

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**



**POLİAKRİLİK ASİT-HİDROKSİAPATİT-BAL
NANOKOMPOZİTLERİNİN SENTEZİ VE BAZI BİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEYMAN KIRMIZI

BALIKESİR, OCAK - 2018

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**



**POLİAKRİLİK ASİT-HİDROKSİAPATİT-BAL
NANOKOMPOZİTLERİNİN SENTEZİ VE BAZI BİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEYMAN KIRMIZI

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Serap DOĞAN (Tez Danışmanı)

Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU

Yard. Doç. Dr. Ümran ALAN

BALIKESİR, OCAK – 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

ŞEYMAN KIRMIZI tarafından hazırlanan “POLİAKRİLİK ASİT-HİDROKSİAPATİT-BAL NANOKOMPOZİTLERİNİN SENTEZİ VE BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 08.01.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. Serap DOĞAN

Üye

Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU

Üye

Yard. Doç. Dr. Ümran ALAN

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

ÖZET

POLİAKRİLİK ASİT-HİDROKSİAPATİT-BAL NANOKOMPOZİTLERİNİN SENTEZİ VE BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ŞEYMAN KIRMIZI

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)

BALIKESİR, OCAK - 2018

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış (%0 - %1 - %2,5 - %5) poli (akrilik asit)(PAA)/Nanohidroksiapatit/Bal nanokompozitleri kullanılmıştır. Hazırlanan nanokompozitlerin sitotoksik etkisi ve hemouyumluluğu araştırılmıştır. Sağlıklı bireyden alınan lenfosit hücreleri üzerine sitotoksik etkileri MTS testi ve tripan mavisi testini gerçekleştiren canlı hücre görüntüleme sistemi (JuLI) ile belirlenmiştir. Antibakteriyal aktivite testi için; bir gram negatif (*Escherichia coli* ATCC-8739) ve bir gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC-6538) bakteri türü kullanılmıştır.

Yapılan MTS testi ile PAA saf polimeri hariç tüm konsantrasyolardaki nanokompozitlerin sitotoksik aktivite sonuçlarına göre biyouyumlu oldukları belirlenmiştir. PAA/BAL olmak üzere tüm nanokompozitlerin kan hücreleri ile olan %hemoliz değerleri %1'in altında belirlenmiştir. Hemoliz değerlerinin %5'in altında olması malzemelerin hemouyumlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca hazırlanan nanokompozitlerin antibakteriyal aktivitelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Poliakrilik asit, nanohidroksi apatit, bal, sitotoksiste, hemouyumluluk, antibakteriyel aktivite.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND DETERMINATION OF THEIR SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF POLYACRYLIC ACID/HYDROXYAPATITE/HONEY NANOCOMPOSITES

MSC THESIS

ŞEYMAN KIRMIZI

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETİC

(SUPERVISOR:PROF. DR. SERAP DOĞAN)

BALIKESİR, JANUARY 2018

In this study, poly acrylic acid(PAA)/nanohidroksiapatit/honey nanocomposites prepared in different concentrations (%1-%2,5-%5) were used. Cytotoxic effect of samples on human lymphocytes were determined by MTS assay and tryphan blue exclusion method performed by live cell imagin system (JuLI). Antibacterial activity, cytotoxic effect and hemocompatibility of nanocomposites were investigated. For antibacterial testing; a gram negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC-8739)and a gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC-6538) species were used.

The nanocomposites in all concentrations except PAA pure polimer were biocompatible according to the cytotoxic activity results by MTS assay. The % hemolysis of all nanocomposites, with PAA/HONEY, with blood cells was determined to be less than 1%. Less than 5% of hemolysis values indicate that the materials are hemocompatibility. In addition, it was determined that the prepared nanocomposites had high antibacterial activity.

KEYWORDS: Poly (acrylic acide), nano-hydroxyapatite, honey, cytotoxicity, hemocompatibility, antibacterial activity.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	ix
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Biyoyumluluk ve Biyomalzemeler.....	1
1.1.1 1. Biyomalzemelerin Sınıflandırılması.....	2
1.1.2 Metaller ve Metal Alaşımları.....	2
1.1.3 Seramik Biyomalzemeler	3
1.1.3.1 Hidroksiapatit.....	3
1.1.4 Polimerik Biyomalzemeler	4
1.1.4.1 Poli (Akrilik asit)	6
1.1.5 Kompozit Biyomalzemeler.....	6
1.1.5.1 Nanokompozitler.....	7
1.2 Bal	8
1.3 Hücre Kültürü ve Sitotoksosite	8
1.3.1 MTS Testi	9
1.3.2 Tripan Mavis Testi ve JuLI	11
1.3.3 Hemoyumluluk	11
1.4 Antibakteriyal Aktivite.....	12
1.5 Litaretür Özeti	12
2. MATERYAL VE METOT.....	14
2.1 Materyal	14
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	14
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	15
2.2 Metot	15
2.2.1 Nanokompozitlerin Sentezi	15
2.2.2 Nanokompozitlerin Karakterizasyonu	16
2.2.2.1 FTIR-ATR Analizleri.....	16
2.2.2.2 Optik Temas Açısı Analizleri	16
2.2.3 Hücre Kültürü İşlemleri.....	16
2.2.3.1 Malzemelerin Sterilizasyonu	16
2.2.3.2 Kullanılan Besi Yerinin Hazırlanması	17
2.2.4 Sitotoksosite Testleri	17
2.2.4.1 Kandan Lenfosit İzolasyonu ve MTS Testi	17
2.2.4.2 JuLI – Hücre Yaşamlılığı Testi.....	18
2.2.5 Hemoyumluluk Testi	18
2.2.6 Antibakteriyal Aktivite	19
3. BULGULAR.....	20

3.1	Nanokompozitlerin Karakterizasyon Sonucu.....	20
3.1.1	FTIR-ATR Analiz Sonuçları	20
3.1.2	Optik Temas Açısı Analiz Sonuçları	23
3.2	Sitotoksisite Sonuçları.....	24
3.2.1	MTS Testi Sonuçları.....	25
3.2.2	Tripan Mavisi ile Hücre Sayım Sonuçları	27
3.2.3	JuLI Hücre Yaşamlılığı Testi Sonuçları	28
3.3	Hemouyumluluk Testi Sonuçları	41
3.4	Antibakteriyal Aktivite Sonuçları	42
4.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	43
4.1	Nanokompozitlerin Karakterizasyonu ve Sonuçları	43
4.1.1	FTIR-ATR Analiz Sonuçları	43
4.1.2	Optik Temas Açısı Analiz Sonuçları	45
4.2	Sitotoksisite Test Sonuçları.....	45
4.3	Biyouyumluluk ve Hemouyumluluk Testi.....	46
4.4	Antibakteriyel Aktivite.....	47
5.	KAYNAKLAR.....	49

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	: Kemik dokusu ve hidroksiapatitin yapısı.....	4
Şekil 1.2	: Poli(Akrilik asit)'in moleküler yapısı.....	6
Şekil 1.3	: Sıkça kullanılan tetrazolyum bileşiklerinin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 3.1	: PAA/BAL filminin FTIR spektrumu.....	21
Şekil 3.2	: PAA/nHAP(%1)/BAL nanokompozitinin FTIR spektrumu.....	21
Şekil 3.3	: PAA/nHAP(%2,5)/BAL nanokompozitinin FTIR spektrumu.....	22
Şekil 3.4	: PAA/nHAP(%5)/BAL nanokompozitlerinin FTIR spektrumu.....	22
Şekil 3.5	: PAA/BAL ve tüm nanokompozitlere ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması olarak gösterilmesi.....	23
Şekil 3.6	: PAA, PAA/BAL ve PAA/nHAP/BAL nanokompozitlerinin 24 saat inkübasyonu sonucu absorbans grafikleri.....	25
Şekil 3.7	: PAA, PAA/BAL ve PAA /nHAP/BAL nanokompozitlerinin 48 saat inkübasyonu sonucu absorbans grafikleri.....	26
Şekil 3.8	: PAA, PAA/BAL ve PAA/nHAP/BAL nanokompozitlerinin 72 saat inkübasyon sonucu absorbans grafikleri.....	26
Şekil 3.9	: PAA, PAA/BAL, PAA/nHAP ve PAA/nHAP/BAL nanokompozitlerinin 24 saat inkübasyonu sonucu tripan mavisi ile hücre sayımı grafiği.....	26
Şekil 3.10	: PAA, PAA/BAL, PAA/nHAP ve PAA/nHAP/BAL nanokompozitlerinin 48 saat inkübasyonu sonucu tripan mavisi ile hücre sayımı.....	27
Şekil 3.11	: PAA, PAA/BAL, PAA/nHAP ve PAA/nHAP/BAL nanokompozitlerinin 72 saat inkübasyonu sonucu tripan mavisi ile hücre sayımı grafiği.....	28
Şekil 3.12	: 24 saat nanokompozit ile muamele edilmemiş kanda % canlılık sonucu (negatif kontrol).....	28
Şekil 3.13	: 24 saat sonunda saf polimer PAA nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	29
Şekil 3.14	: 24 saat sonunda PAA/nHAP(%1) nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	29

Şekil 3.15	: 24 saat sonunda PAA/nHAP(%5) nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	30
Şekil 3.16	: 24 saat sonunda PAA/BAL nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	30
Şekil 3.17	: 24 saat sonunda PAA/nHAP(%1)/BAL nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	31
Şekil 3.18	: 24 saat sonunda PAA/nHAP(%2,5)/BAL nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	31
Şekil 3.19	: 24 saat sonunda PAA/nHAP(%5)/BAL nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	32
Şekil 3.20	: 48 saat nanokompozit ile muamele edilmemiş kanda % canlılık sonucu.....	32
Şekil 3.21	: 48 saat sonunda saf polimer PAA nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	33
Şekil 3.22	: 48 saat sonunda PAA/nHAP(%1) nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	33
Şekil 3.23	: 48 saat sonunda PAA/nHAP(%2,5) nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	34
Şekil 3.24	: 48 saat sonunda PAA/nHAP(%5) nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	34
Şekil 3.25	: 48 saat sonunda PAA/BAL nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	35
Şekil 3.26	: 48 saat sonunda PAA/nHAP(%1)/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.....	35
Şekil 3.27	: 48 saat sonunda PAA/nHAP(%2,5)/BAL nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	36
Şekil 3.28	: 48 saat sonunda PAA/nHAP(%5)/BAL nanokompozitinin % canlılık sonucu	36
Şekil 3.29	: 72 saat nanokompozit ile muamele edilmemiş kanda % canlılık sonucu.....	37
Şekil 3.30	: 72 saat sonunda saf polimer PAA nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	37
Şekil 3.31	: 72 saat sonunda PAA/nHAP(%1) nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	38
Şekil 3.32	: 72 saat sonunda PAA/nHAP(%2,5) nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	38
Şekil 3.33	: 72 saat sonunda PAA/nHAP(%5) nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	39
Şekil 3.34	: 72 saat sonunda PAA/BAL nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	39
Şekil 3.35	: 72 saat sonunda PAA/nHAP(%1)/BAL nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	40

Şekil 3.36	: 72 saat sonunda PAA/nHAP(%2,5)/BAL nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	40
Şekil 3.37	: 72 saat sonunda PAA/nHAP(%5)/BAL nanokompozitinin % canlılık sonucu.....	41
Şekil 3.38	: PAA/BAL ve PAA/nHAP/BAL nanokompozitinin (1-PAA/BAL, 2-PAA/nHAP(%1)/BAL, 3-PAA/nHAP(%2,5)/BAL, 4-PAA/nHAP(%5)/BAL) <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa) ve <i>Escherichia coli</i> (Ec)'ye karşı antibakteriyal aktiviteleri.....	42

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1: Bazı polimer örnekleri ve kullanım alanları.....	5
Tablo 1.2: Balın bileşenleri ve ortalama miktarları.....	8
Tablo 3.1: PAA/BAL ve nanokompozitlerine ait optik temas açısı ölçüleri ve fotoğrafları	24
Tablo 3.2: Saf PAA, PAA/BAL, PAA/nHAP ve PAA/nHAP/BAL malzemelerinin % hemoliz değeri.....	41
Tablo 3.3: Antibakteriyel aktivite testi sonucu elde edilen zon çapları.....	42
Tablo 4.1: Saf PAA'ın bazı karakteristik özellikleri ve IR bantları.....	44
Tablo 4.2: Saf balın bazı karakteristik IR bantları	44

SEMBOL LİSTESİ

PAA	:Poli(akrilik asit)
nHAP	:Nanohidroksiapatit
FTIR-ATR	:Foruer Transform Infrared Attenuated Total Reflectance
MTS	:(3-(4,5- dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum),
FBS	:Fetal bovine serum
NaOH	:Sodyum hidroksit
NaCl	:Sodyum klorür

ÖNSÖZ

Her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Serap DOĞAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve görüşlerini sunarak yol gösteren Prof. Dr. Mehmet DOĞAN, Prof. Dr. Tuncay DİRMENCİ ve Doç. Dr. Yasemin TURHAN hocalarıma,

Bu süreçte desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Uzman Dr. Mehmet Emin DİKEN, Arş. Gör. Dr. Taner ÖZCAN ve Arş. Gör. Begümhan YILMAZ'a,

Her zaman birlikte olduğum laboratuvar arkadaşlarım Nurdan AKICI, Pakize ÖZKAYA, İrem AKINCI, Ahmet Cenkay ORBAY ve Ulaş KUMRAL'a,

Ve ayrıca hayatımın her anında beni yalnız bırakmayan canım babam Ahmet KIRMIZI, canım annem Tülay KIRMIZI, biricik ablam Şadiye GÜRPINAR ve ailemizin neşe kaynağı olan Erdem ERDOĞAN'a sonsuz teşekkür eder, saygı ve sevgilerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Biyomalzemeler, vücut ile sürekli temas halinde bulunan ve vücudun işleyişine yardımcı olmak için üretilen ve geliştirilen malzemelerdir. Doku veya organların çeşitli sebeplerden dolayı işleyişini yitirmesi sonucu biyomalzemelere gereksinim duyulmaktadır. Canlı bir sistemin bir malzemeye verdiği tepki biyoyumluluk olarak tanımlanmaktadır. Bu tepkilere bağlı olarak birçok biyomalzeme türü ortaya çıkmıştır. Bu alanda ki çalışmalar son hızıyla devam etmektedir.

1.1 Biyoyumluluk ve Biyomalzemeler

“Biyomalzeme” ve “biyoyumluluk” terimleri, malzemelerin biyolojik performanslarını belirtmek için kullanılmıştır. Biyoyumluluk, bir biyomalzemenin vücut ile uyuşabilirliği olarak tanımlanır [1]. Bir biyomalzemenin biyoyumlu olması için dokuda fizyolojik ortama kabul edilmesi gerekir. Biyomalzemeler; kullanıldıkları dokunun çevresinde pıhtı oluşumu ve iltihaplanma gibi istenmeyen tepkilere yol açmayıp, bu dokuların normal değişimlerini destekleyen yapılardır. [2] Gün geçtikçe önemi ve uygulama alanı artan biyomalzemelerin tarihi çok eski zamanlara dayanmaktadır. Buna Mısır mumyalarında bulunan; yapay göz, burun ve dişleri örnek olarak gösterebiliriz. Ayrıca eski Çin’de dişlerin altın ile kaplanması biyomalzeme kullanımının tarihini 2000 yıl öncesine kadar taşımaktadır. 19.yy’ın ortasından itibaren biyomalzemelerin kullanıma yönelik önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu süreçte atılan önemli adımlar; 1938’de ilk metal protez vitilyum, 1950’lerde kan damarlarının değişimi, 1960’larda kalça protezleri ve 1970’lerde sentetik ameliyat ipliği kullanımına başlanmıştır. Kısacası, biyomalzemeler son 30 yılda metal, seramik ve polimer olarak hasarlı dokuların onarımı ve yenilenmesi için kullanılmıştır [3].

Günümüzde ise birçok biyomalzeme kalp yetmezliği, damar sertleşmesi, aort anevrizması, işitme kayıpları ve katarakt gibi hastalıkların tedavisinde, ayrıca kemik,

kas, deri ve göğüs dokularında travma sonrası oluşan hasarlarda veya kozmetik amaçlı doku yenilemesi uygulamalarında kullanılmaktadırlar. Biyomalzemeler, organ ve dokuların işlevlerini yerine getirmek amacıyla dizayn edilmiş olup, aynı zamanda dokulara, bağı, eklemsi ve kemiksi yapılara destek olması amacıyla üretilen protezler ve implantların temel bileşenlerini de oluşturmaktadırlar [4].

Biyomalzemeler, temel olarak tıbbi uygulamalarda kullanılmasının yanı sıra, biyoteknolojik alanlarda da kullanılmaktadır. Bununla birlikte hücre teknolojisinde, hücre ve hücre üretilen ürün üretiminde yapı malzeme olarak, atık su arıtımında adsorban malzeme olarak, biyosensörlerde, biyoayırma işlemlerinde, enzim, doku, hücre gibi biyoaktif maddelerin sabitlenmesinde ve biyoçiplerdeki kullanımı sıralanabilir [5].

1.1.1 1. Biyomalzemelerin Sınıflandırılması

Biyomalzemeler 4 farklı sınıf altında toplanmaktadır;

- Metaller ve metal alaşımları,
- Polimerler,
- Seramikler,
- Kompozitler.

