



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BYF-YL-2009-0002

***TOXOPLASMA GONDII* ÜZERİNE DARBELİ VE SÜREKLİ
ELEKTROMANYETİK ALANIN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Serçin ÖZLEM

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN

İkinci Danışman
Doç. Dr. Hatice ERTABAKLAR

AYDIN-2009

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BYF-YL-2009-0002**

***TOXOPLASMA GONDII* ÜZERİNE DARBELİ VE SÜREKLİ
ELEKTROMANYETİK ALANIN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Serçin ÖZLEM

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN**

**İkinci Danışman
Doç. Dr. Hatice ERTABAKLAR**

AYDIN-2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Serçin ÖZLEM tarafından hazırlanan “*Toxoplasma Gondii* Üzerine Darbeli ve Sürekli Elektromanyetik Alanın Etkilerinin İncelenmesi ” başlıklı tez, 27.08.2009 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

<u>Unvanı, Adı ve Soyadı:</u>	<u>Üniversitesi:</u>	<u>İmzası:</u>
(Başkan) Doç. Dr. M. Dinçer BİLGİN	ADÜ, Tıp Fakültesi	
(Üye) Prof.Dr. Sema ERTUĞ	ADÜ, Tıp Fakültesi	
(Üye) Doç. Dr. Hatice ERTABAKLAR	ADÜ, Tıp Fakültesi	
(Üye) Doç. Dr. R. Onur EK	ADÜ, Tıp Fakültesi	
(Üye) Yrd. Doç. Dr. Hayrullah KÖSE	ADÜ, Tıp Fakültesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Doç. Dr. Muharrem BALKAYA
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Toxoplasma gondii (*T.gondii*) zorunlu olarak çekirdekli hücre içine yerleşen insan dahil hemen hemen tüm memelileri ve kuşları enfekte edebilen ve dünyanın her yerinde sıklıkla görülebilen bir parazittir. *T.gondii*'nin yaşam döngüsünde, birbirlerine göre önemli morfolojik farklılıkları olan takizoit, doku kisti, ookist gibi şekilleri bulunmaktadır. Geniş bir konak yelpazesi olan *T.gondii* 'nin konak hücrelerine girmesi için çeşitli reseptörlerin olduğu öne sürülmektedir. Fakat konak plazma membranında kesin bir reseptör tanımlanmamıştır. Bununla birlikte *T.gondii*'nin ekstrasellüler matriks proteini olan laminine fibroblastlar üzerindeki β_1 integrin reseptörü gibi bağlandığı bildirilmiştir.

Elektromanyetik radyasyon, hücre membranının yüzeyindeki özel bağlanma bölgelerine iyon, nörotransmitter, hormon ve antikor bağlanmasını etkilemektedir. Bu durum hücre membranı yüzey proteinlerinin elektriksel yapısını ve iyon geçişini etkileyen transmembran sinyalde değişikliğe neden olmaktadır.

Takizoitlerin yüzeyinde bulunan beş major yüzey antijeninin parazitin konak hücreye girmesinde mediatör roller üstlendikleri tahmin edilmektedir. Bu çalışma elektromanyetik alanın *T.gondii*'nin yüzey antijenlerine etkisini ve böylece *T.gondii*'nin virulansına etkinin incelendiği ilk deneysel çalışmadır.

Araştırma "*T.gondii* üzerine darbeli ve sürekli elektromanyetik alanın etkilerinin incelenmesi" isimli ve SAE-08010 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafında desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Toxoplasma Gondii</i> ile ilgili Genel Bilgiler.....	1
1.1.1. Tarihçe ve Sistematikteki Yeri.....	2
1.1.2. Morfolojisi.....	3
1.1.3. Yaşam Döngüsü.....	9
1.1.4. <i>T.gondii</i> Antijenleri.....	11
1.1.5. <i>T.gondii</i> 'nin Virulansı ve Virulansa Etki Eden Faktörler.....	13
1.1.6. Epidemiyoloji.....	15
1.1.7. Klinik.....	16
1.1.8. Tanı.....	17
1.2. Elektromanyetik Alan ile ilgili Genel Bilgi.....	18
1.3. Elektromanyetik Dalgalar.....	19
1.3.1. Elektrik Alan.....	24
1.3.2. Manyetik Alan.....	25
1.4. Elektromanyetik Alan Kaynakları.....	27
1.4.1. Selenoid.....	27
1.4.2. Helmholtz Halkaları.....	28
1.5. Elektromanyetik Alanın Olası Etki Mekanizmaları.....	29
1.6. Elektroforez.....	31
1.6.1. Elektroforez Türleri.....	34
1.7. Proteinlerin Analizi.....	34
1.7.1. Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	35

	sayfa
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
2.1. Gereç.....	37
2.2. Yöntem.....	38
2.2.1. Çalışma grupları.....	38
2.2.2. RH Suşu Takozoitlerinin Fare Peritonu İçinde Üretilmesi.....	38
2.2.3. Elektromanyetik Alan <i>In Vivo</i> Etkisinin Gözlenmesi.....	40
2.2.3.1. Sürekli Elektromanyetik Alan Uygulaması.....	40
2.2.3.2. Darbeli Elektromanyetik Alan Uygulaması.....	41
2.2.4. Elektromanyetik Alanın <i>In Vitro</i> etkisinin gözlenmesi.....	43
2.2.4.1. Elektromanyetik alan uygulaması.....	43
2.2.4.2. Farelerdeki Etkinin Gözlenmesi.....	43
2.3. Değerlendirme Yöntemi.....	44
2.3.1. Genel Değerlendirme.....	44
2.3.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	44
2.3.2.1. Gümüş Nitrat Boyama.....	51
2.3.3. İstatistik.....	54
3. BULGULAR.....	55
3.1. Genel Değerlendirme Bulguları.....	55
3.2. Elektromanyetik Alan <i>In Vivo</i> Etkisinin Değerlendirilmesi.....	56
3.3. Elektromanyetik Alan <i>In Vitro</i> Etkisinin Değerlendirilmesi.....	58
4. TARTIŞMA.....	61
5. SONUÇ.....	65
ÖZET.....	67
SUMMARY.....	69
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	80
TEŞEKKÜR.....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>T.gondii</i> :	<i>Toxoplasma gondii</i>
PKF:	Penetrasyon-kolaylaştırıcı faktör
PV :	Parazitofor vakuol
WB:	Western Blot
SDS-PAGE:	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SAG:	Yüzey antijeni
PVN:	Parazitofor vakuol ağı
DB:	Densebody
HSP:	Isı şok proteinleri
PCR:	Polimeraz zincir tepkimesi
EMA:	Elektromanyetik alan
SF:	Serum fizyolojik
ϵ_0 :	Boşluğun elektrik geçirgenliği
λ :	Dalga boyu
J_f :	Serbest hacimsel akım yoğunluğu
ρ_f :	Serbest hacimsel yük yoğunluğu
\vec{B} :	Manyetik alan vektörü
\vec{E} :	Elektrik alan vektörü
μ_0 :	Boşluğun manyetik geçirgenliği
χ_e :	Dielektrik duygunluk
χ_m :	Manyetik duygunluk
μ :	Mobilite

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1.1 Ekskretuvar/Sekretuvar antijenler	13
Çizelge 3.1 Kilo takibi <i>in vitro</i> deney grubu	55
Çizelge 3.2 Kilo takibi <i>in vivo</i> deney grubu	56
Çizelge 3.3 Deney grupları için makrofaj başına düşen <i>T.gondii</i> ortalaması	59

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.1	<i>T.gondii</i> trofozitinin elektron mikroskobunda görünümü.	4
Şekil 1.2	<i>T.gondii</i> 'nin anterior ucunun büyütülmüş şekli.	5
Şekil 1.3	<i>T.gondii</i> takizoitinin konak hücreye girişi.	6
Şekil 1.4	Endodiyogeni ile <i>T.gondii</i> takizoitlerin çoğalması.	7
Şekil 1.5	<i>T.gondii</i> bradizoitinin elektron mikroskobunda görünümü.	8
Şekil 1.6	<i>T.gondii</i> ookistleri.	9
Şekil 1.7	<i>T.gondii</i> hayat döngüsü.	10
Şekil 1.8	Selenoid.	27
Şekil 1.9	Helmholtz halkaları.	28
Şekil 1.10	Elektroforez düzeneği.	36
Şekil 2.1	Fare karın bölgesi derilerinin soyulması.	39
Şekil 2.2	Serum fizyolojik ile fare periton boşluğunun yıkanması.	39
Şekil 2.3	Helmholtz halkaları geometrisi.	40
Şekil 2.4	Helmholtz halkalarının deney düzeneği.	41
Şekil 2.5	Darbeli elektromanyetik alan deney düzeneği.	42
Şekil 2.6.a	<i>In vitro</i> deneyler için Helmholtz halkalarının deney düzeneği.	43
Şekil 2.6.b	<i>In vitro</i> deneyler için darbeli elektromanyetik alan deney düzeneği.	43
Şekil 2.7	Thoma lamında <i>T.gondii</i> 'lerin görüntüsü.	44
Şekil 2.8	Elektroforez düzeneğinde cam levhaların yerleştirilmesi.	47
Şekil 2.9	Elektroforez düzeneğinde tarağın jele yerleştirilmesi.	49
Şekil 2.10	Elektroforezde jelin çukurlarına marker, örnek tampon solüsyonu ve antijen karışımının konulması.	50
Şekil 2.11	Elektroforez düzeneğinde cam levhaların elektrot tankına koyulmadan önce gerekli aparatlara takılması.	50
Şekil 2.12	Elektroforez düzeneğinde jelin elektrot tankına koyulması.	51
Şekil 3.1	<i>In vivo</i> EMA ölçümlerinden elde edilen <i>T.gondii</i> sayı değerleri.	57

		Sayfa
Şekil 3.2	<i>In vivo</i> deney sonunda SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılan <i>T.gondii</i> protein bantlarının gümüş nitrat ile boyanmış görüntüsü.	57
Şekil 3.3	<i>In vitro</i> EMA ölçümlerinden elde edilen <i>T.gondii</i> sayı değerleri.	58
Şekil 3.4	Sürekli EMA uygulanan <i>T.gondii</i> takizoitleri.	59
Şekil 3.5	Darbeli EMA uygulanan <i>T.gondii</i> takizoitleri.	59
Şekil 3.6	Kontrol grubu <i>T.gondii</i> takizoitleri.	60
Şekil 3.7	SDS-PAGE ile ayrıştırıldıktan sonra jelde oluşan protein bantlarının gümüş nitrat ile boyanmış görüntüsü.	60

1. GİRİŞ

1.1. *Toxoplasma Gondii* ile ilgili genel bilgiler

Apicomplexa grubundaki *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) insanların da içinde bulunduğu çoğu memeliler ile kanatlılarda yerleşen zoonotik bir parazittir (Altıntaş 1997). *T.gondii* enfeksiyonuna dünyanın her yerinde rastlanmakla birlikte *T.gondii* ve Toxoplasmosis hakkındaki bilgiler 20.yüzyılda gelişmiştir (Markel ve ark 1999).

T.gondii yaşam döngüsünde, birbirlerine göre önemli morfolojik farklılıkları olan takizoit, doku kisti (bradizoit) ve ookist gibi şekilleri bulunmaktadır (Montoya ve Liensenfeld 2004). Geniş bir konak yelpazesi olan *T.gondii*'nin konak hücrelerine girmesi için çeşitli reseptörlerin olduğu varsayılmakla beraber konak plazma membranında kesin bir reseptör henüz tanımlanmamıştır (Ertuğ 1999).

T.gondii hücrelerinin içine girebilen ve burada kendini kopya ederek hücre içinde yaşamını sürdürebilen bir protozodur. *T.gondii* ile bulaşmış olan iyi pişirilmemiş yiyecekler veya hastalığın ookist formunu taşıyan kedilerle temas sonucu parazit insana geçmektedir (Gürüz ve Özcel 2007).

1.1.1. Tarihçe ve Sistematikteki Yeri

T.gondii ilk defa 1900 yılında Laveran tarafından Java serçesinin (*Padda oryivora*) dalak ve kemik iliğinde görülmüş fakat *Haemamoeba danilewskyi*'nin üreyen formu olduğu düşünülmüştür. İlk kez 1909'da Nicolle ve Manceaux tarafından Tunus'ta bir kemirgen olan *Ctenodactylus gondii*'nin dalak ve karaciğerinde saptanan parazite *T.gondii* adı verilmiştir (Ho-Yen 1992). *T.gondii*'nin cins ismi ise parazit yay şekline benzediği için Yunancada aynı anlama gelen toxon kelimesinden alınmıştır (Beaman ve ark 1995).

İnsanda ise ilk defa 1923 yılında Prag'lı bir Oftalmolog olan J. Janku tarafından hidrosefalili bir bebeğin retinasındaki yalancı kistlerde tespit edildiği bildirilmiştir ve daha sonra 1928'de *T.gondii* olarak isimlendirmiştir (Gürüz ve Özcel 2007). Wolf ve Cohen 1937'de bir yenidoğanda toxoplasmik granülomatöz ensefaliti rapor etmişlerdir. 1948'de Sabin ve Feldman, kendi adlarını taşıyan boya yöntemiyle bu parazite karşı insanlarda antikolar bulunduğunu saptamışlardır (Kuman ve Altıntaş 1996). *T.gondii* yurdumuzda ise ilk defa 1953 yılında Unat ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Unat ve ark 1991).

T.gondii'nin canlılar âlemindeki sınıflaması aşağıda belirtildiği şekilde kabul edilmektedir (Kuman ve Altıntaş 1996).

Phylum	: Protozoa
Subpylum	: Apicomplexa
Classis	: Sporozoa
Subclassis	: Coccidia
Ordo	: Eucoccidiida
Subordo	: Eimeriina
Familia	: Sarcocystidae
Genus	: Toxoplasma
Tür	: <i>gondii</i>

1.1.2. Morfolojisi

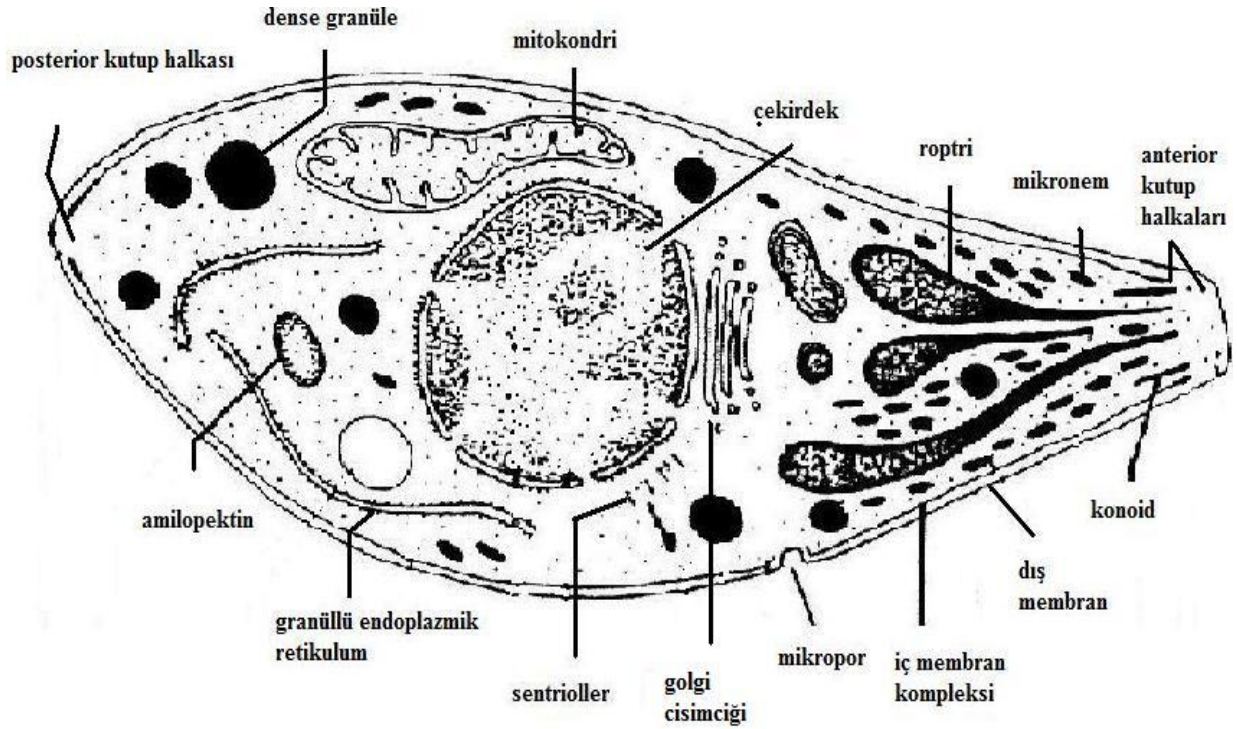
Parazitin bilinen üç morfolojik şekli bulunmaktadır.

- Takizoit (trofozit, endozit); aseksüel olarak hızlı çoğalabilen şeklidir.
- Doku kisti (bradizoit); dokulardaki enfektif olan şeklidir.
- Ookist; sadece enfekte kedi dışkısında görülen ve parazitin kedi ince bağırsaklarında seksüel döngü sonucu oluşan şeklidir. İnsanlar dahil çoğu memeliler ile kuşları enfekte edebilmektedir.

Takizoit

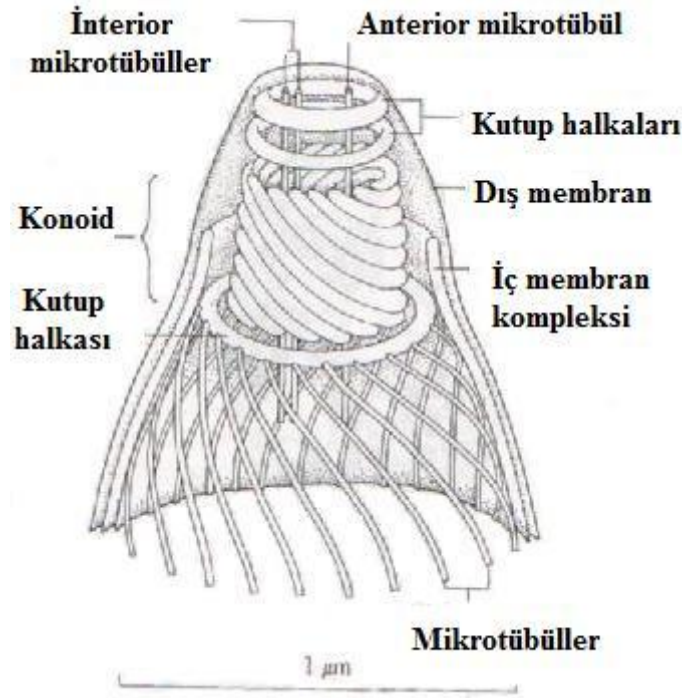
Takizoitler aseksüel siklusun hızlı çoğalan evresi olup, uzunluğu 4-6 µm ve genişliği ise 2-3 µm arasında değişen yarım ay şeklinde ön ucu hafifçe sivri, arka ucu yuvarlak yapılardır.

Sitoplazmasında mitokondri, golgi cisimciği, endoplasmik retikulum ve merkezi yerleşimli nükleusu olduğu bildirilmiştir (Evans 1992, Gürüz ve Delibaş 2007). Takizoiti dıştan çevreleyen ve genelde pelikül adı verilen hücre zarı, üç katlı membrandan oluşmaktadır. Dışta olan membran sürekli olup hücre hareketi ile değişmemektedir. İki kat membrandan oluşan içteki yapı, değişerek parazitin anterior ve posteriorunda kutup halkası adı verilen oluşumları meydana getirmektedir (Şekil 1.1). Bu membranlar aynı zamanda hücre içine doğru helozoni kıvrımlar oluşturan ve hücre beslenmesinde rol alan mikrotübüllere açılan mikroporlara sahip bulunmaktadırlar.



Şekil 1.1. *T.gondii* trofozitiinin elektron mikroskopunda görünümü (Dubey ve ark 1998).

Takizoitlerin ön veya sivri ucunda kesik koni biçimindeki oluşuma konoid adı verilmekte olup parazitin beslenmesinde ve konak hücre sine girişi için sekresyon salgılamasında rol aldığı kabul edilmektedir. Konoidin arkasında veya altında ince uzun kesecikler halindeki oluşumlara roptri adı verilmektedir ve roptrin konoidin sekresyonunda görev aldığı düşünülmektedir (Şekil 1.2). Hücre zarı altında bulunan ve hücrenin hareketi ile ilgili oldukları bildirilen 22 adet pelikül altı tübüller yer almaktadır. Pelikül altı tübüller konoide çok yakın anterior kutup halkası üzerinde dizilmiş olup tüm vücut boyunca uzanmaktadırlar.

