

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERDE STATİK MANYETİK ALANIN
OSTEOBLASTİK FARKLILAŞMAYA ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Kaya MOLO

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Emel ORDU

Kasım, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE
STATİK MANYETİK ALANIN OSTEOLASTİK
FARKLILAŞMAYA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Kaya MOLO tarafından hazırlanan tez çalışması 14.11.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğretim Üyesi Emel ORDU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğretim Üyesi Emel ORDU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nevin Gül KARAGÜLER, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Emel ORDU sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerde Statik Manyetik Alanın Osteoblastik Farklılaşmaya Etkisinin İncelenmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Kaya MOLO

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü' nün FLY-2019-3520 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Aileme,

TEŞEKKÜR

Tamamladığım yüksek lisans eğitim programının her aşamasında, sabırla dinleyen, yüreklendiren ve yol gösteren ve de tez çalışmasının planlanmasında, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında ilgi ve desteğini esirgemeyen sayın Danışman Dr. Öğretim Üyesi Emel ORDU'ya; tez çalışması süresince Hücre ve Doku Laboratuvarı'nı olanaklarından faydalanmamı sağlayan sayın Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU'na ve Protein Mühendisliği Laboratuvarı'ndaki tüm değerli arkadaşlarıma yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Kaya MOLO

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xiii
HARİTA LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1 Giriş	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Jeomanyetizma ve Manyetizma Biyolojisi	1
1.1.2 Doğulan Coğrafyada Yuvalama Davranışı (Natal Homing)	6
1.1.3 Manyetizma ve İnsan Sağlığı	10
1.1.4 Manyetizma Esaslı Yardımcı Tedaviler	15
1.1.5 Manyetizma ve Manyetik Malzemeler (Maddeler)	18
1.1.6 Manyetizmanın Biyolojik Sistemlerle Etkileşim Mekanizması	24
1.1.7 Manyetik Alan Parametrelerine Bağlı Değişken Biyolojik Etkiler	30
1.1.8 Manyetik Akı Yoğunluğu (B) Parametresi ve Değişken Biyolojik Etkiler	33
1.1.9 Hücre Tipi Parametresi ve Değişken Biyolojik Etkiler	34
1.1.10 Hücre Sayısal Yoğunluğu ve Değişken Biyolojik Etkiler	35
1.1.11 Hücresel Durum (Yaşlanma, Parazitler) ve Değişken Biyolojik Etkiler	35
1.1.12 Biyomoleküler ve Hücresel Oryantasyon	36
1.1.13 Hücresel Büyüme ve Çoğalma	38

1.1.14 Hücre Canlılığı	39
1.2 Tezin Amacı	39
1.3 Hipotez	40
2 Materyal ve Yöntem	41
2.1 Hücre Kültürü Malzemeleri.....	41
2.1.1 İnsan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Temini.....	41
2.1.2 Hücre Kültürü Besi Ortamları ve Besi Katkıları	41
2.1.3 Hücre Kültür Sarfları	42
2.2 Kİ-MKH Büyütme, Çoğaltma ve Kriyoprezervasyon	43
2.2.1 Hücre Kültür Tabak (Flask) Yüzeylerinin Opimizasyonu	43
2.2.2 Kriyoprezerve Kİ-MKH'lerin Çözündürülmesi	44
2.2.3 Toplam Canlı Hücre Sayısının Tespiti	44
2.2.4 Kİ-MKH Büyütme ve Çoğaltma	44
2.2.5 Kİ-MKH Kriyoprezervasyonu.....	45
2.3 Statik Manyetik Alan Kaynağı ve Manyetik Akı Yoğunluğu	45
2.4 Deney Metodolojisi.....	47
2.4.1 328 mT SMA Tesiri ve Kİ-MKH Oryantasyonu Gözlemi.....	48
2.4.2 328 mT SMA Tesirinde Kİ-MKH Büyüme ve Çoğalmasının Analizi... 49	
2.4.3 328 mT SMA Tesirinde Osteogenez Sürecinin İncelenmesi	50
3 Sonuç ve Öneriler.....	53
3.1 328 mT Statik Manyetik Alan Tesirinin Kİ-MKH Oryantasyonu Üzerindeki Etkisi.....	53
3.2 328 mT Statik Manyetik Alan Tesirinin Kİ-MKH Büyüme ve Çoğalmasına Etkisi.....	59
3.3 328 mT Statik Manyetik Alan Tesirinin Kİ-MKH Osteogenezi Üzerindeki Etkisi.....	61
3.4 Tartışma ve Öneriler	66
Kaynakça	70
Tezden Üretilmiş Yayınlar	79

SİMGE LİSTESİ

Y	Coğrafik Doğu
P	Coğrafik Konum
X	Coğrafik Kuzey
L	Dönme Momenti
E,U	Enerji
Gs	Gauss
p	Güç
V	Hacim
Hz	Hertz
F	Kuvvet,
Φ	Manyetik Akı
B	Manyetik Akı Yoğunluğu
m	Manyetik Dipol Momenti
X	Manyetik Duyarlılık
M	Manyetik Moment
I	Manyetik Meyil
D	Manyetik Sapma veya Kayma
H	Manyetizasyon Kuvveti
r	Mesafe
μ T	microTesla
mT	miliTesla
Oe	Oesterds
T	Tesla
l	Uzunluk
μ_0	Vakum içerisinde manyetik permilyabilite
Z	Vertikal Dikey

KISALTMA LİSTESİ

CGS	Santim-Gram-Dakika Sistemi Birimleri
DMSO	Dimetil Sulfoksit
DPBS	Dulbecco Tamponlanmış Fosfat Çözeltisi
ELF	Aşırı Düşük Frekanslar
EMA	Elektromanyetik Alan
FBS	Fetal Bovin Serum
IF	İntermediate Frekanslar
JMA	Jeomanyetik Alan
Kİ-MKH	Kemikliği Mezenkimal Kök Hücresi
MB	Manyetizma Biyolojisi
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MKS	Metre-Kilo-Dakika Sistemi Birimleri
MT	Manyetizma Tedavisi
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NdFeB	Neodimium Demir Boron
PBS	Tamponlanmış Fosfat Çözeltisi
PEMA	Atımlı Elektromanyetik Alan
PDT	Population Doubling Time
RF	Radyo Frekans
SMA	Statik Manyetik Alan

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.1** Doğal magnetit. 2
- Şekil 1.2** Coğrafik ve manyetik kutup; coğrafik ve manyetik ekvator 3
- Şekil 1.3** Dünya üzerinde yer alan bir p noktasına etkiyen, toplam manyetik şiddet ve manyetik elementlerin (D, H, Z, X, F,F,I) coğrafik konumlaması..... 4
- Şekil 1.4** Yeşil deniz kaplumbağalarında manyetik harita bilgisi olduğunu gösteren bir deney ve kaplumbağaların manyetik uyarıya göre oryantasyonları..... 9
- Şekil 1.5**Deniz kaplumbağalarının manyetik haritalardan yararlanması halinde, yuvalama alanlarında ön görülen değişim, yeşil noktalar yuva alanları..... 9
- Şekil 1.6**Yeşil kaplumbağa yuvalarının birim alanda yoğunluğunda değişimler (isoclinis hatların birbirine yaklaşması (converging isolines) ve isoclinics hatların birbirinden uzaklaşması (dicerging isolines) halinde). 10
- Şekil 1.7** Elektrik akımı (mor renkli ok) sırasında oluşan iki boyutlu ema gösterilmektedir..... 11
- Şekil 1.8** Elektromanyetik alanların frekans değişimlerini göstermektedir. 12
- Şekil 1.9** JMA etkisinde pusula iğnelerinin yönelimi, mavi ve kırmızı zıt kutuplar..... 18
- Şekil 1.10** (a) Manyetik alan kuvvet çizgileri ve (b) harici manyetik alanda tork 19
- Şekil 1.11** Hysteresis eğrisi: Hc coercivite ve Br retentivite olarak bilinir. 21
- Şekil 1.12** Periyodik üzerinde elementlerin manyetik özelliklerinin gösterimi. 22
- Şekil 1.13** Magnetotaktik bakteride magnetit kristallerin hücre boyunca dizilimi..... 25
- Şekil 1.14** Diyamanyetik levitasyon (a) küçük kurbağa, 16 T sma ve (b) su damlası 16 T sma 26
- Şekil 1.15** Mikrotübülün diyamanyetik anizotropisi ((a) polipeptitin α helikslerinde yar alan planar peptid bağlar anizotropi oluşturması, (b) ve (c) heliks yapılarınc oluşturulan manyetik vektörler izlenmesi, (d) peptid bağların α heliks içerisinde paralel olması ve mükrotübülün içerdiği halkasal yapının anizotropiyi artırması). 288
- Şekil 1.16** Sma'nın çift tabaka membran fosfolipidleri üzerindeki etkisi. 299
- Şekil 2.1** Ki-mkh çözündürme, büyütme ve çoğaltma, pasajlama ve kriyoprezervasyon uygulama akışı..... 43
- Şekil 2.2** SMA kaynağının yerleşimi (NdFeB mıknatıslar (a1); 24 kuyulu hücre kültür tabağında (b1) bir kuyunun altına yerleştirilen (b2) NdFeB mıknatıslar; 24 kuyulu hücre kültür tabağının bir kuyusunun altına yerleştirilen NdFeB mıknatısların üstten görünümü (c1))......46
- Şekil 2.3** Manyetik alan yoğunluğunun ölçümü (NdFeB mıknatıslar ile hücre kültür tabağında oluşturulan manyetik alan yoğunluğu manyetik akı ölçer ile

ölçülmüştür; oluşturulan manyetik alanın B değerinin 328 mT olduğu görülmektedir).....	46
Şekil 2.4 Deneysel metodoloji.....	47
Şekil 2.5 328 mT sma tesirinin ki-mkh'lerin oryantasyonu üzerindeki etkinin incelenmesi.....	48
Şekil 2.6 328 mT sma tesirinde ki-mkh büyüme ve çoğalması analiz sürecidir.....	50
Şekil 2.7 328 mT sma tesirinde ki-mkh osteojenez sürecinin analiz süreci.....	52
Şekil 3.1 SMA tesirindeki Kİ-MKH'lerin mikroskop altındaki görüntüsü (Kontrol (K1) ve deney (D1) grupları sırasıyla 5x, 10x ve 20x büyütmede görüntüleriyle karşılaştırılmıştır. Deney grubu hücrelerin kontrol grubu hücrelere göre belirli bir düzen aldıkları görülmektedir).....	54
Şekil 3.2 SMA tesirindeki Kİ-MKH'lerin mikroskop altındaki görüntüsü (Kontrol (K2) ve deney (D2) grupları sırasıyla 5x, 10x ve 20x büyütmede görüntüleriyle karşılaştırılmıştır. Deney grubu hücrelerin kontrol grubu hücrelere göre belirli bir düzen aldıkları görülmektedir.....	55
Şekil 3.3 SMA tesirindeki Kİ-MKH'lerin mikroskop altındaki görüntüsü (Kontrol (K3) ve deney (D3) grupları sırasıyla 5x, 10x ve 20x büyütmede görüntüleriyle karşılaştırılmıştır. Deney grubu hücrelerin kontrol grubu hücrelere göre belirli bir düzen aldıkları görülmektedir.....	56
Şekil 3.4 Kontrol grubu (A) ve deney grubu (B) kuyularında MTT inkübasyonu sonrası Kİ-MKH'lerin mikroskop görüntüleri. (5x,10x ve 20x büyütme görüntüleri karşılaştırıldığında deney grubu hücrelerin kontrol grubu hücrelere göre belirli bir düzende olduğu görülmektedir).....	57
Şekil 3.5 Manyetik alan akısının demir tozları ile görünür kılınması. (Kİ-MKH'lere uygulanan manyetik alan akı demir tozları ile görünür hale getirildiğinde, deney grubu (D1) Kİ-MKH'lerin manyetik alan akı (M1) ile paralel yönde oryantasyon gösterdiği tespit edilmiştir).....	58
Şekil 3.6 MTT testi standard eğrisi.....	59
Şekil 3.7 6. Gün sonunda deney ve kontrol gruplarında hücre sayıları (p=0,2025).....	61
Şekil 3.8 ALP Aktivitesi analiz sonuçları (IU/L).....	63
Şekil 3.9 Alizarin Red S boyaması ile SMA'nın mineralleşme üzerine etkisinin gösterilmesi (a sırasındaki kuyucuklarda yer alan NutriStem XF Besi Ortamında 328 mT SMA tesirindeki hücre gruplarında mineralleşmenin gerçekleşmediği, b sırasındaki kuyucuklarda yer alan Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi Ortamında 328 mT SMA tesirindeki hücre gruplarında mineralleşmenin gerçekleştiği ve C sırasındaki kuyucuklarda yer alan SMA etkisi olmadan sadece NutriStem XF Besi Ortamındaki hücrelerde mineralleşmenin gerçekleşmediği görülmektedir).....	65
Şekil 3.10 Alizarin Red S boyaması ile Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi ortamının mineralleşme üzerine etkisinin gösterilmesi (a sırasındaki kuyucuklarda yer alan NutriStem XF Besi Ortamında 328 mT SMA tesirindeki hücre gruplarında	

mineralleşmenin gerçekleşmediği, b sırasındaki kuyucuklarda yer alan Osteogenez Uyarıcı Ortamında 328 mT SMA tesirindeki hücre gruplarında mineralleşmenin gerçekleştiği ve C sırasındaki kuyucuklarda yer alan SMA etkisi olmadan sadece Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi Ortamındaki hücrelerde mineralleşmenin gerçekleşmediği görülmektedir).....66



TABLO LİSTESİ

- Tablo 1.1** Ev ve kamusal alanlarda karşılaşılan ema kaynakları, ema frekansları ve manyetik akı yoğunlukları..... 13
- Tablo 3.2** MTT analizi (deney ve kontrol grubu herbir kuyucuktaki ki-mkh'lerin mtt absorbans değerleri ve tespit edilen hücre sayıları gösterilmektedir).....60
- Tablo 3.3** ALP aktivitesi 470 nm'de ölçülen absorbans değerleri ve IU/L sonuçları.....63



HARİTA LİSTESİ

Harita 1.1 US/UK world magnetic model - 2019.0 main field inclination (I)	5
Harita 1.2 US/UK world magnetic model - 2019.0 main field declination (D)	5
Harita 1.3 Doğu ve batı amerika boyunca uzanan isoclinics hatların değişen meyil dereceleri (a) ve manyetik alan şiddetler (b) izlenmektedir	8



Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerde Statik Manyetik Alanın Osteoblastik Farklılaşmaya Etkisinin İncelenmesi

Kaya MOLO

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Emel ORDU

Doku mühendisliği, kök hücre-tabanlı terapi yöntemleri, hedefe yönelik yeni ilaç iletim sistemlerinin geliştirilmesi son yılların en önemli araştırma alanlarından. Manyetik alan ya da manyetik nanoparçacık uygulamaları bu alanlarda öne çıkan stratejilerden biridir. Statik manyetik alan aynı zamanda halen yara iyileşmesinde, kemik rejenerasyonunda ve manyetik rezonans tekniğinin bir komponenti olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte statik manyetik alanın kök hücre popülasyonları üzerindeki biyolojik etkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), hücre tedavileri için önemli biyolojik araçlardır. Çeşitli hücre gruplarında Statik Manyetik Alan (SMA), farklı hücre hatlarının fizyolojik süreçlerini düzenleyen bir uyandır. İn Vitro’da SMA şiddeti/yoğunluğu ve süresine bağlı olarak hücre membran polarizasyonunda ve yapısında, hücre iskeletinde, hücre içi oksidasyon koşullarında, gen ifadelerinde ve proliferasyon süreçlerinde değişimlere neden olmaktadır. Bu çalışmamızda, insan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri, Neodimium Demir Boron (NdFeB) mıknatıs kaynaklı 328 mT SMA tesirinde bırakılarak, büyüme ve çoğalma oranlarındaki, oryantasyonlarındaki, osteojenik farklılaşma

süreçlerindeki değişimler incelenmiştir. 0,6 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen MTT analizine göre 6 gün boyunca 24 saat 328 mT SMA tesirinde kalan kök hücrelerin büyüme ve çoğalma oranlarında, kontrol grubuna göre bir değişim gözlenmez iken, aynı SMA tesiri hücrelerin, manyetik akıya paralel oryantasyon kazanmasına sebep olmuştur. SMA'nın osteogenez sürecine olan etkisini araştırmak amacıyla yaptığımız deneylerde 14 gün boyunca 24 saat 328 mT SMA tesiri ve kimyasal osteojenez uyarımına maruz kalan grupta, alkalın fosfataz aktivitesinin, sadece kimyasal osteojenez uyarımına maruz kalan gruba göre azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Alizarin Red S boyama ile gerçekleştirilen mineralleşmeye olan etkinin incelenmesinde, 14 gün boyunca 24 saat 328 mT SMA tesiri ve kimyasal uyarıma maruz kalan grupta daha az mineralleşme odaklarının olduğu tespit edilmiştir. Literatür verileriyle değerlendirildiğinde, SMA varlığında artan hücre içi demir konsantrasyonun, serbest radikallerin oluşumunu tetiklemesi, sonucu hücre büyüme ve çoğalmasında istatistiki olarak anlamlı bir artışın olmamasına rağmen osteojenez sürecinde alkalın fosfataz gen ifadesini ve biyomineralenmeyi önlediği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Statik manyetik alan, mezenkimal kök hücre

Investigation Of The Effect Of Static Magnetic Field On Osteoblastic Differentiation Of Mesenchymal Stem Cells Originated From Bone Marrow

Kaya MOLO

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science

Advisor: Assist. Prof. Dr. Emel ORDU

Tissue engineering, stem cell-based therapies and developing new targeted drug systems are the most important research fields. In this research field, the application of the magnetic field or magnetic nanoparticles is one of the main strategies. The static magnetic field has already been utilized in chronic wound therapies, nonunion bone fractures treatments, and magnetic resonance imaging. However, the effects of static magnetic field on mesenchymal stem cell has not been explained properly yet. Mesenchymal stem cells (MSCs) are important biological tools for regenerative medicine or cell therapies. Static Magnetic Field (SMF) is one of the physical stimulants to modulate physiological processes in different cell lines. In vitro conditions, SMFs, according to their intensity and duration, change cellular membrane polarization, oxidative product concentrations, gene expression patterns, and cell propagation rates. In this study, human bone marrow-derived MSCs were grown under 328 mT SMF by using Neodymium Iron Boron (NdFeB) magnets to investigate SMF influence on their proliferation rates, morphologies, osteogenic differentiation capacity. The proliferation rate was analyzed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 0,6 mg/mL) 24 hours and 6 days

after SMF induction. Although preliminary results showed that cells in the SMF treated group gained a parallel orientation according to magnetic field direction, SMF influence did not significantly change proliferation rates. It was analyzed and compared alkaline phosphatase (ALP) activity in the cells grown for 14 days under both continual SMF and chemically osteogenic induction. It was observed that ALP activity in this group decreased compared to the control groups. Also, Alizarin Red S staining showed that mineralization decreased in the cells grown under the same conditions compared to control cells. When the results are evaluated with literature data, it is comprehended that although increased intracellular iron concentration and changed production or half-life of free radicals in SMF may not affect cell growth and proliferation, it can alter the ALP gene expression and bio-mineralization.

Keywords: Static magnetic field, mesenchymal stem cell

1.1 Literatür Özeti

Manyetizma terimi, Türk Dil Kurumu tarafından “mıknatıs özelliklerinin bütünü” ve “fiziğin bu özellikleri inceleyen bölümü” olarak tanımlanmaktadır. Ancak manyetizma, günlük yaşamda pusulanın; enerji üretim, güçlendirme ve dağıtım sistemlerinin (jeneratörler, transformatörler ve indüktörler); ses sistemlerinin (hoparlör, mikrofonlar); bilgi işlem sistemlerinin (bilgisayar, bilgisayar ekranı, CD); iletişim sistemlerinin (mobil telefonlar); tıbbi görüntüleme sistemlerinin (Manyetik Rezonans Görüntüleme-MRI sistemleri) ve ulaşım sistemlerinin (manyetik hızlı trenler) temelidir. Manyetizmanın üretilmesinde, yine bu sistemlerin ve diğer sıradan günlük evsel cihazlar payı bulunmaktadır. Öte yandan inşa edilen yüksek ve çelik konstrüksiyonlu binalar, etkileşimde olunan çevresel manyetizmayı zayıflatmakta veya güçlendirmektedir. Manyetizma, en önemlisi, insanın diğer tüm canlılarla paylaştığı Dünya'nın jeolojik/astronomik faaliyetlerinin bir sonucudur. Tüm canlılık, Dünya'nın kuşatan ancak zayıf manyetik alanı içerisinde oluşmuş ve gelişmiştir. Bu nedenle de insan ve diğer canlıların manyetik alanlara hassasiyeti söz konusudur. Bu bölüm içerisinde, doğal ve insan faaliyetlerinden şekillenen manyetik alanlar sıcaklık, basınç, nem, aydınlık gibi bir fiziksel çevre etmeni olarak ele alınarak açıklanacaktır. Biyolojik sistemlerle (insan ve diğer canlılarla makro ve hücrelerle mikro düzeyde) kurduğu etkileşimlerin olası mekanizmaları; etkileşimlerin olumlu veya olumsuz sonuçları değerlendirilecektir. Ayrıca manyetizmanın hücre biyolojisini hangi parametreler, hangi mekanizmalar ile etkilediği ve hangi fizyolojik sonuçlara neden olduğu tartışılacaktır.

1.1.1 Jeomanyetizma ve Manyetizma Biyolojisi

Manyetizma için entelektüel ilgimiz uzak bir geçmişe dayanmaktadır. Mıknatıs taşının (doğal magnetit, $\text{FeO-Fe}_2\text{O}_3$) (Şekil 1.1), M.Ö. 600-800'lü yıllarda Ege ve Akdeniz havzasında tanındığı bilinmektedir. M.S. 1100'lerde İtalyan, Arap veya Çin düşünürleri tarafından, deniz ve okyanus seyahatini kolaylaştıracak “pusula” insanlık tarihine dahil

edilmiştir [1]. Ayrıca manyetizma fenomeni, çeşitli simya ve şifacılık uygulamalarında kullanılmıştır. Ancak modern bilim tarafından da paylaşılan doğal manyetik alanın kaynağına ve davranış biçimine yönelik fiziki gözlemler ve veriler Aydınlanma Çağı'nda üretilmeye başlanmıştır. Bu çağda manyetizma, diğer fizik soruları gibi mekanikçi felsefeye ele alınarak, gizemlerinden arındırılarak açıklanmaya çalışılacaktır.

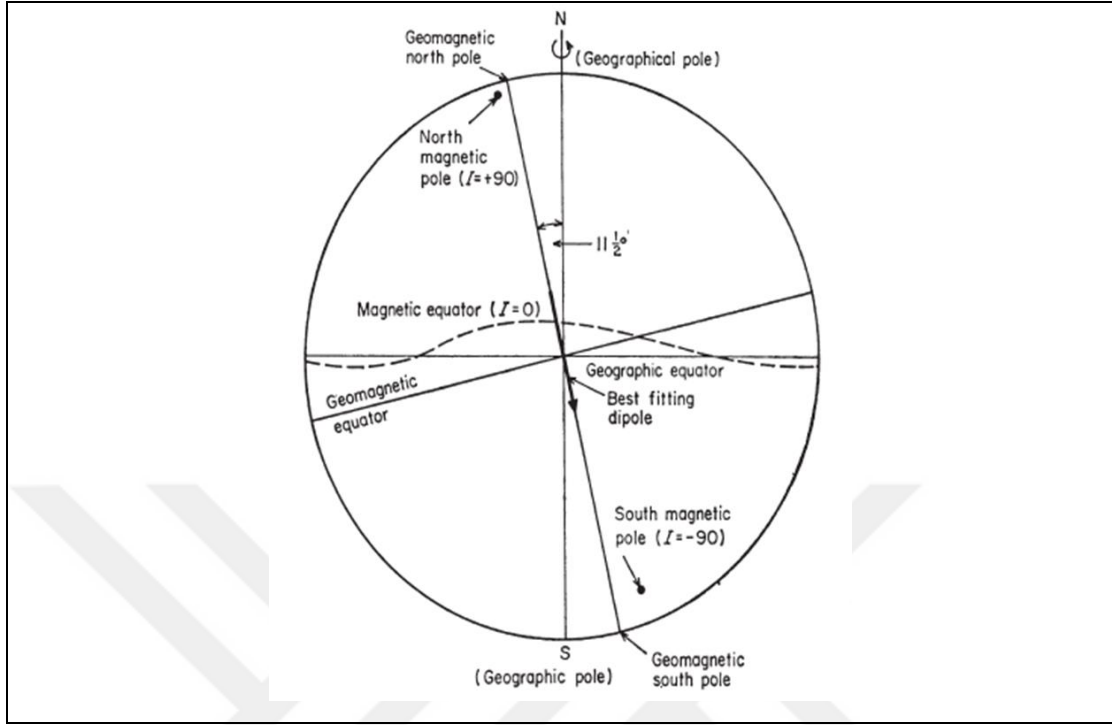


Şekil 1.1 Doğal magnetit [6]

İlk olarak W.Gilbert (1600), gezegenimizi iki kutuplu tek biçimli manyetik bir küre olarak tanımlamıştır [2]. Doğal manyetizmanın ise gezegenin içsel faaliyetlerinden kaynaklandığını savunmuştur. Lomonosov (1769), yerkürenin farklı manyetize cisimlere sahip olduğunu ve bu nedenle tek biçimli manyetizmaya sahip olmadığını iddia etmiştir. Dünya'nın manyetik alanına yönelik ilk analitik veriler ise M. Simonov (1835) ve K. Gauss (1838) tarafından sunulmuştur [3].

Gezegene ait manyetik alan, jeomanyetik alan (JMA) olarak adlandırılır. Yıldızlar, Dünya ve diğer gezegenler değişen güçlerde JMA'ya sahiptir. Ancak doğal uydumuz Ay'da JMA gelişmemektedir. Dünya yüzeyinde JMA'nın şiddeti, Brezilya, Rio de Janeiro yakınlarında 0,24 Gauss (Gs) ancak kutup bölgelerinde 0,61-0,68 Gs'tur [4]. Gezegenimizin manyetik alanı dipoldür (çift kutupludur) [4]. Ancak coğrafik kutup noktaları ile manyetik kutup noktaları arasında 11.5° fark bulunmaktadır (Şekil 1.2) [4]. Ayrıca günümüzde manyetik güney kutup noktası, kuzey yarımkürede; manyetik kuzey kutup bölgesi ise güney yarımkürede yerleşiktir. Bu nedenle de manyetik vektörler

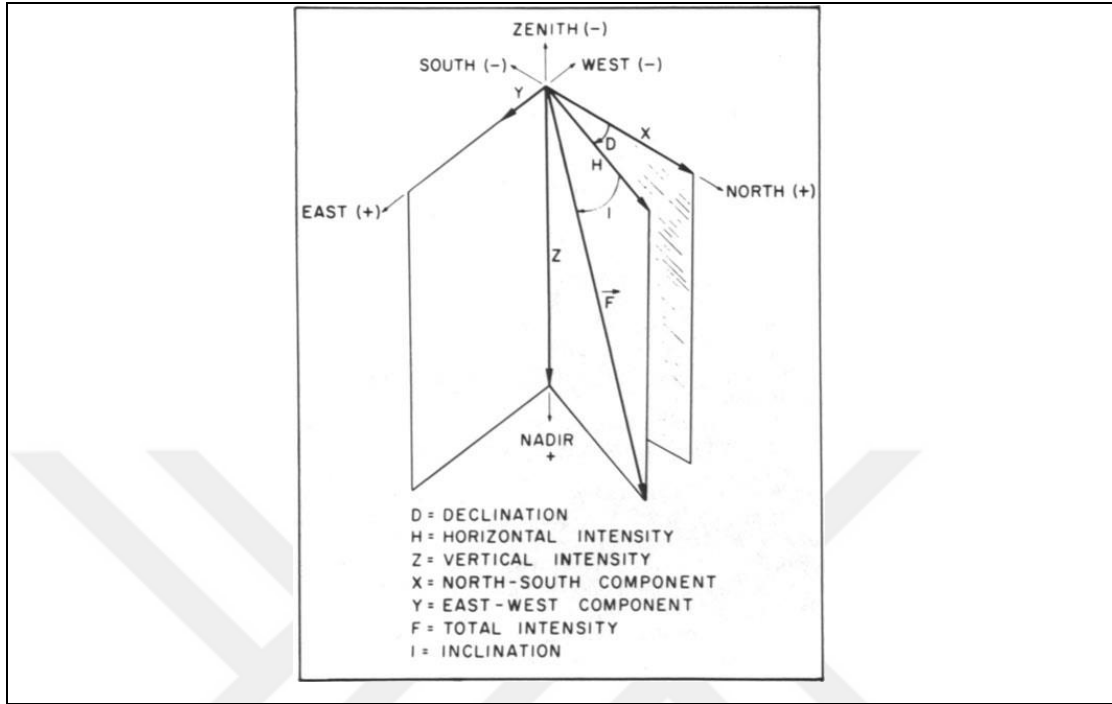
manyetik kuzey kutup bölgesinden (coğrafik güney kutbundan) manyetik güney kutup bölgesine (coğrafik kuzey kutba) doğru ilerlemektedir [4].



