

**BİYOMEDİKAL TEKNOLOJİLERDE
KULLANIM POTANSİYELİ OLAN
BAZI NANOMATERYALLERİN İN VİTRO
BİYUYUMLULUKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Giray Buğra AKBABA

**Doktora Tezi
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ
2013
Her Hakkı Saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BİYOMEDİKAL TEKNOLOJİLERDE KULLANIM
POTANSİYELİ OLAN BAZI NANOMATERYALLERİN
İN VİTRO BİYOUYUMLULUKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Giray Buğra AKBABA

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**ERZURUM
2013**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

BİYOMEDİKAL TEKNOLOJİLERDE KULLANIM POTANSİYELİ OLAN BAZI
NANOMATERYALLERİN İN VİTRO BİYOUYUMLULUKLARININ
ARAŞTIRILMASI

Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Giray Buğra AKBABA tarafından hazırlanan bu çalışma ...14.../...12.../...2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ömer Selim YILDIRIM

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hakan AŞKIN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Onur ATAKİŞİ

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

BİYOMEDİKAL TEKNOLOJİLERDE KULLANIM POTANSİYELİ OLAN BAZI NANOMATERYALLERİN İN VİTRO BİYUYUMLULUKLARININ ARAŞTIRILMASI

Giray Buğra AKBABA

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

21. yüzyılım bilimi olarak tanımlanan nanoteknolojideki gelişmeler malzeme mühendisliği alanında köklü değişikliklere neden olmuştur. Özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanılan mikro boyutlardaki klasik biyomalzemelerin yerini nano boyutta üretilen biyomalzemeler almaya başlamış ve bu gelişmelere bağlı olarak nanobiyomalzemelerin gerek hammadde olarak tıbbi cihazlarda gerekse tıbbi malzeme (kemik protezi, diş implantı, kalp kapakçığı, yapay damar vs.) olarak vücut içerisinde kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu nedenle son zamanlarda malzeme mühendisliğinde yapılan çalışmalar bu nanopartiküllerin vücuttaki olası etkileri ve biyoyumları noktasına odaklanmış durumdadır.

Bu çalışmada, biyomalzeme olarak kullanılabilen farklı nanopartiküllerin (alüminyum oksit = Al_2O_3 , kalsiyum fosfat = $Ca_3(PO_4)_2$ ve çinko oksit = ZnO) insan periferik kan hücreleri (lenfosit) üzerinde *in vitro* genetik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmamız söz konusu nanopartiküllerin lenfosit kan hücreleri üzerindeki genotoksik etkileri konusunda ilk deneysel çalışmadır. Araştırmamız kapsamında *in vitro* koşullarda periferik kan kültürleri seçilen nanomalzemelerin farklı dozlarına (0, 1, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 2000 ppm) maruz bırakıldı. Genetik araştırmalarda kullanılan heparinize kan örnekleri mesleği gereği daha önce herhangi bir toksik ajana maruz kalmamış, sigara ve alkol kullanmayan 4 sağlıklı bireyden alındı. DNA ve kromozom hasarlarını tespit etmek için Mikroçekirdek (MÇ) ve Kromozom Aberasyon (KA) testleri uygulandı.

Mevcut çalışmanın sonuçlarına göre, Al_3O_2 ve $Ca_3(PO_4)_2$ nanopartiküllerinin *in vitro* koşullarda insan periferik kan kültürlerinde en yüksek doz değerinde dahi genotoksik etkilerinin olmadığı bu nedenle biyoyumlu olarak kullanılabilirleri önerilmektedir. ZnO nanopartiküllerinin ise çok düşük doz değerlerinde (≥ 12.5 ppm) genotoksositeye sebep olduğu gözlenmiştir. Buna ek olarak ZnO nanopartikülleri yüksek konsantrasyonlarda (500 ppm ve üzeri) hücre bölünme koşullarını olumsuz etkilemiştir. Bu nedenlerle biyomalzeme olarak biyoyumluluğunun bulunmadığı kanaatine varılmıştır.

2013, 67 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, Biyomalzeme, Toksikite, Lenfosit, *In vitro*, DNA hasarı

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE IN VITRO INVESTIGATION OF BIOCOMPATIBILITY OF SOME NANOMATERIALS POTENTIALLY IN BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

Giray Buğra AKBABA

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

The advances in nanotechnology defined as the science of 21st century have led to fundamental changes in the field of materials engineering. Manufactured nano-scale materials have begun to take place of conventional micro-sized materials especially in biomedical applications and depending on these developments, the using of nano-biomaterials as well as raw materials in medical devices as medical equipment (bone implants, dental implants, heart valves, artificial blood vessels, etc.) is expanding in body. For this reason, the recent studies in material engineering have been focused on the possible effects of these nano-particles in body and biocompatibilities of these materials.

In this study, it is aimed to determine the in vitro genetic effects of different nanoparticles used as biomaterials (aluminum oxide = Al_2O_3 , calcium phosphate = $Ca_3(PO_4)_2$ and zinc oxide = ZnO) on human peripheral blood cells (lymphocytes). Our study is the first experimental study about genotoxic effects of nanoparticles on the lymphocyte blood cells. In this investigation, peripheral blood cultures in vitro conditions were exposed to different doses (0, 1, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 and 2000 ppm) of selected nanomaterials. Heparinized blood samples used in genetic research were taken from 4 healthy individuals that they had not previously been exposed to any toxic agent as a part of their work, not smoking and drinking. Micronucleus (MN) and Chromosome Aberration (CA) tests were applied to determine DNA and chromosomal damages.

According to the results of the present study, Al_3O_2 and $Ca_3(PO_4)_2$ nanoparticles have not genotoxic effects on human peripheral blood cultures in vitro conditions even the highest doses therefore they are recommended that they can be used as biocompatible. It was observed that, even at a very low dose (≥ 12.5 ppm), ZnO nanoparticles had led to genotoxicity. In addition, in high concentrations (500 ppm and above) ZnO nanoparticles affected the reproductive conditions adversely. For these reasons, it was concluded that ZnO nanoparticles are not appropriate for using whether as a biocompatible biomaterial.

2013, 67 pages

Keywords: Nanoparticle, Biomaterials, Toxicity, Lymphocyte, *In vitro*, DNA damage

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alıŐma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü'nde yapılmıştır.

ÇalıŐmalarım süresince görüş ve bilgi birikiminden yararlandığım değerli hocam ve danıŐmanım, Sayın Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ'e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

ÇalıŐmamın her aŐamasında olumlu teŐvikleri ile beni cesaretlendiren ve destekleyen Sayın Prof. Dr. Ömer Selim YILDIRIM'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Uğur AKBABA'ya minnet ve Őukranlarımı sunmayı her zaman için bir borç bilirim. Ayrıca deneylerim sırasında periferik kan örneklerini temin ettiğim gönüllü katılımcılara ve kan örneklerinin alınmasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji servisi çalıŐanlarına teŐekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bu zorlu ve yorucu çalışma sürecinde göstermiŐ olduğu özveri ve hassasiyetlerinden ötürü çok değerli annem Canan AKBABA'ya her zaman yanımda olduğu için sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Giray Buğra AKBABA

Aralık, 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler.....	1
1.2. Biyomalzemelerin Uygulama Alanları.....	5
1.3. Biyomalzeme Çeşitleri ve Sınıflandırılması.....	6
1.3.1. Metalik biyomalzemeler.....	7
1.3.2. Seramik biyomalzemeler.....	10
1.3.3. Polimer biyomalzemeler.....	11
1.3.4. Kompozit biyomalzemeler.....	12
1.4. Biyomalzemeler ve Biyouyumluluk.....	12
1.5. Kullanılan Test Yöntemleri.....	14
1.5.1. Kromozom aberasyon testi (KA).....	15
1.5.2. Mikroçekirdek testi (MÇ).....	17
1.6. Tez Çalışmasında Kullanılan Biyomalzemeler.....	18
1.6.1. Alüminyum oksit (Al_2O_3) nanopartikülleri.....	18
1.6.2. Kalsiyum fosfat [$Ca_3(PO_4)_2$] nanopartikülleri.....	19
1.6.3. Çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri.....	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Kan örneklerinin alınması ve kültürlerin kurulması.....	26
3.1.2. Test çözeltilerinin hazırlanması.....	26
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	27
3.1.4. Kullanılan aletler ve cihazlar.....	27

3.1.5. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	28
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Genotoksisite testleri	28
3.2.1.a. Kromozom aberasyon (KA) yöntemi	29
3.2.1.b. Mikroçekirdek (MÇ) yöntemi	31
3.3. Biyomalzemelerin Karakterizasyonu	31
3.3.1. Alüminyum oksit bileşiğinin karakterizasyonu.....	32
3.3.2. Kalsiyum fosfat bileşiğinin karakterizasyonu	33
3.3.3. Çinko oksit bileşiğinin karakterizasyonu	35
3.4. İstatistiksel İşlemler.....	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	37
4.1. Alüminyum oksit (Al ₂ O ₃) Nanopartikülüne Ait Sonuçlar	37
4.1.1. Kromozom aberasyon testi sonuçları	37
4.1.2. Mikroçekirdek testi sonuçları	39
4.2. Kalsiyum fosfat [Ca ₃ (PO ₄) ₂] Nanopartikülüne Ait Sonuçlar	43
4.2.1. Kromozom aberasyon testi sonuçları	43
4.2.2. Mikroçekirdek testi sonuçları	45
4.3. Çinko oksit (ZnO) Nanopartikülüne Ait Sonuçlar	49
4.3.1. Kromozom aberasyon testi sonuçları	49
4.3.2. Mikroçekirdek testi sonuçları	51
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	68

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
kg	Kilogram
mg	Miligram
g	Gram
ppm	Parts per million
L	Litre

Kısaltmalar

MÇ	Mikroçekirdek testi
KA	Kromozom aberasyon testi
TB	Trypan Blue
XRD	X-ray diffraction
SEM	Scanning Electron Microscope
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
KKD	Kardeş kromatid değişimi
NRU	Neutral red uptake testi
MTT	Dimethylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium-bromide
Comet	Single cell microgel electrophoresis
MIT	Metabolic Inhibition Test
MLA	Mouse lymphoma Test

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Nanopartiküller ile bazı biyolojik yapıların karşılaştırıldığı uzunluk ölçeği.....	2
Şekil 1.2. Nanopartikül içeren mevcut tüketici ürünleri. Ocak 2009 Woodrow Wilson veritabanından uyarlanmıştır.....	3
Şekil 1.3. Başlıca kromozomal aberasyon türleri	16
Şekil 1.4. Mikroçekirdek oluşum mekanizması.....	18
Şekil 3.1. Alüminyum oksit nanopartikülünün XRD görüntüsü	32
Şekil 3.2. Alüminyum oksit nanopartikülünün SEM görüntüsü.....	33
Şekil 3.3. Kalsiyum fosfat nanopartikülünün XRD görüntüsü	34
Şekil 3.4. Kalsiyum fosfat nanopartikülünün SEM görüntüsü	34
Şekil 3.5. Çinko oksit nanopartikülünün XRD görüntüsü	35
Şekil 3.6. Çinko oksit nanopartikülünün SEM görüntüsü	36
Şekil 4.1. Alüminyum oksit maruziyeti sonucunda gözlenen KA/Hücre değerleri.....	38
Şekil 4.2. Alüminyum oksit bileşiğinin 1000 ppm’de neden olduğu kromozomal aberrasyon (kromatid gap).....	39
Şekil 4.3. Alüminyum oksit maruziyeti sonucunda gözlenen MÇ/1000 hücre değerleri.....	40
Şekil 4.4. Karyokinez evresini tamamlamış çift çekirdekli lenfosit hücresi.....	41
Şekil 4.5. 500 ppm alüminyum oksit maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu	41
Şekil 4.6. 1000 ppm alüminyum oksit maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu.....	42
Şekil 4.7. 2000 ppm alüminyum oksit maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu.....	42
Şekil 4.8. Kalsiyum fosfat maruziyeti sonucunda gözlenen KA/Hücre değerleri	44
Şekil 4.9. Kalsiyum fosfat bileşiğinin 500 ppm’de neden olduğu kromozomal aberrasyon (kromatid kırığı).....	44
Şekil 4.10. Kalsiyum fosfat bileşiğinin 1000 ppm’de neden olduğu kromozomal aberrasyon (Kromozom kırığı)	45

Şekil 4.11. Kalsiyum fosfat maruziyeti sonucunda gözlenen MÇ/1000 hücre değerleri.....	46
Şekil 4.12. Karyokinez evresini tamamlamış çift çekirdekli lenfosit hücresi.....	47
Şekil 4.13. 500 ppm kalsiyum fosfat maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu	47
Şekil 4.14. 1000 ppm kalsiyum fosfat maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu	48
Şekil 4.15. 2000 ppm kalsiyum fosfat maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu	48
Şekil 4.16. Çinko oksit maruziyeti sonucunda gözlenen KA/Hücre değerleri	50
Şekil 4.17. Çinko oksit bileşiğinin 100 ppm’de neden olduğu kromozomal aberasyon (kromozom gap)	50
Şekil 4.18. Çinko oksit bileşiğinin 100 ppm’de neden olduğu kromozomal aberasyon (kromozom kırığı)	51
Şekil 4.19. Çinko oksit maruziyeti sonucunda gözlenen MÇ/1000 hücre değerleri.....	52
Şekil 4.20. Karyokinezi evresini tamamlamış çift çekirdekli lenfosit hücresi	53
Şekil 4.21. 50 ppm çinko oksit maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu	53
Şekil 4.22. 100 ppm çinko oksit maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu	54
Şekil 4.23. 250 ppm Çinko oksit maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu	54

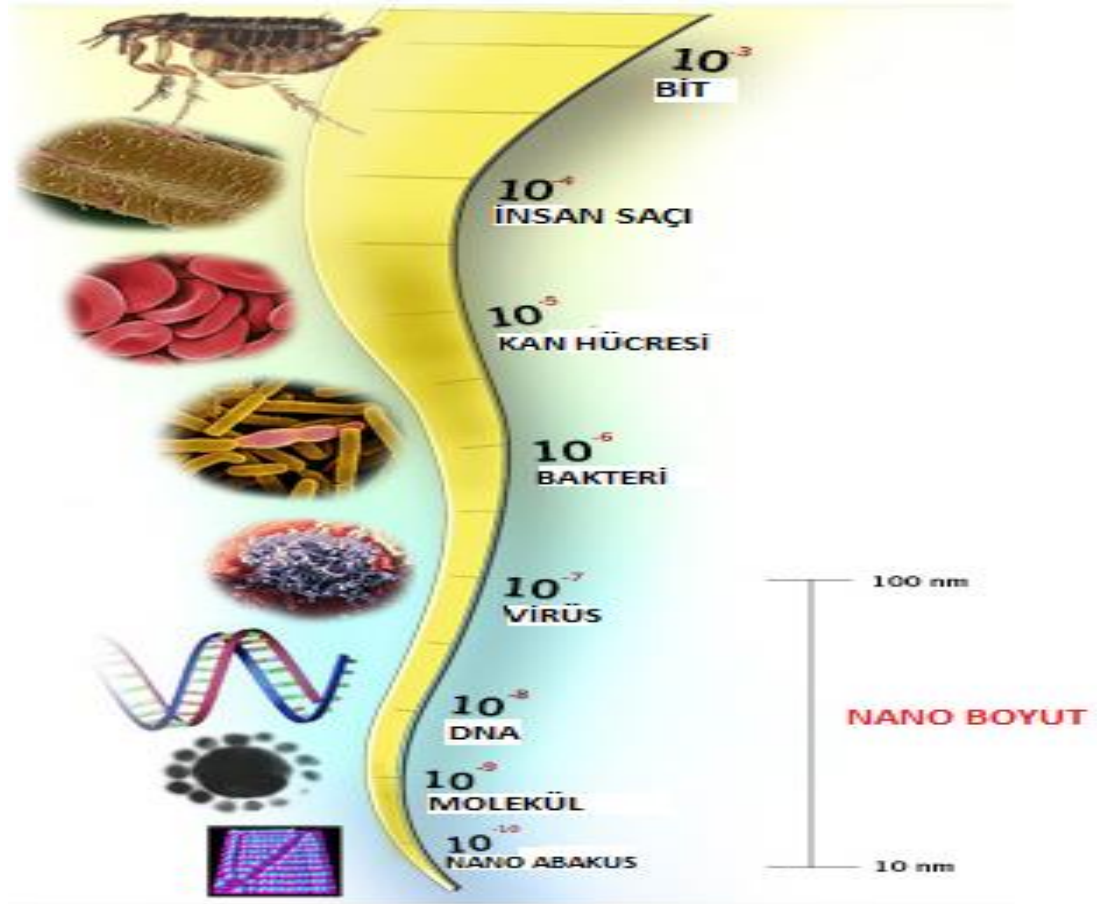
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. 2015’te Dünyada nanoteknoloji için ayrılan paradan pay alacak sektörler ..3	
Çizelge 3.1. Test edilen biyomalzemeler ve uygulanan konsantrasyonları26	26
Çizelge 3.2. Araştırma süresince kullanılan cihazlar27	27
Çizelge 4.1. <i>İn vitro</i> koşullarda alüminyum oksit bileşiğinin konsantrasyonlarına göre oluşturduğu KA değerlerinin istatistiksel dağılımı38	38
Çizelge 4.2. <i>İn vitro</i> koşullarda alüminyum oksit bileşiğinin konsantrasyonlara göre oluşturduğu MÇ/1000 hücre ve MÇ sayısına göre ÇÇH (çift çekirdekli hücre) dağılımı40	40
Çizelge 4.3. <i>İn vitro</i> koşullarda kalsiyum fosfat bileşiğinin konsantrasyonlarına göre oluşturduğu KA değerlerinin istatistiksel dağılımı43	43
Çizelge 4.4. <i>İn vitro</i> koşullarda kalsiyum fosfat bileşiğinin konsantrasyonlara göre oluşturduğu MÇ/1000 hücre ve MÇ sayısına göre ÇÇH (çift çekirdekli hücre) dağılımı46	46
Çizelge 4.5. <i>İn vitro</i> koşullarda çinko oksit bileşiğinin konsantrasyonlarına göre oluşturduğu KA değerlerinin istatistiksel dağılımı49	49
Çizelge 4.6. <i>İn vitro</i> koşullarda çinko oksit bileşiğinin konsantrasyonlara göre oluşturduğu MÇ/1000 hücre ve MÇ sayısına göre ÇÇH (çift çekirdekli hücre) dağılımı52	52

1. GİRİŞ

1.1. Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler

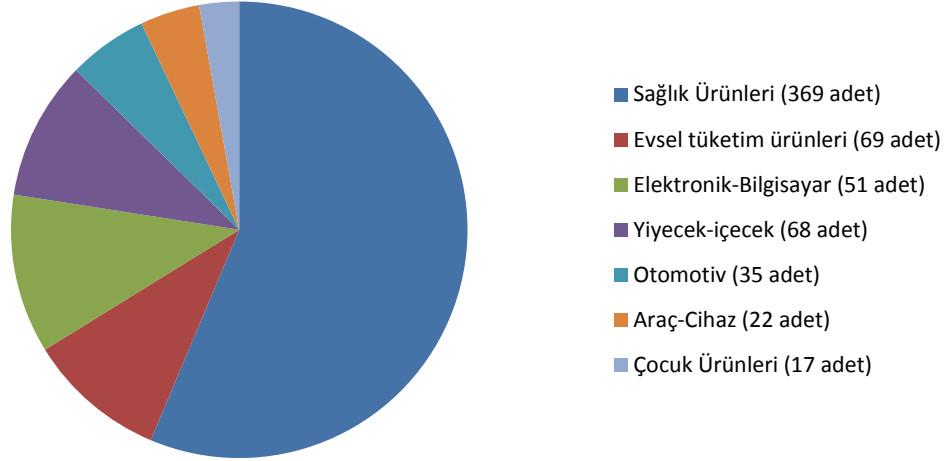
Ünlü fizikçi Richard Feynman'ın 1959 yılında malzeme ve cihazların moleküler boyutlarda üretilmesi üzerine yapmış olduğu “küçük boyutlarda yapılabilecek çok şey var” cümlesinin geçtiği konuşması nanoteknoloji disiplininin başlangıcı olarak kabul edilmektedir (Drexler 2004). “Nano” kelimesi Yunanca *nannos* kelimesinden türetilmiştir ve küçük yaşlı adam veya cüce anlamına gelmektedir. Nano bir uzunluk ölçüsü birimidir ve metrenin milyarda birini ifade eder (Şekil 1.1). Yeni sanayi ve teknoloji devrimi olarak nitelendirilen nanoteknoloji ise, yapı taşları olarak atom veya moleküllerin kullanımıyla insan yapımı 100 nm'den küçük yapıların işlevsel olarak tasarlanarak imal edilmesi şeklinde tanımlanmaktadır (Thrall 2004; Syed *et al.* 2013). 1981 yılında Binnig ve Rohrer tarafından geliştirilen ve atomların doğrudan görüntülenmesini sağlayan Taramalı Tünelleme Mikroskobu (STM) geliştirilmiştir. Bunu takip eden yıllarda STM'den türetilen Atomik Kuvvet Mikroskobunun (AFM) geliştirilmesi ile bilim dünyasına çok küçük boyutları görüntüleme ve bu boyutlara müdahale etme imkânı sunulmuştur. Bu gelişmeler sayesinde nano süreçleri, etkileşimleri, kimyasal reaksiyonları izleyerek atomları teker teker kontrollü bir şekilde istenen yerlere taşıyıp yapay malzemeler oluşturmak mümkün hale gelmiştir (Drexler 2004; Kocaefe 2007).



Şekil 1.1. Nanopartiküller ile bazı biyolojik yapıların karşılaştırıldığı uzunluk ölçeği (Anonim 2013)

Önemli ekonomik ve bilimsel etkileri olacağına inanılan nanoteknoloji sektörü, uzay mühendisliği ve nanoelektrik alanlarından çevre iyileştirme ve sağlık alanına kadar değişik disiplinlerle ilişki halindedir. Nanoteknoloji sayesinde mühendislik alanında kullanılan yeni nanomateryallerinin tasarımı ve geliştirilmesi yararlı fiziko-kimyasal özellikler sunduğu için endüstriye önemli bir temel oluşturmuştur. 2009 yılı itibariyle içerisinde nanopartikül bulunan yaklaşık 800 adet tüketim ürünü bulunduğu tahmin edilmektedir (Şekil 1.2). 2007 yılı içerisinde 147 milyon dolar pazar payı olan nanoteknoloji endüstrisinin bu payının 2015 yılı sonuna kadar 3.1 trilyon dolar seviyelerine çıkaracağı ön görülmektedir. Bu veriler göstermektedir ki içinde bulunduğumuz yüzyılda canlılar ve doğa sürekli artan dozlarda nanomateryallere maruz kalacaktır (Singh *et al.* 2009)

Ürün Kategorileri



Şekil 1.2. Nanopartikül içeren mevcut tüketici ürünleri. Ocak 2009 Woodrow Wilson veritabanından uyarlanmıştır (Singh *et al.* 2009).

Çizelge 1.1. 2015'te Dünyada nanoteknoloji için ayrılan paradan pay alacak sektörler (Ersan 2006)

Sektör	Pay (\$)
Malzeme Bilimi	340 Milyar
Elektronik	300 Milyar
Eczacılık	180 Milyar
Kimya&Petrol	100 Milyar
Uçak Sanayi	70 Milyar
Sağlık-Bakım-Kozmetik	30 Milyar
Cihaz-Aletler	20 Milyar
Üretim Teknikleri	45 Milyar
Toplam	~1 Trilyon Dolar

Nanoteknolojiye ayrılan paradan en büyük payı alacak olan sektör malzeme bilimidir (Çizelge 1.1). Bu bağlamda tamamen ekonomik açıdan bakıldığında bile malzeme bilimi içerisinde değerlendirilen biyomalzeme alanı için nanoteknolojinin önemi açık bir şekilde görülmektedir. Biyomalzemeler teşhis ve tedavi amaçlı tıp, cerrahi, diş hekimliği ve veteriner hekimliği uygulamalarında kullanılan bunun yanı sıra medikal implantların ve vücut dışı cihazların parçaları olarak tasarlanan çeşitli malzemeler olarak tanımlanır. Başka bir ifadeyle biyomalzemeler canlı sistemlerin bir kısmını

değiştirmek için kullanılan sentetik malzemelerdir (Park and Lakes 1992). Yine Park ve Lakes (1992)'e göre canlı dokularla temas içerisinde çalışabilecek veya canlı bir sistemin yerine kullanılabilen malzemelere biyomalzeme denir. Hastalıkların tedavisi anlamında son 30 yılda dikkatler biyomalzemeler üzerinde toplanmıştır. Biyomalzemelerin yaklaşık 8000 çeşit tıbbi cihazda kullanıldığı bilinmekle beraber (Ratner 2004) asıl ihtiyaç daha iyi polimer, seramik ve metal biyomalzemelerin geliştirilmesidir (Peppas and Langer 1994). Polimer biyomalzemeler diyaliz, vasküler greft ve yapay kalp uygulamalarında sıklıkla kullanılmalarına rağmen çeşitli komplikasyonları önleyecek fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip değildirler. Sentez tekniğinde ki son gelişmeler polimerik biyomalzemelere biyouyumluluk özelliğine sahip olma imkânını sunmaktadır. Nanoteknoloji tam da bu noktada devreye girmekte ve mikro boyutta uyumluluk sorunu yaşayan polimerik biyomalzemenin nano boyuta üretimi gerçekleştirilerek vücuda daha iyi entegre olması sağlanmaktadır. Sadece polimerler üzerinde değil seramik, metal ve kompozit biyomalzemeler için de benzer örnekler çoğaltılabilir. Kuşkusuz nano ölçekli bilim ve mühendislikteki ilerlemeler gelişmiş tanı ve tedavi yöntemlerine olanak sağlayacak tıp bilimi ve teknolojiye ivme kazandıracak potansiyele sahiptir (Hilt 2004).

Geniş kullanım alanı ile birlikte nanomalzemeler ve nanoteknoloji gün geçtikçe daha fazla dikkat çekmektedir. Mühendislik alanında kullanılan nanopartiküller yüksek seviyede yüzey enerjileri, yüksek manyetizma, geniş yüzey alanı ve düşük erime noktası gibi olağanüstü özellikleri sayesinde endüstride çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadırlar (Chibber *et al.* 2013). Nanoteknolojinin mühendislik malzemesi olan biyomalzemelere kazandırdığı birçok üstün özelliğin yanı sıra toksikolojik çalışmalar, nanobiyomalzemelerin sağlık açısından zararlı etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle canlı hücrelerde dâhil olmak üzere biyolojik sistemlerle nanomalzemelerin etkileşimi, malzeme bilimi ve biyolojinin en acil ortak çalışma alanlarından biri haline gelmiş (Nel *et al.* 2006; Medina *et al.* 2007) ayrıca nanomalzemelerin güvenliği dünya çapında ciddi bir sorun haline almıştır (Moore 2006; Handy *et al.* 2008).

