

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE DARBELİ ELEKTROMANYETİK
ALAN MARUZİYETİ VE RESVERATROLÜN APOPTOTİK YOLAKTA
SİNERJİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Atike DOĞAN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HAZİRAN 2025

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE DARBELİ ELEKTROMANYETİK
ALAN MARUZİYETİ VE RESVERATROLÜN APOPTOTİK YOLAKTA
SİNERJİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Atike DOĞAN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HAZİRAN 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE DARBELİ ELEKTROMANYETİK
ALAN MARUZİYETİ VE RESVERATROLÜN APOPTOTİK YOLAKTA
SİNERJİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Atike DOĞAN
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez TÜBİTAK tarafından 123R068 nolu proje ile desteklenmiştir.

HAZİRAN 2025

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE DARBELİ ELEKTROMANYETİK
ALAN MARUZİYETİ VE RESVERATROLÜN APOPTOTİK YOLAKTA
SİNERJİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Atike DOĞAN
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 03/06/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Çiğdem SARAÇ (Danışman)

Prof. Dr. Şükrü ÖZEN

Doç. Dr. Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU

ÖZET

GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE DARBELİ ELEKTROMANYETİK ALAN MARUZİYETİ VE RESVERATROLÜN APOPTOTİK YOLAKTA SİNERJİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Atike DOĞAN

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Çiğdem SARAC

İkinci Danışman: Prof. Dr. Serdar KARAKURT

Haziran 2025; 91 sayfa

Glioblastoma multiforme (GBM) erişkinlerde en sık görülen malign astrositik beyin tümörü olup modern tedavilerin çeşitliliğine rağmen hala son derece kötü prognozu olan ölümcül bir hastalıktır. Darbeli manyetik alan (PEMF), iyonlaştırıcı veya termal etkiye sahip olmayan düşük frekanslı elektromanyetik alan olup çok sayıda terapötik etkileri raporlamıştır. Resveratrol (RES), güçlü antioksidan özelliğiyle çok sayıda terapötik etkiye sahip stilben yapılı doğal olarak oluşan polifenolik bir bileşiktir. Literatürde PEMF maruziyeti ve resveratrolün beyin kanseri hücrelerinde etkilerinin birlikte değerlendirildiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sınırlıdır. Özellikle, PEMF maruziyetinin RES ile birlikte glioblastomada apoptotik yolağa olası etkilerinin incelendiği çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu nedenle, tez çalışmasında insan glioblastoma U87MG hücre hattında resveratrol-PEMF maruziyeti kombinasyonunun hücre canlılığına, hücreleri hangi yolla ölüme sürüklendiğine (apoptoz/nekroz), hem proapoptotik hem de P13K/AKT/mTOR hücre içi sinyal yolağında yer alan kilit genlerin ve bu genlerin kodladığı proteinlerin ekspresyonlarının düzeylerine etkileri sırasıyla Alamar Mavisi, Flow Sitometri, qRT-PCR, ve Western-Blot teknikleriyle incelenmiştir. Elde edilen veriler topluca değerlendirildiğinde RES uygulamasını takiben 6 saat PEMF maruziyetinin U87-MG hücre hattında hücre canlılığını azaltarak, kaspaz-9, kaspaz-3, bax/BcL-2, TP53 ve P53 ekspresyonlarını arttırarak apoptozu tetiklediği raporlanmıştır. P13K, AKT ve mTOR ekspresyonları artmış olmasına rağmen, apoptozda kilit rol oynayan gen ve proteinlere göre daha az artış göstermesi bu yolakların apoptoz yanıtını baskılama yönündeki etkilerini sürdürdüğünü göstermiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan temozolomid (TMZ) ile yapılan karşılaştırmalarda, RES-PEMF kombinasyonunun, TMZ-PEMF kombinasyonuna göre daha güçlü bir hücresel yanıt oluşturduğunu göstermektedir. Elde edilen bilimsel bulgular, stilben yapılı doğal bir polifenol olan resveratrolün PEMF ile birlikte glioblastoma hücrelerinde apoptoz mekanizmaları üzerindeki olası etkilerini ortaya koymuş ve bu kombinasyonun glioblastoma kanseri gibi birçok kanser türünde diğer konvansiyonel olarak uygulanan tedavilere karşı alternatif bir tedavi yönteminin geliştirilmesine potansiyel terapötik bir araç olarak kullanılabileceğini öne sürmüştür. Bu çalışmanın, özellikle RES ve PEMF'nin sinerjik etkilerinin daha geniş bir yelpazede değerlendirileceği gelecekteki klinik ve biyomedikal araştırmalar için önemli bir temel oluşturacağına inanmaktayız.

ANAHTAR KELİMELEER: Apoptoz, Darbeli Manyetik Alan, Glioblastoma, Resveratrol

JÜRİ: Doç. Dr. Çiğdem SARAÇ

Prof. Dr. Şükrü ÖZEN

Doç. Dr. Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE SYNERGISTIC EFFECT OF PULSED ELECTROMAGNETIC FIELD EXPOSURE AND RESVERATROL ON APOPTOTIC PATHWAY IN GLIOBLASTOMA CELLS

Atike DOĞAN

MSc Thesis in Biomedical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Çiğdem SARAÇ

Co-Supervisor: Prof. Dr. Serdar KARAKURT

June 2025; 91 pages

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common malignant astrocytic brain tumor in adults and, despite the variety of modern treatments, it remains a lethal disease. Pulsed magnetic field (PEMF) is a low-frequency electromagnetic field that does not have ionizing or thermal effects and has reported numerous therapeutic effects. Resveratrol (RES) is a naturally occurring polyphenolic compound that has numerous therapeutic effects. In the literature, there are limited studies that assess the effects of PEMF exposure and resveratrol on brain cancer cells together. In particular, there are almost no studies examining the possible effects of PEMF exposure along with RES on the apoptotic pathway in glioblastoma. Hence, the synergistic effects of resveratrol and PEMF exposure on cell viability, the pathways leading to cell death (apoptosis/necrosis), and the expression levels of key genes and proteins involved in both pro-apoptotic and PI3K/AKT/mTOR intracellular signaling pathways in the human glioblastoma U87MG cell line were investigated using Alamar Blue, Flow Cytometry, qRT-PCR, and Western blot techniques in this thesis. Overall data reported that 6 hours of PEMF exposure following RES treatment triggered apoptosis in the U87-MG cell line by reducing cell viability and increasing the expressions of caspase-9, caspase-3, bax/Bcl-2, TP53 and P53. Although PI3K, AKT, and mTOR expressions were elevated, their increase was less pronounced compared to the main apoptotic genes and proteins, suggesting these pathways may still inhibit the apoptotic response. Comparisons with temozolomide (TMZ) show that the RES-PEMF combination produces a stronger cellular response than the TMZ-PEMF combination. Scientific findings suggest that resveratrol and PEMF may synergistically enhance apoptosis in glioblastoma cells and could serve as a potential alternative cancer therapy, including for glioblastoma. We believe that this study will provide an important basis for future clinical and biomedical research, especially in which the synergistic effects of RES and PEMF will be evaluated in a broader spectrum.

KEYWORDS: Apoptosis, Glioblastoma, Pulsed Magnetic Field, Resveratrol

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Çiğdem SARAÇ

Prof. Dr. Şükrü ÖZEN

Assoc. Prof. Dr. Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU

ÖNSÖZ

Tez sürecim boyunca bilgi, deneyim ve rehberliğiyle yolumu aydınlatan, eleştirel düşünmeye yönlendiren, sabrı ve desteğiyle akademik yaşantım da yanımda olan aynı zaman da Biyomedikal alanda sahip olduğu akademik birikim, vizyoner yaklaşımı ve disiplinli çalışmaları sayesinde bu alana olan merakım artmış; bilimsel düşünme, sorgulama ve analiz etme becerilerim gelişmesinde yardımcı olan çok değerli danışmanım Doç. Dr. Çiğdem GÖKÇEK-SARAÇ'a en derin teşekkürlerimi sunarım. Akademik alandaki donanımı, yönlendirmeleri ve özverili yaklaşımı sayesinde yalnızca bu çalışmanın şekillenmesine değil, aynı zamanda bilimsel bakış açımın gelişmesine ve araştırmacı kimliğimin oluşmasına büyük katkı sağlamıştır. Bana duyduğu güven ve gösterdiği anlayışla bu süreci daha anlamlı ve öğretici kıldıği için kendisine minnettarım.

Tez çalışmamın oluşumunda ve deneysel süreçlerin yürütülmesinde değerli katkılarıyla yol gösteren, bilgi birikimi ve tecrübesiyle desteğini esirgemeyen aynı zamanda laboratuvar olanaklarını kullanmam konusunda sağladığı imkanlar ve oluşturduğu samimi, destekleyici çalışma ortamı sayesinde süreci verimli bir şekilde yürütmem de bana destek olan eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Serdar KARAKURT'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, deney süreçlerinde gösterdikleri özverili desteklerinden dolayı Doktora Öğrencisi İrem Mukaddes DURMUŞ BİLGİSEVEN'e, Doktora Öğrencisi Kemal BAŞ'a Yüksek Lisans Öğrencisi Sude KOCABIYIK'a ve laboratuvar ekibine de içtenlikle teşekkür ederim.

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

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, sevgisiyle güç veren, bilgeliğiyle yol gösteren ve başarılarımı her daim gururla karşılayan, beni daima cesaretlendiren, umutsuzluğa düştüğüm anlarda pes etmeme izin vermeyen, karanlıkta yolumu aydınlatan canım annem Selda DOĞAN ve canım babam Rauf DOĞAN'a sonsuz teşekkür ederim. Varlığı ile mutlu eden her zaman yanımda olan desteğini hiç esirgemeyen canım kardeşim Doğukan DOĞAN'a teşekkür ederim.

Her zaman bilimin olması dileğiyle bilim ile kalın...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	iv
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Elektromanyetik Alan.....	3
2.2. Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF)	6
2.3. Glioblastoma	10
2.4. Resveratrol.....	15
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Kimyasal Malzeme.....	19
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	19
3.3. Darbeli Manyetik Alan (PEMF) Kurulumu	20
3.4. Hücre Kültürü.....	25
3.5. Hücre Çalışma Grupları.....	25
3.6. Sitotoksikite Deneyleri	26
3.6.1. Hücre Hatlarının RES ve TMZ ile Muamelesi	26
3.6.2. Hücre Hatlarının RES ve TMZ ile Muamelesinin PEMF Maruziyeti.....	27
3.6.3. Apoptoz.....	28
3.8. TP53, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9, P13K, AKT, mTOR Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi	29
3.8.1. Total RNA izolasyonu	29
3.8.2. cDNA Sentezi	30
3.8.3. mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi.....	31
3.9. p53, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9, P13K, AKT, mTOR Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi	33

3.9.1. Protein Miktar Tayini	33
3.9.2. Protein Ekspresyonu Çalışmaları.....	34
4. BULGULAR.....	38
4.1. <i>In Vitro</i> Sitotoksosite Ölçüm Sonuçları	38
4.1.1. U87-MG Hücre Hattı Üzerinde RES ve TMZ Sitotoksosite Etkisi.....	38
4.1.2. U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesi ve Kısa Süreli PEMF Maruziyetinin Sitotoksik Etkileri	43
4.1.3. U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesi ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetinin Sitotoksik Etkileri	45
4.1.4 PEMF Maruziyeti Olmayan, Kısa Süreli ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Sitotoksik Etkilerinin Kıyaslanması.....	47
4.1.5. SVG-P12 Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Sitotoksik Etkileri.....	49
4.1.6. SVG-P12 Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin ve Kısa Süreli PEMF Maruziyetinin Sitotoksik Etkileri.....	51
4.1.7. SVG-P12 Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetinin Sitotoksik Etkileri.....	53
4.1.8 PEMF Maruziyeti Olmayan, Kısa Süreli ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan SVG-p12 Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Sitotoksik Etkilerinin Kıyaslanması	55
4.2. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptotik Etkileri.....	57
4.3 PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz ve P13K/AKT/mTOR Yolağında Rol Alan Kilit Genlerin Ekspresyonlarının qRT-PCR Tekniği ile Değerlendirilmesi	59
4.4. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz Yolağında Rol Alan Kilit Proteinlerin Ekspresyonlarının Western-Blot Tekniği ile Değerlendirilmesi	63

4.4.1. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz Yolağında Rol Alan BAX Proteinlerin Ekspresyonlarının Western-Blot Tekniği ile Değerlendirilmesi	64
4.4.2. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz Yolağında Rol Alan Bcl-2 Proteinlerin Ekspresyonlarının Western-Blot Tekniği ile Değerlendirilmesi	65
4.4.3. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz Yolağında Rol Alan Kaspaz-3 Proteinlerin Ekspresyonlarının Western-Blot Tekniği ile Değerlendirilmesi	66
4.4.4. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz Yolağında Rol Alan Kaspaz-9 Proteinlerin Ekspresyonlarının Western-Blot Tekniği ile Değerlendirilmesi	67
4.4.5. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz Yolağında Rol Alan p53 Proteinlerin Ekspresyonlarının Western-Blot Tekniği ile Değerlendirilmesi	68
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇLAR	77
7. KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Glioblastoma Hücrelerinde Darbeli Elektromanyetik Alan Maruziyeti ve Resveratrolün Apoptotik Yolakta Sinerjik Etkisinin İncelenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

03/06/2025

Atike DOĞAN

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cm	: santimetre
$d\vec{B}$	: Manyetik Alan
$d\vec{l}$	: Telin Küçük Parçası
dH ₂ O	: Distile Su
g	: Gram
kg	: Kilogram
M	: Molarite
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
ms	: Milisaniye
nm	: Nanometre
s	: Saniye
V/m	: Volt/Metre
W/kg	: Watt/Kilogram
W/m ²	: Watt/Metrekare
Λ	: Dalga Boyu
μT	: Mikro Tesla
$\mu 0$	: İletkenliğin Geçirgenliği
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

$\hat{r}$	: Birim Vektörü
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
Δt	: Zaman
π	: Pi Sayısı
$2d$	: Bobinler Arasındaki Mesafe



Kısaltmalar

A	: Amper
AC	: Alternatif Akım Voltajı
APS	: Amonyum Per Sülfat
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
ATP	: Adenozin Trifosfat
B	: Manyetik Alan
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
Bx1	: Birinci Bobin Manyetik Alan
Bx2	: İkinci Bobin Manyetik Alan
Bxsum	: Toplam Manyetik Alan
D	: Örnek Seyreltme Faktörü
DC	: Doğru Akım Voltajı
dH ₂ O	: Distile Su
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dT	: Oligo Primeri
E	: Elektriksel Alan
ELF-EMF	: Aşırı Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alan
EMEM	: Eagle Minimum Besi Ortamı
EMF	: Elektromanyetik Alan
FBS	: Fetal Sığır Serumı
FBS	: Fetal Sığır Serumı
GHz	: Giga Hertz
GST	: Glutasyon S-Transferaz

Hz	: Hertz
I	: Bobinden geçen akım miktarı
IC ₅₀ Konsantrasyonu	: Toplam Hücre Sayısının Yarisını İnhibe Eden İlaç/Madde
ICNIRP Komisyon	: Uluslararası İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyondan
IFN- γ	:İnterferon gamma
KHz	: Kilo Hertz
LED	: Işık Yayan Diyot
MHz	: Mega Hertz
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	: Mesajcı RNA
mT	: Mili Tesla
MUFA	: Tekli Doymamış Yağ Asidi
NaCl	: Sodyum klorür
OA	: Oleik Asit
OD	: Optik yoğunluk
p53	: Tümör Protein 53
PBS	: Fosfat Tamponu
PEMF	:Darbeli ManyetikAlan
Pen-Strep	: Penisilin-Streptomisin
PKC	: Protein Kinaz C
R	: Bobin Yarıçapı
RES	: Resveratrol
RF-EMF	: Radyo Frekans-Elektromanyetik Alan
RNA	: Ribonükleik Asit

ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPM	: Devir Sayısı
SAR	: Özgül Soğurma Oranı
SD	: Sprague Dawley
SD	: Standart Sapma
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAJE	: SDS-Poliakrilamit Jel Elektrophorez
SMF	: Statik Manyetik Alan
SVG-p12	: İnsan Astroglia Sağlıklı Hücre Hattı
T	: Tesla
TBST	: Tween 20 İçeren Tris Tamponu
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TMZ	: Temozoloid/Temozolomid
TNF-alfa	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
Tripsin-EDTA	: Tripsin Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
TSCC	: Primer Tiroid Squamoz Hücre Karsinomu
U87-MG	: İnsan Glioblastoma (Beyin Kanseri) Hücre Hattı
UV	: Ultraviyole
V	: Reaksiyon Kuyucuğundaki Numune Hacmi (mL)
V	: Volt
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
X ₀	: Bobin yarıçap ekseni
Xg	: Devir Sayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Elektromanyetik Spektrum: a) iyonize olmayan elektromanyetik b) İyonize radyasyon c) Frekans türleri d) Frekans ve Dalga boyu aralığı e) Elektromanyetik gündelik kullanım yeri (http://www.zamandayolculuk.com/html-3/em_spektrum.htm) .4	4
Şekil 2. 2. Darbeli Manyetik Alanın Dalga Tipleri (BioRender.com ile oluşturulmuştur)6	6
Şekil 2. 3. PEMF devrelerinde kullanılan bobin çeşitleri: a) Ruben's Bobin; b) Fransleau-Braunbeck; c) Helmholtz Bobin (Ahmed vd. 2013) 7	7
Şekil 2. 4. Helmholtz Bobin Çifti. R/2: Bobin yarıçap eksen; I: Bobinden geçen akım miktarı;R: Bobin çapı (https://www.scielo.br/j/rbef/a/nCZBbDJXDtydyjchjB8HDdz/?lang=en).....8	8
Şekil 2. 5. Helmholtz bobinlerinde indüklenen manyetik alan Bx1 : Birinci bobin manyetik alan; Bx2 : İkinci bobin manyetik alan; Bxsum: Toplam manyetik alan; a: Bobin yarıçap eksen; I: Bobinden geçen akım miktarı; 2d: Bobinler Arasındaki Mesafe şeması 9	9
Şekil 2. 6. Glioblastoma temsili gösterimi..... 11	11
Şekil 2. 7. Glioblastomada apoptotik yolak. (A) PI3K/AKT/ mTOR yolağı; (B) TNFR1/TNF- α yolağı; (C) Proapoptotik sinyal yolağı (Valdes-Rives vd., 2017)..... 13	13
Şekil 2. 8. Resveratrolün Bulunduğu Kaynaklar 16	16
Şekil 2. 9. Resveratrol'ün kimyasal yapısı..... 17	17
Şekil 3. 1. Darbeli Manyetik Alan (PEMF) Devresi.....20	20
Şekil 3.2. Pasco 850 Universal Interface model Sinyal Üreticisi (Pasco- 012-12355B) 21	21
Şekil 3.3. Pasco 850 Capstone Yazılımı Ara yüzü 23	23
Şekil 3.4. U87-MG Hücre Hattına Manyetik Alan Maruziyeti 24	24
Şekil 3.5. U87-MG ve SVG-P12 hücre hatlarının büyüme ortamlarına ekimi.....25	25
Şekil 3.6. Deney Aşamaların Şematik Gösterimi 26	26
Şekil 3.7. PEMF maruziyeti olmaya U87-MG ve SVG-P12 hücre hatlarının RES ve TMZ ile muamele edilmesi ile hücre canlılığın ölçümü 27	27
Şekil 3.8. U87-MG ve SVG-P12 hücre hatlarının RES ve TMZ ile muamele edilip kısa ve uzun süre PEMF'ye maruz bırakılan hücrelerin hücre canlılığın ölçülmesi.....28	28
Şekil 3.9. Apoptoz çalışmasının şematik gösterimi 29	29
Şekil 3.10. Total RNA izolasyonu 30	30
Şekil 3.11. cDNA sentezi..... 31	31
Şekil 3.12. qRT-PCR deneyinin şematik gösterimi 32	32
Şekil 3.13. Protein izolasyonu 34	34
Şekil 3.14. Western Blotting şematik gösterimi (Bio-Render ile çizilmiştir).....37	37
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda RES ve TMZ ile muamele edilen hücrelerin optimizasyon çalışmalarındaki ışık mikroskobu görüntüleri 39	39
Şekil 4.2. a) İlk 0.15 dakikadaki, b) 15 dakikadaki sıkıştırılmış, ve c) 6 saatteki sıkıştırılmış 1 ± 0.2 mT manyetik alan sinyallerinin Pasco Capstone Yazılım ile elde edilen manyetik alan dalga sinyalleri 40	40

Şekil 4.3. İnsan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ sitotoksik etkileri	41
Şekil 4.4. İnsan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerinde RES ve TMZ'nin konsantrasyonuna bağlı hücre canlılığı	42
Şekil 4.5. İnsan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki kısa süreli (15 dakika) PEMF maruziyetinin RES ve TMZ sitotoksik etkileri	43
Şekil 4.6. Kısa süreli (15 dakika) PEMF maruz bırakılan insan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ konsantrasyonuna bağlı hücre canlılığı	44
Şekil 4.7. İnsan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki uzun süreli (6 saat) PEMF maruziyetinin RES ve TMZ sitotoksik etkileri	45
Şekil 4.8. Uzun süreli (6 saat) PEMF maruz bırakılan insan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ konsantrasyonuna bağlı hücre canlılığı	46
Şekil 4.9. PEMF maruziyeti olmayan, kısa süreli (15 dk) ve uzun süreli (6 saat) PEMF'ye maruz bırakılan insan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ'nin sitotoksik etkilerinin heat-map analizi ile gösterimi	47
Şekil 4.10. PEMF maruziyeti olmayan, kısa (15 dk) ve uzun süreli (6 saat) PEMF maruziyetine bırakılan insan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ'nin konsantrasyonuna bağlı yüzde (%) hücre canlılığının sütun ve eğri grafiği ..	48
Şekil 4.11. İnsan glia SVG-P12 hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ sitotoksik etkileri	49
Şekil 4.12. İnsan astroglial SVG-P12 hücre hattı üzerinde RES ve TMZ'nin konsantrasyonuna bağlı yüzde (%) hücre canlılığı	50
Şekil 4.13. İnsan glia SVG-P12 hücre hattı üzerindeki kısa süreli (15 dakika) PEMF maruziyetinin resveratrol ve TMZ sitotoksik etkileri	51
Şekil 4.14. İnsan astroglial SVG-P12 hücre hattı üzerindeki kısa süreli (15 dakika) PEMF maruziyetinin RES ve TMZ'nin konsantrasyonuna bağlı yüzde (%) hücre canlılığı	52
Şekil 4.15. İnsan glia SVG-P12 hücre hattı üzerindeki uzun süreli (6 saat) PEMF maruziyetinin RES ve TMZ sitotoksik etkileri	53
Şekil 4.16. İnsan astroglial SVG-P12 hücre hattı üzerindeki uzun süreli (6 saat) PEMF maruziyetinin RES ve TMZ'nin konsantrasyonuna bağlı yüzde (%) hücre canlılığı	54
Şekil 4.17. PEMF maruziyeti olmayan, kısa süreli (15 dk) ve uzun süreli (6 saat) PEMF'ye maruz bırakılan insan astroglial SVG-P12 hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ'nin sitotoksik etkilerinin heat-map analizi ile gösterimi	55
Şekil 4.18. PEMF maruziyeti olmayan, kısa (15 dk) ve uzun süreli (6 saat) PEMF maruziyetine bırakılan insan astroglial SVG-P12 hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ'nin konsantrasyonuna bağlı yüzde (%) hücre canlılığının sütun ve eğri grafiği	56
Şekil 4.19. Deney gruplarının (a) Annexin V+ hücre yüzdesi gösterimi, (b) erken/geç apoptotik ve nekrotik etkisi. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. *** $p < 0.001$ 'de NT grubuna göre istatistiksel farkı işaret etmektedir	58
Şekil 4.20. U87-MG hücresi için reaksiyon döngüsündeki amplifikasyon eğri grafiği ..	59

Şekil 4.21. U87-MG hücresi için sıcaklık oluşumuna karşı emisyon erimesinin olduğu erime eğrisi piki.....	60
Şekil 4.22. U87-MG hücresi için sıcaklık oluşumuna karşı emisyon erimesinin olduğu erime eğrisi piki.....	60
Şekil 4.23. U87-MG hücre gruplarında kaspaz-9, kaspaz-3, bax/Bcl-2, TP53, P13K, AKT, mTOR genlerinin mRNA seviyelerinin GAPDH internal standard kontrole göre relatif ekspresyonları. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmekte.....	62
Şekil 4.24. Bisinkoninik asit (BCA) testi standart eğrisi. Mavi noktalı çizgi, trend çizgisine sağlam bir uyum göstermiştir. Sığır serum albümini= BSA.....	63
Şekil 4.25. U87-MG hücresinin apoptoz yolağında yer alan apoptotik Bax proteininin ekspresyonundaki bant ve değişim grafiği. GAPDH internal standard kontrole göre relatif ekspresyonları. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmekte .t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$, *; $P<0.05$)	64
Şekil 4.26. U87-MG hücresinin apoptoz yolağında yer alan apoptotik Bcl-2 proteininin ekspresyonundaki bant ve değişim grafiği. GAPDH internal standard kontrole göre relatif ekspresyonları. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmekte . t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$, *; $P<0.05$)	65
Şekil 4.27. U87-MG hücresinin apoptoz yolağında yer alan apoptotik Kaspaz-3 proteininin ekspresyonundaki bant ve değişim grafiği. GAPDH internal standard kontrole göre relatif ekspresyonları. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmekte . t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$, *; $P<0.05$)	66
Şekil 4.28. U87-MG hücresinin apoptoz yolağında yer alan apoptotik Kaspaz-9 proteininin ekspresyonundaki bant ve değişim grafiği. GAPDH internal standard kontrole göre relatif ekspresyonları. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmekte . t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$, *; $P<0.05$)	67
Şekil 4.29. U87-MG hücresinin apoptoz yolağında yer alan apoptotik Kaspaz-9 proteininin ekspresyonundaki bant ve değişim grafiği. GAPDH internal standard kontrole göre relatif ekspresyonları. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmekte. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$, *; $P<0.05$)	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. Kullanılan cihaz ve markaları.....	19
Çizelge 3. 2. Pasco 850 Universal Interface model sinyal üreticinin özellikleri	22
Çizelge 3. 3. qRT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen genlere ait ileri (F:forward) ve geri (R:reverse) primer dizileri (NCBI)	32
Çizelge 3. 4. SDS-PAGE için hazırlanan ayrıştırıcı jeli ve sıkıştırma jeli içerikleri	36



1. GİRİŞ

Glioblastoma multiforme (GBM), merkezi sinir sisteminin en yaygın ve en agresif primer tümörlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflamasında IV. derece malign tümörler grubunda yer alan glioblastoma, hızlı proliferasyon, invaziv büyüme özelliği, yüksek nüks oranı ve mevcut tedavi yöntemlerine karşı gelişen direnç nedeniyle klinik açıdan oldukça zorlu bir tümör tipi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bugün için uygulanan standart tedavi yaklaşımları; cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve oral alkilleyici bir ajan olan temozolomid (TMZ) ile gerçekleştirilen kemoterapidir. Ancak bu tedavi kombinasyonuna rağmen hastaların medyan sağkalım süresi genellikle 12–15 ay ile sınırlı kalmaktadır. Bu durum, glioblastoma tedavisinde yeni nesil biyomedikal yaklaşımların araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir.

Bu bağlamda, son yıllarda kanser tedavilerinde doğal kaynaklı ajanların ve fiziksel uygulamaların birlikte kullanımına yönelik çalışmalar dikkat çekmektedir. Bu tez çalışmasında da glioblastoma hücre hattı üzerinde doğal bir bileşik olan Resveratrol (RES) ile iyonlaştırıcı olmayan, düşük frekanslı bir fiziksel ajan olan Darbeli Manyetik Alan (PEMF)'in etkileri değerlendirilmiştir. Bu kombinasyonun sinerjik etkiler gösterip göstermediği, özellikle apoptotik yollar üzerindeki düzenleyici rolü araştırılmıştır.

Resveratrol, başta üzüm, dut, yaban mersini ve yer fıstığı gibi bitkilerde bulunan stilben yapısına sahip bir polifenol olup, antioksidan, anti-inflamatuar, antiproliferatif ve proapoptotik etkileriyle bilinmektedir. Yapılan birçok çalışmada, Resveratrol'un çeşitli kanser hücre hatları üzerinde apoptotik etkiler gösterdiği ve hücre döngüsünü durdurduğu bildirilmiştir. Ancak biyoyararlanımı düşük olması ve hücre içine alım kapasitesinin sınırlı olması, bu molekülün terapötik etkinliğini sınırlandırmakta ve farklı destekleyici yaklaşımlarla kombine kullanımını gerekli kılmaktadır.

Darbeli Elektromanyetik Alanlar (PEMF), düşük frekanslı, iyonlaştırıcı olmayan ve invazif olmayan fiziksel uyarıcılardır. Hücresel iyon kanalları, membran geçirgenliği, oksidatif stres yanıtları ve sinyal iletim mekanizmaları üzerindeki etkileri ile son yıllarda birçok biyolojik ve klinik araştırmada değerlendirilmiştir. Özellikle PEMF'nin hücre içinde apoptoz sinyal yollarını aktive edebileceği, hücre proliferasyonunu baskılayabileceği ve bazı kemoterapötik ajanlarla sinerjik etki oluşturabileceği gösterilmiştir. Bu potansiyel etkiler ışığında PEMF, kanser tedavilerinde ilaç etkinliğini artırmak ve hücre direncini kırmak amacıyla kullanılabilecek önemli bir yardımcı ajan olarak öne çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasında, U87-MG glioblastoma hücre hattı üzerinde Resveratrol ve PEMF uygulamasının tek başına ve kombine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, 75 Hz frekansta ve 1 mT manyetik alan şiddetinde 15 dk (kısa) 6 sa (uzun) uygulanan PEMF'nin, Resveratrol ile sinerjik bir etkileşim gösterip göstermediği; hücre canlılığı, apoptoz düzeyi, apoptotik sinyal yollarına ait gen ve protein ekspresyonları üzerinden değerlendirilmiştir. Kullanılan analiz yöntemleri arasında Alamar Blue testi ile hücre canlılığı, akış sitometrisi ile apoptoz/nekroz düzeyleri, qRT-PCR ile gen ekspresyon düzeyleri ve Western Blot ile protein ekspresyonları yer almaktadır.

Deneysel olarak altı farklı grup oluşturulmuştur: Tedavi edilmeyen kontrol grubu, yalnızca Resveratrol uygulanan grup, yalnızca Temozolomid uygulanan grup, yalnızca PEMF maruziyeti uygulanan grup, RES sonrası PEMF uygulanan grup ve TMZ sonrası PEMF uygulanan grup. Özellikle RES + PEMF grubunda sitotoksik etkinin ve apoptoz oranlarının diğer gruplara göre anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır. Proapoptotik genler olan bax, caspase-3, caspase-9 ve TP53'in ekspresyon düzeylerinde belirgin artış görülürken, antiapoptotik Bcl-2 geninin ekspresyonu azalmıştır. PI3K/AKT/mTOR yolunun düzenlenmesi ile hücre sağkalım mekanizmalarının baskılandığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışma, Resveratrol'un terapötik etkinliğinin PEMF uygulamasıyla artırılabilirliğini ve bu kombinasyonun glioblastoma hücrelerinde apoptotik yanıtı güçlü bir şekilde indükleyebileceğini ortaya koymaktadır. Elde edilen bulgular, gelecekte glioblastoma ve benzeri dirençli tümörlerde non-invazif fiziksel ajanlarla doğal bileşiklerin kombinasyonunun, geleneksel tedavi yöntemlerine ek olarak umut vaat eden alternatif yaklaşımlar olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu tür çalışmalar, ilaç direnci ile mücadele, düşük doz kullanım ile yan etkilerin azaltılması ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi açısından da önemli katkılar sağlayacaktır.

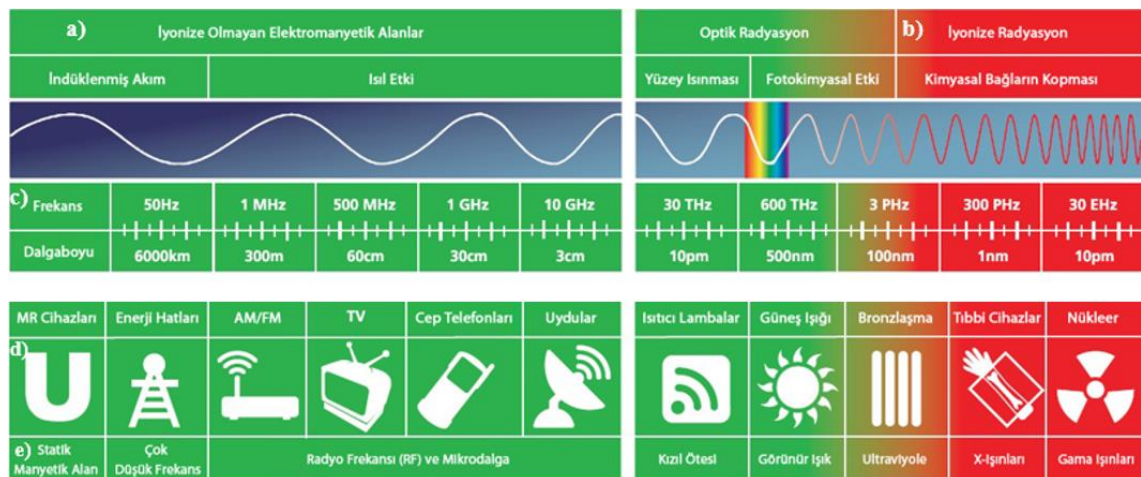
2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Elektromanyetik Alan

Tarih boyunca elektromanyetik alanlar dünyanın gelişiminde ve canlıların yaşamında önemli rol oynamıştır (Wade 2013). Dünyanın çeşitli bölgelerinde insanların bazı doğal malzemelerin, belirli sağlık sorunlarının iyileştirilmesinde kullanılabilecek elektron ve manyetik özelliklere sahip olduğunu bildiklerine dair çok sayıda geçmişten günümüze araştırmalar mevcuttur (Markov 2015; Wade 2013). En eski bilimsel açıklamalardan biri, 1600 yılında doktoru William Gilbert tarafından yazılan De Magnete kitabında çeşitli sağlık sorunlarını tedavi etmek için manyetik özelliğinden yararlanılarak "yük taşları" kullandığını belirtmiştir (Markov 2007). 1820'lerde elektrik akımının pusula iğnesini saptırabileceğinin anlaşılmasının ardından Michael Faraday, mıknatısların yardımıyla elektrik akımı üretilebileceğini keşfederek "elektromanyetik alan teorisi"nin ortaya çıkmasının yolunu açtı (ICNIRP 2014; Gürdal 2017; Jiang 2018). Maxwell ve Lorenz, elektrik alanı ile manyetik alan arasındaki ilişkiyi kanıtlamak amacıyla "elektromanyetik alan teorisini" öne sürdüler. Elektromanyetik alan teorisine göre, karşılıklı dik elektrik alanları ve manyetik alanlarda zamanla meydana gelen değişiklikler "elektromanyetik alanlar" üretir. Bir maddedeki yükler arasındaki itme veya çekme kuvvetine "E" harfiyle gösterilen elektrik alanı denir ve birimi volt/metredir (V/m) (Fano vd. 1963; Staebler 2017). Elektrik alanını oluşturan yapı, elektrik yüklerinin ortamda varlığıdır. Manyetik alan, zamanla değişen elektrik yükleri yer değiştirdiğinde, yani bir elektrik akımı sirkülasyonu olduğunda ortaya çıkar ve akım taşıyan bir telin etrafında oluşan manyetik alan çizgilerinin yoğunluğuyla temsil edilir (Fano vd. 1963; Staebler 2017). Manyetik alan "B" harfi ile ifade edilir ve birimi Tesla (T)'dir. Manyetik alanlar, kalıcı mıknatıslar veya yük yer değiştirmesi ile "Statik Manyetik Alan (SMA)" veya "Zamanla Değişen (Dinamik) Manyetik Alan" olmak üzere iki gruba ayrılır (Fano vd. 1963; Staebler 2017; Pawluk ve Layne 2017; Ronzio 2020; ICNIRP 2020; Wang ve Zhang 2017). Dünyanın yapısından kaynaklanan doğal SMA'ların yanı sıra insan yapımı SMA'lar da vardır. Yapay SMA, sabit bir mıknatıs ve yoğunluğu ve yönü zamanla değişmeyen (0 Hz frekans) bir DC EMF tarafından üretilir. Yoğunluğu zamanla değişen manyetik alanlar; "zayıf manyetik alan (<1mT)", "orta manyetik alan (1 mT-1 T)", "güçlü manyetik alan (1-20 T)" ve "çok güçlü manyetik alan" alanıdır. (>20T)" (Wang ve Zhang 2017; Hao vd. 2018).

Elektrik ve manyetik alanların titreşimleri sonucu belirli bir enerjiye sahip elektromanyetik dalgalar üretilir ve bu enerjinin uzaya yayılmasına "elektromanyetik radyasyon" adı verilir (Vallero 2013; Zhang 2017; Houck 2018). Elektromanyetik dalgaları belirleyen özellikler dalganın frekansı, dalga boyu, hızı ve genliğidir. Elektromanyetik dalgaların saniyede üretilme periyoduna "frekans" adı verilir ve birimi hertz (Hz)'dir (Houck 2018). Elektromanyetik dalgaların bir diğer özelliği de "Dalga boyu" dur. Dalganın bir saniyede kat ettiği mesafeyi temsil eden " λ "

sembolöyle temsil edilir (Teimori vd. 2016; Staebler 2017; Houck 2018; Wade 2013). Elektromanyetik alanlar (EMF'ler), aşırı düşük statik manyetik alanlardan aşırı yüksek gama ışınlarına kadar değişen fiziksel elektromanyetik ifade olan spektrumun bir parçasıdır (Markov 2007; Wade 2013). Bu spektrum dalga boyuna (0,0001 nm ila 100 m) göre sınıflandırılan elektromanyetik dalgaların listesine "Elektromanyetik Spektrum" veya "Elektromanyetik Tayf " adı verilir (Vallero 2013; Zhang 2017). Elektromanyetik spektrum, dalga boyları 120 nanometreden küçük olan yüksek enerjili elektromanyetik radyasyonu ve dalga boyları 120 nanometreden büyük olan düşük enerjili elektromanyetik radyasyonu gösterir (Vallero 2013; Staebler 2017; Zhang 2017). Elektromanyetik spektrumun 10 kHz ila 300 GHz frekans aralığında çalışan sistemlere örnek olarak radyo, televizyon, kablosuz sistemler, radar sistemleri, uydu iletişim sistemleri, mikrodalga fırınlar, tıpta ve endüstride RF frekanslarını kullanan sistemler ve GSM iletişimleri sistemleri verilebilir. "Özgül soğurma oranı" (SAR), ilgili sistem tarafından üretilen elektromanyetik radyasyonun biyolojik doku ile etkileşiminin bir ölçüsüdür (Tamam 2016; Demirel 2016; Rağbetli 2010; Wade 2013). SAR, doku tarafından emilen ve ısıya dönüştürülen enerjiyi ifade eder. Yüksek enerjili radyasyon atomların içindeki elektronların yörüngelerini bozabilir, iyonlar oluşturabilir ve moleküller içindeki kimyasal bağları kırabilir (Tamam 2016; Rağbetli 2010; Wade 2013). Yüksek frekanslı X ışınları, gama ışınları ve kozmik ışınlar, canlı dokudaki atomlarla çarpışarak yeni iyonlar oluşturdukları için "iyonlaştırıcı radyasyon" olarak adlandırılır (Markov 2015 Teimori vd. 2016; Staebler 2017). İyonlaştırıcı radyasyonun frekans aralığı 10^{15} ile 10^{21} arasındadır ve X-ışını ve gama ışını bantları bu radyasyonun kaynaklarıdır (Krath vd., 2017). İyonlaştırıcı radyasyon, tıbbi teşhis ve tedavi ekipmanlarında, özellikle mamogramlarda, bilgisayarlı tomografi (BT) taramalarında ve X-ışınlarında kullanılır (Teimori vd. 2016).



