

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK FARKLILAŞMASINA
ELEKTROMANYETİK ALANIN VE SERAMİK-KAPLI MANYETİK
NANOPARTİKÜLLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Burcu Bayramlı Öner

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Murat Elçin

Ocak

2023

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Burcu Bayramlı Öner

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Murat Elçin danışmanlığında Burcu Bayramlı Öner tarafından hazırlanan bu çalışma 12/01/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

Üye: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

İmza:

Üye: Prof. Dr. Y. Çetin KOCAEFE

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi E. Doruk ENGİN

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Cem BAYRAM

İmza:

Üye: Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK FARKLILAŞMASINA ELEKTROMANYETİK ALANIN VE SERAMİK-KAPLI MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Burcu Bayramlı Öner

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Y. Murat Elçin

Yapılan bu tez çalışmasında, kemik rejenarasyonunu yeni bir yaklaşım olarak manyetik nanopartiküllerin ve düşük frekanslı darbeleri manyetik alanın birlikte kullanımının adipoz kök hücrelerinin farklılaşma kapasitesi araştırıldı. Bu amaçla ilk olarak, silika kaplamalı ve aminosilan modifikasyonlu nanopartiküller sentezlenerek, düşük frekanslı manyetik alan ile birlikte adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelere uygulanarak, hücreler üzerine etkileri incelendi. Çalışmanın ilk aşamasında MNP, S-MNP, IS-MNP, A-MNP ve AIS-MNP sentezi yapıldı. Sentezlenen nanopartiküllerin morfolojisinin incelenmesi için TEM, kimyasal ve manyetik yapılarının incelenmesi için XRD, XPS, VSM, FTIR ve zeta potansiyeli analizleri gerçekleştirildi. Biyolojik uygulamalarda kullanma ve uygun doz oranını bulmak için *in vitro* sitotoksikite testleri gerçekleştirilirken nanopartiküllerin hücre ile etkileşimini belirlemek için TEM analizleri yapıldı. Bu tez kapsamında sentezlenen manyetik nanopartiküllerin uygulanan dozlarının sitotoksik olmadığı bulundu ve nanopartiküller besiyerinde disperse edilerek hücreler ile etkileştirildi. Tez çalışmasının ikinci kısmında ise nanopartikül içeren hücrelere 1.3 mT 15 Hz düşük frekanslı darbeleri manyetik alan 20 gün boyunca, her gün 3 saat olacak şekilde uygulandı. Elektromanyetik alan sonrası hücre canlılığı için MTT, hücre morfolojisi için hematoksilin & eosin, hücre farklılaşma çalışmaları için ALP, alizarin kırmızısı ve kalsiyum birikim analizleri yapıldı. Bu tez çalışması göstermiştir ki ayrı ayrı manyetik nanopartiküller ve elektromanyetik alan adipoz kökenli mezenkimal kök hücreleri farklılaşmaya itmekte, birlikte kullanımı ise daha etkili bir yöntem oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: demir oksit nanopartiküller, düşük frekanslı elektromanyetik alan, nanobiyomalzeme, mezenkimal kök hücre, osteojenik farklılaşma

ABSTRACT

PhD Thesis

Evaluation of the Effects of Electromagnetic Field and Ceramic-Coated Magnetic Nanoparticles on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells

Burcu Bayramlı Oner

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Y. Murat Elçin

In this thesis study, the differentiation capacity of adipose stem cells was investigated by using magnetic nanoparticles and low frequency pulsed magnetic field as a new approach to bone regeneration. For this purpose, silica-coated and aminosilane modified nanoparticles were synthesized and applied to adipose-derived mesenchymal stem cells together with a low-frequency magnetic field, and their effects on cells were investigated. In the first stage of the study, synthesis of MNP, S-MNP, IS-MNP, A-MNP and AIS-MNP was performed. TEM was used to examine the morphology of the synthesized nanoparticles, and XRD, XPS, VSM, FTIR and zeta potential analyzes were performed to examine their chemical and magnetic structures. While *in vitro* cytotoxicity tests were performed to find the appropriate dose rate and use in biological applications, TEM analyzes were performed to determine the interaction of nanoparticles with the cell. The applied doses of the synthesized magnetic nanoparticles were found to be non-cytotoxic, and the nanoparticles were dispersed in the medium and interacted with the cells. In the second part of the thesis study, a 1.3 mT 15 Hz low-frequency pulsed magnetic field was applied to the cells containing nanoparticles for 3 hours every day for 20 days. MTT for cell viability after electromagnetic field, hematoxylin & eosin for cell morphology, ALP for cell differentiation studies, alizarin red and calcium deposition analyzes were performed. This thesis study has shown that individual magnetic nanoparticles and electromagnetic field push adipose-derived mesenchymal stem cells to differentiation, and their use together creates a more effective method.

Keywords: iron oxide nanoparticles, low frequency electromagnetic field, nanobiomaterial, mesenchymal stem cell, osteogenic differentiation

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması kapsamında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek bana yol gösteren, her aşamada beni yönlendiren değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında hiçbir konuda yardımını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e, yaptıkları katkı ve harcadıkları zamandan dolayı tez izleme kurulu üyeleri değerli hocalarım sayın Dr. Doruk ENGİN ve sayın Prof. Dr. Y. Çetin KOCAEFE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın tamamında değerli katkılarını, her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen kıymetli dostum ve çalışma arkadaşım Dr. Özge LALEGÜL-ÜLKER'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca aldığım her kararda sonuna kadar arkamda olan ve hayallerimin peşinden gitmem konusunda beni yüreklendirirken maddi- manevi desteklerini esirgemeyen babam Ekber BAYRAMLI, annem Songül BAYRAMLI ve ablam Özge ÖZTÜRK'e, her zaman yanımda olduğu gibi bu yoğun çalışma sürecinde de desteği ve önerileri ile yanımda olan ve hayatımı anlamlı kılan hayat arkadaşım Arda ÖNER'e teşekkür ederim. Bu tezi varlığıyla bana neşe katan ve birkaç ay önce aramızdan ayrılan canım kedim Ares'e ithaf ediyorum.

Burcu BAYRAMLI ÖNER

Ankara, 2023

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. NANOPARTİKÜLLER.....	3
2.2. MANYETİK NANOPARTİKÜLLER.....	3
2.2.1. MANYETİZMA	4
2.2.1.1. Paramanyetizma	4
2.2.1.2. Diyamanyetizma.....	4
2.2.1.3. Ferromanyetizma.....	5
2.2.1.4. Süpermanyetizma	5
2.2.2. DEMİR OKSİT MANYETİK NANOPARTİKÜLLER	6
2.2.3. SİLİKA KAPLI DEMİR OKSİT MANYETİK NANOPARTİKÜLLER	7
2.2.4. AMİNO SİLİAN MODİFİKASYONLU DEMİR OKSİT MANYETİK NANOPARTİKÜLLER ..	9
2.3. KÖK HÜCRELER.....	10

2.3.1. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER	10
2.3.1.1. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler	11
2.3.2. KÖK HÜCRELER VE REJENERATİF TIP	11
2.4. ELEKTROMANYETİK ALAN.....	13
<u>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</u>	17
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM</u>	18
4.1. MATERYAL.....	18
4.2. YÖNTEM	20
4.2.1. MANYETİK NANOPARTİKÜL SENTEZİ	20
4.2.2. MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN SİLİKA İLE KAPLANMASI	21
4.2.3. İN-SİTU SİLİKA KAPLI MANYETİK NANOPARTİKÜL SENTEZİ	23
4.2.4. MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN AMİNO SİLİAN İLE MODİFİYE EDİLMESİ.....	23
4.2.5. SİLİKA KAPLI MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN AMİNO SİLİAN İLE MODİFİYE EDİLMESİ	24
4.2.6. MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN SİLİKA VE AMİNO SİLİAN İLE KAPLANMASI.....	25
4.2.7. MALZEME KARAKTERİZASYONU	26
4.2.7.1. Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi	26
4.2.7.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Analizi.....	26
4.2.7.3. X-ışını Kırınımı (XRD) Analizi	26
4.2.7.4. Titreşimli örnek manyetometri (VSM) analizi.....	26
4.2.7.5. Zeta Potansiyel Ölçümü	26
4.2.7.6. X-Ray fotoelektron spektroskopisi (XPS)	27
4.2.8. MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN HÜCRE İLE ETKİLEŞİMİ.....	27

4.2.8.1. Hücre Kültürü.....	27
4.2.8.2. Nanomalzemelerin Hücre ile Etkileştirilmesi	27
4.2.8.3. <i>İn-vitro</i> sitotoksosite testi	27
4.2.9. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) ANALİZİ	28
4.2.10. DÜŞÜK FREKANSLI ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMASI	29
4.2.10.1. Hücre Kültürü.....	30
4.2.10.2. Hücre canlılığı testi.....	33
4.2.10.3. Alkalın fosfataz (ALP) analizi	33
4.2.10.4. Kalsiyum aktivite analizi	35
4.2.11. HİSTOKİMYASAL BOYAMALAR	36
4.2.11.1. Hematoksilin & Eosin.....	36
4.2.11.2. Alizarin Red S (AR-S).....	37
4.2.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	37
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	38
5.1. MANYETİK NANOPARTİKÜL KARAKTERİZASYON ANALİZLERİ	38
5.1.1. FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ (FTIR) ANALİZİ	38
5.1.2. X-IŞINI DİFRAKTOMETRESİ(XRD)	39
5.1.3. TİTREŞİMLİ ÖRNEK MANYETOMETRİ (VSM) ANALİZİ	39
5.1.4. X-RAY FOTOELEKTRON SPEKTROSKOPİSİ (XPS).....	40
5.1.5. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) ANALİZİ	42
5.1.6. ZETA POTANSİYEL ÖLÇÜMÜ.....	44
5.2. NANOPARTİKÜL-HÜCRE ETKİLEŞİMİ SONRASI ANALİZLER.....	45
5.2.1. <i>İN VİTRO</i> SİTOTOKSİSİTE TESTİ	45

5.2.2. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) ANALİZİ	49
5.3. DÜŞÜK FREKANSLI MANYETİK ALAN UYGULAMASI SONRASI ANALİZLER.....	51
5.3.1. HİSTOKİMYASAL BOYAMALAR	51
5.3.1.1. Hematoksilin & Eosin histokimysal boyama.....	51
5.3.1.2. Alizarin Red S	55
5.3.2. HÜCRE CANLILIĞI TESTİ.....	58
5.3.3. KALSİYUM AKTİVİTE ANALİZİ	61
5.3.4. ALKALİN FOSFATAZ ANALİZİ	62
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>64</u>
6.1. TARTIŞMA.....	64
6.2. SONUÇ.....	72
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>73</u>
<u>EKLER.....</u>	<u>91</u>
EK 1: Kullanılan Makine-Teçhizat Listesi.....	91
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>93</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>95</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Silika kaplı manyetik nanopartikül	8
Şekil 2.2. Amino silan modifikasyonlu manyetik nanopartikül	9
Şekil 2.3. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma faktörleri ve mezenkimal kök hücre farklılaşma kapasitesi (Biorender kullanılarak çizilmiştir)	12
Şekil 4.1. Çalışmanın ana hatlarının şematik gösterimi (Biorender ile çizilmiştir).....	20
Şekil 4.2. Cam baget ve üç ağızlı cam balon içeren mekanik karıştırıcı sistemi	21
Şekil 4.3. S-MNP sentezi	22
Şekil 4.4. 60°C su banyosu, cam baget, üç ağızlı cam balon içeren mekanik karıştırıcı sistemi	22
Şekil 4.5. Manyetik nanopartikülün amino silan ile modifikasyonu	24
Şekil 4.6. Silika kaplı manyetik nanopartikülün, amino silan ile modifikasyonu	25
Şekil 4.7. Elektromanyetik alanı oluşturmak için kullanılan cihaz. Cihaz dört ana bölümden oluşur: dalga formu üretici, amplifikatör, osiloskop ve Helmholtz bobinleri. Helmholtz bobini %5 CO ₂ ve 37 °C'lik bir inkübatöre yerleştirildi. Hücreler, EMA'nın eşit olduğu (%90) bobinlerin merkezine yerleştirildi (114).	30
Şekil 4.8. ALP analizi için hazırlanan 96 kuyucuklu kültür kabı	34
Şekil 4.9. Kalsiyum aktivite analizi için hazırlanan 96 kuyucuklu kültür kabı	36
Şekil 5.1. MNP, S-MNP ve <i>in situ</i> üretilen S-MNP'lerin FTIR spektrumları (Silika kaplı manyetik nanopartiküller: S-MNP-1; <i>in situ</i> silika kaplı manyetik nanopartiküller: S-MNP-2, Manyetik Nanopartiküller: MNP)	38
Şekil 5.2. MNP'lerin kaplama işlemi öncesi ve sonrası X-ışını kırınım desenleri.	39
Şekil 5.3. Sentezlenen MNP'lerin VSM eğrileri	40

Şekil 5.4. MNP, S-MNP, A-MNP ve AS-MNP'nin X-Ray fotoelektron spektroskopisi	41
Şekil 5.5. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin TEM görüntüleri. a) MNP, b) S-MNP, c) IS-MNP, d) A-MNP, e) AS-MNP, f) AT-MNP	43
Şekil 5.6. Sentezlenen nanopartiküllerin boyutları	43
Şekil 5.7. MNP, SMNP, ISMNP'nin zeta potansiyeli dağılım grafiği	44
Şekil 5.8. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin nanopartiküllerin 5 dozuyla, 24 saat inkübe edildikten sonraki faz kontrast mikroskobu görüntüleri.....	46
Şekil 5.9. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin nanopartiküllerin 5 dozuyla, 72 saat inkübe edildikten sonraki faz kontrast mikroskobu görüntüleri.....	47
Şekil 5.10. MTT kolorimetrik analiz sırasında oluşan formazan kristallerinin faz kontrast mikroskobu görüntüleri, (a) MNP doz 2, (b) MNP doz 5 (800 µm)	48
Şekil 5.11. Sentezlenen nanopartikül gruplarının 5 dozunun hücreler ile etkileşimi sonucu elde edilen MTT absorbans grafiği.....	49
Şekil 5.12. Manyetik nanopartikül hücre etkileşimi TEM görüntüleri (S;sitoplazma, N; nukleus, M; mitokondri, pm; plazma membranı, ger; granüllü endoplazmik retikulum)....	50
Şekil 5.13 Hücre ile etkileştirilmiş olan nanopartiküllerin aynı kültür ortamında (Standart vasat) dfEMA varlığında ve yokluğundaki morfolojik özellikleri (H&E histokimyasal boyama, 50µm ışık mikroskobu görüntüsü).....	51
Şekil 5.14. Hücre ile etkileştirilmiş olan nanopartiküllerin aynı kültür ortamında (Osteojenik vasat) dfEMA varlığında ve yokluğundaki morfolojik özellikleri (H&E histokimyasal boyama, 50µm ışık mikroskobu görüntüsü).....	53
Şekil 5.15. dfEMA varlığında S-MNP H&E görüntüleri a) 10.gün b) 20.gün	54
Şekil 5.16. A-MNP standart vasat 20.gün a) dfEMA varlığında b)dfEMA yokluğunda (50µm ışık mikroskobu görüntüsü).....	54

Şekil 5.17. Hücre ile etkileştirilmiş olan nanopartiküllerin osteojenik kültür ortamında dfEMA varlığında ve yokluğundaki alizarin red histokimyasal boyama ışık mikroskobu görüntüleri (100µm).....	56
Şekil 5.18. Hücre ile etkileştirilmiş olan nanopartiküllerin standart kültür ortamında dfEMA varlığında ve yokluğundaki alizarin red histokimyasal boyama ışık mikroskobu görüntüleri (100µm).....	57
Şekil 5.19. EMA yokluğunda adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin nanopartiküllerin 2 dozuyla, 2 farklı kültür ortamında ve 3 zaman noktasında inkübe edildikten sonraki faz kontrast mikroskobu görüntüleri.....	58
Şekil 5.20. EMA varlığında adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin nanopartiküllerin 2 dozuyla, 2 farklı kültür ortamında ve 3 zaman noktasında inkübe edildikten sonraki faz kontrast mikroskobu görüntüleri.....	59
Şekil 5.21. MTT analizi sırasında oluşan formazan kristallerinin faz kontrast mikroskop görüntüleri, (a) AIS-MNP doz 1 EMA varlığında 10.gün, (b) AIS-MNP doz 1 EMA varlığında 20.gün	60
Şekil 5.22. Sentezlenen nanopartikül gruplarının ve EMA'nın adipoz kökenli kök hücre kültürün belirli zaman noktalarında MTT yöntemi ile belirlenen hücre canlılık oranları. ..	61
Şekil 5.23. Sentezlenen nanopartikül gruplarının ve EMA'nın adipoz kökenli kök hücre kültürün belirli zaman noktalarında Kalsiyum aktivitesi	62
Şekil 5.24. Sentezlenen nanopartikül gruplarının ve EMA'nın adipoz kökenli kök hücre kültürün belirli zaman noktalarında Alkalın fosfataz aktivitesi	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Elektromanyetik alan ve nanopartiküllerin kök hücreler üzerine etkisini inceleyen çalışmalar	14
Çizelge 4.1. Manyetik nanopartikül sentezi ve kaplamasında yer alan kimyasallar	18
Çizelge 4.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar.....	19
Çizelge 4.3. Deney grupları.....	32
Çizelge 4.4. Alp analizi kuyucuk dağılımı	34
Çizelge 4.5. Kalsiyum standartları.....	35
Çizelge 5.1. Sonuçlar doğrultusunda tez çalışmasının devamında kullanılmayacak nanopartiküller.....	42

SİMGELER DİZİNİ

A-MNP	Amino silan modifikasyonlu manyetik demir oksit nanopartikül
AKMKH	Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler
ALP	Alkalen fosfataz
APTES	Amino silan
AS-MNP	Amino modifikasyonlu, silika kaplı demir oksit nanopartikül
AIS-MNP	Amino modifikasyonlu, <i>in situ</i> silika kaplı demir oksit nanopartikül
AT-MNP	Amino silan ve silika kaplı manyetik nanopartikül
DFDEMA	Düşük frekanslı darbeli manyetik alan
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
Hz	Hertz
IS-MNP	<i>in situ</i> sentezlenmiş Silika kaplı manyetik demir oksit nanopartikül
MKH	Mezenkimal kök hücre
MNP	Manyetik demir oksit nanopartikül
MTT	[3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]
NP	Nanopartikül
NP	Nanopartikül
ROS	Reaktif oksijen

S-MNP	Silika kaplı manyetik demir oksit nanopartikül
TEM	Geçirimli elektron mikropisi
TEOS	Tetraetil orto silikat
VSM	Titreşimli örnek manyetometresi
XPS	X-ışını Fotoelektron spektroskopisi
XRD	X-ışını difraktometresi



1. GİRİŞ

İskelet sisteminin insan vücuduna fizyolojik aktivitelerde mekanik destek sağlamak, organları korumak ve mineral homeostazını dengelemek gibi hayati görevleri bulunduğundan dolayı, kemik rejenerasyonuna yönelik stratejiler her zaman araştırmaların odak noktası olmuştur. Diğer dokuların aksine, kemik dokunun kendini yenileyebilme / onarabilme potansiyeli yüksektir ve birçok durumda kemik hasarları skar oluşumu olmadan iyileşmektedir. Ancak patolojik kemik kırıklarında veya kritik boyutun üzerindeki kemik kusurlarında iyileşme ve onarım başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte yetersiz kanlanma, kemik veya çevre dokuların enfeksiyonu ve sistemik hastalıklar kemik dokunun iyileşmesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Ayrıca yaş ortalaması giderek yükselen toplumlarda, kemik hasarları en sık görülen hastalıklardan birisi haline gelmiştir. Kemik mikro-yapısının bozulması, kemik kütlesinde azalmaya, osteoporoza ve patolojik kemik kırığı dahil olmak üzere birçok sistemik kemik hastalığına neden olmaktadır (1).

Genel olarak kemik rejenerasyonunu hızlandırma stratejileri cerrahi, biyolojik ve fiziksel olarak kategorize edilebilmektedir. Ortopedik prosedürlerde kemik rejenerasyonunu arttırmak için sıklıkla cerrahi yöntemlere başvurulmaktadır. Dünya çapında her yıl iki milyondan fazla kemik doku nakli işlemi gerçekleştirilmektedir. Öyle ki kemik doku kandan sonra en sık nakledilen ikinci dokudur. Ancak cerrahi yaklaşımların immünojenik yanıt oluşma ve donör bölge morbiditesi gibi komplikasyonlar oluşturma riski mevcuttur. Biyolojik yaklaşımlarda ise kullanılan geleneksel farmakolojik ajanlar (örneğin, kalsitonin, östrojen, büyüme hormonu ve bifosfonatlar) kemik oluşumunu teşvik etmeleri veya kemik rezorpsiyonunu inhibe etmeleri nedeniyle osteopenia (düşük kemik yoğunluğu) tedavisinde uzun zamandır kullanılmaktadır (2). Bununla birlikte, bu ajanlar vücuda sistemik olarak alındığından yan etkilere sebep olabilmektedir ve ayrıca hastalığın tekrarlama oranı yüksektir (3). Cerrahi ve biyolojik yöntemlere alternatif hücresel tedavi yaklaşımlarında, mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma ve kemik oluşturma potansiyellerinden yararlanılmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin izolasyon işlemleri kolay olmakla birlikte bu hücreler, hastaların kendilerinden elde edilebilmekte, böylece immün yanıt ortadan kalkmaktadır (4,5). Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), osteoblast, kondroblast ve adiposit gibi çeşitli soylara farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu nedenle doku

mühendisliği ve rejeneratif tıpta yoğun ilgi görmüşlerdir (6). Ancak hücresel tedavilerin kemik rejenerasyonunda tek başına kullanımı konusunda gerek tedavi verimliliği gerekse güvenilirliği açısından çekinceler mevcuttur. Bu nedenle, kemik hasarlarının önlenmesi ve tedavisi amacıyla daha güvenli ve etkili yöntemler geliştirmek önem taşımaktadır. Kemik rejenerasyonunu hızlandırma stratejileri arasında fiziksel stratejiler değerlendirildiğinde girişimsel olmama (non-invaziv), düşük maliyet ve ağrıya sebep olmama gibi avantajlar ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte fiziksel stratejilerde altın standart olarak belirlenen bir doz veya maruziyet süresi mevcut değildir. Ancak tedavi potansiyeli yüksek olduğundan araştırmaya açık bir konudur. Tüm yaklaşımların avantaj ve dezavantajları birlikte değerlendirildiğinde birden çok yaklaşımın bir arada kullanılmasının kemik rejenerasyonunun sağlanması konusunda tedavi verimini arttıracakı düşünülmektedir. Elektromanyetik alanın (EMA) rejeneratif tıp alanında kemik doku rejenerasyonunu artırıcı bir fiziksel bir uyarı olarak kullanım potansiyeli yüksektir. Elektromanyetik alanın kemik doku üzerindeki terapötik etkileri uzun yıllardır çalışılmaktadır ve kök hücrelerin osteojenik farklılaşması üzerindeki olumlu etkileri gösterilmiştir. Bununla birlikte, EMA uyarına duyarlı manyetik nanopartiküllerin (MNP), kemik iliği hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını desteklediğini gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur. Bu tez çalışmasının amacı, EMA uyarıları uygulanarak yüzeyi kaplı MNP'ler aracılığıyla mezenkimal kök hücrelerin manyetik ve mekanik olarak uyarılması sonucu osteojenik farklılaşmanın arttığının gösterilmesidir. Bu tez kapsamında yüzeyi biyoaktif silika bileşeni ile kaplı manyetik nanopartiküllerin üretilmesi ve bu nanopartiküllerin EMA varlığında osteojenik farklılaşma potansiyeli incelenecek olan kök hücreler ile muamele edilmesi planlanmaktadır. Tez kapsamında literatürde ilk defa, EMA ve silika kaplı ve/veya manyetik nanopartiküllerin adipoz kökenli MKH'lerin farklılaşma kapasitesi üzerindeki sinerjik etkisi incelenecektir. Silika kaplı MNP'ler ile etkileştirilmiş hücrelerin elektromanyetik alan maruziyeti sonrasında osteojenik farklılaşma potansiyellerinin arttığını göstermek bu tez çalışmasının ana hedefidir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. NANOPARTİKÜLLER

Nanopartiküller, çevresindeki bir arayüzey tabakası ile 1 ila 100 nanometre büyüklüğünde yapılardır. Nano; kelimesi “cüce” anlamına gelmektedir ve bir metrenin milyarda birini ifade etmektedir. Nanopartiküller (NP’ler), nanoteknolojinin en hızlı gelişen alanların başında gelmektedir. (7). Nanopartiküller, nanoteknolojinin en hızlı gelişen alanların başında gelmektedir. Boyuta bağlı özel özellikleri, bu malzemeleri insan faaliyetlerinin birçok alanında vazgeçilmez ve üstün kılmaktadır. Çok sayıda çalışma, nano ölçekli malzemelerin kök hücre tedavisi ve kemik doku mühendisliğini kolaylaştırabileceğini göstermiştir. Örneğin, baryum titanat nanopartikülleri, hidroksiapatit nanopartikülleri ve altın nanopartikülleri, MKH'nin osteogenezini indükleyebilir veya geliştirebilir.

2.2. MANYETİK NANOPARTİKÜLLER

Manyetik nanopartiküller, manyetik alan uyarıları ile manipüle edilebilen bir nanopartikül sınıfıdır. Manyetik nanopartiküller biyotıp (8), spesifik doku hedefleme (9), manyetik rezonans görüntüleme (10), veri depolama (11), manyetik soğutma (12,13) gibi çok farklı alanda kullanılmaktadır. Biyolojik uygulamalarda kullanılan manyetik nanopartiküller genel olarak süpermanyetik özellik göstermektedir. Süpermanyetizmaya sahip maddelerde manyetik alan varlığında manyetik dipoller hizalanırken manyetik alan etkisi ortadan kalktığında manyetik dipoller rastgele yönlendirilir. Bu sebeple süperparamanyetik nanopartiküllerin verdikleri tepki niteliksel olarak bir paramagnetin yanıtına benzemektedirken, net manyetizasyonları paramagnetlere oranla daha büyüktür (14). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda manyetik nanopartiküller arasında, Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri süperparamanyetik özellik göstermesi, yüksek koersivite ve düşük Curie sıcaklıkları nedeniyle yoğun ilgi görmektedir (15). MNP’ler rejeneratif tıp alanında kemik doku rejenerasyonunu artırıcı bir alan olarak kullanılabilir. MNP’in kemik iliği hücrelerinin osteoblastlara farklılaşmasını desteklediğini gösteren çalışmalar literatürde mevcut olmasına karşın (16), bu çalışmaların sayısı mekanizmanın aydınlatılması bakımından yetersizdir. Bu durum gelecekte yapılabilecek klinik çalışmalar için engel oluşturmaktadır. MNP’lerin tek başına kullanılmasının yanı sıra, farklı bileşenler ile etkileştirildiği ve bu şekilde 3-boyutlu yapıların kemik rejenerasyonuna yönelik olarak elde edildiği çalışmalar da mevcuttur (17–19).

2.2.1. MANYETİZMA

Manyetizma, manyetik alan tarafından oluşturulan fiziksel bir olgudur. Manyetizma, yüklü parçacıkların (elektron, proton gibi) hareketinden kaynaklanmaktadır. Atomların yörüngelerinde dönen elektron sayıları birbirinden farklı ise manyetizma ortaya çıkar. Bu atomların en önemlisi demirdir ve Fe_3O_4 birleşği doğal bir mıknatıs özelliği göstermektedir. Mıknatıs etkisiyle oluşan alan manyetik alan iken, iletken malzemeler üzerine uygulanan elektrik potansiyeli ile oluşan ise elektromanyetik alan olarak adlandırılır. Her iki durumla etkileşen maddeler “manyetik maddeler” olarak adlandırılır. Bu maddelerin manyetik alandan etkilenme durumlarına göre manyetizmalarını sınıflandırmak mümkündür (20). Bunlar; diyamanyetizma, ferromanyetizma, paramanyetizma ve süperparamanyetizma.

2.2.1.1. Paramanyetizma

1845'ten itibaren İngiliz bilim adamı Michael Faraday tarafından adlandırılan paramanyetizma, güçlü bir mıknatıs tarafından zayıf bir şekilde çekilen malzemelerin özelliği olan bir tür manyetizmadır. Çoğu element ve bazı bileşikler paramanyetikdir. demir, nikel, kobalt güçlü paramanyetik maddelerdendir. Bunlar, 1'den biraz daha büyük göreceli bir manyetik geçirgenliğe sahiptir ve dolayısıyla manyetik alanlara çekilirler. Herhangi bir manyetik alan uygulanmadığında mıknatıslama yapmazlar. Uygulanan manyetik alan olmadığında mıknatıslanma sıfıra düşer.

2.2.1.2. Diyamanyetizma

Diyamanyetik materyaller manyetik alanla itilir; uygulanmış bir manyetik alan, ters yönde bir itici güç alanı yaratır, bu da itme kuvvetine açığa çıkarır. Diyamanyetizm, tüm materyallerde ortaya çıkan kuantum mekaniksel bir etkidir; manyetizmaya tek katkı olduğunda, malzemeye diamagnetik denir. Diyamanyetik malzemelerin manyetik geçirgenliği, 0'dan daha azdır. Çoğu malzemedeki diyamanyetizma, laboratuvar cihazlarının algılayabileceği hassas bir etki iken süperiletken olan maddeler, güçlü diamagnet gibidirler ve uygulanan manyetik alanı geri gönderebilirler.

2.2.1.3. Ferromanyetizma

Ferromanyetizma, elektriksel olarak yüklenmemiş belirli malzemelerin diğerlerini güçlü bir şekilde çektiği fiziksel bir fenomendir. Mıknatıs taşı (veya manyetit, bir demir oksit, Fe_3O_4) ve demir, bu tür çekici güçler elde etme yeteneğine sahiptir ve bunlara genellikle doğal ferromanyetler denir. 2.000 yıldan daha uzun bir süre önce keşfedilen ferromanyetik maddeler ile manyetizma ile ilgili tüm erken bilimsel çalışmalar yapılmıştır. Günümüzde ferromanyetik malzemeler, elektrik motorları ve jeneratörler, transformatörler, telefonlar ve hoparlörler gibi günlük yaşam için gerekli olan çok çeşitli cihazlarda kullanılmaktadır. Ferromanyetik malzemelerdeki manyetizma, temel olarak elektromıknatıslar gibi davranan atomlarının hizalanma modellerinden kaynaklanır. Bazı atom türlerinin manyetik bir momenti vardır, böyle bir atomun kendisi, elektronların çekirdeği etrafındaki hareketi ve bu elektronların dönüşü tarafından üretilen temel bir elektromıknatıstır. Curie noktasının altında, ferromanyetik malzemelerde küçük mıknatıslar gibi davranan atomlar kendiliğinden hizalanırlar. Manyetik alanları birbirini güçlendirecek şekilde aynı yönde yönlendirilirler. Fe, Ni, Co elementleri ve birçok alaşımları tipik olarak ferromanyetik malzemelerdir. Ferromanyetik malzemelerin belirgin iki özelliği vardır. Bunlar;

- 1- Doğal olarak manyetizasyonları bulunur,
- 2- Manyetik olarak düzenlenme sıcaklığında diğer özelliğidir.

2.2.1.4. Süpermanyetizma

Süperparamanyetizma, küçük ferromanyetik veya ferrimanyetik nanopartiküllerde görülen bir manyetizma şeklidir. Yeterince küçük nanopartiküllerde, manyetizasyon sıcaklığın etkisi altında rastgele yön değiştirebilir. İki spin atma arasındaki tipik süreye Néel gevşeme süresi denir. harici bir manyetik alanın yokluğunda, nanopartiküllerin manyetizasyonunu ölçmek için kullanılan süre Néel gevşeme süresinden çok daha uzun olduğunda, bunların manyetizasyonu ortalama sıfır gibi görünür; süperparamanyetik durumda oldukları söylenir (21). Bu durumda, bir dış manyetik alan, bir paramanyete benzer şekilde nanopartikülleri mıknatıslayabilir. Bununla birlikte, manyetik duyarlılıkları paramanyetiklerinkinden çok daha büyüktür. Süperparamanyetik nanopartiküllerin bir düzeneğine harici bir H manyetik alanı uygulandığında, bunların manyetik momentleri, uygulanan alan boyunca hizalanma eğilimindedir ve bu da net bir mıknatıslanmaya yol açar. Düzeneğin mıknatıslanma eğrisi,

yani uygulanan alanın bir fonksiyonu olarak mıknatıslanma, tersinir bir S-şekilli artan fonksiyondur.

2.2.2. DEMİR OKSİT MANYETİK NANOPARTİKÜLLER

Demir ve oksijen kimyasal olarak birleşerek demir oksitler (bileşikler) oluşturur ve ~16 tanımlanmış demir oksit vardır. Doğada demir (III) oksit pas şeklinde bulunur. Ucuz oldukları için yaygın olarak kullanılırlar. Ayrıca günümüzde, katalizör olarak, dayanıklı boya maddelerinde (kaplamalar, boyalar ve renkli betonlar) ve hemoglobin olarak kullanılmaktadırlar. Demir oksitlerin doğada en yaygın üç şekilde bulunurlar; manyetit (γ -Fe₂O₃), maghemit (γ -Fe₂O₃) ve hematit (α -Fe₂O₃). Bu formlar bilim ve teknoloji alanında oldukça sık kullanılırlar. Ferromanyetik malzemelerden oluşan ve boyutu <10–20 nm olan NP'ler, süperparamanyetizma sergilerler. Ferromanyetik malzemeler, harici bir manyetik alan tarafından mıknatıslanan temel metalleri, alaşımları, oksitleri ve diğer kimyasal bileşiklerini içerir. Fe₃O₄ manyetik nanopartikülleri süperparamanyetik özellik göstermesi, yüksek koersivite ve düşük Curie sıcaklıkları nedeniyle yoğun ilgi görmektedir (15). Aynı zamanda Fe₃O₄ MNP'leri toksik özellik göstermemektedir ve biyouyumludur. Bu nedenle Fe₃O₄ MNP'leri dinamik sızdırmazlık (22), biyosensörler (23), manyetik rezonans (MR) görüntülemeye kontrast maddesi (24), terapötik olarak hipertermide (25) ve manyetik hedefli-ilaç dağıtım sistemlerinde (26) kullanılmaktadır. Bu, normalde yalnızca NP sistemlerinde bulunan önemli bir olgudur. 2.6 Düşük toksisiteleri, yüzey alanı ve hacim oranı gibi süperparamanyetik özellikleri ve basit ayırma metodolojisi nedeniyle, manyetik demir oksit (Fe₃O₄ ve γ -Fe₂O₃) nanopartiküller içerisinde en çok kullanılanıdır. Demir oksit NP'ler, kendi kendine ısınarak manyetik rezonansla kolayca ve hemen indüklenebilir.

Demir oksit manyetik nanopartiküller, mekanokimyasal (yani, lazer ablasyon ark deşarjı, yanma, elektrobiriktirme ve piroliz) ve kimyasal (sol-jel sentezi, şablon destekli sentez, ters misel, hidrotermal, birlikte çökeltme, vb.) yöntemler kullanılarak sentezlenebilir (27). Değişik sentetik protokoller kullanılarak (öncü demir tuzlarını değiştirerek) çeşitli şekillerde (nanoçubuk, gözenekli küreler, nanoküpler, vb.) sentezlenebilirler (28). Sentezin yanı sıra (biyosistemlerde daha fazla uyumluluk, uygun işlevselleştirme ve moleküler konjugasyon üretmek için), demir oksidin yüzey modifikasyonu çok önemlidir. Kararsızlıktan kaynaklanan kimyasal korozyonu önlemek için hem biyouyumlu hem de kararlı olan demir

NP'ler üretmek için yüzey modifikasyonu sentez sonrası temel adımdır. Uygulanabilecek ve demir oksit NP'ler üzerinde ek fiziksel ve kimyasal özelliklerle sonuçlanabilecek başka değişiklikler de vardır(27).

Şon zamanlarda, NP'lerin tıbbi tedaviler, endüstri üretiminin dalları, kozmetik ve giyim gibi çeşitli malzemelere geniş bir şekilde dahil edilmesi gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır (29). Bununla birlikte NP'ler ve biyolojik sistemler arasındaki moleküler seviyedeki etkileşim mekanizmaları büyük ölçüde bilinmemektedir (8). Bununla birlikte, nano boyutlu tasarlanmış malzemelerin moleküler seviyede bitki fizyolojisi üzerindeki rolünün tam olarak anlaşılması gerekmektedir hala eksiktir (30).

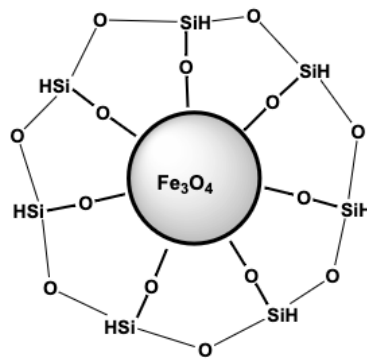
Demir oksit NP'ler, güçlü manyetik özelliklerinden dolayı önce biyolojide ve daha sonra tıpta biyolojik ürünlerin ve hücrelerin manyetik olarak ayrılmasının yanı sıra hedefe bağlı ilaç dağıtımında da kullanılırlar (31,32). Yüzey kimyası, boyutu ve manyetik parçacıkların yükü NP'lerin biyolojik dağılımını etkiler (28). Manyetik taşıyıcıların ve parçacıkların son yıllarda klinik uygulamalardaki faaliyetleri teşhis ve tedavi modalitelerindeki rolleri nedeniyle artmaktadır. Ayrıca manyetik NP'ler bir hücre etiketleme materyali olarak da büyük oranda kullanılmaktadır (33).

