

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**DARBELİ ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMASININ (PEMA) BEYİN
HÜCRELERİNDE HİDROJEN PEROKSİT (H_2O_2) İLE İNDÜKLENMİŞ
OKSİDATİF STRES ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Tuğçe ŞİMŞEK

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ**

**ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ARALIK 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**DARBELİ ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMASININ (PEMA) BEYİN
HÜCRELERİNDE HİDROJEN PEROKSİT (H_2O_2) İLE İNDÜKLENMİŞ
OKSİDATİF STRES ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Tuğçe ŞİMŞEK

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ**

**ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ARALIK 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DARBELİ ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMASININ (PEMA) BEYİN
HÜCRELERİNDE HİDROJEN PEROKSİT (H₂O₂) İLE İNDÜKLENMİŞ
OKSİDATİF STRES ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Tuğçe ŞİMŞEK
BIYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 17/12/2021 tarihinde jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem SARAÇ (Danışman)

Prof. Dr. Şükrü ÖZEN

Dr. Öğr. Üyesi Sinan KANDIR

ÖZET

DARBELİ ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMASININ (PEMA) BEYİN HÜCRELERİNDE HİDROJEN PEROKSİT (H_2O_2) İLE İNDÜKLENMİŞ OKSİDATİF STRES ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Tuğçe ŞİMŞEK

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem SARAÇ

İkinci Danışman: Doç. Dr. Serdar KARAKURT

Aralık 2021; 60 sayfa

Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF), termal etkileri indüklemeden doku onarımını hızlandırmak için biyolojik dokuda bir seri elektrik enerjisinin manyetik darbesini kullanan elektromanyetik alanların iyonlaştırıcı olmayan formlarından biridir. PEMF, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi bazı nörodejeneratif bozuklukların semptomlarının tedavisine ek olarak, ameliyat sonrası ağrı, yumuşak doku hasarı ve migren gibi çeşitli tıbbi problemler için alternatif bir tedavi olarak kullanılmaktadır.

Nöronal hücreler, aşırı oksijen ihtiyacı ve serbest radikallere karşı yetersiz savunma mekanizmaları nedeniyle oksidatif strese oldukça duyarlıdır. PEMF doz, frekans, yoğunluk ve süre gibi parametrelerine bağlı olarak nöronlarda oksidatif strese karşı olası sitoprotektif etkilere sahiptir. Glial hücre tipi olan astrositler, merkezi sinir sisteminde oksidatif stresin düzenlenmesinde ve nöronlara fizyolojik destek sağlanmasında çok önemli rollere sahiptir. Erişkinlerde en sık görülen malign astrositik beyin tümörlerinden biri glioblastoma multiforme (GBM)'dir. Bugüne kadar, farklı zaman aralıklarında hidrojen peroksit (H_2O_2) muamelesiyle oksidatif stresin indüklendiği insan glioblastoma hücrelerinde belirli bir süre içinde belirli bir dozda PEMF maruziyetinin maruziyet sonrası etkilerini inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, mevcut çalışmanın amacı, H_2O_2 ile muamele edilen insan glioblastoma U87-MG hücrelerinde kısa süreli (15 dakika) 75 Hz frekanslı PEMF maruziyetinin olası etkilerini araştırmaktır. U87-MG hücreleri üç deneysel gruba ayrıldı: (I) sham-kontrol; (II) üç farklı zaman aralığında (sırasıyla 30 dakika, 24 saat ve 48 saat) H_2O_2 ile muamele edilen hücreler; (III) grup II ile aynı zaman aralıklarında H_2O_2 muamelesinin ardından PEMF'ye maruz bırakılan hücreler. Daha sonra hücre canlılığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Daha sonra hücre gruplarındaki reaktif oksijen türlerinin seviyeleri, glutatyon peroksidaz aktivitesi ve glutatyon miktarı sırasıyla spektrofotometrik, spektrofotometrik ve HPLC teknikleri ile belirlendi. İstatistiksel analiz SPSS yazılım paketi v23.0 kullanılarak yapıldı. Farklı zaman aralıklarında H_2O_2 ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde muamele sonrası PEMF maruziyetinin oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı sitoprotektif etkisinin, reaktif oksijen türleri seviyesindeki azalma, hücre canlılığındaki artış, antioksidan moleküllerin aktivite ve miktarında yükselmeyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Ek olarak, sonuçlar, PEMF maruziyetinin sitoprotektif etkisinin

H₂O₂ muamelesinin farklı zaman aralıklarına bağılı olarak değiştiğini göstermektedir. Bu bulgular ışığında, oksidatif strese bağılı nörodejeneratif süreçlere ek olarak antioksidan savunma mekanizmaları ve onların tetiklediği redoks-bazlı nöronal yolların aydınlatılması için PEMF'nin nörofizyolojik etkileri ve altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılacağı daha fazla *in vivo* ve/veya *in vitro* alışmalara ihtiyaç vardır. Mevcut alışmanın, PEMF maruziyeti ile aktive edilen moleküler, biyokimyasal ve hücrenel süreçlere odaklanan daha ileri çalışmalara ışık tutabileceğine ve biyomedikal uygulama alanlarını genişleterek alternatif tedavi yöntemleri bulmayı sağlayabileceğini kanaatindeyiz.

ANAHTAR KELİMELELER: Darbeli elektromanyetik alan, Glutasyon peroksidaz, Glutasyon, Hücre canlılığı, Oksidatif stres, Reaktif oksijen türleri, U87-MG hücreleri

JRİ: Dr. ğr. yesi iğdem SARA

Prof. Dr. şkr ÖZEN

Dr. ğr. yesi Sinan KANDIR

ABSTRACT

EFFECT OF PULSED ELECTROMAGNETIC FIELD APPLICATION (PEMF) ON HYDROGEN PEROXIDE (H₂O₂)-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN BRAIN CELLS

Tuğçe ŞİMŞEK

MSc Thesis in Biomedical Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Çiğdem SARAÇ

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serdar KARAKURT

December 2021; 60 pages

The Pulsed Electromagnetic Field (PEMF) is one of the non-ionizing forms of electromagnetic fields that uses series of magnetic pulses of electrical energy into exposed biological tissue to accelerate tissue repair without induced thermal effects. PEMF has been used as an alternative therapy for various medical problems, including post-operative pain, soft tissue damage, and migraine, in addition to treating symptoms of some neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases.

Neuronal cells are particularly susceptible to oxidative stress due to their excessive oxygen demand and inadequate defense mechanisms against free radicals. PEMF has possible cytoprotective effects in neurons against oxidative stress depending on its parameters such as dose, frequency, intensity, and duration. Astrocytes, type of glial cells, have crucial roles in regulating oxidative stress in central nervous system as well as providing physiological support to neurons. One of the most common types of malignant astrocytic brain tumors in adults is glioblastoma multiforme (GBM). Till date, there is no report on the post-exposed effects of a certain dose of PEMF exposure within a certain period in human glioblastoma astrocyte-like cells in which oxidative stress was induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment at different time intervals. Therefore, the present work's goal is to explore the possible effects of short-term (15 min) exposure to 75 Hz frequency of PEMF on H₂O₂ treated human glioblastoma U87-MG cells. U87-MG cells were divided into three experimental groups: (I) sham-control; (II) cells challenged by H₂O₂ at three different time intervals (30 min, 24 h, and 48 h, respectively); (III) cells post-exposed to PEMF following H₂O₂ challenge at same time intervals as group II. Then, the cell viability was measured by spectrophotometrically. Next, levels of reactive oxygen species, activity of glutathione peroxidase, and amount of glutathione in cell groups were determined by spectrofluorometric, spectrophotometric, and HPLC techniques, respectively. Statistical analysis was performed using SPSS software package 23.0. It has been found that the cytoprotective effect of post-PEMF exposure against deleterious effects of oxidative stress triggered by the different time interval of H₂O₂ treatment in U87-MG cells is mediated by the increase in the cell viability, the elevation in the antioxidant molecules' activity and amount, in addition to the decrease in the reactive oxygen species level. In addition, results suggest that the cytoprotective effect of post-

PEMF exposure varies depending on different time intervals of H₂O₂ treatment. In the light of these findings, further *in vivo* and/or *in vitro* studies on neurophysiological effects of PEMFs and their underlying molecular mechanisms are needed to elucidate neurotoxic or neuroprotective role against antioxidant defense mechanisms and their triggered redox-based neuronal pathways in addition to oxidative stress-induced neurodegenerative processes. We firmly believe the present work may shed light on further works focusing on the molecular, biochemical and cellular processes activated by PEMF exposure and may enable to find alternative treatment methods by expanding the fields of biomedical applications.

KEYWORDS: Cell viability, Glutathione peroxidase, Glutathione, Oxidative stress, Pulsed electromagnetic field, Reactive oxygen species, U87-MG cells

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. iğdem SARAÇ

Prof. Dr. Şükrü ÖZEN

Asst. Prof. Dr. Sinan KANDIR

ÖNSÖZ

Sevgili danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem (GÖKÇEK) SARAÇ'ın çalışma boyunca beni şahsi olarak cesaretlendirmesi, sabrı, eleştirisi, rehberliği, tavsiyeleri ve denetimleri çalışmanın neticelenmesinin temelini oluşturmuştur. Sınır bilimi alanındaki eşsiz başarıları, bilgi ve deneyimleri ile bu alanı bana sevdirmesi ve tezimi başarılı olarak tamamlamama katkılarından dolayı kendisine teşekkürü bir borç bilir ve sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca, sadece bilimsel alanla sınırlı kalmayan, günlük yaşantımda da gerek sıcak-sevimli duruşu ile gerekse alanındaki bilgi ve tecrübeleri ile rehberliği, yol göstericiliği ile ufkuma katkıda bulunması nedeniyle de derin bir şükran borçluyum.

Çalışmanın şekillenmesinde ve deneysel aşamalarında çok değerli rehberliği, eşsiz bilgi ve tecrübeleri ile katkıda bulunan ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Serdar KARAKURT'a sonsuz teşekkür ederim. Laboratuvarının tüm imkanlarından yararlanmama izin ve imkân vermesi, laboratuvarında samimi bir çalışma ortamı sağladığı için kendisine ve ekip arkadaşlarına ayrıca likit kromatografi deneyinde eşsiz yardımı nedeniyle Yüksek Lisans Öğrencisi Süreyya ERTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Çalışmanın önemli basamaklarından elektromanyetik alan devre kurulumu aşamalarında eşsiz bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Şükrü ÖZEN hocama ve yardımlarından dolayı Araş. Gör. Kayhan ATEŞ'e sonsuz teşekkür ederim.

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı öğretim üyelerinden başta Sayın Prof. Dr. Ahmet BOZKURT olmak üzere tüm bölüm öğretim üyesi hocalarıma bilgi ve tecrübeleriyle mesleki kariyerime katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Deney süresi boyunca verdikleri eşsiz bilgi, motivasyon ve yardımlarından dolayı Selçuk Üniveristesi Biyokimya Bölümü Laboratuvarı'ndan Doktora Öğrenci İrem Mukaddes DURMUŞ'a ve Kemal BAŞ'a, , Sümeyye ÇINAR'a, Halime Şeyma AKALIN'a, ve Hatice Gül BATUR'a çok teşekkür etmek isterim.

Bana ailem gibi desteklerini ve enerjilerini esirgemeyen sevgi dolu Nilgün Özkurt ile Zekiye Bayrakçı'ya ve Sevgi Hande Kar'a, Nuran Kavaklı'ya, Ayşe Ünğan'a, Tansu Demir'e, Beyza Evcimen'e, Sümeyra Demir'e, Beyza Şimşek'e, Sariye Emek'e çalışma boyunca bana verdikleri destek, zor günlerimde her zaman yanımda oldukları ve uzun gecelerde yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Sonsuz sabrı, desteği ve sevgisi için can kardeşim Ayça ŞİMŞEK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sevgisi, bilgeliği, sarsılmaz desteği, çabası ve cesaretlendirmesi ile yıllar boyunca benim her zaman yanımda olan, hayat amaçlarımda en başında yer alan sevgili annem ve babama teşekkürümü hiçbir kelime ifade edemez.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİN.....	xv
ÇİZELGELER DİZİN.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Elektromanyetik Alan.....	3
2.2. Darbeli Elektromanyetik Alan.....	5
2.3. Elektromanyetik Alanların Biyolojik-Nörobiyolojik Etkileri ve Klinikte Kullanımı.....	8
2.3.1. Oksidatif stres.....	9
2.3.2 Oksidatif stresin biyolojik-nörobiyolojik etkileri.....	13
2.4. Darbeli Elektromanyetik Alanların Biyolojik-Nörobiyolojik ve Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri.....	16
3. MATERYAL VE METOT.....	19
3.1. Kimyasallar.....	19
3.2. Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF) Devresinin Kurulumu.....	19
3.3. Hücre Kültürü.....	23
3.4. PEMF Maruziyeti.....	24
3.5. Hücre Canlılığı.....	24
3.6. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Miktarının Tayini.....	25
3.7. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	26
3.8. Glutasyon (GSH) Miktar Tayini.....	29
3.9. İstatiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Pasco 850 Capstone Yazılımı ile Kayıt Edilen Manyetik Alan Dalga Grafiklerinin Analizi.....	32
4.2. PEMF Maruziyetinin U87-MG Hücre Hattında Oksidan-Antioksidan Molekülleri Üzerine Etkileri.....	34

4.2.1. PEMF maruziyetinin U87-MG hücre hattında hücre canlılığı üzerine etkileri	34
4.2.2. PEMF maruziyetinin U87-MG hücre hattında ROS düzeyine etkileri.....	35
4.2.3. PEMF maruziyetinin U87-MG hücre hattında glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi üzerine etkileri.....	36
4.2.4. PEMF maruziyetinin U87-MG hücre hattında glutatyon (GSH) miktarına etkileri	37
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇLAR	46
7. KAYNAKLAR	48

ÖZGEÇMİŞ



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Darbeli Elektromanyetik Alan Uygulamasının (PEMA) Beyin Hücrelerinde Hidrojen Peroksit (H₂O₂) ile İndüklenmiş Oksidatif Stres Üzerindeki Etkisi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

17/12/2021

Tuğçe ŞİMŞEK



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler:

Ca^{+2}	: Kalsiyum
cm	: santimetre
\vec{dB}	: Manyetik Alan
$d\vec{l}$: Telin Küçük Parçası
dH ₂ O	: Distile Su
g	: Gram
kg	: Kilogram
M	: Molarite
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
ms	: Milisaniye
nm	: Nanometre
s	: Saniye
V/m	: Volt/Metre
W/kg	: Watt/Kilogram
W/m ²	: Watt/Metrekare
Λ	: Dalga Boyu
μT	: Mikro Tesla
μ_0	: İletkenliğin Geçirgenliği
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre

μM	: Mikromolar
$\gamma\text{-Glu}$: Gama Glutamat
\hat{r}	: Birim Vektörü
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat Derece

Kısaltmalar:

A	: Amper
A1	: 570 nm'deki hücre absorbansı
A2	: 600 nm'deki hücre absorbansı
AH	: Alzheimer Hastalığı
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
ATP	: Adenozin Trifosfat
B	: Manyetik Alan
BIO IND	: Biological Industries (Biyolojik Endüstrisi)
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CAT	: Katalaz
$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2$: Kümen Hidroperoksit
CO_2	: Karbondioksit
$\text{CO}_3^{\cdot-}$: Karbonat Radikali
Cu/Zn	: Bakır/Çinko
Cu-Zn SOD (SOD1/ SOD 3)	: Bakır-Çinko Bağlı Süperoksidad Dismutaz
Cys	: Sistein
CW	: Sürekli Dalga (Continuous Wave)
D	: Örnek Seyreltme Faktörü
DCF	: 2',7'-Dikloroflorosein
DCFH-DA	: 2',7'-Dikloroflorosein Diasetat
DMSO	: Dimetil Sülfoksit

DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTNB	: 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik acit)
E	: Elektriksel Alan
ELF-EMF	: Aşırı Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alan
EMA	: Elektromanyetik Alan
EMEM	: Eagle Minimum Besi Ortamı
ETC	: Elektron Taşıma Zinciri
FBS	: Fetal Sığır Serumı
GC-2	: Fare Spermatozoid Türevli Hücre
GCS	: Glutamat-Sistein Sentetaz
g-GCS	: g-Glutamil-Sistein Sentetaz
GHz	: Giga Hertz
Gly	: Glisin
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSSG	: Azaltılmış Glutasyon
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
Hela	: Rahim Ağzı Kanseri Hücreleri
H ₂ DCF	: 2'-7'-Diklorodihidroflorosein
HIF1	: Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1
HOBs	: İnsan Osteoblast Hücreleri
HOCl	: Hipokloröz Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
KH ₂ PO ₄	: Dipotasyum Fosfat
H ₃ PO ₄	: Fosforik Asit

HPLC	: Yüksek Performanslı Likit Kromatografisi
HuR	: İnsan Antijen R
Hz	: Hertz
I	: Bobinden geçen akım miktarı
ICNIRP	: Uluslararası İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyondan Komisyon
IC ₅₀	: Toplam Hücre Sayısının Yarisını İnhibe Eden İlaç/Madde Konsantrasyonu
IL-6	: İnterlökin-6
JNK1/2	: Jun N- Terminal Kinaz1/2
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
KCl	: Potasyum Klorür
K _D	: Enzim Aktivasyonu
K _i	: Bağlanma Affinitesi
KHz	: Kilo Hertz
LC3-II	: Mikrotübül İlişkili Protein 1A/1B Hafif Zincir 3-II
LOOH	: Lipit Peroksit
MDA	: Malondialdehit
MHz	: Mega Hertz
mRNA	: Mesajcı RNA
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MnSOD	: Manganez Bağlı Süperoksit Dismutaz
MS	: Multipl Skleroz
mT	: Mili Tesla
N1	: 570 nm'de negatif kontrol kuyucuğunun absorbanısı
N2	: 600 nm'deki negatif kontrol kuyucuğunun absorbanısı
NaCl	: Sodyum Klorür

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	: Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
O1	: 570 nm'de oksitlenmiş alamar mavisinin sönüm katsayısı
O2	: 600 nm'de oksitlenmiş alamar mavisinin sönüm katsayısı
¹ O ₂	: Singlet Oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit Anyonu
OH ⁻	: Hidroksil Radikali
PBS	: Fosfat Tamponu
PEMF	: Darbeli Elektromanyetik Alan
Pen-Strep	: Penisilin-Streptomisin
PKC	: Protein Kinaz C
p53	: Tümör Protein 53
R	: Bobin Yarıçapı
R1	: 570 nm'de indirgenmiş alamar mavisinin sönüm katsayısı
R2	: 600 nm'deki indirgenmiş alamar mavisinin sönüm katsayısı
RF-EMA	: Radyo Frekans-Elektromanyetik Alan
RFU	: Reaktif Florans Unit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RO [·] /ROO [·]	: Alkoksit/Alkil Peroksit
RPM	: Devir Sayısı
SAR	: Özgül Soğurma Oranı
SD	: Sprague Dawley
SD	: Standart Sapma

SMA	: Statik Manyetik Alan
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOD2	: Süperoksit Dismutaz 2
T	: Tesla
T1	: Hücrelerin O.D. 340 nm'deki birinci ışımaya değerleri
T2	: Hücrelerin O.D. 340 nm'deki ikinci ışımaya değerleri
TCA	: Triklorikasetik Asit
TMS	: Transkraniyal Manyetik Stimülasyon
TNF-alfa	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
Tris-HCL	: Tris Hidroklorür Asit
V	: Volt
V	: Reaksiyon Kuyucuğundaki Numune Hacmi (mL)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
X ₀	: Bobin yarıçap eksenini
X _g	: Devir Sayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Elektromanyetik Spektrum: a) 10^2 ile 10^{21} Hz frekans aralığı; b) radyasyon özelliklerine göre bant isimleri; c) baz istasyonları ve ev aletlerinden tıbbi cihazlara kadar gündelik yaşantımızda elektromanyetik alana kaynaklık eden cihazlar (Kim vd. 2019).....	4
Şekil 2.2. Dalga formları; a) Sinüs dalga formu; b) Darbeli kare dalga formu; c) Üçgen formu; d) Testere formu	5
Şekil 2.3. PEMF devrelerinde kullanılan bobin çeşitleri: a) Helmholtz Bobin; b) Ruben's Bobin; c) Fransleau-Braunbeck (Ganesan vd. 2009).....	6
Şekil 2.4. Helmholtz Bobin Çifti. $R/2$: Bobin yarıçap eksen; I : Bobinden geçen akım miktarı; R : Bobin yarıçapı	6
Şekil 2.5. Helmholtz bobinlerinde indüklenen manyetik alan şeması (http://www.emf-portal.de) B_{x1} : Birinci Bobin Manyetik alan; B_{x2} : İkinci Bobin Manyetik Alan; B_{xsum} : Toplam Manyetik Alan; a : Bobin yarıçap eksen; I : Bobinden geçen akım miktarı; $2d$: Bobinler Arasındaki Mesafe.....	7
Şekil 2.6. Glutasyonun Tripeptit yapısı (van Haaften vd. 2003).....	12
Şekil 2.7. Tipik bir nöronun glial hücreler ile bağlantısı.....	15
Şekil 3.1. Manyetik alan sağlayan helmholtz bobin çifti, bobinlerin sabitlendiği helmholtz bobin altlığı, platform ayakları, bobinlere elektromanyetik alan sağlayan Pasco 850 sinyal üretici, manyetik alanı ölçen manyetik alan sensörü ve PEMF'ye maruz bırakılan U87-MG insan glioblastoma hücrelerini içeren petri kabından oluşan Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF) Düzenegi.....	18
Şekil 3.2. Pasco 850 Universal Interface model sinyal üretici.....	19
Şekil 3.3. PEMF devresinin sinyal üretici (Signal Generator) ve Pasco Capstone Yazılımı ile bağlantısı.....	20
Şekil 3.4. Pasco 850 Capstone Yazılımı Ara yüzü.....	20
Şekil 3.5. a) Bobinlere eş uzaklıkta dikey (aksiyel) ekseninde yerleştirilen manyetik alan sensörü, b) ilk 0.16 dakikadaki ve c) 15 dakikaya sıkıştırılmış 1 ± 0.2 mT manyetik alan sinyallerinin Pasco Capstone Yazılım ile elde edilen manyetik alan dalga sinyalleri...	22
Şekil 3.6. Tripan mavisi ile süspanse edilen U87-MG hücrelerinde canlı ve ölü hücrelerin ışık mikroskobu altında incelenmesi.....	22
Şekil 3.7. U87-MG hücrelerinde ROS seviyesinin belirlenme aşamaları.....	24

Şekil 3.8. Kolorometrik reaksiyon karışımının hazırlanması aşamaları.....	25
Şekil 3.9. 340 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak ölçülen farklı konsantrasyondaki NADPH standartlarının kalibrasyon eğrisi.....	26
Şekil 3.10. a) 304 nm dalga boyunda HPLC tekniği ile ölçülen farklı konsantrasyonlardaki GSH standartlarının kalibrasyon eğrisi; b) 304 nm dalga boyunda 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB), Glutasyon (GSH) ve Ellman reaktifi 5,5-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asid (DTNB)'in temsili kromatogram gösterimi.....	30
Şekil 3.11. HPLC tekniği ile GSH miktar tayini.....	30
Şekil 4.1. Pasco Capstone Yazılım ile elde edilen 0.16 dakikalık 1 ± 0.2 mT'lık manyetik sinyallerinin 4 farklı zamandaki (0.001 dakika, 0.040 dakika, 0.102 dakika, 0.158 dakika) değerleri.....	32
Şekil 4.2. Pasco Capstone Yazılım ile elde edilen 15 dakikalık 1 ± 0.2 mT manyetik alan sinyallerinin 4 farklı zamandaki (0.30 dakika, 6.30 dakika, 12.10 dakika ve 15.01 dakika) değerleri.....	33
Şekil 4.3. U87-MG hücrelerinde 0.1 mM H ₂ O ₂ muamele zamanına bağlı hücre canlılığı yüzdelерinin (%) sırasıyla a) Grup 2; ve b) Grup 3'de gösterimi.....	34
Şekil 4.4. Reaktif Oksijen Tür (ROS) (Relatif Floresan Unit (R.F.U) seviyelerinin (ortalama \pm SD) a) gruplar arası, ve b) grup içi, 0.1 mM H ₂ O ₂ muamele zamanına göre karşılaştırılması. **p<0.01; ***p<0.001'deki istatistiksel farkı işaret etmektedir. Veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirilmiş, çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılmıştır.....	35
Şekil 4.5. Glutasyon Peroksidaz (GPx) aktivitesinin (ortalama \pm SD) a) gruplar arası ve b) grup içi, 0.1 mM H ₂ O ₂ muamele zamanına göre karşılaştırılması. ***p<0.001'deki istatistiksel istatistiksel farkı işaret etmektedir. Veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirilmiş, çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılmıştır.....	36
Şekil 4.6. Glutasyon (GSH) miktarının (ortalama \pm SD) a) gruplar arası, ve b) grup içi 0.1 mM H ₂ O ₂ muamele zamanına göre karşılaştırılması. ***p<0.001'deki istatistiksel istatistiksel farkı işaret etmektedir. Veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirilmiş, çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılmıştır.....	37

ÇİZELGELER DİZİN

Çizelge 2.1. Reaktif Oksijen Türleri.....	9
Çizelge 3.1. Pasco 850 Universal Interface model sinyal üretici özellikleri.....	19
Çizelge 3.2. 1 mM NDPH standartları.....	26
Çizelge 3.3. 20 mM GSH standartları.....	29



1. GİRİŞ

Günlük yaşantımızda sıkça kullandığımız Elektromanyetik Alan (EMA)'a sahip cep telefonu, bilgisayar ve elektronik ev aletleri farklı frekansta, dalga boyunda, hız ve genlikte “Elektromanyetik Radyasyon” yaymaktadır (Teimori vd. 2016; Hao vd. 2018; Hosseinabadi vd. 2018; Poljak ve Cvetkovic 2019). Yüksek frekanslı elektromanyetik radyasyonlar moleküllerdeki kimyasal bağları koparabilecek enerjiye sahip olup bu ışınlar “İyonlaştırıcı Radyasyon” denilmektedir (Vallero ve Letcher 2013; Poljak ve Cvetkovic 2019). Elektromanyetik radyasyonun kimyasal bağları koparabilecek enerjiye sahip olmaması düşük frekansta olduğunu ve elektromanyetik spektrumun iyonlaştırıcı olmayan kısmında bulunduğunu göstermektedir (Vallero ve Letcher 2013; Teimori vd. 2016; Poljak ve Cvetkovic 2019). İyonlaştırıcı olan radyasyona, mamografi ve bilgisayarlı tomografi (BT) taraması gibi tıbbi ekipmanlardan yayılan X ışınları ve gama ışınları örnek olarak gösterilebilir (Teimori vd. 2016). İyonlaştırıcı olmayan radyasyon ise tıbbi teşhis cihazlarından biri olan Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI), ultraviyole ışınlar ve kızılötesi radyasyon gibi doğal kaynaklardan gelen radyasyonu içermektedir (Teimori vd. 2016). Yüksek frekanslı EMA'lar insan vücudunun sahip olduğu dengeyi bozarak, süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH^-) gibi serbest radikallerin veya hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına neden olmaktadır (Kim vd. 2019; Hasanuzzaman vd. 2020). Hücrelerdeki ROS seviyesinin dengesi vücut için önemli olup, bu dengenin sağlanmasında glutatyon (GSH) ve melatonin gibi moleküller ve süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan savunma sistemi enzimleri görev almaktadır (Ighodaro ve Akinloye 2017). Özellikle yüksek frekanslı (300 Hz-10 MHz) EMA maruziyetinin hücrelerde oksidan-antioksidan dengesini bozarak oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir (Wang ve Zhang 2017; Hasanuzzaman vd. 2020). Merkezi sinir sistemini kontrol eden, insan vücudunun hemen hemen tüm işlevlerini düzenleyen, vücudumuzun oksijen tüketiminin %20'sinin gerçekleştiği yer olan beynimiz diğer organlara göre daha düşük antioksidan kapasitesine sahip olması nedeniyle oksidatif strese karşı oldukça duyarlı bir organımızdır (Zhang vd. 2019; Chen vd. 2020). Böylece organik peroksit gibi yeni radikaller oluşmakta ve hücrelerdeki oksidatif stres seviyesi artmaktadır (Babusikova vd., 2013). Beynimizde, oksidatif strese karşı etkili olduğu bilinen antioksidan moleküllerden glutatyon ve antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz, beyinde yüksek miktarda H_2O_2 seviyesini elimine etmekte ve hidroksil radikallerin oluşmasını engellemektedir (Babusikova vd. 2013; Copley, 2018; Harris ve DeNicola 2020).

Son yıllarda iyonlaştırıcı veya termal etkiye sahip olmayan düşük frekanslı elektromanyetik alanların sağlık sektöründe tedavi amaçlı uygulanması için araştırmalar yapılmaktadır (Gümüştay vd. 2016; Krath vd. 2017; Markov vd. 2020). Araştırmalar içinde en dikkat çekici olanı belirli dalga formu ve genliğe sahip, “Darbeli Elektromanyetik Alan (Pulsed Electromagnetic Field) (PEMF)” uygulamasıdır (Ronzio 2020; Qiu vd. 2020). Çalışmalar, düşük frekanslı PEMF maruziyetinin, yara onarım sürecini kolaylaştırdığını (Strauch vd. 2009), yumuşak doku hasarını iyileştirdiğini (Daish vd. 2018), ödemi (Markov 2015), ameliyat sonrası ağrıyı (Strauch vd. 2009; Gessi vd. 2019), migreni tedavi ettiğini (Mattsson ve Simko 2019), Alzheimer (Capelli vd. 2017), Parkinson (Sherrard vd. 2018) gibi nörodejeneratif bozuklukların tedavisinde (Gessi vd. 2019) potansiyel bir uygulama olduğunu göstermiştir. Ayrıca, farklı frekans

ve dalga boyunda PEMF maruziyetinin hücrede oksidan-antioksidan mekanizmasının dengesinde önemli olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Osera vd. 2015; Falone vd. 2016; Ehnert vd. 2017; Vincenzi vd. 2017). İnsan osteoblast hücrelerine (hOBs) uygulanan 16 Hz frekansa ve 6-282 μ T yoğunluğa sahip PEMF maruziyetinin GPx, SOD, CAT enzimlerinin aktivasyonunu arttırdığı raporlanmıştır (Ehnert vd. 2017). Diğer bir çalışmada ise, oksijen seviyesinin %2'lere düştüğü hipoksik koşullarda 24 ve 48 saat %2'lik oksijenli ortamda inkübe edilen N9 insan mikroglia hücrelerine eş zamanlı olarak 75 Hz-1.5 mT PEMF maruziyeti uygulanmış ve PEMF'nin hipoksinin indüklediği ROS seviyesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Vincenzi vd. 2017). Ayrıca, önemli bir düzenleyici ve tümör baskılayıcı protein olan tümör protein 53 (p53)'ün, çeşitli çevresel veya hücrel stres faktörleri tarafından fonksiyonunu kaybetmesinin, nöroblastoma gibi beyin hücrelerinin antioksan aktivitesini etkilediği bilinmektedir (Osera vd. 2015; Falone vd. 2016). Örneğin, p53 fonksiyonuna sahip ve ilaca duyarlı olan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde manganez bağlı SOD (MnSOD) aktivasyonunun etkisini araştıran Osera vd. (2015) çalışmasında, 75 Hz-2 mT PEMF'ye maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde ROS seviyesi incelenmiştir. Falone vd. (2016) çalışmasında ise, p53 fonksiyon kaybı barındıran ve ilaca dirençli insan nöroblastoma SK-N-BE(2) hücreleri Osera vd. (2015) çalışmasına benzer olarak 75 Hz-2 mT PEMF'ye maruz bırakılmış ve hücrelerdeki MnSOD enzim aktivitesi incelenmiştir. Her iki çalışma karşılaştırılarak, 75 Hz-2 mT PEMF'nin p53 fonksiyonunu kaybetmiş ilaca dirençli SK-N-BE(2) hücrelerinde ilaca hassas SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine göre MnSOD enzim aktivasyonunu daha fazla arttırdığı raporlanmıştır.