1.1.2 Metaller ve Metal Alaşımları

Metaller ve metal alaşımlarının; dayanımlı, kolay şekil verilebilir ve aşınmaya dayanıklı olmaları nedeni ile mekanik özelliklerinden dolayı kullanım alanı oldukça yaygındır. Ancak metallerin avantajlarının yanı sıra, biyoyumluluklarının düşük olması, vücut sıvılarında korozyona uğramaları (Metallerin çevreleriyle istenmeyen bir kimyasal reaksiyona girerek, oksijen hidroksit gibi başka bileşenler oluşturarak bozunması.) dokulara kıyasla daha sert yapıda olmaları ve alerjik doku reaksiyonlarına sebep olmaları dezavantajları olarak sıralanabilir. İnsanlarda biyomalzeme olarak geliştirilen ilk metal alaşımı vanadyum çeliği kırık kemiklerin tedavisinde vida ve plaka olarak kullanılmıştır. Vanadyum çeliği dışında demir (Fe), krom (Cr), kobalt (Co), nikel (Ni), titanyum (Ti), tantalum (Ta), niobiyum (Nb), molibden (Mo) ve tungsten (W)'de vücut içinde kullanılan alaşımlar arasındadır [6].

1.1.3 Seramik Biyomalzemeler

Biyoseramik malzemeler, polikristalin yapılı olup mikroorganizmalara, sıcaklığa, çözücülere ve pH değişimlerine karşı direnç göstermektedir.

Biyoseramik malzemelerin kullanımında avantajları şunlardır;

- Biyoyumlulukları üstündür
- Zehirleyici etki göstermemektedir
- Alerjik ve kanserojen değildir
- Kimyasal yapılarının kararlı olması nedeni ile paslanma riskleri yoktur
- Aşınmalara karşı oldukça dayanıklıdırlar.

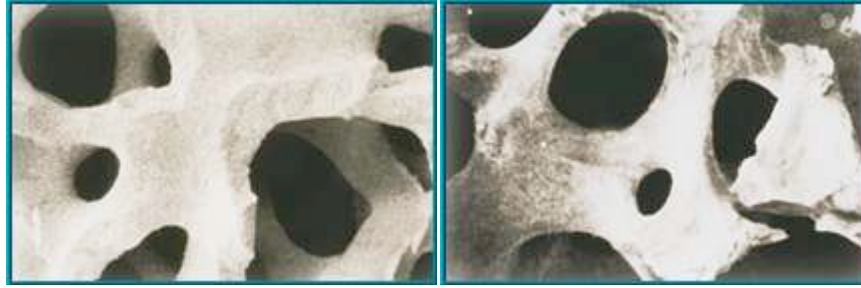
Sıklıkla kullanılan biyoyumlu biyoseramik malzemelere örnek olarak alümina, hidroksiapatit ve biyoaktif cam verilebilir. Alümina; yüksek yoğunluk, yüksek dayanım, iyi bir korozyon dayanımı ve iyi bir biyoyumluluk özelliğinden dolayı kalça protezlerinde, diş implantlarında ve ortopedik uygulamalarda geniş bir kullanıma sahiptir. Alümina ve hidroksiapatit (HA), kemik dokusunun inorganik yapısında olup, kalsiyum fosfat esaslı bir seramiktir. Yapay kemik olarak çeşitli protezlerin yapımında, çatlak ve kırık kemiklerin onarımında ve metalik biyomalzemelerin kaplanmasında kullanılmaktadır [7].

1.1.3.1 Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HAP: $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) sıkça klinikte kullanılan bir inorganik bileşiktir. Temeli kalsiyum fosfat olan bu bileşik, biyoyumlu olması sebebiyle yapay kemik olarak farklı protezlerin üretiminde, çatlak ve kırık kemiklerin tedavisinde ve metalik biyomalzemelerin kaplanmasında kullanılır. Diğer kalsiyum fosfatlı bileşiklere göre %100 saf olan hidroksiapatitin en düşük çözünürlüğe, en yüksek kararlı yapı ve dayanıma sahip olduğu belirlenmiş ve aynı zamanda vücut içinde bulunan kalsiyum fosfat bileşiklerine oranla en kararlı yapıyı göstermektedir [8].

Hidroksiapatit, kemik yapısına benzerliği ile implant uygulamalarında sıkça kullanılmaktadır. Kemik dokusunu oluşturan hücresel hidroksiapatitin yüzeyine yapışma özelliğine sahiptir. Böylece kollejen ve kemik mineralleri doğrudan yüzeyde büyüebilmektedir. Bu malzemenin direnme gücü düşük olduğu için yük taşıyan implant/protez çalışmalarında metal implantların yüzeyine kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra yüksek dayanım gücü istenmeyen kemik doku malzemesi çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır.

Hidroksiapatit biyoseramiklerinin diğer bir kullanım alanı ise mercek sistemi implant uygulamasıdır. Biyouyumluluk ve toksik etki göstermeme gibi özellikler sayesinde hidroksiapatiti mercek sistemi implant uygulaması için uygun bir biyomalzeme türü yapmaktadır [9].



a) Kemik

b) HAP

Şekil 1.1: Kemik dokusu ve Hidroksiapatit'in yapısı.

Hidroksiapatitin en önemli uygulamalarından biri metal implant üzerine kaplamadır. PMMA'nın kullanımı sırasında oluşan komplikasyonlardan kaçınmak için bir fiksasyon aracı olarak femurprotezlerinde ve kapsüllerinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır [11].

1.1.4 Polimerik Biyomalzemeler

Çok sayıda aynı ya da farklı monomerlerin kovalent bağlar ile düzenli biçimde birbirine bağlanarak oluşturduğu yüksek moleküler ağırlıklı yapılara “polimerler” denir [12].

Polimerlerin yoğunluklarının dokuların yoğunluklarına benzer olmaları ile birlikte farklı oranlarda ve biçimlerde hazırlanmaları, biyomalzeme olarak kullanım alanını

genişletmektedir. Poliglikolik asit, polilaktik asit, polimetilmetakrilat, polisülfon, polietilenteraftalat, polietilen, polietrafloroetilen, poliüretan, poliasetal gibi polimerler tıp alanında tercih edilmektedir. Kararlı, esnek olmaları sebebiyle diş kulak, çene ve burun implantları protezlerinde, parmak eklemlerinde, kontakt lensler, kontrollü ilaç salınım yöntemlerinde, kalp damarında, kalp kapakçıklarında ve göğüs implantlarında yüksek oranda tercih edilmektedir [13].

Tablo 1.1: Bazı polimer örnekleri ve kullanım alanları.

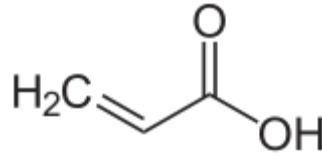
Polimer Örnekleri	Uygulama Alanları
Silikonlar	Kontrollü ilaç salınımında, yumuşak kontakt lenslerde, implant kaplamalarında, kalp destek cihazlarında, yumuşak dokuda
Polietilen (PE)	Eklemler
Polimetil metakrilat	Sert kontakt ve göz içi lenslerde, kemik yapıştırıcılarında, diş dolgularında
Polivinil klorür (PVC)	Tıbbi borular, kan ve sıvı torbaları
Polietilen teraftalat (PET)	Kalp kapakçıkları halkası örtüsü, kan damarlarında
Poliüretan (PU)	Kalp için destek biyomalzemeleri ve kan ile etki yüzeyi
Polihidroksietil metakrilat	Kontrollü ilaç salınımı, yanık örtüleri ve yumuşak kontakt lensler
Polivinil pirolidan	Kan miktarı yükseltici, yumuřak kontakt lensler
Polisiyano akrilatlar	Sert, yumuşak doku için yapıştırıcılar

1.1.4.1 Poli (Akrilik asit)

Poli (Akrilik asit) (PAA), sulu çözeltilerindeki pH ve CO₂ fotokimyasal analizleri için sensör uçlarında, ilaç salım çalışmalarında, bebek bezleri ve temizleme faktörü gibi çalışmalarda kullanılan, suda çözünen ve yapay biyobozunur bir polimerdir [14].

PAA suda şişme özelliği ve çözünmeden içerisindeki suyun büyük bir kısmını tutan bir hidrojel türüdür. Çapraz bağlı bileşiklere sahip olan hidrojeller suda şişme özelliği gösterirler. Hidrojeller insan dokularına benzer fiziksel özellikleri ile doku uyumluluğu açısından tıp dünyasında sıklıkla tercih edilmektedirler [15].

PAA biyoyumlu olması nedeniyle, polielektrolit olarak biyomedikal çalışma alanlarında kullanılmaktadır. Bununla birlikte PAA'nın kimyasal formülünde karboksil grupları olması nedeniyle biyoaktif moleküllerle etkileşim fonksiyonelleşmesi sağlanabilir [16]. Araştırmalara göre PAA'nın metallerle etkileşim göstermesi ve metali kaplama özelliği ile antikorzyon ve biyoaktif gibi biyoyumlu olma niteliği göstermesinden dolayı vücut içinde ve biyomedikal alanında tercih edildiği gözlemlenmiştir [17].



Şekil 1.2: Poli (Akrilik asit)'in moleküler yapısı.

1.1.5 Kompozit Biyomalzemeler

Kompozit iki ya da daha fazla malzemenin özelliklerinden faydalanabilmek için karıştırılmış bir materyaldir. Kompozit malzemeler, matriks içerisine farklı dolgu malzemesi ilave edilmesiyle oluşturulur. Matriks için çeşitli polimerler, dolgu malzemesi olarak genellikle cam, polimer lifler veya karbon, nadiren toz seramikler ve mika kullanılmaktadır. Kompozit malzemelerin bileşenlerinin değiştirilebilmesi vücut içerisinde kullanılacak olan implantın fizyolojik ve mekanik olarak daha biyoyumlu olmasına avantaj sağlar [18].

1.1.5.1 Nanokompozitler

Nanoteknolojinin özü, moleküler boyutta çalışarak moleküler yapısı yenilenmiş büyük yapılar elde etmektir. Nanokompozitler, bir matriks içerisinde nanometre ölçüsünde parçacıkların yayılması ile oluşan malzemelerdir [19].

Nanoyapılar hacimlerine göre yüksek-hacim oranına sahiptir (geniş ölçüde yüzey atomlarına sahiptir). Yapıları atomsal düzeye indirgeniğinden klasik fizik yerine kuantum etkiler işin içine girmektedir. Kuantum kuyusu gibi davranan nanoyapıların bant aralığı yapısı da değişmektedir. Külçe halinde oda sıcaklığında tepkime girmeyen altın 3-5 nm boyutlarında pek çok tepkimeyi tetikleyebilmektedir.

Nanokompozitlerin bu özelliklerinden dolayı sağladığı avantajlar ise şu şekilde sıralanabilir;

- ✓ Dolgu kompozitleri ve metallere oranla parlaktır,
- ✓ Düşük maliyetle üretilirler,
- ✓ Yüksek gerilme özelliği ve boyut uygunluğu gibi mekanik özellikler gösterirler,
- ✓ İçerisinde bulunan su ve hidrokarbonlardan dolayı, gaz geçirgenliği azalır.
- ✓ Termal stabiliteyi ve ısıl bozulma sıcaklığını yükseltirler,
- ✓ Yanmaya karşı dirençleri yüksektir,
- ✓ Kimyasal etkilere dayanıklılıkları fazladır,
- ✓ Elektrik iletme özelliği fazladır, konvansiyonel dolgulu polimerlere oranla optik geçirgenlik özellikleri daha iyidir [20].

1.2 Bal

Bal, içeriğindeki mineral, vitamin, organik asitler ve enzimler sebebiyle besleyici ve tedavi amaçlı bir çok hastalık için tercih edilen bir gıdadır. Balın bileşimi arının nektarını aldığı çiçek türü, arının cinsi ve iklim koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir [21].

Tablo 1.2: Balın bileşenleri ve ortalama miktarları.

Bileşim maddeleri	Ortalama miktarı (g/100g)	Bileşim maddeleri	Ortalama miktarı (mg/100g)
Su	17.10	Riboflavin (B ₂)	0.04
Fruktoz	38.50	B ₆ vitamini	0.02
Glukoz	31.00	Potasyum	52.00
Maltoz	7.20	Kalsiyum	6.00
Sakkaroz	1.50	Sodyum	4.00
Diğer karbonhidratlar	4.00	Fosfor	4.00
Toplam protein	0.30	Magnezyum	2.00
Kül	0.20	Selenyum	0.80
C vitamini	0.50 mg	Demir	0.42
Niasin	0.12 mg	Manganez	0.08
Pantotenikasit	0.07 mg	Bakır	0.04
Kalori (kkal.)	304		

Tabloda görüldüğü gibi balın içeriğindeki fruktoz, glukoz, maltoz ve sakkaroz şekerleri önemli bir paya sahiptir. Baldaki şekerler antibakteriyel etkili osmotik basınca neden olmaktadır. Ayrıca balın içeriğindeki lizozim ve balda az miktarda bulunan antibakteriyel flavonoidlerden pinocembrin de balın antibakteriyel özelliğini arttırmaktadır [22].

1.3 Hücre Kültürü ve Sitotoksisite

Biyouyumluluk test yöntemlerinde *in vitro* çalışmalar hızlı uygulanması, maliyetinin hayvan deneylerine göre daha düşük olması, standardize edilebilir,

deney ortamının kontrolünün kolay olması ve geniş bir skalada değerlendirme yapılabilmesi gibi özellikleri ile avantajlıdır.

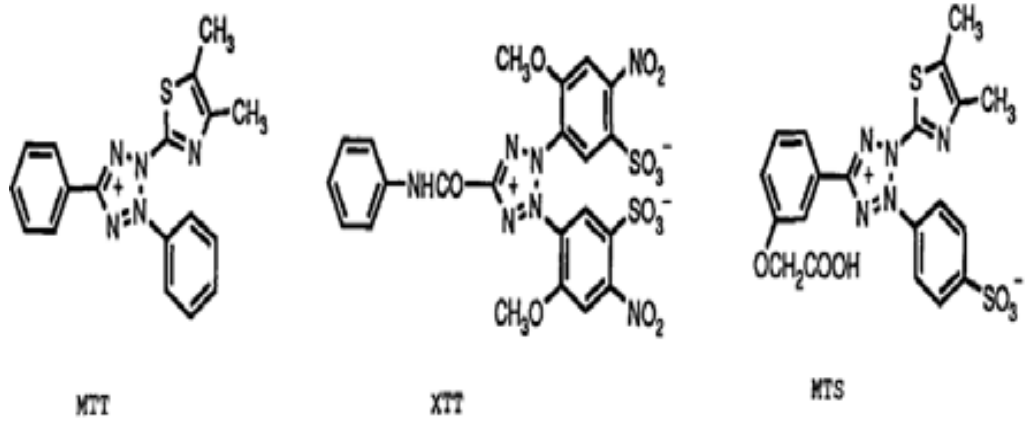
Hücre kültürü yönteminin temeli, canlı dokulardan alınan parçaların *in vitro* koşullarda yaşamalarını ve çoğalmalarını sağlamaktır. Bu amaca yönelik çeşitli canlılardan alınan dokular uygun besi ortamlarında üremeye bırakılır [23, 24]. Çalışmalarda primer hücreler ve devamlı hücreler olmak üzere iki tip hücre hattı kullanılmaktadır. Primer hücre kültürü doku veya organlardan alınan hücrelerin 24 saatten daha fazla süre kültür edilmesi anlamına gelmektedir. Hücre çoğalması için substrat, medium ve daha fazla alan içeren yeni kaplar kullanılır. Primer hücre hatlarından elde edilen hücreler sınırlı ömre sahiptir. Bazı hücre hatları ise viral ya da kimyasal uyarılma yolu ile transformasyon süreci sırasında sınırsız bölünme yeteneğine sahip olur. Bu hücre hatlarına devamlı hücre hatları denir.

Sitotoksisite, moleküler olaylar sonucu monomer organik moleküllerin polimerleşmesiyle oluşan büyük moleküllerin sentezinin yavaşlaması veya durmasına bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında hasarlar meydana gelmesidir [25, 26]. Sitotoksisite testleri; hücre canlılığı ve ölümü, hücre membran yüzeyi, hücre organelleri, protein sentezi, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi ile ilgili bilgi verir [27].

1.3.1 MTS Testi

Tetrazolyum tuzları halkalı organik bileşiklerdir. Tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenir ve renk değişimine neden olur. Tetrazolyum halkası sadece aktif mitokondri tarafından kırıldığından renk değişimi yalnızca canlı hücrelerde gözlemlenir. Ölü hücrelerin ise tetrazolyum bileşikleri indirgenemez ve herhangi bir renk değişimine neden olmaz [28, 29].

Mossman tarafından geliştirilen MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) testinden sonra XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid), MTS (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum), WST (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum) gibi tetrazolyum bileşikleri geliştirilerek kolorimetrik metodlara eklenmiştir.



Şekil 1.3: Sıkça kullanılan tetrazolyum bileşiklerinin kimyasal yapısı.

Araştırmalarda kullanılan tetrazolyum-formazan maddeleri hücre içine girebilme ve besi ortamında çözünmelerine göre iki gruba ayrılır. İlk grupta bulunan MTT pozitif yüklüdür ve ökaryot hücre membranından geçerek hücre içinde indirgenir. İndirgenme ile oluşan formazan suda çözünmez ve besi ortamında kristal şeklinde çöker.

