

**Araştırma Makalesi****Yüksek Doz Hidrojen Peroksit ile Muamele Edilen İnsan Nöroblastoma Hücre Hattında Darbeli Elektromanyetik Alan Maruziyetinin Glutasyon Miktarına Etkisi**Tuğçe ŞİMŞEK¹, Serdar KARAKURT², Çiğdem GÖKÇEK-SARAÇ*¹

¹Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, 07070, Antalya, Türkiye

²Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 42250, Konya, Türkiye

*yazışılan yazar e-posta: gokcekcigdem@gmail.com

(Alınış / Received: 29.11.2021, Kabul / Accepted: 29.03.2022, Yayınlanma / Published: 27.05.2022)

Öz: Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF) elektromanyetik alanların iyonlaştırıcı olmayan formlarından biri olup nörodejeneratif bozuklukların semptomlarının tedavisi gibi çeşitli tıbbi problemler için alternatif bir tedavi olarak kullanılmaktadır. Çalışmanın amacı, yüksek doz hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edilen insan nöroblastoma hücre hattında kısa süreli 75 Hz frekanslı PEMF maruziyetinin glutasyon (GSH) miktarına etkilerini araştırmaktır. Hücreler üç deneysel gruba ayrılmıştır: (I) sham-kontrol; (II) H₂O₂ ile muamele edilen hücreler; (III) H₂O₂ muamelesinin ardından PEMF'ye maruz bırakılan hücreler. Hücre canlılığı ve glutasyon miktarı sırasıyla spektrofotometrik ve Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (HPLC) teknikleri kullanılarak ölçülmüştür. Yüksek doz H₂O₂ ile muamele edilen nöroblastoma hücre hattında muamele sonrası PEMF maruziyetinin oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı sitoprotektif etkisinin, hücre canlılığında ve GSH miktarında artış ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Darbeli elektromanyetik alan, Nöroblastoma, Oksidatif stres, Glutasyon, HPLC

Effect of Pulsed Electromagnetic Field Exposure on Glutathione Amount in Human Neuroblastoma Cell Line Treated with High-Dose Hydrogen Peroxide

Abstract: The Pulsed Electromagnetic Field (PEMF) is one of the non-ionizing forms of electromagnetic fields that has been used as an alternative therapy for various medical problems, including treating symptoms of neurodegenerative disorders. The present work's goal is to explore the possible effects of short-term exposure to 75 Hz frequency of PEMF on the amount of glutathione (GSH) in high-dose hydrogen peroxide (H₂O₂) treated human neuroblastoma cell line. Cells were divided into three experimental groups: (I) sham-control; (II) cells treated by H₂O₂; (III) cells post-exposed to PEMF following H₂O₂ challenge. The cell viability and the amount of glutathione were measured by spectrophotometrically and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) techniques, respectively. It has been found that the cytoprotective effect of post-PEMF exposure against deleterious effects of oxidative stress triggered by high-dose H₂O₂ challenge in neuroblastoma cell line is mediated by the increase in the cell viability and the elevation in the GSH amount.

Key words: Pulsed electromagnetic field, Neuroblastoma, Oxidative stress, Glutathione, HPLC

Tuğçe ŞİMŞEK, simsektugce684@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5379-2767>

Serdar KARAKURT, karakurt@selcuk.edu.tr, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4449-6103>

Çiğdem GÖKÇEK SARAÇ, gokcekcigdem@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3538-6551>

1. Giriş

Günlük yaşantımızda sıkça kullandığımız Elektromanyetik Alana (EMA) sahip cep telefonu, bilgisayar ve elektronik ev aletleri gibi cihazlar farklı frekans, genlik, hız ve dalga boyunda “Elektromanyetik Radyasyon” yaymaktadır [1,2]. Yüksek frekanslı elektromanyetik radyasyonlar moleküllerdeki kimyasal bağları koparabilecek enerjiye sahip olup bu ışınlar “İyonlaştırıcı Radyasyon” denmektedir [2,3]. Elektromanyetik radyasyonun kimyasal bağları koparabilecek enerjiye sahip olmaması düşük frekansta olduğunu ve elektromanyetik spektrumun iyonlaştırıcı olmayan kısmında bulunduğunu göstermektedir [2-4]. Yüksek frekanslı EMA’lar insan vücudunun sahip olduğu dengeyi bozarak, hücre içi süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH^-) gibi serbest radikallerin veya hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına neden olmaktadır [1,5]. Özellikle yüksek frekanslı (300 Hz-10 MHz) EMA maruziyetinin hücrelerde oksidan-antioksidan dengesini bozarak oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir [6]. Merkezi sinir sistemini kontrol eden, insan vücudunun hemen hemen tüm işlevlerini düzenleyen, vücudumuzun oksijen tüketiminin %20’sinin gerçekleştiği yer olan beynimiz, diğer organlara göre daha düşük antioksidan kapasitesine sahip olması nedeniyle oksidatif strese karşı oldukça duyarlı bir organımızdır [7]. Endojen bir antioksidan ve önemli bir hücrel savunma ajanı olan glutatyon (GSH), antioksidan enzimlerin substratı olarak görev alarak radikal süpürücü olarak davranmaktadır [8]. Beynimizde, oksidatif strese karşı etkili olduğu bilinen antioksidan moleküllerden GSH’ın yüksek miktarda H_2O_2 seviyesini elimine ettiği bilinmektedir [9,10].