Literatürde, PEMF maruziyetinin oksidatif stres üzerindeki etkileri araştırılmış fakat H₂O₂ ile muamele edilerek oksidatif stresin indüklendiği nöronal hücrelerde PEMF maruziyetinin antioksidan savunma sistemindeki önemli moleküller üzerindeki etkileri hakkında bilgiler sınırlıdır. Özellikle, H₂O₂ ile muamele edilen insan glioblastoma hücrelerinde PEMF maruziyetinin antioksidan savunma sistemindeki önemli moleküllerden glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon (GSH) aktivitesine ve/veya miktarına etkisini gösteren çalışmalar yok denecek kadar azdır. Çalışma, daha önceki çalışmalardan farklı olarak 0.1 mM H₂O₂ muamelesiyle oksidatif stresin indüklendiği U87-MG insan glioblastoma hücresine 75 Hz-1±0.2 mT PEMF maruziyetinin hücre canlılığına, antioksidan enzimlerden GPx ve GSH aktivitesine ve/veya miktarına ve ROS düzeyine etkisini inceleyerek literatüre katkı sağlamayı amaçlamıştır. Çalışmadan elde edilen bilimsel verilerle, PEMF maruziyetinin insan beyin hücrelerinde, oksidatif stresin neden olduğu nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde biyomedikal uygulama alanlarının genişletilmesine olanak sağlanması hedeflenmiştir.

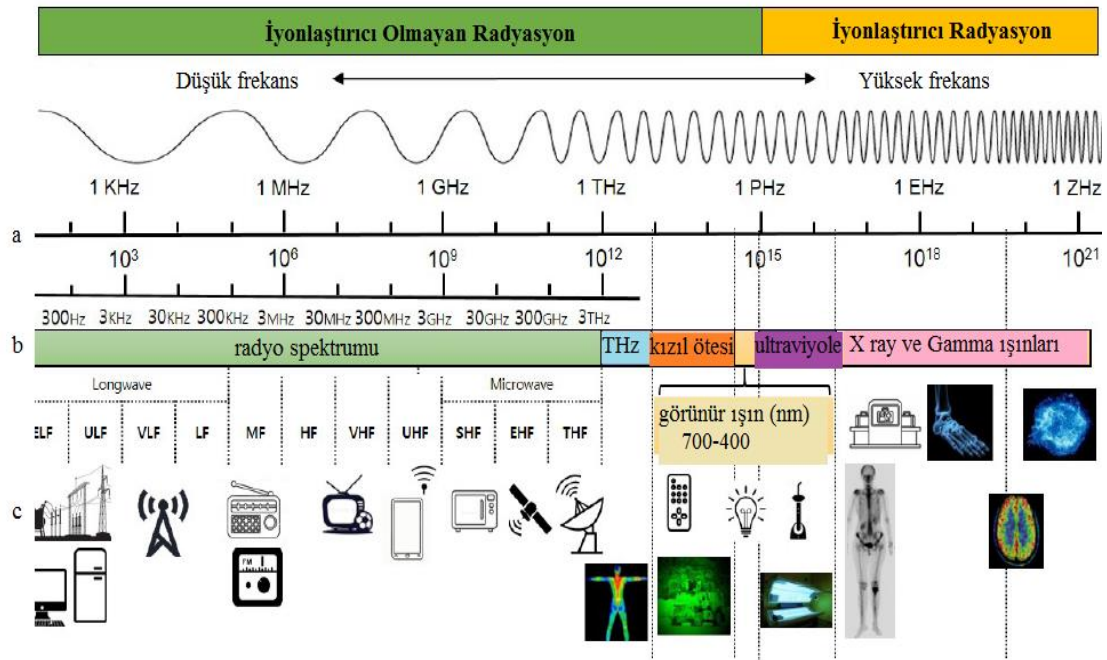
2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Elektromanyetik Alan

Elektromanyetik alan, tarih boyunca dünyanın gelişimi ve canlıların yaşamı için önemli bir yere sahip olmuştur (Markov 2015). 1820’li yıllarda pusula ibresinin elektrik akımı ile sapabildiğinin fark edilmesinden ardından, Michael Faraday’ın mıknatıs yardımı ile elektriksel akımın üretilebildiğini keşfetmesi “Elektromanyetik Alan Teorisinin” ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır (ICNIRP 2014; Gürdal 2017; Jiang 2018). Elektrik alan ve manyetik alan arasındaki ilişkiyi kanıtlamak için Maxwell ve Lorentz “Elektromanyetik Alan Teorisini” ortaya atmıştır (Maxwell 1954; Zhang 2017; Jiang 2018). Elektromanyetik alan teorisine göre, birbirlerine dik doğrultuda bulunan elektrik ve manyetik alanın zamanla değişmesi “Elektromanyetik Alanı” oluşturmaktadır (Staebler 2017; Gürdal 2017). Maddelerdeki elektriksel yük/yüklerin birbirleri üzerinde itme veya çekme kuvvetine Elektriksel Alan denilmekte olup “E” harfi ile gösterilir ve birimi Volt/metre (V/m)’dir (Fano vd. 1963; Staebler 2017). Manyetik alan ise zamana göre değişim gösteren elektriksel alanın bir ürünü olup akım geçen iletken telin etrafında oluşan manyetik alan çizgilerinin yoğunluğu ile ifade edilmektedir (Fano vd. 1963; Staebler 2017). Manyetik alan “B” harfi ile gösterilir, ve birimi Tesla (T)’dir (Fano vd. 1963; Staebler 2017; Pawluk ve Layne 2017; Ronzio 2020; ICNIRP 2020). Manyetik alanlar sabit mıknatıslar tarafından ya da elektriksel yüklerin yer değiştirmesi sonucunda “Statik Manyetik Alan (SMA)” veya “Zamanla Değişen (Dinamik) Manyetik Alan” olarak iki gruba ayrılmaktadır (Wang ve Zhang 2017). Dünyanın yapısından kaynaklı doğal SMA'nın dışında insan yapımı yapay SMA'lar da mevcuttur (Wang ve Zang 2017). Yapay SMA'lar hareketsiz mıknatıslar ve zaman içinde yoğunluk ve yönde değişiklik göstermeyen (0 Hz frekans) doğrudan akım şeklindeki EMA'lar tarafından üretilmektedir (Wang ve Zhang 2017; Hao vd. 2018). Zaman içinde yoğunluğu değişim gösteren manyetik alanlar ise “Zayıf Manyetik Alan (Weak Magnetic Field) (<1mT)”, “Orta Manyetik Alan (Moderate Magnetic Field) (1 mT-1 T)”, “Güçlü Manyetik Alan (Strong Magnetic Field) (1-20 T)” ve “Ultra Güçlü Manyetik Alan (Ultra Strong Magnetic Field) (>20T)” olarak gruplandırılır (Wang ve Zhang 2017).

Elektrik alan ve manyetik alanın salınımı belirli enerjideki “Elektromanyetik Dalgaları” oluşturmakta olup enerjinin uzay boşluğunda yayılmasına “Elektromanyetik Radyasyon” denilmektedir (Vallero 2013; Zhang 2017; Houck 2018). Elektromanyetik dalgaları belirleyen özellikler: dalganın frekansı, dalga boyu, hızı ve genliğidir (Teimori vd. 2016; Staebler 2017; Houck 2018). Elektromanyetik dalganın bir saniyede oluşturduğu devir sayısına “Frekans” adı verilir ve birimi Hertz (Hz)’dir (Houck 2018). Elektromanyetik alanlar ise sahip oldukları frekansa göre “Aşırı Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alan (Extremely Low Frequency Electromagnetic Field) (ELF-EMF, <300 Hz)”, “Ara Frekanslı Elektromanyetik Alan (Intermediate Frequency Electromagnetic Field) (300 Hz–10 MHz)” ve “Radyo Frekansı (Radio Frequency) (10 MHz-300 GHz)”ndan oluşmaktadır (Hao vd. 2018; Wang ve Zhang 2017). Elektromanyetik dalgaların bir diğer özelliği olan “Dalga Boyu”, dalganın saniyede aldığı yolu ifade etmekte ve λ işareti ile gösterilmektedir (Staebler 2017; Houck 2018). Elektromanyetik dalgaların sahip oldukları dalga boylarına (0.0001 nm-100 m) göre sıralandığı cetvele “Elektromanyetik Tayf” veya “Elektromanyetik Spektrum” denilmektedir (Şekil 2.1) (Vallero 2013; Zhang 2017). Elektromanyetik spektrum, dalga boyu 120 nm’den küçük ve yüksek enerjili elektromanyetik radyasyonu, ve dalga boyu

120 nm’den büyük ve düşük enerjili elektromanyetik radyasyonu göstermektedir (Vallero 2013; Staebler 2017; Zhang 2017). Yüksek enerjili radyasyonlar, atomda bulunan elektronu yörünge dışına çıkararak iyon oluşturmakta ve moleküllerdeki kimyasal bağları koparabilmektedir (Vallero 2013; Teimori vd. 2016). Yüksek frekanslı X, gama ve kozmik ışınları, canlı dokulardaki atomlara çarparak yeni iyon üretebildiğinden bu ışınları “İyonlaştırıcı Radyasyon” denilmiştir (Markov 2015 Teimori vd. 2016; Staebler 2017). İyonlaştırıcı radyasyonlar 10^{15} - 10^{21} frekans aralığında olup X ışını ve gama ışını bantları bu radyasyona kaynaklık etmektedir (Şekil 2.1) (Kim vd. 2019). Özellikle mamografi, bilgisayarlı tomografi (CT) taramaları ve röntgen gibi medikal tanı ve tedavi cihazlarında iyonlaştırıcı radyasyon mevcuttur (Teimori vd. 2016).



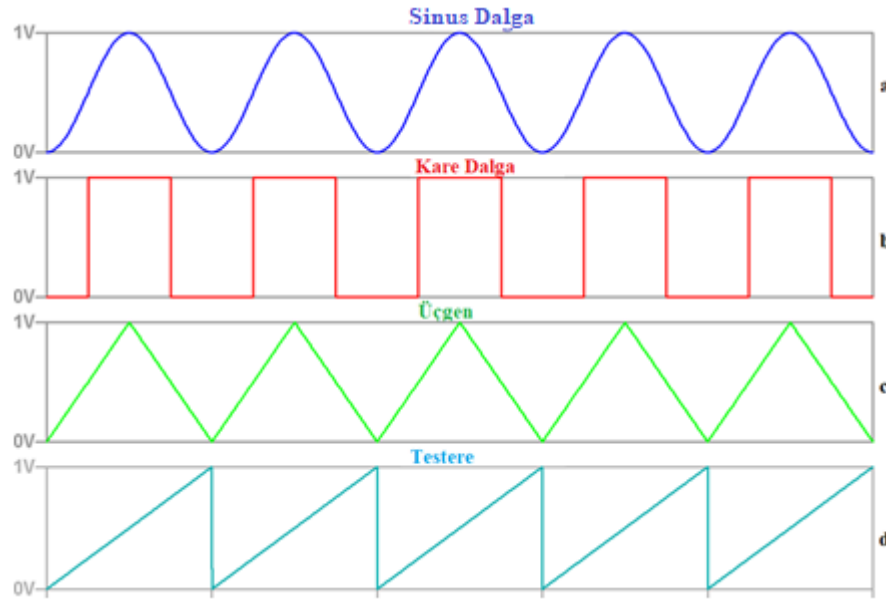
Şekil 2.1. Elektromanyetik Spektrum: **a)** 10^2 ile 10^{21} Hz frekans aralığı; **b)** radyasyon özelliklerine göre bant isimleri; **c)** baz istasyonları ve ev aletlerinden tıbbi cihazlara kadar gündelik yaşantımızda elektromanyetik alana kaynaklık eden cihazlar (Kim vd. 2019)

Elektromanyetik spektrumdaki bir diğer radyasyon, atomlardan elektron koparamayacak enerjiye sahip ve dalga boyları 120 nm’den büyük olan “İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyon”dur (Vallero 2013; Poljak ve Cvetkovic 2019). İyonlaştırıcı olmayan radyasyonlar, geniş frekans bandında yer alıp radyasyon kaynakları günlük yaşantımızın her alanında bulunmaktadır. 3-3000 Hz frekans aralığındaki dalgalara evlerde, iş yerlerinde kullanılan elektronik aletler kaynaklık ederken, 100 kHz-300 GHz frekans aralığındaki cep telefonları, Wi-Fi sistemleri, radyo, TV istasyonları gibi iletişim araçları mikro dalgalara kaynaklık etmektedir (Şekil 2.1) (Kim vd. 2019). Ayrıca Şekil 2.1’de ultraviyole ışınlar, görünür ışınlar, kızılötesi radyasyonlar, statik ve darbeli elektromanyetik alan gibi düşük frekanslı elektromanyetik alanlar da yer almaktadır (Mattsson ve Simko 2019).

2.2. Darbeli Elektromanyetik Alan

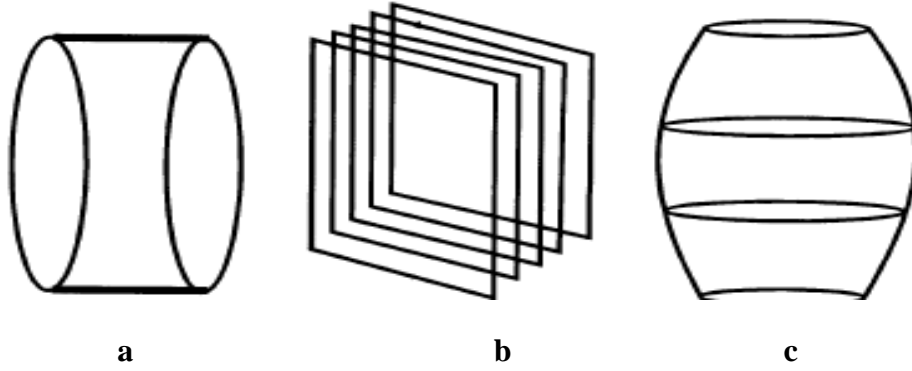
Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF), iyonlaştırıcı olmayan düşük frekanslı elektromanyetik alanlar arasında önemli yere sahiptir (Vadalà vd. 2016; Gessi vd. 2019). Temel olarak sinyal üreticiden ve bobin devresinden oluşan PEMF sistemi, farklı frekans ve genlik değerine sahip dalga formları üretmektedir (Hug ve Röösli 2012; Ahmed vd. 2013; Jiang 2018; Kohli vd. 2020). Uluslararası İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyondan Koruma Komisyonu (ICNIRP)'nin yayınladığı yönergeye göre PEMF dalgası üreten cihazlar, 10 μ T ve 10 mT arasında manyetik alan yaymalıdır (ICNIRP 1998; Ganesan vd. 2009; Hug ve Röösli 2012).

Darbeli elektromanyetik alanlar (PEMF) bir tür periyodik alternatif akım (AC) manyetik alandır ve sıradan statik ve AC manyetik alanların aksine darbeli manyetik alanlar kesikli ve periyodiktir (Shupack vd. 1992; Jiang 2018). Elektromanyetik dalgalar, sahip oldukları dalga formuna göre iki gruba ayrılmaktadır: Sinüs dalga formuna sahip “Sinüsoidal Dalgalar” ve sinüs dalga formuna sahip olmayan “Darbeli (Kare) Dalgalar”, “Üçgen Dalgalar”, ve “Testere Dalgalar” (Pawluk ve Layne 2017; Kohli vd. 2020) (Şekil 2.2).



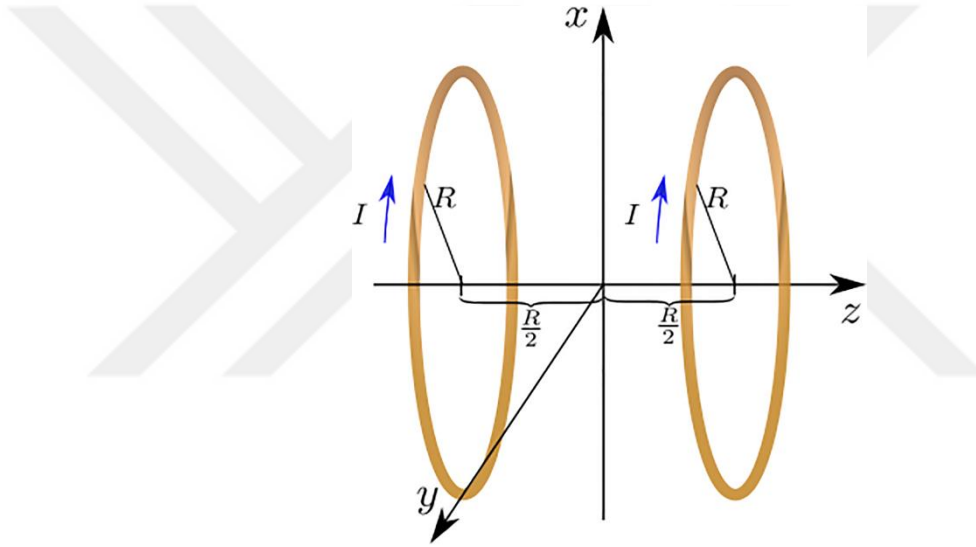
Şekil 2.2. Dalga formları; **a)** Sinüs dalga formu; **b)** Darbeli kare dalga formu; **c)** Üçgen formu; **d)** Testere formu (<https://www.analog.com/en/technical-articles/ltpice-generating-triangular-sawtooth-waveforms.html>)

PEMF, alternatif elektrik sinyalini indükleyerek bobinlerde bir dizi manyetik darbe oluşturmaktadır (Hug ve Röösli 2012). Bobin şeklinin ve boyutunun ayarlanması dokuların manyetik alan maruziyetini etkilemekte olup alanın homojen yayılmaması ve uyarılan noktanın tespit edilememesi devre için dezavantaj oluşturmaktadır (Pawluk ve Layne 2017; Ahmed vd. 2013; Ganesan vd. 2009). Helmholtz bobin sistemi, farklı şekil ve boyutta bobinler olmasına rağmen düzgün manyetik alan sağlayarak bu dezavantajı ortadan kaldırmaktadır (Ahmed vd. 2013; Jiang 2018; Kohli vd. 2020) (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. PEMF devrelerinde kullanılan bobin çeşitleri: **a)** Helmholtz Bobin; **b)** Ruben's Bobin; **c)** Fransleau-Braunbeck (Ganesan vd. 2009)

Helmholtz bobin çiftinde oluşan manyetik alan değeri “Biot-Savart kanunu” ile hesaplanmaktadır (Ahmed vd. 2013; Staebler 2017) (Şekil 2.4; Denklem 2.1).



Şekil 2.4. Helmholtz Bobin Çifti. R/2: Bobin yarıçap eksenini; I: Bobinden geçen akım miktarı; R: Bobin yarıçapı
(<https://www.scielo.br/j/rbef/a/nCZBbdJXDtydyjchjB8HDdz/?lang=en>)

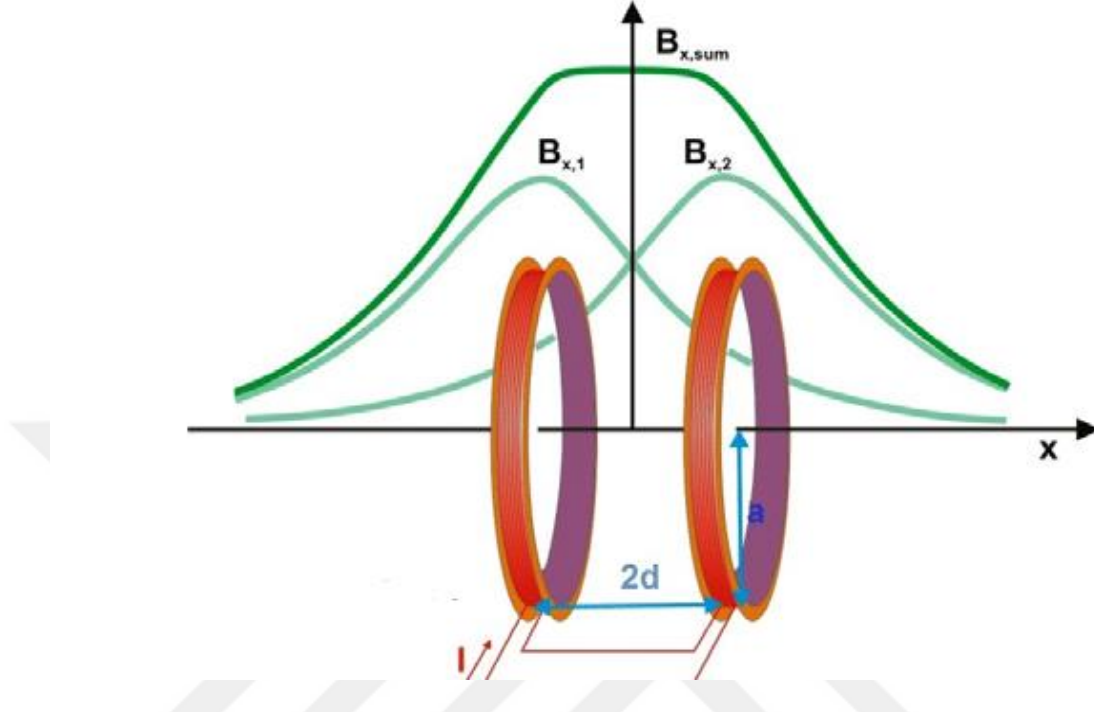
Biot-Savart kanunu:

$$d\vec{B} = \frac{\mu_0 I d\vec{l} \times \hat{r}}{4\pi r^2} \quad (2.1)$$

$d\vec{B}$, manyetik alan; $d\vec{l}$, telin küçük parçası; I iletken telde üretilen akım; r referans noktasından bobinlerdeki manyetik alana olan uzaklığı; \hat{r} i birim vektörü; μ_0 iletkenliğin geçirgenliği. $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$ T·m/A

Bobinler arasında homojen manyetik alana oluşturulabilmesi için en ideal bobin sistemi Helmholtz bobinler olarak kabul edilmektedir (Ahmed vd. 2013; Jiang 2018). Yukarıdaki formülde (Denklem 2.1)’de hesaplanan manyetik alanlar biri birine paralel olarak yerleştirilerek bobinlerle oluşmaktadır (Ahmed vd. 2013; Jiang 2018). Özellikle Helmholtz bobinlerin her birinde indüklenen manyetik alanların toplamı ve toplam

manyetik alanın bobin eksenini boyunca homojen olarak yayıldığı Şekil 2.5’de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Helmholtz bobinlerinde indüklenen manyetik alan şeması (<http://www.emf-portal.de>) B_{x1} : Birinci bobin manyetik alan; B_{x2} : İkinci bobin manyetik alan; B_{xsum} : Toplam manyetik alan; a: Bobin yarıçap eksenini; I: Bobinden geçen akım miktarı; 2d: Bobinler Arasındaki Mesafe

Helmholtz bobinlerde oluşan iki ayrı manyetik alanın toplamı (B_x) ve net manyetik alanın hesaplanması denklem 2.2’ye göre yapılmaktadır. Bobinlerin yarıçaplarına ve aralarındaki mesafeye göre hesaplanan alan, bobinler arasındaki mesafe ile bobinin merkeze olan uzaklığı arasındaki farkın ve toplamın karesi ile hesaplanmaktadır. Aynı zamanda bobinlerde oluşan manyetik alan bobinin sarım sayısına, geçirgenlik katsayısına, iletken telde üretilen akıma bağlıdır.

$$B_x = \frac{\mu_0 I N a^2}{2} \left[\frac{1}{a^2 + (d-x)^2} + \frac{1}{a^2 + (d+x)^2} \right] \quad (2.2)$$

B_x : manyetik alan; N: sarım sayısı; I iletken telde üretilen akım; a bobin yarıçapı; 2d: bobinler arası uzaklık; x: referans noktasından bobinlerdeki manyetik alana olan uzaklığı; μ_0 iletkenliğin geçirgenliği. $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$ T·m/A

2.3. Elektromanyetik Alanların Biyolojik-Nörobiyolojik Etkileri ve Klinikte Kullanımı

Günümüzde, yaklaşık üç milyardan fazla insanın her gün telefon, televizyon, bilgisayar, ev aletleri gibi elektronik cihazları kullanımı nedeniyle farklı frekans ve dalga boyuna sahip EMA'ya maruz kalınması, EMA maruziyetinin biyolojik sistemlerde etkilerini inceleyen bilimsel araştırma sayısını arttırmıştır (Kıvrak vd. 2017). Çalışmalar, biyolojik dokulardaki elektromanyetik alan etkisinin, dalganın enerjisine, yoğunluğuna, dokuda soğurulan enerji miktarına ve maruziyet süresine bağlı olduğunu göstermiştir (Markov 2015; Hao vd. 2018; Niederhäusern vd. 2019). Elektromanyetik radyasyonun vücutta termal ve termal olmayan etkiler gösterdiği bilinmekte olup emilen ışınların vücut sıcaklığında artışa ve dokuların yapısında bozulmalara neden olduğu gözlemlenmiştir (Hao vd. 2018; Kim vd. 2019; Poljak ve Cvetkovic 2019). Vücutta birim kütle (1 kg veya 1 g) başına emilen elektromanyetik dalgalar sayısal olarak özgül soğurma oranı (SAR) ile ifade edilmekte ve enerji W/kg ile birimlendirilmektedir (Kim vd. 2019). Cep telefonlarından yayılan (100 kHz ile 300 GHz) yüksek frekanslı EMA'lar, vücuda nüfuz ederek polar yüklü moleküllerin titreşimini artırır, vücut ısısını yükseltir ve bu tür ısı reaksiyonları nicel olarak SAR'a göre belirlenir (Kim vd. 2019). Ayrıca maruziyete bağlı olarak dokulardaki sıcaklık artışı, sinir hücrelerindeki voltaj kapılı kalsiyum kanallarının açılmasına ve nöronlardaki elektriksel aktivitenin değişmesiyle hücre ölümüne neden olmaktadır (Pall 2013; Kim vd. 2019). Vücutta ulaşamayan düşük frekanslı EMA'ların, dokularda sıcaklık artışına neden olmadığı ve bu nedenle frekansı 100 kHz'den küçük olan dalgaların termal etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (WHO 2002; Kim vd. 2016; Poljak ve Cvetkovic 2019). Yüksek frekanslı EMA maruziyeti ise biyolojik sistemlerdeki elektriksel akımı etkileyerek hücre membranındaki iyon kanallarının işleyişini ve membranın kimyasal yapısını bozmakta olup birçok rahatsızlığın oluşmasını tetiklemektedir (Hug ve Röösli 2012; Staebler 2017; Kıvrak vd. 2017). Örneğin, cilt yanıklarına (Poljak ve Cvetkovic 2019), göz kataraktına (Poljak ve Cvetkovic 2019), kan beyin bariyer geçirgenliğinin değişmesine (Kim vd. 2019), kan basıncının atmasına (Kim vd. 2019), hipotermiye (Poljak ve Cvetkovic 2019) neden olup, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkları tetiklediği (Arendash vd. 2010; Hao vd. 2018) bilinmektedir. Yüksek frekanslı 1.8 GHz EMA maruziyetinin kan beyin bariyer geçirgenliğini etkileyerek ağır metallerin geçişini arttırdığı (Stefi vd. 2019), hipertansiyona (Zhang vd. 2019) ve hipoksiye (Zhang vd. 2019) neden olduğu raporlanmıştır. Radyo Frekans Elektromanyetik Alan (RF-EMA) maruziyetinin genotoksik etkilerinin olabileceğini gösteren birçok çalışma vardır. Örneğin, yeni doğmuş Sprague Dawley (SD) cinsi sıçanlardan alınan nöron hücrelerine uygulanan 1800 MHz (2 W/kg SAR) RF-EMA maruziyeti, nöronların deoksiribonükleik asit (DNA) zincirinde harabiyetlere (Xu vd. 2010), kromozomal kararsızlığa, gen ekspresyonunun değişmesine ve gen mutasyonlarına (Kim vd. 2019) neden olmuştur. Ayrıca, deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmada (Megha vd. 2015), uzun süreli (30 gün/ günde 2 saat) 900 MHz frekanslı cep telefonuna maruz kalan Fischer cinsi sıçanlarda, kognitif bozukluklar, anksiyete ve yorgunluk gözlemlenmiştir. Son yıllardaki çalışmalar, elektromanyetik alan maruziyetinin beyin kanserlerine (Teimor vd. 2016), oksidatif stres kaynaklı nöronal ölümlere (Pall 2013; Kim vd. 2019), öğrenme ve bellek bozukluklarına (Megha vd. 2015; Kıvrak vd. 2017) ve Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara (Hao vd. 2018) neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, RF-EMA maruziyeti nöronlarda impuls

iletiminde önemli rolü olan miyelin kılıfının elektriksel yapısının bozulmasına dolayısıyla miyelin hasarına neden olmaktadır (Kim vd. 2019).