Şekil 2.1. Elektromanyetik Spektrum: **a)** iyonize olmayan elektromanyetik **b)** İyonize radyasyon **c)** Frekans türleri **d)** Frekans ve Dalga boyu aralığı **e)** Elektromanyetik alanın gündelik kullanım yeri (http://www.zamandayolculuk.com/html-3/em_spektrum.htm)

Elektromanyetik spektrumdaki diğer bir radyasyon türü ise "iyonlaştırıcı olmayan radyasyon"dur (Şekil 2.1.) (Vallero 2013; Poljak ve Cvetkovic 2019). Bir atomdan elektron çıkaramayacak bir enerjiye ve 120 nanometrenin üzerinde bir dalga boyuna sahiptir (Vallero 2013; Staebler 2017; Zhang 2017). İyonlaştırıcı olmayan radyasyonun frekans bandı çok geniştir ve radyasyon kaynakları günlük hayatımızın her sahnesinde mevcuttur. 3 ila 3000 Hz frekans aralığındaki radyo dalgaları, ev ve iş yerlerinde kullanılan elektronik cihazlar ve 100 kHz ila 300 GHz frekans aralığındaki iletişim araçları tarafından yayılır (Şekil 2.1.) (Vallero 2013; Poljak ve Cvetkovic 2019; Israel 2013). Elektromanyetik spektrumun 100 kHz ila 300 GHz frekans aralığında çalışan sistemlere örnek olarak radyo, televizyon, kablosuz sistemler, radar sistemleri, uydu iletişim sistemleri, mikrodalga fırınlar, tıpta ve endüstride RF frekanslarını kullanan sistemler ve GSM iletişimleri sistemleri verilebilir (Kim vd. 2016; Rağbetli 2010). Bu kullanım alanları dışında iyonlaştırıcı olmayan radyasyonlar sağlıkta birçok teşhis ve tedavide kullanılmaktadır. Bu kullanımlar mikrodalga kaynaklı katarakt, RF ve mikrodalgalardan kaynaklanan termal yanıklar, kas ve sinir hasarı ve testis fonksiyonundaki değişiklikler. Bununla birlikte, termal üretimin tıbbi uygulamada, kalp hastalığı ve kötü huylu tümörler de dâhil olmak üzere çeşitli birçok hastalık sürecinde olumlu şekilde kullanılmaktadır (Vincenzi 2016; Demirel 2015). EMF nin biyolojik doku ile etkileşiminin bir ölçüsü bulunmaktadır. Bu ölçü 'Özgül soğurma oranı (SAR)' dır. SAR ilgili sistem tarafından üretilen elektromanyetik radyasyonun, doku tarafından emilen ve ısıya dönüştürülen enerjiyi ifade eder (Demirel 2015; Rağbetli 2010). Elektromanyetik alan Hz aralıklarına göre çeşitli sınıflara ayrılmaktadır. Bu sınıflandırmalar şu şekildedir; "son derece düşük frekanslı elektromanyetik alanlar (ELF-EMF, <300 Hz)", "orta frekanslı elektromanyetik alanlar (300 Hz - 10 MHz)" ve "yüksek frekanslar (10 MHz - 300 GHz)" olarak sınıflandırılır (Wang ve Zhang 2017). Ayrıca ultraviyole ışık, görünür ışık, kızılötesi ışık, statik elektromanyetik alanlar vardır. Bunlar dışında günümüzde araştırmalarda dikkat çeken, düşük frekanslı elektromanyetik alan olan Darbeli Manyetik alanda bulunmaktadır (Mattsson ve Simko 2019).

2.2.Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF)

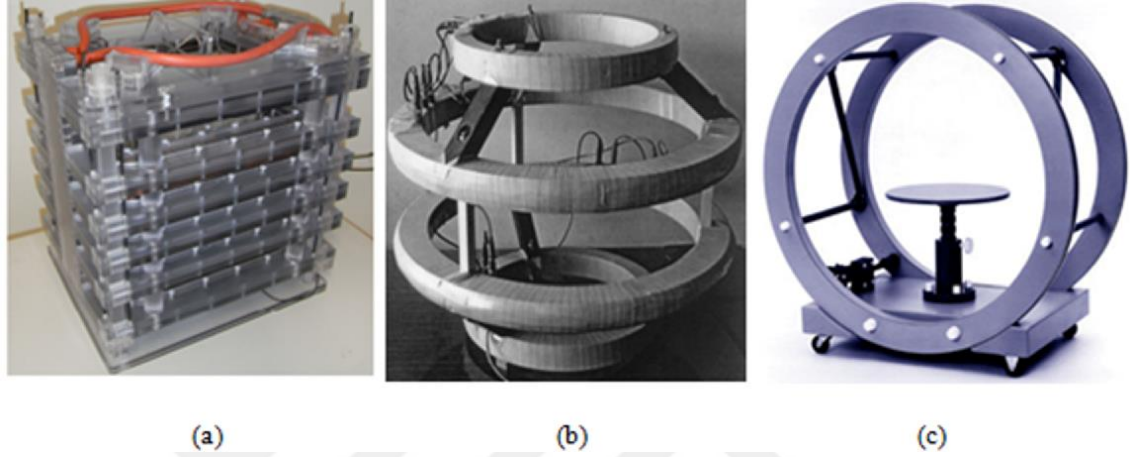
Elektromanyetik alan günümüzde çeşitleriyle farklı alanlarda çok fazla çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalarda kullanılan en dikkat çeken elektro manyetik alan , iyonlaştırıcı veya termal etkiye sahip olmayan düşük frekanslıDarbeli ManyetikAlan (Pulsed Electromagnetic Field) (PEMF)” uygulamasıdır (Vadalà vd. 2016; Gessi vd. 2019; Demirel 2015). Bu uygulamanın belirli dalga formuna ve genliğe sahip olması ve kolay kontrol edilebilmesi dikkat çeken özellikte olması belirlemektedir. PEMF dalgası üreten cihazların belli bir manyetik aralığında üretilmesi gerekmektedir. Bu aralık Uluslararası İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyondan Koruma Komisyonu (ICNIRP) tarafından yayınladığı yönergeye göre 10 μ T ve 10 mT arasında değere sahip olması gerekmektedir (ICNIRP 1998; Ganesan vd. 2009; Hug ve Röösli 2012). Periyodik alternatif akım (AC) olan PEMF sıradan statik manyetik alanlardan farklı olarak kesikli ve periyodiktir (Shupack vd. 1992; Jiang 2018).



Şekil 2.2. Darbeli Manyetik Alanın Dalga Tipleri (BioRender.com ile oluşturulmuştur)

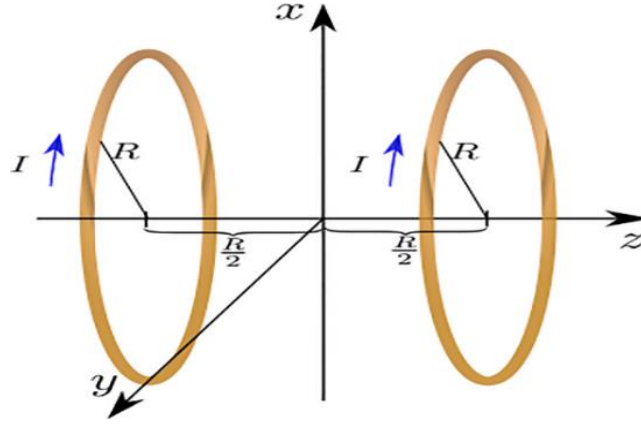
Darbeli Manyetik Alan (Pulsed Electromagnetic Field) (PEMF) genel olarak sinyal üretici ve bobin şeklinde iki mekanizmadan oluşmaktadır (Hug ve Röösli 2012; Ahmed vd. 2013; Jiang 2018; Kohli vd. 2020). Bu iki mekanizma sayesinde PEMF’nin farklı frekans ve dalga boyunun oluşmasını sağlamaktadır. Bu sistemin diğer manyetik alanlara göre daha fazla önemli yere sahip olmasının asıl sebebi ise farklı frekans ve genlik değerine sahip dalga formları üretmesidir. Ayrıca bir darbe tekrarlama frekansı f kullanarak canlı dokuya kısa bir zaman dilimi Δt üzerinden aralıklı, akım ile oluşturulan manyetik alan uygulamasıyla invaziv olmayan bir metottur (Vincenzi 2016; Markov 2007; Demirel 2015). PEMF iletken malzemelerde ek bir elektrik akımını indüklenmesiyle kısa atım süresi ve düşük tekrarlama frekansı nedeniyle, manyetik alan etki süresinin yalnızca bir kısmı için etkinleştirilir (Vincenzi 2016; Demirel 2015). PEMF de darbelerin üretilmesi için Sinüzoidal ve Sinüzoidal olmayan Kare(Darbeli), Tester ve Üçgen’e kadar değişmesiyle çeşitli harmonik alan frekansı içeren farklı dalga biçimleri kullanılır (Şekil 2.2.) (Pawluk ve Layne 2017; Kohli vd. 2020)

PEMF, uygulanacak alanda belli bir manyetik alan oluşturmak için bobinler kullanılır (Hug ve Röösli 2012; Ahmed vd. 2013; Jiang 2018; Kohli vd. 2020). Bu bobinlerde alternatif elektrik sinyalini indükleyerek bir dizi manyetik darbe oluşturmaktadır (Hug ve Röösli 2012). Uygulanacak olan alandaki manyetik maruziyet etkisini ise bobin şeklinin (Şekil 2.3.) ve boyutunun etkilemesiyle beraber uygulanacak alanda homojen yayılmaması ve uyarılan noktanın belirlenememesi bu sistem için dezavantaj oluşturmaktadır (Pawluk ve Layne 2017; Ahmed vd. 2013; Ganesan vd. 2009).



Şekil 2.3. PEMF devrelerinde kullanılan bobin çeşitleri: **a)** Ruben's Bobin; **b)** Fransleau-Braunbeck; **c)** Helmholtz Bobin (Ahmed vd. 2013)

Bobinler, merkez dışında doğrusal olmayan manyetik alan gücü dağılımlarına sahip olması doğru uygulamayı sınırlandırmaktadır. Bir bobinin ucundaki manyetik akı yoğunluğu, merkezine göre iki katı kadar düşebilir ve bobinin uzunluğunun artırılması, yalnızca uçlardaki manyetik alandaki azalmayı artırmasıyla ayrı bir dezavantaja sebep olabilmektedir (Ahmed vd. 2013; Vincenzi 2016; Markov 2007; Demirel 2015). Bu dezavantaj durumları en az indirmek hatta ortadan kaldırmak için Helmholtz bobin sisteminin farklı şekil ve boyutta bobinler olmasından yararlanılarak düzgün manyetik alan sağlayarak ortadan kaldırılabilir. Düzgün manyetik alan sağlanabilmesi için bobin sayısı ve akım miktarı dikkate alınması gerekmektedir. Bir elektrik alan tarafından üretilen manyetik alan Jean-Baptiste ve Felix Savart tarafından 1820’de ortaya çıkan “Biot-Savart yasası” ile ifade edilmektedir (Ahmed vd. 2013; Staebler 2017). Bu yasa ile Manyetik alanı (B) oluşturan elektrik yükün ne kadar manyetik alan oluşturduğunu açıklamak için kullanılır.



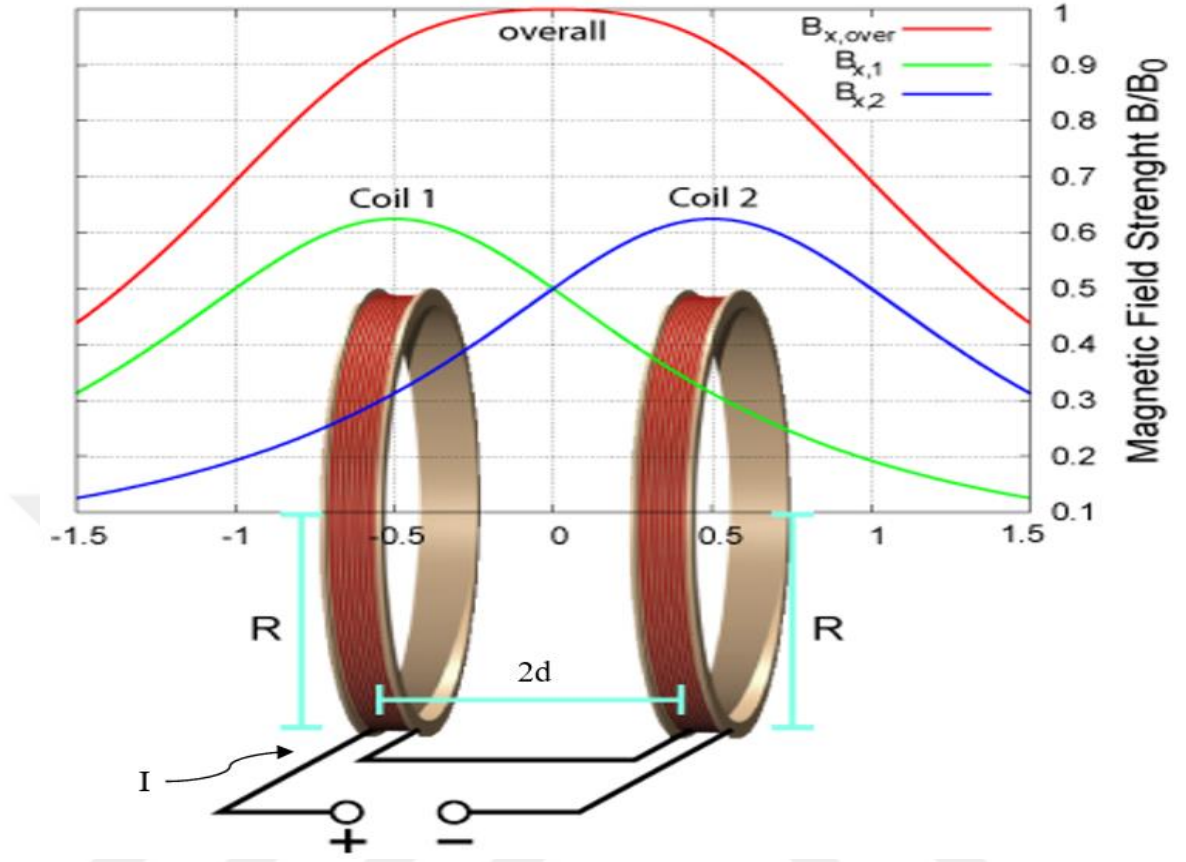
Şekil 2.4. Helmholtz Bobin Çifti. $R/2$: Bobin yarıçap eksen; I : Bobinden geçen akım miktarı; R : Bobin çapı
(<https://www.scielo.br/j/rbef/a/nCZBbDJXDtydyjchjB8HDdz/?lang=en>)

Biot-Savart kanunu:

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

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

Bobinler arasında homojen manyetik alana oluşumunda kullanılan Helmholtz bobinlerin biri birine paralel olarak yerleştirilmesiyle yukarıdaki formül kullanılarak manyetik alanlar hesaplanmaktadır (Ahmed vd. 2013; Jiang 2018).



Şekil 2.5. Helmholtz bobinlerinde indüklenen manyetik alan B_{x1} : Birinci bobin manyetik alan; B_{x2} : İkinci bobin manyetik alan; B_{xsum} : Toplam manyetik alan; a : Bobin yarıçap eksen; I : Bobinden geçen akım miktarı; $2d$: Bobinler Arasındaki Mesafe şeması

Yukarıdaki resimde Helmholtz bobinlerde oluşan iki ayrı küçük manyetik alan B_{x1} ve B_{x2} şeklinde gösterilmiştir. Bu iki manyetik alanın toplamını ise net manyetik alan ifade eden değer ise B_x 'dir.

B_x değeri;

$$B_x = \frac{\mu_0 I N a^2}{2} \left[\frac{1}{(a^2 + (d-x)^2)^{3/2}} + \frac{1}{(a^2 + (d+x)^2)^{3/2}} \right] \quad (2.2)$$

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

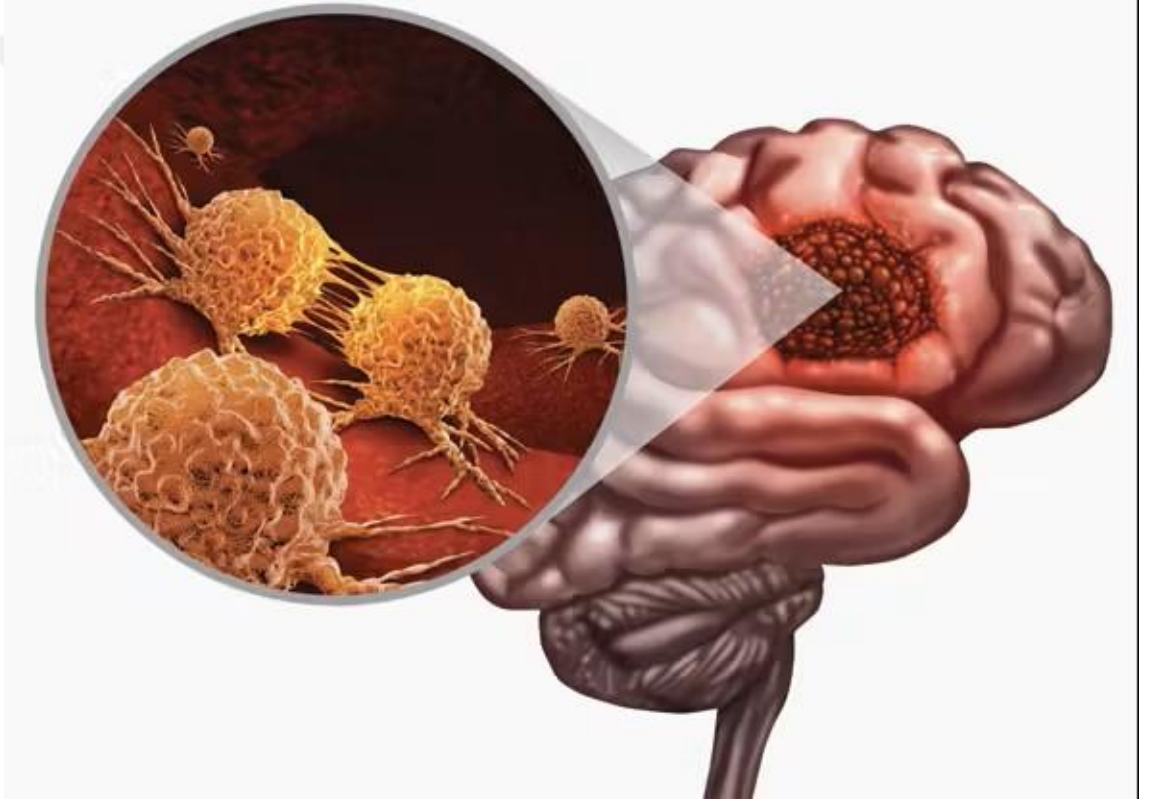
2.3. Glioblastoma

Canlıların gelişiminde hücrelerdeki büyüme mekanizması doğru ve kontrollü bir şekilde gelişmesi gerekmektedir. Bu kontrol mekanizmasının hasar almasıyla hücreler de kontrolsüz gelişme ve çoğalmayı gerçekleştirerek kanser meydana gelmektedir. Hücrelerde bu durumun gerçekleşmemesi için programlanmış hücre ölümü yani apoptoz meydana gelmektedir. Apoptoz, çok hücreli organizmalarda homeostaz ve gelişimin sürdürülmesi için hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması gibi belirli morfolojik özelliklerle karakterize edilen düzenlenmiş bir hücre ölümü sürecidir (Souza. F.G. vd., 2022. Ghobrial vd., 2005, Muryama T. Vd., 2024) Bu süreci gerçekleştiren iki ana yolu içerir; içsel ve dışsal yollar. İçsel yol DNA hasarı veya oksidatif stres gibi içsel uyaranlar tarafından tetiklenir ve mitokondriyal dış zar geçirgenleşmesine yol açar. Bu, hücre parçalanmasından sorumlu proteazlar olan kaspazları aktive eden sitokrom c'nin salınmasıyla sonuçlanır (Souza. F.G. vd., 2022., Vermeulen, K. vd., 2003). Bcl-2 ailesi proteinleri, apoptozu teşvik ederek veya engelleyerek bu yolun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan genlerdendir (Vermeulen, K. vd., 2003) Dışsal yol genel olarak ligandların hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine, örneğin Fas veya TNF reseptörlerine bağlanmasını içeren dış sinyaller tarafından başlatılır. Bu bağlanma, ölüm indükleyen bir sinyal kompleksinin oluşumu yoluyla kaspazları aktive eder (Vermeulen, K. vd., 2003 Ghobrial vd., 2005). Bir ligandın bir ölüm reseptörüne bağlanması ölüme neden olan bir sinyal kompleksinin (death-inducing signaling complex) (DISC) oluşumunu indükler. Bu protein kompleksi, adaptör proteinlerin yardımıyla kaspaz-8'in dimerizasyonuna ve aktivasyonuna yol açar (Garcia vd., 2012; Ghobrial vd., 2005). Aktif kaspaz-8 ya direkt olarak prokaspaz-3,-6, -7'yi aktive ederek apoptozu başlatır ya da Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'ı kesip aktifleştirerek apoptozun mitokondriyal yolağının aktifleşmesine neden olur (Pistritto vd., 2016). Apoptoz, genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak gelişen tümör protein 53 (p53)'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır (Xu vd., 2020). Mitokondriyal yolda denilen içsel yol ise, DNA hasarı gibi şiddetli hücre stresi ile hücrenin içinden aktive edilir (Xu vd., 2020). Her iki yol da, hücre ölüm programını temel hücresel bileşenleri keserek yürüten kaspazların aktivasyonunda birleşir (Lossi, L. Vd., 2024)

Avrupa'da, primer merkezi sinir sistemi kanserlerinin insidansı 100.000 erkek başına 4.5 ila 11.2 vaka ve 100.000 kadın başına 1.6 ila 8.5 vaka arasında değişmektedir (Kiskova vd. 2020). Glioblastoma, merkezi sinir sisteminin en yaygın birincil tümörlerinden biridir ve invazif bir büyümeyle karakterize olup tedaviye direnç gösterme özelliğine sahiptir. Bu nedenle, glioblastoma yolakları, bu tümörlerin patofizyolojisi ve tedavisinde kritik öneme sahiptir. Glioblastoma sorumlu yolakların, tümör hücresi büyümesi ve canlılığıyla ilişkilenirilen hücresel sinyal iletim yollarıdır. Bu

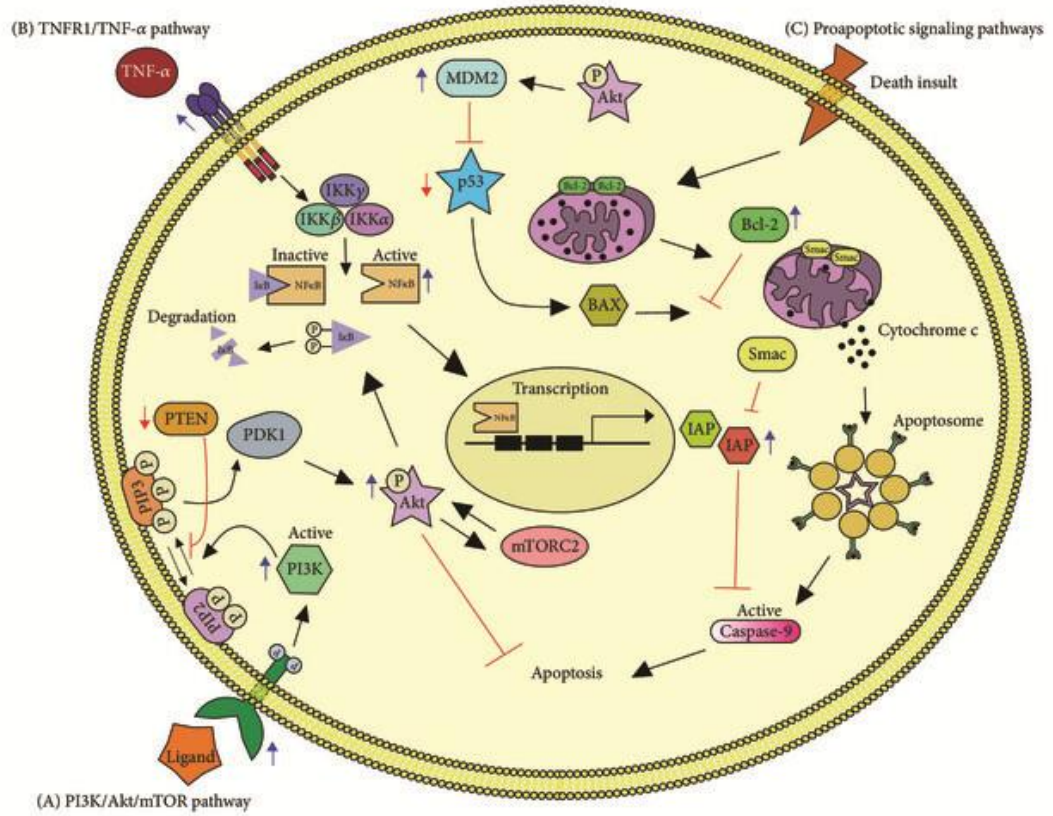
yolaklardaki değişiklikler genellikle glioblastoma'nın invazivitesiyle ve tedavi yanıtıyla ilgilidir. Tedavideki ilerlemelere rağmen modaliteler, büyük ölçüde tedavi edilemez olmaya devam etmektedir (Minniti vd., 2019; Kiskova vd., 2020). GBM'ye karşı modern tedavilerin çeşitliliğine rağmen, hala son derece kötü prognozu olan ölümcül bir hastalıktır. Hastalar genellikle tanıdan itibaren yaklaşık 14 ila 15 aylık bir medyan sağkalıma sahiptir (Thakkar vd., 2014; Lee vd., 2016; Kiskova vd., 2020).

Glioblastoma agresif bir tümördür ve tedavi sonrası tekrar eder. Ayrıca, genetik heterojenliği ve standart tedavilere özellikle direnciyle karakterizedir (Thakkar vd., 2014). Birincil ve ikincil olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Birincil glioblastomalar prekürsör lezyon olmaksızın aniden oluşurken, ikincil glioblastoma düşük dereceli astrositomlardan türemiştir ve farklı genetik profillere sahiptir.



Şekil 2.6. Glioblastoma temsili gösterimi

Glioblastomada apoptoz, PI3K/AKT/mTOR, TNFR1/TNF- α , ve proapoptotik yolak olmak üzere üç hücre içi apoptoz-kontrol edici sinyal yolları tarafından düzenlenmektedir (Şekil 1). Proapoptotik yolda, hücrenin ölümüne ya da yaşamına karar verecek olan en önemli faktör sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını başlatan apoptozis uyarıcı proapoptotik (bax, bcl-xs, bad, bim, bid), ve sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını baskılayan apoptozis baskılayıcı antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-xl, mcl-1) üyeleri bulunan Bcl-2 ailesinin üyeleridir (Pistritto vd., 2016). Apoptozun mitokondriyal yolağında sitokrom c'nin salınması önemli bir basamak olup apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'e bağlanarak prokaspaz-9'un aktivasyonuna, aktive kaspaz-9'da apoptotik yoldaki bir seri kaspaz aktivasyonunun (kaspaz-3, -6, -7 gibi) başlamasına yol açar (Garcia vd., 2012; Belden vd., 2011). TNFR1/TNF- α yolağında, TNF- α NF κ B'nin potent aktivatörüdür. Ekstrinsik apoptotik (Ölüm reseptörü yolu-The death receptor pathway) sinyal yolunda en iyi bilinen reseptör-ligand çifti TNF- α /TNFR1'dir. TNF- α 'nın TNFR1 reseptörüne bağlanması I κ B kinazın degradasyonuna, bu da NF κ B'nin kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'u doğrudan bağlayabilen ve inhibe edebilen IAPs gibi hedef genlerin ekspresyonunun düzenlendiği çekirdeğe translokasyonuna neden olur. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı ise, insülin, glukoz, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi faktörlerle ve moleküler yanıtlarla etkinleşen hücre döngüsü kontrolünde önemli rol oynayan hücre içi sinyal yolağıdır (Küçüköner vd., 2013; Engelman vd., 2006; Terracciano vd., 2018). PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı GBM'de apoptozu inhibe etmektedir. Bu yolda kilit rol oynayan moleküller şunlardır:



Şekil 2.7. Glioblastomada apoptotik yolak. (A) PI3K/AKT/ mTOR yolağı; (B) TNFR1/TNF- α yolağı; (C) Proapoptotik sinyal yolağı (Valdes-Rives vd., 2017).

Fosfatidilinositol-3-Kinaz (PI3K), hücre sağkalımını, proliferasyonunu, hareketliliğini, anjiyogenezi ve apoptozu kontrol eden PI3K-AKT-mTOR yolağında önemli sinyal yolağı bileşenlerinin aktive edilmesini sağlayan merkezi bir kinazdır (Ghobrial vd., 2005; Cantley, 2002; Franke vd., 2003; Pathuri vd., 2014; Valdes-Rives vd., 2017). Bu bileşenlerden biri de rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi-mTOR'dur (Wang vd., 2008). mTOR apoptotik hücre ölümünü düzenleyen p53, Bcl-2, Bcl-2-antagonisti (BAD), p21, p27, c-myc gibi sinyal iletim hedefleri moleküllerinin aktivasyonunu inhibe eder (Faivre vd., 2006). Çok sayıda kanser tipinin patogenezinde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının düzensizliği rol oynamaktadır (Küçüköner vd., 2013; Raval vd., 2017). Bu yolağın aşağı aktivasyonunda anahtar molekül olan mTOR'un inhibisyonu potansiyel terapötik bir hedeftir ve çok çeşitli kanser türlerinde (meme kanseri, mide kanseri, akciğer kanseri, lenfoma gibi) mTOR inhibitörleri ile kanser hücrelerinde bozulan yolakları hedef alan moleküler ilaçların geliştirilmesi çalışmaları güncelliğini korumaktadır. AKT, diğer adıyla Protein Kinaz B (PKB), genel olarak hücre proliferasyonundan ve sağkalımından sorumlu bir serin/treonin protein kinazdır. PI3K'nın plazma zarı üzerindeki lipitleri fosforile ederek ikinci haberci fosfatidilinositol-

4,5-bisfosfat (PIP2) ve fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfat (PIP3) etkinleştirmesi ve bunların aşağı akış efektörlerinden olan AKT'ın da bu fosfoinositid kenetlenme bölgeleriyle etkileşime girerek zara alınması AKT'ın tamamen aktive olmasını sağlar (Terracciano vd., 2018; Guo vd., 2015; Patruno vd., 2015). Bu süreç içerisinde fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) PI3K'nın negatif düzenleyicisi olarak görev yapar (Terracciano vd., 2018; Guo vd., 2015; Valdes-Rives vd., 2017). AKT, PI3K sinyallemede ve Thr308 ve Ser473 gibi belirli amino asit rezidüleri ile PI3K tarafından fosforile edildiğinde, proapoptotik faktörler olan Bad ve kaspaz-9'un inaktivasyonunda ve mTOR'un düzenlenmesinde kritik role sahiptir (Pathuri vd., 2014; Sun vd., 2020; Lee vd., 2018).

PI3K/AKT sinyalinin muhtemelen tüm GBM'nin %80'inde deregüle olduğu, AKT aktivasyonu ile GBM'nin histopatolojik derecesi arasında doğrudan bir korelasyon olduğu ve GBM'nin %84'ünün fosforile AKT'ye (pAKT) pozitif olduğu raporlanmıştır (Wang vd., 2004; Verhaak vd., 2010; Mao vd., 2012; Valdes-Rives vd., 2017). GBM'de pAKT, p53'ün önemli bir negatif regülatörü olan E3-ubiquitin protein ligaz (MDM2) protoonkogenin aşırı ekspresyonunu indükler (Halatsch vd., 2006; Costa vd., 2013; Daniele vd., 2015; Valdes-Rives vd., 2017) ve Bad'ı inhibe eder (Valdes-Rives vd., 2017). Ayrıca AKT, kritik bir protein kinaz olan mTOR'u dolaylı olarak aktive edebilir (Fan vd., 2012; Duzgun vd., 2016). mTOR, hem aşağı akış efektörü hem de yukarı akış regülatörü olarak işlev görür ve sinyali, mTORC1 ve mTORC2 olarak bilinen iki protein kompleksi tarafından gerçekleştirilir. mTORC1, hücre büyümesini düzenlerken, mTORC2 AKT'yi Ser-473'te fosforile eder ve daha sonra hücrenin hayatta kalması, metabolizması, çoğalması ve hücre iskeleti organizasyonunda yer alır (Fan vd., 2012; Cantley, 2002; Valdes-Rives vd., 2017). PI3K/AKT/mTOR yolağının hücre sağkalımı üzerindeki etkisi, PI3K/AKT/mTOR yolağının inhibisyonunun apoptozu artırıcı ve GBM'de terapötik değere sahip olduğunu düşündürmektedir (Duzgun vd., 2016). PEMF ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, osteoblast ve fibroblast benzeri hücrelerde mTOR fosforilasyonun PEMF uyarımı ile indüklendiği (Patterson vd., 2006), aralıklı PEMF stimülasyonunun (intermittent PEMF stimulation) sürekli PEMF stimülasyonunun (continuous PEMF stimulation) aksine mTOR yolağının sürekli aktivasyonuna neden olduğu ve osteoblast benzeri hücrelerde hücre proliferasyonunu stimüle ettiği (Miyamoto vd., 2019) gösterilmiştir.

2.4. Resveratrol

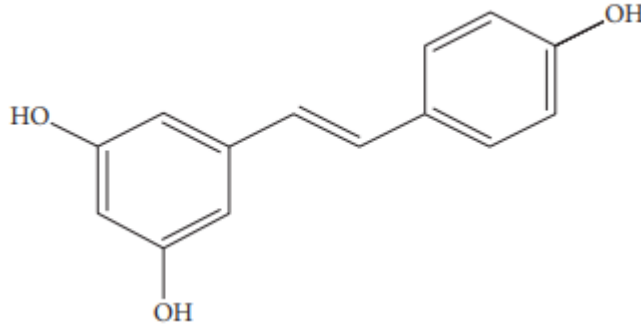
Resveratrol (RES), üzüm (*Vitis vinifera*), dut (*Morus sp.*), yaban mersini (*Vaccinium myrtillus*), böğürtlen (*Rubus*) ve yer fıstığı (*Arachis Hypogaea*) gibi kabuklu birçok bitkide bulunan polifenoldür (Riba vd., 2017; Hasan vd., 2017; Kiskova vd., 2020; Tomé-Carneiro vd., 2013). RES yoğun olarak asmanın kökünde, sapında, üzüm tohumlarında, üzümlerin kabuğunda, Akdeniz diyetinin bir parçası olan kırmızı şarapta RES ve türevleri yüksek oranda bulunmaktadır (Ko vd., 2017; Kiskova vd., 2020; Tomé-Carneiro vd., 2013). Bu bitkilerde RES savunma mekanizmasında görev alan son ürün RES 3-O-beta-glikoziltransferazlara bağlı olarak cis formuna veya trans ve cis-piceid'e izomerleşebilen trans formu olarak sentezlenen stilben fitoaleksindir (Riba vd., 2017; Hasan vd., 2017). RES'in keşfi kullanımı ilk olarak 1939 yılında beyaz çöpleme otunun (white hellebore-*Veratrum grandiflorum* O. Loes) köklerinden izole edilmiş trans-RES (3,5,4'-Trihidroksistilben) kimyasal yapısına sahip tıp ve eczacılıkta önemi giderek artan bir bitki ürünüdür (Tomé-Carneiro vd., 2013; Hasan vd., 2017; Göçmez vd., 2014; Kiskova vd., 2020). 1963 yılında ise RES'in kimyasal bileşini *Polygonum cuspidatum*'undan (Ko-jo-kon) biri olarak tanımlandı. 1976 yılında ise cis-trans-RES' in kimyasal yapısı rapor edilerek ilk tespitinden bahsedilmiştir. Daha sonra RES, Renaud ve de Lorgeril'in ilk kez "Fransız paradoksunu" tanımladı. "Fransız paradoksu", koroner kalp hastalığı insi dansı düşük olan Fransızlar hastalardan elde edilen epidemiyolojik verilere dayanmaktadır. Fakat RES bu kadar önemli etki alanına sahip olmasına rağmen 1992 yılına kadar unutulmuştu (Riba vd., 2017; Hasan vd., 2017; Kiskova vd., 2020).



Şekil 2.8. Resveratrolün Bulunduğu Kaynaklar

RES'in kimyasal yapısında ise birden fazla fenol grubundan oluştuğu için polifenoldür. Ayrıntılı incelendiğinde RES, iki fenol halkasının birbirine bir etilen köprüsüyle bağlanmasıyla stilbenoid polifenoldür. RES'in biyosentezinde genel olarak, fenilalanin amonyak liyaz (PAL), sinamat-4 hidroksilaz (C4H), kumaroil-CoA ligaz (4CL) ve stilben sentazın (STS) sentezde temel bir rol oynadığı fenilalanin yoluyla gerçekleşir. Gerçekleşen sentez sonucunda, RES 3-O-beta glikosiltransferazlar (O-3-GT) oluşur ve cis formuna izomerleşebilen veya hatta trans ve cis-piceid'e değişebilen trans formuyla oluşur. RES'in hem cis hem de trans formlarının oluşması ise 'köprü' varlığından kaynaklanmaktadır. Bu özelliğe rağmen trans izomer cis izomerden uzaysal olarak daha kararlı yapıda olmasını sağlamaktadır (Riba vd., 2017; Hasan vd., 2017; Kiskova vd.,2020). Bu iki formun uzaysal olarak farklılıkları spektrum değerlerini de değiştirmektedir. Trans-RES'in maksimum absorbanısı yaklaşık 304 nm'de ölçüm değeri alınırken, cis RES ise 286 nm aralığında ölçüm alınmaktadır. Trans-RES'in stabilitesi çeşitli kimyasal ve fiziksel faktörlerden etkilenir; örneğin ışığa maruz kalma, 6, 8 pH 'ın

üzerindeki veya 37 °C'nin üzerindeki sıcaklık bozunmaya neden olabilir ve trans formu UV maruz kaldığında yapı olarak değişerek cis formuna da dönüşebilmektedir. RES, suda çözünmeyen fakat çeşitli kimyasallar ile çözünen (etanol, dimetilsülfoksit (DMSO) ve metanol ile ekstrakte edilir)) kirli beyaz bir tozudur. Diğer özellikleri ise 253-255 °C erime noktasına ve 228,25 g/mol molekül ağırlığına sahiptir (Hasan vd., 2017; Kiskova vd.,2020).



Şekil 2.9. Resveratrol'ün kimyasal yapısı

RES antioksidan özellikli bileşiklerdir. Bu antioksidan özelliğini ise polifenel yapılı olmasından kaynaklanmaktadır. Polifenoller, serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve radikalın kendisinden daha az toksik olan stabil bir molekül oluşturabildikleri için RESlere antioksidan özelliği kazandırmaktadır (Riba vd., 2017; Hasan vd., 2017; Tomé-Carneiro vd., 2013; Kiskova vd.,2020).

RES'in etki mekanizmasının incelenmesi sırasında, antikanser özelliği ile kansere bağlı sıçanlarda tümörün başlamasını ve ilerlemesini sınırlayan bir stilben bileşiği olduğu yapılan çalışmalarla görülmüş. Ayrıca bitkilerde mikrobiyal enfeksiyona karşı direnci indüklediği bunun dışında maya ve omurgalılar da dahil olmak üzere farklı organizmalarda yaşam süresini uzattığı gözlenmiştir. Ayrıca bitkilerde fitoaleksin RES, savunma mekanizmasını etkilemesiyle, patojenlerle enfeksiyon veya diğer dış uyaranlara tepki olarak ikincil metabolit formunda oluşturduğu çalışmalar ile elde ettiği gözlemlenmiştir (Hasan vd., 2017). Kısaca RES'in antioksidan özelliğinden kaynaklı antiinflamatuvar, kardiyoprotektif, diyabet ve obezite nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson ve diğerleri), beyin tümörleriyle, kanser (meme, prostat, deri, akciğer, karaciğer veya kolorektal) veya analjezik etkiler gibi çok sayıda terapötik ve antikanser etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Riba vd., 2017; Hasan vd., 2017; Tomé-Carneiro vd., 2013; Kiskova vd.,2020).

RES'in etkisi yapılan çalışmalar sonucunda belli dozda kullanıldığı takdirde etkili olduğu görülmüş. Aksi halde RES her ne kadar bitkisel doğal bileşik olsa da doğru doz da kullanılmadığı takdirde çeşitli yan etkileri olabilmektedir. Bu yan etkiler kusma, baş dönmesi, alerjik reaksiyonlar ve kan değerlerinde çok fazla değişiklik olmasa da belli bir ölçüde etkiye sebep olabilmektedir. Bununla birlikte RES in kullanılması gereken doz

aralığı kıstlı olduğu için çeşitli yöntemlerle birlikte kullanılarak düş doz kullanılarak daha fazla verim elde edebileceği görülmüş. Bunlar, ultrasonikasyon, ışık yayan diyot (LED), ultraviyole (UV), elisitörler veya sinyalizasyon gibi yöntemlerdir gösterilmiştir (Hasan vd., 2017; Kiskova vd.,2020).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Malzeme

Önerilen çalışma kapsamında kullanılan malzemeler; insan glioblastoma U87-MG hücre hattı ve SVG p12 insan astroglia sağlıklı hücre hattı ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) firmasından satın alınmıştır. Eagle Minimum Besi Ortamı (EMEM; 01-025-1A), L-Glutamin (03-020-1B), Fetal Sığır Serumı (FBS; 04-007-1A), Tripsin Etilendiamin Tetraasetik Asit (Tripsin EDTA; 03-053-1B) ve Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep: 03-031-1B), Biological Industries (BIO IND, Cromwell, ABD) firmasından; Dimetil sülfoksit ($\geq 99.9\%$)(DMSO; 276855-1L), Tuzlu fosfat tampon tableti (PBS; P4417), Kloroform (12445), Sodyum klorür (NaCl: 106400), Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 106580) ve Triton X-100 (108603) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından; Alamar Mavi (Alamar Blue) reaktifi (DAL1100) Invitrogen (Waltham, Massachusetts, ABD), TMZ (KOÇAK FARMA ilaç ve Kimya Sanayisinin Ürettiği TEMOMİD 5 mg kapsül ilaç kullanılmıştır .