İkinci grupta bulunan MTS, XTT ve WST bileşikleri negatif yüklü olduğu için hücre membranından geçemezler. Bu moleküllerin geçişi ara elektron alıcılar (fenazin metil sülfat, fenazin etil sülfat) kullanılarak sağlanır. Elektron alıcı molekül hücre içersine girerek elektronu alıp besi ortamına çıkar ve tetrazolyum bileşiğini indirger. İndirgenen tetrazolyum bileşiği suda yani besi ortamında çözünebilme yeteneğine sahiptir [30].

Bu canlılık testi temelde üç aşamada gerçekleşmektedir. İlk olarak hücreler toksik maddeye maruz bırakılır. İkinci aşamada toksik madde ortamdaki kaldırılarak tetrazolyum bileşiği besi ortamına eklenir ve 1-4 saat boyunca inkübasyonu sağlanır. Bu sırada canlı hücrelerdeki bileşikler indirgenerek formazana dönüşür ve renk değişimi gözlemlenir. Üçüncü aşamada ise spektrofotometrik yöntemle ölçüm alınarak canlı / ölü hücre oranı belirlenir [28].

1.3.2 Tripan Mavisi Testi ve JuLI

Tripan mavisi hücre canlılığı devamlılığı için gerekli olmayan bir boya çeşididir. Membran bütünlüğü zarar görmüş hücrelerin sitoplazmalarında birikir. Hemositometre yardımı ile boyanmış ölü hücreler tespit edilir. Canlı hücreler ise membran bütünlüğünü koruduğu için boyayı hücre içine almaz ve şeffaf gözlemlenir [31]. JuLI, tripan mavisi testiyle beraber yarı otomatik odaklanma teknolojisini hücre sayımında kullanabilen bir cihazdır [32].

1.3.3 Hemouyumluluk

Dolaşım sistemi içerisinde yer alan kanın bileşiminde sıvı ve hücresel kısım bulunmaktadır. Sıvı kısım yani plazma kısmında; su, kan proteinleri, tuzlar, glikoz, hormonlar, çeşitli metabolizma atıkları, lipitler, az miktarda çözünmüş oksijen ve karbondioksit bulunur. Hücresel kısımda ise eritrositler, lökositler ve trombositler bulunmaktadır. Alyuvarlar, içinde bulunan hemoglobin proteini ile oksijen ve karbondioksit taşınmasında görevlidir. Ayrıca hücrelerin içindeki hemoglobin asit baz tamponlamasını oluşturur. Kanın tamponlama gücünün %70'i alyuvarlar tarafından sağlanır [33].

Hemoliz, alyuvarların parçalanarak içinde bulunan hemoglobinin plazmaya geçmesiyle renksiz olan plazmanın pembe-kırmızı renk alması durumudur [34]. Bu testin amacı biyomalzemenin kan ile teması sonucu hücrelerin hemoliz olup olmayacağını tespit etmek için plazmaya geçen hemoglobinin spektrofotometrik olarak ölçülmesidir [35].

1.4 Antibakteriyal Aktivite

Mikroorganizmalar ekolojik denge için önemli canlılar olmakla birlikte, canlı sistemleri olumsuz etkileyen patojen türleri de bulunmaktadır. Bu etkileri ölümcül hastalıklara neden olabilmektedir. Fırsatçı patojen türleri normal şartlar altında canlılar üzerinde hastalık yapıcı etkisi bulunmasa da, canlı sistem üzerinde sayıca artışı olduğunda ya da canlılığın bağışıklık sisteminde zayıflık olduğu durumlarda patojenik etki gösterebilmektedirler [36]. Spesifik antibakteriyal kullanımı ile patojen mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar azaltılmakta, onlarla savaşılması ve yok edilmesi sağlanmaktadır. Geliştirilen biyoimplant malzemeler bakteriler tarafından enfekte edilebilir. Bu durum biyoimplant malzemenin bozulması ya da vücut tarafından kabul edilmemesine yol açabilir. Enfeksiyona engel olmak için günümüzde yaygın olarak antibiyotikler kullanılmaktadır fakat uzun süre kullanılan antibiyotikler karşısında bakterilerin direnç kazandığı ve bu yöntemin kesin olmadığı gerçeği ortadadır. Bu amaçla yeni antibiyotikler ve etkin antibakteriyal biyomalzemeler üretimi yapılması ihtiyaçtır [37].

1.5 Litaretür Özeti

E. Becoli ve arkadaşları farklı konsantrasyonlarda magnezyum ve florür iyonları ile nanohidroksiapatit kristalleri sentezlemişler ve hidroksiapatitin kristalleşmesini Poli akrilik asit polimerini kullanarak engellemişlerdir [38]. K. Şerbetçi ve arkadaşları HAP ile oluşturdukları kemik çimentosunun ticari olarak kullanılan türlerinden daha hemouyumlu olduğunu belirlemişlerdir [39]. N. Özmen ve E. Aklın yaptıkları araştırmalarda balın; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, ve *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium* gibi bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlara karşı etkili olduğunu göstermişlerdir. Bazı balların hastalığa neden olan bakteri gelişimini yavaşlatıcı ve gıda ömrünü uzatabilecek olduğunu tespit etmişlerdir [40]. J. Chung ve arkadaşları çalışmalarında kemik ve dişlerin ana yapısı olan hidroksiapatiti inorganik-organik nanokompozit madde yapımında kullanmışlardır. %75 inorganik bileşen olarak hidroksiapatiti kullanırken %25 oranında ise kitosan, aljinat ve albumin organik bileşenlerini kullanmışlardır. Sentezlenen nanokompozitlerin MTT testi ile sitotoksik etkileri MG-63 hücre

hattında araştırılmıştır. Hidroksiapatitin kristal boyutu doku mühendisliği tarafından hücre eklenmesi ve besin takviyesi için tercih edilmektedir [41]. A.Z. Yıldırım Biçer, iki indirekt kompozit sentezleyerek toksik etkilerini MTT testi ile değerlendirmiştir. Çalışmada Artglass ve Solidex olarak iki indirekt kompozit kullanılmıştır. Hazırladığı örnekleri DMEM/F12 besiyerinde 1 saat, 24 saat, 72 saat, 1 hafta ve 2 hafta bekletilmiştir. Kompozitlerin sitotoksik etkileri L 929 fare fibroblastlarında ölçülmüş ve tüm deney zamanlarında farklılık gözlemlenmiştir. 24 saatte Solidex ve Artglass kompozitleri arasında belirgin fark bulunmuştur. 72. saatte Artglass, Solidex'e göre toksik bulunmuştur [42]. Wataha ve arkadaşları çalışmalarında kompozitler ve hücreler arasında temas olup olmadığını ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bunun için kompozit biyomalzemelerinin 24 ve 48 saatlik özütleri kullanılmıştır ve ekstraksiyon süreci boyunca ortama biriken toksik maddelerin bileşenlerinde artış olup olmadığı ve örneklerin hücreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır [43].

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

- Poli(akrilikasit) (molekül ağırlığı : 3.000.000 g/mol)
- Nano hidroksiapatit
- Bal
- RPMI 1640 Besiyeri
- Fetal Bovine Serum
- Penisilin / Streptomisin
- Phytohemoglutinin
- Ficoll – Paque PLUS
- Tripan Mavisi
- Etil Alkol
- MTS Ölçüm Kiti
- Besi yeri
- NaOH
- NaCl

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Analitik terazi	: Denver Instrument
Manyetik karıştırıcı	: Heidolph
Saf su cihazı	: Human Power
Su banyosu	: Elma Sonic
pH metre	: Hanna Instruments
Etüv	: Memmert
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Rotina 380R
Biyogüvenlik kabini	: Labconco
CO ₂ 'li inkübatör	: Nuair
Canlı hücre görüntüleyicisi (JuLI)	: Nano Entek
Faz-Kontrast mikroskobu	: Olympus
Mikropipet seti	: Eppendorf
Mikroplaka	
okuyuculu spektrofotometre	: Thermo Scientific
Spektrofotometre	: Perkin Elmer Spektrum 100
Buzdolabı (-4°C)	: Regal
Buzdolabı (-20°C)	: Altus
Otoklav	: Hirayama

2.2 Metot

2.2.1 Nanokompozitlerin Sentezi

Çözücü ortamında etkileştirme ile biyonanokompozit sentezi gerçekleşmiştir. Temeli çözücü tercihine dayanır. Polimer madde çözücü içerisinde çözülür, aynı çözücü kullanılarak dolgu maddesinin (nHAP) (%1, %2,5 ve %5) dağılması sağlanır. Aynı erlenlerde çözdürülen polimer ile dolgu maddesi çalkalayıcı inkübatörde belirli

zaman aralığında karıştırılması sağlanır. nHAP çözeltisi belirli aralıklarla ultrasonik banyo içerisinde bekletilir, çalkalayıcı inkübatöre tekrar koyulur. Çözümler tamamlandıktan sonra polimer ve nHAP solüsyonları aynı erlen içine alınır ve her erlene eşit miktarda bal ilave edilerek çalkalayıcı inkübatörde en az 24 saat bekletilir. Solüsyonlar uygun petri kaplarına aktarılır. Vakumlu etüvde bekletilerek çözücü uzaklaştırılır. Çözücünün uzaklaşması ile nanokompozitler film şeklinde elde edilir [44].

2.2.2 Nanokompozitlerin Karakterizasyonu

2.2.2.1 FTIR-ATR Analizleri

FTIR-ATR analizleri, Perkin Elmer Spektrum 100 spektrofotometresi ile 4000-650 cm^{-1} dalga boyu aralığında geçirgenlik modunda yapılmıştır.

2.2.2.2 Optik Temas Açısı Analizleri

Polimer ve organik bileşik olan bal ile modifiye edilmiş hidroksiapatitin yüzey özelliklerinin belirlenmesi için optik temas açısı fotoğrafları çekilmiştir.

2.2.3 Hücre Kültürü İşlemleri

2.2.3.1 Malzemelerin Sterilizasyonu

Hücre kültürü laboratuvarı, çamaşır suyu ile, biyogüvenlik kabini ve hücre kültürüne dışarıdan alınan tüm malzemeler %70'lik etil alkol ile steril edilmiştir. Deneylerde kullanılan pipet uçları ve santrifüj tüpleri 121 $^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dk (1,02 atm basınçta) otoklavlanmıştır. Hücre kültürü laboratuvarı ve biyogüvenlik kabini kullanılmadığı durumlarda UV lamba ile sterilizasyonu sağlanmıştır.

2.2.3.2 Kullanılan Besi Yerinin Hazırlanması

392,5 mL RPMI 1640 medium içerisine; 100 mL fetal bovine serum 2,5 mL penicilin-streptomycin, 5 mL phtohemoglutinin eklenerek besi ortamı hazırlanmıştır. Yeterli miktarda büyüme faktörü içeren FBS içine penicilin-streptomycin; bakteriyel kontaminasyona engel olmak için, phtohemoglutinin ise *in vitro* ortamda hücre çoğalmasını sağlamak için ilave edilmiştir. 10 mg phtohemoglutinin 10mL steril suda çözünerek 5mL alınıp besi ortamına dahil edilmiştir. Hazırlanan besi yeri +4⁰C'de muhafaza edilmiştir. Hazırlanan besi yeri, 15 mL'lik steril falkon tüplere bölünerek 5'er mL'lik kültür ortamları hazırlanmıştır. Hemen kullanılmayacak tüpler -20⁰C'de saklanmıştır.

2.2.4 Sitotoksisite Testleri

2.2.4.1 Kandan Lenfosit İzolasyonu ve MTS Testi

MTS testi 5 gün süren bir sitotoksisite uygulamasıdır.

- 1.gün; Kimyasallar ile hazırlanmış besi yeri steril falkonlara koyulduktan sonra besi yeri üzerine sağlıklı ve gönüllü kişiden alınmış kan örnekleri eklenir.
2. gün; Kültürlere 1 gece UV ışık altında bekletilerek steril edilmiş nanokompozitler ilave edilir. Negatif kontrol grubuna nanokompozit eklenmez.
3. gün; Lenfosit izolasyonu gerçekleştirilerek, işlemler sonucunda 24 saatlik ölçüm alınır.

Lenfosit izolasyonu; Kültürler serum fizyolojik serum ile sulandırılır. (kültürlerin bulunduğu steril falcon tüpler yaklaşık tamamı doluncaya kadar.) Kuru tüplere 2,5 mL Ficol-Paque koyulur ve fizyolojik serum ile sulandırılmış kan örnekleri Ficol-Paque ile karışmamasına dikkat edilerek yavaşça eklenir. Her bir kültür 15dk 1500 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüj sonunda orta fazda toplanmış olan lenfositler dikkatlice başka steril kuru falkonlara alınır. Lenfositler tekrar 10 mL serum fizyolojik ile sulandırılarak 10 dk 1500 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüj sonunda süpernatant atıldıktan sonra dipte kalan lenfositler bir miktar besi yeri ile

çözülüp 1 mL içerisinde 10 µL hücre alınıp sayılır. İstenen sayıda hücreye göre seyreltme işlemi yapılır. Sayısı ayarlanmış hücreler 3'er tekrarlı halde 96 well plate'e eklenir. (Her kuyucuğa 100 µL eklenir.) Negatif kontrol grubu kuyucuğuna ise 100 µL besi yeri eklenir. Üzerlerine 20 µL MTS reaktifi eklenip 37⁰C'de %5 CO₂ ortamında 1, 2, 3 veya 4 saat inkübasyondan sonra mikrolaka okuyuculu spektrofotometrede 490 nm'de ölçüm yapılır. Aynı işlemler her gün uygulanarak 4. Gün 48 saatlik, 5. Gün 72 saatlik ölçümler alınır.

2.2.4.2 JuLI – Hücre Yaşamlılığı Testi

Hücre yaşamlılığı testi JuLI Hücre Görüntüleyicisi cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu cihazın temeli tripan mavisi testine dayanmaktadır. 24, 48, 72 saatlik lenfosit izolasyonlarından sonra lenfosit süspansiyonlarından ve negatif kontrol grubundan 10 µL alınarak steril ependorflara koyulur. Her bir ependorf üzerine 10 µL tripan mavisi boyası eklenir ve JuLI Hücre Görüntüleyicisi cihazı ile hücre sayımı ve görüntülemesi gerçekleştirilir.

2.2.5 Hemouyumluluk Testi

Bu test Motlag ve arkadaşlarının yöntemi (2006) uyarlanarak yapılmıştır [45]. Nanokompozit örnekleri her biri eşit olacak şekilde kesilerek 400 µL Antikogülanlı kan 20 mL %0,9'luk NaCl çözeltisinde seyreltilmiştir. 2 mL'lik ependorf içersine 1 gece UV ışık altında bekletilmiş nanokompozitler eklenir ve üzerine 1 mL seyreltilmiş kan ilave edilir. Pozitif kontrol grubu için; 200 µL antikogülanlı kan 10 mL steril ultra saf su içinde seyreltilmiş ve içersinden 1 mL alınarak tüpe koyulmuştur. Negatif kontrol grubuna ise tuz çözeltisi ile seyreltilmiş kandan 1 mL alınarak içine nanokompozit ilave edilmemiştir. Tüpler 2 saat 37⁰C %5 CO₂ ortamda inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası 1000g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılan tüplerden 200 µL alınarak well plate'e eklenmiştir. Mikrolaka okuyuculu spektrofotometrede 545 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

% Hemoliz oranı aşağıda formüle göre hesaplanmıştır;

$$\% \text{Hemoliz} = \frac{[\text{Absorbans}_{\text{Test Polimeri}} - \text{Absorbans}_{\text{Negatif kontrol}}]}{[\text{Absorbans}_{\text{Pozitif Kontrol}}]} \times 100$$

2.2.6 Antibakteriyal Aktivite

Antibakteriyal aktivite için nanokompozitler eşit ölçülerde kesilerek UV ışık altında steril edilmiştir. Besi yeri olarak hazır triptik soy agar kullanılmıştır. Antibakteriyal aktivite testi için; bir gram negatif (*Escherichia coli* ATCC-8739) ve bir gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC-6538) bakteri türü kullanılmıştır 10^{-4} oranında seyreltilmiş bakterilerden 200 μL alınarak besi yerlerine ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılmış besi yerlerinin üzerlerine nanokompozit örnekleri yerleştirilip, 1 gece 37°C 'de inkübatörde bekletilmiştir. Bir gecelik inkübasyondan sonra nanokompozitlerin çevresindeki zon çapı ölçülerek bakterilerin nanokompozitlere karşı dirençleri belirlenmiştir.

