

## Nöroblastoma Hücre Hattında Uzun Süreli Darbeli Elektromanyetik Alan Maruziyetinin Apoptoz Üzerine Etkileri

Çiğdem Gökçek Saraç<sup>1\*</sup>, Ebru Çetin<sup>2</sup>, Serdar Karakurt<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, Mühendislik Fakültesi, Akdeniz Üniversitesi, 07070, Antalya, TÜRKİYE

<https://orcid.org/0000-0002-3538-6551>

\*yazışılan yazar: [gokcekcigdem@gmail.com](mailto:gokcekcigdem@gmail.com)

<sup>2</sup>Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, Mühendislik Fakültesi, Akdeniz Üniversitesi, 07070, Antalya, TÜRKİYE

<https://orcid.org/0000-0001-8675-5479>

<sup>3</sup>Biyokimya Anabilim Dalı, Fen Fakültesi, Selçuk Üniversitesi, 42250, Konya, TÜRKİYE

<https://orcid.org/0000-0002-4449-6103>

(Alınış / Received: 29.12.2022, Kabul / Accepted: 08.03.2023, Yayınlanma / Published: 22.06.2023)

**Öz:** Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF) düşük frekanslı elektromanyetik alan olup son yıllarda klinik araştırmalarda tedavi amaçlı uygulanmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Farklı frekans, yoğunluk, dalga boyu ve sürelerde kemoterapötik ilaçlarla birlikte uygulanan PEMF maruziyetinin beyin kanseri hücreleri dahil çeşitli kanser hücrelerinde apoptoz üzerine etkilerini değerlendiren çalışmalardan farklı olarak çalışmada sabit frekans ve yoğunlukta (50 Hz, 1 mT) uzun süre (48 saat) PEMF maruziyetinin SK-N-SH insan nöroblastoma hücresinde apoptoz mekanizmasına olası etkileri farklı tekniklerle araştırılmıştır. Hücreler kontrol grubu, PEMF maruziyetinin olmadığı SK-N-SH hücre grubu, ve PEMF'ye 48 saat maruz bırakılan SK-N-SH hücre grubu olmak üzere üçe ayrılmıştır. Hücre canlılığı, apoptoz tayini, kaspaz-8 mRNA düzeyi ve kaspaz-8 protein ekspresyonu sırasıyla alamar mavisi, akış sitometri, qRT-PCR ve Western-Blot teknikleriyle belirlenmiştir. Uzun süreli PEMF maruziyetinin insan nöroblastoma hücresinde hücre canlılığını belirgin şekilde azaltıp hücreleri daha fazla erken apoptoza uğratarak hücreleri apoptoza sürüklediği ve bu mekanizmanın kaspaz-8 mRNA düzeyinde ve protein ekspresyon seviyesinde artışla ilişkili olabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Darbeli elektromanyetik alan, Nöroblastoma, Kaspaz-8

### Effects of Long-Term Pulsed Electromagnetic Field Exposure on Apoptosis in Neuroblastoma Cell Line

**Abstract:** Pulsed Electromagnetic Field (PEMF) is a low-frequency electromagnetic field that has gained popularity in clinical research in recent years for its potential therapeutic benefits. Unlike studies evaluating the effects of PEMF exposure combined with chemotherapeutic drugs at different frequencies, intensities, wavelengths and durations on apoptosis in various cancer cells, including brain cancer cells, in the study, the possible effects of long-term (48 hours) PEMF exposure at constant frequency and intensity (50 Hz, 1 mT) on the apoptosis mechanism in human neuroblastoma cells have been investigated by different techniques. Cells group is divided into three experimental groups as control, SK-N-SH cell group without PEMF exposure, and SK-N-SH cell group exposed to PEMF for 48 hours. Alamar blue, flow cytometry, qRT-PCR and Western-Blotting techniques were utilized to measure cell viability, apoptosis, mRNA level and protein expression of the caspase-8. It has been shown that long-term PEMF exposure significantly reduces cell viability in human neuroblastoma cells,

inducing the cells to a significant amount of early apoptosis, and this mechanism may be explained by the increased mRNA and protein expression level of the caspase-8.

**Key words:** Pulsed electromagnetic field, Neuroblastoma, Caspase-8

## 1. Giriş

Elektromanyetik alanlar (EMA), mıknatısların ve elektrik akımların birleşimi sonucunda oluşan manyetik alanlardır [1]. Dünyanın yapısından kaynaklı oluşan statik manyetik alanın dışında insan yapımı EMA'lar bulunmaktadır [1]. Yapay yollarla elde edilen elektromanyetik alanlar, sahip oldukları frekansa göre düşük frekanslı elektromanyetik alanlar (ELF-EMA<300 Hz), ara frekanslı elektromanyetik alanlar (300 Hz-10 MHz) ve radyo frekansından (10 MHz-300 GHz) oluşmaktadır [1]. *In vitro* çalışmalar ELF-EMA'nın nöron benzeri hücrelerde gen ifadesinin düzenlenmesinde, nörit büyümesinde, apoptozun inhibisyonunda, nöronal farklılaşmada rolü olduğunu göstermiştir [2]. Düşük frekanslı EMA uygulamalarının içinde en dikkat çekenini belirli dalga formuna ve genliğe sahip olan "Darbeli Elektromanyetik Alan (Pulsed Electromagnetic Field) (PEMF)"dir [3]. PEMF'ler darbeleri sinyallerle üretilir, manyetik alan tepe değeri miliTesla(mT) ve dU/değişim oranı (dt) hızlıdır (milisaniye) [4]. PEMF maruziyetinin nörodejeneratif hastalıkların [5], ödemin [6], migrenin [7], ameliyat sonrası ağrının [8], yumuşak doku hasarının [9], yaranın tedavisinde [10], oksidatif stresin sitotoksik etkilerini azaltmada [11], ve oksidan-antioksidan mekanizmasının dengesinde rolü olduğu [12,13] çeşitli çalışmalarca gösterilmiş ve klinikte potansiyel bir tedavi yöntemi olarak kullanılması hız kazanmıştır.