In vitro ve *in vivo* koşullarda EMA maruziyetinin reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu tetiklediğini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Örneğin, Zmyslony vd. (2004), erkek albino Wistar sıçanları 5 ve 15 dakika boyunca 930 MHz frekanslı sürekli dalga (CW) EMA'ya (güç yoğunluğu 5 W/m², 1.5 W/kg SAR) maruz bırakmış ve sıçanların lenfositlerinde ROS seviyesinin arttığını raporlamıştır. Benzer olarak, Wu vd. (2008) çalışmasında (4 W/kg) 1800 MHz EMA'ya 24 saat boyunca maruz kalan insan lens epitel hücrelerinde hücre içi ROS seviyesinin ve DNA hasarının önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Liu vd. (2014) çalışmasında ise, EMA maruziyetinden sonra oluşan ROS'ların, vücudun hasarlı hücreleri elimine etme yolu olan otofaji aktivasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Çalışmada, 24 saat boyunca 1800 MHz RF-EMA'ya maruz kalmış fare spermatozoid türevli hücrelerde (GC-2), otofaji süreçlerinin belirteci olan LC3-II'nin ekspresyonunun arttığı, ROS seviyesinin arttığı, ve apoptotik hücre ölümünün arttığı gözlemlenmiştir.

ROS seviyesindeki artış ve oksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar lehine bozulması, doymamış yağ asitleri içeren fosfolipid oksidasyonuna ve hücre zarlarının harabiyetine, membran transportunun bozulmasına neden olmaktadır (Kıvrak vd. 2017). Örneğin, Höytö vd. (2008) çalışmasında EMA maruziyetinin insan SH-SY5Y nöroblastoma ve sıçan L929 fibroblast hücrelerinde lipid peroksidasyonunu indüklediği raporlanmıştır. Ayrıca, oksidatif stres diğer organlara kıyasla ROS'a ve oksidatif hasara daha yatkın olan beynimizde nekroza, beyin dokusunda nöronal hasarlara, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara, omurilik yaralanması, Multipl Skleroz (MS) ve epilepsi hastalığı gibi nörolojik bozukluklara yol açmaktadır (Kıvrak vd. 2017). Örneğin, Lai ve Singh (1997) çalışmasında, 60 Hz-0.1 mT EMA'ya 24 saat boyunca maruz kalan erkek SD cinsi sıçanların beyin hücrelerinde serbest radikallerin arttığı böylece DNA yapısının bozulduğu gösterilmiştir. Benzer olarak Kesari vd. (2016) çalışmasında, 24 saat boyunca 50 Hz (10 ve 30 mT) EMA'ya maruz bırakılan SH-SY5Y nöroblastoma ve C6 glioma hücre hatlarında sitozolik ve mitokondriyal süperoksit seviyesinin arttığı, genotoksik etki ve oksidatif stresin indüksiyonunun olduğu raporlanmıştır.

2.3.1. Oksidatif stres

Canlılarda hücresel aktivasyonun gerçekleşmesi için oksijen temel faktör olup oksijenin su molekülüne indirgenmesi sırasında metabolik yan ürün olarak “Reaktif Oksijen Türleri (ROS)” ortaya çıkmaktadır (Wang ve Zhang 2017; Zhang vd. 2019). Hücrelerdeki ROS seviyesinin artmasıyla oksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar lehine ilerlemesi “Oksidatif Stres” olarak tanımlanmaktadır (Serafini ve Del Rio 2004).

Reaktif Oksijen Türleri kimyasal yapılarına göre “serbest radikaller” ve “serbest radikal olmayan moleküller” olarak iki gruba ayrılır (Upadhyay vd. 2019; Zhang vd. 2019). Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunan moleküller olarak tanımlanmaktadır (Uttara vd. 2009) (Çizelge 2.1). Eşleşmemiş elektron içeren süperoksit anyonu (O₂⁻), hidroksil radikali (OH[·]), nitrik oksit (NO[·]), karbonat radikal anyonu (CO₃⁻) ve alkoksit/alkil peroksit (RO[·]/ROO[·]) gibi moleküller serbest radikallere

örnek gösterilmektedir. Radikal olmayan yapıları ise hidrojen peroksit (H_2O_2), lipit peroksit (LOOH), singlet oksijen (1O_2) ve hipokloröz asit (HOCl) gibi iki elektronlu oksidanlar oluşturmaktadır (Hao vd. 2018; Zhang vd. 2019; Upadhyay vd. 2019) (Çizelge 2.1). Eşleşmemiş elektronlu olan serbest radikaller diğer radikallere göre daha kararsız ve daha reaktiftir (Zhang vd. 2019).

Çizelge 2.1. Reaktif Oksijen Türleri

REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali (OH)	Lipit peroksit (LOOH)
Nitrik oksit (NO^{\cdot})	Singlet oksijen (1O_2)
Karbonat radikali ($CO_3^{\cdot-}$)	Hipokloröz asit (HOCl)
Alkolsit radikali (RO^{\cdot})	

Reaktif oksijenlerin üretilmesi sırasıyla başlangıç, yayılma ve sonlandırma basamaklarından oluşmaktadır (Zhang vd. 2019). Kimyasallar, ilaçlar, kirleticiler, sigara dumanı ve yapay yollarla üretilen elektromanyetik radyasyon gibi ekzojen kaynaklar veya çeşitli hücrel metabolizmaların neden olduğu endojen kaynaklar organizmada serbest radikallerin üretilmesinden ve ROS seviyesindeki artıştan sorumludur (Uttara vd. 2009; Zhang vd. 2019; Upadhyay vd. 2019). Örneğin, 900 MHz EMA'ya maruz kalan insan mononükleer hücrelerinde oksidatif stresin indüklendiği, hücre içi ROS seviyesinin arttığı böylece lipidlerde, proteinlerde ve nükleik asitlerde oksidatif stresin olduğu raporlanmıştır (Kazimi vd. 2015). Bu bahsi geçen kaynakların oksijenli solunum mekanizmasını etkileyerek serbest radikalleri oluşturduğu basamağa, “başlangıç basamağı” denilmektedir (Zhang vd. 2019). Hücrel aktivasyon için gerekli adenozin trifosfat (ATP)'nin sentezi sırasında mitokondrideki glikoz, lipit, aminoasit gibi biyomoleküllerin oksitlenmesi yeni elektronları oluşturmaktadır (Wang ve Zhang 2017). Elektronların, mitokondriyal membran üzerindeki elektron taşıma zincirine (ETC) aktarılmasıyla ATP, oksijen, büyük miktarlarda oksidan ve ROS ürünleri ortaya çıkmaktadır (Zhang vd. 2019). Bu nedenle oksijenli solunum, ROS üretiminin ana kaynağı olarak bilinmektedir (Wang ve Zhang 2017; Hao vd. 2018; Zhang vd. 2019). Mitokondrinin yanı sıra peroksizom, nötrofil ve makrofaj hücrelerinde de ROS üretimi mevcuttur (Rahman vd. 2012; Wang ve Zhang 2017). Peroksizomların matriksindeki yağ asidinin ve diğer lipit moleküllerin bozulmasıyla yan ürün olarak süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşmaktadır (Uttara vd. 2009; Rahman vd. 2012; Babusikova vd. 2013).

Başlangıç radikalinin oluşumunun ardından, oksidatif solunum ürünleri güçlü radikallere dönüşerek veya çeşitli biyomoleküllerle reaksiyona girerek yeni tür radikalleri

meydana getirmektedir (Kıvrak vd. 2017; Zhang vd. 2019). Oluşan serbest radikallerin diğer dokulara difüze olmasıyla ve komşu dokuların radikal seviyesini arttırmasıyla “yayılma basamağı” aktifleşmektedir. Dokulara yayılan ROS’un ömrü 10^{-9} ile 1 saat arasında, kat ettiği difüzyon uzaklığı 10^{-12} ile 10 m arasındadır (Zhang vd. 2019). Serbest radikallerin başlatıcı molekülü olan oksijenin, bir elektrona indirgenmesiyle ya da nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) gibi farklı enzim reaksiyonuyla ömrü 50 ms olan “Süperoksit Anyonu ($O_2^{\cdot-}$)” oluşmaktadır (Rahman vd. 2012; Zhang vd. 2019; Chen vd. 2020). Süperoksit anyonun, bir elektron veya bağ yapısını tamamlamış oksijenin iki elektron alması sonucunda “Hidrojen Peroksit (H_2O_2)” molekülü meydana gelmektedir (Rahman vd. 2012; Zhang vd. 2019). Hidrojen peroksit ortaklaşmamış elektron içermediği için radikal değildir ancak uzun bir ömre (~ 1 ms) ve difüzyon mesafesine (1.5 mm) sahiptir (Wang ve Zhang 2017; Zhang vd. 2019). Her ne kadar radikal olmasa da hücre içi H_2O_2 seviyesi oldukça önemli olup yüksek seviyeli H_2O_2 ’nin oksidatif strese yol açtığı bilinmektedir (Harris ve DeNicola 2020). Örneğin, 100 μM ’dan 1mM’a kadar olan H_2O_2 konsantrasyonunun nöron hücrelerinde oksidatif stres seviyesini arttırdığı bilinmektedir (Oyama vd. 1996; Konyalioglu vd. 2013). Hidrojen peroksit radikal özellik göstermese de süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ile reaksiyona girerek “Hidroksil Radikalini (OH^{\cdot})” oluşturmaktadır (Rahman vd. 2012; Kıvrak vd. 2017; Zhang vd. 2019). Hidroksil radikali (OH^{\cdot}), son derece reaktif radikal olup süperoksit anyonun hidrojen peoksit (H_2O_2) ile reaksiyonu sonucunda ürün olarak ortaya çıkmaktadır (Sefidbakht vd. 2014; Zhang vd. 2019). Lipid, protein, karbonhidrat ve DNA dahil birçok biyomolekül ile oldukça hızlı reaksiyona girebilen OH^{\cdot} , yaklaşık 10^{-9} s kadar kısa bir sürede 4.5 nm’den az mesafeyi kat edebilir (Sánchez-Rodríguez ve Mendoza-Núñez 2019; Zhang vd. 2019). Hidroksil radikali (OH^{\cdot}) reaksiyonlar sonucunda karbon merkezli organik radikal ve organik peroksit gibi yeni radikallerin oluşmasına neden olmaktadır (Kasap 2010; Tekeli 2012; Babusikova vd. 2013).

Hücrelerdeki serbest radikalleri ve ROS’ları uzaklaştırarak oksidatif stresin etkilerini ortadan kaldırmak için canlılarda özelleşmiş moleküller ve enzimler mevcut olup bu yapılar “Antioksidanlar” olarak adlandırılmaktadır (Rahman vd. 2012; Ighodaro ve Akinloye 2017). Özellikle antioksidanlar yardımıyla serbest radikal seviyesinin azaldığı evreye de “sonlanma basamağı” denilmektedir (Zhang vd. 2019). Serbest radikallerin ve radikal olmayan ara ürünlerin antioksidan savunma sistemi molekülleri ile nötralize edilememesi yukarıda ifade edildiği gibi oksidatif stresin ve oksidatif strese bağlı rahatsızlıkların oluşmasına yol açmaktadır (Wang ve Zhang 2017; Pérez- Torres vd. 2017; Rahman vd. 2012). ROS seviyesini dengeleyen ve oksidatif stresin bu etkilerini azaltan antioksidan enzimler, serbest radikal mekanizmasının sonlandırma basamağı olarak bilinmektedir (Zhang vd. 2019). Hücrelerdeki serbest radikal mekanizmasını sonlandıran antioksidanlar, kaynağına göre doğal ve sentetik antioksidanlar olarak iki gruba ayrılmaktadır (Uttara vd. 2009). Doğal antioksidanlar, radikal oluşumunu önleyen süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi “Enzimatik Antioksidanlar”dan veya radikallerin dokudaki etkilerini önleyen A, C, ve E vitamini, lipoik asit, polifenoller, karotenoidler ve glutatyon (GSH) gibi “Enzimatik Olmayan Antioksidanlar”dan oluşmaktadır (Wang ve Zhang 2017; Hasanuzzaman vd. 2020). Antioksidan savunma mekanizmasının ilk basamağını SOD, CAT ve GPx gibi enzimatik antioksidanlar oluşturmaktadır (Ighodaro ve Akinloye 2017; Babusikova vd. 2013). Enzimatik antioksidanlar, serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu baskılamakta ya da önlemektedir (Ighodaro ve Akinloye

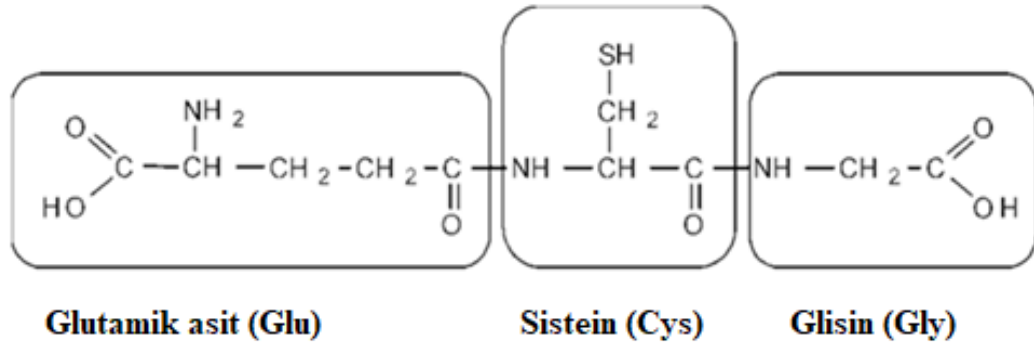
2017). Örneğin, hücrelerde ROS'un detoksifikasyonundan sorumlu SOD, aerobik solunumun toksik ürünü olan süperoksit anyonunu (O_2^-) oksijene ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'e katalizlemektedir (Pérez-Torres vd. 2017; Kıvrak vd. 2017; Ighodaro ve Akinloye 2017; Zhang vd. 2019). Bir metaloenzim olan SOD, kofaktör iyonlarına göre SOD1 (Cu-Zn SOD), SOD2 (Mn SOD) ve SOD3 (Cu-ZnSOD) olarak üç sınıfa ayrılmaktadır (Babusikova vd. 2013; Ighodaro ve Akinloye 2017; Zhang vd. 2019). SOD enziminin bu formları hücre canlılığı için vazgeçilmez olup hücrelerde yaşlanmaya ve programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) karşı koruyucudur (Sánchez-Rodríguez ve Mendoza-Núñez 2019). Örneğin, SOD3, nörolojik hastalıklara (Ighodaro ve Akinloye 2017), diyabete (Ighodaro ve Akinloye 2017), hipertansiyona (Ighodaro ve Akinloye 2017), inflamasyona (Ighodaro ve Akinloye 2017) ve iskemi hasarına (Ighodaro ve Akinloye 2017) karşı oldukça önemliyken intrasellüler ortamdaki SOD2 eksikliği nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır (Falone vd. 2016; Zhang vd. 2019). Bir diğer enzimatik antioksidan olan CAT, hidrojen peroksit molekülünün suya ve oksijene indirgendiği reaksiyonu katalizleyerek hücre içi ROS seviyesinde azalmaları tetiklemektedir (Babusikova vd. 2013; Zhang vd. 2019). Karaciğer ve eritrositlerde yüksek, hücre sitozolinde düşük seviyede bulunan CAT, hücre içi H_2O_2 seviyesinin artması durumunda milyonlarca H_2O_2 'nin parçalanmasını sağlamaktadır (Ighodaro ve Akinloye 2017; Zhang vd. 2019). CAT aktivitesindeki düşüş ise H_2O_2 'nin birikmesine ve hidroksil radikalinin oluşumuna neden olmaktadır (Zhang vd. 2019). Ayrıca memelilerin mitokondrisinde katalaz enzimi mevcut değildir ve bu nedenle memeli hücrelerinde yüksek seviyeye ulaşmış H_2O_2 'nin eliminasyonu GPx yardımı ile gerçekleşmektedir (Ighodaro ve Akinloye 2017).

Glutasyon peroksidaz (GPx), sitozolik bir enzim olup glutasyon (GSH) yardımıyla hem hidrojen peroksiti suya hem de hidroperoksidlerin su, alkol ve azaltılmış glutatyona (GSSG) indirgenmesini sağlamaktadır (Babusikova vd. 2013; Ighodaro ve Akinloye 2017). Bu durumda, hücre içi GPx aktivitesinin artmasıyla fagositik hücrelerin zarar görmesinin önüne geçilmiş olmaktadır (Kıvrak vd. 2017). Selenyum kofaktörü ile aktifleşen enzim, lipid peroksidasyonunu engelleyerek hücreleri oksidatif hasardan korumaktadır (Ighodaro ve Akinloye 2017). Ayrıca insanlarda sekiz farklı izoformu (GPx1-8) bulunan GPx, kanser ve kardiyovasküler hastalıklarının önlenmesinde görev almakta (Ighodaro ve Akinloye 2017) ve gastrointestinal sistemde (Zhang vd. 2019), böbrekte (Ighodaro ve Akinloye 2017), akciğerde (Zhang vd. 2019), embriyoda (Zhang vd. 2019), adrenal bezde (Ighodaro ve Akinloye 2017) ve hücre dışı sıvıda (Ighodaro ve Akinloye 2017) bulunmaktadır.

Enzimatik olmayan antioksidanlar, serbest radikallerin ve ROS'ların oluşumunu veya yayılımını engellemekle görevli olup bu antioksidanlara A, C ve E vitamini, polifenoller, karotenoidler ve glutasyon (GSH) örnek olarak gösterilebilir (Wang ve Zhang 2017; Kıvrak vd. 2017). Ayrıca, radikallere elektron vererek nötralize eden bu antioksidanlar "Süpürücü Antioksidanlar" olarak da adlandırılmaktadır (Ighodaro ve Akinloye 2017). Enzimatik olmayan ve endojen kaynaklar tarafından üretilen GSH'nin, hücre içi antioksidanlar arasında sayıca fazla olması onu oksidatif hasarı önleyen etkili savunma ajanı yapmaktadır (Pérez-Torres vd. 2017; Kıvrak vd. 2017; Zhang vd. 2019). GSH, hücre içinde üretilen H_2O_2 'yi, su ve oksijen moleküllerine indirgeyerek H_2O_2 'nin hücrelerden uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Wang ve Zhang 2017). Ayrıca, O_2^- ve

OH⁻ radikallerini etkisiz hale getirerek membranın lipit peroksidasyona karşı korunmasına da yardımcı olmaktadır (Babusikova vd. 2013; Pérez-Torres vd. 2017).

Glutamik asit (Glu), sistein (Cys) ve glisin (Gly) aminoasitlerinden oluşan ve düşük molekül ağırlıklı tripeptit olan Glutasyon'un %15'ini proteinler, geri kalanını serbest formu yapılar oluşturmaktadır (Pérez-Torres vd. 2017; van Haaften vd. 2003; Zhang vd. 2019) (Şekil 2.5).



Şekil 2.6. Glutasyonun Tripeptit yapısı (van Haaften vd. 2003)

Tripeptit yapıda bulunan GSH'nin sentezi iki aşamada gerçekleşmektedir (Harris ve DeNicola 2020). İlk basamakta, glutamat ve sistein glutamat-sistein sentetaz (GCS) enzimi yardımıyla peptit bağı yaparak bağlanır (Pérez-Torres vd. 2017; Harris ve DeNicola 2020). İkinci basamakta, glutamat-sistein ve glisin aminoasitleri glutasyon sentetaz enzimiyle katalizlenerek glutasyonun tripeptit yapısını oluşturmakta ve bu reaksiyona "Glutasyon Sentez Reaksiyonu" denilmektedir (Harris ve DeNicola 2020).

Glutasyon sentez reaksiyonu ile üretilen GSH, GPx'in kofaktörü olup H₂O₂'nin nötralizasyonunda ve okside Glutasyon (GSSG)'un üretilmesinde rol oynamaktadır (Wang ve Zhang 2017; Kıvrak vd. 2017). GPx ile H₂O₂'nin nötralizasyonunda oluşan okside Glutasyon (GSSG), NADPH⁺dan bir elektron alarak tekrardan GSH'ye dönüşmektedir. İkinci kez GSH'nin üretilmesi ise, glutasyon redüktaz (GR) enzimi tarafından gerçekleşmektedir (Harris ve DeNicola 2020). Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz'ın oluşturduğu bu döngüye "Glutasyon Redoks Döngüsü" denilmektedir (Wang ve Zhang 2017; Kıvrak vd. 2017). Kanser hücrelerinin detoksifikasyonunu sağlayan GSH'nin, beyin hücrelerindeki oksidatif strese ve özellikle de orta beyindeki substantia nigra'da dopaminerjik nöronların hasarına karşı önemli bir molekül olduğu bilinmektedir (Pearce vd. 1997; Babusikova vd. 2013; Copley, 2018; Harris ve DeNicola 2020). Parkinson hastalarında yapılan otopsi çalışması, sağlıklı bireylere kıyasla hastalarda GSH seviyesinin azaldığını ve bunun hastalığın şiddetini etkilediğini göstermiştir (Babusikova vd. 2013). Bu nedenle, oksidatif hasarın belirlenmesi için GSH düzeyi ölçülmesi önem kazanmış olup SOD, CAT, GPx aktiviteleri ve GSH miktarı birer biyobelirteç olarak bu hastalıkların tedavilerinde kullanılmaktadır.

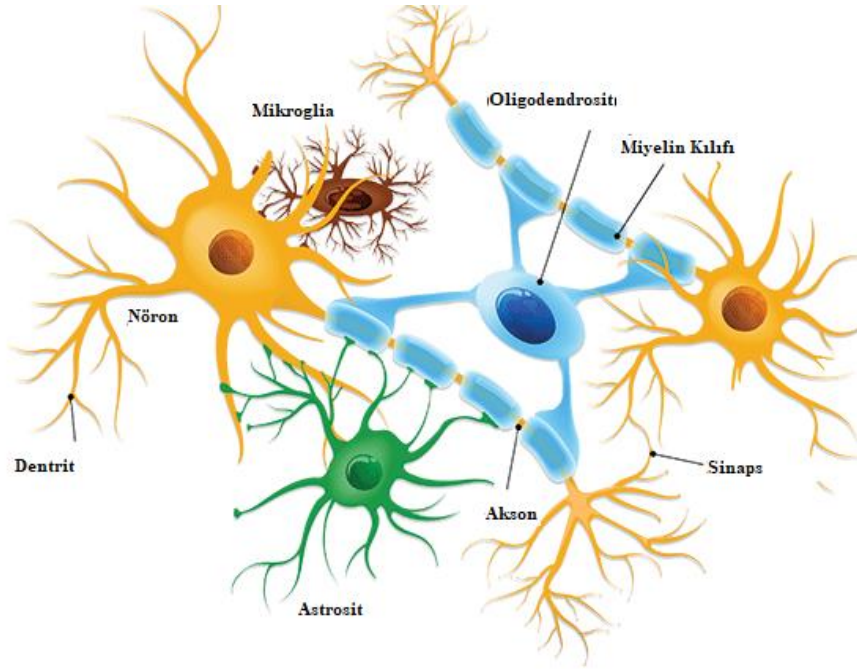
2.3.2 Oksidatif stresin biyolojik-nörobiyolojik etkileri

Sağlıklı dokularda reaktif oksijen türlerinin seviyesi önemli olup düşük seviyelerdeki ROS gen ekspresyonunu, hücre proliferasyonunu aktive edebilirken, yüksek seviyelerdeki ROS DNA, protein ve lipid gibi biyomolekülleri etkileyerek ve

sinyal yollarını baskılayarak mitokondriyal fonksiyon gibi farklı fizyolojik süreçlerin bozulmasına neden olmaktadır (Wang ve Zhang 2017). Ayrıca, ROS'ların biyomolekülleri etkilemesi hem hücre içi hem de hücreler arası homeostazide değişikliğe (Gandhi ve Abramov 2012), hücre ölümüne (Gandhi ve Abramov 2012), kardiyovasküler hastalıklara (Wang ve Zhang 2017) ve inmeye (Gandhi ve Abramov 2012) sebep olarak gösterilebilir. Özellikle, vücut ağırlığının %2'sini oluşturmaya rağmen kan dolaşımına giren oksijenin %20 kadarını kullanan beynimizde, ROS üretiminin yüksek olması ve antioksidan molekül veya enzimlerin düşük seviyede bulunması beyni oksidatif strese karşı oldukça duyarlı duruma getirmektedir (Gandhi ve Abramov 2012; Babusikova vd. 2013; Zhang vd. 2019; Cheng vd. 2020).

İnsan vücudunun yapısal ve fonksiyonel olarak en karmaşık organı olan beynimiz, farklı işlevsel özelliklere sahip hücrelerden oluşmaktadır (Bhandage 2016; Chiaradia ve Lancaster 2020). Sinir sistemindeki bir nöronun başka bir nörona veya kas, salgı bezi gibi hedef hücrelere elektriksel veya kimyasal sinyal iletmeye olanak sağlayan bağlantı noktalarına "sinaps" denilmektedir (Uzbay 2004; Watson vd. 2010; Caire vd. 2020). Kimyasal bir sinaps, morfolojik olarak presinaptik uç, sinaptik aralık ve postsinaptik uç olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır (Watson vd. 2010; Glasgow vd. 2019). Presinaptik ve postsinaptik uçlar arasındaki iletişimi sağlayan kimyasal aracı maddeler (nörotransmitterler), hücrelerin uyarılmasına, hücre içi kaskadlara ve hücreler arası nörokimyasal iletime aracılık ederler (Uzbay 2004; Glasgow vd. 2019; Caire vd. 2020). Hücreler arasında bir diğer iletişim yolu olan elektriksel sinyaller ise, hücrenin bir uçtan bir uca uyarılmasını sağlamakta ve membranın elektriksel geriliminin değişmesine, sinir boyunca Aksiyon Potansiyeli'nin oluşmasına neden olmaktadır (Lovinger 2008; McCormick 2014; Caire vd. 2020).

Merkezi sinir sistemi hücrelerinin üçte birinden fazlasını oluşturan glialar, nöron olmayan ve elektriksel sinyaller üretmeyen bir tür nöron benzeri hücrelerdir (Blanco-Suárez vd. 2017; Carlson 2019). Bu hücreler nöronlarla hemen hemen temas halinde bulunmakta ve nöronların işlevsel partnerleri olarak metabolik süreçleri ve sinaptik sinyalleri düzenlemektedirler (Blanco-Suárez vd. 2017). Örneğin, glial hücrelerinden astrositler, nöronlara mekanik destek sağlama, kan beyin bariyerinin bütünlüğünü koruma, nörotransmitter miktarını kontrol etme, besin metabolizmasını aktifleştirme, elektrik sinyallerinin iletiminde görevli miyelin maddesini sentezleme ve toksik maddeleri ortamdan uzaklaştırarak sinirlerin sağlıklı kalmasını sağlama gibi önemli rollere sahiptirler (Brandao vd. 2018) (Şekil 2.6.). Astrositler bu görevlerine ek olarak, yüksek metabolik aktiviteye sahip nöronlarda oluşan reaktif oksijen türlerini engellemekte ve nöronları oksidatif hasardan korumaktadırlar (Chen vd. 2020). Beyin dokusundaki kronik inflamasyon, astrosit ve mikroglia gibi glial hücrelerinde ROS seviyesinin artmasına, oksidatif stresin oluşmasına ve böylece DNA tamir mekanizmalarında harabiyete, immunsupresif ortama ve en önemlisi de tedaviye dirençli beyin kanserlerinin oluşmasına neden olmaktadır (Salazar-Ramiro vd. 2016). Örneğin, erişkinlerde en sık görülen malign astrositik primer beyin tümörlerinden biri olan glioblastoma multiforme (GBM) bunlardan biridir (Dukhande vd. 2013; Ahmadi-Zeidabadi vd. 2019).



Şekil 2.7. Tipik bir nöronun glial hücreler ile bağlantısı (<https://www.sciencenewsforstudents.org/article/scientists-say-glia>)

Beynimiz, EMA maruziyeti gibi çeşitli faktörler sonucu ortaya çıkan oksidatif strese ve etkilerine karşı oldukça hassastır (Babasikova 2013). Normal beyin fonksiyonları sırasında oksijen tüketiminin yan ürünü olarak %90-95 oranında ortaya çıkan ROS nörodejeneratif hastalıkların patogenezinin neden olmaktadır (Babasikova 2013; Cobley, 2018). Orantısız oluşan ROS'lar oksidatif stresi tetiklemekte ve nöronal apoptoza, protein, lipid, DNA hasarına, glukoz metabolizmasının bozulmasına, glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna neden olarak nöronal toksisiteyi tetiklemektedir (Babasikova 2013). Örneğin, H_2O_2 gibi endojen veya radyasyon gibi ekzojen kaynaklar, nöronlarda oksidatif stresi arttırmakta, nekroza (Kıvrak vd. 2017), apoptoza (Kıvrak vd. 2017), omurilik yaralanmasına (Kıvrak vd. 2017), Multipl Skleroz (MS) (Kıvrak vd. 2017), epilepsiye neden olmakta ve Alzheimer (Babusikova vd. 2013), Parkinson (Babusikova vd. 2013) gibi nörodejeneratif hastalıklarının görülme sıklığını arttırmaktadır. ROS'ların nörodejeneratif hastalıklara etkilerini inceleyen çalışmalar mevcut olup nörofibriler yumakların gelişimi sırasında oluşan ROS'ların amiloid plakları oluşturduğu ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkları tetiklediği bilinmektedir (Babasikova 2013). Özellikle yaşlanmaya bağlı olarak beyin birkaç farklı bölgesinde ROS seviyesi artmakta olup protein ve lipidlerde oksidatif hasarlar oluşmaktadır ve Alzheimer hastalığının ana belirteçlerinden olan amiloid beta ($A\beta$) peptit'in, oksidatif stresin bir ürünü olarak ortaya çıktığı bilinmektedir (Pluta vd. 1996; Babasikova 2013). Alzheimer hastalarının merkezi ve periferik sinir sistemi hücrelerinde SOD ve CAT gibi antioksidan enzim aktivitesinin veya ekspresyonunun azaldığını gösteren çalışmalar mevcut olup Alzheimer ile oksidatif stres arasındaki ilişki olduğu raporlanmıştır (Padurariu vd. 2010; Babasikova 2013). Örneğin, Marcus vd. (1998) çalışmasında Alzheimer hastalarının (AD) farklı beyin bölgelerinden alınan (frontal, temporal ve serebellar korteks) dokularda bakır/çinko (Cu/Zn) süperoksit dismutaz (SOD) aktivasyonu incelenmiş olup hastaların frontal ve temporal korteksinde SOD aktivitesinin azaldığı

gözlemlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise (Padurariu vd. 2010), 15 Alzheimer hastası ve 15 sağlıklı kontrolden alınan kan örnekleri incelenmiş ve hastalarda SOD ve GP_x aktivasyonunun azaldığı raporlanmıştır.

