

# Darbeli Elektromanyetik Alanların (PEMF) L929 Hücrelerinde Yara İyileşmesine Tedavi Edici Etkisi

Mehmet Gümüşay<sup>1</sup>, Adnan Kaya<sup>1</sup>, Fulya Gülbağça<sup>2</sup>, Dila Hatun Sal<sup>2</sup>, Suna Saygılı<sup>2</sup>,  
M. İbrahim Tuğlu<sup>2</sup>, Merih Palandöken<sup>1</sup>

<sup>1</sup>İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Biyomedikal Teknolojileri Anabilim Dalı, Çiğli, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Uncubozköy, Manisa, Türkiye

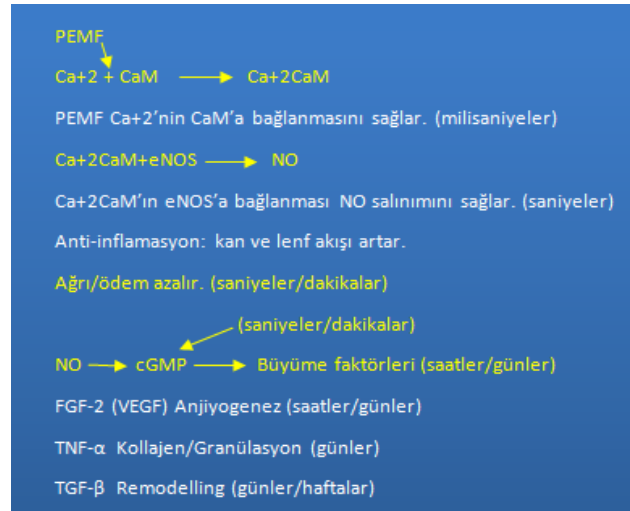
## Özet

Kronik yaralar 4-6 haftadan uzun iyileşme sürecine sahip yaralar olup kanserli, yüksek dozda ilaç alan veya diyabetli hastalarda problemlili olmakta ve takip eden sağlık çalışanı için tedavide güçlükler oluşturmaktadır. Dokunun yeniden şekillenmesi birbirine seri olan olaylardan oluşan karmaşık bir süreçtir. Bu çalışmada FDA ve WHO tarafından onay verilmiş düşük seviyeli elektromanyetik alan uygulamalarının yara iyileşmesinde etkisi L929 hücrelerinde araştırılmaktadır. Burada amaçlanan kısa sürede hızlı bir iyileşmenin sağlanmasıdır. Elektromanyetik alan yaşamımızın her alanında bulunuyor ve insan vücuduna etkisi son yıllarda büyük bir önem kazanmıştır. Tıpta elektromanyetik alanlar (EMA) tanı ve tedavi amacıyla hâlihazırda kullanılmaktadır. Darbeli Elektromanyetik alan uygulamalarında frekans, manyetik alan yoğunluğu, kullanılan bobin yapısı ve uygulama süresi çok önemlidir. Bu çalışmada kullanılan PEMF sinyali 75 Hz frekans, kare dalga formu ve 1 mT manyetik alan intensitesine sahiptir. Bu sinyal bir Helmholtz bobin ile hücrelere 5 saat boyunca uygulanmıştır. Etkin bir uygulama yapılabilmesi için hücre kültürü ile birlikte sistemin simülasyonu CST Studio Suit programı ile yapılmıştır. Elde edilen bulgularda PEMF uygulaması yapılan hücrelerde yara iyileşmesi uygulama yapılmayan hücrelere oranla daha hızlı gerçekleşmiştir. Uygun parametreler seçildiğinde PEMF tedavisinin özellikle diyabetik ayak gibi hasta yaşam kalitesini düşüren patolojik durumlarda sağlık çalışanlarına daha iyi tedavi ve daha kaliteli bir yaşam sunmak için bir destek tedavi olacağı düşünülmektedir. Yapılacak çalışmalarla bu tedavinin biyolojik sistemler üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılmasıyla gelecekte kullanımının yaygınlaşması ve etkinliğinin artmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

