



DERLEME/REVIEW

5G (6 GHz) Radyofrekans Elektromanyetik Alanın Sıçan Kan Hücrelerinde Canlılık, Apoptotik ve Nekrotik Hücre Oranına Etkisinin Araştırılması

Investigation of the Effect of 5G (6 GHz) Radiofrequency Electromagnetic Field on the Ratio of Vitality, Apoptotic and Necrotic in Rat Blood Cells

Yasin Karamazı¹, Mustafa Emre¹, Salih Çetiner², Çağatay Aydın³, Gülsevinç Aksoy⁴, Hülya Binokay⁵, Toygar Emre⁶

¹Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Tıbbi ⁴Biyoloji Anabilim Dalı, ⁵Biyostatistik Anabilim Dalı, Adana, Turkey

²Çukurova Üniversitesi, Balcalı Hastanesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Merkez Laboratuvarı, İmmünoloji Birimi, Adana, Turkey

³Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Elektrik-Elektronik Müh. Anabilim Dalı, İzmir, Turkey

⁶Boğaziçi Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Endüstri Müh. Anabilim Dalı, İstanbul, Turkey

ABSTRACT

Radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) exposure is increasing in various areas of life. In our study, we investigated the effects of 5G (6 GHz, 0.083 W/kg SAR) RF-EMF on the ratio of vitality, apoptotic (the early/late) and necrotic in rat blood cells. In our study, 10 Wistar Albino male rats were used weights range between 250-300g. Before RF-EMF applications, blood samples (2cc) were collected from all rats by cardiac puncture method. These rats were selected as the control groups. The same rats, by placing in the special application cage were exposed to the 6 GHz RF-EMF application for 4 hour/day during 6 weeks. After RF-EMF applications, blood samples (2cc) were re-collected from the same rats. These rats were selected as the radiofrequency radiation (RFR) groups. Flow cytometric analysis in which annexin-V kit used, was performed to determine the percentage the ratio of viable, the early/late apoptotic and necrotic cell. The ratio of % viable cells were increased in the RFR group by compared to the control group, the ratio of % cells in the early apoptotic and necrotic decreased and this between the two groups difference was statistically significant ($p<0.05$). However, there were no statistically meaningful differences between groups by compared to the ratio of % cells in the late apoptotic. As a results of 6 GHz RF-EMF, had significant effects on vitality, apoptotic and necrotic in blood cells. while it supported to the ratio of vitality, were inhibited the ratio of apoptotic and necrotic

Keywords: Vitality, apoptotic, necrotic.

ÖZET

Hayatın çeşitli alanlarında radyofrekans elektromanyetik alanlara (RF-EMA) maruziyet giderek artmaktadır. Çalışmamızda, 5G (6 GHz, 0.083 W/kg SAR) RF-EMA'nın sıçan kan hücrelerinde canlılık, apoptotik (erken/geç) ve nekrotik oranlarına etkilerini araştırdık. Çalışmamızda, ağırlıkları 250-300g arasında değişen 10 adet Wistar Albino türü erişkin erkek sıçan kullanıldı. RF-EMA uygulama öncesi tüm sıçanlardan kardiyak ponksiyon yöntemi ile kan alınarak (2cc) kontrol grubu olarak seçildi. Aynı sıçanlar özel uygulama kafesine yerleştirilerek 6 hafta boyunca 4 saat/gün 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakıldı. RF-EMA uygulama sonrası aynı sıçanlardan 2.kez kan alımı (2cc) yapılarak radyofrekans radyasyon (RFR) grubu olarak seçildi. Sıçan kan hücrelerinde canlı, erken/geç apoptotik ve nekrotik hücre yüzde oranları annaksin-V kiti kullanılarak flow sitometrik yöntemle analiz edildi. RFR grubunda canlı hücrelerin % oranı, kontrol grubuna kıyasla artış gösterirken, erken apoptotik ve nekrotik hücrelerin % oranları azaldığı ve iki grup arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Ancak, geç apoptotik hücrelerin % oranları gruplar arasında istatistiksel olarak kayda değer herhangi bir değişiklik tespit edilemedi. Sonuç olarak 6 GHz RF-EMA, kan hücre canlılığı, apoptotik ve nekrotik oranlar üzerine önemli etkilere sahipti. Kan hücrelerinde canlılık oranını desteklerken, apoptotik ve nekrotik oranlarını baskılamıştır.

Anahtar Kelimeler: Canlılık, apoptotik, nekrotik.



Giriş

Son yıllarda iletişim çağının inanılmaz bir hızla sürekli gelişimine paralel olarak yaşamımıza giren teknoloji ürünleri yaşantımıza kolaylıklar sağlarken birtakım olumsuzlukları da beraberinde getirmişlerdir. Hızla gelişen teknoloji ile birlikte günlük hayatın birçok alanında radyo frekans elektromanyetik alan (RF-EMA)'lara maruziyet giderek artmaktadır. RF-EMA'ların etkisini uzun süre sonra göstermesi ve muhtemel olan zararlı etkileri kamoyu tarafından yeteri kadar bilinmemektedir¹.

Genel olarak, günlük yaşantıda elektromanyetik spektrumun (3 kHz - 300 GHz) frekans aralığında bulunan elektromanyetik dalgalar; telekomünikasyon, cep telefonları, kablosuz iletişim ağları, baz istasyonları, radyo frekans tanımlama sistemleri, radyo ve televizyon yayınları, medikal ve endüstriyel uygulamalar dahil olmak üzere çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır².

5. generasyon (5G), birçok standart uygulamaları ve kablosuz ağ alt yapı bağlantıları ile önceki nesillere kıyasla daha yüksek performanslı veri iletim hızı, çok düşük gecikme süreleri, güçlü güvenilirlik özellikleri ve gelişmiş ağ kapasitesi olanaklarına sahiptir³. Günümüze kadar gerek cep telefonu gerekse RF- EMA kaynaklı radyasyonların sağlık üzerindeki etkisine ilişkin yapılan anketler, insan ve hayvan modellemeleri kullanılarak çok sayıda in vivo, in vitro ve epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır^{4,6}. Ancak son yıllarda RF-EMA'lara maruz kalınmasından ve olası herhangi bir olumsuz etki konusunda potansiyel sağlık riski ve güvenlikle ilgili kamuoyu endişeleri giderek artış göstermektedir^{7,8}.

