



Darbeli Elektromanyetik Alan ve Darbeli Radyofrekans Uygulamalarının Sıçanlarda Yara İyileşme Etkilerinin Karşılaştırması

Comprassion of the Effect of Pulsed Electromagnetic Field and Pulsed Radio Frequency Energy on Wound Healing in Rats

Mehmet GÜMÜŞAY¹, Fulya GÜLBAĞÇA², Suna SAYĞILI², Işıl AYDEMİR², Adnan KAYA², M. İbrahim TUĞLU²
¹Biyomedikal Teknolojileri ABD, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye
{mehmet.gumusay, adnan.kaya}@ikc.edu.tr
²Histoloji ve Embriyoloji ABD, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa, Türkiye
{fulya.gulbagca, suna.saygili, isil.aydemir, ibrahim.tuglu}@cbu.edu.tr

Özetçe— Yara iyileşmesinin gecikmesi ve yeterince iyi olmaması tıpta önemli bir problem olup düzeltilebilmesi için destek tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır. Düşük frekans elektromanyetik alan (EMA) uygulamaları bu desteği verebilecek etkinlikte gözükmemektedir. Yara ortamında bozulan damarlanma, bağ doku birikimi, matriks değişimi ve inflamasyon süreci EMA uygulamaları sonrasında kontrole göre değişikliğe uğrayan faktörler olmaktadır. Elektriksel uyarı ile geri döndürülebilen bu faktörlerdeki bozulmalar DNA sentezi, transkripsiyon ve protein sentezi dönüşümleri fibroblast ve endotel hücrelerinde çoğalmanın artması EMA mekanizmalarının varlığını göstermektedir. Süre ve ortam koşullarının sabit tutulup uygulama tipinin değiştirildiği çalışmamızda darbeli radyo frekans enerjisi (PRFE), darbeli elektromanyetik alanlara (PEMF) göre daha etkin ve daha uzun süreli iyileşme sağlanmıştır. Bu uygulamaların hücre üzerindeki etkileri ve davranışa ait mekanizmaları anlaşıldıkça tedaviye katkıları çok daha belirgin ve anlamlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler — epitelizasyon; yara kapanması; darbeli elektromanyetik alanlar, PEMF, darbeli radyo frekans enerjisi, PRFE, kronik yaralar.

Abstract— Delayed or not sufficiently good wound healing is a significant problem in medical treatment is needed to support in order to improve healing. Low frequency electromagnetic field (EMF) applications are seems to give this support. Disturbed vascularization, connective tissue formation, matrix exchange, and inflammation process in the wound environment are modified after EMF applications compared with control groups. Deteriorations in these factors which can be returned with the electrical impulses, DNA

synthesis, transcription and transforms of protein synthesis, increasing of fibroblasts and endothelial cell proliferation indicate the presence of EMF mechanisms. Since the application and ambient conditions are kept constant but the type of the application has been changed in our study, it was provided that pulsed radio frequency energy (PRFE) is more effective and has more long-term improvement compared to pulsed electromagnetic fields (PEMF). The effects of these applications on cells and understanding of the mechanisms of the behavior will be much more significant and meaningful contribute to the treatment

Keywords — epithelialization; wound closure; pulsed electromagnetic fields, PEMF; pulsed radio frequency energy, PRFE, chronic wounds.

I. GİRİŞ

Elektromanyetik alan (EMA) terimi belirli koşullar altında birbirini tetikleyen elektrik ve manyetik alanların kombinasyonu anlamında kullanılmaktadır [1]. EMA'ların keşfedilmesinden itibaren bilim adamlarının ilgisini tedavi ve teşhis konularında çekmektedir. Özellikle iyonize olmayan EMA'lar hücrelerde çeşitli biyolojik etkileri tetiklemek amacıyla kullanılmaktadır [2]. Daha önce yapılmış çalışmalarda EMA hücre çoğalması, farklılaşması, hücre döngü, apoptoz, DNA eşlemesi ve ekspresyonu, sitokin ekspresyonu ve daha fazlasını etkilediği gösterilmiştir [3-5]. EMA'nın elektrik alanlar komponenti hücrelerin manipasyonu, yapay biyo-iskelet ve ilaç salınım sistemlerinin geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır [6]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda elektrik alanların sinirsel kök hücreler dahil bazı kök hücrelerde farklılaşmayı sağladığı gösterilmiştir [7]. EMA'nın manyetik alan bileşeni de aynı

