T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİMDALI

5G TEKNOLOJİSİNİN MİKROGLİAL HÜCRELERDE İNFLAMASYON ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Gülsevinç AKSOY

TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI

ADANA-2024

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİMDALI

5G TEKNOLOJİSİNİN MİKROGLİAL HÜCRELERDE İNFLAMASYON ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Gülsevinç AKSOY

TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) tarafından desteklenmiştir.

ADANA-2024

KABUL ve ONAY

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
"5G Teknolojisinin Mikroglial Hücrelerde İnflamasyon Üzerindeki Etkisinin Araştırılması"
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: / /

TEZ SINAV JÜRİSİ

Dr.
Üniversitesi
Başkan

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 12/01/2024

İMZA

Gülsevinç AKSOY

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Biyoloji Doktora Programı
Tezin Konusu : 5G Teknolojisinin Mikroglial Hücrelerde İnflamasyon Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☐ Doktora: X

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI
Danışmanın İletişim Bilgileri
Telefon :
E-Posta :

Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon :
E-Posta :
Adresi :

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Bu zorlu eğitim sürecimde ve tez çalışmamda bana her zaman destek olan ve yol gösteren sevgili danışmanım sayın Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI' na, yine çalışmalarım sırasında bilgi birikiminden çokça yararlandığım ve bu tez çalışmasında yardımlarını esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Biyofizik ABD'ndan sayın hocam Prof. Dr. Mustafa EMRE'ye en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitim hayatımda bana yardımcı ve yol gösterici olan değerli Çukurova Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ABD Başkanımız sayın Prof. Dr. Davut ALPTEKİN' e, bölümümüz öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Osman DEMİRHAN'a ve sayın Prof. Dr. M. Bertan YILMAZ'a ve ayrıca anabilim dalımızın değerli çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. İnayet Nur USLU'ya ve Dr. Yasin KARAMAZI'ya teşekkür ederim.

2017 yılında başladığım doktora eğitimim boyunca 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında beni maddi açıdan destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

Yükseköğretim Kurulu (YÖK) Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitü'süne destekleri ve yardımları için teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, bugünlere gelmemdeki en büyük paya sahip olan, sevgilerini her zaman hissettiğim ve hissedeceğim biricik anneme, bu günlerde yanımda olmasını en çok istediğim canım babacığıma, ayrıca beni her koşulda koruyup kollayan canım abime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Her zaman yanımda olan, beni her kararımda destekleyen ve bu hayattaki en büyük şansım biricik eşim Hamit Aksoy'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ve ONAY ii
ETİK BEYANI iii
TEŞEKKÜR iv
İÇİNDEKİLER v
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xi
ÖZET xvi
ABSTRACT xvii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Elektrik Yükü 3
2.2. Elektrik Alan 3
2.3. Manyetik Alan 5
2.4. Elektromanyetik Alan (EMA) 6
2.5. Elektromanyetik Spektrum 8
2.6. Radyofrekans Elektromanyetik Alan (RF-EMA) 9
2.7. Özgül Soğurma Oranı (SAR) 10
2.8. RF-EMA'ın Biyolojik Etkileri 11
2.9. Mikroglia 12
2.9.1. Mikroglianın Keşfi ve Kökeni 12
2.9.2. Mikroglia'nın Fonksiyonları 17
2.9.3. Mikroglia ve Nöroinflamasyon 20
2.10. Sitokinler 23
2.10.1. Pro-İnflamatuvar Sitokinler 23
2.10.1.1. İnterlökin 1 Beta (IL-1β) 24
2.10.1.2. İnterlökin-6 (IL-6) 25
2.10.1.3. Tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) 26
2.10.2. Anti- İnflamatuvar Sitokinler 27

2.10.2.1. İnterlökin-10 (IL-10) 28
2.10.2.2. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-β (TGF-β) 29
2.10.3. Nitrik Oksit (NO) 30
3. GEREÇ ve YÖNTEM 31
3.1. Araç ve Gereçler 32
3.1.1. Kimyasal Malzemeler 32
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler 33
3.2. Yöntem 34
3.2.1. N9 Hücrelerinin Özellikleri 34
3.2.2. N9 Hücrelerinin Çözülmesi 35
3.2.3. N9 hücreleri için Büyüme Ortamının Hazırlanması 36
3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması 37
3.2.5. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı 37
3.2.6. 6 GHz RF-EMA Uygulama Düzeneği 38
3.2.7. SAR Değeri Hesaplanması 41
3.2.8. LPS Maruziyeti 41
3.2.9. Hücre Canlılık Testi: MTT 42
3.2.10. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyaması 43
3.2.10.1. AO/EB Boya Kokteyli Hazırlanması 43
3.2.11. NO Ölçümü 44
3.2.11.1. 1 M NaOH Çözeltisinin Hazırlanması 44
3.2.11.2. Nitrit Standartlarının Hazırlanması 44
3.2.11.3. Nitrit Tamponu Hazırlanması 44
3.2.11.4. Nitrat Standartlarının Hazırlanması 45
3.2.11.5. Nitrat Tamponu Hazırlanması 45
3.2.11.6. Nitrit Ölçümü 45
3.2.11.7. Nitrat ölçümü 45
3.2.12. RNA İzolasyonu 46
3.2.13. cDNA Sentezi 47
3.2.14. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (RT-PCR) Gerçekleştirilmesi 47
3.2.14.1. RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi 49

3.2.15. Protein Miktarı Tayini 50
3.2.15.1. Protein Miktarının Ölçülmesi 50
3.2.15.2. ELİSA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Testi 51
3.2.16. İstatistiksel Analiz 52
4. BULGULAR 53
4.1. MTT Yönteminden Elde Edilen Bulgular 53
4.2. Akridin Oranj /Etidyum Bromür Boyaması Bulguları 55
4.3. NO Ölçümü Bulguları 60
4.5. RT-PCR Bulguları 61
4.4. ELISA Bulguları 72
5. TARTIŞMA 82
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 89
KAYNAKLAR 90
ÖZGEÇMİŞ 97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No: **Sayfa No:**

Şekil 1. Noktasal elektrik yüklerin etrafında oluşan elektrik alan çizgileri 5

Şekil 2. **a)** Sağ El Kuralı (19). **b)** Mıknatıslarda manyetik alan çizgileri 6

Şekil 3. Elektromanyetik Spektrum 8

Şekil 4. Beyin gelişimi ve mikroglial oluşum. 15

Şekil 5. Mikroglia'nın Homeostazideki Rolü 19

Şekil 6. M1 ve M2 mikroglia tipleri. 22

Şekil 7. Çalışmanın Grafiksel Özeti. 32

Şekil 8. N9 mikroglial hücrelerin mikroskop altındaki görüntüsü. 35

Şekil 9. 6 GHz RF-EMA düzeneği 38

Şekil 10. Uygulamanın Simülasyonu. 39

Şekil 11. **A.** Elektrik Alan Simülasyonu. **B.** Manyetik Alan Simülasyonu 40

Şekil 12. **a)** Petri Kabının Ortasındaki SAR Simülasyonu (XZ Ekseni). **b)** petrinin yakından görünümü Maksimum SAR=11.882. **c)** Petri kabının üstten görünümü Maksimum SAR=11.882 W/kg. 41

Şekil 13. Lazar Lab ArrowSTRAIGHT markalı NO ölçüm cihazı 44

Şekil 14. Çeşitli sürelerde 6 GHz RF-EMA uygulamasının mikroglia hücrelerinin (N9) canlılığına etkisi 54

Şekil 15. Farklı sürelerde RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin AO/EB boyamasında elde edilen floresan mikroskop görüntüleri 58

Şekil 16. Çeşitli sürelerde 6 GHz RF-EMA uygulamasının mikroglia hücrelerinin (N9) canlılığına etkisi 59

Şekil 17. Çeşitli sürelerde 6 GHz RF-EMA uygulamasının mikroglia hücrelerinin büyüme ortamındaki NO miktarına etkisi 61

Şekil 18. 20 dk 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin Il6, Tnf, Il1b, Nos2 ve Tgf1 genlerinin ekspresyonu bulguları 62

Şekil 19. 1 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin Il6, Tnf, Il1b, Nos2 ve Tgf1 genlerinin ekspresyonu bulguları 64

Şekil 20. 3 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin Il6, Tnf, Il1b, Nos2 ve Tgf1 genlerinin ekspresyonu bulguları 65

Şekil 21. 6 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial Il6, Tnf, Il1b, Nos2 ve Tgf1 genlerinin ekspresyonu bulguları 67

Şekil 22. 12 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin Il6, Tnf, Il1b, Nos2 ve Tgfb1 genlerinin ekspresyonu bulguları. 68

Şekil 23. 24 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin Il6, Tnf, Il1b, Nos2 ve Tgfb1 genlerinin ekspresyonu bulguları. 69

Şekil 24. 24 saat 1µg/mL LPS'ye maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin Il6, Tnf, Il1b, Nos2 ve Tgfb1 genlerinin ekspresyonu bulguları 71
Şekil 25. 20 dk 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinleri için ELISA bulguları 73
Şekil 26. 1 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinleri için ELISA bulguları 74
Şekil 27. 3 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinleri için ELISA bulguları 76
Şekil 28. 6 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinleri için ELISA bulguları 77
Şekil 29. 12 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinleri için ELISA bulguları 79
Şekil 30. 24 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinleri için ELISA bulguları. 80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No: **Sayfa No:**

Çizelge 1. N9 hücreleri için çözdürme ortamının içeriği 35
Çizelge 2. N9 hücrelerinin büyüme ortamının içeriği 36
Çizelge 3. N9 hücrelerinin RF-EMA muamelesi sırasında kullanılan Düşük Serumlu Büyüme ortamının içeriği 40
Çizelge 4. Reverse transkripsiyon için kullanılan reaksiyon bileşenleri 47
Çizelge 5. Revers transkripsiyon reaksiyonunun koşulları 47
Çizelge 6. Hedef genlere özgü dizayn edilen primer çiftleri 48
Çizelge 7. SYBR green RT-PCR reaksiyonu için gerekli bileşenler 48
Çizelge 8. RT- PCR reaksiyonunun aşamaları 49
Çizelge 9. Protein ölçümü için standartların hazırlanması 50
Çizelge 10. Protein ölçümü için standartların ve örneklerin 96 kuyucuklu plakaya aktarımı 50
Çizelge 11. TNF-α protein standardının hazırlanması 51
Çizelge 12. IL-6 protein standardının hazırlanması 51
Çizelge 13. IL-10 ve TGF-β proteinlerinin standardının hazırlanması 51
Çizelge 14. MTT sitotoksisite testine ilişkin bulgular. 54
Çizelge 15. AO/EB boyamasından elde edilen bulgular. 56
Çizelge 16. NO Ölçümünden elde edilen bulgular. 60
Çizelge 17. 20 dk 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları. 63
Çizelge 18. 1 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları. 63
Çizelge 19. 3 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları. 66
Çizelge 20. 6 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları. 66
Çizelge 21. 12 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları. 68
Çizelge 22. 24 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları. 70
Çizelge 23. 24 saat 1 µg/mL LPS maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları. 70
Çizelge 24. 20 dk 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası ELISA bulguları. 72
Çizelge 25. 1 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası ELISA bulguları. 75
Çizelge 26. 3 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası ELISA bulguları. 75
Çizelge 27. 6 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası ELISA bulguları. 78
Çizelge 28. 12 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası ELISA bulguları. 78
Çizelge 29. 24 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası ELISA bulguları. 81

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

1G : 1. Nesil Teknoloji
2G : 2. Nesil Teknoloji
3G : 3. Nesil Teknoloji
4G : 4. Nesil Teknoloji
5G : 5. Nesil Teknoloji
A : Amper
ADAM17 : TNF-α Dönüştürücü Enzim
AH : Alzheimer Hastalığı
ANOVA : Tek Yönlü Varyans Analizi
AO : Akridin Oranj
B : Manyetik Akım Yoğunluğu
BAM : Sınırla İlişkili Makrofaj
BDNF : Beyin Türevli Büyüme Faktörü
c : Işık Hızı
CCL2 : C-C Motif Kemokin Ligand-2
cDNA : Komplementer DNA
Chi3l3 : Kitinaz-3-Benzeri-3
CSF : Koloni Uyarıcı Faktör
CSF1R : Koloni Uyarıcı Faktör-1 Reseptörü
Ct : Döngü Eşiği
CW : Sürekli Dalga
DAM : Hastalıkla İlişkili Mikroglia
DAMP : Hasar ile İlişkili Moleküler Patern
DC : Dendritik Hücre
dk : Dakika
DMSO : Dimetil Sülfoksit
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
E : Elektrik Alan
EB : Etidyum Bromür

ELF : Çok Düşük Frekans

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EMA : Elektromanyetik Alan

EMD : Elektromanyetik Dalga

EMP : Eritro-Miyeloid Progenitör

eNOS : Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz

f : Frekans

FBS : Fetal Sığır Serumu

FGF-2 : Fibroblast Büyüme Faktörü-2

g : gram

GAPDH : Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz

Gbps : Saniyedeki Gigabit

GDNF : Glia Kaynaklı Nörotrofik Faktör

GHz : GigaHertz

H : Manyetik Alan Şiddeti

HRP : Yaban Turbu Peroksidazı

Hz : Hertz

I : Şiddet

IARC : Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı

IFN-α : İnterferon-Alfa

IFN-γ : İnterferon-Gama

IGF : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IL-1 : İnterlökin-1

IL-10 : İnterlökin-10

IL-12 : İnterlökin-12

IL-13 : İnterlökin-13

IL-17A : İnterlökin-17A (IL-17A)

IL-18 : İnterlökin-18

IL-1R : İnterlökin-1 Reseptör

IL-1RA : IL-1 Reseptör Antagonisti

IL-1α : İnterlökin-1 Alfa

IL-1β : İnterlökin-1 Beta

IL-2 : İnterlökin-2

IL-23R : İnterlökin-23 Reseptörü

IL-3 : İnterlökin-3

IL-34 : İnterlökin-34

IL-4 : İnterlökin-4

IL-6 : İnterlökin-6

IL-6R : İnterlökin-6 Reseptörü

IR : Kızıl Ötesi Radyasyon

iNOS : İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentaz

iTreg : İndüklenmiş Düzenleyici T Hücreleri

KBB : Kan-Beyin Bariyeri

kDa : KiloDalton

kg : Kilogram

kHZ : KiloHertz

LF : Düşük Frekans

LIF : Lösemi inhibitör faktör

LPS : Lipopolisakkarit

LTE : Long Term Evolution

m : Metre

mA : MiliAmper

mg : Miligram

MHC : Doku Uygunluk Kompleksi

mHz : MegaHertz

mL : Mililitre

mm : Milimetre

mM : Milimolar

MMP-8 : Metalloproteinaz-8

MMP-9 : Metalloproteinaz-9

mRNA : Mesajcı Ribonükleik Asit

MS : Multipl Skleroz

MSS : Merkezi Sinir Sistemi

MTT : Thiazolyl blue tetrazolium bromide

MW : Mikrodalga

NADPH : Nikotin Adenin Dinükleotid Hidrofosfat

NF-κB : Nükleer Faktör Kappa B

ng : nanogram

NGF : Sinir Büyüme Faktörü

NK : Doğal Öldürücü Hücre

NMDA : N-metil-d-aspartat

nNOS : Nöronal Nitrik Oksit Sentaz

NO : Nitrik Oksit

ºC : Santigrat Derece

OD : Optik Dansite

p Değeri : Olasılık (probability) Değeri

PAMP : Patojen İlişkili Moleküler Patern

PBS : Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PD : Güç Yoğunluğu

pg : Pikogram

PH : Parkinson Hastalığı

PPR : Patern Tanıma Reseptörleri

q : Yük Miktarı

q0 : Deneme Yükü

r : Uzaklık

RF : Radyofrekans

RF-EMA : Radyofrekans Elektromanyetik Alan

RNA : Ribonükleik Asit

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

rpm : Dakikadaki Devir Sayısı

RT-PCR : Gerçek Zamanlı PCR

SCENIHR : Ortaya Çıkan ve Yeni Tanımlanan Sağlık Riskleri Bilimsel Komitesi

SAPK : Aktif-Stres İlişkili Protein Kinazlar

SAR : Özgül Soğurma Oranı

SI : Uluslararası Birimler Sistemi

sn : Saniye

Std : Standart

T : Tesla

TACE : TNF-α Dönüştürücü Enzim

TGF-β : Transformasyon Büyüme Faktörü-Beta

TGF-β1 : Transformasyon Büyüme Faktörü-Beta1

TGF-β2 : Transformasyon Büyüme Faktörü-Beta2

Th1 : Yardımcı T hücresi-1

Th17 : Yardımcı T hücresi-17

Th2 : Yardımcı T hücresi-2

TLR : Toll Benzeri Reseptör

TNF-α : Tümör Nekroz Faktörü-Alfa

Treg : Düzenleyici T Hücreleri

TREM2 : Miyeloid Hücrelerde Eksprese Edilen Tetikleyici Reseptör-2

UV : Ultraviyolet (Mor Ötesi) Işın

V : Volt

W : Watt

YS : Yolk Kesesi

µ : Mikro

µg : Mikrogram

µL : Mikrolitre

µM : Mikromolar

γ : Gama

λ : Dalga boyu

ρ : Kütle Yoğunluğu

Ω : Ohm

ÖZET

5G Teknolojisinin Mikroglial Hücrelerde İnflamasyon Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Teknoloji hızla geliştikçe ve teknolojik aletlerin sayısı ve çeşitliliği giderek arttıkça, insanların RF-EMA'lara maruziyeti de artmaktadır. Dolayısıyla RF-EMA'ların insan sağlığı üzerindeki zararlı etkileri tartışma konusu haline gelmiştir. Beyin RF-EMA'lara en hassas dokulardan birisidir ve son zamanlarda RF-EMA maruziyetinin beyin üzerindeki etkileri aktif bir çalışma konusudur. Bu tez çalışmasında 5G teknolojisinde kullanılan 6 GHz RF-EMA'nın beyindeki immün sistem hücrelerinden olan mikroglia üzerindeki etkisini araştırması amaçlanmıştır.

Bu amaçla N9 mikroglial hücreleri 6 GHz RF-EMA'ya çeşitli sürelerde maruz bırakıldı. Mikroglial hücrelerin RF-EMA maruziyeti sonrası hücre canlılığı MTT testi ve AO/EB boyama ile değerlendirildi. Mikroglial hücrelerinde RF-EMA maruziyetinin TNF-α, IL-6, TGF-β ve IL-10 protein düzeylerine etkisi ELISA testi ile belirlendi. Mikroglial hücrelerinde RF-EMA maruziyetinin *Il6, Tnf, Tgfb1, Il1b* ve *Nos2* genlerinin ekspresyonuna etkisi RT-PCR metodu ile değerlendirildi. Ayrıca mikroglial hücrelerinde RF-EMA maruziyet sonrasında Nitrik Oksit konsantrasyonu ölçüldü.

6 GHz RF-EMA maruziyetinin N9 mikroglial hücrelerinin canlılığının 6. Saatten itibaren azalttığı saptandı. 6 GHz RF-EMA maruziyetinden sonra hücrelerin büyüme ortamındaki NO konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik bulunamadı. *Tgfb1* ekspresyonunun 20 dakika ve 1 saatlik maruziyetten sonra azaldığı, 12 saat ve 24 saatlik maruziyetten sonra ise anlamlı düzeyde arttığı belirlendi. 20 dk, 12 saat ve 24 saat maruziyetten sonra, hücre büyüme ortamındaki IL-6 ve IL-10 protein düzeylerinin anlamlı düzeyde azaldığı, 12 saat maruziyetten sonra TNF-α protein düzeyi artarken, 24 saat maruziyetten sonra TNF-α protein düzeyinin azaldığı belirlendi.

Sonuç olarak bu çalışmasında 5G teknolojisinde kullanılan 6 GHz RF-EMA'nın mikroglial hücrelerde *Tnf* ve *Il1b* gibi pro-inflamatuar sitokinlerin espresyonunu artırırken, IL-6 gibi bir pro-inflamatuar sitokin düzeyini azalttığı belirlendi. Ayrıca yine 6 GHz RF-EMA'nın *Tgfb1* gibi bir anti-inflamatuar sitokinin ekspresyonunu artırdığı ve IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinin düzeyini azalttığı da belirlendi. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, 6 GHz RF-EMA'nın mikroglial hücrelerin sitokin profilini değiştirdiği ileri sürülebilir.

Anahtar Kelimeler: **6 GHz Radyofrekans Elektromanyetik Alan, Mikroglia, Nöroinflamasyon, Pro-inflamatuar sitokinler, Anti-inflamatuar sitokinler**

ABSTRACT

Investigation of Effect of 5G Technology on Inflammation in Microglial Cells

As technology rapidly develops and the number and diversity of technological devices gradually increases, human exposure to RF-EMFs also increases. Therefore, the harmful effects of RF-EMFs on human health have become a matter of debate. The brain is one of the most sensitive tissues to RF-EMFs and recently the effects of RF-EMF exposure on the brain have been an active subject. In this thesis study, it is aimed to investigate the effect of 6 GHz RF-EMF used in 5G technology on microglia which is one of the immune system cells in the brain.

For this purpose, N9 microglial cells were exposed to 6 GHz RF-EMF for various periods of time. Cell viability of microglial cells after RF-EMF exposure was evaluated by MTT test and AO/EB staining. The effect of RF-EMF exposure on TNF-α, IL-6, TGF-β and IL-10 protein levels in microglial cells was determined by ELISA test. The effect of RF-EMF exposure on the expression of *Il6, Tnf, Tgfb1, Il1b* and *Nos2* genes in microglial cells was evaluated by RT-PCR method. Additionally, Nitric Oxide concentration was also measured after RF-EMF exposure.

It was determined that 6 GHz RF-EMF exposure decreased the viability of N9 microglial cells for all other exposure times greater than 6 hours. No change was found in the NO concentration in the growth medium of the cells after 6 GHz RF-EMF exposure. It was determined that while *Tgfb1* expression significantly decreased after exposure for 20 min and 1 hour, it significantly increased after exposure for 12 hours and 24 hours. It was also determined that IL-6 and IL-10 protein levels in the growth medium of the cells significantly decreased after 20 min, 12h and 24h of exposure and also TNF-α protein level significantly decreased after 24h of exposure while TNF-α protein level significantly increased after 12h of exposure.

In conclusion, this study showed that 6 GHz RF-EMF used in 5G technology increased the expression of pro-inflammatory cytokines such as *Tnf* and *Il1b* in microglial cells, while decreasing the protein level of a pro-inflammatory cytokine such as IL-6. It was also determined that 6 GHz RF-EMF increased the expression of anti-inflammatory cytokines such as *Tgfb1* and decreased the protein level of an pro-inflammatory cytokine such as IL-10. Based on these results, it can be suggested that 6 GHz RF-EMA changes the cytokine profile of microglial cells.

Keywords: **6 GHz Radiofrequency Electromagnetic Field, Microglia, Neuroinflammation, Pro-inflammatory Cytokines, Anti-inflammatory Cytokines**

1. GİRİŞ

Modern toplumların gelişmesiyle ve teknolojinin ilerlemesiyle, başta iletişim, tıp ve sanayi olmak üzere günlük yaşamın birçok alanında radyofrekans elektromanyetik alanların (RF-EMA) kullanımı artmıştır (1). RF-EMA'lar radyo, televizyon ve cep telefonları da dahil olmak üzere kablosuz iletişim araçlarının sayısının artışından bu yana, günlük hayatta yaygın olarak kullanılan, frekansı 3 kHz ile 300 GHz arasında değişen elektromanyetik dalgalardır. Son zamanlarda 5. Nesil olan 5G ağ teknolojisi, daha hızlı veri iletim hızı ve daha yüksek iletişim kalitesi nedeniyle popülerite kazanmıştır (2). EMA'lar günlük hayatı oldukça kolaylaştırmasına rağmen, olumsuz etkileri ve tehlikeleri ile ilgili tartışmaları da beraberinde getirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO, DSÖ) EMA'ları 4. büyük kirletici olarak ve Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC, The International Agency for Research on Cancer) ise insanlara olası karsinojenik olarak tanımlamıştır (1).

İnsanların EMA'lara maruziyeti birçok farklı kaynaktan ve gündelik yaşamda birçok durumda meydana gelmektedir (3). Beyinin EMA'lara oldukça hassas organlardan biri olduğu düşünülmektedir ve baş bölgesi vücudun diğer organlarından çok daha fazla RF enerjisini almaktadır. Böylece RF'ye maruz kalmanın beyin fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunup bulunmadığı araştırmaların odak noktası haline gelmiştir (1). Cep telefonları üzerindeki epidemiyolojik çalışmalar, EMA maruziyetinin başta beyin tümörleri olmak üzere baş-boyun bölgesi için diğer kanserler açısından bir risk artışı olmadığını gösteren bazı çalışmalar olmasına rağmen, ayrıca 2. nesil (2G)–4. nesil (4G) iletişim ağları tarafından yayılan RF-EMA'ların insanlar üzerinde baş ağrısı, yorgunluk, uyku bozukluğu ve hatta kanser gibi zararlı etkilere neden olabileceği de bildirilmiştir (2,3).

Mikroglia hücreleri, merkezi sinir sisteminde yerleşik makrofajlar olarak işlev yapan immün hücreleri olup, yetişkin beynindeki toplam hücre populasyonunun yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Mikroglia yolk kesesindeki eritro-miyeloid öncüllerinden köken almakta olup yetişkin beyninin gelişimi ve işlevi için önemlidir (4). Mikroglia, MSS'nin gelişiminin yanı sıra homeostatik durumun sürdürülmesinden sorumludur ve küçük patolojik değişikliklere karşı son derece duyarlıdır. Merkezi sinir sistemindeki bu hücreler, Alzehimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi

nörodejeneratif hastalıklarda ve ayrıca inme ve tramvatik beyin yaralanması gibi akut durumlarda aktif hale gelir, proliferasyon ile sayısını artırır ve inflamasyon sürecini başlatacak fenotipik değişimler geçirir (5,6). Ayrıca IL-6, IL-1β ve TNF-α gibi pro-inflamatuar sitokinleri ve nörotoksik aktivite ile ilişkili Nitrik Oksit, Reaktif Oksijen Türlerini (ROS) salgılamaktadır. Bunun aksine, mikroglia bazı durumlarda da doku yeniden modellenmesini ve doku tamirini destekleyen IL-10, IL-4 ve TGF-β gibi anti-inflamatuar sitokinler salgılamaktadır. Bu durum nörokorumaya katkıda bulunmaktadır (6).

Kompleks elektromanyetik çevrelerde yaşamaya devam edildikçe, insanlar çeşitli frekanslarda çoklu elektromanyetik dalgalara sürekli olarak maruz kalmaya devam edecektir. 5G ağ iletişiminin popüleritesiyle birlikte, 5G iletişiminden salınan RF-EMA'ya maruz kalmanın beyin fonksiyonu üzerindeki etkileri önemli bir endişe haline gelmiştir. Hem bu endişeler hem de yeni bir teknoloji olması sebebiyle daha çok çalışma yapılmasına gerek duyulmaktadır (7). Bu nedenle çalışmamızda, 5G teknolojisindeki bir sınır kabul edilen 6 GHz RF-EMA’nın N9 mikroglia hücrelerinde hücre canlılığına, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerin düzeylerine etkisi araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Elektrik Yükü

Maddenin ana niteliklerinden biri olan elektrik yükü veya bir başka deyişle elektriksel yük, bir cismin üzerinde biriken elektrik yüklerinin cebirsel toplamı olarak ifade edilmekte olup, pozitif veya negatif olmak üzere iki temel parçacıktan oluşmaktadır. Negatif yüklü parçacıklar elektron, pozitif yüklü olanlar ise proton olarak adlandırılır (8). Atomların dış yörüngelerindeki elektronlar, bir atomdan diğer bir atoma hareketini rastgele ve serbestçe sürdürebilir (9). Elektrik prensibinin temelini, bu elektronların bir yerden başka bir yere göçü veya bir yerde birikmesi oluşturur (10). Elektrik yüklerinin temel özelliklerinden birisi; aynı yüke sahip cisimler birbirini çekerken, zıt yüke sahip cisimler birbirlerini itmesidir. Coulomb yasasına göre durgun iki elektrik yükü birbirlerini yüklerinin büyüklüğünün çarpımı ile orantılı ve aradaki uzaklığın karesi ile ters orantılı bir kuvvette iter veya çeker (11,12). Elektrik alan ve manyetik alanın temeli elektriksel yüklere bağlıdır. Elektrik alan (E), iki elektrik yükü arasındaki etkileşimin sonucu meydana gelmekte olup birimi volt/metre (V/m) olarak ifade edilir. Manyetik alan ise yön ve şiddet değerine sahip vektörel bir büyüklüktür (13).

2.2. Elektrik Alan

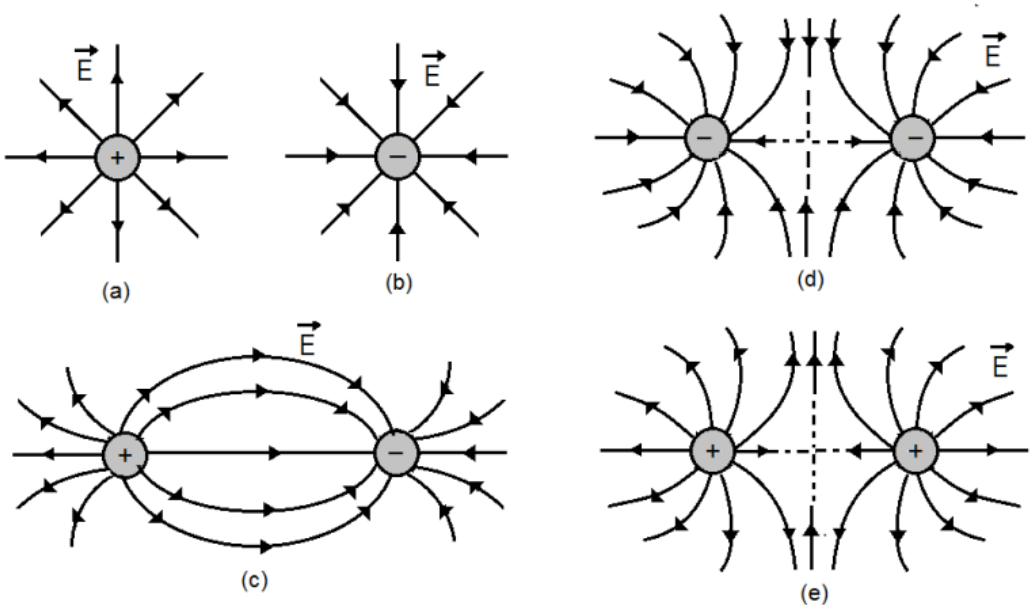
Elektrik alan, yüklü bir nesnenin etrafında oluşan bölge olarak tanımlanır ve bir elektrik yükünün başka bir yük üzerinde yarattığı çekme veya itme etkisini ifade eder (12,14). Elektrik alana başka bir yüklü cisim girdiğinde elektrik kuvveti etki eder. Örneğin, küçük bir q0 deneme yüküne daha büyük bir pozitif yük taşıyan ikinci bir nesne yaklaştırıldığında, deneme yükünün konumundaki elektrik alanın şiddeti, birim yük başına etki eden elektrik kuvveti olarak tanımlanır. Diğer bir deyişle, uzaydaki bir noktadaki E elektrik alanı, o noktaya konulan pozitif bir deneme yüküne etki eden F elektrik kuvvetinin, deneme yükü olan q0 büyüklüğüne bölünmesi ile elde edilir. Bir noktadaki birim yükü etkileyen kuvvet olan elektrik alan (E)

$$\mathrm{E} = \frac{\mathrm{F}}{\mathrm{q}} = \mathrm{k}\frac{\mathrm{q}}{\mathrm{r}^2} e_r$$

şeklinde gösterilir (14). E vektörünün Uluslararası Birimler Sistemindeki (SI) birimi Coulomb başına Newton olup (Newton/Coulomb), yönü alana konulan pozitif deneme yüküne etki eden kuvvetin yönündedir (12). Eğer q yükü pozitif ise elektrik alanı kuvvetle aynı yönde, negatif ise zıt yönde olurlar. Alanın yönü pozitif yüke etki eden kuvvetin yönüdür. Bu denklemde de açıkça görüldüğü gibi; elektrik alan şiddeti, yük miktarı (q) ile artmakta ve uzaklığın (r) karesi ile azalmaktadır. Elektrik alanının şiddeti kaynaktan uzaklaştıkça hızla azalmakla birlikte, bina, ağaç gibi yalıtkan özellikte olan nesneler elektrik alanını engellemektedir (10).

Herhangi bir bölgeye konmuş elektrik yüklü bir cisim üzerine elektriksel kökenli bir kuvvet etki ediyorsa, bu noktada bir elektrik alanın varlığından söz edilir. Ayrıca bir noktada deneme yükünün olup olmadığına bakılmaksızın o noktada elektrik alanı bulunmaktadır (12,14). Bu sebeple elektrik şebekesine bağlı bir lamba yanmıyor olsa bile bir elektrik alan oluşmaktadır (15).

Elektrik alan vektörel bir büyüklük olmakla birlikte, elektrik alanın yönü, elektrik alanı oluşturan yük dağılımının +q0 deneme yüküne uyguladığı kuvvetin yönündedir. Noktalardaki yük dağılımından kaynaklı olarak, elektrik alanların şiddeti ve yönünü göstermek için elektrik alan çizgileri kullanılır. Bu çizgiler pozitif yükten negatif yüke doğrudur. Herhangi bir bölgede bulunan elektrik alan çizgilerinin yoğunluğu, elektrik alanının o bölgedeki şiddeti ile orantılıdır. Pozitif yükün alan çizgileri radyal olarak dışarı doğrudur ve negatif bir yük yoksa sonsuzda biter. Kaynaktan uzaklaştıkça da yoğunlukları azalır (15). Elektrik alan çizgileri Şekil 1'de gösterildiği gibidir.



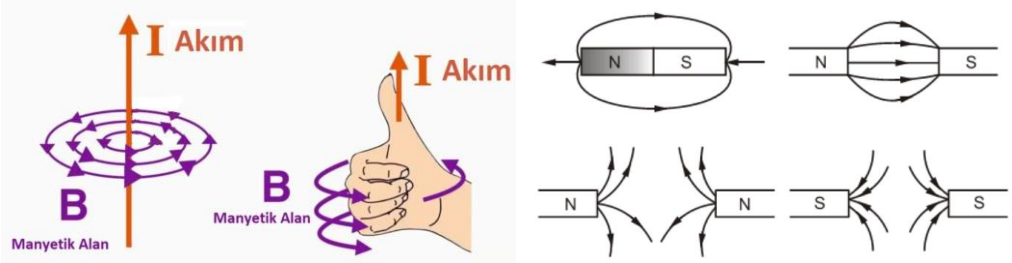
Şekil 1. Noktasal elektrik yüklerin etrafında oluşan elektrik alan çizgileri. **a)** +q noktasal yük etrafında, **b)** –q noktasal yük etrafında, **c)** Zıt işaretli yükler etrafında, d) Negatif yükler etrafında, e) Pozitif yükler etrafında oluşan elektrik alan çizgilerini göstermektedir (16).

2.3. Manyetik Alan

Herhangi bir hareketli elektrik yükünün çevresinde elektrik alana ek olarak bir de manyetik alan bulunmaktadır. Tıpkı elektrik alanda olduğu gibi, herhangi bir manyetik maddeyi de saran bir manyetik alan vardır (12). Manyetik alan, elektrik yükleri yer değiştirdiğinde ortaya çıkabilir veya bir ortamda elektrik akımı olduğunda oluşabilir veya temel parçacıklar tarafından içsel olarak üretilebilir (10). Örneğin, bir lamba yandığı zaman elektrik alanın yanı sıra, akımın kablodan lambaya geçişinden kaynaklı hareketi sonucu bir manyetik alan da oluşmaktadır (15).

Manyetik alan da yine vektörel bir büyüklük olup, yönü ve şiddeti vardır. Manyetik alanda iki kavramdan bahsedilir; manyetik akım yoğunluğu (B) ve manyetik alan şiddeti (H) (13). Manyetik akım yoğunluğunun birimi olarak Tesla (T) veya Gauss kullanılmaktadır. Akım ne kadar büyük olursa, bunun bir sonucu olan manyetik alan da o kadar büyür. Manyetik alan şiddetinin birimi ise Amper/metre (A/m)'dir (17). Manyetik alan vektörü ile yüklerin hareketi birbirine dik konumdadır. Manyetik alan çizgilerinin sık olduğu yerlerde manyetik alan şiddeti daha büyüktür (18). Örneğin; mıknatıslarda oluşan manyetik alan Şekil. 2B'de gösterildiği gibi N kutbundan, S kutbuna doğru olup, manyetik alan kuvvet çizgileri birbirlerini kesmemektedir (10).

Manyetik alan vektörünün yönü sağ el kuralından faydalanarak Şekil 2A'daki gibi belirlenebilir. Bu kurala göre sağ elin baş parmağı akım yönünü gösterirken, diğer parmaklar ise iletken bir tele dolandığında manyetik alan vektörünün yönünü göstermektedir (17).



Şekil 2. a) Sağ El Kuralı (19). **b)** Mıknatıslarda manyetik alan çizgileri (20).

Elektrik alanında olduğu gibi, manyetik alan çizgilerinin sıklığı dolayısıyla manyetik alan şiddeti de uzaklığın karesiyle ters orantılı olarak azalır. Buna karşın manyetik alan, elektrik alanında olduğu gibi engel oluşturan nesnelerce neredeyse hiç engellenmez (10).

