



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

Wİ-Fİ ELEKTROMANYETİK DALGA (Wİ-Fİ RF-EMF) UYGULANMIŞ
RATLARIN TİROİD DOKULARINDA GEN EKSPRESYONU
SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

DR. Musa SERİN
UZMANLIK TEZİ

SİVAS
2022

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

WI-FI ELEKTROMANYETİK DALGA (WI-FI RF-EMF) UYGULANMIŞ
RATLARDA TİROİD DOKULARINDA GEN EKSPRESYONU
SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

DR. Musa SERİN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. SİNAN SOYLU

SİVAS
2022

ONAY SAYFASI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Üye: Prof. Dr. Atilla Kurt

Cumhuriyet Üniversitesi Genel Cerrahi ABD Başkanı

Üye: Doç. Dr. Sinan Soylu

Cumhuriyet Üniversitesi Genel Cerrahi ABD

Üye: Prof. Dr. Namık Özkan

Tokat Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez,tarih vesayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

DEKAN
Prof. Dr. Ahmet ALİM

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak yetişmemde büyük katkıları bulunan, en başta tez danışmanım Doç.Dr.Sinan Soylu'ya ve Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD'ndaki tüm değerli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez hazırlığım ve çalışmalarımın her aşamasında desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Sevgi Durna Daştan hocama çok teşekkür ederim .

Asistanlık dönemim boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım asistan, hemşire ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Asistanlık sürem boyunca her zaman yanımda olan aileme en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr.Musa Serin

Sivas, 2022

ÖZET

Wi-Fi Elektromanyetik Dalga (WI-FI RF-EMF) Uygulanmış Ratlarda Tiroid Dokularında Gen Ekspresyonu Seviyelerinin İncelenmesi

Dr.Musa Serin

Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Sivas 2022

Amaç: Bu çalışmada; ratlarda wireless uygulaması ile meydana gelen değişimlerin, tiroid dokularında bazı genlerin aktifleşen veya inaktive olan gen ifadesi parametrelerine yansımaları araştırılacaktır. Dolayısıyla bu çalışma kapsamında ratlara uygulanan wireless dalgalarının etkilerinin, tiroid dokusundaki çeşitli enzim düzeylerine yansımaları, total RNA miktarı ve belirlenmiş 12 gen bölgesi üzerindeki ekspresyon derecesi belirlenecektir. Bu analizler; son derece hassas ve güvenilir ölçüm yapabilen araştırma kitleri kullanılarak gerçekleştirilecektir. Sonuçta bu çalışmalardan elde edilen verilerin sunumu neticesinde bilim dünyasına katkı sağlaması beklenmektedir. Bu kapsamda, son derece orijinal, güvenilir ve hassas ölçümlerin kullanılacağı bu araştırmanın; bu alanda bundan sonra yapılacak olan birçok çalışma için de yol gösterici ve ışık tutucu olabileceği düşünülmektedir.

Materyal Metod: 20 adet 16 haftalık 200-220 gr ağırlığında sağlıklı Wistar albino dişi rat kullanılmıştır. Deneylerde kontrol ve deney grubu olmak üzere, 2 grup hazırlanmıştır ve her bir grupta 10'ar dişi rat kullanılmıştır. Bu ratlardan deney grubuna WI-FI elektromanyetik alanı uygulanmış, kontrol grubuna uygulanmamıştır. Deney grubundaki ratlara evlerde, ofislerde kullanılan kablosuz internet cihazlarının en çok kullandığı 3 GHertz Elektromanyetik dalga uygulaması, 30 gün süresince günde 12 saat maruz kalacakları şekilde yapılmıştır. Kontrol grubundaki ratlar ise herhangi bir elektromanyetik ortama maruz kalmayacak şekilde 30 gün süresince Faraday Kafesi ortamında korunarak yaşatılmıştır. 30 günün sonunda ratlar kurban edilmemiş ve diseksiyon yapılarak, tiroid dokuları araştırmada kullanılmak üzere alınmıştır. Elde edilen örneklerin μL 'sinde kaç nanogram RNA olduğunu hesaplamak için ve saflık kontrolü yapmak için spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirildi ve konsantrasyon tayinleri yapıldı. Yaklaşık olarak her bir örnek için 20-40 ng aralığında total RNA olduğu görüldü. RNA

saflığını doğrulamak için A260/280 oranı kullanıldı. Sonraki basamaklarda ekspresyon analizleri için kullanılabilecek nitelikte kalitede saf RNA'ların oranının 1.8 -2.2 arasında olmasına dikkat edildi.

cDNA eldesi için WizScript™ cDNA Synthesis Kit (South Korea) kullanıldı. Gen ekspresyon analizleri için Applied Biosystem Step One Plus real time PCR (USA) cihazı kullanıldı. Real Time qPCR aşamasında GeneAll Real Amp™ SYBR master mix (Seoul, Korea) kullanıldı. Sentezlenen cDNA örneklerinin kantitatif analizi için SYBR Green ve pasif referans boyası ROX kullanılarak, boyaların floresan ışığa özelliklerinden yararlanarak real-time PCR gerçekleştirildi. Bu tez çalışması kapsamında gen ifadenmesi (ekspresyon) değerlerinin belirlenmesi amacıyla, *Beta catenin-Axin*, *beta-aktin*, *GAPDH*, *GSk-3B*, *TCF*, *WNT7A*, *WNT10A*, *WNT2*, *Beclin 1 ve 2*, *ATG5 ve 12* olmak üzere çok sayıda farklı gen bölgesinin incelenmesi söz konusudur. Real Time qPCR aşamasında house keeping gen olarak *ACTB* geni primerleri kullanıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra veriler kaydedilerek analizler gerçekleştirildi. Gen ekspresyon sonuçlarından elde edilen fold change değerlerine göre istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Kontrol grubu ve deney grubu arasında her bir gen ifadenme katsayısı arasında istatistiksel anlamlı farklılıkların olup olmadığı GraphPad-Prism programı ile değerlendirildi. Grupların normalite özellikleri, Shapiro-Wilk testi ve Kolmogorov-Smirnov testleri ile değerlendirildiğinde non parametrik test varsayımlarını yerine getirdiği belirlendiği için, gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney istatistiksel analiz testi ile yapıldı. P değerinin <0,05 olması anlamlı kabul edildi. Gen ifadenme katsayıları arasında anlamlı farklılık bulunan gruplar *işareti ile işaretlendi. Farklılıkları en iyi ifade edebilmek için veriler GraphPad-Prism programında grafiklere dönüştürülerek sunuldu.

Bulgular: Kontrol grubuna göre deney grubunun çalışmada araştırılan pek çok gen bakımından, gen ifadenme değerlerinde ciddi yükselişler olduğu bulundu. Gruplar arasında gen ifadenme değerleri bakımından bulunan farklılıkların istatistiksel bakımdan önemli olduğu belirlendi (P<0,05).

Sonuç: Çalışma grupları arasında literatüre göre belirlemiş olduğumuz, otofaji ve oksidatif stresle ilgili olduğu bilinen *Beta catenin-Axin*, *beta-aktin*, *GAPDH*, *GSk-3B*, *TCF*, *WNT7A*, *WNT10A*, *WNT2*, *Beclin 1-2* ve *ATG5-12* gibi 12 farklı genin ifadenme dereceleri araştırıldığında, Wi-Fi EM alanına maruz bırakılan deney grubu ratlarında wnt/β katenin yolağındaki çalışılan *ATG5* ve *ATG12* dışındaki tüm genlerin ifadeleme

katsayılarının oldukça yüksek olduğu ve kontrol grubuna göre aralarında anlamlı farklılıklar bulunduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gen ifadenmesi, RT-PCR, RNA, Wi-Fi maruziyet, tiro



ABSTRACT
**Investigation of Gene Expression Levels in Thyroid Tissues in Rats Treated with WI-FI
Electromagnetic Wave (WI-FI RF-EMF)**

Dr. Musa Serin

Department of General Surgery, Sivas 2022

Objective: In this study; the effects of wireless waves exposure to rats, their reflections on various enzyme levels in the thyroid tissue, the amount of total RNA and the effects of the expression degree on the determined 12 gene regions will be investigated. These analyzes will be carried out using research kits that can make extremely sensitive and reliable measurements. As a result, it is expected to contribute to the scientific world as a result of the presentation of the data obtained from these studies. In this context, this research, in which extremely original, reliable and sensitive measurements will be used; It is thought that it can be a guide and light shedder for many future studies in this field.

Material and Method: 20 healthy Wistar albino female rats, 16 weeks old, weighing 200-220 g, were used. In the experiments, two groups, control and experimental group, were prepared and 10 female rats were used in each group. Wireless electromagnetic field was applied to the experimental group. The rats in the experimental group were exposed to 3 GHertz Electromagnetic waves, most commonly used by wireless internet devices used in homes and offices, for 12 hours a day for 30 days. The control group, on the other hand, was kept alive in a Faraday Cage environment for 30 days without being exposed to any electromagnetic environment. At the end of 30 days, the rats were sacrificed and dissected, and their thyroid tissues were taken to be used in the research. In order to calculate how many nanograms of RNA are in μL of the samples obtained and to control the purity, spectrophotometric measurement was performed and concentration determinations were made. Approximately 20-40 ng of total RNA was found for each sample. A260/280 ratio was used to verify RNA purity. In the next steps, attention was paid to ensure that the ratio of pure RNAs of quality that could be used for expression analysis was between 1.8 and 2.2. WizScript™ cDNA Synthesis Kit (South Korea) was used to obtain cDNA. Applied Biosystem Step One Plus real time PCR (USA) device was used for gene expression analysis. GeneAll Real Amp™ SYBR master mix (Seoul, Korea) was used in Real Time qPCR

stage. For the quantitative analysis of the synthesized cDNA samples, real-time PCR was performed by using SYBR Green and the passive reference dye ROX, taking advantage of the fluorescent luminescence properties of the dyes. Within the scope of this thesis, in order to determine gene expression values, many different genes, including *Beta catenin-Axin*, *beta-actin*, *GAPDH*, *GSk-3B*, *TCF*, *WNT7A*, *WNT10A*, *WNT2*, *Beclin 1* and *2*, *ATG5* and *12 ACTB* gene primers were used as house keeping gene in Real Time qPCR stage. After the reaction was completed, the data were recorded and analyzed. Statistical calculations were made according to the fold change values obtained from the gene expression results. Whether there were statistically significant differences between each gene expression coefficient between the control group and the experimental group was evaluated with the GraphPad-Prism program. When the normality characteristics of the groups were evaluated with the Shapiro-Wilk test and Kolmogorov-Smirnov tests, it was determined that the non-parametric test assumptions were fulfilled, so the comparisons between the groups were made with the Mann-Whitney statistical analysis test. A P value of <0.05 was considered significant. Groups with significant differences in gene expression coefficients were marked with *. In order to best express the differences, the data were presented by converting them into graphs in the GraphPad-Prism program.

Results: Compared to the control group, it was found that the experimental group had significant increases in gene expression values in terms of many genes investigated in the study. It was determined that the differences in gene expression values between the groups were statistically significant ($p<0,05$).

Conclusions: Among the study groups, 12 different genes such as *Beta catenin-Axin*, *beta-actin*, *GAPDH*, *GSk-3B*, *TCF*, *WNT7A*, *WNT10A*, *WNT2*, *Beclin 1-2* and *ATG5-12*, which are known to be related to autophagy and oxidative stress, were determined according to the literature. When the expression levels were investigated, it was determined that the expression coefficients of all genes in the wnt/ β catenin pathway, except *ATG5* and *ATG12*, were quite high in the experimental group rats exposed to Wi-Fi EM field, and there were significant differences between them compared to the control group ($p<0,05$).

Keywords: Gene expression, RT-PCR, RNA, Wi-Fi exposure, thyroid.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VIII
ŞEKİLLER.....	IX
RESİMLER.....	IX
TABLolar.....	IX
KISALTMALAR.....	X
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	1
BULGULAR.....	18
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	25
KAYNAKLAR.....	28

ŞEKİLLER

Şekil 1. Tiroid anatomisi

Şekil 2. Deney ve kontrol grupları arasındaki *ATG5*, *ATG12*, *WNT2*, *WNT7*, *WNT10* ve *GSK3B* genlerinin ifadenme sonuçları

Şekil 3. Deney ve kontrol grupları arasındaki *Beclin1-2*, *Catenin B*, *TCF*, *HIF1A* ve *LC3B* genlerinin ifadenme sonuçları.