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çizelge 3. 1. Kullanılan cihaz ve markaları

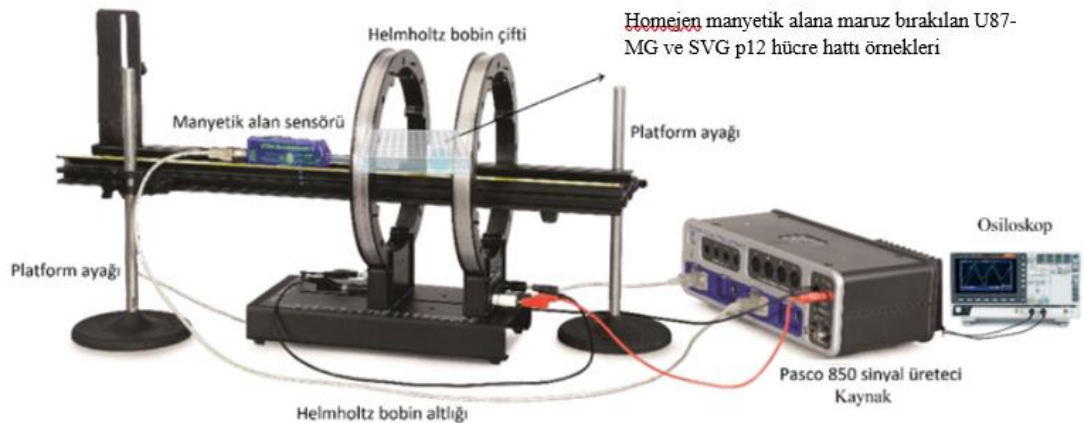
CİHAZ	MARKA
Hücre Kabini	Antech
CO ₂ 'li İnkübatör	Binder
96 Kuyucuklu Plaka Okuyucu	Thermo Scientific
İnverter Mikroskop	VWR
Soğutmalı Santrifüj	VWR
Ultrasonik Banyo	VWR
-80°C Dondurucu	VWR
Floresan Hücre Görüntüleyici	Bio-Rad
Real Time PCR Cihazı	Bio-Rad
Termal Döngüleyici	Bio-Rad
Elektroforez Sistemi	Bio-Rad
Transfer Cihazı	Bio-Rad

Çizelge 3.1. devamı;

Nanodrop	Bio-Rad
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore
Hassas Terazı	A&D Company
Vortex	Jeiotech
Jel Görüntüleme Sistemi	Syne Gene
Su Banyosu	Nüve
Otoklav	Nüve
PEMF	Pasco

3.3. Darbeli Manyetik Alan (PEMF) Kurulumu

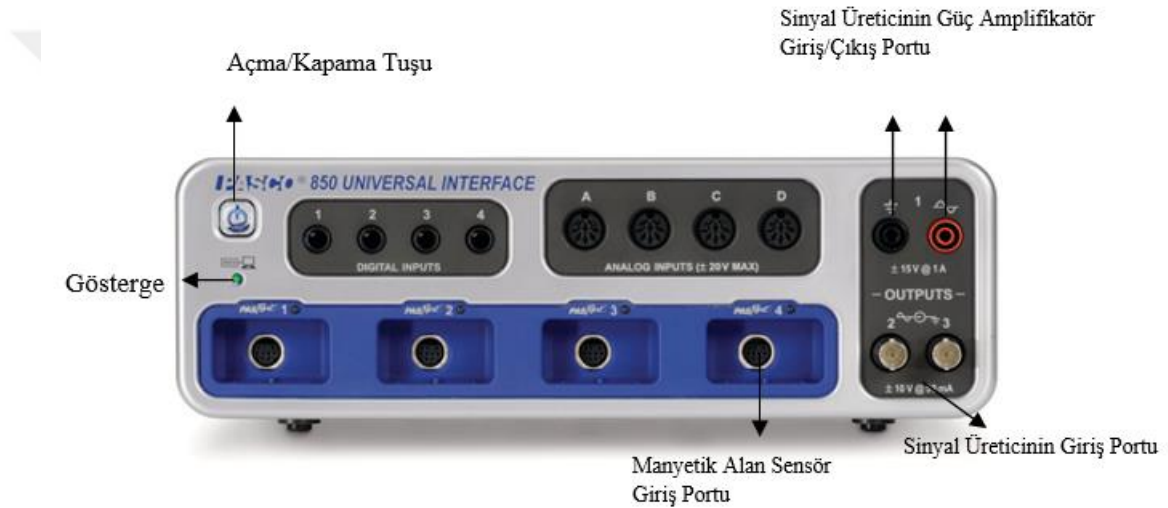
Darbeli Manyetik alan (PEMF) devresinin Helmholtz bobini (EM-6715), manyetik alan sensörü (PS-2162), elektromanyetik alan üretici (Pasco; UI-5000) ve Pasco Capstone Yazılımından (UI-5400) oluşmaktadır. PEMF devre elemanlarının teminini Pasco (Kaliforniya, ABD)'dan satın alınarak sağlanmıştır. Helmholtz bobini, manyetik alan sensörü, Pasco 850 sinyal üretici ve diğer ara parçalardan oluşan PEMF cihazının şematik gösterimi Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 1. Darbeli Manyetik Alan (PEMF) Devresi

Darbeli Manyetik Alan (PEMF) Düzenliğini oluşturan birimleri Şekil 3.1. de gösterildiği gibi sırasıyla şu şekildedir. Manyetik alanın oluşumunu sağlayan helmholtz bobin çifti, bobin çiftinin sabit ve dengede kalmasını sağlayan helmholtz bobin altlığı, platformu hareket ettirmede ve sabit kalması için ayakları, helmholtz bobin çiftinin elektromanyetik alan oluşturabilmesin de Pasco 850 sinyal üretici, oluşan manyetik alanın değerini ölçen manyetik alan sensörü ve PEMF'ye maruz bırakılan U87-MG (insan glioblastoma hücrelerini) ve SVG p12 (sağlıklı insan beyin hücre hattı) içeren 96 well plat den oluşmaktadır.

PEMF sistemindeki helmholtz bobin çiftinin elektromanyetik alanının güç kaynağı olarak Pasco 850 Universal Interface model sinyal üretici (Pasco- 012-12355B) kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Pasco 850 Universal Interface model Sinyal Üreticisi (Pasco- 012-12355B)

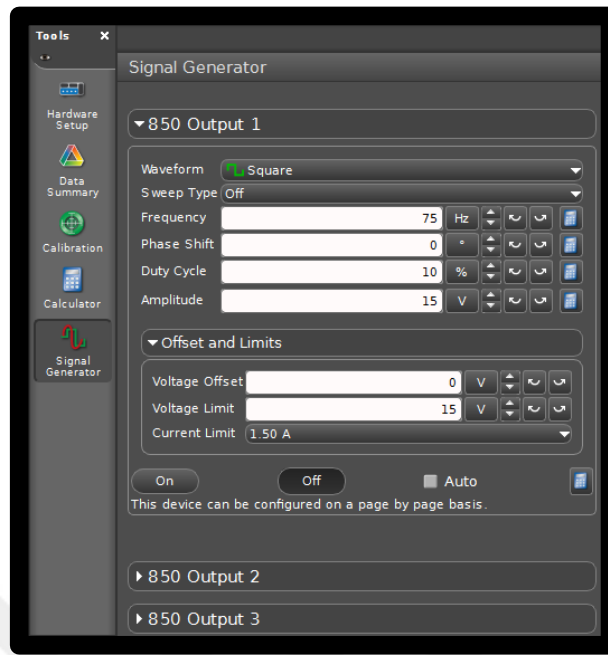
Helmholtz bobinlerin genişliği 1.6 cm, iç yarıçapı 10.06 cm, dış yarıçapı 11.37 cm olup, 500 sarımlı yalıtılmış bakır tellerden meydana gelmektedir. Helmholtz bobinlerin homojen manyetik alan oluşturulabilmesi için Şekil 3.1'de gösterildiği gibi birbirine paralel olması gerekmektedir. Helmholtz bobinlerin çalışma sırasında hareketini engellemek için bobin altlığına sabitlenmiştir. Şekil 3.1'de gösterilen PEMF devresinin sinyal üretici (Signal Generator) ve üç farklı sinyal değerini (850 Output 1, 2, 3) kaydedebilen aynı zamanda verileri grafiğe döken Pasco Capstone Yazılımı bilgisayar ortamında gerçekleştirilmiştir.

Pasco 850 Universal Interface model sinyal üreticisi'nin (Pasco- 012-12355B) özellikleri ise Çizelge 3.2' de gösterilmiştir.

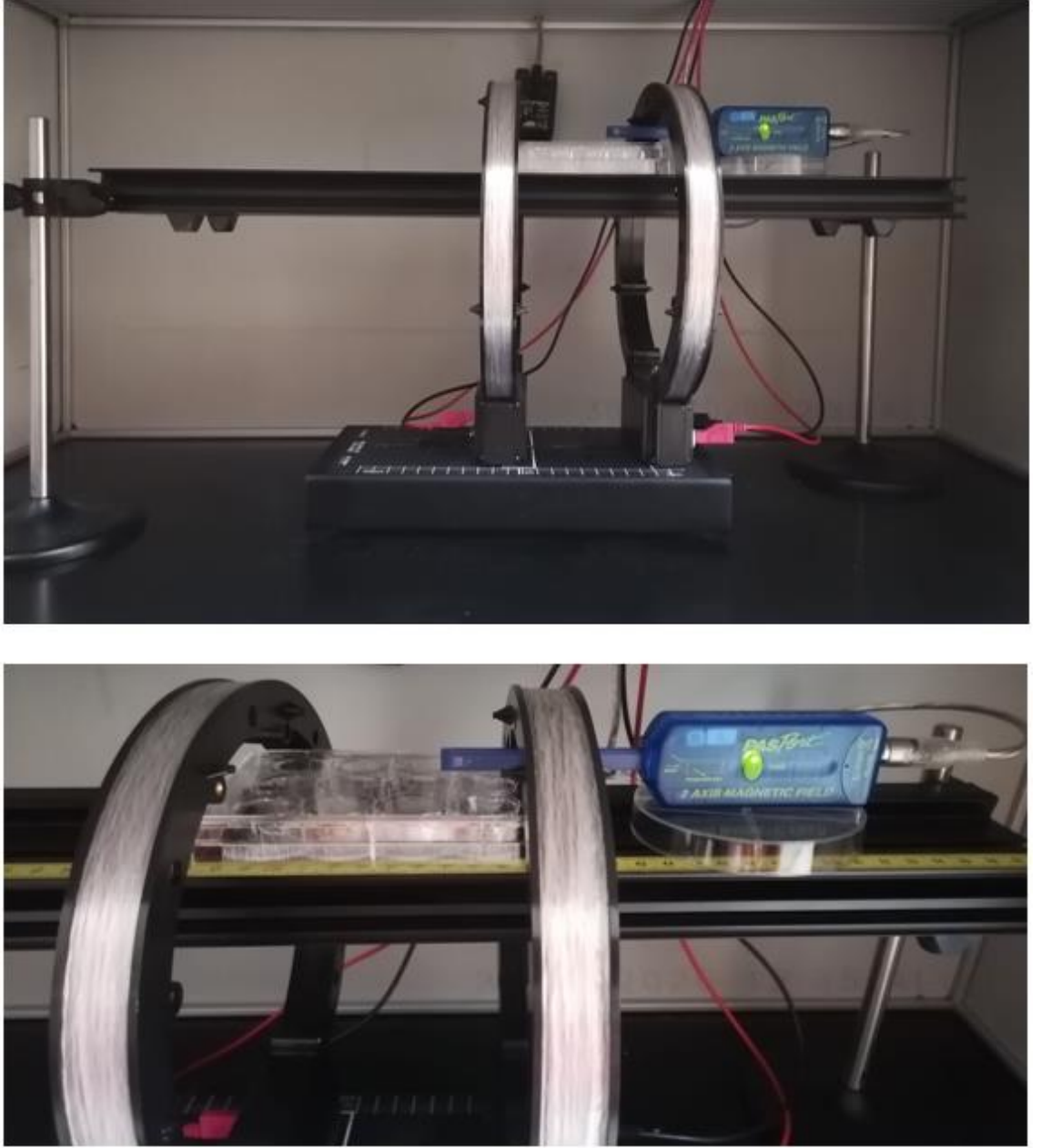
Çizelge 3.2. Pasco 850 Universal Interface model sinyal üreticinin özellikleri

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

Çalışma için belirlenen frekans, dalga formu, volt değeri ve amper değeri girilerek bobinler aracılığı ile manyetik alan oluşturuldu. Bu verilerin girildiği yazılım ise Pasco Capstone Yazılım programıdır. Girdiler ise şu şekildedir; dalga formu (waveform) kare dalga (square), frekans süpürme işlemi (sweep type) kapalı formda ve faz kaydırma (phase shift) açısı da 0° derece olarak belirlenmiştir. Frekansı 75 Hz, dalga genlik değeri (amplitude) 15 V ve elektromanyetik dalganın görev döngüsü (duty cycle) periyodu %10 olacak şekilde değerler 850 Output 1 çıkış penceresine girilmiştir. Ayrıca helmholtz bobinleri besleyen elektrik akımı (current limit) 1.5 amper (A), limit gerilim değeri (V) (voltage limit) 15 V, topraklama gerilim değeri (voltage offset) 0 V olarak yazılımın “Ofset ve Limitler (Offset and Limits)” penceresi yardımıyla belirlenmiştir. Bu verileri Şekil 3.3 de görüldüğü gibi yazılımın ara yüzüne girdiler eklenerek cihaz çalıştırılır.



Şekil 3.3. Pasco 850 Capstone Yazılımı Ara yüzü

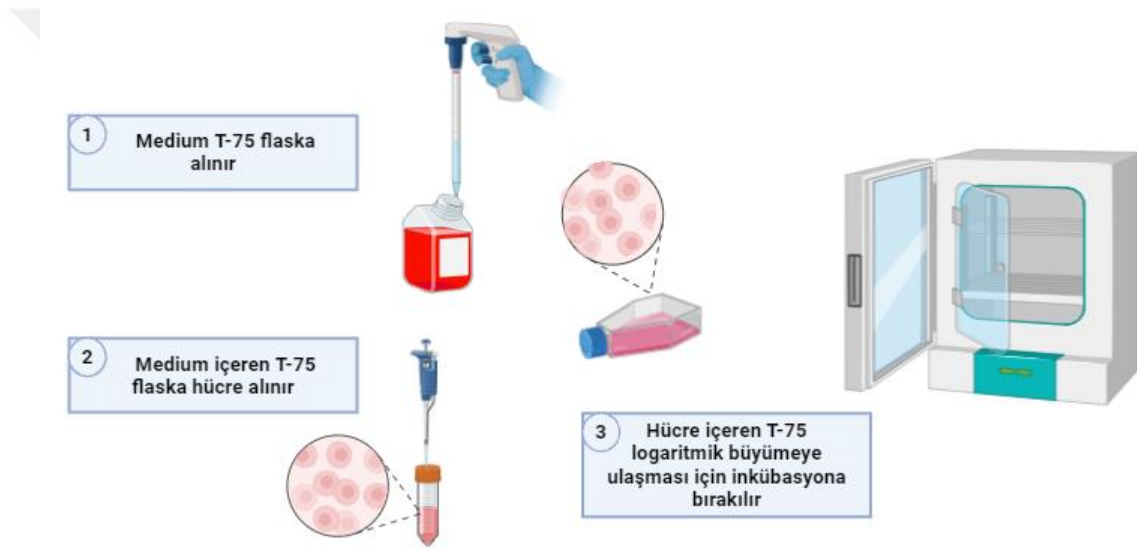


Şekil 3.4. U87-MG Hücre Hattına Manyetik Alan Maruziyeti

3.4. Hücre Kültürü

Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC, Missouri, ABD) temin edilerek -80°C'de muhafaza edilen U87-MG insan glioblastoma hücre hattı ve SVG p12 sağlıklı hücre hattı deney aşamasında çalışabilmek için belli bir büyüklüğe ulaşması sağlandı. U87-MG ve SVG-p12 hücre hatları normal büyüme hacmine ulaşması için T 75 flasklara ekim yapılmıştır. Bunun için hücre hattı Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC, Missouri, ABD) temin edilmiş olup -80°C'de muhafaza edilmekte. Deney öncesinde 37°C'deki su banyosunda (Nüve) çözündürülerek 12 ml besi ortamı ile birlikte (%10 DMEM-F12-%10 DMEM, %10 fetal sığır serumu, %1 L-Glutamin, %1 penisilin-streptomisin) T75 flaskta (Corradin vd. 1993) %5 CO2 içeren 37°C sıcaklıkta, %95 nem ortamındaki steril inkübatörde (Reale vd. 2014) inkübe edilmiştir.

3.5. Hücre Çalışma Grupları

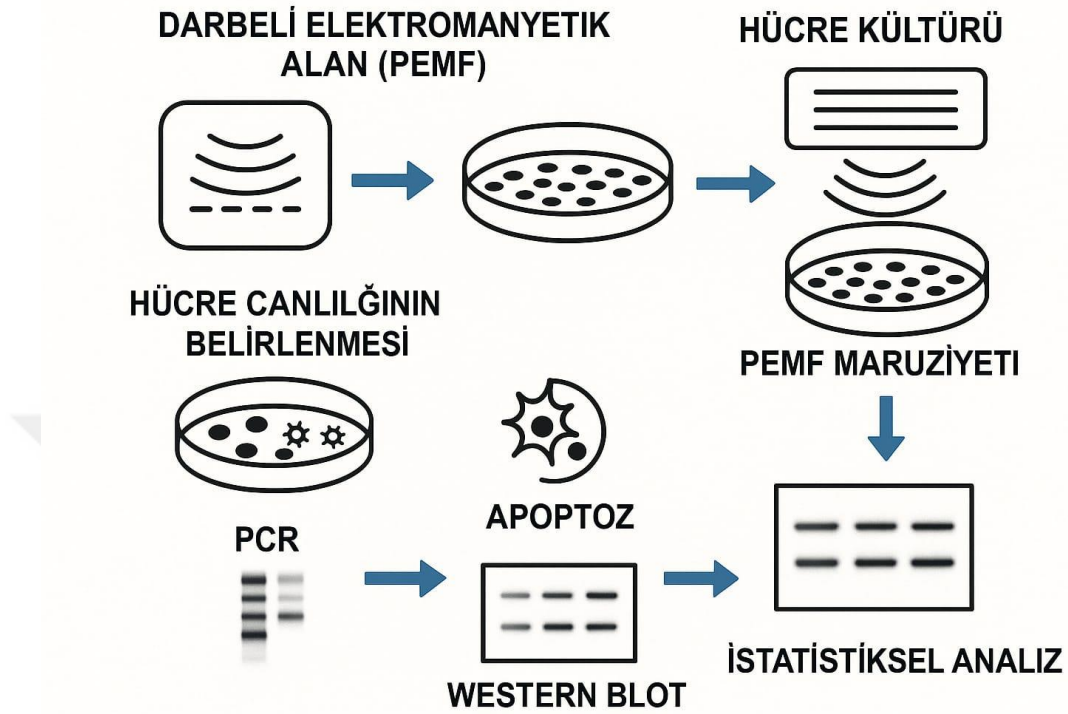


Şekil 3.5. U87-MG ve SVG-P12 hücre hatlarının büyüme ortamlarına ekimi

U87-MG insan Glioblastoma hücre hattı ve SVG-p12 insan astroglia sağlıklı hücre hattının aşağıda belirtilen 7 deneysel gruplara ayrılmıştır.

- 1. Grup:** Kontrol grubu-SVG p12 insan astroglia sağlıklı hücre hattı
- 2. Grup:** Pozitif kontrol grubu- 100 μ M TMZ ile muamele edilecek U87-MG hücre hattı
- 3. Grup:** Pozitif kontrol grubu- 100 μ M TMZ ile muamelenin ardından optimum frekansta PEMF'ye kısa (15 dakika) ve uzun (12 saat) süre maruz bırakılacak U87-MG hücre hattı

4. Grup: Hiçbir muamelenin yapılmadığı (non-treated) U87-MG insan glioblastoma hücre hattı

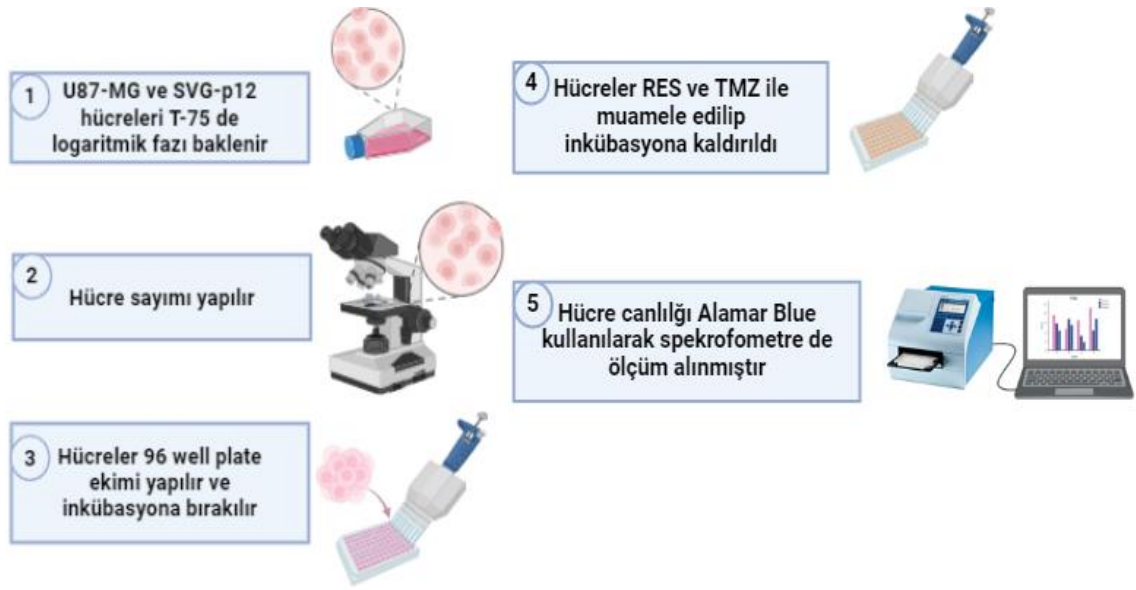


Şekil 3.6. Deney Aşamalarının Şematik Gösterimi

3.6. Sitotoksikite Deneyleri

3.6.1. Hücre Hatlarının RES ve TMZ ile Muamelesi

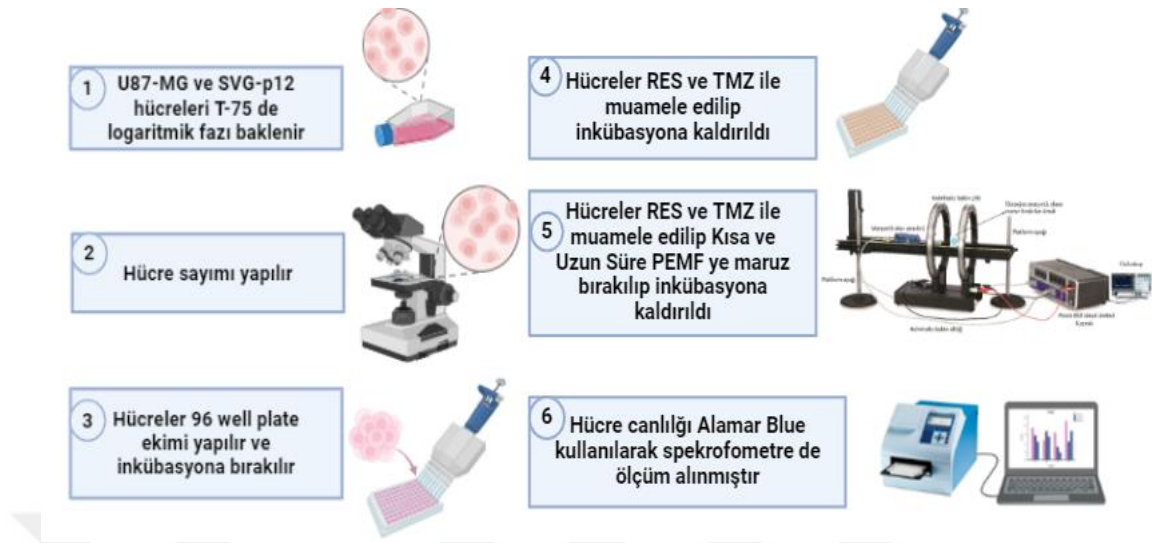
İn vitro hücre çalışmaları T-75 flaslara ekilen hücreler eski medium cam pastör pipet aracılığı ile çekilmiştir. Ortamdaki kirlilik ve ölü hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için 10mM PBS ile yıkama yapıp cam pastör pipet aracılığı ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreleri kaldırmak için ortama Tripsin-EDTA eklenip 5 dakika boyunca %5 CO₂ içeren 37°C sıcaklıktaki inkübatörde inkübasyona kaldırılarak hücrelerin kaldırılmıştır. Hücre sayımı için Tripan Mavisi yöntemi kullanılarak hücreler sayılıp hesaplama sonucuna göre 1.2×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 well plate ekim yapılmıştır (Şekil 3.7). Yaklaşık 24 saat inkübasyon sonucunda yeterli hücre yoğunluğuna ulaşan hücrelere 0-200µg/ml aralığındaki dozlarda TMZ ve RES ile muamele edilmiştir ve bu çalışmayı iki tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. Muamele edilen hücreler 48 saat süre boyunca %5 CO₂ içeren 37°C, %95 nem ortamındaki steril inkübatörde (Binder, Camarillo, ABD) inkübe edilmiştir.



3.6.2. Hücre Hatlarının RES ve TMZ ile Muamelesinin PEMF Maruziyeti

Şekil 3.7. PEMF maruziyeti olmaya U87-MG ve SVG-P12 hücre hatlarının RES ve TMZ ile muamele edilmesi ile hücre canlılığın ölçümü

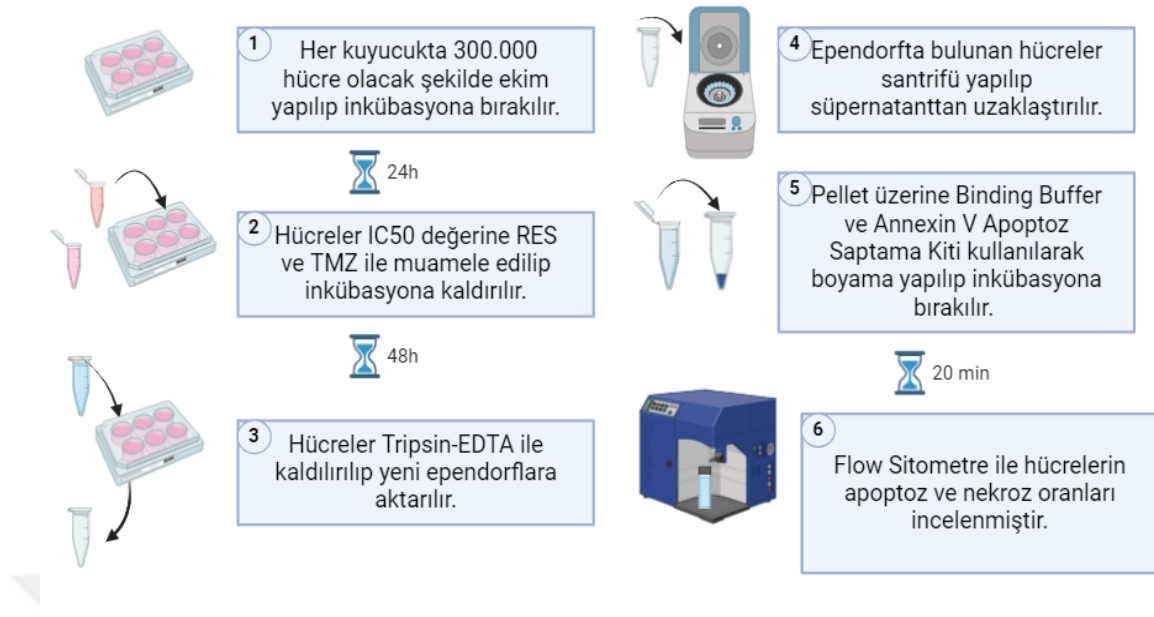
İn vitro hücre çalışmaları T-75 flasksına ekilen hücreler eski medium cam pastör pipet aracılığı ile çekilmiştir. Ortamdaki kirlilik ve ölü hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için 10mM PBS ile yıkama yapıp cam pastör pipet aracılığı ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreleri kaldırmak için ortama Tripsin-EDTA eklenip 5 dakika boyunca %5 CO₂ içeren 37°C sıcaklıktaki inkübatörde inkübasyona kaldırılarak hücrelerin kaldırılmıştır. Hücre sayımı için Tripan Mavisı yöntemi kullanılarak hücreler sayılıp hesaplama sonucuna göre 1.2×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 well plate ekim yapılmıştır (Şekil 3.7). Yaklaşık 24 saat inkübasyon sonucunda yeterli hücre yoğunluğuna ulaşan hücrelere 0-200µg/ml aralığındaki dozlarda TMZ ve RES ile muamele edilip kısa (15 dk) ve uzun (6 sa) süre PEMF ye maruz bırakılıp kalan süreleri 48 saate tamamlayacak şekilde %5 CO₂ içeren 37°C, %95 nem ortamındaki steril inkübatörde (Binder, Camarillo, ABD) inkübe edilmiştir. Bu çalışma iki tekrarlı yapılmıştır.



Şekil 3.8. U87-MG ve SVG-P12 hücre hatlarının RES ve TMZ ile muamele edilip kısa ve uzun süre PEMF'ye maruz bırakılan hücrelerin hücre canlılığının ölçülmesi

3.6.3. Apoptoz

Hücre apoptoz ve nekroz oranları flow sitometre yardımıyla tespit edilmiştir (Karakurt ve Adalı, 2016). Hücreler 37°C, %5 CO₂ koşullarında 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 3 kez 10 mM PBS ile yıkanan hücreler Tripsin-EDTA çözeltisi ile plakadan ayrılmıştır. Üzerlerine DMEM büyüme sıvısı eklendikten sonra hücreler 15000 x g'de santrifüjlenmiştir (VWR, Mega Star 1.6R). Pellete 100 µL (1X) Binding Buffer ilave edilip Annexin V Apoptoz Kiti içinde yer alan Annexin V-APC ve 7-AAD boyaları ile boyanmıştır. Oda sıcaklığında 20 dk süren inkübasyon sonrası hücrelere tekrar 400 µL (1X) Binding Buffer ilave edilmiştir. Böylelikle NovoCyte Flow Sitometre Sistemi (Acea, Kuzey Amerika) yardımı ile hücrelerin erken/geç apoptoz ve nekroz oranları incelenmiştir (Karakurt ve Adalı, 2016) (Şekil 3.9).



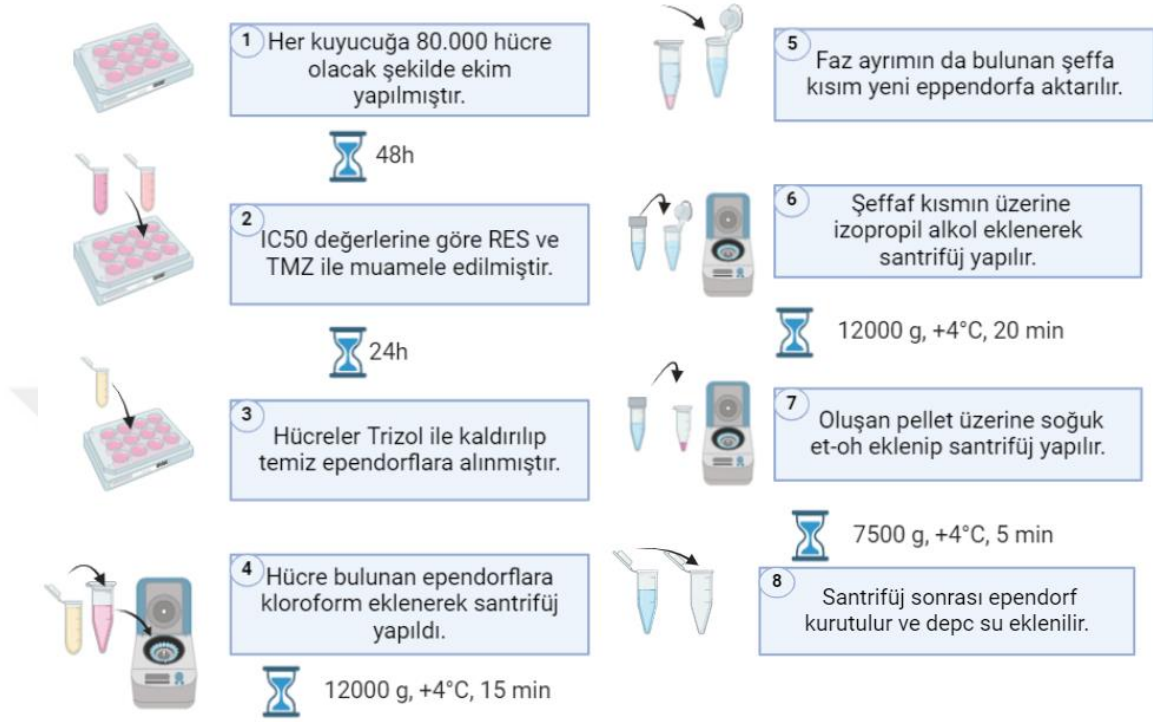
Şekil 3.9. Apoptoz çalışmasının şematik gösterimi

3.8. TP53, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9, P13K, AKT, mTOR Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

3.8.1. Total RNA izolasyonu

Tüm gruptaki hücrelerden total RNA, TRIZOL metodu ile izole edilmiştir (Simms vd., 1993). 24 kuyucuklu plakalarda büyütülen hücrelerden elde edilen örnekler Trizol ile muamele edildikten sonra 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 1,5 mL'lik eppendorf tüplere aktarılıp çeker ocağa alınmıştır. Her bir eppendorf tüpe 120 µL kloroform eklendikten sonra sert bir şekilde karıştırılmıştır. 12000 xg, +4°C'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası oluşan fazlar altta DNA, ortada RNA ve en üstte proteindir. Mikro pipet yardımı ile RNA'nın bulunduğu orta faz alınarak temiz eppendorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra üzerlerine 250 µL izopropil alkol eklenmiştir ve yavaşça karıştırılarak 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüpler 12000 xg, +4°C'de 20 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj ile RNA'lar çöktürüldükten sonra üst faz uzaklaştırılarak pelletin üzerine 600 µL %75'lik soğuk etanol eklenip buza gömülmüştür. Sonrasında 7500 x g, +4°C'de 5 dk santrifüj yapılarak süpernatant atılıp etanol uzaklaştırılmıştır. RNA'lar biyo güvenlik kabininde peçete serilerek 30 dk kurumaya bırakılmıştır. Tüpler kuruduktan sonra üzerine 20 µL DNAaz/RNAaz içermeyen su eklenmiştir. Elde edilen RNA'ların miktarı ve saflığı için örnekler spin atılmış ve buza gömülmüştür. Nanodrop'a (Thermo Scientific) 1 µL DNAaz/RNAaz dH₂O ve 1 µL örneklerden yükleme yapılarak RNA'ların saflık ve konsantrasyonları (ng/µL) bulunmuştur. Elektroferogram diyaframında 2 pik veren (18S ve 28S ribozomal RNA), A260/A280 oranı 1.8 ve 2.0 aralığında, A260/A230 oranı ≥ 1.8

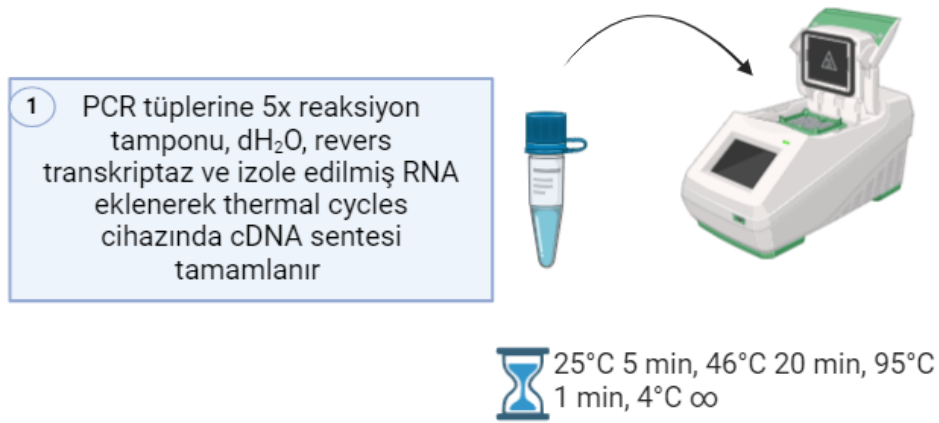
olan örnekler bir sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C 'de saklanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Total RNA izolasyonu

3.8.2. cDNA Sentezi

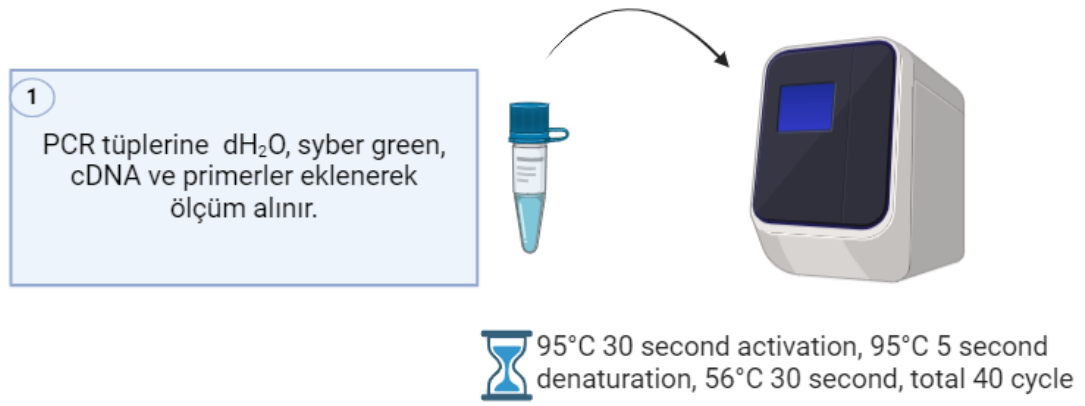
Elde edilen RNA'lerden cDNA sentezi The iScript™ cDNA synthesis kit ile sentezlenecektir (Bio-RAD, USA). cDNA sentezi için toplam RNA ve oligo (dT) primeri karıştırıldı ve RNAaz içermeyen su ile tamamlanmıştır. Karışım 70°C 'de 5 dakika inkübe edilip, üzerine 5X reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂ ve 50 mM DDT) ve dNTP karışımı eklenmiştir. 5 dakika, 37°C 'de inkübasyondan sonra 50 ünite Revers Transkriptaz eklenmiştir. Enzim eklendikten sonra, son karışım cDNA sentezi için ilk önce 42°C 'de 1 saat inkübe edilmiştir ve bu süre sonunda enzim inhibe edilmek üzere 70°C 'de 10 dakika bekletilmiştir. Elde edilen cDNA miktarı Nanodrop cihazında ölçülerek kontrolü sağlanmıştır. cDNA'lar bir sonraki çalışmalarda kullanılmak amacıyla -20°C 'de saklanmıştır.



Şekil 3.11. cDNA sentezi

3.8.3. mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi

Kantitatif Real Time PCR, Bio-Rad CFX96 cihazı (Bio-Rad, USA) kullanılarak gerçekleştirilecektir. Reaksiyon 1X Maxima® SYBR Green qPCR Master karışımı ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon tüpüne cDNA, RNAaz içermeyen su, gen spesifik primer, SYBR green qRT-PCR karışımı eklenmiştir. İç standart gen olarak GAPDH kullanılacaktır. qRT-PCR' da kullanılacak olan primerler Primer 3 yazılımı kullanılarak dizayn edilmiş ve NCBI blast yazılımı ile gene özgünlüğü kontrol edilmiştir (Tablo 3.3). Daha sonra reaksiyon karışımı (tüpü) PCR işlemi için önce 95°C' de 10 dakika denatürasyona tabi tutulacak ve amplikasyon işlemi 95°C' de 20 saniye, 54-60°C' de 30 saniye, ve 72°C' de 30 saniye olmak üzere toplam 45 döngüden sonra, 49°C' de 30 saniye son uzatma ile gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyonlarındaki değişim spesifik gen mRNA ekspresyonlarının GAPDH mRNA ekspresyonuna oranı hesaplanarak bulunacaktır. qRT-PCR çalışmaları sonucunda elde edilen ürünler Agaroz Jel elektroforezi yardımıyla yürütülecek ve istenilen moleküler ağırlıkta ürünün oluşup oluşmadığının kontrolü sağlanmıştır.