2.4. Darbeli Elektromanyetik Alanların Biyolojik-Nörobiyolojik ve Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri

Elektromanyetik alanların çeşitli rahatsızlıklara neden olduğu bilirse de elektromanyetik radyasyonlar tıbbi teşhis ve tedavi amacıyla birçok biyomedikal uygulamada yer almaktadır (Teimor vd. 2016; Kim vd. 2019). Örneğin, bilgisayarlı tomografi (CT) taramaları veya X ışınları gibi yüksek enerjili tıbbi ekipmanlardan akupunktur tedavilerine kadar çok çeşitli terapötik yöntemlerde elektromanyetik alanlar kullanılmaktadır (Oschman 2016; Teimori vd. 2016). Çalışmalar, sadece yüksek frekanslı EMA maruziyetinin biyolojik ve nörobiyolojik etkilerinin olmadığını göstermiştir (Teimor vd. 2016; Hosseinabadi vd. 2018). Örneğin, aşırı düşük frekanslı (5-300 Hz) EMA maruziyetinin uyku, sirkadiyen ritmi etkileyen melatonin hormonunun salınmasını engellediği böylece meme kanserine (Hosseinabadi vd. 2018), beyin tümörüne (Teimor vd. 2016), uyku ritim bozukluğuna (Teimor vd. 2016) neden olduğu bilinmektedir. Ancak, yukarıda bahsi geçen bilgilerin aksine (Hosseinabadi vd. 2018; Kim vd. 2019) elektromanyetik radyasyonun hücrelerde yıkıcı hasarlara ve hücre ölümüne neden olduğunu bilirse de kemoterapi ve radyoterapi gibi kanser tedavilerinde elektromanyetik radyasyon tedavi amacıyla da kullanılmaktadır (Teimor vd. 2016; Vadalà vd. 2016). Bu nedenle biyomedikal uygulamalarda kullanılan EMA'lar çeşitli rahatsızlıklarda terapötik etki sağlamaktadır (Markov 2015; Poljak ve Cvetkovic 2019). Özellikle kas-iskelet sistemi hastalıklarında adjuvan (güçlendirici) bir terapi olarak bilinen manyetoterapi hücre ve doku fonksiyonlarını modüle etmektedir (Markov 2007). Benzer olarak, beyin hücrelerinde elektriksel alanı indükleyen "Transkraniyal Manyetik Stimülasyon (TMS)"un depresyon tedavisi için kullanılan terapötik bir yöntem olduğu bilinmektedir (Poljak ve Cvetkovic 2019). EMA maruziyeti sadece nörodejeneratif hastalıkları tedavi etmekle kalmaz aynı zamanda yumuşak doku hasarının onarımına (Markov vd. 2020), kırıkların iyileşmesine (Daish vd. 2018; Qiu vd. 2020), ameliyat sonrası ağrıların azalmasına da (Stauch vd. 2009; Gessi vd. 2019) yardımcı olmaktadır. Düşük frekanslı (50 Hz-1 mT, 50 Hz -2 mT ve 15 Hz-5 mT) EMA maruziyetinin kök hücrelerde farklılaşmayı ve migrasyonu sağladığı da çalışmalarda raporlanmıştır (Markov 2015; Hao vd. 2018). Örneğin, 15 Hz EMA maruziyetinin insan mezenkimal kök hücrelerinde kırık seviyesini arttırdığı (Mayer-Wagner vd. 2011), 50 Hz-1 mT ELF-EMA maruziyetinin ise hücrelerde farklılaşmayı sağladığı gösterilmiştir (Park vd. 2013). Terapötik EMA uygulamalarından en dikkat çeken, düşük frekanslı EMA olan "Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF)" tedavisidir (Markov 2007; Ehnert vd. 2017; Krath vd. 2017). PEMF, invaziv olmayan güvenli bir terapi yöntemidir (Qiu vd. 2020; Ronzio 2020). PEMF terapisi iki şekilde gerçekleştirilmektedir: Cilt yüzeye doğrudan temas eden "kapasitif yöntem" veya doğrudan temas etmeyen "endüktif kuplaj yöntemi" (Zhai vd. 2016). PEMF tedavisinde kullanılan frekanslar, 1Hz-10 kHz aralığındaki düşük frekanslı manyetik alan bandını içermektedir (Hug ve Röösli 2012). Ancak tipik olarak termal ve iyonlaştırıcı olmayan aşırı düşük frekans (5-300 Hz) aralığının kullanılması tercih edilmektedir (Ganesan vd. 2009; Hug ve Röösli 2012; Wade 2013). PEMF devresinde oluşan manyetik alan ve indüklenmiş elektriksel alan, yara iyileşme mekanizmasını aktifleştirmekte ve böylece ameliyat sonrası ağrıyı, ödemi azaltarak antienflamatuvar ve

prorejenaratif reaksiyonları desteklemektedir (Ahmed vd. 2013; Mattsson ve Simkó 2019; Gessi vd. 2019). Ayrıca PEMF maruziyeti, kemik mineralizasyonunu sağlayarak kırıkların kaynamasında (Markov 2007; Zhai vd. 2016), eklem-kas-iskelet bozukluklarının tedavisinde (Markov 2007; Zhai vd. 2016) kullanılmaktadır. 5-300 Hz frekanstaki PEMF maruziyeti, sinir ve kas membranındaki akımı indükleyerek hücrelerde “Aksiyon Potansiyeli” denen elektriksel değişimlere neden olmaktadır. (Vadalà vd. 2016; Pawluk ve Layne 2017). Ek olarak nöroendokrin, meme, karaciğer, kemik kanser hücrelerine uygulanan PEMF maruziyeti, hücrelerinin Ca^{+2} iyon kanallarını, elektrokimyasını ve fizyolojisini etkileyerek tümör büyüme oranının azalmasına neden olmaktadır (Urnukhsaikhan vd. 2016; Vadalà vd. 2016).

Kemik kırıklarının onarımı ve yara iyileşmesinin yanı sıra invaziv olmayan PEMF'nin klinik uygulamaları Alzheimer, Parkinson ve Demans gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde önem kazanmıştır (Capelli vd. 2017; Li vd. 2019; Gessi vd. 2019). Çünkü PEMF maruziyeti hem nöronal membranın elektriksel yüklerini dengelemekte hem de nöronlar arası kimyasal iletişimi sağlayan noradrenalin, dopamin gibi nörotransmitterlerin salınımını aktifleştirmektedir (Pawluk ve Layne 2017). Ayrıca PEMF maruziyeti, hem PC12 mikroglia nöronal hücre hasarının onarımını sağlamakta hem de bu hasarların ilerlemesini durduran p38, JNK1/2 MAPK kinaz, Akt and kaspaz 3 gibi ajanları uyarmaktadır (Varani vd. 2012; Gessi vd. 2019). PEMF, rejeneratif tıpta parkinson hastalığının semptomlarının hafifletilmesinde (Sherrard vd. 2018), depresyon (Sherrard vd. 2018) ve hafıza kaybı gibi rahatsızlıkların (Sherrard vd. 2018) tedavisinde kullanılmaktadır. Örneğin, Martiny vd. (2010) çalışmasında 18 yaşından büyük 25 majör depresyon hastası, 4 hafta boyunca 55 Hz PEMF ile tedavi edilmiş, PEMF maruziyetinin antidepresan tedavisine alternatif bir teknik olabileceği raporlanmıştır. PEMF maruziyetinin terapötik etkilerine ek olarak, oksijenli solunum reaksiyonlarında ortaya çıkarak DNA harabiyetine, membran yıkımına, hücre ölümüne neden olan serbest radikallere karşı koruyucu etkisinin de olduğu bilinmektedir (Urnukhsaikhan vd. 2016; Gessi vd. 2019). Örneğin, Falone vd. (2016) çalışmasında, 75 Hz PEMF'ye maruz kalan nöron hücrelerinde serbest radikallerin neden olduğu hücre ölüm oranlarının azaldığı raporlanmıştır. Diğer bir çalışmada ise (Ehnert vd. 2017), yetişkin insan kemiklerinden izole edilen osteoblast hücrelerine (hOBs) uygulanan 75 Hz PEMF'nin, antioksidan enzim aktivasyonunu artırarak serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresi azalttığı raporlanmıştır. Çeşitli alanlarda tedavi edici etkisi olan PEMF maruziyetinin serbest radikalleri ve radikallerin neden olduğu oksidatif stresin etkilerinin ortadan kaldırılmasında da etkili olduğu görülmektedir. Oksidan-antioksidan dengesinin sağlanmasında rolü olduğu bilinen farklı hücrelerdeki PEMF maruziyetin enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar üzerine etkilerini araştıran çalışmalar mevcuttur (Falone vd. 2016; Vincenzi vd. 2017). Çalışmalar, düşük frekans (0-100 Hz) ve yoğunluğa (10 μ T-10 mT) sahip PEMF'nin, hücrelerde oksidatif stres seviyesinin artması sonucu oluşan dengesizlikleri ortadan kaldırdığını, hücrelerin ritmik dalgalarla periyodik uyarılmasının dokularda nötralizasyon sağladığını ve antioksidan seviyesinde değişikliklere neden olduğunu raporlamıştır (Tamam vd. 2016). Ayrıca, farklı sürelerde (24 ve 48 saat) 75 Hz PEMF'ye maruz bırakılan insan osteoblast hücrelerinde, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücresinde, sıçan PC12 ve N9 mikroglia ve SK-N-BE(2) insan nöroblastoma hücrelerinde hücre içi ROS seviyesinin düştüğü ve antioksidan enzim aktivasyonunu arttığı gözlemlenmiştir (Osera vd. 2015; Falone vd. 2016; Ehnert vd. 2017; Vincenzi vd. 2017). Fakat, H_2O_2 ile muamele edilerek oksidatif stresin indüklendiği,

yetiŐkinlerde en yaygın agresif astrositik (astrocyte-like) primer beyin tümörü olan glioblastoma multiforme (GBM) insan U87-MG hücre hattında PEMF maruziyetinin oksidatif stres üzerine etkilerinin hücresel, biyokimyasal tekniklerle incelendiği çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle çalışmada farklı sürelerde H₂O₂ ile muamele edilen insan U87-MG glioblastoma hücresinde 15 dakika 75 Hz frekans 1± 0.2 mT yoğunluğundaki PEMF maruziyetinin hücre canlılığına, ROS seviyesine ve antioksidan mekanizmasındaki önemli enzimlerin (GPx ve GSH) aktivite/seviyelerine etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.



3. MATERYAL VE METOT

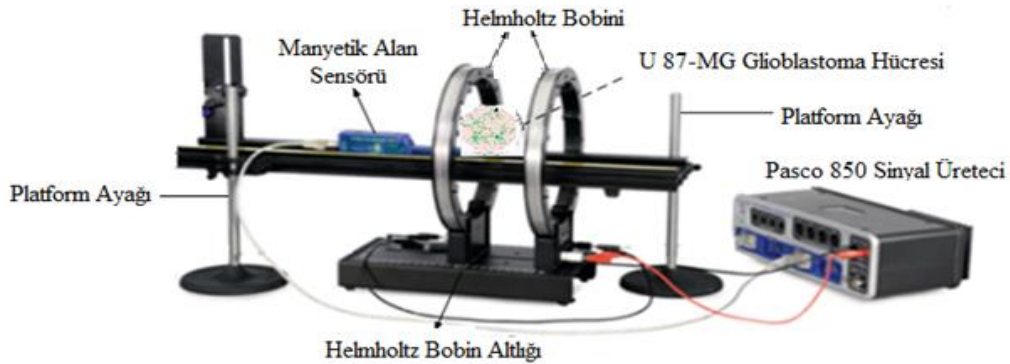
3.1. Kimyasallar

U87-MG insan glioblastoma hücre hattı (HTB-14) Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri, ABD) firmasından satın alınmıştır. Eagle Minimum Besi Ortamı (EMEM; 01-025-1A), L-Glutamin (03-020-1B), Fetal Sığır Serumu (FBS; 04-007-1A), Tripsin Etilendiamin Tetraasetik Asit (Tripsin EDTA; 03-053-1B) ve Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep; 03-031-1B), Biological Industries (BIO IND, Cromwell, ABD) firmasından; Dimetil sülfoksit ($\geq 99.9\%$)(DMSO; 276855-1L), Hidrojen Peroksit (H_2O_2 ; 18304), Tuzlu fosfat tampon tableti (PBS; P4417), 2',7'-Diklorofloresan diasetat (D6883-50MG), Triklorikasetik asit (TCA; T6399), Tris hidroklorür asit (Tris-HCL) (1185-53-1), Potasyum klorür (KCl; 7447-70-7), Metanol (34860), Dipotasyum Fosfat (K_2HPO_4 ; 543890100), Fosforik asit (H_3PO_4 ; 664-38-2), 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB; D218200) ve azaltılmış L-Glutatyon (G4251) Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri, ABD) firmasından temin edilmiştir. Kloroform (12445), Sodyum klorür (NaCl; 106400), Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$; 106580) ve Triton X-100 (108603) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından; Alamar Mavi (Alamar Blue) reaktifi (DAL1100) Invitrogen (Waltham, Massachusetts, ABD); Glutatyon Peroksidaz Test Kiti (Kolorimetrik; ab102530) ise ABCAM (Cambridge, Birleşik Krallık) firmasından satın alınmıştır.

3.2. Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF) Devresinin Kurulumu

Darbeleri elektromanyetik alan (PEMF) devresinin Helmholtz bobini (EM-6715), manyetik alan sensörü (PS-2162), elektromanyetik alan üretici (Pasco; UI-5000) ve Pasco Capstone Yazılımı (UI-5400) Pasco (Kaliforniya, ABD)'den satın alınmıştır.

Helmholtz bobinlerden ve diğer ara parçalardan oluşan PEMF devresi Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Manyetik alan sağlayan helmholtz bobin çifti, bobinlerin sabitlendiği helmholtz bobin altlığı, platform ayakları, bobinlere elektromanyetik alan sağlayan Pasco 850 sinyal üretici, manyetik alanı ölçen manyetik alan sensörü ve PEMF'ye maruz bırakılan U87-

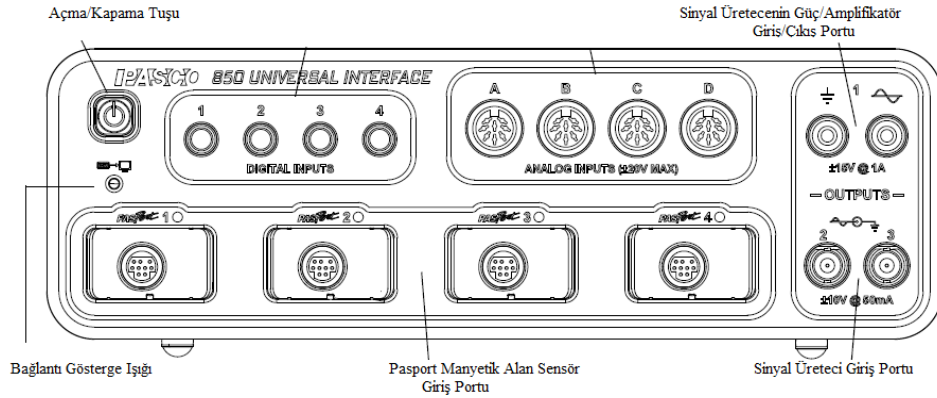
MG insan glioblastoma hücrelerini içeren petri kabından oluşan Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF) Düzenegi

PEMF devresinin güç kaynağı olarak Çizelge 3.1'deki özelliklere sahip Pasco 850 Universal Interface model sinyal üretici (Pasco- 012-12355B) kullanılmıştır (Şekil 3.2).

Çizelge 3.1. Pasco 850 Universal Interface model sinyal üretici özellikleri

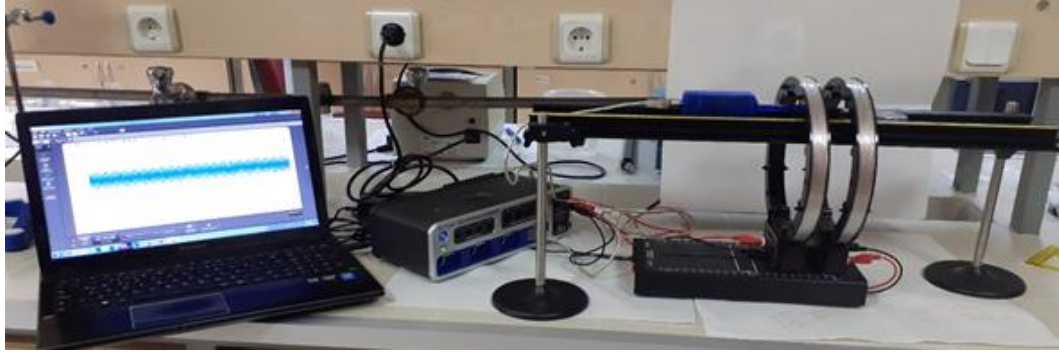
PASCO 850 UNİVERSAL INTERFACE MODEL SİNYAL ÜRETECİ ÖZELLİKLERİ

Dalga Şekilleri	Sinus, Üçgen, Kare Dalga, Pozitif-Negatif Rampalar, Dc
Alternatif Akım Voltajı (Alternative Current Volgate) (AC) Besleme	250 V
Doğru Akım Voltajı (Direct Current Volgate) (DC) Besleme	12 V
Güç Harcanması	15 W
Frekans Aralığı	0.01 Hz-100 kHz
Maksimum Çıkış Akımı	15 V
Çıkış Akım Ölçümü	10 V



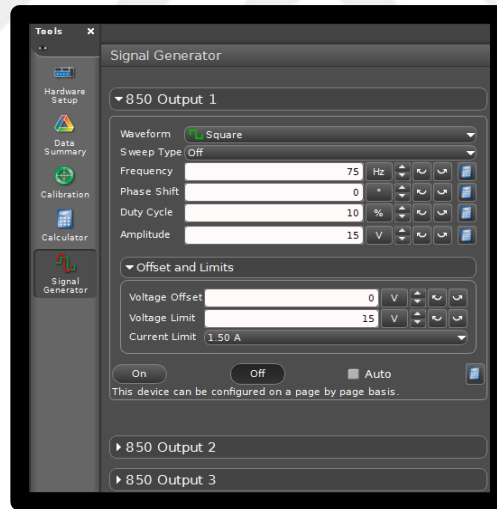
Şekil 3.2. Pasco 850 Universal Interface model sinyal üretici

Helmholtz bobinlerin genişliği 1.6 cm, iç yarıçapı 10.06 cm, dış yarıçapı 11.37 cm olup, 500 sarımlı yalıtılmış bakır tellerden meydana gelmektedir. Homojen manyetik alan oluşturulabilmesi için bobinler Şekil 3.1'de gösterildiği gibi birbirine paralel olarak helmholtz bobin altlığına sabitlenerek yerleştirilmiştir. Şekil 3.1'de gösterilen PEMF devresinin sinyal üretici (Signal Generator) ve üç farklı sinyal değerini (850 Output 1, 2, 3) kayıt edebilen Pasco Capstone Yazılımı ile bağlantısı bilgisayar ortamında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. PEMF devresinin sinyal üretici (Signal Generator) ve Pasco Capstone Yazılımı ile bağlantısı

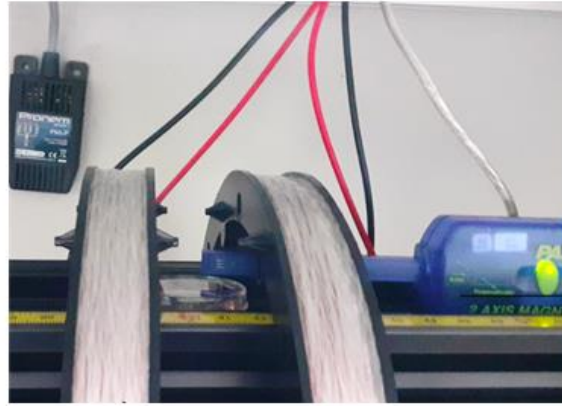
Pasco Capstone Yazılım programında, PEMF devresinin dalga formu (waveform) kare dalga (square) seçilmiş olup frekans süpürme işlemi (sweep type) kapalı formda ve faz kaydırma (phase shift) açısı da 0° derece olarak belirlenmiştir. Frekansı 75 Hz, dalga genlik değeri (amplitude) 15 V ve elektromanyetik dalganın görev döngüsü (duty cycle) periyodu %10 olacak şekilde değerler 850 Output 1 çıkış penceresine girilmiştir. Ayrıca helmholtz bobinleri besleyen elektrik akımı (current limit) 1.5 amper (A), limit gerilim değeri (V) (voltage limit) 15 V, topraklama gerilim değeri (voltage offset) 0 V olarak yazılımın “Ofset ve Limitler (Offset and Limits)” penceresi yardımıyla belirlendikten sonra manyetik alan sensörü açılmıştır (Şekil 3.4).



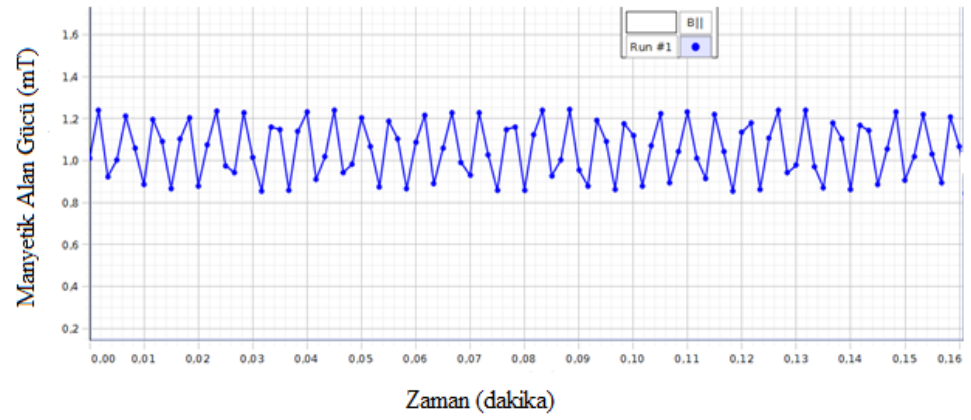
Şekil 3.4. Pasco 850 Capstone Yazılımı Ara yüzü

Pasport manyetik alan sensörü (Şekil 3.5.a) yardımıyla ilk 0.16 dakika boyunca (Şekil 3.5.b) dikey (aksiyal) yöndeki manyetik alan değeri Pasco 850 Capstone Yazılımı kullanılarak 1 ± 0.2 mT olarak ölçülmüştür. Çalışmada PEMF maruziyet süresi 15 dakika olacağından (bakınız Şekil 3.4.) helmholtz bobinlerin oluşturduğu manyetik alan ayrıca 15 dakika (Şekil 3.5.c) süreyle ölçülmüş ve 1 ± 0.2 mT manyetik alan sinyalleri kayıt altına alınmıştır. Ayrıca, PEMF maruziyetinin olası termal etkisinin engellenmesi için maruziyet ortamının sıcaklığı düzenli olarak kontrol edilmiş ve PEMF maruziyetinden kaynaklı herhangi bir sıcaklık artışı tespit edilmemiştir (Şekil 3.3).

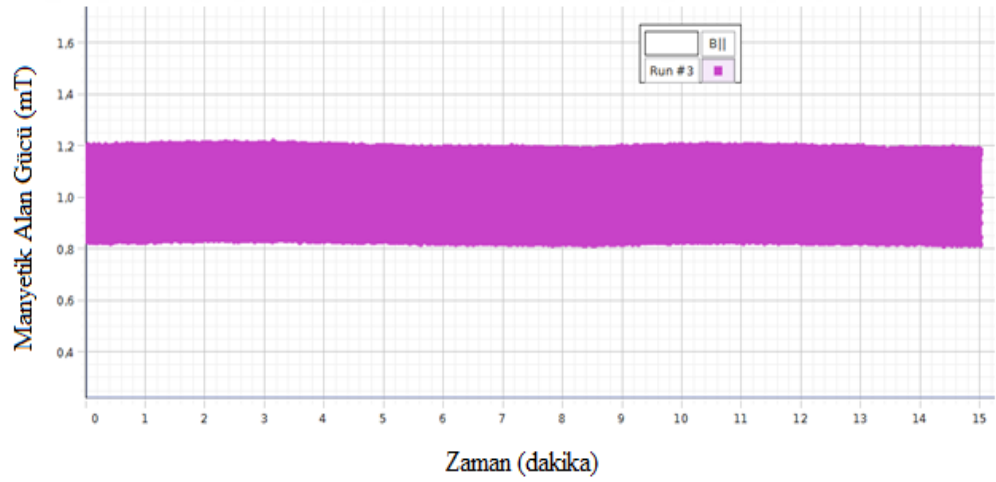
(a)



(b)



(c)

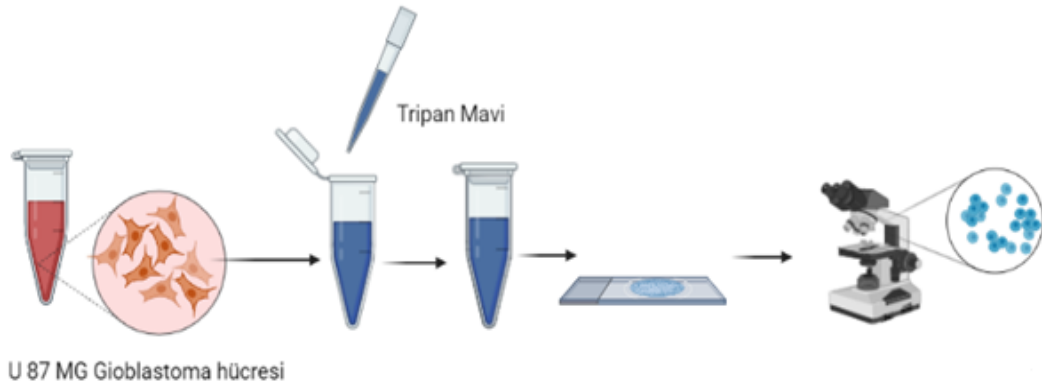


Şekil 3.5. a) Bobinlere eş uzaklıkta dikey (aksiyel) ekseninde yerleştirilen manyetik alan sensörü, **b)** ilk 0.16 dakikadaki ve **c)** 15 dakikaya sıkıştırılmış 1 ± 0.2 mT manyetik alan sinyallerinin Pasco Capstone Yazılım ile elde edilen manyetik alan dalga sinyalleri

3.3. Hücre Kültürü

Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC, Missouri, ABD) temin edilerek -80°C'de muhafaza edilen U87-MG insan glioblastoma hücresi, deney öncesinde 37°C'deki su banyosunda (Nüve) çözündürülmüştür. Çözünen hücreler, içerisinde besi ortamı (%10 EMEM, %10 fetal sıgır serumu, %1 L-Glutamin, %1 penisilin-streptomisin içeren) bulunan T75 hücre kaplarına aktarılmıştır. Hücreler %5 CO₂ içeren 37°C, %95 nem ortamındaki steril inkübatörde (Binder, Camarillo, ABD) inkübe edilmiş ve kültürün besi ortamı 2-3 gün içinde yenilenmiştir.

Hacimce büyüyen hücrelerin T75 kap yüzeyinin %80'ini kaplaması hücre canlılık göstergesi için sınır kabul edilip bu evreye 'Pasajlama Evresi' denilmekte ve bu evre hücrelerin zarar görmeden Tripsin ile kaldırılması ve sıvı içinde süspansiyon edilerek başka ortama aktarılması aşamalarını içermektedir (Freudenrich ve Shafer, 2020). Hücreleri kap yüzeyinden ayıran Tripsin EDTA ile muamele etmeden önce hücreler besi ortamının uzaklaştırması amacıyla 10 mL, 10 mM tuzlu fosfat tamponu (PBS) ile yıkanmış, daha sonra PBS ortamdan uzaklaştırılmıştır. T75 hücre kaplarına hücreleri kap yüzeyinden ayırmak için 2 ml Tripsin-EDTA (%0.25 tripsin-%0.53 EDTA) eklenmiş, 5 dakika boyunca %5 CO₂ içeren 37°C steril inkübatörde inkübe edilerek hücreler kap yüzeyinden ayrılmıştır. T-75 kap yüzeyinden ayrılan hücrelerin petri yüzeyine tutunması gerekli olduğundan hücrelerdeki tripsinin inaktive edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, hücrelere 8 mL EMEM besi ortamı ilave edilmiş ve böylece hücreler petrilere ekim işlemi için hazır hale getirilmiştir. Daha sonra, canlı hücre sayısını belirlemek için hücrelerin 10 µl'si, canlı hücrelerin sitoplazmasını berrak, cansız hücrelerin sitoplazmasını mavi renkte gösteren %0.4 tripan mavisi ile süspansiyon edilerek canlı hücreler ışık mikroskobu (Nikon, Melville, ABD) altında incelenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Tripan mavisi ile süspansiyon edilen U87-MG hücrelerinde canlı ve ölü hücrelerin ışık mikroskobu altında incelenmesi

3.4. PEMF Maruziyeti

U87-MG insan glioblastoma hücreleri aşağıdaki şekilde üç gruba ayrılmıştır:

Grup 1: Kontrol grubu (H₂O₂ muamelesiyle oksidatif stresin indüklenmediği ve PEMF maruziyetinin uygulanmadığı gruptur),

Grup 2: 30 dakika, 24 saat ve 48 saat boyunca 0.1 mM H₂O₂ muamelesiyle oksidatif stresin indüklediği hücre grubudur,

Grup 3: 30 dakika, 24 saat ve 48 saat boyunca 0.1 mM H₂O₂ muamelesiyle oksidatif stresin indüklenmesinin ardından 15 dakika boyunca 75 Hz-1±0.2 mT PEMF'ye maruz bırakılan gruptur.

Daha sonra Grup1, Grup 2 ve Grup 3 hücreleri petri kaplarına (20x10⁴ hücre/petri) ekilmiştir. Hücrelerin kap yüzeyine tutunabilmesi için gerekli 24 saat bekleme süresinin ardından, Grup 2 ve Grup 3 hücreleri belirlenen zaman aralıklarında (30 dk, 24 saat, 48 saat) 0.1mM H₂O₂ ile muamele edilerek oksidatif stres indüklenmiştir. Grup 3 hücreleri ise 30 dakika, 24 saat, 48 saat boyunca 0.1mM H₂O₂ muamelesinin ardından 15 dakika 75 Hz-1±0.2 mT PEMF'ye maruz bırakılmıştır.