Günlük hayatımızda birçok yerde manyetik alan ile karşı karşıya kalmaktayız. İçinden akım geçen her şeyde manyetik alan oluştuğundan, dünyanın dış çekirdeğindeki konveksiyon hareketler nedeniyle, yer kabuğunun da bir manyetik alanı bulunmaktadır. Ayrıca doğadaki her canlının ve maddenin, zayıf da olsa bir manyetik alanı bulunur (21).

2.4. Elektromanyetik Alan (EMA)

Bir elektrik yükünün hareket etmesi sonucunda veya bir kuvvetin etkisi altında bulunan hareket halindeki elektrik yüklü parçacıkların, uzayda oluşturduğu değişiklikler "Elektromanyetik Alan (EMA)" olarak adlandırılmaktadır. Durgun haldeki elektrik yüklerinin çevresinde sadece elektrik alan oluşurken, hareket halindeki elektrik yüklerinin çevresinde ayrıca bir manyetik alan da oluşur. Elektrik alan ve manyetik alan bileşenleri birlikte EMA'yı oluşturmaktadır (22).

Herhangi bir bölgede elektrik alan oluşması için manyetik alana ihtiyaç duyulmamasına rağmen, manyetik alan oluşabilmesi için uzayda değişiklik gösteren elektrik alan olması gereklidir. Elektromanyetik alan ise elektrik alanı ile manyetik

alanın karşılıklı etkileşimi sonucu oluşur. Elektrik alanda bir değişim meydana gelmesi için yüklü cisimleri ivmeli hareket ettirmek gereklidir ve ivmeli hareket eden yükler elektromanyetik dalga yayar. Dolayısıyla bir EMA, belirli koşullar altında, elektromanyetik enerji taşıyan bir dalga hareketi olarak da tanımlanabilir. Elektromanyetik dalgalar (EMD) biçiminde yayılan enerjiye ise elektromanyetik radyasyon (ışınım) denir. Elektromanyetik dalgalar, enine dalgalar olarak tanımlanmakta olup, elektrik ve manyetik alan vektörleri birbirine diktir. Elektrik alan vektörlerinin değişimi ile manyetik alan vektörlerinin değişimi sinüzoidal eğri biçimindedir (15).

EMD boşlukta "c" ışık hızı ($3x10^8$ metre/saniye) ile hareket etmekte olup, uzaklığın karesiyle ters orantılı olacak şekilde çevreye enerji aktarırlar (23). Elektromanyetik ışımalarda iki dalga tepesi arasındaki uzaklığa dalga boyu (λ) denir ve EMD'nin bir salınımda aldığı yolu gösterir (13). Belli bir noktadan bir saniyede geçen dalga sayısı ise o ışımanın frekansıdır (f), birimi ise Hertz (Hz)'dir ve formülü aşağıdaki gibidir:

$$c = \lambda . f$$

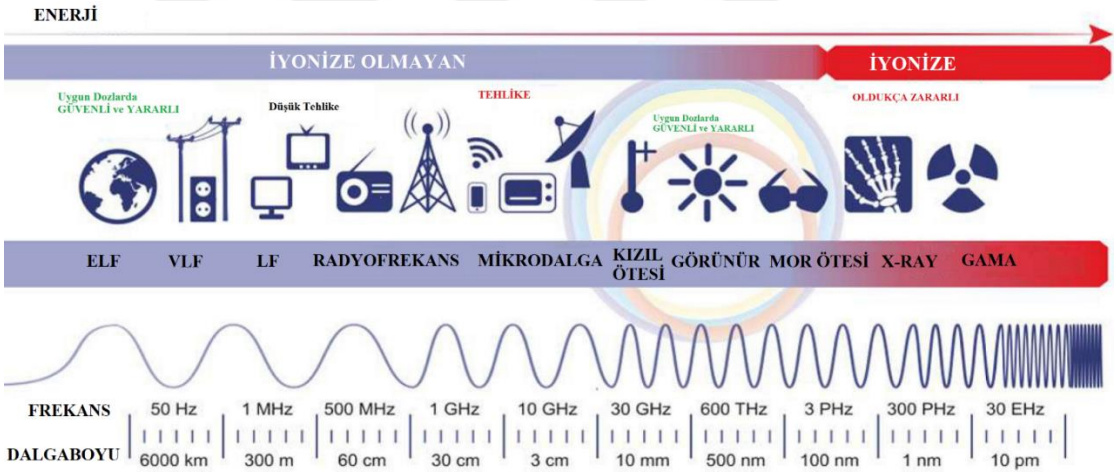
Formülden de anlaşılacağı üzere, frekans arttıkça dalga boyu kısalır ve alanda yayılan enerji artar. Birim yüzeyden geçen ortalama güce ise EMD şiddeti denir ve şiddeti, I ile gösterilir. Elektromanyetik dalgaların yayılmaları için madde ortamına ihtiyaç yoktur (23). Ancak EMD ilerlerken ortamda bir engel ile karşılaşsalar bile hareketine devam edebilirler ve yansıma, kırınım, kırılma ve saçılma davranışı gösterebilirler (13).

Düşük frekanslı EMD "Elektromanyetik Alanlar", yüksek frekanslı EMD ise "Elektromanyetik Radyasyon" olarak isimlendirilmektedir (23). EMA güç hatları, elektrik telleri ve elektrik teçhizatları tarafından üretilmekle birlikte, EMA'nın diğer birçok kaynağı da bulunmaktadır (14). Yapay kaynaklı EMA'lar her evde ev elektrik şebekesi tarafından sağlanan 50-60 Hz elektrik frekansından başlamaktadır. 50-60 Hz'lik temel ev elektrik şebekesinin yanı sıra, bilgisayarlar (MHz), temel ev aletleri ve mikrodalga fırınlar (2450 MHz) bu elektrik manyetik alan yüküne katkıda bulunur. Ofiste standart 50-60 Hz elektrik enerjisinin yanı sıra çok sayıda bilgisayardan gelen

yüksek frekanslı EMA'lar da bulunmaktadır. Son olarak, açık ortamda radyo-televizyon yayınları (300 KHz-500 MHz), cep telefonu istasyonu yayınları (900 MHz ve 1800 Hz) ve radar istasyonu yayınları ile sürekli olarak EMA'lara maruz kalınmaktadır (24).

2.5. Elektromanyetik Spektrum

Elektromanyetik dalgaların, dalga boylarına frekanslarına veya enerjilerine göre sınıflandırılması sonucunda elektromanyetik spektrum oluşturulmuştur (23). Bu spektrumda EMD, en düşük frekanstan başlayarak en yükseğe doğru 9 grup altında toplanmıştır. Bunlar; Çok Düşük Frekans (ELF), Düşük Frekans (LF), Radyo Frekans (RF), Mikrodalga (MW), Kızıl Ötesi Radyasyon (IR), Görünür Işık, Mor Ötesi (Ultraviolet, UV) Işın, X Işını, Gama (γ) ışını ve Kozmik Işınlar şeklindedir (10). Elektromanyetik spektrum Şekil 3'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3. Elektromanyetik Spektrum (25)

Elekromanyetik dalgalar ayrıca canlılar üzerindeki etkileri göz önüne alınarak iyonize ve iyonize olmayan radyasyon olmak üzere de iki sınıfa ayrılmıştır (26). İyonize radyasyon, madde içinden geçerken onları oluşturan atomlardan elektronların ayrılmalarına neden olarak iyonlarına ayıracak enerjiye sahip yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalardır. Bu radyasyon, hücresel hasara ve DNA hasarına neden olabilir. İyonize radyasyon, Mor ötesi radyasyonun bir kısmı (c bandı) ile X ışınları ve Gama ışınlarını kapsar. X-ışınları özelikle tıbbi amaçlı görüntülemede kullanılmaktadır (10). İyonize olmayan radyasyon ise maddeler ile etkileşime girmek ve atomik bağları kırmak için yeterli enerjiye sahip olmayan elektromanyetik dalgalardır. İyonize

olmayan radyasyon, UV ışınların bir kısmı (a ve b bantları), Görünür Işık, Kızılötesi Işınlar, Mikrodalgaları, Radyorekans (RF, radyodalgaları), LF ve ELF'leri kapsar (28). İyonize olmayan radyasyonların, dokular ve hücreler üzerindeki elektrik akımlarının indüksiyonu, kimyasal reaksiyonlar veya ısıtma gibi bazı biyolojik etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır (27).

Spektrumda en düşük frekanslı ELF alanları, evde ve günlük hayatta en çok kullanılan elektronik cihazlardan (50 Hz) yayılır. LF amatör radyoculukta, radyo dalgaları (RF) ise en çok cep telefonu, baz istasyonları ve radar sistemlerinde kullanılır (10).

2.6. Radyofrekans Elektromanyetik Alan (RF-EMA)

RF-EMA, elektromanyetik spektrumun 3 kHz ile 300 GHz bantlarını kapsar ve görünür ışık ile ELF alanlarının arasında bir frekansta yer alır. RF-EMA'ların dalga boyları 100 m-1 mm arasında olup, enerjileri 1 eV'tan çok düşüktür. RF-EMA'lar mikrodalga fırın, televizyon ve radyo vericileri, uzaktan kumanda, cep telefonu ve baz istasyonları gibi birçok farklı kaynaktan yayılabilir. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan RF-EMA kaynağı hiç kuşkusuz cep telefonlarıdır. 1982 yılında kullanılmaya başlanmış olan mobil kablosuz iletişimin birinci nesli (1G) analog teknolojiye dayanmakta olup, 450-900 MHz RF radyasyonu yaymaktadır ve 2.4 kbps ağ hızına sahiptir. 1990'larda kullanılan ikinci nesil (2G) teknoloji dijital tabanlıdır ve kısa mesaj göndermeyi mümkün kılmakta olup, 900-1800 MHz RF radyasyonu yaymaktadır. 2000'li yıllarda kullanılmaya başlanan Üçüncü Nesil (3G) teknolojisi ile görüntülü görüşme olanağı sunulmuş ve 3G'de veri aktarım hızı ve kapasitesi artmıştır. 3G cep telefonları 2000-2600 MHz RF radyasyonu yaymaktadır (29). 2010 yılında kullanılan 4. nesil (4G), kablosuz mobil internet sağlamak amacıyla teknolojisine interneti de dahil etmiş, bant genişliği artırılmış ve erişim maliyeti azaltılmıştır. Ayrıca 4G/4.5G teknolojileri ile daha kaliteli ve hızlı servisler sağlayan teknolojilere geçişler yapılmıştır (17). 2G ve 3G teknolojisiyle karşılaştırıldığında, 4G ve 5G LTE (Long Term Evolution) teknolojisi ile çok daha yüksek hızlı veri aktarımı sağlanmaktadır (23).

Ülkemizde de yeni nesil 5G teknolojisi alt yapı çalışmaları başlatılmıştır. 5G teknolojisi sayesinde; veri iletim hızının 10 Gbps ve daha yüksek hızlarda olması, veri iletim sistemindeki gecikme süresinin en aza indirgenilmesi, yüksek kapasite sistemi ile

veri hacmi etkileşimi bant genişliğinde yüksek miktarlarda veri transferi gerçekleştirilmesi mümkün olabilmektedir. Bunlarla birlikte, enerji verimliliğinde 1000 kata kadar ulaşan iyileştirmeler, cihazların kullanım ömürlerinin arttırılması, küçük boyutlarda baz istasyonları ile kapsama alanların genişletilmesi ve daha geniş coğrafi alanda hizmet verilebilmesi mümkün olacaktır. Yeni 5G spektrumunun frekans band aralığı, 2019'dan bu yana Kuzey Amerika, Avrupa, Okyanusya ve Asya'nın bazı kısımları gibi ticari alanlarda farklı frekans bantlarında kullanıldığından dolayı, 1 GHz ile 100 GHz'e kadar değişen aralıklarda tasarlanmıştır (30). Bu band aralığı oldukça geniş kapsamlı olmakla birlikte, çeşitli haberleşme kuruluşları ve bazı araştırmacılar tarafından farklı band aralıkları belirlenmiştir. Genel olarak 5G spektrumu; 6 GHz altını (sub-6GHz) ve üstünü (top-6 GHz) kapsayacak şekilde iki kategoriye ayrılmıştır. Ayrıca daha spesifik olarak 1 GHz'ın altı (sub-1 GHz), 3 GHz'ın altı (sub-3 GHz) ve 3 GHz'ın üstü (-3 GHz), mm-dalgaların altı (sub-mmWave) ve mm-dalgaları (mmWave) frekanları olacak şeklinde sınıflandırmalar da yapılmıştır (31,32).

2.7. Özgül Soğurma Oranı (SAR)

Canlıların cep telefonlarına maruziyetin sonucunda, dokularda ortaya çıkan ısı artışı gibi biyolojik etkileri incelemek için, özgül soğurma oranı olarak tanımlanan SAR değeri kullanılmaktadır. SAR, EMA maruziyetinden sonra vücut tarafından soğurulan enerji değerinin bir ölçüsü olarak tanımlanmakta olup, genellikle birimi Watt/kg olarak kullanılmaktadır. RF-EMA maruziyetinden sonra, kilogram başına 1 ^{o}C sıcaklık artışı için 4 Watt güç soğurulması gerekmektedir. Genel toplumda SAR değeri, tüm vücut için 0.08 W/kg, işçilerde SAR değeri tüm vücut için 0.4 W/kg olarak kabul edilmektedir. EMA'ların biyolojik etkilerin belirlenebilmesi için SAR değerinin belirlenmesi oldukça önem taşımaktadır. SAR değeri doğrudan ölçülemediği için Elektrik Alan Şiddeti, Manyetik alan şiddeti ve güç yoğumluğu gibi parametreler kullanılarak hesaplanır. Genel anlamda SAR değerinin formülü;

$$SAR = \frac{\sigma|E|^2}{\rho}$$

olarak gösterilmekte olup, burada σ; doku iletkenliği (S/m), ρ; doku kütle yoğunluğunu (kg/m^3) ve E ise dokunun içindeki elektrik alanı şiddetini (V/m) ifade etmektedir. SAR

değeri vücudun kaynağa olan uzaklığı, kaynaktan yayılan güç, maruziyet şekli ve dokuların dielektrik sabiti gibi birçok parametreden etkilenebildiği için hesaplaması oldukça zordur. Bu yüzden SAR değeri hesaplanması için özel olarak tasarlanan bilgisayar simülasyonlarından faydalanmaktadır (27,33).

2.8. RF-EMA'ın Biyolojik Etkileri

RF-EMA'ların biyolojik etkileri; doku üzerindeki maruziyet süresi, frekansı, güç yoğunluğu, aralarındaki uzaklık ve canlının vücut ağırlığı gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. İyonlaştırıcı radyasyon, madde içerisinden geçerken enerjileri sayesinde maddedeki elektronların koparılması ile iyonlaşmaya neden oldukları için, yüksek frekanslı ve yüksek enerjili iyonize radyasyon (X ışınları, gama ışınları vb.) canlıların yapı taşları olan moleküllerin yapısını bozabilmektedir (14). Ayrıca hücrelerin içindeki DNA moleküllerini de etkileyerek veya serbest radikallerin oluşumuna neden olarak kanser gibi ölümcül hastalıklara yakalanma riskini artırmaktadır (10).

Günlük yaşantımızda oldukça sık maruz kaldığımız iyonize olmayan radyasyonun, canlı dokular üzerindeki etkisi termal etkiler ve termal olmayan etkiler olmak üzere iki şekildedir. Termal etkiler, dokuların soğurduğu elektromanyetik enerji ile moleküllerin hareket ederek ısıya dönüşmesi sonucunda dokudaki ısının artışı olarak tanımlanır. Bu ısı artışı vücuttaki termoregülatör sistemler tarafından denge sağlanana kadar devam etmektedir (15). Beyin, göz, kan gibi fazla su bulunan dokulardaki sıcaklık artışı, az su içeren dokulara göre daha fazla olduğu düşünülmektedir (10). Termal etkilerin, dokular üzerinde EMA'ların neden olduğu sıcaklıktaki artışın $1^{o}C$ veya daha fazla olduğunda gözlendiği belirlenmiştir. Termal olmayan etkiler ise, dokularda herhangi bir sıcaklık artışına neden olmadan EMA'ların doğrudan ya da dolaylı olarak canlı dokular üzerindeki etkiler olarak tanımlanmaktadır (22).

2G-4G iletişim ağlarından yayılan radyofrekansın insanlar üzerinde baş ağrısı, yorgunluk, uygu bozukluğu ve hatta kanser gibi zararlı yan etkilere neden olabileceği bildirilmiştir. 2011 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) RF-EMA'ları "insanlar için olası karsinojenik (2B Grubu)" olarak sınıflandırmıştır. Beyin RF'ye en hassas olan organlardan biridir ve baş bölgesi vücudun diğer kısımlarından daha fazla RF enerjisi almaktadır (2).

2.9. Mikroglia

Mikroglia beyinde yerleşik olarak bulunan makrofajlar olup, Merkezi Sinir Sisteminde (MSS) glial populasyonuna ait nöronal olmayan hücreler kategorisindedir. Bu hücreler beyin ve omuriliğin hem beyaz hem de gri maddesinde bulunan yerleşik hücrelerdir. Glial hücrelerin %5-12'sini, beyindeki hücrelerin yaklaşık %10'unu oluştururlar (4). Mikroglia beynin her bölgesinde bulunan ve patolojik uyaranlara ilk cevap verecek olan doğal bağışıklık hücreleridir. MSS'nin doğal immün yeteneğinin büyük bir kısmı mikroglia tarafından düzenlenir (34). Mikroglial hücreler, temel fonksiyonları immün survelansı, bağışıklık savunması ve fagositoz olan beyinde yerleşik immün sistem hücreleri olmalarına rağmen, doku tamiri ve MSS'de homeostaziyi sağlamak için destek de sağlar. Ayrıca mikroglia MSS'nin gelişimi sırasında da gereklidir. Fizyolojik koşullar altında, mikroglial hücreler nöronal gelişim, yetişkin nörojenezi sırasında ve sinaptik iletimi düzenlemede temel roller oynar ve dolayısıyla yetişkin beyninin gelişimi ve işlevi için oldukça önemlidir (35). Mikroglia gerekli olmayan nöronları ve sinapsları ortadan kaldırarak ve farklılaşmasını ve sağkalımını destekleyerek sinaptik budamada yer alır, böylece normal nöronal bağlantının kurulmasında önemli bir rol oynar. Mikroglia ayrıca öğrenme ile ilgili sinapsların oluşumunu teşvik ederek öğrenme ve hafıza gibi daha yüksek bilişsel işlevler ile de ilişkilidir (36).

2.9.1. Mikroglianın Keşfi ve Kökeni

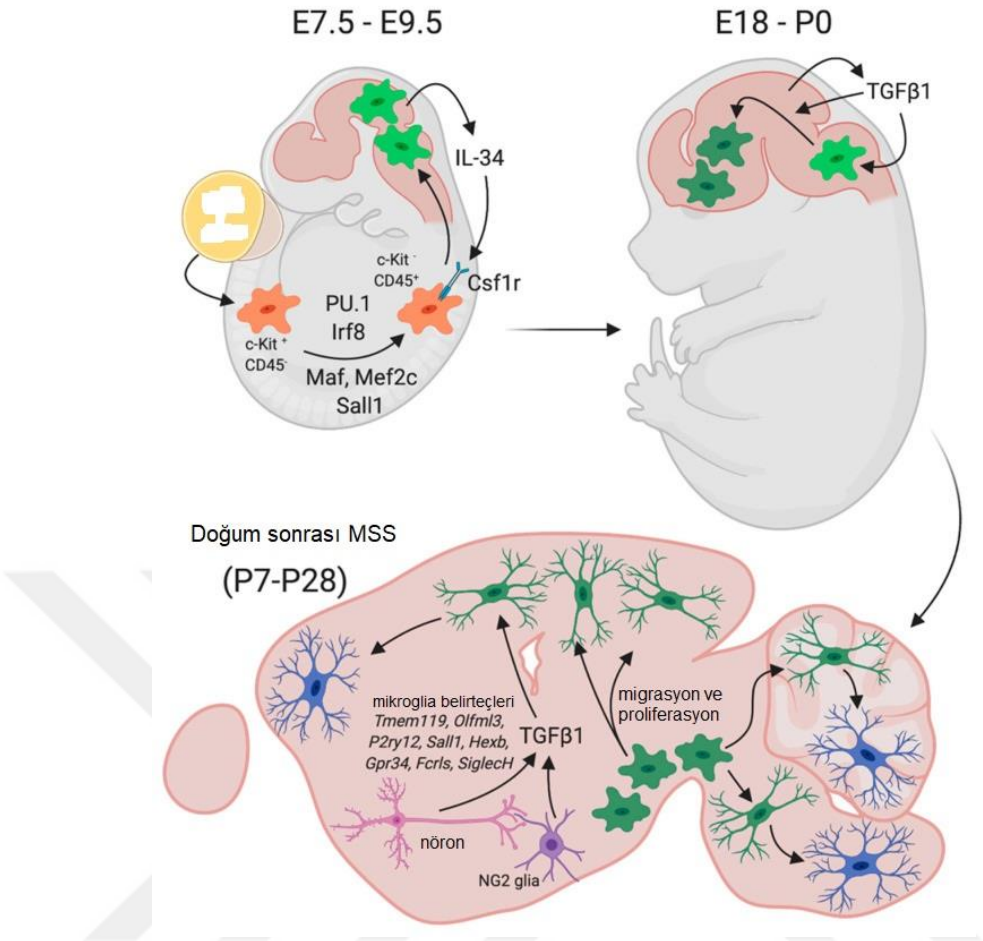
Farklı morfolojilere ve immün fonksiyonlara sahip olmaları nedeniyle mikroglialaların kökenini tanımlamak, araştırmacılar için uzun zamandır devam eden bir tartışma konusu olmuştur (37). Glial hücreler ilk olarak 1856'da Virchow tarafından nöronları bağlayan yapışkan bir malzeme olarak tanımlanmış ve sinir tutkalı anlamına gelen "nevernkitt" olarak adlandırılmış, daha sonra ise "nöroglia" olarak çevrilmiştir. Ancak aslında daha sonra bunların astrositler ve oligodendrositlerden oluşan makroglial populasyona karşılık geldiği belirlenmiştir. Virchow, nöroglia fikrini ortaya attığında nöroglialaların astrositler, oligodendrositler ve mikroglialardan oluştuğu bilinmemekteydi (38). 19. yüzyılın sonlarında ilk kez Franz Nissl mikroglia hücrelerini, göç, fagositoz ve proliferatif potansiyele sahip reaktif glial elementler olarak tanımlamıştır. Yine 19. yüzyılın sonlarında W. Ford Robertson, sinir sisteminde nöronlardan ve nöroglialardan

farklı kökenlere sahip mezoderm kaynaklı fagositik unsurları tanımlamak için "mezoglia" terimini ortaya atmıştır. Ancak yine benzer şekilde mezoglianın aslında oligodendrositlere karşılık geldiği ortaya çıkmıştır. Santiago Ramon y Cajal daha sonra bu hücreleri nöronlardan ve nöroglialardan daha da ayırmak için "sinir sisteminin üçüncü unsuru" olarak yeniden adlandırmış ve bunların muhtemel mezodermal kökenli olduğunu belirtmiştir. Bu "üçüncü element" kavramı, 1919 yılında Ramon y Cajal'ın öğrencisi olan del Rio-Hortega tarafından daha da geliştirilmiş ve oligodendrosit, astrosit gibi "üçüncü element" kapsamında sayılan çeşitli hücre tipleri arasında morfolojik ve işlevsel farklılıklara dayalı bir ayrım yapmıştır. Del Rio-Hortega bu hücreler için "mikroglial hücre" adını vermiş ve bu hücreleri nöronal olmayan, astrositik olmayan MSS bileşenleri olarak yeniden sınıflandırmıştır (37).

Keşfinden sonra uzun bir süre, MSS'de yerleşik doku makrofajları olan mikrogliaların periferal monositler/makrofajlar ve dendritik hücrelere (DC) benzerliklerinden dolayı, dolaşımdaki monositlerden geliştiği ve hematopoietik kökene sahip olduğu düşünülmekteydi. Ancak daha sonra mikrogliaların kesin hücresel soyu ve gelişimsel kökenleri hakkında yapılan çalışmalarda, mikrogliaların erken embriyonik gelişim sırasında yolc kesesindeki ilkel eritro-miyeloid progenitor (EMP) hücrelerden köken aldığı gösterilmiştir (39). Mikroglianın embriyonik yolk kesesinden gelişmesi fikri ilk olarak 1900'lü yılların başında Cuadros ve ark. tarafından önerilmiş olup, daha sonraları Alliot ve ark tarafından yaptıkları çalışmalar ile de desteklenmiştir. Ancak mikroglial kökene ilişkin tartışmalar, bu çalışmalardan sonra bir süre daha devam etmiş, 10 yıl sonra Ginhoux ve ark. tarafından gelişim sırasında mikroglial progenitörlerin E8.5 gündeki yolk kesesindeki ilkel makrofajlardan türediği, daha sonra bu progenitörlerin dolaşım sistemi aracılığıyla beyine doğru göç ettiği ortaya konulmuştur. Ayrıca Schulz ve ark. hematopoez için ve hematopoietik kök hücrelerin üretilmesi için gerekli olan Myb transkripsiyon faktörünün mikroglianın oluşması için gerekli olmadığını göstermesiyle mikroglianın yolk kesesinden türediğine dair önceki çalışmaları doğrulamıştır. Aynı çalışmada, Myb-/- farelerin hematopoietik kökenli monositler/makrofajlarda eksiklik mevcutken, MSS'de normal sayıda mikroglia bulunmuştur. Daha ayrıntılı analizler, mikroglianın CD45-ckit+ EMP'lerden köken aldığını ve bu progenitörlerin CD45+ckit-CX3CR1+ mikroglial hücrelere dönüşüp MMP-8 ve MMP-9 gibi matriks metalloproteinazları kullanarak beyin dokusuna

geçtiğini göstermiştir. Sonuç olarak tüm bu çalışmalar mikroglianın hematopoetik kökenli olmayıp yolk kesesinden köken aldığını desteklemiştir (40).

Şekil 4'de gösterildiği gibi mikroglia ve MSS ile ilişkili yerleşik makrofajların (sınırla ilişkili makrofajlar, BAM'ler) köken aldığı ilkel makrofajlar, PU.1 ve Irf8 trankripsiyon faktörlerine bağımlı bir şekilde E8.5 embriyonik günde yolk kesesindeki erken EMP'lerden gelişir. Monosit türevli makrofajların aksine, bu ilkel makrofajlar, gelişimleri için transkripsiyon faktörü Myb'ye ihtiyaç duymamaktadır. Başlangıçta reseptör tirozin kinaz c-Kit'i eksprese ederken, CD45 ekspresyonundan yoksundur ve daha sonraki olgunlaşma dönemleri sırasında CD45 ekspresyonunu arttırırken, yavaş yavaş c-Kit ekspresyonunu kaybetmektedirler. Birincil kan dolaşım sisteminin kurulmasıyla ilkel makrofajlar, yaklaşık E9.5 embiyo gününde mikrogliayı oluşturacakları gelişmekte olan beyni ve omuriliği doldurmak için nöral tüpe doğru göç etmeye başlar. Bu önemli göç adımı, EMP'ler ve gelişen mikroglia tarafından eksprese edilen Koloni Uyarıcı Faktör-1 Reseptörü (CSF1R) tarafından tanınan İnterlökin-34'ün (IL-34) nöronal ekspresyonuna ve salgılanmasına bağlıdır. CSF1R sinyalizasyonunun aktivasyonu, yetişkin mikrogliasının sürdürülmesi ve hayatta kalması için kritik öneme sahiptir. MSS'de ağırlıklı olarak nöronlar tarafından üretilmekte olan Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (CSF1) ve IL-34 ligandları, CSF1R reseptörü tarafından tanınır. IL-34'ün embriyonik gelişim dönemde bir rolü olmamasına rağmen, yetişkin beyninde mikroglianın homeostazisinin sürdürülmesi için oldukça önemlidir. Ayrıca mikroglial CSF1R sinyallemesi yetişkin mikrogliasının hayatta kalmasına aracılık etmek için de gereklidir. Burada bahsedilen faktörlere ek olarak sinyale bağlı transkripsiyon faktörleri olan Maf, Mef2c ve Sall1 de mikroglia'nın sağlıklı gelişebilmesi için kritik öneme sahiptir (41).



Şekil 4. Beyin gelişimi ve mikroglial oluşum. E8.0 civarında yolk kesesindeki (YS) kan adalarında üretilen ilkel makrofajlar, E8.5 civarında kurulan kan dolaşımının başlangıcında embriyolara yayılır ve E9.0/E9.5'ten nöroepitelyumu kolonize ederek embriyonik mikrogliaya yol açar. Kan-beyin bariyeri (KBB) E13.5'ten oluşmaya başlar. Embriyonik mikroglial hücreler genişler, tüm MSS'yi kolonize eder ve geç gebelik ve doğum sonrası gelişim sırasında ve ayrıca inflamasyona tepki olarak yaralı yetişkin beyninde lokal çoğalma yoluyla yetişkinliğe kadar kendilerini koruyacaktır (41).

Doğum öncesi kan-beyin bariyerinin (KBB) kurulmasıyla birlikte ve doğumdan sonra, mikroglia populasyonu doğum sonrası ilk haftalarda intraparenkimal proliferasyona bağlı olarak artar ve mikroglial proliferasyon ile apoptoz arasındaki sabit bir denge ile yetişkin MSS'de daha da korunur. Bağırsak mikrobiyomu ve doğum sonrası ilk haftalarda olgunlaşan mikrogliaların farklı gelişmekte olan MSS bölgelerindeki çeşitli hücre tipleriyle etkileşimi, bölgeye özgü bir mikroglia heterojenitesinin oluşturulması için kritik öneme sahiptir (41).

Beyin parankiminin prenatal mikroglial kolonizasyonundan ve bunu takip eden doğum öncesi ve sonrası mikroglial çoğalmadan sonra, bu hücrelerin olgunlaşma süreci, onları diğer makrofaj populasyonlarından ayıran mikrogliaya özgü bir gen ekspresyon modelinin oluşması ve indüklenmesiyle daha da karakterize edilmektedir. Mikroglia ile zenginleştirilmiş bu genler, mikroglia homeostatik belirteçleri olarak adlandırılır ve farklı beyin bölgelerinde fizyolojik koşullar altında yetişkin mikroglia tarafından ifade edilir. Tmem119, Olfml3, P2yr12, Sall1, Hexb, Gpr34, Fcrls veya SiglecH dahil olmak üzere bu genlerin ekspresyonu farelerde doğum sonrası ilk iki hafta içinde upregüle halde bulunur ve mikrogliadaki TGF-β (Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta) sinyallemesinin aktivasyonu ile ilişkilidir. İmmünohistokimya ve transgenik yaklaşımlar, NG2-glia hücreleri tarafından salınan nöron türevi TGF-β1 ve TGF-β2'nin, postnatal mikroglia olgunlaşmasının tetiklenmesinde kritik bir rol oynadığını öne sürmektedir. Daha ileri çalışmalarla da TGF-β1'in mikroglianın gelişimi ve olgunlaşması için gerekli olduğunu açıkça gösterilmiştir. MSS'de TGF-β1 eksprese edilememesi, hücre dışı TGF-β1 işlenmesindeki ve aktivasyonundaki bozulma veya hücre dışı TGF-β1 işleme ve aktivasyonunun bozulması veya TGF-β1'in reseptörü olan Tgfbr2 (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Reseptörü-2) geninin delesyonu aracılığıyla mikroglial TGF-β1 sinyalinin susturulması, homeostatik mikroglia belirteç ekspresyonunun eksikliği ile karakterize edilen durumlar mikroglia olgunlaşmasında bozulmalara neden olmaktadır. Her ne kadar TGF-β1 ve mikroglial TGF-β sinyallemesinin, doğum sonrası mikroglia olgunlaşmasının önemli düzenleyicileri olduğu belirlenmiş olsa da farelerde ve insanlarda nihai mikroglia farklılaşması ve olgunlaşma süreçlerinde başka moleküler ve hücresel mekanizmalarının da yer aldığı düşünülmektedir (41).

Tek hücreli transkriptomik analizler ile mikrogliaların heterojen bir hücre populasyonu olduğu tespit edilmiştir. Transkriptomik ve epigenetik analizler, mikroglial gelişimin üç aşamasının varlığını ortaya koymuştur. Erken mikroglia, yolk kesesindeki progenitör hücrelerin oluşmasından E14'e kadar geçen süreyi, Pre-mikroglia E14. günden erken postnatal döneme kadar olan süreyi ve son olarak yetişkin mikroglia ise postnatal süreci kapsamaktadır. Ayrıca, mikroglianın her bir gelişimsel süreci, belirli sinyalleşme basamakları ve işlevleriyle karakterize edilmektedir (42).

2.9.2. Mikroglia'nın Fonksiyonları

Mikroglia, MSS gelişiminin tüm aşamalarında çeşitli fizyolojik işlevleri gerçekleştirmektedir. Mikroglianın ilk temel fonksiyonu çevrelerindeki değişiklikleri belirlemektir. Mikroglia, beyindeki hemen hemen tüm hücre türleri ile etkileşime girerek, MSS homeostazisinin geliştirilmesi ve sürdürülmesine ilişkin çeşitli süreçlere aracılık eden dinamik hücrelerdir. Ayrıca hasar gören bölgeye gitme, sinapsları yeniden modelleme ve miyelin homeostazisini sürdürme gibi fizyolojik fonksiyonları yerine getirmektedir. MSS'nin erken gelişimi sırasında ve yetişkin beyninde mikroglia, fagositoz ve ölen nöronların ortadan kaldırılması yoluyla nörojenezi kontrol edebilmektedir (39). Hasarlı ajanların, apoptotik hücrelerin ve yanlış katlanmış proteinin ortadan kaldırılmasından da sorumludurlar (43).

Mikroglia patojen ile ilişkili moleküler paternler (PAMP'lar) ve Hasar ile ilişkili Moleküler Paternler (DAMP'lar) gibi uyaranlara karşı koruma sağlamaktadır (34). PAMP ve DAMP'ların tanınması ve yine mikroglial hücreler tarafından gerçekleştirilen fagositoz süreci, iki farklı türde reseptöre bağlıdır. Bunlar, birincil enflamasyonu uyaran patojenlerin tespit edilmesine izin veren Toll benzeri reseptörler (TLR) ve anti-inflamatuar yanıt için kritik olan Miyeloid Hücrelerde Eksprese Edilen Tetikleyici Reseptör-2 (TREM2) reseptörleridir (43). TLR'ler birincil enflamasyonu uyaran patojenlerin tanınmasından sorumludur. TLR'ler uyarıldığında ve patojenler fagosite edildiğinde proinflamatuar bir yanıt üretilir, ancak apoptotik materyal ortadan kaldırıldığında ve fosfatidilserin kalıntıları tanımlandığında anti-inflamatuar bir yanıt üretilmektedir (44). Mikroglia sadece fagositozu düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda NGF (sinir büyüme faktörü) ve TNF (Tümör Nekroz Faktörü) gibi çözünür faktörlerin salgılanması ve reaktif oksijen türlerinin üretimi yoluyla nöronların ve sinir öncüllerinin programlanmış hücre ölümünü de düzenleyebilmektedir (39).

Mikroglial hücreler ayrıca gelişim, yetişkinlik ve yaşlanma aşamaları boyunca diğer işlevleri de korur. Tremblay ve ark. tarafından yürütülen araştırma, mikroglianın gelişmekte olan beyindeki sinaptik yeniden şekillenme ve plastisitedeki rolünün yanı sıra sinapsların gelişiminde önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. Homeostazinin sürdürülmesi, doku iyileşmesinin desteklenmesi, nöronlar ve dokular için survelans faaliyetlerinin yürütülmesi gibi işlevlerin yerine getirilmesinden sorumludurlar. Mikroglia normal beyin fonksiyonu için gerekli olmakla birlikte, düzenlenmemiş veya

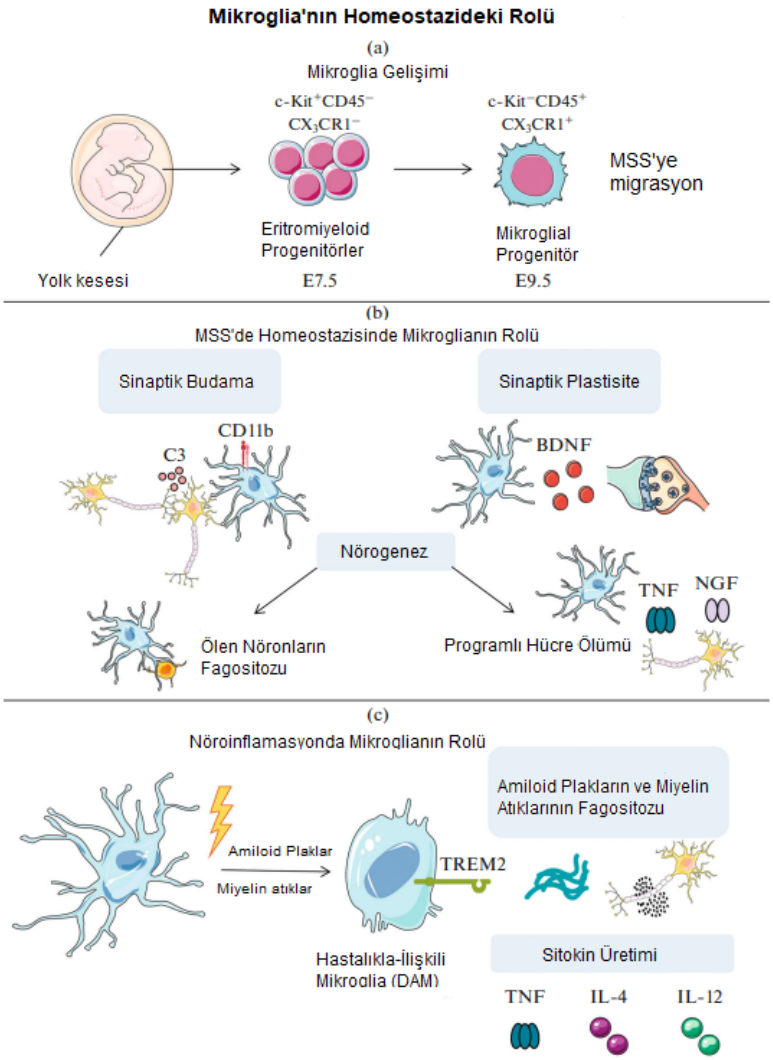
aşırı aktif mikroglia nörotoksisiteye neden olabilir. Takeuchi ve ark. göre, aktive olmuş mikroglia tarafından glutamat salınımı, hücre dışı otonom nöronal hasarın oluşmasında bir faktördür. Tremblay ve ark. göre, aktive olmuş mikroglia, Nikotin Adenin Dinükleotid Hidrofosfat (NADPH) oksidaz enzimi aracılığıyla reaktif oksijen türleri (ROS) üretebilir ve zayıf KBB işlevini indükleyebilir. Aktive olmuş mikroglial hücreler tarafından üretilen çeşitli nörotrofik faktörlerin nöronların hayatta kalması üzerinde etkisi vardır. Bu nörotrofik faktörler arasında, İnterlökin-3 (IL-3) ve IL-10, nörotrofin-4/5, Sinir Büyüme Faktörü (NGF), TGF-β, Glia Kaynaklı Nörotrofik Faktör (GDNF) ve Fibroblast Büyüme Faktörü-2 (FGF-2) yer almaktadır. Mikroglial hücreler hem sinaptik işlevi hem de sinaptik gelişimi kontrol etmekten sorumludur. Nöral öncül hücre havuzlarının aktivitesi mikroglial hücreler tarafından kontrol edilir (38).

