

Radyo Frekans Sinyalinin Rat Spinal Ganglion Hücrelerinde Kalsiyum Bağımlı Klor Kanallarına Etkisi

Alırza ERDOĞAN *  Erkan İPEKÇİOĞLU **

* Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Çanakkale - TÜRKİYE

** Bilgi Teknolojileri ve İletişim Kurumu Erzurum Bölge Müdürlüğü, Erzurum - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): 2009/097-A

Özet

Bu araştırma ile küresel mobil iletişim sistemlerinden (GSM: Global system for mobil communications) yayılan radyo frekans dalgalarının rat spinal ganglion sinir hücreleri hücre zarında bulunan kalsiyum bağımlı klor kanallarına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla 20 adet 2 günlük Wistar sıçanlardan elde edilen ve kültür ortamında hazırlanan spinal ganglion sinir hücreleri kullanılmıştır. Hazırlanan çözelti içinde bulunan sinir hücreleri 5 santim mesafede 10 V/m elektrik alan şiddetinde 900 Mhz. frekansında toplam 6 dakika radyo frekansa maruz bırakıldı. Patch kenetleme tekniği ile hücre klor kanal akımlarında meydana gelen değişiklikler kaydedildi. Kayıtların analizinde ortama uygulanan radyo frekans sinyalinin, kalsiyum bağımlı klor kanallarının akımlarında ve membran potansiyelinde anlamlı değişimler oluşturmadığı gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Radyo frekans sinyali, Patch kenetleme tekniği, Spinal ganglion sinir hücresi*

The Effect of Radio Frequency Signals on Calcium Dependent Chlorur Channels of Spinal Ganglial Cells

Summary

This study is intended to predict the effect of radio frequency waves of global mobile communication systems (GSM: Global system for mobile communication systems) on the calcium dependent chlorur channels of rat dorsal root ganglia neural cell membranes. For this purpose the spinal ganglia cells from 20 Wistar rats which were 2 days old and those prepared in culture media were used. The nerve cells were radiated by 10V/m electric field strength at 900 Mhz. from a distance of 5 cm for six minutes. Changes in cell current were recorded by patch clamp techniques. In the analysis of the records the applied radio frequency signal was not found to change the currents of calcium dependent chlorur channels and the membrane potential meaningfully. The analysis of recordings does not show any meaningful change in the currents of calcium dependent chlorur channels and the membrane potential of the spinal ganglia cells after exposure to a 900 Mhz radiofrequency field.

Keywords: *Radio frequency signal, Patch clamp techniques, Dorsal root ganglia neural cell*

GİRİŞ

Klor bitki ve hayvanlarda çok miktarda bulunan bir anyondur. Elektriksel eksitabilitenin düzenlenmesi, kas kontraksiyonu, sekresyon ve duyuşal işaret dönüşürülmesi gibi birçok anahtar etkili fizyolojik mekanizmayı düzenler.

Klor kanalları hücre membranında ve organellerinde olmak üzere hemen hemen tüm hücre tiplerinde incelenmiştir.

Ca²⁺-bağımlı klor kanalları varlığı hakkında ilk bilgi salamander retinası ¹ ve Xenopus laevis oositlerinden gelmiştir ². Daha sonraları bu iyon kanalları salgı hücreleri, iskelet kası, kalp kası, düz kaslarda ve nöronlarda, fare spinal ganglion nöronları, sıçan spinal ganglion nöronları, civciv spinal ganglion nöronları ve parasempatik nöronlarda bildirilmiştir ³⁻⁸.

Klor kanalları hayvan hücrelerinin plazma ve hücre



İletişim (Correspondence)



