

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**ALTERNATİF ELEKTRİK ALAN KAYNAĞI ÜRETİMİ VE
SH-SY5Y HÜCRE YANITLARININ İNCELENMESİ**

HAZIRLAYAN

EDA ŞEVVAL AKSAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA – 2024

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**ALTERNATİF ELEKTRİK ALAN KAYNAĞI ÜRETİMİ VE
SH-SY5Y HÜCRE YANITLARININ İNCELENMESİ**

HAZIRLAYAN

EDA ŞEVVAL AKSAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. İSMAİL CENGİZ KOÇUM

TEZ EŞ DANIŞMANI

DOÇ. DR. FATİH ŞENTÜRK

ANKARA – 2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Eda Şevval AKSAN tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/ 08 / 2024

Tez Adı: Alternatif elektrik alan kaynağının üretimi ve SH-SY5Y hücre yanıtlarının incelenmesi

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

Prof. Dr. İsmail Cengiz KOÇUM, Başkent Üniversitesi

.....

Doç. Dr. Soner Çakmak, Hacettepe Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Tansel UYAR, Başkent Üniversitesi

.....

ONAY

Prof. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tarih : ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 31 / 08 / 2024

Öğrencinin Adı, Soyadı: Eda Şevval AKSAN

Öğrencinin Numarası: 22210061

Anabilim Dalı: Biyomedikal Mühendisliği

Programı: Tezli Yüksek Lisans

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Prof. Dr. İsmail Cengiz KOÇUM

Tez Başlığı: Alternatif Elektrik Alternatif elektrik alan kaynağının üretimi ve SH-SY5Y hücre yanıtlarının incelenmesi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 45 sayfalık kısmına ilişkin, 31/ 08/ 2024 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8 dir. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:.....

ONAY

ÖĞRENCİ TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. İsmail Cengiz KOÇUM

Tarih: ... / ... / 20...

TEŞEKKÜR

Tez çalışma sürecimde kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her soruma içtenlikle cevap veren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsmail Cengiz KOÇUM'a ve tez eş danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fatih Şentürk'e, tezime bağlantılı TÜBİTAK projesinde birlikte çalıştığımız Uğur DÜZEN'e, her türlü desteği esirgemeyen ve maddi manevi hep yanımda olan aileme, bu zorlu süreçte destek ve anlayışlarını daima hissettiğim arkadaşlarıma, özellikle Melek İlayda SEYİTOĞLU ve Banu Alkım GÜRKAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu tez, bursiyer olarak görev aldığım 222S617 nolu TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir. Tezime verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Eda Şevval Aksan

ALTERNATİF ELEKTRİK ALTERNATİF ELEKTRİK ALAN KAYNAĞININ ÜRETİMİ VE SH-SY5Y HÜCRE YANITLARININ İNCELENMESİ

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

2024

Kanser tedavisinde uygulanan geleneksel yöntemlerin sınırlı etkinliği ve ciddi yan etkileri, tedaviye yönelik potansiyel yaklaşımların araştırılmasını ve tedavi protokollerine dahil edilmesini gerekli kılmaktadır. Bu yaklaşımlardan en dikkat çekici olanı, orta frekanslı (100–500 kHz) alternatif elektrik alanların (AEA) kanser hücrelerinde anti-mitotik etkiler göstererek hücre bölünmesini engellemesi ve hücre ölümüne yol açmasıdır. Bu tez kapsamında, AEA kaynaklı bir *in vitro* maruziyet sisteminin tasarımı, üretimi ve hücre-alan etkileşiminin nöroblastoma hücrelerinde (SH-SY5Y) hücre kültürü ön testleri ile incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 100–500 kHz frekans ve 1,5–11,63 Vpk/cm genlik aralığında sinyaller üretebilen *in vitro* maruziyet sisteminin üretimi gerçekleştirilmiştir. Sistemin üretim aşamaları; alternatif elektrik alan kaynağının oluşturulması, homojen elektrik alan üretim devrelerinin tasarlanması ve elektrik alan doğrultusunun seçimi için gerekli devrelerin geliştirilmesini içermektedir. Daha sonra hücre kültürü ön testleri gerçekleştirilmiş ve SH-SY5Y hücrelerine, iki farklı yönde polarize olabilen (Kuzey-Güney, K-G; Doğu-Batı, D-B) alternatif elektrik alan (200 kHz, 2,13 Vpk/cm genlikte, 48 saat) uygulanmıştır. Hücre canlılığı test sonuçlarına göre, kontrol grubuna kıyasla, K-G grubunda %60,8 ($p \leq 0,001$) ve D-B grubunda %34 ($p \leq 0,0001$) oranında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, optik mikroskop görüntüleri ile de doğrulanmıştır. Ayrıca, D-B yönünde uygulanan AEA'nın, K-G yönüne kıyasla hücre canlılığını daha fazla azalttığı tespit edilmiştir ($p \leq 0,01$). Bu bulgular, hücre canlılığı üzerinde uygulanan yöneline bağlı farklı etkilerin olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen alternatif elektrik alan sisteminin *in vitro* çalışmalarda etkin bir şekilde kullanılabileceği, hücre canlılık testleriyle doğrulanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Alternatif Elektrik Alan Maruziyet Sistemi, Nöroblastoma Hücre Hattı, SH-SY5Y, Anti-Mitotik Etki, Hücre Canlılığı

ABSTRACT

Eda Şevval Aksan

GENERATION OF ALTERNATIVE ELECTRIC FIELD SOURCE AND INVESTIGATION OF SH-SY5Y CELL RESPONSES

Başkent University Institute of Science and Engineering

The Department of Biomedical Engineering

2024

The limited efficacy and serious side effects of conventional methods of cancer treatment necessitate the investigation of potential therapeutic approaches and their incorporation into treatment protocols. One of the most remarkable of these approaches is that mid-frequency (100-500 kHz) alternating electric fields (AEA) exhibit anti-mitotic effects on cancer cells, inhibiting cell division and leading to cell death. In this thesis, we aimed to design and fabricate an AEA-induced in vitro exposure system and to investigate the cell-field interaction in neuroblastoma cells (SH-SY5Y) by preliminary cell culture tests. For this purpose, an in vitro exposure system capable of generating signals with a frequency of 100-500 kHz and an amplitude range of 1.5-11.63 Vpk/cm was realized. The production stages of the system included the creation of an alternating electric field source, the design of homogeneous electric field generation circuits and the development of the necessary circuits for the selection of the electric field direction. Then, preliminary cell culture tests were performed and SH-SY5Y cells were exposed to an alternating electric field (200 kHz, 2.13 Vpk/cm amplitude, 48 hours) polarized in two different directions (North-South, N-S; East-West, D-W). According to the cell viability test results, statistically significant decreases of 60.8% ($p \leq 0.001$) in the N-S group and 34% ($p \leq 0.0001$) in the D-B group were detected compared to the control group. These results were confirmed by optical microscope images. It was also found that AEA applied in the D-B direction decreased cell viability more than in the N-S direction ($p \leq 0.01$). These findings indicate that there are different effects on cell viability depending on the applied orientation. In conclusion, cell viability tests confirmed that the designed and fabricated alternating electric field system can be effectively used in in vitro studies.

KEYWORDS: Alternating Electric Field Exposure System, Neuroblastoma Cell Line, SH-SY5Y, Anti-Mitotic Effect, Cell Viabilit

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.2. Alternatif Elektrik Alanların Kanser Tedavisindeki Rolü	4
2.3. Alternatif Elektrik Alanların Kanser Hücrelerinde Etki Mekanizmaları.....	4
2.3.1. Anti-mitotik Etki	4
2.3.2. DNA Onarımı	5
2.3.3. Otofaji.....	5
2.3.4. İmmünojenik Etki	6
2.3.5. Anti-göç Etkisi	6
2.3.6. Geçirgenlik Etkisi	6
2.4. Alternatif Elektrik Alanların Hücre İçi Polar Yapılar Üzerine Etkileri.....	6
2.4.1. Dielektroforez (DEP) Kuvveti	7
2.5. Alternatif Elektrik Alanlarının Frekans ve Hücre Çoğalması Üzerine Etkileri	
9	
2.6. Alternatif Elektrik Alan Sisteminin Fiziksel Parametreleri	10
2.7. Alternatif Elektrik Alan Maruziyet Sisteminin Elektronik Altyapısı	12

3. MATERYAL VE METOT.....	15
3.1. Alternatif Elektrik Alan Sisteminin Tasarımı ve Üretimi	15
3.1.1. Alternatif Elektrik Alan Kaynağı Üretimi	18
3.1.2. Elektrik Alan Doğrultusu Seçimi	19
3.1.3. Homojen Elektrik Alan Oluşum Devresi.....	21
3.1.4. Elektro-kültür Plaka Üretimi	24
3.2. Hücresel Çalışmalar.....	25
3.2.1. Hücre canlılığı tespiti: MTT yöntemi	26
3.2.2. İstatistiksel Analiz.....	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1. Alternatif Elektrik Alan Kaynağı Üretimi.....	28
4.1.1. Genlik Ölçümü.....	30
4.2. Elektrik Alan Doğrultusu Seçimi.....	34
4.3. Homojen Elektrik Alan Oluşum Devresi	36
4.4. Hücresel Çalışmalar.....	40
4.4.1. Alternatif Elektrik Alan uygulaması	40
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR	45

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Alternatif elektrik alan sisteminin uygulamaları	10
Tablo 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler	16
Tablo 3.2. Röle kartının veri sayfası değerleri.....	20
Tablo 4.1. DDS malzeme kriter tablosu	29
Tablo 4.2. 100 kHz genlik değerleri skala tablosu	31
Tablo 4.3. 500 kHz genlik değerleri skala tablosu	33
Tablo 4.4. Alternatif planlama tablosu.....	37
Tablo 4.5 Güç yükseltici malzeme isterler tablosu	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Alternatif elektrik alan etki mekanizması, A) anti-mitotik etki, B) DNA onarımı, C) otofaji, D) immünojenik, E) anti-göç, F) hücre zarı geçirgenliği [28]	5
Şekil 2.2.	(A) Hareketsiz (bölünmeyen) ve (B) bölünen hücrelerin içinde ve çevresinde elektrik alan dağılımı, [24]'ten uyarlanmıştır.	7
Şekil 2.3.	Mitotik bozulmaya yol açan alternatif elektrik alan uygulaması modeli [13].	8
Şekil 2.4.	Alternatif elektrik alanın kanser hücresi çoğalması üzerindeki etkisinin zaman, frekans ve yoğunluğa bağlı grafikleri. [24] (b) alternatif elektrik alan (9 Vpp) 72 saat boyunca uygulandıktan sonra BT4Ca hücre sayılarında frekansa bağlı azalma grafiği [49]. (c) Alternatif (9 Vpp) 72 saat boyunca uygulandıktan sonra BT4Ca hücre sayılarının yön değiştirme süresine bağlı azalma grafiği [49].	9
Şekil 2.5.	Alternatif elektrik alan maruziyet sistemlerinin elektronik altyapıları.....	13
Şekil 3.1.	Alternatif elektrik alan maruziyet sisteminin şematik gösterimi.....	15
Şekil 3.2.	Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemelerin görselleri. (a) güç kaynağı (12V, 5A), (b) mikrodenteleyici (Arduino Mega 2560 Pro Mini), (c) DDS (AD9850), (d) güç yükselteci (LM675), (e) opamp entegresi (lf356), (f) 16 kanallı röle kartı, (g) 4x16 LCD ekran, (h) potansiyometre, (i) butonlar, (j) 100 nanofarad kondansatör, (k) 10 mikrofaraad kondansatör, (l) 1 nanofarad kondansatör, (m) 1 kiloohm direnç, (n) 10 kohm direnç, (o) 20 kiloohm direnç	16
Şekil 3.3.	Cihazın prototip tasarımı	17
Şekil 3.4.	(a) Tüm sistem devresi, (b) cihaz kutulanması.....	17
Şekil 3.5.	(A) Cihazın elektronik yapısı, (b) cihazın ön paneli. (a) köprü yükselteç devresi, (b) dds-ad9850, (c) güç kaynağı (12v,5a), (d) mikrodenteleyici (arduino mega 2560 pro mini), (e) 16 kanallı röle kartı, (f) 4x16 lcd ekran, (g) frekans ayarlama butonları, (i) sürekli elektrot ayarlama butonları, (j) süreli elektrot ayarlama butonu, (k) potansiyometre, (l) elektrot çıkışı	18

Şekil 3.6.	Diyot pompası devreleri, (a) diyot pompası devre şeması, (b) diyot pompası baskı devresi, (c) ADC çıkışı (d) AC sinyali girişi	19
Şekil 3.7.	Elektro-kültür plakasının yön ve elektrot gösterimleri. (a) Elektro-kültür plakasının yön gösterimi, kuzey-güney (K-G) yönü, doğu-batı (D-B) yönü. (b) Elektro-kültür plakasının elektrot gösterimi, (i) 1. sütunun doğu-batı (D-B) elektrotları, (ii) 1. sütunun kuzey-güney (K-G) elektrotları.....	21
Şekil 3.8.	Elektro-kültür plaka ve alternatif elektrik alan maruziyet sistemi bağlantısı.....	21
Şekil 3.9.	Temel köprü yükselteç devresi (R_1 , R_2 , R_3 : Farklı direnç değerleri, R_{LOAD} : Yük direnci) [57]	22
Şekil 3.10.	(a) LM675 evirmeyen yükselteç tasarımı, (b) LF356 eviren yükselteç tasarımı, (c) köprü yükselteç tasarımı (d) filtre devresi.....	23
Şekil 3.11.	Röle kartı ve köprü yükselteç tasarımı	24
Şekil 3.12.	Alternatif elektrik alan uygulaması (RWD D180 CO2 Incubator	25
Şekil 3.13.	Nikon Eclipse Ti2 Inverted Microscope.....	25
Şekil 3.14.	Elektro-kültür plaka sterilizasyonu (Thermo Scientific MSC Advantage Class II, biyolojik güvenlik kabini),	26
Şekil 4.1.	Yazılım algoritmaları (a) alternatif elektrik alan kaynağı üretimi algoritması, (b) sürekli elektrot seçim algoritması, (c) süreli elektrot ayarı algoritması	28
Şekil 4.2.	Alternatif elektrik alan kaynağından üretilen sinyalin testi (a) osiloskop cihazı (TDS5104B), (b) 200 kHz sinyalin osiloskop görüntüsü	29
Şekil 4.3.	Diyot Pompası Devreleri, (a) diyot pompası devre şeması, (b) diyot pompası baskı devresi, (c) ADC çıkışı, (d) AC sinyali girişi	31
Şekil 4.4.	(a) Elektrik alan doğrultusu seçim testi, (b) röle kartı, 1 ve 16 numaralı röleler aktifken, (c) 200 kHz sinyalin osiloskop görüntüsü	35
Şekil 4.5.	Köprü yükselteç devresi, (a) köprü yükselteç devre şeması, (b) köprü yükselteç devre kurulumu.....	38

Şekil 4.6.	Köprü yükseltecin 200 kHz sinyal görüntüsü (yük olmadan).	38
Şekil 4.7.	Köprü yükselteç devresinin 10 ohm’luk yük altında sinyal görüntüleri, a) 100 kHz frekansta, b) 200 kHz frekansta, c) 300 kHz frekansta, d) 400 kHz frekansta, e) 500 kHz frekansta	39
Şekil 4.8.	İnsan nöroblastoma hücre hattının (SH-SY5Y) 12-kuyucuklu hücre kültür plakaya ekimi ve alternatif elektrik alanların (AEA) uygulama yönlerinin gösterimi.....	41
Şekil 4.9.	Alternatif elektrik alan (AEA) uygulaması sonrası insan nöroblastoma hücrelerinin (SH-SY5Y) görüntüsü.....	42
Şekil 4.10.	İnsan nöroblastoma hücre hattının (SH-SY5Y) inverted mikroskop görüntüleri (10X), (a) kontrol hücreleri (0.saat), (b) sham kontrol grubu hücreleri (48.saat, elektrotlar içerisinde AEA uygulanmayan), (c) 48 saat boyunca K-G yönünde alternatif elektrik alan (200 kHz, 2,13 Vpk/cm) uygulanan hücreler, (d) 48 saat boyunca D-B yönünde alternatif elektrik alan (200 kHz, 2,13 Vpk/cm) uygulanan hücreler. (K-G: Elektrotların kuzey-güney yönünde, D-B: Elektrotların doğu-batı yönünde konumlandırılmaları)	42
Şekil 4.11.	İnsan nöroblastoma hücre hattına (SH-SY5Y) 48 saat boyunca alternatif elektrik alan (200 kHz, 2,13 Vpk/cm) uygulandıktan sonra elde edilen % canlılık grafiği, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,001^{****}$, $n=8$, (K-G: Elektrotların kuzey-güney yönünde, D-B: Elektrotların doğu-batı yönünde konumlandırılmaları).....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

Å	Ångström (Işığın Dalga Boyu Uzunluk Ölçü Birimi)
AC	Alternating Current (Alternatif Akım)
ADC	Analog-Dijital Dönüştürücü
AEA	Alternatif Akım
cm	Santimetre (Uzunluk Ölçü Birimi)
dB	Desibel (Ses Ölçü Birimi)
DC	Alternating Current (Alternatif Akım)
DDS	Direct Digital Synthesized (Doğrudan Dijital Sentezleme)
DEP	Dielektroforez Kuvveti
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ECIS	Elektrik Hücre-Substrat Empedans Algılama
FBS	Fötal Sığır Serum
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç İdaresi)
GBM	Glioblastoma
GUI	Graphical User Interface (Grafiksel Kullanıcı Arayüzü)
Hz	Hertz (Frekans Birimi)
kHz	KiloHertz (Frekans Birimi)
LC	Inductor Capacitor (İndüktans Kapasitör Devresi)
LCD	Liquid Crystal Display (Sıvı Kristal Ekran)
mA	Miliamper (Elektrik Akımı Ölçü Birimi)
MATLAB	Matrix Laboratory
MCM	Mikrodenetleyici Birimi
mg	Miligram (Kütle Birimi)
MHz	MegaHertz (Frekans Birimi)
mL	Mililitre (Hacim Birimi)
mm	Milimetre (Uzunluk Birimi)
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür)
nF	Nanofarad (Kapasitans Birimi)
Opamp	Operational Amplifier (İşlemsel Yükselteç)

PC	Personal Computer (Kişisel Bilgisayar)
PCB	Printed Circuit Board (Baskı Devre Kartı)
sa	Saat (Zaman Birimi)
TTFields	Tumor Treating Fields (Tümör Tedavi Alanları)
V	Volt (Gerilim Birimi)
V _{pk}	Sinyal Genliğinin Pozitif Dalgası
V _{pp}	Tepeden Tepeye Genlik Değeri



1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde en önemli ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Kanser vakalarının artmasıyla birlikte, hastalar kemoterapi de dahil olmak üzere mevcut geleneksel tedavilerin kısa ve uzun vadeli toksisitelerine maruz kalmaktadır. Bu durum, hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen fiziksel, duygusal ve mali yükler getirmektedir. Bu nedenle, daha etkili ve tolere edilebilir antikanser tedavilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntemlerden en dikkat çekici olanı, alternatif elektrik alanlarının (AEA), hücrelerin elektriksel aktivitesi ve hücre bölünmesi gibi birçok temel biyolojik süreçte kritik bir rol oynamasıdır [1]. Dışarıdan uygulanan AEA'ların hücresel süreçlerdeki genel etkisi, iki elektrot arasındaki potansiyel farkın büyüklüğüne (alan yoğunluğu) ve frekansına bağlıdır. [2]. Örneğin, düşük frekanslar (0–300 Hz) membran depolarizasyonunu tetikleme ve sonuç olarak sinir, kas, kalp ve diğer dokuları uyarma eğilimindedir [3]. Defibrilatörler ve elektro-şok tedavisinin her ikisi de yüksek yoğunluklu elektrik alanlarının membran depolarizasyonunu indüklemeye yeteneğine dayanmaktadır [4]. Ayrıca, orta frekanslı alternatif elektrik alanlar kanser hücrelerinde anti-mitotik etkiler göstererek hücre ölümüne yol açmaktadır.

Alternatif elektrik alanları, 100–500 kHz frekans aralığında ve 1–3 V/cm yoğunluğunda uygulandığında, tümör hücrelerinin büyümesini etkin bir şekilde engelleyen elektrik alanlarıdır [5-7]. Bu elektriksel alanlar, minimal sistemik toksisiteye sahip, yenilikçi ve non-invaziv bir bölgesel anti-mitotik tedavi yöntemi olarak öne çıkmaktadır [8, 9]. Hücre bölünmesini ve organel düzenini bozarak anti-mitotik bir etki gösteren bu elektrik alanları, hücre kültürü koşullarında, dielektroforetik kuvvetler aracılığıyla mitotik iğ oluşumuna ve hücresel bileşenlere müdahale ederek yapısal bozulmalara yol açmaktadır [10-12]. Bu müdahale, hücre bölünmesi sırasında plazma zarı üzerinde şiddetli kasılmaların tetiklenmesine ve nihayetinde hücre ölümüne neden olmaktadır [13]. Ayrıca, alternatif elektrik alanları, mitotik iğ kompleksinin kararsızlaşmasına ve mikrotübüllerin işlev bozukluğuna yol açarak hücre bölünmesini engellemekte ve apoptozu indüklemektedir [14, 15]. Bu elektrik alanları, hücre döngüsünü, büyümesini ve bölünmesini bozarak tümör hücrelerinde yoğun bir stres yaratmakta ve bu sayede hücre canlılığını, çoğalmasını ve invazivliğini belirgin şekilde baskılamaktadır [16, 17].