1.2. Biyomalzemelerin Uygulama Alanları

Her ne kadar biyomalzeme alanındaki gelişmeler son otuz yılda ivme kazanmış olsa da, eski çağlarda dahi organ ve dokuların azalan aktivitelerini arttırmak için biyomalzemeler kullanılmıştır. Buna kanıt olarak Mısır mumyalarında bulunan yapay göz, burun ve dişler gösterilebilir (Park and Lakes 1992). Biyomalzemelerin gelişim süreci incelendiğinde genel anlamda üç dönemden bahsetmek mümkündür. Birinci dönem tahta ve fil dişi gibi metal olmayan malzemeler ile altın, gümüş ve bakır gibi metallerin yaygın olarak kullanıldığı 1850 yılı ve öncesidir. İkinci dönem, anestezinin keşfi ile cerrahi operasyon sırasında hastanın acı hissetmemesi ve buna bağlı olarak biyomalzemelere olan talebin arttığı 1850-1925 yılları arasındadır. Yine bu döneme rastlayan X ışınının keşfi ile hasarlı bölge ve ne tür bir hasarın olduğu net bir şekilde belirlenebilmiştir. Söz konusu dönemde bu iki önemli keşif sayesinde biyomalzeme alanında ciddi gelişmeler yaşanmıştır. En hızlı ilerlemenin olduğu dönem hiç kuşkusuz iki büyük Dünya savaşının da etkisiyle 1925 yılından günümüze kadar olan süreçtir. Son dönemde, günümüzde kullanılan biyomalzeme türleri şekillenmiştir (Yetim 2009).

Dünya nüfusunun yaklaşık %10'u vücudunun değişik yerleri için tıbbi bir tedaviye ihtiyaç duymaktadır. Engelli insanların yaşam kalitesini arttırmak ve bu kişilerin yaşamlarını olabildiğince normal insanların yaşamlarına yaklaştırmak için ortopedist ve mühendisler özellikle son 40 yıl içerisinde çeşitli biyomalzemeler geliştirmişlerdir (Gökçek 2006).

Hastalık, yaşlılık, spor yaralanmaları ve trafik kazaları neticesinde işlevini kısmen veya tamamen kaybeden omur, femur başı, diz eklemi gibi organlar ortopedistler tarafından değiştirilerek vücutta ömür boyu kalacak protezler takmaktadırlar. 1990 yılında yapılan Avrupa Topluluğu Biyomekanik Toplantısı'nda verilen rakamlara göre bir yılda İngiltere'de 45.000, Avrupa'da 250.000, Dünyada 500.000 femur başı implantı kullanılmaktadır. Aynı implantın resmi olmayan istatistiklere göre Türkiye'deki kullanım miktarı yılda 20.000 civarındadır (Akdoğan 1998).

Kemik plakalar iskelet sistemindeki kırıkların tedavisinde kullanılan ilk başarılı sentetik protezlerdir. 1950'li yıllarda kan damarlarının değişimi ve yapay kalp vanaları uygulamaları başlamıştır. Bu süreci 1960'lı yıllarda kalça protezlerinin geliştirilmesi ve başarılı bir şekilde uygulanması izlemiştir. Kalça protezlerinin yapımında, ilk olarak 1937'de diş hekimliğinde kullanılmaya başlanan Polimetilmetakrilat (PMMA) ve yüksek molekül ağırlıklı polietilen kullanılmıştır. Poliglikolikasit'den üretilen bozunur yapıdaki ameliyat ipliği ilk defa 1970'lerde üretilmiş ve kullanılmıştır. Sonuç olarak vücudun birçok hasarlı kısmının onarılması ve yenilenmesi için son yıllarda 40'dan fazla metal, seramik ve polimer malzeme kullanılmıştır (Pasinli 2004).

Biyomalzemeler, sadece vücut içerisinde değil, vücut dışına yerleştirilen ama vücutla etkileşim halindeki (ekstrakorporeal) cihazlarda, çeşitli ilaçlarda ve teşhis kitlerinde de geniş kullanım alanı bulmaktadır. Buna rağmen biyomalzemeler ile ilgili çözüm bekleyen birçok sorun vardır. Bu sorunların çözümü noktasında doku mühendisliğinden gen tedavisi alanına kadar birçok alanda farklı alternatifler araştırılmaktadır. Biyouyumluluğu yüksek biyomalzemelerin geliştirilmesi amacı ile özellikle nanoteknoloji, bilişim teknolojileri ve imalat yöntemlerindeki gelişmeler yakından takip edilmektedir (Gümüşderelioğlu 2002).

1.3. Biyomalzeme Çeşitleri ve Sınıflandırılması

Kırıkların tedavisinde, ilk kırık plağı 1900'lü yılların başlarında kullanılmıştır. Bu gelişme ortopedinin klinik bir disiplin olarak görülmeye başlamasını sağlamıştır (Ben-Nissan and Pezzotti 2004). Bu süreçte malzeme seçimi yüzeysel ve rastgele yapılmıştır. İlk başlarda nikel kaplı, yüksek karbonlu ve vanadyumlu çelikler kullanıldı. Kemiklerin sabitlenmesi için kullanılan içten tespit yönteminin (internal fiksasyon) giderek daha geniş uygulama alanı bulması iyi malzemelere olan gereksinimi arttırmıştır. Ortopedik implant cerrahisinin kemik ve eklem transplantasyonlarına doğru genişlemesi ve diğer endüstrilerdeki gelişmeler aynı zamana tekabül etti. Bu eşgüdümlü gelişmeler sonucunda 1950'lerde ortopedik implant üreticileri oldukça kısa bir sürede alaşım sistemlerinden istenen özelliklere sahip olanlarını değerlendirdiler ve paslanmaz çelik,

kobalt bazlı alaşımlar ve titanyum biyomalzeme olarak geniş kabul gördü. Sonraki süreçte daha iyi ya da yakın özelliklere sahip alaşımlar üretilmemiş sadece ısıl işlemler ve imalat teknolojisiyle ilgili iyileştirmelerle yetinilmiştir (Gökçek 2006).

Mühendislik malzemeleri metaller, seramikler ve polimerler olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılırlar. Genellikle bu sınıflandırmaya dördüncü grup olarak en az iki veya üç bileşenden oluşan (metal-seramik, metal-polimer, seramik-polimer gibi) kompozitler eklenir (Van Vlack 1989). Tıbbi uygulamalarda kullanılan malzemeler genel olarak sentetik ve biyolojik malzemeler olarak sınıflandırılır. Biyolojik malzemelerde kendi içlerinde yumuşak ve sert doku tipi olmak üzere iki alt grupta incelenir. Metaller, seramikler, polimerler ve kompozitler olarak sınıflandırılan malzemeler esas olarak sentetik biyomalzeme çeşitleridir (Tur 2009).

1.3.1. Metalik biyomalzemeler

Mekanik performansları açısından çok güvenilir olan metalik biyomalzemeler, yapay kalça eklemleri, kemik plakaları ve diş implantları gibi sert doku implantlarında ayrıca tıbbi cihazların imalat süreçlerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Özellikle paslanmaz çelikler, Co alaşımları, Ti ve alaşımları metalik biyomalzeme üretiminde tercih edilen metallerdir. Titanyum alaşımları üstün biyouyumluluğuğa sahiptirler. Bundan dolayı titanyumdan üretilen biyomalzeme çeşitlerinin araştırılması ve geliştirilmesi biyomalzeme alanında yakından takip edilmektedir (Niinomi 2008). Metalik biyomalzemelerin üstün mekanik özelliklere sahip olmaları mükemmel kristal yapıları ve yapılarında bulunan güçlü metalik bağlardan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle titanyum ve titanyum alaşımları, paslanmaz çelikler, altın ve kobalt gibi metal ve metal alaşımlarının biyomalzeme alanındaki katkıları çok büyüktür. Metalik biyomalzemeler, ortopedik uygulamalarda eklem protezi ve kemik yenileme malzemesi olarak kullanılabilirler gibi yüz-çene cerrahisinde ve kalp-damar cerrahisinde yapay kalp parçaları, kateter ve vana olarak da kullanılmaktadırlar. Ayrıca teşhis ve tedavi amaçlı kullanılan biyomedikal cihazların metalik parçalarının üretiminde de metalik biyomalzemeler tercih edilmektedirler (Park and Kim 2000; Gümüşderelioğlu 2002).

Vanadyum çeliği insan vücudunda kullanılmak üzere geliştirilen ilk metaldir ve kemik kırıklarında plaka ve vida olarak kullanılmıştır. Demir, krom, kobalt, nikel, titanyum, tantal, molibden, niobyum ve tungsten gibi protez üretiminde kullanılan çok sayıda metal, düşük konsantrasyonlarda olmak koşuluyla canlı vücuduna uygunluk göstermektedir. Nitekim vücut içerisinde fazla miktarda bulunması zararlı olan bu metaller, hücrelerin doğal metabolizma faaliyetleri sırasında da oluşabilmektedir. (Ergün 2010).

16. yüzyıl ortalarında çatlak damak tedavisi için altın plaka kullanımı ile metalik implant uygulamasının başladığı düşünülmektedir. 19. yüzyılın başlarında demir, altın, gümüş, kurşun, bronz ve platin gibi metalik biyomalzemeler çatlak kemiklerin tedavisi için çivi ve tel halinde kullanılmaya başlanmıştır. Paslanmaz çelikler, Co-Cr-Mo içeren alaşımlar, titanyum ve alaşımları yük taşıyıcı olarak geniş kullanım alanına sahip metalik implant malzemelerdir (Somunkıran 2006). Metalik biyomalzemeler *in vivo* koşullarda aşınma, korozyon ve metal salınımı gibi olumsuz özelliklere sahip olması nedeniyle bu biyomalzemelerin biyouyumlulukları dikkate alınması gereken bir konudur (Yoo *et al.* 2007). Nitekim korozyon ve aşınma sonucu zayıflayan implanttan kopan parçaların çevre doku ve organlar üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinmektedir (Mudali *et al.* 2003). Metalik biyomalzemeler çelikler, titanyum ve titanyum alaşımları olmak üzere 3 grupta incelenebilir.

Paslanmaz çelikler: İmplant üretimi için kullanılan ilk paslanmaz çelik modern sınıflandırmada Tip 302 olarak bilinen 18-8 paslanmaz çeliğidir. Tip 302 paslanmaz çeliği, vanadyum çeliğinden daha güçlü ve korozyon dayanımı daha yüksektir. *İn vivo* koşullarda korozyon direnci yetersiz olduğu için vanadyum çeliği çok uzun süre kullanılmamıştır. Sonra ki uygulamalarda 18-8sMo paslanmaz çeliğinin Mo yüzdesi artırılarak tuzlu su çözeltilerinde korozyona karşı direnç kazanması sağlanmıştır. Bu alaşım Tip 316 paslanmaz çeliği olarak bilinir. 1950'li yıllarda Tip 316 paslanmaz çeliğinin karbon içeriği %0.08'den %0.03'e düşürülerek tuzlu çözeltilere karşı korozyon direnci daha da arttırılmıştır ki bu süreçten sonra söz konusu çelik Tip 316L paslanmaz çeliği olarak adlandırılmıştır. Paslanmaz çeliklere korozyon direnci sağlayan bir diğer

etmen olan krom %11 oranında paslanmaz çeliklerde bulunmaktadır (Park and Kim 2000). Paslanmaz çeliklerde stabiliteyi artırmak için %12-14 oranında nikel kullanılmaktadır. Bu durum paslanmaz çeliğin Ni alerjisine sebep olma potansiyelini arttırmaktadır. Son zamanlarda başlangıç maddesi olarak ferritik paslanmaz çelik kullanarak nikel ve mangan içermeyen yüksek oranda azot ihtiva eden yeni paslanmaz çelik üretimi çalışmaları yoğunlaşmıştır (Kuroda *et al.* 2006; Niinomi 2008).

Titanyum ve alaşımları: İmplant üretiminde titanyumun hammadde olarak kullanılması 1930'lu yılların sonlarında başlamıştır. 1940'lı yılların sonlarına doğru ise titanyum alaşımları üretilmiş ve implant malzemesi olarak yaygın olarak kullanılmıştır. Mevcut titanyum alaşımları içerisinde en yaygın kullanım alanına sahip olan Ti-6Al-4V alaşımıdır (Allen 1996). Titanyum alaşımı vanadyum (V), molibden (Mo) ve niobiyum (Nb) gibi elementlerin karıştırılması sonucu elde edilmektedir. Bazı titanyum alaşımları 550°C-700°C gibi yüksek sıcaklıklarda bile performans kaybına uğramamaktadırlar. Buna ek olarak titanyum ve alaşımları düşük yoğunluk, kırılma ve yorulma dayanımı, yüksek korozyon direnci gibi özelliklere sahiptirler (Ivasyshyn and Aleksandrov 2008; Chunxiang *et al.* 2011). Titanyum ve titanyum alaşımları gerek mekanik gerekse biyouyumluluk özellikleri bakımından paslanmaz çelik gibi birçok metalik biyomalzemedan daha üstün özelliklere sahiptir. Nitekim kalp ve kardiyovasküler uygulamalardan, ortopedik ve dental uygulamalara kadar pek çok biyomedikal süreçte sıklıkla tercih edilmektedirler (Cui *et al.* 2003).

Kobalt-krom alaşımları: Kobalt alaşımlarının biyomedikal uygulamalardaki en bilinen örneği kobalt ve krom bazlı alaşımlardır. Bu alaşımların paslanmaz çeliklere ve titanyum alaşımlarına göre aşınma dirençleri daha yüksektir. Bu nedenle sürekli sürtünmeye maruz kalan tıbbi cihazların parçalarının üretimi ve kalça eklem başları gibi implantların üretiminde kullanılırlar. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan Co alaşımları döküm ve dövme alaşımları olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Yüksek dayanım özelliğine sahip olan implantlarda, dövme kobalt-krom alaşımlarının kullanımı döküm alaşımlarına göre daha yaygındır (Niinomi 2002). Söz konusu alaşımlar dökülebilirlik ve işlenebilirliğini geliştirmek için önemli miktarlarda nikel

içermektedirler. Özellikle dövme Co-Cr bazlı alaşımlarda nikel oranı daha yüksektir. Bu nedenle dövme alaşımlarının kullanımı nikel alerjisi riskini artırmaktadır. Co-28Cr-6Mo nikel içermeyen dövme alaşımlardan biridir ve döküm Co-Cr-Mo alaşımının özel termomekanik işlemlerden geçirilmesiyle geliştirilmiştir (Berlin *et al.* 1999).

1.3.2. Seramik biyomalzemeler

Biyouyumlulukları yüksek olan seramik biyomalzemeler, homojen kolay uygulanabilir olmaları, az ekipman gereksinimi, kolay şekillenebilirlikleri, toksik madde içermemeleri, immün sistemde olumsuz reaksiyon oluşturmamaları (non immünojenik), kanserojen ve tahriş edici olmamaları nedeniyle biyomedikal uygulamalarda tercih edilen biyomalzemelerdir (Billotte 2006). Biyoseramikler dokuya cevap vermelerine göre biyoinert (alümina, zirkonya), biyoaktif (Hidroksiapatit-HA ve biyocam) ve biyoçözünür (tri kalsiyum fosfat-TCP) seramikler olmak üzere üç gruba ayrılırlar (Hench 1991).

Yüksek derecede biyouyumluluğa sahip olan Alümina (Al_2O_3) klinik olarak ilk defa 1970'de kullanılmıştır. Korozyon ve yorulma direncinin iyi olması ve yapısının sert olması nedeniyle birçok alanda özellikle tercih edilmektedir. Zirkonya (ZrO_2) ise 1985'den beri gerek saf olarak gerekse yitriya ile kararlı halde ortopedik implantların üretim süreçlerinde kullanılmıştır. Kırılma dayanımı olarak zirkonya alüminadan daha üstün özelliklere sahiptir. Alümina ve zirkonya sağlam yapılarından dolayı genellikle kalça bağlantılarının femoral başlarında kullanılmaktadır. Biyoinert olan bu biyomalzemeler termodinamik olarak kararlı oldukları için çevre dokular ile kimyasal ve biyolojik anlamda herhangi bir reaksiyona girmezler (Hulbert *et al.* 1993).

Kemik doku nakli altlığı olarak kullanılan biyoaktif seramikler hidroksiapatit ve biyocam genellikle biyokompozit ve metalik biyomalzemelerin yüzeylerini kaplamak için kullanılırlar. Dokularla kuvvetli ara yüzeyde bağlanma ve etkileşim biyoaktifliğine ayrıca çok az biyoçözünürlüğe sahip olan hidroksiapatit, doku-implant arasında yüzeysel ve yapısal bağlantı (osteointegrasyon) sağlanma yeteneğindedir. Biyoçözünür

seramiklerden olan TCP genellikle kemik doku nakillerinde kullanılmaktadır. Biyomalzemenin çözümlü olması yeni kemik dokusunun gelişmesi için iskeleti oluşturmasına imkân sağlar ve tamamen çözüldükten sonra yerini yeni kemik dokusuna bırakarak işlevini tamamlamış olur. Zayıf mekanik özelliklere (kırılganlık, düşük sertlik) sahip olması nedeniyle taşıyıcı ortopedik uygulamalarında çok az kullanılan TPC'nin çözünme oranı önceden tahmin edilememektedir (Billotte 2006).

1.3.3. Polimer biyomalzemeler

Günlük hayatta genişleyen uygulama alanına sahip olan polimerler uzun organik molekül zincirlerinden oluşurlar (Bhattacharya 2000). Polimerler biyomalzemeler iyi biyoyumlulukları, esnek yapıları, fonksiyonel gruplardan elde edilebilir olmaları, yüzey değişkenlikleri, hafif oluşları ve doğal yumuşaklıkları sayesinde implant üretiminde çok sık tercih edilen biyomalzemelerdir (Hollinger *et al.* 1996, Pachence *et al.* 2000). Bazı polimerler vücut pH'nda çözülebilirlik dereceleri azaltılarak biyomedikal uygulamalara uygun hale getirilir. 1937'de klinik olarak kullanılmaya başlanan polimetilmetakrilat (PMMA) ilk sentetik polimerdir. Polimerler biyolojik olarak parçalanabilen (biodegradable) ve parçalanamayan (non-biodegradable) polimerler olmak üzere iki grupta incelenebilir. Parçalanabilen polimerlere örnek olarak kollajen, jelatin, polilaktikasit (PLA) ve polilaktikglikolik asit (PLGA) verilebilir. Polietilen (PE), polietilenteraftalat (PET) ve PMMA parçalanamayan polimerlerdendir (Murugan and Ramakrishna 2005).

Çok değişik bileşimlerde ve şekillerde (lif, film, levha, jel, boncuk, elyaf) üretilebilen polimerler başta kardiyovasküler uygulamalar olmak üzere birçok biyomedikal süreçte yaygın kullanım alanına sahiptirler. Polimetilmetakrilat (PMMA), poliüretan (PU), polilaktikasit (PLA), polietilen (PE), metilmetaakrilat (MMA), politetrafloroetilen (PTFE), poliasetal (PA), polietilenteraftalat (PET), silikon kauçuk (SR), Polietherekon (PEEK), polisülfon (PS), ve poliglikolik asit (PGA) polimer biyomalzemelere örnek olarak verilebilir (Lee *et al.* 2006).

1.3.4. Kompozit biyomalzemeler

Kompozit malzemeler farklı kimyasal yapıda iki ya da daha fazla bileşen veya faz içeren katı malzemeler olarak tanımlanır. Kompozitler homojen malzemelerle karşılaştırıldıklarında birçok üstün özelliğe sahiptir. Örneğin yapısal uyumluluk açısından kompozitler homojen biyomalzemelere oranla daha güçlüdürler. Çünkü kompozit malzeme kendisini oluşturan bileşenlerden birinin tek başına sahip olmadığı özellikler sergilemektedir. Bu durum bilim adamları ve mühendislere materyalin özellikleri üzererinde önemli bir kontrol yeteneği kazandırmaktadır. Dayanımlarının yüksek olması ve esneme kabiliyetlerinin düşük olmasından dolayı özellikle ortopedik ve dental uygulamalar için oldukça uygundur. Kompozitin biyomalzemelerin özellikleri değiştirilerek, implantın vücuttaki kullanım yerine göre mekanik ve fizyolojik koşullara daha iyi adapte olması sağlanabilir (Katz 1980; Lakes 1993).

1.4. Biyomalzemeler ve Biyouyumluluk

Biyoyumluluk teşhis veya tedavi amaçlı kullanılan malzemenin vücutta istenmeyen lokal veya sistemik olumsuzluklara yol açmaması olarak tanımlanmaktadır (Williams 2008). Biyoyumluluk terimi daha geniş anlamda biyomalzemenin yapısal ve yüzey uyumluluğudur. Yüzey uyumluluğu, bir biyomalzemenin vücut dokularına fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak sağladığı uyumdur. Yapısal uyumluluk ise malzemenin vücut doku ve organlarının mekanik davranışlarıyla uyumluluğunu ifade eder (Wintermantel *et al.* 1996).

Biyomalzemelerin biyoyumlulukları ile ilgili olan diğer bir kriter korozyondur. Korozyon metallerin vücut sıvıları ile kimyasal reaksiyona girmesi ve oksijen, hidroksit gibi bileşikler oluşturarak bozunmasıdır. İnsan vücudunda protein, oksijen, klorür ve hidroksit gibi çeşitli organik ve inorganik maddeler bulunmaktadır. Bu yüzden insan vücudu metal biyomalzemeler için oldukça korozif bir ortamdır. Dolayısıyla biyomalzeme korozyona uğrayarak zayıflar ve korozyon ürünleri doku içerisine girerek hücrelere zarar verir. Bu nedenle metal protezlerin *in vivo* koşullarda kullanılmadan

önce serum, tükürük ve kan gibi temas edebileceği çözeltiler içinde test edilmeleri gerekmektedir (Van Noort 1987; Browne and Gregson 1993). Ayrıca korozyon sonucu vücutta kaşıntı, kızarıklık, iltihaplanma, fibroz doku oluşumu gibi istenmeyen rahatsızlıklar ortaya çıkabilmektedir (Black and Hastings 1998; Helsen and Breme 1998).

Biyomalzemelerin kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan sorunlar;

- Pıhtılaşma,
- Korozyon,
- Kireçlenme,
- İltihaplanma,
- Hücre zehirlenmesi,
- Kan ile uyumsuzluk,
- Mekanik özelliklerde kısıtlanma (esneklik, hafiflik, dayanım, yorulma, ömür),
- Ekonomiklik,
- Hammadde sıkıntısı,
- Cerrahi olarak tatbik edilebilirlik, uygulanabilirlik,
- Tasarım, şekillendirilebilirlik, üretim,
- Onarılabilirlik ve onarım koşulları'dır (Yetim 2009).

Kuşkusuz son 15 yıl içinde ortopedi ve implantolojide meydana gelen gelişmeler içerisinde en önemlisi implantolojideki gelişmelerdir. İmplant olarak kullanılan malzemeler vücut içerisinde farklı koşullarda çalışmaktadırlar. Bu nedenle implantın performansını kullanılan malzemenin özellikleri, implantın dizaynı ve fiksasyon metodu belirlemektedir. Bu nedenle son zamanlarda üzerinde en fazla durulan konular biyomalzeme olarak kullanılacak malzemenin mukavemeti, yorulması, yüzey korozyonu, dokulara karşı alerjik reaksiyon özellikleri ve biyolojik uyumluluğudur (Sarsılmaz 2000).

Tıpta kullanılan implant malzemeler önceden yüzeyleri kaplanmadan doğrudan kullanılmaktaydı. Buna bağlı olarak vücudun implanta uyum süresini uzatmakta ve iltihap, implant bölgesinde renk değişikliği gibi problemler yaşanmaktaydı. Bu sorunları aşmak için çalışmalar implantın vücut içinde kalma süresini uzatmak, vücut dokuları ile bağ yapabilme ve uyumluğunu artırma konularına yoğunlaşmıştır. İmplant malzeme ile kemik arasındaki bağlantı yüzeyindeki zayıflık nedeniyle implant-kemik arasında boşluklar oluşmakta buda zayıf ara yüzey bağlantısına yol açmaktadır. Sonuç olarak dokular hasar görmekte ve iltihap nedeniyle implant ret edilmektedir (Gümüşderelioğlu 2002).

Protez olarak kullanılacak malzemelerin yüzeylerinin kaplanması malzemenin aşınmaya, korozyona, oksidasyona, erozyona ve bakteriyel kolonizasyona karşı dayanıklı olmasını sağlamaktadır (Ibrahim and Hamdy 2011; Kose *et al.* 2013). Biyomalzemelerin biyoyuyumluluk kriterlerinden biri de toksik özellik göstermemesidir. Polimerik biyomalzemelerin sentez aşamalarında çeşitli katkı maddeleri kullanılır ve bu maddeler polimerik ağ yapısından dışarıya salgılanarak ortamdaki hücreler üzerinde toksisiteye neden olur. Bu nedenle biyomedikal uygulamalarda kullanılacak olan biyomalzemelerin toksik özelliklerinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda söz konusu biyomalzemelerin vücut sıvıları içerisinde *in vivo* ve *in vitro* olarak çeşitli test yöntemleriyle sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması gerekmektedir (Ratner 2004).

1.5. Kullanılan Test Yöntemleri

Tez kapsamında kullanılan biyomateryallerin toksik etkilerinin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan, güvenilirliği kanıtlanmış kromozom aberasyon ve mikroçekirdek testleri kullanılmıştır.