Şekil 1.2 Coğrafik ve manyetik kutup; coğrafik ve manyetik ekvator [4]

Dünya üzerinde bulunan bir P noktasında oluşan jeomanyetik alanın şiddet ve yönü bir Kartezyen koordinat sistemi ile tanımlanır (Şekil 1.3) [4]. Bu dik açılı koordinat sisteminde P noktası, koordinat merkezine yerleşir; pozitif eksenleri ise coğrafik kuzeye, coğrafik doğuya ve doğrudan yeryüzünün merkezine yönelir. Manyetik alan vektörü, klasik fizikte gösterimi olan B yerine F veya T ile sembolize edilir. Böylece manyetik alan vektörü, X (coğrafik kuzey), Y (coğrafik doğu) ve Z (aşağı yönlü vertikal-dikey) isimli Kartezyen bileşenlerde çözümlenir. Manyetik alan bileşenlerinden Horizontal Intensity (H), pusula iğnesinin işaret ettiği manyetik kutup noktasıdır. H ile gerçek kuzey arasındaki açısal fark Magnetic Declination veya Variation (manyetik kayma veya sapma) olarak isimlendirilir ve D ile sembolize edilir. Bu açı, kuzeyin doğusu yönünde ise pozitif (+); kuzeyin batısı yönünde ise negatif (-) kabul edilir. F ile H arasındaki açı farkı Magnetic Inclination (manyetik meyil) veya dip olarak bilinir ve I ile sembolize edilir. Eğer F horizontal düzlemin altında ise pozitif (+); horizontal düzlemin üzerinde ise negatif (-) değerlendirilir. Bu manyetik elementlerin birbirleri ile ilişkisi (1.1) eşitliği ile açıklanmaktadır [4]

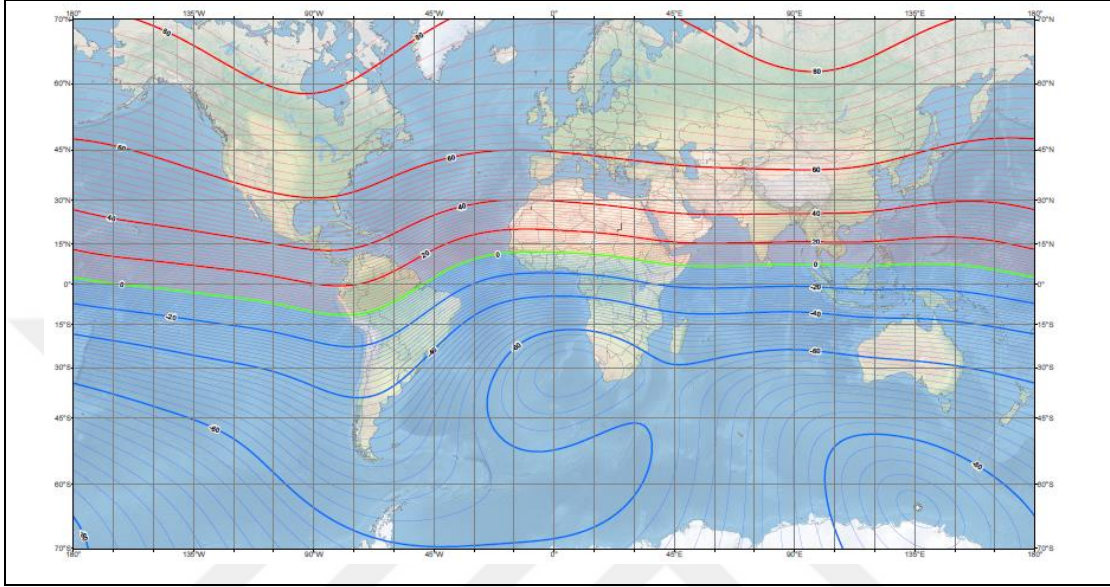
$$F = T = (X^2 + Y^2 + Z^2)^{1/2} \quad (1.1)$$



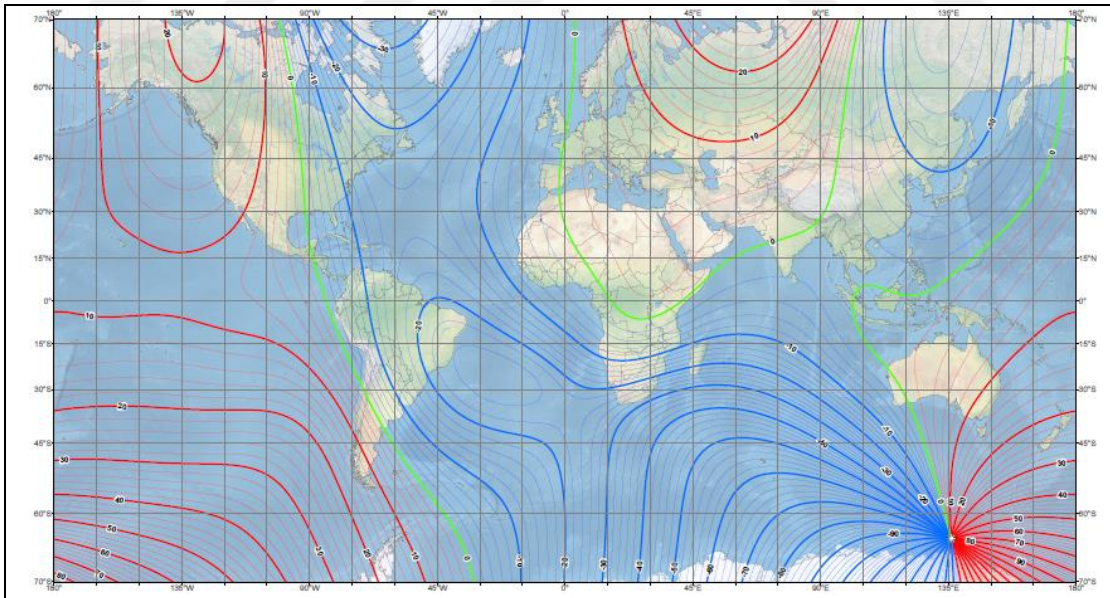
Şekil 1.3 Dünya üzerinde yer alan bir p noktasına etkiyen, toplam manyetik şiddet ve manyetik elementlerin (D, H, Z, X, F,F,I) coğrafik konumlaması [4]

Doğal manyetik alan, coğrafik enlem ve boylamlara analog manyetik enlem ve boylamlar içerir [4]. Manyetik enlem ve boylamlar, eşit manyetik meyille (I) sahip hatlardan (isoclinics olarak adlandırılırlar) ve de eşit manyetik sapmalara (D) sahip hatlardan (isogonics olarak adlandırılır) oluşur [4]. Kuzey yarım kürenin neredeyse tümü üzerinde, manyetik alanlar aşağı (I>0) yönelimlidir (Şekil 1.2) [4]. Güney yarım kürenin neredeyse tümü üzerinde ise, manyetik alan yukarı (I<0) yönelimlidir (Şekil 1.2) [4]. Dünya'yı I=0'da bölen isoclinic hat, manyetik ekvatordur. I=+90° olan nokta manyetik kuzey kutup; I= -90° olan nokta ise manyetik güney kutuptur (Şekil 1.2) [4]. Yine dünyanın manyetik alanında, manyetik sapması "0" olan (D=0) olan iki nokta ve noktalardan uzaklaştıkça derecesi sapma dereceleri artan isogonic hatları bulunmaktadır [4]. Dünyanın manyetik enlem ve boylamları, Main Field Inclination (I) (Harita 1.1) ve Main Faield Declination (D) (Harita 1.2) haritaları ile gösterilir [4]. Bu haritalar, secular variation olarak adlandırılan değişmeler nedeniyle düzenli olarak güncellenmektedir [4].

Küresel veya bölgesel jeomanyetik alan, Main Field Inclination (I) (Harita 1.1) ve Main Field Declination (D) (Harita 1.2) haritalarıyla bizlere etkisinde kaldığımız sıcaklık, basınç ve nem gibi bir çevre etmeni olarak sunulmaktadır. Yine bu haritalar, JMA'nın neden deniz ve hava ulaşımında oryantasyon ve navigasyon için neden değerli veri olduğunu da açıklamaktadır.



Harita 1.1 US/UK world magnetic model - 2019.0 main field inclination (I) [7]



Harita 1.2 US/UK world magnetic model - 2019.0 main field declination (D) [7]

Manyetizma Biyolojisi (MB), kaynağından bağımsız olarak (gezegen faaliyeti veya manyetik rezonans görüntüleme sistemince üretilebilir) manyetik alanı bir biyolojik sistem (örneğin bir kuş veya hücre) için bir çevre faktörü olarak ele almaktadır. MB kapsamında, A. T. Middendorff (1859) ve takipçileri tarafından gerçekleştirilen ilk bilimsel çalışmalarla, JMA'nın güvercinlerin navigasyon davranışlarında etkili olabileceğini göstermeye ve açıklamaya çalışılmıştır. F. Merkel (1958 ve 1965) ve W. Wiltschko (1965 ve 1968) tarafından yürütülen ısrarlı çalışmalar neticesinde Avrupa Kıızılgardan kuşunun (*Erithacus rubecula*) yön tercihinin, bulunduğu kafesin etrafında oluşturulan yapay manyetik alan değişiminden etkilendiğini göstermiştir. Bu öncü çalışmaların bulgularını destekleyici çalışmaların yayınlanması ile manyetik etkileşim (manyetizasyon) kavramı, cansız madde evreninden biyolojik sistemlerin karmaşık fizyolojik ve davranış süreçlerine doğru genişlemiştir [3]. Karmaşık sosyal davranışlara dönüşecek manyetik alan duyusunun gelişim basamaklarından, manyetik duyu oluşumu aranamaksızın manyetik alan etkileşimi neticesinde gelişen fizyolojik ve patolojik tepki basamaklarının araştırılması konuya dahil edilmektedir.

Bu çerçevede manyetizma biyolojisi, bir elektromanyetik veya manyetik alan varlığında (veya yokluğunda) biyolojik sistemlerin (canlının bütünü, bir dokunun, bir hücre grubunun) yanıtlarını ve eylem mekanizmalarını incelemektedir [5]. Ancak, çeşitli biyolojik sistemlerin faaliyetleri neticesinde oluşan biyolojik manyetizma (biyomanyetizma) ile ilgilenmemektedir. MB araştırmalarının günlük yaşamlarımızdaki yansımalarını elektromanyetik ve manyetik alanlara ilişkin güvenlik düzenlemelerinde, temel araştırmaları, teşhis ve tedaviyi içeren biyomühendislik, genetik ve tıp uygulamalarında veya yöntemlerinde sıklıkla karşılaşmaktayız.

1.1.2 Doğulan Coğrafyada Yuvalama Davranışı (Natal Homing)

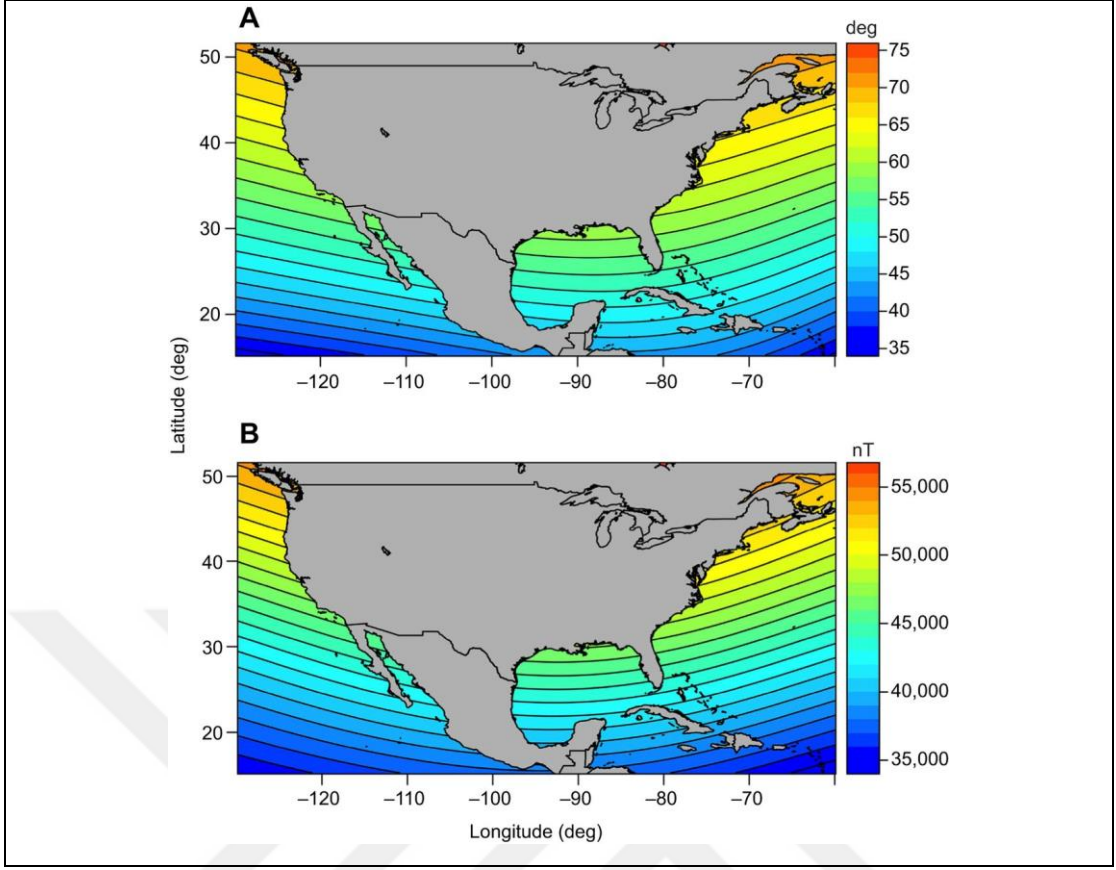
Doğulan coğrafyada yuvalama davranışı (natal homing), balık, sürüngen, kuş ve memelilerde izlenen, bir yavrunun doğduğu nehir ağzını veya kumsalı terk ederek uzun mesafeli göç gerçekleştirmesi ancak ergin evrede, ters göç hareketi ile doğduğu nehir ağzına veya kumsala geri dönerek yumurtlamasıdır [8]. Somonlar ve deniz kaplumbağalarının, yalnızca koku moleküllerinin izlerini takip ederek doğdukları yere geri döndükleri düşünülüyordu. Ancak, bu canlıların okyanuslarda bin kilometreden daha uzak mesafelere ulaşan ileri göçlerinden, koku moleküllerinin yetersiz kalacak

izlerini takip ederek geri dönmelerinin mümkün olmadığı anlaşılmıştır. JMA'nın bu uzak mesafeli geriye göç hareketinde etkili olduğuna güçlü veriler elde edilmektedir [8]. Jeomanyetizma yönlendirmeli doğulan coğrafyaya yuvalama davranışı hipotezi, deniz kaplumbağası ve somon yavrularınca doğulan coğrafyanın JMA özelliklerinin (manyetik meyili (I) ve manyetik alan kuvvetinin (H)) kaydedildiği ve doğulan coğrafyaya doğru gerçekleşen geri göç hareketinin bu kayıtlar yoluyla gerçekleştirdiğini açıklamaktadır [8].

Oncorhynchus nerka, *Oncorhynchus tshawytscha* ve *Oncorhynchus keta* gibi sayabileceğimiz ancak yalnızca bu türlerle sınırlı olmayan somon balığı gruplarında, tatlı nehir sularında doğan yavrular, nehir ağızlarından Pasifik okyanusunda binlerce kilometre yol alarak dağılmakta ve yüksek bir doğrulukla doğdukları alanlara yumurtlamak için geri dönmektedir [8]. *Caretta caretta* deniz kaplumbağası ise on yıl sonra uzun mesafe yol alarak doğduğu kumsala ulaşmaktadır [8]. Türler ve popülasyonlar arasında doğulan noktaya geri dönmekteki kesinlik değişkenlik göstermektedir. Ancak *Lepidochelys kempii* türü deniz kaplumbağalarında bu kesinlik, 30 km'lik dar bir alana düşmesi mümkün olmaktadır [8].

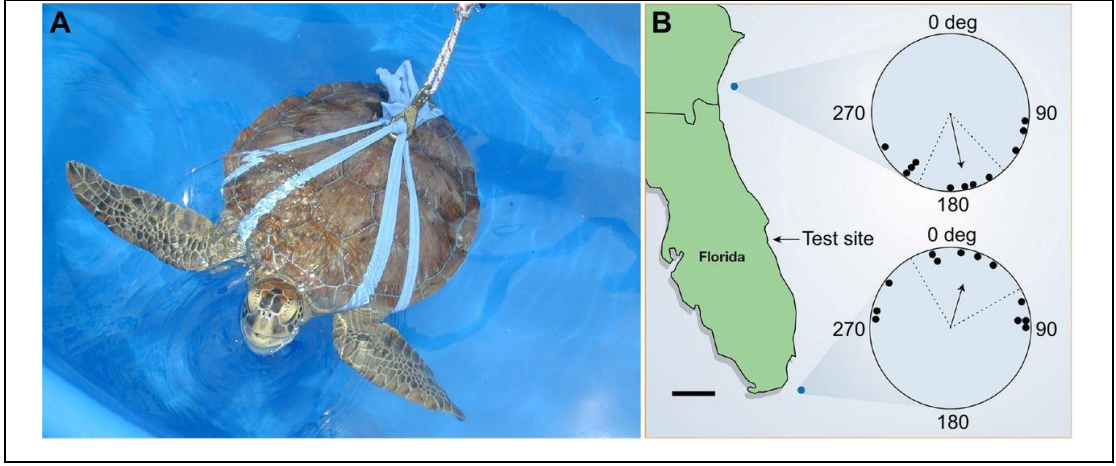
Somon ve deniz kaplumbağalarında, doğulan yere yuvalama davranışı iki basamakta gerçekleşmektedir [8]. Birinci basamak uzak mesafelerden yuvalama yöresine manyetik navigasyon ve jeomanyetik özelliklerden faydalanılarak ulaşılmaktadır. İkinci basamak ise doğru yuvalama alanının, muhtemelen koku ve feromonlar aracılığı ile (özellikle somonlarda) belirlenmesidir.

Jeomanyetizma ve Manyetizma Biyolojisi 1.1.1 bölümünde, isoclinics ve isogonics hat haritalarının oryantasyon ve navigasyon için önemli veri sağladığı tartışılmıştır. Harita 1.3'te Doğu ve Batı Kuzey Amerika haritası üzerinde, siyah noktalar halinde kuzey – güney yönünde uzanan deniz kaplumbağası yuvalama kumsalları izlenmektedir [8]. Aynı harita üzerinde doğu-batı yönünde değişen derece (Harita 1.3 A) ve manyetik alan şiddetlerinde (Harita 1.3 B) uzanan isoclinics hatlar bulunmaktadır. Sonuç olarak kuzey güney yönünde doğu veya batı sahillerinde bulunan yuvaların her biri, özel bir isoclinics hatta denk gelmektedir. Yavruların, açık denize ulaşmadan önce bu alanlara ait JMA özellikleri öğrendikleri, doğum yerine geri dönmeyi bu verilere göre gerçekleştirdikleri düşünülmektedir [8].



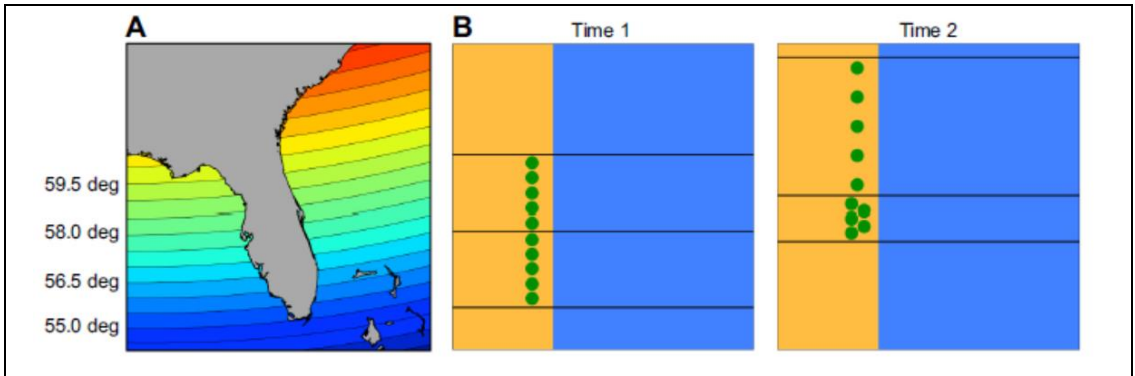
Harita 1.3 Doğu ve batı amerika boyunca uzanan isoclinics hatların değişen meyil dereceleri (a) ve manyetik alan şiddetleri (b) [8]

Kaplumbağaların manyetik navigasyonu kullanarak uzak mesafedeki noktalara ulaşabildiklerine yönelik kanıt, Şekil 1.4 A’da görülen yeşil kaplumbağa (*Chelonia mydas*), yavrularıyla gerçekleştirilen bir deneyde izlenmektedir [8]. Bu yaştaki yeşil deniz kaplumbağaları, beslenme alanlarına bağlılık gösterirler ve mevsimsel göçlerden sonra yine bu alanlara geri dönmektedirler. Şekil 1.4 A’da görülen kaplumbağalar beslenme alanların yakın bir havuzda tutulmuştur. Bu kaplumbağalara 340 km kuzey ve güney beslenme sahalarına ait JMA parametreler uygulandığında, yönelimleri sırtlarına yerleştirilen bir kayıt sistemi ile izlenmiştir. Deneyde kaplumbağaların beslenme noktalarına geri dönmeyi hedefleyen yönelimde oldukları gözlenmiştir (Şekil 1.4 B). Bu deney yeşil kaplumbağaların manyetik harita bilgisini, olgunluk öncesinde kazandıklarını göstermektedir [8]. *Oncorhynchus tshawytscha* somon yavrularının da genç yeşil kaplumbağalar gibi davrandıklarına yönelik bulgular sunulmuştur. Yine somonların manyetik haritaların, hem manyetik kuvvet (H) hem de manyetik meyil (I) parametrelerinden yararlandıkları gösterilmiştir [8].

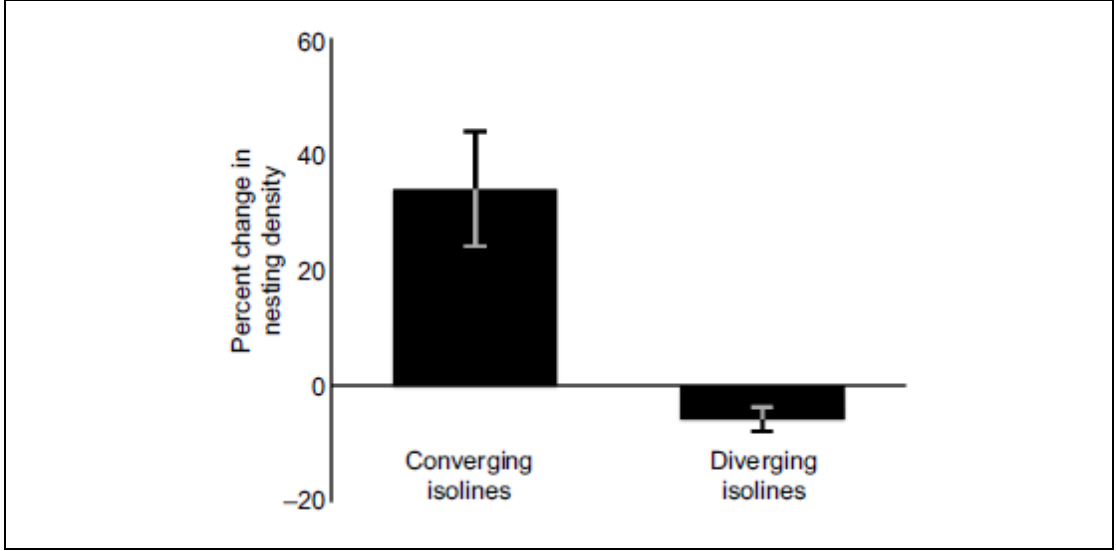


Şekil 1.4 Yeşil deniz kaplumbağalarında manyetik harita bilgisi olduğunu gösteren bir deney ve kaplumbağaların manyetik uyarıya göre oryantasyonları [8]

Deniz kaplumbağalarının natal homing davranışında manyetik harita bilgisinin önemini, JMA'nın secular variation'a (5-10 yılda bir gerçekleşen isoclinics hatlarının birbirine yaklaşması veya uzaklaşması) bağlı yuvalama değişimlerinde izlenmektedir. Şekil 1.5'de isoclinics hatların birbirine yaklaşması veya uzaklaşması halinde, yeşil kaplumbağaların yuvalama davranışlarının nasıl bir değişim olacağına yönelik tahmin gösterilmiştir [8]. Buna göre, isoclinics hatların birbirinden uzaklaştığı yıllarda, yuvaların birim alan başına yoğunluğu azalmalı ancak isoclinics noktalarının birbirine yaklaştığı yıllarda, birim alan başına yuva yoğunluğu artmalıdır. 19 yılı kapsayan *Caretta caretta*'ların yuvalama davranışlarını incelendiğinde, isoclinics hatların birbirine yaklaştığı dönemlerinde birim alanda yuva yoğunluğunun arttığını ancak isoclinics hatların birbirinden uzaklaştığı dönemlerde ise birim alanda yuva yoğunluğunun azaldığını gösterilmiştir. (Şekil 1.6) [8].



Şekil 1.5 Deniz kaplumbağalarının manyetik haritalardan yararlanması halinde, yuvalama alanlarında ön görülen değişim, yeşil noktalar yuva alanları [8]

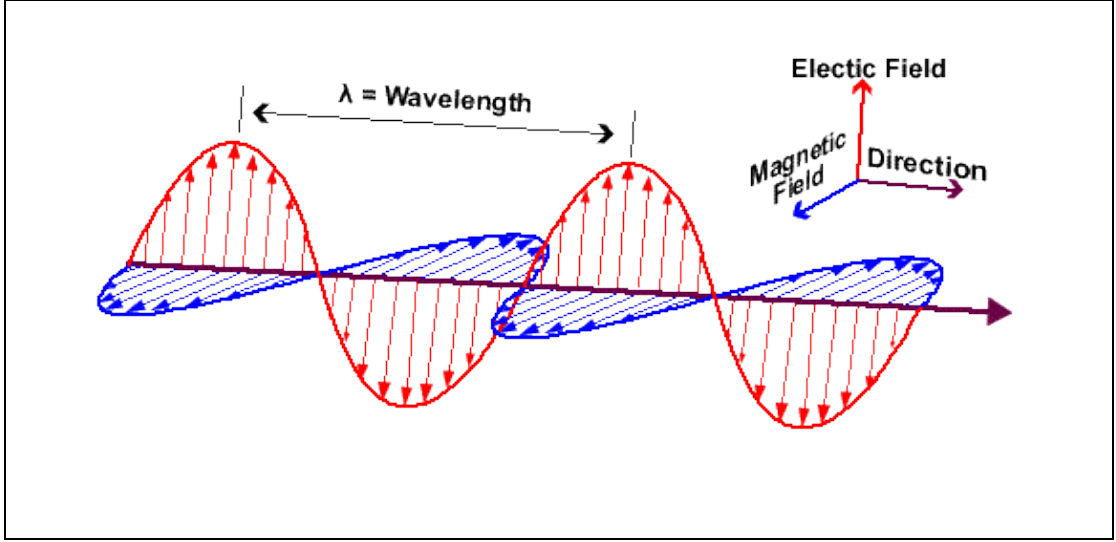


Şekil 1.6 Yeşil kaplumbağa yuvalarının birim alanda yoğunluğunda değişimler (isoclinis hatların birbirine yaklaşması (converging isolines) ve isoclinics hatların birbirinden uzaklaşması (diverging isolines) halinde) [8]

Uzun mesafe göçmen canlıları için, doğulan coğrafyada yuvalama üreme başarısı için önemlidir. Güncel çalışmalar, bu davranışta somon ve deniz kaplumbağalarının manyetik navigasyon ve manyetik haritadan yararlanabildiklerini işaret etmektedir. Canlılar evrimleştikleri çevrenin bir etmeni olan doğal manyetik alan parametrelerinden, üreme potansiyellerini artırmak üzere yararlanmaktadırlar.

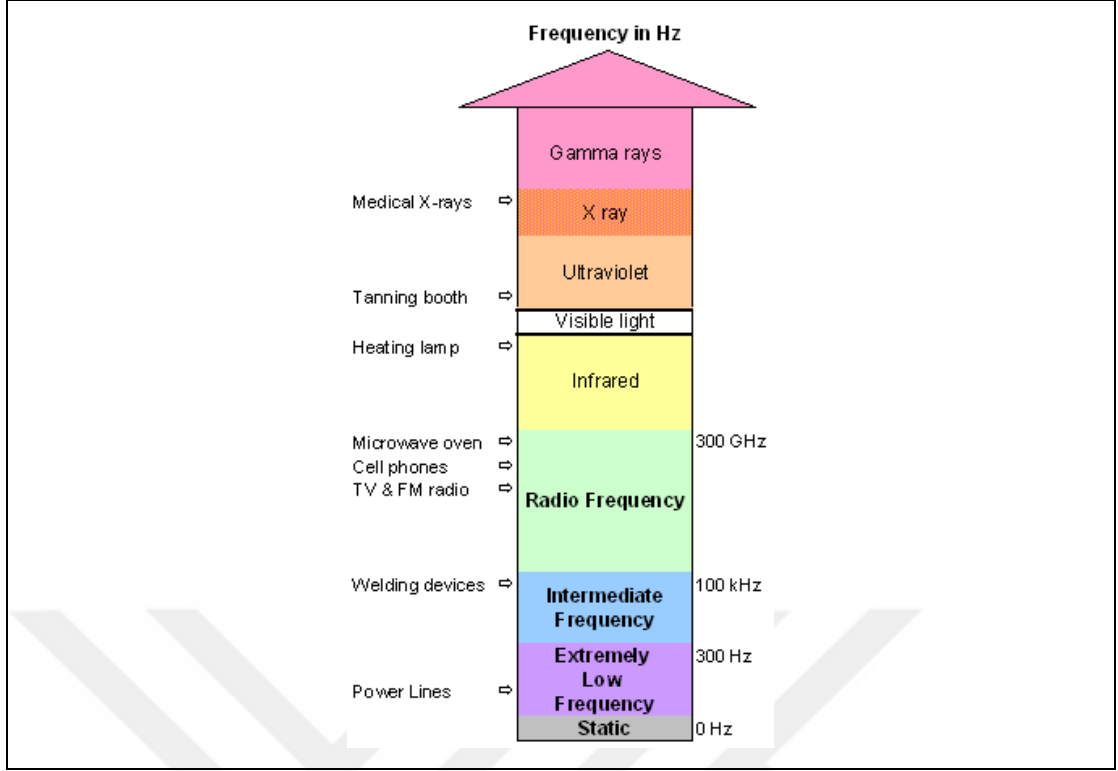
1.1.3 Manyetizma ve İnsan Sağlığı

Manyetik alanlar, daimî mıknatıslar (manyetik dipoller) veya iletken bir telde akan elektrik akımınca oluşturulmaktadır. Elektrik akımı sırasında oluşan alan, elektromanyetik alan (EMA) olarak adlandırılır. EMA, elektrik ve manyetik alan kuvvetlerin birleşimidir (Şekil 1.7) [9]. EMA, doğa olaylarının yanı sıra insan etkinlikleriyle (elektrikli cihazların kullanımı) de oluşabilmektedir.



Şekil 1.7 Elektrik akımı (mor renkli ok) sırasında oluşan iki boyutlu emga gösterilmektedir [13]

İnsan kaynaklı elektromanyetik alanların pek çoğu yönlerini özgün bir frekans ve zamanda değiştirmektedir. Elektromanyetik alanlar, frekanslarına göre üç grup içerisinde tanımlanmaktadır: Radyo Frekanslar (RF), İntermediate Frekanslar (IF) ve Ekstrem (Aşırı) Düşük Frekanslar (ELF) [9]. Günlük yaşamda RF ile mobil telefonlar (cep telefonları); IF ile bilgisayar ekranlarıyla ve ELF ile elektrik hatlarının varlığı ile karşılaşmaktayız. İnsan kaynaklı elektromanyetik alanların bazıları zaman içerisinde bir değişim göstermemektedir. Zaman içerisinde değişim göstermeyen manyetik alanlar, Statik (Durağan) Manyetik Alan (SMA) olarak adlandırılır. SMA'nın frekansı "0"dır. Günlük yaşamda SMA, sıklıkla tıbbi teşhis veya müdahalede aşamasında kullanılan Manyetik Rezonans Görüntüleme Sistemi (MRI) tarafından üretilmektedir. Şekil 1.8'da Günlük kullanımı olan sistem veya cihazların frekans değişimleri gösterilmektedir.