Apoptoz, proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki denge ile düzenlenen, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan programlanmış hücre ölümüdür [14]. Apoptoz, hücre içinden (mitokondriyal yolak) ve hücre dışından (hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri) olmak üzere iki ayrı mekanizma ile indüklenebilir [15]. Mitokondriyal yolakta (intrinsik yolak), hücrenin ölümüne ya da yaşamına karar verecek olan en önemli faktör sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını başlatan apoptozis uyarıcı proapoptotik (bax, bcl-xs, bad, bim, bid), ve sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını baskılayan apoptozis baskılayıcı antiapoptotik (bcl-2, bcl-xl, mcl-1) üyeleri bulunan Bcl-2 ailesinin üyeleridir [16]. Apoptozun mitokondriyal yolağında sitokrom c'nin salınması önemli bir basamak olup Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'un aktivasyonuna, aktifleşen kaspaz-9'da apoptotik yolaktaki bir seri kaspaz aktivasyonunun (kaspaz-3, -7 gibi) başlamasına yol açar [17]. Hücre dışından apoptoz yolağı (ekstremsel yolak) ise, bir ligandın bir ölüm reseptörüne bağlanması yoluyla aktive edilir ve bu da adaptör proteinlerinin yardımıyla kaspaz-8'in dimerizasyonuna ve aktivasyonuna yol açar. Aktif kaspaz-8 ya direk olarak prokaspaz-3, -6, -7'yi aktive ederek apoptozu başlatır ya da bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'i kesip aktifleştirerek apoptozun mitokondriyal yolağının aktifleşmesine neden olur [16].

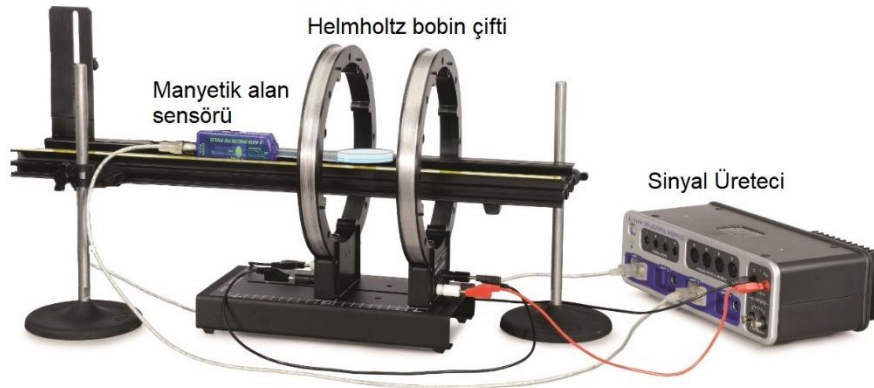
Beyin kanseri hücreleri üzerinde farklı deneysel yaklaşımlarla yapılan *in vitro* çalışmalar, farklı frekans ve farklı dalga boyuna sahip ELF-EMA'nın kemoterapötik ilaçlarla birlikte farklı zaman aralıklarıyla uygulanmasının apoptozu indüklediğini ve apoptozla ilgili proteinlerde değişikliğe neden olduğunu göstermiştir [18, 19]. Ancak, çocukluk çağının erken döneminde görülen sempatik sinir sistemi kaynaklı kötü huylu beyin tümörü olan insan nöroblastoma hücre hattı üzerinde, belirli bir frekansa ve dalga boyuna sahip PEMF'nin direkt olarak uzun süreli maruziyetinin apoptozla ve apoptozun ekstremsel yolağında önemli rol oynayan kaspaz-8'in ekspresyonu üzerinde değişiklikleri araştıran çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu nedenle çalışmanın amacı, insan nöroblastoma hücre hattında (SK-N-SH) 50 Hz frekans, 1.0 mT yoğunluğundaki PEMF'ye uzun süre (48 saat) maruziyetin hücre canlılığına, apoptozu indükleyip indüklemeye ve apoptoz

mekanizmasında rol alan kilit moleküllerden kaspaz-8'in mRNA düzeyine ve protein ekspresyonuna etkisini farklı moleküler tekniklerle incelemektir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. PEMF maruziyeti

PEMF devre seti (Pasco; UI-5000) ve Pasco 850 Capstone Yazılımı (UI-5400) EDUTEK firmasından (Ankara, Türkiye) satın alınmıştır. PEMF devresi, 500 sarımlı Helmholtz bobin çiftinden oluşmaktadır. Bobinler homojen manyetik alan oluşturmak için birbirlerine paralel olarak konumlandırılmıştır. Seri bağlanan bobin çifti 50 Hz frekans, 1 mT manyetik alan, 1.3 ms darbe (pulse) süresi ve kare dalga formu oluşturması için uygun bir sinyalle beslenmiştir. Hücre kültürü plakaları her bobin çiftinden 5 cm uzağa yerleştirilmiştir. Devrenin yazılım programı (Pasco 850 Capstone) ile bağlantısı bilgisayar ortamında yapılmıştır. Hücre kültürüne uygulanacak manyetik alan darbeleri manyetik olarak ayarlanmış ve bobinde elektrik akım değişimi miliamper (mA) cinsinden hesaplanmıştır. Elektrik gerilimi standart bir bobin probu ile ölçülmüştür. Manyetik alanın mekansal homojenitesi hem siliko hem de hücre inkübatörü içinde Hall Effect gausmetre ile ölçülmüştür. Bu yapılandırmada, 1 mT maksimum manyetik akım yoğunluğuna ve 50 Hz frekansa sahip PEMF hücrelere dik doğrultudadır. Hücrelerin PEMF maruziyeti öncesi deney şartlarının muhtemel düşük frekanslı alanlarından etkilenmemeleri için deneylerin yürütüleceği laboratuvar ortamında çok düşük frekanslı (ELF) elektrik ve manyetik alan seviyeleri ölçülmüştür. Buna ilaveten PEMF maruziyetinden kaynaklı olası termal etkinin engellenebilmesi amacıyla ortam sıcaklığı 37°C'ye ayarlanarak sürekli kontrol edilmiş ve sıcaklık artışı tespit edilmemiştir. PEMF devre düzeneği bobin çiftinin ortasına konumlandırılmış hücre plakası ile birlikte Şimşek ve ark. [11] çalışmasından revize edilerek Şekil 1'de temsili olarak gösterilmiştir.