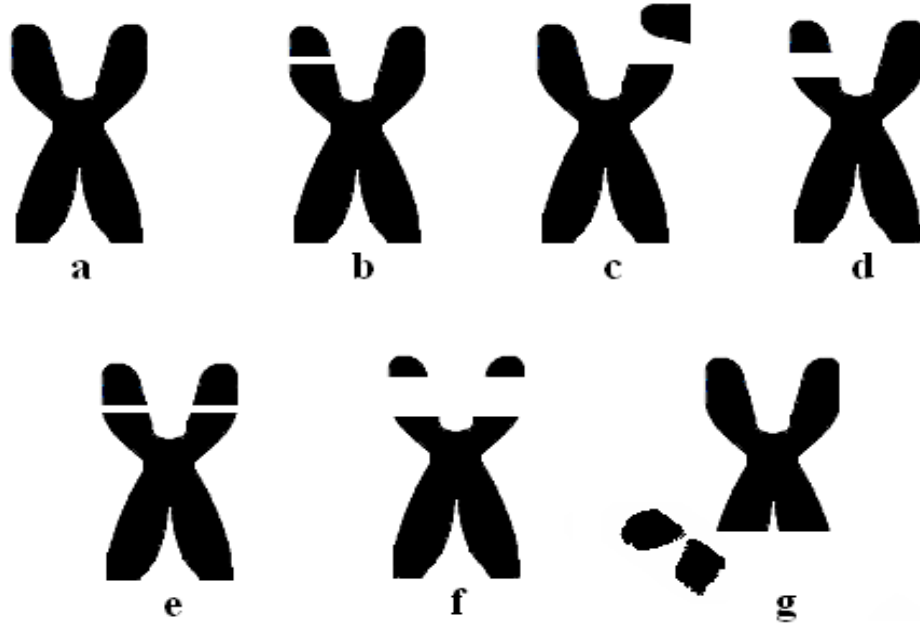
1.5.1. Kromozom aberasyon testi (KA)

De Vries ilk olarak 1918 yılında *Oenothera*'da translokasyon tipi anormalliklerin varlığını saptayarak, kromozom yapısında değişikliklerin oluşabileceğini göstermiştir. Daha sonra Morgan 1922'de ve Bridges 1923'te *Drosophila*'da translokasyon ve inversiyon tipi anormalliklerin olduğunu gözlemişlerdir. *Drosophila* tükrük bezi kromozomlarında ve mısır pakiten kromozomlarında delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyon gibi kararlı aberasyonların kendiliğinden oluştuğu ortaya konmuştur. McClintock'un 1942 yılında mısır bitkisinde yaptığı genetik çalışmalar neticesinde disentrik ve sentrik halka oluşumu gibi kararsız aberasyonların genetik materyalin kırılması, birleşmesi ve köprü oluşumu sonucunda meydana geldiğini saptamıştır. Genotoksik kimyasallar ve iyonize radyasyona maruz kalmış insanlarda, kromozom aberasyonu önemli bir toksisite göstergesi olarak kabul edilmiştir (Natarajan 2002). KA test sistemi ile anöploidi ve poliploidi gibi sayısal kromozom mutasyonları ile kromozom/kromatid tipi kırılmalar ve anormal birleşmeler saptanabilmektedir. 70'li yıllardan bu yana klastojenik etkinin araştırılmasında bu test yöntemi yaygın biçimde kullanılmaktadır (Ayaz 2001).

Kromozomların eşlenmesi (replikasyon) sentez fazı (S fazı) sırasında olur. Replikasyon sırasında DNA molekülleri tamamen açılır. Bu nedenle S fazında DNA molekülleri metafaz kromozomları veya interfaz kromatinin fibrilli yapısına göre çok büyüktürler. Nitekim Du Praw (1970) insanın 1. kromozomunun 7.5 cm uzunluğunda DNA molekülü içerdiğini yaptığı hesaplamalarla göstermiştir. Bu DNA molekülü metafaz'da yaklaşık 10 µm uzunluğunda iken interfaz da 1350 µm fibriller yapıdadır. Dolayısı ile bu DNA molekülleri, çok büyük boyutları nedeniyle hem interfaz evresinde hem de S evresinde mutasyonlara neden olan fiziksel ve kimyasal ajanların açık hedefleridir. Mikroskopta görülebilen yapısal kromozom aberasyonları oluşacak DNA hasarı neticesinde gözlemlenir (Obe *et al.* 2002).

Yapısal kromozom aberasyonları, aberasyonun kromozomun bir kromatidde veya her iki kromatidde görülmesine bağlı olarak iki gruba ayrılır. Eğer aberasyon tek bir

kromatidde görülüyorsa buna kromatid tip, her iki kromatidde de görülüyorsa kromozom tip aberasyon denir (Şekil 1.3). Bu aberasyon tipleri mutajen uygulamasının yapıldığı hücre siklusu safhasına ve kullanılan mutajenik ajanın tipine bağlıdır (Muranlı 2006).



Şekil 1.3. Başlıca kromozomal aberasyon türleri

a) normal kromozom, b) kromatid gap, c-d) kromatid kırığı, e) kromozom gap, f-g) kromozom kırığı (Türkez 2007)

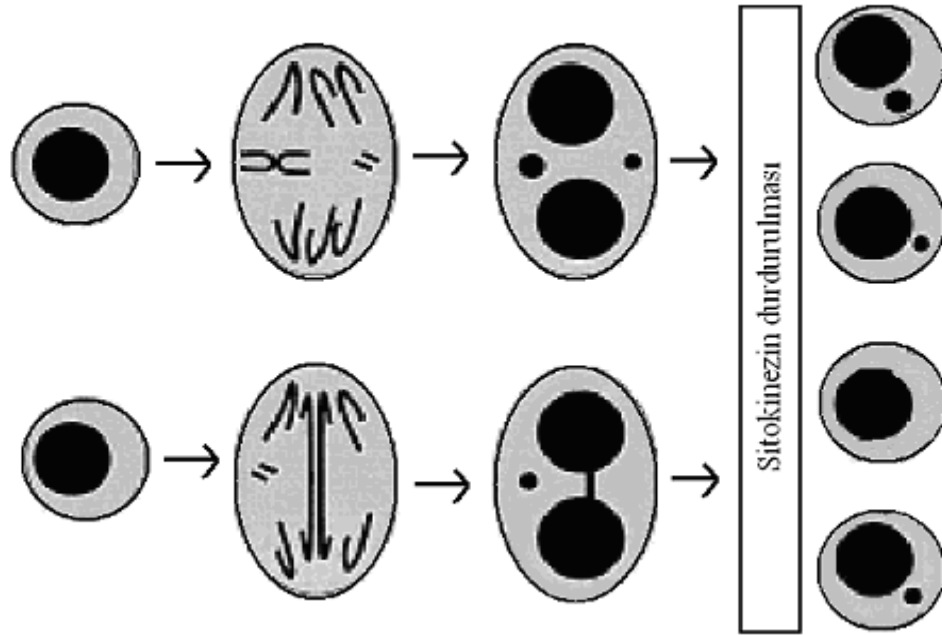
Kromozom aberasyon testide mikroskobik gözlemler yapılırken;

- Metafaz hücrelerinin 46 kromozom içermesine,
- Kromozomların iyi boyanmış ve kollarının birbirinden ayrılmış olmasına,
- Kromozomların etrafa yayılmamış olmasına,
- Üst üste gelmiş kromozomların değerlendirilmemesine,
- Aberasyonların tek tek kaydedilmesine dikkat edilmelidir (Hatayoğlu 2004).

1.5.2. Mikroçekirdek testi (MÇ)

Mikroçekirdek testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom anormalliklerinin belirlenmesinde, 1970'lerde ise hayvan hücrelerinde (Widel *et al.* 2001; Jagetia *et al.* 2001) ve daha sonraki yıllarda kültüre edilmiş insan lenfositlerinde mutajen maddeleri belirlemeye yönelik (Schmidt 1975) bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonraları ise mikroçekirdeklerin aslında iğ ipliklerinin işlevlerini yerine getirememesi sonucunda oluştuğu fark edilmiştir (Yamamoto and Kikuchi 1980). Fenech ve Morley (1985,1986) tarafından geliştirilen Sitokinezi-Blok Metodu ile bazı kinetik problemlerin ortadan kalkması sağlanarak teknik uygulamadaki güvenilirlik artırılmıştır. Daha sonra ise mikroçekirdek testleri yapısal ve sayısal kromozom aberasyonlarının tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Mikroçekirdek testlerinin uygulanmasının kolay olması ve bunun yanı sıra klastojenik veya anojenik kirleticilerin etkilerinin çalışılmasında moleküler yaklaşıma izin vermesi gibi avantajları vardır. Bu sebeple de bu test sistemi günümüzde sitogenetik zararın tanımlanmasında geniş çapta kullanılan bir parametre haline gelmiştir (Pavlica *et al.* 2000).

Mikroçekirdek oluşumunu tetikleyen etmen kimyasal ajanlara veya radyasyona maruz kalma durumudur. Bölünen hücrelerde sentromersiz kromozom kırıkları ve/veya kutuplara çekilme işlemi sırasında iğ ipliklerine tutunamadığı için kutuplara çekilememiş tüm bir kromozom mikronükleusların oluşumuna neden olabilir. Bu sebeple mikronükleusların kromozom kırıklarını ve kromozom kayıplarını belirlemek için güvenilir ve kullanışlı bir gösterge olduğu düşünülmektedir. Geri kalmış kromozomun ya da sentromersiz kromozom parçasının etrafında telofaz evresinde nüklear bir zar oluşur. Bu yüzden mikronükleusların sitoplazmada gözlemlenebilmesi zor değildir (Şekil 1.4). Çekirdek bölünmesi tamamlanmış fakat henüz sitoplazma bölünmesi geçirmemiş binüklear (çift çekirdekli) hücrelerde mikronükleusların en ideal skorlanması yapılıdır (Fenech 2000; Joksış 2004).



Şekil 1.4. Mikroçekirdek oluşum mekanizması

Mikroçekirdek sayma esasları Heddle and Countryman (1976)'ın kriterlerine göre belirlenmiştir. Bunlar;

- Mikroçekirdek çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması,
- Boya alma yoğunluğu esas çekirdek ile aynı olması,
- Sadece sitokinezi bloke edilmiş ve çift çekirdekli hücrelerdeki mikroçekirdeklerin sayılmasıdır.

1.6. Tez Çalışmasında Kullanılan Biyomalzemeler

1.6.1. Alüminyum oksit (Al_2O_3) nanopartikülleri

Alüminyum nanopartikülleri endüstriyel, evsel ve medikal ürünlerden savunma sanayisine kadar geniş kullanım alanına sahiptir (Di Virgilio *et al.* 2010). Farklı boyutlardaki alüminyum nanopartikülleri, nanotıp alanında kullanılan ilaç dağıtım

sistemlerinde çözünürlüğü arttırmak için kullanılmaktadır. 2005 yılı itibari ile Dünya nanopartikül pazarının yaklaşık %20'ne sahip olacağı tahmin edilen alüminyum oksit en bol üretilen nanopartiküldür (Rittner 2002).

Seramik bir biyomalzeme olan ve alümina olarak da bilinen alüminyum oksit yüksek yoğunluk ve saflığa (>%99.5) sahiptir. Ayrıca alüminanın yüksek dayanıklılık özelliği, korozyon direnci ve iyi biyouyumluluk özellikleri vardır. Bu sebeple de kalça protezlerinde ve diş implantlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Protezlerde ve diş implantlarında kullanılan alümina nanopartikülleri, iri tane yapısına sahip polikristalin alfa- Al_2O_3 'ün 1600-1700°C sıcaklıkta sinterlenmesiyle üretilir. 20 yılı aşkın süredir ortopedik uygulamalarda kullanılan ve yüksek saflığı olan alüminanın temel kaynağı boksit ve korendondur. Doğal alümina safir veya ruby olarak da bilinmektedir. İmplant türlerinin %99.5 saflıkta ve %0.1'den az SiO_2 ve alkali oksitler içermesi gereklidir. α alümina rombohedral kristal yapıya ($a=4.758$ ve $c=12.991$ Å) sahiptir (Kawahara 1989; Parker and Bajpai 1993). Alüminyum oksit *in vivo* koşullarda kimyasal reaksiyonları etkilemeyen (tepkimeye girmeyen) bir biyomalzemedir (Park and Lakes 1992). *Rhesus* maymunları üzerinde yürütülen *in vivo* çalışmada kemik dokudaki alüminanın yaklaşık 350 gün boyunca toksik etki göstermediği ve herhangi bir reddetme işaretine rastlanmadığı bildirilmiştir (Henrich *et al.* 1971; Graves *et al.* 1972).

1.6.2. Kalsiyum fosfat [$Ca_3(PO_4)_2$] nanopartikülleri

Kalsiyum fosfat seramikleri yaygın şekilde kemik doku onarımı ve güçlendirilmesinde kullanılan, işlenebilir biyo-çözünür madde sınıfına aittir (Dorozhkin and Epple 2002). Bu biyomateryaller yüzey özellikleri sebebiyle osteoblast yapışma/çoğalması ve yeni kemik oluşumuna (osteoadüksiyon) yardımcı olurlar (Albrektsson and Johansson 2001; Lee *et al.* 2006). Daha da önemlisi bu moleküllerin *in vivo* koşullarda kemik gelişimini desteklediği (Mastrogiacomo *et al.* 2006) ve kemik iliği stromal hücrelerini kuvvetlendirdiği görülmüştür (Song *et al.* 2013). Fakat tüm kalsiyum fosfat türleri *in vivo* koşullarda aynı biyolojik etkiye sahip olmayabilir. Nitekim birçok kalsiyum fosfat

çeşidi vücut içerisinde kemik gelişimini indüklerken (osteoindüktif) bazı çeşitleri ise kemik gelişimini etkilemez (LeGeros 2008).

Kalsiyum fosfat seramikleri kalsiyum ve fosfat atomlarının çoklu oksitleri şeklindeki yapılarıdır. Örnek olarak hidroksiapatit [$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$], trikalsiyum fosfat [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] ve oktakalsiyum fosfat [$\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_6 \cdot 2\text{OH}$] verilebilir. Yaklaşık 20 yıldan beri tıpta ve dişçilikte kalsiyum fosfat bazlı biyoseramikler kullanılmaktadır. Bu malzemeler “kemik tozu” olarak ortopedik kaplamalar ve diş implantlarında, yüz kemiklerinde, kulak kemiklerinde, kalça ve diz protezlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum fosfat seramikleri 1000-1500°C sinterlendikten sonra istenilen geometride sıkıştırılırlar. Değişen hızlarda tüm kalsiyum fosfat seramikleri biyolojik bozunmaya uğrarlar (Pasinli 2004).

1.6.3. Çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri

Çinko 300 den fazla enzimin fonksiyonu, hücre büyümesi, DNA sentezi, RNA transkripsiyonu, hücre bölünmesi ve hücre aktivasyonu için gerekli olan temel eser elementtir (Stefanidou *et al.* 2006; John *et al.* 2010). Ayrıca bu element memelilerde en çok bulunan geçiş metallerindendir. İnsan popülasyonlarında yaygın olarak görülen çinko eksikliği büyümede, sinir hücresi gelişiminde ve bağışıklık sistemi fonksiyonları üzerinde zararlı etkilere neden olmaktadır (Tapiero and Tew 2003; Plum *et al.* 2010). ZnO nanopartikülleri nanomateryal ailesinin en önemli üyelerindendir (Wang 2008). Günümüzde kullanılan mühendislik malzemeleri arasında çinko oksit, tüketim ürünlerinde en yaygın kullanıma sahiptir. ZnO nanopartiküllerinin mühendislik malzemelerinin yanı sıra tekstil, tıbbi tanı, boya, nanoelektronik ve biyomedikal uygulamalar gibi kullanım alanları da vardır. Kozmetik ve güneş kremlerinde ise UV ışınlarını emme özelliğinden dolayı tercih edilmektedir (Schilling *et al.* 2010). Diş macunu, gıda ambalaj malzemesi ve katkı maddesi olarak da antibakteriyel özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır (Gerloff *et al.* 2009; Jin *et al.* 2009; Musee *et al.* 2011; Tankhiwale and Bajpai 2012). Biyoteknoloji ve nonotıp alanında geliştirilmeye başlanan kanser tedavi ve ilaç dağıtım uygulamalarında çinko oksit içeren biosensörler

ve biyomedikal nanopartiküller kullanılmaktadır. Kullanım alanının giderek yaygınlaşmasına paralel olarak güvenlik endişeleri artmaya başlamış ve ZnO nanopartiküllerinin muhtemel toksik etkileri ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (Rasmussen *et al.* 2010; Anish *et al.* 2011).

Yapılan çalışmanın amacı biyomedikal uygulamalarda kullanılacak Alüminyum oksit (Alümina- Al_2O_3), Kalsiyum fosfat ($Ca_3(PO_4)_2$) ve Çinko oksit (ZnO) nanomateryallerinin muhtemel genotoksik etkilerini belirlemektir. Yöntem olarak insan periferik kan kültürlerinde *in vitro* Kromozom Aberasyon (KA) ve Mikroçekirdek (MÇ) test yöntemleri seçilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son yıllarda nanoteknolojide ki gelişmeler birçok disiplini etkilediği gibi biyomalzeme alanında da yeni gelişmelere yol açmıştır. Bu nedenle nano boyutlarda biyomalzeme üretimi ve bu malzemelerin toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar hız kazanmıştır. Nanotoksikoloji alanında ulusal ve uluslararası bilim dünyasında son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Balasubramanyam *et al.* (2009) Al_2O_3 molekülünün 30 ve 40 nm boyutlarındaki formlarıyla yaptıkları *in vivo* çalışmada, 500, 1000 ve 2000 mg/kg Al_2O_3 dozları oral olarak dişi Wistar sıçanlarına uygulanmış ve kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyon ve mikronükleus testleri ile genotoksisite araştırılmıştır. Deney sonucu elde edilen veriler Al_2O_3 molekülünün her iki formunun da 1000 ve 2000 mg/kg uygulama dozlarında genotoksik olduğunu ortaya koymuştur.

Kim *et al.* (2009) *in vitro* olarak yürüttükleri çalışmada, comet ve MLA (Mouse lymphoma assay) testleri ile fare lenfoma hücre hattı (L5178Y) ve insan bronşial epitel hücrelerinde (BEAS-2B) 50 nm'den küçük Al_2O_3 nanopartiküllerinin toksik etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak 0-5000 μ g/mL doz aralığında Al_2O_3 nanopartiküllerinin genotoksik etki gösterdiği kesin olarak gösterilememiş fakat özellikle 2500 μ g/mL ve üzeri dozlarda genotoksisite potansiyeline sahip olabileceği ifade edilmiştir. Bu sonuca ek olarak bu nanopartikülün kesinlikle mutajen olmadığı rapor edilmiştir.

Bir bakteri türü olan *Salmonella typhimurium*'un TA100, TA1535, TA98, TA97a ve TA102 suşları üzerine Al_2O_3 nanopartiküllerinin (30 ve 40 nm) mutajenitesinin araştırıldığı *in vitro* çalışmada Ames testi kullanılmış ve nano- Al_2O_3 moleküllerinin mutajeniteye neden olmadığı tespit edilmiştir (Balasubramanyam *et al.* 2010).

Virgilio *et al.* (2010) TiO_2 ve Al_2O_3 nanopartiküllerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında Chinese Hamster Ovaryum (CHO-K1)

hücrelerinde farklı test yöntemlerini (NR, MTT, KKD ve MÇ testleri) kullanmışlardır. Al_2O_3 'un 0-100 $\mu g/mL$ doz aralığının uygulandığı araştırmanın sonuçlarına göre etkisi araştırılan her iki molekülünde sitotoksik ve genotoksik oldukları rapor edilmiştir.

Radziun *et al.* (2011) Al_2O_3 molekülünün sitotoksik etkilerini sıçan fibroblast (L929) ve insan deri fibroblast (BJ) hücrelerinde 0-400 $\mu g/mL$ doz aralığında araştırmışlardır. EZ4U testi ile yürütülen çalışmanın sonuçlarına göre nano- Al_2O_3 moleküllerinin L929 ve BJ hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Muramatsu *et al.* (2005) *in vivo* olarak yürüttükleri çalışmalarında β -TCP ve karboksimetil-kitin (CM-Kitin) kompozitini kemik kırığının onarımında kullanmışlardır. Yaklaşık 4-7 mg/kg olacak şekilde erkek ve dişi sıçanlara implante edilen kompozit 28 gün boyunca vücutta kalmış ve 28. günün sonunda toplam 44 organda ve dokuda hematolojik, biyokimyasal (kan), ürinolojik (idrar) ve histopatolojik bulgular değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda kullanılan kompozitin subakut sistemik toksisiteye neden olmadığı rapor edilmiştir.

Huang *et al.* (2009) osteoporoz gelişiminin engellenmesi için kullanılan normal boyutta ki kalsiyum bileşiklerinin gastrointestinal sistem tarafından tamamen emilmediği bu nedenle nanoboyutta olan kalsiyum bileşiklerinin kullanılmasını önermişlerdir. Bu amaç doğrultusunda nano boyutlarda ki kalsiyum bileşiklerinin toksikolojik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) ve kalsiyum sitrat ($Ca_3(C_6H_5O_7)_2$) nanopartiküllerinin *in vivo* koşullarda toksik etki göstermediğini, bu nedenle söz konusu tedavide nanopartikül boyuttaki kalsiyum bileşiklerinin kullanılabilceğini önermişlerdir.

Patil *et al.* (2012) dolomit nanopartiküllerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerini insan akciğer epitel hücrelerinde (A549) incelemişlerdir. Moleküler formülü $CaMg(CO_3)_2$ dolomit %54.35 $CaCO_3$ ve %45.65 $MgCO_3$ içermektedir. MTT, TB ve MN test yöntemleriyle yürütülen çalışmada hücre kültürleri 0-400 $\mu g/mL$ doz aralığındaki nanopartikül çözeltilerine maruz bırakılarak hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Deney

sonuçlarına göre söz konusu nanopartiküllerin akciğer hücreleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkileri olduğu rapor edilmiştir.

Jang *et al.* (2012) insan servikal kanser hücreleri (HeLa) üzerinde mono kalsiyum fosfat (CaP) moleküllerinin sitotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında MTT test sistemi ile söz konusu nanopartiküllerin sitotoksik etkisinin olmadığını ve biyosistemlerde kullanılabilceğini göstermişlerdir.

Bauer *et al.* (2009) Yeni Zelanda tavşanlarıyla yürüttükleri *in vivo* çalışmada proksimal tibia ve distal femur parçaları çıkarılarak tekrar implante edilmiş ve β -TCP kemik tutkalı ile tutturulmuştur. Operasyon sonrası 12, 24, 48, 72, 240 ve 504. saatlerin sonunda hematolojik, ürinolojik ve biyokimyasal analizler yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonuçlarına göre β -TCP kemik tutkalının biyoyumluluğunun yüksek olduğu ve akut-subakut, lokal veya sistemik toksisiteye yol açmadığı bildirmiştir.

Zhang *et al.* (2009) AlamarBlue hücre canlılık testi ile *in vitro* olarak yürüttükleri çalışmada peridontal hastalıkların tedavisinde kemik tamir malzemesi olarak kullanılan polifosfoester (UPPE)- β -TCP kompozitinin sitoksik etkilerini araştırılmışlar ve sıçan fibroblast (L929) hücreleri ile gerçekleştirilen çalışma sonuçlarına göre bu kompozitin toksik olmadığı sonucuna varmışlardır.

Young *et al.* (2010) *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) bakteri türlerinin mutant suşları üzerinde β -TCP'in genotoksik etkilerini araştırmışlar ve Ames testi ile yürütülen deney sonuçlarına göre bu molekülün mutajen olmadığını rapor etmişlerdir.

Dofour *et al.* (2006) CHO hücreleri üzerinde kromozom aberasyon testi ile yürüttükleri *in vitro* çalışmada ZnO nanopartiküllerinin (100 nm) DNA hasarını artırdığını dolayısıyla bu molekülün genotoksik olduğunu bildirmişlerdir.

Osman *et al.* (2010) insan monolayer tümör hücrelerini (Hep-2) kullanarak ZnO nanomateriyallerinin genotoksik etkilerinin araştırıldığı *in vivo* çalışmalarında konsantrasyona ve zamana bağlı olarak bu moleküllerin genotoksik olduğunu rapor etmişlerdir. Mevcut araştırmada genotoksisite testi olarak Comet ve mikroçekirdek testleri kullanılmıştır.

Hackenberg *et al.* (2011) ZnO nanopartiküllerinin toksisitesini araştırdıkları *in vitro* çalışmalarında etkisi araştırılan nanopartikülün 0-50 µg/mL toz aralığında MTT ve Comet testleri ile sitotoksik ve genotoksik potansiyellerini belirlemeyi amaçlamışlardır. İnsan mukoza hücreleri üzerinde yürütülen deney sonuçlarına göre ZnO nanopartiküllerinin çok düşük konsantrasyonlarda bile sitotoksik ve genotoksik etkisi olduğu rapor edilmiştir.

Sharma *et al.* (2011a) MIT, NRU ve Comet testleri ile *in vitro* olarak yürüttükleri çalışmalarında, insan karaciğer hücreleri (HepG2) üzerinde ZnO nanopartiküllerinin konsantrasyon ve zamana bağlı toksik etkilerini araştırmışlardır. Deney sonuçlarına göre test edilen molekülünün DNA hasarına yol açmak suretiyle genotoksik olduğu ve aynı zamanda sitotoksik etkisi bulunduğu bildirilmiştir.

Sharma *et al.* (2011b) epidermal keratinosit hücreleri (HEK) ile yaptıkları toksisite çalışmalarında Comet test sistemini kullanarak ZnO nanoparçacıklarının sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

González *et al.* (2012) MTT test yöntemi ile The real time cell analyzer (RTCA) sisteminin sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında 11 farklı molekülün sitotoksik etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. İnsan bronşial epitel hücreleri (16HBE14o-) üzerinde *in vitro* olarak yürütülen deney sonuçlarına göre ZnO nanopartikülünün sitotoksik olduğu rapor edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kan örneklerinin alınması ve kültürlerin kurulması

Bu çalışmaya yaşları 20 ile 25 arasında olan ($22,25 \pm 1,70$) sigara ve alkol kullanmayan, belli bir hastalığı saptanmayan ve mesleği dolayısıyla fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalmamış gönüllü 4 erkek birey dâhil edildi. Heparinize enjektöre alınan periferik kan numuneleri, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Toksikoloji ve Doku Kültürü Laboratuvarlarında yürütülen genetik araştırmalarda kullanıldı. Yapılan ön denemelerden elde edilen sonuçlar ve mevcut literatür bilgileri doğrultusunda test maddelerinin kültürlere uygulanacak olan dozları tespit edildi. Test edilen biyomalzemeler ve kültürlere uygulanan konsantrasyonları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Genotoksisite araştırmaları 72 saatlik tam kan kültürleri üzerinde yapıldı. Elde edilen preparatlar daha sonra analiz edilmek üzere uygun koşullarda saklandı. Kontrol (-) grubu olarak kurulan kültürlere herhangi fizyolojik su eklendi. Kontrol (+) grubu olarak Mitomisin-C (MMC) (10^{-7} M) kullanıldı.

Çizelge 3.1. Test edilen biyomalzemeler ve uygulanan konsantrasyonları

Nanomalzeme	Test edilen konsantrasyonları
Alüminyum oksit	0, 1, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 2000 ppm
Kalsiyum fosfat	
Çinko oksit	

3.1.2. Test çözeltilerinin hazırlanması

Test edilecek nanomalzemeler distile suda hesaplanan miktarlarda çözülerek test çözeltileri hazırlandı.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kromozom medium B Biochrom® firmasından, cytochalasin-B,L- glutamine, colcemid, giemsa, mitomisin-C Sigma® firmasından, potasyum klorür (KCl), glasiyal asetik asit ve sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) Riedel-de Haent® firmasından, metanol ve potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) Fluka® firmasından, sodyum heparin Roche® firmasından temin edildi. Ayrıca çalışmada kullanılan nanomalzemeler Atatürk üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden temin edildi.