RF-EMA'ların biyolojik sistemlerdeki enerji iletişimi; biyolojik dokulardaki giricik (penetrasyon), soğrulma (absorbsiyon), dağılım, güç depolanması ve vücut tarafından üretilen elektrik ve manyetik alan tarafından belirlenmektedir⁹. Bu parametreler bireyden bireye vücut büyüklüğü, cinsiyet, yaş ve fiziksel özelliklerine bağlı olarak farklılık göstermektedir.

RF-EMA'ların, insan ve deney hayvan modelleri kullanılarak lenfosit sayısı ve alt tipleri ile birlikte kan hücreleri, hücre kültürü ve immün sistem üzerine etkisinin değerlendirildiği birçok çalışma vardır¹⁰⁻¹². Bu doğrultuda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, başka bir çalışmanın sonucuyla çoğu zaman tutarlı olmadığı hatta aynı çalışmada bile uyumlu sonuçların olmadığı görülebilmektedir. Bu durumun ortaya çıkış nedeni, bireysel farklılıklardan veya farklı deney koşullarından kaynaklanabileceği olasılığı gösterilebilir¹. Bununla birlikte, insan vücudunda var olan doğal EMA dengesinin bozulması sonucunda da hücrelerde yapısal ve işlevsel farklılıklar ortaya çıkabilmektedir¹³.

Çeşitli çevresel kaynaklı uyaranlara hızlı yanıt verebilen immün sistemi radyasyonun öncelikli hedefleri arasında yer almaktadır. Özellikle çocukluk dönemlerde tanı konulan immün sistem bozukluklarının birçoğu kalıtsal nedenlerle ortaya çıkarken, erişkinlikte ise çevresel faktörlerin (RF-EMA'lar, kimyasal maddeler vb.) etkisi daha belirgindir.

Canlı olan hücrelerde yaşam süresinin sona ermesi durumu fizyolojik ve patolojik şartlarda iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar, apoptoz ve nekroz olaylarıdır. RF- EMA'lara maruz kalma süresi ve sıklığı, canlılık oranlarındaki farklılıklar, apoptoz ve nekroz ile doğrudan ilişkilidir. Apoptozisin morfolojik evrelerinin regülasyonunda Bcl-2 ailesi, p53, kaspazlar, sitokrom-c, geçici reseptör potansiyel (TRP), voltaj kapılı Ca⁺² kanalları (VGCC), reseptörler ve mitokondriyonlar işlev görür^{14,15}. RF-EMA'lara maruz kalan canlı hücrelerinde, apoptotik süreç üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmalarda, maruz kalma koşulları (frekans, sinyal tipi, sıklık, süre vb.) ve biyolojik parametreler ile ilgili veriler etkin rol oynamaktadır¹⁶.

5G RF-EMA ağ sistemlerinin geliştirilmesine yönelik uluslararası bir rekabet söz konusudur. Bu yeni sistemlerin oluşturduğu akut veya kronik maruziyetin immün sistem hücrelerine etkisi üzerine yapılmış

çalışmalar oldukça sınırlıdır. Özellikle immün sistem hücreleri, çevresel uyaran kaynaklı çeşitli pertürbasyonlara uyum sağladığı bilinmektedir. Ancak, kullanılan frekans aralığı çeşitlilik gösteren RF-EMA'ların immün sistemi tarafından tolere edilebilecek ya da uyum sağlayacak değerini/değerlerini bildiren tatmin edici çalışmalar yok denecek azdır. Bu durum göz önünde bulundurularak çalışmamızda, uzun süreli (42 gün) 5G 6 GHz (0.083 W/kg SAR) RF-EMA maruziyetinin sıçan kan hücrelerinde canlı hücre, erken/geç apoptotik hücre ve nekrotik hücre yüzde oranlarına etkilerini araştırmayı amaçladık. Günlük yaşantıda kullanılan teknolojik cihazların frekansları giderek artırılmaktadır¹⁷. Bu yüzden bizde çalışmamızda 5G orta band aralığında yer alan 6 GHz RF-EMA'yı kullandık. Çalışmamızın, immün sistem üzerine yapılacak araştırmalar için oldukça önemli bir yol gösterici olarak bilim dünyasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Materyal ve Metod

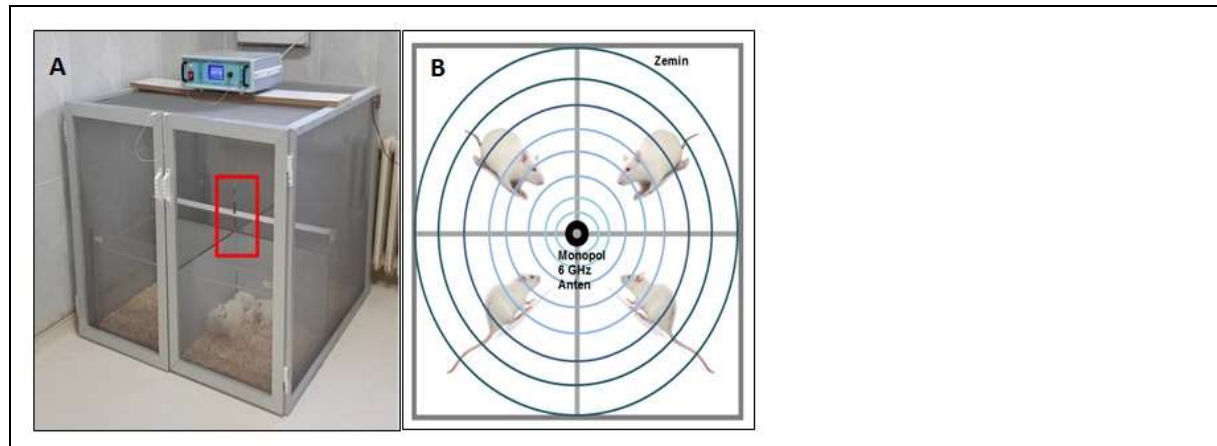
Deney Hayvanlarının Temini ve Düzenek Dizaynı

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurul Başkanlığı uyarınca alınan; Karar No:4/11 esasına uygun olarak yürütülmüştür. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (SABİDAM) yetiştirilen, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 10 adet Wistar Albino cinsi erişkin erkek sıçan kullanıldı. Deney süresi boyunca tüm sıçanlar sirkadiyen ritme uygun olarak (12 saat aydınlık / karanlık), ortamın sıcaklığı 24 ± 2 °C ve nemi % 40-60 olan laboratuvar ortamında barındırılarak adlibitum pelet yem ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı.

