

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

**ELEKTRO-KÜLTÜR PLAKANIN TASARIMI, ÜRETİMİ VE
GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

HAZIRLAYAN

UĞUR DÜZEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA-2024

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

**ELEKTRO-KÜLTÜR PLAKANIN TASARIMI, ÜRETİMİ VE
GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HAZIRLAYAN

UĞUR DÜZEN

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 Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Uğur DÜZEN tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/08/2024

Tez Adı: Elektro-Kültür Plakanın Tasarımı, Üretimi ve Glioblastoma Hücrelerindeki Etkilerinin İncelenmesi

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

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Tansel UYAR – Başkent Üniversitesi

.....

Doç. Dr. Soner ÇAKMAK – Hacettepe Üniversitesi

.....

Prof. Dr. İsmail Cengiz KOÇUM – Başkent Üniversitesi

.....

ONAY

Prof. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tarih: ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

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

Öğrencinin Adı, Soyadı: Uğur DÜZEN

Öğrencinin Numarası: 22110028

Anabilim Dalı: Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Programı: Tezli Yüksek Lisans Programı

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

Tez Başlığı: Elektro-Kültür Plakanın Tasarımı, Üretimi ve Glioblastoma Hücrelerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 55 sayfalık kısmına ilişkin 12/09/2024 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6'dır. 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

Öğrenci Danışmanı

Prof.Dr.İsmail Cengiz KOÇUM

Tarih: ... / ... /

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesi sürecinde bana desteklerini, bilgilerini ve tecrübelerini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. İsmail Cengiz KOÇUM'a ve tez eş danışmanım Doç. Dr. Fatih ŞENTÜRK'e, böylesine önemli bir konuda araştırma ve çalışma fırsatını sundukları için en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisinden aldığım öğretici bilgiler ve değerli tecrübeler, bu çalışmanın başarılı bir şekilde tamamlanmasında büyük katkı sağlamıştır.

Tez çalışması kapsamında üretim süreçlerinde bana destek olan ve yol gösteren mesai arkadaşlarım Mustafa AKYOL ve Salih AYDIN'a, katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Prototip parçaların basımı ve üretiminde bana destek olan Erol ŞENGÜL'e, göstermiş olduğu dostluk ve arkadaşlıktan ötürü minnettarlığımı ifade ederim.

Bu uzun süreçte yanımda olup, desteğini esirgemeyen aile bireylerime sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi iletiyorum. Eğitim hayatımın ilk gününden bugüne kadar benden ilgisini ve güvenini hiç eksik etmeyen annem ve ilk öğretmenim Emine YUMŞAKDEMİR'e, bu çalışma ile bir kez daha teşekkür ederek, kendisinin ilerlediği yoldan asla ayrılmadığımı belirtmek isterim.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 222S617 numaralı proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

ÖZET

Uğur DÜZEN

ELEKTRO-KÜLTÜR PLAKANIN TASARIMI, ÜRETİMİ VE GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

2024

Glioblastoma, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel tedavi yöntemlerinin sınırlı başarı sağladığı, yüksek mortalite oranına sahip en agresif beyin kanseri türlerinden biridir. Alternatif elektrik alanların (AEA) kullanımı, invaziv olmayan tedavi stratejileri için umut vadeden yeni yaklaşımlar sunmaktadır. Bu tez çalışmasında, hücre kültürü deneylerine uygun olarak, AEA sistemi ile entegre edilmiş bir elektro-kültür plakasının tasarımı ve üretimi amaçlanmıştır. Geliştirilen elektro-kültür plakası, standart bir 12-kuyucuklu hücre kültürü plakasına uyumlu paslanmaz çelik elektrotlar içermektedir ve AEA'ların hücrelere eş zamanlı ve kontrollü bir şekilde uygulanmasına olanak tanımaktadır. Her kuyucukta dört adet paslanmaz çelik elektrot (Kuzey-Güney, K-G; Doğu-Batı, D-B yönlerinde) kullanılmış ve toplamda kırk sekiz elektrot aracılığıyla farklı yönlerde elektrik alanlar uygulanmıştır. Deneylerde, aynı sütun içerisindeki üç kuyucuk ile doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlanmış, validasyon testleri ile istenen elektrik alan şiddetinin üretildiği doğrulanmıştır. Hücre kültürü ön testlerinde, U87 glioblastoma hücrelerine iki farklı yönde (K-G ve D-B) polarize edilebilen alternatif elektrik alanlar (200 kHz, 1,5 V_{pk}/cm genlikte, 48 saat) uygulanmıştır. Hücre canlılığı test sonuçlarına göre, kontrol grubuna kıyasla, sham grubu %82,8 ($p \leq 0,05$), K-G grubu %30,26 ($p \leq 0,001$) ve D-B grubu %15,14 ($p \leq 0,0001$) yüzde hücre canlılıklarına sahip olup, 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 ($p \leq 0,05$). Bu bulgular, hücre canlılığı üzerinde uygulanan yönelime bağlı farklı etkilerin olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen elektro-kültür plakanın *in vitro* çalışmalar için etkin bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Elektro-kültür plaka, Alternatif elektrik alan, Glioblastoma, U87 hücre hattı

ABSTRACT

Uğur DÜZEN

DESIGN, PRODUCTION OF ELECTRO-CULTURE PLATE AND INVESTIGATION OF THE EFFECTS ON GLIOBLASTOMA CELLS

Başkent University Institute of Science

Department of Biomedical Engineering

2024

Glioblastoma is one of the most aggressive types of brain cancer, characterized by high mortality rates and limited success with conventional treatment methods such as surgery, radiotherapy, and chemotherapy. The use of alternating electric fields (AEFs) presents promising new approaches for non-invasive treatment strategies. This thesis aims to design and manufacture an electro-culture plate integrated with an AEF system, suitable for cell culture experiments. The developed electro-culture plate features stainless steel electrodes compatible with a standard 12-well cell culture plate, enabling simultaneous and controlled application of AEFs to the cells. Four stainless steel electrodes (aligned in North-South, N-S; and East-West, E-W directions) were used in each well, with a total of forty-eight electrodes allowing for the application of electric fields in different directions. In the experiments, the use of three wells within the same column ensured accuracy and repeatability, and validation tests confirmed the generation of the desired electric field intensity. In preliminary cell culture tests, AEFs that could be polarized in two different directions (N-S and E-W) were applied to U87 glioblastoma cells (200 kHz, 1.5 Vpk/cm amplitude, for 48 hours). According to cell viability test results, statistically significant reductions in cell viability were observed compared to the control group: the sham group had 82.8% viability ($p \leq 0.05$), the N-S group had 30.26% viability ($p \leq 0.001$), and the E-W group had 15.14% viability ($p \leq 0.0001$). These results were also confirmed by optical microscopy images. Furthermore, AEFs applied in the E-W direction were found to reduce cell viability more significantly than those applied in the N-S direction ($p \leq 0.05$). These findings indicate differential effects on cell viability depending on the orientation of the applied fields. In conclusion, the designed and manufactured electro-culture plate has been demonstrated to be effectively usable for in vitro studies.

Keywords: Electro-culture plate, Alternating electric field, Glioblastoma, U87 cell line

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Alternatif Elektrik Alanların Kanser Tedavisindeki Yeri.....	3
2.2. Tümör Tedavi Alanlarının Kanser Hücreleri Üzerine Etkileri	4
2.3. Alternatif Elektrik Alanların Anti-Mitotik Etkisi	5
3. MATERYAL VE METOT.....	13
3.1. Alternatif Elektrik Alan Kaynağı Sisteminin Tasarımı ve Üretilmesi.....	13
3.2. Elektro-Kültür Plakanın Tasarımı ve Üretilmesi	14
3.2.1. Elektro-Kültür Plaka Birinci Tasarım ve Üretim Aşamaları	16
3.2.2. Elektro-Kültür Plaka İkinci Tasarım ve Üretim Aşamaları	22
3.3. Hücre Kültür Çalışmaları	27
3.4. İstatiksel Analiz	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Elektro-Kültür Plaka	32
4.2. Üretim Sürecindeki Bileşenlerin Entegre Süreci.....	34
4.3. Üretimi Tamamlanan Elektro-Kültür Plaka	36
4.4. Elektro-Kültür Plakanın Testleri.....	38
4.5. Hücre Kültürü Deneyleri Sonuçları	41
5. TARTIŞMA	43

5.1. Elektro-Kültür Plakanın Üretiminin Değerlendirilmesi	43
5.2. Tümör Tedavi Alanlarının Klinik ve <i>In Vitro</i> Uygulamaları ve Elektrot Yapıların Değerlendirilmesi	44
5.3. Elektro-Kültür Plakanın Alternatif Tasarımlar ve Yapılan Çalışmalarla Karşılaştırması	45
5.4. Elektro-Kültür Plaka Üretiminde Gelecekte Geliştirilebilecek Noktalar	47
5.5. Karşılaştırmalı Analiz: Alternatif Çalışmaların Deneysel Bulguları	47
6. SONUÇLAR.....	48
KAYNAKLAR	49



TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Elektro-kültür plaka üretiminde kullanılan malzemeler.....	16
Tablo 3.2. İkinci tasarım sürecinde kullanılan malzemeler:	22
Tablo 3.3.U87 glioblastoma hücre hattına alternatif elektrik alan uygulanma protokolü	30
Tablo 4.1.Elektro-kültür plakanın üretilen tüm alt ünitelerin entegre edilmesi ve üretim aşamaları	34
Tablo 5.1.Literatürde kullanılan bazı elektro-kültür plakaların fiziksel ve teknik parametrelerinin kararlaştırılması.	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Tümör tedavi alanlarının kanser hücreleri üzerindeki potansiyel etkileri [21].	4
Şekil 2.2.	Tümör tedavi alanlarının (TTFields) kanser hücrelerinde mitoz süreci, DNA hasarı ve replikasyon stresi üzerindeki etkileri [29]	6
Şekil 2.3.	Tümör tedavi alanlarının (TTFields) kanser hücrelerindeki metafaz sırasında elde edilen görüntüleri, kontrol hücrelerinde (a) düzgün hizalanmış kromozomlar ve düzgün yapıda mitotik iğ iplikçiklerini gösterirken, TTFields uygulanan hücrelerde (b) iğ iplikçiklerinin bozulduğunu ve kromozomların dağınık şekilde yer aldığını göstermektedir [34].	7
Şekil 2.4.	Tümör tedavi alanları (TTFields) siseminde kullanılan elektrot dizisinin manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yardımıyla optimize edilmesine ilişkin bir akış diyagramı [36].	8
Şekil 2.5.	Kadın hasta, taşınabilir NovoTTF-100A cihazını kullanırken (hastanın izni alınarak çekilmiş bir fotoğraf) [37].	8
Şekil 2.6.	Titanyum elektrotlardan oluşan elektro-kültür plaka, (a) kapak, (b) övde ve (c) taban [38].	9
Şekil 2.7.	(a) Üretilmiş dijital mikro-elektrotlar ve (b) dijital mikro-elektrotlara monte edilmiş kuyucuklar [39].	10
Şekil 2.8.	Tamamlayıcı metal-oksit yarı iletken kapasitans sensör çipi (complementary metal-oxide-semiconductor, CMOS) kullanılarak üretilmiş elektro-kültür plaka sistemi [40].	10
Şekil 2.9.	Laboratuvar ortamında yapılan <i>in vitro</i> deneyler için tümör elektrik alan tedavi sistemi tarafından üretilen, tek yönlü ve polarize elektrik alan çıkış modlarının şematik gösterimi. (a) Sabit yönde elektrik alan uygulaması gerçekleştiren dörtgen elektro-kültür plaka, (b) rastgele bir yönde elektrik alan uygulaması gerçekleştiren altıgen elektro-kültür plaka [41].	11
Şekil 2.10.	Gömülü uyarıcı elektrotlar ile hücre kültürü plakanın tasarımı ve hücre kültürü plakanın şematik gösterimi [42].	11
Şekil 2.11.	Hücrelere doğru akım ile elektriksel stimülasyon uygulanmasının şematik gösterimi [43].	12

Şekil 2.12. Hücre kültürü çalışmaları için 6 kuyucuklu elektro-kültür plaka tasarımı (a) üstten görünümü ve pin konnektörler, (b) her bir kuyucuk için karbon elektrot çiftleri [44].	12
Şekil 3.1. Üretimi gerçekleştirilen alternatif elektrik alan kaynağı ve elektro-kültür plakanın birlikte kullanımına ait kavramsal tasarım.....	14
Şekil 3.2. Standart 12-kuyucuklu plakanın teknik ölçüleri (Eppendorf) [45].	15
Şekil 3.3. Farklı doğrultulardaki (x ve y eksenlerinde) elektrot çiftlerinin aktive edildikten sonra oluşturdıkları elektrik alan çizgileri.	16
Şekil 3.4. (a) Standart bir 12-kuyucuklu hücre kültürü plakasının üretim ölçüleri referans alınarak tasarımı yapılan konkav yapılı paslanmaz çelik elektrotlar ile elektro-kültür plakanın Solidworks çizimi ve (b) pleksiden imalatı kararlaştırılan üst plaka ve elektrotların görünümü ile birlikte standart bir 12-kuyucuklu plaka.	17
Şekil 3.5. (a) 9 mm kalınlıkta bir pleksi levhanın istenilen ölçülerde kesimi, (b) paslanmaz çelikten elektrotların lazer ile kesimi ve (c) operatör ekranında paslanmaz çelik elektrotların arayüz görüntüsü.	18
Şekil 3.6. Lazer kesimi sonrasında, paslanmaz çelik elektrotların demonte edilmiş hali (bu şekil, paslanmaz çelik elektrotların yapısını göstermek için kullanılmıştır).	18
Şekil 3.7. Elektrotların hatalı kesim sonucu hücrelerin tutunacağı alt yüzeye ulaşamaması veya askıda kaldığının görseli.	19
Şekil 3.8. Ön çalışmalar kapsamında, (a) puntalama işlemi sırasında punta makinasının ve (b) paslanmaz çelik elektrotların, nikel şerit tellerin ve pleksi levhanın görünümü.	19
Şekil 3.9. (a) Pleksi yüzük yapının tasarım görseli, (b) pleksi kılavuz yapının tasarım görseli, (c) kılavuz ve yüzük yapının paslanmaz çelik elektrotlar üzerindeki görseli, (d) 12-kuyucuklu plaka üzerinde, pleksi plaka, paslanmaz çelik elektrotlar, pleksi kılavuz ve yüzük yapının görseli.	20
Şekil 3.10. a) Proteus V8.13 programı kullanılarak tasarımı ve çizimi yapılan PCB, (b) PCB'nin simülasyon görüntüsü (üst yüzey).	21
Şekil 3.11. (a) PCB'nin freze ile delinmesi, (b) elektronik kart tasarımının PCB'ye basıldıktan sonra, kartın nihai görünümü ve elektrot bağlantıları için açılan bağlantı noktaları.	21
Şekil 3.12. 12-kuyucuklu elektro-kültür plakanın tasarımı ve teknik çizimi; paslanmaz çelik elektrotların PCB'ye montajına kılavuzluk eden pleksi plaka, elektrotların hücre kültür ortamına kılavuzluğunu yapan pleksi plaka, bu iki pleksi plakayı sabitleyici çerçeve (ortası boş) ve standart	

12-kuyucuklu hücre kültür kabının alt plakası (hücrelerin ekildiği plaka).....	23
Şekil 3.13 (a) 0,3 mm lik paslanmaz çelik elektrotların, yeni tasarım pleksi levhaya montajı, (b) şeffaf pleksinin lazer ile elektrot yuvalarının doğrusal kılavuz yapıda işlenmesi (c) 0,3 mm'lik paslanmaz çelik elektrotların lazer ile kesilmesi.	24
Şekil 3.14 (a) 0,3 mm'lik paslanmaz çelik elektrotların pleksi levhaya montajı (üstten görünüm), (b) 0,3 mm'lik paslanmaz çelik elektrotların pleksi levhaya montajı sonrasında 12-kuyucuklu alt plaka üzerindeki görüntüsü (alttan görünüm).	24
Şekil 3.15 (a) İkinci tasarım sonrası PCB'nin Proteus arayüzündeki görünümü, (b) atlama noktalarının kısa devre koruması ve iletim kolaylığı için çift katlı olarak tasarlandığı noktalar ve (c) paslanmaz çelik elektrotların bağlantı noktaları ile iletim yollarının yapısı.	25
Şekil 3.16. (a) PCB üzerinde elektrotların bağlantı yapılacağı noktaların boyutları 6 mm uzunluğunda bağlantı ucu, 1 mm elektrot kalınlığı (0,3 mm kalınlıktaki elektrotun montaj kolaylığı için), (b) karşılıklı elektrotlar arası mesafe.	26
Şekil 3.18. Elektro-kültür plakanın, (a) uygulamalar ve çalışma sırasında korunmasını sağlayacak koruyucu kapak yapının tasarımı, ve (b) üretimi.	26
Şekil 3.18. (a) Class II- Biyogüvenlik Kabini (Thermo Scientific- MSC Advantage 1.2) içinde elektro-kültür plakanın otuz dakikalık ultraviyole ışık altında sterilizasyonu. (b) Class II-Biyogüvenlik kabini içerisinde hücre (U87) ekimi.	28
Şekil 3.19. Hücrelerin, 37°C, %5 CO ₂ ve %95 nem ortamında inkübasyon işlemlerinin gerçekleştirildiği inkübatör (RWD-D180, Çin).	28
Şekil 3.20. İnverted Mikroskop (Nikon Eclipse Ts2) altında besiyeri içerisinde bulunan ve çoğalması beklenen U87 glioblastoma hücreleri.....	28
Şekil 3.21. Hücrelere uygulanacak olan alternatif elektrik alan parametrelerinin gösterimi.....	29
Şekil 3.22. U87 glioblastoma hücreleri ekilen elektro-kültür plakanın inkübatör içerisinde alternatif elektrik alan maruziyeti.....	29
Şekil 4.1. (a) Konkav tasarıma sahip kılavuz pleksi ve paslanmaz çelik elektrotlar, (b) konkav yapıya sahip elektrotların montajı için üretilen baskı devre kartı.....	32

Şekil 4.2.	Elektro-kültür plaka tasarımları, (a) birinci tasarım ve üretim süreci sonucu ortaya çıkan yapı, (b) ikinci tasarım ve üretim süreci sonucu ortaya çıkan yapı.	33
Şekil 4.3.	Hücre kültürü deneylerinde kullanılan elektro-kültür plakasının son hali, elektrotların gösterimi ve eksen gösterimi	34
Şekil 4.4	(a) PCB ile paslanmaz çelik elektrotların lehimlenmesi sonrası ve standart bir 12-kuyucuklu plaka ile elektro kültür plakanın görünümü, (b) paslanmaz çelik elektrotların PCB ile lehimlenmesi sonrası üst yüzey görüntüsü, (c) pleksi levha ve PCB bağlantısı sonrası elektro-kültür plakanın alt yüzey görünümü.....	37
Şekil 4.5.	Elektro-kültür plakanın koruyucu kapak ile birleştirilmiş görseli. (a) Standart bir 12-kuyucuklu hücre kültür plaka ile üst yüzey görünümü, (b) alt yüzey görünümü.	37
Şekil 4.6.	Elektro-kültür plakanın, standart bir 12-kuyucuklu plakaya uygulanması sonrası elektrik alan kaynağına DB25 konnektörü ile bağlantısı.	37
Şekil 4.7.	Alternatif elektrik alan kaynağından elektro-kültür plakaya gelen sinyallerin doğruluk testleri.....	38
Şekil 4.8	(a) Üretimi tamamlanan elektro-kültür plakanın 1. Sütun kuzey-güney (y-doğrultusunda) elektrotlarının aktif olduğunun testi, (b) bu işlem doğrulanmak için elektro-kültür plakanın 1. sütun kuzey-güney elektrotlarına gelen sinyallerin genlik ve frekans değerleri (200 kHz, 26 V) osiloskop ile ölçümü, (c) mikrodenetleyici tarafından 500 kHz frekansta ayarlanan sinyal, elektro-kültür plakadan 500 kHz olarak doğrulanışı.	40
Şekil 4.9.	İnsan glioblastoma hücre hattına (U87) 48 saat boyunca alternatif elektrik alan (200 kHz, 1,50 V/cm) uygulandıktan sonra elde edilen % canlılık grafiği, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,0001^{****}$, $n=5$, (K-G: Elektrotların kuzey-güney yönünde D-B: Elektrotların doğu-batı yönünde konumlandırılmaları).	41
Şekil 4.10.	İnsan glioblastoma hücre hattının (U87) inverted mikroskop görüntüleri (10X), (a) kontrol hücreleri, (b) sham hücreleri (elektrotlar hücre içinde, elektrik alan uygulanmayan), (c) 48 saat boyunca K-G yönünde alternatif elektrik alan (200 kHz, 1,50 V/cm) uygulanan hücreler, (d) 48 saat boyunca D-B yönünde alternatif elektrik alan (200 kHz, 1,50 V/cm) uygulanan hücreler. (K-G: Elektrotların kuzey-güney yönünde, D-B: Elektrotların doğu-batı yönünde konumlandırılmaları)	42

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AEA	Alternatif Elektrik Alan
Ar-Ge	Araştırma ve Geliştirme
Anti-PD-1	Programmed Cell Death Protein 1/(Bağışıklık sistemini destekleyici bir kanser tedavi yöntemi)
Ca ²⁺	Kalsiyum iyonu
cm	Uzunluk birimi santimetre
CMOS	Kapasitans sensör çipi
CO ₂	Karbondioksit
Cr/Au	Bakır / Altın
DDS çip	Direct Digital Synthesized
DSB	DNA çift sarmal kırıkları
DNA	Deoksiribonükleik asit
FDA	U.S. Food and Drug Administration/Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
ECIS	Hücrelerin elektriksel empedansını ölçmek için kullanılan cihaz.
F	Farad, Kapasitans birimi
HeLa	Kanser hücresi
Hel299	Sağlıklı Karaciğer Hücresi
H&E	Hematoksin ve Eozin
Huh7	Karaciğer kanser hücresi
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells / İnsan göbek kordonu damarından izole edilen endotelyal hücreler
Hz	Hertz, Frekans birimi
kHz	Kilo hertz, frekans birimi
LCD	Sıvı kristal ekran/Liquid Crystal Display
LDH	Laktat Dehidrojenaz
M	Uzunluk birimi metre
Mm	Uzunluk birimi milimetre
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

nm	Nanometre
nF	Nano farad, Kapasitans birimi
Ohm	Elektriksel direnç değeri
Op-amp	Operational amplifier/operasyonel yükselteç
PCB	Printed Circuit Board/Baskı Devre Kartı
PMN-PT	Kurşun magnezyum niyobat-kurşun titanat
PDMS	Polindimetilsiloksan
PEMF	Pulsu elektromanyetik alanlar
RPM	Revolutions Per Minute / (Dakikada ki devir sayısı)
Sa	Saat
SH-SY5Y	İnsan nöroblastoma hücrelerinden türetilmiş bir hücre hattı
TTF	TTFIELDS Tumor Treating Fields / Tümör Tedavi Alanları
U87	İnsanlardan elde edilen bir glioblastoma hücre hattı
uL	Mikro Litre
UV	Ultraviole
V	Voltaj, Elektriksel gerilim birimi
V/cm	Voltaj/santimetre, santimetreye düşen voltaj değerinin gösterimi
Vpp	Voltaj peak to peak, Tepeden tepeye gerilim değeri
XRhod-1	Floresan boya çeşidi
%	Yüzde
°C	Derece selsiyus