Şekil 3.12. qRT-PCR deneyinin şematik gösterimi

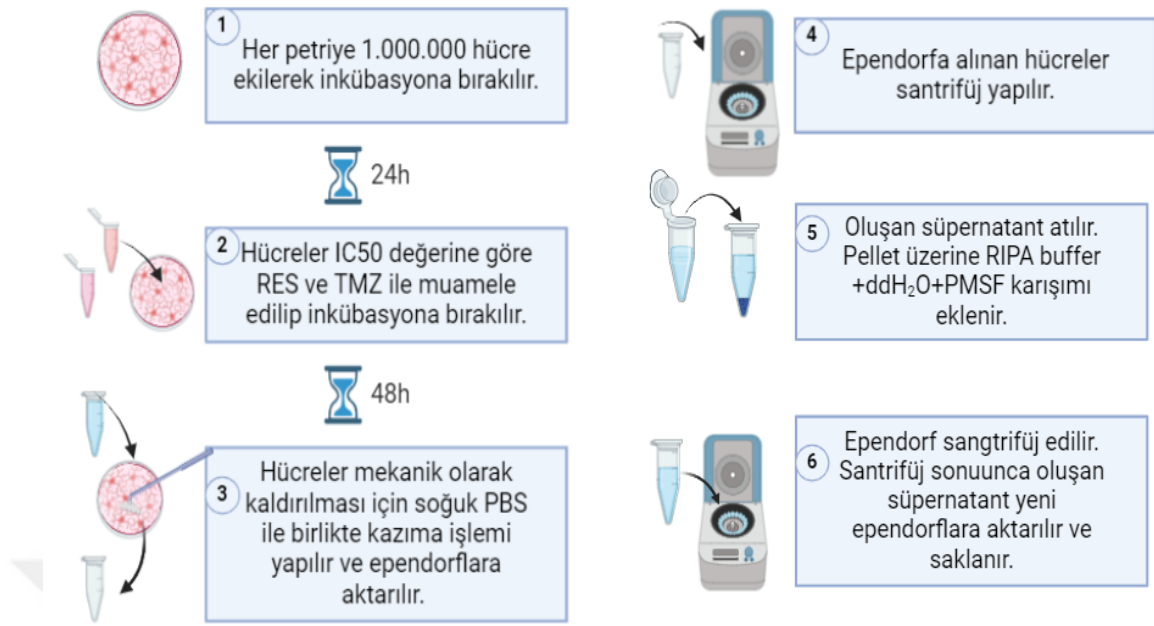
Çizelge 3. 3. qRT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen genlere ait ileri (F:forward) ve geri (R:reverse) primer dizileri (NCBI)

Primer Adı	Primer Dizisi (5'→3')
Bax	F: CCCCCGAGAGGTCTTTTCC R: TGTCCAGCCCATGATGGTTC
TP53	F: CACATGACGGAGGTTGTGAG R: TAGGGCACCACCACACTATG
Kaspaz-3	F: AAGGTATGAGGAGGCTGTGC R: ACACAGCCACAGGTATGAGC
Kaspaz-9	F: AGTTGTCTGAAGCCAACCCTA R: TGCTCAGGATGTAAGCCGAC
BcL-2	F: TTCATCGTCCCATCTCCCCT R: ACACACTACAAGTAACACGGCT
P13K	F: GGAGAACTATGAACAACCTGTG R: CATCTTCCAGTAACGTAGGCAG
AKT	F: CAGGTAGAAGGCAACTCTGCCAAA R: TTCTGCAGCTATGCGCAATGTG
mTOR	F: GCTTGATTTGGTTCCCAGGACAGT R: TGGCCAGCATACCATAGTGAGGTT
GAPDH	F: TGCACCACCAACTGCTTAGC R: AGTTCTATCCGCAGCTCCGCAAT

3.9. p53, Bcl-2, Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9, P13K, AKT, mTOR Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi

3.9.1. Protein Miktar Tayini

Büyüme plakaları (6 kuyucuklu) içerisinde büyüyen hücre hatları 37 °C ve %5 CO₂'de 48 saat inkübe edilecektir. Protein ekspresyonu için 48 saat süre beklenmiştir. İnkübasyondan sonra büyüme ortamları aspire edilmiş ve hücreler soğuk 10 mM PBS ile 3 defa yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra 1 ml soğuk 10 mM PBS daha eklenip bir kazıyıcı yardımıyla hücreler büyüme plakasından mekanik olarak kazınarak PBS içinde süspansiyon edilmiş ve steril bir pipet yardımıyla 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine alınıp sonrasında 14000 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Protein bozulmasını önlemek amacıyla bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücre miktarının 3 katı kadar 3 mM EDTA pH 7.8; 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 0.5 mM PMSF; 0.3 mM ϵ -ACA; 0.15 mM BHT; %10 gliserol, proteaz inhibitör kokteyl ve %0.15 Triton X-100 içeren homojenizasyon çözeltisi eklenerek tüpler vorteks yardımıyla karıştırılmıştır ve 14000 xg'de 10 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Elde edilen fraksiyonda pelet atılıp süpernatant eppendorf tüplere eşit hacimlerde konularak -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır. Elde edilen fraksiyonların protein miktarı tayini, Smith ve ark. (1985) prosedürüne göre gerçekleştirilen Bisinkoninik asit (BCA) yöntemi, toplam protein miktarı tayini için bakır bazlı bir kolorimetrik tahlildir. Bu yöntem, temel bir ortamda bir Cu²⁺ protein kompleksi oluşumuna ve ardından Cu²⁺'nın Cu⁺ 'ya indirgenmesi prensibine dayanır (Otieno ve ark., 2016). Protein ölçüm kiti olan Working Reagent (WR) solüsyonu 50:1 oranında hazırlanarak, ELISA plakası (96 wp) cihaza yerleştirilmiştir. Ardından DEPC-treated Water ile seyreltilen örnekler eklenmiştir. Örneklerin boyayla reaksiyona girmesi için, 37°C'lik yarım saat inkübasyondan sonra 562 nm'de ölçüm yapılmıştır.



Şekil 3.13. Protein izolasyonu

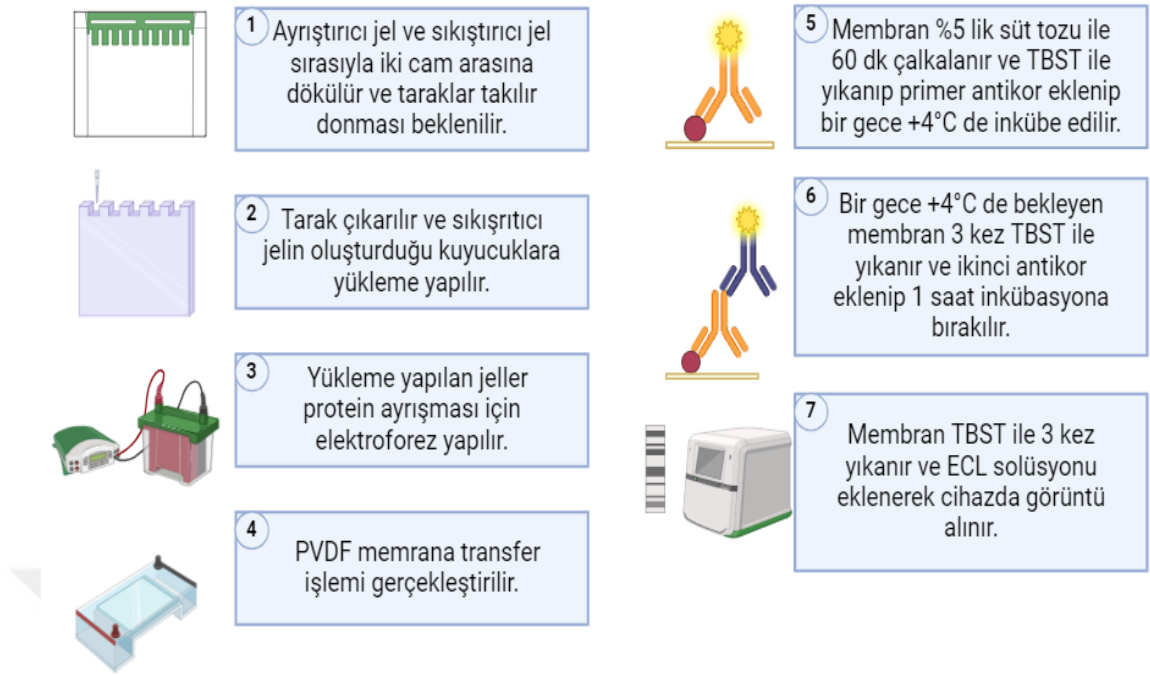
3.9.2. Protein Ekspresyonu Çalışmaları

Hücre gruplarında protein ekspresyon tayini Western Blot yöntemiyle belirlenmiştir (Gökçek-Saraç vd., 2021). SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) yöntemi ile proteinler birbirlerinden ayrıştırıldıktan sonra proteinlere spesifik proteinler kullanılarak protein ekspresyonlarındaki farklılıklar belirlenmiştir (Laemmli, 1970). Poliakrilamit jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde %8.5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. Poliakrilamit slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad, California, USA) elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektroforetik ayrıştırma sistemi Bio-Rad PowerPac Basic güç kaynağına bağlanarak sağlanmıştır. Elektroforez tamamlanmasıyla, jel bloğu aparattan alınacak ve jel sandviçten çıkarılarak oda sıcaklığında 45 dakika süreyle % 0.2 Coomassie Brilliant Blue R 250, % 50 metanol ve % 12 glacial asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak hem boyanacak ve hem de sabitlenecektir. Uygun bir süre bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edilecektir (Bu süre zarfında solüsyon birkaç kez değiştirilecektir). Sonuç olarak, jel fotoğraflanacak ve % 7'lik asetik asit çözeltisi içinde saklanacaktır. Bu aşamada elde edilen proteinlerin sahip olduğu protein bant profilleri çıkartılmış olunacaktır. Aynı koşullar altında yürütülen diğer bir jel ise boyama işlemine tabi tutulmadan Western blot analizi için elektroforezi takiben transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve % 10

metanol) içerisinde 10 dakika süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakılacaktır. Elektroforetik transfer Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell modülü (Bio-Rad, California, USA) kullanılarak ıslak transfer yöntemi uygulanarak yapılacaktır. Panther Semidry Electrobloetter'ın platinyum tabanına önceden nemlendirilmiş Whatman # 1 filtre kağıdı yerleştirilecek ve olası kalabilecek hava kabarcıklarını gidermek amacıyla bir deney tüpü üzerinde yuvarlanacaktır. Whatman # 1 üzerine dikkatlice yerleştirilen jelin üzerine PVDF membran da dikkatlice yerleştirilecektir. Daha sonra membran üzerine önceden ıslatılmış başka bir Whatman # 1 konarak sandviç tamamlanacaktır. Hava kabarcıklarının tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için membranı kendi pozisyonunda sabit tutarken bir deney tüpü nazikçe üzerinde yuvarlanacak ve sandviç etrafına taşan fazla transfer tamponları temizlenerek alan kurulanacaktır. Sandviç hazırlandıktan sonra üst aparat dikkatlice yerleştirilecek ve sistem sıkıca kapatılacaktır. Elektroforetik transfer sistemi Bio-Rad PowerPac Basic güç kaynağına bağlanacak ve voltaj ve maksimum akım limiti 90 V ve 400 mA'e ayarlanacak ve 1.5 saat süresince proteinler elektroforetik olarak transfer edilecektir. Süre sonunda güç kaynağı kapatılacak ve membran modülden çıkartılacaktır. Sonuç olarak üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, 'Blot', elde edilmiş olacaktır. Blot, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içerisine yerleştirilerek 1 saat süreyle bloke çözeltisi (TBST içinde yağsız % 5'lik süt tozu) ile çalkalayıcıda inkübe edilecektir. Süre sonunda blot önce blok çözeltisi içinde hazırlanan primer antikorlar ve daha sonra işaretleyici HRP bağlı olan ikincil antikorlarla inkübe edilecektir. Daha sonra blot TBST solüsyonunda her biri 5 dakika olmak üzere 3 defa yıkanacaktır. Son olarak membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için ECL çözeltisi ile inkübe edilecektir. İnkübasyondan sonra elde edilen membran ChemiDOC XRS+ görüntüleme sisteminde kemilüminesans görüntüleme yapılarak proteinlerin vermiş oldukları band elde edilecektir. Elde edilen bantların densitometrik analizi ImageJ yazılımı kullanılarak yapılacaktır.

Çizelge 3.4. SDS-PAGE için hazırlanan ayırıştırıcı jeli ve sıkıştırma jeli içerikleri

Bileşenler	Ayrıştırıcı Jel (0.375 M Tris, pH 8.8)	Sıkıştırıcı Jel (0.125 M Tris, pH 6.8)
Monomer Konsantrasyonu	%8.5	%4
Jel Solüsyonu (mL)	4.25	0.65
dH ₂ O (mL)	6.775	3.05
Ayrıştırıcı Jel Solüsyonu (mL)	3.75	-
Sıkıştırıcı Jel Solüsyonu (mL)	-	1.25
%10 SDS (mL)	0.15	0.05
%10 APS (mL)	0.075	0.0355
TEMED (mL)	0.02	0.015
Total Hacim (mL)	15	5



Şekil 3.14. Western Blotting şematik gösterimi (Bio-Render ile çizilmiştir)

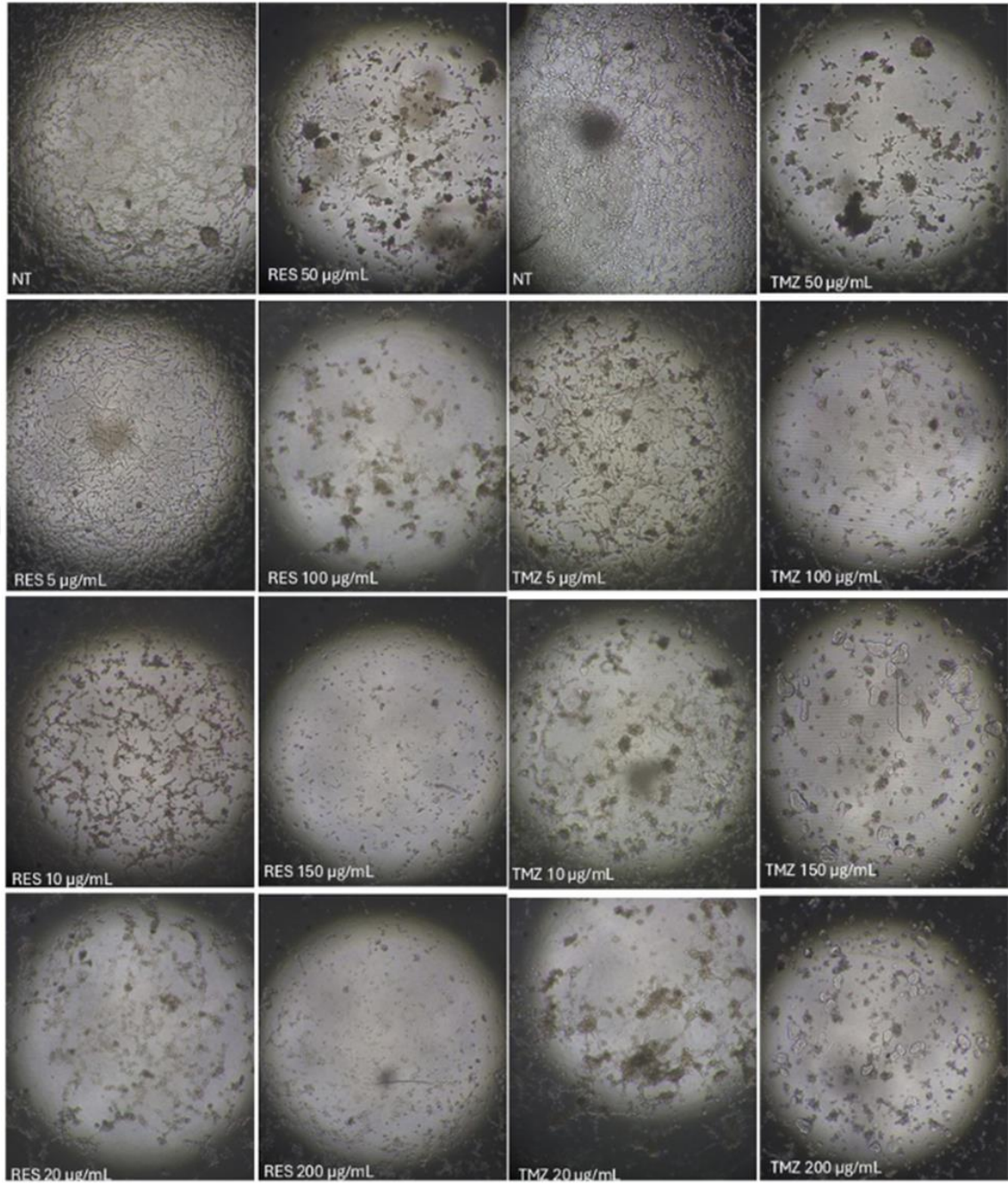
4. BULGULAR

4.1. *In Vitro* Sitotoksisite Ölçüm Sonuçları

4.1.1. U87-MG Hücre Hattı Üzerinde RES ve TMZ Sitotoksisite Etkisi

İnsan glioblastoma U87-MG hücre hattında RES ve TMZ muamelesinin hücre canlılığını tespit edebilmek amacıyla sitotoksisite deneyleri yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler 0 µg/mL-200 µg/mL değişen konsantrasyonlarda (0 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL) RES ve TMZ ile muamele edilip 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücreler ışık mikroskopunda görüntülenmiştir (Şekil 4.1). Diğer konsantrasyonlara kıyasla 100 µg/mL, 150 µg/mL, ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında RES ve TMZ ile muamele edilen insan glioblastoma U87-MG hücrelerinin morfolojilerinde hiçbir muamele yapılmayan (non-treated) U87-MG hücrelerine göre değişiklik olduğu gözlemlenmiştir.

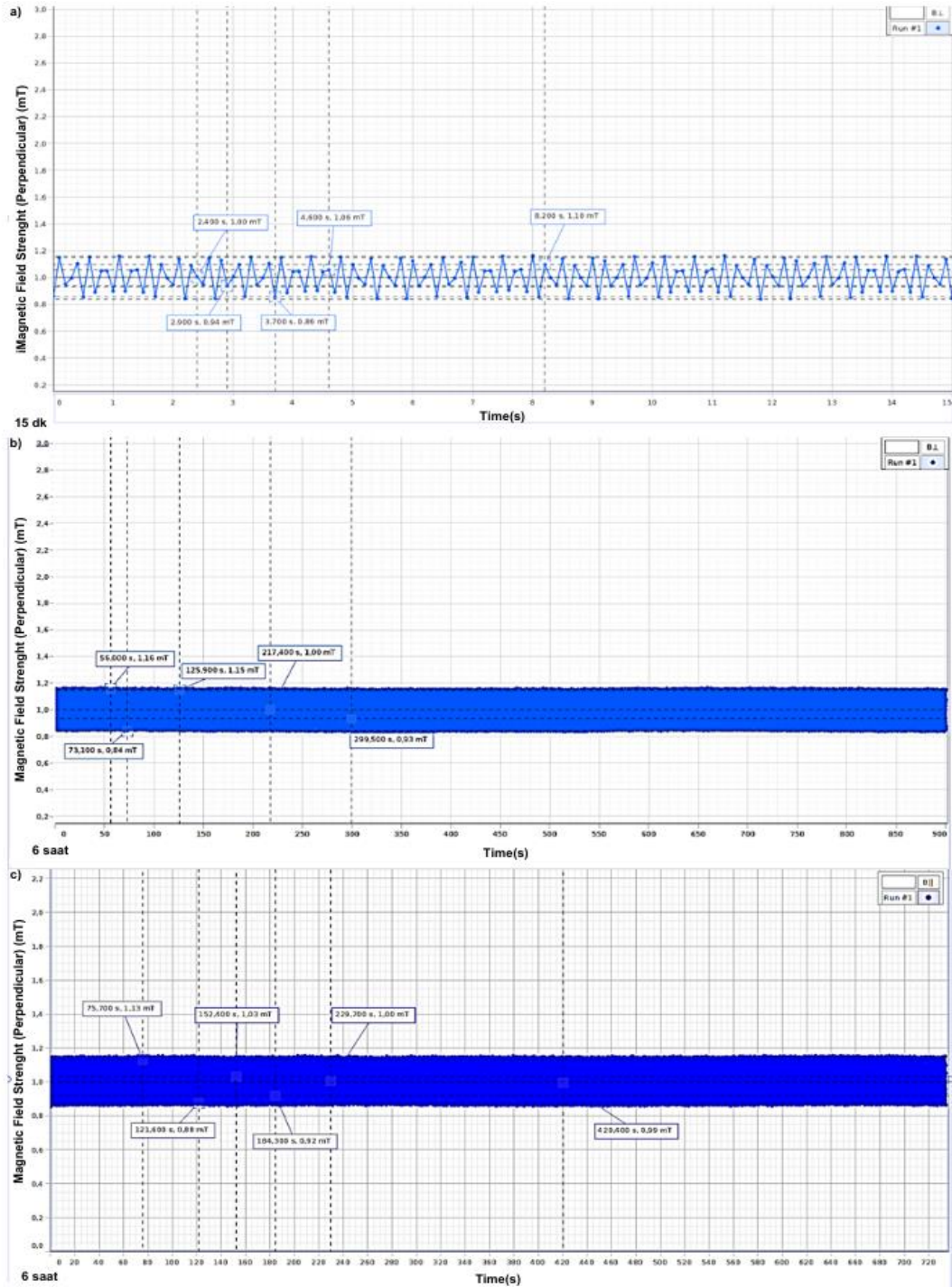
Farklı manyetik alan parametreleri (10 Hz, 75 Hz, 100 Hz) ve farklı zaman aralıklarında (15 dk, 1 saat, 12 saat, 36 saat) optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyon sonucuna göre çalışmaların devamında hücrelerin 75 Hz frekans, 15 dk (kısa) ve 6 saat (uzun) PEMF'ye maruz bırakılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda RES ve TMZ ile muamele edilen hücrelerin optimizasyon çalışmalarındaki ışık mikroskobu görüntüleri

Optimizasyon çalışmaları sonucunda frekansı 75 Hz, dalga genlik değeri (amplitude) 15 V ve elektromanyetik dalganın görev döngüsü (duty cycle) periyodu %10 olacak şekilde değerler 850 Output 1 çıkış penceresine girilmiştir. Ayrıca helmholtz bobinleri besleyen elektrik akımı (current limit) 1.5 amper (A), limit gerilim değeri (V) (voltage limit) 15 V, topraklama gerilim değeri (voltage offset) 0 V olarak yazılımın “Ofset ve Limitler (Offset and Limits)” penceresi yardımıyla belirlenmiştir. Bu veriler yazılımın ara yüzüne girdiler olarak eklenerek cihaz çalıştırılmıştır (Şekil 3.3).

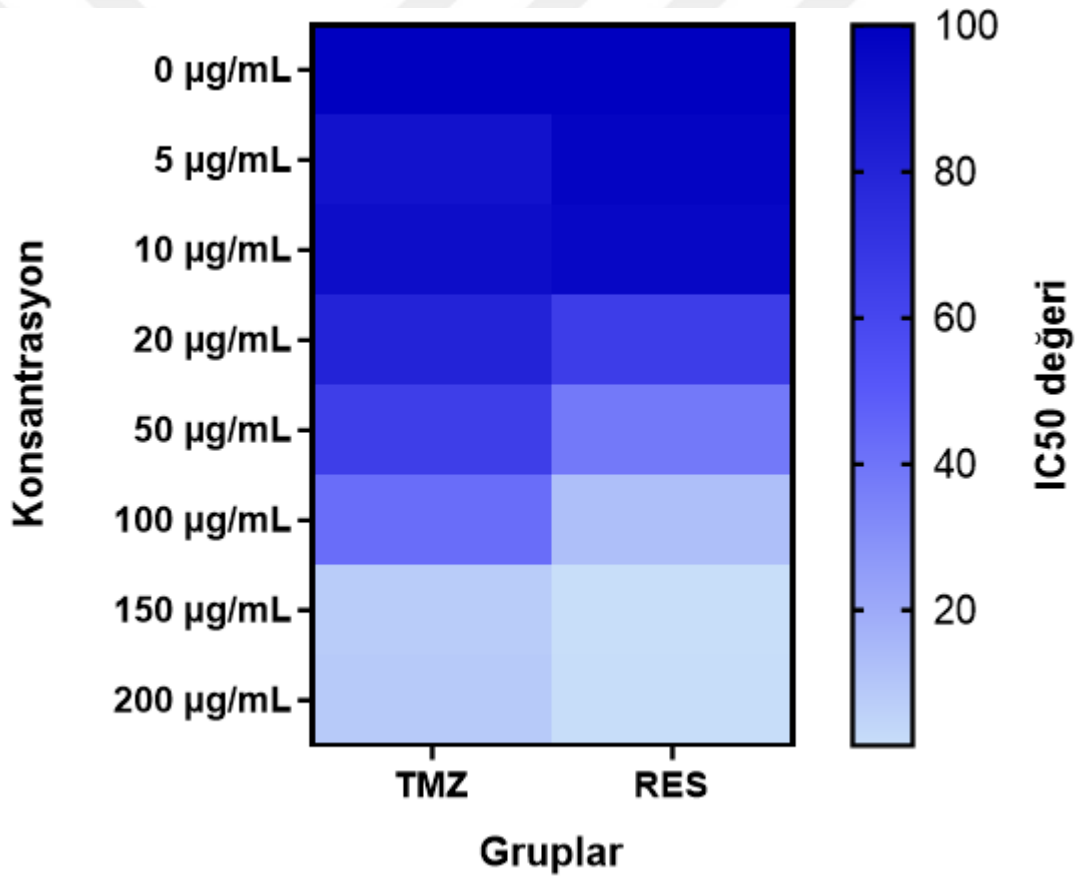
Pasport manyetik alan sensörü yardımıyla ilk 0.15 dakika boyunca (Şekil 4.4.a) dikey (aksiyal) yöndeki manyetik alan değeri Pasco 850 Capstone Yazılımı kullanılarak 1 ± 0.2 mT olarak ölçülmüştür. Çalışmada PEMF maruziyet süresi 15 dk ve 6 saat ölçülmüş olup (Şekil 4.2) ve 1 ± 0.2 mT manyetik alan sinyalleri kayıt altına alınmıştır.



Şekil 4.2. a) İlk 0.15 dakikadaki, b) 15 dakikadaki sıkıştırılmış, ve c) 6 saatteki sıkıştırılmış 1 ± 0.2 mT manyetik alan sinyallerinin Pasco Capstone Yazılım ile elde edilen manyetik alan dalga sinyalleri

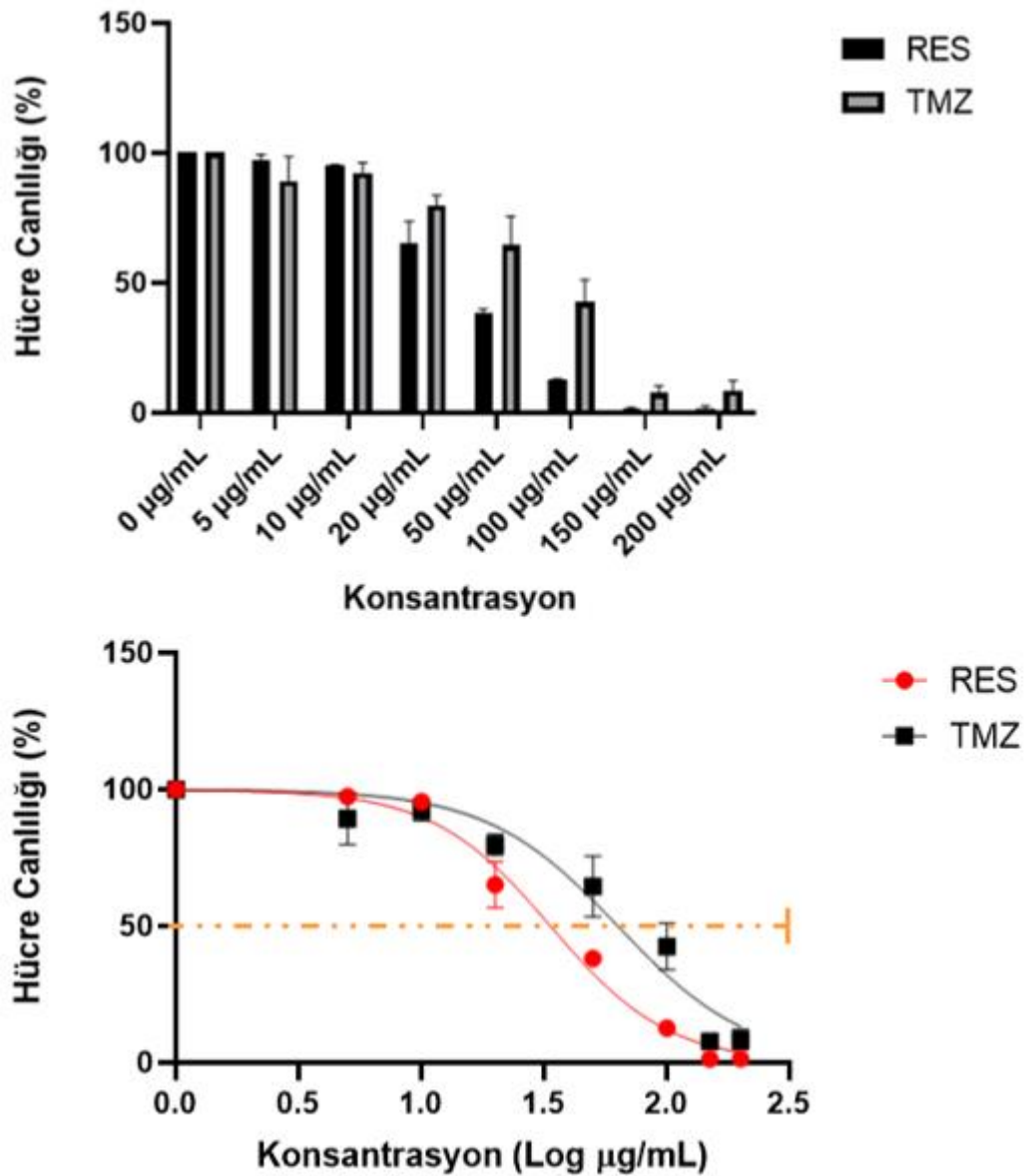
PEMF maruziyeti olmayan, kısa süreli (15 dk), ve uzun süreli (6 saat) PEMF maruziyeti olan insan glioblastoma (U87-MG) hücre hatlarındaki RES ve TMZ muamelesinin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Buna göre PEMF maruziyeti olmayan insan glioblastoma U87-MG hücre hattında RES ve TMZ muamelesinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 33.64 µg/mL ve 63.27 µg/mL olarak hesaplanırken kısa süreli (15 dk) PEMF maruziyeti olan grupta IC₅₀ değerleri sırasıyla 32.43 µg/mL ve 64.21 µg/mL olarak hesaplanmış, uzun süreli (6 saat) PEMF maruziyeti olan grupta ise bu değerler sırasıyla 10.53 µg/mL ve 31.83 µg/mL olarak elde edilmiştir (Tablo 4.1).

Şekil4.3 göre PEMF maruziyeti olmayan insan glioblastoma U87-MG hücre hattındaki TMZ IC₅₀ değerine göre 50-100 µg/ml aralığından itibaren hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir. RES ise 20-50 µg/ml aralığından itibaren hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar heat map analizi ile gösterilmiştir (Şekil4.3).



Şekil 4.3. İnsan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ sitotoksik etkileri

PEMF maruziyeti olmayan insan glioblastoma U87-MG hücre hattının RES ile muamele edilerek hücre canlılığının %50 azaldığı konsantrasyon değeri 33,64 $\mu\text{g/mL}$ olup konsantrasyon aralığı 20-50 $\mu\text{g/mL}$ arasındadır (Şekil 4.4) ve bu değer 1.5-2.0 $\mu\text{g/mL}$ log konsantrasyon aralığına denk gelmektedir (Şekil 4.4). TMZ ile muamele edildiğinde hücre canlılığının %50 azaldığı konsantrasyon değeri 63,27 $\mu\text{g/mL}$ olup konsantrasyon aralığı 50-100 $\mu\text{g/mL}$ arasındadır (Şekil 4.4) ve bu değer 1.5-2.0 log $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda aralığına denk gelmektedir (Şekil 4.4). İn vitro insan glioblastoma U87-MG hücre hattının PEMF maruziyeti olmayan RES ve TMZ sitotoksikite sonucuna göre RES'in IC_{50} değeri daha düşük gözlemlenmesi IC_{50} değerine göre RES temozoloide kıyasla daha fazla toksik etki göstermiştir.

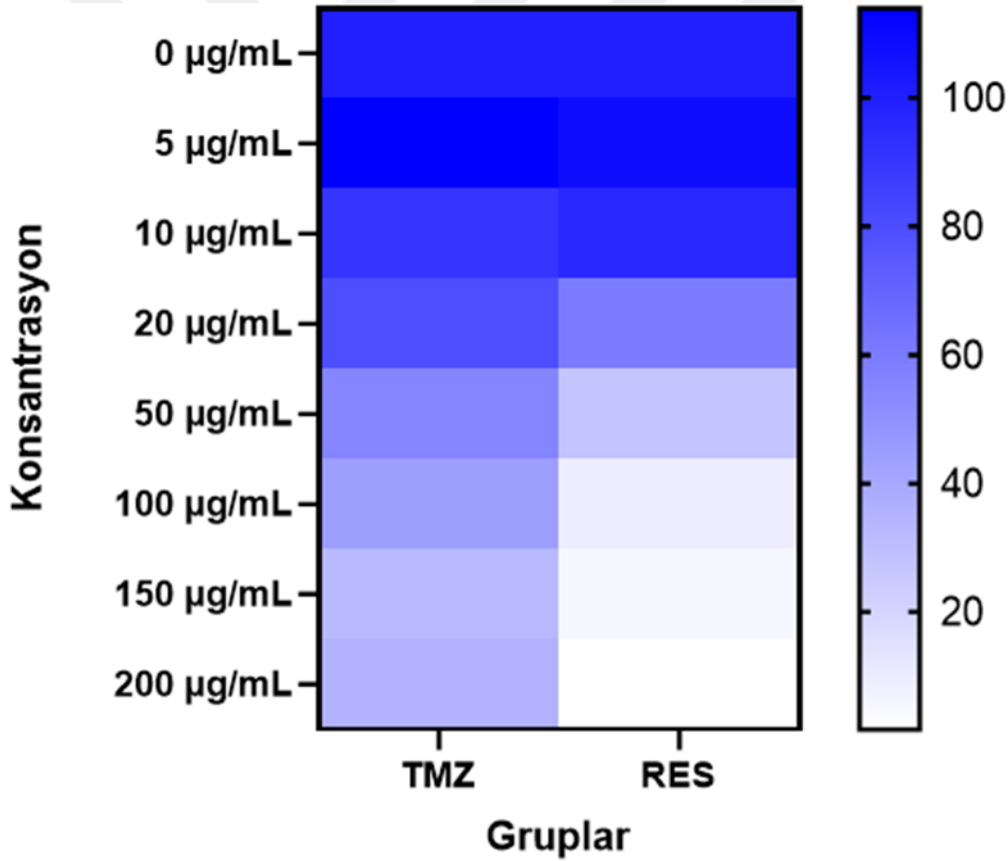


Şekil 4.4. İnsan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerinde RES ve TMZ'nin konsantrasyonuna bağlı hücre canlılığı

4.1.2. U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesi ve Kısa Süreli PEMF Maruziyetinin Sitotoksik Etkileri

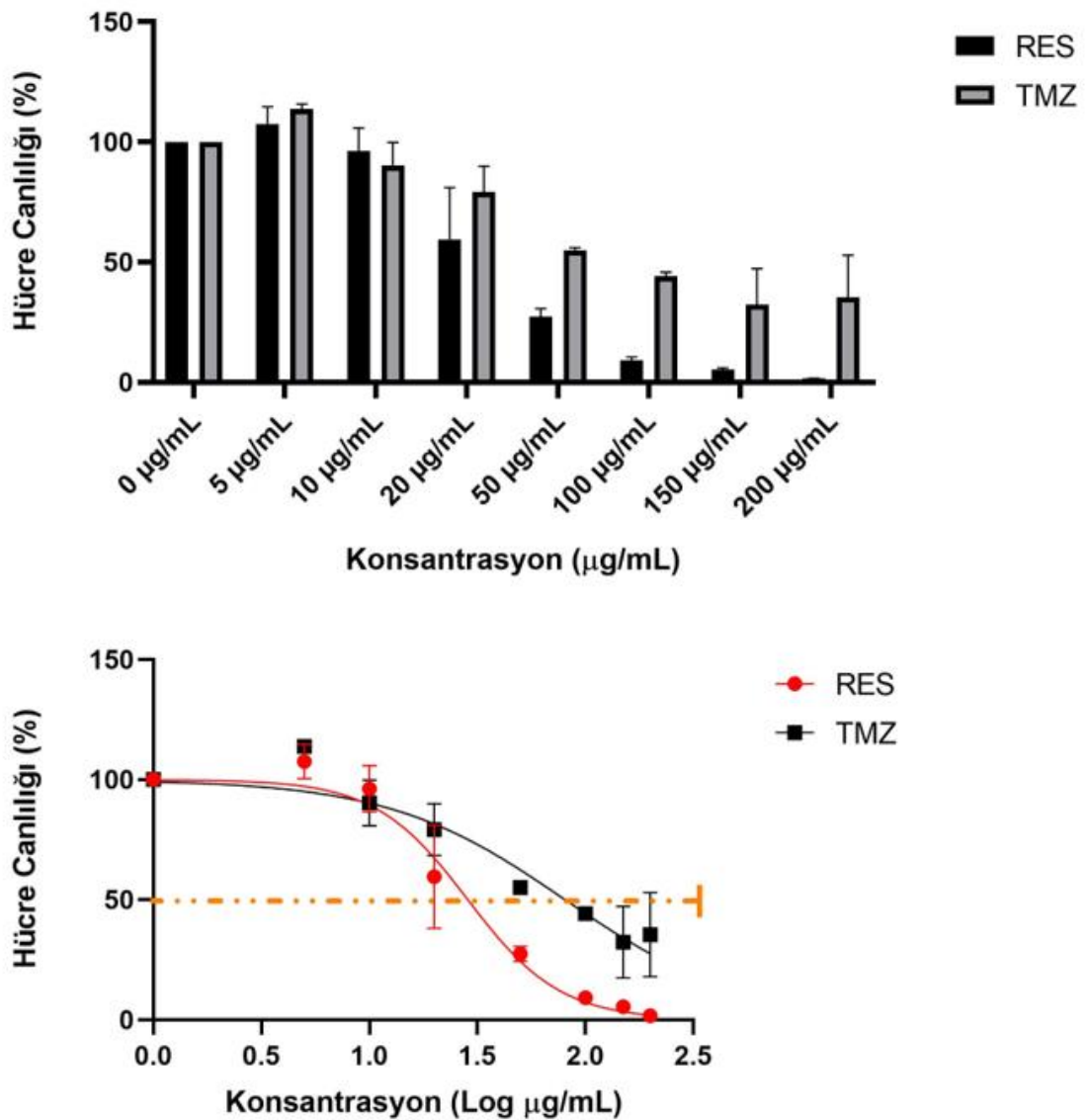
Kısa süreli (15 dakika) PEMF maruz bırakılan insan glioblastoma U87-MG hücre hattında RES ve TMZ muamelesinin sitotoksik etkilerini tespit edebilmek amacıyla sitotoksisite deneyleri yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler 0 µg/mL- 200 µg/mL değişen konsantrasyonlarda (0 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL) RES ve TMZ ile muamele edilip 15 dakika PEMF maruz bırakılmıştır. Tablo 1 göre insan glioblastoma U87-MG hücre hattında kısa süreli (15 dakika) PEMF maruziyeti olan RES ve TMZ IC₅₀ değerleri sırasıyla 28,58 µg/mL ve 80,55 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.5 göre kısa süreli (15 dakika) PEMF maruz bırakılan insan glioblastoma U87-MG hücre hattındaki TMZ IC₅₀ değerine göre 50-100 µg/ml aralığından itibaren hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir. RES ise 20-50 µg/ml aralığından itibaren hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5. İnsan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki kısa süreli (15 dakika) PEMF maruziyetinin RES ve TMZ sitotoksik etkileri

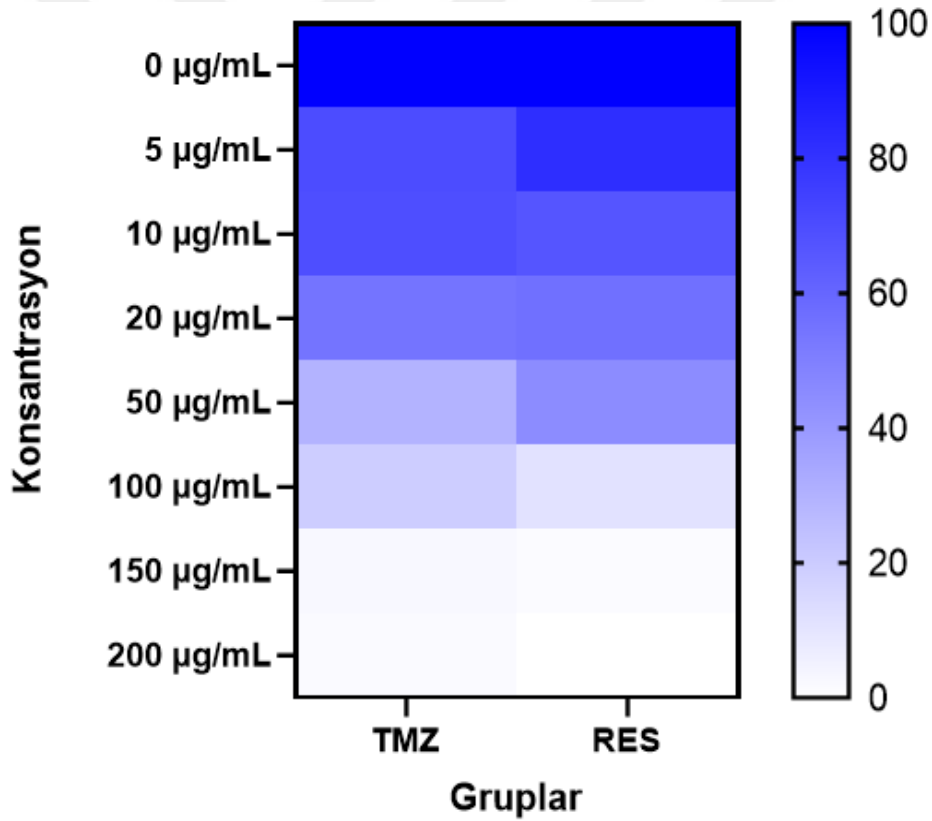
Kısa süreli (15 dakika) PEMF maruz bırakılan insan glioblastoma U87-MG hücre hattının RES ile muamele edilerek hücre canlılığının %50 azaldığı konsantrasyon değeri 28,58 $\mu\text{g/mL}$ olup konsantrasyon aralığı 20-50 $\mu\text{g/mL}$ arasındadır (Şekil 4.6) ve bu değer 1.5-2.0 $\mu\text{g/mL}$ log konsantrasyon aralığına denk gelmektedir (Şekil 4.6). TMZ ile muamele edildiğinde hücre canlılığının %50 azaldığı konsantrasyon değeri 80,55 $\mu\text{g/mL}$ olup konsantrasyon aralığı 50-100 $\mu\text{g/mL}$ arasındadır (Şekil 4.6) ve bu değer 1.5-2.0 log $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda aralığına denk gelmektedir (Şekil 4.6). İn vitro insan glioblastoma U87-MG hücre hattının kısa süreli PEMF maruz bırakılıp RES ve TMZ sitotoksikite sonucuna göre RES IC_{50} değeri daha düşük gözlemlenmesi IC_{50} değerine göre RES TMZ ye kıyasla daha fazla toksik etki göstermiştir.