RESİMLER

Resim 1. Dokuların küçültülerek izolasyon için hazırlanması

Resim 2. Dokuların manyetik bilye kullanılarak homojenize edilmesi ve vortekslenmesi

Resim 3. Denovix DS-11+ Microvolüm Spectrophotometer

TABLolar

Tablo 1. Real Time qPCR reaksiyonunda hazırlanan mikrotüplerin içerik bilgisi

Tablo 2. Çalışma kapsamında araştırılan gen bölgelerine ilişkin primer dizileri

KISALTMALAR

HIF1a : Hypoxia İnducible Factor I Alpha

ATG : Autophagy Related Gene

B-Catenin, Cateninb: Beta Katenin

GSK3b : Glycogen Synthase Kinase 3 Beta

LC3BII : Light Chain 3 Beta

TCF : Transcription Factor

ACTB : Actin,Beta

MIT: Monoiodotirozin

DIT: Diiyodotirozin

MAPK: Mitojen Aktive Protein Kinaz

RET: Rearranged During Transfection

Gs-Alfa: G stimulan Alfa

Ras: Rat sarcoma virüs

PAX8: Paired-box gene 8

PPAR γ 1: Peroxisome proliferators-activated receptor

BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

CTNNB1: Katenin Beta 1

PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog

FTK: Folliküler Tiroid Karsinomu

PTK: Papiller Tiroid Karsinomu

MTK: Medüller Tiroid Karsinomu

HHK: Hürthle Hücreli Tümör

RAI: Radyoaktif iyot

ATK: Anaplastik Tiroid Karsinomu

ATG: Autophagy Related Genes

TSH: Tiroid Stimulan Hormon

APC: Adenomatous Polyposis coli

CK1 Casein Kinase 1

WNT: Wingless and Int-1

DVL: Dishevelled



1. GİRİŞ

İletişim teknolojilerinin gelişmesi ile birlikte internet ve mobil telefon kullanımının, ayrıca kullanım kolaylığı sağlaması nedeniyle özellikle wireless (wi-fi) teknolojinin yaygınlaşması ile birlikte etrafımızı saran bu teknolojinin insan sağlığına olan etkisi araştırılmaya başlanmıştır. Wi-Fi cihazlar bir non iyonize radyasyon çeşidi olan elektromanyetik alan üretirler. İyonize radyasyonun DNA üzerinde yaptığı hasar bilinirken non-iyonize radyasyonun insan sağlığına olan zararlı etkileri henüz bilinmemektedir. Yapılan çalışmaların bir kısmında anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır ancak aksini ispat eden çalışmalar da mevcuttur (1,2). Biz bu çalışmamızda wi-fi'nin canlı dokular üzerindeki etkilerini genetik düzeyde araştırmak istedik. Çalışmamızda hedef doku olarak da son yıllarda klinikte görülme sıklığı artan tiroid kanserleri nedeniyle tiroid dokusu seçilmiştir. Düşük miktarda Elektromanyetik alana maruz kalmanın DNA, RNA, protein sentezi, hücre bölünmesi ve karsinogeneze etkili olduğu gösterilmiştir (3,4,5). Aynı şekilde farklı çalışmalarda da non-iyonize radyasyonun hücre sel solunumu, hormonal ve immün cevapları etkilediği ortaya konmuştur (6).

Halen bu teknoloji yaygınlaşmakta, wi-fi yanında benzer elektromanyetik dalga yayan mobil telefonların da kullanımı ve özellikle maruz kalınan sürenin uzunluğu ve sıklığı artmaktadır. Farklı sonuçlar veren çalışmalar mevcut olup bu sık kullanılan teknolojinin insan sağlığına olan etkisi netleştirilememiştir. Bu çalışmada özellikle çok araştırılmamış olan tiroid dokusu üzerine wi-fi'nin etkisi araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.1 Tiroid Anatomisi Ve Embriyolojisi

Tiroid bezi gestasyonun 3. Haftasında primitif ön bağırsaktan (foregut) çıkar ve dil tabanında foramen çekum düzeyinden köken alır. Hiyoid kemik ve larinksi oluşturacak olan yapıların önünden orta hat boyunca epitelle döşeli olan tiroglossal kanal boyunca aşağı iner. Sekizinci haftada tiroid follikülleri oluşur. Gebeliğin 11. Haftasında ise kolloid oluşmaya başlar (7).

Erişkinde boyun ön kısmında tiroid kıkırdağın önünde bulunur. Sağ ve sol olarak iki lobdan oluşur ve isthmus adı verilen bir parça ile birbine bağlıdır. Bez kahverengi sert kıvamlıdır. Normalde yaklaşık 20 gr ağırlığındadır. Bu yaş, vücut ağırlığı ve iyot alımına göre değişiklik gösterebilir. Popülasyonun %50 sinde piramidal lob bulunur. Bezin önünde strep kaslar bulunur. Bu kaslar ansa servikalis tarafından innerve edilir.

Tiroid bezi eksternal tiroid arterin süperior tiroid arter ve subklavyan arterin tiroservikal trunkusunun inferior tiroid arter dalı tarafından beslenir. Venöz dönüşü ise tiroid kapsülündeki venöz pleksustan süperior, medial ve inferior venlere oradan da internal juguler venlere drene olur. Lenfatikleri ise tiroid bezinden perikapsüler, internal juguler, pretrakeal, paratrakeal, prelaringeal retrofaringeal ve retroözofageal nodlara drene olur (7).

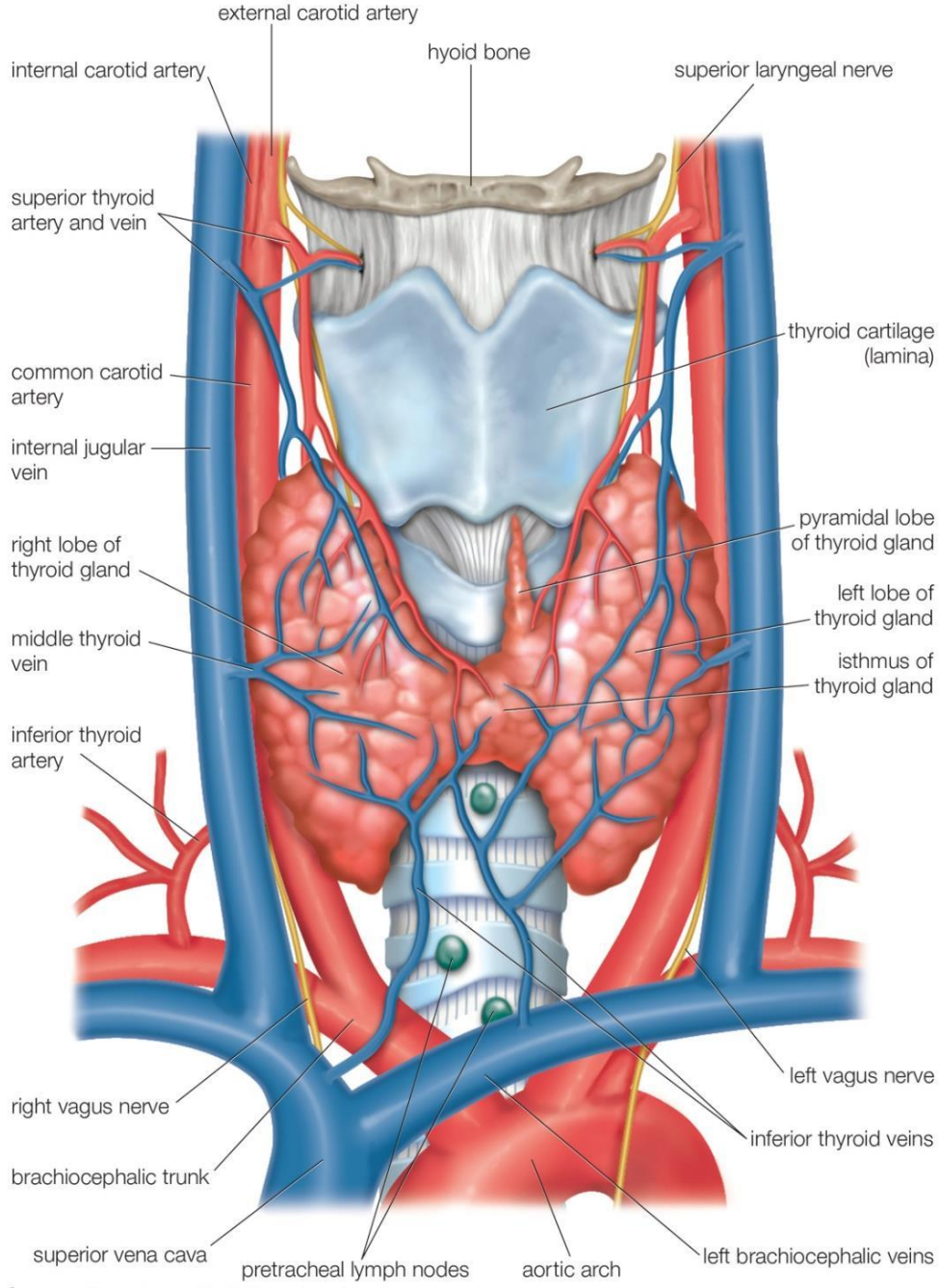
2.1.2 Tiroid Histolojisi

Tiroid bezi her birinde etrafı kuboid epitelle çevirili 20-40 follikül içeren lobullardan oluşur. Bu folliküllerin ortasında epitel hücrelerince salgılanan kolloid bulunur. Tiroid bezinde ayrıca üst polde interfolliküler stromada yerleşmiş c hücreleri (parafolliküler hücreler) bulunur. Bu hücreler de kalsitonin depolayıp salgırlar (7).

2.1.3 Tiroid Fizyolojisi

Gıdalarla alınan iyot follikül hücrelerine ATP bağımlı bir işlemle alınır. Daha sonra iyodid iyodine okside edilir Tiroglobulin üzerindeki tirozin kökleri iyodinasyon yoluyla monoiyodotirozin (MIT) ve diiyodotirozin (DIT) üretilir. İki adet DIT birleşerek Tiroksini (T4) oluşturur. Bir adet DIT ve bir adet MIT in. Bileşmesi ile Triiyodotirozin(T3) veya triiyodotironin revers oluşur. (rT3) Oluşan T3 ve T4, TSH uyarısı altında kana salınır. Kandaki T4ün tamamı tiroid bezi tarafından üretilirken, T3'ün büyük kısmı periferde T4'ün deiyodinasyonu ile oluşur.

Hipotalamustan salınan Tirotropin Releasing Hormon (TRH) Hipofiz Bezini Tiroid Stimulan Hormon (TSH) salgılaması için uyarır. TSH ise tiroid bezinden iyot tutulumunu ve tiroid hormon salgılanmasını sağlar. Buna hipotalamik-pituiter-tiroid aksı denir (7). TSH salgısı T3 ve T4 tarafından negatif feedback mekanizması ile düzenlenir.



Şekil 1: Tiroidin anatomisi (29)

2.2. Tiroid Tümörleri

Tanım Ve Sınıflama

Tiroid Tümörleri;

1)Folikül Epiteli

2) Parafoliküler Hücre

3) Yumuşak Doku

4)Metastaz

5) Ektopik Timus

6) Germ Hücre

7) Hematolenfoid kaynaklı olabirler (30).

2.2.1. Epidemiyoloji

En sık görülen endokrin malignitedir. Türkiye’de tüm maligniteler arasında 5. Sırada görülmektedir (19). ABD’de tüm malignitelerin <%1’ini oluşturmaktadır. Kadınlarda erkeklerin yaklaşık 4 katı görülür. Tiroid kanserlerinin çoğunun prognozu iyi olup her yıl milyonda 6 kişinin ölümünden sorumludur (7).

2.2.2 Tiroid tümorogenezi

Tiroid tümorogenezisinde pek çok onkogen ve tümör supressör geni içermektedir. Bunlardan bilinen bazıları; onkogenlerden, RET , MET, TRK1, TSH-R, gS-alfa, Ras, PAX8/PPAR γ 1, BRAF ve CTNNB1; tümör supressor genlerden p53, p16 ve PTEN olarak sayılabilir. Bu onkogen füzyonlarının en sık sebebi iyonze radyasyon maruziyetidir (16).