3. BULGULAR

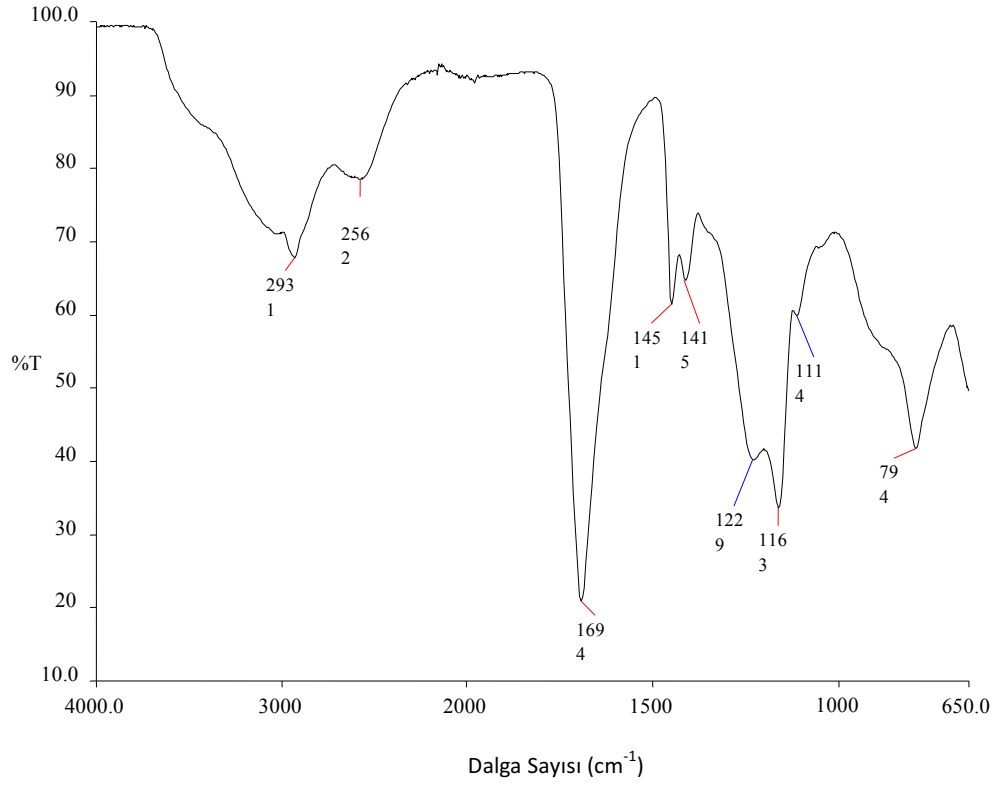
Çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış PAA/nHAP/BAL nanokompozitlerinin FTIR-ATR ve optik temas açısı ile karakterizasyonu, sitotoksosite, hemouyumluluk ve antibakteriyel aktivite testi ile biyouyumlulukları incelenmiştir. Elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

3.1 Nanokompozitlerin Karakterizasyon Sonucu

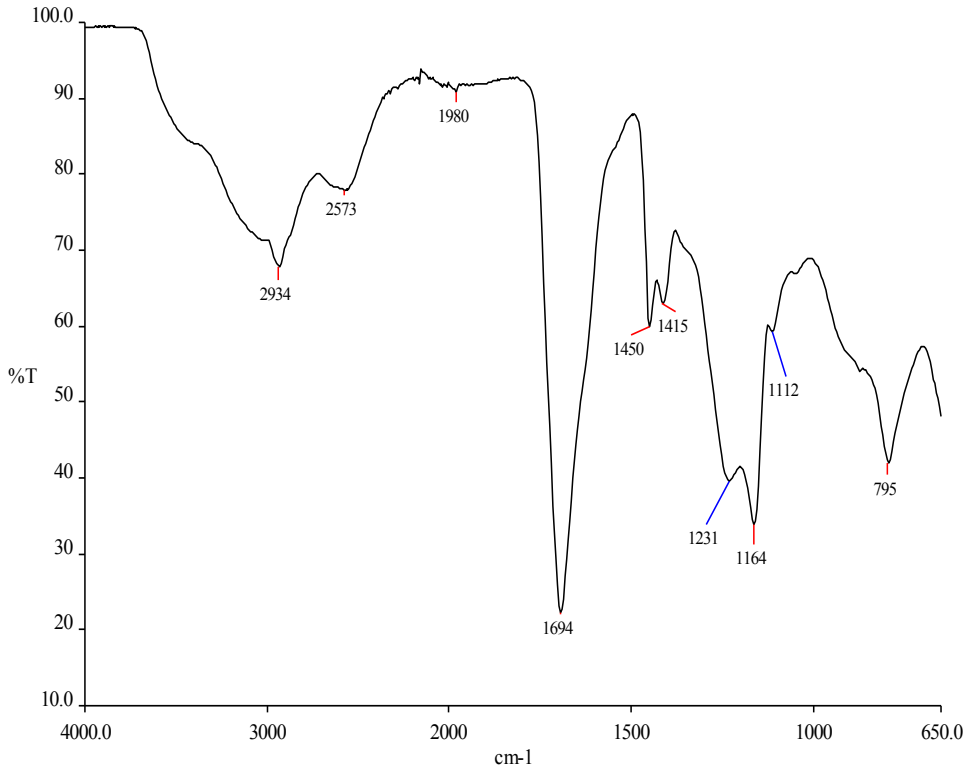
PAA polimeri, bal ve farklı konsantrasyonlarda nHAP nano partikülleri ile hazırlanan nanokompozitlerinin FTIR-ATR ve optik temas açısı analizleri gerçekleştirilerek karakterizasyonları yapılmıştır.

3.1.1 FTIR-ATR Analiz Sonuçları

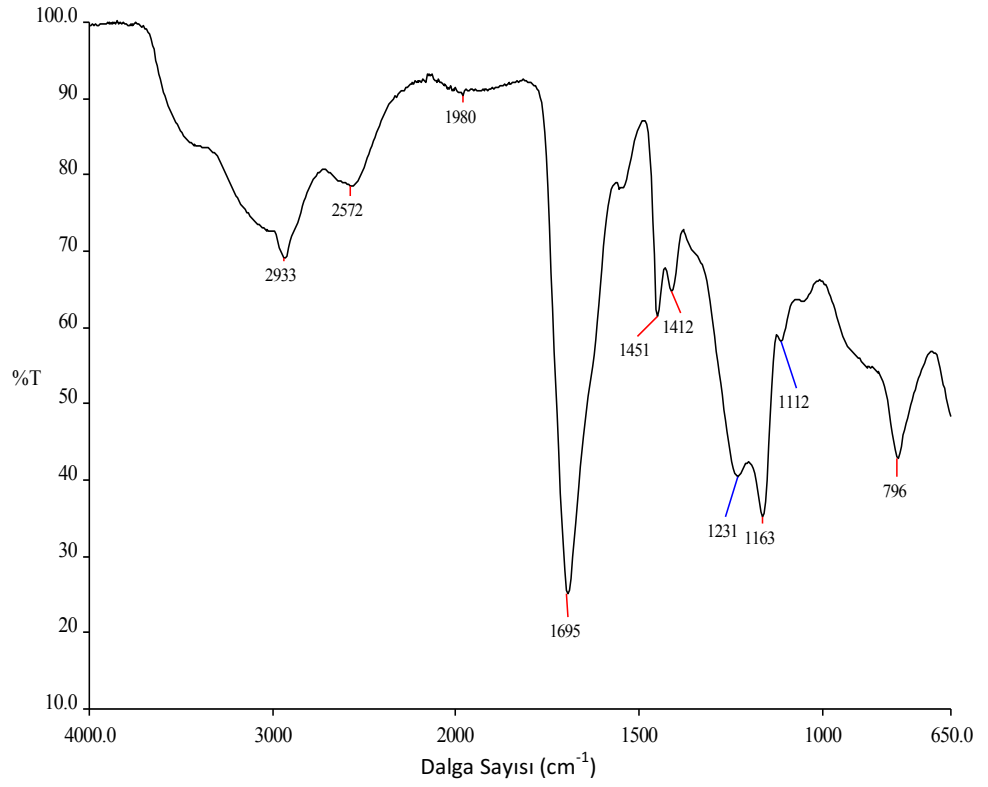
Şekil 3.1– 3.4'te sunulan grafiklerdeki veriler PAA/Bal ve nanokompozitlerinin FTIR-ATR ölçümleri sonucunda elde edilen spektrumlarıdır. Bu spektrumlara ait bantlar grafikler üzerinde belirtilerek sunulmuştur. Şekil 3.5'te ise elde edilen tüm spektrumlar karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.



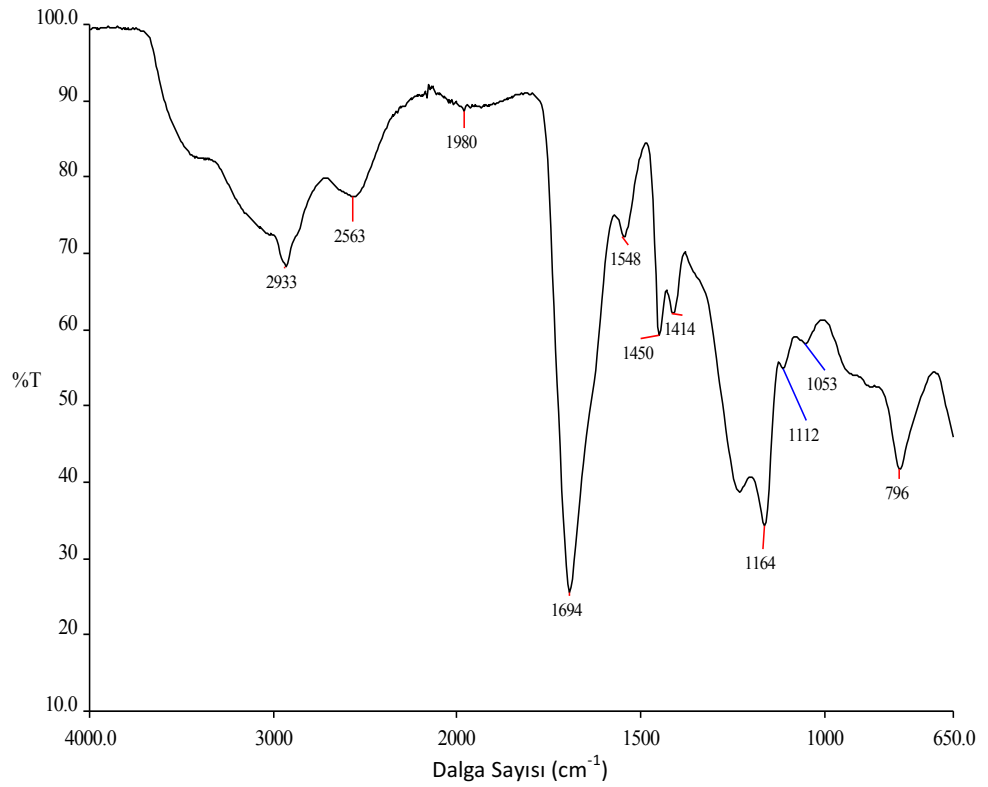
Şekil 3.1:PAA/BAL filminin FTIR spektrumu.



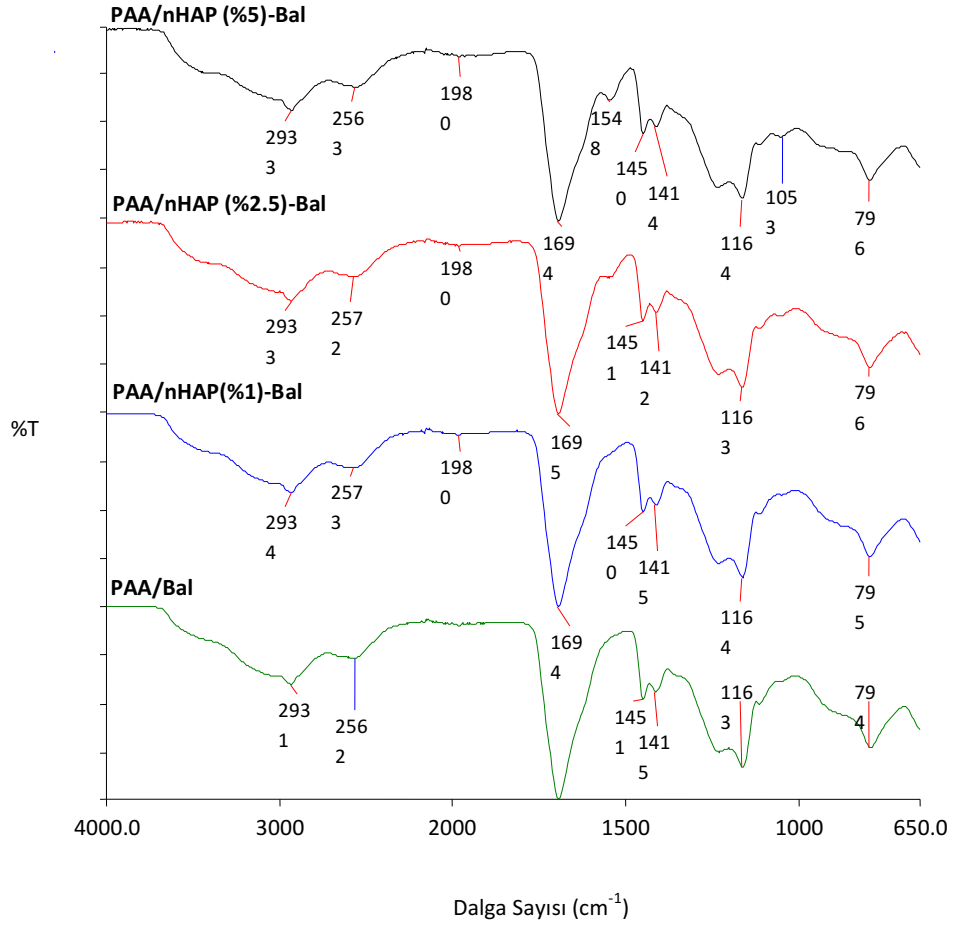
Şekil 3.2: PAA/nHAP (1%)/BAL nanokompozitinin FTIR spektrumu.



Şekil 3.3: PAA/nHAP (%2,5)/BAL nanokompozitinin FTIR spekturumu.



Şekil 3.4: PAA/nHAP (%5)/BAL nanokompozitinin FTIR spekturumu.



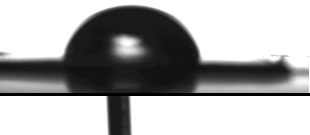
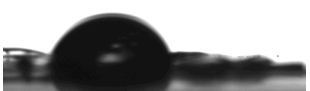


Şekil 3.5: PAA/Bal ve tüm nanokompozitlere ait FTIR spektrumlarının karşılaştırılması olarak gösterimi.

3.1.2 Optik Temas Açısı Analiz Sonuçları

PAA/BAL nanokompozitlerinin optik temas açısı analizleri Tablo 3.1’de sunulmuştur. Yüzey karakterizasyonunu belirlemek için uygulanan bu testte sıvı olarak saf su kullanılmıştır. Saf su damlacığının materyal yüzeyindeki davranışı ve bu davranışın sahip olduğu açısıl veriler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.1: PAA/BAL ve nanokompozitlerine ait optik temas açısı ölçüleri ve fotoğrafları.

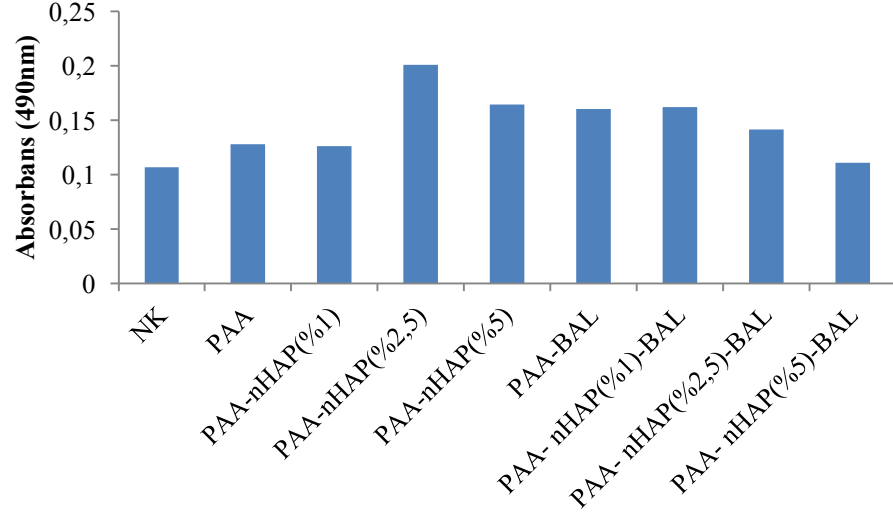
Örnekler	Optik Temas Açıları (°)	Resimler
PAA/BAL	86.70	
PAA/nHAP (%1)/BAL	85.89	
PAA/nHAP(%2,5)/BAL	83.23	
PAA/nHAP (%5)/BAL	81.02	

3.2 Sitotoksisite Sonuçları

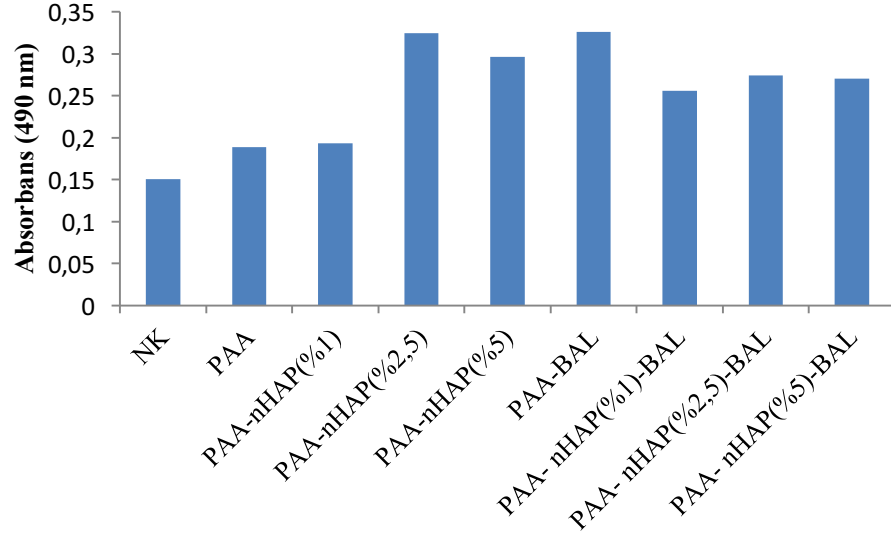
Sentezlenen PAA/nHAP/BAL nanokompozitlerinin toksik etkileri MTS ve JuLI testleri ile belirlenmiştir.