RF-EMA kaynaklarının olası olumsuz etkilerinden deney hayvanlarının korunması ve deney düzeneği içinde oluşturulan elektromanyetik radyasyonun etkisinin sınırlandırılarak dış ortama çıkışının engellenmesi açısından çalışmamızda, boyutu 100 cm x 100 cm x 90 cm olan Faraday kafesi temin edilerek RFR grubu için kullanıldı. Sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmadan önce sıçanlar içerisinde barındıkları standart kafeslerinden çıkartılıp Faraday kafesi içerisindeki özel uygulama kafesine (4 eşit bölmeden oluşan, 90 cm x 90 cm x 42 cm) yerleştirilerek ortama adaptasyon (4 gün) sağlandı.

RF-EMA Uygulaması

Bu çalışmada, RF-EMA uygulaması için Set Electronic, Co. Ltd. (Sakarya, Turkey) tarafından dizaynı yapılan; beslenme kaynağı 220~230 V, çalışma sıcaklığı $-40^{\circ}\text{C} \sim +60^{\circ}\text{C}$, sabit frekans modülasyonlu ve frekansı 5.8 – 6 GHz'de çalışan, gücü 0 - 2 Watt (gücü ayarlanabilir özellikte), Continuous Wave (CW) biçimde sinüzoidal dalga yayan, 50 Ω çıkışlı, modeli FR6GX-2W olan RF jeneratörü kullanıldı. RF jeneratöründen çıkan, her yöne eşit biçimde dağılım gösteren, tek bir iletken levhadan oluşmuş ve çeyrek dalga boyuna ($\lambda/4$) sahip monopol anten kullanıldı. Sıçanlara RF-EMA uygulaması öncesi Faraday kafesinin üst orta noktasına yerleştirilen RF jeneratöründen çıkan monopol anten, özel uygulama kafesinin ortasına (yerden yükseklik: 35 cm), deneklerin vücuduna aynı mesafede eşit yayılacak şekilde sabitlenmesi sağlandı (Şekil 1).



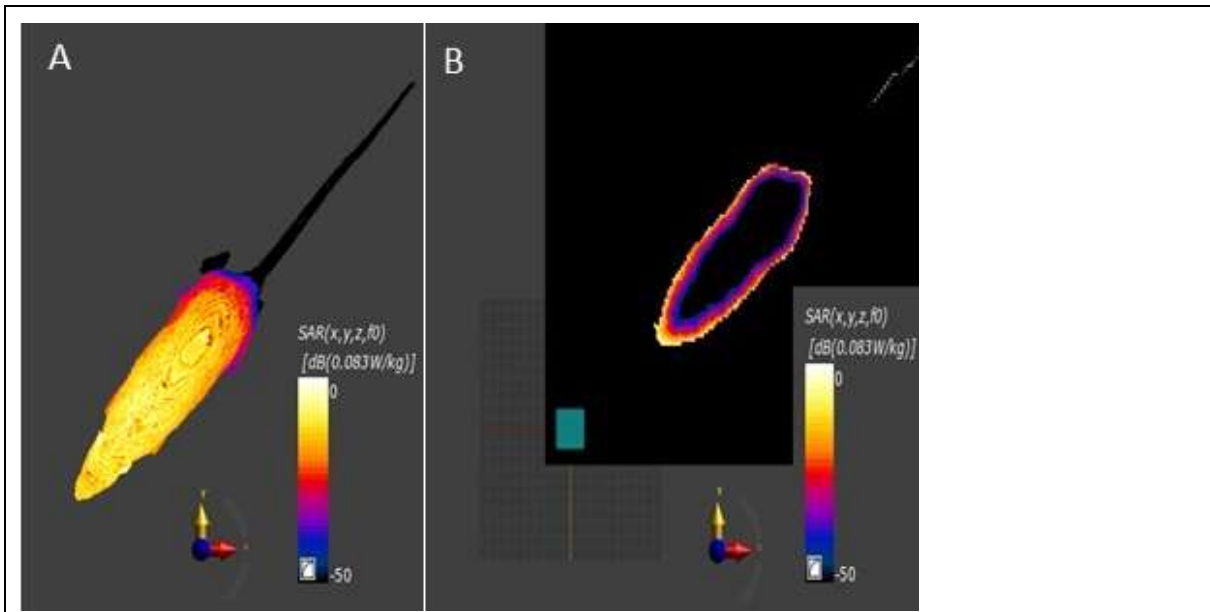
Şekil 1. RF-EMA maruziyet düzeneği. A) 6 GHz RF-EMA uygulanan deneysel kafes sistemi ve RF jeneratörü, B) Uygulama kafesinin üstten görünüş simülasyonu.

Spesifik Absorpsiyon Oranı (SAR)

Deney öncesi RF jeneratörü kapalı durumda ve gücü 1 Watt'ta çalışır durumda iken monopoll antene yakın alan (özel uygulama kafesinin orta noktası) ile kafesin dört köşesinden yansıma ve maruz kalma seviyelerini 3-boyutlu olarak ölçebilen ElectroSmog meter (TES-593, Taiwan) taşınabilir cihaz ile ölçüldü. RF-EMA parametreleri; elektrik alan (E) $6,29 \pm 4\%$ V/m, manyetik alan (H) $0,016 \pm 9\%$ A/m ve güç yoğunluğu (PD) değişimi $11,80 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ olarak kaydedildi.

SAR değerlerinin hesaplanması için Zurich MedTech AG'ye (Zurich, Switzerland) ait Zaman Domeninde Sonlu Farklar yöntemini (FDTD; Finite-Difference Time Domain) temel alan Sim4Life 7.0.2 programı kullanıldı. Hacimsel bir piksel (voksel) sıçan üç boyutlu model simülasyonları, Zurich MedTech AG'ye ait ViZoo 1.0 (Virtual Zoo) programı kullanılarak oluşturuldu. Benzetim için IEE/IEC62704-1 ortalama alma yöntemi kullanıldı. Voksel sıçan modelinde 1 g ortalama kütle için uzamsal-ortalama SAR dağılımı yapıldı¹⁸.

Çalışmamızda SAR değerleri, erişkin sıçanlarda tüm vücut üzerinde ortalama 0.083 W/kg olarak hesaplanırken, kan'da 0.0006 W/kg olarak hesaplanmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. 6 GHz'de SAR simülasyonları. A) Erişkin sıçan voksel modeli, B) 1g ortalama kütle için erişkin sıçan horizontal kesit tüm vücut SAR dağılımı.

