

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



**PMMA/NANOHİDROKSİAPATİT
NANOKOMPOZİTLERİNİN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN VE
HEMOUYUMLULUĞUNUN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BEGÜMHAN YILMAZ

BALIKESİR, HAZİRAN - 2015

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



**PMMA/NANOHİDROKSİAPATİT
NANOKOMPOZİTLERİNİN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN VE
HEMOUYUMLULUĞUNUN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BEGÜMHAN YILMAZ

BALIKESİR, HAZİRAN - 2015

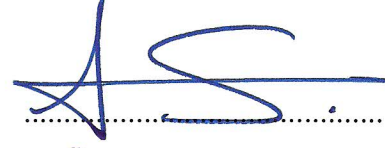
KABUL VE ONAY SAYFASI

Begümhan YILMAZ tarafından hazırlanan “PMMA/ NANOHİDROKSİAPATİT NANOKOMPOZİTLERİNİN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN VE HEMOUYUMLULUĞUNUN ARAŞTIRILMASI ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 15.06.2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

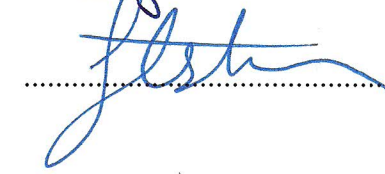
Danışman
Prof. Dr. Serap DOĞAN



Üye
Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ



Üye
Doç. Dr. Fatih COŞKUN



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez alışması BAP tarafından 2015/120 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**PMMA/NANOHİDROKSİAPATİT NANOKOMPOZİTLERİNİN
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN VE HEMOUYUMLULUĞUNUN
ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BEGÜMHAN YILMAZ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)

BALIKESİR, HAZİRAN - 2015

Poli(metil metakrilat) (PMMA) dişçilikte ve ortopedik uygulamalarda 50 yıldan fazla süredir kullanılan ve son yıllarda doku iskelesi olarak tasarlanan biyoyumlu bir polimerdir. Nanohidroksiapatit ise çok iyi bilinen biyoyumlu inorganik bir bileşiktir ve kimyasal yapısı kemik ile çok benzerdir. Bu çalışmada, farklı moleküler ağırlıktaki PMMA (120000, 350000 ve 996000 g/mol) polimerleri ile farklı konsantrasyonlarda hidroksiapatit (%1, 2.5 ve 5) nanopartikülleri kullanılarak PMMA/Nanohidroksiapatit nanokompozit filmleri sentezlenmiştir. Nanokompozitlerin karakterizasyonu aşamasında XRD, ATR-FTIR ve SEM analizleri yapılmıştır. XRD ve SEM analizlerinde, nanopartiküllerin matris ile etkileşim içerisinde olduğu ve homojen bir dağılım sergilediği belirlenmiştir. ATR-FTIR spektrumlarındaki değişimler nanokompozitlerin polimer ve dolgu malzemesinden farklı olduğunu göstermiştir. Saf polimer ve nanokompozitlerin biyoyumluluk ve hemouyumluluk analizleri mikropilaka okuyucu spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. İnsan kanı kullanılarak yapılan hemouyumluluk testinde sentezlenen PMMA/Nanohidroksiapatit nanokompozitlerinin oldukça hemouyumlu ve biyoyumlu olduğu gözlenmiştir. Saf polimer ve nanokompozitlerin insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik etkileri ise asit fosfataz testleri ve tripan mavisi testini gerçekleştiren canlı hücre görüntüleme sistemi (JuLI) ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bu çalışmada kullanılan hiçbir nanokompozit sitotoksik etki göstermemiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Nanokompozitler, PMMA, nanohidroksiapatit, sitotoksiste, hemouyumluluk, biyoyumluluk.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECTS AND HEMOCOMPATIBILITY OF PMMA/NANOHYDROXYAPATITE NANOCOMPOSITES

MSC THESIS

BEGÜMHAN YILMAZ

**BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY**

(SUPERVISOR: PROF. DR. SERAP DOĞAN)

BALIKESİR, JUNE 2015

Poly(methyl methacrylate) (PMMA) is a polymer that has been used in dentistry and orthopedic applications for more than 50 years and it has been designed as tissue scaffolds recently. On the other hand, nanohydroxyapatite is a well known biocompatible particle and its chemical nature is similar to the bone. In this study, PMMA polymers with different molecular weights (120000, 350000 and 996000 g/mol) and nanohydroxyapatite fillers with different concentrations (1, 2.5 and 5%) were used to produce PMMA/Nanohydroxyapatite nanocomposite films. XRD, ATR-FTIR and SEM analyses were performed in order to characterize the nanocomposites. XRD and SEM analyses showed that there is an interaction between the matrix and nanoparticles with a homogeneous dispersion. The changes in the spectrum of ATR-FTIR prove that the nanocomposites differ from the polymers and filler materials. Biocompatibility and hemocompatibility tests of polymers and nanocomposites were performed using microplate spectrophotometer. According to the hemocompatibility tests of human blood, it was investigated that all of the PMMA/Nanohydroxyapatite nanocomposites are highly hemocompatible and biocompatible. The cytotoxic effects of the polymers and nanocomposites on human lymphocytes have been determined by acid phosphatase assay and trypan blue exclusion method performed by live cell imaging system (JuLI). Based on the results, none of the nanocomposites used in this study showed a cytotoxic effect.

KEYWORDS: Nanocomposites, PMMA, nanohydroxyapatite, cytotoxicity, hemocompatibility, biocompatibility.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Biyomalzemeler.....	1
1.1.1 Metalik Biyomalzemeler.....	2
1.1.2 Seramik Biyomalzemeler.....	3
1.1.2.1 Hidroksiapatit.....	3
1.1.3 Polimerik Biyomalzemeler.....	3
1.1.3.1 Poli (Metil Metakrilat)	4
1.1.4 Kompozit Biyomalzemeler.....	5
1.1.4.1 Nanokompozitler.....	6
1.2 Biyoyumluluk.....	6
1.2.1 Hücre Kültürü ve Sitotoksisite.....	7
1.2.1.1 Asit Fosfataz Testi.....	8
1.2.1.2 Tripan Mavisi Testi ve JuLI.....	9
1.2.2 Hemoyumluluk.....	9
1.3 Literatür Özeti.....	9
1.4 Amaç ve Kapsam.....	12
2. MATERYAL VE METOT	13
2.1 Materyal.....	13
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	13
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	14
2.2 Metot.....	15
2.2.1 Nanokompozitlerin Sentezi.....	15
2.2.2 Nanokompozitlerin Karakterizasyonu.....	15
2.2.2.1 XRD Analizleri.....	15
2.2.2.2 FTIR-ATR Analizleri.....	15
2.2.2.3 SEM Analizleri.....	16
2.2.3 Hücre Kültürü İşlemleri.....	16

2.2.3.1 Malzemelerin Sterilizasyonu.....	16
2.2.3.2 Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması.....	16
2.2.3.3 Kandan Lenfosit Hücrelerinin İzolasyonu.....	17
2.2.4 Sitotoksosite Testleri.....	18
2.2.4.1 Asit Fosfataz Testi.....	18
2.2.4.2 JuLI - Hücre Yaşamlılığı Testi.....	18
2.2.5 Hemouyumluluk Testi.....	19
2.2.6 İstatistiksel Analiz.....	20
3. BULGULAR.....	21
3.1 Nanokompozitlerin Karakterizasyon Sonuçları.....	21
3.1.1 XRD Analiz Sonuçları.....	21
3.1.2 FTIR- ATR Analiz Sonuçları.....	24
3.1.3 SEM Analiz Sonuçları.....	28
3.2 Sitotoksosite Test Sonuçları.....	34
3.2.1 Asit Fosfataz Testi Sonuçları.....	34
3.2.1.1 Nanohidroksiapatit Konsantrasyonuna Göre Asit Fosfataz Testi Sonuçları.....	34
3.2.1.2 PMMA'ların Moleküler Ağırlıklarına Göre Asit Fosfataz Testi Sonuçları.....	35
3.2.2 JuLI Sonuçları.....	38
3.2.2.1 Nanohidroksiapatit Konsantrasyonuna Göre JuLI Sonuçları.....	38
3.2.2.2 PMMA'ların Moleküler Ağırlıklarına Göre JuLI Sonuçları.....	39
3.3 Hemouyumluluk Testi Sonuçları.....	41
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	44
4.1 Nanokompozitlerin Karakterizasyon Sonuçları.....	44
4.1.1 XRD Analiz Sonuçları.....	44
4.1.2 FTIR- ATR Analiz Sonuçları.....	45
4.1.3 SEM Analiz Sonuçları.....	46
4.2 Sitotoksosite Test Sonuçları.....	47
4.3 Hemouyumluluk Test Sonuçları.....	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
6. KAYNAKLAR.....	52
7. EKLER.....	57
EK A JuLI Grafikleri.....	58

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1:	PMMA'nın moleküler yapısı..... 5
Şekil 1.2:	Asit fosfataz enziminin reaksiyon şeması..... 8
Şekil 2.1:	Santrifüj sonrası görülen katmanlar..... 17
Şekil 3.1:	Nanohidroksiapatitin XRD deseni..... 22
Şekil 3.2:	Moleküler ağırlığı 120000 g/mol olan PMMA ile hazırlanmış nanokompozitlerin XRD deseni..... 23
Şekil 3.3:	Moleküler ağırlığı 350000 g/mol olan PMMA ile hazırlanmış nanokompozitlerin XRD deseni..... 23
Şekil 3.4:	Moleküler ağırlığı 996000 g/mol olan PMMA ile hazırlanmış nanokompozitlerin XRD deseni..... 25
Şekil 3.5:	Nanohidroksiapatitin FTIR-ATR spektrumu..... 25
Şekil 3.6:	PMMA ($M_A = 120000$ g/mol)'nin FTIR-ATR spektrumu..... 25
Şekil 3.7:	PMMA ($M_A = 120000$ g/mol)/Nanohidroksiapatit nanokompozitlerinin FTIR-ATR spektrumu..... 26
Şekil 3.8:	PMMA ($M_A = 350000$ g/mol)'nin FTIR-ATR spektrumu..... 26
Şekil 3.9:	PMMA ($M_A = 350000$ g/mol)/Nanohidroksiapatit nanokompozitlerinin FTIR-ATR spektrumu..... 27
Şekil 3.10:	PMMA ($M_A = 996000$ g/mol)'nin FTIR-ATR spektrumu..... 27
Şekil 3.11:	PMMA ($M_A = 996000$ g/mol)/Nanohidroksiapatit nanokompozitlerinin FTIR-ATR spektrumu..... 28
Şekil 3.12:	Nanohidroksiapatitin SEM görüntüsü..... 29
Şekil 3.13:	PMMA ($M_A : 120000$ g/mol)/nHAp (%1) nanokompozitinin SEM görüntüsü..... 29
Şekil 3.14:	PMMA ($M_A : 120000$ g/mol)/nHAp (%2.5) nanokompozitinin SEM görüntüsü..... 30
Şekil 3.15:	PMMA ($M_A : 120000$ g/mol)/nHAp (%5) nanokompozitinin SEM görüntüsü..... 30
Şekil 3.16:	PMMA ($M_A : 350000$ g/mol)/nHAp (%1) nanokompozitinin SEM görüntüsü..... 31
Şekil 3.17:	PMMA ($M_A : 350000$ g/mol)/nHAp (%2.5) nanokompozitinin SEM görüntüsü..... 31
Şekil 3.18:	PMMA ($M_A : 350000$ g/mol)/nHAp (%5) nanokompozitinin SEM görüntüsü..... 32
Şekil 3.19:	PMMA ($M_A : 996000$ g/mol)/nHAp (%1) nanokompozitinin SEM görüntüsü..... 32
Şekil 3.20:	PMMA ($M_A : 996000$ g/mol)/nHAp (%2.5) nanokompozitinin SEM görüntüsü..... 33
Şekil 3.21:	PMMA ($M_A : 996000$ g/mol)/nHAp (%5) nanokompozitinin SEM görüntüsü..... 33
Şekil 3.22:	PMMA /nHAp nanokompozitlerinin absorbands grafikleri..... 35
Şekil 3.23:	Nanokompozitlerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbandsların kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması..... 36

Şekil 3.24:	Nanokompozitlerin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbanların kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması.....	36
Şekil 3.25:	Nanokompozitlerin 72 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbanların kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması.....	37
Şekil 3.26:	Nanokompozitlerin 96 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbanların kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması.....	37
Şekil 3.27:	PMMA/nHAp nanokompozitlerinin JuLI cihazıyla elde edilen % canlılık oranları.....	38
Şekil 3.28:	Nanokompozitlerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda JuLI cihazıyla elde edilen % canlılık oranlarının kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması...	39
Şekil 3.29:	Nanokompozitlerin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda JuLI cihazıyla elde edilen % canlılık oranlarının kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması...	40
Şekil 3.30:	Nanokompozitlerin 72 saatlik inkübasyonu sonucunda JuLI cihazıyla elde edilen % canlılık oranlarının kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması...	40
Şekil 3.31:	Nanokompozitlerin 96 saatlik inkübasyonu sonucunda JuLI cihazıyla elde edilen % canlılık oranlarının kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması...	41
Şekil 3.32:	$MA_{PMMA} = 120000$ g/mol olan nanokompozitlerle inkübe edilmiş örneklerin hemouyumluluk testi sonucunda elde edilen santrifüj sonrası görüntüsü.....	42
Şekil 3.33:	$MA_{PMMA} = 350000$ g/mol olan nanokompozitlerle inkübe edilmiş örneklerin hemouyumluluk testi sonucunda elde edilen santrifüj sonrası görüntüsü.....	43
Şekil 3.34:	$MA_{PMMA} = 996000$ g/mol olan nanokompozitlerle inkübe edilmiş örneklerin hemouyumluluk testi sonucunda elde edilen santrifüj sonrası görüntüsü.....	43

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: Nanohidroksiapatitin XRD deseninden elde edilen veriler.....	22
Tablo 3.2: Örneklerin hesaplanan % hemoliz değerleri.....	42
Tablo 4.1: PMMA'nın FTIR-ATR karakteristik pikleri.....	46

SEMBOL LİSTESİ

PMMA	: Poli(metil metakrilat)
nHAp	: Nanohidroksiapatit
XRD	: X Işını Kırınım Difraksiyonu
FTIR-ATR	: Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflectance
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopyu
M_A	: Moleküler Ağırlık
FBS	: Fetal Bovine Serum
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NaCl	: Sodyum Klorür

ÖNSÖZ

Her zaman bana güvenen ve desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Serap DOĞAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında değerli bilgi ve görüşleriyle yardımlarını aldığım hocalarım Prof. Dr. Mehmet DOĞAN ve Doç. Dr. Yasemin TURHAN'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam esnasındaki tüm yardımları ve emekleri için Uzman Dr. Mehmet Emin DİKEN'e, Uzman Berna KOÇER'e ve Uzman Zeliha Gamze ALP'e çok teşekkür ederim. Çalışmalarım esnasında kullandığım kan örneklerinin sağlanmasında gönüllü olan laboratuvar arkadaşlarım İrem AKINCI, Nurdan AKICI, Pakize ÖZKAYA, Şeyman KIRMIZI ve A. Cenkay ORBAY'a tüm iyi niyetleri ve yardımları için çok teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca bana destek olan ve iyi bir akademisyen olma amacıyla çıktığım bu yolda bana her zaman inanan annem Emel YILMAZ, babam Prof. Dr. Ahmet YILMAZ, kardeşlerim Aslıhan YILMAZ OBALI, Selvihan YILMAZ ve Senemhan YILMAZ'a, sevgisiyle yaşam enerjisi veren biricik yeğenim M. Buğra OBALI'ya ve her zaman yanımda olan arkadaşlarım Ezgi AYDOĞMUŞ, Hüseyin AYDOĞMUŞ, Sema ZABCI ve Hulusi KARDAŞ'a çok teşekkür ederim.

Begümhan YILMAZ

Balıkesir, 2015

Canım amcam Prof. Dr. Durmuş YILMAZ'ın anısına...

1. GİRİŞ

Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte endüstri, medikal ve ortopedi gibi alanlarda kullanılmak üzere oldukça fazla malzeme üretilmektedir. Ancak bu malzemelerin insan sağlığı açısından zararlı olmaması gerekmektedir. Özellikle ortopedik uygulamalarda kullanılmak üzere tasarlanan malzemelere olan talep her geçen gün artmaktadır. Biyomalzemeler tasarlanırken fiziksel, kimyasal ve biyolojik açıdan uyumlu olması ve uzun yaşam süresine uygun olması gerekmektedir.

1.1 Biyomalzemeler

Biyomalzeme; bir dokunun, organın ya da organizmanın fonksiyonunun analiz edilmesini, sayıca çoğaltmasını veya kendi yerine kullanılmasını sağlamak amacıyla biyolojik sistemle etkileşim haline getirilen malzemeler olarak tanımlanmaktadır [1]. Günümüzde birçok biyomalzeme kalp yetmezliği, ateroskleroz sebepli hastalıklar, aort anevrizması, işitme kayıpları ve katarakt gibi hastalıkların tedavisi amacıyla insan vücuduna yerleştirilmektedir. Ayrıca kemik, kas, deri ve göğüs dokularında travma sonrası veya kozmetik amaçlı doku yenilemesi uygulamalarında kullanılmaktadırlar. Biyomalzemeler organ ve dokuların yerine geçmesi amacıyla dizayn edilmiş olan aynı zamanda da dokulara, bağı, eklem ve kemiksi yapılara destek olması amacıyla üretilen protezler ve implantların temel bileşenlerini oluşturmaktadırlar [2]. Biyomalzemeler doku mühendisliği ve organ yenilenmesi uygulamalarında mekanik ve yapısal destek sağlamak amacıyla iskele olarak da kullanılmaktadırlar. Bu biyomalzemeler hedef dokunun cinsine bağlı olarak (örneğin, kemik, kırık veya yumuşak doku) spesifik mekanik özellikler ve bozulma hızı gibi ihtiyaçları sağlayabilmek için doku mühendisliği iskelesi olarak üretilmektedir [3].

Biyomalzemeler metaller ve metal alaşımları, polimerler, seramikler ve kompozitler olmak üzere 4 farklı sınıf altında toplanırlar.

1.1.1 Metalik Biyomalzemeler

Metaller kolay sterilizasyonları, mükemmel elektriksel ve termal iletkenlikleri sebebiyle biyomalzeme olarak kullanılmaktadırlar. Metaller ve metal alaşımları kalça ve diz implantları olarak sert dokunun yerini alması amacıyla, kemik plaka ve vidası olarak çatlak onarımında, omurga düzeltici cihazlarda ve diş implantlarında mükemmel mekanik özelliklerine ve korozyon direncine sahip olması sebebiyle kullanılmaktadırlar. Ayrıca, bazı metal alaşımlar stentler, kateter kabloları, ortodontik ark telleri ve işitme cihazı implantlarında daha aktif görevlerde, kablo, bant, vida, zımba, tırnak ve plaka şeklindeki metal implantlar kemik çatlaklarında geçici olarak kullanılmaktadırlar. Kemiğin yerine geçmesi amacıyla üretilen kalıcı metal implantlar da bulunmaktadır. Bu metal ve alaşımlardan bazıları alüminyum, indium, kalay, titanyum, zirkonyum, krom, molibden, tantal, demir-nikel-krom, alüminyum-vanadyum-titanyum ve titanyum-molibden-palladyum'dur. Bu materyaller kalça kemiği ve eklem yenileme uygulamalarında implantların vücutta kalıcı olmasını sağlamak amacıyla gerekmektedir. Kalıcı olarak kullanılan implantlar geçici olarak kullanılan implantlardan farklı olarak bazı ciddi sorunlara sebep olabilmektedir. Bu problemlerden bazıları implant materyallerinin biyouyumluluğu ile ilgilidir (implantın uygulandığı dokuda oluşabilecek bir tepki veya implant alanından uzakta oluşabilecek alerjik bir reaksiyon gibi). Ayrıca yük taşıyan implantların vücut sıvısı varlığında aşınması, çevre dokuda aşınma artıklarının birikmesi, vücut sıvısının bulunduğu yerlerde korozyon ve sürmenaj (zayıflama) gerçekleşmesi ve iskelete bağlanamama gibi sorunlar da oluşabilmektedir. Geçici tamir amacıyla yerleştirilen ortopedik implantlar kemikteki hasarlı bölge iyileşince çıkartılmaktadır. Bu nedenle, geçici implantlar için biyouyumluluk dışında bahsedilen tüm problemler kısa sürelidir. Ancak, implantın kendisinden kaynaklı veya aşınma ya da korozyon kalıntısı sebebiyle gelişen herhangi bir alerjik reaksiyon gözardı edilmemelidir. Klinik uygulamalarda kullanılan ve kabul edilebilir derecede biyouyumlu sayılan başlıca metaller titanyum ve alaşımları, alüminyum, kobalt-krom alaşımları ve birçok paslanmaz çeliktir [4].

1.1.2 Seramik Biyomalzemeler

Seramik biyomalzemeler, oldukça biyouyumlu, korozyona karşı dirençli ve inerttirler. En çok kullanılan seramik materyaller biyoaktif camlar, cam-seramikler ve hem seramik hem çimento olan kalsiyum fosfatlar olarak sınıflandırılmaktadır. Bu materyaller kemik hasarını düzeltmek amacıyla dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Biyouyumlu özellikleri (biyoaktif, biyoinert ve biyobozunur olmaları) sebebiyle tercih edilen biyomalzemelerdendir. Ancak çok ciddi kırılgenlik ve güçsüzlük gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), β -trikalsiyum fosfat (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), türevleri ve kombinasyonları en çok kullanılan seramiklerdir. Sentezlenme tekniklerine bağılı olarak bu materyaller farklı fiziksel ve kimyasal özellikler göstermektedir [5, 6].

1.1.2.1 Hidroksiapatit

Genel adı hidroksiapatit (HAp) olan kalsiyum hidroksiapatitin inorganik kimyadaki tanımını kalsiyum fosfat florid hidroksi klorid [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F}, \text{OH}, \text{Cl})_2$]’dir. İçeriğindeki kalsiyum-fosfor oranı sebebiyle hidroksiapatit, kemiğin doğal yapısına çok benzemektedir. Sentetik olarak bulunan hidroksiapatit kemiğe uygulandığında dokuyla oldukça kuvvetli bir şekilde birleşir. Bu davranışı da hidroksiapatitin osteokondüktif özellikte olduğunu göstermektedir. Bu özellikleri sebebiyle hidroksiapatit kemik çimentosuna destek olması amacıyla ortopedik implantlarda dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır [7, 8].

1.1.3 Polimerik Biyomalzemeler

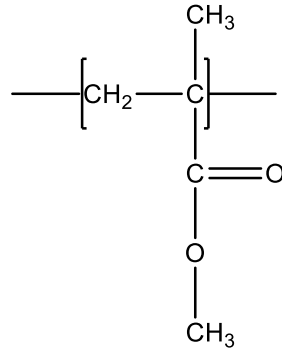
Polimerler, çok sayıda monomerin kovalent bağlarla birbirlerine bağlanarak oluşturduğu moleküllerdir [9].

Polimerik biyomalzemeler biyouyumlu, esnek ve kolay fabrikasyon gibi avantajlara sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı kullanım alanları oldukça fazladır. Polimerler kardiyovasküler cihazlar, yumuşak dokunun yerine kullanılan ve çoğalmasını sağlayan uygulamalar için tercih edilen materyallerdendir. İlaç salınım sistemleri, tanı destek malzemeleri ve tamir edici materyaller olarak da kullanılmaktadırlar. Günümüzdeki kullanım alanları arasında kalp damarları, yapay kalpler, damar parçaları, göğüs protezleri, kontak ve göz içi lensleri, kalp cerrahisinde kullanılan yapay akciğer cihazının bağlantıları, diyaliz ve plazmaferez sistemleri, tıbbi cihaz kaplamaları bulunmaktadır. Polimeri oluşturan makromoleküllerin kompozisyonu, yapısı ve organizasyonu polimerlerin özelliklerini belirlemektedir [6].

En çok kullanılan polimerik biyomalzemeler silikon, polimetilmetakrilat, poliesterler, naylon, polietilen, polipropilen, siyanoakrilatlar ve politetrafloroetilendir [10].

1.1.3.1 Poli (Metil Metakrilat)

Poli (metil metakrilat), PMMA, akrilik polimer ailesinin bir üyesidir. Yapısal olarak camdan daha transparan ve daha az kırılımandır. Hafiftir ve şekil alması kolaydır. PMMA arabalarda, uçaklarda, mobilya sektöründe ve kontak lensler, diş ve hastane inkübatörleri gibi medikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Cerrahi uygulamalarda PMMA kendiliğinden polimerleşebilme özelliği olan kemik çimentosu olarak iyileştirme amacıyla ve kemik vidası, mili gibi ortopedik cihazlarda kullanılmaktadır. PMMA'nın en büyük avantajı hasar bölgesinin geometrisi ne olursa olsun kolayca uyum sağlamasıdır. PMMA'nın dezavantajı ise kemiğe bağlandığı yerde oluşan zayıf arayüzdür. Araştırmacılar bu zayıf arayüzün protezlerin implantasyondan sonra hasar görmesine sebep olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle biyoaktif faz takviyesi yapılarak bu dezavantajlar ortadan kaldırılırken PMMA'ya mekanik bütünlük de kazandırılmaktadır [11, 12].



Şekil 1.1: PMMA'nın moleküler yapısı.

1.1.4 Kompozit Biyomalzemeler

Kompozit iki veya daha çok maddenin herbirinin en iyi özelliğinden faydalanabilmek amacıyla karıştırılması sonucu elde edilen materyaldir. Kompozit belirli bir arayüz ile ayrılmış iki veya daha çok metalden, polimerden veya seramikten meydana gelebilmektedir. Kompozit materyalleri uzun zamandır üstün mekanik özellikleri sayesinde yenilikçi teknoloji uygulamalarında kullanılmaktadır. Kemik, tendon, deri, ligament, diş ve benzeri yapılar insan vücudunda bulunan doğal kompozitlerdir. Yapısal bileşenlerinin miktarı, dağılımları, morfolojileri ve özellikleri doku veya organların davranışını belirlemektedir. Dokuların mekanik özellikleriyle bütünleşmek ve hasarlı dokuların fonksiyonlarını geri getirebilmek için dokuları taklit edebilen protezleri üretmek amacıyla bazı sentetik kompozitler kullanılmaktadır. Kompozitler genellikle metal, seramik ve polimer gibi matriks bileşenlerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Bunun yanında, partiküller, kısa veya uzun fiberler, mikro dolgu maddeleri, nano dolgu maddeleri gibi destek maddelerine göre de sınıflandırılabilmektedirler. Kompozitlerin mekanik özelliklerini ve biyolojik fonksiyonlarını geliştirmek, bazı özel molekülleri taşıyabilmesini sağlamak amacıyla doku mühendisliği alanında birçok araştırmacı çeşitli matriks ve destek bileşenlerini denemişlerdir. Biyouyumlu polimerler, doku mühendisliğinde seramik dolgu maddeleriyle oluşturulan kompozitlerde en çok kullanılan matriks materyalleridir. Seramiklerin genellikle sert ve kırılğan materyaller olmasının yanında, polimerler esnektirler ve mekanik kuvvetleri zayıftır. Kompozitler bu iki materyalin özelliklerini medikal uygulamalar için birleştirmektedir [6].

1.1.4.1 Nanokompozitler

Nanokompozit, içeriğindeki maddelerden herhangi birinin en az bir boyutu nano düzeyde (10^{-9} m) olan kompozit materyaldir [13]. Mikropartiküllerden nanopartiküllere geçiş fiziksel özelliklerde önemli değişikliklere sebep olmaktadır [14]. Nanokompozitlerin kompozitlere göre çok daha üstün olmalarının sebebi matriks ile dolgu malzemelerinin birbirlerine temas ettikleri noktadaki ara yüzey alanlarının kompozitlerden çok daha fazla olmasıdır [15].

Nanokompozitler geleneksel kompozitlerde bulunmayan özelliklerin bir kombinasyonu olmaları ve dizayn olarak eşsiz olmaları sebebiyle 21. yüzyılın materyali olarak kabul edilmektedirler. Boyutları nanometre seviyesinde olduğu için arayüzlerinde oluşan etkileşimler oldukça gelişmiştir, bu da materyal özelliklerinin sağlanması için önemlidir. Nanokompozitlerin geliştirilmiş özellikleri, katı atık miktarının azalması ve gelişmiş üretim kapasitesi gibi (özellikle paketlenme uygulamalarında) birçok yararı vardır [16].

Nanokompozitler dolgu maddesi ve matriks bileşenlerine göre altı sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlar metal/metal, metal/seramik, seramik/seramik, inorganik/polimer, polimer/polimer ve polimer/seramik nanokompozitlerdir. Bu gruplar içerisinde polimerik nanokompozitler çok geniş uygulama sahası bulmaktadır [17].