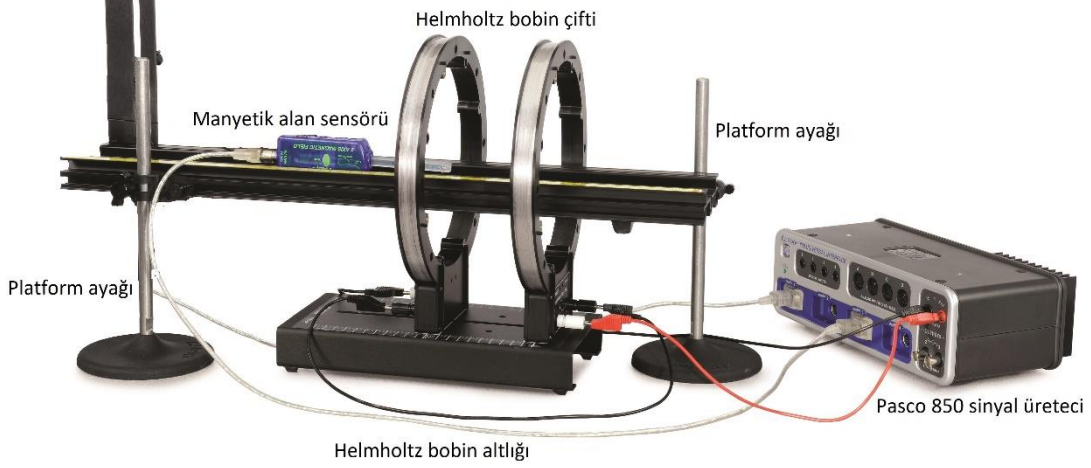
Son yıllarda iyonlaştırıcı veya termal etkiye sahip olmayan düşük frekanslı elektromanyetik alanların sağlık sektöründe tedavi amaçlı uygulanması için araştırmalar hız kazanmıştır [11,12]. Özellikle, belirli dalga formu ve genliğe sahip, “Darbeli Elektromanyetik Alan (Pulsed Electromagnetic Field) (PEMF)” uygulaması dikkat çekicidir [13]. Düşük frekanslı PEMF maruziyetinin, yara onarım sürecini kolaylaştırdığı [14], yumuşak doku hasarını iyileştirdiği [15], ödemi [16], ameliyat sonrası ağrıyı [17], migreni tedavi ettiği [18], Alzheimer [19], Parkinson [20] gibi nörodejeneratif bozuklukların semptomlarının tedavisinde [17] potansiyel bir uygulama olduğu raporlanmıştır. Ayrıca, farklı frekans ve dalga boyunda PEMF maruziyetinin çeşitli hücrelerde oksidan-antioksidan mekanizmasının dengesinin korunmasında rolü olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur [21-23]. Örneğin, insan osteoblast hücrelerine (hOBs) uygulanan 16 Hz frekansa ve 6-282 μ T yoğunluğa sahip PEMF maruziyetinin glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivasyonunu arttırdığı [21], hipoksi koşulunda (%2’lik oksijen) inkübe edilen N9 insan mikrogliya hücrelerine uygulanan 75 Hz-1.5 mT PEMF maruziyetinin hipoksinin indüklediği ROS seviyesinde azalmaya neden olduğu [22], 75 Hz-2 mT PEMF’ye maruz bırakılan insan nöronal SK-N-BE(2) hücrelerinde de manganez bağlı SOD (MnSOD) aktivasyonunun arttığı [23] raporlanmıştır.