## 1. Giriş

Son yıllarda yara iyileşmesinde hücresel, moleküler ve fizyolojik süreçlerin olumlu etkileri ve süreçleri anlaşılmıştır. Yerel yara faktörleri ve sistematik araçlar iyileşme sürecinde düzenleyici olarak görev yapar. Gelişmiş ülkelerdeki nüfusun yaklaşık % 1-2'si kronik yaralara yakalanır. Günümüzde yapılan çalışmalar yara iyileşmesi sırasında ortaya çıkan önemli moleküler mekanizmaları ortaya çıkarmıştır. İyileşme süreci 3 ayrı evreden oluşur: (i) enflamasyon safhası; (ii) proliferatif safha veya yeni doku oluşum safhası (neoenjijiyogenez, proliferasyon, yeniden epitelizasyon); ve (iii) yeniden doku oluşumu (hücre dışı matriks, ECM) [1]. Son yüzyılda yara iyileşmesine katkı yapan sadece birkaç teknik ilerleme kaydedilmiştir. Bu ilerlemelere rağmen yara tedavisi günümüzde hala özneliği, yara iyileşmesi sürecinin karmaşıklık ve hastaların çeşitliliği sebepleriyle oldukça zordur [2]. Teşvik edici faktörler olarak doku tamiri için moleküler seviyede hücreleri uyarmak gerektiği tespit edilmiştir. Kronikleşmiş yaralarda moleküller yetersizdir ve diğer hücreler arasından endotel hücreler çoğalarak iyileşme sürecini kesintiye uğratır. Bu sürecin tekrar başlaması için, hücrelerin uyarmı yöntemlerinden birisi de darbeli elektromanyetik alanlar ile gerçekleştirilir. Bu uyartım (Şekil 1), tekrarlayan cerrahi işlemlerde oluşan yaralardan ve kontrol edilemeyen ülserlerin iyileşmesini sağlar [3]. Böylece hastaların yaşam kalitesi artar. Literatürde bulunan araştırmaların büyük çoğu oldukça düşük frekanslı manyetik alanların biyolojik etkilerinin laboratuvar ortamında araştırılması ile alakalıdır. Araştırmaların çokluğuna rağmen halen elektromanyetik alanların biyolojik etkileri üzerindeki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Şekil 1'de dünyada en çok kabul edilen darbeli elektromanyetik alanların transdüksiyon mekanizması bulunmaktadır.

Bu çalışmanın asıl amacı, 75 Hz frekanslı darbeli elektromanyetik alan (PEMF) tedavisinin L929 hücre hatlarında yara iyileşmesi üzerindeki etkisini immünohistokimyasal olarak incelemektir. Bir fare yumuşak doku kültürü olan L 929 (ATCC cell line, NCTC clone 929) DMEM besiyerinde üreyen kısa sürede hızlı çoğalan ve yara iyileşmesinde örnek olarak kullanılabilir uygun bir hücre dizin tipidir. Birçok çalışmada yara iyileşmesi modeli olarak kullanılmış ve bizim çalışmamızda ek olarak kültür ortamında yara yapılarak yeni bir iyileşme süreci ortaya konmuştur. Bu PEMF ışın sistemlerinin, In Vitro yara iyileşmesi modelinde hücre migrasyonuna, morfolojisine ve proliferasyonuna olan etkisi immünohistokimyasal analizler yapılarak incelendi. Ayrıca bu çalışma kapsamında PEMF uygulamasında kullanılan helmholtz bobinler hücre kültürleri ile birlikte CST Studio Suit yazılımı kullanılarak simüle edilmiş ve ölçüm sonuçları ile doğrulanması araştırıldı. Ayrıca yara iyileşmesinin kriterleri olan TGF-beta ve NOS için immünohistokimyasal yöntemle incelendi.