3.5. Hücre Canlılığı

Grup1, Grup 2 ve Grup 3 hücreleri 96 kuyucuklu (1x10⁴ hücre/kuyucuk) plakaya aktarılmış, Karakurt (2016) çalışmasında revize edilen Alamar Mavisini (Alamar Blue) tekniği kullanılarak hücre canlılığı spektrofotometrede (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ABD) (uyarma:570 nm, yayılma: 610 nm) ölçülmüştür. Spektrofotometri tekniği, 570 nm dalga boyundaki uyarma ışınlarının hücreleri uyurarak 610 nm dalga boyundaki yayılma ışınlarını oluşturmasına ve bu ışınların dedektörden algılanması prensibine dayanmaktadır. Hücre canlılığı yüzdesi (%) Denklem 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{[(O2 \times A1) - (O1 \times A2)]}{[(R1 \times N2) - (R2 \times N1)]} * 100 \quad (3.1)$$

O1: 570 nm'de, O2: 600 nm'deki oksitlenmiş alamar mavisinin sönüm katsayısını, R1: 570 nm'de, R2: 600 nm'deki indirgenmiş alamar mavisinin sönüm katsayısını, A1: 570 nm'de, A2: 600 nm'deki hücre absorbansını, N1: 570 nm'de, N2: 600 nm'deki negatif kontrol kuyucuğunun absorbans değerini ifade etmektedir.

Yüksek sitotoksik etkiye sahip H₂O₂'nin Grup 2 ve Grup 3 hücrelerinin %50'sini öldüren konsantrasyon (IC50) değeri Cheng-Prusoff denklemi (Newton vd. 2008) kullanılarak hesaplanmıştır (Denklem 3.2).

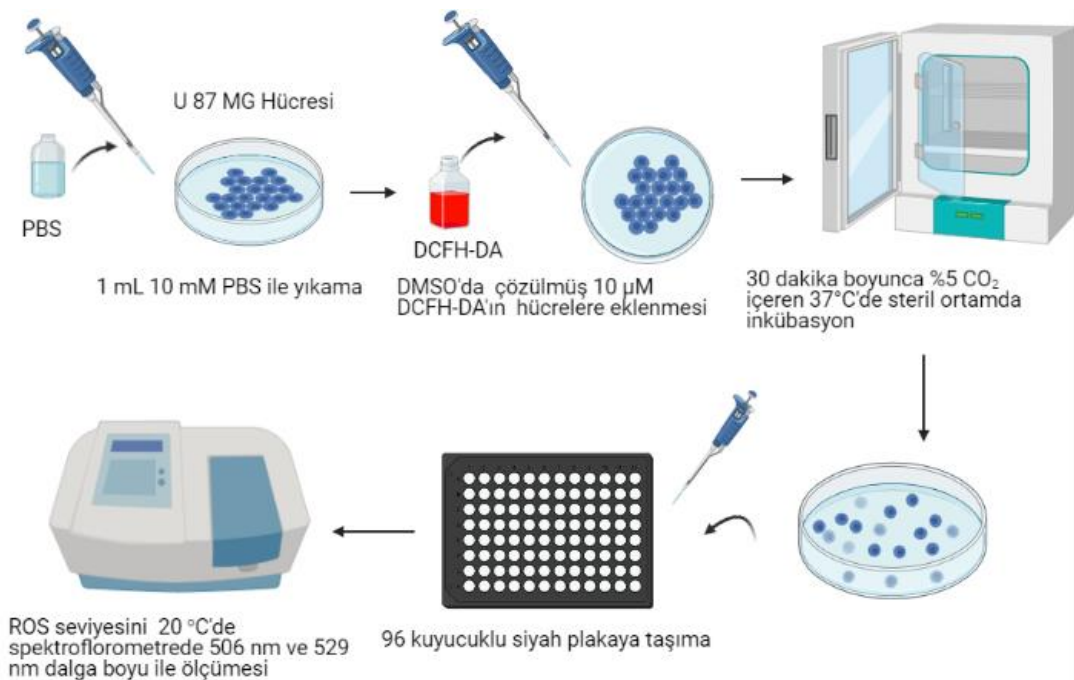
$$IC\ 50\ değeri: ([K_i]/[K_D]*[L])+K_i \quad (3.2)$$

K_i : bağlanma affinitesini, K_D : enzim aktivasyonunun %50'sinin maksimum olduğu konsantrasyon değerini, L : hücre konsantrasyonunu ifade etmektedir.

3.6. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Miktarının Tayini

Hücrelerde ROS seviyesinin ölçümde 2',7'-Diklorodihidrofloresans diasetat (DCFH-DA) yöntemi (Keston ve Brandt, 1965) kullanılmıştır. Sulu çözeltilerdeki H_2O_2 seviyesinin belirlenmesinde kullanılan bu yöntem, DCFH-DA'nın hücre içi esterez enzimleriyle önce 2'-7'-diklorodihidrofloresin (H_2DCF)'e sonrasında da floresan ürün olan 2',7'-Diklorofloresin (DCF)'e dönüşmesi prensibine dayanmaktadır. Böylece hücrelerdeki Reaktif Florans Unit (R.F.U) değerleri belirlenmektedir.

Grup 2 ve Grup 3'ün bulunduğu petrilere, H_2O_2 muamelesinden (Grup 2), H_2O_2 muamelesinin ardından uygulanan PEMF maruziyetinden (Grup 3) sonra ölü hücrelerin ve besi ortamının uzaklaştırılması amacıyla 1 mL 10 mM PBS ile yıkanmıştır. Kontrol grubu olan Grup 1 hücreleri de Grup 2 ve Grup 3 hücreleri ile eş zamanlı olarak 1 mL 10 mM PBS ile yıkanmıştır. 0.19 mg DCFH-DA, homojen karışım hazırlamak için iyi bir çözücü olarak kullanılan 40 mL Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözümlenerek 10 μ M DCFH-DA karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım hücre gruplarının bulunduğu petrilere eklenmiş ve petrilere 30 dakika boyunca %5 CO_2 içeren $37^\circ C$ 'deki steril inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, ölü hücreleri ortamdaki arındırmak için hücreler 1 mL 10 mM PBS ile yıkanmış, yıkama işleminin ardından da pipetajlama yapılarak 96 kuyucuklu siyah plakaya (1.25×10^3 /kuyucuk) aktarılmıştır. Plakadaki hücrelerin ROS seviyesi, 504 nm uyarma ve 529 nm yayılma ışınması yapan $20^\circ C$ 'deki Synergy H1 Mikroplate Okuyucuda (Bio-Tek, Vermont, ABD) belirlenmiştir. Tüm bu aşamalar şekil 3.7'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.7. U87-MG hücrelerinde ROS seviyesinin belirlenme aşamaları

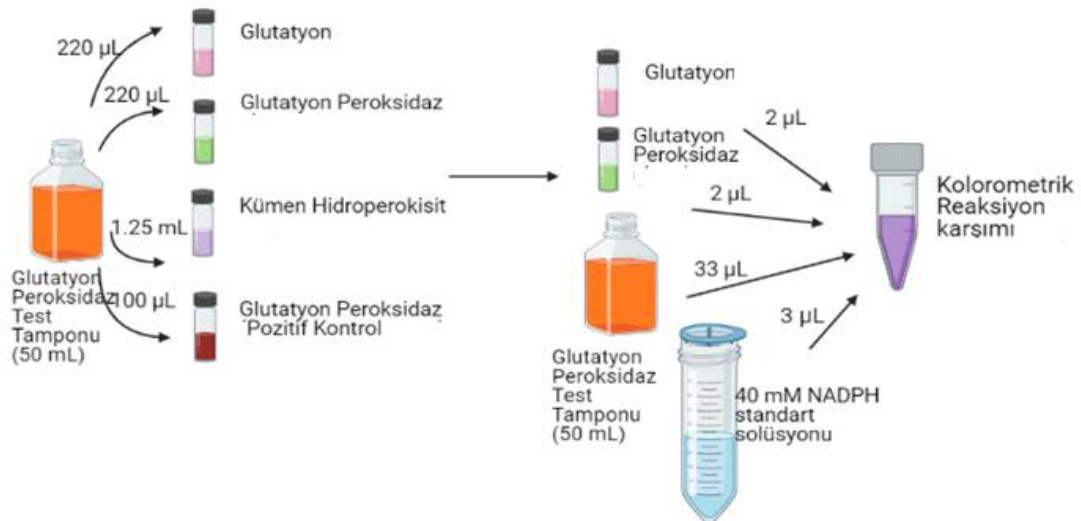
3.7. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesinin tayini için, yüksek verimlilik gösteren Kolorimetrik Glutasyon Peroksidaz Test Kiti (ab102530) kullanılmıştır. Prensibi, 340 nm'deki oksitlenmiş glutasyon (GSSG)'un Glutasyon (GSH)'a dönüşmesi sırasında NADPH seviyesindeki azalmaların belirlenmesi, NADPH seviyesindeki azalmalar ile de GPx aktivitesinin ortaya çıkmasının sağlanmasına dayanmaktadır (Paglia ve Valentine 1967).

Kit içeriğinde yer alan malzemeler aşağıdaki şekilde seyreltilmiştir:

1. 40 mM NADPH standart solüsyonu, 500 µL distile su (dH₂O) ile,
2. Glutasyon (GSH) ve Glutasyon peroksidaz (GPx) şişeleri (vialleri) 220 µL Glutasyon Peroksidaz Test Tamponu ile,
3. Redükte glutasyonun (GSH) oksidasyonunu katalizlemekle görevli kümen hidroperoksit (C₉H₁₂O₂) şişesi (vial), 1.25 mL Glutasyon Peroksidaz Test Tamponu ile,
4. Glutasyon Peroksidaz (Pozitif Kontrol) şişesi (vial) 100 µL Glutasyon Peroksidaz Test Tamponu ile seyreltilmiştir.

Seyreltilen glutasyon, glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksit ve glutasyon peroksidaz (pozitif kontrolleri) şişeleri buz içinde muhafaza edilmiştir. Enzim aktivasyonlarında kullanılan ve reaksiyon sonucunda oluşan renkli bileşiklerin belirlenmesini sağlayan kolorimetrik reaksiyon karışımı (33 µL Glutasyon Peroksidaz test tamponu, 3 µL 40 mM NADPH standart solüsyonunu, 2 µL seyreltilmiş Glutasyon peroksidaz, 2 µL seyreltilmiş Glutasyon), 5 mL ependorf tüp içinde hazırlanarak (bakınız Şekil 3.8) daha sonra kullanılmak üzere buz üzerinde bekletilmiştir.



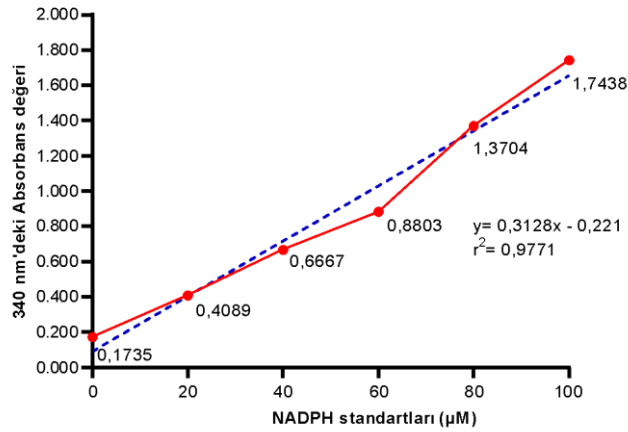
Şekil 3.8. Kolorimetrik reaksiyon karışımının hazırlanması aşamaları

Daha sonra 1 mM NADPH standart solüsyonu hazırlanma aşamasına geçilmiştir. Çözünen 40 mM NADPH standart solüsyonunun 25 µL'si, 975 µL dH₂O ile seyreltilerek 1 mM NADPH standart solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan 1 mM NADPH standart solüsyonu, Glutasyon peroksidaz tampon çözeltisi ile dilüye edilerek Çizelge 3.2'deki gibi 6 farklı molaritedeki standart solüsyonları (0 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM, 100 µM) hazırlanmıştır. Farklı molaritelerdeki bu standartlar, 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 100 µL olacak şekilde eklenmiş ve 340 nm'de spektrofotometrede (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ABD) okunarak standart eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.9).

Çizelge 3.2. 1 mM NADPH standartları

FARKLI MOLARİTEKİ NADPH STANDARTLARI

Standart	1 mM NADPH Standart Hacmi	Glutasyon Peroksidaz Test Tamponu	Kuyucuk hacmi	NADPH Molariteleri
1	0 ml	300 µL	100 µL	0 µM
2	60 µL	240 µL	100 µL	20 µM
3	120 µL	180 µL	100 µL	40 µM
4	180 µL	120 µL	100 µL	60 µM
5	240 µL	60 µL	100 µL	80 µM
6	300 µL	0 µL	100 µL	100 µM



Şekil 3.9. 340 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak ölçülen farklı konsantrasyondaki NADPH standartlarının kalibrasyon eğrisi

Grup 2 ve Grup 3'ün bulunduğu petripler, H₂O₂ muamelesinden (Grup 2), H₂O₂ muamelesinin ardından uygulanan PEMF maruziyetinden (Grup 3) sonra ölü hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılması için 1 mL 10 mM PBS ile yıkanmıştır. Kontrol grubu olan Grup 1 hücreleri de Grup 2 ve Grup 3 hücreleri ile eş zamanlı olarak 1 mL 10 mM PBS ile yıkanmıştır. Petri yüzeyine tutunmuş halde bulunan hücrelere 100 µl Tripsin-EDTA eklenmiştir. Tripsin-EDTA ile petri yüzeyinden ayrılan hücreler 15 mL falkon tüplere

aktarılmış ve 400 xg'de (1718 rpm) 5 dakika santrifüj edilmiştir. Deney süresi boyunca enzimlerin denatüre olmaması için hücreler +4 C°'de muhafaza edilmiş ve diğer işlemler bu sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. +4 C°'de muhafaza edilen 200 µL Glutasyon Peroksidaz Test Tamponu santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlara eklenmiştir. Ardından süpernatantlar 10000 xg'de (8950 rpm) 4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve yeni elde edilen süpernatantlar 1.5 µL'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.

Daha sonra, çizelge 3.2'ye göre 6 farklı konsantrasyonda hazırlanan NADPH standartlarının 100 µL'si, hücre süpernatantlarının 50 µL'si, GPx pozitif kontrollerin ve reaktif kontrollerin (Glutasyon Peroksidaz test tamponu) 50 µL'si 96 kuyucuklu plakaya duplike şekilde aktarılmıştır. Hücre süpernatantlarına ve GPx pozitif kontrollerine önce 40 µL kolorometrik reaksiyon karışımı (bakınız şekil 3.8) eklenmiş ve 15 dakika boyunca %5 CO₂ içeren 37°C steril inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücre süpernatantlarına ve GPx pozitif kontrollerine 10 µL kümen hidroperoksit çözeltisi (bakınız şekil 3.8) ilave edilmiştir.

Tüm hücre grupları O.D. 340 nm mikropilaya okuyucuda (Thermo Fisher Scientific ABD) iki kez okunmuş olup zamana bağlı ışımaya değerleri Denklem 3.3'e göre hesaplanmıştır. Hücrelerin ve Glutasyon Test Tamponunun (Reaktif Kontrol) 340 nm dalga boyundaki birinci okumaları (T1) yapılmış ve elde edilen NADPH dalga boyu değerleri kayıt altına alınmıştır. Hücreler 25°C'de 5 dakika inkübe edilmiş olup benzer şekilde ikinci okumaları (T2) yapılmış hücrelerin ve Glutasyon Test Tamponunun NADPH dalga boyu değerleri kaydedilmiştir (Denklem 3.3).

$$\Delta A_{340nm} = ([\text{Numune (T1)} - \text{Numune (T2)}] - [\text{Reaktif kontrol (T1)} - \text{Reaktif Kontrol (T2)}]) \quad (3.3)$$

Numune (T1): hücrelerin O.D. 340 nm'deki birinci ışımaya değerleri, Numune (T2): hücrelerin O.D. 340 nm'deki ikinci ışımaya değerlerini; Reaktif kontrol (T1): Glutasyon Test Tamponunun O.D. 340 nm'deki birinci ışımaya değerlerini, Reaktif kontrol (T2): Glutasyon Test Tamponunun O.D. 340 nm'deki ikinci ışımaya değerleri

Denklem 3.3'teki ΔA_{340nm} değeri, hücrelerde ve glutasyon test tamponundaki azalan NADPH seviyesinin dalga boyu farkını ifade etmektedir. Öncelikle ΔA_{340nm} değeri kullanılarak NADPH (B) miktarı hesaplanmış (Denklem 3.4) olup ardından belirlenen NADPH miktarına göre GPx enzim aktivitesi (Denklem 3.5) hesaplanmış, bulunan enzim aktivitesi miliünite/mililitre (mU/ml) cinsinden ifade edilmiştir.

$$B = \frac{\Delta A_{340nm} - \text{kesme noktası (intercept)}}{\text{eğim (slope)}} \quad (3.4)$$

$$GPx \text{ aktivitesi} = \left(\frac{B}{(T_2 - T_1) * V} \right) * D \quad (3.5)$$

B: İki farklı zaman arasında (T1 ve T2) ölçülen NADPH miktarı (µM cinsinden), ΔA_{340nm} numunelerin ve reaktif kontrollerin dalga boyu farkı, NADPH standart eğrisinin kesme noktası ve eğimi (bakınız Şekil 3.9.), V: reaksiyon kuyucuğundaki numune hacmi (mL), D: örnek seyreltme faktörü

3.8. Glutasyon (GSH) Miktar Tayini

Hücrelerin sahip olduğu enzim, aminoasitler, proteinler, karbonhidratlar, lipitler, hormonlar ve vitaminler gibi biyokimyasal moleküllerin tayininde kullanılan Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) tekniği, sıvılarda çözülmüş halde bulunan farklı ağırlıklardaki bileşenlerin HPLC kolonlarını farklı zamanlarda terk etmesi temeline dayanmaktadır. Bu teknik sabit ve hareketli olmak üzere iki ayrı fazdan oluşmakta olup kimyasalların fazlar arasında kütle transferine ve bileşenlerin hız faktörüne bağlı olarak dedektörde belirlenmesi presibi ile çalışmaktadır. Bu nedenle hücrelerdeki GSH miktarı tayini için sabit faz olarak C18 kolonu, hareketli faz olarak 500 mL 25 mM Dipotasyum Fosfat (K_2HPO_4) ve 500 mL saf (% 100) Metanol kullanılmış ve HPLC cihazı ile bağlantısı yapılmıştır.

Daha sonra, Grup 2 ve Grup 3'ün bulunduğu petripler H_2O_2 muamelesinden (Grup 2), H_2O_2 muamelesinin ardından uygulanan PEMF maruziyetinden (Grup 3) sonra ölü hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılması için 1 mL 10 mM PBS ile yıkanmıştır. Kontrol grubu olan Grup 1 hücreleri de Grup 2 ve Grup 3 hücreleri ile eş zamanlı olarak 1 mL 10 mM PBS ile yıkanmış ve ardından tüm grup hücreleri 15 mL falkon tüplere alınarak 400 xg'de (1718 rpm) 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Süpernatantlara hareketli fazlardan düşük polariteye sahip olan 300 µL kloroform eklenmiş ve süpernatantlar 10000 xg'de (8950 rpm) 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen yeni süpernatantların 240 µL'sine serbest proteinlerin uzaklaşmasını sağlayan %15 trikloroasetik asit (TCA)'in 100 µL'si eklenmiştir. TCA'nın süpernatant içinde homojen dağılılabilmesi için karışım 10 dakika boyunca 22903 xg'de (13.000 rpm) santrifüjlenmiş ve yeni elde edilen süpernatantların 130 µL'sine 500 µL 0.5 mM Tris HCL (pH: 0.89) ilave edilmiştir. Ardından, süpernatantlardaki glutasyon (GSH) miktarının belirlenmesinde kullanılan 0.5 M K_2HPO_4 (pH: 8 (10 mM DTNB içeren))'in 350 µL'si süpernatantlara eklenmiş ve süpernatantlar 5 dakika boyunca buz içinde inkübe edilmiştir. Daha sonra süpernatantlara 100 µL 7 M H_3PO_4 ilave edilip 3000 xg'de (4705 rpm'de) 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve GSH miktar tayinine kadar süpernatantlar buz içinde bekletilmiştir.

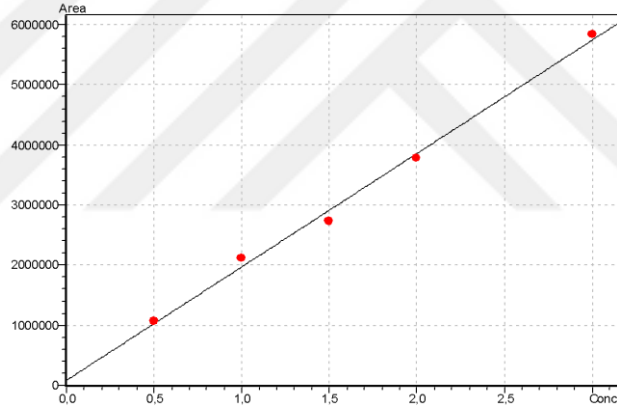
GSH miktar tayininin yapılabilmesi için GSH'ın seyreltilerek 5 farklı molaritelerdeki GSH standart solüsyonunun hazırlanması ve HPLC cihazında (Shimadzu, LC-2050 serisi, Kyoto, Japonya) analiz edilerek standart eğrisinin çizilmesi gerekmektedir. Bu nedenle saf halde bulunan indirgenmiş (redükte) glutasyon (GSH)'un 15.3 mg'ı, 2.5 mL homojenizasyon tamponunda (500 mL'lik hacim içerisinde 4.005 g NaCl, 0.1 g KCl, 0.89 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0.135 g K_2HPO_4 ve 750 µL TritonX-100 içeren tampon, pH: 7.4) çözdürülmüştür. Böylece ilk olarak 20 mM GSH standart solüsyonu hazırlanmış, ardından Çizelge 3.3'teki gibi 5 farklı molaritelerdeki (0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM, 2 mM, 3 mM) standart solüsyonları hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. 20 mM GSH standartları

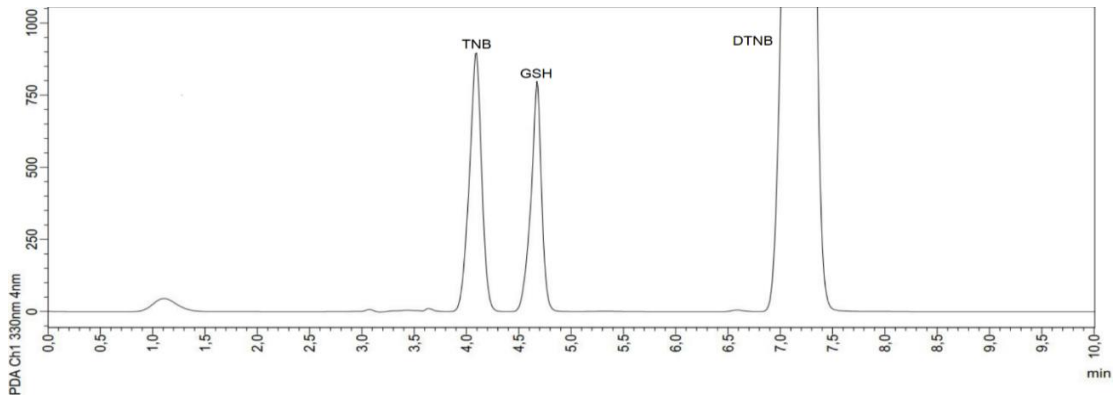
FARKLI MOLARİTEKİ GLUTATYON (GSH) STANDARTLARI

Standart	20 mM GSH Standart Hacmi	Homojenizasyon Tamponu	Glutatyon Molariteleri
1	25 µL	975 µL	0.5 mM
2	50 µL	950 µL	1 mM
3	75 µL	925 µL	1.5 mM
4	100 µL	900 µL	2 mM
5	150 µL	850 µL	3 mM

Yukarıdaki santrifüjlüme işlemlerinin ardından buzda bekletilen süpernatantlar ve Çizelge 3.3' e göre hazırlanan farklı molaritelerdeki standartlar 2 µm'lik membran filtreden geçirilerek 330 nm'ye ayarlanmış HPLC (Shimadzu, LC-2050 serisi, Kyoto, Japonya) cihazında standart grafiği belirlenerek analiz edilmiş ve 4.5 dakikada oluşan pik değerine göre GSH miktar tayini yapılmıştır (Şekil 3.10). Prosedür aşamaları Şekil 3.11'de şematize edilmiştir.



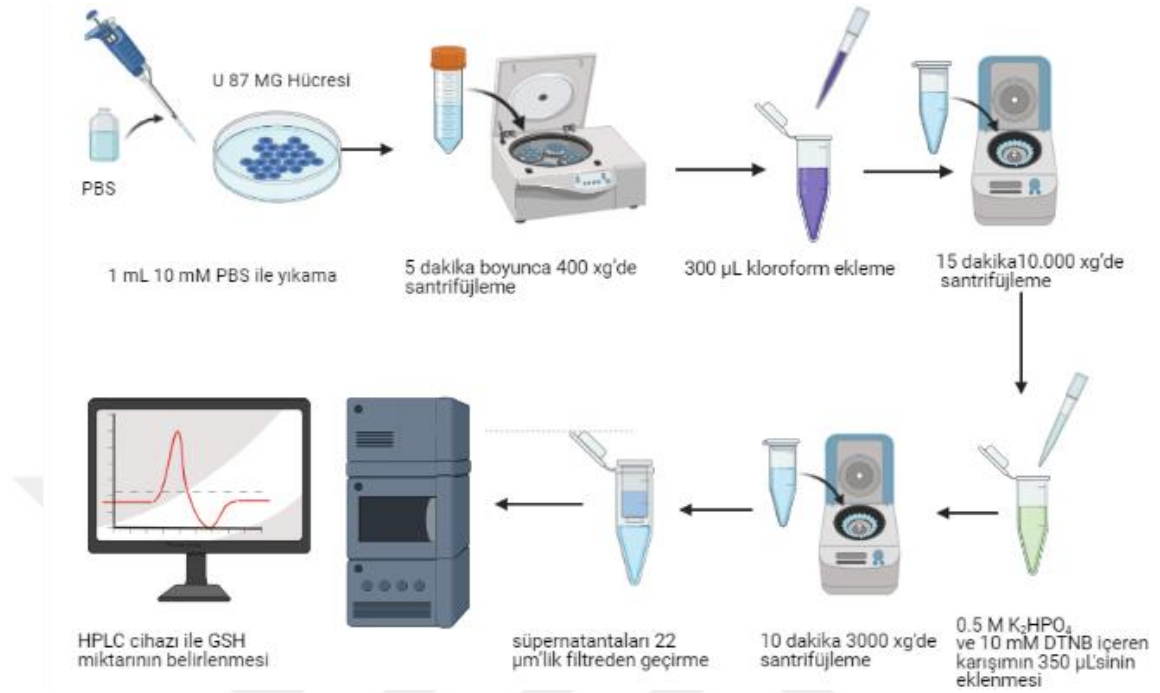
(a)



(b)

Şekil 3.10. a) 330 nm dalga boyunda HPLC tekniği ile ölçülen farklı konsantrasyonlardaki GSH standartlarının kalibrasyon eğrisi; b) 330 nm dalga boyunda

5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB), Glutasyon (GSH) ve Ellman reaktifi 5,5-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asid (DTNB)'in temsili kromatogram gösterimi



Şekil 3.11. HPLC tekniği ile GSH miktar tayini

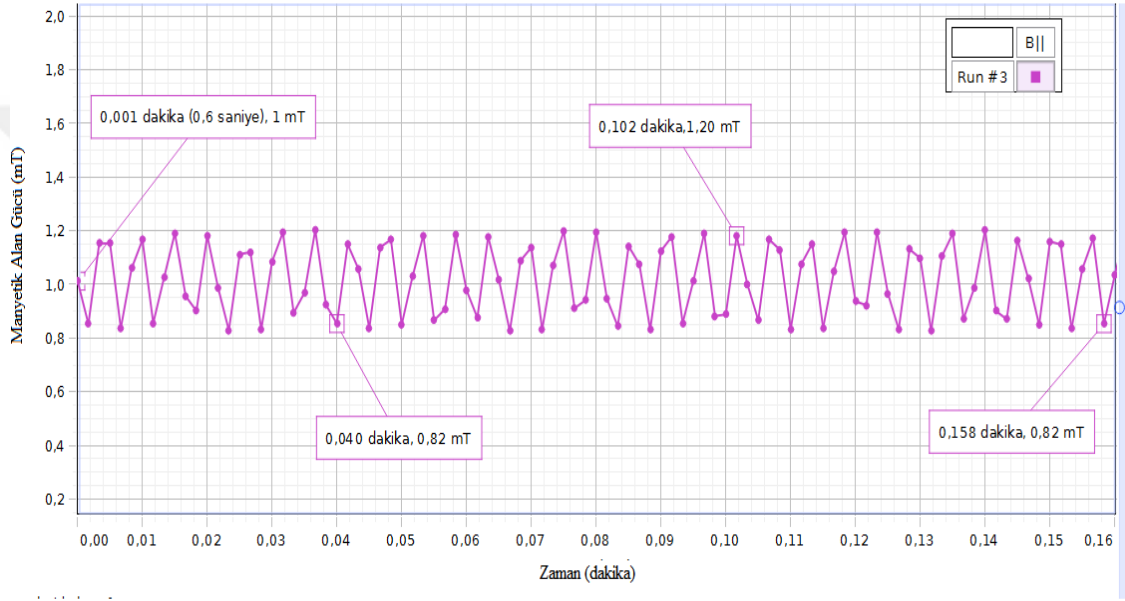
3.9. İstatiksel Analiz

Veriler SPSS v.23 (Chicago, IL) istatistik paket programı yardımıyla değerlendirilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA), çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verilmiştir. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 'deki istatistiksel farkı işaret etmektedir.