1.2 Biyouyumluluk

Biyouyumluluk, belirli bir materyalin görevini yerine getirirken uygulandığı yerden uygun bir tepki almasıdır. Doku uyumluluğu ve kan uyumluluğu test materyalinin biyouyumluluğunu gösterir. Kana uyumlu materyallerin kanda pıhtılaşmaya, hücre içeriğinde tahribe, plazma proteinlerinde ve enzimlerinde değişime sebep olmaması beklenmektedir. Dokuya uyumlu biyomalzemelerin ise bağışıklık sistemi tarafından istenmeyen bir tepkiye, inflamasyona, mutasyona, kansere ve toksik reaksiyonlara sebep olmaması gerekmektedir [18].

Fizikokimyasal ve yapısal özellikleri değiştirilerek boyutları küçültülen nanomateryallerin toksikolojik sonuçlar doğurabileceği bilinmektedir. Nanomateryallerin biyolojik etkileri ve nanopartiküllerin biyokinetikleri boyutlarına, kimyasal bileşimlerine, yüzey yapısına, çözünürlüklerine, şekillerine ve bir araya gelmelerine bağlıdır. Bu faktörler hücre kabulünü, protein bağlanmasını, girişten hedef dokuya kadar taşınımı ve dokuda oluşabilecek muhtemel hasarı belirlemektedir. Nanomateryallerin potansiyel giriş rotası sindirim sistemi, deri, akciğer ve tanı ya da tedavi amaçlı sistemik alımdır. Nanomateryellerin sebep olduğu biyolojik etkiler hücrelerle, vücut sıvılarıyla ve proteinlerle olan etkileşimlerine ve vücut içerisinde dağılabilmelerine bağlıdır [19].

Biyolojik ortam hiçbir materyali tamamen kabul etmemektedir. Bu nedenle, biyolojik performansı optimize edebilmek için biyomalzeme seçerken negatif biyolojik tepkileri azaltan, aynı zamanda da yeterli fonksiyonu yerine getirebilen implantlar seçilmelidir [20].

1.2.1 Hücre Kültürü ve Sitotoksosite

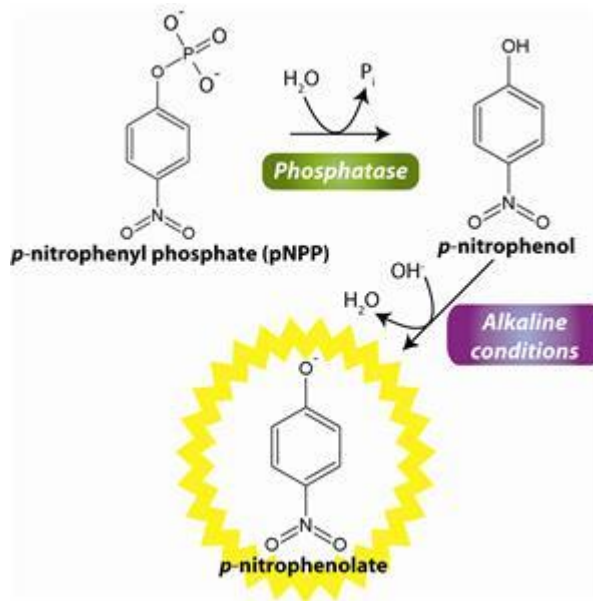
Hücre kültürü yaşanabilir ve uygun yapay bir ortamda çoğalmaları için hücrelerin dokudan izole edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Hücreler dokudan direkt izole edilebilmektedir ve enzimatik veya mekanik yollarla ayrıştırılabilmektedir. Bunun yanında, daha önceden izole edilmiş bir hücre hattından veya soyundan elde edilebilir. Hücre kültürü, hücrelerin standart fizyolojisini ve biyokimyasını anlayabilmek; ilaçların ve toksik maddelerin hücreler üzerindeki etkilerini, mutajenez ve karsinogenezini anlayabilmek; ilaç izleme ve geliştirme çalışmalarında kullanılmak için uygun model sistemleri sağlamaktadır [21].

Hücre kültürü, hücrenin temel fonksiyonlarını (tüm hücreler için aynı olan olaylar) veya özelleşmiş hücre fonksiyonlarını esas alarak toksisite tayini için kullanılabilir. Test edilen maddenin biyolojik aktivitesinin belirlenmesini hedefleyen genel toksisite testleri fibroblastlar, HeLa hücreleri ve karaciğer kanseri hücreleri gibi birçok hücre tipi için kullanılabilir [22].

In vitro sitotoksite testleri test edilen maddenin kültüre edilmiş hücreler için toksik olup olmadığını genellikle belirlenen inkübasyon periyodundan sonra yaşayan hücre sayısının belirlenmesi ile ölçmektedir. Amaçlanan yaklaşım, *in vivo* toksisitenin belirlenmesinde alternatif olarak kullanılan bir markeri ölçerek yaşayan hücreyi negatif kontrole göre kıyaslayan, kullanışlı ve az masraflı bir metod oluşturmaktır. Kültürde bulunan yaşayan hücre sayısının tahmin metotları genellikle bir metabolik aktivitenin belirtecini ölçülmesine dayanmaktadır. Canlı hücrelerin bazı kimyasalları kolaylıkla ölçülebilen başka formlara dönüştürebilme özelliklerine bağlı olarak birçok metod geliştirilmiştir [23] .

1.2.1.1 Asit Fosfataz Testi

Asit fosfataz testi *p*-nitrofenil fosfatın yaşayan hücre içerisindeki asit fosfataz enzimleri tarafından *p*-nitrofenol'e hidrolizini temel almaktadır. Yapılan çalışmalara göre tüm hücre tipleri için *p*-nitrofenol'ün 405 nm'deki absorpsiyonu yaşayan hücre sayısı ile doğru orantılıdır (10^3 - 10^5 hücre aralığında) [24].



Şekil 1.2: Asit fosfataz enziminin reaksiyon şeması [25].

1.2.1.2 Tripan Mavisi Testi ve JuLI

JuLI, standart tripan mavisi testini ve yarı otomatik odaklanma teknolojisini hücre sayımı için kullanabilen bir cihazdır [26]. Tripan mavisi metodu bir süspansiyon içerisinde bulunan yaşayan hücre sayısını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu test ölü hücrelerin membran yapısının bozulması sonucu boyayı içine alması, yaşayan hücrelerin ise içine almaması prensibine dayanmaktadır. Testin sonucunda canlı hücreler şeffaf gözlenirken, ölü hücrelerde mavi sitoplazma gözlenmektedir [27].

1.2.2 Hemouyumluluk

Kan, plazma ve hücreleri içeren kompleks bir dokudur. Kan plazması % 0.9 sodyum klorid içeren izotonik bir çözeltilidir. Kanda en fazla bulunan hücreler eritrositlerdir. Her bir μL 'de dört milyon eritrosit hücresi bulunmaktadır (Toplam kanın % 40'ını oluşturmaktadır). Eritrositler oldukça sağlam hücrelerdir ancak osmotik basınç ve mekanik cihazlara maruz kalmaları sonucu hasara ve hemolize uğrayabilirler [28].

Hemoliz, kırmızı kan hücrelerinin parçalanarak içerdikleri hemoglobinin ve diğer maddelerin plazmaya salınmasıdır. Normal şartlarda renksiz olan plazmanın pembe-kırmızı renk alması hemolizin gerçekleştiğinin bir göstergesidir [29]. Hemouyumluluk testinin amacı bir biyomalzemenin kanla temas etmesi sonucunda kanda hemolizin oluşup oluşmayacağını belirlemektir. Bu test plazmaya salınan hemoglobinin spektrofotometrik olarak ölçülmesini esas alır [30].

1.3 Literatür Özeti

Poplawski, T. ve arkadaşları PMMA'nın hidrofobik özelliklerinin ve fizikokimyasal direncinin artırılması için modifiye edilmiş bir madde olan glisidil metakrilatlarıyla yaptıkları çalışmada, en fazla 5 mM konsantrasyonda olmak üzere glisidil metakrilatlarının lenfosit yaşamlılığında konsantrasyona bağlı %80 oranında

(maximum) azalmaya sebep olduğunu bulmuşlardır. Alkalin ve nötral komet deneylerinin sonucunda ise lenfositlerde konsantrasyona bağlı bir DNA hasarı gözlemlemişlerdir [31]. Tihan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PMMA/Hidroksiapatit kompozitleri üzerinde *in vitro* olarak büyüttükleri diş eti hücrelerinin fenotipinde herhangi bir değişme olmadığını bulmuşlardır. Yaptıkları testlere göre hidroksiapatit eklemenin (%5) hücre yaşamlılığında artışa sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak, hidroksiapatit konsantrasyonunun fazla olmasının da (%10) hücre yaşamlılığında azalmaya sebep olduğunu da belirtmişlerdir [32]. Magnezyum oksit, hidroksiapatit, kitosan, baryum sülfat ve silikon gibi değişik dolgu maddelerinin PMMA'ya eklenmesinin etkilerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada, PMMA ve hidroksiapatit birarada kullanıldığında örnek üzerinde görülen hücre yoğunluğunun tek başına PMMA içeren örneğe göre önemli derecede fazla olduğu belirlenmiştir. Yani, hidroksiapatit eklendikten sonra, PMMA üzerindeki hücre yaşamlılığında hiçbir negatif etki görülmemiştir [33]. PMMA, PMMA/MMA ve PMMA/MMA/Hidroksiapatit materyalinin sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında araştırmacılar tek başına PMMA'nın en çok sitotoksik etki gösterdiğini, en düşük sitotoksitenin de PMMA/MMA/Hidroksiapatit materyalinde görüldüğünü bulmuşlardır [34]. Itokawa ve arkadaşları, Hidroksiapatit/PMMA kompozitinin kranioplasti (daha önce bir ameliyat veya travma sonrasında kaybolan kafa kemiği yerinin tamir edilmesi işlemi) amacıyla uygulanmasını *in vivo* olarak köpekler üzerinde test etmişlerdir. Kompozitin implantından sonra, 6 haftada bağ dokunun belirgin hale geldiğini ve 12-24 haftada yeni kemik dokusunun oluştuğunu gözlemişlerdir. Bir yıl sonunda hidroksiapatit/PMMA eklenen kısımda oluşan yeni kemiğin kendi kendine oluşan diğer kemiklere bağlandığı gözlenmiştir. Böylece PMMA eklemenin hidroksiapatitin kemik dokuya bağlanabilme özelliğinden hiç birşey kaybettirmediği sonucuna varılmıştır. Bu da Hidroksiapatit/PMMA kompozitinin kranioplasti uygulamasında kullanılabilecek iyi bir aday olduğunu göstermektedir [35]. Rao ve arkadaşlarının çalışmasında ise öncelikle Hidroksiapatit/PMMA kompozitleri üretilmiştir. Daha sonra, hidroksiapatit P(MMA-co-MPS) ile yüzey modifikasyonu uygulanmıştır. Böylece PMMA temelli kemik çimentolarının mekanik özellikleri büyük ölçüde geliştirilmiştir. Sitotoksikite testleri sonucunda modifiye hidroksiapatit ile (maximum %20 oranında olmak üzere) yapılan kompozitler ile muamele edilen fare embriyo fibroblast hücrelerinin (BALB 3T3) canlılık oranının % 85'ten fazla olduğu görülmüştür. Aynı kompozitlerin 48 saatlik

inkübasyonu sonucundaki hücrelerin canlılık oranının ise 24 saatlik inkübasyona oranla daha fazla olması hücrelerin kompozitler üzerinde çoğalabildiğini göstermiştir. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak üretilen modifiye-hidroksiapatit/PMMA kompozitlerinin çok düşük toksisiteye sahip olduğunu ve gelecekte ortopedik uygulamalarda kullanılabileceğini rapor etmişlerdir [36]. Turkez ve arkadaşları, bazı nanoparçacıkların sitotoksite, genotoksite ve oksidatif stres etkilerini araştırmışlardır ve hidroksiapatit nanoparçacıklarının artan konsantrasyonlarının (150, 300, 500 ve 1000 ppm) hücre yaşamlılığını azalttığını, oksidatif stresi arttırdığını (300, 500 ve 1000 ppm için) ve antioksidan kapasitede azalmaya (150, 300, 500 ve 1000 ppm için) sebep olduğunu bulmuşlardır. Kompozit ürünlerinde yayılmış halde bulunan veya çalışma ortamında bulunabilen nanoparçacıklara sıklıkla maruz kalmanın nanoparçacıkların insan vücuduna nüfuz edebilme ve aktif metabolizması olan organlara yerleşme ihtimalinin yüksek olması sebebiyle nanomateryallerin toksisitelerinin araştırılmasının sağlık açısından çok önemli olduğunu da belirtmişlerdir [37]. Chow ve arkadaşları, % 5 – 20 aralığındaki oranlarda eklenen poly(laktik asit) tozu ile birlikte ürettikleri PMMA/Hidroksiapatit kompozitlerinin insan diş eti fibroblast hücrelerinin yaşamlılığine etkilerini araştırmışlardır. Yapılan alamar mavisi testlerinin sonuçlarına göre PMMA/ Hidroksiapatit/ PLA kompozitlerinin fibroblastların çoğalması için uygun ortam olduğu belirtilmiştir. Araştırmanın sonucunda artan PLA konsantrasyonuna bağlı olarak kompozitler üzerinde daha fazla fibroblast hücrelerinin olduğu görülmüştür. Bu sonuç, hidroksiapatit ve PLA dolgu maddelerinin fibroblast hücrelerinin çoğalmasını desteklediğini göstermektedir. Konfokal mikroskop görüntülerine göre de yaşayan/ölü hücre oranlarına bakıldığında kompozitler üzerine ekilen hücrelerin yaşama oranının yeterli olduğu görülmüştür. Araştırmacılar bu çalışmalarıyla PMMA/Hidroksiapatit/PLA kompozitlerinin biyoyumlu olduğu sonucuna varmışlardır [38].

1.4 Amaç ve Kapsam

Biyomalzemeler ile temas eden hücrelerin tepkileri çok farklı olabilmektedir. Hücreler bazen biyomalzemeye karşı inflamatorik olarak tepki gösterirken bazen de kendi dokusu gibi yanıt verebilmektedir. Hücreler, doku ölümü (toksik materyaller sebebiyle), bağ doku oluşumu (sabit materyaller sebebiyle), arayüzeyel kemik oluşumu (biyoaktif materyaller sebebiyle) ya da çevreleyen dokunun biyomalzemenin yerini alması (biyobozunur materyaller sebebiyle) şeklinde dört muhtemel tepki gösterebilmektedirler [39]. Ortopedik materyal tabanlı olan PMMA yaygın bir şekilde klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. Yalnız bazı biyolojik ve mekaniksel özellikleri nedeniyle uygulamalarda önemli sınırlamalar getirebilmektedir. Bu nedenle osteojenik ve mekanik özelliklerinin üstün olması hidroksiapatit ile güçlendirilmiş PMMA polimerlerinin kullanımını gündeme getirmiştir. PMMA/HAp nanokompozitleri ortopedik uygulamalarda ve dişçilikte sıklıkla kullanılan biyomalzemelerdendir. Özellikle dişçilikte kullanılan biyomalzemeleri oluşturan polimerlerin monomer ve ko-monomerlerinin ağız boşluğuna salınabileceği ve buradan da kan dolaşımına ulaşabileceği bilinmektedir [31].

Bu çalışmada farklı moleküler ağırlıktaki PMMA polimerleriyle farklı oranlardaki hidroksiapatit nanoparçacıkları kullanılarak sentezlenen nanokompozitlerin sağlıklı insanların lenfosit hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığı farklı testler kullanılarak araştırılmıştır. Aynı zamanda bu nanokompozitlerin kanda hemolize sebep olup olmadığı da belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

- Poli (metil metakrilat) $M_A:120000$ g/mol
- Poli (metil metakrilat) $M_A:350000$ g/mol
- Poli (metil metakrilat) $M_A:996000$ g/mol
- Nano hidroksiapatit
- RPMI 1640 Besiyeri
- Fetal Bovin Serum
- Penisilin / Streptomisin
- Phytohemagglutinin
- Ficoll-Paque PLUS
- Tripan Mavisi
- Etil Alkol
- Asit Fosfataz Deney Kiti
- NaOH
- NaCl

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Soğutmalı santrifüj : Hettich Rotina 380R
- Analitik terazi: : Denver Instrument
- pH metre : Hanna Instruments
- Magnetik karıştırıcı : Heidolph
- Saf su cihazı : Human Power I
- Biyogüvenlik kabini : Labconco
- CO₂' li inkübatör : Nuaire
- Etüv : Memmert
- Su banyosu : Elma Sonic
- Canlı hücre görüntüleyicisi : Nano Entek
(JuLI)
- Faz kontrast mikroskobu : Olympus
- Mikropipet seti : Eppendorf
- Mikroplaka okuyuculu : Thermo Scientific
spektrofotometre
- Çift vidalı mikro ekstruder : DSM Explore
- X-ray diffraktometre cihazı : Analytical Philips X'Pert-Pro
- Spektrofotometre : PerkinElmer Spektrum 100
- Buzdolabı (+4° C) : Regal
- Buzdolabı (-20° C) : Altus
- Otoklav : Hirayama

2.2 Metot

2.2.1 Nanokompozitlerin Sentezi

Nanokompozitlerin sentezi çift vidalı DSM explore mikro ekstruder eritme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kütlece %1 hazırlamak için 0.04 g, %2.5 için 0.1 g ve %5 için 0.2 g nano dolgu maddesi alınarak 4 g'lık PMMA/Nanohidroksiapatit karışımları hazırlanmıştır. Kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıkları 120000 g/mol, 350000 g/mol ve 996000 g/mol'dür. Besleme yapmadan önce dolgu maddesi ve polimer bir süre karıştırılmıştır. Daha sonra 50 rpm'de besleme yapılmıştır. Sıcaklık 210°C'ye ayarlanmış ve 80 rpm'de karıştırma gerçekleştirilmiştir. Karıştırma süresinin sonunda, nanokompozitler film şeklinde elde edilmiştir.

2.2.2 Nanokompozitlerin Karakterizasyonu

2.2.2.1 XRD Analizleri

XRD analizleri, Analytical Philips X'Pert-Pro X-ray diffraktometre cihazı ile oda sıcaklığında yapılmıştır. Cihazda monokromatör olarak dalga boyu $\lambda=1,54$ nm olan bakır elektrot kullanılmıştır. Analizler 2 °/dk tarama hızıyla 30 mA, 40 kV'de ve 5-50° arasında gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.2 FTIR-ATR Analizi

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

2.2.2.3 SEM Analizi

Nanokompozitlerin morfolojisi Zeiss EVO LS 10 taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz edilmiştir. SEM analizleri için örnekler, karbon bant üzerine yapıştırılmış nanokompozit malzemelerin 15 mA akım altında 15 sn süresince tutularak, Au-Pd kaplanması ile hazırlanmıştır.

2.2.3 Hücre Kültürü İşlemleri

2.2.3.1 Malzemelerin Sterilizasyonu

Tüm deneyler için kullanılan pipet uçları ve santrifüj tüpleri, 121 °C' de 20 dakika (1.02 atm basınçta) otoklavda steril edilmiştir. Hücre kültürü laboratuvarı ve biyogüvenlik kabini kullanılmadığı zamanlarda UV lamba ile sterilize edilmiştir. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce biyogüvenlik kabini çalıştırılarak çalışma ortamının sterilizasyonu sağlanmıştır. Çalışmaya başlamadan önce ve çalışma bittikten sonra kabin yüzeyi çamaşır suyu ve % 70' lik etil alkol ile temizlenmiştir. Dışardan kabine alınan her türlü materyal steril olarak ve % 70' lik etil alkol ile temizlenerek kullanılmıştır.

2.2.3.2 Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

500 mL RPMI-1640 besiyeri çözeltisine (L-glutamine katkılı) büyüme faktörleri içeren FBS (50mL) eklenmiştir. Bakteriyel kontaminasyondan korunmak amacıyla da 5 mL Penisilin/Streptomisin eklenmiştir. Perifer kanda bulunan lenfositler hücre döngüsünün G₀ fazında bulunurlar ve bölünmezler [40]. Bu nedenle dışarıdan mitojenik bir ajan olan phytohemaglutinin kültür besiyerine eklenerek hücre çoğalması teşvik edilmiştir. Bunun için 10 mg phytohemaglutinin 10 mL steril ultra saf su ilave edilerek çözülmüştür ve bu çözeltiden 5 mL alınıp besiyerine eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri +4 °C' de saklanmıştır.

2.2.3.3 Kandan Lenfosit Hücrelerinin İzolasyonu

Sağlıklı ve gönüllü bireylerden alınan tam kan EDTA' lı tüplere eklenmiştir. Ficoll-Paque PLUS şişesi kullanmadan önce birkaç kez alt üst ederek çalkalanmıştır. 7 mL Ficoll-Paque üzerine 3 mL EDTA'lı tam kan karışımlarına izin vermeyecek şekilde eklenmiştir. 1500 rpm'de 30 dk oda sıcaklığında santrifüj gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonucunda Şekil 1'deki gibi dört katman oluşmuştur. En üstte plazma katmanı bulunduğu için o katman pipetlenerek atılmıştır. Üstten ikinci katmanda bulunan lenfosit katmanı ise pipetle alınıp temiz bir tüpe aktarılmıştır. Temiz tüpe alınan lenfositler 10 mL besiyeri ile yıkanmıştır ve 1500 rpm'de 10 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmı atılmıştır. Pellet ise hazırlanan besiyerinde çözülmüştür ve gerekli sayıda hücre thoma lamı kullanılarak sayılmıştır.



Şekil 2.1: Santrifüj sonrası görülen katmanlar.

Hücre sayımı için hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak bir eppendorf tüp içerisine alınmıştır. Üzerine eşit miktarda % 0.4 tripan mavisi konarak iyice karışması sağlanmıştır. Thoma lamı distile su ve % 70'lik etil alkol ile iyice temizlenmiştir. Bu karışımdan 10 µL alınarak thoma lamına koyulmuştur ve mikroskopta bu lam üzerinde dört alanda hücre sayımı yapılmıştır. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak, 1 mL besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplanmıştır.

Hesaplama şu şekilde yapılmıştır :

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı / mL} = \frac{\text{Thoma sayım sonucu}}{4} \times 2 \times 10^4$$

2.2.4 Sitotoksosite Testleri

2.2.4.1 Asit Fosfataz Testi

Asit fosfataz testi Yang ve arkadaşlarının metodu (1997) modifiye edilerek yapılmıştır. % 70'lik etil alkol ile temizlenmiş kompozitler (0.5 cm²) petri kapları içerisinde bir gece UV ışık altında bekletilerek sterilize edilmiştir. Taze olarak izole edilen lenfositler her bir kompozit üzerine 1 x 10⁴ hücre/mL olacak şekilde thoma lamı ile sayılarak eklenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan lenfosit çözeltisine hiçbir kompozit eklenmemiştir. Tüm örnekler ve kontrol grupları 37 °C' de % 5' lik CO₂ ortamında 4 gün inkübe edilmiştir. 24., 48., 72. ve 96. saatlerin sonunda hücrelerden 50 µL alınarak 96 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına eklenmiştir. Substrat olarak 50 µL *p*-nitrofenil fosfat (0.005 M) her bir kuyucuğa eklenmiştir. 37 °C' de % 5'lik CO₂ ortamında gerçekleşen 2 saatlik inkübasyondan sonra, 200 µL durdurma çözeltisi (0.5 M NaOH) reaksiyonu durdurarak oluşan renk değişimini spektrofotometrik ölçüm alırken sabit tutması amacıyla her kuyucuğa eklenmiştir ve *p*-nitrofenil fosfatın *p*-nitrofenole enzimatik dönüşümü mikropilaka okuyuculu spektrofotometre ile 405 nm'de belirlenmiştir [41].

2.2.4.2 JuLI - Hücre Yaşamlılığı Testi

Hücre yaşamlılığı testi tripan mavisini temel alan bir cihaz olan “JuLI-Hücre Görüntüleyicisi” ile gerçekleştirilmiştir. Bu test için 24., 48., 72. ve 96. saatlerin sonunda kompozit ile inkübe edilmiş lenfosit süspansiyonlarından ve kontrol grubundan 10'ar µL alınarak bir eppendorf tüp içerisine eklenmiştir. Üzerlerine eşit

miktarda % 0.4' lük tripan mavisi konarak iyice karışması sağlanmıştır. Daha sonra cihazın kendisine ait olan özel hücre sayma aparatına hazırlanan karışım eklenmiş ve cihazın hücre sayma modu ayarlanmıştır. Böylece her bir örneğin % canlılık oranı ve hücrelerin görüntüleri elde edilmiştir.

2.2.5 Hemouyumluluk Testi

Hemouyumluluk testi Motlag ve arkadaşlarının yöntemi (2006) modifiye edilerek yapılmıştır [42]. Nanokompozit örnekleri 0.5 cm² olacak şekilde kullanılmıştır. 400 µL antikogülanlı kan 20 mL %0.9'luk NaCl çözeltisinde seyreltilmiştir. 2 mL'lik eppendorf tüpleri içerisine % 70'lik etil alkol ile steril edilmiş nanokompozit örnekleri konulmuş ve üzerlerine 1 mL seyreltilmiş kandan eklenmiştir. Pozitif kontrol olması için 200 µL antikogülanlı kan 10 mL steril ultra saf su içerisinde seyreltilmiştir ve bunun içerisinde 1 mL alınarak pozitif kontrol olarak belirlenen boş bir tüpe eklenmiştir. Negatif kontrol olarak belirlenen tüpe ise tuz çözeltisinde seyreltilmiş kandan 1 mL eklenmiştir ve içerisine hiçbir nanokompozit konulmamıştır. Tüm tüpler 2 saat boyunca 37 °C' de inkübe edilmiştir. Süre sonunda inkübatörden alınan örnekler 1000g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmı alınarak 96 kuyucuklu plakanın herbir kuyucuğuna 200 µL olarak eklenmiştir. Mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede 545 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

% Hemoliz oranı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır;

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

2.2.6 İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen sonuçların istatistiksel analizi için IBM S.P.S.S statistic 19 programı kullanılmıştır. Kontrol ve deney grupları arasındaki değişikliklerin analizi one way Anova testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. One way Anova testlerinden Duncan ve Fisher's Least Significant Difference (LSD) testleri varyans analizi için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar 0.05 anlam seviyesi göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

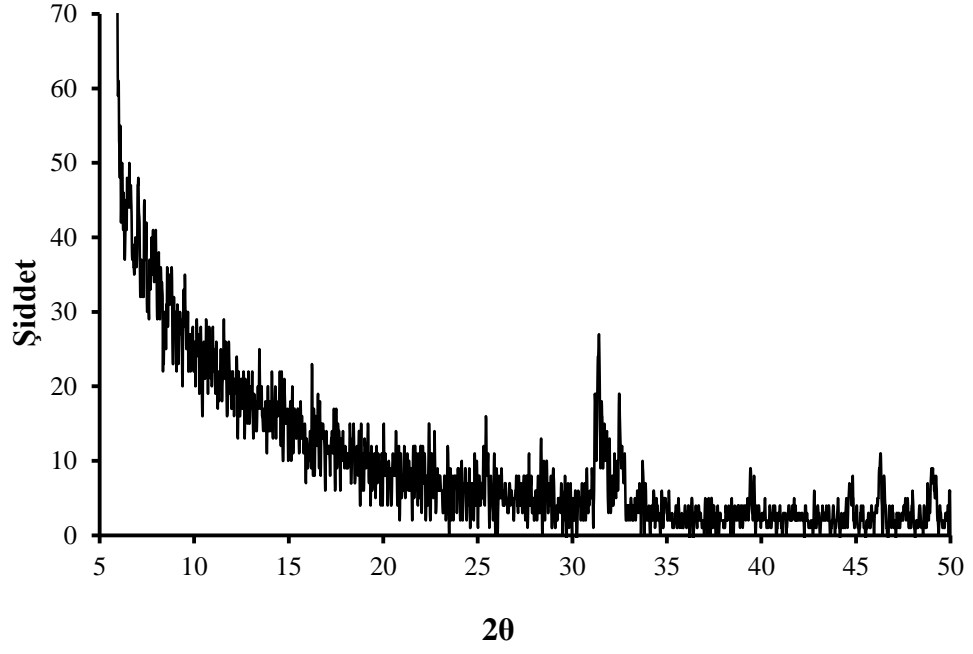
3. BULGULAR

3.1 Nanokompozitlerin Karakterizasyon Sonuçları

Farklı moleküler ağırlıklara sahip PMMA polimerleri ve farklı konsantrasyonlarda nanohidroksiapatit dolgu maddeleri kullanılarak PMMA/Nanohidroksiapatit nanokompozitleri sentezlenmiş ve bu nanokompozitler XRD, FTIR-ATR ve SEM analizleri gerçekleştirilerek karakterize edilmiştir. Bu bölümde karakterizasyon analizlerinden elde edilen sonuçlar bulunmaktadır.