1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu olarak öne çıkmakta ve tedavi yöntemleri ile tedaviye verilen yanıtlar üzerine sürekli araştırmalar yapılmaktadır. İnsan vücudunda gerçekleşen temel yaşamsal faaliyetlerde hücresel ve doku düzeyinde elektriksel aktiviteler meydana gelmektedir [1]. Sağlıklı bir hücrenin patolojik bir duruma geçişiyle birlikte, hücrenin elektriksel özelliklerinde değişiklikler gözlemlenmektedir [2]. Kanser progresyonuyla birlikte hücre yapısında meydana gelen bu değişiklikler, membran kapasitansı ve sitoplazmik iletkenlik gibi elektriksel özelliklerin uyum sağlamasını içermektedir [3]. Ayrıca, malin tümörler, çevrelerindeki sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında daha yüksek iletkenlik ve daha düşük empedans özellikleri göstermektedir [4]. Bu bulgular, kanser hücrelerindeki değişen elektriksel aktivitelerin hem teşhis ve tedavi süreçlerinde hem de alternatif elektrik alan terapisi gibi tedavi yaklaşımlarının etkinliğinin anlaşılmasında etkin bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Tümör tedavi alanları sistemi (Tumor Treating Fields, TTFields, Novocure Inc, Haifa, İsrail), tümör bölgesine düşük şiddette (1–3 V/cm, 100–300 kHz) alternatif elektrik alan verilerek tümör hücrelerinde anti-mitotik etki oluşturan bir yöntem olarak tanımlanmaktadır [5]. Bu sistemin, *in vitro*, *in vivo* ve klinik uygulamalar (tedaviler) için geliştirilen teknolojileri mevcuttur. Örneğin, Novocure Firması tarafından üretilen *in vitro* TTFields sistemi, sekiz seramik petri kabını içeren ve özel bir yazılım tarafından kontrol edilen bir taban plakasından oluşmaktadır [6]. Ayrıca, klinik olarak kullanılan TTFields sistemi, 2011 ve 2015 yıllarında sırasıyla nükseden ve yeni teşhis edilen glioblastoma (GBM) tedavisi için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından standart tedavi protokolüne dahil edilmiştir [7]. Bu bağlamda, alternatif elektrik alanların kanser tedavisindeki potansiyeli üzerine yapılan araştırmalar giderek artan bir öneme sahip olmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, hücre kültürü çalışmalarına uygun olarak, 12-kuyucuklu bir elektro-kültür plakasının tasarımı, üretimi ve bu plakanın glioblastoma hücreleri (U87) üzerindeki canlılık etkisinin incelenmesidir. Çalışma kapsamında, alternatif elektrik alanların U87 hücreleri üzerindeki etkileri hücre canlılığı testleri ile değerlendirilmiştir. Literatür araştırmaları ve mevcut *in vitro* sistemler dikkate alınarak yapılan bu tez çalışmasında, geliştirilen ve üretilen yapının teknoloji ve tasarım farklılıkları, bulgular ve tartışma bölümünde ayrıntılı olarak belirtilmiştir. Tez kapsamında, mikrodenetleyici ve DDS

ipine sahip bir alternatif elektrik alan kaynağı ve bu kaynağı entegre edilen elektro-kültür plakası kullanarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen elektro-kültür plakanın *in vitro* alışmalar için etkin bir şekilde kullanılabileceğı gösterilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

Kanser, dünya genelinde geniş bir popülasyonu etkileyen ve ciddi sağlık sorunlarına yol açan bir hastalıktır. Geleneksel tedavi yöntemleri, cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi gibi tekniklerle sınırlı kalmaktadır. Bu yaklaşımların yan etkileri ve etkinliklerinin sınırlı olması, alternatif tedavi yöntemlerine olan ilginin ve ihtiyacın artmasına neden olmaktadır. Alternatif elektrik alanların (AEA) kullanımı, invaziv olmayan tedavi stratejileri için umut vadeden yenilikçi yaklaşımlar sunmaktadır [8]. Bu bağlamda, alternatif elektrik alanların uygulanması, geleneksel tedavi yöntemlerinin sınırlamaları ve yan etkileri göz önüne alındığında, kanser tedavisinde etkili bir yöntem olarak öne çıkmaktadır.

Bazı çalışmalar, elektromanyetik alanların kemoterapi ile birlikte kullanıldığında tedavi etkinliğini artırabileceğini göstermektedir. Elektromanyetik alanlar, kanser hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına karşı duyarlılığını artırabilir [9]. Elektromanyetik alanların, kanser hücrelerinde oksidatif stres ve apoptozu artırdığı bildirilmiştir [10]. Bu etkilerin, kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını engelleyebileceği düşünülmektedir [11]. Son yıllarda, alternatif elektrik alanların kanser tedavisindeki etkinliğini araştıran çeşitli klinik denemeler yapılmıştır [12]. Bu klinik denemeler, alternatif elektrik alanların kanser hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirerek, bu tedavi yönteminin etkinliğini belirlemeyi amaçlamaktadır.

Alternatif elektrik alan kullanılarak uygulanan tedavi yöntemlerine olan ilgi, kanser tedavilerinde yaşanan zorluklarla başa çıkmak ve hastaların yaşam kalitesini artırmak amacıyla artmaktadır [7]. Örneğin, günümüzde İsrail merkezli Novocure şirketine ait kanser tedavisinde kullanılan teknolojiler [6] ve bu teknolojilerle üretilmiş sistemler bulunmaktadır.

2.1. Alternatif Elektrik Alanların Kanser Tedavisindeki Yeri

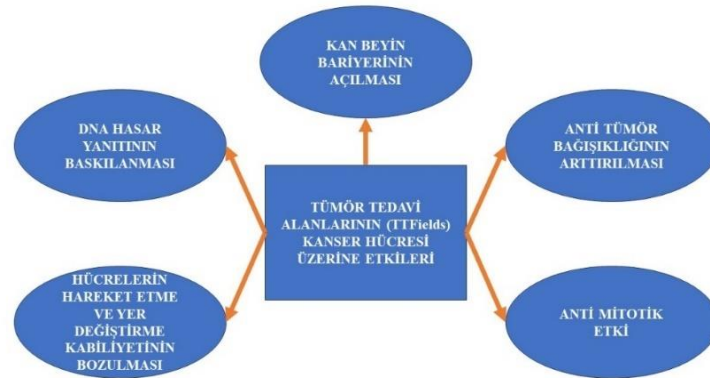
Alternatif elektrik alanların ve doğru akım elektrik alanlarının biyolojik etkileri, embriyonik gelişimden yara iyileşmesine kadar geniş bir araştırma geçmişine sahiptir. Özellikle, tümör tedavi alanları (Tumor Treating Fields, TTFs) olarak bilinen bir alternatif elektrik alan formunun, glioblastoma ve mezotelyoma gibi kanser türlerinin tedavisinde standart tedavi protokollerine dahil edilmiştir [13]. Tümör tedavi alanlarının

(TTFields) terapötik frekans aralıkları genellikle 100–300 kHz, alan şiddetleri ise 1–3 V/cm arasında değişmektedir [14]. Alternatif elektrik alanlar, tümör hücrelerinin mitoz bölünme sürecini bozarak kanser hücrelerinin ölümüne yol açabilir [15]. Bu frekans ve alan şiddetleri, özellikle hücre bölünmesi sırasında kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyebilir ve tümör büyümesini durdurabilir.

2.2. Tümör Tedavi Alanlarının Kanser Hücreleri Üzerine Etkileri

Tümör tedavi alanları (TTFields), kanser hücreleri üzerinde çeşitli etkilere sahiptir. Bu etkiler hücrelerin hayati süreçlerini fiziksel olarak bozar ve hücre ölümüne yol açabilir (Şekil 2.1) [16]. Bu tedavi, metafaz sırasında anormal mitotik iğ oluşumunu tetikleyerek ve bölünme oluğunda septin düzenini bozarak, hücre zarında kabarcık oluşumu, anti-mitotik etki ve asimetrik kromozom ayrışması gibi etkiler yaratabilir [17]. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, tümör hücre zarındaki potansiyel değişikliklerin Ca^{2+} iyonlarının hücre içine girişini artırarak, bu durumun anormal iğ oluşumu ve apoptozu tetikleyebileceğini öne sürmektedir [18].

Tümör Tedavi Alanları, sistemik toksisiteye neden olmayan, yenilikçi ve non-invaziv bir bölgesel anti-mitotik tedavi yöntemidir. Bu tedavi, kanser hücrelerine 1–3 V/cm yoğunlukta ve 100–300 kHz frekans aralığında alternatif elektrik alan uygulanmasını içerir. Preklinik çalışmalar, TTFields’in mitoz aşamasında etkili olduğunu göstermiştir [19]. Kanser hücrelerine uygulanan alternatif elektrikselsel alanlar, hücre membranında depolarizasyon ve repolarizasyon süreçlerini etkileyerek [20] hücresel aktiviteyi değiştirebilir.



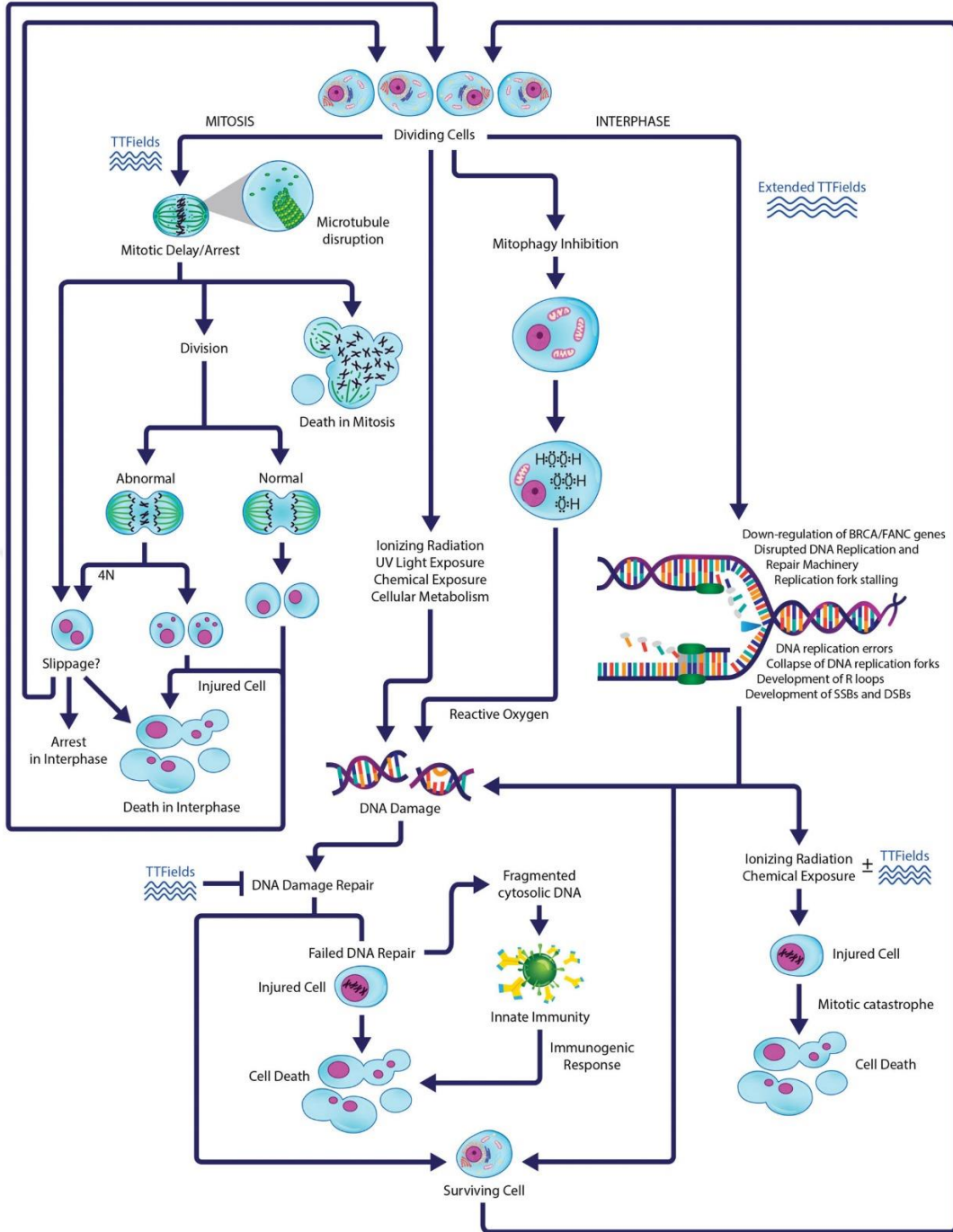
Şekil 2.1. Tümör tedavi alanlarının kanser hücreleri üzerindeki potansiyel etkileri [21].

Alternatif elektrik alanların apoptozu (programlanmış hücre ölümü) indükleyebileceği rapor edilmiştir [22]. Bu alanların hücre zarındaki iyon kanalları üzerinde etkili olduğu ve bu kanallar aracılığıyla hücresel iletişimi değiştirebileceği belirtilmiştir [23], bu da hücre içi ve hücreler arası sinyalizasyonu etkileyebilir. Ayrıca, alternatif elektrik alanlar hücreler üzerinde elektromekanik stres yaratarak hücresel yapıların, özellikle hücre iskeletinin, mekanik özelliklerini etkileyebilir. Bu durum, hücresel hareketlilik ve şekil değişikliklerine yol açabilmektedir [24].

TTFIELDS, kanser hücrelerinin yaşamsal süreçlerini ve tümör ilerlemesini engellemek amacıyla fiziksel kuvvetler uygulayan elektrik alanlarıdır. Bu alanlar, hücre bölünmesini bozarak kanser hücrelerinin büyümesini durdurur ve tümörün ilerlemesini yavaşlatır [21]. TTFIELDS ve anti-PD-1 (bir immünoterapi ilacı) kombinasyonu, antitümör bağışıklığının artırılmasında rol oynamaktadır [25]. TFIELDS'in, yalnızca radyasyon kaynaklı DNA çift sarmal kırıklarının (Double-Strand Break, DSBs) yeniden bağlanmasını engellemekle kalmayıp, aynı zamanda yeni DNA DSB'leri indükleyebildiği rapor edilmiştir [26]. Ayrıca, glioblastoma (GBM) tedavisi için onaylanan TTFIELDS terapisi, kan-beyin bariyerinin (BBB) geçirgenliği üzerinde de etkili olmuştur. Yapılan çalışmalar, TTFIELDS'in BBB'nin yapısal bütünlüğünü etkileyebileceğini ve bariyerin geçirgenliğinde değişikliklere yol açabileceğini göstermektedir [27]. Bu bağlamda, tümör tedavi alanlarının etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi ve tedavi stratejilerinde nasıl kullanılabileceğinin belirlenmesi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

2.3. Alternatif Elektrik Alanların Anti-Mitotik Etkisi

Alternatif elektrik alanların uygulanması, kanser hücrelerinde septinlerin yanlış konumlanmasını artırarak mitotik iğ iplikçiklerinin bozulmasına neden olur. Bu durum, tübülün polimerizasyonuna müdahale ederek mitoz sürecini olumsuz etkiler. Sonuç olarak, hücre bölünmesi düzgün gerçekleşmez ve kanser hücrelerinin büyümesi engellenir [28]. Alternatif elektrik alanların etkisi altında, mitoz sürecinde bulunan kanser hücreleri, anormal hücre bölünmesi ve kromozom ayrışması sonucunda mitotik bozukluğa ve hücre ölümüne yol açar. Bu alanlar, DNA hasar onarımı ve replikasyon çatalı (replication fork) stabilizasyonunda görev alan genlerin ekspresyonunu azaltır. Sürekli yüksek replikasyon stresi ve yetersiz DNA hasar yanıtı, hücre ölümüne neden olur (Şekil 2.2) [29]. Bu süreç, kanser hücrelerinde mitotik bozulmalara yol açarak hücre ölümünü tetikleyen bir mekanizma ortaya koymaktadır.

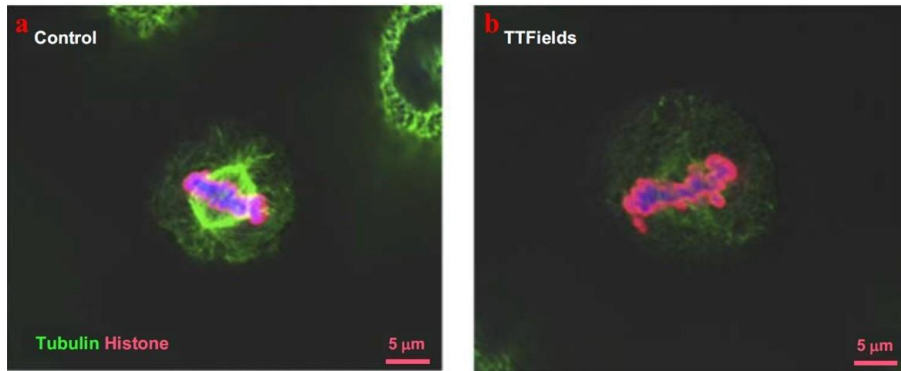


Şekil 2.2. Tümör tedavi alanlarının (TTFields) kanser hücrelerinde mitoz süreci, DNA hasarı ve replikasyon stresi üzerindeki etkileri [29].

TTFields tedavisinin glioma hücrelerini ortadan kaldırmada özgün bir mekanizma sunduğu bildirilmiştir. Elektromanyetik enerjinin belirli frekans ve yoğunluklarda uygulanmasıyla, kanser hücrelerinin mitoz sürecindeki bölünme dinamiklerini bozduğu ve hücre proliferasyonunu engellediği rapor edilmiştir, bu nedenle tümör tedavi alanları,

yenilikçi bir anti-mitotik kanser tedavi yöntemi olarak değerlendirilmektedir [30]. Anti-mitotik etkiler, TTFields'in tanınan ilk biyolojik anti-kanser aktivitesi olsa da veriler tümör tedavi alanlarının anti-kanser etkilerini birden fazla etki mekanizması aracılığıyla sağladığını göstermiştir [31]. Bu nedenle, TTFields, birçok farklı tedavi modülasyonu ile kombinasyon halinde çeşitli kanser türleri için faydalı olabilme potansiyeline sahiptir [32]. Örneğin, uygulanan alternatif elektrik alanların DNA hasarı ve replikasyon stresini hedefleyen ilaçlarla (pemetreksed, doksorubisin, temozolomid, gemcitabin ve platin bazlı bileşenler gibi) birlikte kullanıldığında etkinliğinin arttığı rapor edilmiştir [33]. Bu kombinasyonlar, tümör hücre ölümünü destekleyerek, alternatif elektrik alanların diğer tedavi yöntemleriyle birlikte daha etkili bir şekilde tümör hücrelerine müdahale ettiğini göstermektedir.

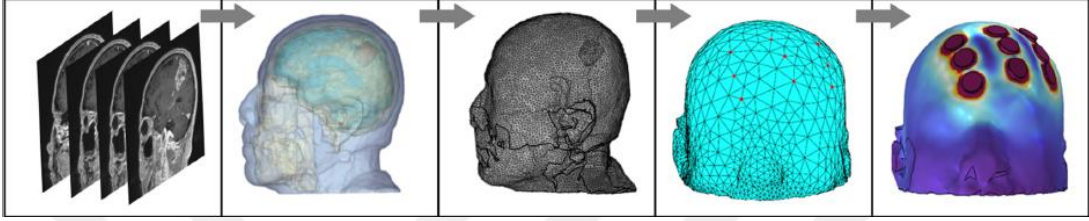
TTFields uygulanan ve kontrol (TTFields uygulanmayan) hücrelerinin metafaz sırasındaki görüntüleri Şekil 2.3'te verilmiştir. Kontrol hücresinde mitotik iğ iplikçikleri açıkça görülmektedir (Şekil 2.3a). Mavi ile işaretlenmiş kromozomlar metafaz plağı boyunca düzgün bir şekilde hizalanmıştır. Yeşil renkle gösterilen mitotik iğ ve hücre kutuplarında yer alan sentromerler net bir şekilde görünmektedir (Şekil 2.3a). Buna karşılık, TTFields'e maruz kalan hücrede mitotik iğ bozulmuş, şekilsiz ve asimetrik hale gelmiştir. Kırmızı boya ise kromozomlardaki DNA'nın paketlenmesinden sorumlu olan histon proteinini göstermektedir (Şekil 2.3b) [34]. Bu gözlemler, TTFields'in mitoz sürecini bozarak hücre bölünmesinde yapısal bozukluklara yol açtığını ve kanser hücrelerinin bölünmesini engelleyerek potansiyel bir tedavi mekanizması sunduğunu göstermektedir.



Şekil 2.3. Tümör tedavi alanlarının (TTFields) kanser hücrelerindeki metafaz sırasında elde edilen görüntüleri, kontrol hücrelerinde (a) düzgün hizalanmış kromozomlar ve düzgün yapıda mitotik iğ iplikçiklerini gösterirken, TTFields uygulanan hücrelerde (b) iğ iplikçiklerinin bozulduğunu ve kromozomların dağınık şekilde yer aldığını göstermektedir [34].