3.1.4. Kullanılan aletler ve cihazlar

Araştırmalar süresince kullanılan aletler ve cihazlarla ilgili bilgiler Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Araştırma süresince kullanılan cihazlar

Aletler ve Cihazlar	Temin edildikleri firmalar
Distile su cihazı	Easypure RF compact ultarpure ws, USA
Etüv	Heraeus FB 420, Germany
Hassas terazi	Sartorius AG, Germany
Mikroskop	Prior T-100 mA, England
Otomatik pipet	Finpipette Labsystems, Finland
pH metre	Handylab - 2BNC
Santrifüj	Nüve NF 200, Nüve M.S.L.T.A, Ankara
Su banyosu	Nüve BM 101, Nüve M.S.L.T.A, Ankara

3.1.5. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Hipotonik çözeltinin hazırlanışı

0,5592 gr KCl tartılarak 100 ml distile suda çözüldü. Konsantrasyonu 0,075 M olan KCl çözeltisi kullanılmadan önce etüvde 37°C'ye kadar ısıtıldı.

Carnoy fiksatifinin hazırlanışı

1 kısım Glasiyel asetik asit'in üzerine 3 kısım metanol ilave edilerek iyice karıştırıldı. Solüsyon her kullanım için taze olarak hazırlandı. Kullanmadan önce buzdolabında (+4°C'de) soğutuldu.

Giemsa boya çözeltisinin hazırlanışı

A Çözeltisi: Na₂HPO₄'ten 11,88gr tartılarak 1litre distile suda çözüldü.

B Çözeltisi: KH₂PO₄'ten 9,08gr tartılarak 1 litre distile suda çözüldü.

A çözeltisinden 30 ml şaleye konuldu. Üzerine; pH metre 6,8'i gösterinceye kadar B çözeltisinden ilave edildi. Sonra üzerine 5 ml Giemsa boyası eklendi. Pipetajla karıştırıldı. Üzerinin yağı kurutma kâğıdı ile alındı. Çözelti oda ısısında muhafaza edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Genotoksisite testleri

Genotoksisite araştırmaları, güvenilir ve oldukça yaygın olarak kullanılan Kromozom aberasyon (KA) ve Mikroçekirdek (MÇ) teknikleri kullanılarak yürütüldü. Tüm kromozom çalışmalarında olduğu gibi bu araştırmada da özellikle hücre kültürlerindeki

kontaminasyon ihtimalini azaltmak ve çalışma sırasında optimum miktarda hücre elde edebilmek için sterilite, pH, sıcaklık ve ışık koşullarına dikkat edildi.

3.2.1.a. Kromozom aberasyon (KA) yöntemi

- 1) Protokol numarası verilmiş steril hücre kültür tüplerine (cellstar) önceden hazırlanmış ve 37°C'ye getirilmiş besiyerinden (Chromosome Medium B) 6 ml konuldu.
- 2) Besiyerinin üzerine 0,5 ml tam kan eklendi.
- 3) Tüplerdeki kültürler son konsantrasyonları 1, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500,1000 ve 2000 mg/L olacak şekilde test edilen nanomalzeme çözeltileri ilave edildi.
- 4) Tüpler alt üst edilerek karıştırıldı ve kapakları kapatılarak 37°C'lik etüve bırakıldı.
- 5) İnkübasyon başlangıcından 70 saat 15 dk sonra, colcemid çözeltisinden (+4°C de muhafaza edilmiş, 10 µg/ml konsantrasyonunda) 0,1 cc tüm kültürler eklendi.
- 6) Tüpler tekrar etüve yerleştirilerek (37°C'de) 1 saat 45dk daha beklendi.
- 7) 72 saatin sonunda etüvden çıkarılan tüpler santrifüj işlemine alındı.
- 8) Kültürler 900 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- 9) Santrifüj süresinin sonunda süpernatant pastör pipeti ile atıldı.
- 10) Tüpte kalan çökeltinin (pellet) üzerine 8 ml Hipotonik çözeltisi yavaş yavaş ilave edildi.

- 11) Hipotonik çözelti eklenen tüpler 37°C'lik etüvde 15-20 dk bekletildi.
- 12) Bekleme süresi sonunda etüvden çıkarılan tüpler 900 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- 13) Tüpte kalan pellet üzerine taze hazırlanmış soğuk tespit çözeltisinden yavaş yavaş 7 ml eklenerek 900 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- 14) Bir önceki basamak iki kez daha tekrar edildi.
- 15) Son süpernatant da atıldı ve pellet pastör pipeti ile yavaş yavaş karıştırıldı.
- 16) Pipetle çekilen pellet önceden üzerine protokol numarası yazılmış, temizlenmiş ve soğutulmuş (+4°C) lamlara 45°'lik açı ile yayılarak lamlar oda ısısında karanlık bir ortamda 3 gün kurumaya bırakıldı.
- 17) 3. günün sonunda preparatlar 15 dk. Giemsa boyasında bekletildi.
- 18) Boyama işleminin sonunda preparatlar tekrar distile sudan geçirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- 19) Kuruyan lamlar entellan kullanılarak kapatıldı ve incelemeye hazır hale getirildi. Preparatlar ışık mikroskobunda immersiyon ($\times 100$) objektifi ile incelendi. Her bir bireyden 30 metafaz plağı değerlendirildi. İncelenen metafazlar da daha çok kromatid ve kromozom gap'leri ile kromatid ve kromozom kırıkları değerlendirmeye alınarak hücre başına ortalama KA değeri elde edildi.

3.2.1.b. Mikroçekirdek (MÇ) yöntemi

KA yönteminde olduğu gibi kültür ortamı hazırlandı. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra, sitokalazin-B'den son konsantrasyonu 3µg/ml olacak şekilde tüm kültürlere ilave edildi. 72 saatin sonunda etüvden çıkarılan tüpler santrifüj işlemine alındı. Santrifüj işlemleri, hipotonik ve tespit çözeltilerinin ilave edilmesi ile yaymaların yapılmasında KA için verilmiş olan protokol uygulandı. Yayma işlemini takip eden 3.günün sonunda preparatlar 15dk. Giemsa boyasında bekletildi. Boyama işleminin sonunda preparatlar tekrar distile sudan geçirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamlar entellan kullanılarak kapatıldı ve incelemeye hazır hale getirildi. Preparatlar ışık mikroskobunda immersiyon ($\times 100$) objektifi ile incelendi. Mikroçekirdek oluşumunu değerlendirmek için hazırladığımız sitokalazin-B'li kültürlerde elde edilen binükleuslu hücrelerde MÇ değerlendirme kriterleri dikkate alınarak sayım yapıldı. Mononükleuslu, trinükleuslu veya daha fazla çekirdekli hücreler değerlendirme dışı bırakıldı. Her bir kültürde en az 1500 binükleuslu hücre incelendi ve MÇ frekansları hesaplandı.

3.3. Biyomalzemelerin Karakterizasyonu

Çalışmamızda kullanılan biyomalzemelerin karakterizasyonları XRD (X-ray diffraction) ve SEM (Scanning Electron Microscope) analizleri ile yapılmıştır. Kullanılan biyomalzemelere ait XRD ve SEM sonuçları Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 ve 3.6'da verilmiştir. XRD sonuçlarından elde edilen raw verileri Scherrer denklemi (Scherrer equation) ile değerlendirilmiş ve biyomalzemelerin nanopartikül boyutları hesaplanmıştır. Hesaplamalar aşağıda verilen denkleme göre yapılmıştır.

Scherrer denklemi; $T = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta}$ şeklindedir (Rodriguesa and Ávila 2012).

T: Parçacık büyüklüğü

K: Boyutsuz şekil faktörü (0.9)

λ : X-ışını dalga boyu (1.54 Å = 0.154 nm)

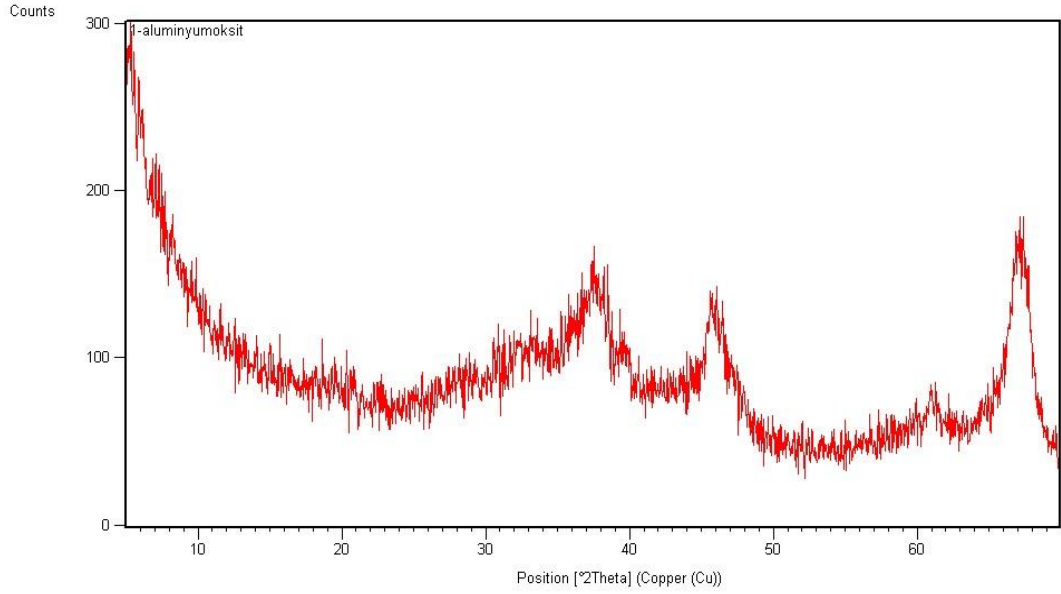
β : Yarı yükseklik genişliği (XRD raw verilerinden elde edilmiştir)

θ : Bragg açısını simgelemektedir.

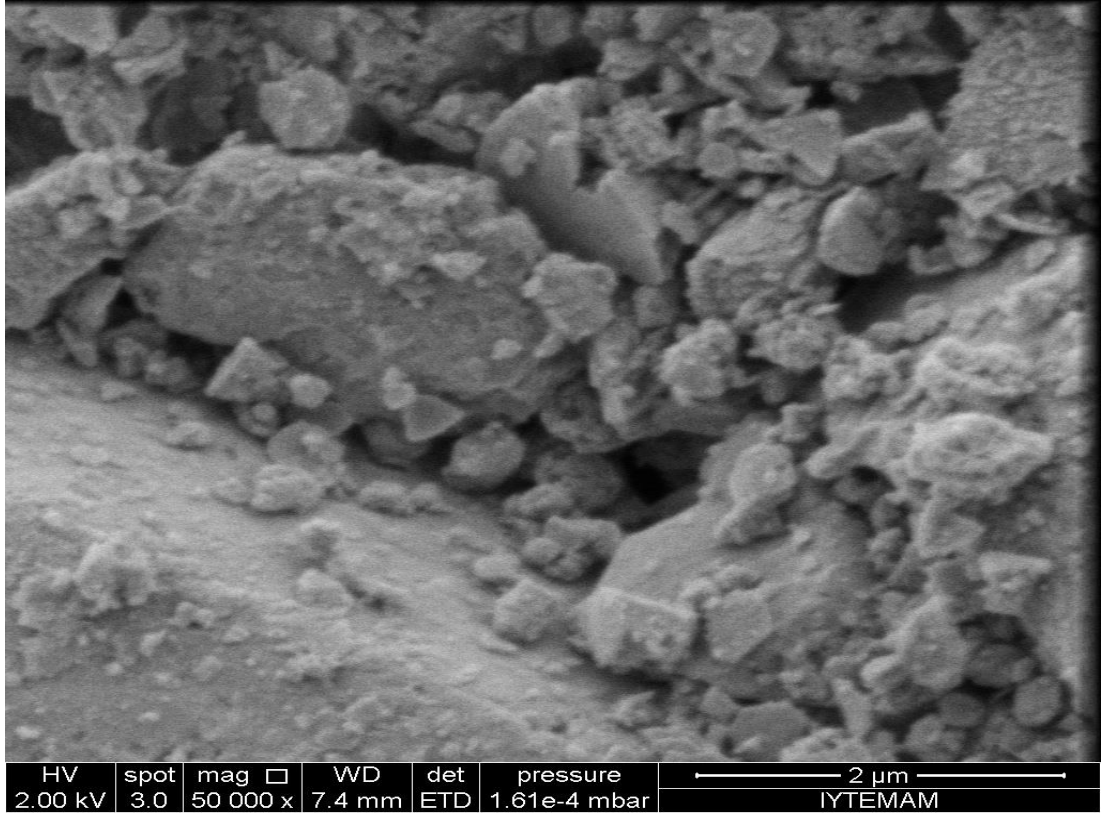
3.3.1. Alüminyum oksit bileşiğinin karakterizasyonu

XRD ve SEM analizleri yapılan alüminyum oksit bileşiğine ait veriler Scherrer denklemi ile hesaplanmış ve partikül büyüklükleri belirlenmiştir.

$$T = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \rightarrow T = \frac{0,90 \times 0,154}{0,04 \times 0,830} \rightarrow T = \frac{0,1386}{0,0332} \rightarrow T = 4,175 \text{ nm}$$



Şekil 3.1. Alüminyum oksit nanopartikülünün XRD görüntüsü

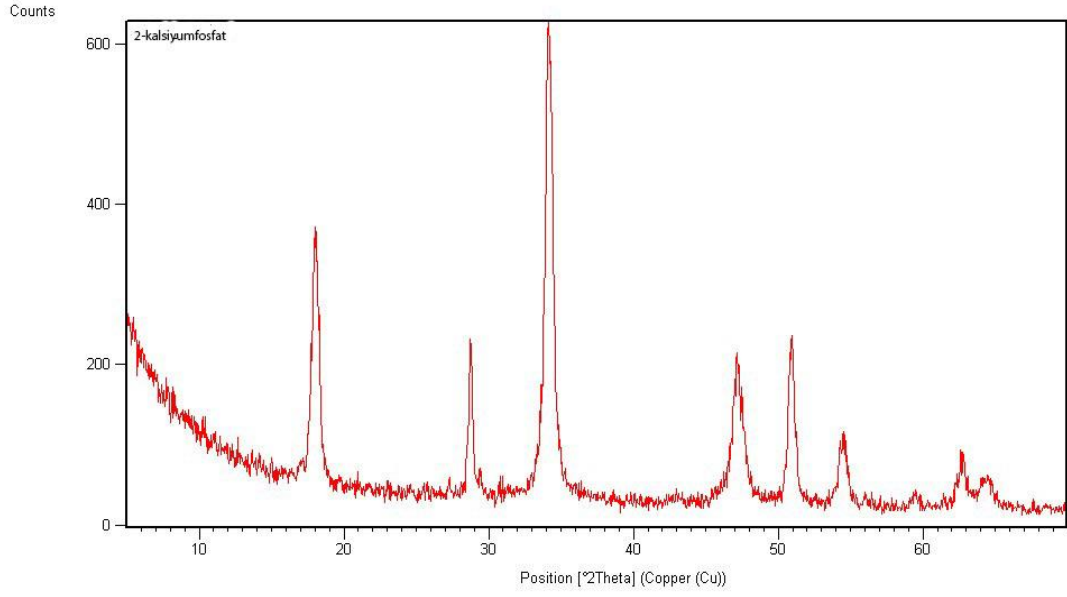


Şekil 3.2. Alüminyum oksit nanopartikülünün SEM görüntüsü

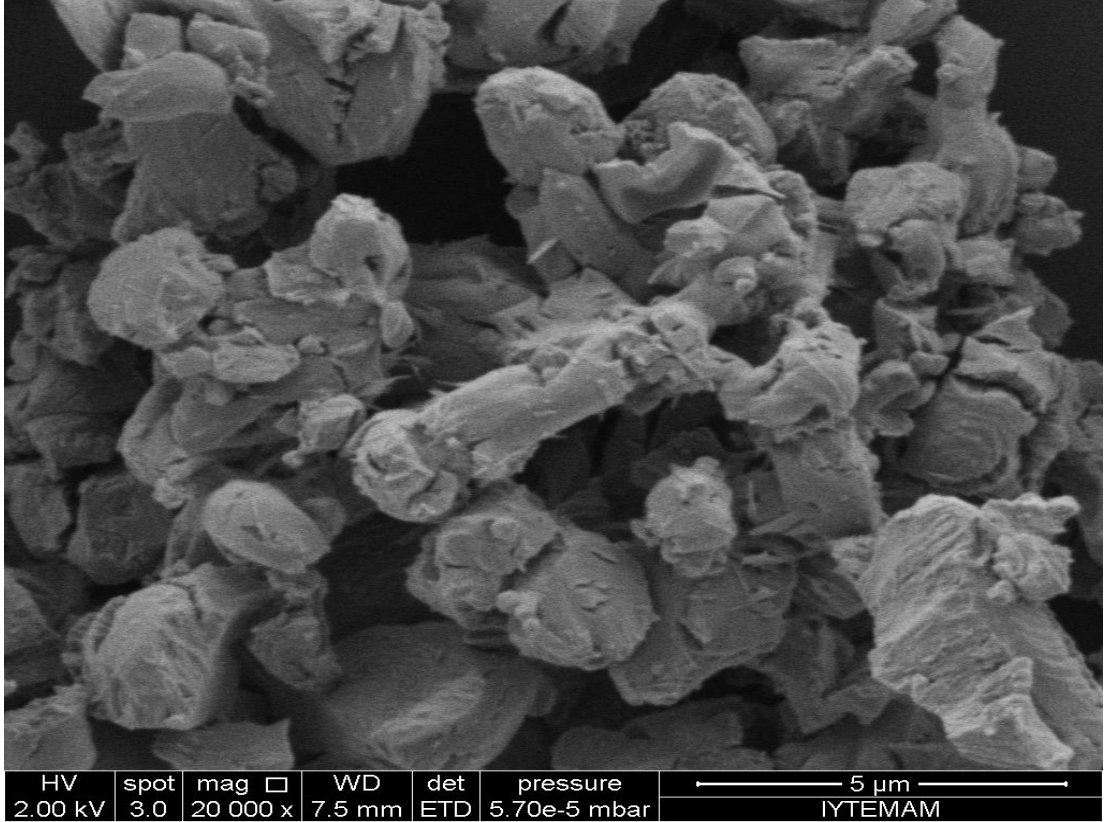
3.3.2. Kalsiyum fosfat bileşiğinin karakterizasyonu

XRD ve SEM analizleri yapılan kalsiyum fosfat bileşiğine ait veriler Scherrer denklemi ile hesaplanmış ve partikül büyüklükleri belirlenmiştir.

$$T = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \rightarrow T = \frac{0,90 \times 0,154}{0,016 \times 0,956} \rightarrow T = \frac{0,1386}{0,0153} \rightarrow T = 9,058 \text{ nm}$$



Şekil 3.3. Kalsiyum fosfat nanopartikülünün XRD görüntüsü

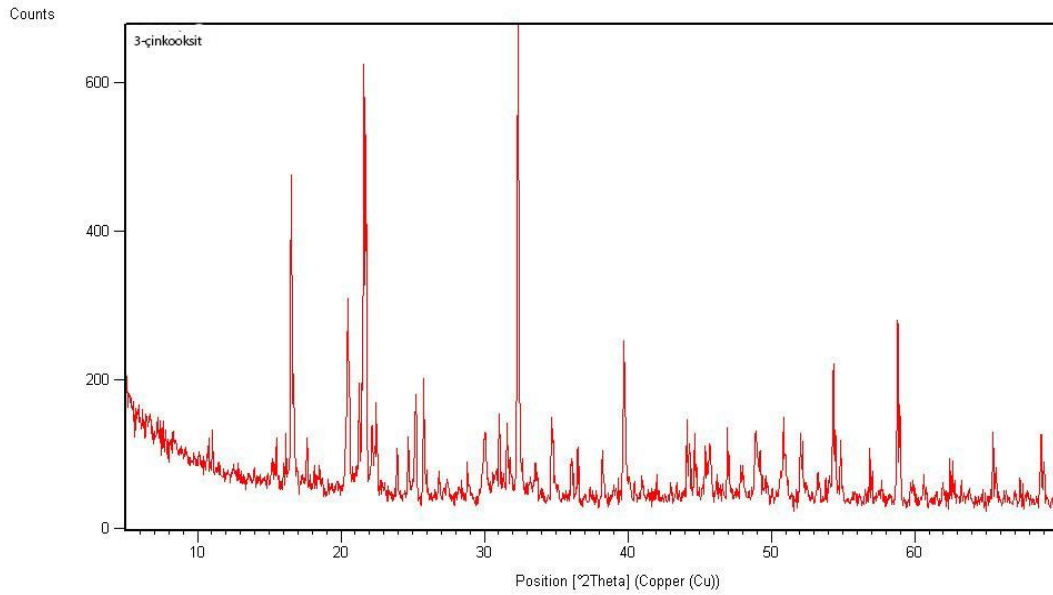


Şekil 3.4. Kalsiyum fosfat nanopartikülünün SEM görüntüsü

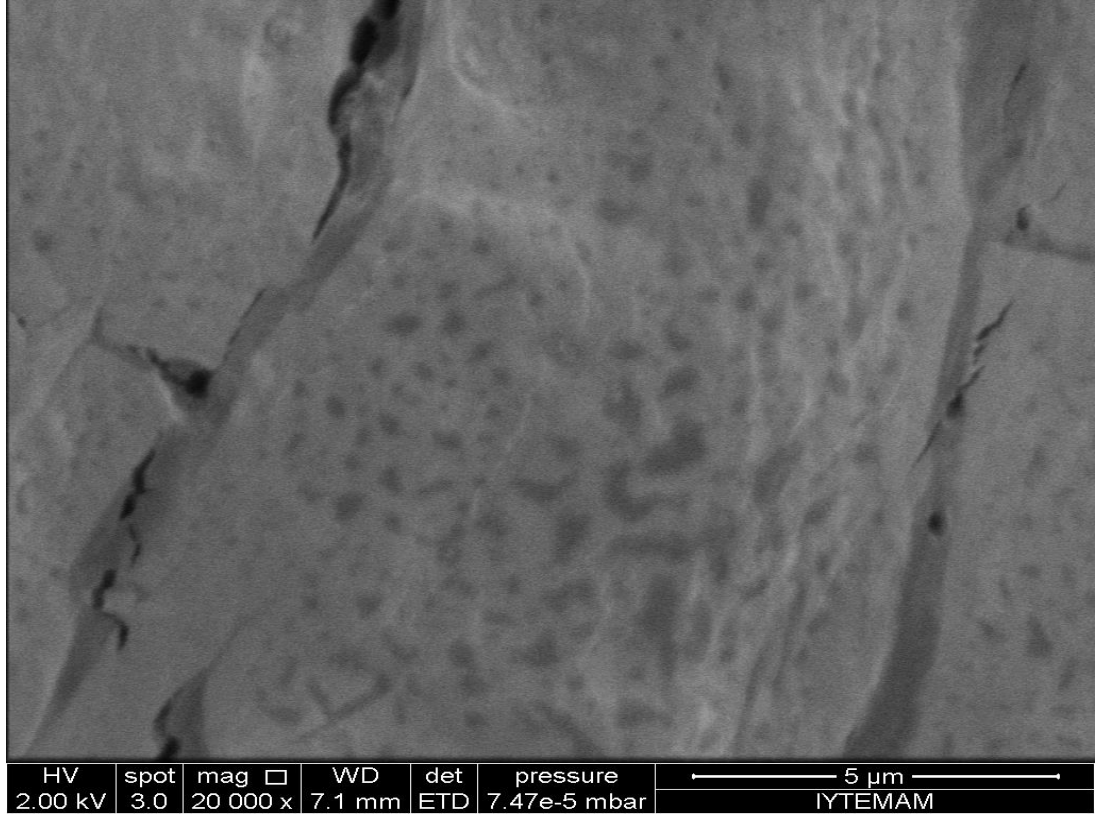
3.3.3. Çinko oksit bileşiğinin karakterizasyonu

XRD ve SEM analizleri yapılan çinko oksit bileşiğine ait veriler yine Scherrer denklemi ile hesaplanmış ve partikül büyüklükleri belirlenmiştir.

$$T = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \rightarrow T = \frac{0,900 \times 0,154}{0,007 \times 0,960} \rightarrow T = \frac{0,1386}{0,0070} \rightarrow T = 19,8 \text{ nm}$$



Şekil 3.5. Çinko oksit nanopartikülünün XRD görüntüsü



Şekil 3.6. Çinko oksit nanopartikülünün SEM görüntüsü

3.4. İstatistiksel İşlemler

Çalışmadan elde edilen bulguların istatistiksel yönden değerlendirilmesinde SPSS 18 programı kullanıldı. Tespit edilen KA ve MÇ analizlerinde belirlenen ortalamaların kontrol ve deney grupları arasında değişiklik gösterip göstermediği varyans analizi kullanılarak belirlendi. Varyans analizi için one way Anova testlerinden Fisher's Least Significant Difference (LSD) testi kullanıldı. Elde edilen veriler 0.05 anlam seviyesi göz önünde bulundurularak yorumlandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada *in vitro* koşullarda insan tam kan kültürleri test bileşikleri olarak belirlenen alüminyum oksit, kalsiyum fosfat ve çinko oksitin son konsantrasyonları 0, 1, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 2000 ppm olacak şekilde hazırlanan solüsyonları ile muamele edilmiştir. Genetik araştırmalar kromozom aberasyon ve mikroçekirdek testleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kültürlerden elde edilen KA/hücre ve MÇ/1000 hücre değerleri üzerinden istatistikî hesaplamalar yapılarak sonuçlar tartışılmıştır.