3.1.1 XRD Analiz Sonuçları

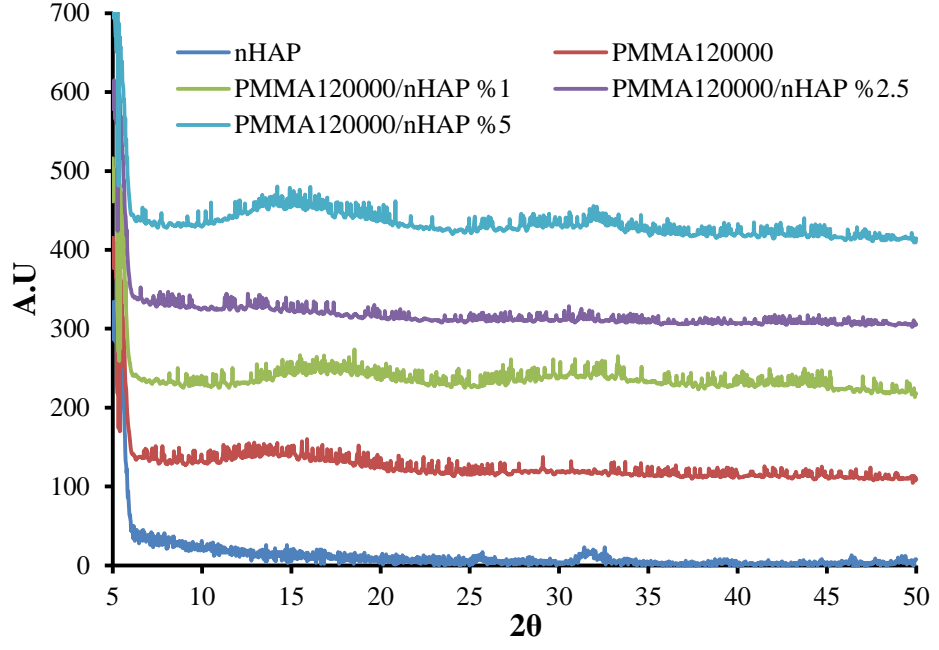
Nanohidroksiapatite ait XRD deseni ve bu desenden elde edilen veriler Şekil 3.1 ve Tablo 3.1’de verilmiştir. PMMA/Nanohidroksiapatit nanokompozitlerinin ve kullanılan saf PMMA polimerlerinin XRD desenleri de Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4’te verilmiştir. Şekil 3.1 ve Tablo 3.1’den görüldüğü gibi nanohidroksiapatit $2\theta=31.58^\circ$ ve $2\theta=32.54^\circ$ ’de karakteristik piklere sahiptir. Nanokompozit oluşumlarına ait XRD desenleri tartışılırken bu karakteristik pikler göz önüne alınacaktır. Dolgu maddesi polimer ile etkileştirildiğinde, dolgu maddesi matriks içerisinde tamamen disperse olmuşsa XRD desenlerinde dolgu maddesine ait karakteristik piklerin görülmemesi beklenir.



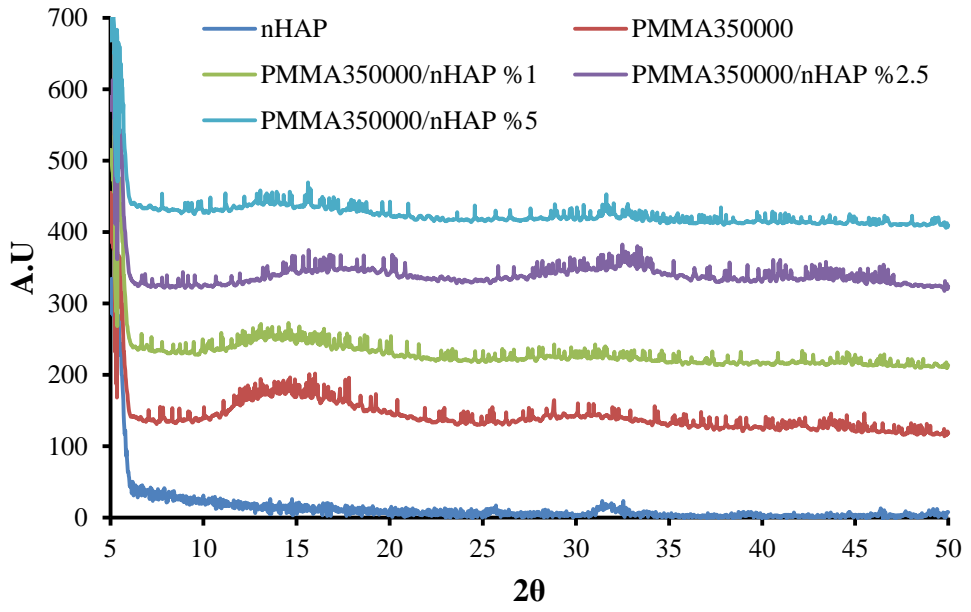
Şekil 3.1: Nanohidroksiapatitin XRD deseni.

Tablo 3.1: Nanohidroksiapatitin XRD deseninden elde edilen veriler.

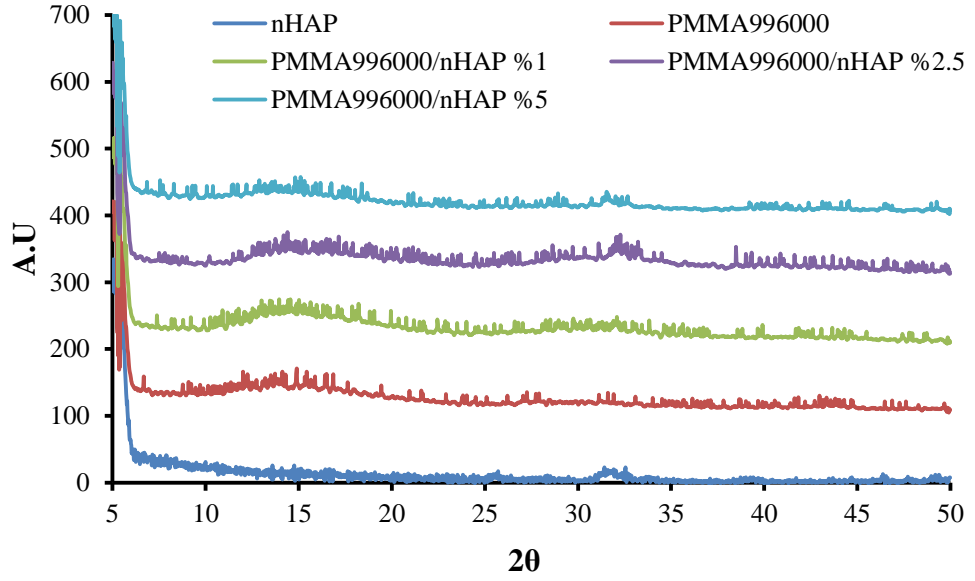
Poz. [$^{\circ}2\theta$.]	d-uzaklığı[Å]	Rel. Int. [%]
25.5998	3.47691	2.60
30.9111	2.89053	2.81
31.5860	2.83029	4.68
32.5412	2.74936	7.78
39.4239	2.28378	1.40
46.3691	1.95659	3.46



Şekil 3.2: Moleküler ağırlığı 120000 g/mol olan PMMA ile hazırlanmış nanokompozitlerin XRD deseni.



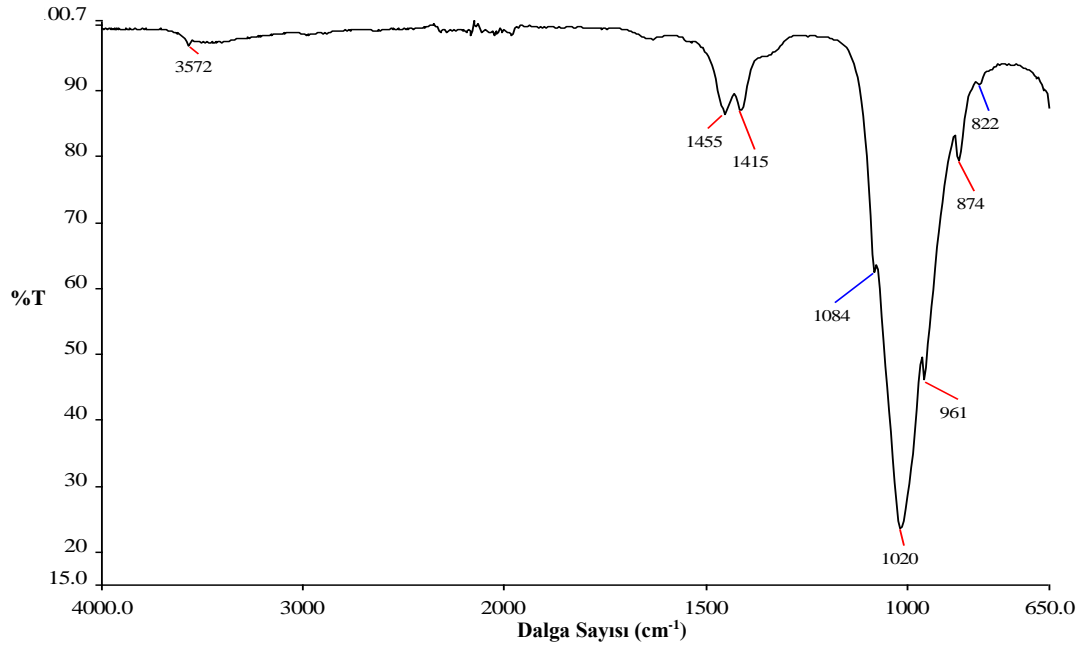
Şekil 3.3: Moleküler ağırlığı 350000 g/mol olan PMMA ile hazırlanmış nanokompozitlerin XRD deseni.



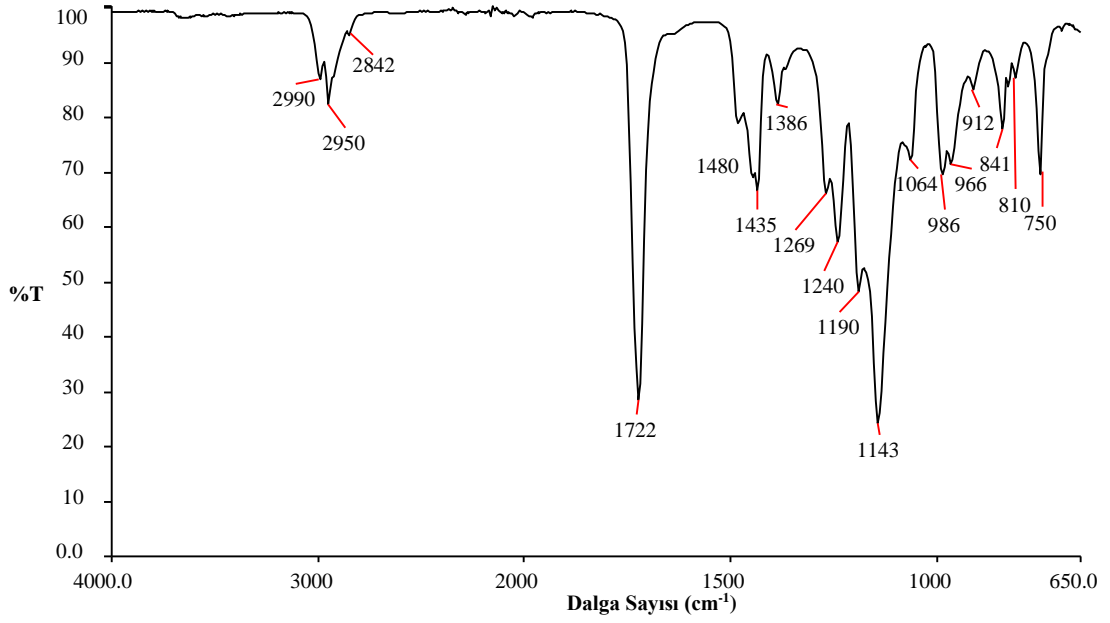
Şekil 3.4: Moleküler ağırlığı 996000 g/mol olan PMMA ile hazırlanmış nanokompozitlerin XRD deseni.

3.1.2 FTIR-ATR Analiz Sonuçları

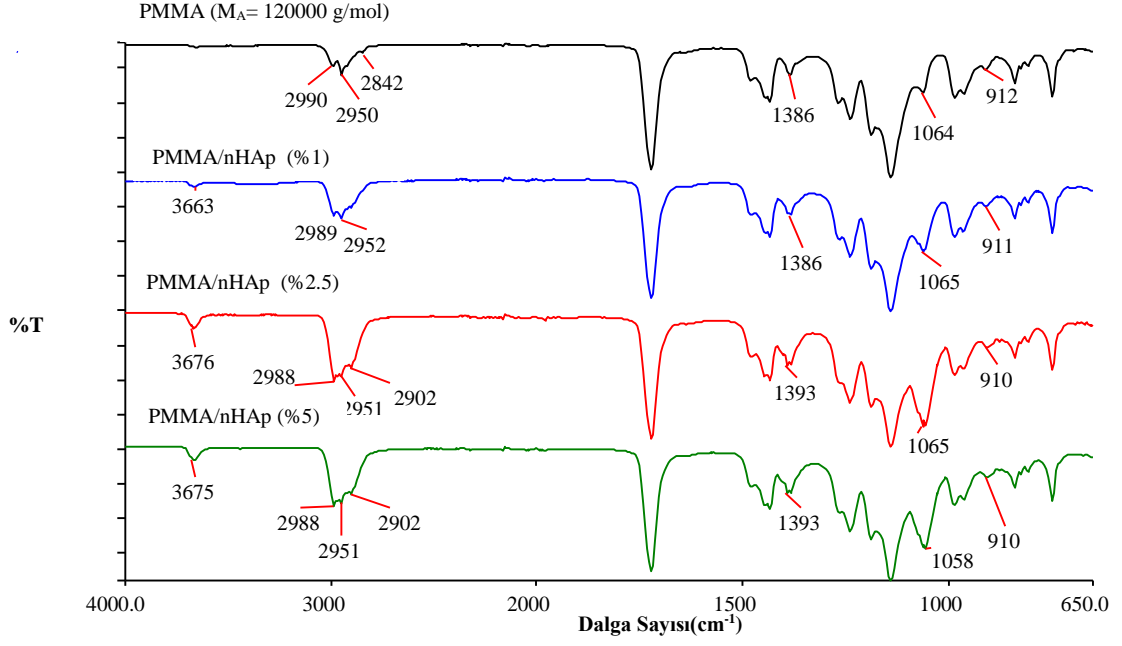
Nanokompozitlerin FTIR-ATR analizleri değerlendirilirken polimer matriksin spektrumu baz alınır. Nanokompozitlerin FTIR-ATR spektrumları polimerin spektrumuna benzemelidir ancak çeşitli kaymalar da gözlenmelidir. Şekil 3.5'te nanohidroksiapatitin FTIR-ATR analizi sonucu elde edilen spektrumu verilmiştir. Ayrıca, Şekil 3.6'da ve 3.7'de moleküler ağırlığı 120000 g/mol olan PMMA'ya ait, Şekil 3.8'de ve 3.9'da moleküler ağırlığı 350000 g/mol olan PMMA'ya ait, Şekil 3.10'da ve 3.11'de ise moleküler ağırlığı 996000 g/mol olan PMMA'ya ait spektrumlar ve farklı moleküler ağırlıklarına sahip bu PMMA'lar ile sentezlenen nanokompozitlerin spektrumları verilmiştir. Tüm spektrumlar üzerinde örneklere ait karakteristik pikler belirtilmiştir.



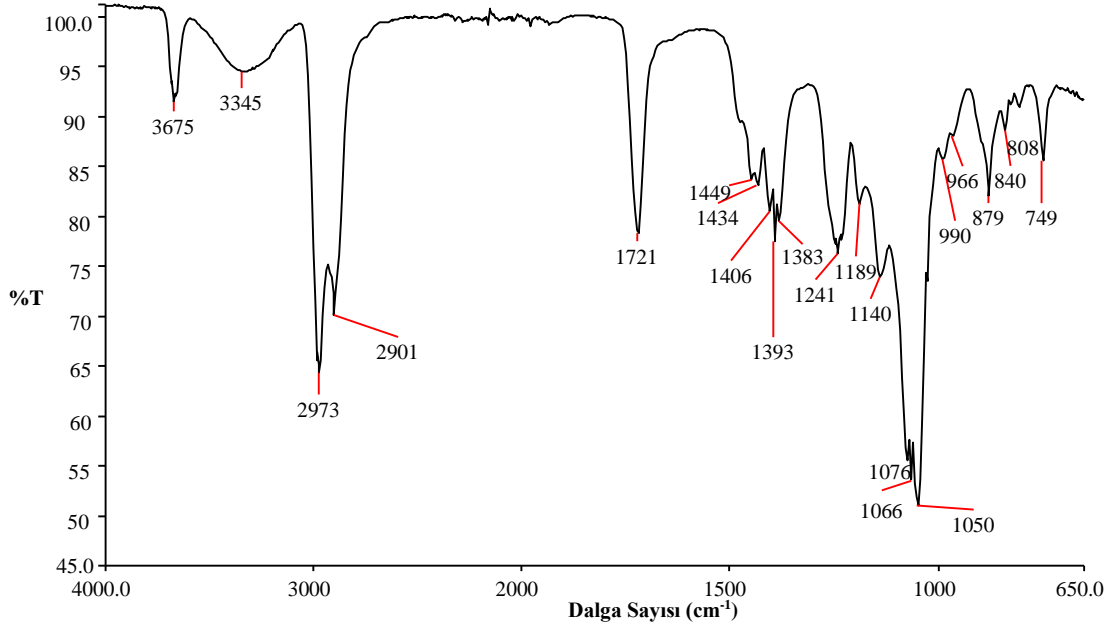
Şekil 3.5: Nanohidroksiapatitin FTIR-ATR spektrumu.



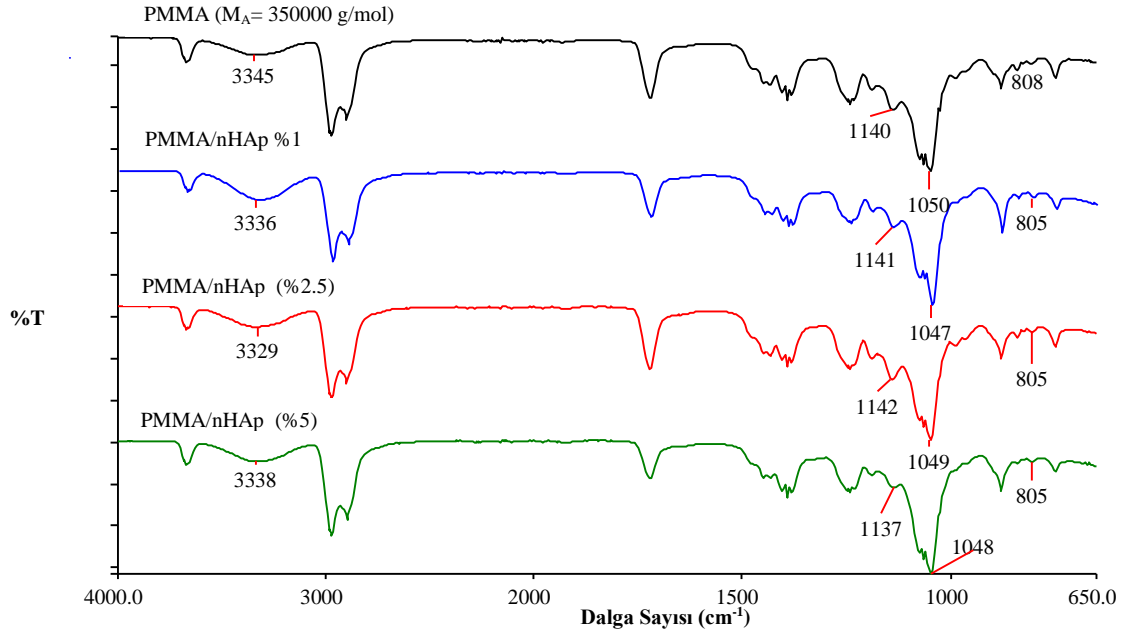
Şekil 3.6: PMMA (M_A = 120000 g/mol)'nin FTIR-ATR spektrumu.



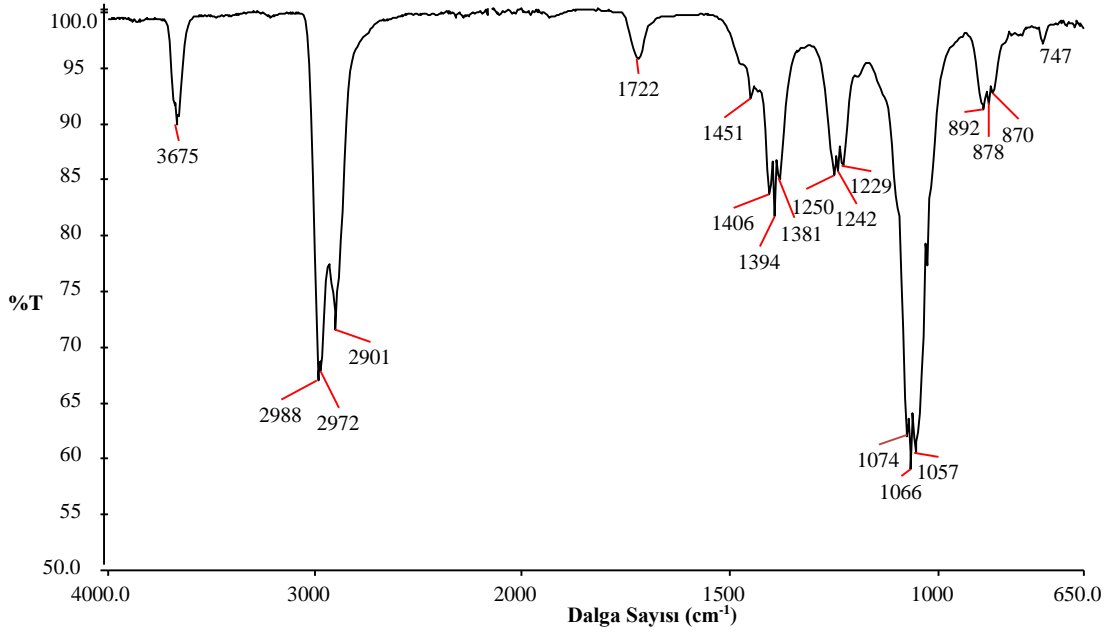
Şekil 3.7: PMMA ($M_A = 120000$ g/mol) / Hidroksiapatit nanokompozitlerinin FTIR-ATR spektrumu.



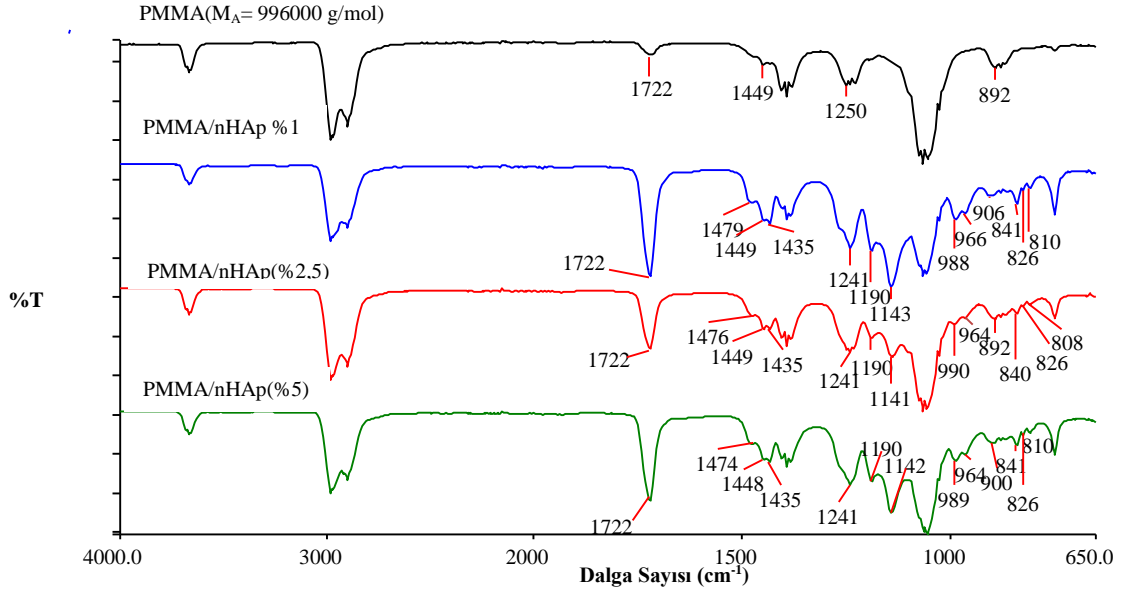
Şekil 3.8: PMMA ($M_A = 350000$ g/mol)'nın FTIR-ATR spektrumu.



Şekil 3.9: PMMA ($M_A = 350000$ g/mol) / Hidroksiapatit nanokompozitlerinin FTIR-ATR spektrumu.



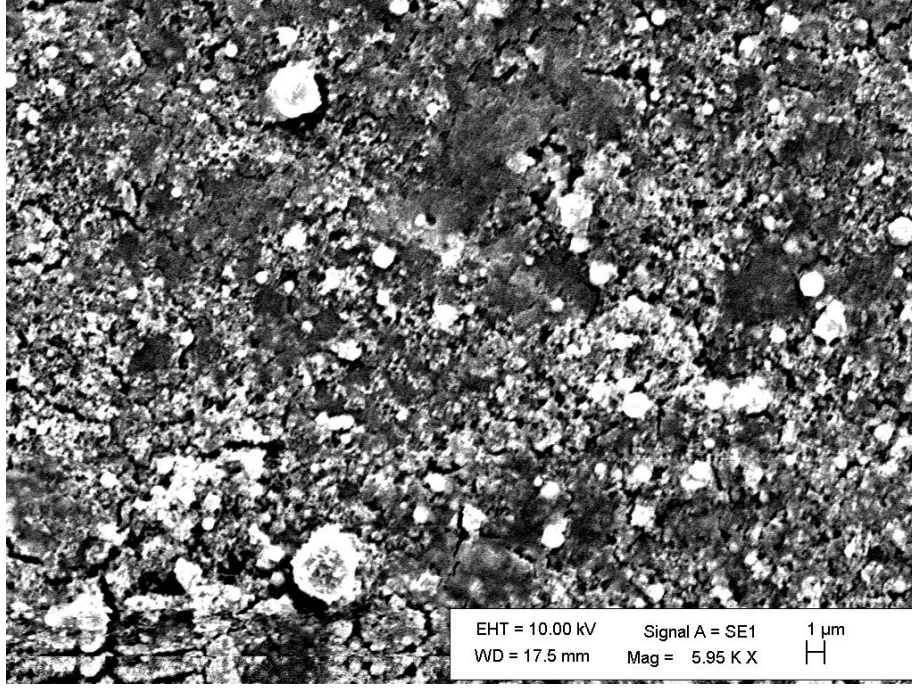
Şekil 3.10: PMMA ($M_A = 996000$ g/mol)'nın FTIR-ATR spektrumu.



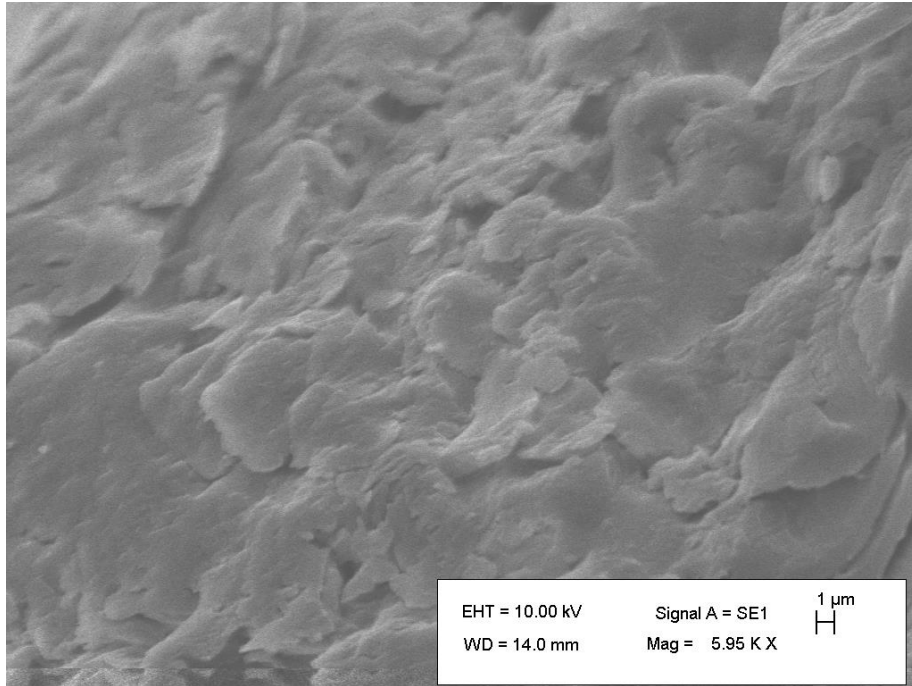
Şekil 3.11: PMMA ($M_A = 996000$ g/mol) / Hidroksiapatit nanokompozitlerinin FTIR-ATR spektrumu.