Şekil 4.6. Kısa süreli (15 dakika) PEMF maruz bırakılan insan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ konsantrasyona bağlı hücre canlılığı

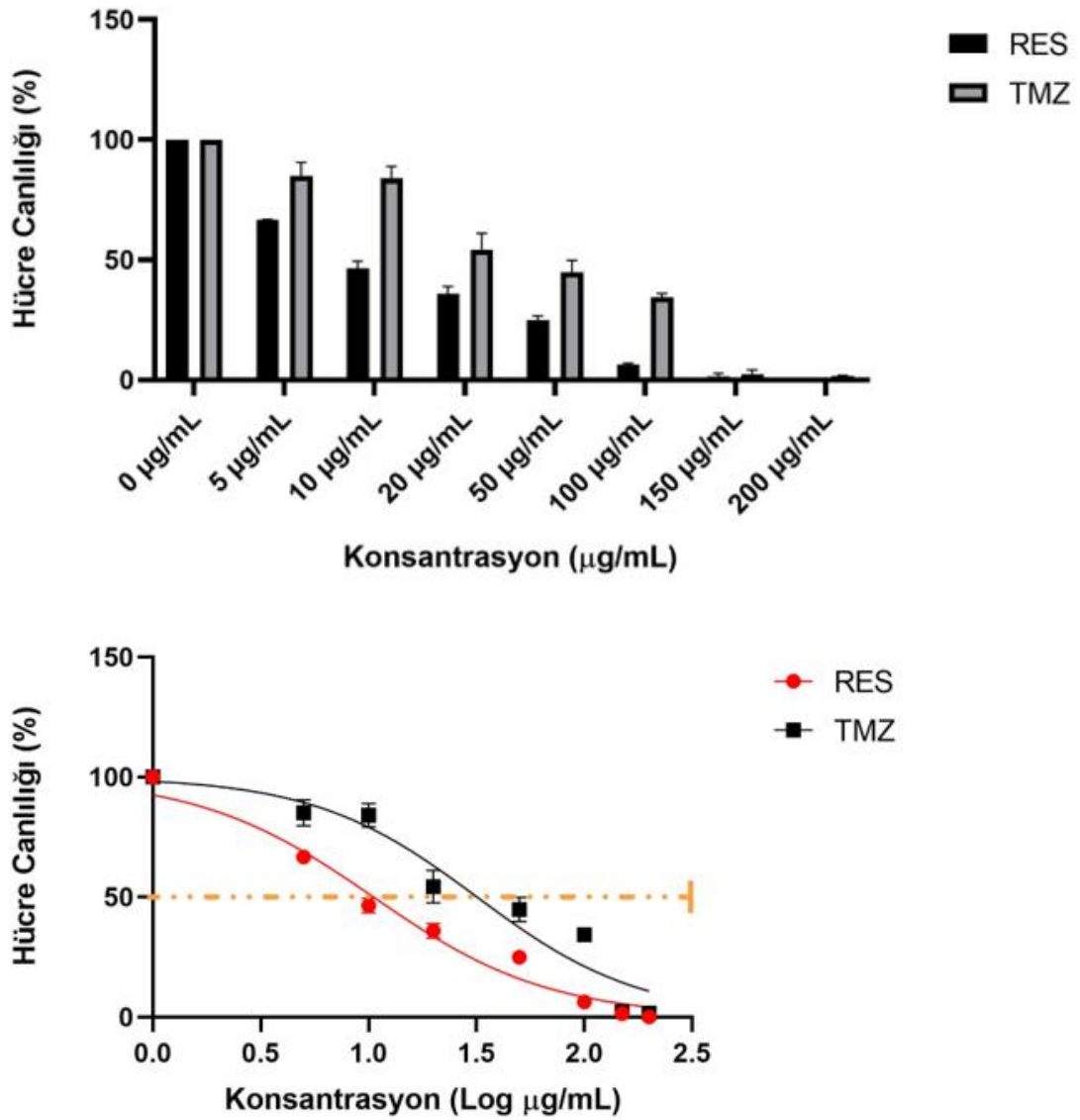
4.1.3. U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesi ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetinin Sitotoksik Etkileri

İnsan glioblastoma U87-MG hücre hattında RES ve TMZ muamelesinin ardından uzun süreli (6 saat) PEMF'ye maruz bırakılarak sitotoksik etkilerini tespit edebilmek amacıyla sitotoksikite deneyleri yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler 0 $\mu\text{g/mL}$ - 200 $\mu\text{g/mL}$ değişen konsantrasyonlarda (0 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$) RES ve TMZ ile muamele edilip 6 saat PEMF'ye maruz bırakılmıştır. RES ve TMZ muamelesinin IC_{50} değerleri sırasıyla 10.53 $\mu\text{g/mL}$ ve 31.83 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. İnsan glioblastoma U87-MG hücre hattında RES ve TMZ muamelesinin ardından uzun süreli (6 saat) PEMF'ye maruz bırakılmasıyla elde edilen IC_{50} değerlerine göre Heat-Map analizi yapılmıştır ve bu analiz sonuçlarına göre RES için 10-20 $\mu\text{g/mL}$ aralığından itibaren hücre canlılığının azaldığı gözlemlenirken TMZ için ise 20-50 $\mu\text{g/mL}$ aralığından itibaren hücre canlılığı azalmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. İnsan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki uzun süreli (6 saat) PEMF maruziyetinin RES ve TMZ sitotoksik etkileri

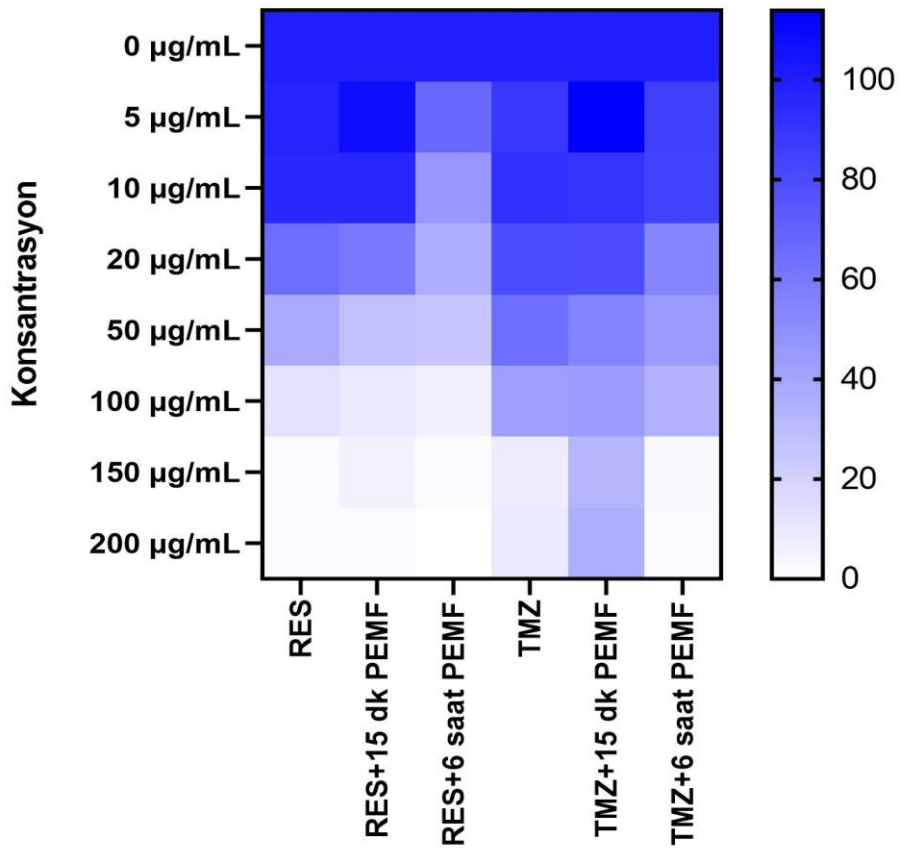
Uzun süreli (6 saat) PEMF maruz bırakılan insan glioblastoma U87-MG hücre hattının RES ile muamele edilerek hücre canlılığının %50 azaldığı konsantrasyon değeri 23,21 $\mu\text{g/mL}$ olup konsantrasyon aralığı 20-50 $\mu\text{g/mL}$ arasındadır (Şekil 4.8) ve bu değer 1.5-2.0 $\mu\text{g/mL}$ log konsantrasyon aralığına denk gelmektedir (Şekil 4.8). TMZ ile muamele edildiğinde hücre canlılığının %50 azaldığı konsantrasyon değeri 19,56 $\mu\text{g/mL}$ olup konsantrasyon aralığı 20-50 $\mu\text{g/mL}$ arasındadır (Şekil 4.8) ve bu değer 1.0-1.5 log $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda aralığına denk gelmektedir (Şekil 4.8).



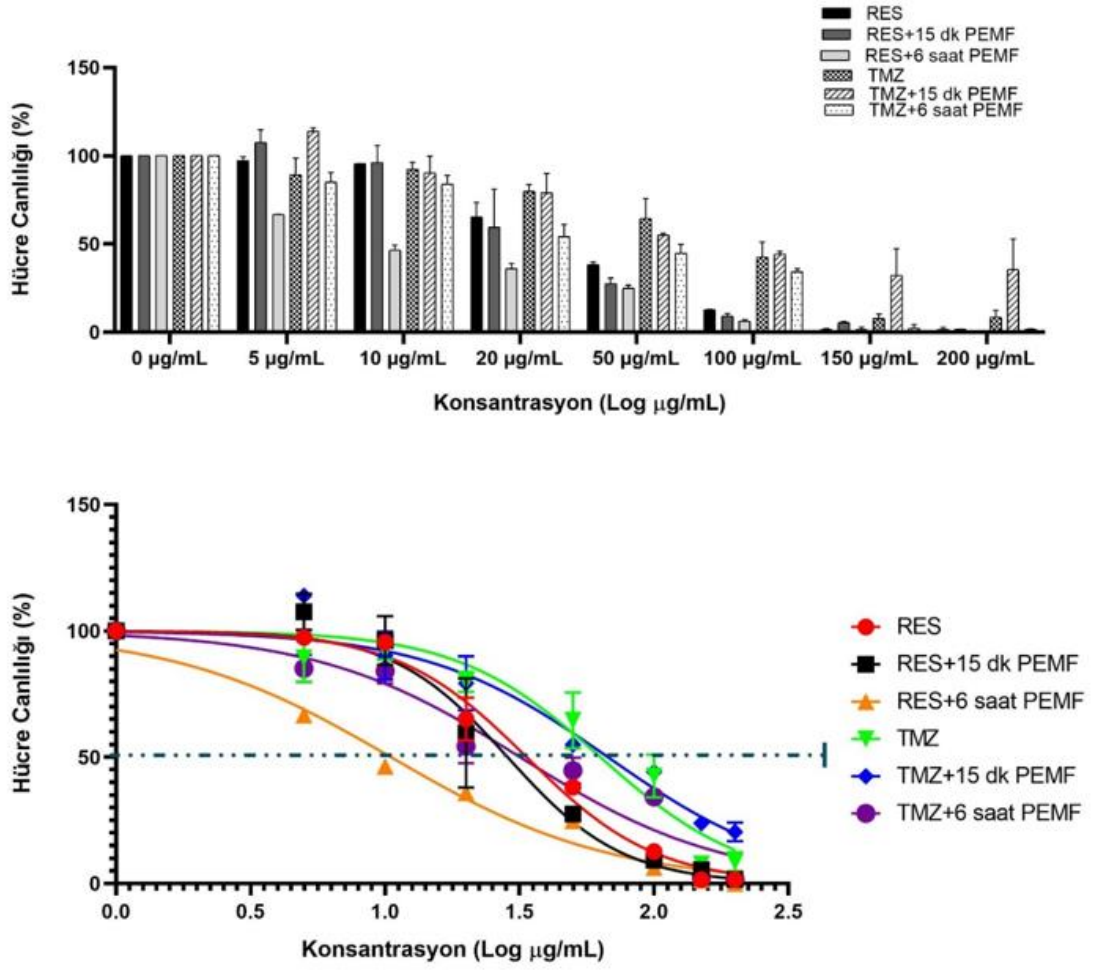
Şekil 4.8. Uzun süreli (6 saat) PEMF maruz bırakılan insan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ konsantrasyona bağlı hücre canlılığı

4.1.4 PEMF Maruziyeti Olmayan, Kısa Süreli ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Sitotoksik Etkilerinin Kıyaslanması

İn vitro insan glioblastoma U87-MG hücre hattının uzun süreli PEMF maruz bırakılıp RES ve TMZ sitotoksikite sonucuna göre TMZ IC₅₀ değeri daha düşük gözlemlenmesi IC₅₀ değerine göre TMZ RES'e kıyasla daha fazla toksik etki göstermiştir. Bu durum uzun süreli PEMF nin kısa süreli ve maruz bırakılmayan hücre hatlarına kıyasla temozoloidin IC₅₀ değerlerine göre daha fazla toksik etki sağladığı ve etkinliğinin arttırdığı gösterilmiştir.



Şekil 4.9. PEMF maruziyeti olmayan, kısa süreli (15 dk) ve uzun süreli (6 saat) PEMF'ye maruz bırakılan insan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ'nin sitotoksik etkilerinin heat-map analizi ile gösterimi

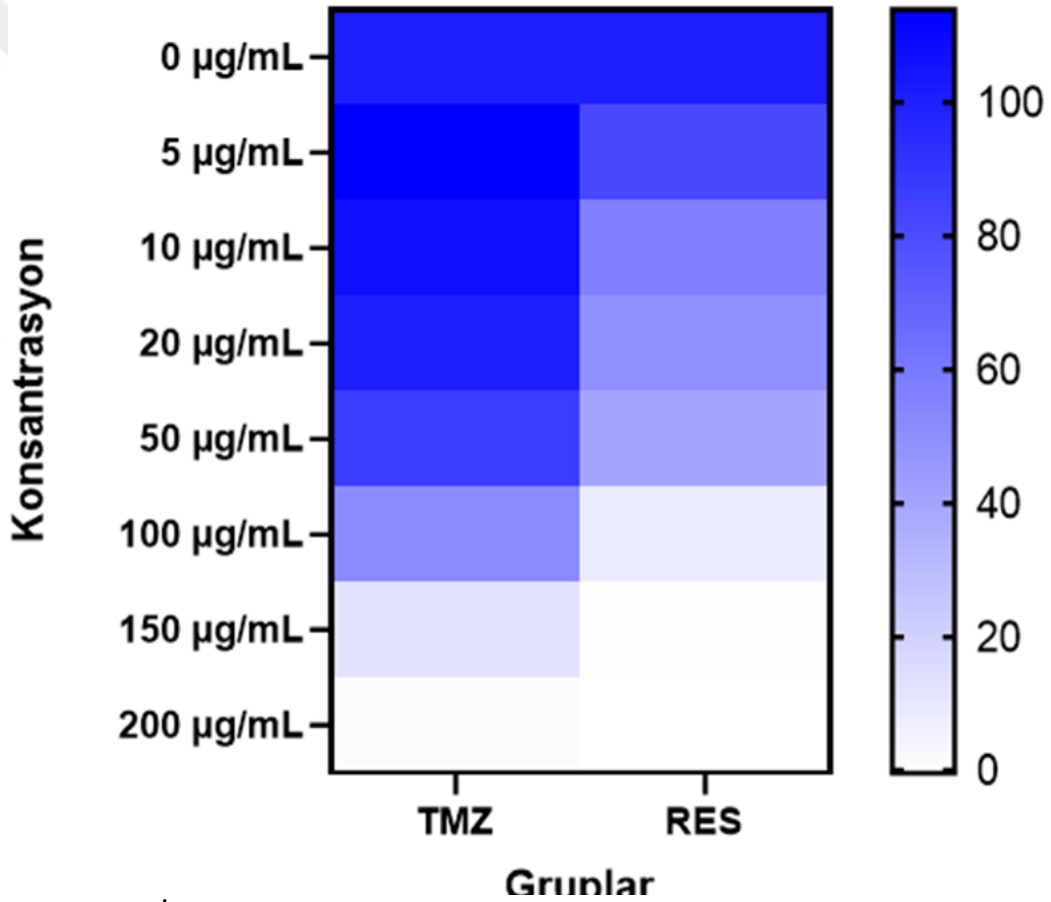


Şekil 4.10. PEMF maruziyeti olmayan, kısa (15 dk) ve uzun süreli (6 saat) PEMF maruziyetine bırakılan insan glioblastoma U87-MG hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ' nin konsantrasyonuna bağlı yüzde (%) hücre canlılığının sütun ve eğri grafiği

4.1.5. SVG-P12 Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Sitotoksik Etkileri

İnsan glia SVG-P12 hücre hattında RES ve TMZ muamelesinin sitotoksik etkilerini tespit edebilmek amacıyla sitotoksikite deneyleri yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler 0 $\mu\text{g/mL}$ - 200 $\mu\text{g/mL}$ değişen konsantrasyonlarda (0 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$) RES ve TMZ ile muamele edilip 48 saat inkübasyona kaldırılmıştır. Tablo 1 göre insan glia SVG-P12 hücre hattında RES ve TMZ IC_{50} değerleri sırasıyla 28,58 $\mu\text{g/mL}$ ve 80,55 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır.

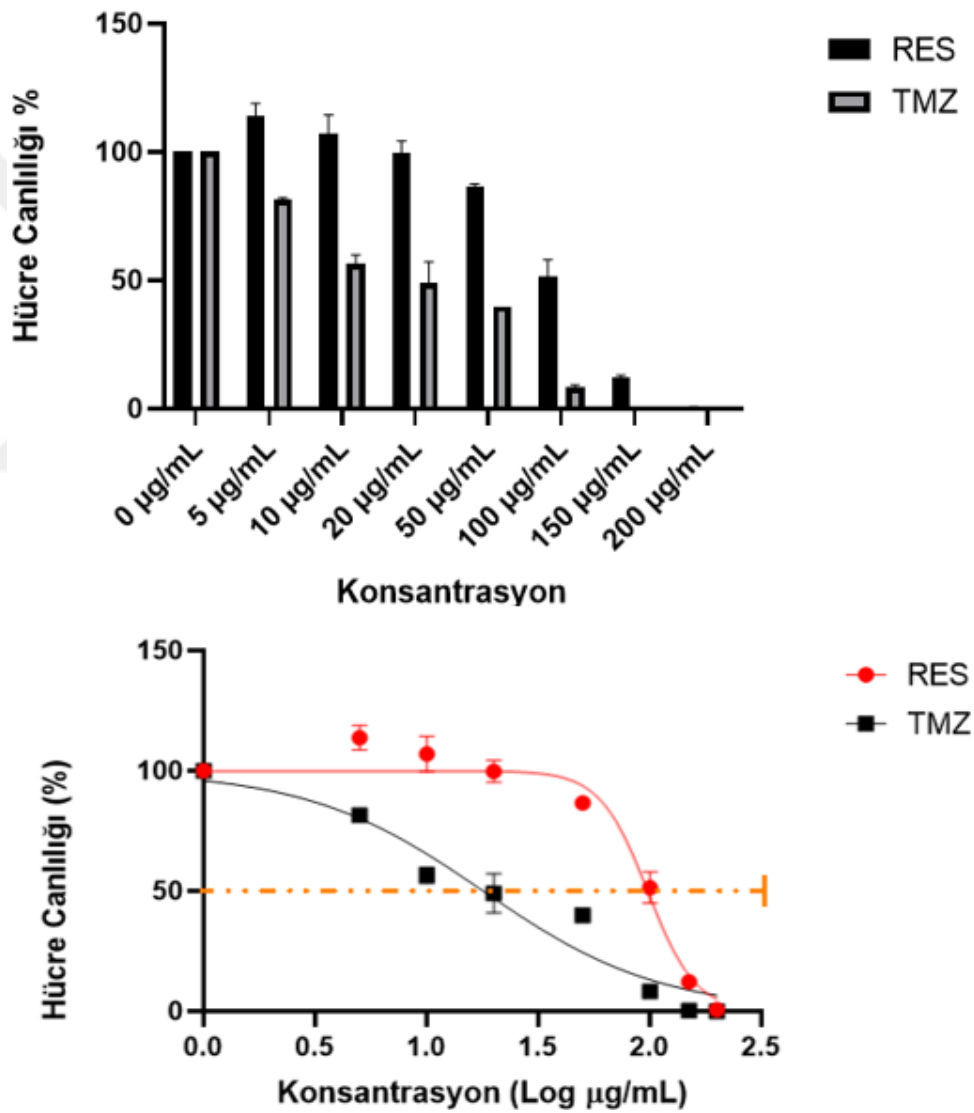
Şekil 4.11 göre insan glia SVG-P12 hücre hattındaki TMZ IC_{50} değerine göre 50-100 $\mu\text{g/mL}$ aralığından itibaren hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir. RES ise 20-50 $\mu\text{g/mL}$ aralığından itibaren hücre canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. İnsan glia SVG-P12 hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ sitotoksik etkileri

PEMF maruziyeti olmayan insan glia SVG-P12 hücre hattının RES ile muamele edilerek hücre canlılığının %50 azaldığı konsantrasyon değeri 17,92 $\mu\text{g/mL}$ olup konsantrasyon aralığı 10-20 $\mu\text{g/mL}$ arasındadır (Şekil 4.12) ve bu değer 1.0-1.5 $\mu\text{g/mL}$ log konsantrasyon aralığına denk gelmektedir (Şekil 4.12). TMZ ile muamele edildiğinde

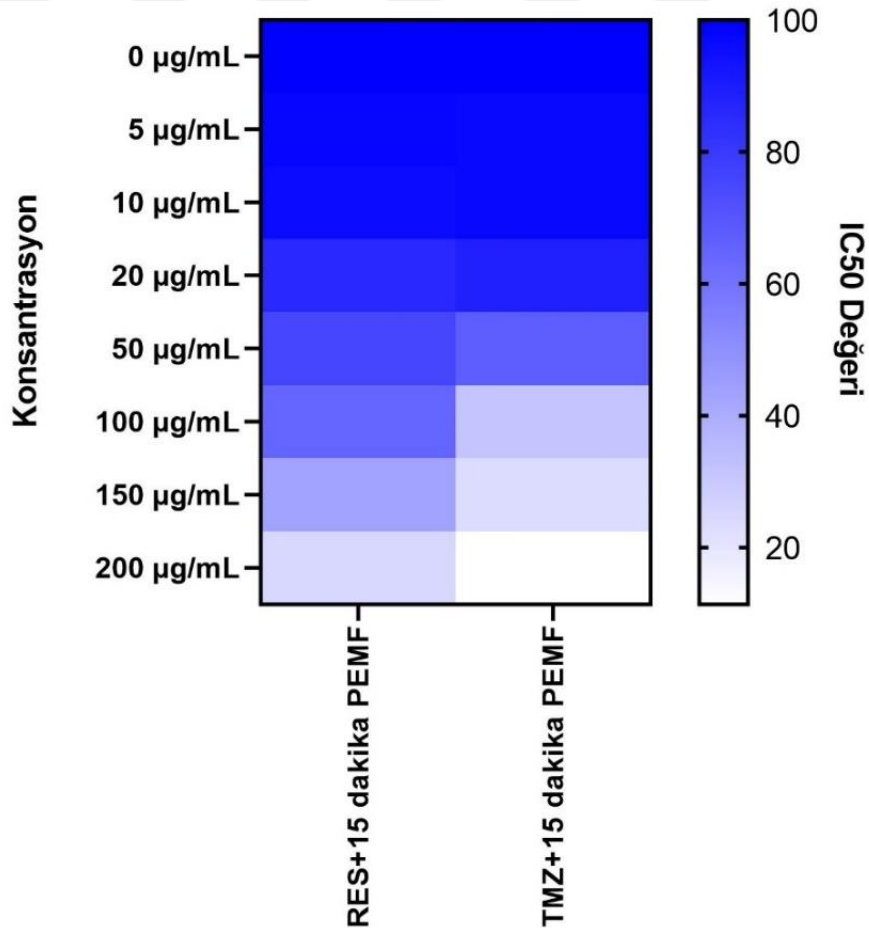
hücre canlılığının %50 azaldığı konsantrasyon değeri 97,70 $\mu\text{g/mL}$ olup konsantrasyon aralığı 50-100 $\mu\text{g/mL}$ arasındadır (Şekil 4.12) ve bu değer 1.5-2.0 log $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda aralığına denk gelmektedir (Şekil 4.12). İn vitro insan glia SVG-P12 hücre hattının PEMF maruziyeti olmayan RES ve TMZ sitotoksosite sonucuna göre RES'in IC_{50} değeri daha düşük gözlemlenmesi IC_{50} değerine göre RES TMZ'ye kıyasla daha fazla toksik etki göstermiştir.



Şekil 4.12. İnsan astroglial SVG-P12 hücre hattı üzerinde RES ve TMZ'nin konsantrasyona bağlı yüzde (%) hücre canlılığı

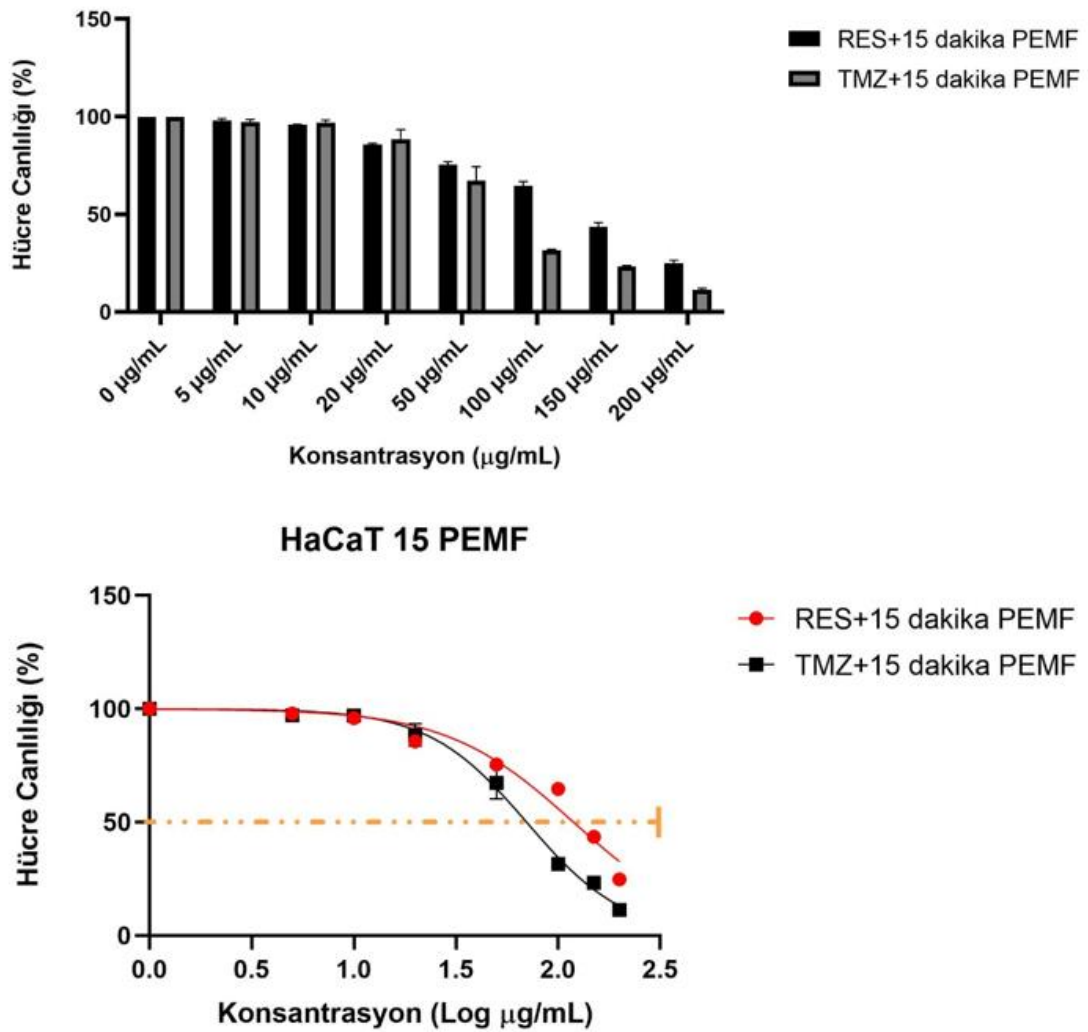
4.1.6. SVG-P12 Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin ve Kısa Süreli PEMF Maruziyetinin Sitotoksik Etkileri

İnsan glia SVG-P12 hücre hattında RES ve TMZ muamelesinin ardından kısa süreli (15 dakika) PEMF'ye maruz bırakılıp, sitotoksik etkilerini tespit edebilmek amacıyla sitotoksikite deneyleri yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler 0 $\mu\text{g/mL}$ - 200 $\mu\text{g/mL}$ değişen konsantrasyonlarda (0 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$) RES ve TMZ ile muamele edilip 15 dakika PEMF'ye maruz bırakılmıştır. RES ve TMZ muamelesinin IC_{50} değerleri sırasıyla 150.4 $\mu\text{g/mL}$ ve 70.5 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 1). İnsan glia SVG-P12 hücre hattında RES ve TMZ muamelesinin ardından kısa süreli (15 dakika) PEMF'ye maruz bırakılmasıyla elde edilen IC_{50} değerlerine göre Heat-Map analizi yapılmıştır ve bu analiz sonuçlarına göre RES için 150-200 $\mu\text{g/mL}$ aralığından itibaren hücre canlılığının azaldığı gözlemlenirken TMZ için ise 50-100 $\mu\text{g/mL}$ aralığından itibaren hücre canlılığı azalmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. İnsan glia SVG-P12 hücre hattı üzerindeki kısa süreli (15 dakika) PEMF maruziyetinin resveratrol ve TMZ sitotoksik etkileri

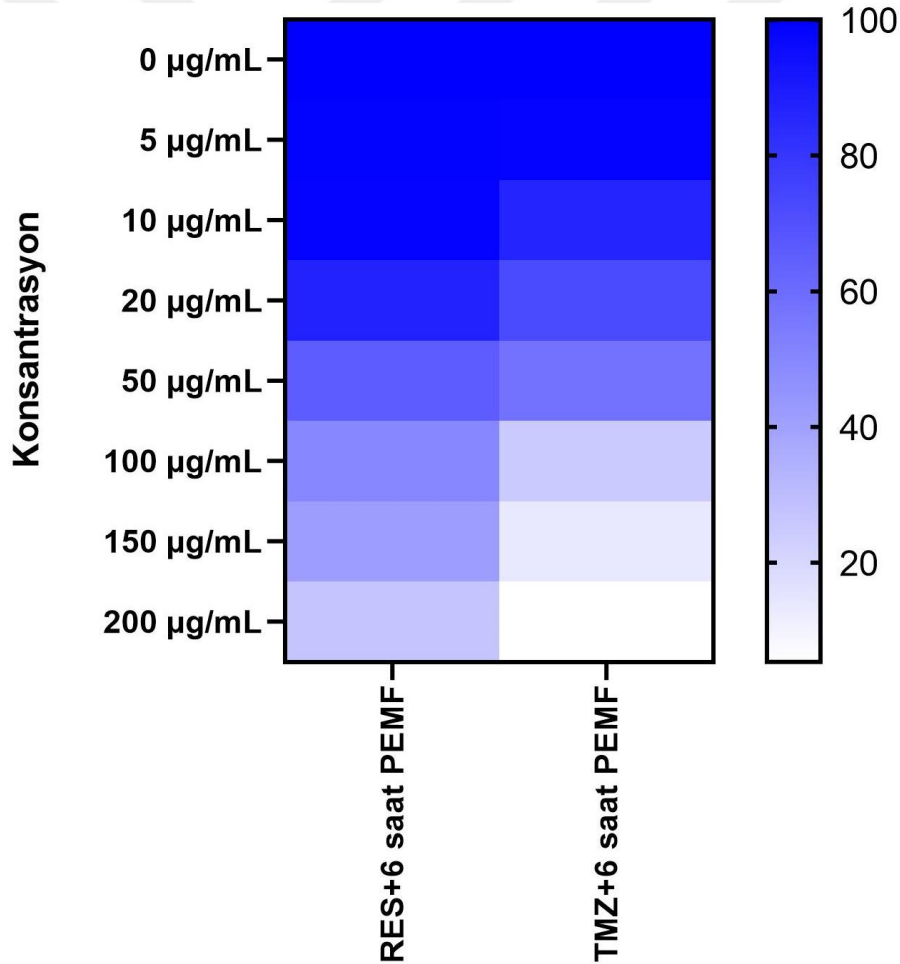
Kısa süreli (15 dakika) PEMF maruz bırakılan insan glia SVG-P12 hücre hattının RES ile muamele edilerek hücre canlılığının %50 azaldığı konsantrasyon değeri 150.4 $\mu\text{g/mL}$ olup konsantrasyon aralığı 150-200 $\mu\text{g/mL}$ arasındadır (Şekil 4.14) ve bu değer 2.0-2.5 $\mu\text{g/mL}$ log konsantrasyon aralığına denk gelmektedir (Şekil 4.14). TMZ ile muamele edildiğinde hücre canlılığının %50 azaldığı konsantrasyon değeri 70.5 $\mu\text{g/mL}$ olup konsantrasyon aralığı 50-100 $\mu\text{g/mL}$ arasındadır (Şekil 4.14) ve bu değer 1.5-2.0 log $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda aralığına denk gelmektedir (Şekil 4.14). İn vitro insan glia SVG-P12 hücre hattının kısa süreli PEMF maruz bırakılıp RES ve TMZ sitotoksosite sonucuna göre TMZ'nin IC_{50} değeri daha düşük gözlemlenmesi IC_{50} değerine göre TMZ RES'e kıyasla daha fazla toksik etki göstermiştir.



Şekil 4.14. İnsan astroglial SVG-P12 hücre hattı üzerindeki kısa süreli (15 dakika) PEMF maruziyetinin RES ve TMZ'nin konsantrasyona bağlı yüzde (%) hücre canlılığı

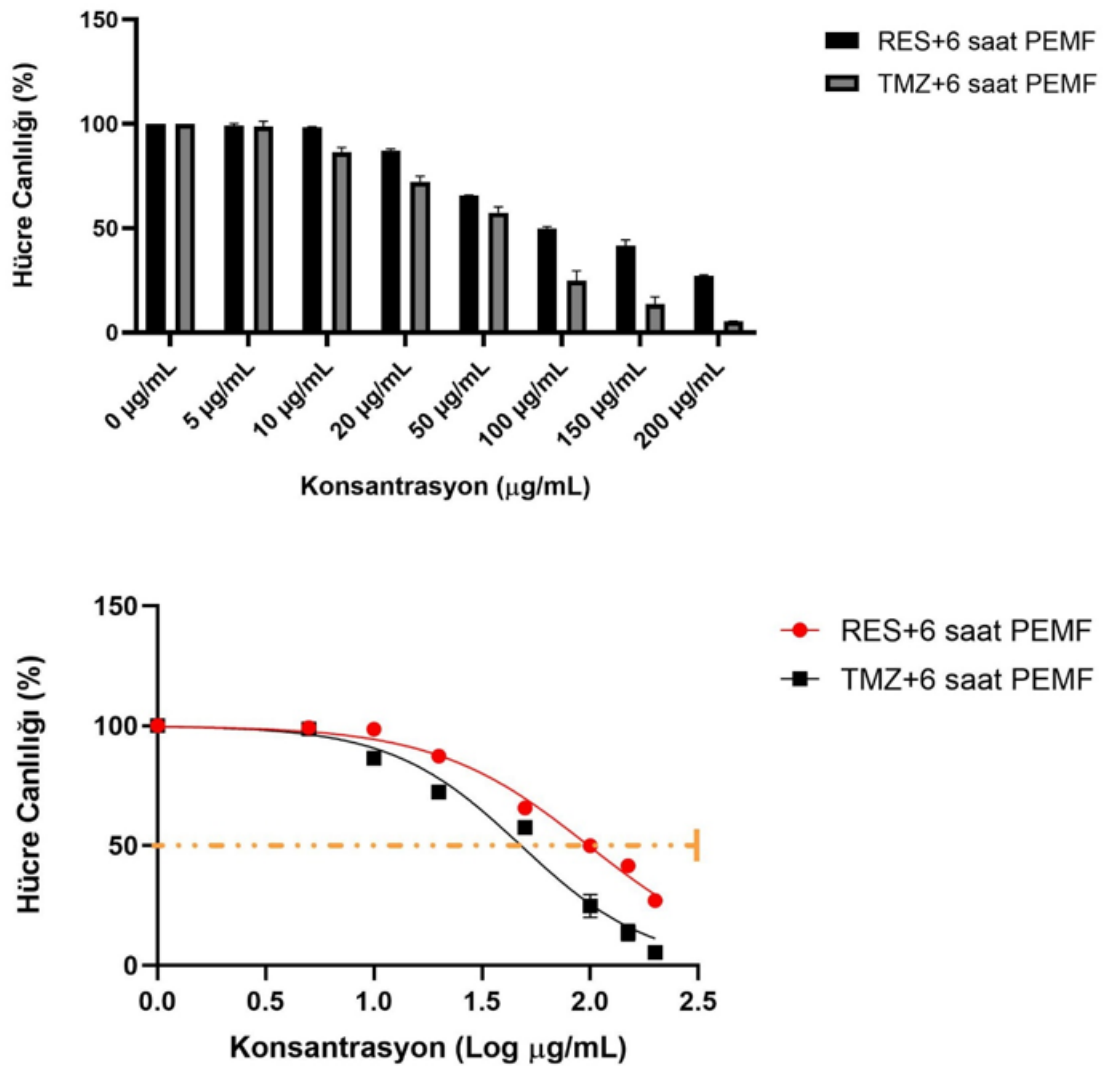
4.1.7. SVG-P12 Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetinin Sitotoksik Etkileri

İnsan glia SVG-P12 hücre hattında RES ve TMZ muamelesinin ardından uzun süreli (6 saat) PEMF'ye maruz bırakılarak sitotoksik etkilerini tespit edebilmek amacıyla sitotoksikite deneyleri yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler 0 $\mu\text{g/mL}$ - 200 $\mu\text{g/mL}$ değişen konsantrasyonlarda (0 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$) RES ve TMZ ile muamele edilip 6 saat PEMF'ye maruz bırakılmıştır. RES ve TMZ muamelesinin IC_{50} değerleri sırasıyla 118.2 $\mu\text{g/mL}$ ve 55.13 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. İnsan glioblastoma U87-MG hücre hattında RES ve TMZ muamelesinin ardından uzun süreli (6 saat) PEMF'ye maruz bırakılmasıyla elde edilen IC_{50} değerlerine göre Heat-Map analizi yapılmıştır ve bu analiz sonuçlarına göre RES için 100-150 $\mu\text{g/mL}$ aralığından itibaren hücre canlılığının azaldığı gözlemlenirken TMZ için ise 50-100 $\mu\text{g/mL}$ aralığından itibaren hücre canlılığı azalmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. İnsan glia SVG-P12 hücre hattı üzerindeki uzun süreli (6 saat) PEMF maruziyetinin RES ve TMZ sitotoksik etkileri

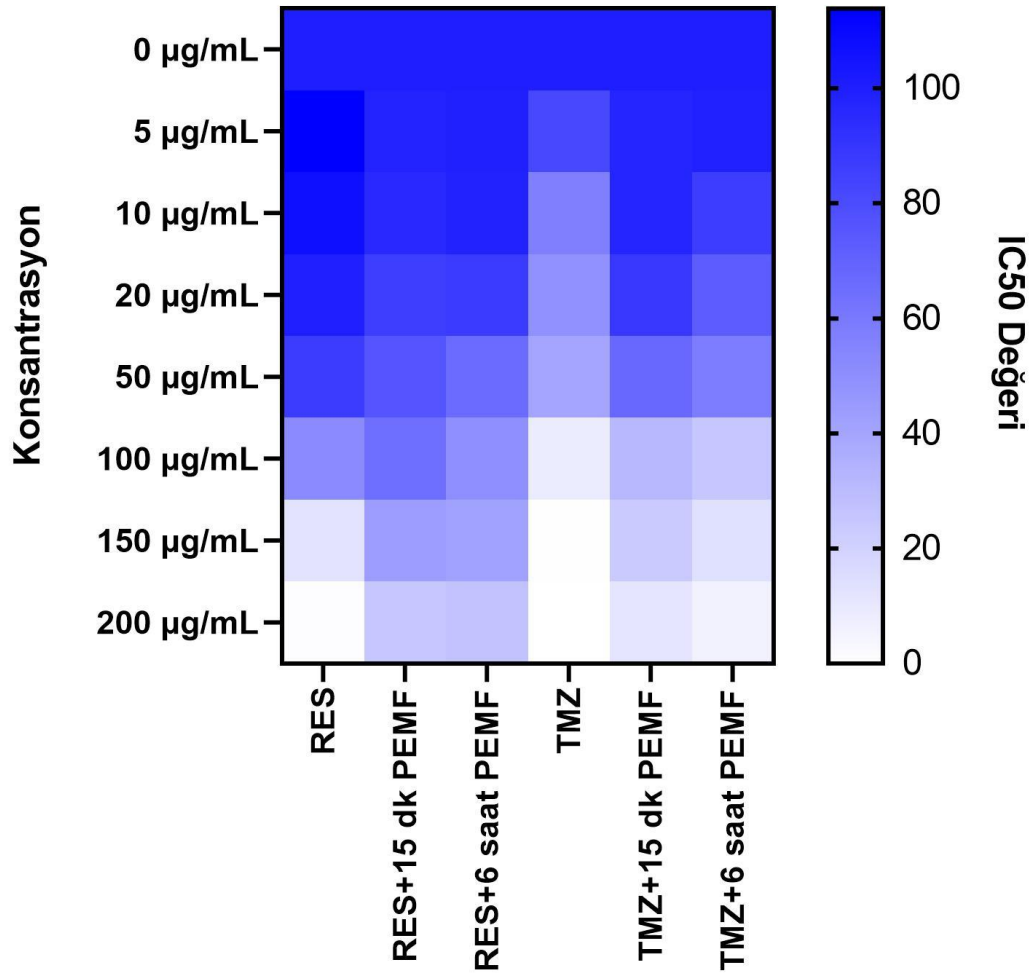
Uzun süreli (6 saat) PEMF maruz bırakılan insan glia SVG-P12 hücre hattının RES ile muamele edilerek hücre canlılığının %50 azaldığı konsantrasyon değeri 118.2 $\mu\text{g/mL}$ olup konsantrasyon aralığı 100-150 $\mu\text{g/mL}$ arasındadır (Şekil 4.16) ve bu değer 2.0-2.5 $\mu\text{g/mL}$ log konsantrasyon aralığına denk gelmektedir (Şekil 4.16). TMZ ile muamele edildiğinde hücre canlılığının %50 azaldığı konsantrasyon değeri 55.13 $\mu\text{g/mL}$ olup (Tablo 1) konsantrasyon aralığı 50-100 $\mu\text{g/mL}$ arasındadır (Şekil 4.16) ve bu değer 1.5-2.0 log $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda aralığına denk gelmektedir (Şekil 4.16). İn vitro insan glia SVG-P12 hücre hattının kısa süreli PEMF maruz bırakılıp RES ve TMZ sitotoksikite sonucuna göre TMZ IC_{50} değeri daha düşük gözlemlenmesi IC_{50} değerine göre TMZ RES'e kıyasla daha fazla toksik etki göstermiştir.



