

Cep telefonu maruziyetinden kaynaklanan Radyofrekans elektromanyetik alanın apoptoz üzerine etkisi

Impacts of radio-frequency electromagnetic field from mobile phone exposure on apoptosis

Mehmet Zahid Tuysuz¹, Handan Kayhan², Atiye Seda Yar Saglam³, Emin Umit Bagriacik⁴, Munci Yagci², Ayşe Gülnihal Canseven⁵

- 1 Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye
- 2 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yetişkin Hematoloji Bilim Dalı, Beşevler, Ankara, Türkiye
- 3 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü, Beşevler, Ankara, Türkiye
- 4 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara, Türkiye
- 5 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz.

Amaç: Cep telefonu kullanımı her geçen gün daha da yaygınlaşmakta olup, olası zararları ile ilgili endişeler toplum içinde artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne bağlı bir kuruluş olan "Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı" tarafından RF elektromanyetik alanlar 2B sınıfı karsinojen olarak ilan edilmiştir. Bu çalışmada, cep telefonu kaynaklı RF elektromanyetik alan (RF-EMF) maruziyetinin, apoptoz ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Materyal ve metod: İnsan astrositoma hücreleri, cep telefonu frekanslı RF-EMF'e 1, 24 ve 48 saat süreler ile maruz bırakıldı. Deney gruplarındaki apoptoz oranları akım sitometride annexin V-FITC/PI yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Hücre canlılığı ise mikropilaka okuyucuda wst-1 yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir.

Bulgular: Deney sonuçları, RF-EMF'e 1 ve 24 saat süre ile maruz bırakılan deney gruplarında hücre canlılığı ve apoptozda önemli bir etki gözlenmemiştir. Bunun aksine 48 saatlik RF alan maruziyeti hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya sebep olurken, apoptozda yine istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: Deney sonuçları RF EMF kaynaklı etkilerin gözlenmesinde hücrelerin ikiye katlanma sürelerinin önemli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Cep telefonu, Radyofrekans, Astrositoma, Apoptoz

Abstract

Background: The use of mobile phones is becoming more widespread and the concerns about possible harmful effects are increasing in the community. The RF electromagnetic fields have been declared as carcinogen class 2B by the International Agency for Research on Cancer, an organization affiliated to the World Health Organization. In this study, we examined effects of radio-frequency electromagnetic field (RF-EMF) from mobile phone exposure on apoptosis and cell viability were investigated.

Methods: Human astrocytoma cell lines, were exposed to RF-EMF at mobile phone frequency for 1, 24, and 48 h. Apoptotic rates of experimental groups were examined by annexin V-FITC/PI assay in flow cytometry. Additionally cell viability was determined by using the wst-1 assay with elisa reader.

Results: The experimental results show that RF-EMF exposure with 1 and 24 hours has no significant effect on cell viability and apoptosis in astrocytoma cells. Conversely, 48-hour RF field exposure statistically significantly decreased cell viability and increased apoptosis in astrocytoma cells.

Conclusions: The results of the experiment show that doubling time of cells is important in observing RF EMF induced effects.

Keywords: Mobile phone, Radiofrequency, Astrocytoma, Apoptosis

Sorumlu Yazar / Corresponding Author

Dr. Mehmet Zahid Tuysuz

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Biyofizik Anabilim Dalı, Dekanlık
Binası D-108, Osmanbey Kampüsü,
Şanlıurfa, Türkiye

Tel: 0414 318 30 00 / 1371

E-mail: mz.tuysuz@harran.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 04/03/2019

Kabul tarihi / Accepted: 14/03/2019

Giriş

Kablosuz iletişim teknolojilerinin, cep telefonlarının ve baz istasyonlarının yaygın olarak kullanılması, radyo frekans elektromanyetik alan (RF-EMF) maruziyetinde önemli bir artışa neden olmaktadır. Cep telefonlarının başa yakın olarak kullanılması, insan beyninin diğer organlara kıyasla daha fazla özgül soğurma oranı (SAR) değerlerine maruz kalmasına neden olur. Söz konusu argümanlar, RF-EMF'e maruz kalınmasından kaynaklı potansiyel sağlık riski ile ilgili kamuoyu endişelerini artırmaktadır.

Bazı deneysel çalışmalar RF alana maruz kalmanın apoptoz (1), DNA hasarı (2), proinflamatuvar yanıtlar (3) ve gen ekspresyonundaki değişiklikleri (4) uyardığını göstermektedir. Buna karşın, RF alan maruziyetinin etkisi olmadığını bildiren farklı çalışmalar (5-9) da vardır. Ayrıca, deneysel çalışmalar RF alan maruziyetinin biyolojik etkileri konusunda tartışmalı sonuçlar göstermesine rağmen (1, 6), epidemiyolojik çalışmalar glioma riskinde artış olduğunu bildirmiştir (10-12). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), cep telefonlarının yoğun kullanımında glioma insidansında bir artış olduğunu bildirmektedir (13).

Epidemiyolojik çalışmaların bir sonucu olarak, RF alanlar IARC tarafından insanlar için muhtemel kanserojen (Grup 2B) olarak sınıflandırılmıştır (14). Kanser insidansındaki artmış riski belirten epidemiyolojik çalışmalara rağmen, deneysel çalışmalar radyo frekans (RF) etkileri ve mekanizmaları hakkında sınırlı bilgiye sahip olup, bu alandaki çalışmalar tartışmalıdır. Farklı hücrelerin RF maruziyetine duyarlılığını belirlemek ve bu hücrelerin RF maruziyetine nasıl tepki verdiğini tespit etmek için yeni deneylere ihtiyaç vardır.