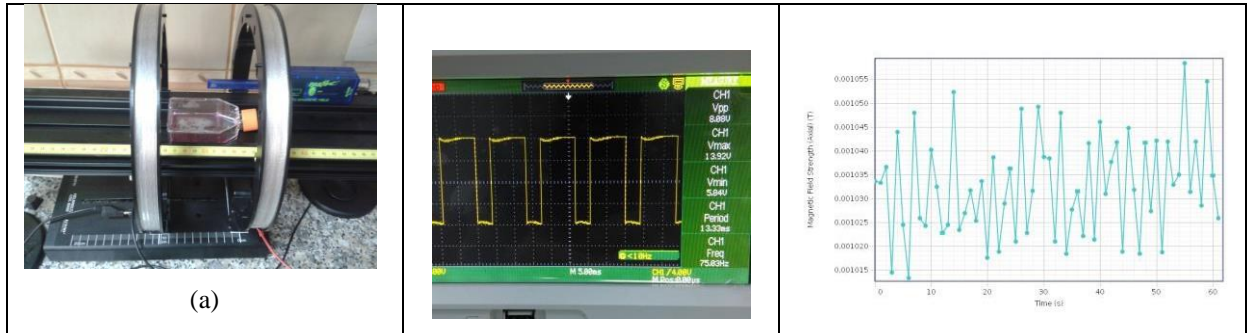


Şekil 1: Darbeli elektromanyetik akanların doku tamiri için önerilen mekanizması.

## 2. Materyal ve Metod

### 2.1 Deney Düzenegi

Denelerimizde düzgün sarıma sahip olduğundan ve daha uniform manyetik alan ürettiğinden dolayı Pasco marka Helmholtz bobin çifti kullanıldı. Birbirine seri olarak bağlanan bobin çiftine 75 Hz frekans, 1.3 ms puls süresi, kare dalga formu ve 1 mT manyetik alan intensitesi oluşturacak şekilde bir sinyalle beslenmiştir. Manyetik aşan büyüklüğü sistemin ortasına yerleştirilen bir hall effect sensörü ile ölçüldü. Şekil 2'de bu uygulamanın yapılışı ve ölçüm sonuçları yer almaktadır.



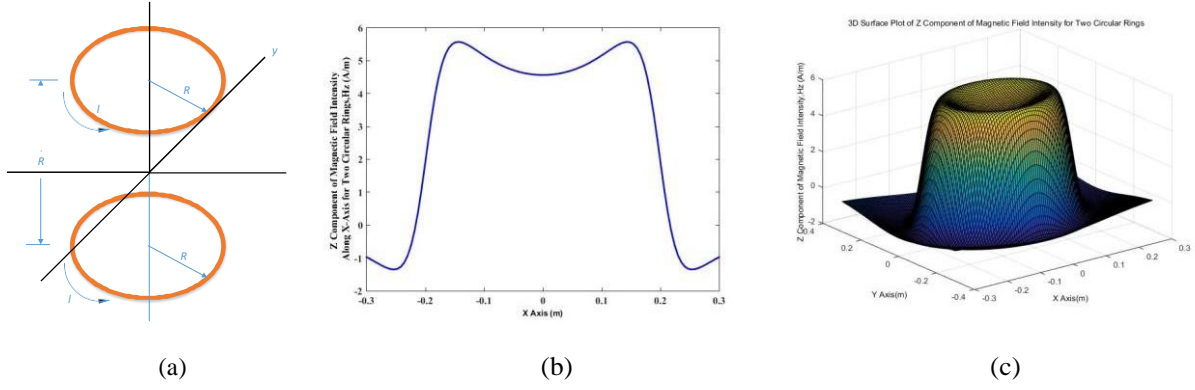
Şekil 2: (a) Hücre kültürüne yapılan PEMF uygulaması, (b) 75 Hz Kare Dalga formunun osiloskop görüntüsü, (c) Hall effect sensörü ile ölçülen manyetik alan intensitesi.