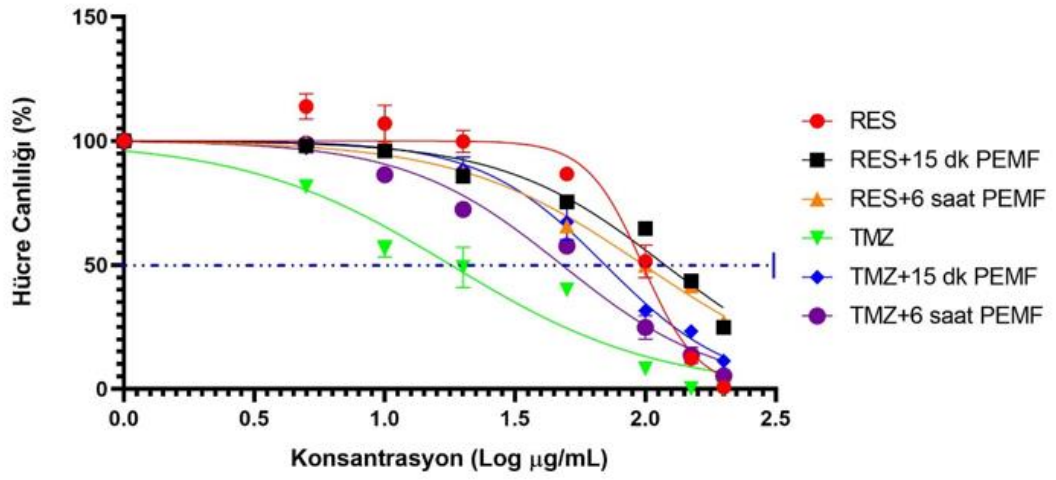
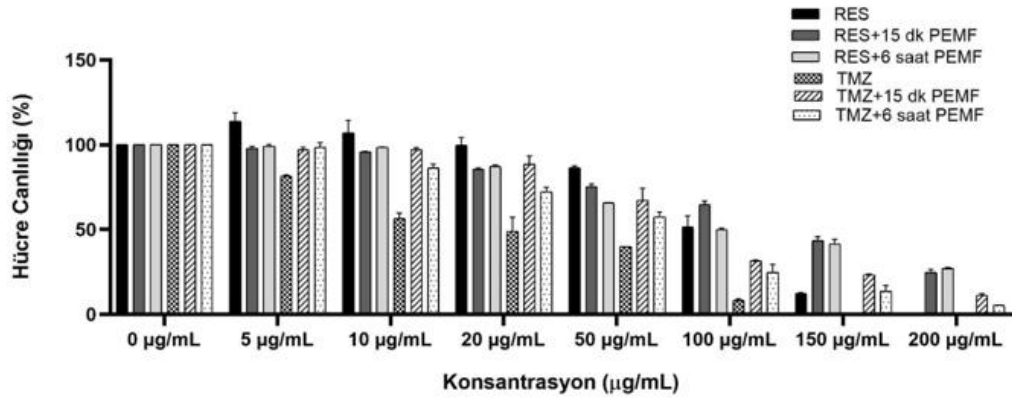
Şekil 4.16. İnsan astroglial SVG-P12 hücre hattı üzerindeki uzun süreli (6 saat) PEMF maruziyetinin RES ve TMZ'nin konsantrasyona bağlı yüzde (%) hücre canlılığı

4.1.8 PEMF Maruziyeti Olmayan, Kısa Süreli ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan SVG-p12 Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Sitotoksik Etkilerinin Kıyaslanması

İn vitro insan glia SVG-p12 hücre hattının uzun süreli PEMF maruz bırakılıp RES ve TMZ sitotoksikite sonucuna göre TMZ IC₅₀ değeri daha düşük gözlemlenmesi IC₅₀ değerine göre TMZ RES'e kıyasla daha fazla toksik etki göstermiştir. Bu durum uzun süreli PEMF'nin kısa süreli ve maruz bırakılmayan hücre hatlarına kıyasla TMZ'nin IC₅₀ değerlerine göre daha fazla toksik etki sağladığı ve etkinliğinin arttırdığı gösterilmiştir.



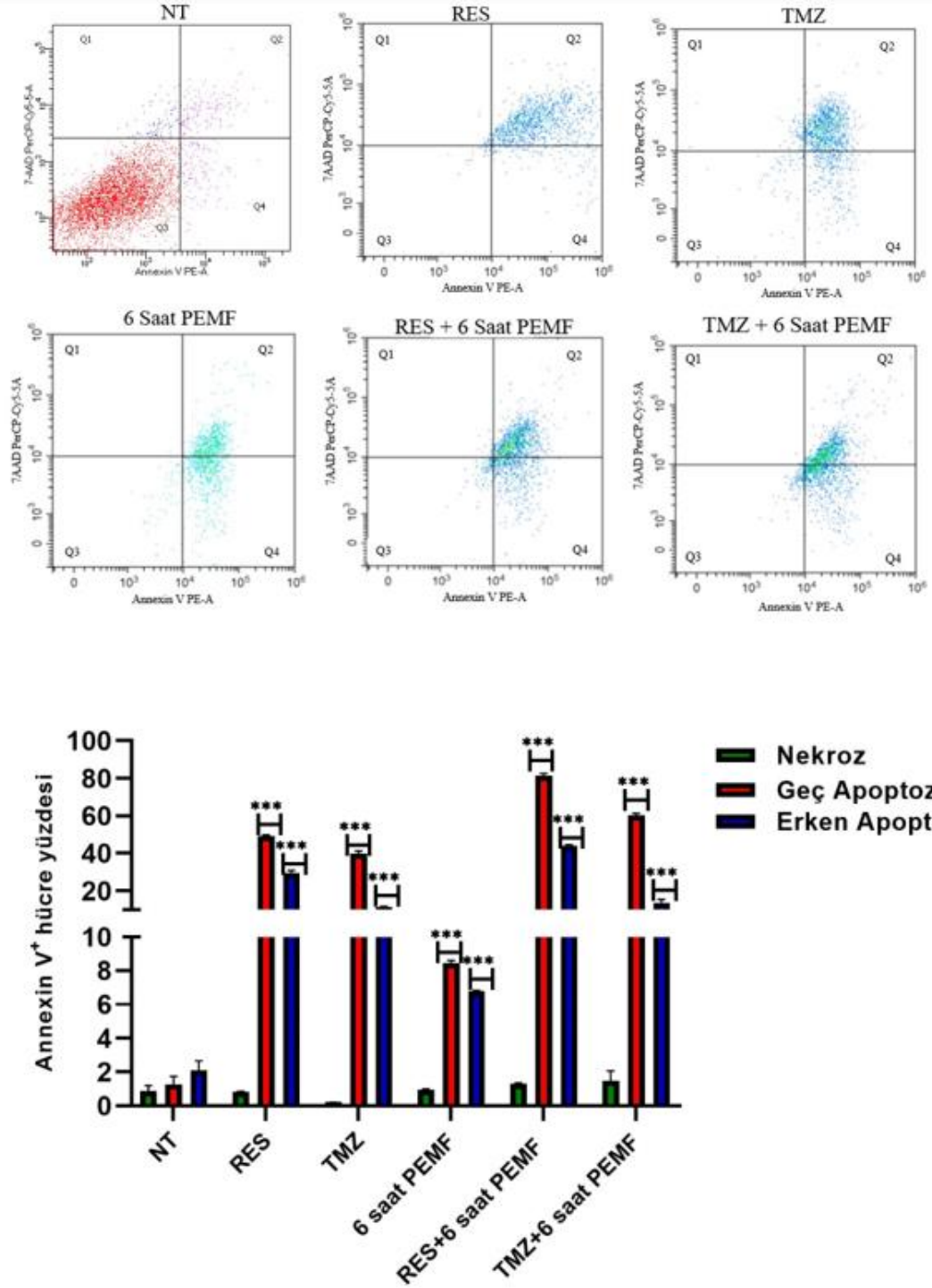
Şekil 4.17. PEMF maruziyeti olmayan, kısa süreli (15 dk) ve uzun süreli (6 saat) PEMF'ye maruz bırakılan insan astroglial SVG-P12 hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ'nin sitotoksik etkilerinin heat-map analizi ile gösterimi



Şekil 4.18. PEMF maruziyeti olmayan, kısa (15 dk) ve uzun süreli (6 saat) PEMF maruziyetine bırakılan insan astroglial SVG-P12 hücre hattı üzerindeki RES ve TMZ' nin konsantrasyonuna bağlı yüzde (%) hücre canlılığının sütun ve eğri grafiği

4.2. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptotik Etkileri

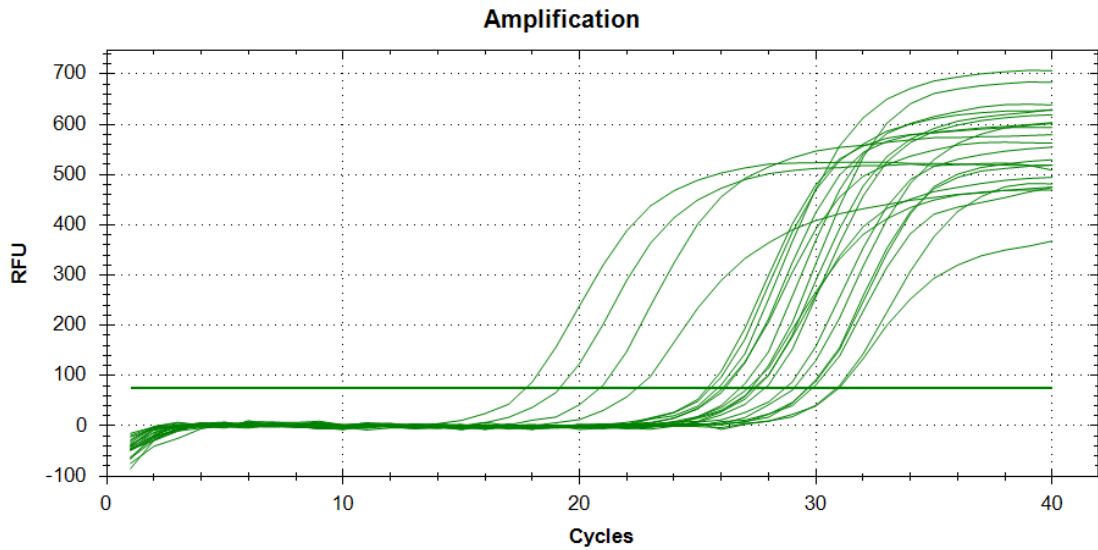
U87-MG hücre hattında belirlenen deney gruplarının apoptoz/nekroz değişimleri Flow Sitometri tekniği ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.19a). RES ve TMZ muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruz bırakılması kanserli hücreleri önemli ölçüde apoptoza sürüklediği gözlemlenmiştir. Çalışılan 6. deney grubunun daha fazla apoptoza sürüklediği gözlemlenmiştir. RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruziyet geç apoptozu %81,35 TMZ muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruziyet ise geç apoptozu %60,43 arttırmıştır (Şekil 4.19b). Bu değer RES muamelesi olan grupta %49,09 iken TMZ olan grupta %39,68 sadece PEMF maruziyeti olan grupta ise %8,46'dır. Öte yandan RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruziyet erken apoptozu %44,08 TMZ muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruziyet ise erken apoptozu %13,71 arttırmıştır (Şekil 4.19b). Bu değer RES muamelesi olan grupta %29,52 iken TMZ olan grupta %11,24 sadece PEMF maruziyeti olan grupta ise %6,81'dir.



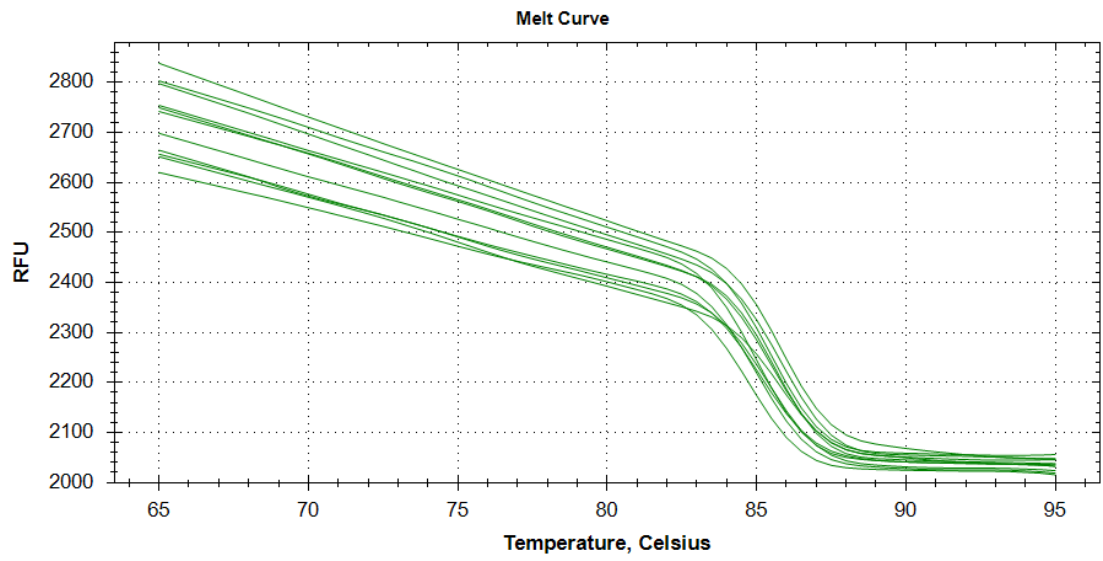
Şekil 4.19. Deney gruplarının (a) Annexin V+ hücre yüzdesi gösterimi, (b) erken/geç apoptotik ve nekrotik etkisi. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. *** $p < 0.001$ 'de NT grubuna göre istatistiksel farkı işaret etmektedir

4.3 PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz ve P13K/AKT/mTOR Yolağında Rol Alan Kilit Genlerin Ekspresyonlarının qRT-PCR Tekniği ile Değerlendirilmesi

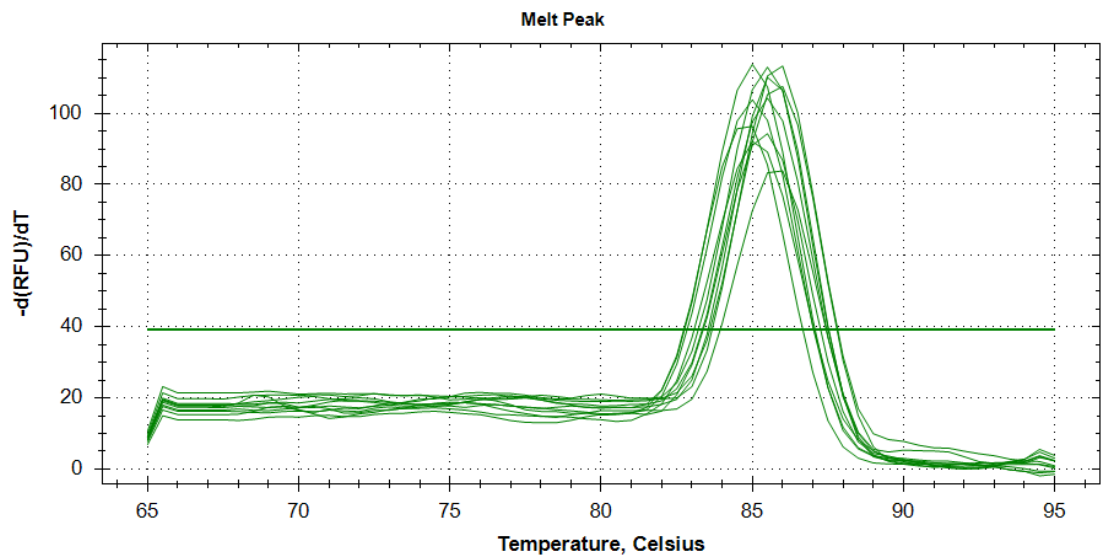
PEMF maruziyeti olmayan insan glioblastoma U87-MG hücreleri sitotoksikite çalışmaları neticesinde elde edilen IC50 konsantrasyonlarında RES (33.64 µg/mL) ve TMZ (63.27 µg/mL) ile muamele edilmiştir. Uzun süreli PEMF'ye maruz bırakılan hücreler ise edilen IC50 konsantrasyonlarında RES (10.53 µg/mL) ve TMZ (31.83 µg/mL) ile muamele edilip 6 saat PEMF'ye maruz bırakılmıştır. Proapoptoz ve P13K/AKT/ mTOR yolağında yer alan kaspaz-9, kaspaz-3, bax/Bcl-2, TP53, P13K, AKT, mTOR genlerinin seviyelerinin belirlenmesi qRT-PCR işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Bağlı mRNA ekspresyonunda referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test ile analiz edilmiştir. qRT-PCR'da optimizasyon çalışmalarında bağli mRNA ekspresyonu, U87-MG hücre hatlarının cDNA'sının 1X, 5X, 25X, 125X, 625X ve 3125X dilüsyonları ile standart eğri üretilerek hesaplanmıştır. Erime eğrisi grafiği amplifikasyonları kontrol etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon sırasında istenildiği gibi tek bir pik gözlemlenmiş ve herhangi bir farklı primer dimer oluşumu görülmemiştir.



Şekil 4.20. U87-MG hücresi için reaksiyon döngüsündeki amplifikasyon eğri grafiği



Şekil 4.21. U87-MG hücresi için sıcaklık oluşumuna karşı emisyon erimesinin olduğu erime eğrisi piki



Şekil 4.22. U87-MG hücresi için sıcaklık oluşumuna karşı emisyon erimesinin olduğu erime eğrisi piki

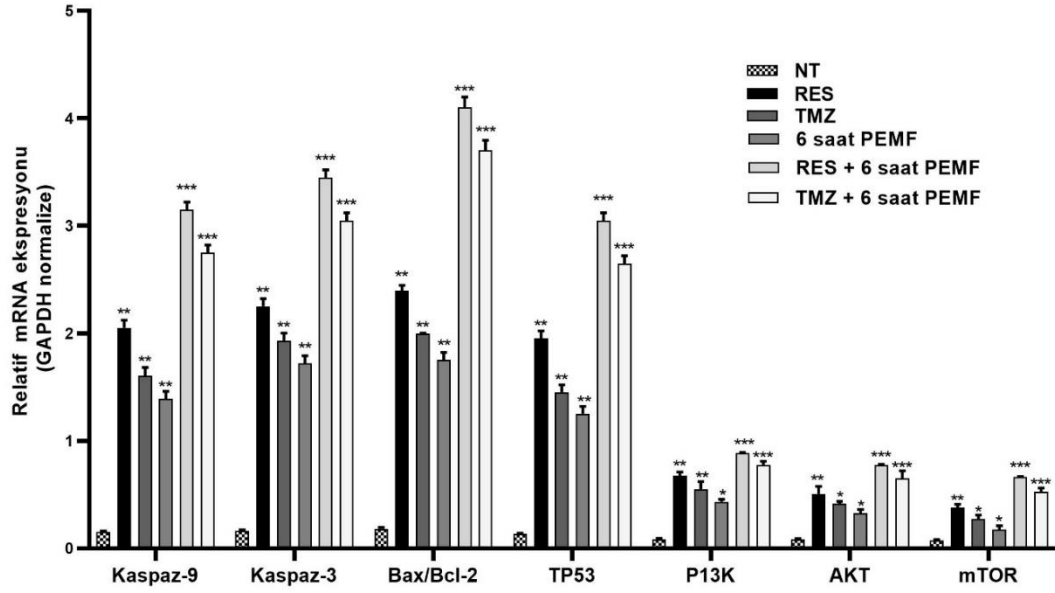
Şekil 4.23’de görüldüğü üzere apoptozun intrinsik (mitokondriyal) yolunun erken aşamasında görev alan kaspaz-9 ve apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarında önemli rol oynayan kaspaz-3’ün mRNA seviyeleri RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan grupta NT grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir ($***p<0.001$, sırsıyla). Bu grupta PEMF maruziyeti olmayan sadece RES ile muamele edilen gruba göre kaspaz-9 ve kaspaz-3 gen ekspresyonları yaklaşık 1.5-kat artmıştır. TMZ muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan grupta ise NT grubuna kıyasla kaspaz-9 ve kaspaz-3 gen ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($***p<0.001$, sırsıyla) (Şekil 4.13). Bu grupta PEMF maruziyeti olmayan sadece TMZ ile muamele edilen gruba göre kaspaz-9 ve kaspaz-3 gen ekspresyonları sırasıyla yaklaşık 1.7-kat ve 1.5-kat artmıştır. Bu genlerin ekspresyonları TMZ muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan grupta RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan gruba göre yaklaşık 1.5-kat daha azdır.

RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan grupta proapoptotik bir gen olan Bax’ın/antiapoptotik bir gen olan Bcl-2’ye oranı, NT grubuna kıyasla en yüksek düzeyde gözlemlenmiştir ($***p<0.001$) ve bu artış sadece RES ile muamele edilen gruba göre 1.71-kat daha fazladır (Şekil 4.13). Bu durum TMZ muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan grupta da gözlenmiş olup ($***p<0.001$) Bax/Bcl-2 oranı RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan gruptan yaklaşık 1.3-kat daha az, sadece TMZ muamelesi olan gruptan yaklaşık 2-kat daha fazladır.

NT grubuna kıyasla RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan grupta gözlenen önemli derecede artmış TP53 mRNA ekspresyonu ($***p<0.001$) apoptozun varlığını göstermektedir. Bu artış sadece RES ile muamele edilen gruba göre 1.56-kat daha fazladır. TMZ muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan grupta da NT grubuna göre TP53 gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($***p<0.001$). Bu grupta PEMF maruziyeti olmayan sadece TMZ ile muamele edilen gruba göre TP53 gen ekspresyonu yaklaşık 2-kat artmıştır. TP53 gen ekspresyonu TMZ muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan grupta RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan gruba göre yaklaşık 1.2-kat daha azdır.

P13K/AKT/mTOR yolağındaki genlerin ekspresyon düzeylerine bakıldığında RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan grupta NT grubuna kıyasla P13K, AKT, mTOR gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($***p<0.001$, sırsıyla) olduğu gözlemlenmiştir. Fakat bu artış apoptoz mekanizmasında kilit rol oynayan genlerin ekspresyon düzeylerinden yaklaşık 4-kat daha azdır. TMZ muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan grupta da NT grubuna kıyasla P13K, AKT, mTOR gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek ($***p<0.001$, sırsıyla) olduğu saptanmış olup RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF’ye maruz bırakılan gruba göre yaklaşık 1-kat daha az olup apoptoz

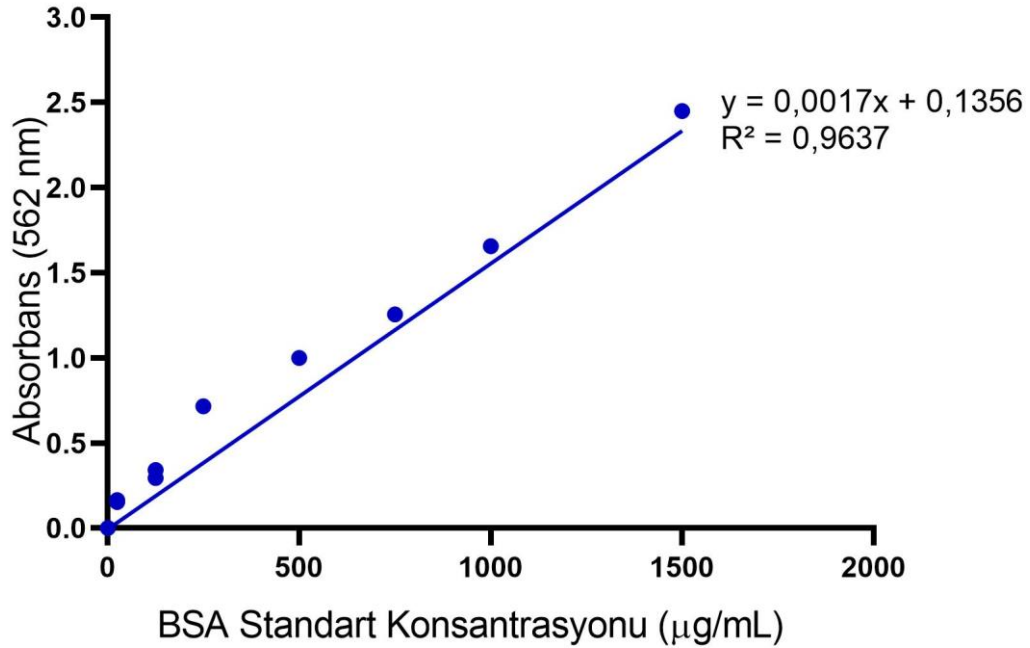
mekanizmasında kilit rol oynayan genlerin ekspresyon düzeylerinden yaklaşık 5.2-kat daha azdır.



Şekil 4.23. U87-MG hücre gruplarında kaspaz-9, kaspaz-3, bax/Bcl-2, TP53, P13K, AKT, mTOR genlerinin mRNA seviyelerinin GAPDH internal standard kontrole göre relatif ekspresyonları. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmekte

4.4. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz Yolağında Rol Alan Kilit Proteinlerin Ekspresyonlarının Western-Blot Tekniği ile Değerlendirilmesi

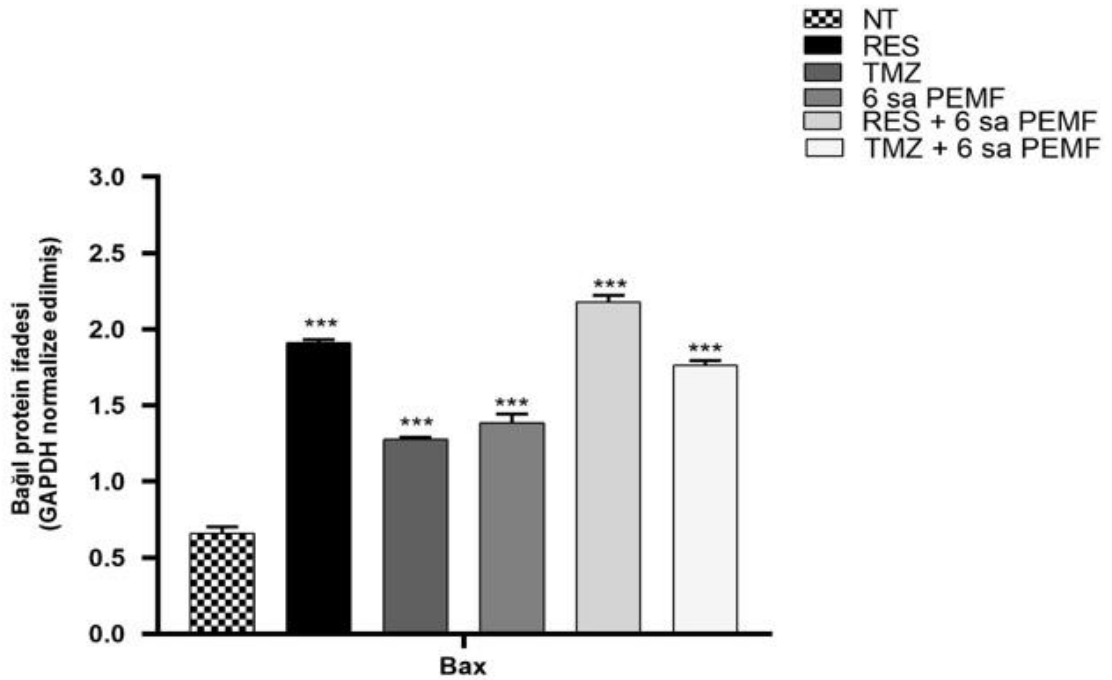
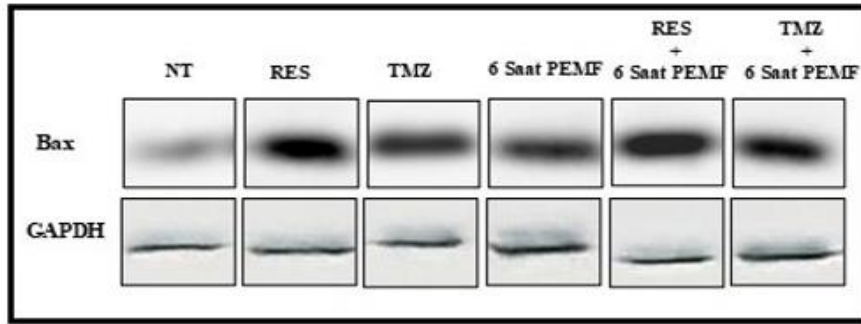
Protein izolasyonu yapılan hücre süspansiyonları -80°C 'den alınıp buza gömülmüştür. Elde edilen süspansiyonların protein miktarı BSA Standartı kullanılarak Bisinkoninik asit (BCA) yöntemine göre yapılmıştır (Smith ve ark., 1985). Protein ölçüm kiti olan Working Reagent (WR) solüsyonu 50:1 oranında hazırlanarak, ELISA plakası (96 wp) cihaza yerleştirilmiştir. Ardından DEPC-treated Water ile seyreltilen örnekler eklenmiştir. Örneklerin boyayla reaksiyona girmesi için, 37°C 'lik yarım saat inkübasyondan sonra 562 nm'de ölçüm yapılmıştır. Standart olarak 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 ve 0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır (Şekil 4.14). Örnekler ve standart tekrarlı olarak ölçülmüştür. Optik yoğunluk (OD) değerleri kullanılarak BSA sonuçları ile standart grafiği oluşturularak, eğim formülü Microsoft Excel yazılımından hesaplanmış olup, GraphPad Prism 8 yazılımı ile grafik elde edilmiştir.



Şekil 4.24. Bisinkoninik asit (BCA) testi standart eğrisi. Mavi noktalı çizgi, trend çizgisine sağlam bir uyum göstermiştir. Sığır serum albümini= BSA

4.4.1. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz Yolağında Rol Alan BAX Proteinlerin Ekspresyonlarının Western-Blot Tekniği ile Değerlendirilmesi

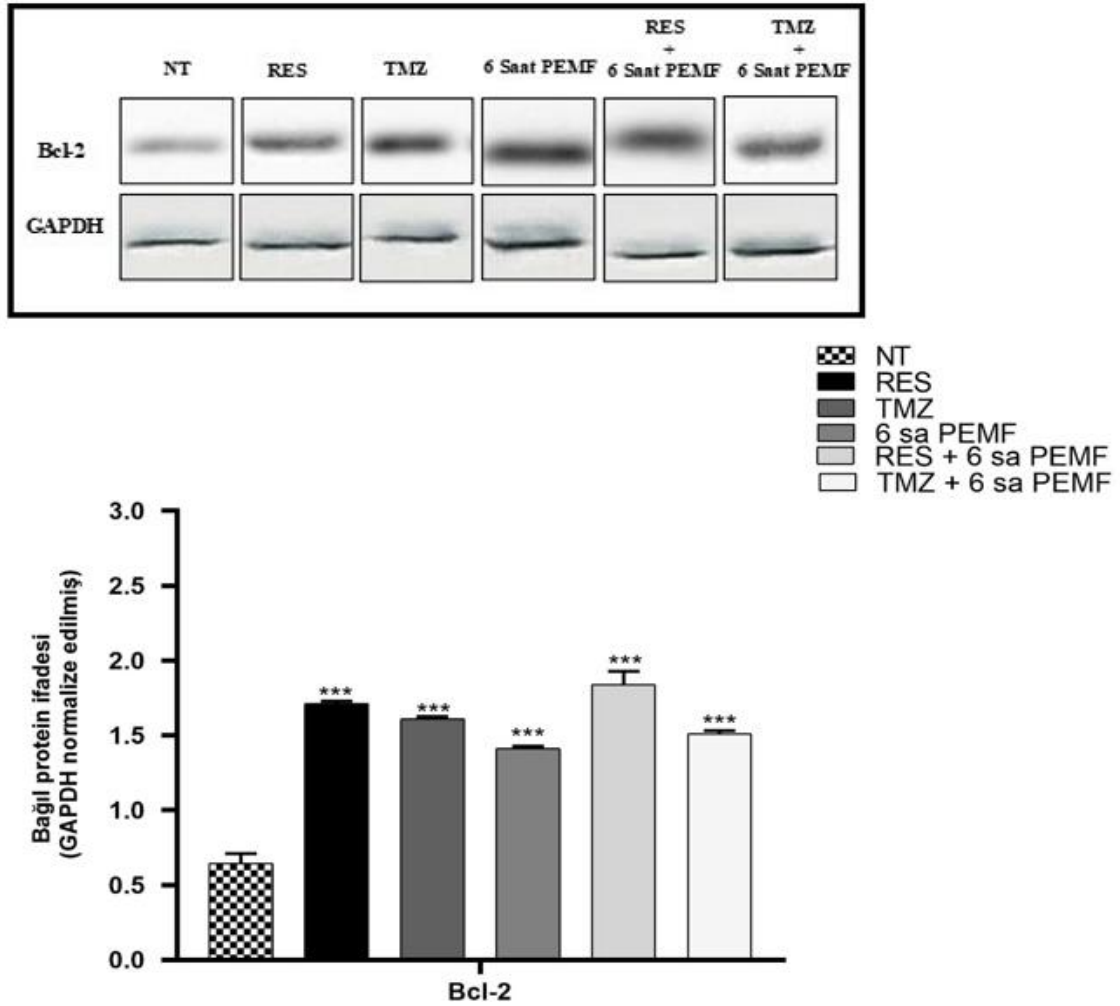
Hücre gruplarında proapoptotik yolak yer alan bax protein seviyelerinin analizleri Western Blot yöntemi kullanılarak yapılmış olup GAPDH referans olarak kullanılmıştır. Elde edilen kantitatif immunoblot analiz sonuçları tek-yönlü varyans analizi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan bax proteinlerin ekspresyonları RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruz bırakılan grupta NT grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (***) $p < 0.001$, sırasıyla). Günümüzde aktif olarak etken ilaç maddesi olarak kullanılan TMZ yi RES ile kıyaslandığında, RES in istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.25. U87-MG hücresinin apoptoz yolağında yer alan apoptotik Bax proteininin ekspresyonundaki bant ve değişim grafiği. GAPDH internal standard kontrole göre relatif ekspresyonları. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmekte .t-test analizlerine göre $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P < 0.0001$, *; $P < 0.05$)

4.4.2. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz Yolağında Rol Alan Bcl-2 Proteinlerin Ekspresyonlarının Western-Blot Tekniği ile Değerlendirilmesi

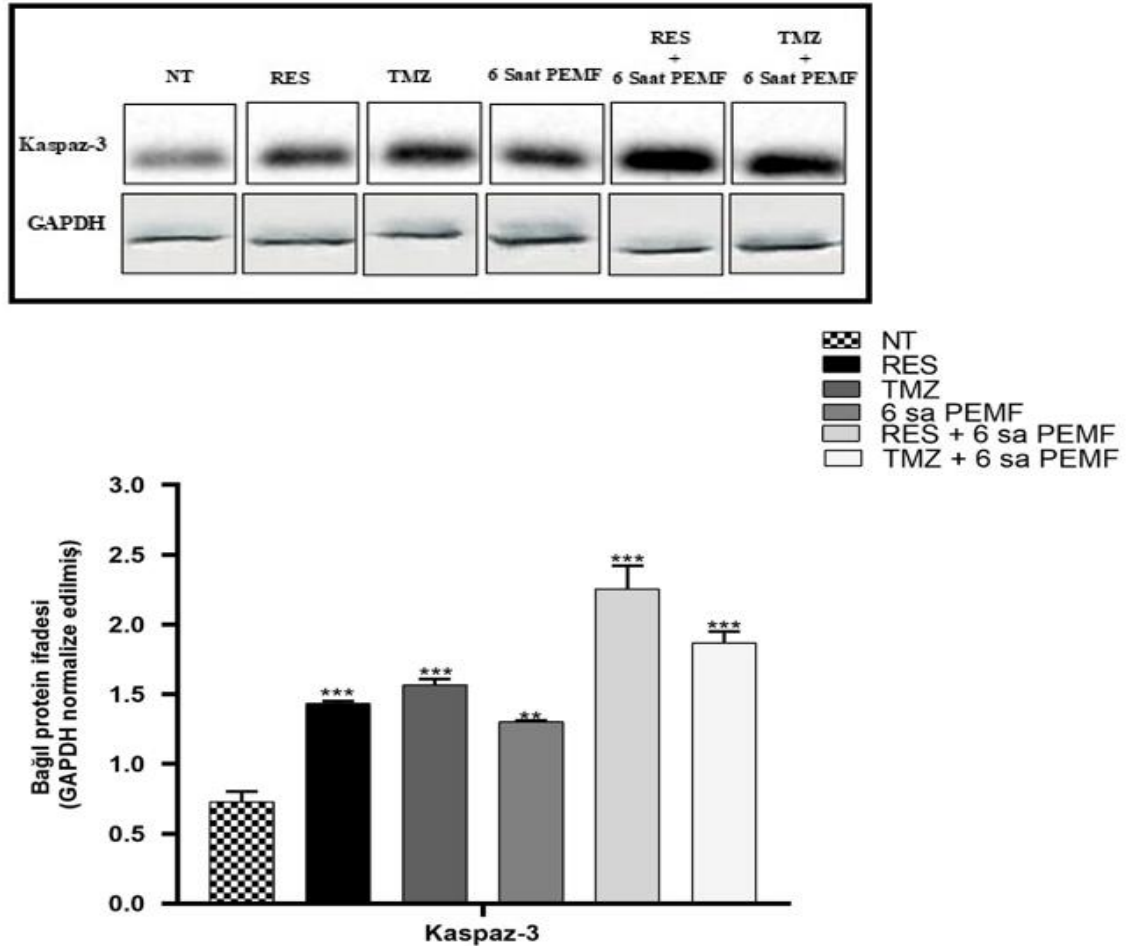
Hücre gruplarında proapoptotik yolak yer alan Bcl-2 protein seviyelerinin analizleri Western Blot yöntemi kullanılarak yapılmış olup GAPDH referans olarak kullanılmıştır. Elde edilen kantitatif immunoblot analiz sonuçları tek-yönlü varyans analizi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan bax proteinlerin ekspresyonları RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruz bırakılan grupta NT grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (**p<0.001, sırasıyla). Günümüzde aktif olarak etken ilaç maddesi olarak kullanılan TMZ yi RES ile kıyaslandığında, RES in istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.26. U87-MG hücresinin apoptoz yolağında yer alan apoptotik Bcl-2 proteininin ekspresyonundaki bant ve değişim grafiği. GAPDH internal standard kontrole göre relatif ekspresyonları. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmekte . t-test analizlerine göre P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir. ***; P<0.0001, *; P<0.05)