Mikroglial hücreler, nöral öncül hücreler nöronlara dönüştüğünde oluşan ve gerekenden daha fazla sinaps üreten ekstra sinapslardan kurtulmaktan sorumludur. Sinaptik budama olarak bilinen bu süreç, sinirsel iletimlerin verimliliğini artırmak için gerekli olan sinaptik yapıların ortadan kaldırılmasıyla karakterizedir. Sinaptik budama, komplemana bağımlı bir yol aracılığıyla, yani mikroglia yüzeyindeki CD11b'nin (CR3) sinaps bölgesindeki C3 proteini ile etkileşimi aracılığıyla gerçekleştirilir (39).

Mikroglia, öğrenme ve hafızanın hücresel temeli olan sinaptik plastisitede de rol oynamaktadır. Aynı zamanda mikroglia, çeşitli nörotrofik faktörleri, özellikle de sinaptik yeniden yapılanmanın önemli bir düzenleyicisi olan Beyin Türevli Nörotrofik Faktörünü (BDNF) salgılayabilmektedir. Bu nedenle, CX3CR1+ mikrogliadaki BDNF'nin tamoksifen ile indüklenebilir silinmesi, öğrenme süreci sırasında sinaps oluşumunda azalmanın yanı sıra, sinaps oluşumundan sorumlu genlerin ekspresyonunun azalmasına yol açmaktadır (39).

Doğal immün hücreleri olan mikroglia immün survelance da aktif rol oynar. Mikroglia mikroçevrelerini aktif şekilde aramak için kendi süreçlerini kullanır. Diğer immünite ile ilgili aktiviteler, periferde başlatılan inflamatuar süreçlerin yayılmasını içerir. Bu yanıtlar beyin ve immün sistem arasındaki koordinasyon için oldukça önemlidir. Enfeksiyon ve hastalıklarda mikroglia aktif hale gelir ve inflamatuar hücresel düzenleyiciler olarak işlev yapar. Aktif mikroglia hızlı bir şekilde transkripsiyonel profillerini değiştirir ve inflamatuar sitokin ve kemokin üretimi ile MSS'nin makrofaj benzeri aktivitelerini gerçekleştirir. Aktif mikroglia, hücre yüzeyinde reseptör

ekspresyonunu değiştiren hücre iskeletinde yeniden düzenlemeler geçirir. Bu değişiklikler mikroglianın hasarlı veya enfeksiyon bölgesine göçmesine ve fagositik etkinliklerini artırmasına izin verir (45).



Şekil 5. Mikroglia'nın Homeostazideki Rolü. **a)** Mikroglia erken embriyogenez sırasında yolk kesesindeki EMP hücrelerinden köken almaktadır. EMP hücreleri PU.1 ve IRF-8 bağımlı yolaklar aracılığıyla mikroglial progenitörlere farklılaşıp MSS'ye kolonize olmaktadır. **b)** Yetişkin organizmalarda MSS homeostazisinin sürdürülmesinde, mikroglia sinaptik yapıları elimine edebilmektedir. Ayrıca mikroglia ölen nöronların fagositozu ve programlanmış hücre ölümünün aktivasyonuyla nörogenezisi düzenlemektedir. **c)** Nöroinflamasyon, mikroglial aktivasyonunu başlatabilen β-amyloid plaklar ve miyelin atıkları ile ilişkilidir. Aktifleşmiş mikroglia fenotipi TREM2-bağımlı fagositik aktivite ile karakterizedir. Hastalıkla ilişkili mikroglia (DAM) çeşitli sitokinleri üretebilmektedir (39).

Sonuç olarak mikroglia, MSS homeostazisinin korunmasında, nörogenezde, sinapsların oluşumunda ve ortadan kaldırılmasının yanı sıra bilişsel işlevlerin oluşumunda aktif olarak rol oynamaktadır (39).

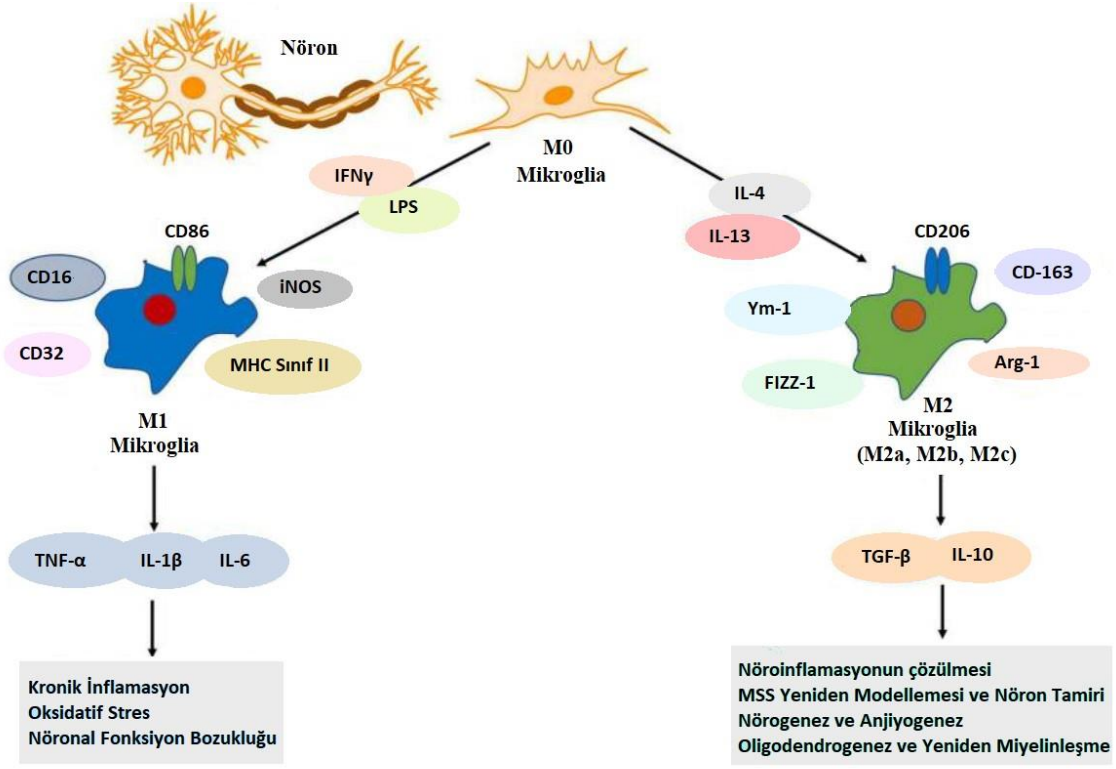
2.9.3. Mikroglia ve Nöroinflamasyon

Nöroinflamasyon, merkezi sinir sistemindeki viral/bakteriyel enfeksiyonları önlemek, bu patojenleri ortadan kaldırmak ve hücre artıklarını veya yanlış katlanmış peptitleri/proteinleri ortadan kaldırmak için gelişen doğal bir bağışıklık tepkisidir (46). Nöroinflamasyon, sitokinlerin, kemokinlerin, reaktif oksijen/azot ürünlerinin ve hücrelerden mikroçevreye ikincil habercilerin salgılanması yoluyla meydana gelir. Sinir sisteminin sağlığının korunmasında önemli bir rol oynayan nöroinflamasyonun ortadan kaldırılamaması ve kronikleşmesi, başta nöronlar olmak üzere MSS'deki tüm hücreler için tehdit oluşturmaktadır (47). Üstelik bu kronik nöroinflamasyon, MSS'de birçok hastalığın oluşmasına ya da ilerlemesine neden olmaktadır. Mikroglia nöroinflamasyonda birincil rol oynamaktadır. Aktive olmuş mikroglia, inflamazom adı verilen çoklu protein komplekslerini aktive eder. Aktivasyon sırasında, mikroglialaların transkripsiyonel profili değişir ve inflamatuar sitokinler ve kemokinler salgılanır (38).

Uyaranlara yanıt olarak mikroglia, TNFα, İnterlökin-1-Beta (IL-1β), İnterlökin-6 (IL-6) gibi pro-inflamatuar sitokinleri ve C-C Motif Kemokin Ligand-2 (CCL2) ve İnterlökin-18 (IL-18) gibi kemokinleri üreterek başka hücrelerin bu bölgeye gelmesini sağlar ve patojen ajanları ortadan kaldırır. Nöroinflamasyon nörokoruyucu bir mekanizma olmasına rağmen, uzun süren nöroinflamasyon nörotoksisiteyi indükleyebilir ve nörodejenerasyona neden olabilir. Yaşlanma ve kronik stresle başa çıkmaya çalışan mikroglia distrofik bir morfoloji ve aşırı bir inflamatuvar yanıt sergiler (34).

Mikroglia, morfolojilerine, yüzey belirteç ekspresyonuna ve fiziksel özelliklerine dayalı olarak M1 ve M2 olmak üzere 2 farklı fenotipe sınıflandırılabilirler. MSS'de mikroglia, onların aktif durumlarına bağlı olarak pro-inflamatuar veya nörokoruyucu olabilir. Patojenlerden veya hasarlı hücrelerden kaynaklanan atıklar, dinlenme halindeki mikrogliayı aktif hale getirerek, nörodejeneratif hastalıklarda zararlı etkileri olan IL-1β, TNF-α, IL-6, Nitrik Oksit (NO) ve proteazlar gibi pro-inflamatuar faktörleri eksprese ederler. M1 fenotipi olarak adlandırılan bu mikroglia sınıfı, pro-

inflamatuar ve nörotoksik aktiviteler gösterir ve CD16, CD32, CD86, iNOS ve Majör Doku Uygunluk Komplesi (MHC) sınıf II gibi hücresel belirteçleri yüksek düzeyde eksprese etmektedir. Bunun aksine, İnterlökin-4 (IL4), İnterlökin-10 (IL-10), İnterlökin-13 (IL-13) ve TGF-β ise nörokoruyucu mikrogliayı aktive eder ve CD163, FIZZ1, Kitinaz-3-Benzeri-3 (Chi3l3), Ym1, CD206, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1) ve Arjinaz 1 gibi farklı faktörlerin salgılanmasına neden olur. Mikrogliadan salgılanan bu faktörler nörokoruma ve doku iyileşmesi ile ilişkili olabilir. M2 mikroglia, inflamatuar sönümleme, atık temizleme ve doku yeniden şekillenmesinde rol oynar. Ayrıca farklı moleküler imzalarına ve fonksiyonel profillerine dayalı olarak, M2 mikroglia M2a, M2b ve M2c olmak üzere daha alt sınıflara ayrılabilir. M2a-benzeri fenotip anti-inflamatuar sitokinler ve büyüme faktörleri salgılamakta ve fagositik aktiviteyi artırmaktadır. M2b benzeri fenotip, immünosupresyon ve doku homeostazisi ile ilişkilidir ve edinilmiş bir deaktivasyon olan M2c benzeri fenotip ise, bağışıklık düzenlemesi, doku onarımı ve yeniden yapılanmada rol oynar (48). M1 ve M2 mikroglia ve ilgili sitokinler Şekil.6'da gösterildiği gibidir.



Şekil 6. M1 ve M2 mikroglia tipleri. Hastalık veya hasar gibi beyin homeostazisinin bozulmasına yanıt olarak, mikroglia nörodejenerasyon ve doku tamirinde faklı rolleri olan M1-benzeri ve M2-benzeri aktivasyon durumuna doğru polarize olmaktadır. IFN-γ (İnterferon-γ) ve Lipopolisakkarit (LPS) gibi klasik pro-inflamatuar uyarıları bakımından zengin bir çevre dinlenme durumundaki mikroglianın M1 fenotipine polarizasyonuna teşvik etmektedir. M1-benzeri mikroglia IL-1β, TNF-α, IL-6 ve iNOS gibi fenotipik protein belirteçlerinin ekspresyonlarının artması ile karakterizedir ve beyin onarımını bozan ve kronik inflamasyona, oksidatif strese ve uzun-dönem nörolojik bozukluklara katkı sağlayan pro-inflamatuar sitokin, kemokin ve serbest radikal salgılarlar. Buna karşın, IL-4 veya IL-13 bakınımdan zengin nöroinflamatuar bir çevre M2 fenotipinin gelişimine katkı sağlar. M2 benzeri fenotip CD206, CD163, FCγR, Arjinaz 1, Ym-1 ve TGF-β gibi protein belirteçlerini yükseltirler. M2-benzeri mikroglia anti-inflamatuar sitokinler, nörotrofik faktörler ve proteazlar salgılar ve artmış fagositik aktiviteye sahiptir. M2-benzeri mikroglia immün baskılamayı ve M1-aracılı nöroinflamasyonun çözülmesini teşvik eder nörogenez, anjiyogenez, oligodendrogenez ve remiyelinasyon gibi süreçleri modüle ederek MSS'nin yeniden şekillenmesine ve onarımına katılırlar (48).

2.10. Sitokinler

Sitokinler hem doğuştan hem de kazanılmış bağışıklık sistemi hücreleri dahil birçok hücre tarafından salgılananan küçük moleküller olup, bağışıklık tepkisindeki çeşitli fonksiyonları spesifik reseptörler aracılığıyla düzenleyebilirler (49). Sitokin genel bir isim olarak kullanılsa da monokin (monositler tarafından üretilen sitokinler), lemfokin (lenfositler tarafından üretilen sitokinler), kemokin (kemotaktik aktiviteye sahip sitokinler) ve interlökin (lökositler tarafından üretilen sitokinler) gibi isimleri de bulunmaktadır (50). Sitokinler, çok yüksek etkilere sahip olan bir grup küçük polipeptitten (8-30 kDa) oluşur (51). İlgili hedef hücrelerin tipine ve gelişim durumuna bağlı olarak çoğalma veya farklılaşma işlevlerini gösterebilirler (52). Çoğu sitokin, çok düşük konsantrasyonlarda (pikomolardan nanomolara kadar) olsalar bile, etkilerini gösterebilmeleri için yeterlidir (51). Sitokinler hayatta kalma, büyüme ve farklılaşma dahil olmak üzere hücresel aktiviteleri düzenlemek için kendilerini salgılayan hücrelere (otokrin etki), yakındaki hücrelere (parakrin etki) veya bazı durumlarda uzak hücrelere (endokrin etki) etki edebilir (50,51).

Farklı hücre tiplerinin aynı sitokini salgılaması veya tek bir sitokinin birkaç farklı hücre tipine etki etmesi (pleiotropi) yaygındır. Benzer fonksiyonlar da farklı sitokinler tarafından uyarılabilmektedir. Bir sitokin, hedef hücrelerini ek sitokinler üretmek için uyardıklarından dolayı, genellikle bir kaskatta üretilirler (50). Hedef hücrelerin yüzeylerinde buılunan spesifik resptörlere bağlandığında etki gösterirler. Esas olarak lökositlerde üretilmekte olup, monositler, lenfositler, makrofajlar ve bazı somatik hücreler tarafından salgılanırlar (17). Periferal sinir harabiyetinden sonra, hasar bölgesinin etrafında toplanan mikroglia ve Schwan hücreleri de sitokin salgılar (50).

Sitokinler ayrıca hastalık, yaralanma ve enfeksiyona yanıt olarak hızla up-regüle olmakta ve bu akut patolojik durumlarda doku onarımında önemli bir rol oynar. Bu peptitler tipik olarak periferik dokulardaki etkilerine göre pro-inflamatuar veya anti-inflamatuar olarak sınıflandırılmıştır (51).

2.10.1. Pro-İnflamatuar Sitokinler

Proinflamatuar sitokinler, çoğunlukla aktive edilmiş makrofajlar tarafından üretilir ve inflamatuar reaksiyonların up-regülasyonunda rol oynar. Çeşitli bakteriyel ve viral enfeksiyonlar sırasında aşırı inflamasyon sonucunda, pro-inflamatuar sitokinlerin sentezindeki artış, konak için zararlı olabilmektedir (50).

2.10.1.1. İnterlökin-1 Beta (IL-1β)

IL-1 ailesi, IL-1α, IL-1β ve endojen bir IL-1 reseptör antagonisti (IL-1RA) dahil olmak üzere birçok farklı proteinden oluşur. IL-1α esas olarak parakrin ve otokrin sinyalleşmeye katıldığı düşünülen membrana bağlı bir protein olarak bulunurken, IL-1β tipik olarak çözünür, salgılanmış bir formda bulunur (51). IL-1β hücre hasarı, enfeksiyon, invazyon ve inflamasyon sırasında makrofajlar, mikroglia, B hücreleri, monositler ve DC'lerin yanı sıra fibroblast ve endoteliyal hücreler gibi immün olmayan hücreler tarafından da üretilmektedir (49,50).

Bu sitokin, vücutta inflamatuar reaksiyonların ana düzenleyicisidir ve B hücresi olgunlaşması, T hücrelerinin uyarılması, doğal öldürücü (NK) hücrelerin aktivasyonu ve inflamatuar cevaplara neden olan mikroglia ve makrofaj aktivasyonu için kritik öneme sahiptir. Ayrıca IL-1β, çok sayıda inflamatuar sitokin ve kemokinin ekspresyonunu indüklemek, inflamatuar bölgelere lökosit infiltrasyonunu sağlamak, immün hücrelerin fagositik aktivitesini artırmak, kompleman sistemin aktivitesini artırmak ve adaptif immün cevapların aktivitesini artırmak gibi işlevleri gerçekleştirerek doğal bağışıklığı aktive etme yeteneğindedir (53). IL-1β, hücre içinde pro-IL-1β olarak adlandırılan ve 31 kDa büyüklüğünde bir inaktif form olarak üretilmektedir. Makrofajlar üzerindeki Patern Tanıma Reseptörlerinin (PRR), patojenlerde bulunan PAMP'lara (patojenle ilişkili moleküler motif) bağlanmasına cevap olarak kaspaz-1 tarafından proteolitik kesim ile aktifleşmekte ve gen ekspresyonunu kontrol eden yolakların düzenlenmesine neden olmaktadır (54). IL-1β sinyal iletimi, birçok farklı hücrede eksprese edilen tip 1 İnterlökin-1 Reseptör (IL-1R) aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu bağlanma ile hücre içi adaptör proteinleri harekete geçmekte ve sonuçta Nükleer Faktör Kappa B (NF-Kb) yolağı aktivasyonuna ve birçok pro-inflamatuar sitokin ve kemokinin indüklenmesine neden olmaktadır. Deneysel beyin hasarına ilişkin hayvan modellerinde, lökositlerin IL-1β aracılı toplanmasını ve diğer inflamatuar olayların nöronal hücre ölümüne yol açtığını, dolayısıyla IL-1β'nin nöroinflamasyon ve nöron ölümü arasında bağlantı olduğunu göstermektedir (49). IL-1β ekspresyonu, MSS'deki mikroglia ve astrositlerde periferik sinirdeki yaralanmayı takiben ve travma sonrasında artar (50).

2.10.1.2. İnterlökin-6 (IL-6)

B hücresi farklılaşma faktörü, T hücresi farklılaşma faktörü, hibridoma/plazmasitoma büyüme faktörü ve hepatosit uyarıcı faktör gibi çeşitli isimlerle de bilinen IL-6, 26 kDa'lık bir glikoproteindir (51). IL-6 hem makrofajlar, DC'ler, T hücreleri, B hücreleri, astrositler ve mikroglia gibi immün hücreler hem de adipoz, fibroblast, endotelyal hücreler ve nöronlar gibi immün olmayan hücrelerden salgılanır (55). Bu sitokinler çok sayıda biyolojik fonksiyona sahiptir, ancak özellikle T hücresi farklılaşması, B hücresi farklılaşması ve hepatositlerde akut faz tepkisi için önemlidir (49). IL-6 reseptörü (IL-6R) ise, hepatositler, bazı lökositler ve mikroglia gibi sadece sınırlı hücrelerde bulunur, oligodendrodit ve astrositlerde bulunmamaktadır (55).

IL-6R, içsel sinyal iletim kapasitesinden yoksundur. Bu nedenle sinyalleme, IL-6/IL-6R kompleksinin β-reseptör gp130'a bağlanması yoluyla indüklenir, bu da istenmeyen, spesifik olmayan hücresel aktivasyonu önler. Bu kompleksin bağlanmasının, JAK/STAT, ERK ve PI3 kinaz gibi aşağı yöndeki hedeflerin fosforilasyonu yoluyla hücresel tepki verilmesi için, gp130'un hücre yüzeyinde mevcut olması gerekir (55).

IL-6, Düzenleyici T (Treg) hücreleri ile inflamasyonu teşvik eden efektör Yardımcı T Hücresi-17 (Th17) hücreleri arasındaki dengenin kontrol edilmesinde kritik öneme sahiptir. IL-6 ile STAT3 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu, İnterlökin-17A (IL-17A) ve İnterlökin-23 Reseptörü (IL-23R) gibi genlerin ekspresyonunu indükleyerek Th17 farklılaşmasında rol oynar. IL-6, yine STAT3'ü içeren bir yolak aracılığıyla Treg hücrelerinin farklılaşmasını inhibe eder. Bu nedenle IL-6, Treg yanıtlarının bastırıldığı ve Th17 efektör yanıtlarının sürdürüldüğü inflamatuar bir yanıtı indüklemektedir (49).

Fizyolojik koşullar altında beyinde IL-6 düşük konsantrasyonda bulunmaktadır. Alzheimer Hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı (PH), beyin kanseri, multipl skleroz (MS) gibi çeşitli nörolojik bozukluklar sırasında IL-6'nın ekspresyonunda ve salgılanmasında dramatik bir artış gözlemlenir. IL-6 sinyallemesinin eksikliği, nöroinflamasyon ve nöronların korunmasında önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, IL-6 aynı zamanda oligodendrositlerin farklılaşmasını da teşvik eder, nörotrofik bir faktör olarak görev yapar ve periferal sinir rejenerasyonunda önemlidir. Tüm bu işlevler IL-6'nın MSS patolojisinde hayatta kalma yanlısı etkisini vurgulamaktadır (55).

IL-6'nın sinir hasarına karşı nöronal cevapta merkezi bir rol oynamasının yanı sıra mikroglial ve astrositik aktivasyonda da rol oynamaktadır (50). Beyindeki mikroglial hücreler, pro-inflamatuar sitokinler üreterek çevreden gelen sinyallere yanıt verir; bu sitokinler daha sonra doğası gereği adaptif bir hastalık davranışı tepkisi ortaya çıkarmak için nöronları hedef alır. Mikroglia, beyinde IL-6 reseptörünü eksprese eden ve periferik immün uyarım sırasında güçlü bir şekilde IL-6 salgılayan temel hücredir. IL-6'nın MSS inflamasyonunun düzenlenmesinde bir rol oynar. Merkezi sinir sistemindeki IL-6 aynı zamanda nörodejenerasyon, astrositoz ve c-fos ekspresyonundaki değişiklikler dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere çok sayıda davranışsal yolda da rol oynamaktadır (56).

2.10.1.3. Tümör nekroz faktörü-α (TNF-α)

TNF-α hem fizyolojik hem de patolojik koşullar altında MSS'nin çeşitli süreçlerini güçlü bir şekilde etkileyen pleiotropik bir sitokindir (57). TNF-α apoptotik yolakları, inflamasyonun NF-kB aktivasyonunu ve Aktif-Stres Ilişkili Protein Kinazların (SAPK'lar) düzenlenmesi için TNFR1 ve TNFR2 olarak adlandırılan 2 farklı hücre yüzey reseptör aracılığıyla farklı sinyal yolakları üzerinde etki göstermektedir. TNF-α Reseptörleri, hem nöronlarda hem de glialarda bulunmaktadır (50).

TNF sitokini, immün ve inflamatuar yanıtların kritik bir aracısıdır. TNF geni, çok çeşitli patojenlere ve iltihaplanma ve stres sinyallerine maruz kalmanın ardından çeşitli hücre tiplerinde hızla kopyalanan, acil erken bir gendir. TNF, doğal ve adaptif bağışıklık tepkisinde ve lenfositlerin, monositlerin, makrofajların, nötrofillerin ve dendritik hücrelerin normal fonksiyonunda kritik bir rol oynar. Her ne kadar TNF başlangıçta makrofajların bir ürünü olarak tanımlansa da, daha sonraki çalışmalar TNF geninin T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri, mast hücreleri, dendritik hücreler ve fibroblastlar gibi çok çeşitli hücre tiplerinde eksprese edildiğini göstermiştir. TNF'nin olgun bir protein olarak salgılanması transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve post-translasyonel düzeylerde düzenlenebilmektedir. Transkripsiyon seviyesinde, TNF geni, hücresel aktivasyon, inflamasyon, enfeksiyon ve stresin özelliği olan çeşitli spesifik uyaranlara yanıt olarak aktive edilir. Bu uyaranlar arasında iyonoforlar tarafından tetiklenen kalsiyum akışı gibi kalsiyum sinyalleri; bakteriler ve virüsler gibi patojenler; forbol esterler gibi mitojenler; ozmotik stres gibi kimyasal stres ve UV ışığı gibi

radyasyon bulunmaktadır. TNF gen transkripsiyonunun indükleyicileri arasında ayrıca T hücre reseptörü gibi antijen reseptörleri; Toll benzeri reseptörler gibi PRR'leri ve sitokin reseptörlerinin ligandlarını içermektedir (58).

TNF-α ya 26 kDa'lık membrana bağlı bir protein olarak veya TNF-α Dönüştürücü Enzim (TACE, ADAM17) olarak bilinen bir metalloproteazın aktivitesiyle üretilen 17 kDa'lık protein olarak bulunur. Mikroglialar nörodejeneratif hastalıklarda ve MSS hasarlarında TNF-α'nın başlıca üreticileri olarak gösterilse de, çok sayıda çalışma astrositlerin ve nöronların da bu pro-inflamatuar sitokinin kaynağı olabileceğini göstermiştir. TNF-α sinyalizasyonu 2 farklı reseptör aracılığıyla meydana gelir. TNF-α sinyalizasyonu, hücre tipleri arasında neredeyse tüm hücre tiplerinde eksprese edilen TNFR1 ve beyindeki belirli nöronal alt tiplerde ve glial hücrelerde daha düşük seviyelerde bulunan TNFR2 olarak adlandırılan iki farklı reseptör aracılığıyla meydana gelmektedir. TNFR1'in pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonu yoluyla nöronal ölümü teşvik etmede veya Nükleer Faktör-κB (NF-κB) aktivitesini artırarak hayatta kalmada önemli rolleri olduğu görülmektedir. TNFR2 aracılığıyla sinyal iletimi, TNFR1 ile başlatılan kaskat ile birçok benzerlik taşımaktadır. Özellikle TNFR2 anti-apoptotik ve pro-apoptotik gen hedeflerinin NF-κB-aracılı transkripsiyonunu artırmak için birçok farklı sinyal yolağı aracılığıyla etki göstermektedir. TNFR2 tercihen membrana bağlı TNF-α tarafından bağlanmaya yanıt verir (51).

2.10.2. Anti- İnflamatuar Sitokinler

Anti-inflamatuar sitokinler, pro-inflamatuar sitokin tepkisini kontrol eden immün düzenleyici molekül sınıfıdır (50). Temel anti-inflamatuar özellik gösteren sitokinler, patojenlere karşı oluşan immün yanıtların baskılanması veya istenmeyen aşırı tepkilerinin düzenlenmesinde önemli rol üstlenirler. Bunlar, aynı zamanda patojenlere karşı oluşacak immün yanıt esnasında pro-inflamatuar görevindeki sitokinlerin sentezini inhibe ederek, aşırı inflamasyon nedeniyle konağın zarar görmesini engellemektedir (59). Başlıca anti-inflamatuar sitokinler arasında IL-1 reseptör antagonisti, IL-4, IL-10, IL-11 ve IL-13 yer alır. Lösemi inhibitör faktör (LIF), İnterferon-Alfa (IFN-α), IL-6 ve TGF-β çeşitli koşullar altında anti-inflamatuar veya pro-inflamatuar sitokinler olarak kategorize ediilebilirler. IL-1, TNF-a ve Interlökin-18'e (IL-18) yönelik spesifik sitokin reseptörleri, aynı zamanda pro-inflamatuar sitokinler için inhibitör görevi de görmektedir (50).

2.10.2.1. İnterlökin-10 (IL-10)

Tüm anti-inflamatuar sitokinler arasında IL-10, güçlü anti-inflamatuar özelliklere sahip bir sitokindir ve aktive edilmiş makrofajlar tarafından TNF-a, IL-6 ve IL-1 gibi inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu baskılamaktadır. Ayrıca IL-10, endojen anti-sitokinleri up-regüle edebilmekte ve pro-inflamatuar sitokin reseptörlerini down-regüle edebilmektedir. Böylece IL-10, pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini ve fonksiyonunu birden fazla seviyede düzenleyebilmektedir (50). IL-10 gerekli olmayan immün cevapların baskılanmasında en önemli sitokinlerden birisidir. IL-10, NK hücreleri, B hücreleri, monositler, makrofajlar ve DC'lerin yanı sıra Yardımcı T hücreleri (Th2), Treg'ler gibi bir çok immün hücre tipinde üretilen pleitropik bir sitokindir. IL-10α/IL-10Rβ reseptör kompleksine bağlandığında, birçok farklı immün baskılayıcı yolağı başlatmaktadır. IL-10 ilk olarak Th1 (Yardımcı T hücresi-1) hücrelerinin sitokin üretimini baskılayan bir sitokin inhibitör faktörü olarak keşfedilmiş, ancak daha sonraki çalışmalarda IL-10'un Makrofaj ve DC gibi antijen-sunucu hücrelerin de sitokin üretimini ve CD80 ve CD86 gibi moleküllerin ko-stimulasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. IL-10'un birçok farklı immün hücresi ve doku epitel hücresi tarafından üretilen önemli bir anti-inflamatuar sitokin olduğu düşünülmüştür. IL-10 reseptörü ise CD4+ T, CD8+ T hücreleri, B hücreleri, DC'ler, makrofajlar, NK hücreleri, mast hücreleri, eozinofiller ve nötrofillerde ekpsrese olmaktadır. IL-10, kaspaz-1 aktivasyonunu ve kaspaz-1 bağımlı pro-IL-1β'dan IL-1β'ya olgunlaşmasını baskılamaktadır. Böylece IL-10, pro-inflamatuar Th17 hücrelerini doğrudan inhibe etmektedir. IL-10 aynı zamanda CD4+Foxp3+ Treg hücrelerinin baskılanma fonksiyonlarını desteklemektedir. İnsan IL-10 geni 1q32 kromozom bölgesinde bulunmakta olup 2 kb uzunluğundadır ve 5 ekzonu bulunmaktadır. IL-10 ayrıca Th1, Th2 ve Th17 hücrelerinde de üretilebilmektedir (60).

IL-10, Th1'in ürettiği sitokinleri inhibe eder ve B hücreleri, mast hücreleri ve T hücrelerinin farklılaşması ve çoğalması üzerindeki ko-simüle etkiye sahiptir. IL-10, B hücreleri üzerindeki MHC-sınıf II antijeni, makrofajlar üzerindeki Fcy reseptör ekspresyonunu artırır ve monositler üzerindeki MHC-sınıf II antijenlerinin ekspresyonunu down-regüle eder (61). Böylece IL-10, doku hasarına neden olabilecek inflamatuar yanıtı sınırlayan bağışıklık sisteminin önemli bir negative düzenleyicisidir. Ayrıca IL-10, bağışıklık sisteminin homeostazisi için gereklidir. Akut enfeksiyonlar

sırasında IL-10 sinyalinin bloke edilmesi, oldukça ciddi patolojilere ve hatta konakçının ölümüne neden olabilir. Bununla birlikte, IL-10'un aşırı üretimi, sürekli kronik enfeksiyonlarla ilişkilidir ve blokajı, patojen temizliğine teşvik eder. IL-10, IL-10 sinyallemesine özgü olan ve hematopoietik hücrelerde eksprese edilen IL-10Rα'dan ve yine IL-22 tarafından paylaşılan ve neredeyse her hücrede eksprese edilen IL-10Rβ'dan oluşan heterodimerik reseptörüne bağlanır. IL-10'nun bu reseptöre bağlanması, Stat3 fosforilasyonuna neden olan Jak1 ve Tyk2'yi aktive eder. Stat3 IL-10'un inhibitör fonksiyonları için gereklidir (62).

TGF-β ve IL-10 'un cevapları benzer şekilde hedef hücreye bağlı olarak değişmektedir. IL-10, makrofajlarda İnterlökin-12 (IL-12) üretimini ve ko-stimülatör moleküllerin ekspresyonunu azaltır, böylece Th1 yanıtının oluşumunu azaltır (62).

2.10.2.2. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-β (TGF-β)

TGF-β güçlü düzenleyici ve inflamatuar aktiviteye sahip bir pleiotropik sitokindir. TGF-β'nın çok sayıda bağışıklık fonksiyonu üzerindeki çok yönlü etkileri hücresel ve çevresel etkilere bağlıdır (62). TGF-β, hem doğal hem de adaptif immün fonksiyon için önemli bir sitokindir. TGF-β nörogenez, mikroglia gelişimi, gliogenez ve miyelinizasyonu düzenlediği için beyin gelişimi için oldukça önemlidir. TGF-β sinyalizasyonu, anti-inflamatuar etki göstermekte olup, büyük ölçüde nörokoruyucudur (63). TGF-β makrofaj ve Th1 hücre aktivitesini inhibe ederek sitokin üretimini baskılamakla kalmayıp, ayrıca IL-1, İnterlökin-2 (IL-2), IL-6 ve TNF'yi etkisiz hale getirmektedir (50). TGF-β ayrıca doğal bağışıklık hücrelerinin baskılanmasında da önemli bir rol oynar (62).

TGF-β'nin düzenleyici aktivitesi ve periferal toleransı indüksiyonu iyi bilinmektedir. Periferde TGF-β, naif T hücrelerinin hayatta kalması için gereklidir ve kendisine reaktif olan CD4+ and CD8+ T hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasını inhibe ederek periferal toleransı sürdürebilirler. TGF-β ayrıca doğal olarak oluşan Treg hücrelerinin hayatta kalmasını sağlarak da periferal toleransın sürdürülmesini sağlayabilmektedir. TGF-β ayrıca indüklenmiş Treg (iTreg) hücrelerinin farklılaşmasını indüklemektedir. TGF-β inflamatuar koşullar altında işlev gösterir. IL-6 varlığında TGF-β, inflamasyonu ve oto-immün koşullarını artıran Th17'nin farklılaşmasını sağlar. TGF-β, hem Treg hem de Th17 hücrelerinin farklılaşmasını konsantrasyona bağlı bir şekilde düzenler (62).

2.10.3. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit (NO), başta kardiyovasküler sistem ve sinir sistemi olmak üzere çok çeşitli homeostatik fonksiyonları düzenleyen, iki atomlu, kısa ömürlü bir gazdır. Hücre zarlarından serbestçe geçebilmekte ve belirli bir zar reseptörüne ihtiyaç duymadan çeşitli biyolojik etkilere katılan hücresel bir sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır. Yağda çözünebilmektedir. Eşlenmemiş elektronunun bir sonucu olarak farklı maddelerle hızlı reaksiyona girmesi nedeniyle (yalnızca birkaç saniyelik) son derece kısa bir yarı ömre sahiptir. Artan lökosit adezyonunda, vasküler geçirgenlikte, vazodilatasyonda ve inflamasyonda önemli işlevlere sahiptir (64). İmmün hücrelerin çoğunda ve endotel hücreleri, fibroblastlar, hepatositler ve keratinositler gibi çeşitli immün olmayan hücrelerde üretilmektedir. NO beyindeki glial hücreler inflamasyona yanıt olarak üretilmekte olup, özellikle korteks ve hipokampusta, sinaptik iletimde ve beyin plastisitesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ancak aşırı düzeyde NO ve nitrerjik/oksidatif stresin aracılık ettiği hücresel stres, nöroinflamasyonu şiddetlendirir, nöron ölümüne ve doku hasarına neden olarak sinaptik plastisitenin bozulmasına ve erken nörodejenerasyona yol açabilir (64,65). MSS içindeki nöronlar, NO kaynaklı hücre hasarına karşı oldukça duyarlıdır ve bu, çeşitli hastalıkların patofizyolojisine katkıda bulunur (64).