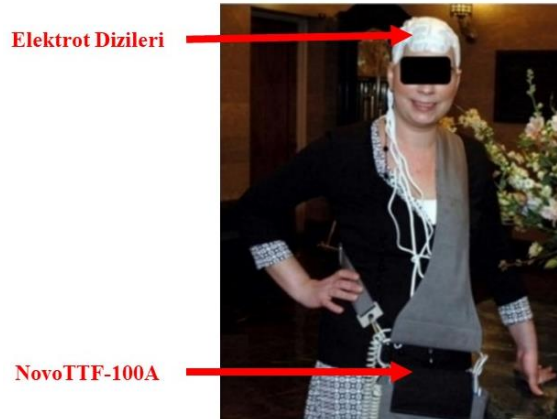
2.4. Tümör Tedavi Alanları Sistemi

Son dönemde yapılan çalışmalarda, kanser hastaları üzerinde giyilebilir yapıda elektrot dizinine sahip tedavi teknolojileri kullanılmaktadır [35]. Bu çalışmalarda, elektrot dizisinin pozisyonunu optimize etmek için akıllı bir optimizasyon algoritması kullanılmakta ve TTFields uygulamaları, kişiye özgü bir tedavi olarak sunulmaktadır [36]. Bu optimizasyonun amacı, alternatif elektrik alan uygulaması sırasında tümör içindeki ortalama elektrik alan yoğunluğunu maksimize etmektir.



Şekil 2.4. Tümör tedavi alanları (TTFields) siseminde kullanılan elektrot dizisinin manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yardımıyla optimize edilmesine ilişkin bir akış diyagramı [36].

Şekil 2.5'te gösterilen tedavi yöntemi, Novocure firmasına ait NovoTTF-100A cihazı ile entegre olarak uygulanmıştır. Bu yöntem, beyin tümörü olan bir hastanın kemoterapi tedavisine destek amaçlı kullanılmıştır. NovoTTF-100A, düşük yoğunluklu ve orta frekansta elektrik alanları sağlayan taşınabilir bir cihazdır ve invaziv olmayan iletim düzenleri aracılığıyla çalışır [37]. TTFields, hücre bölünmesini fiziksel olarak hedefleyerek kanser tedavisinde yeni bir terapötik modalite sunmaktadır.



Şekil 2.5. Kadın hasta, taşınabilir NovoTTF-100A cihazını kullanırken (hastanın izni alınarak çekilmiş bir fotoğraf) [37].

Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar, alternatif elektrik alan uygulamalarının kanser tedavisindeki potansiyel etkinliğini desteklemektedir. Alternatif elektrik alan uygulamaları için farklı tasarımlara sahip hücre kültür sistemleri Bölüm 2.5'te açıklanmıştır.

2.5. Elektro-Kültür Plakalar

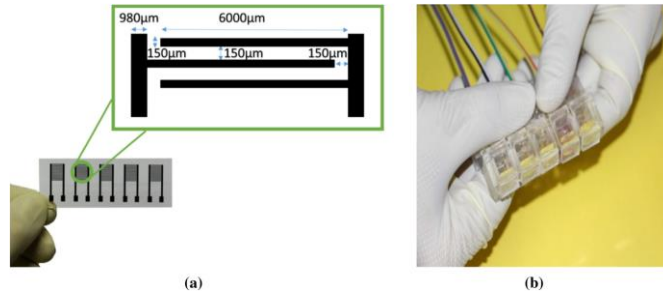
İn vitro deneyler kapsamında kanser hücrelerini incelemek için farklı tasarımlarda elektro-kültür plakalar geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde, alternatif ya da doğru akım elektrik alanlarının hücre kültürü ortamına etkin bir şekilde iletilmesi, uygun elektrot seçimi ile sağlanmaktadır. Elektrotların malzeme özellikleri, elektriksel iletim ve biyouyumluluk açısından kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, her bir tasarımda kullanılan farklı elektrot malzemelerinin performansı değerlendirilmekte ve bu süreç, elektrik alan temelli kanser tedavilerinin geliştirilmesinde önemli bir araştırma alanı olarak öne çıkmaktadır. Örneğin Şekil 2.6'da gösterilen titanyum elektrotlara sahip farklı bir tasarımda, uygulanan elektrik alanın kanser hücrelerinin canlılık oranını azaltması hedeflenmiştir. Üç farklı katmandan oluşan bu yapı, hücrelere 162 mV/mm büyüklüğünde ve 1,2 Hz frekansında elektriksel alan vermektedir [38].



Şekil 2.6. Titanyum elektrotlardan oluşan elektro-kültür plaka, (a) kapak, (b) gövde ve (c) taban [38].

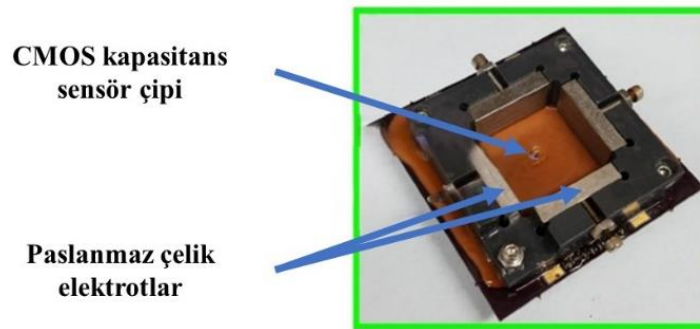
Hücre kültürü çalışmaları için tasarlanan geleneksel uyarı sistemleri, çevresel ısınma sorunlarına yol açabilmektedir. Bu sorunu çözmek amacıyla özel olarak tasarlanmış ve üretilmiş bir empedans ölçüm sistemi (Electric cell-substrate impedance sensing, ECIS) geliştirilmiştir (Şekil 2.7). ECIS, empedans algılama katmanı, uyarı bloğu ve bu yapıları

mikro elektrotlara bağlamak ve kontrol etmek için kullanılan bir arayüz tasarımından oluşmaktadır [39].



Şekil 2.7. (a) Üretilmiş dijital mikro-elektrotlar ve (b) dijital mikro-elektrotlara monte edilmiş kuyucuklar [39].

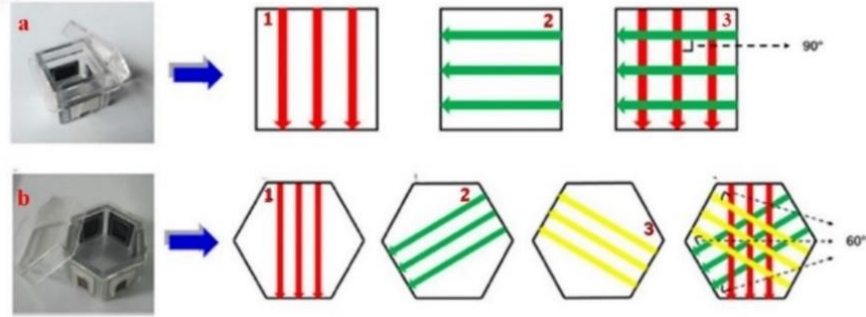
Elektro-kültür plakaları aracılığıyla kanser hücrelerine elektrik alan uygulamasının etkinliğini araştıran çalışmalardan biri, tamamlayıcı metal-oksit yarı iletken kapasitans sensör çipi (complementary metal-oxide-semiconductor, CMOS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sistem, hücre kültürü kuyucukları içinde alternatif elektrik alan desenleri oluşturmak amacıyla minyatürize edilmiş paslanmaz çelik elektrotlardan oluşmaktadır. İlgili sistem, Şekil 2.8’de detaylı olarak sunulmuştur [40].



Şekil 2.8. Tamamlayıcı metal-oksit yarı iletken kapasitans sensör çipi (complementary metal-oxide-semiconductor, CMOS) kullanılarak üretilmiş elektro-kültür plaka sistemi [40].

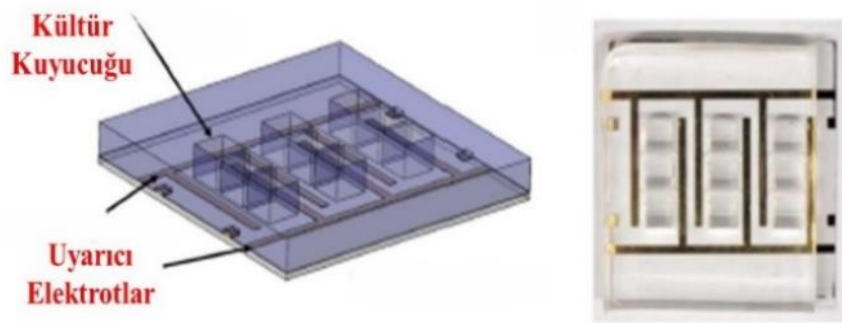
Farklı geometrilerde tasarlanarak üretilen elektro-kültür sistemi Şekil 2.9’da verilmiştir [41]. Çalışmada, elektrotlar dörtgen plakanın dört kenarına yerleştirilmiş ve hücreler dörtgen plakanın içine ekilmiştir (Şekil 2.9a). Sabit bir yönde elektrik alan uygulaması modellenmiştir (Şekil 2.9a1 ve Şekil 2.9a2) ve iki yön her saniye değiştirilmiştir

(Şekil 2.9a3). Alternatif bir tasarımda, elektrotlar plakanın altı kenarına yerleştirilmiş ve hücreler altıgen plakanın içine ekilmiştir. Elektrik alan, belirtilen yönlerde uygulanmış (Şekil 2.9b1 ve Şekil 2.9b2) ve üç yön her saniye rastgele değiştirilmiştir (Şekil 2.9b3).



Şekil 2.9. Laboratuvar ortamında yapılan *in vitro* deneyler için tümör elektrik alan tedavi sistemi tarafından üretilen, tek yönlü ve polarize elektrik alan çıkış modlarının şematik gösterimi. (a) Sabit yönde elektrik alan uygulaması gerçekleştiren dörtgen elektro-kültür plaka, (b) rastgele bir yönde elektrik alan uygulaması gerçekleştiren altıgen elektro-kültür plaka [41].

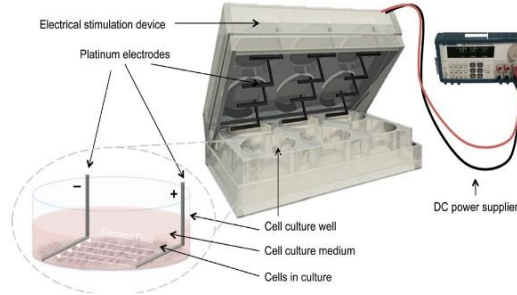
Alternatif bir tasarımın sunulduğu çalışma, Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Bu çalışmada, tasarlanan ve üretilen elektro-kültür plaka; gömülü uyarıcı elektrotlara sahip iki katmanlı bir cam alt tabaka ile dokuz kare kültür kuyucuğuna sahip bir polidimetilsiloksan (PDMS) katmanından oluşmaktadır [42]. Elektrotlar ise bakır/altın (Cr/Au) alaşımından üretilmiştir.



Şekil 2.10. Gömülü uyarıcı elektrotlar ile hücre kültürü plakanın tasarımı ve hücre kültürü plakanın şematik gösterimi [42].

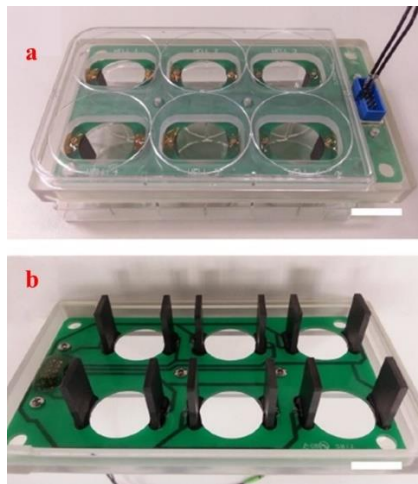
Şekil 2.11'de belirtilen çalışmanın tasarımında, "L" şeklindeki platin elektrotlar, 6 kuyucuklu hücre kültürü plakasının kapağına sabitlenmiş ve standart bir doğru akım güç

kaynağına bağlanmıştır [43]. Elektrotlar, hücre kültürü plakasının tabanıyla temas halindedir ve tamamen kültür ortamı ile kaplanmıştır, böylece hücrelerle doğrudan etkileşim sağlanmaktadır.



Şekil 2.11. Hücrelere doğru akım ile elektriksel stimülasyon uygulanmasının şematik gösterimi [43].

Alternatif bir çalışmada, elektriksel stimülasyon uygulamaları için özel olarak tasarlanmış bir elektrot kartının geliştirilmesi ve kullanımı incelenmiştir (Şekil 2.12). Bu kart, 6 kuyucuktan oluşan bir hücre kültür plakasına entegre edilmiş olup, elektriksel alan stimülasyonu sağlamak amacıyla harici bir elektrik alan jeneratörüne bağlanan pin konnektörlerini içermektedir (Şekil 2.12a). Her bir kuyucuk, karbon elektrot çiftleri ve alt yüzeyde bulunan devre yolları ile detaylandırılmıştır, bu da elektriksel sinyallerin her kuyucukta düzgün bir şekilde iletilmesini sağlamaktadır (Şekil 2.12b) [44].



Şekil 2.12. Hücre kültürü çalışmaları için 6 kuyucuklu elektro-kültür plaka tasarımı (a) üstten görünümü ve pin konnektörler, (b) her bir kuyucuk için karbon elektrot çiftleri [44].

3. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde, tez kapsamında yapılan tasarım, üretim ve hücre kültürü deneylerinde kullanılan malzemeler ve yöntemler detaylı şekilde açıklanmaktadır. Elektro-kültür plakasının üretiminde kullanılan malzemeler, yazılımlar, cihazlar ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar ile kitler tablo şeklinde sunulmuştur. Tez çalışması iki ana tasarım sürecine ayrılmıştır:

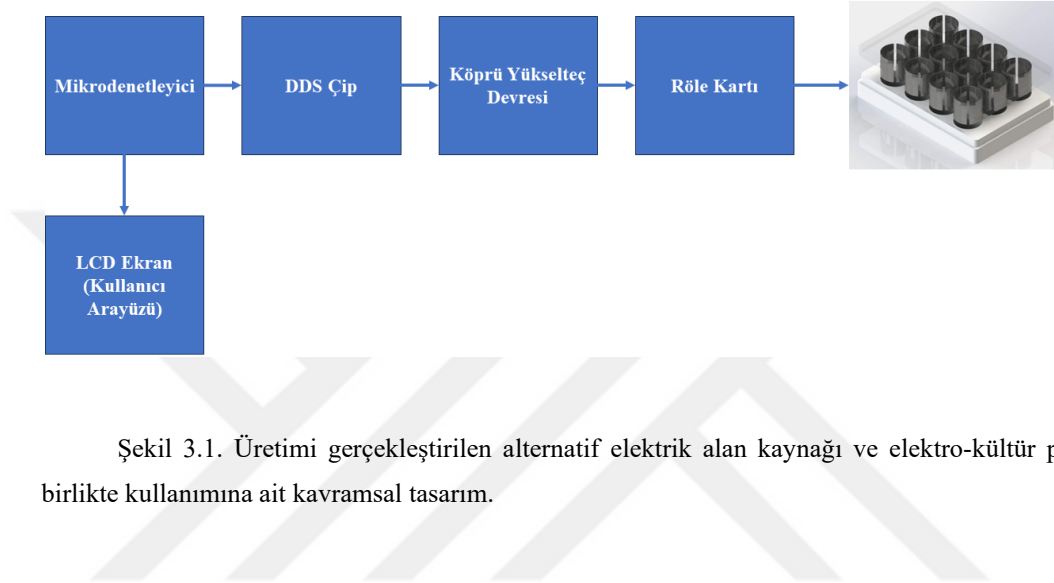
- Birinci tasarım ve üretim aşamaları, kullanılan malzemeler ve montaj süreçleri ayrıntılı olarak şematik çizimlerle sunulmuştur.
 - İkinci tasarımda, bazı malzemeler değiştirilmiş ve yeni üretim süreçleri açıklanmıştır.
- Son bölümde, elektro-kültür plakasının hücre kültürü deneylerinde kullanımı ve alternatif elektrik alanların hücre canlılığına etkisi hücre canlılık testi ve inverted mikroskop görüntüleriyle değerlendirilmiştir.

3.1. Alternatif Elektrik Alan Kaynağı Sisteminin Tasarımı ve Üretilmesi

Bu tez kapsamında tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen elektro-kültür plaka, alternatif elektrik alan kaynağına entegre edilmiştir. Bu kaynak, Başkent Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Eda Şevval AKSAN'ın tezi kapsamında geliştirilmiştir. Alternatif elektrik alan kaynağının üretim süreci aşağıda özetlenmiştir.

Alternatif elektrik alan kaynağı sisteminin üretiminde mikrodenetleyici ile DDS çiplerinden (Direct Digital Synthesis, chip) yararlanılmıştır. DDS çipleri 0,03 Hz çözünürlükte ve MHz seviyelerine kadar sinüs veya kare dalga sentezleyebilen çiplerdir. Bu çipler ticari olarak piyasadan rahatlıkla temin edilebilmektedir. Ayrıca, hangi frekansta sinyalin sentezleneceği mikrodenetleyici (protokolüne uygun olarak yazılımı yapılan) ile belirlenmiştir. Mikrodenetleyici ile tanımlanan bu sinyal (bilgi) ise DDS çipine gönderilerek istenilen frekans değerlerinde (0–500 kHz) sinyal sentezlenebilmektedir. Ancak, DDS çipi ile sentezlenecek sinyalin genliği düşük olduğundan, bu sinyalin yükseltilmesi için köprü yükselteç devresi, tüm elektrotların topraktan bağımsız hale getirilmesinde kullanılmıştır ve bu sayede elektrik alan uygulanmayacak elektrotların pasif durumda (yüzer durumda) kalması sağlanmıştır. Ayrıca, köprü yükselteç devresi, yük boyunca voltajda iki kat artış

sağlar ve bu durum daha yüksek bir elektrik alan oluşumuna olanak tanımıştır. 12-kuyucuklu hücre kültürü plakasında farklı yönlerde elektrik alan oluşturmak için 16 kanallı röle kartı kullanılmıştır. Alternatif elektrik alan kaynağı 0–500 kHz frekans ve 1–3V/cm genlik aralıklarında ve paslanmaz çelik elektrotlar uygulayabilen bir sistem olarak üretilmiştir ve Şekil 3.1’de alternatif elektrik alan maruziyet sistemi ve elektro-kültür plakanın birlikte kullanımına ait kavramsal tasarım verilmiştir.



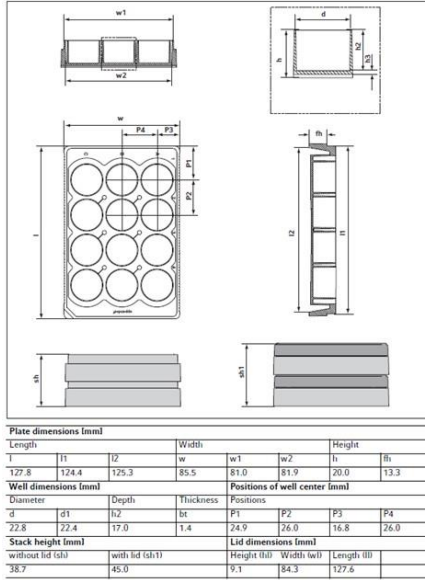
Şekil 3.1. Üretimi gerçekleştirilen alternatif elektrik alan kaynağı ve elektro-kültür plakanın birlikte kullanımına ait kavramsal tasarım.

3.2. Elektro-Kültür Plakanın Tasarımı ve Üretilmesi

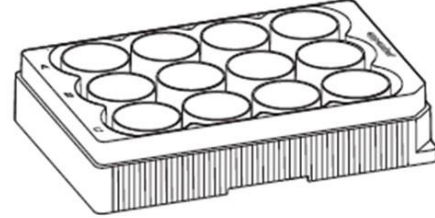
Tez çalışmasının bu kısmında, elektro-kültür plakasının tasarım ve üretim sürecine yer verilmiştir. Bu kapsamda, biyouyumlu malzeme olarak, paslanmaz çelik elektrotlar ve pleksiglas malzemeler tercih edilmiştir. Standart bir 12-kuyucuklu hücre kültür plakasının üretim boyutları (kuyucuklar için 21 mm çap, 17 mm derinlik; plaka dış boyutları için 13 cm uzunluk, 9 cm en) şeklindedir [45].

Elektro-kültür plaka, besiyeri içerisindeki hücrelere istenilen doğrultuda (doğu-batı veya kuzey-güney) alternatif elektrik alan uygulanmasına olanak tanıyacak yapıda her bir kuyucuğa dört adet paslanmaz çelik elektrot, toplamda 48 adet paslanmaz çelik elektrot monte edilmiştir. Bu elektrotlar, alternatif elektrik alan kaynağından gelen sinyalleri iletmek üzere tasarlanan baskı devre kartına (PCB) nikel şerit teller aracılığıyla lehimlenmiştir. Paslanmaz çeliğin lehimlenememesi nedeniyle, nikel şerit teller önce puntalanmış, ardından PCB üzerindeki bağlantı noktalarına lehimlenerek işlem tamamlanmıştır. Bu metal ve PCB yapının, standart 12-kuyucuklu bir plaka üzerinde doğru şekilde ve hasar almadan kullanılabilmesi için pleksi levhalardan oluşturulmuş kılavuz ve çerçeve yapılar

kullanılmıştır. Şekil 3.2’de standart bir 12-kuyucuklu hücre kültür plakasının teknik ölçüleri verilmiştir.



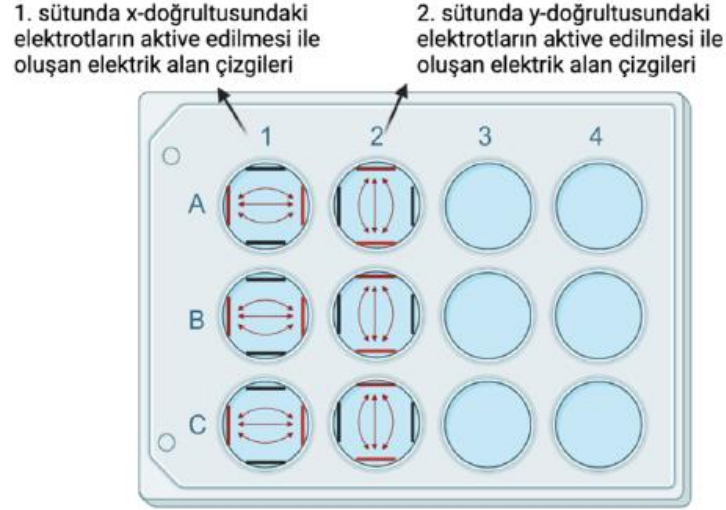
Technical Data Sheet
Eppendorf Cell Culture Plate, 12-Well
English (EN)



Description	Eppendorf Cell Culture Plate, 12-well 0030 721.110: with tissue culture treated surface 0030 721.012: with non-treated surface
Dimensions	Plate with lid: 127.8 x 85.5 x 20.0 mm (l x w x h)
Weight	Plate 41 g , lid 20 g
Filling volume	Working volume/well: 1.0 mL/well to 2.0 mL/well
Growth area	391.1 mm ² /Well

Şekil 3.2. Standart 12-kuyucuklu plakanın teknik ölçüleri (Eppendorf) [45].