Şekil 1.8 Elektromanyetik alanların frekans değişimlerini göstermektedir [9]

1900'lü yıllardan başlayan ancak giderek artan miktarlarda insan kendi yaşam çevresinde kendi üretimine dayalı yapay kesintili veya sürekli manyetik alan odaklarının etkisinde bulunmaktadır. 1960'lı yıllarda, ilk mikrodalga elektromanyetik radyasyon üreticileri geliştirilmiştir. Bu adımın hemen ardından, mikrodalgaların dikkate değer biyolojik etkileri olduğu anlaşılmıştır. EMA'nın enerjisi, çoğu zaman dokularda ısınmaya yol açmayacak kadar düşük bulunmuştur. Ayrıca, EMA kaynaklı enerjinin kimyasal transformasyon enerjisi κT 'den iki kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir [10]. EMA ancak belirli frekanslarda biyolojik dokularda işlevsel olduğu anlaşılmıştır [10]. Sonuç olarak 1980'li yıllara gelindiğinde 10-100 Hz kadar düşük frekansların biyolojik etkinlikleri üzerine dikkate değer veri birikimi sağlanmıştır [10]. Bu oldukça önemli bir gelişmedir çünkü ilgili frekans aralığı, çoğu endüstriyel ve evsel elektrik aletlerinin faaliyetleri neticesinde üretilmektedir [10]. Tablo 1.1'de günlük yaşamda karşılaşılan EMA kaynakları, frekansları ve manyetik akı yoğunlukları örneklenmiştir.

Tablo 1.1 Ev ve kamusal alanlarda karşılaşılan ema kaynakları, ema frekansları ve manyetik akı yoğunlukları [14]

Alan Kaynakları	Frekans (Hz)	Manyetik Akı Yoğunluğu (B)
Ev ve Büro Alanları		
Geri Planda	50/60 Hz	0,04 μ T – 0,5 μ T
Evsel Cihazlar	50/60 Hz	1 metre yakınında 0,01- μ T – 0,5 μ T 0,3 metre yakınında 0,1 μ T -30 μ T
Sanayi Alanlarında		
Elektrolitik Proseslerde	0 veya 50/60 Hz	1-10 mT
Alimünyum Üretiminde	0 Hz	1-10mT/60 mT
Elektrik ve İndüksiyon Fırınlarında	1-10.000 Hz	1-50 mT
Baskı Makinalarında	0 veya 50/60 Hz	0,2-10 mT
Güvenik Sistemlerinde	1-10.000 Hz	1 mT'ya kadar
İşçilerin Etkilenme Ortalaması	50/60 Hz	1 μ T elektrikse, 0,17 μ T Elektriksel olmayan
Ulaşım		
Metro	50/60 Hz	0,7-1 mT
Sağlık Merkezleri		
MRI	0 Hz	0,5-2 mT Çalışan 2T Hasta
Tedavi Cihazları	12-75 Hz	1-10 mT

Manyetizma Biyolojisi (MB), insan faaliyetlerine bağlı EMA'ları öncelikle ekoloji problemi olarak ele almaktadır. Bu yaklaşımda, insan faaliyetleri sonucu oluşan EMA'lar çevresel kirlenici bir etmen olarak da değerlendirilmektedir. Böylece insan sağlığı ve EMA arasında ilişkinin epidemiyolojik ve patofizyolojik açıklamaları gerçekleştirilmektedir.

İnsan faaliyetlerine dayalı EMA'ların insan sağlığına olumsuz etkiye sahip bir çevresel kirlenici olabileceğine yönelik çeşitli veriler bulunmaktadır. Endüstriyal ÷lkelerden Almanya örneğinde psikotropik ilaç kullanımının sosyal ekonomik şartlar ve tedavi şartları ölçeğinde açıklanamayan ancak telekominikasyonda yaşanan teknolojik ilerlemelere paralel yükselişe sahip olduğu bildirilmiştir [11]. Ancak Uluslararası İyonize Edici Olmayan Rasyasyondan Korunma Komitesi'nin (ICNIRP) 1998 yılında belirlediği limitlerde RF tesirinde kalmanın insan sağlığını tehlike oluşturmadığı kabul edilmekle beraber, düşük seviyeli RF'lerin uzun vadede insan sağlığı üzerindeki etkisi araştırılmayı beklemektedir. Ayrıca düşük frekanslı ancak uzun süreli elektromanyetik alanların, tek başına veya diğer kimyasal ve fiziksel çevre kirlenicilerin beraberliğinde (benzen, dioksinler, pasif maruz kalınan sigara dumanı, formaldehit, kurşun, gürültü vb) kronik inflamasyon (yangı) ve nörotransmitter işlevleri üzerindeki olası etkisinin anlaşılması, detaylandırılmış çalışmaları beklemektedir [11]. Bu noktada MB, EMA'ların patolojiye yol açan hücre ve hücre altı yapılarla kurduğu etkileşimlerin anlaşılmasını ve de güvenli tesir altına kalma sınırlarını belirlemeyi çalışma konularına dahil etmektedir.

MB'nin EMA'lar ile insan sağlığı arasındaki etkileşimi belirlemesine yönelik ilgisi, ilk olarak epidemiyolojik araştırmalarla ortaya konmuştur. Bu alanda epidemiyolojik araştırmalar, 1979'da N. Wertheimer ve E. Leeper tarafından elektrik güç hatlarına yakınlıkla ocuk kanserleri (özellikle lösemi ve beyin tümörleri) arasındaki ilişkinin yayınlanmasıyla hızlanmıştır. Aynı dönemde C.D. Robinette, Kore Savaşı (1950'ler) gazileri arasında askeri radar eğitimi alanların yaşam sürelerinin daha kısa olduğuna dair bir araştırma yayınlamıştır. Bu ilk çalışmalara müteakip uzun süreli ve düşük/çok düşük seviyeli elektromanyetik alanı bir risk etmeni olarak değerlendiren çok sayıda destekleyici araştırma sonuçlarının yayınlanmasına rağmen çalışmalar arasında tutarsızlıklar giderilememiştir. Ancak 2000 yılında paralel yürütölen çalışmalarla 0,3 μ T ya da 0,4 μ T'den daha yüksek EMA şiddeti ile artan çocukluk lösemisi riski

arasındaki bağlantıyı çok az belirsizlik veya tutarsızlık değeriyle göstermiştir. Bu çalışmanın neticesinde Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) düşük seviyeli elektromanyetik alanı, grup 2B içerisine dahil etmiştir. Bu grupta, kurşun, DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane), kaynak dumanları ve karbon tetraklor gibi kimyasal etmenler yer almaktadır [11]. Mobil telefonlar ve diğer EMA kaynaklarının kısa ve uzun süreli etkileri konusunda, tartışmalar sürmektedir. Bu tartışmalar, EMA'nın olası etkileri hakkında uyumsuz sonuçlarının bulunması, hayvan deneklerinde etkinin tekrarlına bilirliliğin düşüklüğü ve patofizyolojik mekanizmalarının tam anlaşılması üzerinde toplanmaktadır. Ayrıca konunun ticari boyut taşınması, kamu ve özel sektör tarafından oluşturulan verilerde çatışmaya neden olabilmektedir [12].

SMA'lar ile günlük yaşamda çoğunlukla MRI cihazlarında karşılaşmaktayız. MRI faaliyeti sırasında hastalar 2 T – 8 T arası SMA tesirinde kalırken, MRI tekniker/teknisyenleri ise 0,2 - 0,5 mT SMA tesirinde kalmaktadır. ICNIRP, MRI cihaz sistemlerinde teknikerler/teknisyenler için güvenli kullanım veya güvenli tesir limitlerini tavsiye etmektedir. Hastalar için ise güvenli tesir limitleri belirlenemeyeceğinden, işlem öncesinde hastalar için fayda-zarar değerlendirilmesi yapılmasını tavsiye etmektedir.

1.1.4 Manyetizma Esaslı Yardımcı Tedaviler

Manyetizma esaslı tedavilerin (Magnetotherapy, MT), tarihsel olarak başlangıcını belirlemek mümkün değildir. Ancak, Yunan, Japon, Çin ve Avrupalı şifacıların manyetik özelliği olan madenleri tedavilerde kullandıkları bilinmektedir. Aydınlanma Çağı bilim insanlarından ve bir hekim olan W.Gilbert'in magnetit kayaçları ile tedavi uygulamıştır [15].

Modern manyetizma esaslı tedaviler, ikinci dünya savaşı sonrası Japonya'da başlamıştır. Avrupa'da modern MT'ler, ilk olarak Romanya ve Rusya'da başlamıştır. Bu tarihten günümüze değin MT'ler, esas tedaviye yardımcı tedaviler olarak değerlendirilmiştir. Bu tedavilerden özellikle kas-kemik (muskuloskeletal) hastalıklarında yararlanılmıştır. 1970'lerde bifazik düşük frekanslı sinyaller, kemik kırıklarında kullanılmıştır. Gecikmiş ve tek parçalı olamayan kemik hasarlarının tedavisinde MT'lerden yararlanılmasına yönelik FDA (ABD, Besin ve İlaç Dairesi) onayı geçerliliğini korumaktadır. Ayrıca FDA, 27.12 MHz atımlı elektromanyetik

alanların (PEMA)'ın yumuşak doku ağrı ve ödemlerinin giderilmesinde kullanımına onay vermiştir [15].

Manyetizma esaslı tedavi yöntemi, statik veya dinamik elektromanyetik alanların hissetmeye, görüntülemeye ve tedaviye yönelik kullanılmasını amaçlayan biyo-elektromanyetik teknolojilerin bir alt dalıdır. Etkili MT'lerin ancak disiplinler arası (fizik, mühendislik, biyoloji ve tıp) bir yaklaşımla geliştirilmesi mümkündür [16].

Manyetizma esaslı tedavi cihazları, genel olarak üç tip halinde bulunmaktadır: (a) selonid, (b) ikili burgu ve (c) düz matlar. Selonid sistemlerde, uzuv veya tüm beden EMA üreticisinin içerisine yerleştirilir. İkili burgu sistemlerinde, EMA üretici burgular uzvun her iki yanına yerleştirilir. Düz matlar ise evde kullanıma uygun, hastanın üzerine uzandığı sistemlerdir. MT uygulaması, hasarlı dokuyu hedefleyecek manyetik alan parametrelerin belirlenmesi ile başlar. Sonrasında bir dozimetre yardımıyla uyarım gerçekleştirilmektedir. Tedavi, manyetik alanın hasarlı doku içerisinde uzamsal dağılımının sonucu gerçekleşmektedir [15, 16].

Hasarlı dokuların manyetik uyarımı için genellikle beş farklı yaklaşım benimsenmiştir [15, 16]:

- Statik/Daimi Manyetik Alan: Çeşitli daimi mıknatıslar veya selenoid üzerinden geçen doğrusal akım kullanılarak oluşturmaktadır.
- Düşük Frekanslı Sinüs Dalgası: Akım hatlarında oluşturulan 60 Hz (Amerika ve Kanada) veya 50 Hz (Avrupa ve Asya) frekansından yararlanmaktadır.
- Atımlı Elektromanyetik Alan (PEMA): Atımlı elektromanyetik alan (PEMA), düşük frekanslı ancak özgün dalga biçimi ve amplitüdü olan manyetik uyarımlardır.
- Atımlı Radyo Frekans (PRF): 13.56, 27.12 ve 40.68 MHz frekanslar devamlı ve atımlı formlarda kullanılmaktadır.
- Transkraniyal Manyetik/Elektrik Uyarımı: Beyin dokusunun belirlenen bir bölgesinin 8 T'lık kısa manyetik atımla uyarılmasıdır.

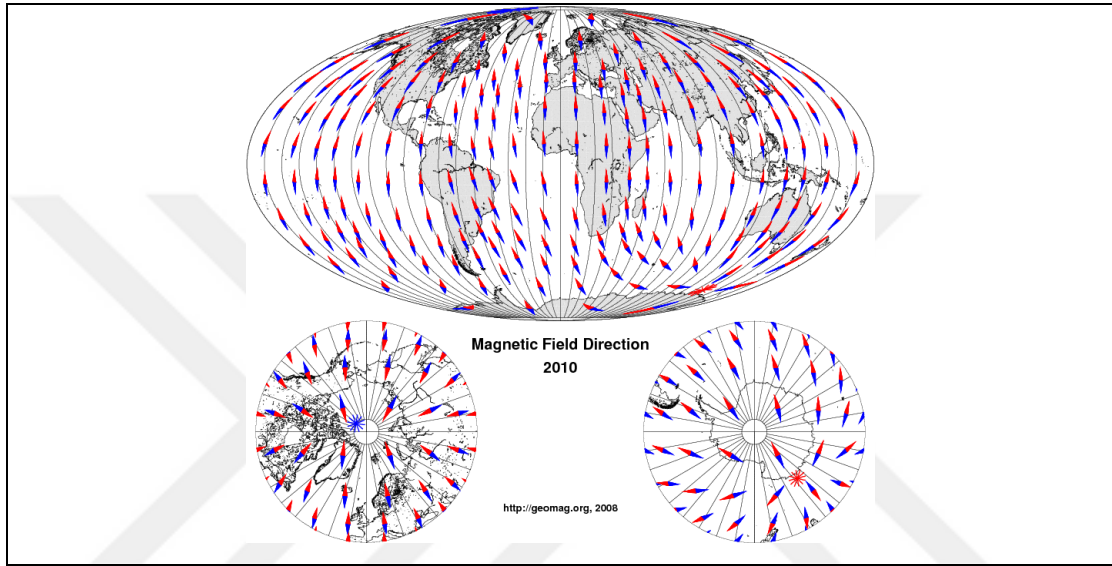
Manyetizma esaslı tedavilerin başarısında, hedef doku ve hücre grubu ile etkileşime geçebilecek doz aralığının tespit edilmesi oldukça önemlidir. Başarılı kabul edilen MT klinik uygulamaları aşağıda listesi verilen parametreleri sağlamaktadır [15, 16].

- Alanın tipi,
- Uyarımın şiddeti,
- Gradient (dB/dt),
- Vektör (dB/dx),
- Frekans,
- Bileşenler (elektrik veya manyetik),
- Lokasyon,
- Nüfuz Derinliği
- Uygulama Süresi
- SMA'dan yararlanıldığında ise zamana göre değişim olmadığından, gradient (dB/dt), frekans ve atım şekli gibi değişken parametreler kullanılmaz.

Sorrell ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, atımlı elektromanyetik alan (PEMA) üreten FDA onaylı bir sistemi, postoperatif süregelen bel ağrısı ve ayak ağrılarının giderilmesinde çift körlü, randomize, plasebo denetimli ve çok merkezli bir çalışmada değerlendirmiştir [17]. PEMA üreticisi sistem, 27.12 MHz frekansa sahip PEMA dalgaları üretmektedir. Bu çalışmada 42µs ve 38µs atımlar gerçekleştirilmiştir. Her bir atım, 1.000µs'de bir tekrar edilmiştir. Cihazda görev döngüsü %4,2 ve %3,8'dir. 5 cm mesafede cihazdan 591±44 V/m enerji yayılımı gerçekleşmektedir. Plasebo cihaz, görünüm olarak sistemle aynı ancak çalıştırıldığında PEMA üretmemektedir. Çalışma 60 gün ve günde 30 dakika iki tekrar ile sürdürülmüştür. ABD'de 13 ayrı merkezde 45 hastanın katılımı ile gerçekleştirilmiştir. Denek grubu, bel lumbar bölge ameliyatı sonrasında 3-36 ay arasında ağrı hisseden, ameliyat sonrasında 30 gün ve üzerinde ağrı kesici tedavisi gören ve ortalama ağrı yoğunluğu değerlendirmesinde 11 üzerinden 3 - 9 puan alan hastalardan seçilmiştir. Randomize çalışma, 42 µs veya 38 µs atım üreten cihazların veya plasebo cihazın kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda hastaların ağrı ölçüleri yeniden belirlenerek, çalışma başlangıcında belirlenen ağrı değerleriyle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, 42 µs PEMA kullanıldığında hastaların sırt ağrılarında %40 ve bel ağrılarında %45 azalma tespit edilmiştir [17].

1.1.5 Manyetizma ve Manyetik Malzemeler (Maddeler)

Manyetik alan, manyetizmanın bir temel kavramıdır. Uzayın bir birim hacminde bir alan oluştuğunda, o hacim kadar enerjide değişim ve de enerji gradienti nedeniyle üretilen kuvvet vardır [18]. Bu kuvvet, manyetik alan içerisinde hareket eden bir yüklü parçacığı hızlanması, bir manyetik dipolde (örneğin çubuk mıknatısta) meydana gelen tork (dönme hareketi), belli tip atomlarda elektronların dönüşündeki yeniden oryantasyon veya JMA içerisindeki pusula iğnesindeki bir yönelim olarak izlenir (Şekil 1.9).



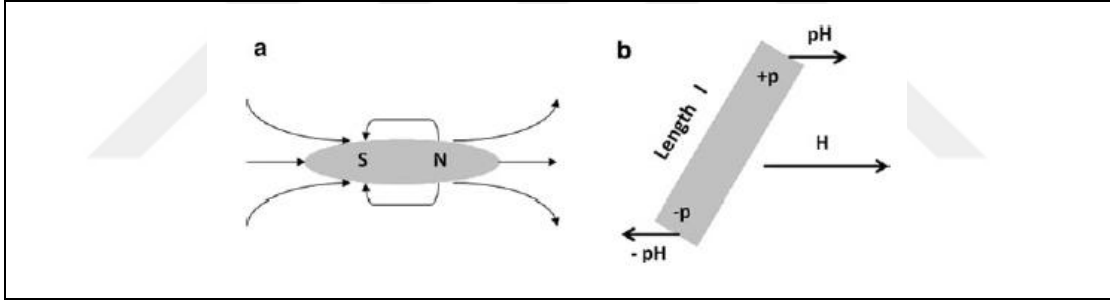
Şekil 1.9 JMA etkisinde pusula iğnelerinin yönelimi, mavi ve kırmızı zıt kutuplar [22]

Manyetizma, elektrostatikle taşıdığı benzerlikler üzerinden belirli bir mesafede (r) konumlu ve belirli güçlerdeki (p_1 ve p_2) iki kutup arasında oluşan etkileşim olarak tanımlanır [19]. Bu elektrikçe yüklü parçacıklar arasındaki Coulomb parçacıklar etkileşiminin bir analogisidir ve (1.1) eşitliğinde gösteriliği gibi ifade edilir [19]. (1.2) eşitliğinde F manyetik kutup üzerine etkileyen kuvvet ve μ_0 vakum ortamının geçirgenliğidir. Tamamlayıcı bir yaklaşımda, elektrik akımı veya diğer bir manyetik kutup tarafından üretilen bir manyetik alan, p gücündeki ilk kutba F kuvveti uygular. Bu (1.3) eşitliğinde olduğu gibi ifade edilir [19]. H_0 , p gücündeki kutba etkileyen manyetik alan şiddetidir.

$$F = \frac{p_1 p_2}{4\pi u_0 r^2} \quad (1.2)$$

$$F = pH_0 \quad (1.3)$$

Maxwell elektromanyetik teoremi, manyetik kutupların daima çiftler halinde oluştuğunu tanımlar. Bu nedenle bir mıknatıs, küçük parçalara ayrıldığında, her bir parça çift kutba sahip olur. Her bir parçaya ait kuzey ve güney manyetik kutuplar, birbirini çekerken, her bir kutup (1.3) eşitliğinde tanımlandığı şekli ile bir diğerine F kuvveti uygulamaktadır. (1.3) eşitliğinde, bir manyetik materyalin bir mıknatısın yakınına getirilmesi halinde, manyetik alanın manyetik materyali manyetize edeceğini vurgulanmaktadır. Sonuç olarak, manyetik alan bir manyetizasyon gücü olarak tanımlanır [19]. Manyetizasyon gücü ise şematik olarak kuvvet çizgileriyle gösterilir. Şekil 1.10 (a)'da kuvvet hatları şematize edilmektedir. Bu kuvvet çizgileri, çubuk mıknatısın kuzey kutbundan çıkar ve tekrar güney kutbundan mıknatısa ulaşacak şekilde hareket etmektedir. Bu nedenle belirli bir mesafe içerisinde ferromanyetik malzemeler, mıknatısa doğru çekilmektedir.



Şekil 1.10 (a) Manyetik alan kuvvet çizgileri ve (b) harici manyetik alanda tork [19]

Belirli bir uzunluğa (l) ve belirli güçte kutuplara ($+p$ ve $-p$) sahip bir çubuk mıknatıs, bir dış kaynaklı homojen manyetik alan içerisine yerleştirilirse; manyetik güç çifti, bir tork (dönme momenti) (L) meydana getirmektedir (Şekil 1.10 b) [19]. L Dönme momenti, (1.4)1.4) eşitliğinde olduğu gibi ifade edilir. θ Açısı, uygulanan H manyetik alanın yönü ile çubuk mıknatısın M manyetizasyon yönü arasındaki açıdır. Bu durumda pl ürünü, çubuğun M manyetizasyonudur. Bu dönme momenti, sürtünmenin olmadığı koşullarda potansiyel enerjiyi (U) yükseltmektedir [19]. Bu (1.5) eşitliğinde açıklanmaktadır. Bir manyetik malzemenin, manyetizasyon gücü doğrultusunda dizilmesi, potansiyel enerjisini "0" a eşitlemesine yardım etmektedir.

$$L = -pl\vec{H}\sin\theta \quad (1.4)$$

$$U = -MH\cos\theta \quad (1.5)$$

l Uzunluğunda bir çubuk mıknatısın boyu, sıfıra yaklaştırılır ve p manyetik kutup gücü aynı anda sonsuz kılınırsa, sistem manyetik dipol olarak isimlendirilir. Manyetik dipol'ün, m manyetik momenti (1.6) eşitliğinde olduğu gibi ifade edilmektedir [19]. Bu durumda M manyetizasyon, dV birim hacim başına m Manyetik Dipol Momentidir.

$$m = \vec{M}dV \quad (1.6)$$

Manyetik Alan Kuvveti ve Manyetik Akı Yoğunluğu, malzemenin manyetik özelliklerini tanımlamak için kullanılan iki ayrı niceliktir. Manyetik Alan Kuvveti, Manyetik Alan Gücü veya Manyetizasyon Kuvveti olarak da adlandırılır ve H ile sembolize edilmektedir. Cgs birim sistemi içerisinde, manyetik alan şiddeti (H), oesterds (Oe) ile ifade edilir ve 1 Oe, bir kutbun 1 cm birimin ürettiği alan gücüdür. H, büyüklükle beraber yöne sahiptir. Bu nedenle \vec{H} , manyetik alan kuvvet vektörleri ve çizgileriyle şematize edilir [19].

Kuvvet çizgilerinin herhangi bir nokta da yoğunluğu, manyetik akı (ϕ) ve alan birim başına akı ise manyetik akı yoğunluğu (densite) B veya vektör biçimi \vec{B} olarak tanımlanır. B cgs sisteminde Gauss (Gs) ve mks sisteminde tesla (T) olarak birimlendirilir [19]. Gauss ve Tesla birimleri arasındaki ilişki (1.8) eşitliğinde gösterilmektedir. Manyetik Akı Yoğunluğu, (1.7) eşitliğinde gösterildiği şekilde ifade edilir. $B - H = 4\pi M$ niceliği, manyetik doyumluk değerini sağlar. 4π Faktörü, kürenin alanıdır ve (1.7) eşitliğinde varlığı, kutbu çevrelen birim çaplı bir kürenin yüzeyi üzerinde bir birim kutup tarafından neden olunan bir birim manyetik alana atfedilir [19].

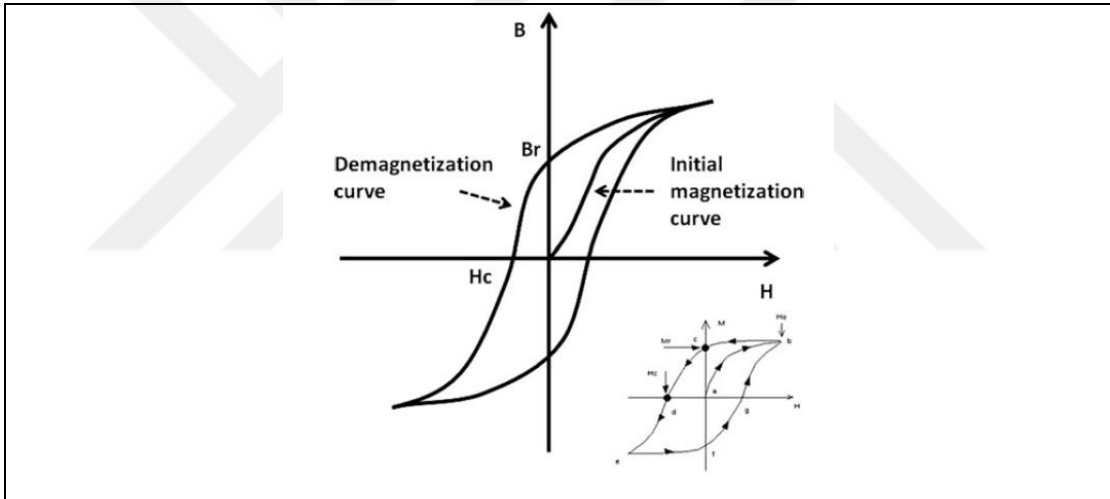
$$B = H + 4\pi M \quad (1.7)$$

$$1 \times 10^3 \text{ miliTesla (mT)} = 1 \text{ Tesla (T)} = 1 \times 10^4 \text{ Gauss (Gs)} \quad (1.8)$$

Manyetik Duyarlılık (Hassasiyet) (X), bir malzemenin manyetik yanıtını tanımlar. Bu (1.9) eşitliğindeki gibi ifade edilir. M manyetizasyonu ve H_0 içinde bulunan manyetik alan kuvvetini tanımlar [19].

$$M = XH_0 \quad (1.9)$$

Bir B-H hysteresis (eğri), koordinat sisteminde x ve y eksenlerine manyetik akı yoğunluğuna (B) karşılık manyetik alan kuvveti (H) yerleştirildiğinde elde edilmektedir [19]. Aynı şekilde M-H eğrisi de koordinat sisteminde x ve y eksenlerine manyetizasyon'a (M) karşılık manyetik alan kuvveti (H) yerleştirildiğinde elde edilmektedir. Her iki durumda da, H sıfırdan en üst limite çıkarılır ve sonra en üst limitten sıfıra düşürüldüğünde birbirleriyle aynı eğri elde edilememektedir (Şekil 1.11). Bunun anlamı malzeme (madde), manyetik akı yoğunluğunun B olduğu yerde manyetik hafıza kazanmıştır ve başlangıç eğriyi bu nedenle takip etmemektedir. Eğer hysteresis eğrisi orijin etrafında simetrikse ve malzeme (madde) doygunluğa kadar manyetize edilmişse, B değerinin sıfır olmasına karşılık Hc manyetik gücü, coercivity olarak tanımlanmaktadır. Diğer yönden Hc manyetik gücünün sıfır olduğu noktaya karşılık akı yoğunluğu Br, retentivite olarak bilinmektedir. Her iki değerde, maddenin manyetik özelliğini belirlemektedir [19].



Şekil 1.11 Hysteresis eğrisi [19]

B-H hysteresis'inden elde edebildiğimiz diğer bilgi, Manyetik Permeabilite (μ)'dir. Manyetik Permeabilite, B/H oranı olarak da bilinir. Manyetik permeabilite, dış kaynaklı manyetik alanda malzemenin varlığı ile manyetik akı'da göreceli artıştır. Manyetik Akı Yoğunluğu (B), Manyetik Alan Kuvveti (H) ve Manyetizasyon (M) arasındaki ilişkinin, (1.10) eşitliğindeki gibide ifade edilmesi mümkündür [20].

$$B = \mu_0(H + M) \quad (1.10)$$

(1.10) Eşitliğinde M manyetizasyon ve H manyetik alan kuvveti arasında (oda sıcaklığında) doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Bu nedenle X değeri malzemenin (maddenin) manyetik sınıflarını belirler [20]. Dört farklı manyetik özellik sınıfları: diyamanyetik, paramanyetik, ferromanyetik ve antiferromanyetik olarak bilinir. En sık karşılaşılan manyetik özelliklerine göre materyaller, diyamanyetikler ve paramanyetiklerdir. Doğada elementlerin oda sıcaklığında sahip oldukları manyetik özellikleri, Şekil 1.12’de periyodik cetvel üzerinde gösterilmiştir. Diyamanyetikler ve paramanyetikler, manyetik olmayan malzemeler (maddeler) olarak sınıflandırılırken; ferromanyetikler esas manyetik malzemeler (maddeler) olarak değerlendirilmektedir. Saf elementlerde gözlenen diğer tip manyetizm, antiferromanyetizmdir. Son olarak doğada saf halde bulunmayan ancak ferrit olarak bilinen oksit alaşımları, ferromanyetik olarak kabul edilmektedir.

1 H		Ferromagnetic																Antiferromagnetic		2 He			
		Paramagnetic																Diamagnetic					
3 Li	4 Be																	5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
11 Na	12 Mg																	13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr						
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe						
55 Cs	56 Ba	57 La	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn						
87 Fr	88 Ra	89 Ac																					
			58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu							

Şekil 1.12 Periyodik tablo elementlerin manyetik özelliklerinin gösterimi [21]

Bir diyamanyetik malzemede, manyetik alan uygulanmadığı sürece atomların açık bir manyetik momenti yoktur [21]. Belirli manyetik alan kuvveti (H) altında dönmekte olan elektronlar yalpalır ve bir çeşit elektrik akımı olan bu hareket, uygulanan manyetik alana zıt yönde manyetizasyon (M) meydana getirmektedir [21]. Tüm malzemelerde diyamanyetik özellik olmakla beraber, bu paramanyetik ve ferromanyetik özelliklerce maskelenmesi mümkündür. Diyamanyetik malzemelerde manyetik duyarlılık X değeri, sıcaklığa bağlı değildir [21].

Malzemelerin belirli tiplerinde geçerli paramanyetizma teorileri bulunmaktadır. Çiftleşmemiş elektronlara sahip malzemeler için geçerli olan Langevin modelinde, termal uyarım nedeniyle oryantasyonları rastlantısal olan atomlarının belirli manyetik momentleri bulunmaktadır [21]. Bu malzemeler bir manyetik alan tesirine bırakıldığında, manyetik alan manyetik momentlere bir dizilim düzeni kazandırır ancak manyetizasyon manyetik alan doğrultusunda ve düşüktür. Sıcaklık artırıldığında, termal uyarım artar ve manyetik momentleri bir dizilim düzeninde tutmak mümkün olmaz. Böylece manyetizasyon tekrar azalır. Bu davranış, Curie yasası olarak bilinir.

Diyamanyetik ve paramanyetik malzemelerde (maddelerde), manyetizasyon yalnızca bir manyetik alan etkisinde oluşur. Bu etki kaldırıldığında ise kaybolur. Bu materyallerin manyetik akı yoğunluğu (1.11) eşitliğiyle açıklanabilir [20, 21]. M manyetizasyonu, manyetik alan dışında “0” olduğundan denkleme dahil edilmemektedir.

$$\vec{B} = \mu \vec{H} \quad (1.11)$$

Bu durumda materyalin manyetik permeabilitesi, $\mu \equiv \mu_0 (1 + X)$ haline gelmektedir [20], [21]. Bu nedenle paramanyetik malzemelerin (maddelerin) permeabilitesi $\mu > \mu_0$ iken diyamanyetik malzemelerin (maddelerin) permeabilitesi $\mu < \mu_0$ haline gelmektedir. Ancak diyamanyetik ve paramanyetik etki genelde zayıf etkidir ve tipik olarak $|X| \ll 1$ olup manyetizasyonun toplam alan üzerindeki etkisinin düşük olduğunu vurgulamaktadır [20, 21].