4.4.3. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz Yolağında Rol Alan Kaspaz-3 Proteinlerinin Ekspresyonlarının Western-Blot Tekniği ile Değerlendirilmesi

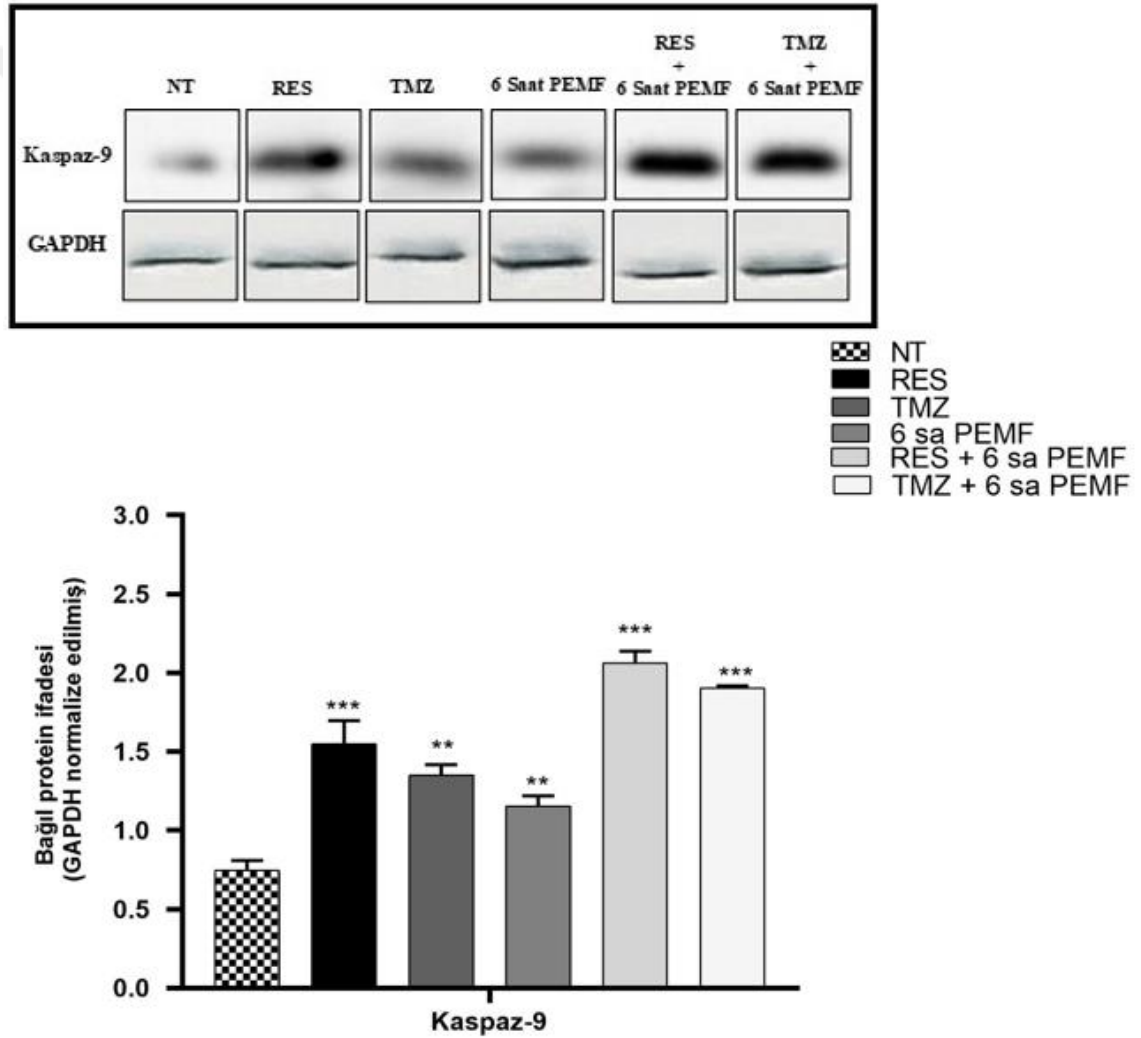
Hücre gruplarında proapoptotik yolak yer alan Kaspaz-3 protein seviyelerinin analizleri Western Blot yöntemi kullanılarak yapılmış olup GAPDH referans olarak kullanılmıştır. Elde edilen kantitatif immunoblot analiz sonuçları tek-yönlü varyans analizi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan bax proteinlerinin ekspresyonları RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruz bırakılan grupta NT grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (**p<0.001, sırasıyla). Günümüzde aktif olarak etken ilaç maddesi olarak kullanılan TMZ yi RES ile kıyaslandığında, TMZ nin istatistiksel olarak anlamlı derede yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Fakat RES ve TMZ ayrı ayrı PEMF ile kombine olarak uygulandığında RES in etkinliğinin TMZ ye kıyasla arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.27. U87-MG hücresinin apoptoz yolağında yer alan apoptotik Kaspaz-3 proteininin ekspresyonundaki bant ve değişim grafiği. GAPDH internal standard kontrole göre relatif ekspresyonları. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmekte . t-test analizlerine göre P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir. ***; P<0.0001, *; P<0.05)

4.4.4. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz Yolağında Rol Alan Kaspaz-9 Proteinlerin Ekspresyonlarının Western-Blot Tekniği ile Değerlendirilmesi

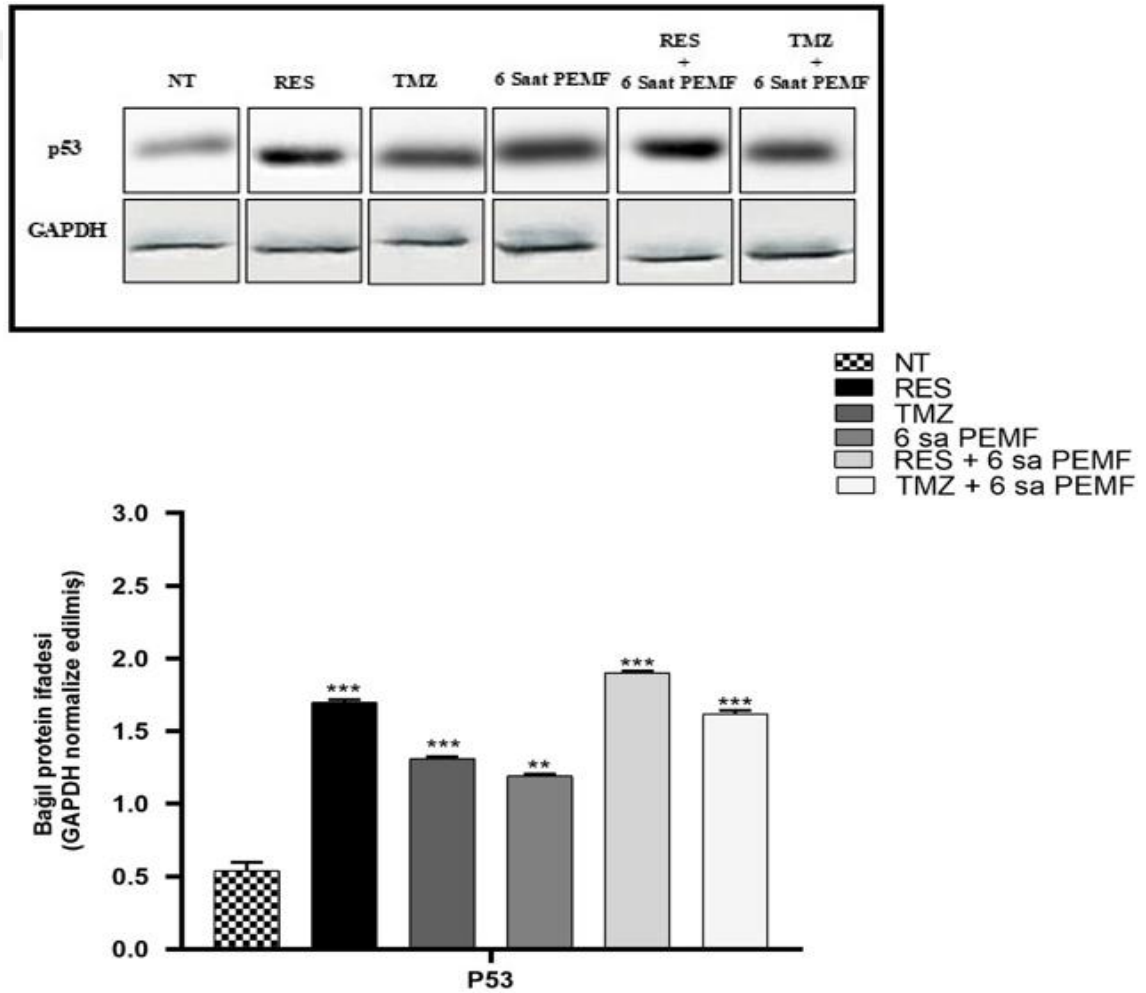
Hücre gruplarında proapoptotik yolak yer alan Kaspaz-9 protein seviyelerinin analizleri Western Blot yöntemi kullanılarak yapılmış olup GAPDH referans olarak kullanılmıştır. Elde edilen kantitatif immunoblot analiz sonuçları tek-yönlü varyans analizi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan bax proteinlerin ekspresyonları RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruz bırakılan grupta NT grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (** $p < 0.001$, sırasıyla). Günümüzde aktif olarak etken ilaç maddesi olarak kullanılan TMZ yi RES ile kıyaslandığında, RES in istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek



Şekil 4.28. U87-MG hücresinin apoptoz yolağında yer alan apoptotik Kaspaz-9 proteininin ekspresyonundaki bant ve değişim grafiği. GAPDH internal standard kontrole göre relatif ekspresyonları. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmekte . t-test analizlerine göre $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P < 0.0001$, *; $P < 0.05$)

4.4.5. PEMF Maruziyeti Olmayan ve Uzun Süreli PEMF Maruziyetine Bırakılan İnsan Glioblastoma U87-MG Hücre Hattında RES ve TMZ Muamelesinin Apoptoz Yolağında Rol Alan p53 Proteinlerin Ekspresyonlarının Western-Blot Tekniği ile Değerlendirilmesi

Hücre gruplarında proapoptotik yolak yer alan p53 protein seviyelerinin analizleri Western Blot yöntemi kullanılarak yapılmış olup GAPDH referans olarak kullanılmıştır. Elde edilen kantitatif immunoblot analiz sonuçları tek-yönlü varyans analizi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan bax proteinlerin ekspresyonları RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruz bırakılan grupta NT grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (***) $p < 0.001$, sırasıyla). Günümüzde aktif olarak etken ilaç maddesi olarak kullanılan TMZ yi RES ile kıyaslandığında, RES in istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.29. U87-MG hücresinin apoptoz yolağında yer alan apoptotik Kaspaz-9 proteininin ekspresyonundaki bant ve değişim grafiği. GAPDH internal standard kontrole göre relatif ekspresyonları. Grafikler ortalama $\pm$ SD'yi göstermekte olup en az 3 bağımsız deneyi temsil etmekte. t-test analizlerine göre $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P < 0.0001$, *; $P < 0.05$)

Elde edilen tüm sonuçlara göre çalışılan tüm proteinlerin ekspresyonları RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruz bırakılan grupta NT grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (**p<0.001, sırasıyla) (Şekil 4.15). Bu grupta PEMF maruziyeti olmayan sadece RES ile muamele edilen gruba göre kaspaz-9, kaspaz-3, Bax, BcL-2, P53, protein ekspresyonları sırasıyla yaklaşık 1.4-kat, 1.6-kat, 1.2-kat, 1.1-kat, 1.1-kat artmıştır. Kaspaz-9, kaspaz-3, Bax, BcL-2, P53 protein ekspresyon düzeyleri TMZ muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruz bırakılan grupta NT grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (**p<0.001, sırasıyla) (Şekil 4.15). Bu grupta PEMF maruziyeti olmayan sadece TMZ ile muamele edilen gruba göre kaspaz-9, kaspaz-3, Bax, P53, protein ekspresyonları sırasıyla yaklaşık 1.5-kat, 1.2-kat, 1.5-kat, 1.2-kat artmıştır. BcL-2 protein ekspresyonu ise 1-kat azalmıştır. Tüm proteinlerin ekspresyonları TMZ muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruz bırakılan grupta RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruz bırakılan gruba göre yaklaşık 1.2-kat daha azdır.

5. TARTIŞMA

Elektromanyetik alan (EMF), elektrik ve manyetik alanların birlikte oluşturduğu bir kuvvet olup, elektrik alan sabit yüklerle, manyetik alan ise hareketli yükler veya akımlar ile oluşmaktadır. Günümüzde yaşam kalitesini artırmak amacıyla birçok alanda kullanılmakta olan elektromanyetik alanlar, sağlık alanında da kırık tedavisinden beyin tümörlerine kadar geniş bir yelpazede teşhis ve tedavi amaçlı olarak uygulanmaktadır. Ancak bu alandaki etkinin faydalı olabilmesi için kullanılan elektromanyetik alanın frekansı oldukça önemlidir. Yüksek frekanslı elektromanyetik alanların canlı organizmalar üzerinde zararlı etkileri bulunurken, düşük frekanslı Darbeli Manyetik Alanlar (PEMF), iyonlaştırıcı olmamaları nedeniyle terapötik uygulamalarda daha güvenli ve etkili kabul edilmektedir. PEMF, cilt hastalıkları, kırıklar, doku yaralanmaları, romatolojik rahatsızlıklar, kas hastalıkları, Parkinson ve beyin tümörleri gibi hastalıkların tedavisinde hem alternatif hem de kombine tedavi olarak kullanılmakta ve tedavi sürecini kısaltma potansiyeli taşımaktadır.

Glioblastoma multiforme (GBM), yetişkinlerde en yaygın malign astrositik primer beyin tümörüdür ve tedavisinde oral alkilleyici ajan olan Temozolomid (TMZ) standart kemoterapi olarak kullanılmaktadır (Ellis vd., 2015; Kiskova vd., 2020). GBM'nin tedavisinde önemli mekanizmalardan biri olan apoptoz; PI3K/AKT/mTOR, TNFR1/TNF- α ve proapoptotik yollar gibi hücre içi sinyal yolları tarafından düzenlenmektedir. Bu noktada, stilben yapılı doğal bir polifenol olan RES, antioksidan, antiproliferatif ve antiinflamatuvar özellikleriyle dikkat çekmektedir (Ko vd., 2017; Göçmez vd., 2014; de Sá Coutinho vd., 2018). RES, hücre büyümesini ve bölünmesini, inflamasyonu, apoptoz, metastazı ve anjiyogenezi kontrol eden çeşitli sinyal iletim yollarını etkileyerek başlangıç (inisiyasyon), promosyon (gelişme) ve progresyon (ilerleme) olmak üzere çeşitli kanser safhalarını etkiler (Ko vd., 2017; Kiskova vd., 2020). Beyin kanser hücreleri üzerine yapılan hücre kültürü çalışmaları, farklı frekans ve dalga boyuna sahip PEMF'nin belirli zaman aralıklarıyla uygulanmasının apoptoz ve apoptoza bağlı genlerin seviyelerinde değişikliğe neden olduğunu göstermiştir (Akbarnejad vd., 2017; Amiri vd., 2018; Kaszuba vd., 2018). Fakat literatürde, yetişkinlerde en yaygın agresif astrositik (astrocyte-like) primer beyin tümörü olan glioblastoma multiforme (GBM) insan hücre hattında PEMF maruziyetinin RES ile birlikte proapoptotik ve PI3K/AKT/mTOR hücre içi sinyal yollarında olası etkilerinin incelendiği çalışmalar yok denecek kadar azdır.

Bu nedenle çalışmada RES ile muamele edilen insan glioblastoma hücre hattını PEMF'ye maruz bırakarak, RES-PEMF kombinasyonunun hücre canlılığına, hücreleri hangi yolla apoptoza sürüklediğine ve glioblastomada apoptotik yolağın proapoptotik ve PI3K/AKT/mTOR yollarında kilit rol oynayan moleküllerin (kaspaz-3, kaspaz-9, Bcl-2, bax, p53, TP53, PI3K, AKT, mTOR) ekspresyonu üzerine etkilerini farklı moleküler tekniklerle incelemek amaçlanmıştır. Elde edilen bilimsel verilerin mevcut tedavi yöntemleriyle karşılaştırma imkanı sağlaması amacıyla çalışma gruplarına glioblastoma tedavisinde konvansiyonel olarak kullanılan bir ilaç olan TMZ pozitif kontrol olarak dahil edilmiştir.

Sonuçlar topluca değerlendirildiğinde insan glioblastoma hücre hattında RES'in TMZ'ye göre daha fazla sitotoksik etki gösterdiği, PEMF ile birlikte uygulandığında ise bu etkinliğin daha da arttığı saptanmıştır. İnsan astroglial sağlıklı hücre hattında ise TMZ'nin RES'e göre daha fazla sitotoksik etki gösterdiği fakat PEMF ile birlikte uygulandığında bu etkinin PEMF olmayan gruba göre daha az olduğu belirlenmiştir. TMZ glioblastoma tedavisinde kullanılan alkile edici bir ajan olup alkile edici ajanlar, kendilerinin daha fazla kopyasını yapmalarını engellemek için kanser hücrelerinin DNA'sına zarar veren ilaçlardır. Vücudunuzdaki kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlatarak veya durdurarak çalışırlar, hızla emilirler ve kan-beyin bariyerini geçerler. Sağlıklı hücre hattı üstünde gözlemlenen yüksek sitotoksik etkinin nedeni kanserli hücreler kadar hızlı bölünmeyen sağlıklı hücrelerin de bu ilaçtan etkilenmesinden kaynaklanabilir. Ayrıca, TMZ sağlıklı hücrelerde DNA hasarına neden olarak hücrelerin normal işlevlerini etkileyebilir. Ancak, glioblastoma hücreleri bu tür DNA hasarına karşı bazı onarım mekanizmaları geliştirebilir. RES ise bu hücrelerin genetik ve metabolik yollarını farklı şekillerde etkileyebilir ve daha etkili olabilir.

Tez çalışmasının elde edilen verilere göre genel değerlendirme yapıldığında RES muamelesinin ardından uzun süre (6 saat) 75 Hz, 1 mT PEMF'ye maruz bırakılan U87-MG insan glioblastoma hücre hattında sitotoksik etkinin diğer deneysel gruplara göre anlamlı derecede yüksektir. Buna göre RES ile birlikte PEMF maruziyetinin maruziyet süresine bağlı olarak U87-MG insan glioblastoma hücre hattının üzerinde hücre canlılığını azaltıcı olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte günümüze kullanılan ilaç etken maddesi olarak kullanılan TMZ nin PEMF ile kombine olarak uygulandığında daha fazla etkilediği gözlemlenmiştir.

Literatürde bu bulguları destekler nitelikte bazı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Akbarnejad vd. (2017) çalışmasında, U87 ve T98G glioblastoma hücrelerine TMZ (100 μ M) uygulamasının ardından 100 Hz (100 G) ELF-PEMF'ye 144 saatlik maruziyetin, hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Dehghani-Soltani vd. 2021 yılında gerçekleştirdiği çalışmada, T98 ve A172 glioblastoma hücre hatları 50 Hz frekansında ve 1 mT şiddetindeki düşük frekanslı elektromanyetik alana maruz bırakılmış ve bu koşullarda TMZ ile kombine tedavi uygulanmıştır. Çalışmanın bulguları, TMZ ve EMF'nin birlikte uygulanmasının tek başına TMZ ya da kontrol grubuna kıyasla hücre ölümünü anlamlı derecede artırdığını ortaya koymuştur. Chen vd. (2022) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada, farklı PEMF parametrelerinin farklı kanser hücre hatları üzerinde farklı etkiler yarattığı, kemoterapi ilaçları ile kombinasyonun hücre canlılığını daha fazla azalttığı gösterilmiştir. İki farklı PEMF (PEMF 1 (0,68 mT genliğe ve 3,846 kHz darbeli frekans) ve PEMF2 (1,19 mT genliğe ve 40,85 kHz darbe frekans)) aralığı kullanmışlardır. PEMF1 değerlerine göre A549 hücre hattının hücre canlılıklarının 4 ila 24 saat PEMF'ye maruziyetinden sonra azalma gözlemlenmiştir. Hücreler kemoterapi ilaçlarıyla birlikte PEMF'ye maruz bırakıldığında canlılıkları önemli ölçüde azaldı ve en güçlü etki, PEMF ayarlarından bağımsız olarak 4 saatte bile 50 μ M pemetreksed ile tedavi edilen MCF 7 hücrelerinde gözlemlenmiştir. PEMF2'nin PEMF1 göre her iki hücre hattı için de daha iyi olduğunu gözlemlenmiştir. Yaptığımız çalışmada sadece PEMF ye maruz kalan hücrelerin kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında azalma gözlemlenmesiyle literatürdeki Chen vd. (2022) yapmış oldukları çalışma ile desteklenmiştir.

Çalışmada hücre canlılığını azalması apoptozis indüksiyonunu meydana gelmesiyle mi oluştuğunu inceleyebilmek için hücrelerin hangi yolla ölüme sürüklendiği (apoptoz/nekroz) akış sitometri tekniği ile incelenmiş ve RES ile muamelesinin ardından uzun süre (6 saat) 75 Hz, 1 mT PEMF'ye maruz bırakılan U87-MG glioblastoma hücre hattında hücrelerin diğer gruplara kıyasla daha fazla erken apoptoza uğrayarak apoptoza sürüklendiği gözlemlenmiştir. RES ve TMZ muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruz bırakılması kanserli hücreleri önemli ölçüde apoptoza sürüklemiştir. U87-MG hücre hattında RES muamelesinin ardından 6 saat PEMF'ye maruziyet hiçbir muamele olmayan (non-treated, NT) hücre hattına göre hücreleri 65.08-kat daha fazla geç apoptoza uğratarak apoptoza sürüklemiştir. Bu değer sadece RES muamelesi olan grupta NT gruba göre 39.27-kattır. Buna göre RES muamelesi ile birlikte 6 saat PEMF maruziyetinin U87-MG insan glioblastoma hücre hattında hücreleri daha fazla apoptoza sürükleyici etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonuçları farklı frekans ve dalga boyuna sahip PEMF'nin belirli zaman aralıklarıyla farklı (U-87, T98G, U-138 gibi) glioblastoma hücre hatlarına direkt ya da kemoterapötik ilaçlarla birlikte uygulanmasının hücre canlılığını değiştirdiği, kanserli hücre proliferasyonunu engellereyerek apoptozu indüklediği, apoptoz ve apoptoza bağlı genlerin seviyelerinde değişikliğe neden olduğunu raporlayan çalışmaların sonuçları ile uyumludur (Akbarnejad vd., 2017; Amiri vd., 2018; Kaszuba vd., 2018). Örneğin, insan U87, T98G, H4 GBM hücre hatlarının farklı frekans ve yoğunluktaki (100 Hz, 10 mT; 10 Hz, 5 mT veya 7 Hz, 30 mT) ELF-PEMF'ye farklı sürelerde (12, 24 ve 48 saat) direkt veya TMZ, karboplatin gibi kemoterapide kullanılan ilaçlarla kombine şekilde maruz bırakılmasının, kaspaz-3, bax, ve P53 proteinlerinin aşırı ekspresyonuna, Bcl-2 ve cyclin-D1'in ekspresyonunun azalmasına, hücre farklılaşmasına, hücredeki canlılık değişikliklerine, apoptozun indüklenmesine ve ayrıca apoptoza bağlı morfolojik değişikliklere neden olduğu farklı teknikler kullanılarak gösterilmiştir (Amiri vd. 2018; Akbarnejad vd. 2017; Kaszuba vd., 2018; Akbarnejad vd. 2017). Yine, Kaszuba-Zwońska Jolanta'nın (2018) araştırmasında, H4 glioma hücre hattında 4 saat, 7 Hz ve 30 mT'lik PEMF maruziyeti ile apoptozun tetiklendiği ve hücre canlılığının azaldığı rapor edilmiştir. Pasi vd. (2016) ise T98G hücre hattında 75 Hz (2 mT) PEMF'yi TMZ ile birlikte uygulayarak, miRNA düzeyinde epigenetik düzeyde proapoptotik yanıt elde etmişlerdir.

Huang vd. (2022) yılında yapmış oldukları çalışmada, PEMF uygulamasının U87-MG glioblastoma hücre hattı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular, PEMF'nin hücre canlılığını azaltma, apoptozu tetikleme, gen ekspresyonunu düzenleme ve oksidatif stresi azaltma konusundaki potansiyelini ortaya koymaktadır. Çalışmanın sonuçları, PEMF'nin glioblastoma hücrelerinde terapötik etkiler yaratabileceğini ve kanser tedavisinde kullanılabilecek etkili bir yardımcı tedavi aracı olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, apoptoz mekanizmalarındaki değişiklikler, hücre ölümünü yönlendiren önemli bir faktör olarak PEMF'nin etkinliğini desteklemektedir. Apoptoz ile ilgili yapılan incelemeler, Bax ve Bcl-2 gen ekspresyonundaki değişiklikleri ortaya koymuştur. PEMF uygulamasının ardından Bax ekspresyonu artarken, anti-apoptotik gen olan Bcl-2 ekspresyonu ise azalmıştır. Bu değişiklikler, PEMF'nin apoptotik yolları aktive ederek kanser hücrelerini öldürebileceğini göstermektedir. Ayrıca, kaspaz-3 aktivitesindeki artış, hücre ölümünü tetikleyen sinyal yollarının etkinleştiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, PEMF'nin glioblastoma hücrelerinde apoptozu tetikleyerek tedaviye katkı sağlama potansiyelini vurgulamaktadır.

Çalışmaların devamında apoptoz sürecindeki genlerin mRNA seviyesinde incelemek için qRT-PCR tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte apoptoz sürecinde yer alan spesifik genler olarak Bax, Bcl-2, kaspaz-3, kaspaz-9, mTOR, AKT, P13K, TP53 kullanılmıştır. RES- PEMF (uzun süre (6 saat) 75 Hz, 1 mT) kombinasyonunun U87-MG glioblastoma hücre hattındaki apoptoz mekanizmasında rol alan spesifik moleküllerden Bax/Bcl-2, kaspaz-3, kaspaz-9, TP53, P13K/AKT/mTOR genlerinin ekspresyonlarına arttırıcı etkisi gözlemlenirken, P13K/AKT/mTOR genlerinin ekspresyonları diğer genlere kıyasla 4-kat daha azdır.

Literatürde kaspaz -3 ve TP53 gen ekspresyonunun PEMF bağlı artışı Vincenzi vd. (2012) yapmış oldukları çalışmada gözlemlenmiştir. Bu çalışmada PEMF'nin U87MG hücrelerinde A3 adenosin reseptörleri aracılığıyla p53 ve kaspaz-3 ekspresyonunu artırarak apoptozu indüklediği rapor edilmiştir. Bu mekanizma, PEMF'nin kanser tedavisinde tamamlayıcı bir ajan olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Vincenzi vd. (2012) çalışmasında, 50 Hz ve intensitesi 70 G PEMF maruziyetinin, A3 adenosin reseptörlerinin anti-tümör etkilerini nasıl güçlendirdiği detaylı bir şekilde incelenmiştir. Çalışma, PC12 sıçan adrenal feokromositoma hücre hattı ve U87MG insan glioblastoma hücre hattı üzerinde yapılmış olup, PEMF maruziyetinin, bu hücrelerdeki A3AR ve A2A adenosin reseptörlerinin mRNA düzeylerini artırdığı gözlemlenmiştir. Bu artış, adenilat siklaz aktivitesinin ve cAMP üretiminin güçlenmesine neden olmuştur. PEMF maruziyetinin, A3AR aktivasyonu aracılığıyla hücredeki önemli genlerin ekspresyonunu değiştirdiği bulunmuştur. Özellikle, A3AR reseptörlerinin aktivasyonu, NF-κB seviyelerinin azalmasına ve p53, kaspaz-3 gen ekspresyonunun artmasına yol açmıştır. Bu bulgular, PEMF'nin, kanser hücrelerinde apoptoz ve hücre ölüm mekanizmalarını modüle ederek tedaviye katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Akbarnejad vd. (2017) çalışmasında, U87 ve T98G glioblastoma hücrelerine TMZ (100 µM) uygulamasının ardından 100 Hz (100 G) ELF-PEMF'ye 144 saatlik maruziyetin, hücre canlılığını azalttığı ve p53, bax, kaspaz-3 gibi proapoptotik genlerin ekspresyonunu artırdığı, buna karşılık Bcl-2 ve cyclin-D1 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Pasi ve ark. (2016) ise T98G hücre hattında 75 Hz (2 mT) PEMF'yi TMZ ile uygulayarak, miRNA düzeyinde epigenetik düzeyde proapoptotik yanıt elde etmişlerdir.

Dehghani-Soltani vd. (2021) yılında gerçekleştirdiği çalışmada, hücre canlılığının azalmasıyla birlikte hücrelerin göç potansiyelini azalttığı, buna ek olarak p53 gen ekspresyonunu belirgin şekilde artırdığı ve hücre proliferasyonu ile ilişkili olan siklin-D1 (cyclin-D1) protein ekspresyonunun ise aşağı regülasyona uğradığı gözlemlenmiştir. Bu veriler, TMZ'nin kemoterapötik etkisinin EMF uygulamasıyla güçlendirilebileceğini ve özellikle TMZ'ye direnç geliştirme potansiyeli taşıyan T98 hücrelerinde bile bu kombinasyonun proapoptotik yanıtları tetikleyebileceğini göstermektedir. Bu bulgular, EMF'nin kanser tedavisinde destekleyici bir araç olarak kullanılabileceğine ve TMZ gibi kemoterapötik ajanların etkinliğini artırabileceğine işaret etmektedir. Bu sonuçlar aynı zamanda Eskandary vd (2024) yapmış oldukları çalışma ile de desteklenmektedir. Bu çalışmada da p53 geninin aşırı ekspresyonuna ve cyclin-D1 proteininin aşağı regülasyonuna yol açmıştır. Ayrıca, hücre göç potansiyeli baskılanmış ve apoptoz oranında artış tespit edilmiştir. Bu veriler, düşük frekanslı EMF'nin TMZ ile sinerjistik etki göstererek, glioblastoma hücrelerinde antiproliferatif ve proapoptotik yanıtı güçlendirdiğini göstermektedir. Söz konusu çalışmalarda, TMZ ile EMF kombinasyonu

glioblastoma hücrelerinde hücre ölümünü artırmış, p53 gen ekspresyonunu yükseltmiş ve hücre proliferasyonu ile ilişkili siklin-D1 ekspresyonunu düşürmüştür. Özellikle TMZ'ye dirençli T98 hücre hatlarında bile bu kombinasyonun proapoptotik yanıtı tetiklediği gözlemlenmiştir.

Glioblastomada apoptoz mekanizmalarının baskılanmasında PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Valdes-Rives vd., 2017). Fosfatidilinositol-3-Kinaz (PI3K), bu yolağın merkezinde yer almakta olup hücre sağkalımı, proliferasyonu, hareketliliği, anjiyogenez ve apoptoz gibi yaşamsal hücresel süreçlerin düzenlenmesinde görev almaktadır (Ghobrial vd., 2005; Cantley, 2002; Franke vd., 2003; Pathuri vd., 2014; Valdes-Rives vd., 2017). Bu yolda yer alan önemli moleküllerden biri olan mTOR, özellikle apoptozla ilişkili p53, Bcl-2, BAD, p21, p27 ve c-myc gibi hedef proteinlerin aktivasyonunu baskılayarak apoptozu inhibe etmektedir (Faivre vd., 2006). Nitekim bu yoldaki düzensizlik pek çok kanser türünün patogeneğinde rol oynamakta olup, bu bağlamda mTOR'un inhibisyonu, farklı kanser türlerinde etkili olabilecek potansiyel bir terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir (Küçüköner vd., 2013; Raval vd., 2017).

PI3K/AKT/mTOR yolağının hücresel düzeyde aktifleşmesi, hücrelerin apoptozdan kaçınmasına neden olabilir. AKT, diğer adıyla Protein Kinaz B, özellikle hücre sağkalımı ve proliferasyonunu destekleyen önemli bir serin/treonin kinaz olup, PI3K aracılığıyla fosforilendiğinde apoptozu baskılayıcı etkilerini göstermektedir (Pathuri vd., 2014; Sun vd., 2020; Lee vd., 2018). Literatürde, bu yoldaki bozulmaların GBM'nin yaklaşık %80'inde gözlemlendiği, ayrıca AKT aktivasyonu ile tümörün histopatolojik derecesi arasında güçlü bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Wang vd., 2004; Verhaak vd., 2010; Mao vd., 2012; Valdes-Rives vd., 2017). PEMF'nin sinyal yolları üzerindeki etkilerine dair literatür, bu yaklaşımı destekler niteliktedir. Örneğin, osteoblast ve fibroblast benzeri hücrelerde PEMF uygulamasının mTOR fosforilasyonunu artırdığı (Patterson vd., 2006), özellikle aralıklı PEMF stimülasyonunun mTOR yolağını sürekli uyarak hücre proliferasyonunu teşvik ettiği bildirilmiştir (Miyamoto vd., 2019). Bu bağlamda, çalışmamızda gözlenen PI3K/AKT/mTOR sinyal bileşenlerindeki artışın, PEMF'nin bu proliferatif etkileri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, apoptozla ilişkili gen ve protein ekspresyonlarındaki artış, RES ve PEMF kombinasyonunun glioblastoma hücrelerinde apoptoz yanıtını indüklediğini göstermektedir. Ancak bu yanıtı rağmen PI3K/AKT/mTOR yolağının belirli düzeyde aktif kalması, hayatta kalma sinyallerinin tamamen baskılanmadığını ve hücrelerin apoptoz ile sağkalım arasında denge kurmaya çalıştığını düşündürmektedir. Bu durum, gözlemlenen gen ekspresyon farklılıklarını ve karmaşık biyolojik yanıtları açıklamak açısından önemli olabilir.

Western Blot analizleriyle de bu genlerin kodladığı proteinlerin ekspresyonları değerlendirilmiş ve kaspaz-9, kaspaz-3, Bax, Bcl-2, P53 proteinlerinin RES ve PEMF kombinasyonu olan grupta yüksek düzeyde ifade edildiği bulunmuştur. Bu bulgular, PEMF'nin apoptozu artırıcı etkilerini moleküler düzeyde doğrulamaktadır. Akbarnejad vd. (2017), ELF-PEMF'lerin çeşitli frekans (10 Hz, 50 Hz, 100 Hz) ve genliklerinin (10 G, 100 G) glioblastoma hücrelerinin yapısı, hayatta kalma yetenekleri ve Kaspaz-3, Cyclin-D1, P53 protein seviyeleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Bulgular, ELF-PEMF'lerin, maruziyetin büyüklüğüne, sıklığına ve uzunluğuna bağlı olarak hücre büyümesini uyarma veya hücre ölümünü tetikleme yeteneğine sahip olduğunu gösterdi.

Amiri vd. (2018) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise 50 Hz, 70 G manyetik alan uygulaması ile karboplatin tedavisinin kombinasyonu, U87 hücre hattında kaspaz-3 protein düzeylerini 24. ve 48. saatlerde sırasıyla %23 ve %4 oranında artırmıştır. PEMF'nin yalnızca glioblastoma değil, farklı tümör hücre hatlarında da benzer etki gösterdiği farklı araştırmalarla da desteklenmektedir. Örneğin Crocetti vd. (2013), MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 20–50 Hz PEMF uygulamasının apoptozu %25 oranında artırdığını rapor etmiştir. Barati vd. (2020), MC4L2 meme kanseri hücre hattında 5 gün süren ELF-EMF maruziyetinin P38 ve P21 mRNA ekspresyon düzeylerini artırarak apoptozu %30 oranında tetiklediğini belirtmiştir. Xu vd. (2020) ise, LF-MF uygulamasının (1 mT, 50–275 Hz) proapoptotik proteinlerin (bax, kaspaz-3) ekspresyonunu artırırken, antiapoptotik Bcl-2 ekspresyonunu azalttığını bildirmiştir. Bu çalışmaların bulguları, mevcut çalışmamızla birlikte değerlendirildiğinde; glioblastoma hücrelerinin hem doğal bileşiklerle hem de konvansiyonel ajanlarla muamelesinin ardından PEMF'ye maruz bırakılmasının hücre canlılığını azalttığı ve apoptozu çeşitli moleküler yollar üzerinden uyardığı görülmektedir. Bu kapsamda RES'in PEMF ile birlikte uygulanması, TMZ ile olan kombinasyona göre daha etkin bir moleküler yanıt oluşturmuş olabilir.

RES, geniş spektrumlu antioksidan etkileri ile dikkat çeken, apoptozu etkin şekilde indükleyebilen doğal bir bileşiktir. Bunun yanı sıra hücrel stres, oksidatif hasar ve inflamatuvar süreçler üzerinde düzenleyici rol oynadığı bilinmektedir. TMZ ise DNA hasarı yoluyla apoptoz mekanizmasını aktive eden bir kemoterapötik ajan olmakla birlikte, glioblastoma hücrelerinde gelişebilecek direnç mekanizmaları nedeniyle etkinliği sınırlı kalabilmektedir. Bu bağlamda, çalışmamızda RES uygulamasını takiben gerçekleştirilen 6 saatlik PEMF maruziyetinin, TMZ muamelesi sonrası aynı süreyle uygulanan PEMF'ye kıyasla gen ve protein ekspresyonunda daha fazla artışa yol açtığı gözlemlenmiştir. RES'in çok yönlü biyolojik etkileri ve hücrel stres yanıtlarını modüle edebilme kapasitesi, bu farkın temelinde yatan başlıca etkenler arasında yer alabilir. Ayrıca PEMF uygulamasının hücrede oluşturduğu ek stres, apoptoz ve hücrel savunma mekanizmalarının daha etkin biçimde aktive olmasına katkı sağlamaktadır. Beyin dokusunda RES'in, nöronlar, astrositler ve mikroglialarda NF- κ B'yi inhibe ettiği, hücre döngüsünü etkileyerek proapoptotik aktivite gösterdiği, otofaji üzerinden oksidatif stresi artırdığı ve PI3K/AKT/mTOR gibi sinyal yolları aracılığıyla beyin tümör hücrelerini etkilediği gösterilmiştir (Kiskova, 2020). Lin vd. (2011) ile Clark vd. (2017), A172, T98G ve U87 GBM hücrelerinde RES'in AKT fosforilasyonunu azalttığını, p53, Bax ekspresyonunu artırırken Bcl-2 ve kaspaz-3 ekspresyonunu azalttığını; dolayısıyla güçlü antiproliferatif ve proapoptotik etkiler oluşturduğunu göstermiştir. Yuan vd. (2012), RES'in ROS/ERK yolunu etkileyerek U251 hücrelerinde TMZ'nin terapötik etkinliğini artırdığını; Goffart vd. ile Fang vd. (2012) ise RES+TMZ kombinasyonunun SHG44 hücrelerinde ROS üretimini artırarak, mTOR sinyalini baskılayıp AKT ekspresyonunu düşürdüğünü ve Bcl-2 düzeylerini azalttığını bildirmiştir. Ayrıca, Huang vd. (2023), bu kombinasyonun T98G hücrelerinde apoptotik morfolojiyi artırdığını raporlamıştır. Yuan vd. (2012) RES'in U251 hücrelerinde ROS/ERK aracılı otofajiyi baskılayarak TMZ'nin terapötik etkisini artırdığını ortaya koymuştur. SHG44 hattında RES+TMZ kombinasyonu, ROS üretimi ve mTOR sinyalleşmesinin baskılanması yoluyla antiproliferatif etki göstermiştir (Goffart vd., 2013; Fang vd., 2012). Aynı kombinasyonun T98G hücrelerinde apoptotik morfolojiyi artırdığı da rapor edilmiştir (Huang vd., 2023).

Çalışmamızda, RES uygulamasının ardından 6 saat boyunca PEMF'ye maruz bırakılan grupta, PI3K/AKT/mTOR yolaklarında yer alan gen ve proteinlerin ekspresyon seviyeleri, apoptoz ile ilişkili gen ve proteinlere kıyasla sırasıyla yaklaşık 4-kat ve 2.4-kat daha düşük bulunmuştur. Bu bulgu, söz konusu sinyal yolaklarının glioblastoma hücrelerinde apoptozu baskılayıcı etkilerinin daha sınırlı düzeyde etkin olduğunu düşündürmektedir. Öte yandan, bu yolakların aktivasyonunun apoptozun başlamasını tamamen engelleyemediği, hücrelerin hayatta kalma ve ölüm arasında bir denge kurmaya çalıştığı da ileri sürülebilir. Bu çalışma, antioksidan kapasitesi yüksek olan stilben yapılı doğal bir polifenol olan RES'in, PEMF ile kombinasyonunun glioblastoma hücre hattında apoptoz mekanizması ve PI3K/AKT/mTOR yolu üzerindeki etkilerini çok yönlü şekilde ele alan ilk çalışmalardan biridir. Bulgular, RES uygulanan glioblastoma hücrelerinin PEMF maruziyetiyle birlikte düzenli ve kesikli uyarı sonucu hücre canlılığında azalma, apoptozun anahtar bileşenlerinde değişiklik ve programlanmış hücre ölümünün artışı ile sonuçlandığını ortaya koymaktadır.