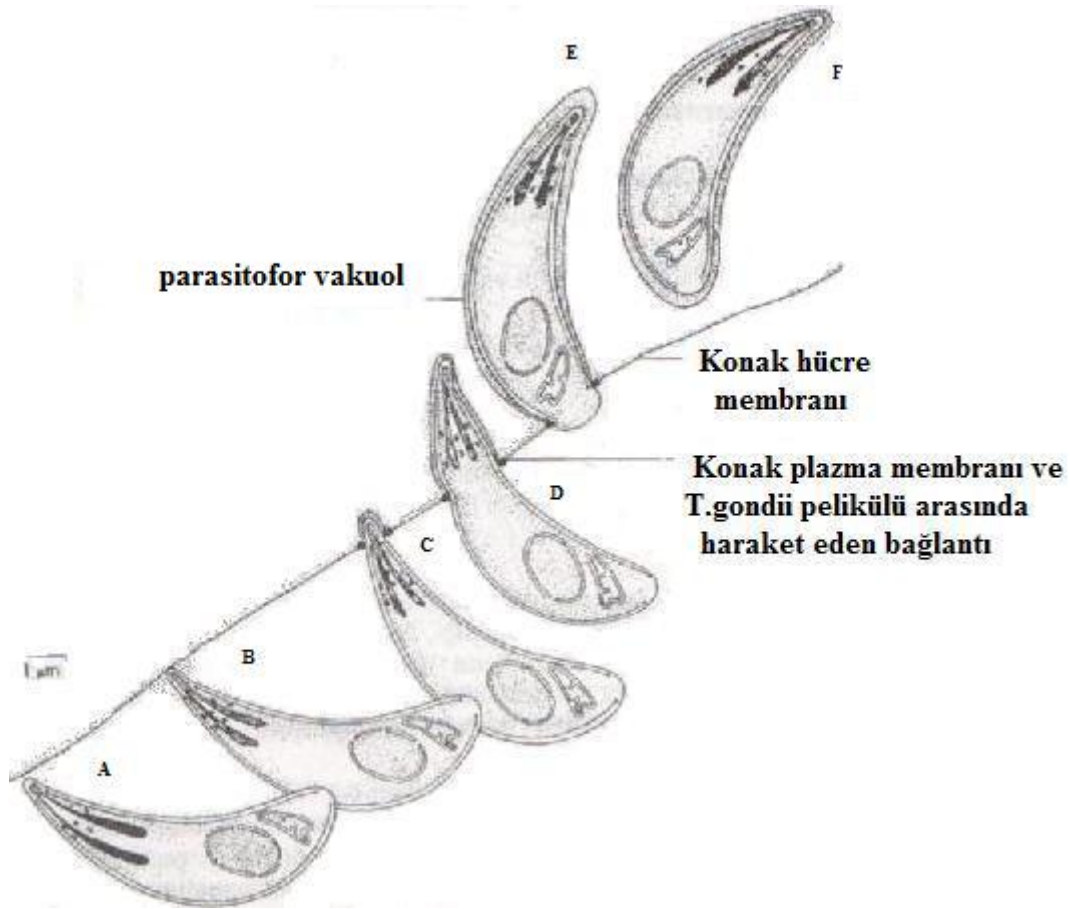


Şekil 1.2. *T.gondii*'nin anterior ucunun büyütülmüş şekli (Kuman ve Altıntaş 1996).

Konak hücreye girişde konoidin spiral şeklindeki ilerleyici hareketi ve roptrilerden salgılanan faktörlerin sorumlu olduğu bildirilmiştir (Şekil 1.3). Takizoitler salgıladıkları penetrasyon-kolaylaştırıcı faktör (PKF) ile konak hücre membranında değişikliğe yol açarak hücre içine girmektedir. Ayrıca takizoitler fagosite edilerek hem fagositik hem de nonfagositik hücreleri işgal edebilmekte ve konak hücredeki bir vakuol içinde vakuol duvarına temas etmeden yaşamını sürdürebilmektedir (Gürüz ve Özcel 2007).

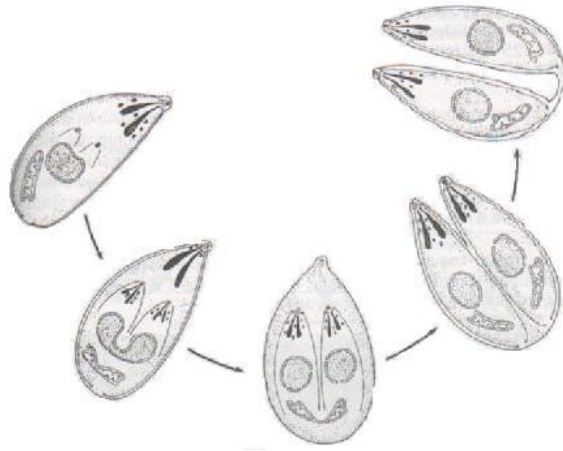
Takizoitlerin yüzeyinde bulunan beş major yüzey antijeninin parazitin konak hücreye girmesinde mediatör roller üstlendikleri tahmin edilmektedir (Grimwood 1996, Mineo ve ark 1993). Hastalığı yapan *T.gondii* takizoit formunun molekül ağırlığı 6-108 kDa arasında değişen yüzey, hücre içi ve ekskretuar/sekretuar antijenleri bulunmaktadır. Molekül ağırlığı 64 kDa olan antijenin karbonhidrat ve 42 ile 28,5 kDa olanlarının ise glikoprotein yapısında olduğu bildirilmektedir (Davidson 1992, Ossorio ve ark 1992, Lecordier ve ark 1993, Mineo ve ark 1993).

T.gondii'nin 55 ve 60 kDa'daki antijenlerine karşı oluşturulan monoklonal antikorlarla yapılan immunoelektron mikroskopisi ile bu antijenlerin takizoitinin ön ucundaki roptrilerde bulunduğu saptanmıştır. Bu antikorların PKF'nin etkisini bloke ettikleri ve yeteri kadar açık olmamakla beraber bu antijenlerin PKF'in bir bileşeni olduğu düşünülmektedir (Schwartzman ve Krug 1989, Sadak ve ark 1988). Daha sonra saptanan 21 kDa ağırlığında olan antijenin parazitin konak invazyonu sırasında parazitofor vakuol (PV)'e salgılandığı ve PV membranı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lecordier ve ark 1993).



Şekil 1.3. *T.gondii* takizoitinin konak hücreye girişi **A.** Bağlanma. **B.** Konoidin uzaması ve roptriler tarafından PKF'ün salgılanması. **C, D ve E.** Hücrenin plazma membranı ile parazitin pelikülü arasında bir bağ oluşması ve bu bağın parazitin posterior ucuna yerleşmesi. **F.** Parazitofor vakuol oluşumunu sağlamak için konak hücre membranının kapanması (Kuman ve Altıntaş 1996).

T.gondii yaşamak ve çoğalmak için hücre içi yerleşimi tercih etmektedir. Takizoit şekli konak hücre sine girince sitoplazmaya yerleşip ovoid şeklini oluşturur ve hücre paraziti bir vakuolle sarar. Konak hücresi içinde tekrarlayan endodiyogeni ile ikiye bölünerek takizoitler çoğalmaktadırlar (Şekil 1.4). Yavru takizoitler konak hücresinin içini doldururlar ve vakuolle çevrili bir çok takizoitin yaptığı klon yapılarını oluştururlar. Sayısı artan takizoitler hücreyi iyice doldurur ve gerer. Bunun sonucu olarak yalancı kist yapısı oluşur ve devam eden gerilme hücre duvarını patlamasına yol açar (Unat ve ark 1991).

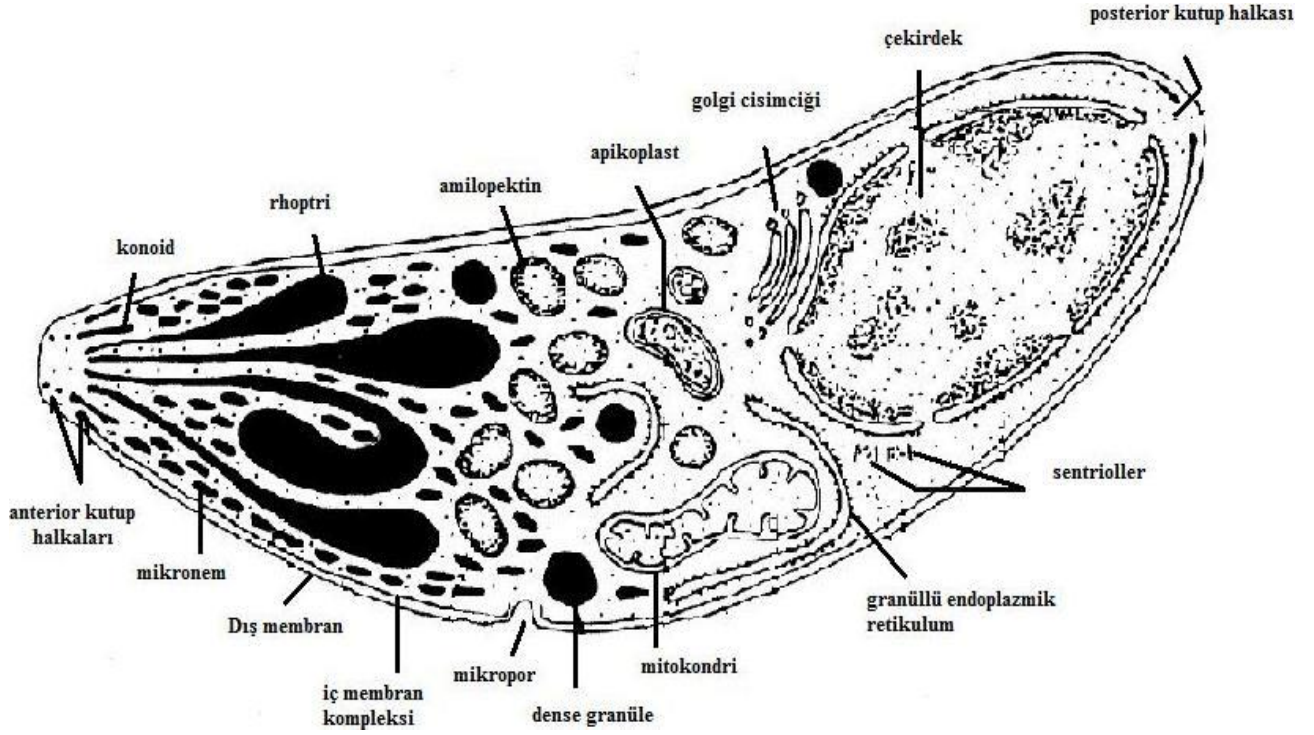


Şekil 1.4. Endodiyogeni ile *T.gondii* takizoitlerin çoğalması

Doku Kistleri

Hücre içinde bulunan takizoitlerin, immun cevabın baskısı ile daha yavaş bölünen bradizoitlere dönüştüğü görülmüştür ve bu sürecin sonunda doku kistlerinin oluştuğu bildirilmiştir (Lyons ve ark 2002). Doku kistlerinin çapları 5–100 µm arasında ve içerdikleri bradizoit sayısının da iki ile yüzlerce arası olabileceği gözlenmiştir. Doku kistleri 7×1,5 µm boyutunda ve hilal şeklinde olduğu bildirilmiştir (Dubey ve ark 1998).

Bradizoitler şekil ve yapı olarak takizoitlere benzediği takizoitler gibi endodiyogeni ile ancak daha yavaş olarak çoğalmaktadır (Şekil 1.5). Bradizoit içeren doku kistleri konak hücre içinde kendisini konak immun sisteminden koruyarak latent enfeksiyona yol açmaktadır. Doku kistlerinin en sık olarak merkezi sinir sistemi, göz, iskelet kası, düz kas ve kalp kasında görüldüğü bildirilmiştir (Montoya ve Liensenfeld 2004).

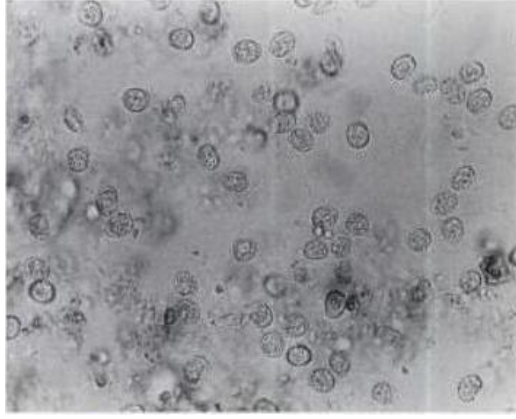


Şekil 1.5. *T. gondii* bradizoitinin elektron mikroskopunda görünümü (Dubey ve ark 1998).

Ookist

Felidae ailesi (kedigiller) memelilerin bağırsaklarında parazitin seksüel evrimi sonucu oluşan formlardır. Ookistlerin oval 11-14×9-11 mikron büyüklüğünde olup iki tabakalı çeperleri bulunmaktadır. Bağırsaklarında ookist gelişmiş kedilerin 2-3 hafta süresince milyonlarca ookist çıkardığı ve kediler ookist çıkarmaları durduktan sonra da portör oldukları belirlenmiş olup bağırsaklıkları düştüğünde ise tekrar ookist çıkararak çevreyi bulaştırdıkları bildirilmiştir (Şekil 1.6) (Altıntaş 1997).

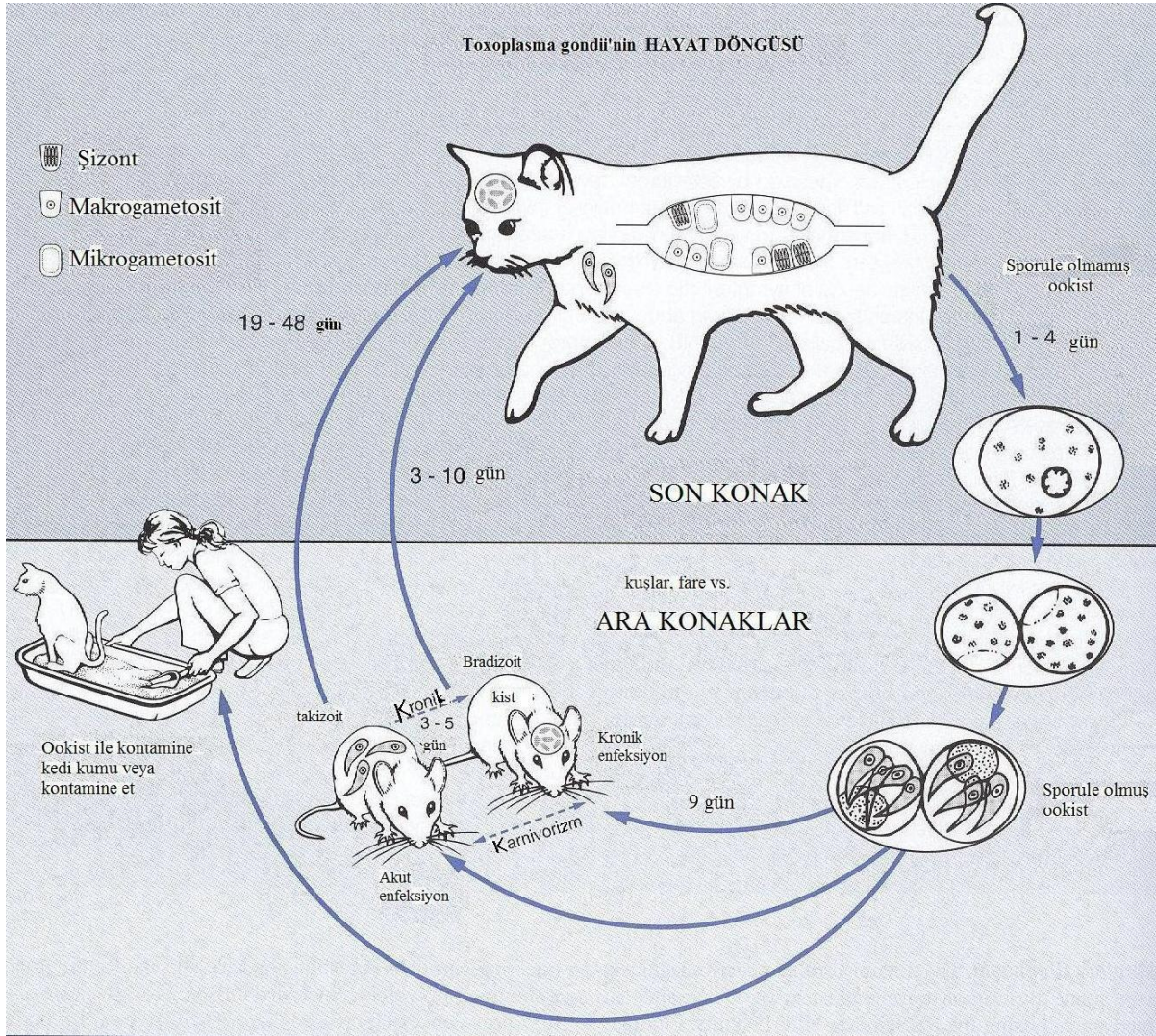
Ookistlerin enfektif olabilmesi için olgunlaşması (sporulasyon) gereklidir. Oksijen ve sıcaklığa bağılı olarak 1-20 günde ookistlerin içinde sporulasyon oluşmaktadır. Sporulasyon yüksek sıcaklıklarda daha hızlı, 24°C'de 2-3 günde olurken ve 11°C'de ise 14-21 günde gerçekleşir. Ookistler 4°C'nin altında ve 37°C'nin üzerinde sporule olamazlar. Ookistlerin nemli toprakta 18 aydan fazla canlılıklarını koruyabilmeleri, doğada ara konaklara bulaşma olasılığını artırmaktadır (Markel ve ark 1999, Beaman ve ark 1995).



Şekil 1.6. *T.gondii* Ookistleri (Levine 1985).

1.1.3. YAŞAM DÖNGÜSÜ

T.gondii'nin seksüel ve aseksüel olmak üzere iki evreli yaşam döngüsü vardır. (Montoya ve Liensenfeld 2004). Aseksüel döngü takizoitlerin oluşturduğu proliferatif faz ve doku kisti evresini içermekte olup, seksüel döngü sadece kedilerde meydana gelen gametogonik ve ookist oluşumunu içermektedir (Frenkel 1975).



Şekil 1.7. *T.gondii* Hayat Döngüsü (Winn ve ark 2006).

Kediler *T.gondii*'nin herhangi bir şekli ile enfekte olduğunda parazit ince barsak epitellerine girer ve şizogoni ile aseksüel üreme sonucu merozoitler, sporogoni ile seksüel çoğalma sonucunda ise ookistler meydana gelir. Önce gametositogenesis yoluyla makro ve mikrogametositler oluşur, daha sonra bunlar olgunlaşarak makro ve mikrogametler haline dönüşürler. Mikrogametinin makro gameti döllemesiyle zigot meydana gelir. Zigottan oluşan olgunlaşmamış ookistler barsak boşluğuna geçer ve buradan da dışkı ile dışarı atılırlar (Mete 1999).

Ookistlerde iki sporoblast oluştuktan sonra bunlar dörder sporozoitli sporokistlere dönüştürler. Kedi, olgun ookistleri sindirim yolundan aldığında yaklaşık üç hafta, takizoit bulunan fareleri yediğinde 10 gün, kist (bradizoit) bulunan fareleri yediğinde 3-5 gün sonra dışkısı ile olgunlaşmamış ookist atmaya başlar ve ookist atılımı 1-2 hafta sürer. İlk 1-3 haftalık dönemde akut bir şekilde enfekte olan bir kedi günde 10^7 - 10^9 ookist çıkarabilmektedir. Olgun ookistteki sporozoitler, enfekte hayvandaki takizoitler ve kistlerdeki bradizoitler, kedi için olduğu gibi diğer konaklar ve insanlar için de enfektiftir. Ara konakların enfeksiyona yakalanması özellikle 2 yolla şekillenmektedir (Soulsby 1986, Kuman ve ark 1995).

1. Ara konak olan tüm memeli hayvanlar, sporlanmış ookistleri ağız yoluyla alarak enfekte olurlar.
2. Memeli hayvanlar parazitin doku kistlerini taşıyan başka bir ara konağı yiyerek enfekte olabilirler.
3. Sindirimi takiben kist veya ookistlerin dış duvarları enzimlerin etkisiyle açılır ve enfektif olan bradizoitler intestinal lumende serbest hale geçerler. Hızlı bir şekilde çevre hücrelerin içine girerek çoğalır ve takizoit haline geçerler. Takizoitlerin dağılması enfekte hücrelerin parçalanması ile şekillenir. Öncelikle birbiri ile temas halindeki hücreler, özellikle kan ve lenf hücreleri enfekte olur. Ayrıca transplasental, kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, organ transplantasyonu ve laboratuvar çalışmaları esnasında bulaşabileceği bildirilen diğer bulaş şekilleridir (Fındık ve ark 1995, Soulsby 1986). Ayrıca takizoitler bütün vücut sıvılarında bulunur ve sütle dışarı atılır. Akut enfeksiyonlu hayvanların yeni sağılmış sütünü çiğ içen kişilerde toxoplasmosis oluşabilmektedir (Tüzer ve ark 1999).