Ferromanyetizma, yalnızca atomlar bir örgü içerisinde ve atomik manyetik momentler birbirine paralel dizildiğinde meydana gelmektedir [20]. Bu etki, ferromanyetik materyal içerisinde bir moleküler alan varlığı ile açıklanmaktadır. Klasik fizikte Weiss 1907’de bu alanın, malzemeyi doyana kadar manyetize etmeye yeterli olduğu belirtmiştir. Kuantum mekaniğinde Heisenberg modeli ferromanyetizmayı, paralel dizilmiş manyetik momentleri, komşu momentler arasında bir değişim etkileşimi olarak açıklamıştır. Ferromanyetik malzemeler ısıtılırken, atomik manyetik momentlerin dizilişi bozulur ve bu nedenle doygun manyetizasyon kaybedilir. Isı enerjisi nedeniyle öyle bir noktaya ulaşılır ki materyal paramanyetik hale gelmektedir.

Periyodik tabloda oda sıcaklığında antiferromanyetizma gösteren tek element kromdur. Antiferromanyetik materyaller, ferromanyetik materyallere benzerler ancak komşu

atomlar arası değişim etkileşimi atomik momentleri anti paralel dizilmesine neden olmaktadır [21]. Bu nedenle manyetik alan kesildiğinde bu materyaller paramanyetik olarak davranmaktadır.

Ferrimanyetizma karmaşık kristal yapıları olan birleşiklerde gözlenmektedir. Kristal bölgelerin kiminde değişim etkileşimleri atomları paralel dizerken bazı kesimlerinde anti paralel dizmektedir. Materyal manyetik domeinlere parçalandığında, elde edilen kısım saturasyonu düşük olsa da ferromanyetik gibi davranır [21].

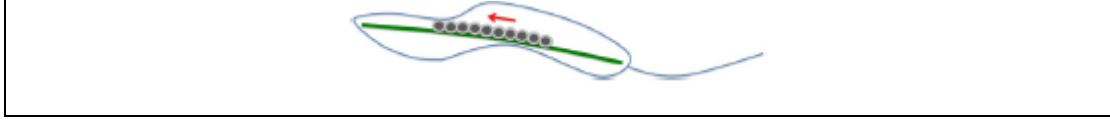
1.1.6 Manyetizmanın Biyolojik Sistemlerle Etkileşim Mekanizması

Manyetik alanların biyolojik sistemlerle kurduğu ilişkinin mekanizması, insan faaliyetleri neticesinde oluşan manyetik alanların insan sağlığına etkisi (1.1.3 Manyetizma ve İnsan Sağlığı), manyetik alanların çeşitli hastalıklarda yardımcı tedavi olarak kullanılabilirliği (1.1.4 Manyetizma Esaslı Yardımcı Tedaviler), 1970'lerde Manyetik Rezonans Görüntüleme Sistemlerinin (MRI) kullanıma girmesi ve MRI cihaz güçlerinin sürekli artması (0,4 T'dan 8 T) nedeniyle oldukça ilgi çekici bir alandır. Statik manyetik alan (SMA), homojen bir fiziksel alandır [23]. Elektromanyetik alan akı yoğunluğunda olan, konuma, zamana ve manyetik alan kuvvet hatlarının yönüne göre bir değişim izlenmez. Ayrıca SMA tesirinde, elektromanyetik alanların biyolojik sistemlerin (bir kuşun veya köpekbalığının) elektromanyetik alan içerisinde hareket etmeleri halinde oluşturduğu elektrik akımı gözlenmemektedir [23].

SMA tesirinin, biyolojik sistemlerde tetiklediği etkilerin daha kolay izlenebilmesi için sınıflandırmıştır [23]. Buna göre, zayıf (<1mT), orta (1 mT- 1 T), güçlü (1 T-5 T) ve çok güçlü (>5 T) SMA grupları bulunmaktadır. Örneğin JMA, zayıf bir SMA olarak kabul edilir. Pek çok canlıda, JMA hassasiyeti uzamsal oryantasyonun ve navigasyonun sağlanabilmesi için gerekliliktir. (1.1.2 Doğulan Coğrafyada Yuvalama Davranışı (Natal Homing)) Canlılar, zayıf JMA alanı üç temel mekanizma ile duyumsanarak bir davranış haline dönüşmektedir:

- Magnetit Kristal Esaslı Manyetizma Reseptörleri: Canlılarda JMA ile ilişkisi ve yapısı tespit edilen ilk manyetizma reseptör çeşididir [24, 25, 26 ve 27]. Magnetit, kimyasal olarak demir çekirdeğinden oluşur ve kimyasal formülü Fe_2O_3 'tür. Bu reseptörler, genetik kontrollün sağlandığı organik matriks yönlendirmeli biyo-mineralleşmeyle üretilmektedir. Magnetit, ferromanyetik bir malzemedir. Manyetik

yönelim gösteren, Alpha, Delta, Gama proteobacteria ve Nitrospire şubesine ait bakterilerde, bir magnetit kristali 35 – 120 nm çapında olabilmektedir. Bu yapılar, membranla çevrili magnetozomlar içerisinde yaklaşık 20 adet kristal içerecek şekilde hücre boyunca düzenlenmektedir (Şekil 1.13). JMA, bu kristaller üzerinde tork meydana getirmektedir. Bu da bakterilerin süzülme yönlerine etkimektedir.

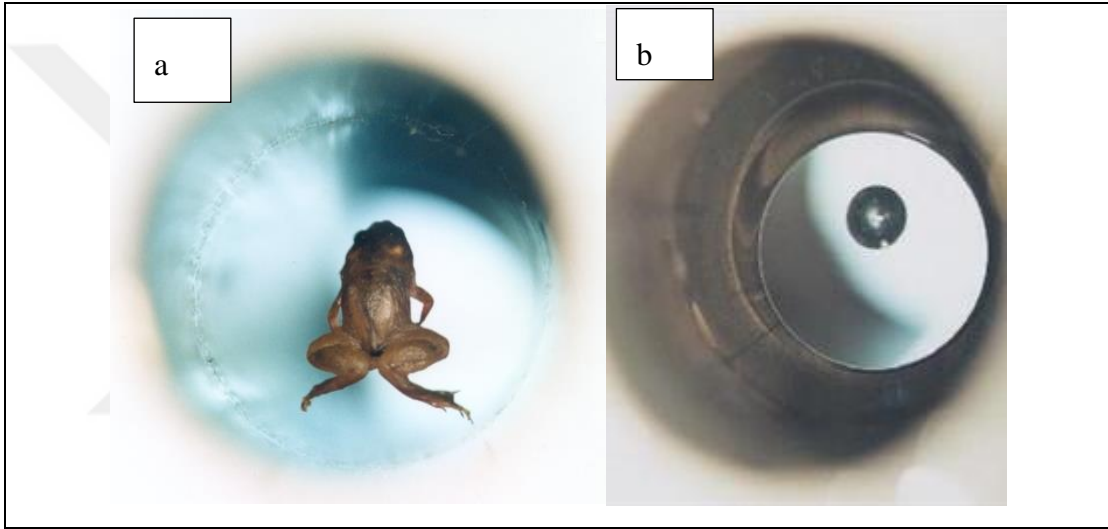


Şekil 1.13 Magnetotaktik bakteride magnetit kristallerin hücre boyunca dizilimi [25]

- Bir Radikal Çifti Esaslı Avian Manyetizma Reseptörleri: Bu duyu sistemi, kuşların gözlerinde bulunmaktadır. Ayrıca ışık bağımlıdır. Kuşlar ancak belirli dalga boylarında ışık varlığında, jeomanyetik alanı hissetmektedir. Yapılan araştırmalar, kuşlarda manyetik oryantasyonun özellikle mavi ışıkta kazanıldığını göstermiştir. Ayrıca kuşlara ait manyetizma reseptörü manyetik meyil (I) odaklıdır. Diğer ifadeyle manyetik polarite değil ancak manyetik meyil ve güç odaklıdır. Bir radikal çifti, genellikle çiftleşmemiş elektrona sahip bir çift moleküldür. Bir radikal çifti oluşması halinde, sistemdeki iki çiftleşmemiş elektronun spinleri karışır. Bu elektronlar singlet veya triplet durumunda bulunabilmektedir. Bu aşamada harici manyetik alan elektronların röletif oryantasyonlarına etkimektedir. Kuşlarda, ratinal Cryptochrome'u (Cryp), radikal çiftlerinin oluştuğu molekül olarak önerilmektedir. Cryp.'lar flavin adenin dinükleotid'lere (FAD) bağlıdır. Işık varlığında, Cryp. fotoredüksiyona uğrayarak flavin ile kendisinin yapısında bulunan tirozin amino asit bakiyeleri arasında radikal çiftin oluşmasına neden olur. Bu durum, Crp.'un içerisinde bulunduğu göz fotoreseptörlerinin uyarılmasına neden olarak duyuyu meydana getirmektedir [28].

- Elektromanyetik İndüksiyon Esaslı Manyetizma Reseptörü: Köpek balıkları ve diğer kıkırdaklı balıklar, Loranzi ampul'ü olarak adlandırılan bir organa sahiptir [27]. Bu yapılar, çevrede oluşan doğrusal akımı algılamaktadır. Bu yapılar, köpek balıklarının JMA varlığını hissetmesine de neden olmaktadır. Bu duyuyu, bir iletkenin, manyetik alana anti paralel hareket etmesi ve sonucunda yüklerin iletken üzerinde manyetik alana zıt yönde hareket etmesini andıran bir mekanizmayla oluşmaktadır. Sonuç olarak manyetik alan varlığında iletken üzerinde voltaj oluşmaktadır. Bu etki, Hall etkisi olarak bilinir.

Statik manyetik alanın, diğeryönden hücre üzerindeki etkisi, membran moleküllerinin yapısının bir fiziksel özelliğı ile ilişkilidir [23]. Bu özellik “diyamanyetik anizotropi”dir. Diyamanyetizm, materyalin manyetik moment taşımasıdır. (1.1.5 Manyetizma ve Manyetik Malzemeler (Maddeler)) Diyamanyetik materyaller, güçlü manyetik alan tarafından itilir. Diyamanyetik atomlarda toplam manyetik moment “sıfır” olmaktadır ancak güçlü bir manyetik alan bunu önleyerek manyetik momentlerin manyetik alana ters düzende konumlanmasına neden olmaktadır. Şekil 1.14’de Diyamanyetik bir malzeme olan küçük bir kurbağanın ve su damlasının, 16 T manyetik alanı tarafından itilmesi ve yerçekimince dengeye ulaşınca kadar yükselerek (levitasyon) askıda kalması görülmektedir.



Şekil 1.14 Diyamanyetik levitasyon (a) küçük kurbağa, 16 T sma ve (b) su damlası 16 T sma [30]

Manyetik moment (m) ve manyetik alan kuvveti (H) arasındaki ilişki manyetizasyon hassasiyeti (X) kavramı ile açıklanmaktadır. X , diyamanyetik malzemeler için negatif bir değerdir. (1.1.5 Manyetizma ve Manyetik Malzemeler (Maddeler)). Diğerybir ifadeyle, diyamanyetik atomların oluşturduğu bir molekül veya malzemede, moleküler eksenlere karşılık gelen vektörler, X 'i belirlemektedir. Dış kaynaklı homojen bir alan varlığında, küresel olmayan molekül asimetric vektörlere kazanmakta ve tork (dönme) hareketi ile en az negatif hassasiyet kazanacağı konumu seçmektedir. Bu konum manyetik alana paralel konumlanmadır. Bir silindirik molekül için diyamanyetik anizotropi (Δ_X), eksene (X_a) ve çapa (X_r) ait vektörlerden kaynaklanmaktadır. (1.12) Eşitliğı diyamanyetik anizotropiyi açıklar [23].

$$\Delta_x = X_a - X_r \quad (1.12)$$

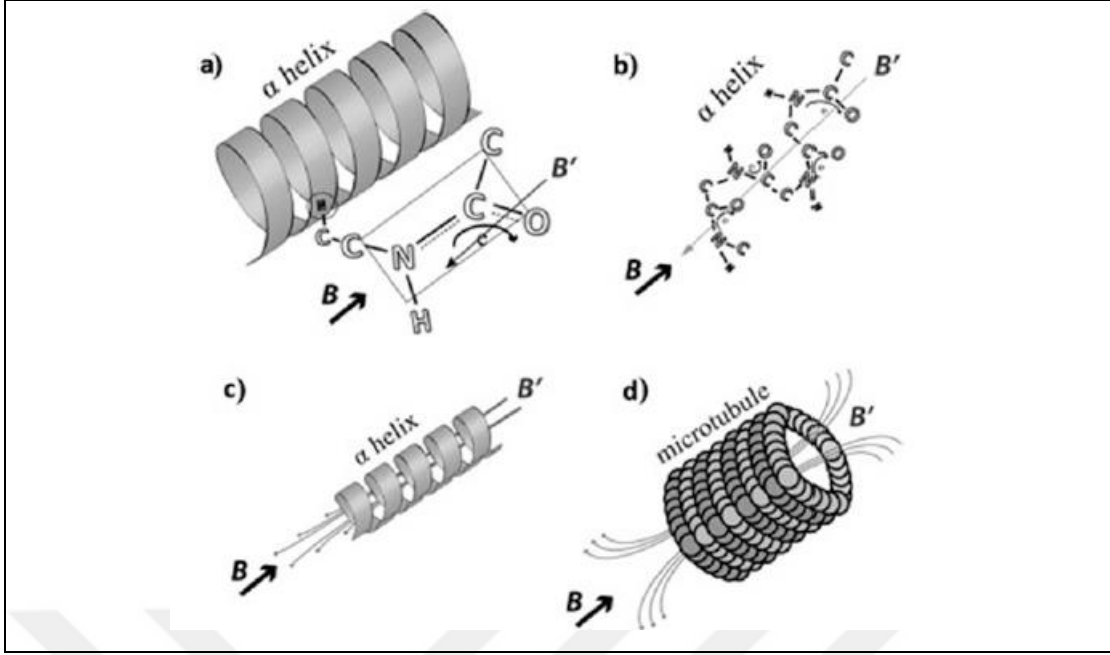
Diyamanyetik molekül, manyetik alan içerisinde dönerek minimum serbest enerji durumunda kararlı oryantasyon kazanmaktadır. Bir V hacimde ve eksen simetrisi olan silindirik diyamanyetik anizotropik bir molekül, H şiddetinde manyetik alana bırakıldığında kazandığı “manyetik enerji (E_M)”, (1.13) eşitliğiyle ifade edilir. \emptyset açısı, dış manyetik alan ile simetri eksini arasında ki açıdır [23].

$$E_M = -\frac{1}{2} H^2 V (X_r + \Delta_x \cos^2 \emptyset) \quad (1.13)$$

Bir manyetik alan içerisindeki moleküler oryantasyon, termal enerjinin rastlantısal etkileri ile çatışmaktadır. Bunun sonucunda, oryantasyon veya oryantasyon derecesi (β), manyetik ve termal enerji arasındaki orana bağlıdır. Bu durum (1.14) (1.14) eşitliğiyle ifade edilmektedir [23]. Bu eşitlikte, K_B Boltzmann Sabiti ve T ise sıcaklıktır.

$$\beta = \frac{E_M}{K_B T} \quad (1.14)$$

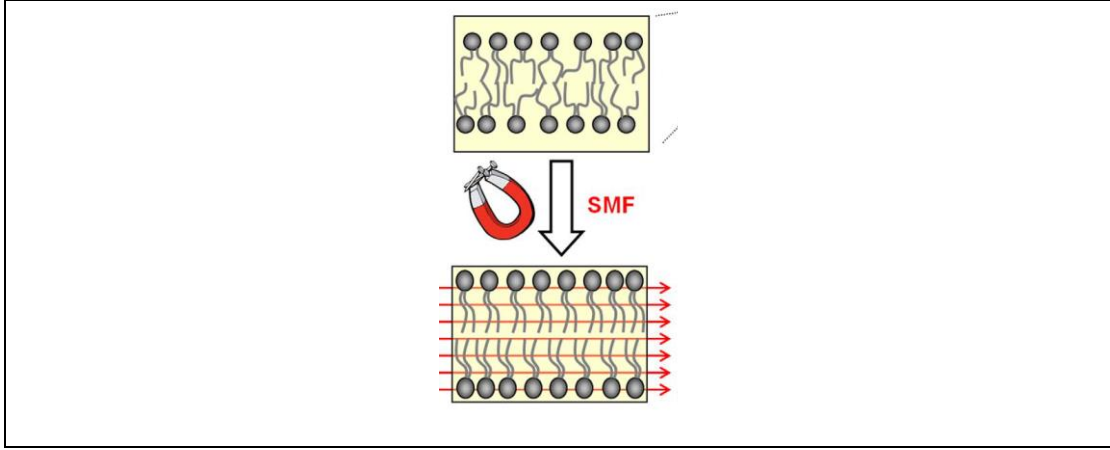
Bu nedenle zayıf diyamanyetik malzeme veya molekül dahi oryantasyon kazanma eğiliminde olacaktır [23]. Pepdit ve polipeptidler, α heliks yapı kuran planar peptid bağlarından dolayı diyamanyetik anizotropi gösterirler (Şekil 1.15 (a), (b) ve (c)). Büyük polipeptid kurulumları olan mikrotübüller, dimer alt birimlerden oluşmaktadır. Her bir dimer, zayıf anizotropik dahi olsa α heliks şeklinde mikrotübüllü oluşturduklarında diyamanyetik anizotropi birkaç kat artmaktadır (Şekil 1.15 (d)) [23].



Şekil 1.15 Mikrotübülün diyamanyetik anizotropisi ((a) polipeptit α helikslerinde yar alan planar peptid bağlar anizotropi oluşturması, (b) ve (c) heliks yapılarının oluşturulan manyetik vektörler izlenmesi, (d) peptid bağların α heliks içerisinde paralel olması ve mikrotübülün içerdiği halkasal yapının anizotropiyi artırması) [27]

Orta şiddetli bir manyetik alan tesirinde oryantasyon, yüksek anizotropi gösteren tek moleküllerde dahi küçük olmaktadır. Ancak moleküller birbirine paralel dizildiğinde ve işlev birlikteliği kurduğunda, diyamanyetik anizotropik etki, N sayıda molekül kadar artmaktadır [23].

Manyetik alan içinde enerjistik oryantasyon, çok sayıda paralel molekülden kurulan yapıları desteklemektedir. Lipidlerin diyamanyetik anizotropisi çoğunlukla açıl zincirlerden kaynaklanmaktadır. Yine yüksek düzenlilikte çift katmanlı lipid membranlar, dikkate değer anizotropik özellik göstermektedir. Manyetik alan tesirinde çift katmanlı fosfolipid membranlarda yeniden oryantasyon, β değeri ile hareketi güçleştiren moleküler arası etkileşimlerin dengesi sonucu oluşmaktadır (Şekil 1.16) [23]. Sonuç olarak SMA tesirinde çift katman fosfolipid membranların oryantasyonu, membranın akışkanlığı tarafından desteklenmektedir. Ayrıca biyolojik membranların içerdiği farklı tipte fosfolipidler ve yağ asitleri, bu etkiyi desteklemektedir. Bu nedenle de SMA tesirinde membranların, permeabilitesi artmaktadır [23].



Şekil 1.16 SMA'nın çift tabaka membran fosfolipidleri üzerindeki etkisi [31]

Manyetik alan içerisinde diyamanyetik yapıların yeniden düzenlenmesi, oldukça yavaş bir süreçtir [23]. Bu yeniden oryantasyon, diyamanyetik yapıların geometrisi, anizotropisi, manyetik alanın kuvveti ve süspansiyon ortamının akışkanlığı ile ilişkilidir. Dengeli bir sıcaklıkta, diyamanyetik yapıların geometrisi, anizotropisi ve ortamın akışkanlığı sabit değer haline gelecektir. Bu durumda oryantasyon H manyetik alan kuvveti ve t zaman değişken parametreleriyle doğrusal olacaktır. Ancak bu doğrusallık hücre membranı ile ilişkili hücre iskeleti ile bozulmaktadır. Böylece, SMA tesirinde yüksek diyamanyetik anizotropi gösteren membran yavaş bir sürede yeniden oryantasyon kazanacaktır [23].

Birkaç protein alt ünitesinden kurulu iyon kanalları, SMA tesirinden en az seviyede etkilenir. Ancak, diyamanyetik membran içerisinde gömülü olmaları uzun bir sürede onların da deforme olmalarına neden olur. Bu yaklaşım, orta şiddetli SMA tesirinde izlenmekte olan Ca^{++} 'un veya Na^{+} 'un hücre içerisinde naklindeki değişimi açıklamaktadır [23].

Statik manyetik alanın biyolojik sistem üzerinde etkisine yönelik önerilen diğer bir önerilen mekanizma, kısa ömürlü serbest radikal ara ürünlerdir. Serbest radikaller, eşlenmemiş elektronlar içerdiğinden paramanyetik özellik göstermektedirler. Serbest radikaller, oldukça reaktif ancak kısa ömürlüdür. SMA, serbest radikallerin oluşturduğu ürünlere etkimez ancak ürünlerin oluşum olasılığını artırmaktadır [23, 29]. Ayrıca SMA'nın serbest radikallerin oluşumunu veya birikimini çeşitli çalışmalarda artırdığı rapor edilmektedir. SMA tesirinde serbest radikallerin oluşumu veya birikimin,

SMA'nın antioksidan mekanizmalarına müdahalesi (örneğin SOD aktivitesinin baskılması) neticesinde gerçekleştiğine deneysel veriler mevcuttur.

1.1.7 Manyetik Alan Parametrelerine Bağlı Değişken Biyolojik Etkiler

Manyetizma biyolojisi kapsamında gerçekleştirilen in vitro çalışmalar, farklı tip ve parametrelere sahip manyetik alanlar içerisinde gerçekleştirilmektedir. Temel olarak, manyetik alanın hangi yöntemle üretildiğinin önemi yoktur. Bu amaçla daimi mıknatısların, hava veya demir çekirdekli elektrik burguların veya selonoidlerin ve süperiletken burguların kullanılması mümkündür [18].

Bir manyetik alanda bulunan biyolojik sistemde gözlenen değişim veya tepki, manyetik alanın parametrelerine göre ortaya çıkmaktadır [18, 27]. En belirleyici parametreler, manyetik alanın tipi (homojen veya dinamik oluşu), manyetik alan kuvvetleri (H manyetik alan kuvveti veya B manyetik akı yoğunluğu), dinamik manyetik alanların frekansı, manyetik alanların yönleri (JMA alan ile aynı veya zıt yönlü) ve manyetik alan tesirinde kalış süresidir.

Statik (durağan) veya dinamik manyetik alan grubu mevcuttur [18, 27]. Statik manyetik alanlar, homojen manyetik alanlar olarak da tanımlanmaktadır. Dinamik manyetik alanlar, frekanslarına göre çeşitlenme göstermektedir. Yine manyetik alanları kuvvetlerine göre çok zayıf, zayıf, orta, güçlü ve çok güçlü olarak gruplandırmak mümkündür. Manyetik alanlar değişimlerine göre de inhomojen (konuma göre manyetik akı yoğunluğunun değişmesi), rotaring (zamana bağlı yön değişimi) ve oscillating (zamana bağlı olarak manyetik akı yoğunluğunun değişmesi) olarak gruplandırılmaktadır.

Statik (durağan) manyetik alanın (SMA) kuvveti ve yönü zaman içerisinde değişim göstermemektedir. Ancak dinamik manyetik alanın, zaman içerisinde kuvveti ve yönü değişim gösterir. Atımlı elektromanyetik alanlar (PEMA), örneğin 50 Hz veya 60 Hz frekanslı alternatif akım manyetik alanları ve radyo frekans manyetik alanlar (RF) en sık rastlanan dinamik manyetik alanlardır.

Güncel araştırmalar, hücrelerin manyetik alanların farklı tiplerine ve şiddetlerine değişen tepkiler verdiklerini göstermektedir. Örneğin, bir 50 Hz, 1 mT PEMA sıçan hipofiz GH3 hücrelerinin çoğalmasını artırırken [32], bir 0,5 T statik manyetik alan açık

bir şekilde GH3 hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmektedir [33]. 72 saat süresince 21,2 MHz PEMA ve 0,6 T SMA'da büyütülen insan kondrositlerinde metabolik etkinlik incelendiğinde, SMA etkisi altında canlılığın belirgin ölçüde artmasına rağmen PEMA etkisinde bir değişim gerçekleşmemektedir [34]. Parçalı kemik kırıklarının tedavisinde kullanılan bir cihazın ürettiği PEMF ile aynı manyetik kuvvette bir SMA'nın insan osteoklast farklılaşması ve etkinliği üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında [35], 7-10 gün süreyle SMA altında bırakılan primer osteoklast hücrelerinin aynı sürelerde PEMA altında büyütülen hücelere göre daha yüksek osteoklast fenotipi ve aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

Statik manyetik alanlar, dinamik manyetik alanlara göre daha az değişken etmen içermesi, biyolojik etkinliklerinin anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır. En sık kullanılan SMA üreticileri, sürekli mıknatıslardır [27]. Manyetik alan akı yoğunluğuna (B) göre, statik manyetik alanlar zayıf (<1 mT), ılımlı (1 mT – 1 T), yüksek (1-5 T) ve çok yüksek (5 T ve üzeri) olarak sınıflandırılmaktadır.

Statik manyetik alanların biyolojik sistemler üzerindeki etkilerinin incelenmesinde temel parametrelerden biri manyetik akı yoğunluğudur (B). 0,2 ve 9 T SMA içerisinde büyütülen sıçan adrenal PC12 hücrelerinde ATP seviyesi incelendiğinde, 1 T altı güçteki manyetik alanların ATP seviyesini etkilemediği ancak 1 T ve üzeri seviyelerin, zamanla doğru orantılı şekilde ATP üretimini artırdığı gözlenmektedir [29]. MC3T3-E1 hücreleri 48 saat süresince hipomanyetik (500 nT), orta şiddetli (0,2 T) ve çok yüksek şiddetli (16 T) SMA'lar içerisinde büyütüldüğünde [36], demir metabolizmalarında ve farklılaşma kapasitelerinde değişim tespit edilmiştir. Hipomanyetik alanda çoğaltılan hücrelerin demir içeriği azalırken, ılımlı ve yüksek manyetik alan içerisinde çoğaltılan hücrelerin demir içeriği yükselmektedir. Hücrelerin farklılaşma ve mineral tutma yeterliliklerinin ise hipomanyetik ve orta şiddetli SMA tesirinde bozulurken yüksek SMA tesirinde artmaktadır. Statik manyetik alanların neden olabileceği hasar ve mutasyonları değerlendirmek için *Drosophila melanogaster* soylarında somatik mutasyon ve rekombinasyon test sistemleri kullanıldığında [37], 2 T, 5 T veya 14 T SMA'nın somatik rekombinasyon frekansını artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca bu artış 0,5 T - 2 T arasında lineerken, daha güçlü alanlarda bu ilişki tespit edilememiştir. Ancak yüksek manyetik akı yoğunluğu (B) değerlerinin, biyolojik süreçleri engelleyebildiği de

gözlenmektedir. Sıçanlarda, 10 veya 70 mT SMA'nın, lambda-carrageenan (CA) veya histamin ile uyarılmış ödemi dağıtırken, 400 mT benzer bir sonuç sağlamamaktadır [38].

Bir biyolojik sistemin statik manyetik kuvvetlere homojen veya inhomojen şekilde maruz kalması, bu kuvvetlerin neden olduğu tepkiyi değiştirmektedir. Yapısal olarak ağırlıklı diyamanyetik materyallerden oluşan belirli hacme sahip (V) bir biyolojik sistem (örneğin hücre), inhomojen manyetik alanda artan kuvvetin etkisinde kalırken, homojen statik manyetik alanda ise biyolojik sistemin tork kuvvetine maruz kaldığı bilinmektedir [18], [27]. 6 T inhomojen manyetik alan ve 10 T homojen statik manyetik alanların HL-60 hücrelerinde proonkogenlerin ifadesi üzerindeki etkileri izlendiğinde, c-Jun ifadesinin 6 T inhomojen manyetik alanda arttığı ancak 10 T homojen SMA'da değişmeden kaldığı gözlenir [39].

Biyolojik sistemler üzerinde manyetik alanların değişken etkilerine dahil olan diğer bir etmen, etkisinde bırakıldıkları süredir. Hep G2 hücreleri 6mT SMA içerisinde 24 saat bırakıldıklarında mikrovillus değişimleri gözlenirken ancak daha uzun sürelerde hücrenin şekli tümüyle değişmekte ve hatta hücre kültür kabının yüzeyinden kalktıkları gözlenmektedir. Bu süreçte organel şekilleri ve hücre çoğalması etkilenmiyorken, hücre membran yapısıyla beraber mikrotübüllerin ve mikrofilementlerin düzenlenişi bozulmaktadır. Ayrıca 24 saat sonunda, deney başlangıcında gözlenmeyen apoptoz %20 oranı tespit edilmektedir [40]. GH3 hücrelerinin 0,5 T SMA'da bırakılma süreleriyle doğru orantılı çoğalmalarının azaldığı ve hücre boyutlarının arttığı gözlenmektedir [33].

Değişen statik manyetik alan yönlerinin, biyolojik sistemler üzerinde değişen etkilere sahip olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. 128 mT yerçekimi ile aynı ve zıt yönlü SMA'larda bırakılan farelerin çeşitli organları ve kan numuneleri incelendiğinde [41], her iki yönde de maruz kalan farelerde HDL seviyesinin arttığı, kan total lökosit ve lenfosit değerinin, dalakta granülosit ve böbreklerde inflamasyonun azaldığı ancak yalnızca yerçekimi ile aynı yönlü manyetik alanın dalak hücrelerini artırdığını, yine yalnızca yerçekimi ile zıt yönlü manyetik alanın kan lökosit değerini azalttığı gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada farklı yönlü manyetik alan oryantasyonlarının, fare beyinde bakır seviyesini farklı etkilediği gösterilmiştir [42]. 12 farklı hücre hattına (insan katı doku kanser hücre hattı, insan lösemi hücre hattı, insan kanserleşmemiş hücre hatları ve Çin Hamsteri over (CHO) hattında) farklı manyetik yönlendirmelerde (aşağı veya yukarı doğrultularda) 0,2 T ve 1 T gücünde SMA uygulandığında, katı tümör

hücrelerinin yukarı yönlü manyetik alan etkisinden [43]; lösemik hücrelerin her iki yönlü manyetik alan etkisinden büyümelerinin engellendiği ancak, kanserleşmemiş hücrelerin ise her iki yönde de manyetik alan etkisinden büyümelerinin olumsuz yönde etkilenmediği gözlenmiştir.

1.1.8 Manyetik Akı Yoğunluğu (B) Parametresi ve Değişken Biyolojik Etkiler

Farklı manyetik akı yoğunluğuna (B) sahip statik manyetik alanlar, farklı hücrel tepkileri tetiklemektedir. Örneğin eritrositlerin disk düzlemleri, SMA tesirinde manyetik alan doğrultusuna paralel dizilmektedir. Bu düzenlenmenin yoğunluğu SMA'nın B değeri ile doğru orantılıdır [44, 27].