2.2.3. SİLİKA KAPLI DEMİR OKSİT MANYETİK NANOPARTİKÜLLER

Manyetik nanopartiküller demir iyonları salarak hücre ile etkileşimde sitotoksik etki yaratabilmektedir. Nanopartikülleri kaplamak, salınan demir iyonları ile hücre toksisitesi arasındaki ilişkiyi anlamak, MNP'lerin toksisitesini ve uzun vadeli etkilerini daha iyi anlamak ve in vivo biyomedikal uygulamalar için kullanılabilecek daha güvenli nanosistemler tasarlamak için önemlidir. Silika, kimyasal kararlılığı, biyouyumluluğu (34,35), yüzey modifikasyonu için çok yönlülüğü nedeniyle süperparamanyetik NP'ler için en uygun kaplama katmanlarından biri olarak bilinmektedir. Ayrıca, hidrofobik NP'lerin hidrofilik suda çözünür partiküllere dönüştürülmesine yardımcı olur (36).

Silika kaplı nanoparçacıklar, ilaç, kozmetik, yazıcı toneri ve gıda paketlenme uygulamalarına katkı maddesi olarak çeşitli endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda, kanser tedavisi ve enzim immobilizasyonu gibi biyomedikal araştırmalar için

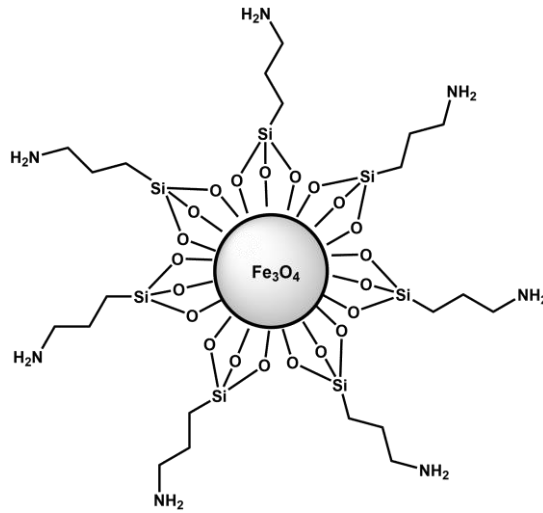
de kullanılmaktadırlar. Geniş uygulama alanı nedeniyle silika kaplı nanopartiküller, insan sağlığı ve çevre üzerindeki etkisi günümüzde ilgi gören konular arasındadır (37–39) S-MNP'lerin hücre etkileşiminde bazı durumlarda hemolize, alveoller epitel dokularda sitotoksositeye neden olduğu aynı zamanda proteinlerle etkileşerek yapılarında modifikasyonlar oluşturdıkları tespit edilmiştir (40–42). Bazı in vitro çalışmalar, S-MNP'lere verilen yanıtın hücre tipinin bir fonksiyonu olarak değiştiğini de vurgulamıştır (34,38,43,44). Bu nedenle, SiO_2 NP'lerin toksisite/biyouyumluluğunun genel değerlendirmesi son derece literatürdeki tartışmalı sonuçlar ve standart prosedürlerin olmaması ve/veya biyolojik sistemlerde nanomalzemelerin yetersiz karakterizasyonu nedeniyle zordur. Mevcut veriler, S-MNP'lerin biyolojik etkilerini net bir şekilde tanımlamak ve karakterize etmek ve bu nanomalzemelerin güvenli kullanımı için uygun koşulları tanımlamak için yeterli değildir. Biyolojik ortamda boyut, dağılım, yüzey alanı, kararlılık ve/veya kümelenme gibi MNP'lerin doğru fiziko-kimyasal karakterizasyonu çok önemlidir (45,46). Nanopartiküllerin yüzey kaplamasında kullanılan inorganik bir biyoaktif bileşen olan silikanın kemik dokusunu desteklediğine dair çalışmalar bulunmaktadır (47). Silikanın yüksek biyoaktivitesi ve kemiğe güçlü bir şekilde bağlanma yeteneği nedeniyle kemik doku rejenerasyonunda kullanım potansiyeli yüksektir. Bu yüzden silika ile kaplanmış MNP'lerin kemik doku mühendisliğine yönelik nanobiyomalzeme uygulamalarında kullanımının umut vaat edici ve araştırmaya açık bir alan olduğu düşünülmektedir.



Şekil 2.1. Silika kaplı manyetik nanopartikül

2.2.4. AMİNO SİLAN MODİFİKASYONLU DEMİR OKSİT MANYETİK NANOPARTİKÜLLER

Yüzey kaplamalı manyetik nanopartiküller günümüzde biyoloji, tıp ve çevre gibi birçok alandaki potansiyel uygulamaları nedeniyle yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bu uygulamalar arasında enzim ve protein ayırmaları, RNA ve DNA saflaştırmaları (48), kanser teşhisi için manyetik rezonans görüntüleme (MRI) teknikleri ve manyetik olarak kontrol edilen ilaç taşıyıcıları gibi kanser tedavisi (49,50) bulunmaktadır. Bir başka önemli örnek, endüstriyel atıklardan toksik elementlerin uzaklaştırılmasıdır (51). Yüzey kaplamalı manyetik nanopartiküller, çekirdek yüzeyi ile kimyasal bir bağ oluşturan organik veya inorganik moleküllerle kaplı bir demir oksit çekirdekten oluşur. Demir oksit çekirdek, nanometre boyutunda parçacıklar içeren ince bir toz olarak elde edilir ve süperparamanyetik davranış gösterir. Belirli görevler için uyarlanmış fonksiyonel gruplar, çekirdeğin etrafına organik bir molekül kabuğu olarak sabitlenir. Bu partiküller, stabil sulu süspansiyonlar oluşturabilir ve bir manyetik alan varlığında aglomerasyondan sonra kolayca yeniden dağılabilir. Bir organosilan olan amino silan kovalent bağ bir metal okside bağlanabilir. Amino silan ile kaplanan bir manyetik nanopartikül yapısındaki amino grubu varlığı nedeniyle biyomoleküllerle daha uyumlu bir hale gelebilir.



Şekil 2.2. Amino silan modifikasyonlu manyetik nanopartikül

2.3. KÖK HÜCRELER

Kök hücrelerin, sayısız hastalık için terapötik bir yöntem olarak kullanılması son on yılda giderek artmaktadır. Geleneksel olarak hematopoetik bozuklukların tedavisi için uygulanan kök hücre tedavisi, son yıllarda diğer bozuklukların da tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır (52,53). Farklılaşma kapasite özelliklerine göre kök hücreler beşe ayrılır. Bunlar totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent kök hücreler olmak üzere adlandırılır. Kök hücreler; embriyonik, mezenkimal, hemapoetik ve indüklenmiş kök hücreler olmak üzere elde edildikleri yere göre dörde ayrılırlar.

2.3.1. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Friedenstein ve meslektaşları mezenkimal kök hücreleri (MKH) 1960 yıllarının ortalarında ilk kez multipotent kök hücreler olarak keşfettiler (54). MKH'ler hematopoietik olmayan hücrelerdir ve mezodermal (adipositler, osteositler ve kondrositler), ektodermal (nörositler) ve endodermal soy (hepatositler) dahil olmak üzere çeşitli soylara farklılaşma yeteneğine sahiptir (55,56).Başlangıçta, mezenkimal kök hücreler “kök hücre” yerine “stromal” hücreler oldukları düşünülüyordu (57). Birkaç araştırmacı, hastalık, yaralanma ve enflamasyon bölgelerinde bazı metabolit moleküllerinin salgılanmasındaki işlevleri nedeniyle MKH'lerin adını tıbbi sinyal hücreleri olarak değiştirmeye çalıştı (58). Daha sonra, bazı araştırmalar, MKH'lerin kendini yenileme yeteneğinde, MKH'lerin immünomodülasyonunda ve MKH'lerin köklüğünü gösteren bir dizi olay oluşturmada önemli bir rol oynayan prostaglandin E2'yi (PGE2) serbest bırakabildiğini belirlemişlerdir. (59). Bunun sonucu, mezenkimal kök hücre terimi ortaya çıkmıştır (60).

Esas olarak kemik iliğinde bulunan MKH'ler, kendini yenileme yeteneğine sahiptir ve ayrıca çok farklı soylara farklılaşma kapasitesi gösterirler (61–63). Kemik iliğinin yanı sıra mezenkimal kök hücreler; yağ dokusu, Wharton jölesi, periferik kan, göbek kordonu, plasenta, amniyotik sıvı ve diş pulpu gibi çeşitli doku ve organlardan elde edilirler (64–67). MKH'ler, izolasyon kaynağına göre çok çeşitli yüzey belirteçleri ve sitokin profilleri ifade edebilir (68). Mezenkimal kök hücreler, osteoblast, kondroblast ve adiposit gibi çeşitli soylara farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu nedenle doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta yoğun ilgi görmüşlerdir (6). Mezenkimal kök hücrelerin izolasyon işlemleri

kolay olmakla birlikte bu hücreler, hastaların kendilerinden elde edilebilmekte, böylece immün yanıt ortadan kalmaktadır (4,5). MKH'ler çok soylu farklılaşma, immünomodülasyon, anjiyogenez, antiapoptotik ve anti-fibrotik aktivite, kemo-çekim ve doku onarımı gelişimi gibi çeşitli biyolojik rollerde görev almaktadır (69,70). MKH'ler daha düşük teratom oluşumu riski taşırlar ve kemotaksi yoluyla yaralı dokuya göç etme kapasiteleri nedeniyle geniş ölçekli terapötik uygulamalar için kullanılabilirler (71,72). Ek olarak, MKH'ler proteinler, büyüme faktörleri kemokinler, mikroRNA'lar (miRNA'lar) ve sitokinler dahil olmak üzere çeşitli biyoaktif bileşenleri serbest bırakabilirler (73).

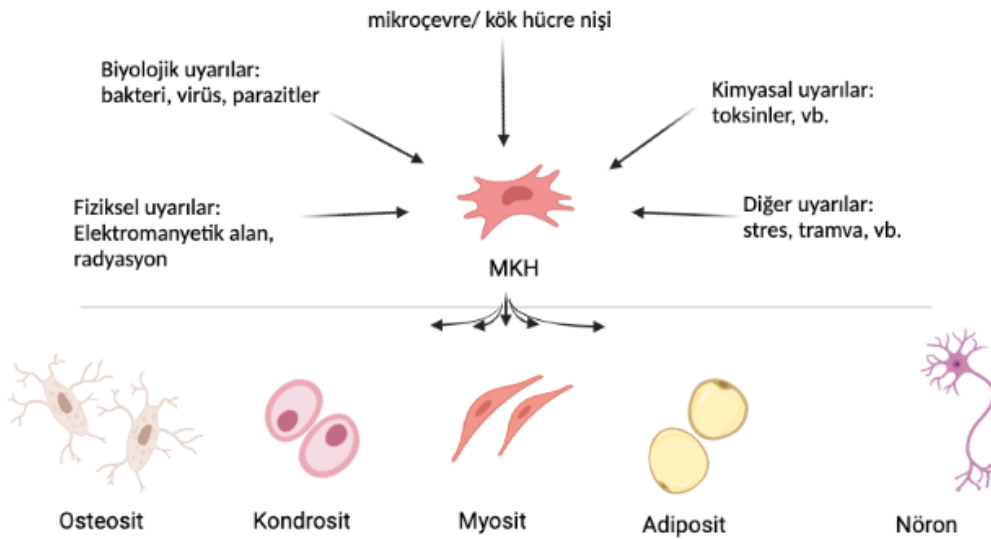
2.3.1.1. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler

Mezenkimal kök hücreler, kemik iliği, adipoz doku ve göbek kordonu başta olmak üzere değişik dokulardan izole edilebilirler. Bu hücreler arasından adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler; bol miktarda hücre bulundurması, minimal invaziv bir yöntemle toplanması ve değişik hücre tiplerine farklılaşabilmesinin yanı sıra otolog veya allojenik konakçıya güvenli ve etkin bir şekilde aktarılması (74) bakımından ön plana çıkmaktadır. Adipoz doku alımı kemik iliğinden çok daha ucuzdur, daha az invaziv işlem gerektirir ve daha büyük miktarlarda hücre elde edilir. Klinik olarak kullanılacak kök hücre sayıları, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinden daha yüksek proliferasyon hızına sahip olduğu için izole edilmiş yağ dokusundan elde edilebilir. Yağ dokusu, otolog hücre replasmanı için bol miktarda, pratik ve çekici bir donör doku kaynağıdır (75). Biyolojik işlevlerini, hücrelerin gelişmesine ve çoğalmasına yardımcı olmak için çeşitli büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin parakrin eylemleri yoluyla uygularlar. Bu nedenle, AKMKH'ler doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve uygulanmıştır.

2.3.2. KÖK HÜCRELER VE REJENERATİF TIP

Kemik rejenerasyonu, kemik kırığı ve defekti, osteoartrit ve osteoporoz dahil birçok vakada çözülmesi gereken önemli bir sorundur (76,77). Otojen kemik greftleri, kemik hastalıklarında osteoindüktif, kemik iletkenliği ve doku uyumluluğunu uyaran, kemiğin kendi hücreleri aracılığıyla kemik yapısı oluşumu için standart yaklaşım olarak kabul edilir (78). Bununla birlikte, bu prosedürün öngörülemeyen absorpsiyon, uzun iyileşme süresi gibi bazı eksiklikleri vardır ve hastalar genellikle uygulama yapılan bölge ile ilgili ağrı ve sinir yaralanmaları yaşarlar (79,80). Kemik dokusu biyolojisinin anlaşılması, MKH'in

uygulanarak kemik dokusu yapısının oluşumunun hızlandırılması son yıllarda kök hücre çalışmalarını ilgi çekici kılmıştır (81,82). Genel olarak, MKH'lerin kemik rejenerasyonu için umut verici, güvenli ve etkili bir alternatif olabileceği, hastaların klinik tezahürlerini önemli ölçüde iyileştirebileceğini ve hastalıkların gelişimini engellediği çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak hücre tedavilerin kemik rejenerasyonunda tek başına kullanımı konusunda gerek tedavi verimliliği gerekse güvenilirliği açısından çekinceler mevcuttur. Bu nedenle, kemik hasarlarının önlenmesi ve tedavisi amacıyla daha güvenli ve etkili yöntemler geliştirmek önem taşımaktadır. Kemik rejenerasyonunu hızlandırma stratejileri arasında fiziksel stratejiler değerlendirildiğinde girişimsel olmama (non-invaziv), düşük maliyet ve ağrıya sebep olmama gibi avantajlar ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte fiziksel stratejilerde altın standart olarak belirlenen bir doz veya maruziyet süresi mevcut değildir. Ancak tedavi potansiyeli yüksek olduğundan araştırmaya açık bir konudur. Tüm yaklaşımların avantaj ve dezavantajları birlikte değerlendirildiğinde birden çok yaklaşımın bir arada kullanılmasının kemik rejenerasyonunun sağlanması konusunda tedavi verimini arttıracakı düşünülmektedir.



Şekil 2.3. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma faktörleri ve mezenkimalkök hücre farklılaşma kapasitesi (Biorender kullanılarak çizilmiştir)

Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması, büyüme faktörleri, hücre-hücre temasları, hücre dışı matriks (HDM) etkileşimleri ve mikro-çevre gibi birçok faktörden etkilenmektedir (83).

EMA gibi fiziksel uyarıların osteojenik farklılaşmayı tetikleyici etki göstermesinin yanında, farklılaşmaya bağlı bazı sinyal yollarının, hücre içine alınan nanopartiküllerden etkilendiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (84,85). Bazı çalışmalarda nano ölçekli malzemelerin kök hücre tedavisi ve kemik doku mühendisliğini destekleyebileceği gösterilmiştir (86,87). Örneğin, baryum titanat nanopartiküller (88), hidroksiapatit nanopartiküller (89), altın nanopartiküller (90) ve silika nanopartiküller (91) MKH'lerin osteogenezini teşvik edebilmekte veya hızlandırabilmektedir.

2.4. ELEKTROMANYETİK ALAN

EMA ve silika kaplı MNP'lerin birlikte kullanılması sonucu kemik dokusu rejenerasyonunu önemli derecede tetikleyeceği düşünülmektedir. Manyetik alan uyarıları ve manyetik alana duyarlı bileşenlerin sinerjik etkisi sonucu gerek manyetik etki gerekse manyetik alanın nanopartiküller üzerinde yarattığı mekanik etki sebebiyle mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma potansiyelinin artacağı ön görülmektedir.

EMA (sinüsoidal ve darbeli) etkisinin mekanizması belirsizliğini koruyor. EMA, işlevleri hücre zarının özellikleriyle yakından ilgili olan bir dizi biyolojik süreci etkiler. EMA, hiperpolarizasyon veya depolarizasyon yoluyla membran potansiyeli ile hücre membranını etkileyebilir. Düşük frekanslı darbeli elektromanyetik alan (100,101) transmembran iyon kanallarını etkileyebilir. Bazı moleküllerin yeniden yönlendirilmesi iyon kanallarının deformasyonuna neden olur ve bu başta Ca^{+2} olmak üzere iyon akışını değiştirebilir. Hücre içi Ca^{+2} seviyelerindeki değişiklikler, kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını etkiler (102,103). EMA ayrıca sinyal iletimini ve hücreler arası iletişimi de etkileyebilir (104).

Olası mekanizmalardan biri de hücre içi ROS üretimini ile ilgili olduğuna inanılmaktadır. Süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit gibi aşırı ROS konsantrasyonunun hücre için yıkıcı olduğu kabul edilir ve gen ekspresyonunun inhibisyonuna neden olur. Buna karşılık, küçük miktarlarda ROS, hücre içi ikinci haberciler olarak işlev görür ve birçok hücre tipinin büyümesi ve farklılaşmasında yer alan sinyalleşme basamaklarını etkinleştirir. Bazı araştırmacılar, EMA'nın (105), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz yolu veya fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz/Akt gibi sinyal yollarını bir modifikasyon yoluyla etki ettiğini düşünmektedir. Park ve arkadaşları (106), ELF-EMF'nin, ROS üretiminde yer alan

NADH oksidazın aktivasyonunu indüklediğini varsaymıştır. Yüksek ROS seviyesi, fosforilasyon mekanizmalarıyla sinyal yollarını değiştirir.

Çizelge 2.1. Elektromanyetik alan ve nanopartiküllerin kök hücreler üzerine etkisini inceleyen çalışmalar

Hücre tipi	Uygulanan EMA/süresi/kaynağı	Kullanılan nanopartikül/yapı	Sonuçlar	Kaynak
Rat Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri	0-5 mT, günde 1 saat, Helmholtz bobini	İçi Boş Mezogözenekli Ferrit Nanopartiküller (MFN)	MFN'ler ve harici manyetik alan birlikte kullanıldığında kemik iliği MKH'lerin osteogenezini teşvik eder. Manyetik alanların kombinasyonel etkileri ve manyetik parçacıkların hücre alımı, hücrelerin içindeki kuvvet değişikliğine ve kemik iliği MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını arttırmaya yol açar.	(92)
Fare Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler	0.2 T- 0,6 T, Haftada 3 kere 15 dakika, neodymium-iron-boron magnet	Demir oksit nanopartikül katkı polüüretan / poli asit süngeri (TPU+PLA)	Yapılan çalışmada, ilk kez, dış SMA (statik manyetik alan) ile birlikte MNP'lerle katkılanan (TPU + PLA) malzemenin Adipoz kökenli MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını arttırdığını gösterilmiştir.	(93)
Rat Dental pulp kök hücreleri ve Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler	>0.05 mT, neodymium-iron-boron magnet	Demir nanopartikül	SMF altındaki yeni manyetik nanopartiküller, daha yüksek alkalik fosfatase aktivite (yaklaşık 3 kat), osteojenik işaretleyici genlerin artan ifadeleri ve daha fazla hücre sentezlenmiş kemik mineralleri (yaklaşık 2,5 kat) sağlayarak, hücre performansını arttırmıştır.	(94)
MC3T3 Hücreleri	Darbeldi elektromanyetik alan 0,6 mT, 28 gün, günde 15,30 ve 60 dakika	-	0.6 mT ve 15 dakika maruz kalma süresine sahip DEMA, MC3T3 hücre proliferasyonunu etkilemiş ve proliferasyon üzerindeki en arttırıcı etkiyi göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuç hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve mineralizasyonunu etkin bir şekilde düzenlemesi için optimal DEMA uygulamasına ihtiyaç duyulmasıdır.	(95)

İnsan mezenkimal stromal hücre (hMKH)	5 Hz, 0.4 mT, 2 hafta süreyle, her hafta 3 kez 20 dakika, Helmholtz bobini	-	5 Hz çok düşük frekanslı EMA'ya, 20 dakika / gün için 0.4 mT, 2 hafta boyunca 3 × / hafta maruz kalmak, hMKH'lerde sitotoksik veya genotoksik etkilere neden olmadığı ortaya konmuştur.	(96)
Rat Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri	1.1 mT, Günde 3 saat, Helmholtz bobini	SPION (Süperparamanyetik demir oksit nanopartikül)	DFDEMA ve SPION'ların kombinasyonunun kemik iliği MKH'lerin yönlü göçünü ve osteojenik farklılaşmasını teşvik etmek için sinerjistik bir etki yaptığını ve bu da SPION'larla birlikte bir DFDEMA uygulamasının kemik kusurlarını tedavi etmek için bir yöntem olabileceğini göstermektedir.	(97)
İnsan mezenkimal stromal hücre (hMSC)	DFDEMA Temel darbe frekansı 100 Hz, darbe tekrarlama frekansı 0.3-2.8 Hz, zaman aralığı 120-180 sn. EMA<40 µT. 21 gün 24 dakika	-	DFDEMA osteojenik farklılaştırıcı ortamda kültürlenmiş Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerde osteogenezi önemli ölçüde artırdığı ve bu tedavinin onarım sürecinin hızlandırılması gereken durumlar için uygun bir aday olabileceği sonucuna varılmıştır.	(98)
Rat dental pulp kök hücreleri	290 mT, 0-24 saat arası, neodymium-iron-boron magnet disk	-	Manyetik bir alanın osteoblastın farklılaşmasını hızlandığı gösterilmiştir. Bu çalışma, ilk kez SMF maruziyetinin diş pulparındaki progenitorların osteoblast benzeri hücrelere farklılaşma potansiyelini artırdığını ortaya koymuştur.	(99)

Ek olarak, zayıf bir EMA elektron transferini hızlandırabilir ve böylece hücreler makromoleküllerin hidrojen bağlarını kararsız hale getirebilir. Bu, EMA'ya maruz kaldıktan sonra gözlemlenen transkripsiyon ve protein ekspresyonunun uyarılmasını açıklayabilir. Bununla birlikte, zayıf bir EMA'nın enerjisi, DNA'daki bir kimyasal bağı doğrudan kırmak için yeterli değildir. Bu nedenle, genotoksik etkilere mikrotermal süreçler, ROS oluşumu veya DNA onarım süreçlerinin bozulması gibi dolaylı mekanizmalar aracılık ettiği sonucuna varılabilir (107).

Elektromanyetik alanlar, ekstrasellüler matriks sentezi, hücre göçlerini uyarmak, hücrelerin çoğalması ve farklılaşması gibi doku rejenerasyonu için bir dizi süreç aracılığıyla doku gelişiminde hayati bir rol oynar. 1974'te elektromanyetik alanlar, özellikle kaynaması güç olan kemik kırıklarında ve psödoartrozu tedavi etmek için terapötik amaçlar için kullanıldı

(108). 1979'da manyetik alanların hücreler üzerindeki etkisini analiz eden birçok çalışmadan sonra FDA, bir tedavi yöntemi olarak darbeli elektromanyetik alanın kullanılmasını onayladı (109). Osteogenezi indüklemek için EMA kullanımı, deformasyon sırasında kemikteki doğal endojen akış potansiyellerinden gelir. Bu tedaviyi kullanan klinik deneyler, elektrotlar kullanılarak doğrudan iletim yoluyla gerçekleştirilmiştir; kırılma yerindeki genel manyetik alana bir tel bobin kullanarak elektrik akımları verilmiştir. Daha sonra, Faraday eşleşmesi yoluyla kemikte gerekli elektrik alanını oluşturmak için zamanla değişen manyetik alan kullanıldı (110,111). Bu cihazlar, kırılma bölgesinde mikrovolt/santimetre düzeyinde alanlar oluşturan, 1 ila 100 Hz arasında değişen son derece düşük frekanslı düşük frekanslı elektro manyetik alanlardı (Funk ve diğerleri, 2006). Darbeli manyetik alanların kullanılmasının nedeni, benzer sinyal şekli ve genliği ile dinamik olarak deforme olmuş kemik dokularında oluşturduğuna benzer bir elektrik alanı indüklemektir. Üretilen alanlar, hücresel hedeflerin doğasına, doku ortamına ve işlevine dayanarak belirli hücresel tepkileri tetiklemek için kullanılır. Son zamanlarda, dfdEMA, romatoid artrit ve osteoartrit ile ilgili ağrı, iltihaplanma ve işlev bozukluklarını tedavi etmek için terapötik bir prosedür olarak kullanılmaktadır (112). Kemik iyileşmesi ve yeniden şekillenmesi için kullanılan FDA onaylı invaziv olmayan manyetik alanlar, son derece düşük frekanslı (15 Hz) ve milivolt/santimetre yapan darbeleri tekrarlayan sinyal başlatmak için bir Helmholtz düzenlemesindeki bobini kullanılarak oluşturulur (110). 0 Hz'den birkaç yüz GHz'e kadar frekans aralığına sahip manyetik alanlar iyonlaştırıcı olmayan radyasyon olarak kabul edilir ve araştırmacılar, bu iyonlaştırıcı olmayan elektromanyetik enerjinin, alan uygulandığında herhangi bir makroskopik ısıtma içermeyen etkileşim mekanizmaları yoluyla farklı biyolojik etkiler üretebileceğini bulmuşlardır (113).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Elektromanyetik alan uygulaması ve yüzeyi osteojenik farklılaşmayı uyaran ajanlarla kaplanmış manyetik nanopartiküllerin birlikte kullanımı, mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma kapasitesini artırır.

Bu tez çalışmasında, yukarıda değinilen bilgilerin ışığında, mezenkimal kök hücrelerin (kemik iliği kaynaklı ve/veya adipoz kaynaklı), *in vitro* osteojenik farklılaşma şartlarında ve yüzeyi kaplanmış manyetik nanopartiküller ile etkileştirilerek elektromanyetik alana maruz bırakılması hedeflenmektedir. Bu çalışmanın amacı, yüzeyi kaplı nanopartiküller aracılığıyla elektromanyetik alan uygulayarak mezenkimal kök hücrelerin mekanik olarak uyarılması sonucu osteojenik farklılaşmanın daha yüksek düzeyde teşvik edilebilirlik durumunun belirlenmesidir.

Bu amaca yönelik hedeflerimiz;

1. Yüzeyi osteojenik farklılaşmayı uyarıcı silika bileşeni ile kaplı manyetik nanopartiküllerin üretilmesi ve karakterize edilmesi
2. Osteojenik farklılaşma potansiyeli incelenecek olan kök hücrelerin silika kaplı manyetik nanopartiküllerle muamele edilmesi sonucu *in-vitro* sitotoksikite testlerinin gerçekleştirilmesi ve en uygun dozun belirlenmesi.
4. Silika kaplı manyetik nanopartiküller ile muamele edilen mezenkimal kök hücrelerin elektromanyetik alana maruz bırakılması sonucudipoz kökenli kök hücrelerde osteojenik farklılaşmanın görülmesi.
5. Tez çalışmasının son aşamasında yüzeyi kaplı olmayan MNP'ler veya silika kaplı MNP'ler ile etkileştirilmiş hücrelerin elektromanyetik alan maruziyeti sonrasında osteojenik farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Bu tez çalışması kapsamında manyetik nanopartikül sentezi için kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 4.1., hücre kültüründe kullanılan materyaller Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Manyetik nanopartikül sentezi ve kaplamasında yer alan kimyasallar

Kimyasal	Özellik	Marka
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\geq 99\%$	Sigma- Aldrich
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\geq 99\%$	
Amonyum hidroksit	%28.0-30.0	
Amino silan (APTES)	$\geq 99\%$	
Tetraetil orto-silikat (TEOS)	$\geq 99\%$	
Etanol	$\geq 99.8\%$	Isolab

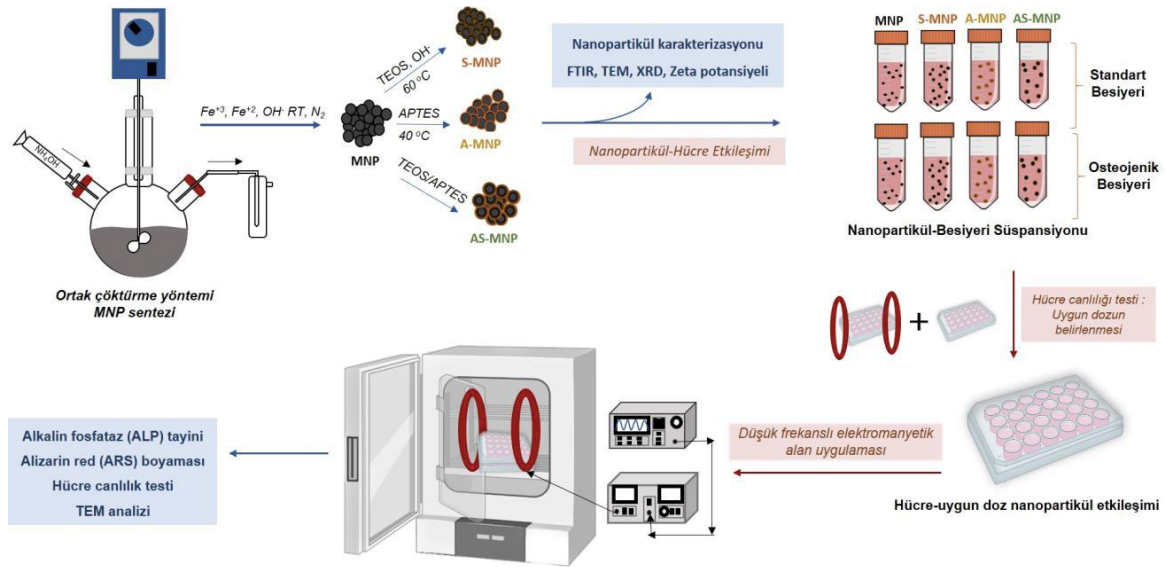
Çizelge 4.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Marka
FBS (Fetal Bovine Serum)	Biological Industries
Penisilin / Streptomisin	
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	
L-Glutamin	
Steril doku kültür kapları, serolojik pipetler ve pipet uçları	Corning
Alkalın Fosfataz Kolorimetrik Aktivite test kiti	Cayman
Kalsiyim Kolorimetrik Aktivite test kiti	BioAssay Systems

Kolorimetrik test sonuçları için Molecular Devices SpectraMax M5 okuyucu(California, ABD) kullanıldı.

4.2. YÖNTEM

Tezin çalışmasının ilk basamağı, daha sonraki aşamalarda mezenkimal kök hücreler ile etkileştirilecek dış yüzeyi kaplı ve dış yüzeyi kaplı olmayan manyetik nanopartiküllerin sentezini ve karakterizasyon çalışmalarını içermektedir. Bu amaçla öncelikle demir oksit nanopartiküller ortak çöktürme yöntemi ile elde edildi ve yüzeyleri sol-gel metodu kullanılarak silika, amino silan ve her ikisi ile kaplandı. Daha sonra MNP ve kaplama yapılan MNP'ler uygun şartlar altında hücreler ile etkileştirildi ve hücreler için en uygun dozu bulmak için MTT testi yapıldı. . Tezin ikinci basamağı olarak nanopartiküllerle etkileştirilen hücrelere düşük frekanslı manyetik alan uygulandı ve hücre üzerine etkilerinin incelenmesi için analizler yapıldı.



Şekil 4.1. Çalışmanın ana hatlarının şematik gösterimi (Biorender ile çizilmiştir)

4.2.1. MANYETİK NANOPARTİKÜL SENTEZİ

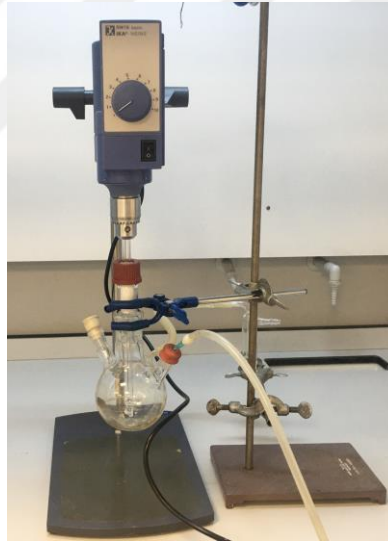


Manyetik nanopartiküller (MNP) ortak çöktürme yöntemi kullanılarak elde edildi. Cam baget ve üç ağızlı cam balon içeren mekanik karıştırıcı sistemi kuruldu (Şekil 4.2.). 2 mol $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (5,41 gr) tartılarak 100 ml distile suda çözündü ve üç ağızlı cam balon içine alındı. 1 mol $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,988 gr) tartılarak 100 ml distile suda çözünerek üç ağızlı cam balona ilave edildi. Mekanik karıştırıcı yardımıyla balon içinde çözünme işlemi

gerçekleştirildi. Çekirdeklenme reaksiyonunun başlaması için ortama %28'lik NH_4OH 'dan 10 ml damla damla eklendi. Tüm sentez Fe^{+2} iyonlarının Fe^{+3} iyonlarına yükseltgenmemesi için inert N_2 ortamında gerçekleştirildi. 2 saat mekanik karıştırıcı ile karıştırılan MNP'ler inert ortamdan alınarak yıkama işlemlerinden geçirildi. Yıkama işlemleri;

- 3000 devir/dakika 25°C 15 dakika distile su
- 3500 devir/dakika 25°C 15 dakika distile su
- 3500 devir/dakika 25°C 15 dakika distile su
- 5000 devir/dakika 25°C 20 dakika etil alkol

Her yıkama işlemi arası örnekler süspanse edildi. Yıkama işlemleri sonrası örnekler süspanse edilerek petrilere alındı ve bir gece kurumak üzere etüve (32°C) bırakıldı. Etüvden alınan örnekler toz haline getirildi ve oda sıcaklığında desikatör içerisinde saklandı.



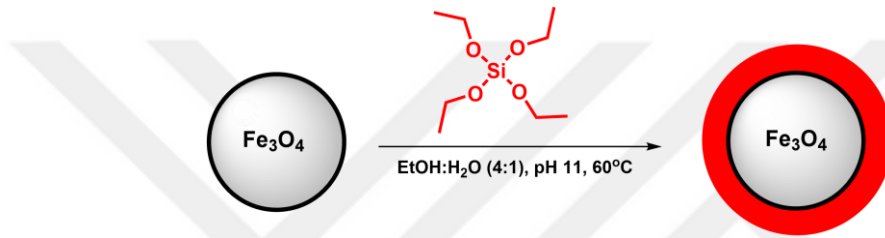
Şekil 4.2. Cam baget ve üç ağızlı cam balon içeren mekanik karıştırıcı sistemi

4.2.2. MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN SİLİKA İLE KAPLANMASI

Manyetik nanopartiküllerin yüzeyini kaplamak için hidroliz ve kondenzasyon basamaklarını içeren bir Sol-jel yaklaşımı olan Stöber yöntemi kullanıldı. 60°C su banyosu, cam baget, üç ağızlı cam balon içeren mekanik karıştırıcı sistemi kuruldu (Şekil 4.4.). 1 gr MNP, 4:1 oranında $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (160 ml EtOH , 40 ml distile H_2O) içerisinde çözünene kadar sonike

edildi. Kondenzasyon reaksiyonlarının gerçekleşmesi için ortamın bazik olması gerekmektedir. Bu amaçla pH:11 olana kadar çözelti içerisine NH_4OH damla damla ilave edildi. Çözelti cam balona alınmadan önce homejenliğinin sağlanması için sonike edildi. Sisteme alınan çözeltiye 1 ml TEOS damla damla eklenerek, 60°C 'de bir gece mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı. Karıştırıcıdan alınan S-MNP'ler yıkama işlemlerinden geçirildi;

- 3000 devir/dakika 25°C 10 dakika distile su
- 3500 devir/dakika 25°C 10 dakika distile su
- 3500 devir/dakika 25°C 10 dakika distile su
- 5000 devir/dakika 25°C 15 dakika Etil alkol



Şekil 4.3. S-MNP sentezi

Her yıkama işlemi arası örnekler süspanse edildi. Yıkama işlemleri sonrası örnekler süspanse edilerek petrilere alındı ve bir gece kurumak üzere etüve (32°C) bırakıldı. Etüvden alınan örnekler toz haline getirildi ve oda sıcaklığında desikatör içerisinde saklandı.