3.2.1 MTS Testi Sonuçları

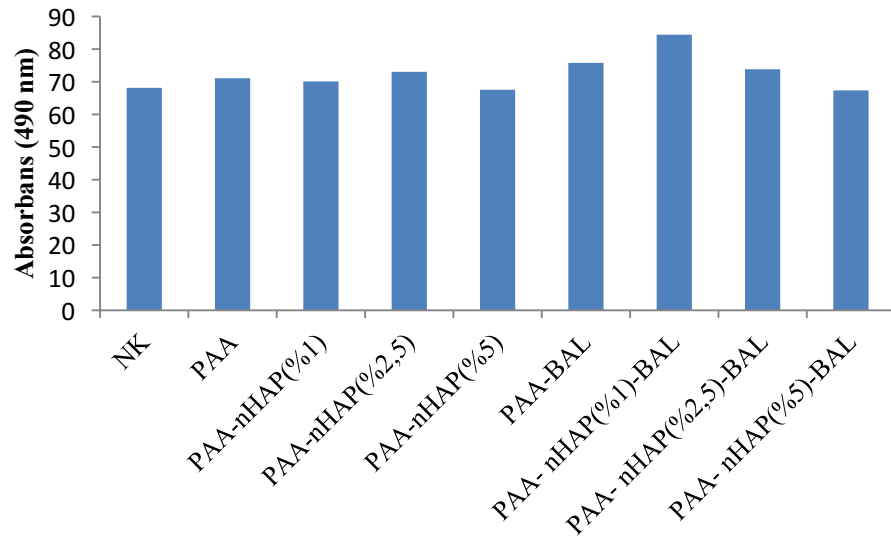
Nanoakompozitlerin 24, 48, 72 saat lenfosit ile inkübasyonu sağlanmış ve her günün sonunda MTS reaktifi eklenip 490 nm’de ölçüm alınarak absorbansları belirlenmiştir.



Şekil 3.6: PAA, PAA/BAL, PAA/nHAP ve PAA/nHAP/BAL Nanokompozitlerinin 24 saat absorbans grafikleri.

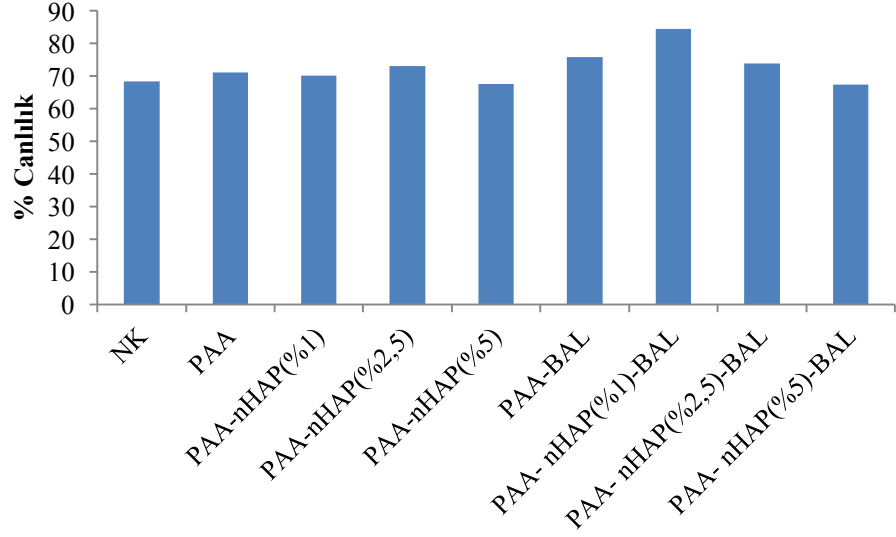


Şekil 3.7: PAA, PAA/BAL, PAA/nHAP ve PAA/nHAP/BAL Nanokompozitlerinin 48 saat absorbans grafikleri.

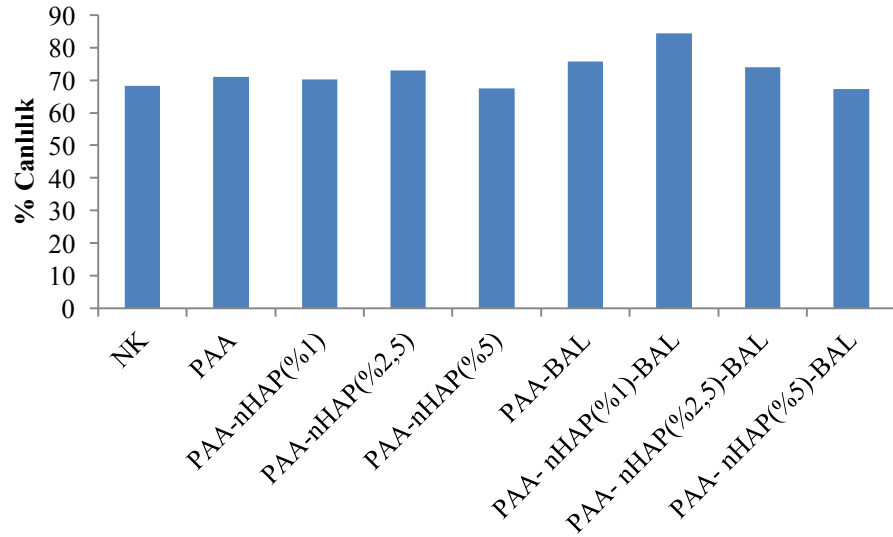


Şekil 3.8: PAA, PAA/BAL, PAA/nHAP ve PAA/nHAP/BAL Nanokompozitlerinin 72 saat absorbans grafikleri.

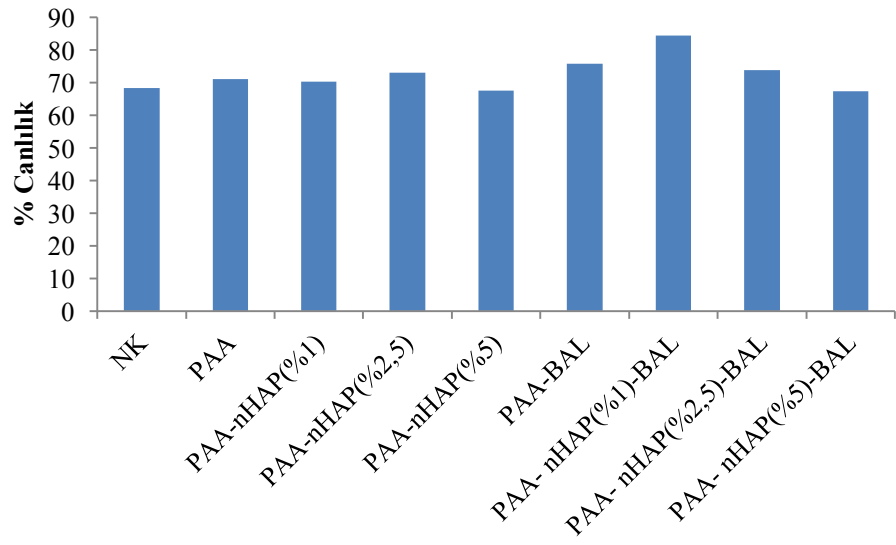
3.2.2 Tripan Mavisi ile Hücre Sayım Sonuçları



Şekil 3.9: PAA, PAA/BAL, PAA/nHAP ve PAA/nHAP/BAL nanokompozitlerinin tripan mavisi ile hücre sayımı 24 saat grafiği.

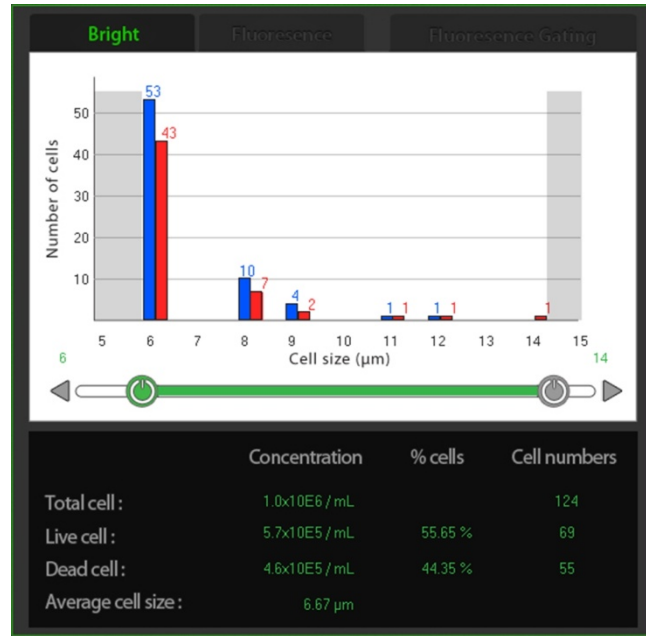


Şekil 3.10: PAA, PAA/BAL, PAA/nHAP ve PAA/nHAP/BAL nanokompozitlerinin tripan mavisi ile hücre sayımı 48 saat grafiği.

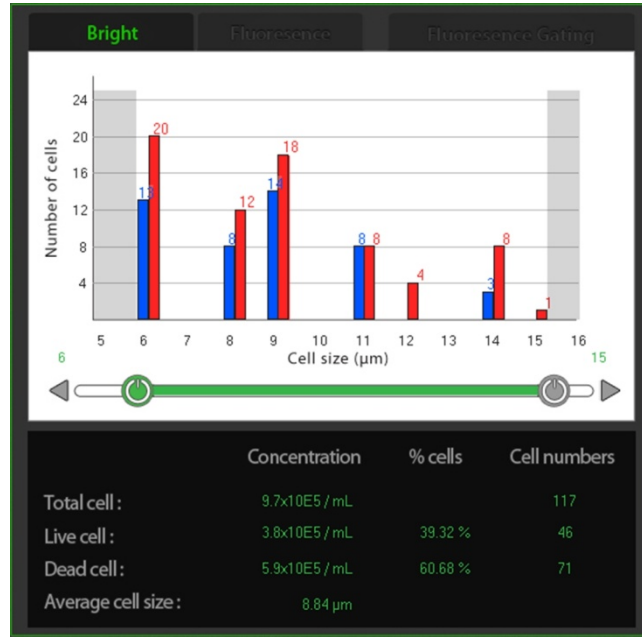


Şekil 3.11: PAA, PAA/BAL, PAA/nHAP ve PAA/nHAP/BAL nanokompozitlerinin tripan mavisi ile hücre sayımı 72 saat grafiği.

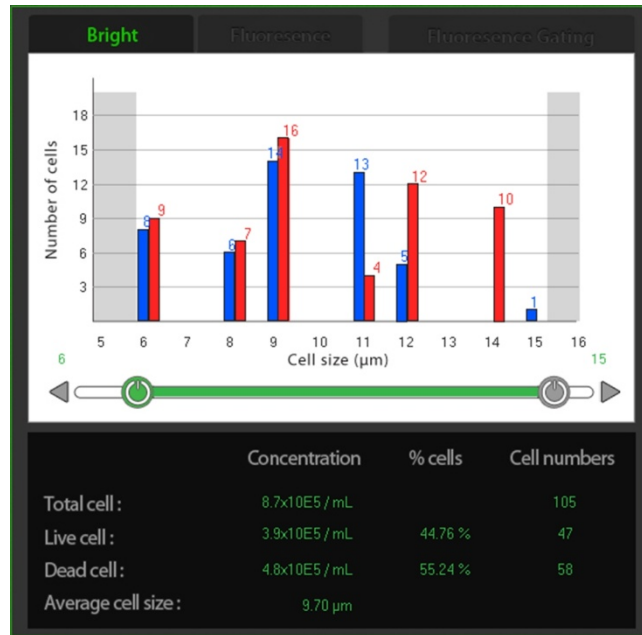
3.2.3 JuLI Hücre Yaşamlılığı Testi Sonuçları



Şekil 3.12: 24 saat sonunda nanokompozit ile muamele edilmemiş kanda % canlılık sonucu (Negatif Kontrol).



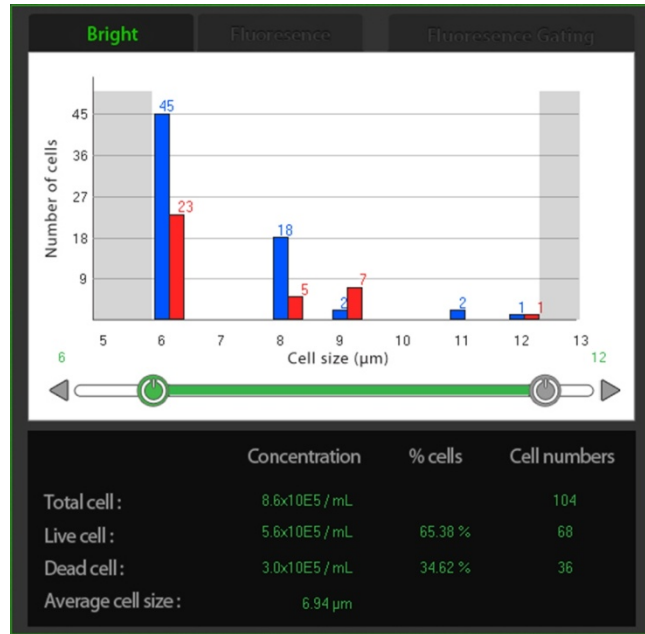
Şekil 3.13: 24 saat sonunda saf polimer PAA nanokompozitinin % canlılık sonucu.



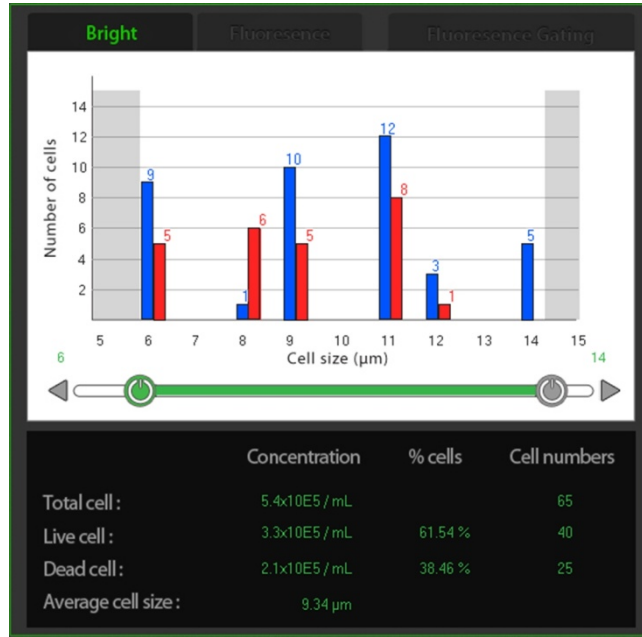
Şekil 3.14: 24 saat sonunda PAA/nHAP (%1) nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



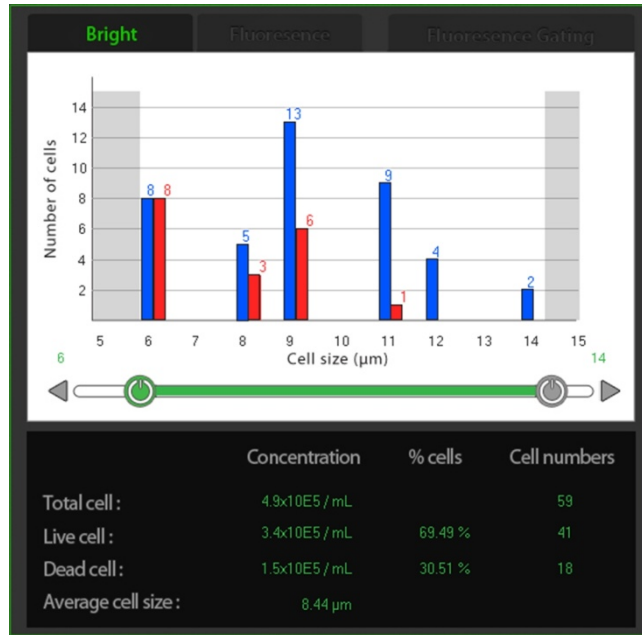
Şekil 3.15: 24 saat sonunda PAA/nHAP (%5) nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



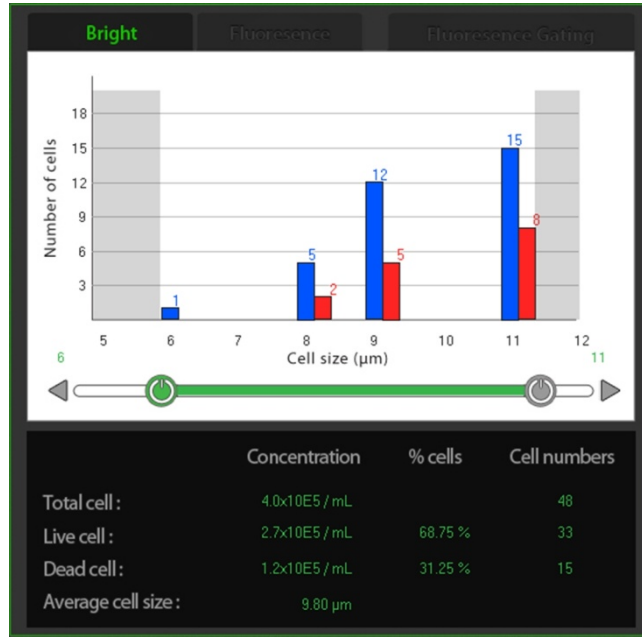
Şekil 3.16: 24 saat sonunda PAA/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



