

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI**

**DÜŞÜK FREKANSLI ELEKTROMANYETİK ALAN
UYGULANAN T-LENFOSİTLERİNİN MEMBRAN
POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ**

PINAR MEGA TİBER

T 91535

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TC YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. AYŞE İNHAN GARİP**

İSTANBUL – 2000

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	i
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ	1
1.1.1 Lenfositler	2
1.1.2. T Lenfositleri	3
1.1.3. T ve B Hücrelerinin Uyarılması	4
1.2. MEMBRAN YAPISI VE VALINOMİSİN	5
1.3. MEMBRAN POTANSİYELİ	6
1.3.1. Nernst Denge Potansiyeli	6
1.3.2. Membran Potansiyeli	7
1.4. SPEKTROSKOPI	9
1.4.1. Moleküler Spektra	11
1.4.2. Floresans	12
1.4.3. Spektrofotometre	14
1.4.4. Di-4-Anepps Probu'nun Özellikleri	15
1.5. ELEKTROMANYETİK ALANLAR	16
1.5.1. Elektromanyetik Dalgalar	16
1.5.2. Tarihçe	16
1.5.3. Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanların Etkileri	17
1.5.4. Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanların Lenfositler Üzerindeki Etkisi	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	22
2.1. KİMYASAL MADDELER	22
2.2. KULLANILAN ÇÖZELTİLER	22
2.2.1 Lenfosit Kültürü İçin Kullanılan Çözeltiler	22

2.2.2 Membran Potansiyeli Kalibrasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler.....	23
2.3 ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZLAR.....	23
2.4. LENFOSİTLERİN AYRILMASI.....	24
2.5. T- HÜCRE AYRIMI.....	24
2.6. LENFOSİT KÜLTÜRÜ.....	24
2.7. FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ ÖLÇÜMLERİ.....	25
2.8. MANYETİK ALAN UYGULANMASI.....	26
3. BULGULAR.....	27
3.1. MEMBRAN POTANSİYELİNİN FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ İLE ÖLÇÜMÜ.....	27
3.1.1. Membran Potansiyel Kalibrasyonu.....	27
3.1.2. Spektraların Analizi.....	29
3.1.3. Membran Potansiyeli Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi.....	34
3.2. MEMBRAN POTANSİYELLERİNİN HESAPLANMASI.....	34
3.3. KALİBRASYON EĞRİSİ.....	35
3.4. MANYETİK ALAN VE KONTROL GRUPLARININ MEMBRAN POTANSİYEL HESAPLAMALARI.....	36
4. TARTIŞMA.....	41
5. SONUÇLAR.....	43
6. KAYNAKLAR.....	44
BİYOĞRAFİ.....	49

ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanmasındaki her aşamada desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli insan Yrd. Doç. Dr. Ayşe İNHAN GARİP hocama sonsuz teşekkürlerimle.

Her türlü sorunlarım ile anlayışlı kişiliği ile yakından ilgilenen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Beki KAN'a, deneysel çalışmamız sırasında mevcut olanaklarını ve yardımını sunan Tübitak MAM'dan Sayın Prof. Dr. Alexander P. DEMCHENKO ve Sayın Andrey KLYMCHENKO'ya, çalışmalarımızın yanı sıra her konuda ve her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Devrim ÖZ'e, Biyofizik Anabilim Dalı Asistan ve Hocalarına, bana ve çalışmalarına gösterdiği sabır, anlayış ve yardımlarından ötürü sevgili eşim Göksel TİBER'e, moral kaynağım güleryüzlü kardeşim Alican MEGA'ya, bilime attığım adımda ışık kaynağım olan ağabeyim Op. Dr. Ertunç MEGA'ya ve bugünlere gelmemde fedakarlıklarını ve şefkatlerini hiçbir zaman esirgemeyen eşsiz insanlar ANNEM ve BABAM'a teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Düşük frekanslı elektromanyetik alanların mitojen ile indüklenmiş lenfositlerin üzerinde olumlu ve olumsuz etkileri olduğu önceki çalışmalarla gösterilmekle birlikte, etki mekanizması bilinmemektedir.

Yapılan önceki çalışmalarda mitojen ile indüklenmiş lenfositlerin çoğalması sırasında membran potansiyellerinin değiştiği saptanmıştır. Bu çalışmada düşük frekanslı elektromanyetik alanın mitojen ile indüklenmiş lenfositlerin membran potansiyelinde meydana getirebileceği değişiklikler ve buna paralel olarak lenfosit çoğalmasında meydana gelen değişiklikler floresans spektroskopisi yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Sağlıklı insan kanından ayrılan T lenfositleri manyetik alana konulmadan önce 72 saat RPMI-1640 içeren hücre kültür ortamında inkübe edilmiş bu kültürden kontrol ve manyetik alan olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Hücreler 90 dakika manyetik alana maruz bırakıldıktan sonra di-4-ANNEPS probu kullanılarak floresans spektroskopik ölçümleri yapılmıştır.

Spektroskopik ölçümlerde manyetik alan ve kontrol grubu için 440 nm ve 506 nm dalga boylarındaki floresans şiddetleri belirlenmiştir. Belirlenen bu şiddetlerle önceden hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak kontrol ve manyetik alana maruz kalan gruplar arasındaki membran potansiyel farkı araştırılmıştır. Bu çalışmaya paralel olarak bu iki grubun çoğalması arasında bir fark olup olmadığı tespit edilmiştir.

Düşük frekanslı manyetik alana maruz bırakılan lenfosit grubunun çoğalmasında kontrol grubuna göre bir azalma saptanmıştır. Lenfositlerin membran potansiyellerinde hiperpolarizasyon durumu saptanmıştır.

ABSTRACT

In recent years a body of data on the interactions of extremely low electromagnetic fields with biological systems has accumulated. However the mechanism of this interaction has not been elucidated yet.

Previous studies have shown that mitogen induced proliferation of lymphocytes is accompanied by a change in electrical potential of the cell and any change in membrane potential causes a change in the proliferative response of the cell.

This work aimed to correlate proliferation with a change in membrane potential that the extremely low electromagnetic fields may induce in the cell.

Lymphocytes obtained from healthy donors were grown in culture in RPMI medium for 72 hours before magnetic field was applied. Magnetic field was applied for 90 minutes and the control group was kept in similar conditions. Using di-4-Anepps as a probe, fluorescence spectroscopy was used to determine membrane potential. The ratio of fluorescence intensity at two wavelengths, 440 nm and 506 nm, was taken for both magnetic field-applied and control groups to determine a change in potential.

Results showed hyperpolarization for magnetic field-applied lymphocytes with respect to control group. A decrease in proliferation was observed for the magnetic field-applied cells.

KISALTMALAR

BCR	: B hücre reseptörü
Dİ-4-ANEPPS	: [1-(3-sulfonatopropyl)-4-[β -[2-(di-n-butylamino)-6-naphthyl] vinyl] pyridinium betaine]
F	: Floresans şiddet değeri
LPS	: Lipopolisakkarit
MHC	: Doku uygunluk kompleksi
MR	: Manyetik rezonans
NK	: Doğal öldürücü hücre
PHA	: Fitohemaglutinin
TCR	: T hücre reseptörü



1. GİRİŞ

1.1. Bağışıklık Sistemi

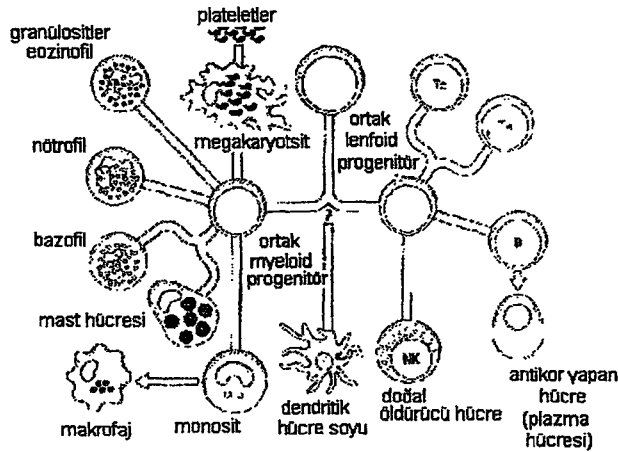
Organizmanın yabancı molekülleri tanınması son derece farklı hücrelerden meydana gelen ve büyük bir uyum içerisinde etkinlik gösteren immün sistem tarafından gerçekleştirilmektedir. (1)

Vücut, yabancı antijen ya da mikroorganizma ile karşılaştığında, doğal immün sistem koruyucu görevi üstlenmekte, aynı antijenle ikinci kez karşılaşıldığında ise, kazanılmış immün sistem ortaya çıkmaktadır. (2)

İmmunolojik uyarı lenfoid hücreler tarafından sağlanır. Lenfoid hücreler embriyonik gelişme boyunca, hematopoetik kök hücre, fetal karaciğerinin ve yumurta kesesinin içinde meydana gelir. Postnatal yaşamda kök hücreleri kemik iliğinde bulunurlar. (3)

Hematopoetik kök hücreler lenfoid ve myeloid olmak üzere iki hücre soyu vermektedirler. Lenfoid kök hücreden daha sonra T hücresi, B hücresi ve "Natural Killer" hücre (NK, doğal öldürücü hücre) farklılaşması gerçekleşmektedir. (2a) Myeloid hücre yönünde gelişme gösteren hücreler monosit, nötrofil, bazofil ve eozonofil olarak ayrılırlar. Mast hücreleri yapı ve işlevsel olarak bazofillere benzer hücrelerdir.

İmmünolojik yanıt lenfoid hücreler tarafından sağlanmaktadır.



Şekil 1.1 : Ortak lenfoid ve myeloid ana kök hücrelerin hemotopoetik hücrelerden kök alması.

1.1.1 Lenfositler

Lenfositler, yüksek canlıyı yabancı etmenler ve yapılardan korumakla görevli olan bağışıklık sisteminin ana ögesini oluşturan çok küçük 7-12 µm çapında mononükleer küresel hücrelerdir. Bu hücre çeşitleri, bakteriyel veya viral patojenlere karşı doğal ve kazanılmış bağışıklıktan sorumludurlar. (4)

Lenfositler, birincil veya merkezi lenfoid organlarında, timus ve yetişkin kemik iliklerinde, yüksek oranda üretilmektedirler. Bu hücrelerin bazıları sirkülasyonu tamamlamak için dalak, lenf düğümleri, apandisit ve bademciklerden oluşan ikincil lenfoid organlarına göç ederler. Bu organlarda yabancı antijenlerle reaksiyona girerler. Yetişkin bir kişide ortalama 2×10^{12} lenfoid hücre bulunmaktadır. (5)

1960'lı yıllardaki çalışmalar, bu hücrelerin iki farklı grubunun varlığını ortaya koymuştur. B (Bursa Fabricus) ve T (Timus) lenfositleri adlarını, farklılaşmanın gerçekleştiği dokulardan alırlar. B lenfositleri antikör moleküllerinin sentezine dayalı humoral bağışıklık, T lenfositleri ise hücresele bağışıklık olarak adlandırılan bağışıklık biçimlerinden sorumludurlar. Ancak bağışık yanıtın (özellikle humoral yanıt) gelişebilmesi için her iki grup kapsamındaki lenfositlerin etkin işbirliği gerekmektedir. (5)

Humoral immünite, kan ve doku sıvılarında bulunan antikörlerin oluşturduğu bağışıklıktır. Bu antikörler immunoglobulin adı verilen gliko - proteinlerdir.