Şekil 1. PEMF düzeneğinin temsili gösterimi

### 2.2. Hücre kültürü çalışmaları

#### 2.2.1. Hücre grupları

Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu-ATCC, (Missouri, ABD)'den insan nöroblastoma hücre hattı, SK-N-SH, satın alınarak %10 fetal sıgır serumu, %1 penisilin-streptomisin,

ve %1 L-Glutamin içeren Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Biological Industries, Cromwell, ABD) ortamında 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren %95 nem ortamlı steril inkübatörde (BINDER, Camarillo, ABD) inkübe edilmiştir. Hücreler üç gruba ayrılmıştır: Grup I: Kontrol grubu-Sağlıklı hücre hattı (HEK293t); Grup II: PEMF maruziyetinin olmadığı SK-N-SH nöroblastoma hücre hattı; Grup III: 48 saat boyunca PEMF'ye (50 Hz, 1 mT) maruz bırakılan SK-N-SH nöroblastoma hücre hattı.

### 2.2.2. Hücre canlılığının tespiti

Tüm gruplardaki hücreler 1:1 oranında seyreltilmiş %0.04 Tripan Mavisıyla (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD) boyanarak Bio-Rad TC20 otomatik hücre sayım cihazı (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD) ile sayılmış ve üçlü tekrar şeklinde 96 kuyucuklu plakalara (1x10<sup>4</sup>/kuyucuk) ekilmiştir. 570 nm ve 610 nm dalga boylarında spektrofotometrede (Multiskan Go; Thermo Scientific Co., Waltham, MA, ABD) hücre canlılığı ve sitotoksosite Alamar Mavisı reaktifi (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak ölçülmüş ve sonuçlar hücre canlılığının yüzdesi (%) olarak gösterilmiştir.

### 2.2.3. Akış sitometri ile apoptoz tayini

PEMF maruziyetinin nöroblastoma hücre hattında apoptotik etkilerini değerlendirmek için, hücreler 3x10<sup>5</sup> hücre/kuyucuk şeklinde 6-kuyucuklu plakalara ekilmiş, hücre canlılığını %50 oranında inhibe eden PEMF maruziyetine eşit sürede Darbeli Elektromanyetik Alan uygulanmış ve akabinde 24 saat boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub> koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben hücreler 5 dakika boyunca 15000 x g' de santrifüj edilmiştir. Pelete 100 µL (1X) bağlanma tamponu eklenip Anneksin V Apoptoz Tespit Kiti içeriğinde yer alan Anneksin V-APC ve 7-AAD ile boyanmıştır. Hücrelerin erken/geç apoptoz ve nekroz oranları NovoCyte Akış Sitometri Sistemi (Acea, Kuzey Amerika) ile ölçülmüştür.

### 2.2.4. Kaspaz-8 mRNA seviyesinin tespiti

Hücre gruplarının total RNA izolasyonları TRIZOL reaktifi kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen RNA (1 ng), cDNA sentezi için kullanılmıştır. Revers transkripsiyon reaksiyonu, iScript cDNA sentez kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan cDNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) çalışmalarında iTaq Universal SYBR Green PCR Kit kullanılmıştır. qRT-PCR çalışmalarında kaspaz-8 spesifik ileri ve geri primerler NCBI Primer Blast yazılımı ile dizayn edilmiş olup ileri primer 3'- AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA-5' ve geri primeri 3'- TCAGGACTTCCTCAAGGCTGC-5' olarak belirlenmiştir. Elde edilen değerler GAPDH kullanılarak normalize edilmiş olup kaspaz-8 mRNA seviyesi 2<sup>-ΔΔCt</sup> formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

### 2.2.5. Kaspaz-8 protein ekspresyon düzeyinin tespiti

Protein izolasyonu yapılan hücre süspansiyonlarındaki protein miktarı BSA standardı kullanılarak BCA yöntemine göre belirlenmiştir. PEMF maruziyetinin apoptoz yolağında rol alan Kaspaz-8 proteinin ekspresyonu üzerindeki etkileri Western Blot tekniğiyle araştırılmıştır. Biorad elektroforez sistemi kullanılarak SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi ile proteinler ayrıştırılmıştır. Elektroforezi takiben jel sandviçten çıkarılan jeller transfer tamponunda (25 mM Tris, 192 mM glisin ve %20 metanol) 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Transfer sandviçin hazırlanmasından sonra sistem güç kaynağına bağlanarak voltaj, maksimum akım limiti ayarlanmış ve 90 dk süreyle proteinler elektroforetik olarak transfer edilmiştir. Proteinlerin tespiti aşamasında

membran 10 dakika süreyle TBST solüsyonu (Tris Buffered Saline + Tween 20: 20 mM Tris-HCL, pH 7.4, 0.5 M NaCl ve %0,05 Tween 20) ile yıkanmıştır. Daha sonra membran bloke çözeltisi (TBST içinde yağsız %5'lik süt tozu) ile 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bağlanmamış fazla bloke çözeltisi uzaklaştırılarak membran 2 saat primer antikor ile daha sonra da 1 saat ikincil antikor ile inkübe edilmiştir. Bağlanmamış antikorların uzaklaştırılması için aralarda 5'er dakika 3'er tekrar olmak üzere TBST ile inkübe edilmiştir. Primer antikor bağlanan proteinlerin tespiti, membran üzerindeki protein-primer antikor kompleksinin alkalın fosfataz (ALP) bağlı ikincil antikor ve ALP tespit kiti ile inkübe edilmesine dayanmaktadır. Protein ekspresyon seviyelerini normalize etmek  $\beta$ -aktin internal standard kontrol olarak kullanılmıştır. Image J programı ile protein bantlarının densitometrik analizi gerçekleştirilmiştir.