Bu çalışma, epidemiyolojik çalışmalar ve IARC tarafından belirlenen, risk artışı tespit edilen glial hücre kanseri türlerinden olan U118-MG insan glioblastoma hücre hattında RF alan maruziyetinin apoptoz ve hücre canlılığı üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlamaktadır (15).

Bu bağlamda, U118-MG insan glioblastom hücreleri, 1, 24 veya 48 saatlik süreler ile 2.1 GHz frekanslı bir RF alana maruz bırakıldı. Hücrelerin apoptotik aktivitesi akım sitometri ile incelenmiş ve hücre proliferasyonu WST-1 yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Materyal ve metod

Hücre kültürü

50 yaşındaki Kafkasyalı bir erkekten çoğaltılan insan glioblastoma hücre hattı (U-118 MG), Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Umit Bağrıaçık'tan temin edilmiştir. Hem glioblastom hem de astrositom hücrelerini içeren karmaşık bir morfolojiye sahiptir. Hücreler %10 fetal bovin serumu (FBS, Gibco, ABD), %1 L-glutamin, 100 µg/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) içerisinde kültüre edildi.

RF maruziyet sistemi

RF alan maruziyeti için, ortasında yarım dalga dipol antene sahip, 8 adet 35 mm petri kültür kabı içeren, yankısız bir RF alan maruziyet kabini kullanılmıştır. RF maruziyet kabini, hücrelere uygun çevresel koşul sağlamak için CO₂ inkübatör içerisine yerleştirildi. RF alan kaynağı için R&S SMBV100A (Rohde ve Schwarz, Almanya) vektör sinyal üretici kullanıldı. RF maruziyet kabininin alt ve üst kısımlarında hava delikleri bulunmaktadır. Ek olarak, sistemdeki sıcaklık dağılımının homojenliğini sağlamak için RF maruziyet kabininin altına bir fan yerleştirildi. RF-EMF'e maruz kalan örneklerin SAR değerleri, FDTD yöntemini kullanan Semcad-X V14.8 (Speag, İsviçre) yazılımı ile hesaplanmıştır.

Hücre maruziyet protokolü

U-118 MG insan glioblastom hücreleri, 35 mm hücre kültür kaplarına her kültür tabağı 2.5 x 10⁵ hücre içerecek şekilde eşit sayıda ekildi. Hücreler dört gruba ayrıldı: (i) maruziyet uygulanmayan, (ii) 1 saatlik maruziyet uygulanan, (iii) 24 saatlik maruziyet uygulanan ve (iv) 48 saatlik maruziyet uygulanan gruplar. Hücreler, hücre yapışmasını sağlamak ve hücreleri strese sokmamak için 24 saat boyunca CO₂ inkübatörde (37°C, %5 CO₂, %95 nemlendirilmiş ortamda) inkübe edilmiştir. Her grupta 8 adet 35 mm hücre kültürü tabağı mevcut olup, hepsi eş zamanlı olarak RF alanına maruz bırakıldı. U-118 MG insan glioblastom hücreleri, *in vitro* RF alan maruziyet sistemine yerleştirildi ve daha sonra ortalama 1 W/kg SAR değerine sahip 2.1 GHz frekanslı RF alana maruz bırakıldı. Maruziyet sonunda, hücreler hücre proliferasyonu ve apoptoz düzeylerini belirlemek için eşzamanlı olarak sistemden çıkarıldı.

Hücre proliferasyonu

Hücre proliferasyonu, Wst-1 Hücre Proliferasyon Reaktif (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılarak belirlendi. U118-MG insan glioblastom hücreleri, her kuyucukta 1x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakaya ekilmiştir. RF alan maruziyetinden sonra, her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 hücre çoğalma reaktif ilave edildi. Hücreler 4 saat süreyle nemli bir atmosferde (37°C, %5 CO₂) inkübe edildi. Daha sonra, Elisa okuyucuda (Tecan-SunRise, İsviçre) 450 nm'de absorbans değerleri ölçülerek hücreler analiz edildi. Her deney üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

Akım sitometri

Apoptoz tayini, FITC Annexin V Apoptoz Saptama Kiti I (BD Biosciences, ABD) kullanılarak akım sitometri (FACS, FACSCalibur, BD Biosciences, ABD) yöntemi ile analiz edildi. U118-MG hücreleri toplandı ve iki kez soğuk fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkandı ve daha sonra 1x10⁶ hücre/ml konsantrasyonunda 1X bağlama tamponunda yeniden süspanse edildi. Solüsyonun 100 mikrolitresi 5 ml'lik bir kültür tüpüne (1x10⁵ hücre) aktarıldı ve sonra

çözeltiye 5 µl FITC Annexin-V ve 5 µl PI eklendi. Daha sonra, hücreler yavaşça vortekslenildi ve karanlıkta oda sıcaklığında (25°C) 15 dakika boyunca inkübe edildi. Her tüpe 400 mikrolitre 1X bağlayıcı tampon ilave edildi ve 1 saat içinde akım sitometri ile analiz edildi. FACS analizi için her örnekte en az 10.000 hücre değerlendirildi.

