

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**FARKLI FORMLARDAKİ NANOHİDROKSİAPATİTLERİN
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve GÜNEŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ŞUBAT 2022

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**FARKLI FORMLARDAKİ NANOHİDROKSİAPATİTLERİN
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve GÜNEŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ŞUBAT 2022

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI FORMLARDAKİ NANOİDROKSİAPATİTLERİN
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve GÜNEŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından FDK-2019-4457 ve FBA-2018-3285 nolu projeler ile
desteklenmiştir.**

ŞUBAT 2022

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI FORMLARDAKİ NANOHİDROKSİAPATİTLERİN
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve GÜNEŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 15/02/2022 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent KAYA (Danışman)

Prof. Dr. Berrin TÜYLÜ

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Prof. Dr. Recep LİMAN

Doç. Dr. Esra AYDEMİR

ÖZET

FARKLI FORMLARDAKİ NANOHİDROKSİAPATİTLERİN SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve GÜNEŞ

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent KAYA

Şubat 2022; 128 sayfa

Biyomalzemeler, ortopedik uygulamalarda, yüz ve çene cerrahisinde, yapay kalp parçalarında, metal parçalarda ve vücuda yerleştirilebilir cihazlarda kullanılmaktadır. Bu malzemeler organizmaya uyumlu olması, alerjik olmaması, fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı dayanıklı olması sebebiyle tıp alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hidroksiapatit (HA) doku ile uyumluluk gösteren biyoaktif kalsiyum fosfat seramiklerindendir. Bu çalışmada nano boyutlu HA (nHA)'ların küre ve çubuk formlarının etkileri *in vivo* ortamda *Drosophila melanogaster*'da ve *in vitro* ortamda iki farklı hücrelerinde (insan embriyonik böbrek epitel (293T) ve insan vasküler endotel (HUVEC) hücre hatları) araştırılmıştır. *in vivo* çalışmalarda *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ve Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (KOMET) yöntemleri ile nHA'ların potansiyel genotoksitesi araştırılmıştır. Hücre ölüm yollarındaki aktivasyonun incelenmesi amacıyla *Drosophila* hemositlerinde kaspaz aktiviteleri değerlendirilmiştir. *Drosophila*'da gen ifadelerinin araştırılması amacıyla Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT²-PCR) yöntemi ile DNA tamirinde görevli 36 adet genin ifadeleri araştırılmıştır. *in vitro* çalışmalar kapsamında 293T ve HUVEC hücre hatlarında WST-1 hücre canlılık testi ve tripan mavisi testi ile sitotoksikite ve KOMET ile genotoksikite potansiyeli değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre nHA küre ve çubuk formlarının potansiyel genotoksik etkileri *D. melanogaster* somatik hücrelerle yapılan SMART testinde küre formda küçük tek tip, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar bakımından 50, 100 ve 200 ppm'lik konsantrasyonlarda genotoksikite tespit edilmiştir. Çubuk formu nHA uygulamalarında çalışılan hiçbir dozda genotoksik etki gözlenmemiştir. *Drosophila* hemositleri ile yapılan KOMET testinde 100 ppm konsantrasyonundaki küre ve çubuk formu nHA'lar *Drosophila* hemositlerinde kuyruk yoğunluğu bakımından genotoksikiteye sebep olmuştur. Yapılan kaspaz aktiviteleri çalışmalarında küre formda 200 ppm'lik konsantrasyonun kaspaz-3/7, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Çubuk formu nHA 25 ve 50 ppm'lik dozlarda içsel yolak sinyal kaskadlarını (kaspaz9 ve kaspaz3/7) aktive ederken, yüksek konsantrasyonlarda dışsal apoptotik yolağı (kaspaz8) aktive ettiği belirlenmiştir. Gen aktivasyonunun incelendiği RT²-PCR analizinde küre formda 25 ppm'lik uygulamada *Mlh1* ve *Brca2* genlerinde artış gözlenirken *spell*, *Rad51C*, *dap*, *MCPH1*, *Rad51D*, *Rad1*, *Pms2*, *mu2*, *Sir2* genlerinde azalma meydana gelmiştir. 200 ppm'lik konsantrasyonda ise *Mlh1* geninin ifadesinde artış gözlenirken *Fen1*, *Rad9*, *Fancd2*, *Rad51C*, *Hus1-like*, *dap*, *DNA-lig1*, *MCPH1*, *Rad51D*, *Ercc1*, *Rev1*, *Pms2*, *tefu*, *RpLP2* genlerinin ifadesinde ise azalma meydana gelmiştir. Çubuk formda 25 ppm'lik konsantrasyonda azalma, *Mlh1* ve *Brca2* gen ifadelerinde artış gözlenmiştir.

Bunun yanında *CG9601/PNKP*, *Rev1*, *Dap*, *mu2*, *RpLP2*, *Pms2*, *spell*, *Sir2*, *Rad51C*, *PCNA*, *stg*, *Rad51D*, *Fen1*, *MCPH1* genlerinde azalma meydana gelmiştir. 200 ppm’lik konsantrasyonda çalışan genlerin ifadelerinde artış meydana gelmemiş olup *Xpac*, *spell*, *Fen1*, *Rad9*, *Tbp*, *Cdk7*, *DNApol-eta*, *Fancd2*, *XRCC1*, *Rad51C*, *Hus1-like*, *Ogg1*, *dap*, *DNA-ligl*, *CG9601*, *mei-41*, *MCPH1*, *put*, *Rad51D*, *Rev1*, *Rad17*, *Rad1*, *Pms2*, *mu2*, *tefu*, *RpL32*, *Sir2*, *RpLP2*, *stg*, *SdhA* genlerinde azalma tespit edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında 293T hücrelerinde WST-1 testi ile yapılan değerlendirmede hem küre hem de çubuk formu nHA uygulamalarında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde doza bağlı olarak hücre canlılığının arttığı gözlenmiştir. Tripan mavisi ile yapılan testte küre formda doza bağlı olarak azalan sitotoksik etki gözlenmiştir. Çubuk formda ise sitotoksik etki saptanmamıştır. HUVEC hücre hattında WST-1 testinde hücre canlılığının hem küre hem de çubuk formda doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Tripan mavisi ile yapılan değerlendirmede sadece 24 saatlik inkübasyonda küre formda 1000, 800, ve 600 ppm’lik konsantrasyonlarda sitotoksik etki gözlenmiştir. Çubuk formda ise 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde sitotoksik etki gözlenmiştir. *in vitro* komet sonuçlarına göre küre formu nHA 293T hücrelerinde kuyruk yoğunluğu parametresinde genotoksik etkinin her üç inkübasyon süresinde de düşük dozlarda daha fazla olduğu gözlenmiştir. Çubuk formu nHA’nın 293T hücrelerindeki genotoksik etkileri kuyruk yoğunluğunda 24 saatlik inkübasyon süresinde 200 ppm haricindeki dozlarda genotoksik etki gözlenirken 48 saatlik inkübasyon süresinde 400 ppm’lik dozda 72 saatlik inkübasyon süresinde 200 ve 400 ppm’de DNA hasarı gözlenmiştir. Küre formu nHA’nın HUVEC hücrelerindeki genotoksik etkisi kuyruk yoğunluğu parametresinde 24 saatlik inkübasyon süresinde 200 ppm, 48 saatlik inkübasyon süresinde 800 ppm ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 1000 ppm haricindeki tüm dozlarda DNA hasarı gözlenmiştir. Çubuk formu nHA HUVEC hücrelerinde kuyruk yoğunluğu parametresinde 24 saatlik inkübasyon süresinde 200 ve 400 ppm, 48 saatlik inkübasyon süresinde 400 ve 800 ppm dozlarında genotoksik etki gözlenmiştir. Bunun yanında 72 saatlik inkübasyon süresinde çalışan dozların hiçbirinde DNA hasarı gözlenmemiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre çubuk formun hem *D. melanogaster*’da yapılan hem de 293T ve HUVEC hücre hatları ile gerçekleştirilen deneylerde küre forma göre daha az toksik etkiye neden olduğu gözlenmiştir. Küre form hem morfolojik yapısı hem de boyutsal olarak çubuk forma göre daha küçük olması sebebiyle hücrelerdeki toksisite yanıtlarını indüklemiş olabileceği düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: *Drosophila melanogaster*, kaspaz, sitotoksisite, somatik mutasyon ve rekombinasyon, tek hücre jel elektroforezi.

JÜRİ: Prof. Dr. Bülent KAYA

Prof. Dr. Berrin TÜYLÜ

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Prof. Dr. Recep LİMAN

Doç. Dr. Esra AYDEMİR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF DIFFERENT FORMS OF NANOHYDROXYAPATITES

Merve GÜNEŞ

PhD Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Bülent KAYA

February 2022; 128 pages

Biomaterials are used in orthopedic applications, facial and maxillofacial surgery, artificial heart parts, metal parts and implantable devices. These materials are widely used in the field of medicine because they are compatible with the organism, not allergic, and resistant to physical and chemical factors. Hydroxyapatite (HA) is bioactive calcium phosphate ceramics that is compatible with tissue. In this study, the effects of spherical and rod forms of nano sized HAs (nHA) were investigated in *Drosophila melanogaster* and two different cell lines (human embryonic kidney epithelium (293T) and human vascular endothelial (HUVEC) cell lines). Potential genotoxicity of nHAs was investigated with *Drosophila* Wing Somatic Mutation and Recombination Assay (SMART) and Single Cell Gel Electrophoresis (COMET) methods. Caspase activities were evaluated in *Drosophila* hemocytes to examine the activation in cell death pathways. In order to investigate gene expressions in *Drosophila*, the expressions of 36 genes involved in DNA repair were investigated with the Real Time Polymerase Chain Reaction (RT²-PCR) method. Within the scope of *in vitro* studies, cytotoxicity with WST-1 cell viability test and trypan blue test and genotoxicity potential with KOMET were evaluated in 293T and HUVEC cell lines.

According to the results obtained, the potential genotoxic effects of nHA sphere and rod forms In the SMART test with *D. melanogaster* somatic cells, genotoxicity was detected in spherical form in small single-type, total *mwh* clones and total clones at concentrations of 50, 100 and 200 ppm. No genotoxic effect was observed at any dose studied in rod-form nHA applications. In the KOMET test with *Drosophila* hemocytes, spherical and rod-shaped nHAs at 100 ppm concentration caused genotoxicity in *Drosophila* hemocytes in terms of tail density. In the caspase activities studies, it was determined that 200 ppm concentration in spherical form increased the caspase-3/7, caspase-8 and caspase-9 activities. It has been determined that rod-formed nHA activates the intrinsic pathway signal cascades (caspase-9 and caspase-3/7) at 25 and 50 ppm doses, while it activates the extrinsic apoptotic pathway (caspase-8) at high concentrations. In the RT²-PCR analysis in which gene activation was examined, an increase in *Mlh1* and *Brca2* genes was observed, while a decrease in *spell*, *Rad51C*, *dap*, *MCPH1*, *Rad51D*, *Rad1*, *Pms2*, *mu2*, *Sir2* genes were observed in the application of 25 ppm in spherical form. At 200 ppm concentration, an increase was observed in the expression of only the *Mlh1* gene, while the expression of the *Fen1*, *Rad9*, *Fancd2*, *Rad51C*, *Hus1-like*, *dap*, *DNA-lig1*, *MCPH1*, *Rad51D*, *Ercc1*, *Rev1*, *Pms2*, *tefu*, *RpLP2* genes decreased. A decrease in 25 ppm concentration and an increase in *Mlh1* and *Brca2* gene expressions were observed in rod form. In addition, there was a decrease in *CG9601/PNKP*, *Rev1*,

Dap, mu2, RpLP2, Pms2, spell, Sir2, Rad51C, PCNA, stg, Rad51D, Fen1, MCPH1 genes. There was no increase in the expression of genes operating at 200 ppm concentration, but a decrease was detected in *Xpac, spell, Fen1, Rad9, Tbp, Cdk7, DNAPol-eta, Fancd2, XRCC1, Rad51C, Hus1-like, Ogg1, dap, DNA-ligl, CG9601, mei-41, MCPH1, put, Rad51D, Rev1, Rad17, Rad1, Pms2, mu2, tefu, RpL32, Sir2, RpLP2, stg, SdhA* genes.

Within the scope of the thesis study, in the evaluation made with the WST-1 test on the 293T cell line, it was observed that the cell viability increased in both spherical and rod form nHA applications in 24, 48 and 72 hours incubation periods depending on the dose. In the test performed with trypan blue, a dose-dependent decreased cytotoxic effect was observed in spherical form. In rod form, however, no cytotoxic effect was detected. In the HUVEC cell line WST-1 test, it was observed that cell viability increased in both spherical and rod form in a dose-dependent manner. In the evaluation made with trypan blue, cytotoxic effects were observed only at concentrations of 1000, 800, and 600 ppm in spherical form in 24 hours of incubation. In rod form, cytotoxic effect was observed in 48 and 72 hour incubation periods. According to *in vitro* comet results, it was observed that the genotoxic effect on tail density parameter in spherical nHA 293T cell line was higher at low doses in all three incubation periods. The genotoxic effects of rod-form nHA in 293T cell line were observed at tail density at doses other than 200 ppm in the 24-hour incubation period, while DNA damage was observed at 200 and 400 ppm in the 72-hour incubation period at a dose of 400 ppm in the 48-hour incubation period. The genotoxic effect of spherical nHA on the HUVEC cell line was observed at all doses except 200 ppm in the 24-hour incubation period, 800 ppm in the 48-hour incubation period, and 1000 ppm in the 72-hour incubation period in the tail density parameter. Genotoxic effects were observed in the rod-formed nHA HUVEC cell line at doses of 200 and 400 ppm in the 24-hour incubation period, and 400 and 800 ppm in the 48-hour incubation period in the tail density parameter. In addition, DNA damage was not observed in any of the working doses during the 72 hour incubation period.

According to the results obtained from the study, it was observed that the rod form caused less toxic effects than the spherical form in both *D. melanogaster* and experiments with 293T and HUVEC cell lines. It is thought that the spherical form may have induced toxicity responses in the cells due to its morphological structure and its smaller size compared to the rod form.

KEYWORDS: Caspase, cytotoxicity, *Drosophila melanogaster*, single cell gel electrophoresis, somatic mutation and recombination.

COMMITTEE: Prof. Dr. Bülent KAYA

Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Prof. Dr. Berrin TÜYLÜ

Assoc. Prof. Dr. Esra AYDEMİR

ÖNSÖZ

Biyomalzemeler biyolojik ortamda hasar görmüş dokunun tedavisinde kullanılan ve vücudun belirli dokuları ile temas halinde bulunan materyallerdir. Canlıda kullanılan malzemenin mekanik ve kimyasal etkilere, sıcaklığa dayanabilmesi gerekmektedir. Ortopedik ve dental tedavilerde mekanik dayanıklılık sebebiyle çoğunlukla metalik implantlar kullanılmaktadır. Metalik malzemelerin kullanımı korozyon, aşınma ve/veya negatif doku reaksiyonu nedeniyle bazı problemlere yol açmaktadır. Bu nedenle seramik madde kullanımına yönelim artmıştır. Metal implantları kaplayan seramik yapıların biyolojik dokuyu taklit edebilmesi ve biyouyumlu olması gerekmektedir. Biyolojik uyumluluk açısından HA en uygun seramik materyal olarak görünmektedir. Doku ile protez arasında uyumun sağlanması için temas noktalarında yüzeylere çeşitli modifikasyonlar yapılmaktadır. Böylece doku kimyasına uygun olan biyoaktif malzemeler üretilmektedir. Kalsiyum fosfat ailesinden olan HA'lar sıklıkla kemik dolgusunda ve kemik dokusundaki metal implantlarında kaplama maddesi olarak kullanılmaktadır. HA kristalleri kısmen çözünerek ortamda kalsiyum ve fosfat miktarını artırmakta ve böylece kemik gelişimine katkıda bulunmaktadır. HA'lar sıcaklık ve pH gibi etkenlerdeki değişikliklerde stabil kalmayı sürdürebildiğinden implant, kaplama, kemik dolgusu gibi işlevlerle kemiklerin tedavisinde ve oral uygulamalarda kullanılmaktadır.

Nanoteknoloji, yıllarda dünya çapında araştırmacıların yakından ilgilendiği, nanomateriyallerin eşsiz özelliklerinin ve uygulamalarının keşfedildiği bir çalışma alanıdır. Nanomateriyallerin karakterizasyonu ve üretimindeki çeşitli ilerlemeler biyomedikal, sağlık, elektronik ve ev aletleri de dahil olmak üzere birçok farklı alanda düzenlemelere imkân vermiştir. Nanoteknolojinin geniş bir pazar payı olmasından dolayı nanoteknoloji ürünleri de her geçen gün artmaktadır. Son yıllarda nano yapıdaki biyomateriyallerin medikal uygulamaları oldukça büyüdüğü gözlenmektedir. İlaç taşıma, teşhis, tedavi, fototermal terapi, fotodinamik terapi, biyomühendislik gibi bir dizi alanda bu biyomateriyaller kullanılmaktadır. Yapılan son araştırmalarda implant yüzeylerinin nano malzemeler ile yapılan modifikasyonlarla implant ile kemik dokusu arasında osteoblast hücrelerinin yayıldığı ve yapışmasının indüklenebildiği gösterilmiştir. Nanokristal HA tozları ile yüzey alanı arttırıldığı için daha güçlü biyoaktivite ve daha güçlü mekanik özellikler kazandırmaktadır.

Biyoaktif yapısı, mekanik özellikleri ve kemik mineraline benzer yapısı sayesinde organizma ile uyumlu bir şekilde kullanılabildiğinden dolayı tercih edilen Hidroksiapatit (HA), kemik implantlarının etkinliğinin ve işlevinin iyileştirilmesi için farklı boyutlarda kemik dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadır. HA'nın biyouyumluluğunun ve dayanıklılığını artırmak amacı ile son yıllarda nano HA ların kullanımı da yaygınlaşmaya başlamıştır. Ancak nanoürünlerin farklı nano boyutta fizikokimyasal özelliklerinin değişebilmesi nedeni ile olası potansiyel risklerinin de detaylıca çalışılması gereğini doğurmaktadır. Diğer taraftan nanopartiküllerin sadece boyutları değil şekilleri (küre ve çubuk) de neden olabilecekleri toksisiteye değiştirebilmektedir. Farklı şekillere sahip HA'ların yol açabilecekleri genotoksisite hakkında oldukça kısıtlı bilgi bulunmaktadır.

Bu çalışmada yeni nesil nHA'ların toksisitesi hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda değerlendirilmiştir. *D. melanogaster* genetik yapısı insanda çeşitli hastalıklara neden genler bakımından yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Bu nedenle bu model

organizmada yapılan genetik ve toksikolojik çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Hedef dokuya yerleştirilen nHA'ların kemiği saran epitel doku ile olan etkileşiminin araştırılması amacıyla insan embriyonik epitel hücreleri toksisite değerlendirilmesi yapılmıştır. Kemik ve diş dolgu materyali olarak kullanılan nHA'ların bir diğer kullanım alanı da ilaç taşıma sistemi olduğundan endotel hücrelerde toksisitesinin değerlendirilmesi de çalışmaya değer katmaktadır. Ayrıca çalışma kapsamında nHA'ların şekil ve boyutsal farklılıklarının toksisite mekanizmaları üzerine olan etkileri açısından da değerlendirilmiş olması çalışmanın önemini artırmaktadır. Elde edilen veriler literatüre biyomalzemelerin güvenli kullanımı ile ilgili katkılar sağlayacak olup ileri çalışmaların yapılması için de zemin oluşturmaları beklenmektedir.

Bana bu konuda çalışma imkânı sağlayan danışman hocam Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Bülent KAYA'ya nHA'ların sentezinde ve karakterizasyonun belirlenmesine katkı sağlayan Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ertuğrul ARPAÇ ve ekibine, hücre kültürü çalışmaları için altyapı desteği sağlayan Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Esra Aydemir ve ekibine teşekkürlerimi sunuyorum. Hücre görüntüleme sistemlerini kullanmamı sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye teşekkür ediyorum. Bu çalışmayı FDK-2019-4457 ve FBA-2018-3285 proje numaraları ile maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ediyorum. Bu tez çalışması Yüksek Öğretim Kurulu (YÖK) 100/2000 Doktora projesi kapsamında oluşturulmuş "100 Tematik Alan" içerisinde bulunan "Biyomalzemeler ve Doku Mühendisliği" alanında hazırlanmıştır. Desteklerinden dolayı YÖK Yükseköğretim Proje Geliştirme ve Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkür ediyorum. Ayrıca tez çalışmam sırasında desteklerini aldığım tüm çalışma arkadaşlarıma ve eşim Alper GÜNEŞ'e teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1. Biyomalzemeler.....	4
2.2. Biyomalzemelerin Tarihçesi.....	5
2.3. Biyomalzemelerin Özellikleri	7
2.4. Biyomalzeme Türleri.....	10
2.5. Hidroksiapatitler.....	13
2.6. İnsan Vücudundaki Hidroksiapatitler.....	14
2.7. Nanopartiküller.....	16
2.8. Nanotoksikoloji	18
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Kullanılan Kimyasallar	27
3.2. Nano Hidroksiapatitlerin Sentezi	27
3.2.1. Küre formu nanohidroksiapatitlerin sentezi.....	28
3.2.2. Çubuk formu nanohidroksiapatitlerin sentezi	28
3.3. Nanopartikül Karakterizasyonu.....	29
3.3.1. TEM görüntüleme analizi.....	29
3.3.2. FTIR analizi.....	29
3.4. <i>Drosophila melanogaster</i>	29
3.4.1. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)	32
3.4.2. <i>Drosophila</i> hemositlerinde tek hücre alkali jel elektroforezi (SCGE/KOMET) testi	39
3.4.3. Kaspaz aktiviteleri.....	42
3.4.4. <i>Drosophila</i> larvalarında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile DNA tamiri gen ifadelerinin belirlenmesi	44
3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	48

3.5.1. Hücreler ve kültür koşulları.....	48
3.5.2. Hücrelere hidroksiapatit uygulanması	49
3.5.3. WST-1 hücre proliferasyon testi	49
3.5.4. Tripan mavisiyle mL’deki canlı ve ölü hücre sayılarının belirlenmesi.....	50
3.5.5. Alkali tek hücre jel elektroforezi (SCGE/KOMET) testi.....	50
3.6. İstatistiksel analiz	52
4. BULGULAR	54
4.1. Hidroksiapatit Sentezi	54
4.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Analizi	54
4.2.1. TEM görüntüleme analizi.....	54
4.2.2. FTIR spektrumu analiz sonuçları	55
4.3. <i>Drosophila melanogaster</i>	55
4.3.1. <i>Drosophila</i> SMART yöntemi.....	55
4.3.2. <i>Drosophila</i> hemositlerinde KOMET testi	57
4.3.3. Kaspaz aktiviteleri analizi	62
4.3.4. <i>Drosophila</i> larvalarında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile DNA tamiri gen ifadelerinin belirlenmesi	65
4.4. Hücre Kültürü Sitotoksosite Çalışmaları	70
4.4.1. 293T hücre hattı	70
4.4.2. HUVEC hücre hattı	74
4.5. Hücre Kültürü KOMET Testi	77
5. TARTIŞMA.....	90
6. SONUÇLAR	104
7. KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Farklı Formlardaki Nanohidroksiapatitlerin Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

15/02/2022
Merve Güneş



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1. Biyomalzemeler.....	4
2.2. Biyomalzemelerin Tarihçesi.....	5
2.3. Biyomalzemelerin Özellikleri	7
2.4. Biyomalzeme Türleri.....	10
2.5. Hidroksiapatitler.....	13
2.6. İnsan Vücudundaki Hidroksiapatitler.....	14
2.7. Nanopartiküller.....	16
2.8. Nanotoksikoloji	18
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Kullanılan Kimyasallar	27
3.2. Nano Hidroksiapatitlerin Sentezi	27
3.2.1. Küre formulu nanohidroksiapatitlerin sentezi.....	28
3.2.2. Çubuk formulu nanohidroksiapatitlerin sentezi	28
3.3. Nanopartikül Karakterizasyonu.....	29
3.3.1. TEM görüntüleme analizi.....	29
3.3.2. FTIR analizi.....	29
3.4. <i>Drosophila melanogaster</i>	29
3.4.1. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)	32
3.4.2. <i>Drosophila</i> hemositlerinde tek hücre alkali jel elektroforezi (SCGE/KOMET) testi	39
3.4.3. Kaspaz aktiviteleri.....	42
3.4.4. <i>Drosophila</i> larvalarında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile DNA tamiri gen ifadelerinin belirlenmesi	44
3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	48

3.5.1. Hücreler ve kültür koşulları.....	48
3.5.2. Hücrelere hidroksiapatit uygulanması	49
3.5.3. WST-1 hücre proliferasyon testi	49
3.5.4. Tripan mavisiyle mL’deki canlı ve ölü hücre sayılarının belirlenmesi.....	50
3.5.5. Alkali tek hücre jel elektroforezi (SCGE/KOMET) testi.....	50
3.6. İstatistiksel analiz	52
4. BULGULAR	54
4.1. Hidroksiapatit Sentezi	54
4.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Analizi	54
4.2.1. TEM görüntüleme analizi.....	54
4.2.2. FTIR spektrumu analiz sonuçları	55
4.3. <i>Drosophila melanogaster</i>	55
4.3.1. <i>Drosophila</i> SMART yöntemi.....	55
4.3.2. <i>Drosophila</i> hemositlerinde KOMET testi	57
4.3.3. Kaspaz aktiviteleri analizi	62
4.3.4. <i>Drosophila</i> larvalarında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile DNA tamiri gen ifadelerinin belirlenmesi	65
4.4. Hücre Kültürü Sitotoksosite Çalışmaları	70
4.4.1. 293T hücre hattı	70
4.4.2. HUVEC hücre hattı	74
4.5. Hücre Kültürü KOMET Testi	77
5. TARTIŞMA.....	90
6. SONUÇLAR	104
7. KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Bd ^S	: Beaded serrate
°C	: Santigrat
cm	: santimetre
<i>flr</i> ³	: Flare
gr	: gram
mg	: Miligram
ml	: mililitre
<i>mwh</i>	: Multiple wing hair
nm	: nanometre
ppm	: Milyonda bir birim
µm	: Mikrometre
<i>Brca2</i>	: <i>Breast and ovarian cancer susceptibility protein 2</i> geni
<i>Cdk7</i>	: <i>cyclin dependent kinase</i> geni
<i>CG9601-/PNKP</i>	: <i>Polynucleotide kinase 3'-phosphatase</i> geni
<i>dap</i>	: <i>Dacapo</i> geni
<i>DNA-lig1</i>	: <i>DNA ligaz 1</i> geni
<i>DNAPol-eta</i>	: <i>DNA polimeraz eta</i> geni
<i>Ercc1</i>	: <i>Endonuclease non-catalytic subunit 1</i> geni
<i>Fancd2</i>	: <i>Fanconi anemia complementation group D2</i> geni
<i>Fen1</i>	: <i>Flap endonuclease 1</i> geni
<i>Hus1-like</i>	: <i>HUS1 checkpoint clamp component 1 like</i> geni
<i>mei-41</i>	: <i>meiotic 41</i> geni
<i>Mlh1</i>	: <i>mutL homolog 1</i> geni
<i>Mus101</i>	: <i>mutagen-sensitive 101</i> geni

<i>mu2</i>	: mutator 2 geni
<i>Ogg1</i>	: 8-oxoguanine DNA glycosylase geni
<i>PCNA</i>	: Proliferating cell nuclear antigen geni
<i>Pms2</i>	: postmeiotic segregation increased 2 geni
<i>PNKP</i>	: Polynucleotide kinase 3'-phosphatase geni
<i>put/punt</i>	: activin A receptor type 2A geni
<i>p53</i>	: protein 63 geni
<i>Rad1</i>	: Radiation insensitive 1 geni
<i>Rad17</i>	: Radiation insensitive 17 geni
<i>spn-D/Rad51C</i>	: spindle D geni
<i>Rad51D</i>	: Rad51 recombinase D geni
<i>Rad9</i>	: Radiation insensitive 1 geni
<i>Rev1</i>	: DNA polymerase Rev1 geni
<i>RpLP2</i>	: Ribosomal protein LP2 geni
<i>Sir2</i>	: Sirtuin 1 geni
<i>spel1</i>	: spellchecker1 geni
<i>stg</i>	: string geni
<i>tefu/dATM</i>	: telomer fusion/Drosophila ATM geni
<i>Xpac/Dxpa</i>	: Xeroderma pigmentosum group A-like geni
<i>XRCC1</i>	: X-ray repair cross complementing 1 geni

Bu tezde ondalık yazım ayırıcı olarak nokta (.) kullanılmıştır.

Kısaltmalar

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	: Diamonyum dihidrojen fosfat
293T	: İnsan embriyonik böbrek epitel hücre hattı
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	: Kalsiyum nitrat tetrahidrat
CO_3^{2-}	: Karbonat

DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EMS	: Etilmetan sülfonat
EtBr	: Etidyum Bromür
FBS	: Fetal bovin serum
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HA	: Hidroksiapatit
HIUVEC	: İnsan vasküler endotel hücre hattı
IR	: Kızılötesi spektroskopi
KOMET	: Tek Hücre Jel Elektroforezi
MMS	: Metil metan sülfonat
mRNA	: Mesajcı RNA
MTT	: 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür
Na ₂ EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH ₄ H ₂ PO ₄	: Amonyum dihidrojen fosfat
nHA	: Nano boyutlu hidroksiapatit
NP	: Nanopartikül
OH ⁻	: Hidroksil
PBS	: Fosfat tamponu
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RPMI 1640	: Hücre kültürü büyüme ortamı
RT ² -PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SMART	: Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi

SOD : Süperoksit dismutaz
TEM : Geçirimli elektron mikroskobu
WST-1 : 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Biyomalzemelerin klinik uygulamaları (Pruitt ve Chakravartula 2011)	1
Şekil 1.2. Nanopartiküllerin boyut karşılaştırması (Poh vd. 2018).....	2
Şekil 2.1. Vücuda alınan biyomalzemeler (Manivasagam vd. 2010)	4
Şekil 2.2. “Kennewick Man” (Owsley ve Jantz 2014)	5
Şekil 2.3. “Tlailotlacan Woman” bulunan diş implantı (Goguitchaichvili vd. 2017).....	6
Şekil 2.4. Biyomalzemelerin sahip olması beklenen temel özellikleri (Hasırcı ve Hasırcı 2018).....	8
Şekil 2.5. Kalsiyum fosfatların zaman içerisinde stabilitesi ve biyoaktivasyonun değişimi (Hasırcı ve Hasırcı 2018)	13
Şekil 2.6. HA kristal yapısı (Pai vd. 2021)	14
Şekil 2.7. Havers kanal sistemi (Tirrell vd. 2002)	15
Şekil 2.8. HA’nın mine (a) ve dentin (b) tabakalarındaki remineralizasyonu (Chen vd. 2021)	16
Şekil 2.9. NP’lerin boyutsal olarak sınıflandırılması ve örnekleri (Poh vd. 2018).....	17
Şekil 2.10. Üretilen nanomalzeme risk değerlendirme algoritmasının şematik gösterimi (Pikula vd. 2020).....	18
Şekil 2.11. NP’lerin indüklediği toksisite mekanizmaları (Khanna vd. 2015).....	19
Şekil 3.1. Hidroksiapatit sentezlenme yöntemleri (Bonilla-Represa vd. 2020).....	28
Şekil 3.2. <i>Drosophila</i> yaşam döngüsü (Stocker ve Gallant 2008).....	30
Şekil 3.3. <i>Drosophila</i> imajinal diskleri ve erginde oluşturduğu yapılar (Aldaz vd. 2010)	31
Şekil 3.4. <i>Drosophila flr³</i> ve <i>mwh</i> mutantlarının vücut ve kanat yapıları	33
Şekil 3.5. <i>Drosophila flr³</i> (a ve b) ve <i>mwh</i> (c ve d) mutantlarının trikom yapıları	33
Şekil 3.6. <i>Drosophila</i> kanat SMART’da kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleri (Lindsley ve Zimm 1992).....	34
Şekil 3.7. SMART deneyinde gözlenen tek tip ve ikiz klonların oluşum yolları (Graf vd. 1984) (Graf vd. 1984’ten uyarlanmıştır).....	35
Şekil 3.8. <i>Drosophila</i> SMART yöntemi	36

Şekil 3.9. <i>Drosophila</i> SMART deneyinde hazırlanan kanat preparatı	37
Şekil 3.10. <i>D. melanogaster</i> kanat bölümleri	38
Şekil 3.11. (a) Küçük tek tip klon görünümü; (b) Büyük tek tip <i>mwh</i> klon görünümü; (c) Büyük tek tip <i>flr³</i> görünümü; (d) İkiz klon görünümü (100X).....	38
Şekil 3.12. <i>Drosophila</i> KOMET Yöntemi.....	39
Şekil 3.13. Kaspaz aktivitelerinin ölçülmesi.....	42
Şekil 3.14. <i>Drosophila</i> larvalarında RT ² -PCR uygulaması	47
Şekil 3.15. 293T (a) ve HUVEC (b) hücre hatları görünümü	48
Şekil 4.1. Çalışma kapsamında sentezlenen nHA'lar. Küre form (a), Çubuk form (b)	54
Şekil 4.2. Küre (a) ve çubuk (b) formu nHA'ların TEM görüntüleri.....	54
Şekil 4.3. Küre ve çubuk formu nHA'ların FTIR spektrumları.....	55
Şekil 4.4. <i>D. melanogaster</i> KOMET görüntüleri (a) Hasarsız hücre (40X) (b) Hasarlı hücre (40X) (c) Hasarlı hücrelerin genel görüntüsü (10X).....	57
Şekil 4.5. Küre formu nHA'ların <i>Drosophila</i> KOMET hemositlerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk uzunluğu bakımından değerlendirilmesi.....	58
Şekil 4.6. Küre formu nHA'ların <i>Drosophila</i> KOMET hemositlerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk yoğunluğu bakımından değerlendirilmesi.....	59
Şekil 4.7. Küre formu nHA'ların <i>Drosophila</i> KOMET hemositlerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk momenti bakımından değerlendirilmesi	59
Şekil 4.8. Çubuk formu nHA'ların <i>Drosophila</i> KOMET hemositlerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk uzunluğu bakımından değerlendirilmesi.....	60
Şekil 4.9.Çubuk formu nHA'ların <i>Drosophila</i> KOMET hemositlerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk yoğunluğu bakımından değerlendirilmesi.....	61
Şekil 4.10.Çubuk formu nHA'ların <i>Drosophila</i> KOMET hemositlerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk momenti bakımından değerlendirilmesi	61
Şekil 4.11. <i>Drosophila</i> hemositlerinde küre formu nHA'nın indüklediği Kaspaz-3/7 aktivitesi sonuçları	62
Şekil 4.12. <i>Drosophila</i> hemositlerinde küre formu nHA'nın indüklediği Kaspaz-8 aktivitesi sonuçları	63
Şekil 4.13. <i>Drosophila</i> hemositlerinde küre formu nHA'nın indüklediği Kaspaz-9 aktivitesi sonuçları	63