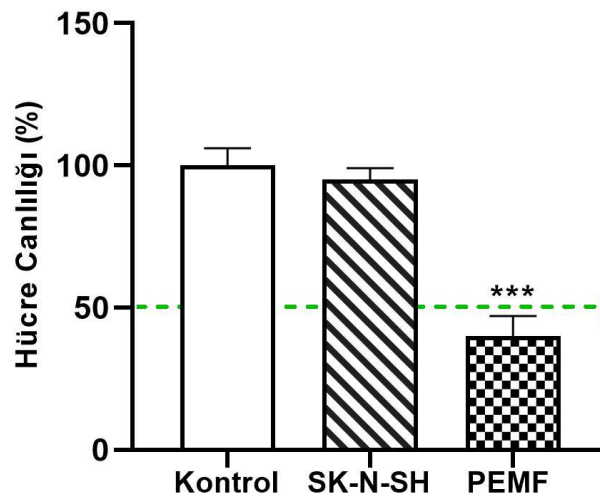
### 2.3. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz SPSS v.23 (Chicago, IL) istatistik paket programı ile Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA), çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılarak değerlendirilmiş ve sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak verilmiştir. Sonuçlar en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. \* $p < 0.05$  düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 3. Bulgular

### 3.1. PEMF maruziyetinin hücre canlılığına etkisi

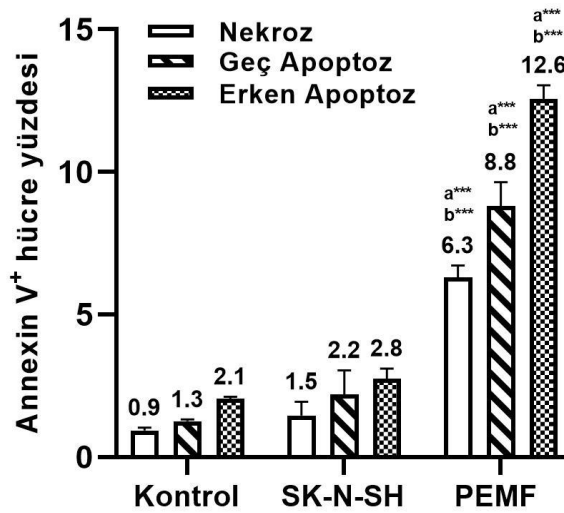
PEMF maruziyetinin hücre gruplarının hücre canlılığı üzerine etkisini inceleyebilmek için Grup I'in hücre canlılığı %100 kabul edilerek Grup II ve Grup III hücrelerinin %50'sini öldüren konsantrasyon ( $IC_{50}$ ) değeri belirlenmiştir (Şekil 2). Elde edilen sonuçlara göre 48 saat PEMF'ye (50 Hz, 1.0 mT) maruz bırakılan SK-N-SH nöroblastoma hücre hattında (Grup III) hücre canlılığı PEMF maruziyetinin olmadığı SK-N-SH nöroblastoma hücre hattı grubuna göre (Grup II) istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür ( $p \leq 0.001$ ) (Şekil 2). Sonuçlar PEMF maruziyetinin SK-N-SH insan nöroblastoma hücre hattında hücre canlılığını azaltıcı olası etkisinin olabileceğini göstermektedir.



Şekil 2. Hücre gruplarında hücre canlılığı yüzdeleri

### 3.2. PEMF maruziyetinin apoptoza etkisi

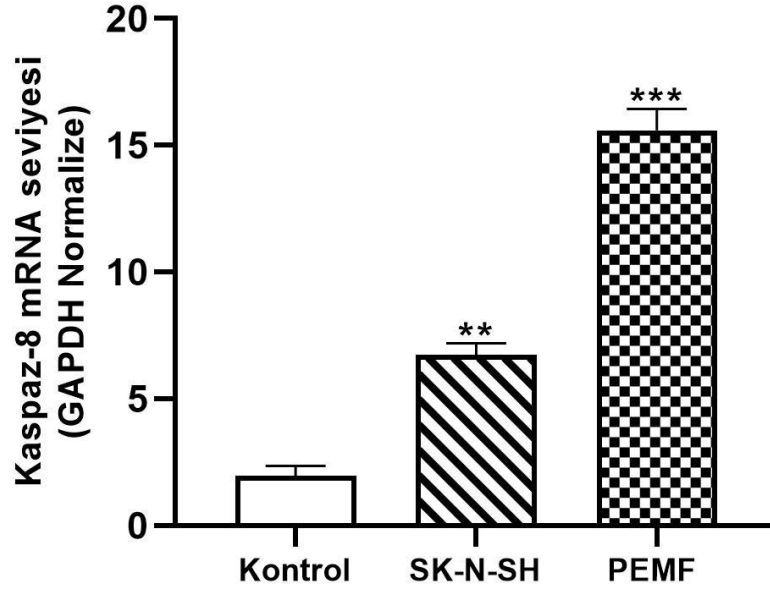
PEMF maruziyetinin nöroblastoma hücre hattında apoptotik etkileri akış sitometrisi ile incelenmiştir. Kontrol grubu olan HEK293t hücre hattının %2.1 erken apoptoz, %1.3 geç apoptoz ve %0.9 nekroza uğradığı belirlenmiştir. PEMF maruziyetinin olmadığı SK-N-SH nöroblastoma hücre hattının ise %2.8 erken apoptoz, %2.2 geç apoptoz ve %1.5 nekroza uğradığı bulunmuştur. 48 saat 50 Hz frekasında 1.0 mT yoğunluğunda PEMF'ye maruz bırakılan SK-N-SH nöroblastoma hücre hattının ise %12.6 erken apoptoz, %8.8 geç apoptoz ve %6.3 nekroza uğradığı tespit edilmiştir. Sonuçlar 48 saat PEMF (50 Hz, 1.0 mT) maruziyetinin SK-N-SH nöroblastoma hücre hattını HEK293t kontrol hücresine göre 6-kat, PEMF maruziyeti olmayan SK-N-SH hücresine göre 4.5 kat daha fazla erken apoptoza uğratarak hücreleri apoptoza sürüklediğini göstermiştir (Şekil 3). Ayrıca, PEMF maruziyetinin erken/geç apoptotik ve nekrotik etkisi HEK293t kontrol hücresine ve PEMF maruziyeti olmayan SK-N-SH hücresine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir (\*\* $p < 0.001$ ).