Şekil 4.4. 60°C su banyosu, cam baget, üç ağızlı cam balon içeren mekanik karıştırıcı sistemi

4.2.3. İN-SİTU SİLİKA KAPLI MANYETİK NANOPARTİKÜL SENTEZİ

İn-situ S-MNP sentezi, manyetik nanopartiküllerin kurutma basamağı olmadan direk silika ile kaplanmasını içermektedir. Manyetik nanopartikül sentezinde yıkama aşamasına kadar olan tüm basamaklar tekrarlandı. 2 saat mekanik karıştırıcı ile karıştırılan MNP'ler inert ortamdan alınarak pH'ı ölçüldü ve pH:11 olana kadar çözelti içerisine NH_4OH damla damla ilave edildi. 60°C su banyosu, cam baget, üç ağızlı cam balon içeren mekanik karıştırıcı sistemi kuruldu. Çözelti cam balona alındı. 1 ml TEOS mekanik karıştırıcı yüksek hızda iken damla damla eklendi. 60°C'de bir gece mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı. Karıştırıcıdan alınan S-MNP'ler yıkama işlemlerinden geçirildi;

- 3000 devir/dakika 25°C 10 dakika distile su
- 3500 devir/dakika 25°C 10 dakika distile su
- 3500 devir/dakika 25°C 10 dakika distile su
- 5000 devir/dakika 25°C 15 dakika Etil alkol

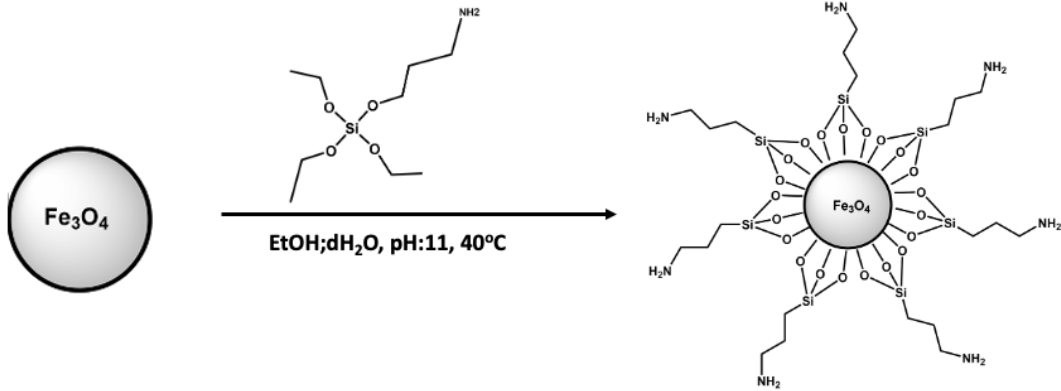
Her yıkama işlemi arası örnekler süspansiyon edildi. Yıkama işlemleri sonrası örnekler süspansiyon edilerek petrilere alındı ve bir gece kurumak üzere etüve (32°C) bırakıldı. Etüvden alınan örnekler toz haline getirildi ve oda sıcaklığında desikatör içerisinde saklandı.

4.2.4. MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN AMİNO SİLAN İLE MODİFİYE EDİLMESİ

40°C su banyosu, cam baget, üç ağızlı cam balon içeren mekanik karıştırıcı sistemi kuruldu. 1 gr MNP, 4:1 oranında EtOH/ H_2O (160 ml EtOH, 40 ML distile H_2O) içerisinde çözünene kadar sonike edildi ve inert N_2 ortamındaki mekanik karıştırıcıya alındı. Mekanik karıştırıcı yüksek hızda iken ortama 1 ml APTES damla damla eklendi. 40°C ve inert ortamda 2 saat mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı. Karıştırıcıdan alınarak yıkama işlemlerine geçildi;

- 3000 devir/dakika 25°C 10 dakika distile su
- 3500 devir/dakika 25°C 10 dakika distile su
- 3500 devir/dakika 25°C 10 dakika distile su
- 5000 devir/dakika 25°C 15 dakika Etil alkol

Her yıkama işlemi arası örnekler süspanse edildi. Yıkama işlemleri sonrası örnekler süspanse edilerek petrilere alındı ve bir gece kurumak üzere etüve (32°C) bırakıldı. Etüvden alınan örnekler toz haline getirildi ve oda sıcaklığında desikatör içerisinde saklandı.



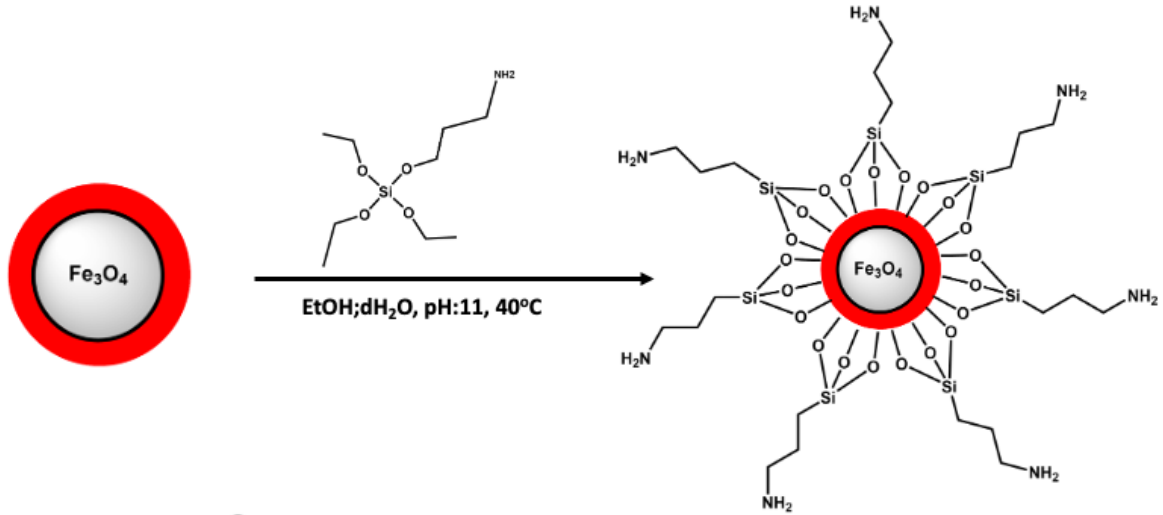
Şekil 4.5. Manyetik nanopartikülün amino silan ile modifikasyonu

4.2.5. SİLİKA KAPLI MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN AMİNO SİLAN İLE MODİFİYE EDİLMESİ

40°C su banyosu, cam baget, üç ağızlı cam balon içeren mekanik karıştırıcı sistemi kuruldu. 0,5 gr S-MNP, 4:1 oranında EtOH/H₂O (160 ml EtOH, 40 ML distile H₂O) içerisinde çözünene kadar sonike edildi ve inert N₂ ortamındaki mekanik karıştırıcıya alındı. 2 ml APTES mekanik karıştırıcı yüksek hızda iken ortama APTES damla damla eklendi. 40°C ve inert ortamda 2 saat mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı. Karıştırıcıdan alınarak yıkama işlemlerine geçildi;

- 3000 devir/dakika 25°C 10 dakika distile su
- 3500 devir/dakika 25°C 10 dakika distile su
- 3500 devir/dakika 25°C 10 dakika distile su
- 5000 devir/dakika 25°C 15 dakika etil alkol

Her yıkama işlemi arası örnekler süspanse edildi. Yıkama işlemleri sonrası örnekler süspanse edilerek petrilere alındı ve bir gece kurumak üzere etüve (32°C) bırakıldı. Etüvden alınan örnekler toz haline getirildi ve oda sıcaklığında desikatör içerisinde saklandı.



Şekil 4.6. Silika kaplı manyetik nanopartikülün, amino silan ile modifikasyonu

4.2.6. MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN SİLİKA VE AMİNO SİLAN İLE KAPLANMASI

İnert ortamda 40°C su banyosu, cam baget, üç ağızlı cam balon içeren mekanik karıştırıcı sistemi kuruldu. 4:1 oranında EtOH/ H_2O (160 ml EtOH, 40 ML distile H_2O) hazırlandı. 0,5 gr MNP tartılarak, 180 ml EtOH/ H_2O içerisinde çözünene kadar sonike edildi. Cam balona alınarak mekanik karıştırıcı ile karıştırılmaya devam edildi. MNP'lerin silika ve amino silan kaplanmasında 3ml TEOS, 1 ml APTES kullanıldı. 20 ml EtOH/ H_2O içerisine belirlenen dozlardaki APTES ve TEOS eklenerek sonike edildi ve mekanik karıştırıcı yüksek hızdayken sisteme damla damla eklendi. 40°C 'de bir gece mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı. Karıştırıcıdan alınarak yıkama işlemlerine geçildi;

- 3000 devir/dakika 25°C 5 dakika distile su
- 3500 devir/dakika 25°C 5 dakika distile su
- 3500 devir/dakika 25°C 5 dakika distile su
- 5000 devir/dakika 25°C 5 dakika etil alkol

Her yıkama işlemi arası örnekler süspanse edildi. Yıkama işlemleri sonrası örnekler süspanse edilerek petrilere alındı ve bir gece kurumak üzere etüve (32°C) bırakıldı. Etüvden alınan örnekler toz haline getirildi ve oda sıcaklığında desikatör içerisinde saklandı.

4.2.7. MALZEME KARAKTERİZASYONU

4.2.7.1. Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

Tez çalışmasında sentezlenen nanopartiküllerin morfolojik yapıları ve aglomerasyon oranlarını belirlemek amacıyla yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu kullanılmıştır. Analizler Ankara Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir. Örnekler etil alkol içerisine dağılımı sağlanması için sonikasyon işlemine tabi tutulmuş ve karbon kaplı bakır gridler üzerine damlatılıp kurutularak TEM için uygun hale getirilmiştir. Görüntüleme işlemi için 100-120 kV voltaj aralığında yapılmıştır.

4.2.7.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Analizi

Manyetik nanopartiküllerin fonksiyonel gruplarının yapı ve bileşimi hakkında bilgi edinmek için FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda Perkin Elmer 400 marka cihaz kullanılarak ölçümler alınmıştır. $400-4000\text{ cm}^{-1}$ absorbans aralığında ve 4 cm^{-1} çözünürlükte ölçümler alınmıştır.

4.2.7.3. X-ışını Kırınımı (XRD) Analizi

Manyetik nanopartiküllerin kristal yapının ortaya konması için XRD analizleri ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda (Rigaku marka Ultima-IV) gerçekleştirilmiştir.

4.2.7.4. Titreşimli örnek manyetometri (VSM) analizi

Sentezlenen ve kaplanan MNP'lerin manyetik yapılarını ortaya koymak için titreşimli örnek manyetometresi analizleri ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda Cryogenic Limited Physical Property Measurement System (PPMS) cihaz ile yapılmıştır.

4.2.7.5. Zeta Potansiyel Ölçümü

Sentezlenen ve kaplanan manyetik nanopartiküller yüzey yüklerinin belirlenmesi ve yoğunlukları sonucu aglomere olma potansiyellerinin ölçülmesi için , zeta potansiyel ölçümleri alındı. Örnekler ölçüm için örnekler distile su içinde hazırlanmış ve tek nokta pH ölçümü yapılmıştır. Ölçümler ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda bulunan MALVERN Nano ZS90 kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.7.6. X-Ray fotoelektron spektroskopisi (XPS)

Farklı yüzey özelliklerine sahip manyetik nanopartiküllerin yüzeyleri hakkında kimyasal bilgi elde etmek ve bu nanopartikülleri karşılaştırmak amacıyla XPS analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda bulunan PHI 5000 VersaProbe kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.8. MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN HÜCRE İLE ETKİLEŞİMİ

4.2.8.1. Hücre Kültürü

Ticari olarak temin edilen adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler, standart kültür ortamında % 5 CO₂, 37 °C'de çoğaltıldı. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler ~%90 oranına geldiğinde, 0.25 Trypsin/EDTA kullanılarak hücreler kaldırılarak 1x10⁴ hücre/cm²'lik yoğunlukta 96 kuyulu doku kültürü kaplarına yerleştirildi. herhangi bir deney yapılmadan önce hücreler 24 saat inkübatörde inkübe edildi.

4.2.8.2. Nanomalzemelerin Hücre ile Etkileştirilmesi

Sentezlenen ve kaplanan nanopartiküllerin uygun dozlarının bulunması ve sitotoksitelerinin belirlenmesi amacıyla adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler ile etkileştirildi. Hücreler ile etkileştirmek üzere 4 grup belirlenmiştir (MNP, IS-MNP, AMNP, AISMNP). Her bir grup için uygun dozu bulmak için 5 doz öngörülmüştür (d1: 50 µg/ml, d2: 100 µg/ml, d3: 200 µg/ml, d4: 400 µg/ml, d5: 800 µg/ml). Sterilizasyon örnekleri 30 dakika UV ışığında bekletilerek yapıldı. Sterilizasyonu tamamlanan örnekler laminar kabin içine alınarak üzerlerine 100 mg/ml serumsuz besiyeri eklendi ve stok çözelti olarak kullanıldı. Bu stok çözeltiden seri dilüsyonla belirlediğimiz dozlar hazırlandı ve 4 grubun 5 dozunu içeren besiyerleri adipoz kökenli mezenkimal kök hücre içeren 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktararak 24 ve 72 saat olmak üzere inkübe edildi.

4.2.8.3. *In-vitro* sitotoksite testi

Uygun dozun bulunması ve sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla kolometrik bir metabolik aktivite belirteci olan MTT analizi gerçekleştirildi. 24 saat ve 72 saat ayrı ayrı inkübasyonun sonunda ekstraksiyon sıvıları kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve hücreler serumsuz besiyeri ile

yıkandı. Hücre canlılığının bir belirteci olarak mitokondriyel dehidrojenaz aktivitesi, MTT [3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi ile ölçüldü. Sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla sırasıyla;

1. Kuyucuklar serumsuz besiyeri ile yıkandı.
2. Her bir kuyucuğa 90 µl DMEM ve 10 µl MTT reaktifi eklendi.
3. Örnekler inkübatöre alınarak 4 saat boyunca inkübe edildi.
4. Formazan kristallerinin çözülmesi için 200 µl HCL/izopropanol eklendi ve yarım saat çözülme için ışık almayan bir yerde bekletildi.
5. Pozitif kontrol için fenol çözeltisi kullanıldı.
6. Negatif kontrol için taze besiyeri kullanıldı.
7. Sonuçlar mikropalak okuyucuda 570 nm absorbansta gerçekleştirildi.

4.2.9. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) ANALİZİ

Manyetik nanopartiküllerin hücreler tarafından alımının ve morfolojik değişikliklerinin incelenmesi için TEM analizi yapılmıştır. Ticari olarak temin edilen adipoz kökenli mezankimal kök hücreler, standart kültür ortamında % 5 CO₂, 37 °C'de çoğaltıldı. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler ~%90 oranına geldiğinde, 0.25 Tripsin/EDTA kullanılarak hücreler kaldırılarak 1x10⁴ hücre/cm²'lik yoğunlukta 96 kuyulu doku kültürü kaplarına yerleştirildi. Herhangi bir deney yapılmadan önce hücreler 24 saat inkübatörde inkübe edildi. Hücreler ile etkileşilmek üzere belirlenen 4 grubun (MNP, IS-MNP, AMNP, AISMNP) her birinin tek dozu (d1: 50 µg/ml) standart vasat içinde disperse edilerek hücrelerle etkileştirildi. 36 saatin sonunda besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 3 kere PBS ile yıkandı. Hücreler % 0,25 tripsin ile kaldırılıp santrifüj edildikten sonra %2,5 gluteraldehit ile sabitlendi. % 2'lik agar hazırlanarak örnekler içine süspanse edildi. Küçük agar bloklara aşağıdaki elektron mikroskobu protokülü uygulanmıştır.

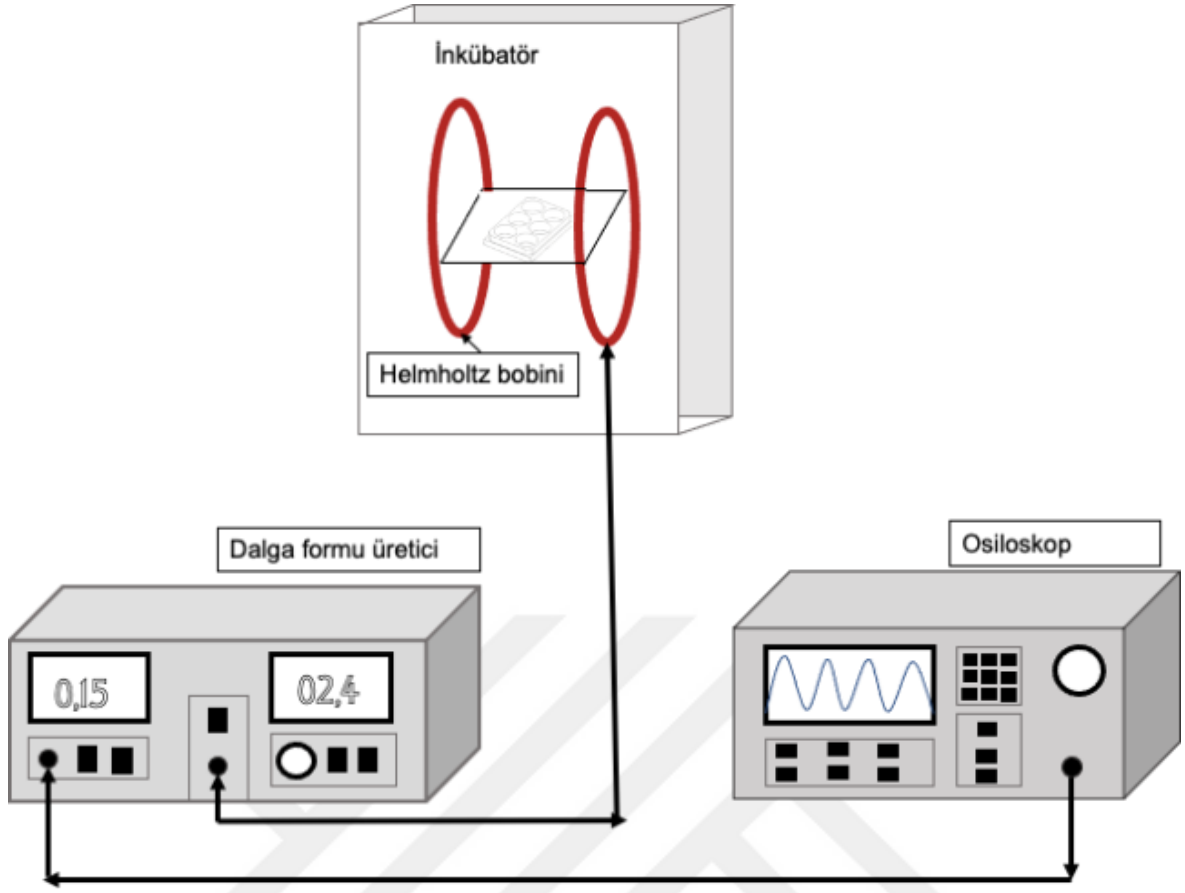
- Agar bloklar gluteraldehitten geçirildi.
- Gluteraldetin uzaklaştırılması için su ile yıkandı (3 kere 30 dakika).
- %70 lik alkolden geçirilir (2 kere 10 dakika).
- %70'lik alkolde uranil asetat hazırlandı ve Örnekler 1 saat Uranil asetat ile boyandı.

- Örnekler alkol serisinden geçirildi; %70'lik alkol (10 dakika), %80'lik alkol (10 dakika), %90'lik alkol (10 dakika), %96'lik alkol (10 dakika), %100'lük alkol (10 dakika)-I, %100'lük alkol (10 dakika)-II
- 10 ml Araldit, 10 ml DDSA, 0,5 ml DMP-30, 1 ml Dibutil fitalat ile araldit gömme ortamı hazırlandı. Daha sonra örnekler sırasıyla Propilen oksit (30 dakika), 1 kısım araldit + 3 kısım propilen oksit (3 saat), 1 kısım araldit + 1 kısım propilen oksit (3 saat), 3 kısım araldit + 1 kısım propile oksit (1 gece), Saf araldite (5 saat) geçirildi. Araldit ortamının katılaşması için 24 saat 45°C'lik etüvde, 24 saat 60°C'lik etüvde bırakıldı.

Araldit bloklardan ultramikrotom aracılığıyla yarı-ince kesitler alınarak metilen mavisi boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. İnce kesitler alınarak karbon kaplı ızgaraların üzerine konuldu ve TEM ile incelendi. Yarı ince kesitler için cam bıçak kullanırken, ince kesitler için elmas bıçak kullanıldı.

4.2.10. DÜŞÜK FREKANSLI ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMASI

Elektromanyetik alan uygulama sistemi Lake Shore marka 475 DSP model gaussmetre ve gauss probu, Rigol marka dg1022 model darbe üretici, Accel Instruments marka TS250 model amplifikatör, Lake Shore marka MH-12 model helmholtz bobininden oluşmaktadır. Helmholtz bobinleri, 37°C, %5 CO₂ şartlarına ayarlı inkübatörün içine yerleştirildi. 20 gün boyunca hergün 3 saat olmak üzere hücrelere uygulandı. 15 Hz'de darbe frekansı (5 ms uzunluğunda darbeler) 1,3 mT'lik bir manyetik akı yoğunluğunda uygulandı.



Şekil 4.7. Elektromanyetik alanı oluşturmak için kullanılan cihaz. Cihaz dört ana bölümden oluşur: dalga formu üretici, amplifikatör, osiloskop ve Helmholtz bobinleri. Helmholtz bobini %5 CO₂ ve 37 °C'lik bir inkübatöre yerleştirildi. Hücreler, EMA'nın eşit olduğu (%90) bobinlerin merkezine yerleştirildi (114).

4.2.10.1. Hücre Kültürü

Ticari olarak temin edilen adipoz kökenli mezankimal kök hücreler, standart kültür ortamında % 5 CO₂, 37 °C'de çoğaltıldı. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler ~%90 oranına geldiğinde, 0.25 Tripsin/EDTA kullanılarak hücreler kaldırılarak 1×10^4 hücre/cm²'lik yoğunlukta 96 kuyulu doku kültürü kaplarına yerleştirildi. Herhangi bir deney yapılmadan önce hücreler 24 saat inkübatörde inkübe edildi. Hücreler ile etkileşilmek üzere belirlenen 4 grubun (MNP, IS-MNP, A-MNP, AIS-MNP) her birinin 2 dozunun (d1: 50 µg/ml, d2: 100 µg/ml) hücrelere uygulanması öngörülmüştür. Deney grupları çizelge 4.3.'te belirtilmiştir. Buna göre deney grupları temelde sentezlenen MNP'ler ile etkileştirilmiş hücreleri içermekte iken bu gruplar standart ve osteojenik kültür ortamında ayrı ayrı

hazırlanmıştır. Ayrıca dış manyetik uyarıların uygulandığı ve uygulanmadığı alt gruplara ayrılmaktadır. Kontrol grubu olarak nanopartiküller ile etkileştirilmeyen hücelere manyetik alanın uygulandığı ve uygulanmadığı gruplar da mevcuttur.



Çizelge 4.3. Deney grupları

	<i>Standart Kültür Ortamı</i>	<i>MNP</i>
		<i>IS-MNP</i>
		<i>A-MNP</i>
		<i>AIS-MNP</i>
<i>EMA +</i>	<i>Osteojenik Kültür Ortamı</i>	<i>MNP</i>
		<i>IS-MNP</i>
		<i>A-MNP</i>
		<i>AIS-MNP</i>
	<i>Standart Kültür Ortamı</i>	<i>MNP</i>
		<i>IS-MNP</i>
		<i>A-MNP</i>
		<i>AIS-MNP</i>
<i>EMA -</i>	<i>Osteojenik Kültür Ortamı</i>	<i>MNP</i>
		<i>IS-MNP</i>
		<i>A-MNP</i>
		<i>AIS-MNP</i>

Sentezlenen 4 grup manyetik nanopartikül grupları tartılarak 30 dakika UV ışığında sterilize edildi. Örnekler daha sonra 50'lik steril tüplere alınarak deney gruplarına göre osteojenik ve standart kültür ortamı örnek miktarı 100 mg/ml olacak şekilde eklendi ve stok çözelti olarak kullanıldı. Bu stok çözeltiden seri dilüsyonla belirlediğimiz 2 doz hazırlandı. 4 grubun 2 dozundan oluşan örnekler adipoz kökenli mezenkimal kök hücre içeren 24 kuyucuklu kültür kaplarına aktarıldı. Kültür kaplarındaki hücreler, MNP içeren kültür ortamı ile 24 saat inkübasyon sonrasında 20 gün boyunca, günde 3 saat süreyle 1-1.5 mT şiddetinde düşük frekanslı darbeli manyetik alana (DFDEMA) maruz bırakıldı.

4.2.10.2. Hücre canlılığı testi

Sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla kolometrik bir metabolik aktivite belirteci olan MTT analizi gerçekleştirildi. 24 saat ve 72 saat ayrı ayrı inkübasyonun sonunda ekstraksiyon sıvıları kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve hücreler serumsuz besiyeri ile yıkandı. Hücre canlılığının bir belirteci olarak mitokondriyel dehidrojenaz aktivitesi, MTT [3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi ile ölçüldü. Sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla sırasıyla;

1. Kuyucuklar serumsuz besiyeri ile yıkandı.
2. Her bir kuyucuğa 90 µl DMEM ve 10 µl MTT reaktifi eklendi.
3. Örnekler inkübatöre alınarak 4 saat boyunca inkübe edildi.
4. Formazan kristallerinin çözülmesi için 200 µl HCL/izopropanol eklendi ve yarım saat çözülme için ışık almayan bir yerde bekletildi.
5. Pozitif kontrol için fenol çözeltisi kullanıldı.
6. Negatif kontrol için taze besiyeri kullanıldı.
7. Sonçlar mikropalak okuyucuda 570 nm absorbansta gerçekleştirildi.

4.2.10.3. Alkalın fosfataz (ALP) analizi

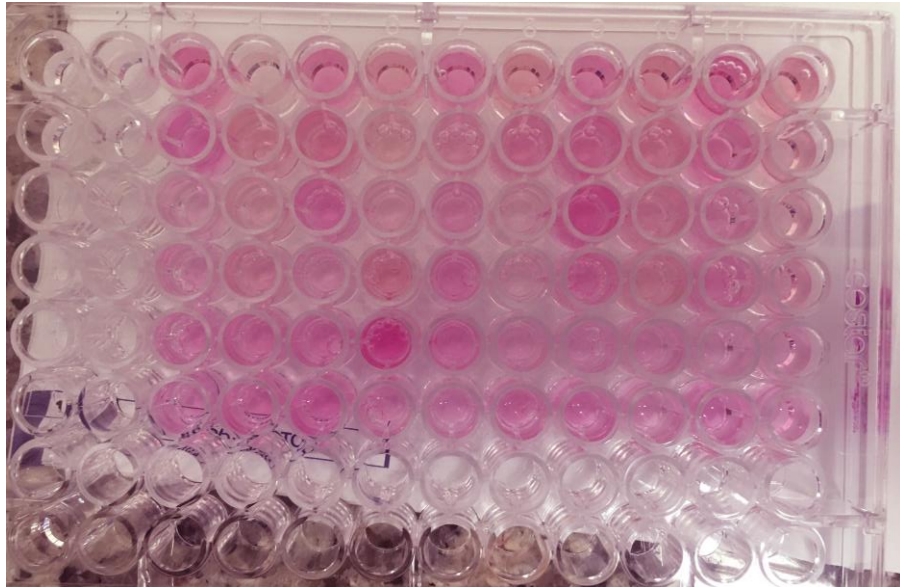
Erken evre osteojenik farklılaşma belirteci olan ALP ifadesini kontrol etmek için 10. Ve 20.günlerde alkalın fosfataz tayini işlemi gerçekleştirildi. ALP aktivitesi, Alkalın Fosfataz Kolorimetrik Aktivite test kiti (Cayman, ABD) ile gerçekleştirildi ve kitin protokolü uygulandı. Protokol kısaca; kit içeriğinde bulunan ALP analiz tamponu, ALP substratı, ALP

için pozitif kontrol ve ALP durdurma solüsyonları örnek sayısına göre hazırlandı. Tablo 4.4'te verildiği gibi kuyucuklara solüsyonlar ve en son olarak tüm kuyucuklara 20 µl ALP substratı eklendi. Kültür kabının üzeri kapatılarak 20 dakika 37°C de inkübe edildi. Daha sonra inkübatörden alınan kültür kabının her kuyucuğuna ALP durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Absorbnas okuma işlemi 405 nm dalga boyuyla mikroparka okuyucu ile gerçekleştirildi. Eşitlik 4.1'de gösterilen formülle ALP aktivitesi hesaplandı.

$$\text{ALP Aktivitesi (U/L)} = A_{405} \times 0,15 \text{ ml} / 8,34 \text{ mM}^{-1} \times 20 \text{ min.} \times 0,00002 \text{ L} \quad (4.1)$$

Çizelge 4.4. Alp analizi kuyucuk dağılımı

Kuyucuk	Alp Analiz Tamponu	Alp Pozitif Kontrol	Örnek
Background	30 µL	-	-
Pozitif Kontrol	10 µL	20 µL	-
Örnek	10 µL	-	20 µL



Şekil 4.8. ALP analizi için hazırlanan 96 kuyucuklu kültür kabı

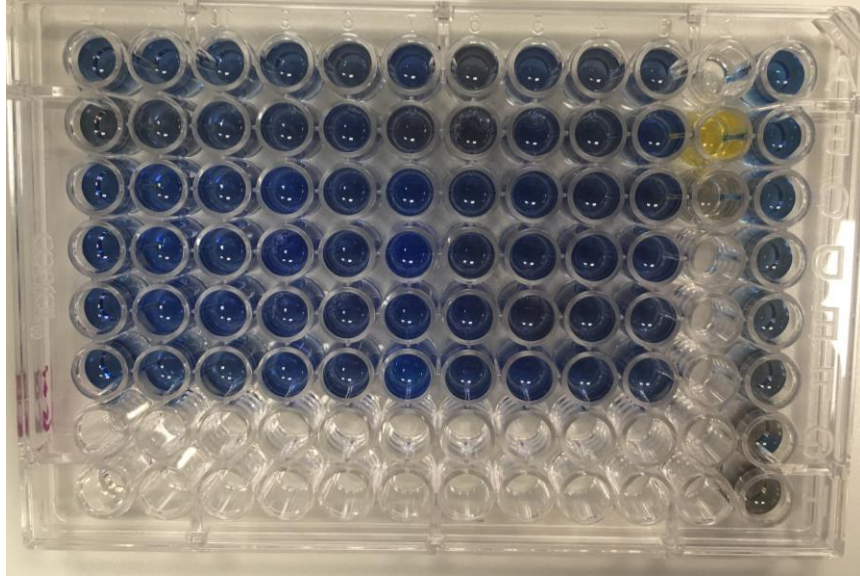
4.2.10.4. Kalsiyum aktivite analizi

Hücrelerdeki kalsiyüm birikimini tayin etmek için belirli zaman noktalarında (10.gün ve 20.gün) hücrelerin besiyeri alınarak kalsiyum analizi yapılmıştır. Kolorimetrik kit (BioAssay Systems, ABD), kılavuzunda yer alan protoköle göre gerçekleştirilmiştir. Kit içerisinde bulunan kalsiyum standartları protokoldede yer aldığı şekilde çizelge 4.5.'te gösterildiği gibi seyreltilmiştir. 96 kuyucuklu kültür kabına 5 µl dilue edilmiş standartlar ve 5 µl örnekler konularak üzerlerine 200 µl çalışma çözeltisi (6 µl A reaktifi, 6 µl B reaktifi) eklenmiştir. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 612 nm dalga boyunda mikropate okuyucu ile ölçüm alınmıştır. Bir kuyucuğa konulan dH₂O'dan oluşan standart OD_{blank} olarak kabul edildi. Eşitlik 4.2'de gösterilen formül ile kalsiyum aktivitesi hesaplandı.

$$\text{Kalsiyum miktarı (mg/dL)} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{eğim}} \quad (4.2)$$

Çizelge 4.5. Kalsiyum standartları

No	STD + dH ₂ O	Hacim (µl)	Ca (mg/dL)
1	5 µl + 0 µl	5	20
2	4 µl + 1 µl	5	16
3	3 µl + 2 µl	5	12
4	2 µl + 3 µl	5	8
5	1,5 µl + 3,5 µl	5	6
6	1 µl + 4 µl	5	4
7	0,5 µl + 4,5 µl	5	2
8	0 µl + 5 µl	5	0



Şekil 4.9. Kalsiyum aktivite analizi için hazırlanan 96 kuyucuklu kültür kabı

4.2.11. HİSTOKİMYASAL BOYAMALAR

4.2.11.1. Hematoksilin & Eosin

Hücrelerin genel yapısını (çekirdek ve sitoplazma) belirlemek için **Hematoksilin & Eosin** histolojik boyama yapıldı. Hematoksilin çekirdeği mavi-siyah renkte boyarken; eosin kolajenleri soluk pembe, kası koyu pembe, asidofilik sitoplazmayı kırmızı, bazofilik sitoplazmayı mor, çekirdeği mavi, eritrositleri kiraz kırmızısı renkte boyar. 10 ve 20 gün olarak belirlenen zaman noktalarında 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarındaki hücreler %2,5 glutaraldehit ile sabitlendi, daha sonra sırasıyla

1. Örnekler distile su ile yıkandı.
2. Hematoksilin ile yıkandı (8 dakika). Fazla Hematoksilini temizlemek için akan su ile muamele edildi.
3. %95'lik etil alkol ile yıkandı ve daha sonra eozin ile boyandı (1 dakika) ve fazla boya tekrar etil alkolden geçirilerek uzaklaştırılmıştır.

Bu protokole göre boyanan hücreler ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

4.2.11.2. Alizarin Red S (AR-S)

Hücrelerde oluşan mineralizasyonu değerlendirmek için **Alizarin Red** (AR-S) boyaması yapıldı. Alizarin red kalsiyum tortuları (oksalat hariç) turuncu-kırmızı renkte boyamaktadır. 24 oyuklu hücre kültürü tabaklarındaki hücreler, 10 ve 20 günlük zaman noktalarında %2.5 glutaraldehit ile sabitlendi ve sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Distile su ile yıkandı.
2. 20 mg/ml AR-S boya ile 5 dakika boyandı.
3. Fazla boyayı uzaklaştırmak için birkaç kez distile sudan geçirildi.
4. Histokimyasal boyamalar yapıldıktan sonra örnekler ışık mikroskopunda incelendi.

4.2.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

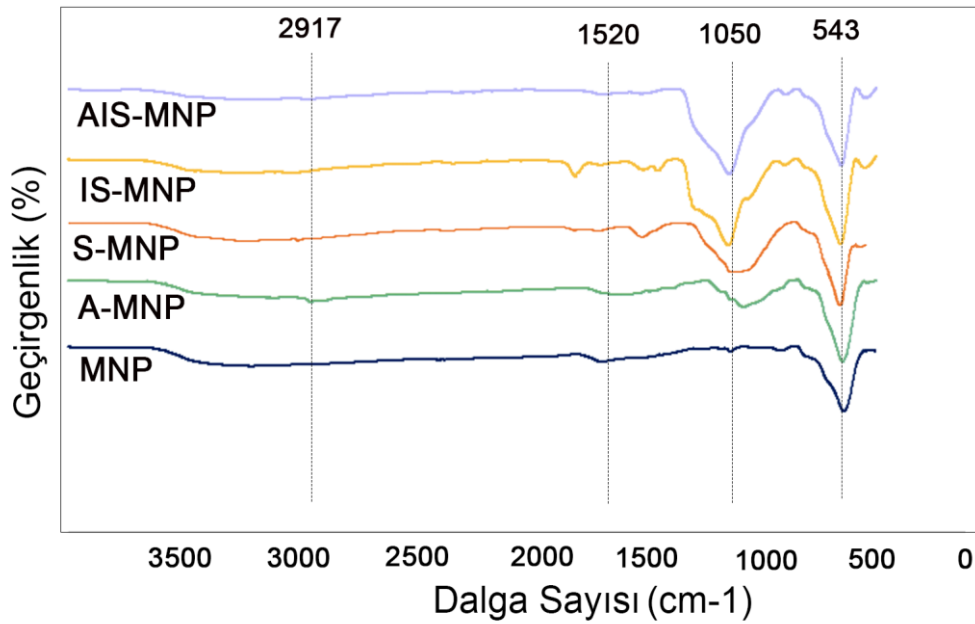
Tüm istatistiksel analizler, Mac için GraphPad Prism sürüm 9 ile hesaplandı. Çoklu karşılaştırmalar, iki yönlü ANOVA ile analiz edildi. Anlamlı farklar, p değerleri olarak gösterilmiştir (**** $p < 0,0001$, *** $p = 0,0002$, ** $= 0,0021$, * $= 0,0332$). $P < 0.05$ 'lik değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. MANYETİK NANOPARTİKÜL KARAKTERİZASYON ANALİZLERİ

5.1.1. FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ (FTIR) ANALİZİ

Elde edilen örneklerin fonksiyonel grupları hakkında (yapı, içerik) bilgilerinin elde edilmesi için FTIR analizi yapıldı. Şekil 5.1.'de görüldüğü gibi manyetik nanopartiküllerin ve silika kaplı ve/veya amino modifikasyonlu demir oksit nanopartiküllerinin FTIR sonuçlarında 543 cm^{-1} dalga sayısındaki bant Fe-O gerilme titreşimini göstermektedir. H_2O 'dan kaynaklanan OH titreşimini ise 1622 cm^{-1} bant göstermektedir. 1520 cm^{-1} N-H eğilmesi, 2917 cm^{-1} APTES yapısında bulunan propil grubundan kaynaklanan C-H gerilmesi gözlemlenmiştir. FTIR spektrumundan elde edilen sonuçlar doğrultusunda S-MNP ve in-situ S-MNP kaplama işleminin başarılı olduğu gözlemlenmiştir.