NO, L-arginin'in L-sitruline dönüşümü sırasında nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından üretilmektedir. Bu enzimlerin üç izotipi tanımlanmıştır: endotelyal NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS). eNOS ve nNOS sırasıyla endotel hücrelerinde ve nöronlarda yapısal olarak eksprese edilir. Beyindeki NO üretiminin ana kaynağı, esas olarak N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptörü post-sinaptik nörondaki glutamata bağlandığında aktive olan nNOS'dur. iNOS, Lipopolisakkarit (LPS) ve sitokinler gibi inflamatuar aracılara yanıt olarak IL-1, İnterferon-γ (IFN- γ) ve NK-κB gibi inflamatuar ajanların etkisiyle makrofajlar, mikroglia ve astrositlerde eksprese edilir. Hatta mikroglialarda rapor edilen tek NOS formudur. iNOS, *Nos2* geni tarafından kodlanmaktadır (66).

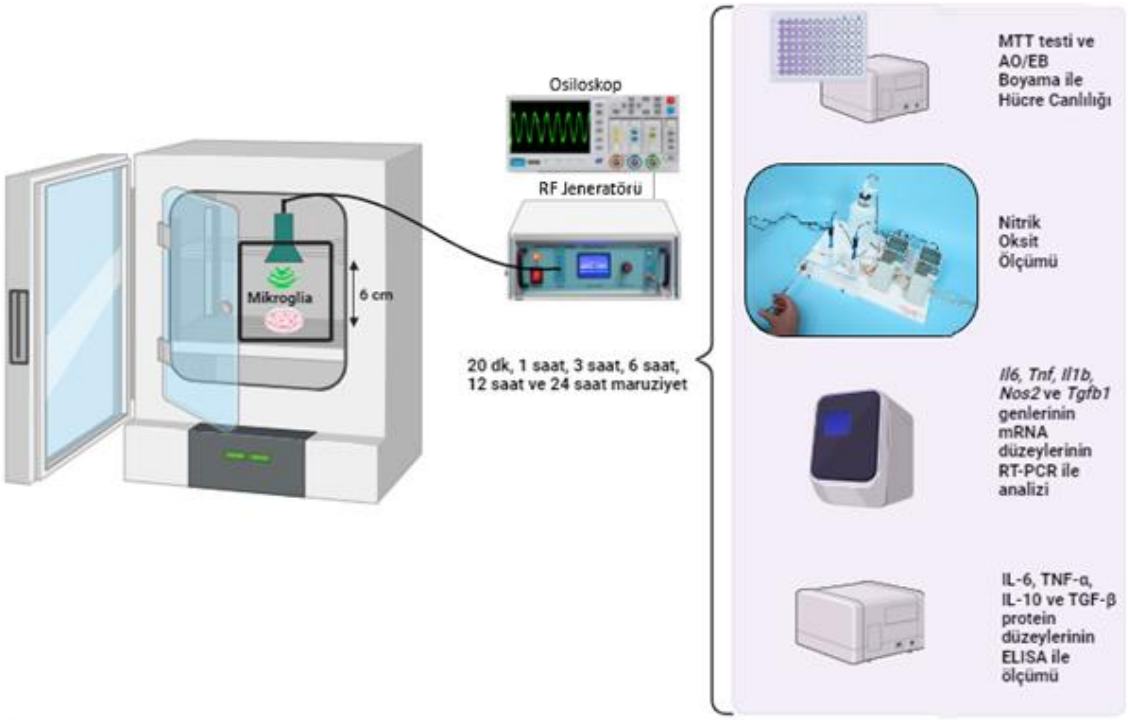
NO'nun sitotoksik etkilerinin çoğuna NO'nun kendisinin yanı sıra oksidasyon ürünleri de aracılık etmektedir. Böylece, pro-inflamatuar koşullar altında aktive edilmiş mikroglia tarafından eşzamanlı NO ve süperoksit üretimi, nöron ölümüne neden olan güçlü bir oksidan olan peroksinitrit oluşumuna yol açabilmektedir (66).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında fare N9 mikroglia hücre hattı 5G teknolojisinin orta band aralığında bulunan 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakıldı. Bunun için, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Elemanları Prof.Dr. Mustafa EMRE ve Dr. Yasin KARAMAZI tarafından özel olarak tasarlanan 6 GHz sürekli elektromanyetik dalgalar üreten jeneratör kullanıldı (17). Elektromanyetik alanı yaymak için Hern anteni kullanıldı. Hern anteni ile petri kutusu arasındaki mesafe, literatür taranarak 6 cm olarak belirlendi (67). Maruz bırakma süreleri de yine literatür taranarak 20 dk, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat olacak şekilde ayarlandı (68).

Çalışmamız, Şekil 7'de özetlendiği gibi kısaca şu aşamalardan oluşmaktadır;

- N9 mikroglial hücrelerin çoğaltılması ve kültürü yapıldı.
- Sistemin tasarımı yapıldı, mikroglial hücreleri çeşitli sürelerde 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakıldı.
- 6 GHz RF-EMA'nın mikroglial hücrelerin canlılığına olan etkisini araştırmak için MTT ve AO/EB boyaması teknikleri kullanıldı.
- 6 GHz RF-EMA'nın N9 mikroglia hücrelerinde nöroinflamasyon etkisini araştırmak için maruziyetten sonra hücre büyüme ortamına salgılanan nitrik oksit (NO) düzeyi NO ölçüm cihazı ile değerlendirildi.
- N9 mikroglia hücreleri 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakıldıktan sonra hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı ve ardından cDNA elde edildi. 6 GHz RF-EMA'nın N9 mikroglia hücrelerinde nöroinflamasyona etkisini araştırmak için *Tnf, Tgfb1, Il1b* ve *Nos2* genlerinin ekspresyon düzeyleri Gerçek Zamanlı-PCR yöntemi kullanılarak belirlendi.
- 6 GHz RF-EMA'nın N9 mikroglia hücrelerde nöroinflamasyon etkisini araştırmak için maruziyetten sonra hücre büyüme ortamına salgılanan IL6, IL-10, TNF-α ve TGF-β sitokin düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü.



Şekil 7. Çalışmanın Grafiksel Özeti.

3.1. Araç ve Gereçler

Bu tez kapsamındaki çalışmalar, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarları'nın olanakları kullanılarak gerçekleştirildi. Bu çalışmada kullanılan kimyasallar, cihazlar ve teknik malzemeler temin edildikleri firmalarla birlikte aşağıda verildiği gibidir.

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

- RPMI 1640 Büyüme Ortamı (Cytiva)
- L-Glutamin (Gibco)
- Fetal Bovin Serum (FBS, Biowest)
- Penisilin-Streptomisin Çözeltisi (Biowest)
- Tripsin-EDTA (Gibco)
- Trypan Blue (Sigma)
- Phosphate Buffered Saline (PBS, Biowest)
- Lipopolisakkarit (LPS, Sigma)
- Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT, VWR Life Science)

- Dimetil sülfoksit (DMSO, Mrck)
- DEPC su (İnvitrogen)
- Nükleaz İçermeyen Su (Hyclone)
- Nucleozol (Macherey-Nagel)
- İzopropanol (Sigma)
- cDNA sentez kiti (OneScript Plus)
- Sybr Green Master Mix (Ampliqon)
- Primerler (Sentebiolab)
- ELISA kitleri (BT Lab)
- Etidyum Bromür (Sigma)

3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

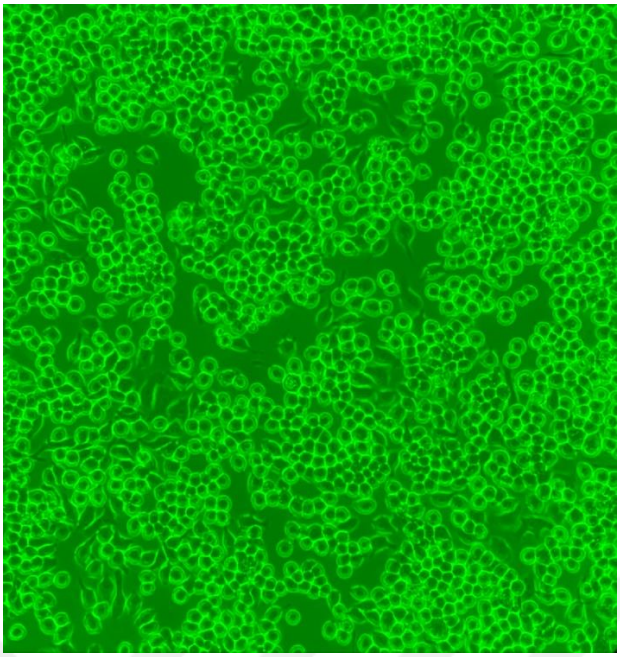
- RF jeneratörü (Set Elektronik Ltd)
- Steril Biyogüvenlik kabini (Kojair)
- CO_2 İnkübatörü (Thermo Scientific HERAcell ve Eppendorf)
- İnverted Faz Kontrast Mikroskop (Leica)
- Floresan Mikroskop (Olympus)
- Işık Mikroskobu (Nikon)
- NO ölçüm cihazı (Lazarlab, ArrowSTRAIGHT)
- Thoma Lamı
- Hassas Terazi (Sartorius)
- Santrifüj (Nüve)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- +4 ve -20 ^oC buzdolabı ve derin dondurucu (Arçelik)
- -80 ^oC dondurucu (Thermo Sientific)
- RT- PCR için Thermal cycler (Biorad)
- Geleneksel Thermal Cycler ()
- ELISA Plaka Okuyucu (Biochrom EZ Read 400)
- Nanodrop (Thermo Scientific Spektofotometre)
- Vortex
- Elektrosmog meter (Egerate Elektronik)

- 32 mm Petri Kabı
- Pastör pipeti
- Steril Falkon (15 mL, 50 mL)
- Steril Enjektörler (5mL,10 mL, 20 mL)
- Steril filtre (0.22 µm)
- PCR tüpü (0,2 µl, 1,5 mL)
- 96 Kuyucuklu Plaka
- Yapışkan Plaka Örtüsü
- Steril Mikropipet Uçları

3.2. Yöntem

3.2.1. N9 Hücrelerinin Özellikleri

Çalışmamızda kullanılan Fare N9 mikroglia hücreleri Dr. Paola Ricciardi-Castagnoli'den (Cellular Pharmacology Center, Milan, Italy) temin edildi (69). Bu hücreler, fare primer mikroglial hücrelerinden köken almış olup, primer fare mikroglial hücreler ile birçok fenotipik özelliği paylaşmaktadır (70). N9 mikroglia hücreleri, primer mikroglia hücrelerinin MH2 retrovirüsünün v-myc veya v-mil onkogenleri ile immortalize duruma getirilerek geliştirilmiştir. Bu süreçten türeyen klonlar, hiçbir spesifik esteraz aktivitesi göstermemesi ve FcR, Mac-1 ve F4/80 gibi mikroglial yüzey belirteçleri bakımından pozitif olması ile karakterizedir. Ayrıca bu hücreler GFAP, A2B5 ve Gal-C bakımından negatiftir. Opsonize edilmiş hücreleri fagozite edebilme yetenekleri olmakla birlikte sitokinleri de üretebilmektedir. LPS ile uyarıldıklarında IL-6, TNF-α ve IL-1 üretebilmektedir (71). Kültüre edilen N9 mikroglial hücrelerin mikroskoptaki görüntüsü Şekil 8'deki gibidir.



Şekil 8. N9 mikroglial hücrelerin mikroskop altındaki görüntüsü.

3.2.2. N9 Hücrelerinin Çözülmesi

Donmuş halde saklanan N9 hücrelerinin çözülmesi sırasında kullanılacak olan büyüme ortamının hazırlanması için Çizelge 1'de gösterilen hacimde malzemeler kullanılmıştır:

Çizelge 1. N9 hücreleri için çözdürme ortamının içeriği

Malzemeler	**%**	**Hacim**
RPMI 1640	%78	39 mL
FBS	%20	10 mL
L-Glutamin	%1	0.5 mL
Penisilin-Streptomisin	%1	0.5 mL
Toplam	%100	50 mL

Steril 50 mL'lik santrifüj tüpüne 10 mL FBS, 0.5 mL L-Glutamin ve 0.5 mL Penisilin-Streptomisin çözeltilerinden eklendi ve RPMI 1640 ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı. Çözdürme ortamı 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Tüpün ağız kısmı parafilm ile sarıldı ve etiketlenerek kullanılana kadar +4°C' de saklandı.

Önceden 37 ºC'ye ayarlanan su banyosunda +4 ºC'de saklanmakta olan büyüme ortamı ısıtıldı. 25 cm^2'lik hücre kültür kapları etiketlendi ve her bir kaba hazırlanan büyüme ortamından 5 mL eklendi. Dondurma tüpü içindeki hücreler -80ºC dondurucudan çıkarılarak hızlıca 37ºC'de çözüldü. Çözülen hücreler pipetaj yapılarak 15 mL'lik tüplere aktarıldı ve üzerine 37 ºC'de ısıtılan 10 mL büyüme ortamı eklendi. 1000 rpm 'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp dipte kalan pelet için 5 ml taze büyüme ortamı eklenerek pipetaj yapıldı.

Hücre süspansiyonu, daha önceden hazırlanmış olan 25 cm^2'lik kültür kaplarına aktarıldı. Flasklar mikroskop altında incelendi ve 37 ºC'de %5 CO_2 bulunan inkübatöre yerleştirildi. 24 saat sonra hücrelerin morfolojileri ve yüzeye yapışmaları mikroskopta kontrol edildi.

3.2.3. N9 hücreleri için Büyüme Ortamının Hazırlanması

Hücreler inkübatörde 37°C ve %5 CO_2 seviyesinde 25 cm^2'lik hücre kültür flasklarında 10% Fetal Sığır Serumu (FBS), 2 mM L-Glutamine, 100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin içeren RPMI 1640 ortamında çoğaltıldı ve idame ettirildi.

N9 hücrelerinin büyüme ortamının hazırlanması için Çizelge 2'de gösterilen hacimde malzemeler kullanılmıştır:

Çizelge 2. N9 hücrelerinin büyüme ortamının içeriği

Malzemeler	**%**	**Hacim**
RPMI 1640	%88	44 mL
FBS	%10	5 mL
L-Glutamin	%1	0.5 mL
Penisilin-Streptomisin	%1	0.5 mL
Toplam	%100	50 mL

Steril 50 mL'lik santrifüj tüpüne 5 mL FBS, 0.5 mL L-Glutamin ve 0.5 mL Penisilin-Streptomisin çözeltilerinden eklendi ve RPMI 1640 ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı. Büyüme ortamı 0.22 µl'lik filtreden geçirilerek yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Tüpün ağız kısmı parafilm ile sarıldı ve etiketlenerek kullanılana kadar +4ºC' de saklandı.

3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin kültür kabı içinde yeterli yoğunluğa ulaştığı belirlendiğinde, büyüme ortamı flasktan uzaklaştırıldı. Hücreler, steril Fosfat Buffer Salin (PBS) ile yıkandı. 25 cm^2'lik hücre kültür kaplarına 1'er mL önceden 37 ^oC'de ısıtılmış Tripsin /EDTA çözeltisi eklendi. Kültür kabının tabanına hafifçe vurularak hücrelerin kalkması sağlandı. Hücrelerin tabandan yeterince ayrılamaması durumunda kültür kapları 2-3 dk'yı geçmeyecek şekilde 37^oC'de inkübatörde bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrıldığı gözlemlendiğinde kültür kaplarına, eklenen Tripsin/EDTA 2 katı kadar hacimde büyüme ortamı eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra hücreler 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dk santifüj edildikten sonra üst kısım uzaklaştırıldı. Thoma lamı yardımıyla hücre sayımı yapılarak istenen sayıda hücre yeni bir flaska ekildi.

3.2.5. Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

Kültüre edilen hücreler Tripsin-EDTA çözeltisi ile kaldırıldı. Tripsin-EDTA'nın etkisini durdurmak için eklenen Tripsin-EDTA miktarının 2 katı kadar büyüme ortamından eklenerek 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pelet bir miktar büyüme ortamı ile iyice homojenize edildi. Homojenize hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 10 µl Tripan Mavisinden eklendi. Bu şekilde hücre süspansiyonu 2 kat seyreltilmiş oldu. Bu karışımdan 10 µl alınarak Thoma lamı ve lamel arasındaki boşluğun her iki tarafına da uygulandı. Tripan Mavisi, bir hücre süspansiyonunda bulunan canlı hücrelerin sayısını belirlemek için kullanılır. Canlı hücreler, sağlam hücre zarlarına sahip olduğu için, şeffaf görünürken, canlı olmayan hücrelerin ise mavi bir sitoplazması olacaktır (72).

Işık mikroskobunda Thoma lamının her bir tarafındaki şeffaf renkli hücreler (canlı) sayıldı ve 2 alanın ortalaması alındı. Aşağıdaki formüle göre mL'deki hücre sayısı hesaplandı. Her bir uygulama için gerekli hücre sayısına uygun hacimde hücre süspansiyonundan alınarak ekim yapıldı.

Canlı hücre sayısı /mL= Ortalama Sayım Değeri x 2 (Seyreltme Faktörü) x 10^4 (72)

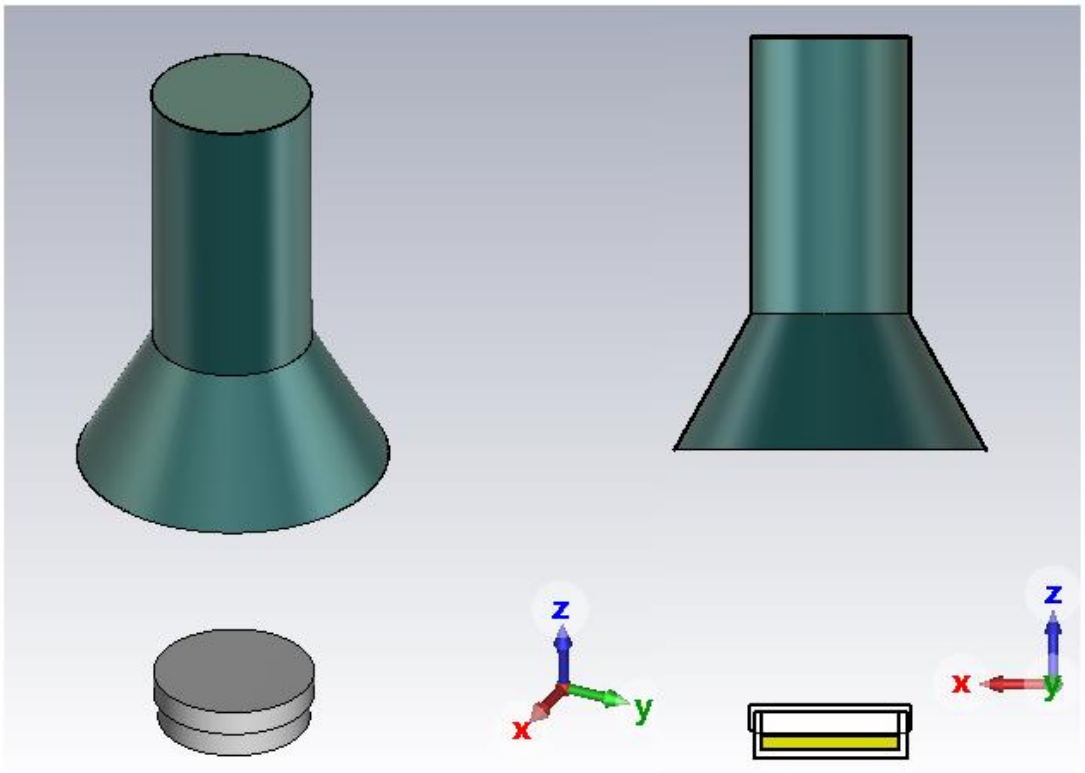
3.2.6. 6 GHz RF-EMA Uygulama Düzeneği

6 GHz RF-EMA uygulanmasında kullanılan cihaz, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik ABD Öğretim Elemanları Prof. Dr. Mustafa EMRE ve Dr. Yasin KARAMAZI tarafından temin edildi. Şekil 8B'de gösterilen cihaz Set Elektronik Ltd. Şti. (Sakarya, Turkey) tarafından dizaynı yapılan; beslenme kaynağı 220~230 V, çalışma sıcaklığı -40°C ~ +60°C, sabit frekans modülasyonlu ve frekansı 5.8 – 6 GHz'de çalışan, gücü 2 Sürekli Dalga (CW) biçimde sinüzoidal dalga yayan, 50 Ω çıkışlı, modeli FR6GX-2W olan RF jeneratörüdür (17). Anten olarak Hern anteni kullanılmış olup, sürekli dalgalar verildi. CO_2 inkübatörüne plastik kutu yerleştirilerek kutunun içerisine antenden 6 cm uzaklıkta olacak şekilde petriler konuldu ve uygulamalar Şekil 9'daki gibi gerçekleştirildi (67). Uygulamanın simülasyonu ise Şekil 10'da gösterildiği gibidir. İşlem sırasında kutunun içindeki sıcaklık termometre ile ölçülerek kaydedildi. Tüm deneyler süresince, deney kabının içindeki ortalama sıcaklık 36.94±0.22 ºC olarak hesaplandı.



a **b**

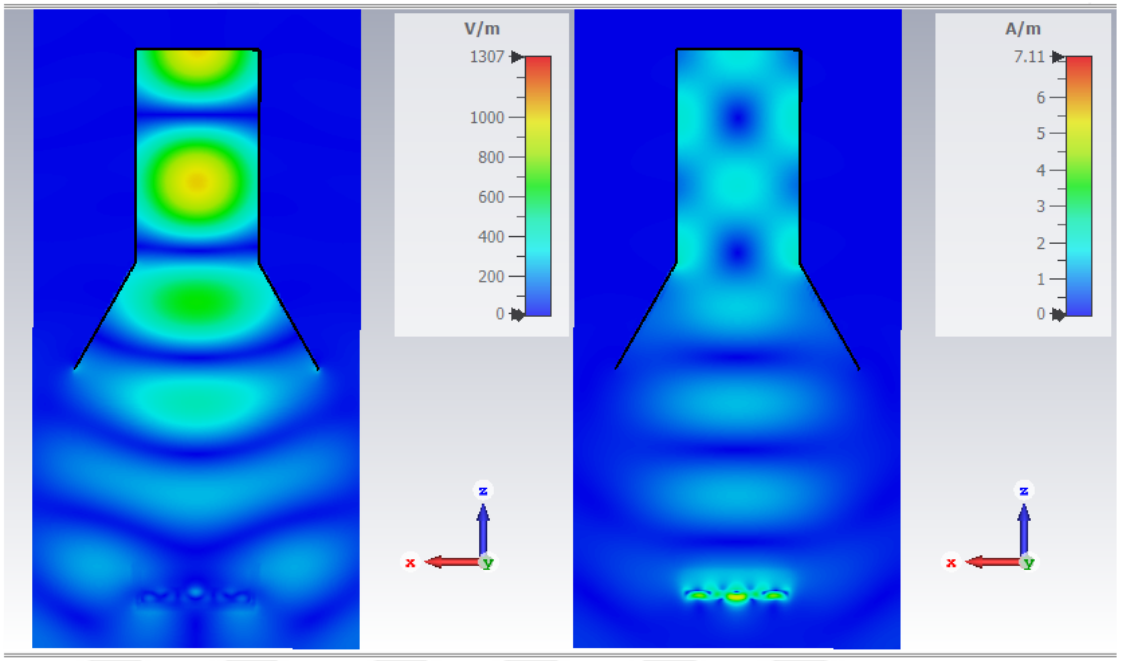
Şekil 9. 6 GHz RF-EMA düzeneği. **a)** Petri kutusunda N9 hücrelerinin kültürü yapıldı. Hern anteni ile petri kutusu arasındaki mesafe 6 cm'dir. **b)**6 GHz RF-EMD yayan jeneratör



a **b**

Şekil 10. Uygulamanın Simülasyonu. **a)** Hern anteni ve petri kabının üstten görünüşü. **b)** Hernanteni ve petri kabının önden görünümü.

Deney öncesi RF jeneratörü gücü kapalı durumda ve 1 Watt'ta çalışır durumda iken ElectroSmog meter (TES-593, Taiwan) taşınabilir cihaz ile elektrik alan (E), manyetik alan (B) ve güç yoğunluğu (PD) ölçüldü. RF-EMA parametreleri; ortalama Elektrik alan E= 25,6 V/m, manyetik alan B= 66,25 mA/m ve güç yoğunluğu PD= 1,73 w/m^2 olarak kaydedildi. Elektrik Alan ve Manyetik Alan simülasyonu Şekil 11'de gösterildiği gibidir.



a **b**

Şekil 11. a) Elektrik Alan Simülasyonu. **b)** Manyetik Alan Simülasyonu

Her bir petriye $1x10^6$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Petriler 37°C ve %5 CO_2 inkübatöründe 24 saat büyümeye bırakıldı. 24 saat sonra hücreler mikroskopta incelendi ve yeterli sıkışıklığa eriştiği belirlenen petrilerden büyüme ortamı uzaklaştırıldı. 1 mL düşük serumlu büyüme ortamından dikkatlice ilave edildi. Yeterli sıkışıklığa ulaşmış N9 hücrelerinin muamele yapılmadan önce eklenecek olan düşük serumlu büyüme ortamının hazırlanması için Çizelge 3'de gösterilen hacimde malzemeler kullanılmıştır.

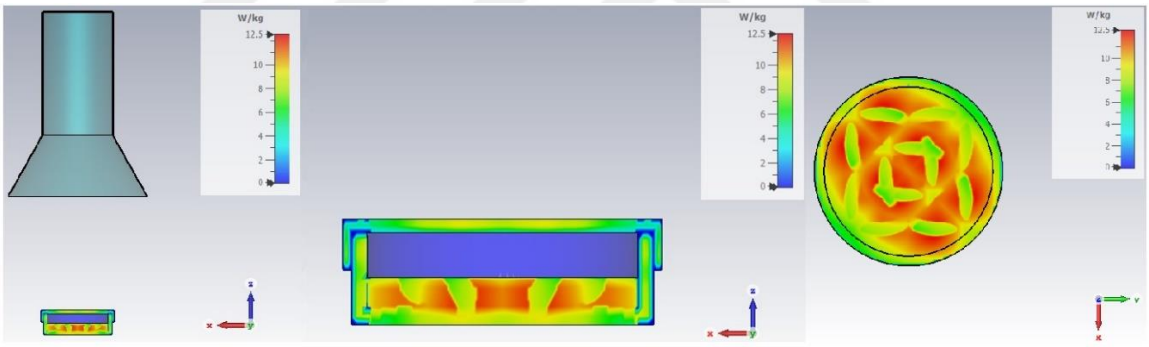
Çizelge 3. N9 hücrelerinin RF-EMA muamelesi sırasında kullanılan Düşük Serumlu Büyüme ortamının içeriği

Malzemeler	**%**	**Hacim**
RPMI 1640	%93	46.5 mL
FBS	%20	2.5 mL
L-Glutamin	%1	0.5 mL
Penisilin-Streptomisin	%1	0.5 mL
Toplam	%100	50 mL

Petri kapları 20 dk, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat olacak şekilde RF-EMA uygulamasına maruz bırakıldı. Her bir süre için ayrı kontrol grupları oluşturuldu ve hiçbir muameleye tabi tutulmadan aynı koşullarda kültüre edildi. Her bir uygulama süresi 3 kere çalışıldı.

3.2.7. SAR Değeri Hesaplanması

Çalışmamızda SAR değerleri, ölçülen elektrik alan (V/m), manyetik alan (A/m) ve güç yoğunluğu ($\mu W/cm^2$) referans alınarak hücreler üzerinde hesaplandı. SAR değeri, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü'nde görev yapan Dr. Öğr. Üyesi Çağatay Aydın'ın yardımıyla CST Microwave Studio 3D Elektromanyetik Simülasyon Yazılımı kullanılarak hesaplandı. IEEE/IEC 62704-1 ortalama bulma yöntemine göre 1 g için hesaplandı. Çalışmamızda, N9 mikroglia hücreleri üzerindeki SAR değeri, 11.882 W/kg olarak bulundu. SAR değeri ile ilgili simülasyonlar Şekil 12'de gösterilmiştir.



a b c

Şekil 12. **a)** Petri Kabının Ortasındaki SAR Simülasyonu (XZ Ekseni) **b)** petrinin yakından görünümü Maksimum SAR=11.882. **c)** Petri kabının üstten görünümü Maksimum SAR=11.882 W/kg.

3.2.8. LPS Maruziyeti

Çalışmamızda RF-EMA'nın mikroglial hücrelerde inflamasyona etkisini incelemek için pozitif kontrol grubu olarak mikroglia hücrelerinde inflamasyonu uyardığı bilinen LPS kullanıldı. Literatür bilgisi göz önüne alınarak LPS konsantrasyonu 1 µg/mL ve uygulama süresi 24 saat olarak belirlendi (73). Her bir petriye $1x10^6$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Petriler 37°C ve %5 CO_2 inkübatöründe 24 saat büyümeye bırakıldı. 24 saat sonra hücreler mikroskopta incelendi

ve yeterli sıkışıklığa eriştiği belirlenen petrilerden büyüme ortamı uzaklaştırıldı. Ticari olarak 1 mg LPS PBS ile çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonda LPS elde edildi. Daha sonra konsantrasyon 100 µg/mL olacak şekilde ardışık seyreltmeler yapıldı. Her bir petriye bu konsantrasyondaki LPS çözeltisinden 10 µL alınarak, son hacim 1 mL olacak şekilde taze besiyerinin üzerine eklendi.

3.2.9. Hücre Canlılık Testi: MTT

Hücre canlılığını belirlemek için kullanılan MTT testinin prensibi, canlı hücrelerdeki mitokondriyal aktivitenin sabit olmasına ve dolayısıyla hücre sayısındaki artış veya azalışın mitokondriyal aktivite ile doğrusal ilişkili olmasına dayalıdır. Hücrelerin mitokondriyal aktivitesi, MTT tetrazolium tuzunun, homojen çözülmüş formazan kristallerine dönüşümü ile değerlendirilir. Canlı hücre sayısındaki artış ya da azalış, plaka okuyucu kullanarak 540 nm'deki Optik Dansite (OD) değeri üzerinden formazan konsantrasyonu ölçülerek değerlendirilir (74).

35 mm petriye 1.5 ml büyüme ortamı içerisine $1x10^6$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimden 24 saat sonra büyüme ortamı uzaklaştırıldı ve 1 mL taze büyüme ortamı eklendi. 20 dk. 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat olacak şekilde RF-EMA uygulaması ve pozitif kontrol olarak 24 saat 1 µg/ml LPS uygulaması yapıldı. Uygulamalardan sonra her bir petriye 5 mg/mL MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) çözeltisinden 200 µl eklendi. MTT eklenen petriler 37ºC ve %5 CO_2 inkübatöründe 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üst kısım, kristallere zarar vermeden dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve her bir petriye 3 mL DMSO eklendi. 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve çözelti homojenize edildi. Çözelti 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyusuna 200 µl olacak şekilde eklendi. Hazırlanan plaka 570 nm'de absorbans değerleri ELISA okuyucuda ölçüldü. Blank olarak 200 µl DMSO (Dimetil Sülfoksit) kullanıldı. MTT verilerinden canlı hücrelerin yüzdesini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{(\text{Örneğin absorbans değeri} - \text{Blank absorbans değeri})}{(Kontrol\text{ün } absorbans\ değeri - Blank\ Absorbans\ Değeri)} \text{x}100$$

3.2.10. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyaması

Akridin Oranj (AO) vital bir boya olup, hem canlı hem ölü hücreleri boyamaktadır. Etidyum Bromür (EB) ise sadece membran bütünlüğü bozulan hücreleri boyamaktadır. Canlı hücreler düzgün bir şekilde dağılmış yeşil renkte görünecektir. Apoptotik hücreler Etidyum Bromürü içeri aldığı için, turuncu renkte boyanacaktır (75).

3.2.10.1. AO/EB Boya Kokteyli Hazırlanması

0.1 g AO boyası tartılıp 10 mL PBS içerisinde çözüldü. Bu boya çözeltisi filtreden geçirildi. Bu çözeltiden 10 µL yeni bir ependorfa alınıp 990 µL PBS eklenerek seyreltildi ve 100 µg/mL AO çözeltisi elde edildi.

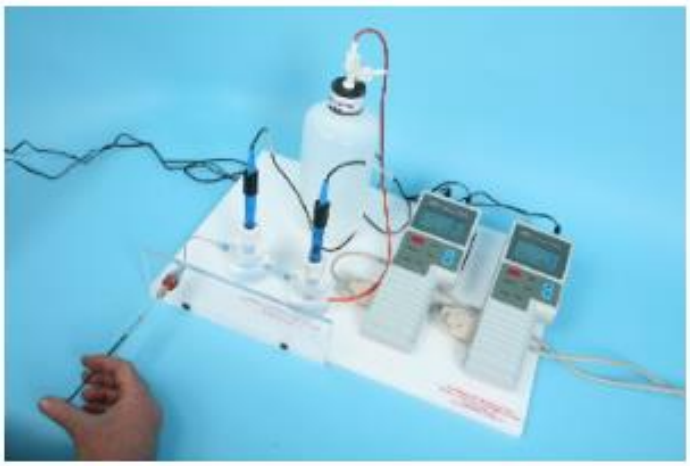
160 µL PBS bir ependorf içine alınıp üzerine 500 µg/mL konsantrasyonda ticari satılan EB çözeltisinden 40 µL eklendiğinde 100 µg/mL EB çözeltisi elde edildi.

100 µg/mL AO ile 100 µg/mL EB boyaları 1:1 oranında karıştırılarak AO/EB kokteyli elde edildi. Bu çözeltiler karanlık ortamda hazırlandı.

35 mm petriye 1.5 ml büyüme ortamı içerisine $1x10^6$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimden 24 saat sonra büyüme ortamı uzaklaştırıldı ve 1 mL taze büyüme ortamı eklendi. 20 dk. 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat olacak şekilde RF-EMA uygulaması ve pozitif kontrol olarak 24 saat 1 µg/ml LPS uygulaması yapıldı. Uygulamadan sonra her bir petriye 1'er mL önceden 37 ^oC'de ısıtılmış Tripsin /EDTA çözeltisi eklendi. Kültür kabının tabanına hafifçe vurularak hücrelerin kalkması sağlandı. Hücrelerin tabandan yeterince ayrılamaması durumunda kültür kapları 2-3 dk'yı geçmeyecek şekilde 37^oC'de inkübatörde bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrıldığı gözlemlendiğinde, kültür kaplarına eklenen Tripsin/EDTA'nın 2 katı hacminde büyüme ortamı eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra hücreler 2 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüp 1000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 100 µl PBS ile yeniden süspansiyon haline getirildi. Karanlık ortamda bu hücre süspansiyonu üzerine 5 µL AO/EB boyası eklendi. Bu karışımdan 10 µL alınarak lam üzerine yayıldı ve lamel ile kapatıldı. Preparatlar karanlık odada floresan mikroskopta WB (mavi) filtre kullanılarak incelendi. Her bir örnekten ortalama 500 hücre sayıldı. Canlı hücrelerin yüzdesi hesaplandı.

3.2.11. NO Ölçümü

NO ölçümü Ç.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik ABD'nda görev yapan Prof. Dr. Mustafa EMRE 'nin Lazar Lab ArrowSTRAIGHT markalı cihazı kullanılarak gerçekleştirildi (76). Cihaz Şekil 13'de gösterildiği gibidir.



Şekil 13. Lazar Lab ArrowSTRAIGHT markalı NO ölçüm cihazı. Bu cihazda NO ölçümü NO_2^- ve NO_3^- 'nun ayrı ayrı ölçümü için tasarlanmış 2 farklı elektrod kullanılarak yapılmaktadır. Elektrodlara çözeltiler öndeki porta enjektör ile uygulanmaktadır (76).

3.2.11.1. 1 M NaOH Çözeltisinin Hazırlanması

Üzerinde bir miktar distile su bulunan kabın içine 0.4 gr NaOH tartılıp konulduktan sonra distile su ile son hacim 10 mL'ye tamamlandı.

3.2.11.2. Nitrit Standartlarının Hazırlanması

0.1 M stok NO_2^- standardı için; üzerinde bir miktar distile su bulunan kabın içine 0.69 g $NaNO_2$ tartılıp konulduktan sonra, üzerine 1 M çözeltisinden 1 mL eklendi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu stok çözeltisinden 1:10 oranında seri dilüsyonlarla 100 µM ve 10 µM NO_2^- standartları hazırlandı.

3.2.11.3. Nitrit Tamponu Hazırlanması

Üzerinde bir miktar distile su bulunan kabın içine 14.2 g $NaSO_4$ tartılıp konulduktan sonra üzerine 1 mL gliserin eklendi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Çözeltinin pH'sı 1.3'e getirmek için Sülfirik Asit kullanıldı.

3.2.11.4. Nitrat Standartlarının Hazırlanması

0.1 M stok NO_3^- standardı için; üzerinde bir miktar distile su bulunan kabın içine 0.85 g $NaNO_3$ tartılıp konulduktan sonra, üzerine 1 M NaOH çözeltisinden 1 mL eklendi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu stok çözeltisinden 1:10 oranında seri dilüsyonlarla 100 µM ve 10 µM NO_3^- standardı hazırlandı.

3.2.11.5. Nitrat Tamponu Hazırlanması

Üzerinde bir miktar distile su bulunan kabın içine 14.2 g $NaSO_4$ tartılıp konulduktan sonra üzerine 1 mL gliserin eklendi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Çözeltinin pH'sı 2.5'e getirmek için Sülfirik Asit kullanıldı.