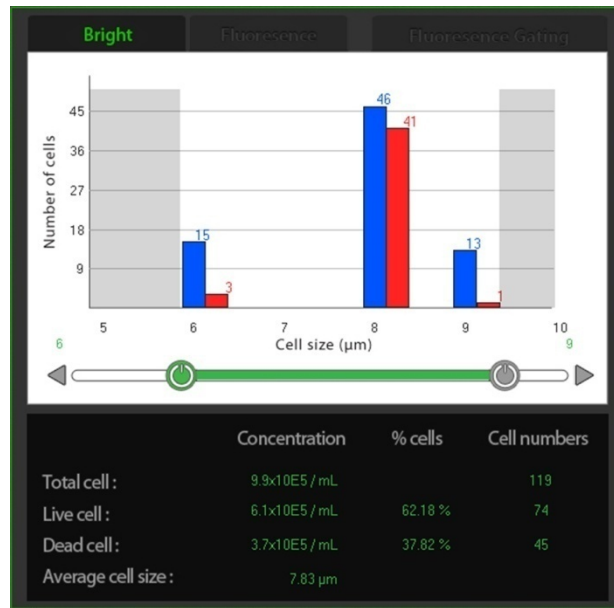
Şekil 3.17: 24 saat sonunda PAA/nHAP (%1)/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



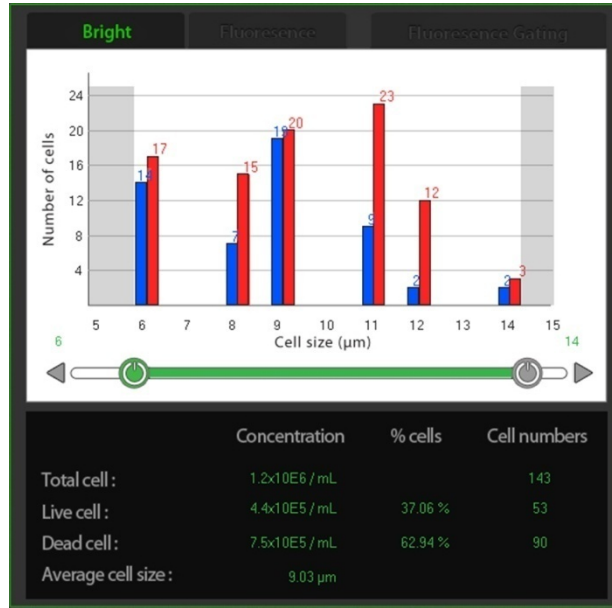
Şekil 3.18: 24 saat sonunda PAA/nHAP (%2,5)/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



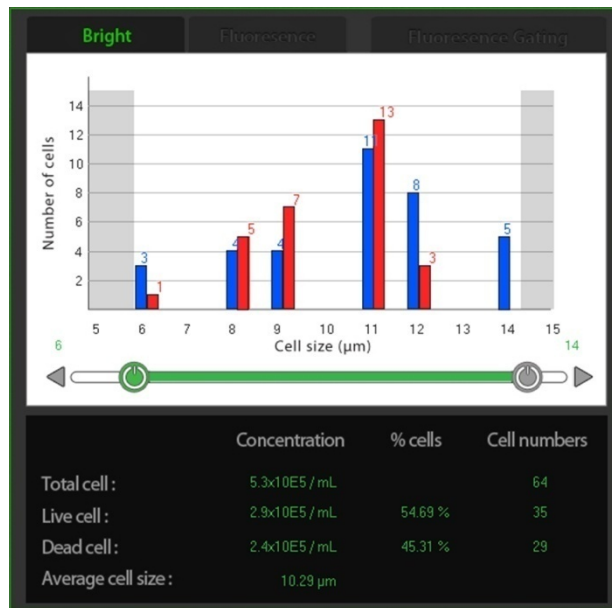
Şekil 3.19: 24 saat sonunda PAA/nHAP (%5)/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



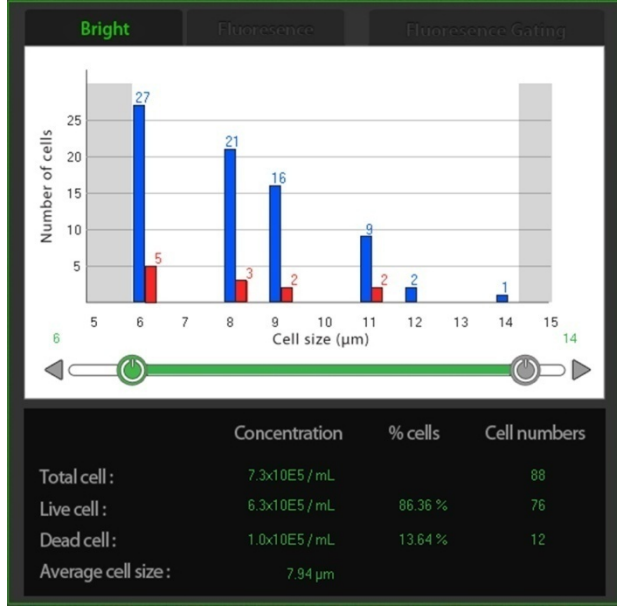
Şekil 3.20: 48 saat sonunda nanokompozit ile muamele edilmemiş kanda % canlılık sonucu (Negatif Kontrol)



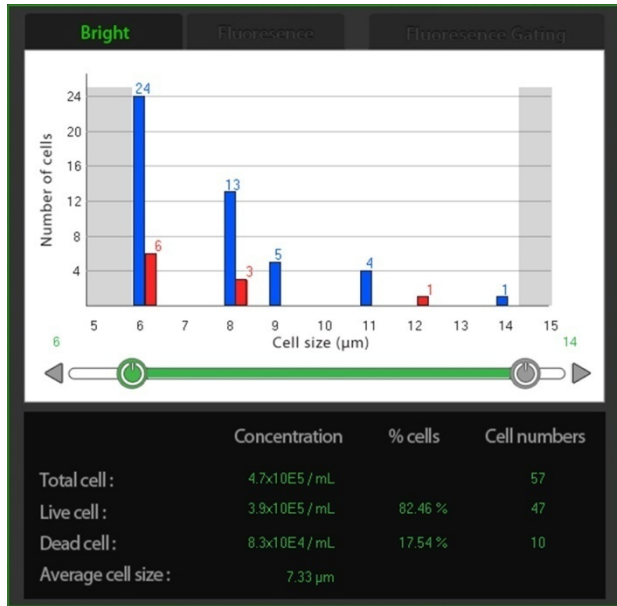
Şekil 3.21: 48 saat sonunda PAA nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



Şekil 3.22: 48 saat sonunda PAA/nHAP (%1) nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



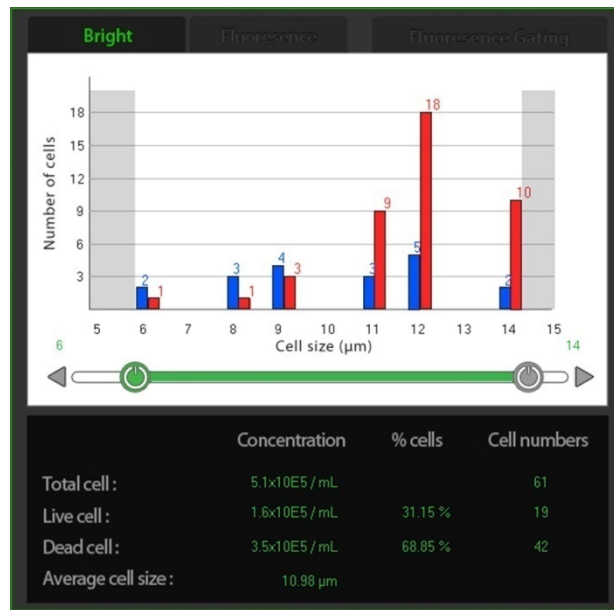
Şekil 3.23: 48 saat sonunda PAA/nHAP(%2,5) nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



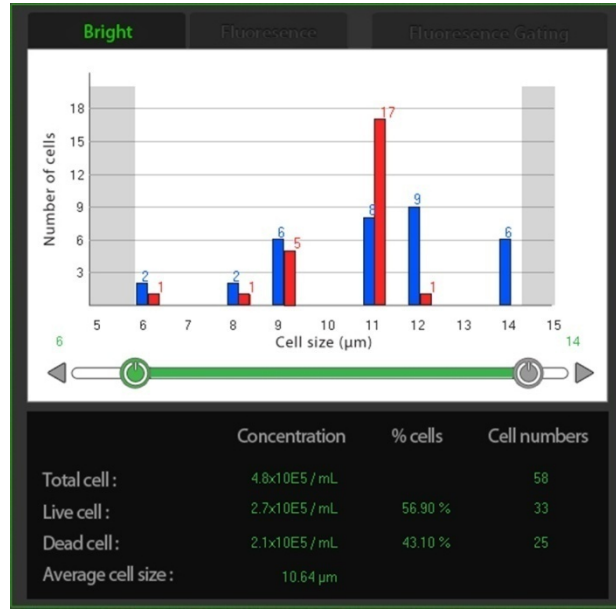
Şekil 3.24: 48 saat sonunda PAA/nHAP (%5) nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



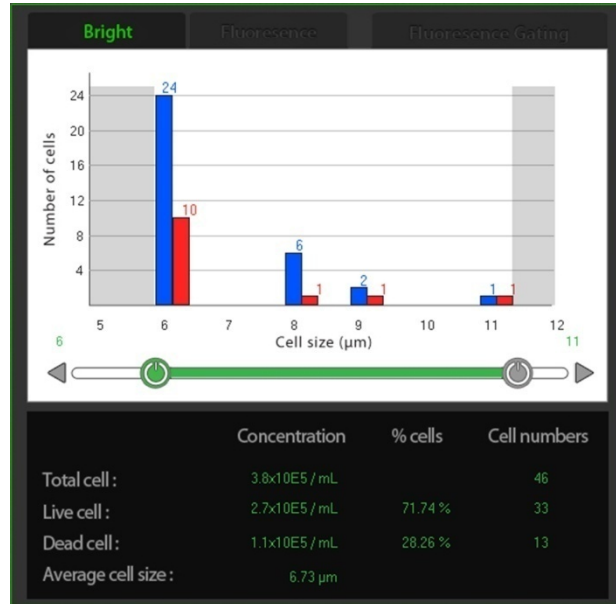
Şekil 3.25: 48 saat sonunda PAA/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



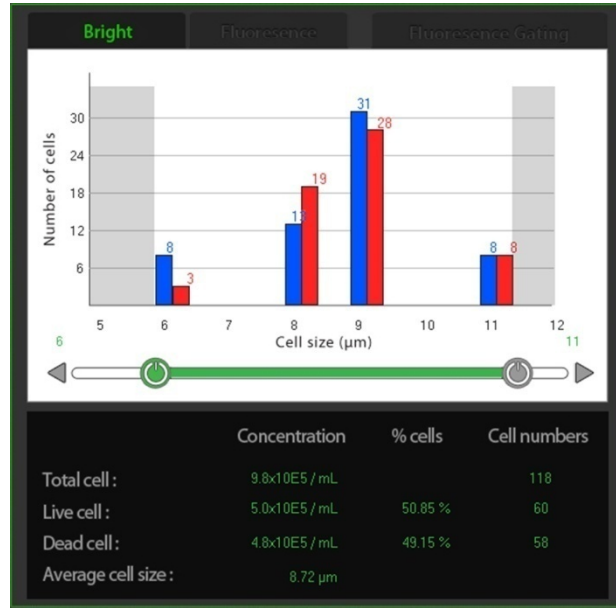
Şekil 3.26: 48 saat sonunda PAA/nHAP (%1)/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



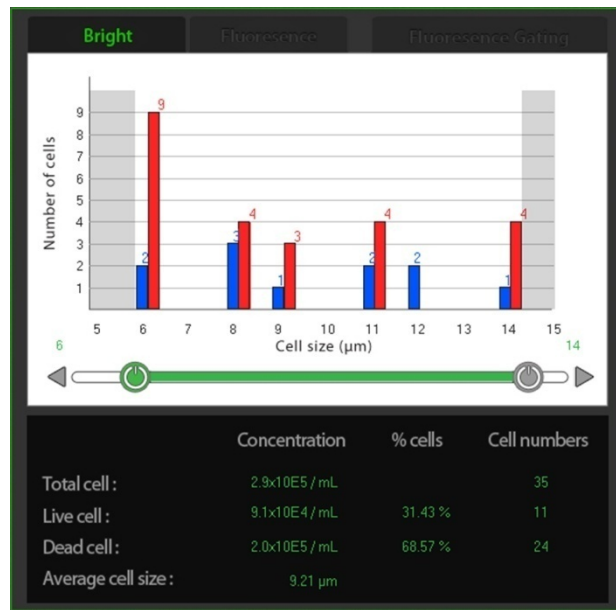
Şekil 3.27: 48 saat sonunda PAA/nHAP (%2,5)/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



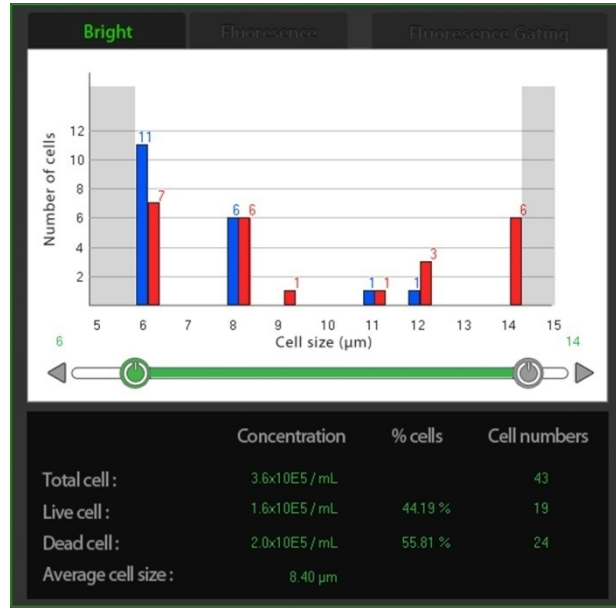
Şekil 3.28: 48 saat sonunda PAA/nHAP (%5)/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



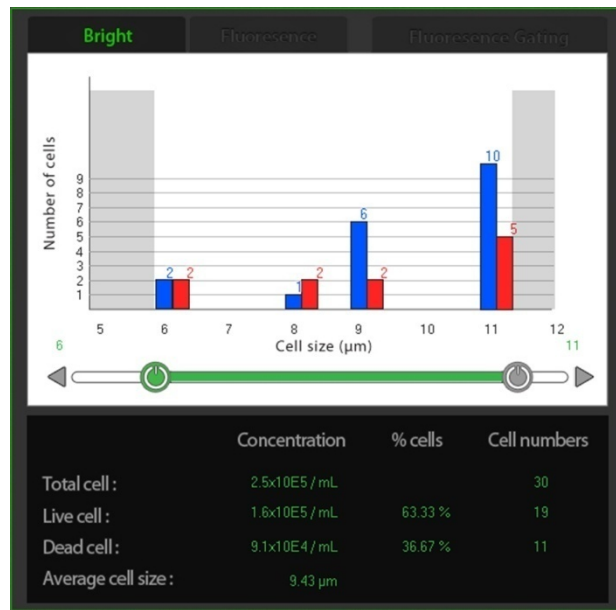
Şekil 3.29: 72 saat nanokompozit ile muamele edilmemiş kanda % canlılık sonucu. (Negatif Kontrol)



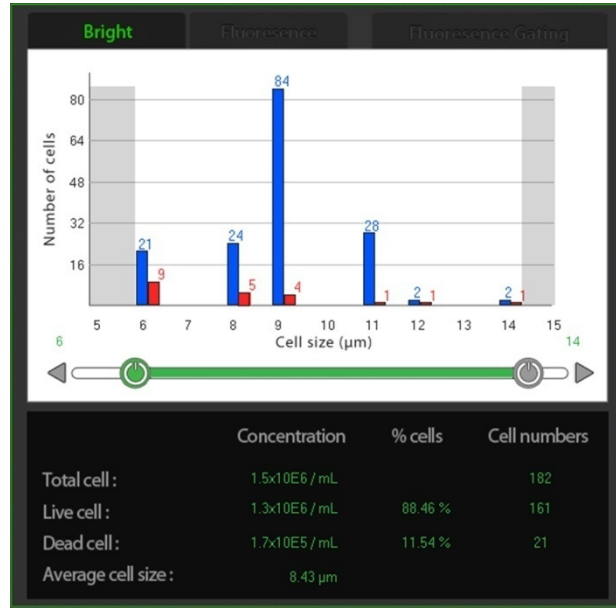
Şekil 3.30: 72 saat sonunda PAA nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



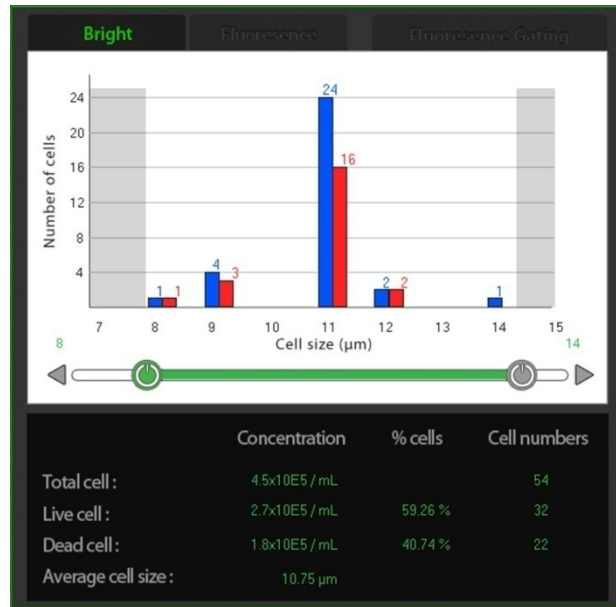
Şekil 3.31: 72 saat sonunda PAA/nHAP(%1) nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