+902862180018/2086



alierdogan@comu.edu.tr

içi organel membranlarında da yer almaktadır. Hücre içi pH değeri, hücre hacmi, sinir uyarılabilirliği ve dinlenti potansiyelin belirlenmesinin düzenlenmesinde çok önemli roller oynar⁹. Klor kanalları sinaptik veziküllerde, mitokondride, mikrozomlarda ve diğer hücre içi organellerde bulunmaktadır¹⁰⁻¹⁴. Aynı zamanda klor kanalları presinaptik terminallerde de yer almaktadır¹⁵⁻¹⁹. Klor hücre dışı fizyolojik anyonlarda bol miktarda bulunur. Hayvan hücrelerinde stoplazmik klor konsantrasyonu plazma konsantrasyonundan daha düşüktür ve çoğu sinir hücresinde klor denge potansiyeli (ECl) dinlenti potansiyeline yakındır. Sinir terminaline bağlı dinlenti potansiyeline klor kanallarının katkısı; bunların iletkenlik ve oransal değerine bağlıdır. Klor kanallarının aktive olmaları beklenildiğinde normal eksitabilite azalır ve aksiyon potansiyeli esnasında hücre repolarize olur. Sinir terminalerinde klor kanallarının presinaptik inhibisyonu düzenlediği bulunmuştur²⁰. Bu kanalların açılması toplam membran iletkenliğinin artmasına neden olur. Bu durum depolarizasyon üreten içeriye doğru akımların veriminin azalmasına neden olur. Matematiksel modelde klor iletkenliğindeki artışla depolarizasyon oluştuğu gösterilmiştir. Sinir terminallerindeki bazı sodyum ve kalsiyum kanallarının inaktive olması presinaptik inhibisyona katkıda bulunur. Genellikle çok fazla sayıda dal ve innerve olan dalların çok farklı postsinaptik hedefleri vardır. Klor iletkenliğinin artmasıyla impuls iletkenliğinin güvenlik faktörü çok daha düz bir şekilde azalır. Bunlar da klor iletkenliğinin artışına neden olur böylece sinir terminalleri daha fonksiyonel hale gelir²¹⁻²⁴.

Klor kanallarının beyin tümörü ile bağlantısı, yapılan bazı çalışmalarla ortaya konmuştur. Kalsiyum bağımlı klor kanalları, özellikle glioma tipi kanser hücrelerinde rastlanılan, hücrenin sıvı dengesinin idamesinden sorumlu özel bir iyon kanalıdır ve glioma hücrelerinin invazyon potansiyelinden sorumlu tutulmaktadır. Glioma hücreleri, taşıdıkları klor kanalları aracılığı ile hücre içi sıvıyı hücre dışına atar ve küçülür. Boyutlarının azalması glioma hücrelerine beyin daha yoğun bölgelerine metastaz yapabilme özelliği kazandırır²⁵⁻²⁹. Bu nedenle bu çalışmada mobil telefon sistemlerinden yayılan radyo frekans (RF) dalgalarının kalsiyum bağımlı klor kanallarına etkisinin, dolayısı ile hücre sıvı kaybına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada sıçan spinal ganglion sinir hücreleri enzimsel ve mekanik işlemlerle izole tek hücreler

halinde elde edilerek elektrofizyolojik kayıtlarda kullanıldı. Spinal ganglion sinir hücreleri Forda ve Kelly adlı araştırmacıların geliştirdiği ve aşağıda ayrıntıları verilen metota göre gerçekleştirildi³⁰.

Hücre Kültür Vasatı

Her kültür vasatı 100 mililitresinde aşağıdaki solüsyonları içermektedir:

- 10 ml at serumu
- 10 ml modifiye edilmiş Dulbeco medyum
- 1 ml Penisilin/Streptomisin
- 120 mg NCO₃

Karışım filtreden süzülerek sterilize edildi ve kullanılabildiği kadar +4°C'de saklandı.

Spinal Ganglion Sinir Hücre Kültürü Protokolü

Kültür vasatı hazırlanarak uygun sıcaklıkta inkübatöre yerleştirildi. Diseksiyon mikroskobu ve diseksiyon cerrahi seti dezenfekte edilerek laminar flow ortama alındı.

Yirmi adet 1-2 günlük Wistar sıçan yavrusu dekapite edilerek, vertebral kolon ayrıldı, daha sonra kaudal uçtan başlayarak boyuna kadar spinal kolonun içi açıldı. Bu izole spinal kolon fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Daha sonra bütün dorsal kök ganglionları hassas bir şekilde izole edilerek kültür vasatına yerleştirildi.

Bütün spinal ganglion nöron gövdeleri toplandıktan sonra, kültür medyumunu bir Pastör pipeti ile çekildi ve 900 µl ılık (37°C'de inkübe edilmiş) kültür vasatı ve 100 µl kollejenaz (Sigma, %0.125) ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve 13 dak. inkübatöre kaldırıldı. Bu süre sonunda hücre, solüsyon, enzim karışımı inkübatörden alınarak PBS ile yıkandı. Daha sonra 900 µl PBS ve 100 µl tripsin (Sigma, %0.25) ilave edildi, 6 saat süreyle inkübe edildikten ve ganglionlar tüpün dibine çöktürüldükten sonra kültür vasatı pastör pipeti ile uzaklaştırılarak yıkandı. Daha sonra 100 µl DNAz ve 900 µl kültür medyumunu ilave edilerek bir pastör pipetine hızla çekip boşaltarak ganglionlar mekanik olarak tek hücrelere ayrıştırıldı. Bir gün önce lamellerin poly-L-ornitinle (Sigma Chemical P3655 50mg) inkübe edildiği petri kutusuna boşaltılarak 2-3 saat inkübe edildi. Bu ön inkübasyon ölü hücreler ve sinir hücreleri dışındaki dokuların uzaklaştırılması amacıyla gerçekleştirildi. Daha önceden lamininle (Sigma-Aldrich) kaplanan lamellerin bulunduğu küçük petri kutuları inkübatörden alınarak hazırlandı. Hücre süspansiyonu bulunan solüsyona 240 µl sinir büyütme faktörü (NGF)