Hücresele immünite de antikörlerin rolü yoktur. T lenfositlerin uyarımı ile oluşan ve virüsler tarafından enfekte olmuş hücrelere ve yabancı organizmalara karşı yanıtta sorumlu bir bağışıklık şeklidir. (6)

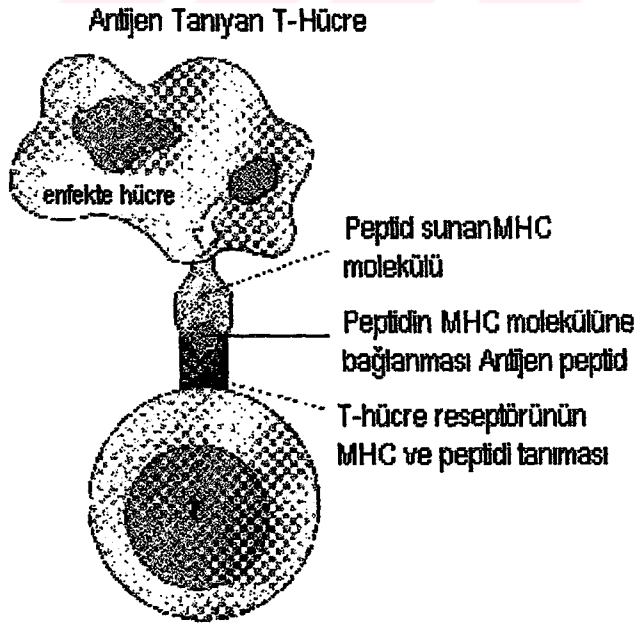
T lenfositlerinin alt grupları, T-Yardımcı (T_H), T-Baskılayıcı veya T-Sitotoksik (T_{CS}) ve B lenfositleri, yüzey zarlarındaki reseptör ve işaret moleküllerinin farklılığı ile tanınırlar. (7)

T ve B lenfositleri morfolojik olarak ayrılmamaktadır. Küçük lenfositler içinde T ve B lenfositlerinin her ikisi de vardır. Normal ışık mikroskopuyla lenfosit alt gruplarını ayırt etmek mümkün değildir. B ve T lenfositleri marker (işaret) denen zar yüzeyindeki proteinlerine göre ayrılırlar.

1.1.2. T Lenfositleri

T lenfositleri immun sistemin çok önemli hücreleridir. T lenfositleri tarafından meydana gelen hücrel immun cevaplar, hayvansal hücrelere saldıran parazit ve virüslere karşı mekanizma oluşturmanın yanında kanserleşmiş hücrelere karşı da korunma mekanizmasını olanaklı kılarlar. Hücrel bağışıklıktan sorumlu olan T lenfositleri, Timus içindeki kök hücrelerin olgunlaşmasından meydana gelmektedirler. Timus içinde, T hücre öncülleri timik hormonları (timosin ve timopoitein) 'nın etkisi altında T hücre alt gruplarına farklılaşırlar. Bu alt gruplar belirli yüzey gliko proteinleri ile belirlenmişlerdir; CD3, CD4, CD8 gibi. Tüm T hücreleri yüzeylerinde CD3 proteinlerine sahiptirler. (8)

T hücreleri yüzeylerinde CD4 ve CD8 proteinlerine sahip olup olmamalarına göre 2 temel kategoriye ayrılırlar. Olgunlaşmış T hücreleri ya CD4 ya da CD8 proteinine sahiptirler. Her ikisine de sahip olma durumu söz konusu değildir. (3)



Şekil 1.2 : Antijen Tanıyan T-hücre

T lenfositleri, belirli antijenlerle, antijene özgül olarak uyarılırlar. T lenfositleri yüzeyinde, antijenleri özgül olarak tanıyan T hücre reseptörleri vardır. TCR-1 (T hücre reseptör-1) ve TCR-2 (T hücre reseptör-2) olmak üzere 2 türlü T hücre reseptörü vardır.

T hücre reseptörleri, vücuttaki kanserleşmiş veya enfekte olmuş hücrelerin yüzeyindeki yabancı proteinleri tanır ve bu tanıma ile birlikte kanserleşmiş veya enfekte olmuş hücrelerin yıkımına başlanır. T hücre reseptörleri, antijenleri serbest olarak tanıyamaz. İmmun sistemde hücreler arası tanıma olaylarında doku uygunluk antijenleri rol oynarlar. Doku uygunluk antijenlerine, MHC (Majör Histocompatibility Complex) adı da verilir. T hücreleri yabancı antijeni, MHC antijen kompleksi olduğunda tanır. (3)

1.1.3. T ve B Hücrelerinin Uyarılması

T ve B hücreleri özel antijenlere bağlanarak uyarılırlar. T hücresi, antijen sunan hücre üzerinde bulunan MHC molekülleri ile kompleks yapmış peptide bağlanır. Bunun yanı sıra, B hücreleri serbest antijenlere bağlanırken, uyarılmak için T hücrelerine ihtiyaçları vardır. T ve B hücrelerinin; üzerindeki antijen reseptörlerinin özel birleşme yerlerine ek olarak, etkili bir T ve B hücre uyarılması için diğer hücre yüzey moleküllerine ihtiyaç vardır. *In vitro* koşullarda lenfosit uyarımı, lenfositin uyarılması sonucu gerçekleşir.

Bu uyarıcı maddeler;

- Yüzey antijen reseptörleri tarafından tanınan antijen.
- Antijenleri tanıyan T hücre yüzeyindeki CD3 – TCR (T-hücre reseptör) proteinlerini uyarıcı monoklonal antikorlar.
- Lektinler'dir.

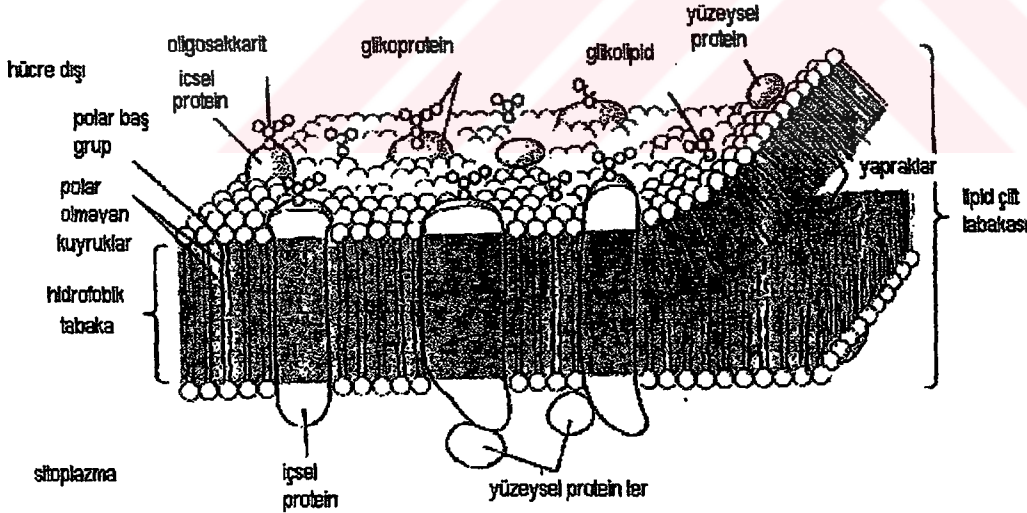
Lektinler, bitkilerden ve bakterilerden elde edilen karbonhidrat bağlayıcı proteinlerdir. BCR (B-hücre reseptör) veya TCR ile bağlanarak lenfositleri uyarıcı lektinlere *mitojen* (çoğalma indükleyicileri) denir. T ve B hücreleri farklı mitojenlerle uyarılır. Fitohemaglutinin (PHA) ve Konkanavalin A (Con A) insan ve hayvan T hücrelerini uyarır. Lipopolisakkarit (LPS), B hücrelerini

uyarır. Pokeweedmitojen (PWM), insan T ve B hücrelerinin her ikisini de uyarmaktadır. Bu maddelerin *in vitro* kullanımı, T ve B hücrelerinin uyarılmasına neden olmaktadır. (2b)

1.2. Membran Yapısı ve Valinomisin

Hücreyi tamamen örten hücre membranı çok ince ancak 7,5 – 10 nm kalınlığında esnek bir yapıdadır. Membranın %55 'lik kısmını proteinler, %25 'lik kısmını fosfolipidler, %13 'lük kısmını kolesterol, %4 'lük kısmını diğer lipidler ve %3 'lük kısmını da karbonhidratlar kapsamaktadır. (9)

Membranın lipid çift tabakası; oksijen ve alkol gibi yağda çözülebilen maddelere geçirgen olmasına karşın suda çözülebilen maddelere -iyonlar, glikoz, üre gibi maddeler- geçirgen olmayan bir yapıdır.



Şekil 1.3. : Hücre zarı akışkan mozaik modeli

Valinomisin K^+ iyon geçirgenliğini arttıran bir iyonofordur. Organik çözücülerde ve hücre membranlarında potasyum, rubidyum ve sezyum

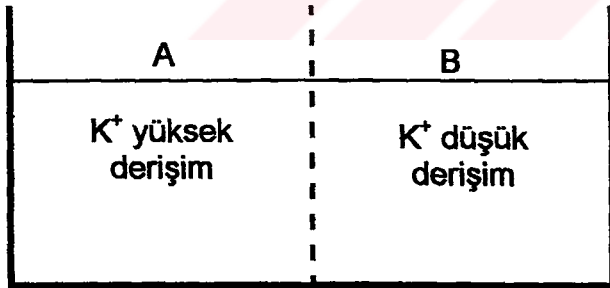
iyonlarına yüksek ve seçici geçirgenlik vermek üzere çözülür. Çalışma mekanizması taşıyıcı protein modeli ile açıklanır.

Potasyum iyonları ile kompleks yapan valinomisin, bu kompleksin lipid membranında çözülebilmesi için hidrofobik bir kafesle potasyum iyonlarını sarmalar ve membranın öbür tarafına aktarır. Valinomisin, K^+ iyonlarının taşınması için özgündür. Valinomisin *in vitro* çalışmalarda K^+ iyonoforu olarak kullanılmaktadır. Dış ortamda K^+ iyon derişimleri ayarlanarak farklı membran potansiyeli değerleri elde edilir. (10)

1.3. Membran Potansiyeli

1.3.1. Nernst Denge Potansiyeli

Yarı geçirgen bir membranda derişim farkından dolayı bir potansiyel meydana gelir.



Şekil 1.4. : K⁺ geçirgen bir zarla ayrılmış iki bölüm

K^+ iyonlarına geçirgenliği fazla olan bir membranda A bölümü [K^+], B bölümü [K^+] göre fazla olduğundan A'dan B'ye doğru derişim gradyanı nedeniyle bir difüzlenme meydana gelir. Bu durumda A bölümünde meydana gelen elektronegatiflikten ve B bölümünde meydana gelen elektropozitiflikten dolayı bir potansiyel fark oluşur. Bir süre sonra K^+ iyonları daha fazla B'ye

difüzenemezler ve sistem dengeye ulaşır. Meydana gelen dengede A'nın B'ye göre elektriksel potansiyeli "Nernst Eşitliği" ile belirlenebilmektedir. (10)

Nernst Denge Denklemi

$$E = - \frac{R_T}{Z \mathcal{F}} \cdot \log \frac{[A]}{[B]} \quad \text{Denklem No: 1}$$

- R : Gaz Sabiti = 8,28 Joule / (derece . mol)
T : Mutlak Sıcaklık = 20 °C 'de 293 °K
 \mathcal{F} : Faraday Sabiti = 96000 Coulombs / (mol . v)
Z : İyon Değeri

Yukarıdaki değerler eşitlikte yerleştirilerek, Nernst Denge Denklemi:

$$E = \pm 59 \log \frac{[\text{iyon}] \text{ hücre içi}}{[\text{iyon}] \text{ hücre dışı}} \quad \text{Denklem No: 2}$$

1.3.2. Membran Potansiyeli

Tüm hücrelerin membranlarında bir iyonik gradyant vardır. Hücre içi potasyum iyonlarının derişimi hücre dışına göre, hücre dışı sodyum iyonlarının derişimi de hücre içine göre fazladır.

Bu derişim farkları, hemen hemen tüm hayvansal hücrelerin plazma membranında bulunan Na^+ - K^+ - ATPaz ile oluşur ve korunur.