3.1.3 SEM Analiz Sonuçları

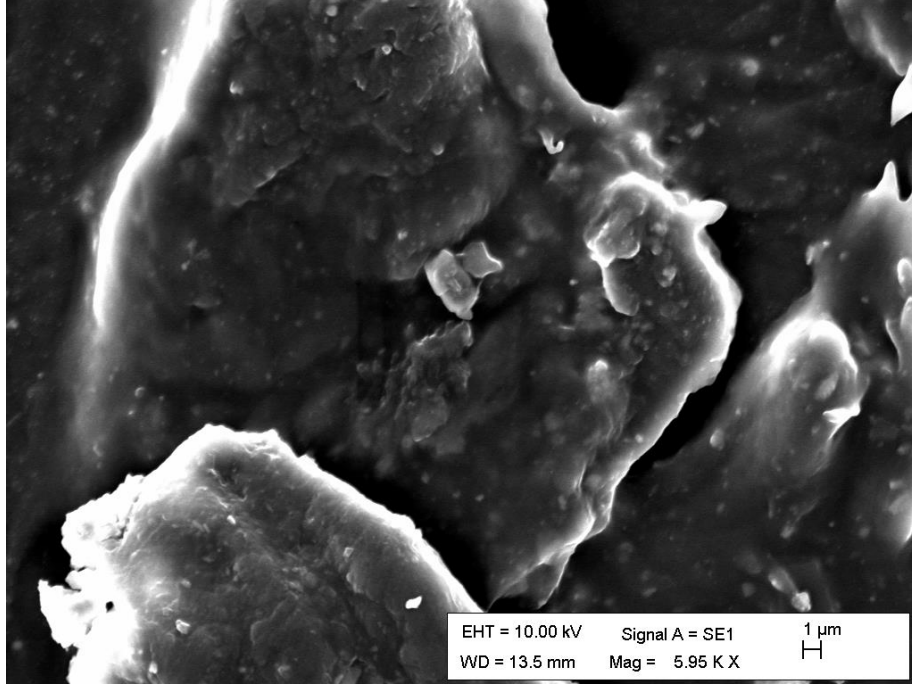
Şekil 3.12’de nanohidroksiapatite ait, Şekil 3.13-3.21’de ise sentezlenen nanokompozitlere ait SEM görüntüleri verilmektedir.



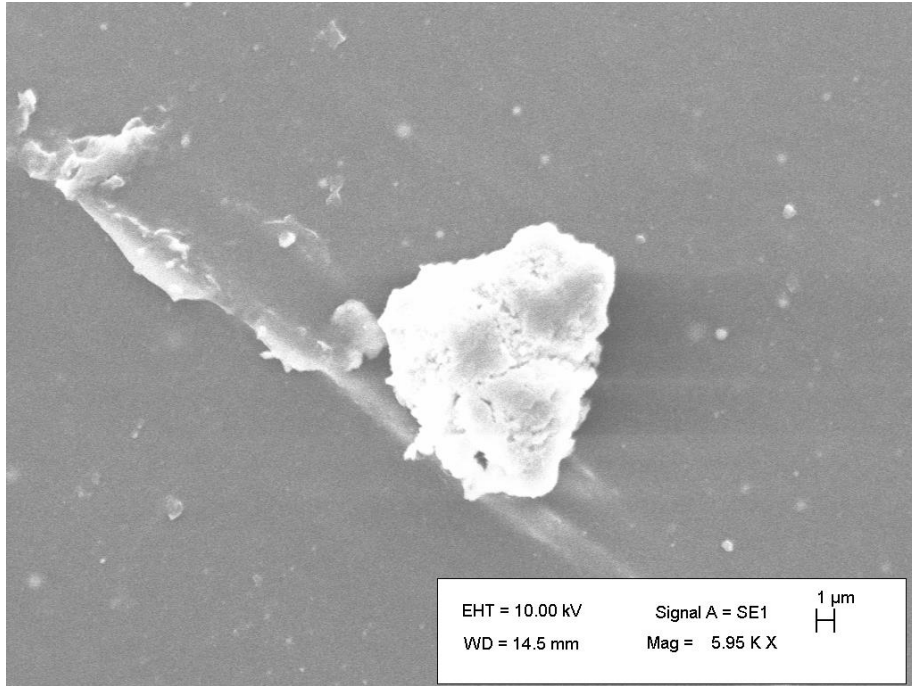
Şekil 3.12: Nanohidroksiapatitin SEM görüntüsü.



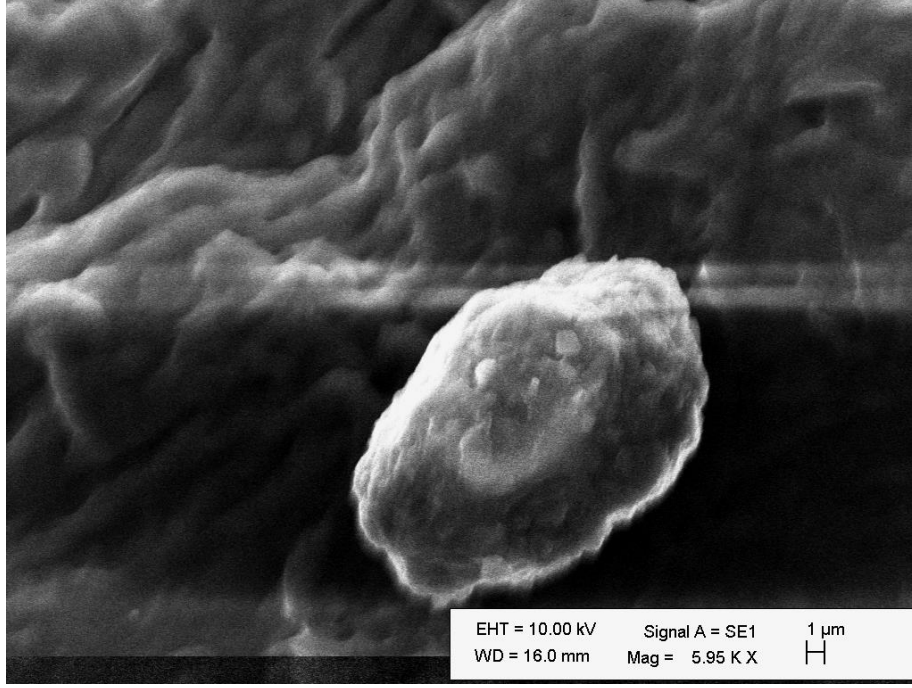
Şekil 3.13: PMMA (M_A : 120000 g/mol)/nHAp (%1) nanokompozitinin SEM görüntüsü.



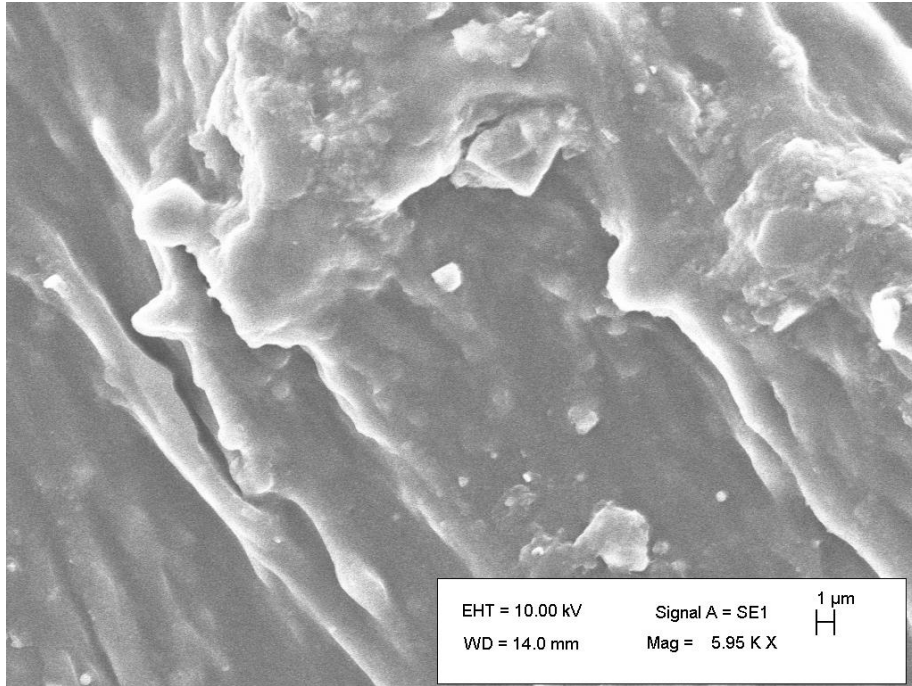
Şekil 3.14: PMMA (M_A : 120000 g/mol)/nHAp (%2.5) nanokompozitinin SEM görüntüsü.



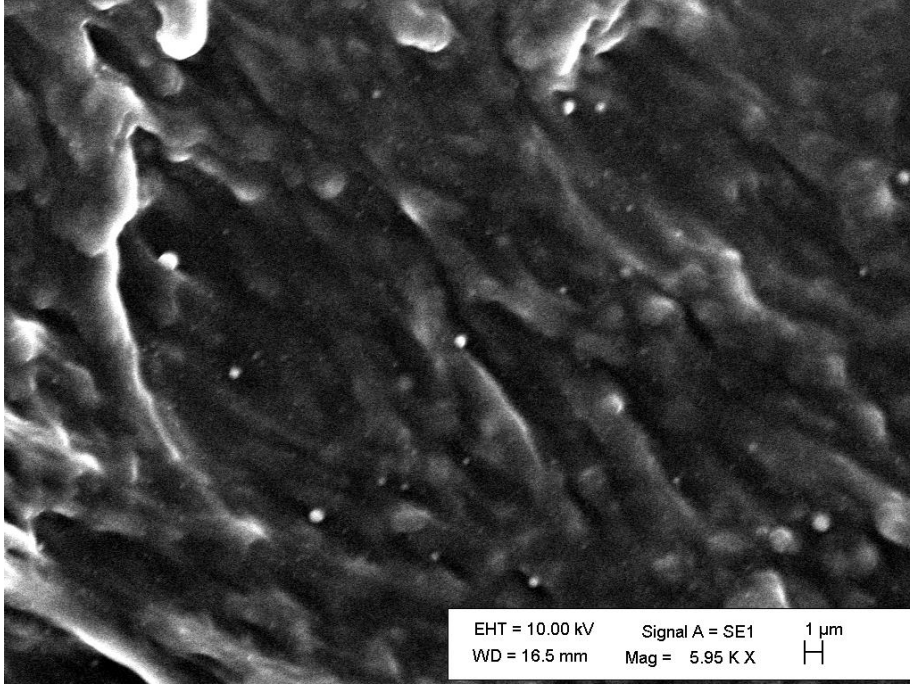
Şekil 3.15: PMMA (M_A : 120000 g/mol)/nHAp (%5) nanokompozitinin SEM görüntüsü.



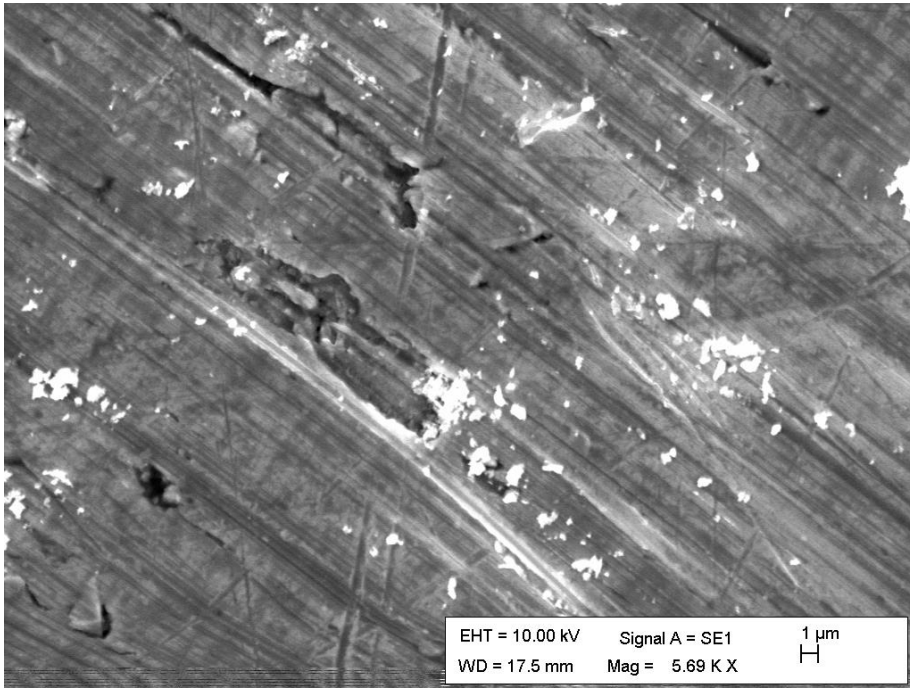
Şekil 3.16: PMMA (M_A : 350000 g/mol)/nHAp (%1) nanokompozitinin SEM görüntüsü.



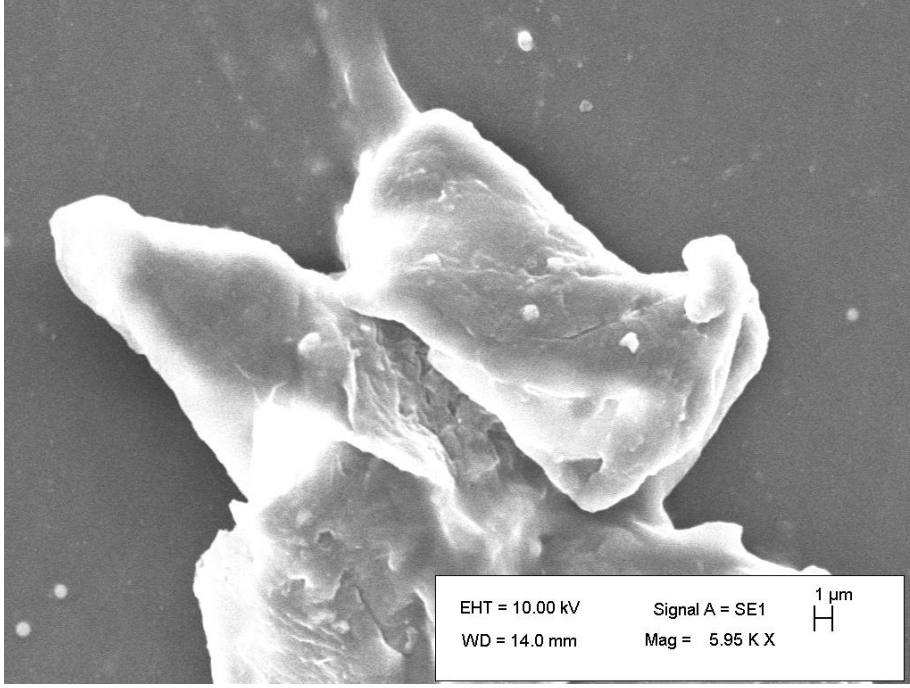
Şekil 3.17: PMMA (M_A : 350000 g/mol)/nHAp (%2.5) nanokompozitinin SEM görüntüsü.



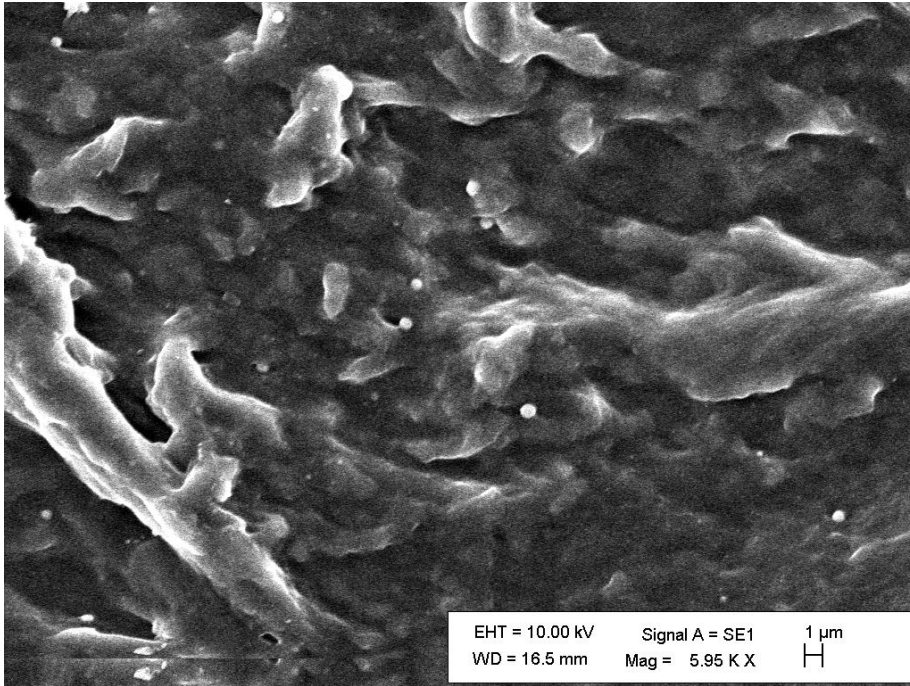
Şekil 3.18: PMMA (M_A : 350000 g/mol)/nHAp (%5) nanokompozitinin SEM görüntüsü.



Şekil 3.19: PMMA (M_A : 996000 g/mol)/nHAp (%1) nanokompozitinin SEM görüntüsü.



Şekil 3.20: PMMA (M_A : 996000 g/mol)/nHAp (%2.5) nanokompozitinin SEM görüntüsü.



Şekil 3.21: PMMA (M_A : 996000 g/mol)/nHAp (%5) nanokompozitinin SEM görüntüsü.

3.2 Sitotoksosite Test Sonuçları

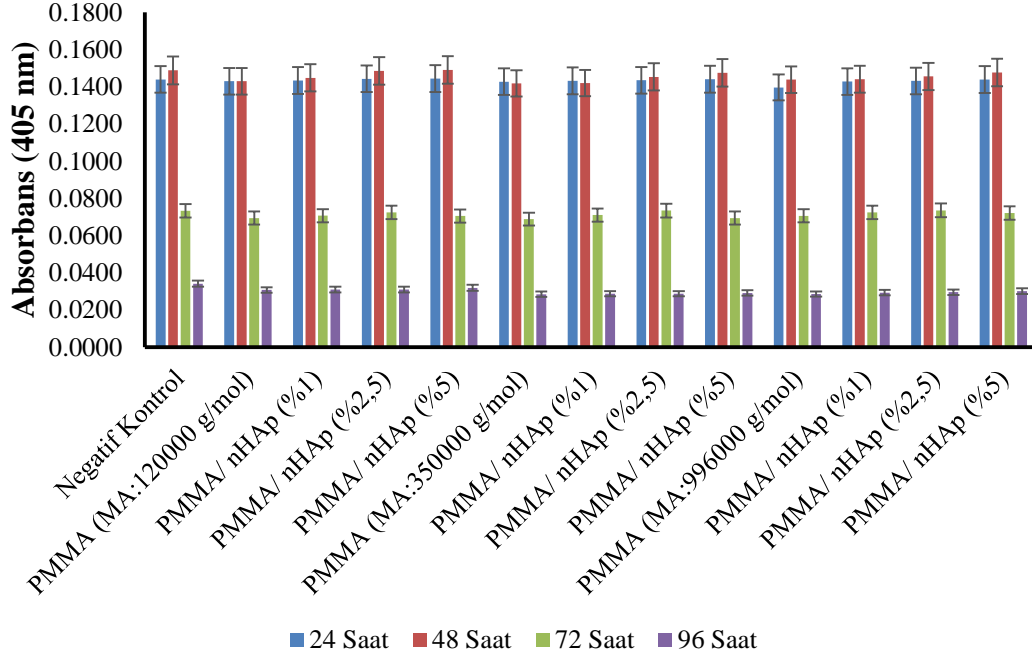
Bu çalışmada sentezlenen PMMA/Nanohidroksiapatit nanokompozitlerinin hücrelerde toksik etki yaratıp yaratmadığı asit fosfataz testi ve JULI cihazı ile yapılan analizler ile araştırılmıştır.

3.2.1 Asit Fosfataz Testi Sonuçları

Sentezlenen nanokompozitler ile inkübe edilen lenfosit hücrelerinin belirlenen inkübasyon periyotlarından sonra gerçekleştirilen asit fosfataz testinin sonucunda 405 nm’de verdikleri absorpsiyon değerleri belirlenmiştir.

3.2.1.1 Nanohidroksiapatit Konsantrasyonuna Göre Asit Fosfataz Testi Sonuçları

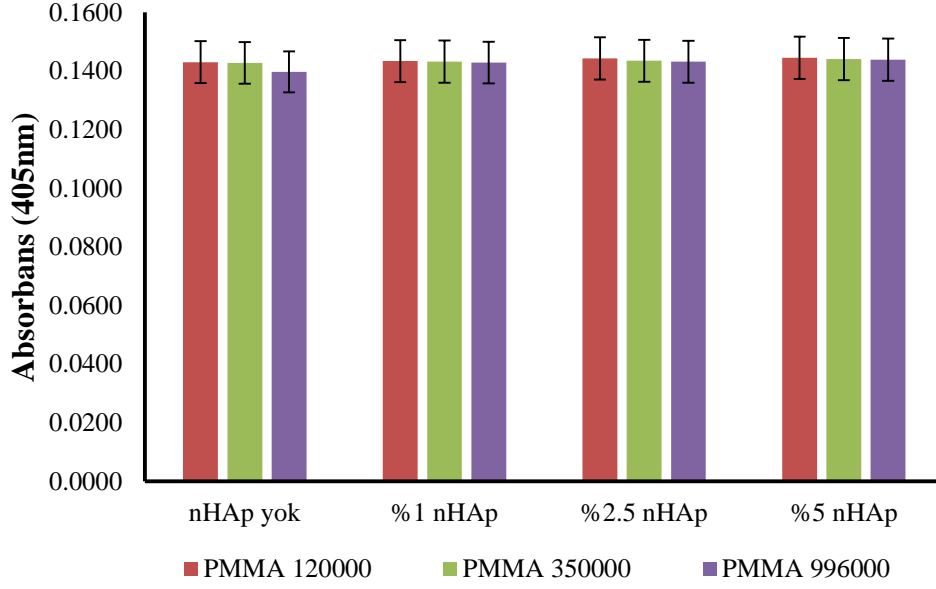
Farklı konsantrasyonlardaki nanohidroksiapatit dolgu maddelerinin asit fosfataz testi sonucuna olan etkileri Şekil 3.22’de verilmiştir.



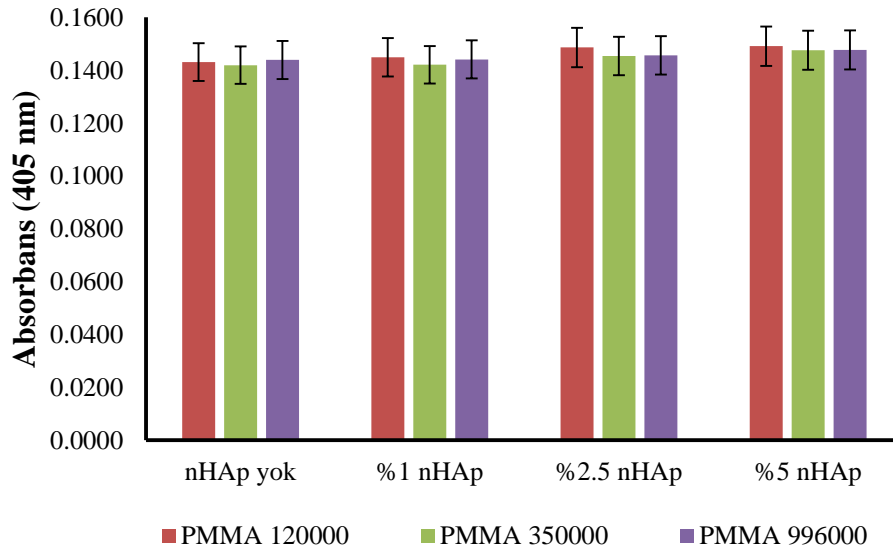
Şekil 3.22: PMMA / HAp nanokompozitlerinin absorbans grafikleri.

3.2.1.2 PMMA'ların Moleküler Ağırlıklarına Göre Asit Fosfataz Test Sonuçları

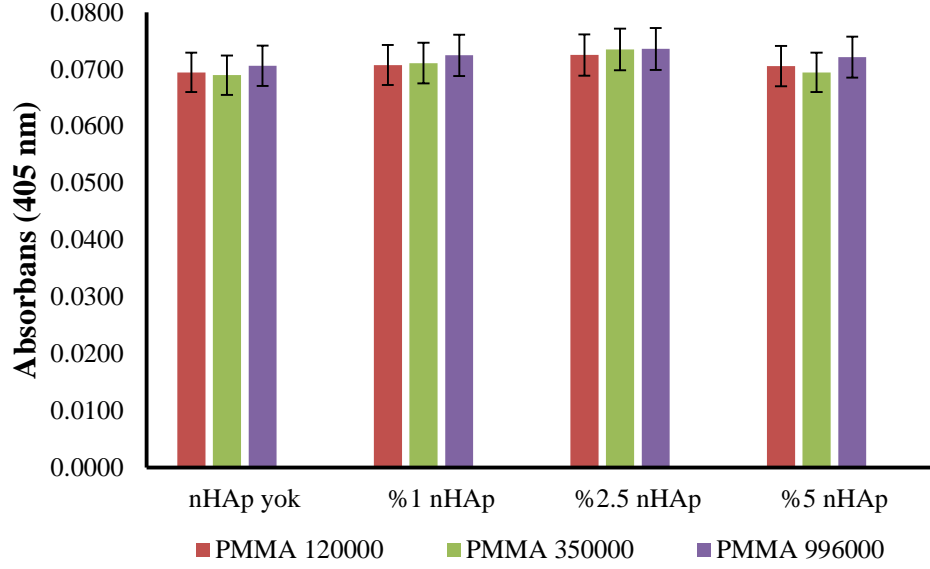
Farklı moleküler ağırlıktaki PMMA polimerlerinin asit fosfataz testi sonuçlarına göre karşılaştırılmaları her inkübasyon periyodu için Şekil 3.23-3.26'da verilmiştir.



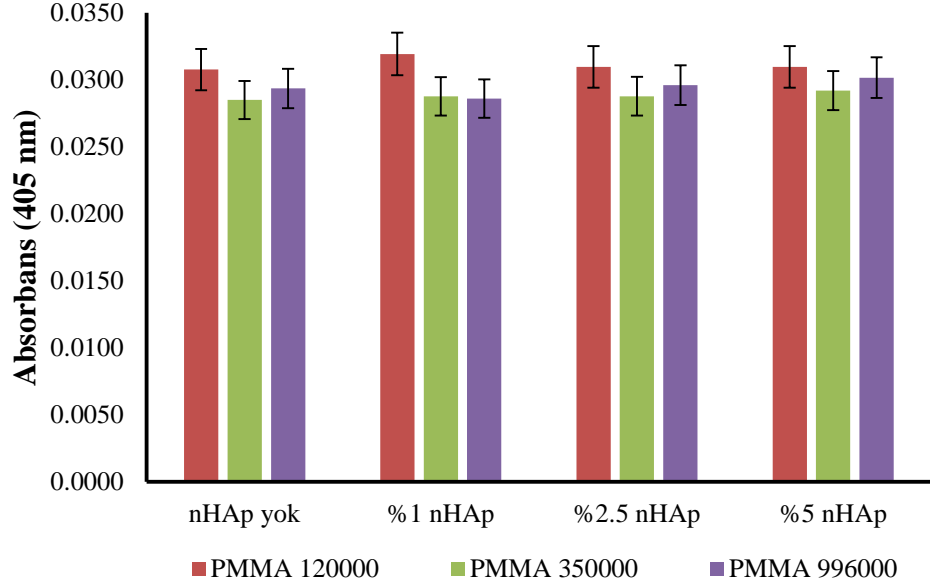
Şekil 3.23: Nanokompozitlerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbanların kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması.