3.2.11.6. Nitrit Ölçümü

96 kuyucuklu plakanın bir kuyucuğuna 100 µM NO_2^- standart çözeltisinden 180 µL alınıp, üzerine 20 µL nitrit tamponundan eklendi. Karışım mikroşırınga yardımıyla NO_2^- enjeksiyon portuna eklenip 100 mM NO_2^- için standart ölçümü alındı. Port kısmı distile su ile yıkandı. 96 kuyucuklu plakanın başka bir kuyucuğuna 10 µM NO_2^- standart çözeltisinden 180 µL alınıp, üzerine 20 µL nitrit tamponundan eklendi. Karışım mikroşırınga yardımıyla NO_2^- enjeksiyon portuna eklenip 10 Mm NO_2^- için standart ölçümü alındı. Port kısmı distile su ile yıkandı. 96 kuyucuklu plakanın boş kuyucuklarına konsantrasyonu bilinmeyen örnek çözeltilerinden 180 µL alınıp, üzerine 20 µL nitrit tamponundan eklendi. Karışım mikroşırınga yardımıyla NO_2^- enjeksiyon portuna eklenip örnekteki NO_2^- miktarının ölçümü kaydedildi. Her bir örneğin ölçümünden sonra port kısmı distile su ile yıkandı.

3.2.11.7. Nitrat ölçümü

96 kuyucuklu plakanın bir kuyucuğuna 100 µM NO_3^- standart çözeltisinden 180 µL alınıp, üzerine 20 µL nitrat tamponundan eklendi. Karışım mikroşırınga yardımıyla NO_3^- enjeksiyon portuna eklenip 100 Mm NO_3^- için standart ölçümü alındı. Port kısmı distile su ile yıkandı. 96 kuyucuklu plakanın başka bir kuyucuğuna 10 µM NO3- standart çözeltisinden 180 µL alınıp, üzerine 20 µL nitrat tamponundan eklendi. Karışım mikroşırınga yardımıyla NO_3^- enjeksiyon portuna eklenip 10 Mm NO_3^- için standart ölçümü alındı. Port kısmı distile su ile yıkandı. 96 kuyucuklu plakanın boş

kuyucuklarına konsantrasyonu bilinmeyen örnek çözeltilerinden 180 µL alınıp, üzerine 20 µL nitrat tamponundan eklendi. Karışım mikroşırınga yardımıyla NO_3^- enjeksiyon portuna eklenip örnekteki NO_3^- miktarının ölçümü kaydedildi. Her bir örneğin ölçümünden sonra port kısmı distile su ile yıkandı.

Her bir örnekteki NO miktarı, cihazda ölçülen NO_2^- ve NO_3^- 'nin cebirsel olarak toplanmasıyla hesaplandı.

3.2.12. RNA İzolasyonu

35 mm petriye 1.5 ml büyüme ortamı içerisine $1.5x10^6$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimden 24 saat sonra büyüme ortamı uzaklaştırıldı ve 1 mL taze büyüme ortamı eklendi. 20 dk. 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat olacak şekilde RF-EMA uygulaması ve pozitif kontrol olarak 24 saat 1 µg/ml LPS uygulaması yapıldı. Muameleler tamamlandıktan sonra hücre büyüme ortamı uzaklaştırılıp her bir petriye 1000 ml Nucleozol eklendi. Hücre kazıyıcı ile hücreler kazındı ve pipetaj yapılarak homojenize olması sağlandı. RNA izolasyon süreci oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Tüm sıvı 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 400 µl RNAaz içermeyen su ilave edildi Tüpler 15 sn. hızlı bir şekilde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildi. Tüpler oda sıcaklığında 15 dk. 13400 rpm'de 17 dk santrifüj edildi. Santifüj sonrası tüpün tabanında pellet kısmında DNA, protein ve polisakkarit bulunurken, RNA'lar süpernatantta çözünmüş halde bulunmaktadır. Bu yüzden 1 ml süpernatant 2 ml'lik yeni tüplere aktarıldı.

Her bir tüpe 1 mL izopropanol eklendikten sonra oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edildi ve 13400 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Bu santrifüj aşamasından sonra RNA'lar tüpün tabanında beyaz bir pellet olarak görünmektedir. Süpernatantın tamamı uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 500 µl %75 etanol eklendi. 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Etanol uzaklaştırıldı. Yıkama aşaması tekrar edildi.

Son olarak elde edilen RNA pelleti miktarına göre RNAaz içermeyen suda çözüldü ve daha etkili çözünme işlemi için örnekler oda sıcaklığında 2 dk vorteklendi. RNA konsantrasyonları ve saflıkları nanodrop cihazı yardımıyla ölçüldü. A260/A280 oranından faydalanarak RNA saflığı belirlendi. En iyi sonuç için RNA saflık oranlarının 1.6-2.0 arasında olmasına dikkat edildi.

3.2.13. cDNA Sentezi

RNA örneklerinden cDNA elde etmek için abm OneScript Plus cDNA Sentez kiti kullanıldı. Reaksiyon hazırlandığı süre boyunca buz üzerinde çalışıldı. 20 µL'lik reaksiyon için kullanılacak olan master mix bileşenleri ve hacimleri Çizelge 4'de gösterilmiştir;

Çizelge 4. Reverse transkripsiyon için kullanılan reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Reaksiyon başına kullanılan hacim(µL)
5X RT Tampon	4
10 µM Rastgele Primerler	1
10 µM dNTP	1
OneScript Plus RTaz enzimi	1
Toplam	7

Hazırlanan karışım her bir tüpe 7 µL olacak şekilde paylaştırıldı. Her bir RNA örneği 1 µg olacak şekilde tüplere gerekli hacimlerde eklendikten sonra son hacim RNAaz içermeyen su ile 20 µL'ye tamamlandı. Tüpler Thermal cycler cihazına yerleştirildi ve PCR koşulları Çizelge 5'deki gibi ayarlandı.

Çizelge 5. Revers transkripsiyon reaksiyonunun koşulları

	1. Aşama	**2. Aşama**	**3. Aşama**
Sıcaklık	25 ºC	55 ºC	85 ºC
Zaman	10 dk.	15 dk.	5 dk.

3.2.14. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (RT-PCR) Gerçekleştirilmesi

Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR), amplifikasyon meydana geldikçe bir örnekte bulunan transkriptlerin miktarının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Özel olarak bilgisayara bağlı bir termal cycler ile görüntülenmesini gerektiren floresan bir boyanın kullanılması ile geleneksel PCR yönteminden farklılaşır. Genellikle ürünün miktarı, reportör boyanın verdiği floresan ışıma ile doğrudan ilişkilidir (77). Reaksiyon ilerledikçe ürün miktarı belirlendiği için, RT-PCR yönteminin hassasiyeti yüksektir. Floresan boya olarak birçok ajan kullanılabilmektedir. Çalışmamızda SYBR green

kullanarak RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. SYBR green, baz çiftleri arasına girerek çift zincirli DNA'ya bağlanır. SYBR green reaksiyon karışımına eklendiğinde, termocycler döngüler boyunca ilerledikçe (denatürasyon, annealing ve uzama) ve yeni amplikonlar Taq polimerazlar tarafından sentezlendikçe, SYBR green boyası çift zincirli DNA'ya bağlanır. SYBR green DNA'ya bağlandığında ışıma verir. Işıma miktarı ölçülerek istenen genin ekspresyonu belirlenir (78). Çalışmamızda fareye ait *Il6, Tnf, Tgfb1, Il1b* ve *Nos2* genleri için RT-PCR Reaksiyonunda kullanılmak üzere PrimerBLAST (79) ve OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA technologies) (80) programları yardımıyla dizayn edilen primer dizileri Çizelge 6'da belirtildiği gibidir.

Çizelge 6. Hedef genlere özgü dizayn edilen primer çiftleri

Gen	Primer Dizileri (5'→3')
Gapdh	**F:** CTGGAAAGCTGTGGCGTGAT
	R: GGGTAGGAACACGGAAGGC
Il6	**F:** CAGTTGCCTTCTTGGGACTGA
	R: CAGGTCTGTTGGGAGTGGTATC
Tnf	**F:** ACTGAACTTCGGGGTGATCG
	R: GTTTGCTACGACGTGGGCTA
Tgfb1	**F:** CCGTGGCTTCTAGTGCTGA
	R: CGAGCCTTAGTTTGGACAGGA
Il1b	**F:** GCCACCTTTTGACAGTGATGA
	R: ATGTGCTGCTGCGAGATTTG
Nos2	**F:** ACGAGACGGATAGGCAGAGA
	R: GCACATGCAAGGAAGGGAAC

F: Forward primer R:Reverse primer

96 kuyucuklu reaksiyon plakasının her bir kuyucuğuna reaksiyon bileşenleri Çizelge 7'de belirtildiği gibi eklenmiştir:

Çizelge 7. SYBR green RT-PCR reaksiyonu için gerekli bileşenler

Bileşen	Reaksiyon başına kullanılan hacim(µL)
Sybr Green Master Mix	12.5
Forward Primer	1.25
Reverse Primer	1.25
Nükleaz İçermeyen Su	9
cDNA	1

96 kuyucuklu reaksiyon plakalar hazırlandıktan sonra üstü optik yapışkan film ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Plaka, hava kabarcığı kalmaması için santrifüjde kısa bir döndürmenin ardından thermal cycler cihazına yerleştirildi. PCR koşulları Çizelge 8'deki gibi olacak şekilde ayarlandı:

Çizelge 8. RT- PCR reaksiyonunun aşamaları

Aşama	Sıcaklık (^{o}C)	Süre (dd:ss)
Holding	95	15:00
Döngü (40 döngü)	95	00:15
	62	1:00

3.2.14.1. RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Yapılan RT-PCR sonucunda Ct (Cycle Treshold, Döngü Eşiği) değerleri elde edilir. Bu değerlerin analiz edilmesi ve böylece istenen genin görece kantifikasyonunu belirlemek icin $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılır. Ct değeri, reaksiyon eğrisi ile eşik çizgisinin kesiştiği noktaya karşılık gelir. Bu nokta, çözeltide istenen nükleik asidin amplifiye olmaya başladığı ve floresan sinyalinin belirlendiği döngü sayısını gösterir (81). Daha düşük Ct değeri, örnek içinde istenen genin transkript miktarının yüksek olduğunu gösterirken, yüksek Ct değeri ise bu transkript miktarının düşük olduğunu gösterir. Her bir gen için deney ve kontrol gruplarından alınan cDNA örnekleri duplike olarak çalışılmıştır ve bu reaksiyonlardan elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alınarak kullanılmıştır. Referans gen olarak da bir housekeeping gen olan Gliseraldehit 3- Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) geni kullanılmıştır. *Il6, Tnf, Tgfb1, Il1b* ve *Nos2* genlerine ait ekspresyon değerleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir;

Deney Grubu ΔCt = Ct Hedef gen – Ct Referans gen

Kontrol grubu ΔCt = Ct Hedef gen – Ct Referans gen

$\Delta\Delta$Ct = Deney Grubu ΔCt - Kontrol grubu ΔCt

Ekspresyon değeri = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (82)

3.2.15. Protein Miktarı Tayini

Muameleler tamamlandıktan sonra büyüme ortamı, yeni bir ependorf tüpe aktarıldı. 2000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi ve üst kısım yeni bir ependorf tüpe aktarıldı. Örnekler -80 ºC'de saklandı.

3.2.15.1. Protein Miktarının Ölçülmesi

Protein miktarını belirlemek için Bradford Testi aşağıda belirtildiği gibi uygulandı. Çizelge 9'da özetlenen şekilde 6 farklı standart oluşturuldu.

Çizelge 9. Protein ölçümü için standartların hazırlanması

Standart	**Su (µl)**	**BSA (10mg/mL)**	**Son Konsantrasyon µg/mL**
1	495	5µl BSA	100
2	250	250 µl standart 1	50
3	250	250 µl standart 2	25
4	250	250 µl standart 3	12,5
5	250	250 µl standart 4	6,25
6	250	-	0

96 kuyucuklu plaka içine standart çözeltilerden 100'er µl eklendi. Örnekler ise 98 µl su + 2 µl protein örneği olacak şekilde eklendi. Standart ve örnekler dublike olarak çalışıldı ve hesaplamalar sırasında ortalamalar kullanıldı. Plaka dizaynı aşağıdaki Çizelge 10'daki gibi yapıldı:

Çizelge 10. Protein ölçümü için standartların ve örneklerin 96 kuyucuklu plakaya aktarımı

Kuyu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std1	Std1	Std2	Std2	Std3	Std3	Std4	Std4	Std5	Std5	Std6	Std6
B	Örnek1	Örnek1	Örnek2	Örnek2								

Bradford boya çözeltisinden her bir kuyuya 100 µl eklendi. Plakalar alüminyum folyo ile kaplanarak 37 ˚C'de 20 dk bekletildi. Protein miktarını ölçmek için plaka okuyucuda 595 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Sonuçlar excel'de grafik çizilerek hesaplandı.

3.2.15.2. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Testi

Çalışmada TNF-α, IL-6, IL-10 ve TGF-β düzeyleri ELİSA kitleri ile ölçüldü. Kit içerisinden çıkan standart solüsyonlar ve örnekler talimatlara göre hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce kitin içeriğindeki tüm bileşenler oda sıcaklığına getirildi. Çalışma, oda sıcaklığında gerçekleştirildi. TNF-α protein için Çizelge 11, IL-6 proteini için Çizelge 12 ve IL-10 ve TGF-β proteinleri için ise Çizelge 13'de özetlenen şekilde standartlar oluşturuldu.

Çizelge 11. TNF-α protein standardının hazırlanması

Standart No	**Su (µl)**	**TNF-α (1280 ng/L)**	**Son Konsantrasyon (ng/L)**
1	120	120 µl standart	640
2	120	120 µl standart 1	320
3	120	120 µl standart 2	160
4	120	120 µl standart 3	80
5	120	120 µl standart 4	40
6	120	-	0

Çizelge 12. IL-6 protein standardının hazırlanması

Standart No	**Su (µl)**	**IL-6 (960 pg/mL)**	**Son Konsantrasyon (pg/mL)**
1	120	120 µl standart	480
2	120	120 µl standart 1	240
3	120	120 µl standart 2	120
4	120	120 µl standart 3	60
5	120	120 µl standart 4	30
6	120	-	0

Çizelge 13. IL-10 ve TGF-β proteinlerinin standardının hazırlanması

Standart No	**Su (µl)**	**IL-10 ve TGF-β için (2400 pg/mL)**	**Son Konsantrasyon (pg/mL)**
1	120	120 µl standart	1200
2	120	120 µl standart 1	600
3	120	120 µl standart 2	300
4	120	120 µl standart 3	150
5	120	120 µl standart 4	75
6	120	-	0

Hazırlanan standartlardan 50 µl alınarak plakalardaki ilgili kuyucuklara eklendi. Standart kuyucuklarına 50 µL ilgili proteinin standartlarından eklendi. Her bir örnekten 40 µl alınarak plakalardaki ilgili kuyucuklara eklendi. Standart çözeltilerin olduğu kuyucuklara standart çözelti içinde zaten mevcut olduğu için biyotinlenmiş antikor eklenmedi. Örneklerin bulunduğu kuyucuklara 10 µl biyotinlenmiş antikor eklendi. Daha sonra tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-Yaban Turbu Proksidazı (HRP) çözeltisi eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra plakanın üzeri kapatılarak 37˚C'de 60 dk. inkübasyona bırakıldı. Plakalardaki her bir kuyucuk, 300 µL yıkama tampon ile 30-60 sn yıkandı. Bu yıkama işlemi 5 kez tekrar edildi. Yıkama işlemleri bittikten sonra plaka kurutma kağıdına ters çevirilerek kurutuldu. Her bir kuyucuğa 50 µL A çözeltisi ve 50 µL B çözeltisi eklendi. Plakanın üstü yapışkan film kağıdıyla kapatılarak karanlıkta 37ºC'de 10 dk. inkübasyona bırakıldı. Her bir kuyucuğa 50µL durdurma çözeltisinden eklendi ve mor rengin hızlıca sarı renge değiştiği gözlemlendi. Her bir kuyucuğun OD değeri, çoklu plaka okuyucusunda 450 nm'de okuma yapılarak belirlendi. Konsantrasyonları bilinen standart protein çözeltilerinin OD'leri kullanılarak excel'de standart bir eğri oluşturuldu ve her bir örneğin protein konsantrasyonu bu eğri kullanılarak hesaplandı.

3.2.16. İstatistiksel Analiz

Sayısal ölçümlerin normal dağılım varsayımını sağlayıp sağlamadığı Shapiro-Wilk testi ile test edildi. Veriler normal dağıldığı için her bir maruziyet süresi ile kontrol grubunun karşılaştırılmasında bağımsız örneklem t-testi kullanıldı. Maruziyet sürelerinin birbiri ile karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanıldı. ANOVA testinde anlamlılık bulunması halinde ikili karşılaştırmalarda Tukey testi kullanıldı. Verilerin istatistiksel analizinde Graphpad Prism ve SPSS programı kullanıldı. Tüm testlerde $p<0.05$ olan durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Her bir grup 3 kez çalışıldı.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında 5. nesil (5G) iletişim teknolojilerinin kapsamında sayılan 6 GHz RF-EMA'nın beyindeki immün sistemi hücrelerinden olan mikroglial hücreleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlandı. 6 GHz RF-EMA'nın mikroglial hücrelerinin canlılığına etkisini belirlemek için MTT ve AO/EB yöntemleri, inflamasyon ile ilişkisini değerlendirmek için ise RT-PCR ve ELISA yöntemleri kullanıldı.

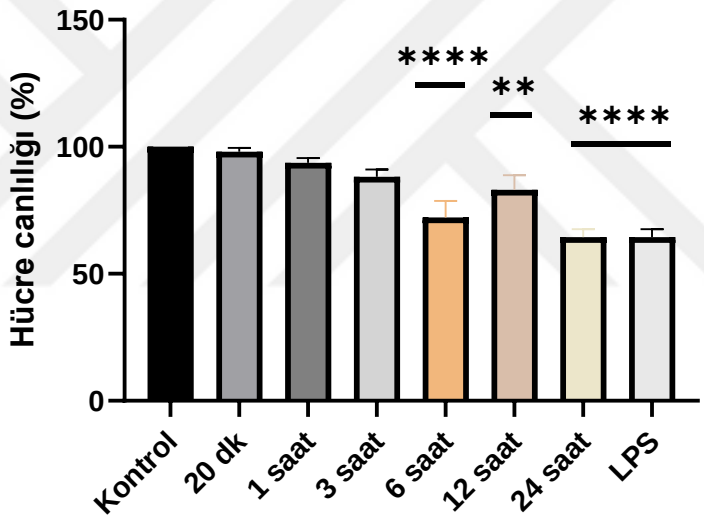
4.1. MTT Sitotoksisite Testinden Elde Edilen Bulgular

N9 mikroglia hücreleri 20 dk, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat 6 GHz RF-EMA uygulamasına maruz bırakıldı ve bu maruziyetlerin hücre canlılığına olan etkisi MTT yöntemi ile değerlendirildi. Her bir uygulama süresinin kontrol grubu olarak aynı sürelerde, aynı koşullarda kültüre edilen ve RF-EMA uygulamasına maruz bırakılmayan hücreler kullanıldı. Hücrelerin her bir uygulama süresindeki canlılığı, kendi kontrol grubunun verileri kullanılarak hesaplandı ve uygulama sürelerinin kontrole göre farklılıkları test etmek için bağımsız örneklem t-testi kullanıldı. Farklı sürelerde RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin MTT testine göre hücre canlılığına ilişkin bulgular Çizelge 14'de ve ilgili grafikler Şekil 14'de gösterilmiştir.

20 dk, 1 saat ve 3 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 hücrelerinin canlılığı ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$). 6 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin canlılığının kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). 12 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin canlılığının kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi ($p<0.01$). 24 saat 6 GHz RF-EMA'ya ve 24 saat 1 μg/mL LPS'ye maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin canlılığının kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi ($p<0.0001$).

Çizelge 14. MTT sitotoksisite testine ilişkin bulgular.

Gruplar	Ortalama ± Standart sapma	Min-Max	p değeri
Kontrol	%100 olarak alınmıştır.		
20 dk RF-EMA	98.02±1.57	96.34-99.45	0.999
1 saat RF-EMA	93.67±1.87	91.68-95.38	0.66
3 saat RF-EMA	88.15±2.95	85.16-91.05	0.07
6 saat RF-EMA	82.15±22.3	107.31-64.8	**<0.0001**
12 saat RF-EMA	83.1±5.73	77.06-88.46	**0.005**
24 saat RF-EMA	73.17±7.58	65.06-80.08	**<0.0001**
24 saat 1 µg/mL LPS	64.42±9.97	60.93-66.93	**<0.0001**



Şekil 14. Çeşitli sürelerde 6 GHz RF-EMA uygulamasının mikroglia hücrelerinin (N9) canlılığına etkisi. LPS 1 µg/mL konsantrasyonda 24 saat uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). Her bir uygulama süresindeki hücre canlılığı, kendi kontrol grubu kullanılarak hesaplanmış ve kontrol grubunun canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. Farklı uygulama süreleri kontrol grubu ile bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. Uygulama sürleri birbirleri ile kıyaslanırken tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey testi kullanılmıştır. ** $p<0.01$; **** $p<0.0001$; ns $p>0.05$ göstermektedir.

6 GHz uygulama süreleri farklı olan gruplar birbirleri ile One-Way ANOVA testi ile karşılaştırıldığında;

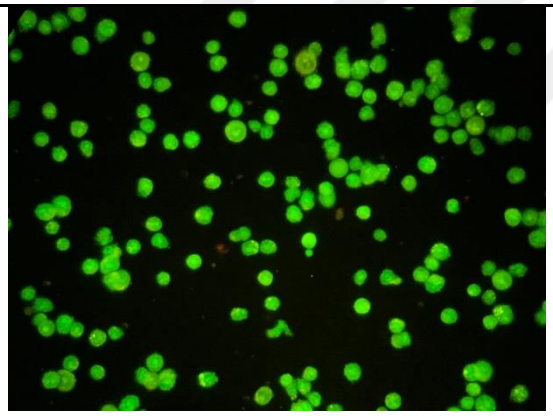
- 20 dk 6 GHz RF-EMA uygulamasına maruz bırakılan N9 hücrelerinin canlılığının, 6 saat ($p<0.0001$), 12 saat ($p<0.01$) ve 24 saat ($p<0.0001$) uygulama süreleri ve LPS grubuna ($p<0.0001$) göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi.
- 1 saat 6 GHz RF-EMA uygulamasına maruz bırakılan N9 hücrelerinin canlılığının, 6 saat ($p<0.005$) ve 24 saat ($p<0.005$) uygulama süreleri ve LPS ($p<0.0001$) grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi.
- 3 saat 6 GHz RF-EMA uygulamasına maruz bırakılan N9 hücrelerinin canlılığının, 6 saat ($p<0.01$) ve 24 saat ($p<0.05$) uygulama süreleri ve LPS ($p<0.005$) grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi.
- 12 saat 6 GHz RF-EMA uygulamasına maruz bırakılan N9 hücrelerinin canlılığının LPS uygulanan hücreler göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi ($p<0.01$).

4.2. Akridin Oranj /Etidyum Bromür Boyaması Bulguları

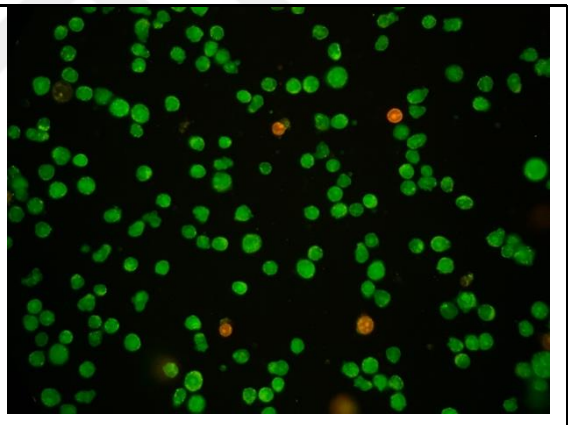
N9 mikroglia hücreleri 20 dk, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat 6 GHz RF-EMA uygulamasına maruz bırakıldı ve bu maruziyetlerin hücre canlılığına olan etkisi ayrıca AO/EB boyaması yöntemi ile de değerlendirildi. Her bir uygulama süresinin kontrol grubu olarak aynı sürelerde, aynı koşullarda kültüre edilen ve RF-EMA uygulamasına maruz bırakılmayan hücreler kullanıldı. Her bir uygulama süresindeki hücre canlılığının, kendi kontrol grubu ile arasındaki farklılıklarını belirlemek için bağımsız örneklem t-testi kullanıldı. Farklı sürelerde RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin AO/EB boyamasında elde edilen bulgular Çizelge 15'de gösterilmiştir. Elde edilen görüntüler Şekil 15'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 15. AO/EB boyamasından elde edilen bulgular.

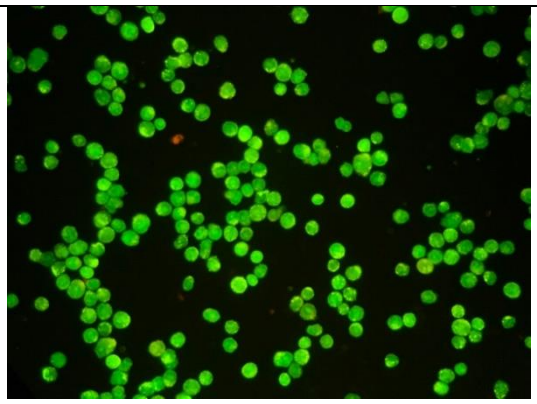
Gruplar	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
20 dk Kontrol	95.03±2.75	92.8-98.1	0.272
20 dk RF-EMA	92.47±2.16	90.2-94.5	
1 saat Kontrol	95.43±3.49	92.3-99.2	0.19
1 saat RF-EMA	89.87±5.02	85.6-95.4	
3 saat Kontrol	97.7±0.84	96.9-98.7	0.264
3 saat RF-EMA	94.77±3.8	90.5-97.8	
6 saat Kontrol	97.9±0.26	97.6-98.1	**0.024**
6 saat RF-EMA	90.47±3.56	86.8-93.9	
12 saat Kontrol	95.97±2.83	92.7-97.6	**0.024**
12 saat RF-EMA	88.03±2.68	85-90.1	
24 saat Kontrol	95.27±2.48	92.6-97.5	**0.0015**
24 saat RF-EMA	76.37±11.01	66.8-88.4	
24 saat LPS	78.17±6.99	70.2-83.3	**0.0051**



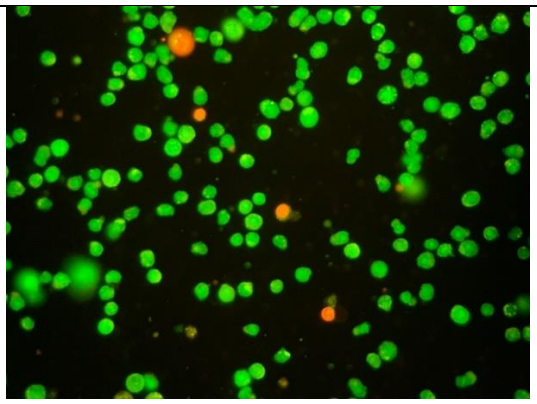
a) 20 dk Kontrol



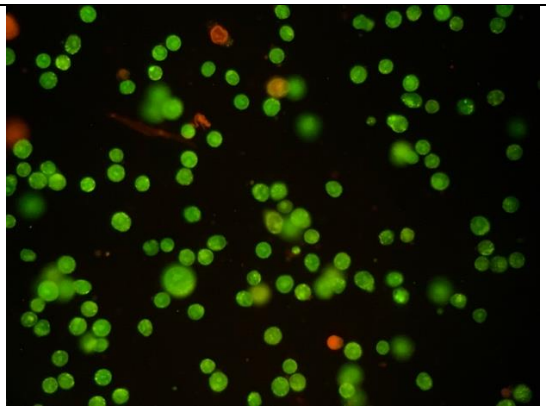
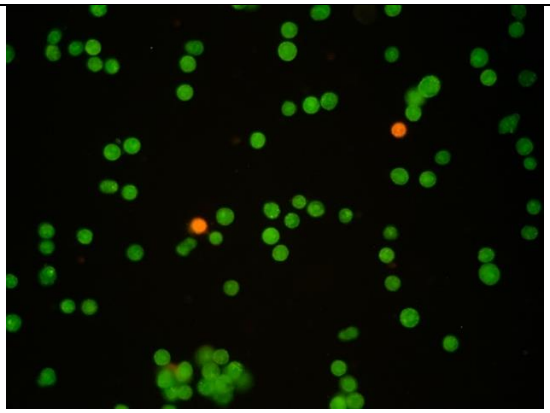
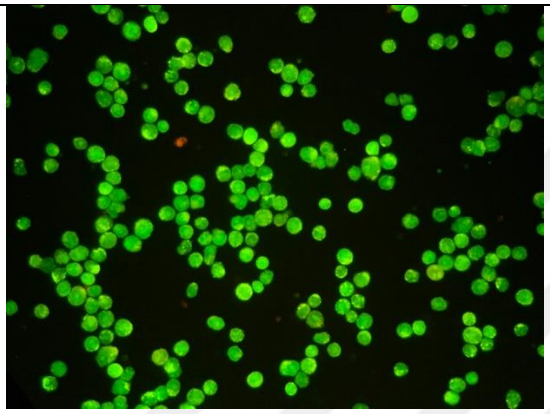
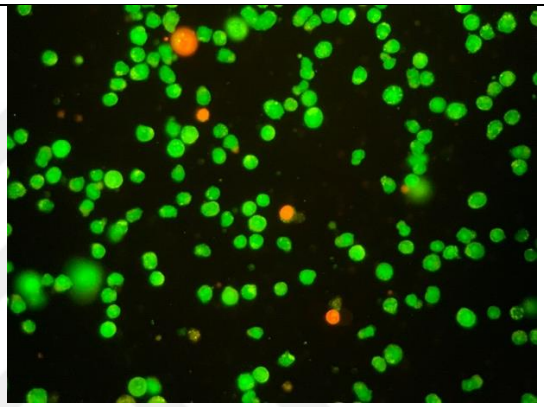
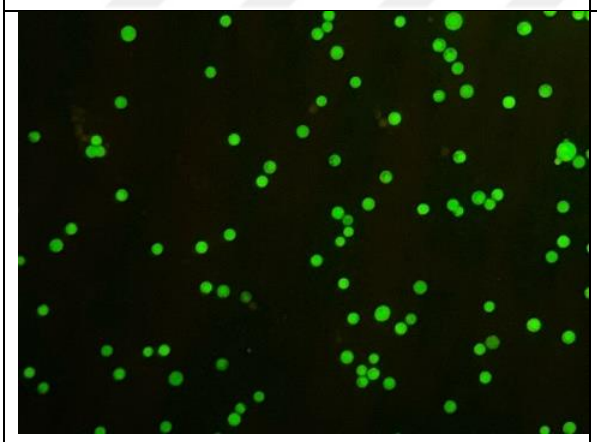
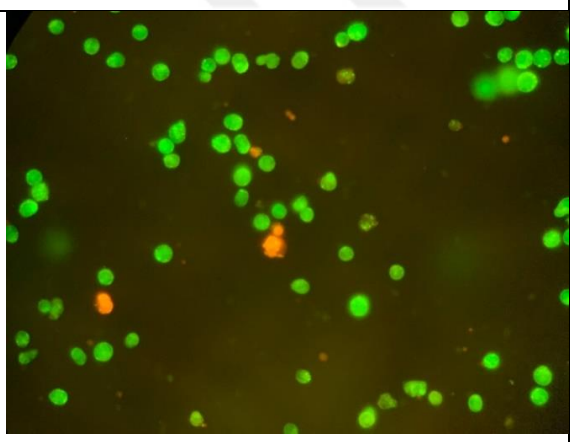
b) 20 dk RF-EMA

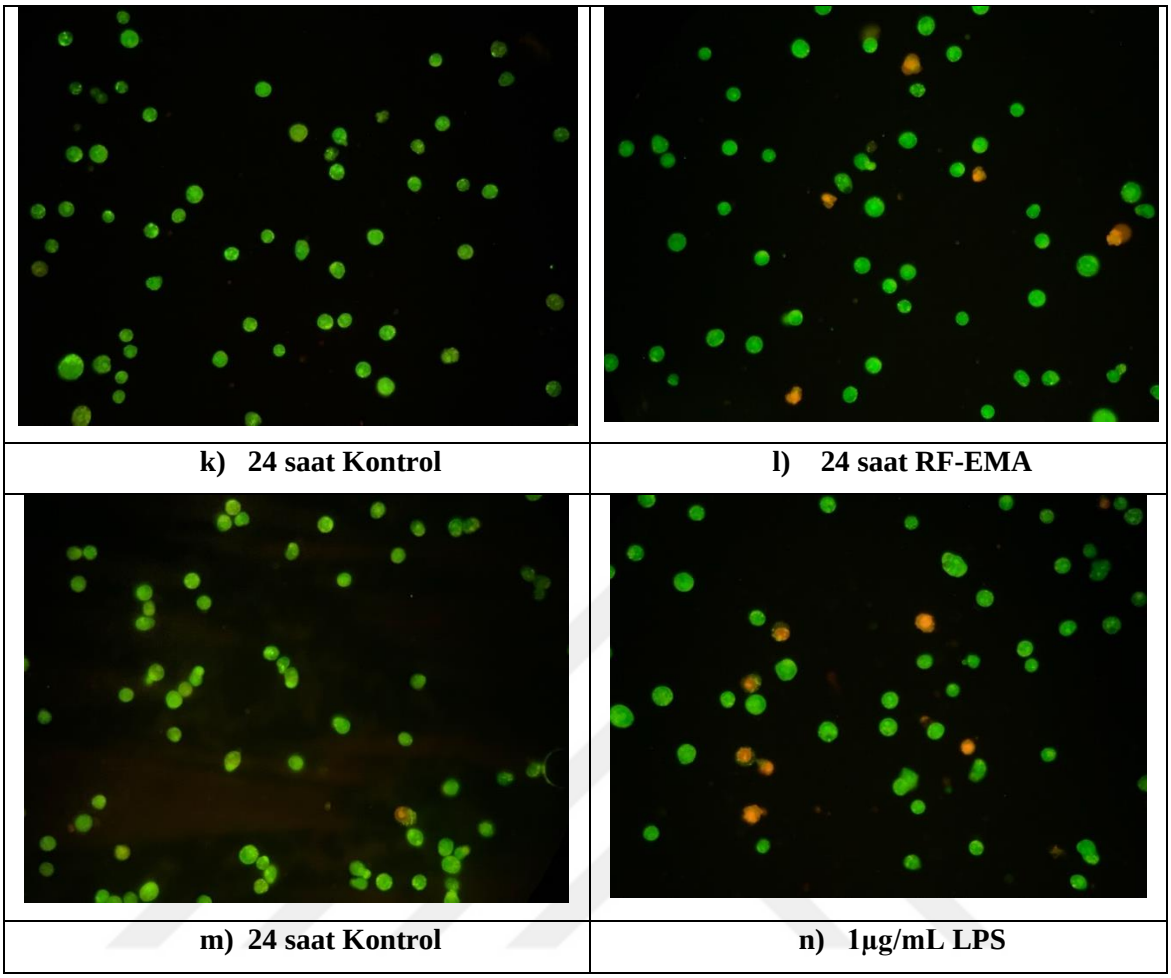


c) 1 saat Kontrol



d) 1 saat RF-EMA

	
e) 3 saat Kontrol	**f) 3 saat RF-EMA**
	
g) 6 saat Kontrol	**h) 6 saat RF-EMA**
	
i) 12 saat Kontrol	**j) 12 saat RF-EMA**



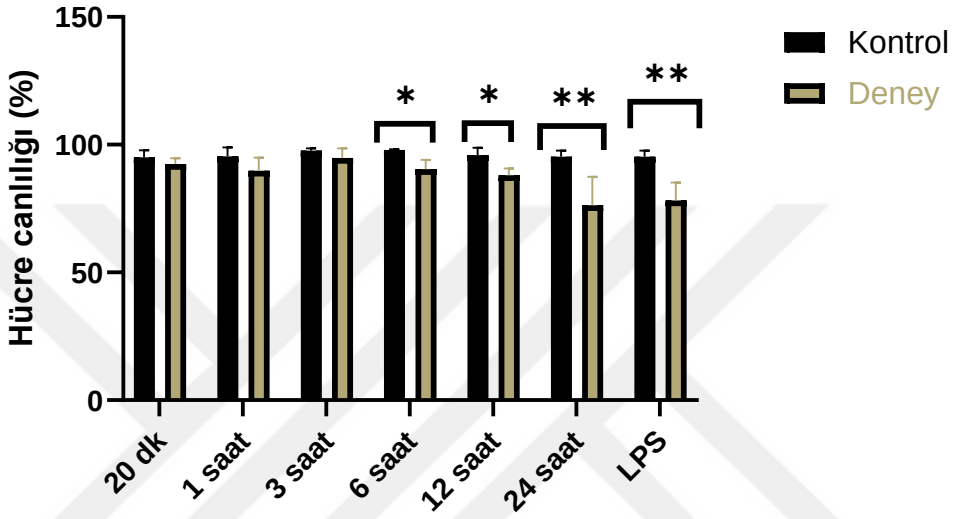
k) 24 saat Kontrol | **l) 24 saat RF-EMA**

m) 24 saat Kontrol | **n) 1µg/mL LPS**

Şekil 15. Farklı sürelerde RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin AO/EB boyamasında elde edilen floresan mikroskop görüntüleri. Kırmızı hücreler ölü hücreleri gösterirken, yeşil hücreler canlı hücreleri göstermektedir. **a)** 20 dk normal koşullarda kültüre edilen N9 hücreleri. **b)** 20 dk 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 hücreleri. **c)** 1 saat normal koşullarda kültüre edilen N9 hücreleri. **d)** 1 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 hücreleri. **e)** 3 saat normal koşullarda kültüre edilen N9 hücreleri. **f)** 3 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 hücreleri. **g)** 6 saat normal koşullarda kültüre edilen N9 hücreleri. **h)** 6 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 hücreleri. **i)** 12 saat normal koşullarda kültüre edilen N9 hücreleri. **j)** 12 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 hücreleri. **k)** 24 saat normal koşullarda kültüre edilen N9 hücreleri. **l)** 24 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 hücreleri. **m)** 24 saat normal koşullarda kültüre edilen N9 hücreleri. **n)** 24 saat 1µg/mL LPS'ye maruz bırakılan N9 hücreleri.