Bunların en önemlilerinden olan RET, sporadik ve ailesel tip medüller tiroid kanseri ve papiller tiroid karsinomunda rol oynamaktadır. RET’in tirozin kinaz alanının rearanjmanı ile onkogen görevi görür. En az 15 adet RET/PTK rearanjmanı tanımlanmıştır (7). Radyasyona maruz kalma ve genç yaş bu rearanjmanın gelişmesinde rol oynamaktadır. RET/PTK sinyali Mitojen Aktive Protein Kinaz(MAPK) yolağını içermektedir. Benzer şekilde Ras ve BRAF geni mutasyonları da MAPK yolağını aktive ederek karsinogeneze katılabilir. Bir tümör supressor geni olan p53 mutasyonları ise daha sık olarak undifferansiye tiroid kanser hücrelerinde görülür (11).

2.2.3. Papiller Tiroid Karsinomu

Papiller tiroid karsinomu iyotun yeterli olduğu bölgelerde tüm tiroid malignansilerinin %80'ini oluşturur. Genelde iyi prognozludur ve 5 yıllık mortalitesi %2 civarındadır (12). Çoğunlukla 3. Ve 4. Dekatlarda görülmektedir. Kadınlarda erkeklere göre 4 kat daha fazla görülme sıklığı vardır (13). En sık görülen etmenler arasında iyonize radyasyona maruz kalma, sigara, obezite, diyabet, alkol ve yüksek iyot alımı bulunmaktadır (14).

Çoğu hastada boyunda kitle ile tespit edilir. Yavaş büyür ve ağrısızdır. bunun yanında çok büyüyen kitleler disfaji, disfoni veya trakeaya basıya bağlı dispne şikayetiyle gelebilirler.

Makroskopik olarak sert ve beyaz renkli olup makroskopik olarak kalsifikasyon, nekroz ya da kistler görülebilir. Histolojik olarak papiller, folliküler veya her ikisinin karışı olan bir varyant şeklinde olabilirler. Tanı nükleer ve hücrel özelliklerine göre konulur. İntranükleer inklzyonlar içeren yapısı Orphan Annie görünümüne neden olur. Hücrelerde küme yapmış kalsifiye depozitler psammoma cisimcikleri olarak adlandırılır (13). Miks yapıdaki papiller-folliküler tümörler de papiller tümörler gibi değerlendirilir. Vakaların %85'inde multifokalite görülür (7). Multifokalitenin, kapsül invazyonu ve lenf nodu metastazları ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (15).

PTK'nın uzun hücreli, insular, diffüz sklerozan, trabeküler, kolumnar, clear hücreli türleri bulunmaktadır ve bu türlerin prognozu daha kötüdür.

2.2.4. Foliküler Tiroid Karsinomu

En sık iyot eksikliği olan bölgelerde görülen Foliküler Tiroid Karsinomu tüm tiroid malignitelerinin %10'unu oluşturur. Görülme sıklığı kadınlarda erkeklere oranla 3 kat fazladır. En sık 5. dekada görülür (7).

FTK, sıklıkla soliter tiroid nodülü olarak saptanan, kapsüllü malign bir tümördür. Folliküller içerse de lümeninde kolloid az görülür.

FTK'nın lenf nodu metastazı tanı anında oldukça azdır. Tanı amaçlı yapılan İİAB'lerinde Folliküler adenom ile histopatolojik açıdan benzeştikleri için sitolojik inceleme ile malign benign ayrımı yapmak da oldukça zordur. Ancak çıkarılan tümörün kapsül ve

damar invazyonu açısından değerlendirilmesiyle tanı konulabilir. Bu nedenle pre-operatif yapılan ince iğne aspirasyon biyopsilerinde tanı amaçlı spesifik biyomarkerlar kullanılır.

FTK tanısında oldukça farklı mutasyonlar görülmüş olup bunların birinin varlığı kanser tanısında önemli bir kanıt olmakla birlikte farklı mutasyonların bir arada tespit edilmesinin tanıyı güçlendirdiği kanısına varmıştır. Tespit edilen mutasyonlardan BRAF, RAS, RET/PTC ve PAX/PPAR γ maligniteyi gösteren DNA mutasyonları açısından anlamlı bulunmuştur (17).

Bunların dışında karsinogenezde önemli bir yeri olan microRNA'lar da malignite tanısında önemli olması açısından araştırılmaktadır. Özellikle miR-197 ve miR-346 yapılan çalışmalarda tiroid kanserinde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Biyokimyasal marker olarak kullanılması açısından çalışmalar yapılmaktadır (18).

2.2.5. Hürthle Hücreli Tümörler

Hürtle hücresi karsinomlar oksifilik hücrelerden köken alır. Sitoplazmalarında çok sayıda mitokondri içerirler ve eozinofilik yapıya sahiptirler. FTK gibi kapsüller ve vasküler invazyon ile tanı aldıklarından daha önce FTK'nın bir varyantı olarak kategorize edilmiş olup daha sonra geniş 2017 28 DSÖ sınıflaması ve 2015 ATA kılavuzunda FTK alt başlığından ayrılmıştır (19).

HHK'lar FTK'lardan daha sık bilateral görülmesi, multifokalite, lenf nodu metastazı, uzak metastazları ve RAI'ye dirençleri nedeniyle ayrılmaktadır. 10 yıllık mortalite oranları FTK'lardan oldukça yüksektir. Ancak cerrahi tedavisi açısından FTK'lar gibidir. Her ne kadar RAI dirençli olsalar da tedavide yine de kullanılmaktadır.

2.2.6. Medüller Tiroid Karsinomu

MTK'lar tiroidin superolateralinde toplanmış olan nöral krest orijinli Parafoliküler C hücrelerinden köken alır. C hücreleri Kalsitonin salgılar ve kalsiyum metabolizmasında rol oynar. Tüm tiroid malignansilerinin %5-7 arasını oluşturur. %75'i sporadiktir. Kalan %25'i ise multiple endokrin neoplazi sendromu MEN2A ve MEN2B kökenlidir. Bu sendromlar RET proto-onkogeni mutasyonuna bağlıdır. Negatif aile öyküsü germline sendromları dışlamamaktadır çünkü jenerasyonlar arasında atlama olabilmekte veya de novo mutasyonlar

da görülebilmektedir. Bu nedenle tüm yeni tanı alan hastalar RET mutasyonları açısından taranmalıdır (20).

MTK'lar eğer sporadikse genel olarak unilateral, sendromlarda ise multisentrik olarak görülür. Histolojik olarak kanser hücreleri aralarında kollajen ve amiloidle ayrılmış tabakalar halinde görülür. Sitolojide CEA ve Kalsitonin Gen İlişkili Peptid (CGRP) pozitif boyanır.

2.2.7. Anaplastik Tiroid Karsinomu

Anaplastik tiroid karsinomu (ATK), andisferansiye karsinom olarak da adlandırılan hızlı büyüyen ağrı disfaji disfoni, dispne gibi semptomlar gösterebilen kötü prognozlu bir tümördür. Tüm tiroid kanserlerinin %1'ini oluşturur. Ortalama sürvisi tanıdan sonra 5 aydır. En çok 7 ve 8. Dekatlarda bulgu verir. Kadınlarda erkeklere göre 2 kat fazla görülür (21).

ATK, etrafa fıkse nekrozlar içeren palpable bir kitle olarak tespit edilir. Tanı anında sıklıkla lenf nodu pozitifliği ve metastazlar görülür. Makroskobide sert beyaz renkli kitle şeklindedir. Nekroz odakları içerirler. Mikroskobide belirgin heterojenite mevcuttur. Hücreler büyük multinükleer özelliktedir. İğsi, skuamoid ve pleomorfik dev hücre paternleri görülür. Biyopsilerde folliküler ve papiller paternler de görülebilir. Diğer tanıların dışlanması için immunohistokimyasal markerlar kullanılabilir.

2.3. Wi-Fi Elektromanyetik Dalga (W1-F1 Rf-Emf)

2.3.1. Wi-fi tanımı

Kablosuz ağlar teknolojinin gelişmesiyle dünyada yaygın bir şekilde kullanılır hale gelmiştir. Kablosuz iletişim ağları (WLAN [Wireless Local Area Network]), iki veya daha fazla bilgisayar veya dijital (sayısal) cihazın birbirleriyle kablosuz olarak veri iletişimini sağlayan yapılardan oluşmaktadır (8). Wi-Fi; 802.11 standardını kullanan, Elektrik ve Elektronik Mühendisleri Enstitüsü'nün (IEEE'nin) ortaya koyduğu wireless radio haberleşme protokülüdür. Wireless Fidelity'nin toplumda kullanılan kısaltmasıdır ve Türkçesi Kablosuz Bağlantıdır. Bilgisayar, cep telefonu, tablet ve pek çok elektronik cihazın kablo olmadan bir tarafın verici ve diğer tarafın bir alıcı anten yardımıyla birbirine veri aktarmasını sağlar. Bu aktarımı sağlayan ise elektromanyetik dalgalardır (EMD).

EMD'nin insan sağlığı üzerindeki etkilerinde bilinen ayırıcı çizgi iyonlaştıran ve iyonlaştırmayan ışınlardır. Dünya da genel kabulün RF spektrumunun 300 GHz' den

bölünmesidir. 300 GHz' in altında kalan RF dalgaları iyonlaştırmayan (non-ionizing), üzerindeki RF dalgaları ise iyonize (ionizing) olarak tanımlanmaktadır (8). Wi-Fi elektromanyetik spektrumun iyonize edici olmayan 2,45 GHz frekanslı radyo frekans dalgaları bölümünde yer almaktadır. İyonize edici olmayan ışınlamalar ise biyolojik sistemleri ısıtıcı ya da ısıtıcı olmayan yöntemlerle etkilemektedir (9,10).

2.4. Otofaji

Canlılığın devamı için hücre içerisinde yaşam ve ölüm döngüsü belirli fizyolojik sınırlar içerisinde bir dengede bulunmaktadır. Bu dengenin bozulma lehine artışı durumunda kanser ve otoimmün hastalıklar, azalma lehine artışında dejeneratif hastalıklarla karşılaşmaktadır. Bu dengenin sağlanması adına hücrede bulunan pek çok ölüm mekanizmaları tespit edilmiştir. Genetik programlı hücre ölümü olan apoptozis, programsız hücre ölümü olarak tanımlanan nekrozis ve bunların yanında önemli ölüm yollarından birisi de otofajidir. Otofaji Yunanca “kendi kendini yeme” anlamına gelmektedir. Otofaji, hücre stres ve besin yokluğu durumlarında hücre içi dengenin sağlanması amacıyla organellerin yıkımıdır (27). Otofajinin aynı zamanda canlıda embriyogenez, organogenezde ve eritropoezde de önemli rol oynadığı gösterilmiştir (30). Ayrıca kemoterapi, radyoterapi, hipoksi gibi stress durumlarında tümör hücrelerinin hayatta kalmasını sağlamaktadır (31).

Otofaji 3 farklı şekilde gerçekleşebilir. 1) Mikro otofaji: Küçük partiküllerin hücre membranında oluşan yapılar tarafından alınıp lizozomlarda parçalanmasıdır. 2) Makro otofaji: Otofajik hücre ölümü olarak adlandırılır. Büyük organellerin yine membranöz yapılar içerisine alındıktan sonra lizozomlarla birleşerek yıkımıdır. 3) Şaperon aracılı otofaji: Sitozoldeki bazı peptid yapıların şaperonlar aracılığıyla lizozomlara taşınarak parçalanmasıdır. Bu aşamada taşınan yapılar herhangi bir zar ile çevrili değildir (28).

2.4.1. Otofaji ile İlgili genler (ATG)

Otofaji ile ilgili genler ATG (Autophagy Related Genes) olarak adlandırılmışlardır. Otofaji sürecinin farklı aşamalarında görevli yaklaşık 30 proteini içeren bir gen ailesidir. Otofaji sürecinde, otofajinin başlamasında (unc-51/ATG1), vezikül nükleasyonunda (beclin-1/ATG6, vps-34/VPS34), protein konjugasyon sisteminde (atg-7/M7.5/ATG7, lgg-1/ATG8, lgg-3/ATG12), alım ve vezikül dönüştürmede (atg-18/F41E6.13/ATG18) fonksiyon göstermektedir (29).