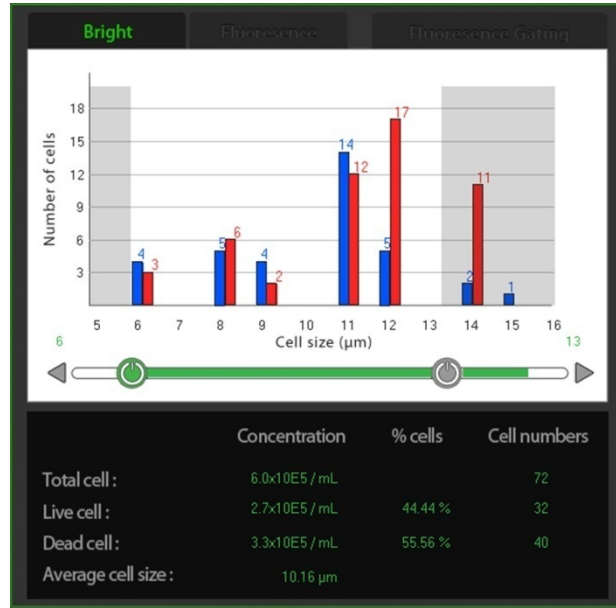
Şekil 3.32: 72 saat sonunda PAA/nHAP (%2,5) nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



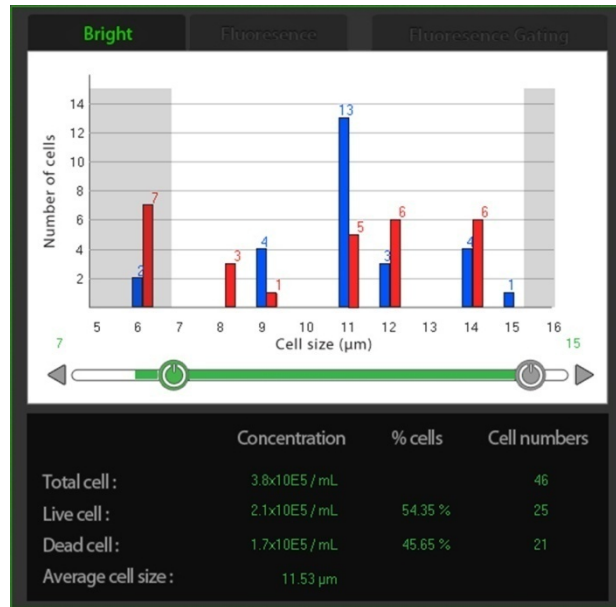
Şekil 3.33: 72 saat sonunda PAA/nHAP (%5) nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



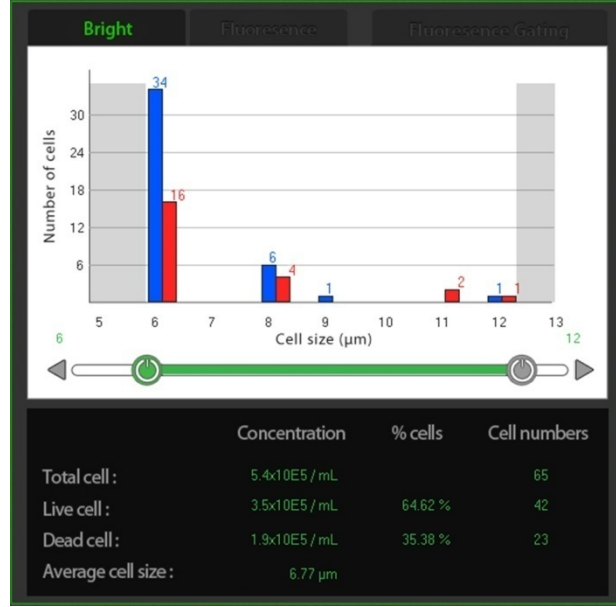
Şekil 3.34: 72 saat sonunda PAA/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



Şekil 3.35: 72 saat sonunda PAA/nHAP (%1)/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



Şekil 3.36: 72 saat sonunda PAA/nHAP (%2,5)/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.



Şekil 3.37: 72 saat sonunda PAA/nHAP (%5)/BAL nanokompozitlerinin % canlılık sonucu.

3.3 Hemouyumluluk Testi Sonuçları

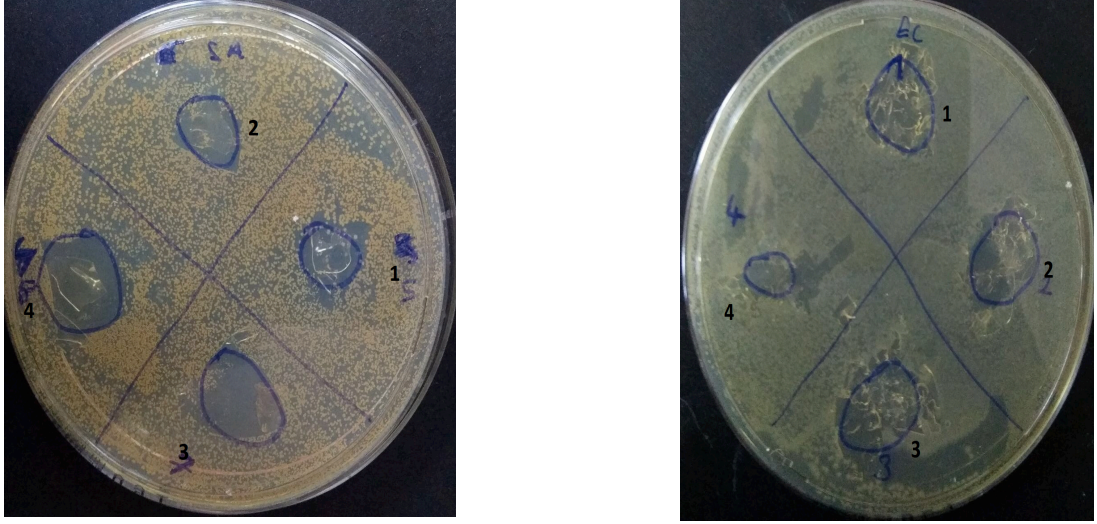
Çözücü uzaklaştırma metodu ile hazırlanan film şeklindeki saf PAA, PAA/BAL, PAA/nHAP ve PAA/nHAP/BAL malzemelerin, biyouyumluluk parametrelerinden birisi olan kan ile uyumluluğu ifade eden % hemoliz değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.2: Saf PAA, PAA/BAL, PAA/nHAP ve PAA/nHAP/BAL malzemelerinin % hemoliz değerleri.

Örnekler	% Hemoliz Oranı
PAA/BAL	0,3990
PAA/nHAP(%1)/BAL	0,3813
PAA/nHAP(%2,5)/BAL	0,3682
PAA/nHAP(%5)/BAL	0,3504

3.4 Antibakteriyal Aktivite Sonuçları

Nanokompozitlerin gram-negatif *Escherichia coli* ve gram-pozitif *Staphylococcus aureus* bakterilere karşı antibakteriyal etkiye sahip oldukları Tablo 3.3’de ve Şekil 3.38’de görülmektedir.



Şekil 3.38: PAA/BAL ve PAA/nHAP/BAL nanokompozitlerinin (1-PAA/BAL, 2-PAA/nHAP(%1)/BAL, 3-PAA/nHAP(%2.5)/BAL, 4-PAA/nHAP(%5)/BAL) *Staphylococcus aureus* (Sa) ve *Escherichia coli* (Ec)’ye karşı antibakteriyel aktiviteleri.

Tablo 3.3: Antibakteriyel aktivite testi sonucu elde edilen zon çapları (cm).

Örnek	Çap	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
PAA	1,4 cm	1,4 cm
PAA/nHAP (%1)	1,6 cm	1,5 cm
PAA/nHAP (%2,5)	1,3 cm	1,25 cm
PAA/nHAP (%5)	1,3 cm	0,9 cm
PAA/BAL	1,1 cm	-
PAA/nHAP (%1)/BAL	1,2 cm	-
PAA/nHAP (%2,5)/BAL	1,7 cm	-
PAA/nHAP (%5)/BAL	1,7 cm	-

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1 Nanokompozitlerin Karakterizasyonu ve Sonuçları

4.1.1 FTIR-ATR Analiz Sonuçları

PAA/BAL ve PAA/nHAP/BAL nanokompozit filmlerinin FTIR-ATR spektrumları Şekil 3.1-3.5’de verilmiştir. Örneklere ait spektrumlar Tablo 4.1’ de bant değerleri verilen saf PAA filminin FTIR-ATR spekturumu ile karşılaştırılmıştır. PAA/BAL örneğine ait FTIR-ATR spektrumu incelendiğinde, saf PAA polimerine ait 2939,1704 ve 1240 cm^{-1} bantlarında çıkan CH gerilme ve karbonil gruplarının titreşimlerine ait pikler sırasıyla 2931, 1694 ve 1229 cm^{-1} ’e kaymaktadır. Bu piklerdeki kaymalar, PAA polimeri ile bal arasında bir etkileşimin olduğunu ve yapıda bir değişiklik meydana getirdiğini göstermektedir. Şekil 3.2 PAA/nHAP(%1)/BAL ve PAA/nHAP(%2.5)/BAL örneklerine ait spektrumlardır. Her iki örnek, PAA/BAL örneğinin spektrumu ile kıyaslandığında 1980 cm^{-1} bandında yeni bir pik oluştuğu gözlenmiştir. Bu farklılığın yanısıra PAA/BAL örneğinin 2562 cm^{-1} bandındaki pik PAA/nHAP (%1)/BAL ve PAA/nHAP (%2.5)/BAL örneklerinde sırasıyla 2573 ve 2572 cm^{-1} bandında oluştuğu tespit edilmiştir. PAA/nHAP(%5)/BAL örneğine ait spektrum incelendiğinde ise yine yeni pik oluşumu ve bantlarda meydana gelen kaymalar tespit edilmiştir. PAA/nHAP(%1)/BAL ve PAA/nHAP(%2.5)/BAL örneklerinde gözlemlenen 1980 cm^{-1} ’deki spektrumun yanı sıra 1548 ve 1053 cm^{-1} bantlarında yeni piklerin oluştuğu tespit edilmiştir. 1053 cm^{-1} bandındaki spektranın nHAP partikülüne ait PO_4^{3-} gruplarına atfedilmektedir [46]. 1548 cm^{-1} ’de çıkan band ise bal örneğine ait $-\text{CH}_2$ gruplarının eğilme titreşimlerine ait olabilir.

Tablo 4.1: Saf PAA'nın bazı karakteristik IR bantlar [53].

Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	Fonksiyonel Grup
2939	C-H ve CH ana zincir gerilmesi
1704	C=O gerilmesi
1453	CH-CO eğilme
1414	-CH ₂ - eğilme
1240	C-O gerilmesi

Matriks (Saf PAA) ile karşılaştırılan tüm örnekler matriksen farklı karakterde spektrumlar oluşturmuşlardır. Bu sonuçlar, hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki PAA/nHAP/BAL örneklerinin aralarındaki etkileşimlerden kaynaklı olduğu kabul edilebilir.

Tablo 4.2: Saf balın bazı karakteristik IR bantları [43].

Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	Fonksiyonel Grup
3276	O-H (H- bağlı)
2948	C-H gerilme
1638	O-H (Su) eğilme
1426	-CH ₂ eğilme (sert)
1362	-CH ₂ eğilme (orta)
1254	C-C ₂ O-CH, C-OH eğilme
1032	C-O gerilme

4.1.2 Optik Temas Açısı Analiz Sonuçları

PAA/BAL ile PAA/nHAP/BAL nanokompozit örneklerinin optik temas açısı analizleri saf su ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucunda elde edilen veriler Tablo 3.1'de ölçüm fotoğrafları ile birlikte verilmiştir. Optik temas açısı ölçümleri örnek yüzeylerinin sahip olduğu hidrofilik veya hidrofobik özellikte olduklarını açıklayan bir parametredir. Yapılan literatür taramasında saf PAA filminin optik temas açısının 84.58° olduğu görülmüştür [51]. Optik temas açısı 90° 'den küçük olması saf PAA filminin yüzeyinin hidrofilik karakterde olduğunu göstermektedir. Tablo 3.1'de gösterildiği üzere PAA/BAL (86.70°), PAA/nHAP (%1)/BAL (85.89°) PAA/nHAP (%2.5)/BAL (83.23°) ve PA/nHAP(%5)/BAL (81.02°) saf PAA filmine yakın bir özellik göstererek hidrofilik birer yüzeye sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca süper hidrofilik olan nHAP dolgu malzemesi [51], hazırlanan materyallerde artan miktarına bağlı olarak hidrofilik özelliğinin orantılı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

4.2 Sitotoksite Test Sonuçları

Bu çalışmada, sentezlenen nanokompozitlerin toksik etkileri, sağlıklı ve gönüllü bireylerden alınan kan örneklerinden izole edilmiş lenfosit hücrelerinin MTS testi sonucunda verdikleri absorbansları, tripan mavisi ve JuLI hücre yaşamlılığı testleri sonucunda ise elde edilen % yaşamlılık oranları kullanılarak araştırılmıştır.

Nanokompozitler ile 72 saat boyunca inkübe edilen hücrelerin MTS test sonuçları Şekil 3.6, 3.7 ve 3.8' de görülmektedir. 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonucunda gerçekleştirilen ölçümlerin sonunda PAA/nHAP(%2,5) nanokompoziti ile, 72 saatlik inkübasyon sonucunda ise PAA/nHAP(%5) nanokompoziti ile muamele edilmiş lenfositlerin en yüksek absorbans değerlerini verdikleri belirlenmiştir. Bal ilave edilmiş örnekler kendi içerisinde değerlendirildiğinde, PAA/nHAP(%1)/BAL örneğinin 24 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonucunda en yüksek absorbans değerine sahip olduğu görülmektedir. nHAP ve bal ilave edilen örneklerde MTS testi sonucu elde edilen absorbansların arttığı belirlenmiştir. Zhang J. ve arkadaşları da %30 ve % 40 oranında hidroksiapatit ile hazırladıkları PMMA/HAP nanokompozitlerinin hücre yaşamlılığını desteklediğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, uyguladıkları MTT testi sonucunda, %30'luk ve

%40'lık hidroksiapatit eklenen PMMA/Hidroksiapatit nanokompozitlerinin hücre yaşamlılığını arttırdığını belirtmişlerdir [47]. Yılmaz ve arkadaşları (2017) ise hidroksiapatitin PMMA'nın az da olsa sebep olduğu sitotoksisiteyi ve genotoksisiteyi ortadan kaldırdığını rapor etmişlerdir [48].

Nanokompozitler ile 72 saat boyunca inkübe edilen hücrelerin tripan mavisi test sonuçları Şekil 3.9-3.11' de, JuLI sonuçları ise Şekil 3.12-3.37'de görülmektedir. Tripan mavisi test sonuçlarına göre 24 saatlik inkübasyon sonunda PAA/nHAP (% 5) örneği, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucunda ise PAA/nHAP (%2,5) örneğinin en yüksek yaşamlılığa sahip olduğu görülmüştür. Ballı örnekler arasında PAA/nHAP (%1)/BAL 24 ve 72 saat sonunda, PAA/nHAP(%2,5)/BAL ise 48 saat sonunda en yüksek % yaşam değerini göstermiştir. JuLI canlı hücre görüntüleme cihazı ile yapılan ölçümlerde elde edilen sonuçlar da bu sonuçlar ile uygunluk göstermiştir. Elde edilen absorbans değerleri ve % yaşamlılık değerleri incelendiğinde tüm örneklerin negatif kontrolün verdiği absorbans değerinden yüksek olduğu görülmektedir. Yang ve arkadaşları da PAA ve poliyüretan ile hazırladıkları PAA/PU membran filmlerinin sitotoksik etkilerini lenfositler ve kanser hücreleri ile test etmişlerdir ve bu malzemelerin çok düşük sitotoksik etkiye sebep olduğunu bulmuşlardır [49].