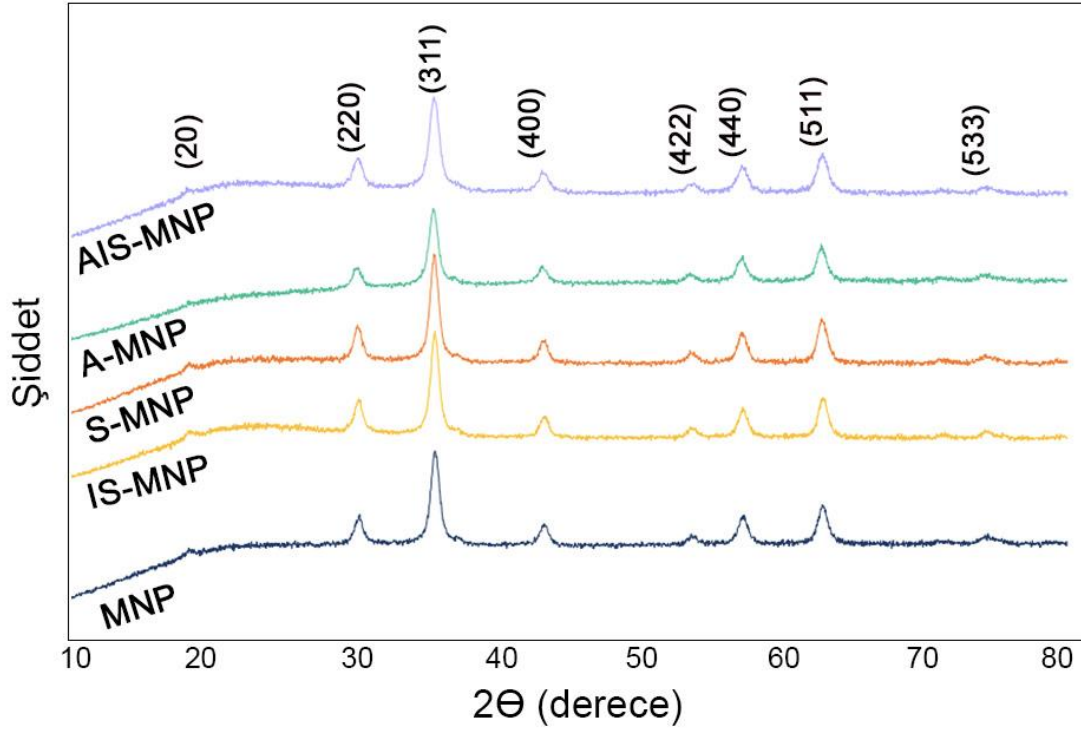


Şekil 5.1. MNP, S-MNP ve *in situ* üretilen S-MNP'lerin FTIR spektrumları (Silika kaplı manyetik nanopartiküller: S-MNP-1; İn situ silika kaplı manyetik nanopartiküller: S-MNP-2, Manyetik Nanopartiküller: MNP)

FTIR spektrumunda gözlemlenen amino gruplarının oluşturduğu titreşimler sonucu manyetik nanopartiküllerin amino silan ile kaplanmasının başarılı olduğu gözlemlenmiştir.

5.1.2. X-IŞINI DİFRAKTOMETRESİ(XRD)

Sentezlenen ve kaplama işlemi yapılan manyetik nanopartiküllerin kristal yapısını incelemek amacıyla XRD analizleri yapılmıştır. Yapılan XRD analizleri $2\theta=30.2^\circ$, 35.5° , 43.2° , 53.5° , 57.1° , 62.7° piklerini vermiştir. Bu pikler Fe_3O_4 kristal yapısı olan ve sırasıyla belirtilen kristal tabakalara tekabül etmektedir; (220), (311), (400), (422), (511), (440), (533). S-MNP, IS-MNP, AT-MNP, AIS-MNP’de $2\theta=20^\circ$ ‘de gözlemlenen geniş pik SiO_2 varlığını işaret etmektedir. Amino silan ile kaplamada silika yoğunluğu düşük olduğu için silika pikleri net olarak görülememektedir.

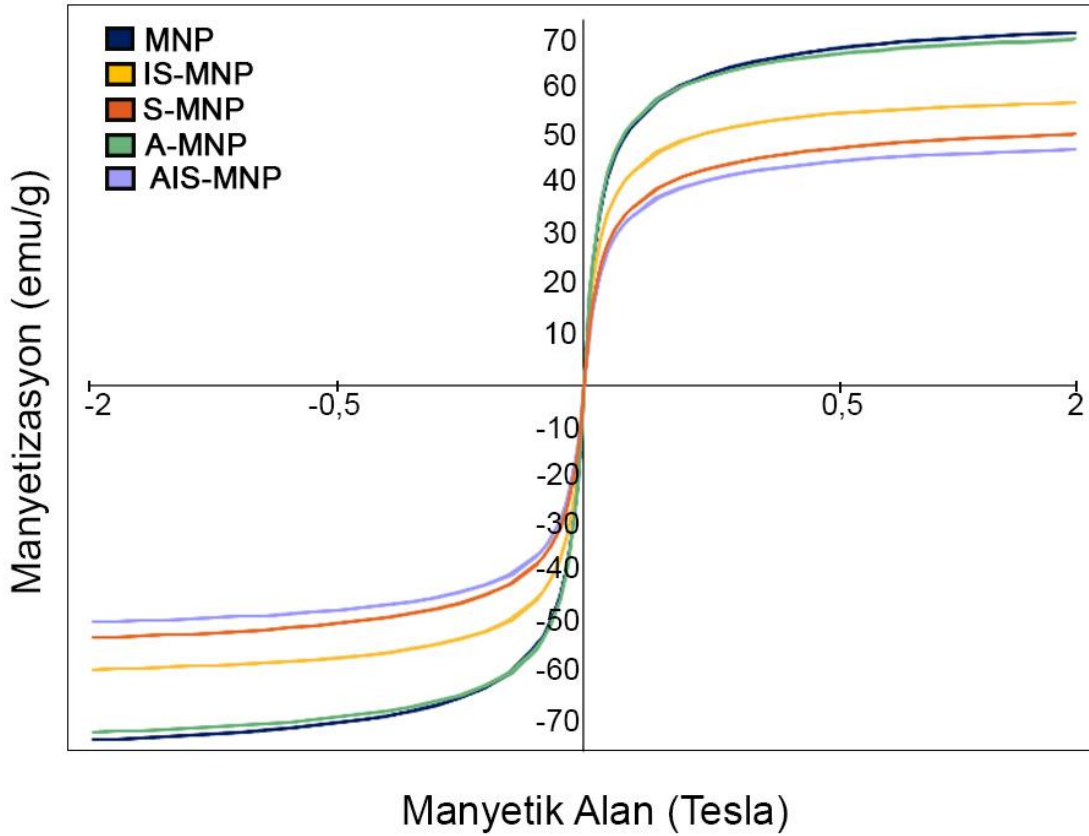


Şekil 5.2. MNP’lerin kaplama işlemi öncesi ve sonrası X-ışını kırınım desenleri.

5.1.3. TİTREŞİMLİ ÖRNEK MANYETOMETRİ (VSM) ANALİZİ

Sentezlenen ve kaplanan MNP’lerin manyetik özelliklerini belirlemek amacıyla oda sıcaklığında VSM analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonucu sentezlenen nanopartiküllerin manyetik özelliğe sahip olduğunu göstermiştir.

Şekil 5.3.'te kaplanmamış MNP, S-MNP, IS-MNP, A-MNP, AT-MNP, AIS-MNP manyetizma yaklaşık değerleri sırasıyla 67,7 emu/g; 48,2 emu/g; 54 emu/g; 66 emu/g; 31 emu/g; 45 emu/g olduğu gözlemlenmiştir. Silika kaplamanın manyetizasyonu anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlemlenirken; *in situ* kaplanan silikanın, normal kaplanan silikadan daha yüksek manyetizasyon değeri verdiği gözlemlenmiştir. Amino silan kaplamanın manyetizasyona anlamlı bir etki yapmadığı saptanmıştır.

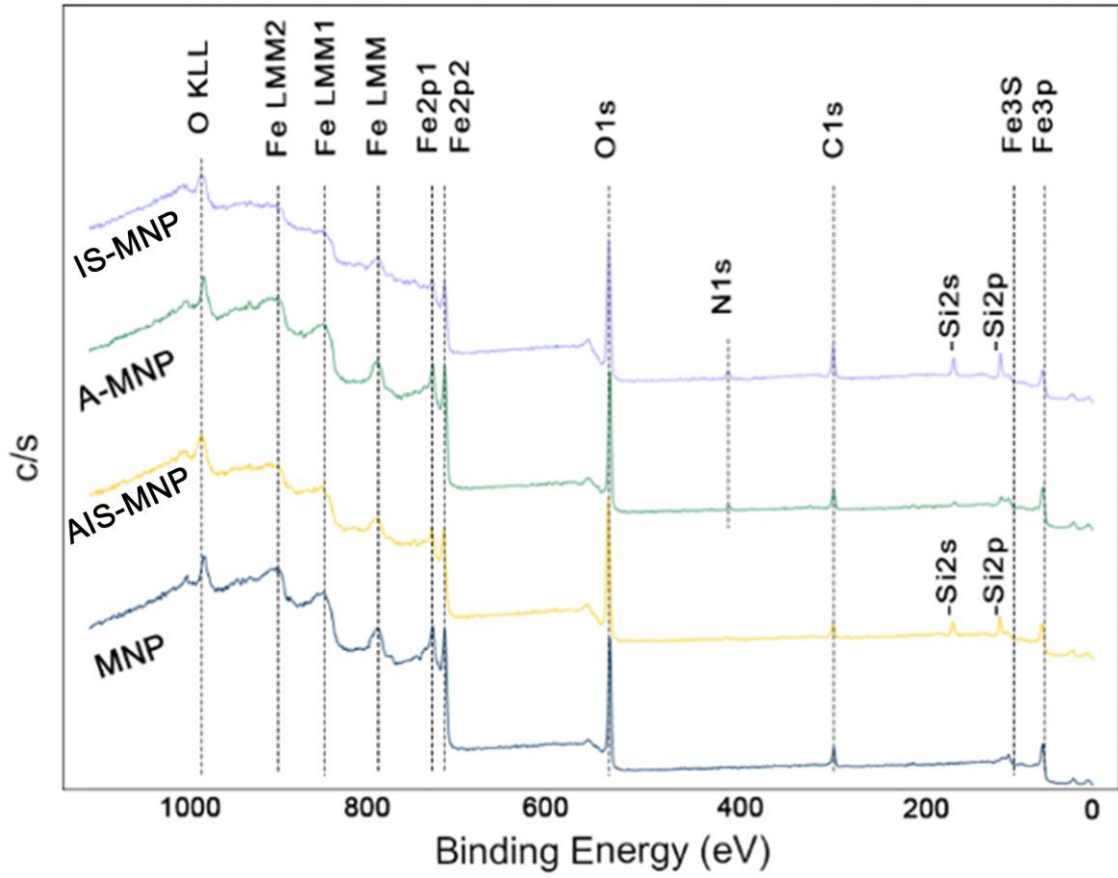


Şekil 5.3. Sentezlenen MNP'lerin VSM eğrileri

5.1.4. X-RAY FOTOELEKTRON SPEKTROSKOPİSİ (XPS)

X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), bir malzemede bulunan (element bileşimi) veya yüzeyini kaplayan elementleri ve bunların kimyasal durumlarını tanımlayabilen fotoelektrik etkiye dayanan yüzeye duyarlı nicel spektroskopik bir tekniktir. İşlevselleştirilmiş NP yüzeyinin bağlı bileşimi XPS ile analiz edildi. Sonuçlar Şekil 5.4.'te verilmiştir. Manyetik

çekirdeğin varlığı Fe 2p1 ve Fe2p2 sırasıyla. 725.25 eV ve 711.85 eV bantlarının varlığıyla gösterilmiştir. 284.9 eV'deki karbon piki, uzun zincirli bir alkil bantına yakındır; bu, bunun APTES uzun zincirli alkilinden geldiğini kesin olarak gösterir. Si2p'nin verdiği bant 100.0 eV 'dedir, bu da silanın (101.9 eV) standart bant verilerine yakındır. N1'lerin Eb'i 395,5 eV ve S2p'ninki 152.1 eV idi; bu, sırasıyla N-C grubunun (399.8 eV) ve SC grubunun (163.8 eV) standart verilerine yakındır. Yukarıdaki sonuçlar, MNP'lerin silan ile kaplamasının ve amino modifikasyonlarının başarılı olduğunu ortaya koymaktadır.



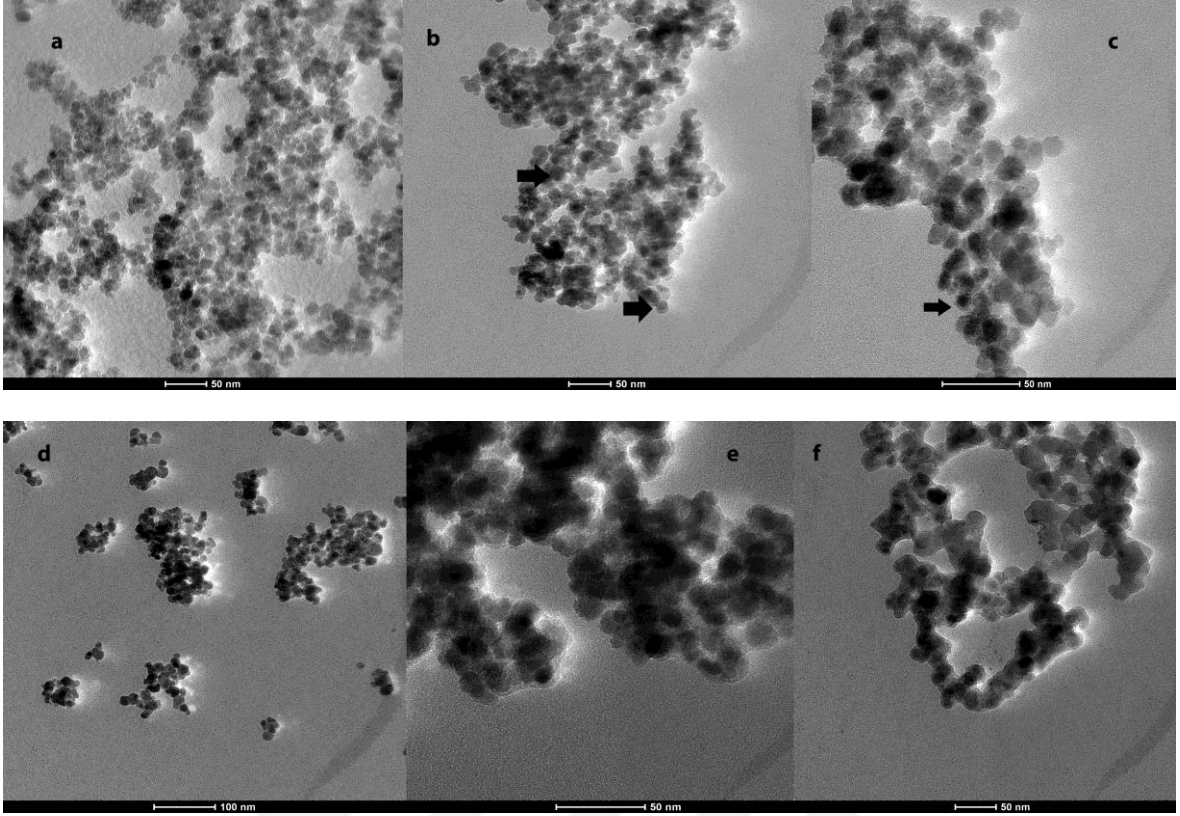
Şekil 5.4. MNP, S-MNP, A-MNP ve AS-MNP'nin X-Ray fotoelektron spektroskopisi

Çizelge 5.1. Sonuçlar doğrultusunda tez çalışmasının devamında kullanılmayacak nanopartiküller

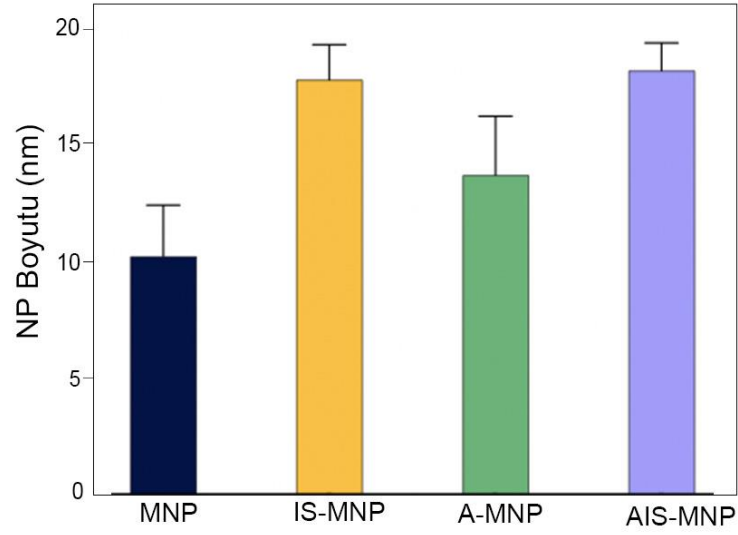
AT-MNP	Sentez sırasında oluşturdıkları jelimsi yapıdan dolayı stabilizasyonları sağlanamamış ve deneylerin devamında kullanılmamışlardır.
S-MNP ve AS-MNP	<i>in situ</i> olarak sentezlenen IS-MNP deneylerin devamında S-MNP yerine kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmaları göstermiştir ki <i>in situ</i> olarak sentezlenen S-MNP'ler normal şartlarda sentezlenen S-MNP ile aynı özelliktedir. Sentez süresinin kısalığı ve kolaylığı nedeniyle tez çalışmasındaki diğer çalışmalar <i>in situ</i> olarak silika kaplanan (IS-MNP) manyetik nanopartiküllerle devam etmiştir. Amino modifikasyonları IS-MNP üzerinde yapılmıştır.

5.1.5. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) ANALİZİ

Nanopartiküllerin boyut ve şekil özelliklerini incelemek amacıyla TEM analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.5. 'de verilen TEM görüntüleri, manyetik nanopartiküllerin karakteristik bir özelliği olan topaklanma eğilimini ortaya koymaktadır. MNP'ler ve kaplama uygulanmış MNP'ler küresel morfolojiye sahiptir ve şekil 5.6'da gösterildiği gibi boyutları 10–20 nm aralığındadır. MNP'lerin silika ve amino silan (oklarla gösterilir) ile kaplandığını doğrulayan katmanlı yüzey görünümünü gözlenmiştir. AT-MNP'de ise demir oksit çekirdeğin etrafında APTES ve TEOS'un eş zamanlı eklenmesinden kaynaklanan kalın bir tabaka gözlemlenmektedir.



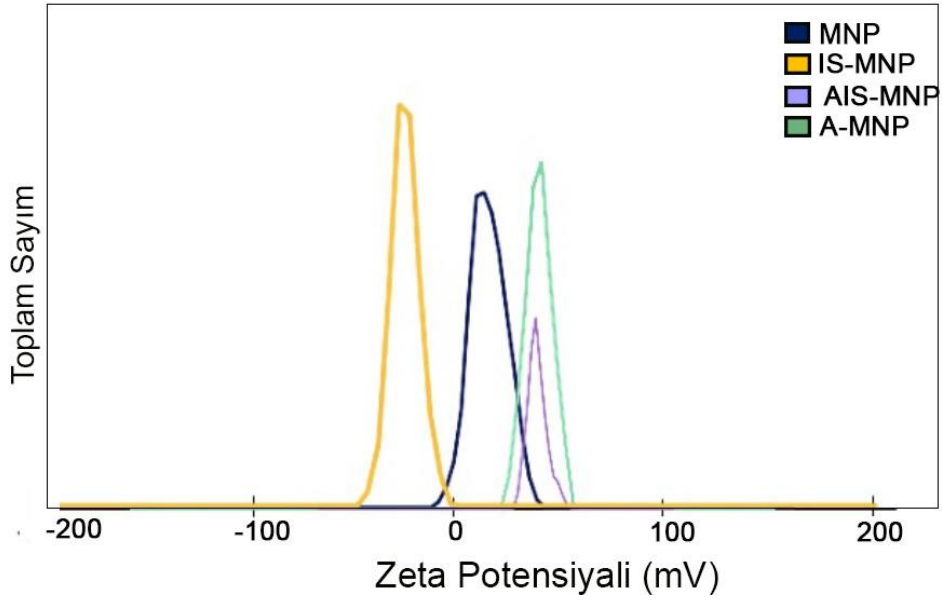
Şekil 5.5. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin TEM görüntüleri. a) MNP, b) S-MNP, c) IS-MNP, d) A-MNP, e) AS-MNP, f) AT-MNP



Şekil 5.6. Sentezlenen nanopartiküllerin boyutları

5.1.6. ZETA POTANSİYEL ÖLÇÜMÜ

Sentezlenen ve kaplanan MNP'lerin yüzey yükleri ve kararlılıklarının belirlenmesi için zeta-potansiyeli ölçümleri yapılmıştır. Şekil 5.6.'da görüldüğü gibi MNP, ISMNP, AMNP, AISMNP'nin zeta potansiyelleri sırasıyla; 8 mV, -15,5 mV, 39.4 mV, 33.5 mV olarak ölçülmüştür. Silika ile kaplamanın MNP'lerin silika içeriği nedeniyle negatif yüklü gruplara sahip olduğunu gösterirken, amino ile modifiye edilen grupların çoğunda zeta potansiyelin pozitif olmasının nedeni ise amin grubunun MNP'lere kattığı gruplardır.



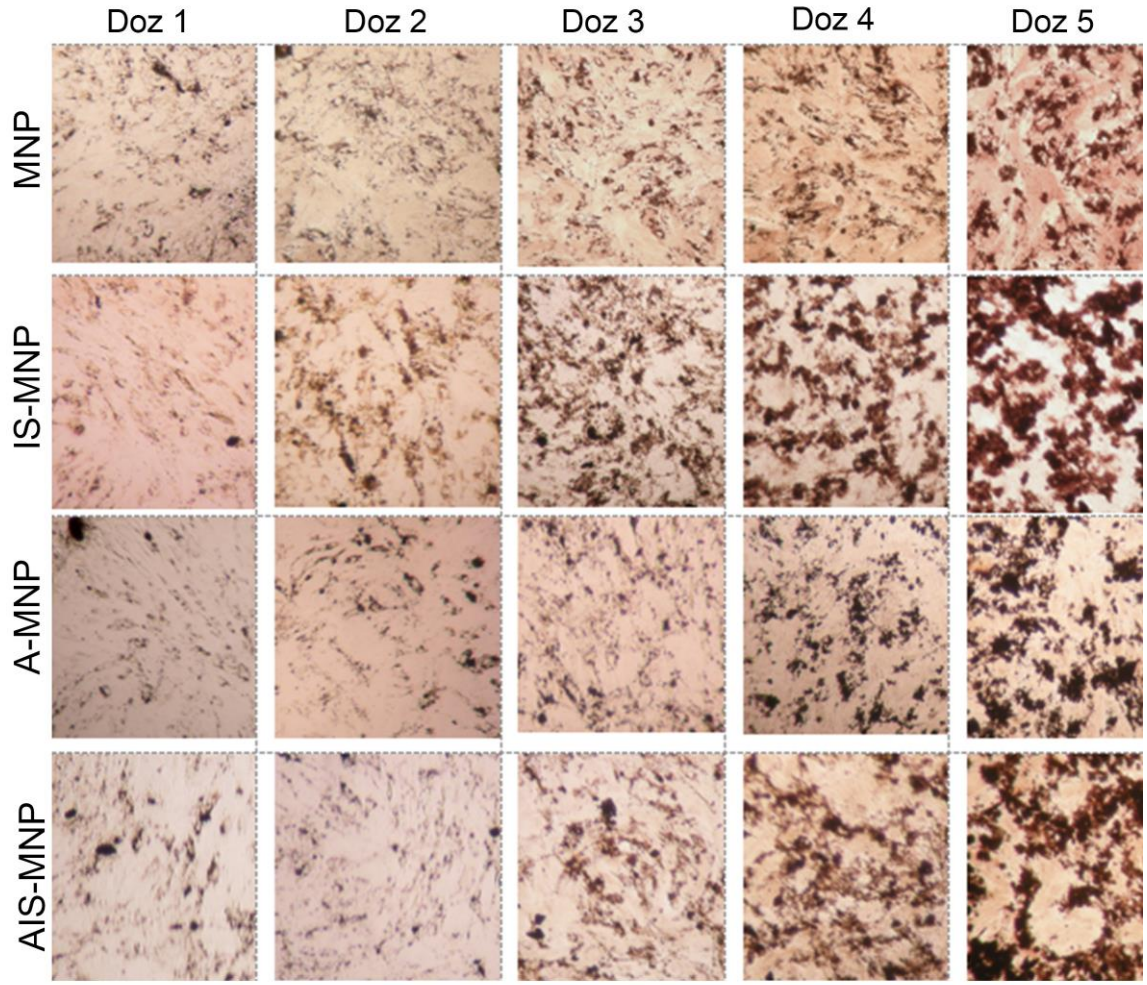
Şekil 5.7. MNP, SMNP, ISMNP'nin zeta potansiyeli dağılım grafiği

5.2. NANOPARTİKÜL-HÜCRE ETKİLEŞİMİ SONRASI ANALİZLER

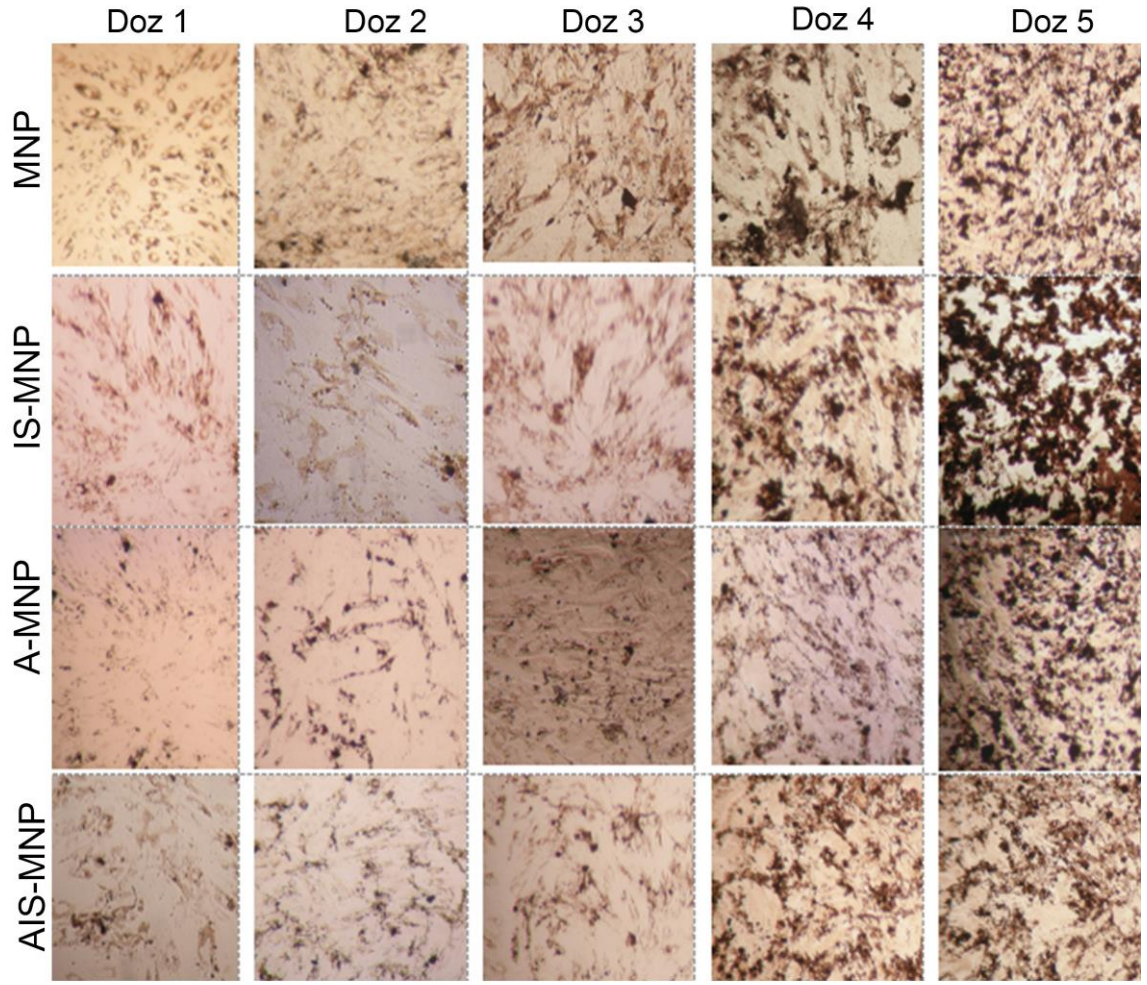
5.2.1. *İN VİTRO* SİTOTOKSİSİTE TESTİ

Nanopartiküllerin uygun doz ve sitotoksosite analizi için MTT testi kullanıldı. Sentezlenen nanopartiküllerin 5 dozu hücrelerle etkileştirildi ve 2 zaman noktasında (24 saat ve 72 saat) faz kontrast mikroskobu ile inceleme yapıldı. Şekil 5.7. ve şekil 5.8.'de inkübe edilen hücrelerin doz uygulamalarının mikroskop görüntüleri verilmiştir. D1 ve D2 dozların da sentezlenen nanopartiküllerin hücre içi ve hücre dışı yüzeylerinde yeterli miktarda dağılımı görülmektedir. D3, D4 ve D5 dozlarında ise uygulanan dozların hücre yüzeyinde birikme yaparak aglomerasyon oluşturduğu gözlemlenmektedir.

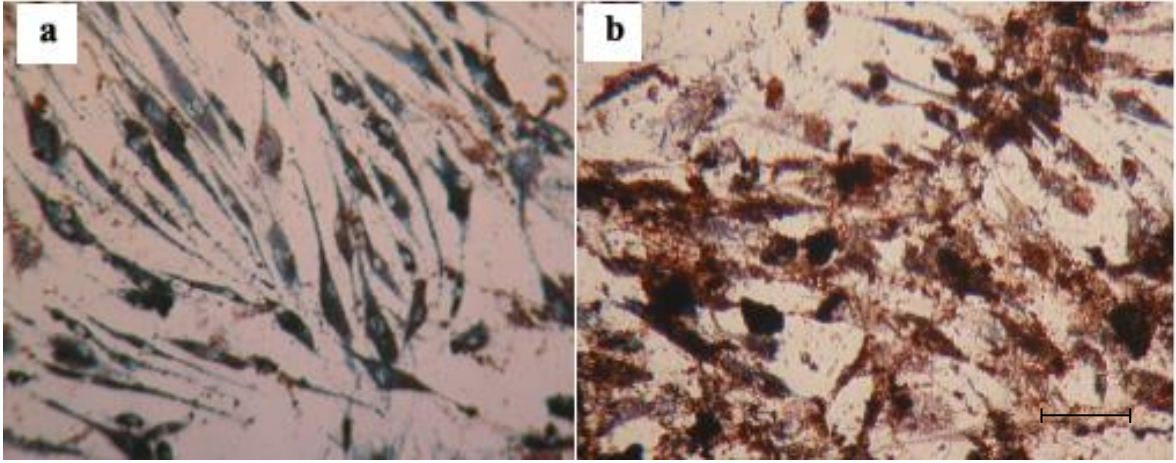




Şekil 5.8. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin nanopartiküllerin 5 dozuyla, 24 saat inkübe edildikten sonraki faz kontrast mikroskobu görüntüleri

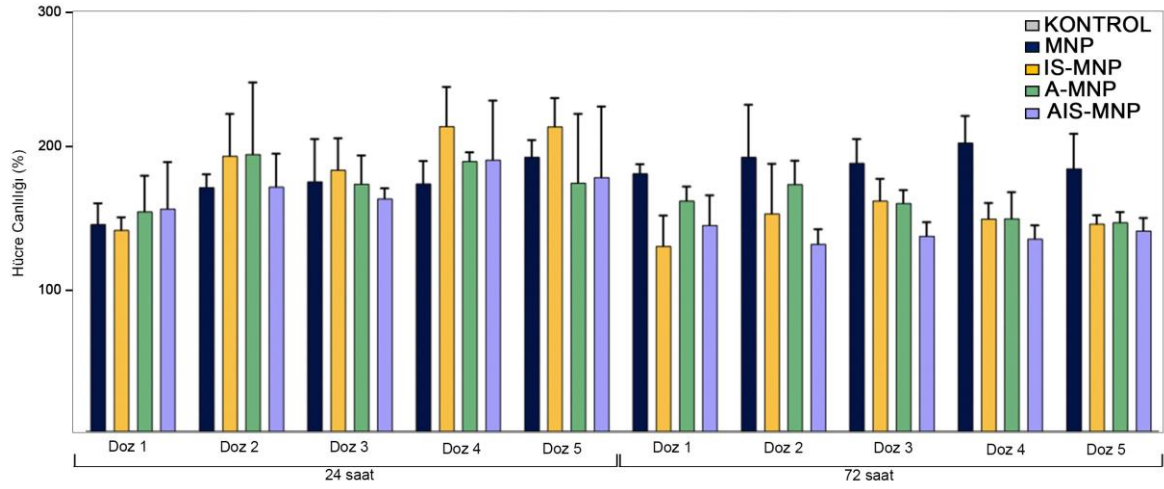


Şekil 5.9. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin nanopartiküllerin 5 dozuyla, 72 saat inkübe edildikten sonraki faz kontrast mikroskobu görüntüleri



Şekil 5.10. MTT kolorimetrik analiz sırasında oluşan formazan kristallerininin faz kontrast mikroskobu görüntüleri, (a) MNP doz 2, (b) MNP doz 5 (800 μm)

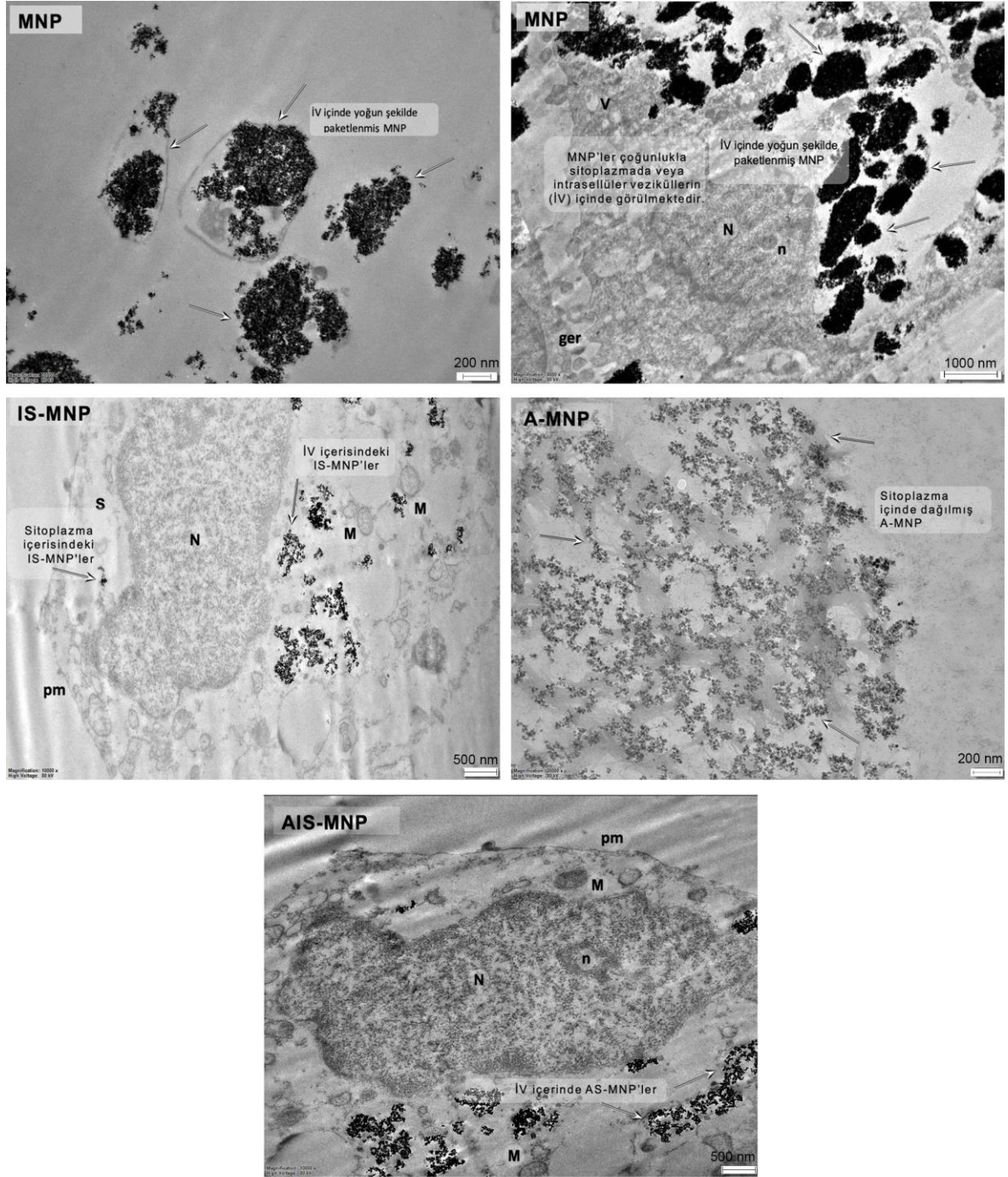
Sentezlenen nanopartiküllerin farklı 5 dozunun (d1: 50 $\mu\text{g/ml}$, d2: 100 $\mu\text{g/ml}$, d3: 200 $\mu\text{g/ml}$, d4: 400 $\mu\text{g/ml}$, d5: 800 $\mu\text{g/ml}$) adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerle etkileşimi sonrası yapılan MTT testine ait absorbans grafikleri şekil 5.10.'da verilmiştir. Pozitif kontrol olarak fenol çözeltisi kullanılır iken negatif kontrol için MNP içermeyen besiyeri kullanılmıştır. MTT sonuçları değerlendirildiğinde tüm dozların absorbans değerleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Dozlar kendi aralarında kıyaslandığında hiçbir dozun sitotoksik olmadığı yani hücre canlılığını etkilemediği ortaya konmuştur. Şekil 5.10'da MTT kolorimetrik analiz sırasında oluşan formazan kristallerininin faz kontrast mikroskobu görüntüleri görülmektedir. MNP'nin doz 1 ile doz 5 görüntüsü kıyaslandığında; doz 5 görüntüsünde nanopartiküllerin aglomere olduğu ve hücre etrafında kirlilik oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu yüzden deneylere düşük doz olan 50 $\mu\text{g/ml}$ ile devam edilmiştir.