Otofajinin bilinen beş basamağı mevcuttur : 1) İndüksiyon (membranın oluşması) 2) Genişleme (membranın uzaması) 3) Olgunlaşma (Otofagozomun tamamlanması) 4) füzyon (lizozom ve otofagozomun birleşmesi) 5) Yıkım (otofagozomun içeriğinin lizozom içerisinde yıkımı). Hücrel stres veya besin azlığı ortamında tip I PI3K-AKT-mTOR sinyalinin inhibisyonuna ve tip III PI3K hVPS34/Beclin 1 (Drosophilada Atg6 ve Mayada Atg6/Vps30)'nın da aktivasyonuna neden olur. Beclin-1, Atg6'nın, memelilerdeki homologudur ve otofajinin belirteci olarak kabul edilir (30). Tip III PI3K hVPS34/Beclin 1 (Atg6) aktivasyonu ile çift tabakalı membran oluşmaya başlar. Atg 7 aktive olunca Atg 12 aktifleşip Atg 5 ile bağlanır. Atg 16 da bu komplekse katılarak Ag12-Atg5-Atg16 kompleksi oluşur. Oluşan bu kompleksle vezikül genişler. Daha sonra bu vezikülün kapanarak olgunlaşması ise iki konjugasyon sistemi (ATG5-ATG12 ve LC3) ile gerçekleşir. Otofagozomların membranlarından izole edilen LC3 (Light chain 3) (hepsi LC3 olarak anılan LC3A/B/C, GATE-16 ve GABARAP 1/2/3) ATG8 ortoloğudur (32). Bu oluşan otofagozomlar sonradan lizozomlarla birleşerek otolizozomları oluştururlar. Otolizozom içerisinde parçalanan yapılar tekrara kullanılmak için sitozole taşınırlar. Görevlerini tamamlayan otolizozomlar ise parçalanırlar (33).

2.4.2. WNT Sinyal yolağı

WNT sinyal yolağı embriyogenezde ve hücre homeostazisinde önemi rol oynamaktadır. İlk olarak Int-1 farede bir proto onkogen olarak keşfedilmiş olup daha sonra Drosophila'da wingless adıyla homologu keşfedilmiştir. Bu iki gen daha sonra birlikte Wnt olarak anılmıştır (34). Daha sonra bu gen üzerine yapılan çalışmalarda genin Tip II diyabet, Parkinson, Alzheimer, hepatokarsinom, kolon kanseri, lösemi gibi hastalıklarla ilişkileri bulunmuştur (35). Şimdiye kadar 3 adet WNT sinyal yolağı bulunmuştur. Bunlar, Wnt/ β -katenin (Kanonik/Klasik), Wnt/ Ca^{+2} (Kanonik olmayan) ve Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP) (Kanonik olmayan) olarak adlandırılmıştır (36).

Wnt/ β -katenin sinyal yolağında, hücre içi sinyalizasyonun ilk basamağı Wnt ligandının Frizzled (Fz) reseptörüne ve Fz'nin ko-reseptörü olan düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili proteine (LRP5/6) bağlanmasıdır. Daha sonrasında sinyal sitoplazmaya geçer ve DVL (dishevelled) fosforile edilir. Ardından bu fosforilasyon Axin, APC (adenomatous polyposis coli), CK1 (casein kinase 1) ve GSK-3 (glycogensynthase kinase 3)'den oluşan yıkım kompleksinin yapısını bozarak, β -katenini stabilize eder ve β -kateninin nükleer

translokasyonunu sağlar. Intranükleer bölgede β -katenin, transkripsiyon faktör ailesi üyelerine bağlanarak (TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor)), hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar (34). Bazı β -katenin ve TCF hedef genleri insanda ve ratlarda tümör oluşumuna ve ilerlemesinde rol oynarlar (37). Daha önce yapılan bir çalışmada Aspirin türevi olan NO-ASA'nın normal bağırsakta toksik etki oluşturmaksızın -katenin/TCF kompleksini bozarak polip oluşumunu azalttığına dair sonuçlara ulaşılmıştır (38).

Tümörögenезis ile ilişkili bir diğer gen olan WNT-2 geni de pek çok kanser türünde izole edilmiştir. Rat meme tümörögenезisinde gösterildikten sonra gastrik kolorektal kanserlerde, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunda ve melanomlarda upregule olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle Wnt-2 antikorlarının küçük hücreli olmayan akciğer karsinomlarında kullanılmasının fayda sağlayacağı düşünülmektedir (39).

WNT7a ise kanonik wnt/ β katenin yolağını aktive ederek hücre proliferasyonunu artırır. Yapılan çalışmalarda WNT7a'nın over kanserlerinde oldukça arttığını gösterilmiştir (40).

WNT sinyal yolağındaki bir diğer gen olan WNT10a'nın ise özofageal, gastrik ve kolorektal kanser hücrelerinde güçlü bir şekilde eksprese olduğu görülmüştür (41).

Solid tümörlerde sık görülen hipoksi durumu, hızlı büyüyen tümörlerde vaskülarizasyonun yetersiz olması durumunda ortaya çıkar ve hipoksiye yanıt olarak tümör hücreleri, oksijendeki değişikliklere, çok sayıda temel hücresel fonksiyonunu düzenlemek için transkripsiyonel faktör HIF-1a'yı kullanarak yanıt verir. HIF-1a'nın gen ekspresyonu yoluyla kanser ilerlemesi üzerindeki derin etkileri ve kemoterapinin tatmin edici olmayan etkinliği göz önüne alındığında, HIF-1a yolunun biyolojisine ve doğrudan veya dolaylı HIF-1 inhibitörlerinin geliştirilmesine büyük bir ilgi olmuştur (42).

Beta-aktin (ACTB) ise tüm ökaryotik hücrelerde yaygın olarak bulunan ve hücre göçü, hücre bölünmesi, embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, bağışıklık tepkisi ve gen ekspresyonunda kritik roller oynayan bir hücre iskeleti proteindir. Bu işlevler, ACTB'nin

hücrelerin ihtiyaçlarına yanıt olarak hızlı bir şekilde bir araya getirilebilen ve sökülebilen filamentler oluşturma yeteneğine atfedilir. Hücre göçü genellikle, zarı ileri iten çıkıntılı kuvvetleri sağlayan ön kenardaki ACTB polimerizasyonu tarafından yönlendirilir. ACTB hücre iskeleti organizasyonu ve tümör hücrelerinin invazivliği ve metastatik kapasitesi, ACTB'nin henüz anlaşılmamış bir şekilde kanser patogenezinde rol oynadığını göstermektedir. ACTB'nin karaciğer, melanom, böbrek, kolorektal, mide, pankreas, özofagus, akciğer, meme, prostat, over kanserleri, lösemi ve lenfomada anlamlı şekilde eksprese olduğu bulunmuştur. (43)

2.5. Amaç Ve Kapsam

Bu çalışmada; ratlarda wireless elektromanyetik dalgalarına maruziyet sonrasında meydana gelen değişimlerin, tiroid dokularında otofaji ve oksidatif stresle ilgili olduğu belirlenmiş bazı genlerin aktifleşen veya inaktive olan gen ifadesi parametrelerine yansımalarının araştırılması amaçlanmıştır. Dolayısıyla bu çalışma kapsamında ratlara uygulanan wireless dalgalarının tiroid dokusundaki etkilerinin, literatüre göre otofaji ve oksidatif stres ile ilişkili olduğu belirlenmiş, 12 farklı genin ifadenme derecelerindeki farklılaşmalarının kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu metoduyla (qRT-PCR) belirlenmesi ile ortaya konulmasına çalışılmıştır.

3. Materyal Metod

3.1. Hayvan Deneylerinin Dizaynı:

Çalışmamızda Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarında hayvan etik kuralı olarak benimsenen 3R (Reduction: azaltma, Replacement: yerine koyma, Refinement: özen gösterme) kurallarına uygun olarak, 20 adet 16 haftalık 200-220 gr ağırlığında sağlıklı Wistar albino dişi ratlar kullanılmıştır. Hayvan deneylerine Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Deney Hayvanları Kullanımı ile ilgili olarak yerel etik kurul kararının alınmasıyla birlikte başlanmıştır (21.12.2021- 65202830-050.04.04-613). Deneylerde kontrol ve deney grubu olmak üzere, 2 grup hazırlanmıştır ve her bir grupta 10 dişi rat kullanılmıştır. Bu ratlardan deney grubuna wireless elektromanyetik alanı uygulanmış, kontrol grubuna uygulanmamıştır. Deney grubundaki 10 adet Wistar Albino türü 16 haftalık 200-220 gram ağırlığındaki dişi ratlara evlerde, ofislerde kullanılan kablosuz internet

cihazlarının en çok kullandığı 3 GHertz Elektromanyetik dalga uygulaması, 30 gün süresince günde 12 saat maruz kalacakları şekilde yapılmıştır. Kontrol grubu ise herhangi bir elektromanyetik ortama maruz kalmayacak şekilde 30 gün süresince Faraday Kafesi ortamında korunarak yaşatılmıştır. 30 günün sonunda ratlar sakrifiye edilmiş ve diseksiyon yapılarak, tiroid dokuları araştırmada kullanılmak üzere alınmıştır.

3.2.Dokuların Saklanması:

Elde edilen dokular, daha önceden steril edilmiş ve etiketlenmiş 1.5 mL’lik eppendorf tüplere alındı ve üzerlerine 1 mL Ribo Saver (Gene All, Seoul, Korea) çözeltisi eklendi. Total RNA izolasyonu yapılınca kadar -80 °C de saklandı.

3.3.Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için GeneAll® Hybrid-R™ Kit kullanıldı (GeneAll® Hybrid-R™ - Seoul, Korea. **Cat. No.:** 305-101- **Lot. No. :** 30519L09056). Çalışmaya başlamadan önce RNA izolasyonunda kullanılacak laboratuvar ekipmanları otoklavlanıp sterilize edildi. Tüm örnekler etiketlendi. -80 °C de eppendorf tüp içerisinde bulunan doku örnekleri oda ısısında çözündürüldü, RNAlater (GeneAll RiboSaver, Seoul, Korea. **Cat. No. :** 351-001- **Lot. No. :** 35119K20013) çözeltisi uzaklaştırıldı. Dokular steril lam üzerinde bistüri ile küçük parçalara ayrıldı, etiketlenmiş temiz eppendorf tüpe içine alındı (Şekil 1). Üzerine 1mL Riboex™ solüsyonu eklendi. (100 mg doku için 1mL Riboex™) 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Manyetik bilye kullanılarak mekanik homejenizasyon ile fiziksel parçalama işlemi tamamlandı. Her tüpe 200 µL kloroform eklendi. 15 saniye vortekslenerek 2 dk oda ısısında bekletildi (Şekil 2). 12000 g de 15 dk 4°C’de santrifüj edildi. Süpernatant steril yeni bir tüp içerisine alındı, üzerinde süpernatantın hacmi kadar RBI tamponu eklenerek vortekslendi. Elde edilen 700 µL kadar karışım, kit içerisinde bulunan kolon tüplere aktarıldı ve 10000 g de 30 sn santrifüj edilip alttaki toplama tüpü atıldı. Kolon ise yeni temiz bir toplama tüpü içine yerleştirildi. Geri kalan örnekler için aynı işlemler gerçekleştirildi. Kolon üzerine 500 µL SWI çözeltisi eklendi. 10000 g de 30 sn oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Toplama tüpü atıldı, kolon yeni bir toplama tüpü üzerine yerleştirildi. Kolon içine 500 µL RNW çözeltisi eklendi. 10000 g de 30 sn oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Altteki toplama tüpü içindeki faz dökülerek, kolon içinde kalan sıvının tamamen uzaklaştırılması için tekrar 1 dk 10000g de santrifüj yapıldı. Toplama tüpleri atıldı, kolonlar steril 1,5 mL lik eppendorf tüplere transfer edilerek üzerine 100 µL of RNase-free water eklendi. 1 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Çalışmamızda daha sonra gerekli olan tüm mRNA’ların eldesi için

10000 g de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Total RNA örnekleri bir sonraki adım için -80°C' ye kaldırılarak saklandı.



Resim 1. Dokuların küçültülerek izolasyon için hazırlanması.



Resim 2. Dokuların manyetik bıye kullanılarak homojenize edilmesi ve vortekslenmesi

3.4.Total RNA Çözeltisinin Kalite Kontrolü

Elde edilen örneklerin μL 'sinde kaç nanogram RNA olduğunu hesaplamak için ve saflık kontrolü yapmak için spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirildi ve konsantrasyon tayinleri yapıldı. Yaklaşık olarak her bir örnek için 20-40 ng aralığında total RNA olduğu görüldü. RNA saflığını doğrulamak için A260/280 oranı kullanıldı. Sonraki basamaklarda ekspresyon

analizleri için kullanılabilecek nitelikte kalitede saf RNA' ların oranının 1.8 -2.2 arasında olmasına dikkat edildi. (Resim 3).