İstatistiksel analiz

Sonuçlar ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. Hücre proliferasyonu ve apoptozun istatistiksel önemini değerlendirmek için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar $p < 0.05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

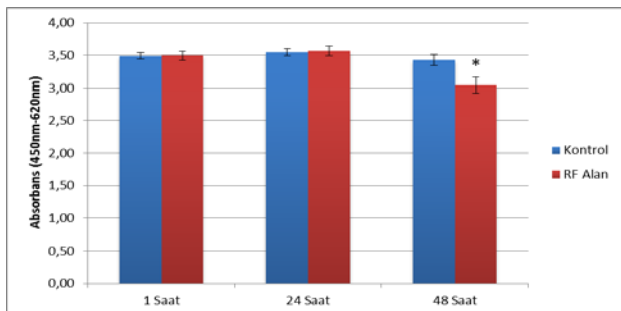
Hücre çoğalması

RF alan maruziyetinin U-118 MG insan glioblastom hücreleri üzerindeki etkisini belirlemek için önce hücre proliferasyonu incelendi. Bu bağlamda hücre kültürleri, 1, 24 veya 48 saatlik süreler ile 1 W/kg'lık 2.1 GHz RF alanına maruz bırakıldı. Hücre proliferasyonu, RF maruziyetinin ardından kolorimetrik Wst-1 yöntemi kullanılarak belirlendi.

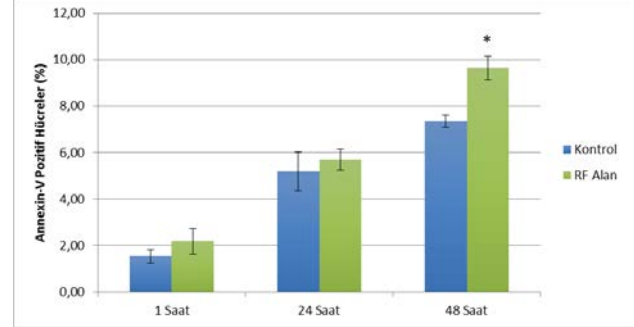
1 saat ve 24 saat RF alan maruziyetinden sonra, U-118 MG hücrelerinde kontrol ve maruziyet grupları arasında hücre çoğalması açısından anlamlı bir fark gözlenmedi. Buna karşılık, 48 saat RF alan maruziyetinde, Şekil 1'de görüldüğü üzere, kontrol grubuna kıyasla U-118 MG hücrelerinin çoğalmasını istatistiksel açıdan önemli ölçüde inhibe etti.

Akım sitometri

U-118 MG hücre hattında 2.1 GHz frekanslı RF alan maruziyetinin apoptoz üzerine etkisi Annexin-V-Fitc/PI testi kullanılarak akım sitometri ile incelendi. Akım sitometri sonuçları kontrol grubuna kıyasla, 1 ve 24 saatlik RF alanına maruziyet gruplarında apoptotik hücre sayısı açısından anlamlı bir farklılığa neden olmadığını göstermiştir. Buna karşılık, Şekil 2'de gösterildiği gibi, sonuçlar, 48 saatlik RF alan maruziyetinin U-118 MG insan glioblastom hücrelerinde apoptozu istatistiksel olarak önemli ölçüde indüklediğini göstermektedir.



Şekil 1. RF-EMF'nin U-118 MG hücrelerinde hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi. U-118 MG hücrelerinin çoğalması, WST-1 yöntemi kullanılarak ölçüldü. Tüm deneyler en az üç tekrarlı gerçekleştirildi ve veriler ortalama ± SEM ile temsil edildi. * $p < 0.05$



Şekil 2. U-118 MG hücrelerinde RF-EMF'nin apoptoz üzerindeki etkisi. U-118 MG hücrelerinde apoptoz, Annexin-V-Fitc/PI yöntemi kullanılarak akım sitometri cihazı ile ölçülmüştür. Tüm deneyler en az üç tekrar ile gerçekleştirildi ve veriler ortalama ± SEM; * $p < 0.05$.

Tartışma

Her geçen gün daha popüler hale gelen WiFi, 3G, LTE ve WiMax gibi kablosuz iletişim teknolojileri nedeniyle (16), insanlık RF alana giderek daha fazla maruz kalmaktadır. Artan RF alan maruziyetinin bir sonucu olarak, RF alanlarının olası sağlık etkileri insanları rahatsız etmektedir. RF alan maruziyetinin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisini inceleyen hücre kültürü çalışmaları ile ilgili literatürdeki veriler çelişkili sonuçlar içermektedir. RF alan maruziyetinden (3, 4, 17, 18) kaynaklı apoptoz ve gen ekspresyonunda önemli değişiklikler bildiren çalışmalar olmasına rağmen RF alan maruziyeti nedeniyle önemli bir etki gözlemlemeyen çalışmalar da mevcuttur (5-8, 19-21). ABD Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) tarafından yapılan çalışmada, 2 yıl boyunca RF alanına maruz kalan sıçanlarda gliomalar ile ilgili kısmi bir ilişki olduğu bildirilmiştir (22).