Şekil 4.14. <i>Drosophila</i> hemositlerinde çubuk formu nHA'nın indüklediği Kaspaz-3/7 aktivitesi sonuçları	64
Şekil 4.15. <i>Drosophila</i> hemositlerinde çubuk formu nHA'nın indüklediği Kaspaz-8 aktivitesi sonuçları	64
Şekil 4.16. <i>Drosophila</i> hemositlerinde çubuk formu nHA'nın indüklediği Kaspaz-9 aktivitesi sonuçları	65
Şekil 4.17. Küre formu 25 ppm nHA uygulamasında analiz edilen gen ifadeleri.....	66
Şekil 4.18. Küre formu 200 ppm nHA uygulamasında analiz edilen gen ifadeleri.....	67
Şekil 4.19. Çubuk formu 25 ppm nHA uygulamasında analiz edilen gen ifadeleri	68
Şekil 4.20. Çubuk formu 200 ppm nHA uygulamasında analiz edilen gen ifadeleri	69
Şekil 4.21. Küre formu nHA'nın 25-1000 ppm aralığında uygulanan dozlarının 24, 48 ve 72 saatlik inlübasyon süresinde 293T hücrelerindeki sitotoksik etkileri	71
Şekil 4.22. Çubuk formu nHA'nın 25-1000 ppm aralığında uygulanan dozlarının 24, 48 ve 72 saatlik inlübasyon süresinde 293T hücrelerindeki sitotoksik etkileri	72
Şekil 4.23. Küre formu nHA'nın 25-1000 ppm aralığında uygulanan dozlarının 24, 48 ve 72 saatlik inlübasyon süresinde HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkileri	74
Şekil 4.24. Çubuk formu nHA'nın 25-1000 ppm aralığında uygulanan dozlarının 24, 48 ve 72 saatlik inlübasyon süresinde HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkileri	75
Şekil 4.25. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerindeki negatif ve pozitif kontrol gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü	77
Şekil 4.26. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerindeki negatif ve pozitif kontrol gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü	77
Şekil 4.27. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonda küre form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü	78
Şekil 4.28. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerinde 48 saatlik inkübasyonda küre form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü	78
Şekil 4.29. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerinde 72 saatlik inkübasyonda küre form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü	78
Şekil 4.30. KOMET testinde küre formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk uzunluğu parametresinde değerlendirilmesi	79

Şekil 4.31. KOMET testinde küre formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk yoğunluğu parametresinde değerlendirilmesi	80
Şekil 4.32. KOMET testinde küre formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk momenti parametresinde değerlendirilmesi	80
Şekil 4.33. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonda çubuk form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü	81
Şekil 4.34. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerinde 48 saatlik inkübasyonda çubuk form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü	81
Şekil 4.35. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerinde 72 saatlik inkübasyonda çubuk form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü	81
Şekil 4.36. KOMET testinde çubuk formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk uzunluğu parametresinde değerlendirilmesi	82
Şekil 4.37. KOMET testinde çubuk formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk yoğunluğu parametresinde değerlendirilmesi	83
Şekil 4.38. KOMET testinde çubuk formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde meydana getirdiği DNA DNA hasarının kuyruk momenti parametresinde değerlendirilmesi	83
Şekil 4.39. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonda küre form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü	84
Şekil 4.40. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerinde 48 saatlik inkübasyonda küre form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü	84
Şekil 4.41. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerinde 72 saatlik inkübasyonda küre form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü	84
Şekil 4.42. KOMET testinde küre formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarı.....	85
Şekil 4.43. KOMET testinde küre formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarı.....	86
Şekil 4.44. KOMET testinde küre formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarı.....	86
Şekil 4.45. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonda çubuk form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü	87

Şekil 4.46. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerinde 48 saatlik inkübasyonda çubuk form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü 87

Şekil 4.47. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerinde 72 saatlik inkübasyonda çubuk form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü 87

Şekil 4.48. KOMET testinde çubuk formlu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarı.....88

Şekil 4.49. KOMET testinde çubuk formlu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarı.....89

Şekil 4.50. KOMET testinde çubuk formlu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarı.....89



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bazı biyomateriyallerin ilk kullanımları (Hasırcı ve Hasırcı 2018)	7
Çizelge 2.2. Biyomalzemeler ve biyoyumluluk için Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO) dizi kılavuz belgeleri (FDA 2020)	9
Çizelge 2.3. Biyomalzemelerin kullanım alanları, avantaj ve dezavantajları (Hasırcı ve Hasırcı 2018)	11
Çizelge 2.4. Kalsiyum fosfat bileşikleri (Cama 2014).....	12
Çizelge 2.5. Tez çalışmasında kullanılan genler ve görevleri	23
Çizelge 3.1. Standart <i>Drosophila</i> besin içeriği	32
Çizelge 3.2. SMART yönteminde kullanılan kimyasallar	36
Çizelge 3.3. <i>Drosophila</i> KOMET testi kimyasalları	40
Çizelge 3.4. Kaspaz aktivitesinde kullanılan kimyasallar	43
Çizelge 3.5. <i>Drosophila</i> RT ² -PCR uygulamasında kullanılacak olan DNA tamir genleri.....	45
Çizelge 3.6. Hücre kültürü solüsyonları	48
Çizelge 3.7. Hücre kültürü KOMET kimyasalları	51
Çizelge 3.8. Çoklu karar prosedürü (Frei ve Würgler 1988'den uyarlanmıştır).....	52
Çizelge 4.1. Küre ve çubuk formu nHA'ların <i>D. melanogaster</i> 'in 72±4 saatlik transheterozigot larvalarındaki genotoksik etkisi.....	56
Çizelge 4.2. Küre formu 25 ppm nHA uygulamasında artan ve azalan gen ifadeleri ...	66
Çizelge 4.3. Küre formu 200 ppm nHA uygulamasında artan ve azalan gen ifadeleri .	67
Çizelge 4.4. Çubuk formu 25 ppm nHA uygulamasında artan ve azalan gen ifadeleri	68
Çizelge 4.5. Çubuk formu 200 ppm nHA uygulamasında analiz edilen gen ifadeleri ..	69
Çizelge 4.6. Küre formu nHA'nın 293T hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda tripan mavisi testi ile değerlendirilen sitotoksik etkinin gösterilmesi	73
Çizelge 4.7. Çubuk formu nHA'nın 293T hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda tripan mavisi testi ile değerlendirilen sitotoksik etkinin gösterilmesi	73

Çizelge 4.7. Çubuk formulu nHA'nın 293T hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda tripan mavisi testi ile değerlendirilen sitotoksik etkinin gösterilmesi	73
Çizelge 4.8. Küre formulu nHA'nın HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda tripan mavisi testi ile değerlendirilen sitotoksik etkinin gösterilmesi	76
Çizelge 4.9. Çubuk formulu nHA'nın HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda tripan mavisi testi ile değerlendirilen sitotoksik etkinin gösterilmesi	76



1. GİRİŞ

Biyomalzemeler bir tıbbi cihaz veya implantın vücuda sokulması amacıyla üretilen, canlı dokular ile temas halinde bulunan ve ciddi bağışıklık yanıt oluşturmeyen doğal veya sentetik materyallerden oluşmaktadır (Bhat ve Kumar 2013). Yıllar içerisinde biyomalzemelerin toksisite, fiziksel ve mekanik güç gibi temel özellikleri geliştirilmiştir. Biyomalzeme üretiminde sağlanan yenilikler ve gelişmeler ile rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanlarının da gelişmesini sağlamıştır (Roi vd. 2019). Tıp alanında sürekli olarak artan gereksinimler nedeniyle binlerce tıbbi cihaz, teşhis ürünü ve tek kullanımlık malzemeler üretilmektedir. Her geçen gün akıllı ilaç dağıtımı, doku mühendisliği ve biyomalzeme uygulamalarında kullanılan materyaller de bu büyük üretim ağına eklenmektedir. Biyomalzemelerin insan ve hayvanların yaşam kalitesinin iyileştirilmesinde, hasta bakımında ve çağdaş tıp uygulamalarında önemli ölçüde katkısı olmuştur (Dee vd. 2002).

Sosyoekonomik ihtiyaçlara ve sağlık sorunlarına yönelik genişletilmiş işlevlere sahip malzemelerin doğru tanımlanması ve geliştirilmesi, klinik araştırmanın merkezinde önemli ve kritik adımlar oluşturmaktadır (Tite vd. 2018). Biyomateryallerin kimyasal yapısı, sertliği, yüzey özelliklerli, gözeneklilik yapısı ve bozunma özellikleri doku iyileştirilmesinde ve yenilenmesinde kritik öneme sahiptir. Bu özellikler vücuda alınan materyallerin hedef dokuya olan uyumunu, çevre dokularla olan etkileşimini, biyoaktivasyonunu önemli ölçüde etkilemektedir (Kim vd. 2021).

Biyomalzemeler, klinik uygulamadaki yerlerine göre Şekil 1.1'deki gibi sınıflandırılabilirler (Pruitt ve Chakravartula 2011);

Cerrahi malzemeler	• Zımbalar, dikişler, neşterler, vb.
Ortopedik malzemeler	• Eklem parçaları, omurilik parçaları, kemik plakaları, vb.
Kardiyovasküler malzemeler	• Kalp kapakçıkları, kalp pilleri, kateterler, greftler, stentler vb.
Diş materyalleri	• Dolgular, kaplamalar, çene eklemi değiştirmeleri, ortodonti, vb.
Yumuşak doku malzemeleri	• Yara iyileştirme, rekonstrüktif ve büyütme, oftalmolojik, vb.
Teşhis materyalleri	• İmplant edilebilir sensörler, ilaç dağıtımı

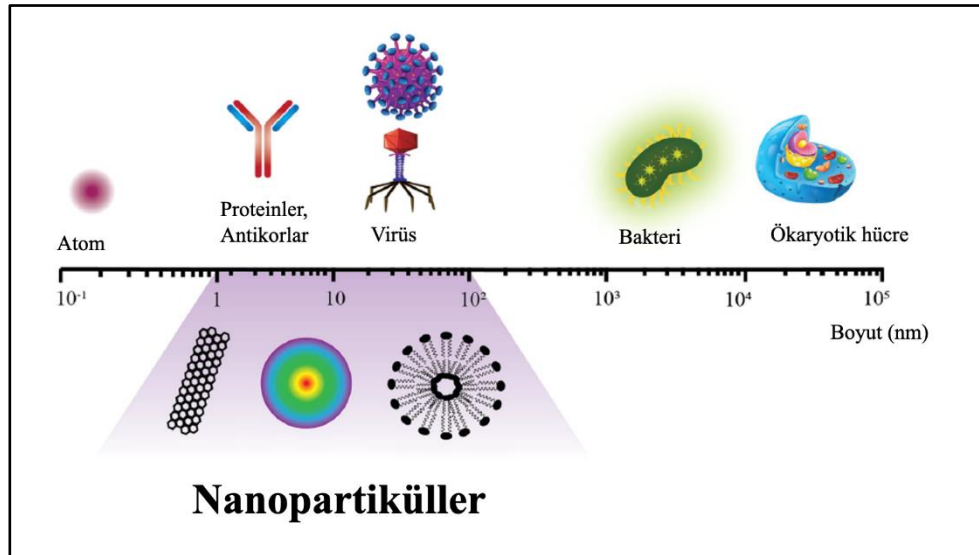
Şekil 1.1. Biyomalzemelerin klinik uygulamaları (Pruitt ve Chakravartula 2011)

Yapı, bağ ve doğal özelliklere dayalı üç sentetik malzeme kategorisi metalleri, seramikleri ve polimerleri içermektedirler (Pruitt ve Chakravartula 2011). Doğuştan ve sonradan meydana gelebilecek hasarların onarılmasında biyomalzemeler kullanılarak kemik ve dişlerin yenilenmesi ve iyileştirilmesi ile yüksek yaşam kalitesininin sağlanması

amaçlanmaktadır (Dubruel ve Van Vlierberghe 2014). Seramik malzemeler, biyolojik dokuya uyum sağlayabilmeleri, korozyon ve kalıntı üretmemeleri, yüksek sıcaklık ve değişken pH aralıklarında dayanıklılığını koruması ve en önemlisi doğal kemik ve diş yapısına uygunlukları nedeniyle ortopedik ve dental tedavilerde önemli bir yere sahiptir (Hasırcı ve Hasırcı 2018).

Kimyager ve metalurjist Johan Gottlieb Gahn 1769 yılında kemiklerde kalsiyum fosfat (CaP) yapısını keşfetmesi ile kemiğin inorganik ve organik yapısı araştırılmaya başlanmıştır. Kemik ve diş yapısının güçlendirilmesi amacıyla hidroksiapatit (HA) kullanımı 1980'lerin başında başlamıştır. İnsanda HA kaplı ilk kalça protezi 1985 yılında Furlong tarafından gerçekleştirilmiştir. Nano boyutlu HA (nHA) üretimi 1994 yılında başlamıştır ve 1998 yılında doku mühendisliği uygulamalarında HA'lar yer almaya başlamıştır (Eliaz ve Metoki 2017).

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ kimyasal formülüne sahip olan HA, diş ve kemik dokularının ana mineral bileşimini oluşturan ve insan vücudunun pH değeri ve sıcaklığındaki en kararlı kalsiyum fosfat mineralidir (Boudemagh vd. 2019). Vücuda alınan tüm materyallerde olduğu gibi kemik yenilenmesinde kullanılan malzeme biyouyumlu olmalıdır. Ayrıca iyi bir bağlanma sağlanması için malzemenin kaplanabilir ve şekillendirilebilir olması gerekmektedir (Pielichowska ve Blazewicz 2010). Kemik dokusuna yerleştirilen HA'lar osteoblastların protez yüzeyine yapışmasını, çoğalmasını sağlayarak doku ve implant arasındaki biyoaktivasyonu sağlamaktadır (Kreller vd. 2021). Bununla birlikte, HA seramiklerinin yüksek biyoaktivitesine karşın mekanik özellikleri genel olarak düşük yük taşıyıcı uygulamalara olan kullanımını kısıtlamaktadır (White ve Best 2007; Zhou ve Lee 2011). Nanobilim ve nanoteknolojideki son gelişmeler sayesinde, HA'nın bu dezavantajlarını ortadan kaldırmak için nanometre ölçekli HA geliştirilmeye başlanmıştır.



Şekil 1.2. Nanopartiküllerin boyut karşılaştırması (Poh vd. 2018)

Nanopartiküller (NP) üç fiziksel boyuttan en az birinin 1 nm ile 100 nm arasında bulunduğu parçacıklardır (Şekil 1.2) (Lewinski vd. 2008). Richard P. Feynman, "nanoteknoloji" terimini ilk olarak 1959'da Amerikan Fizik Derneği Yıllık Toplantısında

kullanmıştır (Toumey 2009). Feynman'ın "Kaçınılması mümkün olmayan bir gelişme" olarak bahsettiği nanoteknoloji ürünleri 2000'lerden beri kozmetik, güneş kremi, gıda ambalajı, giyim ve dezenfektanlarda yer almaktadır. Nanoteknoloji tıpta ve diş hekimliği uygulamalarında doku yenilenmesi ve tedavisi, hedefe yönelik ilaç dağıtımında kullanılmakta, böylece hastalıkların tedavisinde ve sağlık sorunlarının önlenmesine yer almaktadır (Kasimoglu vd. 2020).

NP'lerin moleküler tasarımı ve üretim yöntemlerindeki yenilikler, farklı inorganik, organik ve hibrit NP sınıflarının boyut, morfoloji ve diğer fizikokimyasal özelliklerinin kontrolüne izin vermektedir (Ignjatovic vd. 2020). Nanoteknolojik malzeme üretimi ile implantların gözenek hacmi, şekli, çapı, çözünürlüğü gibi yapısal özellikleri kontrol edilerek biyouyumluluğun artırılması amaçlanmaktadır (Bonilla-Represa vd. 2020). Geleneksel seramik formülasyonları ile karşılaştırıldığında nanofazdaki HA'ların yüzey tanecik boyutu ve gözenek boyutu gibi özelliklerin protein etkileşimlerinde daha etkili olduğu gözlenmektedir. Bu özellikler nHA'ların kemik hücrelerinde uzun süreli fonksiyonellik kazandırmaktadır (Ferraz vd. 2004). Son yıllarda, nano-hidroksiapatit (nHA), biyomedikal uygulamalarda hasar görmüş kemik veya dişler ve diğer kemik ilişkili alanlar, iskele malzemeleri ve ilaç verme maddeleri için yaygın olarak kullanılmaktadır (Phan vd. 2017).

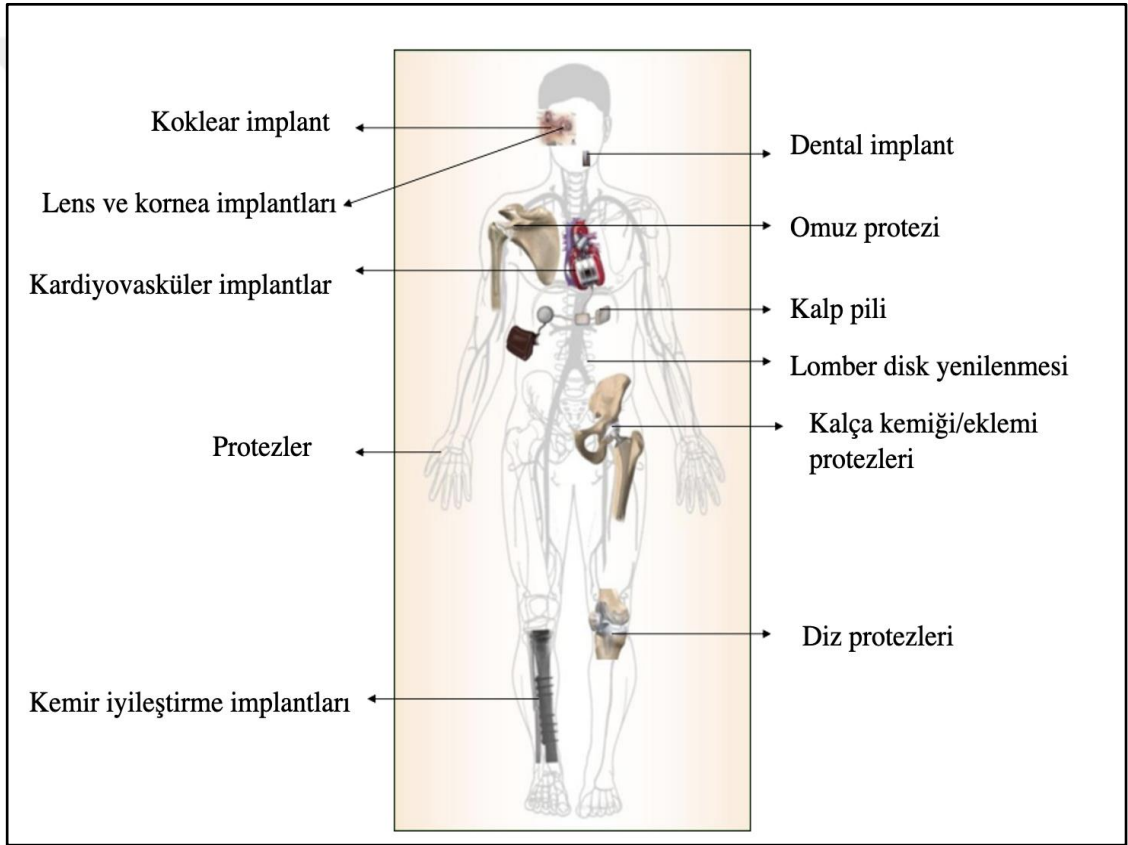
Morfoloji, boyut, şekil ve yapıdan oluşmaktadır. NP'lerin işlevselliği, morfolojilerinin kontrol edilmesiyle sağlanmaktadır. Çubuk, küre, plaka gibi morfolojik özellikler farklı sentezleme yöntemleri ve bu yöntemlerin içerisinde kontrol edilebilen parametrelerle sağlanmaktadır (Singh vd. 2020). HA'nın spesifik geometrisine, gözenek boyutuna ve bozunma hızında meydana gelen değişimler implantın hedef dokuda farklı performans göstermesini sağlamaktadır (Chen vd. 2021).

Biyomalzemelerin sahip olması gereken en önemli özellik biyouyumluluktur. Vücuda alınan materyalin yüksek oranda hedef dokuyu taklit etmesi ve hasta refahı açısından sorun yaratmamak adına cerrahi müdahalelerin en az seviyede tutulması gerekmektedir. Bu amaçlar doğrultusunda nano boyutlarda tasarlanan biyomateryaller tıbbi uygulamalarda önemli bir yer tutmaktadır. Nanomateryallerin sahip olduğu eşsiz optik, katalitik, fiziksel ve kimyasal özellikler nanoteknoloji endüstrisini her geçen gün genişletmektedir. Ancak meydana gelen bu büyüme NP'lerin toksisitesi hakkındaki endişeleri de beraberinde getirmektedir. Bu çalışmada nHA'ların potansiyel toksik etkileri *in vivo* ve *in vitro* ortamda farklı test sistemleri ile değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Biyomalzemeler

Biyomalzemeler tıp, diş hekimliği, veterinerlik ve farmasötik uygulamalarda kullanılan, vücut dokuları ile yakın ve sürekli temas halinde bulunan ve genellikle bu dokulara implante edilen malzemelerdir. Biyomalzemeler fizyolojik ortamda güvenli ve etkili kullanıma uygun hale gelmesini sağlayan kimyasal, mekanik, fiziksel ve biyolojik özelliklerin bir kombinasyonuna sahiptir ve bu özellikleri ile diğer malzemelerden ayrılmaktadır (Williams 1987). Herhangi bir biyomalzeme geliştirilmesinde ve kullanılmasında biyolojik uyumluluğa sahip olmalıdır. Konağın savunma mekanizması implante edilen materyali tolere edebilmelidir. Bu nedenle biyomalzemelerin uyumluluğunun dikkatli bir şekilde incelenmesi bu materyalin geliştirilmesinde önemli bir yer tutmaktadır (Sirova vd. 2014).



Şekil 2.1. Vücuda alınan biyomalzemeler (Manivasagam vd. 2010)

Biyomalzemeler, ilaç dağıtımı, doku mühendisliği, cihaz tabanlı terapiler ve tıbbi görüntüleme gibi tıbbi uygulamalarda rutin olarak kullanılmaktadır. Geliştirilen organik veya inorganik malzemeler, doku büyümesi ve ilaçların hedef dokulara yönlendirilmesi amacıyla özel olarak tasarlanmaktadır (Mitragotri ve Lahann 2009). Günümüzde diş hekimliği, ortopedi, plastik ve rekonstrüktif cerrahi, oftalmoloji, kardiyovasküler cerrahi, beyin cerrahisi, immünolojide yaygın olarak biyomalzemeler kullanılmaktadır (Şekil 2.1). Metaller, alaşımlar, polimerler, seramikler ve kompozitler gibi çeşitli malzeme sınıfları ile biyomateryallerin tasarlanmaktadır. Biyomalzemeler farklı fiziksel ve

kimyasal yapıdaki biyolojik ortamlarla karşılaşmalar ve bunların hedef dokularla olan etkileşimi karmaşık bir problemdir.

2.2. Biyomalzemelerin Tarihçesi

Ham ve doğal ürünlerin karmaşık yapay maddelere evrimi insanlık tarihinde önemli bir bölümü kapsamaktadır. Doğal kaynaklar ve toplumun bilgi düzeyine bağlı olarak farklı coğrafik alanlarda çeşitli teknik yaklaşımlar geliştirilmiştir. Günümüzde biyomateryal biliminde yaygın olarak kullanılan ilkeler tıbbın tamamen deneysel ve mistik temeller üzerinde kurulu olduğu bir zamana dayanmaktadır. İlkel dönemlerde önyargı ve baskı altındaki klinisyenler elde ettikleri başarı ya da başarısızlıklara istatistiksel bir yorum getirmeden ve temel hücre ve mikrobiyoloji bilgilerinden uzak bir biçimde analiz ve tedavileri gerçekleştirmiş ve bu zorluklara rağmen önemli kanıtlar ortaya koymuşlardır (Marin vd. 2020).

Biyolojik olmayan malzemelerin insan vücuduna girişinin örnekleri milattan önceye dayanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri, Washington yakınlarında bulunan ve “Kennewick Man” olarak anılan bir insanın kalıntılarında kalçasına gömülü halde mızrak ucu bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 2.2). Modern biyomalzemelerle çok az benzerliği bulunan 9000 yaşındaki bu metal parça vücut tarafından tolere edilen ilk yabancı madde olarak görülmektedir (Ratner ve Zhang 2020).



Şekil 2.2. “Kennewick Man” (Owsley ve Jantz 2014)

Milattan sonra 600’lü yıllarda kullanılan diş protezleri tasarlanan ilk implantlar arasında görünmektedir. Mayalıların deniz kabuklarından yaptıkları sedef dişler, Meksikalı Tlailotlacan kadınının kafatasında jadeit mineralinden yapılmış diş protezi

implantların ilk örneklerindendir (Şekil 2.3) (Goguitchaichvili vd. 2017; Hasırcı ve Hasırcı 2018).



Şekil 2.3. “Tlailotlacan Woman” bulunan diş implantı (Goguitchaichvili vd. 2017)

Zaman ilerledikçe implant tasarımlarında altın, gümüş ve bakır kullanılmıştır. Dikiş malzemesi olarak kedi bağırsağı, kalp kapakçığı olarak domuz kalp kapakçıkları gibi doğal malzemeler de kullanılmıştır. Ahşap, fildişi, paslanmaz çelik ve çeşitli polimerler zaman içerisinde vücutta farklı dokularda biyomalzeme olarak kullanılmıştır. Son 50 yılda seramik malzemeler kemik dolgularında kullanılmaya başlanmıştır (Pruitt ve Chakravartula 2011; Hildebrand 2013).

Geçmişte, biyomedikal uygulamalarda malzemelerin başarısı, günümüz biyoyoumluluk koşullarından uzak bir şekilde gözlem ve deneme-yanılma süreçlerine bağlı olarak gerçekleşmiştir. İkinci Dünya Savaşı’nda Harold Ridley yaralı bir savaş uçağı pilotunu muayene ettiği sırada pilotun gözünde plastik parçaların enfeksiyon yaratmaksızın kalabildiğini fark etmiştir. Bu gözlem sonucunda kokpitteki akrilik plastik parçalardan göz içi merceğinin tasarlamak için çalışmalar yapmıştır. Ridley 1949 yılında akrilik plastikten ilk göz içi merceğini insan gözünde kullanmış ve başarılı olmuştur. Ridley’in gözlemi ve geliştirdiği materyal ile her yıl 10 milyondan fazla insan gözüne implante edilen ve modern intraoküler lenslerin geliştirilmesine yol açarak katarakt hastaları için bir devrim yaratmıştır. Aynı yıllarda Charnley kalça implantını, Vorhees vasküler grefti, Hufnagel kalp kapakçığını icat etmiştir ve Kolff böbrek diyalizinde devrim yaratan buluşunu gerçekleştirmiştir. Bu öncüler, biyomalzemeler için temel ilkelerin oluşturulmaya çalışıldığı bir çağda, uygulanabilirliğini kanıtladı ve günümüz biyomateryal teknolojisinin temelleri geliştirmiştir. 1960’ların sonlarında mühendisler, kimyagerler ve biyologlar, doktorlarla iş birliği halinde biyomalzemeler için tasarım ilkelerini ve sentez stratejileri oluşturulmaya başlanmıştır (Çizelge 2.1). Biyomalzemelerin toksisitesi hedef doku iyileşmesini olumsuz etkileyeceği fikri kesinlik kazanmış ve günümüz biyoyoumluluk kavramı oluşmaya başlanmıştır (Ratner ve Zhang 2020).

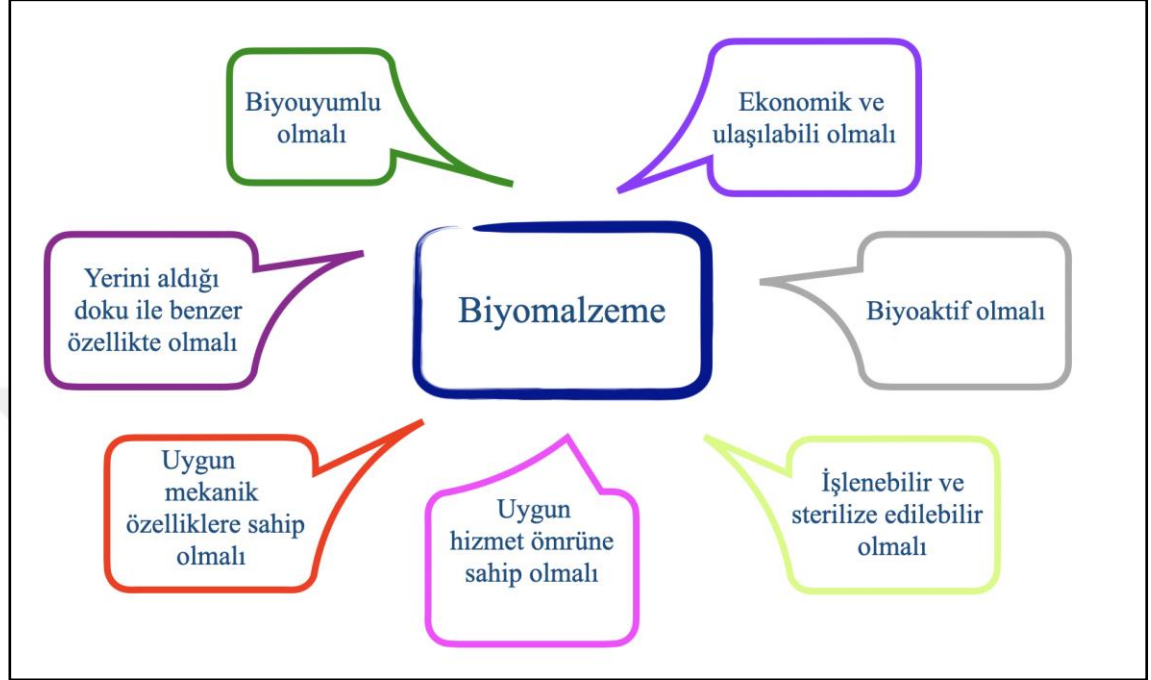
Çizelge 2.1 Bazı biyomateryallerin ilk kullanımları (Hasırcı ve Hasırcı 2018)

Yıl	Uygulama
MÖ 600	Burun Rekonstrüksiyonu
18.-19. yy	Kemik kırıklarının iyileştirilmesinde demir, altın, gümüş ve platin tel ve çivi kullanımı
1893-1912	Kırık tedavilerinde paslanmaz çelik çivi ve plaka kullanımı
1912	Tıbbi uygulamalar için korozyona dayanıklı Vanadyum paslanmaz çelik alaşımlarının geliştirilmesi
1926-1931	Femur boyun kırığının onarımında vida ve çivi kullanımı
1926	Molibden içeren aşındırıcı olmayan alaşımların hazırlanması
1938	İlk kalça protez uygulaması
1940'lar	Kornea implantlarında akrilik kullanımı
1944	Hemodiyaliz sisteminin geliştirilmesi
1946	Kalça protezlerinde uygun polimerlerin kullanımı
1952	Tekstil materyalleri kullanılarak damar greftlerinin oluşturulması
1953	Total kalça protezinde akrilik kemik çimentosu kullanımı
1958	Kalp pili uygulaması
1960	Kalp kapakçığı uygulaması
1980'ler	Bilgisayar kontrollü aletler, elektrotlar ve akıllı malzemeler
1990'lar	Doku mühendisliği, yapay doku ve organların geliştirilmesi
2000'ler	Nanobiyomateryallerin kullanımı

2.3. Biyomalzemelerin Özellikleri

Biyomalzemeler biyolojik ortamda kullanım amaçları doğrultusunda belirli gereksinimleri karşılamalıdır (Şekil 2.4). Vücut dokusunun işlevini eski haline getirmeyi amaçlayan bir biyomedikal implantın geliştirilmesinde malzemenin mekanik özellikleri, tasarımı ve biyoyumluluğunun araştırılması esastır. Seçilen malzeme veya malzeme sistemi, elastikiyet, akma gerilimi, süneklik, tokluk, aşınma direnci vb. gibi uygun mekanik özelliklere sahip olmalıdır. Ayrıca, nispeten düşük maliyetle farklı şekillerde şekillendirilmeye veya işlenmeye uygun olmalı ve kolayca temin edilebilir olmalıdır. Uygun bir implant malzemesi tasarımının, gerekli dayanıklılık, işlevsellik ve biyolojik yanıtı sağlaması amaçlanır. Dayanıklılık ve işlevsellik, malzemenin yığın özellikleri

tarafından yönetilirken biyolojik tepki, yüzey kimyasına, yüzey topografyasına, yüzey pürüzlülüğüne, yüzey yüküne ve yüzey enerjisine bağlıdır. Biyouyumluluk, implant malzemesinin vücuttan herhangi bir olumsuz tepki olmaksızın çevre dokular tarafından kabul edilmesi veya bunun tersi olarak tanımlanabilmektedir (Paital ve Dahotre 2009).



Şekil 2.4. Biyomalzemelerin sahip olması beklenen temel özellikleri (Hasırcı ve Hasırcı 2018)

Vücuda girecek olan materyalin biyouyumlu olması için toksik ve kanserojen olmayan, bağışıklık sistemini harekete geçirmeyen veya çok az harekete geçiren, kimyasal olarak stabil ve korozyon gibi bozulmalara karşı dirençli olmalıdır. Malzemenin fizikokimyasal özellikleri ve dayanıklılığı, protezin istenen işlevi, organ/doku düzeyinde fizyolojik ortamın doğası, arıza durumunda olumsuz etkiler her biyomateryalin uygunluğu hakkında tartışılması gereken en önemli kriterlerdir. Protetik cihazın başarısını sağlamak için son kullanımı ile ilgili olarak malzeme direnci (çekme veya basınç), sağlamlık, yorulma direnci, aşınma direnci ve boyutsal stabilite dikkate alınmalıdır. Örneğin, bir kalça implantı için sert, güçlü bir malzeme daha uygun olurken, bir damar grefti için esnek, daha az güçlü bir malzeme yeterli olacaktır. Ayrıca, birçok implant vücutta çeşitli tip ve büyüklüklerde tekrarlanan streslere maruz kaldığından, dinamik yükleme koşulları altında malzemelerin performansının sürekli olarak kontrol altında olması gerektiği dikkate alınmalıdır. Termal ve elektrik iletkenliği ve ışık geçirgenliği gibi fiziksel özellikler kalp pili elektrotları, göz içi lensler ve diş restoratifleri gibi uygulamalar için oldukça önemlidir ve uygulamalarda malzeme başarısını yakından etkilemektedir (Dee vd. 2002).