Biyomedikal Ölçüm 2

3. Gün / 29 Ekim 2016, Cumartesi

zamanda muhtemel tedavi uygulamalarında kullanılabilir. Bu konuda yapılan çok sayıda araştırma sonucunda elde edilen verilerde oldukça düşük frekanslı EMA'ların kök hücre tedavisinde özellikle sinir hasarlı hastalıkların tedavisinde yenilikçi bir biyofiziksel araç olabileceği düşünülmektedir.

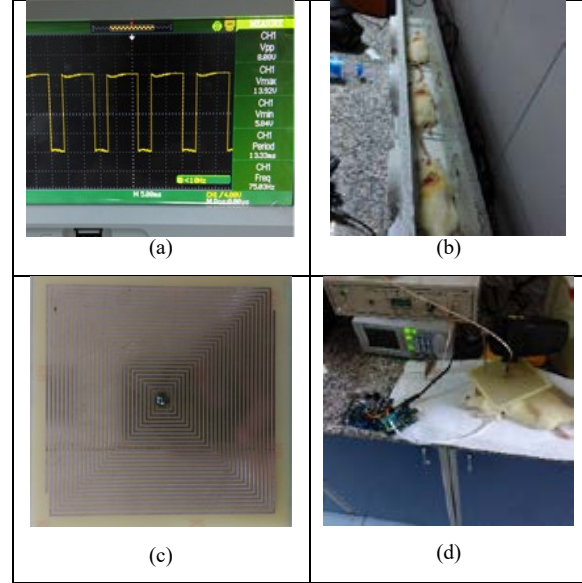
Düşük frekanslı EMA uygulamalarından birisi belirli dalga formu ve genliğe sahip darbeleri elektromanyetik alanlardır (PEMF). Bu alanların etkili bir şekilde kullanımı son yıllarda araştırılmaktadır. PEMF frekansının ve manyetik alan büyüklüğünün 100 Hz ve 3 mT'dan düşük seçildiğinde yara iyileşmesi uygulamalarında daha etkili olduğu bulunmuştur [2]. Yapılan klinik çalışmalarda PEMF tedavisinin iyileşme süresini kısalttığı ve tekrarlama durumlarını azalttığı gösterilmiştir [8]. Yara iyileşmesinde kullanılabilecek bir başka EMA uygulaması da 27.12 MHz taşıyıcı frekansında PRFE uygulamasıdır [9].

Bu çalışmada benzer PEMF ve PRFE tedavilerinin kıyaslanması amacıyla sıçan derisinde açılan 1 cm x 1 cm boyutundaki yaralara uygulama yapılmıştır. Bu uygulamalar hiç maruziyet görmeyen kontrol gruplarıyla makroskobik olarak çekilen fotoğraflar açısından kıyaslandı.

II. MALZEME VE YÖNTEM

Bu deney kapsamında 200±50 g ağırlığında üç adet kontrol ve üç adet PEMF uygulaması gören toplam altı adet erkek sıçan kullanıldı. Bütün hayvanlar standart kafeslerde tutularak beslenmeleri kısıtlanmadı. Oda sıcaklığı 20 ± 2 °C olarak sabit tutuldu. Anestezi için periton içi olarak ketamin ve ksilazin uygulandı. Sırtları tıraşlanan hayvanlarda derideki yara yaklaşık 1x1 cm² boyutunda kare şeklinde açılarak kapatılmadan iyileşmeye yönlendirildi.