Her ne kadar RF-EMF alanları IARC tarafından epidemiyolojik çalışmalara dayanarak (14) olası kanserojenler (Grup 2B) olarak bildirilmiş olsa da *in vitro* deney sonuçları çelişkili ve yetersiz verileri içermektedir. Bu nedenle, RF alanlarının MSS ile olası etkilerini ve etkileşim mekanizmalarını araştıran *in vitro* deneyler önem kazanmaktadır. Cep telefonlarının kullanım konumu nedeniyle, beyin RF alana maruz kalan ve en çok etkilenen organdır. Beyin, nöronlar ve glial hücreler olmak üzere temel olarak iki tip hücreden oluşmaktadır. Zhao ve ark. glial hücrelerden olan astrositlerin, nöronlara göre RF alan maruziyetine karşı daha duyarlı olduğunu bildirmiştir. Astrosit hücrelerinin RF alan maruziyetine duyarlılığı, Liu ve ark. tarafından da doğrulanmıştır. Hücrelerin RF alan maruziyetine tepkisinin, hücre tipine bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (1, 4, 23). Nylund ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, farklı donörlerden üretilen aynı iki hücre hattı için aynı maruziyet sistemi ve aynı şartlar uygulanmış olmasına rağmen, hücre hatlarından elde edilen sonuçların farklı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Liu ve ark. aynı maruziyet koşullarını ve biyolojik prosedürleri uyguladıkları diğer gliomalarda ve astrositik hücrelerde gördükleri aynı etkiyi gözlemleyemediler.

Astrositlerin RF alan maruziyetine daha duyarlı olduğunu bildiren bu çalışmalar göz önüne alındığında, morfolojisinde hem glioblastoma hem de astrositoma (astrositik kökenli) hücreler içeren U-118 MG insan glioblastoma hücre hattının incelenmesi uygun görülmüştür.

Gerçek kullanıma uygun olması ve mevcut literatürle karşılaştırılabilmesi için hücre kültürleri, ortalama bir cep telefonunun SAR değeri olan 1 W/kg'lık, 2.1 GHz RF alanına tabi tutulmuştur.

Glial bazlı hücre kültürleri, RF alanının hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi açısından incelendiğinde, artan proliferasyon (18), azalmış proliferasyon (1, 24, 25) veya önemli bir değişiklik olmadığını bildiren çalışmalar mevcuttur (6, 8, 26 -28) (Tablo 1).

Literatürde 2100 MHz RF alan maruziyetinin hücre canlılığına etkilerini inceleyen tek çalışma Sekijima ve ark. ait olup yaptıkları çalışmada hücre canlılığında önemli bir değişim gözlenmemiştir (8).

Liu ve arkadaşları, çalıştığımız frekansa görece yakın bir değer olan 1950 MHz'de farklı hücre hatlarında 2 ayrı çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmalardan birinde (1) sıçan astrosit hücrelerinde etki gözlemlerine rağmen, diğer çalışmada (6) RF alan maruziyetinden kaynaklı önemli bir etki gözlemlenemediklerini rapor etmişlerdir. Bu durum RF alan maruziyetine hücrelerin, hücre tipine göre farklı yanıtlar verdiğini göstermektedir.

U87 hücre hattı ile çalışmış olan Kang (19) ve French (24); aynı hücre hattını ve yakın frekans değerlerini kullanmalarına rağmen farklı sonuçlar bulmuşlardır. Bu durumun modülasyon farkından, uygulama süresinden, RF alan doz değerinin farklı olmasından ya da farklı RF alan maruziyet sistemleri kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Görüldüğü üzere literatürdeki verilerin sınırlı ve çelişkili olması nedeniyle kıyaslama yapabilmek oldukça güçtür.

İnsan astrositoma (SHG44) hücreleri ile çalışmış olan Cao ve ark. tarafından; önce 3 gün boyunca günde 2 saat farklı güçlerde 900 MHz RF alan ve sonrasında tek doz gama radyasyon uygulanan hücrelerde, hücre canlılığının RF dozuna bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı ve RF düzeyi arttıkça hücre canlılığında daha fazla azalma tespit edildiği rapor edilmiştir (25).

Miyakoshi ve arkadaşlarının çalışmasında, insan glioma (M054) hücrelerine 2 saatlik 1950 MHz RF alan uygulandığında, kontrol ve maruziyet grupları arasında önemli fark gözlenmemiştir (28). Sıçan glioma (C6) hücreleri ile primer sıçan glial hücrelerinde 836.55 MHz RF alanın hücre canlılığını etkilemediği rapor edilmiştir (27). 9.6 GHz RF alana 24 saat maruz kalan insan astrositoma (1321N1) hücrelerinin proliferasyonunda ise artış tespit edilmiştir (18).

Tablo 1. RF alan maruziyetinin Glioblastoma ve Astrositom hücre hatları üzerindeki hücre proliferasyonuna etkisi.