Derişim farkları nedeniyle K^+ , Na^+ ve Cl^- iyonları sızma kanallarından içeriye veya dışarıya difüzenirler. Bu iyonların difüzenmelerinde derişim farkı ve iyonların farklı geçirgenlikte olmaları-farklı mobiliteleri-belirleyici olur. Dolayısıyla difüzyon potansiyeli olarak tanımlanan bu potansiyelin oluşumunu 3 faktör belirlemiş olur. Bunlar; iyonların elektrik yükünün çeşidi, membranların iyonlara olan geçirgenliği (P) ve her bir iyonun membranın

içindeki ve dışındaki derişimidir. Hücre membranında oluşan potansiyeli en iyi açıklayan model **Goldman-Hodgkin-Katz** modelidir:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]^{ds} + P_{Na} [Na^+]^{ds} + P_{Cl} [Cl^-]^{ds}}{P_K [K^+]^{is} + P_{Na} [Na^+]^{is} + P_{Cl} [Cl^-]^{is}} \quad \text{Denklem No: 3}$$

Plazma membranlarında K^+ , Na^+ ve Cl^- iyonlarının geçirgenlikleri K^+ , Na^+ ve Cl^- kanal proteinlerinin aktivitelerine ve miktarlarına bağı olarak membran potansiyeli değışir. Tüm iyonlar kendi denge potansiyeline doğru gitme eğilimindedirler. Eğer membranın bir iyonla geçirgenliği fazla ise, membran potansiyeli o iyonun denge potansiyeline yaklaşır. Bu durumda Goldman denklemi Nernst denge denkleminde indirgenmiş olur. Bir K^+ iyonoforu olan valinomisin ortama eklendiğinde, K^+ iyonlarının geçirgenliği artarak membran potansiyeli K^+ denge potansiyeline yaklaşır. (9b)

Tablo 1.1 : Memeli kas hücrelerinin kararlı durumları için yaklaşık iyon derişimleri ve iyon denge potansiyelleri (11)

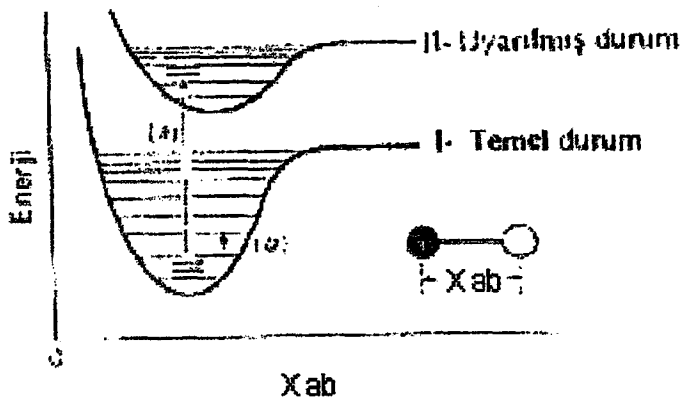
İyon Cinsi	Konsantrasyon		Denge Potansiyeli (mV)
	Hücreler arası Sıvı $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$	Hücre içi Sıvı $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$	
Kasyon Na^+	145	12	+66
K^+	4,1	150	-96
H^+	$3,8 \cdot 10^{-5}$	$13 \cdot 10^{-5}$	-32
Ca^{2+}	1,5	10^{-4}	+129
Diğerleri	5		
Anyon Cl^-	11,8	3,9	-90
HCO_3^-	27	12	-21
Kararlı Durum Potansiyeli		0	-90 mV

1.4. Spektroskopi

Spektroskopi, elektromanyetik dalgaların maddeyle etkileşiminin çalışılmasıdır. Elektromanyetik spektrum radyo izotopların bozunumu sırasında salınan yüksek enerjili δ -ışınları ve sırasıyla azalan enerjiye sahip, x-ışınları, mor ötesi ışınlar, görünür ışınlar, kızılötesi ışınlar, mikrodalgalar ve radyo dalgaları gibi elektromanyetik dalgalardan oluşur. Elektromanyetik ışınlar dalga özelliklerinin yanı sıra tanecik özellikleri de gösterirler.

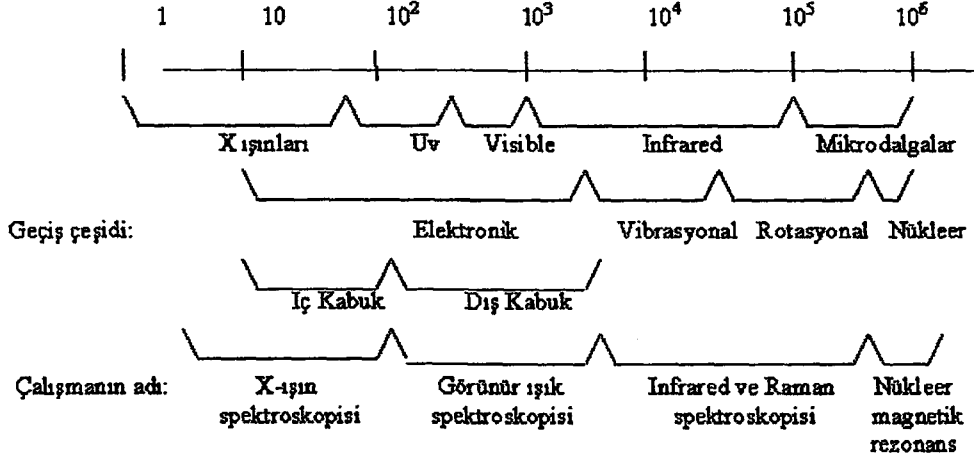
Maddedeki her konum veya davranış (elektronların yer aldığı yörüngeler, atomlar arası titreşim ve dönme hareketleri) belirli enerji seviyelerinde gerçekleşir. Diğer bir deyişle, maddenin dalga mekaniğine dayalı özelliklerine bağlı olarak atomlar basamaklı ya da kesikli enerji değerleri içerirler. Atomlar yalnızca belirli enerji düzeylerinde bulunabildiklerinden, ışının soğurulabilmesi basamak arasındaki enerji farklarına karşılık gelen dalga boylarında olanaklıdır.

Işının atomlar tarafından soğurulması ya da salınımı belirli enerji paketleri üzerinden gerçekleşir. Moleküllerde uyarılma sonrası ışığın geri saçılmasına *floresans etkisi* denir.



Şekil 1.5. : Basit bir diatomik molekülde enerji düzeyleri (kalın çizgiler elektronik enerji düzeylerini; ince düz çizgiler titreşim enerji düzeylerini; ince kısa çizgiler dönme enerji düzeylerini göstermektedir).

Tablo 1.2. : Elektromanyetik spektrum ve spektroskopi çeşitleri.



Işın, enerjisini içinden geçtiği maddede çarpıştığı atomlara aktarır. Uyarılma sonucu elektron veya atomun titreşim dönme hareketleri, bir üst enerji basamaklarına geçebilir. Basamaklar dışındaki bir ara enerji düzeyine geçiş olanaklı değildir. Işını soğurmadan önceki enerji düzeyi E_1 , soğurma sonrası enerji düzeyi E_2 olarak gösterilirse;

$$E_2 - E_1 = h \cdot \nu \text{ olur.}$$

Denklemler No: 4

$h \cdot \nu =$ soğurulma enerjisi

Spektroskopi kullanılan dalga boyları ve dolayısıyla uyarının gerçekleştiği enerji düzeyi farklılıklarına göre çeşitli tiplere ayrılmıştır. (12, 13)

1.4.1. Moleküler Spektra

Moleküllerin 3 temel optiksel spektrumu vardır;

1 – Elektronik Spektra:

Bu tür geçişler, bir temel elektronik durumun üst elektronik enerji seviyesine geçiştir.

2 – Titreşim Spektra:

Bu tür geçişler bir titreşim seviyesinin, aynı elektronik durumdaki diğer titreşim seviyesine geçiştir.

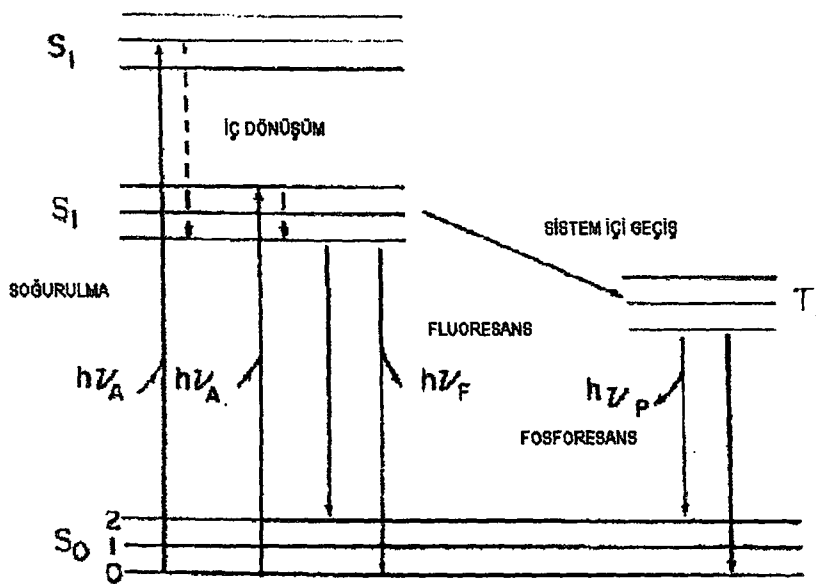
3 – Dönme Spektra:

Aynı elektronik durumun, aynı titreşim durumunda dönme seviyeleri arasındaki geçiştir.

Molekülün elektronik taban enerji değeri, molekülün elektron konfigürasyonu ve yörünge düzeni tarafından belirlenir ve *molekülün elektronik durumu* olarak tanımlanır.

Işığın soğurulmasının ve yayılımının gösterildiği enerji seviyeleri diyagramına "*Jablonski Diyagramı*" denilmektedir. Temel, birinci ve ikinci elektronik durumları sırasıyla; S_0 , S_1 ve S_2 ile gösterilir. (14)

Çeşitli elektronik seviyeleri arasındaki geçişler dikey geçişlerdir. Bu gösterim, ışığın soğurulmasının anlık durumunu göstermek için kullanılır.



1.4.2. Floresans

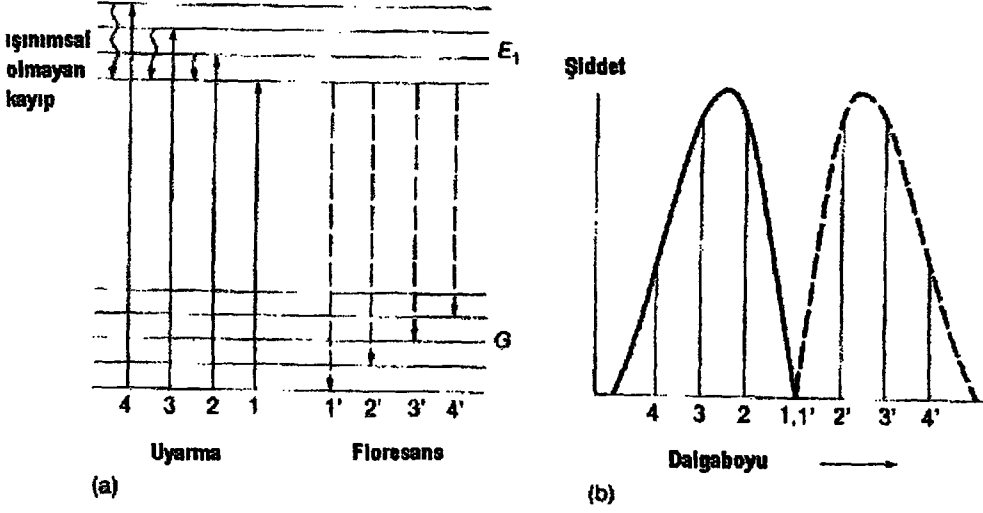
Soğurulan ışın tarafından uyarılan molekül, uyarılmış enerji seviyesine geçer. Molekül buradan çok kısa bir zaman içerisinde uyarılma enerjisini geri vererek düşük enerji seviyesine geri döner. Temel enerji seviyesinin geri dönüşüm mekanizması hem molekül seviyelerine hem de molekülün içinde bulunduğu ortama bağlıdır. (15)

Uyarılmış molekül ortamdaki başka bir molekülle çarpışması sonucunda enerjisini diğer moleküle kinetik ve titreşim enerjisi olarak aktarır. Sonuçta, yüksek titreşim seviyesine uyarılmış molekül hızlı bir şekilde düşük titreşim seviyesine geri döner. Temel durumun yüksek titreşim enerji seviyeleri, uyarılmış durumun en düşük titreşim enerji seviyesine yakın olduğu durumda zayıf çarpışmalarla temel enerji durumuna dönüş gerçekleşir. Bir diğer yol da, kuvvetli çarpışmalarla uyarılmış enerji durumundaki (S_1) en düşük titreşim seviyesinden temel enerji seviyesine (S_0) iniştir. Böylesi çarpışmaların yokluğunda molekül bir foton salar. Uyarılma durumunda salınan bu fotona *floresans* denir.

Floresans fotonlarının enerji aralığı, soğurulan fotonların enerji aralığından daha azdır. *Floresans ömür*, molekülün uyarılma durumundan temel duruma dönerken geçen ortalama zamanıdır.

Salınan foton uyarılma durumunun en düşük enerji seviyesinden, temel durumun titreşim enerji seviyelerine doğru sadece bir enerji bantı verir. Bu durumda, floresans bantın dalga boyu, soğurulan bantın dalga boyundan daha uzundur. Genelde, floresans yayılım spektrumu ve soğurulma spektrumu ayna görüntü simetrisine sahiptirler. Bu simetrik durum; soğurulma ve yayılımda aynı geçişler gerçekleşmesinden ve titreşim enerji seviyeleri arasındaki benzerlikten kaynaklanmaktadır.