4.1. Alüminyum oksit (Al_2O_3) Nanopartikülüne Ait Sonuçlar

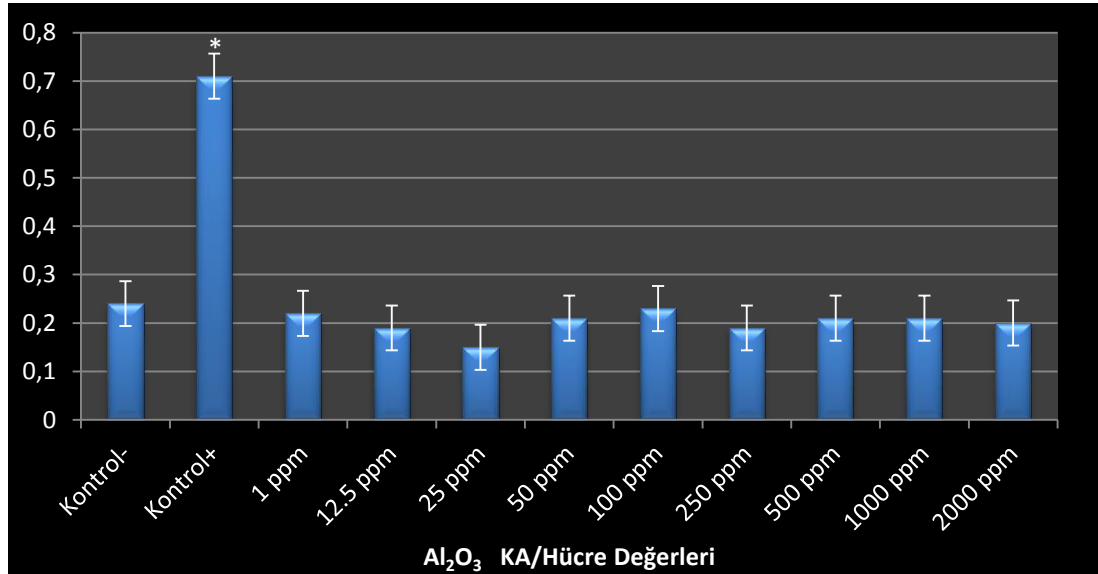
4.1.1. Kromozom aberasyon testi sonuçları

Test bileşiği olarak kullanılan alüminyum oksidin *in vitro* koşullarda kromatid ve kromozom tipi aberasyonların incelendiği KA testi sonuçları, KA/hücre değerlerinin tüm uygulama dozları için 0.15 ± 0.04 ve 0.71 ± 0.07 değerleri arasında olduğunu göstermiştir. Kan kültürlerine uygulanan alüminyum oksidin hiçbir dozu kontrol grubuna (0.24 ± 0.02) kıyasla KA sıklığında istatistikî olarak anlamlı artışa sebep olmamıştır. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan MMC ise hem kontrol grubuna hem de alüminyum oksidin uygulanan konsantrasyonlarına kıyasla KA sıklığında belirgin bir artışa yol açmıştır (Şekil 4.1). Etkisi araştırılan alüminyum oksit bileşiğinin konsantrasyonlarına bağlı olarak tam kan kültürlerinde ortaya koyduğu KA/hücre değerleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Ayrıca metafaz alanlarındaki KA örneği Şekil 4.2'de verilmiştir.

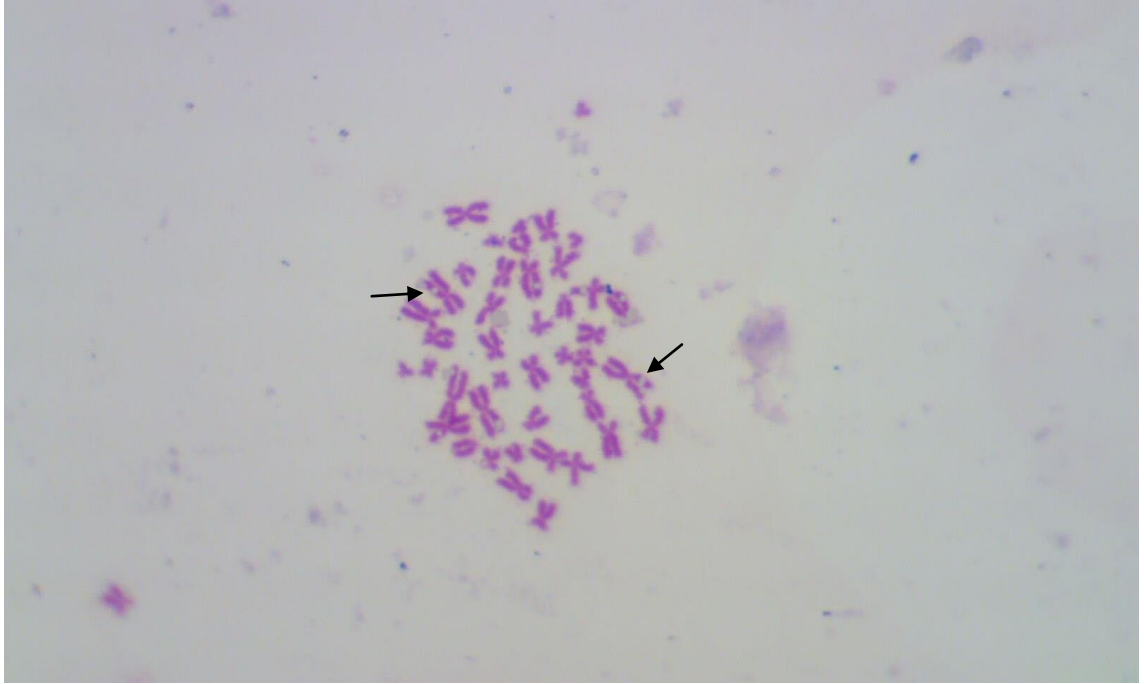
Çizelge 4.1. *In vitro* koşullarda alüminyum oksit bileşiğinin konsantrasyonlarına göre oluşturduğu KA değerlerinin istatistiksel dağılımı

Gruplar	Kromatid tipi		Kromozom tipi		KA/hücre± S.S
	Gap	Kırık	Gap	Kırık	
Kontrol ⁻	0.38	0.35	0.17	0.10	0.24±0.02 ^a
Kontrol ⁺	0.90	0.75	0.63	0.58	0.71±0.07 ^b
1 ppm	0.35	0.32	0.10	0.00	0.22±0.02 ^a
12.5 ppm	0.35	0.34	0.10	0.10	0.19±0.03 ^a
25 ppm	0.31	0.31	0.00	0.00	0.15±0.04 ^a
50 ppm	0.33	0.32	0.10	0.10	0.21±0.02 ^a
100 ppm	0.41	0.31	0.10	0.10	0.23±0.02 ^a
250 ppm	0.38	0.29	0.00	0.10	0.19±0.02 ^a
500 ppm	0.39	0.28	0.10	0.10	0.21±0.03 ^a
1000 ppm	0.39	0.26	0.10	0.10	0.21±0.02 ^a
2000 ppm	0.40	0.33	0.00	0.10	0.20±0.02 ^a

*Değerler Ortalama±Standart Sapma olarak verilmiştir (n=4). Aynı sütundaki farklı harfler P<0.05 düzeyinde istatistiksel farklılığı ifade etmektedir. Kontrol⁻= Fizyolojik su, Kontrol⁺= Mitomisin-C (10⁻⁷M).



Şekil 4.1. Alüminyum oksit maruziyeti sonucunda gözlenen KA/Hücre değerleri



Şekil 4.2. Alüminyum oksit bileşiğinin 1000 ppm’de neden olduğu kromozomal aberasyon (kromatid gap)

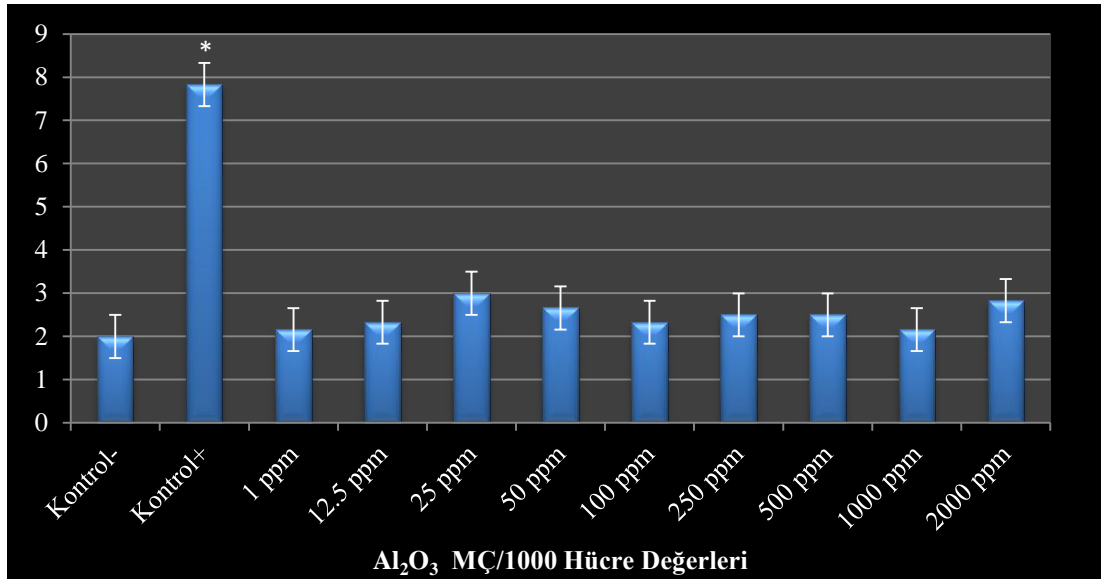
4.1.2. Mikroçekirdek testi sonuçları

In vitro koşullarda MÇ/1000 hücre değerleri, bütün konsantrasyonlar için 2.00 ± 0.35 ve 7.83 ± 0.91 değerleri arasında bulunmuştur. Negatif kontrol grubu için tespit edilen MÇ/1000 hücre değeri (2.00 ± 0.35) ile deney gruplarından elde edilen MÇ/1000 değerleri arasında istatistikî açıdan herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir. Farklı konsantrasyonlarda kültürlerle uygulanan alüminyum oksit hiçbir dozda kontrol grubuna kıyasla MÇ sıklığında belirgin değişikliğe yol açmamıştır. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan MMC’nin MÇ/1000 hücre değeri (7.83 ± 0.91), hem kontrol grubunun hem de deney gruplarının MÇ/1000 hücre değerlerinden istatistikî olarak farklı çıkmıştır (Şekil 4.3). Alüminyum oksit nanopartikülünün tam kan kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu MÇ/1000 hücre değerleri Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Mikroçekirdek testi tekniğine göre hazırlanmış preparatlardan elde edilen örnek MÇ fotoğrafları Şekil 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7’de gösterilmiştir.

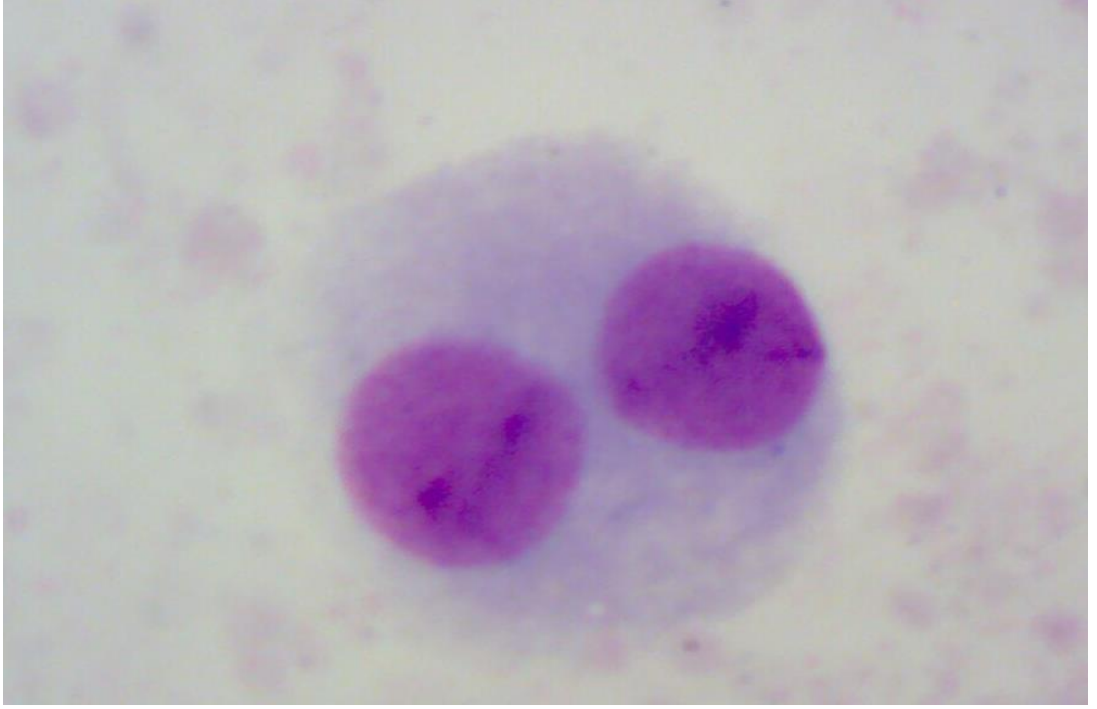
Çizelge 4.2. İn vitro koşullarda alüminyum oksit bileşiğinin konsantrasyonlara göre oluşturduğu MÇ/1000 hücre ve MÇ sayısına göre ÇÇH (çift çekirdekli hücre) dağılımı

Gruplar	Sayılan toplam ÇÇH	MÇ sayısına göre ÇÇH dağılımı			MÇ/1000 hücre
		0	1	2	
Kontrol ⁻	6000	5988	12	0	2.00±0.35 ^a
Kontrol ⁺	6000	5953	44	3	7.83±0.91 ^b
1 ppm	6000	5987	11	2	2.16±0.38 ^a
12.5 ppm	6000	5986	14	0	2.33±0.41 ^a
25 ppm	6000	5982	16	2	3.00±0.38 ^a
50 ppm	6000	5984	16	0	2.66±0.35 ^a
100 ppm	6000	5986	13	1	2.33±0.29 ^a
250 ppm	6000	5985	14	1	2.50±0.33 ^a
500 ppm	6000	5985	15	0	2.50±0.31 ^a
1000 ppm	6000	5987	13	0	2.16±0.42 ^a
2000 ppm	6000	5983	16	1	2.83±0.32 ^a

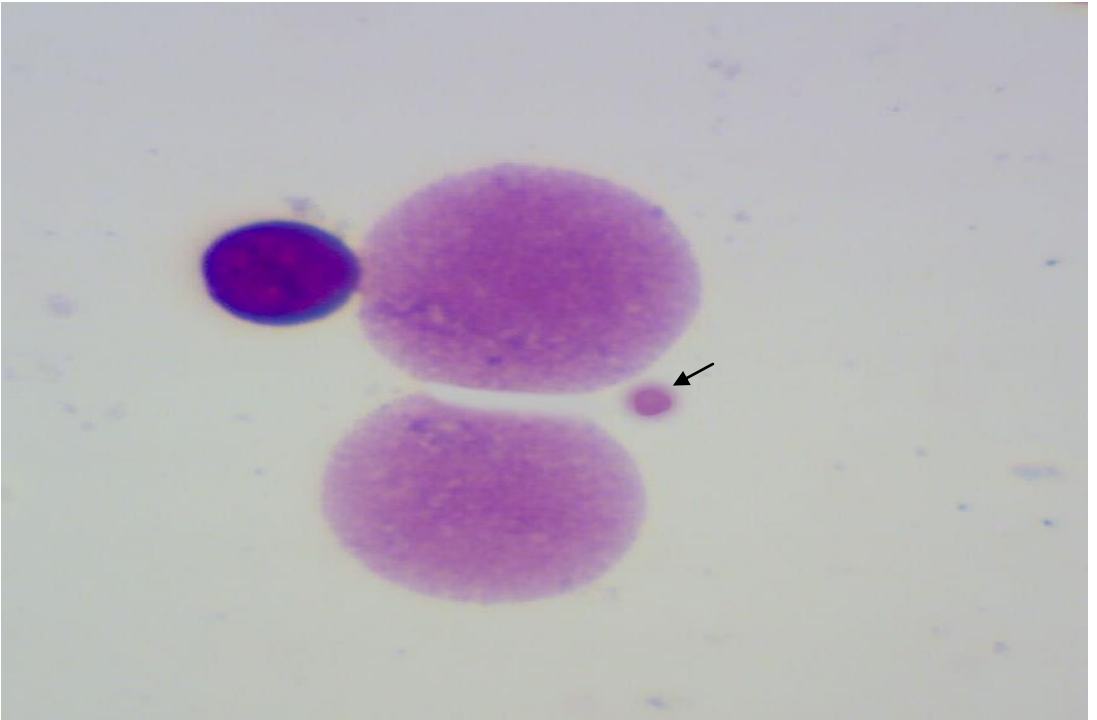
*Değerler Ortalama±Standart Sapma olarak verilmiştir (n=4). Aynı sütundaki farklı harfler P<0.05 düzeyinde istatistiksel farklılığı ifade etmektedir. Kontrol⁻= Fiziyojik su, Kontrol⁺= Mitomisin-C (10⁻⁷M).



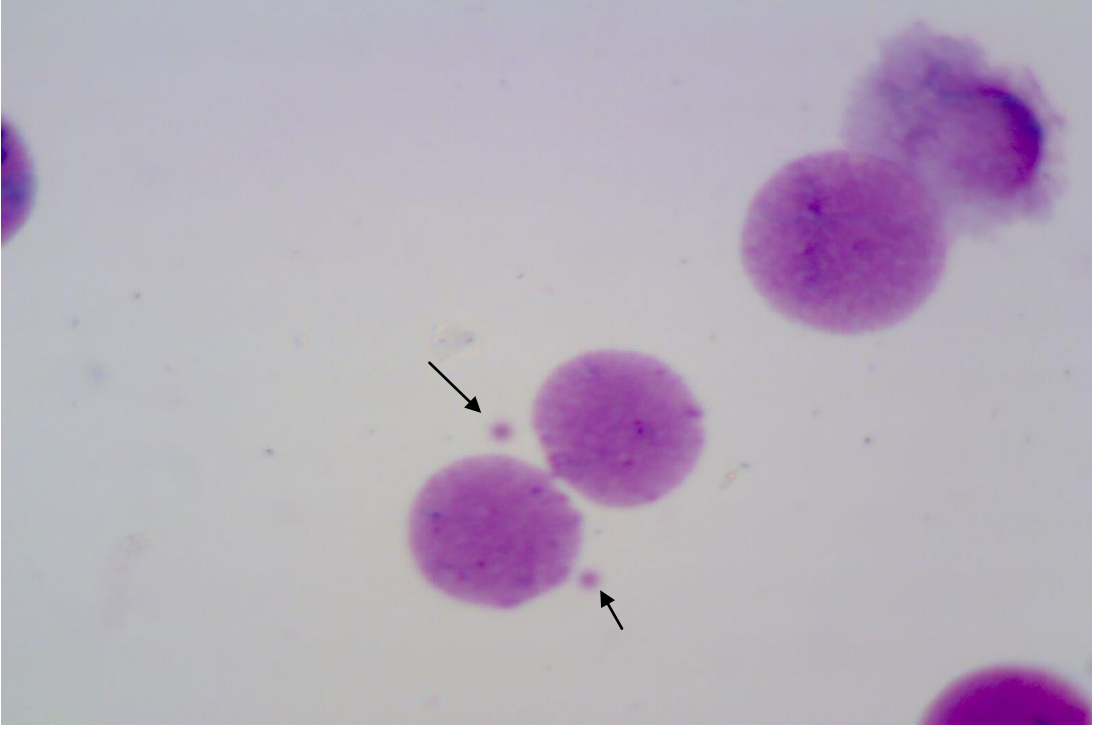
Şekil 4.3. Alüminyum oksit maruziyeti sonucunda gözlenen MÇ/1000 hücre değerleri



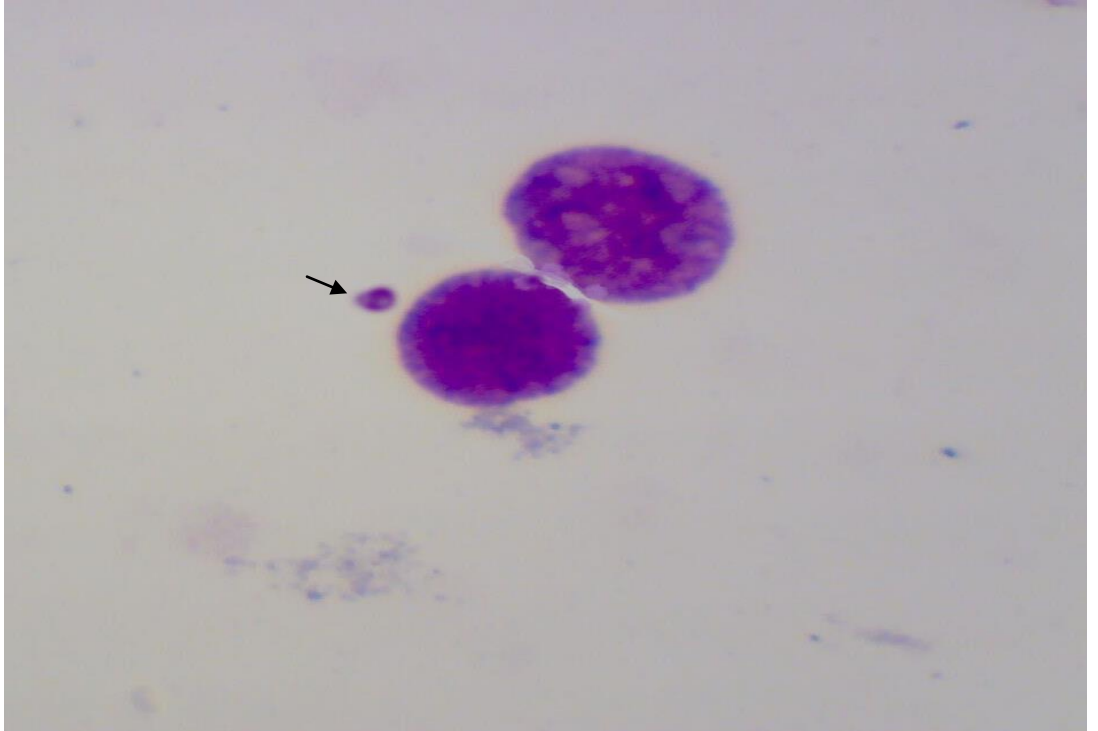
Şekil 4.4. Karyokinez evresini tamamlamış çift çekirdekli lenfosit hücresi



Şekil 4.5. 500 ppm alüminyum oksit maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu



Şekil 4.6. 1000 ppm alüminyum oksit maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu



Şekil 4.7. 2000 ppm alüminyum oksit maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu

4.2. Kalsiyum fosfat [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] Nanopartikülüne Ait Sonuçlar

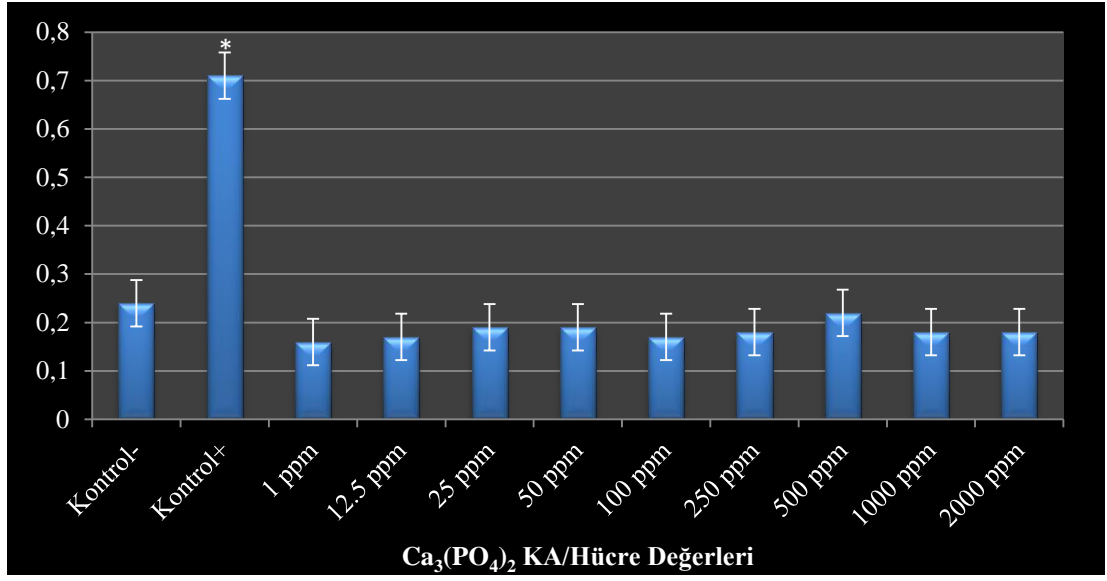
4.2.1. Kromozom aberasyon testi sonuçları

Test bileşiği olarak kullanılan kalsiyum fosfat nanopartikülünün *in vitro* koşullarda kromatid ve kromozom tipi aberasyonların incelendiği KA testi sonuçları KA/hücre değerlerinin tüm uygulama dozları için 0.16 ± 0.03 ve 0.71 ± 0.07 değerleri arasında olduğunu göstermiştir. Kan kültürlerine uygulanan kalsiyum fosfatın hiçbir dozu kontrol grubuna (0.24 ± 0.02) kıyasla KA sıklığında istatistikî olarak anlamlı artışa sebep olmamıştır. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan MMC ise hem kontrol grubuna hem de kalsiyum fosfatın uygulanan konsantrasyonlarına kıyasla KA sıklığında belirgin bir artışa sebep olmuştur (Şekil 4.8). Etkisi araştırılan kalsiyum fosfat bileşiğinin konsantrasyonlarına bağlı olarak tam kan kültürlerinde ortaya koyduğu KA/hücre değerleri Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Ayrıca metafaz alanlarındaki KA örneği Şekil 4.9'da verilmiştir.