Şekil 5.11. Sentezlenen nanopartikül gruplarının 5 dozunun hücreler ile etkileşimi sonucu elde edilen MTT absorbans grafiği

5.2.2. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) ANALİZİ

Manyetik nanopartiküllerin hücreler tarafından alımının gözlemlenmesi için TEM analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan TEM analiz sonuçları Şekil 5.11.'de verilmiştir. 4 grup manyetik nanopartiküllerin her birinin hücre içine alındığı TEM analizi ile gözlemlenmiştir. MNP'lerin diğer gruplara göre daha çok hücre içine alındığı ve hücre içinde intrasellüler veziküller içinde yoğun bir şekilde paketlenildiği görülmüştür. Kaplı olan manyetik nanopartikülleri, MNP'lerin aksine hücre içerisinde aglomere olmadıkları ve tek tek bulundukları gözlemlenmiştir. Bu durum yapılarındaki silika ile ilişkilendirilmiştir.



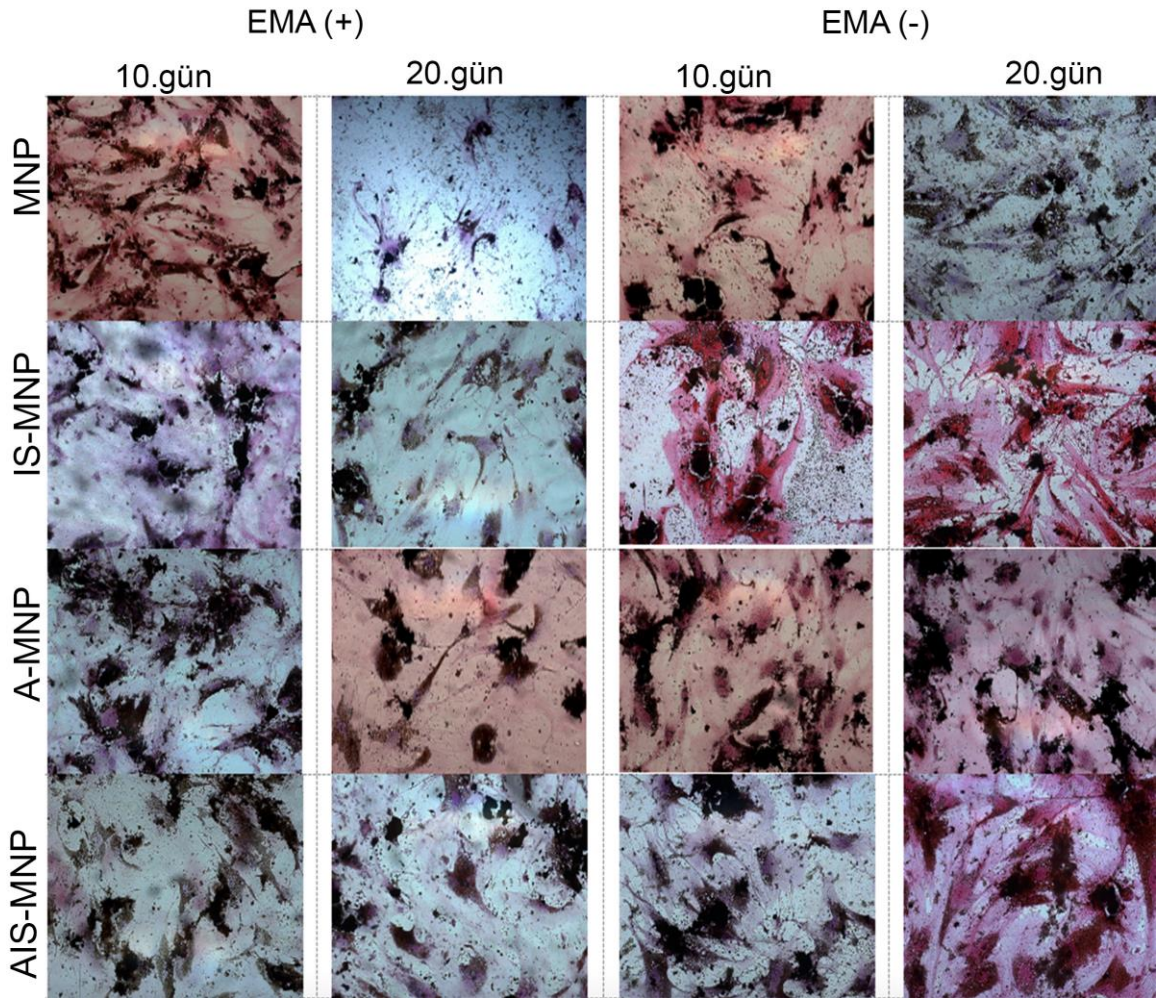
Şekil 5.12. Manyetik nanopartikül hücre etkileşimi TEM görüntüleri (S;sitoplazma, N; nukleus, M; mitokondri, pm; plazma membranı, ger; granüllü endoplazmik retikulum)

5.3. DÜŞÜK FREKANSLI MANYETİK ALAN UYGULAMASI SONRASI ANALİZLER

5.3.1. HİSTOKİMYASAL BOYAMALAR

5.3.1.1. Hematoksin & Eosin histokimyasal boyama

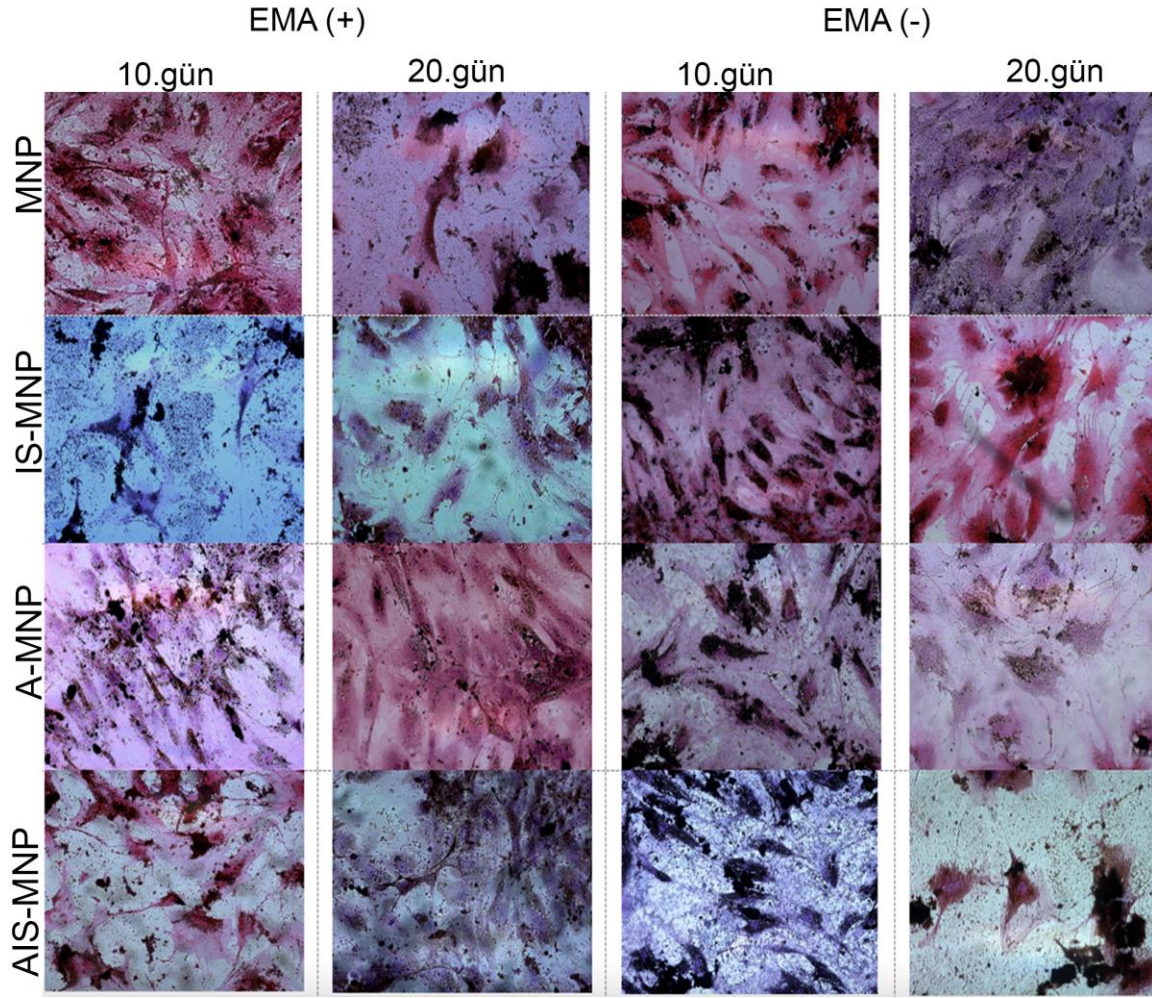
Nanopartiküllerle ve manyetik alanla etkileştirilen/etkileştirilmeyen hücrelerin morfolojik yapılarının incelenmesi için H&E boyaması yapılmıştır. Sonuçlar ışık mikrobuyla incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. 10.gün ve 20.gün de çeşitli parametrelerde (kültür ortamı; osteojenik vasat/standart vasat, dfEMA varlığı/yokluğu) alınan görüntüler Şekil 5.13. ve Şekil 5.14.’ de verilmiştir.



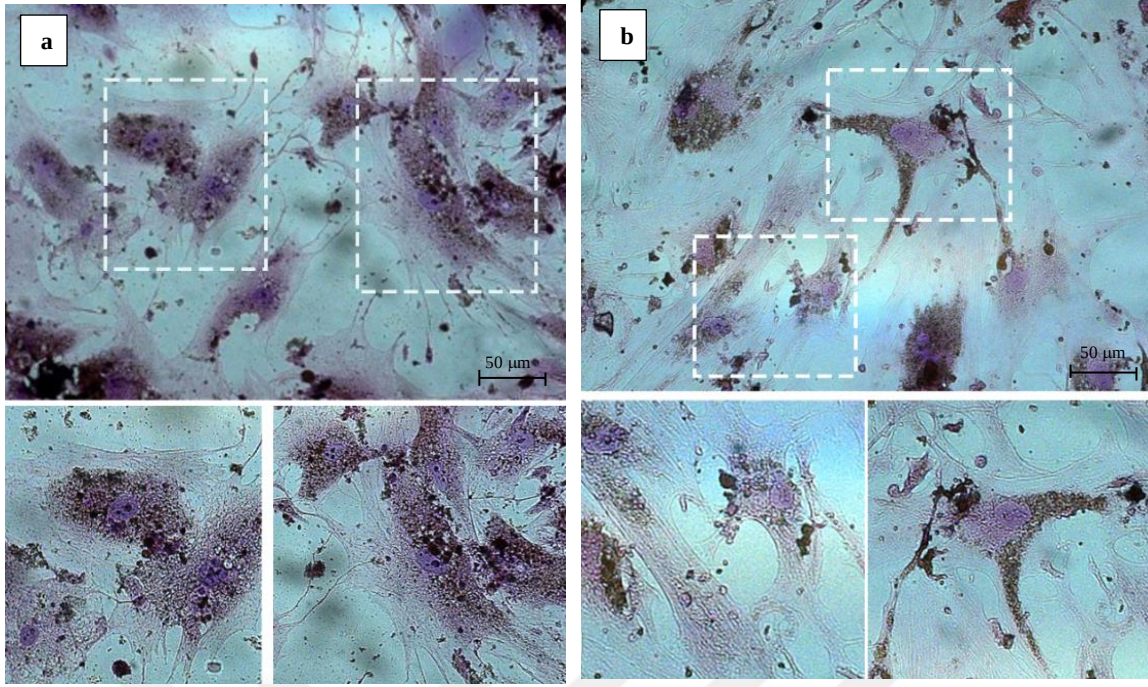
Şekil 5.13 Hücre ile etkileştirilmiş olan nanopartiküllerin aynı kültür ortamında (Standart vasat) dfEMA varlığında ve yokluğundaki morfolojik özellikleri (H&E histokimyasal boyama, 50µm ışık mikroskobu görüntüsü)

Örnekler incelendiğinde kültür ortamının farkının hücre morfoloji üzerinde anlamlı bir fark ortaya koymadığı gözlemlenmiştir. Osteojenik ve standart vasat ortamında kültürlen IS-

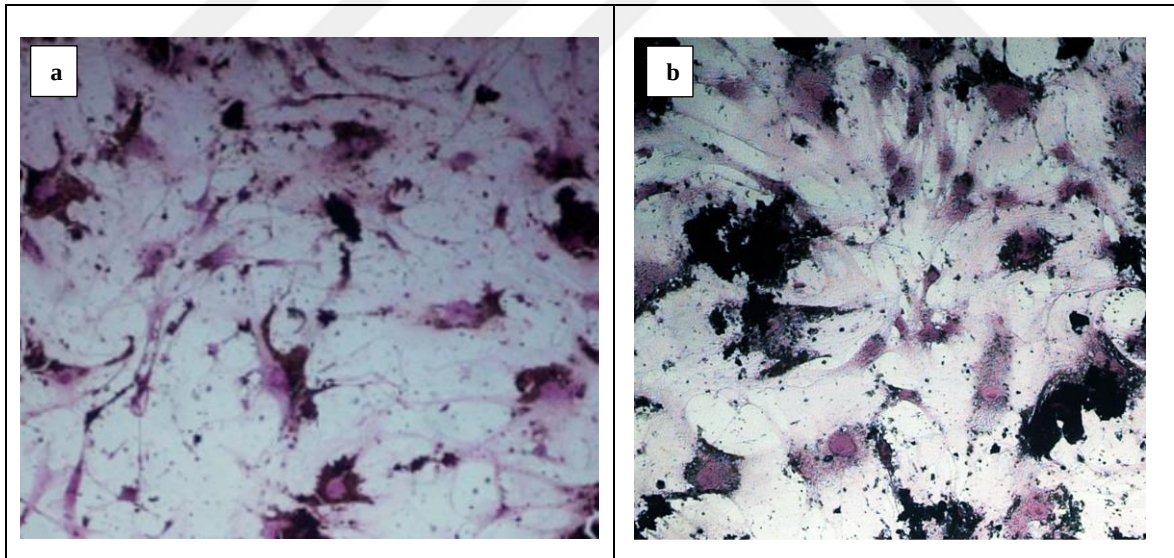
MNP'nin dfEMA varlığında 20.gündeki ışık mikroskobu görüntüleri şekil 5.12.'de verilmiştir. Standart vasat ve osteojenik vasattaki hücrelerde nanopartiküllerin sitoplazmada genellikle çekirdeğin etrafında öbeklenmiş halde bulunduğu gözlemlenmiştir. Her iki durumda da sitoplazma yapısının bozulmadığı ve hücrelerin sağlıklı olduğu görülmektedir. Morfolojik yapılarının benzer özelliktedir. Hücre şekillerinden yola çıkılarak osteojenik yönde farklılaşma olduğundan söz edilebilir. Aynı şekilde dfEMA uygulanan ve uygulanmayan örnekler incelendiğinde; dfEMA uygulanan hücreler morfolojik olarak incelendiğinde, sitoplazma uzantılarının bulunduğu görülmektedir (Şekil 5.16.). Bu da uzantılı kemik hücresi olan osteosit benzeri yapılar oluştuğunu göstermektedir. Aynı şekilde Şekil 5.15.'tede görüldüğü gibi dfEMA uygulanmış hücrelerin 10.gün ve 20.gün sonuçları kendi aralarında kıyaslandığında; 20.gündeki hücrelerin daha çok sitoplazmik uzantıya sahip olduğu gözlemlenmiştir. Tüm bu sonuçlardan yola çıkılarak dfEMA ve nanopartikül varlığında kültür ortamı farketmeksizin hücrelerin osteojenik farklılaşmaya yöneldiği gözlemlenmiştir.



Şekil 5.14. Hücre ile etkileştirilmiş olan nanopartiküllerin aynı kültür ortamında (Osteojenik vasat) dfEMA varlığında ve yokluğundaki morfolojik özellikleri (H&E histokimyasal boyama, 50µm ışık mikroskobu görüntüsü)



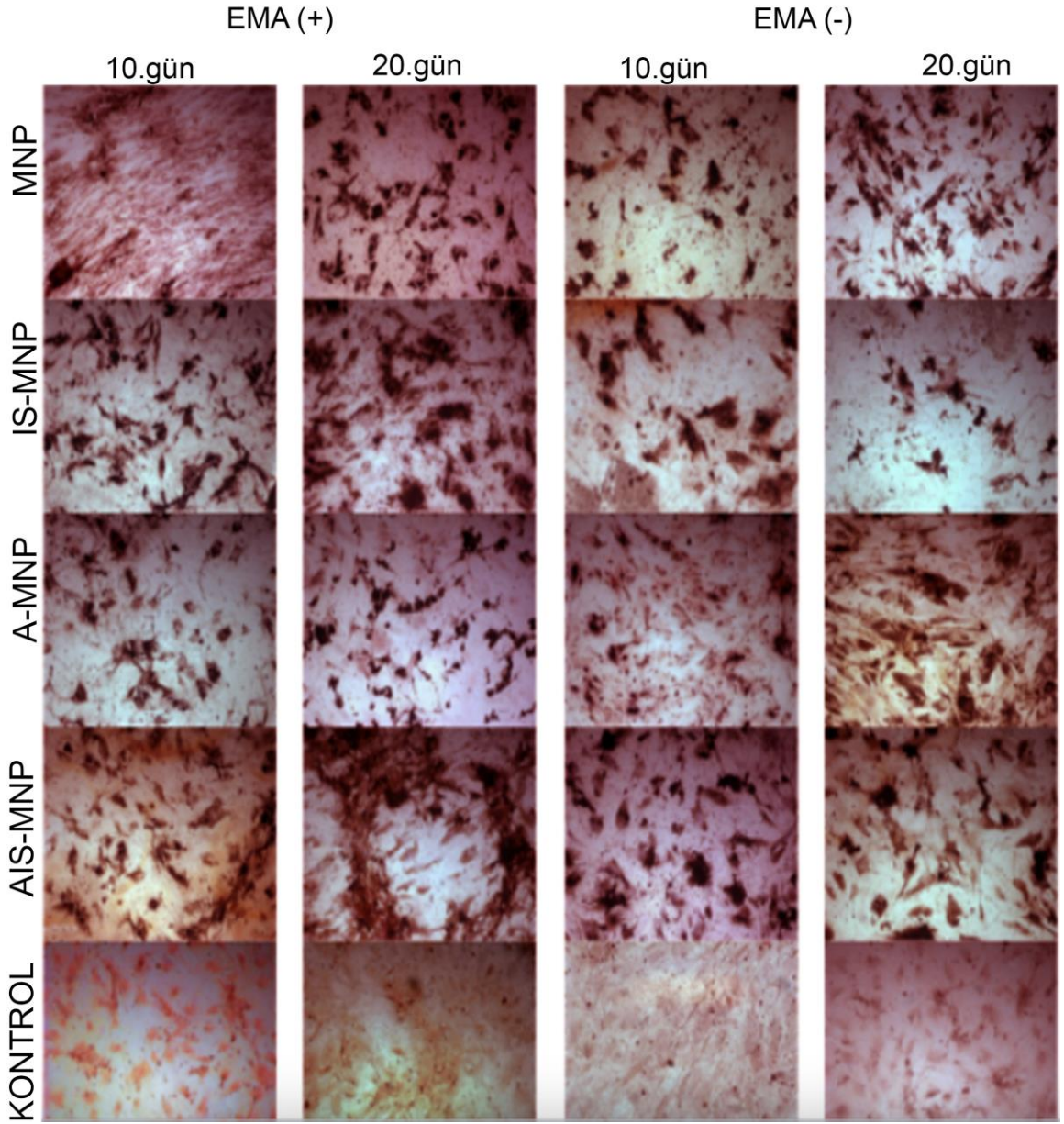
Şekil 5.15. dfEMA varlığında S-MNP H&E görüntüleri a) 10.gün b) 20.gün



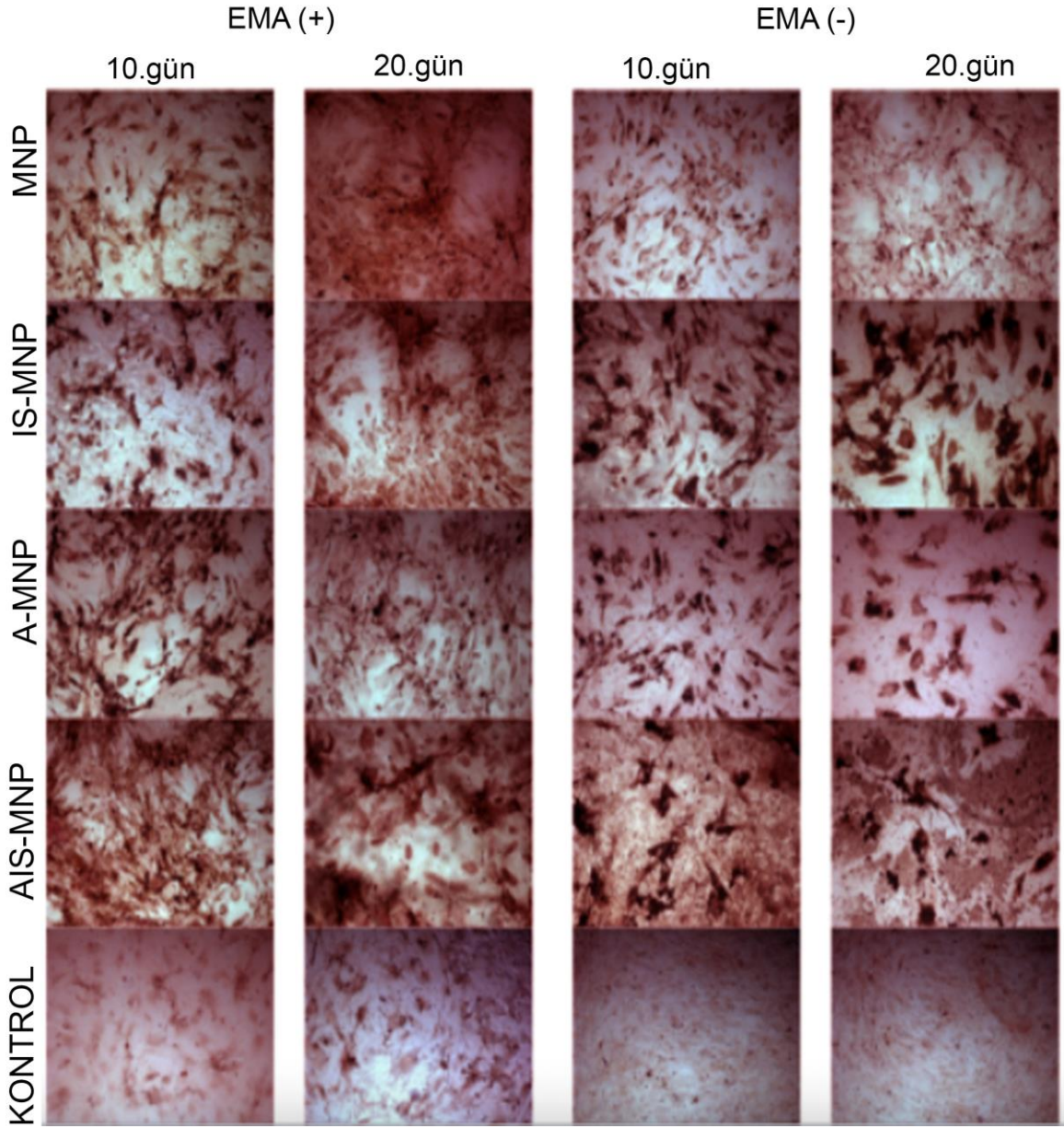
Şekil 5.16. A-MNP standart vasat 20.gün a) dfEMA varlığında b)dfEMA yokluğunda (50µm ışık mikroskobu görüntüsü)

5.3.1.2. Alizarin Red S

Alizarin red S boyaması (ARS), in vitro osteojenik farklılaşma kabiliyetini değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. Alizarin red S hem insan hem de kemirgen mezenkimal kök hücrelerinin (MSC'ler) farklılaştırılmış kültüründe kalsiyum içeren osteositleri tanımlamak için yaygın olarak kullanılan bir histokimyasal boyamadır. Alizarin red S histokimyasal boya kırmızı renk mineralizasyonun gerçekleştiğinin göstergesidir. Şekil 5.16. ve şekil 5.17.'de ARS boyama sonrası mikroskop görüntüleri verilmiştir. Standart vasat içerisinde kültürle edilen hücrelerinde osteojenik vasat içerisindeki hücrelere yakın mineralizasyon görüntülerine sahip olduğunu söylemek mümkündür. dfEMA varlığında kırmızı renk dfEMA yokluğundakinden daha belirgindir ve aynı şekilde dfEMA varlığında/yokluğundaki negatif kontrollerde bu bilgiyi doğrulamaktadır.



Şekil 5.17. Hücre ile etkileştirilmiş olan nanopartiküllerin osteojenik kültür ortamında dfEMA varlığında ve yokluğundaki alizarin red histokimyasal boyama ışık mikroskobu görüntüleri (100µm)

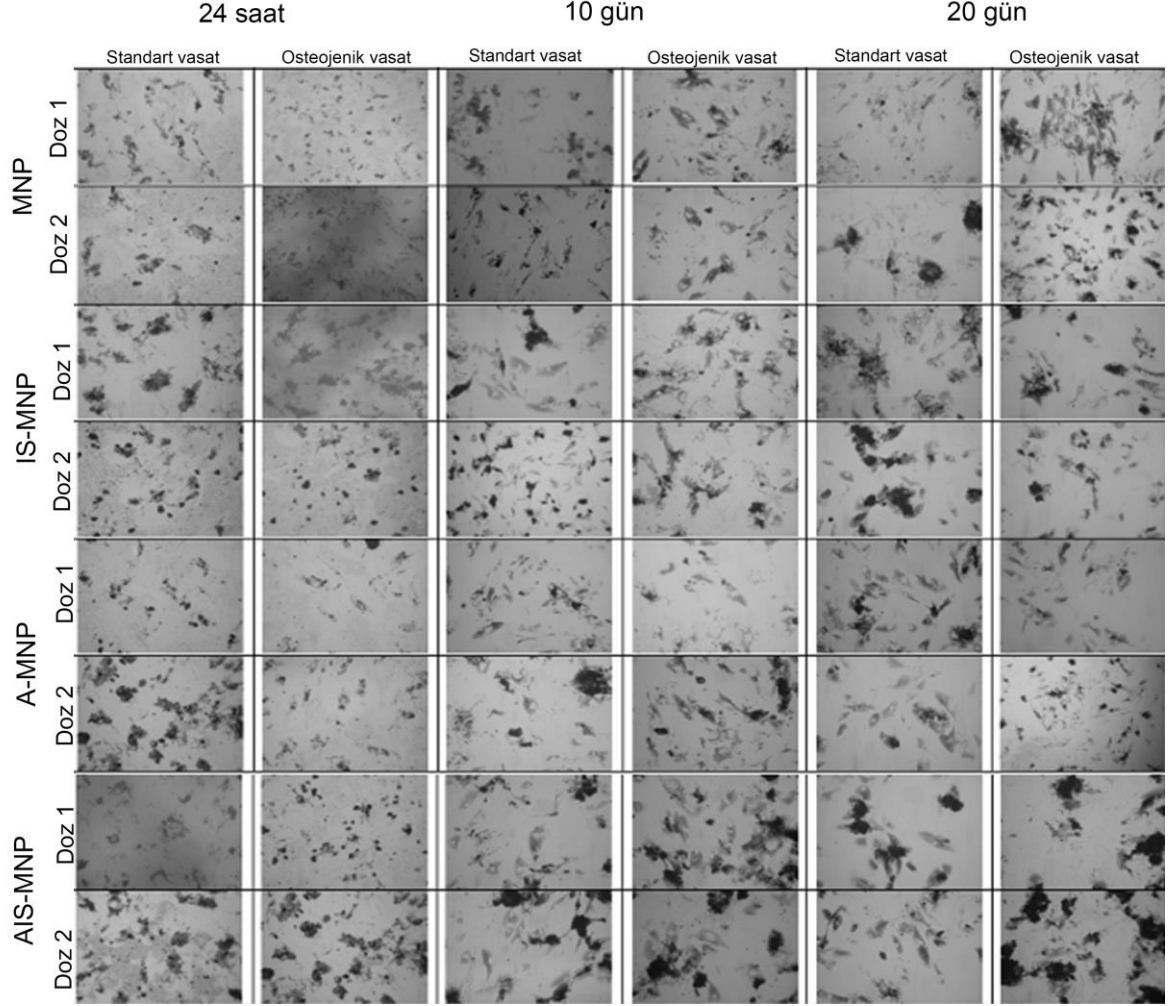


Şekil 5.18. Hücre ile etkileştirilmiş olan nanopartiküllerin standart kültür ortamında dfEMA varlığında ve yokluğundaki alizarin red histokimyasal boyama ışık mikroskobu görüntüleri (100µm)

Osteojenik vasat ve standart vasat ortamında kültürlenmiş hücrelerde anlamlı bir fark oluşmadığı, standart vasatta da hücrelerin osteojenik farklılaşmaya yöneldiği ortaya konmuştur. Aynı şekilde hematoksilin ve eosin boyamadada fark görülmediği için bundan sonraki çalışmalar sadece standart vasat üzerinden devam etmiştir.

5.3.2. HÜCRE CANLILIĞI TESTİ

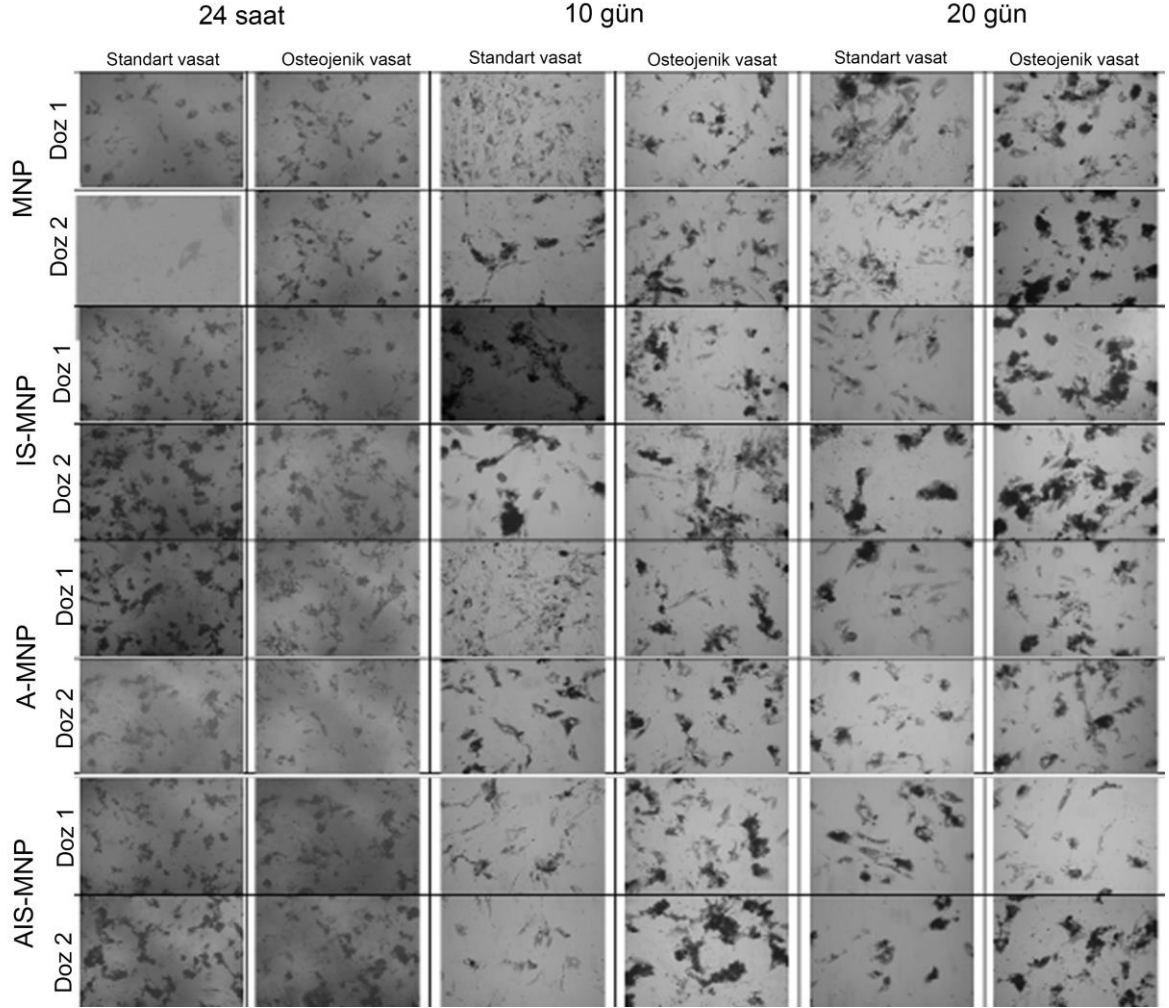
EMA ve nanopartiküllerin hücre canlılığı üzerindeki sinerjik etkisini incelemek için MTT testi kullanıldı. Sentezlenen nanopartiküllerin 2 dozu hücrelerle etkileştirildi ve 3 zaman noktasında (24 saat, 10 gün ve 20 gün) faz kontrast mikroskobu ile inceleme yapıldı.



Şekil 5.19. EMA yokluğunda adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin nanopartiküllerin 2 dozuyla, 2 farklı kültür ortamında ve 3 zaman noktasında inkübe edildikten sonraki faz kontrast mikroskobu görüntüleri

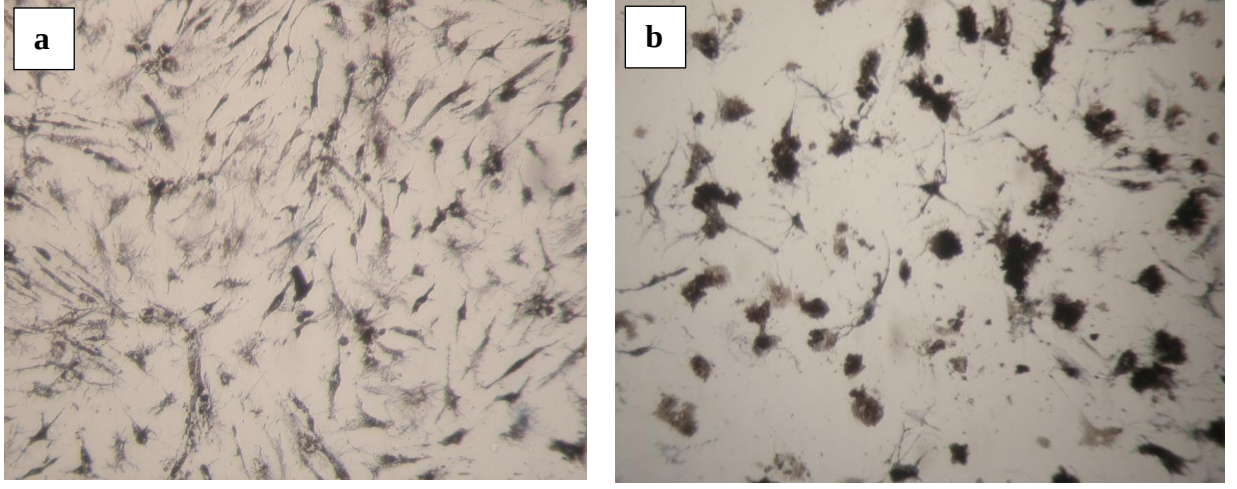
Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin sentezlenen nanopartiküllerin D1 ve D2 dozlarının iki farklı kültür ortamı, üç zaman noktası ve EMA varlığı ile yokluğu durumunda inkübasyon sonucu faz kontrast mikroskobu görüntüleri şekil 5.18. ve şekil 5.19. de verilmiştir. D1 dozunun hücre yüzeylerin yeterli oranda dağılımı gözlenirken, D2 dozunun

hücre yüzeyinde birikme yaparak aglomerasyon oluşturmaya daha yatkın olduğu gözlemlenmektedir.



