



**NÖRON BENZERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNE
DÖNÜŞTÜRÜLMÜŞ NÖROBLASTOM HÜCRE
HATTINDA MANYETİK ALAN TOKSİSİTESİNE
KARŞI PROPOLİSİN NÖROKORUYUCU
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Funda DORU

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes ARSLAN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Şükrü KURT**

2022

Her hakkı saklıdır.



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NÖRON BENZERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNE DÖNÜŞTÜRÜLMÜŞ
NÖROBLASTOM HÜCRE HATTINDA MANYETİK ALAN TOKSİSİTESİNE
KARŞI PROPOLİSİN NÖROKORUYUCU ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Funda DORU

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes ARSLAN

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Şükrü KURT

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2022

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

16 / 05 / 2022

Funda DORU

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NÖRON BENZERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNE DÖNÜŞTÜRÜLMÜŞ NÖROBLASTOM HÜCRE HATTINDA MANYETİK ALAN TOKSİSİTESİNE KARŞI PROPOLİSİN NÖROKORUYUCU ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Funda DORU

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes ARSLAN

Eş Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Şükrü KURT

Sürekli manyetik alan uygulamasının sitotoksik ve nörodejeneratif özelliklerini gösteren kapsamlı çalışma literatürde yoktur. Bu çalışmada, nörodejeneratif özellikleri anlamak için aşırı düşük frekanslı manyetik alanların (ELF-MF'ler) farklılaşmış nöroblastom (SH-SY5Y) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. SH-SY5Y hücre hattını olgun nöron benzeri hücrelere dönüştürmek amacıyla *all-trans* retinoik asit kullanılmış ve hücre döngüsü analiziyle farklılaşma doğrulanmıştır. ELF-MF'nin dönüştürülmüş hücrelerdeki toksikolojik etkilerini araştırmak için hücre kültürüne çeşitli aralıklarda ELF-MF'ler uygulanmıştır. Ayrıca, geniş doz aralığında propolis uygulanarak manyetik alanın olumsuz etkileri nöron hücreleri üzerinde azaltılmaya çalışılmıştır. Hoechst 33258 boyama, maruziyetten sonra kromozomal aberasyonların oluşumlarını araştırmak için kullanılmıştır. ELF-MF'ye maruz bırakıldıktan sonra, hücre ölüm mekanizmasını belirlemek amacıyla nekroz ve apoptoz için akış sitometrisi analizi yapılmıştır. ELF-MF'lerin nöronal hücreler üzerindeki mutasyon oluşturma potansiyelini araştırmak için apuritik/apirimiditik siteler değerlendirme testi kullanılarak DNA hasarı oluşumları gözlemlenmiştir. Toplam Antioksidan Durum (TAS) ve Toplam Oksidan Durum (TOS) parametreleri, oksidatif stresle sonuçlanan DNA hasarını ilişkilendirmek için araştırılmıştır. Hücre kültürlerine çeşitli aralıklardaki manyetik alan uygulamaları %37,6, %44,2 ve %48,2 nekrotik hücre ölümü ile sonuçlanmıştır. Ayrıca, ELF-MF maruziyetinden sonra DNA hasarı birikimi artmıştır. ELF-MF uygulaması, olgun nöron benzeri hücrelerde nekrotik etki göstermiştir. Propolis uygulamasıyla ELF-MF'lere maruz kalan hücre kültürlerinde sitotoksikitenin düştüğü ve oksidatif stres parametrelerinin neredeyse normal seviyelere geldiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, sürekli ELF-MF maruziyetinin, artan oksidatif stres, nükleer mutasyonlar ve nöronal hücrelerde nekrotik hücre ölümü yoluyla nörodejeneratif hastalığa neden olabileceğini ortaya koymaktadır. Propolis gibi bir antioksidan uygulamasının manyetik alan toksisitesinin önüne geçebileceği belirlenmiştir.

2022, 52 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sitotoksikite, Manyetik alan, Genotoksikite, Apuritik/apirimiditik bölgeler

ABSTRACT

MS. Thesis

DETERMINATION OF NEURONPROTECTIVE PROPERTIES OF PROPOLIS AGAINST MAGNETIC FIELD TOXICITY IN NEUROBLASTOMA CELL LINE TRANSFORMED INTO NEURON-LIKE CELL CULTURE

Funda DORU

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Mehmet Enes ARSLAN

Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Mustafa Şükrü KURT

There is no systematic investigation of the cytotoxic and neurodegenerative effects of continuous magnetic field application in the literature. To better understand neurodegenerative features, the cytotoxic effects of extreme low frequency magnetic fields (ELF-MFs) on differentiated neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line were explored in this work. The SH-SY5Y cell line was transformed into adult neuron-like cells using all-trans retinoic acid, and cell cycle analysis verified differentiation. To examine the toxicological effects of ELF-MF on transformed cells, a variety of ELF-MFs were used in cell culture. Furthermore, it was attempted to decrease the detrimental effects of the magnetic field on neuron cells by using propolis in a wide dosage range. The presence of chromosomal abnormalities following exposure was investigated using Hoechst 33258 staining. To establish the mechanism of cell death after exposure to ELF-MF, flow cytometry analysis for necrosis and apoptosis was done. DNA damage occurrences were identified utilizing the apurinic/aprimidinic sites assessment assay to examine the mutation potential of ELF-MFs on neural cells. To correlate DNA damage caused by oxidative stress, researchers looked at the Total Antioxidant Status (TAS) and Total Oxidant Status (TOS) factors. Magnetic fields of varying strengths were applied to cell cultures, resulting in necrotic cell death of 37,6%, 44,2 %, and 48,2%, respectively. Additionally, after being exposed to ELF-MF, the buildup of DNA damage increased. In mature neuron-like cells, ELF-MF injection caused necrosis. In cell cultures exposed to ELF-MFs, cytotoxicity reduced and oxidative stress markers returned to near-normal levels after propolis treatment. These findings show that prolonged ELF-MF exposure can promote neurodegenerative illness in neuronal cells by increasing oxidative stress, nuclear mutations, and necrotic cell death. It has been discovered that using an antioxidant like propolis can help reduce magnetic field poisoning.

2022, 52 page

Keywords: Cytotoxicity, Magnetic fields, Genotoxicity, Apurinic/aprimidinic sites

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca, desteğini ve bilgi birikimini benden esirgemeyen, üzerimde çok büyük emeği bulunan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes ARSLAN'a,

Tez sürecimde bana yol gösteren değerli eş danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Şükrü KURT'a,

Lisans ve yüksek lisans eğitimin boyunca aktardıkları bilgilerle bana katkı sağlayan, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün değerli hocalarına,

Tez sürecimde bana her türlü desteği gösteren değerli ekip arkadaşlarım, Sibel RUA, İlkan MUDU ve Abdurrahim KADI'ya,

Her zaman yanımda olan değerli dostlarım Merve YILDIRIM ve Elif AKSAKAL'a

Sevgisini ve desteęini hissettirerek her zaman yanımda olan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürler.

Funda DORU
Mayıs 2022

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Elektromanyetik Alan ve Özellikleri.....	1
1.1.1. Elektrik alan.....	1
1.1.2. Manyetik alan.....	2
1.1.3. Elektromanyetik alan.....	3
1.1.4. Elektromanyetik spektrum.....	3
1.1.5. Özgül soğurulma oranı (SAR).....	4
1.2. Elektromanyetik Alan Kaynakları.....	5
1.3. Elektromanyetik Alanın Biyolojik Sistemler Üzerine Etkileri.....	7
1.3.1. Elektromanyetik alanın organizmalar üzerine etki mekanizmaları.....	9
1.4. Elektromanyetik Alan ve Oksidatif Stres.....	10
1.4.1. Antioksidanlar.....	13
1.5. Propolis.....	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	25
3.1. Materyal.....	25
3.2. Metot.....	27
3.2.1. Propolisin elde edilmesi ve alkolde çözünen ekstraktların hazırlanması.....	27
3.2.2. ELF-MF üretebilen cihaz.....	27
3.2.3. SHSY-5Y nöroblastom hücre hattı kültürünün hazırlanması ve nöronal farklılaşmanın sağlanması.....	28
3.2.4. 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) hücre canlılığı testi.....	29

3.2.5. Laktat dehidrogenaz (LDH) testi.....	30
3.2.6. Toplam antioksidan durumu (TAS) analizi.....	31
3.2.7. Toplam oksidan durumu (TOS) analizi.....	31
3.2.8. Hoechst 33258 floresan boyama ile kromozomal bütünlük analizi.....	32
3.2.9. Akış sitometrisi analizi.....	33
3.2.10. Apuritik/apirimidinik (AP) bölgeleri analizi.....	34
3.2.11. İstatistiksel analizler.....	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	35
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR	46



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrat Derece
μM	Mikromolar
μT	Mikrotesla
A	Amper
B	Manyetik Akı Yoğunluğu
C	Coulomb
E	Elektrik Alan
G	Gauss
g	Gram
H	Manyetik Alan Gücü
Hz	Hertz
kg	Kilogram
m	Metre
mG	Milligauss
mM	Milimolar
mSv	Milisievert
mT	Militesla
N	Newton
T	Tesla
W	Watt
Z	Elektromanyetik Alan

Kısaltmalar

AChE	Asetilkolinesteraz
AD	Alzheimer Hastalığı
AP	Apurinik/Apirimidinik
ARP	Aldehit Reaktif Prob
ATP	Adenozin Trifosfat

CAT	Katalaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
ELF-MF	Aşırı Düşük Frekanslı Manyetik Alan (Extremely Low Frequency Magnetic Field)
EMF	Elektromanyetik Alan (Electromagnetic Field)
FBS	Fetal Bovine Serum
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş Glutasyon
GST	Glutasyon Transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
LDH	Laktat Dehidrogenaz
MDA	Malondialdehit
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolyum bromid
O ₂ ⁻	Süperoksit
OH	Hidroksil Radikali
PBS	Fosfat Tamponu
PD	Parkinson Hastalığı
PI	Propidium Iyodür
RA	Retinoik Asit
RF	Radyofrekans
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
SAR	Özgül Soğurulma Oranı (Specific Absorption Rate)
SI	Uluslararası Birim Sistemi (Système International d'Unités)
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAS	Toplam antioksidan durum (Total Antioxidant Status)
TOS	Toplam oksidan durum (Total Oxidant Status)
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. E (Elektrik), B (Manyetik) ve Z (Elektromanyetik) alanlarının dalgaları ve vektör yönleri.....	3
Şekil 1.2. Elektromanyetik spektrum.....	4
Şekil 1.3. Oksidatif denge	11
Şekil 1.4. Elde edildiği kaynağa bağlı olarak propolis içeriği	15
Şekil 3.1. ELF-MF üreten cihazın önden görünümü	28
Şekil 3.2. Sarı renkteki MTT ve mor renkteki formazan kristalinin canlı hücredeki kimyasal yapıları	29
Şekil 4.1. Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik hücre yapıları	36
Şekil 4.2. Hoechst 33258 kromozom bütünlüğü analizi için floresan boyama sonuçları	37
Şekil 4.3. Manyetik alan uygulamasına karşı farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre hattının akış sitometrisi analizi.	39
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda (1.56-200 µg/ml) propolis uygulamasına karşı farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre kültürlerinin hücre canlılığı analizi.	40
Şekil 4.5. Manyetik alan uygulamasına karşı propolisin farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre hattını üzerinde ki akış sitometrisi analizi.	41
Şekil 4.6. Manyetik alanla tedaviden sonra farklılaşmış SHSY-5Y hücrelerinde oluşturulan AP bölgeleri.....	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Canlı organizmaları etkileyen elektromanyetik alan kaynaklarının listesi...	6
Çizelge 1.2. Ekzojen antioksidanlar	14
Çizelge 1.3. Endojen antioksidanlar. Enzim yapıda olmayan antioksidanlar.....	14
Çizelge 1.4. Endojen antioksidanlar. Enzim yapıdaki antioksidanlar	14
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların ve modellerin listesi	25
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kit/kimyasal ve markaların listesi	26
Çizelge 4.1. Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik hücre yapıları	36
Çizelge 4.2. Çeşitli yoğunluklarda manyetik alan uygulamalarına karşı SH-SY5Y hücre hattında çekirdek anormallikler (NA).	37
Çizelge 4.3. 72 saat boyunca ELF-MF'lerin in vitro uygulamasından sonra TAS ve TOS seviyeleri.....	42

1. GİRİŞ

1.1. Elektromanyetik Alan ve Özellikleri

Maddeleri oluşturan elektron ve protonlar, negatif ve pozitif yüklerden oluşmaktadır. Uluslararası Birim Sistemi (Système International d'Unités, [SI])'ne göre birim yük Coulomb (C) olarak ifade edilir (Kurakin 2011). Elektrik alanları yalnızca elektrik yükünün varlığı ile ilişkililiken, manyetik alanlar elektrik yükünün (elektrik akımının) fiziksel hareketinin sonucu meydana gelmektedir. Benzer şekilde, hareket halindeki elektrik ve manyetik alan yüklerinin zamanla değişmesiyle elektromanyetik alanlar meydana gelmektedir (Lewczuk et al. 2014).

1.1.1. Elektrik alan

Elektrik alanları, durgun ya da hareketli elektrik yüklü parçacıklar tarafından oluşturulmaktadır. Elektrik yükleri, maddeyi nitelendiren temel parçacıklardan oluşur. Negatif yüke sahip elektronlar ve pozitif yüke sahip protonlar elektriğin oluşumunda rol oynar. Elektronlar, temel ve en küçük taşıyıcı parçacık yüküdür. Elektrik alanları elektronların bir yerden başka yere hareket etmesiyle ya da bir yerde birikmesiyle ortaya çıkar.

Elektrik akımı, bir iletkenin birim zamanda geçen yük miktarıdır. Elektriksel akımın birimi Amper'dir ($1 \text{ Amper [A]}=1 \text{ C/s}$). Elektrik yüklerinin hareketleri Coulomb Yasası ile açıklanır. Coulomb yasasına göre; aynı elektrik yüklü cisimler birbirini iterken, zıt elektrik yüklü cisimler birbirini çekerler. Ortamdaki yüklerin varlığı, elektrik alan oluşumunda rol oynar ve herhangi bir yük ya da yüklerin etrafında sürekli bir elektrik alan oluşmaktadır. Elektrik alanı, E ile gösterilir ve birimi Newton/Coulomb (N/C)'dur. Elektrik alanın doğrultusu, yönü ve bir değeri olduğu için vektörel bir büyüklüktür (Romanenko et al. 2017).

1.1.2. Manyetik alan

Manyetik alanlar, elektriksel yüklerin hareketi sonucunda meydana gelir. Hareket eden elektriksel yükler çevrelerindeki boşlukta bir manyetik alan oluşturlar. SI'ya göre Tesla (T), manyetik alan birimi olarak kullanılır ve genellikle mikrottesla (μT) cinsinden ifade edilir. Manyetik alanın büyüklüğü, alan şiddetine bağlı olarak Tesla, Gauss (G) ve Milligauss (mG) gibi birimlerle ifade edilir. Ortaya çıkan elektriksel akımın büyüklüğüne göre manyetik alanın büyüklüğü de artar. Ancak manyetik alanın etkisi mesafe arttıkça hızla azalır.

Manyetik alandan, birimi T ($1\text{ T}=10.000\text{ G}$) olan manyetik akı yoğunluğu (B) ve birimi Metre (m) başına Amper (A) (A/m) olarak ifade edilen manyetik alan gücü (H) olmak üzere iki şekilde söz edilebilir. İki nicelik $B=\mu H$ ifadesiyle ilişkilidir (burada μ orantı sabitidir). Manyetik alan vektörü, H ile ifade edilir (Ziegelberger et al. 2020).

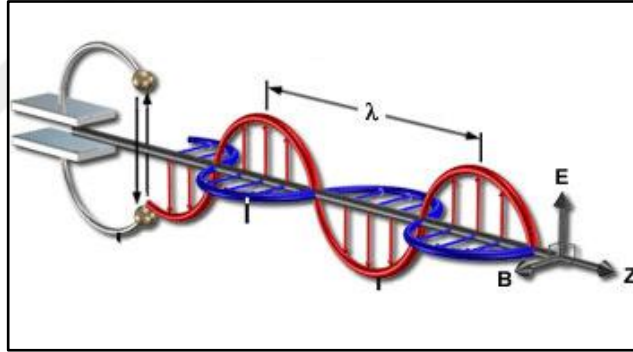
Manyetik alanlar ve elektrik akımları arasındaki bağlantı ile ilgili deneysel çalışmalar 1819 yılında Oersted tarafından başlamıştır. Oersted, akım taşıyan bir telin yakınında olan bir pusula iğnesinin tele dik konuma gelecek şekilde hizalandığını gözlemlemiştir. Pusula iğnesinin, Dünya'nın var olan manyetik alanı tarafından hizalandığını ve akımın etkisi devreye girdiğinde ise pusulanın yeniden yönlendirilmesinin, bir elektrik akımıyla bağlantılı bir manyetik alanın varlığıyla açıklanmıştır. Dolayısıyla, pusula iğnesi, akımla ilişkili manyetik alanın biçimini haritalamak için bir araç sağlamıştır. Bu deneysel buluş, manyetik alan ile elektrik akımı arasındaki bağlantının daha geniş deneysel takibine sebep olarak 1820'de Biot-Savart Teorisi'nin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu teoriye göre, manyetik alanın sonsuz küçük bir akım tarafından üretilir, aynı zamanda bu akımın yönü, doğrultusu ve yoğunluğu manyetik alanın şiddetini ve yönünü de belirler (Shadid and Shadid 2020).