Resim 3. Denovix DS-11+ Microvolüm Spectrophotometer

3.5.cDNA Eldesi:

cDNA eldesi için WizScript™ cDNA Synthesis Kit (South Korea) kullanıldı. Bu kit içerisinde 10X Reaction Buffer, 20X dNTP mix, RNase Inhibitor, RNase free steril su, Random hekzamer, ve Wiz Script™ RTase çözeltileri bulunmaktadır. Her bir örnek için kit prosedüründe belirtilen ölçülerde hazırlanan Reverse transcriptaz master mix tüm örneklerle yetecek şekilde stok halinde hazırlandı. Sonra stok master mix, her bir örneğin konulacağı mikro tüplere 10 µL olacak şekilde dağıtıldı. Önceden elde edilen RNA örneklerinden de, etiketlenmiş mikro tüplere uygun olacak şekilde, 10 µL total RNA çözeltisi eklenerek pipetleme yapıldı. Bileşenlerin daha iyi karışması ve hava kabarcıklarını engellemek için mikro santrifüjde hızlıca bir spin yapıldı. cDNA sentezi için gerekli bileşenler mikrotüpler içinde birleştirildikten sonra, revers transkripsiyonun gerçekleşmesi için; 25°C de 10 dk, 37°C de 120 dk ve 85°C de 5 dk olacak şekilde ardışık 3 basamaklı bir inkübasyon reaksiyonu ayarlandı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra elde edilen cDNA' lar gen ekspresyonu analizlerinin yapılması için Real-Time qPCR de kullanılmak üzere -20 °C ye kaldırıldı.

3.6.Gen Ekspresyon Analizleri

Gen ekspresyon analizleri için Applied Biosystem Step One Plus real time PCR (USA) cihazı kullanıldı. Real Time qPCR aşamasında GeneAll Real Amp™ SYBR master mix

(Seoul, Korea) kullanıldı. Sentezlenen cDNA örneklerinin kantitatif analizi için SYBR Green ve pasif referans boyası ROX kullanılarak, boyaların floresan ışıma özelliklerinden yararlanarak real-time PCR gerçekleştirildi. Real Time qPCR aşamasında reaksiyon ortamı toplamda 10 µL hacimde hazırlanmış olup, bileşenleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 1). Bu tez çalışması kapsamında gen ifadenmesi (expresyon) değerlerinin belirlenmesi amacıyla, Beta catenin-Axin, beta-aktin, GAPDH, GSK-3B, TCF, WNT7A, WNT10A, WNT2, Beclin 1 ve 2, ATG5 ve 12 olmak üzere çok sayıda farklı gen bölgesinin incelenmesi söz konusudur.

Tablo 1. Real Time qPCR reaksiyonunda hazırlanan mikrotüplerin içerik bilgisi

Bileşenler	Miktar
Master mix (2X)	5 µL
ROX (50X)	0,2 µL
İleri yönlü primer (10pmol)	
Geri yönlü primer(10pmol)	0,4 µL
Nuclease free water	0,4 µL
Kalıp DNA(cDNA)	3 µL
	1 µL
Toplam hacim	10 µL

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan Real Time PCR mixi Applied Biosystem qPCR 96 well mikroparka'ya dağıtıldı ve dikkatlice pipetlendi. Mikroparka üzeri optik yapışkan film (seal) ile kaplandı. Mikro plaka Real time PCR cihazına yerleştirildi ve daha sonra real-time PCR cihazında reaksiyonlar için sıcaklık koşulları ayarlandı. Her bir gen bölgesi için Real time PCR aşamasındaki sıcaklık koşulları, primerlerin taşıdığı N'lu organik bazların miktarına ve çeşidine göre ayarlanmıştır. Başlangıç denatürasyonu için 95°C de 10 dk inkübasyon yapılarak, gerçek zamanlı PCR döngüsünün denatürasyon basamağında 95°C de 15sn ve Bağlanma (Annealing)/Uzama (Extention) basamağında 60°C de 1 dk olacak şekilde sıcaklık ve zaman şartları uygulandı.

Bu çalışma kapsamında gen ekspresyonları (ifadeleri) araştırılan gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primerlere ait bilgiler aşağıda verildi (Tablo 2). Real Time qPCR aşamasında house keeping gen olarak ACTB geni primerleri kullanıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra veriler kaydedilerek analizler gerçekleştirildi.

Tablo 2. Çalışma kapsamında araştırılan gen bölgelerine ilişkin primer dizileri

PRİMER ADI	PRİMER DİZİSİ
LC3BII-F	TTATAGAGCGATACAAGGGGGAG
LC3BII-R	CGCCGTCTGATTATCTTGATGAG
Beclin1-F	ATGGAGGGGTCTAAGGCGTC
Beclin1-R	TCCTCTCCTGAGTTAGCCTCT
ATG5-F	AGCCAGGTGATGATTCACGG
ATG5-R	GGCTGGGGGACAATGCTAA
ATG12-F?	TCCCCGGAACGAGGAACTC
ATG12-R?	TTCGCTCCACAGCCCATTTC
Beclin2-F	TCAGCCGGAGACTCAAGGT
Beclin2-R	CACAGCGGGTGATCCACATC
HIF1a-F	ACCTTCATCGGAACTCCAAAG
HIF1a-R	ACTGTTAGGCTCAGGTGAACT
CateninB-F	ATGGAGCCGGACAGAAAAGC
CateninB-R	CTTGCCACTCAGGGAAGGA
GSK3b-F	TGGCAGCAAGGTAACCACAG
GSK3b-R	CGGTTCTTAAAATCGCTTGCCTG
TCF-F	CGCACCAGCAGTACAGATGAG
TCF-R	CAGCTTGGTCTGCGCCTTA
WNT7a-F	TCAGTTTCAGTTCCGAAATGGC
WNT7a-R	CCCGACTCCCCACTTTGAG
WNT10a-F	GCTCAACGCCAACACAGTG
WNT10a-R	CGAAAACCTCGGCTGAAGATG
WNT2-F	CTCGGTGGAATCTGGCTCTG
WNT2-R	CACATTGTCACACATCACCT
ACTB-F	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
ACTB-R	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

3.7.Gen expresyonları için realatif Kantitasyonun hesaplanması:

Her bir gen bölgesi için mesajcı RNA (haberci, mRNA) ekspresyonu miktarlarının belirlenmesinde, Aktin *Beta* (ACTB) referans geni ekspresyonu referans olarak kullanıldı. Mesajcı RNA ekspresyonunun kantitasyonları için ACTB transkripti referans olarak kullanılıp kontrol grubuna göre normalize edildi. Realatif kantifikasyon hesaplanmasında “Delta delta Ct Yöntemi ($\Delta\Delta Ct$)” kullanıldı. $\Delta\Delta Ct$ yönteminin hesaplaması aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

1. Hem hedef grupta (ilaç uygulanan gruplar) hem de referans grupta (kontrol grubu) her bir örneğin hem hedef mRNA (araştırılan genler) hem de referans mRNA (house keeping gen; ACTB) için Real Time PCR sonucunda Ct değerleri elde edildi. Her bir örnek 3 tekrarlı olarak yapıldığından her bir örnek için her bir gen bölgesine ilişkin 3 farklı Ct değeri bulundu. Teknik tekrarlı çalışmalarda Ct değerlerinin ortalaması alınarak hesaplama devam edildi. (Her bir örnek için Ortalama: mean Ct hesaplanmış oldu).
2. Hedef grupta hedef mRNA Ct değerinden, referans RNA Ct değeri çıkarılarak hedef grup ΔCt değerleri elde edildi.
3. Referans grupta hedef mRNA Ct değerinden referans mRNA Ct değeri çıkarılarak referans grup ΔCt değerleri elde edildi.
4. Hedef grup ΔCt değerlerinden referans grup ΔCt değerleri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değerleri elde edildi.
5. $\Delta\Delta Ct$ değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ şeklinde işleme alınarak, ekspresyon seviyesinin kat değişimi (Fold Change) hesaplanması yapıldı.
6. Fold change değerinin 1’in üzerinde çıkması durumunda hedef grubu mRNA ekspresyonunun, referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak artış gösterdiği şeklinde yorumlanmaktadır. Fold change değerinin 1’in altında çıkması durumunda ise hedef grubu mRNA ekspresyonunun, referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak azalış gösterdiği şeklinde yorumlanmaktadır.

3.8.İstatistiksel Hesaplamalar:

Gen ekspresyon sonuçlarından elde edilen fold change değerlerine göre istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Kontrol grubu ve deney grubu arasında her bir gen ifadenme katsayısı arasında istatistiksel anlamlı farklılıkların olup olmadığı GraphPad-Prism programı ile değerlendirildi. Grupların normalite özellikleri, Shapiro-Wilk testi ve Kolmogorov-Smirnov

testleri ile değerlendirildiğinde non parametrik test varsayımlarını yerine getirdiği belirlendiği için, gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney istatistiksel analiz testi ile yapıldı. P değerinin $<0,05$ olması anlamlı kabul edildi. Gen ifadelenme katsayıları arasında anlamlı farklılık bulunan gruplar *işareti ile işaretlendi. Farklılıkları en iyi ifade edebilmek için veriler GraphPad-Prism programında grafiklere dnüştürölerek sunuldu.



4.BULGULAR

Bir ay süresince günde 12 sa Wi-Fi elektromagnetik alanına maruz bırakılan farelerde, tiroid dokularında otofaji ve oksidatif stresle ilgili olduğu belirlenmiş farklı genlerin ifadenme değerlerinin karşılaştırılmasını amaçlayan bu çalışma kapsamında deney grubunda (n:10) ve kontrol grubunda (n:10) toplamda 20 adet fare örneği kullanılmıştır. Deney grubunda ve kontrol grubunda bulunan fareler eşit şekilde ve eşit özellikte olacak şekilde gruplara yerleştirilmiş olup, beslenme, barınma vb. gibi özelliklerinde eşit koşulların sağlanmasına dikkat edilmiştir. Fareler standart boyda ve ağırlıkta olmasına dikkat edilmiştir. Deney grubunda Wi-Fi maruziyeti yapılmasıyla birlikte, gruplar arasında farelerin tiroid dokularında 12 farklı genin ifadenme (ekspresyon) miktarları üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Çalışmada araştırılan genlerin hepsinde, Wi-Fi elektromanyetik alana maruz bırakılan deney grubu bireylerinde gen ifadenme derecelerinde önemli artışlar olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Her bir gen bölgesi için deney grubu ve kontrol grubunun gen ifadenme farklılıkları aşağıda ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