1.1.4. Toxoplasma Antijenleri

Yaşam döngüsündeki takizoit, kist ve bradizoit dönemlerinin birbirinden farklı antijenik yapıları olduğu 1989 yılında Kasper tarafından gösterilmiştir (Kasper 1989).

Son yıllarda Western Blot (WB) ve PCR (Polimeraz zincir tepkimesi) tekniklerinden yararlanılarak detaylı çalışmalar yapılmış, *T.gondii*'nin değişik antijenik karakterleri dikkate alınarak farklı suşlarının bulunduğu gösterilmiştir (Davidson 1992). Laboratuvarlarda kullanılan RH suşunun WB yöntemiyle incelenmesiyle major takizoit antijenler arasında kalitatif ve kantitatif farklılıkların olduğu, her suşun kendisine özel bir antijenik yapısının bulunduğu saptanmıştır (Ware ve Kasper 1987).

T.gondii'nin yüzey proteinleri Handman ve arkadaşları tarafından 1980 yılında tanımlanmıştır (Handman ve ark 1980). RIP (Radyoimmunopresipitasyon) ve Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) gibi spesifik yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulamaya konulması ile antijenlerin özellikleri daha doğru belirlenmeye başlanmıştır (Davidson 1992). SDS-PAGE yönteminin kullanıldığı çalışmalarda, Sibley ve arkadaşları beş tane yüzey antijeni tanımlanmışlardır. 22, 23, 30, 35 ve 43 kDa molekül ağırlığında olan bu yapılar yüzey antijen (SAG) olarak adlandırılmışlardır (Sibley ve ark 1991). Etkenin yüzeyinde glikozil fosfatidilinositol dizisi bağlı olan yapılardır ve çoğu SAG1 ve SAG2'dir. Konak hücreyi invaze etmek, immun modülasyonu ve virulansı sağlamakla görevli oldukları bildirilmiştir (Lekutis ve ark 2001).

Tanı amaçlı olarak kullanılan takizoit proteinin %5'ini oluşturan 30 kDa molekül ağırlığındaki yüzey proteinleri arasında en belirgin olarak görülmekte olanıdır (Kasper ve ark 1983). *T. gondii*'nin en baskın olan yüzey antijeni olan bu yapı, RH suşu ile enfekte farelerde immun yanıt oluşmasında en güçlü uyarıcı sağlayan etkenlerden birisi olduğu bildirilmektedir (Marti ve ark 2001).

Sırasıyla 22 kDa ve 30 kDa ağırlıklarında olan SAG2 ve SAG1 antijenleri hücreye tutunma ve invazyon aşamalarından sorumludur. SAG1 ve SAG2 açısından eksikliği olan mutant suşların konak hücreyi invaze etmede yetersiz kalıp enfeksiyona yol açmadığı gösterilmiştir. 43 kDa ağırlığında bir antijen olan SAG3'ün işlevi tam olarak bilinmese de hücreye bağlanma ile ilgili mekanizmalarda rol aldığı düşünülmektedir. SAG3 eksik olan mutantların yabani tip *T. gondii* suşlarından daha az virulan oldukları bildirilmiştir. SAG4 ve SAG5 ise fonksiyonları tam olarak anlaşılammış olup sırasıyla 35 kDa ve 23 kDa ağırlığında olan antijenlerdir (Lekutis ve ark 2001).

T.gondii'nin 21, 26, 27, 28,5, 39, 57, 69, 97, 108 kDA molekül ağırlığında ekskretuar ürünlerindeki antijenleri de araştırılmıştır (Davidson 1992, Ertuğ 1999). Tablo 1'de Ekskretuar/Sekretuar antijenler gösterilmiştir.

YER	Molekül Ağırlığı (kDA)	Lokalizasyon	Kimyasal Yapı	Kullanım Alanı
Ekskretuar /Sekretuar	21	PVN, DB Yüzeyin altında	Polipeptit	?
	26	Bütünlüğü bozulmamış takizoitte bulunmaz	Polipeptit	?
	27	DB, PVN	Polipeptit	Sirkulatuvar antijen?
	28,5	DB, Yüzeyin altında PVN	Glikoprotein	Latent enfeksiyon belirleyicisi?
	39	Membran	Polipeptit	?
	57	?	Polipeptit	Sirkulatuvar antijen?
	69	?	Polipeptit	Akut enfeksiyon belirleyicisi?
	97	?	Polipeptit	Akut enfeksiyon belirleyicisi?
	108	Bütünlüğü bozulmamış ve Takzoitte bulunmaz	Polipeptit	Latent enfeksiyon belirleyicisi?

Çizelge 1.1. Ekskretuar/Sekretuar antijenler (Davidson 1992)
PVN: Parazitofor vakuol ağı, DB: Densebody.

1.1.5. *T.gondii*'nin virulansı ve virulansa etki eden faktörler

Virulansın konağın savunması ve parazitin antijenik özelliğine bağlı olarak değişiklik gösterdiği ve Howe ve Sibley'e göre Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 olmak üzere 3 tipi olduğu bildirilmiştir (Howe ve Sibley 1995).

İnsanlarda nadir olarak izole edilen Tip 1 farelerde virulan iken, insanlarda virulan olan Tip 2 ve 3 ise farelerde avirulandır. İnsanlarda en çok izole edilen Tip 2, toxoplasmosis olgularının % 80 'inden sorumlu tutulmaktadır. Geri kalan olgularda ise Tip 3'ün rol oynadığı bildirilmektedir (Howe ve Sibley 1995, Appleford ve Smith 2000, Darde 2004).

Virulansı etkileyen faktörleri genel olarak konak hücreye giriş, hastalık yapma ve konak hücre savunmasına karşı dirençte rol oynadığı bildirilmekte olup bu faktörler aşağıda belirtilmiştir.

Konak hücreye girişte virulansa etki eden bazı faktörler sırasıyla Toksofilin, Miyozin A ve Roptri proteindir. Toksofilin invazif parazitin kodladığı aktin bağlayan bir protein olup parazitin hücreye girişinde rol oynamaktadır. Miyozin A ise parazitin hareketini ve hücreye girişini sağlamaktadır. Roptri protein konak hücre sitoplazmasına girişte parazitin aldığı asimetric şekilden sorumludur (Beckers ve ark 1994, Meissner ve ark 2002, Delorme ve ark 2003).

Primidin biyosentezini gerçekleştiren suşlar virulandır ve hastalık oluşturmaktadır. Mutant *T.gondii*' de primidin sentezi için gerekli "karbomil fosfat sentetaz II" enzimi çıkartıldığında mutant suşların farede öldürücü etkisi olmadığı ve immun sistemi sağlam hayvanlarda avirulan ırklar ile aynı derecede bağışıklık gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık bu enzime sahip virulan suşların tek dozu bile fareyi öldürmektedir. Fareye öldürücü dozda mutant *T. gondii* verildikten haftalar sonra yüksek virulansa sahip *T.gondii* verilirse fare infeksiyondan korunduğu gözlenmiştir. Bu sonuç aşı yapımı için umut verici olarak değerlendirilmektedir (Fox ve Bzik 2002).

Virulansa etki eden konak hücre savunmasına karşı dirençte rol oynayan faktörlerden birinin de ökaryot ve prokaryot hücrelerde değişik fizyolojik ve nonfizyolojik uyarılara karşı cevap olarak yapılan önemli bir protein olan Isı şok proteinleri (HSP) olduğu bildirilmiştir. Bu proteinin virulans, değişen çevre şartlarına adaptasyon sağlama ve konak savunmasına karşı dirençte rol oynadığı bildirilmektedir (Nagasawa ve ark 1992).

Süperoksit katalaz, katalaz, glutation peroksidaz ve peroksidoksinler gibi enzimler antioksidanlara örnektir ve hücreyi reaktif oksijenlerden korurlar. Katalaz enzimi H₂O₂ 'yi deoksifiye etmektedir. Kinetoplastida ve Apicomplexa grubunun tüm üyelerinde katalaz enzimi olmamasına rağmen, *T.gondii* 'de bu enzim mevcuttur. Katalaz endojen olarak üretilen reaktif oksijenleri ve konak tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı paraziti korumada rol oynamaktadır (Kwork ve ark 2004).

1.1.6 Epidemiyoloji

Toxoplasmosis'in prevalansının iklim, coğrafi koşullar, insanların yaşam tarzına, alışkanlıklara ve geleneklerine bağlı olarak ülkeler arasında farklılık gösterdiği bildirilmektedir. En yüksek prevalans %93 olarak az pişmiş et yeme alışkanlığı olan Paris'li kadınlarda saptandığı bildirilmiştir (Markel ve ark 1999). Ayrıca soğuk bölgelere nazaran sıcak ve rutubetli yerlerde şehirlere nazaran, kırsal kesimde ve normal popülasyona nazaran hayvanlarla yakın teması olan kişilerde prevalans daha yüksek olarak saptandığı bildirilmiştir (Beaman ve ark 1995).

T.gondii'nin insana üç şekilde bulaştığı bildirilmiştir (Altıntaş 1997, Tenter ve ark 2000, Schwartzman 2001). Bunlar aşağıda açıklanmıştır:

Takizoitlerle ile bulaşım: Takizoit formu ile bulaşım genellikle kan ve doku transplantasyonu veya çiğ süt ile olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda takizoit kaynaklı oral enfeksiyonlar bildirilmiştir fakat bu formla oral yolla bulaşım oldukça nadir olduğu belirtilmiştir. Buna karşılık ağızda herhangi bir yara olduğu durumlar, konjunktivaya temas ile veya laboratuvar kazası sonucu elde yara, bere, kesik gibi bir giriş kapısının varlığında takizoitlerle bulaş olabileceği bildirilmektedir.

Doku kistleri ile bulaşım: İnsanlarda pişmemiş veya az pişmiş kistli dokuların tüketilmesinin önemli bulaş yollarından biri olduğu bildirilmiştir. Ayrıca organ transplantasyonu ile kistlerin vericiden alıcıya aktarımında bu bulaşmada rol oynadığı belirlenmiştir.

Ookistler ile bulaşım: Tek son konak olan kedilerin bulaş da ana rolü üstlendiği bilinmektedir. Dışkı ile atılan ookistlerin ağız yolu ile alınması bütün ara konaklar ve kediler için başlıca bulaş yolu olduğu bildirilmiştir.

1.1.7. Klinik

Toxoplasmosisin kliniği 4 grup altında incelenebilir.

İmmünitesi normal olan kişilerde edinsel toxoplasmosis: İmmünitesi normal olan kişilerde edinsel toxoplasmosis sessiz veya enfeksiyöz mononukleoz benzeri ateşli şekli, poliadenopati ateşsiz şekli ve ağır şekli olarak görülebilmektedir (Altıntaş 1997).

İmmün yetmezlikli hastalarda akut toxoplasmosis: *T.gondii* enfeksiyonundan kaynaklanan doku kistlerinin gelişen immunsupresyonu takiben aktive olmaları ve içlerinden çıkan bradizoitlerin vücuda yayılmalarından kaynaklandığı, oluşan reaksiyonların özellikle merkezi sinir sisteminde dikkati çektiği asıl olarak da beyin kökü ve ganglionların durumdan etkilendiği bildirilmektedir (Altıntaş 1997, Tenter ve ark 2000, Schwartzman 2001).

Oküler toxoplasmosis: Oküler toksoplasmosisi prenatal enfeksiyon sonucu kaynaklandığı gibi nadir olarak da postnatal enfeksiyondan kaynaklandığı, en tipik bulgunun korioretinit olduğu ve reaksiyonun arka göz kamerasında geliştiği gösterilmiştir. Oküler toksoplasmosis genç kişilerde ciddi görme kaybının en sık nedenidir (Atmaca ve ark 2004). Tipik bulgular doğumda da görülebilir veya sonradan ortaya çıkabilir. Sonradan kazanılan toxoplasmosisli olguların %1'inde göz tutulumu görülmektedir. Avrupa ve ABD'de korioretinitli olguların % 35'inde *T. gondii*'nin etken olduğu bildirilmektedir (Ertabaklar ve ark 2005, Boyer ve ark 1998).

Konjenital toxoplasmosis: Konjenital toksoplasmosis, gebelikte geçirilen akut enfeksiyonun plasenta yolu ile fetusa geçmesi ile oluşur. Enfeksiyonun plasentadan fetusa geçebilmesi için gerekli sürenin enfeksiyona neden olan *T.gondii* suşunun virulansı, inokülasyon miktarı ve plasentanın gelişim dönemi gibi faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir (Wong ve Remington 1994).

1.1.8. Tanı

Toxoplasmosisin laboratuvar tanısı, *T.gondii*'nin muayene maddesinde görülmesine, izole edilmesine ve antijen veya meydana gelen antikorların saptanmasına dayanır.

- *T.gondii*'nin İzolasyonu ve Etkensel Tanı
- Toxoplasmik Lenfadenopattideki Karakteristik Histopatolojik Bulgular
- Hücresel İmmünite Testleri ile Tanı
- PCR
- Serolojik Tanı: Serum ve vücut sıvılarındaki antijenlerin ve antikorların saptanması

Toxoplasmosisin tanısında kullanılan en yaygın serolojik testler;

- Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)
- Sabin-Feldman Dye Testi
- İndirekt Hemaglutinasyon Testi
- Direkt Aglutinasyon Testi
- Kompleman Birleşme Yöntemi
- İndirekt Floresans Antikor Yöntemi (IFAT)
- IgM İndirekt Floresans Antikor Testi (IgM IFAT)
- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
- Double-Sandwich IgM ELISA
- Immunosorbent Aglutinasyon Yöntemi
- Immunosorbent Aglutinasyon Yöntemi IgM ve IgE

- Enzyme-Linked Immunofiltrasyon Yöntemi
- Spesifik IgM antikorlarının saptanması

Toxoplasmosisin tanısında kullanılan en yaygın serolojik testlerdir (Yaman ve ark 2004, Ertuğ 1999).

1.2. Elektromanyetik Alan ile İlgili Genel Bilgi

Teknoloji kullanımının gündelik yaşamı ve çalışma yaşamını kolaylaştırmasıyla birlikte, teknolojinin ortaya çıkarabileceği sağlık sorunları çok açık değildir. Gelişmiş toplumlarda yaşayan bireyler sürekli olarak fiziksel, kimyasal, biyolojik ve psikososyal etmenlerle karşılaşmakta ve etkilenebilmektedirler (Johansen 2004).

Toplumun sağlığını etkileyen fiziksel etmenler arasında iyonlaştırıcı olmayan radyasyon da bulunmaktadır. Elektrik ve manyetik alanlar gibi iyonlaştırıcı olmayan radyasyonun etkilerinden kaçınmak oldukça zordur. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik araştırmalarda, elektromanyetik alanların (EMA) sağlık üzerine bazı etkileri olduğu gösterilmesine rağmen, deneysel çalışmalarda hücresel düzeydeki etkiler henüz kesin olarak ortaya konulmamıştır (Schüz ve ark 2009).

Dünya'nın 0.2-0.7 mT olan elektromanyetik alanı canlılığın evriminde doğal belirleyici olmuş ve canlı organizmalar bu EMA koşullarında uyum içinde gelişmişlerdir. Fakat teknolojinin gelişmesi doğal olmayan EMA'lar yaratmış ve bu oluşan elektromanyetik kirliliğin çevre ve canlılar üzerindeki etkisi önemli bir soru ve sorun haline gelmiştir. EMA'nın etkilerini azaltabilmek için dünya sağlık örgütü ve yerel düzenleyici kuruluşlar elektrikli cihazların yayacağı ve maruz kalınabilecek EMA düzeyini sınırlayıcı standartlar oluşturmuşlar ve uzun süreli epidemiyolojik çalışmalar ile değişik frekanslardaki EMA'ların etkileri araştırmaya başlamışlardır (Ahlbom ve ark 2008, Hardell ve Sage 2008, Johansen 2004, Repacholi 1998).

Çinliler, Meksikalılar ve Yunanlılar tarafından bulunan manyetizma ile ilgili birçok hipotezler ortaya konulmuş ve araştırmalar yapılmıştır. Tesla ve d'Arsonval tarafından 1900'lü yılların başında elektromanyetizmanın canlılar üzerindeki etkileri gösterilmiş, bununla birlikte manyetik alanların zaman zaman tedavi amaçları kullanılması üzerinde araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. 1960'lı yıllarda uzay çalışmaları, 1970'li yıllarda manyetik alanların kullanıldığı manyetik rezonans (MR) gibi görüntüleme cihazları, 1980'li yıllardan itibaren geliştirilen çok düşük frekanslı EMA yayan cihazlar ve 1990'lı yıllarda kullanıma başlanan cep telefonları ile baz istasyonlarının olumsuz etkilerinin olabileceği düşünülerek iyonlaştırıcı olmayan radyasyon alanında araştırmalar başlatılmıştır. Bu araştırmalar elektromanyetik kirlilik gibi çevre problemleri ve hücre sel etkilenim ile oluşabilecek kanser ve benzeri hastalıkların etkenlerini ortaya çıkarmayı hedeflemiş olup yaygın teknolojik kullanımının nasıl en az etki oluşturacağını göstermeye yönelmiştir (Johansen 2004, Schüz ve ark 2009).

1.3. Elektromanyetik Dalgalar

Elektromanyetik dalgalar iki etkinin sonucunda oluşurlar: (1) Manyetik alanın değişimi, bir elektrik alan oluşturur. (2) Elektrik alanın değişimi, bir manyetik alan oluşturur (Serway 2005). Elektrik ve manyetik alanların davranışlarını açıklayan denklemler ilk defa Maxwell tarafından gösterilmiştir ve bu denklemler Maxwell denklemleri diye adlandırılmıştır. Yük ve akım bulunmayan boş uzay bölgelerinde Maxwell denklemleri şu şekildedir.

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0, \quad (1.1)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0, \quad (1.2)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (1.3)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{B} = \varepsilon_0 \mu_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad (1.4)$$

Burada, E elektrik alan vektörü olup birimi N/C veya V/m'dir. B, manyetik alan vektörü olup birimi N/A.m veya Tesla'dır.

ε_0 , boşluğun elektrik geçirgenliğidir ($\varepsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2/\text{Nm}^2$). μ_0 ise boşluğun manyetik geçirgenliği olup $\mu_0 = 4\pi 10^{-7} \text{ N/A}$ veya (Henry/metre). Bu denklemler üzerinde bir takım matematiksel işlemler yapılırsa;

$$\nabla^2 \vec{E} = \varepsilon_0 \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \quad (1.5)$$

$$\nabla^2 \vec{B} = \varepsilon_0 \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{B}}{\partial t^2} \quad (1.6)$$

(1.5) ve (1.6) dalga denklemleri elde edilir. Bu dalga denklemleri, boşlukta

$$V = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_0 \mu_0}} = 3.00 \times 10^8 \text{ m/s} = c \quad (1.7)$$

hızıyla hareket eden dalgaları tanımlar. Madde içerisinde, serbest yük ve akımlar cinsinden Maxwell denklemleri şöyle ifade edilir.

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = \frac{\rho_f}{\varepsilon_0} \quad (1.8)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (1.9)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (1.10)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \vec{J}_f + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (1.11)$$

Burada; ρ_f : serbest hacimsel yük yoğunluğu (C/m^3), J_f : serbest hacimsel akım yoğunluğu (A/m^2)dur. Lineer ortamlarda, deplasman vektörü için

$$\vec{D} = \epsilon \vec{E} \quad (1.12)$$

ve manyetik alan vektörü için

$$\vec{H} = \frac{\vec{B}}{\mu} \quad (A/m) \quad (1.13)$$

ilişkileri yazılabilir. Burada

$\epsilon = \epsilon_0 (1 + \chi_e)$ Ortamın elektriksel geçirgenlik katsayısı

$\mu = \mu_0 (1 + \chi_m)$ Ortamın manyetik geçirgenliği

Burada; χ_e dielektrik ortamın duygunluğu adında boyutsuz, pozitif bir büyüklüktür.

χ_m ise manyetik duygunluk adında boyutsuz, paramanyetikler için pozitif, diamanyetikler için negatif bir büyüklüktür. Dielektrik sabiti,

$$K = \frac{\epsilon}{\epsilon_0} = 1 + \chi_e \quad (1.14)$$

olarak tanımlanır.

Elektromanyetik dalganın özelliklerinin daha iyi kavranabilmesi ve verilen formüllerin fiziksel anlamlarının anlaşılabilmesi için elektromanyetik dalgayı karakterize eden büyüklüklerin tanımlanmasında fayda vardır.