4. BULGULAR

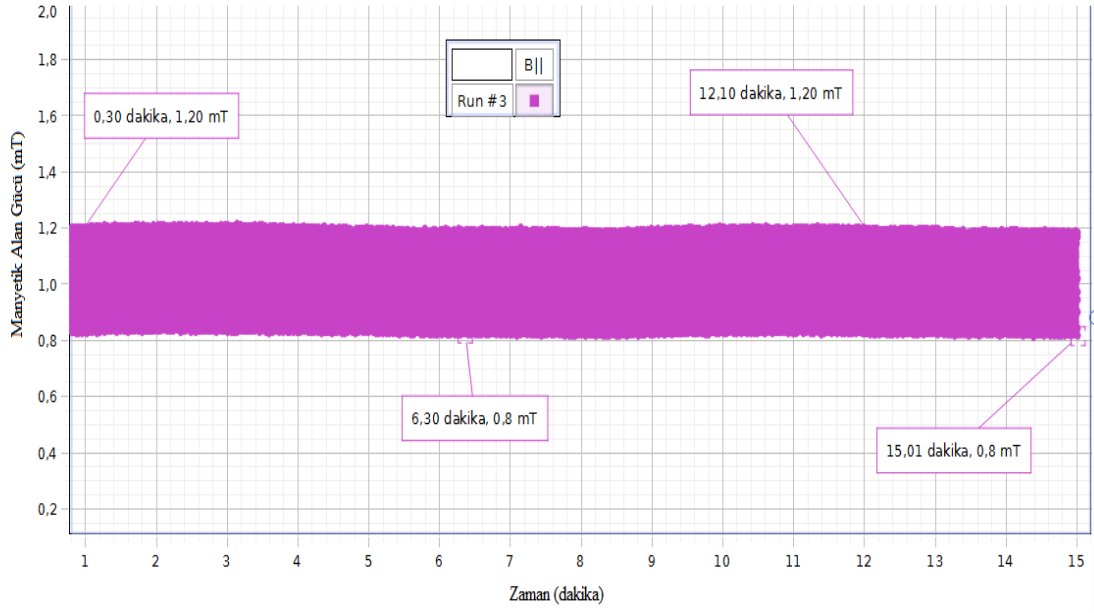
4.1. Pasco 850 Capstone Yazılımı ile Kayıt Edilen Manyetik Alan Dalga Grafiklerinin Analizi

PEMF maruziyeti boyunca bobinler arasındaki manyetik alan değeri iki farklı pencerede şekildeki gibi kayıt edilmiştir (Şekil 4.1.ve Şekil 4.2.). Şekil 4.1’de manyetik alan dalgalarının 0.16 dakikalık kaydı mevcut olup rastgele seçilen 4 farklı zamandaki (0.001 dakika, 0.040 dakika, 0.102 dakika, 0.158 dakika) manyetik alan değerleri sırasıyla 1 mT, 0.82 mT, 1.20 mT ve 0.82 mT olarak ölçülmüştür. 0.16 dakikalık PEMF maruziyeti boyunca manyetik alan değerinin 0.8 mT ile 1.2 mT arasında olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1. Pasco Capstone Yazılım ile elde edilen 0.16 dakikalık 1 ± 0.2 mT’lık manyetik alan sinyallerinin 4 farklı zamandaki (0.001 dakika, 0.040 dakika, 0.102 dakika, 0.158 dakika) değerleri

Şekil 4.2’de manyetik alan dalgalarının 15 dakikalık kaydı mevcut olup rastgele seçilen 4 farklı zamandaki (0.30 dakika, 6.30 dakika, 12.10 dakika ve 15.01 dakika) manyetik alan değerleri sırasıyla 1.20 mT, 0.8 mT, 1.20 mT ve 0.8 mT olarak ölçülmüştür. 15 dakikalık PEMF maruziyeti süresince manyetik alan değerinin 0.8 mT ile 1.2 mT arasında olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. Pasco Capstone Yazılım ile elde edilen 15 dakikalık 1 ± 0.2 mT manyetik alan sinyallerinin 4 farklı zamandaki (0.30 dakika, 6.30 dakika, 12.10 dakika ve 15.01 dakika) değerleri

Helmholtz bobinlerdeki manyetik alan değeri Biot-Savart denklemine göre (Denklem 4.1) hesaplanmıştır.

$$B = \frac{\mu N I r^2}{2(x^2 + r^2)^{3/2}} \quad (4.1)$$

B: Manyetik alan değeri (T), I: bobin akımı (A), r: bobin yarıçapı (m), x: noktanın bobin mesafesi, N: tel halka sayısı ve μ : geçirgenlik sabiti = $1.257 \times 10^{-6} \text{T.m/A}$

Pasco Capstone Yazılım programında seçilen 1.5 amper (A)'lik akım değeri, bobinler arasındaki mesafe 0.035 m, hücrelerin bobin tepesine uzaklığı 0.0201 m, U87-MG glioblastoma hücreleri içeren plakanın bobine uzaklığı 0.0175 m olarak denklemde (Denklem 4.2) yerleştirilmiş ve manyetik alan değeri 0.94 mT olarak hesaplanmıştır.

$$B = \frac{1.257 \times 10^{-6} \left(\frac{\text{T.m}}{\text{A}} \right) * 500 * 1.5 \text{ (A)} * 0.0201 \text{ m}^2}{2 * (0.0175^2 + 0.0201^2 \text{ m}^2)^{3/2}} \quad (4.2)$$

Manyetik alan değeri (B) = 0.0009306 T (Tesla) olarak hesaplanmış olup birim çevirmeleri yapıldığında manyetik alan değeri 0.94 mT (mili Tesla) olarak belirlenmiştir.

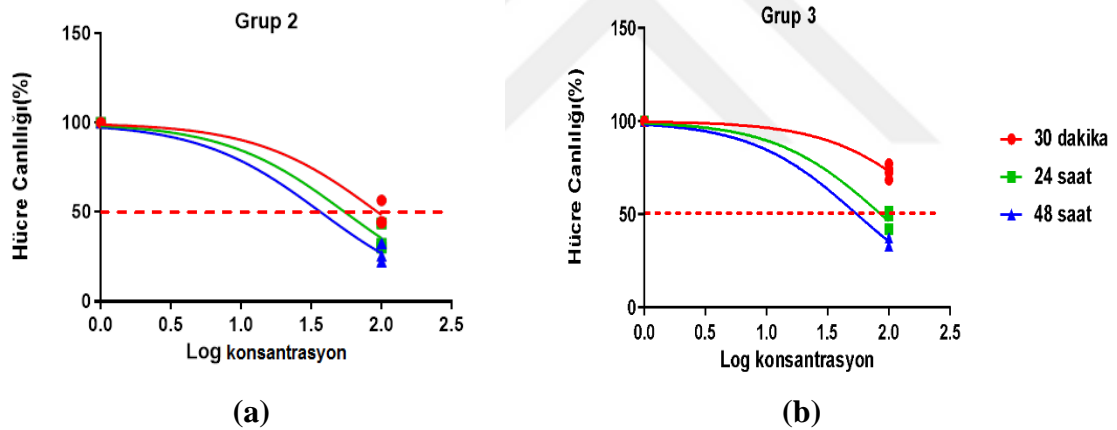
Hesaplanan 0.94 mT manyetik alan değeri, Pasco Capsotone Yazılımının 1 ± 0.2 mT manyetik alan dalga sinyalleri ile eş değerdir. Hesaplamalara (0.94 mT) ve manyetik alan dalga sinyallerine (bakınız Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.) göre manyetik alan değeri 1 ± 0.2 mT'dır. Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde hücrelerin 15 dakika boyunca 1 ± 0.2 mT'ya maruz kaldığı söylenebilir.

4.2. PEMF Maruziyetinin U87-MG Hücre Hattında Oksidan-Antioksidan Molekülleri Üzerine Etkileri

4.2.1. PEMF maruziyetinin U87-MG hücre hattında hücre canlılığı üzerine etkileri

Yüksek sitotoksik etkiye sahip H_2O_2 'nin U87-MG insan glioblastoma hücrelerindeki hücre canlılığına etkilerini belirleyebilmek için Grup 1 (kontrol)'in hücre canlılığı %100 kabul edilip Grup 2 ve Grup 3 hücrelerinin %50'sini öldüren konsantrasyon (IC50) değeri hesaplanmıştır.

Farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat ve 48 saat) 0.1 mM H_2O_2 muamelesi ile oksidatif stresin indüklendiği Grup 2'de hücre canlılığının muamele zamanına bağlı olarak Grup 1'e kıyasla sırasıyla yaklaşık %56, %32 ve %22 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3.a). H_2O_2 'nin en yüksek sitotoksik etkisinin 48 saatlik muamele zamanında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3.a). Farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat ve 48 saat) 0.1 mM H_2O_2 muamelesi ile oksidatif stresin indüklenmesinin ardından 75 Hz- 1 ± 0.2 mT PEMF'ye 15 dk maruz kalan Grup 3'de ise, hücre canlılığının muamele zamanına bağlı olarak Grup 1'e kıyasla sırasıyla yaklaşık % 72, %51 ve %37 olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.b). Benzer olarak Grup 3'de, H_2O_2 'nin en yüksek sitotoksik etkisinin 48 saatlik muamele zamanında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3.b).



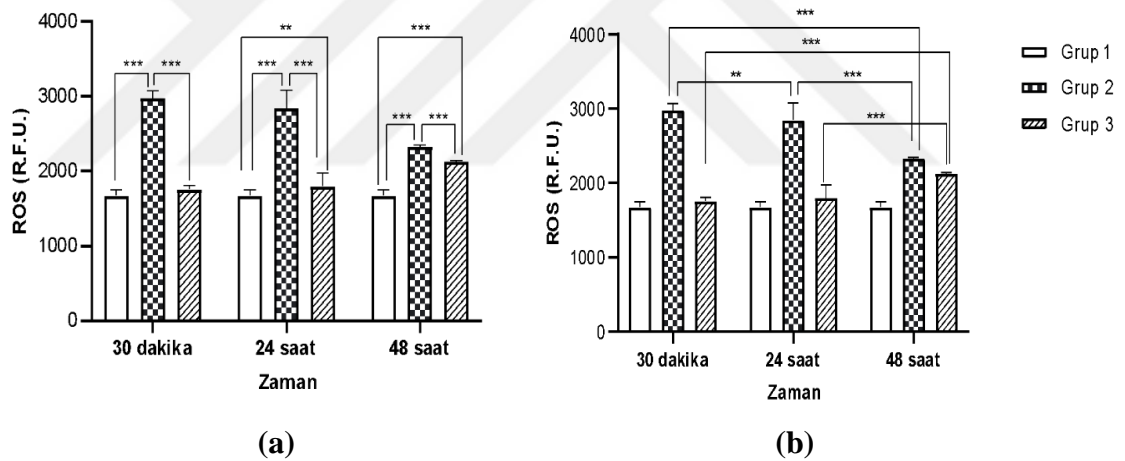
Şekil 4.3. U87-MG hücrelerinde 0.1 mM H_2O_2 muamele zamanına bağlı hücre canlılığı yüzdelерinin (%) sırasıyla **a)** Grup 2; ve **b)** Grup 3'te gösterimi

Elde edilen sonuçlara göre, farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat, 48 saat) 0.1 mM H_2O_2 muamelesinin ardından PEMF'ye maruz bırakılan grupta (Grup 3), PEMF etkisi ile hücre canlılığının farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat, 48 saat) 0.1 mM H_2O_2 ile muamele edilen gruba (Grup 2) göre yüzde olarak daha yüksek olduğu belirlenerek, PEMF'nin oksidatif stresin tetiklediği hücre canlılığındaki düşüşü inhibe edici etkisinin olduğu söylenebilmektedir.

4.2.2. PEMF maruziyetinin U87-MG hücre hattında ROS düzeyine etkileri

Grup 1'in, farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat ve 48 saat) 0.1 mM H₂O₂ muamelesi ile oksidatif stresin indüklendiği Grup 2'nin, ve 0.1 mM H₂O₂ muamelesinin ardından PEMF'ye maruz kalan Grup 3'ün ROS seviyeleri spektrofotometri ile ölçülerek muamele zamanına bağlı olarak hem gruplar arası hem de grup içi karşılaştırması Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre Grup 2'nin farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat ve 48 saat) 0.1 mM H₂O₂ muamelesi sonrasındaki ROS seviyeleri Grup 1 (kontrol) ve Grup 3'ün aynı zaman aralıklarındaki ROS seviyelerine göre ($p \leq 0.001$, sırasıyla) anlamlı derecede daha yüksektir (Şekil 4.4.a). Ayrıca, Grup 2'nin 30 dakikalık ROS seviyesi 24 saat ($p=0.006$) ve 48 saat ($p \leq 0.001$) muamele gruplarına göre, 24 saatlik ROS seviyesi de 48 saatliğe ($p \leq 0.001$) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir (Şekil 4.4.b). Grup 3'ün 24 saat ve 48 saatlik ROS seviyeleri Grup 1 (kontrol)'e ($p=0.009$; $p \leq 0.001$ sırasıyla) göre, 48 saatlik ROS seviyesi de hem 30 dakika ($p \leq 0.001$) hem de 24 saatlik ($p \leq 0.001$) ROS seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir (Şekil 4.4.a).



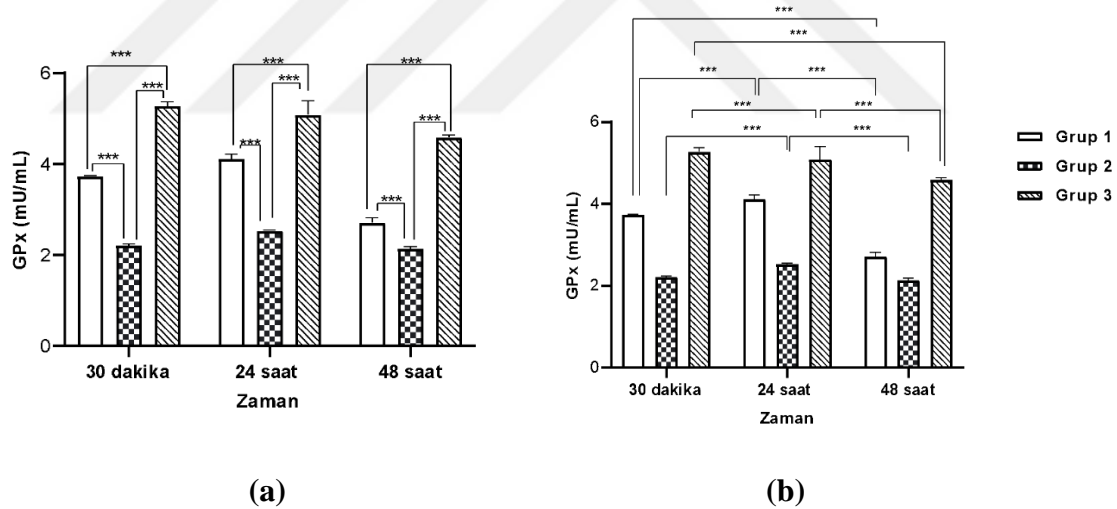
Şekil 4.4. Reaktif Oksijen Tür (ROS) (Relatif Floresan Unit (R.F.U) seviyelerinin (ortalama \pm SD) **a**) gruplar arası, ve **b**) grup içi, 0.1 mM H₂O₂ muamele zamanına göre karşılaştırılması. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 'deki istatistiksel farkı işaret etmektedir. Veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirilmiş, çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılmıştır

Grup 2'de 30 dakika H₂O₂ muamelesinin ROS seviyesine etkisinin 24 ve 48 saatlik muamele zamanlarına göre daha yüksek olması, hücrelerdeki oksidatif stres etkisinin zamana bağlı olarak azalabildiğini göstermektedir. Grup 3'te ise 48 saatlik ROS seviyesinin 30 dakikalık ve 24 saatlik ROS seviyelerine göre daha yüksek olması PEMF'nin oksidatif stres üzerindeki etkisinin H₂O₂ muamele zamanına bağlı olarak değişebildiğini göstermektedir. Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, Grup 3'teki ROS seviyelerinin PEMF etkisinin incelenmediği, sadece farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat, 48 saat) 0.1 mM H₂O₂ ile muamelenin ardından ROS seviyelerinin

değerlendirildiği gruba göre (Grup 2) daha düşük olması PEMF'nin oksidatif stres etkisi ile ortaya çıkan ROS düzeylerine düşürücü etkisinin olabileceğini göstermektedir.

4.2.3. PEMF maruziyetinin U87-MG hücre hattında glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi üzerine etkileri

Grup 1'in, farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat ve 48 saat) 0.1 mM H₂O₂ muamelesi ile oksidatif stresin indüklendiği Grup 2'nin, ve 0.1 mM H₂O₂ muamelesinin ardından PEMF'ye maruz kalan Grup 3'ün GPx aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Grup 1 (kontrol)'in 30 dakika, 24 saat, 48 saatlik GPx aktiviteleri Grup 2'nin aynı muamele zamanları sonrasındaki GPx aktivitelerine göre ($p \leq 0.001$, sırasıyla) anlamlı derecede daha yüksektir (Şekil 4.5.a). Grup 1'in 24 saatlik GPx aktivitesi 30 dakika ($p \leq 0.001$) ve 48 saatliğe ($p \leq 0.001$) göre, 30 dakikalık GPx aktivitesi de 48 saatliğe ($p \leq 0.001$) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir. Grup 2'nin 24 saatlik GPx aktivitesi ise, 30 dakika ($p \leq 0.001$) ve 48 saatliğe ($p \leq 0.001$) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir (Şekil 4.5.b). Grup 3'ün ise, 30 dakika, 24 saat, 48 saatlik GPx aktiviteleri Grup 1 (kontrol) ve Grup 2'nin 30 dakika, 24 saat, 48 saatlik GPx aktivitelerine göre ($p \leq 0.001$, sırasıyla) anlamlı derecede daha yüksektir. (Şekil 4.5.a). Ayrıca, Grup 3'ün 30 dakikalık GPx aktivitesi 24 saat ($p \leq 0.001$) ve 48 saatliğe ($p \leq 0.001$) göre, 24 saatlik GPx aktivitesi de 48 saatliğe ($p \leq 0.001$) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir (Şekil 4.5.b).



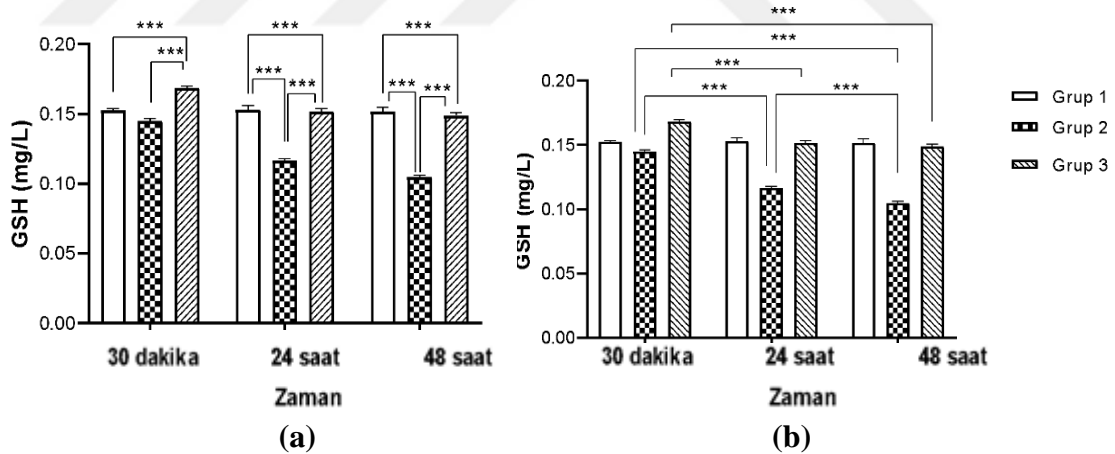
Şekil 4.5. Glutasyon Peroksidaz (GPx) aktivitesinin (ortalama \pm SD) **a)** gruplar arası ve **b)** grup içi, 0.1 mM H₂O₂ muamele zamanına göre karşılaştırılması. *** $p < 0.001$ 'deki istatistiksel istatistiksel farkı işaret etmektedir. Veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirilmiş, çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılmıştır

Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat, 48 saat) 0.1 mM H₂O₂ muamelesi ile oksidatif stresin indüklenmesinin ardından PEMF'ye maruz bırakılan grupta (Grup 3), PEMF etkisi ile GPx aktivitelerinin farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat, 48 saat) 0.1 mM H₂O₂ ile muamele edilen gruba (Grup 2) göre daha yüksek olması, PEMF'nin U87-MG hücrelerinde antioksidan enzim aktivasyonunu arttırarak oksidatif stresin olası yıkıcı etkilerini azaltıcı etkisinin

olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, Grup 3'ün 30 dakikalık H₂O₂ muamelesinin ardından ölçülen GPx aktivitesinin 24 saat ve 48 saatliğe göre daha yüksek olması, PEMF'nin oksidatif stresin indüklenme zamanına bağlı olarak GPx aktivitesinde azaltıcı etkisinin olabileceğini göstermektedir.

4.2.4. PEMF maruziyetinin U87-MG hücre hattında glutatyon (GSH) miktarına etkileri

Grup 1'in, farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat ve 48 saat) 0.1 mM H₂O₂ muamelesi ile oksidatif stresin indüklendiği Grup 2'nin ve 0.1 mM H₂O₂ muamelesinin ardından PEMF'ye maruz kalan Grup 3'ün GSH miktar tayini HPLC tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Grup 3'ün 30 dakika, 24 saat, 48 saatlik GSH miktarı Grup 2'nin aynı muamele zamanları sonrasındaki GSH miktarına göre ($p \leq 0.001$, sırasıyla) anlamlı derecede daha yüksektir (Şekil 4.6.a). Ancak Grup 3'ün 30 dakika, 24 saatlik GSH miktarı Grup 1'in aynı muamele zamanları sonrasındaki GSH miktarına göre ($p \leq 0.001$, sırasıyla) anlamlı derecede daha yüksektir iken, Grup 3'ün 48 saatlik GSH miktarı Grup 1'in aynı muamele zamanları sonrasındaki GSH miktarına göre ($p \leq 0.001$, sırasıyla) anlamlı derecede daha düşüktür (Şekil 4.6.a). Grup 2'nin 48 saatlik GSH miktarı ise, 30 dakika ($p \leq 0.001$) ve 24 saatliğe ($p \leq 0.001$), 24 saatlik GSH miktarı da 30 dakika'ya ($p \leq 0.001$) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşüktür (Şekil 4.6.b). Ayrıca, Grup 3'ün 30 dakikalık GSH miktarı 24 saat ($p \leq 0.001$) ve 48 saatliğe ($p \leq 0.001$) göre, 24 saatlik GSH miktarı da 48 saatliğe ($p \leq 0.001$) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir (Şekil 4.6.b).



Şekil 4.6. Glutatyon (GSH) miktarının (ortalama \pm SD) **a)** gruplar arası, ve **b)** grup içi 0.1 mM H₂O₂ muamele zamanına göre karşılaştırılması. *** $p < 0.001$ 'deki istatistiksel farkı işaret etmektedir. Veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirilmiş, çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılmıştır

Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat, 48 saat) 0.1 mM H₂O₂ muamelesi ile oksidatif stresin indüklenmesinin ardından PEMF'ye maruz bırakılan grupta (Grup 3), PEMF etkisi ile GSH miktarının farklı zaman aralıklarında (30 dakika, 24 saat, 48 saat) 0.1 mM H₂O₂ ile muamele edilen gruba (Grup 2) göre daha yüksek olması, PEMF'nin U87-MG hücrelerinde antioksidan molekül

miktarını arttırarak oksidatif stresin olası yıkıcı etkilerini azaltıcı etkisinin olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, Grup 3'n 30 dakikalık H₂O₂ muamelesinin ardından llen GSH miktarının 24 saat ve 48 saate göre daha yüksek olması, PEMF'nin oksidatif stresin indüklenme zamanına bağlı olarak GSH miktarında düşürücü etkisinin olabileceğini göstermektedir.



5. TARTIŞMA

Elektronik cihazlardan ve tıbbi ekipmanlardan yayılan farklı frekans aralığındaki elektromanyetik alanların (EMA), insan sağlığını olumsuz yönde etkilediği, kan, beyin, akciğer gibi bazı kanser türlerinin, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığını arttırdığı bilinmektedir (Kim vd. 2019; Hao vd. 2018; Teimori vd. 2016). Özellikle, yüksek frekanslı EMA'lar, insan vücudunun sahip olduğu hücre içi iyon dengesi gibi homeostatik dengeleri bozarak hücre içinde hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesinin artmasına neden olmaktadır (Kıvrak vd. 2017; Wang ve Zhan 2017). Hücrelerde düşük seviyelerdeki ROS ikinci haberciler olarak davranabilir ve gen ekspresyonu, hücre proliferasyonu, apoptozis (programlanmış hücre ölümü) ve diğer hücre içi yollara yanıt olarak sinyal yollarını aktive edebilir, öte yandan yüksek seviyelerdeki ROS membran fosfolipitlerine saldırabilir, mitokondriyal fonksiyonu bozabilir ve normal hücresel süreçleri proteinler, lipitler, DNA, RNA gibi temel hücresel bileşenlere hasar vererek bozabilir (Wang ve Zhang, 2017). Bu nedenle hücre içi ROS seviyesinin dengesi önemli olup, bu dengenin korunmasında glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan savunma sistemi elemanları rol almaktadır (Ighodaro ve Akinloye 2017; Kim vd. 2015). Beynimizde nöronların mekanik desteğini sağlayan, sinyallerini modüle eden ve besin metabolizmasını aktifleştiren nöroglia (glia veya glial hücreler) hücrelerinin yüksek seviyelerde SOD, CAT, GPx, GSH, glutatyon disülfid (GSSG), glutatyon S-transferaz (GST) gibi antioksidan savunma sistemi elemanlarına sahip olduğu ve oksidatif stres altında nöronlara göre daha iyi proteksiyon sağladığı bilinmektedir (Carlson, 2019; Khanna ve Nehru, 2007). Nöronal gelişimin ve serebral metabolizmanın düzenlenmesinde rol oynayan glial hücre tipi olan astrositler, nöronları oksidatif strese ve sitotoksositeye karşı korumaktadır (Hayakawa vd. 2016). Ayrıca, nöronların antioksidan kapasitesinin sınırlı olduğu (Khanna ve Nehru, 2007; Copley, 2018), oksidatif stresle mücadele sırasında astrositlerin sitoplazmasında SOD, CAT, GPx, glutatyon redüktaz (GR)'ın aktivitesinin arttığı (Li ve Stary 2016), glial hücrelerinin oksidatif stres ve inme gibi farklı sebeplerin tetiklediği nöronal ölümleri azaltarak nöroproteksiyonu sağladığı bilinmektedir (Xu vd. 2020; Utarra vd. 2009).

Son yıllarda, yumuşak dokularda yara iyileşmesi, cilt ülseri, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde düşük frekanslı darbeleri elektromanyetik alan (PEMF) kullanımı dikkat çekici olup farklı süre (60 dk/gün; 10 dk/gün; 30 dk/gün gibi) ve frekanslardaki (100 Hz-10 mT; 75 Hz-1 mT, 75 Hz-1.5 mT, 16 Hz-282 μ T gibi) PEMF maruziyetinin kemik, karaciğer, böbrek gibi çeşitli dokularda hücre canlılığını, süperoksit anyonu (O_2^-)'nin eliminasyonunu sağlayan SOD ve H_2O_2 'nin eliminasyonunu sağlayan GPx ve/veya CAT gibi antioksidan savunma mekanizmasındaki enzimlerin aktivitesini/seviyesini etkilediği *in vivo* (Gözen vd. 2017; Tasbih-Forosh 2017) ve *in vitro* (Ehnert vd. 2017; Vincenzi vd. 2017; Falone vd. 2016; Osera vd. 2015) çalışmalarca raporlanmıştır. Fakat, beyin hücrelerini önce belirli bir doz ve sürede H_2O_2 ile muamele ederek oksidatif stresi indükleyip, daha sonra sabit süre ve frekansta uygulanan PEMF maruziyeti ile antioksidan savunma sistemi mekanizmasında rol alan enzimler arasındaki hücresel etkilerin araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır (Wang ve Zhang; Falone vd. 2016; Osera vd. 2015). Bu nedenle çalışmada, farklı sürelerde (30 dakika, 24 saat, 48 saat) yüksek doz H_2O_2 muamelesi ile oksidatif stresin indüklendiği U87-MG insan glioblastoma hücre hattında 75 Hz-1 \pm 0.2 mT

PEMF'ye 15 dakika maruziyetin hücre canlılığına, ROS seviyesine, antioksidan enzimlerden GPx ve GSH'in aktivitesi ve/veya miktarına hücrenel ve biyokimyasal etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Farklı konsantrasyondaki H₂O₂ ile muamele edilen beyin hücresi dahil çoğu memeli hücre hattında, H₂O₂ muamelesinin DNA, protein, lipid gibi biyomoleküllerin yapılarını bozduğu, apoptozisi tetiklediği ve hücre içi ROS seviyesini artırarak oksidan-antioksidan dengesinin bozulmasına neden olduğu bilinmektedir (Wang ve Zhang, 2017; Gülден vd. 2010). 0.001 mM'ın üzerindeki H₂O₂ konsantrasyonunun hücre büyümesini durdurduğu, apoptozise, oksidatif strese neden olduğu, çok düşük seviyeli (3-15 µM) H₂O₂ konsantrasyonunun hücre büyümesini stimule ettiği, ara konsantrasyonun (250-400 µM) hücre büyümesini durdurduğu, yüksek konsantrasyonun (100 µM-1 mM arası ve üstü) ise nekrotik hücre ölümlerine neden olduğu raporlanmıştır (Gülден vd. 2010; Oyama vd. 1996). Örneğin, 0.4 mM H₂O₂ ile 4 saat muamele edilen HepG-2 karaciğer hücresinde ve 0.5 mM H₂O₂ ile 8 saat muamele edilen Raw 264.7 kemik hücresinde ROS seviyesinin arttığı, indüklenen oksidatif stres nedeniyle SOD, CAT ve GPx gibi antioksidanların aktivitesinin azaldığı raporlanmıştır (Zhang vd. 2020; Lin vd. 2019). Beyin hücrelerinde yüksek konsantrasyondaki H₂O₂ muamelesinin ROS seviyesini arttırdığı (Daverey ve Agrawal 2018), antioksidan enzim aktivitesini azalttığı (Konyalioglu vd. 2013) ve oksidatif strese neden olduğu (Oyama vd. 1996) raporlanmıştır. Örneğin, sıçanların serebral ve kortikal nöron hücrelerinde, embriyonik nöral kök hücrelerinde yapılan çalışmalar, 100 µM'dan 1mM'a kadar olan H₂O₂ konsantrasyonuna 60 dk maruziyetin oksidatif stres seviyesini arttırdığı (Oyama vd. 1996), 100 µM H₂O₂ konsantrasyonuna 30 dk maruziyetin hücre içi ATP düzeyini azalttığı, kortikal nöron hücrelerinin SOD yoğunluğunda artışa neden olduğu (Tsai vd. 2018), hücrelerin %45'inin ise 100 µM H₂O₂ konsantrasyonunda öldüğü (Konyalioglu vd. 2013) bildirilmiştir. Yukarıda özetlenen çalışmalarda yüksek doz olarak belirtilen 100 µM ve üzeri H₂O₂ konsantrasyonu ile muamelenin ROS seviyesini arttırdığı ve hücre canlılığını yüksek oranda azalttığı raporlandığından çalışmada U87-MG insan glioblastoma hücrelerinde oksidatif stres etkisini net olarak gözlemleyebilmek için yüksek doz (0.1 mM) H₂O₂ ile hücre muamelesi tercih edilmiştir.