Biyolojik sistemler tarafından üretilen manyetik alanlar biyoelektrik yüklerinin hareketiyle oluşur. Dolayısıyla bu manyetik alanlar, kasların kasılması, sinir sistemindeki sinyal iletimi veya biyolojik dokunun manyetizasyonu sonucu doğal olarak meydana gelen elektrik akımları tarafından üretilir (Suárez-Antola et al. 2020).

1.1.3. Elektromanyetik alan

Bileşenlerini elektrik ve manyetik alanların oluşturduğu elektromanyetik alan (Electromagnetic Field-EMF), elektrik yüklerinin hareketi sonucunda boşlukta meydana gelen değişiklikler olarak tanımlanır. Durgun haldeki elektrik yükünün çevresinde elektrik alanlar mevcuttur. Hareket halindeki elektrik yükünün etrafında ayrıca manyetik alan meydana gelir. Belirli şartlarda elektromanyetik alanlar, ayrıca elektromanyetik enerjiyi taşıyan bir dalga hareketi olarak tanımlanır. Bir radyofrekans kaynağından üretilen ve boşlukta yayılan dalgalara ise elektromanyetik dalga denilmektedir.

Dalgalar şeklinde yayılan bu enerji elektromanyetik radyasyon (ışınım) olarak tanımlanır. Tüm alan vektörleri boşlukta birbirlerine dik olarak bulunurlar (Şekil 1.1). Hem manyetik hem de elektrik alanların vektörlerinin hareketi sinüs eğrisi şeklindedir (Lewczuk et al. 2014).



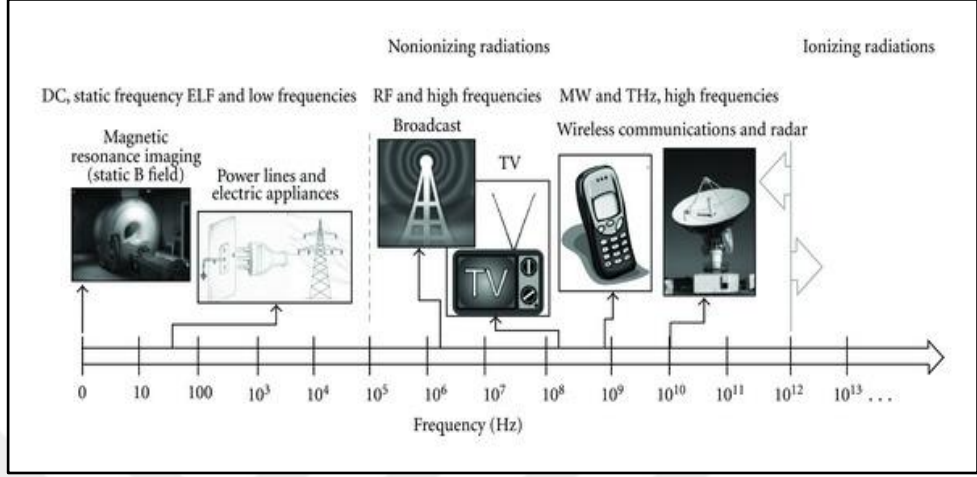
Şekil 1.1. E (Elektrik), B (Manyetik) ve Z (Elektromanyetik) alanlarının dalgaları ve vektör yönleri.

1.1.4. Elektromanyetik spektrum

Çeşitli kaynakların ortaya çıkardığı EMF, geniş frekans aralığına dağılmıştır. Bu durum elektromanyetik spektrum olarak adlandırılır ve elektromanyetik dalgalar frekanslarına göre özel isimlerle adlandırılarak farklı gruplara ayrılırlar. Bu grupların dalga boyları da farklılık göstermektedir (Huang et al. 2021).

1. GİRİŞ

Elektromanyetik spektrumda temel olarak, iyonlaştırıcı ve iyonlaştırmayan radyasyon şeklinde ayrılan ve Şekil 1.2’de yer alan radyasyonların (300 GHz’in altındaki frekanslarda) tümü iyonlaştırıcı olmayan radyasyonlardır.



Şekil 1.2. Elektromanyetik spektrum (Consales et al. 2012)

1.1.5. Özgül soğurulma oranı (SAR)

Elektromanyetik ışınımın vücut dokularındaki soğurulma oranı özgül soğurulma oranı (SAR) olarak adlandırılır. SAR, kilogram başına Watt birimi [W/kg] kullanarak insan dokusunun birim kütledeki soğurulan gücü ölçer. Radyasyonun enerji yoğunluğu, doku ile yaptığı etkileşimin türü, maruz kalma süresi ve dokudan soğurulan enerjinin miktarına bağlı olarak dokuda zarar meydana getirebilir.

Biyolojik sistemlerdeki dokulardan soğurulan enerjinin miktarından çok, SAR değeri önemlidir. Çeşitli çalışmalar, insan vücudunun 1 °C’lık sıcaklık artışını düzenleme konusunda birtakım problemler yaşadığını göstermiştir. Federal İletişim Komisyonu, The Federal Communications Commission (FCC), 1 °C’lık sıcaklık artışı konusunda kısmi vücut maruziyeti durumunda 1 gram (g) doku için yaklaşık 1,6 W/kg’lık SAR sınırlaması uygulamaktadır; diğer düzenleyici kurumlar (örneğin, Avrupa Elektroteknik Standardizasyon Komitesi) da SAR ölçümlerinde 10 g doku için yaklaşık 2 W/kg’lık benzer sınırlama uygulamaktadır (Zhang et al. 2020).

1.2. Elektromanyetik Alan Kaynakları

Elektromanyetik alan kaynakları, doğal ve doğal olmayan kaynaklar şeklinde ikiye ayrılabilir:

i. Doğal kaynaklar: Yıldızlar ve magnetarlar gibi gök cisimlerini, Dünya'yı ve canlı organizmalardaki elektriksel uyarıların akışını içeren biyolojik süreçleri içerir. Dünyanın manyetik alanı, manyetosfer olarak bilinen, Dünya'yı çevreleyen geniş bir alana uzanan gezegen çekirdeğinden kaynaklanan başka bir doğal alandır. Güçlü elektromanyetik alanların önemli bir kaynağı, yıldırım olarak bilinen atmosferik deşarjlardır. Bu doğal fenomenlere eşlik eden hızlı radyasyon salınımları, yüksek güç yoğunlukları ve yüksek frekanslarla karakterize edilir. Canlı organizmalarda elektromanyetik alanlar, sinir sistemindeki sinyallerin iletilmesinden ve otonom olarak elektriksel uyarılar üreten yapılardan (kalp gibi) kaynaklanır (Moon 2020).

ii. Doğal olmayan kaynaklar: Bu tür elektromanyetik alan kaynaklarının tarihi nispeten kısadır ve yalnızca son yüz yılı kapsar. Doğal olmayan elektromanyetik alan kaynakları iki gruba ayrılır. Birinci grup, madde parçacıklarının iyonlaşmasına neden olabilen nispeten yüksek bir enerji ile karakterize edilen iyonlaştırıcı radyasyonu içerir. Bu tür radyasyonun varlığının öncelikle doğal nedenleri vardır (istatistiksel yıllık maruz kalma dozu 2,4 milisievert (mSv) civarındadır). Bununla birlikte, çeşitli radyoaktif izotopların kullanıldığı teknik cihazlar gibi doğal olmayan iyonlaştırıcı radyasyon kaynakları, günümüzde halk sağlığının korunmasında en önemli sorun olarak kabul edilmektedir. İkinci grup, madde parçacıklarını iyonize etmek için çok düşük olan iyonlaştırıcı olmayan enerji radyasyonunu içerir. Bu tür radyasyonun ortak kaynakları, elektrik enerjisi üretimi, iletimi ve kullanımı için kullanılan araçlardır (yüksek voltajlı enerji hatları, trafo merkezleri, motorlar, jeneratörler, endüstriyel aletler ve ev aletleri, ev kabloları vb.). Elektromanyetik radyasyonun çok önemli kaynakları arasında telekomünikasyon sistemleri (radyo, televizyon, internet ve Wi-Fi) ile teşhis veya tedavi için kullanılan tıbbi cihazlar yer alır (Ahlbom et al. 2008).

Avrupa Komisyonu'na göre, iyonlaştırıcı olmayan radyasyon birkaç seviyeye ayrılabilir:

1. GİRİŞ

- i. Statik Alanlar (SMF),
- ii. Son Derece Düşük Frekans Alanları (ELF Alanları),
- iii. Ara Frekans Alanları (IF Alanları),
- iv. Radyo Frekansı Alanları (RF Alanları)

Canlı organizmaları etkileyen ve yukarıda bahsedilen tipik elektromanyetik alan/radyasyon kaynakları Çizelge 1.1’de listelenmiş ve açıklanmıştır.

Çizelge 1.1. Canlı organizmaları etkileyen elektromanyetik alan kaynaklarının listesi (Romanenko et al. 2017).

FREKANS SEVİYLERİ	FREKANS ARALIKLARI	RADYASYON KAYNAKLARI
Statik	0 Hz	Toprak, video ekranları, manyetik rezonans görüntüleme ve diğer teşhis/bilimsel ekipman, elektroliz, kaynak
Son Derece Düşük Frekans Alanları	0–300 Hz	Güç iletim hatları, ev kabloları, araba elektrik motorları, elektrikli trenler ve tramvaylar, kaynak cihazları
Orta düzey frekans	300 Hz–100 kHz	Arabalarda, evlerde ve mağazalarda kullanılan hırsızlık önleme cihazları, kart okuyucular, metal detektörler, manyetik rezonans görüntüleme, kaynak cihazları, video ekranları
Radyo frekansı	100 kHz–300 GHz	Radyo, televizyon, cep telefonları, mikrodalga fırınlar, radarlar ve radyo vericileri, manyetik rezonans görüntüleme

1.3. Elektromanyetik Alanın Biyolojik Sistemler Üzerine Etkileri

Günümüzde geniş spektrumlu elektromanyetik dalgalar radarlardan, iletişim araçlarından, cep telefonu baz istasyonlarından, yüksek gerilim hatlarından, radyo ve televizyon vericilerinden, trafo merkezlerinden, özellikle ofis ve evlerdeki elektrikli cihazlardan olmak üzere birçok elektrikli sistemden çevreye yayılmaktadır. Çevremizdeki bu elektromanyetik alana maruz kalan biyolojik sistemlerin, bu alanlardan olumsuz etkilenme olasılığı, bilim insanlarının ilgisini çekecek düzeydedir. Bu olumsuz etkiler kısa ve uzun vadeli etkiler olarak iki şekilde sıralanabilir. Kısa vadeli etkiler, baş ağrısı, baş dönmesi, halsizlik, gözlerde yanma hissi, uyku düzensizliği, yorgunluk, dikkatsizlik ya da sürekli rahatsızlık nedeniyle topluma katılmamak gibi etkilerdir. Uzun vadeli etkiler, biyolojik sistemlerdeki doku ya da organlarda, sinir sisteminde, hücre yapısında, moleküler ve kimyasal bağlarda, bağışıklık sisteminde görülebilecek olumsuz etkilerdir (Türedi vd 2020).

Elektromanyetik dalgaların frekansı ile dokulara penetrasyon özellikleri arasında ters bir ilişki bulunmaktadır; yüksek frekanslı ışınların dokulara nüfuz edebilme yeteneği daha azken düşük frekanslıların ise daha fazladır. Dolayısıyla yüksek frekans EMF'lerden kaynaklanan enerjinin büyük bir kısmı deri yüzeyine yakın yoğunlaşır ve çoğunlukla ısı etkisi olarak açığa çıkmaktadır. Bu sebepten dolayı düşük frekanslı EMF'ler yüksek frekanslara göre daha derin bölgelere etki etmektedir (Kaplan et al. 2016). Aşırı düşük frekanslı manyetik alanların (Extremely Low Frequency Magnetic Field-ELF-MF) sağlığa olan etkilerine olan ilgi, ilk olarak 1979 yılında Wertheimer ve Leeper'in, ELF-EMF maruziyetiyle çocukluk dönemi kanserleri arasındaki ilişkiyi göstermelerinden sonra artmıştır. Bu çalışmayla birlikte ELF-MF'lerin biyolojik sistemlerdeki etkilerinin ortaya çıkarılması konusundaki araştırmalar hızla artmıştır (Touitou et al. 2022).

Bazı çalışmalar, hücre kültürlerine 50-60 Hz ELF-MF uygulandıktan sonra, DNA kırılmaları, kromozomal kararsızlık ve apoptozun gözlemlendiğini göstermektedir (Park et al. 2018). Bu nedenle, ELF-MF'ler 2002 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından 2B kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. Buna karşılık, düşük enerji nedeniyle, benzer frekans ve yoğunlukları kullanan ELF-MF'ler üzerinde yapılan diğer bazı çalışmalarda, dikkate değer herhangi bir hücre hasar gözlemlenmemiştir.

1. GİRİŞ

Örneğin, 1mT'deki 60 Hz ELF-MF'ler, fare ve insan akciğer fibroblast hücreleri ve ayrıca insan meme bezi ve insan akciğer epitel hücreleri üzerinde önemli etkilere sebep olmamıştır (Song et al. 2018). Ayrıca, 2mT'de 50 Hz ELF-MF'nin kemirgen beyin hücreleri üzerinde hiçbir etkiye neden olmadığı iddia edildi. Bu nedenle, ELF-MF'lerin hücreler üzerindeki etkileri hala oldukça tartışmalıdır ve henüz tam olarak anlaşılmamıştır (Maffei 2022).

Bir açıdan, canlı organizmaların çeşitli hücresel sistemleri, makromoleküler etkileşimlerden protein olgunlaşmasına ve hücre yapılarındaki değişikliklere kadar elektromanyetik alanlar aracılığıyla düzenlenir. Çok sayıda çalışma, düşük ve aşırı düşük frekanslı manyetik alana maruz kalmanın farklı türdeki kanser patolojisi ve oluşumu ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır (Tian et al. 2018). Yapılan diğer araştırmalarda, *in vivo* geliştirilen meme tümörüne karşı manyetik alanların kemoterapötik uygulamada ve akciğer karsinomlarına karşı antitümör aktiviteyi artırıcı etkiye sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Markov 2007; Yuan et al. 2018). Nörofizyolojik çalışmalar, manyetik alanların hücre zarı üzerindeki transmembran kalsiyum (Ca^{2+}) akışını düzenleyerek diyamanyetik özellikleri aracılığıyla fosfolipid moleküllerinin dönüşünü manipüle edebildiğini göstermiştir. Bu çalışmalar, hücre zarından Ca^{2+} transferi üzerindeki manyetik alan etkilerini ve sonuç olarak apoptozun indüklenmesiyle hücre ölümünü ilişkilendirebilir (Tenuzzo et al. 2006).

Manyetik alana maruz kalan sıçan lenfositlerinde DNA hasarını ve dolayısıyla hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir. Sitotoksikite mekanizması için, manyetik alanların oluşturduğu lipid peroksidasyonunun ve demir iyonuna maruz kalmanın serbest radikal oluşumları ile sonuçlandığı öne sürülmüştür (Coballase-Urrutia et al. 2018). Manyetik alanlar ve biyolojik sistemin etkileşim mekanizması muhtemelen radikal çift mekanizmaları yoluyla gerçekleşebilir ve geniş spektrumlu hücresel yapılar nükleik asitler, lipidler, proteinler ve karbonhidratlar gibi serbest radikaller tarafından zarar görebilir (Barnes et al. 2015).

Yapılan çalışmalar, ELF-MF'ye maruz kalmaktan kaynaklanan hücresel oksidatif durumdaki değişikliklerin bir sonucu olarak biyokimya, fizyoloji ve genel işlevlerdeki birtakım değişiklikleri bildirmiştir. Bu değişiklikler; DNA hasarı, bağışıklık tepkisi,

inflamatuar yanıt, apoptoz, protein yanlış katlanması ve prion üretimi, hücre çoğalması ve farklılaşması, beyin hipokampal dilimlerinde ritmik yavaş aktivite, işitsel olayla ilgili potansiyeller, kalp hızı, yara iyileşmesi, kemik oluşumu, inme sonrası iyileşme, hiperaljezi, bilişsel bozulma, uyumsuzluk-olumsuzluk yanıtı, depresif bozukluk, kaygı benzeri davranış şeklinde sıralanabilir (Schuermann et al. 2021).