**Şekil 3.** PEMF maruziyetinin erken/geç apoptotik ve nekrotik etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  SD olacak şekilde gösterilmiş, Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirilmiş, çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılmıştır. “a” kontrol grubuna göre (\*\* $p < 0.001$ ), “b” ise SK-N-SH grubuna göre (\*\* $p < 0.001$ ) istatistiksel farkı işaret etmektedir.

### 3.3. PEMF maruziyetinin kaspaz-8 mRNA seviyesine etkisi

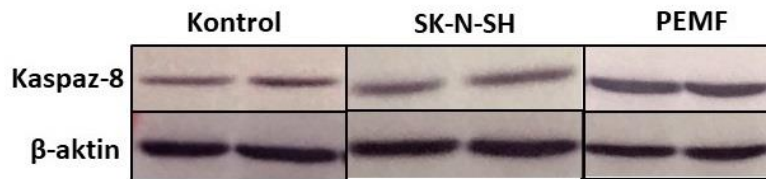
Hücre gruplarındaki kaspaz-8'in mRNA seviyesi qRT-PCR tekniği ile belirlenmiştir. Veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test ile analiz edilmiştir. 48 saat PEMF'ye (50 Hz, 1.0 mT) maruz kalan SK-N-SH hücre hattında (Grup III) kaspaz-8 mRNA seviyesi kontrol grubuna (Grup I) ve PEMF maruziyetinin olmadığı SK-N-SH nöroblastoma hücre hattı grubuna (Grup II) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir ( $p \leq 0.001$ , sırasıyla) (Şekil 4). Ayrıca, kaspaz-8 mRNA seviyesi SK-N-SH nöroblastoma hücre hattında HEK293t sağlıklı kontrol hücreye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir ( $p \leq 0.01$ ) (Şekil 4). Apoptozun kilit moleküllerinden başlatıcı kaspaz olarak bilinen kaspaz-8 mRNA seviyesinin SK-N-SH hücre hattında kontrole kıyasla daha fazla olması apoptozun bu hücre hattında uyarıldığını, SK-N-SH hücre hattında uzun süreli PEMF maruziyetinin ise kaspaz-8 gen ekspresyonunda daha fazla artışa neden olarak apoptozun ektrensek mekanizmasında olası etkisinin olabileceğini göstermiştir.



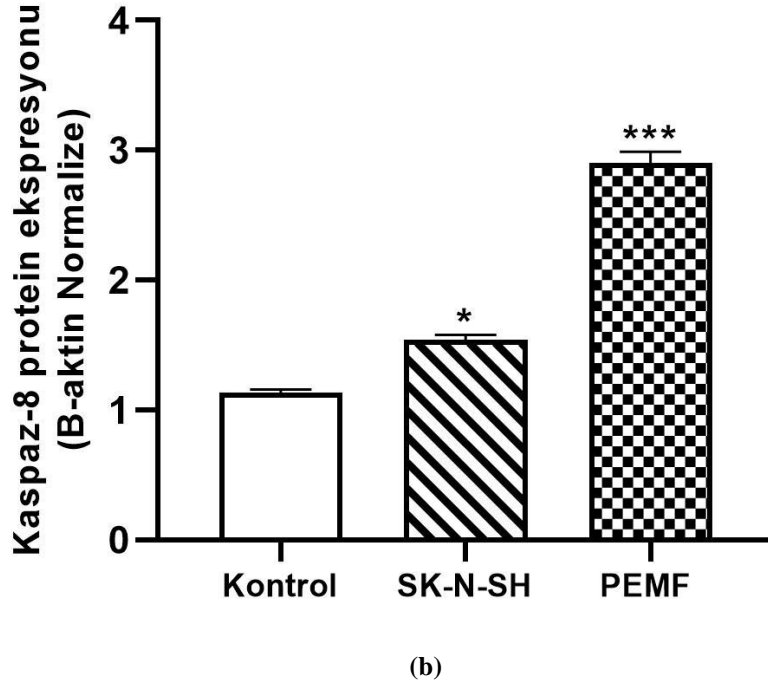
**Şekil 4.** Hücre gruplarında kaspaz-8 mRNA seviyesinin GAPDH'e orantısız relatif değerlerinin karşılaştırılması. Veriler ortalama  $\pm$  SD olacak şekilde gösterilmiş, Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirilmiş, çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılmıştır. \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 'deki istatistiksel farkı işaret etmektedir.