Şekil 3.24: Nanokompozitlerin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbanların kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması.



Şekil 3.25: Nanokompozitlerin 72 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbansların kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması.



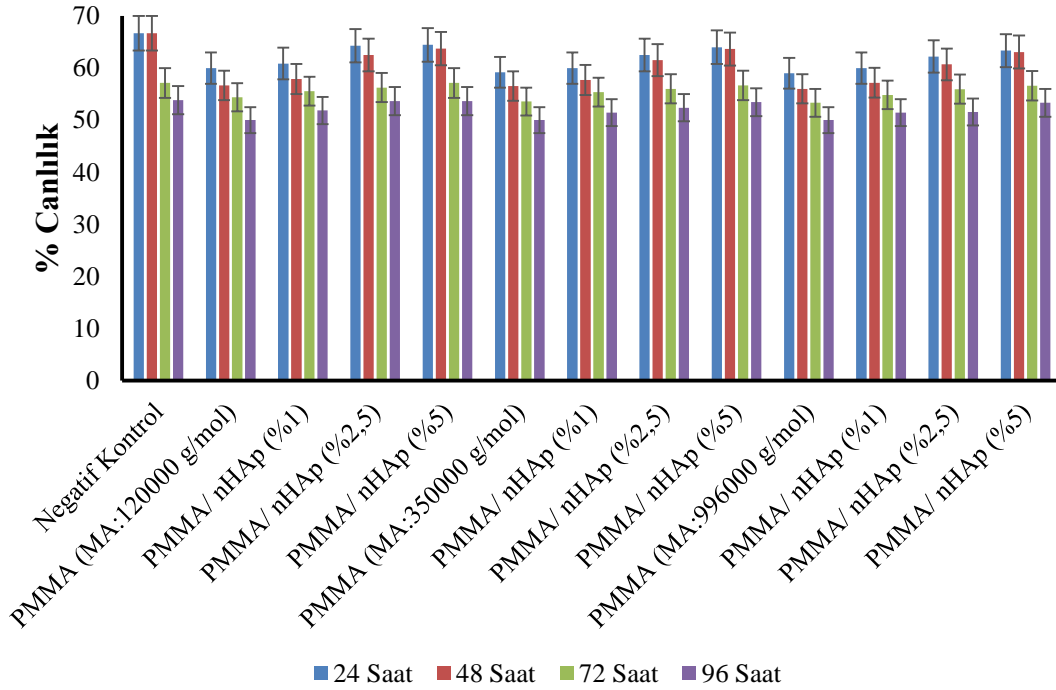
Şekil 3.26: Nanokompozitlerin 96 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen absorbansların kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması.

3.2.2 JuLI Sonuçları

Sentezlenen nanokompozitler ile inkübe edilen lenfosit hücrelerinin JuLI cihazı ile yapılan analizleri sonucunda elde edilen % canlılık oranları belirlenmiştir.

3.2.2.1 Nanohidroksiapatit Konsantrasyonuna Göre JuLI Sonuçları

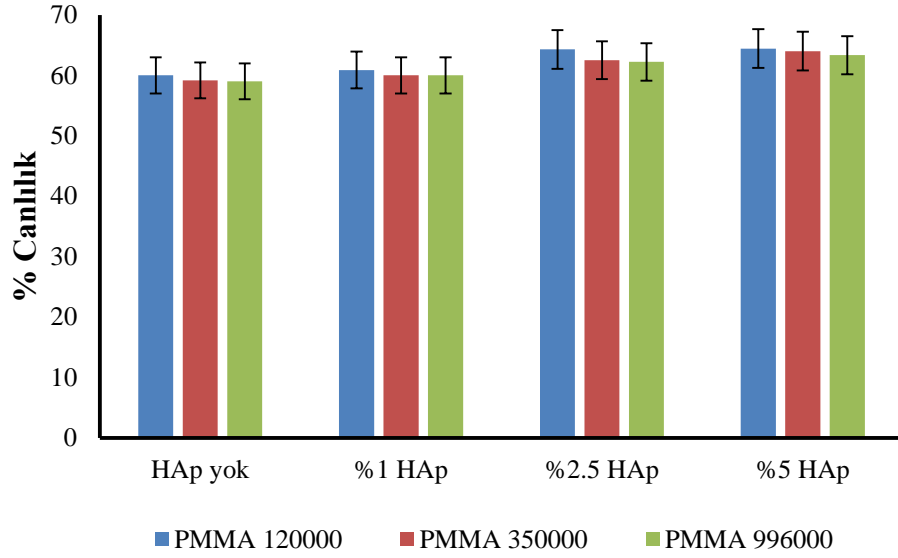
Farklı konsantrasyonlardaki nanohidroksiapatit dolgu maddelerinin % canlılık oranlarına etkileri Şekil 3.27’de verilmiştir.



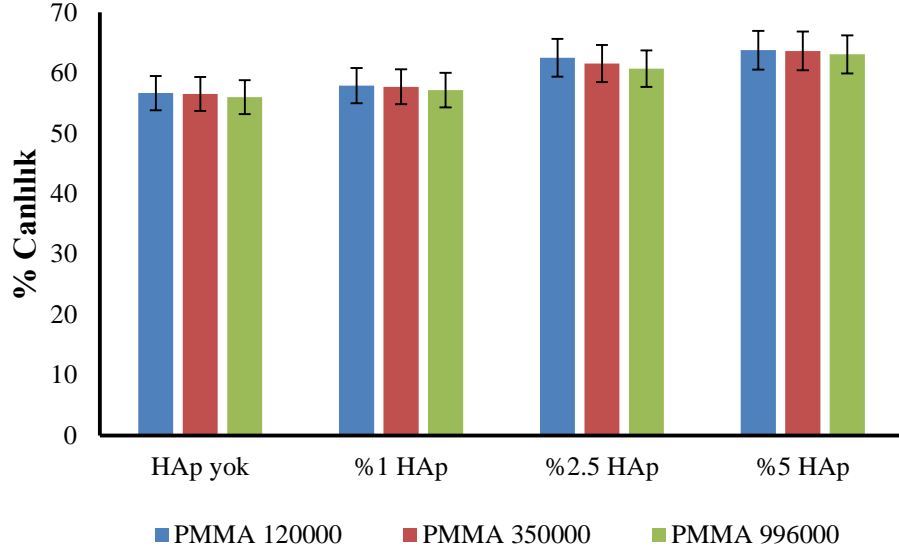
Şekil 3.27: PMMA / HAp nanokompozitlerinin JuLI cihazıyla elde edilen % canlılık oranları.

3.2.2.2 PMMA'ların Moleküler Ağırlıklarına Göre JuLI Sonuçları

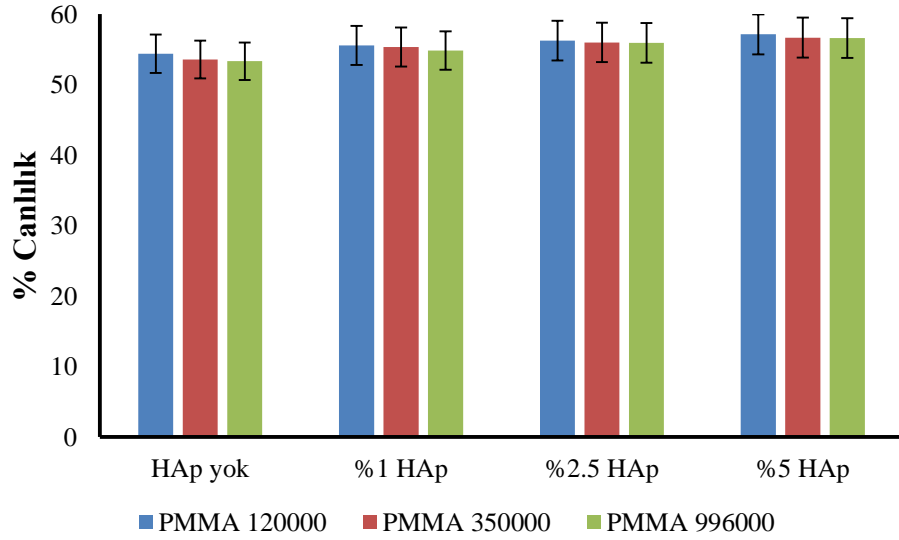
Farklı moleküler ağırlıktaki PMMA polimerlerinin % canlılık oranlarına olan etkilerinin karşılaştırılması her inkübasyon periyodu için Şekil 3.37 – 3.40'da verilmiştir.



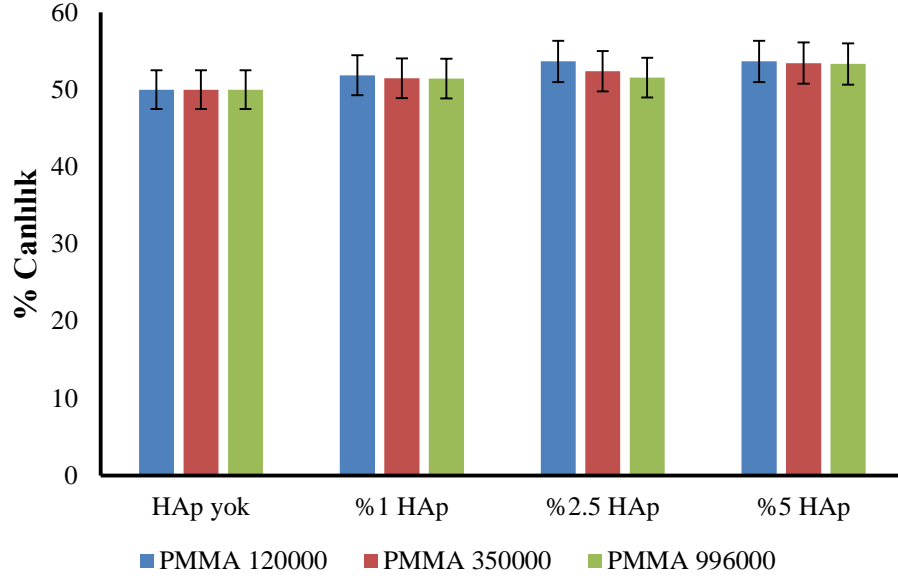
Şekil 3.28: Nanokompozitlerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda JuLI cihazıyla elde edilen % canlılık oranlarının kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması.



Şekil 3.29: Nanokompozitlerin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda JuLI cihazıyla elde edilen % canlılık oranlarının kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması.



Şekil 3.30: Nanokompozitlerin 72 saatlik inkübasyonu sonucunda JuLI cihazıyla elde edilen % canlılık oranlarının kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması.



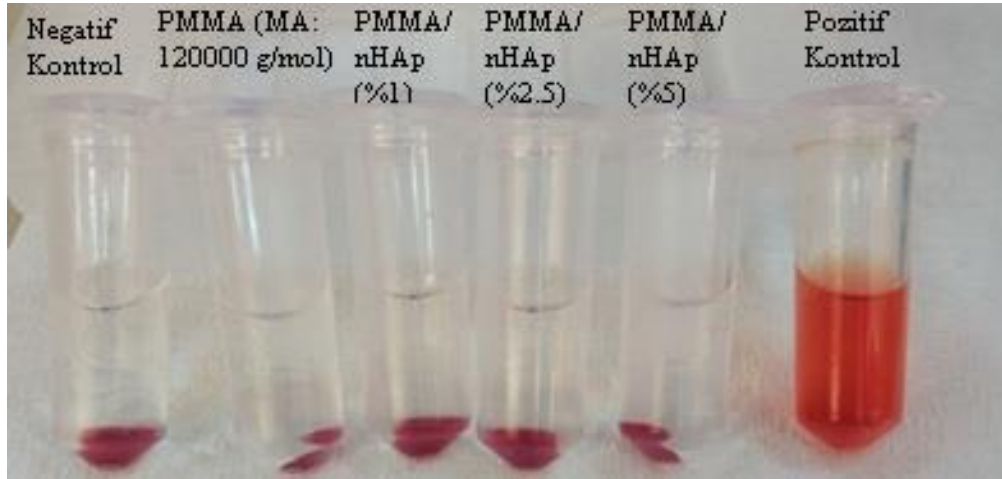
Şekil 3.31: Nanokompozitlerin 96 saatlik inkübasyonu sonucunda JuLI cihazıyla elde edilen % canlılık oranlarının kullanılan PMMA'ların moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırılması.

3.3 Hemouyumluluk Testi Sonuçları

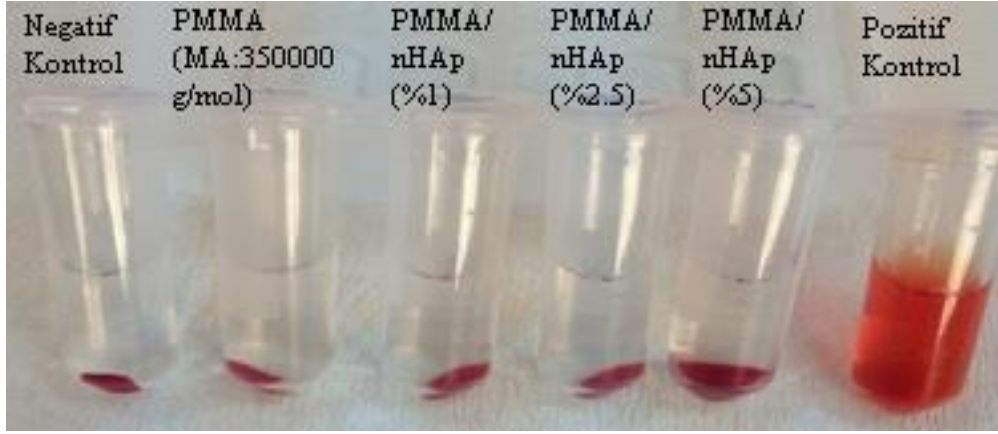
Nannokompozitler ile yapılan hemouyumluluk testi sonucunda hesaplanan % Hemoliz değerleri Tablo 3.2'de, hemouyumluluk testi sonuçlarının deney sonrası görüntüleri ise Şekil 3.44, 3.45 ve 3.46'da verilmiştir.

Tablo 3.2: Örneklerin hesaplanan % hemoliz değerleri.

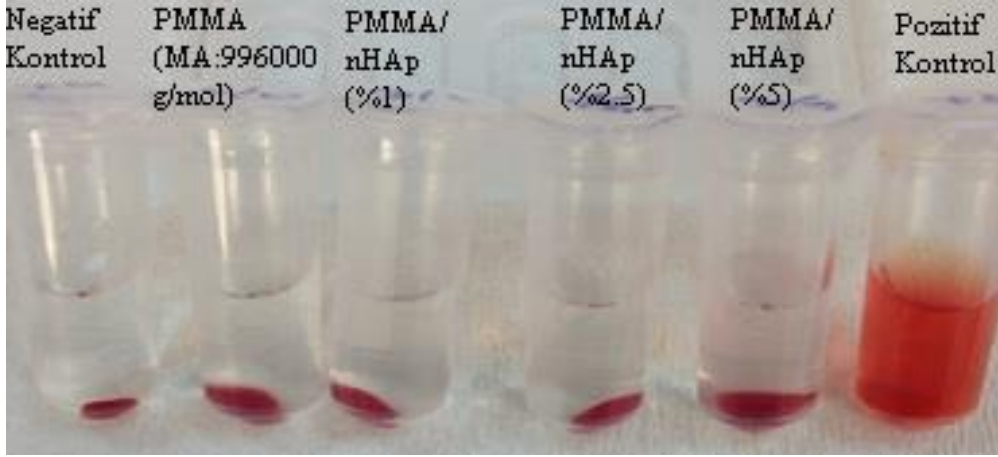
	% 0 HAp	%1 HAp	%2.5 HAp	%5 HAp
PMMA (M_A : 120000 g/mol)	0.0189	0.0354	0.1297	0.0802
PMMA (M_A : 350000 g/mol)	0.0684	0.2381	0.0896	0.2499
PMMA (M_A : 996000 g/mol)	0.3301	0.1485	0.0919	0.0919



Şekil 3.32: MA_{PMMA} = 120000 g/mol olan nanokompozitlerle inkübe edilmiş örneklerin hemouyumluluk testi sonucunda elde edilen santrifüj sonrası görüntüsü.



Şekil 3.33: MA_{PMMA} = 350000 g/mol olan nanokompozitlerle inkübe edilmiş örneklerin hemouyumluluk testi sonucunda elde edilen santrifüj sonrası görüntüsü.



Şekil 3.34: MA_{PMMA} = 996000 g/mol olan nanokompozitlerle inkübe edilmiş örneklerin hemouyumluluk testi sonucunda elde edilen santrifüj sonrası görüntüsü.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1 Nanokompozitlerin Karakterizasyon Sonuçları

4.1.1 XRD Analiz Sonuçları

XRD spektroskopisi kristal yapılı materyallerin atomik boyuttaki üçüncül yapısını tamamen aydınlatmak için kullanılan esas yöntemdir. X-ray kırınımı bir hizadaki X-Ray ışınlarının örnek üzerindeki kristal düzlemlere yansması olayıdır. Tipik olarak X-Ray'lerin geniş açılı elastik yayılımını esas alan XRD tekniği, kristalin boyutunu, şeklini ve yapısını karakterize etmek için kullanılan bir tekniktir [43].

Şekil 3.1'de nano hidroksiapatite ait XRD deseni ve Tablo 3.1'de bu desenden elde edilen veriler gösterilmektedir. Veriler ve grafik incelendiğinde kristalin yapıdaki nano hidroksiapatitin $2\theta = 30.91^\circ$, $2\theta = 31.59^\circ$, $2\theta = 32.54^\circ$, $2\theta = 39.42^\circ$ ve $2\theta = 46.37^\circ$ derecelerinde karakteristik pikleri görülmektedir [44]. Farklı konsantrasyonlarda dolgu malzemesi olarak kullanılan hidroksiapatit nanopartiküllerinin matriks ile etkileşimi ve matriks içerisindeki dispersiyonu bu karakteristik pikler incelenerek değerlendirilmektedir. Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4'de ise farklı moleküler ağırlıktaki PMMA polimerleri ile farklı konsantrasyonlarda nano hidroksiapatitlerden sentezlenen nanokompozitlere ait XRD desenleri gösterilmiştir. Saf polimerlerin karakteristik piklerinin olmadığı ve elde edilen desene bağlı olarak amorf yapıda polimerler oldukları tespit edilmiştir [45]. Tüm nanokompozitlerin XRD desenleri incelendiğinde ise herhangi bir kristalin faz gözlenmemiştir ve matriks benzeri desenler elde edilmiştir. Saf PMMA polimerlerinin XRD desenlerinin nHAp eklendikten sonra farklılaştığı gözlenmiştir. Nanokompozitlerin XRD desenlerinde hidroksiapatit nanopartiküllerine ait herhangi bir karakteristik pik gözlenmemiştir. Bu durum, sentezlenen nanokompozitlerin PMMA ve hidroksiapatit nanopartiküllerinden farklı yapılar olduğunu göstermektedir. Bu farklı malzemeler, nHAp'ın PMMA matriksinin aralarına girerek farklı konformasyonlar oluşturduğunu göstermektedir.

Turhan, Y. de aralanmış yapıdaki nanokompozitlerin XRD deseninde yeni bazal yansımaların ve dolayısıyla piklerin oluştuğunu belirtmiştir [18].

4.1.2 FTIR-ATR Analiz Sonuçları

FTIR-ATR analizi, IR spektroskopisi sistemini kullanmaktadır. IR spektroskopisinin, maddenin infrared ışınlarını absorblamasını esas aldığı ve elde edilen spektrumdaki karakteristik dalgaların, yoğunluk ve bant genişliklerinin moleküllerdeki fonksiyonel grupların ve farklı yapıların belirlenmesinde kullanılabilceği bilinmektedir [46]. FTIR-ATR ölçümleri 4000–650 cm^{-1} aralığında çekilmiştir. Şekil 3.5'te hidroksiapatit nano yapılarına ait spektrum verilmiştir. Nanohidroksiapatitin fonksiyonel gruplarını gösteren FTIR-ATR karakteristik dalga sayıları sırasıyla; 3572 cm^{-1} OH^- grubuna, 1455 ve 1415 cm^{-1} CO_3^{2-} grubuna 1084, 1020, 961, 874 ve 822 cm^{-1} pikleri PO_4^{3-} grubuna aittir [47].

PMMA polimerlerine ve tüm nanokompozitlere ait FTIR-ATR spektrumları Şekil 3.6–3.11'de görülmektedir. Saf polimerlerde görülen spektrum bandlarına ait fonksiyonel gruplar Tablo 4.1'de görülmektedir. Şekil 3.6, 3.8 ve 3.10 PMMA polimerlerinin FTIR spektrumlarını göstermektedir. C-O-C gerilme titreşimine ait olduğu düşünülen 1150 cm^{-1} 'den 1250 cm^{-1} 'e kadar bariz bir absorpsiyon bandı görülmektedir. 1386 cm^{-1} ve 750 cm^{-1} 'deki iki bant da α -metil gruplarının titreşimlerine aittir. 1064 cm^{-1} , 841 cm^{-1} ve 986 cm^{-1} 'deki bantlar da PMMA'nın karakteriksik absorpsiyon titreşimleridir. 1722 cm^{-1} 'deki bant akrilat karboksil grubunun varlığını göstermektedir. 1435 cm^{-1} 'deki bandın sebebi ise $-\text{CH}_3$ grubundaki C-H bağlarının eğilme titreşimidir. 2990 cm^{-1} ve 2950 cm^{-1} 'deki bantlar sırasıyla $-\text{CH}_3$ ve $-\text{CH}_2$ gruplarındaki C-H bağlarının gerilme titreşimlerine aittir. Ayrıca, 3437 cm^{-1} ve 1641 cm^{-1} 'de iki tane zayıf absorpsiyon bandı vardır ve bunlar fiziksel olarak adsorplanmış nemde bulunan $-\text{OH}$ grubunun gerilme ve eğilme titreşimlerine aittir. FTIR-ATR analizi sonucu elde edilen piklerin PMMA'nın karakteristik pikleri olduğu Duan, G. ve arkadaşları tarafından da doğrulanmıştır [48].

Tablo 4.1: PMMA'nın FTIR-ATR karakteristik pikleri.

Dalga Sayısı (cm⁻¹)	Fonksiyonel Grup
3675 – 2990	CH gerilme pikleri
1722	CO çift bağı gerilme pikleri
1393 – 1450	CH ₃ ve CH ₂ deformasyon pikleri
1269 – 1040	C-O-C tek bağı gerilme pikleri
892 - 960	C-O-C tek bağı deformasyon pikleri

Şekil 3.7, 3.9 ve 3.11’de gösterildiği gibi saf PMMA polimerleri ile sentezlenen nanokompozitlerin FTIR-ATR spektrumları karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Nanokompozitlerin spektrumları incelendiğinde artan dolgu maddesi miktarına bağlı olarak pik şiddetlerinde değişim ve yeni piklerin oluşumu gözlenmiştir. Şekil 3.7’de nanokompozitlerde 2902 cm⁻¹ dalga sayısında yeni bir pik gözlemlenmiştir. –CH grubuna ait olduğu düşünülen bu titreşiminin nanohidroksiapatit ve PMMA ile etkileşim sonucu oluştuğu düşünülmektedir. PMMA’ya (M_A: 120000 g/mol) ait 1386, 1064 ve 912 cm⁻¹’deki piklerinin nanokompozit spektrumlarında sırasıyla 1393, 1058 ve 910 cm⁻¹’e kaydığı ve saf PMMA’ya ait 2842 cm⁻¹’deki pikin yok olduğu tespit edilmiştir. Spektrumdaki değişiklikler matris ile dolgu maddesi arasında etkileşim olduğu anlamına gelmektedir. Şekil 3.9 incelendiğinde, saf PMMA’ya (M_A: 350000 g/mol) ait 3345, 1140, 1050 ve 808 cm⁻¹’deki piklerin nanokompozit spektrumlarında sırasıyla 3329, 1137, 1047 ve 805 cm⁻¹ dalga sayısına kaydığı tespit edilmiştir. Yine, Şekil 3.11’deki 960000 g/mol molekül ağırlığa sahip saf PMMA filmi incelendiğinde ise 1722 cm⁻¹ dalga sayısındaki pikin şiddeti artmıştır ve 1451 – 810 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında yer alan tüm pik şiddetlerinde değişimler meydana gelmiştir. Bu değişimlerin saf PMMA’ya ait –CH₃, –CH₂ ve C-O-C tek ve çift bağı grupları ile dolgu maddesindeki PO₄³⁻ grubu arasındaki etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.1.3 SEM Analiz Sonuçları

Taramalı elektron mikroskopu SEM, çeşitli büyütmelerde ve yüksek çözünürlüklerde görüntü alma tekniğidir. Bu teknik ile düşük büyütme değerlerinden yüksek büyütme değerlerine kadar morfolojik, yapısal ve elementel (EDX) bilgiler

elde edilebilmektedir. Bu çalışmada 10 kV potansiyel altında, çeşitli büyütme değerlerinde nanohidroksiapatitin ve nanokompozitlerin morfolojileri araştırılmıştır.

Şekil 3.12, yaklaşık 6000 büyütme oranlarında elde edilen nHAp örneklerine ait SEM fotoğrafını göstermektedir. Bu fotoğraflar nHAp küresel yapısını ve her bir nHAp küresinin nano ölçekli olduğunu doğrulamaktadır.

SEM fotoğrafları, polimer matrisi içinde dolgu maddelerinin dispersiyonu hakkında kesin sonuçlar verir. PMMA (M_A : 120000 g/mol)/nHAp (%1, %2.5, %5) nanokompozitlerine ait SEM fotoğrafları, Şekil 3.13-3.15’de verilmektedir. Şekil 3.16, 3.17 ve 3.18 ise PMMA (M_A : 350000 g/mol)/nHAp (%1, %2.5, %5) nanokompozitlerine aittir. Ayrıca Şekil 3.18-3.21’de 996000 g/mol molekül ağırlığına sahip PMMA polimeri ile hazırlanan nanokompozitlere ait SEM görüntülerini göstermektedir. Yaklaşık 6000 büyütmedeki bu fotoğraflardan görüldüğü gibi nHAp, PMMA matrisinde homojen bir şekilde dağılmaktadır. Bu fotoğraflardaki aydınlık beyaz küreler nHAp’ı, koyu katlı bölgeler polimeri göstermektedir.

SEM fotoğraflarındaki aydınlık kürelerin büyümesi üst üste gelen nHAp yığınlarından dolayıdır. Daha küçük küreler dolgu maddesinin daha küçük boyutta dağıldığını ifade eder. Sonuç olarak çeşitli molekül ağırlıklı PMMA ve nHAp ile hazırlanan nanokompozitlerin SEM fotoğraflarından dolgu maddesinin polimer matrisi içerisinde homojen bir şekilde ve nano boyutta dağıldığı görülmektedir.

4.2 Sitotoksosite Test Sonuçları

Bu çalışmada, sentezlenen nanokompozitler sağlıklı, gönüllü bireylerin kanından taze olarak izole edilen lenfosit hücreleriyle, belirlenen sürelerde inkübe edilmiş ve hücrelerin yaşamlılığında herhangi bir değişimin olup olmadığı araştırılmıştır.

Şekil 3.22’de sentezlenen nanokompozitlerin inkübasyon periyotları sonrasında gerçekleştirilen asit fosfataz testi sonucunda verdikleri absorbanslar görülmektedir. Absorbans değerleri tüm örnekler için birbirine çok yakındır ancak saf PMMA ile etkileşen örneklerin negatif kontrole göre daha az absorbans verdiği görülmektedir. Bunun yanında, tüm nanokompozitlerin 24, 48 ve 96 saatlik

inkübasyonu sonunda nHAp eklenmiş örneklerin absorbands değerinde hidroksiapatitin konsantrasyonuyla doğru orantılı bir artış görülmektedir. %5 nHAp eklenmesi sonucunda negatif kontrolle elde edilen absorbands değeri tekrar elde edilmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonrasında da nHAp eklenmiş örnekler saf PMMA'ya oranla daha yüksek absorbands vermişlerdir. Ancak, 72. saat sonunda % 2.5 nHAp eklenmiş örneklerin % 5 nHAp eklenmiş olan örneklere göre daha yüksek absorbands verdiği görülmektedir. Ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Tüm örneklerin asit fosfataz testi sonucu verdikleri absorbandslar, nHAp eklenen nanokompozitlerde hücre yaşamlılığının arttığını göstermektedir. % 5 nHAp eklemenin absorbandsı negatif kontrolle aynı seviyeye çıkarmış olması da hidroksiapatitin PMMA'nın az da olsa sebep olduğu toksisiteyi ortadan kaldırdığını ortaya koymaktadır. Moleküler ağırlıkların farkına göre bir karşılaştırma yapıldığında ise moleküler ağırlığı 120000 g/mol olan PMMA'nın kullanıldığı nanokompozitlerde tüm nHAp konsantrasyonları için 24, 48 ve 96. saatlerin sonunda en yüksek absorbands görülmektedir (Şekil 3.23 - 3.26).