Fare kortikal nöronları 1 saat 5 T'e kadar SMA tesirinde bırakıldıklarında, sinyalizasyon akışlarında yeniden düzenlenme gözlenmektedir [45]. C-Jun N terminal kinaz (JNK) esaslı sinyalizasyon, manyetik akı yoğunluğuna göre doğrusal olarak artış göstermektedir. Ancak, hücre dışı düzenlenmiş kinaz (ERK, extra cellular regulated kinase) esaslı sinyalizasyon en yüksek aktivitesini 0,75 T'da göstermektedir. ERK, hücrel farklılaşma düzenleyicisi olması, 0,75 T'da hücrel farklılaşmanın tetiklendiğini göstermektedir. Ancak daha yüksek SMA akı yoğunluğunda, stres koşullarının oluştuğu ve bu durumda stres yanıtını düzenleyen JNK'nın aktivite kazandığı görülmektedir.

Çeşitli insan hücre hatlarında 0,3-66 mT, akı yoğunluğu ile orantılı olarak kemoterapötik ajanların neden olduğu apoptozun önlendiği izlenmektedir. Gözlenen anti-apoptotik etkinin, SMA tesirinde hücre içerisine doğru artan Ca^{++} akışı ile ilgili olduğu görülmektedir [46]. NMR cihazının ürettiği ≥ 1 T SMA'nın, kemoterapötik ilaçların uygulandığı tümör hücre hatları üzerindeki etkisi incelendiğinde ise zıt etkiye neden olarak apoptozu tümör hatlarında 1,8 ve 2,5 kat artırdığı gözlenmektedir [47].

MC3T3-E1 hücre kültürleri 500 nT (Hipomanyetik), 0,2 T (orta şiddette) ve 16 T (yüksek şiddette) SMA'lara bırakıldıklarında, mineral element (kalsiyum, bakır, demir, magnezyum, mangan ve çinko) içeriklerinde ve de osteoblastik farklılaşmalarında değişimler izlenmektedir. Hipomanyetik alan, osteoblastik farklılaşma sürecini engellemesine rağmen, hücrelerin mineral element içeriklerinde jeomanyetik alan etkisindeki kontrollere göre bir değişim oluşturmamaktadır. Orta şiddette manyetik alan, osteoblastik farklılaşmada azalma ve demir içeriğinde artışa neden olmaktadır. Yüksek

şiddetteki manyetik alan ise osteoblastik farklılaşmayı ve de bakır hariç tüm mineral elementlerinde artışa neden olmaktadır [48].

1.1.9 Hücre Tipi Parametresi ve Değişken Biyolojik Etkiler

Farklı genetik düzenlemelere sahip hücre grupları, SMA tesirine değişen yanıtlar meydana getirmektedir [27]. İnsan malign melanoma ve normal fibroblast hücre kültürleri 4.7 T SMA alan tesirine bırakıldığında [49], her iki hücre kültürlerinde canlılık ve çoğalma potansiyelinin etkilenmediği gözlenmemiştir. Ancak, SMA etkisinin malign melanoma hücrelerinin plastik yüzey adezyonunu bozduğu gözlenmiştir. İnsan düz kas A7r5, insan glioma GI-1 ve insan böbrek hücre HFK293 kültürleri 60 saat 8 T SMA tesirine bırakıldıklarında, A7r5 ve GI-1 hücrelerine manyetik alan doğrultusunda yönelim meydana geldiği bildirilmiştir. Ancak benzer bir yönelim HFK293 hücrelerinde gözlenmemiştir [50]. 35 – 120 mT SMA tesirinde 18 saat süresince bırakılan fibroblastların plastik yüzeye adezyonlarının azaldığı gözlenirken, melanoma hücrelerinin adezyonunda bozulma gözlenmiştir. 7 gün sonrasında melanoma hücrelerinin canlılık oranlarında %20 oranında düşüş gözlenmiştir [51].

Bahsi geçen çalışmalarda çeşitli hücre tiplerinde SMA'nın değişken hücresel yanıtlara neden olması, bu hücrelerin farklı dokulardan kaynaklanması ile açıklanabilmektedir [27]. Ancak aynı dokudan kaynaklanan farklı hücre tiplerinde de SMA'nın değişken hücresel yanıtlara neden olduğu gözlenmektedir. MC3T3-E1 osteoblast ve Raw264.7 osteoklast hücre kültürleri 500 nT, 0,2 T ve 16T SMA tesirinde bırakıldığında [48], 500 nT ve 0,2T osteoblastik farklılaşmayı inhibe ederken osteoklast farklılaşmasını desteklemektedir. 16T SMA tesiri ise osteoblast farklılaşmasını desteklerken, osteoklast farklılaşmasını önlemektedir. Uyarılmış normal veya PHA ile uyarılmış lenfositler ve Jurkat hücreler, 1 saat 4.75 T SMA ve atımlı (puls) 0,7 T etkiye bırakıldığında, normal veya PHA ile uyarılmış lenfositlerde herhangi bir fizyolojik (proliferasyon, canlılık ve sekresyon etkinliğinde) bir değişim gözlenmezken jurkat hücrelerinde uyarım sonrasında hücre içi kalsiyum akışı, hücre proliferasyonu ve IL-2 sekresyonunda azalma tespit edildiği bildirilmiştir [52]. HTB63 (melanoma), HTB 77 IP3 (over kanser hücreleri) ve CCL 86 (lenfoma hücreleri), 64 saat süresince 7 T SMA tesirinde bırakıldıklarında, yalnızca JMA etkisinde bulunan kontrol gruplarına göre büyümelerinin yavaşladığı tespit edilmiştir [53]. Ancak Çin Hamster Over Hücreleri

(CHO-K1), 10 T manyetik alana tesirine kaldığında hücre büyümesi etkilenmediği görülmüştür. Yalnızca hücre içerisinde mikrotübül formasyonunun artığı gözlenmiştir [54].

1.1.10 Hücre Sayısal Yoğunluğu ve Değişken Biyolojik Etkiler

Hücre sayısı, SMA tesirinin neden olduğu etkinin araştırılmasında önemli bir faktördür. 12 insan ve 3 sıçan farklı hücre hatlarından oluşan düşük ve yüksek yoğunluklu kültürler 1 T SMA tesirine bırakıldıklarında, yüksek yoğunlukta 6 hücre hattında hücre proliferasyonu ve büyümesi engellendiği görülmüştür [55]. Bu durum, hücre yoğunluğunun protein ifade ve sinyalizasyon yollarının işleyişini etkilemesinden kaynaklanmaktadır [27]. Epital Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) ve onunla ilişkili yollar, hücre tipi ve hücre yoğunluğuna bağlı olarak SMA tesirinde zıt hücresel yanıtlar oluşturmaktadır [55]. İnsan düz kas A7r5 ve insan glioma GI-1 kültürleri 60 saat 8 T SMA tesirine bırakıldıklarında, A7r5 ve GI-1 hücreleri manyetik alan doğrultusundaki yönelmelerini ancak kültürler yüksek hücre yoğunluğu ile başlatıldığında kazanmıştır [50].

1.1.11 Hücresel Durum (Yaşlanma, Parazitler) ve Değişken Biyolojik Etkiler

Hücre tipi ve hücre yoğunluğunun yanı sıra, hücresel durum (fizyolojik koşullar, yaşlanma vb.) statik manyetik alan tesirinin neden olduğu tesirde etkilidir [27]. Örneğin eritrositlerde, hemoglobinin durumu, tüm eritrositin manyetik alan özelliğini belirlemektedir. Normal eritrosit içerisinde, hemoglobin oksijenlenmiş halde bulunur ve eritrosit diyamanyetik özellik gösterir. Ancak eritrositler izotonik sodyum dithionit ile muamele edilip hemoglobin, deoksihemoglobine veya sodyum nitrit ile muamele edilip methemoglobine dönüştürüldüğünde, paramanyetik özellik kazanmaktadır [27]. Bu durum, hemoglobinin protoporfirin halkası ve iyonik olarak demir içermesi, deoksihemoglobinin eşleşmemiş elektrona sahip demir içermesinden kaynaklanmaktadır. Deoksihemoglobin içeren eritrositler 1,75 T SMA tesirine bırakıldığında kandan izole edilmiştir [56]. Bir süspansiyon içerisinde methemoglobin içeren paramanyetik eritrositler, oksihemoglobin içeren diyamanyetik eritrosit ve diyamanyetik lökositlerden 3,3 T SMA tesirinde izole edilmiştir [57]. Eritrositlerin SMA tesiri altında davranış biçimlerini, malarya ile enfekte olmaları da belirlemektedir. Malarya trofozoitleri eritrosit içi yaşam sırasında, hemoglobini tüketerek paramanyetik

hem grubunu açığa çıkararak hemozoin oluşturur. Bu nedenle malarya ile enfekte eritrositler, yüksek gradient manyetik ayırıştırma tekniği ile kandan toplanması mümkündür [58].

Yine hücrenin yaşam döngüsü veya yaşı da SMA tesirine yanıtın oluşumunda etkindir. Fötal insan fibroblastları (WI-38), yaşam sürelerinin farklı noktalarında orta şiddetteki SMA tesirine farklı yanıtlar oluşturmaktadır. SMA tesiri genç hücre kültürlerinde hücrelerin yüzeye tutunmasını %10 oranında azaltırken, yaşlı hücre kültürlerinde hücrelerin yüzeye tutunmasını %60 oranında azaltmaktadır [51].

1.1.12 Biyomoleküler ve Hücresel Oryantasyon

SMA tesirinde biyomeleküllerin ve hücrelerin oryantasyon değişimleri, bu alanda en çok çalışılan konudur. 1.1.6 Manyetizmanın Biyolojik Sistemlerle Etkileşim Mekanizması bölümünde özetlendiği şekliyle düşük veya yüksek diyamanyetik anizotropik maddeler veya malzemeler, SMA tesirinde kaldığında, manyetik alana göre dik veya paralel dizilim göstermektedir.

Deoksijenize orak şekilli eritrositlerin, durağan süspansiyon içerisinde manyetik alana dik olarak konumlandığı bildirilmiştir [59]. Ancak, 8 T SMA tesirinin de oksijenizasyon durumuna bağlı olmaksızın normal eritrosit disk düzlemlerinin manyetik alan doğrultusuna paralel oryantasyon kazandırdığı gözlenmiştir [45]. Bu oryantasyon kazanımlarında hemoglobinin paramanyetizmasının etkili olduğu bilinmektedir [60]. Tüm bu sonuçlar, eritrositler örneğinde hücrelerin manyetik alan doğrultusuna göre oryantasyon veya düzenli diziliş kazandıklarını göstermektedir. Bu süreçte hücrelerin içerdikleri biyomoleküllerin etkili olabildiği gözlenmektedir.

Osteoblast hücreleri, düz kas hücreleri ve Schwann hücreleri ile yapılan çalışmalarda da statik manyetik alan tesirinde oryantasyon veya düzen kazandıkları gözlenmektedir. Fare osteoblastik hücre hattının (MC3T3-E1), 8 T SMA tesirine in vitro ve in vivo koşullarda verdiği yanıtlar incelendiğinde in vitro şartlarda 60 saatlik SMA tesiri sonunda, MC3T3-E1 hücrelerinin, çubuk (rod) benzeri şekil kazandıkları ve manyetik alana paralel oryantasyona gösterdikleri tespit edilmektedir [48]. Ayrıca SMA tesirinin subkutanöz olarak yerleştirilen Bone Morfolojik Protein 2 (BMP-2) içeren pelletlerde ve bu pelletlerin etrafında ektotopik kemik şekillenmesini desteklediği ve kemikleşmenin manyetik alana paralel olduğu gözlenmiştir [61]. 14 T SMA tesirinde

düz kas hücrelerinin in vitro şartlarda oryantasyon kazanmaları takip edildiğinde hücre kolonilerinin şekillerinde, uygulanan manyetik alanın doğrultusunda uzama gözlenmiştir. Etki özellikle 10 T SMA tesirinde, hücre kolonilerinin elipsoid yapı kazanması ile gözlenmiştir [62]. Yalnızca Schwann hücreleri ve Schwann hücreleri ile kollajen karışımı kültürleri 8 T SMA tesirine bırakıldığında 60 saatlik SMA tesiri sonrasında yalnızca Schwann hücrelerinden oluşan kültürlerde, hücrelerin manyetik alan doğrultusuna paralel oryantasyon kazandığı tespit edilmiştir. Ancak, Schwann ve kollajen karışımlarında, 2 saatlik tesir sonrasında hücreler manyetik alan doğrultusuna dik oryantasyon gösterilmiştir. Bu grupta, Schwann hücreleri manyetik alan tesirince dizilimi düzenlenen kollajenler boyunca dizilmiştir [63]. Glioblastoma hücre hattı, A172 kollajen varlığı veya yokluğunda 10 T statik manyetik alan tesirinde bırakıldığında, A172 hücrelerinin kollajen varlığında manyetik alan doğrultusuna dik sıralandığı ancak kollajen yokluğunda benzer bir düzenlenmenin gerçekleşmediği bildirilmiştir. Bu durum, manyetik alan tesirinde düzen kazanan kollajenle ilişkili mikrotübüller nedeniyle meydana geldiğini düşündürmektedir [39].

Glutaralaldehit ile fikse edilen boğa sperm hücreleri, 1 T statik manyetik alan tesirinde bırakıldıklarında, baş ve gövdeleri manyetik alan doğrultusuna dik dizilmektedir. Boğa sperm hücresinde paramanyetik öge bulunmamasından dolayı diyamanyetik hücre öğelerinin (hücre membranı, baş kısmında bulunan DNA ve kuyruktaki mikrotübüllerin) bu oryantasyona neden olduğu düşünülmektedir [64]. Rattal rod hücreleri, homojen manyetik alanda oryantasyon kazanmaktadır. Bu yönelimin kazanılmasında, rod membranında bulunan rodopsinin anizotropik etkisinin yönlendirici olduğu gözlenmektedir [65].

Nöronal SH-SY5Y ve PC12 hücreleri, statik manyetik alan tesirinde büyütülerek yeni oluşan aksonların doğrultuları ve morfolojileri incelenmiştir. SH-SY5Y hücreleri, 50 Hz veya 1mT manyetik alan tesirine bırakılarak Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy ile incelendiklerinde, 6 saat sonrasında Amid 1 bandının ve CH₂ esneme titreşimlerinin yoğunluğunda artış olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, hücre membranı içerisinde gömülü proteinlerin α heliks yapılarının ve lipid içeriklerin tesir sonrasında manyetik alan doğrultusunda düzen kazanmaları, hücresel membran kanallarından iyon akışlarının artışı ve değişen hücresel işlevlerle açıklanmaktadır [66].

1.1.13 Hücresel Büyüme ve Çoğalma

SMA, hücre çoğalması ve büyümesini önlediğine yönelik birçok veri bulunmaktadır. L-929 ve WI-38 hücre hatları, 4,2°K'de dondurulup 4-8 saat 0,5 T statik manyetik alan tesirine bırakılmasının ardından kültür şartlarında çoğalmaya ve büyümeye bırakıldıklarında, kontrol gruplarına göre çoğalma ve büyümelerinde gerileme izlenmiştir [67]. 2 T SMA tesirine bırakılan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) proliferasyon ve büyüme azalırken, bu hücreler üzerinde D vitaminin anti proliferatif etkisi artmaktadır [68]. 1 saat 0,2 T SMA tesirine bırakılan insan cilt fibroblastlarında, proliferasyon ve mitojenik sinyal iletimi azalmaktadır [69]. 3 T SMA veya 3 T SMA'la beraber 125,3 MHz Radyo frekans tesirinde bırakılan konrodistlerin in vitro büyüme ve çoğalmalarının inhibe olduğu izlenmiştir. Domuzlarla gerçekleştirilen in vivo gözlemlerde ise tesir altında kalan kondrositlerin kırıldak onarımında yetersiz kaldığı gözlenmiştir [70]. 48 saat 5 mT SMA tesirinde kalan vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve adezyon potansiyelleri azaldığı gözlenmiştir. Gözlenen bu etki, artmış Integrin $\beta(1)$ kümelenmesinin inhibisyonu, fokal adezyon kinaz fosforilasyonunun inhibisyonu ve azalan hücre içi serbest kalsiyum miktarıyla uyumludur [71].

Kemik iliği kökenli kök hücre ve endoteyal hücre gruplarında SMA tesirinin proliferasyonu destekleyici olduğuna dair yayınlarda bulunmaktadır. 60 μ T ve 120 μ T SMA tesirinde bırakılan edonteliyal hücre gruplarında çoğalmanın arttığı bildirilmiştir [72]. İnsan adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada da 0,5 T SMA tesirine bırakıldıklarında çoğalma oranlarını phosphoinositide 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) yollağının aktivasyonuna bağlı olarak arttığı gözlenmiştir [73].

Bununla birlikte SMA etkisinin hücre proliferasyonu ve büyümesine etki etmediğine yönelik verilerde bulunmaktadır. Miyojenik hücre hattı L6, 80 mT SMA tesirine bırakıldığında, miyojenik hücre farklılaşması ve hipertrofi gözlenmesine karşılık, proliferasyon oranlarında bir değişim gerçekleşmediği bildirilmiştir [74]. 290 mT SMA etkisinde bırakılan dental pulp kök hücrelerinde, proliferasyon oranlarında artış tespit edilmemiştir [75].

1.1.14 Hücre Canlılığı

Birçok çalışma statik manyetik alan tesirinin hücre canlılığı üzerindeki minimum etkisini göstermektedir. 4,7 T SMA tesirinde bırakılan insan melonoma ve insan fibroblast hücrelerinin canlılığında bir değişim meydana gelmemiştir [49]. 0,2 T SMA tesirinin insan cilt fibroblast hücre canlılığını etkilemediği görülmektedir [69]. U937 lösemi hücreleri, 12-O-tetradecanoyl-13-phorbol acetate (TPA) uyarımı sırasında 72 saat 6 mT SMA tesirine bırakıldığında, hücre canlılığının etkilenmediği bildirilmiştir [76].

SMA tesirinin bazı hücre tiplerinde de apoptoza neden olduğuna yönelik veriler de mevcuttur. Hep G2 hücre kültürleri 24 saat 6 mT SMA tesirinde bırakıldığında, ilk saatlerde önemsiz düzeyde görülen apoptoz süre sonunda %20 oranında artış göstermemiştir [40]. 3 T SMA tesirinde bırakılan insan kondrositlerinde p53, p21, p27 ve Bax proteinlerinde ve de apoptozda artış gözlenirken [70], 7 gün 0,5 T SMA tesirinde tutulan adipoz doku kaynaklı kök hücrelerde de apoptoz gözlenmiştir [77].

1.2 Tezin Amacı

Manyetik alanların ve/veya manyetik malzemelerin (maddelerin), doku mühendisliği ve yenileyici tedavilerde kullanımı önem kazanmaktadır. Bunun temel sebebi, manyetik alanların dokulara engelsiz ulaşabilmesi; mikro ve nano yapılara yeniden oryantasyon kazandırması ve fizyoloji üzerinde dönüştürücü veya bozucu etki göstermesidir. Günümüzde statik manyetik alanlar (SMA), tıbbi uygulamada görüntüleme (MRI) ve tedavi amacıyla (süreğen yaraların tedavisi, ağrıların tedavisi, tek parçalı olamayan kırıkların onarımı) kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücre, farklı dokulara dönüşebilirliliği ve yenilenmeyi destekleyici parakrin etkinlikleri olması sebebiyle doku mühendisliği ve yenileyici tıp için önemli hücresel araçlardır. Bilimsel literatür, çeşitli statik manyetik alanların ve MKH biyolojisine etkisi gösterilmiştir. Ancak bu alanda yürütülen çalışmalar henüz bir standardizasyona ulaşılmamış ve çelişen sonuçlar mevcuttur. Ayrıca, SMA ve MKH etkileşim mekanizmaları henüz aydınlatılmayı beklemektedir. Bu yüksek lisans tezinin amacı, orta şiddetli SMA tesirinin insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre (Kİ-MKH) oryantasyonuna, büyüme ve çoğalma fonksiyonlarına ve osteogenez sürecine olan etkisini gözlemlemek ve oluş mekanizmalarını açıklamaktır.

1.3 Hipotez

NdFeB sürekli mıknatıslarla oluşturulan 328 mT (orta şiddetli) homojen manyetik alanda (SMA), KI-MKH diyamanyetik anizotropik yapısı nedeniyle, yavaşça manyetik akı doğrultusuna paralel oryantasyon kazanır. KI-MKH, büyüme ve çoğalma işlevi ve de osteojenik soya dönüşme yeterliliği, 328 mT SMA tesirinde biriken veya yarı ömrü uzayan serbest radikaller nedeniyle bozulur. SMA varlığında, hücre içine doğru gerçekleşebilecek Fe²⁺ akışı, Fentom tepkimelerine ve serbest radikal birikimine destek olmaktadır. Hücre içi antioksidasyon mekanizmalarının 328 mT tesirinde bozulması, görülen etkilere neden olmaktadır.



2.1 Hücre Kültürü Malzemeleri

2.1.1 İnsan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Temini

Adherent insan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH), Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden üçüncü pasajda ve kriyoprezerve halde satın alındı. Kİ-MKH'leri, YTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Hücre Kültür Laboratuvarı'na kuru buz aküleri içerisinde ulaştırıldı ve hücre kullanım anına kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

2.1.2 Hücre Kültürü Besi Ortamları ve Besi Katkıları

Çalışmalarımız süresince hücre kültürü çalışmalarının farklı aşamalarında aşağıda belirtilen besi ortamları, besi katkıları, enzimler ve tamponlar kullanıldı.

Kİ-MKH hücrelerinin büyütülmesi ve çoğaltılması için ticari olarak temin edilen MSC NutriStem XF Besi Ortam Kiti (Biological Industries) kullanıldı. Bu kit, iki birleşen içermektedir: MSC NutriStem XF Bazal Ortamı (Cat. 05-200-1A, 500 mL) ve MSC NutriStem XF Supplement Mix (Cat. 05-201-1U, 3 mL). Kullanıma hazır MSC NutriStem XF Zengin Besi Ortamı, her iki birleşenin birbiri içerisinde karıştırılması ile elde edilmektedir. Hazırlanan besi ortamı küçük porsiyonlara ayrılarak, ışıktan korunacak şekilde, +4°C ve +8°C aralığında bulunan soğutucuda saklamaya alındı.

Kİ-MKH'lerinin yüzey adezyonu artırmak için hücre kültürü tabaklarının (flasklarının), MSC Attachment Solüsyon (Cat. No. 05-7520-1, 100x-1 mL) ile kaplanması gerçekleştirildi. Bu işlem için 1x MSC Attachment Solüsyon, steril distile su içerisinde hazırlanan 1x Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Wisent 311-415 CL D-PBS) içerisinde hazırlandı. Stok MSC Attachment Solüsyon, +4°C ve +8°C aralığında bulunan soğutucuda saklamaya alındı.

Kİ-MKH'lerde osteogenez (kemiğe dönüşüm) süreci, Stempro Osteogenesis Differentiation Kit (Cat: A10072-01) kullanılarak uyarıldı. Stempro Osteogenesis

Differentiaition Kit, iki birleşen içermektedir. Bu birleşenleri, Stempro Osteogenesis/Chondrogenesis Basal Medium (Cat:A10069-01) ve Stempro Osteogenesis Supplement (Cat:A10066-01) oluşturmaktadır. Kullanıma hazır Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi Ortamı, 10 mL Stempro Osteogenesis Supplement'in 90 mL Stempro Osteogenesis/Chondrogenesis Basal Medium içerisine katılmasıyla elde edildi. Hazırlanan besi ortamı küçük porsiyonlara ayrılarak +4°C ve +8°C aralığında bulunan soğutucuda saklamaya alındı.

Pasajlama aşamasında tripsinizasyon için ticari HBSS (Hunk's Balanced Salt Solution) içerisinde hazırlanmış %0,25 Tripsin 0,53 mM EDTA (Tripsin-EDTA) (Wisent 325-045EL, 100 mL) çözeltisi kullanıldı. Tripsinizasyon öncesinde hücre kültür tabakları 1x DPBS ile yıkandı. Tripsinizasyon sonrasında nötralizasyon için %10 Fetal Bovin Serum (FBS) (Capricorn FBS-HI-11B, 100 mL) içeren MSC NutriStem XF Zengin Besi Ortamı veya 1x DPBS kullanıldı. Tripsin-EDTA ve FBS, ilk ambalajında çözündürüldükten sonra küçük porsiyonlara ayrılarak, -20°C dondurucuda saklamaya alındı.

Kriyoprezervasyon ortamı olarak %10 Dimetil Sulfoksit (DMSO) (Sigma) içeren FBS kullanıldı. Kriyoprezervayson solüsyonu, her gereklilik halinde taze hazırlandı.

Distile su, mevcut laboratuvar kaynağından temin edildi. Distile suyun sterilizasyonu, 121°C ve yüksek atmosfer basıncında gerçekleştirilen otoklav sterilizasyonu ile sağlandı.

2.1.3 Hücre Kültür Sarfları

Çalışmalarımız süresince hücre kültürü çalışmalarının farklı aşamalarında aşağıda belirtilen sarf malzemeler kullanıldı. Sarf malzemelerin steril ve yalnızca tek defa kullanılmış olmasına dikkat edildi.

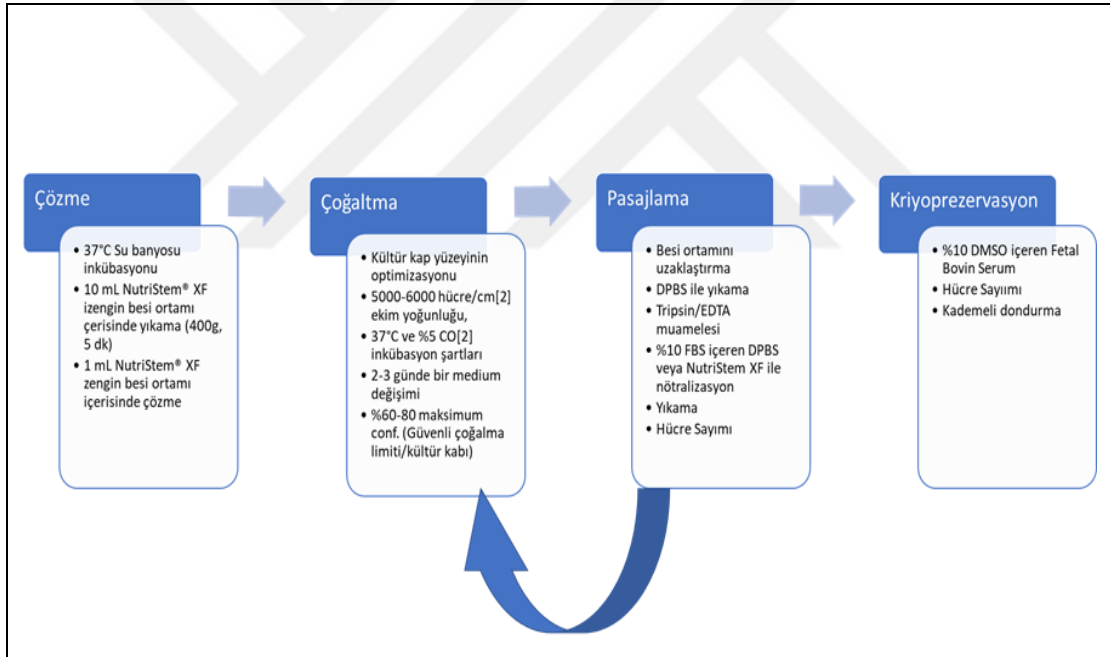
Hücre Kültür Tabakları (Flaskları): Hücre kültür çalışmasının hücre çoğaltma ve büyütme aşamasında, 75 cm² ve 25 cm² vented kapaklı, yüzeyi işlemlili T hücre kültür tabakları (flaskları) kullanıldı. Tüm deneysel çalışmalar ise 12 kuyulu hücre kültür tabakları kullanıldı. Her bir kuyunun yüzey alanı 3,8 cm² ve 22 mm çapındadır. Hücre kültür pasaj işlemi veya besi ortamı değişiminde 25 cm² T cell culture flask'ları için 5

mL, 75 cm² T cell culture flasks için 15 mL ve her bir kuyu için 1 mL besi ortamı tüketimi gerçekleştirildi.

Diğer Sarflar: Çalışmanın çeşitli aşamalarında 10 mL, 5 mL ve 1 mL serolojik pipet, 1 mL ve 200 µL pipet ucu, 50 mL ve 15 mL konik santrifüj tüpleri kullanıldı. Kriyoprezervasyonda, 1,5 mL kriyoviyallerden yararlanıldı. Spektroskopik çalışmalar, düz tabanlı ve 96 adet kuyu içeren tabaklarda gerçekleştirildi.

2.2 Kİ-MKH Büyütme, Çoğaltma ve Kriyoprezervasyon

Kİ-MKH'ler deneyler öncesinde bir defa, 2.1.2 Hücre Kültürü Besi Ortamları ve Besi Katkıları bölümünde açıklanan NutriStem XF Zengin Besi Ortamı içerisinde büyütülerek çoğaltıldı. Deneylerde kullanılmayacak hücreler, stok oluşturmak için kriyoprezervasyon yöntemi uygulanarak -80°C'de korunmaya alındı. Bu süreç Şekil 2.1'de açıklanmaktadır.



Şekil 2.1 Ki-mkh çözündürme, büyütme ve çoğaltma, pasajlama ve kriyoprezervasyon uygulama akışı

2.2.1 Hücre Kültür Tabak (Flask) Yüzeylerinin Optimizasyonu

Kİ-MKH'lerin hücre kültür tabaklarına ekiminden 30 dakika önce, hücre kültür tabakları 1x MSC Attachment Solüsyon ile kaplandı. Bu işlem için 25 T tabaklara 5 mL, 75 T tabaklara 15 mL ve 12 kuyulu tabakların her bir kuyusuna 1 mL 1x MSC

Attachment Solusyon eklendi. Ardından 30 dakika ve 37°C’de inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon, 37°C ‘de gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında 1x DPBS ile kültür kapları yıkandı.

2.2.2 Kriyoprezerve Kİ-MKH’lerin Çözündürülmesi

Kriyoprezerve olarak satın alınan Kİ-MKH’ler, 37°C’de su banyosunda çözülene kadar inkübe edildi. Çözünen hücreler, 1 mL pipet yardımı ile 10 mL NutriStem XF Zengin Besi Ortamı’na alındı. 400 g’de 5 dakika santrifüj işlemi ile yıkama gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant atıldı. Pellet 1 mL NutriStem XF Zengin Besi Ortamı’nda çözündürüldü. İlk numunenin çözündürülmesi sonrasında 2.500.000 canlı hücre/mL elde edildi.

