti-Caspase 3, active form (Millipore)

Bcl-2 Antibody (Novus)

Glutathione Peroxidase Activity Kit (Enzo)

3.1.2. Cihazlar

CO_2 inkübatörü (ESCO Cell Culture CO_2 Incubator)

Laminer akım kabini (ESCO Sentinel Gold Microprocessor Control System)

Işık mikroskobu (Leitz-Diavert)

Işık mikroskobu (Leica DM 2500)

Soğutmalı satrifüj (Z 326 K - Hermle Labortechnik)

Otoklav cihazı (Nüve Steam A- OT 40L),

İnkübator (Nüve Cooled Incubator ES120)

Derin dondurucu (-80 ^{0}C) (Nüve Direct Freeze DF 490)

Azot tankı (Lab Systems Taylor-Wharton)

Spektrofotometre (UV-1800 Shimadzu UV-VIS Spectrophotometer)

Mikroplate okuyucu (Synergy H1 Hybrid Reader-BioTek)

Hassas Terazi (Kern PFB)

Deiyonize Su Cihazı (Nüve NS104)

Buzdolabı (Arçelik)

Su banyosu (Nüve BM302)

Gerilim kontrollü osilatör (Feedback, England, 532/VCO/0138)

Spektrum analizörü (Rohde&Schwarz)

Doğru gerilim kaynağı (Yıldırım, AC/DC Switching Power Supply, CYS 152)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Eriyikler

3.1.3.1. Hücre Kültürü Örneklerinin Hazırlanmasında Kullanılan Eriyikler

Lizis Tamponu

% 0.5	TritonX-100
1 mM	PMSF
10 mM	Tris-HCl (pH:7.4)
1mM	EDTA

Proteaz İnhibitör Kiti

3.1.3.2. Malondialdehit (MDA) Tayininde Kullanılan Eriyikler

% 0.75	TBA Çözeltisi
% 30	TCA Çözeltisi
5M	HCl

3.1.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayininde Kullanılan Eriyikler

400 mmol/L	N_2CO_3
0.6 mmol/L	N_2EDTA
0.3 mmol/L	Ksantin
150 µmol/L	NBT
0.86 mg/mL	Bovine Serum Albumin (BSA)
0.8 mmol/L	$CuCl_2 2H_2O$
167 U/L	Ksantin Oksidaz
2 mol/L	$(NH_4)SO_4$

3.1.3.4. Morfolojik İncelemede Kullanılan Eriyikler

%4'lük Paraformaldehit

4gr Paraformaldehit PBS eriyiği ile 100ml'ye tamamlandı ve 65 °C'de karıştırıcı ile çözelti berraklaşıncaya kadar 1N NaOH damlatılarak karıştırıldı.

%0.05 Tween-20/PBS

25 µl	Tween 20
50 ml	PBS

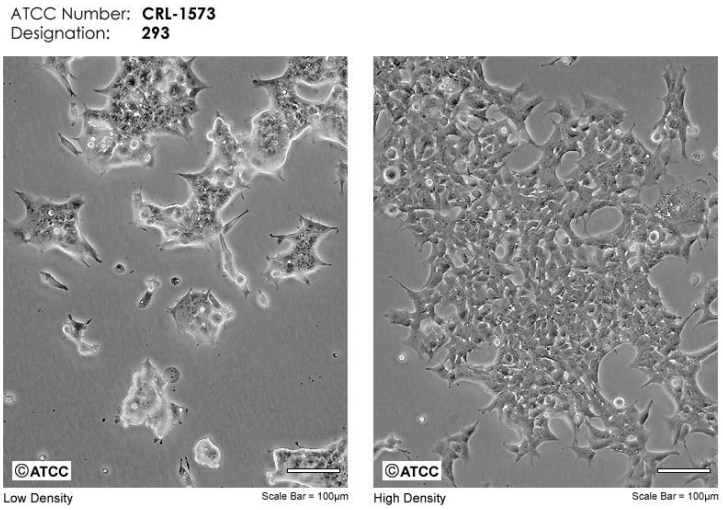
Metil Yeşili

1.36 g	Sodyum asetat
0.5 g	Metil yeşili
100 ml	Distile su

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirdiğimiz deneysel çalışmalarımızda kullanılan insan embriyonik böbrek hücreleri (Human Kidney Embriyonic Cells-HEK293), ticari olarak Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection-ATCC) temin edildi (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: HEK293 Hücreleri

Soğuk zincir ile teslim alınan hücreler çoğaltılmadan önce -196 °C'de sıvı azot tankında muhafaza edildi. Hücre kültürü çalışmaları için standart kültür ortamı %89 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), %10 ısı ile inaktive edilmiş sığır serumu (FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin antibiyotik içerecek şekilde hazırlandı. Karbondioksit inkübatörü dekontamine edildi ve inkübatör standart kültür ortamı ayarlarına (37°C'de %5 CO_2 ve % 97 nemli hava) getirildi. Çalışmalara başlamadan önce çalışma sırasında kullanılacak materyaller otoklavlandı ve 37°C'lik etüvde sterilize edildi. Çalışmada kullanılacak eriyikler hazırlandıktan sonra steril filtrelerden geçirildi ve otoklavlandı (Nüve Steam A- OT 40L, Türkiye) (Şekil 3-2). Her çalışmadan önce laminar akım kabini (ESCO Sentinel Gold Microprocessor Control System, USA) (Şekil 3-3) ve hücre kültürü laboratuvarı 15 dakika boyunca ultraviole ışık (UV) ile sterilize edildi. Laboratuvar içerisinde kullanılacak tüm yüzeyler ve laminar akım kabininin içi %70'lik etil alkol ile temizlendi.

Şekil 3-2: Otoklav Cihazı

Şekil 3-3:Laminar Akım Kabini

3.2.1.1. Hücrelerin Çözdürülmesi

Hücreler deneysel çalışmamızda kullanılmak üzere sıvı azot tankından çıkartılarak 37°C'deki su banyosunda hızlı bir şekilde çözülmesi sağlandı. Su banyosundan alınan kriyotüpler kurulanıp alkolle silindikten sonra laminar akım kabininde 9 ml besiyeri bulunan santrifüj tüpünün içerisine aktarıldı. 1000 rpm'de (revolutions per minute) 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvısı atıldı. Hücre peleti üzerine 2 ml besiyeri konularak pipetaj yapıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu 25 cm^2'lik kültür kabına (T-25 flask) aktarıldı ve üzerine 3 ml besiyeri daha eklendi. Hücreler CO_2 inkübatöründe inkübasyona bırakıldı.

3.2.1.2. Hücrelerin Pasaj İşlemi

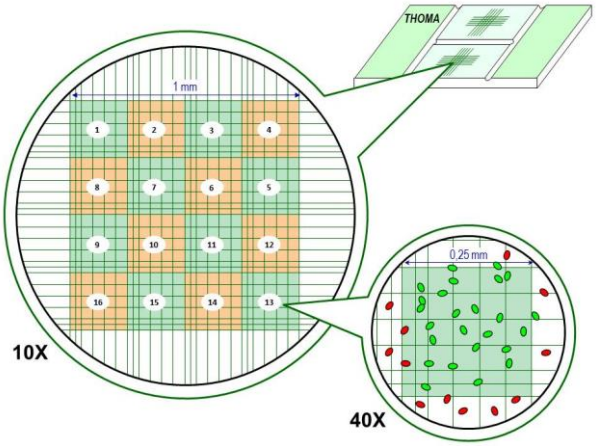
Kültür kaplarında bulunan hücreler 2-3 günde bir ters mikroskop ile kontrol edildi. Hücreler kültür kabının yüzeyini en az %80 yoğunlukta kapladığı zaman laminar akım kabini içerisinde pasajlama işlemi gerçekleştirildi. HEK 293 hücreleri kültür kabının tabanına yapışma özelliği gösterdiği için pasajlanacak hücreler üzerindeki sıvı, steril pipetler aracılığı ile boş bir kaba aktarıldı. Hücrelerin yıkanması için hücreler üzerine 1xPBS konuldu ve 5 dakika bekletildikten sonra sıvı aspire edildi. Hücreleri kültür kabı zemininden kaldırmak için Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi ve 10 dakika CO_2 inkübatöründe inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler laminar akım kabinine alınarak üzerine besiyeri (%89 DMEM, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin) eklendi ve tripsinin aktivitesi durduruldu. Steril pipet ile 25-30 kez pipetaj yapılarak hücrelerin birbirinden iyice ayrılması sağlandı. Elde edilen hücre süspansiyonu 15'lik dibi konik falkon tüplere aktarıldı ve 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Satrifüj sonunda oluşan pelet üzerindeki sıvı atıldı ve besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Pipetaj işlemi sırasına köpük oluşmamasına dikkat edildi. Hücreler 1-2 x 10^5 hücre/ml olacak şekilde 25cm^2'lik veya 75 cm^2'lik yeni steril kültür kaplarına ekildi. 25 cm^2'lik flasklar için 5 ml, 75 cm^2'lik flasklar için 10 ml besiyeri eklendi. Kültür kabı sağa-sola ve öne-arkaya doğru yavaşça hareket ettirilerek hücrelerin homojen bir biçimde dağılması sağlandı ve hücreler CO_2 inkübatöründe çoğalmaya bırakıldı.

3.2.1.3. Hücrelerin Dondurularak Saklanması

HEK2983 hücreleri Tripsin-EDTA ile tutundukları yerden kaldırılarak toplandı ve 15 ml'lik dibikonik falkon tüplere alındı. 2500 rpm'de 5 dakika sanrifüj edildikten sonra pelet üzerindeki sıvı atılarak yeni besiyeri konuldu ve pipetaj yapıldı. Soğuğa dayanıklı olan kriyotüplere 1400 µl hücre süspansiyonu, 400 µl FBS ve 200 µl DMSO eklenerek hızlıca -20 °C'ye kaldırıldı. Kriyotüpler -20 °C'de 1-2 saat bekledikten sonra -80 °C'ye alındı. Hücreler -80℃ 'de yaklaşık olarak 24 saat bekledi ve ardından sıvı azot tankının (-196°C) içerisine konularak hücre soyunun devamlılığı sağlandı.

3.2.1.4. Hücre Sayısının ve Canlılığınn Belirlenmesi

Kültürde çoğalan hücreler Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılarak toplandı ve 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. 2500 rpm'de 5 dakika sanrifüj edildikten sonra pelet üzerindeki sıvı atılarak yeni besiyeri konuldu ve pipetaj yapıldı. 1.5 ml'lik steril bir ependorf içerisine aktarılan hücre süspansiyonu 1/1 oranında %4'lük tripan mavisi ile karıştırıldı ve 5 dakika bekletildi. Sayım işlemi thoma lamında gerçekleştirildi. Mikroskop ile hücre sayımına geçmeden önce thoma lamı ve lamel akol ile silindi. Otomatik pipet ile lam ile lamel arasına tripan mavisi ile karıştırılan hücre süspansiyonu konularak sayım yapıldı. Thoma lamı 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kareden oluşmaktadır (Şekil 3-4). Thoma lamı ile yapılan sayımda lam ile lamel arasında kalan hücre süspansiyonunun hacmi 0.1 mm^3=10^{-4} ml olarak kabul edilmektedir. Mikroskop ile thoma lamında 16 büyük kare içerisindeki hücreler (*N*) sayılarak toplam hücre sayısı hesaplandı (100).



Şekil 3-4: Thoma Lamı

Hücre sayısı/ml = N x 10^4 x seyreltme faktörü

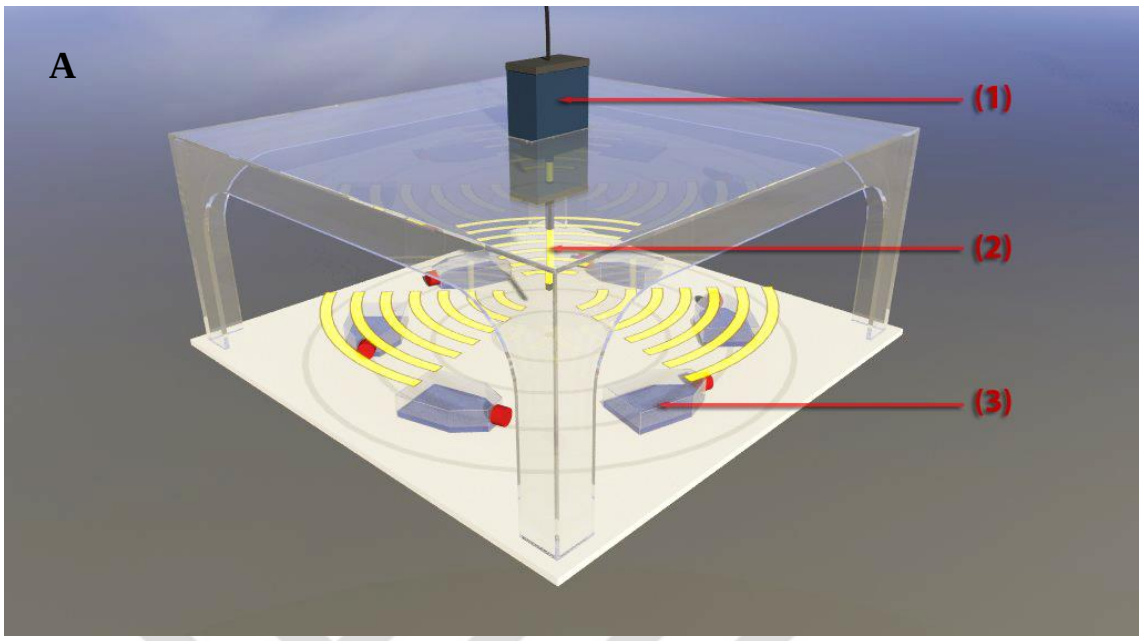
Toplam hücre sayısı = (Hücre sayısı/ml) x toplam hacim

Canlı hücrelerin membran bütünlükleri ve geçirgenlikleri bozulmadığı için tripan mavisi hücre içine giremez. Bu özelliğe dayanarak mikroskop ile bakıldığında ölü hücreler mavi boyanmış, canlı hücreler boyanmamış olarak görüldü. Buna bağlı olarak % canlılık hesaplanması aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

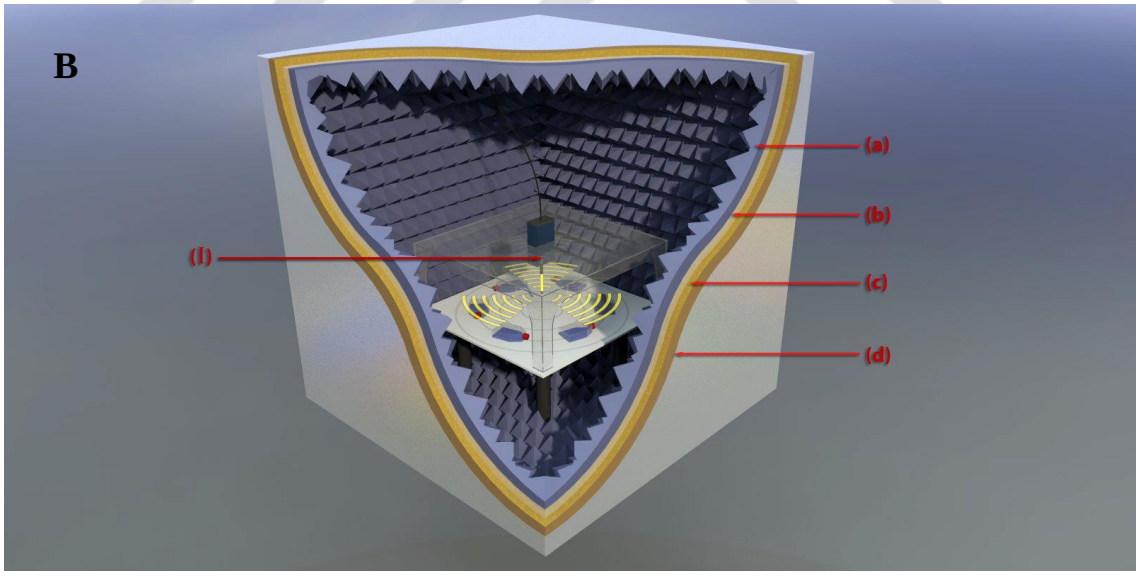
Hücre canlılığı (%) = (Canlı hücre sayısı / Toplam hücre sayısı)x100

3.2.1.5. Elektromanyetik Alan Uygulaması

Tez çalışmasında farklı gruplardaki HEK293 hücrelerine 2.4 GHz frekansında elektromanyetik dalga, gerilim kontrollü osilatör ile verildi (Şekil 3-5). Gerilim kontrollü osilatöre (Feedback, England, 532/VCO/0138) sabit gerilim olarak 15 volt, değişken gerilim olarak 3.3 volt çıkış veren iki adet doğru akım gerilim kaynağı (Yıldırım, AC/DC Switching Power Supply, CYS 152) bağlandı. Osilatörden monopol anten ile 2.4 GHz frekansında sinyal çıkışı sağlandığı spektrum analizörü (Rohde&Schwarz) ile kontrol edildi (Şekil 3-6). Osilatörün çıkış gücü 2.67 dBm ve anten dibindeki elektriksel alan kuvveti 8 V/m olarak ölçüldü. EMA uygulaması yapmak için oluşturduğumuz deney düzeneğinde hücre kültür kapları, antenden 18 cm uzaklıkta konumlandırıldı. Hücre kültür kaplarının bulunduğu mesafedeki elektromanyetik alanın gücü -40 dBm ve elektriksel alan kuvveti 2 V/m olarak ölçüldü. Kabin içerisinde radyasyon yansımalarını önlemek için cihazın ve hücre kültür kaplarının konulacağı düzenek pleksiglas ekipmanlardan oluşturuldu (Şekil 3-5/A, Şekil 3-7/A). Çalışmamızda EMA uygulaması, dışarıdan gelebilecek herhangi bir sinyalin çalışma sonuçlarını etkilemesini önlemek için dış yüzeyi aluminyum ile kaplanmış, iç yüzeyinde de EMD absorblayıcı materyal bulunan kabini içerisinde gerçekleştirildi. (Şekil 3-5/B, Şekil 3-7/B).



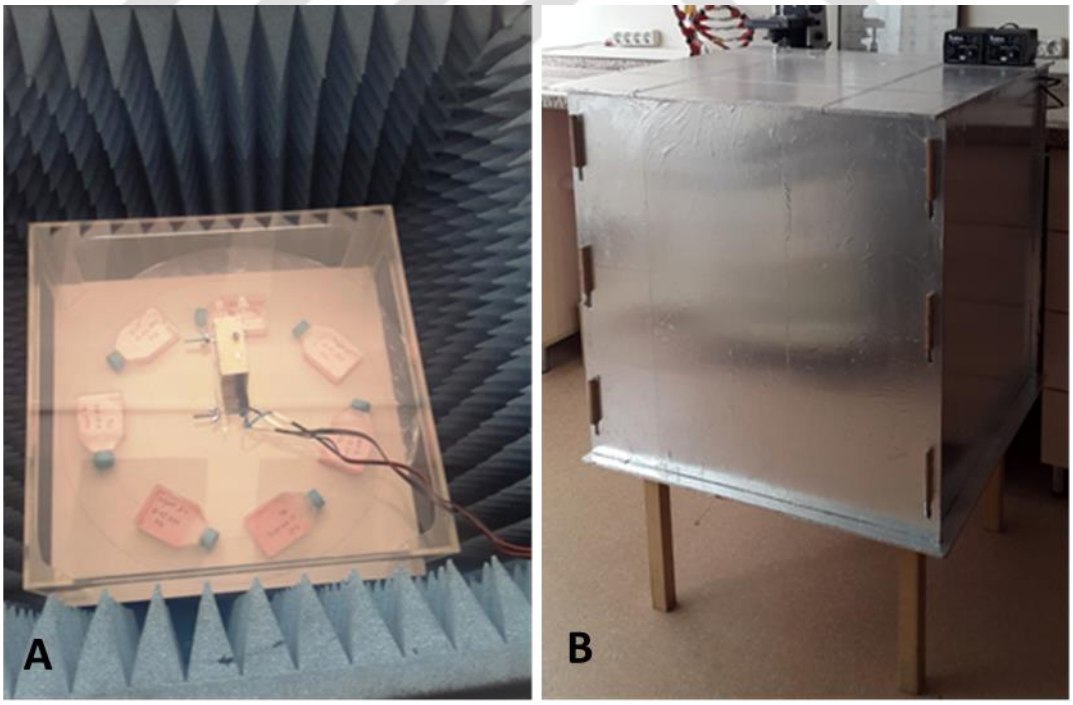
(1) Gerilim kontrollü osilatör (Feedback, England, 532/VCO/0138)
(2) Monopol Anten
(3) Hücre kültür kabları



(1)EMA uygulama düzeneği
(a)EMA absorblayıcı yüzey
(b), (d) Alüminyum yüzey
(c) Yansıtıcı olmayan yüzey

Şekil: 3-5: Elektromanyetik Alan Uygulamamızın Şematik Gösterimi.