Deneyel Grupların Oluşturulması

Anneksin-V yöntemi kullanılarak sıçan kan hücrelerinde canlı hücre, apoptotik süreçteki hücreler (erken, geç), nekrotik hücre % oranlarının belirlenmesi için kontrol (0.gün) ve RFR grubu (42.gün) olmak üzere çalışma 2 gruba ayrıldı.

Kontrol Grubu (0.gün): Bu grupta, totalde 10 adet erkek sıçan kullanıldı. RF-EMA uygulamasından önce tüm sıçanlara intraperioteneal (i.p.) olarak deney hayvanlarına xylazin (mg/kg) ve ketamin (mg/kg) enjeksiyon uygulaması yapıldı. Anestezi altındaki sıçanlardan kardiyak ponksiyon yöntemi ile kan örnekleri (yaklaşık 2cc) alınarak EDTA içeren tüplere aktarıldı. Kan örnekleri tamamlandıktan hemen sonra aynı gün içerisinde flow sitometrik yöntemle Anneksin-V kiti (Beckman Coulter, USA) kullanılarak canlı hücre, apoptotik süreçteki hücreler (erken, geç), nekrotik hücre yüzde oranları değerlendirildi ve analizleri yapıldı.

RFR Grubu (42.gün): Aynı sıçanlar Faraday kafesi içesine konulan özel uygulama kafesine yerleştirilerek 4 günlük adaptasyon döneminden sonra, 6 hafta boyunca 4 saat/gün 0.083 W/kg SAR, 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakıldılar (Şekil 1). RF-EMA uygulaması sonrasında deney öncesinde yapıldığı gibi aynı işlemlerle

kan örnekleri (yaklaşık 2cc) 2.kez alındı. Kan örneklerinin tamamen toplandıktan hemen sonra aynı gün içerisinde flow sitometrik yöntemle Anneksin-V kiti (Beckman Coulter, USA) kullanılarak canlı hücre, apoptotik süreçteki hücreler (erken, geç), nekrotik hücre oranları değerlendirildi ve analizleri yapıldı.

Flow Sitometrik Analiz ve Değerlendirme

Anneksin-V, hücre zarının dış yüzeyine geçiş yapan fosfatidylserine (PS) bağlanabilen bir protein olduğu için floresan bir madde olan FITC ile işaretlenerek apoptotik hücre oranı floresan mikroskop altında belirlendi. Aynı zamanda nekrotik sürece girmiş hücreleri tespit etmek amacıyla diğer floresan bir madde olarak PI kullanıldı.

Anneksin-V pozitif hücrelerin belirlenmesinde Flow Sitometrik yöntem kullanılarak FS INT / SSINT ANNEXIN LOG ile canlı hücrelerin (FITC (-) PI(-)), erken apoptotik süreçteki hücrelerin (FITC(+) PI(-)), nekrotik hücrelerin (FITC(-) PI(+)) ve geç apoptotik süreçteki hücrelerin (FITC(+) PI(+)) % oranları değerlendirildi.

Çalışmamızda, sıçan uyumlu FITC Annexin-V Apoptosis Detection Kiti (Beckman Coulter, USA) içeriği olarak, 20 testlik olmak üzere sırasıyla conjugate reagent (1x 0.1mg/mL BSA), Binding Buffer (1x 1.7mL) ve Propidium iodide (1x 0.25mg) kullanıldı.

Anneksin-V Çalışma prosedürü:

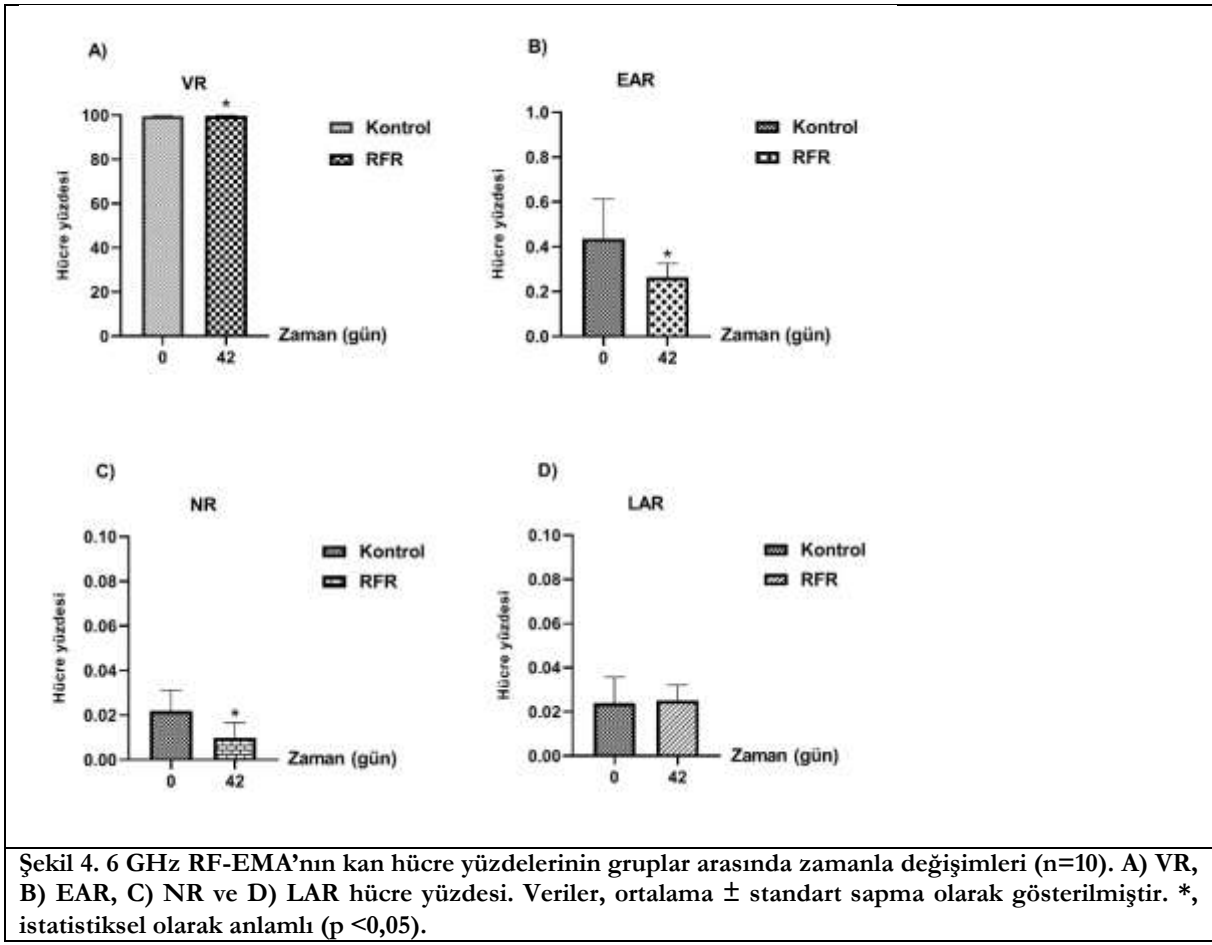
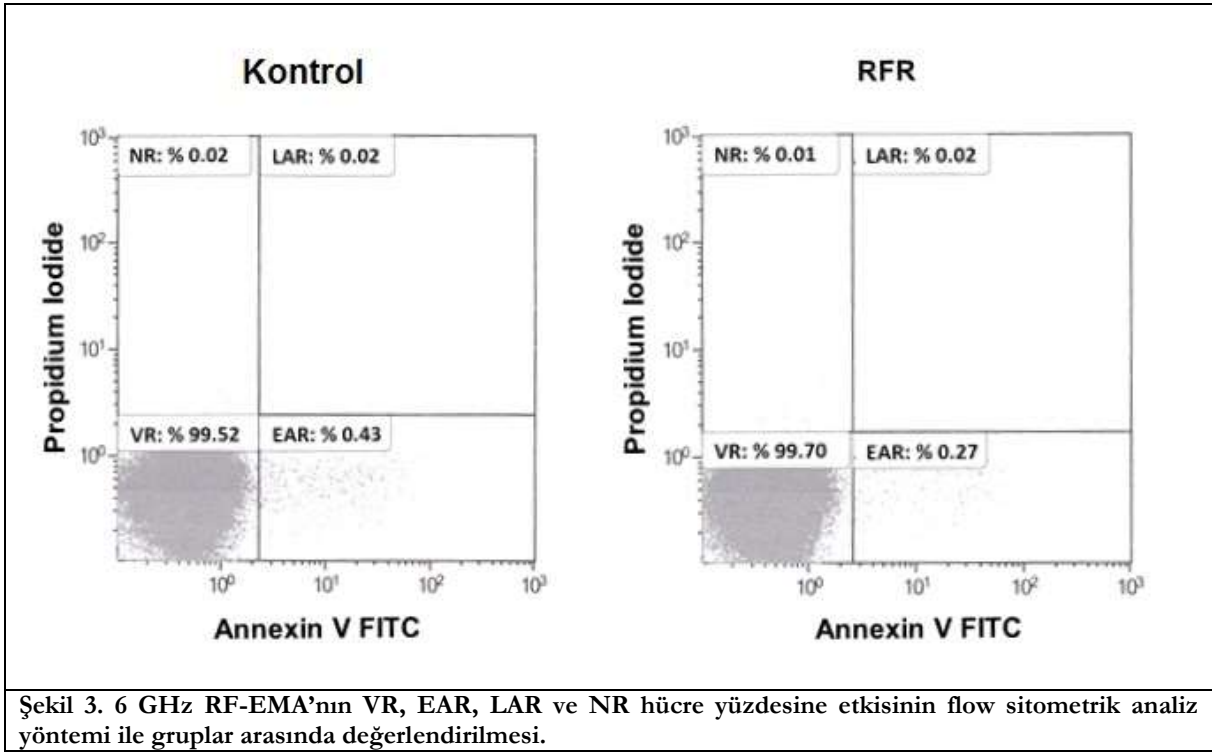
1. Flow sitometri tüpleri numaralandırılarak hazır hale getirildi.
2. Kan örnekleri hücre konsantrasyonları 5×10^3 hücre/ml oranında Phosphate Buffered Saline (PBS) ile dilue edildi (5 µl kan, 995 µl dilue).
3. Her örnekten 200µl dilue yapılan kan alınıp, polstren tüplere aktarılarak üzerine 200µl soğuk PBS eklendi.
4. 500g ayarda, +4°C sıcaklıkta ve 5 dk süreyle santrifüj edildikten sonra üstteki süpernatant atıldı.
5. Kalan süspansiyona Binding Buffer 100µl eklendi.
6. Daha sonra her bir tüpe 1µl Annexin-V FITC ve 5µl PI boya konuldu.
7. Hazırlanan tüpler karanlık ortamda buz kalıbı üzerinde 15 dk boyunca inkübe edildi.
8. Her bir tüpe daha önceden hazırlanmış olan Binding Buffer'den 400 µl ilave edildi (Binding Buffer x 10 distile su ile dilue edilir).
9. Hazırlanan örnekler Flow Sitometri (Marka; Beckman Coulter, Model; Navois 10C13L, USA) cihazına yerleştirilerek analizleri yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Normal dağılım göstermeyen bağımlı iki sayısal ölçümü karşılaştırmada Wilcoxon Signed Rank test kullanıldı. Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanıldı (SPSS referansı: IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0 Armonk, NY: IBM Corp.). Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

BULGULAR

Bu çalışmada, erkek sıçanların 6 GHz RF-EMA uygulama öncesi (kontrol) ve 6 GHz RF-EMA uygulama sonrası (RFR grubu) kan hücreleri iki grupta incelendi. Sıçan kan hücrelerinde canlılık oranı (VR), erken apoptotik oran (EAR), geç apoptotik oran (LAR) ve nekrotik oran (NR) yüzdeleri Şekil 3 ve 4'de gösterildi. 6 GHz RF-EMA maruziyeti kan hücreleri üzerinde önemli etkiye sahipti.



Sıçan kan hücrelerinde 6 GHz RF-EMA uygulamasının farklı günlerdeki (Kontrol; 0. Gün, RFR; 42. gün) dağılımları incelendiğinde; % VR ortalama verileri, kontrol grubu (99.53 ± 0.19) RFR grubu (99.70 ± 0.07) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış belirlenmiştir ($p=0.017$).

Diğer taraftan % EAR ortalama verileri, kontrol grubu (0.44 ± 0.18) RFR grubu (0.26 ± 0.06) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşüş belirlenmiştir ($p=0.014$).