Literatürde, PEMF maruziyetinin oksidatif stres üzerindeki etkileri araştırılmış fakat yüksek doz H_2O_2 ile uzun süre muamele edilerek oksidatif stresin tetiklendiği çocukluk çağında en sık görülen nöroblastik tümör olan nöroblastoma hücre hattında PEMF maruziyetinin GSH miktarına etkileri hakkında bilgiler sınırlıdır. Bu nedenle çalışmanın amacı, yüksek doz (1 mM) H_2O_2 ile uzun süre (96 saat) muamele edilerek oksidatif stresin tetiklendiği insan nöroblastoma hücre hattında (SK-N-SH) 75 Hz frekansında 2 mT yoğunluğundaki PEMF’ye kısa süre (15 dakika) maruziyetin hücre canlılığına ve GSH miktarına etkisini incelemektir.

2. Materyal ve Metot

2.1 Darbeli Elektromanyetik Alan Maruziyet Düzenegi

Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF) devresi (Pasco; UI-5000) Pasco Capstone Yazılımı (UI-5400) ile beraber EDUTEK firmasından (Ankara, Türkiye) satın alınmıştır. Helmholtz bobinlerden ve diğer ara parçalardan oluşan PEMF devresi Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Manyetik alan sağlayan helmholtz bobin çifti, bobinlerin sabitlendiği helmholtz bobin altlığı, platform ayakları, bobinlere elektromanyetik alan sağlayan Pasco 850 sinyal üretici, ve manyetik alanı ölçen manyetik alan sensöründen oluşan Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF) Düzeneginin temsili gösterimi

PEMF devresi, toplam çapı 20 cm olan ve 0.64 mm çapında bakır telden oluşan 500 sarımlı çift Helmholtz bobinden oluşmaktadır. PEMF’ye maruz kalacak hücreler için homojen bir manyetik alan ortamı oluşturmak için bobinler birbirine paralel olarak yerleştirilmiştir. Devrenin Pasco Capstone Yazılımı ile bağlantısı bilgisayar ortamında gerçekleştirilmiştir. Frekans 75 Hz, dalga genlik değeri (amplitude) 15 V, elektromanyetik dalganın görev döngüsü (duty cycle) periyodu %10, helmholtz bobinleri besleyen elektrik akımı (current limit) 1.5 amper (A) ve limit gerilim değeri (V) (voltage limit) 15 V olacak şekilde değerler program ara yüzü kullanılarak girilmiş ve ardından manyetik alan sensörü açılmıştır. Çalışmada PEMF maruziyet süresi 15 dakika olacağından helmholtz bobinlerin oluşturduğu manyetik alan değeri Pasport manyetik alan sensörü yardımıyla Pasco 850 Capstone Yazılımı kullanılarak 15 dakika süreyle ölçülmüş ve 2 mT manyetik alan sinyalleri kayıt altına alınmıştır. Bobin sistemi daha sonra hücre inkübatörüne yerleştirilmiş ve PEMF maruziyetinin olası termal etkisinin engellenmesi için maruziyet ortamının sıcaklığı 37°C’ye ayarlanmış, düzenli olarak sıcaklık kontrol edilmiş ve PEMF maruziyetinden kaynaklı herhangi bir sıcaklık artışı tespit edilmemiştir.

2.2 Hücre Kültürü

SK-N-SH insan nöroblastoma hücre hattı (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu-ATCC, Missouri, ABD) Eagle’ın Minimum Temel Besiyeri (Eagle’s Minimum Essential Medium-EMEM, Biological Industries, Cromwell, ABD) ortamında 75 cm²’lik flasklarda kültürlenerek %10 fetal sıgır serumu, %1 L-Glutamin, %1 penisilinstreptomisin içeren büyüme ortamlarında %5 CO₂ içeren 37°C, %95 nem ortamındaki steril inkübatörde (BINDER, Camarillo, ABD) inkübe edilmiştir. Hücreler üç deney

grubuna ayrılmıştır: Grup I: Sham-kontrol grubu, Grup II: 96 saat 1 mM H₂O₂ ile muamele edilen hücre grubu, ve Grup III: 96 saat 1 mM H₂O₂ muamelesinin ardından 15 dakika 75 Hz-2 mT PEMF'ye maruz bırakılan hücre grubu. Hücre grupları inkübatördeki bobin sistemine yerleştirilmiştir. Sham-kontrol grubu diğer hücre grupları gibi bobin sistemine yerleştirilerek aynı deneysel koşullarda inkübe edilmiş fakat H₂O₂ muamelesi ve PEMF maruziyeti gerçekleştirilmemiştir.