(Sigma-Aldrich) ilave edildi ve her lamele 200 µl hücre içeren bu solüsyondan ekildi ve bir akşam süreyle inkübatöre kaldırıldı ve ertesi sabah her bir petri kutusuna 1.5 ml NGF ihtiva eden (10 µl/petri kutusu) ılık kültür vasatı ilave edildi ve tekrar inkübatöre kaldırıldı. Takip eden 5-7 günde her petri kutusundaki 1.5 ml kültür vasatı çekilerek NGF (10 µl NGF/petri kutusu) içeren kültür vasatı ilave edildi. Spinal ganglion sinir hücreleri elektrofizyolojik kayıtlar için 24 saat sonra kullanılmaya başlandı.

RF Sistemi

RF sinyal jeneratörü (SG-3000 RF Synthesized Signal Generator MICROTEST CORPORATION) ile ortalama GSM Cep Telefonu RF çıkış gücünü örneklemek için ortalama 2 watt civarında 900 Mhz sinyal üretildi. Ortamın elektrik alan şiddeti ortalama 10V/m'de sabit tutularak ölçümler yapıldı.

Radyo Frekans Uygulaması

Spinal ganglion sinir hücrelerine hücre dışı RF uygulaması, mikromanüplatör altında bulunan hücreye 5 cm mesafeden bulunan RF anten (The Symphonie GSM Antenna, 0dBd OMNI, SMA [M] Conn.) ile gerçekleştirildi. Uygulamada alan şiddeti ortamda, 6 dak. süreyle ortalama 10 Volt/metre olarak kaydedildi (Wandel & Goltermann, EMR-300, 100KHz-3GHz, RF E&H Field Radiation Meter "NARDA" with isotropic Probe 100 KHzto 3GHz), (6 dakikalık süre; ortalama Elektrik alan şiddeti değeri tespiti için ICNRP [Uluslararası İyonlaştırmayan Radyasyondan Koruma Kurumu] ve Bilgi Teknolojileri ve İletişim Kurumunun Yönetmelikle belirlediği süredir).

Elektrofizyoloji

Bu çalışmada bütün deneyler tüm hücre diyaliz patch kenetleme tekniği ile gerçekleştirildi³¹. Hücre membranı ile pipet ucu arasında yüksek dirençli bir sabit bağlantı gerçekleştirilmesinden sonra negatif basınç uygulamasının yanında bazı hücrelerde kısa süreli yüksek amplitütlü negatif akım enjeksiyonları, "zapping", ile mühür bölgesinde membran hasara uğrattıldı. Bütün deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi (20-23°C). Akım kenetleme veya voltaj kenetleme deneyleri Axoclamp-2B (Axon Instruments USA) patch kenetleme amplifikatörü kullanılarak gerçekleştirildi.

Elektrofizyolojik kayıt alınan spinal ganglion sinir hücreleri düşük volümlü (<1 ml) bir hücre dışı kayıt (40 mEq/L Potasyum) solüsyonunda tutularak pipet kapasitansı sınırlandırıldı. Düşük rezistanslı patch

pipetleri Pyrex borosilikat cam çubuklardan (dış çap 1.4/1.6 mm, iç çapı 0.8/1.0 mm olan, içerisinde 0.15 mm fibril içeren, Plowden and Thompson Ltd, Dial Glass Works) pipet çekici ile çekildi (Sutter Inst. USA). 3-7 Mohm direncinde olan pipetler hücre içi patch pipet solüsyonu (KCl) ile dolduruldu. Hem eksternal hem de hücre içi solüsyonlar delik büyüklüğü 0.2 µm olan filtrelerden (Sartorius) süzüldü. Pipetler Hamilton şırıngasıyla patch pipet solüsyonuyla dolduruldu, Pipet tutucu (HL-1-17 pipette holder, Axon Instruments) 1 M Potasyum klorür (KCl) ile dolduruldu. Pipet sıkıca yerleştirilen pipet tutucu CV-4 1/100 headstage (Axon Instruments) içerisine yerleştirildi. Pipet tutucunun kenarında mühür oluşturma esnasında negatif basınç uygulamaya ait kısım bir silikon hortum ile 1 ml'lik bir şırıngaya bağlantılıydı. Bu headstage de pipeti hassas hareket ettirmeye yarayan üç boyutlu bir mikromanipulatöre (Narashige MX-3L, Japonya) monte edildi.