### 2.2. Bobinlerde Oluşan Manyetik Alan

Bu sistem 0.95 mm çaplı tel ile 500 sarıma sahip olup 20 cm çapında iki eş bobinden oluşmaktadır. Maksimum 2 amper akım çekebilen bu sistem ile 5 mT'ya kadar manyetik alan oluşturulabilmektedir. Biot-Savart denklemiyle teorik olarak yatay düzlemdaki x-ekseni boyunca hesaplanan z-yönündeki manyetik alan şiddeti MATLAB programı ile hesaplanarak çizilmiştir (Şekil 3).

$$\vec{B} = \frac{\mu_0 i}{4\pi} \int \frac{d\vec{l} \times \vec{r}}{r^3} \quad (1)$$

Bu sistem 2 tane eş bobin yapısı ile hesaplanmıştır. Helmholtz bobindeki manyetik alan dağılımı deneyleri yapmamız için uygun olup test edilmesi istenen biyolojik örnekler iki bobinin tam ortasına yerleştirilmiştir.



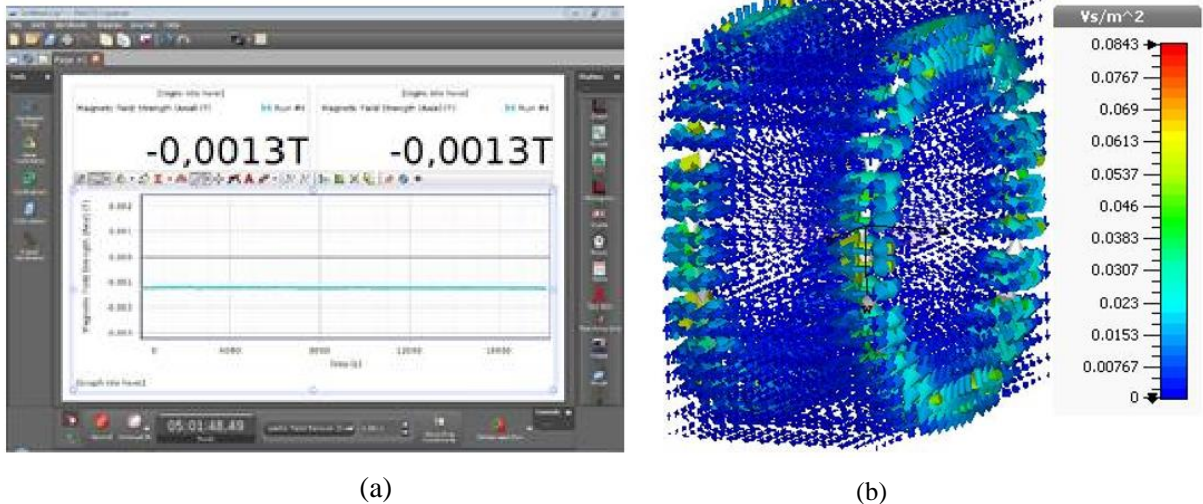
Şekil 3: (a) Helmholtz bobinin yerleşimi. (b) Yatay düzlemdeki x-ekseni boyunca hesaplanan z-yönündeki manyetik alan şiddeti grafiği (b) 3D çizilmiş yatay düzlemdeki z- yönündeki manyetik alan şiddeti

### 2.3 Hücre Kültürü ve In Vitro Yara Modeli

Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı kültür laboratuvarında dondurulmuş L929 fibroblast hücre hattından elde edilen hücreler kullanıldı. Hücreler % 10 FBS, % 1 L-glutamin ve % 0.1 penisin içeren DMEM besiyerinde büyütüldü. Hücreler,  $75 \text{ cm}^2$  kültür flaskında  $37^\circ \text{C}$  sıcaklık ve % 5  $\text{CO}_2$  ortamında kültüre alındı. Hücrelere konfluent aşamasında pipet ucuyla açılmış yara modeli uygulandı. EMA yapılmayan kontrol grubuna aynı yöntem gerçekleştirildi. Hücre davranışı inverted faz kontrast mikroskoba (BX43, Olympus, Japan) bağlanan bir kamerayla (SC50, Olympus, Germany) çekildi.