Bununla birlikte % NR ortalama verileri, kontrol grubu (0.02 ± 0.01) RFR grubu (0.01 ± 0.01) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşüş belirlenmiştir ($p=0.008$).

Öte yandan, % LAR ortalama verileri, kontrol grubu (0.02 ± 0.01) ve RFR grubu (0.03 ± 0.01) karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak herhangi bir değişiklik saptanamamıştır ($p=0.748$).

Tartışma

Dünya genelinde gerek cep telefonu gerekse insan yapımı RF-EMA kaynakların kullanım yoğunluğu, çeşitliliği ve coğrafi bölge dağılımı giderek artış göstermektedir. Bu cihazların kullanımı ile birlikte, RF-EMA maruziyetine bağlı olarak immün sistem üzerindeki etkileri henüz daha tam olarak bilinmemesi nedeni ile bu alanların sağlık ve güvenlik konusundaki risklerin değerlendirilmesinde tolare edilebilir ortak bir karar alınamamıştır.

İnsan ve deney hayvanları modelleri ile yapılan çalışmalarda bazı kısıtlamalar söz konusudur. Bu durumun nedeni olarak, insanların normal yaşamlarında EMA yayan kaynaklara maruziyet durumu ile birebir aynı ortamın tam olarak oluşturulamaması, insan ile deney hayvanları boyutlarındaki kayda değer farklılıklar, postür farklılığı, beyin yapısı farklılığı gibi çeşitli etkenler ileri sürülmüştür¹⁹.

Çalışmamızda, 6 hafta boyunca 4 saat/gün 6 GHz (0.083 W/kg SAR) RF-EMA maruziyetinin sıçan kan hücrelerinde canlılık, apoptotik (erken, geç) ve nekrotik yüzde oranlarına etkisi RF-EMA uygulama öncesi (kontrol) ve sonrasında (RFR grup) aneksin-V kiti kullanarak flow sitometrik analiz ile değerlendirildi. Çalışmamızda, canlı, erken apoptotik ve nekrotik hücre yüzde oranları kontrol grubu ile RFR grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edildi ($p<0.05$). Geç apoptotik hücre yüzde oranında gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir değişiklik saptanmadı ($p>0.05$).

Literatürdeki bazı çalışmalarda, RF-EMA maruziyeti sonrasında çalışmamıza benzer olarak canlı, apoptotik ve nekrotik hücre oranlarında önemli etkilere neden olabileceği belirtilmiştir^{20,21}. RF-EMA'ların hücre canlılık, apoptozis ve nekroz mekanizmaları üzerine etkilerinin belirlenmesinde genellikle düşük frekanslı RF-EMA kaynakları kullanılmıştır. Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada, GSM modülasyonlu 900 MHz RF-EMA sinyalinin Wistar sıçanların C6 beyin tümörleri üzerindeki etkisi in vivo olarak araştırılmıştır. SAR değerlerinin 0 W/kg (kontrol), 0,25 W/kg ve 0.5 W/kg olduğu durumlarda, 45 dakika/gün kısıtlama olmak üzere haftada 5 gün boyunca maruz kalan sıçanlarda canlılık, nekrotik ve hücre bölünmesi üzerinde hiçbir değişim göstermezken, apoptotik hücre oranlarında SAR'a bağlı bir azalma olduğu bildirilmiştir²². Benzer şekilde, Skovierova H ve ark. tarafından kablosuz güç şarj sistemleri tarafından üretilen EMA'nın (87 kHz, 0,3–1,2 μT ,) 30 dakika boyunca normal insan astrositlerinde (HA) ve kanser hücre hatları (T98G ve SH-SY5Y) üzerindeki etkisi morfolojik ve hücresel düzeyde araştırılmıştır. Flow stometri analiz yapılarak, kontrollere kıyasla maruz kalan gruplarda HA, T98G ve SH-SY5Y'de canlı hücre oranında artış gözlenmiştir. Bununla birlikte, HA, T98G ve SH-SY5Y'de erken ve geç apoptotik hücre oranlarında azalma saptanmıştır. Ancak nekrotik hücre oranında T98G'de düşüş tespit edilirken, HA ve SH-SY5Y'de artış olduğu rapor edilmiştir²³.

Çalışmamızın aksine, bazı araştırmacılar tarafından da farklı frekanslı RF-EMA maruziyetinin canlı hücre, apoptotik ve nekrotik oranlarında olumsuz etkilere neden olabileceği ifade edilmiştir^{24,25}. Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada, 8 gün boyunca 6 saat/gün 900 MHz RF-EMR'ye (0.033 W/kg SAR , $26 \text{ V/m} \pm 9\%$, 0.067 A/m) maruz kalan insan fetal hücrelerine etkisi araştırılmıştır. 900 MHz RF-EMR grubu ile maruz kalmayan kontrol grubu karşılaştırıldığında, canlı hücre oranlarında azalma, apoptotik (erken, geç) ve nekrotik hücre oranlarında artış olduğunu tespit etmişlerdir¹¹. Bir başka çalışmada, 935 MHz ($4 \text{ W/kg} \pm 0.16 \text{ SD SAR}$) RF-EMF'nin N9 mikroglyal ve SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde apoptoz değişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, 2 saat süreyle maruz bırakılan kontrol ile 24 saat

süreyle maruz bırakılan deney grupları karşılaştırıldığında SH-SY5Y hücrelerinde deney grubunda canlı hücrelerin fraksiyonunda önemli bir azalma saptanırken, geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzdesinde önemli bir artış tespit edilmiştir. Ancak, erken apoptotik hücre yüzde oranında gruplar arasında anlamlı herhangi bir farklılık olmadığı rapor edilmiştir²⁶. Benzer şekilde bir çalışmada da, 28 gün boyunca 1 saat/gün (0,042 W/kg SAR) 900, 1800 ve 2450 MHz elektromanyetik radyasyonlara (EMR) maruz kalan erkek sıçanların amigdalar hücrelerinde canlı, apoptoz (erken/geç) ve nekroz hücreleri üzerine etkisi flow stometrik yöntemle değerlendirilmiştir. EMR uygulaması sonucunda, canlı hücre % oranında maruz kalmayan kontrole kıyasla tüm EMR gruplarında azalma gözlenirken, erken apoptoz hücre % oranı tüm EMR uygulamalarında indüklendiği ancak 2450 MHz'ye kıyasla 900 ve 1800 MHz'de bu oranın daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, geç apoptoz ve nekroz hücre % oranlarında 900 ve 1800 MHz'de herhangi bir değişim saptanmazken, 2450 MHz EMR'da kontrole kıyasla artış olduğu tespit edilmiştir²⁷.