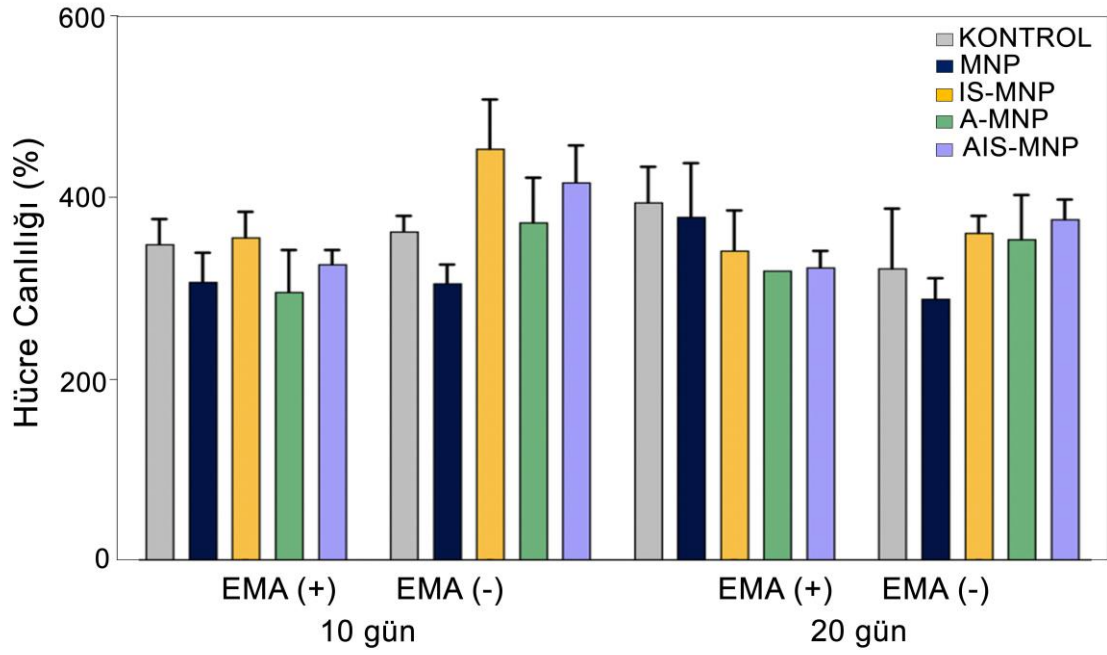
Şekil 5.20. EMA varlığında adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin nanopartiküllerin 2 dozuyla, 2 farklı kültür ortamında ve 3 zaman noktasında inkübe edildikten sonraki faz kontrast mikroskobu görüntüleri

EMA varlığında AIS-MNP doz 1 grubunun 10 ve 20 günlük inkübasyon sonucu MTT analizi sırasında oluşan formazan kristallerinin faz kontrast mikroskop görüntüleri şekil 5.20.'de verilmiştir.



Şekil 5.21. MTT analizi sırasında oluşan formazan kristallerinin faz kontrast mikroskop görüntüleri, (a) AIS-MNP doz 1 EMA varlığında 10.gün, (b) AIS-MNP doz 1 EMA varlığında 20.gün

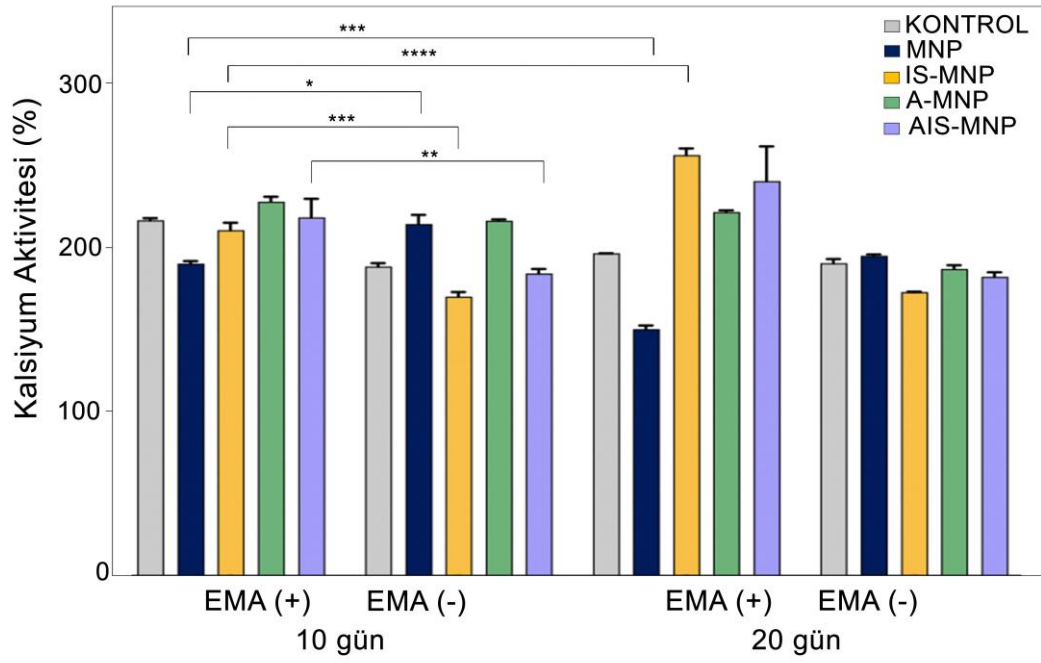
Sentezlenen nanopartiküllerin ve EMA'nın hücre canlılığına etkileri MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir (Şekil 5.21.). Belirlenen zaman noktalarında yapılan MTT analizi sonuçlarıyla elde edilen absorbans değerleri incelendiğinde hücrelerin canlılıklarını korudukları ve genel olarak çoğaldıkları gözlemlenmiştir. Standart kültür ortamı ve osteojenik kültür ortamında inkübe edilen hücreler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak EMA uygulanan hücrelerin, EMA yokluğundaki hücrelere göre daha az hücre yoğunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 0.1. Sentezlenen nanopartikül gruplarının ve EMA'nın adipoz kökenli kök hücre kültürünün belirli zaman noktalarında MTT yöntemi ile belirlenen hücre canlılık oranları.

5.3.3. KALSİYUM AKTİVİTE ANALİZİ

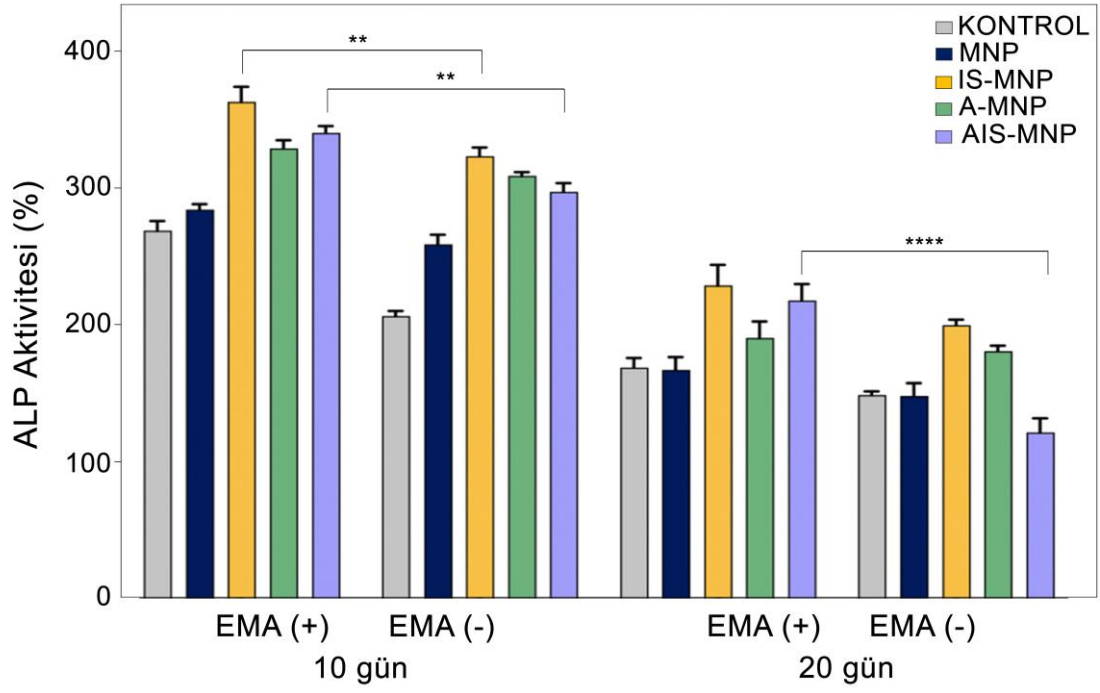
Elektromanyetik alan varlığında S-MNP ve AIS-MNP grupları silika içerikleri grupların diğer gruplara göre 20.günde kalsiyum birikiminin daha çok olduğu görülmektedir. Bu durum her iki grubunda yapısında bulunan silikadan kaynaklanıyor olabilir. Aynı şekilde elektromanyetik alan varlığında 10.günler kıyaslandığında silika içerikli grupların diğerlerine göre kalsiyum aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 0.2. Sentezlenen nanopartikül gruplarının ve EMA'nın adipoz kökenli kök hücre kültürün belirli zaman noktalarında Kalsiyum aktivitesi

5.3.4. ALKALİN FOSFATAZ ANALİZİ

Alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi genel olarak incelendiğinde elektromanyetik alandan bağımsız olarak tüm grupların 10.gün ALP aktiviteleri; 20.gün aktivitelerinden daha yüksektir. Manyetik alan varlığında MNP'lerin ALP aktiviteleri kontrol grubundan daha düşük olduğu görülmektedir. Ancak kaplama yapılan grupların ALP aktivitelerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu da kaplama yapılan MNP'lerin osteoindüktif olabileceğini ortaya koymaktadır. Kalsiyum aktivitesiyle doğru orantılı olarak silika içeren grupların ALP aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Manyetik alan varlığı ve yokluğu durumları kıyaslandığında, ALP aktivitesinin manyetik alan varlığında az da olsa yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 0.3. Sentezlenen nanopartikül gruplarının ve EMA'nın adipoz kökenli kök hücre kültürün belirli zaman noktalarında Alkalın fosfataz aktivitesi

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, manyetik nanopartiküller, yüzeyleri silika ile kaplamış ve aminosilan ile modifiye edilmiş nanopartiküller sentezlenerek düşük frekanslı manyetik alan ile birlikte adipoz kökenli kök hücrelere uygulanarak, kök hücre farklılaşması incelenmiştir. Nanopartiküller fiziksel ve kimyasal (XPS, XRD, FTIR, VSM, TEM, Zeta potansiyeli) olarak karakterize edilmiş ve elektromanyetik alan maruziyeti sonrasında kök hücre proliferasyon ve farklılaşması alkalın fosfataz, alizarin kırmızısı, hematoksin eosin, kalsiyum birikim analizi, MTT, TEM gibi analizler ile değerlendirilmiştir.

Yapılan tez çalışmasında manyetik nanopartiküller sol-gel metodu ile sentezlenmiştir. Abdulwahab ve arkadaşları (115) demir kobalt oksit ve demir mangan oksit nanopartiküllerini sentezlemek için pivalat kümeleri kullanmıştır. Reaksiyon süresinin, sıcaklığın ve öncül konsantrasyonun stokiyometri üzerindeki etkileri incelemişlerdir. Park ve arkadaşları (116) ,6-13 nm'lik sürekli bir boyut spektrumuna sahip monodispers demir oksit nanopartiküllerini sentezledi. Sentetik prosedür yüksek oranda tekrarlanabilirdi. Peng ve Sun (117), amorf çekirdek-kabuk Fe-Fe₃O₄ nanopartiküllerinin oksidasyonunu kontrol ederek tek dağılımlı içi boş Fe₃O₄ nanopartiküllerinin basit bir çözelti fazı sentezini rapor ettiler. Bu nanooksitler başarılı bir şekilde sentezlenmiş olsa da parçacıkların aglomerasyon oranları oldukça yüksekti. Yüksek yüzey enerjisi nedeniyle, çıplak demir oksit nanopartikülleri aglomerasyon eğilimindedirler. Bu nedenle nanopartiküllerin biyolojik ortamda nasıl stabilize edileceği çok önemlidir. Genellikle bu sorunu çözmek için nanopartiküllerin yüzeyi kaplanmaktadır. Nanopartiküllerin sentez sonrası stabilizasyonu için sentez sırasında birden çok stabilizör kullanılmıştır. Nicolas ve arkadaşları (118) demir oksit nanopartiküllerinin stabilizasyonu için biyomoleküller kullanırken, Kovalenko ve arkadaşları (119) çeşitli oleik asit tuzları kullanmıştır. Faiyas ve arkadaşları (120), ortak çöktürme metodu geliştirdiler ve pH değerinin Fe₃O₄ nanopartiküllerinin sentezini ne şekilde etkilediğini araştırdılar. Tüm sonuçlar, pH değerinin nanopartiküllerin gözlenen faz oluşumunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Aynı zamanda ortak çöktürme yönteminde çöktürücü olarak amonyum hidroksit kullanarak, manyetik nanopartiküllerin daha kontrollü şekilde sentezini sağlamışlardır. Amonyum hidroksit daha zayıf bir baz olduğundan sentez sırasında nanopartikül agregasyonu engellemek ve daha küçük

boyutlarda nanopartiküller elde etmek için kullanılabilir. Yapılan çalışmada agregasyonu engellemek ve daha küçük boylarda nanopartiküller elde etmek için amonyum hidroksit kullanılmıştır.

Bir Sol-jel yaklaşımı olan Stöber yöntemi, düşük maliyeti ve kolay kullanımı nedeniyle genellikle silika nanopartikül hazırlamak ve amino modifikasyonları için kullanılmıştır. Bu yöntemde nanopartikülün son boyutu ve homojenliği, TEOS'un hidroliz ve yoğuşma hızı ile belirlenir. Katalizör, çözücü, pH ve yüzey aktif madde araştırılarak silika nanopartikül elde etmek için bir dizi teknik geliştirilmiştir (121–124). Guo ve arkadaşları ortalama boyutu 9 nm olan yüzey aktif madde olarak PEG-1000'i kullanarak ince, iyi dağılan ve topaklanmayan silika nanopartikül üretmişlerdir (125). Yokoi ve arkadaşları amonyağı, elektrostatik etkileşimleri nedeniyle yavaş hidroliz katalizörü olarak kabul edilen lizine dönüştürerek küresel silika nanopartikül sentezlemişlerdir. (126,127). Bununla birlikte, sürfaktanların, değişen çözücülerin veya katalizörlerin eklenmesi çevreye zararlı olabilir ve sentezleme maliyeti artabilir. Bu nedenle, geleneksel Stöber yönteminin mühendislik süreçlerini boyut kontrollü ve dar aralıklı silika nanopartikül üretmek için optimize etmek tercih edilen bir yol olacaktır.

TEM görüntüleri, literatüre paralel olarak parçacıkların genel şeklinin küresel olduğunu ve ortalama boyutlara sahip olduklarını ortaya koymuştur (128). Manyetik nanopartiküllerin karakteristik özellikleri olan aglomere olma özellikleri tüm gruplarda gözlenmiştir (129). Ayrıca TEM fotoğrafları incelendiğinde MNP'lerin silika ile kaplandığı ve aminosilan modifikasyonlarının başarıyla gerçekleştiği görülmektedir. Manyetik nanopartiküllerin boyu genellikle 1 ila 100 nm arasında değişmektedir (130). Lalegül-Ülker ve Elçin yaptıkları çalışmada sol-gel yöntemi ile sentezledikleri MNP'lerin boyunu 10.66 nm olarak belirlemişlerdir (131). Aynı şekilde de Mendonça ve arkadaşları da S-MNP boyunu 15 ila 25 nm olarak belirlemişlerdir (128). Yaptığımız çalışmada MNP, IS-MNP, A-MNP, AIS-MNP nanopartikül boyutları sırasıyla 10.25 nm, 17.82 nm, 13.73 nm, 18.21 nm olarak belirlenmiştir. Literatürle uyumlu olan sonuçlar aynı zamanda birbirleri ile uyum göstermektedir. Aminosilan modifikasyonu tam bir kaplama olmamakla birlikte yüzey yükünün değiştirilmesi için tasarlanmıştır. Bu yüzden ki A-MNP'nin boyutu MNP boyutuna yakinken, AIS-MNP'nin boyutu IS-MNP boyutuna yakındır. Silika ile kaplamak kabuk kalınlığını arttırırken amino modifikasyonun kabuk kalınlığını önemli bir ölçüde

arttırmadığı görülmüştür. Silika kabuğunun kalınlaşması manyetik özelliklerin azalması anlamına gelmektedir (132).

Manyetik nanopartiküllerin kristal yapısının ortaya konulması için XRD analizleri yapılmıştır. XRD sonuçları tipik demir oksit piklerini taşımaktadır (133). Silika kaplı nanopartiküllerde bulunan ancak MNP'de bulunmayan $2\theta=20^\circ$ 'de gözlemlenen geniş pik silika kaplamanın başarılı olduğunun göstergesidir (134). Aminosilan modifikasyonu, APTES'in yapısında bulunan polar amino grupları nedeniyle silika kaplamanın yapısını değiştirebilmektedir. Bu yüzden amino silan modifikasyonu bulunan manyetik nanopartiküllerin XRD sonuçlarındaki silika pik şiddeti daha düşüktür (135). Aminosilan modifikasyonun ve silika kaplamanın, manyetik nanopartikülün kristal yapısını değiştirmedığı ortaya konulmuştur (136).

Manyetik nanopartiküllerin çekirdek elementlerini ve yüzey kaplamanın başarısını görmek adına yüzey elementlerinin incelenmek üzere XPS analizleri gerçekleştirilmiştir. Kaplama prosesinin bir bulgusu olarak XPS spektrometresi Fe2p₁, Fe2p₃, C 1s, O 1s, N 1s ve Si 2p orbitalleri görülmektedir. XPS sonucu, APTES modifikasyonundan sonra N ve silikanın varlığını doğrular. APTES'in bağlanması, 285.2 eV'de yüksek çözünürlüklü spektrumlarda C1s için bir C-N tepesinin varlığı ile teyit edilen bir amin fonksiyonel grubunun varlığı ile de desteklenmiştir (137). Fe2p'nin yüksek çözünürlüklü XPS spektrumu, sırasıyla 711.1 eV ve 713.2 eV'de bulunan Fe⁺² ve Fe⁺³ durumlarının Fe2p₃/ Fe2p₂ tepelerini gösterir. Bu, Fe₃O₄'ün varlığını gösterir ve literatürde bildirilen değerlerle uyumludur (138). 711.85 eV'de daha yüksek bağlanma enerjisi tarafında bir pik noktası ile Fe2p₂ ana pik noktası ayrıca demirin +2-oksidasyon durumunda olduğunu gösterir. 724.8, 727.3 ve 733.7 eV'deki spektral özellikler, spin-yörünge çiftlerinin Fe2p₁/ Fe2p₂ bileşenleridir. A-MNP numuneleri için yüksek çözünürlüklü çözülmüş O1s XPS spektrumu, manyetit yapı oksijene (O₂⁻) karşılık gelen 529.5 eV'de tipik bir oksijen zirvesi gösterir (139). Aynı şekilde 533.4 eV ve 531.7 eV'deki pikleri oksijene ilişkilendirilebilir ve SiO₂ hidroksil veya karboksil grupları (OH/CO) olarak ifade edilebilir (140). Si2p spektrumunda 102.6 eV'de SiO₂ pikinin ve 100.2 eV'de Si-C'nin varlığı MNP yüzeyinde birbirine bağlanan silan molekülleri ile ilişkilidir (36).

Nanopartiküllerin manyetik özelliklerinin belirlenmesi için VSM analizi gerçekleştirildi. Amino silan ile modifiye edilmiş grupların S-şekli, MNP'lerin yüzeyinde APTES'in varlığına atfedilirken 66 emu/g manyetizasyon (Ms) değeri ile süperparamanyetizmasını göstermiştir (136). MNP'ler 67.7 emu/g doygunluk manyetizasyon değeri gösterirken, S-MNP'ler yaklaşık 54 emu/g gibi biraz daha düşük bir değer göstermektedir. Bu sonuç, serbest MNP'lere kıyasla kaplanmış-MNP'lerin manyetik karakterinde %15'lik bir azalma olduğunu gösterir, bu da MNP'lerin kaplamasının manyetik özellik üzerinde sadece hafif bir etkiye sahip olduğunu gösterir. Bu sonuç literatür ile uyum göstermektedir (141).

Nanopartiküllerin fonksiyonel grupları FTIR ile belirlenerek doğrulandı. MNP, S-MNP, AIS-MNP silikadan Si-O'ya atfedilen 970 cm⁻¹ ve 1058 cm⁻¹'de tepe noktalarına sahip tipik bir spektrum gösterdi (142). C-H gerilme titreşimine karşılık gelen 2942 cm⁻¹'de bir eğri vermiştir. Ayrıca, NH₂ işlevselliği, 3227 cm⁻¹, 3416 cm⁻¹ ve 1634 cm⁻¹'de gözlemlenen azot titreşim eğrileri ile doğrulandı. 1200-1350 cm⁻¹'de yer alan pikler, Fe₃O₄-SiO₂'nin APTES türevlerindeki C-N titreşimlerini gösterir. Bu sonuçlar, APTES ve Fe₃O₄-SiO₂ NP'lerine başarılı bir şekilde eklendiğini göstermektedir (143).

Manyetik nanopartiküllerin yüzey yük bilgisi için zeta potansiyeli analizi gerçekleştirilmiştir. -10 ile +10mV arasındaki zeta potansiyel değerleri, nanopartiküllerin nötr olduğunu gösterirken, zeta potansiyeli +30 mV'den büyük veya -30 mV'den az olan nanopartiküller sırasıyla kuvvetli katyonik veya anyoniktir (144). Sentezlenen nanopartiküllerin bu değerlere olan yakınlığı, nanopartiküllerin kararlılığının arttığını göstermektedir. Bu tez çalışmasında manyetik nanopartiküllerin aminosilan ile modifiye edilmesinin amacı manyetik nanopartiküllere pozitif yük kazandırmaktır. Yapılan çalışmaların sonucu gösteriyor ki aminosilan modifikasyonu içeren nanopartiküllerin zeta potansiyel sonucu pozitif yüklüdür. Buda yapılan sentezin başarılı olduğunu göstermektedir.

Mahmoudi ve arkadaşlar (145), süperparamanyeti demir oksit nanopartiküllerini L929 fare fibroblastları ile etkileştirerek sitotoksiste çalışmaları yapmışlardır. Yaptıkları çalışmanın sonucunda manyetik nanopartikülleri kaplayarak sitotoksitelerinin azaltılabileceğini öne sürmüşlerdir. Yaptığımız çalışmada bu önergeye paralellik göstermektedir. Zavisova (146) ve arkadaşları nanopartikülleri sığır serum albümin, dextran, polietilen glikol ve polivinilpirolidon ile kaplayarak, manyetik nanopartiküllerin sitotoksitesini analiz etmiştir.

Fe₃O₄’ün 0 ila 500 µg/ml aralığındaki konsantrasyonlarını Çin hamsterı akciğer fibroblast hücresi V79 ve fare melanom B16 hücre hatlarını uygulamışlardır. Sitotoksiteyi etkileyen ana faktörün, manyetit çekirdek değil, biyouyumlu kabuk kaplaması olduğunu ortaya koymuşlardır. Yapılan çalışmada silika ve amino modifikasyonları manyetik nanopartiküllere eklenerek sitotoksite düşürülmüş ve kaplamada kullanılan silika ve aminosilan ile kök hücreleri ile daha uyumlu hale getirilmeye çalışılmıştır. Aynı zamanda MNP’lerin farklı 5 dozu uygulanarak uygun doz çalışması yapılmış, bu çalışmanın sonucu 5 dozunda sitotoksik etkisi olmadığı bulunmuştur.

Tezin ikinci aşamasında nanopartiküller hücrelerle etkileştirilmiş ve aynı zamanda düşük frekanslı elektromanyetik alan uygulanarak, hücreler üzerinde bir mekanatransdüksiyon oluşturarak adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla uygulama sonrası canlılık testi MTT, hücre morfolojilerinin belirlenmesi için hematoksilin&eosin, erken osteojenik farklılaşmanın belirteci olan alkalın fosfataz, farklılaşmayı ortaya çıkarmak için alizarin kırmızısı ve kalsiyum birikim analizi ve son olarak hücre nanopartikül etkileşimini ortaya koymak için TEM analizi yapılmıştır.

Manyetik nanopartiküllerin hücre ile etkileşimini gözlemlemek için TEM analizi yapılmıştır. TEM analiz sonuçları göstermektedir ki sentezlemiş olduğumuz 4 grup manyetik nanopartikül hücre ile etkileşime girerek sitoplazmasında ya da intrasellüler vakuollerde bulunmaktadır. Yapılan birçok çalışma nanopartiküllerin hücre içinde vakuollerde paklendiğini göstermiştir. Vurro ve arkadaşları yaptıkları çalışmada biyomimetik manyetik nanopartiküllerin hücre içinde vakuollerde biriktiğini tespit etmişler ve bu durumun manyetik nanopartiküllerin hücre içine alım mekanizması olan fagositoz ya da endositoz kaynaklı olabileceğini öne sürmüşlerdir (147). Yapılan bir diğer çalışmada yine manyetik nanoparçacıkların hücre içi endozomlarında bulunduklarını ortaya koymuştur (148). Yaptığımız çalışma göstermiştir ki özellikle MNP’ler intrasellüler vakuollerde konumlanmıştır. MNP’ler kaplamalı manyetik nanopartiküllerden daha çok aglomere olmaya yatkındır. Silika içeren gruplar hem vakuollerde hem sitoplazmada aglomere olmayan yapılar olarak bulunmaktadır. Kaplamanın hücre ile etkileşimde olumlu etkileri olacağı ortaya konmuştur.

Yapılan tez çalışmasında, MNP içeren kültür ortamı 20 gün boyunca, günde 3 saat süreyle 1-1.5 mT şiddetinde düşük frekanslı darbeleri manyetik alana (DFDEMA) maruz bırakıldı. Fu ve arkadaşları (149) beş gün boyunca farklı dört modül (0,6 Tesla, 10 atım/gün; 0,6 Tesla, 30 atım/gün; 1 Tesla, 10 atım/gün ve 1 Tesla, 30 atım/gün) olarak DFDEMA'yı indan kemik iliği kök hücrelerine uygulamışlardır. Uyguladıkları 4 modülden hiçbirinin sitotoksik etki neden olmadığını gösterdi ve deneylerini modüllerinden en yükseği olan 1 mT ile yürütmüşlerdir. Park ve arkadaşları (106) kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine DFEMA uygulayarak nöral farklılaşma çalışmaları yapmıştır. 1 mT şiddetinde 50-100 Hz frekanslı manyetik alan uyguladıkları hücrelerin canlılığında bir değişim tespit etmemişler ve hücrelerin nöral yönde farklılaştığını tespit etmişlerdir. Esposito ve arkadaşları (150), 1.8-3 mT şiddetinde 75 Hz frekans DFDEMA'yı indan kemik iliği kök hücrelerine günde 8 saat 14 gün boyunca uygulamış ve bunun sonucu hücre çoğalmasının hızlandığını ortaya koymuşlardır. Tsai ve arkadaşları (151), günde 2 saat 0.13 mT, 7.5 Hz frekanslı DFDEMA'yı kemik iliği mezenkimal kök hücrelere uygulamıştır. Hücre proliferasyonunun zamanla değiştiğini tespit etmiştir. Yaptığımız çalışmada literatür göz önünde bulundurarak 15 Hz'de darbe frekansı (5 ms uzunluğunda darbeler) 1,3 mT'lik bir manyetik akı yoğunluğunda DFDEMA'yı 20 gün boyunca 3 saat olmak üzere adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelere uyguladık. Hücre canlılığının literatüre uyumlu olarak ilk 10 günde arttığı ortaya konulmuştur. Uzun kültür koşulları ve nanopartikül ile beraber manyetik alanın sinerjik olarak uygulanmasından kaynaklı olarak 20.günde hücre canlılığında azalma görülmekle birlikte 10.gün ve 20.gün hücre canlılığı arasında anlamlı bir fark yoktur. Bu da nanopartiküller ve DFEMA'nın birlikte kullanılmasının sitotoksik etki yaratmadığı hatta kısa süreli kültürlerde (örneğin 10-14 gün) proliferasyonu arttırdığı düşünülmüştür.

Belirli zaman noktalarında hücre morfolojileri hematoksilin ve eosin boyamayla incelenmiştir. Manyetik alan uygulaması ve nanopartikül uygulaması ayrı ayrı ele alındığında; Wang ve arkadaşları (152), demir oksit nanopartiküllerini insan kemik iliği kök hücreleriyle etkileştirerek 72 saat sonuna hücre morfolojisinin değişime başladığını ve osteojenik yönde farklılaşmanın oluştuğunu ortaya koymuştur. Aynı şekilde (153) Luo ve arkadaşları 21 gün boyunca 1.1 mT EMA'yı insan mezenkimal kök hücrelerine uygulamış ve morfolojik olarak incelemiştir. Bu inceleme sonucu hücrelerde sitoplazma uzantılarının bulunduğu görülmektedir. Buda uzantılı kemik hücresi olan osteosit benzeri yapılar oluştuğunu göstermektedir. Yaptığımız tez çalışmasında 10.günden sonra 20.günde bariz bir

şekilde literatürle aynı şekilde sitoplazmik uzantılar görülmüştür. Bu durum aynı şekilde osteosit benzeri yapılar olarak yorumlanmıştır. Manyetik alanın ve kullandığımız 4 tip nanopartikülün de hücre morfolojisini bozmadığı, aksine sitoplazmik uzantılar oluşturarak hücre farklılaşmasına katkıda bulunduklarını söylemek mümkündür. Osteojenik vasat ve standart vasat ortamında kültürlenmiş hücrelerde anlamlı bir fark oluşmadığı (153), standart vasatta da hücrelerin osteojenik farklılaşmaya yöneldiği ortaya konmuştur.

Kalsiyum birikimi osteojenik farklılaşmanın belirteçlerinden birisidir. Kalsiyum analizi ve alizarin kırmızı boyaması hücrelerdeki kalsiyum miktarını tanımlamak için yapılmıştır. Hematoksin ve eozin ile ortak olarak osteojenik ve standart vasatlar arasında alizarin kırmızısı boyamasında bir fark görülebilmiştir. Bu yüzden daha sonraki çalışmalar sadece standart vasat üzerinden değerlendirilmiştir. Yapılan bir çalışmada alizarin kırmızısı boyama ile elde edilen histolojik veriler, EMA stimülasyonunun ilk günlerinde ekstraselüler matrikste kalsiyum birikintilerinin erken ekspresyonunu göstermiştir (150). Yaptığımız çalışmada EMA varlığındaki grupların, EMA yokluğundaki gruplara göre daha pozitif (daha kırmızı) bir görüntü vermiştir. Bu durumda EMA'nın hücrelerde kalsiyum birikimine etki ettiğini yani kemikleşmeyi söylemek mümkündür. Dong ve arkadaşları (154) silika ve amino modifikasyonlu manyetik nanopartiküllerin kalsiyum birikimini artırarak mineralizasyonu da aynı doğrultuda arttırdığını öne sürmüştür. Literatürle uyumlu olarak sonuçlarımız göstermiştir ki manyetik alan varlığı kalsiyum birikimi arttırmaktadır. Kaplamasız olan MNP, EMA varlığında kontrol grubundan daha düşük bu durum kaplamanın osteoindüktif olduğunu göstermektedir. Diğer gruplara göre silika kaplı olan gruplar (IS-MNP, AIS-MNP) manyetik alan varlığında daha yüksek kalsiyum aktivitesine sahiptir. Silika ve manyetik alan varlığında sadece 20.günde kalsiyum birikimi artmaktadır. Bu sonuçlar yapılan çalışmaları desteklemekte, manyetik alan ve kaplanan manyetik nanopartiküllerin birlikte kullanımının osteoindüktif olduğunu ortaya koymaktadır.

Alkalın fosfataz (ALP) osteojenik farklılaşmanın erken belirteçlerinden biridir. Yapılan bir çalışmada darbeli manyetik alan uygulamasının kök hücrelerin 9 ve 14. Günde mineralizasyonu artırırken, ALP aktivitesini değiştirmediğini göstermiştir. Bunun yanı sıra q-RT-PCR, 9. güne kadar, DFDEMA tedavisinin kemik morfogenetik protein 2, dönüştürücü büyüme faktörü-beta 1, osteoprotegerin, matriks metaloproteinaz-1 ve -3, osteokalsin ve kemik sialoproteininin mRNA seviyelerini arttırdığını ortaya çıkarmıştır. Fu

ve arkadaşlarının yaptığı 5 günlük bir çalışmada DFDEMA'nın alp seviyesini arttırdığı öne sürülmüştür (155). Luo ve arkadaşları (153) DFDEMA uygulamasının ilk günlerde ALP aktivitesini çoğaltırken 15.günde sabit hale geldiğini göstermişlerdir. Yaptığımız tez çalışmasında nanopartikül içermeyen grup olan kontrol grubu, elektromanyetik alan varlığında daha yüksek ALP seviyesi göstermiştir. 10.gün ve 20.gün kendi aralarında incelenecek olursa, uzun süreli kültür koşullarından ve ALP'nin literatürde yer aldığı gibi bir süre sonra stabil duruma gelmesi durumundan olayı 20.gün'de alkalın fosfataz aktivitesinin 10.güne göre azaldığı söylenebilir. Demir oksitlerin osteojenik farklılaşma üzerinde etkisini araştıran bir çalışmada, demir oksit nanopartikül içeren insan kemik iliği kök hücrelerinde ALP'nin ilk 14 gün arttığını göstermişlerdir (152,156). Yao ve arkadaşlarının (154) yaptığı çalışmada ise 7.günde silika kaplı ve amino modifikasyonu bulunan manyetik nanopartiküllerin ALP seviyesi, nanopartikül içermeyen grup olan kontrol ile aynı bulunmuştur. Bu çalışmanın tersine yaptığımız çalışmada manyetik alan içermeyen durumda nanopartikül içermeyen grupların, nanopartikül içeren gruplara göre daha az ALP aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Manyetik nanopartikül içeren gruplar kendi arasında incelendiğinde ise kalsiyum analizine benzer bir sonuç olan silika içeren nanopartiküller öne çıkmaktadır. Silika içeren nanopartikül grupları manyetik alan yokluğunda da diğer gruplara göre daha fazla ALP seviyesine sahiptir. Tüm parametreler bir arada göz önünde bulundurulursa manyetik alan, manyetik nanopartiküller olmaksızın tek başına ALP seviyesini yükseltirken, aynı şekilde manyetik nanopartiküller özellikle silika içerikliler manyetik alan yokluğunda dahi ilk 10 günde ALP seviyesini yükseltir. Aynı şekilde bakıldığında dahi iki parametrenin ALP seviyesini ilk 10 günde arttırdığı görülmüştür, manyetik alan ve manyetik nanopartiküllerin bir arada kullanımının ALP seviyesini daha çok arttırdığını söylemek mümkündür.

6.2. SONUÇ

Özetle tez çalışması kapsamında ilk olarak birbirinden farklı 7 nanopartikül grubu sentezlemiş, bu grupların fiziksel, kimyasal, manyetik, biyolojik özellikleri birbiriyle kıyaslanarak incelenmiş ve bunlardan 4 tanesinin rejeneratif tıp alanında gelecek çalışmalara katkıda bulacağı belirlenmiştir. Tezin ikinci aşamasında hücreler sentezlenen nanopartiküllerle birlikte düşük frekanslı manyetik alana maruz bırakılmıştır. Yapılan çeşitli analizler sonucu kaplanan manyetik nanopartiküllerin osteoindüktif yapıda olduğu bulunmuş, bu partiküllerle uygulanan manyetik alanın sinerjik etkisinin kök hücreleri farklılaşmaya ittiği belirlenmiştir.

Yapılan bu çalışma nanopartikül ve manyetik alanın birlikte kullanılması doku mühendisliği için yeni bir alternatif oluşturabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Reid IR. Anti-resorptive therapies for osteoporosis. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(5):473–8.
2. Brommage R. Genetic Approaches to Identifying Novel Osteoporosis Drug Targets. *J Cell Biochem.* 2015;116(10):2139–45.
3. Turgeon JL, McDonnell DP, Martin KA, Wise PM. Hormone therapy: Physiological complexity belies therapeutic simplicity. *Science* (80-). 2004;304(5675):1269–73.
4. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007;100(9):1249–60.
5. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.* 2004;95(1):9–20.
6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (80-). 1999;284(5411):143–7.
7. Ventola CL, Bharali DJ, Mousa SA. The Nanomedicine Revolution: Part 1: Emerging Concepts. Pharmacy and Therapeutics. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2010;128(9):512–25. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725810001506>
8. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 2005;26(18):3995–4021.
9. Nicolas W. Cortes-Penfield, Barbara W. Trautner RJ. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2017;176(5):139–48.
10. Mornet S, Vasseur S, Grasset F, Veverka P, Goglio G, Demourgues A, et al. Magnetic nanoparticle design for medical applications. *Prog Solid State Chem.* 2006;34(2–4):237–47.
11. Elliott DW, Zhang WX. Field assessment of nanoscale bimetallic particles for groundwater treatment. *Environ Sci Technol.* 2001;35(24):4922–6.
12. Chaudhary V, Ramanujan R V. Magnetocaloric Properties of Fe-Ni-Cr Nanoparticles for Active Cooling. *Sci Rep.* 2016;6(October):1–9.