Çizelge 2.2. Biyomalzemeler ve biyoyumluluk için Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO) dizi kılavuz belgeleri (FDA 2020)

1 ISO 10993-1:2018	Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi—Bölüm 1: Risk yönetim süreci içinde değerlendirme ve test etme
3 ISO 10993-3:2014	Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi—Bölüm 3: Genotoksisite, kanserojenite ve üreme toksisitesi testleri
5 ISO 10993-5:2009	Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi—Bölüm 5: İn vitro sitotoksisite testleri
10 ISO 10993-11:2017	Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi—Bölüm 11: Sistemik toksisite testleri
13 ISO 10993-14:2001	Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi—Bölüm 14: Seramik bozunma ürünlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi
15 ISO 10993-16:2017	Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi—Bölüm 16: Bozunma ürünleri için toksikokinetik çalışma tasarımı
17 ISO 10993-18:2005	Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi—Bölüm 18: Malzemelerin kimyasal karakterizasyonu
18 ISO/TS 10993-19:2006	Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi—Bölüm 19: Malzemelerin fizikokimyasal, morfolojik ve topografik karakterizasyonu
22 ISO/TR 10993-33:2015	Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi—Bölüm 33: Genotoksisteyi değerlendirmeye yönelik testler hakkında kılavuz—ISO 10993-3'e Ek
23 ISO/TR 15499:2016	Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi—Risk yönetimi süreci içinde biyolojik değerlendirmenin yürütülmesine ilişkin kılavuz
24 ISO/DTS 21726	Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi—Çıkarılabilir maddelerin biyoyumluluğunu değerlendirmek için toksikolojik endişe eşliğinin uygulanması
35 ISO 22794:2007	Diş Hekimliği—Ağız ve çene cerrahisinde kemik dolgusu ve büyütmesi için implante edilebilir malzemeler
36 ISO 11979-5:2006	Oftalmik implantlar—Göz içi lensler—Bölüm 5: Biyoyumluluk
37 ISO 19227:2018	Cerrahi implantlar—Ortopedik implantların temizliği—Genel gereksinimler
43 ISO 13175-3:2012	Cerrahi implantlar—Kalsiyum fosfatlar—Bölüm 3: Hidroksiapatit ve beta-trikalsiyum fosfat kemik ikameleri

Genel olarak, insan vücuduna kısa, orta veya uzun vadeli implantasyon için endüstriyel ürünler yapmak için kullanılan tüm materyaller “biyouyumluluklarını” kanıtlamak için test edilmelidir. Malzemelere insan implantasyonu için izin verilmeden önce, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), artan düzeyde inceleme için *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmaların yapılması gerekmektedir (Mantovani 2000). Biyomalzemelerin biyouyumluluğunu sistematik olarak değerlendirmesinde kapsamlı araştırmalar yapılması gerekmektedir. Bu bağlamda, Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO) tarafından biyomalzemelerin biyouyumluluğunu araştırmak için önerilen bir dizi standart yöntem vardır. Çizelge 2.2, biyomalzemelerin ve biyouyumluluğun araştırılmasında yer alan standart yöntemleri göstermektedir (Mozafari 2020).

2.4. Biyomalzeme Türleri

Biyomalzemeler doğal kaynaklardan elde edilebildiği gibi çeşitli kimyasal yaklaşımlar kullanılarak laboratuvar şartlarında da üretilenilmektedir. Biyomalzeme kaynakları doğal malzemeler (biyopolimerler), sentetik polimerler, metaller, kompozitler ve seramiklerdir (Pielichowska ve Blazewicz 2010; Hasırcı ve Hasırcı 2018). Çizelge 2.3, biyomalzeme örneklerini, avantaj/dezavantajlarını ve kullanımlarını özetlemektedir.

Doğal malzemeler biyouyumlulukları, biyobozunurlukları, toksik olmamaları ve biyoaktif molekülleri adsorbe etme yetenekleri nedeniyle tıbbi uygulamalar için uygun görülmektedir. Bununla birlikte, bazı dezavantajlar, tıbbi kullanım için doğal polimerlerin gelişimini engellemektedir. Doğal malzemelerde mikrobiyal ve ağır metal kontaminasyonu meydana gelme olasılığı yüksektir. Malzemenin elde edilmesi sırasındaki süreçlerin yavaş ilerlemesi sebebiyle tıbbi kullanım için malzemenin seri üretimini engellemektedir (Park vd. 2017).

Metaller kalça ve diz protezleri, çiviler, vidalar ve plakalar gibi yük taşıyan implantlar için kullanılmaktadır. Metaller ayrıca yapay kalp kapakçıklarının parçaları, vasküler stentler ve kalp pili elektrotları olarak da kullanılmaktadır. Fizyolojik ortam tipik olarak, çözünmüş gazlar, elektrolitler, hücreler ve proteinler ile pH 7.3'te 37°C'lik bir sulu çözelti olarak modellenir. Metallerin bu ortama bulunması, kimyasal reaksiyonlarla metalin bozulması ve korozyona neden olabilmektedir. Korozyon sonucunda oluşan iyon salınımı ile metalik biyomalzemenin biyouyumluluğunu azaltmakta ve implantların başarısını olumsuz etkilenmektedir. Ek olarak korozyon yan ürünlerinin vücuttaki uzak bölgelere taşınması ile hedef doku çevresinde hücre ve dokuları etkileyebilmektedir. Bu koşullar, protezlerin en büyük alıcı grubu olan hasta ve yaşlı hastaların bedenlerinde yeni problemler yaratmaktadır (Dee vd. 2002).

Sentetik polimerler daha iyi yapısal stabilite ve mekanik özellikler önerirken, doğal polimerler yüksek biyouyumluluk ve doğal biyobozunma özellikleri için oldukça faydalıdır. Bununla birlikte, düşük mekanik özellikler, işleme zorlukları ve yaygın olarak çözücü kullanımına ihtiyaç duyan termal hassasiyet, doğal polimerlerin etkinliğini sınırlandırarak araştırmacıları bunları sentetik veya elektro iletken polimerlerle kompozit hale getirmeye teşvik etmektedir (Amini vd. 2021).

Çizelge 2.3. Biyomalzemelerin kullanım alanları, avantaj ve dezavantajları (Hasırcı ve Hasırcı 2018)

Materyal tipi	Örnekler	Avantajlar	Dezavantajlar	Kullanım alanı
Doğal metaryaller (Biyopolimerler)	Selüloz, kolajen, hüyalorinik asit, kıtsan, ipek	Düşük maliyet, hedef dokuya benzerlik, bolluk	Bağışıklık sistemini harekete geçirebilir, denature olabilir, sıcaklığa karşı dayanıksız	Doku mühendisliği, yara iyileştirme, yapay deri
Sentetik polimerler	Polipropilen, profetien, poli(L-laktik), polivinilklorür, polimetilmetakrilat, Teflon	Korozyon riski yok, yumuşak doku ile benzerlik, üretim kolaylığı, parçalanabilir	Yüksek sıcaklıklara karşı dayanıksız, aşınabilir, darbeye karşı dayanıksız	Yumuşak doku implantları, ilaç taşıma sistemleri, kontak lens, doku mühendisliği, kemik dolgusu
Seramikler	Hidroksiapatit, alüminyum oksit	Stabil, biyolojik dokuyu taklit edebilir, yüksek dayanıklılık	Aşırı yoğun, kırılğan	Sert doku implantları
Metaller	Paslanmaz çelik, titanyum, kobalt-krom alaşımları	Yüksek gerilme ve basınçta dayanıklı	Korozyon, aşırı yoğun, iyon salınımı	Kemik plakaları, vida ve çivi gibi bağlantı parçaları
Kompozitler	Metal-seramik, polimer-seramik, metal-polimer	Kompozit türüne göre değişkenlik gösterebilir		Kalça implantları, tendon, vida, çivi, karbon fiber ligamentler

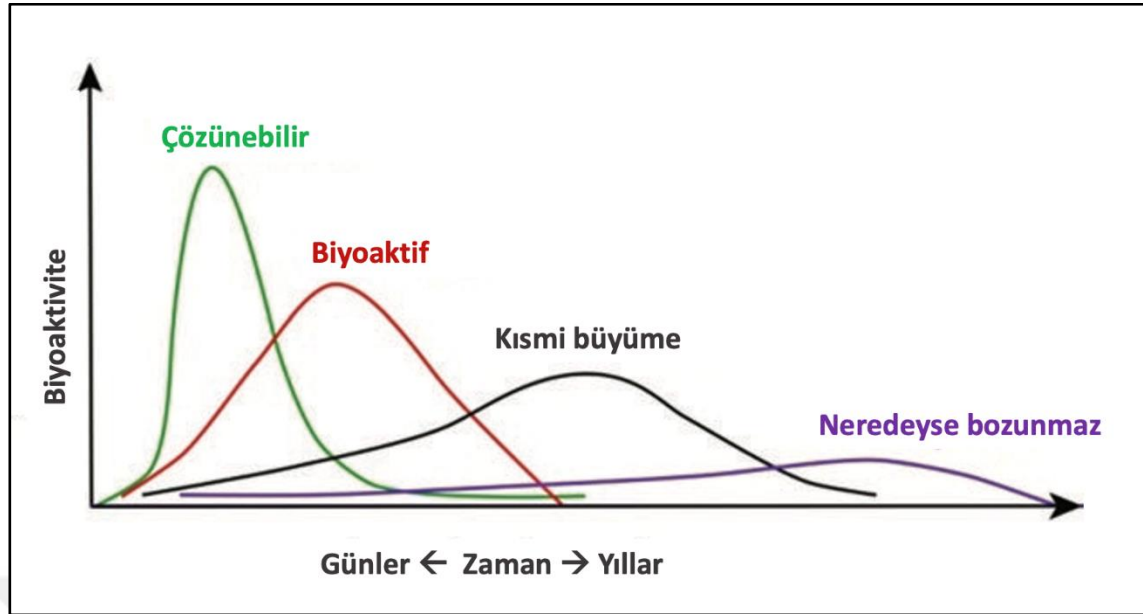
Seramik malzemeler kalça implantları, diş implantları, kalp kapakçığı bileşenleri olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte metaller veya polimerlere göre daha az kullanım oranına sahiptir. Metallerde olduğu gibi, seramiklerdeki atomlar arası bağlar, uzun mesafeli üç boyutlu kristal oluşturmaktadır. Metalik bağın aksine, iyonik ve kovalent bağlardaki elektronlar, kurucu iyonlar/atomlar arasında konumlanmaktadır. Sonuç olarak, seramikler tipik olarak elektriksel ve termal yalıtkanlardır. Güçlü iyonik ve kovalent bağlar aynı zamanda seramiği sert ve kırılğan yapmaktadır (Dee vd. 2002).

Kalsiyum fosfat (CaP) seramikleri üzerinde, kemik ve dişlerin doğal olarak bulunan mineral fazına benzerliği nedeniyle sert doku rejenerasyonu için biyomateryal olarak kullanılmaktadır. Dental implantlar, kemik boşluğu dolgu maddeleri, maksillofasiyal rekonstrüksiyon ve spinal cerrahi kalsiyum fosfat seramiklerinin kullanım alanlarından bazılarıdır. En yaygın olarak kullanılan CaP sistemlerinden bazıları, 0,5 ila 2,0 arasında değişen kalsiyum-fosfat oranları (Ca:P) ile Çizelge 2.4'te listelenmiştir. CaP bazlı malzemeler, çeşitli kimyasal bileşimler, kristal yapılar ve suda çözünürlük ile karakterize edilmektedir. CaP bazlı sistemler, Ca:P oranı ne kadar düşükse, bileşik o kadar asidik ve dolayısıyla materyalin suda daha fazla çözünür hale geldiği bir eğilim izlemektedir (Cama 2014).

Çizelge 2.3. Kalsiyum fosfat bileşikleri (Cama 2014)

Ca/P Molar Oranı	Bileşen	Kimyasal Formül
0.5	Monokalsiyum fosfat monohidrat	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
1.00	Bruşit	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1.00	Monetit	CaHPO_4
1.33	Oktakalsiyum fosfat	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1.20-2.20	Amorf kalsiyum fosfat	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$
1.50	α -Trikalsiyum fosfat	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1.50	β -Trikalsiyum fosfat	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_3$
1.67	Hidroksiapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
1.67	Florapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$
2.00	Tetrakalsiyum fosfat	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$

Seramiklerin biyoaktivitesi, implant materyali ile biyolojik doku ortamında bulunan moleküller arasında meydana gelen reaksiyonlara bağlıdır. Vücut tarafından emilebilir olanlar, su ve mevcut iyonların etkisi altında hidrolitik olarak bozunmaktadır. Bunlar belli bir süre sonra bölgeden ve vücuttan tamamen çıkarılmaktadırlar. Bunun yanında yoğun, gözeneksiz ve inert/durağan seramikler herhangi bir biyolojik aktivite göstermeden veya vücutta herhangi bir olumsuz reaksiyona neden olmadan vücutta kalabilmektedirler (Şekil 2.5) (Hasırcı ve Hasırcı 2018).

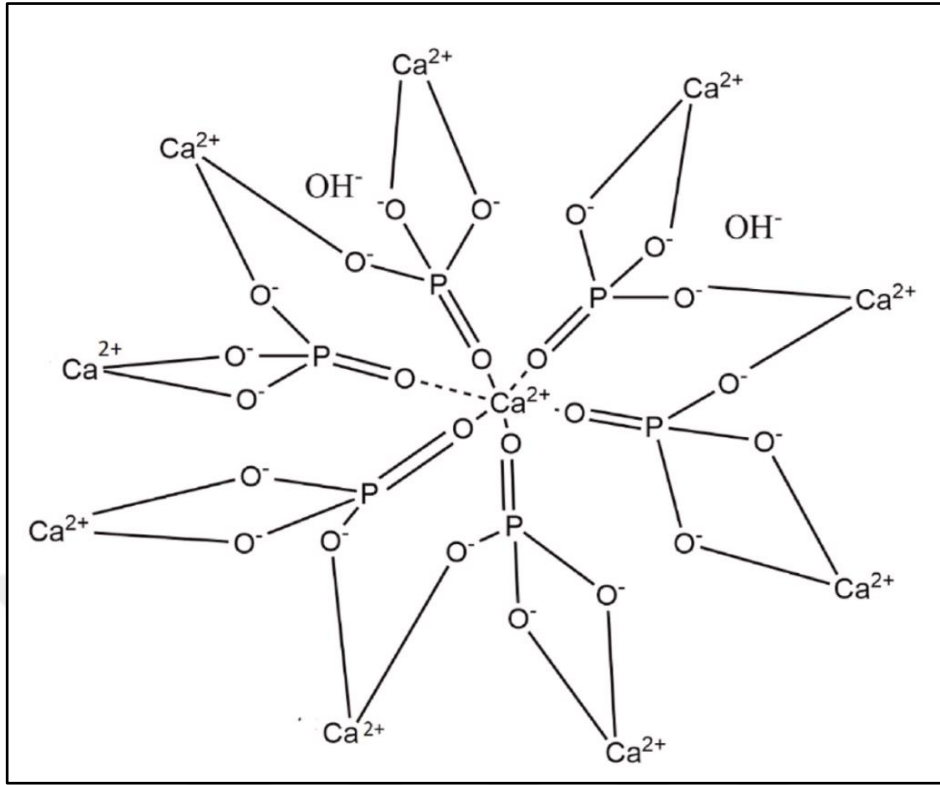


Şekil 2.5. Kalsiyum fosfatların zaman içerisinde stabilitesi ve biyoaktivasyonunun değişimi (Hasırcı ve Hasırcı 2018)

2.5. Hidroksiapatitler

HA, kemik ve diş gibi insan sert dokularının ana mineral bileşenidir ve insan vücudu için kalsiyum alımı ve salınımının kontrolü için depolama sağlamaktadır. HA, kimyasal formülü $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ olan bir kalsiyum fosfat bazlı biyoseramik sınıfına aittir. "Hidroksiapatit" kelimesi, "hidroksil" iyonu ve mineral adı olan "apatit"ten oluşmaktadır. Stokiyometrik Ca/P molar oranı 1.67'dir. HA kristali, $a = b = 0.9432 \text{ nm}$ ve $c = 0.6881 \text{ nm}$ birim hücre boyutlarına sahip altıgen bir yapıya sahiptir (Zhang 2011).

HA seramikleri, hücre büyümesini desteklemeleri ve biyolojik olarak aktif bir madde olmaları ve kemiğe yüksek oranda bağlanma kapasiteleri nedeniyle implant materyalleri arasında biyouyumluluğu en yüksek malzeme olarak öne çıkmaktadır (Sobczak-Kupiec vd. 2019). HA kemik mineralinin kimyasal ve kristal yapısına önemli ölçüde benzerlik göstermekte olup kalsiyum fosfat ailesinde en iyi bilinen doku iskelesi malzemesidir (Şekil 2.6) (Pasinli ve Aksoy 2010; Venkatesan ve Kim 2014). HA kristalleri yavaş ve kademeli olarak bulunduğu dokuda çözünerek ortamda kalsiyum ve fosfat miktarını artırmakta ve böylece kemik gelişimine katkıda bulunmaktadır (Salduz 2010; Coelho vd. 2019). HA'lar sıcaklık ve pH gibi etkenlerdeki değişikliklerde stabil kalmayı sürdürebildiğinden implant, kaplama, kemik dolgusu gibi işlevlerle kemiklerin tedavisinde ve oral uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Pappus vd. 2017). Vücuda implantı gerçekleştirilen HA 4-8 hafta içerisinde yeni lamellerin oluşumu sağlanabilmektedir (Cesur vd. 2018). Böylece enfeksiyon riski en aza indirgenerek implantın uyum içinde doku içerisine yerleşmesi sağlanmaktadır (Yıldız 2011). HA'lar sıcaklık ve pH gibi etkenlerdeki değişikliklerde stabil kalmayı sürdürebildiğinden implant, kaplama, kemik dolgusu gibi işlevlerle kemiklerin tedavisinde ve oral uygulamalarda kullanılmaktadır (Pappus vd. 2017).



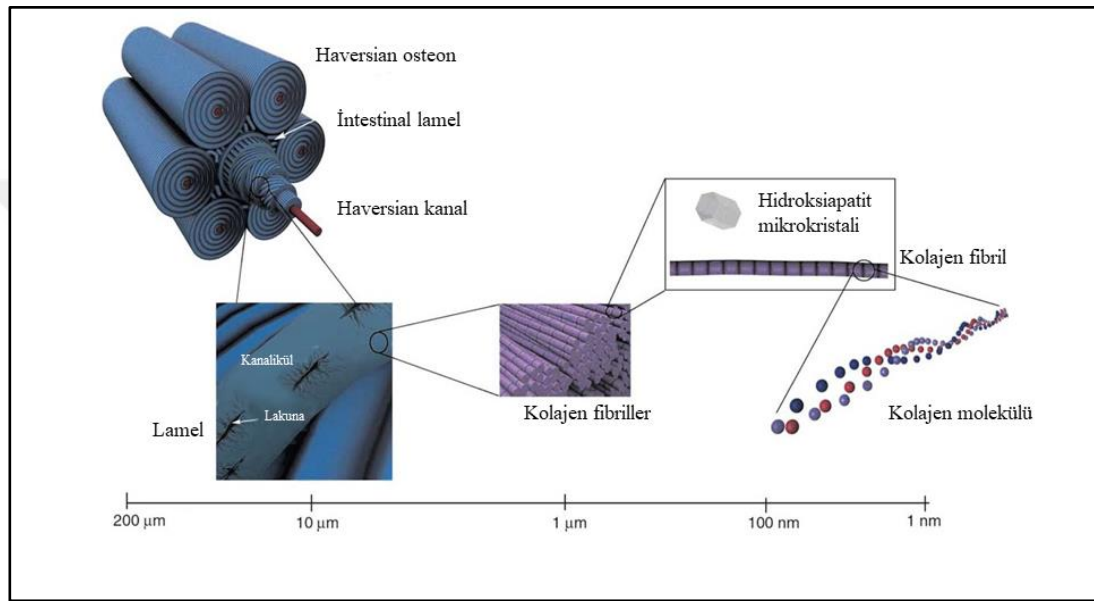
Şekil 2.6. HA kristal yapısı (Pai vd. 2021)

Yaşlanan nüfus, savaş ve sporla ilgili yaralanmalarla birlikte, kemik gibi sert dokuların değiştirilmesi için sürekli genişleyen bir gereksinim bulunmaktadır. Uygun mekanik özelliklere, yüzey kimyasına ve yüzey topografisine sahip tasarlanmış yapay iskele biyomateryalleri, bu hasarlı bölgelerde hücre bağlanmasını, hücre büyümesini ve doku oluşumunu geliştirmek için kullanılmaktadır. Bu mühendislik tekniklerinin çoğu, kemik dokularının doğal organizasyonunu taklit etmeyi ve böylece kemik rejenerasyonu için elverişli bir ortam yaratmayı amaçlamaktadır (Paital ve Dahotre 2009; Zhao vd. 2021). Travma, anormal iskelet gelişimi, hastalıklar, enfeksiyonlar ve tümör oluşumu gibi durumlar sonucu oluşan kemik hasarları önemli sağlık problemlerinden biridir. Tümörlü kemik dokusunun uzaklaştırılmasıyla kemikte bir miktar doku kaybına oluştuğundan hareket işlevinin sağlanması için mekanik destek gerekmektedir (Shea vd. 2000). Kemik kendini yenileyebilme özelliğine sahip olsa da büyük hasarlar karşısında bu özelliği yetersiz kalabilmektedir. Bu tip vakalarda çeşitli malzemelerle yapılan dolgular kemiğe yapısal ve mekanik destek sağlayarak dokunun iyileşmesini sağlamaktadır. Bu bağlamda uygun kemik dolgu malzemelerinin oluşturulması büyük önem taşımaktadır (Huri vd. 2010).

2.6. İnsan Vücudundaki Hidroksiapatitler

Kemik, metabolik açıdan aktif, yüksek vasküler yapıya sahip dinamik bir dokudur. Yetişkinlik döneminde, kemikler değişen çevre koşullarına karşı sürekli bir yeniden şekillenme süreci geçirmektedir. Kemik doku; destek ve hareket, koruma, mineral deposu, kemik matriks protein deposu ve enerjinin düzenlenmesi gibi 5 ana

görevi yerine getirmektedir (Bartl ve Bartl 2017). İskelet yapısı morfolojik olarak %20 kortikal (sıkı), %80 kanselöz (süngerimsi) kemikten oluşmaktadır. Kortikal kemik %10 gözeneklilik yapısına ve kanselöz kemik %50-90 gözenekliliğe sahiptir. Kortikal osteonlar Havers sistemi olarak adlandırılır (Tunçay 2013). Bu yapısal bileşenler protein iskelesinden, HA'lerden $[Ca_5(PO_4CO_3)_3(OH)]$ ve osteositlerden oluşmaktadır. Protein iskelesi 100 nm'den daha küçük boyuttaki liflerin bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Her bir lif üçlü sarmal ve paralel kolajen moleküllerinden oluşmaktadır. HA kristalleri plakalar şeklindedir ve fibriller ile çapraz bağlanmalar göstermektedir (Şekil 2.7) (Tirrell vd. 2002).

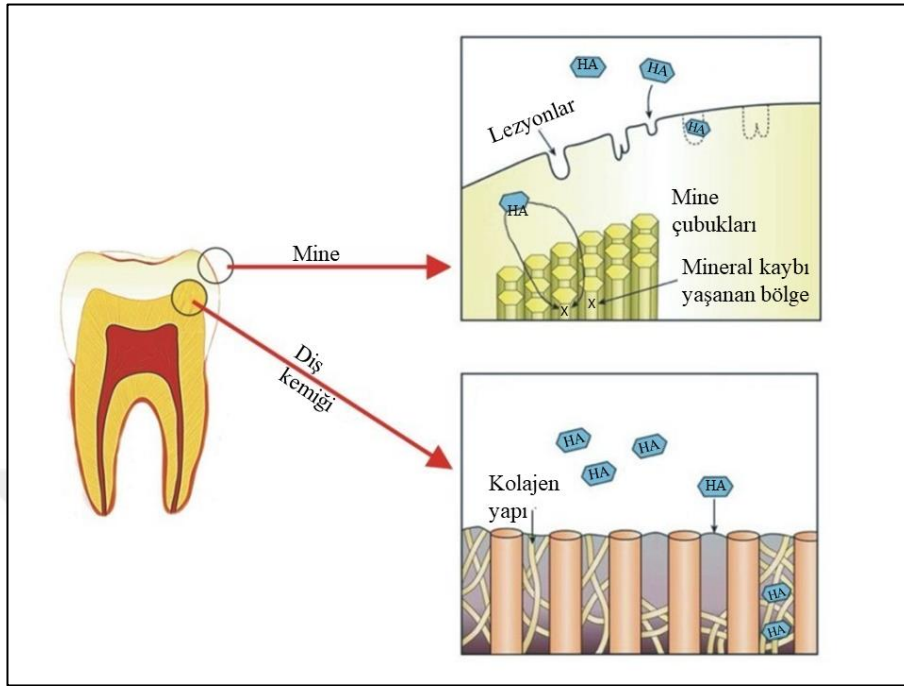


Şekil 2.7. Havers kanal sistemi (Tirrell vd. 2002)

Diş minesini insan vücudunda en yoğun mineral içeriğine sahip olan dokulardan bir tanesidir. Mine tabakasının %96'lık kısmı inorganik materyalden %4'lük kısmı ise organik materyal ve sudan oluşmaktadır. İnorganik materyalin büyük bir bölümünü HA'lar oluşturmaktadır (Pepla vd. 2014). Diş minesini, Mohs sertlik skalasında 5 ile değerlendirilmekte olup insan vücudundaki en sert materyaldir (Yıldız 2011). Restoratif diş hekimliğinde osseintegrasyon kavramı 1960'lerde uygulanmaya başlamıştır ve bu tarihten itibaren özellikle yaşlı hastalarda diş protezleri uzun süre boyunca başarılı bir tedavi aracı olarak kullanılmıştır (Oshida vd. 2010). HA minede bulunan gözeneklere nüfuz eder ve sonrasında kalsiyum ve fosfat iyonlarının salınımı gerçekleştirir. Bunun sonucunda sentetik bir mine tabakası oluşmasını sağlar. Dentin tabakasında iskele görevi gören ve mineral eksikliği bulunan kolajen matrisine giriş yapar ve lokal olarak kalsiyum salınımı gerçekleştirir (Şekil 2.8) (Chen vd. 2021).

HA seramiklerinin yüksek biyoaktivitesine karşın mekanik özellikleri genel olarak düşük yük taşıyıcı uygulamalara olan kullanımını kısıtlamaktadır (White vd. 2007; Zhou ve Lee 2011). Nanobilim ve nanoteknolojideki son gelişmeler sayesinde, HA'nın dezavantajlarını en aza indirmek amacıyla nanometre ölçekli HA geliştirilmeye başlanmıştır. Bu amaçla son yıllarda, nHA, biyomedikal uygulamalarda hasar görmüş

kemik veya dişler ve diğer kemik ilişkili alanlar, iskele malzemeleri ve ilaç verme maddeleri için yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Phan vd. 2017).



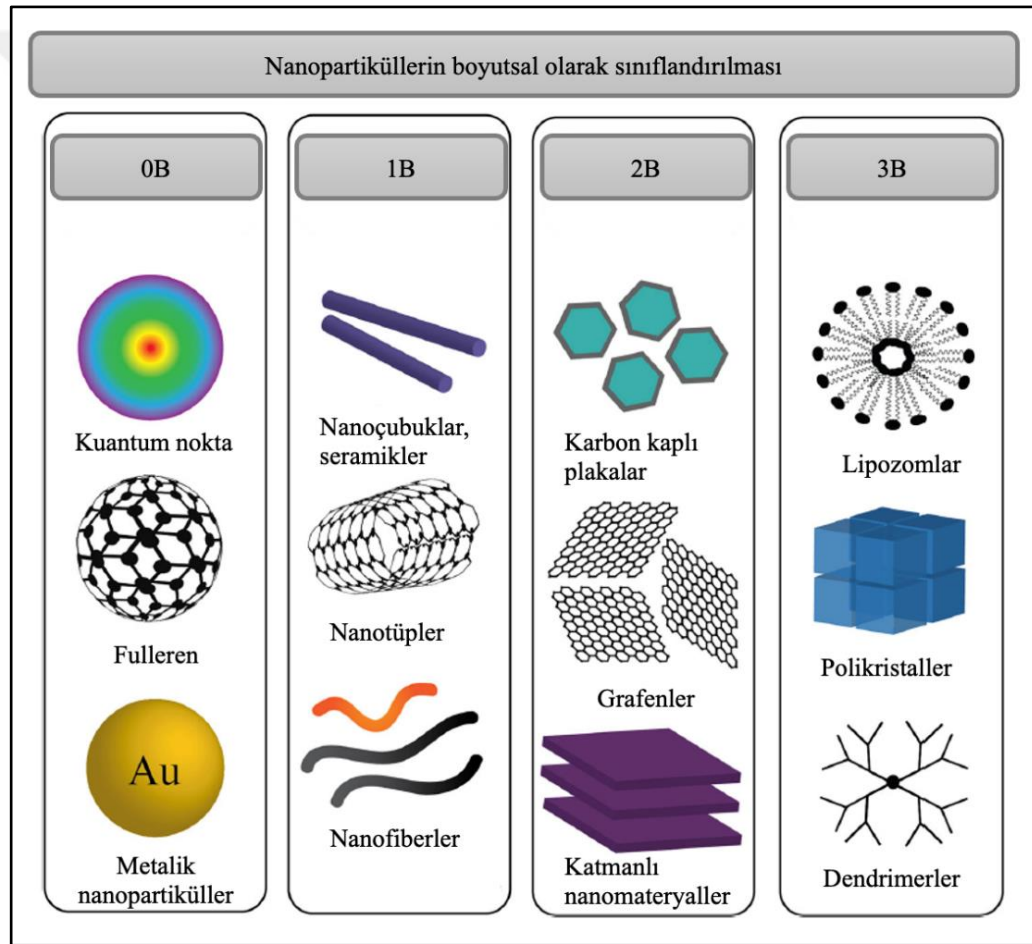
Şekil 2.8. HA'nın mine (a) ve dentin (b) tabakalarındaki remineralizasyonu (Chen vd. 2021)

Apatit bazlı malzemeler yaygın olarak kemik dolgusu olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra HA'ların farklı kullanım alanları bulunmaktadır. Bunlardan ilki ilaç taşıma sistemleridir. Kemik dokusu rahatsızlıklarının tedavisi için tasarlanmış birçok ilaç verme sistemi HA'lara dayanmaktadır (Marques vd. 2014). Tıbbi kullanımına ek olarak, su ve karasal sistemlerden ve atık sulardan gelen ağır metal kirliliğini gidermek için de kullanılmaktadır (Corami vd. 2007). nHA'lar ile oluşturulan kompozitler atık sulardan boya arındırılmasında çevre dostu temizleyici olarak kullanılmaktadır (Pai vd. 2021). Çevre sağlığının korunması amacıyla kontamine toprakların remeditasyonunda nHA'lar kullanılmaktadır (Jin vd. 2016).

2.7. Nanopartiküller

Nano kelimesi metrik ölçekte bir milyarda biri temsil etmek için kullanılan bir ön ektir. NP ise, üç fiziksel boyuttan en az birinin 1-100 nm aralığında olduğu nano nesnelerden oluşan ve belirli nano-ölçekli özellikler gösterebilen materyal olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.10) (Oberdorster vd. 2005). NP'ler aynı bileşime sahip olan makroskobik benzerlerinden boyut, şekil yüzey kimyası, elektronik, optik, manyetik ve katalitik özellikleri ile ayrılmaktadırlar (Tao vd. 2019). Nanoteknoloji etkili tedavi yöntemleri geliştirilmesinde, hastalıkların teşhisi, önlenmesi ve tedavisi amacıyla ilaç dağıtımını, *in vitro* teşhis/tespit, *in vivo* görüntüleme, terapi teknikleri, biyomalzemeler ve doku mühendisliği alanlarında tıpta yoğun olarak kullanılmaktadır (Kumar ve Abrahamse 2020).

Nanomalzemesler (NM'ler) farklı boyutlarda bulunabilmektedir ve nano yapı malzemelerin mevcut sınıflandırma şemaları sıfır (0D), bir (1D), iki (2D) ve üç boyutlu (3D) olarak önerilmektedir. 3D nanokompozitler, farklı özelliklere sahip iki veya daha fazla malzeme, benzersiz özelliklere sahip bir kompozit oluşturmak için sinerjik olarak hareket ettiğinde oluşur (Şekil 2.9) (McCully vd. 2018). NP'lerin elektrik, manyetik, optik, boyut, şekil gibi özelliklerini kapsayan fizikokimyasal özellikleri, teknoloji ve endüstriyel uygulamalar için oldukça elverişlidir. Bu materyalin çeşitli uygulamalarda kullanılması için öncelikle canlı hücreler ile biyouyumlu olması gerekmektedir (Lappas 2015). 2000 yılından bu yana, NP'lerin üretim hacminin yılda ortalama %5 oranında arttığı hesaplanmıştır. "Global Nanotechnology Market Outlook 2022" verilerine göre, nanoteknoloji pazarının öngörülen yıllık büyüme oranı 2016 ve 2022 arasında yılda yaklaşık %17,5 olacaktır. Pazarın daha da genişletilmesi, NP'lerin çevre ve insan güvenliği değerlendirmesi için büyük çabalara ihtiyaç duymasına yol açacaktır (Pikula vd. 2020).



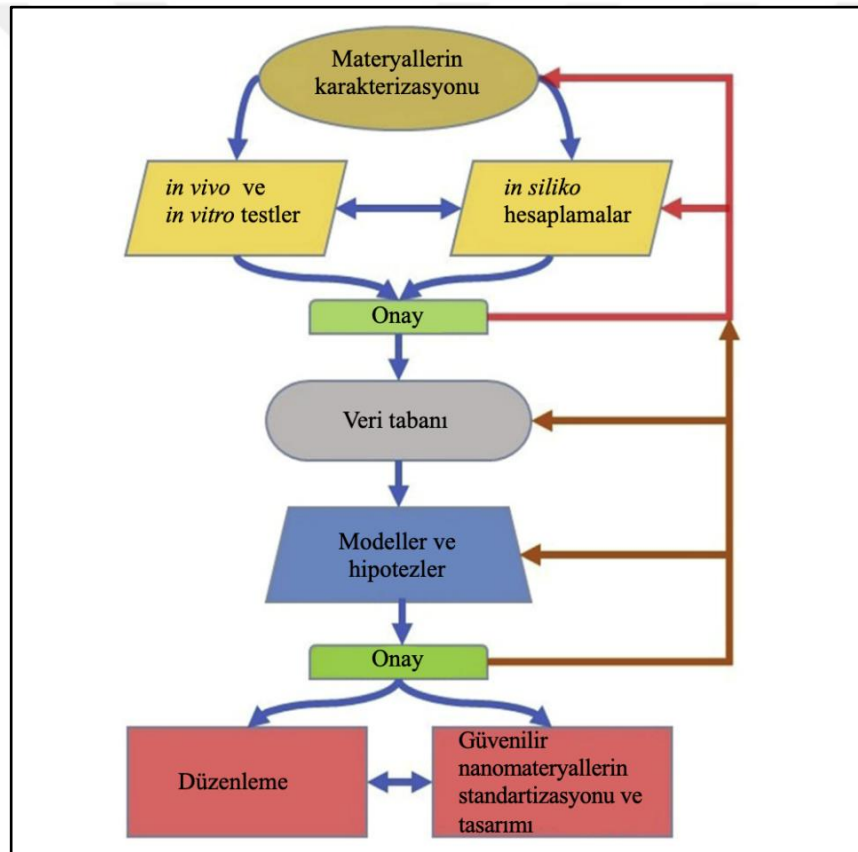
Şekil 2.9. NP'lerin boyutsal olarak sınıflandırılması ve örnekleri (Poh vd. 2018)

Nanobiyomalzemeler hedef doku mikroçevresi, biyomateryal ile nanoteknolojinin arayüzünde bulunmaktadır (An vd. 2013; Kumar vd. 2017). Görüntüleme sistemleri, antimikrobiyal ajanlar, terapötik nanomateriyaller, doku mühendisliği, biyosensörler klinik uygulamalarda nanomalzemelerin kullanıldığı alanlardır (Oksel Karakus vd. 2021). Nanobiyomalzeme teknolojisi hücre, doku ve organlar ile etkileşime girecek olan

nano ölçekli materyallerin hassas bir şekilde tasarlanarak ürün geliştirilmesini sağlamayı amaçlamaktadır (Koutsopoulos 2012). Bununla birlikte, nanomalzemelerin yeni işlevleri yerine getirmesine izin veren yeni özellikler, biyolojik sistemler üzerindeki olumsuz etkiler ve insanlara yönelik potansiyel tehlikeler hakkında endişeleri de beraberinde getirmektedir (De Stefani vd. 2020).