Floresans dalga boyu, soğurulma dalga boyundan bağımsızdır. Bu bağlamda, soğurulma ve floresans spektrası genellikle üst üste gelmez. Ancak çözelti içindeki moleküllerin çevre molekülleri ile etkileşimleri sonucu titreşim enerji seviyeleri değişebilir ve emilim ve yayılım bantları kısmen çakışabilirler. (16)



Şekil 1.7. : Enerji seviyeleri diyagramı.

Soğurulma spektrumu bir çok enerji bantı içerir ve bu bantlar genelde üst üste gelerek geniş bir bant meydana getirirler. Bu nedenle soğurulma spektrumu floresans spektrumundan daha geniştir.

Bir floreforun floresans şiddeti (yoğunluğu), uyarılmış halde çarpıştığı moleküllerin uyarım enerjisini ne oranda soğurduklarına bağlıdır. Bu moleküller uyarılma enerjisini soğurarak floresans yayılım olasılığını azaltır ve böylece floresans şiddetini azaltmış olur. Floresans şiddetini azaltan bu moleküllere *floresans söndürücü* 'leri denilmektedir. Titreşim seviyeleri aralıkları geniş olan moleküller -örneğin su- etkin floresans söndürücüleridir.

Floresans şiddeti, floresans foton verimi ile açıklanmaktadır. Floresans foton verimi; yayılan fotonların sayısının, soğurulan fotonların sayısına oranıdır. (16)

$$\text{Foton Verimi} = \frac{\text{Yayılan Foton Sayısı}}{\text{Soğurulan Foton Sayısı}} \quad \text{Denklem No: 5}$$

1.4.3. Spektrofotometre

Spektrofotometre, küvetin içindeki bir çözültiden geçen ışığın ölçülmesinde kullanılan bir alettir. İletilen ışık, küvetin içindeki ışığı soğuran maddenin derişimini belirlemek için matematiksel hesaplamalarla emilme birimlerine dönüştürülür. Bütün spektrofotometreler temelde aynı parçalara sahiptirler. Bu parçacıklar;

1 – Işık Kaynağı:

Işık kaynağı araştırılan bileşik tarafından soğurulan radyant enerji sunmaktadır. İyi bir ışık kaynağı için şu koşullar gereklidir.

- Yeterli güçte bir ışık demeti üretmelidir.
- Çalışılan spektrum bölgesinin üzerinde sürekli dalga boyları sağlamalıdır.

- Sabit olmalıdır.

2 - Monokromatörler:

Gerekli dalga boylarının seçilmesi için kullanılmaktadır. Monokromatörler ile giriş ve çıkış yarıklarının kombinasyonu sağlanmaktadır. Monokromatörün giriş yarığı, monokromatöre giden istenmeyen ışıkları engellenmesinde kullanılırken, çıkış yarığı sadece küvetten geçen dar ışık demetine izin vermektedir.

3 - Küvet:

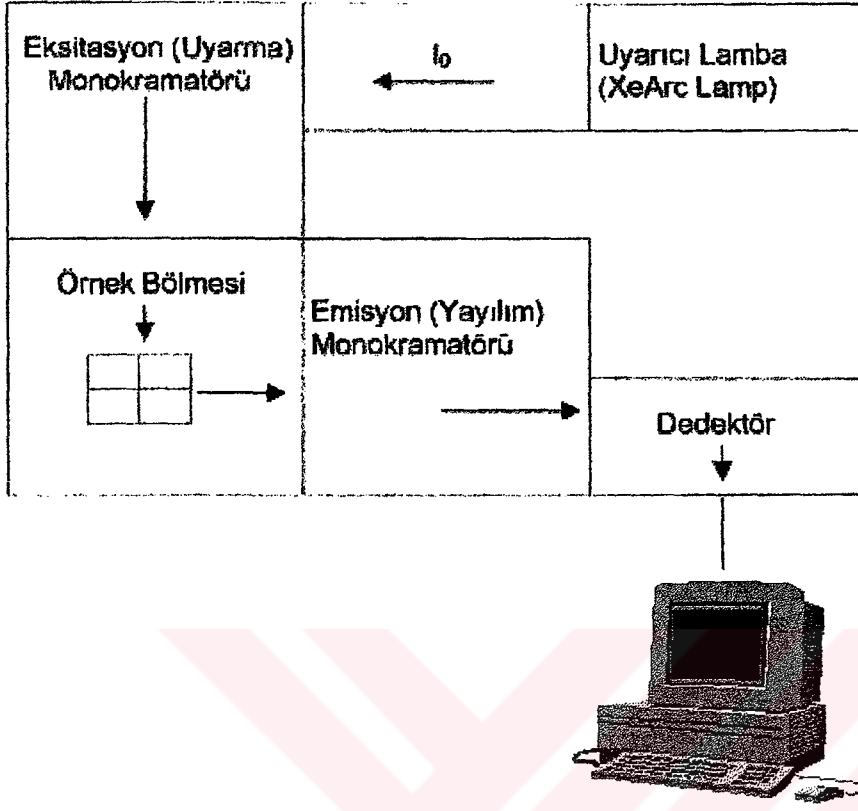
Küvetin içine emilimi ölçülmek istenen çözülti konulmaktadır. Küvet camdan, kuvars dan veya plastikten yapılabilmektedir.

4 - Dedektör:

Dedektör, çözülti içinde iletilen elektromanyetik radyasyonu, elektriksel sinyale dönüştürmektedir. Elektromanyetik radyasyonun şiddeti ne kadar artarsa, elektriksel sinyal de o kadar artmaktadır.

5 – Okuyucu Alet :

Dedektörden gelen elektriksel akımın büyüklüğü, dijital bir göstergede kaydedilmektedir. Sonuçlar genelde iletici birimlerde, soğurulma birimlerinde bazen de direkt derişim birimlerinde olmaktadır. (17)



Şekil 1.8.: Floresans spektrometrenin sistem bileşenleri.

1.4.4. Di-4-Anepss Probonun Özellikleri

Hücre membran potansiyeli ölçümlerinde di-4-Anepss probunun özellikleri :

a – 100 mV'luk membran potansiyel değişikliklerine karşı %9 floresans değişim gerçekleştiği seviyede, membran potansiyeline doğrudan cevap vermesi.

b – Membran çift tabakasının dış tabakasına yerleşmesi.

c –Elektrokromik olması (potansiyel değişimi sonucu floresans etki göstermesi).

e – Nötral pH 'sında yüksüz olması.

f – Çok küçük derişimlerde uygun optikal cevap vermesidir. (18, 19, 20)

1.5. Elektromanyetik Alanlar

1.5.1. Elektromanyetik Dalgalar

Elektromanyetik dalgalar, hepsi aynı hızla yayılma doğrultusunda birbirine dik düzenler içinde elektriksel ve manyetik bileşenden oluşur. Zamanla değişen –sinüzoidal- bir manyetik alan iletken bir maddeye uygulanırsa, (örneğin canlı) bu manyetik alan vektörüne dik bir elektrik alan meydana gelir.

1.5.2. Tarihçe

Dünyanın doğal manyetik alanı (0,02 – 0,07 mT) ve doğal elektromanyetik radyasyonlar, canlılığın evriminde doğal belirleyiciler olmuşlar ve canlı organizmalar bu koşullarda uyum içinde gelişmişlerdir.

Ancak teknolojik gelişim doğal olmayan statik manyetik alanlar ve elektromanyetik alanlar yaratmıştır. Dolayısıyla çevre koşulları açısından bu alanların, canlılığın üzerindeki etkisi önemli bir soru ve sorun haline gelmiştir.

Manyetizma; Yunanlılar, Çinliler ve Meksikalılar tarafından bulunduğu beri, birçok bilim adamı hipotezler ortaya koymuş ve araştırmalar yapmıştır.

Elektromanyetizmanın canlılar üzerindeki etkisi, 1900'ü yılların başında d'Arsonval ve Tesla tarafından gösterilmiştir. Bu önemli gelişmeden hemen sonra manyetik alanların zaman zaman tedavi amaçlı kullanılması üzerinde araştırmalar yapılmıştır.

1960'lı yıllarda uzay çalışmaları, dünyanın yerçekiminin ve manyetik alanının yokluğunda veya yüksek şiddetteki manyetik alanların varlığında canlılar üzerindeki etki araştırmalarına ivme kazandırmıştır.

1970'li yıllardan sonra, manyetik alanların kullanıldığı görüntüleme ve tanı cihazları (MR gibi) geliştirilmeye başlanmış ve konu üzerinde araştırmalar yapılmıştır. (21)

1980'li yılları takiben tanı için kullanılan iyonlaşma oluşturmeyen çok düşük frekanslı elektromanyetik alanların olumsuz etkileri olabileceği düşünülmüş ve bu alanda ciddi araştırmalar başlatmıştır. (21)

Teknolojinin gelişimi sonucu oluşan yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalar iyonlaşmaya yol açarak organizmada değişimlere neden olurlar.

Yüksek gerilim hatları ağı, elektromanyetik iletişim sistemleri, elektrikli aletler, MR gibi tanı cihazları tarafından meydana gelen iyonlaşmaya veya ısınmaya yol açmayan çok düşük frekanslı (<60 Hz) elektromanyetik dalgaların ve sabit manyetik alanların yan etkileri olabileceği kanısı 1980'lerden sonra gelişmiştir.

Bu araştırmaların başlayıp giderek artan boyutta gelişmesi, hem bu alanların yaratabileceği çevre kirliliği kaygısı hem de bu çok düşük frekanslı elektromanyetik alanların hücreyi nasıl etkileyebildiklerine olan bilimsel meraktır. (21)

1.5.3. Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanların Etkileri

Geniş bir spektrumu bulunan elektromanyetik alanlar içinde iyonlaşmaya yol açmayan alanlar günümüzde; yüksek gerilim hatlarından radarlara, iletişim araçlarından TV ve radyo vericilerine, ofis ve evlerdeki elektrikli aletler (elektrikli battaniye, tıraş makinesi, bilgisayar ekranı)' den, trafo merkezlerine kadar pek çok elektrikli sistemden yayılmaktadır. (37) Elektromanyetik dalgaların düşük frekanslarına rağmen kullarımdaki sıklıkları nedeniyle canlı organizmalar üzerine olumsuz etkilerinin olup olmadığı tartışmaları halen devam etmektedir.

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda yüksek gerilim hatlarının yakınında yaşayanlardaki kanser sıklığının arttığı ortaya konmuştur. (23, 24, 33) Hat işçilerinde yapılan çalışmalarda; hematolojik değişimler, kan hücreleri sayısında artışlar, sinir, sindirim ve kardiyovasküler sistemlerde işlevsel bozukluklar gözlemlenmiştir.