Ters mikroskop, mikromanipulatörler mekanik stabiliteyi sağlamak amacıyla titreşimsiz bir elektrofizyolojik masa (Intracel, UK) üzerine yerleştirildi. Elektriksel gürültüyü azaltmak amacıyla masa ve üzerindeki cihazlar Faraday kafesi aracılığı ile topraklandı. Elektrotlar ile amplifikatör arasındaki elektriksel bağlantı Ag-AgCl elektrodu, pipet tutucu içerisindeki kablo ve KCl banyosu ile sağlandı. Ekstraselüler kayıt solüsyonu (40 mEq/L Potasyum) ile KCl banyosu arasındaki bağlantı ise agar KCl köprüsü ile sağlandı (%3 agar içeren borosilikat cam tüp 1 M KCl içerisinde hazırlandı).

Kültüre spinal ganglion sinir hücreleri elektrofizyolojik kayıt için inkübatörden alındıklarında kayıta başlamadan önce 5 dak. aralıklarla ekstraselüler kayıt solüsyonu ile yıkandı. Tüm hücre diyaliz modunun gerçekleştirilmesinden sonra, akım kenetleme deneylerinde dinlenti membran potansiyeli ölçüldü ve akım enjeksiyonu ile membran potansiyeli istenilen değerde tutuldu. Voltaj kenetleme deneylerinde ise membran voltajı -90 mV'ta kenetlenerek akımlar bu potansiyelden aktive edildi.

Seçilen Spinal ganglion sinir hücresi, ters mikroskopun (Nikon, Japonya) görüntü alanının ortasına yerleştirildi. Daha sonra patch pipeti mikromanipulatör (Narishige, Japonya) aracılığı ile önce kayıt solüsyonu içerisine ve kademeli olarak da hücre üzerine yerleştirildi. Patch kenetleme amplifikatörü Axoclamp 2B (Axon Instruments, USA) süresi ve frekansı Digitimer D4030 (İngiltere) stimulus programlayıcısı ile kontrol edilen elektrik dalgaları ile eksternal olarak tetiklendi. 100 pA hiperpolarize edici akım (1 Hz, 100 ms süreli) uygulaması ve elektrojenik potansiyelin ölçülmesi ile

pipet direnci belirlendi. Bu esnada voltaj defleksiyonu giderilinceye kadar rezistans kompanzasyonu uygulandı ve uygulanan akım amplifikatörden okunarak pipet direnci 4 Mohm olarak belirlendi. Bu çalışmada direnci 3-7 Mohm arasında değişen pipetler kullanıldı. Daha sonra osiloskop ekranında voltaj gözlenene kadar pipet dikkatle aşağıya indirildi. Pipet ucu ile hücre yüzeyi arasındaki fiziksel temas direncin arttığının belirtisi olarak yaklaşık 0.5 mV'luk bir defleksiyon gösterdi. Mühür oluşması için pipet tutucuya silikon bir hortumla bağlı bir enjektörle çok hafif bir negatif basınç uygulandı. Birkaç dakika içerisinde 5-15 giga ohm mühürler gelişti. Osiloskop 20-50 mV/division'e ayarlanarak mühür rezistansı takip edildi, membranı zedelememek için uygulanan akımın şiddeti -50 pA ile sınırlandırıldı. Akım kenedi deneyleri için önce dinlenti membran potansiyeli ölçüldü ve voltaj injeksiyonu ile istenilen voltta tutuldu. Kurulu RF sinyal düzeneği çalıştırılarak ortalama 2 Watt gücünde 10 Volt/metre alan şiddeti değerinde elektrik alan oluşturuldu. Voltaj kenetleme deneylerinde hücreler ilk olarak "Neurons were always initially voltage" tutma potansiyeli (V_i) -90 mV tutuldu ve bu esnada -30 mV voltaj injeksiyonları ile (1 Hz, 100 ms süreli) membran akımları monitörize edildi. Tutma akımı -0.20 nA ile -90 mV'da tutulabilen nöronlar kayıt için kullanıldı. Bundan sonra membran kapasitans ve direnç kompanzasyon akımı uygulanarak voltaj kenedi dalgasına cevap olarak gözlenen kalsiyum akımları kayıt edildi. Tutma potansiyeli -90 mV'tan 0 mV'a 100 ms süreli depolarizasyonla maksimum kalsiyum akımı aktive edildi ve akımda düşüşü önlemek için kalsiyum akımı aktivasyon sıklığı en az 30 saniye ile sınırlandırıldı³².