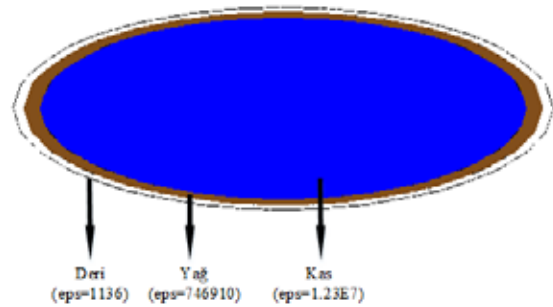
PEMF uygulaması için birbirine seri olarak bağlanan bobin çiftlerine 75 Hz frekans, 1.3 ms puls süresi, kare dalga formu ve 1 mT manyetik alan yoğunluğu oluşturacak şekilde bir sinyalle beslendi (Şekil 1(a)). Manyetik alan büyüklüğü sistemin ortasına yerleştirilen bir Hall Effect sensörü (Pasco, Roseville, CA, USA) ile ölçüldü. Sıçan derisinde yara oluşturulduktan sonra hayvanlara 9 gün boyunca Helmholtz bobin dizisi sistemi ile PEMF uygulaması yapıldı (Şekil 1(b)). PRFE uygulaması için Şekil 1 (c)'de görülen ve 27 MHz'de çalışan aplikatöre Suin TFG3908A marka sinyal jeneratörü (Shijiazhuang, China) aleti ile ortadan besleme yapıldı (Şekil 1 (d)). Üretilen sinyal 27.12 MHz taşıyıcı frekans ve PSK modüleli olup 13 dBm genliğe sahiptir. Bu sinyal 27 MHz 50 Watt gücündeki bir yükseltici ile bir miktar yükseltildi. Kontrol grubu olarak aynı ortamda tutulan ancak uygulama yapılmayan hücreler kullanıldı. Yara alanının hesaplanması için 0, 3, 6 ve 9. günlerde bir dijital kamera ile resimler çekildi (Nikon D80; Nikon, Tokyo, Japan). Yara alanının (YA) yüzde kapanma oranı (%YK)=[(YA₀-YA_g)/YA₀] \times 100 formülü ile hesaplandı. Burada YA₀, 0. gündeki yara alanını, YA_g ise hesaplanan günün yara alanını ifade eder.



Şekil 1. (a) 75 Hz Kare Dalga formunun osiloskop görüntüsü, (b) Hücre kültürüne Helmholtz bobin dizisi sistemi ile yapılan PEMF uygulaması, (c) PRFE'de kullanılan anten, (d) PRFE uygulaması.

A. Bobinlerde Oluşan Manyetik Alan

Bu sistem seri olarak bağlanan üç çift Helmholtz bobin dizisinden olup her bir bobinde 30 sarım bulunmaktadır. Benzetim çalışmaları için sıçanlar bir elipsoit şeklinde çizilmiş ve biyolojik dokuların dielektrik özellikleri ile Şekil 2'de gösterilmiştir. Benzetim çalışmaları için gerekli olan geçirgenlik (eps) ve iletkenlik değerleri farklı doku tiplerinin yer aldığı [10] nolu referanstan alınmıştır.



Şekil 2. Elipsoit şeklinde çizilen sıçanın dielektrik özelliklerine göre modellenmesi

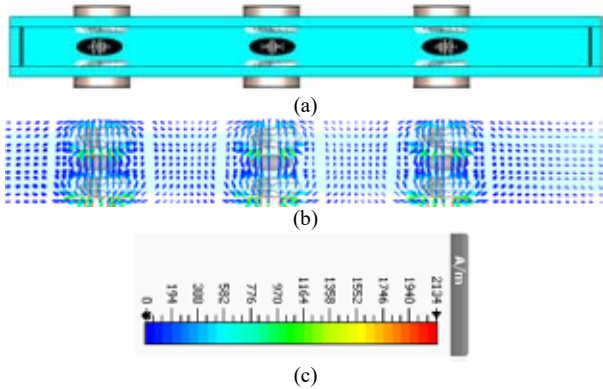
Akım taşıyan bir iletken herhangi bir noktasında oluşan manyetik alan Biot-Savart yasasına göre aşağıda verilen denklem ile bulunabilir. Bu hesaplama yönteminde helikal bobinin spin sayısı küçük bölmelere ayrılarak herhangi bir noktadaki manyetik alan her bir bölmenin vektörel toplamı ile bulunmaktadır. Denklemdeki d_i akım elemanını, r ise akım elemanı ile ölçülmek istenen manyetik alandaki referans noktası arasındaki mesafedir. d_i akım elemanını i akımının yönüne doğru yönlendirilmiştir. Burada telin uzunluğu boyunca düzgün bir akım taşıdığı varsayılmıştır.