2.3 Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Tüm grup hücreleri 1:1 oranında seyreltilmiş %0.04 Tripan Mavis (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD) ile boyanarak Bio-Rad TC20 otomatik hücre sayacı (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD) kullanılarak sayılmıştır. Daha sonra, üç tekrar halinde 96 kuyucuklu plakalara (1x10⁴/kuyucuk) ekilmiştir. Karakurt ve Adalı [24] çalışmasında revize edilen Alamar Mavis reaktif (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak hücre canlılığı ve sitotoksosite 570 nm uyarma ve 610 nm emisyonundaki spektrofotometrede (Multiskan Go; Thermo Scientific Co., Waltham, MA, ABD) ölçülmüştür. IC₅₀ değerlerinin inhibisyon oranı (%) log H₂O₂ konsantrasyonuna karşı sigmoidal grafiği kullanılarak çizilmiştir. Sonuçlar, hücre canlılığının yüzdesi (%) olarak ifade edilmiştir (Şekil 2).

2.4 Glutatyon (GSH) Miktar Tayini

Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) tekniği kullanılarak hücre gruplarındaki glutatyon (GSH) miktarı tayin edilmiştir. Bu teknik, sıvılarda çözülmüş halde bulunan farklı ağırlıklardaki bileşenlerin HPLC kolonlarını farklı zamanlarda terk etmesi temeline dayanmakta, sabit ve hareketli olmak üzere iki ayrı fazdan oluşmakta olup kimyasalların fazlar arasında kütle transferine ve bileşenlerin hız faktörüne bağlı olarak dedektörde belirlenmesi presibi ile çalışmaktadır. Bu nedenle hücrelerdeki GSH miktarı tayini için sabit faz olarak C18 kolonu, hareketli faz olarak 0.5 M Dipotasyum Fosfat (K₂HPO₄) ve 500 mL saf (%100) metanol kullanılmış ve HPLC cihazı ile bağlantısı yapılmıştır. Tüm grup hücreleri ölü hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılması için 1 mL 10 mM PBS ile yıkanmış ve ardından 400 xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlara hareketli fazlardan düşük polariteye sahip olan 300 µL kloroform eklenerek 10000 xg'de 15 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yeni süpernatantlara %15 trikloroasetikasit (TCA) eklenerek 10 dakika 22903 xg'de santrifüj edilmiştir. Glutatyon (GSH) miktarının belirlenmesinde kullanılan 0.5 M K₂HPO₄ (pH: 8 (10 mM DTNB içeren)) süpernatantlara eklenerek 5 dakika buzda inkübe edilmiştir. Daha sonra süpernatantlara 100 µL 7 M H₃PO₄ ilave edilip 3000 xg'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve GSH miktar tayinine kadar süpernatantlar buz içinde bekletilmiştir. En son basamakta, süpernatantlar ve 5 farklı molaritelerdeki GSH standart solüsyonları 2 µm'lik membran filtreden geçirilerek 330 nm'ye ayarlanmış HPLC (Shimadzu, LC-2050 serisi, Kyoto, Japonya) cihazında standart eğrisi çizilerek analiz edilmiştir.