Amplifikatör çıktıları osiloskop üzerinde görüntü- lendi (Hameg PM3305, 35 MHz, two channel Dig. oscilloscope) ve pClamp 7 (Axon Instruments) programı ile kişisel bilgisayara kayıt edilerek analiz edildi.

Data analizi

Elektrofizyolojik data deney esnasında bilgisayarın hafızasına kayıt edilerek daha sonra analiz edildi. Analizler pCLAMP 7.0 (Axon Inst, USA) analiz programı kullanılarak gerçekleştirildi. Data 1 KHz frekansında örneklenerek (Digidata 1200, Axon Inst, USA) arabirim ile bilgisayara kayıt edildi. Klor kanal akımları sızıntı akımı çıkartılmasından sonra değerlendirildi.. Deney esnasında her depolarize edici uyarımın ardından negatif bir uyarım aktive edildi (V_c -150 mV, V_h -90 mV'tan). Negatif uyarım bu koşullarda linear olan kapasitans ve sızıntı akımını elde etmek amacıyla aktive edildi ve akımlardan bu kapasitans ve sızıntı akımları çıkartıldı. Kalsiyum bağımlı klor kanalı akımı

pik amplitüdü, depolarize edici stimulusun sonunda oluşan amplitüd değerleri ölçüldü.

Bütün ortalama değerler ortalama \pm standard hata (mean \pm SE) ile elde edildi. İstatistiksel analiz ve grafikler Microcal Origin programı (V5 Microcal Software Inc, Data Analysis and Technical Graphics, Northampton, USA) kullanılarak Student's t testi veya tek yönlü varyans analizi ile gerçekleştirildi. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

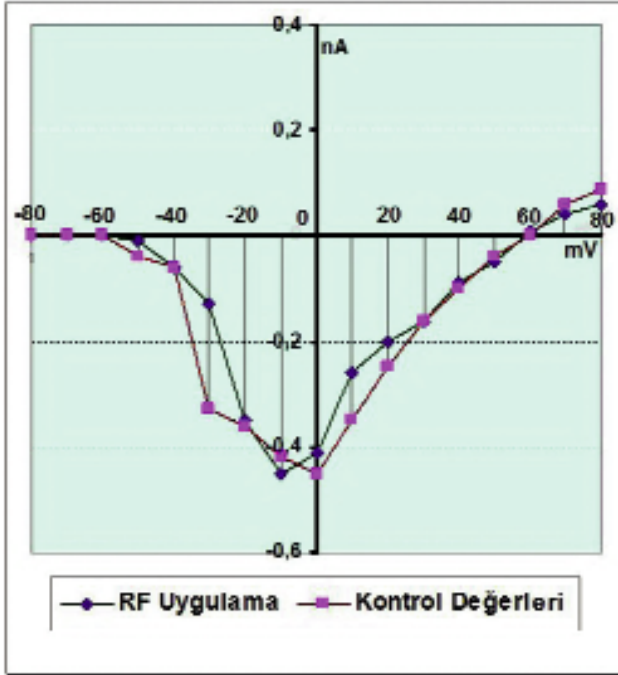
Depolarize edici akım enjeksiyonları, aksiyon potansiyelleri ve belli hücrelerde KTKS (Kalsiyum Tetiklemeli Klor Saliverilmesi) aktivasyonu sonucu ortaya çıkan aksiyon potansiyeli depolarize edici ard potansiyellerini aktive etti. Aksiyon potansiyelleri dinlenti membran potansiyelinden aktive edilerek ard potansiyellerin tipi belirlendi. Radyo frekans elektrik alan şiddetinin (10 V/m) etkisinde 6 dak. bırakılmasının aksiyon potansiyeli parametrelerini etkilemediği ve depolarize edici ard potansiyelleri herhangi bir değişikliğe uğratmadığı belirlendi. RF elektrik alanının, bu nöronlara depolarize edici akım uygulaması ile aktive edilen multipl aksiyon potansiyeli tetiklemesini anlamlı derecede baskılamadığı görüldü ($P > 0.05$). Ayrıca bu nöronlarda kalsiyum bağımlı klor kanal akımlarının sabit durum akım-voltaj eğrisi ilişkisi üzerine anlamlı etki oluşturmadı.