### 3.4. PEMF maruziyetinin kaspaz-8 protein ekspresyonuna etkisi

Hücre gruplarındaki kaspaz-8'in protein ekspresyonu Western-Blot tekniği ile belirlenmiş, elde edilen veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test ile analiz edilmiştir. 48 saat PEMF'ye (50 Hz, 1.0 mT) maruz kalan SK-N-SH hücre hattında (Grup III) kaspaz-8 proteininin ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna (Grup I) ve PEMF maruziyetinin olmadığı SK-N-SH nöroblastoma hücre hattı grubuna (Grup II) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek ( $p \leq 0.001$ , sırasıyla) olduğu bulunmuştur (Şekil 5). Ayrıca, kaspaz-8 proteininin ekspresyon seviyesi SK-N-SH nöroblastoma hücre hattında HEK293t sağlıklı kontrol hücreye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir ( $p \leq 0.05$ ) (Şekil 5). Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, SK-N-SH nöroblastoma hücre hattında başlatıcı kaspaz olarak bilinen kaspaz-8 mRNA seviyesindeki artışa benzer şekilde protein seviyesinde ki artış bu hücre hattında apoptozun indüklendiğini ve hücre hattının uzun süreli PEMF maruziyetine bırakılmasının yine kaspaz-8 mRNA seviyesindeki artışa benzer şekilde protein seviyesinde daha fazla artışa neden olarak apoptozun ekstrinsek mekanizmasında olası etkisinin olabileceğini göstermiştir.



(a)



**Şekil 5. (a)** Hücre gruplarında kaspaz-8 proteini için elde edilen immünoreaktif protein bantlarının internal standard protein olan  $\beta$ -aktin ile birlikte gösterimi, **(b)** Kaspaz-8 proteini ekspresyon düzeylerinin  $\beta$ -aktine orantısız relatif değerlerinin (ortalama  $\pm$  SD) hücre gruplarında karşılaştırmalı olarak gösterimi. Veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One- Way ANOVA) ile değerlendirilmiş, çoklu karşılaştırmada LSD Post-Hoc test kullanılmıştır. \*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ 'deki istatistiksel farkı işaret etmektedir.

#### 4. Sonuç ve Yorum

Literatürde, 100 Hz, 100 G ve 50 Hz, 70 G gibi farklı frekans ve dalga boyunda düşük frekanslı elektromanyetik alanların (ELF-EMA) U-87, T98G, U-138 glioblastoma hücre hatlarına kemoterapötik ilaçlarla birlikte farklı sürelerde uygulanmasının hücre canlılığını değiştirdiği, kanserli hücre proliferasyonunu engellereyerek apoptozu indüklediği raporlanmıştır [18,19]. Ayrıca, statik manyetik alanların (SMF), farklı frekanstaki radyo frekansların (900 MHz, 2.1 GHz RF) farklı sürelerde (gün, saat) maruziyetinin kanser hücrelerinde (meme kanseri, kemik kanseri, cilt kanseri, beyin kanseri hücreleri gibi) apoptoz üzerine etkilerinin farklı yöntemlerle (akış sitometrisi, immünohistokimya, DNA fragmentasyonu) araştırıldığı *in vitro* çalışmalar da mevcuttur [20,21,22,23]. Ancak pulse-darbeleri şeklinde yayılan düşük frekanslı elektromanyetik alanların apoptoz üzerine etkilerinin direkt olarak değerlendirildiği çalışmalar kısıtlıdır. Özellikle, belirli bir frekans ve dalga boyunda PEMF'ye belirli sürede maruziyetin kötü huylu çocukluk dönemi beyin tümörü olan nöroblastoma üzerinde apoptoz etkilerinin incelendiği çalışmalar yok denecek kadar azdır. Çalışmamızda, insan nöroblastoma hücre hattı 48 saat boyunca 50 Hz frekans, ve 1.0 mT yoğunluğunda PEMF'ye maruz bırakılarak maruziyetin hücre canlılığına, apoptozun indüklenip indüklenmediğine ve apoptozun ektrensek yolağında kilit rol oynayan kaspaz-8'in gen ve protein ekspresyonuna etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, PEMF gibi darbeleri şeklinde yayılan düşük frekanslı elektromanyetik alanlara uzun süreli maruziyetin hücreleri kesikli ve periyodik olarak uyararak nöroblastoma hücre proliferasyonunu azalttığını ve apoptozu indüklediğini göstermiştir. PEMF maruziyetinin apoptotik etkisi ile hücre çoğalmasının uyumlu olduğu bulunmuştur. Çalışmanın sonuçları, kanser tedavisinde kullanılan ilaçlarla birlikte farklı frekans (1Hz, 50 Hz, 100 Hz, 125 Hz, 200 Hz, 275 Hz) ve dalga boyuna (10 G, 50 G, 70 G, 100 G, 1000 G) sahip düşük frekanslı elektromanyetik alanların (ELF-EMA), statik manyetik alanların (SMF), farklı frekanstaki radyo frekansların (900 MHz, 2.1 GHz RF), farklı frekans (1Hz,