1.3.1 Elektromanyetik alanın organizmalar üzerine etki mekanizmaları

Elektromanyetik spektrumda, canlılar üzerindeki etkilerine göre iyonlaştırıcı (Ionizing) ve iyonlaştırmayan (Non-Ionizing) olmak üzere iki türlü elektromanyetik ışınım bulunmaktadır.

i. İyonlaştırıcı (Ionizing) elektromanyetik ışınım: Madde içerisine nüfuz ederek molekülleri oluşturan atomlardan elektronların kopmasını sağlayacak kadar foton enerjisine sahip yüksek frekans bölgesinde (300GHz üstü) yer alan elektromanyetik dalgalarıdır. İyonlaştırıcı ışınımın yüksek maruziyeti sonucunda hücre organellerinde ve DNA zincirinde hasar meydana gelebilir. Proton, nötron, alfa, beta, gama ve x ışınları gibi yüksek enerjiye sahip ışınım iyonlaştırıcı ışınımlardır.

ii. İyonlaştırıcı olmayan (Nonionizing) elektromanyetik ışınım: Atomları ve molekülleri iyonize etmek için yeterli enerjiyi taşıyamayan her türlü EMF'leri ifade eder. Maddeden geçerken yüklü iyonlar üretmek yerine, sadece uyarılmak için yeterli enerjiye sahip olduğundan, bir elektronun daha yüksek bir enerji durumuna geçmesini sağlar ve yeterli enerjiye sahip olmadığı için doğrudan DNA'ya zarar vermez. Yakın ultraviyole (UV), görünür ışık, kızılötesi, radyo dalgaları, düşük frekanslı radyofrekans (RF), ve ELF-EMF'ler iyonlaştırıcı olmayan EMF'lere örnektir. Bu ışınım, maruz kalma süresi, maruz kalınan mesafe ve frekans gücü gibi değişkenlere bağlı olarak biyolojik sistemlerde termal etki ve termal olmayan etkiler olmak üzere iki şekilde etki meydana getirebilirler (Shahbazi-G et al. 2018).

i. Termal (Isıl) etkiler: Dokular tarafından soğurulan elektromanyetik enerjinin ısıya dönüşmesiyle vücuttaki sıcaklığın artması şeklinde tanımlanmaktadır. Vücuttaki sıcaklığın artması durumunda, terleme, kan dolaşımı gibi yollardan ısının uzaklaştırılması

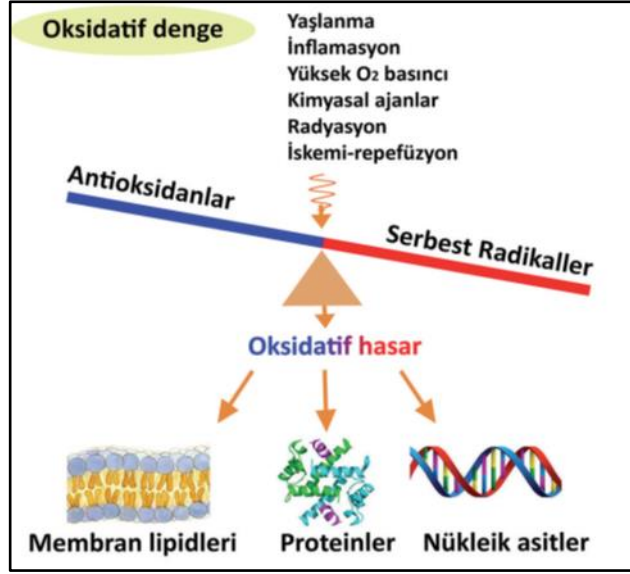
sonucu dokuda ısı dengesi sağlanır. EMF maruziyeti ile biyolojik sistemlerde meydana gelen ısı artışına karşılık meydana gelen çeşitli fizyolojik olaylar doku veya organlarda dejeneratif değişikliklere sebep olabilir.

ii. Termal olmayan etkiler: Dokulardaki ısı artışına bağlı olmadan elektromanyetik dalganın doğrudan veya dolaylı olarak moleküller, hücreler ve dokularda gösterdikleri etkiler olarak tanımlanmaktadır. Günlük hayatta kullanılan elektronik aletlerin canlılarda duyu ve sinir sistemi üzerine, beyin tümörleri üzerine, protein sentezi ve DNA üzerindeki etkileri gibi birçok konuda yapılan deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar ile termal olmayan etkiler belirlenmeye çalışılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, termal olmayan etkiler oksidatif stres oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (Karimi et al. 2020).

Elektromanyetik alanlar iyonlaştırıcı olmadığından, biyolojik sistemlerle etkileşimin altında yatan potansiyel sorumlu olarak görülen geleneksel genotoksik mekanizmaların araştırılması çelişkili sonuçlar göstermiştir. Hücre döngüsündeki değişiklik, hücre ölümünün indüklenmesi, protein ekspresyonunun modifikasyonu ve esas olarak oksidatif stres öne sürülmüştür. Ancak, insan hastalıkları ile elektromanyetik alanlara maruz kalma arasındaki bağlantıyı ortaya koyan ikna edici bir moleküler mekanizma hala net olarak belirlenmemiştir (Van Huizen et al. 2019).

1.4. Elektromanyetik Alan ve Oksidatif stres

Biyolojik sistemler, serbest radikaller ile onları temizleme etkisine sahip olan antioksidanların oluşturduğu oksidatif dengeye sahiptir. Organizmalarda bu dengenin bozulması oksidatif stresin meydana gelmesine sebep olur (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Oksidatif denge

Oksidatif stres, öncelikle reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarı nötralizasyon kapasitesini aştığında ortaya çıkar. En önemli reaktif oksijen türleri, hidroksil radikalleri ($\bullet\text{OH}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), Süperoksit ($\bullet\text{O}_2^-$) ve organik bileşikleridir. ROS'un ana kaynaklarından biri, her hücrede bulunan ve enerji ihtiyacında merkezi bir rol oynayan mitokondridir. ROS, mitokondriyal elektron taşıma zincirinin (solunum zinciri), özellikle $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 ve $\bullet\text{OH}$ 'nin metabolik süreçleri sırasında oluşur. Mitokondriyal solunum zincirinde tüketilen oksijenin yaklaşık %2'sinin süperoksit radikallerine dönüştürüldüğü tahmin edilmektedir (Aslankoç vd 2019).

Normal koşullar altında, serbest radikal seviyeleri, glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) dahil olmak üzere çeşitli indüklenebilir antioksidan enzimler tarafından kontrol altında tutulur. Serbest radikal üretiminde aşırı bir artış veya antioksidan kapasitede bir eksiklik olduğu durumlarda meydana gelen oksidatif stres, hücre hasarına ve fonksiyonel eksikliklere yol açar. Bununla birlikte, serbest radikaller aynı zamanda önemli hücre işlevlerine de hizmet eder ve normal hücre işlevlerini yöneten hücre sinyalleşme basamaklarında ve bakterilere karşı bağışıklık savunmasında yer alır. Ayrıca apoptozu tetikleyen hücre süreçlerinde yer alırlar. Bu nedenle, serbest radikalleri kritik bir fizyolojik homeostatik seviyede tutmak önemlidir. Dolayısıyla kalıcı oksidatif stres, oksidasyon yoluyla işlevlerini kaybeden mitokondri, mikrofilamentler ve proteinlerin yıkımına ve sonuçta bu bileşenlerin metabolik süreçlerde işlevlerinin bozulmasına neden olabilir (Forman and Zhang 2021).

1. GİRİŞ

Oksidanlar ve antioksidanlar üreten metabolik süreçler, EMF'ler gibi çevresel faktörlerden etkilenir. Artan EMA maruziyeti, normal seviyeden daha fazla ROS üreterek oksidatif dengenin bozulmasına sebep olabilir (Piszczek et al. 2021). EMF'ye maruz kalma, serbest radikal üretiminde bozulmaya yol açtığından ve hücrelerde aşırı serbest radikal varlığı bir stres olarak kabul edilebileceğinden, kronik EMA'ya maruz kalan canlı organizmalarda gözlemlenen etkiler, maruz kalmanın ne kadar süredir gerçekleştiğine, çalışılan organa ve hücre tipine bağlı olabilir. Yapılan çalışmalarda, EMF'nin sebep olduğu oksidatif stresin hücresel bileşenlere, özellikle zarlardaki lipidlere ve nükleik asitlere zarar verebileceği gözlemlenmiştir (Albuquerque et al. 2016).

ROS birikimi, özellikle nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere, yaşlanmaya bağlı hastalıklarda etkin bir role sahiptir; ancak rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan bazı çalışmalar ELF-MF'ye maruz kaldıktan sonra insan sinir sisteminde daha yüksek tümör insidansı olduğunu kanıtlamıştır.

Uzun ömürleri ve sınırlı yenilenmeleri nedeniyle, nöronların oksidatif strese karşı çok duyarlı olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle, ROS oluşumu ve oksidatif stres, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma ile ilişkilendirilmiştir. Artan yaşlı nüfus göz önüne alındığında, özellikle gelişmiş ülkelerde, yaşlanmaya bağlı hastalıkların doğru yönetimi önemli hale gelerek özellikle antioksidan tedaviler üzerine araştırmalar gelişmektedir. Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu veya iyileştirici tedaviler geliştirmeye yönelik çalışmaların yürütüldüğü oksidatif stres araştırmalarının merkezinde nöronal hücreler yer almaktadır (Oswald et al. 2018).

1.4.1. Antioksidanlar

Genel olarak, ROS'un da dahil olduğu serbest radikallerin biyolojik sistemlere vereceği hasarı engellemek için antioksidanlar olarak adlandırılan savunma mekanizmaları mevcuttur (Gulcin 2020).

Canlı organizmalar, serbest radikaller oluşumuna karşı güçlü savunma sistemlerine sahiptirler. Organizmalar, oksidatif dengeyi sağlandığı sürece bu zararlı bileşiklerden etkilenmemektedir. Ancak antioksidan savunma sistemlerinin yeteri kadar etkili olamadığı durumlarda veya serbest radikallerin miktarı antioksidan enzimlerden yüksek olduğu durumlarda organizmada hücrel ve metabolik hasarlar meydana gelmektedir. Antioksidan etki mekanizmalarından bazıları şu şekildedir:

- i. Serbest haldeki tekli oksijeni ortamdaki uzaklaştırırlar ya da bu oksijenin olduğu bölgedeki miktarını düşürürler.
- ii. Katalitik metal iyonlarının ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlarlar.
- iii. H_2O_2 ya da $\bullet O_2$ gibi önemli ROS'ları uzaklaştırırlar ya da etkisini azaltarak zayıf hale dönüştürürler.
- iv. ROS oluşumuna sebep olan reaksiyonların başlamasına engel olurlar.
- v. ROS oluşumuyla meydana gelen hasarların onarımını sağlarlar (Moldogazieva et al. 2018).

Endojen ve Ekzojen olarak iki şekilde sınıflandırılan antioksidanların türleri ve etki mekanizmaları Çizelge 1.2 ve 1.3'te yer almaktadır (Pisoschi and Pop 2015).

1. GİRİŞ

Çizelge 1.2. Ekzojen antioksidanlar

Antioksidan	Etki Mekanizmaları
Askorbik Asit	OH•'i uzaklaştırır.
B-Karoten	Yağda çözünür radikaller ile tekli oksijeni uzaklaştırır.
Vitamin E	Yağda çözünür.

Çizelge 1.3. Endojen antioksidanlar. Enzim yapıda olmayan antioksidanlar

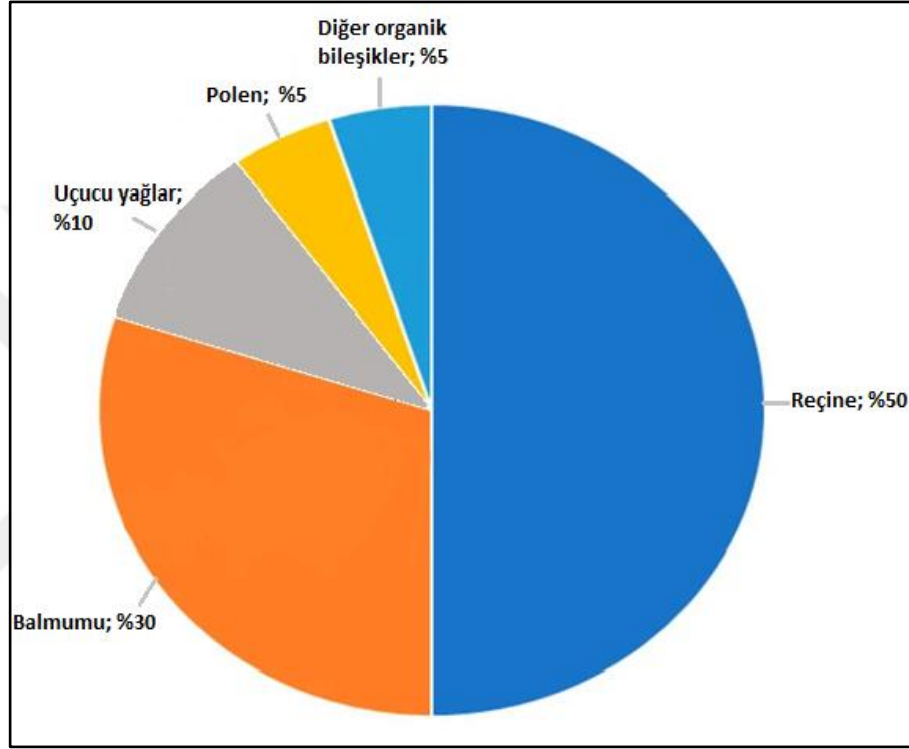
Enzim Yapıda Olmayan Antioksidanlar	
Albümin	Bakır ve hem grubu bağlar, HOCl'u ortamdan uzaklaştırır.
Seruloplazmin	H ₂ O ₂ 'i kullanarak bakırın reoksidasyonunu sağlar.
Transferrin	Ferrik haldeki demir iyonlarını (Fe ³⁺) bağlar.
Laktoferrin	Fe ³⁺ 'ü düşük pH değerlerinde bağlar.
Haptoglobin	Hemoglobini bağlar.
Hemopeksin	Hem grubunu bağlar.
Bilirübin	Peroksil radikallerini uzaklaştırır.
Glikoz	OH• temizler.
Ürat	Metalleri bağlayarak radikalleri uzaklaştırır.
Melatonin	OH• uzaklaştırır.
Mukus	OH• uzaklaştırır.

Çizelge 1.4. Endojen antioksidanlar. Enzim yapıdaki antioksidanlar

Enzim Yapıdaki Antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz (SOD)	•O ₂ ⁻ uzaklaştırır. (O ₂ ⁻) O ₂ ⁻ + 2H ⁺ → H ₂ O ₂ + O ₂
Katalaz (CAT)	H ₂ O ₂ 'i ortamdan uzaklaştırır. 2 H ₂ O ₂ + O ₂ → H ₂ O + O ₂
Glutatyonperoksidaz (GPx)	H ₂ O ₂ 'i ortamdan uzaklaştırır. H ₂ O ₂ +2 GSH → GSSG+2 H ₂ O
Sitokrom Oksidaz	Oksijenin indirgenmesi esnasında serbest oksijenin ortama girişini önleyerek ROS'un oluşmasını engeller.

1.5. Propolis

Arı tutkalı olarak da bilinen propolis, arılar tarafından çeşitli bitki türlerinden biriktirilen bir reçine maddesidir. Propolisin üretiminde yer alan farklı kıtalar, bölgeler ve bitki türleri, bileşimini birbirinden farklı kılmaktadır. Elde edildiği kaynağa bağlı olarak propolisin içerdiği bileşikler Şekil 1.4 de gösterilmiştir (Przybyłek and Karpiński 2019).



Şekil 1.4. Elde edildiği kaynağa bağlı olarak propolis içeriği

Propolisin, farklı kimyasal bileşime sahip olsa da antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiparaziter, antiprotozoal, antimutajenik ve antitümör gibi benzer aktivitelere sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Villena et al. 2022). Temel olarak, delik ve çatlakların kapatılması, kovan iç yüzeyinin pürüzsüzleştirilmesi ve kovan sıcaklığının korunması amacıyla kullanılmasının yanı sıra yırtıcıların istilasının önlenmesi amacıyla da propolis yaygın olarak kullanılır. Aynı zamanda antimikrobiyal aktivite gösterdiğinden kovanda aseptik ortam sağlayarak kovanlara yayılan ve dışarı atılmayacak kadar büyük olan ölü haşerelerin vücudunu örtmek için kullanılır (Coşkun ve İnci 2020).

1. GİRİŞ

Propolis, sayısız hastalığın kaynağı olan oksidatif stresin etkilerine karşı koyabilen doğal antioksidan olma potansiyeli göstermektedir. Propolisin farmakolojik etkilerinin çoğu, bu ürünün antioksidan özellikleri ile ilgilidir (Bazmandegan et al. 2017). Tüm propolis türlerinin (Avrupa, Brezilya, Türk) yüksek düzeyde antioksidan aktiviteye sahip olduğunu gösteren bilimsel kanıtlar vardır. Kimyasal analiz deneyleri, propolis ve ekstraktlarının serbest radikal temizleme ve metal şelatlama özelliklerine sahip olduğunu göstermektedir. Genellikle, serbest radikalleri elimine etme yeteneği gösteren maddelerde bulunan fenolik karakterdeki bileşikler (flavonoidler ve fenolik asitler) ve fenolik karaktere sahip olmayan bileşikler (amirinler gibi) propolisin antioksidan kapasitesinden sorumludur (Rzepecka-Stojko et al. 2015; Almeida et al. 2017).

Flavonoidler genellikle glikozidler şeklinde bulunurlar ve burada bir karbonhidrat grubuyla bir glikozidik bağ ile bağlanan aglikonların rolünü oynarlar. Flavonoidlerin moleküllerinde fenol gruplarının varlığı onlara antiradikal aktivite kazandırır çünkü süpürme sırasında oluşan radikaller rezonans stabilize edilir (Panche et al. 2016). Bir propolis türü olan Okinawa propolisinin prenil edilmiş flavonoidlerinin enzim inhibitör etkileri, asetilkolinesteraz (AChE) aktiviteleri açısından incelenmiştir. Bazı flavonoidlerin, Alzheimer Hastalığı (AD)'nı tedavi etmek için kullanılan bir AChE inhibitörü olan Donepezil'e kıyasla güçlü AChE inhibe edici aktivite sergilediği bulunmuştur (Shahinozzaman et al. 2018).

Fenolik asitler, karboksilik ve fenol gruplarına sahip bileşiklerdir. Son zamanlarda, oksidasyon süreçlerinin önlenmesi ve oksijen türlerinin üretilmesinin yanı sıra prooksidatif metallerin şelatlanması dahil olmak üzere antioksidan aktiviteleri göz önüne alındığında, insan sağlığının korunması için olası uygulamalarına merakın arttığı gözlemlenmiştir (De Paula et al. 2017).