Tablo 1. Rat DRG sinir hücrelerindeki kalsiyum bağımlı klor kanalı akımı pik amplitüdü, depolarize edici stimulusun sonunda oluşan RF uygulama sinyalinin oluşturduğu voltaja bağlı etki değerleri

Table 1. Shows values depending on the effects caused by the voltage created by the RF application signal wich occurs at after depolarisation stimulus acting on calcium dependent chlorur channel peak amplitude of the rat DRG neurones

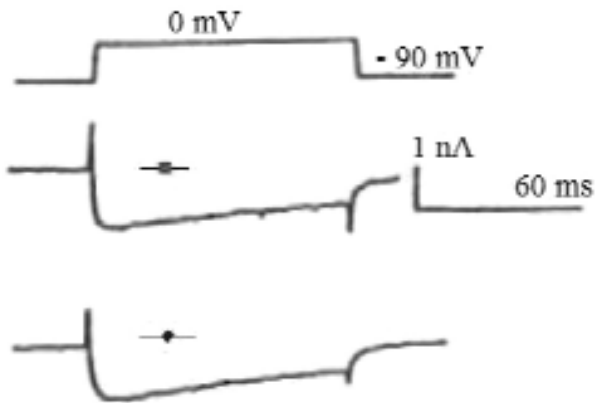
RF Uygulama (nA)	Kontrol Değerleri (nA)	İstirahat Membran Potansiyeli (mV)
0	0	-100
0	0	-80
0	0	-60
-0.01	-0.04	-50
-0.06	-0.06	-40
-0.13	-0.33	-30
-0.35	-0.36	-20
-0.45	-0.42	-10
-0.41	-0.45	0
-0.26	-0.35	10
-0.2	-0.25	20
-0.16	-0.16	30
-0.09	-0.1	40
-0.05	-0.04	50
0.01	0	60
0.04	0.06	70
0.06	0.09	80

Kalsiyum bağımlı klor kanalı pik amplitüdü depolarize edici stimulusun sonunda oluşan amplitüd değerleri ölçüldü. Bu değerler *Tablo 1*'de verildi.



Şekil 1. Rat DRG sinir hücrelerindeki kalsiyum bağımlı klor kanalı akımı pik amplitüdü, depolarize edici stimulusun sonunda oluşan RF uygulama sinyalinin oluşturduğu voltaja bağlı etkileri ('X' eksen) Her ara 10 mV.dur

Fig 1. Shows the graph depending on the effects caused by the voltage created by the RF application signal which occurs after depolarisation stimulus acting on calcium dependent chlorur channel peak amplitude of the rat DRG neurones. ('X' axis) Each range is 10 mV



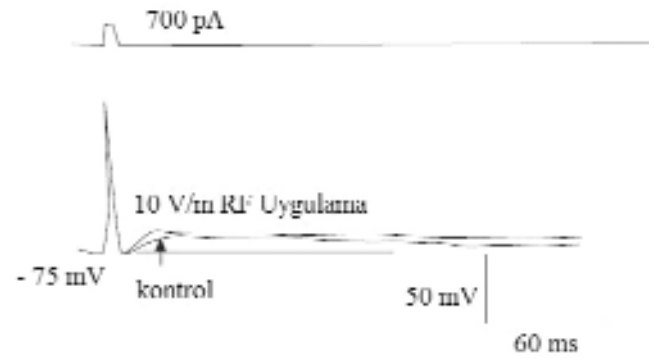
Şekil 2. Rat DRG sinir hücrelerindeki kalsiyum bağımlı klor kanalı akımı pik amplitüdü, depolarize edici stimulusun sonunda oluşan RF uygulama sinyalinin oluşturduğu voltaja bağlı etkileri

Fig 2. Show the figure depending on the effects caused by the voltage created by the RF application signal which occurs after depolarisation stimulus acting on calcium dependent chlorur channel peak amplitude of the rat DRG neurones

Patch kenetleme tekniğinin tüm hücre diyaliz yöntemi kullanılarak DRG Sinir hücreleri -90 mV'ta tutuldu

ve 100 ms süreyle voltaj kenetleme modu altında depolarizasyon ve hiperpolarizasyon (-90 ile 170 mV) gerilim adımları boyunca kalsiyum bağımlı klor kanal akımları ölçüldü ve 10 Volt/metre elektrik alan değerinde RF uygulamasından sonra özgün membran potansiyeline göre değişimi çizildi.

Şekil 1, 2 ve 3'te görüldüğü gibi, depolarize edici ard potansiyellerde anlamlı değişim gözlenmedi (-75 mV), tutma potansiyelinde 6 dak. süreyle uygulanan 10 V/m elektrik alan değerinin aksiyon potansiyelinin özelliklerini değiştirmeden depolarize edici ard potansiyelleri uyardığı görüldü.