Çalışma	Hücre Tipi	Maruziyet Koşulları			Metod	Sonuç
		Frekans/Mod.	Süre	SAR		
Liu et al. (2015)	T98, A127, U251, U87	1950 MHz TD-SCDMA	12/24/48 Saat	5 W/kg	CCK-8	Önemli Bir Değişim Yok
Sekijima et al. (2010)	A172, H4, IMR-90	2.1425 GHz CW, W-CDMA	24/48/72/96 Saat	80/250/800 mW/kg	CellTiter-Glo (ATP kit)	Önemli Bir Değişim Yok
French et al. (1997)	U87	864.3 MHz CW	3 x 20dk x 7gün	8.1 mW/cm ²	3H-Thymidine	Azalış Tespit edilmiş
Kang et al. (2014)	NIH3T3, U87, PC12, SH-SY5Y	837 MHz (CDMA), 1950 MHz (W-CDMA)	2 Saat	2 W/kg	MTT	Önemli Bir Değişim Yok
Liu et al. (2012)	Rat Astrosit, C6 Rat Glioma	1950 MHz TD-SCDMA	12/24/48 Saat	5.36 W/kg	CCK-8	Azalış Tespit edilmiş
Cao et al. (2009)	SHG44	900 MHz + Gama Işını	2 saat x 3 gün	2/4/6 mW/cm ² 5 Gy	MTT	Azalış Tespit edilmiş
Miyakoshi et al. (2005)	M054	1950 MHz CW	2 Saat	2/10 W/kg	Coulter Particle Counter	Önemli Bir Değişim Yok
Stagg et al. (1997)	C6 Rat Glioma, Primer Rat Glial	836.55 TDMA	4/24 Saat, 14 Gün	0.59-59 uW/g, 0.15-15 uW/g	3H-Thymidine	Önemli Bir Değişim Yok
Perez-Castejon et al. (2009)	1321N1 (Astrositoma)	9.6 GHz (Pulsu)	15/30/60dk 24 Saat	0.4 mW/kg	Trypan Blue	24 Saat maruziyette Artış Tespit edilmiş

Tablo 2. RF alan maruziyetinin Glioblastoma ve Astrositoma hücre hatlarında apoptoza etkisi ve akım sitometre çalışmaları.

Çalışma	Hücre Tipi	Maruziyet Koşulları			Metod	Sonuç
		Frekans/Mod.	Süre	SAR		
Liu et al. (2015)	T98, A127, U251, U87	1950 MHz TD-SCDMA	12/24/48 Saat	5 W/kg	Annexin V-Fitc PI	Önemli Bir Değişim Yok (Apoptoz)
de Gannes FP et al. (2011)	SH-SY5Y, U87, CHME5, primer nöron	1800 MHz GSM Edge	1/24 Saat	2 W/kg 10 W/kg	DCFH-DA	Önemli Bir Değişim Yok (ROS)
Hirose et al. (2006)	A172, IMR-90	2.1425 GHz CW, W-CDMA	24/48 Saat 28 Saat	80/250/800 mW/kg	Annexin V-Fitc PI	Önemli Bir Değişim Yok (Apoptoz)
Kang et al. (2014)	NIH3T3, U87, PC12, SH-SY5Y	837 MHz (CDMA), 1950 MHz (W-CDMA)	2 Saat	2 W/kg	DCFH-DA	Önemli Bir Değişim Yok (ROS)
Liu et al. (2012)	Rat Astrosit, C6 Rat Glioma	1950 MHz TD-SCDMA	12/24/48 Saat	5.36 W/kg	Fitc	48 Saat Maruziyet Grubunda, Astrosit Hücrelerinde Apoptozda Artış Tespit Edilmiş
Cao et al. (2009)	SHG44	900 MHz Gama Işını	2 saat x 3 gün	2/4/6 mW/cm ² 5Gy	DNA Fragmentasyonu	Gama ışını ile birlikte uygulandığında, sadece Gama uygulanan gruba kıyasla Apoptozda Artış Tespit Edilmiş
Perez-Castejon et al. (2009)	1321N1 (Astrositoma)	9.6 GHz (Pulsu)	15/30/60dk 24 Saat	0.4 mW/kg	Hoechst - PI	Protein bazında Bcl-2 artmış, Bax Azalmış
Terro et al. (2012)	Primer Serebral Kortikal Rat Hücresi	900 MHz GSM	24 Saat	0.25 W/kg	DAPI + Western Blot (Casp3)	Önemli Bir Değişim Yok

Çalışmamızda RF alan maruziyeti ile indüklenen hücre proliferasyonu, U-118 MG insan glioblastoma hücre hatlarında Wst-1 kullanılarak incelenmiştir. 1 ve 24 saatlik RF alan maruziyeti hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etki göstermediği tespit edilmiştir. 48 saatlik RF alan maruziyetinin ise hücre çoğalmasında önemli ölçüde azalttığı tespit edildi.

Glial hücre kültürlerinde RF alanın apoptoz üzerindeki etkileri incelendiğinde, apoptozun (1, 25) arttığını, apoptozun azaldığını (18) veya apoptozda anlamlı bir değişiklik olmadığını bildiren çalışmalar mevcuttur (6, 7, 21, 26, 31) (Tablo 2). Tablo 2 apoptotik etkiye sahip çalışmaların genellikle astrositik kökenli olduğunu göstermektedir.

2.1 GHz frekanslı tek çalışma olan Hirose ve arkadaşlarının çalışmasında apoptozda önemli bir değişim olmadığı rapor edilmiştir (21, 29).