Biyomedikal Ölçüm 2

3. Gün / 29 Ekim 2016, Cumartesi

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

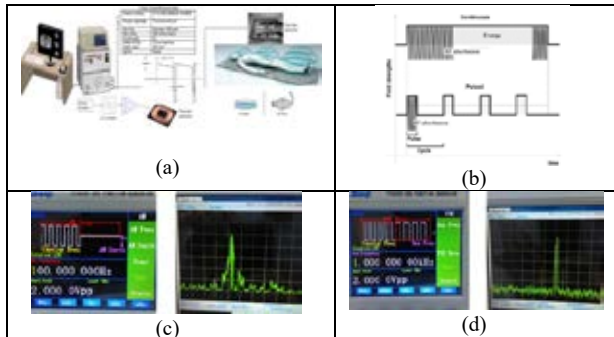
Helmholtz bobindeki manyetik alan dağılımı deneyleri yapmamız için uygun olup test edilmesi istenen sıçanlar bir tutucu içerisinde iki bobinin tam ortasına yerleştirildi. Biot-Savart denklemiyle teorik olarak yatay düzlemdeki x-ekseni boyunca hesaplanan z-yönündeki manyetik alan şiddeti CST Studio Suit programı ile hesaplandı (Şekil 3).



Şekil 3. (a) Sıçanlara Helmholtz bobin dizisi sistemi ile yapılan PEMF uygulaması, (b) CST Studio Suit programıyla Helmholtz bobin dizisi sisteminde meydana gelen manyetik alanın dağılımı. (c) Manyetik alanın renk skalasına göre A/m cinsinden büyüklüğü

B. PRFE Sistem Analizi

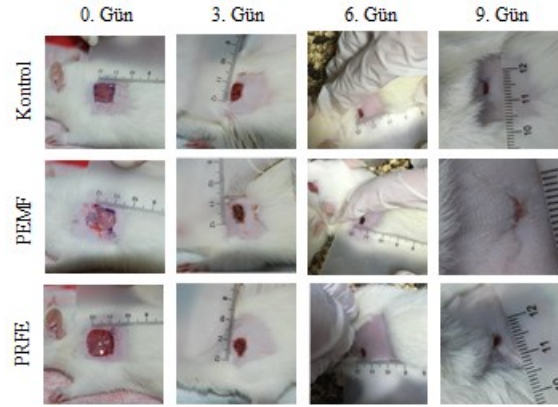
Tasarladığımız PRFE cihazı ile yüksek genlik ve 27 MHz civarı dalga formları uygun bir antene uygulanarak istenilen seviye alanların oluşması sağlanmaktadır. Şekil 4 (a)'da bu cihaza ait blok diyagram ve Şekil 4 (b)'de dalga formları görülmektedir. Saniyede 2 milisaniye atmalı 27.12 MHz sinüzoidal dalga darbeleri elektromanyetik alan sinyali oluşturuldu. Pik manyetik alan 0.05 G ve bu da yaklaşık 10 mV/cm elektrik alan indükleyerek kas dokusunda 7.3 mW/cm³'lük bir etki oluşturdu. Uygulama günde 1 defa 60 dakikalık süre ile yapıldı.