Bu tez kapsamında, alternatif elektrik alan kaynaklı bir in vitro maruziyet sisteminin tasarımı, üretimi ve hücre-alan etkileşiminin SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hücre kültürü ön testleri ile incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 100–500 kHz frekans ve 1,5–11,63 Vpk/cm genlik aralığında sinyaller üretebilen in vitro maruziyet sisteminin üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen bu sistem kullanılarak in vitro koşullarda SH-SY5Y hücresine alternatif elektriksel alan (2,13 V/cm, 200 kHz) uygulanmış ve % canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, tez çalışmasının temel aldığı konular, literatürdeki bilgiler ışığında özetlenmiştir. İlk olarak, kanser hücreleri ile sağlıklı hücreler arasındaki elektriksel özellik farklılıkları açıklanmıştır. Sonrasında, alternatif elektrik alanların kanser tedavisindeki rolüne dair bilgiler verilmiş ve bu alanların kanser hücreleri üzerindeki etki mekanizmaları incelenmiştir. Ardından, alternatif elektrik alanların hücre içi polar yapılar üzerindeki etkileri ele alınmıştır. Alternatif elektrik alanların frekanslarının hücre çoğalması üzerindeki etkileri grafiklerle gösterilmiş ve bu sistemin fiziksel parametreleri sunulmuştur. Son olarak, alternatif elektrik alan maruziyet sisteminin elektronik altyapısı açıklanmıştır.

2.1. Kanser Hücreleri ve Sağlıklı Hücreler Arasındaki Elektriksel Özellik Farklılıkları

Hücreler sağlıklı bir durumdan patolojik bir duruma geçtiğinde elektriksel özellikleri değişmektedir [18]. Ayrıca, kanserin ilerlemesi ile hücre yapısı değişmekte, membran kapasitansı ve sitoplazmik iletkenlik bu değişikliklere adapte olmaktadır [19]. Sağlıklı ve kanser hücrelerinin farklı elektriksel özelliğe ve farklı membran geçirgenliğine sahiptir [20]. Tümör hücreleri, sağlıklı hücrelere kıyasla nispeten daha depolarize bir dinlenme membran potansiyeline sahiptir. Tümör hücreleri, değişen membran yapıları nedeniyle sağlıklı hücrelere kıyasla daha fazla deforme olabilmektedir [3]. Ayrıca, tümör hücreleri kendilerini çevreleyen sağlıklı dokulara göre daha yüksek iletkenlik [21] ve daha düşük empedans değerleri göstermektedir [22]. Kanser hücresi ve sağlıklı hücreler arasında bölünme oranı, geometri, elektrik özellikleri bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Alternatif elektrik alan bu özelliklerin farklılığına bağlı olarak kanser hücrelerini daha fazla etkileyebilmektedir [23]. Alternatif elektrik alanların, hızla bölünen normal hücreler ve kemik iliği hücreleri üzerinde olumsuz etkiler yaratması beklenebilir. Ancak, kemik iliği hücreleri hem kemik hem de kemik iliğinin yüksek empedansı sayesinde bu elektrik alanlardan korunmaktadır. Bu koruma, kemik iliği içindeki alan yoğunluğunun çevre dokulara kıyasla yaklaşık 100 kat daha düşük olması ile açıklanmaktadır [24]. Bu bağlamda, alternatif elektrik alanların kanser tedavisinde kullanımı, sağlıklı dokular üzerinde minimal hasar oluştururken, kanser hücrelerine yönelik hedefli bir tedavi yaklaşımı sunma potansiyeline sahiptir.

2.2. Alternatif Elektrik Alanların Kansere Tedavisindeki Rolü

Kanser tedavisinde kullanılan konvansiyonel yöntemlerin sınırlı etkinliği ve önemli yan etkileri nedeniyle, tedavi etkinliğini geliştirebilecek alternatif potansiyel yöntemler araştırılmakta ve tedavi protokollerinde yer almaktadırlar. Son zamanlarda, elektromanyetik alanların (EMA) direkt biyolojik etkileri kullanılarak kanser tedavisinde oldukça önemli gelişmeler yaşanmaktadır. Bu gelişmelerden en dikkat çekici olanı, alternatif elektrik alan (AEA) kaynaklı sistemlerin (Tumor Treating Fields, TTFields, Novocure Inc, Haifa, İsrail) 2011 ve 2015 yıllarında sırasıyla, nükseden ve yeni teşhis glioblastoma (GBM) tedavisi için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından standart tedavi protokolüne dahil edilmesidir [25]. Ayrıca, TTField'lar 2019'da malign plevral mezotelyoma tedavisi için de FDA tarafından onaylanmıştır [26], ve birçok kanser türünde (pankreas, over, karaciğer vb.) klinik çalışmaları devam etmektedir.

2.3. Alternatif Elektrik Alanların Kanser Hücrelerinde Etki Mekanizmaları

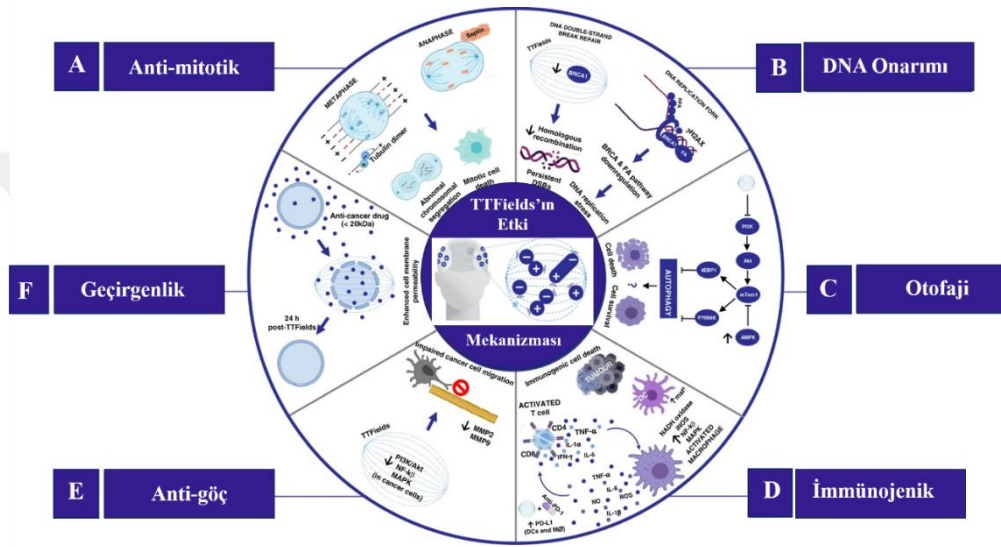
Alternatif elektrik alanları (AEA), kanser hücreleri üzerinde çeşitli mekanizmalar aracılığıyla etki gösteren ve hücre ölümüne yol açan düşük yoğunluklu, orta frekanslı elektriksel alanlardır [27]. AEA'ların başlıca etki mekanizmaları; anti-mitotik etki, DNA onarımı, otofaji, immünojenik etki, anti-göç ve geçirgenlik olarak sıralanabilir. Bu etkiler aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

2.3.1. Anti-mitotik Etki

Alternatif elektrik alan uygulamasının terapötik etkilerinin temel mekanizması, anti-mitotik etki olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.1A). AEA uygulanan tümör hücrelerinde mitotik bozulma ve bunu takiben hücre ölümü meydana gelmektedir. AEA, çeşitli elektriksel kuvvetler aracılığıyla bölünmekte olan hücrelere odaklanarak hücre ölümünü indüklemektedir [13]. Kanser hücrelerinin, normal doku hücrelerine kıyasla daha hızlı bölünmesi, bu hücrelerin AEA'lara karşı belirgin bir duyarlılık geliştirmesine neden olmaktadır [28]. AEA'ların oluşturduğu anti-mitotik etkiler ve bu etkilerde rol oynayan proteinler ise Bölüm 2.4'te ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.3.2. DNA Onarımı

Alternatif elektrik alanlar, kanser hücrelerindeki stresi artırarak DNA replikasyon çatalını (DNA replication fork) bozacak şekilde etki göstermektedir (Şekil 2.1B) [28]. Radyoterapiden önce uygulandığında, alternatif elektrik alanların kanser hücrelerinde DNA hasarını artırma [29], DNA onarımını geciktirme [30], mitotik bozulmayı artırma ve kanser hücrelerinin sağkalımını azaltma gibi etkileri bulunmaktadır [31]. Ayrıca, radyoterapi tedavi planıyla birlikte uygulandığında, radyasyon dozunu azaltma potansiyeline de sahiptir [32].



Şekil 2.1. Alternatif elektrik alan etki mekanizması, A) anti-mitotik etki, B) DNA onarımı, C) otofaji, D) immünojenik, E) anti-göç, F) hücre zarı geçirgenliği [28]

2.3.3. Otofaji

Otofaji, hücresel bileşenlerin parçalanmak üzere lizozomlara yönlendirildiği ve düzenli bir şekilde gerçekleşen katabolik bir kendini sindirme sürecidir. Bu süreç, açlık koşullarında enerji ve metabolik öncüller sağlamakta, ayrıca hasarlı proteinler ve organelleri uzaklaştırarak hücrenin hayatta kalmasını desteklemektedir. Alternatif elektrik alanların otofajinin aktivasyonunu artırma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir [33]. Bu elektriksel alanlar kanser hücrelerine uygulandığında, anormal kromozomal ayrışmalara neden olmakta ve bu mitotik olaylar otofajinin artan aktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir (Şekil 2.1C) [34]. Bu mekanizma, otofajinin aktivasyonunu artırarak kaspazlardan (hücre ölümünde rol alan enzim) bağımsız bir hücre ölümü gerçekleştirmekte ve kanser hücrelerinin göçünü ve invazivliğini engellemektedir [35].

2.3.4. İmmünojenik Etki

Alternatif elektrik alan, immünojenik hücre ölümünü artırarak bağışıklık sisteminin tümör hücrelerini tespit etmesini kolaylaştırmakta ve vücudun anti-tümör bağışıklık kazanmasına olanak sağlamaktadır (Şekil 2.1D). Ayrıca, makrofaj (RAW 264.7) aktivasyonunu etkileyerek anti-tümör bağışıklığını destekleyebilmektedir [36]. Alternatif elektrik alan uygulamasının kanser ilaçları, özellikle PD-1 inhibitörleri ile kombinasyonu, bu elektrik alanların antitümör etkisini artırmaktadır. PD-1, T hücresi aktivasyonunu engelleyerek immün yanıtı baskılar; ancak anti-PD-1 inhibitörleri, alternatif elektrik alan uygulamaları tarafından tetiklenen antikanser immün yanıtını güçlendirebilir. Anti-PD-1 gibi immün kontrol noktası inhibitörleri, T hücrelerinin kanser hücrelerini yeniden öldürmesini teşvik ederek, alternatif elektrik alan uygulamalarının antikanser immün yanıt üzerindeki etkisini artırabilir [26].

2.3.5. Anti-göç Etkisi

Bazı kanser türleri, özellikle glioma hücreleri, lokal olarak invazivdir ve sağlıklı beyin dokusuna yoğun bir şekilde göç edip infiltrasyon yapabilirler. Bu hücrelerin bu özelliklerinin kısıtlanması, terapötik dirençle mücadelede büyük önem taşır. Alternatif elektrik alanın, kanser hücrelerini bölünme anında hedef alarak çeşitli proteinler (ekstraselüler matris proteinleri, ECM) aracılığıyla besin arzını azalttığı ve bu durumun hücre göçünü engellediği düşünülmektedir (Şekil 2.1E) [37, 38].

2.3.6. Geçirgenlik Etkisi

Alternatif elektrik alan, hücre zarı geçirgenliğini artırarak [36], hücre içi ilaç konsantrasyonlarını artırmaktadır (Şekil 2.1F). Bu özellikleri sayesinde, potansiyel olarak ilaca dirençli tümörlerin tedavisinde etkili bir yöntem olarak kullanılabilir [39]. Hücre zarındaki porların sayısını ve boyutunu artırarak, kemoterapötik ilaçlara duyarlılığı potansiyel olarak yükseltmektedir [40].

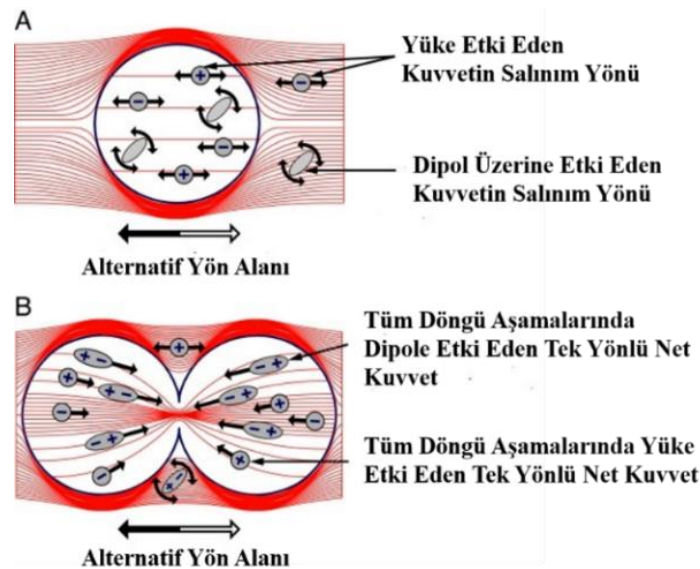
2.4. Alternatif Elektrik Alanların Hücre İçi Polar Yapılar Üzerine Etkileri

Mitoz ve sitokinezden sorumlu hücre altı partiküllerin çoğu oldukça polar yapılara sahiptir. Bu nedenle, tübülün, aktin ve DNA gibi yapılar, uygulanan elektrik alanlarına karşı son derece hassastır [41]. Alternatif elektrik alanların bölünen kanser hücrelerindeki spesifik

etkisi, bir veya daha fazla yüksek dipol momentli protein üzerinde gösterdiği etkiden kaynaklanmaktadır [42]. Bu alanların etki mekanizması, bölünmekte olan hücrelere odaklanan elektrik kuvvetlerine dayanmaktadır [43]. Bu elektrik kuvvetlerinin hücre içinde oluşturduğu etkilere dielektroforez (DEP) kuvveti adı verilir ve bu kuvvet, polarize olmuş hücre içi yapıları belirli bir yöne doğru hareket ettirerek hücre bölünmesi sürecini bozabilir.

2.4.1. Dielektroforez (DEP) Kuvveti

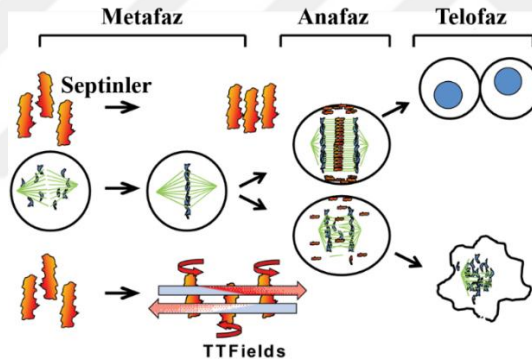
Canlı hücreler iyonlardan, polar veya yüklü moleküllerden, membranlardan ve organellerden oluştuğundan elektrik alanlarına ve akımlarına duyarlılık göstermektedir. Elektrik alanları iyon akışına neden olurken, polar moleküller kendilerini yalnızca homojen bir alanın çizgileri boyunca yönlendirmektedir. Bölünmeyen hücrelerin içinde alan homojendir ve salınan elektrik kuvvetleri sadece iyonların ve dipollerin titreşimine neden olmaktadır (Şekil 2.2A). Buna karşılık, bölünen hücrelerdeki homojen olmayan alan (Şekil 2.2B) tüm dipolleri bölünme oluğuna (cleavage furrow) doğru iten kuvvetleri indüklemektedir [24]. Homojen olmayan elektrik alanları, polar moleküller üzerinde kuvvet uygulayarak onları daha yüksek alan yoğunluğuna doğru hareket etmeye zorlamaktadır. Bu kuvvet dielektroforez (DEP) olarak adlandırılmaktadır [44]. DEP kuvveti dipol momentine sahip septin proteinini ve polar yapıdaki mikrotübülleri etkileyerek işlevlerini bozmaktadır.



Şekil 2.2. (A) Hareketsiz (bölünmeyen) ve (B) bölünen hücrelerin içinde ve çevresinde elektrik alan dağılımı, [24]'ten uyarlanmıştır.

2.4.2. Septin Etkisi

Septin proteinleri, hücre iskeletinin bir parçası olan ve hücre bölünmesi, hücre polaritesi ve hücre içi hareket gibi birçok önemli hücresel süreçte rol oynayan bir protein ailesidir. Septin kompleksi, interfaz sırasında mikrotübül hücre iskeleti ile ilişkili filamentler oluşturmaktadır. Yüksek dipol momentine sahip olan Septin proteini, bu özelliği nedeniyle DEP kuvveti tarafından etkilenebilir ve bu kuvvet, mitotik septin kompleksinin iğ orta hattına ve anafazdaki bölünme oluşuna lokalizasyonunu değiştirebilir [13]. Anillin, mitotik yapılarda Septin'in doğru lokalizasyonu için gerekli bir protein olarak işlev görürken [45], MAP-4 ise Septin kompleksinin interfaz mikrotübül hücre iskeletine entegrasyonundan sorumludur [46]. Alternatif elektrik alanlar, bu proteinler aracılığıyla Septin'in işlevini etkileyerek onun hücre içindeki lokalizasyonunu değiştirmektedir. Septin kompleksinin uygun şekilde lokalize edilememesi, anormal kromozomal ayrışma, mitoz süresinin uzaması, hücre zarında yırtılma gibi etkilerle mitoz sonrası hücre ölümüne yol açabilmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Mitotik bozulmaya yol açan alternatif elektrik alan uygulaması modeli [13].

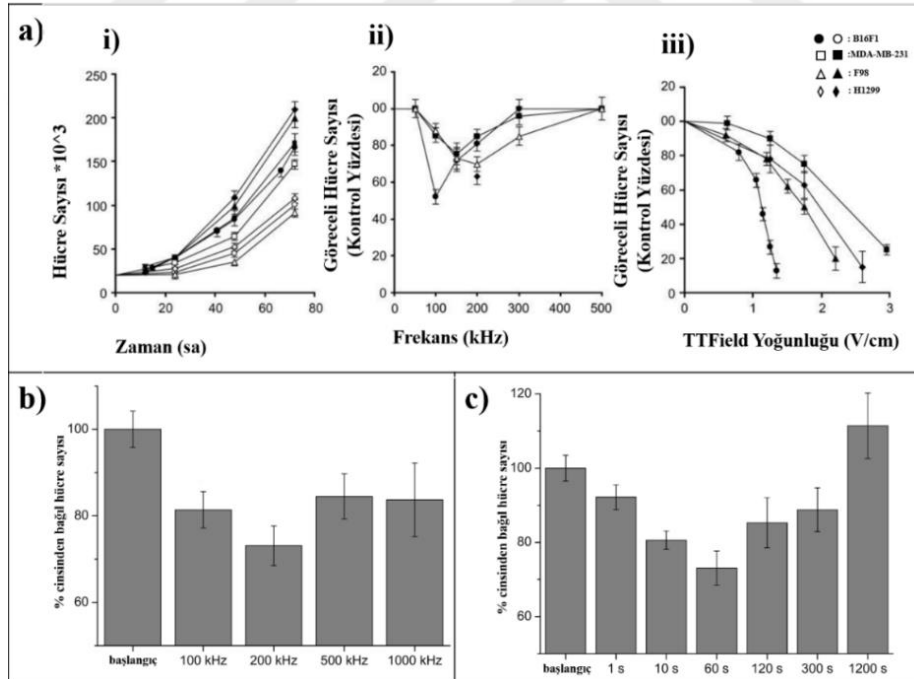
2.4.3. Mikrotübül Etkisi

Alternatif elektrik alan, polar mikrotübüller üzerinde DEP kuvveti aracılığıyla yönlendirilmiş kuvvetler uygulayarak normal mitotik iğ yapısının oluşumuna müdahale etmektedir. Mitotik iğ, her bir tübülün alt biriminin nispeten yüksek bir dipol momentine sahip olduğu tübülün polimerlerinden oluşan bir mikrotübül dizisidir. AEA'nın anti-mitotik etkisinin temel mekanizması, tübülün alt birimlerinin içsel dipol momentlerine dayanmaktadır [47]. AEA uygulandığında, tübülün dimerleri elektrik alan çizgisine hizalanır ve bu durum mitoz sırasında normal mikrotübül polimerizasyon-depolimerizasyon sürecine müdahale eder. Sonuç olarak, anormal iğ yapısının oluşumu, mitozda birkaç saat süren

hücreler duraklamaya ve nihayetinde mitotik hücre ölümüne yol açabilmektedir. Mikrotübül dinamiklerine yapılan bu müdahale, anormal iğ yapısına ve dolayısıyla mitotik duraklama veya gecikmeye neden olur, bu da anormal kromozom sayısına sahip yavru hücrelerin oluşumuna yol açabilir [48]. Bu nedenle, AEA'ların mitotik iğ yapısını bozarak hücre bölünmesini durdurma ve dolayısıyla kanser hücrelerinin proliferasyonunu engelleme potansiyeli, kanser tedavisinde önemli bir mekanizma olarak değerlendirilebilir.

2.5. Alternatif Elektrik Alanlarının Frekans ve Hücre Çoğalması Üzerine Etkileri

Alternatif elektrik alanların hücreler üzerindeki etkileri, uygulanan frekansa ve hücre tipine bağlı olarak önemli farklılıklar göstermektedir. Örneğin, fare melanomu (B16F1) hücre hattı için 100 kHz, insan meme karsinomu (MDA-MB-231) için 150 kHz ve sıçan glial-benzeri hücreler (F98) için 200 kHz, hücre canlılığını baskılayan en etkili frekanslar olarak belirlenmiştir (Şekil 2.4aii). Alan yoğunluğunun tümör hücre hatlarına etkisi de Şekil 2.4aiii'de görülmektedir [24].