Özellikle Brezilya türüne ait olan propolisin antioksidan kapasitesinden sorumlu olan amirinler fenolik karaktere sahip olmayan bileşiklere aittir. Bitki kaynaklı triterpenoidlerden olan α - ve β - amirinlerin, antioksidan, antiapoptotik, anti-inflamatuar, antifibrotik ve ayrıca gastro- ve hepatoprotektif etkiler dahil olmak üzere çok sayıda faydalı özellik sergiledikleri bildirilmiştir. Çalışmalar, Parkinson hastalığı tedavisinde β -amirin'in olası uygulamasını ortaya çıkarmıştır (Moreira et al. 2013; Wei et al. 2017).

1. GİRİŞ

Çeşitli çalışmalarda, farklı bölgelerden alınan propolisin öz nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Örneğin, Brezilya yeşil propolisi, farklılaştırılmış PC12 nöronal hücre kültürlerinde H₂O₂ ile indüklenen nörotoksisiteye karşı engelleyici bir etki göstermiştir. Aynı çalışmada propolisin fokal serebral iskemi ile indüklenen fare modellerinde oksidatif stresin inhibisyonu yoluyla beyin hasarını iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Brezilya yeşil propolisinin anti-Parkinson hastalığı (PD) özellikleri de araştırılmış ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA) sıçan modelinde propolis uygulamasının dopaminerjik nigrostriatal nöronların kaybını ve kardiyak otonomik disfonksiyonu azaltacağı ortaya konmuştur (Shimazawa et al. 2005).

Günümüzde, nörodejeneratif bozukluklar, kanser, diyabet ve ateroskleroz gibi çok sayıda hastalığın patogenezinin altında yatan oksidatif stresin etkilerinin yanı sıra farklı zararlı faktörlerin ve ilaçların olumsuz etkilerine karşı koyabilen doğal maddelere gösterilen merak giderek artmaktadır. İlaçların doğal kaynaklardan elde edilmesinin önemi göz önünde bulundurularak yapılan çalışmalarda amaç, propolis gibi seçilmiş ürünlerinin antioksidan kapasitesi ve bunların antioksidanla ilgili potansiyel terapötik uygulamaları ile mevcut antioksidan özelliklerinin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasıdır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Wertheimer and Leeper (1979) tarafından yapılan çalışmada, 1976-1977 yıllarında Colorado'da, kansere yakalanan çocukların evlerinin yakınında, sağlıklı çocukların evlerine kıyasla, fazla sayıda yüksek akımlı elektrik tesisatı olduğu kaydedilmiştir. Uzun süre aynı adreste yaşayan çocuklarda hastalığın görülmesi, bu bulguyu güçlendirmiştir. Yapılan araştırma, hastalığın maruziyet ve dozla ilişkili olduğunu göstermiştir.

Scarfi et al. (1991) tarafından yapılan çalışmada, mikronükleus yöntemi ile 16 sağlıklı donörden alınan fitohemagglutinin ile uyarılan insan lenfosit kültürlerinde, aşırı düşük frekanslı manyetik alanların olası genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. 4 farklı koşulda çalışılan bu çalışmada mikronükleusu indükleyebilen güçlü genotoksik ajan olarak bilinen Mitomisin-C'nin eklendiği kültürler, mikronükleus yöntemi için kontrol olarak kullanılmıştır. Alana maruz bırakılan kültürlerdeki mikroçekirdeklerin sıklığı, maruz kalmayan kontrol gruplarıyla benzerlik göstermiştir.

Rosen (1993) tarafından yapılan çalışmada, 123 mT'lik bir statik manyetik alana maruz kalma ile ilişkili presinaptik membran fonksiyonundaki geri dönüşümlü değişimin süreci, bu alanların biyomembranları etkilediği mekanizmayı tanımlamaya yardımcı olmak amacıyla incelenmiştir. Elde edilen bulgular, membran içindeki diyamanyetik moleküler alanların, nörotransmitter salınımından sorumlu mekanizmayla bağlantılı olduğunu düşündürmüştür.

Bowman et al. (1995) tarafından yapılan çalışmada, statik ve ELF-MF'lerin bileşik etkilerine maruz kalmanın çocukluk çağı lösemi riskiyle ilişkili olabileceği sunulmuştur. Denek ve kontrol gruplarının, biyolojik aktivite gösterdiği tahmin edilen 38.0 μ T ve 50.6 μ T bant aralığındaki statik manyetik alanlara maruz bırakıldığı çalışmada ölçülen ELF veya statik manyetik alanların tek başına çocukluk çağı lösemisi ile ilişkileri bulunmamakla birlikte, bu statik alan bantları içindeki denekler için ölçülen ELF alanları ile artan bir lösemi riski eğilimi gösterdiği bulunmuştur.

Sobel et al. (1995) tarafından yapılan çalışmada, ELF-MF'lere orta ve çok maruz kalan meslek çalışanlarının Alzheimer hastalığı ile olan ilişkileri incelenmiştir. Vaka-kontrol analizleri birkaç üniversite hastanelerinden alınmıştır. Sonuçlar, elektromanyetik alan maruziyetinin, kalsiyum homeostazını olumsuz etkileyebilme, mikrogial hücreler gibi bağışıklık sistemi hücrelerini uygunsuz biçimde aktive edebilme ve nöronal dejenerasyon ile sonuçlanan olayları başlatabilme gibi biyolojik tepkilerle ilişkilendirilebileceğini göstermiştir.

Vorobyov et al. (1998) tarafından yapılan çalışmada, Dünya'nın statik manyetik alanıyla karşılaştırılabilir yoğunluğa sahip zayıf bileşik manyetik alanın (CMF) 0,8-23 Hz frekans aralığında normal koşullarında ve intraperitoneal koşullardaki sıçan beyninin EEG aktivitesini etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. CMF'nin istatistiksel olarak anlamlı etkileri hem morfin maruziyeti bulunmayan hem de morfin maruziyeti bulunan sıçanlarda görülmesiyle birlikte, en önemli etki morfin enjeksiyonuna maruz kalan hayvanlarda ortaya çıktığı görülmüştür. Bu sonuçlar, zayıf CMF'nin tek başına elektriksel beyin aktivitesini etkileyebileceğini göstermiştir.

Miyakoshi et al. (1999) tarafından yapılan çalışmada, 60 Hz'de 5 mT ELF-MF'ye uzun süreli maruz kalmanın mutant frekans üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çin hamsteri yumurtalık K1 (CHO-K1) hücreleri, 6 haftaya kadar X-ışınlanması (3 Gy) ve hipoksantin-guanin fosforibosil transferazın (HPRT) mutant frekansı ile 5 mT ELF-MF'ye maruz bırakılarak gen analizi yapılmıştır. 5 mT ELF-MF'ye uzun süreli maruz kalma, mutasyonları artırmadı Bununla birlikte, X-ışını ile muamelenin ardından 5 mT ELF-MF'ye uzun süreli maruziyetten sonra X-ışını kaynaklı mutasyon oranında artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, 5 mT'den fazla ELF-MF'ye maruz kalmanın X-ışını kaynaklı mutasyonları destekleyebileceğini düşündürmektedir.

Gray et al. (2000) tarafından yapılan çalışmada hem statik elektrik alan hem de statik manyetik alanların, bir kemoterapötik ajan olan Adriamisin'in farelere nakledilen meme tümörlerine karşı in vivo etkisini artırma yeteneği değerlendirilmiştir. Çalışmada, yapılan istatistiksel testler, statik alana maruz bırakılan grupların tümünün, yalnızca adriamisin ile tedavi edilen gruptan daha büyük ($P \leq 0,05$) tümör regresyonu elde ettiğini dolayısıyla, tek tip olmayan statik elektrik ve manyetik alanların, farelere

2. KAYNAK ÖZETLERİ

nakledilen meme tümörlerine karşı adriamisin'in in vivo etkisini önemli ölçüde artırabildiği gösterilmiştir.

Mezei et al. (2001) tarafından yapılan çalışmada, yetişkinlerde (1) işte, evde ve başka yerlerdeki çeşitli günlük aktiviteler sırasında ve uyku sırasında MF maruziyetlerinin dağılımını; (2) belirli temel ev aletlerinden kaynaklanan MF maruziyetlerinin dağılımını; ve (3) çeşitli faaliyetlerin ve belirli ev aletlerinin toplam günlük EMF maruziyetine görece katkısını açıklamak amaçlanmıştır. Yapılan ankette, 162 denek cihaz kullanım biçimleri hakkında bilgi vermiştir ve ortalama MF ölçümleri, denekler uyku halindeyken en düşük, işteyken ve mikrodalga fırın, kahve makinesi, saç kurutma makinesi ve elektrikli tıraş makinesi kullanımı sırasında en yüksek olma eğilimi göstermiştir. Ayrıca, önemli MF maruziyeti evde, işte ve başka yerlerde birikir; bu nedenle, çalışmada doğru maruziyet değerlendirmesinin yapılması için konut, mesleki ve diğer kaynakların birlikte dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır.

Jajte et al. (2002) tarafından yapılan çalışmada, sıçan lenfositlerinin 7 mT SMF ve Fe²⁺ iyonlarına aynı anda maruz bırakılması sonucu DNA moleküllerinin bozulmasının apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne sebep olabileceği gösterilmiştir. Bu iki ajanın olası prooksidatif özellikleri, hücrelerde serbest radikal mekanizmasını işaretleyerek lipid peroksidasyon sürecini indüklediği ve bu şekilde hücre ölümüne yol açabileceğini düşündürmektedir.

Sabo et al. (2002) tarafından yapılan çalışmada, SMF'nin, yaygın olarak kullanılan HL-60 insan lösemik hücrelerinin metabolik aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. SMF'nin, antineoplastik ilaçların potansiyelini modüle edip edemeyeceğinin değerlendirildiği bu çalışmada, 72 saat boyunca 1 T SMF'ye maruz bırakılan insan lösemik hücre hattı HL-60'ta metabolik aktivite geriliği gözlemlenmiştir.

Tofani et al. (2003) tarafından yapılan çalışmada, 3 mT'nin üzerinde statik ve ELF-MF'lere maruz kalmanın, immün yetmezliği olan farelerde aşılmiş insan tümörlerinin büyüme kinetiğini yavaşlattığını, metastaz yapma güçlerini azalttığını ve fare hayatta kalma süresini uzattığı gösterilmiştir. Çalışmada, karsinom taşıyan ve bağışıklığı yeterli fareler, MF'ye maruz bırakılarak sırasıyla yaygın olarak kullanılan iki

2. KAYNAK ÖZETLERİ

anti-kanser ilacıyla tedavi edilmiştir. Sonuç olarak, sisplatin ile tedavi edilen fareler diğer siklofosamid ile tedavi edilen farelerden daha fazla hayatta kalmıştır. Bu durum, sisplatin ile tedavisi yapılan farelerde bulunan MF'nin, platin iyonunun radikal üretimi uyarması ve MF'nin aktif oksijen üretimini arttırarak tümör hücre zarı geçirgenliğinde değişiklikler meydana getirerek ilaç alımını olumlu etkilemesiyle açıklanmıştır.

Zhang et al. (2003) tarafından yapılan çalışmada, SMF'lerin biyolojik sistemler üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada SMF'nin mutajenik etkilerini görebilmek için *E.coli*'nin çeşitli mutantları kullanılarak 9 T SMF'ye 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak DNA onarım enzimlerinde olumsuz faaliyet gözlenmedi. Öte yandan oksidatif strese karşı savunma mekanizmaları yetersiz olan mutantların, SMF maruziyeti ile mutasyon görülme sıklığı önemli miktarda arttığı belirtilmiştir.

Ding et al. (2004) tarafından yapılan çalışmada, ELF-MF'ye (60 Hz, 5 mT) maruz kalmanın insan lösemi HL-60 hücreleri üzerinde, hidrojen peroksit (H₂O₂) kaynaklı hücre ölümünün rolü araştırılmıştır. Bulgular, maruziyetin apoptotik ve nekrotik hücre sayısını önemli ölçüde arttırdığını ve canlı hücre sayısını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir.

Chionna et al. (2005) tarafından yapılan çalışmada, Hep G2 hücreleri 6 mT statik manyetik alana maruz bırakıldığında hücre şeklinin, plazma zarının ve hücre iskeletinin bütünlüğünün ve apoptoz oranının etkilendiği bildirilmiştir. Hep G2 hücreleri üzerindeki bu biyolojik etkilerin, maruz kalma süresine bağlı olarak meydana geldiği belirtilmiştir.

Moriyama and Yoshitomi (2005) tarafından yapılan pilot çalışmada, ELF-MF'ler, bir Japon apartmanının bir odasında 696 noktada ölçülerek ELF-MF'ler yaşam alanının %24'ünde 0,4 µT'yi aşmış ve zemin seviyesinde maksimum değer olan 1,8 µT olarak tespit edilmiştir. MF dağılımının analizi, zemin ve tavandaki oda lambaları için 60 Hz 100 V elektrik kablolarının 1 dönüşlü bobinlere eşdeğer büyük dikdörtgenler halinde yerleştirildiğini ortaya çıkarmıştır. Araştırmacılar, incelenen bu binanın ELF-MF'ler açısından tipik Japon binaları olduğunu ileri sürerek ev içindeki kablo bağlantılarını

2. KAYNAK ÖZETLERİ

değiştirerek veya bükümlü çift kablolar kullanarak maruziyetin azaltılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Winker et al. (2005) tarafından yapılan çalışmada, ELF-EMF'lere çevresel olarak maruz kalmanın insanda kanser gelişimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. ELF alanlarının (50 Hz, 1 mT'de 2-24 saat aralığında) kültürlenmiş insan fibroblastlarında mikronükleus ve kromozomal anormalliklerin indüksiyonu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. ELF-EMF radyasyonuna 1 mT'lik yoğunlukta 10 saatlik aralıklı maruz bırakılma sonucunda zamana bağlı mikronükleus artışı ve kromozomal anormallik durumları standart seviyenin 10 katına kadar çıktığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, maruziyetin bölünen hücrelerde önemli kromozomal hasara yol açabilme potansiyeli güçlü bir şekilde gösterilmiştir.

McNamee et al. (2005) tarafından yapılan çalışmada, uzun süreli manyetik alana maruz kalmanın yetişkin sıçanlardan, yetişkin farelerden ve olgunlaşmamış farelerden tüm beyin ve serebellar homojenatlardan alınan hücrelerde DNA hasarı değerlendirilmiştir. 2 saat boyunca 60 Hz'lik bir manyetik alana (0, 0,1, 1 veya 2 mT) maruziyetin ardından yapılan analizler sonucunda, deney gruplarının hiçbirinde herhangi bir zamanda, beyin hücresi homojenatlarında DNA hasarında önemli bir artış görülmemiştir. Bu çalışmada test edilen çoklu hayvan gruplarından alınan doz-tepki ve zaman süreci verileri, manyetik alan kaynaklı DNA hasarına dair hiçbir kanıt sağlamamaktadır.

Kim et al. (2009) tarafından yapılan çalışmada, 16 haftalık farelerde, 14 veya 200 mT ELF-MF maruziyetinin testis germ hücre apoptozu üzerindeki etkisi karakterize edilmiştir. Çalışmada sonucunda, ELF-MF maruziyetinin vücut ağırlığını veya testis ağırlığını önemli ölçüde etkilemediği, ancak yapılan TUNEL boyamasında (In situ terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı deoksi-UTP çentik ucu etiketlemesi), maruz kalan farelerdeki germ hücreleri, maruz kalmayan kontrollere göre önemli ölçüde apoptotik oran göstermiştir. Dolayısıyla bu sonuçlar, 14 mT'lik 60 Hz ELF-MF'ye sürekli maruziyetin farelerde spermatojenik hücrelerde apoptozun indüklenebileceğini göstermektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Mi-Na et al. (2012) tarafından yapılan çalışmada, ELF-MF maruziyetinin kültürlenmiş insan meme epitelyal MCF10A hücrelerinde ROS seviyelerini ve antioksidan enzim aktivitesini etkileyip etkilemediğini belirleyerek hücrelerde oksidatif strese yol açıp açmayacağı araştırılmıştır. ELF-MF'ye maruz bırakılan hücreler, control gruplarıyla karşılaştırıldığında, yukarıda belirtilen biyolojik parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin olmadığı gösterilmiş ve çalışmadaki maruz kalma koşullarında ELF-MF'nin hücre içi ROS düzeyi, SOD aktivitesi ve GSH/GSSG oranı üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Jin et al. (2014) tarafından yapılan çalışmada, NIH3T3 fare fibroblast hücreleri, WI-38 insan akciğer fibroblast hücreleri, L132 insan akciğer epitel hücreleri ve MCF10A insan meme bezi epitel hücreleri, çeşitli dış faktörlerle kombinasyon halinde [iyonlaştırıcı radyasyon (IR, 1 Gy), H₂O₂ (50 µM) veya c-Myc onkojenik aktivasyon varlığında] 4-16 saat boyunca 60 Hz (1 mT) homojen ELF-MF'ye maruz bırakılarak normal hücre hattı sistemindeki DNA hasarı değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, tek başına ELF-MF'ye maruz kalan hücreler ile maruz kalmayan hücreler arasında önemli bir fark göstermemiştir.

Luukkonen et al. (2017) tarafından yapılan çalışmada, serbest radikalleri indükleyen bir ajan olan (mitokondriyal süperoksit üretimini artırarak) menadion varlığında ELF-MF maruziyetinin, DNA'da meydana getirebileceği hasar ve hücre döngüsü dağılımında yer alan proteinler üzerindeki olası değişiklikleri değerlendirilmiştir. ELF-MF'ye maruz kalan hücrelerde, 1 saatlik menadion muamelesinden sonra p21 protein seviyesinde azalma, ayrıca 3 saatlik menadion muamelesinden sonra G1 fazındaki hücre oranında artış ve S fazı hücre oranında azalma şeklinde bulgular gözlemlenmiştir.