2.2.3 Toplam Canlı Hücre Sayısının Tespiti

Toplam canlı hücre sayısı, %0,4 Tripan blue (Sigma) boyasıyla 1:3 veya 1:5 boya/hücre oranında hazırlanan süspansiyonda, canlı hücrelerin boyanmaması prensibine göre tespit edildi. Thoma lamı kullanılarak 10x büyütmede boyanmayan hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. Alan içerisinde sayılan toplam canlı hücre sayısı ve (2.1) eşitliği ile 1 mL içerisindeki total canlı hücre sayısına ulaşıldı.

$$\frac{\text{Canlı Hücre Sayısı}}{\text{mL}} = \text{Dilüsyon Sayısı} \times \text{Sayılan Mavi Boyanmamış Hücre Miktarı} \times 10^4 \quad (2.1)$$

2.2.4. Kİ-MKH Büyütme ve Çoğaltma

Çoğaltma amacı ile Kİ-MKH’leri, yüzey optimizasyonu yapılmış 25 cm² ve 75 cm² T tabaklarına 5000-6000 hücre/cm² olacak şekilde ekildi. 3-4 gün 37°C ve %5 CO₂ şartlarında durağan inkübasyon gerçekleştirilerek, Kİ-MKH’lerin hücre kültürü tabaklar yüzeyini %60-80 kaplamaları sağlandı. Daha sonrasında NutriStem XF Zengin Besi Ortamı bir serolojik pipet yardımı ile çekildi. 1xDPBS ile hücrelerin yüzeyi 1-2 defa yıkandı. Tripsinizasyon için 1-3 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Kİ-MKH’lerin hücre kültür tabak yüzeylerinden ayrılması ve yüzer hale gelmeleri beklendi. Elde edilen hücre süspansiyonu, 15 mL falkon santrifüj tüplerine aktarıldı. Tripsin nötralizasyonu için süspansiyon üzerine 1:1 oranında %10’luk FBS:DPBS çözeltisi eklendi. 300 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernetant atıldı. Çalışmada kullanılacak hücre pelleti, MSC NutriStem XF Zengin Besi Ortamı içerisinde

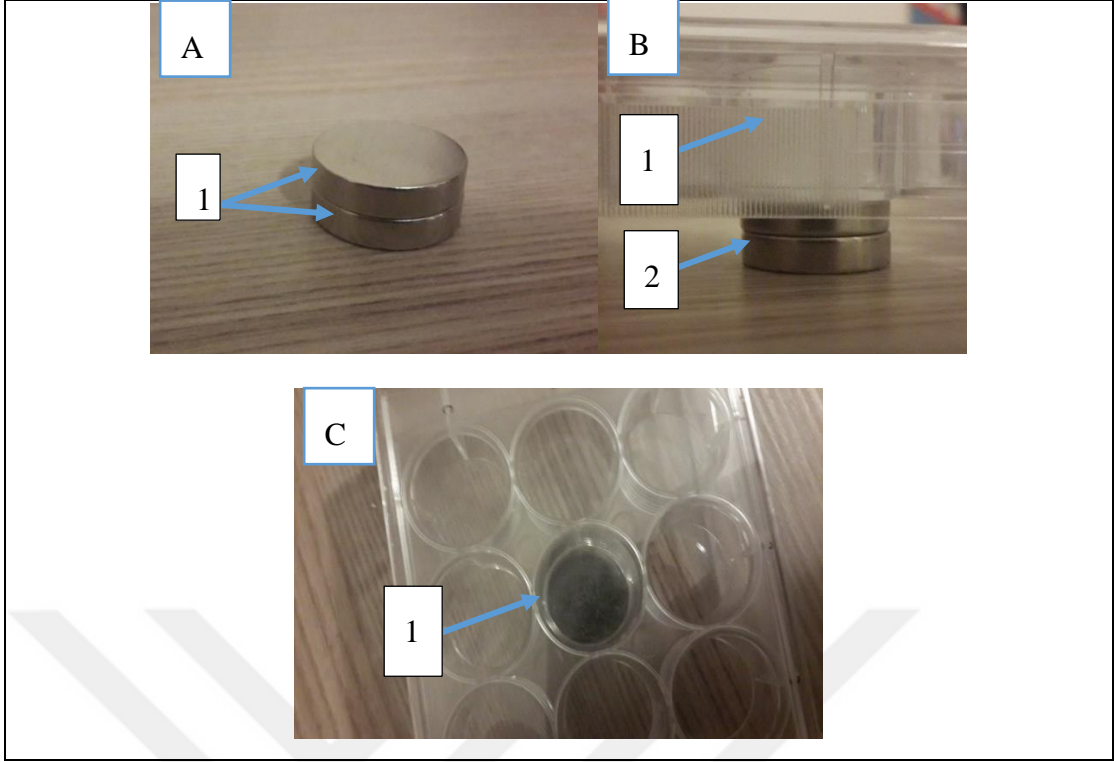
tekrar çözüldürüldü. Deneyler öncesinde, besi ortamı ve katkılarının tüketimi ve hücrelerin yaşlanması gözetilerek tek bir defa hücre çoğaltma uygulandı.

2.2.5 Kİ-MKH Kriyoprezervasyonu

Deneylerde kullanılmayan hücreler ise 1×10^6 canlı hücre/kriyoreservasyon vialı konsantrasyonunda, %10 DMSO-FBS kreyoprezervasyon çözeltisi içerisinde kademeli yöntemle donduruldu. Kademeli dondurma, hücrelerin 10 dakika $+4^{\circ}\text{C}$, donma gerçekleşene kadar -20°C 'de tutulması ve sonrasında -80°C 'ye kaldırılması olarak uygulandı.

2.3 Statik Manyetik Alan Kaynağı ve Manyetik Akı Yoğunluğu

SMA, toplamda 328 mT manyetik akı yoğunluğu (B) oluşturan iki adet 22 mm çaplı Neodimium-Demir-Boron (NdFeB) mıknatıslar (Mıknatıs Teknik) (Şekil 2.2 A:1) aracılığı ile sağlandı. Neodyum mıknatıslar, 12 kuyulu hücre kaplarının alt yüzeylerine, ikisi üst üste gelecek şekilde yerleştirildi (Şekil 2.2 B ve Şekil 2.2 C). Manyetik akı yoğunluğu (B), AC/DC Magnetic Meter PCE-MFM 3000 cihazı ile ölçüldü (Şekil 2.3). SMA uygulaması literatür incelemeleri ve besi ortamı üreticileri tavsiyesi doğrultusunda Kİ-MKH büyütme ve çoğaltma deneylerinde 6 gün boyunca 24 saat olarak, osteogenez deneylerinde ise 14 gün boyunca 24 saat olacak şekilde gerçekleştirildi.



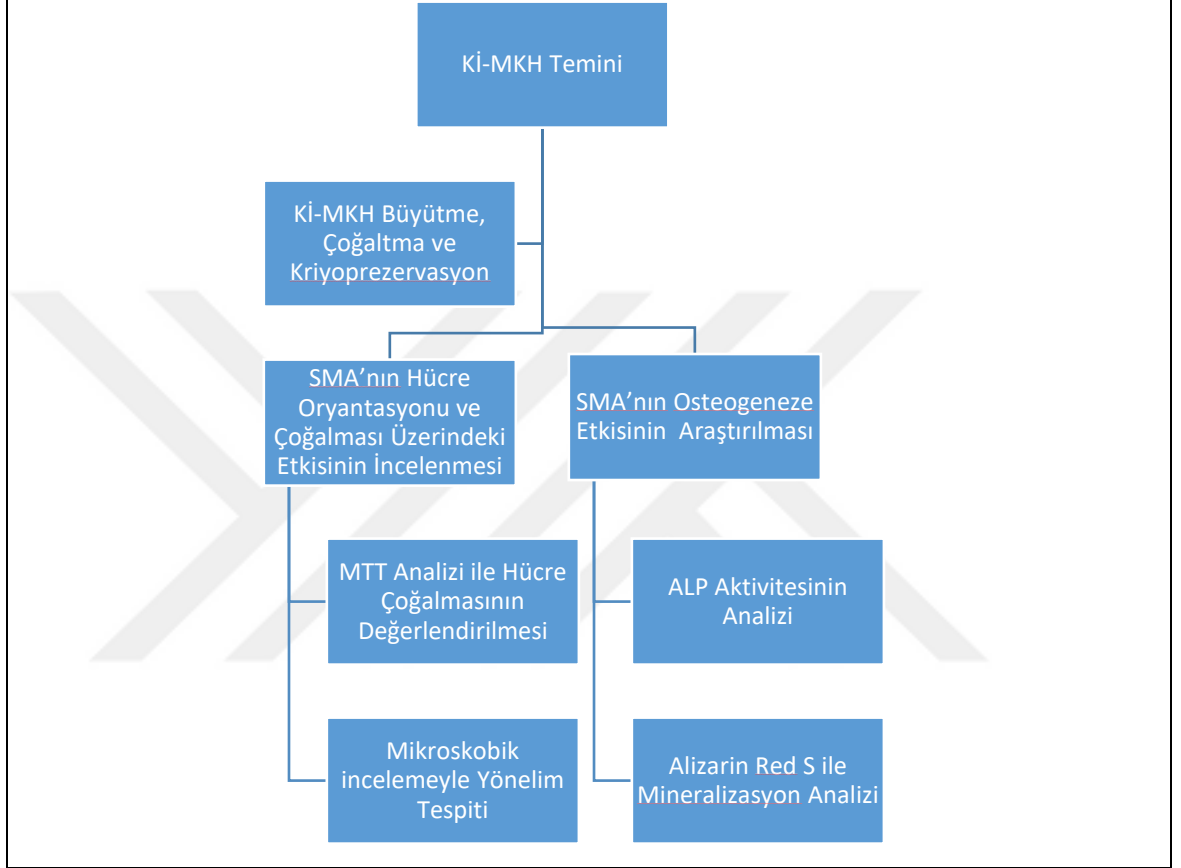
Şekil 2.2 SMA kaynağının yerleşimi (NdFeB mıknatıslar (a1); 24 kuyulu hücre kültür tabağında (b1) bir kuyunun altına yerleştirilen (b2) NdFeB mıknatıslar; 24 kuyulu hücre kültür tabağının bir kuyusunun altına yerleştirilen NdFeB mıknatısların üstten görünümü (c1))



Şekil 2.3. Manyetik alan yoğunluğunun ölçümü (NdFeB mıknatıslar ile hücre kültür tabağında oluşturulan manyetik alan yoğunluğu manyetik akı ölçer ile ölçülmüştür; oluşturulan manyetik alanın B değerinin 328 mT olduğu görülmektedir)

2.4 Deney Metodolojisi

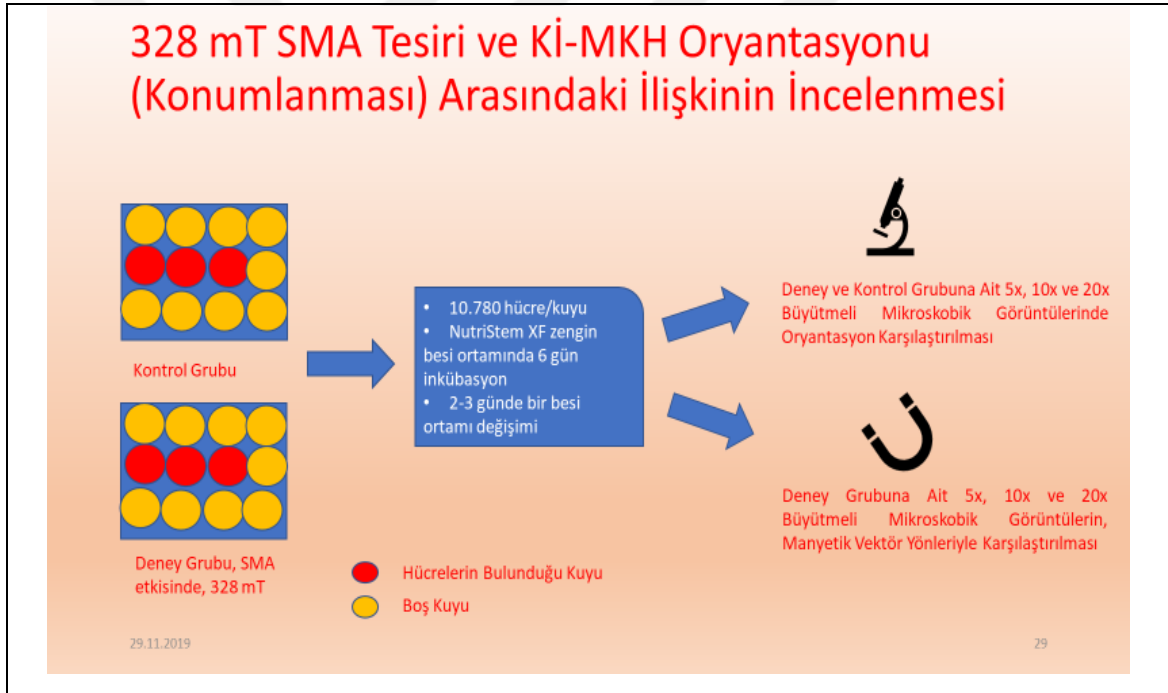
Bu tez çalışmasında, 328 mT SMA tesirinin Kİ-MKH'lerinin hücre kültür tabaklarında oryantasyonu (konumlanması), büyüme ve çoğalması, osteogenez sürecinde Alkalın Fosfataz (ALP) ve biyo-minerallenme üzerindeki etkileri incelendi. Şekil 2.4'de gösterilen çalışma programı takip edildi.



Şekil 2.4 Deneysel metodoloji

2.4.1 328 mT SMA Tesiri ve Kİ-MKH Oryantasyonu Gözlemi

328 mT SMA tesiri ve hücre kültür tabak yüzeyinde Kİ-MKH oryantasyon arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla iki ayrı 12 kuyulu hücre kültür tabağında, 3 adet kuyudan oluşan Kontrol Grubu ve 3 adet kuyudan oluşan Deney Grubu oluşturuldu. Her kuyuda başlangıçta hücre yoğunluğunun 10.780 canlı hücre/mL olması sağlandı. Deneye 6 gün süre ile devam edildi. Deney sürecince Kİ-MKH grupları 37°C, %5'lik CO₂ ve %100 nemli ortamda durağan olarak inkübe edildi. Besi ortamı olarak yalnızca, MSC NutriStem XF Zengin Besi Ortamı kullanıldı. Deney süresince, besi ortamı 2-3 günde bir değiştirildi. Deney süresi sonunda kontrol ve deney gruplarının 5x, 10x ve 20x büyütmede invert mikroskop görüntüleri alındı. SMA etkisi oluşturmak için kullanılan disk NdFeB mıknatısların oluşturduğu manyetik vektörler, demir tozları ile görüntülendi ve fotoğraflandı. Bu gözlem süreci, Şekil 2.5'de özetlenmiştir.



Şekil 2.5 328 mT sma tesirinin ki-mkh'lerin oryantasyonu üzerindeki etkinin incelenmesi

2.4.2 328 mT SMA Tesirinde Kİ-MKH Büyüme ve Çoğalmasının Analizi

328 mT SMA tesirinin Kİ-MKH'lerin büyüme ve çoğalması üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla iki ayrı 12 kuyulu hücre kültür tabağında, 3 adet kuyudan oluşan Kontrol Grubu ve 3 adet kuyudan oluşan Deney Grubu oluşturuldu. Her kuyuda başlangıçta hücre yoğunluğunun 10.780 canlı hücre/mL olması sağlandı. Deneye 6 gün süre ile devam edildi. Deney sürecince Kİ-MKH grupları 37°C, %5'lik CO₂ ve %100 nemli ortamda durağan olarak inkübe edildi. Besi ortamı olarak yalnızca, MSC NutriStem XF Zengin Besi Ortamı kullanıldı. Deneyin 6. gününde Deney ve Kontrol Gruplarının büyüme ve çoğalma miktarları MTT (3- (4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) (Sigma) analizi ile değerlendirildi. Deney süreci Şekil 2.6'de açıklanmaktadır.

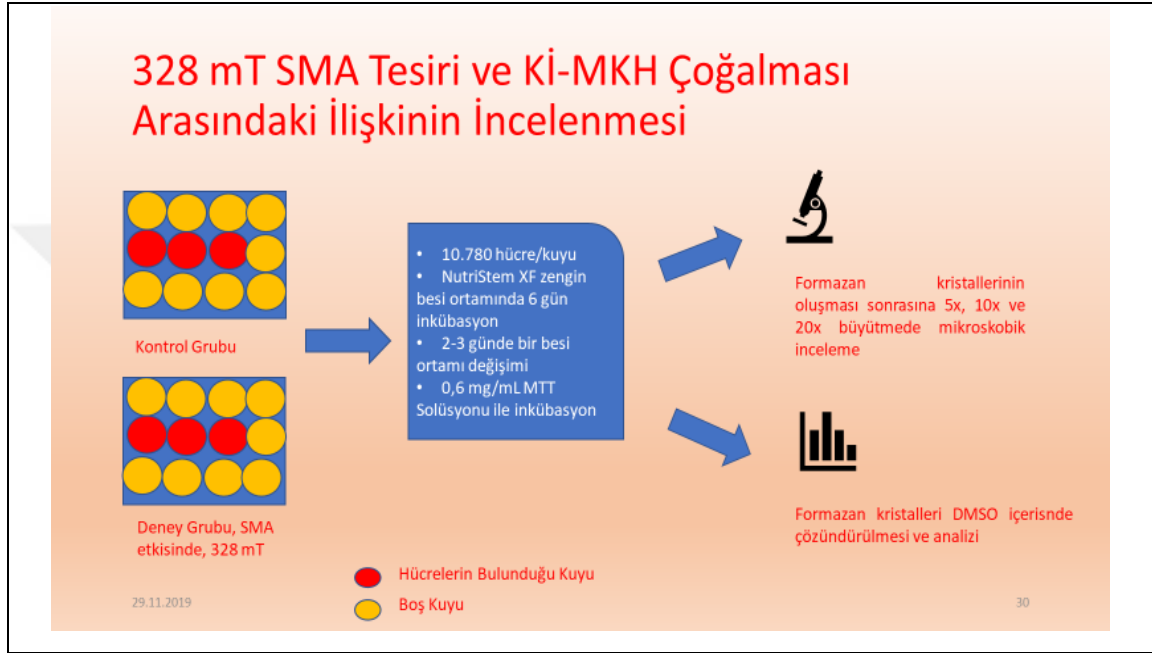
MTT solüsyonu, 1x Fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde 0,6 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. Hücre kültürlerinde bulunan besi ortamı tümüyle çekildi. 1xDPBS ile hücre kültürleri bir defa yıkandı. MTT solüsyonu her kuyuya 400 µL olacak şekilde dağıtıldı. Hücre kültürleri 3 saat inkübe edilerek mavi/mor formazan kristallerinin oluşması sağlandı. Bir adet Kontrol Grubu ve bir adet Deney Grubu kuyusundan 5x, 10x ve 20x büyütme mikroskop görüntüsü alındı. İnkübasyon sonrasında MTT solüsyonu kuyulardan toplandı. Her kuyuya 300 µL DMSO eklendi. 15 dakika çalkalama ile inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda Kontrol ve Deney Grubuna ait her kuyudan 100 µL alınarak 96 kuyucuklu "plate" lere aktarıldı. Okuma 570 nm ve 650 nm'de otomatik "plate" okuyucuda gerçekleştirildi. Net absorbans 570 nm ile elde edilen değerden 650 nm'de elde edilen değer çıkarılması ile ulaşıldı.

Hücre sayısının tespiti amacı ile, MTT testinden 24 saat önce artan hücre dizisine sahip bir cetvel oluşturuldu. 1 mL zengin besi ortamı içeren ön kaplama yapılmış 12 kuyulu hücre kabının kuyularına, 0, 1.620, 16.200, 32.400, 64.800, 97.200, 129.600, 162.000 sayıda hücre ekimi gerçekleştirildi. MTT testi, bu artan hücre dizisinden oluşan cetvel kültüre de yukarıda bahsedildiği gibi uygulandı.

“Populasyon doubling time “(PDT), (2.2) eşitliğine göre hesaplandı.

$$PDT = \frac{\text{Toplam Süre (Saat)} \times \text{Log}(2)}{\text{Log}(\text{Son Ulaşılan Hücre Sayısı}) - \text{Log}(\text{İlk Ulaşılan Hücre Sayısı})} \quad (2.2)$$

Elde edilen sayısal verilerin istatistiki değerlendirmesi unpaired Student t test ile Graphpad-Quickcalcs istatistiki analiz web sayfasından yararlanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 2.6 328 mT sma tesirinde ki-mkh büyüme ve çoğalması analiz sürecidir

2.4.3 328 mT SMA Tesirinde Osteogenez Sürecinin İncelenmesi

328 mT SMA tesirinde KI-MKH'lerin osteogenez süreci, Alkalın Fosfataz (ALP) aktivitesi ve biyo-mineralleşmenin Alizarin Red S boyama ile tespiti esasına göre analiz edildi. Çift Kontrol ve çift Deney Grubu uygulandı. Kontrol-1, osteogenez uyarıcı olmayan MSC NutriStem XF Zengin Besi Ortamı'nda kültüre edilen KI-MKH'ler; Kontrol-2, Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi Ortamı'nda kültüre edilen KI-MKH gruplarıdır. Deney Grubu-1, 328 mT SMA etkisine bırakılan MSC NutriStem XF Zengin Besi Ortamı'nda kültüre edilen MKH'ler; Deney Grubu-2, 328 mT SMA etkisine bırakılacak Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi Ortamı'nda kültüre edilen MKH'lardır. Her grupta 3 tekrar uygulandı. Toplam deney süresi, literatür incelemesi ve besi ortamı üreticisi tavsiyesi doğrultusunda 14 gün olarak belirlendi. Şekil 2.7'de deney süreçleri açıklanmaktadır.

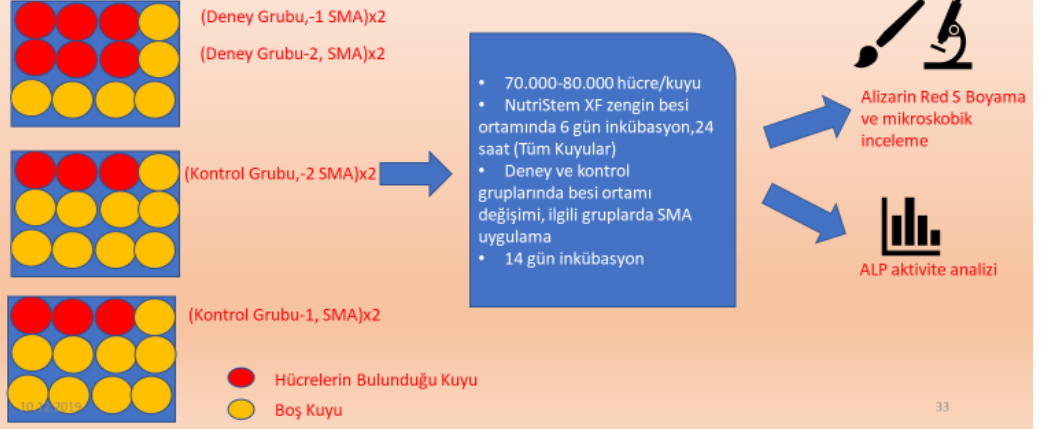
Deneyden 24 saat öncesinde 70.000-80.000 hücre/kuyu olacak şekilde Kİ-MKH'ler NutriStem XF Zengin Besi Ortamı içerisinde 12 kuyulu kaplara ekildiler. 24 sonrasında %100 konflüans yakalandığında, Kontrol-2 ve Deney-2 gruplarında NutriStem XF Zengin Besi Ortamı, Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi Ortamı ile değiştirildi. Kontrol-1 ve Deney-1 gruplarında, NutriStem XF Zengin Besi Ortamı yenilendi. Besi ortamlarının yenilenmesi 2-3 günde bir tekrarlandı. 14. günde Alkalen fosfataz aktivitesinin değerlendirilmesi için önce hücreler %1 (v/v) Triton x-100 içeren fosfat tamponunda (DPBS, pH 7.4) 2 defa dondurma ve çözme yöntemi ile lizize uğratıldı. Daha sonra 1 mg/mL alkalın fosfataz substarı (p-nitrophenol phosphate, p-npp) içeren 1 M diethanolamin, 0,5 M MgCl₂ (pH 9.8) çözeltisi ile muamale edildi. Hücre lizatından 75 µL ve p-npp çözeltisinden 25 µL alınarak, 96 kuyucuklu plate içerisinde 20 dakika karanlıkta inkübasyon gerçekleştirildi. Aktivite ölçümü 405 nm'de UV spektrofotometre ile gerçekleştirildi. ALP aktivitesi (2.3) eşitliği kullanılarak belirlendi. Bu eşitlikte O.D.ÖRNEK ölçülen örneğe ait absorbans değerini; t dakika cinsinden süreyi; ε molar ansorption coefficient değerini; l kuvvet boyunu tanımlar. ε Molar ansorption coefficient değeri, p-npp için 18.75 m⁻¹.cm⁻¹'dir. l kuvvet boyu ise 1 cm'dir.

$$ALP \text{ Aktivite } (IU/L) = \frac{(OD_{\text{ÖRNEK}}) \times 1000 \times \text{Reaksiyon Hacmi}}{(t) \times (\epsilon) \times (l) \times (\text{Örnek Hacmi})} \quad (2.3)$$

Biyo-mineralleşme analizi Alizarin Red S (pH:4,1-4,3) boya çözeltisi ile gerçekleştirildi. Hücreler 500 µL %4 tamponlanmış formalin çözeltisi ile 30 dakika süresince fikse edildi. Çift distile su yıkması sonrası, her kuyuya 1 mL Alizarin Red S boya çözeltisi eklendi ve 20 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında 4 defa distile su ile yıkama gerçekleştirildi. Boyamalar makro ve mikroskop düzeyinde fotoğraflandı.

Elde edilen sayısal verilerin istatistiki değerlendirmesi unpaired Student t test ile Graphpad-Quickcalcs istatistiki analiz web sayfasından yararlanılarak gerçekleştirildi.

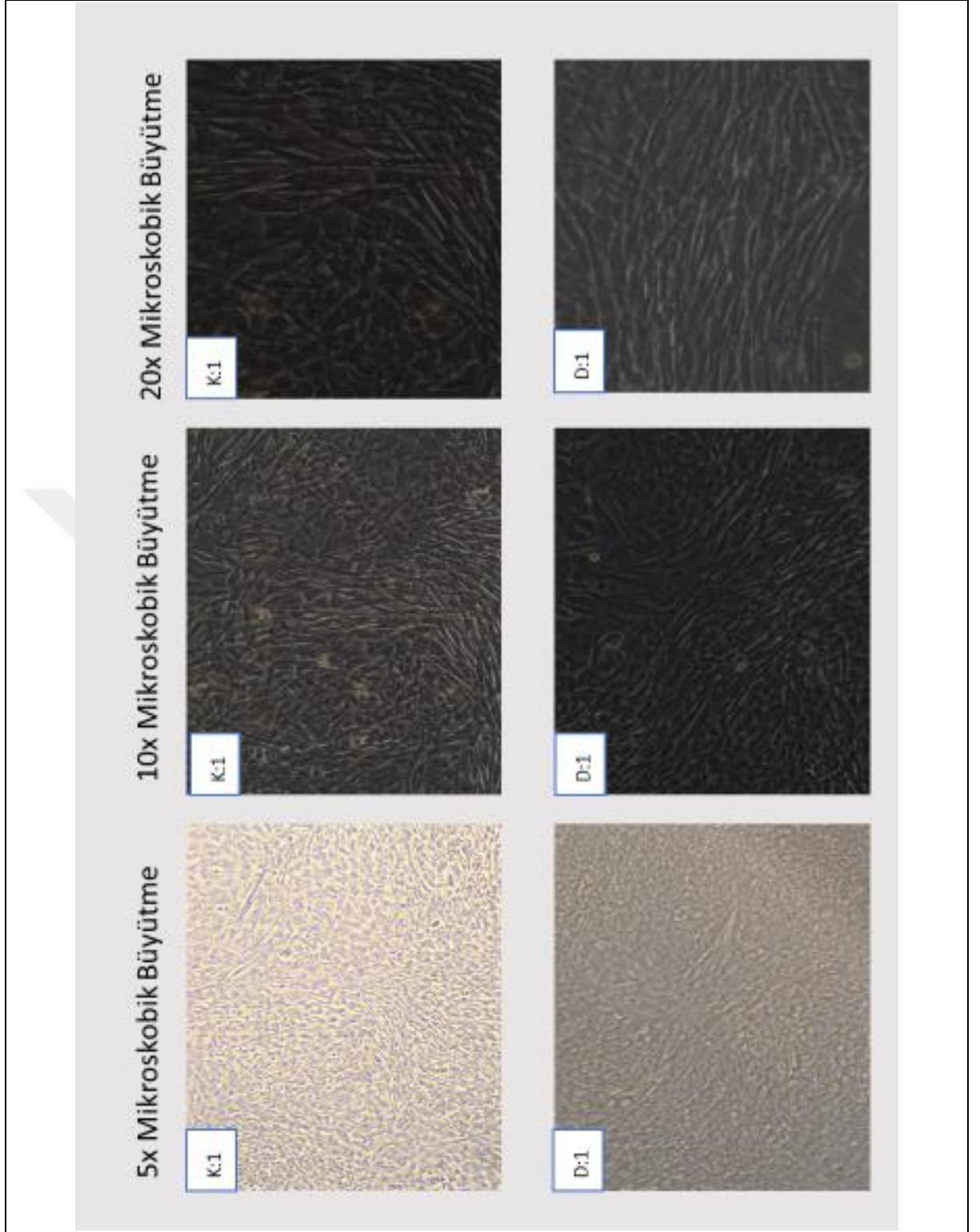
328 mT SMA Tesirinde Osteogenez Sürecinin İncelenmesi



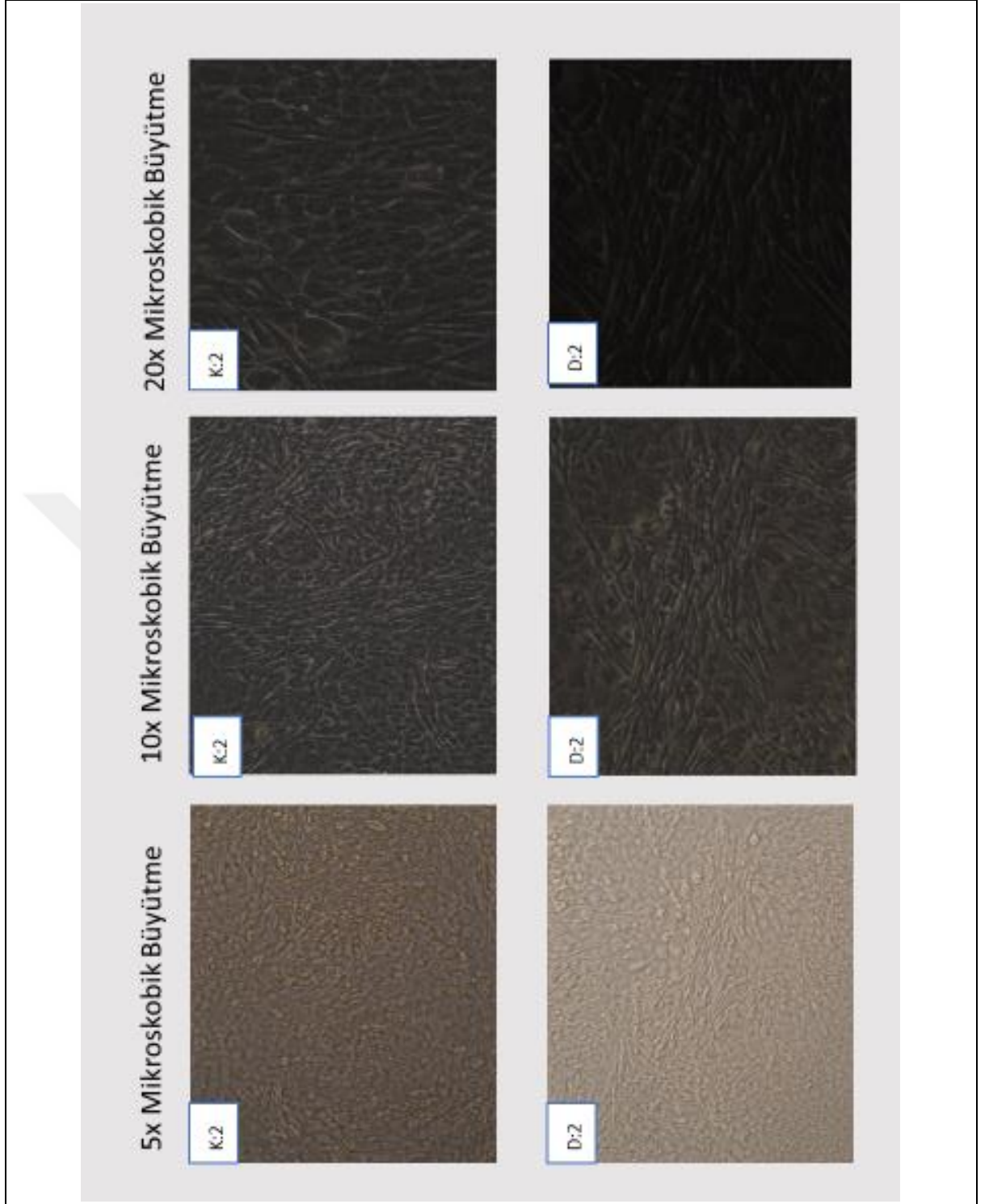
Şekil 2.7 328 mT sma tesirinde ki-mkh osteojenez sürecinin analiz süreci

3.1 328 mT Statik Manyetik Alan Tesirinin Kİ-MKH Oryantasyonu Üzerindeki Etkisi

Kİ-MKH'ler 6 gün kesintisiz (24 saat) 328 mT SMA tesirinde kültüre edildiklerinde belirli bir dizilim kazanırken, SMA tesiri olmayan şartlarda kültüre edilen Kİ-MKH'lerin rastlantısal bir dizilimde oldukları mikroskopik incelemede gözlemlendi (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3). Kİ-MKH büyüme ve çoğalma sürecinin incelenmesinde kullanılan 3 saatlik MTT çözeltisi muamelesi sonrasında elde edilen görüntülerde, deney grubuna ait kuyularda da belirli bir dizilim izlenmektedir. Ancak kontrol grubuna ait kuyuların mikroskopik görüntüsünde rastlantısal dizilim olduğu görülmektedir (Şekil 3.4). Manyetik alan akısı, demir tozları ile görünür kılındığında, 328 mT SMA tesirinde kültüre edilen Kİ-MKH'lerin manyetik alan akı yönüne paralel oryantasyon kazandığı gözlemlendi (Şekil 3.5).