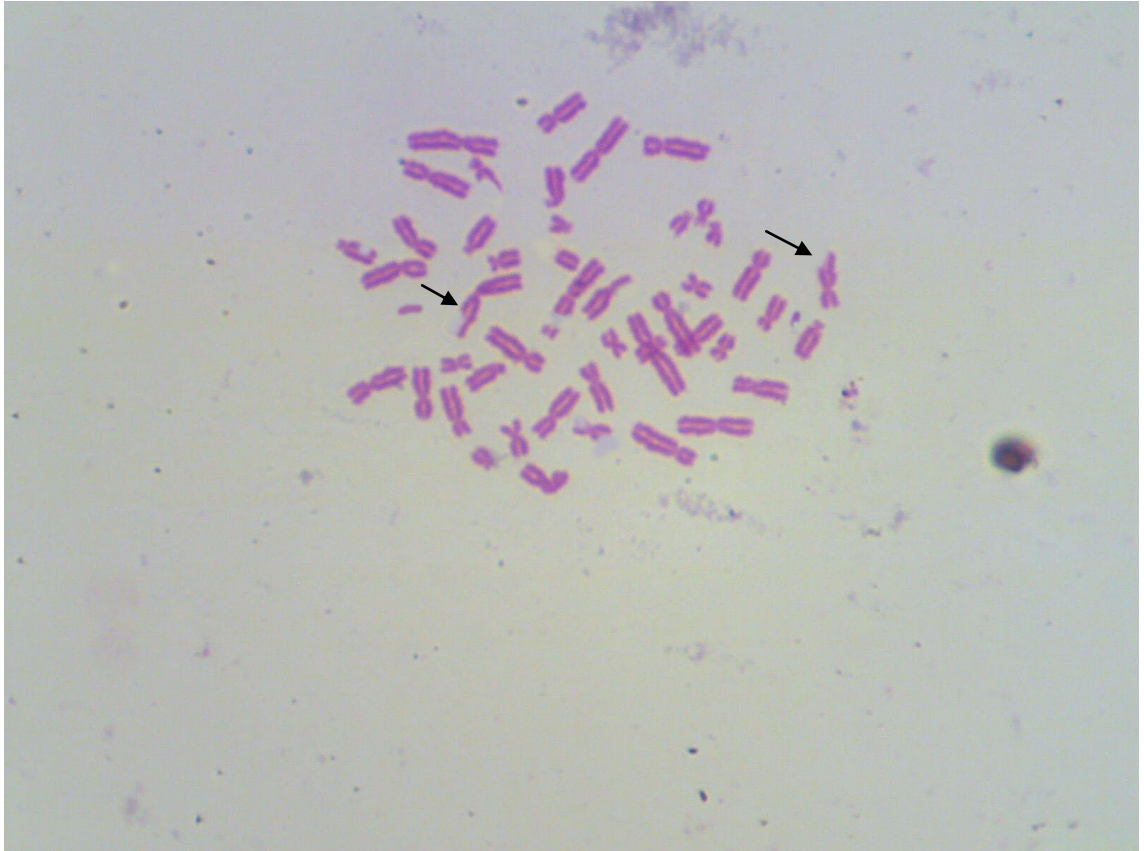
Çizelge 4.3. *In vitro* koşullarda kalsiyum fosfat bileşiğinin konsantrasyonlarına göre oluşturduğu KA değerlerinin istatikselsel dağılımı

Gruplar	Kromatid tipi		Kromozom tipi		KA/hücre \pm S.S
	Gap	Kırık	Gap	Kırık	
Kontrol ⁻	0.38	0.35	0.17	0.10	0.24 ± 0.02^a
Kontrol ⁺	0.90	0.75	0.63	0.58	0.71 ± 0.07^b
1 ppm	0.31	0.32	0.00	0.00	0.16 ± 0.03^a
12.5 ppm	0.39	0.30	0.00	0.00	0.17 ± 0.03^a
25 ppm	0.28	0.30	0.10	0.10	0.19 ± 0.05^a
50 ppm	0.35	0.32	0.00	0.10	0.19 ± 0.03^a
100 ppm	0.37	0.32	0.00	0.00	0.17 ± 0.02^a
250 ppm	0.34	0.29	0.00	0.10	0.18 ± 0.01^a
500 ppm	0.43	0.24	0.10	0.10	0.22 ± 0.03^a
1000 ppm	0.35	0.27	0.00	0.10	0.18 ± 0.03^a
2000 ppm	0.33	0.30	0.10	0.00	0.18 ± 0.02^a

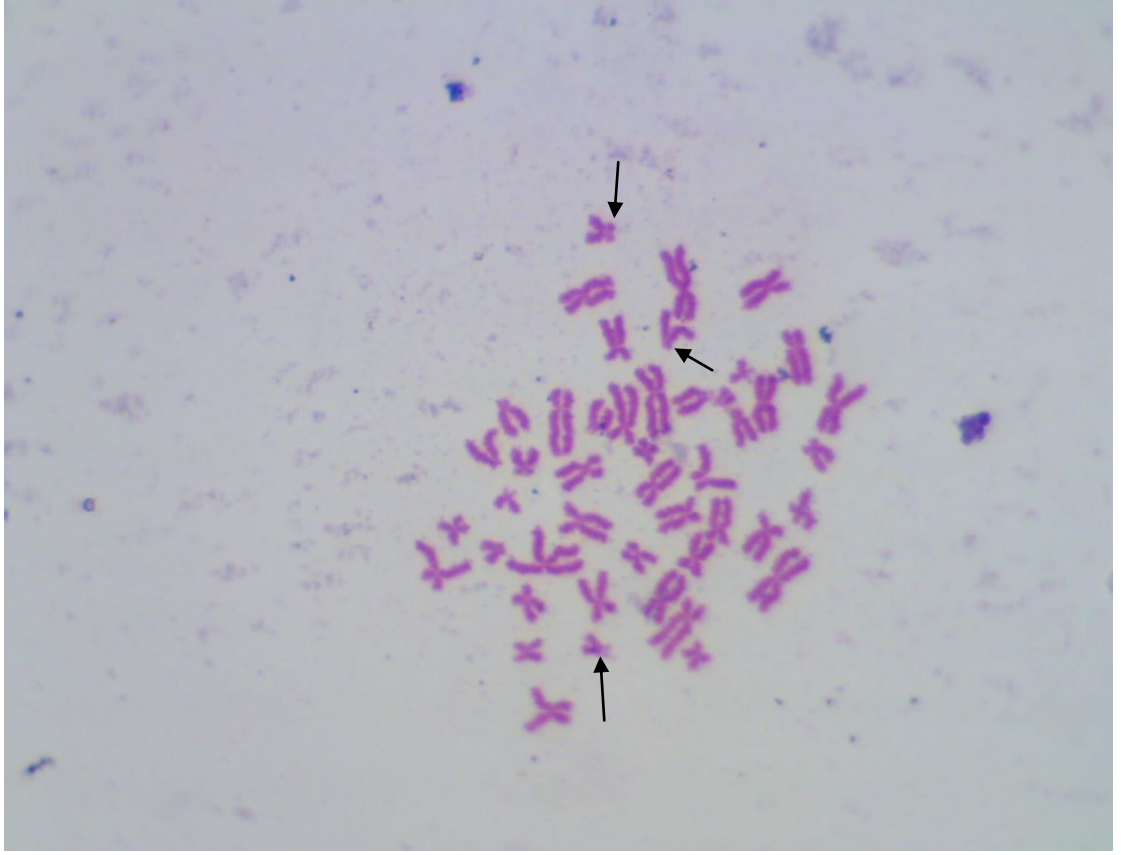
*Değerler Ortalama \pm Standart Sapma olarak verilmiştir (n=4). Aynı sütundaki farklı harfler $P < 0.05$ düzeyinde istatikselsel farklılığı ifade etmektedir. Kontrol⁻ = Fizyolojik su, Kontrol⁺ = Mitomisin-C (10^{-7} M).



Şekil 4.8. Kalsiyum fosfat maruziyeti sonucunda gözlenen KA/Hücre değerleri



Şekil 4.9. Kalsiyum fosfat bileşiğinin 500 ppm’de neden olduğu kromozomal aberasyon (kromatid kırığı)



Şekil 4.10. Kalsiyum fosfat bileşiğinin 1000 ppm’de neden olduğu kromozomal aberasyon (Kromozom kırığı)

4.2.2. Mikroçekirdek testi sonuçları

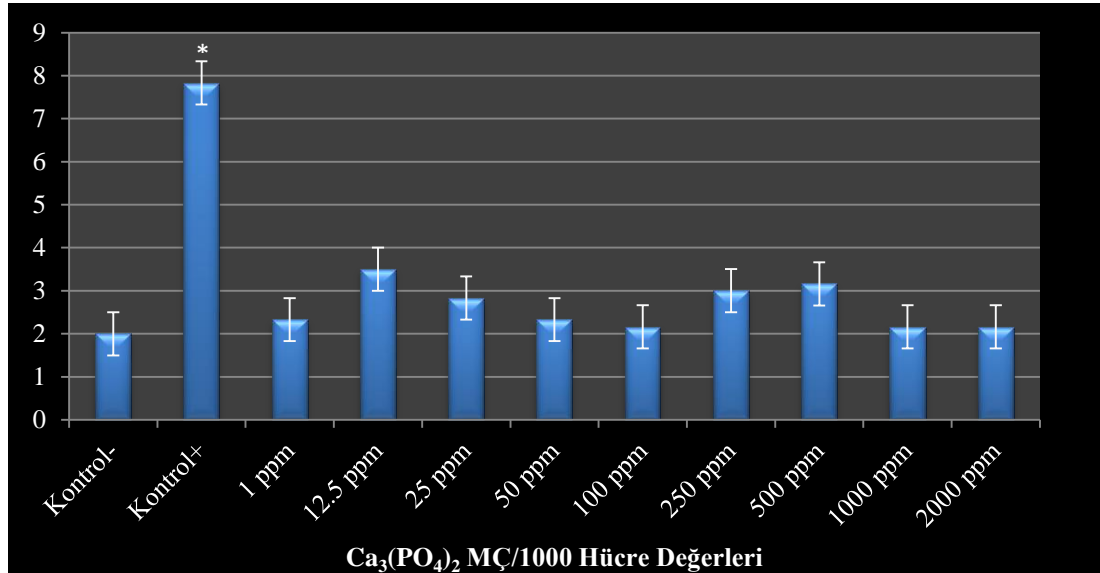
İn vitro koşullarda MÇ/1000 hücre değerleri, bütün konsantrasyonlar için 2.00 ± 0.35 ve 7.83 ± 0.91 değerleri arasında bulunmuştur. Negatif kontrol grubu için tespit edilen MÇ/1000 hücre değeri (2.00 ± 0.35) ile deney gruplarından elde edilen MÇ/1000 değerleri arasında istatistikî açıdan herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Farklı konsantrasyonlarda kültürlere uygulanan kalsiyum fosfat hiçbir dozda kontrol grubuna kıyasla MÇ sıklığında belirgin değişikliğe yol açmamıştır. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan MMC’nin MÇ/1000 hücre değeri (7.83 ± 0.91), hem kontrol grubunun hem de deney gruplarının MÇ/1000 hücre değerlerinden istatistikî olarak farklı çıkmıştır (Şekil 4.11). Kalsiyum fosfat nanopartikülünün tam kan kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu MÇ/1000 hücre değerleri Çizelge 4.4’de sunulmuştur.

Mikroçekirdek test tekniğine göre hazırlanmış preparatlardan elde edilen örnek MÇ fotoğrafları Şekil 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14’de gösterilmiştir.

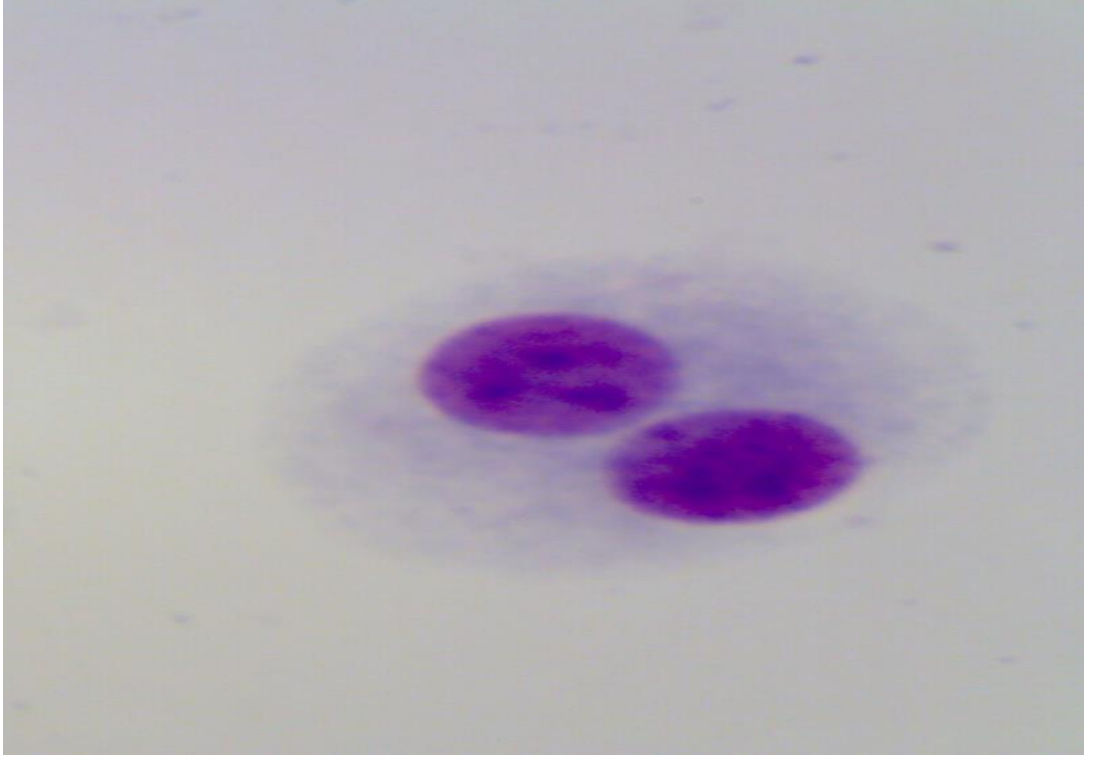
Çizelge 4.4. *In vitro* koşullarda kalsiyum fosfat bileşiğinin konsantrasyonlara göre oluşturduğu MÇ/1000 hücre ve MÇ sayısına göre ÇÇH (çift çekirdekli hücre) dağılımı

Gruplar	Sayılan toplam ÇÇH	MÇ sayısına göre ÇÇH dağılımı			MÇ/1000 hücre
		0	1	2	
Kontrol ⁻	6000	5988	12	0	2.00±0.35 ^a
Kontrol ⁺	6000	5953	44	3	7.83±0.91 ^b
1 ppm	6000	5986	13	1	2.33±0.30 ^a
12.5 ppm	6000	5979	21	0	3.50±0.22 ^a
25 ppm	6000	5983	17	0	2.83±0.41 ^a
50 ppm	6000	5986	14	0	2.33±0.29 ^a
100 ppm	6000	5987	13	0	2.16±0.29 ^a
250 ppm	6000	5982	18	0	3.00±0.43 ^a
500 ppm	6000	5981	19	0	3.16±0.37 ^a
1000 ppm	6000	5987	13	0	2.16±0.36 ^a
2000 ppm	6000	5987	13	0	2.16±0.31 ^a

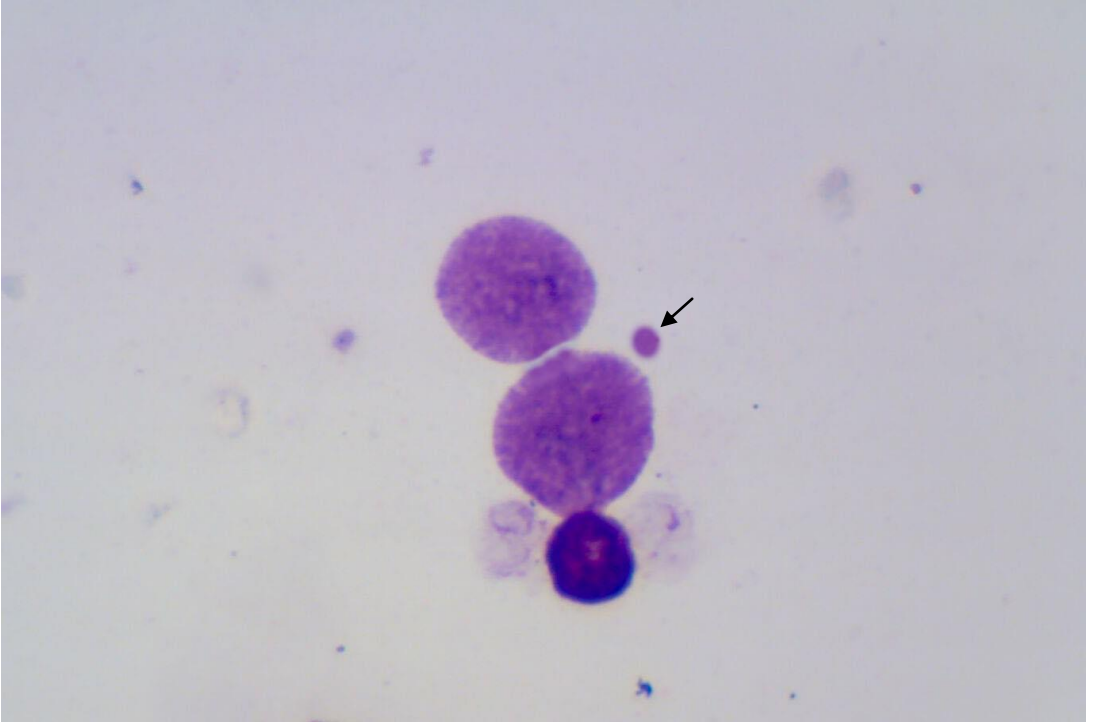
*Değerler Ortalama±Standart Sapma olarak verilmiştir (n=4). Aynı sütundaki farklı harfler P<0.05 düzeyinde istatistiksel farklılığı ifade etmektedir. Kontrol⁻= Fizyolojik su, Kontrol⁺= Mitomisin-C (10⁻⁷M).



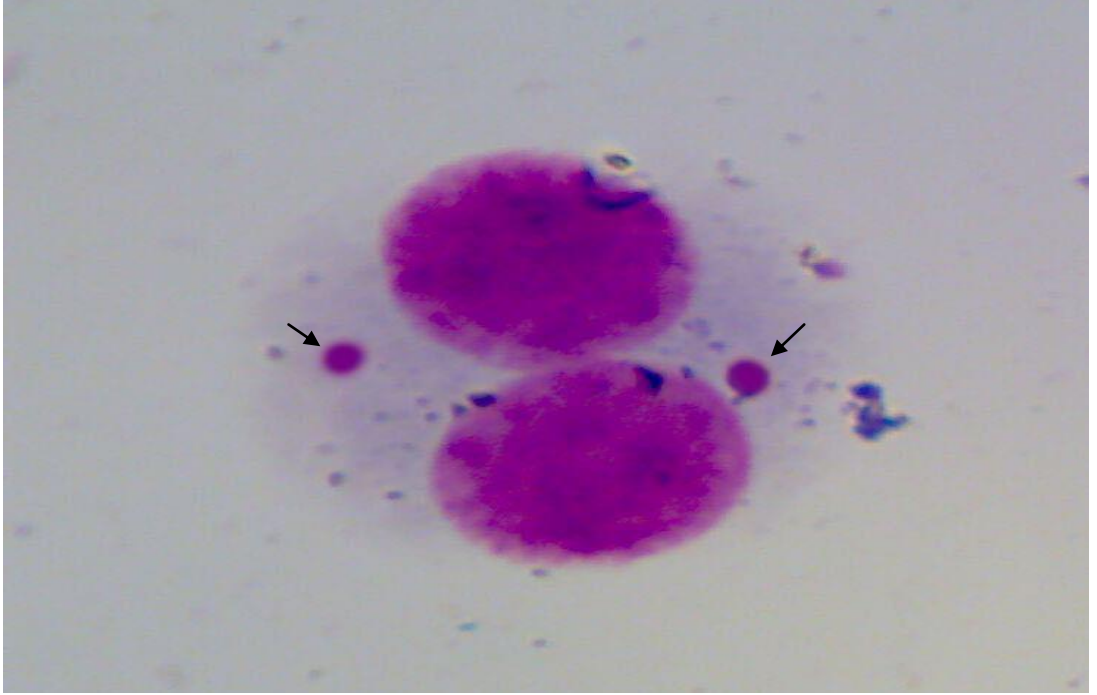
Şekil 4.11. Kalsiyum fosfat maruziyeti sonucunda gözlenen MÇ/1000 hücre değerleri



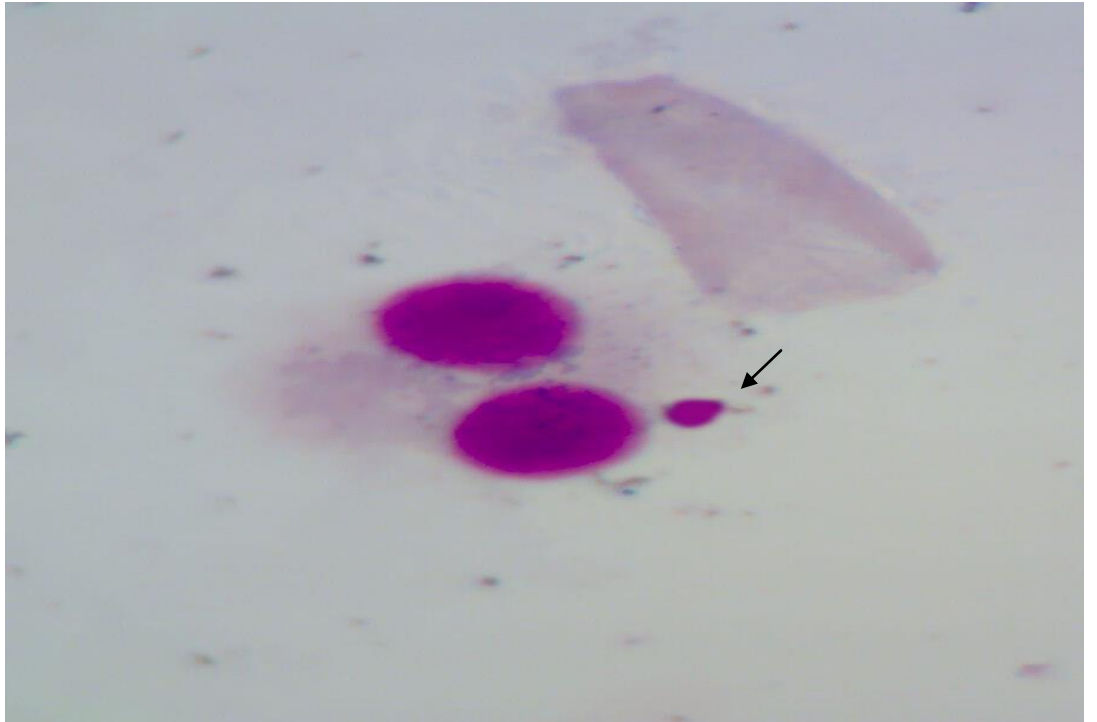
Şekil 4.12. Karyokinez evresini tamamlamış çift çekirdekli lenfosit hücresi



Şekil 4.13. 500 ppm kalsiyum fosfat maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu



Şekil 4.14. 1000 ppm kalsiyum fosfat maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu



Şekil 4.15. 2000 ppm kalsiyum fosfat maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu

4.3. Çinko oksit (ZnO) Nanopartikülüne Ait Sonuçlar

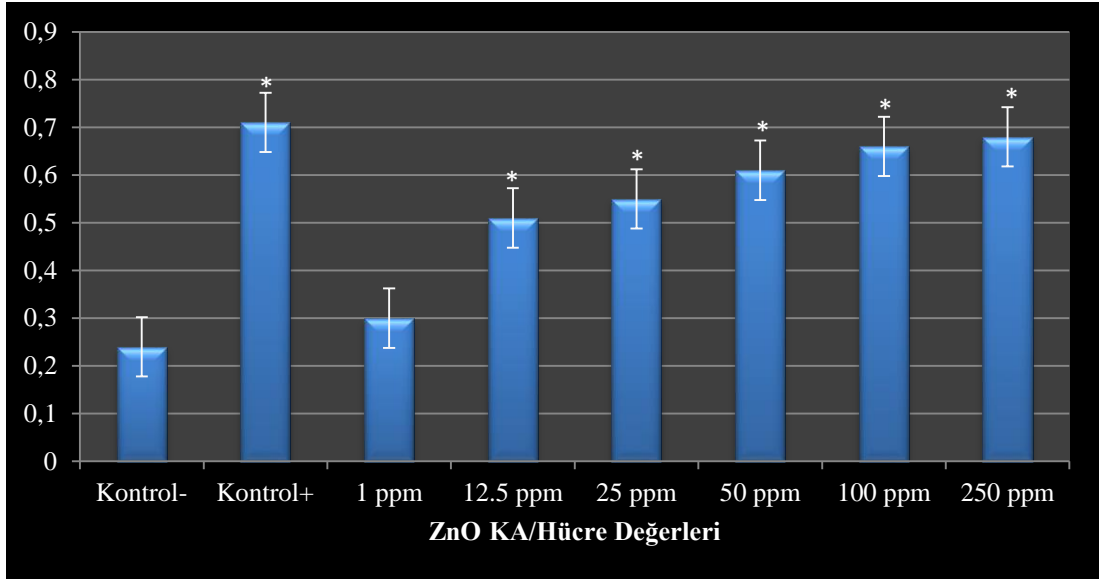
4.3.1. Kromozom aberasyon testi sonuçları

Test bileşiği olarak kullanılan çinko oksit nanopartikülünün *in vitro* koşullarda kromatid ve kromozom tipi aberasyonların incelendiği KA testi sonuçları KA/hücre değerlerinin tüm uygulama dozları için 0.24 ± 0.03 ve 0.71 ± 0.07 değerleri arasında olduğunu göstermiştir. Ayrıca ZnO'un 500 ppm ve yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkilerinden dolayı kültürlerin üreme koşullarını olumsuz etkileyerek steriliteye neden olduğu gözlenmiştir. Kan kültürlerine uygulanan çinko oksit 'in 1 ppm hariç bütün dozları kontrol grubuna (0.24 ± 0.03) kıyasla KA sıklığında istatistikî olarak anlamlı artışa sebep olmuştur. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan MMC ise hem kontrol grubuna hem de çinko oksidin uygulanan konsantrasyonlarına kıyasla KA sıklığında belirgin bir artışa sebep olmuştur (Şekil 4.16). Etkisi araştırılan çinko oksit bileşiğinin konsantrasyonlarına bağlı olarak tam kan kültürlerinde ortaya koyduğu KA/hücre değerleri Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Ayrıca metafaz alanlarındaki KA görünümüleri Şekil 4.16 ve 4.17'de verilmiştir.