50 Hz, 100 Hz) ve dalga boyunda (50 G, 70 G, 100 G, 100 G) PEMF'nin, farklı sürelerde (gün, saat) maruziyetinin kanser hücrelerinde (meme kanseri, kemik kanseri, cilt kanseri, beyin kanseri hücreleri gibi) hücre proliferasyonunu azalttığını, apoptozu indüklediğini gösteren *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur [18,19,20,21,22,23,24,25]. Kaspaz-8 apoptozun ekstrensek yolağında önemli rol oynayan ve kanserin oluşumu, gelişimi ve tedavisi ile ilişkili olan önemli bir kaspazdır [26,27,28,29]. Kaspaz-8'in aktifleşmesi, kaspaz kaskadını aktifleştirerek apoptozu başlatır ve proenzim halindeki efektör kaspazların (kaspaz-3,6,7) aktifleşmesine ve hücrenin ölüme doğru gitmesine ya da apoptozun intrinsek yolağa ilerlemesine neden olacak bir seri kaskadın tetiklenmesine yol açar [26,27,28,29]. Tüm bu bilgiler ışığında, PEMF'ye uzun süre maruz kaldıktan sonra insan nöroblastoma hücre hattında kaspaz-8 mRNA seviyesinin ve protein ekspresyon düzeyinin daha fazla artması gözlemlenen bu etki için olası bir yol önermekte ve PEMF maruziyetinin apoptozun ekstrensek yolağında olası etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Nöroblastoma hücresi dahil beyin kanseri hücrelerinde PEMF ile apoptoz arasındaki ilişki ve bu etkinin altında yatan apoptotik mekanizmaların aydınlatılması apoptotik yolda yer alan çok sayıda molekülün inceleneceği daha ileri çalışmaları gerektirmektedir. Çalışmamız kolay uygulanabilir, non-invazif, güvenli bir teknik olan PEMF maruziyetinin farklı frekans, yoğunluk, doz, genlik, ve farklı maruziyet süreleri gibi değişik parametrelerle direkt veya kematerapötik ilaçlarla birlikte sadece beyin kanseri hücreleri değil farklı kanser hücreleri (meme kanseri, kemik kanseri, cilt kanseri gibi) ve farklı dokularda apoptotik süreçlere etkilerinin inceleneceği çok çeşitli klinik uygulamaların ve alternatif tedavi yöntemlerinin önünü açmaktadır. Çalışmanın sonuçlarının PEMF maruziyeti ile aktive edilen çeşitli biyolojik ve fizyolojik süreçlere odaklanan ileriki çalışmalara ışık tutacağına inanıyoruz.

### ***Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı***

**Ç. G. Saraç:** Kavramsallaştırma, Araştırma, Kaynak/Materyal/Malzeme Temini, Metodoloji, Denetim/Gözlem/Tavsiye, İnceleme ve Düzenleme, Veri Analizi, Doğrulama, Biçimsel Analiz, Orjinal Taslak Yazımı, Proje Yönetimi; **E. Çetin:** Araştırma, Metodoloji; **S. Karakurt:** Metodoloji, Denetim/Gözlem/Tavsiye, İnceleme ve Düzenleme.

### ***Çatışma Beyanı***

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir çatışma beyanımız bulunmadığını bildiririz.

### ***Destek ve Teşekkür Beyanı***

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: FYL-2022-5915). PEMF devre kurulumunda desteklerinden dolayı Prof. Dr. Şükrü Özen'e ve hücre canlılığının tespiti aşamasında yardımlarından dolayı Doktora öğrencisi İrem Durmuş'a teşekkür ederiz.

### ***Etik Kurul Onayı ve/veya Aydınlatılmış Onam Bilgileri***

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

### ***Kaynakça***

- [1] H. Wang and X. Zhang, "Magnetic fields and reactive oxygen species," *Int. J. Mol. Sci.*, 18(10), 2175-2017. doi: 10.3390/ijms18102175.
- [2] T. Oda and T. Koike, "Magnetic field exposure saves rat cerebellar granule neurons from apoptosis *in vitro*," *Neurosci. Lett.*, 365(2), 83-86, 2004. doi: 10.1016/j.neulet.2004.04.068.
- [3] A. Krath, T. Klüter, M. Stukenberg, P. Zielhardt, H. Gollwitzer, N. Harrasser, J. Hausdorf, M. Ringeisen, and L. Gerdesmeyer, "Electromagnetic transduction therapy in non-specific low back pain:

- A prospective randomised controlled trial,” *J. Orthop.*, 14(3), 410-415, 2017. doi: 10.1016/j.jor.2017.06.016.
- [4] M. Vadalà, A. Vallelunga, L. Palmieri, B. Palmieri, J. C. Morales-Medina, and T. Iannitti, “Mechanisms and therapeutic applications of electromagnetic therapy in Parkinson's disease,” *Behav. Brain Funct.*, 11, 26, 2015. doi: 10.1186/s12993-015-0070-z.
- [5] E. Capelli, F. Torrisi, L. Venturini, M. Granato, L. Fassina, G. F. D. Lupo, and G. Ricevuti, “Low-frequency pulsed electromagnetic field is able to modulate miRNAs in an experimental cell model of Alzheimer's disease,” *Journal of Healthcare Engineering*, (5-6), 1-10, 2017.
- [6] M. Markov, “XXIst century magnetotherapy,” *Electromagn. Biol. Med.*, 34(3), 190-196, 2015.
- [7] M. O. Mattsson, and M. Simkó, “Emerging medical applications based on non-ionizing electromagnetic fields from 0 Hz to 10 THz,” *Medical Devices: Evidence and Research*, 12, 347-368, 2019.
- [8] S. Gessi, S. Merighi, S. Bencivenni, E. Battistello, F. Vincenzi, S. Setti, M. Cadossi, P. A. Borea, R. Cadossi, and K. Varani, “Pulsed electromagnetic field and relief of hypoxia-induced neuronal cell death: The signaling pathway,” *J. Cell Physiol.*, 234, 15089-15097, 2019.
- [9] C. Daish, R. Blanchard, K. Fox, P. Pivonka, and E. Pirogova, “The application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for bone fracture repair: past and perspective findings,” *Annals of Biomedical Engineering*, 46(4), 525-542, 2018.
- [10] B. Strauch, C. Herman, R. Dabb, L. J. Ignarro, and A. A. Pilla, “Evidence-based use of pulsed electromagnetic field therapy in clinical plastic surgery,” *Surgery Journal*, 29(2), 135-143, 2009.
- [11] T. Şimşek, S. Karakurt, and Ç. Gökçek Saraç, “Yüksek doz hidrojen peroksit ile muamele edilen insan nöroblastoma hücre hattında darbeli elektromanyetik alan maruziyetinin glutatyon miktarına etkisi,” *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 17(1), 146-154, 2022. doi: 10.29233/sdufeffd.1029835.
- [12] F. Vincenzi, A. Ravani, S. Pasquini, M. Merighi, S. Gessi, S. Setti, R. Cadossi, P. A. Borea, and K. Varani, “Pulsed electromagnetic field exposure reduces hypoxia and inflammation damage in neuron-like and microglial cells,” *Journal Cellular Physiology*, 232, 1200-1208, 2017.
- [13] S. Falone, N. Marchesi, C. Osera, L. Fassina, S. Comincini, M. Amadio, and A. Pascale, “Pulsed electromagnetic field (PEMF) prevents pro-oxidant effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in SK-N-BE (2) human neuroblastoma cells,” *International Journal of Radiation Biology*, 92(5), 281-286, 2016.
- [14] S. Goldar, M. S. Khaniani, S. M. Derakhshan, and B. Baradaran, “Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment,” *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 16(6), 2129-2144, 2015. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.6.2129.
- [15] G. Atagün, Z. Eren, and İ. Gürkanlı, “Apoptoziste mitokondrinin rolü,” *Türk Blimşel Derlemeler Dergisi*, 4(2), 49-53, 2011.
- [16] G. Pistrutto, D. Trisciuglio, C. Ceci, A. Garufi, and G. D'Orazi, “Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies,” *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603-619, 2016. doi: 10.18632/aging.100934.
- [17] A. W. Roberts, J. F. Seymour, J. R. Brown, W. G. Wierda, T. J. Kipps, S. L. Khaw, D. A. Carney, S. Z. He, D. C. S. Huang, H. Xiong, Y. Cui, T. A. Busman, E. M. McKeegan, A. P. Krivoshik, S. H. Enschede, and R. Humerickhouse, “Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease,” *Journal of Clinical Oncology*, 30(5), 488-496, 2011. doi: 10.1200/JCO.2011.34.7898.2011.
- [18] Z. Akbarnejad, H. Eskandary, L. Dini, C. Vergallo, S. N. Nematollahi-Mahani, A. Farsinejad, M. F. S. Abadi, and M. Ahmadi, “Cytotoxicity of temozolomide on human glioblastoma cells is enhanced by the concomitant exposure to an extremely low-frequency electromagnetic field (100Hz, 100G),” *Biomed. Pharmacother.*, 92, 254-264, 2017. doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.050.
- [19] M. Amiri, M. Basiri, H. Eskandary, Z. Akbarnejad, M. Esmaeeli, Y. M. Ardakani, and M. Ahmadi-Zeidabadi, “Cytotoxicity of carboplatin on human glioblastoma cells is reduced by the concomitant exposure to an extremely low-frequency electromagnetic field (50 Hz, 70 G),” *Electromagnetic Biology and Medicine*, 37(3), 138-145, 2018. doi: 10.1080/15368378.2018.1477052.
- [20] T. Mercantepe, L. Tümkaya, M. F. Gökçe, Z. S. Topal, and E. Esmer, “900 MHz elektromanyetik alanın serebellum üzerine etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi,” *Med. Bull. Sisli Etfal Hosp.*, 52(2), 129-134, 2018.
- [21] M. Z. Tuysuz, H. Kayhan, A. S. Yar-Saglam, E. U. Bagriacik, M. Yagci, and A. G. Canseven, “Cep telefonu maruziyetinden kaynaklanan radyofrekans elektromanyetik alanın apoptoz üzerine etkisi,” *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(1), 123-129, 2019.
- [22] M. Barati, H. Fahimi, L. Farahmand, and A. Madjid-Ansari, “1Hz 100mT electromagnetic field induces apoptosis in breast cancer cells through up-regulation of P38 and P21,” *Multidisciplinary Cancer Investigation*, 4(1), 23-29, 2020. doi: 10.30699/acadpub.mci.4.1.23.
- [23] A. Xu, Q. Wang, and T. Lin, “Low-frequency magnetic fields (LF-MFs) inhibit proliferation by triggering apoptosis and altering cell cycle distribution in breast cancer cells,” *Int. J. Mol. Sci.*, 21(8), 2952, 2020. doi: 10.3390/ijms21082952.

- [24] J. Kaszuba-Zwoinska, K. Wojcik, M. Bereta, A. Ziomber, P. Pierzchalski, E. Rokita, J. Marcinkiewicz, W. Zaraska, and P. Thor, "Pulsating electromagnetic field stimulation prevents cell death of puromycin treated U937 cell line," *Journal of Physiology and Pharmacology*, 61(2), 201-205, 2010.
- [25] F. Pasi, L. Fassina, M.E. Mognaschi, G. Lupo, F. Corbella, R. Nano, and E. Capelli, "Pulsed electromagnetic field with temozolomide can elicit an epigenetic pro-apoptotic effect on glioblastoma T98G cells," *Anti Cancer Research*, 36, 5821-5826, 2016. doi:10.21873/anticancerres.11166.
- [26] M. Jiang, L. Qi, L. Lisha, Y. Wu, D. Song, and Y. Yanjing, "Caspase-8: A key protein of cross-talk signal way in "PANoptosis" in cancer," *Int. J. Cancer*, 149, 1408-1420, 2021.
- [27] M. Fritsch, S.D. Günther, R. Schwarzer, M.C. Albert, F. Schorn, J.P. Werthenbach, L.M. Schiffmann, N. Stair, H. Stocks, J.M. Seeger, M. Lamkanfi, M. Krönke, M. Pasparakis, and H. Kashkar, "Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis," *Nature*, 575(7784), 683-687, 2019. doi: 10.1038/s41586-019-1770-6.
- [28] D.R. McIlwain, T. Berger, and T.W. Mak, "Caspase functions in cell death and disease," *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7(4), a026716, 2015.
- A. Bildik and İ. Bayar, "Kanserde apoptotik yolların inhibisyonu," *Turkiye Klinikleri J Vet Sci.* 9(2):42-51, 2018. doi: 10.5336/vetsci.2018-62141.