Ağır metaller, geçiş metalleri, endüstriyel çözücüler, pestisitler gibi kimyasallar, anti-kanser ilaçları, sigara dumanı ve mitokondride oksijen seviyesinin azalmasıyla oluşan hipoksi hücre içi serbest radikal seviyesini ve oksidatif stresi arttırmaktadır (Zhang vd. 2019; Fong, 2018; Phaniendra vd.2015; Uttarra vd. 2009). Mitokondride oksijen seviyesinin azalmasıyla oluşan hipoksinin, hipoksiyle indüklenen faktör-1-alfa (HIF1-α) geninin aktivasyonunu attırdığı, artan HIF1-α gen aktivasyonunun süperoksid dismutaz 2 (SOD2) ekspresyonunu baskıladığı, ROS üretimini düzenlediği (Thomas ve Ashroft 2019), mikrogliya, astrositler ve nöronlarda tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α), interlökin-6 (IL-6) gibi apoptotik etkiye sahip proteinlerin artan seviyesiyle hücre içi ROS üretiminin artarak oksidatif stresin tetiklendiği (Cobley, 2018; Vincenzi vd. 2017; Tanabe vd. 2010) bilinmektedir. 24 ve 48 saat süre ile oksijen seviyesinin %2 olduğu hipoksi koşulunda inkübe edilen SH-SY5Y insan nöroblastoma ve N9 insan mikrogliya hücrelerinde eş zamanlı olarak uygulanan 75 Hz-1.5 mT PEMF maruziyetinin SH-SY5Y hücrelerinde HIF 1-α geninin aktivasyonunu ve N9 hücrelerinde TNF-α ve IL-6 protein seviyesini azaltarak apoptotik ölümleri azalttığı raporlanmıştır (Vincenzi vd. 2017). Çalışmada, Vincenzi vd. (2017) çalışmasının sonuçları ile uyumlu olarak farklı sürelerde

(30 dakika, 24 saat, 48 saat) 0.1 mM H₂O₂ muamelesiyle oksidatif stresin indüklenmesinin ardından 75 Hz-1±0.2 mT PEMF'ye 15 dakika maruz bırakılan U87-MG insan glioblastoma hücrelerinde (Grup 3), PEMF maruziyetinin muhtemel sitoprotektif etkisi ile hücre canlılığında artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. PEMF maruziyetinin olmadığı Grup 2 ve PEMF maruziyetinin olduğu Grup 3'de 30 dakikalık hücre canlılığı 24 ve 48 saatlikten, 24 saatlik hücre canlılığı da 48 saatlikten daha yüksektir. Bu durum, PEMF'nin olası sitoprotektif etkisinin H₂O₂ muamele süresine bağlı olarak değişebileceğini düşündürse de kesin değildir. Çünkü, bizim sonucumuza uyumlu olarak PEMF maruziyetinin olmadığı sadece H₂O₂ ile muamele edilen glial hücreleri ve embriyonik nöral kök hücrelerinde hücre canlılığının H₂O₂ muamele süresine bağlı olarak azaldığını raporlayan çalışmalar mevcuttur (Kang vd. 2014; Konyagiloglu vd. 2013). Örneğin, Kang vd. (2014) çalışmasında U87-MG glioblastoma hücreleri 12 ve 24 saat sürelerde 0.1 mM H₂O₂ ile muamele edilmiş ve 12 saatlik muamele sonundaki hücre canlılığının 24 saatlikten fazla olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde, Konyagiloglu vd. (2013) çalışmasında 0.1 mM H₂O₂ ile farklı sürelerde (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 dk) muamele edilen embriyonik nöral kök hücrelerinde hücre canlılığının muamele süresine bağlı olarak azaldığı raporlanmıştır. Bu sonuçlar, Grup 3 hücrelerinde gözlemlenen zamanla azalan hücre canlılığının H₂O₂ muamele süresine bağlı olabileceğini, PEMF'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin tüm H₂O₂ muamele sürelerine bağlı olarak Grup 3'te Grup 2'ye göre daha yüksek olması da PEMF'nin oksidatif stresten kaynaklı hücre ölümlerini azaltıcı olası sitoprotektif etkisinin olabileceğini göstermektedir.

PEMF'nin, oksidatif stresin indüklemesinin ardından kemik ve beyin gibi farklı tip hücrelerde ROS seviyesini azalttığını, antioksidan enzim aktivitesini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Pi vd. (2019) çalışmasında yüksek doz (1 mM) H₂O₂ muamelesinin ardından 75 Hz-1 mT PEMF'ye maruz bırakılan RAW 264.7 kemik hücrelerinde, H₂O₂ ile muamele edilmeyen ve PEMF'ye maruz bırakılmayan hücrelere göre ROS seviyesinin düşük, SOD ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir. Benzer olarak, Vincenzi vd. (2017) çalışmasında 75 Hz-1.5 mT PEMF'ye maruz bırakılan hipoksinin indüklendiği SH-SY5Y insan nöroblastoma ve N9 insan mikrogliya hücrelerinde ROS seviyesinin PEMF'ye maruz bırakılmayan hücrelere göre daha az olduğu raporlanmıştır. Bu sonuçlara benzer şekilde, çalışmada PEMF'ye maruz bırakılan Grup 3'ün ROS seviyesi Grup 2'ye göre daha düşüktür. Ayrıca, Grup 3'de hücre canlılığı, antioksidan elemanlardan GPx aktivitesi, ve GSH miktarı Grup 2'ye göre daha yüksektir. Sonuçlar, PEMF'nin glioblastoma hücrelerinde olası sitoprotektif etkisi ile farklı sürelerde H₂O₂ muamelesi ile indüklenen oksidatif stresin tetiklediği sitotoksik etkileri hücre canlılığını, GPx aktivitesini, GSH miktarını arttırarak, ROS seviyesini ise azaltarak önleyebileceğini göstermektedir. Çalışma sonuçları, çok düşük frekansa sahip elektromanyetik alana (ELF-EMA) maruziyetin nöron hücrelerinde hücre sağkalım oranını ve antioksidan enzim ekspresyonunu arttırdığını gösteren çalışmalarca da uyumludur. Örneğin, Falone vd. (2007) SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerini 50 Hz-1mT ELF-EMA'ya 96 saat maruz bırakarak hücre canlılığının arttığını, GPx ve glutatyon S-transferazın (GST) ise pozitif olarak modüle olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde, beş gün, günde 7 dk olacak şekilde tekrarlı olarak uygulanan 16 Hz ELF-PEMF maruziyetinin hOBs osteoblast hücrelerinde GPx, SOD2, CAT'ın mRNA, protein seviyelerine ve enzim aktivitesine arttırıcı, ROS seviyesini ise azaltıcı etkisinin olduğunu gösteren çalışma da mevcuttur. (Ehnert vd. 2017). Söz konusu çalışmada PEMF maruziyetinin ROS düzeyindeki azaltıcı etkisi, %0.001 H₂O₂ ile muamele edilen pozitif

kontrol hOBs osteoblast hücreleri ile karşılaştırılarak gösterilmiştir. Yine benzer şekilde, 75 Hz-2 mT PEMF'ye kısa ve tekrarlı (15 dk, 3 tekrarlı 5 gün ya da haftada 4 kez 10 dk) ön-maruziyetin ardından farklı sürelerde (10 dk, 30 dk) yüksek doz (1 mM) H₂O₂ ile muamele edilen ilaca duyarlı SH-SY5Y ve ilaca dirençli SK-N-BE(2) insan nöroblastoma hücrelerinde hücre canlılığı, Mn-bağımlı superoksit dismutaz (MnSOD) aktivitesi, ROS seviyesi, apoptotik belirteçlerden p53 geninin aktivitesi, protein kinaz C (PKC) sinyal yolağı ve onun downstream hedeflerinden insan antijeni R (HuR) proteininin ekspresyonları araştırılmış ve ROS seviyesinin PEMF'ye ön-maruziyet sonrası H₂O₂ ile muamele edilen grupta PEMF ön-maruziyetinin olmadığı sadece H₂O₂ ile muamele edilen gruba göre düşük, MnSOD aktivitesinin ise yüksek olduğu raporlanmıştır (Falone vd. 2016; Osera vd. 2015). Bu çalışmalardan farklı olarak çalışmada PEMF'nin oksidatif stres üzerine olası sitoprotektif etkisini inceleyebilmek için glioblastoma hücreleri önce yüksek doz H₂O₂ ile muamele edilerek oksidatif stres indüklenmesi sağlanmış, ardından PEMF maruziyeti uygulanmıştır.

Çalışmada PEMF maruziyetinin olduğu Grup 3'ün farklı zaman aralıklarındaki ROS seviyesine bakıldığında H₂O₂ muamele süresine bağlı olarak ROS seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir (bakınız Şekil 4.4.b). Bu sonuç, 75 Hz-2 mT PEMF'ye ön maruziyetin ardından 10 ve 30 dk 1 mM H₂O₂ ile muamele edilen SK-N-BE(2) ve SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde 30 dakikalık ROS seviyesinin 10 dakikalıktan düşük olduğunu gösteren Falone vd. (2016) ve Osera vd. (2015) çalışmaları ile örtüşmemektedir. Fakat, yukarıda da bahsedildiği gibi Falone vd. (2016) ve Osera vd. (2015) çalışmalarından farklı olarak çalışmada yüksek doz H₂O₂ muamelesinin ardından PEMF uygulanarak PEMF'nin U87-MG insan glioblastoma hücrelerinde indüklenen oksidatif stres üzerine olası nöroprotektif etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, Falone vd. (2016) ve Osera vd. (2015) çalışmalarında H₂O₂ muamele süresi olarak 10 ve 30 dk gibi kısa süreler tercih edilerek kısa süreli hücresel etkiler incelenmiş ancak çalışmada 24 ve 48 saat gibi uzun sürelerde yüksek doz H₂O₂ muamelesi ile hücrelerde daha fazla oksidatif stres indüklenmesi hedeflenmiş ve bu durum 48 saat muamele süresi sonrasında ölçülen ROS seviyesinin diğer muamele sürelerine göre daha yüksek olmasına neden olmuş olabilir. Benzer olarak Grup 3'ün farklı zaman aralıklarındaki GPx aktivitesi incelendiğinde H₂O₂ muamele süresine bağlı olarak GPx aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir (bakınız Şekil 4.5.b). Çalışma sonucuna uyumlu olarak, 75 Hz-2 mT PEMF'ye ön-maruziyetin ardından 10 dakika H₂O₂ muamelesi sonrasında ölçülen antioksidan enzimlerden MnSOD aktivitesinin 30 dakikalık muameleden daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Osera vd. 2015). Osera vd. (2015) çalışmasında, PEMF ön maruziyetinin ardından ilaca duyarlı SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri oksidatif strese maruz bırakılmış olsa da çalışma sonuçlarına uyumlu olarak H₂O₂ muamele süresine bağlı olarak oksidatif stres etkisinin daha fazla görülmesi beklenen nöronal hücrelerde muamele süresine bağlı ROS seviyesindeki artışa paralel olarak gözlemlenen azalmış antioksidan aktivitesi beklenen bir sonuçtur. Bu durum PEMF'nin antioksidan enzim aktivitesinde azaltıcı etkisi olduğu anlamına gelmemekte tam tersi çalışmamıza bütün olarak baktığımızda diğer çalışmalardan farklı olarak oksidatif stresin indüklenmesinin ardından uygulanan PEMF ile antioksidan enzim aktivitesinde artış, ROS seviyesinde ise azalış gözlemlenmiştir.

Çalışmada ayrıca gruplardaki GSH miktarı da tayin edilmiştir. Endojen bir antioksidan ve önemli bir hücresel savunma ajanı olan GSH, antioksidan enzimlerin substratı olarak görev alarak radikal süpürücü olarak davranmakta olup hücresel seviyesi

radikal hasarı belirlemek için kullanılan bir belirteçtir (Kıvrak vd. 2017). Oksidatif stres sürecinde GSH seviyeleri düşerken glutasyon disülfid artar, H₂O₂ birikimi redüktaz ve GPx etkileri ile süpürülür (Kıvrak vd. 2017). GPx aktivitesinde azalma H₂O₂ birikimine ve dolayısıyla hücrel hasara neden olur (Kıvrak vd. 2017). Çalışmada, Grup 3'ün GSH miktarının Grup 2'ye göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçları toplu olarak değerlendirdiğimizde PEMF maruziyeti ile artan GPx aktivasyonu ile beraber hücre içi GSH miktarının da arttığını söyleyebiliriz. Bu beklenen bir sonuçtur, çünkü GSH, GPx aktivitesi için de oldukça önemli olup GPx'in kofaktörü olarak rol oynayarak H₂O₂'nin nötralizasyonunda GPx ile beraber çalışmaktadır (Wang ve Zhang 2017; Kıvrak vd. 2017). Farklı sürelerde 0.1 mM H₂O₂ muamelesinin ardından uygulanan PEMF, GPx aktivitesi ve GSH miktarını arttırmakta bu da PEMF'nin glutasyon redoks döngüsünde etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde, PEMF maruziyetinin nöronal hücrelerde GSH miktarına etkilerini inceleyen çalışmalara denk gelinmemiş fakat farklı frekanstaki EMA'lara maruziyetin beyin hücrelerinde antioksidan enzim aktivitesine/miktarına etkilerini inceleyen çalışmalar değerlendirilmiştir (Meral vd. 2007; Reale vd. 2014; Berköz 2018; Peker vd. 2019; Sharma vd. 2021). Örneğin, Meral vd. (2007) çalışmasında 30 gün, günde 12 saat 890-915 MHz RF-EMA'ya maruz kalan Guinea pigs kobaylarının beyin dokusunda GSH miktarının ve CAT aktivitesinin azaldığı raporlanmıştır. Benzer şekilde, 24 saat boyunca eş zamanlı olarak 0.1 mM H₂O₂ muamele edilen ve 50 Hz ELF-EMA'ya maruz kalan insan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde CAT aktivitesinin azaldığı Reale vd. (2014) çalışmasında gösterilmiştir. Yine benzer olarak, 8 hafta boyunca günde 2 kez 1800 MHz RF-EMA'ya maruz bırakılan sıçanların karaciğer, böbrek ve beyin dokularındaki malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve indirgenmiş GSH seviyeleri ile SOD ve CAT aktiviteleri Berköz vd. (2018) çalışmasında incelenmiş, RF-EMA'ya maruziyetin sıçanların karaciğer, böbrek ve beyin dokularında oksidatif stresi tetikleyerek GSH düzeyini, SOD, ve CAT aktivitelerini düşürücü etkisinin olduğu bildirilmiştir. Sıçanların beyin ve karaciğer dokularındaki bazı antioksidanların (GR, GPx, GST, SOD, CAT, GSH) seviyelerinin değerlendirildiği Sharma vd. (2021) çalışmasında ise, 1 ay boyunca 1 saat/gün, 5 gün/hafta olacak şekilde 0.434 (W/Kg), 0.433 (W/Kg) ve 0.453 (W/Kg) spesifik absorpsiyon oranı (SAR) değerine sahip 900, 1800 ve 2100 MHz RF-EMA'ya maruz bırakılan sıçanların beyin ve karaciğer dokularında GSH miktarının önemli ölçüde azaldığı özellikle 2100 MHz RF-EMA'ya maruz kalan sıçanların beyin ve karaciğer dokularında GSH miktarının diğer gruplara göre daha az olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 900, 1800 ve 2100 MHz RF-EMA'ya maruz kalan sıçanların tüm maruziyet gruplarında beyin dokularındaki GSH miktarının karaciğer dokusuna göre düşük olduğu raporlanmış olup bu çalışmanın sonucu da beyin oksidatif strese karşı daha duyarlı olduğunu bir kez daha göstermiş olmuştur.

Yukarıda özetlenen beyin dokularında RF-EMA maruziyetinin uygulanan frekansa, doza, süreye bağlı olarak antioksidan enzim seviyelerinde/miktarında azaltıcı etkisinin olduğunu gösteren çalışmaların aksine PEMF gibi düşük frekanslı elektromanyetik alan olan ELF-EMA'ya maruziyetin antioksidan enzim seviyelerinde/miktarında artışı tetiklediğini gösteren çalışmalarda vardır. Örneğin, Di Loreto vd. (2009) çalışmasında Sprague-Dawley (SD) cinsi sıçanların embriyolarının kortikal nöron hücreleri 7 gün boyunca 50 Hz frekansta 0.1-1.0 mT manyetik alandaki ELF-EMA'ya maruz bırakılmış ve ELF-EMA maruziyetin nöron hücrelerinin hücre canlılığını arttırdığı, sıçan nöronal primer kültürlerinde apoptotik ölüm seviyelerini azalttığı, 1 mT ELF-EMA maruziyetin nöron hücrelerinde GSH seviyesini arttırıcı

etkisinin olduğu raporlanmıştır. Benzer şekilde, yeni doğan sıçanları (doğumdan 10 gün sonra) 30 gün boyunca günde 24 saat sürekli olarak 50 Hz-0.5 mT ELF-EMA'ya maruz bırakmanın sıçanların beyin hücrelerinde oksidatif stres parametrelerinden MDA ve SOD seviyesini yükseltici etkisinin olduğu, GSH seviyesinin ise değişmediği gösterilmiştir (Rageh vd. 2012). Peker vd. (2019) çalışmasında ise Guinea domuzları 7 gün boyunca sürekli (günde 4 saat) ve kesikli (2 saat açık/2 saat kapalı/2 saat açık) olacak şekilde 1.5 Hz-50 mT ELF-EMA'ya maruz bırakılmış ve beyin dokularında kesikli ELF-EMA maruziyetinin sürekli maruziyet gruplarına kıyasla GSH seviyesini artırıcı etkisi olabileceği bildirilmiştir. Darbeli elektromanyetik alanlar (PEMF) bir tür periyodik alternatif akım (AC) manyetik alandır ve sıradan statik ve AC manyetik alanların aksine darbeli manyetik alanlar kesikli ve periyodiktir (Jiang 2018; Shupack vd. 1992). Çalışmada gözlemlenen PEMF maruziyeti sonrası beyin hücresinde artan GSH miktarı, ELF-EMA maruziyetinin beyin hücrelerinde/dokularında antioksidan enzim seviyelerinde artırıcı etkisinin olduğunu gösteren çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur. Buna ilaveten, çalışmada U87-MG insan glioblastoma hücre hattı darbe süresinin 1.3 ms (görev döngüsü 1/10) olduğu 75 Hz frekansında, 1 ± 0.2 mT yoğunluğunda PEMF'ye 15 dakika maruziyet bırakılarak aslında hücreler kesikli ve periyodik olarak uyarılmıştır. Bu nedenle çalışmada uygulanan PEMF maruziyeti Peker vd. (2019) çalışmasındaki kesikli olarak uygulanan ELF-EMA maruziyeti ile benzerlik göstermekte olup her iki maruziyette de hücrelerin sürekli değil kesikli ve periyodik olarak uyarılması hücrel antioksidan cevapları daha fazla tetiklemiş olabilir. Çalışmada olduğu gibi PEMF gibi pulse yani darbeli yayılan düşük frekanslı EMA'ların hücreleri kesikli ve periyodik olarak uyararak oksidatif stresin olası sitotoksik etkilerini hücre içi antioksidan enzim aktivitesini/miktarını artırarak azaltabileceği düşünülebilir. Çalışmada, Grup 3'ün farklı zaman aralıklarındaki GSH miktarına bakıldığında GSH miktarının H_2O_2 muamele süresine bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir (bakınız Şekil 4.6.b). Bu sonuç, elektromanyetik alan etkisinin incelenmediği beyin hücresi dışındaki hücrelerde H_2O_2 muamele süresine bağlı olarak GSH seviyesinin/miktarının azaldığını gösteren çalışmalarca uyumludur (Park vd. 2013; Park 2014; Coimbra-Costa vd. 2017; Liu vd. 2019). Örneğin, pulmoner fibroblast (HPFs) akciğer hücrelerinde 25, 60, 120, 180 dk farklı sürelerde 0.1 mM H_2O_2 ile muamele süresine bağlı olarak GSH miktarını azalttığı gösterilmiştir (Park vd. 2013). Benzer olarak Park (2014) çalışmasında rahim ağzı kanser hücresi (Hela) 1 ve 24 saat boyunca 0.1 mM H_2O_2 ile muamele edilerek hücre içi tükenen GSH miktarı incelenmiş ve 24 saat 0.1 mM H_2O_2 muamele sonrası GSH miktarının diğer gruplara kıyasla daha fazla azaldığı bildirilmiştir. Yine, hücre içi redoks durumunu modüle eden ve tiyol içeren antioksidan olan N-asetilsistein (NAC)'nin embriyonik sıçan kalp hücresinden köken alan H9c2 hücrelerindeki etkisini inceleyen Liu vd. (2019) çalışmasında pozitif kontrol olarak hücreler 15 ve 30 dk sürelerde 0.01 mM H_2O_2 ile muamele edilmiş ve 30 dk muamele sonundaki GSH seviyesinin 15 dk'ya göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. Coimbra-Costa vd. (2017) çalışmasında ise yetişkin albino SD cinsi sıçanlar hipoksi ortamda (% 21 O_2) 24 ve 48 saat sürelerde tutulmuş, kontrol grubuna kıyasla 24 ve 48 saatlik hipoksi koşulunun GSH miktarını azalttığı, en düşük GSH miktarının ise 48 saatte olduğu belirlenmiştir. Literatürde, H_2O_2 muamele süresine bağlı olarak beyin hücrelerinde GSH miktarındaki değişimlerin PEMF maruziyetiyle birlikte değerlendirildiği çalışmalar yoktur. Fakat, çalışmada gözlemlenen H_2O_2 muamele süresindeki artışa paralel olarak GSH miktarındaki azalış yukarıda özetlenen elektromanyetik alan etkisinin değerlendirilmediği beyin hücresi dışındaki hücrelerde (akciğer hücresi, rahim ağzı kanser hücresi, kalp hücresi) uzun süreli H_2O_2

muamelesinde ve hipoksi koşulunda muamele süresinin artmasıyla beraber oksidatif stresin daha fazla tetiklenerek GSH gibi antioksidan savunma mekanizmasında rol alan enzimlerin aktivitesinde/seviyesinde/miktarında azalışa neden olabileğini düşündüren çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur. Çalışmaya toplu olarak bakıldığında, H₂O₂ muamele süresine bağlı olarak oksidatif stresin daha fazla indüklenmesi beklenen glioblastoma hücrelerinde muamele süresine bağlı olarak gözlemlenen azalan GPx aktivitesi ile beraber GSH miktarının da azalması beklenen bir sonuçtur. Bu durum PEMF'nin antioksidan enzim aktivitesinde/miktarında azaltıcı etkisi olduğu anlamına gelmemekte tam tersi yüksek doz H₂O₂ muamelesi ile oksidatif stresin indüklenmesinin ardından uygulanan PEMF ile hücre canlılığında artış, GPx aktivitesinde artış, GSH miktarında artış, ROS seviyesinde ise azalış gözlemlenmiştir.



6. SONUÇLAR

Günümüzde çeşitli hastalıkların tanı, tedavi ve araştırılması amacıyla elektromanyetik alana sahip çeşitli cihazların kullanım sıklığının arttığı bilinmektedir. Ancak yüksek frekanslı (300 Hz-10 MHz) elektromanyetik alanların insan vücudunun sahip olduğu oksidan-antioksidan dengesini bozarak süperoksid anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit gibi ROS'ların artmasına, dolayısıyla oksidatif strese neden olmaktadır (Wang ve Zhang 2017). Merkezi sinir sisteminin temel organı ve vücudumuzun oksijen tüketiminin %20'sinin gerçekleştiği yer olan beynimiz diğer organlara göre daha düşük antioksidan kapasitesine sahip olması nedeniyle oksidatif strese karşı daha duyarlıdır. Çalışmalar düşük frekans ve yoğunluğa sahip darbeli elektromanyetik alanın (PEMF) hücre zarının geçirgenliğini artırdığını, yumuşak dokularda yara iyileşmesini sağladığını ve cilt ülseri, nörodejeneratif ve oküler hastalıkların semptomlarının tedavisinde dikkat çekici rolü olduğunu ayrıca EMA maruziyetinin neden olduğu hücrelerdeki enerji mekanizmalarındaki dengesizlikleri ortadan kaldırdığını göstermiştir (Tamam vd., 2016; Wang ve Zhang, 2017). Mevcut çalışma literatürden farklı olarak 30 dk, 24 saat, 48 saat süreyle yüksek doz (0.1 mM) H₂O₂ ile muamele edilerek oksidatif stresin indüklendiği U-87 MG insan glioblastoma hücresinde 75 Hz, 1±0.2 mT PEMF maruziyetinin hücre canlılığına, ROS seviyesine, antioksidan savunma sistemindeki önemli moleküllerden GPx ve GSH'ın aktivitesine ve/veya miktarına etkisini araştırmıştır.

Çalışma sonuçları toplu olarak değerlendirildiğinde, oksidatif stresin indüklenmesinin ardından 75 Hz, 1±0.2 mT PEMF'ye maruz kalan U-87 MG insan glioblastoma hücrelerinde hücre canlılığının arttığı, ROS seviyesinin azaldığı, GPx aktivitesinin ve GSH miktarının arttığı belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bilimsel veriler, PEMF uygulamasının oksidatif strese duyarlı olan insan beyin hücrelerinde olası nöroprotektif etkisiyle oksidatif stresin nörotoksik etkilerini azaltabileceğini göstermiştir. Özellikle, yara onarım sürecini kolaylaştıran, yumuşak doku hasarını iyileştiren, ödemi, ameliyat sonrası ağrıyı, migreni tedavi edici etkilerinin olduğu bilinen PEMF uygulamasının, ayrıca merkezi sinir sistemi hücrelerinin canlılığı için önemli olduğu bilinen, nöronlara mekanik destek sağlayan, kan beyin bariyerinin bütünlüğünün korunmasına, nörotransmitter miktarının kontrol edilmesinde, besin metabolizmasının aktifleştirilmesinde ve böylece nöronların sağlıklı kalmasına yardımcı olan astrosit hücrelerinde oksidatif stresin yıkıcı hasarlarına karşı koruyucu etkisinin olabileceği de gösterilmiş olmuştur. Bunlara ilaveten, oksidatif stresin tetiklediği Alzheimer, Parkinson, Demans gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde PEMF uygulaması tedavi süresini kısaltmaya, alternatif tedavi yolları bulmaya ve biyomedikal uygulama alanlarının genişletilmesine olanak sağlayabilir. Bu anlamda da çalışma literatüre katkı sağlamaktadır. Çalışma, non-invazif, güvenli ve kolay bir yöntem olan PEMF maruziyetinin beyin hücrelerinde oksidatif stres üzerindeki etkilerini araştırarak sadece beyin hücresi değil farklı doku ve hücrelerde de PEMF maruziyetinin etkilerinin incelenmesinin önünü açmaktadır.

Bu bilgiler ışığında, PEMF'lerin oksidatif stresin indüklediği nörodejeneratif süreçlere ek olarak antioksidan savunma mekanizmalarına ve bu mekanizmaların tetiklediği redoks bazlı nöronal yollara olası nörotoksik veya nöroprotektif etkilerinin araştırılabilmesi için daha fazla *in vivo* ve/veya *in vitro* çalışmalara ihtiyaç vardır. Farklı

hücreler, dokular veya hayvan modelleri üzerindeki farklı doz, frekans, yoğunluk, genlik, maruziyet süreleri gibi PEMF parametrelerinin değerlendirileceği çalışmalar PEMF'nin fizyolojik etkileri hakkında daha kesin bilimsel veriler elde edilmesini sağlayacaktır. Bu nedenle, mevcut çalışmanın PEMF maruziyeti ile aktive edilen moleküler, biyokimyasal ve hücresel süreçlere odaklanan daha ileriki çalışmalara ışık tutacağına inanıyoruz.



7. KAYNAKLAR

- Ahmadi-Zeidabadi, M., Akbarnejad, Z., Esmaceli, M. 2019. Impact of extremely low-frequency electromagnetic field 100 Hz, 100 G exposure on human glioblastoma U87 cells during Temozolomide administration. *Electromagn Biol Med*, 2019; 38: 3, 198-209. doi: 10.1080/15368378.2019.1625784.
- Ahmed, I., Istivan, T., Cosic, I. ve Pirogova, E. 2013. Evaluation of the effects of Extremely Low Frequency (ELF) Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF) on survival of the bacterium *Staphylococcus aureus*. *EPJ Nonlinear Biomedical Physics*, 1(5): 1-17
- Arendash, G. W., Sanchez-Ramos, J., Mori, T., Mamcarz, M., Lin, X., Runfeldt, M., Wang, L., Zhang, G., Savad, V. ve Tan, J. 2010. Electromagnetic Field Treatment Protects Against and Reverses Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19: 191-210.
- Babusikova, E., Evinova, A., Hatok, J., Dobrota, D. ve Jurecekova, J. 2013. Oxidative Changes and Possible Effects of Polymorphism of Antioxidant Enzymes in Neurodegenerative Disease. In: Kishore, U. (Ed.), *sNeurodegenerative Diseases*, InTech, 421-456.
- Berköz, M., Arslan, B., Yıldırım, M., Aras, N., Serap Yalın, S., Çömelekoğlu, Ü. 2018. 1800 MHz radio-frequency electromagnetic radiation induces oxidative stress in rat liver, kidney and brain tissue. *Eastern Journal of Medicine*, 23(2): 71-78. DOI:10.5505/ejm.2018.20982
- Bhandage, A. K. 2016. Glutamate and GABA signalling components in the human brain and in immune cells. Doktora Tezi, Uppsala Üniversitesi, Uppsala, İsveç, 82s
- Blanco-Suárez, E., Alison L. M., Caldwell, A. L. M. ve Allen, N. J. 2017. Role of astrocyte-synapse interactions in CNS disorders. *J Physiol*, 15;595 (6):1903-1916.
- Brandao, M., Simon, T., Critchley, G. ve Giamas, G. 2018. Astrocytes, the rising stars of the glioblastoma microenvironment. *Glia*, 67(5):779-790.
- Caire, M. J., Reddy, V., Varacallo, M. 2020. Physiology, Synapse, *StatPearls*.
- Capelli, E., Torrisi, F., Venturini, L., Granato, M., Fassina, L., Lupo, G. F. D. ve Ricevuti, G. 2017. Low-Frequency Pulsed Electromagnetic Field Is Able to Modulate miRNAs in an Experimental Cell Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Healthcare Engineering*, (5-6):1-10.
- Carlson, B. M. 2019. The Human Body Bağlantı Yapısı ve İşlevi, Bölüm 2 - Dokular Sayfa 27-63, Academic Press.