Şekil 3-6 : Sinyal Analizörü



Şekil 3-7 : Elektromanyetik Alan Uygulaması Yaptığımız Deney Düzeneği.

3.2.1.6. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Deneysel işlemler için 6 farklı grup oluşturuldu. Kültür kablarında (T-75 flask) çoğaltılan hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında tripsinizasyon işlemi ile yerlerinden kaldırıldı ve hücrelerin sayımı yapıldı. Deneysel işlemlerin yapılacağı flasklara her bir grup için 10^5 hücre ekildi ve deneyler altı defa tekrarlandı.

1. **Grup (Kontrol Grubu):** Hücre ekimi yapıldıktan sonra hücreler 48 saat standart hücre kültürü ortamında (37 °C ve %5 CO_2) inkübe edidi ve hücrelere hiçbir uygulama yapılmadı.
2. **Grup (2.4 GHz Grubu):** Hücre ekimi yapıldıktan sonra hücreler 48 saat standart hücre kültürü ortamında (37 ºC ve %5 CO_2) inkübe edildi ve inkübasyon sonunda 1 saat süre ile 2.4 GHz frekanslı elektromanyetik alana maruz bırakıldı.
3. **Grup (50 µM Zn + 2.4 GHz Grubu):** 50 µM Zn eklenerek hazırlanmış besiyeri ile ekilen hücreler, standart hücre kültürü ortamında 48 saat inkübe edildikten sonra 1 saat süre ile 2.4 GHz frekanslı elektromanyetik alana maruz bırakıldı.
4. **Grup (100 µM Zn + 2.4 GHz Grubu):** 100 µM Zn eklenerek hazırlanmış besiyeri ile ekilen hücreler, standart hücre kültürü ortamında 48 saat inkübe edildikten sonra 1 saat süre ile 2.4 GHz frekanslı elektromanyetik alana maruz bırakıldı.
5. **Grup (100 nM Se + 2.4 GHz Grubu):** 100 nM Se eklenerek hazırlanmış besiyeri ile ekilen hücreler, standart hücre kültürü ortamında 48 saat inkübe edildikten sonra 1 saat süre ile 2.4 GHz frekanslı elektromanyetik alana maruz bırakıldı.
6. **Grup (200 nM Se+ 2.4 GHz Grubu):** 200 nM Se eklenerek hazırlanmış besiyeri ile ekilen hücreler, standart hücre kültürü ortamında 48 saat inkübe edildikten sonra 1 saat süre ile 2.4 GHz frekanslı elektromanyetik alana maruz bırakıldı.

3.2.1.7. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

1. Deneysel işlemler bittikten sonra laminar akım kabinine alınan hücrelerin üzerindeki sıvı aspire edildi.
2. Hücreler PBS ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin eklenerek 10 dak. inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübatörden alınan hücrelerin üzerine besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı.
5. Hücreler santrifüj tüplerine alınarak 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrasında hücrelerin üst sıvıları atıldı ve pelet üzerine PBS konulup pipetaj yapıldı.
7. Hücreler tekrar 2500 rpm'de santrifüj edildi.
8. Hücrelerin üst sıvıları atıldı ve pelet PBS'ta ile tekrar çözünerek hücre sayımı yapıldı.
9. Deney başına hücre süspansiyonundan 10^5 hücre alındı ve ependorfa aktarıldı.
10. Ependorflar 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve hücrelerin üst sıvıları atıldı.
11. Pelet üzerine 200 µl lizis tamponu konuldu ve hücreler buz üzerinde insülin enjektörü yardımıyla çek-bırak yapılarak patlatıldı.
12. Hücre lizatları +4 °C'de 10000 rpm'de 1 saat santrifüj edildi.

Santrifüjün sonunda süpernatantlar yeni bir ependorfa aktarıldı ve daha sonra çalışılmak üzere -80 °C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2.2. Biyokimyasal Analizler

3.2.2.1. Malondialdehit (MDA) Tayini

MDA tayini Buege ve ark.'nın (47) metoduna göre çalışıldı. "Tiyobarbitürik Asit Metodu" , MDA'nın tiyobarbitürik asitle 90-95 °C'de reaksiyona girerek kırmızı renk oluşturmasına ve oluşan rengin 535 nm' de absorbansının okunmasına dayanmaktadır.

Eriyikler:

% 30 TCA: %100'luk TCA çözeltisinden 30 ml alınıp distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

% 0.75 TBA: 0.75 gram TBA distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

5M HCl: %37'lik HCl çözeltisinden 41.666 ml alınıp distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Analizi yapılacak olan örneklerden 125 µl vidalı kapaklı cam tüplere alındı. Örneklerin üzerine öncelikle 750 µl % 0.75'lik TBA koyuldu, ardından 500 µl % 30'luk TCA koyulduğunda opak beyaz renk oluştuğu gözlemlendi. Daha sonra 100 µl 5 M'lık HCl karışıma eklendi. Tüpler kaynamakta olan suda (en az 95 °C) 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonrasında tüpler soğutularak havası alındı. Çözeltilerde berrak bir görüntü eldesi için 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Son olarak örneklerin absorbansı 535 nm'de okundu ve absorbans değeri aşağıdaki denklemde yerine konularak sonuçlar nM/ml cinsinden ifade edildi.

$$\text{Sonuç} = (\text{OD}/1.56 \times 10^5) \times (\text{Total hacim/örnek hacmi}) \times (10^6)$$

3.2.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini

SOD enzim değerleri Sun ve ark. (101) tarafından önerilen metotla İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında ölçüldü. Bu metot Ksantin/Ksantinoksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgemesi esasına dayanmaktadır. Oluşan süperoksit radikallerini ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazonlar oluşturur. Süperoksit dismutaz enziminin bulunmadığı veya aktivitenin düşük olduğu ortamda bu indirgenme meydana gelir ve mavi-mor renk oluşur. Bu kompleks 560nm'de maksimum absorbans verir.

$$Ksantin \xrightarrow{XOD} \text{Ürik Asit} + O_2^{*-}$$

$$N.B.T. + O_2^{*-} \rightarrow Formazan\ Boyası$$

$$O_2^{*-} + O_2^{*-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$$

SOD'un bir ünitesi %50 oranında ksantin oksidaz aktivitesini inhibe eder. Bu sonuç çalışma sırasında reaksiyon ortamına koyulan örnekteki SOD aktivitesidir. Çalışmamızda SOD aktivitesi ünite/ml (U/ml) olarak ifade edildi.

<u>Aktivite Ölçümü</u>

Substrat karışımı:

Konsantrasyon	**Reaktif**	**Gerekli miktar**	**Yapılan işlem**
0.3 mM	Ksantin	9.13mg	200 ml saf suda çözüldü
0.6 mM	EDTA	22.3 mg	100 ml saf suda çözüldü
150 mg/L	N.B.T.	12.3 mg	100 ml saf suda çözüldü
400 mM	Na_2CO_3	2.544g	60 ml saf suda çözüldü
1g/L	Sığır serum (BSA)	30 mg	30ml saf suda çözüldü
2 M	$(NH_4)2SO_4$	2.643 g	10 ml'ye saf su ile tamamlandı
0.8 mM	$CuCl_2.2H_2O$	13.6 mg	100 ml'ye saf su ile tamamlandı
(167 U/L)	Ksantin oksidaz	18 ml	3 ml 2 M $(NH_4)2SO_4$ da çözüldü

Deneyin yapılışı:

		Kör	Numune
1.	Substrat karışımı	500 µL	500 µL
2.	Örnek	-------	50 µL
3.	Ksantin oksidaz (XOD)	25 µL	25 µL
4.	25°C de karanlıkta 20 dakika bekletilmiştir.		
5.	$CuCl_2$	25 µL	25 µL
6.	Karanlıkta inkübasyona bırakılır.		
7.	560 nm'de suya karşı okunur		

SOD için Aktivite Hesaplanması:

Sonuç = [(Kör OD – Numune OD)/Kör OD] x 20 U/ml

3.2.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Tayini

GSH-Px aktivitesinin spektrofotometrik ölçümü İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında ticari olarak temin edilen kit (Glutathione Peroxidase Activity Kit-Enzo, ADI-900-158,USA) prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalize eder. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir.

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GP} GSSG + 2H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

GSH-Px aktivitesi, NADPH'ın $NADP^+$'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans değerindeki azalmasının 340 nm'de 1 dakika aralıklarla 15 dakika boyunca zamana karşı okunmasıyla hesaplandı ve sonuçlar ünite/ml (U/ml) şeklinde elde edildi.

3.2.3. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

HEK293 hücrelerinde apoptoz tayini ve immünohistokimya incelemeleri 24 kuyucuklu kültür kaplarında gerçekleştirildi. 75'lik T-flasklarda çoğaltılan hücreler tripsinizasyon işlemi ile kültür kabı zemininden kaldırıldı ve gerekli işlemler yapılarak hücre sayımı gerçekleştirildi. Önceden sterilize edilmiş olan 12 cm'lik yuvarlak lameller alevden geçirilerek 24'lük kuyulara yerleştirildi. Kuyucuklara her bir grup için hazırlanan cDMEM'ler eklendi ve üzerine $15x10^4$ hücre ekildi. Ekim sonrasında hücreler 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ardından kontrol gruplarına direkt tespit işlemi uygulanırken EMA uygulanacak gruplar tespit işlemi öncesinde 1 saat süre ile EMA'a maruz bırakıldılar.

3.2.3.1. Hücrelerin Tespiti

24 kuyucuklu kültür kabında bulunan hücreler üzerine yapılan deneysel uygulama bittikten sonra kuyulardan besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler Tween-20/PBS ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı ve ardından %4'lük paraformaldehit ile 20 dakika fikse edildi. Ardından hücreler tekrar Tween-20/PBS ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı. Morfolojik incelemeler yapılana kadar hücrelerin üzerine 1 ml PBS eklendi ve +4℃'ye kaldırıldı.

3.2.3.2. Apoptoz Tayini

Apoptoz tayini, DNA kırıklarının in situ olarak saptanmasına dayanan TUNEL (TdT-dUTP nick and labeling- In Situ DNA Uç İşaretleme Yöntemi) yöntemi ile İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Hücre Araştırmaları Laboratuvarında yapıldı. TUNEL yöntemi ticari olarak temin edilen kit ile gerçekleştirildi (ApopTag Plus, In Situ Apoptosis Detection Peroksidase kit, S7101-KIT, Chemicon). Kit içerisinde tavsiye edilen işlem sırası bazı değişiklikler yapılarak optimize edildi ve ölçümler yapıldı. Apoptotik süreçte kırılan DNA parçaları boyanarak mikroskopta görünür hale getirildi.

1. Hücreler 2 defa PBS ile 5 dakika yıkandı.
2. PBS ile 20 µl/ml'lik Proteinaz K hazırlanarak hücrelere 15 dakika oda ısında uygulandı.
3. Hücreler 3 defa distile su ile yıkandı.
4. PBS ile hazırlanmış %3 H_2O_2 ile hücreler 5 dakika oda ısısında muamele edildi.
5. Hücreler, 2 defa 5'şer dakika PBS ile yıkandı.
6. Hücrelerin üzerine dengeleyici tampon konulup 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
7. Dengeleyici tampon pipet ile alınarak üzerlerine TdT enzimi konuldu ve 37°C'lik etüvde 1 saat inkübe edildi.
8. Hücreler durdurma/yıkama tamponu ile oda ısısında 10 dakika yıkandı.
9. Hücreler 3 defa 1'er dakika PBS ile yıkandı.
10. Her lamel üzerine Anti-Digoksigenin-Peroksidaz konuldu ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
11. Hücreler 3 defa 2'şer dakika yıkandı.
12. Her bir kuyucuğa DAB (diaminobenzidine) substrat solüsyonu damlatıldı. 3-6 dakika sonra pozitif renk reaksiyonu mikroskop altında kontrol edildi.
13. Renk reaksiyonunun oluşmasından sonra hücreler distile su ile 3 defa 1'er dakika yıkandı.
14. Hücreler zıt boyama için metil yeşili ile 2 dakika boyandı, distile su ile boyama durduruldu.
15. Lamaller ince uçlu pens ile dikkatlice kaldırıldı ve lamellerden fazla boyanın uzaklaşması için %100 alkole muamele edildi.
16. Alkol sonrasında lameller touol ile muamele edildi.
17. Lamellere entellan damlatılarak lamlar üzerine kapatıldı.
18. Lameller 1 saat 37℃'lik etüvde inkübasyona bırakıldıktan sonrası mikroskop ile gözlem yapıldı.

<u>Uygulama esnasında taze olarak hazırlanan solüsyonlar:</u>

% 3 H_2O_2: 1ml H_2O_2/ 9ml PBS

Tdt: 77 µl Reaksiyon Tamponu + 33 µl Tdt Enzimi = 110 µl

Durdurma/Yıkama tamponu: 10 µl Yıkama solüsyonu + 340 µl Distile Su = 350 µl

DAB Substrat: 147 µl DAB Dilüsyon solüsyonu + 3 µl DAB Substratı= 150 µl

TUNEL Boyama özgünlüğünün kontrolü:

Boyamanın kontrolü için negatif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol olarak TUNEL işlem sırasındaki Tdt enziminin yerine distile su damlatıldı.

3.2.3.3. Apoptotik İndeks

Lameller üzerine ekilen hücrelerde apoptoz tayini TUNEL yöntemi ile yapıldı. Apoptotik indeks, ışık mikroskopunda x20 büyütmede rastgele seçilen 10 alanda TUNEL pozitif olarak işaretlenen apoptotik (kahverengi boyanan) ve normal nukleuslar (yeşil renkli boyanan) sayılarak hesaplandı (88).

Apoptotik İndeks (APOİ)= Apoptotik nukleus sayısı / Toplam hücre sayısı X 100

3.2.3.4. İmmünhistokimya

İşaretlenmiş antikorlar kullanılarak hücre ve doku antijenlerini bulundukları yerde göstermek amacıyla Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal boyama uygulandı. Apoptoz yolaklarının aydınlatılmasını sağlayacak belirteçlerden aktif kaspaz-3 antikoru (Millipore, 1:50 dilüsyon) ve Bcl-2 (Novus, 1:50 dilüsyon) antikoru kullanılarak %4'lük paraformaldehit ile tespit edilen hücrelerde kit (Histostain-Plus Bulk Kit, Life Technologies) içinde tavsiye edilen işlem sırası antikorlara göre modifiye edilerek immünhistokimyasal boyama yapıldı.

1. Hücreler, 5 dakika PBS ile yıkandı.
2. %3 H_2O_2'de 10 dakika muamele edildi.
3. Hücreler, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
4. İstenmeyen antijenlerin baskılanması için maskeleme solüsyonu ile 10 dakika muamele edildi.
5. Aktif kaspaz-3 antikoru (1:50) ve Bcl-2 (1:50) antikoru ile bir gece +4°C'de nemli ortamda muamele edildi.
6. Hücreler, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
7. Biotin ile işaretli ikinci antikor ile 10 dakika muamele edildi.
8. Hücreler, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
9. Streptavidin-Peroksidaz kompleksinde 8 dakika muamele edildi.

10. Hücreler, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
11. Substrat-kromojen (AEC = 3-aminoetil 9-karbazol) solüsyonu ile 20 dakika renk reaksiyonu gözlenene kadar inkübe edildi.
12. Distile suda yıkandı.
13. Hücrelere 40 saniye boyunca metil yeşili zıt boyası uygulandı.
14. Distile suda yıkandı.
15. İHK yöntemi uygulandıktan sonra kuyulardaki lameller dikkatli bir şekilde ince uçlu pens yardımıyla kaldırılıp, lamlar üzerine damlatılan gliserin-jelatin ile kapatıldı ve 1 saat 37℃'lik etüvde tutuldu.

İmmün boyama özgüllüğünün kontrolü:

İmmün boyamanın kontrolü için negatif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol olarak İHK işlem sırasında primer antikor yerine PBS damlatıldı.

3.2.4. İstatistiksel Analiz

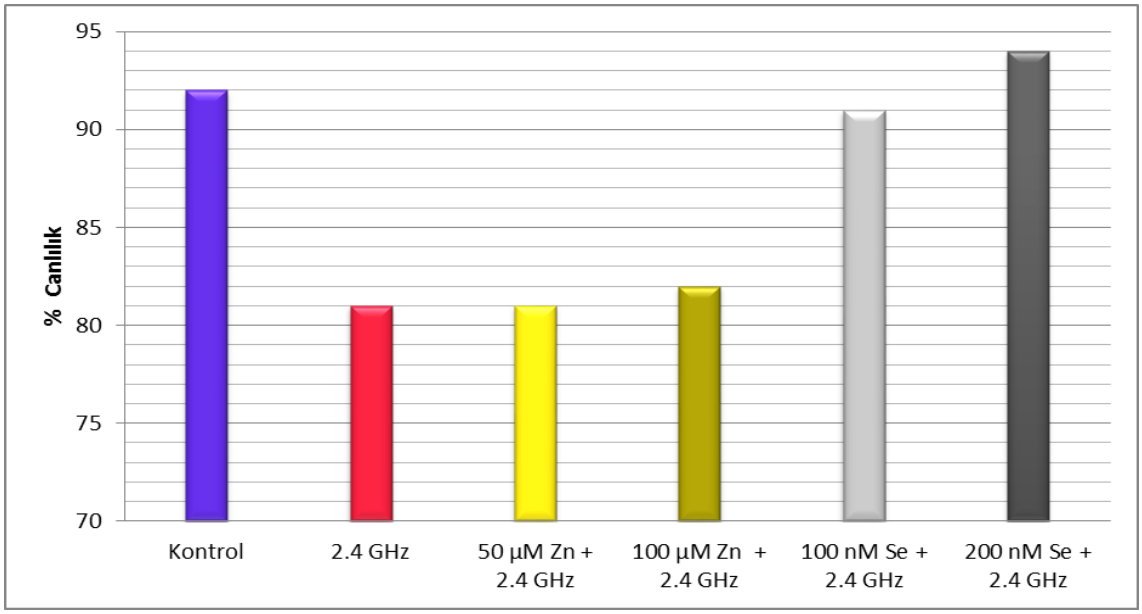
Deney sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması SPSS bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma [mean ± standard deviation (SD)] şeklinde ifade edildi. Gruplar arasında normal dağılıma uygunluk kontrolü Kolmogorovsmirnov testi ile yapıldı. İstatistiksel önem varlığını göstermek için normal dağılım gösteren gruplara ANOVA Tukey testi uygulandı, normal dağılıma uymayanlar için Kruskal Wallis testi uygulandı ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

HEK293 hücrelerine farklı derişimlerde Zn ve Se uygulandıktan sonra bir saat süre ile EMA'a maruz bırakılmalarıyla meydana gelen hücre canlılığı, biyokimyasal ve morfolojik değişimleri incelendi. Gruplar arası yapılan değerlendirme sunuçları Tablo 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13, 4-14 ve Şekil 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9,4-10, 4-11, 4-12, 4-13, 4-14, 4-15, 4-16'te verildi.

4.1. Hücre Canlılığı Analizi

Işık mikroskobu ile yapılan incelemede 2.4 GHz EMA uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, hücre canlılığının EMA uygulanan grupta azaldığı tespit edilidi. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda uygulanan Zn ve Se takviyesinin EMA'nın hücre canlılığı üzerine yaptığı olumsuz etkisini azalttığı, özellikle 200 nM Se uygulanan grupta hücre canlılığının kontrolden daha yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 4-1).



Şekil 4-1: Zn ve Se'un EMA uygulanan HEK293 hücrelerinde canlılık oranları

4.2. Biyokimyasal Bulguar

4.2.1. Malondialdehit (MDA) Analizi

Araştırmamızda, 2.4 GHz frekanslı EMA uygulanan gruptaki HEK293 hücrelerinde MDA seviyesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı ($p<0.001$) arttığı görüldü (Tablo 4-1, 4-2, Şekil 4-2, 4-3). Bununla birlikte 50 µM ve 100 µM Zn uygulanması sonrası 2.4 GHz frekanslı EMA'a maruz bırakılan gruplarda ölçülen MDA seviyelerinin sadece 2.4 GHz frekanslı EMA uygulanan gruptaki MDA seviyesine göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) azaldığı tespit edildi (Tablo 4-1, Şekil 4-2).

Araştırmamızda, 2.4 GHz frekanslı EMA uygulaması yapılan gruptaki MDA değerlerine göre,100 nM ve 200 nM Se uygulanması sonrası 2.4 GHz frekanslı EMA'a maruz bırakılan gruplarda ölçülen MDA değerlerinin her iki grupta da istatistiksel bakımdan anlamlı (sırası ile, $p<0.05$; $p<0.001$) olarak azaldığı bulundu (Tablo 4-2, Şekil 4-3).