Farklı sürelerde RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin AO/EB boyamasına göre hücre canlılığına ilişkin grafikler Şekil 16'da gösterildiği gibidir. 20 dk, 1 saat ve 3 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 hücrelerinin canlılığı ile kontrol grupları arasında anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$). 6 ve 12 saat 6

GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin canlılığının kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). 24 saat 6 GHz RF-EMA'ya ve 24 saat 1 µg/Ml LPS maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin canlılığının kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi ($p<0.01$).



Şekil 16. Çeşitli sürelerde 6 GHz RF-EMA uygulamasının mikroglia hücrelerinin (N9) canlılığına etkisi. LPS 1 µg/mL konsantrasyonda 24 saat uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). Her bir uygulama süresi grubu, kendi kontrol grubu ile bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; ns $p>0.05$ göstermektedir.

6 GHz uygulama süreleri farklı olan gruplar birbirleri ile One-Way ANOVA testi ile karşılaştırıldığında;

- 20 dk uygulama süresine maruz bırakılan hücrelerin canlılığının, ve 24 saat ($p<0.01$) uygulama süresi ve LPS grubuna ($p<0.05$) göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi.
- 3 saat uygulama süresine maruz bırakılan hücrelerin canlılığının, ve 24 saat ($p<0.005$) uygulama süresi ve LPS grubuna ($p<0.005$) göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi.

- 6 saat uygulama süresine maruz bırakılan hücrelerin canlılığının, ve 24 saat ($p<0.05$) uygulama süresine göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi.

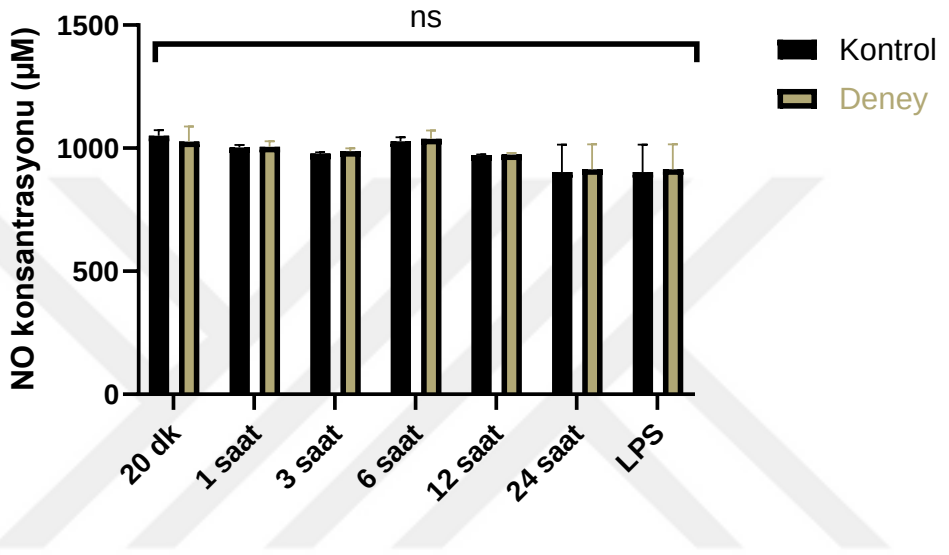
4.3. NO Ölçümü Bulguları

N9 mikroglia hücreleri 20 dk, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat 6 GHz RF-EMA uygulamasına maruz bırakıldı ve bu maruziyetlerin büyüme ortamındaki NO miktarına olan etkisi NO ölçüm cihazı ile değerlendirildi. Her bir uygulama süresinin kontrol grubu olarak aynı sürelerde, aynı koşullarda kültüre edilen ve RF-EMA uygulamasına maruz bırakılmayan hücreler kullanıldı. Hücrelerin her bir uygulama süresinde büyüme ortamındaki NO konsantrasyonu, kendi kontrol grubunun NO konsantrasyonu ile bağımsız örneklem t-testi kullanılarak karşılaştırıldı. Farklı sürelerde RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerinin büyüme ortamındaki NO konsantrasyonunun ölçümüne ilişkin bulgular Çizelge 16'da ve ilgili grafikler Şekil 17'de gösterilmiştir.

Çizelge 16. NO Ölçümünden elde edilen bulgular.

Gruplar	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
20 dk Kontrol	1051±21.52	1030-1073	0.558
20 dk RF-EMA	1027±61.44	957-1072	
1 saat Kontrol	1003.33±9.29	993-1011	0.854
1 saat RF-EMA	1006±21.63	988-1030	
3 saat Kontrol	977.67±5.86	971-982	0.246
3 saat RF-EMA	988±11.79	975-988	
6 saat Kontrol	1028.67±16.29	1010-1040	0.687
6 saat RF-EMA	1038±33.6	1006-1073	
12 saat Kontrol	971.67±2.52	969-974	0.559
12 saat RF-EMA	974.33±6.81	969-982	
24 saat Kontrol	903.67±110.56	776-968	0.908
24 saat RF-EMA	914.33±101.11	798-981	
24 saat LPS	906±128.42	758-988	0.934

Her bir 6 GHz uygulama süresindeki NO konsantrasyonu, kendi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak ikisi arasında herhangi bir farklılık olmadığı belirlendi ($p>0.05$). 6 GHz uygulama grupları birbirleri ile One-Way ANOVA testi ile karşılaştırıldığında, uygulama sürelerindeki farklılıkların büyüme ortamındaki NO konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı bulundu ($p>0.05$).

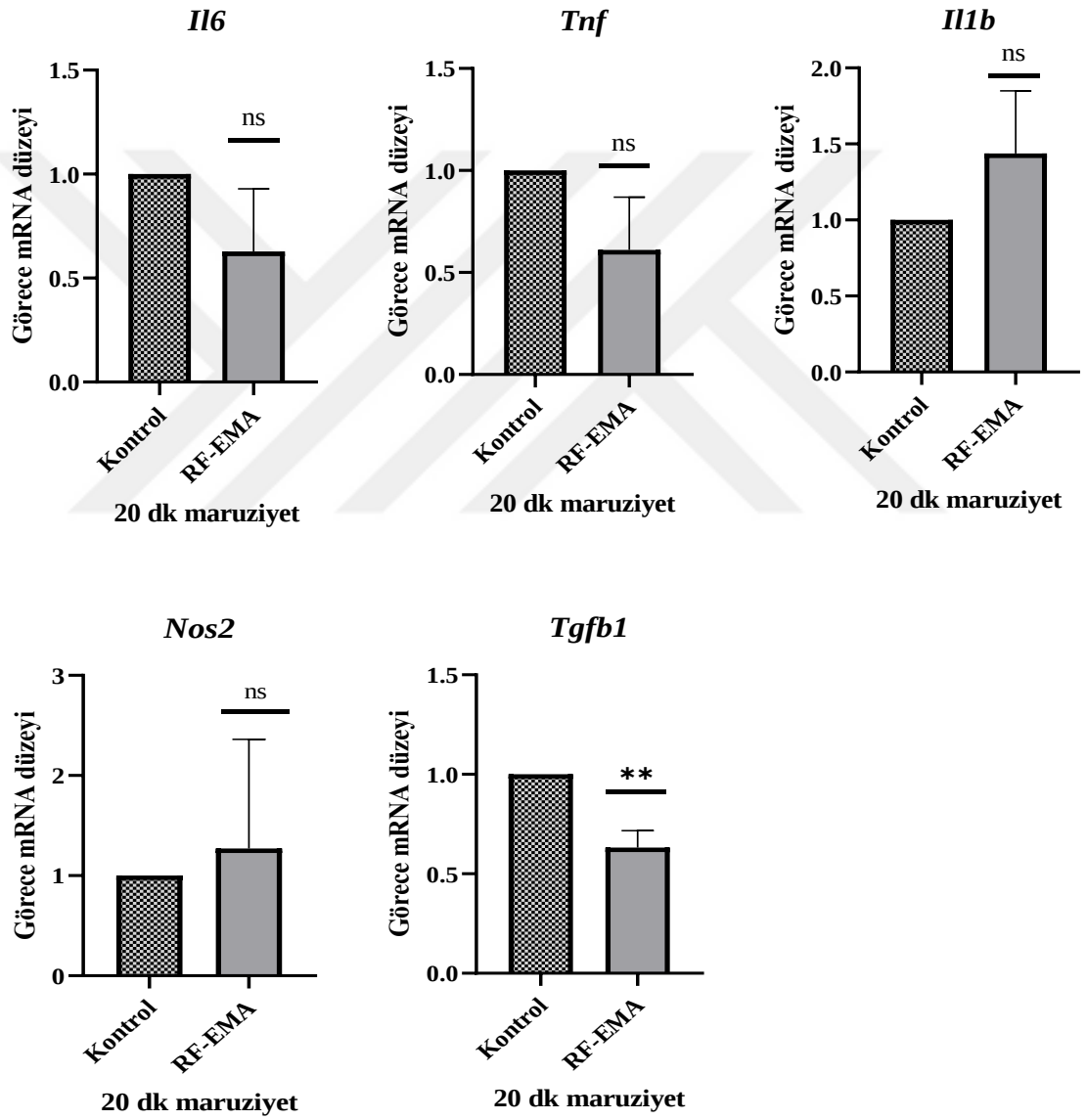


Şekil 17. Çeşitli sürelerde 6 GHz RF-EMA uygulamasının mikroglia hücrelerinin büyüme ortamındaki NO miktarına etkisi. LPS 1 µg/mL konsantrasyonda 24 saat uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). Her bir uygulama süresi grubu, kendi kontrol grubu ile bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. ns $p>0.05$ göstermektedir.

4.5. RT-PCR Bulguları

N9 mikroglia hücreleri 20 dk, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat 6 GHz RF-EMA uygulamasına maruz bırakıldı ve bu maruziyetlerin *Il6, Tnf, Tgfb1, Il1b* ve *Nos2* genlerinin ekspresyonuna etkisi RT-PCR ile değerlendirildi. Her bir uygulama süresinin kontrol grubu olarak aynı sürelerde, aynı koşullarda kültüre edilen ve RF-EMA uygulamasına maruz bırakılmayan hücreler kullanıldı. Her bir uygulama süresindeki hücre canlılığının, kendi kontrol grubu ile arasındaki farklılıkları belirlemek için bağımsız örneklem t-testi kullanıldı.

20 dk 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgfb1* genlerinin ekspresyonuna ait RT-PCR bulguları Çizelge 17'de ve grafikleri Şekil 18'de gösterilmiştir. 20 dk 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Tgfb1* geninin ekspresyonunun kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak düştüğü tespit edildi ($p<0.01$). 20 dk 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Il6, Tnf, Il1b* ve *Nos2* genlerinin ekspresyonunda kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).



Şekil 18. 20 dk 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgf1* genlerinin ekspresyonu bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 20 dk. uygulama süresi, kontrol grubu ile bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. ** $p<0.01$; ns $p>0.05$ göstermektedir.

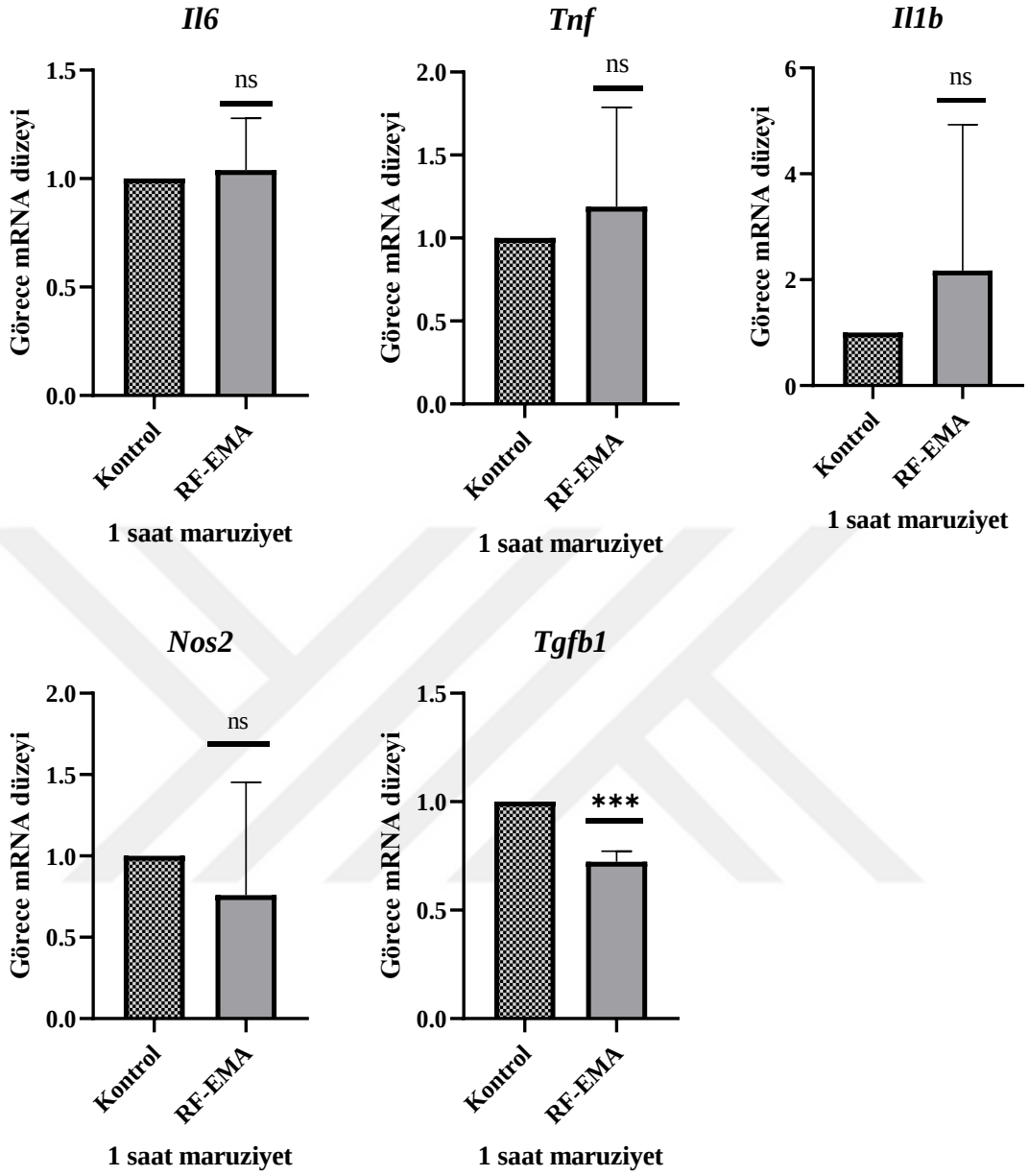
Çizelge 17. 20 dk 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları.

Genler	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
Il6	0.63±0.3	0.29-0.86	0.099
Tnf	0.61±0.26	0.4-0.9	0.0597
Il1b	1.44±0.41	1.06-1.87	0.138
Nos2	1.27±1.09	0.41-2.5	0.689
Tgfb1	0.63±0.08	0.54-0.69	**0.0016**

1 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgfb1* genlerinin ekspresyonuna ait RT-PCR bulguları Çizelge 18'de ve ilgili grafikler Şekil 19'da gösterildiği gibidir. 1 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Tgfb1* geninin ekspresyonunun kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak düştüğü tespit edildi ($p<0.005$). 1 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Il6, Tnf, Il1b* ve *Nos2* genlerinin ekspresyonunda kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).

Çizelge 18. 1 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları.

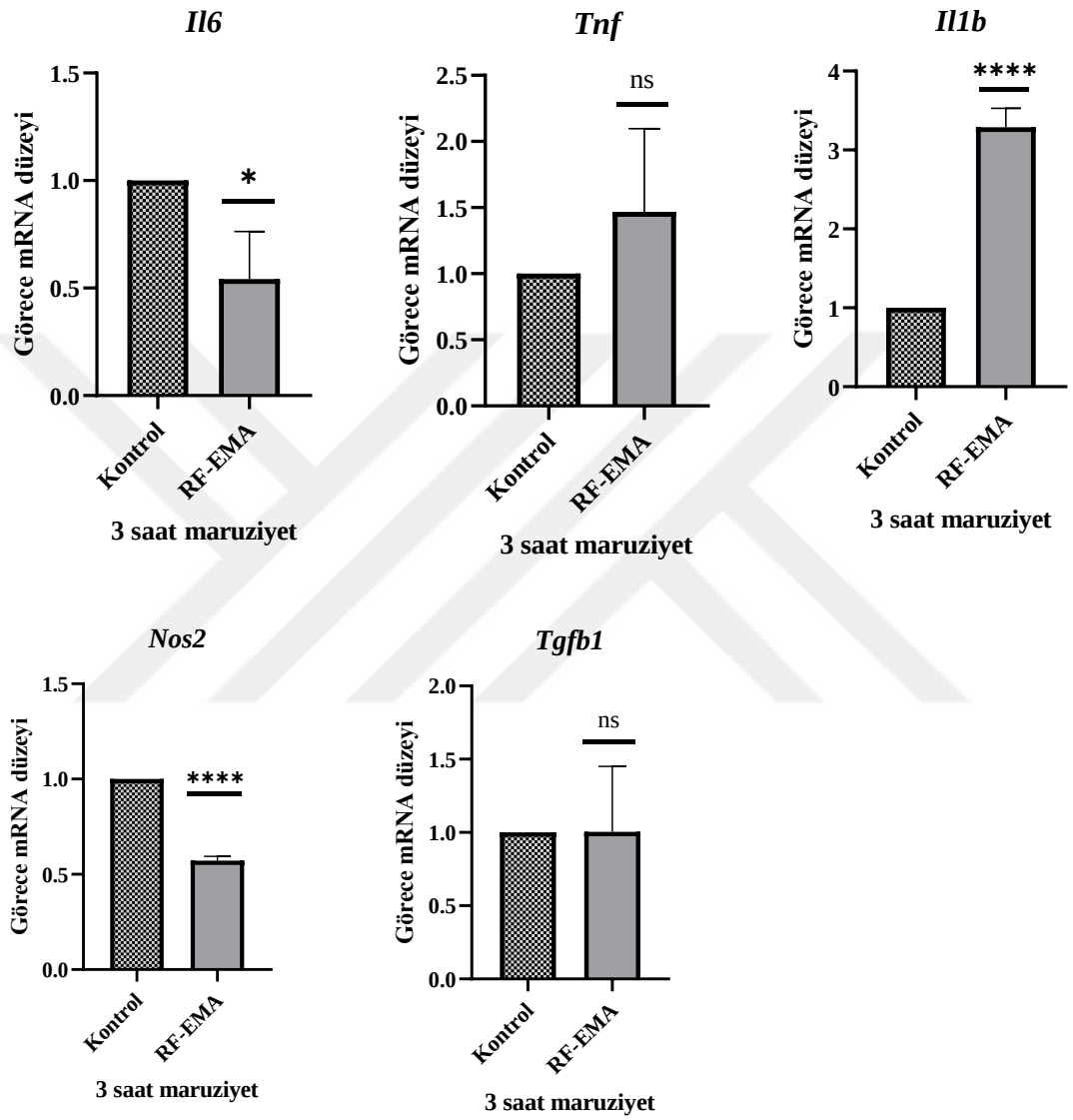
Genler	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
Il6	1.04±0.24	0.81-1.29	0.79
Tnf	1.19±0.6	0.65-1.83	0.6133
Il1b	2.17±2.75	0.51-5.35	0.502
Nos2	0.76±0.69	0.23-1.54	0.579
Tgfb1	0.72±0.05	0.67-0.77	**0.0006**



Şekil 19. 1 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgf1* genlerinin ekspresyonu bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 1 saat uygulama süresi, kontrol grubu ile bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. *** $p<0.005$; ns $p>0.05$ göstermektedir.

3 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgfb1* genlerinin ekspresyonuna ait RT-PCR bulguları Çizelge 19'da ve grafikleri Şekil 20'de gösterildiği gibidir. 3 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Il6* ve *Nos2* geninin ekspresyonunun kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak düştüğü tespit edildi ($p<0.05$). 3 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Il1b* geninin ekspresyonunun

kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak arttığı tespit edildi (p<0.0001). 3 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Tnf* ve *Tgfb1* genlerinin ekspresyonunda kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı (p>0.05).



Şekil 20. 3 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgf1* genlerinin ekspresyonu bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 1 saat uygulama süresi, kontrol grubu ile bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. * p<0.05; **** p<0.0001; ns p>0.05 göstermektedir.

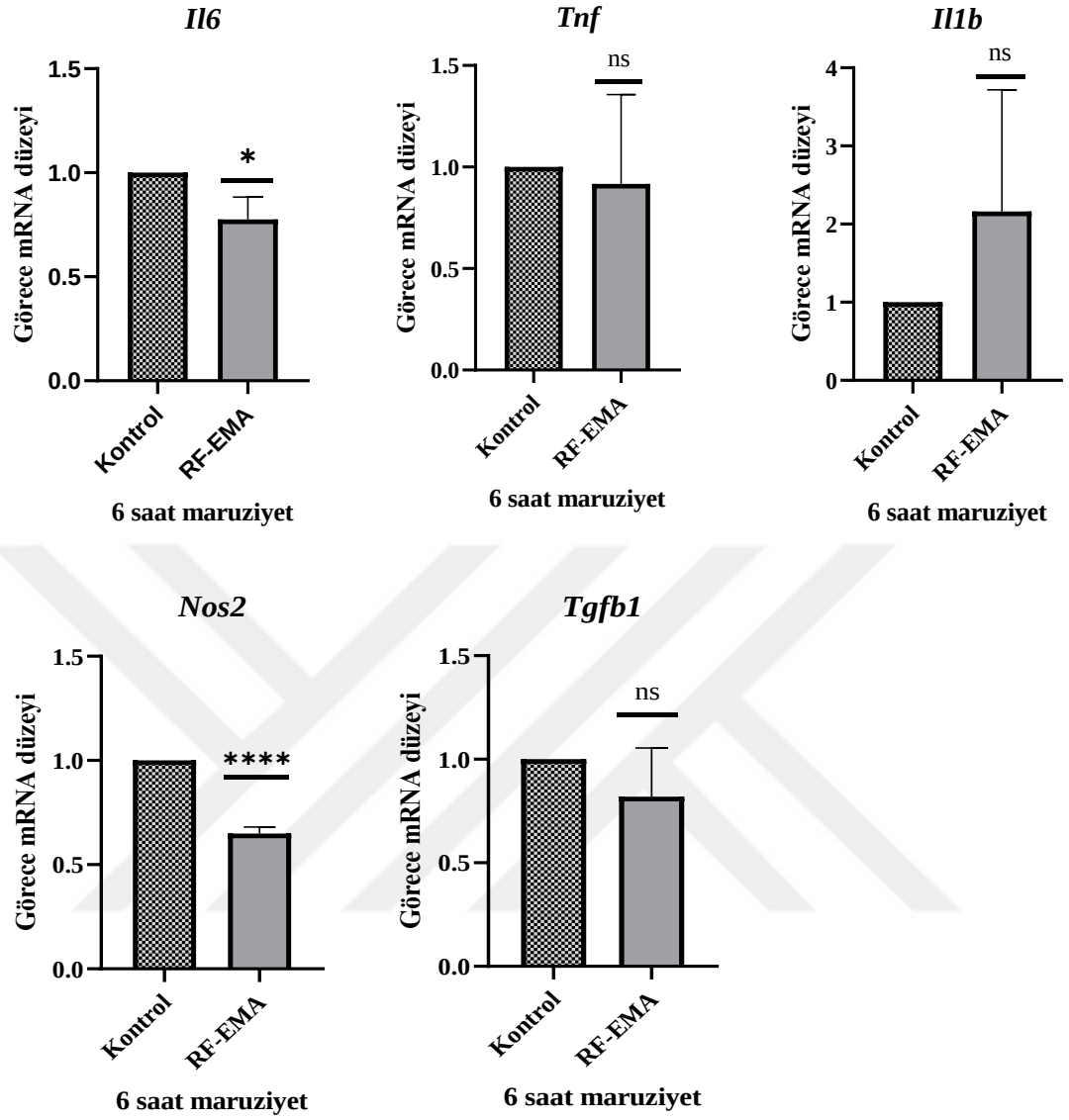
Çizelge 19. 3 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları.

Genler	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
Il6	0.54±0.22	0.29-0.71	**0.0229**
Tnf	1.47±0.63	0.75-1.95	0.2684
Il1b	3.29±0.24	3.1-3.56	**<0.0001**
Nos2	0.57±0.02	0.55-0.59	**<0.0001**
Tgfb1	1±0.45	0.51-1.38	0.988

6 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgfb1* genlerinin ekspresyonuna ait RT-PCR bulguları Çizelge 20'de ve ilgili grafikler Şekil 21'de gösterildiği gibidir. 6 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Il6* ve *Nos2* geninin ekspresyonunun kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak düştüğü tespit edildi ($p<0.05$). 6 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Il1b, Tnf* ve *Tgfb1* genlerinin ekspresyonunda kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).

Çizelge 20. 6 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları.

Genler	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
Il6	0.77±0.11	0.68-0.89	**0.0228**
Tnf	0.92±0.44	0.41-1.23	0.759
Il1b	2.16±1.56	1.08-3.94	0.266
Nos2	0.65±0.03	0.62-0.68	**<0.0001**
Tgfb1	0.82±0.24	0.68-1.1	0.253

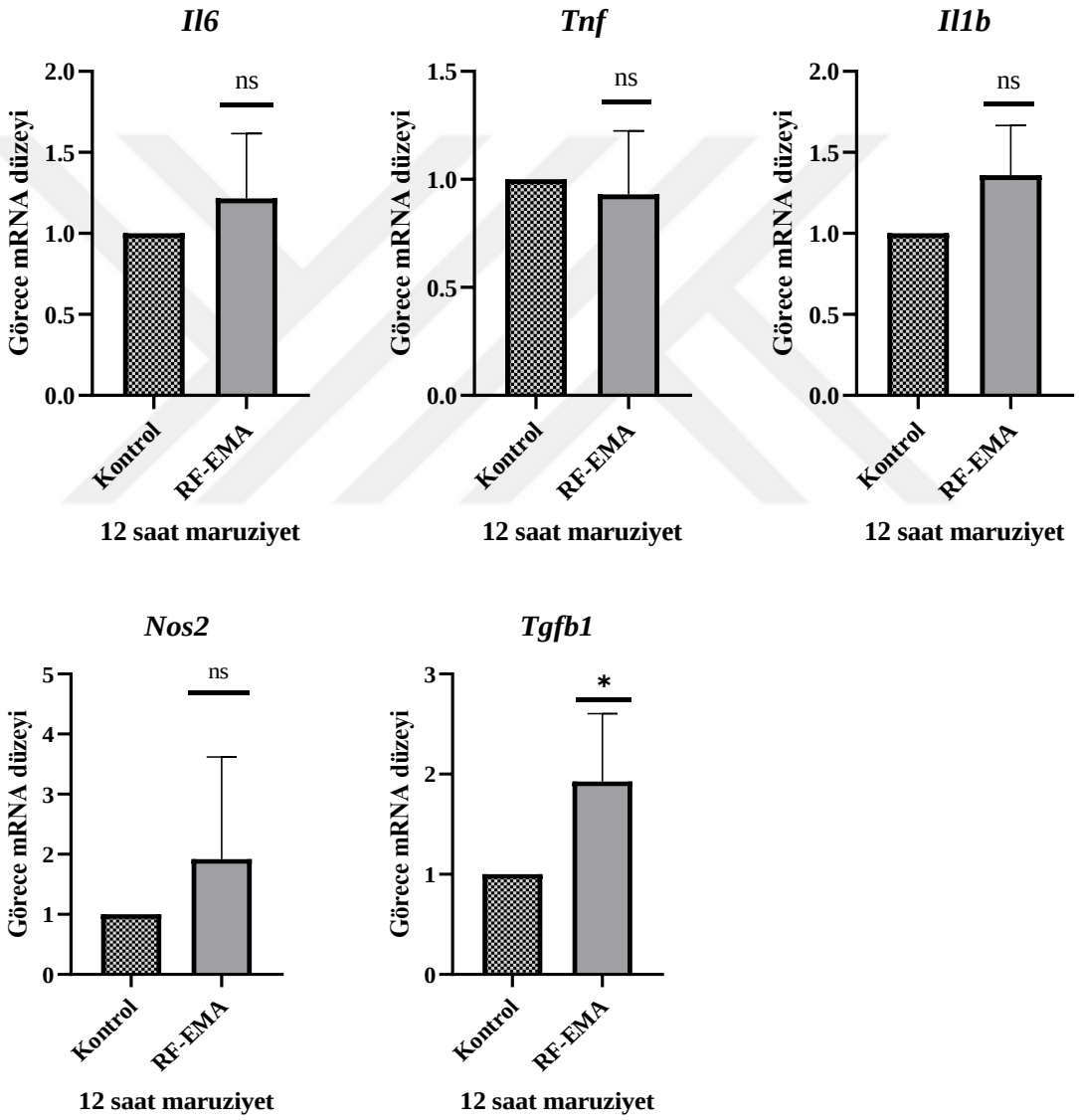


Şekil 21. 6 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgf1* genlerinin ekspresyonu bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 1 saat uygulama süresi, kontrol grubu ile bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. * $p<0.05$; ****<0.0001; ns $p>0.05$ göstermektedir.

12 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgfb1* genlerinin ekspresyonuna ait RT-PCR bulguları Çizelge 21'de ve ilgili grafikler Şekil 22'de gösterilmiştir. 12 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Tgfb1* geninin ekspresyonunun kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p<0.05$). 12 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Il6, Tnf, Il1b* ve *Nos2* genlerinin ekspresyonunda kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).

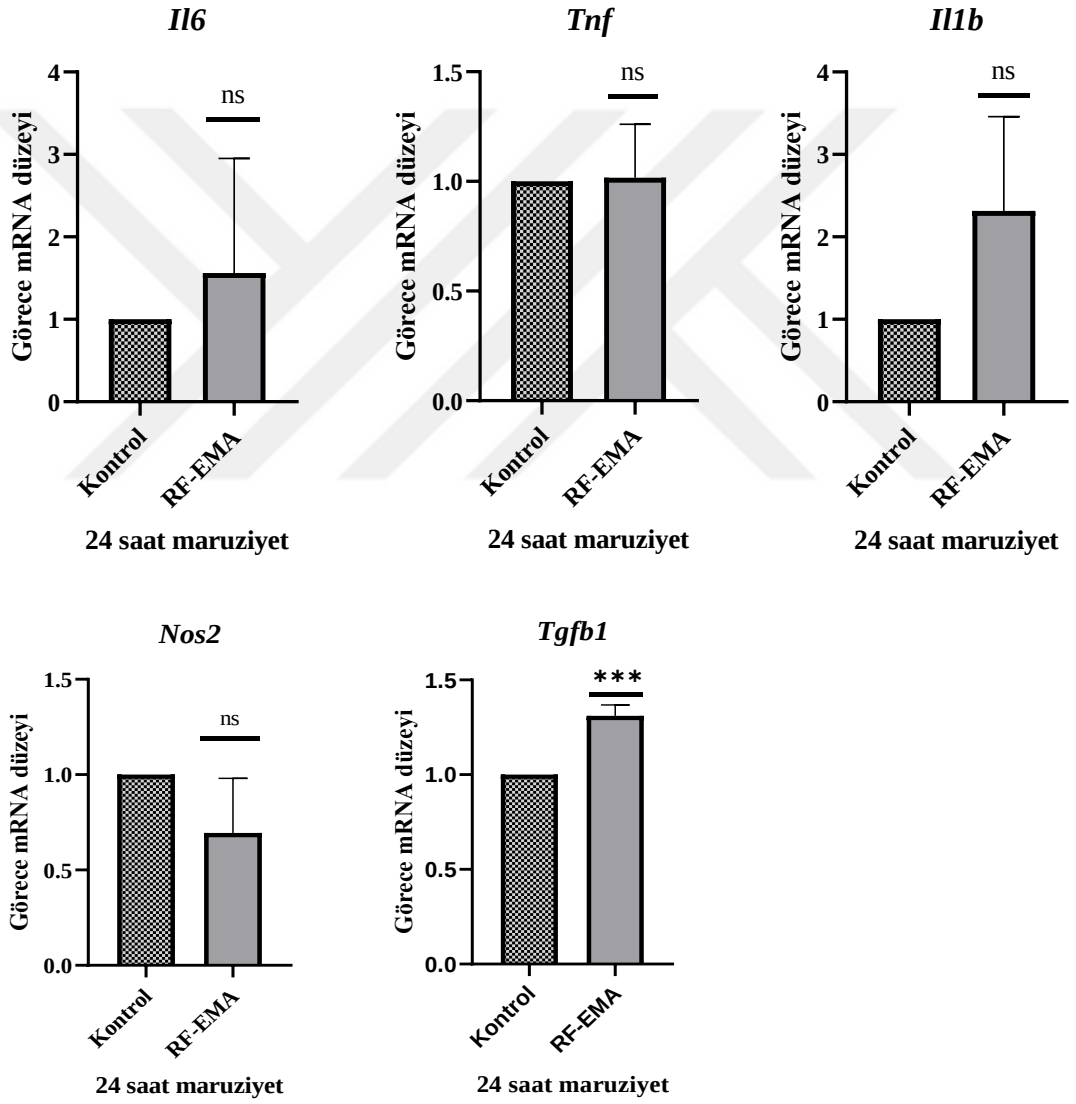
Çizelge 21. 12 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları.

Genler	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
Il6	1.22±0.4	0.88-1.66	0.4029
Tnf	0.93±0.29	0.68-1.25	0.704
Il1b	1.36±0.31	1.1-1.7	0.113
Nos2	1.92±1.7	0.84-3.88	0.403
Tgfb1	1.93±0.68	1.28-2.63	**0.046**



Şekil 22. 12 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgfb1* genlerinin ekspresyonu bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 1 saat uygulama süresi, kontrol grubu ile bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. * $p<0.05$; ns $p>0.05$ göstermektedir.

24 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgfb1* genlerinin ekspresyonuna ait RT-PCR bulguları Çizelge 22'de ve ilgili grafikler Şekil 23'de gösterildiği gibidir. 24 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Tgfb1* geninin ekspresyonunun kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p<0.05$). 24 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Il6, Tnf, Il1b* ve *Nos2* genlerinin ekspresyonunda kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).



Şekil 23. 24 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgfb1* genlerinin ekspresyonu bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 1 saat uygulama süresi, kontrol grubu ile bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. *** $p<0.005$; ns $p>0.05$ göstermektedir.

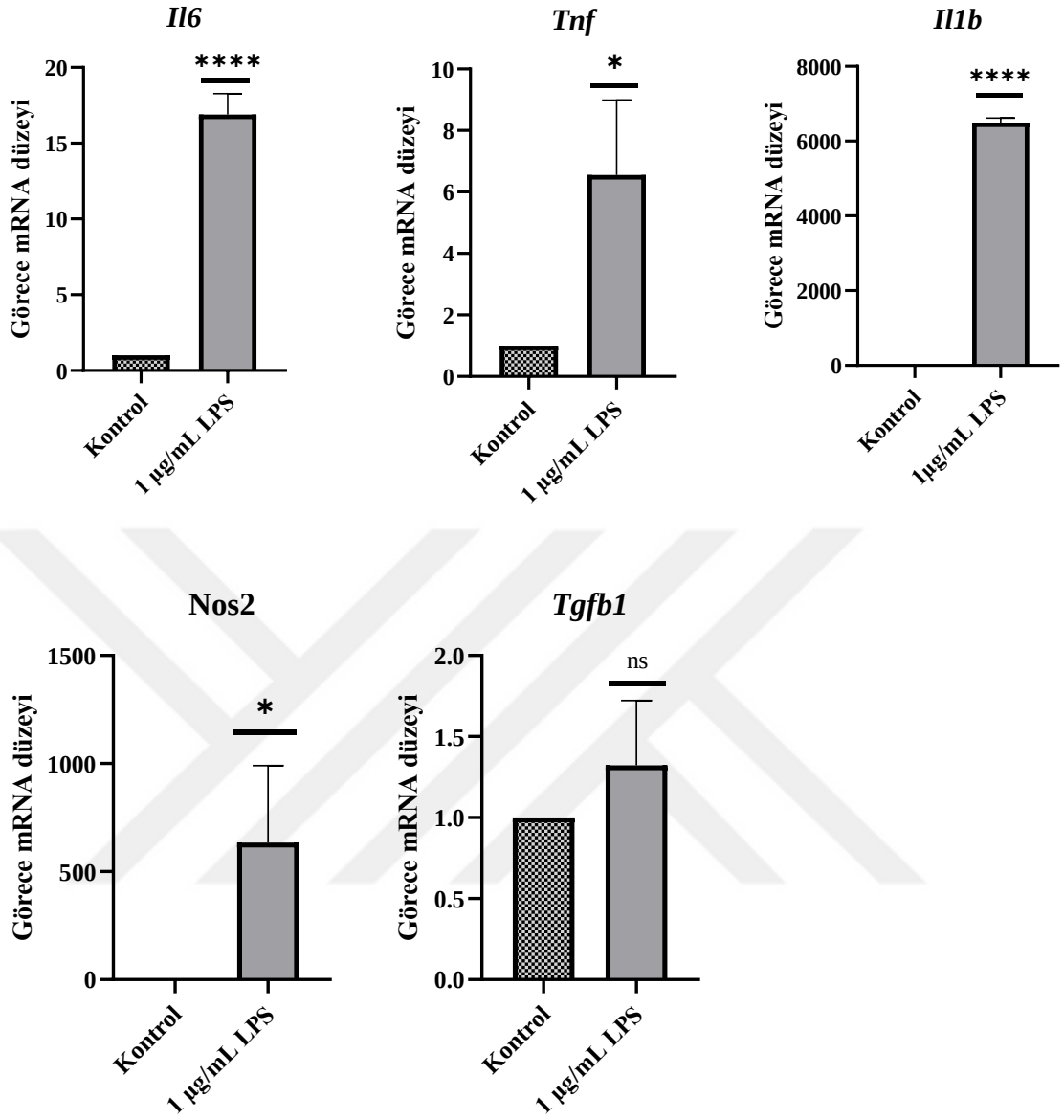
Çizelge 22. 24 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları.