2.8. Nanotoksikoloji

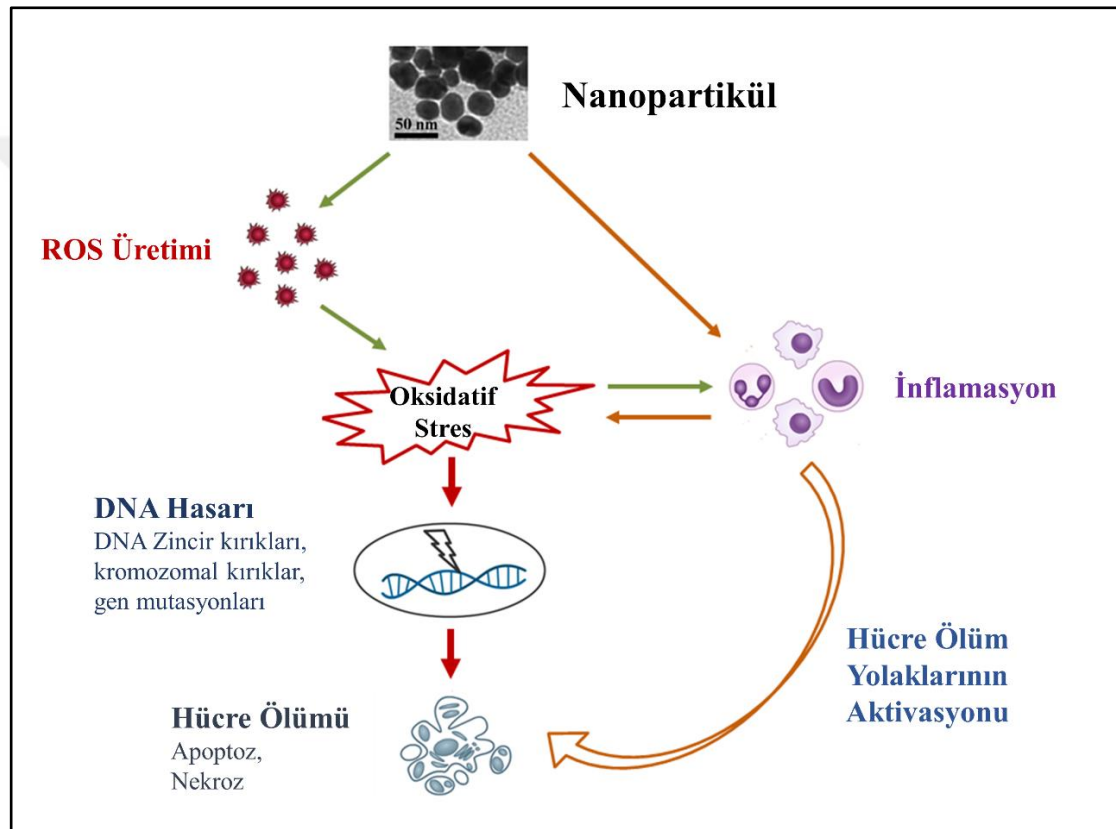
Hızla büyüyen nanoteknoloji pazarında bulunan binlerce ürünün biyolojik yapılarla olan etkileşimi insan ve çevre sağlığı açısından üzerinde çalışılması gereken bir konudur (Arora vd. 2012; Malysheva vd. 2015). Önemli ölçüde insan maruziyetinin söz konusu olduğu NP kullanımı nedeniyle toksikolojinin alt bir kategorisi olarak nanotoksikoloji kavramı öne sürülmüştür (Donaldson vd. 2004). Nanotoksikolojide risk değerlendirmesinde toksikolojik ve ekotoksikolojik araştırmalar çok önemli bir role sahiptir.



Şekil 2.10. Üretilen nanomalzeme risk değerlendirme algoritmasının şematik gösterimi (Pikula vd. 2020)

Kapsamlı *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların araştırma verileri, NP'lerin toksik etki mekanizmasının anlaşılması için temel sağlamaktadır. NP risk değerlendirmesinin hesaplamalı veya *in silico* yöntemleri ile temel araştırmalardan elde edilen veriler ile NP'lerin çevreye ve insanlara olan zararlı etkisini tahmin edebilecektir. Üretilen nanomalzeme risk değerlendirmesinin basitleştirilmiş şematik çerçevesi Şekil 2.10'te gösterilmektedir (Pikula vd. 2020).

NP'ler özellikle küçük boyutlarda olmaları nedeniyle kolayca hücre zarını geçerek nükleusa ulaşabilir ve nükleer porlardan da girerek DNA ile etkileşime geçip DNA hasarına sebep olabilmektedir. Şekilleri ve boyutları NP'lerin hücre alım ve potansiyel toksisitede önemli belirleyicilerdir (Huang vd. 2017). Genotoksisitede NP'lerin indüklediği toksik ve genotoksik mekanizmalar sadece DNA ile etkileşime geçerek değil mitozda görev alan proteinleri etkileyerek, reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek ve hücrelerdeki antioksidan bariyerinin (süperoksit dismutaz (SOD) ve Glutasyon) kırılmasına neden olarak da DNA hasarına yol açabilirler (Şekil 2.11) (Carmona vd. 2015; Carmona vd. 2016). NP'lerin hücre ölümünü tetiklediği mekanizmalar genellikle oksidatif stresle açıklanmaktadır (Frohlich vd. 2009). Oksidatif stres sonucu oluşan ROS, kaspazlar aracılığıyla apoptotik kaskadı aktive etmektedir (Şekil 2.13) (Arora vd. 2008).



Şekil 2.11. NP'lerin indüklediği toksisite mekanizmaları (Khanna vd. 2015)

Hücreyel organellerinin apoptotik uyarıları tetiklemesine bağlı olarak sinyal yolları değişebilmektedir. Bu uyarı plazma membranında gerçekleştiğinde kaspaz8 ve kaspaz10 dışsal apoptotik yolağı uyarırken, mitokondiride içsel bir uyarı olduğu takdirde kaspaz9 aktive olmaktadır. Kaspaz3 ve kaspaz7 hem içsel hem de dışsal uyarıların indükleyebildiği apoptotik kaskadın oluşmasını sağlayan başlatıcılardandır (Bexiga vd. 2011).

Besinis vd. (2017), titanyum alaşım implantlarını nano ve mikro boyuttaki HA eklentisi ile antibakteriyel aktiviteyi ölçmüşlerdir. Çalışmada mikro ve nanoboyuttaki HA kaplanmış titanyum alaşımlar, kaplama yapılmamış kontrol grubuna göre daha yüksek antibakteriyel etki göstermiştir. Klinik uygulamalarda nHA'ların kullanımı umut verici

olsa da bu kaplamalar vücutta inflamasyon ve toksisiteye sebep olabilmektedir (Sonmez vd. 2016; Pujari-Palmer vd. 2017; Remya vd. 2017). nHA'ların etkilerinin *in vitro* koşullarda araştırıldığı bir çalışmada BEL-7402 (insan karaciğer hücre hattı)'de 20-200mg/L dozlarında hücre büyümesini inhibe ettiği ve apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (Liu vd. 2003). Pappus vd. (2017) *D. melanogaster*'da nHA gelişimsel ve davranışsal etkilerinin araştırmışlardır. Elde edilen bulgulara göre nHA oksidatif hasara, hücre hasarına, larval gelişimde gecikmeye ve ergin sineklerde düşük vücut ağırlığı ve yürüme bozuklukları, göz, kanat, kollar ve toraksta fenotipik bozukluklar gözlemişlerdir. Yang vd. (2009), tavşanlarda implant yüzeylerinde HA kaplamaların etkilerini araştırmışlardır. HA kaplama yapılan implantların kaplama yapılmamış kontrol grubuna göre daha uyumlu olduğu gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada kalsiyum-fosfat kaplamaları da denenmiş olup HA'ların vücutta çözünürlüğü daha az olduğundan uzun süre yapısını koruyabildiği gözlenmiştir. Sonmez vd. (2016), nano ve mikro boyuttaki HA'ların toksisitesini rat hepatosit hücrelerinde araştırmıştır. Çalışmada hücre canlılığı, DNA eklentileri miktarı, kromozomal hasar ve oksidatif stres parametreleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda artan boyutlarda hücre canlılığının azaldığını, 8-OH-dG miktarını, kromozomal hasarı ve oksidatif stresi arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Uzun yıllar boyunca insan hastalıklarının altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması amacıyla model organizmalar kullanılmıştır. Kullanılan türe bağlı olarak özellikle omurgalı hayvanların üretimi sırasında çok sayıda canlı kullanımı gerekmektedir. Omurgalı model organizmaların daha az kullanılmasına yönelik ilk alternatifler Russel ve kaya Bu genetik benzerliklere ek olarak bir nesilde çok yavru verebilmesi, kısa yaşam döngüsüne sahip olması, bakımının ekonomik olması, genom yapısının bilinmesi ve çok sayıda mutant hatlara sahip olması nedeniyle *Drosophila* genetik çalışmalarında ilgi gören bir model organizmadır (Sario vd. 2018).

Drosophila'nın bu avantajları ve memelilere metabolik benzerlikleri (besin alımı-sindirimi-emilimi-depolaması dahil diyet girdisi, ksenobiyotik metabolizma sistemi, antioksidan enzimler ve DNA replikasyon ve onarım sistemleri) göz önüne alındığında farklı genotoksik ajanların araştırılmasındaki uygulanabilirliğini göstermektedir (Mishra vd. 2017; Furlanetto vd. 2018; Naves vd. 2018). Muller'in 1927 yılında iyonize radyasyonun etkilerini *Drosophila*'da araştırdığı çalışması mutajenite araştırmaları için öncü olmuştur (Auerbach 1949) ve günümüzde *Drosophila* genotoksikolojik araştırmalar için model organizma olarak yaygın şekilde tercih edilmektedir.

Drosophila kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), genotoksitenin hızlı bir şekilde tespit edilebilmesi için Graf vd. (1984) tarafından bilim dünyasına önerilmiştir (Graf vd. 1984; Guzman-Rincon vd. 2001). Memeli sistemleri ile yüksek genetik benzerlik gösteren *Drosophila* ile bir nesil sonrasında gen mutasyonu, delesyon, kromozomlarda ayrılma gibi birçok genetik hasar yanında ve rekombinasyon sonucu oluşabilecek sonuçlar da saptanabilmektedir. SMART testi yaklaşık 40 yıllık süre içerisinde pestisitler, gıda katkı maddeleri, gıda koruyucuları, radyasyon, çevresel kirlenimler ve NP'ler de dahil olmak üzere çok sayıda ksenobiyotiğin mutajenitelerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Graf vd. 1984; Graf ve Singer 1992; Reis vd. 2016; Mishra vd. 2017; Naves vd. 2018; Barik ve Mishra 2019). SMART yöntemi *Drosophila* larvalarında imajinal disk hücrelerindeki uygun işaretçi genlerdeki mutasyon ve delesyonlar ile işaretçi genlerin bulunduğu kromozomda ayrılma ve

rekombinasyon gibi olaylar sonucunda heterozigotluğun kaybolması ve sonuç olarak yetişkin sinek kanatlarında mutant trikom klonları olarak oluşumuna yol açabileceği ilkesine dayanmaktadır (Guzman-Rincon vd. 2001).

Tek hücre jel elektroforezi testi, ökaryotik hücrelerde farklı bileşiklerin neden olduğu DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan hızlı, güvenilir, hassas bir tekniktir ve genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Fairbairn vd. 1995; Sierra ve Gaivão 2014). Endüstriyel kimyasallar, pesitisitler, tarım ürünleri ve ilaçlar gibi pek çok maddenin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Hartmann vd. 2003). KOMET testi, agaroz içine gömülen hücre çekirdeğinin elektrik alana tutulduktan sonra hasarlı DNA'nın pozitif yüklü bölgeye doğru çekilmesi ve floresans boya ile boyandığında kuyruklu yıldız görünümü alarak hasarın boyutunun tespiti esasına dayanmaktadır (Collins 2015). Bu test sistemi Ostling ve Johanson (1984) tarafından hücrelerde gama radyasyonu maruziyeti sonucunda oluşan DNA zincir kırıklarının belirlenmesi için geliştirilmiştir. Akridin turuncusu ile boyama yapılan bu yöntemde DNA çift zincir kırıklarının tespiti yapılmaktadır. Ancak nötral şartlarda gerçekleştirilen KOMET prosedüründe protein ve RNA gibi istenmeyen hücresel ürünlerin varlığı söz konusudur. Analizlerde kullanılacak olan boya DNA, RNA ve proteinleri boyayabilme özelliğinde olduğundan sonuçların değerlendirilmesinde risk yaratmaktadır (Singh vd. 1988).

Genotoksik ajanların genellikle DNA tek zincir kırıklarına neden olmasından dolayı Singh vd. (1988) hem lizis hem de elektroforez aşamalarının alkali ortamda gerçekleştiği KOMET yöntemini geliştirmişlerdir. Alkali ortamda gerçekleşen lizis süresince hücre DNA ve proteinlerin denatürasyonu da gerçekleşerek nötral KOMET'teki dezavantajların önüne geçilmiştir. Mukhopadhyay vd. (2004) alkali KOMET yöntemi ile fiziksel ve kimyasal genotoksik ajanların indüklediği DNA tek iplik kırığı hasarlarının *Drosophila* bağırsak hücrelerinde araştırılmasını önermişlerdir. Carmona vd. (2011) farklı mutajenik ajanların genotoksisitesini *Drosophila* hemositlerinde alkali KOMET yöntemi ile araştırmışlardır. Bu gelişmelerden sonra KOMET testi, *D. melanogaster*'in larvalarından izole edilen hemositlerde çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların indüklediği DNA tek iplik kırığı hasarlarını tespit etmede yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Shukla vd. 2011; Augustyniak vd. 2016; Bajpayee vd. 2016). KOMET yöntemi hassas ve çok aşamalı bir süreç gerektirdiğinden laboratuvarlar arasındaki işleyiş farkını en aza indirmek ve sonuçların analizinin tüm araştırmacılar tarafından daha doğru anlaşılabilmesi için deney prosedüründe standart düzen oluşturulmuştur. Farklı çalışma gruplarından araştırmacıların yer aldığı bir komite tarafından oluşturulan OECD TG486 kılavuzu, hayvan modelleri, hücre kültürleri, bitkiler ve insan biyolojik izleme ve klinik araştırmalarda dikkat edilmesi gereken ayrıntıları belirtmektedir (Moller vd. 2020).

Apoptotik hücre, hacim kaybı, plazma membranında girinti çıkıntılarının oluşumu, nüklear kondensasyon, DNA'nın nükleozomal fragmentasyonu ve apoptotik cisimciklerin oluşmasıyla karakterize edilmektedir. Tüm bu değişiklikler apoptoz mekanizmasını oluşturan proteinlerin, bir dizi hücresel sinyalin ve kaspazlardan oluşan bir yolun işlemesiyle gerçekleşmektedir (Serbes 2009). İçsel apoptotik yolak genotoksik hasar, hücresel organeller ya da sinyalizasyon sistemlerinin hasar alması ve mitokondriyal hasar sonucu aktive olmaktadır (Singh vd. 2019). Dışsal apoptotik yolak ölüm reseptörü yolu olarak da bilinmekte ve makrofajlar, doğal öldürücü hücreler ve T

hücresinin ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla aktifleşmektedir. Kaspaz-8 dışsal yolak, Kaspaz-9 ise içsel yolak elemanlarından. Kaspaz-3/7 ise her iki yolak tarafından aktive edilmektedir (Celepli vd. 2020).

Tüm canlıların genomu, devam eden DNA hasarı ve DNA tamir yolları aracılığı ile bu hasarın giderilmesi arasında dinamik bir denge içinde bulunmaktadır. Organizmalar içsel ve dışsal ajanlar tarafından indüklenen genotoksik strese korumak için çoklu DNA onarım mekanizmaları geliştirmiştir. Bu ajanlar, reaktif oksijen türleri (ROS) gibi hücre metabolitlerinden çevresel kirlenimlere ve güneşten gelen ultraviyole (UV) radyasyona kadar değişkenlik gösterebilmektedir. DNA tamir yolları, bu zararlı ajanlar tarafından oluşturulan neredeyse tüm olası DNA lezyonlarını onarabilme yeteneğine sahiptir. Hücresinin DNA onarım kapasitesindeki bir azalma sonucunda mutajenez, karsinogenez, hücre yaşlanma veya hücre ölümü ile sonuçlanabilmektedir ve bir dizi hastalığın oluşmasına sebep olabilmektedir (Araujo ve Kuraoka 2019).

Ters transkripsiyon ile kombine edilmiş gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT²-PCR) gen ifadesinin belirlenmesinde kullanılan güçlü bir metottur (Livak ve Schmittgen 2001). Çalışmada kullanılacak panel sistemi uygulamalarında *Drosophila* Oregon R+ bireylerin larvaları kullanılmıştır. *D. melanogaster* genomu hastalık yapan genler bakımından insan genomu ile yaklaşık %77'si ile homoloji göstermektedir (Reiter vd. 2001). Ökaryotlarda DNA hasarına temel hücresel cevap üç temel yoldan oluşur: DNA tamiri, hasar kontrol noktaları ve apoptoz. Genomik bütünlüğün korunması için bu üç yol oldukça önem taşımaktadır. DNA hasarını direkt olarak düzeltmek için farklı tamir mekanizmaları gereklidir. Kullanılan tamir yolu lezyonun türüne ve hasarın hücre döngüsünün hangi evresinde meydana geldiğine göre değişmektedir (LaRocque 2007). Birçok hücresel fonksiyon, gen ifadesindeki değişiklikler ile düzenlenmektedir. Bu nedenle, genlerin transkripsiyon seviyelerinin niceliğinin belirlenmesi; gen fonksiyonunun anlaşılmasında ve hastalık durumunda regülasyondaki anormal değişikliklerin saptanmasında önemli bir role sahiptir (Overbergh vd. 2003). Ters transkripsiyon ile kombine edilmiş gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT²-PCR) gen ifadesinin belirlenmesinde kullanılan güçlü bir metottur (Livak ve Schmittgen 2001). Literatürde *Drosophila* DNA tamir sistemleri yolları ile ilgili yapılmış çalışmaların sayısı oldukça kısıtlıdır. Bu çalışma kapsamında DNA Tamir yollarında görevli 36 farklı genin ifadesi çalışılmıştır (Çizelge 2.5). Bu çalışma ile NP toksisitesi sonucu *Drosophila*'da DNA tamir sistemi genlerindeki yanıtlar incelenmiştir. Kapsamlı gen ifadesi yanıtlarının elde edilmesiyle literatürde yer alan eksikliğin giderilmesi amaçlanmıştır.

Çizelge 2.5. Tez çalışmasında kullanılan genler ve görevleri

Gen	Açıklama	Kaynak
<i>Brca2</i>	Homolog rekombinasyon tamir sisteminde ve hücre döngüsü kontrol noktalarında görev alır	(Lee vd. 1999)
<i>Cdk7</i>	Transkripsiyon sırasında oluşan hataların giderilmesi ve hücre döngüsü kontrol noktalarında görev alır	(Schwartz vd. 2003)
<i>CG9601-PNKP</i>	Homolog olmayan uç birleştirme, çift zincir kırıkları ve baz kesip çıkarma tamir sistemlerinde görev alır	(Shen vd. 2010)
<i>dap</i>	Apoptozun inhibe edilmesinde görevli	(Gartel ve Tyner 2002; Ruiz-Losada vd. 2021)
<i>DNA-lig1</i>	DNA replikasyonu ve DNA hasarlarının giderilmesinde görev alır	(Liddiard vd. 2019)
<i>DNAPol-eta</i>	<i>PCNA</i> ile kompleks oluşturarak translezyon sentezinde görev alır. Hataya meyilli onarım yapar	(Goodman ve Woodgate 2013)
<i>Ercc1</i>	Nükleotid kesip çıkarma tamirinde <i>PCNA</i> ile birlikte çalışır	(Fregoso vd. 2007)
<i>Fancd2</i>	Zincirler arası çapraz bağlanmaların tamirinde görev alır	(Sekelsky 2017)
<i>Fen1</i>	Baz kesip çıkarma tamirinde görevli. Apoptoz, telomer bakımı, homolog olmayan uç birleştirmede görevli	(Kleppa vd. 2012)
<i>Hus1-like</i>	<i>Rad17</i> , <i>Rad9</i> ve <i>Rad1</i> ile birlikte DNA hasar indüklü hücre kontrol noktasının aktive edilmesini sağlar.	(Bermudez vd. 2003)
<i>mei-41</i>	<i>ATR</i> homologudur, DNA hasarı varlığında hücre döngüsünü G2/M evresinde durdurur	(Bayer vd. 2018)
<i>Mlh1</i>	Yanlış eşleşme tamirinde MutL α kompleksinin çalışmasında görev alır.	(Jiricny 2006; Vimal vd. 2018)

(Devamı arkada)

Çizelge 2.5'in Devamı

Gen	Açıklama	Kaynak
<i>Mus101</i>	Hücre döngüsü kontrol noktalarında görevlidir. DNA replikasyonu sonrasında DNA tamirinde görev alır.	(Yamamoto vd. 2000)
<i>mu2</i>	Çift zincir kırıklarının tanınması hücre kontrol noktasının aktifleşmesi tamir sistemlerinin tetiklenmesinde görevli	(Dronamraju ve Mason 2011)
<i>Ogg1</i>	Oksidatif stres indüklü 8-oxo-guanin'lerin tamirinde görevlidir	(Yasukawa 2015)
<i>PCNA</i>	Nükleotid kesip çıkarma tamirinde ve DNA polimeraz delta kompleksinde yer alır	(Fregoso vd. 2007)
<i>Pms2</i>	<i>tefu</i> ile birlikte çalışır. Apoptozun baskılanmasında görev alır, <i>Mlh1</i> ile kompleks oluşturarak hasarlı DNA bölgesine tutunur	(Do ve LaRocque 2015)
<i>PNKP</i>	Homolog olmayan uç birleştirmede, çift zincir kırıklarının tamirinde ve baz kesip çıkarma tamir sisteminde çalışır	(Shen vd. 2010)
<i>put/punt</i>	Çift zincir kırıklarının tamirinde <i>BRCA2</i> geni birlikte çalışır	(Gesualdi ve Haerry 2007)
<i>p53</i>	DNA hasarının tanınması, tamir mekanizmalarının harekete geçirilmesi, hücre döngüsü kontrol noktaları, yaşlanma ve apoptoz süreçlerinde görevlidir	(Zhang vd. 2015)
<i>Rad1</i>	<i>Rad9</i> ve <i>Hus1-like</i> ile birlikte DNA hasar indüklü hücre kontrol noktasının aktive edilmesini sağlar	(Bermudez vd. 2003)
<i>Rad17</i>	<i>Hus1-like</i> 'ın <i>Rad9</i> ve <i>Rad1</i> kompleksi ile birleşerek DNA hasar indüklü hücre kontrol noktasının aktive edilmesini sağlar	(Wu vd. 2005)
<i>Rad51C</i>	<i>Rad51</i> gen ailesine aittir, çift zincir kırıkların tamirinde çalışır	(Bonilla vd. 2020)

(Devamı arkada)

Çizelge 2.5'in Devamı

Gen	Açıklama	Kaynak
<i>Rad51D</i>	<i>Rad51</i> ailesine aittir. Çift zincir kırıklarının tanınmasında ve homolog rekombinasyonda görevli	(Bonilla vd. 2020)
<i>Rad51D</i>	<i>Rad51</i> ailesine aittir, çift zincir kırıklarının tanınması, homolog rekombinasyonda görevli	(Bonilla vd. 2020)
<i>Rad9</i>	<i>Rad-1</i> ve <i>Hus1-like</i> ile birlikte DNA hasar indüklü hücre kontrol noktasının merkezinde görevli	(Dore vd. 2009)
<i>Rev1</i>	Translezyon polimerazı, hasarlı bölgenin hataya meyilli şekilde onarılmasını sağlar.	(Sekelsky 2017)
<i>RpLP2</i>	DNA tamiri ve apoptozun başlatılmasında görev alan komplekslerle birlikte çalışır	(Marygold vd. 2007)
<i>Sir2</i>	<i>p53</i> 'ü deasetilasyon ile inhibe ederek apoptoza engel olur	(Frankel vd. 2011)
<i>spell</i>	Yanlış eşleşme tamir sisteminde çalışır. Hasarlı bölgeye tutunarak tamir mekanizmalarının bölgede çalışmasını sağlar	(Flores ve Engels 1999)
<i>stg</i>	Hücre döngüsü kontrol noktasında G2'den M fazına geçişi kontrol eder	(Ruiz-Losada vd. 2021)
<i>tefu/dATM</i>	DNA hasarının tanınıp tamir mekanizmalarının harekete geçirilmesinde görev alır	(Rimkus ve Wassarman 2018)
<i>Xpac/Dxpa</i>	Nükleotid kesip çıkarma tamirinde görevli. <i>ERCC</i> ve <i>RAD</i> gen aileleri ile birlikte çalışır	(Shimamoto vd. 1995)
<i>XRCC1</i>	Abazik bölgelerin ve tek zincir kırıklarının tamirinde görev alır. <i>DNA ligaz 3</i> ile birlikte çalışır	(Taylor vd. 2000)

1959'da William Russell ve Rex Burch, "İnsancıl Deneysel Tekniğin İlkeleri"ni yayınlamışlardır. Buna göre hayvanlarda yapılan araştırmalar 3R "Replace=değiştirme, Reduce=azaltma ve Refine=iyileştirme" ilkesine göre yapılmalıdır. Deneyde kullanılan hayvanlar daha az duyarlılarla değiştirilmeli, kullanılan hayvan sayısını azaltılmalı ve hayvanlardaki acı ve stresin azaltılması için gerekli iyileştirmeler yapılmalıdır (Flecknell 2002). Gelişmiş hayvanlarla yapılan toksikolojik değerlendirmeler maliyetli zaman alan prosedürleri gerektirmektedir. Hayvan refahı için yapılan son değerlendirmeler, test edilmesi gereken kimyasalların sayısındaki artış nedeniyle *in vitro* kültür sistemlerini değer kazanmıştır (Soldatow vd. 2013). Bu çalışma kapsamında küre ve çubuk formu

nHA'ların toksisitelerinin *in vitro* çalışmaları iki farklı memeli hücre hattında gerçekleştirilmiştir.

HUVEC hücre hattı 1973 yılında Jaffe vd. tarafından izole edilmiştir. Takip eden yıl içerisinde Gimrone vd. endotel hücreleri kültüre etmiş ve hücre büyümesini karakterize etmiştir (Medina-Leyte vd. 2020). İnsan damarları ince bir tabaka halinde endotel hücreleri ile kaplanmış halde bulunmaktadır (Cao vd. 2017). Bu durum HUVEC hücre hattını kardiyovasküler rahatsızlıklar başta olmak üzere, doku yenilenmesi, ilaç taşıma sistemlerinin incelenmesi ve endüstriyel kimyasalların toksisitelerinin araştırılmasında önemli bir model yapmaktadır (Danhier vd. 2009; Cao vd. 2017; Chandran vd. 2017). HUVEC hücre hattı uygun koşullar altında 3 boyutlu hücre kültürüne olanak sağlamak ve anjiyogenez çalışmaları için de model olmaktadır (Heiss vd. 2015).

HEK293 ya da 293 epitel hücrelerinin izolasyonu 1973 yılında canlılığı sonlandırılmış bir insan embriyosunun böbreğinden izole edilmiştir (Lin vd. 2014). 293 hücre hattı 1977 yılında Graham vd. tarafından kültüre edilebilir forma getirilmiştir (Thomas ve Smart 2005). Daha sonra sıcaklığa duyarlı SV40 T antijenin alevini ifade eden 293T hücreleri 1980'li yıllarda geliştirilmiştir (Lin vd. 2014). Bu hücre hattı insandaki toksisite modellemelerinde başarılı bir şekilde karakterize edilmiştir. Sitotoksitenin olası mekanizmaları olan mitokondriyal fonksiyon, hücre canlılığı, hücre zarı hasarları gibi çeşitli parametrelerle değerlendirilmektedir (Reddy vd. 2010). Günümüzde NP'lerin, çevresel kontaminantların, gıda katkı maddelerinin toksisitesinin araştırılmasında kullanılmaktadır (Cui vd. 2005; Hao vd. 2009; McKim vd. 2015).

Suda çözülebilir tetrazolum tuzlarının kullanıldığı WST-1 testi, canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin WST-1'i parçalayarak çözülebilir formazan tuzları oluşturması ile ölçmektedir. Çoğalma gösteren hücrelerde metabolik aktiviteye bağlı olarak mitokondriyal dehidrogenaz enzim seviyesinde artış gözlenmektedir. Dehidrogenaz enzimi açık kırmızı renkte olan tetrazoluyumu koyu kırmızı renkteki formazana dönüşümünü sağlar ve bu renk değişim oranı spektrofotometrede absorbanz ölçümü ile değerlendirilmektedir (Terzioğlu 2014). Tripan mavisi testi Nobel Tıp Bilim Ödül'üne layık görülen Paul Ehrlich tarafından 1904 yılında geliştirilmiştir. Kullanım kolaylığı, ekonomik olması, hızlı sonuç alınması nedeniyle hücre canlılığının araştırılmasında en yaygın boya haline gelmesine sağlamıştır (Piccinini vd. 2017).

Bu çalışma ile küre ve çubuk formu nano boyutlu HA'ların (nHA) toksisiteleri hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda farklı test sistemleri ile değerlendirilmiştir. *In vivo* çalışmalar nanotoksikoloji çalışmalarının uzun yıllardır başarı ile yürütüldüğü bir model organizma olan *D. melanogaster* ile gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda küre ve çubuk formu nHA'ların Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ve Tek Hücreli Jel Elektroforezi Testi ile genotoksitesi, kaspaz aktivasyonu testi ile programlı hücre yolağında görev alan proteinlerin varlığı ve RT²-PCR ile DNA tamir yolağında görev alan genlerin ifadeleri araştırılmıştır. Çalışmanın *in vitro* kısmında küre ve çubuk formu nHA'ların iki farklı hücre hattında (HUVEC (ATCC CRL-1730) ve 293T (HEK-293) (ATCC CRL-1573) WST-1 proliferasyon testi, tripan mavisi testi ile sitotoksiteleri ve Tek Hücreli Jel Elektroforezi Testi ile genotoksik potansiyelleri değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar

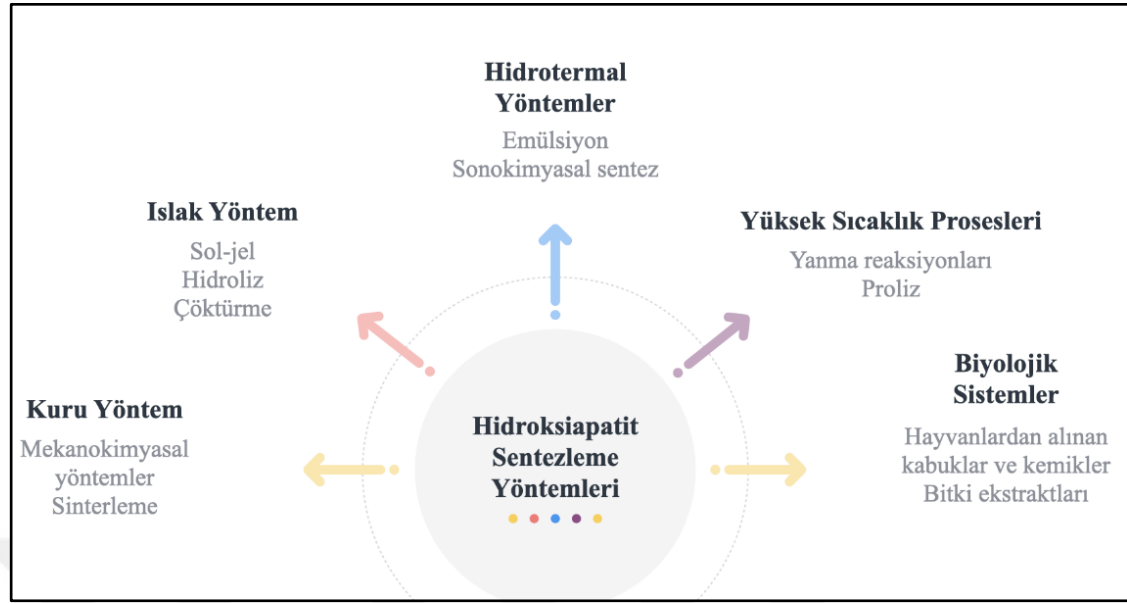
Kalsiyum nitrat tetrahidrat $[Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O]$, amonyum dihidrojen fosfat $[NH_4H_2PO_4]$, diamonyum dihidrojen fosfat $[(NH_4)_2HPO_4]$, Orto-fosforik asit, propiyonik asit, gum arabik, kloral hidrat, gliserol, sodium hidroksit (NaOH), etilendiamin tetraasetik asit (Na_2EDTA), sodium klorür (NaCl), Trizma Base BioUltra, sodium hidroksit (NaOH), etidyum bromür (EtBr), fosfat tamponu (PBS), Feniltiyoüre, Triton-X, Sarcosine, dimetil sülfoksit (DMSO) Sigma Aldrich, Tris HCl, $Na_2H_2P_2O_7$, β -gliserofosfat, Coomassie Blue, Sigma Aldrich; Low melting Agar, Low melting Agar "DNA Grade" AppliChem; %0.25 Tripsin-EDTA, FBS, Antibiyotik-Antimikotik Gibco, WST-1 Biovision, non-essential amino asit solüsyonu, RPMI 1640 Capricorn, Sodyum piruvat Pan Biotech, Penisilin/Streptomisin solüsyonu Cegrogen firmalarından satın alınmıştır.

3.2. Nano Hidroksiapatitlerin Sentezi

HA, sol-jel yöntemi, hidrotermal reaksiyon, birlikte çöktürme reaksiyonu, ıslak/kuru yöntem ve mekanik-kimyasal reaksiyonlarla sentezlenebilmektedir (Şekil 3.1) (Bonilla-Represa vd. 2020; Osuchukwu vd. 2021; Venkatesan ve Anil 2021). Kuru yöntem, uygun maliyetle kısa zaman aralığında ve büyük ölçekli HAP üretimi amacıyla endüstriler tarafından kullanılmaktadır. Islak yöntem, HAP üretimi için sıcaklık, basınç ve voltaj gibi uyarıcılarla çözücülerin reaksiyonlara girmesini temel almaktadır ve çökeltme, hidroliz ve sol-jel yöntemlerini içermektedir. Hidrotermal yöntem, yüksek sıcaklıkta HAP'ın kimyasal çöktürme yoluyla sentezlenmesini içermektedir. Yüksek sıcaklık süreçlerinde oksidan ve organik yakıt arasındaki kimyasal reaksiyonlar sonucunda sulu ortamda ultra saf HAP üretimi yapılmaktadır. Biyolojik sistemlerden alınan omurga, deri ve kabuk örneklerinden de kemik ve diş dokusuna benzer yapıda HAP üretimi gerçekleştirilebilmektedir.