Elektromanyetik Radyasyonun Sınıflandırılması

Noktasal bir enerji kaynağından yarıçapları doğrultusunda çevreye her türlü kütleli, yüklü, enerjilik tanecik veya dalgalı enerji yayılması olarak tanımlanan radyasyon (Pehlivan 1997) frekans ve enerjilerine göre iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olarak ikiye ayrılır.

İyonlaştırıcı Radyasyon

Molekülleri bir arada tutan atomik bağları kırarak, pozitif ve negatif yüklü elektrik yüklü atomlar üretmeye yetecek foton enerjisine sahip olan aşırı yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalar, iyonlaştırıcı radyasyon olarak adlandırılır. Dalga boyu 10^{-7} m'den küçük olan yani frekansı 3 petaHertz (pHz) den büyük olan elektromanyetik dalgalardır. İyonlaştırıcı radyasyon hücredeki moleküllere çarptığında onları iyonlaştırarak, molekül yapısını bozar ve olumsuz biyokimyasal tepkimelerin DNA'yı etkilemesi sonucu kanser oluşumunu kolaylaştığı bildirilmiştir (Pehlivan 1997, Paksu 1997).

Gamma bandı : Enerji düzeyi 4000 eV, dalga boyu 10^{-11} metrenin altındadır.

X ışını bandı : Enerji düzeyi 400 eV, dalga boyu 10^{-9} ile 10^{-11} metre arasındadır.

Uzak Morötesi : Enerji düzeyi 40 eV, dalga boyu 10^{-9} ile 10^{-7} metre arasındadır.

İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyon

Atomik bağları kırmak için son derece zayıf foton enerjilerine sahip bulunan elektromanyetik spektrum kısmını ifade etmek için, genel olarak iyonlaştırıcı olmayan radyasyon terimi kullanılır. Dalga boyu 10^{-7} m'den büyük olan yani frekansı 3 petaHertz (pHz) den küçük olan elektromanyetik dalgalarıdır.

Bu grupta az enerjiliden yüksek enerjiliye doğru çok düşük/düşük frekanslı elektromanyetik dalgalar, radyo-Tv dalgaları, mikrodalgalar, kızılötesi radyasyon, görünür ışınlar, yakın morötesi elektromanyetik dalgalar olmak üzere sıralanırlar (Cleveland ve Ulcek 1999).

Yakın Morötesi : Mor-mavi ışığa kadar enerji düzeyi 10 eV, dalga boyu 300-400 nm arasındadır.

Görünür ışık : Enerji düzeyi 4 eV, dalga boyu 400 -770 nm arasındadır.

Mor :	400-420 nm
Mavi :	420-490 nm
Yeşil :	490-540 nm
Sarı :	540-570 nm
Turuncu :	620 nm
Kırmızı :	600-770 nm

Kızılötesi (infrared) Radyasyon:

Yakın Kızıl Ötesi : Dalga boyu 770-1400 nm arasındadır.

Uzak Kızıl Ötesi : Dalga boyu 1.4-1000 μ m arasındadır.

Mikrodalgalar : Frekansları 300-300000 MHz arasında olan giderek yaygın olarak kullanılan elektromanyetik dalgalarıdır.

Tv-Radyo Dalgaları : Frekansları 300 kHz-300 MHz arasında olan elektromanyetik dalgalarıdır.

Çok Düşük/ Düşük frekanslı elektromanyetik dalgalar: Frekansı 0-300 kHz arasında olan elektromanyetik dalgalarıdır (Pehlivan 1997).

1.3.1. Elektrik Alan

Yüklü parçacıklar arasında elektromanyetik kuvvet, doğanın temel kuvvetlerinden biri olup kütle çekim kuvvetinden $\sim 10^{42}$ kat daha etkilidir. Uzayda bir noktadaki elektrik alan vektörü, o noktaya konulan artı bir birimlik yüke etkileyen elektrik kuvveti olarak tanımlanır. Durgun yüklerin elektrik alanı Coulomb yasası ile verilir:

$$E(P) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \int_V \frac{R}{R^2} \rho d\tau \quad (1.15)$$

Elektrik kuvveti

$$\vec{F} = q\vec{E} \quad (1.16)$$

ve elektrik alanında depolanan enerji, boşluk için,

$$W = \frac{\epsilon_0}{2} \int_{\text{tüm uzay}} E^2 d\tau \quad (1.17)$$

ile, lineer maddesel ortam için, $D = \epsilon E$ olmak üzere,

$$W = \frac{1}{2} \int (\vec{E} \cdot \vec{D}) d\tau \quad (1.18)$$

ile verilir.

Elektrik yüklerinin serbest hareket edebildikleri maddelere iletken denir. Statik durumda iletken içinde elektrik alan, hacimsel yük yoğunluğu ve potansiyel fark sıfır olur. Yalıtkan veya dielektrik maddelerde ise tüm yükler belirli atom veya moleküllere bağlıdır ve hareketleri molekül içinde sınırlıdır. Bir elektrik alanda dielektrik atom veya moleküllerin yük dağılımları başlıca iki şekilde değişebilir; genleşme ve dönme (Serway 2005). Her iki mekanizma aynı temel sonuca yol açar. Elektrik alan etkisiyle, madde içinde her bir atom veya molekül alan yönünde bir dipol momenti kazanır yani, dielektrik içinde kutuplanma olur. Bu etki, lineer dielektriklerde

$$P = \epsilon_0 \chi_e E \quad (1.19)$$

şeklinde elektrik alanla doğrusal ilişkiye sahiptir.

1.3.2. Manyetik Alan

Durgun bir yük sadece elektrik alan oluşturur. Hareketli yük, elektrik alana ek olarak birde B manyetik alanı oluşturur. Elektrik yükleri çizgisel, yüzeysel veya hacimsel bir yol boyunca, yol kesitinden birim zamanda eşit miktarda yük geçecek şekilde hareket ediyorsa kararlı akım oluşur. Kararlı bir akım geçen telin R kadar uzağındaki bir P noktasındaki manyetik alanı Biot-Savart Yasası ile verilir.

$$\vec{B}(P) = \frac{\mu_0}{4\pi} \int \frac{I \times \vec{R}}{R^2} dl \quad (1.20)$$

Dünyanın manyetik alanı yarım Gauss, laboratuarda üretilen şiddetli bir manyetik alan ise 1 Tesla kadardır (Serway 2005). Manyetik alan içerisinde v hızıyla hareket eden bir Q yüküne etkiyen elektromanyetik kuvvet ise

$$F = Q[E + (v \times B)] \quad (1.21)$$

olup (1.21) ifadesine Lorentz Kuvveti denir. Manyetik alanda depolanan enerji ise elektrik alanda depolanan enerjiye benzer şekilde, boşluk için

$$W = \frac{1}{2\mu_0} \int_{\text{tüm uzay}} B^2 d\tau \quad (1.22)$$

ile, lineer maddesel ortamda, $B = \mu H$ olmak üzere,

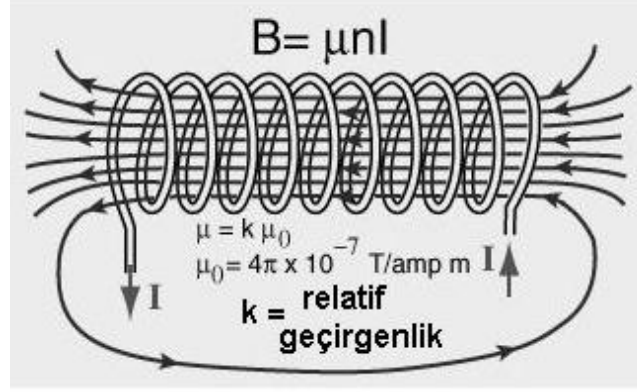
$$W = \frac{1}{2} \int (B \cdot H) d\tau \quad (1.23)$$

ile verilir.

Temel büyüklüklerin ve bunların birbirleriyle ilişkilerinin anlaşılabilmesi için “Elektrik Alan” ve “Manyetik Alan” başlıkları altında statik durumları incelenmiştir. Fakat daha önce belirtildiği gibi elektromanyetik dalganın elektrik ve manyetik alanları zamanla değişmektedir. Bu durumda alanlar arasındaki ilişkiler Maxwell denklemleri ile verilmelidir (Griffiths 1996).

1.4. Elektromanyetik Alan Kaynakları

1.4.1 Selenoid



Şekil 1.8. Selenoid

İçinden i akımı geçen ve bir helis boyunca sık olarak sarılmış düzeneğe selenoid denir. Selenoidde oluşan toplam manyetik alan, sarımların tek tek oluşturdukları manyetik alanların vektörel toplamına eşittir. Sarımlardan yeterince uzakta bulunan noktalardaki B manyetik alan selenoidin eksenine paraleldir. Eğer sarım sayısı çoğalır ve sarımlar sıklaşırsa içinden akım geçen silindirik bir tabaka ile belirlenen ideal selenoide yaklaşılır.

Bir selenoidin manyetik alan şiddeti şu bağıntıyla teorik olarak hesaplanır (Resnick ve Halliday 1998).

$$B = \frac{\mu N i}{2\sqrt{R^2 + L^2}} \quad (1.24)$$

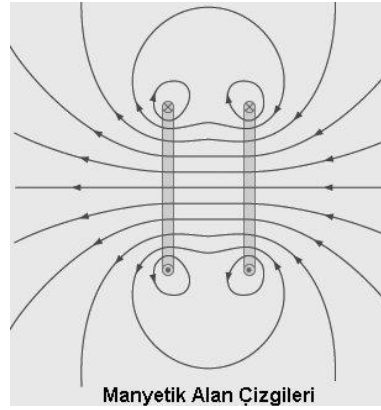
- i = Selenoidden geçen akım şiddeti
- L = Selenoidin uzunluğu
- N = Selenoidin sarım sayısı
- R = Selenoidin yarıçapı
- μ = Ortamın geçirgenliği

1.4.2. Helmholtz Halkaları

Deneysel olarak oluşturulan manyetik alan sistemlerine selenoid sisteminden başka Helmholtz halkaları sistemini de örnek olarak verebiliriz. Şekillerde manyetik alan kuvvet çizgileri görülmektedir. Sistemde oluşan manyetik alan şiddeti (B),

$$B = \mu n I \quad (1.25)$$

formülüyle hesaplanır. Burada μ değeri μ_0 denkleminde hesaplanır ve k relatif geçirgenlik iken μ_0 ise $4\pi \times 10^{-7}$ T/amp.m dir. I akımı (amper) ve n ise sarım yoğunluğunu belirtmektedir. Sarım yoğunluğu ise sarım sayısının (N) metre olarak selenoid uzunluğuna (L) bölünmesiyle sarım/metre olarak hesaplanır. SI birim sisteminde manyetik alan şiddetinin birimi $\mu\text{T}/\text{amp.m}$ olup “n” sarım sayısı/m , “I” akım olup amper cinsinden alındığında elde edilen birime Tesla (T) denir (Ufuktepe ve Bozdemir 1997).



Şekil 1.9. Helmholtz halkaları (Ufuktepe ve Bozdemir 1997)

1.5. EMA'nın Olası Etki Mekanizmaları

Elektromanyetik alanların iki bileşeni olan elektrik ve manyetik alanların özellikleri farklıdır ve bu alanların canlıların biyolojik yapıları üzerindeki etkilerinin de değişik olduğu gözlenmiştir. İnsanların bu alanlardan nasıl etkilendiği kesin olarak bilinmemektedir. Çalışmalar manyetik alanların elektrik alanlara göre biyolojik sistemleri daha fazla etkilediğini göstermektedir. Burada manyetik alanların özel olarak üretilmiş kimi maddeler dışında hemen hemen hiçbir engel tanımadan ortamlardan geçerken elektrik alanların ise duvarlardan bile geçemediği ve hatta insan derisinden geçerken bile şiddetinin çok düşmesinde rolü bulunmaktadır. Elektrik alanlar vücut yüzeyinde zayıf akımlar oluştururken, manyetik alanlar ise bedenin içine girerek etkilerini iç organlarda bile oluşturabilmektedir. Değişken manyetik alanlar çevresinde bulunan tüm iletkenlerde akım oluştururlar, bu akımların yönü manyetik alana diktir (Frey 1993, Juutilainen 2005, Funk ve ark 2008). Elektromanyetik radyasyon hücre membranının yüzeyindeki özel bağlanma bölgelerine iyon, nörotransmitter, hormon, antikor bağlanmasını uyarmaktadır (Adey 1988). Bu olaylar hücre membranı yüzey proteinlerinin elektriksel yapısını ve iyon geçişini etkileyen transmembran sinyalin değişmesiyle olmaktadır (Funk ve ark 2008).

Çok düşük frekans EMA'nın biyolojik sistemleri etkileyerek kanser oluşumunu bir veya daha fazla mekanizma ile başlattığı bildirilmektedir. EMA'nın kanser oluşurmasında çeşitli mekanizmalar sorumlu tutulmuştur. EMA'nın maruziyetine uğrayanlarda direkt genotoksik etki ile kanser olduğu (Ivancsits ve ark 2002) yada spesifik onkojenik gen dizilerinin aktivasyonunun (Strasak ve ark 2009) kanser oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir. Spesifik DNA bölgelerinde elektromanyetik etkiyle transkripsiyonun başlatılmasında EMA'nın DNA içinde hareket eden elektronları hızlandırarak DNA zincirleri arasında büyük itici kuvvet oluşturmasının etkili olabileceği bildirilmiştir (Blank ve Goodman 2001). EMA'nın iyon geçişine etkisinin ve özellikle de intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunu değiştirerek sinyal iletim yolağının etkilenmesi kanser oluşum mekanizmalarından kabul edilmektedir (Lindström ve ark 1995). Stres faktörlerinin etkisiyle hormonal ve immun sistemde tümör kontrol eden mekanizmaların bozulmasında, kanser oluşumunda etkisi olduğunu bildirilmektedir (Goldberg ve Creasey 1991).

Yapılan çalışmalarda EMA'nın merkezi sinir sistemi hastalıklarının özellikle Alzheimer, epilepsi ve Parkinson hastalığı riskini arttırdığı bildirilmektedir ve bu etkinin de reaktif oksijen türlerinin ortamda arttırılması ile oluştuğu belirtilmek ile birlikte kesin bir mekanizma gösterilememiştir. Fakat EMA ve nörodejeneratif hastalıklar arasında ilişki belirgin olarak gösterilmiştir (Johansen 2004).

Yara iyileşmesi üzerine elektrik alanı ve EMA'nın pozitif bir etki göstererek yara iyileşmesini tetiklediği belirtilmiştir (Vodovnik ve Karba 1992, Lee ve ark 1993). Darbeli EMA uygulamalarının deri epitelyum hücrelerinde hücre membranı etkileyerek hücre proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Stiller ve ark 1992). EMA'nın yara iyileşmesi sırasında TGF- β ekspresyonunu arttırıcı etkileri olduğu belirtilmiştir (Anglen 2002). Monache ve ark (2008) 50 Hz 1 mT EMA uygulamasının insan endotel hücrelerinde *in vitro* olarak anjiogenez işlemini arttırdığını göstermişlerdir ve EMA'nın anjiogenez ile ilişkili bazı endotel fonksiyonlarını VEGF bağlı olan sinyal iletim yollarını etkileyerek değiştirdiklerini belirtmişlerdir.

EMA tek başına veya büyüme faktörleriyle birlikte kondrositlerin proliferasyon ve ekstraselüler matris proteinlerini sentez kapasitelerini arttırdığı bildirilmiştir. Mohamed-Ali ve ark (1995) yüksek frekanslı EMA uygulamasının embriyonik kartilaj dokusunda anabolik etkisini *in vitro* olarak göstermişlerdir. De Mattei ve ark (2007) kıkırdak doku kültürlerine EMA'nın kondrosit proteoglikan sentezini arttırdığını ve bu etkinin EMA ile birlikte insülin benzeri büyüme faktörü-1 arttığını göstermektedir (De Mattei ve ark 2004). Sürekli EMA [50 Hz, 2 mT, 30 dk/gün] ve darbeli EMA [1.3 msn aralıklar ile 75 Hz, 2.3 mT, 30 dk/gün] 7 gün tek tabaka ve pellet kondrosit kültürlerine tek başına veya büyüme faktörleri ile birlikte uygulandığında kondrosit proliferasyonunu ve ekstraselüler matris yapımını arttırıcı etkilere sahip olduğu bildirilmektedir. (Kozacı ve ark 2007, Kozacı ve ark 2008).

Kalp hızı düzenindeki azalmaların özellikle gençlerde öldürücü olduğu bildirilmektedir ve 60 Hz aralıklı EMA (20 μ T) uygulamasının normal kalp hızı düzeninde reversibl olarak azalttığı gösterilmiştir (Sastre ve ark 1998).

EMA'nın mikroorganizma özellikle bakteri ve mantar üzerine etkisi incelendiğinde 50 Hz EMA (10 mT) kültür ortamında *Saccharomyces cerevisiae* sayısını azlattığını ve büyümeleri üzerine yavaşlatıcı etki gösterdiği görülürken (Novak ve ark 2007), *Escherichia coli* ile *Paracoccus denitrificans* canlılıklarını ve sayılarını azaltmaktadır fakat bakterilerin morfolojisini değiştirmedeği belirlenmiştir (Fojt ve ark 2009).

1.6. Elektroforez

Sulu bir çözelti içinde, suspansiyeye ya da çözünmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine elektroforez denir. Bu küçük parçacıklar; bakteri hücreleri, virüsler, protein molekülleri veya sentetik parçacıklar olabilir. Doğal olarak bu parçacıkların çoğu elektrik yükü taşırlar (Kaya 2002).

Bir çözeltide bir iyon elektrik alan etkisi altında sabit hızla hareket yapar ve bu hız elektrik alan şiddeti ile orantılıdır. Nicel olarak,

$$\vec{V} = \mu \vec{E} \quad (1.26)$$

olup burada v iyonun hızı, μ mobilitesi ve \vec{E} elektrik alan şiddetidir. Ortam ve tanecik özelliklerine bağlı olan mobilite, farklı iyonlar için farklı değerler gösterir. Mobiliteleri birbirinden farklı iki cins artı iyon ihtiva eden bir çözeltide aynı elektrik alanında aynı yönde kazandıkları hızlar birbirinden farklı olur. Bunun sonucu olarak belli sürelerde alınan yollarda farklı olacağından tanıda bu iki farklı cins iyon birbirinden ayrılabilir.

Elektroforez olayının matematiksel analizini yapmak çok kolay değildir. Çünkü elektrik alanında diğer iyonlar (katyon ve anyonlar) da hareket eder. Bu iyonlar diğer makromoleküllerle kimyasal etkileşim yaparak elektriksel alanın özelliğini değiştirebilirler. Bu nedenle, hareket eden parçacığı izole ve viskoz bir ortamda küresel bir iletken gibi düşünebiliriz (Kaya 2002).

Yüklü makromoleküllerin elektriksel alan etkisinde göçlerinden yararlanarak, makromolekül karışımını ayırmak, özelliklerini ve konsantrasyonlarını belirlemek olanaklıdır. Protein moleküllerini ayırmak için de elektroforez yöntemi kullanılabilir çünkü plazma proteinleri farklı molekül ağırlıklarına ve elektriksel özelliklere sahiptirler (Pehlivan 1997).

Yüklü bir parçacığı elektrik alanında etkileyen elektriksel kuvvetler Coulomb Kanunu ile açıklanır. İki elektrik yükünün birbirine etkisi; yüklerin miktarı ile doğru orantılı, aralarındaki uzaklığın karesi ile ters orantılıdır.

$$F = K \cdot q_1 \cdot q_2 / d^2 \quad (1.27)$$

F= Etkileşim kuvveti (itme veya çekme kuvveti)

K= Ortamın dielektrik sabiti

$$K = 9 \cdot 10^9 \text{ N} \cdot \text{m}^2 / \text{C}^2$$

Q₁ ve Q₂= Yük miktarı (Coulomb)

Ayrıca yüke etki eden elektriksel kuvvet, elektron sayısı (n), elektron yükü (q=4,8x10⁻¹⁰ ve elektrostatik kuvvet=1,6x10⁻¹⁹ C) ve elektrik alan şiddeti (E) ile doğru orantılıdır.

$$F = nqE \quad (1.28)$$

Diğer taraftan, Stokes Kanununa göre: Yarıçapı r olan yüklü bir küre viskoz bir sıvıda hareket ederken F kuvvetinin etkisinde bir hız kazanır.

$$F = 6 \pi \eta r v \quad (1.29)$$

Burada F kuvveti, η viskozite sabitini, r iletken kürenin yarıçapını ve v partikülün hızını göstermektedir.

$$nqE = 6 \pi \eta r v \quad (1.30)$$

$$v/E = nq/6 \pi \eta r \quad (1.31)$$

$$v/E = \mu \quad (1.32)$$

Elde edilen 1.32 denklemi ile birim elektrik alanda parçacığın hızını ve mobilitasını belirleyebiliriz. Bu denklemin 1.31 ile modifikasyonu ile parçacığın mobilitasını elde ederiz.

$$\mu = nq/6 \pi \eta r \quad (1.33)$$

Bu denklem ile parçacık mobilitesi parçacığın yükü ile doğru orantılı fakat parçacığın büyüklüğü ve ortamın viskozitesi ile ters orantılı olduğu görülmektedir.