Elektronik anahtarlama teknolojisi sayesinde, elektro-kültür plakasındaki kuyucuklara uygulanan sinyaller x ve y eksenlerinde (doğu-batı veya kuzey-güney doğrultusunda) hassas bir şekilde yönlendirilmektedir. Standart 12-kuyucuklu hücre kültür plakasının 1. sütunundaki hücelere x ekseninde alternatif elektrik alan uygulanırken, 2. sütundaki hücelere y ekseninde alternatif elektrik alan uygulanabilmektedir (Şekil 3.3). Bu plaka, 3 satır ve 4 sütun olmak üzere toplamda 12-kuyucuktan oluşan bir matris yapısına sahiptir. Her sütunda 3 kuyucuk bulunduğundan, her sütuna farklı doğrultularda elektrik alanlar eşzamanlı olarak iletilmiş ve her sütundaki 3 kuyucuk arasında tekrarlı bir uygulama sağlanmıştır. Elektro-kültür plakasının tasarımı ve elektrik alan yönleriyle ilgili ayrıntılı görsel Şekil 3.3'te sunulmuştur.



Şekil 3.3. Farklı doğrultulardaki (x ve y eksenlerinde) elektrot çiftlerinin aktive edildikten sonra oluşturdukları elektrik alan çizgileri.

3.2.1. Elektro-Kültür Plaka Birinci Tasarım ve Üretim Aşamaları

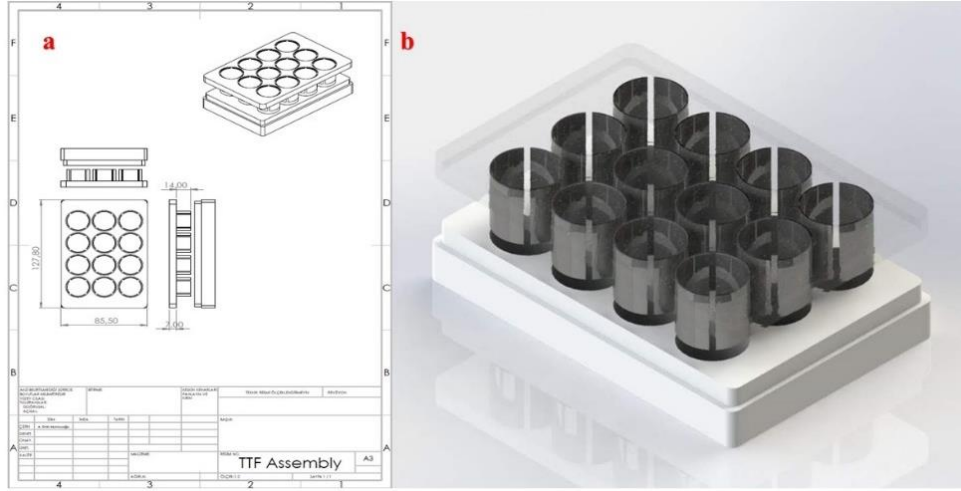
Bu aşamada, ihtiyaç doğrultusunda uygun elektro-kültür plakanın üretilmesi için uygulanan işlemler ve aşamalar detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Üretim sürecinde kullanılan malzeme listesi aşağıda sunulmuştur:

Tablo 3.1. Elektro-kültür plaka üretiminde kullanılan malzemeler.

Sıra	Malzemeler
1	Şeffaf pleksi levha, 9mm kalınlık
2	Şeffaf pleksi levha, 5mm kalınlık
3	Beyaz pleksi levha, 9mm kalınlık
4	Paslanmaz çelik elektrot: 304/316/316L (0,03mm kalınlık)
5	Paslanmaz çelik elektrot: 304/316/316L (0,3mm kalınlık)
6	Elektronik kart (PCB): Epoksi, 13cm x 9cm, tek katmanlı
7	Elektronik kart (PCB): Epoksi, 13cm x 9cm, çift katmanlı
8	Nikel şerit levha: 0.15mm kalınlık (puntalama ve lehimleme için)
9	Punta makinası: DH20 Pro+ nokta kaynak punta makinası
10	Standart 12-kuyucuklu hücre kültür plaka
11	Lehim
12	Konnektör, DB25, erkek

Tasarım ve üretim sürecinde, standart 12-kuyucuklu hücre kültür plakasının ölçüleri temel alınarak SolidWorks yazılımı (Dassault Systèmes, Fransa) kullanılarak modelleme

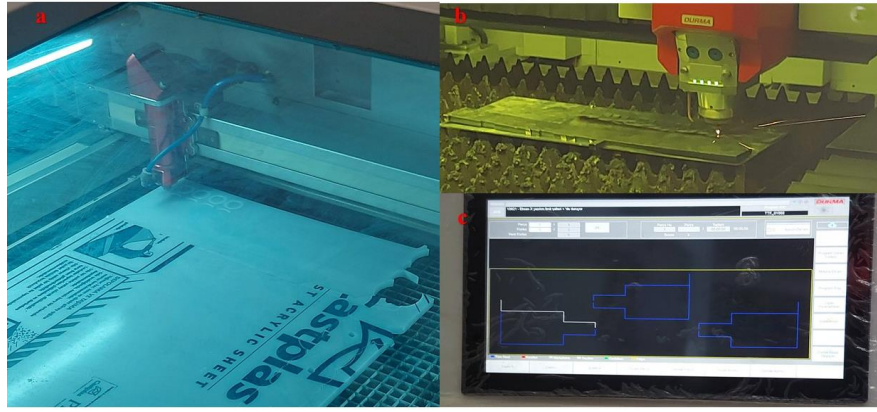
gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.4'te, elektrotların yer aldığı üst pleksi kapak, paslanmaz çelik elektrotlar ve hücrelerin yer alacağı (hücrelerin tutunup çoğalacağı) alt plaka tasarımlarına ait teknik çizimler ve üç boyutlu modeller sunulmuştur.



Şekil 3.4. (a) Standart bir 12-kuyucuklu hücre kültürü plakasının üretim ölçüleri referans alınarak tasarımı yapılan konkav yapılı paslanmaz çelik elektrotlar ile elektro-kültür plakanın Solidworks çizimi ve (b) pleksiden imalatı kararlaştırılan üst plaka ve elektrotların görünümü ile birlikte standart bir 12-kuyucuklu plaka.

12-kuyucuklu hücre kültürü plakalarının teknik çizimleri tamamlandıktan sonra, elektrotların yerleştirileceği üst plaka için pleksi levha (9 mm kalınlık) malzemesi tercih edilmiştir. Pleksi levha, lazer kesim cihazı (HD-F 3015 Fiber Lazer, Durma, Türkiye) kullanılarak standart 12-kuyucuklu kültür kabı boyutlara uygun olarak kesilmiştir (Şekil 3.5a). Ayrıca, bu kesim işlemi sırasında, elektrotların yerleştirileceği üst plakanın istenilen özelliklere (her bir kuyucuk için 4 adet elektrotun yerleştirileceği 14 mm uzunluğa ve 1 mm inceliğe sahip 4 adet delik) tam olarak uyumlu olması sağlanmıştır. Bu detaylar, üst plakaya elektrotların düzgün bir şekilde yerleştirilmesini ve deneylerin doğru bir şekilde gerçekleştirilmesini sağlamak için önemlidir.

Pleksi malzemeden üst plakanın işlenmesinden sonra, paslanmaz çelik elektrotların lazer cihazı ile kesim işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5b). Ön çalışmalar kapsamında, 0,03 mm kalınlığında paslanmaz çelik elektrotlar kullanılmıştır. Farklı doğrultularda elektrik alan polarizasyonunun hücre cevaplarına etkisinin incelenebilmesi için 12-kuyucuklu elektro-kültür plakanın (üst plaka) her bir kuyucuğu karşılıklı iki çift-elektrot (toplam dört elektrot) içerecek şekilde toplamda 48 adet paslanmaz çelik elektrot (0,03 mm kalınlık) kesilmiştir.



Şekil 3.5. (a) 9 mm kalınlıkta bir pleksi levhanın istenilen ölçülerde kesimi, (b) paslanmaz çelikten elektrotların lazer ile kesimi ve (c) operatör ekranında paslanmaz çelik elektrotların arayüz görüntüsü.

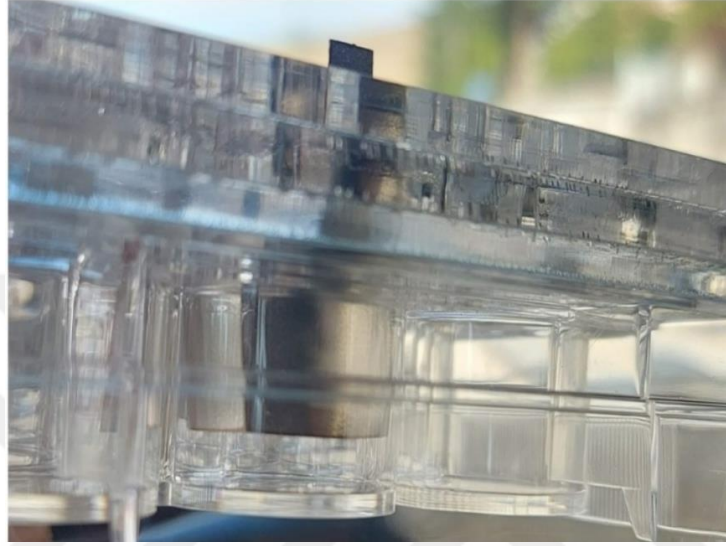
Paslanmaz çelik elektrotlar, üretim, montaj ve kullanım kolaylığı sağlamak amacıyla iki farklı uç ölçüsüne sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu tasarım, elektrotların bir ucu hücre kültürü ortamına uygun bir şekilde yerleştirilirken, diğer ucunun pleksi levha ve devre elemanlarına bağlantısını kolaylaştırmayı hedeflemektedir.

Paslanmaz çelik elektrotlar, üretim, montaj ve kullanım kolaylığı sağlamak amacıyla iki farklı uç ölçüsüne sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Elektrotların kuyucuk içerisinde yer alacak kısmı 14 mm genişliğinde olup, pleksi levha ve PCB'ye bağlantı yapılacak kısmı ise 4 mm genişliğindedir. Toplam elektrot uzunluğu, kuyucuk içerisinde 17 mm kalacak şekilde 27 mm olarak belirlenmiştir. Bu farklılıkları ve ölçüleri net bir şekilde göstermek amacıyla, Şekil 3.6'da elektrotların lazer kesim sonrası demonte hali ayrıntılı olarak sunulmuştur.



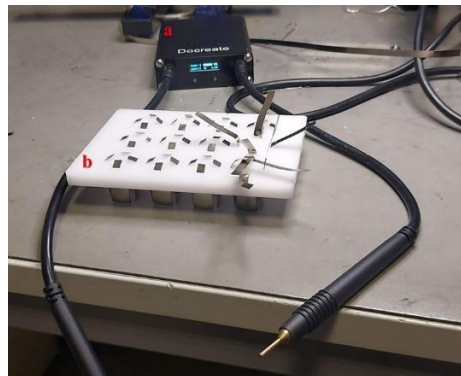
Şekil 3.6. Lazer kesimi sonrasında, paslanmaz çelik elektrotların demonte edilmiş hali (bu şekil, paslanmaz çelik elektrotların yapısını göstermek için kullanılmıştır).

Kesim işlemleri gerçekleştirildikten sonra, elektrotların pleksi-plakaya (üst plaka) montaj işlemi yapılmıştır (Şekil 3.7). Ancak, montaj işleminde elektrotları PCB'ye lehimlemek için gerekli olan elektrot-uzunluğu hesaba katılmadığından, elektrotlar 12-kuyucuklu hücre kültür plakasının tabanına tam oturmamıştır (Şekil 3.7). Şekil 3.7'de gösterilen boyut kesim hataları yukarıda bahsedilen durumlar dikkate alınarak düzeltilmiştir.



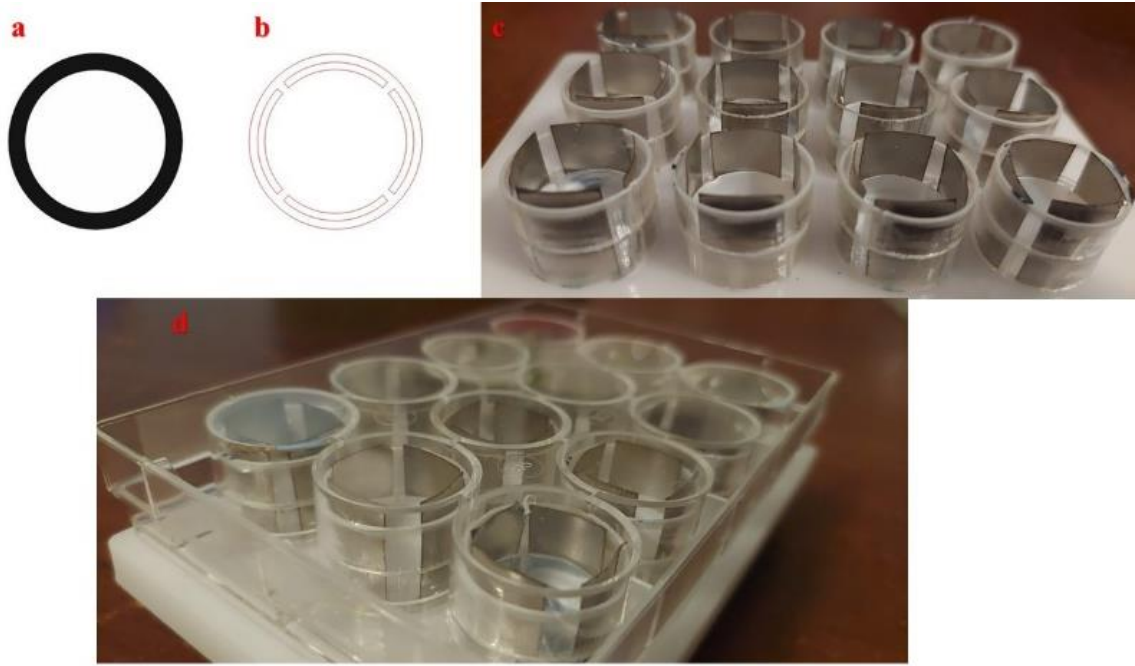
Şekil 3.7. Elektrotların hatalı kesim sonucu hücrelerin tutunacağı alt yüzeye ulaşamaması veya askıda kaldığının görseli.

Ön çalışmalar kapsamında tespit edilen bir diğer durum, PCB üzerine paslanmaz çelik elektrotların doğrudan lehimlenememesi olmuştur. Bu sorunu çözmek amacıyla, paslanmaz çelik elektrotlara (0,03 mm) nikel şerit teller (0,15 mm) puntalama yöntemiyle birleştirilmiştir (Şekil 3.8).



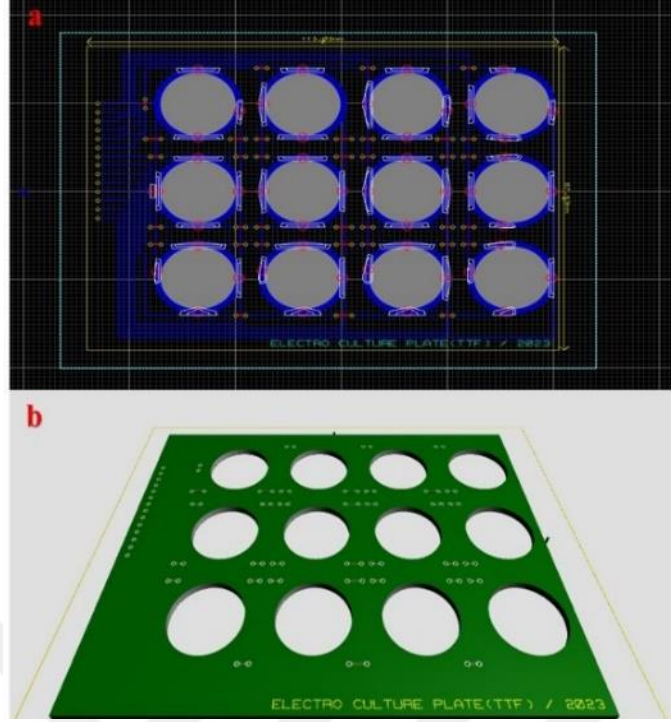
Şekil 3.8. Ön çalışmalar kapsamında, (a) puntalama işlemi sırasında punta makinasının ve (b) paslanmaz çelik elektrotların, nikel şerit tellerin ve pleksi levhanın görünümü.

Tasarım çalışmaları sırasında dikkate alınması gereken bir diğer önemli faktör, elektrotların dayanıklılığıdır. Elektrotların alt plakaya (12-kuyucuklu hücre kültür plakası) takılıp çıkarılması sırasında yapısının korunması (eğilme, bükülme gibi deformasyonların önlenmesi) amacıyla bir kılavuz tasarlanmış ve lazer kesim işlemleri uygulanmıştır (Şekil 3.9). Bu kılavuz, elektrotların montaj ve kullanım sırasında zarar görmesini engellemek için geliştirilmiştir. Ön çalışmalar kapsamında üretilen 12-kuyucuklu elektro-kültür plakasının alttan çekilmiş görüntüsü, PCB içermeyen haliyle Şekil 3.9'de sunulmuştur.



Şekil 3.9. (a) Pleksi yüzük yapının tasarım görseli, (b) pleksi kılavuz yapının tasarım görseli, (c) kılavuz ve yüzük yapının paslanmaz çelik elektrotlar üzerindeki görseli, (d) 12-kuyucuklu plaka üzerinde, pleksi plaka, paslanmaz çelik elektrotlar, pleksi kılavuz ve yüzük yapının görseli.

Tasarım sürecinin bir sonraki aşamasında, PCB'nin tasarımı ve üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, devre şeması tasarımı için Proteus (V8.13) yazılımından faydalanılmıştır. Tasarım, ihtiyaç duyulan boyutlara (13 cm x 9 cm) uygun olarak hazırlanmış ve PCB'ye aktarılmıştır. Baskı işleminin tamamlanmasının ardından, PCB üzerinde elektrotlara puntalanmış nikel şerit tellerin lehimleneceği noktalar, metal bir kılavuz tezgâhı kullanılarak freze işlemiyle delinmiştir. Bu işlemlerle ilgili görseller, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11'de sunulmuştur.



Şekil 3.10. a) Proteus V8.13 programı kullanılarak tasarımı ve çizimi yapılan PCB, (b) PCB'nin simülasyon görüntüsü (üst yüzey).



Şekil 3.11. (a) PCB'nin freze ile delinmesi, (b) elektronik kart tasarımının PCB'ye basıldıktan sonra, kartın nihai görünümü ve elektrot bağlantıları için açılan bağlantı noktaları.

Birinci tasarım ve üretim sürecinin ardından çeşitli çıkarımlar elde edilmiştir. Bu çıkarımlar doğrultusunda, olası hataların önlenmesi amacıyla elektro-kültür plakasının tasarımında ve paslanmaz çelik elektrotların malzeme kalınlığında bazı değişiklikler yapılması kararlaştırılmış ve bu değişiklikler uygulanmıştır. İlgili çıkarımlar ve yapılan iyileştirmeler, tez çalışmasının bulgular kısmında ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

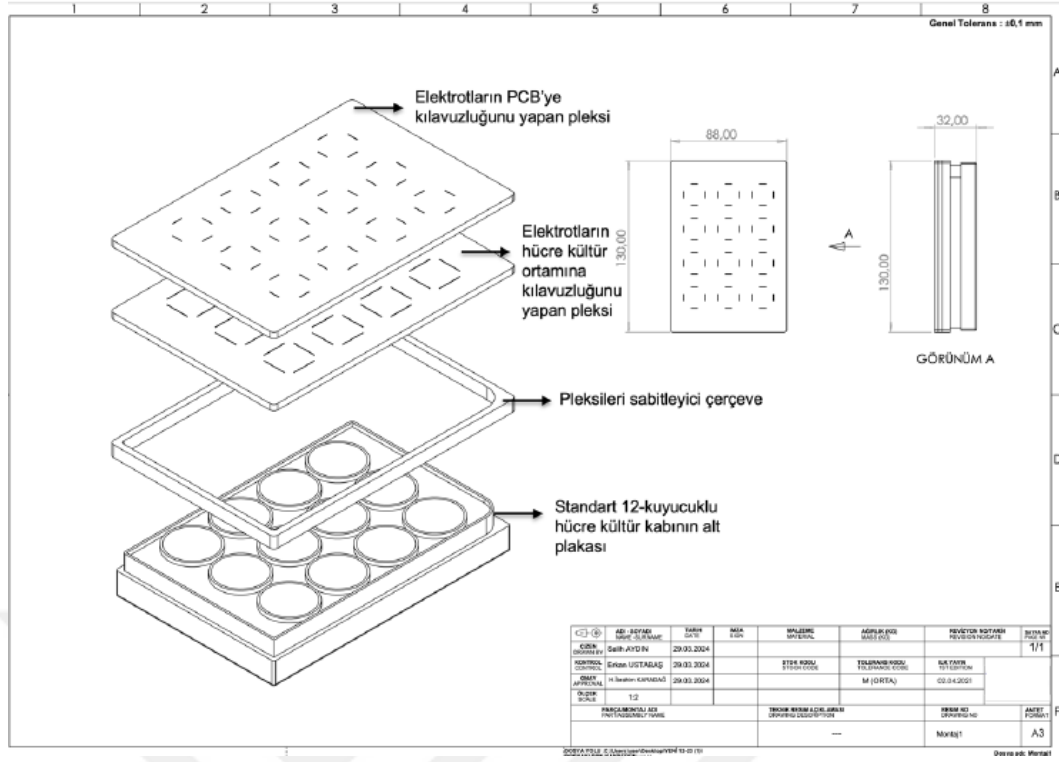
3.2.2. Elektro-Kültür Plaka İkinci Tasarım ve Üretim Aşamaları

Birinci tasarım süreci sırasında elde edilen çıkarımlar doğrultusunda, bu aşamada elektro-kültür plakanın üretimi için gerçekleştirilen işlemler ve aşamalar detaylı bir şekilde açıklanmıştır. İkinci tasarım ve üretim sürecinde kullanılan malzemelerin listesi aşağıda sunulmuştur.

Tablo 3.2. İkinci tasarım sürecinde kullanılan malzemeler.