Elektromanyetik dalgaların kansere yol açtığını kanıtlayan hayvan modeli çalışmaları ve hücre düzeyinde çalışmalar ile elde edilen kesin sonuçlar olmadığı için epidemiyolojik sonuçlara yapılan itirazlar giderilememektedir. (47,48)

Elektromanyetik dalgaların çocuklarda; kan kanseri riskinin artmasını, kan tablosunun değişmesini, baş dönmesi ve baş ağrılarının artmasının elektromanyetik alanlarla bağlayan çalışmalar vardır. (24, 25)

Bütün bu olumsuz etkileşimlere karşın çok düşük elektromanyetik alanlar, tıpta tedavi amaçlı kullanılmaktadırlar. Düşük frekanslı elektromanyetik alanların tıpta en çok kullanıldığı alan ortopedidir. Kemik kaynamasının uyarılmasında ve kırıkta tamirlerinde bu alanlardan yararlanılmaktadır. Düşük frekanslı elektromanyetik alanların tıptaki uygulama alanlarından bir diğeri de nörolojide manyetik uyarı ile tedavi yapılmasıdır. (26)

Elektromanyetik alanın bir diğeri önemli doğal etkisi de, bakteriden birçok organizmaya kadar görülen manyetik duyarlılıktır. Bu canlılar dünya manyetik alanında meydana gelen en ufak değişimleri bile algılayıp davranışlarını yönlendirirler. (21)

Tablo 1.3. : Düşük frekanslı elektromanyetik alanların etkilerine örnekler. (21)

Deneysel Koşullar	Uygulama Alanı	Sonuç
40 mT – 450 mT 1,05 mT, 50 Hz	Kan Hücreleri Lenfosit Kültürü	Mitoz hızında artış Mitoz hızında düşme, kromozom bozukluğu
22 mT, 60 Hz. 0,1 mT, 0-100 Hz 10mT, 50 Hz.	Sıçan Lenfosit HL-60 hücreleri HPBL, (Con A)	Ca ⁺² 'da %170 artış Sitozol Ca ⁺² 'da %28 artış [³ H]-Timidin alımında %30 azalma
20 µT, 60 Hz.	Güvercin Pineal Bezi	%20-30 apokrin salgı artışı

1.5.4. Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanların Lenfositler Üzerindeki Etkisi

Bağışıklık sistemi hücrelerinin oldukça düşük frekanslı manyetik alanlara maruz kalması, sistemin işleyişi ile ilgili hücresel değişiklikler meydana getirmektedir. Elektromanyetik alanların bağışıklık sistemi üzerinden etki ederek tümör oluşumunu hızlandırdığı fikri bugün genel kabul görmektedir. (22) Elektromanyetik alanların hücre yüzeyindeki elektro kimyasal mekanizmaları etkiledikleri düşünülmektedir. Diğer bir deyişle, bu zayıf elektromanyetik alanlar nörotransmitter, antikor ve hormonların hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanmasını etkileyebilir (25, 27) veya katyon taşıyıcı kanallar ile taşınacak katyonlar arasında etkileşimi değiştirebilirler. K^+ , Na^+ , Ca^{+2} gibi iyonların kanallarından geçişi baskılanabilir veya hızlanabilir. Bu şekilde membrandan iyon akışının değişimi ile sinyal ileti yolları da etkilenip hücre davranışında farklılıklar meydana gelebilir. (28-31)

Lenfositlerin *in vitro* ortamda düşük frekanslı elektromanyetik alana maruz bırakılması ile yapılan çalışmalar manyetik alanın T lenfosit çoğalmasını etkilediğini göstermiştir. (32)

Bu alandaki bulgular, çok düşük frekanslı elektromanyetik alanın lenfositlere etki mekanizmasının Ca^{+2} 'a bağımlı sinyal ileti yolu ile gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bu da çok düşük frekanslı elektromanyetik dalgaların organizmayı etkileme mekanizmasının anlaşılması için bir ipucu olabilir. (27, 30, 34) Bu çalışmaların ortaya çıkardığı bir diğer bulgu ise lenfositlerin uyarılmamış durumda elektromanyetik alanlardan etkilenmemiş olmalarıdır. (22, 35)

Lenfosit çoğalması konusunda yapılan çalışmaların ortaya koyduğu bir diğer bulgu da, membran potansiyelinde meydana gelen değişikliklerin çoğalmayı etkilediğidir. (36)

Tablo 1.4. :Düşük frekanslı elektromanyetik alanların immun sistem üzerindeki etkileri. (22)

ETKİ ŞEKLİ	F(Hz)	B, mT	T(h)
Ca⁺² Metabolizmasındaki Etkileri:			
----- %70 azalma. PHA bağımlı Ca ⁺² alımı. Sağlıklı insan lenfositleri. Dinlenme durumundaki hücrelerde etki yok.	3,0	6,0	1,0
% 170 artış. Con-A bağımlı. Ca ⁺² alımı. Sıçan lenfositleri. Dinlenme durumundaki hücrelerde etki yok.	30,0	22,0	1,0
%28 artış. Sitozolik serbest Ca ⁺² . HL-60 hücreleri. NMR manyetik alan.	0-100	0,1	0,38
RNA Sentezi Etkileri:			
----- %55 azalma. [³ H] uridin alımı. HL-60 hücreleri.	60	1,0	0,5
DNA Sentezi Etkileri:			
----- %55 azalma. [³ H] timidin alımı. PHA aktiviteli sağlıklı insan kanı lenfositleri. Dinlenme durumundaki hücrelerde etki yok.	3,0	6,0	72
%60 azalma. [³ H] timidin alımı. PHA aktiviteli sağlıklı insan kanı lenfositleri. Dinlenme durumundaki hücrelerde etki yok.	3,0	4,5	72
Etki yok. Hücre siklus dönemi. PHA aktiviteli sağlıklı insan kanı lenfositleri.	50	0,2	69
%30 - 60 azalma. [³ H] timidin alımı. Mitojen aktiviteli insan lenfositleri. Dinlenme durumundaki hücrelerde etki yok.	50	2,5	66
%8 artış. Hücre siklus dönemi. . PHA aktiviteli sağlıklı insan kanı lenfositleri.	50	5,0	48
%30 azalma. [³ H] timidin alımı. Con A aktiviteli insan lenfositleri. Dinlenme durumundaki hücrelerde etki yok	50	10,0	72

Düşük frekanslı elektromanyetik alanların canlılar üzerindeki etkileri son yıllarda üzerinde oldukça durulan bir konu olmuştur.

Bu alanlara maruz kalan lenfositlerin çoğalmalarında ve metabolik işlevlerinde değişme görüldüğü daha önce yapılan çalışmalarda belirlenmesine rağmen etki mekanizması bilinmemektedir. (38)

Yapılan bu çalışmada, manyetik alana maruz bırakılan lenfositlerin çoğalmalarının, elektromanyetik alanın oluşturabileceği potansiyellerdeki değişiklikler ile ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kimyasal Maddeler

D⁺ - Glikoz (Farmakim)

Fitohemaglutinin (Sigma)

Ficoll (Histopaque)

Fötal Dana Serumu (Gibco)

Hepes (Sigma)

İzotonik Sodyum Klorür Solüsyonu (Eczacıbaşı / Baxter)

Kalsiyum Klorür (Sigma)

Penisilin (Gibco)

Potasyum Klorür (Horasan Kimya)

RPMI -1640 Medyum (Sigma)

Sodyum Bikarbonat (Merck)

Sodyum Klorür (Merck)

Sodyum Pirüvat (Gibco)

Streptomisin (Gibco)

Tripan Mavisi Çözeltisi (Sigma)

2.2. Kullanılan Çözeltiler

2.2.1 Lenfosit Kültürü İçin Kullanılan Çözeltiler

RPMI -1640 Medyum

%10 Fötal Dana Serumu

100 U/ml Penisilin

100 µg/ml Streptomisin

200 mM L-glutamin,

%1 Sodyum Pirüvat

%3 Sodyum Bikarbonat

2.2.2 Membran Potansiyeli Kalibrasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler

Yüksek Sodyum Çözeltisi

140 mM NaCl

2 mM KCl

1 mM CaCl₂

10 mM Glikoz

20 mM Hepes

Yüksek Potasyum Çözeltisi

140 mM KCl

2 mM NaCl

1 mM CaCl₂

10 mM Glikoz

20 mM Hepes

2.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Floresans Spektroskopisi (Photon Technology International)

Santrifüj (International Equipment Company / Centra MP4R)

%5 CO₂ Etür (Forma Scientific, Model 3548)

Steril Laminer Akım Kabini (Kutay)

Buzdolabı (Arçelik)

Otoklav (All American)

Terazi (Oertling NA-114)

2.4. Lenfositlerin Ayrılması

İçinde 2 ml heparin (5U/ml, Nevparin, Mustafa Nevzat) bulunan steril falkon tüpüne 20 ml sağlıklı insan kanı toplandı. Toplanan kan örneklerinden steril koşullarda mononükleer hücreler ayrıldı. Ficoll (Histopaque) üzerine tabakalandırılarak yayılan kan örnekleri, 500xg'de, oda ısısında santrifüj edilerek yoğunluk gradyanı oluşturuldu. Yoğunluk gradyanı sonucu oluşan mononükleer hücre halkası toplanarak başka steril bir tüpe alındı. Bu hücreler daha sonra 500xg'de, oda ısısında izotonik sodyum klorür ile iki kez, RPMI-1640 (Sigma, USA) medyum ile üçüncü kez yıkandı.

2.5. T- Hücre Ayrımı

T-lenfosit ayrımı için "Nylon wool" yöntemi (39) kullanıldı. Steril "Nylon wool" enjektörü RPMI-1640 medyumla ıslatılarak yatık bir pozisyonda 37 °C 'ta %5 CO₂ içeren ortamda 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra çıkarılan enjektörden medyumun akması sağlandı. Enjektörün üzerine mononükleer hücre ayrımı eklendi (1 ml de yaklaşık 40 milyon hücre). Hücrelerin enjektöre iyi biçimde yayılması için üzerine RPMI-1640 medyumunu eklendi. İğnenin ucu kapatılarak 37 °C 'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübatörden alınan enjektörün iğnesinin ucu açıldı ve üstten medyum eklenerek yapışmayan T hücreleri endorf tüplerine (3-4 ml) toplandı. Bu hücreler 200 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Flow-sitometri ile T hücrelerin varlığı test edildi.

2.6. Lenfosit Kültürü

%10 fetal dana serumu (FCS, Gibco) 100 U/ml penisilin (Gibco), 100 µg/ml streptomisin (Gibco), 200 mM L-glutamin, %1 Sodyum pirüvat (Gibco), %3 Sodyum bikarbonat (Merck, Germany) içeren RPMI-1640 medyum hazırlandı. Hücreler tripan mavisi ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda

toma camında sayıldı ve canlılıklarına bakıldı. Mitojen eklenmesinden sonra, bu hücreler hücre kültür kaplarına dağıtıldı. Mitojen olarak fitohemaglutinin (PHA, Sigma, USA) 2 µg/ml kullanıldı. Hücre kültür kaplarındaki hücreler 37 °C 'de, %5 CO₂ içeren ortamda 72 saat inkübe edildi. Floresans çalışmalar için 72 saatten sonra, hücreler yüksek Na⁺ çözelti ile yıkandıktan sonra tripan mavisi çözeltisi ile canlılıklarına bakıldı.

2.7. Floresans Spektroskopisi Ölçümleri

Membran potansiyeli ölçümü için floresans spektroskopisi (Photon Technology International Spectrofotometer) kullanıldı. Floresans probu olarak; 5x10⁻⁷ M di-4-Anepps [1-(3-sulfonatopropyl)-4-[β-[2-(di-n-butylamino)-6-naphthyl] vinyl] pyridinium betaine] (molecular probe) probu kullanıldı. Bu probun seçilmesinin sebebi, daha önceki çalışmalarda probun membran potansiyel değişikliklerine milisaniyeden daha az bir zamanda hızlı bir spektral kayma yaptığının gözlemlenmesidir. (40)

Floresans ölçümü için küvete, hazırlanan çözeltilerden 950 µl , floresans prop di-4-Anepps 'ten 5x10⁻⁷ M ve hücrelerden 50 µl eklendi. Hücrelerin çözelti ile dengeye gelmeleri için 7 dakika bir zaman gerektiği, daha önce yapılan zamana bağlı çalışmalarda gösterilmiştir. (40) Bu nedenle hücreler küvete konulduktan 7 dakika sonra ilk floresans ölçümü yapıldı.

Floresans spektroskopi ölçümünde başlama dalga boyu 350 nm, bitiş dalga boyu 550 nm, emisyon dalga boyu 610 nm olarak alındı. İlk ölçüm yapıldıktan sonra küvete 10⁻⁶ M valinomisine eklendi. Valinomisinin çözelti ile dengeye ulaşması için 3 dakika beklenildi ve bu süreden sonra ikinci ölçüm yapıldı. Floresans ölçümünde yarık değerleri; giriş 12 nm, çıkış 3,0 nm olacak şekilde ayarlandı. Bu yarık ayarları şiddeti arttırmak veya gürültü fazlalığını azaltmak için önemli bir koşuldu.

Floresans spektroskopisi ölçümü farklı derişimlerdeki çözelti için tekrarlandı ve bu ölçümler membran potansiyeli kalibrasyon eğrisi için kullanıldı.

Manyetik alana maruz bırakılan hücrelerin ve kontrol grubunun spektroskopik ölçümleri yüksek Na⁺ çözeltisi kullanılarak yapıldı. Manyetik alan ve kontrol grubu için yapılan ölçümlerde sıcaklığın sabitlenmesi için çözelti 37 °C 'taki su banyosunda ve hücreler 37 °C 'taki inkübatörde bekletildi. Bu nedenle ölçümlerdeki sıcaklığa bağlı bir ölçüm hatası en aza indirilmiş oldu. Bu ölçümler hem karışık T ve B hücre kültürleri için, hem de T hücre kültürü için tekrarlandı.