Genler	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
Il6	1.56±1.39	0.56-3.15	0.5221
Tnf	1.02±0.24	0.85-1.3	0.909
Il1b	2.07±1.49	0.6-3.58	0.117
Nos2	0.69±0.29	0.41-0.98	0.138
Tgfb1	1.31±0.06	1.25-1.37	**0.0007**

24 saat 1 µg/mL LPS'ye maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgfb1* genlerinin ekspresyonuna ait RT-PCR bulguları Çizelge 23'de ve ilgili grafikler Şekil 24'de gösterildiği gibidir. 24 saat 1 µg/mL LPS maruziyetinde *Il6, Tnf, Il1b* ve *Nos2* genlerinin ekspresyonunun kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p<0.05$). 24 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde *Tgfb1* geninin ekspresyonunda kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).

Çizelge 23. 24 saat 1 µg/mL LPS maruziyeti sonrası RT-PCR bulguları.

Genler	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
Il6	16.89±1.38	15.34-18	**<0.0001**
Tnf	7.15±4.04	2.8-10.78	**0.0168**
Il1b	6495.22±119.64	6405.08-6630.95	**<0.0001**
Nos2	634.27±356.63	291.02-1002.93	**0.037**
Tgfb1	1.32±0.4	0.99-1.78	0.236



Şekil 24. 24 saat 1µg/mL LPS'ye maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin *Il6, Tnf, Il1b, Nos2* ve *Tgfb1* genlerinin ekspresyonu bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 1 saat uygulama süresi, kontrol grubu ile bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. * $p<0.05$; ****; $p<0.0001$; ns $p>0.05$ göstermektedir.

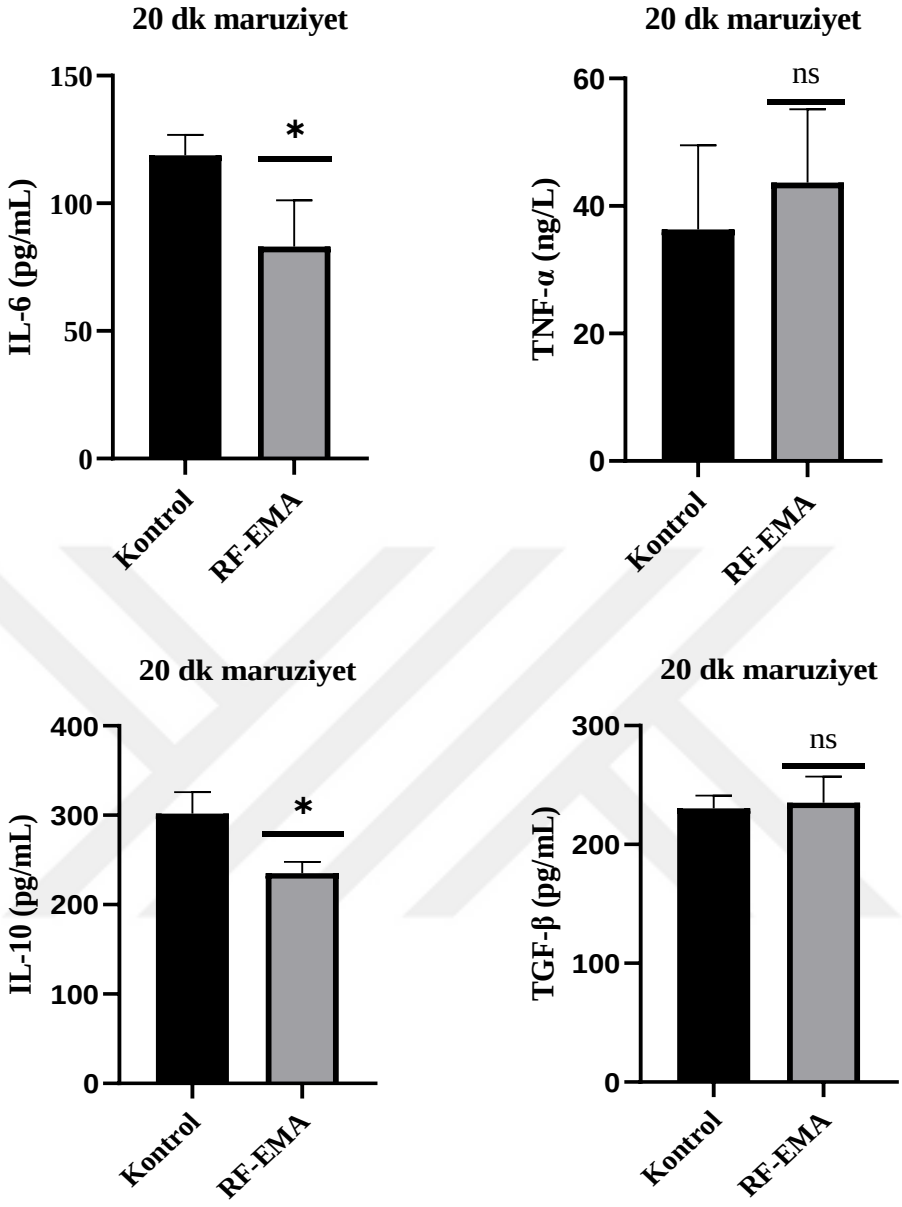
4.4. ELISA Bulguları

N9 mikroglia hücreleri 20 dk, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat 6 GHz RF-EMA uygulamasına maruz bırakıldı ve bu maruziyetlerin hücrelerin büyüme ortamlarında bulunan TNF-α, IL-6, IL-10, proteinlere olan etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Her bir uygulama süresinin kontrol grubu olarak aynı sürelerde, aynı koşullarda kültüre edilen ve RF-EMA uygulamasına maruz bırakılmayan hücreler kullanıldı. Hücrelerin her bir uygulama süresindeki canlılığı, kendi kontrol grubunun verileri kullanılarak hesaplandı ve uygulama sürelerinin arasındaki farklılıkları test etmek için One-Way ANOVA testi kullanıldı.

20 dk 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerinin büyüme ortamlarındaki IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinlerinin konsantrasyonlarına ait ELISA bulguları Çizelge 24'de ve ilgili grafikler Şekil 25'de gösterildiği gibidir. 20 dk 6 GHz RF-EMA maruziyetinde IL-6 ve IL-10 protein konsantrasyonlarının kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak düştüğü tespit edildi ($p<0.05$). 20 dk 6 GHz RF-EMA maruziyetinde TNF-α ve TGF-β protein konsantrasyonlarında kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).

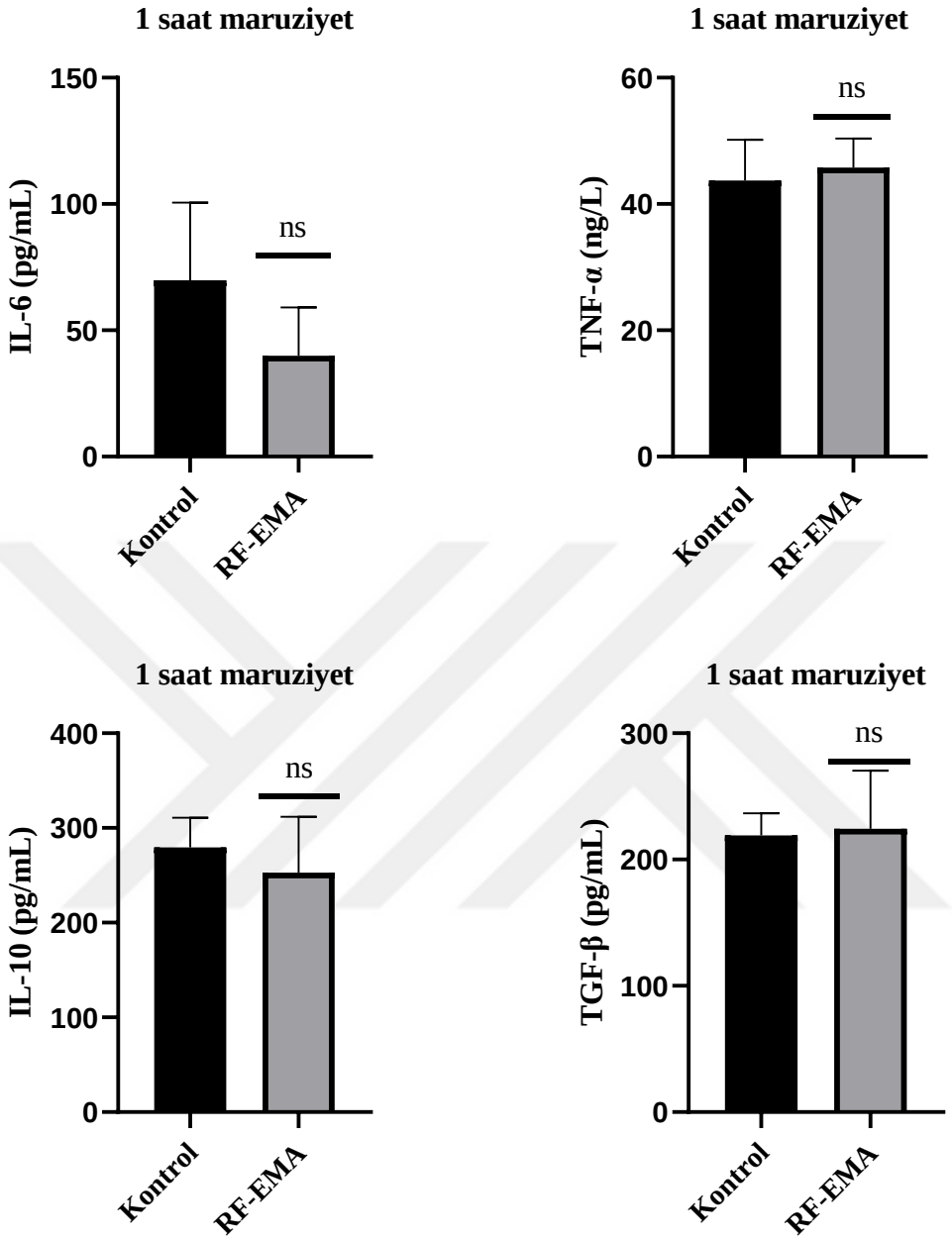
Çizelge 24. 20 dk 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası ELISA bulguları.

Genler	Grup	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
IL-6	Kontrol	118.78±7.98	110.66-126.62	**0.0353**
	RF-EMA	83.04±18.12	68.14-103.21	
TNF-α	Kontrol	36.34±13.2	25.87-51.16	0.509
	RF-EMA	43.66±11.53	31.58-54.55	
IL-10	Kontrol	301.98±23.71	275.93-322.31	**0.0127**
	RF-EMA	235.09±12.86	224.89-249.54	
TGF-β	Kontrol	230.48±10.58	222.17-242.39	0.757
	RF-EMA	235.15±21.95	212.85-256.74	



Şekil 25. 20 dk 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinleri için ELISA bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 20 dk. uygulama süresi ile kontrol grubu bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. * $p<0.05$; ns $p>0.05$ göstermektedir.

1 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerinin büyüme ortamlarındaki IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinlerinin konsantrasyonlarına ait ELISA bulguları Çizelge 24'de ve ilgili grafikler Şekil 26'da gösterildiği gibidir. 1 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β protein konsantrasyonlarında kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).



Şekil 26. 1 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinleri için ELISA bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 1 saat uygulama süresi ile kontrol grubu bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. ns $p>0.05$ göstermektedir.

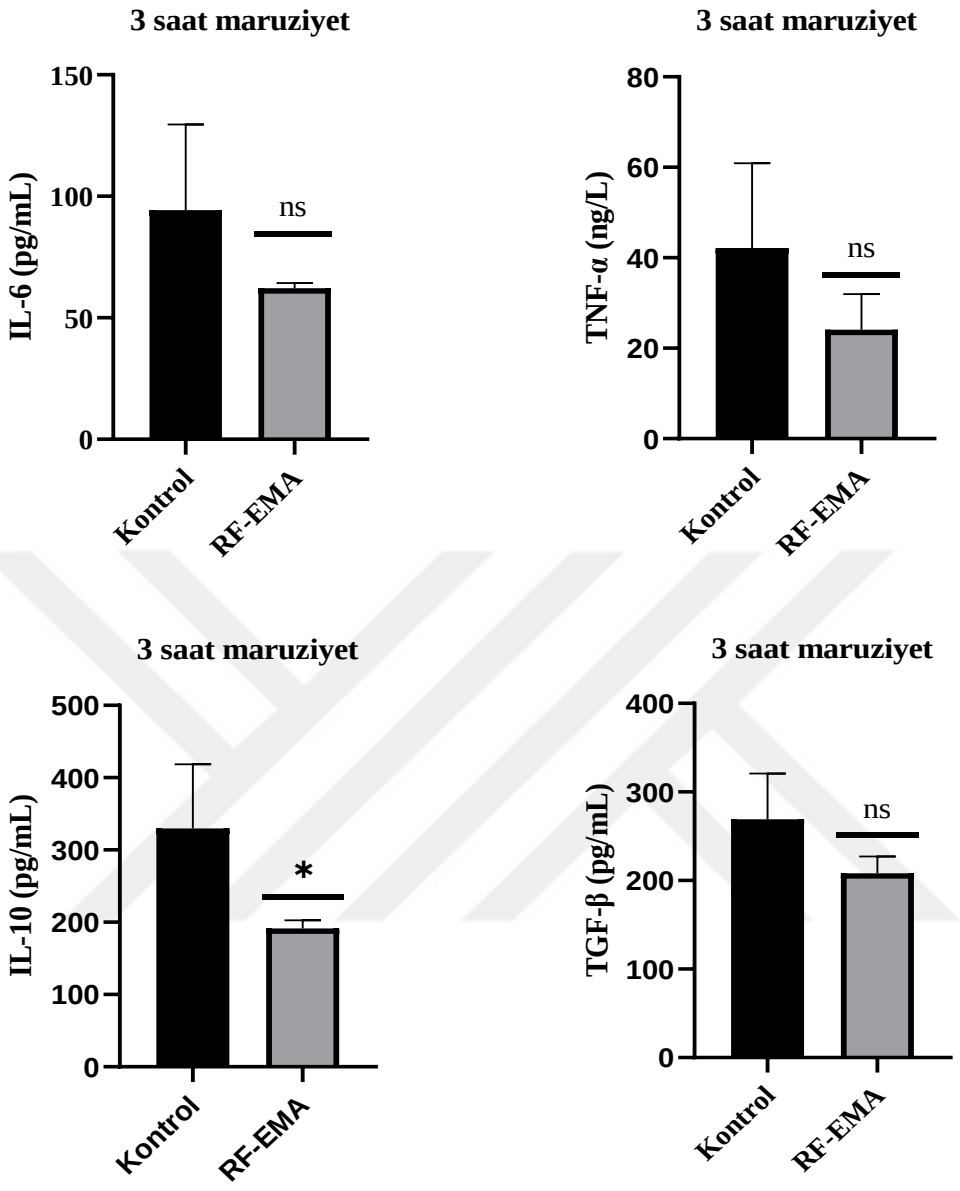
Çizelge 25. 1 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası ELISA bulguları.

Genler	Grup	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
IL-6	Kontrol	69.82±30.75	35.8-95.63	0.226
	RF-EMA	39.93±19.08	21.22-59.35	
TNF-α	Kontrol	43.75±6.43	36.46-48.63	0.6798
	RF-EMA	45.77±4.6	41.9-50.85	
IL-10	Kontrol	279.49±31.26	261.38-315.59	0.526
	RF-EMA	252.68±59.17	203.64-318.4	
TGF-β	Kontrol	219.23±17.34	207.58-239.15	0.867
	RF-EMA	224.3±46.08	185.04-275.04	

3 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerinin büyüme ortamlarındaki IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinlerinin konsantrasyonlarına ait ELISA bulguları Çizelge 26'da ve ilgili grafikler Şekil 27'de gösterildiği gibidir. 3 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde IL-10 protein konsantrasyonlarının kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak düştüğü tespit edildi ($p<0.05$). 3 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde IL-6, TNF-α ve TGF-β protein konsantrasyonlarında kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).

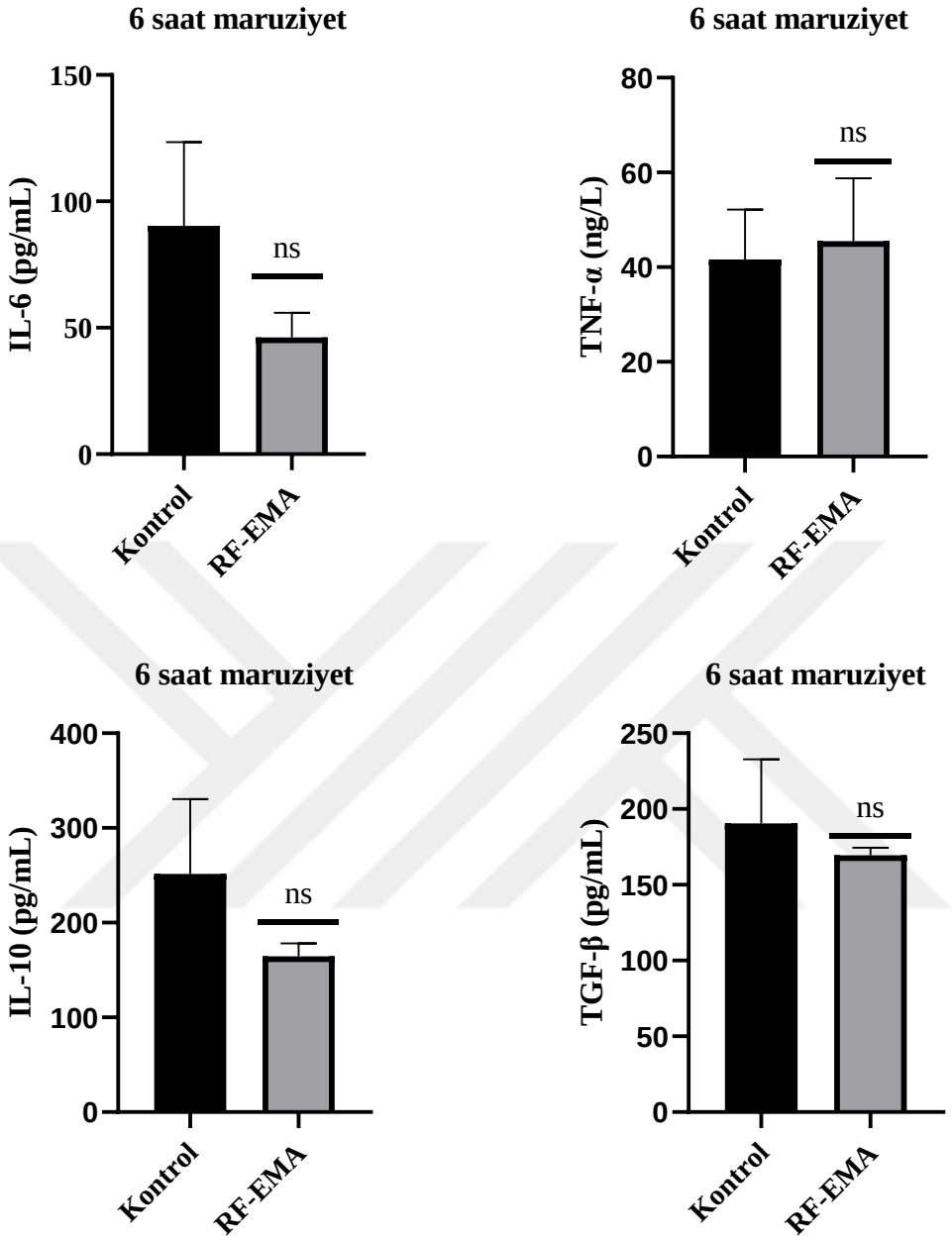
Çizelge 26. 3 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası ELISA bulguları.

Genler	Grup	Ortalama ± Standart sapma	Min-Max	p değeri
IL-6	Kontrol	94.31±35.29	64.45-133.26	0.191
	RF-EMA	62.21±2.07	60.83-64.59	
TNF-α	Kontrol	42.14±18.75	29.84-63.71	0.199
	RF-EMA	24.11±7.83	15.52-30.87	
IL-10	Kontrol	329.62±89.06	270.23-432.02	**0.0459**
	RF-EMA	191.34±11.41	184.32-204.5	
TGF-β	Kontrol	269.11±51.6	211.07-309.78	0.127
	RF-EMA	208.02±19.11	189.8-227.91	



Şekil 27. 3 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinleri için ELISA bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 3 saat uygulama süresi ile kontrol grubu bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. * $p<0.05$: ns $p>0.05$ göstermektedir.

6 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerinin büyüme ortamlarındaki IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinlerinin konsantrasyonlarına ait ELISA bulguları Çizelge 27'de ve ilgili grafikler Şekil 28'de gösterildiği gibidir. 6 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β protein konsantrasyonlarında kontrol ile kıyaslandığında herhangi bir istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).



Şekil 28. 6 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinleri için ELISA bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 6 saat uygulama süresi ile kontrol grubu bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. ns $p>0.05$ göstermektedir.

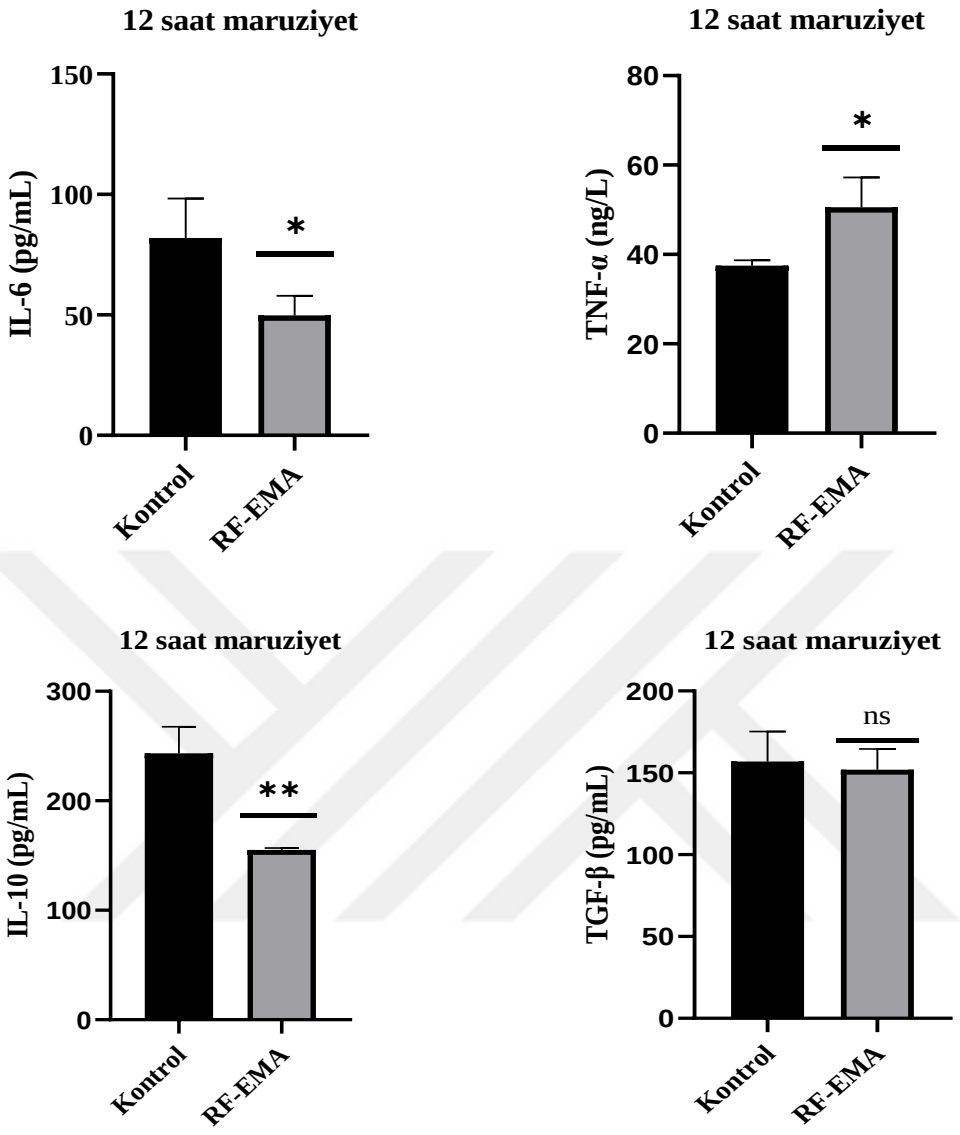
Çizelge 27. 6 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası ELISA bulguları.

Genler	Grup	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
IL-6	Kontrol	90.25±33.17	57.48-123.81	0.092
	RF-EMA	46.20±9.74	40.26-57.44	
TNF-α	Kontrol	41.66±10.52	33.1-53.4	0.717
	RF-EMA	45.47±13.32	34.78-60.39	
IL-10	Kontrol	251.59±78.87	196.16-341.88	0.132
	RF-EMA	164.44±13.58	149.12-174.97	
TGF-β	Kontrol	190.59±42.31	147.57-232.15	0.44
	RF-EMA	169.53±4.96	164.3-174.2	

12 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerinin büyüme ortamlarındaki IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinlerinin konsantrasyonlarına ait ELISA bulguları Çizelge 28'de ve ilgili grafikler Şekil 29'da gösterildiği gibidir. 12 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde IL-6 ve IL-10 protein konsantrasyonlarının kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak düştüğü tespit edildi ($p<0.05$). 12 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde TNF-α protein konsantrasyonlarının kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p<0.05$). 12 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde TGF-β protein konsantrasyonlarında kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).

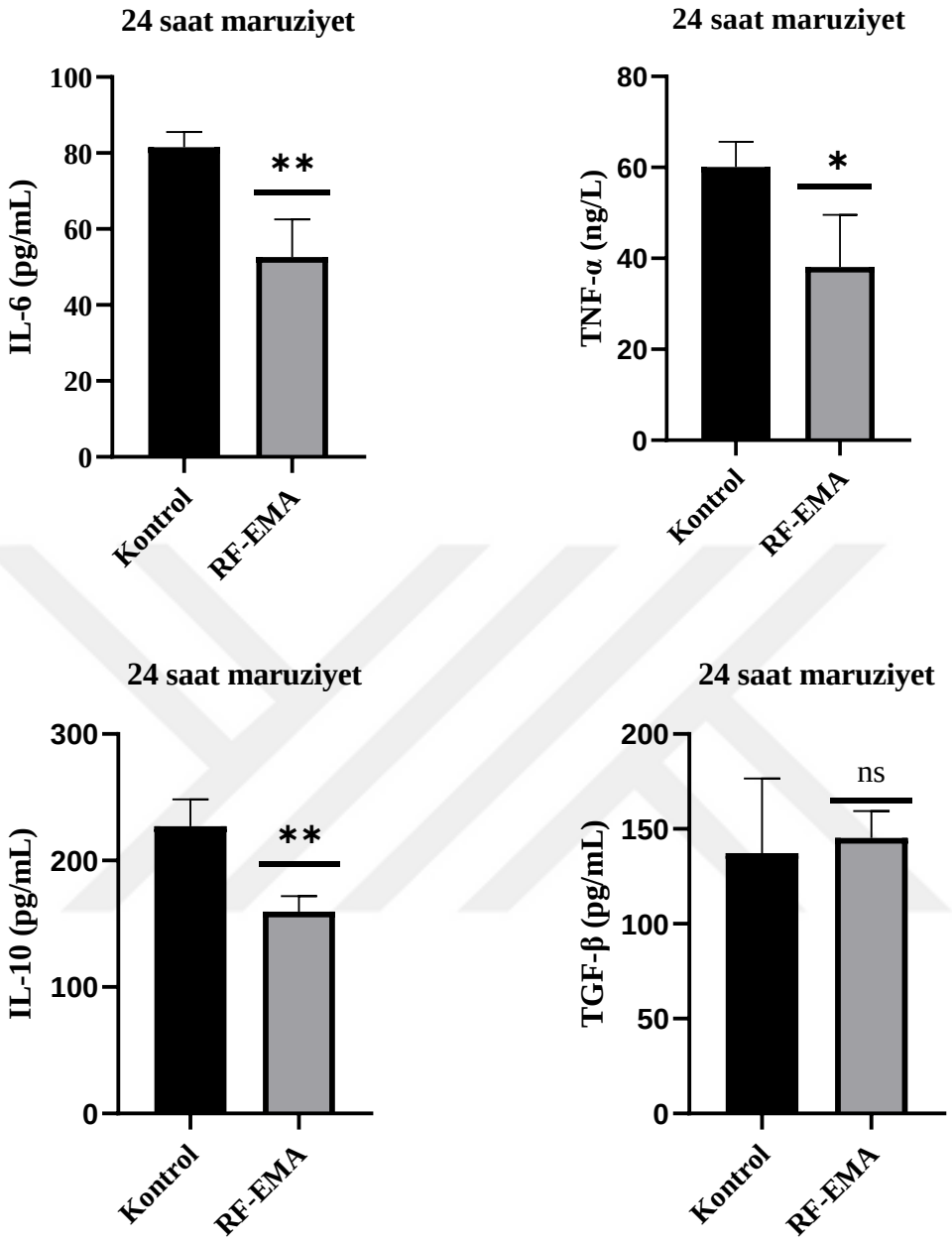
Çizelge 28. 12 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası ELISA bulguları.

Genler	Grup	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
IL-6	Kontrol	81.93±16.35	63.69-95.28	**0.038**
	RF-EMA	55.09±12.59	42.84-71.1	
TNF-α	Kontrol	37.52±1.16	36.31-38.62	**0.028**
	RF-EMA	45.83±10.9	31.64-57.1	
IL-10	Kontrol	243.4±24.18	226.6-271.12	**0.0032**
	RF-EMA	155.2±1.8	153.2-156.7	
TGF-β	Kontrol	156.96±18.22	137.33-173.33	0.717
	RF-EMA	141.48±23.42	109.93-162.91	



Şekil 29. 12 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinleri için ELISA bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 12 saat uygulama süresi ile kontrol grubu bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; ns $p>0.05$ göstermektedir.

24 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerinin büyüme ortamlarındaki IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinlerinin konsantrasyonlarına ait ELISA bulguları Çizelge 29'da ve ilgili grafikler Şekil 30'da gösterildiği gibidir. 24 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde IL-6, IL-10 ve TNF-α protein konsantrasyonlarının kontrol ile kıyaslandığında anlamlı olarak düştüğü tespit edildi ($p<0.05$). 24 saat 6 GHz RF-EMA maruziyetinde TGF-β protein konsantrasyonlarında kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).



Şekil 30. 24 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan N9 mikroglial hücrelerin IL-6, TNF-α, IL-10 ve TGF-β proteinleri için ELISA bulguları. Sonuçlar ortalama+ortalamaların standart hatası olarak verilmiştir (n=3). 24 saat uygulama süresi ile kontrol grubu bağımsız örneklem t-testi ile kıyaslanmıştır. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; ns $p>0.05$ göstermektedir.

Çizelge 29. 24 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti sonrası ELISA bulguları.

Genler	Grup	Ortalama± Standart sapma	Min-Max	p değeri
IL-6	Kontrol	81.5±4.07	77.24-85.36	**0.0095**
	RF-EMA	52.62±9.91	43.77-63.32	
TNF-α	Kontrol	60.07±5.59	53.63-63.69	**0.041**
	RF-EMA	38.07±11.5	29.93-51.24	
IL-10	Kontrol	227.16±21.3	209.08-250.64	**0.009**
	RF-EMA	159.65±12.33	150.93-173.76	
TGF-β	Kontrol	137.24±39.38	92.6-167.09	0.756
	RF-EMA	145.29±14.13	135.62-161.5	

5. TARTIŞMA

Toplumun ve teknolojinin hızlı gelişimi, elektrik hatları, elektrikli cihazlar, radyo vericileri ve mikrodalga kaynakları dahil olmak üzere EMA kaynaklarının sayısında ve çeşitliliğinde benzeri görülmemiş bir artışa yol açmıştır. EMA sayısı ve çeşitliliğindeki bu artış, EMA'nın dördüncü en büyük kirlilik tehlikesi olarak tanımlanmasına neden olmuştur (68). Ayrıca 2011 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Merkezi (IARC), RF-EMA'ları insanlar için olası karsinojenik (2B Grubu) olarak sınıflandırmıştır. Ortaya Çıkan ve Yeni Tanımlanan Sağlık Riskleri Bilimsel Komitesi (SCENIHR), mobil telefonda kullanılan aralıkların üzerindeki frekanslarda EMA'ya maruz kalmanın etkilerini rapor etmişlerdir. Bu rapora göre; cep telefonu RF-EMA'sına maruz kalmayla ilgili epidemiyolojik çalışmalar, RF-EMA'nın beyin tümörleri ve baş ve boyun bölgesindeki diğer kanserler için riski artırmadığını bildirmektedir. Ancak bazı çalışmalar, yoğun cep telefonu kullanıcılarında artan glioma ve akustik nörinom riskine ilişkin soruları gündeme getirmiştir. O zamandan bu yana, uzun süreli (10 yıldan fazla) cep telefonu kullanımının, intrakranial tümör riskini artırdığını gösteren meta-analizler de dahil olmak üzere birçok yeni çalışma yayınlanmıştır (83).

RF-EMA'nın yaydığı radyasyon enerjisi, iyonize radyasyonun aksine maddeki elektronları koparmadığı için iyonlaşmaya neden olmamakta ve moleküllerin yapısını bozmamaktadır. Ancak termal ve termal olmayan etkiler ile biyolojik dokular üzerinde doğrudan ya da dolaylı olarak zararlı olabilmektedir. Termal etkiler, dokuların soğurduğu elektromanyetik enerji ile moleküllerin hareket ederek ısıya dönüşmesi sonucunda ortaya çıkmakta ve dokudaki ısıda artışa neden olmaktadır (10). Canlı organizmaların RF-EMA'lara maruz kalması, öncelikle moleküler rotasyondan dolayı dokularda ısı üretimine sebep olmaktadır. Dokulardaki ısı, konveksiyon (kan akışı) yoluyla dengelenene kadar tüm vücuda dağıtılmaktadır (84).

EMA uygulamaları modern toplumda hemen her yerde mevcuttur. 5. nesil iletişim sistemi olarak tanıtılan yeni nesil 5G teknolojisi, veri iletim hızının yüksekliği, yüksek kapasite ve yüksek miktarda enerji transferi olanakları sunmaktadır. Yeni nesil 5G teknolojisi 1 GHz-100 GHz aralıklarında tasarlanmış olup, her ülkede farklı frekans belirlenmiş durumdadır. Bu yüzden 6 GHz altı ve 6 GHz üstü olmak üzere iki

kategoriye ayrılmıştır (85). Çalışmamızda bu sınıflama göz önünde bulundurularak 5G için EMA'nın frekansı 6 GHz olarak belirlenmiştir.

EMA'ya mesleki veya konutsal maruz kalmanın etkilerini araştıran çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Çeşitli çalışmalar, biyolojik sistemlerin; ev aletlerinde, tıbbi uygulamalarda ve iletişim sistemlerinde yaygın olarak kullanılan 2.45 GHz RF-EMA'ya karşı belirli bir hassasiyet sergilediğini ileri sürmektedir. Birkaç epidemiyolojik ve deneysel çalışma EMA maruziyetinin, bilişsel fonksiyonlar üzerinde zararlı etkilere sahip olabildiğini ve glioma ve Alzheimer hastalığı gibi nörolojik hastalık riskini artırabildiğini göstermiştir (68). Ayrıca RF-EMA'nın immün sistemi hücreleri üzerinde olası etkileri, hücre kültürleri, insan lenfosit kültürleri ve deney hayvanlarında yapılan birçok çalışmada incelenmiştir. Bazı çalışmalarda RF-EMA maruziyetinden kaynaklı önemli zararlı etkiler gösterilmiş olmasına karşın, bazılarında ise kayda değer bulgular elde edilememiştir (86). EMA maruziyetinin farklı beyin bölgelerinde güçlü glial reaktivitesini indüklediği gösterilmiştir. EMA'ya maruziyetten sonra ratların korteks ve hipokampusunde mikroglianın aktifleştiği gösterilmiştir. Bu nedenle, EMA'ya maruz kalmanın MSS üzerindeki etkileri son yıllarda aktif bir araştırma konusu olmuştur (68).