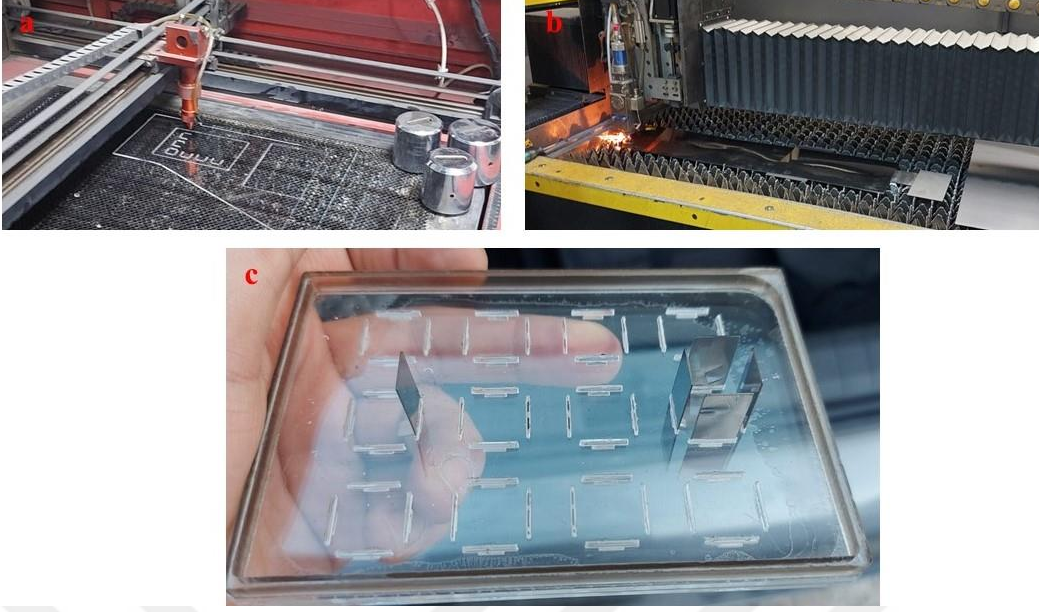
Sıra	Malzemeler
1	Şeffaf pleksi levha, 5mm kalınlık
2	Paslanmaz çelik elektrot: 304/316/316L (0,3mm kalınlık)
3	Elektronik kart (PCB): Epoksi, 13cm x 9cm, çift katmanlı
4	Nikel şerit levha: 0.15mm kalınlık (puntalama ve lehimleme için)
5	Punta makinası: DH20 Pro+ nokta kaynak punta makinası
6	Standart 12-kuyucuklu hücre kültür plaka
7	Lehim
8	Konnektör, DB25, erkek
9	Koruyucu Kapak (PORIMA PLA), 13 cm X 9 cm

Standart 12-kuyucuklu hücre kültürü plakası için SolidWorks yazılımı kullanarak yeni bir modelleme gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.12). Bu teknik çizim; paslanmaz çelik elektrotların PCB'ye montajına kılavuzluk eden pleksi plakayı (5 mm kalınlık), elektrotların hücre kültür ortamına kılavuzluğunu yapan pleksi plakayı (5 mm kalınlık), bu iki pleksi plakanın sabitlendiği çerçeveyi ve standart 12-kuyucuklu hücre kültür kabının alt plakasını (hücrelerin ekildiği plaka) içermektedir (Şekil 3.12).

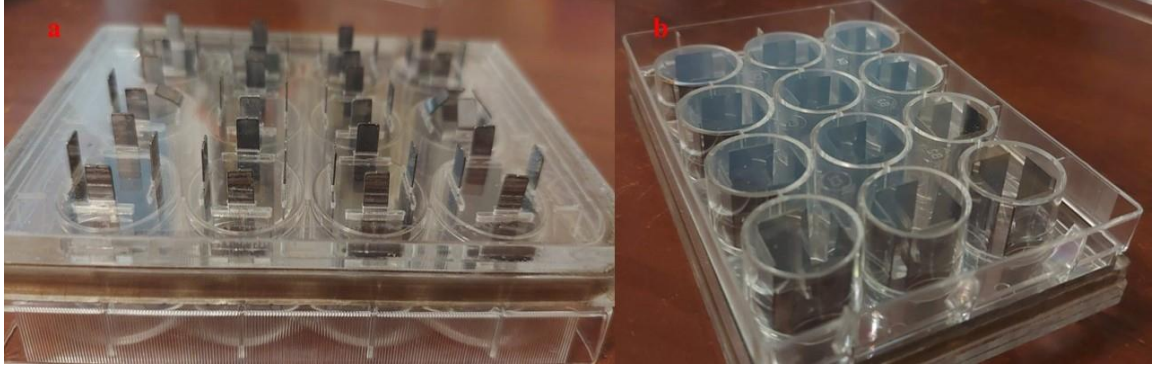


Şekil 3.12. 12-kuyucuklu elektro-kültür plakanın tasarımı ve teknik çizimi; paslanmaz çelik elektrotların PCB'ye montajına kılavuzluk eden pleksi plaka, elektrotların hücre kültür ortamına kılavuzluğunu yapan pleksi plaka, bu iki pleksi plakayı sabitleyici çerçeve (ortası boş) ve standart 12-kuyucuklu hücre kültür kabının alt plakası (hücrelerin ekildiği plaka).

Teknik çizimler tamamlandıktan sonra pleksi levhanın kesilmesi ve elektrot yuvalarının işlenmesi (Şekil 3.13b) lazer cihazı ile yapılmıştır. Ayrıca, 0,3 mm'lik paslanmaz çelik elektrotların (Şekil 3.13c) lazer kesim işlemleri gerçekleştirilmiştir. Lazer kesim işlemleri sonrası paslanmaz çelik elektrotlar ve pleksi plaka bir araya getirilerek standart bir 12-kuyucuklu hücre kültür plaka üzerine montajı yapılmıştır. Montaj sonrası oluşan yapının üst plaka görüntüsü (Şekil 3.14a) ve alt plaka görüntüsü (Şekil 3.14b) verilmiştir.



Şekil 3.13 (a) 0,3 mm lik paslanmaz çelik elektrotların, yeni tasarım pleksi levhaya montajı, (b) şeffaf pleksinin lazer ile elektrot yuvalarının doğrusal kılavuz yapıda işlenmesi (c) 0,3 mm'lik paslanmaz çelik elektrotların lazer ile kesilmesi.

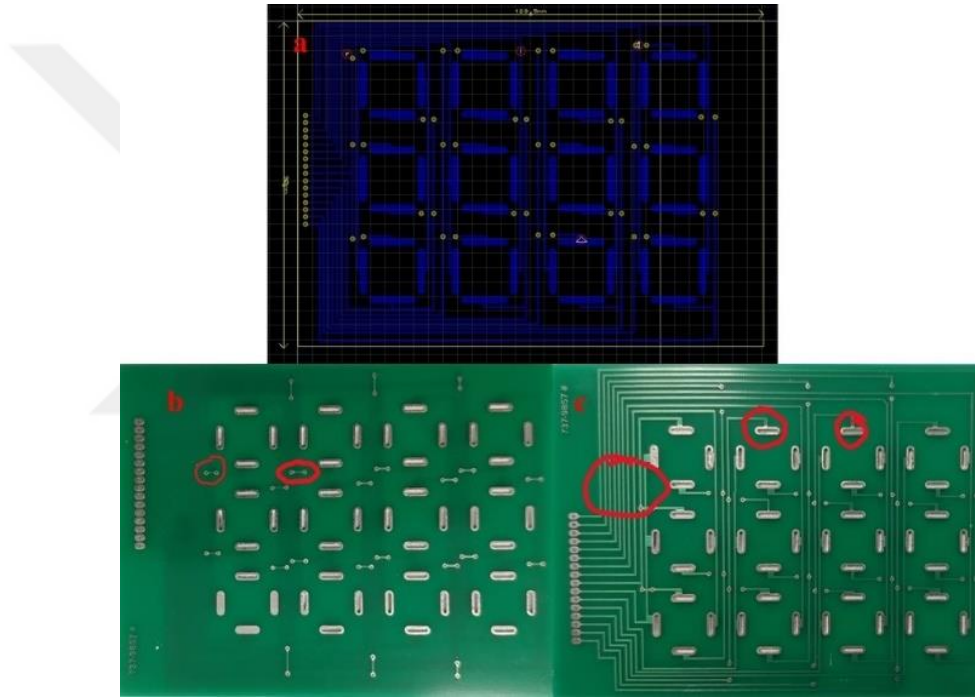


Şekil 3.14 (a) 0,3 mm'lik paslanmaz çelik elektrotların pleksi levhaya montajı (üstten görünüm), (b) 0,3 mm'lik paslanmaz çelik elektrotların pleksi levhaya montajı sonrasında 12-kuyucuklu alt plaka üzerindeki görüntüsü (alttan görünüm).

İkinci tasarım ve ön çalışma sürecinde üretilen PCB, elektrot yapısındaki değişiklikler nedeniyle revize edilmiştir. PCB'nin boyutlarında bir değişiklik yapılmamış ve ilk tasarımda olduğu gibi 13 cm x 9 cm ölçülerinde kalmıştır. Tasarım, Proteus V8.13 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Paslanmaz çelik elektrotlardaki yapısal değişiklikler, dikdörtgensel yapıya uygun olacak şekilde düzenlenmiş ve Şekil 3.15'te gösterilmiştir.

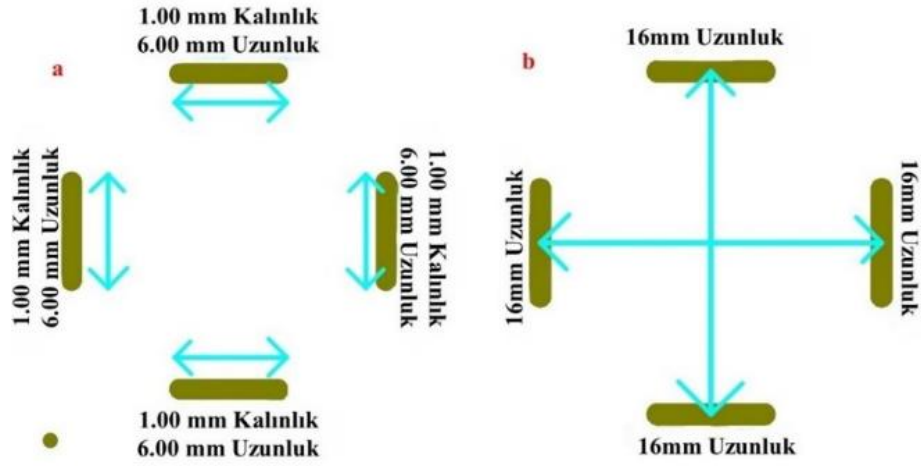
Elektrotların montajının sorunsuz gerçekleştirilmesi ve iletim güvenliğinin artırılması amacıyla, PCB üzerindeki montaj noktaları çift kat kaplama ile güçlendirilmiş, ayrıca iletim

yolları üzerindeki kısa devre riskini önlemek için korunaklı bir yapı ile kaplanmıştır. Devre üzerindeki atlama noktaları da çift kat kaplama ile tasarlanarak, ek bir bileşen ihtiyacı olmaksızın doğrudan kullanım için hazır hale getirilmiştir. Puntalama aşamasında, birinci tasarımda olduğu gibi paslanmaz çelik elektrotlar nikel şeritler ile puntalanmış ve PCB üzerine lehimlenmiştir. Lehimleme sırasında kullanılan nikel şerit tellerin boyutlarında veya malzeme yapısında bir değişiklik yapılmamış olup, paslanmaz çelik elektrotlar 0,3 mm kalınlığında (birinci tasarımda 0,03 mm olarak belirlenmişti) ve nikel şerit teller ise 0,15 mm kalınlığında tercih edilmiştir. Bu boyutlar hem elektrotların dayanıklılığını artırmak hem de iletkenliğin sorunsuz bir şekilde sağlanması amacıyla seçilmiştir.



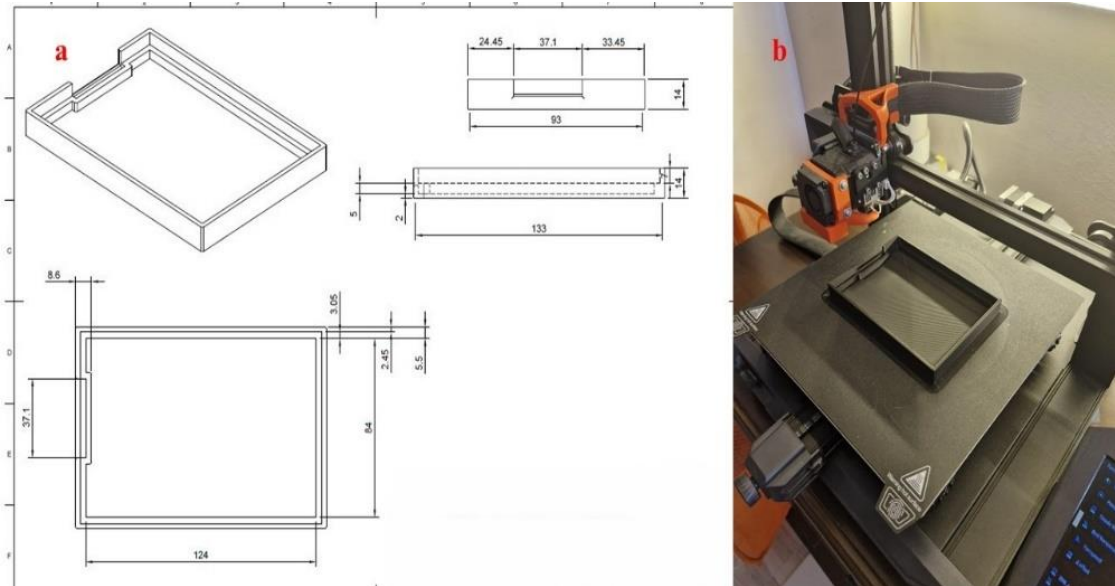
Şekil 3.15 (a) İkinci tasarım sonrası PCB'nin Proteus arayüzündeki görünümü, (b) atlama noktalarının kısa devre koruması ve iletim kolaylığı için çift katlı olarak tasarlandığı noktalar ve (c) paslanmaz çelik elektrotların bağlantı noktaları ile iletim yollarının yapısı.

PCB tasarımında kullanılan malzemelerin yapısı, ölçüleri ve baskı devre kartı üretimi sonrası gerçekleştirilecek montaj işlemleri dikkate alınarak, Şekil 3.16'da PCB tasarım ölçüleri detaylı bir şekilde belirtilmiştir.



Şekil 3.16. (a) PCB üzerinde elektrotların bağlantı yapılacağı noktaların boyutları 6 mm uzunluğunda bağlantı ucu, 1 mm elektrot kalınlığı (0,3 mm kalınlıktaki elektrotun montaj kolaylığı için), (b) karşılıklı elektrotlar arası mesafe.

Tasarım ve üretim süreçlerinin tamamlanmasının ardından, elektro-kültür plakasının elektronik kısmının kullanım sırasında (inkübasyon, dezenfeksiyon, taşıma, çarpma ve depolama koşulları) korunması amacıyla, 3D yazıcı ile üretilen koruyucu bir kapak tasarlanmıştır. Bu koruyucu yapı, elektro-kültür plakasının tüm kullanım koşullarında güvenliğini sağlamak için geliştirilmiştir (Şekil 3.17a ve Şekil 3.17b).



Şekil 3.17. Elektro-kültür plakanın, (a) uygulamalar ve çalışma sırasında korunmasını sağlayacak koruyucu kapak yapının tasarımı ve (b) üretimi.

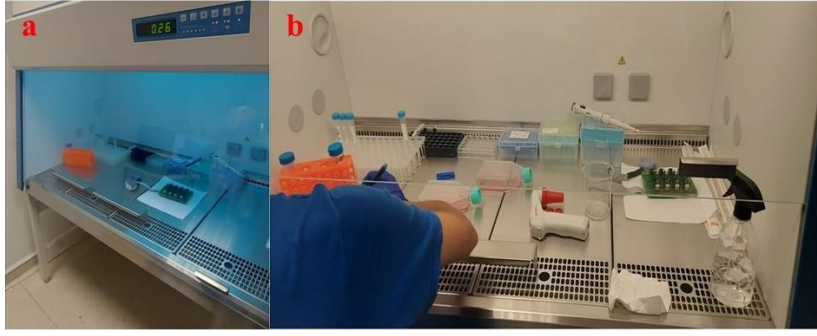
3.3. Hücre Kültür Çalışmaları

Elektro-kültür plakanın tasarım ve üretim işlemleri tamamlandıktan sonra hücre kültürü çalışmalarına geçilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında U87 glioblastoma hücre hattı kullanılmıştır.

Hücre açma işlemi: -80°C’de dondurulmuş olarak muhafaza edilen U87 hücreleri, tekrar aktif hale getirmek amacıyla 37°C su banyosunda çözölmeye bırakılmıştır. Çözölme tamamlandıktan sonra, hücreler 1000 rpm hızda ve +4°C’de santrifüjlenmiş, süpernatant atılarak taze besiyeri ile hücreler steril bir 25 cm²’lik flaska aktarılmıştır.

Hücre kültürü ekipmanları ve elektro-kültür plaka sterilizasyonu: Hücre kültürü işlemleri, biyogüvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir (Class II Biyogüvenlik Kabini, Thermo Scientific - MSC Advantage 1.2). Elektro-kültür plaka, biyogüvenlik kabininde otuz dakika boyunca UV ışığı ile sterilize edilmiştir (Şekil 3.18a). Elektro-kültür plakaya U87 glioblastoma hücrelerinin ekim işlemlerinin görseli Şekil 3.18b’de verilmiştir. Ayrıca, hücrelerin inkübasyon işlemlerinin gerçekleştirildiği inkübatör (RWD-D180, Çin) Şekil 3.19’da verilmiştir. Hücrelerin ekiminden itibaren gelişimleri, inverted mikroskop (Nikon Eclipse TS2, Japonya) ile düzenli olarak izlenmiştir (Şekil 3.20).

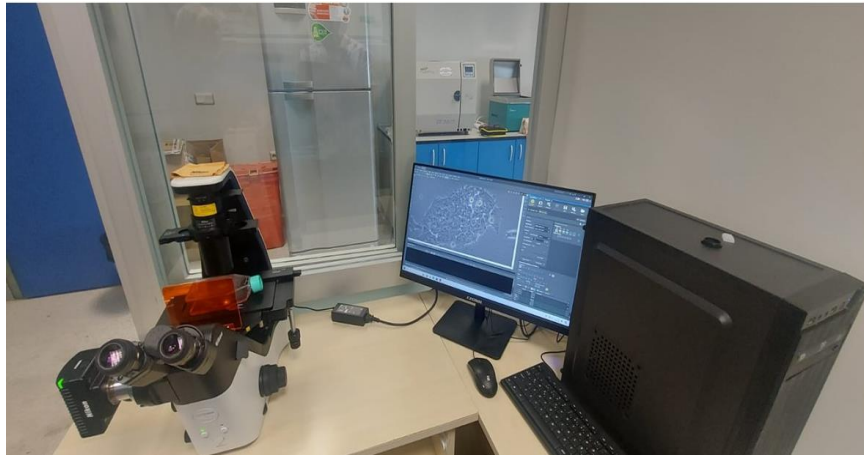
Hücre pasajlama ve 12-kuyucuklu elektro-kültür plakaya ekme işlemi: Çalışma için gerekli hücrelerin çoğaltılması ve uygun şartlarda yaşatılması amacıyla hücre pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. %80-%90 yoğunluğa (confluence) ulaşan hücreler, eski besiyeri atılarak tripsin ile muamele edilmiş ve 37°C, %5 CO₂’li inkübatörde 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, taze besiyeri eklenerek tripsinin etkisi nötralize edilmiştir. Hücreler, 1000 rpm hızda ve +4°C’de santrifüjlenerek canlı hücreler çöktürölmüştür. Üstte kalan süpernatant atılmış, elde edilen hücre pellet’i taze besiyeri ile homojenize edilmiş ve elektro-kültür plakaya her kuyucukta 2x10⁵ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin kültür kabının tabanına tutunmalarını sağlamak amacıyla, 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren bir inkübatörde inkübe edilmiştir.



Şekil 3.18. (a) Class II- Biyogüvenlik Kabini (Thermo Scientific- MSC Advantage 1.2) içinde elektrokültür plakanın otuz dakikalık ultraviyole ışık altında sterilizasyonu. (b) Class II–Biyogüvenlik kabini içerisinde hücre (U87) ekimi.

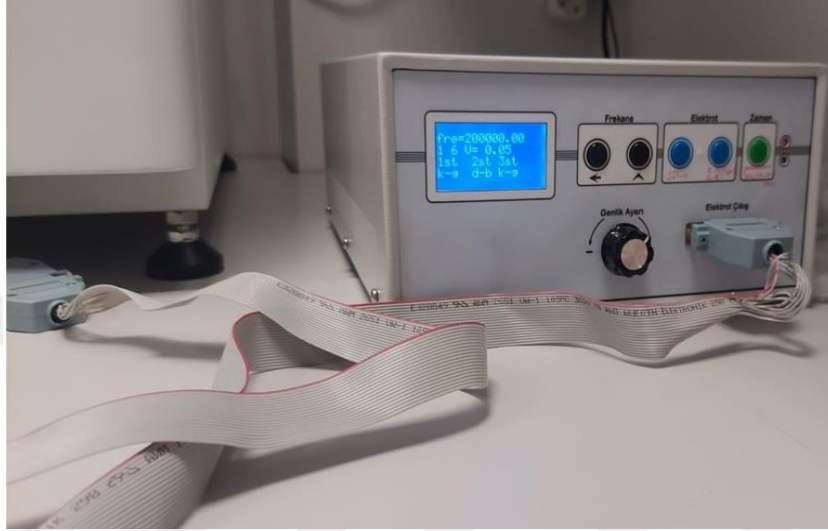


Şekil 3.19. Hücrelerin, 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem ortamında inkübasyon işlemlerinin gerçekleştirildiği inkübatör (RWD-D180, Çin).