Negatif kontrol gruplarında ve tüm örneklerde asit fosfataz testlerinde 72. ve 96. saatlere bakıldığında absorbandsın gitgide azaldığı görülmektedir. JuLI ile yapılan % canlılık oranları için de benzer sonuçlar gözlenmiştir. Bunun nedeni ise, primer lenfosit hücrelerinin kültür ortamındaki yaşamlılığının kısıtlı olmasıdır [49]. Şekil 3.27'de sentezlenen nanokompozitlerin inkübasyon periyotları sonrasında JuLI cihazı ile yapılan analiz sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre % 1, % 2,5 ve % 5 nanohidroksiapatit oranlarının hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sebep olduğu ve nHAp'ın hücre canlılığını tek başına PMMA'ya oranla arttırdığı açıkça görülmektedir ($p<0.05$). Literatürde de PMMA'nın kemik çimentosunda getirdiği dezavantajların hidroksiapatit eklenmesiyle giderilebileceği belirtilmektedir [50]. Moleküler ağırlıkların farkına göre bir karşılaştırma yapıldığında tüm inkübasyon periyotları için örneklerde en çok hücre canlılığının moleküler ağırlığı 120000 g/mol olan PMMA'nın kullanıldığı nanokompozitlerde devam ettiği tespit edilmiştir (Şekil 3.28 – 3.31). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar literatürdeki sonuçlarla uygunluk göstermektedir. Örneğin, Tihan T. G. ve arkadaşları MTT testi ile diş eti hücrelerinde yaptıkları çalışmalarda hidroksiapatit eklemenin hücre yaşamlılığını arttırıcı etkisi olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar, saf PMMA içeren örneklerde canlılık oranını % 81.42 olarak bulurken, % 5'lik hidroksiapatit eklenmiş

PMMA kompozitleri ile inkübe ettikleri diş eti hücrelerinde canlılık oranını % 90.48 olarak tespit etmişlerdir. % 10 hidroksiapatit eklenmiş kompozitlerde ise canlılık oranının % 74.88'e düştüğü gözlenmiştir. Bu sonucu seramik materyal içeriğinin artmasıyla hidrofilik özelliğın artması ve buna bağılı olarak hücre büyümesi ve proliferasyonu için gerekli olan ortamın elverişsiz hale gelmesi ile açıklamışlardır [32]. Zhang J. ve arkadaşları da uyguladıkları MTT testi sonucunda, %30'luk ve %40'lık hidroksiapatit eklenen PMMA/Hidroksiapatit nanokompozitlerinin hücre yaşamlılığını arttırdığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, PMMA'ya nano hidroksiapatitin eklenmesiyle sitouyumluluğunun arttığını rapor etmişlerdir [50]. Moursi ve arkadaşları ise osteoblastlar ile yaptıkları çalışmada alamar mavisi testi sonucunda PMMA/Hidroksiapatit kompozitinin osteoblast hücrelerinin çoğalmasının tek başına PMMA'ya oranla daha fazla olduğunu bulmuşlardır ve kompozite eklenen hidroksiapatitin bu çoğalmayı teşvik ettiğı sonucuna ulaşmışlardır [51]. Khandeker ve arkadaşları magnezyum oksit, hidroksiapatit, kitosan, baryum sülfat ve silika gibi dolgu maddelerinin PMMA'nın mekanik, termal ve hücre fonksiyonlarındaki performansına olan etkilerini araştırmışlardır. Osteoblastlarla yaptıkları çalışmada hidroksiapatitin ve diğeri tüm dolgu maddelerinin eklenmesi sonucu hücre yoğunluğunun arttığını bulmuşlardır [33]. Dalby M.J. ve arkadaşları % 0, 4.6 ve 8.8'lik hidroksiapatit eklenen PMMA disklerinin osteoblastların çoğalması ve farklılaşmasını [3H]-thymidine testi ve alkalın fosfataz aktivitelerine göre araştırmışlardır. Araştırmacılar, saf PMMA ile örnekleri karşılaştırdıklarında hidroksiapatit eklemenin total DNA miktarında artışa sebep olduğunu bulmuşlardır. Ancak % 4.6 ve % 8.8'lik örnekler arasında önemli bir fark elde etmemişlerdir. Araştırmacılar alkalın fosfataz aktivitesinde de hidroksiapatit eklendikten sonra saf PMMA'ya oranla bir artış olduğunu fakat % 4.6 ve % 8.8'lik örneklerde bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir [52].

4.3 Hemouyumluluk Test Sonuçları

Tablo 3.2'de tüm örneklerin hemoliz testi sonucunda 545 nm'de elde edilen absorbansları sonucu hesaplanan % hemoliz değerleri verilmiştir. Shanthini G. ve arkadaşları materyallerin sebep oldukları hemoliz oranlarını % 5'ten küçük ise oldukça

hemouyumlu, % 10'a kadar hemouyumlu ve % 20'den fazla ise hemouyumlu olmayanlar olarak sınıflandırmışlardır [53]. Tablo 3.2'deki değerlere bakıldığında tüm moleküler ağırlıkları için PMMA/Hidroksiapatit nanokompozitlerinin % hemoliz değerleri % 0.5'ten küçüktür. Buna bağlı olarak bu çalışmada sentezlenen tüm nanokompozitler oldukça hemouyumlu materyaller sınıfına dahil edilebilirler. Bu sonuçlar daha önceki çalışmalarla uyum içindedir. Çünkü, PMMA'nın oldukça biyouyumlu ve hemouyumlu olduğu ve bu özellikleri sebebiyle kan pompaları ve diyaliz makinalarında kullanıldığı bilinmektedir [54]. Eklenen nHAp'ın hemouyumlu olması da beklenen bir sonuçtur. Radha ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlardaki nHAp'ın ve nHAp/aliminyum kompozitlerinin hemolize sebep olup olmadığını araştırmışlardır. Araştırmacılar tek başına nHAp'ın farklı konsantrasyonlarında önemli bir hemolitik etki gözlemlenmediğini, ancak aliminyum eklenen örneklerde hafif de olsa lizinin görüldüğünü belirtmişlerdir [55].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma ile,

1. XRD desenleri ve SEM görüntüleri, nHAp nanopartiküllerinin PMMA polimeri içerisinde disperse olduğunu ve nanokompozit oluşumunun meydana geldiğini göstermektedir.
2. FTIR-ATR cihazından elde edilen nanokompozitlere ait spektrumlar, PMMA'nın IR spektrumu ile kıyaslandığında matriks ile dolgu maddesi arasında bir etkileşim olduğunu, yeni piklerin oluşup bazı piklerde de kaymalar gözlemlendiğini ortaya koymuştur.
3. Eklenen nanohidroksiapatitin tüm PMMA/Nanohidroksiapatit nanokompozitlerinin biyoyumluluğunu tek başına PMMA'ya oranla arttırdığı bulunurken, kütlece %5 nanohidroksiapatit eklenmiş nanokompozitlerde % canlılık oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.
4. Moleküler ağırlığı 120000 g/mol olan PMMA'nın kullanıldığı PMMA/Nanohidroksiapatit nanokompozitlerinde en yüksek % canlılık oranı görülmüştür.
5. Polimerlerin molekül ağırlıklarının hemoyumluluğu etkilemediği ve sentezlenen tüm PMMA/Nanohidroksiapatit nanokompozitlerinin oldukça hemoyumlu olduğu bulunmuştur.

In vitro olarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada farklı moleküler ağırlıktaki PMMA'ların kullanıldığı PMMA/Nanohidroksiapatit nanokompozitlerinin biyoyumlu olduğu ve kültür ortamındaki hücrelerde hiçbir toksik etkisinin bulunmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] International Organization for Standardization, “ISO 22803:2004(en)”, (2004).
- [2] Marois, Y. and Guidoin, R., “Biocompatibility of polyurethanes”, *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*, Landes Bioscience, (2000).
- [3] Jiang, B., Akar, B., Waller, T. M., Larson, J. C., Appel, A. A. and Brey, E. M., “Design of a composite biomaterial system for tissue engineering applications”, *Acta Biomater.*, 10, 1177–1186, (2013).
- [4] Srivastav, A., “An overview of metallic biomaterials for bone support and replacement”, (ed: Laskovski, A. N.) *Biomed. Eng. Trends Mater. Sci.*, InTech 153–168, (2011).
- [5] Navarro, M., Michiardi, A., Castaño, O. and Planell, J. A., “Biomaterials in orthopaedics”, *J. R. Soc. Interface*, 5 (July), 1137–1158, (2008).
- [6] Yoruç, B. A. H. and Şener, C. B., “Biomaterials”, *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*, Kara, P.S., Ed. InTech, (2012).
- [7] Serbetci, K., Orhun, S., Korkusuz, F. ve Hasirci, N., “Hidroksiapatit içeren kemik çimentosunun in-vivo biyouyumluluğu”, *J. Arthroplast. Arthrosc. Surg.*, 13 (4), 259–263, (2002).
- [8] Viano, A. M., Auwarter, J. A., Rho, J. Y. and Hoffmeister, B. K., “Ultrasonic characterization of the curing process of hydroxyapatite-modified bone cement”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 56 (4), 593–599, (2001).
- [9] Oujı, H. A. A., “Polistren/magnezyum hidroksit nanokompozit sentezi ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, (2013).
- [10] Breitbart, A. S. and 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).
- [11] Duval-Terrié, C. and Lebrun, L., “Polymerization and characterization of PMMA. Polymer chemistry laboratory experiments for undergraduate students”, *J. Chem. Educ.*, 83 (3), 443, (2006).
- [12] Liu, T. Y., Chen, S. Y. and Liu, D. M., “Influence of the aspect ratio of bioactive nanofillers on rheological behavior of PMMA-based orthopedic materials”, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 71 (1), 116–122, (2004).
- [13] Polat, Y., “Influence of halloysite nanotubes on the mechanical and thermal properties of epdm nanocomposites”, M.Sc. Thesis, *Istanbul Technical University Graduate School Of Science Engineering And Technology*, Polymer Science and Technology Programme, Istanbul, (2014).

- [14] Hussain, F., Hojjati, M., Okamoto, M. and Gorga, R. E., "Polymer-matrix nanocomposites, processing, manufacturing, and application: an overview", *J. Compos. Mater.*, 40 (17), 1511–1575, (2006).
- [15] Kocer, B., "Al-montmorillonit/Poli(metil metakrilat) nanokompozitlerinin sentezi ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Balikesir Universitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2013).
- [16] Camargo, C.H.P., Satyanarayana, K.G. and Wypych, F., "Nanocomposites : synthesis , structure , properties and new application opportunities", *Mater. Res.*, 12 (1), 1–39, (2009).
- [17] Turhan, Y., "Kil/Polivinil türevleri nanokompozitlerinin sentezi ve karakterizasyonu", Doktora Tezi, *Balikesir Universitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir (2010).
- [18] Sudagidan, M., "Test of biomaterials in biological systems", M.Sc. Thesis, *Izmir Institute of Technology Department of Biotechnology and Bioengineering*, Biotechnology Programme, Izmir, (2001).
- [19] Nel, A., Xia, T., Mädler, L. and Li, N., "Toxic potential of materials at the nanolevel", *Science*, 311 (5761), 622–627, (2006).
- [20] Saini, M., Singh, Y., Arora, P., Arora, V. and Jain, K., "Implant biomaterials: A comprehensive review", *World J. Clin. cases*, 3 (1), 52–7, (2015).
- [21] Antoni, D., Burckel, H., Josset, E. and Noel, G., "Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo", *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 5517–5527, (2015).
- [22] Ekwall, B., Silano, V. and Zucco, F., "Toxicity tests with mammalian cell cultures", *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects*, Bordeau, P. Ed., 75–98, (1990).
- [23] Riss, T. L., Moravec, R. A. and Niles, A. L., "Cytotoxicity testing: Measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death", *Methods in molecular biology*, 740, 103–114, (2011).
- [24] Yang, T. T., Sinai, P. and Kain, S. R., "An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells", *Anal. Biochem.*, 241 (1), 103–8, (1996).
- [25] Geno Technology, "Phosphatase assay [Online]", (21 March 2015) <http://www.gbiosciences.com/ResearchProducts/PhosphataseAssay-desc.aspx>, (2014).
- [26] NanoEnTek, "JuLI counting introduction [Online]", (15 March 2015), <http://www.nanoentek.com/product.php?id=21>, (2012).
- [27] Strober, W., "Trypan blue exclusion test of cell viability", *Curr. Protoc. Immunol.*, Appendix 3, Appendix 3B, (2001).

- [28] Sanak, M., Jakiela, B. and Węgrzyn, W., “Assessment of hemocompatibility of materials with arterial blood flow by platelet functional tests”, *Bull. Polish Acad. Sci. Tech. Sci.*, 58 (2), 317–322, (2010).
- [29] Sowemimo-Coker, S. O., “Red blood cell hemolysis during processing”, *Transfus. Med. Rev.*, 16 (1), 46–60, (2002).
- [30] 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).
- [31] Poplawski, T., Pawlowska, E., Wisniewska-Jarosinska, M., Ksiazek, D., Wozniak, K., Szczepanska, J. and Blasiak, J., “Cytotoxicity and genotoxicity of glycidyl methacrylate”, *Chem. Biol. Interact.*, 180 (1), 69–78, (2009).
- [32] Tihan, T. G., Ionita, M. D., Popescu, R. G. and Iordachescu, D., “Effect of hydrophilic–hydrophobic balance on biocompatibility of poly(methyl methacrylate) (PMMA)–hydroxyapatite (HA) composites”, *Mater. Chem. Phys.*, 118 (2–3), 265–269, (2009).
- [33] Khandaker, M., Vaughan, M.B., Morris, T.L., White, J.J. and Meng, Z., “Effect of additive particles on mechanical , thermal , and cell functioning properties of poly (methyl methacrylate) cement”, *Int. J. Nanomedicine*, 9, 2699–2712, (2014).
- [34] Iz, S. G., Gurhan Deliloglu, S. I., Sen, B. H., Endogan, T. and Hasirci, N., “Comparison of in vitro cytotoxicity and genotoxicity of MMA-based polymeric materials and various metallic materials”, *Turkish J. Med. Sci.*, 40 (6), 905–916, (2010).
- [35] Itokawa, H., Hiraide, T., Moriya, M., Fujimoto, M., Nagashima, G., Suzuki, R. and Fujimoto, T., “A 12 month in vivo study on the response of bone to a hydroxyapatite polymethylmethacrylate cranioplasty composite”, *Biomaterials*, 28 (33), 4922–4927, (2007).
- [36] Rao, M., Su Q., Liu, Z., Liang, P., Wu, N., Quan, C. and Jiang, Q., “Preparation and characterization of a poly(methyl methacrylate) based composite bone cement containing poly(acrylate-co-silane) modified hydroxyapatite nanoparticles”, *J. Appl. Polym. Sci.*, 131 (15), 40587–40587, (2014).
- [37] Turkez, H., Yousef, M. I., Sönmez, E., Togar, B., Bakan, F., Sozio, P. and Di Stefano, A., “Evaluation of cytotoxic, oxidative stress and genotoxic responses of hydroxyapatite nanoparticles on human blood cells”, *J. Appl. Toxicol.*, 34 (4), 373–379, (2014).
- [38] Chow, W. S., Ng, K., Mohd Ishak, Z. A., Hashim, H. and Mohd Noor, S. N. F., “Human gingival fibroblasts cell viability of poly(lactic acid) powder reinforced PMMA/Hydroxyapatite biocomposites”, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, 64 (4), 192–197, (2014).

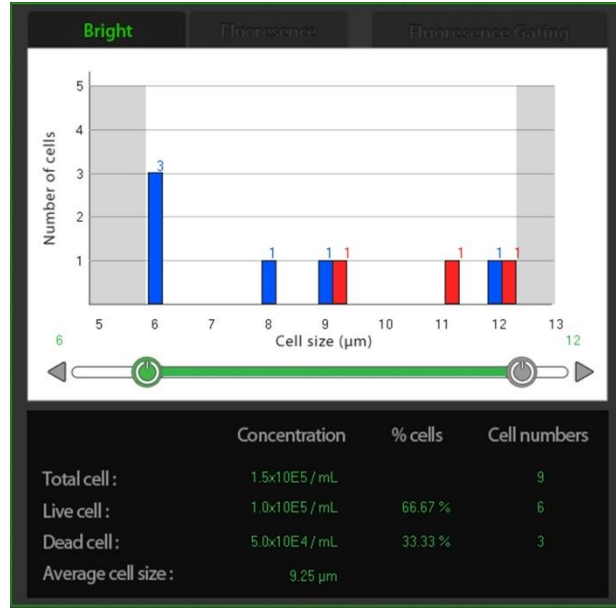
- [39] Dalby, M. J., Di Silvio, L., Harper, E. J. and Bonfield, W., “Initial interaction of osteoblasts with the surface of a hydroxyapatite-poly (methylmethacrylate) cement”, *Biomaterials*, 22 (2001), 1739–1747, (2001).
- [40] Marsh, J. A. and Kendall, M. D., *The physiology of immunity*. Boca Raton [u.a.] : CRC Press, 464, (1996).
- [41] 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.*, 45 (2), 133–139, (1999).
- [42] Motlagh, D., Allen, J., Hoshi, R., Yang, J., Lui, K. and Ameer, G., “Hemocompatibility evaluation of poly(diols citrate) in vitro for vascular tissue engineering”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 82 (4), 907–916, (2007).
- [43] Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C. and Sridhar, R., “Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials”, *Biotechnol. Adv.*, 32, 711–726, (2014).
- [44] Ragu, A., Senthilarasan, K. and Sakthivel, P., “Synthesis and characterization of nano hydroxyapatite with poly vinyl pyrrolidone nano composite for bone tissue regeneration”, *Int. J. Eng. Res. Appl.*, 4 (7), 50–54, (2014).
- [45] Shobhana, E., “X-Ray diffraction and UV-visible studies of PMMA thin films”, *Int. J. Mod. Eng. Res.*, 2 (3), 1092–1095, (2012).
- [46] Albayrak, G., “Halofilik arkea ve bakteria identifikasyonunda FT-IR kullanımı”, Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İleri Teknolojiler Anabilim Dalı*, Eskişehir, (2010).
- [47] Cengiz, B., “Hidroksiapatit nanoparçacıklarının sentezi”, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı*, Ankara, (2007).
- [48] Duan, G., Zhang, C., Li, A., Yang, X., Lu, L. and Wang, X., “Preparation and characterization of mesoporous zirconia made by using a poly (methyl methacrylate) template”, *Nanoscale Res. Lett.*, 3, 118–122, (2008).
- [49] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J., “Growth of animal cells in culture”, *Molecular Cell Biology*, New York: W. H. Freeman, (2000).
- [50] 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).
- [51] Moursi, A.M., Winnard, A.V., Winnard, P.L., Lannutti, J.J. and Seghi, R.R., “Enhanced osteoblast response to a polymethylmethacrylate – hydroxyapatite composite”, *Biomaterials*, 23 (1), 133–144, (2002).

- [52] Dalby, M. J., Di Silvio, L., Harper, E. J. and Bonfield, W., “Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response”, *Biomaterials*, 23 (2), 569–576, (2002).
- [53] Shanthini, G. M., Ann, C., Sakthivel, N., Chandra, S., Elayaraja, K., Lakshmi, B. S., Asokan, K., Kanjilal, D. and Kalkura, S. N., “Physical and biological properties of the ion beam irradiated PMMA-based composite films”, *Appl. Surf. Sci.*, 329, 116–126, (2015).
- [54] Hacker, M. C. and Mikos A. G., “Synthetic polymers”, *Principles of Regenerative Medicine*, A. Atala, R. Lanza, R. Nerem, and J. A. Thomson, Eds. Academic Press, 604–635, (2011).
- [55] Radha, G., Balakumar, S., Venkatesan, B. and Vellaichamy, E., “Evaluation of hemocompatibility and in vitro immersion on microwave-assisted hydroxyapatite–alumina nanocomposites”, *Mater. Sci. Eng. C*, 50, 143–150, (2015).

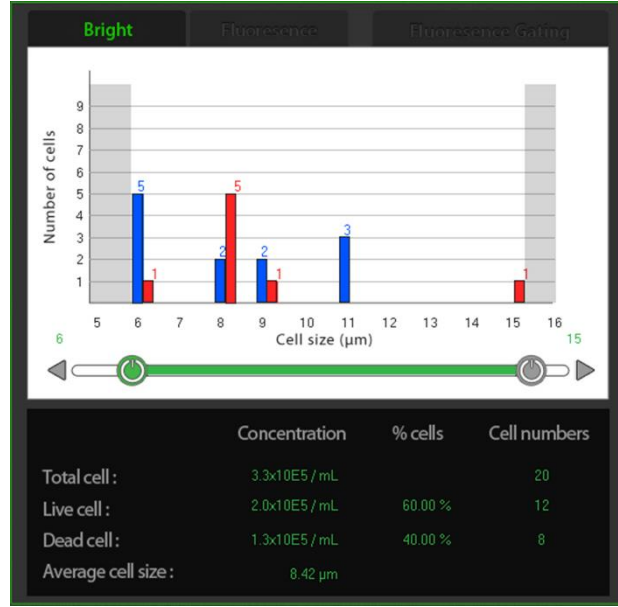
EKLER

EKLER

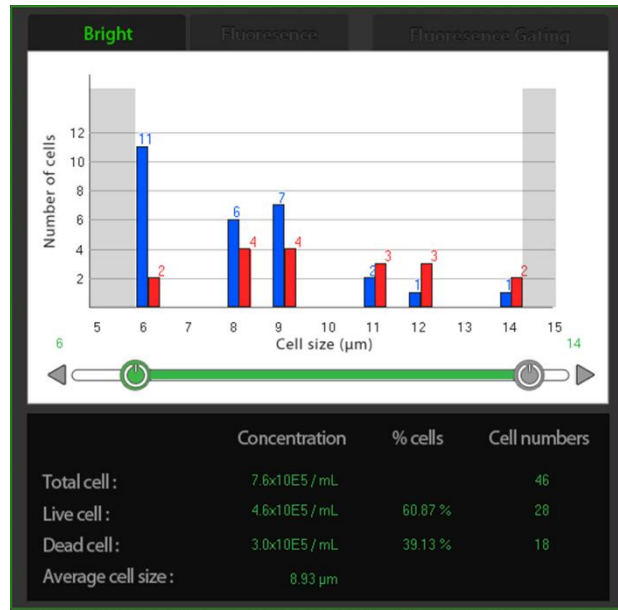
EK A JuLI Grafikleri



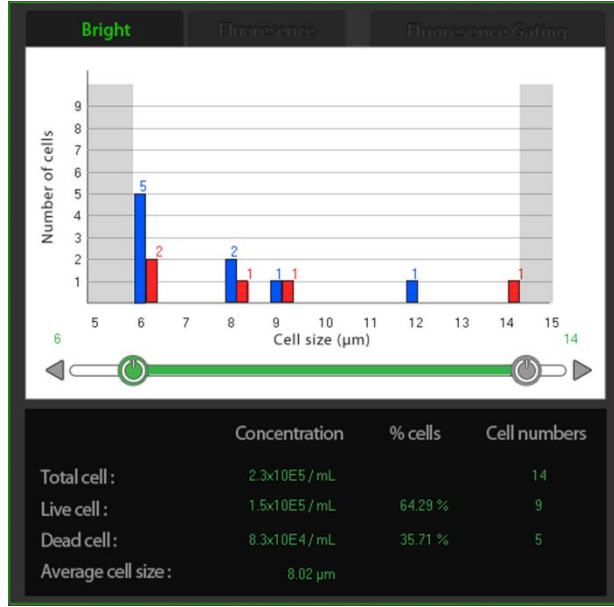
Şekil A.1: 24 saat sonunda hiçbir nanokompozit ile inkübe edilmemiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu (Negatif Kontrol).



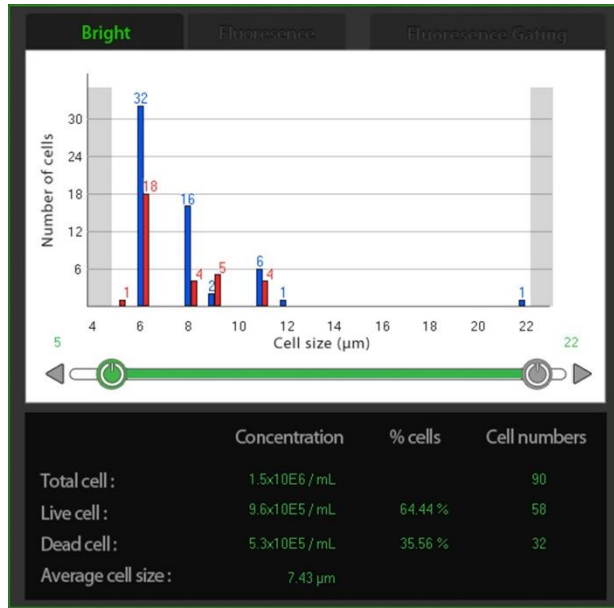
Şekil A.2: 24 saat sonunda tek başına PMMA (MA = 120000 g/mol) ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



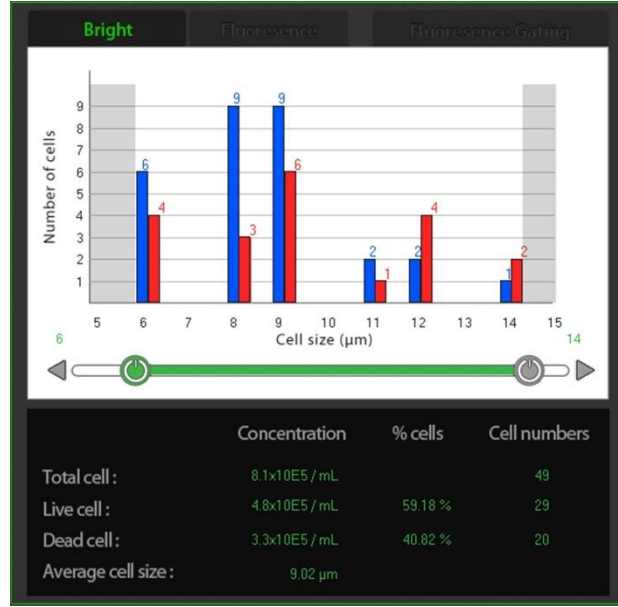
Şekil A.3: 24 saat sonunda PMMA (MA = 120000 g/mol)/ HAp (%1) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



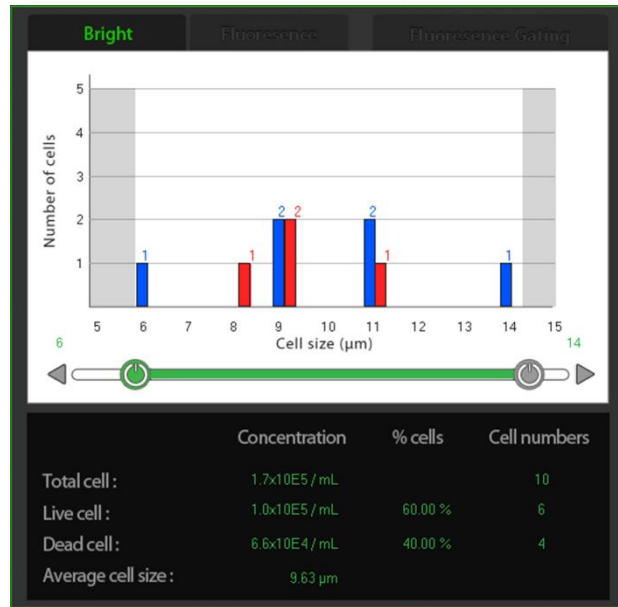
Şekil A.4: 24 saat sonunda PMMA (MA = 120000 g/mol)/ HAp (% 2,5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