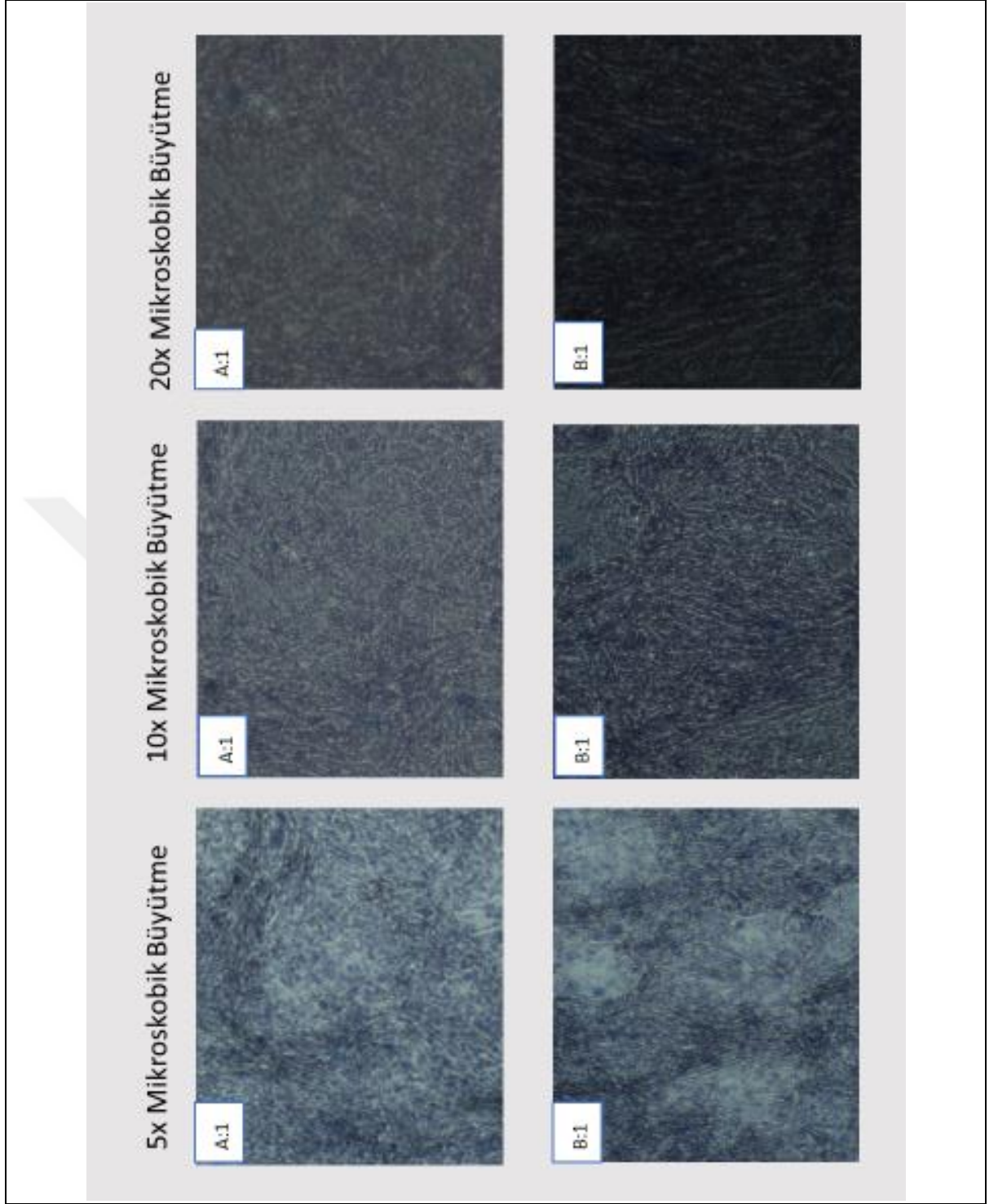
Şekil 3.1 SMA tesirindeki Kİ-MKH'lerin mikroskop altındaki görüntüsü (Kontrol (K1) ve deney (D1) grupları sırasıyla 5x, 10x ve 20x büyütmede görüntüleriyle karşılaştırılmıştır. Deney grubu hücrelerin kontrol grubu hücelere göre belirli bir düzen aldıkları görülmektedir)



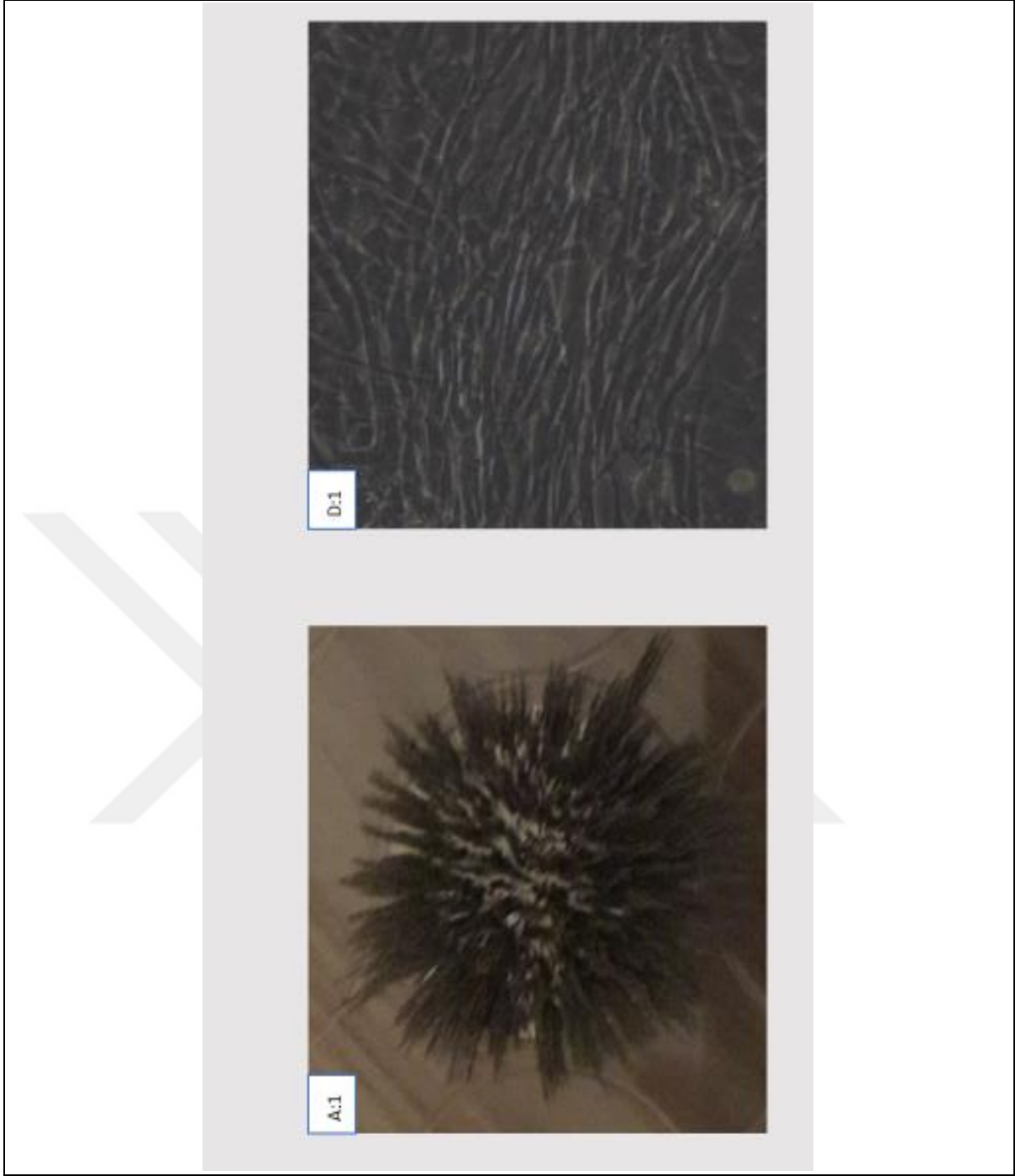
Şekil 3.2 SMA tesirindeki Kİ-MKH'lerin mikroskop altındaki görüntüsü (Kontrol (K2) ve deney (D2) grupları sırasıyla 5x, 10x ve 20x büyütmede görüntüleriyle karşılaştırılmıştır. Deney grubu hücrelerin kontrol grubu hücrelere göre belirli bir düzen aldıkları görülmektedir)



Şekil 3.3 SMA tesirindeki KI-MKH'lerin mikroskop altındaki görüntüsü (Kontrol (K3) ve deney (D3) grupları sırasıyla 5x, 10x ve 20x büyütmede görüntüleriyle karşılaştırılmıştır. Deney grubu hücrelerin kontrol grubu hücelere göre belirli bir düzen aldıkları görülmektedir)



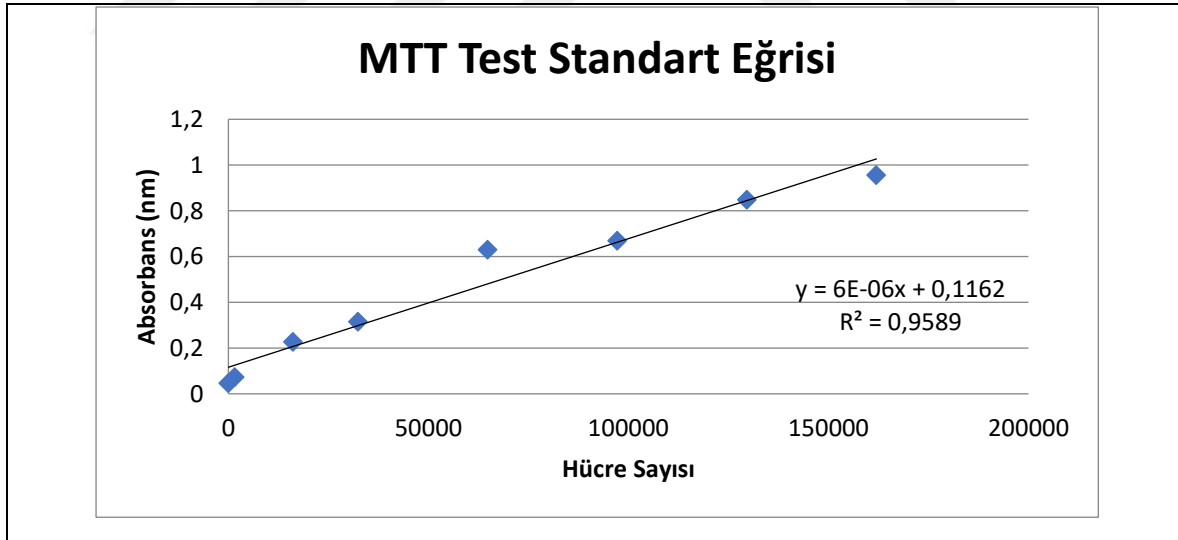
. **Şekil 3.4** Kontrol grubu (A) ve deney grubu (B) kuyularında MTT inkübasyonu sonrası Kİ-MKH'lerin mikroskop görüntüleri. (5x,10x ve 20x büyütmeli görüntüler karşılaştırıldığında deney grubu hücrelerin kontrol grubu hücrelere göre belirli bir düzende olduğu görülmektedir)



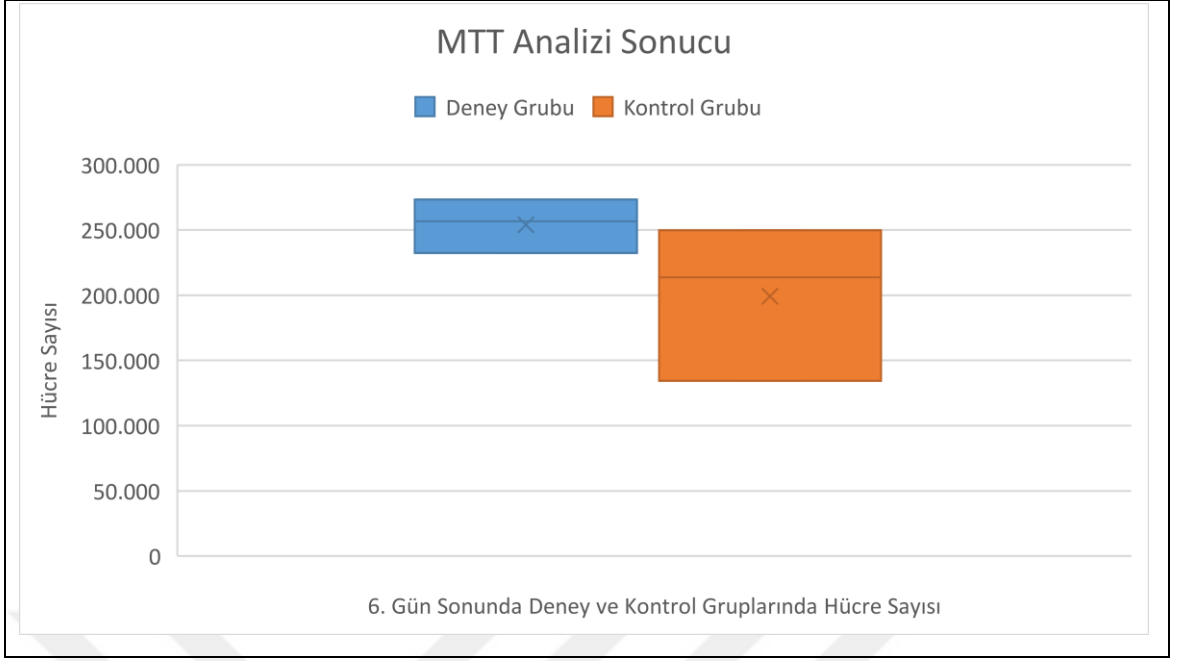
Şekil 3.5 Manyetik alan akısının demir tozları ile görünür kılınması. (Kİ-MKH'lere uygulanan manyetik alan akı demir tozları ile görünür hale getirildiğinde, deney grubu (D1) Kİ-MKH'lerin manyetik alan akı (M1) ile pararel yönde oryantasyon gösterdiği tespit edilmiştir)

3.2 328 mT Statik Manyetik Alan Tesirinin Kİ-MKH Büyüme ve Çoğalmasına Etkisi

6 gün kesintisiz 328 mT SMA tesirinde ve yalnızca doğal jeomanyetik alan büyütülen Kİ-MKH gruplarının büyüme ve çoğalma oranları MTT analizi ile tespit edildi. SMA tesirinde kalan grupta altıncı gün sonunda ortalama, 253.744 canlı hücre/well sayısına ulaşılrken, yalnızca doğal jeomanyetik alan etkisinde bırakılan grupta ortalama 199.300 canlı hücre/well sayısına ulaştı (Tablo 3.1 ve Şekil 3.7). Hücre sayıları, oluşturulan MTT standart eğrisine göre belirlendi (Şekil 3.6). Deney ve kontrol gruplarının populasyon “doubling time (PDT)” süreleri hesaplandığında, kontrol gruplarında ortalama 34,21 saat hesaplanan PDT süresinin deney gruplarında ise, ortalama 31.06 saatte düştüğü tespit edildi (Tablo 3.1). Deney grubu (SMA tesirinde bırakılan) ile kontrol grubu canlı hücre sayısı ortalamalarında ve PDT süreleri incelendiğinde deney grubunda büyüme ve çoğalmanın desteklenmesi yönünde pozitif etki gözlenmesine rağmen ortalamaları arasındaki fark “unpaired student t” testi ile istatistiki olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,2055$). Çalışmamız 328 mT SMA uygulamasının hücre büyümesi ve çoğalması üzerinde olumlu veya olumsuz etkisinin olmadığını göstermektedir.



Şekil 3.6 MTT testi standart eğrisi



Şekil 3.7 6. Gün sonunda deney ve kontrol gruplarında hücre sayıları ($p=0,2025$)

Tablo 3.1 MTT analizi (deney ve kontrol grubu herbir kuyucuktaki ki-mkh'lerin mtt absorbans değerleri ve tespit edilen hücre sayıları gösterilmektedir)

	Kontrol Grubu Absorbans	Kontrol Grubu Hücre Sayısı	Kontrol Grubu Populasyon Dubling Time (PDT)
	0,922	134300	34,21 Saat
	1,399	213800	
	1,615	249800	
Ortalama	1,312	199300	
	Deney Grubu Absorbans	Deney Grubu Hücre Sayısı	Deney Grubu Populasyon Dubling Time (PDT)
	1,656	256633	31,06 Saat
	1,51	232300	
	1,75	272300	
Ortalama	1,639	253744	

3.3 328 mT Statik Manyetik Alan Tesirinin Kİ-MKH Osteogenezi Üzerindeki Etkisi

Yalnızca Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi Ortamı (Kontrol-2) ve Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi Ortamıyla beraber 14 gün kesintisiz 328 mT SMA tesirinde kalan (Deney-2) grupların Alkalen fosfataz (ALP) aktivite ortalamaları karşılaştırıldığında, Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi Ortamıyla beraber 14 gün kesintisiz 328 mT SMA tesirinde kalan grupların (Deney Grubu-2) ALP aktivitesinde azalım olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.2 ve Şekil 3.8). Kontrol ve deney gruplarının ALP aktivite değerleri arasındaki fark “unpaired student t” testiyle istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p değeri 0,0336; kontrol ve deney grubu ortalamaları sırayla 31,367 IU/L ve 25,966 IU/L). Alizarin Red S boyama, hücre kültüründe kalsiyum birikiminin (biyo-mineralleşme) gösterilmesi amacıyla kullanıldı. Şekil 3.10’de Kontrol 2 ve Deney 2 Gruplarının Alizarin Red S ile boyanma biçimleri gösterilmektedir. Kontrol 2’de (Şekil 3.10 D) daha yoğun kırmızı renk ile daha yoğun biyo-mineralleşmenin ve Deney-2’de (Şekil 3.10 B) ise daha az yoğunlukta kırmızı renk ile daha az biyo-mineralleşmenin gerçekleştiği gözlemlendi. Bu gözlem, Deney 2 Gruplarında azalan ALP aktivitesi ile uyumludur.

NutriStem XF Zengin Besi Ortamı (Kontrol-1) ve NutriStem XF Zengin Besi Ortamıyla beraber 328 mT SMA tesirinde büyütülen (Deney-1) gruplarının ALP aktivite değerleri arasındaki fark, “unpaired student t” test ile değerlendirildiğinde istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (p değeri 0,1015) (Tablo 3.2 ve Şekil 3.8). Osteogenez için kimyasal uyarım olmaksızın doğal jeomanyetik alan veya 328 mT SMA tesirinin Kİ-MKH’lerin osteoblastik farklılaşması üzerindeki etkisi incelendiğinde, doğal jeomanyetik alan veya 328 mT SMA tesirinin tek başına ALP aktivitesinde değişime neden olmadığı anlaşıldı. Bu gözlem, Şekil 3.9’de izlenen A (Deney-1 grubu) ve C (Kontrol-1 grubu) sıralarında biyo-mineralleşme olmamasıyla (Alizarin Red S ile boyanmama) da desteklenmektedir.

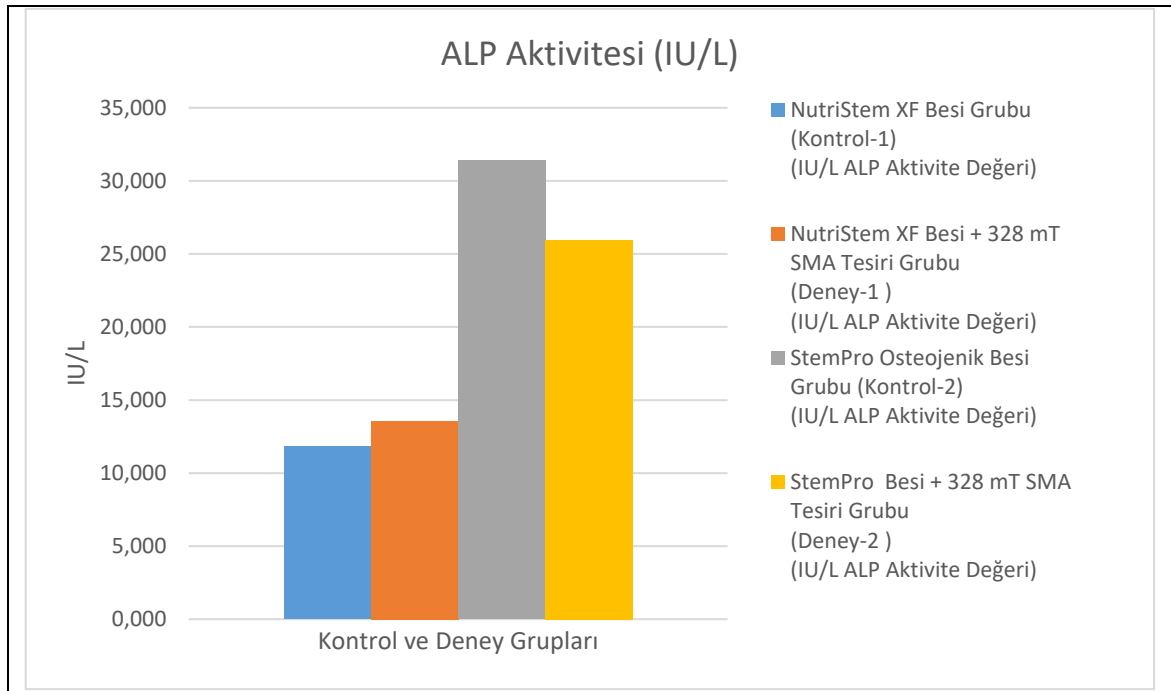
NutriStem XF Zengin Besi Ortamı (Kontrol-1) ve Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi Ortamında büyütülen (Kontrol-2) grupların ALP aktivite değerleri arasındaki fark, “unpaired student t” test ile istatistiki olarak değerlendirildiğinde iki grup arasındaki fark yüksek anlamlılıkta bulunmuştur. (p değeri 0,001; NutriStem ve Stempro gruplarının ALP aktivite ortalamaları 11,844 IU/L ve 31,367 IU/L) (Tablo 3.2 ve Şekil 3.8). Bu durum, Şekil 3.9 ve Şekil 3.10’ de izlenen C (Kontrol-1 grubu) ve D (Kontrol-2 grubu) sıralarında izlenen biyo-

mineralleşme biçimleriyle desteklenmektedir. Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi ortamıyla Ki-MKH grubunda, Alizarin Red S boyaması izlenmektedir.

Stempro Osteogenez Uyarıcı Besiyeri ortamı ile kimyasal osteojenik indüklenmenin Kİ-MKH'lerin osteoblastik dönüşümü tetiklediği, ALP aktivitesindeki ve mineralleşmedeki artış ile gösterildi.

NutriStem XF Zengin besi ortamıyla beraber 328 mT SMA (Deney-1) ve Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi Ortamıyla beraber 328 mT SMA uygulanan (Deney-2) gruplarının ALP aktivitesi değerleri arasındaki fark, “unpaired student t “testi ile değerlendirildiğinde istatistiki olarak yüksek anlamlılıkta olduğu belirlenmiştir. (p değeri 0,001; NutriStem ve Stempro gruplarının ortalamaları 13,575 IU/L ve 25,966 IU/L) (Tablo 3.2 ve Şekil 3.8). Bu durum, Şekil 3.9 ve Şekil 3.10 de izlenen A (Deney-1 grubu) ve B (Deney-2 grubu) sıralarında izlenen biyo-mineralleşme biçimleriyle desteklenmektedir. Stempro Osteogenez Uyarıcı Besi ortamıyla Ki-MKH grubunda, Alizarin Red S boyaması izlenmektedir.

ALP aktivitesi ve Alirazid Red S boyaması ile değerlendirilen biyo-mineralleşme analizlerinden elde edilen sonuçlara göre kesintisiz olarak 328 mT SMA tesirinde kalan Kİ-MKH hücrelerin osteojenik farklılaşmalarında zayıflama olduğu belirlendi.



Şekil 3.8 ALP Aktivitesi analiz sonuçları (IU/L)

Tablo 3.3 ALP aktivitesi analizi için 470 nm’de ölçülen absorbans değerleri ve IU/L sonuçları

	NutriStem XF Besi Grubu (Kontrol-1) (405 nm'de O.D. Değerleri)	NutriStem XF Besi Grubu (Kontrol-1) (IU/L ALP Aktivite Değeri)	NutriStem XF Besi + 328 mT SMA Tesiri Grubu (Deney-1) (405 nm'de O.D. Değerleri)	NutriStem XF Besi + 328 mT SMA Tesiri Grubu (Deney-1) (IU/L ALP Aktivite Değeri)
	0,989	10,549	1,239	13,216
	1,097	11,701	1,274	13,589
	1,245	13,280	1,305	13,920
Ortalama	1,110	11,844	1,273	13,575
	StemPro Osteojenik Besi Grubu (Kontrol-2) (405 nm'de O.D. Değerleri)	StemPro Osteojenik Besi Grubu (Kontrol-2) (IU/L ALP Aktivite Değeri)	StemPro Besi + 328 mT SMA Tesiri Grubu (Deney-2) (405 nm'de O.D. Değerleri)	StemPro Besi + 328 mT SMA Tesiri Grubu (Deney-2) (IU/L ALP Aktivite Değeri)
	2,879	30,709	2,486	26,517
	3,072	32,768	2,161	23,051
	2,871	30,624	2,656	28,331
Ortalama	2,941	31,367	2,434	25,966



Şekil 3.9 Alizarin Red S boyaması ile SMA'nın mineralleşme üzerine etkisinin gösterilmesi (a sırasındaki kuyucuklarda yer alan NutriStem XF Besi Ortamında 328 mT SMA tesirindeki hücre gruplarında mineralleşmenin gerçekleşmediği, b sırasındaki kuyucuklarda yer alan Stempro Osteogenesis Uyarıcı Besi Ortamında 328 mT SMA tesirindeki hücre gruplarında mineralleşmenin gerçekleştiği ve C sırasındaki kuyucuklarda yer alan SMA etkisi olmadan sadece NutriStem XF Besi Ortamındaki hücrelerde mineralleşmenin gerçekleşmediği görülmektedir)

3.4 Tartışma ve Öneriler

Bu çalışmada kesintisiz 328 mT statik manyetik alan (SMA) tesirinin hücre kültür tabağı yüzeyine tutunan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin (Kİ-MKH'lerin) oryantasyonu, büyümesi-çoğalması ve kemik dokusu oluşturma sürecine (osteogeneze) olan etkisi araştırılmıştır. Kİ-MKH'lerin 6 günlük 328 mT SMA tesirinde, manyetik alan akı yönüne paralel oryantasyon kazandığı gözlenirken, aynı etkinin Kİ-MKH'lerin büyüme ve çoğalması üzerinde etki oluşturmadığı görülmüştür. Kemik dokusu oluşturma sürecine olan etkinin incelenmesi deneyinde 14 gün boyunca 328 mT SMA tesirinde bırakılan ve aynı zamanda kimyasal olarak osteogenik indüksiyonu yapıldığında Kİ-MKH'lerin Alkalın Fosfataz (ALP) aktivitesinin ve biyo-mineralleşmesinin bozulduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte osteogenik indüksiyon yapılamayan sadece 328 mT SMA tesirinde bırakılan deney koşullarında ise Kİ-MKH'lerin bazal ALP aktivitesinin etkilenmediği görülmüştür.

Manyetik alan akısı, demir tozları ile görünür kılındığında (Şekil 3.5) 328 mT SMA tesirinde Kİ-MKH'lerin manyetik akı yönünde oryantasyon kazandığının gözlemlenmesi, yayınlanmış çalışma bulgularıyla desteklenmektedir. Kotani ve arkadaşları tarafından, MC3T3-E1 hücrelerinin 60 saat kesintisiz 8 T SMA tesirinde kültür tabağı yüzeyinde manyetik akı doğrultusuna paralel dizildikleri gösterilmiştir [61]. Göbek kordon bağı kök hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada Sadri ve arkadaşları tarafından, 8 saat 18 mT SMA içerisinde çoğaltılan göbek kordon bağı MKH'ların manyetik alan doğrultusunda konum kazandığı bildirilmektedir [78]. Benzer gözlemler, Murayama ve arkadaşları tarafından eritosit süspansiyonlarında da gerçekleştirilmiştir [59]. Bu yönelim eğilimi, harici statik manyetik alanın küresel olmayan diyamanyetik anizotrop parteküller üzerinde tork uygulaması kaynaklıdır.