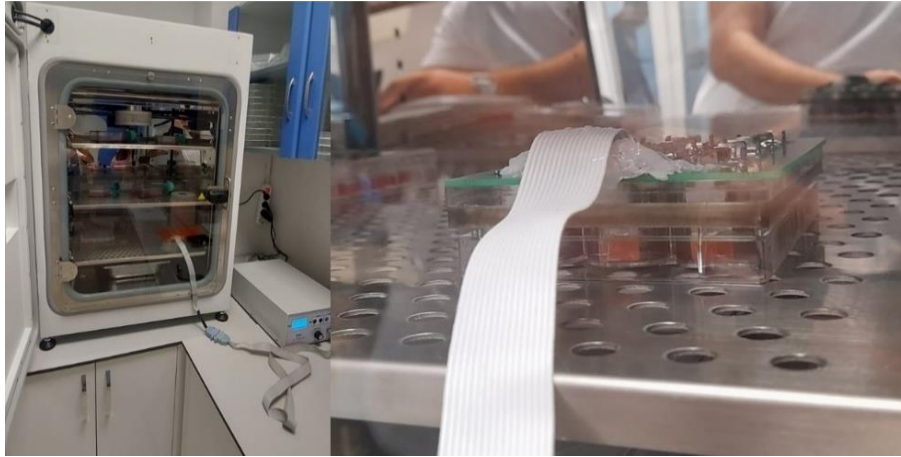


Şekil 3.20. İnverted Mikroskop (Nikon Eclipse Ts2) altında besiyeri içerisinde bulunan ve çoğalması beklenen U87 glioblastoma hücreleri

Hücre ekimi tamamlandıktan sonra, hazırlanan U87 hücrelerinin bulunduğu standart 12-kuyucuklu hücre kültür plakasına, üretilen elektro-kültür plaka kullanılarak alternatif elektrik alan uygulaması (200 kHz, 1,5 V/cm ve 48 saat) inkübatör içinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelere uygulanan alternatif elektrik alan parametreleri Şekil 3.21'de, uygulama sırasında elektro-kültür plakanın inkübatördeki konumlandırılması ise Şekil 3.22'de sunulmuştur.



Şekil 3.21. Hücrelere uygulanacak olan alternatif elektrik alan parametrelerinin gösterimi

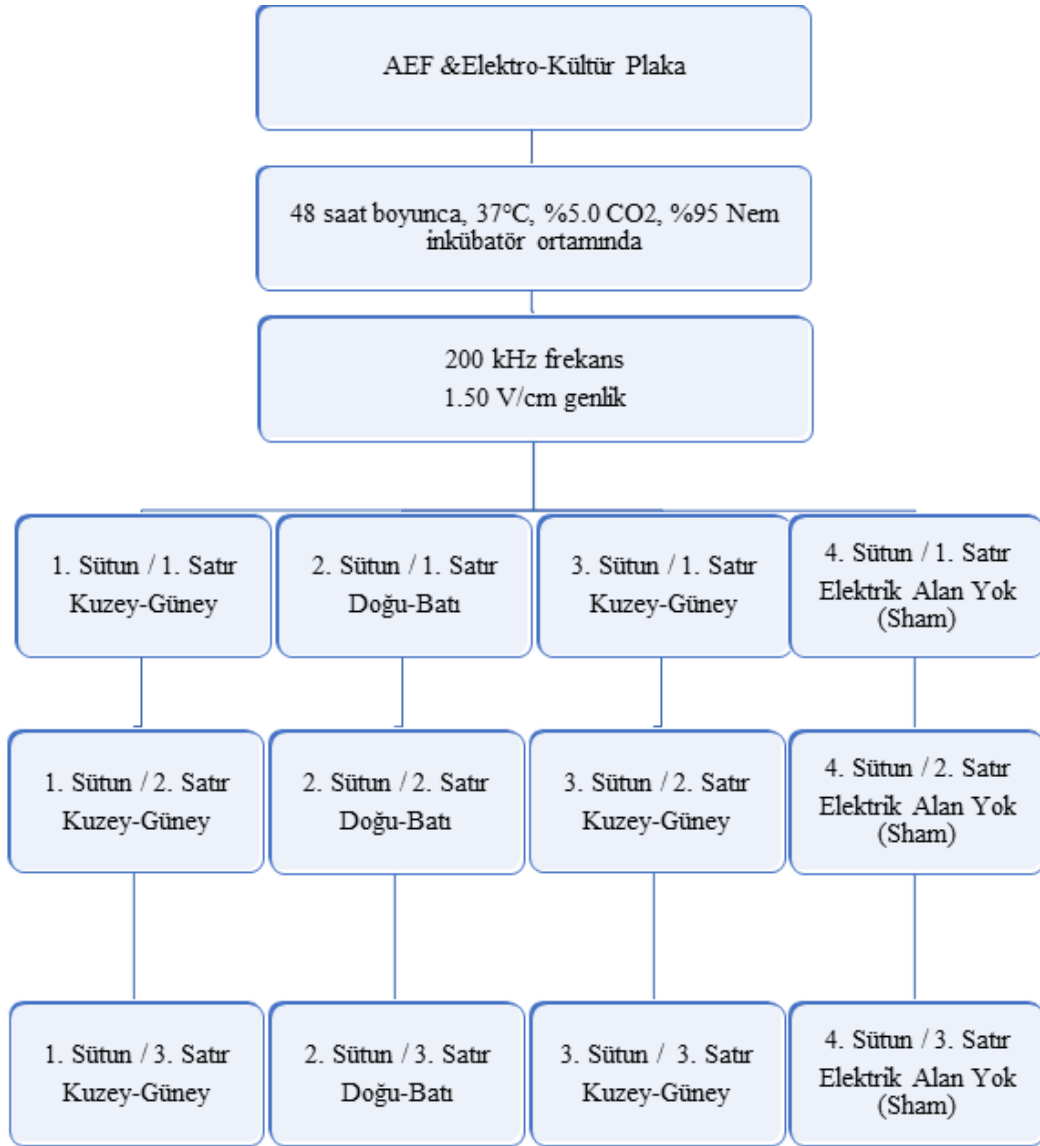


Şekil 3.22. U87 glioblastoma hücreleri ekilen elektro-kültür plakanın inkübatör içerisinde alternatif elektrik alan maruziyeti

Alternatif elektrik alan uygulama gruplarının belirlenmesi: Hücrelere uygulanan alternatif elektrik alanların gruplandırılması ve şeması, Tablo 3.3'te ayrıntılı olarak sunulmuştur. Deneyler sırasında, 12-kuyucuklu hücre kültür plakasında 1. sütuna kuzey-güney eksen, 2. sütuna doğu-batı eksen, 3. sütuna tekrar kuzey-güney eksen boyunca

elektrik alan uygulanmış, 4. sütunda ise yalnızca paslanmaz çelik elektrotların daldırıldığı sham grubu oluşturulmuştur. Ayrıca, farklı bir 12-kuyucuklu hücre kültürü plakasında kontrol grubu (negatif kontrol) kullanılmıştır. 48 saat boyunca uygulanan 1,5 V/cm ve 200 kHz frekansındaki elektrik alanın hücreler üzerindeki etkileri, hücre canlılığı analizi ve inverted mikroskop ile incelenmiştir.

Tablo 3.3. U87 glioblastoma hücre hattına alternatif elektrik alan uygulanma protokolü



Hücre canlılık analizi: Alternatif elektrik alanların hücelere uygulanmasının ardından, bu alanların hücreler üzerindeki etkileri hücre canlılığı testi ile değerlendirilmiştir. Canlı hücrelerde, mitokondriyal dehidrogenaz aracılığı ile tetrazolyum tuzlarının formazan

kristallerine dönüşmesine dayanan MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) kolorimetrik bir test olup, ölçülen absorbans değerleri doğrudan canlı hücre sayısı ile orantılıdır. Alternatif elektrik alan maruziyeti sonrasında (200 kHz, 1,5 V/cm ve 48 saat), her bir kuyucuğa 1000 µL DMEM-F12 ve 100 µl MTT çözeltisi eklenmiştir. Örnekler, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren nemli ortamda 3 saat inkübe edildikten sonra, üzerlerindeki MTT içeren ortam uzaklaştırılmıştır ve her bir göze 1000 µL izopropanol çözeltisi eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır.

3.4. İstatiksel Analiz

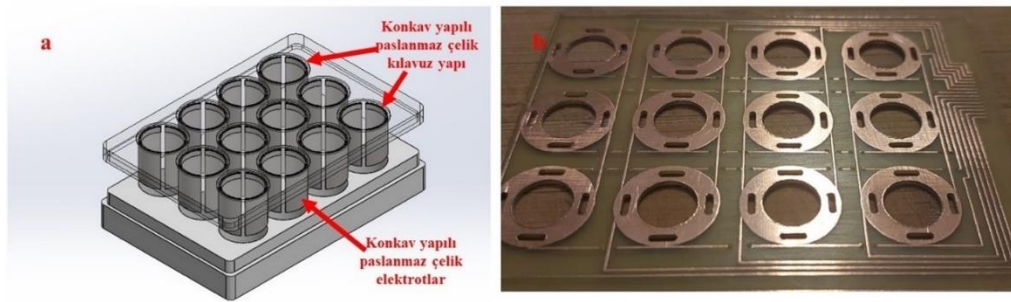
Hücre kültürü analizlerinde, veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Çalışma sonuçları, Graphpad Prism 8 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA) programı kullanılarak farklı grupların istatistiksel açıdan karşılaştırılması tek-yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanılarak yapılmıştır. 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

Bu bölümde, elektro-kültür plakanın tasarım ve üretim süreçleri sonrasında elde edilen test sonuçları ve deneysel bulgular detaylı bir şekilde sunulmuştur. İlk olarak, elektro-kültür plakanın tasarım ve üretim aşamaları ele alınmış, bu aşamalar sırasında ortaya çıkan yapıların entegrasyon süreçleri açıklanmıştır. Ardından, oluşan yapının test ölçümleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Son olarak, alternatif elektrik alan kaynağı ile elektro-kültür plakanın birlikte kullanılarak gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarına ve bu deneylerden elde edilen bulgulara yer verilmiştir.

4.1. Elektro-Kültür Plaka

Elektro-kültür plakasının tasarım ve üretim süreci iki aşamadan oluşmakta olup, bu süreçler tez çalışmasının materyal ve metot bölümünde (3. Bölüm) ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır. İlk tasarım ve üretim aşamasının ardından, yapıda karşılaşılan eksiklikler ve iyileştirilmesi gereken noktalar belirlenmiştir. İlk tasarımda elektrotlar, pleksi plaka, paslanmaz çelik elektrotların kılavuz yapıları ve baskı devre kartı konkav bir yapıya sahipti. Bu tasarımın temsili görselleri Şekil 4.1'de sunulmuştur. İlk aşamada tespit edilen eksiklikler, ikinci aşamada yapılan iyileştirmeler için bir temel oluşturmuş ve daha optimize bir tasarımın geliştirilmesini sağlamıştır.

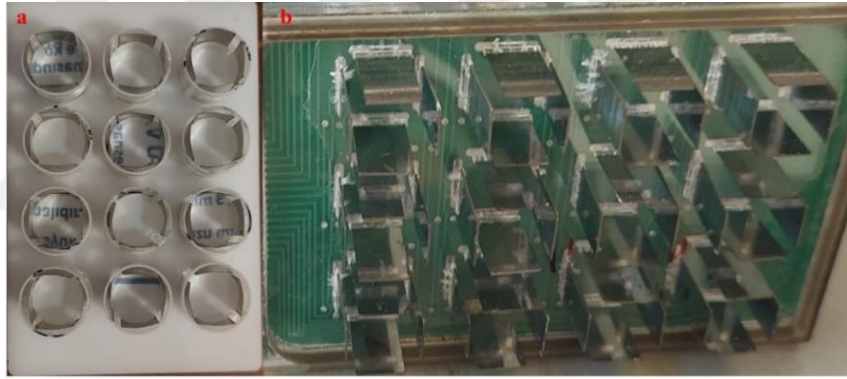


Şekil 4.1. (a) Konkav tasarıma sahip kılavuz pleksi ve paslanmaz çelik elektrotlar, (b) konkav yapıya sahip elektrotların montajı için üretilen baskı devre kartı.

İlk aşama sonucunda, elektro-kültür plakanın dayanıklılığını artırmak ve kullanım hatalarını minimize etmek amacıyla bazı tasarım değişiklikleri yapılmıştır. Bu değişiklikler kapsamında, konkav pleksi kılavuz yapı yerine doğrusal kılavuz yapı tercih edilmiş ve

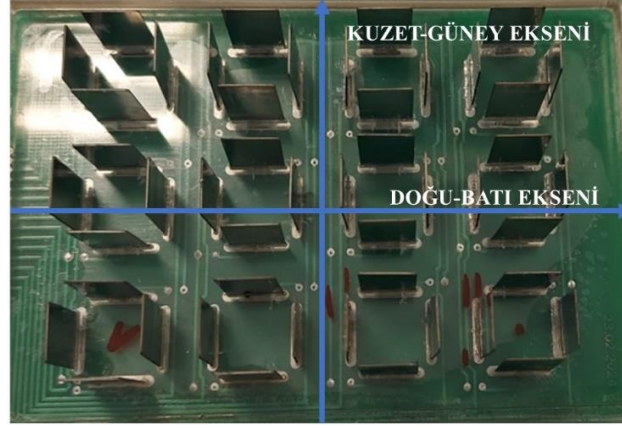
elektrotlar dikdörtgen levha şeklinde güncellenmiştir. Ayrıca, pleksi kılavuz plaka ve baskı devre kartı, bu yeni elektrot yapısına uygun şekilde revize edilmiştir. Bu düzenlemeler, elektrotların montaj sırasında deformasyonunu önleyerek, hücrelere daha homojen bir elektrik alan uygulanmasını sağlamıştır.

Tasarım sürecinde, paslanmaz çelik elektrotların kalınlığı 0,03 mm'den 0,3 mm'ye artırılmıştır. İlk tasarımda kullanılan daha ince elektrotlar, lazer kesimi sırasında malzeme yüzeyinde yanık izlerine ve kullanım sırasında bükülme gibi deformasyonlara neden olmuştur. Bu deformasyonlar, elektrotlar arasındaki mesafenin değişmesine ve elektrik alanın homojen dağılımını engellemiştir. Homojen bir elektrik alan sağlamak için elektrot kalınlığının artırılması gerekli görülmüştür. Diğer metot ve malzeme aşamalarında ise herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. İki tasarım arasındaki farklar Şekil 4.2'de görsel olarak sunulmuştur.



Şekil 4.2. Elektro-kültür plaka tasarımları, (a) birinci tasarım ve üretim süreci sonucu ortaya çıkan yapı, (b) ikinci tasarım ve üretim süreci sonucu ortaya çıkan yapı.

Elektrik alanlarının farklı doğrultularda uygulanmasının hücre yanıtlarına etkisini araştırmak için, her kuyucuğa karşılıklı yerleştirilmiş toplam dört paslanmaz çelik elektrot içeren bir yapı tasarlanmıştır. 12-kuyucuklu plakada oluşturulacak elektrik alanın yönleri, elektronik hızlı anahtarlama yöntemiyle kontrol edilerek farklı yönlerde uygulama yapılmasına olanak tanınmıştır. Bu anahtarlama işlemleri elektronik röleler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü deneylerinde kullanılan elektro-kültür plakasının son hali, Şekil 4.3'te verilmiştir.



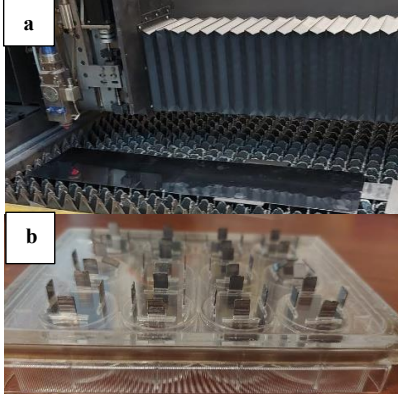
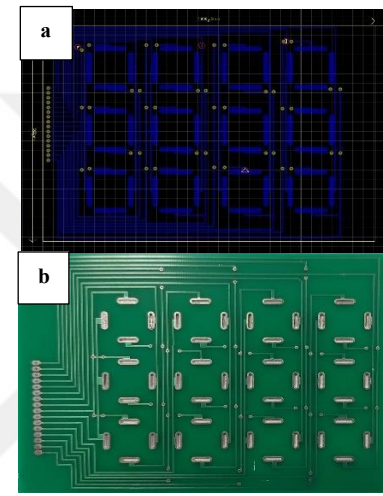
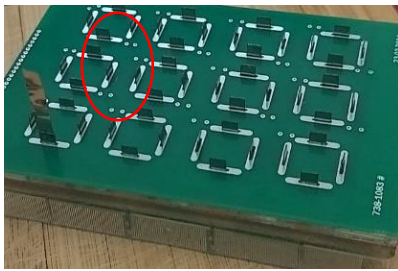
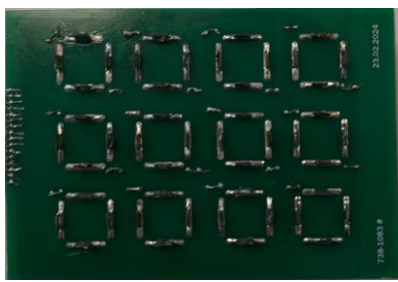
Şekil 4.3. Hücre kültürü deneylerinde kullanılan elektro-kültür plakasının son hali, elektrotların gösterimi ve eksen gösterimi

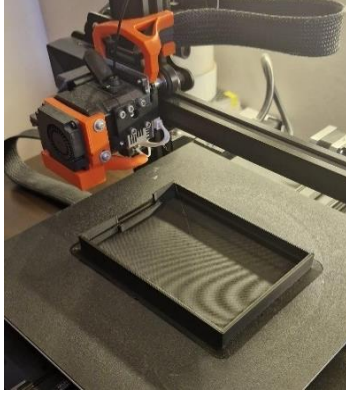
4.2. Üretim Sürecindeki Bileşenlerin Entegre Süreci

Elektro-kültür plakanın tasarım ve üretim sürecinde birçok alt ünite bulunmaktadır. Bu alt ünitelerin tamamının bir araya gelmesi ile elektro-kültür plaka oluşturulmaktadır. Tüm bu alt üniteleri ve entegre edilişlerini Tablo 4.1’de açıklayıcı bir şekilde özetlenmiştir.

Tablo 4.1. Elektro-kültür plakanın üretilen tüm alt ünitelerin entegre edilmesi ve üretim aşamaları

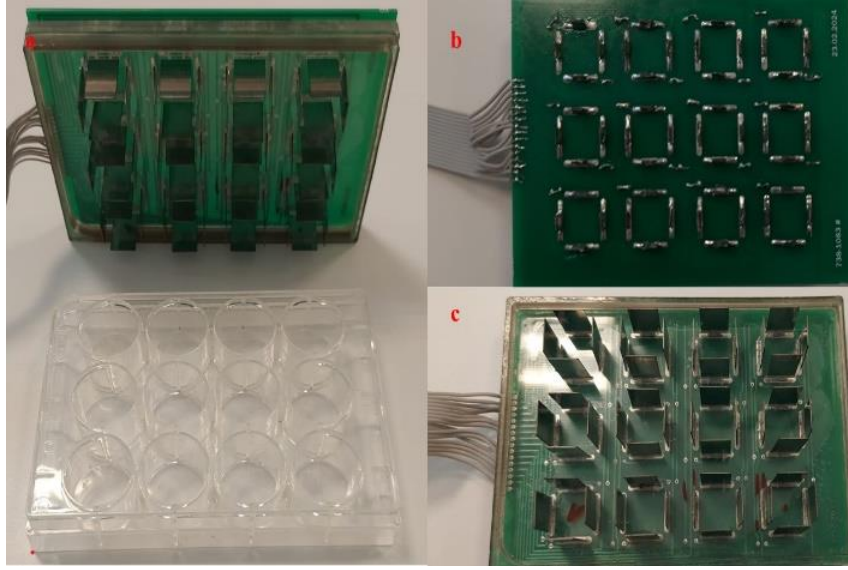
Aşama No	Görsel	Üretilen Alt Ünite	Açıklama
1		Pleksi plaka yapının üretimi.	Pleksi plaka yapının (a) lazer kesim cihazı ile kesilmesi ve (b) ortaya çıkan pleksi plaka

2		Paslanmaz çelik elektrotların üretimi.	Paslanmaz çelik elektrotların, (a) lazer kesim cihazlı ile kesilmesi, ve (b) pleksi plaka üzerine montajı.
3		Baskı devre kartının üretimi.	Baskı devre kartının (a) proteus tasarımı ve (b) çift kaplı yüzey sahip şekilde üretimi.
4		Aşama no 1 ve 2'ye ait alt ünitelerin bir araya getirilmesi.	Üretimi gerçekleştirilen alt ünitelerden PCB, pleksi plaka ve elektrotların birleştirilmiş hali. Nikel şerit tel ile paslanmaz çeliğin ilk puntalamanın denemesi (kırmızı işaretli alan).
5		Lehimleme süreci.	Üretim aşama no 1, 2 ve 3 sonrası tüm alt ünitelerin lehimleme ile birleştirilme işleminin (işlem sürecinde nikel şerit tel ve lehim teli kullanılmıştır)

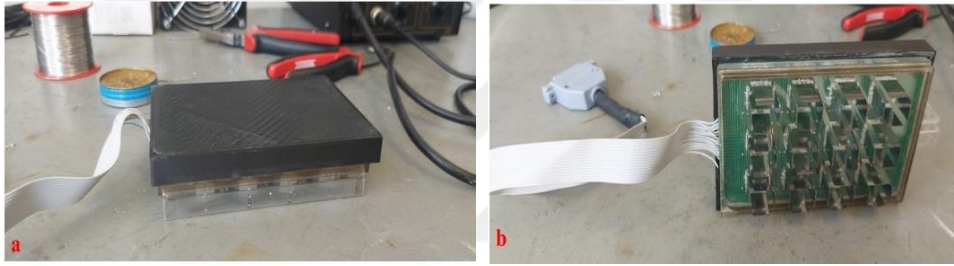
6		Korucuyu kapak üretimi.	PLA malzemeden 3D yazı ile elektro-kültür plakanın elektronik kısmını koruyucu kapak yapının üretilmesi.
7		AEA kaynağı ile DB25 konnektör kullanılarak entegre edilmesi.	Üretimi tamamlanan tüm alt ünitelerin birleştirilmesi sonrası ortaya çıkan elektro kültür plakanın tamamlanmış hali.

4.3. Üretimi Tamamlanan Elektro-Kültür Plaka

Tasarımı ve üretim süreci tamamlanan elektro-kültür plakanın montaj işlemlerinin tamamlanarak birleştirilmiş hali sunulmuştur. PCB ile paslanmaz çelik elektrotların bağlantısı, öncelikle nikel şerit tel ile elektrotların puntalanması ve ardından PCB yüzeyine lehimlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Lehimleme işlemi tamamlandıktan sonra 12-kuyucuklu elektro-kültür plakanın nihai görünümü Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Lehimleme işlemlerinin ardından, elektro-kültür plakasının kullanım ve depolama süreçlerinde korunması amacıyla koruyucu kapak takılmış ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Üretim ve tasarım aşamaları tamamlanan elektro-kültür plakasının, alternatif elektrik alan kaynağına bağlantısı ve standart 12-kuyucuklu hücre kültür plakasına uygulanışı, tamamlanmış sistem ile Şekil 4.6'da sunulmuştur.