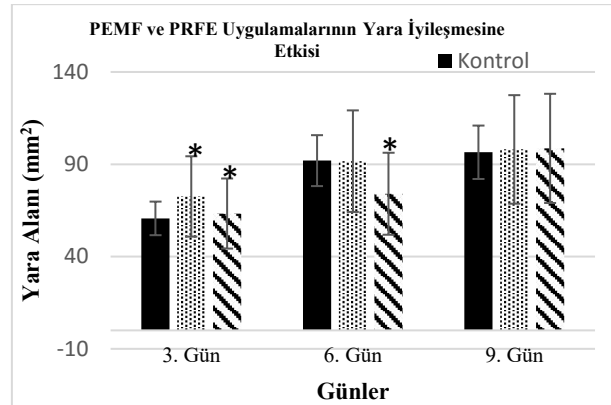
Şekil 4. Sistemimizde kullanılan (a) Uygulamanın blok diyagramı (b) RF darbe dalga formları (c) PRFE uygulaması için AM sinyal tipi (d) PRFE uygulaması için FSK sinyali

III. SONUÇLAR

Deride 1 cm x 1 cm yapılan yara iyileşmesinde makroskobik olarak gözlemlenen yara alanının 3. gününde başlayan, 6. gününde anlamlılığını kaybeden PEMF etkisi altında hızlandığı, PRFE uygulaması yapılan grupta PEMF grubuna göre daha erken başlayan küçük yara alanı saptandı (Şekil 5). Bu alanların morfometri olarak değerlendirilmesi amacıyla kapanma yüzdesi 0. güne göre ImageJ yazılımı yardımıyla bulunmuştur. Sonuç olarak PEMF uygulaması yapılan grupta yara oluşturulduktan sonra 3. günde görülen anlamlı ($P < 0.05$) hızlanma etkisinin 6. günde kaybolduğu, 3. günde başlayan ve 6. günde belirginleşen PRFE etkisinde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde daha hızlı yara iyileşmesi görüldü. 9. günde her üç grupta da yaranın kapandığı bulundu (Şekil 6).



Şekil 5. Çekilen fotoğraflar üzerinden yapılan morfometrik analizde PEMF ve PRFE etkisinin anlamlı bir şekilde yara iyileşmesini hızlandırdığı izlendi.



Şekil 6. Fotoğraflar üzerinden dijital ortamda yapılan morfometrik ölçümlerde PEMF etkisinin istatistiksel olarak 3. günde, PRFE etkisinin ise 3 ve 6. günlerde anlamlı olduğu ortaya kondu.

IV. TARTIŞMA

Bu çalışmada, PEMF uygulamasının PRFE ile karşılaştırıldığında daha erken başlayan ve daha uzun süren bir etkiye sahip olduğunu gösterdi. Kullandığı mekanizmalar özellikle fibroblast olmak üzere hücre sayısının artırılması, özellikle kollajen yapımı etkilenecek



Biyomedikal Ölçüm 2

3. Gün / 29 Ekim 2016, Cumartesi

bağ dokusunun arttırılması, inflamasyonun ve inflamasyona ait faktörlerin baskılanması ve bunlara ek olarak immün modülasyonun etkinleştirilmesi EMA uygulamalarında doz, süre ve sıklığın değiştirilmesiyle daha etkin bir iyileşmenin sağlanabileceği durumlar olarak ortaya kondu. [11].

EMA uygulamalarının doku tamiri, kemik iyileşmesi, aksonal rejenerasyon ve tendon iyileşmesi gibi birçok farklı yarada tedaviye katkı sağlayacağı düşünülmüştür. PRFE uygulamasının PEMF ile karşılaştırıldığında bahsedilen faktörler açısından incelendiğinde daha çabuk ve daha uzun bir süre etkiye neden olduğu gösterildi. Etkinin özellikle hücreler ve hücre çevresindeki faktörler üzerinden gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

EMA uygulamalarının fibroblast üzerindeki etkisi kollajen üretimi üzerinden olmakta ve bu üretim dokunun ölçülebilir gerginliğini göstermektedir. Hatta fazla miktarda kollajen üretimi skor dokusu dediğimiz kötü tamire ve aşırı artmış doku gerginliğine neden olmaktadır [12]. Bir diğer etki büyüme faktörlerinin ve onların kalsiyum bağlama yeteneklerinin değişikliğe neden olmasıdır. EMA uygulamasının kalsiyum düzenlenmesi üzerindeki etkisi hücre ölümü ve apoptozu da ilgilendirmektedir [13]. EMA etkisine bir diğer önemli faktörü yüzey elektro potansiyeli olup özellikle epidermiste 30-100 mili volt arası değişen ve dermise göre farklı bir elektriksel değişim gösteren deri bu tür değişikliklere histolojik ve fizyolojik olarak tepki vermektedir. EMA ile değişen epidermis için de voltaj yükü yara iyileşmesinde de önemli rol oynamaktadır. EMA etkisinin biyolojik ortamlardaki oluşturduğu bu değişiklikler damarlanma, oksidatif stres ve apoptoz gibi önemli sonuçlara neden olmaktadır.