Elektroforez yöntemi çok iyi bir ayırma yöntemi olmakla birlikte makromolekülün yapısı hakkında fazla bilgi vermez. Sadece molekülün ağırlığını bulmakta kullanılır. Ancak son yıllarda yüklü parçacıkların molekül ağırlığına göre ayrılabilirdiği gibi, elektrik yüklerine göre de sınıflandırılabilir.

Elektroforezin kullanım alanlarını:

- Saflık kontrolü
- Molekül ağırlığı saptama
- Kalıtsal veya kalıtsal olmayan hastalık saptama
- Enzim izozimlerinin saptanması (tanısal amaçlı, populasyon çalışması için, adli tıpta)
- İmmünolojik ve moleküler biyoloji

olarak sıralayabiliriz.

1.6.1 Elektroforez Türleri

- Kağıt elektroforezi
- Selüloz asetat elektroforezi
- Jel elektroforezi
 - Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)
 - Agaroz jel elektroforezi
- Kapiller elektroforez

1.7. Proteinlerin Analizi

Protein karışımlarının ya da proteinlerin genellikle agaroz veya poliakrilamid jel içinde analizleri için değişik yöntemler bulunmaktadır. Elektroforetik yöntemler oldukça hızlı ve mikrogramla ifade edilebilecek hassasiyete sahip oldukları gibi boyama ya da otoradyografi ile jeldeki proteinlerin teşhisinde de son derece elverişli ve hassas oldukları bilinmektedir. Elektroforetik yöntemlerin bir diğer önemli özelliği de tek bir elektroforez ile çok sayıda örneğin analizine olanak sağlaması olduğu belirtilmiştir. Yıllardır temel elektroforetik yöntemler üzerinde pekçok modifikasyonlar yapılmıştır. Bu nedenle çok farklı jel sistemleri mevcuttur. Bunlardan en fazla kullanılanları aşağıda belirtilmiştir (Altıntaş ve Yolasığmaz 1997).

Sodyum Dodesil Sülfat jel elektroforezi: Protein örnekleri deterjan ile denature edilir ve SDS içeren jel sistemi içinde molekül büyüklüklerine göre ayrıştırmaya tabii tutulurlar.

Denatüre olmayan şartlar altındaki jel elektroforezi

Gradient jeller: SDS ve tampon jel ile birlikte tek bir akrilamid konsantrasyonunda hazırlanmaktadır. Bu jeller oldukça yakın şekilde elektroforez yapılan standart jel sistemlerinde proteinlerin ayrıştırmasını optimize edebilmektedir.

İzoelektrik nokta jeller: Bu yöntemle proteinler izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılmaktadır. Protein, izoelektrik noktasının eşit olduğu pH'a kadar jel üzerinde hareket etmesi prensibine dayanmaktadır.

İki yönlü jel: Proteinler öncelikle izoelektrik noktaları ile ayrıştırılmakta ve daha sonra SDS jel içinde yürütülmektedir.

1.7.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE'i proteinlerin analizi için en fazla kullanılan yöntemlerden birisidir. Proteinlerin karakterizasyonunda ve karşılaştırılmalarında kullanılan bu yöntemde, proteinler anyonik bir deterjan olan SDS ile reaksiyona girerek negatif yüklü kompleksler oluşturup, denatüre olurlar ve çözünürlük kazanırlar. Böylece proteinler yüklerindeki ve büyüklüklerindeki farklılığa göre poliakrilamid jelin kalbura benzer yapısında elektrofrez ile ayrıştırma işlemine tabii tutulurlar (Altıntaş 1991, Altıntaş ve Yolasiğmaz 1997).

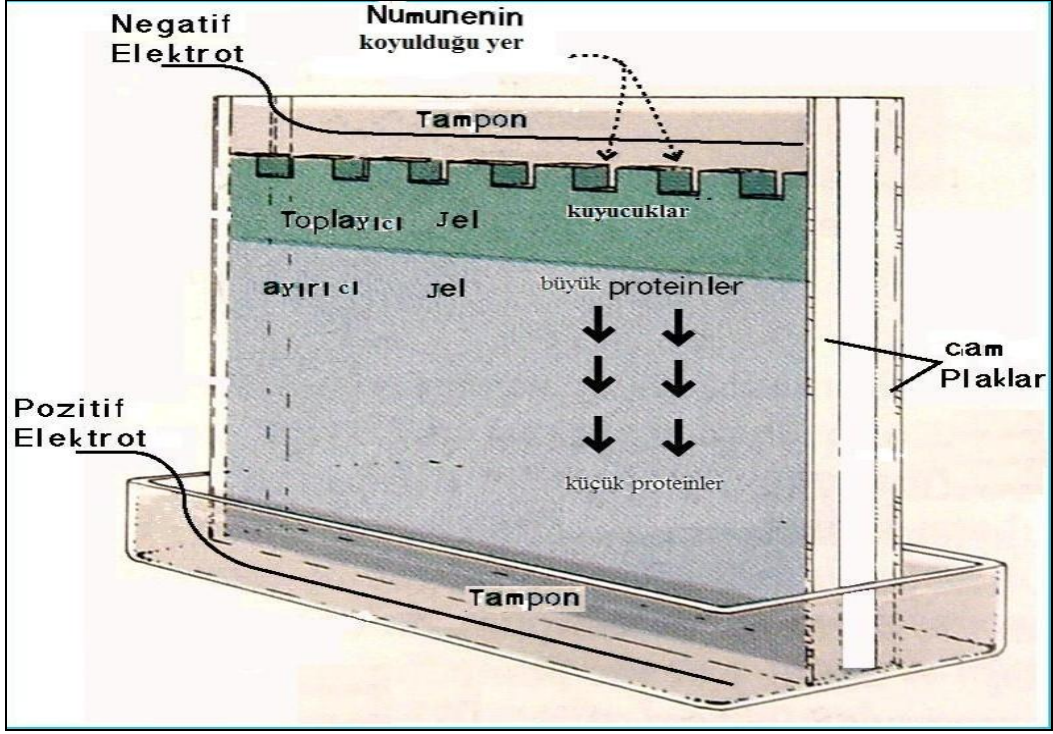
Poliakrilamid jellerin akrilamid ve bisakrilamid'den kimyasal polimerizasyon ile elde edildiği bilinmektedir. Amonyum persülfat ve katalizör olarak TEMED polimerizasyonu başlatmak için kullanılmaktadır (Sambrook ve ark 1989).

Proteinlere ve seçilecek tampon solüsyonlarına göre poliakrilamid yüzdesi değişmektedir.

$\% \text{Poliakrilamid} = \text{Total poliakrilamid/bisakrilamid şeklinde hesaplanır.}$

SDS-PAGE'de pH'ları ve bileşimleri farklı ayırıcı ve toplayıcı jel olmak üzere iki tip jel kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan örnekler toplayıcı jele konmaktadır. Toplayıcı jelde büyük hacimlerde bulunan SDS-protein bileşimlerinin çok küçük alanlara yoğunlaştırılmasının sağlandığı bilinmektedir. Elektrik akımı uygulandığında, SDS-protein bileşimleri elektrolit solüsyonu içinde bulunan klor ve glisin iyonları arasında hareket ederek

ayırıcı jele geçmeden önce toplayıcı jelde yoğun hale geldiği bildirilmektedir. Toplayıcı jelden ayırıcı jele geçen SDS-protein bileşimlerinin molekül büyüklüklerine göre ayrıldığı ifade edilmektedir (Tijssen 1985).



Şekil 1.10. Elektroforez düzeneği ([1]).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Deneylede Adnan Menderes Üniversitesi hayvan laboratuvarında yetiştirilmiş olan 100 adet (24-32 g) erkek Balb/c fare kullanılmıştır. Çalışma sürecinde fareler $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ çevre sıcaklığı, 12/12 saat aydınlık/karanlık siklusunun sağlandığı, bağıl nem oranı (40-50%) ve havalandırılması kontrol edilen semiklimatize bir odada barındırılmıştır. Fareler standart yem ile serbest olarak beslendi ve suluktan serbestçe su içmeleri sağlanmıştır. Cerrahi işlemler öncesinde fareler alışmaları için bir hafta süreyle laboratuvar ortamında tutulmuşlardır. Çalışma süresince kullanılan 100 fareden 40 tanesi *T.gondii* pasajı için kullanılmıştır. Tüm deneysel süreç Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Komitesi'nden alınan izin çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

Cerrahi işlemler öncesinde fareler servikal dislokasyon yolu ile sakrifiye edilmiştir. Tüm cerrahi işlemler aynı kişi tarafından ve standart teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Cerrahi işlemler batın bölgesinde gerçekleştirilmiştir.

2.2. Yöntem

Adnan Menderes Üniversitesi Parazitoloji Bilim Dalı'ndan temin ettiğimiz *T.gondii* takizoitlerinin farelerde hastalık oluşturacağı optimal dozun belirlenmesi amacıyla ön çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla değişik sürelerde ve değişik sayılarda takozoitler farelere enjekte edilmiş ve fare peritonundan alınan solüsyonlarda *T.gondii* miktarları belirlenmiştir. Bu ön standardizasyon çalışmaları sonucu ml'inde 10^5 *T.gondii* bulunan 0.2 ml periton sıvısının farelere verilmesi sonucu 5. günde farelerde hastalığa bağlı ölüm gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda 5 gün süresince enfekte farelere darbeli veya sürekli EMA uygulanmıştır.

2.2.1. Çalışma Grupları

In vivo ve *in vitro* deneylerde Sürekli EMA, Darbeli EMA ve kontrol grubu olmak üzere 3'er ayrı grup oluşturulmuş olup her grupta randomize olarak 10'ar fare bulunmaktadır.

Sürekli EMA Uygulanan Gruplar: *In vivo* deneyde farelere bir ml'sinde 10^5 *T.gondii* takizoitleri enjekte edilip, pleksglasstan yapılmış kafeste sabah 4 saat, öğleden sonra 4 saat olmak üzere toplam 8 saat sürekli 5 gün boyunca EMA uygulamasına maruz bırakılmıştır. *In vitro* deneyde ise farklı olarak *T.gondii* takizoitleri farelere enjekte edilmeden önce 1 gün boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de flaskların içinde sürekli EMA'ya maruz bırakılmıştır.

Darbeli EMA Uygulanan Gruplar: *In vivo* deneyde farelere bir ml'sinde 10^5 *T.gondii* takizoiti enjekte edilip, 5 gün boyunca toplam 8 saat EMA uygulanmasına maruz bırakılmıştır. *In vitro* deneyde ise farklı olarak *T.gondii* takizoitleri farelere enjekte edilmeden önce 1 gün boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de flaskların içinde darbeli EMA'ya maruz bırakılmıştır.

Kontrol Grupları: *In vivo* deneyde farelere bir ml'sinde 10^5 *T.gondii* takizoiti içeren solüsyonun intraperitoneal olarak enjekte edilip, EMA uygulanmadan fareler 5 gün boyunca kafeslerinde tutulurken, *In vitro* deneyde ise *T.gondii* takizoitleri flask içerisinde 1 gün boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiş, herhangi bir EMA uygulanmaksızın farelere enjekte edilmiştir.

2.2.2. RH Suşunun Takizoitlerin Fare Peritonu İçinde Üretilmesi

Çalışmada Balb/c cinsi beyaz laboratuvar fareleri kullanıldı. ADÜ Tıp Fakültesi Parazitoloji Bilim Dalı'ndan alınan RH suşu virulan suşlar olduklarından fare peritonu içinde üretilerek deney süresince kullanıldı. RH suşu insülin iğnesiyle deney farelerinin peritonlarına 0.2 ml miktarda enjekte edildi. Fareler oda sıcaklığında sabit nem koşullarında bekletildi. 5 gün sonra klinik belirtiler görülmeye başlandığında, servikal dislokasyon yolu öldürüldü ve karın bölgesi derileri Şekil 2.1'deki gibi soyuldu.



Şekil 2.1. Fare karın bölgesi derilerinin soyulması.

Fare peritonları içine pastör pipetiyle 10 ml Serum fizyolojik (SF) ile periton boşluğu iyice yıkandı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Serum fizyolojik ile fare periton boşluğunun yıkanması.

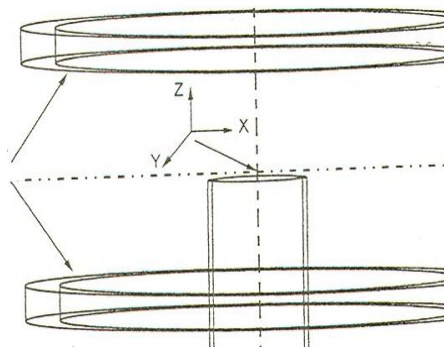
Peritona verilen sıvı pastör pipetiyle tekrar toplandı ve takizoitli periton sıvıları fare pasajı için uygun miktara getirildi.

2.2.3. Elektromanyetik Alanın *In Vivo* Etkisinin Gözlenmesi

T.gondii ile enfekte edilen farelere kuzey-güney doğrultusunda sürekli veya darbeli elektromanyetik alana maruz bırakıldı. Kontrol grubundaki fareler ise aynı süreyle ve aynı deney düzeneğinde manyetik alan dışında benzer şartlarda bulunduruldu.

2.2.3.1. Sürekli Elektromanyetik alan uygulaması

T.gondii ile enfekte edilen fareler 50 Hz frekansta, kuzey-güney doğrultusunda sürekli elektromanyetik alana maruz bırakıldı. Manyetik alan birbirine paralel olan bir çift 40 cm çapında helmholtz halkaları tarafından oluşturuldu. Halka başına 154 sarım ve maksimum 5 amper akım olacak şekilde düzenlenen sistemde, halka direnci 2.1 ohm ve maksimum akı yoğunluğu ise 3.5 mT olarak düzenlendi (Phywe, Almanya). Bu helmholtz halkalarıyla fareler 5 gün boyunca 4 saat sabahtan, 4 saat öğleden sonra olmak üzere (uygulamalar arasında 2 saat ara verilmiştir) toplam 8 saat 50 Hz, 2 mT elektromanyetik alana maruz bırakıldı. İki halka arasındaki manyetik alanın şiddeti okuma duyarlılığı 0.02 olan teslametre (Model 6010, SYPRUS, Orlando, ABD) ile ölçüldü. Böylece elektromanyetik alan içinde her yerde düzenli bulunduğu gösterildi. Örneklerin bulunduğu helmholtz halkaları geometrisi ve düzeneği Şekil 2.3 ve 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.3 Helmholtz halkaları geometrisi.



Şekil 2.4 Helmholtz halka düzeneği.

Bu çalışmada deneysel olarak $x=0$ da $B=2,00$ mT kullanılmıştır. Deneysel düzeneğinde Sarım sayısı (N) =154, İki Helmholtz halkası arası mesafe(R)=0,20 m ve Akım (I)= 3,0 A olarak kullanılmıştır. Bu değerleri kullanarak teorik olarak helmholtz halkalarında $x=0$ da elektromanyetik alan şiddeti (B) aşağıdaki formülle 2.07 mT olarak hesaplanmıştır.

$$B = 0,716 \frac{N \mu_0 I}{R} = 0,716 \frac{154 \times (4\pi \times 10^{-7} \text{ T.m/A}) (3,5 \text{ A})}{0,2 \text{ m}} = 2,07 \text{ mT}$$

2.2.3.2. Darbeli Elektromanyetik alan uygulaması

T.gondii ile enfekte edilen fareler, 5 gün boyunca günde toplam 8 saat boyunca birbirine zıt olarak yerleştirilmiş bir çift dairesel bakır halka (50 sarım, 0.5 cm çaplı) tarafından oluşturulan Darbeli EMA uygulamasına maruz bırakılmıştır. Bu düzenek ile (Igea, İtalya) 1.3 ms aralıklarla, 75 Hz, toplam 2.3 mT şiddette Darbeli EMA ve 2 mV uyarılmış elektrik alan oluşturuldu. Oluşan manyetik alan yüzeye paraleldir. Sistemde oluşan manyetik alanın şiddeti

Teslametre (Model 6010, SYPRUS, Orlando, ABD) ile deney sırasında takip edildi. Deneklere günlük olarak uygulanan Darbeli EMA uygulama protokolü aşağıda belirtilmiştir:

Saat: 8.00 → 2saat Darbeli EMA → 10.00 → 1saat dinlenme → 11.00 → 2saat Darbeli EMA → 13.00 → 1saat dinlenme →
Saat: 14.00 → 2saat Darbeli EMA → 16.00 → 1saat dinlenme → 17.00 → 2saat Darbeli EMA → 19.00



şekil 2.5. Darbeli Elektromanyetik Alan Deney Düzeneği

EMA uygulamalarından 5 gün sonra klinik belirtiler görölmeye başlandığında, fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi ve karın bölgesi derileri soyulup, 10 ml SF ile periton boşluğu iyice yıkandı. Tüp içine aktarılan takizoitli periton sıvıları, fare kaynaklı hücrelerin ve çeşitli kaba partiküllerin çökmesi için 5 dk 500 devirde oda sıcaklığında santrifüj edildi. Ardından üst sıvı alındı ve 10 dk 3000 devirde oda sıcaklığında santrifüj edildi. Aynı şekilde beş kez santrifüjden sonra üstteki sıvı atıldı. Dipteki takizoitler 2 ml SF ile sulandırıldı ve yıkanan takizoitli periton sıvıları içindeki *T.gondii* miktarı Thoma Lam'ı ile sayıldı. Örnekler çalışılana kadar -20°C saklandı.

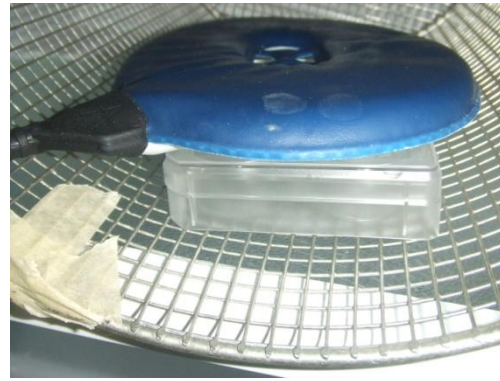
2.2.4. Elektromanyetik Alanın *In Vitro* etkisinin gözlenmesi

2.2.4.1. EMA Uygulaması

Fare pasajı ile elde edilen flaskların içindeki takizoitli periton sıvıları 1 gün boyunca 8 saat +4 °C'de uygulama gruplarında eş zamanlı olarak kuzey-güney doğrultusunda sürekli veya darbeli elektromanyetik alana maruz bırakıldı. Kontrol grubundaki tüp ise aynı süreyle ve aynı deney düzeneğinde manyetik alan dışında benzer şartlarda bulunduruldu.



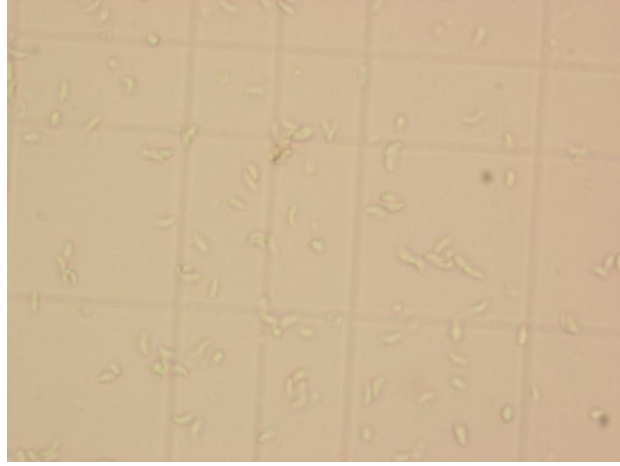
Şekil 2.6.a. *In vitro* deneyler için Helmholtz halkalarının deney düzeneği.



Şekil 2.6.b. *In vitro* Darbeli Elektromanyetik Alan Deney Düzeneği.

2.2.4.2. Farelerdeki etkinin Gözlenmesi

Fareler randomize olarak her grupta 10 fare olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır. 1 gün boyunca 8 saat +4 °C'de eş zamanlı olarak kuzey-güney doğrultusunda sürekli veya darbeli elektromanyetik alan uygulanan flaskların içindeki takizoitli periton sıvıları 1 ml sinde 10^5 *T.gondii* olacak şekilde farelere 0.2ml enjekte edildi. 5 gün sonra klinik belirtiler görülmeye başladığında, servikal dislokasyonla sakrifiye edildi ve karın bölgesi derileri soyulup, 10 ml SF ile periton boşluğu iyice yıkandı. Toplanan takizoitli periton sıvıları içindeki *T.gondii* miktarı Thoma Lam'ı ile sayıldı (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Thoma lamında *T.gondii*'lerin görüntüsü.