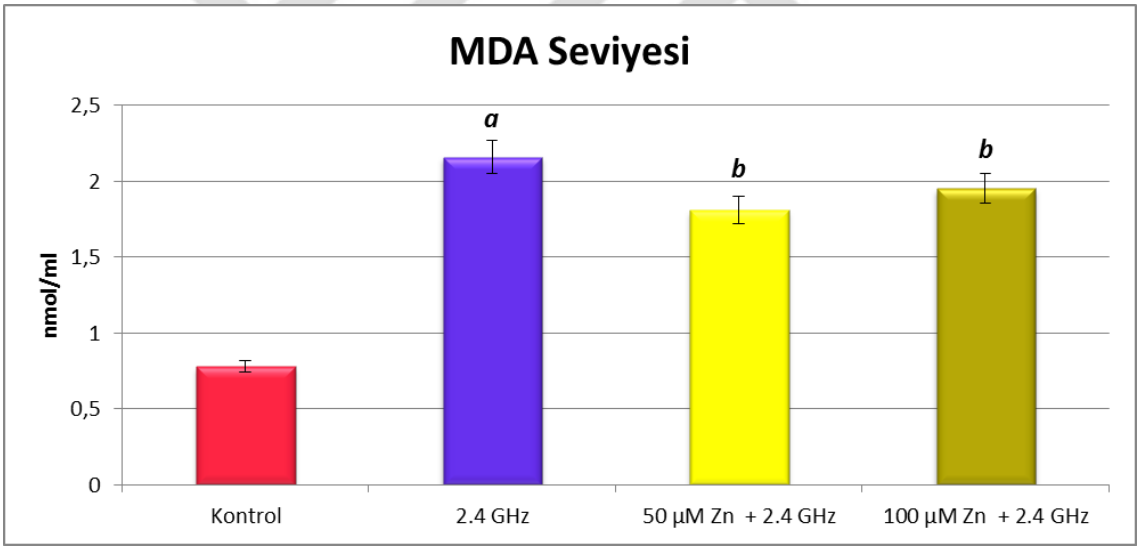
Tablo 4-1: Zn'nun farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki MDA seviyeleri üzerine etkileri

Parametre	Kontrol	2.4 GHz	50µM Zn + 2.4 GHz	100µM Zn + 2.4 GHz
MDA (nmol/ml)	0.78±0.1	2.16±0.02[a]	1.81±0.17[b]	1.95±0.05[b]

ortalama ± standart sapma (M±SD)

[a] *p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla,*

[b] *p<0.05 ve 2.4 GHz EMA gruplarına kıyasla istatistiksel karşılaştırma.*



Şekil 4-2: Zn'nun farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki MDA seviyeleri ve karşılaştırılması

[a] *p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla,*

[b] *p<0.05 ve 2.4 GHz EMA gruplarına kıyasla istatistiksel karşılaştırma.*

Tablo 4-2: Se'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki MDA seviyeleri üzerine etkileri

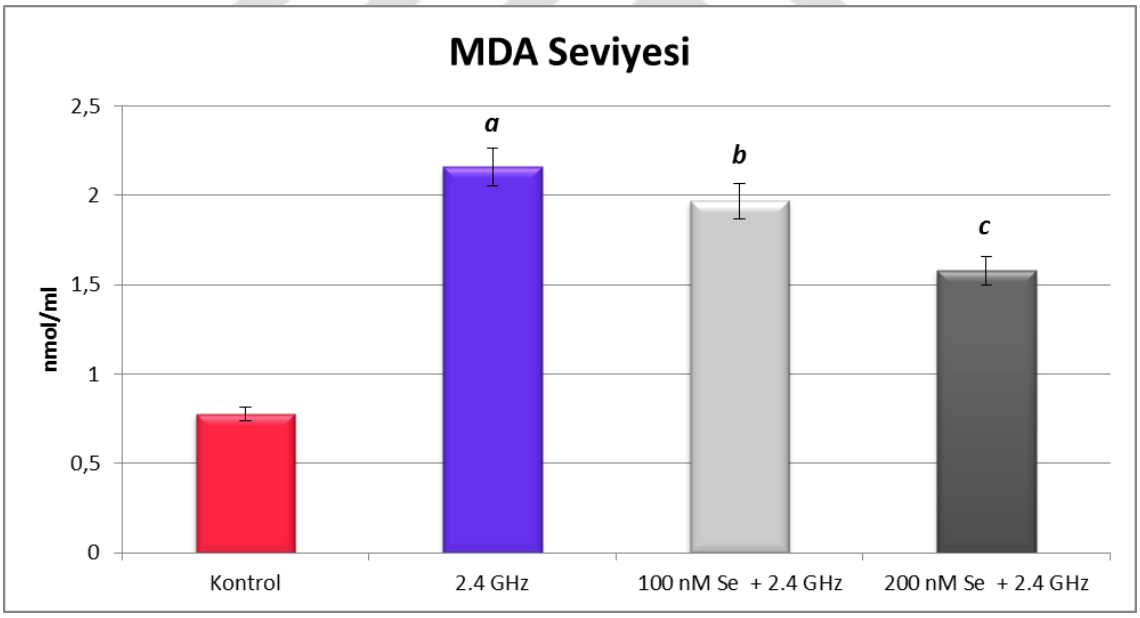
Parametre	Kontrol	2.4 GHz	100 nM Se + 2.4 GHz	200nM Se + 2.4 GHz
MDA (nmol/ml)	0.78±0.1	2.16±0.02[a]	1.97±0.1 [b]	1.58±0.08[c]

ortalama ± standart sapma (M±SD)

[a] *p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla,*

[b] *p<0.05 ve 2.4 GHz EMA grubuna kıyasla*

[c] *p<0.001 ve 2.4 GHz EMA grubuna kıyasla istatistiksel karşılaştırma.*



Şekil 4-3: Se'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerinde MDA seviyeleri ve karşılaştırılması.

[a] *p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla,*

[b] *p<0.05 ve 2.4 GHz EMA grubuna kıyasla,*

[c] *p<0.001 ve 2.4 GHz EMA grubuna kıyasla istatistiksel karşılaştırma.*

4.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi

Deney gruplarından elde edilen lizatlarda Sun ve ark. (1988 sod sun) yöntemine göre ölçülen SOD enzim aktivitesi sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi Tablo 4-3 ve 4-4 ile Şekil 4-4 ve 4-5 de verilmektedir. Bulgularımıza göre, 2.4 GHz EMA uygulanan grup ile kontrol grubu SOD aktivite değerleri karşılaştırıldığında, 2.4 GHz EMA uygulanan grubun SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir azalma saptandı. Yalnızca 2.4 GHz EMA uygulanan grup ile 2.4 GHz EMA ve farklı dozlarda Zn (50µM ve 100µM) uygulanan gruplara ait SOD aktivitelerinin istatistiksel karşılaştırılmasında, Zn ile birlikte 2.4 GHz EMA uygulanan gruplarda SOD aktivitesinin 2.4 GHz EMA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir artma olduğu bulundu (Tablo4-3,Şekil 4- 4).

Benzer şekilde, yalnızca 2.4 GHz EMA uygulanan grubun ölçülen SOD aktivitesine göre 2.4 GHz EMA ile birlikte Se (100nM ve 200nM) uygulanan gruplara ait ölçülen SOD aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış ($p<0.05$) olduğu saptandı (Tablo 4-4, Şekil 4-5).

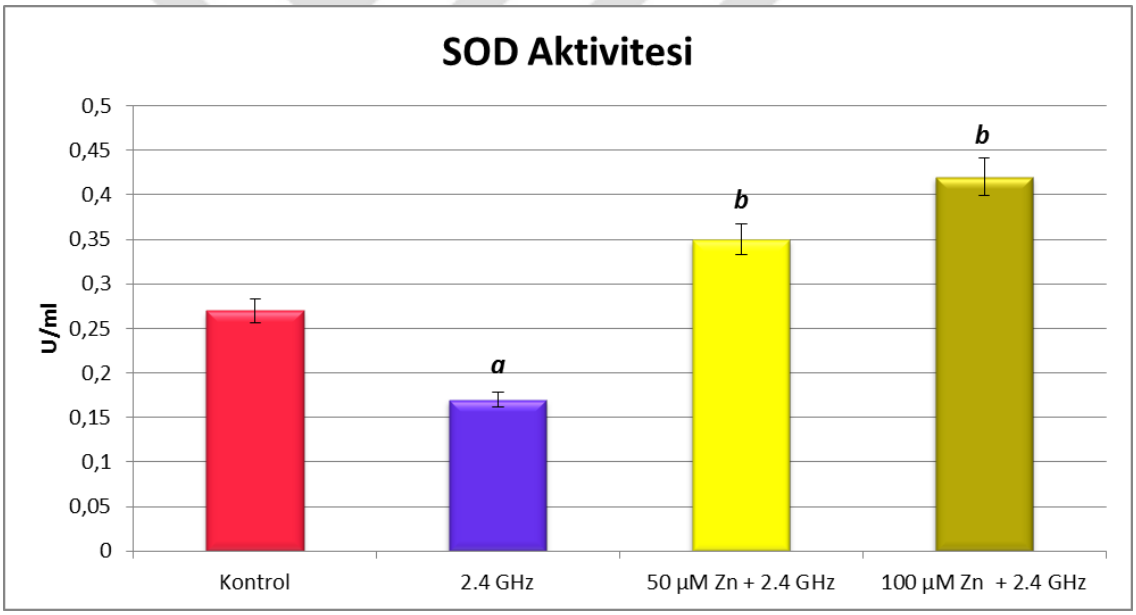
Tablo 4-3: Zn'nun farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki SOD aktiviteleri üzerine etkileri

Parametre	Kontrol	2.4 GHz	50µM Zn + 2.4 GHz	100µM Zn + 2.4 GHz
SOD (U/ml)	0.27±0.04	0.14±0.01 [a]	0.35±0.03 [b]	0.42±0.02 [b]

ortalama ± standart sapma (M±SD)

[a] *p<0.05 ve kontrol grubuna kıyasla,*

[b] *p<0.05 ve 2.4 GHz EMA gruplarına kıyasla istatistiksel karşılaştırma.*



Şekil 4-4: Zn'nun farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki SOD aktivite değerleri ve karşılaştırılması.

[a] *p<0.05 ve kontrol grubuna kıyasla,*

[b] *p<0.05 ve 2.4 GHz EMA gruplarına kıyasla istatistiksel karşılaştırma.*

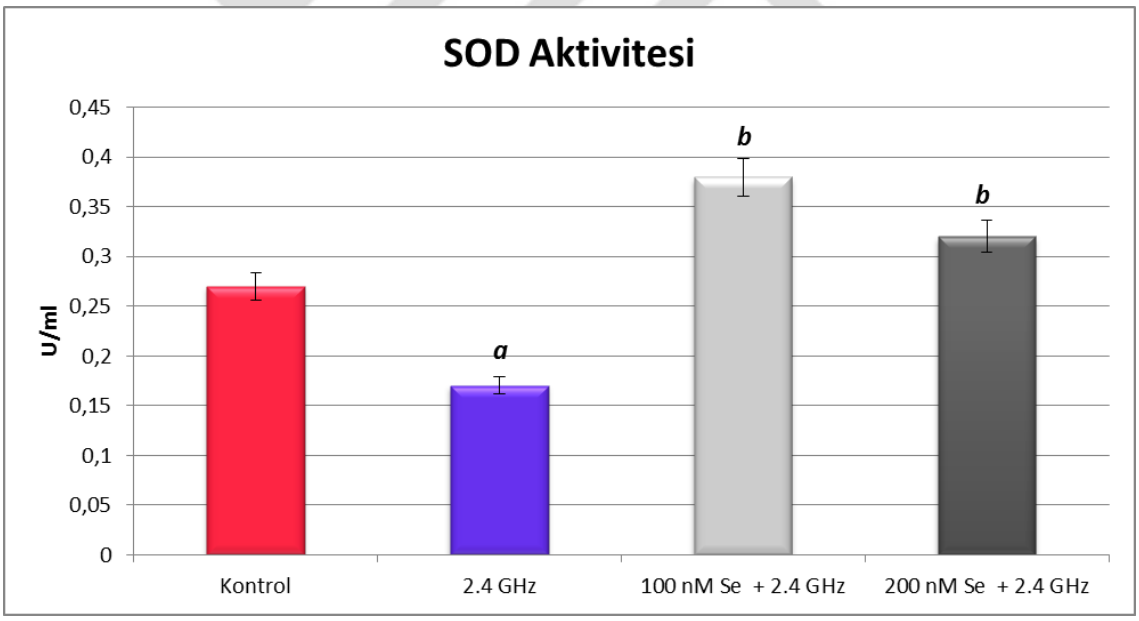
Tablo 4-4: Se'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki SOD aktiviteleri üzerine etkileri

Parametre	Kontrol	2.4 GHz	100 nM Se + 2.4 GHz	200nM Se + 2.4 GHz
SOD (U/ml)	0.27±0.04	0.14±0.01 [a]	0.38±0.07 [b]	0.32±0.05 [b]

ortalama ± standart sapma (M±SD)

[a] *p<0.05 ve kontrol grubuna kıyasla,*

[b] *p<0.05 ve 2.4 GHz EMA gruplarına kıyasla istatistiksel karşılaştırma.*



Şekil 4-5: Se'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki SOD aktivite değerleri ve karşılaştırılması

[a] *p<0.05 ve kontrol grubuna kıyasla,*

[b] *p<0.05 ve 2.4 GHz EMA gruplarına kıyasla istatistiksel karşılaştırma.*

4.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizi

HEK293 hücreleri ile yapılan çalışmamızda kontrol grubu ve 1 saat süre ile 2.4 GHz frekanslı EMA uygulanan grupların GSH-Px aktivitesinin istatistiksel değerlendirmesinin sonuçları Tablo 4-5, 4-6 ve Şekil 4-6, 4-7'da verilmektedir. Bu değerlendirmeler sonucunda; 2.4 GHz frekanslı EMA uygulanan gruptaki GSH-Px aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı ($p<0.05$) olarak azaldığı bulundu. EMA uygulaması öncesinde 50µM Zn ve 100µM Zn ilavesinin GSH-Px seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmediği görüldü (Tablo 4-5 ve Şekil 4-6).

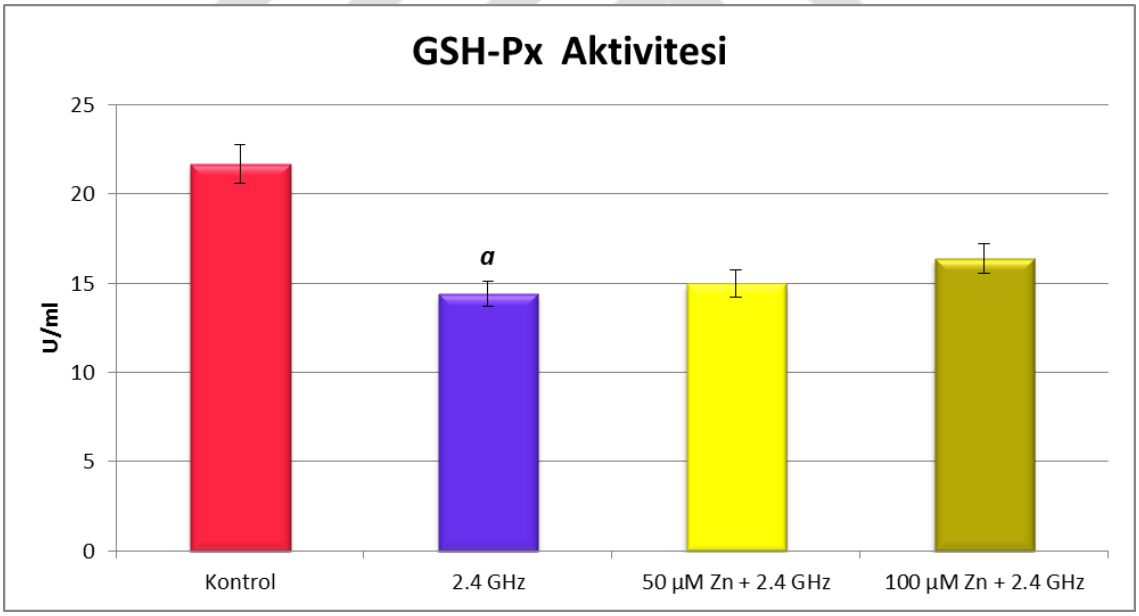
GSH-Px aktivitesinin, 2.4 GHz frekanslı EMA uygulama öncesinde 100 nM Se ve 200 nM Se ilavesi yapılan gruplarda yalnız 2.4 GHz frekanslı EMA uygulanan gruba göre istatistiksel olarak $p<0.05$ anlamlılıkta arttığı saptandı (Tablo 4-6 ve Şekil 4-7).

Tablo 4-5: Zn'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki GSH-Px aktivitelerine etkileri

Parametre	Kontrol	2.4 GHz	50µM Zn + 2.4 GHz	100µM Zn + 2.4 GHz
GSH-Px (U/ml)	21.7±4.1	14.4±0.4[a]	15.0±1.8	16.4±0.5

ortalama ± standart sapma (M±SD)

[a] *p<0.05 ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel karşılaştırma.*



Şekil 4-6: Zn'nun farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerinde GSH-Px aktiviteleri ve karşılaştırılması

[a] *p<0.05 ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel karşılaştırma.*

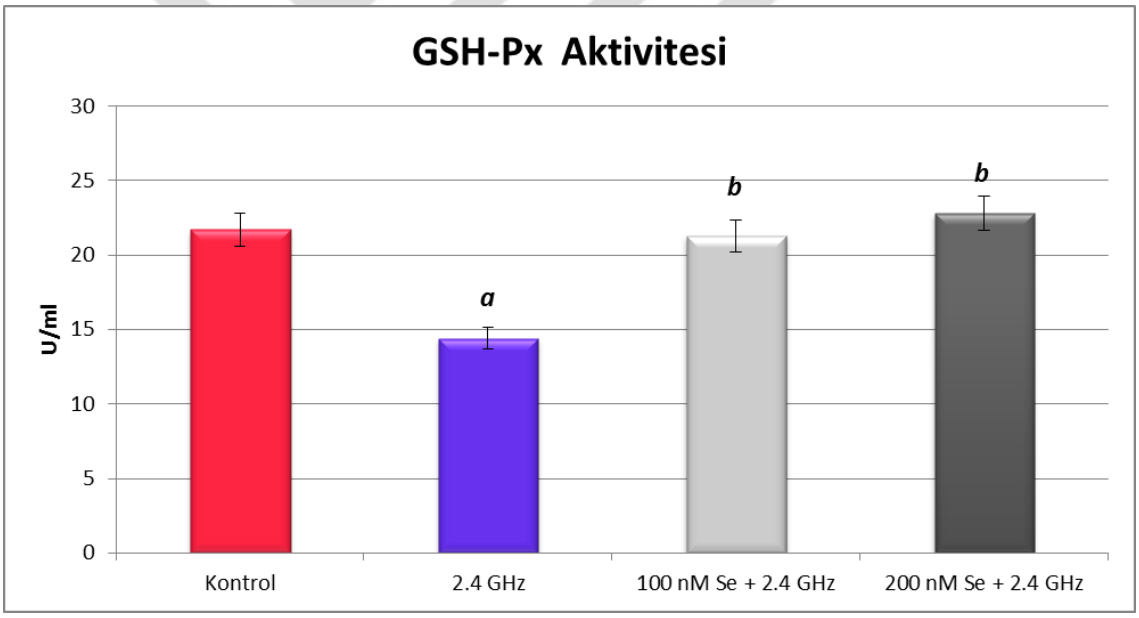
Tablo 4-6: Se'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerindeki GSH-Px aktivitelerine etkileri

Parametre	Kontrol	2.4 GHz	100 nM Se + 2.4 GHz	200nM Se + 2.4 GHz
GSH-Px (U/ml)	21.7±4.1	14.4±0.4 [a]	21.3±3.3 [b]	22.8±3.8 [b]

ortalama ± standart sapma (M±SD)

[a] *p<0.05 ve kontrol grubuna kıyasla,*

[b] *p<0.05 ve 2.4 GHz EMA gruplarına kıyasla.*



Şekil 4-7: Se'un farklı dozlarının, EMA uygulanan HEK293 hücrelerinde GSH-Px aktiviteleri ve karşılaştırması.