Şekil 2.4. Alternatif elektrik alanın kanser hücresi çoğalması üzerindeki etkisinin zaman, frekans ve yoğunluğa bağlı grafikleri. [24] (b) alternatif elektrik alan (9 Vpp) 72 saat boyunca uygulandıktan sonra BT4Ca hücre sayılarında frekansa bağlı azalma grafiği [49]. (c) Alternatif (9 Vpp) 72 saat boyunca uygulandıktan sonra BT4Ca hücre sayılarının yön değiştirme süresine bağlı azalma grafiği [49]

Şekil 2.4b’de gösterildiği gibi, hücre sayım çalışmaları alternatif elektrik alanlarının frekansa bağlı olarak farklı etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır. 9 Vpp (peak-peak) genliğinde uygulanan 100–1000 kHz frekans aralıkları incelendiğinde, sadece 100 kHz ile 200 kHz aralığındaki frekansların hücre çoğalmasını önemli ölçüde azalttığı, daha yüksek frekansların ise bu etkiyi göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca, alternatif elektrik alanın yön değiştirme süresinin hücre yüzde canlılığı üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Farklı yön değiştirme süreleri (1-1200 saniye) test edildiğinde, 60 saniyelik yön değiştirme süresinin en fazla etkiye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 2.4c) [49]. Xiang ve arkadaşları, telofaz aşamasındaki hücrelerin bölünme oluşu bölgesinde, 200 kHz civarındaki frekanslarda elektrik alan yoğunluğunun arttığını ortaya koymuşlardır. Bu bulgulara dayanarak, glioblastoma tümör hücreleri için optimum frekansın 200 kHz olduğu belirlenmiştir [50].

2.6. Alternatif Elektrik Alan Sisteminin Fiziksel Parametreleri

Çeşitli tümör hücre hatlarına belirli aralıklarla uygulanmış alternatif elektrik alan parametreleri Tablo 2.1’de özetlenmiştir. Bu tablodaki uygulamaların kısa açıklamaları ise aşağıda detaylandırılmıştır.

Tablo 2.1. Alternatif elektrik alan sisteminin uygulamaları

Literatür	Frekans	Genlik	Alternatif Elektrik Alan (AEA) Uygulama Sistemi	Elektro-kültür Plakası	AEA Uygulanan Hücreler
Kirson ve ark. (2004)	100–300 kHz	1.0-2.5 V / cm	Osilatör ve yüksek voltajlı amplifikatörden oluşmaktadır.	4’lü hücre kültürü plakası ve birbirinden 1 mm uzaklıkta her bir plakanın altına sabitlenmiş 15 mm uzunluğunda, tamamen yalıtılmış tel çiftlerinden oluşmaktadır.	Patricia C, U-118, U-87, H-1299, MDA231, PC3, B16F1, F-98, C-6, RG2 ve CT-26 (insan ve kemirgen tümör hücre hatları).
Kirson ve ark. (2007)	100–500 kHz	0-3 V/cm	<i>İn vitro</i> AEA, osilatör ve yüksek voltajlı amplifikatörden oluşmaktadır. Klinik deneyler için NovoCure Ltd., Haifa, Israel kullanılmıştır.	Klinik çalışmalar için, implante edilmiş harici elektrotlar kullanılmıştır. <i>İn vitro</i> çalışmalar için 35 mm’lik Petri kapları ve birbirine dik olarak yerleştirilmiş yüksek dielektrik	İnsan meme karsinomu; MDA-MB-231 ve insan küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (H1299) ve hayvan tümör modellerine

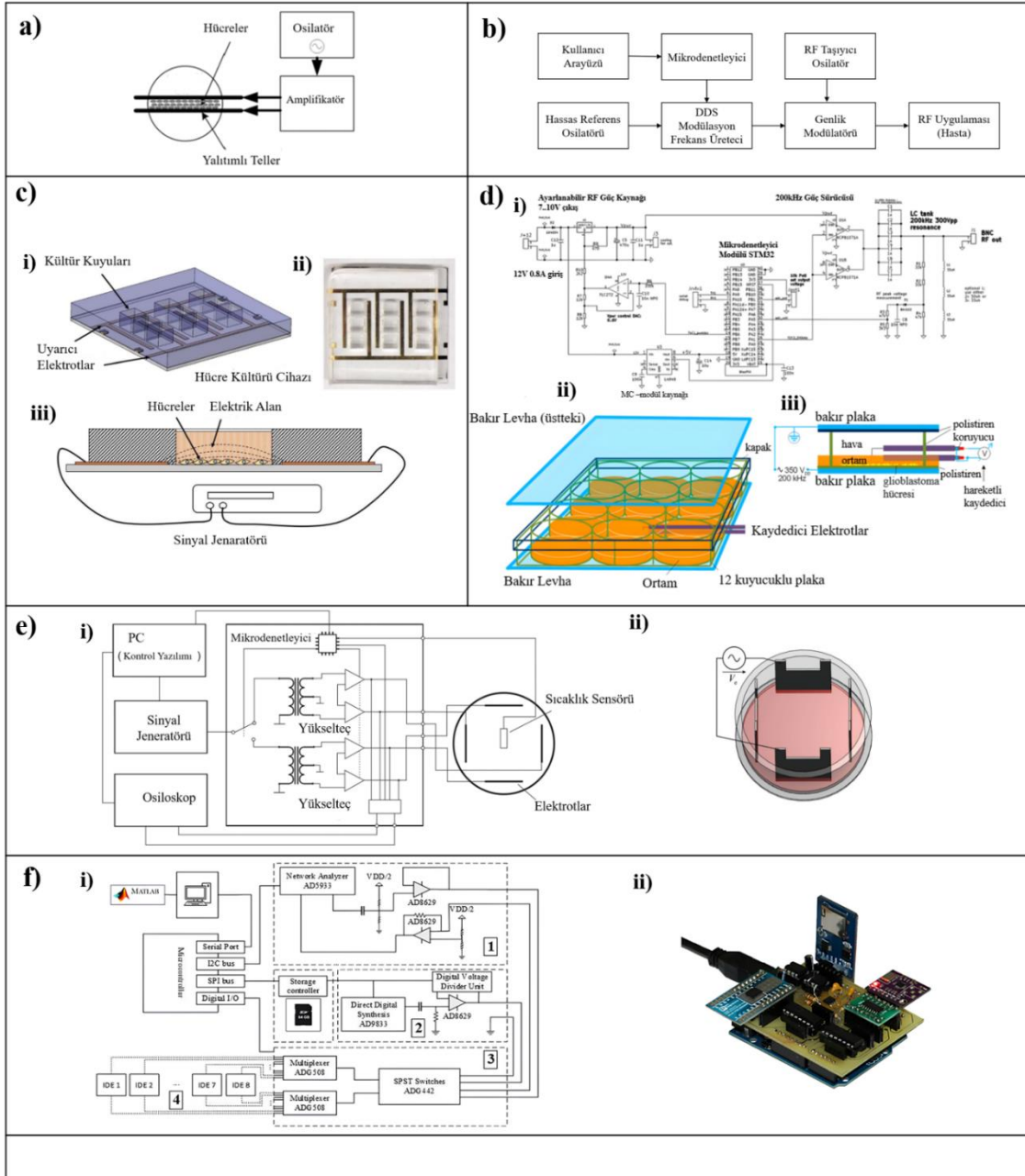
				sabit seramik ile izole edilmiş iki çift elektrottan oluşmaktadır.	(intradermal B16F1 melanom ve intrakraniyal F-98 glioma)
Gera ve ark. (2016)	150-500 kHz	1 V/cm ²	TTFields jeneratörleri (NovoCure Inc., Haifa, Israel)	NovoCure Inc Kültür Plakaları	HeLa (rahim tümör hücre hattı), MDA-MB-231 (meme tümör hücre hattı), HCT116 (kolon tümör hücre hattı) ve MCF-7 (meme tümör hücre hattı).
Berkelman ve ark. (2019)	100-1000 kHz	5Vpp, 7Vpp, 9Vpp, 12Vpp	Sinyaller DG1022Z fonksiyon jeneratörü (Rigol Technologies, Pekin, Çin) aracılığıyla üretilmiştir. Sinyalleri yükseltmek ve elektrotlara değişken bir şekilde dağıtmak için özel tasarlanmış bir devre kullanılmıştır.	Hücre kültürü ortamına daldırılmış dört paslanmaz çelik elektrot plakasından oluşan bir düzenek kullanılmışlardır.	BT4Ca, C6, F98, RG-2
Silginer ve ark. (2017)	100-300 kHz	0-3V/cm	Novocure (Hayfa, İsrail)	20 mm çaplı kültür plakası (Thermo Scientific), birbirine dik iki elektrot çiftine bağlı bir taban plakası üzerine yerleştirilmiştir.	LN-18, LN-229, ZH-161, T-325, ZH-161

İlk olarak 2004 yılında Kirson ve arkadaşları tarafından yalıtılmış elektrotlar kullanılarak geliştirilen düşük yoğunluklu ve orta frekansta (100–300 kHz) alternatif elektrik alan sistemi, çeşitli insan ve kemirgen tümör hücre hatlarının büyüme hızını belirgin şekilde inhibe edici etkiler göstermiştir [43]. 2007 yılında Kirson ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise insan meme karsinomu ve insan akciğer karsinomu hücreleri üzerinde harici yalıtımlı elektrotlar kullanılarak alternatif elektrik alan uygulaması gerçekleştirilmiştir [24]. Bu çalışma, alternatif elektrik alanın minimal yan etkilerle, yalıtımlı elektrotlar aracılığıyla tümör hücrelerinin büyümesini etkili bir şekilde engellediğini ortaya koymuştur. Gera ve ark. tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada, rahim, meme ve kolon tümör hücre hatları üzerinde 150–500 kHz aralığında alternatif elektrik alan uygulaması gerçekleştirilmiştir [13]. Bu çalışma, alternatif elektrik alanın hücre bölünmesinde rol oynayan kilit proteinleri

etkileyerek hücre proliferasyonunu azalttığını ve hücre ölümüne yol açabileceğini göstermiştir. Berkelmann ve ark. 2019'da farklı tümör hücre hatlarına 100–1000 kHz frekans aralığında alternatif elektrik alan uygulamıştır [49]. Alternatif elektrik alanlarının hücre üzerine etkisinin frekans ve yön değiştirme süresine bağlı olduğunu göstermişlerdir. Silginer ve ark. 2017'de alternatif elektrik alanlarının glioma hücreleri üzerindeki etkilerinin yanı sıra altta yatan mekanizmaların işlevsel karakterizasyonunu araştırmışlardır [35]. Bu çalışma özetle alternatif elektrik alanın otofajinin hücre ölümünü indüklediğini ve glioma hücrelerinin metastazını ve invazivliğini engellediğini göstermiştir

2.7. Alternatif Elektrik Alan Maruziyet Sisteminin Elektronik Altyapısı

Bu bölümde, literatürde yer alan alternatif elektrik alan maruziyet sistemlerinin elektronik altyapıları detaylandırılmıştır. Literatürdeki alternatif elektrik alan maruziyet sistemlerine ait devre şemaları Şekil 2.5'te sunulmuştur. Örneğin, Şekil 2.5a'da gösterildiği üzere, hücre kültürleri standart kültür plakalarında çoğaltılmıştır. Alternatif elektrik alan, 1 mm mesafede yerleştirilmiş ve her bir tabanın altına sabitlenmiş 15 mm uzunluğundaki tamamen yalıtılmış tel çiftleri ile üretilmiştir. Bu teller, sinüs dalga sinyalleri üreten bir osilatöre ve yüksek voltajlı bir yükselteçe bağlanmıştır. Alternatif elektrik alan, tellerin bir sinyal üretici tarafından kontrol edilen yüksek gerilimli bir yükselteçe bağlanmasıyla uygulanmıştır [43]. Şekil 2.5b'de, genlik modülasyonlu elektromanyetik alanların üretimini sağlayan cihazın tasarımı gösterilmektedir. Frekans sentezleyici olarak, 10^{-7} hassasiyetinde frekans üretici olan AD9835 tabanlı Doğrudan Dijital Sentez (DDS) kullanılmıştır. Cihaz, bir batarya ile çalışan radyo frekansı (RF) elektromanyetik alan jeneratöründen oluşmaktadır. 27,12 MHz frekansta çalışan RF kaynağı yüksek seviyeli genlik modülasyonlu sınıf C yükselteçe karşılık gelmektedir. Çıkış sinyali, bir mikrodenetleyici olan AT89S8252 (Atmel, Fribourg, İsviçre) tarafından kontrol edilmektedir [44]. Şekil 2.5c'de, deney koşullarını hassas bir şekilde kontrol etmek ve hücreleri bir elektrik alan varlığında kültürlemek amacıyla geliştirilmiş bir mikroakışkan cihaz gösterilmektedir. Cihaz, gömülü uyarıcı elektrotlara sahip iki katmanlı cam alt tabakadan ve dokuz kare kültür odacığı içeren bir polidimetilsiloksan tabakasından oluşmaktadır (Şekil 2.5ci). Hücre kültürü cihazı (Şekil 2.5cii) dokuz kare kültür odacığı ($6 \times 6 \text{ mm}^2$) içermektedir. Şekil 2.5cii'de, alternatif elektrik alanına maruz kalan hücrelerin şematik bir gösterimi yer almaktadır [51].



Şekil 2.5. Alternatif elektrik alan maruziyet sistemlerinin elektronik altyapıları

Şekil 2.5d'de, alternatif elektrik alanın hücre ile etkileşimini incelemek amacıyla geliştirilmiş bir hücre kültürü AEA uygulama sistemi gösterilmektedir. Mikrodenetleyici modülü (MCM), dahili programlanabilir zamanlayıcılar kullanarak 200 kHz frekansta bir dijital sinyal üretmektedir. LC rezonans tankı, 7-10 Vpp sinyalini 200 kHz sinüs dalgasına dönüştürmektedir (Şekil 2.5di). Hücelere uygulanan elektrik alanın şiddeti, her bir kuyuda 1 ml kültür ortamı ile doldurulmuş bir 12-kuyucuklu plaka odasına yan taraflardan yerleştirilen iki kalkanlı elektrot kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 2.5dii, iii) [52].

Şekil 2.5e'de, basitleştirilmiş bir alternatif elektrik alan uygulama kurulumu gösterilmektedir. Hücre kültürlerine homojen bir elektrik alan uygulaması sağlamak amacıyla, hücre kültürü ortamına batırılmış dört paslanmaz çelik elektrottan oluşan bir tasarım geliştirilmiştir (Şekil 2.5ei). Sinyaller, fonksiyon üretici DG1022Z (Rigol Technologies, Pekin, Çin) aracılığıyla üretilmiştir. Sinyalleri elektrotlara yükseltmek ve değişken bir şekilde dağıtmak için özel olarak tasarlanmış bir devre kullanılmıştır (Şekil 2.5eii) [49].

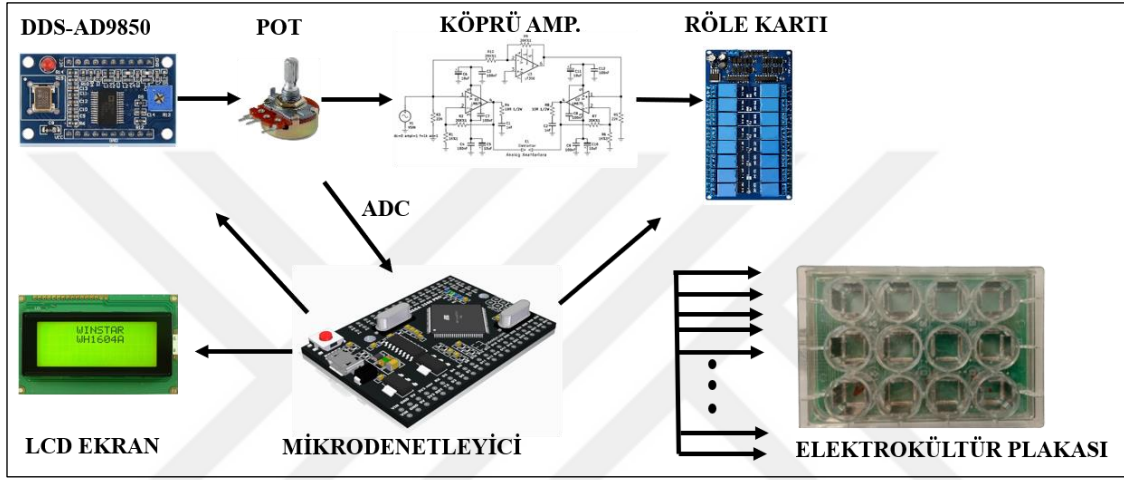
Şekil 2.5f'de, gerçek zamanlı hücre empedansı algılamalı bir *in vitro* elektrik alan maruz kalma cihazı geliştirilmiştir. Bu tasarım, alternatif elektrik alan sinyali üretmek için bir stimülasyon sistemi ve gerçek zamanlı hücre empedansı ölçmek için bir elektrik hücre-substrat empedans algılama (ECIS) sistemi olmak üzere iki entegre bileşen içermektedir (Şekil 2.fii). Stimülasyon sistemi için sinyal üretici olarak Doğrudan Dijital Sentez (DDS) entegresi AD9833 kullanılmıştır. Dalga formu AD8629 entegresi ile yükseltilmiş ve genlik seviyesi bir dijital potansiyometre aracılığıyla ayarlanmıştır. ECIS sistemi için çeşitli empedans ölçüm entegreleri ve yükselteç devreleri kullanılmıştır (AD5933, AD8629). Adresleme işlemleri için çoklayıcı birimi (ADG508) tercih edilmiştir. İki sistemin DC seviyelerinin uyumsuzluğu nedeniyle, her iki devrenin sinyal kesintisi olmadan düzgün çalışabilmesi için stimülasyon ve ECIS modları arasında geçiş yapmak üzere dörtlü bir SPST anahtarı (ADG442) kullanılmıştır (Şekil 2.5fi) [53].

Alternatif elektrik alan maruziyet sistemlerinin elektronik altyapıları, hücre kültürü ve elektriksel devrelerin hassas bir şekilde kontrol edilmesini sağlamak amacıyla çeşitli bileşenler ve tasarım stratejileri kullanılarak geliştirilmiştir. Bu literatür bilgilerinden yararlanılarak, bu tez kapsamında üretilen alternatif elektrik alan maruziyet sistemi daha etkin bir şekilde tasarlanmış ve geliştirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

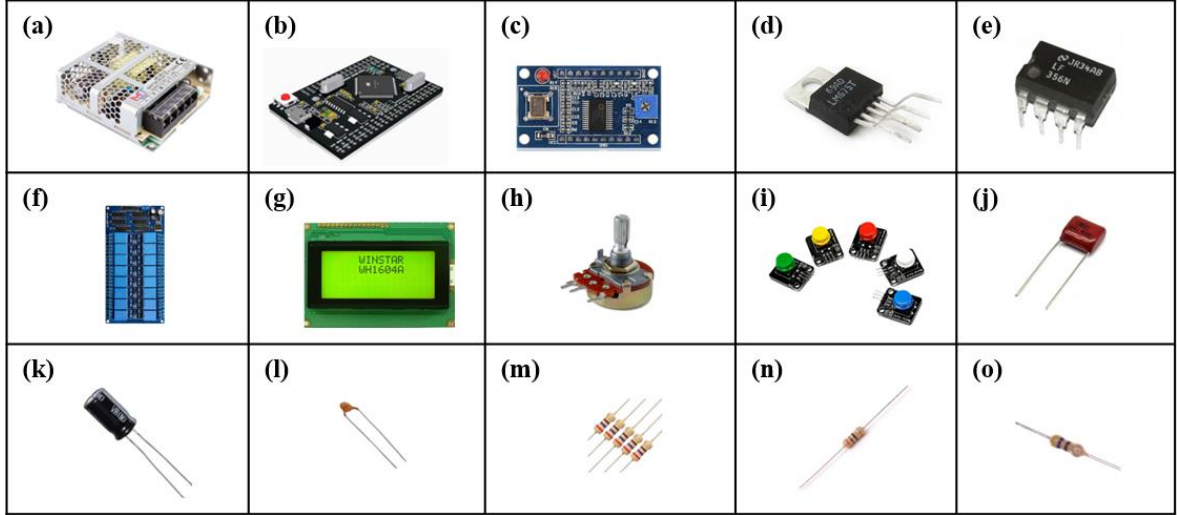
Bu bölümde tez çalışması için kullanılan materyaller ve özellikleri ile tasarım ve seçilen yöntem ilgili açıklamalar verilmiştir. Seçilen malzemelerin kriter tabloları ve seçim nedenleri “Bulgular ve Tartışma” bölümünde yer almaktadır.

3.1. Alternatif Elektrik Alan Sisteminin Tasarımı ve Üretimi



Şekil 3.1. Alternatif elektrik alan maruziyet sisteminin şematik gösterimi

Alternatif elektrik alan sisteminin şematik gösterimi Şekil 3.1'de sunulmuştur. Bu sistem; DDS (Direct Digital Synthesis) çipi (AD9850), potansiyometre, güç kaynağı, köprü yükselteç devresi (bridge amplifier), 16 kanallı röle kartı, mikrodenetleyici, LCD ekran ve butonlardan oluşmaktadır. Alternatif elektrik alan maruziyet sisteminin tasarımı ve üretiminde kullanılan malzemeler, Tablo 3.1'de "Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler" başlığı altında listelenmiştir. Ayrıca, Şekil 3.2'de deneysel çalışmalarda kullanılan malzemelerin görselleri verilmiştir. Frekans aralığı (100–500 kHz) AD9850 DDS çipi kullanılarak üretilmiştir. Elektrik alan seviyesini (1,5–11,63 V_{pk}/cm) ayarlamak için potansiyometre kullanılmıştır. Köprü yükselteç devresi, DDS'ten gelen sinyali iki katına çıkararak homojen elektrik alan çizgileri elde edilmesini sağlamıştır. Elektrik alan doğrultusu ise 16 kanallı röle kartı ile belirlenmiştir.