### 3. Bulgular

Bu çalışmada 5 saat boyunca uygulanan PEMF terapisi in Vitro kültür ortamında L929 fibroblast dizin hücrelerinde konfluent olmuş hücrelerde pipet ucuyla oluşturulmuş yara modelinde iyileşmeye az miktarda etki etti ancak bu etki anlamlı ( $p < 0.05$ ) bulundu. Asıl etki 24 saatlik süreçte görüldü. Burada görülen iyileşme sürecine olan etki oldukça anlamlı bulundu ( $p < 0.01$ ). Yapılan uygulamaya ait manyetik alan ölçüm sonucu Şekil 3 (a)'da görülmektedir. Bu ölçüm sonucuna göre uygulama sırasında eşit düzeyde manyetik alan 5 saat boyunca uygulanabilmiştir. Şekil 3 (b)'de uygulamanın simülasyon sonucu görülmektedir. Bu sonuç ölçüm sonucu ile örtüşmektedir.

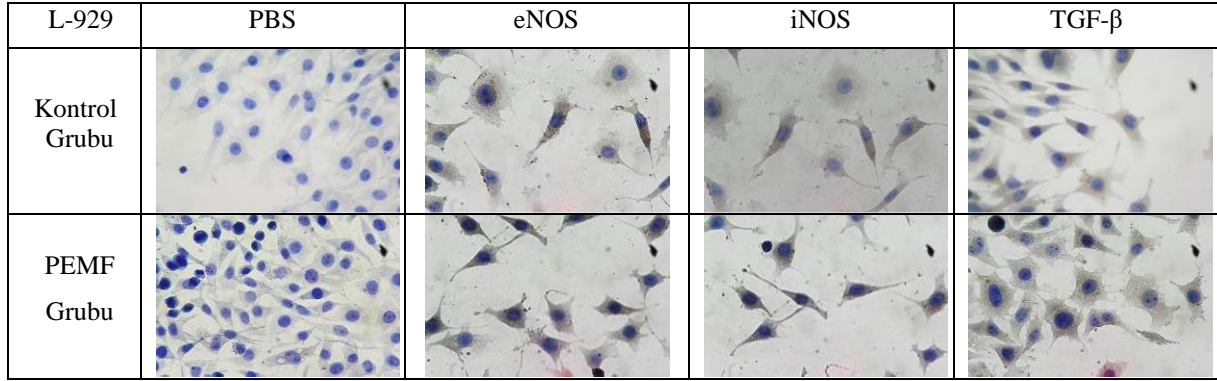


Şekil 4: (a) PEMF uygulaması sırasında ölçülen manyetik alan büyüklüğü (b) CST Studio Suit programıyla Helmholtz bobin çiftinde meydana gelen manyetik alanın benzetim sonucu.

Yara iyileşmesi, hücre kültüründe çizilen bölgenin kapanmasını karşılaştıracak şekilde histolojik analizlerle belirlenmiştir. Şekil 5'te PEMF uygulaması yapılan kontrol ve maruziyet gruplarına ait immünohistokimyasal boyamalar yer almaktadır. Bu sonuçlara göre yara oluşturulmuş hücre hattında kontrol grubuna göre iyileşme anlamlı bir şekilde daha hızlı gerçekleşmiştir.