[a] *p<0.05 ve kontrol grubuna kıyasla,*

[b] *p<0.05 ve 2.4 GHz EMA gruplarına kıyasla istatistiksel karşılaştırma.*

4.3. Morfolojik Bulgular

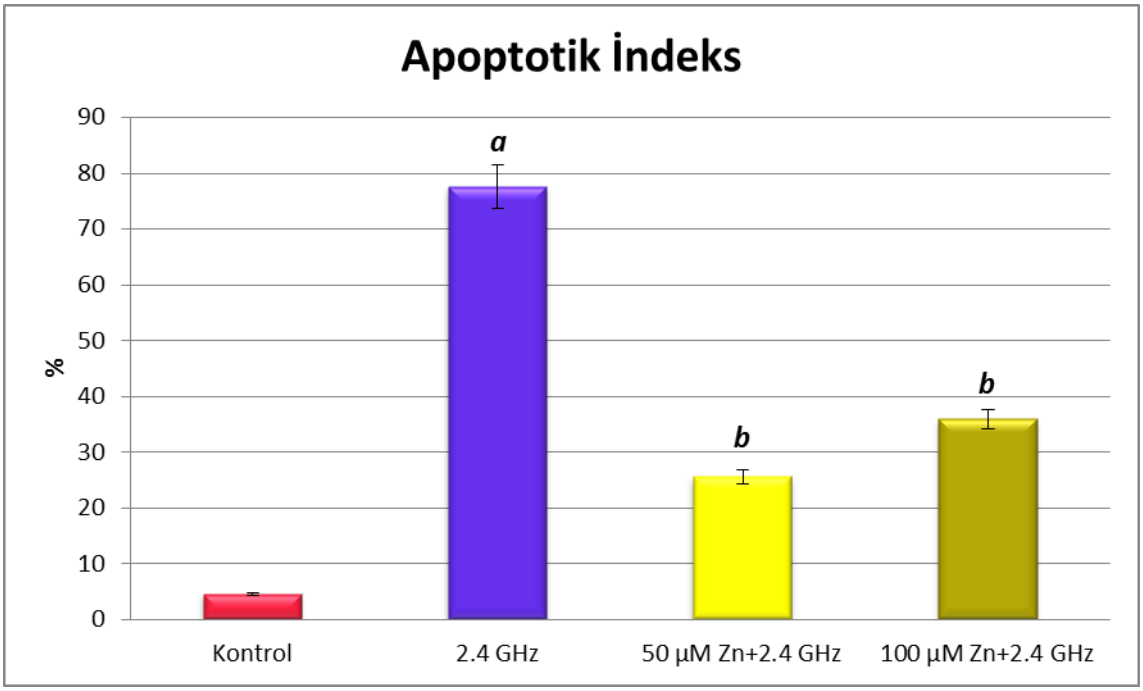
4.3.1. Apoptoz Tayini

Apoptotik hücreleri belirlemek amacıyla TUNEL yöntemi ile boyanan hücrelerden nukleusları kahverengi boyanmış hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Sağlıklı olan hücreler ise metil yeşili ile nukleusları yeşil renkli boyandı. Hücrelerin ışık mikroskobu ile değerlendirilmesinde rastgele seçilen 10 alandaki TUNEL (+) ve sağlıklı hücreler (Şekil 4-10) sayılarak apoptotik hücre indeksi hesaplandı ve istatistiksel değerlendirme yapıldı. EMA uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla apoptotik hücre sayısında anlamlı artış ($p<0.001$) gözlemlendi. EMA öncesinde farklı dozlarda (50-100 µM) Zn ve Se (100-200 nM) uygulanmasının apoptotik hücre sayısını ($p<0.001$) anlamlı olarak azalttığı tespit edildi. (Tablo 4-7, 4-8 Şekil 4-8, 4-9).

Tablo 4-7: TUNEL yöntemi ile boyanan hücrelerin apoptotik indeksinin istatistiksel analizi.

Parametre	Kontrol	2.4 GHz	50µM Zn + 2.4 GHz	100µM Zn + 2.4 GHz
APOİ *Ortalama ± SD*	4.51±1.46	77.5±22 [a]	25.5±6.2 [b]	35.9±11 [b]

[a] p<0.001 kontrol grubuna kıyasla, [b] p<0.001 2.4 GHz EMA grubuna kıyasla.



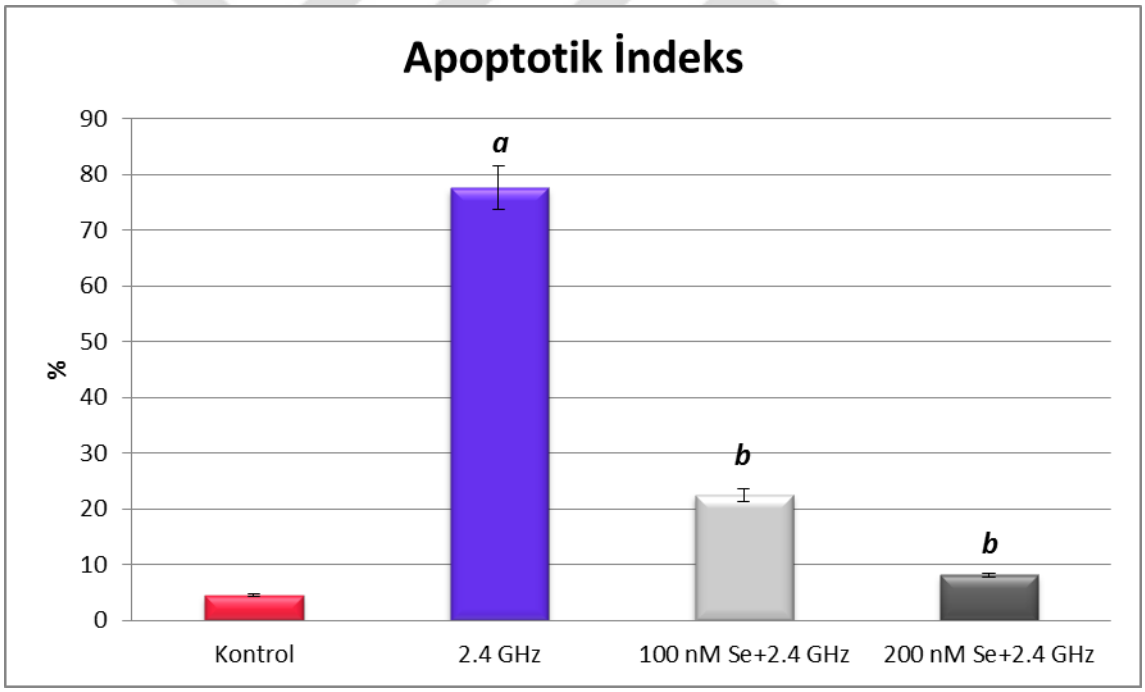
Şekil 4-8: TUNEL yöntemi ile boyanan hücrelerdeki apoptotik indeks ve karşılaştırılması

Tablo 4-8: TUNEL yöntemi ile boyanan hücrelerin apoptotik indeksinin istatistiksel analizi.

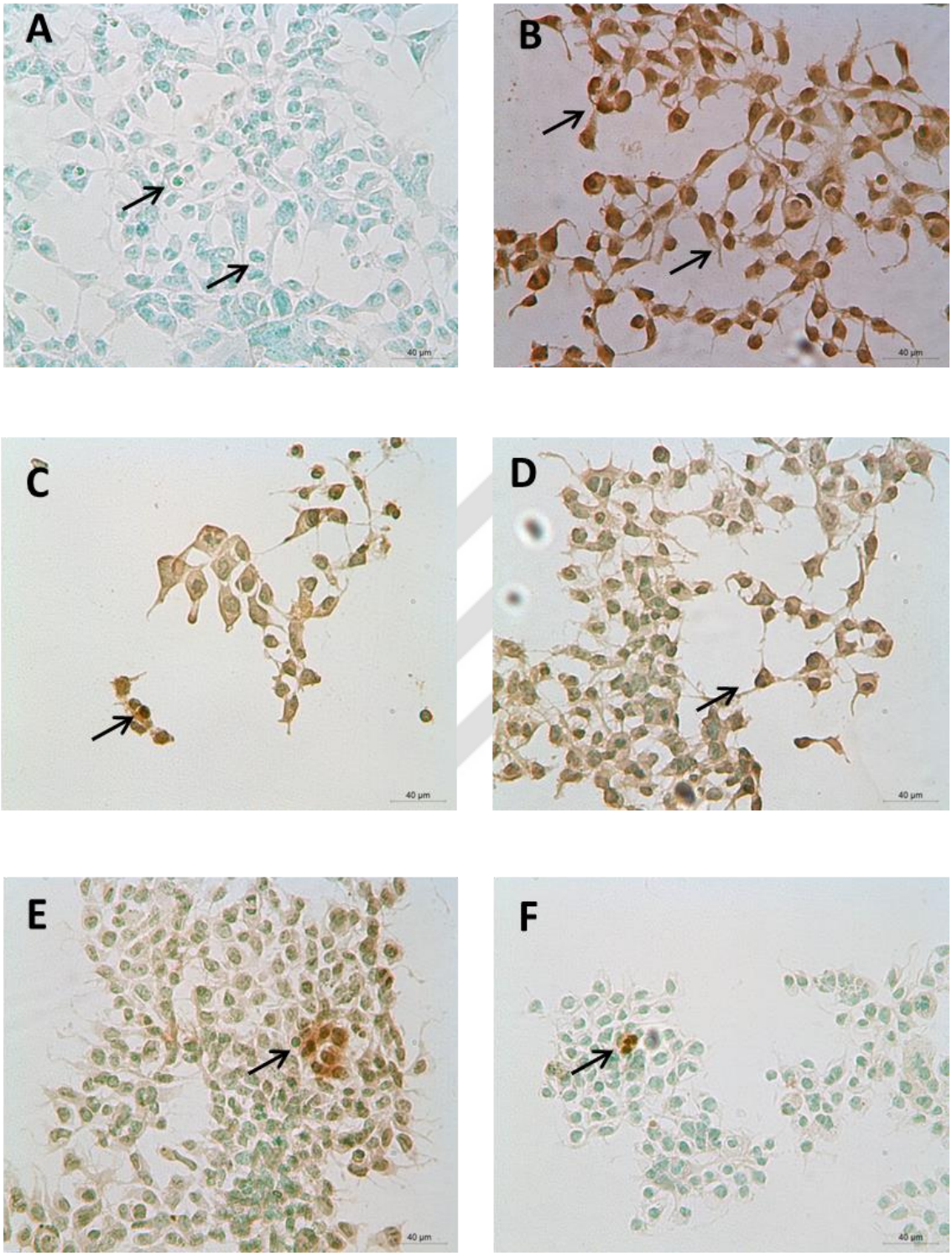
Parametre	Kontrol	2.4 GHz	100 nM Se + 2.4 GHz	200nM Se + 2.4 GHz
APOİ *Ortalama* ± SD	4.51±1.46	77.5±22[a]	22.5±2.9 [b]	8.10±4.6 [b]

[a] *p<0.001 kontrol grubuna kıyasla,*

[b] *p<0.0012.4 GHz EMA grubuna kıyasla.*



Şekil 4-9: TUNEL yöntemi ile boyanan hücrelerdeki apoptotik indeks ve karşılaştırılması



Şekil 4-10: HEK 293 hücrelerinde TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin gösterilmesi.

(A)Kontrol grubu, (B) 2.4 GHz grubu, (C) 50µM Zn grubu, (D) 100 µM Zn grubu, (E) 100 nM Se grubu, (F) 200 nM Se grubu**.** *Zıt Boya; Metil Yeşili, TUNEL pozitif hücreler (→), Bar; 40 µm.*

4.3.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

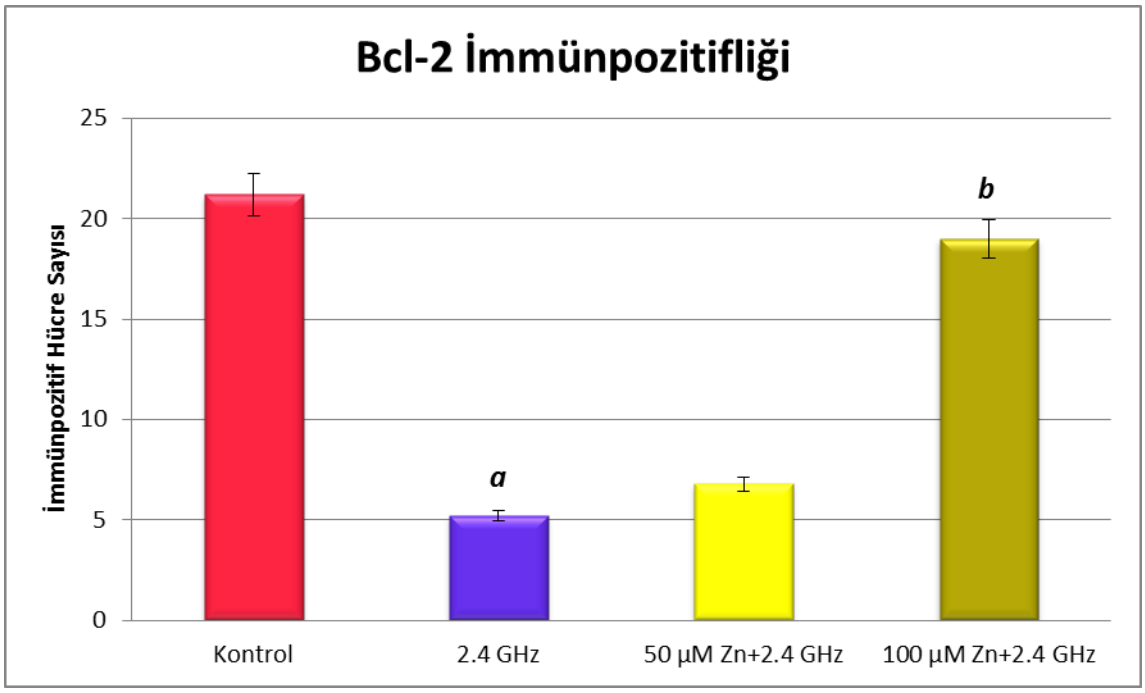
4.3.2.1. Bcl-2

Monoklonal bcl-2 (Novus ,Bcl-2 Antibody) antikoru ile boyanma sonucu sitoplazması kırmızı olarak boyanan hücreler bcl-2 immünpozitif olarak belirlendi. HEK 293 hücrelerinde istatistiksel değerlendirme, rastgele seçilmiş 10 bölgede bcl-2 (+) olan hücreler (Şekil 4-13) sayılarak gerçekleştirildi. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre EMA'ın bcl-2 immünpozitifliğini anlamlı olarak ($p<0.001$) azalttığı belirlendi. EMA öncesinde 100 µM Zn ve 100 nM Se uygulamasının ise bcl-2 immünpozitifliğini arttırdığı istatistiksel olarak saptandı (sırasıyla; $p<0.01$, $p<0.001$). Bcl-2 immünpozitifliğindeki artış 200 nM Se uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bulunmuştur (Tablo 4-9, 4-10, Şekil 4-11, 4-12).

Tablo 4-9: Bcl-2 immün boyaması yapılan hücrelerin pozitifliklerinin değerlendirilmesi.

Parametre	Kontrol	2.4 GHz	50µM Zn + 2.4 GHz	100µM Zn + 2.4 GHz
Bcl-2 (+) *Ortalama* ± SD	21.2±5.3	5.2±2.8 [a]	6.8±2.5	19±5.7 [b]

[a] *p<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla,* [b] *p<0.01ve* 2.4 GHz *EMA gruplarına kıyasla,*



Şekil 4-11: İmmünohistokimyasal boyama yapılan hücrelerde bcl-2 immünpozitifliği karşılaştırılması.

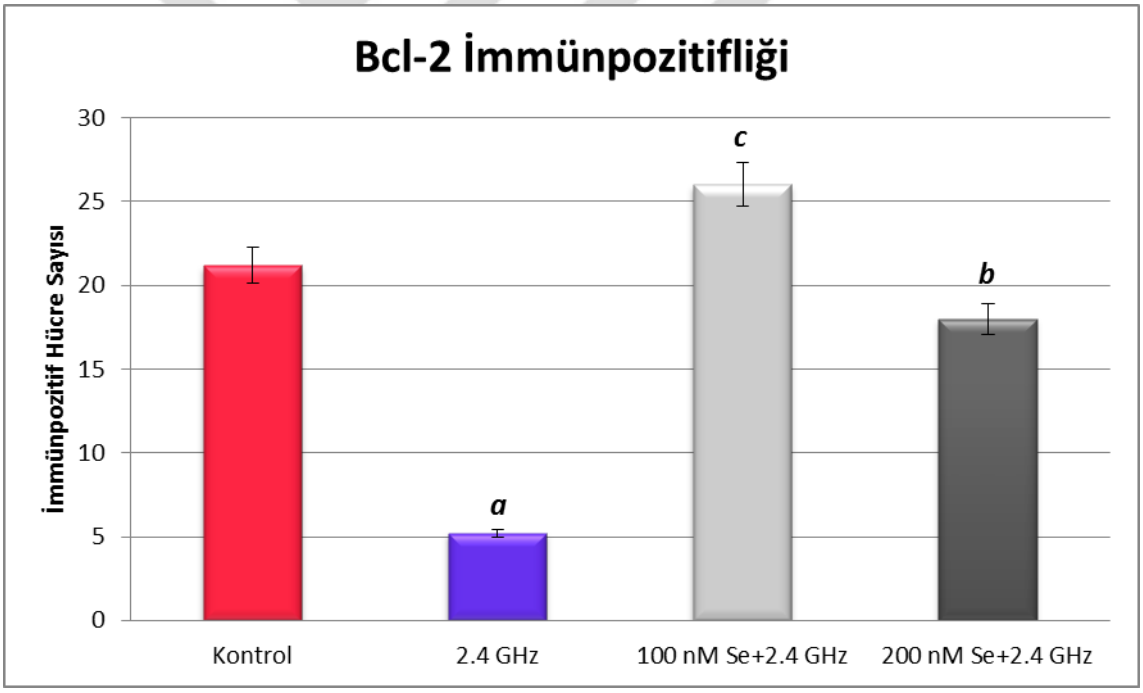
Tablo 4-10: Bcl-2 immün boyaması yapılan hücrelerin pozitifliklerinin değerlendirilmesi.

Parametre	Kontrol	2.4 GHz	100 nM Se + 2.4 GHz	200nM Se + 2.4 GHz
Bcl-2 (+) *Ortalama* ± SD	21.2±5.3	5.2±2.8 [a]	26±9.3 [c]	18±5.1 [b]

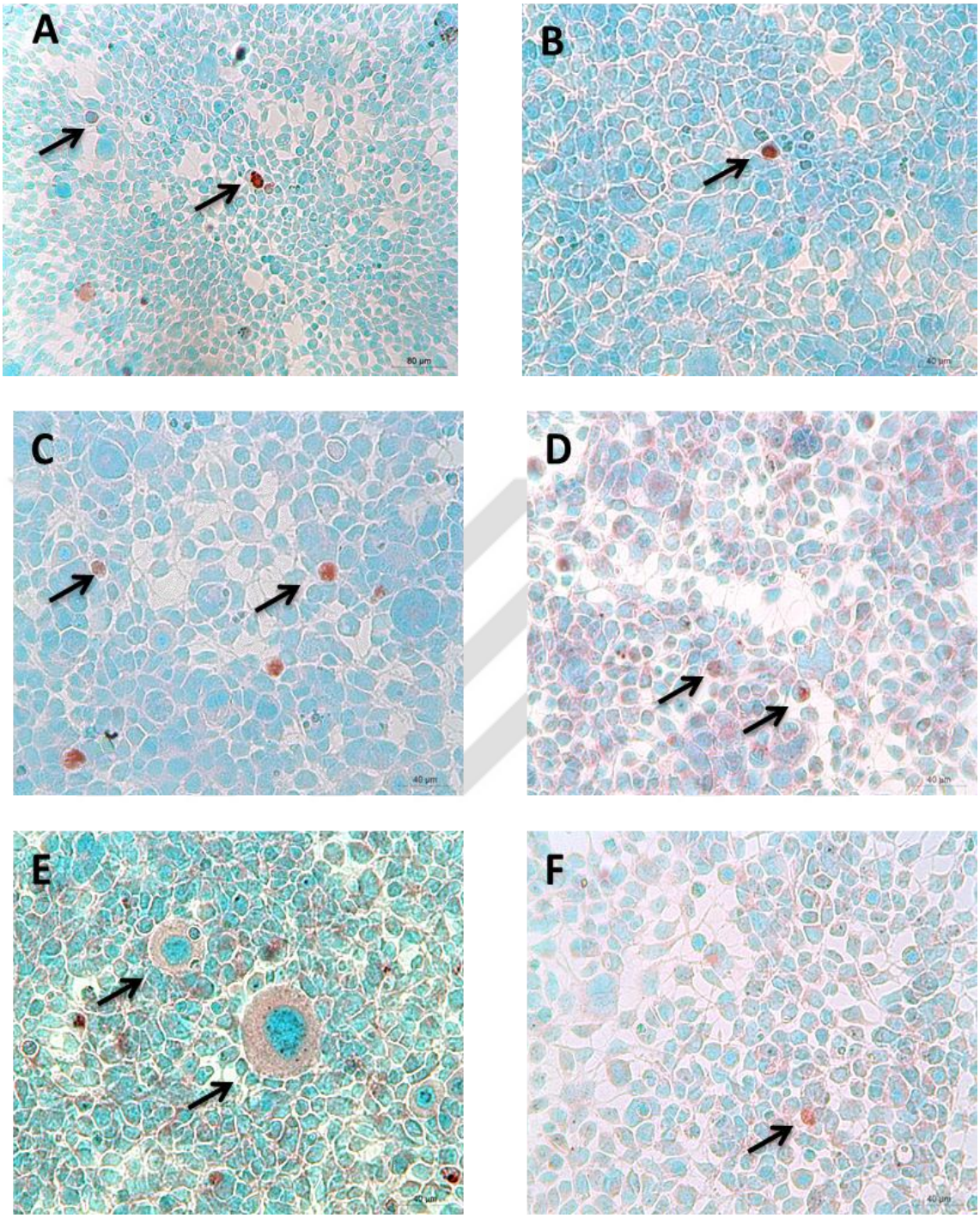
[a] *p<0.001 kontrol grubuna kıyasla,*

[b] *p<0.01ve* 2.4 GHz *EMA gruplarına kıyasla,*

[c] *p<0.001* 2.4 GHz *EMA grubuna kıyasla istatistiksel karşılaştırma.*



Şekil 4-12: İmmünohistokimyasal boyama yapılan hücrelerde bcl-2 immünpozitifliği karşılaştırılması.