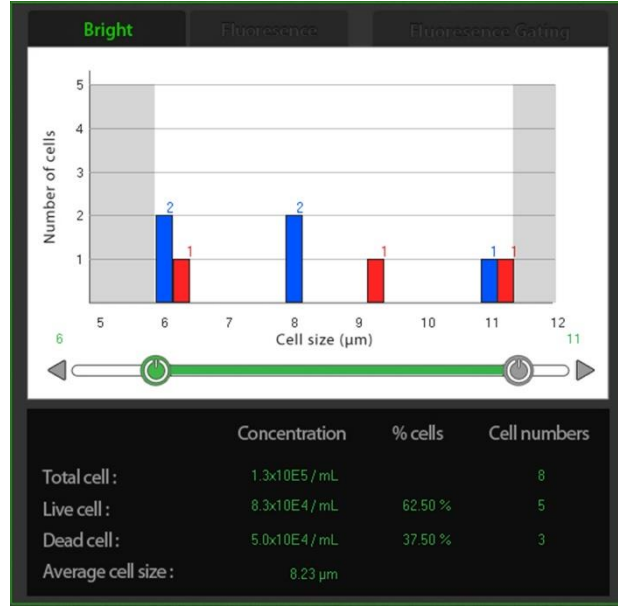
Şekil A.5: 24 saat sonunda PMMA (MA = 120000 g/mol)/ HAp (%5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



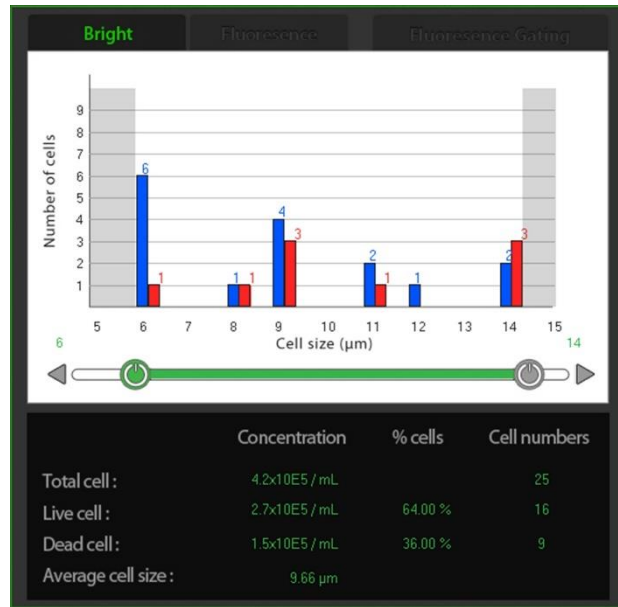
Şekil A.6: 24 saat sonunda tek başına PMMA (MA = 350000 g/mol) ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



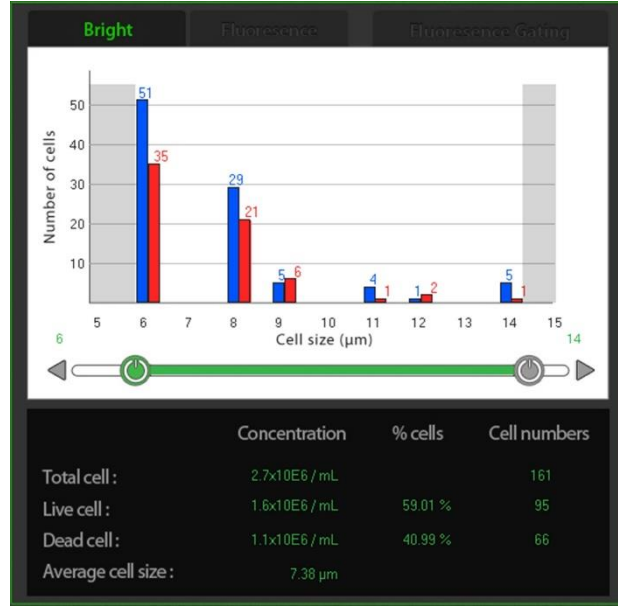
Şekil A.7: 24 saat sonunda PMMA (MA = 350000 g/mol)/ HAp (% 1) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



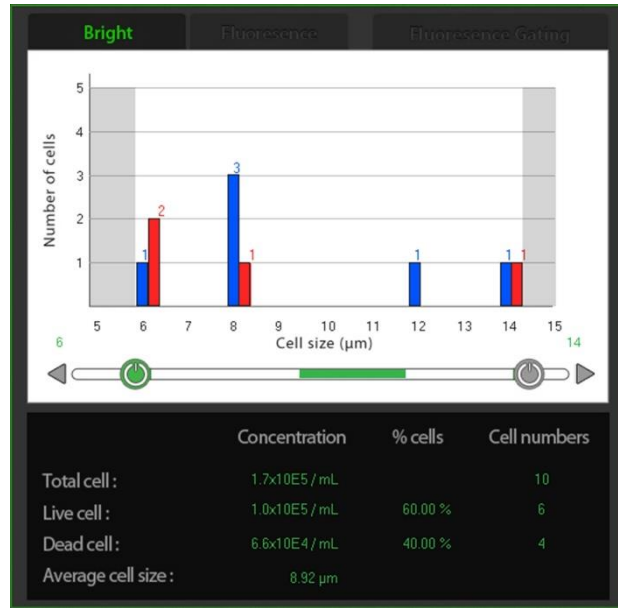
Şekil A.8: 24 saat sonunda PMMA (MA = 350000 g/mol)/ HAp (%2,5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



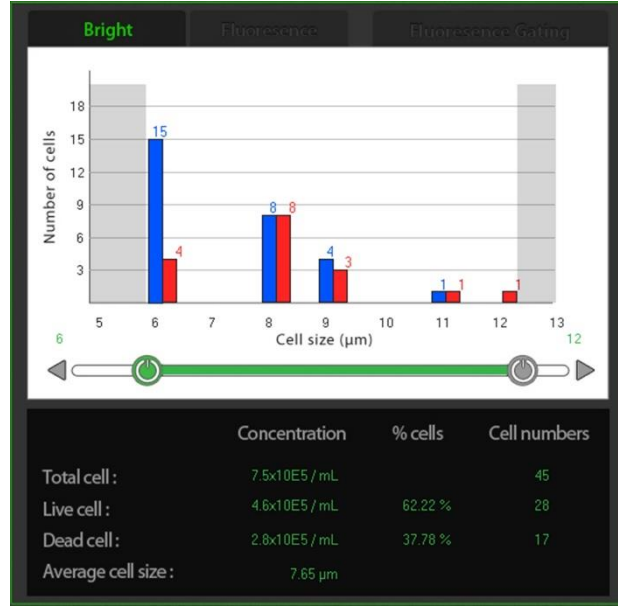
Şekil A.9: 24 saat sonunda PMMA (MA = 350000 g/mol)/ HAp (%5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



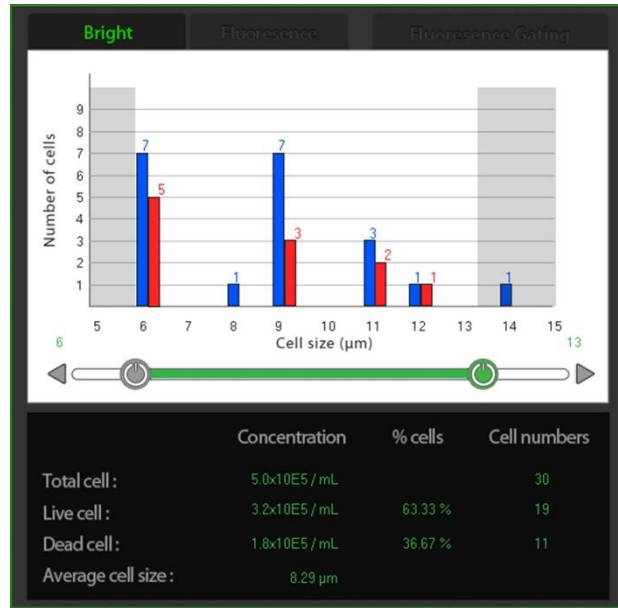
Şekil A.10: 24 saat sonunda tek başına PMMA (MA = 996000 g/mol) ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



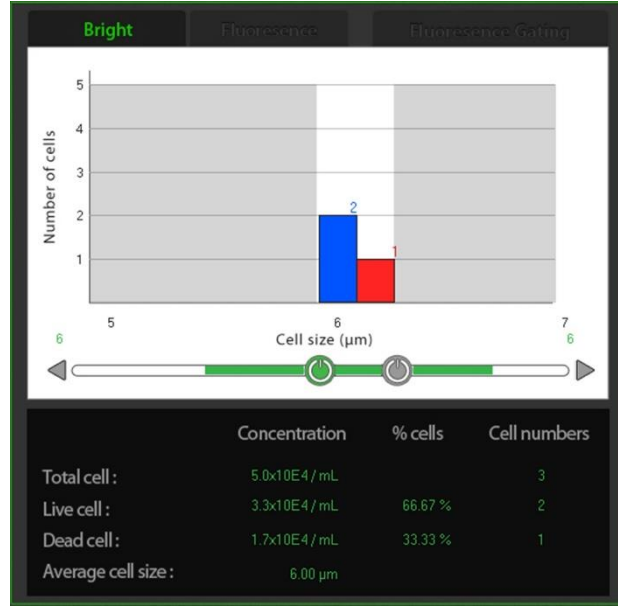
Şekil A.11: 24 saat sonunda PMMA (MA = 996000 g/mol)/ HAp (%1) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



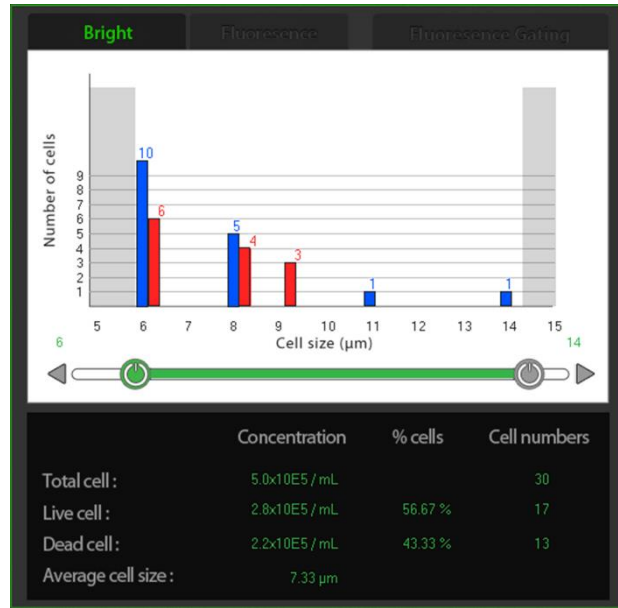
Şekil A.12: 24 saat sonunda PMMA (MA = 996000 g/mol)/ HAp (%2,5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



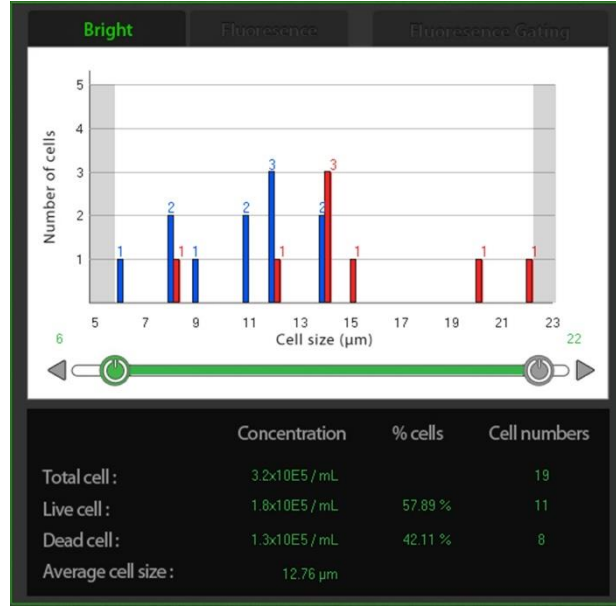
Şekil A.13: 24 saat sonunda PMMA (MA = 996000 g/mol)/ HAp (%5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



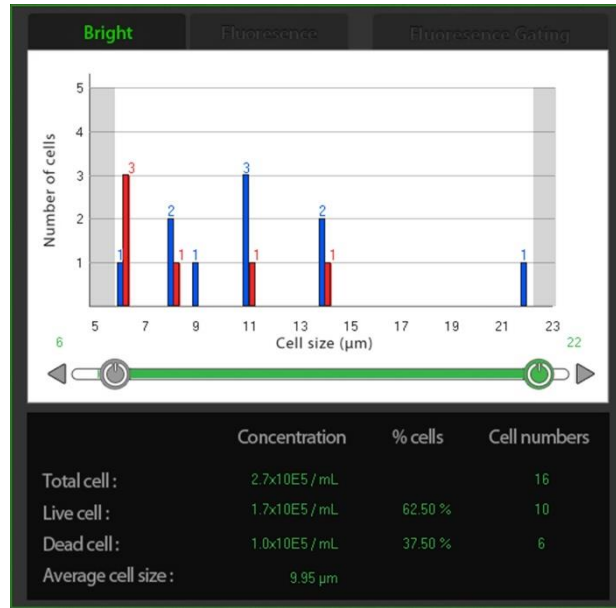
Şekil A.14: 48 saat sonunda hiçbir nanokompozit ile inkübe edilmemiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu (Negatif Kontrol).



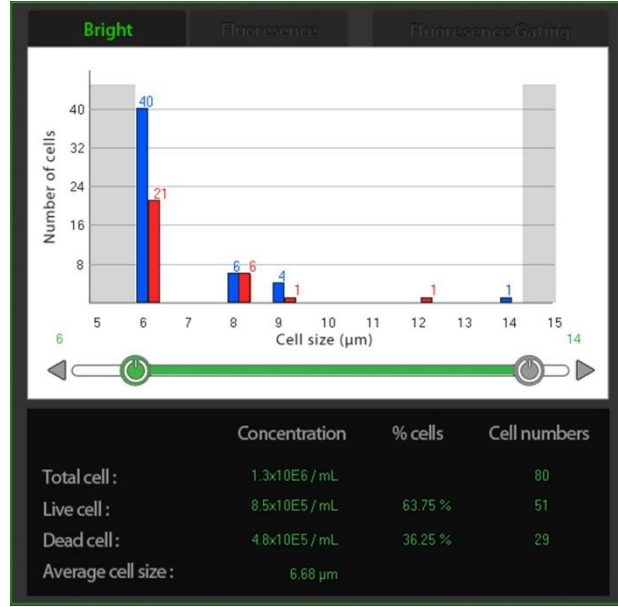
Şekil A.15: 48 saat sonunda tek başına PMMA (MA = 120000 g/mol) ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



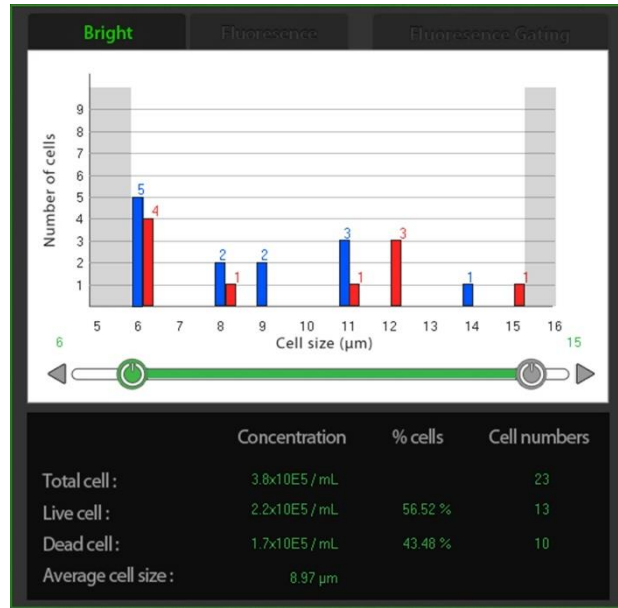
Şekil A.16: 48 saat sonunda PMMA (MA=120000 g/mol)/ HAp (%1) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



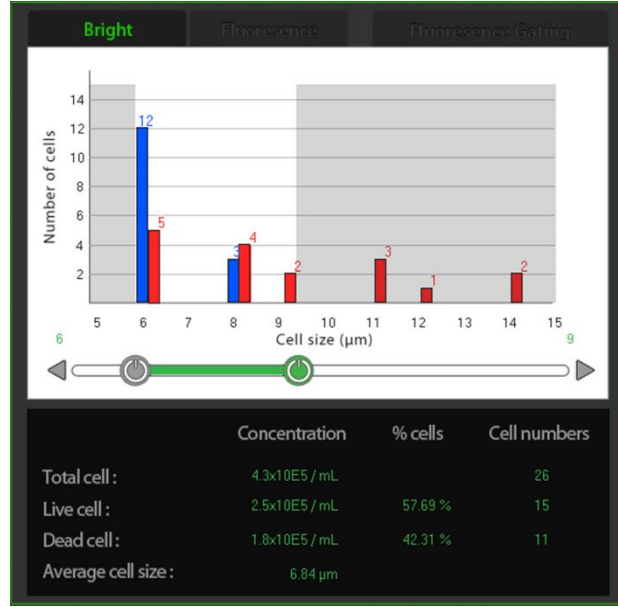
Şekil A.17: 48 saat sonunda PMMA (MA=120000 g/mol)/ HAp (%2,5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



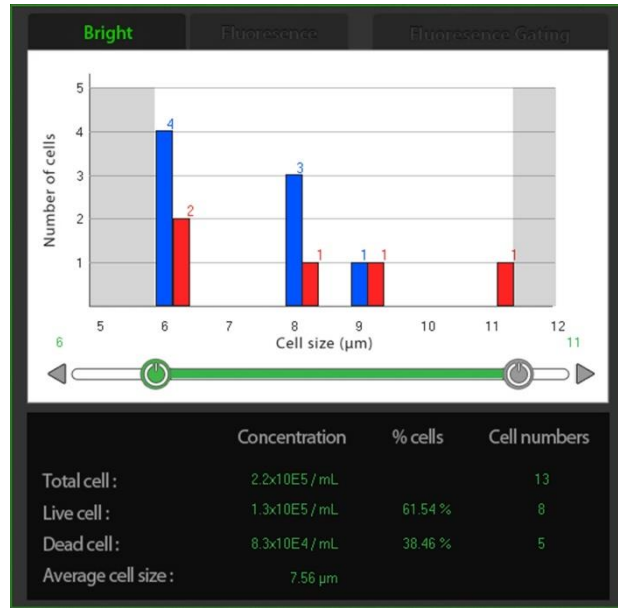
Şekil A.18: 48 saat sonunda PMMA (MA=120000 g/mol)/ HAp (%5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



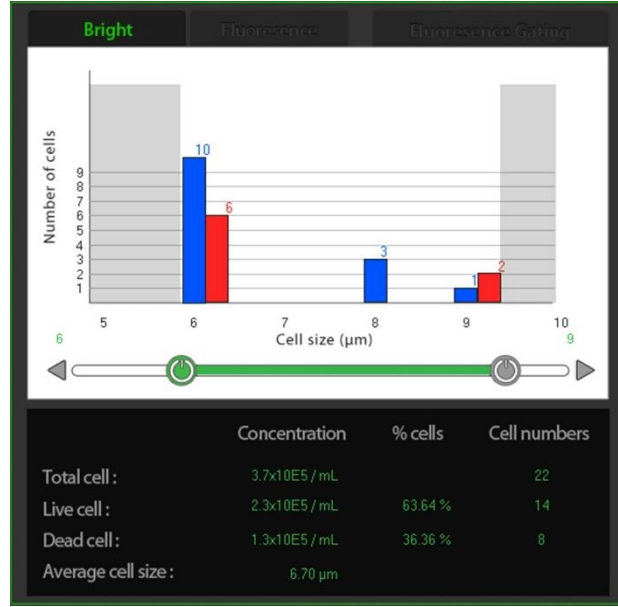
Şekil A.19: 48 saat sonunda tek başına PMMA (MA = 350000 g/mol) ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



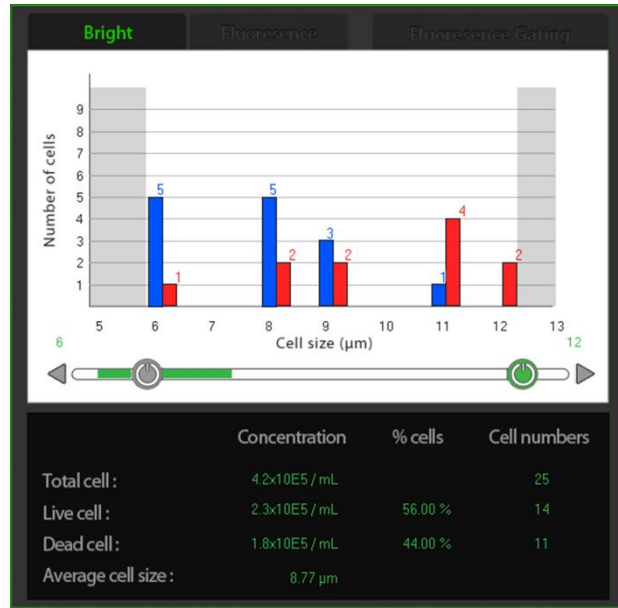
Şekil A.20: 48 saat sonunda PMMA (MA=350000 g/mol)/ HAp (%1) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



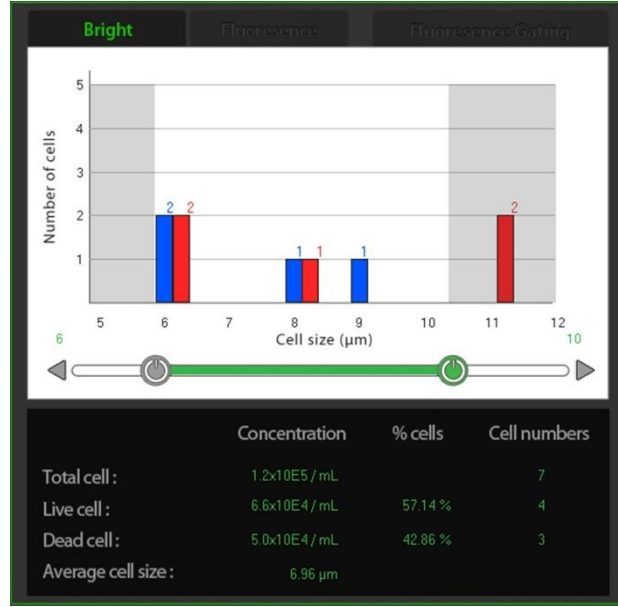
Şekil A.21: 48 saat sonunda PMMA (MA=350000 g/mol)/ HAp (%2,5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



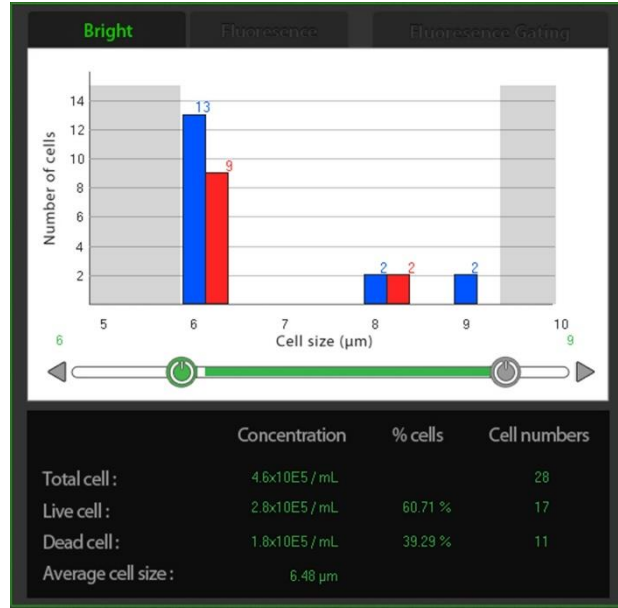
Şekil A.22: 48 saat sonunda PMMA (MA=350000 g/mol)/ HAp (%5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



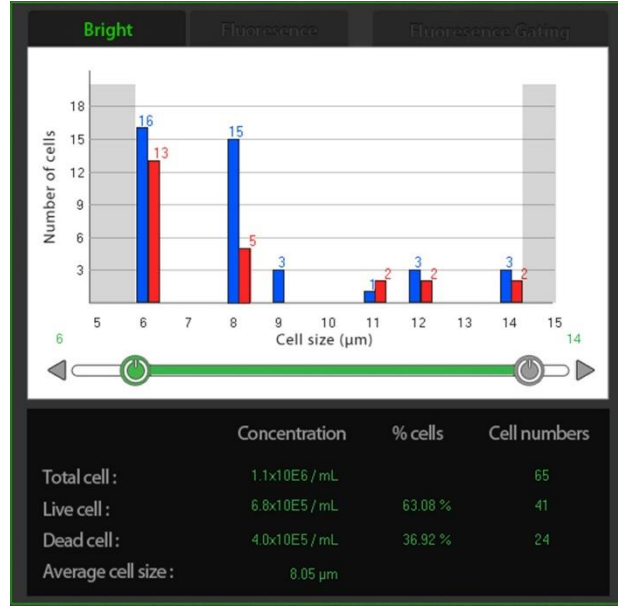
Şekil A.23: 48 saat sonunda tek başına PMMA (MA = 996000 g/mol) ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



Şekil A.24: 48 saat sonunda PMMA (MA=996000 g/mol)/ HAp (%1) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



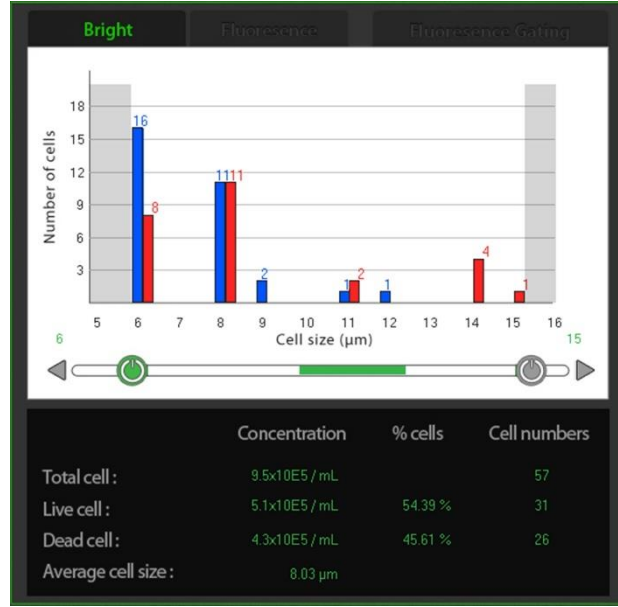
Şekil A.25: 48 saat sonunda PMMA (MA=996000 g/mol)/ HAp (%2,5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



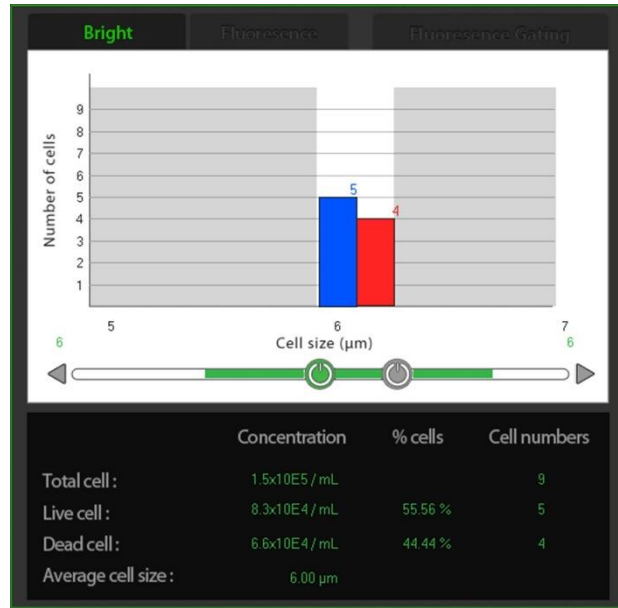
Şekil A.26: 48 saat sonunda PMMA (MA=996000 g/mol)/ HAp (%5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



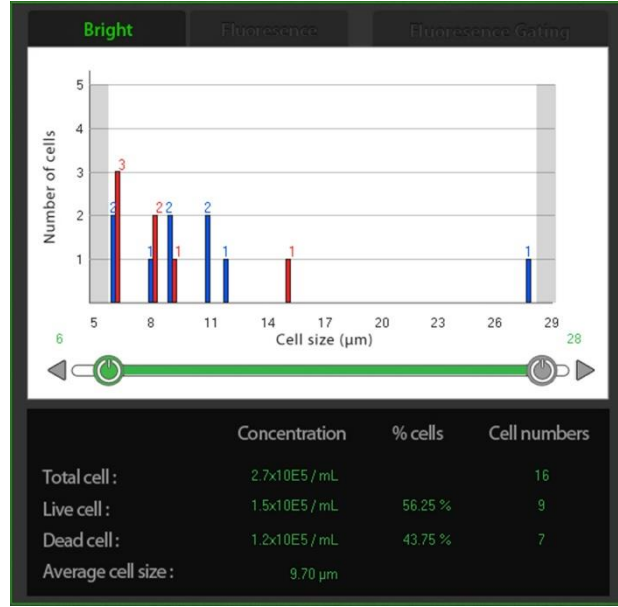
Şekil A.27: 72 saat sonunda hiçbir nanokompozit ile inkübe edilmemiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu (Negatif Kontrol).