Synowiec-Wojtarowicz et al. (2017) tarafından yapılan çalışmada, 700 mT büyüklüğündeki SMF'lerin ve dihidrokalkonların fibroblastlarda antioksidan yanıt üzerindeki etkileri incelenmiştir. Fibroblastlar orta seviyedeki manyetik alanlarda 72 saat boyunca kültürlenerek SOD, GPx, CAT, GST, MDA, ATP ve toplam antioksidan seviyeleri ölçülmüştür. Çalışma sonucunda, SOD, GPx, GST, MDA konsantrasyonlarının

SMF'de daha yüksek olduğu görülmüştür. Dolayısıyla sonuçlar, dihidrokalkonların SMF'ye (0,7 T) maruz kalması fibroblastlarda oksidatif stresi indüklediğini göstermiştir.

Zeng et al. (2017) tarafından yapılan çalışmada, evsel ve endüstriyel elektrikli aletlerinin yaydığı ELF-MF'lerin insan nöronlarına olan etkilerini gözlemlenmiştir. Bu çalışmada kültürlenmiş nöronlar kullanılarak farklı ELF-MF aralığına maruz bırakılan nöronların biyolojik etkileri canlılık, apoptoz, genomik kararsızlık ve oksidatif stres açısından değerlendirilmiştir. Sonuçlar, kültürde farklı zamanlardan sonra günde 8 saat boyunca 50 Hz 2 mT ELF-MF'ye tekrarlı olarak maruz kalmanın canlılığı azalttığını ve hipokampal nöronlarda hücre içi ROS üretimini artırdığı gözlemlenmesiyle birlikte ELF-MF maruziyetinin kültürlenmiş hipokampal nöronlarda ciddi biyolojik sonuçları olmadığı da öne sürülmüştür.

Consales et al. (2018) tarafından yapılan çalışmada, son zamanlarda nöronal dejenerasyona sebep olan önemli olaylar arasında yer alan epigenetik modülasyonlardan yola çıkılarak, miRNA (miR-34)'ların aracılık ettiği gen ekspresyonunun kontrolünün, in vitro ortamda 50 Hz (1 mT) manyetik alanın nöronal hücre tepkisini harekete geçirmede herhangi bir rolünün olup olmadığı değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, ELF-MF maruziyetinin, hem doğrudan miR-34'ü hedefleyerek hem de oksidatif stres yoluyla nöronal bir protein olan α -synucleinin ifadesini değiştirdiği gösterilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez kapsamında deneylerde kullanılan İnsan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı, kit/kimyasal maddeler, cihazlar ve diğer materyaller Erzurum Teknik Üniversitesi Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi (YÜTAM) tarafından temin edilmiş olup çalışmalar, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Hücre Kültür Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan materyaller ile marka/model adları Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2' de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların ve modellerin listesi

Cihaz Adı	Marka/Model Adı
Class II Laminer Kabin	ESCO NordicSafe™
Flow Sitometri	The CyFlow® Cube 6
Gauss Metre	Eles, EE406 HP1 (Türkiye)
İnkübatör (37 °C ve %5 CO2)	ESCO Cell Culture
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C
Mikroplaka Okuyucu	Biotek EPOCH
Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan Go
Su banyosu	Çalışkan Ultrasonic Cleaner
Vorteks	WisdWisemix VM-10

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kit/kimyasal ve markaların listesi

Kit/Kimyasal Adı	MarkaAdı
Annexin V-FITC/PI Kit	Sigma-Aldrich® (Almanya)
DMEM	Gibco® (ABD)
DMSO	Sigma-Aldrich® (Almanya)
Etanol	Merck (Almanya)
FBS (Fetal Bovin Serum)	Gibco® (ABD)
Hoechst-33258 Floresan Boya	Sigma-Aldrich® (Almanya)
LDH -Assay Kit	Thermo Fisher Scientific® (ABD)
MTT- Assay Kit	Sigma-Aldrich® (Almanya)
OxiSelect™ Oxidative DNA Damage Quantitation Kit (AP Sites)	Cell Biolabs, (ABD)
PBS	Sigma-Aldrich® (Almanya)
Retinoik Asit	Sigma-Aldrich® (Almanya)
Streptavidin-Cy3	GE Healthcare Bio- Sciences (İngiltere)
TAS Kit	Rel Assay Diagnostics® (Türkiye)
TOS Kit	Rel Assay Diagnostics® (Türkiye)
Triton X-100	Sigma-Aldrich® (Almanya)

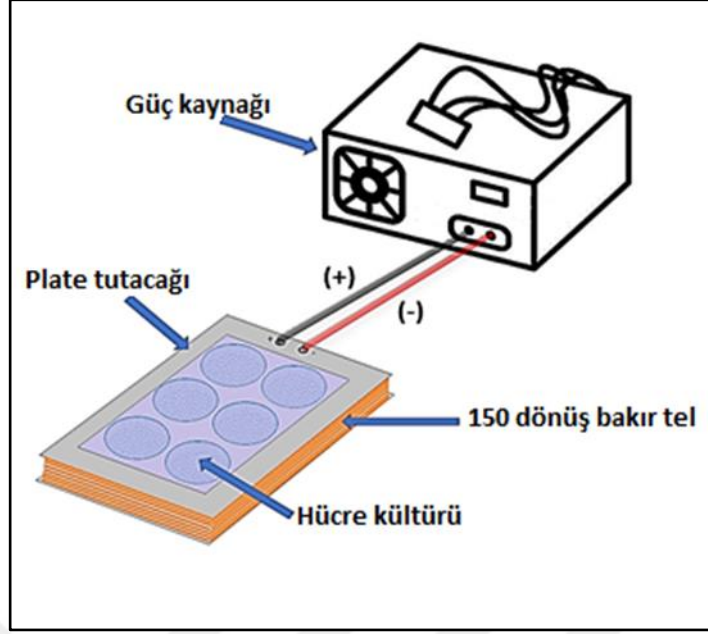
3.2. Metot

3.2.1 Propolisin elde edilmesi ve alkolde çözünen ekstraktların hazırlanması

Propolis numuneleri Bursa ilindeki arı kovanlarından elde edilmiştir. 10 g propolis, aynı orana denk gelen %70 etanolle çözülmüştür. Çözücü, 4 gün karanlık ortamda bekletildikten sonra tekrardan toplanarak 24 saat boyunca çalkalanmıştır. Daha fazla ekstraksiyon elde etmek amacıyla üzerlerine etanol eklenmiştir. Bu işlem sonraki 24 saat boyunca tekrarlanmıştır. Ekstraktlara, 40-60 °C'de, 40 rpm'de ve 250'lik basınç altında bir hafta buharlaştırma işlemi yapılmıştır. Yeniden etanolle çözülen ekstraktlara hücre kültürü için kullanılmadan önce steril bir kabinde aseptik olarak süzülme işlemi yapılmıştır. Balmumu yapısındaki ekstrakt, daha iyi çözünen bileşenler elde etmek amacıyla bir takım dispersiyon prosedürü için kullanılmıştır. Ardından in vitro çalışmalar için çeşitli konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Ekstrakt örneklerinin tamamı, kültür ortamında yeniden dilüe edildikten sonra çalışmaya alınmıştır. Hücre kültürlerinde kullanılmak üzere %1 (V/V)'in altındaki etanol konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.2 ELF-MF üretebilen cihaz

Şekil 3.1'de gösterilen cihaz tasarlanırken ELF-MF üretmesi hedeflenmiştir. Cihaz, plate tutucu ve onun etrafını saran bakır bir tel olmak üzere iki temel kısımdan oluşmaktadır. Ayrıca, cihazın 1,5 m bakır telle 150 dönüş yapabilen bobini, 30 militesla (mT)'ya kadar ısınmadan manyetik alan üretebilir. Manyetik alan yoğunluğunun en yüksek değerde olduğu yerler köşe noktalarıyken plate tutucunun merkezine gittikçe bu yoğunluk değeri azalmaktadır. Daha sağlıklı sonuç elde edebilmek için yapılan çalışmada, hücre kültürleri yalnızca bu alanda tutulmuştur.



Şekil 3.1. ELF-MF üreten cihazın önden görünümü

Cihazdan sağlanan manyetik alan büyüklüğünün ölçümü bir Gauss metre (Eles, EE406 HP1, Türkiye) ile yapılmıştır. 1 mT, 2 mT ve 3 mT manyetik alan elde etmek için cihaza sırasıyla 0,6 V/1,07 A, 1,2 V/2,12 A ve 1,7 V/3,13 A oranlarında akım uygulanmıştır (1 mT=0,6 V/1,07 A, 2 mT=1,2 V/2,12 A ve 3 mT=1,7 V/3,13 A manyetik alanı ifade eder).

3.2.3 SHSY-5Y nöroblastom hücre hattı kültürünün hazırlanması ve nöronal farklılaşmanın sağlanması

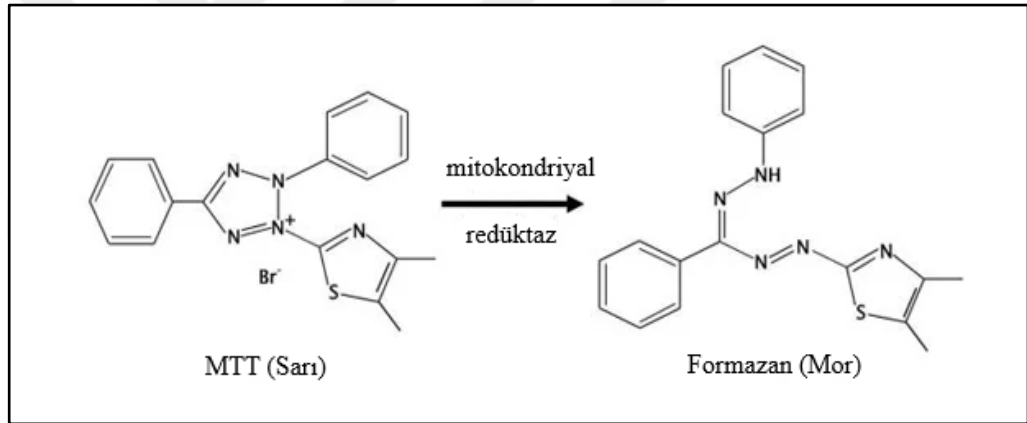
SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı, içerisinde %15 Fetal Bovin Serum (FBS), %1 L-Glutamin ve %1 penisilin/streptomisin bulunan Dulbecco's Modified Eagle's Medium:F12 (DMEM:F12) besiyeri içerisinde, T-25'lik flaska aktarılmıştır. Daha sonra, %5 CO₂ ve 37 °C koşullarındaki inkübatör içerisinde inkübe edilmiştir. 2-3 günde bir eski besiyeri uzaklaştırılarak flask yüzeyi PBS ile yıkanmıştır ve taze besiyeri ile inkübasyon sürecine devam edilmiştir.

Flask yüzeyi %70-80 yoğunluğa (~10⁴ hücre/cm²) ulaşınca taze besiyerine 10 µL retinoik asit (RA) eklenerek inkübasyona devam edilmiştir. 11. günün sonunda flask yüzeyi PBS ile yıkanmıştır. Ardından, kültüre 50 ng/ml BDNF eklenerek hücreler, RA

varlığında 3 gün inkübe edilmiştir. Meydana gelen hücre farklılaşması morfolojik olarak invert mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.4 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) hücre canlılığı testi

MTT testi, hücre proliferasyonunu ölçmek ve antikanser ilaçlarının etkisini belirlemek amacıyla sıkça kullanılan bir yöntemdir. Esas olarak, aktif olarak büyüyen hücrelerin redoks aktivitesi yardımıyla sarı renkli tetrazolyum tuzu olan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)'ün, mor renkli formazan kristallerine biyolojik olarak indirgenmesi temeline dayanmaktadır (Şekil 3.2) (Grela et al. 2018).



Şekil 3.2. Sarı renkteki MTT ve mor renkteki formazan kristalinin canlı hücredeki kimyasal yapıları.

Propolis uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapılan MTT testi, aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirilmiştir:

1. 1,56 ila 200 µg/mL aralığında olan farklı konsantrasyon seviyelerindeki Propolis ekstraktları, platteki kuyucuklara eklenmiştir.
2. Hücre kültürleri, 96 saat boyunca 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildikten sonra platede pozitif kontrol (+) olarak belirlenen kontrol grubuna 20 µL %1 oranında hazırlanmış olan Triton X-100 eklenerek 20 dakika oda

3. MATERYAL ve YÖNTEM

sıcaklığında bekletilmiştir. Bu işleme tabi tutulmamış farklılaştırılmış hücre kültürleri, bir negatif kontrol (-) olarak belirlenmiştir.

3. Kültür plateinde tüm kuyucuklara 10 µL MTT solüsyonu eklenerek %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklığındaki inkübatörde 3 saat bekletilmiştir.
4. 3 saatin sonunda metabolik olarak aktif hücreler, inkübasyondan 3 saat sonra MTT'yi formazan kristaline dönüştürmüştür.
5. Daha sonra, platedeki sıvı dökülerek üzerine 100 µL DMSO eklendi. Formazan kristallerinin DMSO ile reaksiyona girmesiyle renk değişimi meydana gelmiştir.
6. Çözülme tamamlandıktan sonra, mikropilaka okuyucu ile 570 nm ve 670 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülmüştür.

3.2.5. Laktat dehidrojenaz (LDH) testi

Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer yöntem, hasar görmüş hücrelerden kültürü süpernatantına veya hücre dışı ortama salınan laktat dehidrojenaz (LDH) enziminin aktivitesinin belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzim olan LDH enziminin hücre kültüründe gösterdiği aktivite, hasarlı veya ölmüş hücrelerin varlığını ifade etmektedir (Farhana et al. 2021).

Propolis uygulamasının ardından sitotoksiteyi ölçmek ve MTT testini doğrulamak amacıyla yapılan LDH testi, aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirilmiştir:

1. Propolis uygulamasından sonra, inkübatörden alınan plaka deney gruplarından [(+) ve (-) kontrol grupları da dahil] 100 µL alınarak yeni (boş) bir plaka içerisine aktarılmıştır.

2. Daha sonra üzerine 100 µL LDH kit çözeltisi eklenerek ve %5 CO₂ içeren, 37 °C sıcaklığındaki inkübatörde 30 dakika bekletilmiştir.
3. Daha sonra, mikropilaka okuyucu ile 450 nm dalga boyunda renk yoğunluklarının absorbansı ölçülmüştür.

3.2.6. Toplam antioksidan durumu (TAS) analizi

TAS analizi, renkli yapıdaki 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal katyonunun (ABST+), konsantrasyonuna ve antioksidan kapasitesine göre antioksidanlar tarafından indirgenmesiyle renksiz hale dönüşmesi temeline dayanmaktadır. İndirgenme sonucu renkte meydana gelen bu değişikliğin, absorbans farkının ölçülmesiyle örneklerin toplam antioksidan seviyeleri belirlenmektedir. Antioksidan düzeylerini hesaplamak için Rel Assay Diagnostics (Türkiye) TAS kitine göre, aşağıda belirtilen protokol uygulanmıştır:

1. Hücre kültürü süpernatantından 18 µL alınarak 300 µL Reaktif-1 ile karıştırılmıştır.
2. Renk yoğunluğu, bir mikropilaka okuyucu kullanılarak 660 nm'de ölçülmüştür.
3. 30 saniye bekledikten sonra oluşturulan karışım içerisine 45 µL Reaktif-2'den eklenerek 37°C'lik inkübatörde 5 dakika inkübe edilmiştir ve absorbans, 660 nm'de tekrar ölçülmüştür.
4. Sonuçlar, Trolox ile analiz edilerek, mM Trolox Equiv./L birimiyle ifade edilmiştir.

3.2.7. Toplam oksidan durumu (TOS) analizi

TOS analizi, örneklerdeki oksidanların, demir iyonu kompleksini ferrik iyonla oksitlemesi sonucu, ortamın asidik özelliğinin etkisiyle renkli bir kompleksin meydana

gelmesi temeline dayanmaktadır. Oluşan renk yoğunluğunun absorbansı ölçülerek, örnekte bulunan toplam oksidan molekül miktarı belirlenmektedir (Altindag et al. 2008). Oksidan düzeylerini hesaplamak için Rel Assay Diagnostics (Türkiye) TOS kitine göre, aşağıda belirtilen protokol uygulanmıştır:

1. Hücre kültürü süpernatantından 45 µL alınarak 300 µL kitin içerisinde yer alan Reaktif-1 ile karıştırılmıştır.
2. 30 saniye bekledikten sonra bir mikropilaya okuyucu kullanılarak 530 nm'de absorbans ölçülmüştür.
3. Daha sonra 15 µL Reaktif-2 eklenerek 37°C'lik inkübatörde 5 dakika inkübe edilmiştir ve absorbans, 530 nm'de tekrar ölçülmüştür.
4. Sonuçlar, H₂O₂'ye göre analiz edilerek µM H₂O₂ Equiv./L birimiyle ifade edilmiştir.

3.2.8. Hoechst 33258 floresan boyama ile kromozomal bütünlük analizi

Hoechst 33258 boyama, apoptotik hücre çekirdeğini belirleyerek kromozomal düzeyde meydana gelen mutasyonların tespit edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Çift sarmallı DNA'nın küçük oluşuna bağlanma afinitesi gösteren Hoechst 33258, bağlanma gerçekleştiğinde mavi ışık yayan floresan bir boyadır (Flauzino et al. 2021).