2.8. Manyetik Alan Uygulanması

72 saatten sonra kültürden alınan hücreler, 90 dakika süreyle 50 Hz 5mT şiddetindeki düşük frekanslı manyetik alana maruz bırakıldılar. Bunun için eşit hücre sayılarında, kontrol ve manyetik alan olmak üzere iki ayrı grup hazırlandı ve bunlar için iki ayrı bobin kullanıldı. Hücreler bobinde manyetik alanın homojen olduğu orta bölgeye doğru yerleştirildi. Diğer bobinde kontrol grubu için eşit koşullar sağlandı.

Manyetik alan düzeneği olarak; 1 güç kaynağı, 1 ampermetre ve 1 reosta kullanıldı. Ayrıca hücrelerin buldukları ortamın sıcaklığını sabitlemek için 37 °C 'deki bir su banyosu kullanılarak, bobinlerin içinden geçen hortumlarla su sirkülasyonu sağlandı.

3. BULGULAR

3.1. Membran Potansiyelinin Floresans Spektroskopisi İle Ölçümü

Membran potansiyeli ölçümü için floresans spektroskopisi yöntemi kullanıldı. Membran potansiyelinin ölçülmesi için ön çalışma olarak Kalibrasyon eğrisi çizildi.

3.1.1. Membran Potansiyel Kalibrasyonu

Membran potansiyeli kalibrasyon eğrisini elde etmenin yöntemi çeşitli K⁺ iyon derişiminde farklı membran potansiyel değerlerin oluşturulması ve bu potansiyel değerlerindeki floresansın belirlenmesidir. Deneysel olarak hücrenin membran potansiyelini kesin olarak belirlemek mümkün değildir. Bu durum, hücrenin iyonik iletiminin tanımlanamamasından ve hücrenin içindeki iyon aktivitelerinin (derişimler) kesin olarak belirlenememesinden kaynaklanmaktadır.

Değişik membran potansiyeli değerleri, farklı K⁺ derişimlerinde valinomisinin varlığında hesaplanır. Valinomisinin varlığında hücrenin K⁺ geçirgenliği diğer iyonların iletiminden daha fazladır ve membran potansiyeli Nernst eşitliği ile hesaplanan Potasyum denge potansiyeline eşit olur.

$$V_M = -59 \cdot \log \frac{[K_i]}{[K_o]} \quad \text{Denklem No: 6}$$

Membran potansiyeli kalibrasyonunda hücre içi K⁺ derişimi 2mM olarak alındı. (41) Daha sonra farklı hücre dışı K⁺ derişimine bağlı olarak valinomisini ortamda hücrelerin floresansı ölçüldü.

Bunun için 2 ayrı çözelti hazırlandı. Bunlar yüksek Na^+ çözeltisi ve yüksek K^+ çözeltisi olarak tanımlandılar. Membran potansiyeli kalibrasyon eğrisi ayrı ayrı bu iki çözeltiyle ve bu iki çözeltinin farklı oranlardaki karışımlarından oluşan çözeltilerle floresans spektroskopik ölçümler yapılarak elde edildi. Yüksek Na^+ çözeltisi hücrenin doğal fizyolojik ortamındaki iyon derişimi ile eşdeğerdir. (40, 43)

A çözeltisi (Yüksek Na^+ çözeltisi): 140 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 10 mM Glikoz, 20 mM Hepes kullanıldı. Solüsyon pH'sı 7,3 'e ayarlandı.

B çözeltisi (Yüksek K^+ çözeltisi): 140 mM KCl, 2 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 10 mM Glikoz, 20 mM Hepes kullanıldı. Solüsyon pH'sı 7,3 'e ayarlandı. (42) Membran Potansiyeli kalibrasyonu için farklı Na^+ ve K^+ derişimleri aşağıdaki gibidir.

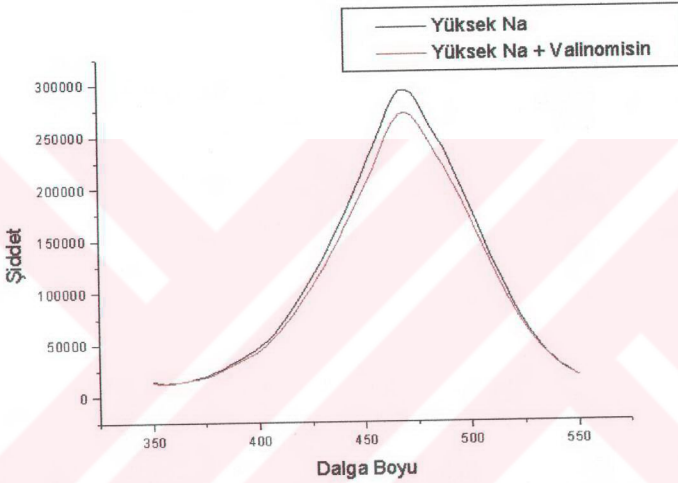
Tablo 3.1. : Farklı Na^+ ve K^+ derişimleri ve Valinomisin eklenmesi ile Nernst denge denklemi ile hesaplanan potansiyel değerleri.

Solüsyon Derişimleri	+ Valinomisin ile bu Derişimlerdeki Potansiyel Değerleri (mV)
Yüksek Na^+ Derişimi : 5 ml A çöz.	-109,760
4 ml A çöz. + 1 ml B çöz.	- 40,714
3 ml A çöz.+ 2 ml B çöz.	- 23,834
2 ml A çöz.+ 3 ml B çöz.	- 13,745
1 ml A çöz. + 4 ml B çöz.	- 6,526
Yüksek K^+ Derişimi : 5 ml B çöz.	- 0,899

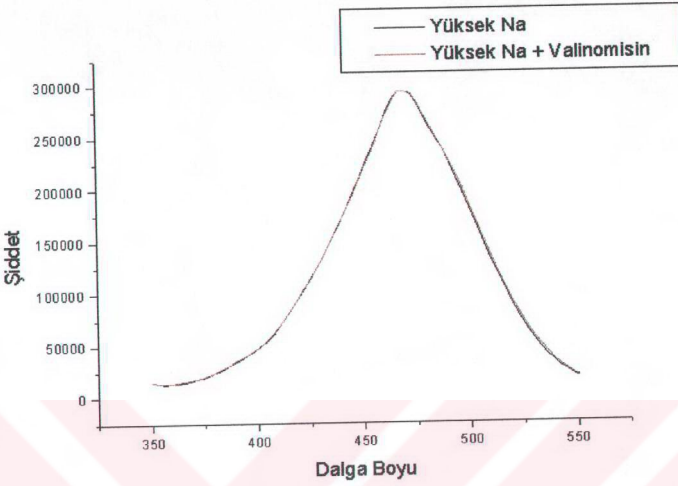
Yüksek Na^+ ortamda valinomisin eklenmesi hiperpolarizasyona neden olur. Artan K^+ değerleri sistemin sıfır potansiyele doğru depolarizasyonuna yol açar. Ortamın K^+ derişimlerine göre Nernst denklemi ile hesaplanan potansiyel değerleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

3.1.2. Spektraların Analizi

Floresans spektroskopisinde elde edilen bantlar Origin-5 programı kullanılarak analiz edildi. Hücelere valinomisin eklenmeden ve eklendikten sonra elde edilen bantlar bir arada çizildi. (Şekil 3.1)

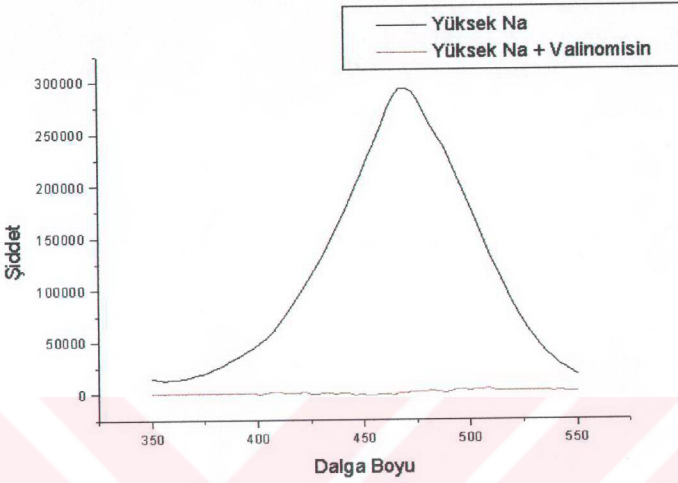


Şekil 3.1. : Na^+ derişimi yüksek olan A çözeltisinin ilk spektrası (siyah) ve ilk ölçümden sonra ortama valinomisin eklenerek ölçülen spektra (kırmızı).



Şekil 3.2. : İki bantta kayma olup olmadığına bakabilmek için iki bantın şiddet maksimum değerlerinin oranları alınarak ve bu oran maksimum değeri düşük olan bant ile çarpılarak elde edilen normalizasyon grafiği.

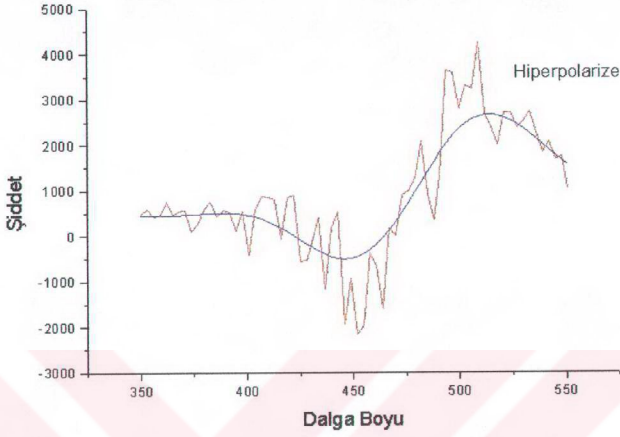
Bu iki spektra arasında yüksek veya düşük dalga boyuna doğru bir kayma, hücrelerde meydana gelen hiperpolarize veya depolarize durumun göstergesidir. Kayma olup olmadığına bakabilmek için önce bu iki bantın şiddet maksimum değerlerinin oranları alındı ve bu oran, maksimum değeri düşük olan bant ile çarpılarak normalizasyon yapıldı. (Şekil 3.2)



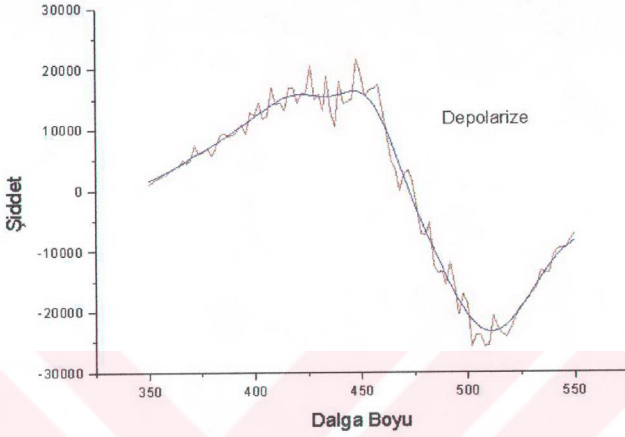
Şekil 3.3. : Normalizasyondan sonra valinomislinli banttın, valinomisinsiz bant çıkarılarak fark grafiğinin elde edilmesi.

Normalizasyondan sonra valinomislinli banttın valinomisinsiz bant çıkartılarak, bu iki bant arasındaki fark bantı elde edildi. (Şekil 2.4 , 2.5 ve 2.6)

Elde edilen banttı depolarizasyon ve hiperpolarizasyon olup olmadığına bakıldı. Kırmızı kayma olarak tanımlanan uzun dalga boyuna doğru kayma hiperpolarizasyonu, mavi kayma diye tanımlanan kısa dalga boyuna doğru bir kayma da depolarizasyonu göstermektedir.



Şekil 3.4. : Yüksek Na⁺ ve yüksek Na⁺ + valinomisin fark spektrallerinin hiperpolarizasyon durumu. Hiperpolarizasyon , kırmızı kayma olarak tanımlanan uzun dalga boyuna doğru kayma durumudur.



Şekil 3.5. : Yüksek K^+ ve yüksek K^+ + valinomisin spektralarının depolarizasyon durumu. Depolarizasyon , mavi kayma olarak tanımlanan kısa dalga boyuna doğru kaymadır.