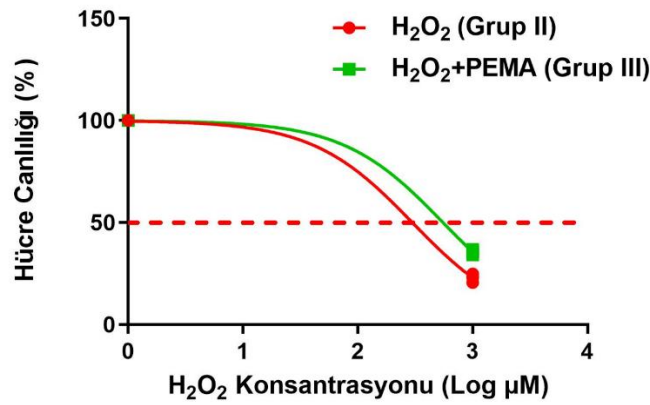
2.5 İstatistiksel Analiz

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

3. Bulgular

3.1 Darbeli Elektromanyetik Alan Maruziyetinin Hücre Canlılığına Etkisi

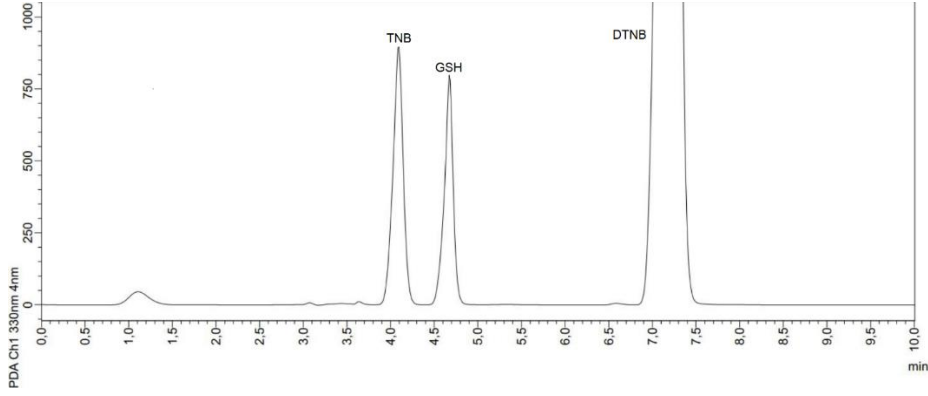
Yüksek sitotoksik etkiye sahip H_2O_2 'nin SK-N-SH insan nöroblastoma hücre hattında hücre canlılığına etkilerini belirleyebilmek için Grup 1 (Sham-kontrol)'in hücre canlılığı %100 kabul edilip Grup 2 ve Grup 3 hücrelerinin %50'sini öldüren konsantrasyon (IC_{50}) değeri hesaplanmıştır (Şekil 2). 96 saat 1 mM H_2O_2 ile muamele edilen grup II'de ve 96 saat 1 mM H_2O_2 ile muamelesinin ardından 75 Hz-2 mT PEMF'ye 15 dakika maruz bırakılan grup III'te hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir. Grup II'de H_2O_2 muamelesi 298.7 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile yaklaşık %80 hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur. H_2O_2 muamelesinin ardından PEMF maruziyetinin olduğu Grup III'te ise hücre canlılığındaki azalma Grup II kadar olmayıp, 552.6 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile yaklaşık %65 azalmış, ve bu sonuç PEMF maruziyetinin oksidatif stresin tetiklendiği nöroblastoma hücre hattında olası sitoprotektif etkisinin olabileceğini göstermiştir.



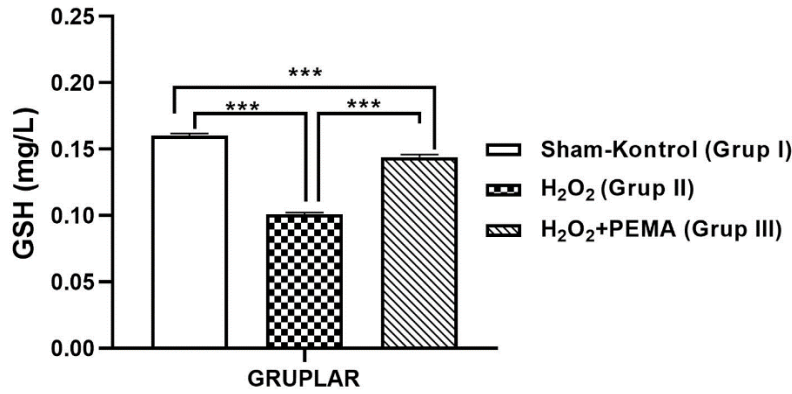
Şekil 2. Hücre canlılığı yüzdelерinin (%) hücre gruplarında gösterimi.

3.2 Darbeli Elektromanyetik Alan Maruziyetinin Glutasyon Miktarına Etkisi

Tüm grup hücrelerindeki GSH miktarı HPLC tekniği ile belirlenmiş ve elde edilen veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 3). HPLC cihazından elde edilen 4.5 dakikada oluşan kromatogram pik değerine göre GSH miktar tayini yapılmıştır (Şekil 3a). Elde edilen sonuçlara göre, Sham-Kontrol grubundaki (Grup I) GSH miktarı Grup II ve Grup III'den anlamlı derecede daha yüksektir ($p \leq 0.001$; sırasıyla) (Şekil 3b). PEMF maruziyetinin olmadığı 1 mM H_2O_2 muamelesi ile oksidatif stresin indüklendiği Grup II'de ki GSH miktarı ise diğer gruplara göre anlamlı derecede daha düşüktür ($p \leq 0.001$, sırasıyla) (Şekil 3b). İlginç şekilde, 1 mM H_2O_2 muamelesi ile oksidatif stresin tetiklenmesinin ardından PEMF'ye maruz bırakılan grupta (Grup III) GSH miktarı, Grup II'ye göre anlamlı derecede daha yüksektir ($p \leq 0.001$) (Şekil 3b). Sonuçlar, PEMF maruziyetinin olası sitoprotektif etkisi ile oksidatif stresin tetiklendiği nöroblastoma hücre hattında antioksidan moleküllerden GSH miktarına arttırıcı etkisi olduğunu göstermektedir.