MKH'lerin manyetik akı yönünde oryantasyon kazandığına dair çalışma sonuçları ortaklık gösterirken, SMA tesirinin hücrelerin büyüme ve çoğalma süreçlerine etkisi üzerine çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Kim ve çalışma grubu tarafından 1, 3, 5, 7 ve 9 gün, 3 mT, 15 mT ve 50 mT SMA tesirinde büyütülen Kİ-MKH'lerin, proliferasyon ve büyüme oranlarında artış tespit edildiği bildirilmiştir [79]. Marediziak ve çalışma grubu tarafından 7 gün, 0,5 T SMA'da büyütülen adipoz kaynaklı MKH'ların proliferasyon ve büyüme oranlarında tespit edilen artışla bu gözlem desteklenmektedir [73]. Ancak, Silva ve çalışma grubu tarafından,

24 ve 48 saat, 0,3-0,45 T SMA tesirinde büyütülen fare kemik iliği MKH'lerinde canlılık kaybı olduğu gösterilmiştir [80]. Cunha ve çalışma grubu tarafından 1, 3 ve 7 gün 1 saat veya 24 saat 320 mT SMA tesirinde büyütülen insan osteoblast benzeri hücrelerin proliferasyon ve büyüme oranlarının da azaldığı tespit edilmiştir [81]. Yamamoto ve arkadaşları tarafından 2, 4, 6, 8 ve 10 gün, 280 mT veya 340 mT SMA tesirinde çoğaltılan sıçan osteoblastlarının proliferasyonlarında, kontrol gruplarına göre bir değişim görülmediği bildirilmektedir [82].

Çalışmamızda 328 mT SMA tesirinin hücre büyüme ve çoğalması üzerinde bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Bu bulgu, Hsu ve Chang tarafından [75] dental pulpa hücrelerinde ve Yamamoto ve arkadaşları tarafından [82] sıçan osteoblastlarında 280-340 mT aralığında SMA'nın hücre büyüme ve çoğalma üzerine bir etkisinin olmadığına dair verilerle uyumludur. Bu iki çalışmada sonuçlar, S fazında yer alan hücre sayısında artışa rağmen G2/M fazının tetiklenmemesi ile açıklanmaktadır. Yang ve arkadaşları, 200 mT SMA tesirinde büyütülen MC3T3-C1 hücrelerinde, Hsu ve Yamamoto'nun açıklamalarını benzer gözlemlerle destekleyerek, bu şartlar altında hücre kültürü besi ortamında demir konsantrasyonu azılırken hücre içerisinde demir konsantrasyonunun artışına yönelik veriler sunmuşlardır [36].

SMA'nın osteogenez sürecine olan etkisini araştırmak amacıyla yaptığımız deneylerde 328 mT SMA tesirinde ALP aktivitesinin ve mineralleşmenin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.8 ve Şekil 3.10). Bir metalloenzim olan ALP'nin, doku çeşitliliği gösteren izoenzimler halinde bulunduğu bilinmektedir. ALP'nin temel işlevi, fosfomonosterleri hidrolize etmektir. ALP'in kemik dokusunda yüksek konsantrasyonlarda ifade edildiği de bilinmektedir. Dokunun mineralleşmesinde ALP'in lokal fosfat konsantrasyonu artırdığı ve böylece mineralleşme sürecini tetiklediği düşünülmektedir. ALP'in doku mineralleşmesindeki önemi, ALP eksikliği ve mineralleşmeyen (yumuşak) kemik bulgularıyla ortaya çıkan genetik hipofosfataz hastalığında anlaşılmaktadır. ALP'in doku mineralleşmesindeki katkısının ne şekilde olduğu tam anlaşılmamış olsa da kemikleşme ve doku mineralleşmesinde bir belirteç olduğu kabul edilmektedir [83]. Osteoblast ve kondrosit kültürlerinde gerçekleştirilen çalışmalar, ALP'nin mineralleşme sürecinin erken evresinde artarak hücre yüzeyinde ve matriks vesikülleri içerisinde tespit edilir hale geldiğini göstermiştir. Sürecin ileri evresinde ise osteokalsin ve diğer gen ifadeleri artarken ALP ifadesi azaldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle kemikleşme veya mineralleşmenin erken

evresinde ALP, kalsifikasyon sürecinde etkili olmaktadır. Transgenik hayvan modellerinde, bir kalsifikasyon inhibitörü olan pirofosfatın (ePPI) ankilosiz proteini tarafından hücre içine taşınması sonrasında ALP etkinliği ile yıkıldığı ve kalsifikasyon tetikleyicisi inorganik fosfat konsantrasyonunun artırıldığı gösterilmiştir [83]. Bu bulgular, çalışmamızda ALP aktivitesi ile minerallenme arasında kurduğumuz pozitif korelasyonu desteklemektedir.

Wang ve arkadaşları tarafından 7 gün kesintisiz 0.5 T SMA tesirinde adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinde yapılan çalışmada da osteojenik farklılaşma yeterliliğinde azalma tespit edilmiştir [77]. Bir başka çalışmada 8 gün 200 mT SMA tesirine bırakılan MC3T3-E1 hücrelerinin ALP aktivitesi ve mineralleşme etkinliğinde azalma gösterilirken hücreler 16 T SMA tesirine bırakıldığında ALP aktivitesi ve mineralleşmenin kontrol grubuna göre arttığı bildirilmiştir [36]. Ayrıca 200 mT SMA varlığında MC3T3-C1 hücrelerinde, demiri hücre dışına taşıyan ferroprotein 1 ve demir deposu olarak işlev gören Ferritin H alt ünitesinin gen ifadesinde artış olduğunu gösterilmiştir [38].

Literatür verileri, ekstraselüler ve intraselüler demir konsantrasyonu ile osteojenez süreci arasında negatif korelasyon olduğunu göstermektedir. 128 mT SMA etkisinde fare plazmalarında demir konsantrasyonunun azaldığı ve transferin oranının arttığı kaydedilmiştir [84]. 128 mT SMA etkisinde bırakılan sıçanların serumlarında Na, K, Ca, P, Se, Zn ve Fe konsantrasyonları incelemiştir. Bu çalışmada Na, K, Ca, P ve Se konsantrasyonlarında değişim gözlenmezken Zn konsantrasyonunun arttığı ve Fe konsantrasyonu azaldığı tespit edilmiştir [85]. Demir konsantrasyonlarında büyütülen osteoblast hücrelerinde, hücre içi demir ve reaktif oksijen türevlerinin arttığını; ALP etkinliğinin ve biyo-mineralleşmenin ise azaldığının tespit edilmiştir [86]. Hücre içi artan demir konsantrasyonunun ALP aktivitesini ve osteojenik yolağı inhibe ettiği, ayrıca dışardan ferritin tekviyesinin de yine inhibisyona sebep olduğu gösterilmiştir [87]. Böylece hem hücre içi demir hem de ferritin konsantrasyonundaki artışın osteojenik yönelimi engellediğini belirtmişlerdir.

Orta şiddetli SMA tesirinde hücre içi serbest veya çözünebilir demir (Fe^{+2}) konsantrasyonunun değişimi, Fenton tepkimeleri aracılığı ile serbest radikallerin oluşumuna ortam oluşturması bakımından önemlidir. Ayrıca orta şiddetli SMA tesirinin, hücre içerisinde serbest radikal (reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türevleri) oluşumunu tetiklediği, serbest radikallerin yarı ömrünü artırdığı bildirilmektedir [89]. Bu durumu hücre içi antioksidasyon sistemlerinin (katalaz, glutatyon peroksidaz vb.) etkinliklerini azaltarak gerçekleştirdikleri gösterilmiştir.

Serbest radikal çiftlerin oluşması halinde, SMA'nın elektronların rölatif oryantasyonlarına etkiyerek tepkime kinetiğine ve hücrel işlevlere müdahale etmesi de mümkündür [23].

Çalışmamızın bulguları mevcut literatür verileriyle beraber değerlendirildiğinde, 328 mT SMA varlığında artan hücre içi demir konsantrasyonun, hücre içi serbest radikallerin oluşumunu tetiklediği, bunun sonucu olarak da kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında hücre büyüme ve çoğalmasında istatistiki olarak anlamlı bir artışın olmamasına rağmen osteojenez sürecinde ALP gen ifadesinde olması gereken artışı ve biyomineralenmeyi önlediği düşünülmektedir.

Çalışmamız yenileyici tedavi yöntemleri, hedefe yönelik ilaç salınımı gibi yöntemlere bir araç olarak kullanılan SMA'nın bu uygulamalar sırasında kök hücreler üzerindeki etkisinin anlaşılmasına yönelik bir başlangıç çalışmasıdır. İleriki çalışmalarımızda, deney setlerinin farklı SMA seviyelerinde etkisini gözlemek üzere genişletilerek, bu SMA uygulamalarında ortaya çıkan hücrel cevapların farklı gen ve protein markırlarının transkripsiyon ve ekspresyon düzeyinde ölçümleri ile incelenmesi hedeflenmektedir. Ayrıca ileri seviye çalışmalarda, orta şiddetli SMA'nın hücre oryantasyonu üzerindeki etkisinin membran mikrodomeinleri (raft benzeri yapılar veya tetraspaninler) üzerindeki etkisinin gösterilmesinin de açıklayıcı olacağı düşünülmektedir. SMA tesirinin hücre çoğalması ve farklılaşması üzerindeki etkisinin açıklanmasında, ortama antioksidan etken ilavesiyle (vitamin C vb.) beraber orta şiddetli SMA tesirinin tekrarlanacağı in vitro modellerin işlevsel olacağı deneyler planlanabilir.

- [1] D.C. Mattis, The theory of magnetism. Verlag Berlin Heidelberg:Springer, 1981.
- [2] R. S. Westfall, Modern bilimin oluşumu. Ankara: Tübitak, 2008.
- [3] A. P. Dubrov, The geomagnetic field and life: Geomagnetobiology. New York: Springer US, 1978.
- [4] D. S. Durward, Magnetite biomineralization and magnetoreception in organisms, Boston:Springer US, 1985.
- [5] V. N. Binhi ve F. S. Prato, “Biological effects of the hypomagnetic field: An analytical review of experiments and theories”, Plos One, vol. 12, pp. e0179340, 2017.
- [6] Ladestone (Magnetit), Rock Gallery, <https://www.therockgallery.co.uk/lodestone-magnetite---natural-magnets-1032-p.asp>, [Erişim tarihi: 01-Aralık-2019].
- [7] Maps of Magnetic Elements from the WMM2015v2, National Centers for Enviromental Information (NOAA), <https://www.ngdc.noaa.gov/geomag/WMM/image.shtml>. [Erişim tarihi: 01-Aralık-2019]
- [8] K. J. Lohmann ve C. M. Lohmann, “There and back again: Natal homing by magnetic navigation in sea turtles and salmon”, Journal of Experimental Biology”, vol. 222, pp. jeb184077, 2019.
- [9] Electromagnetic Fields, European Union Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/en/electromagnetic-fields07/#1. [Erişim tarihi: 25-Kasım-2019]
- [10] V. N. Binhi, Magnetobiology : Underlying physical problems. Londra: Elsevier Science-Academic Press, 2002.
- [11] I. Belyaev, A. Dean, H. Eger, G. Hubmann, R. Jandrisovits, M. Kern, M. Kundi, H. Moshammer, P. Lercher, K. Müller, G. Oberferld, P. Ohnsorge, P. Pelzmann, C. Scheingraber, R. Thrill, “EUROPAEM EMF Guideline 2016 for the prevention diagnosis and treatment of EMF-related health problems and illnesses”, Reviews on Environmental Health, vol. 31, pp. 363–397, 2016.

- [12] D. O. Carpenter, “Extremely low frequency electromagnetic fields and cancer: How source of funding affects results”, *Environmental Research*, vol. 178, pp. 108688, 2019.
- [13] *Plane Electromagnetic Waves*, BC Open Textbooks: University Physics Volume II, <https://opentextbc.ca/universityphysicsv2openstax/chapter/plane-electromagnetic-waves/>. [Erişim tarihi:25-Kasım-2019].
- [14] Geneva CERN Accelerator School, (1997). CAS - CERN Accelerator School : Measurement and Alignment of Accelerator and Detector Magnets, Yayın No: 98-05, Geneva.
- [15] M.S. Markov, “XXIst Century magnetotherapy”, *Electromagnetic Biology and Medicine*, vol. 34, pp. 190-196, 2015.
- [16] M.S. Markov, “Magnetic field therapy: A review”, *Electromagnetic Biology and Medicine*, vol.26, pp. 1-23, 2007.
- [17] R. G. Sorrell, J. Muhenfeld, J. Moffett, G. Stevens ve S. Kesten, “Evaluation of pulsed electromagnetic field therapy for the treatment of chronic postoperative pain following lumbar surgery: A pilot, double-blind, randomized, sham-controlled clinical trial”, *Journal of Pain Research*, vol. 11, pp. 1209-1222, 2018.
- [18] M.F. Barnothy, *Biological effects of magnetic fields*. London:Springer, 1965.
- [19] C.G. Stefanita, *Magnetism: Basics and applications*. London:Springer, 2012.
- [20] R.S. Rikken, R.M. Nolte, J.C. Maan, J.M. Hest, D.A. Wilsonb , P.M. Christianen, “Manipulation of micro- and nanostructure motion with magnetic fields”, *Soft Matter*, vol. 10, pp.1295-1308, 2014.
- [21]Magnetic Materials Background,University of Birmingham, <http://www.magnets.bham.ac.uk/magneticmaterials/index.shtml>. [Erişim tarihi:12 Nisan 2019].
- [22] Geomagnetism Historical Main Field Change and Declination, Cooperative Institute for Research in Environmental Sciences at the University of Colorado Boulder, <http://geomag.org/info/declination.html>. [Erişim tarihi: 26-Kasım-2019]
- [23] A.D. Rosen, “Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems”, *Cell Biochemistry and Biophysics*, vol. 39, pp. 163-173, 2003.

- [24] S. Klumpp, B. Kiani, P. Vach ve D.Faivre, “Navigation with magnetic nanoparticles:Magnetotactic bacteria and magnetic micro-robot”, *Physica Scripta*, vol. 2015, pp. 1-6, 2015.
- [25] R.B. Frankel, ve R.P. Blakemore,“Navigational compass in magnetic bacterias”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol.15-18, pp.1562-1564, 1980.
- [26] T. Islam, C. Peng, I. Ali, “Morphological and cellular diversity of magnetotactic bacteria:Review”, *Journal of Basic Microbiology*, vol. 58, pp.1-12, 2017.
- [27] X. Zhang, K. Yarema, ve A. Xu, *Biological Effects of Static Magnetic Fields*. Singapore: Springer,2017.
- [28] Cryptochrome and Magnetic Sensing, University of Inninois :Theoretical and Computational Biophysic Group, <http://www.ks.uiuc.edu/Research/cryptochrome/>. [Erişim tarihi: 11-Kasım-2019]
- [29] D. Wang , Z. Wang, L. Zhang, Z. Li , X. Tian , J. Fang ve X. Zhang, “Cellular ATP levels are affected by moderate and strong static magnetic fields”, *Bioelectromagnetics*, vol. 39, pp. 350-360, 2018.
- [30] Diamagnetic Levitation, High Field Magnet Laboratory-Redbound University Faculty of Science, <https://www.ru.nl/hfml/research/levitation/diamagnetic-levitation/>. [Erişim tarihi: 27-Kasım-2019].
- [31] Z. Wang, P. Che, J. Du, B. Ha ve K. J. Yarema, “Static magnetic field exposure reproduces cellular effects of the Parkinson’s Disease drug candidate ZM241385”, *PLoS One*, vol. 5, pp. e13883, 2010.
- [32] C. Grassi, M. D'Ascenzo, A. Torsello, G. Martinotti, F. Wolf , A. Cittadini, G. Azzena, “Effects of 50 Hz Electromagnetic Fields on Voltage-Gated Ca²⁺ Channels and Their Role in Modulation of Neuroendocrine Cell Proliferation and Death”, *Cell Calcium*, vol. 35, pp. 307-315,2004.
- [33] A.D. Rosen ve E.E. Chastney, “Effect of long term exposure to 0.5 T static magnetic fields on growth and size of GH3 cells”, *Bioelectromagnetics*, vol. 30, pp. 114-119, 2009.

- [34] S. Stolfa, M. Sorvánek, P. Stolfa, J. Rosocha, G. Vasko ve J. Sabo, “Effects of static magnetic field and pulsed electromagnetic field on viability of human chondrocytes in vitro”, *Physiological Research*, vol. 56, pp. 45-49, 2007.
- [35] S.A. Barnaba, L. Ruzzini, A. Di Martino, A. Lanotte, A. Sgambato ve V. Denaro, “Clinical significance of different effects of static and pulsed electromagnetic fields on human osteoclast cultures”, *Rheumatology International*, vol. 32, pp. 1025-1031, 2012.
- [36] J. Yang, J. Zhang ve C. Ding, “Regulation of osteoblast differentiation and iron content in MC3T3-E1 cells by static magnetic field with different intensities”, *Biological Trace Element Research*, vol. 184, pp. 214-225, 2018.
- [37] Y. Takashima, J. Miyakoshi, M. Ikehata, M. Iwasaka, S. Ueno, T. Koana, “Genotoxic effects of strong static magnetic fields in DNA-repair defective mutants of *Drosophila Melanogaster*”, *Journal of Radiation Research*, vol. 45, pp. 393-397, 2004.
- [38] C.E. Morris ve T.C. Skalak, “Acute exposure to a moderate strength static magnetic field reduces edema formation in rats”, *American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology*, vol. 294, pp. 50-57, 2008.
- [39] H. Hirose, T. Nakahara, Q.M. Zhang, S.S. Yonei ve J. Miyakoshi, “Static magnetic field with a strong magnetic field gradient (41.7 T/m) induces c-Jun expression in HL-60 cells”, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, vol. 39, pp. 348-352, 2003.
- [40] A. Chionna, B. Tenuzzo, E. Panzarini, M.B. Dwikat, L. Abbro ve L. Dini, “Time dependent modifications of Hep G2 cells during exposure to static magnetic fields”, *Bioelectromagnetics*, vol. 26, pp.275-286, 2005.
- [41] I.D. Milovanovich, S. Ćirković, S.R. De Luka, D.M. Djordjevich, A. Ž. Ilić, T. Popović ve A.M. Trbovich, “Homogeneous static magnetic field of different orientation induces biological changes in subacutely exposed mice”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, pp.1584-1597,2016.
- [42] S.R. De Luka, A. Ž. Ilić, S. Janković, D.M. Djordjevich, S. Ćirković, I.D. Milovanovich ve A.M. Trbovich, “Subchronic exposure to static magnetic field differently affects zinc and copper content in murine organs”, *International Journal of Radiation Biology*, vol. 92, pp. 140-147, 2016.

- [43] X. Tian, D. Wang, M. Zha, X. Yang, X. Ji, L. Zhang ve X. Zhang, “Magnetic field direction differentially impacts the growth of different cell types”, *Electromagnetic Biology and Medicine*, vol. 37, pp. 114-125, 2018.
- [44] T. Higashi, A. Yamagishi, T. Takeuchi, N. Kawaguchi, S. Sagawa, S. Onishi ve M. Date, “Orientation of erythrocytes in a strong static magnetic field”, *Blood*, vol. 82, pp. 1328-1334, 1993.
- [45] A. Prina-Mello, E. Farrell, P.J. Prendergast, V. Campbell ve J.M. Coey, “Influence of strong static magnetic fields on primary cortical neurons”, *Bioelectromagnetics*, vol. 27, pp. 35-42, 2006.
- [46] C. Fanelli, S. Coppola, R. Barone, C. Colussi, G. Gualandi, P. Volpe ve L. Ghibelli, “Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca²⁺ influx”, *The FASEB Journal*, vol. 13, pp. 95-102, 1999.
- [47] L. Ghibelli, C. Cerella, S. Cordisco, G. Clavarino, S. Marazzi, M. De Nicola ve L.M. Porfiri, “NMR exposure sensitizes tumor cells to apoptosis”, *Apoptosis*, vol. 11, pp. 359-365, 2006.
- [48] J. Zhang, C. Ding ve P. Shang, “Alterations of mineral elements in osteoblast during differentiation under hypo, moderate and high static magnetic fields”, *Biological Trace Element Research*, vol. 162, pp. 153-7, 2014.
- [49] W.O. Short, L. Goodwill, C.W. Taylor, C. Job, M.E. Arthur ve A.E. Cress, “Alteration of Human Tumor Cell Adhesion by High-Strength Static Magnetic Fields”, *Investigative Radiology*, vol. 27, pp. 836-840, 1992.
- [50] M. Ogiue-Ikeda ve S. Ueno, “Magnetic cell orientation depending on cell type and cell density”, *IEEE Transactions on Magnetics*, vol. 40, pp. 3024-3026, 2004.
- [51] K. Sullivan, A.K. Balin, R.G. Allen, “Effects of static magnetic fields on the growth of various types of human cells”, *Bioelectromagnetics*, vol. 32, pp. 140-147, 2011.
- [52] C. Aldinucci, J.B. Garcia, M. Palmi, G. Sgaragli, A. Benocci, A. Meini ve C. Bonechi, “The effect of exposure to high flux density static and pulsed magnetic fields on lymphocyte function”, *Bioelectromagnetics*, vol. 24, pp. 373-379, 2003.

- [53] R.R. Raylman, A.C. Clavo ve R.L. Wahl, "Exposure to strong static magnetic field slows the growth of human cancer cells in vitro", *Bioelectromagnetics*, vol.17, pp. 358-363, 1996.
- [54] T. Nakahara, H. Yaguchi, M. Yoshida ve J. Miyakoshi, "Effects of exposure of CHO-K1 cells to a 10-T static magnetic field", *Radiology*, vol.224, pp. 817-822, 2002.
- [55] L. Zhang, X. Ji, X. Yang ve X. Zhang, "Cell type- and density-dependent effect of 1 T static magnetic field on cell proliferation", *Oncotarget*, vol. 8, pp. 13126-13141, 2017.
- [56] D. Melville, "Direct magnetic separation of red cells from whole blood", *Nature*, vol. 255, pp.706, 1975.
- [57] C.S. Owen, "High gradient magnetic separation of erythrocytes", *Biophysics Journal*, 22(2):171-178, 1978.
- [58] F. Paul, S. Roath, D. Melville, D.C. Warhurst ve J.O. Osisanya, "Separation of malaria-infected erythrocytes from whole blood: Use of a selective high-gradient magnetic separation technique", *Lancet*, vol. 8, pp. 70-71, 1981.
- [59] M. Murayama, "Orientation of sickled erythrocytes in a magnetic field", *Nature*, vol. 206, pp. 420-422, 1965.
- [60] T. Higashi, S. Sagawa, N. Ashida ve T. Takeuchi, "Orientation of glutaraldehyde-fixed erythrocytes in strong static magnetic fields", *Bioelectromagnetics*, vol.17, pp. 335-338, 1996.
- [61] H. Kotani, H. Kawaguchi, T. Shimoaka, M. Iwasaka, S. Ueno, H. Ozawa ve K. Hoshi, "Strong static magnetic field stimulates bone formation to a definite orientation in vitro and in vivo", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 17, pp. 1814-1821, 2002.
- [62] M. Iwasaka, J. Miyakoshi, S. Ueno, "Magnetic field effects on assembly pattern of smooth muscle cells", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, vol. 39, pp. 120-123, 2003.
- [63] Y. Eguchi, M. Ogiue-Ikeda ve S. Ueno, "Control of orientation of rat schwann cells using an 8-T static magnetic field", *Neuroscience Letters*, 351(2):130-132, 2003.
- [64] R. Emura, N. Ashida, T. Higashi, ve T. Takeuchi, "Orientation of bull sperms in static magnetic fields", *Bioelectromagnetics*, vol. 22, pp. 60-65, 2001.

- [65] F.T. Hong, D. Mauzerall ve A. Mauro, “Magnetic anisotropy and the orientation of retinal rods in a homogeneous magnetic field”, *Proceedings of The National Academy of Sciences of United States of America*, vol. 68, pp. 1283-1285, 1971.
- [66] E. Calabrò ve S. Magazù, “Infrared spectroscopic demonstration of magnetic orientation in SH-SY5Y neuronal-like cells induced by static or 50 Hz magnetic fields”, *International Journal of Radiation Biology*, vol. 95, pp. 1-8, 2019.
- [67] G. Malinin, W.D. Gregory, L. Morelli, V.K. Sharma, J.C. Houck, “Evidence of morphological and physiological transformation of mammalian cells by strong magnetic fields”, *Science*, vol. 194, pp. 844-846, 1976.
- [68] S. Pacini, S. Aterini, P. Pacini, C. Ruggiero, M. Gulisano ve M. Ruggiero, “Influence of static magnetic field on the antiproliferative effects of vitamin D on human breast cancer cells”, *Oncology Research*, vol. 11, pp. 265-271, 1996.
- [69] S. Pacini, M. Gulisano, B. Peruzzi, E. Sgambati, G. Gheri, S. Gheri Bryk ve M. Ruggiero, “Effects of 0.2 T static magnetic field on human skin fibroblasts”, *Cancer Detection and Prevention*, vol. 27, pp. 327-332, 2003.
- [70] C.H. Hsieh, M.C. Lee, J.J. Tsai-Wu, M.H. Chen, H.S. Lee, H. Chiang, H. ve C.C. Jiang, “Deleterious effects of MRI on chondrocytes”, *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 16, pp. 343-351, 2008.
- [71] Y. Li, L.Q. Song, M.Q. Chen, Y.M. Zhang, J. Li, X.Y. Feng ve J. Yu, “Low strength static magnetic field inhibits the proliferation, migration, and adhesion of human vascular smooth muscle cells in a restenosis model through mediating integrins β 1-FAK, Ca^{2+} signaling pathway”, *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 40, pp.2611-2618, 2012.
- [72] C.F. Martino, H. Perea, U. Hopfner, V.L. Ferguson, E. Wintermantel, “Effects of weak static magnetic fields on endothelial cells”, *Bioelectromagnetics*, vol. 31, pp. 296-301, 2010.
- [73] M. Marędziak, K. Tomaszewski, P. Polinceusz, D. Lewandowski ve K. Marycz, “Static magnetic field enhances the viability and proliferation rate of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells potentially through activation of the phosphoinositide 3-

- kinase/Akt (PI3K/Akt) pathway". *Electromagnetic Biology and Medicine*, vol. 36, pp. 45-54, 2017.
- [74] D. Coletti, L. Teodori, M.C. Albertini, M. Rocchi, A. Pristerà, M. Fini ve S. Adamo, "Static magnetic fields enhance skeletal muscle differentiation in vitro by improving myoblast alignment", *Cytometry Part A: Journal of Quantitative Cell Science*, vol.71, pp. 846-856,2007.
- [75] S.H. Hsu ve J.C. Chang, "The static magnetic field accelerates the osteogenic differentiation and mineralization of dental pulp cells", *Cytotechnology*, vol. 62, pp. 143-155,2010.
- [76] L. Dini, M. Dwikat, E. Panzarini, C. Vergallo ve B. Tenuzzo, B., "Morphofunctional study of 12-O-tetradecanoyl-13-phorbol acetate (TPA)-induced differentiation of U937 cells under exposure to a 6 mT static magnetic field", *Bioelectromagnetics*, vol. 30, pp. 352-364, 2009.
- [77] X.B. Wang, "Inhibition of viability, proliferation, cytokines secretion, surface antigen expression, and adipogenic and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells by seven-day exposure to 0.5 T static magnetic fields", *Stem Cells International*, vol. 2016, pp. 7865178,2016.
- [78] M. Sadri, P. Abdolmaleki, M. Behmanesh, S. Abrun ve B. Beiki, "Static magnetic field effect on differentiation in human mesenchymal stem cells", *Journal of Stem Cells Research, Reviews & Reports*, vol. 5, pp. 1025,2018.
- [79] E.C. Kim, R. Leesungbok, S. Lee, H.W. Lee, S.H. Park, S.J. Mah ve S. J. Ahn, "Effects of moderate intensity static magnetic fields on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells", *Bioelectromagnetics*, vol. 36, pp. 267-276,2015.
- [80] L.H. Silva, S.M. Silva, E.D. Lima, R.C. Silva, D.J. Weiss, M.M. Morales ve P.M. Rocco, "Effects of static magnetic fields on natural or magnetized mesenchymal stromal cells: Repercussions for magnetic targeting", *Nanomedicine*, vol.14, pp. 2075-2085, 2018.
- [81] C. Cunha, S. Panseri, M. Marcacci ve A. Tampieri, "Evaluation of the effects of a moderate intensity static magnetic field application on human osteoblast-like cells", *American Journal of Biomedical Engineering*, vol. 2, pp. 263-268, 2012.

- [82] Y. Yamamoto, Y. Ohsaki, T. Goto, A. Nakasima ve T. Lijima, “Effects of static magnetic fields on bone formation in rat osteoblast cultures”, *Journal of Dental Research*, vol. 82, pp. 962-966, 2003.
- [83] E. Golub, K. Boesze-Battaglia, “The role of alkaline phosphatase in mineralization”, *Current Opinion in Orthopaedics*, vol. 18, pp. 444-448, 2007.
- [84] M. Elferchichi, M. Ammari, K.K. Maaroufi, M.M. Sakly ve H. Abdelmelek “Effects of exposure to static magnetic field on motor skills and iron levels in plasma and brain of rats”, *Brain Injury*, vol. 25, pp. 901-8, 2011.
- [85] L. Aida, G. Soumaya, S. Myriam ve A. Hafedh, “Effects of static magnetic field exposure on plasma element levels in rat”, *Biological Trace Element Research*, 160(1): 67-72, 2014.
- [86] Y.F. He , Y. Ma , C. Gao, G.Y. Zhao, L.L. Zhang, G.F. Li ve Y.J. Xu, “Iron overload inhibits osteoblast biological activity through oxidative stress” *Biological Trace Element Research*, vol. 152, pp. 292-6, 2013.
- [87] E. Balogh, E. Tolnai, B.J. Nagy, B. Nagy, G. Balla, J. Balla ve V. Jeney, “Iron overload inhibits osteogenic commitment and differentiation of mesenchymal stem cells via the induction of ferritin”, *Biochemica et Biophysica Acta*, vol.1862, pp. 1640-9, 2016.
- [89] H. Wang, ve X. Zhang, “Magnetic fields and reactive oxygen species”, *International Journal Of Molecular Science*, vol. 18, pp. 2-20, 2017.

İletişim Bilgisi: molokaya@gmail.com

Konferans Bildirileri

1. Poster : K. Molo ve E.Ordu, "Investigation of Mesenchymal Stem Cells Differentiation Under Statik Magnetic Field Induction", in 8th Molecular Biology and Biotechnology Congress, Poster Sunum, Afyon, 2019, p. 15.