- Chen, Y., Qin, C., Huang, J., Tang X., Liu, C., Huang K., Xu, J., Guo, G., Tong, A. ve Zhou, L. 2020. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Prolif.*, 53(3): 1-13.
- Chiaradia, I. ve Lancaster, M. A. 2020. Brain organoids for the study of human neurobiology at the interface of in vitro and in vivo. *Nat Neurosci*, 23(12):1496-1508.
- Cerrato, J. A., Yung, W. K. ve Liu, T. J. 2001. Introduction of mutant p53 into a wild-type p53-expressing glioma cell line confers sensitivity to Ad-p53-induced apoptosis. *Neuro Oncol.* 3(2): 113–122.doi: 10.1093/neuonc/3.2.113.
- Cobley, J. N., Fiorello, M. L., Baile, D. M. 2018. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology*, 15, 490-503.
- Coimbra-Costa, D., Alva, N., Duran, M., Carbonell, T., Rama, R. 2017. Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain. *Redox Biol.*, 12:216–225.
- Daish, C., Blanchard, R., Fox, K., Pivonka, P. ve Pirogova, E. 2018. The Application of Pulsed Electromagnetic Fields (PEMFs) for Bone Fracture Repair: Past and Perspective Findings. *Annals of Biomedical Engineering*, 46(4): 525-542.
- Daverey, A. ve Agrawal, S. K. 2018. Pre and post treatment with curcumin and resveratrol protects astrocytes after oxidative stress. *Brain Res*, 1692:45-55. doi: 10.1016/j.brainres.2018.05.001.
- Di Loreto, S., Falone, S., Caracciolo, V., Sebastiani, P., D'Alessandro, A., Mirabilio, A., Zimmiti, V., Amicarelli, F. 2009. Fifty hertz extremely low-frequency magnetic field exposure elicits redox and trophic response in rat-cortical neurons. *J Cell Physiol*, 219(2):334–343.
- Dukhande, V. V., Kawikova, I., Bothwell, A. L. M. 2013. Neuroprotection against neuroblastoma cell death induced by depletion of mitochondrial glutathione. *Apoptosis*, 18:6, 702-712. doi: 10.1007/s10495-013-0836-4.
- Ehnert, S., Fentz, A. K., Schreiner, A., Birk, J., Wilbrand, B., Ziegler, P., Reumann, M. K., Wang, H., Falldorf, K. ve Nussler, A. K. 2017. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields cause antioxidative defense mechanisms in human osteoblasts via induction of O₂⁻ and H₂O₂. *Scientific Reports*, 7(1):14544.
- Falone, S., Grossi, M. R., Cinque, B., D'Angelo, B., Tettamanti, E., Cimini, A., Di Ilio, C., Amicarelli, F. 2007. Fifty Hertz Extremely Low-Frequency Electromagnetic Field Causes Changes in Redox and Differentiative Status in Neuroblastoma Cells, *Int J Biochem Cell Biol*, 39(11):2093-2106. doi: 10.1016/j.biocel.2007.06.001

- Falone, S., Marchesi, N., Osera, C., Fassina, L., Comincini, S., Amadio, M. ve Pascale, A. 2016. Pulsed electromagnetic field (PEMF) prevents pro-oxidant effects of H₂O₂ in SK-N-BE (2) human neuroblastoma cells. *International Journal of Radiation Biology*, 92 (5): 281-286.
- Fano, R., Adler, R. B. ve Chu, L. J. 1963. Electromagnetic Field, Energy and Foces. Massachusetts Teknoloji Enstitüsü, Elektrik elektronik Mühendisliği
- Fong, C. W. 2016. Platinum based radiochemotherapies: Free radical mechanisms and radiotherapy sensitizers. *Free Radic Biol Med*, 99-109. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.006.
- Freudenrich, T. M. J. ve Shafer, T. J. 2020. In book: An Introduction to Interdisciplinary Toxicology, Chapter: Mammalian cell culture model (pp.463-475). DOI:10.1016/B978-0-12-813602-7.00033-8
- Gandhi, S. ve Abramov, A. Y. 2012. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (3)428010: 1-11.
- Ganesan, K., Gengadharan, A. C., Balachandran, C., Manohar, B. M. ve Puvanakrishnan, R. 2009. Low frequency pulsed electromagnetic field-A viable alternative therapy for arthritis. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47: 939-948.
- Gessi, S., Merighi, S., Bencivenni, S., Battistello, E., Vincenzi, F., Setti, S., Cadossi, M., Borea, P. A., Cadossi, R. ve Varani, K. 2019. Pulsed electromagnetic field and relief of hypoxia-induced neuronal cell death: The signaling pathway. *J Cell Physiol*, 234: 15089-15097.
- Gözen, H., Demirel, C., Akan, M., Tarakçioğlu, M. 2017. Effects of pulsed electromagnetic fields on lipid peroxidation and antioxidant levels in blood and liver of diabetic rats, *European Journal of Therapeutics*, 23,152-158.
- Glasgow, S. D., McPhedrain, R., Madranges, J. F., Kennedy, T. E. ve Ruthazer, E. S. 2019. Approaches and limitations in the investigation of synaptic transmission and plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 11(20).
- Gülden, M., Jess, M. A., Kammann, J., Maser, E., Seibert, H. 2010. Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic Biol Med.*, 49(8):1298-305. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.015
- Güleç-Peker, E. G., Balabanlı, K. B., Tomruk, A., Canseven-Kurşun, A. G., Coşkun-Cevher, Ş. 2019. Evaluation of The Effects of ELF-EMF on Oxidative Parameters in Brain, Liver and Heart Tissues. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 9(2), 264-274, DOI: 10.31466/kfbd.59498
- Gümüşay, M., Gülbağça, F., Saygılı, S., Aydemir, I., Kaya, A. ve Tuğlu, M. İ. 2016. Darbeli Elektromanyetik Alan ve Darbeli Radyofrekans Uygulamalarının Sıçanlarda Yara İyileşme Etkilerinin Karşılaştırması, 27-29 Ekim, Medical

- Technologies National Congress (TIPTEKNO 16), Antalya.
- Gürdal, O. 2017. Elektromanyetik Alan Teorisi. Bursa Osmangazi Üniversitesi Yayınlar
- Hao, Y. H., Zhao, Li. ve Peng, R. Y. 2018. Effects of Electromagnetic Radiation on Autophagy and its Regulation. *Biomed Environ Sci*, 31(1): 57-65.
- Harris, I. S. ve DeNicola, G. M. 2020. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends in Cell Biology*, 30(6): 440-451.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., Fujita, M. Ve Fotopoulos, V. 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants*, 9(8): 681.
- Hayakawa, K, Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., Ji, X., Eng H. Lo, E. H. 2016. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*, 28:535(7613): 551–555.
- Houck, M. M., Crispino, F. ve McAdam, T. 2018. What Is Light and How Do We See an Object?. In: Paguio, J. C. (Ed.), *The Science of Crime Scenes*. Elsevier, 150-164.
- Hosseinabadi, M., Borhannuddin Bhuyan, M. H. M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Al Mahmud, J., Fujita, M. ve Fotopoulos, V. 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants*, 9 (681):1-52
- Hosseinabadi, M. B., Khanjani, N., Ebrahimi, M. H., Haji, B. ve Abdolahfard, M. 2018. The effect of chronic exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields on sleep quality, stress, depression and anxiety. *Electromagn Biol Med*, 38(1): 96-101.
- Höytö, A., Luukkonen, J., Juutilainen, J. and Naarala, J. 2008. Proliferation, Oxidative Stress and Cell Death in Cells Exposed to 872 MHz Radiofrequency Radiation and Oxidants. *Radiat. Res.* 170, 235–243. doi.org/10.1667/RR1322.1
- Hug, K. ve Rössli, M. 2012. Therapeutic Effects of Whole-Body Devices Applying Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF): A Systematic Literature Review. *Bioelectromagnetics*, 33: 95-105.
- Ighodaro, O. M. ve Akinloye, O. A. 2017. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4): 287-293.
- International Commission on Non-ionizing Radiation Protection. 1998. Guidelines for Limiting exposure to Time-Varying Electric, Magnetic and Electromagnetic Fields (UP TO 300 GHZ) *Health Physics*, 74 (4):494-522.

- International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. 2014. For Limiting Exposure to Electric Fields Induced By ovement of The Human Body in A Static Magnetic Field and by Time-Varying Magnetic Fields Below 1 Hz. *Health Physics* 106(3):418-425.
- International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. 2020. For Limiting Exposure to Electromagnetic Fields (100 Khz to 300 Ghz). *Health Phys* 118(5): 483–524.
- İkinci, A., Mercantepe, T., Unal, D., Erol, H. S., Sahin, A., Aslan, A., Baş, O., Erdem, H., Sönmez, O. F., Kaya, H., Odacı, E. 2016. Morphological and antioxidant impairments in the spinal cord of male offspring rats following exposure to a continuous 900MHz electromagnetic field during early and mid-adolescence. *J Chem Neuroanat*, 75:99-104.
- Jiang, Y. 2018. A Unipolar Pulse Electromagnetic Field Apparatus for Magnetic Therapy: design, simulation and development. Doktora Sonrası Tezi, Electrical and Computer Engineering School of Electrical Engineering and Computer Science Faculty of Engineering University of, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 117s.
- Kang, K. A., Lee, H. C., Lee, J. J., Hong, M. N., Park, M. J. Lee, Y. S., Choi, H. D., Kim, N., Ko, Y. G., Lee, J. S. 2014. Effects of combined radiofrequency radiation exposure on levels of reactive oxygen species in neuronal cells, *J Radiat Res*, 55(2):265-76. doi: 10.1093/jrr/rrt116.
- Karakurt, S. ve Adali, O. 2016, Tannic Acid Inhibits Proliferation, Migration, Invasion of Prostate Cancer and Modulates Drug Metabolizing and Antioxidant Enzymes, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16 (6), 781-789
- Kasap, Y. 2010. Glutasyon (GSH) Düzeyinin Plasentada Araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Ankara Üniversitesi.
- Kazemi, E., Mortazavi, S. M. J., Ali-Ghanbari, A., Sharifzadeh, S., Ranjbaran, R., Mostafavi-Pour, Z., Zal, F., Haghani, M. 2015. Effect of 900 MHz electromagnetic radiation on the induction of ROS in human peripheral n human peripheral blood mononuclear cells. *J. Biomed. Phys. Eng.* 5:105–114
- Kesari, K. K., Juutilainen, J., Luukkonen, J., Naarala, J. 2016. Induction of micronuclei and superoxide production in neuroblastoma and glioma cell lines exposed to weak 50 Hz magnetic fields. *J. R. Soc. Interface* 13: 20150995. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2015.0995>
- Keston, A. ve Brandt, R. 1965. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Chemistry, Medicine.* Corpus ID: 42317112 doi:10.1016/0003-2697(65)90034-5
- Khanna, P., ve Nehru, B. 2007. Antioxidant enzymatic system in neuronal and glial cells

- enriched fractions of rat brain after aluminum exposure. *Cell. Mol., Neurobiol.* 27, 959–969.
- Kıvrak, E. F., Yurt, K. K., Kaplan, A. A., Alkan, I. ve Altun, G. 2017. Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 5(4): 167-176.
- Kim, J. H., Quilantang, N. G., Kim, H. Y., Lee, S. ve Cho, E. J. 2019. Attenuation of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells by three flavonoids from *Acer okamotoanum*. *Chemical Papers*, 73: 1135–1144.
- Kim, J. V., Yu, D. H., Huh, Y. H., Lee, E. H., Kim, H. G. ve Kim, H. R. 2016. Long-term exposure to 835 MHz RF-EMF induces hyperactivity, autophagy and demyelination in the cortical neurons of mice. *Scientific Reports*, 7, 41129.
- Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., Yoon, S. 2015. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol*, 24(4):325-40. doi: 10.5607/en.2015.24.4.325
- Kohli, H., Srivastava, S., Oza, M., Chouhan, S., Verma, S., Bansal, A., Kumar, B. ve Sharma, S. K. 2020. Design and Study of Novel Tunable ELF-PEMF System for Therapeutic Applications. *IETE Journal of Research*.
- Konyalioglu, S., Armagan, G., Yalcin, A., Atalayin, Ç. ve Dagci, T. 2013. Effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in embryonic neural stem cells. *Neural Regen Res*, 8(6): 485–495.
- Krath, A., Klüter, T., Stukenberg, M., Zielhardt, P., Gollwitzer, H., Harrasser, N., Hausdorf, J., Ringeisen, M. ve Gerdesmeyer, L. 2017. Electromagnetic transduction therapy in non-specific low back pain: A prospective randomised controlled trial. *Journal of Orthopedic*, 14(3):410-415.
- Lai, H. Ve Singh, N. P. 1997. Acute exposure to a 60Hz magnetic field increases DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics*, 18: 156–165.
- Li, L. ve Sary, C. M. 2016. Targeting Glial Mitochondrial Function for Protection from Cerebral Ischemia: Relevance, Mechanisms, and the Role of MicroRNAs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. ID 6032306, 11.
- Liu, X., Wang, L., Cai, J., Liu, K., Liu, M., Wang, H., Zhang, H. 2019. N-acetylcysteine alleviates H₂O₂-induced damage via regulating the redox status of intracellular antioxidants in H9c2 cells. *Int. J. Mol. Med.*, 43; 199–208.
- Li, Y., Zhang, Y., Wang, W., Zhang, Y., Yu, Y., Cheing, G. L. Y. ve Pan, W. 2019. Effects of pulsed electromagnetic fields on learning and memory abilities of STZ-induced dementia rats. *Electromagn Biol Med.*, 38(2): 123-130
- Liu, K., Zhang, G., Wang, Z., Liu, Y., Dong, J., Dong, X., Liu, J., Cao, J., Ao, L., Zhang,

- S. 2014. The protective effect of autophagy on mouse spermatocyte derived cells exposure to 1800MHz radiofrequency electromagnetic radiation. *Toxicol Lett*, 228: 216-22.
- Lin, X., Bai, D., Wei, Z., Zhang, Y., Huang, Y., Deng, H., Huang, X. 2019. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. *PLoS One*, 14(5):e0216711. doi: 10.1371/journal.pone.0216711.
- Lovinger, D. M. 2008. Communication networks in the brain: neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol. *Alcohol Res Health.*, 31(3):196-214.
- Luukkonen, J., Liimatainen, A., Juutilainen, J., Naarala, J. 2014. Induction of genomic instability, oxidative processes, and mitochondrial activity by 50Hz magnetic fields in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Mutat Res*, 760:33-41.
- Marcus, D. L., Thomas, C., Rodriguez, C., Simberkoff, K., Tsai, J. S., Strafaci, J. A., Freedman, M. L. 1998. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 150:40 – 44.
- Markov, M., Ryaby, J. ve Waldorff, E. I. 2020. Pulsed Electromagnetic Fields for Clinical Applications. Taylor & Francis Group. New York. 237s.
- Markov, M. 2015. XXIst century magnetotherapy. *Electromagn Biol Med*, 34(3): 190-196.
- Markov, M. S. 2007. Pulsed electromagnetic field therapy history, state of the art and future. *Environmentalist*, 27, 465-475.
- Martiny, K., Lunde, M. ve Bech, P. 2010. Transcranial Low Voltage Pulsed Electromagnetic Fields in Patients with Treatment-Resistant Depression. *Biol Psychiatry*, 68, 163–169.
- Mattsson, M. O. ve Simkó, M. 2019. Emerging medical applications based on non-ionizing electromagnetic fields from 0 Hz to 10 THz. *Medical Devices: Evidence and Research*, 12, 347-368.
- Mayer-Wagner, S., Passberger, A., Sievers, B., Aigner, J., Summer, B., Schiergens, T. S., Jansson, V. ve Müller, P. E. 2011. Effects of Low Frequency Electromagnetic Fields on the Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Bioelectromagnetics*, 32, 283-290.
- Maxwell, J. C. 1954. Treatise on Electricity and Magnetism. Vol.1
- McCormick, D. A. 2014. Membrane Potential and Action Potential. In: Byrne, J. H., Heidelberger, R. Ve Waxham, M. N., From Molecules to Networks (Third Edition): An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience, 351-376.

- Megha, K., Deshmukh, P. S., Banerjee, B. D., Tripathi, A. K., Ahmed, R. ve Abegaonkar, P. 2015. Low intensity microwave radiation induced oxidative stress, inflammatory response and DNA damage in rat brain. *NeuroToxicology*, 51:158-165.
- Meral, I., Mert, H., Mert, N., Deger, Y., Yoruk, I., Yetkin, A., Keskin, S. 2007. Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs. *Brain Res*,1169:120-4.
- Newton, P., Harrison, P., Clulow, S. 2008. A novel method for determination of the affinity of protein: protein interactions in homogeneous assays *J Biomol Screen*,13(7):674-82. doi: 10.1177/1087057108321086.
- Niederhäusern, N. V., Ducray, A., Zielinski, J., Murbach, M. ve Mevissen, M. 2019. Effects of radiofrequency electromagnetic field exposure on neuronal differentiation and mitochondrial function in SH-SY5Y cells. *Toxicology in Vitro*, 61:104609.
- Oschman, J. L. 2016. *Energy Medicine: The Scientific Basis*. Elsevier, New Hampshire, 345 s
- Osera, C., Amadio, M., Falone, S., Fassina, L., Magenes, G., Amicarelli, F., Ricevuti, G., Govoni, S. ve Pascale, A. 2015. Pre-exposure of neuroblastoma cell line to pulsed electromagnetic field prevents H₂O₂-induced ROS production by increasing MnSOD activity, *Bioelectromagnetics*, 36(3):219-232.
- Oyama, Y., Okazaki, E., Chikahisa, L., Nagano, T. ve Sadakata, C. 1996. Oxidative Stress-Induced Increase in Intracellular Ca²⁺ and Ca²⁺-Induced Increase in Oxidative Stress: An Experimental Model Using Dissociated Rat Brain Neurons, *Jpn. J.Pharmacol*, 72:381-385.
- Padurariu, M., Ciobica, A., Hritcu, L., Stoica, B., Bild, W., Stefanescu, C. 2010. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 18;469(1):6-10. doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.03
- Paglia, D. E., Valentine, W. N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70:1,158-169, 1967. PMID:6066618
- Pall, M. L. 2013. Electromagnetic fields act via activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects. *Cell. Mol. Med.* 1-9.
- Park, J. E., Seo, Y. K., Yoon, H. H., Kim, C. W., Park, J. K. ve Jeon, S. 2013. Electromagnetic fields induce neural differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells via ROS mediated EGFR activation. *Neurochem Int*,62(4): 418-424.

- Park, W. H. 2013. H₂O₂ inhibits the growth of human pulmonary fibroblast cells by inducing cell death, GSH depletion and G1 phase arrest. *Molecular Medicine Reports* 7: 1235-1240.
- Park, W. H. 2016. Exogenous H₂O₂ induces growth inhibition and cell death of human pulmonary artery smooth muscle cells via glutathione depletion. *Molecular Medicine Reports* 14: 936-942.
- Pawluk, W. ve Layne, C. 2017. Power Tools for Health: How pulsed magnetic fields (PEMFs) help you. FriesenPress, Victoria, 291 ss.
- Pearce, R. K., Owen, A., Daniel, S., P Jenner, P. ve Marsden, C. D. 1997. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 104(6-7):661-677.
- Pérez-Torres I., Guarner-Lans, V. ve Rubio-Ruiz, M. E. 2017. Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents. *Int J Mol Sci.*, 18(10):1-26.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases *Ind J Clin Biochem*, 30(1), 11–26 doi 10.1007/s12291-014-0446-0
- Pluta, R., Barcikowska, M., Januszewski, S., Misicka, A., Lipkowski, A.W. 1996. Evidence of blood-brain barrier permeability/leakage for circulating human Alzheimer's beta-amyloid-(1-42)-peptide. *Neuroreport* 7, 1261-1265.
- Poljak, D. ve Cvetkovic, M. 2019. On Exposure of Humans to Electromagnetic Fields—General Considerations. In: Garcia, A.C. (Ed.), *Human Interaction with Electromagnetic Fields: Computational Models in Dosimetry*. Elsevier, Slipt, ss. 1-20.
- Pi, Y., Liang, H., Yu, Q., Yin, Y., Xu, H., Lei, Y., Han, Z., Tian, J. 2019. Low-frequency pulsed electromagnetic field inhibits RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 cells by scavenging reactive oxygen species. *Mol Med Rep*, 19(5):4129-4136. doi: 10.3892/mmr.2019.10079.
- Qiu, X., Li, X. ve Chen, Y. 2020. Pulsed electromagnetic field (PEMF): A potential adjuvant treatment for infected nonunion. *Medical Hypotheses*, 136, 109506.
- Rahman, T., Hosen, I., Islam, M. M. T. ve Shekhar, H. U. 2012. Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3:997-1019.
- Rageh, M. M., El-Gebaly, R. H., El-Bialy, N. S. 2012. Assessment of genotoxic and cytotoxic hazards in brain and bone marrow cells of newborn rats exposed to extremely low-frequency magnetic field *J Biomed Biotechnol* 2012: 716023, doi:10.1155/2012/716023 .

- Reale, M., Kamal, M. A., Patruno, A., et al. 2014. Neuronal Cellular Responses to Extremely Low Frequency Electromagnetic Field Exposure: Implications Regarding Oxidative Stress and Neurodegeneration. *Plos One*. 15:9(8):e104973. doi: 10.1371/journal.pone.0104973.
- Ronzio, O. 2020. Magnetic and Pulsed magnetic (PEMF) Therapies. In: Watson, T. ve Nussbaum, E. (Ed.), *Electro Physical Agents E-Book: Evidence-Based Practice*. Elsevier, ss. 219-224.
- Salazar-Ramiro, A., Ramírez-Ortega, D., de la Cruz, V. P., Hernández-Pedro, N. Y., González-Esquivel, D. F., Sotelo, J., ve Pineda, B. 2016. Role of Redox Status in Development of Glioblastoma. *Front Immunol.* 7:156. doi: 10.3389/fimmu.2016.00156
- Sánchez-Rodríguez, M. A. ve Mendoza-Núñez, V. M. 2019. Oxidative Stress Indexes for Diagnosis of Health or Disease in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 4128152.
- Sefidbakht, Y., Moosavi-Movahedi, A. A., Hosseinkhani, S., Khodaghali, F., Torkzadeh-Mahani, M., Foolad, F. Ve Faraji-Dana, R. 2014. Effects of 940 MHz EMF on Bioluminescence and Oxidative Response of Stable Luciferase Producing HEK Cells. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 7:1-33.
- Serafini, M. ve Del Rio, D. 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool?. *Redox report: communications in free radical research*, 9(3):145-52.
- Sherrard, R. M., Morellini, N., Jourdan, N., El-Esawi, M., Arthaut, L. D., Niessner, C., Rouyer, F., Klarsfeld, A., Doulazmi, M., Witczak, J. 2018. Low-intensity electromagnetic fields induce human cryptochrome to modulate intracellular reactive oxygen species. *PLoS Biol.*, 16(10):1-17.
- Staebler, P. 2017. *Human Exposure to Electromagnetic Fields: From Extremely Low Frequency (ELF) to Radiofrequency*. ISTE ve John Wiley, Sons, Inc., Londra ve Hoboken, 385.
- Stefi, A. L., Margaritis, L. H., Aikaterini S Skouroliakou, A. S ve Vassilacopoulou, D. 2019. Mobile phone electromagnetic radiation affects Amyloid Precursor Protein and α -synuclein metabolism in SH-SY5Y cells. *Pathophysiology*, 26(3-4): 203-212.
- Strauch, B., Herman, C., Dabb, R., Ignarro, L. J. ve Pilla, A. A. 2009. Evidence-Based Use of Pulsed Electromagnetic Field Therapy in Clinical Plastic Surgery. *Surgery Journal*, 29(2):135-143.
- Tamam, C., Evrensel, M., Tamam, Y. 2016. Elektromanyetik Alanların İnsan Sağlığı Üzerinde Etkileri, *Bilimsel Tamamlayıcı tıp, Regülasyon ve Nöralterapi Dergisi*, 10(3), 19-24.

- Tanabe, K., Matsushima-Nishiwaki, R., Yamaguchi, S, Iida, H., Dohi, S., Kozawa, O. 2010. Mechanisms of tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *Journal of Neuroinflammation*, 7:16.
- Tasbih-Forosh, M. Zarei, L., Saboory, E., Bahrami-Bukani, M. 2017. Effects of Pulsed Electromagnetic Field with Predatory Stress on Functional and Histological Index of Injured-Sciatic Nerve in Rat. *Bull Emerg Trauma*, 5(2):96-103.
- Thomas, L. W. ve Margaret Ashcroft, M. 2019. Exploring the molecular interface between hypoxia-inducible factor signalling and mitochondria, *Cell Mol Life Sci*, 1759-1777. doi: 10.1007/s00018-019-03039-y.
- Tekeli, H. 2012. Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Karaciğer Hasarında Glutatyon (GSH) ve Glutatyon S-Transferaz (GST) Aktivitesi Üzerine N-Asetil Sisteinin Etkisi. Yüksek Lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 87 s.
- Teimori, F., Khaki, A. A., Rajabzadeh, A. ve Roshangar, L. 2016. The effects of 30 mT electromagnetic fields on hippocampus cells of rats. *Surgical Neurology International*, 7(70).
- Tsai, Y. R., Chang, C. F., Lai, J. H., Wu, J. C. C., Che, Y. H. C., Kang, S. J., Hoffer, B. J., Tweedie, D., Luo, W., Greig, N. H., Chiang, Y. H., Chen, K. Y. 2018. Pomalidomide Ameliorates H₂O₂-Induced Oxidative Stress Injury and Cell Death in Rat Primary Cortical Neuronal Cultures by Inducing Anti-Oxidative and Anti-Apoptosis Effects, *Int J Mol Sci*, 19(10), 3252. doi:10.3390/ijms19103252
- Upadhyay, S., Vaish, S. ve Dhiman, M. 2019. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress and its impact on innate immune responses in lung carcinoma A549 cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 450(1-2):135-147.
- Urnukhsaikhan, E., Cho, H., Mishig-Ochir, T., Seo, Y. K. ve Park, J. K. 2016. Pulsed electromagnetic fields promote survival and neuronal differentiation of human BM-MSCs. *Life Sciences*, 151, 130-138.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. ve Mahajan, R.T. 2009. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, 7:65-74.
- Uzbay, İ. T. 2004. Psikofarm akolojinin Temelleri ve Deneysel Araştırma Teknikleri. Çizgi Tıp Yayınevi, Ankara.
- Vadalà, M., Morales-Medina, J. C., Vallelunga, A., Palmieri, B., Laurino, C. ve Iannitti, T. 2016. Mechanisms and therapeutic effectiveness of pulsed electromagnetic field therapy in oncology. *Cancer Medicine*, 5(11):3128-3139.
- Vallero, D. A. ve Letcher, T. M. 2013. Radiation. EDD, *Unraveling Environmental Disasters*. Elsevier, ss. 299-320.

- Varani, K., Vincenzi, F., Targa, M., Corciulo, C., Fini, M., Setti, S., Cadossi, R. ve Borea, P. A. 2012. Effect of Pulsed Electromagnetic Field Exposure on Adenosine Receptors in Rat Brain. *Bioelectromagnetics*, 33, 279-287.
- van Haften, R. I. M., Haenen, G. R. M. M. I. Evelo, C. T. A, Bast, A. 2003. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metab Rev*, 35(2-3):215-53. doi: 10.1081/dmr-120024086.
- Vincenzi, F., Ravani, A., Pasquini, S., Merighi, M., Gessi, S., Setti, S., Cadossi, R., Borea, P. A. ve Varani, K. 2017. Pulsed Electromagnetic Field Exposure Reduces Hypoxia and Inflammation Damage in Neuron-Like and Microglial Cells, *Journal Cellular Physiology*, 232, 1200–1208.
- Wade, B. 2013. A review of pulsed electromagnetic field (PEMF) mechanisms at a cellular level: a rationale for clinical use. *American Journal of Health Research*, 1, 3, 51-55.
- Wang, H. ve Zhang, X. 2017. Magnetic Fields and Reactive Oxygen Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10): 2175-219.
- Watson, C., Kirkcaldie, M. ve Paxino, G. 2010. The Brain: An Introduction to Functional Neuroanatomy. Elsevier, Avustralya, ss165.
- World Health Organization (WHO). 2002. Establishing a Dialogue on Risks From Electromagnetic Fields, ss. 32-64, Geneva, Switzerland. 3
- Wu, W., Yao, K., Wang, K.J., Lu, D.Q., He, J.L., Xu, L.H., Sun, W.J. 2008. Blocking 1800 MHz mobile phone radiation-induced reactive oxygen species production and DNA damage in lens epithelial cells by noise magnetic fields. *Zhejiang Da. Xue. Xue. Bao. Yi. Xue. Ban* 37, 34–38.
- Xu, S., Lu, J., Shao, A., Zhang, J. H., Zhang, J. 2020. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Front Immunol.*, 11: 294. doi: 10.3389/fimmu.2020.00294.
- Xu, S., Zhou, Z., Zhang, L., Yu, Z., Zhang, W., Wang, Y., Wang, X., Li, M., Chen, Y., Chen, C., He, M., Zhang, G. and Zhong, M. 2010. Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons. *Brain Res.* 1311, 189-196
- Zhai, M., Jing, D., Tong, S., Wu, Y., Wang, P., Zeng, Z., Shen, G., Wang, X., Xu, Q. ve Luo, E. 2016. Pulsed Electromagnetic Fields Promote In Vitro Osteoblastogenesis Through a Wnt/b-Catenin Signaling-Associated Mechanism. *Bioelectromagnetics*, 37, 152-162.
- Zhang, L., Wang, X., Cueto, R., Effi, C., Zhang, Y., Tan, H., Qina, X., Ji, Y., Yang, X. ve Wang, H. 2019. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biology*, 26, 101284.

- Zhang, X., Li Wang, Lu, H., Zong, Z., Chen, Z., Yongfu Li, Y., Xiaohu Luo, X., Yanan Li, Y. 2020. Preservation of hydrogen peroxide-induced oxidative damage in HepG-2 cells by rice protein hydrolysates pretreated with electron beams. *Scientific Reports*, 10, 8415.
- Zhang, Y., Li, Q. ve Zhou, H. 2017. Theoretical Foundation and Basic Properties of Thermal Radiation. In: Robertson, N. (Ed.), *Theory and Calculation of Heat Transfer in Furnaces*. Elsevier, 1-43.
- Zmyslony, M., Politanski, P., Rajkowska, E., Szymczak, W., Jajte, J. 2004. Acute exposure to 930 MHz CW electromagnetic radiation in vitro affects reactive oxygen species level in rat lymphocytes treated by iron ions. *Bioelectromagnetics*, 25(5):324-8. Doi: 10.1002/bem.10191.



ÖZGEÇMİŞ

TUĞÇE ŞİMŞEK

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2018-2022	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2014-2018	Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Denizli

MESLEKİ DENEYİM

Biyomedikal Mühendisi Temmuz 2021-	Alpmed Tıbbi Cihazlar San. ve Tic. Ltd. Şti.
---------------------------------------	---