Çalışma, aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirilmiştir:

1. Manyetik alan uygulamaları için; farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre kültürleri, %5 CO₂ içeren ve 37°C sıcaklığındaki inkübatörde 96 saat boyunca 1 mT, 2 mT ve 3 mT büyüklüğündeki manyetik alanlara maruz bırakılmıştır.
2. İnkübasyonun ardından platedeki besiyeri dökülerek hücreler PBS ile yıkanmıştır.

3. Hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde %4'lük Glutaraldehit eklendi ve hücreler, 4°C'de 30 dakika boyunca sabitlenmiştir.
4. Hücreler tekrar PBS ile yıkandıktan sonra, 1 µM Hoechst 33258 floresan boya eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. Hücreler, karanlık ortamda floresan mikroskop altına incelenmiştir.

3.2.9. Akış sitometrisi analizi

Akış sitometrisi, hücre yüzeyi ve hücre içi molekülleri kullanarak hücrelerde meydana gelen apoptoz ve nekroz oranlarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Apoptoz esnasında, hücre zarının iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin proteini, translokasyon ile dış yüzeye taşınmaktadır. Annexin V, apoptoz sırasında transloke olan fosfatidilserine bağlanan bir proteindir. Bu proteininin, Annexin V'in bir flüoresan konjüгатı olan Annexin V-FITC ile bağlanmasıyla apoptik hücreler gözlemlenmektedir. Annexin V-FITC tek başına apoptoz ve nekroz hücrelerinin ayrımını yapmak için yeterli olmadığından nekroz hücrelerin yapısının bozulmasından dolayı hücre dışına çıkan DNA'nın propidyum iyodür (PI) ile boyanmasıyla nekroz oranı ölçülmektedir. Böylece, Annexin V-FITC veya PI ile boyanarak apoptoz ve nekroza uğrayan hücreler ile boyanmayan sağlıklı hücrelerin ayrımı flow sitometri kullanılarak görselleştirilmektedir (Akçapınar vd 2021).

Yapılan çalışma, Annexin V-FITC-PI Kiti kullanılarak, aşağıdaki protokol ile gerçekleştirilmiştir:

1. İnkübasyon sonunda platedeki kontrol grubu ve diğer gruplardaki hücreler ayrı ayrı ependorflara aktararak plate yüzeyi PBS ile yıkanmıştır.
2. PBS uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa Tripsin eklenmiştir. 37 °C'de 5 dakika inkübe edilerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmıştır.
3. Tripsinle muamele edilmiş hücreler ependorflara eklenerek santifüj edilmiştir.

4. Daha sonra her bir santrifüj tüpünün üzerine 500 µL bağlanma tamponu eklenerek çöken hücreler süspansiyon edilmiştir.
5. Tüplere 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl PI eklenerek karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir.
6. Son olarak, hücreler flow sitometri cihazında analiz edilmiştir.

3.2.10. Apuritik/apirimiditik (AP) bölgeleri analizi

SH-SY5Y hücrelerinden alınan DNA ekstraktlarındaki apuritik/apirimiditik (AP) bölgeleri olarak da bilinen abazik bölgeler, 450 nm absorbesta biotin etiketli bir Aldehit Reaktif Prob (ARP) ile belirlenmiştir. Çalışma, OxiSelect™ Oxidative DNA Damage Quantitation Kit (AP Sites) kullanılarak üreticinin protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. DNA örneğindeki AP bölgelerinin miktarı, ARP standart eğrisi ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

3.2.11. İstatistiksel analizler

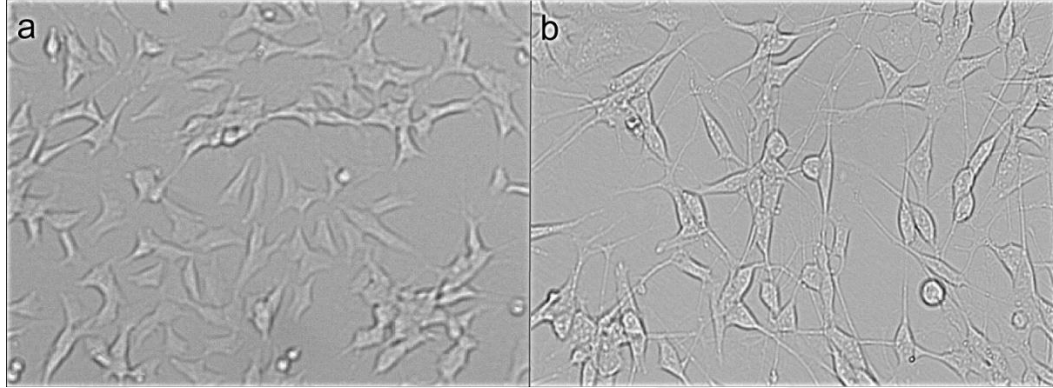
Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler için istatistiksel analizler, GraphPad Prism 7,0 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. ANOVA ve Dunnett testleri yapılarak $p < 0,05$ olan veri değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm veri analizi ve farklı olarak ifade edilen genlerin görselleştirilmesi, R-3.1.2 yazılımıyla istatistiksel olarak gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Statik manyetik alanların (SMF) olumsuz etkileri, radyofrekans ve güç-frekans alanları gibi diğer maruz kalma türlerine göre çok daha az dikkat çekmektedir. Manyetik alan maruziyetlerine en çok kloralkali/alüminyum işleme fabrikaları, tanı ve demiryolu sistemlerinde Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi çeşitli endüstriyel ve tıbbi alanlarda rastlanmaktadır (Feychting et al. 2005). SMF uygulaması insan fibroblast hücresi üzerinde araştırılmış ve hücre kültüründe redoks homeostazını güçlü bir şekilde etkilemekte ve hücrel oksidatif stresi arttırmaktadır (Synowiec-Wojtarowicz et al. 2017). Ayrıca, ELF-MF'lerin günde 8 saat uygulanması, hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı ve hipokampal nöronlarda hücre içi reaktif oksidatif türlerinin üretimini arttırdığı gösterilmiştir (Zeng et al. 2017). Uzun süreli manyetik alanlara maruz kalma ile ilgili sağlık sorunları, çoğunlukla farklı kanser türlerine odaklanılmıştır (Ahlbom et al. 2001). Öte yandan, manyetik alanın en endişe verici sonuçlarından biri, yüksek veya orta elektromanyetik alanlar ve sporadik Alzheimer hastalığını ilişkilendiren öncü bir çalışma ile ortaya çıkmıştır (Sobel et al. 1995). ELF-MF'lere maruz kalmanın epigenetik faktörleri etkilediği ve insan nöroblastom hücre kültüründe nöronal dejenerasyona yol açan farklı gen ifadelerini değiştirdiği gösterilmiştir (Consales et al. 2018). Bu çalışmada, manyetik alanın moleküler mekanizmalara ve Alzheimer hastalığı ile ilişkisini incelemek için farklılaştırılmış SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı kullanılarak statik manyetik alanın insan beyni üzerindeki etkisine odaklanılmıştır ve propolis uygulamasının manyetik alanın neden olduğu toksisiteye karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır.

SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı, *all-trans* retinoik asit ve BDNF'in hücre kültürüne entegre edilmesiyle olgun nöron benzeri hücre kültürüne dönüştürülmüştür. Hücre hattı farklılaşması, beyin ve nöron faktörleriyle ilgili çeşitli hastalıkları ve toksikolojik vakaları incelemek için standart bir prosedür haline gelmiştir (Cells et al. 2000; Presgraves et al. 2003; Kovalevich and Langford 2013). 11 günlük inkübasyondan sonra hücre morfolojisi invert floresan mikroskop altında incelenmiştir. Kübik yapılardan daha yassı hücrel formasyonlara dönüşen hücreler arasındaki etkileşimler ve bağlantıların arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, dendritlere ve akson benzeri hücrel yapıların oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). Bunun yanında, akış sitometrisi analizi kullanılarak hücrel farklılaşmayı doğrulamak için hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Farklılaşmamış

hücre kültürlerine göre farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde hücre döngüsü evrelerine göre S fazında bulunan toplam hücre sayısı azalmış ve G1 evresindeki hücreler önemli ölçüde artış göstermiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. Farklılaşmamış ve farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik hücre yapıları. a- Farklılaşmamış SH-SY5Y hücre kültürünün 60x çözünürlüğü, b- Farklılaştırılmış hücre kültürünün 60x çözünürlüğü (11 gün boyunca hücre kültürüne 10 µM all-trans RA uygulaması).

Çizelge 4.1. Akış sitometrisi ile belirlendiği üzere 11 gün boyunca all-trans retinoik ile tedavi edilen SH-SY5Y hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı.

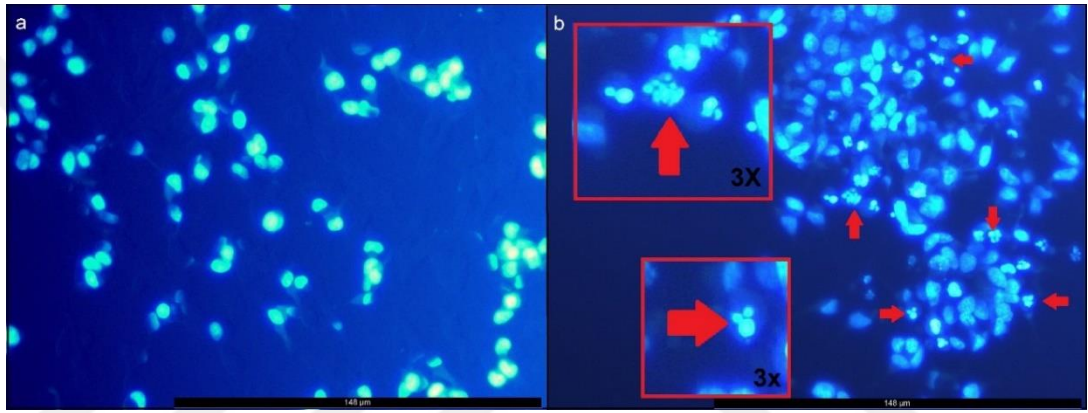
Gruplar	Hücre Populasyonu (%)			
	G1 fazı	G2 fazı	S fazı	G2/G1
(-) Kontrol	48,18±2,24	12,65±0,65	36,74±2,34	2,43±0,08
RA uygulanmış	74,39±4,32*	3,45±0,12*	20,43±2,11*	2,86±0,13

Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilir. Sembol (*), kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farkı (P<0,01) temsil eder.

Manyetik alanlara maruz kalmanın etkilerini araştırmak için, ELF-MF jeneratör cihazı, 1,5 mm bakır tellerle çevrili 150 dönlü bir kültür plakası tutucusu olarak tasarlanmıştır. Tellerin kalınlığı, bobini hücre kültürü için öldürücü olan sıcaklıklara ısıtmadan 1-10 mT manyetik alan oluşturmaya uygun olacak şekilde seçilmiştir. 96 saatlik manyetik alan uygulamasından sonra hücre çekirdek bütünlükleri Hoechst 33258 floresan boyama tekniği ile analiz edilmiştir. ELF-MF oranları hücre kültürüne uygulandığında, hücre çekirdek yapılarında anomalilerin meydana geldiği gözlenmiştir. Esas olarak, mikronükleus yapıları gibi daha büyük kromozomal aberasyonlar yoğun olarak görülmektedir. Ayrıca, nekrotik hücre grupları ve anormal çekirdek yapıları

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

sağlıklı hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Şekil 4.2). Çekirdek anomali sayıları, floresan mikroskop kullanılarak değerlendirilmiştir. İncelemelere göre, ELF-MF uygulamalarının tamamı nükleer mutasyonları (MN, Lobbed ve Çentikli) negatif kontrole göre önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Negatif kontrole (1.000 hücrede $0,020\pm0,0022$) kıyasla en yüksek mutasyon sayıları 4 gün boyunca 3 mT manyetik alan uygulamasında (1.000 hücrede $0,054\pm0,0048$) gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Diğer araştırmalara göre 400 mT ELF-MF'ler kromozomal aberasyonlarla sonuçlanmıştır, ancak manyetik alan 1 mT'ye düştüğünde bu alan oranının herhangi bir mutasyona neden olup olmadığı belirsiz hale geldiğini belirtmişlerdir (Miyakoshi et al. 2002).

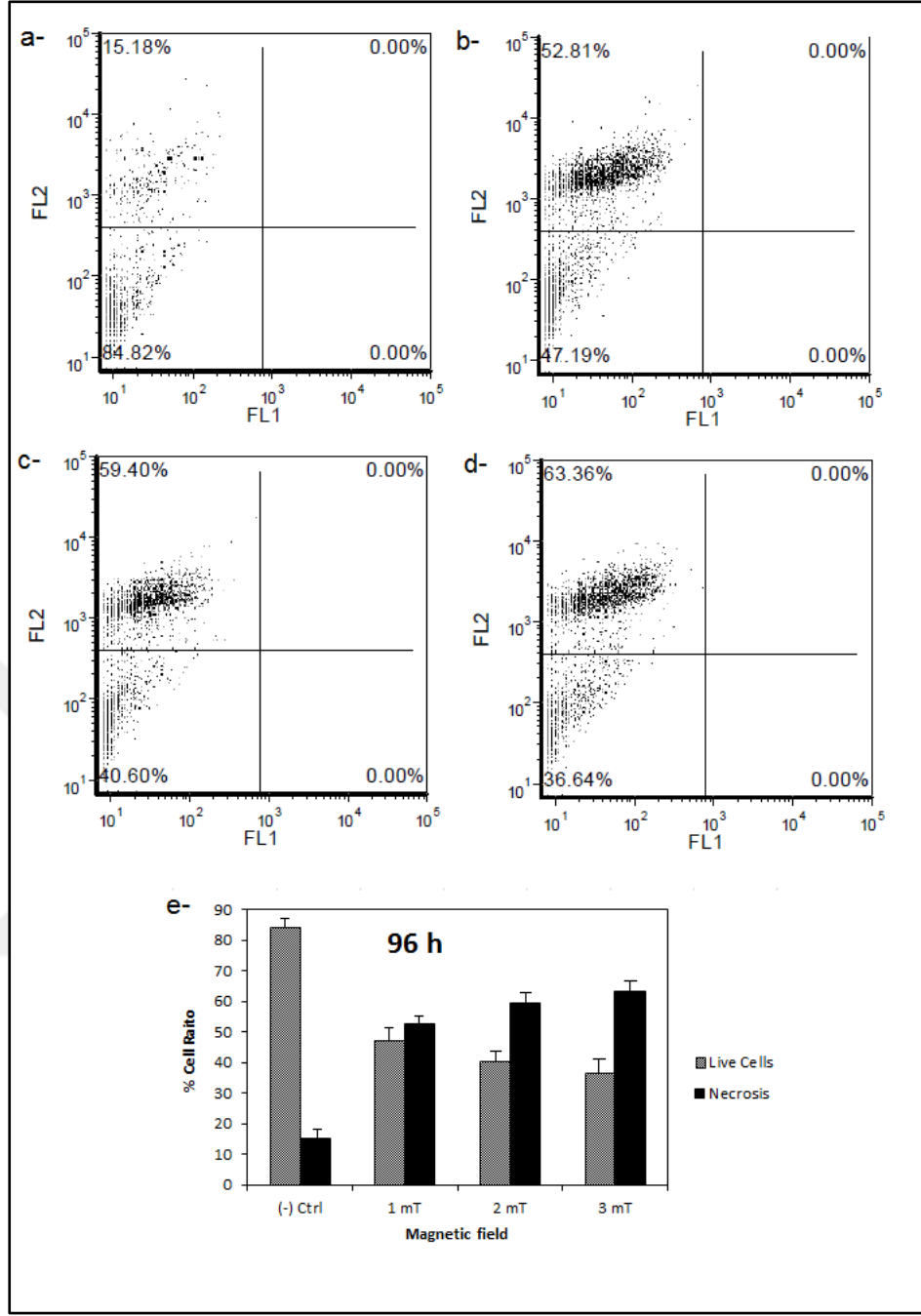


Şekil 4.2. Hoechst 33258 kromozom bütünlüğü analizi için floresan boyama sonuçları. a- Manyetik alan uygulaması olmayan farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre kültürü, b- 4 gün boyunca 3 mT manyetik alana maruz kalan SHSY-5Y hücre kültürü (Kırmızı oklar mutasyona uğramış veya bozulmuş hücre çekirdeklerini gösterir).

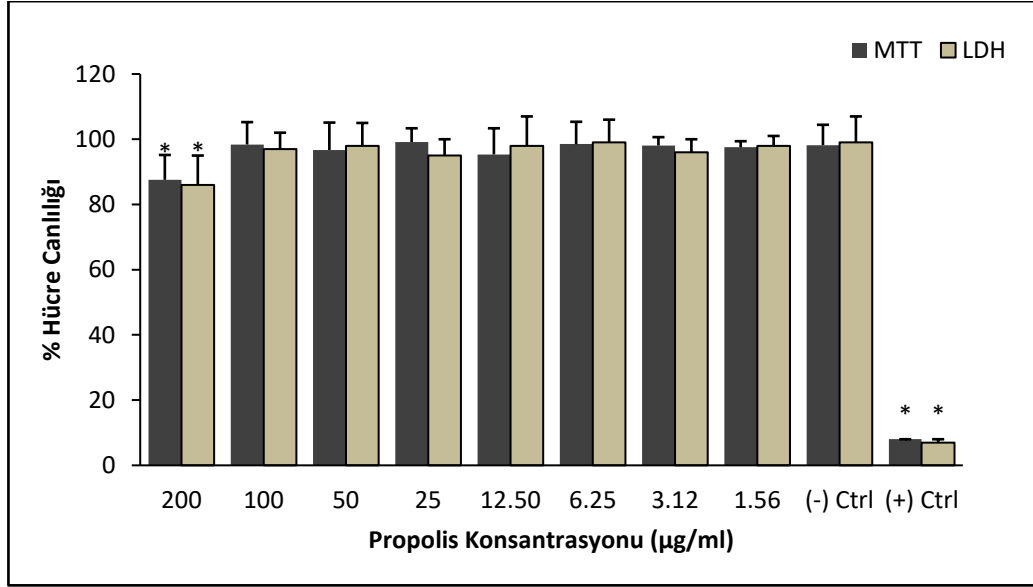
Çizelge 4.2. Çeşitli yoğunluklarda manyetik alan uygulamalarına karşı SH-SY5Y hücre hattında çekirdek anormallikler (NA) (Değerler, her 1.000 hücre için 3 numuneden elde edilen ortalama anomali sayısıdır. Aynı sütundaki farklı harfler birbirinden istatistiksel farklılıklar göstermektedir).