PEMF uygulamasındaki farklılık EMA için otokrin ve parakrin etkiyi değiştirerek FGF-2 bağlantılı damarlanmayı arttırmaktadır. Bunun geç dönemde yeniden epitelizasyon üzerinde de olumlu etkisi vardır. Ancak uygulamaların geç dönemde azalması inflamasyon döneminde asıl etkinin oluştuğuna işaret etmektedir. Tüm bu etkiler ve kullandıkları mekanizmalar gelişmekte olan biyomühendislik uygulamaları dikkate alındığında gelecekteki yara iyileşmesine önemli katkılar sağlayacağına işaret etmektedir.

V. TEŞEKKÜR

Bu çalışma 11E490 nolu TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] J. A. Stratton, *Electromagnetic theory*: John Wiley & Sons, 2007.
- [2] M. Pesce, A. Patruno, L. Speranza, and M. Reale, "Extremely low frequency electromagnetic field and wound healing: implication of cytokines as biological mediators," *European cytokine network*, vol. 24, pp. 1-10, 2013.
- [3] S. Sundelacruz, M. Levin, and D. L. Kaplan, "Role of membrane potential in the regulation of cell

proliferation and differentiation," *Stem cell reviews and reports*, vol. 5, pp. 231-246, 2009.

- [4] L. Y. Sun, D. K. Hsieh, P. C. Lin, H. T. Chiu, and T. W. Chiou, "Pulsed electromagnetic fields accelerate proliferation and osteogenic gene expression in human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation," *Bioelectromagnetics*, vol. 31, pp. 209-219, 2010.
- [5] M. Lupke, J. Frahm, M. Lantow, C. Maercker, D. Remondini, F. Bersani, *et al.*, "Gene expression analysis of ELF-MF exposed human monocytes indicating the involvement of the alternative activation pathway," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1763, pp. 402-412, 2006.
- [6] O. Orwar, M. Karlsson, D. Chiu, A. Stromberg, and A. Karlsson, "Method and apparatus for manipulation of cells and cell-like structures focused electric fields in microfluidic systems and use thereof," ed: Google Patents, 2006.
- [7] M. T. Tsai, W. J. Li, R. S. Tuan, and W. H. Chang, "Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 27, pp. 1169-1174, 2009.
- [8] M. S. Markov, "Pulsed electromagnetic field therapy history, state of the art and future," *The Environmentalist*, vol. 27, pp. 465-475, 2007.
- [9] L. Guo, N. J. Kubat, and R. A. Isenberg, "Pulsed radio frequency energy (PRFE) use in human medical applications," *Electromagnetic biology and medicine*, vol. 30, pp. 21-45, 2011.
- [10] (10 July 2016). *An Internet Resource for the calculation of the dielectric properties of body tissues*, Institute for Applied Physics, Italian National Research Council. Available: <http://niremf.ifac.cnr.it/tissprop/>
- [11] I. J. Sosa, O. Reyes, and D. P. Kuffler, "Elimination of a pressure ulcer with electrical stimulation-a case study," *Puerto Rico health sciences journal*, vol. 27, 2008.
- [12] I. Goudarzi, S. Hajizadeh, M. E. Salmani, and K. Abrari, "Pulsed electromagnetic fields accelerate wound healing in the skin of diabetic rats," *Bioelectromagnetics*, vol. 31, pp. 318-323, 2010.
- [13] A. Athanasiou, S. Karkambounas, A. Batistatou, E. Lykoudis, A. Katsaraki, T. Kartsioni, *et al.*, "The effect of pulsed electromagnetic fields on secondary skin wound healing: an experimental study," *Bioelectromagnetics*, vol. 28, pp. 362-368, 2007.