Şekil 4.4 (a) PCB ile paslanmaz çelik elektrotların lehimlenmesi sonrası ve standart bir 12-kuyucuklu plaka ile elektro kültür plakanın görünümü, (b) paslanmaz çelik elektrotların PCB ile lehimlenmesi sonrası üst yüzey görüntüsü, (c) pleksi levha ve PCB bağlantısı sonrası elektro-kültür plakanın alt yüzey görünümü.



Şekil 4.5. Elektro-kültür plakanın koruyucu kapak ile birleştirilmiş görseli. (a) Standart bir 12-kuyucuklu hücre kültür plaka ile üst yüzey görünümü, (b) alt yüzey görünümü.



Şekil 4.6. Elektro-kültür plakanın, standart bir 12-kuyucuklu plakaya uygulanması sonrası elektrik alan kaynağına DB25 konnektörü ile bağlantısı.

4.4. Elektro-Kültür Plakanın Testleri

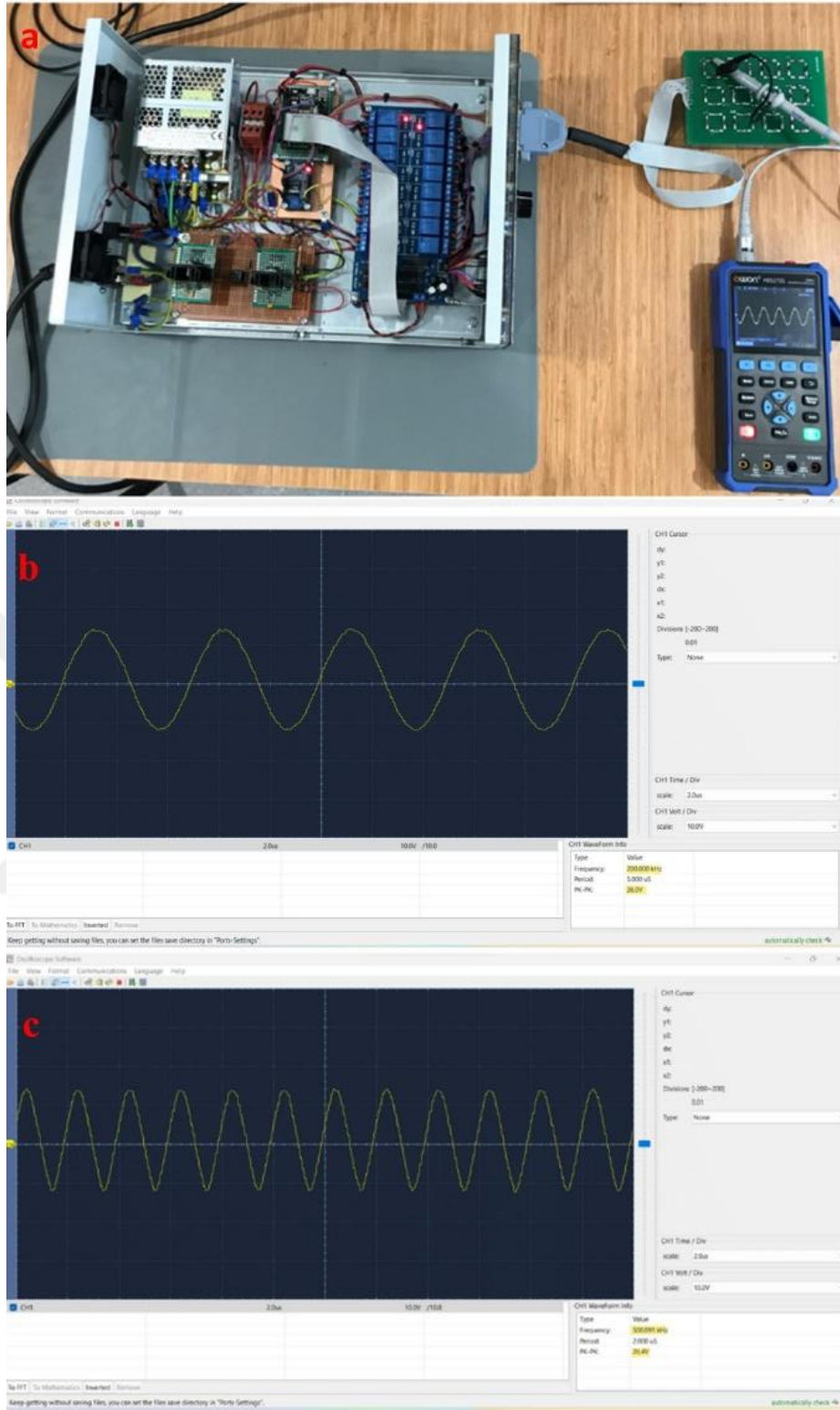
Alternatif elektrik alan kaynağının entegrasyonu tamamlandıktan sonra, bu entegrasyon ve ön panelde yer alan bileşenler Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Cihazın ön panelinde; LCD ekran ile parametre takibi, frekans ayarlamaları için butonlar, elektrik alan uygulanacak elektrotların seçimi, elektrik alan genliğinin ayarlanması için potansiyometre ve elektro-kültür plaka bağlantısı için DB25 konnektörü bulunmaktadır. Üretilen elektro-kültür plaka, alternatif elektrik alan kaynağı ile entegre edilerek elektronik testlere tabi tutulmuş ve bu testler, elektro-kültür plakanın doğru çalıştığını ve tüm bileşenlerin başarılı şekilde entegre edildiğini doğrulamak amacıyla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.7. Alternatif elektrik alan kaynağından elektro-kültür plakaya gelen sinyallerin doğruluk testleri.

Şekil 4.8'de belirtilen LED ışıkları yanarak, 1 ve 16 numaralı rölelerin, üretimi tamamlanan elektro-kültür plakanın 1. sütun kuzey-güney (y-doğrultusunda) elektrotlarının

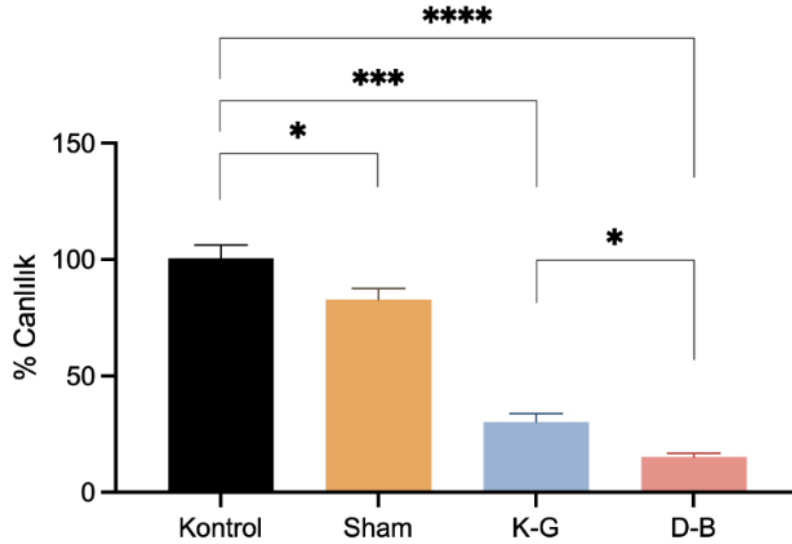
aktif olduğunu göstermektedir. Bu durumun doğruluğunu teyit etmek amacıyla, elektro-kültür plakanın 1. sütun kuzey-güney elektrotlarına gelen sinyallerin genlik ve frekans değerleri osiloskop ile ölçülmüştür. Örneğin, mikrogenetleyici tarafından 200 kHz frekansta ayarlanan sinyal, elektro-kültür plakasında yapılan ölçümde 200 kHz olarak doğrulanmış ve 26 V genlik değerine yükseltilmiştir (Şekil 4.8b). Benzer şekilde, mikrogenetleyici tarafından 500 kHz frekansta ayarlanan sinyal, elektro-kültür plakasında 500 kHz olarak doğrulanmış ve 26.4 V genlik değerine yükseltilmiştir (Şekil 4.8c). Ölçüm sonuçları, sinyal güzergahının şu şekilde özetlenebileceğini göstermektedir: Alternatif elektrik alan kaynağı tarafından belirlenen frekansta sinyal, röleler aracılığıyla elektro-kültür plakasındaki farklı doğrultudaki elektrotlara başarıyla iletilmiştir. 12-kuyucuklu elektro-kültür plakanın çalışması, elektrik alan kaynağı ile test edilmiş ve bu testler, tasarım ve üretimin başarıyla tamamlandığını ortaya koymuştur.



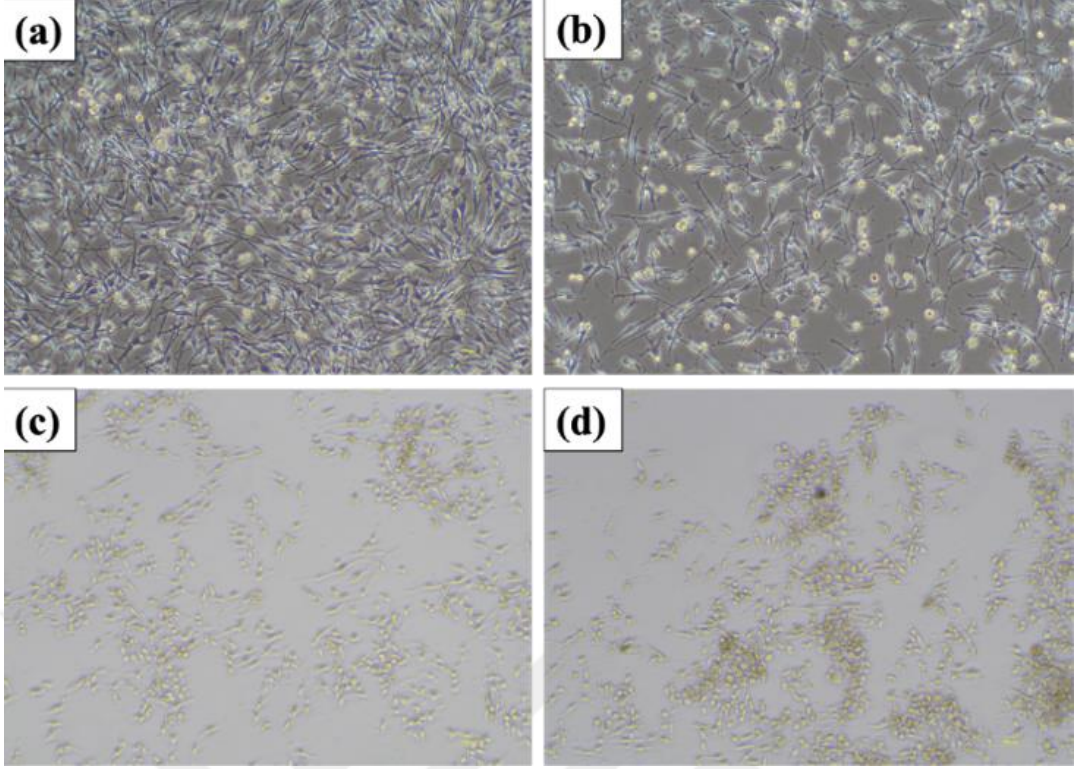
Şekil 4.8 (a) Üretimi tamamlanan elektro-kültür plakanın 1. Sütun kuzey-güney (y-doğrultusunda) elektrotlarının aktif olduğunun testi, (b) bu işlem doğrulanmak için elektro-kültür plakanın 1. sütun kuzey-güney elektrotlarına gelen sinyallerin genlik ve frekans değerleri (200 kHz, 26 V) osiloskop ile ölçümü, (c) mikrodenetleyici tarafından 500 kHz frekansta ayarlanan sinyal, elektro-kültür plakadan 500 kHz olarak doğrulanışı.

4.5. Hücre Kültürü Deneyleri Sonuçları

Çalışma kapsamında, U87 insan glioblastoma hücre hattına 48 saat boyunca alternatif elektrik alan kaynağı ile üretilen ve 12-kuyucuklu elektro-kültür plakasına iletilen sinyal (200 kHz, 1,50 V/cm) uygulanmış, hücre canlılık analizleri MTT testi ve inverted mikroskop kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü deneyleri sonucunda elde edilen canlılık yüzdeleri değerlendirildiğinde, sham grubunda hücrelerde kontrol grubuna göre canlılık oranının %82,8'ye ($p \leq 0,05$) düştüğü gözlemlenmiştir. Alternatif elektrik alan uygulanan gruplarda ise canlılık oranlarında belirgin bir azalma meydana gelmiştir. Kuzey-Güney (K-G) doğrultusunda uygulanan elektrik alan ile hücre canlılık oranı %30,26'ya ($p \leq 0,001$), Doğu-Batı (D-B) doğrultusunda ise %15,14'e ($p \leq 0,0001$) kadar düşmüştür ve istatistiksel olarak anlamlı azalmalar tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Ayrıca, D-B yönünde uygulanan alternatif elektrik alanların, K-G yönüne kıyasla hücre canlılığını daha fazla azalttığı tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$). Bu bulgular, hücre canlılığı üzerinde uygulanan yöneline bağlı farklı etkilerin olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, inverted mikroskop görüntüleri ile doğrulanmıştır. Kontrol grubuna (Şekil 4.10a) ve sham grubuna (Şekil 4.10b) ait hücrelerin canlılığı net bir şekilde gözlemlenmiştir. U87 hücrelerine K-G yönünde 48 saat boyunca uygulanan alternatif elektrik alan sonucunda elde edilen hücresel görüntüler Şekil 4.10c'de, D-B yönündeki uygulama sonucunda elde edilen görüntüler ise Şekil 4.10d'de sunulmuştur.



Şekil 4.9. İnsan glioblastoma hücre hattına (U87) 48 saat boyunca alternatif elektrik alan (200 kHz, 1,50 V/cm) uygulandıktan sonra elde edilen % canlılık grafiği, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,0001^{****}$, $n=5$, (K-G: Elektrotların kuzey-güney yönünde D-B: Elektrotların doğu-batı yönünde konumlandırılmaları).



Şekil 4.10. İnsan glioblastoma hücre hattının (U87) inverted mikroskop görüntüleri (10X), (a) kontrol hücreleri, (b) sham hücreleri (elektrotlar hücre içinde, elektrik alan uygulanmayan), (c) 48 saat boyunca K-G yönünde alternatif elektrik alan (200 kHz, 1,50 V/cm) uygulanan hücreler, (d) 48 saat boyunca D-B yönünde alternatif elektrik alan (200 kHz, 1,50 V/cm) uygulanan hücreler. (K-G: Elektrotların kuzey-güney yönünde, D-B: Elektrotların doğu-batı yönünde konumlandırılmaları)

5. TARTIŞMA

Tez çalışmasında, elektro-kültür plakanın üretilmesi ve *in vitro* ortamda U87 glioblastoma hücreleri üzerinde alternatif elektrik alan uygulanarak hücre canlılık deneylerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, ilk olarak TTFields uygulamasının geliştirilmesine yönelik yapılan *in vitro* çalışmalar özetlenmiştir. Ayrıca, alternatif olarak geliştirilen elektro-kültür plaka çalışmaları ile bu tezde üretilen elektro-kültür plakanın karşılaştırması yapılmıştır. Son olarak, tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlar “Bulgular” bölümündeki sıralama izlenerek literatür eşliğinde tartışılmıştır.

5.1. Elektro-Kültür Plakanın Üretiminin Değerlendirilmesi

Elektro-kültür plaka, paslanmaz çelik elektrotlar (304/316L), pleksi plakalar, çift kat kaplamalı baskı devre kartı (PCB), DB25 konnektör, nikel şerit tel, ribbon kablo ve koruyucu kapaktan oluşan bir sistem olarak tasarlanmıştır. Kullanılan paslanmaz çelik elektrotlar, hücrelerle temas edecek yüzeyleri inert ve dayanıklı olup, lazer kesim ve kullanım sırasında oluşabilecek hasarlara karşı yüksek direnç göstermektedir. Pleksi plakalar ve paslanmaz çelik elektrotlar, %70 alkol dezenfeksiyonu ve UV sterilizasyonu ile uyumludur. Deneyler, paslanmaz çelik elektrotların standart 12-kuyucuklu plakaya yerleştirme sırasında fiziksel olarak dayanıklı olduğunu ve baskı devre kartının çift kaplı yüzeyi sayesinde iletim yolu hasarı gibi sorunların yaşanmadığını göstermiştir.

Deneyler sırasında paslanmaz çelik elektrotlar, ayarlanan elektrik alan yönlerinde (K-G/D-B) sorunsuz şekilde elektrik alanını iletmiştir. Bu elektro-kültür plakanın, ticarileşme potansiyeli olup, hücre kültürü deneylerinde kullanıma uygun olduğu şeklinde değerlendirilmiştir. Elektro-kültür plaka standart 12-kuyucuklu hücre kültür plakası ile uyumlu olup, ek bir aksesuar veya alt sistem gerektirmemektedir.

5.2. Tümör Tedavi Alanlarının Klinik ve *In Vitro* Uygulamaları ve Elektrot Yapıların Değerlendirilmesi

Tümör Tedavi Alanları (TTFields), kanser tedavisinde destekleyici bir yöntem olarak giderek önem kazanmaktadır. TTFields, düşük yoğunluklu (1–3 V/cm) ve orta frekanslı (100–300 kHz) elektrik alanlarının, cilt yüzeyine yerleştirilen elektrotlar aracılığıyla tümör bölgesine non-invaziv olarak uygulanmasıyla gerçekleştirilen bir antikanser tedavisidir [46]. Bu yöntem, özellikle glioblastoma ve malin plevral mezotelyoma hastalarında uygulanmak üzere ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış yeni bir tedavi yaklaşımıdır [47]. TTFields uygulamasında elektrotların doğru yerleşimi, tedavi etkinliği ve dozajı açısından kritik bir rol oynamaktadır [48].

Son yıllarda, TTFields'in hücre kültürü uygulamalarında farklı hücre tipleri ve mekanizmalar üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla *in vitro* ortamlara uygun çeşitli cihazlar geliştirilmiştir [49-52]. Bu cihazlarda, elektrotlar, elektron değişimi ve toksik metal iyonlarının salınımını önlemek amacıyla kaplanarak yalıtılmıştır [49]. TTFields sistemleri arasında temel fark, kullanılan elektrotların yalıtım türü ile ilişkilidir. Bazı sistemlerde, metal tellerden yapılmış ve ince bir yalıtkan film ile kaplanmış elektrotlar [50] diğerlerinde ise yüksek dielektrik sabitine sahip malzemeler (örneğin, kurşun magnezyum niyobat-kurşun titanat (PMN-PT)) ile kaplanmış elektrotlar tercih edilmektedir [53].

Yalıtılmış tel elektrotlar, TTFields uygulaması için nispeten basit ve düşük maliyetli bir çözüm sunmasına rağmen, etkili elektrik alan yoğunluklarına ulaşmak için yüksek voltaj gereksinimi ve elektrotlar arasındaki sınırlı mesafe gibi dezavantajlara sahiptir. Buna karşılık, daha karmaşık tasarım ve üretim süreçleri gerektirse de, yüksek voltaj gerektirmemekte ve elektrotlar arasında hücre büyümesi için daha geniş bir alan sunabilmektedir [54].

Bu çalışmada üretilen elektro-kültür plakada kullanılan paslanmaz çelik elektrotlara kaplama işlemi uygulanmamıştır. Bu kaplama işlemleri, ilerleyen ürün geliştirme (ÜR-GE) aşamalarında ve kullanım koşullarına bağlı olarak, özellikle sıklık ve yıpranma payı göz önünde bulundurularak değerlendirilecektir. Ayrıca, standart 12-kuyucuklu plakaları kullanmamız, hücre büyümesi için geniş bir alan sağlayarak deneylerin etkin bir şekilde gerçekleştirilmesine olanak tanımıştır.

5.3. Elektro-Kültür Plakanın Alternatif Tasarımlar ve Yapılan Çalışmalarla Karşılaştırması

Literatür araştırmaları sonucunda, üretilen elektro-kültür plakaların tasarımları ve fiziksel parametreleri Tablo 5.1'de ayrıntılı olarak sunulmuştur. Bu tablo, farklı çalışmaların elektro-kültür plaka tasarımlarını ve ilgili fiziksel özelliklerini karşılaştırmalı bir şekilde göstermektedir.

Tablo 5.1. Literatürde kullanılan bazı elektro-kültür plakaların fiziksel ve teknik parametrelerinin karşılaştırılması.

Hürelere uygulanan frekans ve gerilim değerleri	Hücre kültür plaka	Kuyucuk başına yüzey alanı (cm ² /well)	Elektrotların cinsi	Elektrotlar arası mesafe (cm)	Elektrot Boyutu ve Şekli	Elektrotlar arasında oluşan akım değerler	Kaynak
100-200 kHz; 1-4V/cm	6-well plates	0,786 cm ²	Kurşun magnezyum niobat / kurşun titanat seramik ile kaplı	1 cm aralıklar ile elektrotlar yerleştirilmiş	Bilgi yok	0-30 nA aralığında bir akım uygulanmakta	[47]
0,1– 7,0 Hz; 0,5 V/cm	Bilgi yok	Bilgi yok	Grafit, Titanyum, Paslanmaz Çelik, Titanyum Nitrür Kaplı elektrotlar denenmiş.	Bilgi yok	1cm uzunluğunda, 0,2 cm çapında	1 mA/cm ²	[55]
200 kHz; 2,5 V _{pp}	12-well plates	Kuyucuk başına çap 15 mm. Alan 1,76 cm ²	Paslanmaz Çelik	15 mm	12 mm genişlik, 19 mm uzunluk	mA seviyesinde	[56]
50-500 kHz; 1-3 V/cm	12-well plates	Kuyucuk başına çap 15 mm. Alan 1,76 cm ²	Seramik inseert elektrot	35 mm	Bilgi yok	155 mA	[57]
100-300 kHz, 1-3V/cm	5-8mm çapında plate	1,33 cm ²	Cmsol üzerinde Conductor Ceramic Ve hidrojel den oluşan bir plate ve elektrot yapısı tasarlanmış	50 mm	18 mm çapında ve 3,1 mm uzunluğunda	31 mA/cm	[58]

Tablo 5.1'de belirtilen parametreler doğrultusunda, *in vitro* ortamda kullanılmak üzere geliştirilen elektro-kültür plakaların elektrot yapıları, boyutları ve malzeme seçimleri incelenmiş, bu tez çalışmasında paslanmaz çelik elektrotların kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürde referans alınan çalışmalar değerlendirildiğinde şu sonuçlara ulaşılmıştır: Titanyum elektrotlar, paslanmaz çeliğe kıyasla tedarik açısından oldukça maliyetlidir ve grafit veya karbon elektrotlar [55] ise dayanıklılık ve yeniden kullanılabilirlik açısından paslanmaz çelik kadar uygun değildir. Seramik kaplamalı kurşun elektrotlar [47] ise yüksek maliyetli olup üretim süreçleri zaman alıcıdır. Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan paslanmaz çelik elektrotlar, yüksek dayanıklılık, yeniden kullanılabilirlik ve kolay dezenfekte/sterilize edilebilme özelliklerine sahiptir. Ayrıca, paslanmaz çelik levhalar farklı boyut ve kalitelerde kolayca temin edilebilmektedir, bu da üretim sürecini daha pratik ve ekonomik hale getirmektedir.