Şekil 4-13: HEK 293 hücrelerinde bcl-2 immünohistokimyasal boyaması.

(A) Kontrol grubu, (B) 2.4 GHz grubu, (C) 50µM Zn grubu, (D) 100 µM Zn grubu, (E) 100 nM Se grubu, (F) 200 nM Se grubu. *Zıt Boya; Metil Yeşili, İmmunpozitif hücreler (→), Bar; 40 µm.*

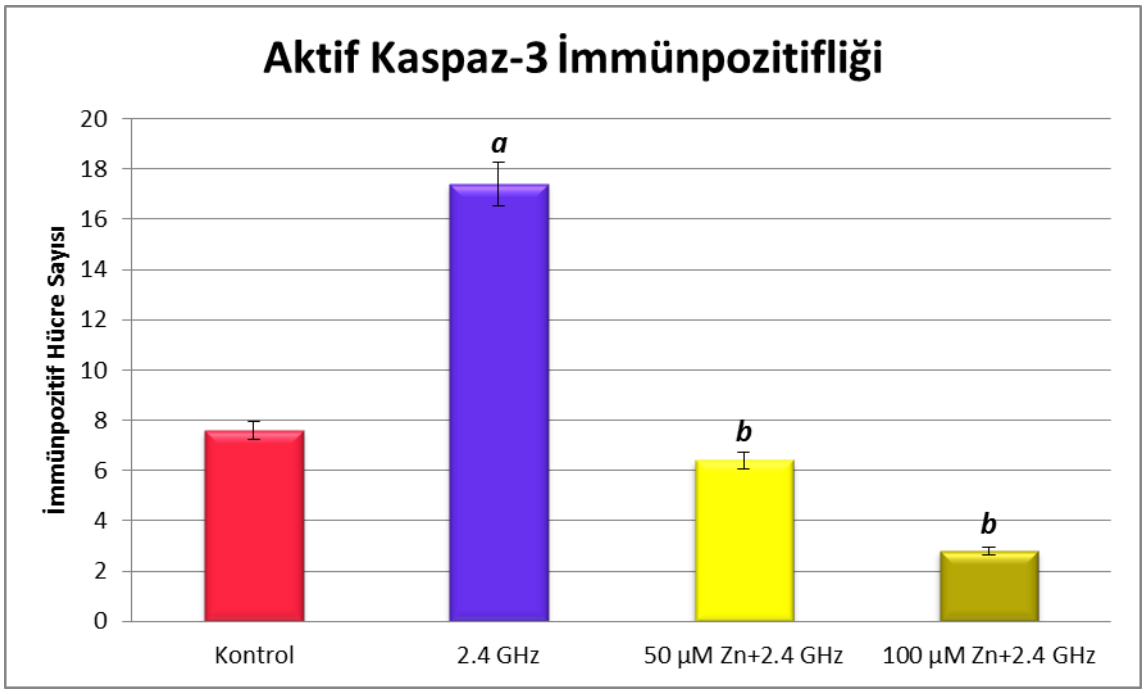
4.3.2.2. Kaspaz-3

Aktif kaspaz-3 antikoru (Millipore, Anti-Caspase-3, active form) ile immünohistokimyasal boyama sonucu sitoplazması kırmızı olarak boyanan hücreler kaspaz-3 immünpozitif olarak değerlendirildi. Rastgele seçilen 10 alanda kaspaz-3 immünpozitif hücrelerin (Şekil 4-16) sayımı ile yapılan değerlendirme sonuçlarına bakıldığında 2.4 GHz EMA uygulanan gruptaki kaspaz-3 immünpozitif hücre sayısının kontrol grubuna göre artmış olduğu ($p<0.05$) tespit edildi. EMA öncesi 50-100 µM Zn ve 100-200 nM Se uygulamasının kaspaz-3 immünpozitif hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) azalttığı belirlendi (Tablo 4-11, 4-12, Şekil 4-14, 4-15).

Tablo 4-11: Kaspaz-3 immün boyaması yapılan hücrelerin immünpozitifliklerinin değerlendirilmesi

Parametre	Kontrol	2.4 GHz	50µM Zn + 2.4 GHz	100µM Zn + 2.4 GHz
Kaspaz-3 (+) *(Ortalama* ± SD)	7.6±3.6	17.4±1.2[a]	6.4±2.7[b]	2.8±0.8[b]

[a] p<0.05 kontrol grubuna kıyasla [b] p<0.001 2.4 GHz EMA grubuna kıyasla

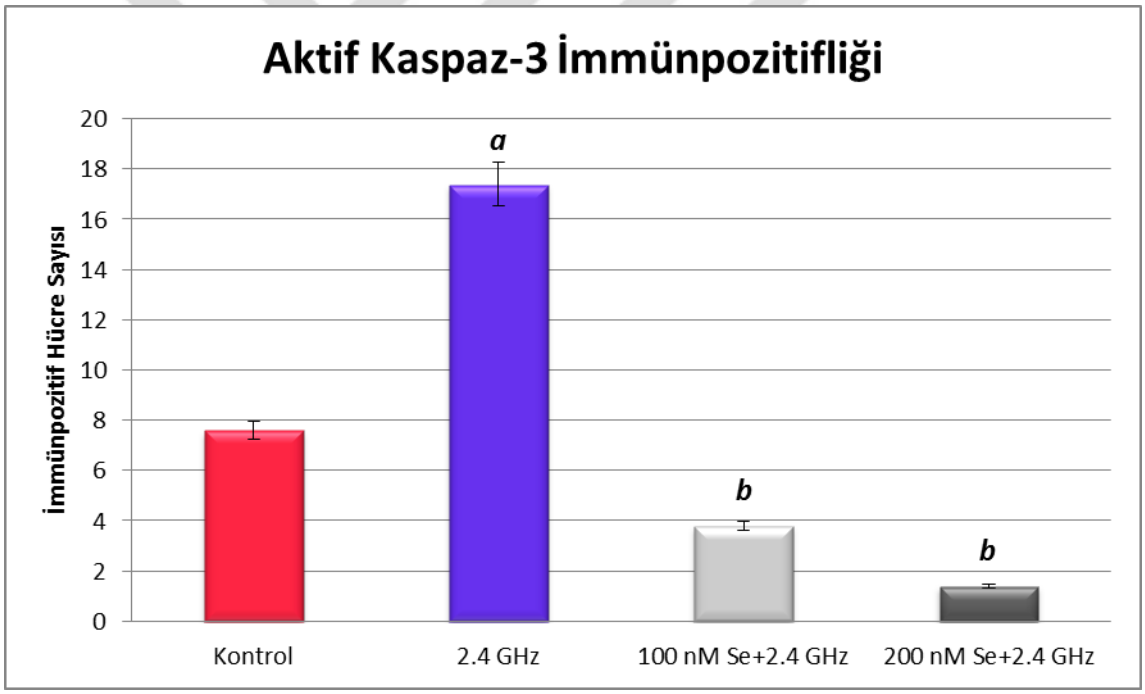


Şekil 4-14: İmmünohistokimyasal boyama yapılan hücrelerde aktif kaspaz-3 immünpozitifliği karşılaştırılması.

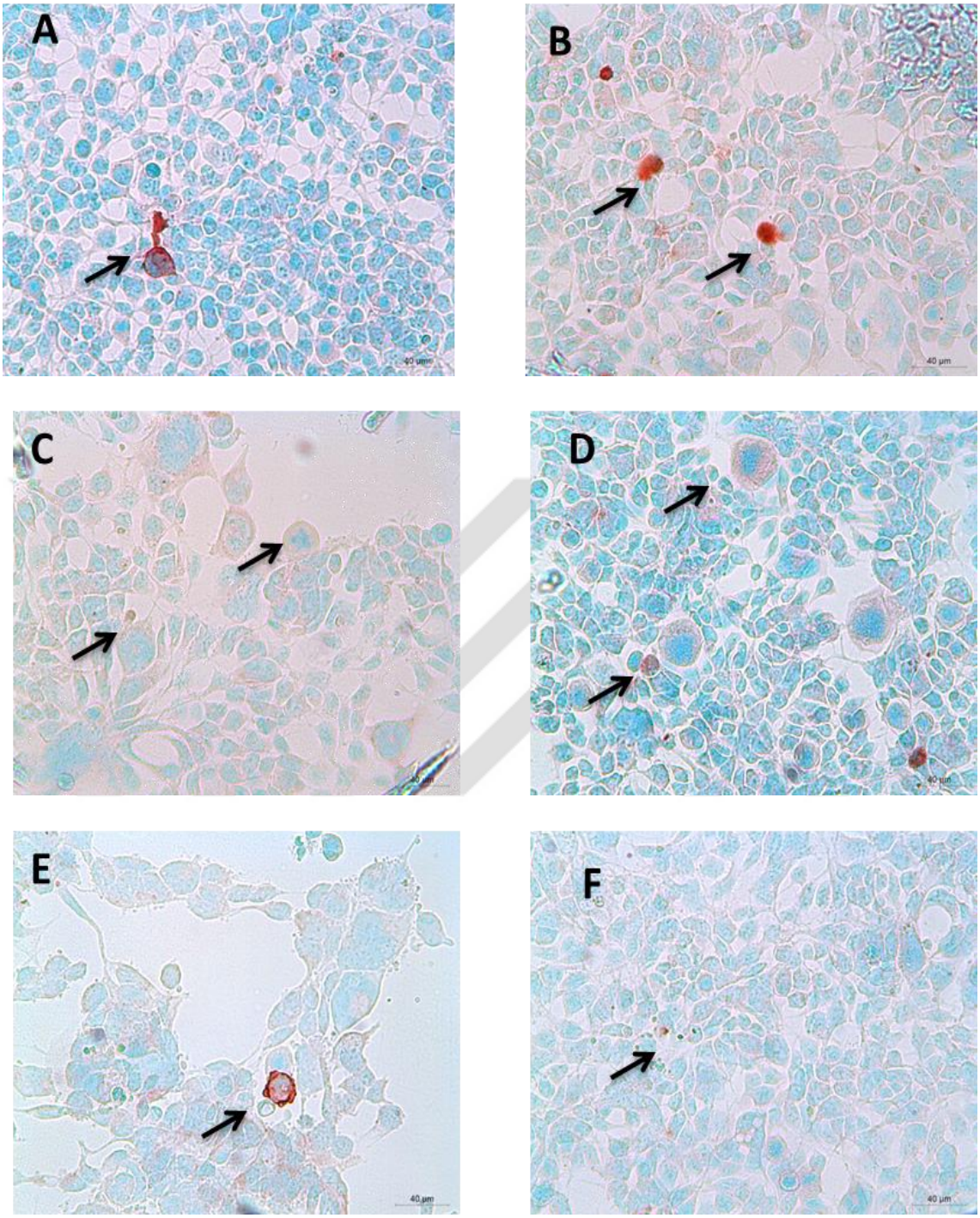
Tablo 4-12: Kaspaz-3 immün boyaması yapılan hücrelerin immünpozitifliklerinin değerlendirilmesi

Parametre	Kontrol	2.4 GHz	100 nM Se + 2.4 GHz	200 nM Se + 2.4 GHz
Kaspaz-3 (+) *(Ortalama* ± SD)	7.6±3.6	17.4±1.2[a]	3.8±1.5 [b]	1.4±1.4[b]

[a] *p<0.05 kontrol grubuna kıyasla* [b] *p<0.001 2.4 GHz EMA grubuna kıyasla*



Şekil 4-15: İmmünohistokimyasal boyama yapılan hücrelerde aktif kaspaz-3 immünpozitifliği karşılaştırılması.



Şekil 4-16: HEK 293 hücrelerinde aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal boyaması.

(A) Kontrol grubu, (B) 2.4 EMA grubu, (C) 50µM Zn grubu, (D) 100 µM Zn grubu, (E) 100 nM Se grubu, (F) 200 nM Se grubu *Zıt Boya; Metil Yeşili, . Aktif kaspaz-3 immünpozitif hücreler (→), Bar; 40 µm.*

5. TARTIŞMA

Kablosuz yerel alan ağ (WLAN) teknolojisi 1990'ların başlarında ortaya çıkmış olup endüstriyel, askeri, bilimsel ve medikal bir çok alanda kullanımı hızla artmaktadır. Bu alanların kullanımında iletişim, elektromanyetik dalgalar ile sağlanmaktadır ki bunun sonucu olarak insanlar yoğun bir şekilde EMA'a maruz kalmaktadır. EMA oluşturan ve günük yaşantımızda sıkça kullanığımız mikrodalga fırınlar, bilgisayarlar, internet erşimini sağlayan modemler ve cep telefonları yaşantımızın bir parçası olmuştur (26, 102). İngilterede yapılan bir çalışmada Khali ve ark. (26) 6 okul ve 12 derslikte kablosuz internet ağlarının kullanımı ile öğrencilerin maruz kaldıkları EMA değerleri ölçülmüştür. Bu araştırmada, sınıfta bir erişim noktası ve 30 dizüstü bilgisayarın 0.5 m mesafede aynı anda maksimum güç yoğunluğu ile çalıştırıldığında kişisel maruziyet 16 mW/m^2 olarak ölçülmüştür ki; bu değer, 10 mW/m^2 olan ICNIRP'ın referans aralığının oldukça üstünde olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalar 2.4 GHz frekanslı EMA'ın insan sağlığını olumsuz etkilediğini ortaya koymaktadır (10, 103, 104, 105).

Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen oluşumları ile EMA arasında pozitif korelasyon olduğu bilinmektedir ve bu oluşumun altındaki hücresel ve moleküler mekanizmalar araştırılmaya devam etmektedir (102). Moleküler düzeyde EMA hücrelerde iyon kanalları, membran reseptörleri ve enzimleri etkileyerek intraselüler ve moleküler membran potansiyellerini değiştirmektedir (4). EMA'a maruz kalma sonucu reaktif oksijen türleri oluşumunun artmasının birincil nedeni mitokondride sitokrom aktivitesinin azalmasına bağlı olarak ATP sentez hızının azalması olarak bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda EMA sonucu oluşan oksidatif stresin mitokondriyal enerjinin tükenmesine, proteolitik enzimlerin artmasına ve DNA fragmantasyonuna yol açarak hücreyi apoptoza götürdüğü belirtilmektedir (5, 102).

Salah ve ark.'nın (3) 2.45 frekanslı Wi-Fi sinyali ile indüklenen oksidatif stres ve metabolik bozukluklar üzerine yaptıkları çalışmada sıçanlara uygulanan EMA'ın böbrek ve karaciğer dokusunda GSH-Px, CAT ve SOD aktivitelerini düşürdüğünü, MDA seviyesini ise arttırdığı tespit edilmiştir.

EMA'ın biyolojik dokulara etkilerinden biri, oluşturduğu hipertermik etkilerdir. Bunun üreme sistemindeki olumsuz etkilerinden dolayı infertilite sıklığını arttırdığı

bilinmektedir (12). Saygın ve ark. da (1) 2.45 GHz frekanslı EMA'ın 28 gün boyunca 1 saat/gün uygulanmasının testis dokusuna olan etkisini araştırmışlardır. EMA uygulanan grupta Leyding hücre sayısının kontrol grubuna göre azaldığı, fakat TNF-α, kaspaz-3 ve bcl-2'nin ise gruplar arasında değişmediği belirlenmiştir. Çalışmada bax ve kaspaz-8 ekspresyonunun artması EMA'ın apoptozu tetiklediğini, ve testis dokusunda dejenerasyona sebep olarak infertilite meydana getirilebileceğini ileri sürmektedirler. Nazıroğlu ve ark.'nın (106) yaptıkları çalışmada sıçanlara 2.45 GHz frekanslı EMA'ın 1 saat/gün olarak 30 gün süreyle uygulanmasının nöron hücrelerinin içerisine Ca girişini arttırdığını, buna bağlı olarak oksidatif toksisiteye neden olduğunu göstermişlerdir.

İnsan vücudunda oluşan reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirerek hücrelerde oluşabilecek zararları engelleyen SOD, GSH-Px ve katalaz (CAT) gibi enzimatik antioksidanlar ile vitaminler, mineraller gibi enzimatik olmayan antioksidan sistemler mevcuttur. Canlı organizmada antioksidan ve oksidanlar arasındaki dengenin bozulması sonucunda çeşitli hastalıkların oluştuğu bilinmektedir (5, 102).

Stander ve ark'nın (107) kanserli meme hücrelerinde yaptıkları çalışmada 900 MHz frekanslı EMR'un reaktif oksijen türlerini arttırdığını, bununla birlikte apoptotik hücre sayısında da artış olduğunu tespit etmişlerdir. Chaturvedi ve ark.'nın (108) yaptıkarı çalışmada farelere 2.45 GHz EMA'ın 2 saat/gün olacak şekilde 30 gün uygulanmasının eritrosit ve lökosit sayısını arttırdığı ve beyin hücrelerinde DNA kırıkları oluşturarak hafıza üzerine etkili olduğunu gözlemlemişlerdir.

Canlılarda büyüme ve gelişme için gerekli olan ve antioksidan enzimlerin kofaktörü olarak bulunan Zn, canlılığın devam etmesinde hücre bölünmesi, apoptoz ve hücre içi haberleşmede büyük önem taşımaktadır (109). İnsanlar, deney hayvanları ve hücre kültürü çalışmaları Zn eksikliğinin oksidatif stresin regülasyonu ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. Çinko, Cu/Zn, SOD ve metallotiyoninler gibi oksidatif strese karşı koruyucu etki gösteren proteinlerin esansiyel bir kofaktörüdür (110).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile canlılar için önemi anlaşılan selenyum, insanlar ve hayvanlarda hücre döngüsü ve apoptoz için kritik öneme sahiptir. Selenyum eksikliği immün sistem bozuklukları gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirildiği, ayrıca Se takviyesinin bazı kanser türlerine karşı koruyucu etki gösterdiği belirtilmekle birlikte yapılan çalışmalar Se etkinliğinin kimyasal formu ve dozu ile ilişkili olduğunu belirtmektedir (8). Yapısında Se bulunan antioksidan bir enzim olan GSH-Px,

indirgenmiş glutatyon varlığında hidro ve organik peroksitleri etkisiz hale getirmektedir. Se'un, bir diğer önemli antioksidan enzim olan tiyoredoksin redüktazın katalitik aktivitesi için de gerekli olduğu bilinmektedir (102). Selenyumun ayrıca sinir sistemi ve çeşitli kanser türleri için koruyucu etkiye sahip anti-inflamatuvar özellikte bir element olduğu bilinmektedir. Farklı kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda Se'un hücre proliferasyonunu arttırdığı, apoptozu inhibe ettiği belirtilmiştir (10, 111, 112).

Bu literatür bilgileri doğrultusunda tez çalışmamızda 2.4 GHz frekanslı EMA uygulanan HEK293 hücrelerinde Zn ve Se'un antioksidan etkinliği, biyokimyasal ve morfolojik değerlendirmeler yapılarak incelendi. Bu amaçla araştırmamızda, HEK293 hücreleri Zn ve Se ilavesiz, ayrıca Zn ve Se ile 48 saat inkübe edildikten sonra 1 saat süre ile 2.4 GHz EMA'a maruz bırakıldı. Oluşturduğumuz çalışma gruplarına deneysel uygulamalarımız sonrasında hazırlanan hücre lizatlarında biyokimyasal parametrelerden MDA, SOD ve GSH-Px ölçümü yapılırken, morfolojik değerlendirme için TUNEL yöntemi ile apoptoz tayini yapıldı, bcl-2 ve kaspaz-3 immünohistokimyasal olarak değerlendirildi.