Uygulama	Çekirdek Anomalileri (NA)			
	MN	Loblu	Çentikli	Ortalama NA/1000 cells \pm SD
(-) Kontrol	7	7	6	$0,020\pm0,0022^a$
1 mT	15	11	8	$0,034\pm0,0051^b$
2 mT	20	12	11	$0,043\pm0,0032^c$
3 mT	20	16	18	$0,054\pm0,0048^d$
Propolis+3 mT	11	9	8	$0,027\pm0,0086^e$

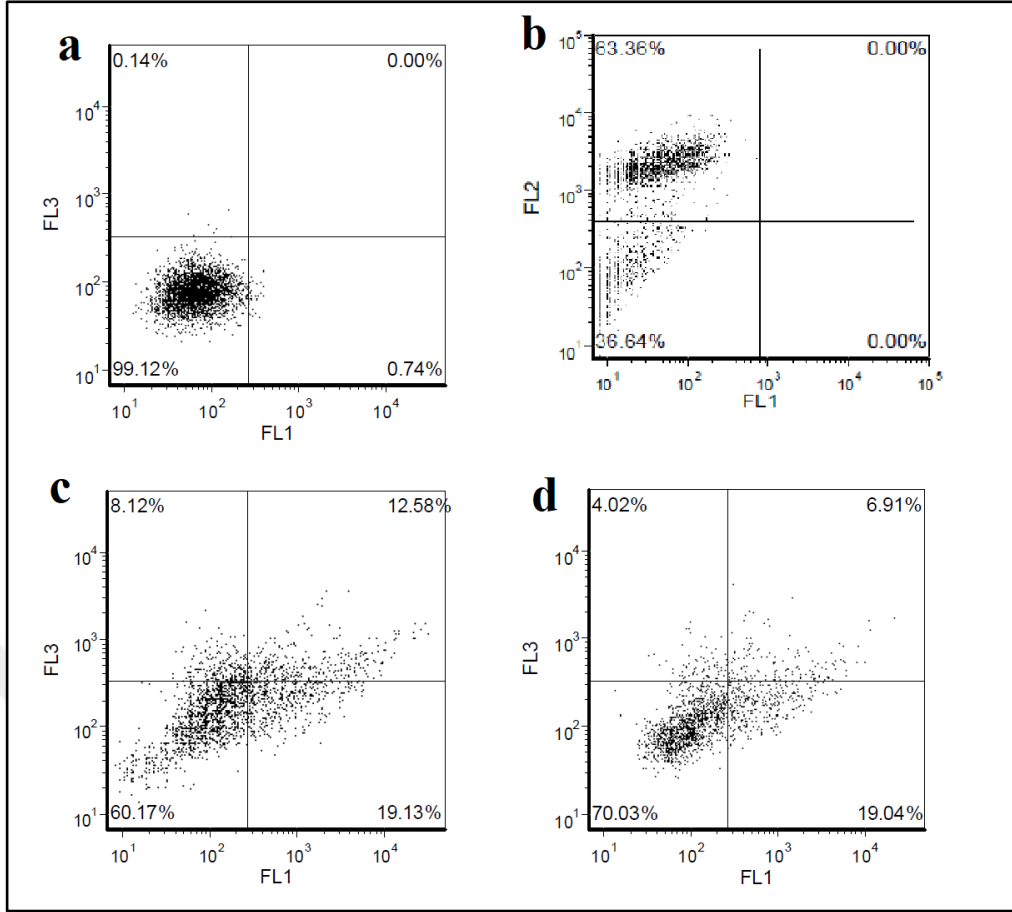
Sitotoksisite ve hücre ölümü mekanizmaları, akış sitometresi (Kanallar: FL1-green: Annexin V-FITC ve FL2-red: Propodium iodide) analizi kullanılarak incelenmiştir. Hücre kültürleri 37°C'de %5 CO₂ ile 96 saat süreyle inkübe edildi ve bu zaman aralığında hücre ortamları manyetik alan-hücre etkileşimini kesintiye uğratmayacak şekilde taze ortam tarafından değiştirilmeden bekletilmiştir. Bu nedenle negatif kontrol grubu için %15,8 sitotoksisite gözlemlendi. Bu sitotoksisite oranı, hücre canlılık yüzdesini normalleştirmek için deney gruplarından çıkarıldı. 1 mT, 2 mT ve 3 mT manyetik alanlar için çıkarma işlemi uygulandıktan sonra sitotoksisite sırasıyla %37,6, %44,2 ve %48,2 olarak bulunmuştur (Şekil 4.3). Ayrıca, propolis uygulamasının potansiyel sitotoksik etkilerini belirleme amacıyla, farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre hattına geniş doz aralığında (1,56-200 µg/ml) propolis uygulanmıştır. Sonuçlar göstermektedir ki, 100 µg/ml konsantrasyon seviyesine kadar propolisin hücre kültürü üzerinde önemli düzeyde sitotoksisiteye neden olmamaktadır (Şekil 4.4). Bu sonuçlar doğrultusunda 3 mT manyetik alan uygulaması ile beraber 100 µg/ml ve 50 µg/ml dozlarda propolis hücre kültürüne uygulanarak propolisin manyetik alana karşı nörokoruyucu etkisi akış sitometrisi yöntemiyle incelenmiştir. Analizler göstermektedir ki, 50 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda propolis uygulamalarının hücre canlılığını yakalaşık olarak sırasıyla %24 ve %34 oranında korumaktadır (Şekil 4.5).



Şekil 4.3. Manyetik alan uygulamasına karşı farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre hattının akış sitometrisi analizi. a- (-) Kontrol (sadece shsy-5y hücreleri), b- 1 mT manyetik alan uygulaması, c- 2 mT manyetik alan uygulaması ve d- 3 gün süreyle hücre kültürüne 3 mT manyetik alan uygulaması (Kanallar: FL1-green: Annexin V-FITC ve FL2-red: Propidium iodide), e-Flow sitometri sonuçları.



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda (1,56-200 µg/ml) propolis uygulamasına karşı farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre kültürlerinin hücre canlılığı analizi (*, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil etmektedir).



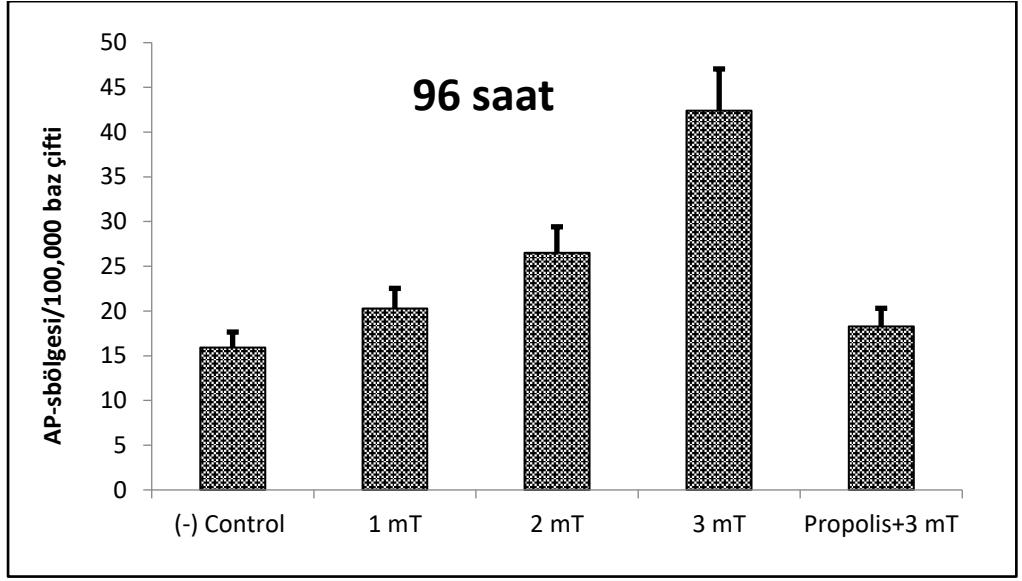
Şekil 4.5. Manyetik alan uygulamasına karşı propolisin farklılaştırılmış SHSY-5Y hücre hattını üzerinde ki akış sitometrisi analizi. a- (-) Kontrol (sadece farklılaştırılmış shsy-5y hücreleri), b- 4 gün boyunca 3 mT manyetik alan uygulaması, c- 3 mT manyetik alan + 50 µg/ml propolis uygulaması ve d- 3 mT manyetik alan + 100 µg/ml propolis uygulaması (Kanallar: FL1-green: Annexin V-FITC ve FL2-red: Propodium iodide).

Kademeli aralıklarla manyetik maruziyetten sonra DNA hasarını belirlemek için, ekstrakte edilmiş genomik DNA üzerinde ARP testi kullanılarak AP bölgelerinin sayısı ölçülmüştür. AP bölgesi, oksidatif DNA baz lezyonlarının bir göstergesi olarak kullanıldı. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi manyetik alanların yoğunluğuna bağlı lezyon oluşumları meydana gelmiştir. Hücre kültürleri 1 mT, 2 mT ve 3 mT manyetik alana maruz bırakıldığında, 96 saatlik zaman noktalarında sırasıyla 20, 26 ve 42 AP alanı birikimi ortaya çıkmıştır. Bunun yanında, TAS ve TOS analizi, uzun süreli ELF-MF uygulamasının, negatif kontrole kıyasla hücre kültürlerinde antioksidan seviyelerini önemli ölçüde azalttığını ve oksidatif stresi artırdığını göstermiştir. Sonuçlara göre, TAS ve TOS düzey değişikliklerinin ELF-MF'nin induksiyon oranlarına paralel olarak değiştiği bulunmuştur. Ayrıca, 3 mT manyetik alan uygulamasına karşı 100 µg/ml konsantrasyonda propolis ile kültüre edilen hücrelerde, antioksidan seviyelerinde önemli

ölçüde artış ve oksidatif stres parametreleride ise önemli düzeyde azalma gözlenmiştir (Çizelge 4.3). Ayrıca, genomdaki bu tür daha büyük yeniden düzenleme mutasyonlarının dış etkenlerin türünü bulmak önemlidir. Apurik/apirimidinik (AP) bölgeleri genellikle oksidatif DNA hasarlarının etkileriyle oluşabilmektedir. Genellikle abazik bölge olarak adlandırılan bu tür küçük mutasyonların birikmesi, mikronükleus veya translokasyon gibi daha büyük kromozomal anormalliklere neden olabilir. Çeşitli hücre kültürü tiplerine farklı manyetik alan maruziyetinin genomik DNA'da oksidatif strese ve oksidasyon reaksiyonu stimülasyonuna neden olabileceği başka araştırmalarda keşfedilmiştir (Scarfi et al. 1991; Zhang et al. 2003). Sonuçlarımız, manyetik alan uygulanmasının ve oksidatif stres stimülasyonları üzerindeki olumsuz etkileri ile ilgili önceki çalışmalarla benzer olduğu gözlenmektedir. AP bölgeleri tüm uygulamalarda (1 mT, 2 mT ve 3 mT manyetik alanlara maruz kalma) artmış 3 mT'lik alanlar abazik alan oluşumlarında daha yüksek bir artışa neden olmuştur. Fakat, 3 gün boyunca uygulanan 3 mT manyetik alanın yanında 100 µg/ml konsantrasyonda propolis uygulamasının manyetik alan nedeniyle oluşan AP bölge mutasyonlarını önemli düzeyde düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 4.6).

Çizelge 4.3. 72 saat boyunca ELF-MF'lerin in vitro uygulamasından sonra TAS ve TOS seviyeleri (*, negatif kontrole kıyasla TAS'ta istatistiksel olarak anlamlı azalmayı ve TOS düzeyindeki artışı temsil eder).

Uygulama	TAK (mmol Trolox Equiv./l)	TOD (µmol H ₂ O ₂ Equiv./l)
(-) Kontrol	1,63±0,018	7,55±0,62
1 mT	1,13±0,028*	11,38±0,41*
2 mT	1,02±0,036*	13,63±1,2*
3 mT	0,82±0,025*	14,48±1,1*
100 µg/ml Propolis+3 mT	1,55±0,022	7,94±0,85



Şekil 4.6. Manyetik alanla tedaviden sonra farklılaşmış SHSY-5Y hücrelerinde oluşturulan AP bölgeleri (n = 3; P değeri < 0,05).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Statik manyetik alan uygulaması 96 saat sonra hücre ölümünü arttırdığı belirlenmiştir. Farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültürü modeli için sitotoksitedeki ana mekanizma, apoptozdan ziyade nekroz olduğu tespit edilmiştir. 1 mT manyetik alan için nekrotik hücre ölümü artışı yaklaşık %37 olduğu ve manyetik alan uygulamasının 3 mT'ye yükseltildiğinde, hücrelerdeki nekroz oranı %48'e yükseldiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, farklılaşmış SH-SY5Y hücre kültürlerinde nekrotik hücre ölümünde birincil bir işlevi olduğu ve düşük frekanslı statik manyetik alan uygulamasının, artan oksidatif stres ve abazik bölge kromozomal aberasyonları yoluyla Alzheimer hastalığı patolojisine katkıda bulunabileceği literatür verileriyle ilişkilendirilmiştir. Çalışmamız sonuçlarına göre, farklılaşmış nöroblastom hücre hattına ELF-MF'lerin sürekli uygulamaları, esas olarak nekrotik hücre ölümü ile sonuçlanan yüksek sitotoksositeye neden olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca manyetik alan uygulamasının mikronükleus ve abazik bölge anormallikleri olarak nükleer ve kromozomal aberasyonlara neden olduğu tespit edilmiştir. Hücre kültürlerinde oksidatif durum araştırıldıktan sonra, mutasyonların büyük olasılıkla oksidatif strese bağlı reaktif oksijen türlerinden (ROS) kaynaklandığı düşünülmüştür. Elde edilen bulgular ışığında, uzun süreli ELF-MF'lere maruz kalmanın, mutasyon birikimleri yoluyla nörodejenerasyonlara ve nekrotik hücre ölümlerine neden olabileceği söylenebilir. Ayrıca, manyetik alan ile birlikte propolis uygulamasının hücre canlılığı üzerinde önemli bir seviyede nörokoruyucu bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçlar doğrultusunda, propolisin tek başına uygulamasının farklılaşmış SHSY-5Y hücre hattında yüksek konsantrasyonlarda toksik bir etki göstermemiştir. 3 mT manyetik alan uygulamasına karşı propolisin %34 seviyelerinde bir koruyuculuk gösterdiği ve manyetik alan nedeniyle oluşan nekrotik hücre ölümlerini azalttığı söylenebilir. Antioksidan seviyeleri üzerine yapılan incelemeler göstermektedir ki, propolis uygulaması nörokoruyucu etkiyi manyetik alan sebebiyle hücre kültüründe oluşan oksidatif stresi azaltma ile gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Bu doğrultuda, propolis uygulaması manyetik alan nedeniyle oluşan mutasyonları önemli düzeyde azalttığı ve büyük çekirdek mutasyonlarını engellediği düşünülmektedir. Öte yandan, nekroz, DNA hasarı ve oksidatif stres arasındaki doğrudan ilişkiyi değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Manyetik alan toksisitesinin arkasındaki ana

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

mekanizma hakkında daha iyi fikir edinmek için gen ekspresyon değişimleri incelenmelidir.



KAYNAKLAR

- Ahlbom, A., Bridges, J., De Seze, R., Hillert, L., Juutilainen, J., Mattsson, M.-O. and Broman, K. 2008. Possible effects of electromagnetic fields (EMF) on human health - opinion of the scientific committee on emerging and newly identified health risks. *Toxicology*, 246(2-3), 248-250.
- Ahlbom, A., Cardis, E., Green, A., Linet, M., Savitz, D. and Swerdlow, A. 2001. Review of the epidemiologic literature on EMF and health. *Environmental Health Perspectives*, 6(6), 911-933
- Akçapınar, R., Garipcan, B., Goodarzi, V. and Uzun, L. 2021. Designing of various biosensor devices for determination of apoptosis: A comprehensive review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 578(1), 42-62.
- Albuquerque, W. W. C., Costa, R. M. P. B., Fernandes, T. de S. E. and Porto, A. L. F. 2016. Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 121(1), 16-28.
- Almeida, J. D. F., Reis, A. S. D., Heldt, L. F. S., Pereira, D., Bianchin, M., Moura, C. D. and Carpes, S. T. 2017. Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 76(3), 299-305.
- Altındag, O., Erel, O., Soran, N., Celik, H. and Selek, S. 2008. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatology International*, 28(4), 317-321.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M. ve Yılmaz, B. 2020. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362-369.
- Barnes, F. S. and Greenebaum, B. 2015. The effects of weak magnetic fields on radical pairs. *Bioelectromagnetics*, 36(1), 45-54.
- Bazmandegan, G., Boroushaki, M. T., Shamsizadeh, A., Ayoobi, F., Hakimizadeh, E. and Allahtavakoli, M. 2017. Brown propolis attenuates cerebral ischemia-induced oxidative damage via affecting antioxidant enzyme system in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 85(1), 503-510.
- Bowman, J. D., Thomas, D. C., London, S. J. and Peters, J. M. 1995. Hypothesis: The risk of childhood leukemia is related to combinations of power-frequency and static magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 16(1), 48-59
- Cells, H. N., Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Cefia, V. and Comella, X. 2000. Sequential treatment of sh-sy5y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 991-1003.