Şekil 3. RF uygulama sonrasında DRG sinir hücrelerinde, aksiyon potansiyelinin depolarizasyon öncesi değerlere (dinlenti membran potansiyeline) dönüşünün kontrol grubu ile karşılaştırılması

Fig 3. Shows the measurement value of the return of DRG nerve cell action potentials to prepolarisation levels (resting membrane potential) after RF application compared to control group

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kobaylarda ventriküler kardiyak myozit üzerinde RF elektromanyetik alan oluşturulmasının intrasellüler kalsiyum konsantrasyonuna etkisi üzerine yapılan çalışmalarda da istatistiksel anlamlılık ifade eden değişiklikler gözlenmediği tespit edilmiştir³³.

İnsan retinablastoma hücresi ve hamster pinealositlerinde melatonin üretimine, RF elektromanyetik alana maruz kalmanın etkileri araştırıldı. Pinealosit ve retinoblastom hücrelerinin melatonin üretimine etkileri (900 MHz veya 1.8 GHz GSM) incelendi, hücre içi Ca^{++} konsantrasyonları melatonin homeostazına kısa süreli etkilerini belirlemek amacı ile ölçüldü. 900 MHz RF, hücre içi Ca^{++} seviyesini etkilemedi²⁵. Bu çalışmada 900 MHz civarında uyguladığımız RF sinyali, benzer durumda kalsiyum bağımlı klor kanal akımlarının seviyesini ve aksiyon potansiyeli değişimini de etkilemedi.

Rat kortikal hücre primer kültürlerinde RF elektro-

manyetik alanının nontermal etkisi üzerine yapılan çalışmalarda kalsiyum kanal geçitlerinde değişikliğin gözlenmediği literatür taramasında belirlenmiş olup bizim gözlemimizi destekler yöndedir³⁴.

Güncel olan ve dünyadaki milyarlarca insanı ilgilendiren bu konuda çalışmamızdaki kadar hassas yön-temlere ait yeterli literatür zenginliği henüz oluşmamıştır. Bu konuda çalışmaların devam etmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak kayıtların analizinde; çalışmalarda^{33,34} olduğu gibi benzer bir biçimde, ortama uygulanan Radyo Frekans taşıyıcı sinyalinden kaynaklanan elektromanyetik alana maruz bırakılan ve elektromanyetik alana maruz bırakılmayan durumlarda çalışıldı. Kalsiyum bağımlı klor kanallarının iyon akımlarında ve hücre membran potansiyelinde, aksiyon potansiyeli eşik değerinde, pik amplitüt, aksiyon potansiyelinin süresi ve ard potansiyellerin (depolarize edici ve hiperpolarize edici) amplitüdü ve bu potansiyellerin dinlenti membran potansiyeline dönme zamanında, belirgin değişimler oluşturmadığı gözlemlendi. Çalışılan hücrede, doğal davranışına bir etkisinin olmadığı saptandı.