Deneyimizde HEK293 hücrelerinde EMA uygulanması sonrasında oksidatif strese neden olan lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kabul edilen MDA değerlendirmesi sonucunda, 2.4 GHz frekanslı EMA'ın kontrol grubuna kıyasla MDA seviyesini ileri derecede anlamlı ($p<0.001$) olarak arttırdığı görülmüştür. Bunun yanı sıra 50 µM ve 100 µM Zn uygulanmasının 2.4 GHz frekanslı EMA'ın lipid peroksidasyonunundaki artışı anlamlı olarak ($p<0.05$) önlediği bulundu. Benzer şekilde, EMA uygulanması SOD aktivitesini ($p<0.05$) azaltırken, 2.4 GHz EMA uygulanmadan önce HEK293 hücrelerinin Zn ile inkübe edilmesi EMA'ın neden SOD aktivitesindeki düşüşü anlamlı olarak ($p<0.05$) engellediği tespit edildi.

Shahin ve ark.'nın (113) fareler üzerinde yaptıkları çalışmada 2 saat/gün olarak 45 gün uygulanan EMA'ın reaktif oksijen türlerini artırırken SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini azalttığını bildirilmektedirler.

900 MHz EMA uygulanan sıçanların böbrek dokularında yapılan araştırmada Ozguner ve ark. (114) EMA'ın MDA ve nitrik oksitin miktarını arttığını, SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini azalttığı belirlemişlerdir. Kuyubulu ve ark.'nın (115) yaptıkları çalışmada, 2.45G Hz frekanslı EMA'a maruz bırakılan sıçanların böbrek dokularında

total oksidan ve MDA seviyesinin arttığını, total antioksidan seviyesi ve SOD aktivitesinin ise azaldığını belirtmişlerdir.

Bediz ve ark.'larının (6) yaptıkları çalışmada EMA'ın indüklediği lipid peroksidasyonun üzerine Zn'nun etkisi incelenmiştir. Deneyde kullanılan sıçanları 6 ay boyunca gün aşırı 5 dakika 50 Hz frekanslı EMA' maruz bırakılmıştır. Plazma ve beyin dokularından yapılan ölçümlerde uzun süreli düşük frekanslı EMA'a maruz kalma sonucunda lipid peroksidasyon seviyelerinin arttığı, EMA ile birlikte Zn uygulanan gruplarda ise lipid peroksidasyonun düşük seviyelerde kaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada uygulama farklılıkları olmasına rağmen Zn'nun EMA'ın oluşturduğu lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösteriyor olması bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir.

2.4 GHz frekanslı EMA uygulanan gruptaki GSH-Px aktivitesinin de kontrol grubuna kıyasla anlamlı ($p<0.05$) olarak azalmış ve EMA uygulaması öncesinde 50 µM Zn ve 100 µM Zn ilavesi yapılan gruplarda ölçülen GSH-Px aktivitesinde EMA uygulanan gruplara göre farklılık gözlemlenmemiştir. Bu bulgularımızın sonucu olarak Zn ilavesinin, EMA uygulanması sonucu HEK293 hücrelerinde anlamlı olarak azalan GSH-Px aktivitesinde etkili olmadığı saptanmıştır.

2.4 GHz frekanslı EMA'ın HEK293 hücrelerinin MDA seviyelerinde meydana getirdiği anlamlı artışın ($p<0.001$), 2.4 GHz frekanslı EMA öncesinde 100 nM Se uygulanması ile anlamlı olarak azaldığı ($p<0.05$), 200 nM Se uygulandığında ise bu azalmanın ileri derece anlamlılıkta ($p<0.001$) olduğu bulundu. Çalışmamızda SOD enzim aktiviteleri bulguları ise EMA'ın SOD aktivitesini anlamlı ($p<0.05$) olarak azalttığını, elektromanyetik alan uygulanmadan önce Se (100nM ve 200nM) ile inkübe edilmesi ise bu azalışı anlamlı olarak ($p<0.05$) arttırdığını göstermektedir.

Çalışmamızda HEK293 hücrelerinin kontrol grubuna göre 1 saat süre ile 2.4 GHz frekanslı EMA uygulanmasının GSH-Px aktivitesini anlamlı olarak ($p<0.05$) azalttığı bulunmuştur. EMA öncesinde besiyerine Se eklenerek inkübe edilen hücrelerde ise 2.4 GHz frekanslı EMA sonucu meydana gelen GSH-Px seviyesindeki azalmaya göre anlamlı ($p<0.05$) olarak arttığı tespit edilmiştir.

Tüker ve ark. (102) ile Gümral ve ark.'nın (116) sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada 2.45 GHz frekanslı EMR'un oluşturduğu oksidatif stres üzerine sodyum selenitin koruyucu etkisi incelenmiştir. 28 gün boyunca 1 saat süre ile uygulanan

EMA'ın etkileri sıçanların kalp dokusu, plazma ve eritrositlerinde incelenmiştir. Çalışmamızla aynı frekanslı elektromanyetik alanın farklı uygulamasının değişik dokularda ölçülen lipid peroksidasyonunu arttırdığı ve GSH-Px aktivitesini azalttığı, selenyum uygulamasının ise lipid peroksidasyonunu azalttığı ve GSH-Px aktivitesini arttırdığını belirten bu araştırma bulgularının çalışmamızda elde edilen bulgularla uyumlu olduğu görülmektedir.

Organizmada GSH-Px'ın sententezlenmesinde GSH substrat, Se ise kofaktör olarak kullanılmaktadır (117). Dolayısıyla canlılarda oksidatif stresin artması , GSH-Px enzim tüketiminin artması ve GSH düzeylerinin azalması ile birlikte gözlemlenmektedir (118, 111).

Oksidatif stress, reaktif oksijen türleri ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. EMA sonucu oluşan oksidatif stresin apoptozu indüklediği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda EMA'ın hücre membranlarını etkileyerek lipid peroksidasyonu oluşturduğu ve dolayısıyla apoptozu başlattığı belirtilmektedir (119). Radyasyonun hücre membranları üzerine etkisi sonucunda oluşan lipid peroksidasyonunun, apoptozu başlatıcı etkiler arasında yer aldığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (119). Birçok yayında EMA'ın oksidatif stres ve apoptozu indüklediği belirtilmektedir (120, 121, 122, 123, 124).

Hücresel proliferasyon ve apoptoz gibi hücresel fonksiyonların çevresel stresler ile modüle edildiğini gösteren çeşitli çalışmalar vardır. Yapılan araştırmalarda EMA'ın onkogen traskripsiyonu ve ısı şok proteinleri gibi çeşitli hedefleri aktive ettiği gösterilmiştir (125, 126). Apoptoz, canlılarda embriyogenezden çok hücreli organizma oluşumunda önemli bir fizyolojik olaydır ve apoptoz yolaklarındaki düzensizlik çeşitli hastalıkların oluşmasına sebep olmaktadır (127, 128).

EMA'ın canlı ile etkileşimi üzerine yapılan çalışmalarda; EMA'ın bazı proteinleri aktive ettiği, membran proteinlerini etkileyerek hücre potansiyelini etkilediği, DNA'da kırıkları oluşturduğu belirtilmektedir (104). Günlük yaşantımızda artan bir şekilde maruz kaldığımız EMA'ın hücrede apoptotik mekanizmaları aktive ederek mevcut dengeyi bozduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Kaspaz ailesi üyeleri, hücresel apoptozun en belirgin belirteçleri olarak kabul edilmektedir (129, 130).

Merola ve ark.'ları (131) bazı telefonların SAR değerlerinin ICNIRP'ın mesleki maruziyet için belirlenen sınır değerinden daha yüksek olduğunu ve bu değerin

nöroblastoma hücrelerinde apoptoz üzerine etki ettiğini tespit etmişlerdir. 900 MHz frekanslı EMA'ın sıçan tiroid dokusu üzerine etkisini morfolojik olarak değerlendiren Eşmekaya ve ark. (130) 3 hafta süresince 20 dak/gün olarak uyguladıkları EMA'ın kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunu arttırdığı ve apoptotik keseciklerin oluşumunu gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Oral ve ark.'nın (7) 900 MHz frekanslı EMA ile sıçanlar üzerinde yaptığı çalışma sonucunda EMA'ın endometriyal dokusunda lipid peroksidasyununu arttırdığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada immünohistokimyasal değerlendirmede ise EMA uygulaması sonucunda kaspaz-3, kaspaz-8 ve bax'ın arttığı gözlemlenmiştir. Güler ve ark.'ın (2) yaptıkları çalışmada 1800 MHz frekanslı EMA hamile ve hamile olmayan tavşanlara uygulanmıştır. Deney hayvanlarının beyin, göz, böbrek, akciğer, karaciğer, kalp ve dalakları histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Hamile olanlar, olmayanlar ve infantlarda TUNEL boyaması yapılan beyin dokusunda, gözün ön epitel hücrelerinde ve lenste apoptotik hücreler tespit edilmiştir. Ait-Aissa ve ark.'nın (13) yaptığı çalışmada hamile sıçanlar ICNIRP'nin belirlediği kritik seviyeler olan 0, 0.08, 0.4 ve 4 W/kg SAR değerleri oluşturacak Wi-Fi sinyaline maruz bırakılmıştır. Beyin dokusunda TUNEL yöntemi ile belirlenen apoptoza bakıldığında, pre ve postnatal dönemlerde EMA'a maruz kalan sıçanların beyinlerinde apoptotik açıdan bir değişim gözlenmediği belirtilmektedir. İnsan lenfosit hücrelerinde Hansteen ve ark.'nın (132) yaptıkları çalışmada 2.3 GHz EMR'un 10 W/m^2 değerinde pulslu ve sürekli uygulanması sonucunda EMA'ın kromozomal parametreler üzerinde istatistiksel olarak herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı belirtilmişse de EMR'un pulslu uygulanmasının sürekli uygulanmasına karşın zayıf bir etkileşim oluşturduğu görüşüne varılmıştır. Ghazizadeh ve ark. (4) 2.45 GHz frekanslı EMA'ın etkisini TRPV1 kalsiyum (Ca) kanalı ile ilişkilendirilmiş ve TRPV1 'in 2.45 GHz frekanslı EMA etkisi ile hücre içi Ca miktarını arttırdığı ve bu şekilde reaktif oksijen türlerini oluşturarak hücrede apoptotik faaliyeti başlattığı belirtilmiştir.

Çalışmamızda, HEK293 hücrelerine EMA uygulamasının ve bununla birlikte bu hücrelerin Zn ve Se ile inkübasyonu sonrası EMA 'a maruz bırakılmasının HEK293 hücrelerinde meydana getirdikleri etkileri değerlendirmek için ölçülen biyokimyasal parametrelerin yanında apoptotik aktiviteleri de araştırılmıştır. Ayrıca apoptoz yolaklarının belirlenmesi amacıyla HEK293 hücrelerine immünohistokimyasal boyama yapılarak bcl-2 ve kaspaz-3 tayini yapılmıştır.

Çinko, tüm canlı organizmaların hücre farklılaşması, gelişmesi ve bölünmesi gibi pek çok fizyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gerekli bir esansiyel element olup, eksikliği beyin, akciğer, kalp ve böbrek gibi pek çok hayati öneme sahip organın gelişimini ve fonksiyonunu etkiyebilir (133, 134). Yapılan araştırmalarda çinko yetersizliğinin, farklı organlarda (karaciğer, böbrek, testis, deri, timus) değişik seviyelerde apoptoz yolu ile hücre ölümünde bir artışa neden olduğu bildirilmektedir. Çinko homeostazındaki değişikliklerin hücrenin apoptoza duyarlılığını etkileyebildiği gösterilmiştir (135, 136, 137). Çinko'nun hücre ölümlerinin azaltılmasındaki rolü; antioksidan özelliğinden ve metallotiyonin (MT) ekspresyonunda belirgin bir artışa neden olması ile de açıklanmaktadır (138, 139). Yapılan çalışmalarda böbrek dokusunda Zn ve Zn ile indüklenen MT'in değişik koşullarda oksidatif stres sonucu oluşan böbrek hasarına karşı anlamlı bir koruma sağladığı belirtilmektedir (140, 141). Çinkonun pek çok fizyolojik sistemlerdeki muhtelif rolüne ek olarak apoptozun düzenlenmesinde de önemli olduğu gösterilmiştir. Hem *in vivo* hem de *in vitro* yapılan çalışmalarda Zn uygulamasının, farklı ajanların tetiklediği apoptozu önleyebildiği gösterilmiştir (142, 143, 144).Çinkonun apoptoz regülasyonunda önemli olduğu ilk olarak 1970'li yıllarda ortaya konmuştur. Yapılan çalışmada Zn eksikliği bulunan sıçanların ince bağırsağında apoptotik hücre sayısının fazlalığı dikkat çekmektedir. Bu fazlalığın DNA sentezi sırasında meydana gelen bir hatadan dolayı oluştuğu öne sürülmüştür (145). Sonraki yıllarda gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında, hücre kültürü ortamında Zn şelatlanmasının apoptozu arttırdığı, bununla birlikte, apoptotik hücrelerin bulunduğu besiyerine Zn eklenmesinin ise apoptozu engellediği tespit edilmiştir (146, 147). Yapılan çalışmalar Zn eksikliğinin apoptozu arttırdığı, Zn takviyesinin ise apoptozu engellediğini ortaya koymaktadır (9). Schrantz ve ark.'nın (9) Zn ve kaspaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada, insan B lenfoma hücrelerinde belirli konsantrasyonlardaki Zn'nun, kaspaz-3 ve kaspaz-9'u aktive ederek apoptozu regüle ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmaların sonucu olarak Zn'nun kaspaz aktivasyonu ile hücre canlılığını kotrol ettiği gösterilmiştir. Ancak çinkonun apoptozun düzenlenmesinde oynadığı rol ve yolaklar tam olarak aydınlatılamamıştır (148).

Çalışmamızda HEK293 hücrelerinde 2.4 GHz frekanslı EMA uygulanmasının apoptotik hücre sayısında anlamlı artışa ($p<0.001$) sebep olduğu gözlemlenmiştir. 50 µM ve 100 µM Zn ile inkübe edildikten sonra 2.4 GHz frekanslı EMA uygulanmasının apoptotik hücre sayısındaki artışı anlamlı olarak ($p<0.001$) azalttığı tespit edilmiştir.

Çinkonun anti-apoptotik mekanizmalarından biri, hücresel oksidatif hasarı azaltarak apoptoza yol açan bazı yolakları ve böylece kaspaz aktivasyonunu engelleyebildiği öne sürülmektedir (137).

Tez çalışmamızda, antiapoptotik protein bcl-2 ve apoptozun düzenleyici proteinlerden olan kaspaz-3'ün immümohistokimyasal boyama yöntemi ile immünpozitifliği değişimi de araştırılmıştır. Yaptığımız çalışmada 1 saat süresince 2.4 GHz frekanslı EMA uygulanan HEK293 hücrelerinde bcl-2 pozitifliğini anlamlı olarak ($p<0.001$) azalttığı gözlemlenmiştir. 2.4 GHz frekanslı EMA öncesinde 50 µM Zn uygulaması bcl-2 pozitifliğini anlamlı olarak arttırmadığı, 100 µM Zn uygulamasının ise bcl-2 immünpozitifliğini anlamlı olarak ($p<0.01$) arttırdığı tespit edilmiştir.

Deneysel işlemlerimiz sonrasında immünohistokimyasal boyama ile gözlemlediğimiz kaspaz-3 immünpozitifliğinin 2.4 GHz frekanslı EMA uygulaması sonrası anlamlı olarak arttığı ($p<0.05$) gözlemlenmiştir. Hücrelerin (HEK293) 2.4 GHz frekanslı EMA öncesinde 50 ve 100 µM Zn ile inkübe edilmesi sonrası 2.4 GHz frekanslı EMA uygulan gruplardaki kaspaz-3 immünpozitifliğinin EMA uygulanan gruba göre anlamlı olarak ($p<0.001$) azalttığı belirlenmiştir.

Kaspaz-3 hücre içerisinde apoptotik düzenleyici protein olarak bilinmekle birlikte kaspaz-3'ün varlığı apoptozun başladığının bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (7). Çinkonun kaspaz-3 aktivitesini engelleyerek hücreleri apoptoz sürecinden koruduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, in vivo çalışmalarda apoptozda görülen artışın hücre içi çinko konsantrasyonundaki azalmanın, doğrudan ya da dolaylı olarak bir sonucu olduğu belirtilmektedir (149). Çinko'nun bir antiapoptotik protein olan bcl-2 ekspresyonunu artırma, buna karşın bir proapoptotik protein olan bax ekspresyonunu azaltarak ikisi arasında denge kurduğu ve hücrelerin apoptoza olan direncini artırabildiği belirtilmektedir (150).

Hidrojen peroxide maruz bırakılarak apoptozun tetiklendiği monosit hücre kültür ortamına Zn eklenmesi ile antiapoptotik bcl-2 protein ekspresyonunun artması ve proapoptotik bax protein ekspresyonunun azalması ile kaspaz-3 aktivitesinin inhibe edildiği, dolayısıyla apoptotik hücre ölümünde bir azalma olduğu gösterilmiştir (151, 152).

Santon ve ark. (139) apoptozu uyaran ajanlar ile birlikte fibroblast hücrelerine oksidatif ajan olan Fe uygulanması sonucu apoptotik indeksin Zn uygulaması yapılan grupta Fe uygulaması ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca Zn yetersiz besinle beslenen hayvanların farklı dokularında ve memeli hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, apoptotik indeksin arttığı buna karşılık Zn uygulamasının apoptoz üzerinde inhibitör etkisinin olduğu gösterilmiştir (136, 137). Bunlara ilaveten; çinkonun bax aktivasyonu ve mitokondriden sitokrom-c serbestleşmesini önleyerek (153) kaspaz aktivasyonunun inhibisyonunda etkili olduğu (154) ve hücre apoptozunu engellediği belirtilmektedir.

Çinko uygulamasının anti-apoptotik etkisini araştıran ve yukarıda belirtilen farklı deneysel çalışmaların sonucularında, farklı doku ve hücrelerde diğer bulgular ile birlikte, çinkonun antiapopototik etkisi il kaspaz-3 aktivitesini azaltığı ve bcl-2 aktivitesini artırdığı yönündeki bulguları, çalışmamızda Zn uygulaması sonucu bulunan kaspaz-3 immünpozitifliğindeki azalma ve de bcl-2 immünpozitifliğindeki artma ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Son zamanlarda önemi vurgulanan elementlerden olan selenyum, GSH-Px ‘ın kofaktörü olarak majör bir antioksidan öneme sahiptir (58). Bununla birlikte, deneysel çalışmalarda selenyumun apoptozu indüklemesi ya da inhibisyonunun uygulanan doz ile ilişkisi gösterilmiştir. Düşük dozlarda oksidatif strese bağlı indüklenen apoptozu azaltırken yüksek dozlarda radikal oluşumunu artırarak hücrede apoptoza neden olduğu belirtilmektedir (155, 156).

Ayrıca, kanserli hücreler üzerinde selenyumun etkisinin yapıldığı araştırmalarda, verilen Se’un dozuna, kimyasal bileşimine ve araştırma yapılan hücre çeşidine bağlı olarak hücre canlılığı üzerindeki etkisinde farklılık görülmüştür (157, 158, 159). Araştırmalarda yüksek konsantrasyonlardaki selenyum uygulamasının hücrelerde lipid peroksidasyon artışına paralel olarak apoptozu artırarak kanser hücrelerinin artmasını önlediği gösterilmiştir. Bununla birlikte daha az konsantrasyonlarda ise hücrelerde lipid peroksidasyonunu azaltarak hücre sayılarının arttığı da belirtilmektedir (155, 158, 159).

Literatür taramasında rastlamadığımız HEK293 hücrelerinin EMA’a maruz kalması sonucu oluşabilecek oksidatif strese bağımlı apoptozun önlenmesinde, bu hücrelerin farklı konsantrasyonlardaki Se uygulamasının rolünü de araştırdık. Çalışmamızın sonuçlarında; 2.4 GHz frekanslı EMA sonucu apoptotik hücre sayısında

anlamlı artış ($p<0.001$) gözlemlenirken, 2.4 GHz frekanslı EMA öncesinde farklı dozlarda Se (100-200 nM) uygulanmasının apoptotik hücre sayısını ($p<0.001$) anlamlı olarak azalttığı tespit edildi.