(a)



(b)

Şekil 3. (a) Optimum koşullar altında 330 nm’de elde edilen 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB), Glutatyon (GSH) ve Ellman reaktifi 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asid (DTNB)’in temsili kromatogram gösterimi (b) Glutatyon (GSH) miktarının (mg/L) hücre grupları arasında karşılaştırılması. Veriler ortalama \pm SD olacak şekilde gösterilmiş, Tek-Yönlü Varyans Analizi (One- Way ANOVA) ile değerlendirilmiş, çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılmıştır. *** $p < 0.001$ 'deki istatistiksel farkı işaret etmektedir.

4. Sonuç ve Yorum

Farklı süre (60 dk/gün; 10 dk/gün; 30 dk/gün gibi) ve frekanslardaki (100 Hz-10 mT; 75 Hz-1 mT, 75 Hz-1.5 mT, 16 Hz-282 μ T gibi) PEMF maruziyetinin çeşitli dokularda (kemik, karaciğer, böbrek gibi) hücre canlılığını, SOD, GPx, ve CAT gibi antioksidan savunma mekanizmasındaki önemli enzimlerin aktivitesini/seviyesini etkilediği *in vivo* [25,26] ve *in vitro* [21-23,27] çalışmalarca raporlanmıştır. Fakat, insan nöroblastoma hücre hattını önce belirli bir doz ve sürede H₂O₂ ile muamele ederek oksidatif stresi tetikleyip, daha sonra sabit süre ve frekansta uygulanan PEMF maruziyeti ile antioksidan savunma sistemi mekanizmasında rol alan önemli moleküller arasındaki hücrel etkilerin araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle çalışmada, yüksek doz H₂O₂ ile uzun süre muamele edilerek oksidatif stresin tetiklendiği çocukluk çağında en sık görülen nöroblastik tümör olan insan nöroblastoma hücre hattında (SK-N-SH) 75 Hz frekansında 2 mT yoğunluğundaki PEMF’ye kısa süre (15 dakika) maruziyetin hücre canlılığına ve antioksidan moleküllerden GSH’ın miktarına etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Farklı konsantrasyondaki H₂O₂ ile muamele edilen beyin hücresi dahil çoğu memeli hücre hattında, H₂O₂ muamelesinin DNA, protein, lipid gibi biyomoleküllerin yapılarını bozduğu, apoptozisi tetiklediği ve hücre içi ROS seviyesini arttırarak oksidan-antioksidan dengesinin bozulmasına neden olduğu [6,28], özellikle de

yüksek doz olarak belirtilen 100 µM ve üzeri H₂O₂ konsantrasyonu ile muamelenin ROS seviyesini arttırdığı, hücre canlılığını ve antioksidan enzim aktivitesini azalttığı [29,30] raporlandığından çalışmada SK-N-SH insan nöroblastoma hücre hattında oksidatif stres etkisini net olarak gözlemleyebilmek için yüksek doz (1 mM) H₂O₂ ile uzun süre (96 saat) hücre muamelesi tercih edilmiştir. Çalışma sonuçları toplu olarak değerlendirildiğinde, hücresel seviyesi radikal hasarı belirlemek için kullanılan bir belirteç olan endojen bir antioksidan ve önemli bir hücre savunma ajanı olan GSH'nin miktarının oksidatif stresin indüklenmesinin ardından uygulanan PEMF maruziyeti ile nöroblastoma hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı derecede artması PEMF gibi pulse yani darbeleri yayılan düşük frekanslı elektromanyetik alanların hücreleri kesikli ve periyodik olarak uyararak oksidatif stresin olası yıkıcı sitotoksik etkilerini hücre içi antioksidan enzim miktarını artırarak azaltabileceğini göstermektedir. Çalışma, non-invazif, güvenli ve kolay bir yöntem olan PEMF maruziyetinin nöroblastoma hücre hattında oksidatif stres üzerindeki etkilerini araştırarak sadece nöroblastoma hücre hattı değil farklı doku ve hücre hatlarında PEMF maruziyetinin etkilerinin incelenmesinin önünü açmaktadır. Bu bilgiler ışığında, PEMF'lerin oksidatif stresin indüklediği nörodejeneratif süreçlere ek olarak antioksidan savunma mekanizmalarına ve bu mekanizmaların tetiklediği redoks bazlı nöronal yollara olası nörotoksik veya nöroprotektif etkilerinin araştırılabilmesi için daha fazla *in vivo* ve/veya *in vitro* çalışmalara ihtiyaç vardır. Farklı hücreler, dokular veya hayvan modelleri üzerindeki farklı doz, frekans, yoğunluk, genlik, maruziyet süreleri gibi PEMF parametrelerinin değerlendirileceği çalışmalar PEMF'nin fizyolojik etkileri hakkında daha kesin bilimsel veriler elde edilmesini sağlayacaktır. Bu nedenle, mevcut çalışmanın PEMF maruziyeti ile aktive edilen moleküler, biyokimyasal ve hücresel süreçlere odaklanan daha ileriki çalışmalara ışık tutacağına inanıyoruz.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Tuğçe Şimşek: Araştırma, Metodoloji, Görselleştirme