13. Chaudhary V, Chen X, Ramanujan R V. Iron and manganese based magnetocaloric materials for near room temperature thermal management. *Prog Mater Sci* [Internet]. 2019;100(September 2018):64–98. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.09.005>
14. Datta P. Magnetic gels. In: *Polymeric Gels*. Elsevier; 2018. p. 441–65.
15. Wei Y, Han B, Hu X, Lin Y, Wang X, Deng X. Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and their magnetic properties. *Procedia Eng* [Internet]. 2012;27(2011):632–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2011.12.498>
16. Sun J, Liu X, Huang J, Song L, Chen Z, Liu H, et al. Magnetic assembly-mediated enhancement of differentiation of mouse bone marrow cells cultured on magnetic colloidal assemblies. *Sci Rep*. 2014;4:1–8.
17. Lalegül-Ülker Ö, Vurat MT, Elçin AE, Elçin YM. Magnetic silk fibroin composite nanofibers for biomedical applications: Fabrication and evaluation of the chemical, thermal, mechanical, and in vitro biological properties. *J Appl Polym Sci*. 2019;136(41):1–11.
18. Singh RK, Patel KD, Lee JH, Lee EJ, Kim JH, Kim TH, et al. Potential of magnetic nanofiber scaffolds with mechanical and biological properties applicable for bone regeneration. *PLoS One*. 2014;9(4).
19. Li Y, Ye D, Li M, Ma M, Gu N. Adaptive Materials Based on Iron Oxide Nanoparticles for Bone Regeneration. *Chemphyschem*. 2018;19(16):1965–79.
20. Zia K, Siddiqui T, Ali S, Farooq I, Zafar MS, Khurshid Z. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Medical and Dental Applications: A Comprehensive Review. *Eur J Dent*. 2019;13(1):124–8.
21. Vandendriessche S, Brulot W, Slavov D, Valev V, Verbiest T. Magneto-optical harmonic susceptometry of superparamagnetic materials. *Appl Phys Lett*. 2013;102:161903.
22. Shen L, Laibinis PE, Hatton TA. Bilayer Surfactant Stabilized Magnetic Fluids: Synthesis and Interactions at Interfaces. *Langmuir* [Internet]. 1999 Jan 1;15(2):447–53. Available from: <https://doi.org/10.1021/la9807661>

23. Jordan A, Scholz R, Wust P, Fähling H, Felix R. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. 1999;201(1–3):413–9.
24. Cao J, Wang Y, Yu J, Xia J, Zhang C, Yin D, et al. Preparation and radiolabeling of surface-modified magnetic nanoparticles with rhenium-188 for magnetic targeted radiotherapy. *J Magn Magn Mater*. 2004;277(1–2):165–74.
25. Jordan A, Scholz R, Wust P, Schirra H, Thomas Schiestel, Schmidt H, et al. Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells in vitro. *J Magn Magn Mater*. 1999;194(1):185–96.
26. Li Q, Xuan Y, Wang J. Experimental investigations on transport properties of magnetic fluids. *Exp Therm Fluid Sci*. 2005;30(2):109–16.
27. Sun SN, Wei C, Zhu ZZ, Hou YL, Venkatraman SS, Xu ZC. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chinese Phys B*. 2014;23(3).
28. Fortin J-P, Wilhelm C, Servais J, Ménager C, Bacri J-C, Gazeau F. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2007 Mar 1;129(9):2628–35. Available from: <https://doi.org/10.1021/ja067457e>
29. Siddiqui MH, Al-Whaibi MH, Sakran AM, Ali HM, Basalah MO, Faisal M, et al. Calcium-Induced Amelioration of Boron Toxicity in Radish. *J Plant Growth Regul* [Internet]. 2013;32(1):61–71. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9276-6>
30. Khodakovskaya M V, de Silva K, Nedosekin DA, Dervishi E, Biris AS, Shashkov E V, et al. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2011;108(3):1028–33. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1008856108>
31. Estelrich J, Escribano E, Queralt J, Busquets MA. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):8070–101.

32. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2013;11(6):371–84. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>
33. Srivastava N. Iron Nanoparticles Induced Toxicity in *Sesbania cannabina*: A Morphological Aspect. *Adv Sci Focus* [Internet]. 2014 Jun 1;2(2):135–9. Available from: <http://www.ingentaconnect.com/content/10.1166/asfo.2014.1088>
34. Malvindi MA, Brunetti V, Vecchio G, Galeone A, Cingolani R, Pompa PP. SiO₂ nanoparticles biocompatibility and their potential for gene delivery and silencing. *Nanoscale*. 2012;4(2):486–95.
35. Bardi G, Malvindi MA, Gherardini L, Costa M, Pompa PP, Cingolani R, et al. The biocompatibility of amino functionalized CdSe/ZnS quantum-dot-Doped SiO₂ nanoparticles with primary neural cells and their gene carrying performance. *Biomaterials* [Internet]. 2010;31(25):6555–66. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296121000579X>
36. Quanguo H, Lei Z, Wei W, Rong H, Jingke H. Preparation and magnetic comparison of silane-functionalized magnetite nanoparticles. *Sensors Mater*. 2010;22(6):285–95.
37. Oberdörster G, Stone V, Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology* [Internet]. 2007;1(1):2–25. Available from: <https://doi.org/10.1080/17435390701314761>
38. Napierska D, Thomassen LCJ, Lison D, Martens JA, Hoet PH. The nanosilica hazard: Another variable entity. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7:1–32.
39. Fadeel B, Garcia-Bennett AE. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2010;62(3):362–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X09003469>
40. Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2003;34(12):1507–16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584903001497>
41. Horie M, Nishio K, Fujita K, Endoh S, Miyauchi A, Saito Y, et al. Protein adsorption

- of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. *Chem Res Toxicol*. 2009;22(3):543–53.
42. Shang W, Nuffer JH, Muñiz-Papandrea VA, Colón W, Siegel RW, Dordick JS. Cytochrome c on Silica Nanoparticles: Influence of Nanoparticle Size on Protein Structure, Stability, and Activity. *Small* [Internet]. 2009;5(4):470–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/sml.200800995>
 43. Díaz B, Sánchez-Espinel C, Arruebo M, Faro J, de Miguel E, Magadán S, et al. Assessing Methods for Blood Cell Cytotoxic Responses to Inorganic Nanoparticles and Nanoparticle Aggregates. *Small* [Internet]. 2008;4(11):2025–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/sml.200800199>
 44. Malvindi MA, Brunetti V, Vecchio G, Galeone A, Cingolani R, Pompa P. SiO₂ nanoparticles biocompatibility and their potential for gene delivery and silencing. *Nanoscale*. 2011;4:486–95.
 45. Sayes CM, Warheit DB. Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* [Internet]. 2009;1(6):660–70. Available from: <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wnan.58>
 46. Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2009;234(2):222–35. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X08004213>
 47. Lu AH, Salabas EL, Schüth F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chemie - Int Ed*. 2007;46(8):1222–44.
 48. Elässari A, Bourrel V. Thermosensitive magnetic latex particles for controlling protein adsorption and desorption. *J Magn Magn Mater*. 2001;225(1–2):151–5.
 49. Xiao Y, Du J. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *J Mater Chem B*. 2020;8(3):354–67.
 50. Maret RH. United States Patent (19). 1975;(19).
 51. Yamaura M, Camilo RL, Sampaio LC, Macêdo MA, Nakamura M, Toma HE. Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite

- nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. 2004;279(2–3):210–7.
52. Fugger L, Jensen LT, Rossjohn J. Challenges, Progress, and Prospects of Developing Therapies to Treat Autoimmune Diseases. *Cell* [Internet]. 2020;181(1):63–80. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420302695>
 53. Syme R, Bewick M, Stewart D, Porter K, Chadderton T, Glu S. The Role of Depletion of Dimethyl Sulfoxide before Autografting : On Hematologic Recovery , Side Effects ,. 2004;141:135–41.
 54. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16(3):381–90.
 55. Abbaszadeh H, Ghorbani F, Derakhshani M, Movassaghpour A, Yousefi M. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: A novel therapeutic paradigm. *J Cell Physiol* [Internet]. 2020;235(2):706–17. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.29004>
 56. Zeng G, Wang G, Guan F, Chang K, Jiao H, Gao W, et al. Human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: The effect on neuron-like differentiation in vitro. *Mol Cell Biochem*. 2011;357(1–2):331–41.
 57. Horwitz EM, Blanc K Le, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2005;7(5):393–5. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14653240500319234>
 58. Dewindt TS, Vonk LA, Saris DBF. Response to: Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(8):1747–8.
 59. Lee B-C, Kim H-S, Shin T-H, Kang I, Lee JY, Kim J-J, et al. PGE2 maintains self-renewal of human adult stem cells via EP2-mediated autocrine signaling and its production is regulated by cell-to-cell contact. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(1):26298. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep26298>
 60. Margiana R, Markov A, Zekiy AO, Hamza MU, Al-Dabbagh KA, Al-Zubaidi SH, et al. Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a

- narrative review. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2022;13(1):366. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03054-0>
61. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2019;10(1):68. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
 62. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* [Internet]. 2002;418(6893):41–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature00870>
 63. Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant* [Internet]. 2011;20(1):5–14. Available from: <https://doi.org/10.3727/096368910X>
 64. Pan L, Liu C, Liu Q, Li Y, Du C, Kang X, et al. Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells alleviate concanavalin A-induced fulminant hepatitis by repressing NF-κB signaling and glycolysis. *Stem cell Res & Ther* [Internet]. 2021 Sep;12(1):496. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC8427901>
 65. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Critical reviews in oral biology & medicine: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in Regenerative Medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792–806.
 66. Ghorbani F, Movassaghpour AA, Talebi M, Yousefi M, Abbaszadeh H. Renoprotective effects of extracellular vesicles: A systematic review. *Gene Reports* [Internet]. 2022;26:101491. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452014421004751>
 67. Tang Y, Zhou Y, Li HJ. Advances in mesenchymal stem cell exosomes: a review. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):1–12.
 68. Wu Y, Hoogduijn MJ, Baan CC, Korevaar SS, Kuiper R De, Yan L, et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have a Heterogenic Cytokine Secretion Profile. *Stem Cells Int*. 2017;2017.
 69. Maqbool M, Algraittee SJR, Boroojerdi MH, Sarmadi VH, John CM, Vidyadaran S, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit the differentiation and effector functions of monocytes. *Innate Immun*. 2019;26(5):424–34.

70. Marinescu C-I, Preda MB, Burlacu A. A procedure for in vitro evaluation of the immunosuppressive effect of mouse mesenchymal stem cells on activated T cell proliferation. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2021;12(1):319. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02344-3>
71. Steens J, Klein D. Current strategies to generate human mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells Int*. 2018;2018:24–9.
72. Hmadcha A, Martin-Montalvo A, Gauthier BR, Soria B, Capilla-Gonzalez V. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8(February):1–13.
73. Aravindhan S, Ejam SS, Lafta MH, Markov A, Yumashev AV, Ahmadi M. Mesenchymal stem cells and cancer therapy: insights into targeting the tumour vasculature. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2021;21(1):158. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01836-9>
74. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2003 Aug 1;3(5):705–13. Available from: <https://doi.org/10.1517/14712598.3.5.705>
75. Cowan CM, Shi Y-Y, Aalami OO, Chou Y-F, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2004;22(5):560–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt958>
76. Oryan A, Alidadi S. Reconstruction of radial bone defect in rat by calcium silicate biomaterials. *Life Sci* [Internet]. 2018;201:45–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320518301620>
77. Qaseem, A., Forciea, M. A., McLean, R. M., Denberg TD. Treatment of Low Bone Density or Osteoporosis to Prevent Fractures in Men and Women: A Clinical Practice Guideline Update From the American College of Physicians. *Ann Intern Med* [Internet]. 2017;166(11):818–39. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/abs/10.7326/M15-1361>
78. Raghoobar GM, Liem RSB, Bos RRM, Van Der Wal JE, Vissink A. Resorbable screws for fixation of autologous bone grafts. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2006;17(3):288–93. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0501.2005.01200.x>

79. Felice P, Pistilli R, Lizio G, Pellegrino G, Nisii A, Marchetti C. Inlay versus Onlay Iliac Bone Grafting in Atrophic Posterior Mandible: A Prospective Controlled Clinical Trial for the Comparison of Two Techniques. *Clin Implant Dent Relat Res* [Internet]. 2009;11(s1):e69–82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1708-8208.2009.00212.x>
80. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363–408.
81. Fu J, Wang Y, Jiang Y, Du J, Xu J, Liu Y. Systemic therapy of MSCs in bone regeneration: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2021;12(1):377. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02456-w>
82. Gjerde C, Mustafa K, Hellem S, Rojewski M, Gjengedal H, Yassin MA, et al. Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2018;9(1):213. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0951-9>
83. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*. 2006;126(4):677–89.
84. Chen C, Xiao S. Induced pluripotent stem cells and neurodegenerative diseases. 2011;27(2):107–14.
85. Deng J, Yu D, Gao C. Biological identity of nanomaterials: Opportunities and challenges. *Sci China Chem*. 2013;56(11):1533–41.
86. Kaur G, Valarmathi MT, Potts JD, Wang Q. The promotion of osteoblastic differentiation of rat bone marrow stromal cells by a polyvalent plant mosaic virus. *Biomaterials*. 2008;29(30):4074–81.
87. Wang W, Li B, Yang J, Xin L, Li Y, Yin H, et al. The restoration of full-thickness cartilage defects with BMSCs and TGF-beta 1 loaded PLGA/fibrin gel constructs. *Biomaterials*. 2010;31(34):8964–73.
88. Ciofani G, Ricotti L, Canale C, D'Alessandro D, Berrettini S, Mazzolai B, et al. Effects of barium titanate nanoparticles on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2013;102:312–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.001>

89. Huang Y, Zhou G, Zheng L, Liu H, Niu X, Fan Y. Micro-/Nano- sized hydroxyapatite directs differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells towards an osteoblast lineage. *Nanoscale*. 2012;4(7):2484–90.
90. Wei M, Li S, Yang Z, Zheng W, Le W. Gold nanoparticles enhance the differentiation of embryonic stem cells into dopaminergic neurons via mTOR/p70S6K pathway. *Nanomedicine*. 2017;12(11):1305–17.
91. Mieszawska AJ, Fourligas N, Georgakoudi I, Ouhib NM, Belton DJ, Perry CC, et al. Biomaterials Osteoinductive silk e silica composite biomaterials for bone regeneration. *Biomaterials* [Internet]. 2010;31(34):8902–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.109>
92. Xu C, Wang S, Liu L, Yu S, Wu X, Dai H. Manipulating mesenchymal stem cells differentiation under sinusoidal electromagnetic fields using intracellular superparamagnetic nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol*. 2019;15(2):301–10.
93. Marycz K, Kornicka-garbowska MAK, Polnar J, Rafa AL, Wiglusz J, Roecken M, et al. Promotion through external magnetic field of osteogenic differentiation potential in adipose-derived mesenchymal stem cells : Design of polyurethane / poly (lactic) acid sponges doped with iron oxide nanoparticles. 2019;(January):1–14.
94. Xia Y, Sun J, Zhang F, Gu N, Xu HHK. Novel Magnetic Cell-Scaffold Construct with and without Magnetic Field Enhanced Osteogenesis of Stem Cells and Formation of new bone. 2019 IEEE MTT-S Int Microw Biomed Conf. 2019;1:1–4.
95. Suryani L, Too JH, Hassanbhai AM, Wen F, Lin DJ, Yu N, et al. Effects of electromagnetic field on proliferation, differentiation, and mineralization of MC3T3 Cells. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2019;25(2):114–25.
96. Ross CL, Pettenati MJ, Procita J, Cathey L, George SK, Almeida-Porada G. Evaluation of Cytotoxic and Genotoxic Effects of Extremely Low-frequency Electromagnetic Field on Mesenchymal Stromal Cells. *Glob Adv Heal Med*. 2018;7:216495611877747.
97. Tu C, Xiao Y, Ma Y, Wu H, Song M. The legacy effects of electromagnetic fields on bone marrow mesenchymal stem cell self-renewal and multiple differentiation potential. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):1–11.

98. Tocco I, Gardin C, Piattelli A, Zavan B, Menarin M, Ferroni L, et al. Pulsed magnetic therapy increases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells only if they are pre-committed. *Life Sci* [Internet]. 2016;152:44–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.020>
99. Hsu SH, Chang JC. The static magnetic field accelerates the osteogenic differentiation and mineralization of dental pulp cells. *Cytotechnology*. 2010;62(2):143–55.
100. Sun L-Y, Hsieh D-K, Yu T-C, Chiu H-T, Lu S-F, Luo G-H, et al. Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics* [Internet]. 2009;30(4):251–60. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bem.20472>
101. Sun W, Tan Q, Pan Y, Fu Y, Sun H, Chiang H. Effects of 50-Hz magnetic field exposure on hormone secretion and apoptosis-related gene expression in human first trimester villous trophoblasts in vitro. *Bioelectromagnetics* [Internet]. 2010;31(7):566–72. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bem.20596>
102. Kang KS, Hong JM, Kang JA, Rhie J-W, Jeong YH, Cho D-W. Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions. *Exp Mol Med* [Internet]. 2013;45(1):e6–e6. Available from: <https://doi.org/10.1038/emm.2013.11>
103. Gaetani R, Ledda M, Barile L, Chimenti I, De Carlo F, Forte E, et al. Differentiation of human adult cardiac stem cells exposed to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2009 Jun 1;82(3):411–20. Available from: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp067>
104. Mayer-Wagner S, Passberger A, Sievers B, Aigner J, Summer B, Schiergens TS, et al. Effects of low frequency electromagnetic fields on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics* [Internet]. 2011;32(4):283–90. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bem.20633>
105. Schwartz Z, Fisher M, Lohmann CH, Simon BJ, Boyan BD. Osteoprotegerin (OPG) Production by Cells in the Osteoblast Lineage is Regulated by Pulsed Electromagnetic

- Fields in Cultures Grown on Calcium Phosphate Substrates. *Ann Biomed Eng* [Internet]. 2009;37(3):437–44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10439-008-9628-3>
106. Park J-E, Seo Y-K, Yoon H-H, Kim C-W, Park J-K, Jeon S. Electromagnetic fields induce neural differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells via ROS mediated EGFR activation. *Neurochem Int* [Internet]. 2013;62(4):418–24. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018613000417>
 107. Maziarz A, Kocan B, Bester M, Budzik S, Cholewa M, Ochiya T, et al. How electromagnetic fields can influence adult stem cells: positive and negative impacts. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2016;7(1):54. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0312-5>
 108. Bassett CA. Low energy pulsing electromagnetic fields modify biomedical processes. *Bioessays*. 1987 Jan;6(1):36–42.
 109. Biological effects of electric and magnetic fields [electronic resource] . Volume 1, sources and mechanisms / edited by David O. Carpenter, Sinerik Ayrapetyan. Biological effects of electric and magnetic fields Volume 1, sources and mechanisms. *San Diego: Academic Press*; 1994. (Biological effects of electric and magnetic fields ; v. 1).
 110. Pilla AA. Low-intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent? *J Orthop Sci Off J Japanese Orthop Assoc*. 2002;7(3):420–8.
 111. Funk RHW, Monsees TK. Effects of electromagnetic fields on cells: physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction. A review. *Cells Tissues Organs*. 2006;182(2):59–78.
 112. Ganesan K, Gengadharan AC, Balachandran C, Manohar BM, Puvanakrishnan R. Low frequency pulsed electromagnetic field-A viable alternative therapy for arthritis. *Indian J Exp Biol*. 2009;47(12):939–48.
 113. Walieczek J. Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling 1 . *FASEB J*. 1992;6(13):3177–85.

114. Zhang Y, Yan J, Xu H, Yang Y, Li W, Wu H, et al. Extremely low frequency electromagnetic fields promote mesenchymal stem cell migration by increasing intracellular Ca²⁺ and activating the FAK/Rho GTPases signaling pathways in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):1–10.
115. Abdulwahab KO, Malik MA, O'Brien P, Timco GA, Tuna F, Muryn CA, et al. A One-Pot Synthesis of Monodispersed Iron Cobalt Oxide and Iron Manganese Oxide Nanoparticles from Bimetallic Pivalate Clusters. *Chem Mater* [Internet]. 2014 Jan 28;26(2):999–1013. Available from: <https://doi.org/10.1021/cm403047v>
116. Park J, Lee E, Hwang N-M, Kang M, Kim SC, Hwang Y, et al. One-Nanometer-Scale Size-Controlled Synthesis of Monodisperse Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 2005;44(19):2872–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.200461665>
117. Peng S, Sun S. Peng, S. & Sun, S. Synthesis and characterization of monodisperse hollow Fe₃O₄ nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Edn* 46, 4155–4158. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2007;46:4155–8.
118. Nicolás P, Saleta M, Troiani H, Zysler R, Lassalle V, Ferreira ML. Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: Experimental and mechanistic issues. *Acta Biomater* [Internet]. 2013;9(1):4754–62. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706112004771>
119. Kovalenko M V, Bodnarchuk MI, Lechner RT, Hesser G, Schäffler F, Heiss W. Fatty Acid Salts as Stabilizers in Size- and Shape-Controlled Nanocrystal Synthesis: The Case of Inverse Spinel Iron Oxide. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2007 May 1;129(20):6352–3. Available from: <https://doi.org/10.1021/ja0692478>
120. Faiyas APA, Vinod EM, Joseph J, Ganesan R, Pandey RK. Dependence of pH and surfactant effect in the synthesis of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and its properties. *J Magn Magn Mater* [Internet]. 2010;322(4):400–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304885309009767>
121. Bogush GH, Tracy MA, Zukoski CF. Preparation of monodisperse silica particles: Control of size and mass fraction. *J Non Cryst Solids* [Internet]. 1988;104(1):95–106. Available from:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022309388901871>
122. van Blaaderen A, Kentgens APM. Particle morphology and chemical microstructure of colloidal silica spheres made from alkoxysilanes. *J Non Cryst Solids* [Internet]. 1992;149(3):161–78. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002230939290064Q>
 123. Bazula PA, Arnal PM, Galeano C, Zibrowius B, Schmidt W, Schüth F. Highly microporous monodisperse silica spheres synthesized by the Stöber process. *Microporous Mesoporous Mater* [Internet]. 2014;200:317–25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138718111400417X>
 124. Van Helden AK, Jansen JW, Vrij A. Preparation and characterization of spherical monodisperse silica dispersions in nonaqueous solvents. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 1981;81(2):354–68. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021979781904173>
 125. Guo Q, Huang D, Kou X, Cao W, Li L, Ge L, et al. Synthesis of disperse amorphous SiO₂ nanoparticles via sol–gel process. *Ceram Int* [Internet]. 2017;43(1, Part A):192–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884216316649>
 126. Yokoi T, Sakamoto Y, Terasaki O, Kubota Y, Okubo T, Tatsumi T. Periodic Arrangement of Silica Nanospheres Assisted by Amino Acids. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2006 Oct 1;128(42):13664–5. Available from: <https://doi.org/10.1021/ja065071y>
 127. Davis TM, Snyder MA, Krohn JE, Tsapatsis M. Nanoparticles in Lysine–Silica Sols. *Chem Mater* [Internet]. 2006 Dec 1;18(25):5814–6. Available from: <https://doi.org/10.1021/cm061982v>
 128. de Mendonça ESDT, de Faria ACB, Dias SCL, Aragón FFH, Mantilla JC, Coaquira JAH, et al. Effects of silica coating on the magnetic properties of magnetite nanoparticles. *Surfaces and Interfaces* [Internet]. 2019;14:34–43. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468023018303407>
 129. Ding HL, Zhang YX, Wang S, Xu JM, Xu SC, Li GH. Fe₃O₄@SiO₂ Core/Shell Nanoparticles: The Silica Coating Regulations with a Single Core for Different Core

- Sizes and Shell Thicknesses. *Chem Mater* [Internet]. 2012 Dec 11;24(23):4572–80. Available from: <https://doi.org/10.1021/cm302828d>
130. Tadic M, Kralj S, Jagodic M, Hanzel D, Makovec D. Magnetic properties of novel superparamagnetic iron oxide nanoclusters and their peculiarity under annealing treatment. *Appl Surf Sci* [Internet]. 2014;322:255–64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433214021813>
 131. Lalegül-Ülker Ö, Elçin YM. Magnetic and electrically conductive silica-coated iron oxide/polyaniline nanocomposites for biomedical applications. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2021;119:111600. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493120335189>
 132. Husain H, Hariyanto B, Sulthonul M, Klysubun W, Darminto D, Pratapa S. Structure and magnetic properties of silica-coated magnetite-nanoparticle composites. *Mater Res Express* [Internet]. 2019 Jun;6(8):86117. Available from: <https://dx.doi.org/10.1088/2053-1591/ab29af>
 133. Kayani ZN, Arshad S, Riaz S, Naseem S. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles by Sol-Gel Technique and Their Characterization. *IEEE Trans Magn*. 2014;50(8).
 134. Liu C, Li Y, Duan Q. Preparation of magnetic and thermal dual-responsive zinc-tetracarboxyl-phthalocyanine-g-Fe₃O₄@SiO₂@TiO₂-g-poly(N-isopropyl acrylamide) core-shell green photocatalyst. *Appl Surf Sci*. 2019;503:144111.
 135. Mokkarat A, Kruanetr S, Sakee U. One-step continuous flow synthesis of aminopropyl silica-coated magnetite nanoparticles. *J Saudi Chem Soc* [Internet]. 2022;26(4):101506. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610322000886>
 136. Bassam Saif, Congli Wang, Dong Chuan SS. Synthesis and characterization of Fe₃O₄@ZnS and Fe₃O₄@Au@ZnS core-shell nanoparticles. *Appl Surf Sci*. 2015;6(October):267–75.
 137. Park HJ, McConnell JT, Boddohi S, Kipper MJ, Johnson PA. Synthesis and characterization of enzyme–magnetic nanoparticle complexes: effect of size on activity and recovery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2011;83(2):198–203. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777651000620X>

138. Karade VC, Sharma A, Dhavale RP, Dhavale RP, Shingte SR, Patil PS, et al. APTES monolayer coverage on self-assembled magnetic nanospheres for controlled release of anticancer drug Nintedanib. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):5674. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84770-0>
139. Biesinger MC, Payne BP, Grosvenor AP, Lau LWM, Gerson AR, Smart RSC. Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni. *Appl Surf Sci* [Internet]. 2011;257(7):2717–30. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433210014170>
140. Lesiak B, Rangam N, Jiricek P, Gordeev I, Tóth J, Kövér L, et al. Surface Study of Fe₃O₄ Nanoparticles Functionalized With Biocompatible Adsorbed Molecules. *Front Chem*. 2019;7(October).
141. Abdelaziz MM, Hefnawy A, Anter A, Abdellatif MM, Khalil MAF, Khalil IA. Silica-Coated Magnetic Nanoparticles for Vancomycin Conjugation. *ACS Omega* [Internet]. 2022 Aug 30;7(34):30161–70. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03226>
142. Pham X-H, Hahm E, Kim H-M, Son BS, Jo A, An J, et al. Silica-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Grafted onto Graphene Oxide for Protein Isolation. *Nanomaterials* [Internet]. 2020;10(1). Available from: <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/1/117>
143. Tariq A, Aamir M, Farhat Mehmood R, Akhtar J, Sher M. Nanostructured Fe₃O₄@SiO₂ shell-coated APTES/AEAPS as an efficient and recyclable catalyst for selective N-alkylation of amines using alcohol. *Mater Today Proc* [Internet]. 2022;53:361–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785322004394>
144. Clogston JD, Patri AK. Zeta Potential Measurement. In: McNeil SE, editor. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 63–70. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6

145. Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Shokrgozar MA, Milani AS, Häfeli UO, et al. A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2010;75(1):300–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776509004044>
146. Zavisova V, Koneracka M, Kovac J, Kubovcikova M, Antal I, Kopcansky P, et al. The cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different modifications evaluated in vitro. *J Magn Magn Mater* [Internet]. 2015;380:85–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304885314009524>
147. Vurro F, Jabalera Y, Mannucci S, Glorani G, Sola-Leyva A, Gerosa M, et al. Improving the cellular uptake of biomimetic magnetic nanoparticles. *Nanomaterials*. 2021;11(3):1–16.
148. Yang Y, Wang Q, Song L, Liu X, Zhao P, Zhang F, et al. Uptake of magnetic nanoparticles for adipose-derived stem cells with multiple passage numbers. *Sci China Mater*. 2017;60(9):892–902.
149. Fu Y-C, Lin C-C, Chang J-K, Chen C-H, Tai I-C, Wang G-J, et al. A Novel Single Pulsed Electromagnetic Field Stimulates Osteogenesis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Bone Repair. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(3):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091581>
150. Esposito M, Lucariello A, Riccio I, Riccio V, Esposito V, Riccardi G. Differentiation of human osteoprogenitor cells increases after treatment with pulsed electromagnetic fields. *In Vivo (Brooklyn)*. 2012;26(2):299–304.
151. Tsai M-T, Li W-J, Tuan RS, Chang WH. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation. *J Orthop Res* [Internet]. 2009;27(9):1169–74. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jor.20862>
152. Wang Q, Chen B, Cao M, Sun J, Wu H, Zhao P, et al. Response of MAPK pathway to iron oxide nanoparticles in vitro treatment promotes osteogenic differentiation of hBMSCs. *Biomaterials* [Internet]. 2016;86:11–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961216001010>

153. Luo F, Hou T, Zhang Z, Xie Z, Wu X, Xu J. Effects of pulsed electromagnetic field frequencies on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Orthopedics*. 2012;35(4):526–31.
154. Yao D, Liu N, Mo B. Assessment of proliferation, migration and differentiation potentials of bone marrow mesenchymal stem cells labeling with silica-coated and amine-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Cytotechnology* [Internet]. 2020;72(4):513–25. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00397-5>
155. Zheng W, Shen J, Wang H, Yin Y, Wang P, Jin P, et al. Effects of Frozen Stromal Vascular Fraction on the Survival of Cryopreserved Fat Tissue. *Aesthetic Plast Surg* [Internet]. 2019;43(3):826–35. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00266-019-01314-8>
156. Wang Q, Chen B, Ma F, Lin S, Cao M, Li Y, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles accelerate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via modulation of long noncoding RNA INZEB2. *Nano Res*. 2017;10(2):626–42.

EKLER

EK 1: Kullanılan Makine-Teçhizat Listesi

Kullanılan Makine – Teçhizat Listesi	
Adı/Modeli	Kullanım Amacı
Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM) Cihaz: Cryogenic Limited PPMS https://merlab.metu.edu.tr/tr/elektrik-ve-manyetik-ozellikler-olcum-sistemi	Sentezlenen MNP'lerin manyetik özelliklerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında (https://merlab.metu.edu.tr/tr) yapılmıştır.
Zeta Potansiyel Ölçümü Cihaz: MALVERN Nano ZS90 (Teknik özellikler için bkz: https://merlab.metu.edu.tr/tr/zeta-potansiyel-ve-mobilite-olcum-cihazı)	Sentezlenen MNP'lerin partikül boyutu, yüzey yükü, partikül dağılımı ve fiziksel stabilitelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilecektir. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında (https://merlab.metu.edu.tr/tr) yapılmıştır.
X-Işını Fotoelektron Spektrometresi (XPS) Cihaz: PHI 5000 VersaProbe (Teknik özellikler için bkz: https://merlab.metu.edu.tr/tr/x-isini-fotoelektron-spektrometresi-phi)	Farklı yüzey özelliklerine sahip manyetik nanopartiküllerin yüzeyleri hakkında kimyasal bilgi elde etmek ve bu nanopartikülleri karşılaştırmak amacıyla XPS analizi gerçekleştirilecektir. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında (https://merlab.metu.edu.tr/tr) yapılmıştır.
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Cihaz: Bruker IFS 66/S, FRA 106/S, HYPERION 1000, RAMANSKOPE II (Teknik özellikler için bkz: https://merlab.metu.edu.tr/tr/fourier-donusumlu-kizil-otesi-spektrometresi)	Sentezlenen MNP'lerin yapısındaki fonksiyonel gruplar arasındaki benzerlik ve farklılıkların belirlenmesi ve kaplama veriminin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilecektir. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında (https://merlab.metu.edu.tr/tr) yapılmıştır.
X-Işınımı Kırınımı (XRD) Cihaz: Rigaku MiniFlex Masaüstü X-Işını Kırınım Cihazı (Teknik özellikler için bkz: https://merlab.metu.edu.tr/tr/x-isini-difraktometresi)	Sentezlenen MNP'lerin kristal yapı ve bileşim bakımından incelenmesi için gerçekleştirilecektir. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında (https://merlab.metu.edu.tr/tr) yapılmıştır.
Transmisyon elektron mikroskop analizi (TEM) (100-120kV elektron eğitiminde)	Sentezlenen MNP'lerin kaplama formu, parçacık boyutu, şekil vb. morfolojik özelliklerin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilecektir. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik

yüksek kontrastlı Te G2 Spirit Biotwin modeli, Fisher Scientific, Waltham, MA)

(Teknik özellikler için bkz: <https://merlab.metu.edu.tr/tr/yuksek-cozunurluklu-transmisyon-elektron-mikroskobu-rtem>)

Üniversitesi, Merkez
(<https://merlab.metu.edu.tr/tr>) yapılmıştır.

Laboratuvarında



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Burcu BAYRAMLI ÖNER

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoloji Anabilim Dalı

Yayınlar

BAYRAMLI-ÖNER, B., GUL, N. Histochemical effects of brodifacoum on rat spleen. *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology*, 31(2), 148-164.

Uluslararası Kongrelerde Sözlü Bildiri

Bayramlı-Öner, B., Lalegül-Ülker, Ö., Elçin, A.E. ve Elçin, Y.M., Synergic Effect of Electromagnetic Field and Coated Magnetic Nanoparticles on Adipose-Derived Stem Cell, 26th International Biomedical Science and Technology Symposium, 25-27 Kasım 2022, Ankara, Türkiye, *Sözlü sunum*

Bayramli, B., Gül, N., Eskizengin, H., Yiğit, N., Saygili-Yigit, F., Histochemical Effects Of Brodifacoum On Rat Spleen, 11th European Vertebrate Pest Management Conference, 25-29 Eylül 2017, Varşova, Polanya, *Sözlü sunum*

Proje Deneyimleri

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), ‘Üç-Boyutlu Biyobasım ile Canlı Perio/Osteo Mikroakışkan Doku Çip Sisteminin Geliştirilmesi ve Model İlaç Etkileşiminin İncelenmesi’, (2017-2019), Bursiyer



TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR



Recent Developments in
Biomedical Science and Technology

BIOMED 2022 PROCEEDINGS BOOK

The Proceedings of the 26th International
Biomedical Science and Technology Symposium

Editor

Y. Murat Elçin



Biomaterials and Tissue Engineering Society Publications: 01

Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Derneği Yayınları: 01

Ankara, Türkiye

Synergistic Effect of Electromagnetic Field and Coated Magnetic Nanoparticles on Adipose Stem Cells

Burcu Bayramli-Öner^{1,2}, Özge Lalegül-Ülker¹, A. Eser Elçin¹, Y. Murat Elcin^{1,3}

¹ Tissue Engineering, Biomaterials and Nanobiotechnology Laboratory, Ankara University Faculty of Science, and Stem Cell Institute, Ankara, Türkiye

² Institute of Biotechnology, Ankara University, Ankara, Türkiye

³ Biovalda Health Technologies, Inc., Ankara, Türkiye

(<https://orcid.org/0000-0002-7959-5179>)

Abstract

Every year, an average of one and a half billion people around the world develop disorders related to bone tissue. Treatment of bone injuries that are so common in the society has gained great importance today. Efforts to accelerate bone regeneration through surgical, biological and physical approaches are ongoing. Among the existing approaches, while the surgical approach has the risk of creating complications such as immunogenic response and donor site morbidity, traditional pharmacological agents used in biological approaches may cause various side effects. The stem cell differentiation potential is utilized in stem cell therapy, which is an alternative to these methods. However, there are reservations about the efficiency of treatment of stem cell therapy alone in the treatment of bone regeneration. For this reason, it is important to develop additional effective methods to treat bone injuries. Due to its advantages such as low cost and not causing pain, physical strategies have a high potential to be used in bone regeneration. When the advantages and disadvantages of current approaches are evaluated together, it is thought that efficiency will increase in providing bone regeneration by using more than one approach together. The potential of using the electromagnetic field (EMF) as a physical stimulus to increase bone tissue regeneration in the field of regenerative medicine is high. However, studies showing that magnetic nanoparticles (MNP) sensitive to EMF stimulation support osteogenic differentiation of the bone marrow cells are also available in the literature. The aim of this study is to investigate the effect of magnetic and mechanical stimulation of adipose-derived mesenchymal stem cells via surface-coated MNPs by applying low-frequency EMA on the cells. In this study, magnetic nanoparticles coated with bioactive silica component were synthesized and interacted with mesenchymal stem cells of adipose origin and the differentiation potential of stem cells under low-frequency magnetic field was investigated. Within the scope of the study, the synergistic effect of EMA and silica-coated MNPs on the osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells was investigated for the first time in the literature. The main objective of this study is to determine the viability and osteogenic differentiation state of cells interacting with silica coated MNPs after exposure to electromagnetic field.

Keywords: stem cell, magnetic nanoparticles, low frequency electromagnetic field

Abstracts

Zbigniew Borowski, Wanda Olech, Agnieszka Suchecka (eds.)

11th European Vertebrate Pest Management Conference

September 25–29, 2017, Warsaw, Poland



HISTOCHEMICAL EFFECTS OF BRODIFACOU ON RAT SPLEEN

**Burcu Bayramlı, Nursel Gül¹, Hakan Eskiçengiz¹,
Nuri Yigit¹, Fulya Saygılı Yigit²**

¹ Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara/Turkey

² Ömer Halisdemir University, Faculty of Science and Art, Dep. of Biotechnology, Niğde/Turkey

Histochemical effects of Brodifacoum on rat spleen were examined under light microscope by using histochemical staining method. Rats were divided into five groups (n:6 individual): control group, 24 hours, 72 hours, 14 days and 30 days of Brodifacoum application. Single dose of 0.2 mg Brodifacoum was given orally to mature male rats. Spleen samples were collected under ether anaesthesia. The tissues were fixed, dehydrated and embedded into paraffin and taken sections examined.

It was observed that capsule, white pulp and red pulp zones in the spleen of control rats were constructed normally and in their natural structure were few primary and secondary follicles (germinal center). Also, CD4 and CD8 lymphocytes were spherically structured. In the 24 hours Brodifacoum applied rat spleens, the diameters of germinal centers were expanded and deterioration of the structure of CD4 and CD8 cells was observed. Related to the increase in time (72 hours and 14 days Brodifacoum application) it was determined that primary follicles increased in number and the diameters of germinal centers expanded. In addition to this, after 30 days, the rate of CD4:CD8 of the brodifacoum applied rat spleens was approximate to the rate of the control group and the improvement of the structures of the cells were reported as an effect of regeneration.