KAYNAKLAR

1. **Bader C, Bertrand D, Schwartz E:** Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. *J Physiol Lond*, 331, 253-284, 1982.
2. **Barish M:** A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J Physiol*, 342, 309-325, 1983.
3. **Scott R, Sutton K, Griffin A, Stapleton S, Currie K:** Aspects of calcium-activated chloride currents: a neuronal perspective. *Pharmacol Ther*, 66, 535-565, 1995.
4. **Owen D, Segal M, Barker J:** A Ca-dependent Cl-conductance in cultured mouse spinal neurones. *Nature*, 311 (5986): 567-570, 1984.
5. **Mayer M:** A calcium-activated chloride current generates the after-depolarization of rat sensory neurones in culture. *J Physiol*, 364, 217-239, 1985.
6. **Scott R, McGuirk S, Dolphin A:** Modulation of divalent cation-activated chloride ion currents. *Br J Pharmacol*, 94 (3): 653-662, 1988.
7. **Ivanenko A, Baring M, Airey J, Sutko J, Kenyon J:** A caffeine- and ryanodine-sensitive Ca²⁺ store in avian sensory neurones. *J Neurophysiol*, 70 (2): 710-722, 1993.
8. **Bader C, Bertrand D, Schlichter R:** Calcium-activated chloride current in cultured sensory and parasympathetic quail neurones. *J Physiol*, 394, 125-148, 1987.
9. **Brown C, Dudley A:** Chloride channel blockers decrease intracellular pH in cultured renal epithelial LLC PK-1 cells. *Br J Pharmacol*, 118 (3): 443-444, 1996.
10. **Hoffmann E, Dunham P:** Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int Rev Cytol*, 161, 173-262, 1995.
11. **Nilius B, Eggermont J, Voets T, Droogmans G:** Volume-activated Cl-channels. *Gen Pharmacol*, 27 (7): 1131-1140, 1996.
12. **Albertson T, Walby W, Stark L, Joy R:** The effect of propofol on CA1 pyramidal cell excitability and GABA A mediated inhibition in the rat hippocampal slice. *Life Sci*, 58 (26): 2397-2407, 1996.
13. **Yakir N, Rahamimoff R:** The non-specific ion channel in *Torpedo ocellata* fused synaptic vesicles. *J Physiol*, 485, 683-697, 1995.
14. **Mannella C:** The "ins" and "outs" of mitochondrial membrane channels. *Trends Biochem Sci*, 17 (8): 315-320, 1992.
15. **Blachly-Dyson E, Zambronicz E, Yu W, Adams V, McCabe E, Adelman J, Colombini M, Forte M:** Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem*, 268 (3): 1835-1841, 1993.
16. **Landry D, Sullivan S, Nicolaidis M, Redhead C, Edelman A, Field M, Al-Awqati Q, Edwards J:** Molecular cloning and characterization of p64, a chloride channel protein from kidney microsomes. *J Biol Chem*, 268 (20): 14948-14955, 1993.
17. **Al-Awqati Q:** Chloride channels of intracellular organelles. *Curr Opin Cell Biol*, 7, 504-508, 1995.
18. **Hille B:** Ionic Channels of Excitable Membranes. 2nd ed. 467-478, Sinauer, Sunderland, MA: USA, 1992.
19. **Dudel J, Kuffler S:** Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. *J Physiol*, 155, 543-562, 1961.
20. **Rudomin P:** Presynaptic inhibition of muscle spindle and tendon organ afferents in the mammalian spinal cord. *Trends Neurosci*, 13 (12): 499-505, 1990.
21. **Graham B, Redman S:** A simulation of action potentials in synaptic boutons during presynaptic inhibition. *J Neurophysiol*, 71 (2): 538-549, 1994.
22. **Wall P, Bennett D:** Do nerve impulses penetrate terminal arborizations? A presynaptic control mechanism. *Trends Neurosci*, 18 (2): 99-103, 1995.
23. **Redman S:** Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. *Physio Rev*, 70 (1): 165-98, 1990.
24. **Eguibar J, Quevedo J, Jimenez I, Rudomin P:** Selective cortical control of information flow through different intraspinal collaterals of the same muscle afferent fiber. *Brain Res*, 643 (1-2): 328-333, 1994.
25. **Gollnick F, Lerchl A, Neihaus M, Brendal H, Hansen VW, Meyer R:** Do weak RF fields influence the calcium regulation in hamster pinealocytes and human retinoblastoma cells. Presented at BEMS Long Beach California, 1999.
26. **İlker Kelle:** Kanser tedavisinde biotoksinler. *Dicle Tıp Dergisi*, 34 (3): 226-232, 2007.
27. **Lippens G, Najib J, Wodak SJ, Tartar A:** "NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels". *Biochemistry*, 34 (1): 13-21, 1995. PMID 7819188.
28. **DeBin JA, Maggio JE, Strichartz GR:** "Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion". *Am J Physiol*, 264 (2 Pt 1): C361-9, 1993. PMID 8383429.
29. **Sontheimer H:** An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis experimental biology and medicine. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 779-791, 2008.
30. **Forda S, Kelly J:** The possible modulation of the development of rat dorsal root ganglion cells by the presence of 5-HT-containing neurones of the brainstem in dissociated cell culture. *Brain Res*, 354 (1): 55-65, 1985.
31. **Hamill O, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F:** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*, 391(2), 85-100, 1981.
32. **Belles B, Malecot C, Hescheler J, Trautwein W:** Run-down of the Ca current during long whole-cells: Role of phosphorylation and intracellular calcium. *Pflügers Arch*, 411 (4): 353-360, 1988.
33. **Wolke S, Neibig U, Elsner R, Gollnick F, Meyer R:** Calcium homeostasis of isolated heart muscle cells exposed to pulsed high-frequency electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 17 (2): 144-153, 1996.
34. **Platano D, Mesirca P, Paffi A, Pellegrino M, Liberti M, Apollonio F, Bersani, Aicardi G:** Acute exposure to low-level CW and GSM-modulated 900 MHz radio frequency does not affect Ba (2+) currents through voltage-gated calcium channels in rat cortical neurons. *Bioelectromagnetics*, 28 (8): 599-607, 2007.