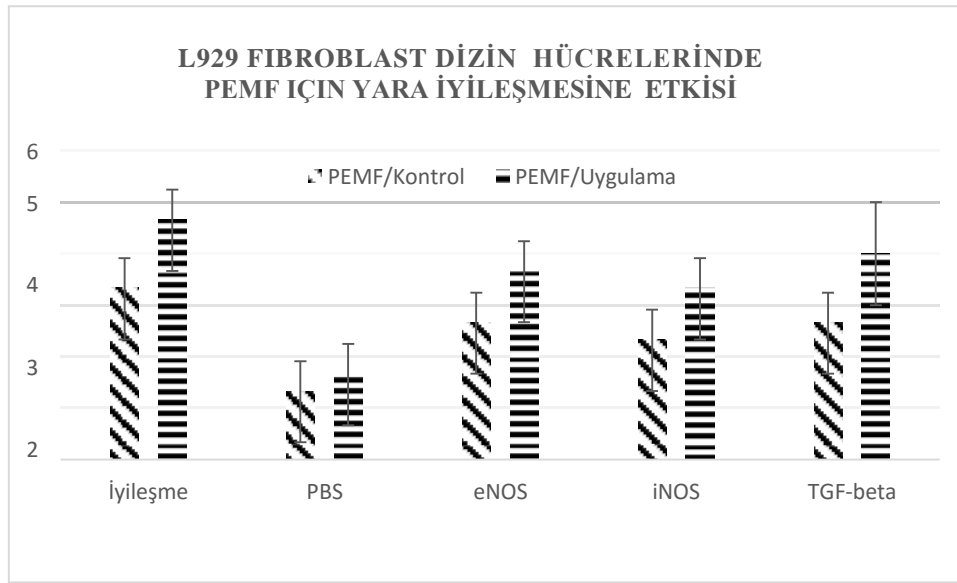
Yara yerinde hücreler çoğalmaya, göç etmeye ve tamir dokusu oluşturmaya başladıkları görüldü. Böylece seçilen

frekans ve manyetik alan intensitesinin doğru parametlerden olduğu gösterilmiş oldu. Mikroskopta görülen etkinin belirgin bir şekilde gerçekleşmesi PEMF etkisinin varlığına ve doğruluğuna işaret etti. İmmünohistokimyasal belirteçler üzerinden yaptığımız çalışmada da bu etkinin protein düzeyinde de var olduğu görüldü.



Şekil 5: L929 Hücresinde yapılan immünohistokimyasal analiz sonucu (Büyütme 400X).

Yapılan gözlemlerin doğrulanması için skorlama yöntemleri ile gerçekleştirilen histolojik değerlendirme ile PEMF'in iyileşmeye katkının oksidatif stres aracılı ve TGF-beta iletimli bir şekilde gerçekleştiği eNOS, iNOS ve TGF-beta immünohistokimyasıyla gerçekleştirildi (Şekil 6).



Şekil 6: Mikroskopta izlenen hücrelerin yara iyileşmesindeki davranışı ve buna PEMF'in etkisi yara iyileşmesinin +1 hiç yok veya çok az ile +5 tamamen iyileşmiş durumları arasında preparatları bilmeyen histolog tarafından yapılan skorlama ile PEMF etkisi karşılaştırıldı. 5 saatlik uygulama sonucunda belirgin bir fark oluşmazken 24 saat beklemenin sonucunda hem yara iyileşmesinde hem de bununla ilgili belirteçler olan immünohistokimya bulgularında anlamlı bir şekilde PEMF etkisi görüldü.

#### 4. Tartışma

Bu çalışma yara iyileşmesinde düşük frekanslı EMA etkisini sağlamak üzere uygun enerji formunun kullanılması için yapıldı. Bu amaçla 75 Hz frekansta darbeli elektromanyetik alanın *in vitro* yara modeli oluşturulmuş L929 hücrelerine olan etkisine bakıldı. Elde edilen bulgularda yara modelinin bu tür etkilerde kullanılabilecek iyi bir model olduğu, yara yapılan grupta PEMF etkisinin 24 saatlik süreçte belirgin bir şekilde olduğu görüldü. Düşük frekansta yapılan manyetik alan simülasyonlarıyla hücre kültüründe oluşan etkinin PEMF için iyileşmeyi sağlayacak hücrelere başlangıçta verdiği olumlu katkı verdiği gösterildi. Başlangıçta oluşan bu olumlu katkının 24 saatlik bir izleme sonucunda anlamlı bir etkiye kavuşması EMA çalışanlarına biyolojik etkinin gösterilmesi açısından literatür olarak önemli katkı sağlayacaktır. Literatürde düşük frekanslarda yan etkisi bulunmayan bu



metodun daha iyi sonuçlar elde etmek amacıyla ileri çalışmalarla desteklenmesi ve hücre davranışına etkisin anlaşılması tıpta tedavi olarak kullanılabilen bir ürün olma olasılığını giderek arttırmaktadır.