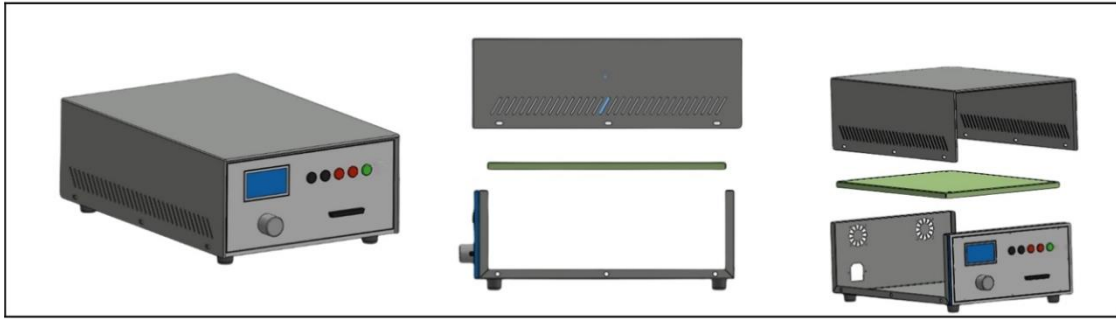


Şekil 3.2. Deneyisel çalışmalarda kullanılan malzemelerin görselleri. (a) güç kaynağı (12V, 5A), (b) mikrodeneleyici (Arduino Mega 2560 Pro Mini), (c) DDS (AD9850), (d) güç yükselteci (LM675), (e) opamp entegresi (LF356), (f) 16 kanallı röle kartı, (g) 4x16 LCD ekran, (h) potansiyometre, (i) butonlar, (j) 100 nanofarad kondansatör, (k) 10 mikrofaraad kondansatör, (l) 1 nanofarad kondansatör, (m) 1 kilohm direnç, (n) 10 kohm direnç, (o) 20 kilohm direnç

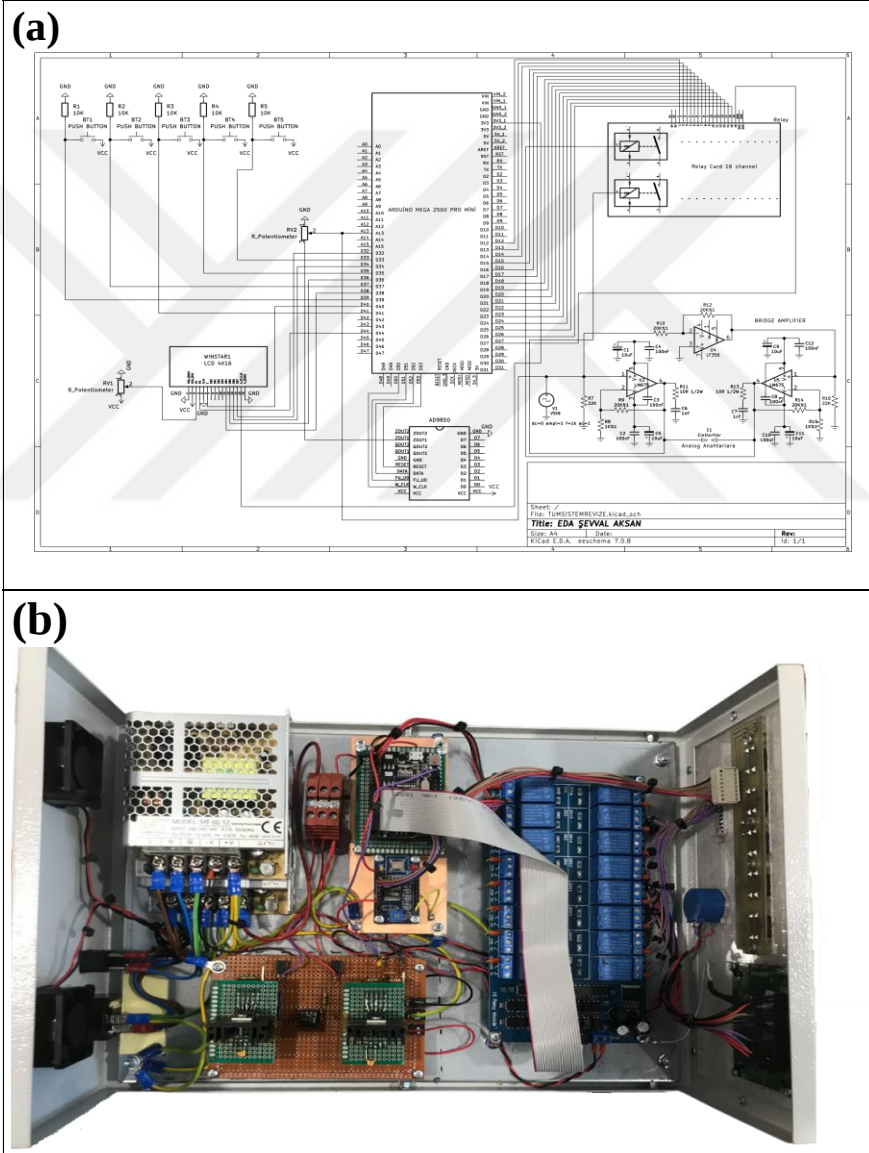
Tablo 3.1. Deneyisel çalışmalarda kullanılan malzemeler

Malzemeler	
LM675 (2 adet)	100 nanofarad kondansatör (6 adet)
LF356	Arduino Mega2560 pro mini
1 nanofarad kondansatör (2 adet)	12 V Güç Kaynağı (2 adet)
2 kilohm direnç (2 adet)	16 kanallı röle kartı
10 mikrofaraad kondansatör (4 adet)	AD9850 DDS Sinyal Jenaratörü 0-40 MHz
20 kilohm %1 direnç (4 adet)	5'li Buton Kartı
1 kilohm %1 direnç (2 adet)	Genlik ayar göstergesi
10 kilohm ½ W direnç (2 adet)	LCD ekran (4x16)

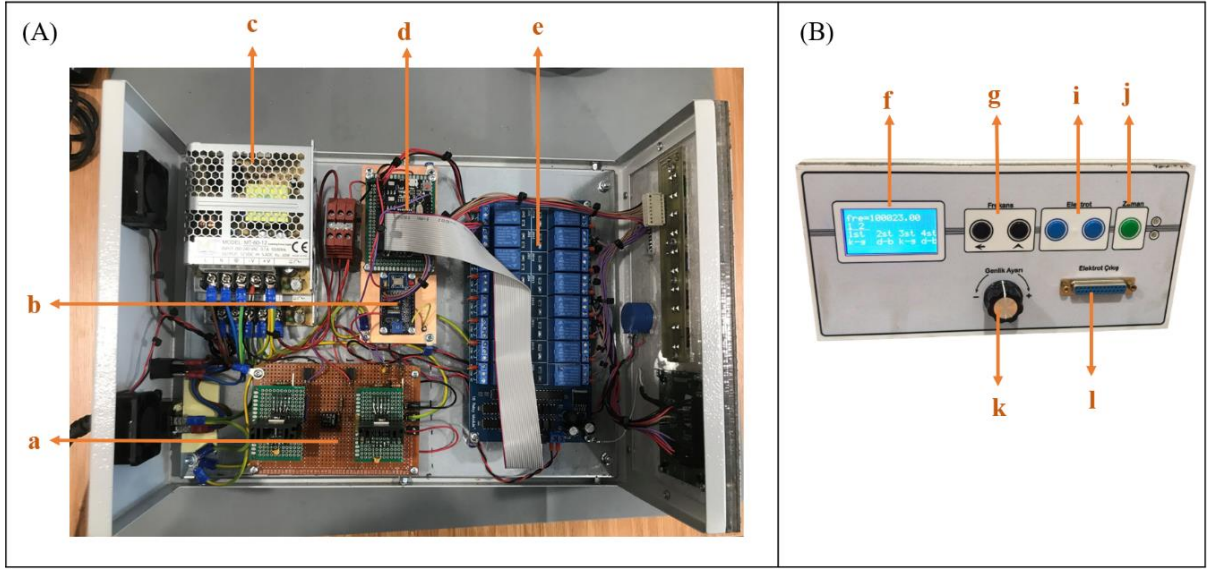
Şekil 3.3'te görüldüğü üzere, cihazın ön panelinde bir adet 4x16 LCD ekran, frekans ayarlamak ve elektrot seçmek için kullanılan 5 adet buton, elektrotlara giden bir çıkış ve elektrik alan seviyesinin ayarlanması için bir potansiyometre bulunmaktadır. Cihazın arka panelinde ise AC girişi ve sigorta yer almaktadır. Tasarlanan sistemin devreleri, tüm sisteme entegrasyonu ve kutulanması Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Şekil 3.5'te ise kutulanmış cihazın elektronik yapısı detaylı bir şekilde açıklanmaktadır.



Şekil 3.3. Cihazın prototip tasarımı



Şekil 3.4. (a) Tüm sistem devresi, (b) cihaz kutulanması



Şekil 3.5. (A) Cihazın elektronik yapısı, (b) cihazın ön paneli. (a) köprü yükselteç devresi, (b) dds-ad9850, (c) güç kaynağı (12v,5a), (d) mikrodenetleyici (arduino mega 2560 pro mini), (e) 16 kanallı röle kartı, (f) 4x16 lcd ekran, (g) frekans ayarlama butonları, (i) sürekli elektrot ayarlama butonları, (j) süreli elektrot ayarlama butonu, (k) potansiyometre, (l) elektrot çıkışı

Alternatif elektrik alan sisteminin tasarımı ve üretimi; alternatif elektrik alan kaynağı üretimi, homojen elektrik alan oluşum devresi, elektrik alan doğrultusu seçimi ve elektrokültür plaka üretimi aşamalarından oluşmaktadır. Bu aşamalar aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

3.1.1. Alternatif Elektrik Alan Kaynağı Üretimi

Alternatif elektrik alan kaynağı, 0–500 kHz frekans aralığında ve 1,5–11,63 V_{pk}/cm genlikte dijital olarak ayarlanabilen bir sinyal üretmektedir. Bu sistem, mikrodenetleyici (Şekil 3.2b) ve DDS (Direct Digital Synthesis) çipinden (Şekil 3.2c) oluşmaktadır. Sinyal genliğini ayarlamak için ayrıca bir potansiyometre (Şekil 3.2h) kullanılmaktadır. Bu bileşenler, ilgili alt başlıklar altında açıklanmıştır.

DDS (Direct Digital Synthesis, chip)

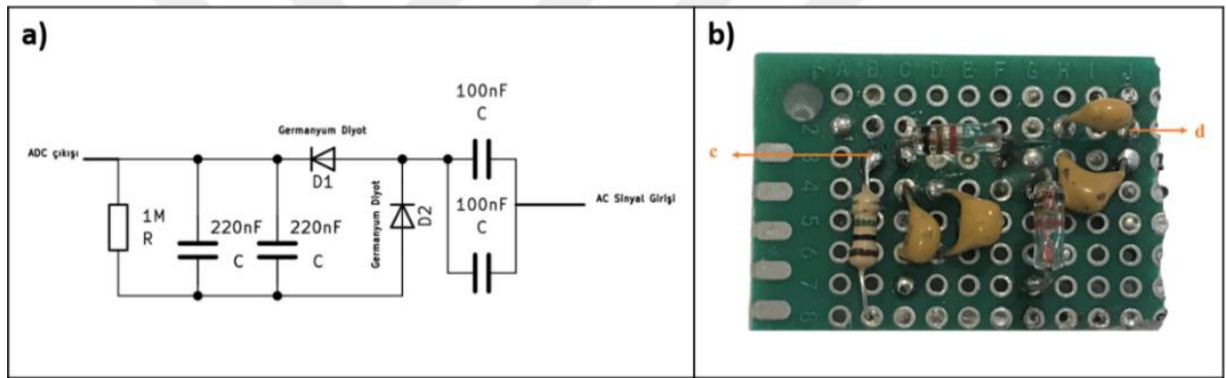
DDS çipleri, 1,0 Hz çözünürlükte ve MHz seviyelerine kadar sinüs veya kare dalga sentezleyebilen çiplerdir [54]. Arduino ile AD9850 DDS çipi (Şekil 3.5c), birçok sistemde birlikte kullanıldığından, tasarlamak istediğimiz sisteme uygun bulunmuştur. Sistem için gerekli olan malzeme kriterleri ve DDS çipinin özellikleri Tablo 4.2’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Mikrodenetleyici

Kontrol edilen entegre sayısının fazlalığı nedeniyle, mikrodenetleyici olarak kolay programlanabilen, çoklu portlara sahip ve kompakt bir yapıya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu gereksinimleri karşılamak amacıyla Arduino Mega 2560 Pro Mini (Şekil 3.5b) tercih edilmiştir.

Genlik Ayarı

Alternatif elektrik alan yoğunluğunu (1,5–11,63 V/cm) ayarlamak için bir potansiyometre kullanılmaktadır. DDS'ten gelen AC sinyalin DC sinyale dönüştürülüp Arduino entegresinin ADC girişinden (A3) okunabilmesi için diyot pompası devresi [55] kullanılmıştır. Diyot pompası devreleri Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Arduino tarafından okunan sinyal, LCD ekranda görüntülenmektedir.



Şekil 3.6. Diyot pompası devreleri, (a) diyot pompası devre şeması, (b) diyot pompası baskı devresi, (c) ADC çıkışı (d) AC sinyali girişi

3.1.2. Elektrik Alan Doğrultusu Seçimi

Elektrik alan doğrultusu seçimi, sürekli elektrot seçimi ve süreli elektrot seçimi olmak üzere iki ayrı mekanizmadan oluşmaktadır. Sürekli elektrot seçimi mekanizmasında, her sütun için iki yön seçeneği bulunmaktadır. Bu mekanizmada, her sütun için kuzey-güney veya doğu-batı yönlerinden biri seçilmektedir (Şekil 3.7a). Kuzey-güney yönü seçildiğinde, sütundaki tüm kuzey ve güney elektrotları aynı anda açılmakta; doğu-batı yönü seçildiğinde ise sütundaki tüm doğu ve batı elektrotları aynı anda açılmaktadır.

Tüm sütun seçimleri yapıldıktan sonra, belirlenen frekanslarda (100–500 kHz) hücrelere elektrik alan uygulanabilmektedir. Süreli elektrot seçimi mekanizmasında ise 10, 60, 120, 300 saniye sürelerinden biri seçilmektedir. Örneğin, 10 saniyelik süre seçildiğinde

sistem, her 10 saniyede bir kuzey-güney ve doğu-batı yönlerinde yön değiştirerek (polarize şekilde) çalışmaktadır. Şekil 3.7b'de ise elektro-kültür plakasının yön ve elektrot gösterimleri sunulmuştur.

Röle Kartı

Röle, akım geçtiğinde devreyi tamamlayan elektromanyetik bir devre elemanıdır. Röleler, yüksek güçlü alıcıları düşük akımlarla anahtarlama için kullanılır ve bu sayede kontrol devrelerini denetlenen cihazdan veya sistemden izole eder. Her bir rölede kontrol LED'leri bulunur ve röleler lojik 0 (0 V) ile tetiklenir. Röle kartının veri sayfasında belirtilen değerler Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Bu veri sayfasına göre, 12 V gerilimde bir rölenin çektiği akım (rated current) 30 mA'dir.

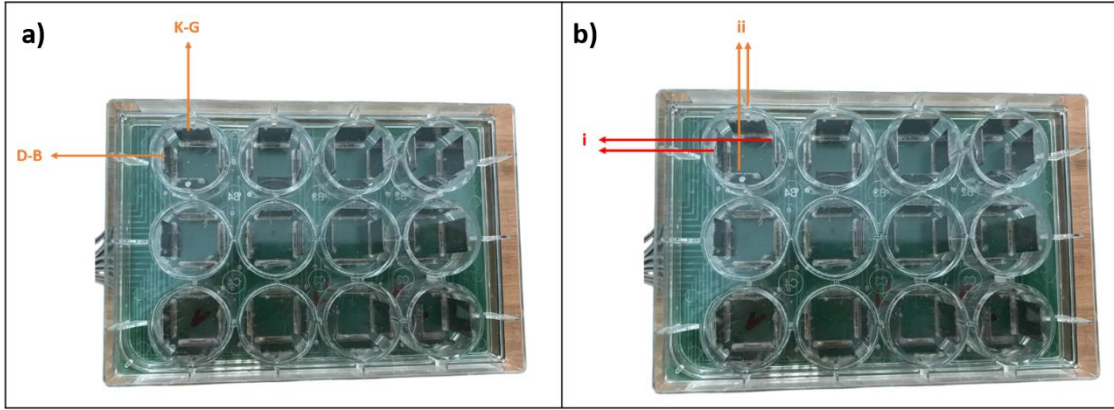
Elektro-kültür plaka ile alternatif elektrik alan maruziyet sistemi arasındaki bağlantı, Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Rölelerin verimli çalışabilmesi için gerekli olan akım değeri, her bir rölenin çektiği akım miktarına bağlıdır. 16 kanallı röle kartının toplam çektiği akım, Denklem 3.1 ile hesaplanabilir. Bu hesaplama, tüm devre için uygun bir güç kaynağı seçimi açısından kritik öneme sahiptir. Tablo 3.2'de, veri sayfasından alınan bilgiler doğrultusunda, rölenin akım çıkışı aşağıdaki şekilde hesaplanır:

$$\text{Toplam Çekilen Akım} = \text{Röle sayısı} \times \text{Bir rölenin çektiği akım değeri} \quad 3.1$$

$$I = 16 \times 30 \text{ mA} = 480 \text{ mA}$$

Tablo 3.2. Röle kartının veri sayfası değerleri

Nominal (VDC)	3	5	6	9	12	18	24	48	0,36W
Bobin Direnci ($\Omega \pm \%10$)	25	69	100	225	400	900	1600	6400	
Anma Akımı (mA)	120	71,4	60	40	30	20	15	7,5	
Max Çalışma Voltajı (VDC)	2,25	3,75	4,5	6,75	9	13,5	18	36	
Min Serbest Bırakma Voltajı (VDC)	0,15	0,25	0,3	0,45	0,6	0,9	1,2	2,4	
Max Uygulanabilir Voltaj	70°C’de nominal voltajın %130’u, 23°C’de ise nominal voltajın %170’i								



Şekil 3.7. Elektro-kültür plakasının yön ve elektrot gösterimleri. (a) Elektro-kültür plakasının yön gösterimi, kuzey-güney (K-G) yönü, doğu-batı (D-B) yönü. (b) Elektro-kültür plakasının elektrot gösterimi, (i) 1. sütunun doğu-batı (D-B) elektrotları, (ii) 1. sütunun kuzey-güney (K-G) elektrotları



Şekil 3.8. Elektro-kültür plaka ve alternatif elektrik alan maruziyet sistemi bağlantısı

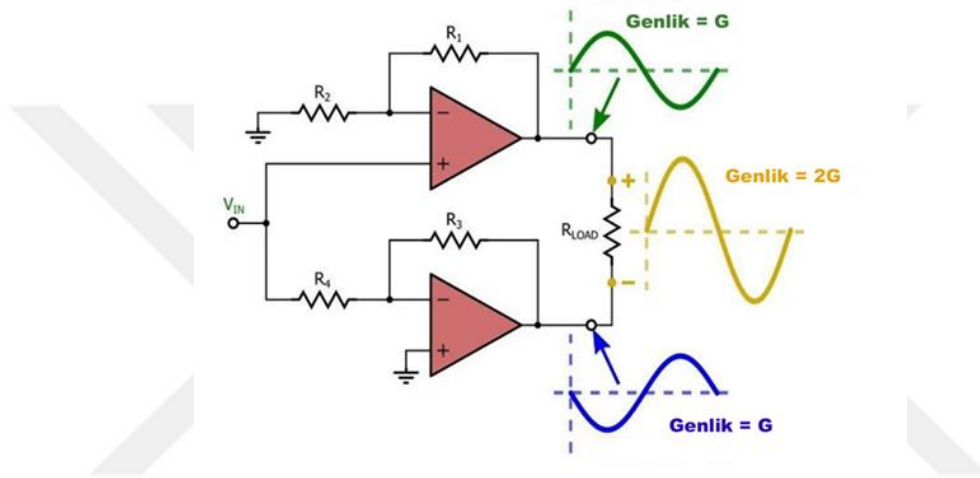
3.1.3. Homojen Elektrik Alan Oluşum Devresi

Tasarımda, 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında iki farklı doğrultuda elektrik alan oluşturulurken, seçilmeyen elektrotların mevcut elektrik alan çizgilerini bozmaması gerekmektedir. Örneğin, 1. sütun için kuzey-güney yönündeki elektrotlar kullanıldığında, doğu-batı yönündeki seçilmeyen elektrotların üretilen elektrik alanın çizgilerini etkilememesi sağlanmalıdır. Bu amaç doğrultusunda, homojen elektrik alan çizgileri

oluşturmak için köprü yükselteç (bridge amplifier) devresi tasarlanmış olup, devrenin ayrıntıları aşağıda sunulmuştur.

Köprü Yükselteç (Bridge Amplifier) Tasarımı

Güç yükselteçleri, belirli bir giriş sinyalinin genliğini yükselterek yük direncine daha fazla güç sağlamak amacıyla tasarlanır. Bu yükselteçler, tek yükselteç ve köprü yükselteç olmak üzere iki topolojiye ayrılır. Köprü yükselteçler, tek yükseltece kıyasla daha yüksek güç verimliliği sergiler. Aynı besleme gerilimi ile daha yüksek bir çıkış gücü üretebilirler [56].