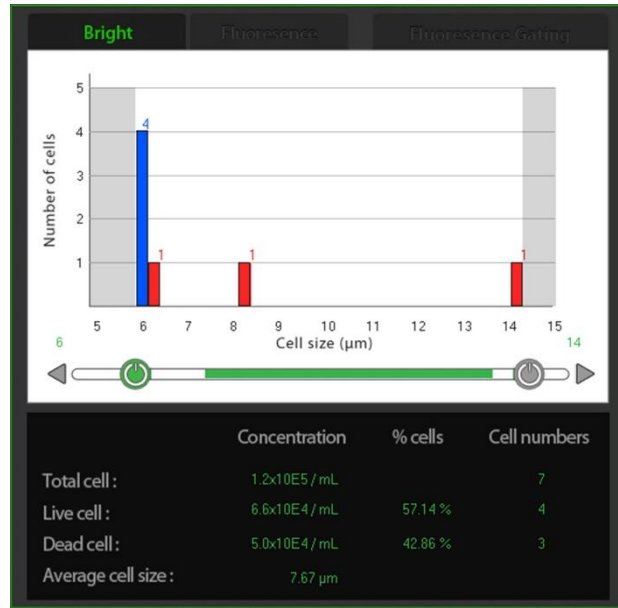
Şekil A.28: 72 saat sonunda tek başına PMMA (MA = 120000 g/mol) ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



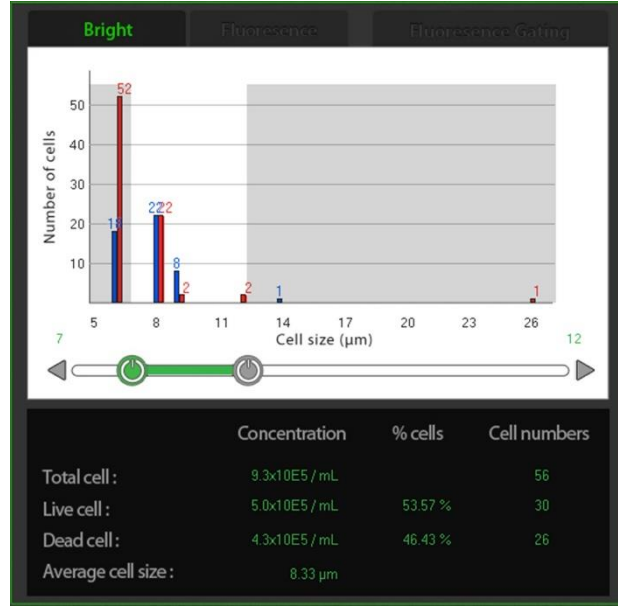
Şekil A.29: 72 saat sonunda PMMA (MA=120000 g/mol)/ HAp (%1) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



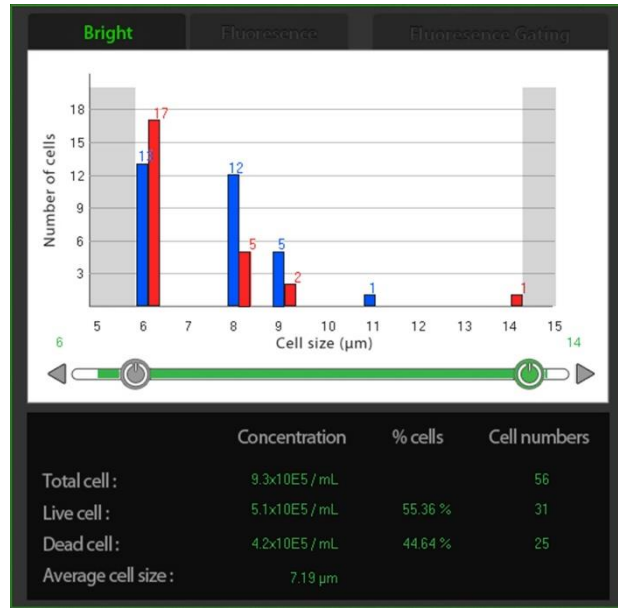
Şekil A.30: 72 saat sonunda PMMA (MA=120000 g/mol)/ HAp (%2,5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



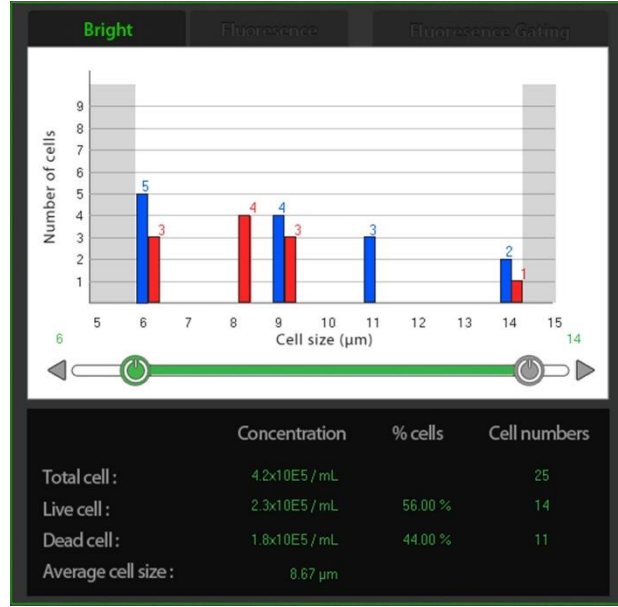
Şekil A.31: 72 saat sonunda PMMA (MA=120000 g/mol)/ HAp (%5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



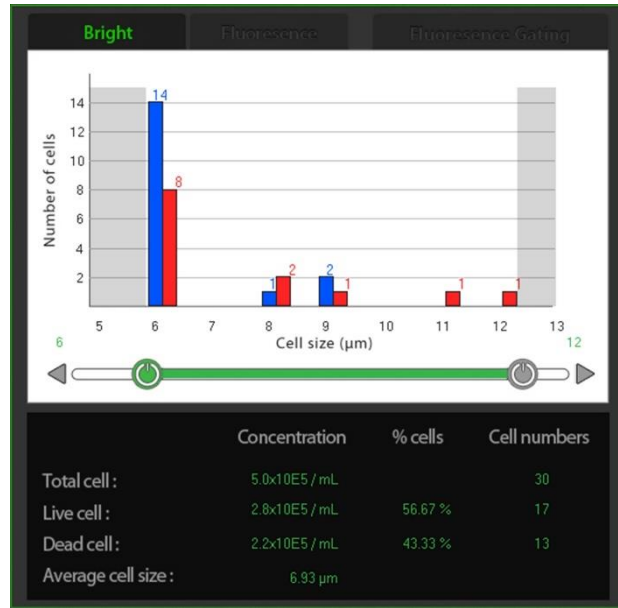
Şekil A.32: 72 saat sonunda tek başına PMMA (MA = 350000 g/mol) ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



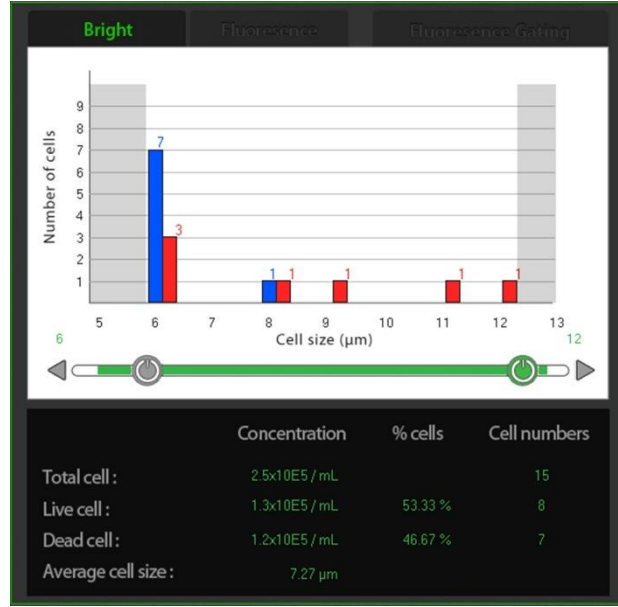
Şekil A.33: 72 saat sonunda PMMA (MA=350000 g/mol)/ HAp (%1) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



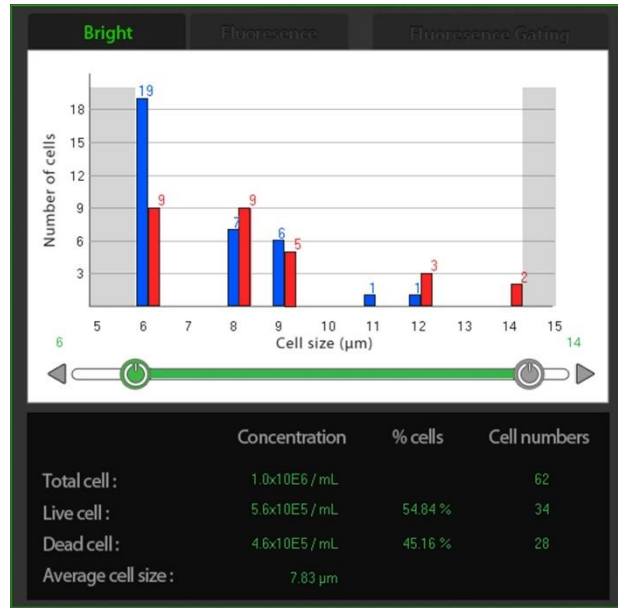
Şekil A.34: 72 saat sonunda PMMA (MA=350000 g/mol)/ HAp (%2,5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



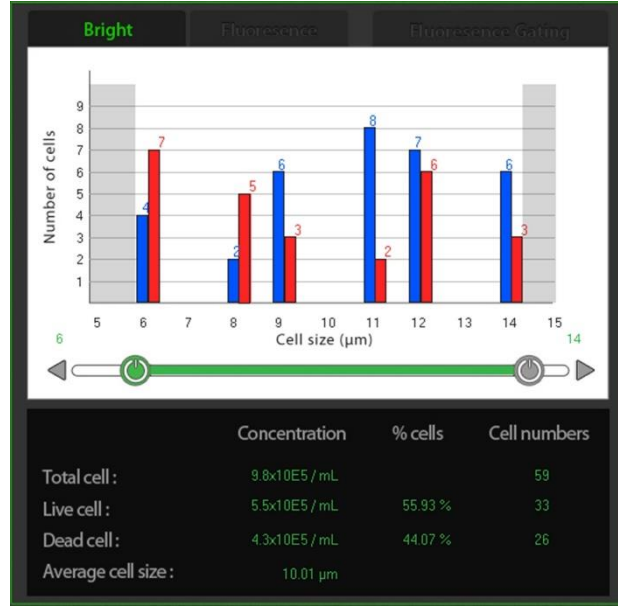
Şekil A.35: 72 saat sonunda PMMA (MA=350000 g/mol)/ HAp (%5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



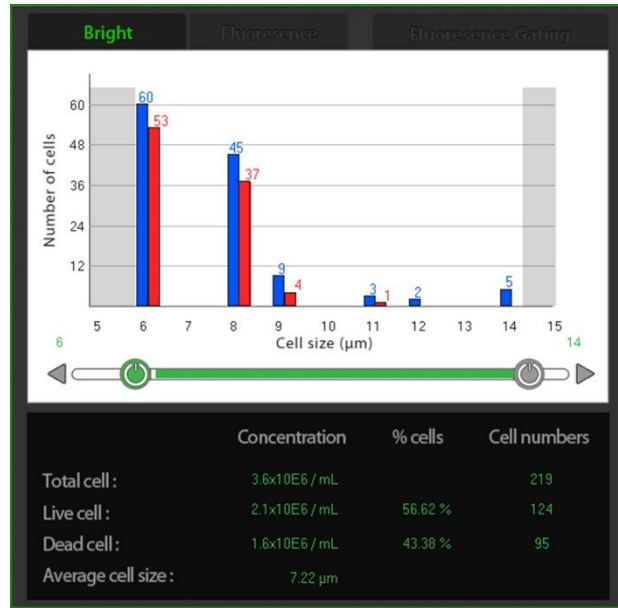
Şekil A.36: 72 saat sonunda tek başına PMMA (MA = 996000 g/mol) ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



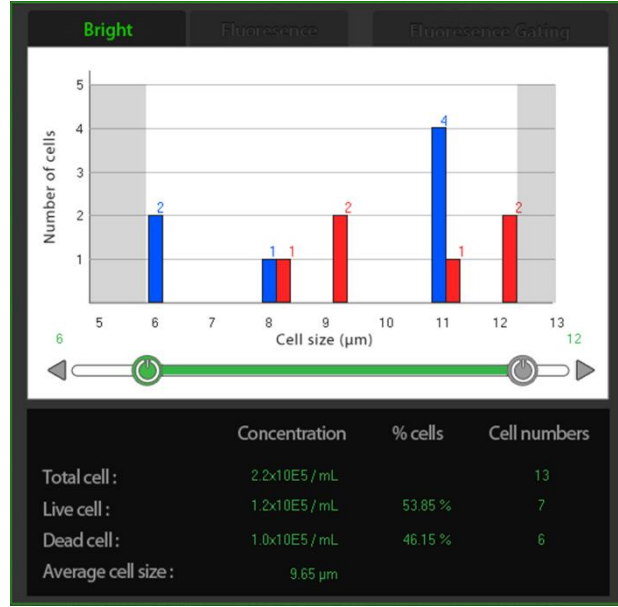
Şekil A.37: 72 saat sonunda PMMA (MA=996000 g/mol)/ HAp (%1) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



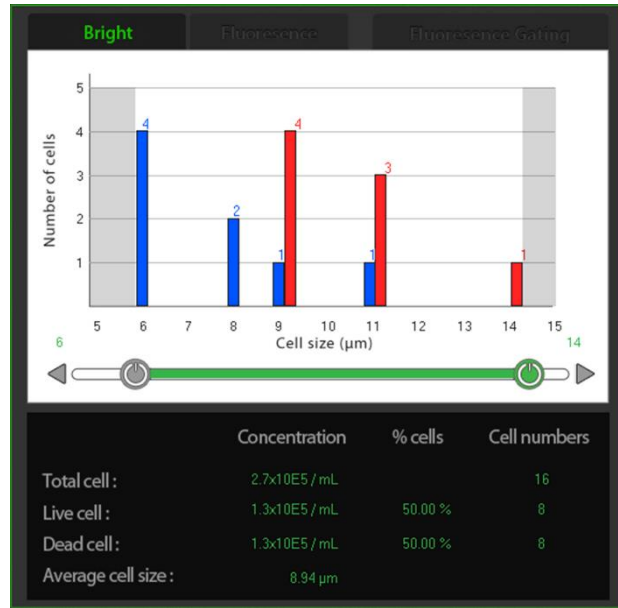
Şekil A.38: 72 saat sonunda PMMA (MA=996000 g/mol)/ HAp (%2,5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



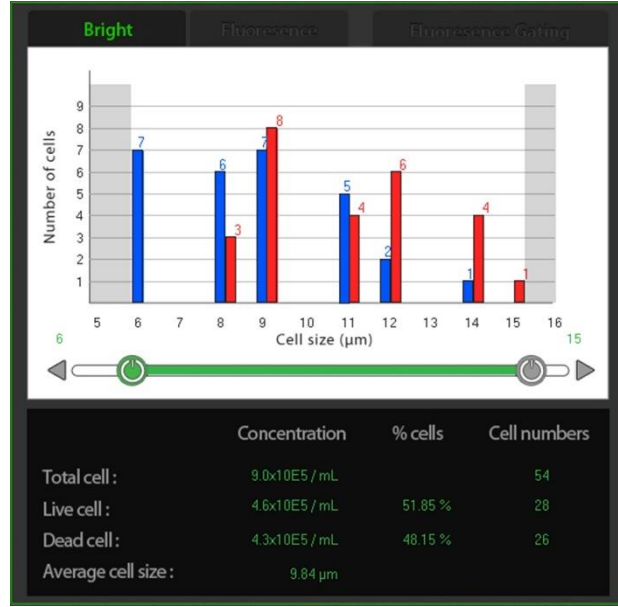
Şekil A.39: 72 saat sonunda PMMA (MA=996000 g/mol)/ HAp (%5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



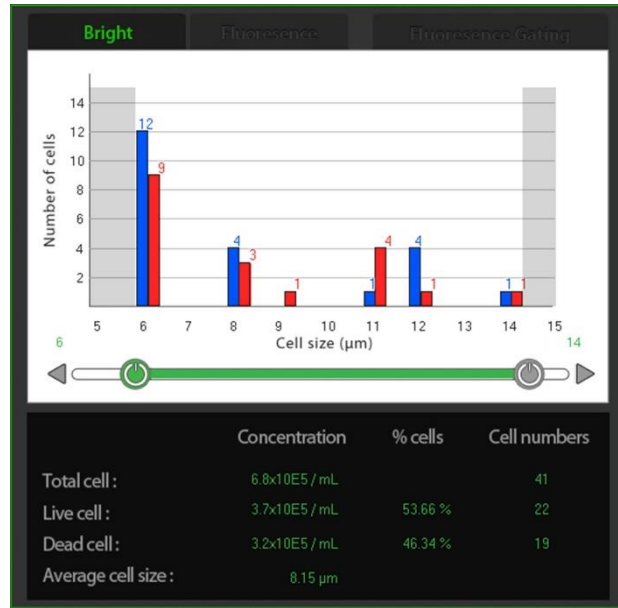
Şekil A.40: 96 saat sonunda hiçbir nanokompozit ile inkübe edilmemiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu (Negatif Kontrol).



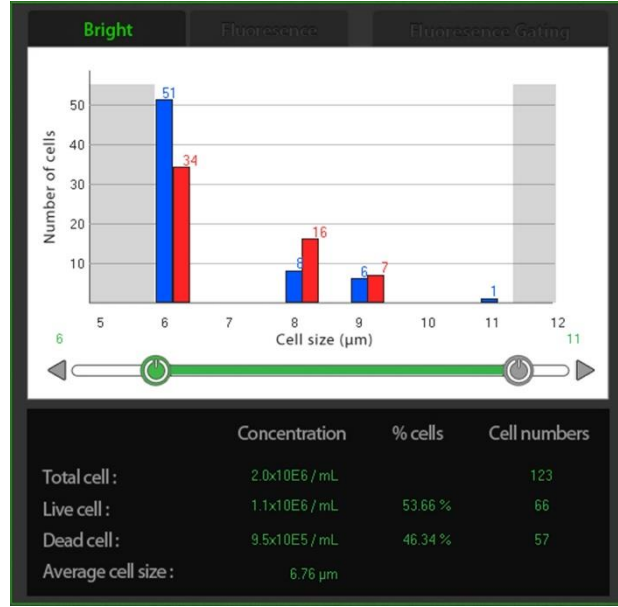
Şekil A.41: 96 saat sonunda tek başına PMMA (MA = 120000 g/mol) ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



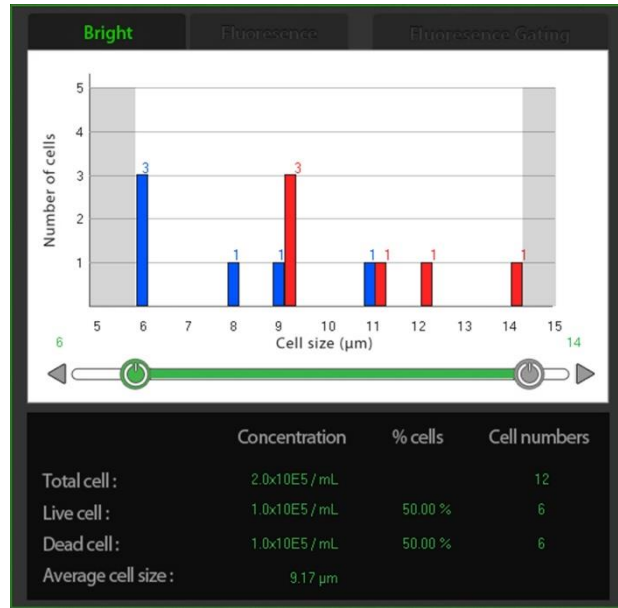
Şekil A.42: 96 saat sonunda PMMA (MA=120000 g/mol)/ HAp (%1) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



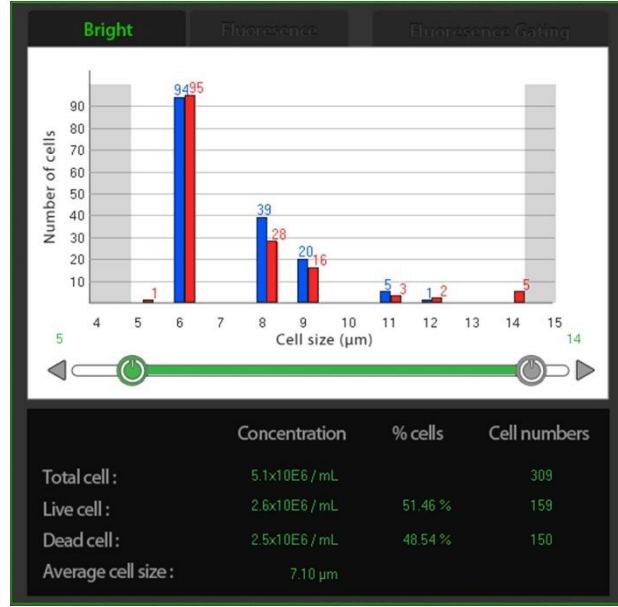
Şekil A.43: 96 saat sonunda PMMA (MA=120000 g/mol)/ HAp (%2,5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



Şekil A.44: 96 saat sonunda PMMA (MA=120000 g/mol)/ HAp (%5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



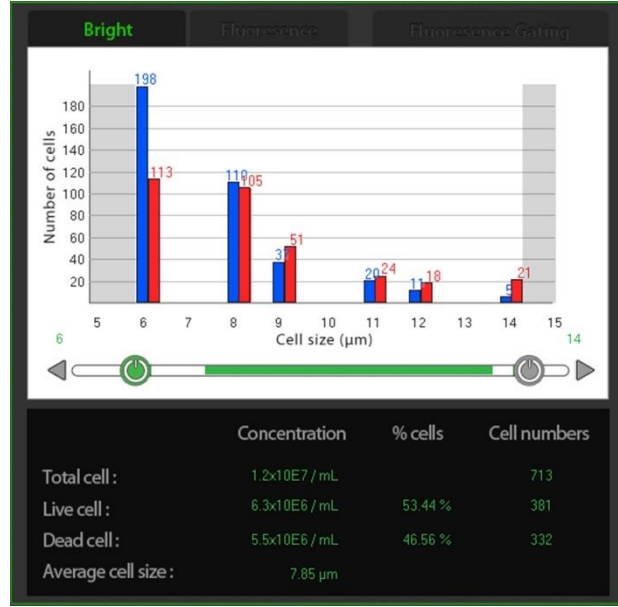
Şekil A.45: 96 saat sonunda tek başına PMMA (MA = 350000 g/mol) ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



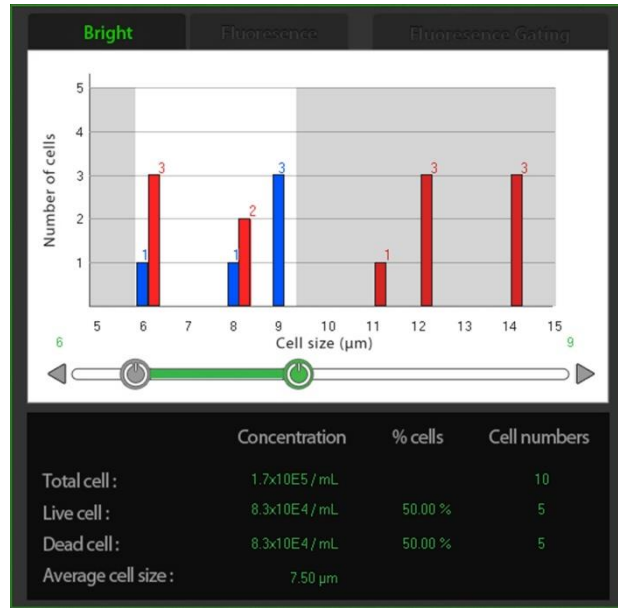
Şekil A.46: 96 saat sonunda PMMA (MA=350000 g/mol)/ HAp (%1) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



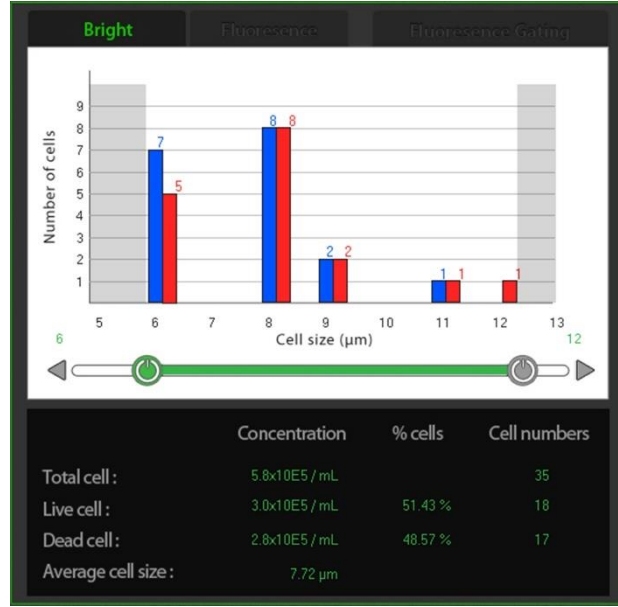
Şekil A.47: 96 saat sonunda PMMA (MA=350000 g/mol)/ HAp (%2,5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



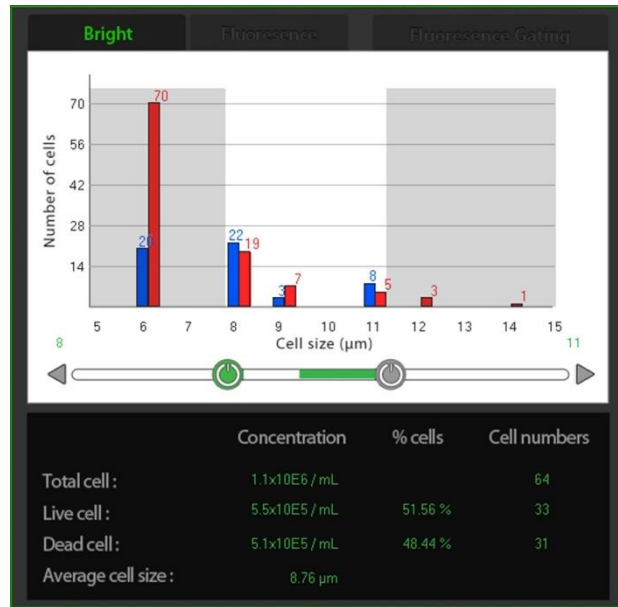
Şekil A.48: 96 saat sonunda PMMA (MA=350000 g/mol)/ HAp (%5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



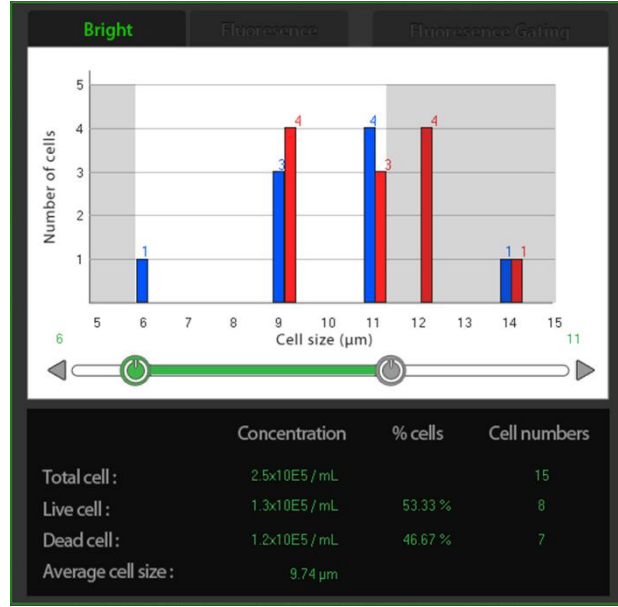
Şekil A.49: 96 saat sonunda tek başına PMMA (MA = 996000 g/mol) ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



Şekil A.50: 96 saat sonunda PMMA (MA=996000 g/mol)/ HAp (%1) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



Şekil A.51: 96 saat sonunda PMMA (MA=996000 g/mol)/ HAp (%2,5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.



Şekil A.52: 96 saat sonunda PMMA (MA=996000 g/mol)/ HAp (%5) nanokompoziti ile inkübe edilmiş hücrelerin % canlılık analiz sonucu.