According to results of this study, the brodifacoum caused immunohistochemically abnormalities in rat spleen including T lymphocytes structure and numbers.

HISTOCHEMICAL EFFECTS OF BRODIFACOUM ON RAT SPLEEN

BURCU BAYRAMLI-ÖNER¹, NURSEL GÜL²

¹Institute of Biotechnology, Ankara University, Ankara, TURKEY

²Department of Biology, Faculty of Science, Ankara University, Ankara, TURKEY

ABSTRACT. In this study, the histochemical effects of Brodifacoum, an anticoagulant used against rodents, on the spleen are examined under a light microscope using CD4 and CD8 histochemical staining methods. A single dose of 0.2 mg Brodifacoum was dissolved in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and was given orally to mature male rats. Spleen samples were collected under ether anesthesia after 24 h, 72 h, 14 days, and 30 days from the rats in the experimental groups and after 14 days from the rats in the control group. In this light microscope study, it was observed that the capsule, white pulp, and red pulp zones in the rat spleen were constructed normally and as their natural structures primary and secondary follicles (germinal center) they were few, and CD4 and CD8 lymphocytes were spherically structured. In the 24 h spleens of the rats, the diameters of germinal centers were expanded and deterioration of the structure of CD4 and CD8 cells was observed. Related to the increase in time (72 h and 14 days) it was determined that primary follicles increased in number and the diameters of germinal centers expanded. In addition to this, after 30 days, the rate of CD4:CD8 of the brodifacoum applied rat spleens were approximately the rate of the control group, and the improvement of the structures of the cells was reported as an effect of regeneration. As a result of this study, it was found that Brodifacoum caused immunohistochemical abnormalities in the rat spleen, affected the morphological structure of CD4 and CD8 T lymphocytes and created an immune response in rats. It is thought that the obtained results will be a source for the studies on Brodifacoum.

1. INTRODUCTION

Colloquially known as rat poison, Rodenticides are a chemicals used for pest and rodent population control [1]. There are two groups of rodenticides

Keywords. Brodifacoum, Rattus norvegicus, spleen, histochemistry, anticoagulant, CD4 T lymphocyte, CD8 T lymphocyte, light microscope

- Corresponding author;  0000-0002-7959-5179
 0000-0003-2978-4163

© 2022 Ankara University
Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C: Biology

T lymphocytes is recognized by the CD8 marker protein. These cells play important tasks in the immunity of the organism. Helper T lymphocytes secrete the cytokine hormone, which initiates immune system reactions. Cytotoxic T lymphocytes, on the other hand, neutralize pathogenic organisms or molecules with some enzymes they secrete [13]. The development of the primary immune response involving T lymphocytes may take up to 14 days, depending on the antigen and the region where it enters the organism [14]. There are 30%-40% T lymphocytes in the spleen. According to Langeveld et al.'s (2006) study, it has been suggested that CD8 T lymphocytes are more abundant than CD4 T lymphocytes in the human spleen. It has been determined that active cells are in most populations of these cells and CD8 T cells are mostly in the cytotoxic CD27(-) CD45RA(+) memory cell phenotype [15]. It has been shown that the fact that the lymphocyte subgroups in the spleen differ according to the lymphocyte subgroups in the peripheral blood means that CD4 and CD8 T lymphocyte activation in the spleen has an important and distinct place [15]. It has been reported that CD4+ and CD8+ T cells play an important role in the cytokine response to virus infection, and the release of antiviral and regulatory cytokines is shared between these two-T lymphocyte subgroups [16]. In previous studies, the effects of Brodifacoum on the histological structure of the spleen have been observed. In this study, both structural and immunological changes in the membranes of rodent spleen cells, CD4 helper T lymphocytes, and CD8 cytotoxic T lymphocytes and how Brodifacoum affected the immunity of rats were determined. In this study, it was observed that Brodifacoum affected rat spleen structures and an immune response occurred in rats on the 7th and 14th days. It was thought that the results of the study would be a source and support for studies on the resistance of rats to rodenticides.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experimental animals

After the approval of the Ankara University Ethics Committee (Decision number: 2014-18-133), 30 male albino rats (*Rattus norvegicus*, 7–9 weeks old, 200–250 g) were used in the experiments, 24 of which were in the experimental group and 6 of them are in the control group (Table 1). Before starting the experiments, the experimental animals were quarantined for seven days. Each animal was kept in separate cages under appropriate laboratory conditions (22±2 °C; 12h:12h photoperiod, 60% relative

commercially available. These are acute and anticoagulant rodenticides. Anticoagulant rodenticides are among the most important pesticides used for the control of harmful rodent populations [2]. The hydroxycoumarine derivatives Difenacoum, Brodifacoum, and Bromadiolone belong to the group of second-generation anticoagulant rodenticides. Second-generation anticoagulants (4-anticoagulants) inhibit one or more enzymes related to blood IX, II, VII, and K synthesis. The lipophilic structure of long-acting anticoagulant rodenticides facilitates the tight binding of the enzymes to the cell membranes they target [3]. Anticoagulant rodenticides are stored in the liver until the microsomal binding sites are saturated [4]. It has been reported many times that rodenticides have toxic effects on non-target organisms. Therefore, it is imperative to investigate the possible effects of these dangerous chemicals on organisms. Second-generation anticoagulant rodenticides have been reported multiple times to contaminate non-target wildlife, particularly poisoning primary predator birds and mammals, and their routes of exposure are not yet understood [5]. However, it has been reported that the poison accumulates in the body because of its consumption [6]. In a study with rabbits, one of the non-target animals, the clearance times of Warfarin, Brodifacoum and Difenacoum from plasma were compared and it was shown that Brodifacoum was cleared more slowly than warfarin, but Difenacoum spread to larger volumes [7]. Predators are at a risk of secondary poisoning due to the persistent accumulation of anticoagulants in the liver [8]. In mammalian predator population studies, for example, anticoagulant rodenticide residues were found in 84% of the red fox (*Vulpes vulpes*) population [9]. The presence of anticoagulant rodenticides was investigated in liver samples taken from red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*) and great-horned owls (*Bubo virginianus*), and they were found in 81% of red-tailed hawks and 82% of great-horned owls [10].

The spleen plays an important role in host defense. It is the organ where antigens from the blood are cleared. The spleen is an essential organ for blood homeostasis [11]. These functions are performed by two structurally and cellularly different components of the spleen, white pulp, and red pulp. The spleen is a vascular organ as it acts as a blood filter. The arterial branches were surrounded by lymphoid tissues. The main arteries feed the red pulp, and the smaller arteries feed the white pulp [12]. Lymphocytes involved in the immune system consist of two main groups, B and T. T lymphocytes get their name from the Thymus from which they are formed about 80% of all lymphocytes in the peripheral blood. T lymphocytes have several subgroups. One of these groups, helper T lymphocytes, is recognized by the CD4 marker protein on their surface, while another group of cytotoxic

humidity). Animals were fed ad libitum with solid food throughout the experiment.

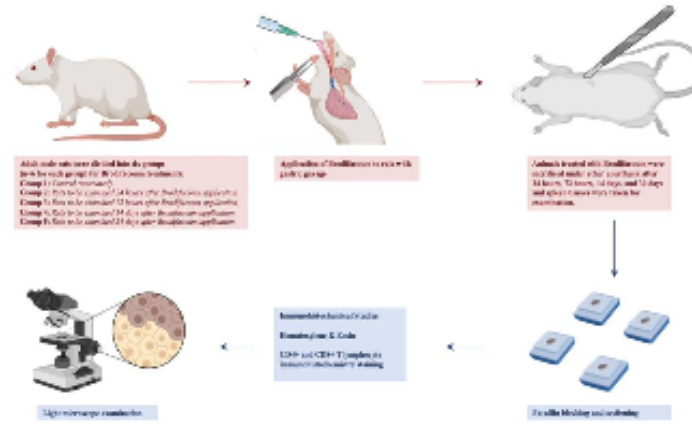


FIGURE 1. Schematic representation of the implementation stages of the experiment (Created with BioRender.com)

2.2. Brodifacoum Application

Experimental animals were divided into five groups (Table 1). Once groups of animals were determined, optimum drug doses (below LD50 dose to determine chronic cytotoxic effects) were calculated by measuring the weight of each rat.

TABLE 1. Experiment groups

Group 1	Control group rats	n: 6
Group 2	Rats to be examined 24 h after Brodifacoum application	n: 6
Group 3	Rats to be examined 72 h after Brodifacoum application	n: 6
Group 4	Rats to be examined 14 days after Brodifacoum application	n: 6
Group 5	Rats to be examined 30 days after Brodifacoum application	n: 6

A dose of 0.2 mg/kg BW (Body Weight) Brodifacoum prepared with DMSO (Dimethyl sulfoxide)/polyethyleneglycol-400/water (0.02ml/1ml/1ml)

solution was given orally to rats by gastric gavage method [4]. 1ml/kg BW DMSO (Dimethyl sulfoxide)/polyethyleneglycol-400/water (0.02ml/1ml/1ml) solution was administered to the control group animals by gastric gavage. Spleen samples were taken from the rat groups under ether anesthesia 24 h, 72 h, 14 days, and 30 days after Brodifacoum was applied, while spleen samples were taken 14 days later from the control group [17].

2.3. Light Microscope Preparation

Spleen samples taken from rats in the control group (after 14 days) and Brodifacoum (0.5 mg/kg) administered (24 h, 72 h, 14 days, and 30 days) under ether anesthesia were prepared for examination under a light microscope. The removed spleen samples were weighed on a precision balance, the samples were washed with distilled water, and the samples were taken in 2.5% Formaldehyde (prepared in 0.1 M Sodium phosphate buffer) and their first determinations were made (2 h, +4 °C). After fixation, the samples were washed with the same buffer (washed with 3 solution changes in 1 h) and then incubated for 5 min in alcohol series (80, 90, 96, and 100%) to dehydrate the samples. The samples were embedded in paraffin blocks by passing through xylol and 5µ thick sections were taken using a microtome [18].

2.4. Immunohistochemical Analysis

Hematoxylin-eosin staining was performed to examine the general structure of the spleen. The sections taken were treated with hematoxylin and then washed under running water. After being treated with 95% ethyl alcohol, it was dyed with Eosin and the excess paint was removed by passing it through ethyl alcohol again. Special antibody staining kits (Santa Cruz Biotech, USA) were used to examine CD4 and CD8 T lymphocytes. The instruction manual in the kit was followed for CD4 and CD8 T lymphocytes immunohistochemical staining. The stained sections were examined under a light microscope (Olympus BX43, Tokyo, Japan).

3. RESULTS

This study investigated how Brodifacoum affected the spleen weights and histological structure of the spleen in rats. According to the spleen weight measurements (Figure 2.a.), although the spleen weight of the rats treated with Brodifacoum for 24 h, 72 h, and 14 days compared with the control

that there were a few primary follicles in the spleen samples taken from the control group of rats. In the spleen of the rats in the control group, CD4 T lymphocytes were found to have a spherical shape in the white pulp region where thymus-derived T lymphocytes were located. It was determined that CD4s were more numerous in this region compared to other cells. In the CD8 control group, white pulp and red pulp regions were prominent in the spleen structure, and there were hardly any primary and secondary follicles. It was observed that CD8 T lymphocytes in the control group were round or nearly angular and found in the same proportion as other cells.

In the spleen samples taken from rats treated with Brodifacoum for 24 h in the study, it was observed under the light microscope that large-scale germinal centers were formed and erythrocytes proliferated (Figure 4). In the spleen sample taken at the end of 24 h, it was determined that the lymphocyte count increased, and the erythrocytes were smaller than normal compared to the control group. As a sign of immunity, many newly developing primary follicles and a few secondary follicles (germinal centers) were found, in which primary follicles and germinal centers became prominent. It was observed that in the white pulp region, CD4 T lymphocyte cells also deteriorated and decreased in number compared to the control group, while in the red pulp region in the spleen of the CD8 group, the morphology of CD8 cytotoxic T lymphocytes changed from a round shape to a triangular or pentagonal shape compared to the control group and decreased compared with other cells.

The presence of primary and secondary follicles and the width of their diameters were noted in the spleen sample taken from the rat 72 h after the application of Brodifacoum, it was observed that erythrocytes were more numerous than lymphocytes and that they were smaller than their normal structure (Figure 5). While small-diameter primary follicles were seen in the areas close to the capsule, secondary follicles were not found and germinal center diameters were observed to be large. It was noted that the diameters of CD4s were smaller and in different shapes compared to the control group, and simultaneously, the number of cells other than CD4 was less. It was observed that CD8s, in which other cells were reduced, changed shape, were large and small, and macrophages were more numerous.

group decreased, a weight close to the control group was detected during the 30-day application period. The effect of Brodifacoum on CD8 and CD4 lymphocyte counts is given in Figure 2. b and 2. c. It was determined that CD4 and CD8 levels increased at the same rate in terms of the effect of brodifacoum on T lymphocyte types.

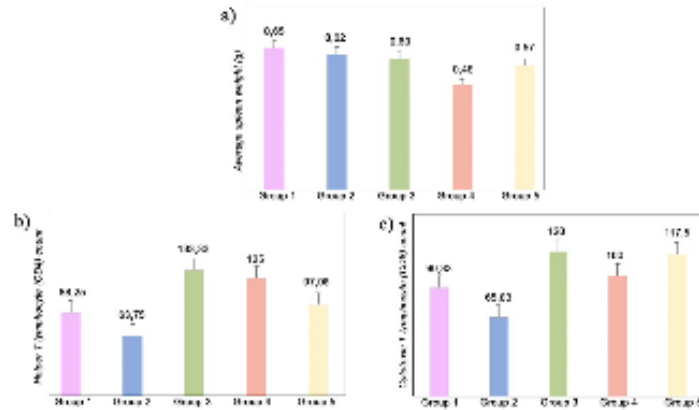


FIGURE 2. a) Spleen weights of rats treated with Brodifacoum b) Helper T lymphocyte (CD4) count of Brodifacoum-treated rat groups c) Cytotoxic T lymphocyte (CD8) count of rat groups treated with Brodifacoum

In this study, the effect of Brodifacoum on CD4 (helper T) lymphocytes, which stimulate other cells by secreting cytokines in the presence of immune antigen in the white pulp region of the spleen of rats, and on CD8 (cytotoxic T) lymphocytes, which eliminate foreign organisms and toxic substances in immunity with their enzymes, were examined by the histochemical method. When the control group was examined histologically, it was found that the capsule, white pulp, and red pulp regions in the spleen were in the normal structure and that the primary and secondary follicles (germinal center) were few in number as in their natural structures (Figure 3). A large number of normal erythrocytes, lymphocytes, and macrophage cells were found in the red pulp area. In terms of helper T lymphocytes, it was observed that the spleen of CD 4 Control group rats had a normal structure and white pulp, red pulp, and primary follicles were properly located. Additionally, it was noted

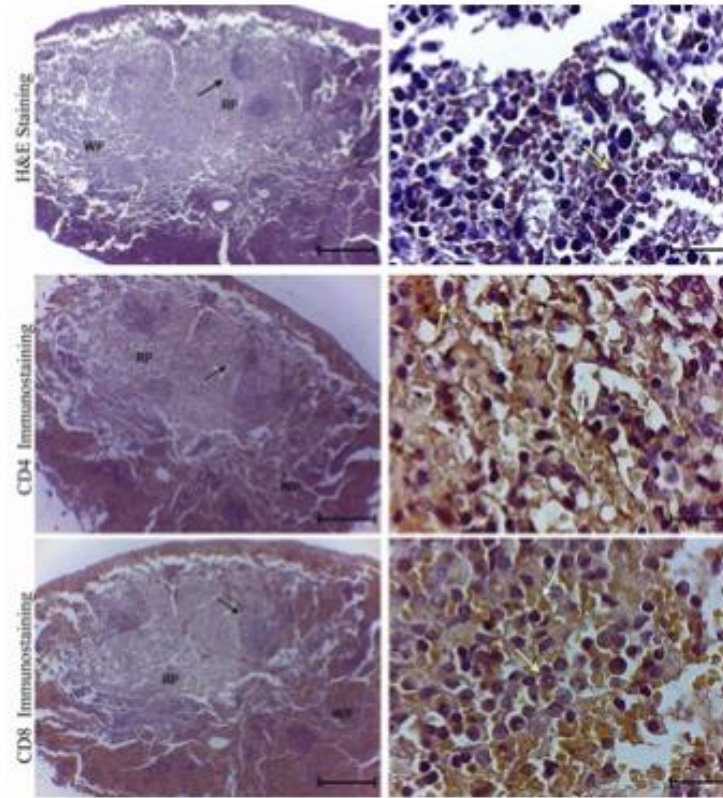


FIGURE 3. The general view of the control group rat spleen. White pulp region (WP), Red pulp region (RP), Primary follicle (black arrow), macrophage (yellow arrow), T lymphocytes (white arrow) (Scale bar left: 200 μ m, right: 50 μ m)

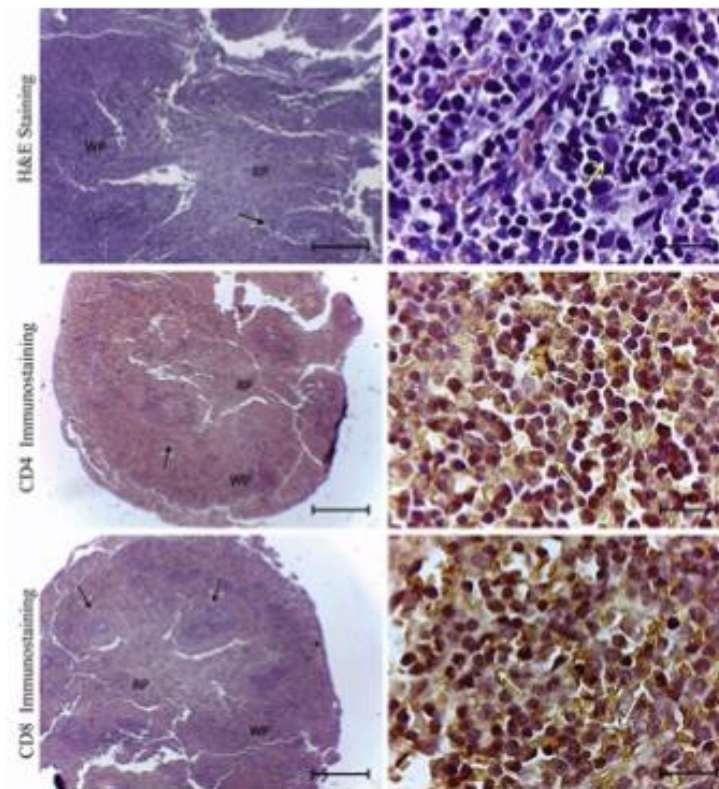


FIGURE 4. The general view of rat spleen taken 24 h after Brodifacoum application. White pulp region (WP), Red pulp region (RP), Primary follicle (black arrow), macrophage (yellow arrow), and T lymphocytes (white arrow) (Scale bar left: 200 μ m, right: 50 μ m)

It was observed that the primary and secondary follicles in the spleen covered the entire organ on the day when the immunity was most intense 14 days after the application of Brodifacoum, which was the fourth experimental group (Figure 6). We observed that the erythrocytes, which should be of the same size as the lymphocytes, were gradually getting smaller compared to the control group. In some places, lysis and cell groups

were observed in the tissue, it was observed that CD4s changed into triangular or rectangular shapes in the white pulp region compared to the control group, and they fused in some regions. It was noted that CD8s were few, shrunk by changing their shape and formed groups, whereas cells other than CD8s were more numerous.

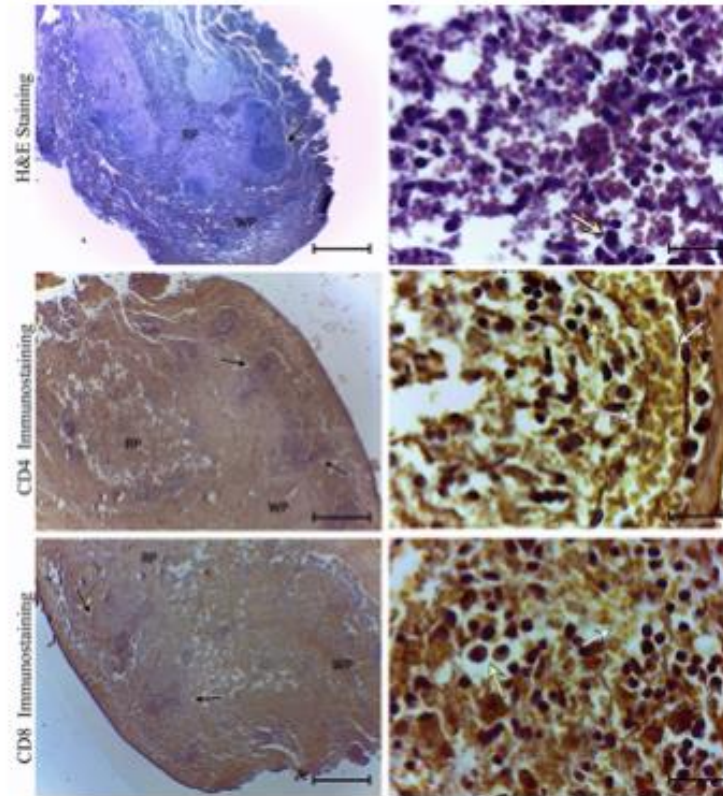


FIGURE 5. The general view of rat spleen taken 72 h after Brodifacoum application. White pulp region (WP), Red pulp region (RP), Primary follicle (black arrow), macrophage (yellow arrow), and T lymphocytes (white arrow) (Scale bar left: 200 μ m, right: 50 μ m) □

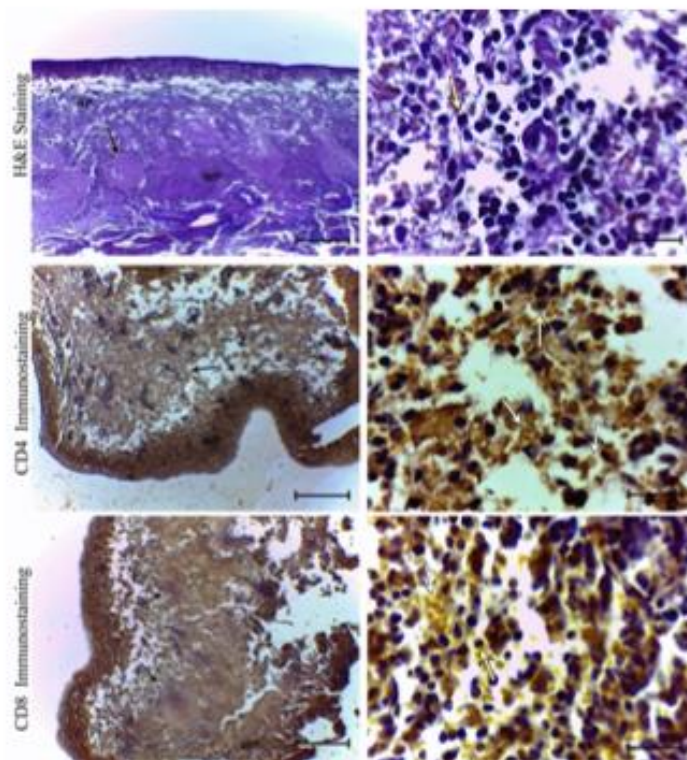


FIGURE 6. The general view of rat spleen taken 14 days after Brodifacoum application. White pulp region (WP), Red pulp region (RP), Primary follicle (black arrow), macrophage (yellow arrow), and T lymphocytes (white arrow) (Scale bar left: 200 μ m, right: 50 μ m)

In the spleen samples taken 30 days after the application of Brodifacoum, which is the fifth and last of the experimental groups, it was observed that there were few primary and secondary follicles in the spleen like in the control group (Figure 7). A large number of lymphocytes and a smaller number of irregularly adhered erythrocytes compared with lymphocytes were observed. In the general structure of the spleen, the germinal centers

were almost non-existent, whereas the large and small diameter primary follicles were numerous, which was accepted as a sign of recovery. As in the control group, CD4 T lymphocytes were observed to be round in shape and all of approximately the same size. This situation was thought to be a sign of retrograde recovery, and few follicles were observed as another sign of recovery. It was observed that CD8 T lymphocytes were close in size to the control group and were in the same shape as the cells in the control group.

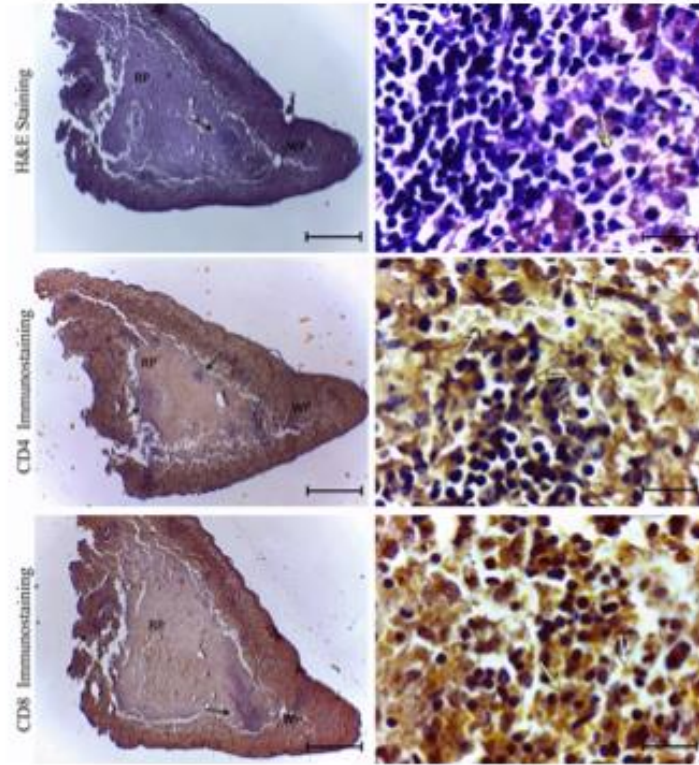


FIGURE 7. The general view of rat spleen taken 30 days after Brodifacoum application. White pulp region (WP), Red pulp region (RP), Primary follicle (black arrow), macrophage (yellow arrow), and T lymphocytes (white arrow) (Scale bar left: 200 μ m, right: 50 μ m)

It was administered to rats and the changes were observed to examine the changes in the spleen as a result of the toxicity of chlorophem. The spleen weights of the experimental rats increased significantly compared to the control group of rats, and fibrosis in the capsule and lesions in the parenchyma was observed [26]. In our study, it was observed that the weight decreased in groups 2, 3, and 4 in which Brodifacoum was applied and increased in group 5. It has been interpreted as a part of the healing process.

By the current research, Brodifacoum causes various clinical symptoms in rabbits and rats, including drowsiness, fatigue, anorexia, decreased movement, and rapid and easy exhaustion after administration [27]. Because of our experiments, male rats treated with Brodifacoum experienced fatigue, loss of appetite, etc., similar to previous studies. Weight loss was observed in Brodifacoum-administered rats because of anorexia. Likewise, studies have reported that Brodifacoum causes weight loss. Behavioral disorders and mouth and nose bleeding were observed in rats after Brodifacoum administration [28].

5. CONCLUSION

In this study, the damaging effect of Brodifacoum on the spleen of rats in the mammalian group, including humans, was demonstrated histochemically. It has been understood that Brodifacoum even disrupts the structure of CD4 and CD8, which shows an immune reaction, and therefore is effective against rats. It is thought that the results obtained from this study will contribute and be a source for chemical control studies against rodents. In addition, this study reveals that the spleen structure will histologically deteriorate in humans and non-target organisms that accidentally come into contact with Brodifacoum.

Acknowledgement. I gratefully acknowledge Hakan ESKİZENGİN and Ceren GÜLER for their valuable suggestions during this part of my research work.

Author Contribution Statements BBÖ - Conceptualization, Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing. NG – supervising, resources, conceptualization, writing-review & editing. Both authors have read and approved the manuscript.

4. DISCUSSION

T cells are divided into 6 groups: helper T cells (CD4+ T cells), cytotoxic T cells (CD8+ T cells), effector T cells, suppressor T cells, memory T cells, and delayed-type hypersensitive (DTH) T cells. CD4+ T cells and CD8+ T cells are T cells involved in the immune system. CD4+ T cells assist cellular immune function, while CD8+ T cells can destroy target cells labeled with specific antigens [19]. Therefore, CD4 and CD8 T-cell counts are an important indicator of cellular immunity [20]. In a study on the effect of boron on spleen T lymphocytes in rats, the results obtained from immunohistochemical staining showed that the cytoplasm of CD4+ and CD8+ cells was yellowish brown, and the cells were scattered in and around the splenic periarteriolar lymphoid sheaths [21]. It is possible to interpret the immunohistochemical staining results of our study similarly. Likewise, immunohistochemical staining showed that the number of CD4 cells increased as the boron concentration increased [21]. Our study observed that Brodifacoum increased the number of CD4 cells on the 14th day, which is the most intense day of immunity. Because of immunohistochemical staining, deterioration in lymphocyte shapes was observed on the 72nd and 14th days. In the study examining the effect of Cyclosporine A on rats, structural deterioration was observed in lymphocytes in the spleen tissues, similar to our study [22]. The effect of ethanol on the immune system was investigated in a study on mice [23]. In this study, the ETOH diet was applied to mice and CD4 and CD8 cells in the thymus and spleen were examined by immunohistochemical staining at certain time points. According to the findings of the study, T cell loss was detected in mice on the ETOH diet. In our study, when the first 14 days are examined, the decrease in the numbers of CD4 and CD8 shows compatibility with this study. When lymphocytes in mouse spleens treated with ETOH were examined by immunohistochemical staining, it was revealed that T lymphocytes were structurally smaller, which is similar to our study.

Humoral and cellular immunity was investigated by administering Propoxur (PPX) insecticide to C57-bl/6 mice. Because of this study, it was reported that PPX at a dose of 10 mg/kg suppressed the delayed-type hypersensitivity response and increased the percentage of CD4(-)/CD8(+) T cells [24]. In another study, it was reported that cocaine increased cytokine-secreting CD4(+) T lymphocytes in the spleen in vitro [25]. In our study, it was observed that the CD4/CD8 ratio increased on the 14th day, which is the immune response was most intense.

Declaration of Competing Interests The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

REFERENCES

- [1] Walther, B., Geduhn, A., Schenke, D. & Jacob, J. Exposure of passerine birds to brodifacoum during management of Norway rats on farms. *Science of the Total Environment*, 762, (2021), 144160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144160>
- [2] Albert, C.A., Wilson, L.K., Mineau, P., Trudeau, S. & Elliott, J.E. Anticoagulant rodenticides in three owl species from western Canada, 1988–2003. *Archives of Environ. Cont. and Toxicology*, 58, (2010), 451–459. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9402-z>
- [3] Chu, Y.-J., Lin, J.-H. & Hung, D.-Z. Oral administration of injectable vitamin K1 in Brodifacoum intoxication. *BioMedicine*, 12, (2022), 47–49. <https://doi.org/10.37796/2211-8039.1305>
- [4] Mosterd, J.J. & Thijssen, H.H.W. The long-term effects of the rodenticide, brodifacoum, on blood coagulation and vitamin K metabolism in rats. *British Journal of Pharmacol.*, 535, (1991), 531–535. <https://doi.org/10.37796/221-039.1305>
- [5] Elliott, J.E., Hindmarch, S., Albert, C.A., Emery, J., Mineau, P. & Maisonneuve, F. Exposure pathways of anticoagulant rodenticides to nontarget wildlife. *Environ. Monit. Assess.*, 186, (2014). <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3422-x>
- [6] Nosal, D.G., van Breemen, R.B., Haffner, J.W., Rubinstein, I. & Feinstein, D.L. Brodifacoum pharmacokinetics in acute human poisoning: implications for estimating duration of vitamin K therapy. *Toxicol. Commun.*, 5, (2021), 69–72. <https://doi.org/10.1080/24734306.2021.1887637>
- [7] Breckenridge, A.M., Cholerton, S., Hart, J.A., Park, B.K. & Scott, A.K. A study of the relationship between the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of the 4-hydroxycoumarin anticoagulants warfarin, difenacoum and brodifacoum in the rabbit. *British Journal of Pharmacology*, 84, (1985), 81–91.
- [8] Eason, C.T., Murphy, E.C., Wright, G.R.G. & Spurr, E.B. Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zealand. *Ecotoxicology*, 11, (2002), 35–48. <https://doi.org/10.1023/a:1013793029831>
- [9] Tosh D.G., McDonald R.A., Bearhop S., Llewellyn N.R., Fee S., Sharp E.A., Barnett E.A., Shore R.F. Does small mammal prey guild affect the exposure of

- predators to anticoagulant rodenticides?. *Environmental Pollution*, 159, (2011), 3106–3112.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.03.028>
- [10] Stansley, W., Cummings, M., Vudathala, D. & Murphy, L.A. Anticoagulant rodenticides in red-tailed hawks, *Buteo jamaicensis*, and great horned owls, *Bubo virginianus*, from New Jersey, USA, 2008–2010. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology Toxicol.*, 92, (2014), 6–9.
<https://doi.org/10.1007/s00128-013-1135-z>
- [11] Mebius, R.E. & Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, 5, (2005), 606–616.
<https://doi.org/10.1038/nri1669>
- [12] Cesta, M.F. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic Pathology*, 34, (2006), 455–465.
<https://doi.org/10.1080/01926230600867743>
- [13] Fabrizio, V.A., Rodriguez-Sanchez, M.I., Mauguen, A., Dahi, P.B., Doubrovina, E., O'Reilly, R.J. & Prockop, S.E. Adoptive therapy with CMV-specific cytotoxic T lymphocytes depends on baseline CD4+ immunity to mediate durable responses. *Blood Advances* 5.2 (2021), 496–503.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002735>
- [14] Ademokun, A.A. & Dunn-Walters, D. Immune Responses: Primary and Secondary. *eLS*, (2010).
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000947.pub2>
- [15] Langeveld, M., Gamadia, L.E. & Ten Berge, I.J.M. T-lymphocyte subset distribution in human spleen. *European Journal of Clinical Investigation*, 36, (2006), 250–256.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-362.2006.01626.x>
- [16] Falchetti, R., Lanzilli, G., Casalnuovo, I.A., Gaziano, R., Palamara, A.T., Di Francesco, P., Ravagnan, G. & Garaci, E. Splenic CD4+ and CD8+ T cells from influenza immune mice concurrently produce in vitro IL2, IL4, and IFN- γ . *Cellular Immunology*, 170, (1996), 222–229.
<https://doi.org/10.1006/cimm.1996.0155>
- [17] Hadler, M.R. & Buckle, A.P. Forty five years of anticoagulant rodenticides—past, present and future trends. *Proceedings of the Fifteenth Vertebrate Pest Conference* (1992), 149–155.
- [18] Whiteland, J.L., Nicholls, S.M., Shimeld, C., Easty, D.L., Williams, N.A. & Hill, T.J. Immunohistochemical detection of T-cell subsets and other leukocytes in paraffin-embedded rat and mouse tissues with monoclonal antibodies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 43, (1995), 313–320.
<https://doi.org/10.1177/43.3.7868861>
- [19] Murphy, K.M., Reiner, S.L. The lineage decisions of helper T-cells. *Nature Reviews Immunology*, 2, (2002), 933–944.
<https://doi.org/10.1038/nri954>

- [20] Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. & Wahl, S.M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T-cells to CD4+CD25+ regulatory T-cells by TGF- β induction of transcription factor foxp3. *Journal of Experimental Medicine*, 198, (2004), 1875–1886. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>
- [21] Jin, E., Li, S., Ren, M., Hu, Q., Gu, Y., & Li, K. Boron affects immune function through modulation of splenic T-lymphocyte subsets, cytokine secretion, and lymphocyte proliferation and apoptosis in rats. *Biological Trace Element Research*, 178, (2017), 261–275. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-0932-3>
- [22] Omar, H.E.-D.M., Saad Eldien, H.M., Badary, M.S., Al-Khatib, B.Y. & Abdelgaffar, S.K. The immunomodulating and antioxidant activity of fucoidan on the splenic tissue of rats treated with cyclosporine A. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 66, (2013), 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2013.05.003>
- [23] Saad, A.J. & Jerrells, T.R. Flow cytometric and immunohistochemical evaluation of ethanol-induced changes in splenic and thymic lymphoid cell populations. *Alcoholism: Clinical and Exper. Research*, 15, (1991), 796–803. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1991.tb00603.x>
- [24] Neishabouri, E., Hassan, Z.M. & Ostad, S. Humoral and cellular immunomodulation induced by propoxure in C57-bl/6 mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3, (2004), 41–45. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.295>
- [25] Falchetti, R., Lanzilli, G., Casalnuovo, I.A., Gaziano, R., Palamara, A.T., Di Francesco, P., Ravagnan, G. & Garaci, E. Splenic CD+ and CD8+T cells from influenza immune mice concurrently produce in vitro IL2, IL4, and IFN-. *Cellular Immunology*, 170, (1996), 222–229. <https://doi.org/10.1006/cimm.1996.0155>
- [26] Fujitani, T., Tada, Y. & Yoneyama, M. Chlorpropham-induced splenotoxicity and its recovery in rats. *Food and Chem. Toxicology*, 42, (2004), 1469–1477. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.04.008>
- [27] Valchev, I., Binev, R., Yordanova, V. & Nikolov, Y. Anticoagulant rodenticide intoxication in animals - A review. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 32, (2008), 237–243.
- [28] Maamar, H., Mallem, L. & Boulakoud, M.S. The effect of the anticoagulant rodenticide "Brodifacoum" on the bioindicators parameters in male rabbit. *Annals of Biological Research*, (2013), 53–61.