Şekil 3.9. Temel köprü yükselteç devresi (R_1 , R_2 , R_3 : Farklı direnç değerleri, R_{LOAD} : Yük direnci) [57]

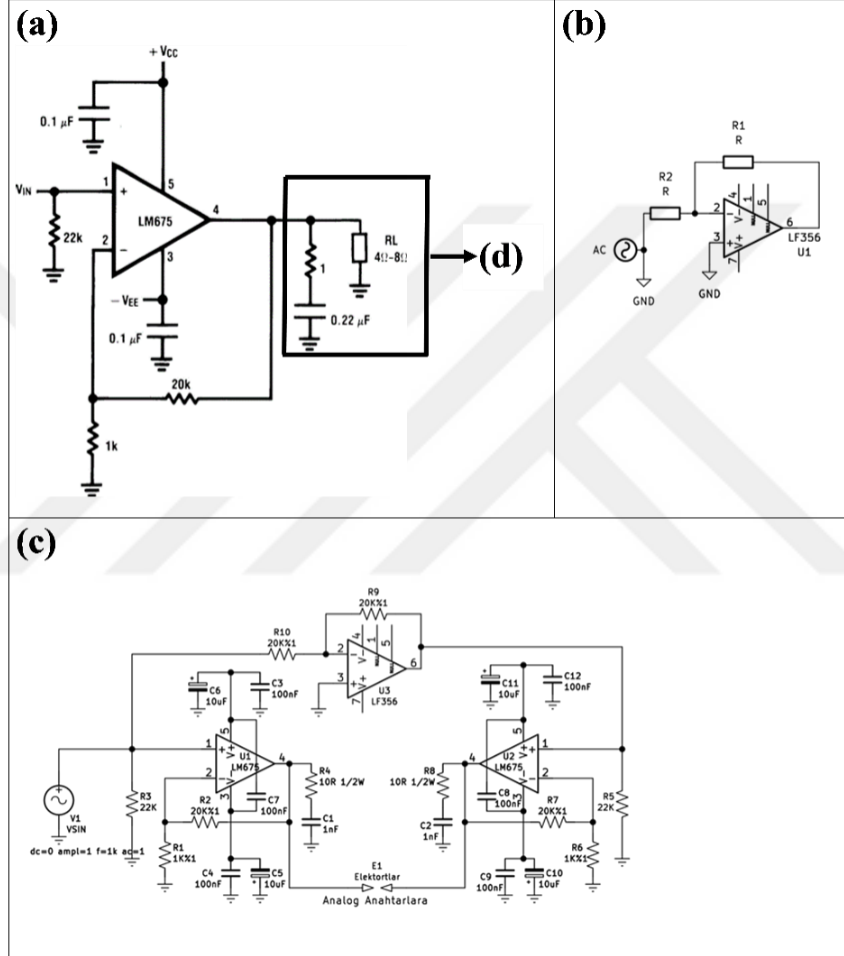
Temel bir köprü yükselteç devresi (Şekil 3.9), bir evirmeyen ve bir eviren yükseltecin giriş sinyaliyle beslenmesiyle oluşur. Dirençler, her iki yükseltecin kazancını aynı olacak şekilde seçilmektedir. Yük direnci, iki yükseltecin çıkışları arasına bağlanır ve toprak hattına doğrudan bir bağlantısı bulunmamaktadır. Bu düzenleme, köprü yükseltecin yük üzerindeki gerilimi iki katına çıkarmasını sağlar.

Cihaz tasarımında, 12-kuyucuklu hücre kültürü plakalarında iki farklı doğrultuda elektrik alan oluşturulurken, seçilmeyen elektrotların oluşan elektrik alan çizgilerini bozmaması sağlanmalıdır. Köprü yükselteç devresinin yüklerinin topraktan bağımsız olması, hücrelere uygulanan elektrik alanın homojenliğini temin eder. Köprü yükselteç, yük boyunca voltajda iki kat artış sağlayarak daha yüksek bir elektrik alan oluşumuna olanak tanır. Literatürde yapılan bir çalışmada, elektrotlar arasında oluşan akım değeri 155 mA olarak belirlenmiştir [49]. Sistemimizdeki akım çıkışı, bu 155 mA değeri ve 12-kuyucuklu plaka dikkate alınarak hesaplanmıştır (Denklem 3.2).

Akım Çıkışı = Elektrotlar arasında oluşan akım değeri $\times$ Kuyucuk sayısı 3.2

$$I=155 \text{ mA} \times 12 = 1860 \text{ mA}$$

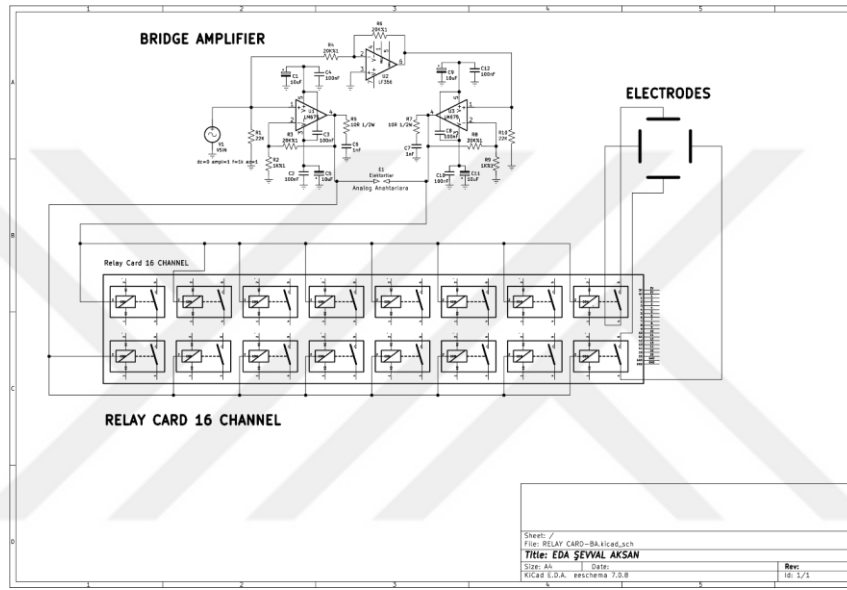
Hesaplamalara göre, tüm devreye en az 2 A akım çıkışı sağlayabilen bir veya birden fazla yükselteç gerekmektedir. Güç yükselteci olarak LM675 tercih edilmiştir. Aşağıda görülen köprü yükselteç tasarımı (Şekil 3.10), LM675 yükseltecinin veri dosyası (datasheet) incelenerek tasarlanmıştır [58].



Şekil 3.10. (a) LM675 evirmeyen yükselteç tasarımı, (b) LF356 eviren yükselteç tasarımı, (c) köprü yükselteç tasarımı (d) filtre devresi

Veri dosyasındaki çalışmalarda, LM675 yükselteci evirmeyen bir konfigürasyonda (Şekil 3.10a) kullanılmıştır. Tasarımda evirme işlemi, yaygın olarak kullanılan ve kolay erişilebilen LF356 ile gerçekleştirilmiştir. LF356'nın eviren yükselteç tasarımı, veri dosyasından alınarak Şekil 3.10b'de gösterilmiştir [59]. Tasarım, Şekil 3.10c'de görüldüğü gibi iki evirmeyen (LM675) ve bir eviren (LF356) yükselteçten oluşmaktadır. LM675

yükseltecinin çıkışında, şebeke gürültüsünden arındırmak amacıyla bir filtre (Şekil 3.10d) kullanılmıştır (LM675 veri sayfası). LM675 genellikle ses yükselteci tasarımlarında kullanılır ve 20 kHz bandında çalışır. Ancak, bu tez kapsamında 500 kHz bandında çalışılması gerektiğinden, filtre devresinin (Şekil 3.10d) kısa devre olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, veri sayfasındaki direnç ve kapasitör değerleri, tasarıma uygun olacak şekilde uyarlanmıştır. Tasarımı yapılan köprü yükselteç devresinin röle kartı ile bağlantısı Şekil 3.11’de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Röle kartı ve köprü yükselteç tasarımı

3.1.4. Elektro-kültür Plaka Üretimi

Elektro-kültür plakası üretimi, Uğur Düzen'in "*Elektro-kültür Plakanın Tasarımı, Üretimi ve Glioblastoma Hücrelerindeki Etkilerinin İncelenmesi*" başlıklı yüksek lisans tezi kapsamında tasarlanmış ve üretilmiştir. Bu bölümde, standart 12-kuyucuklu hücre kültürü plaka boyutlarına uygun olarak paslanmaz çelik elektrotlardan oluşan elektro-kültür plakalarının tasarımı ve üretimi ele alınmaktadır. Tasarımın amacı, her bir kuyucuk için dört paslanmaz çelik elektrot içeren bir elektro-kültür plakasının üretilmesidir. Bu hedef doğrultusunda, farklı yönlerde elektrik alan polarizasyonunun hücre tepkileri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla, 12-kuyucuklu elektro-kültür plakalarının her bir kuyucuğu, karşılıklı iki çift elektrot (toplam dört elektrot) içerecek şekilde tasarlanmıştır. Standart 12-kuyucuklu hücre kültürü plakası için modelleme, SolidWorks yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Hücresel Çalışmalar

200 kHz frekans ve 2,13 Vpk/cm alan yoğunluğunda üretilen alternatif elektrik alanlar 48 saat boyunca SH-SY5Y hücrelerine uygulanmış (Şekil 3.12) ve hücre kültürü ön deneyleri (hücre canlılığı) ile incelenmiştir. Hücre hattı, %10 (hacim/hacim: h/h) Fötal Sığır Serum (FBS) ve %1 antibiyotik çözeltisi (penisilin-streptomisin) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12 (DMEM-F12) besiyerinde kültüre edilmiştir. İnkübasyon işlemleri, 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda gerçekleştirilmiştir. Besiyeri 2-3 günde bir tazelenmiş ve hücreler %70-80 doygunluğa ulaştığında deneysel aşamalar için ekim işlemi yapılmıştır [60].



Şekil 3.12. Alternatif elektrik alan uygulaması (RWD D180 CO2 Incubator)



Şekil 3.13. Nikon Eclipse Ti2 Inverted Microscope

Tüm hücresel görüntüler, Nikon Eclipse Ti2 İverted Microscope (Şekil 3.13) ile elde edilmiştir. UV sterilizasyon işlemleri, biyolojik güvenlik kabini (Thermo Scientific MSC Advantage Class II) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Elektro-kültür plaka sterilizasyonu (Thermo Scientific MSC Advantage Class II, biyolojik güvenlik kabini),

3.2.1. Hücre canlılığı tespiti: MTT yöntemi

Hücre canlılıkları kolorimetrik bir test olan MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi ile belirlenmiştir. Canlı hücrelerde, mitokondriyal dehidrogenaz aracılığı ile tetrazolyum tuzlarının formazan kristallerine dönüşmesine dayanan MTT kolorimetrik bir test olup, ölçülen absorbans değerleri doğrudan canlı hücre sayısı ile orantılıdır [61]. Alternatif elektrik alan maruziyetinden sonra, hücrelere taze besiyerinde hazırlanmış 0,5 mg/mL MTT çözeltisi (5 mg/mL PBS içerisinde) ilave edilerek 3 saat 37°C’de bekletilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra, hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılarak ve her bir göze 100 µL izopropanol eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözeltinin optik yoğunluğu, 650 nm referans olmak üzere 570 nm’de mikropilaka okuyucu ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kontrol örneğinin absorbansı %100 kabul edilerek diğer gruplardan elde edilen absorbans değerleri, kontrol örneğinin absorbans değerine göre hesaplanarak ve % canlılık olarak ifade edilmiştir.

3.2.2. İstatistiksel Analiz

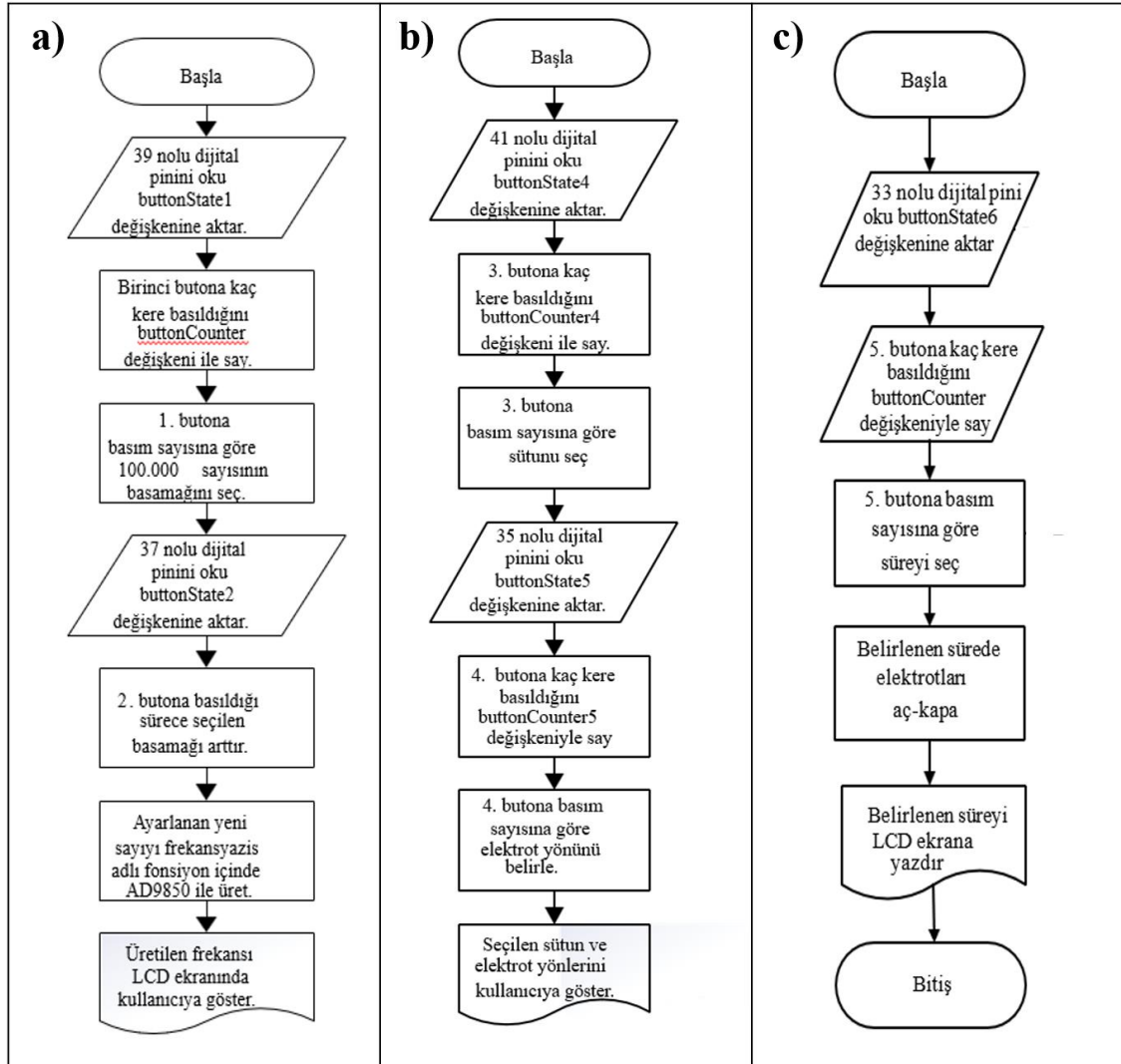
Hücre kültürü analizlerinde, veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Çalışma sonuçları, Graphpad Prism 8 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA) programı kullanılarak farklı grupların istatistiksel açıdan karşılaştırılması tek-yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık dereceleri, $p > 0,05$ (anlamlı değil), $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,001^{****}$ olarak değerlendirilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, tez çalışması için tasarlanan sistem ve devrelerin deneysel aşamalarında elde edilen bulgular sunulmuş ve sonuçlar tartışılmıştır. Ayrıca, devre tasarımları için belirlenen malzeme kriterleri açıklanmış, malzeme seçimlerinin nedenleri ve bu malzemelerin deneysel sonuçlara göre belirlenen kriterleri karşılama düzeyi detaylandırılmıştır.

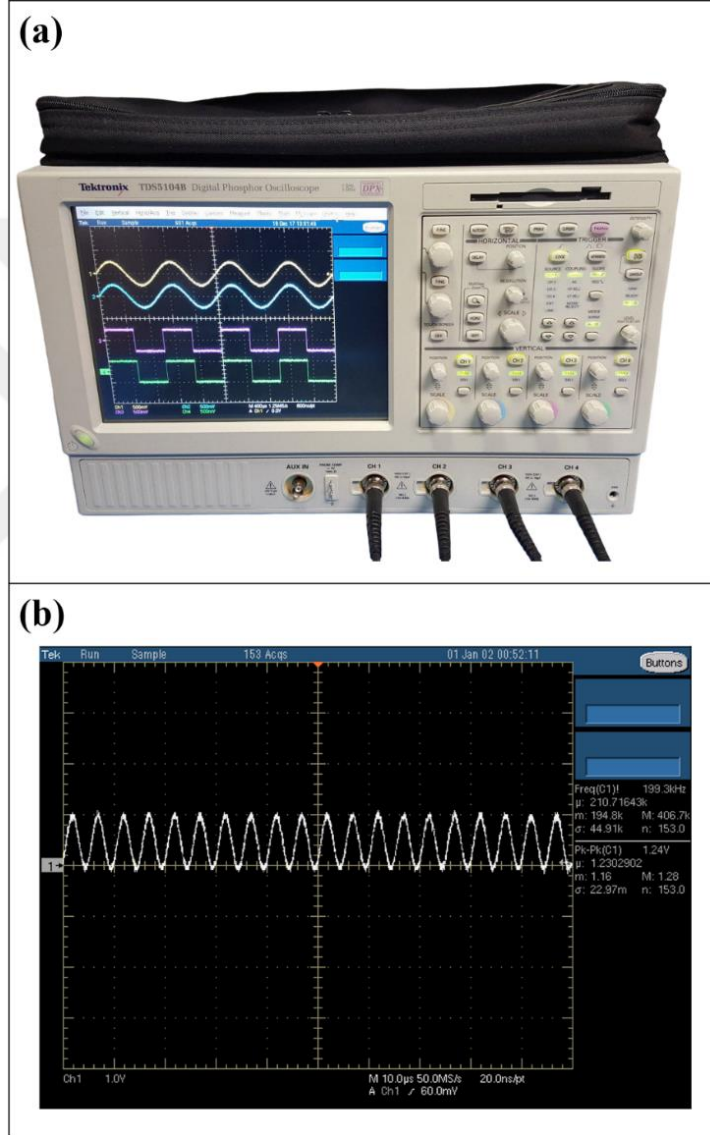
4.1. Alternatif Elektrik Alan Kaynağı Üretimi



Şekil 4.1. Yazılım algoritmaları (a) alternatif elektrik alan kaynağı üretimi algoritması, (b) sürekli elektrot seçim algoritması, (c) süreli elektrot ayarı algoritması

Tablo 4.1. DDS malzeme kriter tablosu

Kriterler	Malzeme Özellikleri
100kHz-500kHz aralığını 1 Hz kadar küçük çözünürlükle üretmelidir.	0-40 MHz aralığında 0,0291 Hz'e kadar çözünürlükle üretebilmektedir.
Sürekli sinüs üretmelidir.	2 sinüs dalgası ve 2 kare dalga çıkışı bulunmaktadır. Analog çıkış sinüs dalgası üretmektedir.
Arduino'nun tüm çipleri ile uyumlu çalışmalıdır.	Tüm Arduino çipleriyle birlikte çalışmaktadır. Frekans sinyal jeneratörü olarak birçok kez kullanılmıştır.



Şekil 4.2. Alternatif elektrik alan kaynağından üretilen sinyalin testi (a) osiloskop cihazı (TDS5104B), (b) 200 kHz sinyalin osiloskop görüntüsü

Hücre kültürü çalışmalarında, hücre sayısındaki azalma (hücre canlılık testleri), uygulanan alternatif elektrik alanının süresi, yoğunluğu ve frekansına bağlı olarak değişiklik

göstermektedir [49]. Alternatif elektrik alan kaynağı, 100–500 kHz frekans aralığında ve 1,5–11,63 V_{pk}/cm genlikte sinüs sinyalleri üretmektedir. Sistemin algoritması, Şekil 4.1’de şematik olarak sunulmuştur. Tasarlanan algoritmada, cihazın ilk iki butonu frekans ayarını gerçekleştirmek üzere yapılandırılmıştır. Birinci buton, frekans değerinin basamağını seçmek için, ikinci buton ise frekans değerini artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Ayarlanan frekans değeri, LCD ekranda görüntülenmektedir. Sinüs dalgalarını sentezlemek için, AD9850 DDS çipi, mikrodenetleyici tarafından protokolüne uygun şekilde komutlandırılmıştır.

Sinüs dalgasının sentezleme ve kontrol süreci detaylandırıldığında, öncelikle Arduino master kütüphanesi kullanılarak Arduino kodları ve protokolü ile istenilen frekans aralığı (100–500 kHz) tanımlanmış ve bu bilgiler DDS çipine komut olarak gönderilmiştir. Bu süreçte, farklı frekans değerlerinde sinyaller sentezlenmiş ve alternatif elektrik alan kaynağının sinyal durumu, cihazın validasyon testleri ile gözlemlenmiştir. Sinyal genliğinin ayarlanması için devre tasarımında bir potansiyometre (Şekil 3.2h) kullanılmıştır.

Bu sistemde, istenilen frekans, Şekil 3.5g’de gösterilen butonlar aracılığıyla ayarlanabilmektedir. AD9850, kolay temin edilmesi ve mevcut kütüphanesinin hazır bulunması nedeniyle tercih edilmiştir. Arduino-DDS kartı tarafından sentezlenen sinyallere örnek olarak, 200 kHz frekansında bir sinyal sentezlenmiş ve bu sinyal, osiloskop ekranında izlenerek doğrulanmıştır (Şekil 4.2b). Ölçümler, osiloskop cihazı (Şekil 4.2a) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DDS çipinden elde edilen sinyalin genliği (1,24 V) ve frekansı (200 kHz), osiloskop ile doğrulanmıştır. AD9850, Tablo 4.1’de belirtilen tüm kriterleri karşılamakta olup, Şekil 4.2’de gösterildiği üzere istenilen frekansları üretebilmektedir.