Her bir yöntemin avantajları göz önünde bulundurularak HAP sentezi için kombinasyon halinde üretim süreçleri de oluşturulması mümkündür. Sol-jel yönteminde öncü monomerler karıştırılarak katı parçacıkların süspansiyonu oluşturulur, yaşlandırılır, jelleştirilir ve kurutulur. Nispeten düşük sıcaklıklarda farklı partikül boyutlarında homojen bir malzeme üretimi yapılmaktadır. Sol-jel yönteminde kalsiyum ve fosforun iyonik düzeyde karıştırılması özgül mikro yapı, üstün fiziksel ve kimyasal homojenlik sağlamaktadır (Panda vd. 2021).

Sol-jel prosesi 1800'lü yıllarda kullanılmaya başlanmış olup, genellikle seramik, cam ve kompozitlerin sıcak presleme ve sinterleme gibi diğer geleneksel yöntemlerden çok daha düşük sıcaklıklarda ürünlerin hazırlanması için kullanılan bir kimyasal sentez yöntemidir. Sol-jel işleminde, çözelti sistemi sıvı "sol" halden katı "jel" fazına geçişi içerir. "Sol"un hazırlanmasında kullanılan başlangıç malzemeleri genellikle inorganik metal tuzları veya metal alkoksitler gibi metal organik bileşiklerdir. Sol ile belirli bir işlemden sonra (örneğin, bir substrat üzerine "sol"un kaplanması), ardından artık organik maddeleri uzaklaştırmak için kurutma ve ısı işleminden sonra, "jel" yoğun malzemelere dönüştürülür. Sol-jel sisteminin tasarımı ve ilgili sol-jel prosesi kolaylıkla kontrol edilebildiğinden, bu yöntem istenilen boyut, şekil ve formatta (örneğin partikül, lif, kaplama, yığın) çeşitli ürünler üretmek için kullanılmıştır (Zhang 2011).



Şekil 3.1. Hidroksiapatit sentezlenme yöntemleri (Bonilla-Represa vd. 2020)

3.2.1. Küre formulu nanohidroksiapatitlerin sentezi

Küre formulu nHA'ların sentezi Yavuz vd. (2021) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar Ca/P atomik oranı 1.67 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Başlangıç olarak 78.88 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve 129.6 ml etanol homojen bir çözelti olana kadar karıştırılmıştır ve NH_3 ile pH değeri 10 olarak ayarlanmıştır. Homojen bir fosfat çözeltisi elde etmek amacıyla 23.2 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{P}_0_4$ ve 186.5 ml distile su ile karıştırılmıştır. Çözeltinin pH'ı NH_3 ile 10'a ayarlanmıştır. Ardından, kalsiyum çözeltisi ve fosfat çözeltisi 2.4 g/d hızda 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti, 22 saatte oda sıcaklığında yaşılandırılmıştır ve 5 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Son olarak, elde edilen HA partikülleri altı kez distile su ile yıkanmış, daha sonra 750°C'de 4 saat kalsine (yüksek sıcaklık yardımıyla uçucu maddelerin uzaklaştırılması) edildikten sonra 24 saat 70°C'de vakum altında kurutulmuştur.

3.2.2. Çubuk formulu nanohidroksiapatitlerin sentezi

Çubuk formulu nHA'ların sentezi Nagyne-Kovacs vd. (2018) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar küre formulu nHA sentezinde olduğu gibi Ca/P atomik oranı 1.67 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Homojen bir kalsiyum ve fosfat çözeltisi hazırlamak için 17.712 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve 5.940 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ sırasıyla 32.288 ml ve 44.06 ml distile suda çözündürülmüştür. Her iki çözeltinin pH değeri NH_3 ile 10'a ayarlanmıştır. Daha sonra kalsiyum çözeltisi ve fosfat çözeltisi 2.4 g/d hızda 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Elde edilen HA partikülleri 5 saat boyunca 500°C'de kalsine edildikten sonra, oluşan çözelti 5000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

3.3. Nanopartikül Karakterizasyonu

3.3.1. TEM görüntüleme analizi

NP'lerin konsantrasyonu, fiziksel özellikleri ve karakterizasyonu hakkında bilgi almak amacıyla başta mikroskopik görüntüleme sistemleri, spektroskopik ve kromatografik yöntemler olmak üzere çok sayıda analitik yöntem bulunmaktadır (Dağlıoğlu ve Yılmaz 2018). Geçirimli electron mikroskopisi (TEM) NP'lerin görselleştirilmesi, dağılım ve yığılım özellikleri, boyutları ve şekilleri gibi özelliklerin belirlenmesi mümkün olmaktadır (Woehrle vd. 2006; Hondow vd. 2014). Bu çalışmada küre ve çubuk formlu nHA'ların morfolojik incelemeleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde bulunan ZEISS marka LEO906 model TEM ile yapılmıştır.

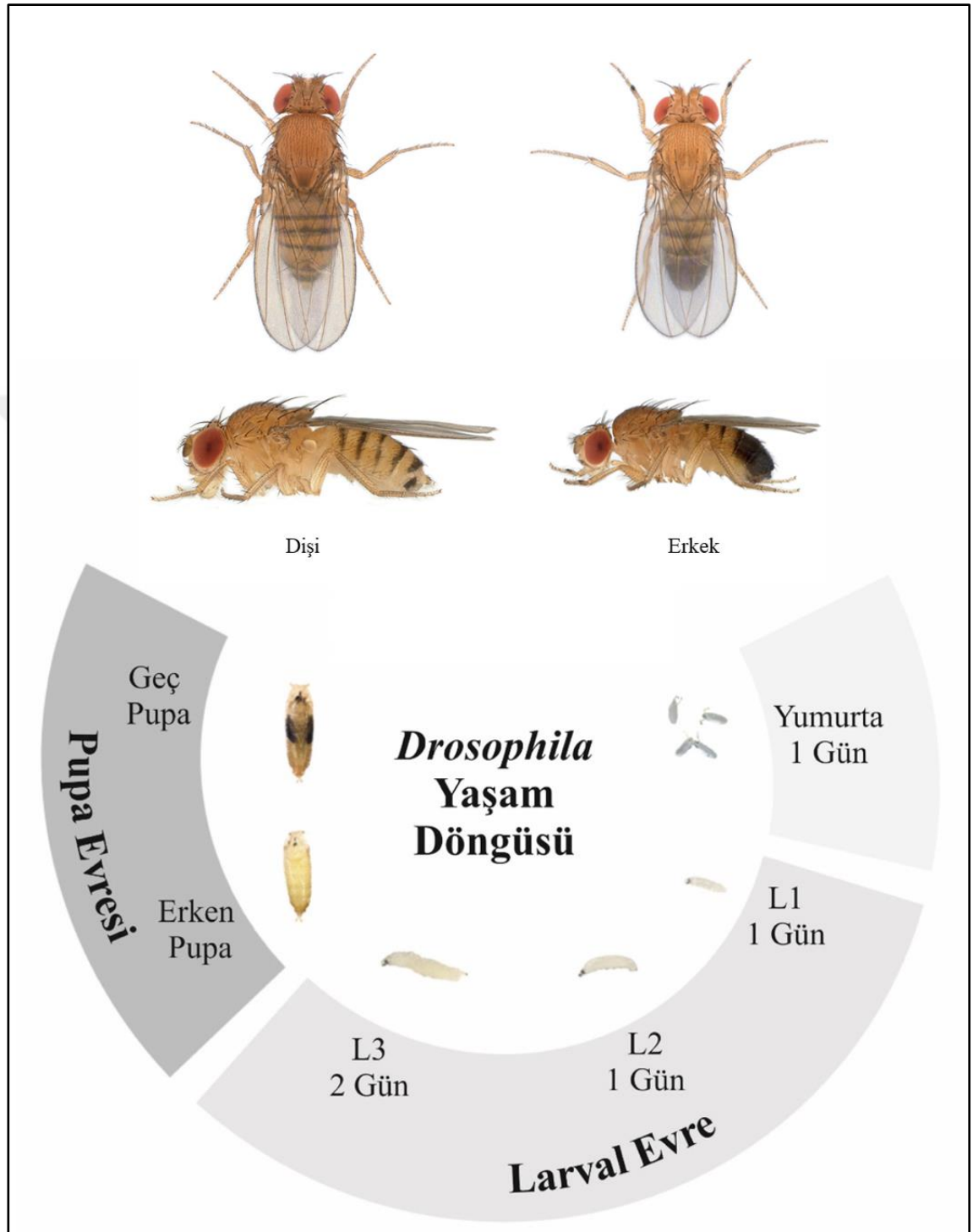
3.3.2. FTIR analizi

Kızılötesi spektroskopi (IR), çeşitli yollarla sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan hızlı ve kullanışlı bir yöntemdir (Kazarian vd. 2004; Lopez-Lorente ve Mizaikoff 2016). Fourier dönüşümü kullanılarak, her bir frekanstaki soğurma, bireysel frekanslar arasında ardışık tarama yapmadan geniş bantlı bir radyasyon kaynağı ile hızla belirlenmektedir. Atom gruplarının benzersiz temel titreşim modları olduğundan, bir Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) spektrumundaki tepe noktaları belirli kimyasal bağları ve kimyasal fonksiyonel grupları temsil eder (Dee vd. 2002). Moleküller kızılötesi ışığa maruz kaldığında, temel titreşim modlarına uyan frekanslardaki radyasyon emilmektedir. IR spektrumları, radyasyonun emildiği frekanslara karşılık gelen pik değerlerini göstermektedir ve ölçülen maddenin parmak izi bölgelerini oluşturmaktadır (Yongsheng 2011). Bu bölgeler sentez veya işleme koşullarının sentetik HA üzerindeki etkisi hakkında önemli bilgiler sağlamakta ve ayrıca diğer kalsiyum fosfat türlerinden de ayırt edilmesine yardımcı olmaktadır (Gibson 2020). HA'da hidroksil bantları (OH^- grupları), karbonat bantları (CO_3^{2-} grupları) ve fosfat bantları (PO_4^{3-} grupları) kendilerine özgü karakteristik tepe değerlerine sahip olmakta ve FTIR ile ölçülebilmektedir (Kiefer vd. 2015). Spektrumun x eksenini dalga sayısını, y eksenini ise absorpsiyon veya geçirgenliği temsil etmektedir (Faghihzadeh vd. 2016). Küre ve çubuk formlu nHA'ların analizi, Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi Bruker-Tensor 27 ile 400 ila 4000 cm^{-1} arasında değişen iletim modunda 4 cm^{-1} çözünürlükte incelenmiştir.

3.4. *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster 100 yılı aşkın süredir klasik ve modern genetik çalışmalarında kullanılmaktadır. Hızlı yaşam döngüsü, verimli bir çiftleşme ile birlikte kısa bir süre sonunda yüzlerce yavru verebilmesi *Drosophila*'yı kemirgen modellerden üstün kılmaktadır. Bunun yanında *Drosophila* yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere tüm gelişim evreleri kolaylıkla izlenebilen model organizmadır (Yamaguchi ve Yoshida 2018). Gelişim süreçleri yumurta, larva, pupa ve ergin dönemlerinden oluşan *Drosophila* holometabol bir canlıdır (Şekil 3.2). Yumurtadan çıkan larvaların birincil görevleri beslenmeyi oluşturmaktadır. Larvaların büyüme periyodu 4 gün boyunca sürer ve bu süre sonunda ağırlığı yaklaşık olarak 200 kat artmaktadır. Üçüncü larva döneminin sonunda larvalar beslenmeyi durdurmakta ve pupa oluşumu için kuru bir yer bulmak üzere besin

ortamını terk etmektedir (Stocker ve Gallant 2008). Normal yaşam döngüsünü 25°C’de 9-11 günde tamamlayarak ergin hale gelmektedir.

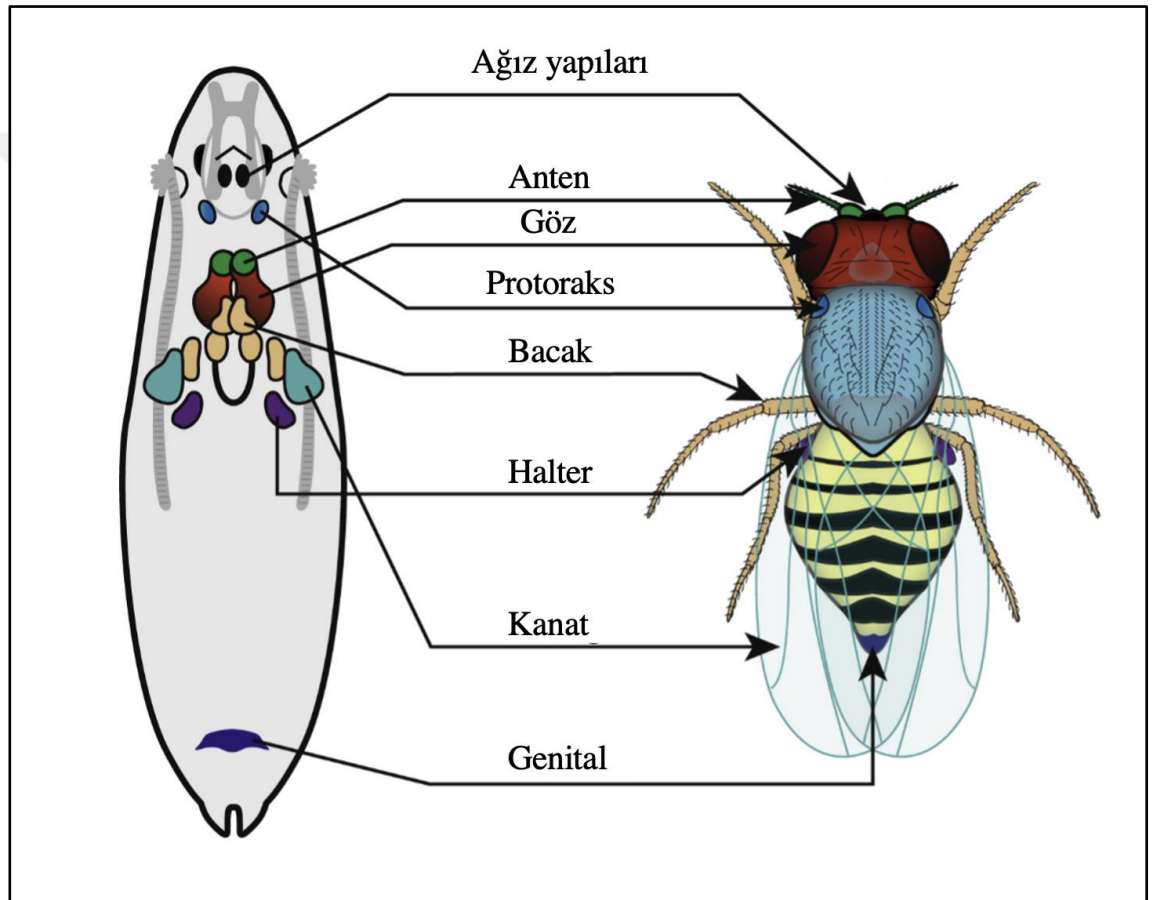


Şekil 3.2. *Drosophila* yaşam döngüsü (Stocker ve Gallant 2008)

Larval dönemde, ağız açıklıkları yaklaşık 50-200 µm arasında değişmekte ve bu boyut aralığındaki her türlü kimyasala oral maruziyet sonucunda larval dönemde imajinal disk hücrelerindeki genetik farklılaşma doğrudan fenotipe yansımaktadır (Liu vd. 2009).

Drosophila larvalarında erken embriyonik gelişim sırasında vücut planını oluşturan hücre grupları (imajinal disk hücreleri) sürekli bölünme halindedir ve ergin *Drosophila* yapılarının üretilmesinden sorumludur. Üçüncü larval evrenin sonunda imajinal diskler farklılaşarak ergin yapılarını oluşturmaktadır (Yamaguchi ve Yoshida 2018).

Genital disk haricindeki tüm imajinal diskler çift halinde bulunmaktadır. Ağız yapılarını 4 disk oluşturmakta ve anten ile göz imajinal diskleriyle birlikte kafayı oluşturmaktadır. Protoraks, bacak, halter, kanat ve genital diskler olmak üzere *Drosophila* larvaları toplamda 19 adet imajinal diske sahiptir (Şekil 3.3). İmajinal diskler dört gün süren larval dönemde yaklaşık 10 saatte bir bölünmektedir. Yaklaşık 50000 hücrelik yapısıyla kanat imajinal diskleri en büyük yapıya sahiptir (Aldaz vd. 2010).



Şekil 3.3. *Drosophila* imajinal diskleri ve erginde oluşturduğu yapılar (Aldaz vd. 2010)

Drosophila ile yapılan deneylerde standart Lewis besin ortamı yanında etkisi araştırılan kimyasal ile ıslatılan *Drosophila* hazır besini kullanılmıştır (Graf ve Schaik 1992; Marcos ve Carmona 2013). Standart *Drosophila* besini “Lewis mediumu” olarak da bilinmektedir ve içeriği Çizelge 3.1’de gösterilmiştir (Lewis 1960).

Çizelge 3.1. Standart *Drosophila* besin içeriği

Mısır unu	104 gr
Toz şeker	94 gr
Toz maya	19 gr
Agar	5 gr
Distile su	1020 mL
Asit karışımı	6 mL

Hazır *Drosophila* besini: *Drosophila* hazır besini solüsyon olarak hazırlanmış ksenobiyotiklerin farklı derişimlerine larvaların maruz bırakılması amacı ile kullanılmaktadır. 4.5 gram *Drosophila* Instant Medium'un [Formula 4-24 ® (Carolina Biological Supply Co., USA)] 9 mL distile su veya test kimyasalı ile ıslatılmasıyla hazırlanmaktadır.

3.4.1. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

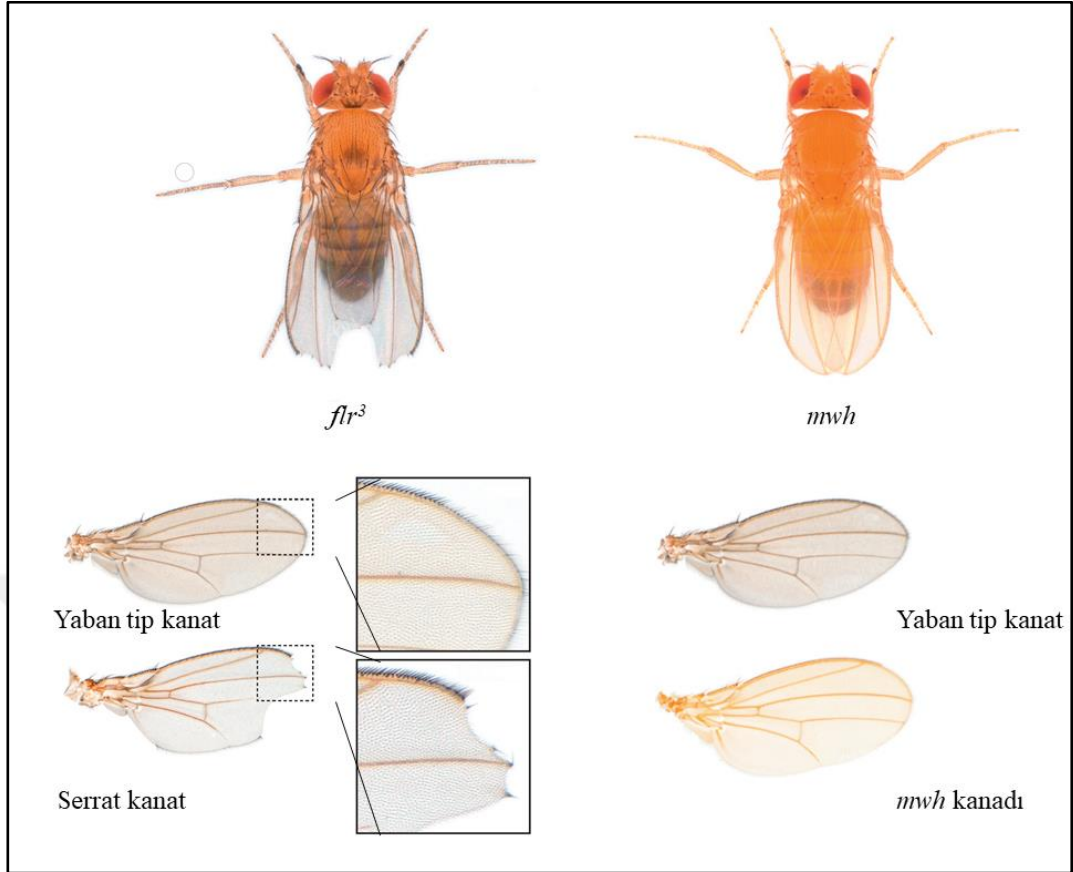
Drosophila SMART testinde *multiple wing hair (mwh)* ve *flare-3 (flr³)* hatları kullanılmaktadır. *mwh* (3-0,03) ve *flr³* (3-38,8) genleri üçüncü kromozom üzerinde bulunmaktadır. Normalde her bir kanat hücrelerinden tek bir trikom çıkarken, *mwh* mutant geninin homozigot durumda olduğu mutant hatta bir hücreden birden fazla trikom oluştuğu gözlenmektedir. *flr³* mutantlarında *flr³* geninin homozigot durumda embriyonik letal etki gösterdiği için bu genin homozigotlaştığı embriyolarda ergin sinek oluşumu gözlenmez (Marcos ve Carmona 2013). *flr³* mutantları çoklu inversiyonlar geçirmiş ve *Ser* (*Bd^S* Beaded Serrate) genini bulunduran dengeleyici kromozom TM3 taşımaktadır ve embriyonik dönemde homozigotlaşma engellenerek bireyler hayatta kalabilmektedir. TM3 rekombinasyonun baskılanarak mutasyon ve rekombinasyonun birbirinden ayrılmasını da sağlamaktadır (Graf vd. 1984; Graf ve Vanschaik 1992).

Erkek bireyler: *mwh/mwh*

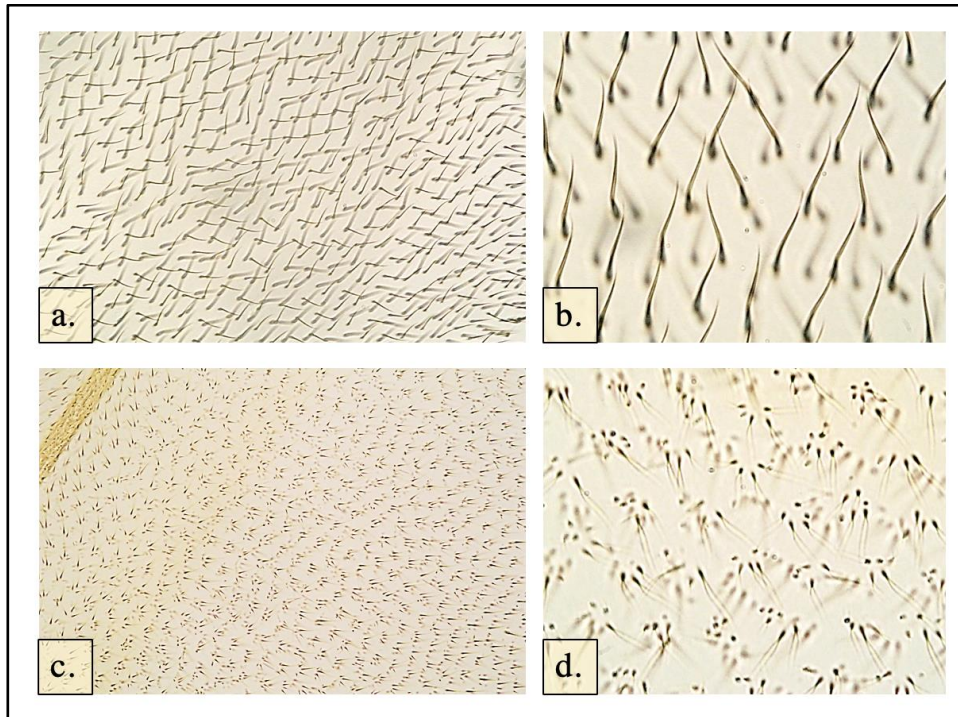
Dişi bireyler: *flr³/ln (3LR) TM3, Bd^S*

Yaban tip *Drosophila*'larda kanat uç kısımları oval yapıda olup trikomlar düz ve uzun şekildedir (Şekil 3.4). *flr³* geni nokta şeklinde, kısalmış koyu renkli düzgün olamayan yapıya sahip trikomlar ile kendini göstermektedir. Bunun yanında kanat uç kısımları kesikli bir yapıya sahiptir. *flr³* geni ve *Bd^S* genine sahip olan TM3 kromozomuna taşıyan bireylerde kanat uç kısımları yaban tipe benzer olarak ovak şeklindedir. *mwh* gen fenotipi ise tek bir hücreden birden fazla trikom çıkması ile karakterizedir (Şekil 3.5) (Kaya 2000).

SMART deneyi için yapılan çaprazlamada kullanılan marker mutant genler otozomal kromozom üzerinde bulunduğu için dişi ve erkeğin hangi mutant hattın seçildiğinin bir önemi yoktur. Bu nedenle yumurta verimliliğinin daha yüksek olması nedeni ile *flr³* bireyler dişi ebeveynler, *mwh* bireyler de erkek ebeveynler olarak tercih edilmektedir (Marcos ve Carmona 2013).



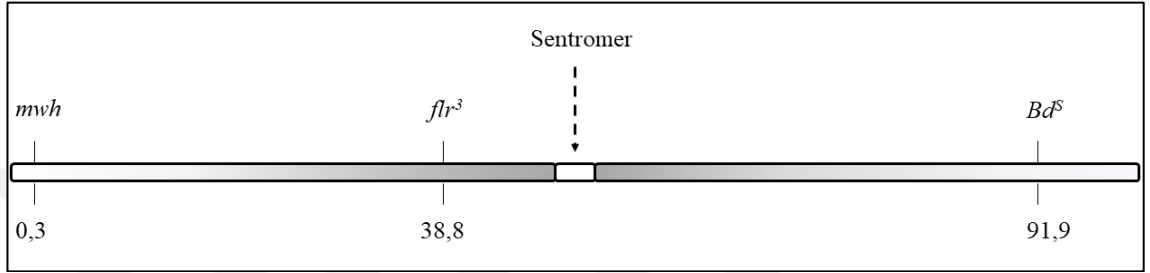
Şekil 3.4. *Drosophila flr*³ ve *mwh* mutantlarının vücut ve kanat yapıları



Şekil 3.5. *Drosophila flr*³ (a ve b) ve *mwh* (c ve d) mutantlarının trikom yapıları

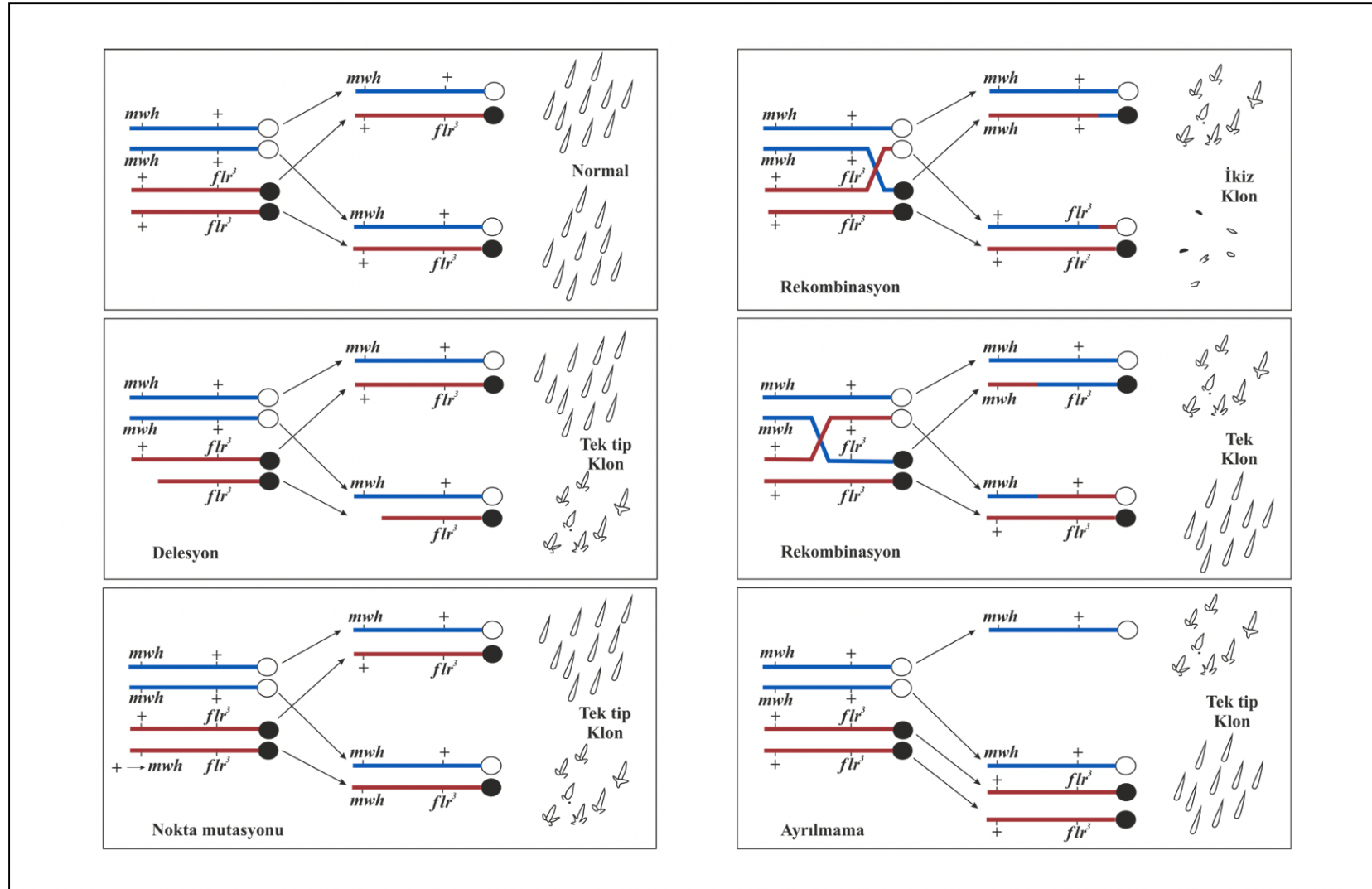
Drosophila SMART deneyi için yapılan çaprazlama sonucunda iki farklı fenotipte bireyler meydana gelmektedir.

- **Transheterozigot sinekler (Normal kanatlı):** Kanatlarda gözlenen klonlar mutasyon veya rekombinasyon sonucu ortaya çıkmaktadır.
- **Balancer-heterozigot sinekler (Serrat kanatlı):** TM3 dengeleyici kromozom taşıyan sineklerin kanatlarında gözlenen klonlar sadece mutasyonlarla (nokta mutasyon, delesyon, non-disjunction) sonucu oluşmaktadır (Spano vd. 2001).



Şekil 3.6. *Drosophila* kanat SMART'da kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleri (Lindsley ve Zimm 1992)

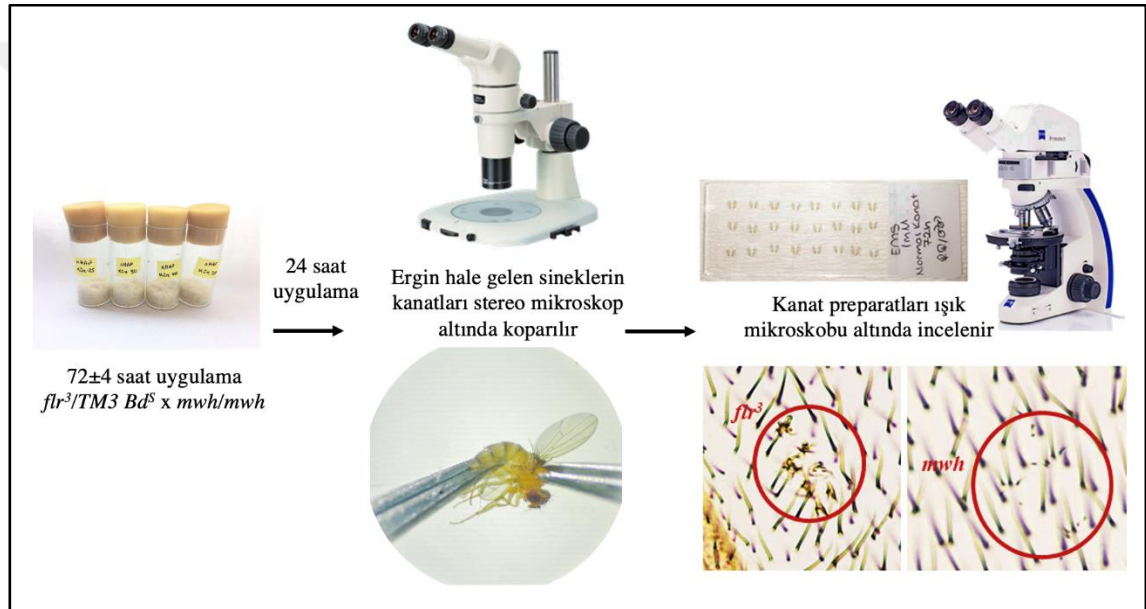
flr³ ve *mw h* genleri *Drosophila*'nın 3. kromozomu üzerinde yer almaktadır ve aralarında 38,8 cM (SantiMorgan) mesafe bulunmaktadır. *flr³* geni ve sentromer arasında 9 cM mesafe bulunmaktadır (Şekil 3.6). Genlerin kendi aralarındaki ve sentromer ile olan uzaklıkları rekombinasyonun gerçekleşmesi için yeterli olmaktadır. İkiz klonlar *flr³* ve sentromer arasındaki bir bölgede oluşan rekombinasyon sonucu gözlenirken yalnızca *mw h* içeren klonlar *flr³* ve *mw h* bölgeleri arasındaki rekombinasyon sonucu oluşmaktadır (Şekil 3.7). (Ramel ve Magnusson 1992).



Şekil 3.7. SMART deneyinde gözlenen tek tip ve ikiz klonların oluşum yolları (Graf vd. 1984)

Çizelge 3.2. SMART yönteminde kullanılan kimyasallar

SMART testinde kullanılan kimyasalların hazırlanışı			
Solüsyon Türü	Kimyasal	Miktar	Açıklama
Faure solüsyonu	Gliserol	20 mL	Manyetik karıştırıcıda karıştırılır.
	Gum arabik	30 gr	
	Kloral hidrat	50 gr	
	Distile su	50 mL	
<i>Drosophila</i> Asit Karışımı	Orto-fosforik asit	83 mL	Manyetik karıştırıcıda karıştırılır.
	Propiyonik asit	836 mL	
	Distile su	108 mL	

Şekil 3.7. *Drosophila* SMART yöntemi

Drosophila erkek bireyleri pupadan çıktıklarında eşeyssel olgunluğa ulaşmış durumdayken, dişiler için 4-6 saatlik bir süre geçmesi gerekmektedir. Dişiler sperm depolayabildiğinden çaprazlamaların doğru olması için virjin dişi seçimi yapılmıştır (Graf ve Schaik 1992).