Her fare için farklı preparat olacak şekilde 30 preparat için 150 ml distile suyun içine 150 damla Giemmsa boyası damlatılıp, preparatlar boyandı ve *T.gondii*-makrofaj oranına bakıldı.

2.3. Değerlendirme yöntemleri

2.3.1. Genel değerlendirme

Değerlendirmeye alınan deneklerde çalışma sürecinde deneğin çalışma dışı bırakılmasını gerektiren durumların oluşup oluşmadığı sürekli gözlenmiştir.

2.3.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Elektromanyetik alanın *T.gondii*'nin antijenik yapısına etkisinin incelenmesi amacıyla SDS-PAGE yapılmıştır.

Testte kullanılan malzemeler:

- Mini elektroforez cihazı (Bio Rad, 170-3930)
- Güç Kaynağı (Bio Rad, Power Pac 300,165-5050)
- Kaynamış Su Banyosu

Kullanılan Kimyasal Maddeler:

- %30 Akrilamid/Bis hazırlandı.
- Amonyum persülfat (Applichem, A1142,0250)
- TEMED (N,N,N,N-Tetra-metil-etilendiamin) (Applichem, A 1148,0100)
- Trizma Base (SIGMA, 034K5447)
- Dodesilsülfat Natriyumsalz (SDS) (Merck, 822050)
- Glisin (Applichem, A1067,1000)
- Marker (Pre-stained SDS-PAGE standart Low Range) (Santa cruz, SC2360)
- SDS-Page Sample Buffer (Novex, LC2676)

Testte Kullanılan Solüsyonlar:

%30 luk Akrilamid/Bis :

- Akrilamid : 30.0 gr
- Bisakrilamid 0.8 gr
- Distile su ile 100ml'ye tamamlanmıştır

1M Trizma Base:

- Trizma Base : 12.11 gr
- Distile su ile 100ml'ye tamamlandıktan sonra pH' ı 6.8'e ayarlanmıştır.

Amonyum persülfat(%10):

- Distile Su 1ml
- Amonyum persülfat 0.1 gr

1.5 M Ayırıcı Jel:

- Tris 18,16 gr
- 100 ml distile su içinde çözüldü. pH ayarlaması HCl ile 8,8' e ayarlandı

%10 SDS:

- SDS 10 gr
- Distile Su 100ml

Elektrot Solüsyonu:

- Trizma Base 3 gr
- SDS 1 gr
- Glisin 14.4 gr

Testin Yapılışı:

- Testteki bütün işlemler eldiven giyilerek yapılmıştır.
- Kullanılacak cam ve diğer malzemeler test öncesinde steril edilmiştir.
- Elektroforez aletinin, biri kalın diğeri ince iki cam levhası birbiri üzerine getirildikten sonra mengene şeklindeki alet yardımıyla düzgün bir zeminde, dik olarak şekildeki gibi sehpaye yerleştirilmiştir.



Şekil 2.8. Elektroforez düzeneğinde cam levhaların yerleştirilmesi

- Cam levhalardan sızıntı olup olmadığını kontrol etmek için camların arasında oluşan aralığa alkol doldurulmuş ve sızıntı olup olmadığı gözlemlendikten sonra alkol kurutma kağıdına emdirilerek uzaklaştırılmıştır. Ayırıcı jel solüsyonu 50 ml'lik santrifüj tüpü içinde aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Ayırıcı jel solüsyonu (%10'luk):

- | | |
|--------------------------------|---------|
| • Distile Su | 4000 µl |
| • Akrilamid/Bis %30 | 3300 µl |
| • 1.5M Tris solüsyonu (pH:8.8) | 2500 µl |

- %10 SDS 100 µl
- %10 Amonyum Persulfat 100 µl
- TEMED 4 µl

TEMED ve amonyum persulfat polimerizasyonu başlattıkları için en son eklenmiştir. Hazırlanan ayırıcı jel solüsyonu cam levhaların arasına bir pipet yardımıyla dökülmüştür.

- Jelin hava ile temasının kesilmesi için üzerine %70'lik alkol dökülmüştür.
- Polimerizasyon için 45 dakika beklenmiştir.
- Polimerizasyon işleminden sonra jelin üzerindeki alkol kurutma kağıdı ile alınmıştır.

Toplayıcı jel solüsyonu:

- Distile Su 3400 µl
- Akrilamid/Bis %30 830 µl
- 1M Tris Solüsyonu 630 µl
- %10 SDS 50 µl
- %10 Amonyum persulfat 50 µl
- TEMED 5 µl

Toplayıcı jel solüsyonu de 50 ml'lik santrifüj tüpü içinde hazırlanmıştır.

- Toplayıcı jel solüsyonu ayırıcı jel solüsyonunun üzerine dökülmüştür ve hemen üzerine şekildeki gibi çok dişli tarak yerleştirilmiştir. Tarağın mutlaka toplayıcı jel içinde kalmasına, ayırıcı jel ile temas etmemesine ve jel ile tarak arasında hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Elektroforez düzeneğinde tarağın jele yerleştirilmesi.

- Toplayıcı jelin polimerizasyonu için 45 dakika beklenmiştir.
- Antijenin ideal sulandırım oranını belirlemek amacıyla *T.gondii* sıvısının farklı sulandırımları çalışılmıştır ve 15 µl antijen, 20 µl sample buffer karışımı belirlenmiştir.
- Ependorf tüplerin kapakları üzerine iğne ile 3-4 delik açılmış ve kaynar su içinde 5 dakika bekletilmiştir.
- Buzdolabından çıkarılan marker kaynar suyun içine daldırılıp çıkarılarak ısıtılmıştır.

Örneklerin Jelde Elektroforezi

- Taraklar jele zarar vermeden çıkarılmıştır.
- Jeldeki çukurlar çoklu tarak kullanılarak açıldığı için jelin baştaki çukuruna 8 µl standart işaret protein, diğer çukurlarına ise 20 µl örnek tampon solüsyonu ve antijen karışımı konulmuştur.



Şekil 2.10. Elektroforezde jelin çukurlarına marker ve örnek tampon solüsyonu ve antijen karışımının konulması.



Şekil 2.11. Elektroforez düzeneğinde cam levhaların elektrot tankına koyulmadan önce gerekli aparatlara takılması.

- Arasında jel bulunan cam levhalar elektroforez tankına yerleştirildi ve sonra soğuk ortamdan çıkarılan elektrolit solüsyonu ile elektroforez tankı jelin üzerinden taşmıyacak şekilde dolduruldu.
- Bu işlemlerden sonra elektroforez aletinin kapağı anod ve katod uçlarının doğruluğu kontrol edilerek kapatıldı ve cihaz, proteinlerin ayrılması işlemi için 1 saat 30 dakika süre ile 100 V 'luk sabit akıma ayarlanarak çalıştırıldı.



Şekil 2.12. Elektroforez düzeneğinde jelin elektrot tankına koyulması.

- Bu süre sonunda markırın oluşturduğu rengin jelin alt ucuna kadar gelip gelmediği kontrol edildi. Eğer hala gelmemişse, markır jelin alt ucuna ulaşınca kadar bir süre daha beklendikten sonra akım kesildi ve uçlar çıkarıldı.
- Jel, elektroforez aletinden dikkatli bir şekilde çıkarıldı.
- Antijenin ayrışıp ayrışmadığını kontrol etmek ve uygun antijenik konsantrasyonu saptamak amacıyla jel boyanmıştır.

2.3.2.1. Gümüş Nitrat Boyama

Gümüş boyama için gerekli malzemeler:

- Ultra distile su (>18 megohm/cm)
- Steril 10ml'lik pipetler
- Beher
- %30'luk etil alkol (ultra distile su ile hazırlanmış)
- Fiksatif (%40'luk etil alkol, %10'luk asetik asit, ultra distile su ile hazırlanmış)
- Sensitizer
- Boyama

- Geliştirici
- Developer Enhancer
- Durdurucu

Kullanılan Solüsyonlar

Fiksatif:

- Etil alkol 40 ml
- Asetik asit 10 ml

Ultra distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Yıkama Solüsyonu:

- Etil alkol 30 ml

Ultra distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sensitizing solution:

- Etil alkol 30 ml
- Sensitizer 10 ml

Ultra distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Boyama Solüsyonu:

- Stainer 1 ml

Ultra distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Geliştirici Solüsyon:

- Geliştirici 10 ml
- Developer enhancer 1 damla

Ultra distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Durdurucu

- Durdurucu 10 ml

Boyamanın uygulanışı:

- Elektroforezden sonra jel dikkatlice çıkarılıp ultra distile suda bir süre bekletildi.
- Ultra distile su dökülüp jel 100 ml'lik hazırlanan fiksatif solüsyonunda 20 dakika bekletildi.
- Fiksatif solüsyonundan çıkarılan jel 10 dakika boyunca %30'luk etil alkol ile yıkandı.
- Etil alkol dökülüp 10 dakika Sensitizing solutionda bekletildi.
- Sensitizing solutiondan çıkarılan jel 10 dakika %30'luk etil alkol ile yıkandı daha sonra 10 dakika ultra distile suda bekletildi.
- Ultra distile su dökülüp Boyama solüsyonunda 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

- Boyama tamamlandıktan sonra jel 100 ml'lik ultra distile su ile 20-60 saniye arasında yıkandı.
- Daha sonra 4-8 dakika bantlar görünmeye başlayıncaya kadar 100 ml'lik Geliştirici solüsyonda bekletildi.
- Geliştirici solüsyon dökülüp 10 ml durdurucu içinde jel 10 dakika boyunca kaldı.
- Son olarak durdurucu dökülüp 100 ml ultra distile su içinde jel bir gece boyunca bekletildi.

SDS-PAGE yönteminde ortaya çıkan bantların molekül ağırlıkları markır ve bir logaritmik cetvelden yararlanılarak hesaplanmıştır.

2.3.3. İstatistik

İstatistiksel değerlendirmede GraphPad Instad yazılımı kullanılmıştır. Veriler Kruskal-Wallis testi (parametrik olmayan veriler için) ile analiz edilmiştir. Değerlendirmelerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sayısal değerler aritmetik ortalama \pm standart hata olarak ifade edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Genel Değerlendirme Bulguları

EMA uygulama sırasında *in vitro* deneylerde herhangi bir fare kaybı olmadığından değerlendirmeye 30 fare dahil edilmişken, *in vivo* deneylerde ise altı fare çalışma dışı kalmış ve değerlendirmeye sağlıklı olan 24 fare dâhil edilmiştir. Deneklere günlük kilo takibi yapılmıştır. Tedavinin başı ile sonu arasında hem *in vivo* hem de *in vitro* deney gruplarında kilolar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 3.1 ve 3.2). Farelerin canlılığı, hareketliliği ve beslenmesi günlük olarak izlenmiştir ve bunun sonucunda farelerin sağlıklı bir süreç geçirdikleri saptanmıştır.

EMA Grupları	n	1. Gün	5. Gün
Sürekli EMA	10	28,4 ± 2,01	24,4 ± 1,83
Darbeli EMA	10	28,2 ± 2,4	25,4 ± 2,12
Kontrol	10	28,6 ± 2,3	25,2 ± 1,93

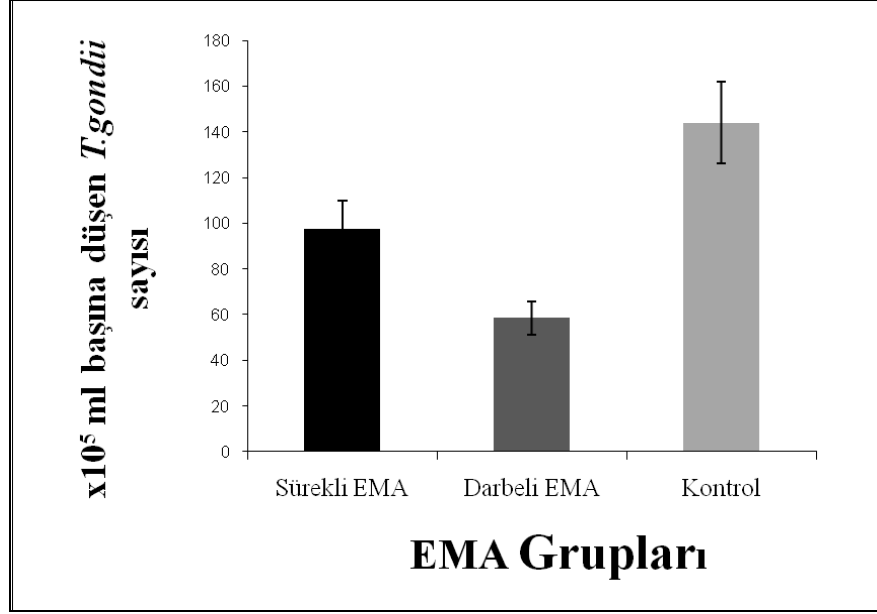
Çizelge 3.1. Kilo takibi *in vitro* deney grubu.

EMA Grupları	n	1. Gün	5. Gün
Sürekli EMA	8	28,25 ± 1,3	24,75 ± 1,4
Darbeleri EMA	8	27,7 ± 1,7	24,0 ± 1,5
Kontrol	8	28,0 ± 1,5	25,9 ± 1,85

Çizelge 3.2. Kilo takibi *in vivo* deney grubu.

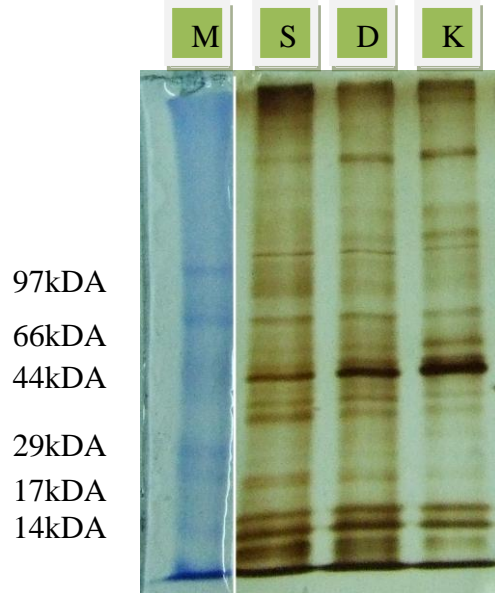
3.2. Elektromanyetik Alan *In Vivo* Etkisinin Değerlendirilmesi

EMA'nın beş gün süreyle uygulanmasından sonra fare periton yıkama sıvısından alınan takizoitli sıvılar Thoma lamı ile incelenmiştir ve EMA uygulamalarının sonunda mililitreye düşen *T.gondii* miktarı EMA'a maruz kalmayan kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. 50 Hz ve 2 mT sürekli EMA'ya maruz bırakılan deney grubunda ml'ye düşen ortalama *T.gondii* sayısı $(97.5 \pm 12) \times 10^5$ olarak belirlenirken kontrol grubunda ise $(144 \pm 18) \times 10^5$ olarak hesaplanmış olmasına karşın iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p > 0,05$). 75 Hz ve toplam 2.3 mT şiddette uygulanan darbeleri EMA uygulaması ile ml'ye düşen ortalama *T.gondii* sayısında $(59 \pm 7) \times 10^5$ olarak hesaplanmıştır ve ml'deki *T.gondii* sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmış olduğu saptanmıştır ($p < 0,01$).



Şekil 3.1 *In vivo* EMA ölçümlerinden elde edilen *T.gondii* sayı değerleri.

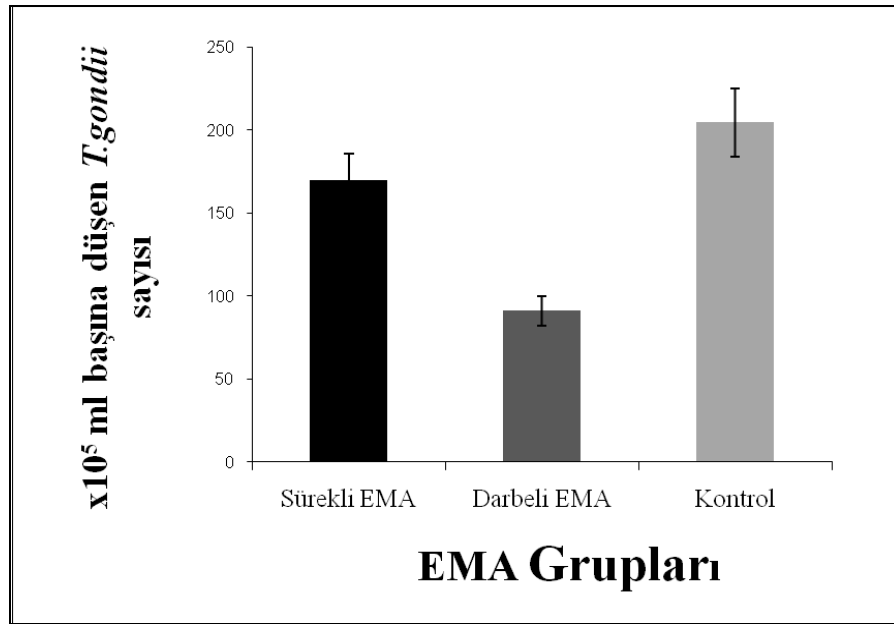
Örneklerdeki takizoit sayıları eşitlenerek SDS-PAGE yöntemiyle incelenen *T.gondii* protein bantlarında EMA uygulamaları ile kontrol grubu arasında farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 3.2. *In vivo* deney sonunda SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılan *T.gondii* protein bantlarının gümüş nitrat ile boyanmış görüntüsü (**M**:Markır, **S**:Sürekli EMA, **D**:Darbeli EMA, **K**:Kontrol).

3.3. Elektromanyetik Alan *In Vitro* Etkisinin Değerlendirilmesi

Flaskların içindeki takizoitli periton sıvılarına +4°C'de 1 gün boyunca EMA uygulanmasından sonra bu takizoitli periton sıvıları farelere enjekte edilmiş ve bu farelerde yaşam sürelerinde herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Fare peritonlarından alınan takizoitli sıvılar Thoma lamı ile incelenmiştir ve *T.gondii* sayısı hesaplanmıştır. Sürekli EMA ve Darbeli EMA uygulanan gruplardaki ml'deki ortalama *T.gondii* sayısı sırasıyla $(170\pm 17)\times 10^5$ ile $(91\pm 9)\times 10^5$ olarak belirlenirken kontrol grubunda ise ml'deki ortalama *T.gondii* sayısı $(205\pm 20)\times 10^5$ olarak hesaplanmıştır. Darbeli EMA uygulaması ile kontrol grubuna göre ml'deki *T.gondii* sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanırken ($p<0,05$) Sürekli EMA uygulamasında görülen azalma istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$).



Şekil 3.3. *In vitro* EMA ölçümlerinden elde edilen *T.gondii* sayı değerleri.

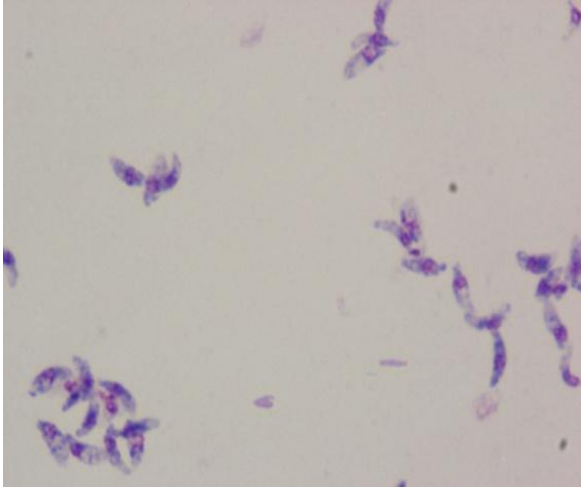
Her denekten alınan periton sıvıları için preparatlar boyanmış ve makrofaja başına düşen ortalama *T.gondii* miktarları belirlenmiştir (Çizelge 3.3). Sürekli EMA ile kontrol grubu arasındaki makrofaja başına düşen ortalama *T.gondii* sayısında istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalma görülürken ($p>0,05$), Darbeli EMA ile kontrol grubu

karşılaştırıldığında makrofaj başına düşen ortalama *T.gondii* sayısındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).