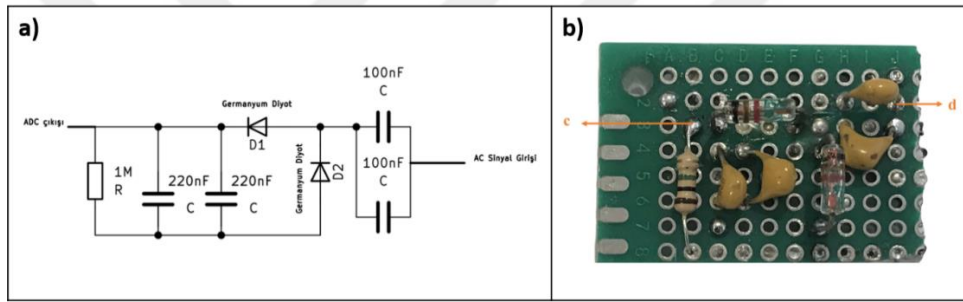
Literatürde, alternatif elektrik alan maruziyet sistemlerinin tasarımında, yüksek voltajlı amplifikatörler ve sinyal jeneratörlerine ek olarak çeşitli cihazlar ve devreler geliştirilmiştir [49, 52, 53]. Bu tez kapsamında ise, dijital olarak panel üzerinden kolayca kontrol edilebilen, masaüstü tek parça bir cihaz tasarımı geliştirilmiştir. Bu tasarım, kullanıcıya pratiklik ve kompakt bir çözüm sunmaktadır.

4.1.1. Genlik Ölçümü

Geliştirilen sistemde, alternatif elektrik alan yoğunluğunu (1,5–11,63 V/cm) ayarlamak için bir potansiyometre kullanılmaktadır [53]. DDS tarafından üretilen sinyalin genliğini ölçmek amacıyla, voltajı AC'den DC'ye dönüştüren basit bir diyot pompası devresi

kullanılmıştır. Diyot pompası, diğer karmaşık AC/DC dönüştürücülere göre daha basit ve ekonomik bir çözüm sunar. DDS'ten gelen AC sinyalin, Arduino entegresinin ADC girişinden (A3) okunabilmesi amacıyla DC sinyale dönüştürülmesi için bu devre tercih edilmiştir [55].

Diyot pompası devresinin şeması Şekil 4.3'te sunulmaktadır. Arduino tarafından okunan sinyal, LCD ekranda görüntülenmiştir. Cihaz ekranında gözlemlenen genlik değerleri temel alınarak, çeşitli hesaplamalar yapılmış ve sonuçlar doğrultusunda bir derecelendirme tablosu oluşturulmuştur (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3). Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te, 100 kHz ve 500 kHz frekanslarındaki ölçümlerde, diyot pompasından elde edilen analog veriler Arduino entegresinin ADC girişi ile okunmuş ve cihaz ekranında görüntülenmiştir. Bu tabloda belirtilen genlik değerleri referans alınarak, hücrelere uygulanacak alternatif elektrik alan parametreleri belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Diyot Pompası Devreleri, (a) diyot pompası devre şeması, (b) diyot pompası baskı devresi, (c) ADC çıkışı, (d) AC sinyali girişi

Tablo 4.2. 100 kHz genlik değerleri skala tablosu

Osiloskop Değeri DDS	Cihaz Göstergesi (Diyot pompası)	Genlik Değeri Elektro-kültür Plakası (Vpk)	Vpk/cm (Elektrotlar mesafe 1.6 cm)	Değeri arası
1,07 V	0,69	18,60	11,63 V/cm	
1,06 V	0,68	18,40	11,50 V/cm	
1,05 V	0, 67	18,00	11,25 V/cm	
1,05 V	0,66	17,80	11,13 V/cm	
1,03 V	0,65	17,60	11,00 V/cm	
1,00 V	0,64	17,40	10,88 V/cm	
0,99 V	0,63	17,20	10,75 V/cm	
0,98 V	0,62	17,00	10,63 V/cm	
0,97 V	0,61	16,80	10,50 V/cm	
0,96 V	0,60	16,40	10,25 V/cm	
0,95 V	0,59	16,20	10,13 V/cm	
0,94 V	0,58	16,00	10,00 V/cm	
0,95 V	0,57	15,80	9,88 V/cm	
0,93 V	0,56	15,60	9,75 V/cm	
0,90 V	0,55	15,40	9,63 V/cm	
0,89 V	0,54	15,20	9,50 V/cm	

0,88 V	0,53	14,80	9,25 V/cm
0,87 V	0,52	14,70	9,19 V/cm
0,86 V	0,51	14,60	9,13 V/cm
0,85 V	0,50	14,40	9,00 V/cm
0,84 V	0,49	14,20	8,88 V/cm
0,83 V	0,48	14,00	8,75 V/cm
0,81 V	0,47	13,80	8,63 V/cm
0,79 V	0,46	13,40	8,38 V/cm
0,78 V	0,45	13,20	8,25 V/cm
0,77 V	0,44	13,00	8,13 V/cm
0,76 V	0,43	12,60	7,88 V/cm
0,74 V	0,42	12,40	7,75 V/cm
0,73 V	0,41	12,20	7,63 V/cm
0,72 V	0,40	12,00	7,50 V/cm
0,70 V	0,39	11,60	7,25 V/cm
0,69 V	0,38	11,50	7,19 V/cm
0,68 V	0,37	11,40	7,13 V/cm
0,66 V	0,36	11,02	6,88 V/cm
0,65 V	0,35	10,80	6,75 V/cm
0,63 V	0,34	10,56	6,60 V/cm
0,62 V	0,33	10,40	6,50 V/cm
0,61 V	0,32	10,16	6,35 V/cm
0,59 V	0,31	9,920	6,20 V/cm
0,57 V	0,30	9,760	6,10 V/cm
0,56 V	0,29	9,520	5,95 V/cm
0,55 V	0,28	9,200	5,75 V/cm
0,54 V	0,27	8,960	5,60 V/cm
0,53 V	0,26	8,800	5,50 V/cm
0,52 V	0,25	8,560	5,35 V/cm
0,51 V	0,24	8,400	5,25 V/cm
0,50 V	0,23	8,160	5,10 V/cm
0,51 V	0,22	7,680	4,80 V/cm
0,49 V	0,21	7,520	4,70 V/cm
0,48 V	0,20	7,200	4,50 V/cm
0,57 V	0,19	7,040	4,40 V/cm
0,56 V	0,18	6,720	4,20 V/cm
0,55 V	0,17	6,560	4,10 V/cm
0,54 V	0,16	6,320	3,95 V/cm
0,53 V	0,15	6,020	3,76 V/cm
0,52 V	0,14	5,920	3,70 V/cm
0,51 V	0,13	5,680	3,55 V/cm
0,50 V	0,12	5,240	3,28 V/cm
0,49 V	0,11	5,000	3,13 V/cm
0,48 V	0,10	4,760	2,98 V/cm
0,47 V	0,09	4,520	2,83 V/cm
0,46 V	0,08	4,280	2,68 V/cm
0,45 V	0,07	4,000	2,50 V/cm
0,44 V	0,06	3,760	2,35 V/cm
0,43 V	0,05	3,480	2,18 V/cm
0,42 V	0,04	3,160	1,98 V/cm
0,41 V	0,03	3,040	1,90 V/cm
0,19 V	0,02	2,720	1,70 V/cm
0,18 V	0,01	2,400	1,50 V/cm

Tablo 4.3. 500 kHz genlik değerleri skala tablosu

Osiloskop Değeri DDS	Cihaz Gstergesi (Diyot pompası)	Genlik Değeri Elektro-kltr Plakası (Vpk)	V/cm Değeri (Elektrotlar arası mesafe 1,6 cm)
1,07 V	0,69	12,50	7,81 V/cm
1,06 V	0,68	12,45	7,78 V/cm
1,05 V	0, 67	12,40	7,75 V/cm
1,05 V	0,66	12,25	7,66 V/cm
1,03 V	0,65	12,20	7,63 V/cm
1,00 V	0,64	12,00	7,50 V/cm
0,99 V	0,63	11,69	7,30 V/cm
0,98 V	0,62	11,68	7,30 V/cm
0,97 V	0,61	11,67	7,29 V/cm
0,96 V	0,60	11,66	7,29 V/cm
0,95 V	0,59	11,65	7,28 V/cm
0,94 V	0,58	11,64	7,28 V/cm
0,95 V	0,57	11,63	7,27 V/cm
0,93 V	0,56	11,60	7,25 V/cm
0,90 V	0,55	11,40	7,13 V/cm
0,89 V	0,54	11,20	7,00 V/cm
0,88 V	0,53	10,96	7,48 V/cm
0,87 V	0,52	10,88	6,80 V/cm
0,86 V	0,51	10,80	6,75 V/cm
0,85 V	0,50	10,72	6,70 V/cm
0,84 V	0,49	10,56	6,60 V/cm
0,83 V	0,48	10,40	6,50 V/cm
0,81 V	0,47	10,32	6,45 V/cm
0,79 V	0,46	10,16	6,35 V/cm
0,78 V	0,45	9,920	6,20 V/cm
0,77 V	0,44	9,840	6,15 V/cm
0,76 V	0,43	9,600	6,00 V/cm
0,74 V	0,42	9,440	5,90 V/cm
0,73 V	0,41	9,280	5,80 V/cm
0,72 V	0,40	9,200	5,75 V/cm
0,70 V	0,39	9,120	5,70 V/cm
0,69 V	0,38	8,800	5,50 V/cm
0,68 V	0,37	8,640	5,40 V/cm
0,66 V	0,36	8,560	5,35 V/cm
0,65 V	0,35	8,400	5,25 V/cm
0,63 V	0,34	8,240	5,15 V/cm
0,62 V	0,33	8,080	5,05 V/cm
0,61 V	0,32	7,920	4,95 V/cm
0,59 V	0,31	7,680	4,80 V/cm
0,57 V	0,30	7,520	4,69 V/cm
0,56 V	0,29	7,320	4,58 V/cm
0,55 V	0,28	7,200	4,50 V/cm
0,54 V	0,27	7,040	4,40 V/cm
0,53 V	0,26	6,880	4,30 V/cm
0,52 V	0,25	6,640	4,15 V/cm
0,51 V	0,24	6,460	4,04 V/cm
0,50 V	0,23	6,320	3,95 V/cm
0,51 V	0,22	6,080	3,80 V/cm
0,49 V	0,21	6,000	3,75 V/cm
0,48 V	0,20	5,760	3,60 V/cm
0,57 V	0,19	5,600	3,50 V/cm
0,56 V	0,18	5,280	3,30 V/cm
0,55 V	0,17	5,080	3,18 V/cm

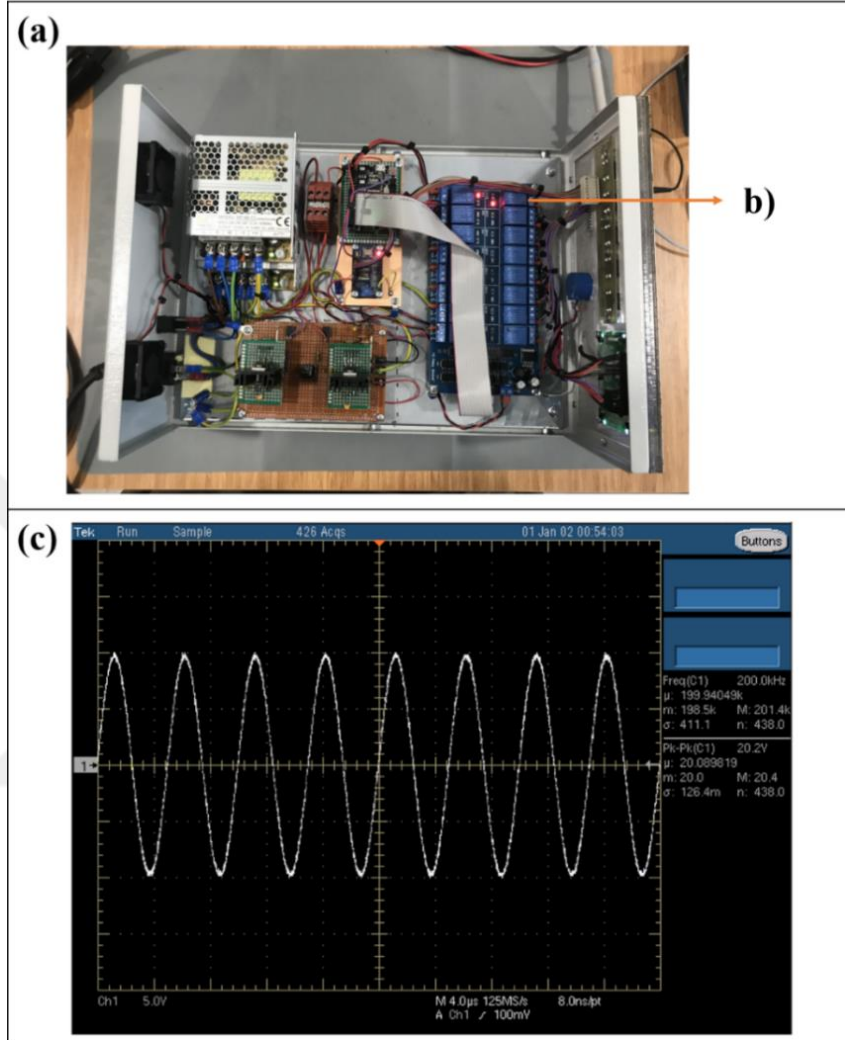
0,54 V	0,16	4,880	3,05 V/cm
0,53 V	0,15	4,680	2,93 V/cm
0,52 V	0,14	4,520	2,83 V/cm
0,51 V	0,13	4,320	2,70 V/cm
0,50 V	0,12	4,120	2,58 V/cm
0,49 V	0,11	3,960	2,48 V/cm
0,48 V	0,10	3,800	2,38 V/cm
0,47 V	0,09	3,600	2,25 V/cm
0,46 V	0,08	3,400	2,13 V/cm
0,45 V	0,07	3,200	2,00 V/cm
0,44 V	0,06	3,040	1,90 V/cm
0,43 V	0,05	2,800	1,75 V/cm
0,42 V	0,04	2,560	1,60 V/cm
0,41 V	0,03	2,320	1,45 V/cm
0,19 V	0,02	2,160	1,35 V/cm
0,18 V	0,01	1,960	1,23 V/cm

Cihaz ekranında görülen değerlere karşılık gelen elektrik alan yoğunluğunun değerleri, elektro-kültür plakası sütununda verilmiştir. Bu genlik değerinin pozitif tepe noktası (V_{pk}) ve elektrotlar arası mesafe (1,6 cm) kullanılarak, elektrotlara uygulanan alternatif elektrik alan yoğunluğu V_{pk}/cm cinsinden hesaplanmıştır. Genlik skala tabloları, başlangıç (100 kHz) ve bitiş (500 kHz) frekans değerlerine göre oluşturulmuştur. Ara frekans değerleri için genlik ayarlamaları, bu tablolardaki verilere dayanarak yapılmaktadır.

4.2. Elektrik Alan Doğrultusu Seçimi

12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında farklı doğrultularda elektrik alan oluşturmak amacıyla iki malzeme alternatifini değerlendirilmiştir. İlk olarak, analog anahtar (analog switch) entegresinin kullanılması planlanmış olup, bu uygulama için üç ana gereksinim belirlenmiştir. Bu gereksinimler frekans aralığı (100–500 kHz), akım kapasitesi (200 mA) ve bastırma oranı (1 MHz’de -60 dB’nin üzerinde) olmak üzere sıralanmaktadır. Ancak, bu gereksinimleri tam olarak karşılayan analog anahtar entegreleri oldukça sınırlıdır. Veri sayfaları incelenmiş ve MAX4603 CAE analog anahtar entegresi test edilmiş, ancak yeterli bastırma oranına sahip olmadığı için (100 ohm yük altında -56 dB) uygun bulunmamıştır. Bu durum karşısında, ikinci alternatif olarak 16 kanallı röle kartı tercih edilmiştir. Röle kartı, Arduino'nun tüm entegreleriyle kolaylıkla adreslenebilmekte olup, bu çalışmada istenilen elektrotların aktive edilmesi için kullanılmıştır. Ancak, 16 kanallı röle kartının analog anahtarlara kıyasla tek dezavantajı, daha fazla alan kaplamasıdır; bu durum, cihazın toplam boyutunu artırmıştır. Elektrik alan doğrultusu seçimi, iki farklı mekanizma ile

gerçekleştirilir: sürekli elektrot seçimi ve süreli elektrot seçimi. Bu iki yöntem için kullanılan elektrot seçim algoritmaları, Şekil 4.1b ve Şekil 4.1c'de gösterilmektedir.



Şekil 4.4. (a) Elektrik alan doğrultusu seçim testi, (b) röle kartı, 1 ve 16 numaralı röleler aktifken, (c) 200 kHz sinyalin osiloskop görüntüsü

Köprü yükselteç devresi ile güçlendirilen sinyal doğrulandıktan sonra, röleler aracılığıyla farklı doğrultularda (Kuzey-Güney (K-G) ve Doğu-Batı (D-B) doğrultuları) konumlandırılmış elektrotlara yönlendirilmiştir. Elektrik alan doğrultusu seçiminin sinyal durumu, cihazın validasyon testleri ile değerlendirilmiştir. Osiloskopta, 1 ve 16 numaralı rölelere yönlendirilen sinyalin frekansı 200 kHz, genliği ise 20,2 V olarak gözlemlenmiştir. Şekil 4.4b'deki elektrik alan doğrultusu seçim testinde, 1 ve 16 numaralı rölelerin aktif olduğu görülmektedir; bu durum, 12-kuyucuklu elektro-kültür plakasının ilk sütunu için K-G doğrultusunda elektrotların seçildiğini göstermektedir. Sinyalin, DDS tarafından üretilip

köprü yükselteç devresi ile güçlendirilerek ilk sütundaki K-G elektrotlarına ulaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4c). Test sonuçlarına göre, röle kartı malzeme seçim kriterlerini başarıyla karşılamaktadır.

4.3. Homojen Elektrik Alan Oluşum Devresi

Tasarlanan köprü yükselteç ve 16 kanallı röle kartının birlikte çalışması (Şekil 3.11) homojen elektrik alan çizgilerinin oluşmasını sağlamaktadır. Ayrıca, köprü yükselteç devre yapısında yüklerin topraktan bağımsız olması, hücrelere uygulanan elektrik alan çizgilerinin homojenliğine katkı sağlamıştır. Tasarlanan köprü yükselteç devresinin şeması Şekil 4.5a’da gösterilmektedir. Bu tasarım için uygun bir yükselteç seçimi yapılmıştır ve seçimde Gain Bandwidth Product (GBP) değeri kritik bir parametre olarak değerlendirilmiştir. GBP, bir yükseltecin kazancının bant genişliği ile çarpımını ifade eder ve yükseltecin performansını belirleyen önemli bir ölçüttür. GBP, yükseltecin hangi kazançta en yüksek frekansta çalıştırılabileceğini gösterir. Örneğin, GBP değeri ne kadar yüksekse, yükselteç o kadar yüksek frekansta çalışabilirken, kazanç da o kadar düşük olabilir.

Homojen elektrik alan devresi üretiminde kullanılacak malzeme seçimi için iki alternatif plan değerlendirilmiştir ve bu alternatiflere yönelik planlama Tablo 4.4’te gösterilmektedir. A planı doğrultusunda, her bir röle için bir işlemsel yükselteç (opamp) paketi olmak üzere toplam 12 opamp paketi kullanılması planlanmıştır. Ancak mevcut opampların Gain Bandwidth Product (GBP) değeri (1 MHz), akım kapasitesi (200 mA) ve besleme voltajı (15 V) gibi özelliklerinin sınırda olması nedeniyle bu plan tercih edilmemiştir. Bunun yerine, baskılı devre tasarımının ve entegre temininin kolaylığı, ayrıca tasarımın daha az yer kaplaması gibi avantajlar göz önünde bulundurularak, B planı olan tek bir güç yükselteci kullanımının daha uygun olduğuna karar verilmiştir.

Denklem 3.2’deki hesaplamalara göre, malzeme seçimi için tüm devreye en az 2 A akım sağlayabilen bir güç yükselteci gerekmektedir. Ayrıntılı malzeme kriterleri ve seçilen malzemenin özellikleri, güç yükselteci malzeme isterler tablosunda (Tablo 4.5) sunulmuştur. Tablo 4.4’te belirtilen kriterlere göre, OPA548 ve LM675 olmak üzere iki seçenek öne çıkmaktadır.