6. SONUÇLAR

Tıpta birçok hastalığın tanı ve tedavisi geçmişten günümüze kadar sürekli gelişmektedir. Bu hastalıkların tanı ve tedavisinde elektromanyetik alanların kullanılması ve gün geçtikçe kullanımının artıp ilerleme kaydetmesi önemli bir rol oynamaktadır. Bunlardan birisi de düşük frekanslara sahip olan Darbeli Manyetik alandır. Elektromanyetik alanların yüksek frekansta (300 Hz-10 MHz) kullanılması vücut sağlığını etkileyebilirken Darbeli Manyetik alan düşük frekanslı bir elektromanyetik alan olup, çalışmalar PEMF uygulamasının parkinson hastalığı, ameliyat sonrası ağrı ve ödem, kronik yaraların tedavisi, nörodejeneratif ve oküler hastalıkların tedavisi, kanser hücrelerinin tedavisi gibi alanlarda kullanıldığını, ve kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Hug vd., 2012; Vadala vd., 2016; Zou vd., 2017; Strauch vd., 2009; Markov vd., 2007; Amiri vd., 2018). Literatürde, PEMF maruziyeti ve RES'in beyin tümör hücrelerinde apoptoz mekanizmalarındaki rolü, beyin tümör hücrelerinin hücre proliferasyonu ve/veya hücre ölümüne etkileri ve etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılmış değildir. Özellikle, yetişkinlerde en yaygın agresif astrositik (astrocyte-like) primer beyin tümörü olan glioblastoma multiforme (GBM) insan hücre hattında PEMF maruziyetinin RES ile glioblastomada apoptotik yolağın proapoptotik ve P13K/AKT/mTOR hücre içi sinyal yollarında olası etkilerinin incelendiği çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu nedenle, tez çalışmada daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak insan glioblastoma U87MG hücre hattında RES ile birlikte PEMF maruziyetinin apoptoz mekanizmasındaki olası etkileri hem proapoptotik hem de P13K/AKT/mTOR hücre içi sinyal yollarındaki önemli moleküllerin hem gen hem de protein düzeylerinin çalışılmasıyla aydınlatmak amaçlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, RES muamelesinin ardından 6 saat 75 Hz frekans 1 ± 0.2 mT yoğunlukta PEMF'ye maruziyetin U87-MG hücre hattında NT grubuna kıyasla hücre canlılığını azaltıcı, kaspaz-9, kaspaz-3, bax/Bcl-2, TP53, P53 ekspresyonunu arttırıcı etki göstererek hücreleri apoptozla sürüklediği bulunmuştur. Ayrıca, P13K, AKT ve mTOR gibi hayatta kalma yollarının ekspresyonları artmış olmasına rağmen, apoptozda kilit rol oynayan gen ve proteinlere göre daha az artış göstermesi bu yolların apoptoz yanıtını baskılama yönündeki etkilerini sürdürebildiğini göstermiştir. TMZ, çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılmış olup RES muamelesi sonrası 6 saat PEMF maruziyeti TMZ muamelesi sonrası 6 saat PEMF maruziyetine kıyasla daha fazla gen ve protein ekspresyonu artışına yol açmıştır. Bu da RES ile PEMF'nin birlikte uygulanmasının, TMZ ile PEMF kombinasyonuna göre daha güçlü bir hücresel yanıt oluşturmuş olabileceğini göstermiştir.

Elde edilen bilimsel verilerle, çok sayıda terapötik etkiye sahip stilben yapılı doğal olarak oluşan polifenolik bir bileşik olan RES ile birlikte PEMF uygulamasının insan glioblastoma hücrelerinde apoptoz mekanizmalarındaki etkileri farklı moleküler yöntemlerle incelenerek, beyin tümörlerinin progresyonu ve tedavisinde RES kullanımı

ve bunların PEMF ile birlikte sinerjik etkisinin çalışılacağı biyomedikal uygulama alanlarının genişletilmesine katkı sağlanmış olup, çalışmanın ilerideki *in vivo* ve/veya *in vitro* çalışmalara ışık tutabilme potansiyeli de bulunmaktadır. Farklı hücreler, dokular veya hayvan modelleri üzerindeki farklı doz, frekans, yoğunluk, genlik ve 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 klinik, biyomedikal alanlarındaki çalışmalara da yön verebilme potansiyeli bulunmaktadır.



7. KAYNAKLAR

- Ahmed, I., Istivan, T., Cosic, I. ve Pirogova, E. 2013. Evaluation of the effects of Extremely Low Frequency (ELF) Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF) on survival of the bacterium *Staphylococcus aureus*. *EPJ Nonlinear Biomedical Physics*, 1(5): 1-17
- Akbarnejad, Z., Eskandary, H., Dinf, L., VergalloC, Nematollahi-Mahanie, SN., Farsinejadf, A., Abadf, MFS., Ahmadi, M. 2017. Cytotoxicity of temozolomide on human glioblastoma cells is enhanced by the concomitant, exposure to an extremely low-frequency electromagnetic field (100 Hz, 100 G). *Electromagnetic Biology and Medicine*, 92:254-264.
- Akbarnejad, Z., Eskandary, H., Vergallo, C., Nematollahi-Mahani, SN., Dini, L., Darvishzadeh-Mahani, F., Ahmadi, M. 2016. Effects of extremely low-frequency pulsed electromagnetic fields (ELF-PEMFs) on glioblastoma cells (U87). *Electromagnetic Biology and Medicine*, 36:3, 238-247.
- Al-Arafat, T., Mao, A., Katsube, T., Wang, B. 2024. Exploring the Role of p53 in Radiosensitivity: A Key Player in Cancer Therapy. *Radiation*. 2024; 4(4):309-324.
- Amiri, M., Basiri, M., Eskandary, H., Akbarnejad, Z., Esmaeeli, M., Ardakani, YM., Ahmadi-Zeidabadi., M. 2018. Cytotoxicity of carboplatin on human glioblastoma cells is reduced by the concomitant exposure to an extremely low-frequency electromagnetic field (50 Hz, 70 G). *Electromagnetic Biology and Medicine*, 37(3):138-145.
- Arabzadeh, A., Mortezaazadeh, T., Aryafar, T., Gharepapagh, E., Majdaeen, M., Farhood, B. 2021. Therapeutic potentials of resveratrol in combination with radiotherapy and chemotherapy during glioblastoma treatment: a mechanistic review. *Cancer Cell Int*. 2021 Jul 21;21(1):391. doi: 10.1186/s12935-021-02099-0.
- Azimian, H., Dayyani, M., Bahreyni Toossi, M.T., Mahmoudi, M. 2018. *Bax/Bcl-2* expression ratio in prediction of response to breast cancer radiotherapy. *Iran J Basic Med Sci* 2018; 21:325-332. doi: 10.22038/IJBMS.2018.26179.6429
- Barati, M., Fahimi, H., Farahmand, L., Madjid Ansari, A. 2020. 1Hz 100mT Electromagnetic Field Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells Through Up-Regulation of P38 and P21. *Multidiscip Cancer Investig* 2020; 4 (1) :23-29
- Barber, C.N., Raben, D.M. 2019. Lipid Metabolism Crosstalk in the Brain: Glia and Neurons. *Front. Cell. Neurosci*. 13:212. doi: 10.3389/fncel.2019.00212
- Belden, C.J., Valdes, P.A., Ran, C., Pastel, D.A., Harris, B.T., Fadul, C.E., Israel, M.A., Paulsen, K., Roberts, D.W. 2011. Genetics of glioblastoma: a window into its imaging and histopathologic variability. *Radiographics*. 2011 Oct;31(6):1717-40. doi: 10.1148/rg.316115512.

- Benassi, B., Filomeni, G., Montagna, C., Merla, C., Lopresto, V., Pinto, R., Marino, C., Consales, C. 2016. Extremely Low Frequency Magnetic Field (ELF-MF) Exposure Sensitizes SH-SY5Y Cells to the Pro-Parkinson's Disease Toxin MPP(.). *Mol Neurobiol.* 2016 Aug;53(6):4247-4260. doi: 10.1007/s12035-015-9354-4.
- Berg, H., Günther, B., Hilger, I., Radeva, M., Traitcheva, N., Wollweber, L. 2010. Bioelectromagnetic field effects on cancer cells and mice tumors. *Electromagn Biol Med.* 2010 Dec;29(4):132-43. doi: 10.3109/15368371003776725.
- Bishayee, A. 2009 . Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev Res (Phila).* 2009 May;2(5):409-18. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0160. Epub 2009 Apr 28.
- Bomzon, Z., Wenger, C., Proescholdt, M., Mohan, S. 2021. Tumor-Treating Fields at EMBC 2019: A Roadmap to Developing a Framework for TTFields Dosimetry and Treatment Planning. In: Makarov, S.N., Noetscher, G.M., Nummenmaa, A. (eds) *Brain and Human Body Modeling* 2020. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45623-8_1
- Cantley, L.C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002 May 31;296(5573):1655-7. doi: 10.1126/science.296.5573.1655.
- Capelli, E., Torrisi, F., Venturini, L., Granato, M. , Fassina. L . 2017. Giuseppe Francesco Damiano Lupo, Ricevuti G. Low-Frequency Pulsed Electromagnetic Field Is Able to Modulate miRNAs in an Experimental Cell Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Healthcare Engineering* 2017. doi.org/10.1155/2017/2530270
- Chen, M.Y., Li, J., Zhang, N., Waldorff, E.I., Ryaby, J.T., Fedor, P., Jia, Y., Wang, Y. 2022. In Vitro and in Vivo Study of the Effect of Osteogenic Pulsed Electromagnetic Fields on Breast and Lung Cancer Cells. *Technol Cancer Res Treat.* 2022 Jan-Dec; 21:15330338221124658. doi: 10.1177/15330338221124658.
- Clark, P.A., Bhattacharya, S., Elmayan, A., Darjatmoko, S.R., Thuro, B.A., Yan, M.B., van Ginkel, P.R., Polans, A.S., Kuo, J.S. 2017. Resveratrol targeting of AKT and p53 in glioblastoma and glioblastoma stem-like cells to suppress growth and infiltration. *J Neurosurg.* 2017 May;126(5):1448-1460. doi: 10.3171/2016.1.JNS152077.
- Crocetti, S., Beyer, C., Schade, G., Egli, M., Fröhlich, J., Franco-Obregón, A. 2013. Low intensity and frequency pulsed electromagnetic fields selectively impair breast cancer cell viability. *PLoS One.* 2013 Sep 11;8(9):e72944. doi: 10.1371/journal.pone.0072944.
- Daish, C., Blanchard, R., Duchi, S., Onofrillo, C., Augustine, C., Fox, K., Pivonka, P., Pirogova, E. 2018. Design, Fabrication and Validation of a Precursor Pulsed Electromagnetic Field Device for Bone Fracture Repair. *Annu Int Conf IEEE Eng*

- Med Biol Soc. 2018 Jul;2018: 4166-4169. doi: 10.1109/EMBC.2018.8513239.
- de Sá Coutinho, D., Pacheco, M.T., Frozza, R.L., Bernardi, A. 2018. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol: Mechanistic Insights. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 20;19(6):1812. doi: 10.3390/ijms19061812.
- Dehghani-Soltani, S., Eftekhar-Vaghefi, S.H., Babaee, A., Basiri, M., Mohammadipoor-Ghasemabad, L., Vosough, P., Ahmadi-Zeidabadi, M. 2021. Pulsed and Discontinuous Electromagnetic Field Exposure Decreases Temozolomide Resistance in Glioblastoma by Modulating the Expression of O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase, Cyclin-D1, and p53. *Cancer Biother Radiopharm.* 2021 Sep;36(7):579-587. doi: 10.1089/cbr.2020.3851.
- Demirel, C., Gözen, H. 2016. Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanın Tedavide Kullanımı. *Selçuk Tıp Dergisi.* 32(3): 70-7432(3): 70-7.
- Duzgun, Z., Eroglu, Z., Biray Avcı, C. 2016. Role of mTOR in glioblastoma. *Gene.* 2016 Jan 10;575(2 Pt 1):187-90. doi: 10.1016/j.gene.2015.08.060. Epub 2015 Sep 1.
- El-Ghazaly, M.A., Fadel, N.A., Abdel-Naby, D.H., Abd El-Rehim, H.A., Zaki, H.F., Kenawy, S.A. 2020. Potential anti-inflammatory action of resveratrol and piperine in adjuvant-induced arthritis: Effect on pro-inflammatory cytokines and oxidative stress biomarkers. *The Egyptian Rheumatologist*, 2020 42/1, 71-77: 1110-1164, doi.org/10.1016/j.ejr.2019.08.003.
- Ellis, H.P., Greenslade, M., Powell, B., Spiteri, I., Sottoriva, A., Kurian, K.M. 2015. Current Challenges in Glioblastoma: Intratumour Heterogeneity, Residual Disease, and Models to Predict Disease Recurrence. *Front Oncol.* 2015 Nov 16;5:251. doi: 10.3389/fonc.2015.00251.
- Engelman, J.A., Luo, J., Cantley, L.C. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006 Aug;7(8):606-19. doi: 10.1038/nrg1879.
- Faivre, S., Kroemer, G., Raymond, E. 2006. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Aug;5(8):671-88. doi: 10.1038/nrd2062.
- Falone, S., Marchesi, N., Osera, C., Fassina, L., Comincini, S., Amadio, M., Pascale, A. 2016. Pulsed electromagnetic field (PEMF) prevents pro-oxidant effects of H₂O₂ in SK-N-BE(2) human neuroblastoma cells. *Int J Radiat Biol.* 2016 May;92(5):281-6. doi: 10.3109/09553002.2016.1150619. Epub 2016 Mar 4.

- Fang, Y., DeMarco, V.G., Nicholl, M.B. 2012. Resveratrol enhances radiation sensitivity in prostate cancer by inhibiting cell proliferation and promoting cell senescence and apoptosis. *Cancer Sci.* 2012 Jun;103(6):1090-8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02272.x.
- Fano, R., Adler, R. B. ve Chu, L. J. 1963. *Electromagnetic Field, Energy and Foces.* Massachusetts Teknoloji Enstitüsü, Elektrik elektronik Mühendisliği
- Flatscher, J., Pavez Lorie, E., Mittermayr, R., Meznik, P., Slezak, P., Redl, H., Slezak, C. 2023. Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF)-Physiological Response and Its Potential in Trauma Treatment. *Int J Mol Sci.* 2023 Jul 8;24(14):11239. doi: 10.3390/ijms241411239.
- Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A., Sugimoto, C. 2003. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene.* 2003 Dec 8;22(56):8983-98. doi: 10.1038/sj.onc.1207115.
- Gabriel, C., Peyman, A., Grant, E.H. 2009. Electrical conductivity of tissue at frequencies below 1 MHz. *Phys Med Biol.* 2009 Aug 21;54(16):4863-78. doi: 10.1088/0031-9155/54/16/002. Epub 2009 Jul 27.
- Ganesan, K., Gengadharan, A. C., Balachandran, C., Manohar, B. M. ve Puvanakrishnan, R. 2009. Low frequency pulsed electromagnetic field-A viable alternative therapy for arthritis. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47: 939-948.
- García-Minguillán, O., Prous, R., Ramirez-Castillejo, M.D.C., Maestú, C. 2019. CT2A Cell Viability Modulated by Electromagnetic Fields at Extremely Low Frequency under No Thermal Effects. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 24;21(1):152. doi: 10.3390/ijms21010152.
- Gessi, S., Merighi, S., Bencivenni, S., Battistello, E., Vincenzi, F., Setti, S., Cadossi, M., Borea, P. A., Cadossi, R. ve Varani, K. 2019. Pulsed electromagnetic field and relief of hypoxia-induced neuronal cell death: The signaling pathway. *J Cell Physiol*, 234: 15089-15097.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005 May-Jun;55(3):178-94. doi: 10.3322/canjclin.55.3.178.
- Giotakis, A.I., Kontos, C.K., Manolopoulos, L.D., Sismanis, A., Konstadoulakis, M.M., Scorilas, A. 2016. High BAX/BCL2 mRNA ratio predicts favorable prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma, particularly in patients with negative lymph nodes at the time of diagnosis. *Clin Biochem.* 2016 Aug;49(12):890-6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.04.010. Epub 2016 Apr 26. PMID: 27129795.

- Goffart, N., Kroonen, J., Rogister, B. 2013. Glioblastoma-initiating cells: relationship with neural stem cells and the micro-environment. *Cancers (Basel)*. 2013 Aug 14;5(3):1049-71. doi: 10.3390/cancers5031049.
- Gollwitzer, H., Harrasser, N., Hausdorf, J., Ringeisen, M. ve Gerdesmeyer, L. 2017. Electromagnetic transduction therapy in non-specific low back pain: A prospective randomised controlled trial. *Journal of Orthopedic*, 14(3):410-415.
- Göçmez, A., Seferoğlu, HG. 2014. Asmalarda resveratrol içeriğini etkileyen faktörler ve insan sağlığına faydaları. *Journal of Adnan Menderes University Agricultural Faculty* 2014; 11(1) : 31 – 38
- Gökçek Saraç, Ç., Şimşek, T., Karakurt, S. 2022. Post-exposure Effects of PEMF on ROS levels in H2O2-treated Glioblastoma Cell Line . 8th World Congress on Electrical Engineering and Computer Systems and Science (EECSS'22) (9th International Conference on Biomedical Engineering and Systems (ICBES22)). Praha, Czech Republic. 2022
- Gökçek-Saraç, Ç., Akçay, G., Karakurt, S., Ateş, K., Özen, Ş., Derin, N. 2021. Possible effects of different doses of 2.1 GHz electromagnetic radiation on learning, and hippocampal levels of cholinergic biomarkers in Wistar rats. *Electromagn Biol Med*. 2021 Jan 2;40(1):179-190. doi: 10.1080/15368378.2020.1851251. Epub 2020 Dec 1.
- Gökçek-Saraç, Ç., Şimşek, T., Karakurt, S. 2023. Cytoprotective effects of low-frequency pulsed electromagnetic field against oxidative stress in glioblastoma cells. *Gen Physiol Biophys*. 2023 Jan;42(1):97-106. doi: 10.4149/gpb_2022056.
- Guo, H., German, P., Bai, S., Barnes, S., Guo, W., Qi, X., Lou, H., Liang, J., Jonasch, E., Mills, G.B., Ding, Z. 2015. The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. *J Genet Genomics*. 2015 Jul 20;42(7):343-53. doi: 10.1016/j.jgg.2015.03.003. Epub 2015 Mar 19.
- Gürdal, O. 2017. Elektromanyetik Alan Teorisi. Bursa Osmangazi Üniversitesi Yayınlar
- Hall-Younger, E., Tait, S.W. 2025. Mitochondria and cell death signalling. *Curr Opin Cell Biol*. 2025 Apr 10;94:102510. doi: 10.1016/j.ceb.2025.102510.
- Hasan, M., Bae, H. 2017. An Overview of Stress-Induced Resveratrol Synthesis in Grapes: Perspectives for Resveratrol-Enriched Grape Products. *Molecules*. 2017 Feb 14;22(2):294. doi: 10.3390/molecules22020294.
- Houck, M. M., Crispino, F. ve McAdam, T. 2018. What Is Light and How Do We See an Object. In: Paguio, J. C. (Ed.), *The Science of Crime Scenes*. Elsevier, 150-164.

- Huang, M., Li, P., Chen, F., Cai, Z., Yang, S., Zheng, X., Li, W. 2023. Is extremely low frequency pulsed electromagnetic fields applicable to gliomas? A literature review of the underlying mechanisms and application of extremely low frequency pulsed electromagnetic fields. *Cancer Med.* 2023 Feb;12(3):2187-2198. doi: 10.1002/cam4.5112.
- Hug, K. ve Rösli, M. 2012. Therapeutic Effects of Whole-Body Devices Applying Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF): A Systematic Literature Review. *Bioelectromagnetics*, 33: 95-105.
- International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. 2014. For Limiting Exposure to Electric Fields Induced By Movement of The Human Body in A Static Magnetic Field and by Time-Varying Magnetic Fields Below 1 Hz. *Health Physics* 106(3):418-425.
- International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. 2020. For Limiting Exposure to Electromagnetic Fields (100 Khz to 300 Ghz). *Health Phys* 118(5): 483–524.
- International Commission on Non-ionizing Radiation Protection. 1998. Guidelines for Limiting exposure to Time-Varying Electric, Magnetic and Electromagnetic Fields (UP TO 300 GHZ) *Health Physics*, 74 (4):494-522.
- Israel, M., Zaryabova, V., Ivanova, M. 2013. Electromagnetic field occupational exposure: non-thermal vs. thermal effects. *Electromagn Biol Med.* 2013 Jun;32(2):145-54. doi: 10.3109/15368378.2013.776349.
- İl, N., Ateş, K., Özen, Ş. 2023. Electromagnetic field exposure to human head model with various metal objects at sub-6 GHz frequencies. *Electromagn Biol Med.* 2023 Jul 3;42(3):114-122. doi: 10.1080/15368378.2023.2220736. Epub 2023 Jun 4.
- Jiang, Y. 2018. A Unipolar Pulse Electromagnetic Field Apparatus for Magnetic Therapy: design, simulation and development. *IEEE Instrumentation and Measurement Magazine* 21(5):41-48. doi:10.1109/MIM.2018.8515707.
- Jiang, Y. 2018. A Unipolar Pulse Electromagnetic Field Apparatus for Magnetic Therapy: design, simulation and development. *Electrical and Computer Engineering School of Electrical Engineering and Computer Science Faculty of Engineering University of, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara*, 117s.
- Jiapaer, S., Furuta, T., Tanaka, S., Kitabayashi, T., Nakada, M. 2018. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2018 Oct 15;58(10):405-421. doi: 10.2176/nmc.ra.2018-0141. Epub 2018 Sep 21.
- Karakurt, S. ve Adali, O. 2016. Tannic Acid Inhibits Proliferation, Migration, Invasion of Prostate Cancer and Modulates Drug Metabolizing and Antioxidant Enzymes, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16 (6), 781-789.

- Karpel-Massler, G., Shu, C., Chau, L., Banu, M., Halatsch, M.E., Westhoff, M.A., Ramirez, Y., Ross, A.H., Bruce, J.N., Canoll, P., Siegelin, M.D. 2015. Combined inhibition of Bcl-2/Bcl-xL and Usp9X/Bag3 overcomes apoptotic resistance in glioblastoma in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2015 Jun 10;6(16):14507-21. doi: 10.18632/oncotarget.3993.
- Kaszuba-Zwońska, J., Nowak, B., Guzdek, P., Gil, K. 2018. Cell viability changes in cultured H4 glioma cells upon low frequency pulsed electromagnetic field (7Hz, 30mT) exposure in flow cytometry analysis. *2018 EMF-Med 1st World Conference on Biomedical Applications of Electromagnetic Fields (EMF-Med)*, Split, Croatia, 2018, pp. 1-2, doi: 10.23919/EMF-MED.2018.8526058.
- Kim, J. V., Yu, D. H., Huh, Y. H., Lee, E. H., Kim, H. G. ve Kim, H. R. 2016. Long-term exposure to 835 MHz RF-EMF induces hyperactivity, autophagy and demyelination in the cortical neurons of mice. *Scientific Reports*, 7, 41129.
- Kiskova, T., Kubatka, P., Büsselberg, D., Kassayova, M. 2020. The Plant-Derived Compound Resveratrol in Brain Cancer: A Review. *Biomolecules*. 2020 Jan 19;10(1):161. doi: 10.3390/biom10010161.
- Ko, J.H., Sethi, G., Um, J.Y., Shanmugam, M.K., Arfuso, F., Kumar, A.P., Bishayee, A., Ahn, K.S. 2017. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 1;18(12):2589. doi: 10.3390/ijms18122589.
- Kohli, H., Srivastava, S., Oza, M., Chouhan, S., Verma, S., Bansal, A., Kumar, B. ve Sharma, S. K. 2020. Design and Study of Novel Tunable ELF-PEMF System for Therapeutic Applications. *IETE Journal of Research*.
- Kong, Y., Lin, M., Yin, M., Hao, L. 2018. Rotor Structure on Reducing Demagnetization of Magnet and Torque Ripple in a PMA-synRM With Ferrite Permanent Magnet. *IEEE Transactions on Magnetics*, vol. 54, no. 11, pp. 1-5, Nov. 2018, Art no. 8108705, doi: 10.1109/TMAG.2018.2827104.
- Küçüköner, M. 2013. Kanser tedavisinde mTOR sinyal yolağı ve mTOR inhibitörleri. *diclemedj*. March 2013;40(1):156-160. doi:10.5798/diclemedj.0921.2013.01.0248
- Lee, Y.R., Chen, M., Pandolfi, P.P. 2018. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 547–562 (2018). doi.org/10.1038/s41580-018-0015-0
- Lin, H., Xiong, W., Zhang, X., Liu, B., Zhang, W., Zhang, Y., Cheng, J., Huang H. 2011. Notch-1 activation-dependent p53 restoration contributes to resveratrol-induced apoptosis in glioblastoma cells. *Oncol Rep*. 2011 Oct;26(4):925-30. doi: 10.3892/or.2011.1380.

- Liu, Y., Tang, Q., Tao, Q., Dong, H., Shi, Z., Zhou, L. 2025. Low-frequency magnetic field therapy for glioblastoma: Current advances, mechanisms, challenges and future perspectives. *J Adv Res.* 2025 Mar;69:531-543. doi: 10.1016/j.jare.2024.03.024. Epub 2024 Mar 31.
- Lomholt, S., Mellekjaer, A., Iversen, M.B., Pedersen, S.B., Kragstrup, T.W. 2018. Resveratrol displays anti-inflammatory properties in an ex vivo model of immune mediated inflammatory arthritis. *BMC Rheumatol.* 2018 Oct 10;2:27. doi: 10.1186/s41927-018-0036-5.
- Lossi, L., Castagna, C., Merighi, A. 2024. An Overview of the Epigenetic Modifications in the Brain under Normal and Pathological Conditions. *Int J Mol Sci.* 2024 Mar 30;25(7):3881. doi: 10.3390/ijms25073881.
- Mao, H., Lebrun, D.G., Yang, J., Zhu, V.F., Li, M. 2012. Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cancer Invest.* 2012 Jan;30(1):48-56. doi: 10.3109/07357907.2011.630050.
- Markov, M. 2015. XXIst century magnetotherapy. *Electromagn Biol Med.* 2015 Sep;34(3):190-6. doi: 10.3109/15368378.2015.1077338
- Markov, M. S. 2007. Pulsed electromagnetic field therapy history, state of the art and future. *The Environmentalist*, 27(4), 465-475.
- Markovà, E., Malmgren, L.O., Belyaev, I.Y. 2010. Microwaves from Mobile Phones Inhibit 53BP1 Focus Formation in Human Stem Cells More Strongly Than in Differentiated Cells: Possible Mechanistic Link to Cancer Risk. *Environ Health Perspect.* 2010 Mar;118(3):394-9. doi: 10.1289/ehp.0900781. Epub 2009 Oct 23. PMID: 20064781; PMCID: PMC2854769.
- Mattsson, M. O. ve Simkó, M. 2019. Emerging medical applications based on non-ionizing electromagnetic fields from 0 Hz to 10 THz. *Medical Devices: Evidence and Research*, 12, 347-368.
- Mayer, Y., Shibli, J.A., Saada, H.A., Melo, M., Gabay, E., Barak, S., Ginesin, O. 2024. Pulsed Electromagnetic Therapy: Literature Review and Current Update. *Braz Dent J.* 2024 Oct 25;35:e246109. doi: 10.1590/0103-6440202406109.
- Merighi, S., Nigro, M., Travagli, A., Fernandez, M., Vincenzi, F., Varani, K., Pasquini, S., Borea, P.A., Salati, S., Cadossi, R., Gessi, S. 2024. Effect of Low-Frequency, Low-Energy Pulsed Electromagnetic Fields in Neuronal and Microglial Cells Injured with Amyloid-Beta. *Int J Mol Sci.* 2024 Nov 29;25(23):12847. doi: 10.3390/ijms252312847.
- Minniti, G., Lombardi, G., Paolini, S. 2019. Glioblastoma in Elderly Patients: Current Management and Future Perspectives. *Cancers (Basel).* 2019 Mar 8;11(3):336. doi: 10.3390/cancers11030336.

- Miyamoto, H., Sawaji, Y., Iwaki, T., Masaoka, T., Fukada, E., Date, M., Yamamoto, K. 2023. Intermittent pulsed electromagnetic field stimulation activates the mTOR pathway and stimulates the proliferation of osteoblast-like cells. *Bioelectromagnetics*. 2019 Sep;40(6):412-421. doi: 10.1002/bem.22207. Epub 2019 Jul 23.
- Murayama, T., Nakayama, J., Jiang, X., Miyata, K., Morris, A.D., Cai, K.Q., Prasad, R.M., Ma, X., Efimov, A., Belani, N., Gerstein, E.R., Tan, Y., Zhou, Y., Kim, W., Maruyama, R., Campbell, K.S., Chen, L., Yang, Y., Balachandran, S., Cañadas, I. 2024. Targeting DHX9 Triggers Tumor-Intrinsic Interferon Response and Replication Stress in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov*. 2024 Mar 1;14(3):468-491. doi: 10.1158/2159-8290.CD-23-0486.
- Nwaecheifu, O., Adeoye, B., Lateef, I. 2024. Cajanus cajan induces mitochondrial-mediated apoptosis via caspase activation and cytochrome c release. *Comp Clin Pathol*. March 2024 33 ;207–222.
- Pasi, F., Fassina, L., Mognaschi, M.E., Lupo, G., Corbella, F., Nano, R., Capelli, E. 2016. Pulsed Electromagnetic Field with Temozolomide Can Elicit an Epigenetic Proapoptotic Effect on Glioblastoma T98G Cells. *Anticancer Res*. 2016 Nov;36(11):5821-5826. doi: 10.21873/anticancer.11166.
- Pathuri, P., Norton, D., Willems, H., Tisi, D., Jhoti, H. 2014. Chapter 4- Structural Biology and Anticancer Drug Design, Editor(s): Stephen Neidle, *Cancer Drug Design and Discovery (Second Edition)*, Academic Press. 2014. 121-141/9780123965219. doi.org/10.1016/B978-0-12-396521-9.00004-8.
- Patruno, A., Pesce, M., Grilli, A., Speranza, L., Franceschelli, S., De Lutiis, M.A., Vianale, G., Costantini, E., Amerio, P., Muraro, R., Felaco, M., Reale, M. 2015. mTOR Activation by PI3K/Akt and ERK Signaling in Short ELF-EMF Exposed Human Keratinocytes. *PLoS One*. 2015 Oct 2;10(10):e0139644. doi: 10.1371/journal.pone.0139644. PMID: 26431550; PMCID: PMC4592237.
- Patterson, T.E., Sakai, Y., Grabiner, M.D., Ibiwoye, M., Midura, R.J., Zborowski, M., Wolfman, A. 2006. Exposure of murine cells to pulsed electromagnetic fields rapidly activates the mTOR signaling pathway. *Bioelectromagnetics*. 2006 Oct;27(7):535-44. doi: 10.1002/bem.20244.
- Pawluk, W. ve Layne, C. 2017. *Power Tools for Health: How pulsed magnetic fields (PEMFs) help you*. FriesenPress, Victoria, pp .291.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D'Orazi, G. 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016 Apr;8(4):603-19. doi: 10.18632/aging.100934.
- Poljak, D. ve Cvetkovic, M. 2019. On Exposure of Humans to Electromagnetic Fields–General Considerations. In: Garcia, A.C. (Ed.), *Human Interaction with*

- Electromagnetic Fields: Computational Models in Dosimetry. Elsevier, Slipt, ss. 1-20.
- Raval, A.P., Perez-Pinzon, M.A., Dave, K.R. 2017. Chapter 50 - Protein Kinases in Cerebral Ischemia, Editor(s): Caplan LR, Biller J, Leary MC, Lo EH, Thomas AJ, Yenari M, Zhang JH. Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition). Academic Press. 2017. 246-250/9780128030585. doi.org/10.1016/B978-0-12-803058-5.00050-3.
- Riba, A., Deres, L., Sumegi, B., Toth, K., Szabados, E., Halmosi, R. 2017. Cardioprotective Effect of Resveratrol in a Postinfarction Heart Failure Model. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6819281. doi: 10.1155/2017/6819281. Epub 2017 Oct 3.
- Ronzio, O. 2020. Magnetic and Pulsed magnetic (PEMF) Therapies. In: Watson, T. ve Nussbaum, E. (Ed.), *Electro Physical Agents E-Book: Evidence-Based Practice*. Elsevier, ss. 219-224.
- Roy van, B., Anna C, van Brummelen. 2022. The potential role of resveratrol as supportive antiviral in treating conditions such as COVID-19 – A formulator’s perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 148, 112767. doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112767.
- Saliev, T., Begimbetova, D., Masoud, A.R., Matkarimov, B. 2019. Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields: Two sides of a coin. *Prog Biophys Mol Biol*. 2019 Jan;141:25-36. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.009. Epub 2018 Jul 17.
- Sengupta, S., Balla, V.K. 2018. A review on the use of magnetic fields and ultrasound for non-invasive cancer treatment. *J Adv Res*. 2018 Jun 20;14:97-111. doi: 10.1016/j.jare.2018.06.003.
- Shakeri, R., Kheirollahi, A., Davoodi, J. 2017. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*. 2017 Apr;135:111-125. doi: 10.1016/j.biochi.2017.02.001
- Sherrard, R.M., Morellini, N., Jourdan, N., El-Esawi, M., Arthaut, L.D., Niessner, C., Rouyer, F., Klarsfeld, A., Doulazmi, M., Witczak, J., d'Harlingue, A., Mariani, J., Mclure, I., Martino, C.F, Ahmad, M. 2018. Low-intensity electromagnetic fields induce human cryptochrome to modulate intracellular reactive oxygen species. *PLoS Biol*. 2018 Oct 2;16(10):e2006229. doi: 10.1371/journal.pbio.2006229.
- Shupak, N. M., Prato, F. S., Thomas, A. W. 2004. Human exposure to a specific pulsed magnetic field: Effects on thermal sensory and pain thresholds. *Neurosci Lett* 363(2):157-162.
- Souza, F.G., Cavalcante, G.C. 2022. Mitochondria in *Mycobacterium* Infection: From the Immune System to Mitochondrial Haplogroups. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 23;23(17):9511. doi: 10.3390/ijms23179511.
- Staebler, P. 2017. Human Exposure to Electromagnetic Fields: From Extremely Low

- Frequency (ELF) to Radiofrequency. ISTE ve John Wiley, Sons, Inc., Londra ve Hoboken, 385.
- Strauch, B., Herman, C., Dabb, R., Ignarro, L.J., Pilla, A.A. 2009. Evidence-based use of pulsed electromagnetic field therapy in clinical plastic surgery. *Aesthet Surg J.* 2009 Mar-Apr;29(2):135-43. doi: 10.1016/j.asj.2009.02.001.
- Sun, K., Luo, J., Guo, J., Yao, X., Jing, X., Guo, F. 2020. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2020 Apr;28(4):400-409. doi: 10.1016/j.joca.2020.02.027.
- Tamam, C., Evrensel, M., Tamam, Y. 2016. Elektromanyetik alanların insan sağlığı üzerindeki etkileri, Bilimsel Tamamlayıcı Tıp, Regülasyon ve Nöralterapi Dergisi. 10/3 2016
- Tatarov, I., Panda, A., Petkov, D., Kolappaswamy, K., Thompson, K., Kavirayani, A., Lipsky, M.M., Elson, E., Davis, C.C., Martin, S.S., DeTolla, L.J. 2011. Effect of magnetic fields on tumor growth and viability. *Comp Med.* 2011 Aug;61(4):339-45.
- Teimori, F., Khaki, A. A., Rajabzadeh, A. ve Roshangar, L. 2016. The effects of 30 mT electromagnetic fields on hippocampus cells of rats. *Surgical Neurology International*, 7(70).
- Terracciano, L.M., Piscuoglio, S., Charlotte, K.Y. 2019. Hepatocellular Carcinoma: Pathology and Genetics, Editor(s): Boffetta P, Hainaut P. *Encyclopedia of Cancer* (Third Edition). Academic Press. 2019.198-210/9780128124857. doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65261-3.
- Thakkar, J.P., Dolecek, T.A., Horbinski, C., Ostrom, Q.T., Lightner, D.D., Barnholtz-Sloan, J.S., Villano, J.L. 2014. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Oct;23(10):1985-96. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275. Epub 2014 Jul 22.
- Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., González-Sarriás, A., Tomás-Barberán, FA., García-Conesa, M.T., Espín, J.C. 2013. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr Pharm Des.* 2013;19(34):6064-93. doi: 10.2174/13816128113199990407.
- Vadalà, M., Morales-Medina, J. C., Vallelunga, A., Palmieri, B., Laurino, C. ve Iannitti, T. 2016. Mechanisms and therapeutic effectiveness of pulsed electromagnetic field therapy in oncology. *Cancer Medicine*, 5(11):3128-3139.
- Valdés-Rives, S.A., Casique-Aguirre, D., Germán-Castelán, L., Velasco-Velázquez, M.A., González-Arenas, A. 2017. Apoptotic Signaling Pathways in Glioblastoma and Therapeutic Implications. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:7403747. doi: 10.1155/2017/7403747. Epub 2017 Nov 12.
- Vallero, D. A. ve Letcher, T. M. 2013. Radiation. EDD, *Unraveling Environmental*

Disasters. Elsevier, ss. 299-320.

- Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., Hayes, D.N. 2010. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
- Vermeulen, K., Berneman, Z.N., Van Bockstaele, D.R. 2003. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.* 2003 Jun;36(3):165-75. doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00267.x. PMID: 12814432; PMCID: PMC6496173.
- Vincenzi, F., Ravani, A., Pasquini, S., Merighi, M., Gessi, S., Setti, S., Cadossi, R., Borea, P. A.ve Varani, K. 2017. Pulsed Electromagnetic Field Exposure Reduces Hypoxia and Inflammation Damage in Neuron-Like and Microglial Cells, *Journal Cellular Physiology*, 232, 1200–1208.
- Vincenzi, F., Targa, M., Corciulo, C., Gessi, S., Merighi, S., Setti, S., Cadossi, R., Borea, P.A., Varani, K. 2012. The anti-tumor effect of A3 adenosine receptors is potentiated by pulsed electromagnetic fields in cultured neural cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(6):e39317. doi: 10.1371/journal.pone.0039317.
- Wade, B. 2013. A review of pulsed electromagnetic field (PEMF) mechanisms at a cellular level: a rationale for clinical use. *American Journal of Health Research*, 1, 3, 51-55.
- Wang, H. ve Zhang, X. 2017. Magnetic Fields and Reactive Oxygen Species. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2175-219.
- Wang, H., Zhang, W., Huang, H.J., Liao, W.S., Fuller, G.N. 2004. Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest*. 2004 Aug;84(8):941-51. doi: 10.1038/labinvest.3700123.
- Wang, Y., Mikhailova, M., Bose, S., Pan, C.X. 2008. deVere White, R.W., Ghosh, PM., Regulation of androgen receptor transcriptional activity by rapamycin in prostate cancer cell proliferation and survival. *Oncogene*. 2008 Nov 27;27(56):7106-17. doi: 10.1038/onc.2008.318. Epub 2008 Sep 8.
- Xu, F., Na, L., Li, Y., Chen, L. 2020. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci.* 2020 Apr 1;10(1):54. doi: 10.1186/s13578-020-00416-0. Retraction in: *Cell Biosci.* 2021 Aug 06;11(1):157. doi: 10.1186/s13578-021-00667-5.
- Yuan, Y., Xue, X., Guo, R.B., Sun, X.L., Hu, G. 2012. Resveratrol enhances the

antitumor effects of temozolomide in glioblastoma via ROS-dependent AMPK-TSC-mTOR signaling pathway. *CNS Neurosci Ther.* 2012 Jul;18(7):536-46. doi: 10.1111/j.1755-5949.2012.00319.x.

Zhang, Y., Li, Q. ve Zhou, H. 2017. Theoretical Foundation and Basic Properties of Thermal Radiation. In: Robertson, N. (Ed.), *Theory and Calculation of Heat Transfer in Furnaces.* Elsevier, 1-43.

Zhou, D.D., Luo, M., Huang, S.Y., Saimaiti, A., Shang, A., Gan, R.Y., Li, H.B. 2021. Effects and Mechanisms of Resveratrol on Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2021 Jul 11;2021:9932218. doi: 10.1155/2021/9932218.

Zou, J., Chen, Y., Qian, J., Yang, H. 2017. Effect of a low-frequency pulsed electromagnetic field on expression and secretion of IL-1 β and TNF- α in nucleus pulposus cells. *J Int Med Res.* 2017 Apr;45(2):462-470. doi: 10.1177/0300060516683

ÖZGEÇMİŞ

Atike DOĞAN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2022-2025	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2016-2021	Giresun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik, Giresun

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

DERMODİES-2025	E-TİCARET
----------------	-----------

PROJE GÖREVLERİ

Araştırmacı; “Resveratrol ile Muamele Edilen Glioblastoma Hücrelerinde Darbeli Elektromanyetik Alan Maruziyetinin Proapoptotik ve P13K/AKT/mTOR Sinyal Yolaklarında Olası Moleküler Etkileri”, TÜBİTAK 1002, Proje No: 123R068, Yürütücü: Doç. Dr. Çiğdem SARAÇ.

ESERLER

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

DOĞAN, A., SARAÇ, Ç., & KARAKURT, S., (2024) Investigation of Synergistic Effects of Resveratrol and PEMF exposure on Caspase-12 Gene Expression in Glioblastoma Cell. 6th Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (EBAT)Congress was supported by TUBITAK with 2223-B Support Program for Scientific Activities

DOĞAN, A., SARAÇ, Ç., & KARAKURT, S., (2024) Cytotoxic Effects of Pulsed Magnetic Field Exposure on Human Glioblastoma Cell Line Treated with Resveratrol and Themozoloid. 4th International Conference on Scientific and Academic Research (ISCAR)