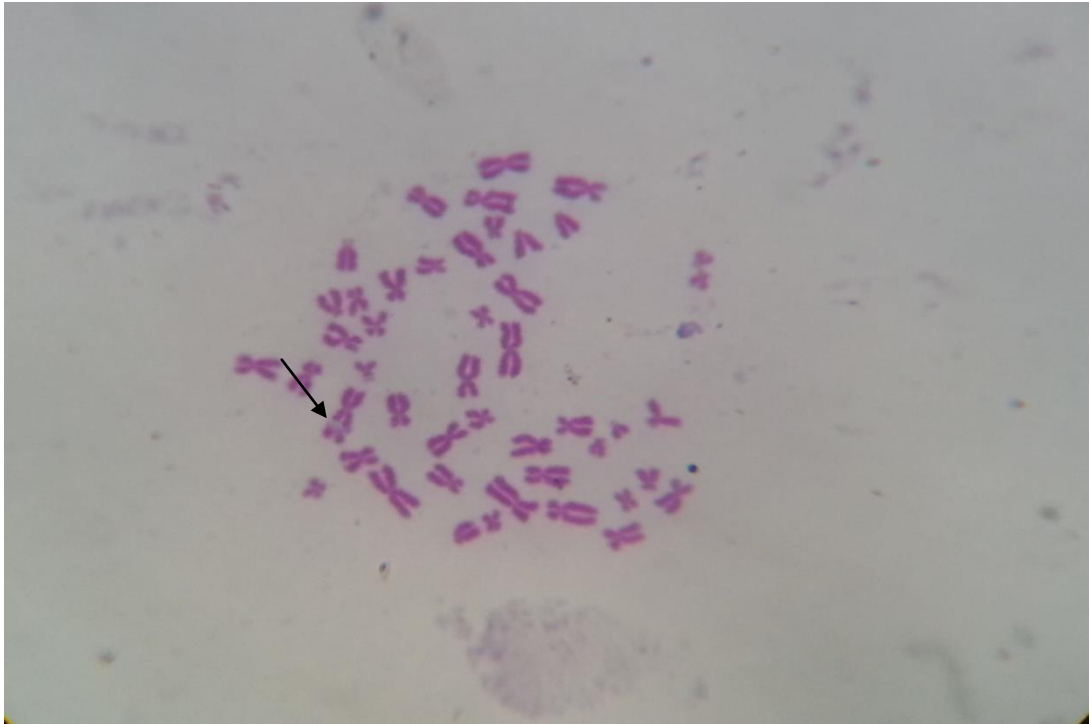
Çizelge 4.5. *In vitro* koşullarda çinko oksit bileşiğinin konsantrasyonlarına göre oluşturduğu KA değerlerinin istatistiksel dağılımı

Gruplar	Kromatid tipi		Kromozom tipi		KA/hücre \pm S.S
	Gap	Kırık	Gap	Kırık	
Kontrol ⁻	0.38	0.35	0.17	0.10	0.24 ± 0.03^a
Kontrol ⁺	0.90	0.75	0.63	0.58	0.71 ± 0.07^b
1 ppm	0.44	0.40	0.18	0.14	0.29 ± 0.06^a
12.5 ppm	0.67	0.53	0.47	0.40	0.51 ± 0.04^b
25 ppm	0.74	0.57	0.47	0.43	0.55 ± 0.03^b
50 ppm	0.72	0.66	0.58	0.47	0.61 ± 0.04^b
100 ppm	0.79	0.69	0.62	0.55	0.66 ± 0.03^b
250 ppm	0.83	0.75	0.59	0.57	0.68 ± 0.03^b
500 ppm	-	-	-	-	-
1000 ppm	-	-	-	-	-
2000 ppm	-	-	-	-	-

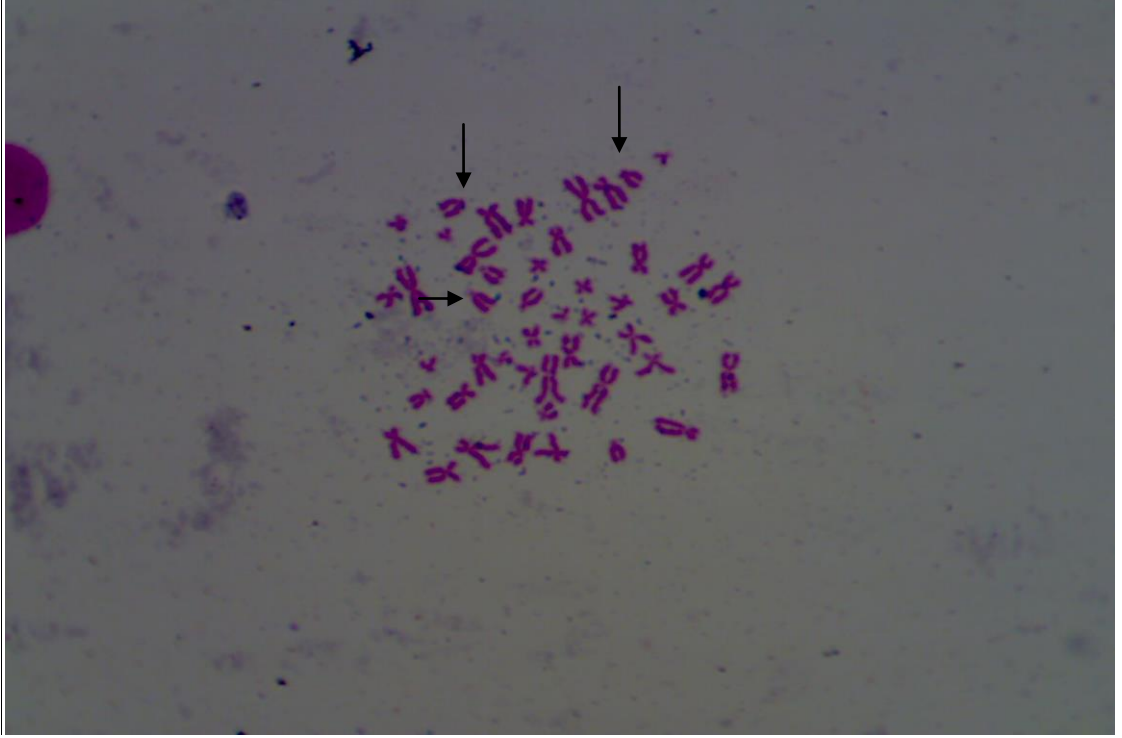
*Değerler Ortalama \pm Standart Sapma olarak verilmiştir (n=4). Aynı sütundaki farklı harfler P<0.05 düzeyinde istatistiksel farklılığı ifade etmektedir. Kontrol⁻= Fizyolojik su, Kontrol⁺= Mitomisin-C (10^{-7} M).



Şekil 4.16. Çinko oksit maruziyeti sonucunda gözlenen KA/Hücre değerleri



Şekil 4.17. Çinko oksit bileşiğinin 100 ppm'de neden olduğu kromozomal aberasyon (kromozom gap)



Şekil 4.18. Çinko oksit bileşiğinin 100 ppm’de neden olduğu kromozomal aberasyon (kromozom kırığı)

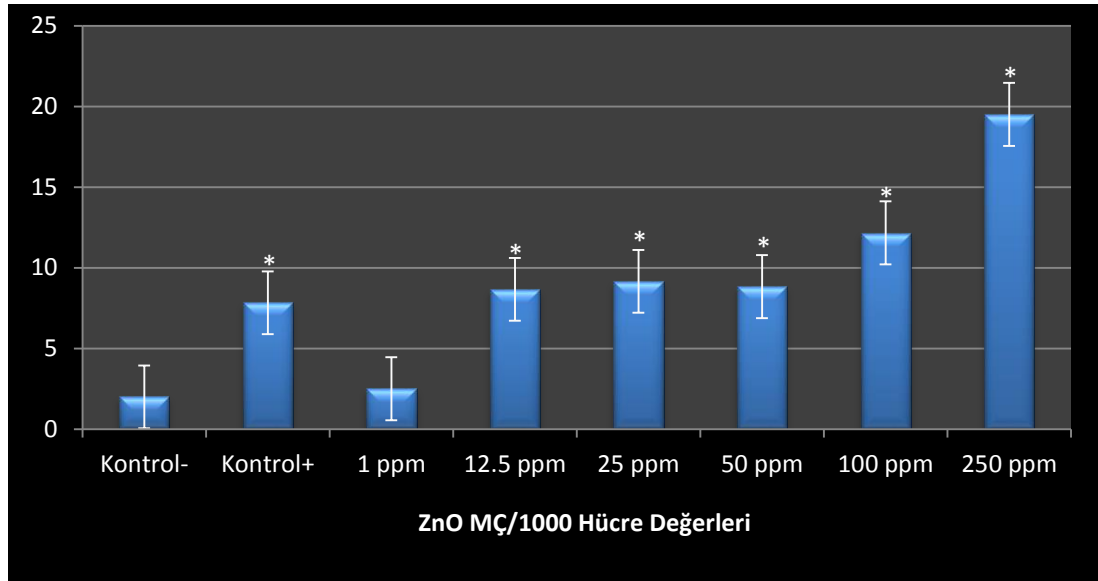
4.3.2. Mikroçekirdek testi sonuçları

In vitro koşullarda MÇ/1000 hücre değerleri, bütün konsantrasyonlar için 2.00 ± 0.35 ve 19.50 ± 1.41 değerleri arasında bulunmuştur. Negatif kontrol grubu için tespit edilen MÇ/1000 hücre değeri (2.00 ± 0.35) ile 1 ppm hariç diğer bütün deney gruplarından elde edilen MÇ/1000 değerleri arasındaki farkların istatistikî olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan MMC’nin MÇ/1000 hücre değeri (7.83 ± 0.91), kontrol grubu ve 1 ppm deney grubunun MÇ/1000 hücre değerlerinden istatistikî olarak farklı çıkmıştır (Şekil 4.19). Yine 500 ppm ve daha yüksek deney gruplarında sitotoksositeye bağlı olarak hücre sayılamamıştır. Çinko oksit nanopartikülünün tam kan kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu MÇ/1000 hücre değerleri Çizelge 4.6’da sunulmuştur. Mikroçekirdek test tekniğine göre hazırlanmış preparatlardan elde edilen örnek MÇ fotoğrafları Şekil 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22’de gösterilmiştir.

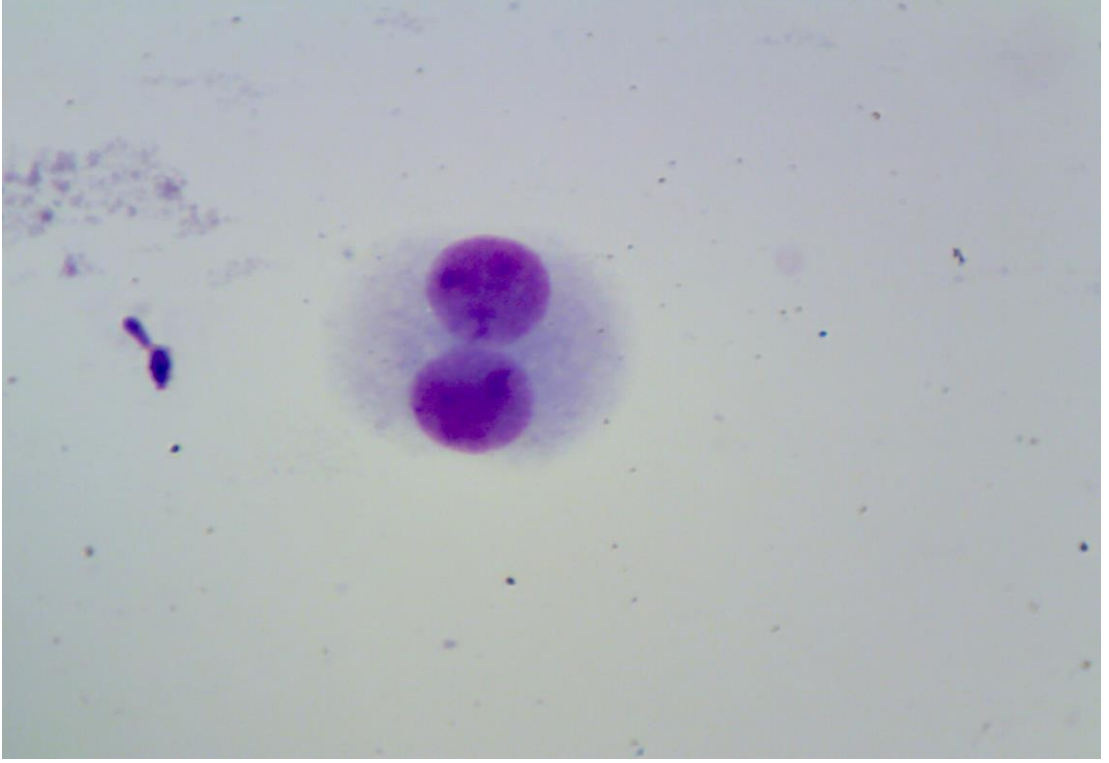
Çizelge 4.6. *In vitro* koşullarda çinko oksit bileşiğinin konsantrasyonlara göre oluşturduğu MÇ/1000 hücre ve MÇ sayısına göre ÇÇH (çift çekirdekli hücre) dağılımı

Gruplar	Sayılan toplam ÇÇH	MÇ sayısına göre ÇÇH dağılımı			MÇ/1000 hücre
		0	1	2	
Kontrol ⁻	6000	5988	12	0	2.00±0.35 ^a
Kontrol ⁺	6000	5953	44	3	7.83±0.91 ^b
1 ppm	6000	5985	15	0	2.50±0.20 ^a
12.5 ppm	6000	5948	52	0	8.66±1.31 ^b
25 ppm	6000	5945	55	0	9.16±1.34 ^b
50 ppm	6000	5947	53	0	8.83±1.21 ^b
100 ppm	6000	5927	73	0	12.16±1.54 ^b
250 ppm	6000	5883	117	0	19.50±1.41 ^b
500 ppm	-	-	-	-	-
1000 ppm	-	-	-	-	-
2000 ppm	-	-	-	-	-

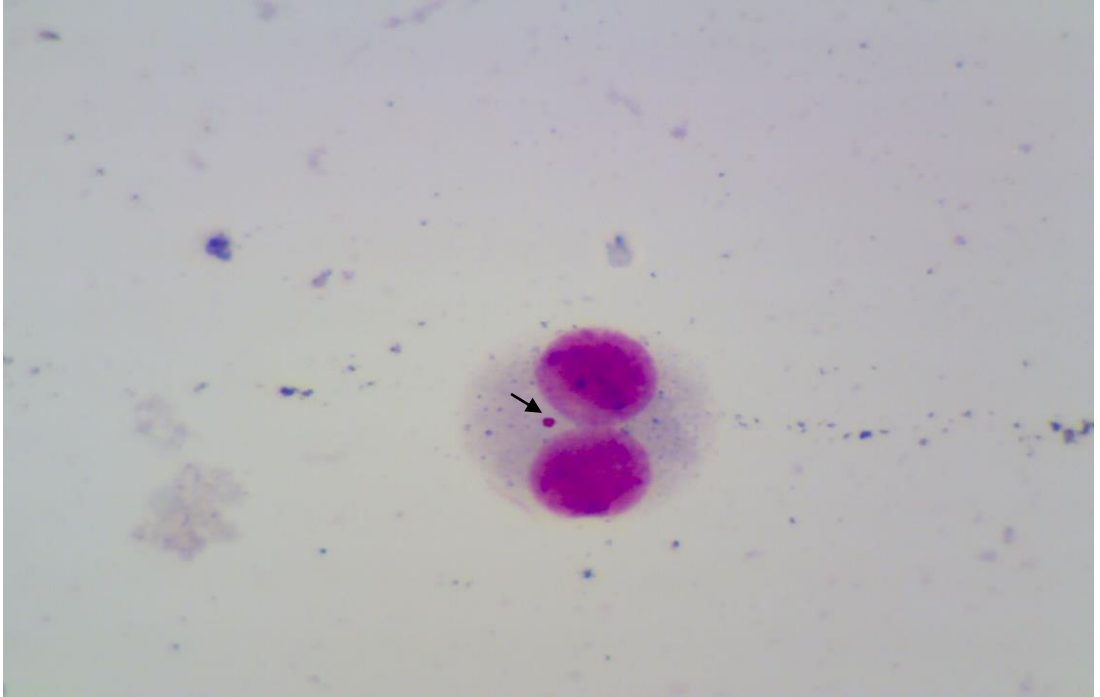
*Değerler Ortalama±Standart Sapma olarak verilmiştir (n=4). Aynı sütundaki farklı harfler P<0.05 düzeyinde istatistiksel farklılığı ifade etmektedir. Kontrol⁻= Fiziyojik su, Kontrol⁺= Mitomisin-C (10⁻⁷M).



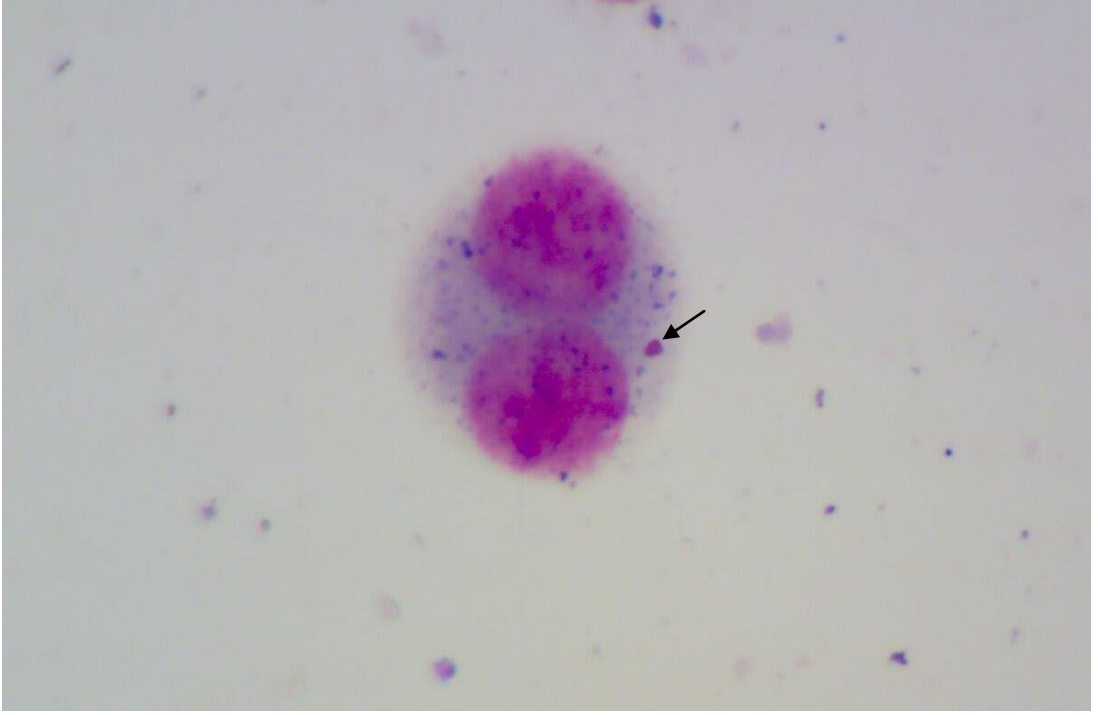
Şekil 4.19. Çinko oksit maruziyeti sonucunda gözlenen MÇ/1000 hücre değerleri



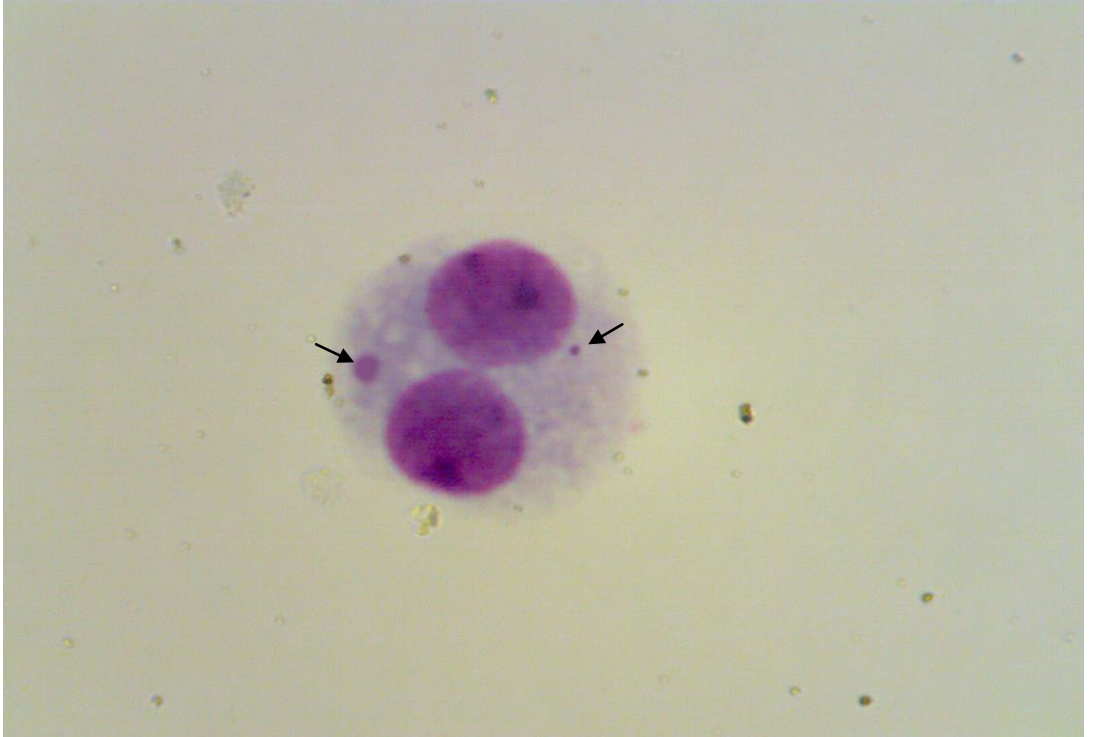
Şekil 4.20. Karyokinezi evresini tamamlamış çift çekirdekli lenfosit hücresi



Şekil 4.21. 50 ppm çinko oksit maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu



Şekil 4.22. 100 ppm çinko oksit maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu



Şekil 4.23. 250 ppm Çinko oksit maruziyeti sonucunda gözlenen mikroçekirdek oluşumu

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez çalışmamız kapsamında KA ve MÇ test sistemleri kullanılarak, biyomedikal süreçlerde biyomalzeme olarak kullanılabilir Al₂O₃, Ca₃(PO₄)₂ ve ZnO nanopartiküllerinin insan lenfosit kültürlerinde genotoksik etkileri araştırılmıştır. Araştırma kapsamında kullanılan nanomalzemelerin toksik etkilerini belirlemek amacıyla bugüne kadar yapılmış olan önceki araştırmalarda farklı hücre sistemlerine (fare ovarium hücresi, bitki hücre süspansiyonları, insan bronş epitel hücreleri) KA ve MÇ testleri uygulanmıştır. Bu çalışmada Al₂O₃, Ca₃(PO₄)₂ ve ZnO nanomateryallerinin *in vitro* insan periferik kan kültürleri üzerinde doza bağlı genetik etkileri ilk kez değerlendirilmektedir. Araştırma sonuçları alüminyum oksit ve kalsiyum fosfat biyomateryallerinin genetik hasara yol açmadığını ortaya koymuştur. Nitekim kontrol grubuna kıyasla test bileşiklerine maruz kalan lenfosit kültürlerinde KA ve MÇ oranlarında istatistiksel olarak önemli bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. Aksine çinko oksit nanopartiküllerinin ise uygulanan doz aralıklarında genotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Mevcut literatür bilgileri, KA testinin biyolojik ve kimyasal mutajenlere maruziyetin çok önemli ve faydalı bir indikatörü olduğunu kabul etmektedir (Padovani *et al.* 1997). Benzer şekilde MÇ testi, klastojenik ve anojenik aktivitelerde kromozom kırığı, kromozom kaybı ve kromozom ayrılmasına dair güvenilir ölçüm olanakları sağlamaktadır (Karaman *et al.* 2009).

Çalışma bulgularımıza paralel olarak sıçan fibroblast (L929) ve insan deri fibroblast (BJ) hücrelerinde EZ4U testi ile Al₂O₃ nanopartiküllerinin (10-400 µg/ml konsantrasyon aralığında) toksik etkilerinin araştırıldığı *in vitro* çalışmada Al₂O₃'ün sitotoksik etkili olmadığı tespit edilmiştir (Radziun *et al.* 2011). Ames testi ile *S. typhimurium* türünün farklı suşları üzerinde nano-Al₂O₃'ün etkisinin araştırıldığı çalışmada toksisite saptanmamıştır (Balasubramanyam *et al.* 2010). Benzer şekilde *in vitro* olarak yürütülen diğer bir çalışmada fare lenfoma ve insan bronş epitel hücrelerinde comet ve MLA (mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay) testi ile nano-Al₂O₃'ün mutajenik olmadığı bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada 0-1250 µg/mL konsantrasyon aralığında genotoksik etki gözlemlenmemiştir (Kim *et al.* 2009).

Bu bulguların aksine CHO-K1 (Chinese hamster ovary) hücrelerine Al_2O_3 nanopartikülünün toksik etkilerini belirlemek amacıyla *in vitro* koşullarda NR, MTT, KKD ve MÇ analizleri uygulanmış ve bu molekülün sitotoksik ve genotoksik etkili olduğu ileri sürülmüştür (Di Virgilio *et al.* 2010). İlgili çalışma bulgularındaki farklılığın kullanılan hücre kültürlerinin ve kullanılan nanopartiküllerin boyutlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Chithrani *et al.* (2006) nanopartiküllerin partikül büyüklüğüne bağlı olarak hücreye alınma hızlarını ve toksik etkilerini karşılaştırmışlardır. Karşılaştırma sonuçlarına göre 50 nm büyüklüğündeki partiküllerin, 14 nm'den küçük partiküllerden daha hızlı hücreye alındığını ve toksik etkilerinin daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Nitekim bu çalışmada kullanılan Al_2O_3 'ün partikül büyüklüğü 4,175 nm iken, ilgili çalışmada 28 nm'dir. Benzer şekilde *in vivo* koşullarda KA ve MÇ testi sonuçlarına göre (sıçan kemik iliği hücrelerinde) Al_2O_3 nanomaterialinin 500, 1000 ve 2000 mg/kg doz aralığında genotoksik olduğu belirtilmiştir (Balasubramanyam *et al.* 2009). Deneilerin *in vivo* koşullarda gerçekleştirilmesinin ve çok yüksek dozlarda Al_2O_3 nanopartikülü kullanılmasının mevcut farklılığa neden olduğu kanaatindeyiz. Tez bulgularımız ve genel literatür verileri doğrultusunda Al_2O_3 'ün nanopartikül boyutta toksik etki göstermediği ve biyomalzeme olarak kullanılabilir olduğu teklif edilebilir.

$Ca_3(PO_4)_2$ nanopartikülünün toksisitesi ile ilgili literatürde kayıtlı bilgi bulunmamaktadır. Ancak kalsiyum veya fosfat içeren farklı bileşiklerin nanopartikül formları ile yapılan çalışmalar mevcuttur. Örneğin Jang *et al.* (2012) insan servikal kanser hücreleri (HeLa) üzerine CaP nanopartiküllerinin sitotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında MTT testi sonuçlarına göre söz konusu nanopartikülün sitotoksik potansiyelinin olmadığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde ICR (Imprinting Control Region) fareler üzerinde yapılan *in vivo* çalışmada yüksek dozlarda (1.3 g/kg ve 2.3 g/kg) $CaCO_3$ ve $Ca_3(C_6H_5O_7)_2$ nanopartiküllerine maruz bırakılan (oral olarak) farelere 7-gün akut oral toksisite ve tekrarlanan-doz 28-gün subkronik oral toksisite testleri uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre her iki nanopartikülün de yüksek dozlarda dahi toksik etki göstermediği rapor edilmiştir (Huang *et al.* 2009). Dolomit [$CaMg(CO_3)_2$] adı verilen ve kalsiyum içeren nanopartikül boyuttaki bileşiğin sitotoksik

ve genotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmada MTT, TB ve MN testleri kullanılarak söz konusu nanopartikülün insan akciğer epitel hücreleri (A₅₄₉) üzerinde 0-400 µg/mL doz aralığında hem sitotoksik hem de genotoksik etkisinin olduğu bildirilmiştir (Patil *et al.* 2012). Bakır iyodür ve bakır fosfat nanoparçacıklarının sitotoksik etkilerinin araştırıldığı *in vitro* çalışmada insan meme kanseri hücreleri (MCF7) farklı konsantrasyonlarda (0-50 µg/mL) nanopartikül çözeltilerine maruz bırakılmış ve hücre canlılığının belirlenmesi amacı ile MTT testi uygulanmıştır. Elde edilen test sonuçlarına göre her iki bileşiminde sitotoksik olduğu sonucuna varılmıştır (Laha *et al.* 2012). Toksikite tespit edilen çalışmalarda bileşiklerin toksik olduğu gösterilmesine rağmen bu toksisitenin bileşiği oluşturan elementlerin hangisinden kaynaklandığı tam olarak anlaşılamamıştır.