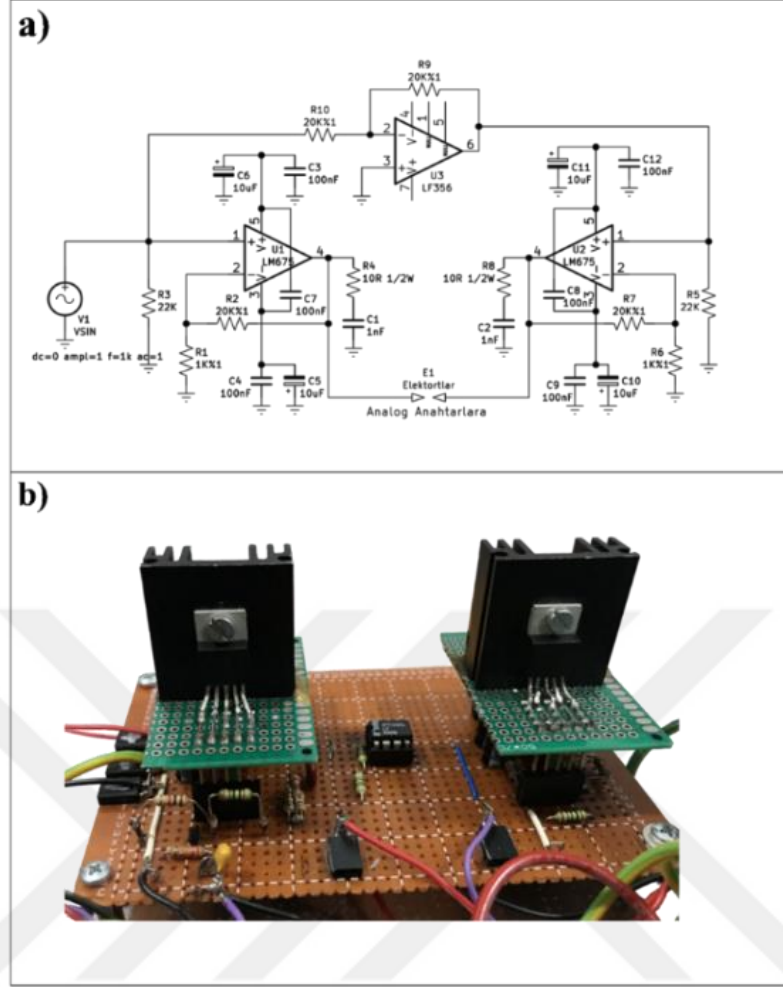
Tablo 4.4. Alternatif planlama tablosu

A planı	B planı
Her bir röleye en az 200mA veren bir opamp bulmak.	Tüm devreye en az 2A verebilen bir güç yükselteci bulmak
Opamp paketi kanal sayısı 4 olmalıdır (en az 4 opamp içermelidir).	1 veya 2 kanal içerebilir (1 veya 2 yükselteç içerebilir).
Literatür araştırmalarına göre uygulanan elektrik alan ortalama 2V/cm dir. Buna göre opampın besleme voltajı en az 15V olmalıdır.	Literatür araştırmalarına göre uygulanan elektrik alan ortalama 2V/cm dir. Buna göre yükseltecin besleme voltajı en az 15V olmalıdır.
İşlemsel yükseltecin 'Gain Bandwidth Product (GBP) değeri' 1MHz ve üzeri olmalıdır	İşlemsel yükseltecin 'Gain Bandwidth Product (GBP) değeri' 1MHz ve üzeri olmalıdır.

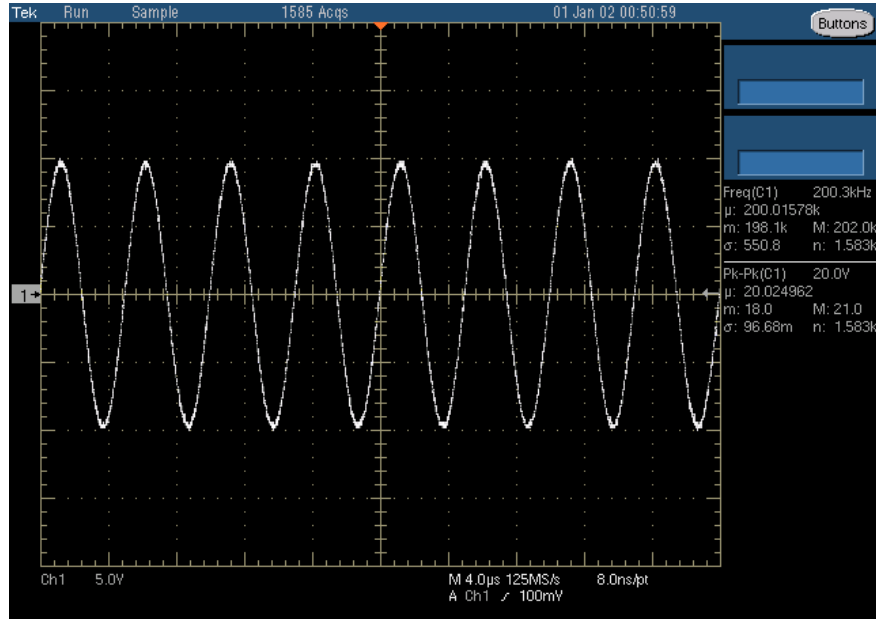
Tablo 4.5 Güç yükselteci malzeme isterler tablosu

Güç yükselteci malzeme isterler tablosu	
Kriterler	Malzeme Özellikleri
İşlemsel yükseltecin 'Gain Bandwidth Product değeri' 1 MHz ve üzeri olmalıdır.	5.5 MHz Gain Bandwidth Product'a sahiptir.
Tüm devreye en az 2 A verebilen bir opamp olmalıdır.	3 A Akım kapasitesine sahiptir.
Literatür araştırmalarına göre uygulanan elektrik alan ortalama 2 V/cm dir. Buna göre opampın besleme voltajı en az 15 V olmalıdır.	Supply Voltage = ± 30 V Aralığında çalışır.
Köprü Yükselteç uygun olmalıdır.	Çeşitli ses yükselteci ve köprü devre devrelerinde kullanılmıştır

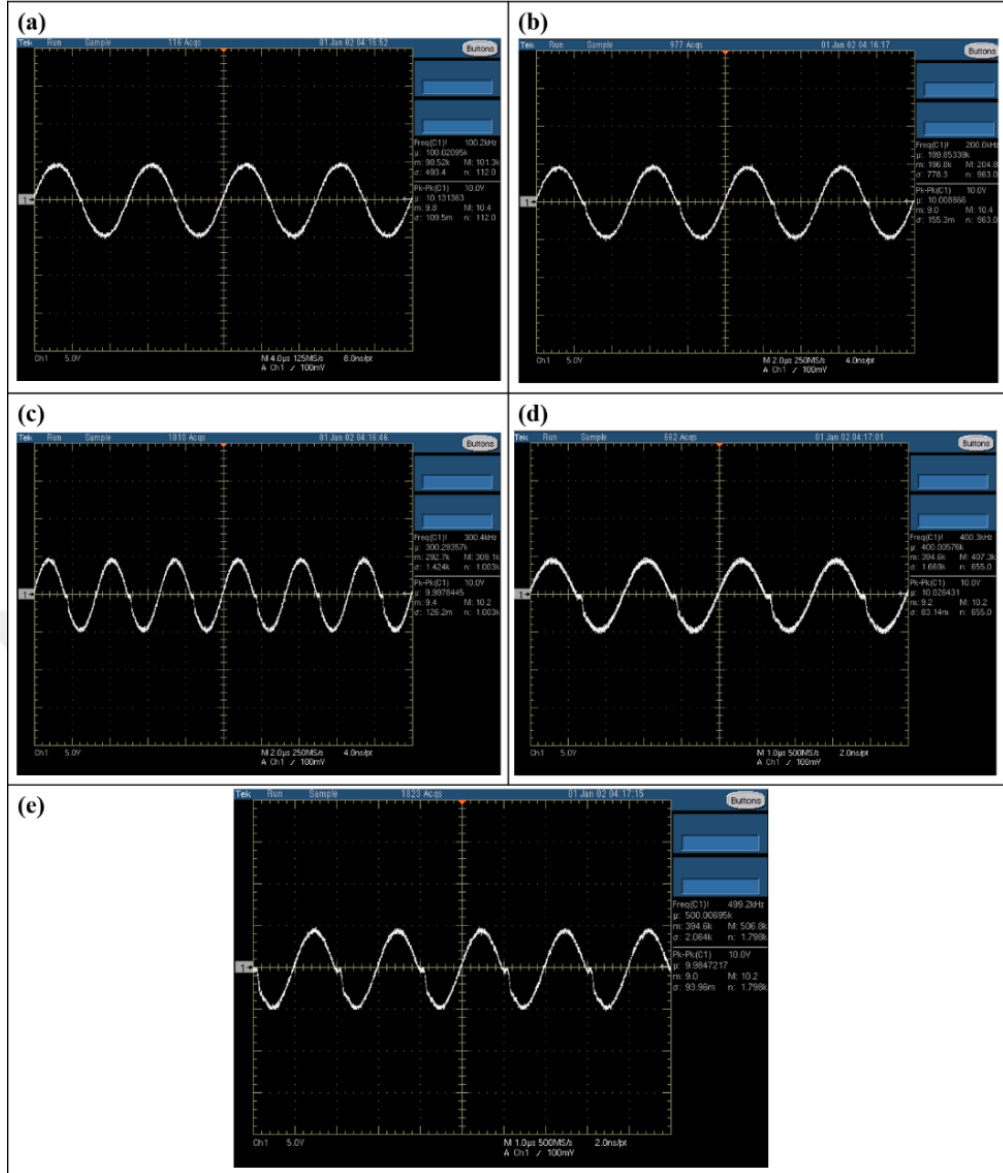
Batista ve ark. (2023) çalışmasında çeşitli güç yükselteçlerini karşılaştırmış ve OPA548 ile LM675'in de dahil olduğu bu yükselteçlerin özelliklerini tablo halinde sunmuştur. Bu tabloların ve LM675'in veri sayfasının incelenmesi sonucunda, LM675 güç yükselteci (Şekil 3.2d) seçilmiştir. LM675'in veri sayfası ve bu karşılaştırmalar incelenerek, LM675 (Şekil 3.2d) seçilmiştir. LM675, düşük maliyetli bir güç yükselteci olarak öne çıkmaktadır. Teknik özelliklerine göre, LM675'in giriş voltajı ± 30 V ile sınırlıdır ve çıkış akımı ± 3 A'ya kadar ulaşabilmektedir [62]. LM675 kullanılarak Şekil 4.5b'de gösterilen köprü yükselteç devresi kurulmuş ve sistem, yük olmadan test edilmiştir. Test sonuçları, Şekil 4.6'daki sinyalde gösterilmektedir.



Şekil 4.5. Köprü yükselteç devresi, (a) köprü yükselteç devre şeması, (b) köprü yükselteç devre kurulumu



Şekil 4.6. Köprü yükseltecin 200 kHz sinyal görüntüsü (yük olmadan).



Şekil 4.7. Köprü yükselteç devresinin 10 ohm'luk yük altında sinyal görüntüleri, a) 100 kHz frekansta, b) 200 kHz frekansta, c) 300 kHz frekansta, d) 400 kHz frekansta, e) 500 kHz frekansta

Bu tez kapsamında, DDS çipinden çıkan sinyalin genlik (1,24 V) ve frekansı (200 kHz) osiloskop (TDS5104B) ile doğrulanmış, sinyaller köprü yükselteç devresinin yardımıyla yükseltilmiştir. Elde edilen sinyal frekansı 200 kHz ve genliği 20 V gözlenmiştir. Buna göre 1,24 olan DDS sinyalini yaklaşık 20 kat yükselttiği görülmektedir. Buna göre köprü yükselteç devresi teorikteki değerleri tam anlamıyla karşılamaktadır.

LM675 güç yükseltici, 10 ohm yük altında test edilmiştir. Seçilen LM675 güç yükselticiyle kurulan köprü yükselteç tasarımının, veri sayfasındaki değerleri sağladığı ve malzeme kriter tablosundaki (Tablo 4.5) gereksinimleri karşıladığı, Şekil 4.7'deki sinyallerde gözlemlenmiştir. Teknik gereksinimleri karşılarken aynı zamanda daha düşük

maliyetli olması, LM675'in tercih edilmesinde önemli bir faktör olmuştur. Bu sistemdeki yük, hücrelerin toplamda oluşturacağı akımdır.

Her sıvının içerdiği iyon miktarına bağlı olarak iletkenliği değişmektedir. Elektrotların yerleştirildiği sıvının iletkenliğine göre, akımın nanoamper (nA) seviyelerinden 200 miliamper (mA) aralığına kadar değişebileceği bilinmektedir. Hücrelerin oluşturacağı toplam akımın yaklaşık 2 A seviyelerinde olacağı öngörülmektedir. Bu nedenle, tüm sistemin 1 A gibi ortalama bir değer altında test edilmesi uygun görülmüştür.

Tüm bu devre tasarımları için uygun bir güç kaynağı gerekmektedir. Güç kaynağı seçilirken, 16 kanallı röle kartı (Denklem 3.1) ve tasarlanan tüm devrelerin toplam çektiği akımlar ve çalışma voltajları dikkate alınmıştır. Ayrıca, köprü yükselteç tasarımında hesaplandığı üzere (Denklem 3.2), akımın 2 A'e kadar çıktığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, 12 V 5 A güç kaynağı (Şekil 3.2a) seçilmiştir. Düşük voltajlı iki güç kaynağı kullanımı, daha fazla elektrik alan sağlamanın yanı sıra entegrelerin ısı üretimini azaltarak, bileşenlerin daha verimli çalışmasını mümkün kılar. Tüm devre elemanları bir araya getirildikten ve sistem montajı tamamlandıktan sonra, hücresel çalışmalar aşamasına geçilmiştir.

4.4. Hücresel Çalışmalar

Bu çalışmada insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) kullanılmıştır. SH-SY5Y hücrelerine alternatif elektrik alan uygulama protokolü aşağıda verilmiştir.

4.4.1. Alternatif Elektrik Alan uygulaması

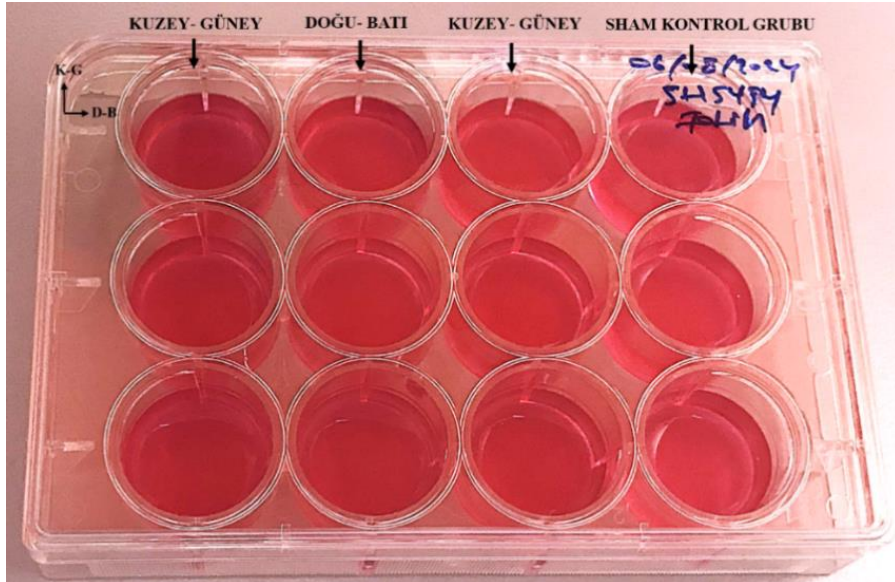
Alternatif elektrik alan daha önce çeşitli tümör hücre hatlarına uygulanmıştır [13, 24, 35, 43, 49]. Bununla birlikte, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerini elektriksel olarak uyarmak için literatürde yalnızca DC akım uygulamaları rapor edilmiştir [63]. SH-SY5Y hücrelerine AC sinyal verilmesi ve alternatif elektrik alan uygulamaları üzerine ise henüz bir çalışma bulunmamaktadır.

Genel olarak, literatürde çeşitli tümör hücre hatlarına 200 kHz frekans ve 2 V/cm genlikte alternatif elektrik alan uygulanmıştır [13, 24, 35, 43, 49]. Alternatif alan yoğunluğu genellikle 2 V/cm olarak belirtilse de, beyin kanseri için bu yoğunluk yaklaşık ~2,45 V/cm olarak rapor edilmektedir [64]. Alan yoğunluğu, alternatif elektrik alanının etkinliği açısından kritik bir faktördür; çünkü *in vitro* deneylerde alan yoğunluğunun 1 V/cm'den 2 V/cm'ye yükseltilmesi durumunda kanser hücre sayısında önemli bir azalma olacağı öngörülmektedir

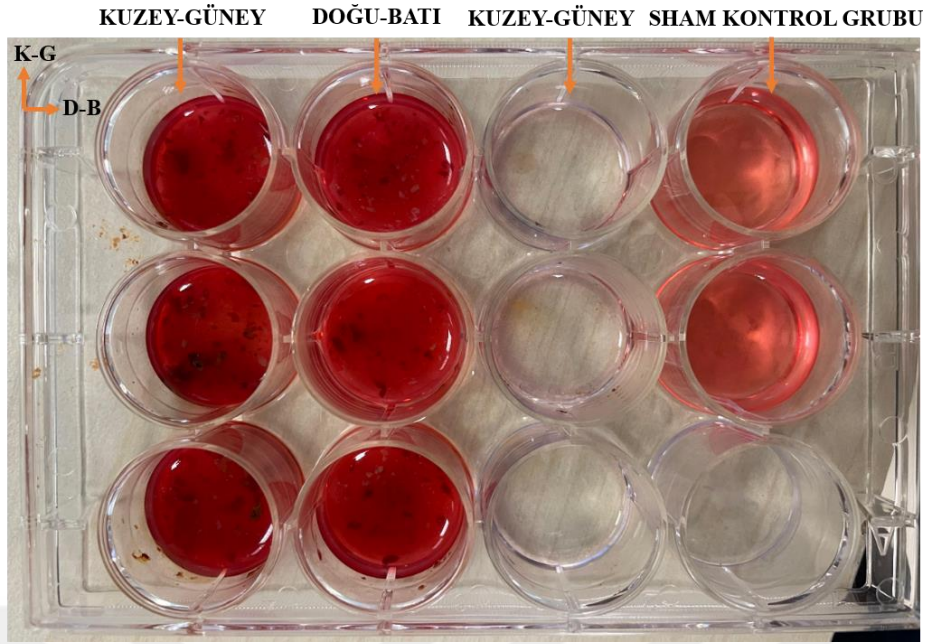
[65]. Örneğin, sıçan glioma hücreleri, 2,25 V/cm'lik alternatif elektrik alana 24 saat maruz bırakıldıklarında proliferasyonun durduğu gözlemlenmiştir [43].

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen hücresel çalışmalar için, elektro-kültür plakası önce etil alkol ile temizlenmiş ve ardından 20 dakika boyunca UV sterilizasyonuna tabi tutulmuştur (Şekil 3.13). SH-SY5Y hücrelerinin 12'li kültür plakasına ekimi yapılmış ve alternatif elektrik alan uygulama yönleri belirlenmiştir (Şekil 4.8). SH-SY5Y hücrelerine, 200 kHz frekans ve 2,13 Vpk/cm elektrik alan yoğunluğunda, 48 saat boyunca kesintisiz olarak alternatif elektrik alan uygulanmıştır.

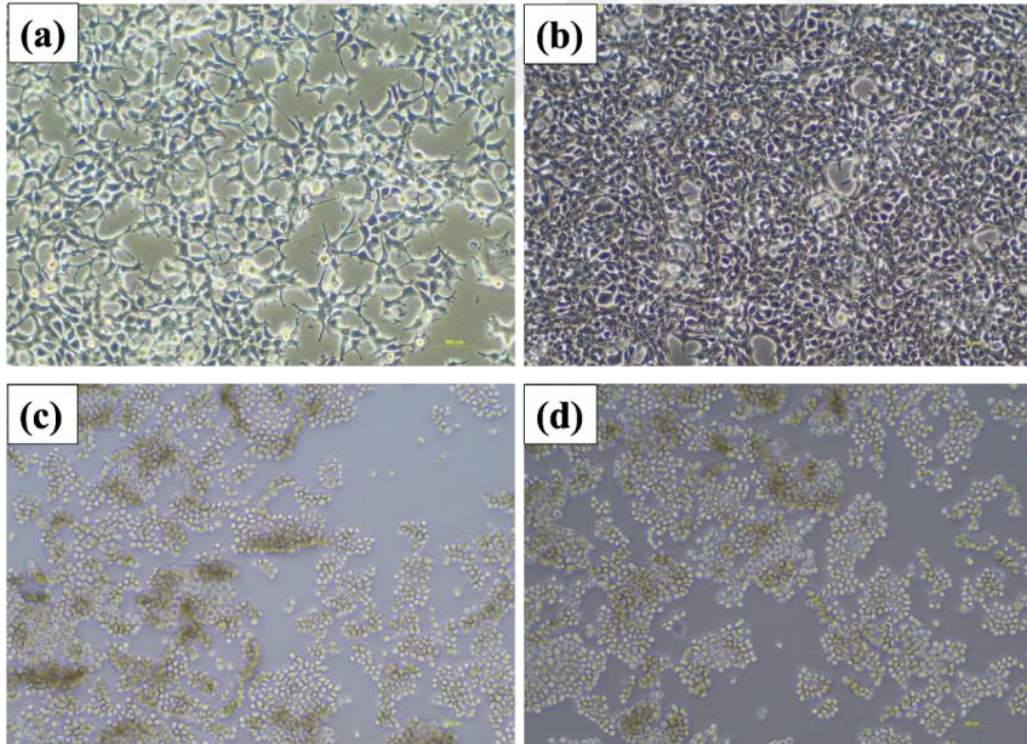
Bu uygulama sonrasında, SH-SY5Y hücrelerinde toksik etkiler ve siyah noktalar gözlemlenmiştir (Şekil 4.9). Bu etkilerin, elektrik alan yoğunluğunun yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Şekil 4.12 ve Şekil 4.13, alternatif elektrik alanın 48 saatlik uygulamasının ardından elde edilen hücrelerin inverted mikroskop görüntülerini ve MTT sonuçlarını göstermektedir. Hücresel görüntülerde, kontrol grubuna (Şekil 4.10a) ve sham kontrol grubuna (Şekil 4.10b) ait hücrelerin canlılığı net bir şekilde gözlemlenmiştir. SH-SY5Y hücrelerine kuzey-güney yönünde 48 saat boyunca uygulanan alternatif elektrik alan sonucunda elde edilen hücresel görüntüler Şekil 4.10c'de, doğu-batı yönündeki uygulama sonucunda elde edilen görüntüler ise Şekil 4.10d'de sunulmaktadır.