Çalışmamızda apoptoz düzenleyici proteinlerden kaspaz-3 ve antiapoptotik proteinlerden bcl-2 immünpozitifliği araştırıldı. Farklı gruplardaki HEK293 hücrelerimizin bcl-2 immünpozitifliği değerlendirildiğinde; 2.4 GHz frekanslı EMA'ın bcl-2 pozitifliğini anlamlı olarak ($p<0.001$) azalttığı belirlendi. 2.4 GHz frekanslı EMA öncesinde 100 nM Se uygulamasının bcl-2 immünpozitifliğini arttırdığı ($p<0.001$), 200 nM Se uygulanan grupta ise artışın istatistiksel olarak $p<0.01$ anlamlılıkta olduğu tespit edildi. Araştırmamız sonucunda, kaspaz-3 immünpozitif hücre sayısını Se uygulanan gruplarda değerlendirildiğinde ise 2.4 GHz frekanslı EMA uygulanan grupta artmış olan ($p<0.05$) kaspaz-3 immünpozitifliği, 2.4 GHz frekanslı EMA öncesi 100-200 nM Se uygulanan gruplarda anlamlı olarak ($p<0.001$) azaldığı belirlendi.

Hidrojen peroksitin hücresel düzeyde oksidatif stres oluşturması yolu ile apoptozu indüklediği ve bu apoptotik oluşumun Se'un antioksidan özelliği ile önlenebildiği bildirilmektedir (160, 161, 162). Deneysel hayvan çalışmalarında tiroid hücrelerine hidrojen peroksit uygulamasında GSH-Px seviyelerinde azalma, buna karşın kaspaz aktivitesinde artma gösterilmiştir. Bu çalışmada hücrelere 10 ile 100nM Se uygulanması GSH-Px seviyesini artarken, kaspaz-3 aktivitesi azalmıştır. Araştırmada hidrojen peroksite bağlı lipid peroksidasyon etkisi ile apoptozdaki artışın selenyumun antioksidan özelliğine bağlı olarak kaspaz-3 aktivitesinde azalma gösterilmiştir (162).

Nöronal hücrelerde yapılan bir çalışmada Se'un apoptotik yolaklara baskı yaparak apoptozu engellediği, fizyolojik seviyelerdeki Se'un primer hasarı azaltarak hücre hasarına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (164). Uguz ve arkadaşları (111), HL-60 hücrelerinde oksidatif stresin indüklediği apoptozu, Se uygulamasının kaspaz-3'ü de regüle ederek düzenlediğini göstermişlerdir. Kahya ve ark. (10) yaptıkları çalışmada metastatik meme kanseri hücrelerine 900 MHz frekanslı EMA 1 saat süre ile uygulanmış ve selenyumum koruyucu etkisi gözlemlenmiştir. Çalışmada hücre canlılığı, ROT üretimi, mitokondri membran depolarizasyonu, apoptoz, kaspaz-3 ve kaspaz-9 değerlendirilmiştir. Selenyumun, oksidatif stresi azaltarak ve mitokondri potansiyelini normalleştirerek EMA'ın indüklediği oksidatif hasarı baskılamış ve hücre canlılığının artmasını sağlamıştır.

Yukarıda sonuçları verilen araştırmalar, çalışmamızda Se uygulaması sonucu bulunan kaspaz-3 immünpozitifliğindeki azalma ile uyumludur. Çalışmamızın sonucuna göre HEK293 hücrelerinin 2.4 GHz EMA'a maruz bırakılması öncesinde Se ile inkübasyonunun uygulanan EMA'ın oluşturduğu apoptoza karşı, kaspaz-3 ekspresyonunu azaltan, bcl-2'yi artıran koruyucu bir ajan olduğu söylenebilir.

Sanayi, teknik, tıbbi alanlarla birlikte günlük yaşamda 2.4 GHz EMA kullanımının yaygınlaşması, hamile kadınların ve yeni doğanların sürekli EMA'a maruz kalması bakımından da söz konusu EMA'ın diğer hücre ve dokularda olduğu gibi böbrek hücre ve dokusunda olası zararlarını açılığa kavuşturmak önem kazanmıştır.

Fetal ve doğum sonrası böbrek üzerindeki EMA'ın farklı dozlarda zararlı etkileri hakkında önceki sınırlı sayıdaki veriler, tübüller, glomeruluslarda ve böbrek parankiminde kistik değişiklikler gibi olası gelişimsel anormallikleri ortaya koymuştur. Literatür tarama sonuçlarımıza göre, böbrekler ve böbrek hücreleri üzerinde EMA'ın toksik etkileri hakkında sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır (165, 166).

Böbrek dokusu üzerinde EMA etkilerini inceleyen çalışmalarda farklı sonuçlar rapor edilmektedir. Bu farklı sonuçlar; cinsiyet, uygulama yöntemleri, süreleri, konsantrasyon gibi çeşitli faktörlere bağlı olabilir. Gebelerin elektromanyetik alana maruz kalması dolayısı ile fetüste EMA'ın olası yan etkilerini araştıran çalışmalar günümüzde artarak devam etmektedir. Fetüs üzerine elektromanyetik alanların etkilerini bildiren çok az sayıda çalışma yayınlanmıştır (167, 168, 169).

Düşük frekanslı EMF (50 Hz) maruz kalma *blastosid* sayısının azaltılması ve *blastosid* DNA parçalanmasını artırarak embriyo gelişimi üzerinde zararlı etkilere neden olduğu bulunmuştur (167). Hücrelerde; oksidatif stres artışı makromoleküllerin oksidasyonuna neden olmakta ve bu DNA mutasyonları, yaşlanma ve hücre ölümü ile ilişkilendirilmektedir. Aynı zamanda, oksijen radikal oluşumları, kaspaz aktivasyonu gibi apoptozu tetikleyebilen pro-apoptotik proteinlerin salınımında önemli rol oynamaktadır (170).

Apoptotik ve anti-apoptotik faktörler arasındaki kritik denge, böbrek hastalıkları ve kanserlerin embriyolojik gelişimi için çok önemlidir (171, 172, 173).

EMA ile ilgili DNA hasarı, apoptoz ile bağlantılıdır. Deneysel bir çalışmada, çok düşük frekanslı EMA'a maruz kalmanın çift iplikli DNA hasarına neden olduğu ve de bcl-2 ekspresyonunu artırdığı bildirilmektedir (174). Dolayısıyla hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki denge elektromanyetik alan maruziyeti sonrasında bozulabildiği ileri

sürülmektedir. Daha önceki araştırmalarda 50-60 Hz frekanslı elektromanyetik alana maruz kalmanın apoptotik hücrelerin sayısını artırarak beyin embriyonik hücreler üzerinde toksik etkilere neden olduğunu da belirtilmektedir (175).

Sonuç olarak; hücreler üzerine EMA'nın etkisi araştırılan tez çalışmamızda, 2.4 GHz frekansında elektromanyetik alanın HEK 293 hücrelerine uygulanması sonrası oksidatif stres açısından ve apoptoz indeksi ve de immünohistokimyasal olarak araştırılan apoptoz belirteçlerinden kaspaz-3 immünpozitifliğindeki artma ve bcl-2 immünpozitifliğindeki azalma, farklı embriyonik hücreler üzerindeki önceki bulgularla uyumludur.

Bununla birlikte HEK293 hücrelerinin farklı dozlardaki Se ve Zn inkübasyonu sonrası EMA'a maruz bırakılmasında aynı parametrelerin ölçüm ve değerlendirmeleri sonucunda, bcl-2'de artma kaspaz-3 immünpozitifliğininde azalma dolayısıyla apoptoz indeksinde gözlenen azalma çalışmamızın önemli sonuçlarındandır.

Çalışmamızda Se ve Zn'nun EMA tarafından indüklenebilecek olan oksidatif strese bağlı apoptoz artışına karşı koruyucu etkisi bu elementlerin antioksidan özellikleri ile birlikte bu enzimlerin yapısında kofaktör olarak bulunuyor olmasından kaynaklandığını söyleyebiliriz. Bulgularımıza göre, embriyonik hücrelerden HEK293 hücrelerinin 2.4 GHz frekanslı EMA'a maruz kalması sonucu bu hücrelerde lipid peroksidasyonunu artırarak ve antioksidan enzimlerden SOD ve GSH-Px aktivitelerinin azaltarak oksidatif strese neden olduğu gösterildi. Ayrıca elektromanyetik alan uygulaması öncesi çalışmamızdaki HEK293 hücrelerine çinko eklenmesinin antioksidan enzimlerden SOD aktivitesini, selenyum eklenmesinin ise SOD ve GSH-Px aktivitelerini regüle ederek lipid peroksidasyonu oluşmasını engellediği söylenebilir. HEK293 hücrelerinin 2.4 GHz frekanslı elektromanyetik alana maruz bırakılması; apoptoz düzenleyici proteinlerden kaspaz-3 immünpozitifliğinde artma anti-apoptotik protein olan bcl-2 immünpozitifliğinde azalma ve dolayısı ile apoptotik indekste bir artmaya neden olduğu görüldü. Elektromanyetik alan etkisi ile HEK293 hücrelerindeki apoptozda artma ve apoptotik proteinlerden kaspaz-3 ve bcl-2'nin regülasyonundaki bozulmaya karşı hücrelerin EMA uygulaması öncesi Zn ve Se ile inkübasyonunun koruyucu olduğu sonucuna varıldı.

Günümüzde elektrikli ev aletleri ve kablosuz internet günlük yaşamımızın vazgeçilmezlerindendir ve bu EMA kaynakları insan sağlığı için olumsuz yan etkilerinin olduğu araştırılan ve tartışılan bir konu olarak devam etmektedir. Bununla

birlikte araştırma sonuçlarımıza göre EMA'nın bu olumsuz etkilerine karşı çinko ve selenyumdan zengin diyetlerin hafifletici ya da önleyici olabileceğini söyleyebiliriz. Ancak, araştırmamızda HEK293 hücrelerinde gözlenen bu sonuçlarımızın daha iyi anlaşılması için benzer araştırmalar başka hücre soyları için de yapılmalı ayrıca hayvan deneyleri ve epidemiyolojik çalışmalar ile desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Saygin M, Caliskan S, Karahan N, Koyu A, Gumral N, Uguz AC. Testicular apoptosis and histopathological changes induced by a 2.45 GHz electromagnetic field. *Toxicol Ind Health* 2011; **27(5):** 455-463.
2. Guler G, Ozgur E, Keles H, Tomruk A, Vural SA, Seyhan N. Apoptosis resulted from radiofrequency radiation exposure of pregnant rabbits and their infants. *Bull Vet Inst Pulawy* 2011; **55:** 127-134.
3. Salaha MB, Abdelmeleka H, Abderraba M. Effects of olive leave extract on metabolic disorders and oxidative stress induced by 2.45GHz WIFI signals. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; **36(3):** 826-834.
4. Ghazizadeh V, Nazıroğlu M. Electromagnetic radiation (Wi-Fi) and epilepsy induce calcium entry and apoptosis through activation of TRPV1 channel in hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metab Brain Dis* 2014; **29:**787-799.
5. Achudume A, Onibere B, Aina F, Tchokossa P. Induction of oxidative stress in male rats subchronically exposed to electromagnetic fields at non-thermal intensities. *JEMAA* 2010; **2(8):** 482-487.
6. Bediz CS, Baltacı AK, Mogulkoc R, Öztekin E. Zinc supplementation ameliorates electromagnetic field-induced lipid peroxidation. *Tohoku J Exp Med* 2006; **208(2):** 133-140.
7. Oral B, Guney M, Ozguner F, Karahan N, Mungan T, Comlekci S, Cesur G. Endometrial apoptosis induced by a 900-MHz mobile phone: preventive effects of vitamins E and C. *Adv Ther* 2006; **23(6):** 957-73.
8. Zeng H. Selenium as an essential micronutrient: roles in cell cycle and apoptosis. *Molecules* 2009; **14(3):** 1263-1278.
9. Schrantz N, Auffredou MT, Bourgeade MF, Besnault L, Leca G, Vazquez A. Zinc-mediated regulation of caspases activity: dose-dependent inhibition or activation of caspase-3 in human Burkkitt lymphoma B cells (Ramos). *Cell Death Differ* 2001; **8(2):** 152-61.

10. Kahya MC, Nazıroğlu M, Çiğ B. Selenium reduces mobile phone (900 MHz)-induced oxidative stress, mitochondrial function, and apoptosis in breast cancer cells. *Biol Trace Elem Res* 2014; **160(2):** 285-93. doi:10.1007/s12011-014-0032-6.

11. Faa G, Nurchi VM, Ravarino A, Fanni D, Nemolato S, Gerosa C, Eyken PV, Geboes K. Zinc in gastrointestinal and liver disease. *Coord Chem Rev* 2008; **252:** 1257-1269.

12. Kim JY, Kim HT, Moon KH, Shin HJ. Long-term exposure of rats to a 2.45 GHz electromagnetic field: effects on reproductive function. *Korean J Urol* 2007; **48:** 1308-1314.

13. Ait-Aissa S, Billaudel B, De Gannes FP, Hurtier A, Haro E, Taxile M, Ruffie G, Athane A, Veyret B, Lagroye I. In situ detection of gliosis and apoptosis in the brains of young rats exposed in utero to a Wi-Fi signal. *C R Physique* 2010; **11:** 592-601.

14. Arthur Beiser. *Modern Fiziğin Kavramları*. İstanbul: Akademi Yayıncılık; 1997.

15. Şeker S, Çerezci O. *Radyasyon Kuşatması Elektriğin Ve Nükleer Enerjinin Sağlığımıza Etkileri.* Boğaziçi Üniveristesi Yayınevi; 2000.

16. Öngen S. *Radyasyon Biyofiziği Ders Kitabı*. İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları; 1993.

17. Güner R. *Elektromanyetik Alanların Çalışanların Sağlık Ve Güvenliğine Etkisi Ve Alınacak Tedbirler*. T.C. Çalışma Ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı; 2014

18. Kumaş A. *Radyasyon Biyofiziği ve Tıbbi Uygulamaları*. Palme Yayın Dağıtım Pazarlama; 2006.

19. Güler İ, Çetin T, Özdemir AR, Uçar N. Türkiye Elektromanyetik Alan Maruziyet Raporu. Bilgi Teknolojileri ve İletişim Kurumu Sektörel Araştırma ve Stratejiler Dairesi Başkanlığı; Aralık 2010

20. Sarmaşık G, Durusoy R, Özkurt A. Bilgisayar laboratuvarlarında maruz kaldığımız elektromanyetik alanların zararları ve çözüm önerileri. *Akademik Bilişim'12 - XIV. Akademik Bilişim Konferansı Bildirileri* 1 - 3 Şubat 2012 Uşak Üniversitesi. s393-399.

21. Çerezci O, Pala K, Türkkan A. *Elektromanyetik Alan ve Sağlık Etkileri*. Bursa; Nilüfer Belediyesi, s.34; Mayıs 2012.

22. Caputa K. Modeling of Interactions of Electromagnetic Fields with Human Bodies. Doctor of Philosophy. Canada: University of Victoria; 2002.

23. Yılmaz H. Kablosuz yerel alan ağlarından kaynaklanan elektromanyetik alanın, işitme üzerine etkilerinin araştırılması. *T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz Kliniği, Uzmanlık tezi,* İstanbul 2007.

24. Neoh D.*Corporate Wireless LAN: Know the Risks and Best Practices to Mitigate them.* SANS Institute Reading Room 2003.

25. Taşdelen M. Kablosuz internet sistemlerinin kanser hücre hatlarına olan etkisinin araştırılması. *Gaziantep Üniversitesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi,* Gaziantep 2012.

26. Khalid M., Mee T., Peyman A., Addison D., Calderon C., Maslanyj M., Mann S.. Exposure to radio frequency electromagnetic fields from wireless computer networks: Duty factors of Wi-Fi devices operating in schools. Progress in Biophysics and Molecular Biology 107 (2011) 412e420

27. Çiğ B. 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. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi,* Isparta 2014.

28. Baan R, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Islami F, Galichet L and Straif K. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *Lancet Oncol* 2011; **12(7):** 624-626.

29. Guidelines for Limiting Exposure to Time-Varying Electric, Magnetic, and Electromagnetıc Fields. *Health Phys* 1998; **74(4):** s.497.

30. Kuzay D. Radyo frekans radyasyon ve oldukça düşük frekanslı manyetik alanların diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanların testis dokusunda

oksidan stres üzerine etkisi. *Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi,* Ankara 2014.

31. Repacholi M. Low level exposure to RF electromagnetic fields: Health effects and research needs. *Bioelectromag* 1998; **19:** 1-19.
32. Tomruk A. Radyo frekans radyasyonun; hamile ve hamile olmayan tavşanlarda DNA ve oksidatif hasara etkilerinin HPLC ve spektrofotometrik yöntemlerle incelenmesi. *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi,* Ankara 2008.
33. Tübitak-Biltem, Elektromanyetik Dalgalar Ve İnsan Sağlığı Sıkça Sorulan Sorular Ve Yanıtları, 2001, s.15-16
34. Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Mecmuasi* 1995; **48:** 253-262.
35. Bohr VA, Dianov GL. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 1999; **81:** 155-160.
36. Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC. Reactive oxygen species: The unavoidable environmental insult? *Mutation Research* 1999; **428:** 17–22
37. Tarhan D. Sıçanlarda aralıklı hipobarik hipokside kan ile böbrek ve karaciğerde antioksidan statüye bakır, çinko ve bikarbonat etkilerinin incelenmesi. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi,* İstanbul 2015.
38. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif. *Turk Biyokimya Derg* 2006; **31(2):** 51-56.
39. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *J Nutr* 2004; **134(11):** 3143-3163.
40. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; **91(3c):** 14-22.
41. Genç H. Fetal plasentasyon aşamasında serum prostanoid ve lipid hidroperoksid düzeylerinin preeklampsi gelişimiyle ilişkisinin incelenmesi. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi,* İstanbul 2008.

42. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 1995; **369(2-3):** 131-5.

43. Yurdakul Z. *Canlılar ve Oksijen.* Klinik Biyokimya Seminer Notları, 2003.

44. Ayala A, Muñoz M.F., Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2014, Article ID 360438, 31 pages.

45. Aydın S. Farklı hücre soylarında oksidatif stresin lipit ve protein molekülleri üzerindeki etkileri. *İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi,* İstanbul 2013.

46. Martfnez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 1995; **77:** 147-161.

47. Buege JA, Aust SD. *Microsomal Lipid Peroxidation in Methods in Enzymology.* New York: Academic Press, 1978: 302-10.

48. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci and Nutr* 1995; **35(1-2):** 21-39.

49. Clarkson PM. Antioxidants and physical performance. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; **35(1-2):** 131-141.

50. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39(1):** 44–84.

51. Demirci S. Topiramat ve selenyumun PC12 hücrelerinde Ca+2 sinyali, oksidatif stres ve hücre canlılığı üzerine etkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dali, Uzmanlık Tezi,* Isparta 2011.

52. Donma O. Reaktif oksijen türevleri ve antioksidan sistem. İçinde Burçak G, editor. *Biyokimya Ders Kitabı.* İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları; 2012. pp. 1023-1030.

53. Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection. *Drugs* 1991; **42(4):** 569-605.

54. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; **41:** 1819-28.

55. Kurt N. Yaşa bağlı olarak antioksidan enzimlerinin süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) aktivitelerinin ve malondialdehit (MDA) seviyesinin incelenmesi. *Çukurova Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi,* Adana 2008.

56. Weydert C. J., Cullen J. J.. Measurement Of Superoxide Dismutase, Catalase, And Glutathione Peroxidase In Cultured Cells And Tissue. *Nat Protoc*. 2010 ; 5(1): 51–66. Doi:10.1038/Nprot.2009.197.

57. Li S, Yan T, Yang J-Q, Oberley T. D., Oberley L. W. The Role of Cellular Glutathione Peroxidase Redox Regulation in the Suppression of Tumor Cell Growth by Manganese Superoxide Dismutase. Cancer Research 60, 3927–3939, July 15, 2000.

58. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 2007; **9(7):**775-806.

59. Foster LH, Sumar S. Selenium in health and disease: a review. *Crit Rev Food Sci* 1997; **37:** 211-228.

60. Zimmerman MT, Bayse CA, Ramoutar RR, Brumaghim JL. Sulfur and selenium antioxidants: challenging radical scavenging mechanisms and developing structure-activity relationships based on metal binding. J Inorg Biochem. 2015 Apr;145:30-40.

61. Uğuz A.C. Oksidatif Stresle Uyarılan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinde Kalsiyum Sinyali Ve Apoptotik Hücre Ölümü Üzerinde Selenyumun Etkisinin Araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Tezi*. 2011

62. Zeng H., Combs Jr G. F. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2008;**19** :1 –7

63. Erden M, Bor NM. Changes of reduced glutathione, glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. *Biochemical Med* 1984; **31:** 217-27.