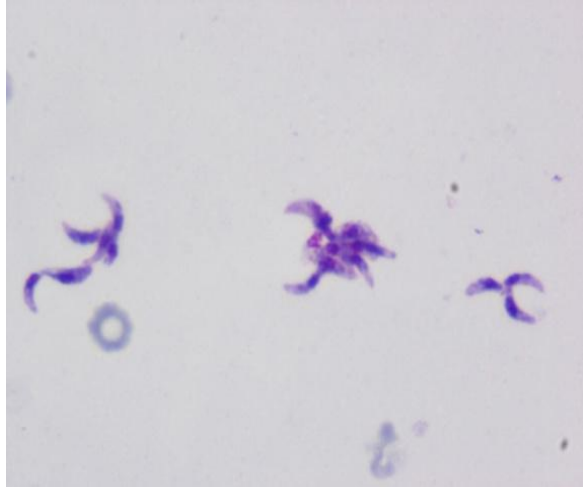
Deney Grupları	n	Makrofaj başına düşen ortalama <i>T.gondii</i> sayısı
Sürekli EMA	10	158,0± 15,8
Darbeli EMA	10	83,5± 8,3
Kontrol	10	223,5± 22,3

Çizelge 3.3. Deney grupları için makrofaj başına düşen *T.gondii* ortalaması.

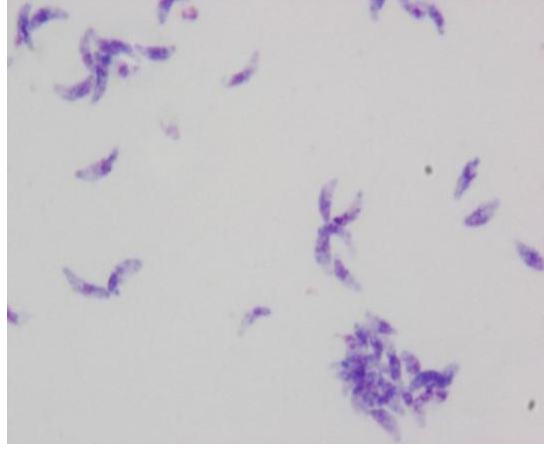
Deney grupları ve kontrolden alınan periton sıvısından hazırlanan preparatlar Şekil 3.4-3.6 gösterilmektedir. Darbeli EMA uygulamasında daha fazla makrofaj görülürken kontrol grubunda ise daha fazla *T.gondii* görülmüştür (Şekil 3.4-3.6).



Şekil 3.4. Sürekli EMA uygulanan *T.gondii* takizoitleri.

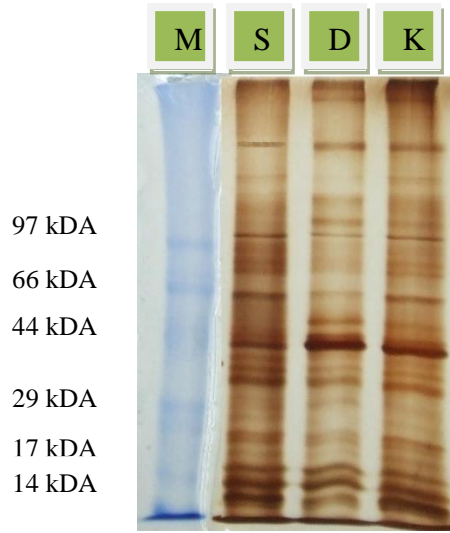


Şekil 3.5. Darbely EMA uygulanan *T.gondii* takizoitleri.



Şekil 3.6. Kontrol grubu *T.gondii* takizoitleri.

Takizoit sayıları eşitlenerek SDS-PAGE yöntemiyle deney gruplarında incelenen *T.gondii* protein bantlarında belirgin farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. *In vitro* deney sonunda SDS-PAGE ile oluşan antijen bantlarının gümüş nitrat ile boyanmış görüntüsü (**M**:Markır, **S**:Sürekli EMA, **D**:Darbeli EMA, **K**:Kontrol).

Jel boyandıktan sonra oluşan bantların molekül ağırlıkları değerlendirildiğinde 6 ile 120 kDa molekül ağırlığında olduğu belirlenmiştir. En koyu boyanan bantların 60-70 kDa arasında ve 30-35 kDa seviyesinde olduğu gözlenmiştir. Diğer bantlar ise 6, 12, 22, 23, 35, 43, 49, 108 kDa hizasında görülmüştür.

4. TARTIŞMA

Günlük yaşantımızda kullandığımız çeşitli taşıtlar ve elektrikli ev aletleri elektromanyetik alan oluşturan ortamlardır. Işık hızıyla yayılabilen elektromanyetik dalgaların oluşturduğu elektrik ve manyetik alan bileşenleri mevcuttur. Elektrik ve manyetik alanlar herhangi bir elektrikli aleti çevreleyen görünmez kuvvet çizgilerdir. Elektrik alanları voltaj tarafından üretilir ve voltaj arttıkça daha güçlü hale gelirler. Manyetik alanlar, teller ya da kablolardan akım geçmesi sonucu oluşur ve gücü, akım arttıkça artmaktadır. Değişik şiddet, frekans, enerji ve doğrultulardaki elektromanyetik alanların canlı organizmaların biyolojik dengelerinde değişimler yarattığı ve bu değişimlerin pek çok çalışmada araştırıldığı bildirilmiştir. Elektromanyetik alanların molekül ve iyonların biyolojik membranların içinden seçimli geçmesini etkileyebildiği, hücre yüzeydeki tabakaların yapısını değişiklik oluşturabildiği, membrana bağlanmış yeni moleküllerin yolunu ya da yüzeye bağlanmasını etkileyebildiği bildirilmiştir (Çetin 2005).

Çevresel etkilerin de stres genlerinin aktifleşmesini sağladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Blank ve Goodman 2001). Kariya ve ark (2006) 50 Hz elektrik alanının *T.gondii* ile enfekte olmuş farelerin hareketliliğine etki göstermediği fakat oksidatif stres cevaplarının erken safhasında inhibe edici rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca elektrik alanının *T.gondii* ile enfekte olan farelerin yaşam süresine bir etki göstermediğini belirtmişlerdir (Kariya ve ark 2006). Bu çalışmada da 50 Hz sürekli EMA'nın *T.gondii* ile enfekte olan farelerdeki *T.gondii* sayısına etkisi istatistiksel olarak anlamlı olarak belirlenmemiştir fakat 75 Hz darbeli EMA'nın enfekte farelerdeki *T.gondii* sayısında istatistiksel olarak azalma oluşturduğu görülmüştür.

EMA'nın canlılar üzerine ne tür etkilerinin olduğunun araştırılması için yapılan çalışmalarda, özellikle kromozom ve DNA incelemelerinde 0,1 ile 7,5 mT arasındaki dozlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Winker ve arkadaşları insan fibroblast hücrelerini 1 mT EMA'nı 2-24 saat süreyle maruz bırakmışlar ve çalışma sonucunda hem kromozomal anormallikler bakımından hem de mikronukleus oluşumu bakımından önemli düzeyde artışlar tespit ettikleri bildirilmiştir (Winker ve ark 2005). Bu çalışmada enfekte periton sıvılarından alınan örneklerle 2 ve 2.3 mT dozunda uygulanan EMA'nın SDS-PAGE yöntemiyle yapılan incelemede EMA'nın protein bantlarında belirgin bir etkisi saptanmamıştır.

Aksoy ve ark (2005) *Entamoeba histolytica* (*E.histolytica*) ve *Entamoeba dispar* (*E. dispar*) örneklerine 1 saat aralıklarla 60 saniye olarak 37 ve 22°C'de toplam 24 saat süreyle 900 MHz frekansındaki elektromanyetik radyasyon uygulamışlar ve maruziyet sonunda sıcaklıktan bağımsız olarak *E.histolytica* ve *E.dispar* sayılarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma saptamışlardır ($p<0,01$). Rodriguez-De la Fuente ve ark (2008) 1, 1,5 ve 2 mT dozlarında 60 Hz EMA'nın *Entamoeba invadens*'in büyüme ve diferansiyasyonu üzerine etkisini incelediklerinde 1,5 ve 2 mT EMA'ya maruz kalan trofozoit kültürlerinde büyümeyi inhibe edici etkiyi göstermişlerdir. Bu çalışmada da başka bir parazit olan *T.gondii*'ye benzer şekilde 1,3 saniye aralıklarla 2 saat maruziyet ve 1 saat ara şeklinde toplam 8 saat/gün uygulanan 2.3 mT 50 Hz darbeleri EMA ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, *T.gondii* sayısında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma belirlenmiştir ($p<0,01$). Rodriguez-De la Fuente ve ark (2008) EMA'ya maruziyet sonucu hücre sayısındaki azalmanın hücre siklusunun etkilenmesi sonucu olduğunu belirtmişlerdir. Goodman ve ark (1993) ise hücre içi kalsiyum konsantrasyonu değişiminin büyüme işleminde rol alan genleri etkileyen sinyal iletim mekanizmasını etkilemesinin etkili olduğunu belirtmişleridir. Bu iki mekanizma bu çalışmada da hücre sayısındaki azalmayı açıklamaya yardımcı olabilir.

Ramstad ve ark. (2000) 550 V/m elektriksel alanın prokaryot *Propionibacterium acnes* canlılığını %50 azalttığını bildirmişlerdir. 50 Hz elektrik alanının Elektromanyetik alana maruz kalan *Caenorhabditis elegans*'da ısı şok proteinlerinin salgılanmasını artırdığı belirtilmiştir (Miyakawa 2001). *T.gondii*'ye uygulanan 50 Hz sürekli EMA'nın ml deki hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma yapmadığını ve SDS-PAGE de elde edilen protein bantlarında kontrol grubuna göre farklılık gözlenmemiştir.

Silyalı bir protozoa olan *Paramecium* çevresel uyarılara yüzme özelliğini değiştirerek cevap verdiği bildirilmektedir (Nakaoka ve ark 2000). Hemmersbach ve ark 50 Hz ve 0.5-2 mT EMA uygulaması ile *Paramecium*'un ortalama yüzme hızının ve *Paramecium* hücreindeki yöne bağlı dönme sayısının EMA dozuna bağlı olarak arttığını göstermişlerdir. Bu sonuç düşük doz EMA'nın bile protozalarda etki gösterebileceğini belirtmektedir (Hemmersbach ve ark 1997). Buna karşılık Dihel ve ark (1985) 72 Hz darbeli EMA maruziyetin *Paramecium* hücre bölünme hızını arttırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmada *T.gondii*'in hücre içine girişinde de benzer doz EMA'nın etki göstereceği *Paramecium*'un siliasına etki ettiği gibi gözlenmeye çalışılmış fakat SDS-PAGE yönteminde bu etki gözlenmemiştir.

Delgado bir bakteri olan *Lactobacillus acidophilus* 'a 26 Hz ve 40 Gauss (4 mT) dozunda darbeli EMA'a uygulaması ile bakterinin üremesinin inhibe olduğunu gözlemiştir (Delgado 1985). Benzer şekilde daha az dozda (2 ve 2.3 mT) uygulanan EMA'nın bir parazit olan *T.gondii* sayısında hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerde azalma olduğu belirlenmiştir. Graham ve arkadaşlarının (2000) yapmış olduğu çalışmada, 1.5 ve 80 μ T'lı elektromanyetik alanların (60Hz) *Drosophila melanogaster* üzerine etkileri araştırılmış ve bunun sonucunda drosophila'nın ağırlığında tanımlanabilir düzeyde değişiklikler elde edilmiş, 80 μ T'daki manyetik alan uygulanan drosophila'ların gelişiminin 1.5 μ T'daki manyetik alana göre daha yavaş olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada 50 ve 75 Hz EMA maruziyetinin *T.gondii* ile enfekte olan farelerin ağırlığında anlamlı bir fark olduğu saptanmamıştır.

Drosophila üzerine Goodman ve ark (1992) yaptıkları çalışmada, çok düşük seviyede EMA'ya 20 dakika maruziyetin canlılarda translasyon seviyesinde değişikliklere neden olduğununun SDS-PAGE ile göstermişlerdir. Bu çalışmada ise *T.gondii* üzerine 50 ve 75 Hz olarak uygulanan EMA'nın SDS-PAGE ile yapılan incelemelerde belirgin bir azalma ya da artma görülmemektedir ve daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Fojt ve ark (2004) *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'u 50 Hz ve 10 mT dozunda EMA'na maruz bıraktıklarında (30 dakikadan kısa süreli) koloni oluşturan birimlerinin sayısında kontrollere göre azalma saptanmıştır. Elektromanyetik alana maruziyet başlar başlamaz en fazla olarak *Escherichia coli*'de daha az olarak da *Staphylococcus aureus* soylarında koloni oluşturan birim sayılarında azalma saptanmıştır. Bakterilerde hemen

başlayan sayısal azalma, en az 8 saatlik ve özellikle darbeleri EMA maruziyetinden sonra ml'deki *T.gondii* sayılarında görülebilmektedir.

Bir protozoa olan *Eimeria maxima* sonucu kuşlarda oluşan enfeksiyon, 21 gün süresiyle 5 μ T /30 dakika/gün EMA verilmesiyle azaldığı gösterilmiştir. EMA'nın etkisi enfekte kuşların dışkılarının gram ağırlığındaki ookist sayısındaki azalmasının belirlenmesiyle göstermişlerdir (Elmusharaf ve ark 2007). Bu çalışmada ise EMA'ın etkisi enfekte farelerin periton sıvılarında alınan *T.gondii*'lerin sayılarındaki değişimin gösterilmesiyle belirlenmiştir.

5. SONUÇ

1. *In vivo* deneyde *T.gondii* ile enfekte edilen farelere 50 Hz 2 mT şiddette sürekli EMA 5 gün boyunca günde 8 saat olacak şekilde uygulanması sonunda periton sıvısından yapılan incelemede mililitreye düşen *T.gondii* sayısının EMA uygulanmayan kontrol grubuna göre azaldığı görülmüş fakat bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).
2. *In vivo* deneyde *T.gondii* ile enfekte edilen farelere 75 Hz, toplam 2.3 mT şiddette darbeleri EMA 5 gün boyunca günde 8 saat olacak şekilde uygulanması sonunda periton sıvısından yapılan incelemede mililitreye düşen *T.gondii* sayısının EMA uygulanmayan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı gözlemlenmiştir ($p < 0,01$).
3. *In vivo* deneyinde *T.gondii* ile enfekte edilen farelerin kilolarında sürekli veya darbeleri EMA uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır ($p > 0,05$).
4. *In vitro* deneylerde fare peritonlarından alınan takizoitli sıvılara + 4 °C 8 saat boyunca sürekli veya darbeleri EMA uygulanmıştır. Daha sonra *T.gondii* enjekte edilen denekler beş gün boyunca gözlemlenmiş ve takiben sakrifiye edilmiştir. Periton sıvılarından alınan örneklerde ml'ye düşen *T.gondii* miktarı *in vivo* deney düzeneğine benzer şekilde Sürekli EMA uygulanlarda kontrol grubuna göre azalmıştır fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Darbeleri EMA uygulaması ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ml başına düşen *T.gondii* sayısını azaltmıştır ($p < 0,05$).

5. *In vitro* deneyde farelere EMA uygulanmış *T.gondii* enjekte edilmiştir ve farelerin yaşam süresinde değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Bu farelerin kilolarında da EMA uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmamıştır ($p>0.05$).
6. *T.gondii* takizoit sayıları eşitlenerek *in vivo* ve *in vitro* deney düzeneklerinde bulunan üç farklı deney grubumuzun SDS-PAGE yöntemi ile incelenmesinde *T.gondii*'ye ait protein bantları gözlenmiştir fakat *in vivo* ve *in vitro* EMA uygulamasının bu protein bantlarında kontrol grubuna göre belirgin bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmemiştir.

Sonuç olarak elektromanyetik alanın *T.gondii* proliferasyonu üzerinde etkilerinin bulunduğu gözlemlenmiştir. Fakat bu etkinin gösterilebilmesi için SDS-PAGE yönteminden daha spesifik olan ileri tekniklerin kullanılmasının gerektiğine ve daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğu görüşüne varılmıştır.

ÖZET

Toxoplasma gondii (*T.gondii*) bütün dünyada yaygın olarak bulunan ve bütün memelileri enfekte edebilen hücre içi bir parazittir. Parazit konak hücreye plazma membranında parazitik vakuol oluşturmak suretiyle saldırılmaktadır. Virülant toxoplasma infeksiyonundan sorumlu etkenler ve mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmada elektromanyetik alanın *T.gondii*'nin hem hücre içine girişine hem de virulansına olan olası etkileri incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca *T.gondii* model olarak kabul edilerek hücre içi organizmalara elektromanyetik alanın olası etkisinin belirlenmesi planlandı.

T.gondii'ye elektromanyetik alanın etkisi *in vitro* ve *in vivo* deneyler ile incelenmiştir. Çalışmamızda erişkin erkek Balb/c fareler, her grupta rastgele olarak seçilen 10 fare olacak şekilde kullanıldı. *In vivo* deneylerde erişkin erkek Balb/c farelere 1 ml sinde 10^5 *T.gondii* bulunan solüsyon intraperitoneal olarak enjekte edildi. Sonra 5 gün boyunca darbeleri (1.3 msn aralıklarla, 75 Hz, 2.3 mT, 8 saat/gün) ve sürekli (50 Hz, alternatif akım, 2 mT, 8 saat/gün) elektromanyetik alan enfekte farelere uygulandı. Kontrol grubuna ise herhangi bir elektromanyetik alan uygulanmamıştır. *In vitro* deneylerde ise takizoitli periton sıvıları bir gün boyunca +4 ° C'de eş zamanlı olarak sekiz saat süreyle sürekli veya darbeleri elektromanyetik alana maruz bırakıldı. Kontrol grubundakilerde ise elektromanyetik alan uygulaması hariç bütün koşullar aynı tutuldu. Sonra, elektromanyetik alan uygulanan veya uygulanmayan takizoitli periton sıvıları, ml sinde 10^5 *T.gondii* olacak şekilde farelere enjekte edildi. Toplanan takizoitli periton sıvıları içindeki *T.gondii* miktarı elektromanyetik alanın etkisini göstermek için sayıldı. Alınan bütün örneklerde SDS-PAGE yöntemi ile *T.gondii* protein bantları incelendi.

In vivo ve *In vitro* deneyler, darbeleri ve sürekli elektromanyetik alana maruz bırakılan deney gruplarında *T.gondii* sayısında kontrol grubuna göre azalma saptandığını belirlenmiştir. Buna karşılık SDS-PAGE yöntemi ile incelenen *T.gondii* protein bantlarında anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır. Bu sonuçlar elektromanyetik alanın *T.gondii* üzerine bazı

etkilerinin bulunduğunu fakat bu etkilerin tam olarak anlaşılabilmesi için daha ileri tekniklerle incelenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: darbeli elektromanyetik alan, fare, SDS-PAGE, sürekli elektromanyetik alan, *T.gondii*.

SUMMARY

Toxoplasma gondii (*T.gondii*) is an intracellular parasite found throughout the world and capable of infecting all mammals. The parasite invades the host cell through its plasma membrane with formation of a parasitophorous vacuole. Factors and mechanism responsible for virulent toxoplasma infections has not been explained yet. The possible effects of electromagnetic fields (EMF) on both the invasion of the host cell and virulence of *T. gondii* are aimed in this work. Furthermore, determination of the possible effect of EMF on intracellular microorganisms was planned by taking *T.gondii* as a model.

Electromagnetic effects on *T.gondii* have been shown by *in vitro* and *in vivo* experiments. In our study, adult male Balb/c mice have been used, containing randomly selected 10 mice in each group. During *in vivo* experiments, the solutions containing 10^5 *T.gondii* per ml were intraperitoneally injected into the male adult Balb/c mice (n=30). Then, pulsed (duration time 1.3 ms, 75 Hz, 2.3 mT 8 hr/day) and continuous (50 Hz, alternating current, 2 mT, 8 hr/day) EMF were applied for 5 days to the infected mice. EMF didn't apply to the control group. During *in vitro* experiments, pulsed (duration time 1.3 ms, 75 Hz, 2.3 mT) and continuous (50 Hz, alternating current, 2 mT) EMF were applied to the tachyzoites containing peritoneal liquids for 8 hours at 4 °C in a day. The same conditions except EMF were applied to the controls. Then, tachyzoites containing periton liquids which were exposed either EMF or not have been injected to mice containing 10^5 *T.gondii* per ml. The amount of *T.gondii* within all tachyzoites containing periton liquid has been counted to determine the effect of EMF. All the taken samples have been investigated of *T.gondii* protein bands by using SDS-PAGE technique.

In vivo and *in vitro* experiments determined that pulsed and continuous EMF reduced the number of *T.gondii* compared to controls. However, no differences have been observed at the protein bands of *T.gondii* examined by SDS-PAGE technique. These results showed that EMF has some effects on *T.gondii* but these effects should be investigated by using advance techniques.

Key Words: continuous electromagnetic field, mice, pulsed electromagnetic field, SDS-PAGE, *T. gondii*.

KAYNAKLAR

Adey WR (1988) *Cell membranes: the electromagnetic environment and cancer promotion*, Neurochem Res, 13: 671-677.