Liu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 1950 MHz'de aynı maruziyet koşullarının farklı hücre hatlarına uygulandığı 2 farklı çalışma gerçekleştirmişlerdir. Aynı maruziyet koşulları uygulanmasına rağmen sıçan astrosit ve C6 hücrelerinde (1) apoptozda önemli oranda artış görülmesine

rağmen insan glioblastoma (U87 ve U251) hücre hatlarında (6) önemli bir değişim gözlenmemiştir. 1950 MHz frekanslı alan etkisinde C6 glioma hücre hattında önemli bir değişim gözlenmemiştir. Sıçan astrosit hücrelerine 12 saat, 24 saat ve 48 saat RF alan uygulandığında; 48 saat uygulamanın diğer gruplara kıyasla 3 kat daha fazla apoptoz oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu etki, 48 saat uygulama süresinin; çalışılan hücrelerin ikiye katlanma süresinin (doubling time of cell culture) üzerinde olması ile izah edilmiştir. Bizim çalışığımız U-118 MG hücre hattı 48 saatten önce ikiye katlanma süresine ulaşmakta olduğundan 48 saat için etki gözlenmesi literatür ile uyumlu bulunmuştur. RF alan maruziyetine hücrelerin yanıtı, hücre tipine göre farklılık göstermektedir. Deneysel verilerin sınırlı ve çelişkili olması nedeniyle kıyaslama yapabilmek oldukça güçtür (1). De Gannes ve arkadaşları, 1 saat ve 24 saat 1800 MHz GSM maruziyetinin apoptoza etkilerini; glioblastoma (U87), nöroblastoma (SH-SY5Y) ve insan mikrogliya (CHME-5) hücrelerinde ROS tayini ile araştırmış ve önemli bir etki gözlemediklerini rapor etmişlerdir (7).

İnsan glioblastoma (A172) ve insan fibroblast (IMR-90) hücrelerinde 2.1 GHz RF alanın apoptoza etkisi Hirose ve arkadaşları tarafından incelenmiş, kontrol ve maruziyet grupları arasında önemli bir fark gözlenmediği rapor edilmiştir (21). Kang ve arkadaşları, 837 MHz ve 1950 MHz alanları birlikte, 2 saat süreyle, fare fibroblast hücresi (NIH3T3), insan glioblastoma (U87), sıçan feokromosoma (PC12) ve insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hatlarına uygulamışlar ve bu maruziyetin ROS'u etkilemediğini rapor etmişlerdir (19).

Cao ve arkadaşları, insan astrositoma (SHG44) hücre hattı ile yaptıkları araştırmada RF alan doz değeri arttıkça, apoptozun da arttığını rapor etmişlerdir (25). İnsan astrositoma (1321N1) hücre hattına 24 saat süre ile 9.6 GHz frekanslı RF alan uygulanmış, antiapoptotik Bcl-2 proteininde önemli oranda artış, proapoptotik Bax proteininde ise önemli oranda azalış tespit edildiği belirtilmiştir (18). Terro ve arkadaşları tarafından primer serebral kortikal sıçan hücre hattına, 24 saat boyunca uygulanan 900 MHz GSM alanının ise apoptoz oluşumunu etkilemediği rapor edilmiştir (31).

Çalışmamızda hücrelerin RF alanına apoptotik tepkisi incelendiğinde hücre çoğalması ile uyumlu bir seyir gözlemlendi. Her ne kadar 1 ve 24 saat RF alanına maruz kalma önemli bir apoptotik etki yaratmasa da 48 saat RF alana maruz kalmanın apoptozda istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu tespit edildi.

RF alan maruziyeti kaynaklı etkilerin 48 saatlik deney gruplarında gözlenmesi önem arz etmektedir. Bu durum, hücre kültürünün iki katı sayıya çıkması için gerekli zamanı içermesinden kaynaklandığını öngörmekteyiz. RF alan maruziyeti ile ilgili hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin iki katına çıkması için gereken zamanın dikkate alınmasının, bu literatürdeki çelişkili çalışma sonuçlarını azaltma potansiyeline sahip olduğuna inanıyoruz.

U-118 MG hücre çizgisi için, hücre çoğalması ve apoptoz birlikte değerlendirildiğinde:

- 1 ve 24 saatlik RF alan maruziyetinin önemli bir etkiye neden olmadığı,
- 48 saatlik RF alan maruziyetinin ise apoptozu etkili bir şekilde indüklediği gözlenmiştir.

Daha önce yaptığımız nöron kaynaklı SH-SY5Y hücre deneyinde (9), RF alana maruz kalmadan kaynaklanan apoptotik bir etki gözlenmemiştir. Bununla birlikte, RF alan maruziyetinden kaynaklı astrosit türevli U118-MG hücre hattında apoptotik bir etkinin gözlemlenmesi, astrosit türevli hücrelerin nöron türevli hücrelerden daha duyarlı olduğu fikrini güçlendirmektedir.