Bu çalışmada PEMF etkisi ile oksidatif stresin arttığı bunun özellikle eNOS'ta belirginleştiği ve iyileşme sürecinde yer alan L929 hücrelerinin hem daha hızlı göç ettiği hem daha çok çoğaldığı bulundu. Bu bulgunun literatürle uyumlu olduğu bulunan eNOS aktivitesinin fazlalığı biyomateryaller üzerinde yapılan L929 fibroblastlarında da gösterilmiştir [5].

L929 hücrelerinin iNOS etkisi ise ektrakt çalışmalarında gösterilmiş antienflamatuar etkinin iNOS üzerinden gerçekleştiği ve yara iyileşme sürecinde değişikliklere neden olduğu saptanmıştır [6, 7]. PEMF için NOS etkisinin mikrosirkülasyon üzerinden gerçekleştiği darbeli EMA uygulamasında sağlıklı sıçan üzerinde arterioller üzerinden gösterilmiş ve NOS inhibisyonunun doku oksidasyonunu bozduğu gösterilmiştir [8]. PEMF için bu etkinin varlığı çalışmamızla da uyumlu bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada L929 fibroblastlarının matris etkisine kitosan etkisine bakılmış tip1 ve 3 kollejen ile fibronektin, kitosanla indüklenmiş makrofajlarda TGF-beta1 aracılığı uyarılma ile daha çok matris ürettiği gösterilmiştir [9]. Bizim çalışmamızda da PEMF uygulaması sonrasında hücre çoğalması ve göçünün arttığı ve yara iyileşmesinin hızlandığı bulundu. Bunun klinikte deri yara iyileşmesinde etkili olabileceği dermatoloji ve plastik cerrahi gibi kliniklerde kaliteli bir yara iyileşmesinde kullanılabilenliği düşünüldü.

### **Teşekkür**

Bu çalışma 11E490 nolu Tübitak projesi ve 2014-1-1MÜH-18 nolu İzmir Katip Çelebi Üniversitesi BAP projesi tarafından desteklenmektedir.

### **Kaynaklar**

1. Behm, B., et al., Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2012. 26(7): p. 812-820.
2. Dargaville, T.R., et al., Sensors and imaging for wound healing: a review. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. 41: p. 30-42.
3. Moffett, J., et al., Pulsed radio frequency energy field treatment of cells in culture results in increased expression of genes involved in the inflammation phase of lower extremity diabetic wound healing. *J Diabet Foot Complicat*, 2010. 2: p. 57-64.
4. Polk, C., *Physical mechanisms for biological effects of low field intensity ELF magnetic fields*. 1996: Springer.
5. Alcaide, M., et al., Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials. *Biomaterials*, 2009. 30(1): p. 45-51.
6. Tewtrakul, S., et al., Antiinflammatory and Wound Healing Effects of *Caesalpinia sappan* L. *Phytother Res*, 2015. 29(6): p. 850-6.
7. Sudsai, T., et al., Evaluation of the wound healing property of *Boesenbergia longiflora* rhizomes. *Journal of ethnopharmacology*, 2013. 150(1): p. 223-231.
8. Bragin, D.E., et al., Increases in microvascular perfusion and tissue oxygenation via pulsed electromagnetic fields in the healthy rat brain. *Journal of neurosurgery*, 2015. 122(5): p. 1239-1247.
9. Ueno, H., et al., Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials*, 2001. 22(15): p. 2125-2130.