Çalışmamızda, 6 GHz RF-EMA maruziyeti erken apoptotik evrede önemli etkilere neden olurken, geç apoptotik evrede anlamlı herhangi bir değişiklik tespit edilemedi. Ancak, 6 GHz üzerindeki frekanslarda RF-EMA'ya akut (≤ 1 saat) olarak maruz kalma, apoptozun her iki evresinde de istatistiksel olarak önemli etkilere neden olabileceği rapor edilmiştir¹⁶. Günümüze kadar RF-EMA maruziyeti ile ilgili yapılan çalışmalarda, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozis ve nekrozis üzerindeki etkisine dair kesin bir kanıt gösterilememiştir. Ancak, RF-EMA ile hücre etkileşiminde hücrede protein, nükleik asit ve lipid yapılarının bozulabileceği bildirilmiştir²⁸. Çalışmamızda, yüksek frekanslı (6 GHz) RF-EMA'nın uzun süreli maruziyeti, sıçan kan hücrelerinde olumsuz herhangi bir etkiye neden olmadı. Bu durum, 6 GHz RF-EMA'nın immün sistem hücrelerinin normal fonksiyonlarını yerine getirmesinde, hücre stresini regüle eden proteinlerin ekspresyonunda ve moleküllerin artışında önemli rol üstlenebileceğini düşündürmektedir.

Hemostatik bir mekanizmanın sağlanması amacıyla organizmada hücre popülasyonunun ve doku homeostazının korunması apoptozun en temel işlevlerinden birisidir¹⁴. Hücre içerisinde Ca^{+2} konsantrasyonundaki kontrolsüz artış apoptotik süreç ile ilişkili iyon kanallarında meydana gelen bozukluğu gösterir²⁹. Bu kanallar içerisinde yer alan Ca^{2+} kanalları, Ca^{2+} akımını düzenleyerek hücre içi metabolik olayları düzenlemekle işlev görürler³⁰.

İyon kanallarındaki işlev bozukluğu sonucunda, RF-EMA'ya maruz kalan hücrelerin elektrokimyasal dengesinde ve homeostazını belirleyen hücre içi iyonik konsantrasyonlarında değişiklikler meydana gelir. Bu konuda çok düşük frekanslı (50 Hz) RF-EMA maruziyeti apoptozu indükleyerek hücre içi Ca^{2+} seviyelerini ve hücre homeostazını değiştirebileceği öne sürülmüştür³¹.

Diğer taraftan, hücre membranında yer alan katyon kanalları aracılığı ile hücre içerisine Ca^{+2} girişi, potansiyel olarak geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanalları ve/veya voltaj kapılı kalsiyum kanalları (VGCC) tarafından gerçekleşir³². Bu kanallar doğrudan plazma zarında Ca^{+2} kanalları gibi davranmakta ve hücre içerisine Ca^{+2} girişini modüle etmektedir. Aktive olan TRPV1 kanalından hücre içerisine Ca^{+2} artışı ile apoptoz, inflamasyon ve kanser gibi olayların patolojik süreçlerinin gelişimine yol açar³³. Yukarıdaki bilgiler göz önüne alındığında çalışmamızdaki apoptotik ve nekrotik hücre oranlarındaki düşüşün bir nedeni olarak, 6 GHz RF-EMA'nın TRP kanallarını ve VGCC aktivasyonunu indükleyebileceğine işaret etmektedir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda farklı prosedür ve yöntemler kullanılarak uygulanan RF-EMA kaynaklarına maruziyetin, immün sistemi üzerine etkilerinin belirlenmesinde henüz daha tutarlı sonuçlar elde edilememiştir. Bizim çalışmamızda 6 GHz RF-EMA maruziyeti sıçan kan hücrelerinde gruplar arasında her ne kadar önemli değişiklikler saptanmış olsa da 6 GHz RF-EMA uygulamalarının immün sistem üzerinde pozitif etkilerinin olduğunu söylemek için henüz daha çok erken. Bu doğrultuda daha çok sayıda araştırmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç

RF-EMA maruziyetinin immün sistem üzerine etkilerine ilişkin yapılan çalışmalarda, aynı doğrultuda sonuçlar elde edilebildiği gibi zıt sonuçlarda ortaya çıkarılmıştır. Bizim çalışmamızda sıçan kan hücrelerinde canlı hücreler, apoptotik hücreler (erken, geç) ve nekrotik hücre yüzde oranları aneksin- V kiti kullanılarak flow sitometrik yöntemle analiz edildi. Sonuçlarımıza göre 6 GHz (0.083 W/kg SAR) RF-EMA, kan hücrelerinde canlı hücre yüzde oranlarında önemli artış meydana getirirken, erken apoptotik ve nekrotik hücre

yüzde oranlarında kayda değer azalmaya neden olmuştur. Ek olarak, geç apoptotik hücre yüzde oranlarında herhangi bir etkiye neden olmadı. İmmün sistemi üzerinde, RF-EMA'lara maruziyet yoğunluğunun artması sonucunda canlılarda neden olabileceği sağlık ve güvenlik etkilerinin daha iyi ve tam olarak anlaşılması açısından daha ileri deneysel ve epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