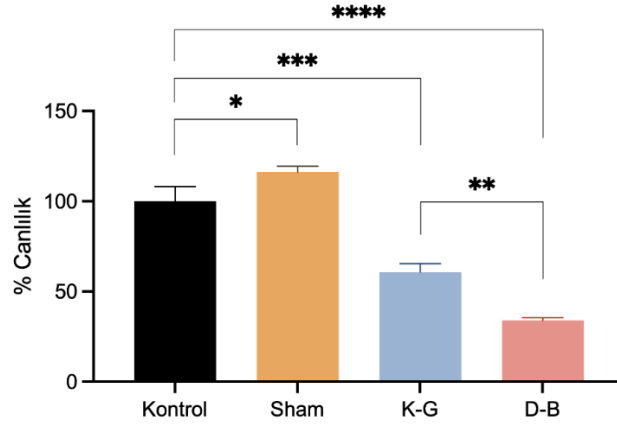
Şekil 4.8. İnsan nöroblastoma hücre hattının (SH-SY5Y) 12-kuyucuklu hücre kültür plakaya ekimi ve alternatif elektrik alanların (AEA) uygulama yönlerinin gösterimi



Şekil 4.9. Alternatif elektrik alan (AEA) uygulaması sonrası insan nöroblastoma hücrelerinin (SH-SY5Y) görüntüsü



Şekil 4.10. İnsan nöroblastoma hücre hattının (SH-SY5Y) inverted mikroskop görüntüleri (10X), (a) kontrol hücreleri (0.saat), (b) sham kontrol grubu hücreleri (48.saat, elektrotlar içerisinde AEA uygulanmayan), (c) 48 saat boyunca K-G yönünde alternatif elektrik alan (200 kHz, 2,13 Vpk/cm) uygulanan hücreler, (d) 48 saat boyunca D-B yönünde alternatif elektrik alan (200 kHz, 2,13 Vpk/cm) uygulanan hücreler. (K-G: Elektrotların kuzey-güney yönünde, D-B: Elektrotların doğu-batı yönünde konumlandırılmaları



Şekil 4.11. İnsan nöroblastoma hücre hattına (SH-SY5Y) 48 saat boyunca alternatif elektrik alan (200 kHz, 2,13 Vpk/cm) uygulandıktan sonra elde edilen % canlılık grafiği, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,001^{****}$, $n=8$, (K-G: Elektrotların kuzey-güney yönünde, D-B: Elektrotların doğu-batı yönünde konumlandırılmaları)

İnsan nöroblastoma hücre hattına 48 saat boyunca alternatif elektrik alan (200 kHz, 2,13 Vpk/cm) uygulandıktan sonra elde edilen yüzde canlılık grafiği Şekil 4.11’de verilmiştir. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine uygulanan 200 kHz, 2,13 Vpk/cm alternatif elektrik alanın 48 saat sonunda, K-G yönünde uygulanan AEA’nın hücrelerin yüzde canlılığını %60,8’e ($p \leq 0,001$) ve D-B yönünde uygulanan AEA’nın hücrelerin yüzde canlılığını %34’e ($p \leq 0,0001$) düşürdüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca, D-B ve K-G yönlerine uygulanan AEA’ların hücre canlılığına olan etkileri kıyaslandığında, D-B yönünde uygulanan AEA’nın, K-G yönünde uygulanan AEA’ya kıyasla hücre canlılığını daha fazla azalttığı tespit edilmiştir ($p \leq 0,01$). Alternatif elektrik alanın bölünen kanser hücreleri üzerindeki etkisi, alanın hücre bölünme yönüyle hizalandığında daha da güçlenmektedir. Tümör hücrelerinin bölünme yönlerinin rastgele olduğu düşünüldüğünde, tek bir alan yönü yerine iki veya daha fazla yönde elektrik alan kullanıldığında tedavi etkinliğinin arttığı rapor edilmiştir [66]. Pfeifer ve ark. (2023), 250 kHz frekansında alternatif elektrik alanı BxPC-3 ve BxGem hücreleri üzerinde uygulamış ve alternatif elektrik alanın hücrelerin çoğalması ve canlılığı üzerindeki toksik etkisinin, yalnızca elektrik alan çizgilerinin 96 kuyulu plakaların kuyu tabanına paralel olduğu durumlarda gözlemlendiğini rapor etmiştir [67]. Bu yön bağımlı etki, Tuszyński ve ark. tarafından, mitoz sırasında iğ iplikçiklerinin elektrik alan çizgilerine paralel olarak hizalanmasının, mitotik oluk bölgesinde elektrik alan gücünün artmasına yol açmasıyla açıklanmıştır [68]. Sonuç olarak, bulgularımızla literatür çalışmalarının uyumlu olduğu görülmüştür.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu bölümde, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların genel sonuçları, karşılaşılan sınırlılıklar ve çözüm önerileri sunulmuştur. Tez çalışmasında, alternatif elektrik alan kaynaklı bir *in vitro* maruziyet sisteminin tasarımı ve üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu sistem kullanılarak SH-SY5Y hücrelerine alternatif elektrik alanlar uygulanmış ve hücre-alan etkileşiminin öncü deneyleri *in vitro* koşullarda yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, orta frekanslı (200 kHz) alternatif elektrik alanlarının etkili bir anti-tümör sistemi olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Tez kapsamında, 100-500 kHz frekans aralığında ve 1,5-11,63 Vpk/cm alan yoğunluğuna ulaşabilen bir alternatif elektrik alan maruziyet sistemi geliştirilmiş ve bu sistem hücre kültürü deneylerinde kullanılmıştır. Sistemde frekans ve elektrot seçimleri dört buton yardımıyla yapılmıştır; ancak gelecekte bu seçimler için bir arayüz tasarımı düşünülebilir. Ayrıca, genlik ayarı potansiyometre ile yapılmaktadır. Daha geniş bir alan yoğunluğu aralığına ulaşmak için farklı devre tasarımları ve yöntemler geliştirilebilir. Hücre kültürü deneyleri sonucunda, kontrol hücrelerine göre SH-SY5Y hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar görülmüştür. Literatürde uygulanan elektrik alan yoğunlukları genellikle 1-3 V/cm aralığındadır ve daha önce SH-SY5Y hücrelerinde benzer çalışmaya rastlanılmamıştır. Deney sonuçları, çalışılan tümör hücre hattında toksik etkilerin görüldüğünü ve bu yöntemin potansiyel olarak anti-tümör sistemi olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

- [1] S. Di Carla Santos *et al.*, "A crossover clinical study to evaluate pain intensity from microneedle insertion in different parts of the oral cavity," *Int. J. Pharm.*, vol. 592, p. 120050, Jan 5 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.120050.
- [2] R. Stupp *et al.*, "Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial," *JAMA*, vol. 318, no. 23, pp. 2306-2316, Dec 19 2017, doi: 10.1001/jama.2017.18718.
- [3] A. A. Aguilar *et al.*, "Permeabilizing cell membranes with electric fields," *Cancers*, vol. 13, no. 9, p. 2283, 2021.
- [4] A. R. Araujo, V. P. Soares, F. S. Silva, and S. Moreira Tda, "Radiofrequency for the treatment of skin laxity: myth or truth," *An. Bras. Dermatol.*, vol. 90, no. 5, pp. 707-21, Sep-Oct 2015, doi: 10.1590/abd1806-4841.20153605.
- [5] in *Brain and Human Body Modeling 2020: Computational Human Models Presented at EMBC 2019 and the BRAIN Initiative® 2019 Meeting*, S. N. Makarov, G. M. Noetscher, and A. Nummenmaa Eds. Cham (CH): Springer Copyright 2021, The Editor(s) (if applicable) and The Author(s). This book is an open access publication., 2021.
- [6] N. Gentilal *et al.*, "Temperature and impedance variations during tumor treating fields (TTFields) treatment," *Frontiers in Human Neuroscience*, vol. 16, p. 931818, 2022.
- [7] Y. Gilpin, C.-Y. Lin, M. Forssell, S. Zheng, P. Grover, and M. Dandin, "Tracking the effects of tumor treating fields on human breast cancer cells in vitro using a capacitance sensing lab-on-CMOS microsystem," in *2022 29th IEEE International Conference on Electronics, Circuits and Systems (ICECS)*, 2022: IEEE, pp. 1-4.
- [8] F. A. Carrieri, C. Smack, I. Siddiqui, L. R. Kleinberg, and P. T. Tran, "Tumor treating fields: at the crossroads between physics and biology for cancer treatment," *Frontiers in oncology*, vol. 10, p. 575992, 2020.
- [9] A. Makimoto *et al.*, "Tumor-treating fields therapy for pediatric brain tumors," *Neurology International*, vol. 13, no. 2, pp. 151-165, 2021.
- [10] R. Stupp *et al.*, "Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma: a randomized clinical trial," *Jama*, vol. 314, no. 23, pp. 2535-2543, 2015.
- [11] M. Glas *et al.*, "The impact of tumor treating fields on glioblastoma progression patterns," *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 112, no. 5, pp. 1269-1278, 2022.
- [12] S. Liu *et al.*, "Progress and prospect in tumor treating fields treatment of glioblastoma," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 141, p. 111810, 2021.

- [13] N. Gera, A. Yang, T. S. Holtzman, S. X. Lee, E. T. Wong, and K. D. Swanson, "Tumor treating fields perturb the localization of septins and cause aberrant mitotic exit," *PloS one*, vol. 10, no. 5, p. e0125269, 2015.
[Online].ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4444126/pdf/pone.0125269.pdf.
- [14] T. Voloshin *et al.*, "Alternating electric fields (TTFields) in combination with paclitaxel are therapeutically effective against ovarian cancer cells in vitro and in vivo," *International journal of cancer*, vol. 139, no. 12, pp. 2850-2858, 2016.
- [15] H. T. Le, M. Staelens, D. Lazzari, G. Chan, and J. A. Tuszyński, "Real-time monitoring of the effect of tumour-treating fields on cell division using live-cell imaging," *Cells*, vol. 11, no. 17, p. 2712, 2022.
- [16] S. Shams and C. B. Patel, "Anti-cancer mechanisms of action of therapeutic alternating electric fields (tumor treating fields [TTFields])," *Journal of molecular cell biology*, vol. 14, no. 8, p. mjac047, 2022.
- [17] H. Wu *et al.*, "Exploring the efficacy of tumor electric field therapy against glioblastoma: an in vivo and in vitro study," *CNS neuroscience & therapeutics*, vol. 27, no. 12, pp. 1587-1604, 2021.
- [18] B. Yafouz, N. A. Kadri, H. A. Rothan, R. Yusof, and F. Ibrahim, "Discriminating dengue-infected hepatic cells (WRL-68) using dielectrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 37, no. 3, pp. 511-518, 2016.
- [19] A. Salmanzadeh, M. B. Sano, R. C. Gallo-Villanueva, P. C. Roberts, E. M. Schmelz, and R. V. Davalos, "Investigating dielectric properties of different stages of syngeneic murine ovarian cancer cells," *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 1, 2013.
- [20] H. Mulhall, F. Labeed, B. Kazmi, D. Costea, M. Hughes, and M. Lewis, "Cancer, pre-cancer and normal oral cells distinguished by dielectrophoresis," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 401, pp. 2455-2463, 2011.
- [21] S. Mansouri, T. Alhadidi, and M. Ben Azouz, "Breast cancer detection using low-frequency bioimpedance device," *Breast Cancer: Targets and Therapy*, pp. 109-116, 2020.
- [22] A. A. Pathiraja, R. A. Weerakkody, A. C. von Roon, P. Ziprin, and R. Bayford, "The clinical application of electrical impedance technology in the detection of malignant neoplasms: a systematic review," *Journal of Translational Medicine*, vol. 18, pp. 1-11, 2020.
- [23] X. Li, F. Yang, and B. Rubinsky, "A theoretical study on the biophysical mechanisms by which tumor treating fields affect tumor cells during mitosis," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 67, no. 9, pp. 2594-2602, 2020.
- [24] E. D. Kirson *et al.*, "Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 24, pp. 10152-10157, 2007.

- [25] P. Zhu and J.-J. Zhu, "Tumor treating fields: a novel and effective therapy for glioblastoma: mechanism, efficacy, safety and future perspectives," *Chinese clinical oncology*, vol. 6, no. 4, pp. 41-41, 2017.
- [26] T. Voloshin *et al.*, "Tumor-treating fields (TTFields) induce immunogenic cell death resulting in enhanced antitumor efficacy when combined with anti-PD-1 therapy," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 69, no. 7, pp. 1191-1204, 2020.
- [27] M. Giladi *et al.*, "Alternating electric fields (tumor-treating fields therapy) can improve chemotherapy treatment efficacy in non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo," in *Seminars in oncology*, 2014, vol. 41: Elsevier, pp. S35-S41.
- [28] O. Rominiyi, A. Vanderlinden, S. J. Clenton, C. Bridgewater, Y. Al-Tamimi, and S. J. Collis, "Tumour treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions," *British journal of cancer*, vol. 124, no. 4, pp. 697-709, 2021.[Online].Available.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7884384/pdf/41416_2020_Article_1136.pdf.
- [29] H. Mumblat *et al.*, "Tumor Treating Fields (TTFields) downregulate the Fanconi Anemia-BRCA pathway and increase the efficacy of chemotherapy in malignant pleural mesothelioma preclinical models," *Lung Cancer*, vol. 160, pp. 99-110, 2021.
- [30] H. Jeong, Y. Jo, M. Yoon, and S. Hong, "Thymidine decreases the DNA damage and apoptosis caused by tumor-treating fields in cancer cell lines," *Genes & Genomics*, vol. 43, no. 9, pp. 995-1001, 2021.
- [31] Y. Jo *et al.*, "Selective toxicity of tumor treating fields to melanoma: an in vitro and in vivo study," *Cell death discovery*, vol. 4, no. 1, p. 46, 2018.
- [32] M. Shojaee *et al.*, "A novel microscale platform for leukemia tumor treating field therapy and electrochemical screening," *Microelectronic Engineering*, vol. 257, p. 111738, 2022.
- [33] E. H. Kim *et al.*, "Tumor-treating fields induce autophagy by blocking the Akt2/miR29b axis in glioblastoma cells," *Oncogene*, vol. 38, no. 39, pp. 6630-6646, 2019.
- [34] A. Shteingauz *et al.*, "AMPK-dependent autophagy upregulation serves as a survival mechanism in response to Tumor Treating Fields (TTFields)," *Cell death & disease*, vol. 9, no. 11, p. 1074, 2018.
- [35] M. Silginer, M. Weller, R. Stupp, and P. Roth, "Biological activity of tumor-treating fields in preclinical glioma models. Cell Death Dis 8: e2753," ed, 2017.
- [36] J.-I. Park *et al.*, "Tumor-treating fields induce RAW264. 7 macrophage activation via NK- κ B/MAPK signaling pathways," *Technology in cancer research & treatment*, vol. 18, p. 1533033819868225, 2019.

- [37] E. H. Kim, H. S. Song, S. H. Yoo, and M. Yoon, "Tumor treating fields inhibit glioblastoma cell migration, invasion and angiogenesis," *Oncotarget*, vol. 7, no. 40, p. 65125, 2016.
- [38] G. Lavy Shahaf *et al.*, "P04. 17 Cancer cell lines response to tumor treating fields: results of a meta-analysis," *Neuro-Oncology*, vol. 20, no. suppl_3, pp. iii282-iii282, 2018.
- [39] R. S. Schneiderman, E. Shmueli, E. D. Kirson, and Y. Palti, "TTFields alone and in combination with chemotherapeutic agents effectively reduce the viability of MDR cell sub-lines that over-express ABC transporters," *BMC cancer*, vol. 10, pp. 1-7, 2010.
- [40] I. Vergote, T. Macarulla, F. R. Hirsch, C. Hagemann, and D. S. Miller, "Tumor treating fields (TTFields) therapy concomitant with taxanes for cancer treatment," *Cancers*, vol. 15, no. 3, p. 636, 2023.
- [41] J. Lantos, R. J. Young, P. C. Miranda, C. Wenger, and E. T. Wong, "TTFields therapy: Preclinical and clinical data," in *Handbook of Neuro-Oncology Neuroimaging*: Elsevier, 2016, pp. 243-256.
- [42] K. D. Swanson, E. Lok, and E. T. Wong, "An overview of alternating electric fields therapy (NovoTTF Therapy) for the treatment of malignant glioma," *Current neurology and neuroscience reports*, vol. 16, pp. 1-10, 2016.
- [43] E. D. Kirson *et al.*, "Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields," *Cancer research*, vol. 64, no. 9, pp. 3288-3295, 2004.
- [44] A. Barbault *et al.*, "Amplitude-modulated electromagnetic fields for the treatment of cancer: discovery of tumor-specific frequencies and assessment of a novel therapeutic approach," *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 28, pp. 1-10, 2009.
- [45] C. M. Field, M. Coughlin, S. Doberstein, T. Marty, and W. Sullivan, "Characterization of anillin mutants reveals essential roles in septin localization and plasma membrane integrity," 2005.
- [46] R. Ghossoub *et al.*, "Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length," *Journal of cell science*, vol. 126, no. 12, pp. 2583-2594, 2013.
- [47] E. Chang *et al.*, "Tumor treating fields increases membrane permeability in glioblastoma cells," *Cell death discovery*, vol. 4, no. 1, p. 113, 2018.
- [48] M. Giladi *et al.*, "Mitotic spindle disruption by alternating electric fields leads to improper chromosome segregation and mitotic catastrophe in cancer cells," *Scientific reports*, vol. 5, no. 1, p. 18046, 2015.
- [49] L. Berkelmann *et al.*, "Tumour-treating fields (TTFields): Investigations on the mechanism of action by electromagnetic exposure of cells in telophase/cytokinesis,"

Scientificreports, vol.9, no.1, p.7362, 2019. [Online]. Available: ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6517379/pdf/41598_2019_Article_43621.pdf.

- [50] X.-W. Xiang *et al.*, "Glioblastoma behavior study under different frequency electromagnetic field," *Iscience*, vol. 26, no. 12, 2023.
- [51] K. F. Lei, S.-C. Hsieh, A. Goh, R.-L. Kuo, and N.-M. Tsang, "Proliferation arrest, selectivity, and chemosensitivity enhancement of cancer cells treated by a low-intensity alternating electric field," *Biomedical Microdevices*, vol. 20, no. 4, p. 90, 2018.
- [52] E. Neuhaus *et al.*, "Alternating electric fields (TTFields) activate Cav1. 2 channels in human glioblastoma cells," *Cancers*, vol. 11, no. 1, p. 110, 2019.
- [53] A.-M. Shamaee, M. Saviz, A. Solouk, and M. Abdollahad, "An In Vitro Electric Field Exposure Device with Real-Time Cell Impedance Sensing," *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, vol. 44, pp. 575-585, 2020.
- [54] A. devices. CMOS, 125MHz Complete DDS Synthesizer AD9850 [Online] Available: analog.com/media/en/technical_documentation/data-sheets/ad9850.pdf
- [55] F. Senturk, I. C. Kocum, M. I. Seyitoglu, and E. S. Aksan, "A quartz crystal microbalance (QCM)-based easy setup device for real-time mass change detection under high-power RF plasma," *Review of Scientific Instruments*, vol. 94, no. 6, 2023.
- [56] W. S. Tam and C. W. Kok, "Design of CMOS Class AB Bridged Audio Amplifier: A Tutorial," *Solid State Electronics Letters*, vol. 3, pp. 70-79, 2021.
- [57] R. Keim. "Bridge Amplifiers for Single-Supply Applications." ALL ABOUT CIRCUIT, allaboutcircuits.com/technical-articles/bridge-amplifiers-for-single-supply-applications/ (accessed 01 JULY 2016).
- [58] T.Instrument.LM675PoverOperationalAmplifier[Online]Available: alldatasheet.com/datasheet-pdf/pdf/517644/TI1/LM675.html
- [59] T. Instruments. LF155/LF156/LF256/LF257/LF355/LF356/LF357 JFET Input OperationalAmplifiers[Online]Available: alldatasheet.com/datasheet-pdf/pdf/551684/TI/LF356.html
- [60] F. Senturk, S. Cakmak, I. C. Kocum, M. Gumusderelioglu, and G. G. Ozturk, "GRGDS-conjugated and curcumin-loaded magnetic polymeric nanoparticles for the hyperthermia treatment of glioblastoma cells," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 622, p. 126648, 2021.
- [61] F. Senturk, S. Cakmak, M. Gumusderelioglu, and G. G. Ozturk, "Hydrolytic instability and low-loading levels of temozolomide to magnetic PLGA nanoparticles remain challenging against glioblastoma therapy," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 68, p. 103101, 2022.

- [62] D. S. Batista, F. Granziera Jr, M. C. Tosin, and L. F. de Melo, "Analysis and practical implementation of a high-power Howland Current Source," *Measurement*, vol. 207, p. 112404, 2023.
- [63] G. M. Xiong, A. T. Do, J. K. Wang, C. L. Yeoh, K. S. Yeo, and C. Choong, "Development of a miniaturized stimulation device for electrical stimulation of cells," *Journal of biological engineering*, vol. 9, pp. 1-10, 2015.
- [64] J. C. Moser *et al.*, "The mechanisms of action of Tumor Treating Fields," *Cancer Res.*, vol. 82, no. 20, pp. 3650-3658, 2022.
- [65] C. Wenger, R. Salvador, P. J. Bassar, and P. C. Miranda, "Improving tumor treating fields treatment efficacy in patients with glioblastoma using personalized array layouts," *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 94, no. 5, pp. 1137-1143, 2016.
- [66] A. R. Korshoej, F. L. Hansen, N. Mikic, G. von Oettingen, J. C. H. Sørensen, and A. Thielscher, "Importance of electrode position for the distribution of tumor treating fields (TTFields) in a human brain. Identification of effective layouts through systematic analysis of array positions for multiple tumor locations," *PLoS One*, vol. 13, no. 8, p. e0201957, 2018.
- [67] T. Pfeifer *et al.*, "Therapy of pancreatic cancer with alternating electric fields: limitations of the method," *Bioelectrochemistry*, vol. 141, p. 107881, 2021.
- [68] J. A. Tuszyński, C. Wenger, D. E. Friesen, and J. Preto, "An overview of sub-cellular mechanisms involved in the action of TTFields," *International journal of environmental research and public health*, vol. 13, no. 11, p. 1128, 2016.