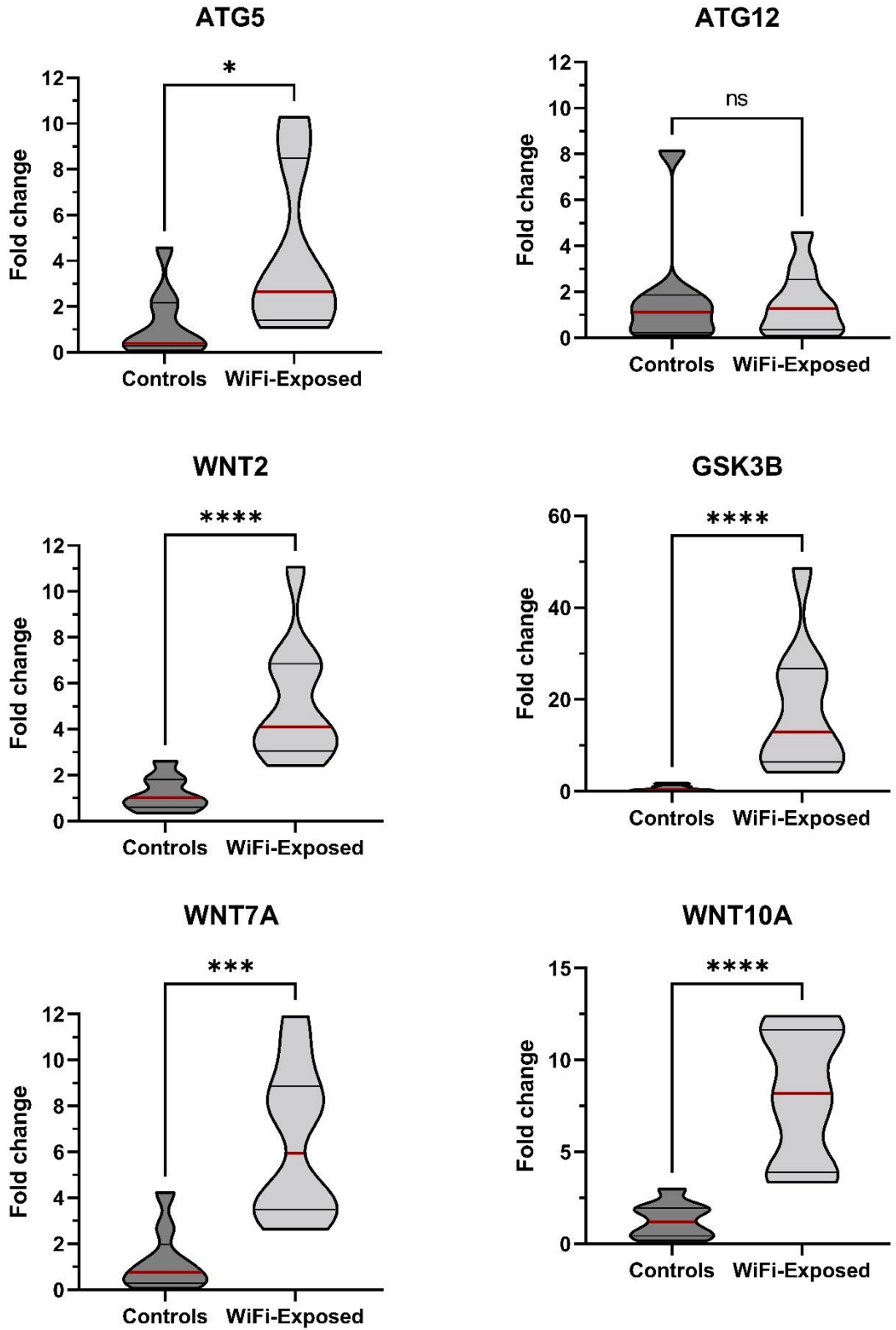
Çalışma gruplarının *otofaji ile ilişkili gen (autophagy related 5, ATG5)* gen ifadenme katsayıları karşılaştırıldığında genel olarak aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Wi-Fi EMF uygulaması yapılan ratlardan oluşan deney grubunun gen ifadenme katsayılarının 2.648 ± 0.315 değeri ile, kontrol grubunun 0.393 ± 0.112 değerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). ATG5 geni ifadenme katsayısı bakımından gruplar arası bireylerde büyük farklılıklar gözlenmekle birlikte grup ortalamalarına bakılırsa, deney grubunun kontrol grubuna göre 6 kattan daha fazla oranda ifadenme gösterdiği ve her iki grup arasındaki ATG5 geni ifadenme farkının 2.256 değerinde olduğu görülmektedir (Şekil 4).

Şekil 4' te deney ve kontrol gruplarının *otofaji ile ilişkili gen (autophagy related 12 , ATG12)* gen ifadenme katsayıları gösterilmiştir. Bu gen bölgesinin ifadenme düzeyi bakımından gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir ($p>0,05$). Deney grubunun ATG12 gen ifadenme katsayısının ortalaması 1.279 ± 0.441 bulunmuş olup, kontrol gurubunun gen ifade katsayısı olan 1.124 ± 0.347 değerine yakın olduğu görülmektedir. Ayrıca *otofaji ile ilişkili gen 12 (ATG 12)* için ekspresyon seviyesinin diğer genlerin ifadenme katsayılarına göre oldukça düşük olduğu bulunmuştur ($p>0,05$, Şekil 4).

Deney grubunun, *glikojen sentaz kinaz 3 beta (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3B)* gen ifadenme katsayısı 12.98 ± 1.639 , kontrol grubunun ifadenme katsayısı ise 0.362 ± 0.059

olarak bulunmuştur. Tiroid dokusunda ekspresyonu incelenen *GSK3B* geni bakımından gruplar arasında genel olarak istatistiksel seviyede anlamlı fark görülmektedir ($p<0.05$). Tiroid dokusunda Wi-Fi maruziyeti sonrasında *GSK3B* geninde ekspresyon derecesinin, Wi-Fi uygulaması yapılmayan kontrol grubuna göre yaklaşık 35 kattan daha fazla artış gösterdiği ve gruplar arasındaki farkın 12.62 değerinde olduğu görülmektedir (Şekil 4).



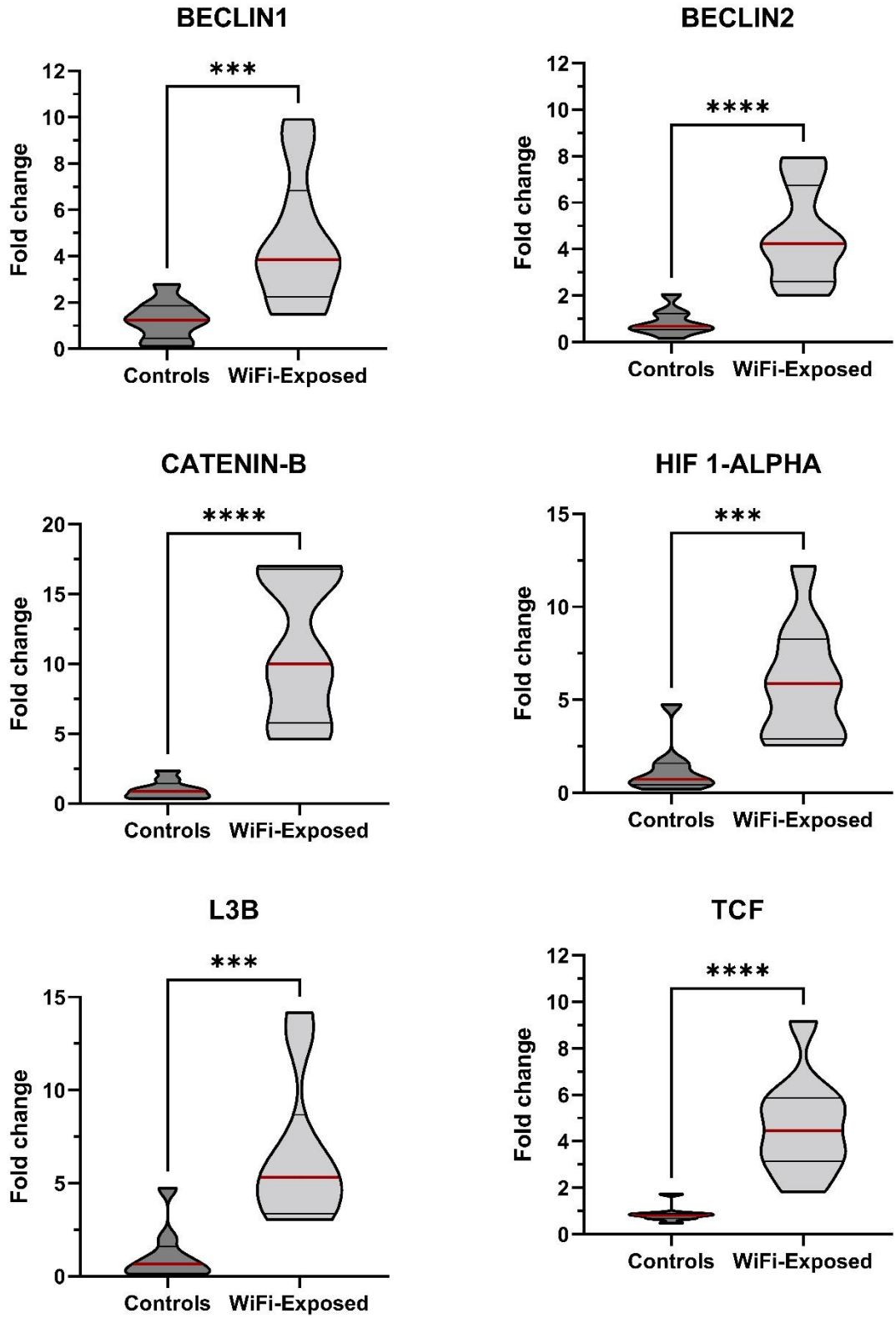


Şekil 2. Deney ve kontrol grupları arasındaki *ATG5*, *ATG12*, *WNT2*, *WNT7*, *WNT10* ve *GSK3B* genlerinin ifadenme sonuçları.

Kanatsız tip-MMTV entegrasyon sitesi ailesi üyesi 2 (wingless- type MMTV integration site family member 2, WNT2) geni ifadenme katsayıları deney grubu ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel önemli fark görülmüştür ($p<0.05$). Deney grubunun *WNT2* geni ekspresyon değeri 4.100 ± 1.124 olarak bulunurken; kontrol grubunun *WNT2* geni ifadenme derecesi 1.026 ± 0.737 olarak tespit edilmiştir. ($p<0.05$). Her iki grup arasındaki median değerleri farkının 3.074 olduğu ve yaklaşık 4 katlık bir fazla ekspresyon olduğu görülmektedir (Şekil 4).

Bu tez çalışması kapsamında incelenen grupların, tiroid dokusundaki *kanatsız tip-MMTV entegrasyon sitesi ailesi üyesi 10 alfa (wingless- type MMTV integration site family member 10 alpha, WNT10a)* gen ifadenme katsayıları incelendiğinde, gruplar arasında *WNT10a* gen ifadenme katsayıları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Deney grubu örneklerinde tiroid dokusundaki *WNT10a* gen ifadenme katsayısının 8.195 ± 1.995 olduğu ve kontrol grubunun tiroid dokusundan elde edilen *WNT10A* gen ifadenme katsayısının ise 1.199 ± 0.538 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4). Deney ve kontrol gruplarının *WNT10a* gen ifadenme katsayıları arasındaki farkın 6.995 değerinde olduğu görülürken, deney grubunun, kontrol grubuna göre 6 kattan daha fazla olacak şekilde ciddi bir ifadenme farkı gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4).

Örneklemlerimizin tiroid dokularındaki, *kanatsız tip-MMTV entegrasyon sitesi ailesi üyesi 7 alfa (wingless- type MMTV integration site family member 7 alpha, WNT7a)* gen ifadenme katsayıları incelendiğinde, gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Deney grubu dokularından elde edilen *WNT7a* gen ifadenme katsayısının 5.945 ± 1.389 olduğu ve kontrol grubu tiroid dokularından elde edilen *WNT7A* gen ifadenme katsayısının ise 0.765 ± 0.138 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4). Deney grubunun *WNT7a* gen ifadenme katsayısının, kontrol grubuna göre 5.180 değerinde farklı olduğu görülürken, deney grubunun, kontrol grubuna göre 7 kattan daha fazla olacak şekilde ciddi bir ifadenme farkı gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$; Şekil 4).



Şekil 3. Deney ve kontrol grupları arasındaki *Beclin1-2*, *Catenin B*, *TCF*, *HIF1A* ve *LC3B* genlerinin ifadenme sonuçları.

Şekil 5' te deney ve kontrol gruplarının tiroid dokularındaki *Beclin 1* geni ifadenme katsayıları arasındaki ilişki gösterilmiş olup, deney grubundaki *Beclin 1* geni ifadenme düzeyinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). Deney grubundaki ratlarda tiroid dokularındaki *Beclin 1* geni ifadenme katsayısının 3.855 ± 0.7344 olduğu görülürken, kontrol grubundaki ratların tiroid dokularında *Beclin 1* geni için belirlenen ifadenme katsayısının 1.245 ± 0.256 olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Deney grubu ve kontrol grubu arasındaki gen ifadenme farkının 2.610 değerinde olduğu ve aralarında 3 kattan daha fazla olacak şekilde bir ifadenme farklılığının bulunduğu görülmektedir (Şekil 5).

Bu araştırma kapsamında incelenen gruplar arasında tiroid dokularında *Beclin 2* geni ifadenme düzeyi bakımından bulunan farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$) (Şekil 5). Deney grubuna ait ratların tiroid dokularındaki *Beclin 2* geni ekspresyon katsayısı 4.244 ± 0.956 olarak ve kontrol grubu ratlarından elde edilen *Beclin 2* gen ekspresyon katsayısı ise 0.686 ± 0.122 olarak bulunmuştur ($p<0,05$). *Beclin 2* geni ifadenme katsayısı bakımından gruplar arası bireylerde büyük farklılıklar gözlenmekle birlikte grup ortalamalarına bakılırsa, deney grubunun kontrol grubuna göre 6 kattan daha fazla oranda ifadenme gösterdiği ve her iki grup arasındaki *ATG5* geni ifadenme farkının 3.559 değerinde olduğu görülmektedir (Şekil 5).