Ahlbom A, Bridges J, de Seze R, Hillert L, Juutilainen J, Mattsson MO, Neubauer G, Schüz J, Simko M, Broman K (2008) *Possible effects of elektromagnetic fields (EMF) on human health-opinion of the scientific committee on emerging and newly identified health risks (SCENIHR)*, Toxicology, 246(2-3): 248-250.

Altıntaş K (1997) *Tıbbi Genel Parazitoloji ve Protozooloji*, Medical Network & Nobel, s: 171-188

Altıntaş N (1991) *SDS -Polyacrylamide gel elektroforezi ile proteinlerin Seperasyonu*, Türkiye Parazitoloji Dergisi., 15:119-129.

Altıntaş N, Yolasıǧmaz A (1997). *Proteinlerin analizi ve SDS-PAGE*, Özcel MA, Altıntaş N, (ed), *Parazit Hastalıklarında Tanı*, Türk Parazitol Dern Yayın No:15, s: 321-341.

Aksoy Ü, Sahin S, Ozkoc S, Ergor G (2005) *The effect of electromagnetic waves on the growth of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar*, Saudi Med J, Vol. 26 (9): 447-450.

Anglen J. (2002) *Enhancement of Fracture Healing With Bone Stimulators*, Techniques in Orthopaedics, 17: 506-514.

Appleford PJ, Smith JE (2000) *Strain and stage specific variation in Toxoplasma gondii antigens*, Int J Parasitol, 30: 1187-1191.

Atmaca LS, Şimşek T, Batioglu F (2004) *Clinical features and prognosis in ocular toxoplasmosis*, Jpn J Ophthalmol, 48: 386-391.

Beaman MH, McCabe RE, Wong S, Remington JS (1995) *Toxoplasma gondii*, Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4th Ed., Churchill Livingstone, pp: 2393-2525, New York.

Beckers CJ, Dubremetz JF, Puijalon OM, Joiner KA (1994) *The Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm, *J Cell Bio*, 127: 947-961.

Blank M ve Goodman R (2001) *Electromagnetic initiation of transcription at specific DNA sites*, *Journal of Cellular Biochemistry*, 81: 689-692.

Bonassar LJ, Grodzinsky AJ, Frank EH, Davila SG, Bhaktav NR, Trippel SB (2001) *The effect of dynamic compression on the response of articular cartilage to insulin-like growth factor-I*, *J Orthop Res*, 19: 11-17.

Boyer KM, Remington JS, Mcleod RL (1998) *Toxoplasmosis*, Feigin RD, Cherry JD (eds), *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 4th Ed., WB Saunders, p:2473-2490, Philadelphia.

Cleveland RF, Ulcek JL (1999) *Questions and answers about biological effects and potential hazards of radiofrequency electromagnetic fields*, 4th Ed., OET Bulletin, p: 1-8.

Çetin ND (2005) *X bandındaki elektromanyetik alanın Dropshila Melonagaster'de somatik mutasyon oluşumuna etkilerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Darde ML (2004) *Genetic analysis of the diversity in Toxoplasma gondii*, *Ann Ist Super Sanita*, 40: 57-63.

Davidson MM (1992) *Clinical features. Human Toxoplasmosis*, Ho-Yen DO, Joss AWL (eds), Oxford University Press, Chapter 8, p: 204-225, New York.

De Mattei M, Fini M, Setti S, Ongaro A, Gemmati D, Stabellini G, Pellati A, Caruso A. (2007) *Proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage explants exposed to different low-frequency low-energy pulsed electromagnetic fields*, *Osteoarthritis Cartilage*, 15: 163-168.

Delgado JMR (1985), *Biological effects of extremely low frequency electromagnetic field*, *J of Bioelectricity*, 4 (1): 75-91.

Delorme V, Cayla X, Faure G, Garcia A, Tardieux I (2003) *Actin dynamics is controlled by a Casein Kinase II and Phosphatase 2C interplay on Toxoplasma gondii toxofilin*, *Mol Biol Cell*, 14: 1900-1912.

Dihel LE, Smith-Sonneborn J, Middaugh CR (1985) *Effects of an extremely low frequency electromagnetic field on the cell division rate and plasma membrane of paramecium tetraurella*, *Bioelectromagnetics*, 6(1): 61-71.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA (1998) *Structures of toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts*, *Clin Microbiol Rev*, 11: 267-299.

Elmusharaf MA, Cuppen JJ, Grooten HNA, Beynen AC (2007) *Antagonistic effect of electromagnetic field exposure on coccidiosis infection in broiler chickens*, *Poultry Science*, 86: 2139-2143.

Ertabaklar H, DüNDAR S, Aktunç T, Ertuğ S (2005) *Oküler Toxoplazmosis: olgu sunumu*, *Türkiye parazitoloji Dergisi*, 29(2): 73-75.

Ertuğ S (1999) *Toxoplazmosis tanısında ELISA sonuçlarının standardizasyonu ve Western blot ile doğrulanması*, *Uzmanlık Tezi*, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.

Evans R (1992) *Life cycle and animal infection*, Ho-Yen DO, Joss AWL (eds), *Human Toxoplasmosis*, Oxford University Press, p: 26-55, New York.

Fındık D, Sosyal S, Onur E (1995) *Toksoplazmosis*, *Türk Parazitol Derg*, 19: 433-438.

Fox BA, Bzik DJ (2002) *De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of Toxoplasma gondii*, *Nature*, 415: 926-929.

Frenkel JK (1975) *Toxoplazmosis. Pathology of protozoal and helminthic diseases with clinical correlation. Protozoal diseases*, Publishing co, 13:254-290, New York.

Frey H (1993) *Electromagnetic field interactions with biological systems*, *Faseb J*, 7: 272-281.

Fojt L, Strasak L, Vetterl V, Smarda J (2004) *Comparison of the low frequency magnetic field effects on bacteria Escherichia coli, Leclercia adecarboxylata ve Staphylococcus aureus*, *Bioelectrochemistry*, 63: 337-341.

Fojt L, Klapetek P, Strasak L, Vetterl V (2009) *50 Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria*, *Micron*, doi: 10.1016/j.micron.2009.06.009.

Funk RHW, Monsees T, Ozkucur N (2008) *Elektromagnetic effects-From cell biology to medicine*, *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 43: 177-264.

Goldberg RB, Creasey WA (1991) *A review of cancer induction by extremely low frequency electromagnetic fields. Is there a plausible mechanism?*, Med Hypotheses, 35 (3): 265-274.

Goodman R, Weisbrot D, Uluc A, Henderson A (1992) *Transcription in Drosophila melanogaster salivary gland cells is altered following exposure to low-frequency electromagnetic fields: analysis of chromosome 3R*, Bioelectromagnetics, 13(2): 111-8.

Goodman R, Chizmadzhev Y, Shirley-Henderson A (1993) *Electromagnetic fields and cells*, J Cell Biochem, 51(4): 436-41.

Graham JH, Fletcher D, Tigue J, McDonald M (2000), *Growth and developmental stability of Drosophila melanogaster in low frequency magnetic fields*, Bioelectromagnetics, 21: 465-472

Griffiths D (1996) *Elektromanyetik Teori*, çeviri, Arte Güven Yayınevi s: 45-301, İstanbul.

Grimwood J, Smith JE (1996) *Toxoplasma gondii: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion*, Int J Parasitol, 26: 169-173.

Gürüz Y, Özcel MA (2007) *Toxoplasmosis*, Özcel MA, *Tıbbi parazit hastalıkları*, Türkiye Parazitoloji Derneği, 22: 141-182, İzmir.

Gürüz Y, Delibaş SB (2007) *Toxoplasmosis ve immunolojisi*, Özcel MA, İnci A, Turgay N, Köroğlu, *Tıbbi ve veteriner immunoparazitoloji*, Türkiye Parazitoloji Derneği, 21: 167-172, İzmir.

Handman E, Goding JW, Remington JS (1980) *Detection and characterization of membrane antigens of Toxoplasma gondii*, The journal of Immunology, 124 (6): 2578-2583.

Hardell L, Sage C (2008) *Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards*, Biomed Pharmacother, 62(2): 104-9.

Hemmersbach R, Becker E, Stockem W (1997) *Influence of extremely low frequency electromagnetic fields on the swimming behavior of ciliates*, Bioelectromagnetics, 18:491-498.

Ho-Yen DO (1992) *Clinical features*, Ho-Yen DO, Joss AWL (eds.) *Human toxoplasmosis*, Oxford University Press, Chapter 3, p: 56-76, New York.

Howe DK, Sibley LD (1995) *Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease*, J Infect Dis, 172: 1561-1566.

Ivancsits S, Diem E, Pilger A, Rüdiger HW, Jahn O (2002) *Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts*, *Mutat Res*, 519(1-2): 1-13.

Johansen C (2004) *Electromagnetic fields and health effects epidemiologic studies of cancer, diseases of the central nervous system and arrhythmia-related heart disease*, *Scand J Work Environ Health*, 30 (1):1-30.

Juutilainen J (2005) *Developmental effects of electromagnetic fields*, *Bioelectromagnetics Supplement, Review*, 7: 107-115.

Kariya T, Hori T, Harakawa S, Inoue N, Nagasawa H (2006) *Exposure to 50-Hz electric fields on stress response initiated by infection with the protozoan parasite, Toxoplasma gondii, in mice*, *J Protozool Res*, 16: 51-59.

Kasper HL, Crabb JH, Pfefferkorn ER (1983) *Purification of a major membrane protein of Toxoplasma gondii by immunoabsorption with a monoclonal antibody*, *The Journal of Immunology*, 130 (5): 2407-2412.

Kasper HL (1989) *Identification of stage-specific antigens of Toxoplasma gondii*, *Infection and Immunity*, 57(3): 668-672.

Kaya A (2002) *Elektroforez yöntemleri*, *Dicle Tıp Dergisi*, 29: 3.

Kozacı LD, Bilgin RD, Ek RO, Kafienah W (2007) *Effects of electromagnetic fields on chondrocytes: An in vitro study*, *Tissue Engineering*, 13: 1678-1679.

Kozacı LD, Bilgin RD, Ek RO (2008) *Elektromanyetik Alanın Kondrositler, Üzerine Etkisinin In Vitro Araştırılması*, TÜBİTAK SBAG-104S434, Aydın.

Kuman HA, Altıntaş N, Üstün, S, Gürüz AY (1995) *Toxoplasmosis İmmün yetmezlikte önemi artan parazit hastalıkları*, *T Parazitoloj Dergisi*, 12:137-164.

Kuman HA, Altıntaş N (1996) *Protozoon Hastalıkları*, Ege Üniveristesi Basımevi, s: 112-141, İzmir.

Kwork LY, Schülter D, Clayton C, Soldati D (2004) *The antioxidant systems in Toxoplasma gondii and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury*, *Mol Microbiol*, 51: 47-61.

Lecordier L, Mercier C, Torpier G, Tourvieille B, Darcy F, Li Liu J, Maes P, Tartar A, Capron A, Cesbron-Delauw MF (1993) *Molecular structure of a T. gondii dense granule antigen (GRA 5) associated with the parasitophorous vacuole membrane*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 59: 143-154.

Lee RC, Canaday DJ, Doong H (1993) *A review of the biophysical basis for the clinical application of electric fields in soft-tissue repair*, J Burn Care Rehabil, 14: 319-335.

Lekutis C, Ferguson DJP, Grigg ME, Canps M, Boothroyd JC (2001) *Surface antigens of Toxoplasma gondii : variations on a Theme*, Int J. Parasitol, 31: 1285-1292.

Levine ND (1985) *Veterinary Protozoology*, Iowa State University Pres, Ames, Iowa, USA.

Lindström E, Lindström P, Berglund A, Lundgren E, Mild KH (1995) *Intracellular calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities*, Bioelectromagnetics, 16(1):41-7.

Lyons RE, McLeod R, Roberts CW (2002) *Toxoplasma gondii tachyzoite interconversion*, Trends Parasitol, 18: 198-201.

Markell EK, Voge M, John DT (1999) *Medical Parasitology*, 8th Ed., WB Saunders Co, pp:161-170, London.

Marti M, Li Y, Kohler P, Hehl AB (2001). *Conformationally correct expression of membrane anchored Toxoplasma gondii SAG1 in the primitive protozoan Giardia duodenalis*, Infect Immun, 70: 1014-1016.

Meissner M, Schlüter D, Soldati D (2002) *Role of Toxoplasma gondii myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion*, Science, 298: 837-840.

Mete M (1999) *Toxoplasma gondii*, Ustaçelebi Ş, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji s:* 1231-1234.

Mineo, JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely KH, Kasper LH (1993) *Antibodies to Toxoplasma gondii major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection*, J Immunol, 150: 3951-3964.

Miyakawa T, Yamada S, Harada S, Ishimori T, Yamamoto H, Hosono R (2001) *Exposure of Caenorhabditis elegans to extremely low frequency high magnetic fields induces stress responses*, Bioelectromagnetics, 22: 333-339.

Mohamed-Ali H, Scheller M, Hetscher M, Kohlsmann S, Kramer K (1995) *Action of a high-frequency magnetic field on the cartilage matrix in vitro*, Bioelectrochemistry and Bioenergetics 37: 25-29.

Monache SD, Alessandro R, Iorio R, Gualtieri G, Colonna R (2008) *Extremely low frequency electromagnetic fields(ELF-EMFs) induce in vitro angiogenesis process in human endothelial cells*, Bioelectromagnetics, 29: 640-648.

Montoya JG, Liensenfeld O (2004) *Toxoplasmosis*, Lancet, 363: 1965-1976.

Nagasawa H, Oka M, Maeda K, Jian-Guo C, Hisaeda H, Ito Y, Good RA, Himeno K (1992) *Induction of heat shock protein closely correlates with protection against Toxoplasma gondii infection*, N Acad Scis, 89: 3155-3158.

Nakaoka Y, Shimizu K, Hasegawa K, Yamamoto T (2000) *Effect of a 60 Hz Magnetic field on the behavior of Paramecium*, Bioelectromagnetics, 21: 584-588.

Novak J, Strasak L, Fojt L, Slaninova I, Vetterl V (2007) *Effects of low-frequency magnetic field on the viability of yeast saccharomyces cerevisiae*, Bioelectrochemistry, 70: 115-121.

Ossorio PN, Schwartzman JD, Boothroyd JC, (1992) *A Toxoplasma gondii rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry*, Molecular and Biochemical Parasitology, 50: 1-16.

Paksu C (1997) *Yüksek gerilim hattında çalışan ve yakınında yaşayan bireylerin eritrosit membran proteinlerinin SDS poliakrilamid jel disk elektroforezi yöntemi ile araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.

Pehlivan F (1997) *Biyofizik*, 2. Baskı, Hacettepe Taş Kitapçılık, s: 343-361, Ankara.

Ramstad S, Futsaether CM, Johnsson A (2000) *Effects of 50 Hz electric currents and magnetic fields on prokaryote Propionibacterium acnes*, Bioelectromagnetics, 21: 302-311.

Repacholi MH (1998) *Low-level exposure to radiofrequency electrognetic fields: Health effects and Research needs*, Bioelectromagnetics, Review article, 19: 1-19.

Resnick R, Halliday D (1998) *Fiziğin Temelleri 2*, Yalçın C (eds), Elektrik, s: 141-175, Ankara.

Rodriquez-DE la Fuente AO, Heredia-Rojas JA, Mata-Cardenas BD, Vargas-Villarreal J, Rodriquez-Flores LE, Balderas-Candanosa I, Alcocer-Gonzalez JM (2008) *Entamoeba invadens: Influence of 60 Hz magnetic fields on growth and differentiation*, Experimental Parasitology, 119: 202-206.

Sadak A, Taghy Z, Fortier B, Dubremetz JF (1988) *Characterization of a family of rhoptry proteins of Toxoplasma gondii*, Molecular and Biochemical Parasitology, 203-211.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, ABD.

Sastre A, Cook MR, Graham C (1998) *Nocturnal exposure to intermittent 60 Hz Magnetic fields alters human cardiac rhythm*, *Bioelectromagnetics*, 19: 98-106.

Schwartzman JD, Krug EC (1989) *Toxoplasma gondii: Characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries*, *Experimental Parasitology*, 68: 74-82.

Schwartzman JD (2001) *Toxoplasmosis*, Gillespie SH, Pearson RD (eds), *Principles and Practice of Clinical Parasitology*, John Wiley and Sons Ltd, p: 113-138.

Schüz J, Lagorio S, Bersani F (2009) *Electromagnetic fields and epidemiology: An overview inspired by the fourth course at the International School of Bioelectromagnetics*, *Bioelectromagnetics*, Review, May 28.

Serway RA (2005) *Fen ve Mühendislik İçin Fizik*, Palme Yayıncılık, s: 955-966, Ankara.

Sibley LD, Pfefferkorn ER, Boothroyd JC (1991) *Proposed nomenclature for Toxoplasma gondii*, *Parasitol Today*, 7: 327- 328.

Soulsby EJJ (1986) *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*, 7thEd., Bailliere Tindall, p:800-807, London.

Stiller MJ, Pak GH, Shupack JL, Thaler S, Kenny C, Jondreau L (1992) *A portable pulsed electromagnetic field (PEMF) device to enhance healing of recalcitrant venous ulcers: a double-blind, placebo-controlled clinical trial*, *Br J Dermatol*, 127: 147-154.

Strasák L, Bártová E, Krejci J, Fojt L, Vetterl V (2009) *Effects of ELF-EMF on brain proteins in mice*, *Electromagn Biol Med*, 28(1): 96-104.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM (2000) *Toxoplasma gondii: from animal to humans*, *Inter J Parasitol*, 30: 1217-1230.

Tijssen P (1985) *Practice and theory of enzyme immunoassays, Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, Burdon RH, Van Knippenberg PH (eds), Elsevier, , 6th Ed., 15: 423-444, Netherlands.

Tüzer E, Toparlak M (1999) *Veteriner Protozooloji*, İstanbul Üniv. Vet Fak. Yayını. Ders notu No: 105, İstanbul.

Ufuktepe Y, Bozdemir S (1997) *Elektromanyetik Teori*, Ç.Ü. Basımevi, Adana.

Unat EK, Yücel A, Atlas K, Samastı M (1991) *Unat'ın Tıp Parazitolojisi*, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Yayın No: 162, s: 601-618.

Vodovnik L, Karba R (1992) *Treatment of chronic wounds by means of electric and electromagnetic fields*, Part 1, Literature review. *Med Biol Eng Comput*, 30: 257-266.

Ware PL, Kasper LH (1987) *Strain-specific antigens of toxoplasma gondii. Infection and immunity*, 55(3): 778-783.

Winker R, Ivancsits S, Pilger A, Adlkofer F, Rüdiger H W (2005), *Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields*, *Muta. Res*, 585: 43-49.

Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G (2006) *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, Lippincott Williams&Wilkins, 6th Ed., p: 1310, Philadelphia.

Wong SY, Remington JS (1994) *Toxoplasmosis in pregnancy*, *Clinical Infectious Diseases*, 18: 853-862.

Yaman S, Ertabaklar H, Kapdağlı A, Ertuğ S (2004) *2002 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına Toxoplasmosis araştırılması amacıyla başvuran olguların Retrospektif olarak değerlendirilmesi*, *Türkiye parazitoloji Dergisi*, 28(1): 1-4.

[1]http://web.chemistry.gatech.edu/~williams/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html 2001, erişim tarihi 08.07.2009.

ÖZGEÇMİŞ

Ankara'da 1983 yılında doğdu. İlkokulu Ankara'da, ortaokul ve liseyi Aydın'da tamamladı. Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik bölümünden 2006 yılında mezun oldu. 2006 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimin gerçekleştirilmesinde her zaman büyük desteğini gördüğüm ve çalışmamın her aşamasında beni yönlendiren, bilgisini benimle paylaşan danışman hocalarım Sayın Doç. Dr. M. Dinçer BİLGİN ve Doç. Dr. Hatice ERTABAKLAR'a, tez çalışmam sırasında benden değerli görüşlerini ve bilgisini esirgemeyen Prof. Dr. Sema ERTUĞ'a yardımları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin tamamlanmasındaki tüm aşamalarda bilgisini, desteğini ve yardımlarını benden esirgemeyen sevgili dostum Metin ÇALIŞKAN'a, laboratuvar çalışmalarım ve deneysel araştırmalarım sırasında yardımcı olan Cengiz GÜLER'e, Tez çalışmam sırasında bana her zaman, destek olan sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Ş. Gökçe ZENCİRCİ'ye ve Sevinç TOMBUL'a, ayrıca tez çalışmamda emeği geçen tüm çalışma arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülebilmesi için gerekli finansal desteği sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na ve Biyofizik Anabilim Dalı'na teşekkürlerimi sunarım.

Aldığım eğitim ve öğretim boyunca her zaman desteklerini hissettiğim canım annem Sevil Özlem ve babam M. Besim Özlem'e içtenlikle teşekkür ederim.

Serçin Özlem