1. Emre M. The effects of radiofrequency and low frequency electromagnetic fields on the immune system. *J Immunol Clin Microbiol.* 2018;3:68-80.
2. Saygın M, Çalışkan S, Köylü H. Kablosuz ağ ve testisler. *SDÜ Tıp Fak Derg.* 2011;18:110-115.
3. Yanık C, Gingir E, Özkan S. Possible health effects of 5G technology: A Literature Review. *Chj.* 2021;2:72-78.
4. Kaszuba-Zwoińska J, Gremba J, Galdzińska-Calik B, Wójcik-Piotrowicz K, Thor PJ. Electromagnetic field induced biological effects in humans. *Przegl. Lek.* 2015;72:636-641.
5. Diab AK. The impact of the low frequency of the electromagnetic field on human. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1237:135-149.
6. Karimi A, Moghaddam FG, Valipour M. Insights in the biology of extremely low-frequency magnetic fields exposure on human health. *Mol Biol Rep.* 2020;47:5621-33.
7. Zmysłony M, Bienkowski P, Bortkiewicz A, Karpowicz J, Kieliszek J, Politański P et al. Protection of the population health from electromagnetic hazards - challenges resulting from the implementation of the 5G network planned in Poland. *Med Pr.* 2020;71:105-113.
8. Velghe M, Aerts S, Martens L, Joseph W, Thielens A. Protocol for personal RF-EMF exposure measurement studies in 5th generation telecommunication networks. *Environ Health,* 2021;20:36.
9. Majchrzak E, Dziatkiewicz G, Paruch M. The modelling of heating a tissue subjected to external electromagnetic field. *Acta of Bioengineering And Biomechanics,* 2008;10:29-37.
10. Kim HS, Park JS, Jin YB, Choi HD, Kwon HJ, Park JK et al. Effects of exposure to electromagnetic field from 915 MHz radiofrequency identification system on circulating blood cells in the healthy adult rat. *Bioelectromagnetics,* 2018;39:68-76.
11. Emre M, Boğa A, Çetiner S, Tunç E, Demirhan O. The effects of exposure to 900 MHz radiofrequency radiation and nicotine on apoptotic ratio of human fetal cells. *SEE J Immunol.* 2021;4:1-7.
12. Lamkowski A, Kreidl M, Radunz J, Willenbockel M, Stiemer M, Fichte LO et al. Analyzing the impact of 900 MHz EMF short-term exposure to the expression of 667 miRNAs in human peripheral blood cells. *Sci Rep.* 2021;11:4444.
13. Miyakoshi J. Cellular and molecular responses to radio-frequency electromagnetic fields. *proceedings of the IEEE.* 2013;101:1492-1502.
14. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv,* 2011;20:145-158.
15. Prendergast G. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene.* 1999;18:2967-2987.
16. Romeo S, Zeni O, Scarfi MR, Poeta L, Lioi MB, Sannino A. Radiofrequency electromagnetic field exposure and apoptosis: A scoping review of in vitro studies on mammalian cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:2322.
17. Küçükbağrıçık Y, Büyükatalay EÖ. New generation mobile phone frequencies and biological effects. *Genel Tıp Derg.* 2021;31:309-312.
18. Alkis ME, Bilgin HM, Akpolat V, Dasdag S, Yegin K, Yavas MC et al. Effect of 900-, 1800-, and 2100-MHz radiofrequency radiation on DNA and oxidative stress in brain. *Electromagnetic Biology and Medicine.* 2019;38:32-47.
19. Qubty D, Schreiber S, Rubovitch V, Boag AG, Pick C. No significant effects of cell phone electromagnetic radiation on mice memory or anxiety: Some mixed effects on traumatic brain injured mice. *Neurotrauma Reports.* 2021;2:381-90.
20. Pirozzoli M, Marino C, Lovisolo G, Laconi C, Mosiello L, Negroni A. Effects of 50 Hz electromagnetic field exposure on apoptosis and differentiation in a neuroblastoma cell line. *Bioelectromagnetics,* 2003;24:510-16.
21. Kaszuba-Zwoińska J, Wójcik K, Bereta M, Ziomber A, Pierzchalski P, Rokita E et al. Pulsating electromagnetic field stimulation prevents cell death of puromycin treated U937 cell line. *Journal Of Physiology and Pharmacology.* 2010;61:201-5.
22. Ouadah NS, Lecomte A, Robidel F, Olsson A, Deltour I, Schüz J et al. Possible effects of radiofrequency electromagnetic fields on in vivo C6 brain tumors in Wistar rats. *J Neurooncol.* 2018;140:539-46.
23. Skovierova H, Pavelek M, Okajčekova T, Palesova J, Strnadel J, Spanik P et al. The biocompatibility of wireless power charging system on human neural cells. *Applied Sciences,* 2021;11:3611.
24. Lin YY, Wu T, Liu JY, Gao P, Li KC, Guo QY et al. 1950MHz Radio Frequency Electromagnetic Radiation Inhibits Testosterone Secretion of Mouse Leydig Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2018;15:17.
25. Li DY, Song JD, Liang ZY, Oskouei K, Xiao XQ, Hou WZ et al. Apoptotic Effect of 1800 MHz Electromagnetic Radiation on NIH/3T3 Cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020;17:819.
26. Zielinski J, Ducray AD, Moeller AM, Murbach M, Kuster N, Mevissen M. Effects of pulse-modulated radiofrequency magnetic field (RF-EMF) exposure on apoptosis, autophagy, oxidative stress and electron chain transport function in human neuroblastoma and murine microglial cells. *Toxicol In Vitro,* 2020;68:104963.
27. Gupta SK, Patel SK, Tomar MS, Singh SK, Mesharam MK, Krishnamurthy S. Long-term exposure of 2450 MHz electromagnetic radiation induces stress and anxiety like behavior in rats. *Neurochemistry International.* 2019;128:1-13.
28. Panganiban RA, Snow AL, Day RM. Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int J Mol Sci.* 2013;14:15931-58.
29. Çiftçi N. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali, Apoptoz ve kanser progresyonunda kalsiyum kanallarının (Voc, Trp ve Soc Kanallar) rolü. *MCBU-SBED,* 2017;4:1021-27.
30. Emre M. Voltage-gated calcium channels and molecular features. *Archives Medical Review Journal,* 2018;27:1-17.

31. Barbier E, Dufy B, Veyret B. Stimulation of Ca²⁺ influx in rat pituitary cells under exposure to a 50 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics*, 1996;17:303-11.
32. Parate D, Franco-Obregón A, Fröhlich J, Beyer C, Abbas AA, Kamarul T et al. Enhancement of mesenchymal stem cell chondrogenesis with short-term low intensity pulsed electromagnetic fields. *Sci Rep*. 2017;7:9421.
33. 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. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1848:2756-65.

Correspondence Address / Yazışma Adresi

Yasin Karamazı

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyofizik Anabilim Dalı

Adana

e-mail: yasin_karamazi@hotmail.com

Geliş tarihi/ Received: 20.12.2022**Kabul tarihi/Accepted:** 24.03.2023

Bu çalışma, **Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi (ÇUBAP)** tarafından Proje No: TDK-2021-13488 desteklendi.

Bu çalışmanın ön verileri sözlü bildiri olarak sunulmuştur (**4th International 33rd National Biophysics Congress-2022** August 31- September 3, 2022, Adıyaman / TÜRKİYE).