Tiroid dokularındaki *beta katenin* (β -*catenin*, *catenin B*) geni ifadenme katsayıları kontrol grubu ve Wi-Fi uygulaması yapılan deney grubu ratlarında karşılaştırıldığı zaman, gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli ve anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$, Şekil 5). Wi-Fi maruziyetine uğratılan ratların bulunduğu deney grubu bireylerinin tiroid dokularındaki *catenin B* geni ifadenme katsayısının 9.995 ± 1.359 olduğu ve Wi-Fi elektromagnetik dalgalarından korunmuş kafes ortamında yetiştirilen kontrol grubu ratlarının *catenin beta* gen ifadenme katsayılarının ise 0.856 ± 0.213 olduğu görülmüştür. *Beta katenin* geni ifadenme katsayısı bakımından gruplar arası bireylerde büyük farklılıklar gözlenmekle birlikte grup ortalamalarına bakılırsa, deney grubunun kontrol grubuna göre 11 kattan daha fazla oranda ifadenme gösterdiği ve her iki grup arasındaki *beta katenin* geni ifadenme farkının 9.137 değerinde olduğu görülmektedir (Şekil 5).

İnce zincir 3 beta (*light chain 3 beta*, *LC3BII*) geni ifadenme katsayıları bakımından kontrol grubu ve deney grubuna ait ratların tiroid dokuları karşılaştırıldığı zaman, gruplar arasında önemli bir istatistiksel farkın bulunduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 5). Wi-Fi maruziyeti oluşturulan deney grubuna ait ratların tiroid dokularında genel olarak *LC3BII* geninin ekspresyonunun arttığı ve deney grubunun ifadenme katsayısının 5.321 ± 1.058

olduğu görülmektedir. Kontrol grubunun *LC3BII* geni ekspresyon miktarının ise 0.662 ± 0.039 olduğu görülmektedir. Kontrol grubu ve deney grubu *LC3BII* geninin ifadenme verileri arasında 4.660 değerinde bir farkın bulunduğu ve gen ekspresyonları bakımından deney grubunun, kontrol grubuna göre 8 kattan daha fazla bir artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5).

Bu çalışma kapsamında Wi-Fi EMF uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında tiroid dokusunda ifadenme miktarlarını araştırdığımız diğer bir gen olan *Transkripsiyon faktör (transcription factor, TCF)* geni ifadenme katsayıları karşılaştırıldığında, kontrol grubu ve deney grubu arasındaki ekspresyon miktarlarının istatistiksel önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 5). Wi-Fi maruziyeti sonucunda tiroid dokularındaki *TCF* gen ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla arttığı ve grubun ortalama ekspresyon seviyesinin 4.467 ± 1.012 olduğu görülmüştür. Diğer taraftan WI-FI EMF maruziyetinden korunan kafes ortamlarında yetiştirilen ratlardaki *TCF* gen ekspresyonunun ise 0.827 ± 0.167 olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ve deney grubu *TCF* geninin ifadenme verileri arasında 3.640 değerinde bir farkın bulunduğu ve gen ekspresyonları bakımından deney grubunun, kontrol grubuna göre 5 kattan daha fazla bir artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$; Şekil 5).

Gruplar arasındaki *hipoksi uyarılabılır faktör (hypoxia inducible factor I alpha, HIF1a)* geni ifadenme katsayıları karşılaştırıldığında ise gruplararası istatistiksel olarak önemli ve anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$; Şekil 5). Deney grubunda bulunan ratların tiroid dokularındaki *HIF1a* gen ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla arttığı ve grubun ortalama ekspresyon seviyesinin 5.868 ± 1.218 olduğu görülmüştür. Diğer taraftan kontrol grubuna ait ratlardaki *HIF1a* gen ekspresyonunun ise 0.735 ± 0.215 olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ve deney grubu arasında *HIF1a* geninin ifadenmesi bakımından 5.133 değerinde bir farkın bulunduğu ve gen ekspresyonları bakımından deney grubunun, kontrol grubuna göre 8 kata yakın bir artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$; Şekil 5).

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

İçinde bulunduğumuz çağda internet, mobil bilgisayarlar ve akıllı telefonlar, yeni enerji teknolojileri gibi pek çok alanda teknolojik atılımlar gerçekleşmektedir. Bütün bu teknolojik atılımlar insan yaşantısını büyük çoğunlukla kolaylaştırmak, kısa zamanda büyük işler yapabilmeyi sağlamak üzere tasarlanmaktadır. Ancak hızla değişen teknolojiler küresel ekonomiyi ve insan yaşamını, olumlu veya olumsuz yönde değiştirmiştir. Bununla birlikte, insan hastalıklarına yönelik tedaviler, diğer alanlardaki ilerlemelere ayak uyduramamıştır. Belki de teknoloji baş döndürücü hızla gelişirken, bütün bu teknolojinin canlılık üzerinde ne tür etkiler yaratabileceği göz ardı edilmektedir, ya da yeterince araştırılmamaktadır.

İletişim alt yapılarının geliştirilmesi konusunda elektromanyetik dalgalardan fazlaca yararlanılması son yılların en önemli gelişmelerinden birisidir. Kablosuz internet altyapıları kullanım kolaylıkları nedeniyle çok daha fazla tercih edilir olmuştur. Cep telefonu, televizyon, mikro dalga vb gibi çeşitli teknolojik araçların canlılar üzerindeki etkileri çeşitli çalışmalarda incelenmesine rağmen, wireless kaynaklı elektromanyetik dalgaların ve wireless alt yapılarının canlılara etkileri üzerinde yapılan çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların bir kısmında Elektromanyetik dalgaların canlılardaki etkilerinin önemli olduğu belirtilirken (1,2,46), bir kısmında ise önemli etkiler tespit edilemediği belirtilmektedir (22,23). Doku ve hücre sistemleri ile yapılan çalışmalarda düşük şiddette EM alanlara maruz kalmanın; biyomoleküllerin (DNA, RNA ve protein) sentezi, hücre bölünmesi, kanser oluşumu, hücre yüzeyine ait özelliklerine, membrandan kalsiyum giriş-çıkışı ve bağlanması üzerine etkili olduğu gözlenmiştir (3-5). Epidemiyolojik çalışmalardan bazıları, RF-EMF'ye uzun süre maruz kalmanın belirli kanser türlerindeki ve diğer hastalıklar üzerinde artış oluşturduğunu göstermektedir (46, 48, 49). Öte yandan, diğer bazı çalışmalar bu tür iddiaları desteklememektedir (50, 51). Bununla birlikte, konu üzerindeki endişeler her geçen gün belirgin hale gelmektedir. Bazı araştırmalarda, RF-EMF maruziyetinin olası epigenetik etkileri ile birlikte ısı şoku proteini (HSP) ailesi, ornitin dekarboksilaz (ODC), p38 mitojenle aktive protein kinaz (MAPK), c-jun, c-myc, p21, bax, GADD45 ve Nurr1 genleri ve bunların ifade ettiği proteinlerinin radyofrekans dalgalarına karşı duyarlı olabildiklerini göstermiştir (52, 53, 54).

Biz bu çalışmada insanların kendi kullandıkları teknolojik aletlerinin ürettiği wireless dalgalarına maruziyeti veya etrafında başka insanların kullandığı teknolojik eşyaların ürettiği wireless EM alanlarına topluca maruziyetleri sonucunda, maruz kalınan 3G, 4G veya 5G enerjisindeki elektromanyetik alanların canlıların tiroid dokusunda çeşitli genlerin ifadenmesinde farklılıklara neden olup olmadığını değerlendirmeyi hedefledik. Bu çalışmada

ekspresyon profillerini araştırdığımız genler, genel olarak embriyogenez, doku yenilenmesi, hücre çoğalması ve otofaji gibi yaşamın temel olaylarında önemli görevi olan WNT/beta-katenin yolağı üzerindeki genlerden seçilmiştir. Ayrıca oksidatif hasar durumunda canlılığın sürdürülmesi ve hasarın en aza indirgenmesi hususunda görevleri olduğu düşünölen genler tercih edilmiştir. WNT / β -katenin yolu, embriyonik gelişimde, dokunun kendini yenilemesinde ve çeşitli hastalıklarda önemli rollere sahiptir (24,25). Literatüre bakıldığında WNT sinyal iletiminin programlanmış hücre ölümünü birçok farklı yollardan regöle ettiğini göstermiştir.

Genel olarak bu çalışma kapsamında Wi-Fi elektromagnetik alan dalga boylarının 1 ay boyunca ve uzun süreli ratlara uygulanması sonucunda, tiroid dokusunda 12 farklı genin ekspresyon profillerinin ortaya konulmasına çalışılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre çoğunlukla araştırılan bu 12 genin ifadelenme katsayılarının Wi-Fi maruziyetiyle birlikte arttığı, deney grubu gen ekspresyon sonuçlarının kontrol grubu sonuçlarına göre, çalışmamızdaki ATG12 dışındaki hemen hemen diğör tüm genler için yükseldiğı gözlemlenmiştir (Şekil 4 ve şekil 5). ATG5 geninde de deney grubunda gen ekspresyonunun arttığı görölmekle beraber, grup içlerindeki ATG5 geni ekspresyon değörlerinin bireysel olarak dalgalanma göstermesi ve verilerin homojen olmaması nedeniyle, gruplar arasında 6 kat gibi büyük bir farkının bulunmasına rağmen istatistiksel olarak farkın $p \leq 0.05^*$ düzeyinde olduğunu göz önünde bulundurmak gereklidir. Diğör genlere bakıldığında deney grubu ve kontrol grubu arasında benzer oranda ekspresyon katsayılarının olduğu görölsede, istatistiksel olarak anlamlılık değörleri çok daha dikkat çekicidir ($p < 0.01^{**}$ ve $p < 0.001^{***}$ vb. gibi) (Şekil 4-5).

Yine bu tez kapsamında araştırdığımız genler literatüre göre canlı sistemlerde oksidatif stresin göstergesi olabilen veya oksidatif stres durumunda hücre homeostasisini sağlamak üzere ekspresyon farklılıkları gösterdiğı bilinen genler arasından en çok yaygın olan genlerden seçilmiştir. Ayrıca çalışmada araştırılan bu genlerin hücrelerde otofaji mekanizmalarıyla yakından ilgili olduğu bilinmektedir. Otofaji işleminin en önemli yararı hücresel düzeyde yaşlanma etkilerine karşı çalışmasından kaynaklanmaktadır. Hücresel düzeyde stres arttıkça vücudu korumak için otofaji de artmaktadır. Böylece hücrelerde üretilmiş toksik olabilecek metabolitler temizlenmiş olur. Bununla birlikte, disfonksiyona uğramış hücrelerin belirli bir kısmını yeniden oluşturarak hücrelerin yaşam sürelerini uzatmış olur.