Literatürde geliştirilen ve üretilen elektro-kültür plakaları, kanser hücrelerine elektrik alan uygulamak için çeşitli sistemler sunmaktadır, ancak her birinin belirli sınırlamaları vardır. Örneğin, bazı tasarımlar sabit ve polarize elektrik alanlar kullanarak farklı sürelerde uygulamalar yapmış, ancak etkili sonuçlar yalnızca 48 ve 72 saatlik maruziyetlerde gözlenmiştir. Bu sistemler tek bir yönde elektrik alan uygulamakta ve farklı yönlerdeki uygulamaların etkilerini araştırma imkânı sunmamaktadır [41]. Ayrıca, kullanılan elektro-kültür plakalarının malzeme bilgisi ve yeniden kullanılabilirliği konusunda sınırlı veri bulunmaktadır. Buna karşın, bizim geliştirdiğimiz elektro-kültür plaka, her iki doğrultuda istenilen seviyede ve tekrarlanabilir şekilde elektrik alan uygulayabilme yeteneğine sahip olup, alternatif elektrik alan maruziyet sistemleri için daha esnek bir kullanım sunmaktadır.

Başka bir çalışmada, krom/altın alaşımından üretilmiş elektrotlarla düşük yoğunluklu elektrik alan uygulanarak kanser hücrelerinin proliferasyonu incelenmiş, ancak istenilen anti-mitotik etkinin sağlanamadığı görülmüştür. Ayrıca, kullanılan malzemelerin maliyetli ve temininin zor olması, pratik kullanım açısından bir dezavantaj oluşturmuştur [42]. Benzer şekilde, platin elektrotların kullanıldığı bir sistemde de, elektrot konumlandırmasının homojen olmayan bir elektrik alan dağılımına neden olduğu ve bu durumun beklenen anti-mitotik etkilerle uyumlu olmadığı rapor edilmiştir [43]. Bu çalışmalarda karşılaşılan bu sınırlamaların aksine, bizim geliştirdiğimiz plaka, 3 satır ve 4 sütunlu yapısıyla aynı anda farklı doğrultularda elektrik alan uygulayarak daha homojen bir dağılım ve çeşitli yönlerdeki uygulamaların karşılaştırılmasına olanak tanımaktadır.

Son olarak, ticari olarak üretilmiş bir elektro-kültür plakası, nöroblastoma hücre hattı üzerinde düşük frekanslı monofazik darbelerle elektriksel uyarım sağlamış [44] ancak bu sistem de darbe frekansları ve dalga formu çeşitliliği açısından sınırlıdır. Bizim tasarımıımız da farklı yönlü elektrik alanlarını (K-G, D-B) aynı anda uygulama imkânı sunmaktadır. Bu şekilde, hücre kültür deneylerinde daha karmaşık ve kapsamlı elektriksel uyarı protokolleri uygulanabilmektedir.

5.4. Elektro-Kültür Plaka Üretiminde Gelecekte Geliştirilebilecek Noktalar

Paslanmaz çelik elektrotların baskı devre kartı (PCB) ile montaj aşamaları, puntalama ve lehimleme işlemleri için özel bir tezgâh gereksinimi açıktır. Bu tezgâh, paslanmaz çelik elektrotların konumlandırılmasını daha hassas ve verimli hale getirecek, böylece üretim sürecinde hata olasılığını minimize edecektir. Ayrıca, baskı devre kartı (PCB) üzerinde DB25 bağlantı konnektörleri için alternatif bir tasarım, kullanım kolaylığını artıracak bir sistem üretimini mümkün kılacaktır. Buna ek olarak, standart 12-kuyucuklu hücre kültür kabına kıyasla, tasarımı ve üretimi yapılan pleksi plaka yapısı, tek parçadan oluşan yekpare paslanmaz çelik elektrotların dış yüzeylerini koruyan bir kılavuz ile desteklenerek üretilir.

5.5. Karşılaştırmalı Analiz: Alternatif Çalışmaların Deneysel Bulguları

Bu bölümde, literatürdeki ve önceki benzer çalışmaların deneysel sonuçlarıyla yapılan karşılaştırma sunulmaktadır. Bu çalışma çerçevesinde, üretilen elektro-kültür plaka kullanılarak inkübatör ortamında uygulanan alternatif elektrik alanının (1,5 V/cm genlik, 200 kHz frekans) U87 glioblastoma hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, kontrol hücre grubuna kıyasla, maruziyet gruplarında hücre canlılık oranları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır. Benzer çalışmaların hücre kültür deney sonuçlarıyla yapılan karşılaştırmalarda, düşük yoğunluklu alternatif elektrik alanının apoptozu (programlanmış hücre ölümü) arttırdığı ve hücre proliferasyonunu (bölünmesini) engellediği doğrulanmıştır [50-55] Bu sonuçlar, çalışmamız ile uyumludur.

6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, glioblastoma gibi yüksek mortalite oranına sahip beyin kanserlerinin tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak alternatif elektrik alanların kullanımını inceleyen bir elektro-kültür plakasının tasarımı ve üretimi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen elektro-kültür plakası, standart 12-kuyucuklu hücre kültürü plakalarına uyumlu olarak tasarlanmış olup, paslanmaz çelik elektrotlar içerir ve AEA'ların hücrelere eş zamanlı ve kontrollü bir şekilde uygulanmasını sağlar. Her kuyucukta, K-G ve D-B yönlerinde olmak üzere toplamda kırk sekiz paslanmaz çelik elektrot kullanılmıştır, böylece farklı yönlerde elektrik alanlar uygulanmıştır.

Yapılan deneylerde, aynı sütun içerisindeki üç kuyucuk ile doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlanmış ve validasyon testleri ile istenen elektrik alan şiddetinin üretildiği doğrulanmıştır. Hücre kültürü ön testlerinde, U87 glioblastoma hücrelerine, 200 kHz frekansta ve 1,5 Vpk/cm genlikteki alternatif elektrik alanlar (K-G ve D-B yönlerinde) 48 saat boyunca uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubuna kıyasla, sham grubunda hücre canlılık oranı %82,8, Kuzey-Güney (K-G) grubunda %30,26 ve Doğu-Batı (D-B) grubunda ise %15,14 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı azalmalar göstermektedir (K-G: $p \leq 0,001$; D-B: $p \leq 0,0001$). Ayrıca, D-B yönünde uygulanan AEA'nın, K-G yönüne kıyasla hücre canlılığını daha fazla azalttığı gözlemlenmiştir ($p \leq 0,05$).

Bu bulgular, alternatif elektrik alan uygulamalarının hücre canlılığı üzerinde yöneline bağlı olarak farklı etkiler yarattığını göstermektedir. Bu sonuçlar, geliştirilen elektro-kültür plakalarının *in vitro* çalışmalar için etkin bir şekilde kullanılabileceğini doğrulamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Zhao, "Tumor-treating fields (TTFields)-based cocktail therapy: a novel blueprint for glioblastoma treatment," *American Journal of Cancer Research*, 2021.
- [2] A. A. Aguilar, "Permeabilizing Cell Membranes with Electric Fields.," *Cancers*, 2020.
- [3] P. P. Andreas F. Hottinger, Roger Stupp, (2016) "Tumor treating fields: a novel treatment modality and its use in brain tumors." *Neuro-Oncology*
- [4] R. A. W. Angela A. Pathiraja, Alexander C. von Roon, Paul Ziprin and Richard Bayford, "The clinical application of electrical impedance technology in the detection of malignant neoplasms: a systematic review," *Journal of Translational Medicine*, 2020.
- [5] Berkelmann, "Tumour-Treating Fields (TTFields): Investigation on the mechanism of action by electromagnetic exposure of cell in telophase/cytokinesis," *Scientific Reports*, 2019.
- [6] *Novocure*. TTFields: a radical new approach to cancer treatment using electric fields, 2017.
- [7] P. Zhu, and Zhu, J. J., "Tumor treating fields: a novel and effective therapy for glioblastoma: mechanism, efficacy, safety and future perspectives.," *Chinese Clinical Oncology*, 2017.
- [8] S. S. a. C. B. Patel, (2022) "Anti-cancer mechanisms of action of therapeutic alternating electric fields (tumor treating fields [TTFields])," *Journal of Molecular Cell Biology*
- [9] C. Johnson. (2014) Combining Electromagnetic Fields with Chemotherapy. *Cancer Research*.

- [10] S. C. Mustafa Emre, Sevil Zencir, Isa Unlukurt, Ibrahim Kahraman & Zeki Topcu, (2010) "Oxidative Stress and Apoptosis in Relation to Exposure to Magnetic Field.," *Springer*.
- [11] S. Patel. (2013) Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Electromagnetic Fields. *Journal of Oncology*.
- [12] ClinicalTrials.gov. (2021) *Clinical Trials on Electromagnetic Fields in Cancer Treatment*. .
- [13] N. A. Gbolahan Olatunji, Temiloluwa Adefusi, Emmanuel Kokori, Olumide Akinmoju, Ismaila Yusuf, Tobi Olusakin, Muhammad Ali Muzammil, (2023) "Efficacy of tumour-treating fields therapy in recurrent glioblastoma A narrative review of current evidence," *Medicine*.
- [14] R. Stupp. (2015) Tumor Treating Fields in Cancer Therapy. . *Neuro-Oncology*.
- [15] K. D. S. E. L. E. T. Wong, (2016)"An Overview of Alternating Electric Fields Therapy (*NovoTTF Therapy*) for the Treatment of Malignant Glioma," *Springer*.
- [16] R. S. S. Tali Voloshin, Alexandra Volodin, Reuben Ruby Shamir, NoaKaynan, Einav Zeevi, Lilach Koren, Anat Klein-Goldberg, Rom Paz, Moshe Giladi, Zeev Bomzon, Uri Weinberg and Yoram Palti, (2020) "*Tumor Treating Fields (TTFields) Hinder Cancer Cell Motility through Regulation of Microtubule and Actin Dynamics*," *Cancers*.
- [17] R. S. S. Moshe Giladi, Tali Voloshin, Yaara Porat, Mijal Munster, Roni Blat, Shay Sherbo, Zeev Bomzon, Noa Urman, Aviran Itzhaki, Shay Cahal, Anna Shteingauz, Aafia Chaudhry, Eilon D Kirson, Uri Weinberg & Yoram Palti,(2015) "Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells," *Scientific Reports*.
- [18] F. Y. Xing Li, Boris Rubinsky, (2020)"A Theoretical Study on the Biophysical Mechanisms by Which Tumor Treating Fields Affect Tumor Cells During Mitosis," *IEEE*.

- [19] F. A. Carrieri, "Tumor Treating Fields: At the Crossroads Between Physics and Biology for Cancer Treatment," *Frontiers in Oncology*, 2020.
- [20] T. O. Hideya Nakamura, Masaya Tajima, Ryuji Kawano, Misa Yamaji, Shuji Ohsaki and Satoru Watano, "Enhancement of cell membrane permeability by using charged nanoparticles and a weak external electric field," *Royal Society of Chemistry*., 2020
- [21] T. M. Ignace Vergote, Fred R. Hirsch, Carsten Hagemann and David Scott Miller, "Tumor Treating Fields (TTFields) Therapy Concomitant with Taxanes for Cancer Treatment," *Cancer*, 2023.
- [22] Y. 2. Lee. (2019) Electric Field-Induced Cell Proliferation and Apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*.
- [23] Q. 3. Liu. (2017) Liu, Q., et al. (2017). Modulation of Ion Channels by Electric Fields. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015, *Repect of The Royal Society Interface*
- [24] H. Kim. (2016) Electromechanical Stress in Cells under Electric Fields. *The Journal of Membrane Biology*.
- [25] N. K. Tali Voloshin, Shiri Davidi, Yaara Porat, Anna Shteingauz, Rosa S. Schneiderman, Einav Zeevi, Mijal Munster, Roni Blat, Catherine Tempel Bami, Shay Cahal, Aviran Itzhaki, Moshe Giladi, Eilon D. Kirson, Uri Weinberg, Adrian Kinzel, Yoram Palti, "Tumor-treating fields (TTFields) induce immunogenic cell death resulting in enhanced antitumor efficacy when combined with anti-PD-1 therapy," ed: *Orginal Article*, 2019.
- [26] L. D. Narasimha Kumar Karanam, Asaithamby Aroumougame, Michael D Story, "Tumor treating fields cause replication stress and interfere with DNA replication fork maintenance: Implications for cancer therapy," 2019, *Science Direct*.
- [27] A. F. K. Ellaine Salvador, Dominik Domröse and D. Domröse, "Tumor Treating Fields (TTFields) Reversibly Permeabilize the Blood–Brain Barrier In Vitro and In Vivo," 2022, *Biomolecules*.

- [28] A. Y. Nidhi Gera , Talia S. Holtzman, Sze Xian Lee, Eric T. Wong, Kenneth D. Swanson, "Tumor Treating Fields Perturb the Localization of Septins and Cause Aberrant Mitotic Exit," *PlusOne*, 2015.
- [29] N. K. K. M. D. Story, "An overview of potential novel mechanisms of action underlying Tumor Treating Fields-induced cancer cell death and their clinical implications," *INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY*, vol. 97, 2021.
- [30] A. B.-Z. Dorota Bądziul, Jacek Tabarkiewicz, "An overview of the preclinical and clinical studies of the effects of tumor treating fields on malignant glioma cells", *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2017.
- [31] C. W. Jack A. Tuszynski, Douglas E. Friesen and Jordane Preto, "An Overview of Sub-Cellular Mechanisms Involved in the Action of TTFields," *Environmental Research and Public Health*, 2016.
- [32] E. S. Justin C. Moser, Karina Deniz, Kenneth Swanson, Jack Tuszynski, Kristen W. Carlson, Narasimha Kumar Karanam, Chirag B. Patel, Michael Story, Emil Lou, Carsten Hagemann, "The mechanisms of action of Tumor Treating Fields," *American Association for Cancer Research*, 2022.
- [33] Y. J. K. Eun Ho Kim, Hyo Sook Song, Youn Kyoung Jeong, Ji Young Lee, Jiwon Sung, Seung Hoon Yoo, Myonggeun Yoon, "Biological effect of an alternating electric field on cell proliferation and synergistic antimitotic effect in combination with ionizing radiation," *Oncotarget*, 2016.
- [34] Z. e. Bomzon, "Treating solid tumors using tumor treating fields: an overview of the theory and practices," ed, *Academic Press*, 2022.
- [35] L. B. Aafia Chaudhry, Michael Varshaver, Ori Farber, Uri Weinberg, Eilon Kirson and Yoram Palti, "NovoTTF™ -100A System (Tumor Treating Fields) transducer array layout planning for glioblastoma: a NovoTAL™ system user study," *Novocure*.
- [36] L. Wang¹, C. Chen¹, Y. Xiao¹, R. Gong², J. Shen², and M. Lu³, "Personalized optimization strategy for electrode array layout in TTFields of glioblastoma", *Wiley Online Library*. 2024.

- [37] E. T. W. Roger Stupp, Andrew A. Kanner, David Steinberg, Herbert Engelhard, Volkmar Heidecke, Eilon D. Kirson, Sophie Taillibert, Frank Liebermann, Vladimir Dbalý, Zvi Ram, J. Lee Villano, Nikolai Rainov, Uri Weinberg, David Schiff, Lara Kunschner, Jeffrey Raizer, Jerome Honnorat, Andrew Sloan, Mark Malkin, Philip H. Gutin ad, "NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: A randomised phase III trial of a novel treatment modality," ed: *European Journal of Cancer*, 2012.
- [38] J. R. A. Sara Abasi, "Design, fabrication and testing of an electrical cell stimulation and recording apparatus (ECSARA) for cells in electroculture.," *Biosensors and Bioelectronics*, 2020.
- [39] M. S. Amir-Mohammad Shamaee, Atefeh Solouk, Mohammad Abdolahad, "An In Vitro Electric Field Exposure Device with Real-Time Cell Impedance Sensing", *Iranian Journal of Science and Technology*, 2020.
- [40] C.-Y. L. Yann Gilpin, Mats Forssell, Siyang Zheng, Pulkit Grover and Marc Dandin, "Tracking the Effects of Tumor Treating Fields on Human Breast Cancer Cells in vitro Using a Capacitance Sensing Lab-on-CMOS Microsystem", *IEEE*, 2022
- [41] L. Y. Hao Wu, Hanjie Liu, Dan Zhou, Dikang Chen, "Exploring the efficacy of tumor electric field therapy against glioblastoma: An in vivo and in vitro study.," *Wiley*, 2021.
- [42] K. F. Lei, "Proliferation arrest, selectivity, and chemosensitivity enhancement of cancer cells treated by a low-intensity alternating electric field," *Biomedical Microdevices*, 2018.
- [43] L. L. Sahba Mobini, Vishnu Thottakkattumana Parameswaran and John Howard Barker, "In vitro effect of direct current electrical stimulation on rat mesenchymal stem cells," *PeerJ*, 2017.
- [44] A. T. D. Gordon Minru Xiong, Jun Kit Wang, Chee Leong Yeoh, Kiat Seng Yeo and Cleo Choong., "Development of a miniaturized stimulation device for electrical stimulation of cells," *Journal of Biological Engineering*, 2015.
- [45] E. T. D. Sheet. "epENDORF.com/za-en/service-support." (*accessed 09.09.2024, 2024*).

- [46] A. V. Ola Rominiyi, Susan Jane Clenton, Caroline Bridgewater, Yahia Al-Tamimi & Spencer James Collis, "Tumour treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions," ed: *British Journal of Cancer*, 2020.
- [47] H. N. Christoph Pohling, Edwin Chang, Keith E. Schubert, Ying Nie,, V. Y. Vladimir Bashkurov, Yuping Zeng, Roger Stupp, Reinhard W., and C. B. P. Schulte, "Current status of the preclinical evaluation of alternating electric fields as a form of cancer therapy.," *Bioelectrochemistry.*, 2023.
- [48] F. L. H. Anders Rosendal Korshoej , Nikola Mikic, Gorm von Oettingen, Jens Christian Hedemann Sørensen, Axel 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", *PlusOne*, 2018.
- [49] V. D. Eilon D. Kirson, František Tovaryš, Josef Vymazal, Jean F. Soustiel, Aviran Itzhaki, Daniel Mordechovich, Shirley Steinberg-Shapira, Zoya Gurvich, Rosa Schneiderman, Yoram Wasserman, Marc Salzberg, Bernhard Ryffel, Dorit Goldsher, Erez Dekel, and Yoram Palti, "Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors," ed: *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2007.
- [50] Z. G. Eilon D Kirson 1, Rosa Schneiderman, Erez Dekel, Aviran Itzhaki, Yoram Wasserman, Rachel Schatzberger, Yoram Palti, "Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields," *Cancer Research*, 2004.
- [51] a. Moshe Giladi, 1, Rosa S Schneiderman,1, Tali Voloshin,1 Yaara Porat,1 Mijal Munster,1 Roni Blat,1 Shay Sherbo,1 Zeev Bomzon,1 Noa Urman,1 Aviran Itzhaki,1 Shay Cahal,1 Anna Shteingauz,1 Aafia Chaudhry,1 Eilon D Kirson,1 Uri Weinberg,1 and Yoram Palti1, "Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells," *Scientific Reports*, 2015.
- [52] a. Andrea Pavesi, 1, Giulia Adriani,1,* Andy Tay,2,3, Majid Ebrahimi Warkiani,4 Wei Hseun Yeap,5 Siew Cheng Wong,5 and Roger D. Kamm1,6, "Engineering a 3D

microfluidic culture platform for tumor-treating field application," *Scientific Reports*, 2016.

- [53] U. W. Moshe Giladi 1, Rosa S Schneiderman 2, Yaara Porat 2, Michal Munster 2, Tali Voloshin 2, Roni Blatt 2, Shay Cahal 2, Aviran Itzhaki 2, Amir Onn 3, Eilon D Kirson 2, Yoram Palti 2, "Alternating electric fields (tumor-treating fields therapy) can improve chemotherapy treatment efficacy in non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo," *Science Direct*, 2014.
- [54] M. G. Yaara Porat, Rosa S. Schneiderman, Roni Blat, Anna Shteingauz, Einav Zeevi, Mijal Munster, Tali Voloshin, Noa Kaynan, Orna Tal, Eilon D. Kirson, Uri Weinberg, Yoram Palti, "Determining the Optimal Inhibitory Frequency for Cancerous Cells Using Tumor Treating Fields (TTFields)," *Cancer Research*, 2017.
- [55] M. R. a. Z. Z. Shiyun Meng, "Electrical Stimulation and Cellular Behaviors in Electric Field in Biomedical Research," *Materials*, 2021.
- [56] J. E. L. EUNBI YE, YOUNG-SOO LIM, SEUNG HO YANG and SUNG-MIN PARK, "Effect of duty cycles of tumor-treating fields on glioblastoma cells and normal brain organoids," *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, 2021.
- [57] M. S. Hoa T. Le, Davide Lazzari , Gordon Chan and Jack A. Tuszy ´ nski, "Real-Time Monitoring of the Effect of Tumour-Treating Fields on Cell Division Using Live-Cell Imaging," *Cells*, 2022.
- [58] Y. J. Heehun Sung, Geon Oh, Yongha Gi, Hyunwoo Kim, Sangmin Park, Jaehyeon Seo, Myonggeun Yoon., "Evaluation of methods for reducing edge current density under electrode arrays for tumor-treating fields therapy.," *Medical Physics*, 2022.