Drosophila SMART yöntemi için aşağıdaki yollar izlenmiştir (Şekil 3.8) (Graf vd. 1984; Marcos ve Carmona 2013);

- Drosophila* besini bulunan şişelerde 40 virjin *flr-3* dişi ve 20 *mwh* erkek 24-48 saat süreyle aynı şişede çaprazlandıktan sonra bu bireylerden 8 saatlik yumurta toplama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Toplanan yumurtalar 72±4 saatlik olduklarında (üçüncü larval evre başlangıcına ulaşmaktadır) larvaların bulunduğu kültür şişeleri çeşme suyu altında yıkanmıştır

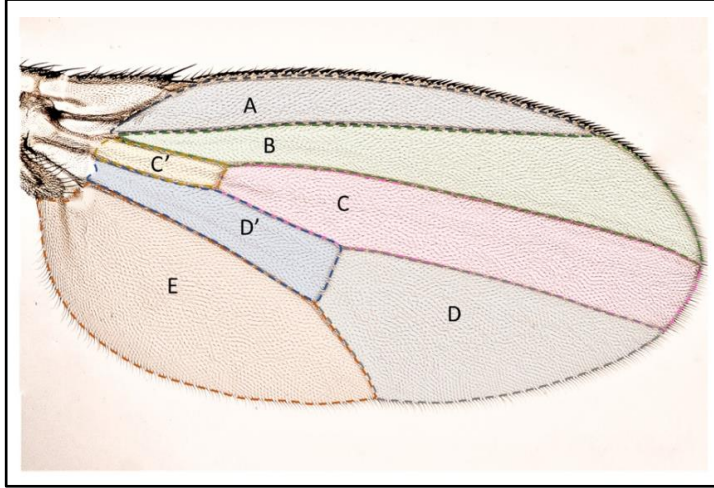
ve ince gözenekli elekten süzülerek larvalar uygulama yapmak üzere toplanmıştır (Graf vd. 1984).

- Uygulamalar 3 ayrı test tüpünde 25, 50, 100 ve 200 ppm’lik küre ve çubuk formu nHA solüsyonlarının 9 ml’si 4.5 gram hazır *Drosophila* Instant Medium üzerine eklenerek uygulama ortamı hazırlanmıştır. Musluk suyu altında seçilmiş olan transheterozigot larvalardan 1-2 mikrospatül uygulama ortamına aktarılarak bireylerin ergin oluncaya kadar bu ortamda kalmaları sağlanmıştır.
- Çalışmada pozitif kontrol olarak 1 mM EMS, negatif kontrol grubu olarak distile su, kullanılmıştır.
- Uygulama tüpleri sinekler ergin hale gelene kadar %60 bağıl nem olan ortamda 25°C’de *Drosophila* kültür odasında bekletilmiştir.
- Ergin hale gelen sinekler eter yardımıyla bayıltılmış ve %70 etil alkol bulunan tüplere aktarılmış ve preparat hazırlama aşamasına kadar +4°C’de saklanmıştır.
- %70 etil alkolde bulunan sinekler çukur lama damlatılan faure solüsyonu içerisine alınmış ve ince uçlu pens yardımıyla kanatları kopartılmıştır (Çizelge 3.2).
- Her bir preparata 40 bireyden kopartılan 80 adet kanat çiftler halinde yapıştırılmıştır.
- Hazırlanan preparatlar 24 saat süre boyunca tozsuz bir ortamda kurumaya bırakılmıştır.
- 24 saat sonunda lamlar faure solüsyonu kullanılarak lamel ile kanatlar üzerinde hava kabarcığı kalmamasına dikkate edilerek kapatılmıştır (Şekil 3.9).
- Hazırlanan preparatlar 40X büyütmede ışık mikroskobunda analiz edilmiştir.



Şekil 3.8. *Drosophila* SMART deneyinde hazırlanan kanat preparatı

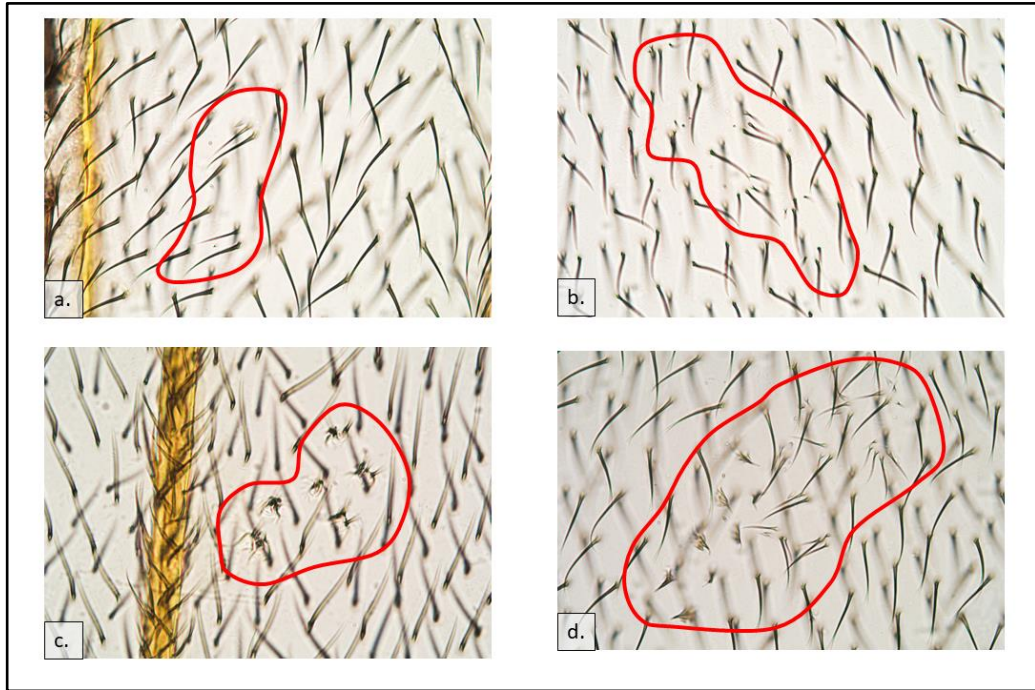
D. melanogaster kanatları mutant klonların analizinde kolaylık olması için A, B, C, C', D, D' ve E olmak üzere farklı bölgelere ayrılmıştır (Şekil 3.10) (Graf vd. 1984; Marcos ve Carmona 2013).



Şekil 3.9. *D. melanogaster* kanat bölümleri

Mutant klonların sınıflandırılması (Şekil 3.11);

- **Küçük tek tip klon:** 1 veya 2 tane *mwh* klonundan oluşur.
- **Büyük tek tip klon:** 3 ve 3'ten fazla *mwh* klonu veya 4 ve 4'ten fazla *flr³* klonundan oluşur. *flr³*'ün tek başına 4'ten az olduğu durumların varyasyon nedeniyle gerçekleşme ihtimalinin yüksek olması nedeniyle değerlendirmeye alınması önerilmemektedir (Szabad vd. 1983).
- **İkiz klon:** Hem *mwh* hem de *flr³* klonlarının aynı klon içerisinde bir arada bulunduğu durumda oluşur (Graf vd. 1984).

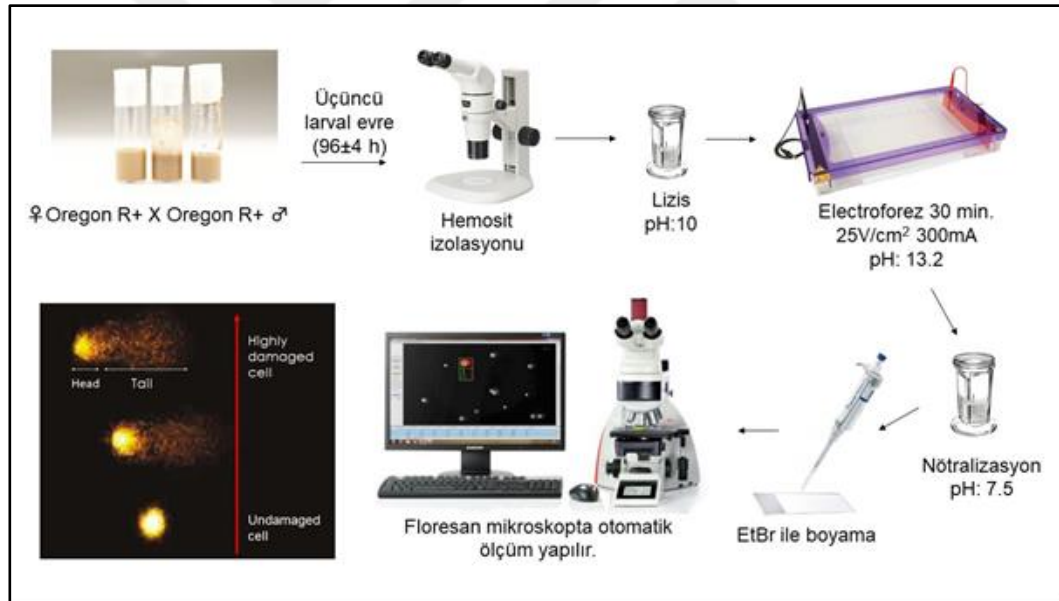


Şekil 3.10. (a) Küçük tek tip klon görünümü; (b) Büyük tek tip *mwh* klon görünümü; (c) Büyük tek tip *flr³* görünümü; (d) İkiz klon görünümü (100X)

3.4.2. *Drosophila* hemositlerinde tek hücre alkali jel elektroforezi (SCGE/KOMET) testi

KOMET yönteminde hasarlı hücrelerin analizi görsel skorlama ve bilgisayar yazılımı ile otomatik ölçüm ile yapılmaktadır. Collins vd. (1995) 0 ile 4 arasında skorlama sistemleri önermişlerdir. Bu yöntemlerde hasarsız hücreye en az puan verilmekte hasar arttıkça verilen skor değeri de artmaktadır. Bilgisayar yazılımı ile yapılan otomatik ölçüm için farklı ölçüm yazılımları bulunmaktadır. Bu programlar yardımıyla 30'dan fazla sayıda parametrenin ölçümü aynı anda hızlı bir şekilde yapılabilmektedir (Kumaravel vd. 2009). Bunlar içerisinde kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti yaygın olarak kullanılan ve kabul edilen ölçüm parametreleridir (Moller vd. 2020).

Komet yazılımlarında "Baş" ve "kuyruk" bölgesi tanımlandıktan sonra, kuyruk uzunluğu piksel cinsinden ölçülmektedir ve daha sonra mikrona dönüştürülmektedir. Kometlerin baş ve kuyruk kısımlarındaki ışık yoğunlukları farklı komet parametrelerinin hesaplanmasında kullanılmaktadır (Kumaravel vd. 2009). Kuyruk momenti, kuyruk uzunluğunun ve kuyruktaki toplam DNA fraksiyonunun ürünü olarak tanımlanmaktadır. Kuyruk momenti=kuyruk uzunluğu x kuyruktaki % DNA formülü ile komet yazılımları tarafından otomatik olarak hesaplanmaktadır (Mozaffarieh vd. 2008; Moller vd. 2014).



Şekil 3.11. *Drosophila* KOMET Yöntemi

Laboratuvar koşullarında uygulanacak analizlerde aşağıdaki şekilde bir yol izlenmiştir (Şekil 3.12);

- *Drosophila* Oregon R+ hattından 8 saatlik yumurtalar toplanmıştır. Toplanan yumurtalar 72±4 saatlik (3. larval evre) olduklarında 25, 50, 100 ve 200 ppm küre ve çubuk formu nHA maruziyetine bırakılmıştır.

- Uygulamalar, 72±4 saatlik larvaların yaklaşık 4.5 gramı kuru halde bulunan *Drosophila* hazır besininin (*Drosophila* Instant Medium) 25-200 ppm aralığındaki nHA

derişimlerinin 9 ml'si ile ıslatılmasıyla oluşan besin ortamında 24 saat bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. *Drosophila* KOMET testi kimyasalları

<i>Drosophila</i> KOMET testi kimyasallarının hazırlanması			
Solüsyon Türü	Kimyasal	Miktar	Açıklama
10 M NaOH	NaOH	40 g	100 ml distile suya tamamlanır
0.4 M EDTA	Na ₂ EDTA	1,488	Isıtıcıly manyetik karıştırıcı ısı yardımıyla karışması sağlanır.
	Distile su	10 ml	
Lizis solüsyonu	NaCl	84.6 g	Elde edilen karışım 10 M NaOH ile pH:10 olacak şekilde ayarlanır. Karışımından 12 ml alınır. 6 ml Triton-X ve 6 ml Sarcosin eklenir.
	Na ₂ EDTA	22.4 g	
	Trizma	0.72 g	
	Distile su	540 ml	
Elektroforez solüsyonu	NaOH	60 ml	NaOH veya HCl ile pH:13.20 olacak şekilde ayarlama yapılır.
	Na ₂ EDTA	10 ml	
	Distile su	1930 ml	
Nötralizasyon solüsyonu	Trizma		HCl ile pH: 10 olacak şekilde ayarlanır.
	Distile su	600 ml	
Düşük erime ısıly agar	Agar	0.075	Isıtıcıly manyetik karıştırıcı ısı yardımıyla karışması sağlanır.
	Distile su	10 ml	
Düşük erime ısıly agar "DNA grade"	Agar	0.075	
	Distile su	10 ml	
Etidyum Bromür	EtBr	0.01 g	Işık görmeyecek şekilde +4°C'de saklanır.
	Distile su	100 ml	
PBS	PBS	1 tablet	Manyetik karıştırıcıda karıştırılır.
	Distile su	200 ml	
%0.07'lik Feniltiyoüre	Feniltiyoüre	0.07 g	Manyetik karıştırıcıda en az 12-18 saat karıştırılır.
	PBS	100 ml	

• *Drosophila* larvaları 96 ± 4 saatlik olduklarında her bir uygulama grubundaki larvalar bir elek yardımı ile musluk suyu altında toplanmıştır. Daha sonra toplanan larvalar suda yıkanıp %5'lik sodyum hipoklorid çözeltisinde steril edildikten sonra kurutma kâğıdı yardımıyla kurutulmuştur.

• Distile su negatif kontrol, 4 mM EMS pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

• *D. melanogaster* hemositleri toplanmadan bir gün önce KOMET testinde kullanılacak solüsyonlar (Çizelge 3.3) taze olarak hazırlanmıştır.

• Her bir uygulama grubundan toplanan 40-60 larvadan *D. melanogaster* hemositlerinin toplanması Irving vd. (2005) metoduna göre yapılmıştır.

• İki ince uçlu pens yardımı ile *D. melanogaster* hemolenfi ve hemositleri larvalardan içerisinde %0.07 feniltiyöre bulunan fosfat tamponu (PBS) içerisine toplanmıştır.

• İzole edilen hemositler 1.5 ml'lik santrifüj tüpleri içerisine alınıp $+4$ oC'de 10 dakika 300Xg'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak soğuk 20 µl PBS solusyonu ile süspanse edilmiştir.

• Singh vd. (1988) prosedürüne göre 20 µl PBS solusyonu ile süspanse edilen hemositler düşük erime ısisına sahip agaroz (LMA)'un 80 µl'si ile hızlı bir şekilde karıştırılıp, bir gün önceden hazırlanmış normal erime ısisına sahip agaroz (NMA)'la kaplanmış lamalar üzerine 100 µl şeklinde yayılmış ve lamelle kapatılmıştır.

• Preparatlar 10 dakika soğuk levha üzerinde bekletilip daha sonra lameller kaldırılarak 3. katman olarak tekrar LMA'dan 80 µl eklenmiştir ve tekrar lamelle tekrar kapatılmıştır. Preparatlar 10 dakika soğuk levha üzerinde bekletilmiştir.

• Süre sonunda preparatların üzerindeki lameller kaldırılarak ve içerisinde lizis solüsyonu bulunan etrafı ışık almayan şale içerisine yerleştirilmiş ve buzdolabında en az 1 saat bekletilmiştir.

• Lizis işlemi sonrasında preparatlar elektroforez tankında elektroforez solüsyonu içerisinde 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 30 dakika 25 V (1 V/cm) 300 mA'de yürütülmüştür.

• Elektroforez işleminden sonra lamalar, içerisinde nötralizasyon solüsyonu bulunan şale içerisine alınıp, burada soğukta 5 dakika bekletilmiştir. Aynı işlem 2 kez tekrar edilmiştir.

• İşlemler sonunda her bir lama 50 µl Etidyum bromür (EtBr, 60 µg/ml) eklenerek üzeri lamel ile kapatılmıştır.

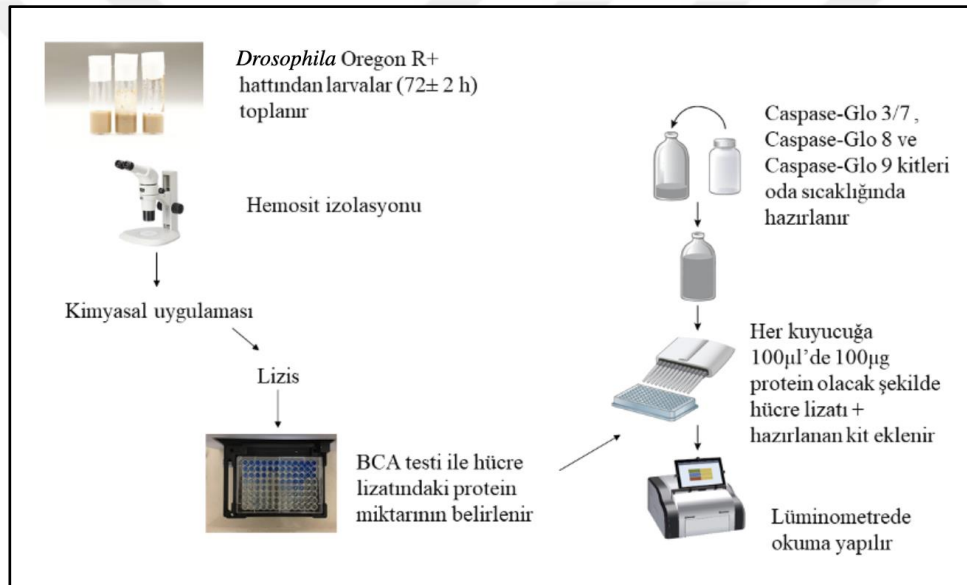
• Elde edilen preparatlarda her bir preparat için 50 hücre 40X büyütmede Floresans mikroskopta (Nikon Eclipse E200) sayılmıştır.

• Değerlendirme parametresi olarak % DNA Tail Intensity (Kuyruk Yoğunluğu), Tail Moment (Kuyruk Momenti) ve Tail Length (Kuyruk Uzunluğu) kullanılmıştır.

- Bütün ölçümler Floresan mikroskopta KOMET-IV (Version 4.11) programı ile otomatik ölçüm şeklinde yapılmıştır.

3.4.3. Kaspaz aktiviteleri

Kaspaz aktiviteleri ölçümleri için *Drosophila* Oregon R+ hattından 8 saatlik yumurtalar toplanmıştır. Toplanan yumurtalar 72 ± 4 saatlik (3. larval evre) olduklarında 25, 50, 100 ve 200 ppm küre ve çubuk formu nHA maruziyetine bırakılmıştır. Uygulamalar, 72 ± 4 saatlik larvaların yaklaşık 4.5 gramı kuru halde bulunan *Drosophila* hazır besininin (*Drosophila* Instant Medium) 25-200 ppm aralığındaki nHA derişimlerinin 9 ml'si ile ıslatılmasıyla oluşan besin ortamında 24 saat bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Larvalar 96 ± 4 saatlik olduklarında hemosit izolasyonu Irving vd. 2005 metoduna göre gerçekleştirilmiş ve her bir kaspaz aktivitesinin ölçümü için kitler kullanılmıştır.



Şekil 3.12. Kaspaz aktivitelerinin ölçülmesi

Kaspaz-3/7 aktivitesinin ölçümü

Drosophila hemositlerinde kaspaz-3/7 aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Caspase-Glo 3/7 Assay kiti (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılmıştır.

- İzole edilen hemositlere kimyasal uygulaması ve lizis solüsyonu (Çizelge 3.4) ile lizis işlemi yapıldıktan sonra elde edilen hücre lizatındaki protein miktarı BCA testi ile belirlenmiş ve 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 100 µl'de 100 µg protein olacak şekilde eklenmiştir.

- Caspase-Glo 3/7 Assay Kit'de bulunan 2,5 ml Caspase-Glo 3/7 Buffer, Caspase-Glo 3/7 substratı ile oda sıcaklığında karıştırılarak substratın tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

- Elde edilen bu karışımdan her kuyucuğa 100 µl eklenmiştir.
- Plakalar çalkalayıcı yardımıyla 300-500 rpm’de 30 saniye karıştırılmıştır.
- Sonrasında plakalar oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Süre sonunda oluşan lüminesans miktarı çok modüllü plaka okuyucu ile ölçülmüştür (Şekil 3.13).

Çizelge 3.4. Kaspaz aktivitesinde kullanılan kimyasallar

Solüsyon Türü	Kimyasal	Miktar	Açıklama
Lizis solüsyonu	Tris HCl	0.315 g	Manyetik karıştırıcıda karıştırılır.
	NaCl	0.877 g	
	Na ₂ EDTA	0.074 g	
	%1 Triton-X	1 ml	
	Na ₂ H ₂ P ₂ O ₇	0.066 g	
	β-gliserofosfat	0.022 g	
	Distile su	100 ml	
Bradford Boyası	Coomasie Blue	10 ml	Karışım filtreden geçirilir, ışık görmeyecek şekilde +4°C’de saklanır.
	%95’lik etanol	2.5 ml	
	% 85’lik Ortofosforik asit	5 ml	
	Distile su	42.5 ml	
PBS	PBS	1 tablet	Manyetik karıştırıcıda karıştırılır.
	Distile su	200 ml	
Bovine serum albumin (BSA)	BSA	10 mg	Manyetik karıştırıcıda karıştırılır.
	PBS	10 ml	

Kaspaz-8 aktivitesinin ölçümü

Drosophila hemositlerinde kaspaz-8 aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Assay kiti (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılmıştır.

- İzole edilen hemositlere kimyasal uygulaması ve lizis işlemi yapıldıktan sonra elde edilen hücre lizatındaki protein miktarı BCA testi ile belirlenmiş ve 96 kuyucuklu

hücre kültürü plakalarına 100 µl'de 100µg protein olacak şekilde eklenmiştir.

- Caspase-Glo 8 Assay Kit'de bulunan 2,5 ml Caspase-Glo 8 Buffer, Caspase-Glo 8 substratı ile oda sıcaklığında karıştırılarak substratın tamamen çözünmesi sağlanmıştır.
- Elde edilen bu karışımdan her kuyucuğa 100 µl eklenmiştir.
- Plakalar çalkalayıcı yardımıyla 300-500 rpm'de 30 saniye karıştırılmıştır.
- Sonrasında plakalar oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- Süre sonunda oluşan lüminesans miktarı çok modüllü plaka okuyucu ile ölçülmüştür (Şekil 3.13).

Kaspaz-9 aktivitesinin ölçümü

Drosophila hemositlerinde kaspaz-9 aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Caspase-Glo 9 Assay kiti (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılmıştır.

- İzole edilen hemositlere kimyasal uygulaması ve lizis işlemi yapıldıktan sonra elde edilen hücre lizatındaki protein miktarı BCA testi ile belirlenmiş ve 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 100 µl'de 100µg protein olacak şekilde eklenmiştir.
- Caspase-Glo 9 Assay Kit'de bulunan 2,5 ml Caspase-Glo 9 Buffer, Caspase-Glo 9 substratı ile oda sıcaklığında karıştırılarak substratın tamamen çözünmesi sağlanmıştır.
- Elde edilen bu karışımdan her kuyucuğa 100 µl eklenmiştir.
- Plakalar çalkalayıcı yardımıyla 300-500 rpm'de 30 saniye karıştırılmıştır.
- Sonrasında plakalar oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- Süre sonunda oluşan lüminesans miktarı çok modüllü plaka okuyucu ile ölçülmüştür (Şekil 3.13).

3.4.4. *Drosophila* larvalarında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile DNA tamiri gen ifadelerinin belirlenmesi

RT² Profillem PCR Dizileri, hızlı ve güvenilir gen ifadesi analizine olanak tanıyarak araştırmacıların geleneksel PCR yöntemlerine göre daha hızlı ve daha çok sayıda test yapabilmesine olanak sağlamaktadır. Diziler, her seferinde başarılı bir deney sağlamak için entegre, patentli kontrollere sahip, üretici firmanın laboratuvarında doğrulanmış qPCR testlerinin yolak odaklı panelleridir. Bu sistemde yer alan her bir dizi, kişiye özel olarak tasarlanabilmekte ve benzersiz deneysel ihtiyaçlara uyacak şekilde değiştirilebilmektedir.

Çalışma kapsamında ifadesi araştırılacak genlerin insan genleri homoloji oranı flybase.org üzerinden doğrulanmıştır. Çizelge 3.5'te çalışma kapsamında kullanılacak olan genler, ait oldukları tamir sistemleri veya sinyal yolları ile homoloji götserdikleri insan genleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. *Drosophila* RT²-PCR uygulamasında kullanılacak olan DNA tamir genleri

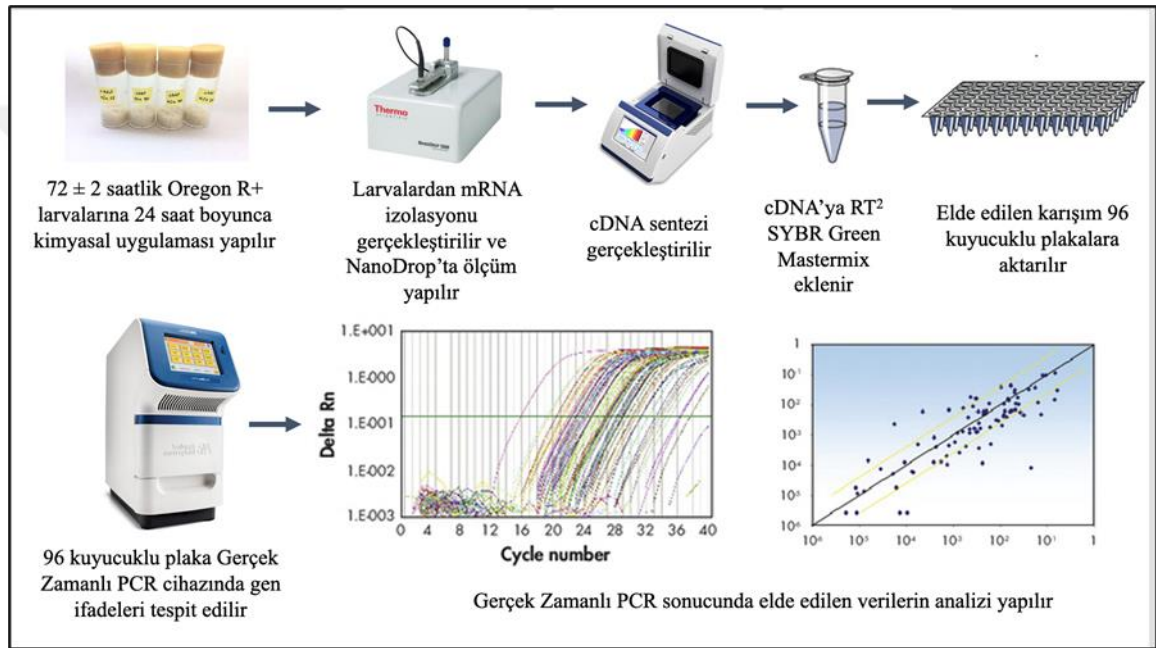
	İnsan	<i>Drosophila</i>
Nükleotid Kesip Çıkarma Tamiri (NER)	<i>CDK7</i>	<i>Cdk7</i>
	<i>ERCC1</i>	<i>Ercc1</i>
	<i>LIG1</i>	<i>DNAlig1</i>
	<i>OGG1</i>	<i>Ogg1</i>
	<i>PNKP</i>	<i>CG9601</i>
	<i>TP53 (p53)</i>	<i>p53</i>
	<i>XPA</i>	<i>Xpac</i>
	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>
	<i>MLH1</i>	<i>Mlh1</i>
	İnsan	<i>Drosophila</i>
Baz Kesip Çıkarma Tamiri (BER)	<i>LIG1</i>	<i>DNAlig1</i>
	<i>OGG1</i>	<i>Ogg1</i>
	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>
	<i>TP53 (p53)</i>	<i>p53</i>
	<i>XRCC1</i>	<i>XRCC1</i>
	<i>FEN1 (Dnase IV)</i>	<i>Fen1</i>
	İnsan	<i>Drosophila</i>
Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR)	<i>MLH1</i>	<i>Mlh1</i>
	<i>MLH3</i>	<i>Pms2</i>
	<i>MSH2</i>	<i>spel1</i>
	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>
	<i>PMS2/MLH3</i>	<i>Pms2</i>
	<i>TP73</i>	<i>p53</i>
	<i>LIG1</i>	<i>DNAlig1</i>
	İnsan	<i>Drosophila</i>
Çift Zincir Kırıklarının Tamiri (DSBR)	<i>ATM</i>	<i>tefu</i>
	<i>HUS1</i>	<i>Hus1-like</i>
	<i>LIG1</i>	<i>DNAlig1</i>
	<i>MDC1</i>	<i>mu2</i>
	<i>MLH1</i>	<i>Mlh1</i>
	<i>ATR</i>	<i>mei-41</i>
	<i>RAD50</i>	<i>rad50</i>
	<i>RAD51</i>	<i>Rad51D</i>
	<i>BRCA2</i>	<i>brca2</i>
	<i>RAD51</i>	<i>Rad51C</i>

(Devamı Arkada)

Çizelge 3.5'in Devamı

	İnsan	Drosophila
ATM / ATR Sinyal Yolağında Görevli Genler	ATM	tefu
	ATR	mei-41
	FANCD2	Fancd2
	HUS1	Hus1-like
	MDC1	mu2
	RAD1	Rad1
	RAD17	Rad17
	RAD50	rad50
	RAD9A	Rad9
	TOPBP1	mus101
	TP53 (p53)	p53
	MCPH1	MCPH1
	ATRIP	mus304
	CDC25	stg
	İnsan	Drosophila
Hücre Döngüsü Kontrol Genleri	ATM	tefu
	Hsap/POLH	DNA-pol-eta
	REV1 (REV1L)	Rev1
	ATR	mei-41
	CDK7	Cdk7
	MDC1	mu2
	TP73	p53
	CDKN1A	dap/dacapo
	MCPH1	MCPH1
	LIG1	DNAlig1
	ATRIP	mus304
	CDC25	stg
	RPLP2	RpLP2
	ACVR2	put
	LIG1	DNA-lig1
	İnsan	Drosophila
Apoptoz Yolaklarında Görevli Genler	ATM	tefu
	RAD9A	Rad9
	TP73	p53
	SIRT2	sir2
	RAD21	vtd
	CDKN1A	dap

Bu uygulamada genom ve proteom yapısı insan ile yüksek benzerlik gösteren *Drosophila* için belirtilen yollara ait gen paneli firma (Qiagen) tarafından oluşturulmuştur. *Drosophila* için hazırlanmış RT profiler 96 kuyulu PCR array plakalarında "DNA Hasarı Sinyalizasyon Yolağı PCR Array (DNA Damage Signaling Pathway PCR Array) Paneli" (Qiagen) kullanılarak gen ifadeleri araştırılmıştır. Hazırlanan panel format 96 kuyucuklu plakalarda 2 konsantrasyon çalışılabilir şekilde tasarlanmıştır. Bu 48 kuyucuğun 7 tanesi pozitif PCR kontrol (3 adet), revers-transkripsiyon kontrol (3 adet) ve genomik DNA kontrol (1 adet) olmak üzere kontrol kuyucuklarıdır. 5 kuyucuk ise "housekeeping" genlerini içermektedir (*Act42A*, *Gapdh1*, *RpL32*, *SdhA* ve *Tbp*). Bu housekeeping genleri analiz sisteminde normalizasyonun hesaplanmasında kullanılmaktadır. Geri kalan 36 kuyucuk DNA tamirinde görevli genleri içermektedir (Çizelge 3.5).



Şekil 3.13. *Drosophila* larvalarında RT²-PCR uygulaması

Drosophila RT²-PCR uygulamasında (Şekil 3.14);

- *Drosophila* Oregon R+ bireylerden 8 saat boyunca yumurta toplanmıştır.
- Toplanan yumurtalar 72 ± 4 saatlik evreye geldiklerinde 25 ve 200 ppm küre ve çubuk formu nHA'ların 9 ml'si ile ıslatılan *Drosophila* instant medium besin ortamına aktarılmış ve bu besin ortamında 96 ± 4 saatlik evreye gelene kadar maruziyet sürdürülmüştür.
- Uygulama yapılan larvalardan 30 birey mikrosantrifüj tüplerine toplanmıştır.
- Larvalardan total mRNA izolasyonu, RNeasy Mini İzolasyon Kiti (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
- RNA'lar izole edildikten sonra Nanodrop cihazı kullanılarak RNA miktarı

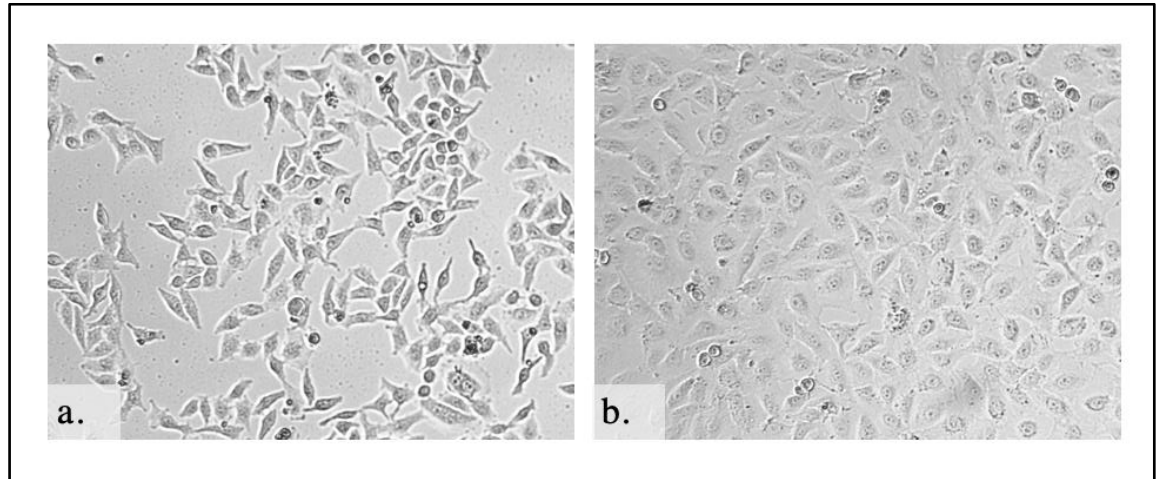
ve kalitesi belirlenmiştir.