Mikro boyutlara sahip kalsiyum fosfat bileşiği ile yapılan çalışmalar ayrıca incelenmiştir. Kalsiyum fosfat bileşikler mükemmel biyoyumluluk ve toksik olmayan özellikleri nedeniyle tercih edilen biyomedikal materyallerdir (Kumta *et al.* 2005). Örneğin Young *et al.* (2010) moleküler biyolojide kullanılan bir büyüme faktörü PDGF-BB ile β-TCP kombinasyonunun biyoyumluluğunu araştırmışlar ve sonuç olarak bu kombinasyonun sistemik veya lokal toksisiteye yol açmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Beyaz Yeni Zelanda tavşanları ile *in vivo* olarak yürütülen çalışmada β-TCP'in biyoyumluluğunun yüksek olduğu ve toksik etki göstermediği rapor edilmiştir (Bauer *et al.* 2009). β-TCP molekülünün subakut sistemik toksisitesi *in vivo* olarak araştırılmış (sıçan femur kemiği) ve toksik herhangi bir bulgu kaydedilmemiştir (Muramatsu *et al.* 2005). L-929 fibroblast hücre hattında AlamarBlue testi ile *in vitro* olarak yürütülen hücre canlılığının takip edildiği deneyde β-TCP bileşiklerinin sitotoksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır (Zhang *et al.* 2009). Tez çalışmamız kapsamında elde edilen veriler nanomateryal boyutta da Ca₃(PO₄)₂ bileşiğinin toksik olmadığını ve biyomedikal uygulamalarda biyomalzeme olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Çinko oksit nanopartiküllerinin (nano-ZnO) sitotoksik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla birçok araştırma yapılmıştır ve yapılan araştırmalarda bu molekülün genotoksik etkisinin olduğu ortaya konmuştur. Nano-ZnO'nun düşük

konsantrasyonlarda bile lipid peroksidasyonuna ve oksidatif strese yol açarak insan epidermal hücrelerinde genotoksisiteye sebep olabileceği ileri sürülmüştür (Vandeputte *et al.* 1994; Osman *et al.* 2010). Comet ve cytokinesis-blocked micronucleus testleri ile Hep-2 (insan monolayer tümör hücreleri) hücre hattında nano-ZnO' un toksisitesi araştırılmış ve bu molekülün sitotoksisiteye sebep olmadan genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Osman *et al.* 2010). Benzer şekilde ZnO nanopartiküllerinin 0-500 mg/L doz aralığında insan bronş epitel hücreleri (16HBE14o-) üzerinde methyl tetrazolium (MTT) testi ile toksisitesi araştırılmış ve ZnO'un düşük konsantrasyonlarda bile sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (González *et al.* 2012). İnsan karaciğer (HepG2), epidermal keratinosit (HEK) ve epidermal (A431) hücreleri ile yürütülen farklı çalışmalarda nano-ZnO'un bu hücrelerde (Comet testi) DNA hasarına yol açtığı bildirilmiştir (Sharma *et al.* 2009, 2011a, 2011b). Mevcut çalışma sonuçlarına paralel olarak Dufour *et al.* (2006) CHO hücrelerinde kromozom aberasyon testi ile yürüttükleri çalışmada nano-ZnO moleküllerinin genotoksisiteye neden olduğunu göstermiştir. Comet ve MTT testi ile nano-ZnO bileşiklerinin insan mukozal hücreleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik etkisi gösterilmiştir (Hackenberg *et al.* 2011). Tez çalışmamız kapsamında elde edilen veriler ve ZnO nanopartikülleri ile yapılan diğer toksisite çalışmaları bu bileşiğin çeşitli organizmalarda düşük doz değerlerinde bile toksik etkili olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, biyomedikal uygulamalarda biyomalzeme olarak kullanılan alüminyum oksit ve kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin *in vitro* insan kan kültürlerinde genotoksik etkilerinin olmadığı bu nedenle Al_2O_3 ve $Ca_3(PO_4)_2$ nanomateryallerinin biyomedikal uygulamalarda biyoyumlu olduğu kanaatindeyiz. Mevcut bilgilerimiz doğrultusunda kalsiyum fosfatın nanopartikül boyutta toksik etkisinin araştırıldığı ilk çalışma sunulan tez araştırmamızdır. Kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin toksik etkisini belirlemek amacıyla farklı hücre kültürleri üzerinde çeşitli genotoksisite testleri ile araştırmalar yapılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir. Çalışmamız kapsamında genotoksik etkisi araştırılan ZnO nanopartiküllerinin ise genotoksik potansiyele sahip oldukları ve biyoyumlu olmadıkları sonucuna varılmıştır. Her ne kadar ZnO nanopartikülünün toksisitesinin çözünme ürünü olan Zn^{+2} iyonlarından kaynaklandığı düşünülse de (John

et al. 2010) bu konu henüz aydınlatılmış değildir. Bu nedenlerle ZnO nanopartiküllerinin biyomalzeme veya kaplama malzemesi olarak kullanılmalarının uygun olmadığı, buna ek olarak yapılacak olan ileri çalışmaların söz konusu nanopartiküllerin toksikokinetiği üzerine odaklanması gerektiği önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Akdoğan, G., 1998. Ti-6Al-4V Alaşımının Biokorozyon ve Biouyumluluk Özelliklerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Albrektsson, T., Johansson, C., 2001. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.*, 10, 96–101.
- Allen, P., 1996. Titanium alloy development. *Adv. Mater. Processes*, 154, 35-37.
- Anish, K.M., Jung S., Ji T., 2011. Protein biosensors based on polymer nanowires, carbon nanotubes and zinc oxide nanorods. *Sensors*, 11, 5087–5111.
- Anonim 2013. <http://nanogenc.org/index.php/nanoteknoloji-nedir> (17.12.2013)
- Ayaz, T.B., 2001. Bazı İlaç Öncül Maddelerinin Mutajenik Etkilerinin Bakteriyal Ve Hücre Kültürü Testleriyle Araştırılması. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Balasubramanyam, A., Sailaja, N., Mahboob, M., Rahman, M.F., Hussain, S.M., Grover, P., 2010. *In vitro* mutagenicity assessment of aluminium oxide nanomaterials using the salmonella/microsome assay. *Toxicol in vitro*, 24, 1871-1876.
- Balasubramanyam, A., Sailaja, N., Mahboob, M., Rahman, M.F., Misra, S., Hussain, S.M., Grover, P., 2009. Evaluation of genotoxic effects of oral exposure to Aluminum oxide nanomaterials in rat bone marrow. *Mutation Research*, 676, 41-47.
- Bauer, N.B., Brinke, N., Heiss, C., Skorupa, A.B., Peters, F., Kraus, R., Schnettler, R., Moritz, A., 2009. Biodegradable beta-Tri Calciumphosphate/hydroxyethyl methacrylate enhanced three component bone adhesive demonstrates biocompatibility without evidence of systemic toxicity in a rabbit model. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 90, 767-777.
- Ben-Nissan, B., Pezzotti, G., 2004. Bioceramics: An Introduction. In: *Engineering Materials for Biomedical Applications*, Ed: S.W. Teoh. World Scientific Publishing, New Jersey, (6), 1-15.
- Berlin, R.M., Gustavson, L.J., Wang, K.K., 1999. In Cobalt-Base Alloys for Biomedical Applications. Ed: J.A. Disegi, R.L. Kennedy, R. Pilliar. ASTM STP 1365, West Conshohocken, 62-70.
- Bhattacharya, A., 2000. Radiation and industrial polymers. *Polymer Science*, 25, 371-401.
- Billotte, W.G., 2006. Ceramic Biomaterials. *The Biomedical Engineering Handbook Edition*. Ed. Joseph D.Bronzino, CRC Press LLC, Boca Raton, 39.1-39.34.
- Black, J., Hastings, G., 1998. *Handbook of biomaterials properties*. Thomson Science, 654 p, London.
- Browne, M., Gregson, P.J., 1993. Surface Modification of Titanium Alloy Implants. *Biomaterials*, 15 (11), 894-898.
- Chibber, S., Ansari, S.A., Satar R., 2013. New vision to CuO, ZnO, and TiO₂ nanoparticles: their outcome and effects. *J. Nanopart. Res.*, 15, 1492-1503.
- Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C.W., 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters*, 6 (4), 662-668.

- Chunxiang, C., Baomin, H., Lichen, Z., Shuangjin, L., 2011. Titanium alloy production technology, market prospects and industry development. *Materials and Design*, 32, 1684-1691.
- Cui, C.X., Shen, Y.T., Xu, Y.J., 2003. Fabrication and biocompatibility of K₂Ti₆O₁₃ bioceramic coating on the surface of the titanium alloy TiAl_xZr_x-4Sn_x-3.5Nb_x-4.5. *Rare. Metal Mater. Eng.*, 32(8), 627-631.
- Di Virgilio, A.L., Reigosa, M., Arnal, P.M., Mele M.F.L., 2010. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of Hazardous Materials*, 177, 711-718.
- Dorozhkin, S.V., Epple, M., 2002. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed*, 41, 3130-3146.
- Drexler, K.E., 2004. Nanotechnology: From Feynman to Funding. *Bull. Sci. Technol. Soc.*, 24 (1), 21-27.
- Dufour, E.K., Kumaravel, T., Nohynek G.J., Kirkland D., Toutain H., 2006. Clastogenicity, photo-clastogenicity or pseudophoto-clastogenicity: Genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese Hamster Ovary cells. *Toxicology Letters*, 164, 290-291.
- Ergün, Y., 2010. Titanyum Yüzeyine Sol-Jel ve Biyomimetik Yöntemleriyle İnce Film Çeklinde Hidroksiapatitin Kaplanması ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Ersan, I., 2006. Sigorta Sektörü Nanoteknoloji Devrimine Hazır mı?. *Best*, 32, 11-14.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* mikronükleus technique. *Mutation Research*, 455, 81-95.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1985. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, 43, 233-246.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of *in vivo* ageing and dose X-irradiation. *Mutat. Res.*, 161, 193-198.
- Gerloff, K., Albrecht, C., Boots, A.W., Förster, I., Schins, R.P.F., 2009. Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. *Nanotoxicology*, 3, 355-364.
- González, L.O., Alvarez, R.S., Boitano, S., Field, J.A., 2012. Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells. *Environmental Sci. Tech.*, 46, 10271-10278.
- Gökçek, E.I., 2006. Ortopedik İmplant ve Protez Tasarımı İçin Biyomalzemelerin Mekanik Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak.
- Graves, G.A., Hentrich, R.L., Stein, H.G., Bajpai, P.K., 1972. Resorbable Ceramic Implants in Bioceramics. *Engineering and Medicine (Part I)*. Hall, C.W., Hulbert, S.F., Levine, and Young, F.A., Eds, 91-115. Interscience Publishers, New York.
- Gümüşderelioğlu, M., 2002. Biyomalzemeler. *Bilim ve Teknik*, Temmuz 2002 Sayısı, 2-4, 23.

- Hackenberg, S., Scherzed, A., Technau, A., Kessler, M., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Burghartz, M., Hagen, R., Kleinsasser, N., 2011. Cytotoxic, genotoxic and pro inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 25, 657- 663.
- Handy, R.D., Owen, R., Valsami-Jones, E., 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17 (5), 315-325.
- Hatayoğlu, Ş.E., 2004. *In Vitro* Radyasyon Uygulaması Sonucu Lenfositlerde Meydana Gelen Kalıcı Olmayan Kromozom Aberasyonları ile Mikronükleus Oluşumları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Heddle, J.A., Countryman, R.I., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 41, 321-32.
- Helsen, J.A., Breme, H.J., 1998. Metals as biomaterials. Wiley, 510 page, Chishester.
- Hench L.L., 1991. Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74(7), 1487-1510.
- Henrich, R.L., Graves, G.A., Stein, H.G., Bajpai, P.K., 1971. An evaluation of inert and resorbable ceramics for future clinical applications. *J. Biomed. Mater. Res.*, 5(1), 25-51.
- Hilt, J.Z., 2004. Nanotechnology and biomimetic methods in therapeutics: molecular scale control with some help from nature. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 56, 1533-1536.
- Hollinger, J.O., Brekke, J., Gruskin, E., Lee, D., 1996. The role of bone substitutes. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 324, 55-65.
- Huang, S., Chen, J.C., Hsu, C.W., Chang, W.H., 2009. Effects of nano calcium carbonate and nano calcium citrate on toxicity in ICR mice and on bone mineral density in an ovariectomized mice model. *Nanotechnology*, 20, 1-7.
- Hulbert, S.F., 1993. The use of alumina and zirconia in surgical implants. An introduction to bioceramics, L. Larry Hench, June Wilson. World Scientific, Singapore, 25-40.
- Ibrahim, A., Hamdy, A.S., 2011. Microstructure, Corrosion, and Fatigue Properties of Alumina-Titania Nanostructured Coatings. *Journal of Surface Engineered. Materials and Advanced Technology*, 1, 101-106.
- Ivasyshyn, O.M, Aleksandrov, A.V., 2008. Status of the titanium production, research, and applications in the CIS. *Mater Sci*, 44(3), 311-327.
- Jagetia, G.C., Jayakrishnan, A., Fernandes, D., Vidyasagar, M.S., 2001. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat. Res.*, 491, 9-16.
- Jang, S., Lee, S., Kim, H., Ham, J., Seo, J.H., Mok, Y., Noh, M., Lee, Y., 2012. Preparation of pH-sensitive CaP nanoparticles coated with a phosphate-based block copolymer for efficient gene delivery. *Polymer*, 53, 4678-4685.
- Jin, T., Sun, D., Su, J.Y., Zhang, H., Sue, H.J., 2009. Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, and *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Sci.*, 74, 46-52.
- John, E., Laskow, T.C., Buchser, W.J., Pitt, B.R., Basse, P.H., Butterfield, L.H., Kalinski, P., Lotze M.T., 2010. Zinc in innate and adaptive tumor immunity. *J. Transl. Med.*, 8, 118.

- Joksiš, G., Petroviš, S., Iliš, Ž., 2004. Age-related changes in radiation induced micronuclei, among healthy adults. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37, 1111-1117.
- Karaman, A., Kadi, M., Kara, F., 2009. Sister chromatid exchange and micronucleus studies in patients with Behcet's disease. *Journal of Cutaneous Pathology*, 36, 831-837.
- Katz, J.L., 1980. Anisotropy of Young's modulus of bone. *Nature*, 283, 106–107.
- Kawahara, H., 1989. *Oral Implantology and Biomaterials*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Kim, Y.J., Choi, H.S., Song, M.K., Youk, D.Y., Kim, J.H., Ryu, J.C., 2009. Genotoxicity of aluminum oxide (Al_2O_3) nanoparticle in mammalian cell lines. *Molecular and Cellular Toxicology*, 5, 172-178.
- Kocaeŕe, Ç., 2007. Nanotip: Yaŕam bilimlerinde nanoteknoloji uygulamaları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38, 33-38.
- Kose, N., Otuzbir, A., Peksen, C., Kiremitci, A., Dogan, A., 2013. A Silver Ion-doped Calcium Phosphate-based Ceramic Nanopowder-coated Prosthesis Increased Infection Resistance. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 471, 2532-2539.
- Kumta, P.N., Sfeir, C., Lee, D.H., Olton, D., Choi, D., 2005. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: Novel synthesis and characterization. *Acta Biomaterialia*, 1, 65-83.
- Kuroda, D., Hanawa, T., Hibara, T., Kobayashi, M., Kuroda, H., 2006. New manufacturing process of nickel-free stainless steel through nitrogen absorption treatment. *J. Jpn. Inst. Met.*, 70, 287-294.
- Laha, D., Bhattacharya, D., Pramanik, A., Santra, C.R., Pramanik, P., Karmakar, P., 2012. Evaluation of copper iodide and copper phosphate nanoparticles for their potential cytotoxic effect. *Toxicol. Res.*, 1, 131-136.
- Lakes, R.S., 1993. Materials with structural hierarchy. *Nature*, 361, 511-515.
- Lee, H.B., Khang, G., Lee, J.H., 2006. *Polymeric Biomaterials. The Biomedical Engineering Handbook Edition*. Ed. Joseph D. Bronzino, CRC Press LLC, Boca Raton, 40.1-40.24.
- Lee, K.Y., Park, M., Kim, H.M., Lim, Y.J., Chun, H.J., Kim, H., Moon, S.H., 2006. Ceramic bioactivity: Progresses, challenges and perspectives. *Biomed. Mater.*, 1, 31-37.
- LeGeros, R.Z., 2008. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chem. Rev.*, 108, 4742-4753.
- Mastrogiacomo, M., Scaglione, S., Martinetti, R., Dolcini, L., Beltrame, F., Cancedda, R., Quarto, R., 2006. Role of scaffold internal structure on *in vivo* bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*, 27, 3230-3237.
- Medina, C., Santos-Martinez, M.J., Radomski, A., Corrigan, O.I., Radomski, M.W., 2007. Nanoparticles: Pharmacological and toxicological significance. *Br. J. Pharmacol.*, 150 (5), 552-558.
- Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.*, 32 (8), 967-976.
- Mudali, U.K., Sridhar, T.M., Raj, B., 2003. Corrosion of bio implants. *Sadhana*, 28 (3-4), 601-637.

- Muramatsu, K., Oba, K., Mukai, D., Hasegawa, K., Masuda, S., Yoshihara, Y., 2005. Subacute systemic toxicity assessment of β -tricalcium phosphate/carboxymethyl-chitin composite implanted in rat femur. *J. Mater. Sci.*, 18, 513-522.
- Muranlı, F.D., 2006. Kültürü Yapılan İnsan Lenfositlerinde Triasulfuron'un Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Murugan, R., Ramakrishna, S., 2005. Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Science and Technology*, 65, 2385-2406.
- Musee, N., Thwala, M., Nota, N., 2011. The antibacterial effects of engineered nanomaterials: Implications for wastewater treatment plants. *J. Environ. Monit.*, 13, 1164-1183.
- Natarajan, A.T., 2002. Chromosome aberrations: Past, present and future. *Mutation Research*, 504, 3-16.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311 (5761), 622-627.
- Niinomi, M., 2002. Recent Metallic Materials for Biomedical Applications. *Metallurgical and Materials Transactions*, 33(A), 477-486.
- Niinomi, M., 2008. Metallic biomaterials. *The Japanese Society for Artificial Organs*, 11, 105-110.
- Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J.R.K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A.T., Martinez-Lopez, W., Folle, G.A., Drets, M.E., 2002. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research*, 504, 17-36.
- Osman, I.F., Baumgartner, A., Cemeli, E., Fletcher, J.N., Anderson, D., 2010. Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titaniumdioxide in HEp-2 cells. *Nanomedicine*, 5(8), 1193-1203.
- Pachence, J.M., Kohn, J., InLanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J., 2000. Principles of Tissue Engineering. Academic Press., San Diego.
- Padovani, L., Tronati, L., Mauro, F., Testa, A., Appolloni, M., Azzidei, P., Caporossi, D., Tedeschi, B., Vernole, P., 1997. Cytogenetic effects in lymphocytes from children exposed to radiation fall-out after the chernobyl accident. *Mutation Research*, 395, 249-254.
- Park, J.B., Kim, K.Y., 2000. Metallic Biomaterials. *Biomedical Engineering Handbook*, Ed: D. Bronzino. CRC Press LLC, Florida, Unit 37.
- Park, J.B., Lakes, R.S., 1992. *Biomaterials An Introduction*, 2nd ed., Plenum Press, New York.
- Parker, D.R., Bajpai, P.K., 1993. Effect of locally delivered testosterone on bone healing. *Trans. Oc. Biomat.*, 26, 293.
- Pasinli, A., 2004. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler. *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4, 25-34.
- Patil, G., Khan, M.I., Patel, D.K., Sultana, S., Prasad, R., Ahmad, I., 2012. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic responses of micro- and nano-particles of dolomite on human lung epithelial cells A549. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34, 436-445.
- Pavlica, M., Klabucar, G.I.V., Vetma, N., Erben, R., Papes, D., 2000. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. *Mutation Research*, 465, 145-150.

- Peppas, N.A., Langer, R., 1994. New challenges in biomaterials. *Science*, 263, 1715-1720.
- Plum, L.M., Rink, L., Haase, H., 2010. The essential toxin: Impact of zinc on human health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7, 1342-1365.
- Radziun, E., Dudkiewicz, J.W., Książek, I., Nowak, K., Anuszevska, E.L., Kunicki, A., Olszyna, A., Ząbkowski, T., 2011. Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. *Toxicology in vitro*, 25, 1694-1700.
- Rasmussen, J.W., Martinez, E., Louka, P., Wingett, D.G., 2010. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert. Opin. Drug Deliv.*, 7, 1063-1077.
- Ratner, B.D., 2004. Biomaterials science: a multidisciplinary endeavor, in *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*, 2nd ed., Eds: B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. Academic Press, San Diego, 1-9.
- Rittner, M.N., 2002. Market analysis of nanostructured materials. *American Ceramic Society Bulletin* 81, 33-36.
- Rodriguesa, L.R., Ávila, M.A., 2012. Synthesis and Characterization of Nanocrystalline Hydroxyapatite Gel and its Application as Scaffold Aggregation. *Materials Research*, 15(6), 974-980.
- Sarsılmaz, F., 2000. *Biyomalzemeler. Yüksek Lisans Semineri, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.*
- Schilling, K., Bradford, B., Castelli, D., Dufour, E., Nash, J.F., Pape, W., Schulte, S., Tooley, I.J., Bosch, V.D., Schelllauf, F., 2010. Human safety review of nano titanium dioxide and zinc oxide. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 9, 495-509.
- Schmidt, W., 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31, 9-15.
- Sharma, V., Anderson, D., Dhawan, A., 2011a. Zinc Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Liver Cells (HepG2). *Nanotechnology*, 7, 98-99.
- Sharma, V., Shukla, R.K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M., Dhawan, A., 2009. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology Letters*, 185, 211-218.
- Sharma, V., Singh, S.K., Anderson, D., Tobin D.J., Dhawan A., 2011b. Zinc Oxide Nanoparticle Induced Genotoxicity in Primary Human Epidermal Keratinocytes. *Nanotechnology*, 11, 3782- 3788.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright C.J., Doak S.H., 2009. Nano Genotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30, 3891-3914.
- Somunkıran, İ., 2006. *Kobalt Esaslı Alaşımların Toz Metalurjisi Yöntemiyle Üretimi, Mikroyapı ve Mekanik Özelliklerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.*
- Song, G., Habibovic, P., Bao, C., Hu, J., Van Blitterswijk, C.A., Yuan, H., Chen, W., Xu, H.H.K., 2013. The homing of bone marrow MSCs to non-osseous sites for ectopic bone formation induced by osteoinductive calcium phosphate. *Biomaterials*, 34, 2167-2176.
- Stefanidou, M., Maravelias, C., Dona, A., Spiliopoulou, C., 2006. Zinc: A multipurpose trace element. *Arch. Toxicol.*, 80, 1-9.

- Syed, S., Zubair, A., Frieri, M., 2013. Immune response to nanomaterials: Implications for medicine and literature review. *Curr. Allergy. Asthm. Rep.*, 13 (1), 50-57.
- Tankhiwale, R., Bajpai S.K., 2012. Preparation, characterization and antibacterial applications of ZnO-nanoparticles coated polyethylene films for food packaging. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 90, 16-20.
- Tapiero, H., Tew, K.D., 2003. Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and metallothioneins. *Biomed. Pharmacother*, 57, 399-411.
- Thrall, J.H., 2004. Nanotechnology and medicine. *Radiology*, 230, 315-318.
- Tur, K., 2009. Biomaterials and Tissue Engineering for Regenerative Repair of Articular Cartilage Defects. *Turk J. Rheumatol*, 24, 206-217
- Türkez, H., 2007. Bazı Bor Bileşiklerinin *İn Vitro* Şartlarda Periferal İnsan Kanı Üzerine Genetik ve Biyokimyasal Etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Van Noort, R., 1987. Titanium: The Implant Mater.of Today. *Jour. Mater. Sci.*, 22, 3801-3811.
- Van Vlack, L.,1989. Elements of materials science and engineering. Prentice Hall, Boston.
- Vandeputte, C., Guizon, I., Enestie-Denis, I., Vannier, B., Lorenzon, G., 1994. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells-performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol. Toxicol.*, 10(56), 415-421.
- Wang, Z.L., 2008. Splendid one-dimensional nanostructures of zinc oxide: A new nanomaterial family for nanotechnology. *ACS Nano*, 2, 1987-1992.
- Widel, M., Kolosza, Z., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek-Zwierzycka, K., Swierniak, A., 2001. Micronucleus assay *in vivo* provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 77, 631-636.
- Williams, D.F., 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953.
- Wintermantel, E., Mayer, J., Blum, J., Eckert, K.L., Lüscher, P., Mathey, M., 1996. Tissue engineering scaffolds using superstructures. *Biomaterials*, 17, 83-91.
- Yamamoto, K.I., Kikuchi, Y., 1980. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat. Res.*, 71, 127-131.
- Yetim, A.F., 2009. Biyomalzeme Olarak Kullanılan AISI316L Paslanmaz Çelik Ve Ti6Al4V Alaşımının Plazma İle Nitrürasyon Davranışı, Ti-DLC İnce Film Kaplama İle Karşılaştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yoo, Y.R., Cho, H.H., Jang, S.G., Lee, K.Y., Son, H.Y., Kim, J.G., Kim, Y.S., 2007. Effect Of Co Content On The Corrosion Of High Performance Stainless Steels In Simulated Biosolutions. *Key Engineering Materials*, 342-343, 585-588.
- Young, C.S., Bradica, G., Hart, C.E., Karunanidhi, A., Street, R.M., Schutte, L., Hollinger, J.O., 2010. Preclinical toxicology studies of recombinant human platelet-derived growth factor-bb either alone or in combination with beta tricalcium phosphate and type-1 collagen. *J. Tissue Eng.*, doi : 10.4061/2010/246215.

Zhang, Z., Feng, X., Mao J., Xiao J., Liu C., Qiu J., 2009. *In vitro* cytotoxicity of a novel injectable and biodegradable alveolar bone substitute. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379, 557-561.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Kars ili Selim ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Selim Atatürk İlkokulunda ve Selim Lisesi Ortaokulunda tamamladı. 1998 yılında Bursa Karacabey lisesinden mezun oldu. Lisans eğitimini Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde 2004 yılında, Yüksek Lisans eğitimini Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde 2010 yılında tamamladı. 2010-2013 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimini tamamladı.