- Chionna, A., Tenuzzo, B., Panzarini, E., Dwikat, M. B., Abbro, L. and Dini, L. 2005. Time dependent modifications of Hep G2 cells during exposure to static magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 26(4), 275-286.
- Coballase-Urrutia, E., Navarro, L., Ortiz, J. L., Verdugo-Díaz, L., Gallardo, J. M., Hernández, M. E. and Estrada-Rojo, F. 2018. Static Magnetic Fields Modulate the Response of different oxidative stress markers in a restraint stress model animal. *BioMed Research International*, 2018(18), 1–9.
- Consales, C., Cirotti, C., Filomeni, G., Panatta, M., Butera, A., Merla, C. and Benassi, B. 2018. Fifty-hertz magnetic field affects the epigenetic modulation of the miR-34b/c in neuronal cells. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5698–5714.
- Consales, C., Merla, C., Marino, C. and Benassi, B. 2012. Electromagnetic fields, oxidative stress and neurodegeneration. *International Journal of Cell Biology*, 2012(1), 1–16.
- Coşkun, P. ve İnci, H. 2020. Propolisin kimyasal içeriği ile antibakteriyel, antiviral ve antioksidan aktivitesi. *ISPEC Journal of Agricultural Sciences*, 4(4), 1053–1070.
- De Paula, R., Rabalski, I., Messia, M. C., Abdel-Aal, E.-S. M. and Marconi, E. 2017. Effect of processing on phenolic acids composition and radical scavenging capacity of barley pasta. *Food Research International*, 102(4), 136–143.
- Ding, G., Nakahara, T., Hirose, H., Koyama, S., Takashima, Y. and Miyakoshi, J. 2004. Extremely low frequency magnetic fields and the promotion of H₂O₂-induced cell death in HL-60 cells. *International Journal of Radiation Biology*, 80(4), 317–324.
- Farhana, A. and Lappin, S. L. 2022. Lactate dehydrogenase. *StatPearls Publishing*, 11(4), 191-292.
- Ferdek, P. E., Jakubowska, M. A., Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V. and Petersen, O. H. 2016. Bile acids induce necrosis in pancreatic stellate cells dependent on calcium entry and sodium-driven bile uptake. *Journal of Physiology*, 594(21), 6147-6164.
- Feychting, M. 2005. Health effects of static magnetic fields-A review of the epidemiological evidence. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 87(2), 241-246.
- Flauzino, J. M. R., Peres, R. C. S., Alves, L. M., Vieira, J. G., Dos Santos, J. G., Brito-Madurro, A. G. and Madurro, J. M. 2021. DNA electrochemical biosensor for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* utilizing Hoechst 33258 as indicator. *Bioelectrochemistry*, 140(2021), 107801.
- Forman, H. J. and Zhang, H. 2021. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(9), 689–709.
- Gray, J. R., Frith, C. H. and Parker, J. D. 2000. In vivo enhancement of chemotherapy with static electric or magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 21(8), 575-583
- Grela, E., Kozłowska, J. and Grabowiecka, A. 2018. Current methodology of MTT assay in bacteria-A review. *Acta histochemica*, 120(4), 303–311.
- Grissom, C. B. 1995. Magnetic field effects in biology: A survey of possible mechanisms with emphasis on radical-pair recombination. *Chemical Reviews*, 95(1), 3-24.

- Gulcin, I. 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715.
- Hong, M. -N., Han, N. -K., Lee, H. -C., Ko, Y. -K., Chi, S. -G., Lee, Y. -S. and Lee, J. -S. 2012. Extremely low frequency magnetic fields do not elicit oxidative stress in MCF10A cells. *Journal of Radiation Research*, 53(1), 79-86.
- Huang, P., Xu, L. and Xie, Y. 2021. Biomedical applications of electromagnetic detection: A brief review. *Biosensors*, 11(7), 225.
- Jajte, J., Grzegorzczak, J., Zmyslacute, M. and Rajkowska, E. 2002. Effect of 7 mT static magnetic field and iron ions on rat lymphocytes: Apoptosis, necrosis and free radical processes. *Bioelectrochemistry*, 57(2), 107-111.
- Jin, Y. B., Choi, S.-H., Lee, J. S., Kim, J.-K., Lee, J.-W., Hong, S.-C. and Lee, Y.-S. 2014. Absence of DNA damage after 60-Hz electromagnetic field exposure combined with ionizing radiation, hydrogen peroxide, or c-Myc overexpression. *Radiation and Environmental Biophysics*, 53(1), 93–101.
- Kaplan, S., Deniz, O. G., Önger, M. E., Türkmen, A. P., Yurt, K. K., Aydın, I. and Davis, D. 2016. Electromagnetic field and brain development. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 75(8), 52–61.
- Karimi, A., Ghadiri Moghaddam, F. and Valipour, M. 2020. Insights in the biology of extremely low-frequency magnetic fields exposure on human health. *Molecular Biology Reports*, 47(7), 5621–5633.
- Kim, Y. -W., Kim, H. -S., Lee, J. -S., Kim, Y. -J., Lee, S. -K., Seo, J. -N. and Gimm, Y. -M. 2009. Effects of 60 Hz 14 μ T magnetic field on the apoptosis of testicular germ cell in mice. *Bioelectromagnetics*, 30(1), 66–72.
- Kim, Y. W., Kim, H. S., Lee, J. S., Kim, Y. J., Lee, S. K., Seo, J. N. and Gimm, Y. M. 2009. Effects of 60 Hz 14 μ T magnetic field on the apoptosis of testicular germ cell in mice. *Bioelectromagnetics*, 30(1), 66-72.
- Kovalevich, J. and Langford, D. 2013. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in Molecular Biology*, 5(3), 9-23.
- Kurakin, A. 2011. The self-organizing fractal theory as a universal discovery method: The phenomenon of life. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 8(1), 1-66.
- Lewczuk, B., Redlarski, G., Zak, A., Ziółkowska, N., Przybylska-Gornowicz, B. and Krawczuk, M. 2014. Influence of electric, magnetic, and electromagnetic fields on the circadian system: current stage of knowledge. *BioMed Research International*, 2014(14), 169459.
- Luukkonen, J., Höytö, A., Sokka, M., Liimatainen, A., Syväoja, J., Juutilainen, J. and Naarala, J. 2017. Modification of p21 level and cell cycle distribution by 50 Hz magnetic fields in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *International Journal of Radiation Biology*, 93(2), 240-248.
- Maffei, M. E. 2022. Magnetic fields and cancer: Epidemiology, cellular biology and theranostics. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1339.

- Markov, M. S. 2007. Magnetic field therapy: A review. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 26(1), 1–23.
- McNamee, J. P., Bellier, P. V., Chauhan, V., Gajda, G. B., Lemay, E. and Thansandote, A. 2006. Evaluating DNA damage in rodent brain after acute 60 Hz magnetic-field exposure. *Radiation Research*, 164(6), 791-797.
- Mezei, G., Kheifets, L., Nelson, L., Mills, K., Iriye, R. and Kelsey I. 2002. Household appliance use and residential exposure to 60-Hz magnetic fields. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 11(1), 41-49.
- Miyakoshi, J., Koji, Y., Wakasa, T. and Takebe, H. 2002. Long-term exposure to a magnetic field (5 mT at 60 Hz) increases X-ray-induced mutations. *Journal of Radiation Research*, 40(1), 13–21.
- Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Feldman, N. B. and Lutsenko, S. V. 2018. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free Radical Research*, 52(5), 507–543.
- Moon, J. -H. 2020. Health effects of electromagnetic fields on children. *Clinical and Experimental Pediatrics*, 63(11), 422–428.
- Moreira, F. de L., de Souza, G. H. B., Rodrigues, I. V., Lopes, N. P. and de Oliveira, A. R. M. 2013. A non-michaelian behavior of the in vitro metabolism of the pentacyclic triterpene alfa and beta amyryns by employing rat liver microsomes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 84(5), 14–19.
- Moriyama, K. and Yoshitomi, K. 2005. Apartment electrical wiring: A cause of extremely low frequency magnetic field exposure in residential areas. *Bioelectromagnetics*, 26(3), 238-241.
- Oswald, M. C. W., Garnham, N., Sweeney, S. T. and Landgraf, M. 2018. Regulation of neuronal development and function by ROS. *FEBS Letters*, 592(5), 679–691.
- Panche, A. N., Diwan, A. D. and Chandra, S. R. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 2016(5), 47-59.
- Park, S., Kim, Y. -J., Kim, M. S., Kim, H. -S., Kim, M. -W., Kang, Y. -M. and Kim, Y. -W. 2018. The effect of 20-week continuous 60 Hz magnetic field exposure on testicular function in sprague-dawley rats. *Bioelectromagnetics*, 39(7), 539–546.
- Pisoschi, A. M. and Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97(3), 55–74.
- Piszczyk, P., Wójcik-Piotrowicz, K., Gil, K. and Kaszuba-Zwońska, J. 2021. Immunity and electromagnetic fields. *Environmental Research*, 200(4) 111-115.
- Presgraves, S. P., Ahmed, T., Borwege, S. and Joyce, J. N. 2003. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotoxicity Research*, 5(8), 579-598.
- Przybyłek, I. and Karpiński, T. M. 2019. Antibacterial properties of propolis. *Molecules*, 24(11), 2047-2059.

- Romanenko, S., Begley, R., Harvey, A. R., Hool, L. and Wallace, V. P. 2017. The interaction between electromagnetic fields at megahertz, gigahertz and terahertz frequencies with cells, tissues and organisms: Risks and potential. *Journal of the Royal Society Interface*, 14(137), 20170585.
- Rosen, A. D. 1993. Membrane response to static magnetic fields: effect of exposure duration. *Biomembranes*, 1148(2), 317-320.
- Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Kabała-Dzik, A., Kubina, R. and Buszman, E. 2015. Polyphenols from bee pollen: Structure, absorption, metabolism and biological activity. *Molecules*, 20(12), 21732–21749.
- Sabo, J., Mirossay, L., Horovcak, L., Sarissky, M., Mirossay, A. and Mojzis, J. 2002. Effects of static magnetic field on human leukemic cell line HL-60. *Bioelectrochemistry*, 56(1), 227-231.
- Scarfi, M. R., Bersani, F., Cossarizza, A., Monti, D., Castellani, G., Cadossi, R. and Franceschi, C. 1991. Spontaneous and mitomycin-C-induced micronuclei in human lymphocytes exposed to extremely low frequency pulsed magnetic fields. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 176(1), 194-200.
- Schuermann, D. and Mevissen, M. 2021. Manmade electromagnetic fields and oxidative stress-biological effects and consequences for health. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3772.
- Shadid, W. G. and Shadid, R. 2020. The electric origin of magnetic forces theory: General framework. *IEEE Access*, 8(1), 73756–73766.
- Shahbazi-G, D., Sadat Seta, S., Aminolroay, F. and Shahbazi-G, S. 2018. Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields on human body and biological system: A systematic literature review. *Journal of Medical Sciences*, 18(3), 149–156.
- Shahinozzaman, M., Taira, N., Ishii, T., Halim, M., Hossain, M. and Tawata, S. 2018. Anti-inflammatory, anti-diabetic, and anti-alzheimer's effects of prenylated flavonoids from okinawa propolis: An investigation by experimental and computational studies. *Molecules*, 23(10), 2479.
- Shimazawa, M., Chikamatsu, S., Morimoto, N., Mishima, S., Nagai, H. and Hara, H. 2005. Neuroprotection by brazilian green propolis against in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(2), 201–207.
- Sobel, Eugene, Davanipour, Z., Sulkava, R., Erkinjuntti, T., Wikstrom, J., Henderson, V. W. and Lee, P. J. 1995. Occupations with exposure to electromagnetic fields: A possible risk factor for alzheimer's disease. *American Journal of Epidemiology*, 142(5), 515-524.
- Song, K., Im, S. H., Yoon, Y. J., Kim, H. M., Lee, H. J. and Park, G. S. 2018. A 60 Hz uniform electromagnetic field promotes human cell proliferation by decreasing intracellular reactive oxygen species levels. *Plos One*, 13(7), e0199753.
- Suárez-Antola, R. 2020. A modification of Plonsey's formula for biomagnetism Version with corrections. *Journal of Biomagnetics*, 5(2), 12-25

- Synowiec-Wojtarowicz, A., Kimsa-Dudek, M., Pawłowska-Góral, K., Kurzeja, E., Glinka, M. and Gawron, S. 2017. Influence of static magnetic fields up to 700 mT and dihydrochalcones on the antioxidant response in fibroblasts. *Journal of Environmental Science and Health*, 52(4), 385–390.
- Tenuzzo, B., Chionna, A., Panzarini, E., Lanubile, R., Tarantino, P., Jeso, B. Di. and Dini, L. 2006. Biological effects of 6 mT static magnetic fields: A comparative study in different cell types. *Bioelectromagnetics*, 27(7), 560–577.
- Tian, X., Wang, D., Zha, M., Yang, X., Ji, X., Zhang, L. and Zhang, X. 2018. Magnetic field direction differentially impacts the growth of different cell types. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 37(2), 114–125.
- Tofani, S. 2003. Static and ELF magnetic fields enhance the in vivo anti-tumor efficacy of cis-platin against lewis lung carcinoma, but not of cyclophosphamide against B16 melanotic melanoma. *Pharmacological Research*, 48(1), 126-139.
- Tofani, S., Barone, D., Berardelli, M., Berno, E., Cintonino, M., Foglia, L. and Eandi, M. 2003. Static and ELF magnetic fields enhance the in vivo anti-tumor efficacy of cis-platin against lewis lung carcinoma, but not of cyclophosphamide against B16 melanotic melanoma. *Pharmacological Research*, 48(1), 83-90.
- Touitou, Y., Selmaoui, B. and Lambrozo, J. 2022. Assessment of cortisol secretory pattern in workers chronically exposed to ELF-EMF generated by high voltage transmission lines and substations. *Environment International*, 161(22), 107103.
- Türedi, S., Hancı, H. ve Odacı, E. 2020. 900 megahertz dalga frekansına sahip elektromanyetik alanın biyolojik sistemler üzerindeki olası etkilerine bilimsel yaklaşım: Derleme. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(1), 140–148.
- Van Huizen, A. V, Morton, J. M., Kinsey, L. J., Von Kannon, D. G., Saad, M. A., Birkholz, T. R. and Beane, W. S. 2019. Weak magnetic fields alter stem cell-mediated growth. *Science Advances*, 5(1), eaau7201.
- Villena, J., Del Fabbro, S., Quilodrán-Vega, S., El-Seedi, H. R., Wang, K., El-Wahed, A. A. and M. Khalifa, S. A. 2022. Honey bee products: Preclinical and clinical studies of their anti-inflammatory and immunomodulatory properties. *Frontiers in Nutrition*, 1(5), 761267.
- Vorobyov, V. V., Sosunov, E. A., Kukushkin, N. I. and Lednev, V. V. 1998. Weak combined magnetic field affects basic and morphine-induced rat's EEG. *Brain Research*, 781(2), 182-187.
- Wei, C.-C., Chang, C.-H. and Liao, V. H.-C. 2017. Anti-Parkinsonian effects of β -amylin are regulated via LGG-1 involved autophagy pathway in *caenorhabditis elegans*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 36(6), 118–125.
- Wertheimer, N. and Leeper, E. 1979. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *American Journal of Epidemiology*, 109(3), 273-284.

- Winker, R., Ivancsits, S., Pilger, A., Adlkofer, F. and Rüdiger, H. W. 2005. Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585(2), 43-49.
- Yuan, L.-Q., Wang, C., Zhu, K., Li, H.-M., Gu, W.-Z., Zhou, D.-M. and Chen, X. 2018. The antitumor effect of static and extremely low frequency magnetic fields against nephroblastoma and neuroblastoma. *Bioelectromagnetics*, 39(5), 375–385.
- Zeng, Y., Shen, Y., Hong, L., Chen, Y., Shi, X., Zeng, Q. and Yu, P. 2017. effects of single and repeated exposure to a 50-Hz 2-mT electromagnetic field on primary cultured hippocampal neurons. *Neuroscience Bulletin*, 33(3), 299–306.
- Zhang, J., Zheng, G., Krikidis, I. and Zhang, R. 2019. Specific absorption rate-aware beamforming in MISO downlink SWIPT systems. *IEEE Transactions on Communications*, 68(2), 1312–1326.
- Zhang, Q.-M., Tokiwa, M., Doi, T., Nakahara, T., Chang, P.-W., Nakamura, N. and Yonei, S. 2003. Strong static magnetic field and the induction of mutations through elevated production of reactive oxygen species in *Escherichia coli* soxR. *International Journal of Radiation Biology*, 79(4), 281–286.
- Ziegelberger, G., Croft, R., Feychting, M., Green, A. C., Hirata, A., d’Inzeo, G. and Watanabe, S. 2020. Guidelines for limiting exposure to electromagnetic fields (100 kHz to 300 GHz). *Health Physics*, 118(5), 483–524.