- Yeterli miktarda RNA izole edildikten sonra RT² First Strand Kiti (Qiagen) ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.
- cDNA'lar DNA hasar yolağındaki genlerin anlatımının değişip değişmediğini belirlemek için RT²-PCR cihazında (Applied Biosystems) ile test edilmiştir.
- RT² Profiler PCR Dizilerinin önemli bir avantajı, sonuçların teknik kalitesi hakkında bilgi sağlamak için kuyucuklara dahil edilen kontrol testleridir (PCR kontrolü, ters-transkripsiyon kontrolü, genomik DNA kontrolü). Panel sisteminde 7 kuyucuk pozitif PCR kontrolü, ters-transkripsiyon kontrolü, genomik DNA kontrolü olmak üzere tasarlanmıştır. Bu kontroller, genomik DNA'nın ham CT değerlerine potansiyel katkısını ölçen Genomik DNA Kontrolü kontrolüdür; ters transkripsiyon reaksiyonunun göreceli verimliliğini ölçen Ters Transkripsiyon Kontrolü; ve genel PCR'nin ne kadar iyi performans gösterdiğini ölçen Pozitif PCR Kontrolüdür.

3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.5.1. Hücreler ve kültür koşulları

Çalışma kapsamında 293T [HEK-293] (American Type Culture Collection (ATCC®) CRL-1573™, insan embriyonik böbrek epitel hücresi), HUVEC (ATCC® CRL-1730™, insan vasküler endotel hücresi).hatları kullanılmıştır (Şekil 3.15). Tüm hücreler %5 CO₂'li atmosferde 37°C'de inkübe edilmiştir. ATCC'nin tavsiye ettiği şekilde hücreler %0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırılıp 1:2 ya da 1:3 oranında olacak şekilde paşalanmış ve kullanılmayan hücreler %95 besiyeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan solüsyon içerisinde -80°C derin dondurucuda korunmuştur (Çizelge 3.6).



Şekil 3.14. 293T (a) ve HUVEC (b) hücre hatları görünümü

Çizelge 3.6. Hücre kültürü solüsyonları

Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar			
Solüsyon Türü	Kimyasal	Miktar	Açıklama
Besiyeri	RPMI 1640	500 ml	Steril ortamda hazırlanır. Kullanım amacına göre %10 ya da %1 FBS eklenir.
	Non-essential aminoasit	5 ml	
	Sodyum piruvat	2.5 ml	
	Anti-anti	0.5 ml	
Hücre dondurma solüsyonu	RPMI 1640	34 ml	Steril ortamda hazırlanır.
	FBS	4 ml	
	DMSO	2 ml	

3.5.2. Hücrelere hidroksiapatit uygulanması

Sentezlenen küre ve çubuk formu nHA'lar serumsuz besi yeri içerisinde çözdürülerek hazırlanan dozlar doğrultusunda 1×10^4 hücre/kuyucuk (96 kuyucuklu plak) olacak şekilde bölünmüş hücrelere uygulanmıştır. Literatür incelemesi ve ön denemeler doğrultusunda uygulama dozları 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 50 ve 25 ppm olarak belirlenmiştir.

3.5.3. WST-1 hücre proliferasyon testi

WST-1 ile hücre canlılığının ölçülmesi için aşağıdaki yol izlenmiştir.

- Hücreler stoktan açılarak küçük petri kaplarına ekilmiş ve petri kapları %80-90 oranında dolunca tripsin ile kaldırılıp 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekilmiştir.
- 24 saatlik süre ardından besiyerleri uzaklaştırılıp, HA dozları %1 serum içeren besiyerlerine eklenmiştir.
- HA uygulamasının arkasından tek bir sıra kuyucuktaki hücre canlılığı belirlenmiştir (sıfıncı zaman/ T_0).
- İnkübasyon süresi olarak 24, 48 ve 72 saatlik periyotlar olarak belirlenmiştir.
- İnkübasyon sonrasında besi yerleri uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara $90 \mu\text{l}$ serumsuz besiyeri ve WST-1 karışımından $10 \mu\text{l}$ eklenmiş ve 37°C de 2 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon süresi sonunda örneklerin absorbensları, spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

3.5.4. Tripan mavisiyle mL'deki canlı ve ölü hücre sayılarının belirlenmesi

Tripan mavisi testi ile hücre canlılığı mikroskopik inceleme ile belirlenmektedir. Hücrelerin canlılığı, hücre içine tripan mavisi alınıp alınmadığına bağlı olarak gözlenen renk ile değerlendirilmiştir. Canlı hücrelerin miktarı aşağıda verilen formüller ile hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı / ml} = (\text{Toplam Hücre Sayısı / n}) \times \text{Sulandırma Faktörü} \times 104$$

(n: Hemositometredeki karelerden kaç tanesinin sayıldığını göstermektedir)

$$\% \text{ Canlı Hücre} = \frac{\text{Canlı Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100$$

- Hücreler 1x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde 12 kuyucuklu plaklara bölünmüştür ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Inkübasyon sonrasında besi yerleri uzaklaştırılarak; HA dozlarını içeren 1 ml %1 serumlu besi yerleri uygulanmıştır.
- Kontrol grubu olarak kullanılacak kuyucuklara %1 serumlu besi yeri ve EMS uygulanan deneyler; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, sonlandırılmıştır.
- Besiyerleri toplanarak 1000 rpm'de 2 dakika döndürülerek çöktürülüp çökelti uzaklaştırılmış ve kuyucukların üzerine 500µl, EDTA-Versen eklenerek hücrelerin plaklardan ayrılması sağlanacak ve tüpteki çökeltinin üzerine eklenmiştir.
- Karışım, 1500 rpm'de 2 dakika daha döndürülerek çöktürülmüştür.
- Süpernatant uzaklaştırılıp üzerlerine 300µl PBS eklenerek peletler çözülmüştür.
- Örnekler buz içerisine alınarak hücre konsantrasyonuna bağlı olarak sulandırılmış, canlı ve ölü hücre sayıları ışık mikroskop altında 40X büyütmede hemositometre kullanılarak belirlenmiştir.

3.5.5. Alkali tek hücre jel elektroforezi (SCGE/KOMET) testi

Hücre kültürünün gerektirdiği şartlar doğrultusunda modifiye edilerek ve gerekli kimyasallar eklenerek *Drosophila* KOMET yöntemi oluşturulmuştur ve KOMET prosedürü 293T ve HUVEC hücreleri için 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.7. Hücre kültürü KOMET kimyasalları

Hücre kültürü ile yapılan KOMET testi kimyasallarının hazırlanması			
Solüsyon Türü	Kimyasal	Miktar	Açıklama
10 M NaOH	NaOH	40 g	100 ml'ye tamamlanır
	Distile su		
0.4 M EDTA	Na ₂ EDTA	1,488	Isıtıcılı manyetik karıştırıcı ısı yardımıyla karışması sağlanır.
	Distile su	10 ml	
Lizis solüsyonu	NaCl	84.6 g	Elde edilen karışım 10 M NaOH ile pH:10 olacak şekilde ayarlanır. Karışımdan 60 ml alınır. 30 ml Triton-X ve 30 ml DMSO eklenir.
	Na ₂ EDTA	22.4 g	
	Trizma	0.72 g	
	Distile su	540 ml	
Elektroforez solüsyonu	NaOH	60 ml	NaOH veya HCl ile pH:13.20 olacak şekilde ayarlama yapılır.
	Na ₂ EDTA	10 ml	
	Distile su	1930 ml	
Nötralizasyon solüsyonu	Trizma		HCl ile pH: 10 olacak şekilde ayarlanır.
	Distile su	600 ml	
Düşük erime ısıllı agar	Agar	0.075	Isıtıcılı manyetik karıştırıcı ısı yardımıyla karışması sağlanır.
	Distile su	10 ml	
Düşük erime ısıllı agar "DNA grade"	Agar	0.075	
	Distile su	10 ml	
Etidyum Bromür	EtBr	0.01 g	Işık görmeyecek şekilde +4°C'de saklanır.
	Distile su	100 ml	
PBS	PBS	1 tablet	Manyetik karıştırıcıda karıştırılır.
	Distile su	200 ml	

Petri kaplarından santrifüj edilerek izole edilen hücreler fosfat tamponu (PBS) ile süspanse edilerek düşük erime ısısına sahip agaroz (LMA) ile hızlı bir şekilde karıştırılıp normal erime ısısına sahip agaroz (NMA) ile kaplanmış lamalar üzerine yayılmıştır.

- Lamlar soğuk plakada bekletilmiş ve sonrasında içerisinde lizis solüsyonu (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton X-100 ve %1 N-lauroylsarcosine sodium salt solution, pH = 10) bulunan etrafi ışık almayan şalelere yerleştirilmiştir.

- Lizis işleminden sonra preparatlar elektroforez tankında bulunan solüsyon (1 mM Na₂EDTA ve 300 mM NaOH, pH = 13) içerisine konulacak ve burada 30 dakika bekletilmiştir.

- Süre sonunda 30 dakika boyunca 300mA, 25V'da elektroforez yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Elektroforez işleminden sonra lamlar, içerisinde nötralizasyon solüsyonu (400 mM Tris buffer, pH = 7.5) bulunan şale içerisine alınmıştır.

- İşlemler sonunda her bir lama 50 µl Etidyum bromür eklendikten sonra preparatlar 20 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Her bir doz için 100 hücre 40X büyütmede Floresans mikroskopta sayılmıştır.

- Tüm ölçümler Comet-IV (Version 4.11) programı ile otomatik ölçüm şeklinde yapılmıştır. Değerlendirme parametreleri olarak kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti hesaplanmıştır.

3.6. İstatistiksel analiz

Drosophila SMART testinde kanat preparatlarından elde edilen klon sayılarının istatistiksel değerlendirmesi MICROSTA paket programında Kastenbaum ve Bowman (1970) binominal koşullu test kullanılarak 0.05 anlamlılık düzeyine göre yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirme için iki farklı hipotez kuruldu.

H₀: Uygulama kimyasalları ile negatif kontrol arasında fark bulunmamaktadır.

H_A: Uygulama kimyasalları ile negatif kontrol arasında çarpım faktörü (m) katında fark bulunmaktadır.

Küçük tek tip klonlar ve toplam klonlar yüksek spontan frekanslara sahip olduğundan ve m=2 olarak kabul edilirken, büyük klonlar ve ikiz klonlar düşük spontan frekansı gösterdiğinden m=5 olarak kabul edilmiştir (Graf ve Singer 1992). Uygulanan frekansların pozitif (+), negatif (-), zayıf pozitif (w) ve ihmal edilebilir fark (i) değerlendirmeleri (Frei ve Würzler 1995) çoklu karar prosedürlerine göre yapılmıştır (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Çoklu karar prosedürü (Frei ve Würzler 1988'den uyarlanmıştır)

		H _A hipotezi	
		Kabul	Ret
H ₀ hipotezi	Kabul	Anlamsız (i)	Negatif (-)
	Ret	Pozitif (+)	Zayıf pozitif (w)

Drosophila KOMET testi, kaspaz aktiviteleri deneyi, WST-1 hücre proliferasyon testi, tripan blue testi ve hücre kültürü KOMET testinden elde edilen veriler IBM SPSS 20 paket programında varyans analizi (ANOVA) kullanılarak Dunnet Çoklu karşılaştırma Testi ile değerlendirilmiştir.

DNA Hasarı Sinyalizasyon Yolağı PCR Array sonuçları RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis Software versiyon 3.5 programı üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu program delta delta CT (cycle threshold (döngü eşiği)) yöntemini kullanarak gen ifadelerindeki kat değişimini/düzenlemesini hesaplamaktadır. Delta CT ilgilenilen (ifadesi ölçülmek istenen) gen ile “housekeeping” genleri arasında hesaplanmaktadır. Bunun ardından Delta-delta CT hesaplamaları Delta CT (Deney) ve Delta CT (kontrol) hesaplamaları yapılmaktadır. Katlanma değişiklikleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplanmaktadır. Verilerin analiz raporu Qiagen’e ait GeneGlobe web portalından alınmaktadır.



4. BULGULAR

4.1. Hidroksiapatit Sentezi

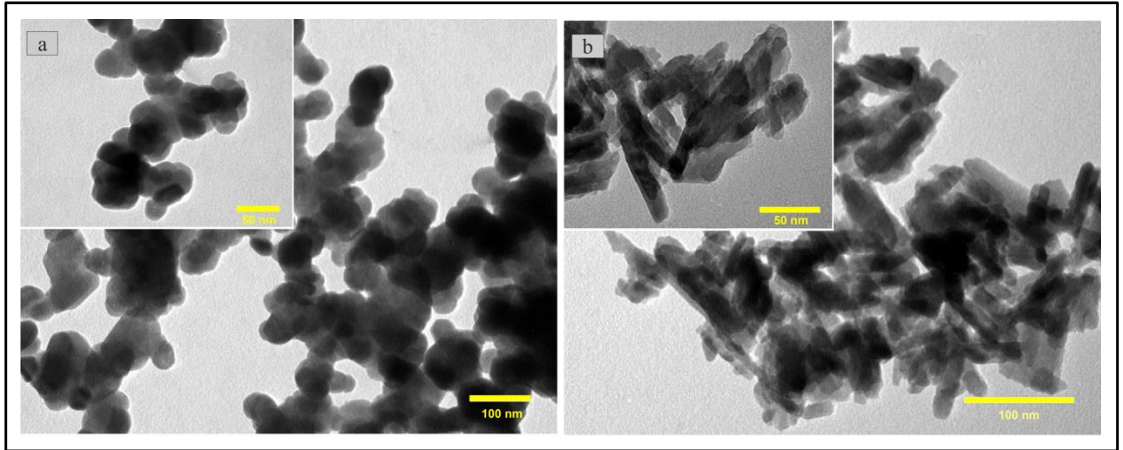
Çalışma kapsamında sol-gel yöntemi ile sentezlenen küre ve çubuk formu nHA'ların görüntüleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışma kapsamında sentezlenen nHA'lar. Küre form (a), Çubuk form (b)

4.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Analizi

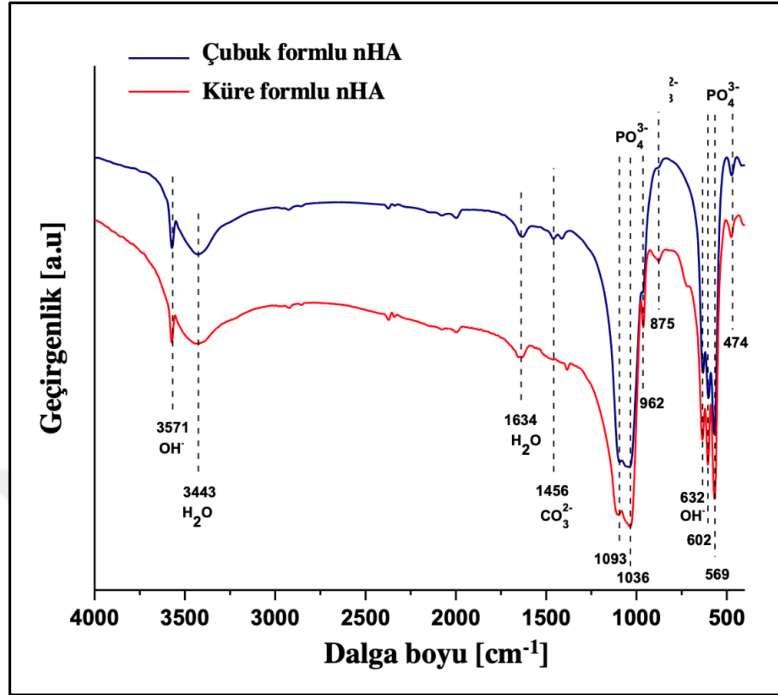
4.2.1. TEM görüntüleme analizi



Şekil 4.2. Küre (a) ve çubuk (b) formu nHA'ların TEM görüntüleri

Geçirimli elektron mikroskopunda yapılan analizler sonucunda, sentezlenen nHA'ların küre (Şekil 4.2.a) ve çubuk (Şekil 4.2.b.) formu oldukları ve sırasıyla 35-60 nm ile 45-90 nm aralığında uzunluklara sahip oldukları belirlenmiştir.

4.2.2. FTIR spektrumu analiz sonuçları



Şekil 4.3. Küre ve çubuk formu nHA'ların FTIR spektrumları

Küre ve çubuk formu nHA'ların FTIR spektrumları Şekil 4.3'te gösterilmiştir. FTIR spektrumları, HA'ların fonksiyonel gruplarını göstermektedir. Tipik PO_4^{3-} bantları 472, 569, 602, 962, 1036 ve 1093 cm^{-1} 'de görülmektedir (Sun vd. 2006; Salarian vd. 2009). Absorbe edilen su (H_2O) 1634 ve 3443 cm^{-1} 'deki bantlarda gözlenmektedir (Sun vd. 2006; Wang vd. 2006; Lin vd. 2007). HA kristal yapısındaki hidroksil grupları (OH^-) 632 ve 3571 cm^{-1} 'de gözlenmektedir (Panda vd. 2003). Karbonata (CO_3^{2-}) ait olan zayıf bantlar ise 875 ve 1456 cm^{-1} 'deki gözlenmektedir (van der Houwen vd. 2003; Sun vd. 2006; Ren vd. 2014). Elde edilen sonuçlar her iki formdaki nHA'nın etkin bir şekilde sentezlendiğini doğrulamaktadır.

4.3. *Drosophila melanogaster*

4.3.1. *Drosophila* SMART yöntemi

Küre ve çubuk formu nHA'ların *Drosophila* kanat imajinal disklerinde meydana getirdikleri genotoksik potansiyel *Drosophila* SMART deneyi ile belirlenmiştir. SMART çalışması kapsamında 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalara kimyasal uygulaması yapılmıştır. Tüm larvaların uygulama tüplerinde ergin hale gelmesi beklenmiştir. Ergin hale gelen sinekler uygulama tüplerinden toplanıp içerisinde %70 etil alkol bulunan tüplere toplanmıştır. Analizler normal kanat yapısına sahip *Drosophila* bireylerinin kanatlarının ışık mikroskobu altında taranması ile gerçekleştirilmiştir. Uygulama dozları olarak 25, 50, 100 ve 200 ppm belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak nHA solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan distile su, pozitif kontrol olarak 1 mM EMS kullanılmıştır

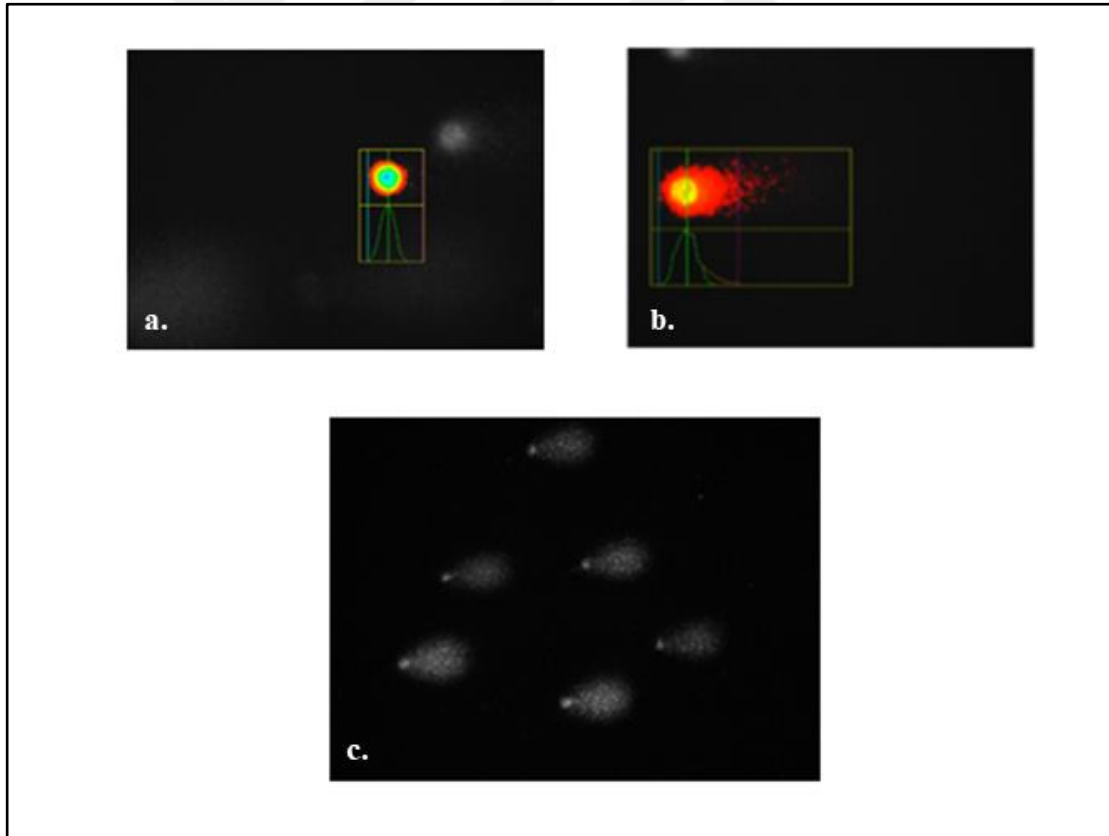
Çizelge 4.1. Küre ve çubuk formlu nHA'ların *D. melanogaster*'ın 72±4 saatlik transheterozigot larvalarındaki genotoksik etkisi

Dozlar (ppm)	Kanat Sayısı	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) ($m=2$)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) ($m=5$)			İkiz klonlar ($m=5$)			Toplam <i>mwh</i> klonlar ($m=2$)			Toplam klonlar ($m=2$)			Klon İndüksiyon Frekansı 10^5 hücre
		N	Fr	S	N	Fr	S	N	Fr	S	N	Fr	S	N	Fr	S	
Distile Su	80	19	0.24		1	0.01		0	0.00		20	0.25		20	0.25		1.02
1 mM EMS	40	64	1.6	+	29	0.72	+	17	0.42	+	111	2.78	+	113	2.82	+	5.69
<i>Küre Form</i>																	
25	80	25	0.31	i	1	0.01	i	0	0.00	i	26	0.32	i	26	0.32	i	1.33
50	80	26	0.32	i	10	0.12	+	2	0.02	i	38	0.48	+	38	0.48	+	1.95
100	80	32	0.45	+	4	0.40	i	0	0.00	i	36	0.45	+	36	0.45	+	1.84
200	80	34	0.48	+	2	0.03	i	2	0.03	i	38	0.48	+	38	0.48	+	1.95
<i>Çubuk Form</i>																	
25	80	19	0.24	-	6	0.08	i	0	0.00	i	25	0.31	i	25	0.31	i	1.28
50	80	20	0.25	-	2	0.02	i	1	0.01	i	23	0.29	-	23	0.29	-	1.18
100	80	28	0.35	i	0	0.00	i	0	0.00	i	28	0.35	i	28	0.35	i	1.43
200	80	15	0.19	-	2	0.02	i	0	0.00	i	17	0.21	-	17	0.21	-	0.87
N:klon sayısı; Fr:frekans; S:istatistik sonuçlarının gösterimi; +:pozitif; -:negatif; i:önemsiz fark; m:çarpım faktörü; EMS:Etil metan sülfonat; olasılık düzeyi= 0.05																	

Elde edilen sonuçlara göre küre formu nHA *Drosophila* imajinal disk hücrelerinde toplam klon bakımından 50, 100 ve 200 ppm dozlarında istatistiksel olarak anlamlı genotoksik etkiye neden olmuştur. Klon indüksiyon frekansı 50 ve 200 ppm'lik dozlarda en yüksek değer olan 1.95 olarak tespit edilmiştir. Çubuk formu nHA'nın *Drosophila* imajinal disk hücrelerinde çalışılan hiçbir dozda istatistiksel olarak anlamlı genotoksik etkiye neden olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

4.3.2. *Drosophila* hemositlerinde KOMET testi

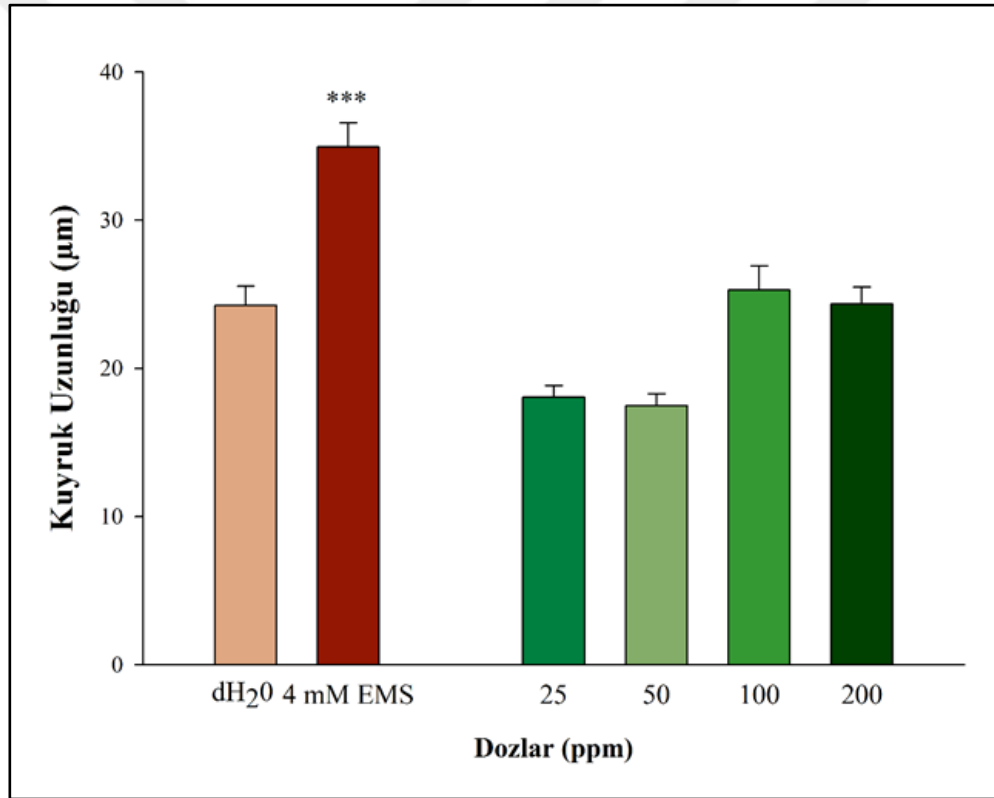
Drosophila hemositlerinde KOMET testi kapsamında 72 ± 4 saatlik *Drosophila* Oregon R+ bireylerine 24 saat kimyasal uygulaması yapılmıştır. Maruziyet süresi sona erdiğinde stereo mikroskop altında hemosit izolasyonu gerçekleştirilmiş ve KOMET prosedürü uygulanmıştır. Hazırlanan preparatlardaki DNA hasarı Nikon Eclipse E200 ışık mikroskopunda COMET Assay yazılımı (Comet assay IV version 4.11, Kinetic Imaging, UK) ile otomatik olarak ölçülmüştür (Şekil 4.4). KOMET deneyinde uygulama dozları olarak 25, 50, 100 ve 200 ppm kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak nHA solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan distile su, pozitif kontrol olarak 4 mM EMS kullanılmıştır (Carmona vd. 2011). Her bir doz uygulaması için rastgele olarak 50 hücre sayılmıştır. Hücreler kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğu parametreleri bakımından değerlendirilmiştir.



Şekil 4.4. *D. melanogaster* KOMET görüntüleri (a) Hasarsız hücre (40X) (b) Hasarlı hücre (40X) (c) Hasarlı hücrelerin genel görüntüsü (10X).

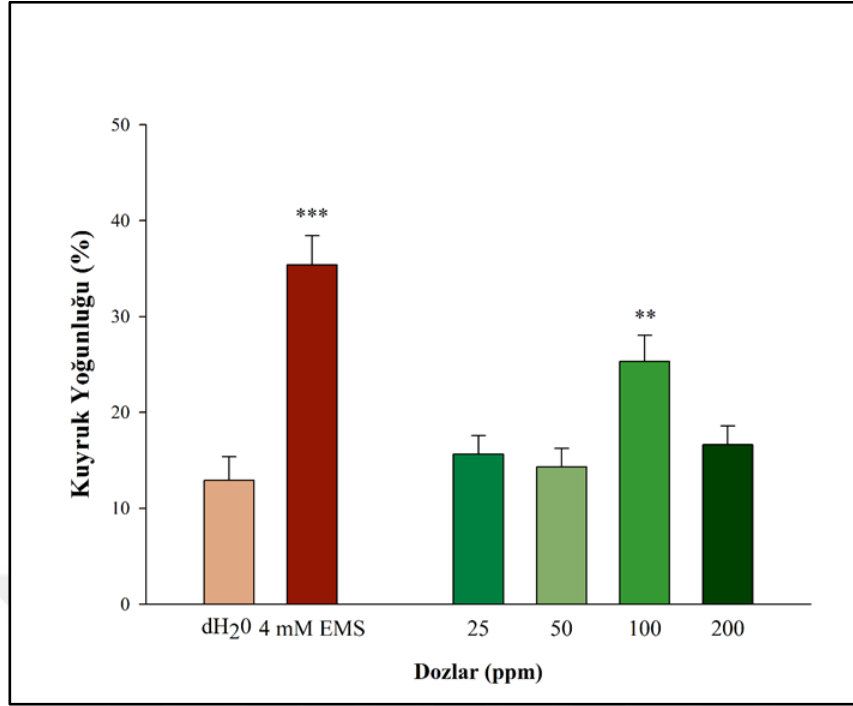
Elde edilen sonuçlara göre pozitif kontrol olarak kullanılan 4 mM EMS negatif kontrol grubu olan distile suya göre tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarına neden olmuştur.

- Küre formu nHA'nın kuyruk uzunluğu parametresinde *Drosophila* hemositlerinde 100 ppm haricinde doza bağlı olarak DNA hasarını indüklediği belirlenmiştir. Ancak elde edilen bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.5).
- Kuyruk yoğunluğu parametresinde küre formu nHA yalnızca 100 ppm'lik dozda istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarına neden olmuştur (Şekil 4.6). Diğer dozlarda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ortaya çıkmamıştır.
- Kuyruk momenti parametresinde 100 ppm'lik dozda görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.7).



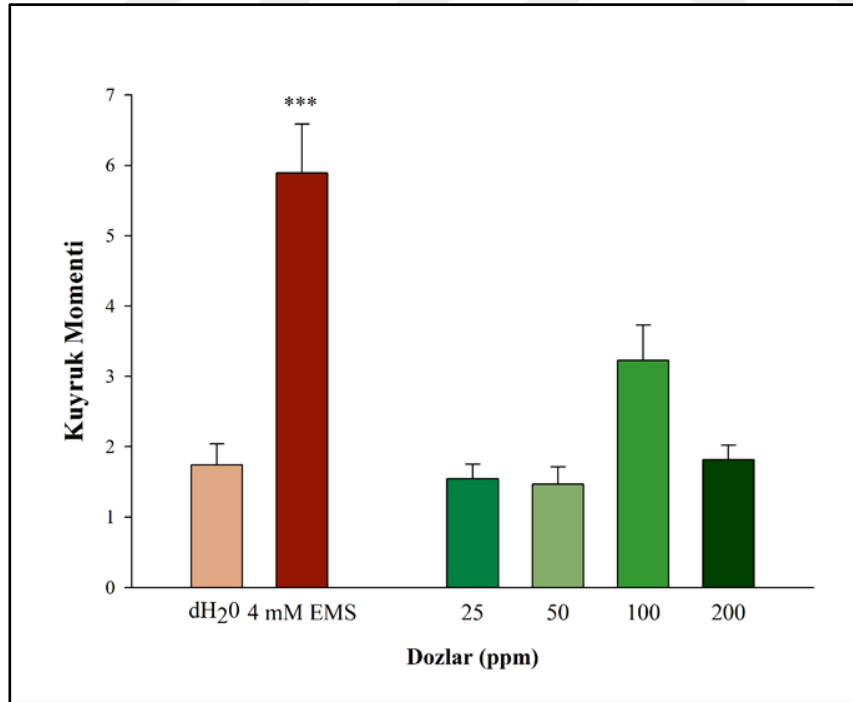
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.5. Küre formu nHA'ların *Drosophila* KOMET hemositlerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk uzunluğu bakımından değerlendirilmesi



* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.6. Küre formulu nHA'ların *Drosophila* KOMET hemositlerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk yoğunluğu bakımından değerlendirilmesi

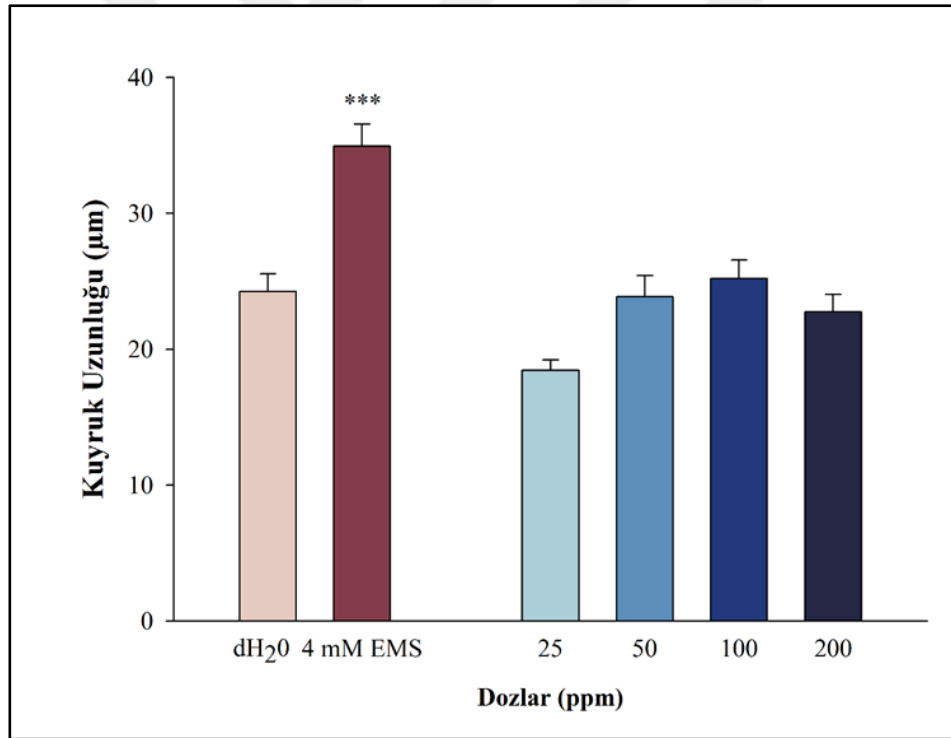


* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.7. Küre formulu nHA'ların *Drosophila* KOMET hemositlerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk momentini bakımından değerlendirilmesi

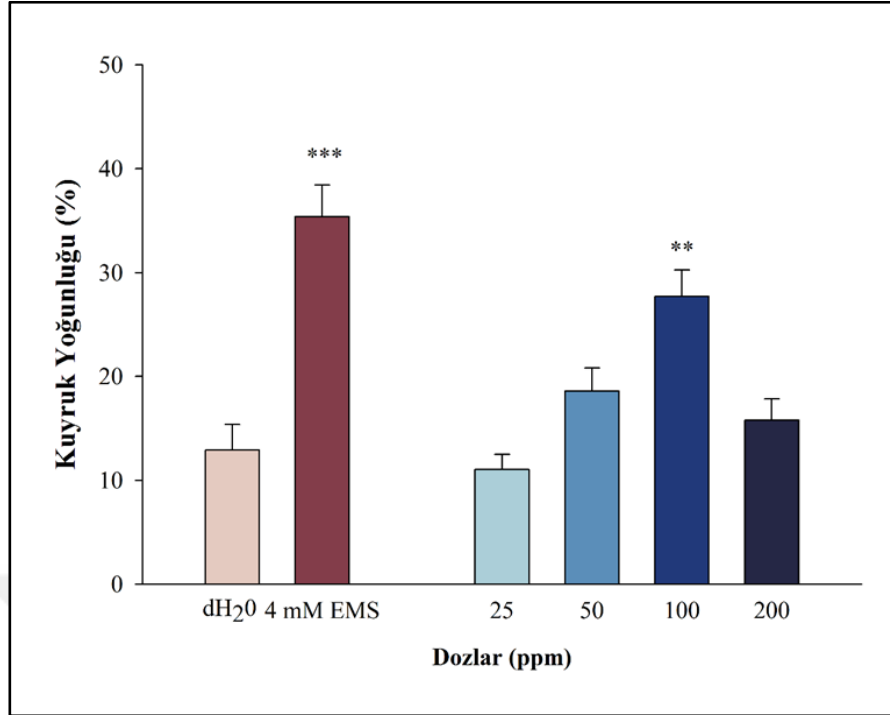
Çubuk formu nHA ile yapılan *Drosophila* KOMET uygulamasında pozitif kontrol olarak kullanılan 4 mM EMS negatif kontrol grubu olan distile suya göre tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarına neden olmuştur.