Daha önce yapılan farklı çalışmalarda WNT/ β katenin yolağının meme, prostat, renal, servikal gibi pek çok kanser türlerinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda RF-EMF'nin tiroid dokularında farklı yollardan kanserojen etkileri olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (44). Biz bu yaptığımız çalışmada WNT sinyal yolağındaki genleri detaylıca tespit

ederek RF-EMF'ye maruz kalan ratlardaki tiroid hücrelerinde bu yolaktaki gen ekspresyonlarında anlamlı artışlar tespit edip edemeyeceğimizi araştırdık. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının önemi kanser kök hücrelerin “self renewal” ve farklılaşma özelliklerinin düzenlemesidir. Bu yolağın upregülasyonu çeşitli kanserler ile ilişkilendirilmiş ve böylelikle bu yolağın elemanları anti-kanser terapötikler için iyi birer hedef olarak kullanılmaya başlanmıştır. Son 5 yılda Wnt sinyal yolağının değişik basamaklarını hedef alan ajanlar (Wnt salgılanması, sinyal transdüksiyonu ya da β -katenin transkripsiyonel aktivitesi) geliştirilmiş ve bu ajanlar klinik çalışmalara yavaş yavaş girmeye başlamıştır. Wnt/ β -katenin yolağı ile ilişkili hastalıklar için etkili tedavi yolları bulabilmek amacıyla bu yolağın kendisi ve diğer yolaklarla ilişki halinde bulunan mikroçevreyi kapsayan ağ üzerinde çalışmalar halen devam etmektedir. Gelecekteki çalışmalar Wnt sinyal yolağının yeni hedef genlerinin keşfine ihtiyaç duymaktadır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre wireless elektromagnetik alan uygulamasının WNT/beta katenin yolağı ile ilişkili incelediğimiz bazı genlerin ifadenme katsayılarında değişiklik yapabildiğini göstermiştir. Ancak gen üzerindeki bu etkilerin hücre düzeyinde oluşturduğu etkilerin belirlenebilmesi için protein, enzim gibi diğer moleküllerle de yapılacak araştırmalara ihtiyaç vardır. Çünkü WNT yolağı incelendiğinde genel olarak WNT sinyal yolağının embriyonik kök hücreler üzerine olan etkileri konusunda birbirine zıt bulguların olduğunu görmekteyiz. Bazı çalışmalar WNT sinyal yolağının embriyonik kök hücrelerde pluripotensi ve kendini yenileme özellikleri için gerekli olduğunu göstermektedir. Ancak diğer bazı çalışmalar ise aksine WNT sinyal yolağının bu hücrelerde farklılaşmayı uyardığı ve farklılaşmanın engellenmesi için WNT inhibisyonunun gerektiğini savunmaktadır (47). Aslında bu durum sinyal yolağının moleküler mekanizmasının karmaşıklığı ve diğer mekanizmalarla olan etkileşimleri nedeniyle gözlenen doğal bir sonuçtur. Çünkü embriyonik gelişim esnasında farklı basamaklarda farklı WNT ligandları, reseptörleri, aktivatörleri veya antagonistleri eksprese edilmektedir ve bunlara bağlı olarak farklı etkiler gözlenmektedir (26). Bunun haricinde bir gen ifadenmesiyle birlikte başlayan değişikliklerin, hücre tarafından değerlendirilmesi sırasında, canlının bulunduğu mikroçevreye ve mikroçevrenin sağladığı diğer sinyallerin etkisine bağlı olarak da değişebildiğini unutmamak gerekmektedir. Yine de çalışmamızın sonuçlarının, insanlarda klinik uygulamaya sokulabilecek yeni tedavilerin ve yeni tedbirlerin geliştirilmesinin önünü açacak nitelikte olduğu ve farkındalık oluşturacak nitelikte veriler sağlaması nedeniyle önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

1. A. Maes, L. Verschaeve, A. Arroyo, W.C. De, L. Vercruyssen, In vitro cytogenetic effects of 2450 MHz waves on human peripheral blood lymphocytes, Bioelectromagnetics 1993 ;14 : 495–501.
2. G. d'Ambrosio, M. Lioi, M. Scarfi, O. Zeni, genotoxic effects of amplitude-modulated microwaves on human lymphocytes exposed in vitro under controlled conditions, Electro-Magnetobiol. 1995 ; 14 : 157–164.
3. K.S. Bisht, E.G. Moros, W.L. Straube, J.D. Baty, J.L. Roti Roti, The effect of 835.62 MHz FDMA or 847.74 MHz CDMA modulated radiofrequency radiation on the induction of micronuclei in C3H 10T(1/2) cells, Radiat. Res. 2002 ; 157 : 506–15.
4. Karadağ T., Özdemir T, Abbasov T . Bir üniversite yerleşkesinde uzun süreli elektromanyetik alan ölçümleri ve kirlilik haritaları. Pamukkale Univ Muh Bilim Derg, 2014 ; 20(8) : 314-8.
5. Hardell L, Sage C. Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards. Biomed Pharmacother. 2008 ;62(2):104-9.
6. Abdus-salam A, Elumelu T, Adenipekun A. Mobile phone radiation and the risk of cancer; a review. Afr J Med Med Sci. 2008 ;37(2):107-18.
7. Schwartz Principles of surgery 10th edition Mc Graw Hill
8. Yılmaz H. (2007) Kablosuz Yerel Alan Ağlarından Kaynaklanan Elektromanyetik Alanın İşitme Üzerine Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kulak-Burun-Boğaz Kliniği, Uzmanlık Tezi
9. Magiera A, Solecka J. Radiofrequency electromagnetic radiation from Wi-fi and its effects on human health, in particular children and adolescents. Review. Rocz Panstw Zakl Hig. 2020;71(3):251-259
10. Foster KR, Moulder JE. Wi-Fi and health: review of current status of research. Health Phys. 2013 Dec;105(6):561-75.

11. Malaguarnera R, Vella V, Vigneri R, Frasca F. p53 family proteins in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Mar;14(1):43-60.
12. Zhu X, Yao J, Tian W. Microarray technology to investigate genes associated with papillary thyroid carcinoma. *Mol Med Rep*. 2015;11:3729-33
- 13 . LiVolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: An update. *Mod Pathol*. 2011;24(Suppl 2):S1-9
14. Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J. WHO classification of tumours of endocrine organs (IARC WHO classification of tumours). 4th ed. Lyon: IARC Press, 2017
15. Genpeng L, Jianyong L, Jiaying Y, Ke J, Zhihui L, Rixiang G, Lihan Z, Jingqiang Z. Independent predictors and lymph node metastasis characteristics of multifocal papillary thyroid cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Feb;97(5):e9619.
16. Efanov AA, Brenner AV, Bogdanova TI, Kelly LM, Liu P, Little MP, et al. Investigation of the relationship between radiation dose and gene mutations and fusions in post-Chernobyl thyroid cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2018; 110:371–378.
17. Nikiforov, Y., Nikiforova, M. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 7, 569–580 (2011)
18. Frank Weber, Rosemary E. Teresi, Christoph E. Broelsch, Andrea Frilling, Charis Eng, A Limited Set of Human MicroRNA Is Deregulated in Follicular Thyroid Carcinoma, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 91, Issue 9, 1 September 2006, Pages 3584–3591
19. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26:1-133.
20. Thomas CM, Asa SL, Ezzat S, Sawka AM, Goldstein D. Diagnosis and pathologic characteristics of medullary thyroid carcinoma-review of current guidelines. *Curr Oncol*. 2019;26(5):338-344. doi:10.3747/co.26.5539

21. mallridge RC, Ain KB, Asa SL, Bible KC, Brierley JD, Burman KD, Kebebew E, Lee NY, Nikiforov YE, Rosenthal MS, Shah MH, Shaha AR, Tuttle RM; American Thyroid Association Anaplastic Thyroid Cancer Guidelines Taskforce. American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer. *Thyroid*. 2012 Nov;22(11):1104-39

22. V. Garaj-Vrhovac, S. Vojvodic, A. Fue`ie` , D. Kubelka, Effects of 415 MHz frequency on human lymphocyte genome, in: IRPA9 Congress, Proceedings of IRPA9 Congress 3, IRPA, Vienna, 1996, pp. 604--606.

23. Vijayalaxmi, B.Z. Leal, M.L. Meltz, W.F. Pickard, K.S. Bisht, J.L. Roti Roti, W.L. Straube, E.G. Moros, Cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed in vitro to radiofrequency radiation at a cellular telephone frequency (835.62 MHz, FDMA), *Radiat. Res.* 2001; 155 : 113--121.

24. Wend P, Holland JD, Ziebold U, Birchmeier W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21:855–863. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.09.004. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

25. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:387–398. doi: 10.1038/nrc2389. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

26. Dravid G, Ye Z, Hammond H et al., Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005;23(10):1489-1501.

27. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107–120 (2012).

28. Amy E. Majeski, J. Fred Dice, Mechanisms of chaperone-mediated autophagy, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 36, Issue 12, 2004, Pages 2435-2444

29. Eszter S. Hars, Haiyan Qi, Shengkan V. Jin, Li Cai, Chengcheng Hu & Leroy F. Liu (2007) Autophagy Regulates Ageing in *C. elegans*, *Autophagy*, 3:2, 93-95
30. Gábor Juhász, Jahda H. Hill, Ying Yan, Miklós Sass, Eric H. Baehrecke, Jonathan M. Backer, Thomas P. Neufeld; The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila* . *J Cell Biol* 19 May 2008; 181 (4): 655–666
31. Ozpolat B, Benbrook DM. Targeting autophagy in cancer management - strategies and developments. *Cancer Manag Res.* 2015;7:291-299. Published 2015 Sep 11.
doi:10.2147/CMAR.S34859
32. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2000), LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19: 5720-5728
33. Shuhei Nakamura, Tamotsu Yoshimori; New insights into autophagosome–lysosome fusion. *J Cell Sci* 1 April 2017; 130 (7): 1209–1216.
34. Nusse, R., Varmus, H.E. 1992. Wnt genes. *Cell*. 69(7) ;1073-87.
35. Duchartrea, Y., KimaY., Kahn M., 2016. The Wnt signaling pathway in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 99, 141–149.
36. Huelsken, J., Beh, Rens, J. 2002. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 115(21);3977-8.
37. Kolligs F, T, Bommer G, Göke B: Wnt/Beta-Catenin/Tcf Signaling: A Critical Pathway in Gastrointestinal Tumorigenesis. *Digestion* 2002;66:131-144.
38. Williams, J.L., et al., 2001. Nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) alter the kinetics of human colon cancer cell lines more effectively than traditional NSAIDs: implications for colon cancer chemoprevention. *Cancer Res.* 61, 3285–3289.
39. Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett.* 2005 May 10;222(1):1-10

40. Yoshioka S, King ML, Ran S, Okuda H, MacLean JA 2nd, McAsey ME, Sugino N, Brard L, Watabe K, Hayashi K. WNT7A regulates tumor growth and progression in ovarian cancer through the WNT/ β -catenin pathway. *Mol Cancer Res*. 2012 Mar;10(3):469-82
41. Kirikoshi H, Inoue S, Sekihara H, Katoh M. Expression of WNT10A in human cancer. *Int J Oncol*. 2001 Nov;19(5):997-1001.
42. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Sep;5(5):378-89
43. Guo C, Liu S, Wang J, Sun MZ, Greenaway FT. ACTB in cancer. *Clin Chim Acta*. 2013 Feb 18;417:39-44.
44. Veronica Silva, Ohad Hilly, Yulia Strenov, Cochava Tzabari, Yirmi Hauptman & Raphael Feinmesser (2016) Effect of cell phone-like electromagnetic radiation on primary human thyroid cells, *International Journal of Radiation Biology*, 92:2, 107-115
45. Di Bartolomeo, S., Nazio, F. and Cecconi, F. (2010), The Role of Autophagy During Development in Higher Eukaryotes. *Traffic*, 11: 1280-1289
46. Durna Dastan S., Soylu, S., Pence, H.H., Uyanik, B., Duman, M., Kurt, A., Dastan, T., Zilan, A., Turan, M., 2018. Hazardous Genomic Bioeffects of Home Wi-Fi Systems. *NeuroQuantology* , 16,11: 12-19.
47. Sokol S. Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development* (Cambridge, England), 2011;138(20):4341-4350.
48. Abdel-Rassoul G, El-Fateh OA, Salem MA, Michael A, Farahat F, El-Batanouny M, Salem E. Neurobehavioral effects among inhabitants around mobile phone base stations. *Neurotoxicology* 2007; 28(2): 434-40.
49. Hardell L, Sage C. Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2008; 62(2):104-09.

50. Kundi M, Mild KH, Hardell L, Mattsson MO. Mobile telephones and cancer—a review of epidemiological evidence. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 2004; 7(5): 351-84.
51. Ahlbom A, Green A, Kheifets L, Savitz D, Swerdlow A. Epidemiology of health effects of radiofrequency exposure. *Environmental Health Perspectives* 2004; 112(17): 1741-54.
52. Cotgreave IA. Biological stress responses to radio frequency electromagnetic radiation: are mobile phones really so (heat) shocking?. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2005; 435(1):2 27-40.
53. Czyz J, Guan K, Zeng Q, Nikolova T, Meister A, Schönborn F, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM. High frequency electromagnetic fields (GSM signals) affect gene expression levels in tumor suppressor p53-deficient embryonic stem cells. *Bioelectromagnetics* 2004; 25(4): 296-307.
54. Czyz J, Nikolova T, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM. Nonthermal effects of power-line magnetic fields (50Hz) on gene expression levels of pluripotent embryonic stem cells—the role of tumour suppressor p53. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2004; 557(1): 63-74.