3.1.3. Membran Potansiyeli Kalibrasyon Eğrisinin

Çizilmesi

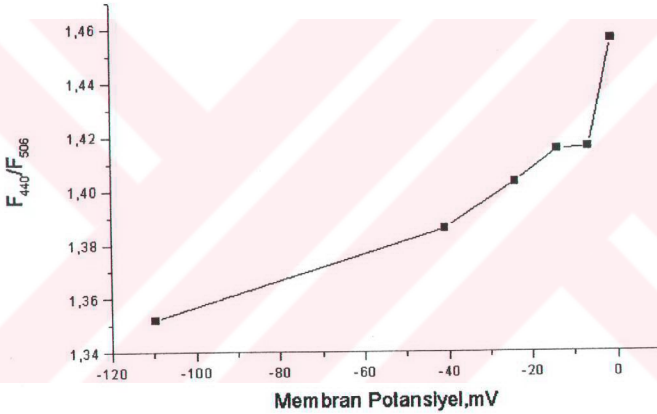
Kalibrasyon eğrisi elde etmek için valinomisinli ve valinomisinsiz çözeltilerin fark bantlarında belirlenen en yüksek şiddet farkını veren iki dalga boyu (440 nm ve 506 nm) belirlendi. Her çözelti için bu dalga boyu oranları F_{440} / F_{506} 'dır. K^+ için Nernst denklemi ile hesaplanan potansiyel değerlere karşı çizildi ve kalibrasyon eğrisi elde edilmiş oldu. Kalibrasyon eğrileri Bulgular bölümünde verilmiştir.

3.2. Membran Potansiyellerinin Hesaplanması

Manyetik alana maruz bırakılan hücrelerin ve kontrol gruplarının membran potansiyellerinin belirlenebilmesi için, her iki grubunda 440 nm ve 506 nm dalga boylarındaki floresans şiddetlerinin oranları belirlendi. Bu hesaplanan oranlara karşılık gelen membran potansiyel değerleri kalibrasyon eğrisinde belirlendi.

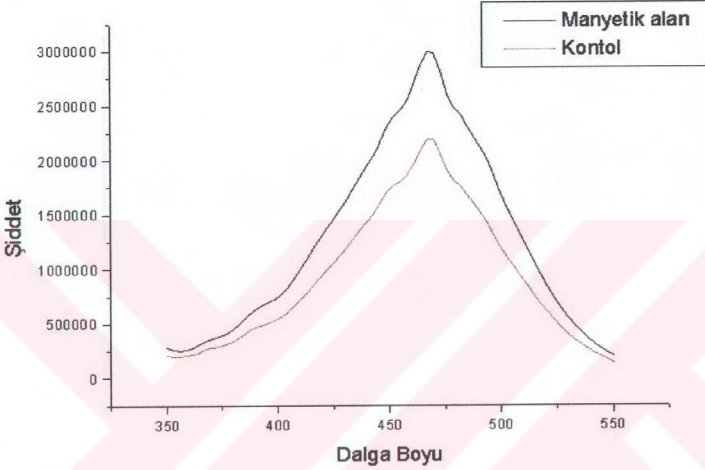
3.3. Kalibrasyon Eğrisi

Kalibrasyon eğrisinin elde edilmesi 3.1.3 bölümünde açıklanmıştır. Elde edilen kalibrasyon eğrileri aynı eğimle değişkenlik göstermektedirler. Şekil 3.6'da verilen kalibrasyon eğrisi membran potansiyellerinin hesaplanması için kullanılmıştır.



Şekil 3.6. : Membran potansiyel kalibrasyon eğrisi, valinomisinli ve valinomisinsiz çözeltilerin fark bantlarında belirlenen en yüksek şiddet farkını veren iki dalga boyu belirlenerek (440 nm ve 506 nm) ve bu dalga boylarının oranları F_{440} / F_{506} alınarak, bu değerlere karşılık gelen K^+ için Nernst Denge Denklemi ile hesaplanan potansiyel değerlere karşı çizildi.

3.4. Manyetik Alan ve Kontrol Gruplarının Membran Potansiyel Hesaplamaları



Şekil 3.7. : Manyetik alan kontrol grubu spektraları. Elde edilen bu spektradan 440 nm ve 506 nm şiddet değerleri, membran potansiyellerinin kalibrasyon eğrisinden belirlenebilmesi için elde edildi.

Manyetik alan grubunun şekil 3.7. 'den elde edilen 440 nm ve 506 nm şiddet değerleri:

440 nm → 1940590

506 nm → 1430680 olarak belirlendi.

Manyetik alan membran potansiyelinin belirlenmesi için 440 nm ve 506 nm şiddet değerlerinin oranı:

$$\frac{F_{440}}{F_{506}} = \frac{1940590}{1430680}$$

$$\frac{F_{440}}{F_{506}} = 1,356$$

Kontrol grubunun Şekil 3.7'den elde edilen 440 nm ve 506 nm şiddet değerleri:

440 nm → 1428300

506 nm → 1023550 olarak belirlendi.

Manyetik alan membran potansiyelinin belirlenmesi için 440 nm ve 506 nm şiddet değerlerinin oranı:

$$\frac{F_{440}}{F_{506}} = \frac{1428300}{1023550}$$

$$\frac{F_{440}}{F_{506}} = 1,395$$

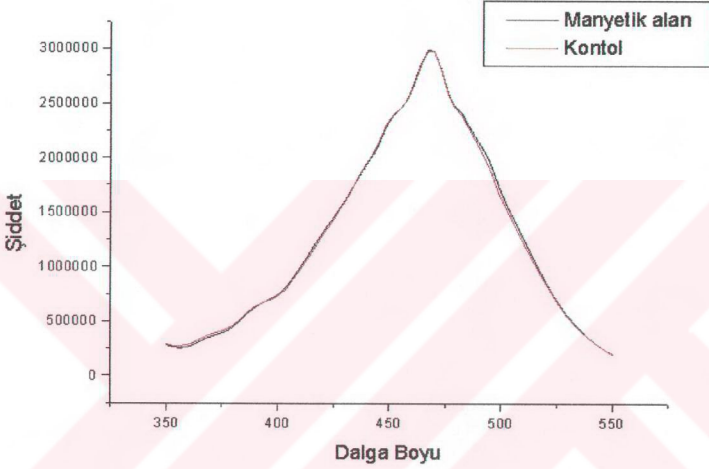
Manyetik alan ve kontrol grubu için belirlenen bu oranların kalibrasyon eğrisinde karşılık gelen membran potansiyel değerleri belirlendi.

Manyetik alan grubu için karşılık gelen membran potansiyeli değeri kalibrasyon eğrisinden **-101,008 mV** olarak belirlenmiştir.

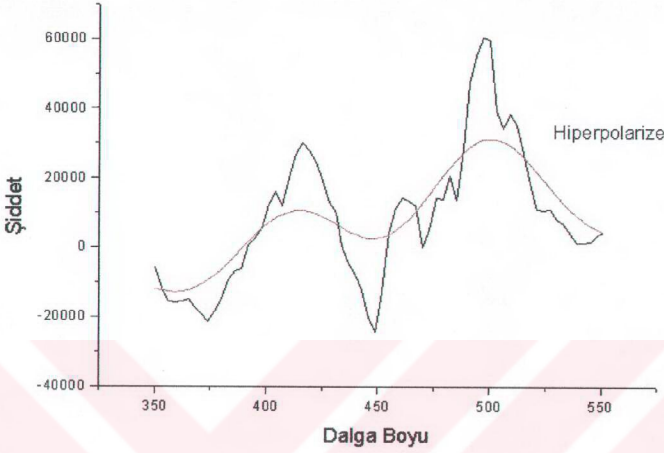
Kontrol grubu için karşılık gelen membran potansiyeli değeri kalibrasyon eğrisinden **-31,942 mV** olarak belirlenmiştir.

Bu belirlenen sonuçlardan manyetik alan grubunun membran potansiyelinin, kontrol grubu membran potansiyeline göre azaldığı saptanmıştır. Manyetik alan-kontrol fark grafiğinde görüldüğü gibi manyetik alan uygulanan hücrelerin membran potansiyelleri hiperpolarize olmuşlardır.

Bu hiperpolarize olma durumu manyetik alan – kontrol fark grafiğinde açıkça görülmektedir.



Şekil 3.8. : Manyetik alan kontrol grubunun bantlarında kayma olup olmadığına bakabilmek için, iki bantın maksimum şiddet değerlerinin oranları alındı ve bu oran maksimum değeri düşük olan bant ile çarpılarak normalizasyon grafiği çizildi.



Şekil 3.9. : Manyetik alan – kontrol grafiğinin normalizasyondan sonra fark spektralleri alınarak elde edilen hiperpolarizasyon durumu.

Manyetik alan ve kontrol gruplarının yapılan hücre sayımlarında, manyetik alan grubunun çoğalmasında kontrol grubuna göre azalma görülmüştür.

Tablo 3.2. : Manyetik alan ve kontrol gruplarının yapılan hücre sayımları.

	Manyetik Alan Grubu Hücre Sayısı	Kontrol Grubu Hücre Sayısı
Önce	3,000,000	2,800,000
Sonra	400,000	700,000

Manyetik alan ve kontrol grubundaki azalmanın karşılaştırılması:

$$\frac{\text{Manyetik alan uygulama öncesi hücre sayısı}}{\text{Manyetik alan uygulama sonrası hücre sayısı}} = \frac{400.000}{3.000.000} = 0,13$$

$$\frac{\text{Manyetik alan uygulama öncesi kontrol grubu hücre sayısı}}{\text{Manyetik alan uygulama sonrası kontrol grubu hücre sayısı}} = \frac{700.000}{2.800.000} = 0,25$$

Manyetik alan ve kontrol grubundaki azalmanın karşılaştırılması için hücre sayısındaki düşüşün birbirlerine göre oranı alınmıştır.

$$\frac{\text{Manyetik alan uygulama hücre grubu}}{\text{Manyetik alan kontrol hücre grubu}} = \frac{0,13}{0,25} = 0,52$$

Manyetik alan uygulanmış hücre grubunda kontrol hücre grubuna göre %52 azalma görülmüştür.

4. TARTIŞMA

Çok sayıda çalışmada, lenfositlerin *In vitro* ortamda düşük frekanslı elektromanyetik alana maruz bırakılmasıyla, manyetik alanın T-lenfosit çoğalmasını etkilediği gösterilmiştir. (32) Ortak olan diğer bir görüş ise, çok düşük frekanslı elektromanyetik alanın lenfositlere etki mekanizmasının Ca^{+2} 'a bağımlı sinyal ileti yolu ile gerçekleştiğidir. (27,30,34) bu çalışmaların ortaya çıkardığı bir diğer bulgu ise lenfositlerin uyarılmamış durumda elektromanyetik alanlardan etkilenmemiş olmalarıdır. (22,35)

Lenfosit çoğalması konusunda yapılan çalışmaların ortaya koyduğu bulgularla, membran potansiyelinde meydana gelen değişikliklerin lenfosit çoğalmasını etkilediği görülmüştür. (36)

Bu çalışmada amaçlanan düşük frekanslı elektromanyetik alanların kullanılan şiddet ve frekansta, lenfositlerin membran potansiyelini etkileyip etkilemediklerini floresans spektroskopisi ile saptamak ve bu değişimi hücrenin çoğalması ile bağdaştırmaktı.

Bulgular 5 mT ve 50 Hz'lik elektromanyetik alanın membran potansiyelinde hiperpolarizasyona yol açtığını göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalar lenfositlerin uyarımı membran potansiyelinin değiştiğini (44) ve membran potansiyelinde meydana getirilen değişimlerin de çoğalmayı inhibe edebileceğini göstermiştir. (36)

Bu çalışmada hiperpolarizasyonun lenfosit çoğalmasında azalmaya neden olduğu saptandı. Schultz ve Shahidi (45) yaptıkları çalışmalarda valinomisin eklenmesinin lenfosit çoğalmasında inhibasyona yol açtığını ve artan K^{+} değerlerinin bu inhibasyonu engellediğini göstermiştir. Hücrenin doğal ortamında valinomisin eklenmesi hiperpolarizasyona yol açar ve artan K^{+} derişimleri depolarizasyona neden olur. Proliferasyonun inhibasyonu artan valinomisin derişimlerinde artmaktadır ve maksimum yanıt kullanılan 10^{-6} M 'da elde edilmiştir. (46)

Elde edilen bulgularda elektromanyetik alanın membran potansiyelinde hiperpolarizasyona yol açarak çoğalmayı inhibe ettiğini göstermektedir. Çalışmada kullanılan di-4-Anepps probu potansiyel değişimlerine hızlı yanıt

vermekle beraber kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde sorunlar yaratmıştır. Di-4-Anepps, membran potansiyeli değişimlerinde şiddet farkı değil spektral bantlarda kayma meydana getirmektedir. Farklı K^+ derişimleri dolayısıyla farklı potansiyel değerler ile oluşan bu kaymalar kontrol edilemeyen parametreler (membran akışkanlığı, sıcaklık gibi) 'den etkilenebilmektedirler.