Serdar Karakurt: Metodoloji, Denetim/Gözlem/Tavsiye, İnceleme ve Düzenleme

Çiğdem Gökçek Saraç: Kavramsallaştırma, Araştırma, Kaynak/Materyal/Malzeme Temini, Metodoloji, Denetim/Gözlem/Tavsiye, İnceleme ve Düzenleme, Veri Analizi, Doğrulama, Biçimsel Analiz, Orjinal Taslak Yazımı, Proje Yönetimi

Destek ve Teşekkür Beyanı

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: FBA-2020-5388).

Çatışma Beyanı

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir çatışma beyanımız bulunmadığını bildiririz.

Etik Kurul Onayı ve/veya Aydınlatılmış Onam Bilgileri

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir etik kurul onayı ve/veya aydınlatılmış onam bilgileri beyanımız bulunmadığını bildiririz.

Kaynakça

- [1] J. H. Kim, N. G. Quilantang, H. Y. Kim, S. Lee, and E. J. Cho, "Attenuation of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells by three flavonoids from *Acer okamotoanum*," *Chemical Papers*, 73 (5), 1135–1144, 2019.
- [2] D. Poljak, and M. Cvetkovic, "On Exposure of Humans to Electromagnetic Fields—General Considerations," *Human Interaction with Electromagnetic Fields: Computational Models in Dosimetry*. Elsevier, Slipt, 2019, pp. 1-20.
- [3] D. A. Vallerio, and T. M. Letcher, "Radiation," *EDD Unraveling Environmental Disasters*. Elsevier,