64. Halsted JA, Smith JC, Irwin MI. A conspectus of research on zinc requirements of man. *J Nutr* 1974; **104(3):** 345-78.

65. Pastacı N. Diyet ile Alınan Çinkonun Metallothionein Seviyesine Etkisi. *İ.Ü. CerrahpaşaTıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Yükseklisans Tezi,* İstanbul 2010.

66. Maret W, Sandstead HH. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. J Trace Elem Med Biol. 2006;20(1):3-18

67. King JC, Shames DM, Woodhouse LR. Zinc homeostasis in humans. *J Nutr* 2000; **130:** 1360-1366.

68. Özçelik D. Bakır, çinko, kurşun ve kadmiyum katkılı besinlerle beslenen civcivlerin kan, serum ve değişik dokularındaki element konsantrasyonlarının ölçülmesi ve besi performansına etkilerinin saptanması. *İ.Ü. CerrahpaşaTıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Doktora Tezi,* İstanbul 1998.

69. Belgemen T, Akar N. Çinkonu yaşamsal fonksiyonları ve çinko metabolizması ile ilişkili genler. *Ankara Üniv Tıp Mecm* 2004; **57(3):** 161-166.

70. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother*. 2003 Nov;**57(9):**399-411.

71. Kordas K, Stoltzfus RJ. New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. *J Nutr* 2004; **134(6):** 1295-1298.

72. Beyersmann D. Homeostasis and cellular functions of zinc. *Werkstofftech* 2002; **33:** 764-769.

73. Thambiayya K, Kaynar A. M., St. Croix C. M., Pitt B. R. Functional role of intracellular labile zinc in pulmonary endothelium. *Pulmonary Circulation*. October-December 2012; **2**:No 4

74. Rink L, Haase H. Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2006; **28(1):** 1-4.

75. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26(4):** 239-57.

76. Sjöström J, Bergh J. How apoptosis regulated, and what goes wrong in cancer? *BMJ* 2001; **322:** 1538-1539.

77. Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis mekanizmları: tümör gelişiminde faz-fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşiv* 2003; **4:** 165-174.

78. Alpaslan Balkan B.M. HEPG2 Hücrelerinde Selenyum ve Vitamin C'nin Apoptozis Üzerine Etkileri. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Biyokimya Anabilim Dalı.Doktora Tezi*. 2012

79. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *The Lancet* 1993; **341:** 1251-4.

80. Truong LD, Choi YJ, Tsao CC, Ayala G, Sheikh-Hamad D, Nassar G, Suki WN. Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: the roles of caspases. *Kidney Int* 2001; **60(3):** 924-934.

81. Wang V, Tzanidis A, Dıvjak M, Thomson NM, Stein-Oakley AN. Altered signalling and regulatory mechanisms of apoptosis in focal and segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12:** 1422-1433.

82. Ortiz A, Justo P, Sanz A, Lorz C, Egido J. Targeting apoptosis in acute tubular injury. *Biochem Pharmacol* 2003; **66(8):** 1589-94.

83. Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1997; **45:** 923-934.

84. Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and autoimmunity. İçinde Koopman WJ, editör. A, Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

85. Ortiz A, Ziyadeh FN, Neilson EG. Expression of apoptosis-regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys. *J Investig Med* 1997, **45(2):** 50-56.

86. Öztürk M. Apoptoz ve Kanser. *IX.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi Bildiriler Kitabı*. Manisa 24-27 Kasım 2005; 12-15.

87. Salvesen GS. Caspases and apoptosis. *Essays Biochem* 2002, **38:** 9-19.

88. Tunçdemir M. STZ-Diabetik Sıçanlarda ACE İnhibitörü ve Angiotensin Reseptör Blokerinin Böbrek Dokusunda Clusterin ve Apoptoz Üzerine Etkileri. *İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı*, *Doktora Tezi*. 2006

89. Coskun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı*, ADANA ARŞİV 2011; 20: 145

90. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; **267:** 1456-1462.

91. Cooper GM. Programmed cell death. İçinde Cooper GM, editor. *The Cell.* Chapter 14. Washington: ASM Pres; 592-5961994.

92. Adams JM, Cory S. Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends Biochem Sci* 2001; **26(1):** 61-6.

93. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001; **26:** 390-7.

94. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E. van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, de Jong S. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 2004; **52(6):** 821-831.

95. Yang B, Johnson TS, Thomas GL, Watson PF, Wagner B, Skill NJ, Haylor JL, El Nahas AM. Expression of apoptosis-related genes and proteins in experimental chronic renal scarring. *J Am Soc Neph* 2001; **12(2):** 275-288.

96. Yılmaz N, Pençe S. Kaspazlar. *İbni Sina Tıp Derg* 2002; 127-146.

97. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science* 1998; **281(5381):** 1312-17.

98. Cuoltas L, Strasser A. The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis* 2000; **5:** 491-507.

99. Sheikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 2000; **182:** 171-81.

100. **http://insilico.ehu.eus/counting_chamber/thoma.php** **Erişim: 09.06.2016**

101. Sun Y, Larry W., Oberley, Ying Li. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clinical Chemistry*, **34(3)**: 1988; 497

102. Türker Y, Nazıroğlu M, Gümral N & Çelik Ö & Saygın M., Çömlekçi S& Flores-Arce M. Selenium and L-Carnitine Reduce Oxidative Stress in the Heart of Rat Induced by 2.45-GHz Radiation from Wireless Devices.

Biol Trace Elem Res, 2011*;* **143:** 1640–1650. DOI 10.1007/s12011-011-8994-0

103. Topal Z., Hancı H., Mercantepe T, Erol H. S., Keleş O. N., Kaya H., Mungan S., Odacı E.. The Effects Of Prenatal Long-Duration Exposure To 900-Mhz Electromagnetic Field On The 21-Day-Old Newborn Male Rat Liver. *Turk J Med Sci* (2015) **45:** Tübitak Doi:10.3906/Sag-1404-168
104. Çiğ B., Nazıroğlu M. Investigation of the effects of distance from sources on apoptosis, oxidative stress and cytosolic calcium accumulation via TRPV1 channels induced by mobile phones and Wi-Fi in breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015;**1848**:2756–2765.
105. Funk RH, Monsees T, Ozkucur N. Electromagnetic effects – From cell biology to medicine. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry (*2009*)* **43***;*177–264
106. Nazıroğlu M., Çelik Ö., Özgül C., Çiğ B., Doğan S., Bal R., Gümral N., Rodríguez A.B., Pariente J.A.. 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. *Physiology & Behavior*. 2012; **105**: 683–692.
107. Barend A. Stander, Sumari Marais, Carin Huyser, Zen Fourie, Dariusz Leszczynski, Annie M. Joubert. Effects of non-thermal mobile phone radiation on breast adenocarcinoma cells. *S Afr J.* 2011; **107**:9/10.
108. C. M. Chaturvedi, V. P. Singh, P. Singh, P. Basu and M. Singaravel. 2.45GHz (CW) Microwave Irradiation Alters Circadian Organization, Spatial Memory, Dna Structure In The Brain Cells And Blood Cell Counts Of Male Mice, Mus Musculus. *Progress In Electromagnetics Research B*, 2011;**29**: 23-42.
109. Yang V. Li. Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. *Endocrine.*2014; **45:**178–189.
110. Yunan Tanga, Qin Yang, Jiayin Lu, Xiaolin Zhang, Di Suen, Yi Tan, Litai Jin, Jian Xiao, Rujia Xie, Madhavi Rane, Xiaokun Li, Lu Cai. Zinc Supplementation Partially Prevents Renal Pathological Changes In Diabetic Rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2010; **21:** 37–246.

111. Uğuz A.C, Nazıroğlu M, Espino J., Bejarano I, Gonza´lez D, Rodrı´guez A.B., Pariente J.A. Selenium Modulates Oxidative Stress-Induced Cell Apoptosis in Human Myeloid HL-60 Cells Through Regulation of Calcium Release and Caspase-3 and -9 Activities. *J Membrane Biol.* 2009; **232:**15–23. DOI 10.1007/s00232-009-9212-2

112. Guan L., Han B., Li J., Li Z, Huang F. Yang Y., Xu C. Exposure of human leukemia NB4 cells to increasing concentrations of selenite switches the signaling from pro-survival to pro-apoptosis. *Ann Hematol (*2009*)* **88**:733–742. DOI 10.1007/s00277-008-0676-4.

113. Saba Shahin, Vineet Prakash Singh, Ritesh K. Shukla, Alok Dhawan, Ravi Kumar Gangwar, Surya Pal Singh, Chandra Mohini Chaturvedi. 2.45 GHz Microwave Irradiation-Induced Oxidative Stress Affects Implantation or Pregnancy in Mice, Mus musculus. *Applied Biochemistry and Biotechnology March* 2013;**169/5**, 1727-1751.

114. Ozguner F., Oktem F, Ayata A., Koyu A., Yilmaz H.R. A novel antioxidant agent caffeic acid phenethyl ester prevents long-term mobile phone exposure-induced renal impairment in rat. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005:**277**;73–80.

115. Kuybulu AE, Öktem F, Çiriş İM, Sutcu R, Örmeci AR, Çömlekçi S, Uz E. Effects of long-term pre- and post-natal exposure to 2.45 GHz wireless devices on developing male rat kidney. *Ren Fail.* 2016 *May*;**38(4)**:571-80.

116. Gumral N, Naziroglu M., Koyu A., Ongel K., Celik O, Saygin M., Kahriman M., Caliskan S., Kayan M., Gencel O., Flores-Arce M. F. 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:**153–163.

117. Nazıroğlu M. Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-induced Molecular Pathways in Epilepsy. *Neurochem Res (*2009*)* **34**:2181–2191. DOI 10.1007/s11064-009-0015-8.

118. Chen J., Berry M.J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *Journal of Neurochemistry.* 2003; **86**: 1–12. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01854.x.

119. Ozben, T. Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy. *J. Pharmaceut. Sci.* 2007. **96**:2181–2196.

120. Lin, H., Opler, M., Head, M., et al. Electromagnetic field exposure induces rapid, transitory heat shock factor activation in human cells. *J. Cell. Biochem.* 1997. **66**:482–488.

121. Junkersdorf, B., Bauer, H., Gutzeit, H. O. Electromagnetic fields enhance the stress response at elevated temperatures in the nematode Caenorhabditis elegans. *Bioelectromagnetics* 2000. **21**:100–106.

122. Mangiacasale, R., Tritarelli, A., Sciamanna, I., et al. Normal and cancer-prone human cells respond differently to extremely low frequency magnetic fields. 2001. *FEBS Lett*. **487**:397–403.

123. Olsson, G., Belyaev, I., Helleday, T., Harms-Ringdahl, M. ELF electromagnetic field affects proliferation of SPD8/V79 Chinese hamster cells but does not interact with intragenic recombination. *Mutat. Res.* 2001. **493**:55–66.

124. Belyaev, I. Non-thermal biological effects of microwaves. *Microwave Rev. 2005*.**11**:13–29.

125. Lantow, M., Lupke, M., Frahm, J., et al. ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1.800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. Radiat. Environ. Biophys. 2006. **45**:55–62.

126. Peinnequin, A., Piriou, A., Mathieu, J., et al. Non-thermal effects of continuous 2.45 GHz microwaves on Fas-induced apoptosis in human Jurkat T-cell line. *Bioelectrochemistry.* 2000. **51**:157–161

127. Ferlini, C., DeAngelis, C., Biselli, R., et al. Sequence of metabolic changes during X-ray induced apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 1999. **247**:160–167.

128. Ameison, J. C., Capron, A.. Cell dysfunction and depletion in AIDS: The programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today.*1991. **12**:102–105.

129. Dasdag S, Akdag MZ, Ulukaya E, Uzunlar AK, Ocak AR. Effect of mobile phone exposure on apoptotic glial cells and status of oxidative stress in rat brain. *Electromagn Biol Med.* 2009;**28(4)**:342-54. doi: 10.3109/15368370903206556.

130. Eşmekaya MA, Seyhan N, Ömeroğlu S. Pulse modulated 900 MHz radiation induces hypothyroidism and apoptosis in thyroid cells: a light, electron microscopy and immunohistochemical study. *Int J Radiat Biol.* 2010; Dec;**86(12)**:1106-16. doi: 10.3109/09553002.2010.502960.

131. Merola, P., Marino, C., Lovisolo, G. A., et al. Proliferation and apoptosis in a neuroblastoma cell line exposed to 900MHz modulated radiofrequency field. *Bioelectromagnetics.* 2006. **27**:164–171.

132. Hansteen IL, Clausen KO, Haugan V, Svendsen M, Svendsen MV, Eriksen JG, Skiaker R, Hauger E, Lågeide L, Vistnes AI, Kure EH. Cytogenetic effects of exposure to 2.3 GHz radiofrequency radiation on human lymphocytes in vitro. *Anticancer Res.* 2009;Nov;**29(11):**4323-30.

133. Maggini S, Wenzlaff S, Hornig D. Essential role of vitamin C and zinc in child immunity and health. *J Int Med Res* 2010; **38:** 386-414.

134. Stefanidou M, Maravelias C, Dona A, Spiliopoulou C. Zinc: a multipurpose trace element. *Arch Toxicol* 2006; **80:** 1-9.

135. Sunderman FW. The influence of zinc on apoptosis. *Ann Clin Lab Sci* 1995; **25:** 134-142.

136. Nodera M, Yanagisawa H, Wada O. Increased apoptosis in variety of tissues of zinc-deficient rats. *Life Sci* 2001; **69:** 1639-1649.

137. Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, Zalewski PD. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Bio Metals* 2001; **14:** 315-330.

138. Shimoda R, Achanzar WE, Qu W, Nagamine T, Takagi H, Mori M, Waalkes MP. Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicol Sci* 2003; **73(2):** 294-300.

139. Santon A, Formigari A, Albergoni V, Irato P. Effect of Zn treatment on wild type and MT-null cell lines in relation to apoptotic and/or necrotic processes and on MT isoform gene expression. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1763:** 305-312.

140. Alscher DM, Braun N, Biegger D, Stuelten C, Gawronski K, Murdter TE, Kuhlmann U, Fritz P. Induction of metallothionein in proximal tubular cells by zinc and its potential as an endogenous antioxidant. *Kidney Blood Press Res* 2005; **28(3):** 127-33.

141. Sharma R, Sharma M, Datta PK, Savin VJ. Induction of metallothionein-I protects glomeruli from superoxide-mediated increase in albumin permeability. *Exp Biol Med* 2002; **227:** 26-31.

142. Thomas DJ, Caffrey TC. Lipopolysaccharide induces doublestranded DNA fragmentation in mouse thymus: protective effect of zinc pre-treatment. *Toxicology* 1991; **68(3):** 327-337.

143. Matsushita K, Kitagawa K, Matsuyama T, Ohtsuki T, Taguchi A, Mandai K, Mabuchi T, Yagita Y, Yanagihara T, Matsumoto M. Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. *Brain Res* 1996; **743(1-2)**: 362-365.

144. Meerarani P, Ramadass P, Toborek M, Bauer HC, Bauer H, Hennig B. Zinc protects against apoptosis of endothelial cells induced by linoleic acid and tumor necrosis factor alpha. *Am J Clin Nutr* 2000; **71:** 81-87.

145. Chai F, Truong-Tran AQ, Ho LH, Zalewski PD. Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: A review. *Immunol Cell Biol*. 1999 Jun;**77(3)**:272-8.

146. Bonaventura P., Benedetti G., Albarède F., Miossec P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev*. 2015 Apr;**14(4)**:277-85. doi: 10.1016/j.autrev.2014.11.008. Epub 2014 Nov 24.

147. Mao L, Chen J, Peng Q, Zhou A, Wang Z. Effects of different sources and levels of zinc on H2O2-induced apoptosis in IEC-6 cells. *Biol Trace Elem Res.* 2013 Oct;**155(1)**:132-41. doi: 10.1007/s12011-013-9759-8.

148. Formigari A, Irato P, Santon A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2007; **146(4)**: 443-59

149. Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. *J Biol Chem* 1997; **272(30)**: 18530-3.

150. Fukamachi Y, Karasaki Y, Sugiura T, Itoh H, Abe T, Yamamura K, Higashi K. Zinc suppresses apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the Bcl-2/Bax ratio. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **246(2):** 364-9.

151. Zalewski, PD, Forbes IJ, Giannakis C. Physiological role for zinc in prevention of apoptosis (gene-directed death). *Biochem Int* 1991; **24:** 1093-1101

152. Aiuchi T, Mihara S, Nakaya M, Masuda Y, Nakajo S, Nakaya K.. Zinc ions prevent processing of caspase-3 during apoptosis induced by geranylgeraniol in HL-60 cells. *J Biochem* 1998; **124:** 300-303.

153. Ganju N, Eastman A. Zinc inhibits Bax and Bak activation and cytochrome c release induced by chemical inducers of apoptosis but not by death-receptor-initiated pathways. *Cell Death Differ* 2003; **10:** 625-661.

154. Lambert JC, Zhou Z, Kang YJ. Suppression of Fas-mediated signaling pathway is involved in zinc inhibition of ethanol-induced liver apoptosis. *Exp Biol Med* 2003; **28:** 406-412.

155. Gopee NV, Johnson VJ, Sharma RP. Selenite-induced apoptosis in murine B-sslymphoma cells is associated with inhibition of protein kinase C, nuclear factor Kb, and inhibitor of apoptosis protein. *Toxicol Sci* 2004; **78**: 204-214.

156. Li GX, Hu H, Jiang C, Schuster T, Lu J. Differential involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by two classes of selenium compounds in human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2007; **120**: 2034-2043.

157. Chen T, Wong YS. Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2009; **63(2):** 105-113.

158. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Castantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kromer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000; **192(4)**: 571-580.

159. Zou Y, Niu P, Yang J, Yuan J, Wu T, Chen X. The JNK signaling pathway is involved in sodium-selenite-induced apoptosis mediated by reactive oxygen in HepG2 cells. *Cancer Biol and Ther* 2008; **7(5)**: 691-698.

160. Koistinaho J, Alho H, Hervonen A. Effect of vitamin E and selenium supplement on the aging peripheral neurons of the male Sprague-Dawley rat. *Mech Ageing Dev* 1990; **51(1):** 63-72.

161. Yuan H, Lan T, Lin J. Modulation of nano-selenium on tetrodotoxin-sensitive voltage-gated sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2005; **5:** 4846-9.

162. Yuan H, Lin J, Lan T. Effects of nano red elemental selenium on sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006;**1**:896-9.

163. Demelash A, Karlsson JO, Nilsson M, Björkman U. Selenium has a protective role in caspase-3-dependent apoptosis induced by H_2O_2 in primary cultured pig thyrocytes. *Eur J Endocrinol*. 2004 Jun;**150(6)**:841-9.

164. Savaskan NE, Bräuer AU, Kühbacher M, Eyüpoglu IY, Kyriakopoulos A, Ninnemann O, Behne D, Nitsch R. Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. *FASEB J*. 2003 Jan;**17(1)**:112-4.

165. Robert E. Intrauterine effects of electromagnetic fields (low frequency, mid-frequency RF, and microwave): Review of epidemiologic studies. *Teratology*. 1999;**59**:292–298.

166. Ulubay M, Yahyazadeh A, Deniz OG, et al. Effects of prenatal 900 MHz electromagnetic field exposures on the histology of rat kidney. *Int J Radiat Biol*. 2015;*91(1)*:35–41.

167. Schultz DR, Harrington Jr WJ. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*. 2003;**32**:345–369.

168. Kukhta VK, Marozkina NV, Sokolchik IG, Bogaturova EV. Molecular mechanisms of apoptosis. *Ukr Biokhim Zh*. 2003;**75**:5–9.

169. Fischer U, Schulze-Osthoff K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev*. 2005;**57**:187–215.

170. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. Cancer *Biol Ther*. 2005;**4**:139–163.

171. Erkan E, Garcia CD, Patterson LT, et al. Induction of renal tubular cell apoptosis in focal segmental glomerulosclerosis: Roles of proteinuria and Fas-dependent pathways. *J Am Soc Nephrol*. 2005; **16**:398–407.

172. Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubin˜a P, Lahera V, Lunõ J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl*. 2008;**111**:S4–S9.

173. Wu X, Guo R, Chen P, Wang Q, Cunningham PN. TNF induces caspase-dependent inflammation in renal endothelial cells through a Rho- and myosin light chain kinasedependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;**297**:F316–F326

174. Lahijani MS, Bigdeli MR, Kalantary S. Effects of sinusoidal electromagnetic fields on histopathology and structures of brains of preincubated white Leghorn chicken embryos. *Electromagn Biol Med.* 2011;**30**:146–157.

175. Basile A, Zeppa R, Pasquino N, et al. Exposure to 50 MHz electromagnetic field raises the levels of the anti-apoptotic protein BAG3 in melanoma cells. *J Cell Physiol*. 2011;**226**:2901–2907.