Elde edilen kalibrasyon eğrileri Montana, Farkas ve Loew un (40) buldukları gibi lineer çıkmamıştır. Probu hassasiyeti hiperpolarizasyon durumunda depolarizasyon durumuna göre daha düşüktür. (Şekil 3.6)

Elektromanyetik alanın etki mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunmak amacıyla yapılan bu çalışmada elde edilen bulgular çalışmaların bu yönde devam etmesi için umut vericidir.

Bu çalışmaların Siyanin probu kullanılarak ve öncelikle;

a – Manyetik alana maruz kalma süresi,

b – Manyetik alan şiddeti, değiştirilerek tekrarlanması amaçlanmaktadır.

5. SONUÇLAR

1 – Düşük frekanslı elektromanyetik alana maruz bırakılan lenfosit hücrelerinin çoğalmalarında kontrol grubuna göre azalma görülmüştür.

2 – Düşük frekanslı elektromanyetik alana maruz bırakılan lenfositlerin membran potansiyellerinde hiperpolarizasyon görülmüştür.



6. KAYNAKLAR

- 1 - Gusyov, S., Nassal, J.V.: Yaşam, ölüm ve bağışıklık sistemi. Bilim Scientific American, Türkçe basım, 1, s.9-17, 1993**
- 2 – Roitt, I., Brostoff, J., Mace, D: Immunology. Intruduction the Immune System, Ch.1, 4th Ed., Mosby, Spain, s.1-12, 1996**
- 2a – Roitt, I., Brostoff, J., Mace, D: Immunology. Cell involved in the immune response, Ch.2, 4th Ed., Mosby, Spain, s.1-18, 1996**
- 3 – Levinson, W. E., Jautz, E.: Medical Microbiology and immunology. Cellular basis of the immune response, Ch.58, 3rd Ed., Prentice- Hall International Inc., London, s.294-300, 1994.**
- 4 – Stites, D.P., Terr, A.I.: Basic and Clinical Immunology. Cells of the immune response: Lymphocytes and mononuclear phagocytes, Ch.5, 7th Ed., Middle East Edition, E Publishing Division of Prentice Hall, London, s. 61-67, 1991.**
- 5 – Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Roff, M., Roberts, K., Watson, J.D.: Molecular Biology of the Cell. The immune system, Ch.23, 3rd Ed., Garland Publishing Inc., NewYork and London, s.1195-1205, 1994.**
- 6 – Dow J., Lindsay G., Morrison J.: Biochemistry Molecules, Cells and the Body. Immunoglobulins and defence mechanisms of the body. Ch.16, Addison- Wesley Publishing Company, USA, s.483-499, 1996.**
- 7 – Gülmezoğlu, E., Ergüven, S.: İmmunoloji. Bağışık yanıtta rol oynayan hücreler, Böl.8, Hacettepe-Taş, Ankara, s.99-102, 1994.**
- 8 – Abbas, A.K, Lichtman, A.H., Pober, J.S.: Cellular and Molecular Immunology. Cells and tissues of the immune system, W. B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc., The Curtic Center Independence Square West Philadelphia, s.14-31, 1994.**
- 9 – Guyton, A.C.: Textbook of Medical Physiology. The cell and its function, Ch.12, 7th Ed., W. B. Saunders Company International Edition, USA, s.11-14, 1986.**

9b – Guyton, A.C.: Textbook of Medical Physiology. Membrane potentials and action potentials, Ch.10, 7th Ed., W. B. Saunders Company International Edition, USA, s.101-104

10 – Stein, W.D.: Channels, Carriers and Pumps. An Introduction to Membrane Transport. Carrier-Mediated transport: Facilitated diffusion, Ch.4, Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers, San Diego California, s.143-146, 1990.

11 – Pehlivan, F.: Biyofizik. Hücrede biyofiziksel olaylar. Böl.4, 2. Baskı, Hacettepe- Taş, Ankara, s.54-59, 1997.

12 – Freifelder, D: Physical Biochemistry. Applications to Biochemistry and Molecular Biology, Absorption spectroscopy, Ch.14, W.H. Freeman and Company, San Francisco, s.377-382, 1976.

13 – Bermek, E., Nurten, R., Tiryaki, D., Gökçe, S.: Biyofizik Ders Notları. Radyoaktiflik ve ışın biyofiziği, Böl.3, 2. Baskı, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul, s.78-81, 1997.

14 – Lakowicz, J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Introduction to fluorescence, Ch.1, Plenum Press, NewYork and London, s.1-11, 1986.

15 – Demchenko, A.P., Somogyi, B., Galay, J., Baysal, K., Flenko, A., Erçelen, Ş.: Spectroscopy in Molecular and Cellular Biology. Principles of fluorescence spectroscopy, Lec.2, s.7-8, 1998.

16 – Freifelder, D.: Principles of Physical Chemistry with applications to the Biological Sciences. Quantum mechanics and spectroscopy, Ch.17, 2nd Ed., Jones and Bartlett Publishers Inc., Boston Portola Valley, s.639-643, 1982.

17 - Demchenko, A.P., Somogyi, B., Baysal, K., Flenko, A., Erçelen, Ş., Klymchenko, A.: Spectroscopy in Molecular and Cellular Biology. Instrumentation in light absorption and fluorescence spectroscopy, Lec.3, s.15-19, 1999.

18 – Gross,d., Loew, L.M.,Webb, W.W.: Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electric fields. Biophysical Journal, 50: 339-348, 1986.

- 19** – Waggoner, A.S.: The use of cyanine dyes for the determination of membrane potentials in cells, organelles and vesicles. *Methods in Enzymology* Vol. 55, : 689-695, 1979.
- 20** – Schlichter, L.C., Sakellaropoulos, G.: Intracellular Ca^{+2} signaling induced by osmotic shock in human T lymphocytes. *Experimental Cell Research*, 215: 211-222, 1994.
- 21** – Azanza, M.J., Moral, A.D.: Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism. *Progress in neurobiology*, 44: 517-601, 1994.
- 22** – Walleczek, J.: Electromagnetic field effects on cells of the immune system: The role of calcium signaling. *The FASEB Journal*, 6: 3177-3185, 1992.
- 23** – Moulder, J.E., Foster, K.R.: Is there a link between exposure to power frequency electric fields and cancer? , *IEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 18: 109-116, 1999.
- 24** – Norden, B., Ramel, C.: Interaction Mechanisms of Low-Level Electromagnetic Fields in Living Systems. *Magnetic field and cancer: More information is still needed*, Ch.2, s.14-21, 1992.
- 25** - Norden, B., Ramel, C.: Interaction Mechanisms of Low-Level Electromagnetic Fields in Living Systems. *ELF Magnetic fields and promotion of cancer*, Ch.3, s.23-25, 1992.
- 26** – Polk, C.:Therapeutic applications of low frequency electric and magnetic fields. *Advances in electromagnetic fields in living systems*, 1: 129-153, 1994
- 27** – Frey,A.H.: *Electromagnetic Field Interactions. Biophysical aspects of electromagnetic field effects on mammalian cells*, Ch.3, s.32-33,1995.
- 28** - Karabakhtsian, R., Broude, N., Kochlatyi, S., Goodman, R., Henderson, A.S.: Calcium is necessary in the cell response to electromagnetic fields, *FEBS Letters*, 349 : 1-6 ,1994.
- 29** – Cabodo, A.G., Despa,S., Botana,M.A., Vieytes, M.R., Gonzales, M., Botana, L.M.: Membrane potential changes associated with

calcium signals in human lymphocytes and rat mast cells. *Life Sciences* , Vol 64, No.8: 681-696,1999.

30 – Balcavage, W.X., Alvager, T., Swez, J., Goff, C.W., Fox, M.T., Abculyava, S., King, M.W.: A mechanism for action of extremely low frequency electromagnetic fields on biological system, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.222, 374-378, 1996.

31 – Lewis, R.S., Cahalan, M.D.: Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.*, 13: .623-653, 1995.

32 – Cadossi, R., Bersani, F., Cossarizza, A., Zucchini, P., Emilia, G., Torelli, G., Franceschi, C.: Lymphocytes and low frequency electromagnetic fields. *FASEB Journal*, 6 : 2667-2674,1992.

33 – Saffer, J.D., Thurstan, S.J.: Cancer risk and electromagnetic fields. *Nature*, 375 : 22-23, 1995.

34 – Tenforde, T.S., Kavne, W.t.: Interaction of extremely low frequency electric and magnetic fields with humans. *Health Physics*, Vol.53 , No.6 : 585-606, 1987.

35 – Eichwald, C., Walleczek, J.: Activation – dependent and biphasic electromagnetic field effects, *Bioelectromagnetics*, 17: 427-435, 1996.

36 – Gelfand, E.W., Cheung, R.K., Mills, G.B., Grinstein, S.: Role of membrane potential in the response of human T lymphocytes to phytohemagglutinin. *The Journal of Immunology*, Vol.138 , No.2 : 527-531, 1987.

37 – Polk, C.: Biological effects of low-level low-frequency electric and magnetic fields. *IEEE Transactions on education*, Vol.34 , No.3: 243-249, 1991.

38 – Berdiushkov, J.N.,Goroshinskaia, I.V.: Structural – functional changes in lymphocyte and erythrocyte membranes after exposure to alternating magnetic field. *Vopr Med Khim.*, Vol.46, No.1: 72-80, 2000.

39 – Coliga, E.J., Kruisbeek, A.M., Morgulies, D.H., Shevach, E.M., Strober,W.: Current protocols in immunology.In vitro assays for mouse lymphocyte function,Ch.3, s.3-2, 1991.

- 40** – Montana, V., Farkas, D.L., Loew, L.M.: Dual – Wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential. *Biochemistry*, 28: 4536–4539, 1989.
- 41** – Sarkadi, B., Tordai, A., Gardos, G.: Membrane depolarization selectively inhibits receptor – operated calcium channels in human T(Jurkat) lymphoblasts. *Biochemical Biophysical Acta.*, 1027: 130-140, 1990.
- 42** – Rader, R.K., Kahn, L.E., Anderson, G.D., Martin, C.L., Chinn, K.S., Gregory, S.A.: T cell activation is regulated by voltage dependent and calcium – activated potassium channels. *The Journal of Immunology*, 156: 1425-1430, 1996.
- 43** – Grinstein, S., Cohen, S., Rothstein, A.: Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amiloride – sensitive Na^+/H^+ antiport. *J. Gen. Physiol.*, 83: 341-369, 1984.
- 44** – Kiefer, H., Blume, A.J., Kabach, H.R.: Membrane potential changes during mitogenic stimulation of mouse spleen lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 2200, 1980.
- 45** – Schultz, J.C.: Effect of valinomycin on human peripheral blood lymphocytes. *Biochemical Pharmacology*, Vol.33, No.13: 2151-2154, 1984.
- 46** – Daniele, R.P., Holian, S.K.: A potassium ionophore (valinomycin) inhibits lymphocyte proliferation by its effects on the cell membrane. *Cell Biology*, Vol.73, No.10: 3599-3602, 1976.
- 46** – Daniele, R.P., Holian, S.K.: A potassium ionophore (valinomycin) inhibits lymphocyte proliferation by its effects on the cell membrane. *Cell Biology*, Vol.73, No.10: 3599-3602, 1976.
- 47** – Poole, C., Trichopoulos, D.: Extremely low-frequency electric and magnetic fields and cancer. *Cancer Causes Control*, 2: 267-276, 1991.
- 48** – Michaelson, S.M., : Household magnetic fields and childhood leukemia-a critical analysis. *Pediatrics* , 88: 630-635, 1991.

BİYOĞRAFI

Adı Soyadı : Pınar MEGA TİBER

Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul. 03.03.1974

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİMİ

1980 – 1984 : Deniz-İş İlköğretim Okulu

1984 – 1988 : Marmara Koleji

1988 – 1990 : Bilfen Koleji

1992 – 1997 : Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi
İngilizce Fizik Öğretmenliği

1997 - : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans öğrencisi Pınar MEGA TİBER'in, çalışması jürimiz tarafından Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr.Ayşe İNHAN GARİP
Üniversitesi : Marmara

.....
Ayşe

Üye : Prof.Dr.Beki KAN
Üniversitesi : Marmara

.....
Beki

Üye : Öğr. Gör. Dr. Hülya CABADAK
Üniversitesi : Marmara

.....
Hülya

ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 03 / 08 / 2000 tarih ve
sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof.Dr. Sevim ROLLAS
Müdür

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