EMA'nın sağlığı etkileyip etkilemediğina dair tartışmalı çalışmalar bulunmaktadır. Bazı epidemiyolojik çalışmalara EMA'nın beyin tümörleri, meme kanseri, kalp tümörleri ve benzeri hastalıklara sebep olabildiğini göstermiştir. Ayrıca EMA, MSS'de ve üreme sisteminde de zararlı etkilere sahiptir ve ayrıca anksiyete ve strese de neden olabilmektedir. Ancak bazı çalışmalarda RF-EMA'nın nöronlarda hücre apoptozuna neden olmadığına, spermatozoada pro-apoptozu indüklemediğine, 900 MHz EMA'nın dişi farelerde hayatta kalma oranını etkilemediğine ve Radyofrekansın yetişkin erkek farelerde depresyon benzeri davranışı, uzamsal hafızayı ve beyin histolojisini etkilemediğine dair sonuçlar bulunmaktadır. Ancak EMA maruziyetinden sonra p53, bax ve kaspaz-3 gibi birçok apoptoz ile ilişkili genin up-regüle olduğu ve hücre apoptozunun arttığını da gösteren çalışmalar bulunmaktadır (87). Lin ve ark. 24 saat boyunca 1950 MHz, SAR 3 W/kg EMA'nın fare Leydig hücrelerinde apoptoz üzerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığını göstermişlerdir (88). Buttiglione ve ark. insan nöroblastoma hücreleri olan SH-SY5Y hücrelerini 900 MHz RF-EMA'ya maruz bırakmış ve 24 saat maruziyetinden sonra hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığını kanıtlamıştır (89). Li ve ark. 1800 MHz RF-EMA'ya maruz bırakılan fare

embriyonik fibroblast hücrelerinin canlılığının 12, 36 ve 48 saat maruziyetlerinden sonra kontrole göre anlamlı ölçüde azaldığını göstermiştir (87). Bu çalışmada, 6 GHz RF-EMA'nın N9 mikroglial hücrelerinin canlılığı, pro-inflamatuar sitokinlere, anti-inflamatuar sitokinlere ve NO konsantrasyonuna olan etkisi araştırılmıştır. N9 mikroglial hücreleri 20 dk, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakıldı. Çalışmamızda MTT testi ve AO/EB boyamasına göre N9 hücrelerinin RF-EMA'ya maruz kalma süresinin arttıkça hücrelerin canlılığının azaldığı bulundu. Yine bu iki yönteme göre, 6 saat ve daha yüksek maruziyet sürelerinde hücre canlılığının kontrole göre anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi. Bu çalışmada uygulanan frekansa nazaran 1800 MHz gibi düşük frekanslarda uygulanan RF-EMA gruplarında hücre canlılığı 36, 48 saat gibi sürelerde anlamlı ölçüde azaldığı çalışmalara karşın, bizim çalışmamızda hücre canlılığı 6 saatten daha uzun maruziyet sürelerinde anlamlı ölçüde azalmıştır. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen hücre canlılığı ile ilgili bulguların literatür ile uyumlu olduğunu düşünülmektedir.

NO beyinde hafıza ve öğrenme gibi fizyolojik işlevlerin yanı sıra nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik koşullarda da önemli rol oynar. MSS'de hem koruyucu hem de nörotoksik ajan olarak da bulunabilen NO; serebral kan akışımı ve nöronal taşınmayı kolaylaştırır, nöron aktivitesini başlatır ve nöronal apoptozu teşvik eder. NO sentezindeki artış, NO'nun metabolik oksiti olan peroksinitritin (ONOO-) sentezinde ve birirkiminde artışla devam eder. Bu şekilde NO, nörotoksisitenin yanı sıra oksidatif hasarın ortaya çıkmasına ve yayılmasına neden olabilir. NO sentez mekanizmasının belirlenmesinin, beyin dokusunun biyoaktivasyonu ve inhibisyonunun anlaşılması açısından önemli olduğu ileri sürülmektedir. Modern yaşamın ayrılmaz bir parçası haline gelen cihazlardan kaynaklanan EMA'nın, beyin üzerindeki olası etkileri halen tartışmalıdır. Çiftçi ve ark. yaptığı bir çalışmada 90 gün boyunca 900 MHz EMA'ya maruz bırakılan sıçanların beyninin sağ ve sol hemisferlerinde NO düzeyinde kontrol grubuna göre artış gözlenirken, 1800 MHz EMA'ya maruz bırakılan sıçanların beyninde kontrol grubuna göre bir değişiklik gözlenmemiştir (90). Irmak ve ark. yaptığı başka bir çalışmada, günde 30 dk olmak üzere 7 gün boyunca 900 MHz RF-EMA'ya maruz bıraktığı tavşanların beyninde NO düzeyinde bir değişiklik gözlenmemiştir (91). Lu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, N9 mikroglial hücrelerin 1800 MHz RF-EMA'ya maruz bırakıldığında 12 saat ve 24 saatte NO konsantrasyonunun arttığı, daha düşük

sürelerde ise NO konsantrasyonu düzeyinde herhangi bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca yine aynı çalışmada çeşitli sürelerde 1800 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılan astrosit hücrelerinde, NO konsantrasyonunda anlamlı bir farklılık bulunamadığı gösterilmiştir (92). Çalışmamızda N9 mikroglia hücreleri çeşitli sürelerde 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakıldıktan sonra hücrelerin kültür ortamındaki NO konsantrasyonu ölçüldü. Hücrelerin büyüme ortamına salınan NO konsantrasyonu bakımından maruziyet süreleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Elde ettiğimiz bulguların literatürdeki bazı çalışmalarla uyumlu olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar oldukça farklı olduğundan, çalışmalar arasında karşılaştırma yapmak zordur. Bunun sebebi olarak da radyasyon protokolündeki farklılıklar, hücre farklılıkları, ortam farklılıkları gösterilebilir.

MSS'de yerleşik immün hücreleri olan mikroglia, M1 ve M2 olmak üzere 2 farklı durumda bulunabilirler. M1 mikroglia, LPS gibi uyaranlara yanıt olarak indüklenerek TNF-α, IL-6, NO, IL-1β ve ROS gibi pro-inflamatuar sitokinler üretip salgılamaktadır. M1 mikroglia inflamasyon aracılı nörotoksisitede rol oynamaktadır. Bunun aksine M2 mikroglia IL-10, TGF-β ve IL-4 anti-inflamatuar sitokinleri eksprese etmektedir. M2 mikroglia doku tamiri ve nörokoruyucu etki göstermektedir (93). Farklı frekanslarda RF-EMA'nın, mikroglia başta olmak üzere birçok farklı hücrede sitokinler üzerindeki etkisini araştıran çok sayıda farklı araştırma bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda RF-EMA'nın pro-inflamatuar sitokinlerin düzeyini artırdığı, bazı çalışmalarda ise azalttığı ya da hiç değiştirmediği belirlenmiştir. Ayrıca yine RF-EMA'nın anti-inflamatuar sitokinlerin düzeyini artırdığı, bazı çalışmalarda ise azalttığı ya da değiştirmediği belirlenmiştir. Yang ve ark. EMA ile uyarımın mikroglianın aktivasyonunu tetiklediğini, ayrıca mikroglial aktivasyona paralel olarak JAK2/STAT3 yolağının aktivasyonu meydana geldiğini ve pro-inflamatuar faktörlerin salgılandığını göstermiştir. Ayrıca yine aynı çalışmada, N9 mikroglial hücreleri 2.45 GHz frekansta EMA'ya maruz bırakılmış ve 1. Saaten itibaren 24 saate kadar TNF-α ve iNOS ekspresyonunun ve NO miktarının arttığı bildirilmiştir (68). Ayrıca Hao ve ark. yapılan aynı zamanlarda yayınlanan benzer bir çalışmada, yine N9 mikroglia hücreleri 2.45 GHz RF-EMA'ya maruz bırakılmış ve STAT3 fosforilasyonun arttığı, iNOS ve TNF-α ekspresyonunu arttığı ve NO salınımının arttığı gösterilmiştir (94). Bu bulgular 2.45 GHz RF-EMA'nın mikroglial aktivasyonu tetiklediğini göstermektedir. Reale ve ark.

tarafından yapılan bir çalışmada, SH-SY5Y nöron benzeri hücreler oldukça düşük frekans 50 Hz EMA'ya maruz bırakılmış ve 24 saat maruziyet sonucunda TGF-β ekspresyonu anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir (95). Jonai ve ark. yaptığı başka bir çalışmada insan mononükleer hücreleri farklı manyetik akı yoğunluklarında, 70 saat oldukça düşük frekans 50 Hz EMA'ya maruz bırakılmış ve TNF-α proteinin düzeyinin anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca IL-10 protein düzeylerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (96). Pena-Philippides ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, serebral iskemi modeli farelerde 27.12 MHz pulslu EMA uygulamasının IL-6, IL-1α ve TNF-α genlerinin ekspresyonunu azalttığı ve IL-10 geninin ekspresyonunun artırdığı gösterilmiştir. Bu bulgular Pulslu EMA uygulamasının nöroinflamasyon üzerinde olumlu etkileri olduğunu düşündürmektedir (97). RF-EMA'ların transgenik Alzheimer hastalığı (AH) ile ilgili hayvan modellerinde nöropatolojik ve davranışsal değişikler üzerinde birçok töropotik etkisi bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda transgenik AH fare modellerinde EMA uygulamasının, hastalığın bilişsel bozuklukları üzerinde yararlı etkiye sahip olduğu bildirilmiş ve EMA uygulamasının etki mekanizması olarak beyinde anti-amiloyid beta birikimi, mitokondriyal güçlendirme ve nöronal aktivitenin artması olarak ileri sürülmüştür (98). Son ve ark. yaptıkları çalışmada, 1950 MHz RF-EMA uygulamasının AH beynindeki mikroglial fonksiyon bozukluğunu düzenlediği ve IL-1β ve IL-6 ekspresyonunu azaltarak anti-inflamatuar bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (99). Bu tez çalışmasında N9 mikroglial hücreleri 20 dk, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakıldı. Bu maruziyet sürelerinin *Il6, Tnf, Il1b* gibi pro-inflamatuar ve *Tgfb1* gibi anti-inflamatuar sitokinlerin mRNA ekspresyonları üzerindeki etkisi araştırıldı. 20 dk ve 1 saat gibi kısa maruziyet sürelerinde *Tgfb1* geninin ekspresyon düzeyinde anlamlı bir azalma, 12 saat ve 24 saat gibi uzun maruziyet sürelerinde *Tgfb1* geninin ekspresyon düzeyi anlamlı bir artış saptandı. 3 saat maruziyet süresinde bir pro-inflamatuar sitokin olan *Il1b* geninin ekspresyon düzeyinde anlamlı bir artış olduğu bulundu. 3 saat ve 6 saat maruziyet sürelerinde pro-inflamatuar sitokinler olan *Il6* ve *Nos2* genlerinin ekspresyonlarında kontrole göre anlamlı bir azalma olduğu belirlendi.

Ignacio Gómez-Ochoa ve ark. yaptığı bir başka çalışmada, kandaki elde edilen fibroblast benzeri hücreler 14 gün boyunca 50/60 Hz pulslu EMA'ya maruz bırakılmış ve PEMA'nın an pro-inflamatuar sitokinlerden olan IL-1β ve TNF-a ve anti-inflamatuar

sitokinlerden olan IL-10 proteinin düzeylerini azaltığı gösterilmiştir (100). Kleijn ve ark. yaptığı çalışmada, U937 monositik hücreleri 2 ve 10 W/kg SAR değerindeki 2.45 GHz RF-EMA'ya 4 ve 24 saat maruz bırakılmış ve IL-1β, TNF-α ve IL-6 protein düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (101). Bu tez çalışmasında N9 mikroglial hücreleri 20 dk, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakıldı. Bu maruziyet sürelerinin IL-6 ve TNF-α gibi pro-inflamatuar ve TGF-β ve IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinlerin protein düzeyleri üzerindeki etkisi araştırıldı. 12 saat ve 24 saat maruziyet sürelerinde pro-inflamatuar sitokinlerden IL-6 ve TNF-α ve bir anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 protein düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir azalma olduğu saptandı. Ayrıca 20 dk ve 3 saat maruziyet sürelerinde IL-10 protein düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu belirlendi. 20 dk maruziyette ayrıca IL-6 protein düzeyinde de kontrole göre anlamlı bir azalma olduğu bulundu.

Pulslu EMA'nın immün sistem üzerinde yapılan çalışmalarda, düşük yoğunluklu EMA'nın anti-inflamatuvar bir yanıt geliştirdiği ve özellikle de yara iyileşmesine katkı sağladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte EMA'ların immün sistemdeki özellikle fagositik hücrelerde canlılığı ve büyümeyi azaltmadaki rolü önemlidir (86). Bizim çalışmamızda da fagositik bir hücre olan mikroglia, yüksek frekanslı 6 GHz RF-EMA'ya maruz bırakıldığında, hücre canlılığı süreye bağımlı bir tarzda azaldığını, ancak pro-inflamatuar sitokin olan *Tgfb1*'nın ekspresyon düzeyinin arttığını belirledik.

Farklı frekanslarda, in vitro olarak farklı tipteki kültüre edilen hücreler ve in vivo olarak farklı deney hayvanları üzerinde yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Bu tez çalışması, literatürdeki mevcut çalışmalardan hem radyasyon maruziyeti protokolü olarak hem de kültür koşulları ve birçok biyolojik faktörden kaynaklı olarak farklılık göstermektedir. 6 GHz RF-EMA'nın in vitro hücreler üzerindeki ve mikroglia özelinde etkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bundan kaynaklı olarak bulgularımızın, literatürden farklılık gösterdiği kısımlar bulunmaktadır. RF-EMA maruziyetinin bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri ile ilgili hem in-vitro hem de in-vivo çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, birbiriyle tutarlı olmayan, çelişki gösteren bulgular ortaya konulmuştur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlardan, 6 GHz RF-EMA'nın mikroglial hücrelerde, *Tnf* ve *Il1b* gibi pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu artırırken, IL-6 gibi bir pro-inflamatuar sitokinin protein düzeyini

azalttığı belirlendi. Ayrıca yine 6 GHz RF-EMA'nın *Tgfb1* gibi bir anti-inflamatuar sitokinin ekspresyonunu artırdığı ve IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinin protein düzeyini azalttığı da belirlendi. Çalışmamızdaki bulgulardan yola çıkılarak, mikroglial hücrelerde 6 GHz RF-EMA'nın anti-inflamatuar yanıta mı yoksa pro-inflamatuar yanıta mı sebep olduğu net olmamakla birlikte, 6 GHz RF-EMA'nın mikroglial hücrelerin sitokin profilini değiştirdiği anlaşılmaktadır. Ayrıca bu çalışmada elde edilen ELISA yöntemindeki protein düzeyleri ve gen düzeyindeki ekspresyon düzeyleri arasındaki uyuşmazlıkların, post-transkripsiyonel düzenlenmenin bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

Günümüze kadar yapılan RF-EMA ile ilgili çalışmalarda farklı deney sistemleri ve farklı metodlar kullanılarak uygulanan RF-EMA kaynaklarına maruziyetin, başta mikroglia olmak üzere beyin ve davranış üzerine etkilerinin belirlenmesinde henüz daha kesin sonuçlar elde edilememiştir. Bu yüzden 6 GHz RF-EMA'nın bu açıdan mikroglia üzerindeki etkisinin mekanizmasının daha fazla aydınlatılması gerekmektedir. Literatürde 5G teknolojisini 6 GHz ile 100 GHz arasındaki frekansları kapsayan frekansların kullanıldığı çok az çalışma bulunmaktadır. Bu yüzden 5G teknolojisinin olası etkilerinin belirlenmesi için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

N9 mikroglia hücrelerinde çeşitli sürelerde 6 GHz RF-EMA'nın etkisini araştırdığımız çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar aşağıda özetlendiği gibidir;

1. MTT testine göre, 6 GHz RF-EMA maruziyeti, N9 mikroglial hücrelerinin canlılığını 6. saatten itibaren kontrole göre anlamlı olarak azaltmıştır.
2. AO/EB boyamasına göre 6 GHz RF-EMA maruziyeti, N9 mikroglial hücrelerinin canlılığını 6. saatten itibaren anlamlı olarak azaltmıştır.
3. Tüm sürelerde 6 GHz RF-EMA uygulamasından sonra hücre büyüme ortamına salınan NO düzeyi kontrole göre herhangi bir farklılık yoktur.
4. 12 saat ve 24 saat gibi fazla sürelerde 6 GHz RF-EMA maruziyeti, bir anti-inflamatuar sitokin olan TGF-β'nın ekpresyonunu artırmıştır.
5. Çeşitli sürelerde 6 GHz RF-EMA uygulaması, bir pro-inflamatuar sitokin olan IL-6'nın hem mRNA hem de protein düzeyinde miktarı kontrole göre azaltmıştır.
6. 3 ve 6 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti, bir pro-inflamatuar sitokin olan IL-1β'nin gen ifadesi artırmıştır.
7. 12 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti, bir pro-inflamatuar sitokin olan TNF-α'nın protein düzeyini anlamlı düzeyde artırmış ancak, 24 saat 6 GHz RF-EMA uygulaması TNF-α'nın protein düzeyini anlamlı düzeyde azaltmıştır.
8. Çeşitli sürelerde 6 GHz RF-EMA maruziyeti, bir anti-inflamatuar sitokin olan IL-10'un protein düzeyini anlamlı düzeyde azaltmıştır.
9. 3 saat ve 6 saat 6 GHz RF-EMA maruziyeti, NO oluşumunu katalizleyen enzimi kodlayan Nos2 geninin ifadesini azaltmıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulguların ve sonuçların, primer mikroglia hücre kültürleri, fare veya rat gibi deney hayvanları kullanılarak desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Zhu R, Wang H, Xu X, Zhao L, Zhang J, Dong J, Yao B, Wang H, Zhou H, Gao Y, Peng R.** Effects of 1.5 and 4.3 GHz microwave radiation on cognitive function and hippocampal tissue structure in Wistar rats. *Sci Rep*. **2021**;11(1):10061.

2. **Qin TZ, Wang X, Du JZ, Lin JJ, Xue YZ, Guo L, Lai PP, Jing YT, Zhang ZW, Ding GR.** Effects of radiofrequency field from 5G communications on the spatial memory and emotionality in mice. *Int J Environ Health Res.* **2022**;22:1-12.

3. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Potential health effects of exposure to electromagnetic fields (EMF). SCENIHR adopted this Opinion at the 9th plenary meeting on 27 January **2015.**

4. **Sousa C, Biber K, Michelucci A.** Cellular and Molecular Characterization of Microglia: A Unique Immune Cell Population. *Front Immunol.* **2017**;8:198.

5. **Shao F, Wang X, Wu H, Wu Q, Zhang J.** Microglia and Neuroinflammation: Crucial Pathological Mechanisms in Traumatic Brain Injury-Induced Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* **2022**;14:825086.

6. **Pozzo ED, Tremolanti C, Costa B, Giacomelli C, Milenkovic VM, Bader S, Wetzel CH, Rupprecht R, Taliani S, Settimo FD, Martini C.** Microglial Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Phenotypes Are Modulated by Translocator Protein Activation. *Int J Mol Sci.* **2019**;20(18):4467.

7. **Pons M, Valenzuela E, Rodríguez B, Nolazco-Flores JA, Del-Valle-Soto C**. Utilization of 5G Technologies in IoT Applications: Current Limitations by Interference and Network Optimization Difficulties-A Review. *Sensors (Basel).* **2023**;23(8):3876.

8. **Durney CH Massoudi H, lskander MF (2002).** Radiofrequency Radiation Dosimetry. Handbook. Fourth Edition, Brooks AFB 11-55.

9. Elektrik nedir? Erişim: (https://www.incimelektrik.com/tr/article/desc/35587/elektrik-nedir.html). **2023.** Erişim Tarihi: 07.12.2023.

10. Uslu IN. 900 - 1800 MHz Radyofrekans Elektromanyetik Alanın (Rf-Ema) İnsan Fetal Hücre Kültürlerinde Kromozomlar Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2013.**

11. **Purcell EM.** *Elektrik ve Magnetizma*. *Berkeley Fizik Dersleri Cilt: 2*. 4.baskı, Ankara: Palme Kitabevi, **1994.**

12. **Serway RA**. *Fen ve Mühendislik için Fizik Cilt:2*. Ankara: Palme Kitabevi, **2007**:709-732.

13. **Özulus Tüzün D.** Subkronik 1800 MHz Elektromanyetik Alan Uygulanmış Sıçanların Testis Dokusunda Grp78 Ekspresyonunun İncelenmesi. Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2019.**

14. **Güçlü GG.** 50 Hz Elektromanyetik Alanlar Ve Biyolojik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Enerji Enstitüsü, İstanbul, **2011.**

15. **Kıvrak EG.** Elektromanyetik Alana Maruz Kalan Sıçan Hipokampusu Üzerine Boswellia Sacra Ve Folik Asitin Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun, **2014.**

16. Erişim:(http://phys.eng.ankara.edu.tr/wp-content/uploads/sites/611/2017/03/FZM-156 F%C4%B0Z%C4%B0K-II-LAB-Deney-I-II-III-IV.pdf) **2023**. Erişim Tarihi: 23.07.2023.

17. **Karamazı Y.** Yeni Nesil 5g Radyofrekans Radyasyonun Sıçan Sitokin Düzeyleri Ve Kemik Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2023.**

18. **Hancı H.** Prenatal Dönemde Uygulanan 900 MHz Elektromanyetik Alanın Sıçan Periferik Sinir Morfolojisi Ve Fonksiyonuna Etkisi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, **2019.**

19. İndüktörlere Giriş. Erişim: (https://devreyakan.com/induktor-bobin-enduktans-iliskisi-rehberi/). **2023**. Erişim Tarihi: 30.09.2023.

20. Manyetizma.Erişim:(https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/32678/mod_resource/content/0/12. %20HAFTA-MANYET%C4%B0ZMA.pdf). **2023** Erişim Tarihi: 30.09.2023.

21. **Okur ZH.** Elektromanyetik Alan Maruziyetinin Gelişmekte Olan Sıçan (Wistar Albino) Beyni Hipokampusunda Oluşturduğu Etkilerin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sinop, **2019.**

22. **Deniz NB.** Elektromanyetik Alana Maruz Kalan Sıçanlarda Kafeinin Nöron Sağkalımı Üzerine Etkilerinin Stereolojik Yöntemlerle Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun,**2016.**

23. **Uzun C.** Radyofrekans Elektromanyetik Alanın Amniyosit Hücrelerinde Elektrobiyofiziksel Ve Nörogenez İle Wnt Sinyal Yolağı Genlerinin Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2022.**

24. **Panagopoulos DJ and. Margaritis LH.** *Theoretical Considerations for the Biological Effects of Electromagnetic Fields.* **In: Stavroulakis P.** *Biological Effects of Electromagnetic Fields Mechanisms, Modeling, Biological Effects, Therapeutic Effects, International Standards, Exposure Criteria.* New York:Springer, **2003**:1-30.

25. **Okonkwo UC, Ohagwu CC, Aronu ME, Okafor CE, Idumah CI, Okokpujie IP, Chukwu NN, Chukwunyelu CE.** Ionizing radiation protection and the linear No-threshold controversy: Extent of support or counter to the prevailing paradigm. *J Environ Radioact.* **2022**;253-254:106984.

26. **Semerci M.** Telekomünikasyon cihazlarından kaynaklı EMA şiddeti ölçüm yöntemleri: Samsun il merkezi saha çalışması. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, **2011**.

27. **Gherardini L, Ciuti G, Tognarelli S, Cinti C**. Searching for the perfect wave: the effect of radiofrequency electromagnetic fields on cells. Int J Mol Sci. **2014**;15(4):5366-87.

28. **Adey WR**. Biological effects of electromagnetic fields. *Journal of Cellular Biochemistry*, **1993**;51 (4):410-416.

29. **Adebusola JA, Ariyo AA, Elisha OA, Olubunmi AM, Julius OO.** An overview of 5G technology. In 2020 International Conference in Mathematics, Computer Engineering and Computer Science (ICMCECS). March **2020**:1-4.

30. **Wali SQ.** RF-EMF Measurement for 5G over C-band and mm-Wave frequency band: Exposure assessment and Procedures. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*. **2022**:1254 012002.

31. **Al-Yasir YIA, Ojaroudi Parchin N, Tu Y, Abdulkhaleq AM, Elfergani ITE, Rodriguez J, Abd-Alhameed RA**. A Varactor-Based Very Compact Tunable Filter with Wide Tuning Range for 4G and Sub-6 GHz 5G Communications. *Sensors.* **2020**;20(16):4538.

32. **Celaya-Echarri M, Azpilicueta L, Rodríguez-Corbo FA, Lopez-Iturri P, Ramos V, Alibakhshikenari M, Shubair RM, Falcone F.** Towards Environmental RF-EMF Assessment of mmWave High-Node Density Complex Heterogeneous Environments. *Sensors*. **2021**;21(24):8419.

33. **McIntosh RL, McKenzie RJ, Iskra S, Carratelli A, Standaert P.** Computation of SAR in Cell Culture Flasks Exposed to 900 MHz GSM Type Signals in a Modified TEM Cell. *Aces Journal*, **2003**;18(4):107-113.
34. **Kwon HS, Koh SH.** Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener*. **2020**;9(1):42.

35. **Casali BT, Reed-Geaghan EG.** Microglial Function and Regulation during Development, Homeostasis and Alzheimer's Disease. *Cells.* **2021**;10(4):957.

36. **Gao C, Jiang J, Tan Y, Chen S.** Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* **2023**;8(1):359.

37. **Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T.** Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci.* **2013**;7:45.

38. **Taştan B.** The Role Of Long Noncoding Rna Neat1 In Regulation Of Microglial Nlrp3 Inflammasome Activation. PhD Thesis, Dokuz Eylul University Izmir International Biomedicine And Genome Institute. İzmir, Türkiye, **2023.**

39. **Gogoleva VS, Drutskaya MS, Atretkhany KS.** The Role of Microglia in the Homeostasis of the Central Nervous System and Neuroinflammation. *Mol Biol (Mosk).* **2019**;53(5):790-798.

40. **Nayak D, Roth TL, McGavern DB.** Microglia development and function. *Annu Rev Immunol.* **2014**;32:367-402.

41. **Wurm J, Konttinen H, Andressen C, Malm T, Spittau B.** Microglia Development and Maturation and Its Implications for Induction of Microglia-Like Cells from Human iPSCs. *Int J Mol Sci.* **2021**;22(6):3088.

42. **Li Q, Cheng Z, Zhou L, Darmanis S, Neff NF, Okamoto J, Gulati G, Bennett ML, Sun LO, Clarke LE, Marschallinger J, Yu G, Quake SR, Wyss-Coray T, Barres BA.** Developmental Heterogeneity of Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing. *Neuron.* **2019**;101(2):207-223.e10.

43. **Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y.** Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*, **2014**;49(3):1422-1434.

44. **Piccio L, Buonsanti C, Mariani M, Cella M, Gilfillan S, Cross AH, Colonna M, Panina-Bordignon P.** Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* **2007**;37(5):1290-301.

45. **DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP**. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*. 2016;139(Suppl 2):136-153.

46. **Yang QQ, Zhou JW.** Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia.* **2019**;67(6):1017-1035.

47. **Schain M, Kreisl WC.** Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review. *Curr Neurol Neurosci Rep.* **2017**;17(3):25.

48. **Shao F, Wang X, Wu H, Wu Q, Zhang J.** Microglia and Neuroinflammation: Crucial Pathological Mechanisms in Traumatic Brain Injury-Induced Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*. **2022**;14:825086.

49. **Moulton VR** *Cytokines.* **In: Tsokos GC.** *Systemic Lupus Erythematosus Basic, Applied and Clinical Aspects.* 1st Ed, USA: Academic Press, **2016**;137-141.

50. **Zhang JM, An J.** Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. **2007**;45(2):27-37.

51. **Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL.** Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull.* **2012**;87(1):10-20.

52. **Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S.** The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. **2011**;1813(5):878-88.

53. **Liu X, Quan N.** Microglia and CNS Interleukin-1: Beyond Immunological Concepts. *Front Neurol*. 2018;9:8.

54. **Lopez-Castejon G, Brough D.** Understanding the mechanism of IL-1β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2011**;22(4):189-95.

55. **Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S.** The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta.* **2016**;1863(6 Pt A):1218-27.

56. **Garner KM, Amin R, Johnson RW, Scarlett EJ, Burton MD**. Microglia priming by interleukin-6 signaling is enhanced in aged mice. *J Neuroimmunol.* **2018**;324:90-99.

57. **Raffaele S, Lombardi M, Verderio C, Fumagalli M.** TNF Production and Release from Microglia via Extracellular Vesicles: Impact on Brain Functions. *Cells*. **2020**;9(10):2145.

58. **Falvo JV, Tsytsykova AV, Goldfeld AE.** Transcriptional control of the TNF gene. *Curr Dir Autoimmun.* **2010**;11:27-60.

59. **Akdoğan M, Yöntem M.** Sitokinler. Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi, 2018;3(1):36-45.

60. **Huaxing Wei, Bofeng Li, Anyuan Sun, Feng Guo.** Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. Adv. Exp. Med. Biol. **2019**;1172:79-96.

61. **Taniyama T, Takai S, Miyazaki E, Fukumura R, Sato J, Kobayashi Y, et al.** The human interleukin-10 receptor gene maps to chromosome 11q23.3. Hum. Genet. **1995**;95(1):99-101.

62. **Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA.** Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol.* **2009**;9(4):447-53.

63. **Hammond TR, Marsh SE, Stevens B.** Immune Signaling in Neurodegeneration. *Immunity.* 2019;50(4):955-974.

64. **Liy PM, Puzi NNA, Jose S, Vidyadaran S.** Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood).* **2021**;246(22):2399-2406.

65. **Justo AFO, Suemoto CK.** The modulation of neuroinflammation by inducible nitric oxide synthase. *J Cell Commun Signal*. **2022**;16(2):155-158.

66. **Sierra A, Navascués J, Cuadros MA, Calvente R, Martín-Oliva D, Ferrer-Martín RM, Martín-Estebané M, Carrasco MC, Marín-Teva JL.** Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in microglia of the developing quail retina. *PLoS One*. **2014**;9(8):e106048.

67. **Ioniţă E, Marcu A, Temelie M, Savu D, Şerbănescu M, Ciubotaru M.** Radiofrequency EMF irradiation effects on pre-B lymphocytes undergoing somatic recombination. *Sci Rep.* **2021**;11(1):12651.

68. **Yang X, He G, Hao Y, Chen C, Li M, Wang Y, Zhang G, Yu Z.** The role of the JAK2-STAT3 pathway in pro-inflammatory responses of EMF-stimulated N9 microglial cells. *J Neuroinflammation.* **2010**;7:54.

69. **Corradin SB, Mauël J, Donini SD, Quattrocchi E, Ricciardi-Castagnoli P**. Inducible nitric oxide synthase activity of cloned murine microglial cells. *Glia*. **1993**;7(3):255-62.

70. **Weinstein JR, Swarts S, Bishop C, Hanisch UK, Möller T.** Lipopolysaccharide is a frequent and significant contaminant in microglia-activating factors. *Glia*. **2008**;56(1):16-26.

71. **Braghin E, Galimberti D, Scarpini E, Bresolin N, Baron P.** Alpha1-antichymotrypsin induces TNF-alpha production and NF-kappaB activation in the murine N9 microglial cell line. *Neurosci Lett.* **2009**;467(1):40-2.

72. **Strober W.** Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* **2015**;111:A3.B.1-A3.B.3.

73. **Ye X, Zhu M, Che X, Wang H, Liang XJ, Wu C, Xue X, Yang J.** Lipopolysaccharide induces neuroinflammation in microglia by activating the MTOR pathway and downregulating Vps34 to inhibit autophagosome formation. *J Neuroinflammation.* **2020**;17(1):18.

74. **van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J.** Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* **2011**;731:237-45.

75. **Kasibhatla S, Amarante-Mendes GP, Finucane D, Brunner T, Bossy-Wetzel E, Green DR.** Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. CSH Protoc. **2006**;2006(3):pdb.prot4493.

76. Nitric Oxide Measurement System. Erişim: (http://www.shelfscientific.com/cgi-bin/tame/newlaz/non.tam) 2023. Erişim Tarihi: 06.12.**2023.**

77. Introduction to SYBR Green Real Time PCR. Erişim: (http://www.sabiosciences.com/newsletter/validating.pdf) **2023**. Erişim Tarihi: 23.07.2023.

78. **Thornton B, Basu C.** Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. Biochemistry and Molecular Biology Education, **2011**;39(2):145-54.

79. Oligoanalyzer tool. Erişim: (https://www.idtdna.com/calc/analyzer) **2023.** Erişim Tarihi: 23.07.2023.

80. Primer designing tool. Erişim: (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) **2023.** Erişim Tarihi: 23.07.2023.

81. What is the Ct value? Erişim: (http://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/) **2023.** Erişim Tarihi: 06.12.2023.

82. 4 easy steps to analyze your qPCR data using double delta Ct analysis. Erişim: (https://bitesizebio.com/24894/4-easy-steps-to-analyze-your-qpcr-data-using-double-delta-ct-analysis/) **2023**. Erişim Tarihi: 06.12.2023.

83. **Bortkiewicz A.** Health effects of Radiofrequency Electromagnetic Fields (RF EMF). *Ind Health.* **2019**;57(4):403-405.

84. **D'Andrea JA, Ziriax JM, Adair ER.** Radio frequency electromagnetic fields: mild hyperthermia and safety standards. *Prog Brain Res.* **2007**;162:107-35.

85. 5G & Radio Frequency (RF) Electromagnetic Fields (EMF) [Rf Fields] Radiation. Erişim: (https://www.ict.gov.sc/documents/2020/5G_Article.pdf.pdf) **2023.** Erişim Tarihi:06.12.2023.

86. EMRE M. Radyofrekans ve düşük frekanslı elektromanyetik alanların bağışıklık sistemine etkileri. *J Immunol Clin Microbiol.* **2018**;3(4):68-80.

87. Li DY, Song JD, Liang ZY, Oskouei K, Xiao XQ, Hou WZ, Li JT, Yang YS, Wang ML, Murbach M. Apoptotic Effect of 1800 MHz Electromagnetic Radiation on NIH/3T3 Cells. *Int J Environ Res Public Health.* **2020**;17(3):819.

88. Lin YY, Wu T, Liu JY, Gao P, Li KC, Guo QY, Yuan M, Lang HY, Zeng LH, Guo GZ. 1950MHz Radio Frequency Electromagnetic Radiation Inhibits Testosterone Secretion of Mouse Leydig Cells. *Int J Environ Res Public Health.* **2017**;15(1):17.

89. Buttiglione M, Roca L, Montemurno E, Vitiello F, Capozzi V, Cibelli G. Radiofrequency radiation (900 MHz) induces Egr-1 gene expression and affects cell-cycle control in human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol.* **2007**;213(3):759-67.

90. Irmak MK, Fadillioğlu E, Güleç M, Erdoğan H, Yağmurca M, Akyol O. Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits. *Cell Biochem Funct*. **2002**;20(4):279-83.

91. Çiftçi G, Nisbet HÖ, Akar A, Sunan E. The effects of electromagnetic fields to whole protein, myelin basic protein, neuron specific enolase profiles and nitric oxide levels in rat brains. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **2012**;59:175-181.

92. Lu Y, He M, Zhang Y, Xu S, Zhang L, He Y, Chen C, Liu C, Pi H, Yu Z, Zhou Z. Differential pro-inflammatory responses of astrocytes and microglia involve STAT3 activation in response to 1800 MHz radiofrequency fields. *PLoS One*. **2014**;9(9):e108318.

93. Zhou X, Spittau B, Krieglstein K. TGFβ signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia. *J Neuroinflammation.* **2012**;9:210.

94. Hao Y, Yang X, Chen C, Yuan-Wang, Wang X, Li M, Yu Z. STAT3 signalling pathway is involved in the activation of microglia induced by 2.45 GHz electromagnetic fields. *Int J Radiat Biol.* **2010**;86(1):27-36.

95. Reale M, Kamal MA, Patruno A, Costantini E, D'Angelo C, Pesce M, Greig NH. Neuronal cellular responses to extremely low frequency electromagnetic field exposure: implications regarding oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS One*. **2014**;9(8):e104973.

96. Jonai H, Villanueva MB, Yasuda A. Cytokine profile of human peripheral blood mononuclear cells exposed to 50 Hz EMF. *Ind Health.* **1996**;34(4):359-68.

97. Pena-Philippides JC, Yang Y, Bragina O, Hagberg S, Nemoto E, Roitbak T. Effect of pulsed electromagnetic field (PEMF) on infarct size and inflammation after cerebral ischemia in mice. *Transl Stroke Res.* **2014**;5(4):491-500.

98. de Kleijn S, Bouwens M, Verburg-van Kemenade BM, Cuppen JJ, Ferwerda G, Hermans PW. Extremely low frequency electromagnetic field exposure does not modulate toll-like receptor signaling in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*. **2011**;54(1):43-50.

99. Son Y, Park HJ, Jeong YJ, Choi HD, Kim N, Lee HJ. Long-term radiofrequency electromagnetic fields exposure attenuates cognitive dysfunction in 5×FAD mice by regulating microglial function. *Neural Regen Res.* **2023**;18(11):2497-2503.

100. Gómez-Ochoa I, Gómez-Ochoa P, Gómez-Casal F, Cativiela E, Larrad-Mur L. Pulsed electromagnetic fields decrease proinflammatory cytokine secretion (IL-1β and TNF-α) on human fibroblast-like cell culture. *Rheumatol Int*. **2011**;31(10):1283-9.

101. Narita E, Sakurai Y, Suzuki M, Taki M, Miyakoshi J. Influence of a high-frequency electromagnetic field at 2.45 GHz on cytokine productions in macrophage-like U937 cells. IEEE MTT-S International Microwave Workshop Series on Innovative Wireless Power Transmission: Technologies, Systems, and Applications. Kyoto-Japan, 2012:123-126.