Özetle, U-118 MG insan glioblastoma hücre hattında RF alana maruz kalmaya bağlı etkiler, hücre proliferasyonu ve apoptozu inceleyen bu çalışmada değerlendirildi. U-118 MG hücrelerinin RF alan maruziyetine karşı yanıtı, RF alana maruz kalma süresine bağlı olarak değişmektedir. RF alan maruziyetinin en önemli etkileri, hücrelerin iki

katına çıkması için gerekli süreyi de kapsayan 48 saatlik maruziyet grubunda gözlemlendi. Bir diğer önemli husus astrosit kaynaklı hücrelerin RF alan maruziyetine karşı daha duyarlı olmasıdır. İleriki çalışmalarda, astrosit kaynaklı hücre hatlarında, hücrelerin ikiye katlanma sürelerinin de dikkate alındığı deney gruplarında, RF alan etkilerinin farklı güç ve frekanslarda incelenmesinin faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Liu YX, Tai JL, Li GQ, Zhang ZW, Xue JH, Liu HS, et al. Exposure to 1950-MHz TD-SCDMA electromagnetic fields affects the apoptosis of astrocytes via caspase-3-dependent pathway. *PLoS One*. 2012;7(8):e42332. doi: 10.1371/journal.pone.0042332. PubMed PMID: 22870319; PubMed Central PMCID: PMC3411641.
2. Xu S, Chen G, Chen C, Sun C, Zhang D, Murbach M, et al. Cell type-dependent induction of DNA damage by 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields does not result in significant cellular dysfunctions. *PLoS One*. 2013;8(1):e54906. Epub 2013/01/29. doi: 10.1371/journal.pone.0054906. PubMed PMID: 23355902; PubMed Central PMCID: PMC3552808.
3. Lu Y, He M, Zhang Y, Xu S, Zhang L, He Y, et al. Differential pro-inflammatory responses of astrocytes and microglia involve STAT3 activation in response to 1800 MHz radiofrequency fields. *PLoS One*. 2014;9(9):e108318. Epub 2014/10/03. doi: 10.1371/journal.pone.0108318. PubMed PMID: 25275372; PubMed Central PMCID: PMC34183530.
4. Zhao TY, Zou SP, Knapp PE. Exposure to cell phone radiation up-regulates apoptosis genes in primary cultures of neurons and astrocytes. *Neurosci Lett*. 2007;412(1):34-8. Epub 2006/12/26. doi: 10.1016/j.neulet.2006.09.092. PubMed PMID: 17187929; PubMed Central PMCID: PMC34183530.
5. Chauhan V, Qutob SS, Lui S, Mariampillai A, Bellier PV, Yauk CL, et al. Analysis of gene expression in two human-derived cell lines exposed *in vitro* to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Proteomics*. 2007;7(21):3896-905. Epub 2007/09/29. doi: 10.1002/prot.200700215. PubMed PMID: 17902192.
6. Liu YX, Li GQ, Fu XP, Xue JH, Ji SP, Zhang ZW, et al. Exposure to 3G mobile phone signals does not affect the biological features of brain tumor cells. *BMC Public Health*. 2015;15:764. Epub 2015/08/09. doi: 10.1186/s12889-015-1996-7. PubMed PMID: 26253141; PubMed Central PMCID: PMC34183530.
7. Poulletier de Gannes F, Haro E, Hurtier A, Taxile M, Ruffie G, Billaudel B, et al. Effect of exposure to the edge signal on oxidative stress in brain cell models. *Radiat Res*. 2011;175(2):225-30. Epub 2011/01/28. PubMed PMID: 21268716.
8. Sekijima M, Takeda H, Yasunaga K, Sakuma N, Hirose H, Nojima T, et al. 2-GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields have no significant effect on cell proliferation and gene expression profile in human cells. *J Radiat Res*. 2010;51(3):277-84. Epub 2010/03/11. PubMed PMID: 20215713.
9. Kayhan H, Esmekaya MA, Saglam AS, Tuysuz MZ, Canseven AG, Yagci AM, et al. Does MW Radiation Affect Gene Expression, Apoptotic Level, and Cell Cycle Progression of Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells? *Cell Biochem Biophys*. 2016;74(2):99-107. Epub 2016/06/05. doi: 10.1007/s12013-016-0734-9. PubMed PMID: 27260669.
10. Lahkola A, Auvinen A, Raitanen J, Schoemaker MJ, Christensen HC, Feychting M, et al. Mobile phone use and risk of glioma in 5 North European countries. *Int J Cancer*. 2007;120(8):1769-75. Epub 2007/01/19. doi: 10.1002/ijc.22503. PubMed PMID: 17230523.