- Slipt, 2013, pp. 299-320.
- [4] F. Teimori, A. A. Khaki, A. Rajabzadeh, and L. Roshangar, "The effects of 30 mT electromagnetic fields on hippocampus cells of rats," *Surgical Neurology International*, 7 (70), 2016.
 - [5] M. Hasanuzzaman, M. H. M. B. Bhuyan, F. Zulfiqar, A. Raza, S. M. Mohsin, J. Mahmud, M. Fujita, and V. Fotopoulos, "Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator," *Antioxidants*, 9 (8), 681, 2020.
 - [6] H. Wang, and X. Zhang, "Magnetic Fields and Reactive Oxygen Species," *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (10), 2175-2195, 2017.
 - [7] Y. Chen, C. Qin, J. Huang, X. Tang, C. Liu, K. Huang, J. Xu, G. Guo, A. Tong, and L. Zhou, "The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing," *Cell Prolif.*, 53 (3), 1-13, 2020.
 - [8] E. F. Kıvrak, K. K. Yurt, A. A. Kaplan, I. Alkan, and G. Altun, "Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system," *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 5 (4), 167-176, 2017.
 - [9] I. S. Harris, and G. M. DeNicola, "The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer," *Trends in Cell Biology*, 30 (6), 440-451, 2020.
 - [10] J. N. Cobley, M. L. Fiorello, and D. M. Baile, "13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress," *Redox Biology*, 15, 490-503, 2018.
 - [11] M. Gümüşay, F. Gülbağça, S. Saygılı, I. Aydemir, A. Kaya, and M. İ. Tuğlu, "Darbeli Elektromanyetik Alan ve Darbeli Radyofrekans Uygulamalarının Sıçanlarda Yara İyileşme Etkilerinin Karşılaştırması," 27-29 Ekim, Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO 16), Antalya. 2016.
 - [12] M. Markov, J. Ryaby, and E. I. Waldorff, "Pulsed Electromagnetic Fields for Clinical Applications," Taylor & Francis Group. New York, 2020, pp. 237.
 - [13] X. Qiu, X. Li, and Y. Chen, "Pulsed electromagnetic field (PEMF): A potential adjuvant treatment for infected nonunion," *Medical Hypotheses*, 136, 109506, 2020.
 - [14] B. Strauch, C. Herman, R. Dabb, L. J. Ignarro, and A. A. Pilla, "Evidence-Based Use of Pulsed Electromagnetic Field Therapy in Clinical Plastic Surgery," *Surgery Journal*, 29 (2), 135-143, 2009.
 - [15] C. Daish, R. Blanchard, K. Fox, P. Pivonka, and E. Pirogova, "The Application of Pulsed Electromagnetic Fields (PEMFs) for Bone Fracture Repair: Past and Perspective Findings," *Annals of Biomedical Engineering*, 46 (4), 525-542, 2018.
 - [16] M. Markov, "XXIst century magnetotherapy," *Electromagn Biol Med*, 34 (3), 190-196, 2015.
 - [17] S. Gessi, S. Merighi, S. Bencivenni, E. Battistello, F. Vincenzi, S. Setti, M. Cadossi, P. A. Borea, R. Cadossi, and K. Varani, "Pulsed electromagnetic field and relief of hypoxia-induced neuronal cell death: The signaling pathway," *J Cell Physiol*, 234, 15089-15097, 2019.
 - [18] M. O. Mattsson, and M. Simkó, "Emerging medical applications based on non-ionizing electromagnetic fields from 0 Hz to 10 THz," *Medical Devices: Evidence and Research*, 12, 347-368, 2019.
 - [19] E. Capelli, F. Torrisi, L. Venturini, M. Granato, L. Fassina, G. F. D. Lupo, and G. Ricevuti, "Low-Frequency Pulsed Electromagnetic Field Is Able to Modulate miRNAs in an Experimental Cell Model of Alzheimer's Disease," *Journal of Healthcare Engineering*, (5-6), 1-10, 2017.
 - [20] R. M. Sherrard, N. Morellini, N. Jourdan, M. El-Esawi, L. D. Arthaut, C. Niessner, F. Rouyer, A. Klarsfeld, M. Doulazmi, and J. Witczak, "Low-intensity electromagnetic fields induce human cryptochrome to modulate intracellular reactive oxygen species," *PLoS Biol.*, 16 (10), 1-17, 2018.
 - [21] S. Ehnert, A. K. Fentz, A. Schreiner, J. Birk, B. Wilbrand, P. Ziegler, M. K. Reumann, H. Wang, K. Falldorf, and A. K. Nussler, "Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields cause antioxidative defense mechanisms in human osteoblasts via induction of O₂⁻ and H₂O₂," *Scientific Reports*, 7 (1), 14544, 2017.
 - [22] F. Vincenzi, A. Ravani, S. Pasquini, M. Merighi, S. Gessi, S. Setti, R. Cadossi, P. A. Borea, and K. Varani, "Pulsed Electromagnetic Field Exposure Reduces Hypoxia and Inflammation Damage in Neuron-Like and Microglial Cells," *Journal Cellular Physiology*, 232, 1200-1208, 2017.
 - [23] S. Falone, N. Marchesi, C. Osera, L. Fassina, S. Comincini, M. Amadio, and A. Pascale, "Pulsed electromagnetic field (PEMF) prevents pro-oxidant effects of H₂O₂ in SK-N-BE (2) human neuroblastoma cells," *International Journal of Radiation Biology*, 92 (5), 281-286, 2016.
 - [24] S. Karakurt, and O. Adali, "Tannic Acid Inhibits Proliferation, Migration, Invasion of Prostate Cancer and Modulates Drug Metabolizing and Antioxidant Enzymes," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16 (6), 781-789, 2016.
 - [25] H. Gözen, C. Demirel, M. Akan, and M. Tarakçıoğlu, "Effects of pulsed electromagnetic fields on lipid peroxidation and antioxidant levels in blood and liver of diabetic rats," *European Journal of Therapeutics*, 23, 152-158, 2017.

- [26] M. Tasbih-Forosh, L. Zarei, E. Saboory, and M. Bahrami-Bukani, "Effects of Pulsed Electromagnetic Field with Predatory Stress on Functional and Histological Index of Injured-Sciatic Nerve in Rat," *Bull Emerg Trauma*, 5 (2), 96-103, 2017.
- [27] C. Osera, M. Amadio, S. Falone, L. Fassina, G. Magenes, F. Amicarelli, G. S. Govoni, and A. Pascale, "Pre-exposure of neuroblastoma cell line to pulsed electromagnetic field prevents H₂O₂-induced ROS production by increasing MnSOD activity," *Bioelectromagnetics*, 36 (3), 219-232, 2015.
- [28] M. Glden, M. A. Jess, J. Kammann, E. Maser, and H. Seibert, "Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time," *Free Radic Biol Med.*, 49 (8), 1298-305, 2010.
- [29] A. Daverey, and S. K. Agrawal, "Pre and post treatment with curcumin and resveratrol protects astrocytes after oxidative stress," *Brain Res*, 1692,45-55, 2018.
- [30] S. Konyalioglu, G. Armagan, A. Yalcin, C. Atalayin, and T. Dagci, "Effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in embryonic neural stem cells," *Neural Regen Res*, 8 (6), 485-495, 2013.