4.3 Biyouyumluluk ve Hemouyumluluk Testi

Hemouyumluluk testi, hazırlanan malzemelerin kan hücreleri ile aynı ortamda bulunarak kan hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak için yapılan bir testtir. Bu testin ölçüsü ise malzemeler ile aynı ortamda bulunan kan hücrelerinin hemolize uğrayıp uğramadığıdır. Hemoliz oranına bakılarak hazırlanan malzemelerin değerlendirilmesi yapılarak biyouyumlu ve/veya hemouyumlu olduğu belirlenir. Bu değerlendirme; belirlenen hemoliz yüzdelerinde hemoliz yüzdesi %10'dan az ise sentezlenen nanokompozitler hemouyumlu, %5'den az ise daha çok hemouyumlu olarak kabul edilir. Diken ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, PAA ve nHAP kullanılarak hazırlanan nanomalzemelerin biyouyumluluk dereceleri incelenmiş ve sentezlenen nanokompozitlerden PAA/nHAP(%5)'in en uyumlu nanomalzeme olduğunu ve %5'lik hemoliz derecesi ile PAA/nHAP(%1)'in ise %25'lik hemoliz

derecesi ile uyumsuz olduğunu belirtmişlerdir [50]. Bir başka çalışmada, fare fibroblast hücreleri ile saf PAA polimerinin birbirleri ile muamelesi sonucu elde edilen verilerde; saf PAA'nın fibroblast hücrelerinin yapısını bozduğu ve toksik etkide bulunduğu belirtilmiştir [46]. Yüksek oranda hemouyumlu karakteristik özelliğe sahip olan nHAP [47], katıldığı yapılara da bu karakteristik özelliğini vermektedir. Örneğin, Wang H. doku mühendisliğinde kullanılması için hazırladığı nHAP/poliamid nanokompozitlerinin *in vitro* test sonuçları; kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerinin gelişmesi, çoğalması ve farklılaşması üzerine herhangi bir negatif etki göstermemiştir. Histolojik ve mikroradyografik sonuçlar, nHAP/Poliamid nanokompozitlerin oldukça biyoyumlu olduğunu göstermiştir [56]. Khan A.S. ve arkadaşları, poliüretan/nHAP nanokompozitleri hazırlayarak biyoyumluluk özelliğini araştırmak amacı ile osteblast hücrelerini kullanarak MTS testini uygulamışlardır. Analiz sonucunda nHAP'in osteblast hücrelerinin gelişimini ve çoğalmalarını desteklediğini ve biyoyumluluk özelliklerini arttırdığını belirtmişlerdir [51]. Tablo 3.2'deki elde edilen sonuçlar PAA/BAL olmak üzere tüm nanokompozitlerin kan hücreleri ile olan %hemoliz değerlerinin %1'in altında olduğunu işaret etmektedir. Yukarıda da bahsedildiği gibi hemoliz yüzdesinin %5'in altında olması malzemelerin hemouyumlu olduğunu göstermektedir. Bu çalışmadaki sonuçların literatür ile uyumlu olduğu ve hazırlanan nanokompozitlere BAL ve nHAP'in katılması kan ile olan uyumluluğun arttığı görülmüştür.

4.4 Antibakteriyel Aktivite

Biyoteknoloji, biyomühendislik ve malzeme bilimi gibi alanlardaki son çalışmaların merkez odağı malzemelerin antibakteriyel özellik taşımasına yönelik olmuştur. Bu talep doğrultusunda canlı vücudunda ya da dışında canlılığın temas halinde olacağı materyaller için aranan en önemli özelliklerden birisi de antibakteriyel aktiviteye sahip olmasıdır. Bu çalışma da buna paralel olarak bir gram negatif (*Escherichia coli*) ve bir gram pozitif (*Staphylococcus aureus*) bakterisine karşı antibakteriyel bir test olan disk difüzyon testi uygulanmıştır. Disk difüzyon testi, katı besiyeri üzerinde ekimi yapılmış bakterinin gelişimini durdurmak amacıyla materyalin kendi çevresinde oluşturduğu zon ile antibakteriyel aktiviteye sahip olup olmadığının tespit edilmesidir. Şekil 3.38'de PAA/BAL ve PAA/nHAP/BAL

nanokompozitlerinin her iki bakteri türüne karşı inhibisyon dereceleri gözlenmiştir. Bal sahip olduğu antibakteriyel özelliği [52] PAA matriksi ile birleşerek muhafaza etmiştir. Herhangi bir antibakteriyel özelliğe sahip olmayan saf PAA [50] bal ile kompozit oluşturduğunda her iki bakteri türüne karşı antibakteriyel özelliğe sahip bir PAA matriksli kompozit elde edilmiştir. Bir hidrojel özelliğe sahip olan PAA, bakteri ekimi yapılmış besiyeri üzerine yerleştirilip 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra yapısındaki bal, besiyerine nüfuz ederek bakteri inhibisyon zonlarının oluşmasını sağlamıştır. PAA/nHAP/BAL nanokompozitleri sırasıyla incelendiğinde ise, hidroksiapatit nano partiküllerinin yapıya eklenmesi ile özellikle *S. aureus* bakterisine karşı daha yüksek aktivite göstererek inhibisyon alanı artmıştır. *S. aureus* bakterisine karşı antibakteriyel aktivite nHAP miktarının artması ile doğru orantılı bir şekilde artmıştır. nHAP'ın antibakteriyel özelliği daha önceden yapılan çalışmalarda kesinleşmiştir [53]. Nanokompozitlerin *E. coli* bakterisine karşı inhibisyon dereceleri farklılık göstermiştir. Şekil 3.38 incelendiğinde PAA/nHAP(%2,5)/BAL nanokompoziti diğer materyallere oranla daha fazla inhibisyonu alanı oluşturmuştur. Bunu takiben %1 oranında nHAP içeren nanokompozit ve PAA/BAL en yüksek inhibisyon alanlarına sahip olmuştur. %5 oranında nHAP içeren nanokompozit ise en az inhibisyon alanına sahip materyal olmuştur. Michalska-Sionkowska ve arkadaşları fenolik bir bileşik olan Timol'i hiçbir antibakteriyel özellik göstermeyen kollajene yükleyerek filmler hazırlamışlardır. Hazırladıkları filmlerin patojen olan *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. aerogenes* ve *Candida albans* mikroorganizmalarına karşı aktivitelerini incelemişlerdir. Kollajen/Timol filmleri bütün mikroorganizmalara karşı inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir [54]. Yine bir başka çalışmada, Koosehgol ve arkadaşları antibakteriyel özellikli timol kullanarak yara örtü malzemesi olarak kitosan/polietilen glikol fumarat/timol hazırlamışlardır. Antibakteriyel hedef olarak seçtikleri *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerini yara örtü malzemelerin sahip oldukları timol konsantrasyonlarına göre farklı derecelerde inhibe etdiklerini tespit etmişlerdir [55]. Yapılan literatür taramasında antibakteriyel özelliğe sahip bir bileşiğin genellikle bu özelliğini koruduğunu ve hazırlanan yeni malzemede de etkinliğini devam ettirdiği görülmüştür.

5. KAYNAKLAR

- [1] Wintermantel, E., Mayer, J., Blum, J., Eckert, K.L., Lüscher, P. and Mathey, M., "Tissue engineering scaffolds using spurstructures", *Biomaterials*, 17, 83, 91 (1991).
- [2] Cengiz, B., "Hidroksiapatit nanoparçacıklarının sentezi," Yüksek Lisans Tezi , *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı , Ankara Üniversitesi, Ankara, (2007).
- [3] Gümüşderelioğlu, M., "Biyomalzemeler", *Bilim ve Teknik Dergisi*, Temmuz sayısı, 2-4, 23, TÜBİTAK, (2002).
- [4] Marois, Y. ve Guidoin, R., "Biocompatibility of polyurethanes", *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*, Landes Bioscience, (2000).
- [5] Gümüşderelioğlu, M., "Biyomalzemeler," *Bilim ve Teknik Dergisi*, Ankara, July-(2002).
- [6] Niinomi, M., "Recently Metallic Materials for Biomedical Applications, Metalurgical and Materials Transactions"; Warrendale, 477-486, (2002).
- [7] Özcan, T., "Biyonanoimplantların Biyouyumluluğu", Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, (2010)
- [8] Özcan, C., "Surface free energy evaluation, plasma surface modification and biocompatibility studies of pmma films," M. S. Thesis, Natural and Applied of Sciences, Chemistry, Middle East Technical Universty, Ankara, (2006).
- [9] Cengiz, B., "Hidroksiapatit nanoparçacıklarının sentezi," Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı , Ankara Üniversitesi, Ankara, (2007).
- [10] Gümüşderelioğlu, M., "Biyomalzemeler," *Bilim ve Teknik Dergisi*, Ankara, Temmuz (2002).
- [11] Willert, H.G., Bertram, H., Buchhorn, G.H., "Osteolysis in alloarthroplasty of the hip: the role of bone cement fragmentation." *Clin. Orthop.*, 258, 108-121 (1990).
- [12] Baysal, B., "*Polimer Kimyası*", Cilt 1, İTÜ yayınları, (1981).
- [13] Breitbart, A. S. ve Ablaza, V. J., "Implant materials", *Grabb and Smith's Plastic Surgery*, 6th ed., Thorne, C. H., Ed. Lippincott Williams & Wilkins, A

Wolters Kluwer Business, 58–65, (2007).

- [14] Shukla, N. B., Daraboina, N. ve Madras, G., “Oxidative and photooxidative degradation of poly (acrylic acid),” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 94, no. 8, pp. 1238–1244, Aug. (2009).
- [15] Yang, J. M., Huang, M. J. and Yeh, T. S., “Preparation of poly (acrylic acid) modified polyurethane membrane for biomaterial by UV radiation without degassing,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 133–139, (1999).
- [16] Giglio, E. D., Cometa, S., Cioffi, N., Torsi, L. ve Sabbatini, L., “Analytical investigations of poly(acrylic acid) coatings electrodeposited on titanium-based implants: a versatile approach to biocompatibility enhancement,” *Anal. Bioanal.Chem.*, 2055–2063, Dec. (2007).
- [17] Giglio, E. D., Cafagna, D., Ricci, M. A., Sabbatini, L., Cometa, S., Ferretti, C. ve Mattioli-Belmonte, M., “Biocompatibility of poly(acrylic acid) thin coatings electrosynthesized onto titanium-based implants,” *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 25, no. 4, pp. 374–391, May (2010).
- [18] Ayhan, H., “Biyomalzemeler”, *Bilim ve Teknik Dergisi*, Temmuz Sayısı, s. 11, TÜBİTAK (2002).
- [19] Yetgin, S.H., “*Nanoteknoloji ve Nanokompozitler*”, Sakarya Üniversitesi Metal Eğitimi Bölümü.
- [20] Tae H.K., Lee W.J., Dong C.L., Hyoung J.Choi, Myung S.Jhon., “*Macromol. Rapid Commun.*”, 23, No.3,29 (2002).
- [21] Hışıl, Y., Börekçioğlu, N., “Balın Bileşimi ve Bala Yapılan Hileler”, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın Organı. 2,S. 79-821 (1986).
- [22] Bandarow, “Nature and Origin of the Antibacterial Substances In Honey.” *Lebensm. - Wiss. U.-Technol.*, 30,S. 748-753 (1997).
- [23] Ian, R., “*Freshney Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*”, Fifth Edition, Haboken; John Wiley & Sons., .p.1-216 (2005).
- [24] Candan, Ç., Bilgiç, A., Klinik Viroloji Laboratuvarında Uzmanlık Öğrencisine Verilen Hücre Kültürü Eğitim Programı: Bir Model, *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 20 (3): 231-241 (2006).
- [25] Murray, P.E., Garcia, G.C., “How is the 50 Iocompatibility of dental biomaterials evaluated?”, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*, 12(3), E258-66 (2007).
- [26] Aldridge, W.N., “The biochemical principles of toxicology.” *Exp. Toxicol*;5,56-78(1993).
- [27] Nicholson, J.W. “*The Chemistry of Medical and Dental Materials.*” Cambridge; The Royal Society of Chemistry, P.186-195, (2002).

- [28] Mossman, T., "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods*, 65, 55-63, (1983).
- [29] Riss TL, Moravec R.A., "Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture." In "Cell Biology", Ed; Celis JE, Elsevier Academic Press, Burlington, (2006).
- [30] Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellmann, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., 2016, "Assay guidance manual: cell viability assays." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader#!po=1.16279>, Erişim tarihi; (2016).
- [31] Jenkins, N., *Methods in Biotechnology, Volume 8: Animal cell biotechnology* Totawa NJ, Humana Press p:239-252.
- [32] NanoEnTek, "JuLI counting introduction [Online]", (15 March 2015), <http://www.nanoentek.com/product.php?id=21>, (2012).
- [33] Guyton, C., "*Fizyoloji*." Ankara, Guven Kitabevi, (1977).
- [34] Sowemimo-Coker, S. O., "Red blood cell hemolysis during processing", *Transfus. Med. Rev.*, 16 (1), 46–60, (2002).
- [35] Cai, X., Yuan, J., Chen, S., Li, P., Li, L. and Shen, J., "Hemocompatibility improvement of poly (ethylene terephthalate) via self-polymerization of dopamine and covalent graft of zwitterions", *Mater. Sci. Eng. C*, 36, 42–48, (2014).
- [36] Ustaoglu, Z., "Developing antimicrobial surfaces using ion-exchanged zeolites," Ph.D. Thesis, Chemical Engineering, Yeditepe University, Istanbul, (2013).
- [37] Ordoobadi, S. M., "Fusion peptides for controlling antimicrobial activity on biomedical implants," Istanbul Technical University, (2007).
- [38] Bertani, E., Bigi, A., Cojazzi, G., Gandolfi, M., Panzavolta, S. and Roveri, N. "Nanocrystals of magnesium and fluoride substituted hydroxyapatite." *Journal of Inorganic Biochemistry*, 72, 29-35, (1998).
- [39] Şerbetçi, K., Orhun, S., Korkusuz, F ve Hasırcı, N., "Hidroksi apatit içeren kemik çimentosunun *in vivo* biyouyumluluğu." *Deneysel Araştırma*, Vol.13, No.4. (259-263), (2002).
- [40] Özmen, N. ve Alkın, E., "Balın antimikrobiyel özellikleri ve insane sağlığı üzerine etkileri.", *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 155-160, (2006).
- [41] Chung, J.H., Kim, Y.K., Kim, K.H., Kwon, T.Y., Vaezmomeni, S.Z., Samiei, M., Aghazadeh, M., Davaran, S., Mahkam, M., Asadi, G. & Akbarzadeh, A., "Synthesis, characterization, biocompatibility of hydroxyapatite–natural polymers nanocomposites for dentistry applications", *Artificial Cells*,

Nanomedicine, and Biotechnology, 44:1, 277-284, DOI: 10.3109/21691401.2014.944644, (2016).

- [42] Biçer, A.Z., “Seromer esaslı iki farklı indirekt kompozit materyalin sitotoksik etkilerinin *in vitro* değerlendirilmesi.”, *GÜ Diş Hek Fak Derg.* ,28(2): 69-74, (2011).
- [43] Wataha, J.C., Rueggeberg, F.A., Lapp, C.A., Lewis, J.B., Lockwood, P.E., Ergle, J.W., Mettenberg, D.J., “In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after ageing in artificial saliva.” *Clin Oral Investig* 3: 144-149, (1999).
- [44] Shen, Z., Simon, G. P., ve Cheng, Y.B., “Comparison of solution intercalation and melt intercalation of polymer–clay nanocomposites,” *Polymer (Guildf)*., vol. 43, no.15, pp. 4251–4260, Jul. (2002).
- [45] Motlagh, D., Allen, J., Hoshi, R., Yang, J., Lui, K. and Ameer, G., “Hemocompatibility evaluation of poly(diol citrate) in vitro for vascular tissue engineering”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 82 (4), 907–916, (2007).
- [46] Çakır, R., “Polimerlerin toksisitesinin incelenmesinde yeni kültür modelinin geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, (2008).
- [47] Zhang, J., Liao, J., Mo, A., Li, Y., Li, J. and Wang, X., “Characterization and human gingival fibroblasts biocompatibility of hydroxyapatite/PMMA nanocomposites for provisional dental implant restoration”, *Appl. Surf. Sci.*, 255 (2), 328–330, (2008).
- [48] Yılmaz, B., Doğan S., and Çelikler Kasimoğullari S., “Hemocompatibility, cytotoxicity and genotoxicity of poly(methylmethacrylate)/nanohydroxyapatite nanocomposites synthesized by melt blending method,” *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–10, (2017).
- [49] Yang, J. M., Huang, M. J., and Yeh, T. S., “Preparation of poly (acrylic acid) modified polyurethane membrane for biomaterial by UV radiation without degassing.” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 133–9, May (1999).
- [50] Diken, M.E., “Bazı biyonanoimplanların sentezi ve biyouyumlulukları”, Doktora Tezi, Biyoloji Ana Bilim Dalı, *Fen bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, (2015).

- [51] Khan, A. S., Wong, F.S.L., McKay, I.J., Whiley, R.A., Rehman, I.U., “Structural, Mechanical and Biocompatibility Analyses of a Novel Dental Restorative Nanocomposite J. Appl. Polym. Sci., DOI:10.1002/App.37841, (2013).
- [52] Almasaudi S. B., Al-Nahari, A. M., El-Ghany, E.S.M., Barbour E., Muhayawi, S.M., Jaouni, S.A.J., Azhar, E., Qari, M., Quari Y.A., Harakeh, S., “Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*.”, *Saudi Journal of Biological Sciences*, Vol 24, Issue 6, 1255-1261, (2017).
- [53] Shanmugam, S. and Gopal, B., “Copper substituted hydroxyapatite and fluorapatite: Synthesis, characterization and antimicrobial properties,” *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 10, pp. 15655–15662, (2014).
- [54] Marta Michalska-Sionkowska, Walczak, M., Sionkowska A., “Antimicrobial activity of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing”, *Polymer Testing* 63, 360-366 (2017).
- [55] Koosehgo, S., Mehdi Ebrahimian-Hosseiniabadi, Alizadeh, M., Zamanian A., “Preparation and characterization of in situ chitosan/polyethylene glycol fumarate/thymol hydrogel as an effective wound dressing”, *Materials Science and Engineering, C* 79 (66–75), (2017).
- [56] Wanga H., Lia, Y., Zuoa Y., Lib, J., Mab, S., Cheng, L., “Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering.” *Biomaterials*, 28,3338-3348, (2007).