11. Boyle P, Levin B, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. World cancer report 2008. Lyon Geneva: International Agency for Research on Cancer; Distributed by WHO Press; 2008. 510 p. p.
12. Hardell L, Carlberg M, Hansson Mild K. Use of mobile phones and cordless phones is associated with increased risk for glioma and acoustic neuroma. *Pathophysiology*. 2013;20(2):85-110. Epub 2012/12/25. doi: 10.1016/j.pathophys.2012.11.001. PubMed PMID: 23261330.
13. Humans IWGotEoCRt. Non-ionizing radiation, Part 2: Radiofrequency electromagnetic fields. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2013;102(Pt 2):1-460. Epub 2013/01/01. PubMed PMID: 24772662; PubMed Central PMCID: PMC4780878.
14. Baan R, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *Lancet Oncol*. 2011;12(7):624-6. Epub 2011/08/17. PubMed PMID: 21845765.
15. Tuysuz MZ: RF alan in vitro maruziyet sistemi oluşturulması ve RF alanın beyin kanserine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2016.
16. Tuysuz MF. An energy-efficient QoS-based network selection scheme over heterogeneous WLAN-3G networks. *Comput Netw*. 2014;75:113-33. doi: 10.1016/j.comnet.2014.09.012. PubMed PMID: WOS:000347602900008.
17. Liu YX, Tai JL, Li GQ, Zhang ZW, Xue JH, Liu HS, et al. Exposure to 1950-MHz TD-SCDMA Electromagnetic Fields Affects the Apoptosis of Astrocytes via Caspase-3-Dependent Pathway. *PLoS One*. 2012;7(8):10. doi: 10.1371/journal.pone.0042332. PubMed PMID: WOS:000307212800082.
18. Perez-Castejon C, Perez-Bruzon RN, Llorente M, Pes N, Lacasa C, Figols T, et al. Exposure to ELF-pulse modulated X band microwaves increases *in vitro* human astrocytoma cell proliferation. *Histol Histopathol*. 2009;24(12):1551-61. Epub 2009/10/02. doi: 10.14670/HH-24.1551. PubMed PMID: 19795354.
19. Kang KA, Lee HC, Lee JJ, Hong MN, Park MJ, Lee YS, et al. Effects of combined radiofrequency radiation exposure on levels of reactive oxygen species in neuronal cells. *J Radiat Res*. 2014;55(2):265-76. Epub 2013/10/10. doi: 10.1093/jrr/rrt116. PubMed PMID: 24105709; PubMed Central PMCID: PMC3951078.
20. Sakurai T, Kiyokawa T, Narita E, Suzuki Y, Taki M, Miyakoshi J. Analysis of gene expression in a human-derived glial cell line exposed to 2.45 GHz continuous radiofrequency electromagnetic fields. *J Radiat Res*. 2011;52(2):185-92. Epub 2011/02/24. PubMed PMID: 21343680.
21. Hirose H, Sakuma N, Kaji N, Suhara T, Sekijima M, Nojima T, et al. Phosphorylation and gene expression of p53 are not affected in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW or W-CDMA modulated radiation allocated to mobile radio base stations. *Bioelectromagnetics*. 2006;27(6):494-504. Epub 2006/05/23. doi: 10.1002/bem.20238. PubMed PMID: 16715525.
22. Wyde M, Cesta M, Blystone C, Elmore S, Foster P, Hooth M, et al. Report of Partial findings from the National Toxicology Program Carcinogenesis Studies of Cell Phone Radiofrequency Radiation in Hsd: Sprague Dawley SD rats (Whole Body Exposure). 2016 Contract No.: 055699.
23. Nylund R, Leszczynski D. Mobile phone radiation causes changes in gene and protein expression in human endothelial cell lines and the response seems to be genome- and proteome-dependent. *Proteomics*. 2006;6(17):4769-80. Epub 2006/08/01. doi: 10.1002/pmic.200600076. PubMed PMID: 16878295.
24. French PW, Donnellan M, McKenzie DR. Electromagnetic radiation at 835 MHz changes the morphology and inhibits proliferation of a human astrocytoma cell line. *Bioelectroch Bioener*. 1997;43(1):13-8. doi: Doi 10.1016/S0302-4598(97)00035-4. PubMed PMID: WOS:A1997XW73000003.
25. Cao Y, Zhang W, Lu MX, Xu Q, Meng QQ, Nie JH, et al. 900-MHz microwave radiation enhances gamma-ray adverse effects on SHG44 cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2009;72(11-12):727-32. doi: 10.1080/15287390902841466. PubMed PMID: 19492235.
26. Kang KA, Lee HC, Lee JJ, Hong MN, Park MJ, Lee YS, et al. Effects of combined radiofrequency radiation exposure on levels of reactive oxygen species in neuronal cells. *Journal of Radiation Research*. 2014;55(2):265-76. doi: 10.1093/jrr/rrt116. PubMed PMID: WOS:000333085300007.
27. Stagg RB, Thomas WJ, Jones RA, Adey WR. DNA synthesis and cell proliferation in C6 glioma and primary glial cells exposed to a 836.55 MHz modulated radiofrequency field. *Bioelectromagnetics*. 1997;18(3):230-6. Epub 1997/01/01. PubMed PMID: 9096841.
28. Miyakoshi J, Takemasa K, Takashima Y, Ding GR, Hirose H, Koyama S. Effects of exposure to a 1950 MHz radio frequency field on expression of Hsp70 and Hsp27 in human glioma cells. *Bioelectromagnetics*. 2005;26(4):251-7. Epub 2005/04/16. doi: 10.1002/bem.20077. PubMed PMID: 15832340.
29. Hirose H, Sakuma N, Kaji N, Nakayama K, Inoue K, Sekijima M, et al. Mobile phone base station-emitted radiation does not induce phosphorylation of Hsp27. *Bioelectromagnetics*. 2007;28(2):99-108. Epub 2006/09/28. doi: 10.1002/bem.20277. PubMed PMID: 17004241.
30. Qutob SS, Chauhan V, Bellier PV, Yauk CL, Douglas GR, Berndt L, et al. Microarray gene expression profiling of a human glioblastoma cell line exposed *in vitro* to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Radiat Res*. 2006;165(6):636-44. Epub 2006/06/29. doi: 10.1667/RR3561.1. PubMed PMID: 16802863.
31. Terro F, Magnaudeix A, Crochetet M, Martin L, Bourthoumieus S, Wilson CM, et al. GSM-900MHz at low dose temperature-dependently downregulates alpha-synuclein in cultured cerebral cells independently of chaperone-mediated-autophagy. *Toxicology*. 2012;292(2-3):136-44. Epub 2011/12/22. doi: 10.1016/j.tox.2011.12.003. PubMed PMID: 22185909.