- *Drosophila* hemositlerinde çubuk formu nHA uygulamasında yapılan analizde kuyruk uzunluğu parametresinde anlamlı genotoksik etki gözlenmemiştir (Şekil 4.5).
- Kuyruk yoğunluğu parametresinde 25, 50 ve 100 ppm’lik konsantrasyonlarda doza bağlı olarak artan bir eğilim görülmektedir. Bunlardan yalnızca 100 ppm çubuk formu nHA’nın istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarına neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6). Uygulama yapılan diğer dozlarda kontrol grubu olan distile suya göre anlamlı farklılık tespit edilmemiştir.
- Kuyruk momenti incelendiğinde 25, 50 ve 100 ppm’lik konsantrasyonlarda doza bağlı olarak artış gözlenmiş ancak meydana gelen DNA hasarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.7).



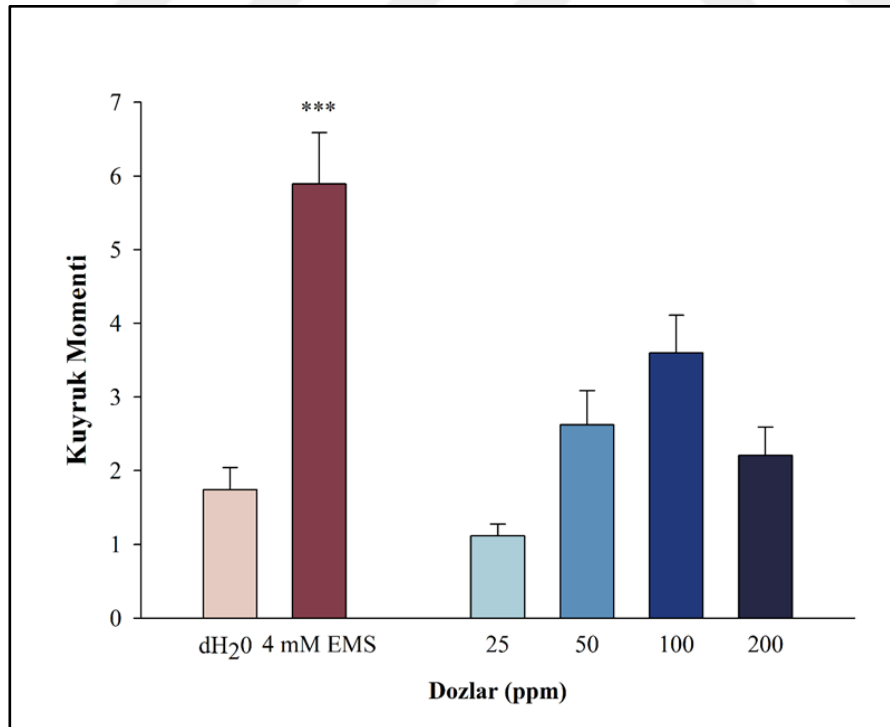
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.8. Çubuk formu nHA’ların *Drosophila* KOMET hemositlerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk uzunluğu bakımından değerlendirilmesi



* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.9. Çubuk formu nHA'ların *Drosophila* KOMET hemositlerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk yoğunluğu bakımından değerlendirilmesi



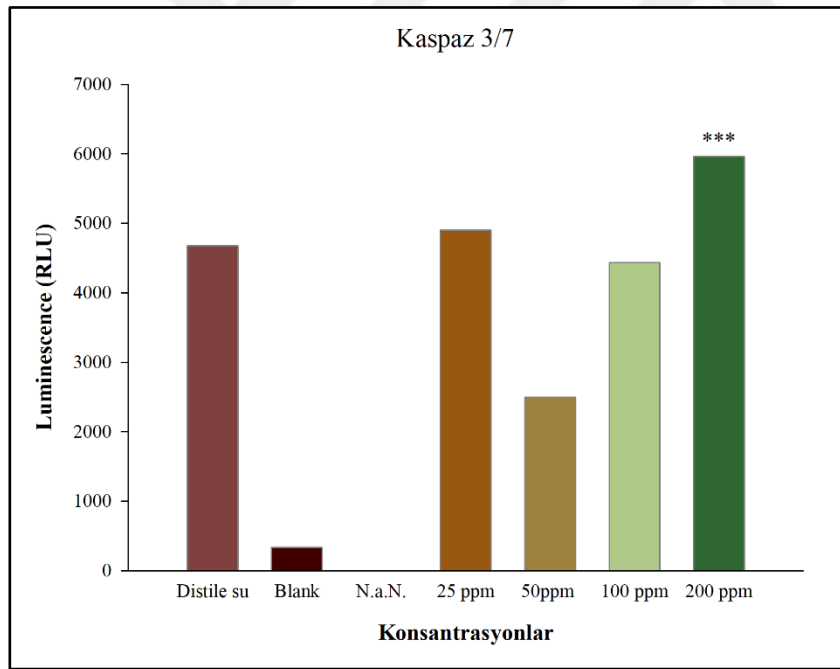
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.10. Çubuk formu nHA'ların *Drosophila* KOMET hemositlerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk momenti bakımından değerlendirilmesi

4.3.3. Kaspaz aktiviteleri analizi

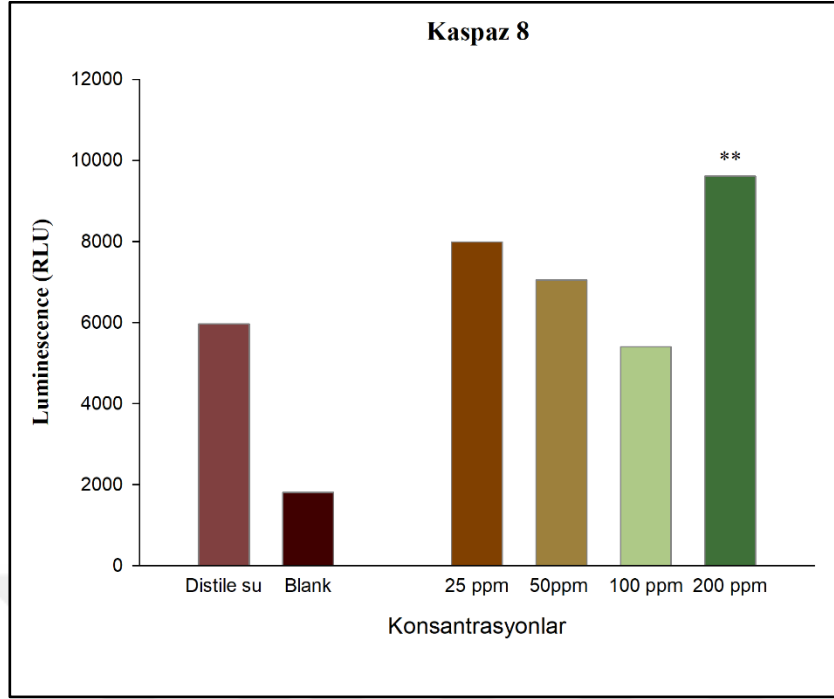
Kaspaz aktivitelerinin ölçümü için 72 ± 4 saatlik *Drosophila* Oregon R+ bireylerine 24 saat kimyasal uygulaması yapılmıştır. Maruziyet süresi sona erdiğinde KOMET prosedüründe olduğu gibi stereo mikroskop altında hemosit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon yapılan hemositlerdeki toplam protein konsantrasyonunun belirlenmesi için BCA (Bikinkoninik asit ölçümü) gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucunda her bir örnek için 100 μ l'de 100 μ g protein olacak şekilde hücreler 96 kuyucuklu opak okuma plağına aktarılmıştır. Kaspaz-3/7, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 aktiviteleri ölçümleri Promega Multi Detection System üzerinde otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyucuk için 10 okuma yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre *Drosophila* hemositlerinde 50, 100 ve 200 ppm dozlarındaki küre formulu nHA'nın Kaspaz-3/7 aktivitesini doza bağlı olarak artırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bunlardan yalnızca 200 ppm'lik konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı aktivasyon gözlenmiştir. Kaspaz-8 aktivitesi incelendiğinde 25, 50 ve 100 ppm'lik konsantrasyonlarda doza bağlı olarak azalan bir eğilim gözlenirken 200 ppm'lik konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı kaspaz aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 4.9). Kaspaz-9 aktivasyonunda 100 ve 200 ppm'lik konsantrasyonların istatistiksel olarak anlamlı kaspaz aktivasyonu tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



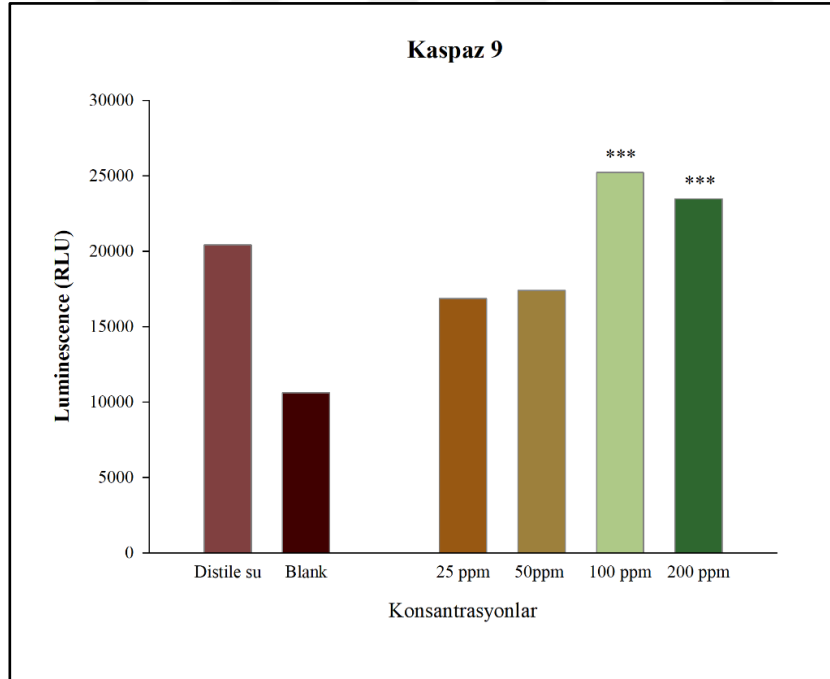
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.11. *Drosophila* hemositlerinde küre formulu nHA'nın indüklediği Kaspaz-3/7 aktivitesi sonuçları



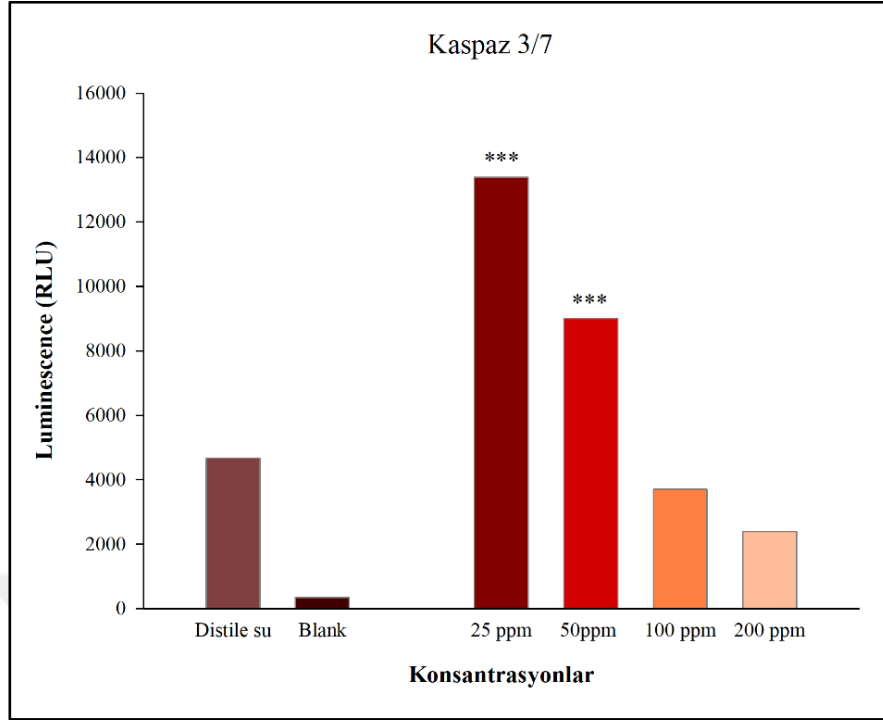
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.12. *Drosophila* hemositlerinde küre formu nHA'nın indüklediği Kaspaz-8 aktivitesi sonuçları



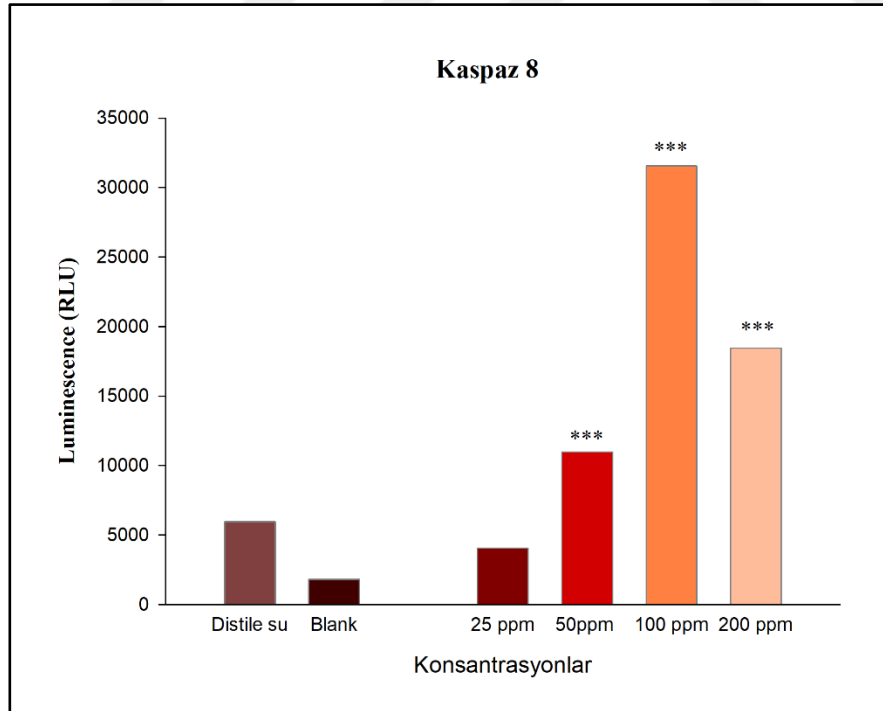
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.13. *Drosophila* hemositlerinde küre formu nHA'nın indüklediği Kaspaz-9 aktivitesi sonuçları



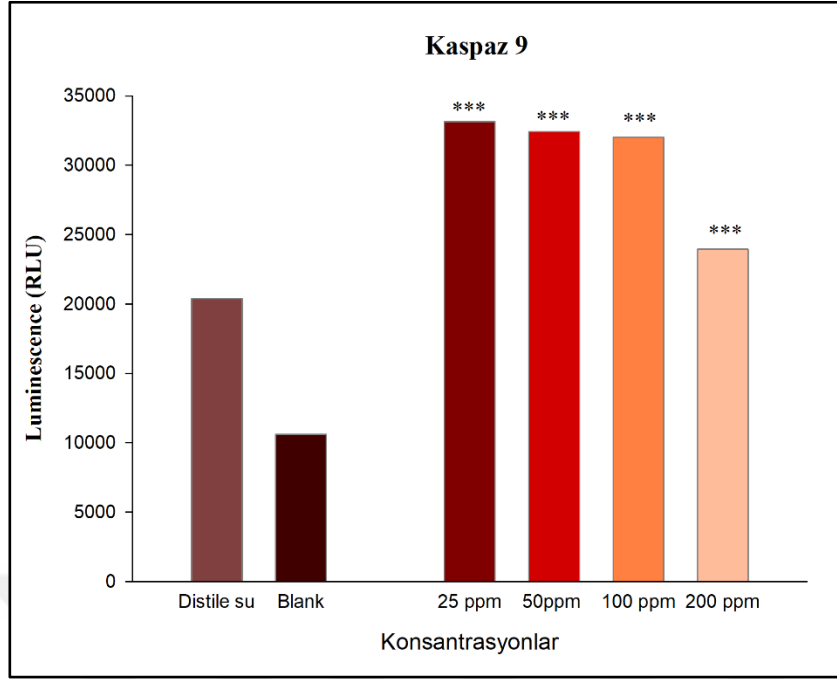
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.14. *Drosophila* hemositlerinde çubuk formu nHA'nın indüklediği Kaspaz-3/7 aktivitesi sonuçları



* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.15. *Drosophila* hemositlerinde çubuk formu nHA'nın indüklediği Kaspaz-8 aktivitesi sonuçları



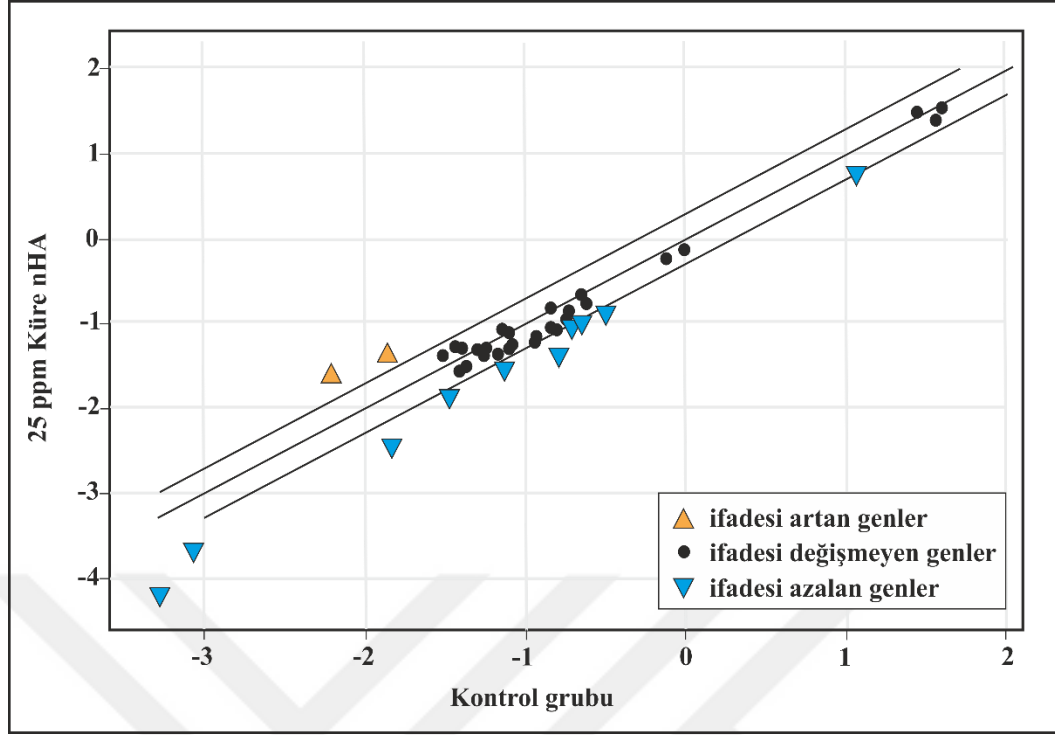
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.16. *Drosophila* hemositlerinde çubuk formu nHA'nın indüklediği Kaspaz-9 aktivitesi sonuçları

Çubuk formu nHA uygulamasında *Drosophila* hemositlerinde doza bağlı olarak azalan Kaspaz-3/7 aktivasyonu gözlenmiştir. Çalışan konsantrasyonlardan 25 ve 50 ppm'in istatistiksel olarak anlamlı Kaspaz-3/7 aktivasyonuna neden oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.8). Kaspaz-8 seviyeleri incelendiğinde 50, 100 ve 200 ppm'lik konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı kaspaz aktivasyonu gözlenmiştir (Şekil 4.9). Çubuk formu nHA çalışan tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı Kaspaz-9 aktivasyonuna neden olmuştur (Şekil 4.10).

4.3.4. *Drosophila* larvalarında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile DNA tamiri gen ifadelerinin belirlenmesi

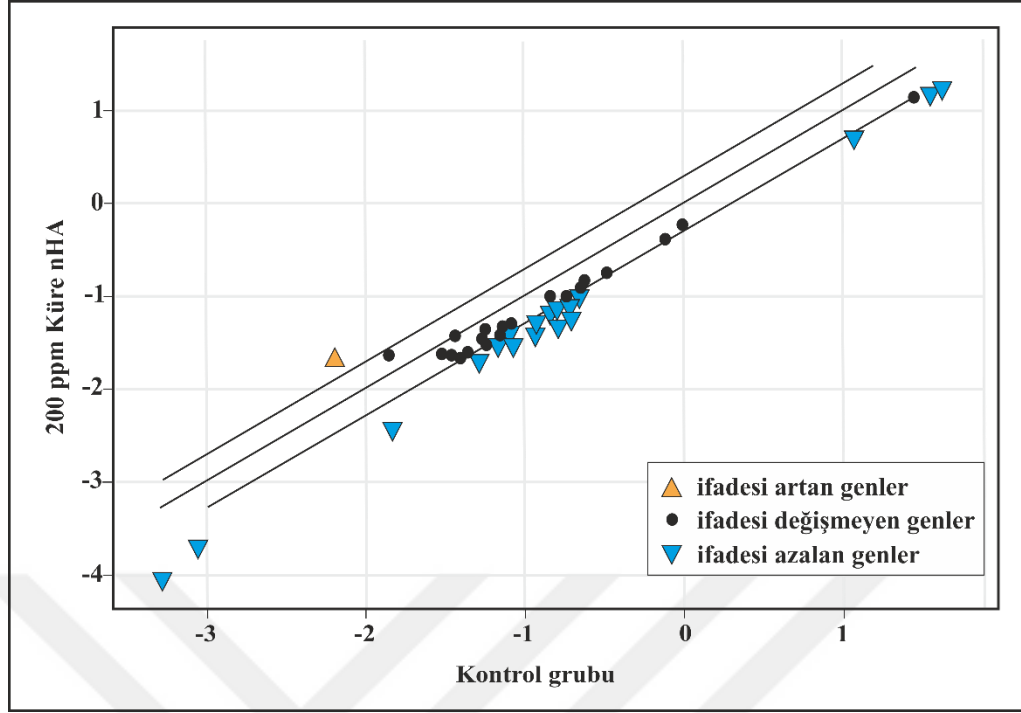
Gen ifadelerinin belirlenmesi amacıyla 72±4 saatlik *Drosophila* Oregon R+ bireylerine 24 saat kimyasal uygulaması yapılmıştır. Maruziyet süresi sona erdiğinde her bir doz için 30 adet larva mikrosantrifuj tüpüne alınıp homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenizattan RNeasy Mini İzolasyon Kiti (Qiagen) toplam RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'ların miktarı Nanodrop cihazında ölçülmüştür. Ardından RT² First Strand Kiti (Qiagen) ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve elde edilen cDNA'lar RT²-PCR sisteminde analiz edilmiştir. Çalışma kapsamında küre ve çubuk formu nHA'ların 25 ve 200 ppm'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların grafikleri Qiagen GeneGlobe'da analiz edilmiş ve "plot/plot" grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Ayrıca analiz edilen gen ifadesi değişimleri Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Küre formülü 25 ppm nHA uygulamasında analiz edilen gen ifadeleri

Çizelge 4.2. Küre formülü 25 ppm nHA uygulamasında artan ve azalan gen ifadeleri

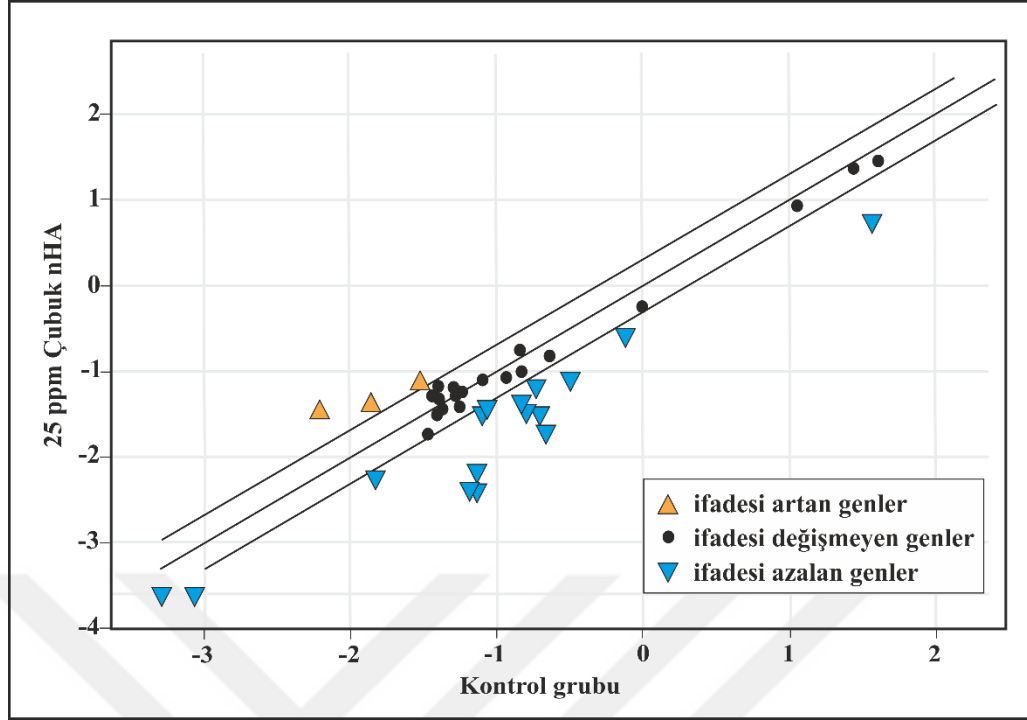
Küre form 25 ppm	Gen	Katlanma Değişimi
İfadesi artan genler	<i>Mlh1</i>	3,86
	<i>Brca2</i>	3,13
İfadesi Azalan Genler	<i>spel1</i>	3,89
	<i>Rad51C</i>	4,15
	<i>dap</i>	2,11
	<i>MCPH1</i>	8,04
	<i>Rad51D</i>	4,32
	<i>Rad1</i>	2,38
	<i>Pms2</i>	2,14
	<i>mu2</i>	2,44
	<i>Sir2</i>	2,27



Şekil 4.18. Küre formülü 200 ppm nHA uygulamasında analiz edilen gen ifadeleri

Çizelge 4.3. Küre formülü 200 ppm nHA uygulamasında artan ve azalan gen ifadeleri

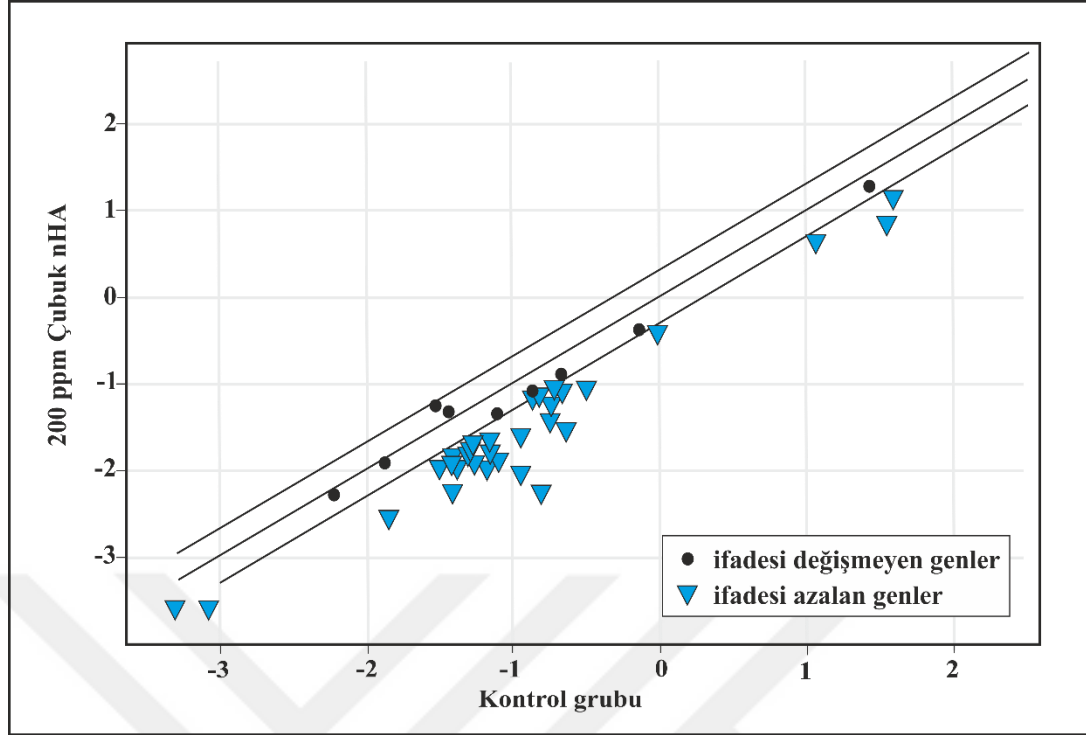
Küre form 200 ppm	Gen	Katlanma Değişimi
İfadesi artan gen	<i>Mlh1</i>	3,32
İfadesi Azalan Genler	<i>spel1</i>	3,48
	<i>Fen1</i>	2,56
	<i>Rad9</i>	2,89
	<i>Fancd2</i>	2,61
	<i>Rad51C</i>	4,49
	<i>Hus1-like</i>	2,24
	<i>dap</i>	2,24
	<i>DNA-lig1</i>	2,25
	<i>MCPH1</i>	5,92
	<i>Rad51D</i>	4,08
	<i>Ercc1</i>	2,09
	<i>Rev1</i>	2,15
	<i>Pms2</i>	3,52
	<i>tefu/dATM</i>	2,98
	<i>RpLP2</i>	2,26



Şekil 4.19. Çubuk formu 25 ppm nHA uygulamasında analiz edilen gen ifadeleri

Çizelge 4.4. Çubuk formu 25 ppm nHA uygulamasında artan ve azalan gen ifadeleri

Çubuk form 25 ppm	Gen	Katlanma Değişimi
İfadesi artan genler	<i>Mlh1</i>	5,34
	<i>Brca2</i>	2,97
	<i>Mus101</i>	2,24
İfadesi Azalan Genler	<i>Ercc1</i>	2,59
	<i>CG9601/PNKP</i>	18,03
	<i>Rev1</i>	17,42
	<i>dap</i>	10,94
	<i>mu2</i>	10,92
	<i>RpLP2</i>	6,67
	<i>Pms2</i>	6,3
	<i>spel1</i>	4,73
	<i>Sir2</i>	4,22
	<i>Rad51C</i>	3,6
	<i>PCNA</i>	2,94
	<i>stg</i>	2,73
	<i>Rad51D</i>	2,63
	<i>Fen1</i>	2,62
	<i>MCPH1</i>	2,19



Şekil 4.20. Çubuk formu 200 ppm nHA uygulamasında analiz edilen gen ifadeleri

Çizelge 4.5. Çubuk formu 200 ppm nHA uygulamasında analiz edilen gen ifadeleri

Çubuk form 200 ppm	Gen	Katlanma Değişimi
İfadesi Azalan Genler	<i>spel1</i>	29,79
	<i>tefu/dATM</i>	12,88
	<i>put/punt</i>	7,95
	<i>Xpac/Dxpa</i>	7,25
	<i>Rev1</i>	6,20
	<i>Rad9</i>	6,07
	<i>Rad51D</i>	5,41
	<i>Rpl2</i>	5,10
	<i>stg</i>	4,89
	<i>Hus1-like</i>	4,56
	<i>Rad17</i>	4,53
	<i>mu2</i>	4,24
	<i>Cdk7</i>	4,00
	<i>Sir2</i>	3,67
	<i>Fen1</i>	3,43
	<i>Rad51C</i>	3,35
	<i>mei-41</i>	3,30
	<i>Rad1</i>	3,27

(Devamı arkada)

Çizelge 4.5'in Devamı

Çubuk form 200 ppm	Gen	Katlanma Değişimi
İfadesi Azalan Genler	<i>CG9601-PNKP</i>	3,25
	<i>Fancd2</i>	3,10
	<i>DNAPol-eta</i>	3,00
	<i>Ogg1</i>	2,83
	<i>dap</i>	2,78
	<i>XRCC1</i>	2,76
	<i>DNA-lig1</i>	2,21
	<i>Pms2</i>	2,12
	<i>MCPH1</i>	2,04

Drosophila larvalarına uygulanan 25 ve 200 ppm dozlarındaki küre formu nHAP uygulamasının DNA tamir sinyalizasyon yolağında bulunan gen ifadeleri üzerine etkileri Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre 25 ppm uygulamasında *Mlh1* ve *Brca2* genlerinin ifadesinde artış gözlenmiştir. Her iki genin de ifadelerinde meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). *spell*, *Rad51C*, *dap*, *MCPH1*, *Rad51D*, *Rad1*, *Pms2*, *mu2*, *Sir2* genlerinin ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı ise azalma tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Gen ifadeleri analizinde küre formda 200 ppm uygulamasına bakıldığında yalnızca *Mlh1* geninin ifadesinde artış gözlenmiştir. Bunun yanında *spell*, *Fen1*, *Rad9*, *Tbp*, *Fancd2*, *Rad51C*, *Hus1-like*, *dap*, *DNA-lig1*, *MCPH1*, *Rad51D*, *Erccl*, *Rev1*, *Pms2*, *tefu*, *RpLP2* genlerinin ifadesinde azalma meydana gelmiştir. *Rad51D* geninin ifadesinde meydana gelen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir.

Drosophila larvalarına uygulanan 25 ve 200 ppm dozlarındaki çubuk formu nHAP uygulamasının DNA tamir sinyalizasyon yolağında bulunan gen ifadeleri üzerine etkileri Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre 25 ppm uygulamasında *mus101*, *Mlh1* ve *Brca2* genlerinin ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir ($p < 0.05$). *spell*, *Fen1*, *PCNA*, *Rad51C*, *dap*, *CG9601*, *MCPH1*, *Rad51D*, *Erccl*, *Rev1*, *Pms2*, *mu2*, *Sir2*, *RpLP2*, *stg* genlerinin ifadesinde ise istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

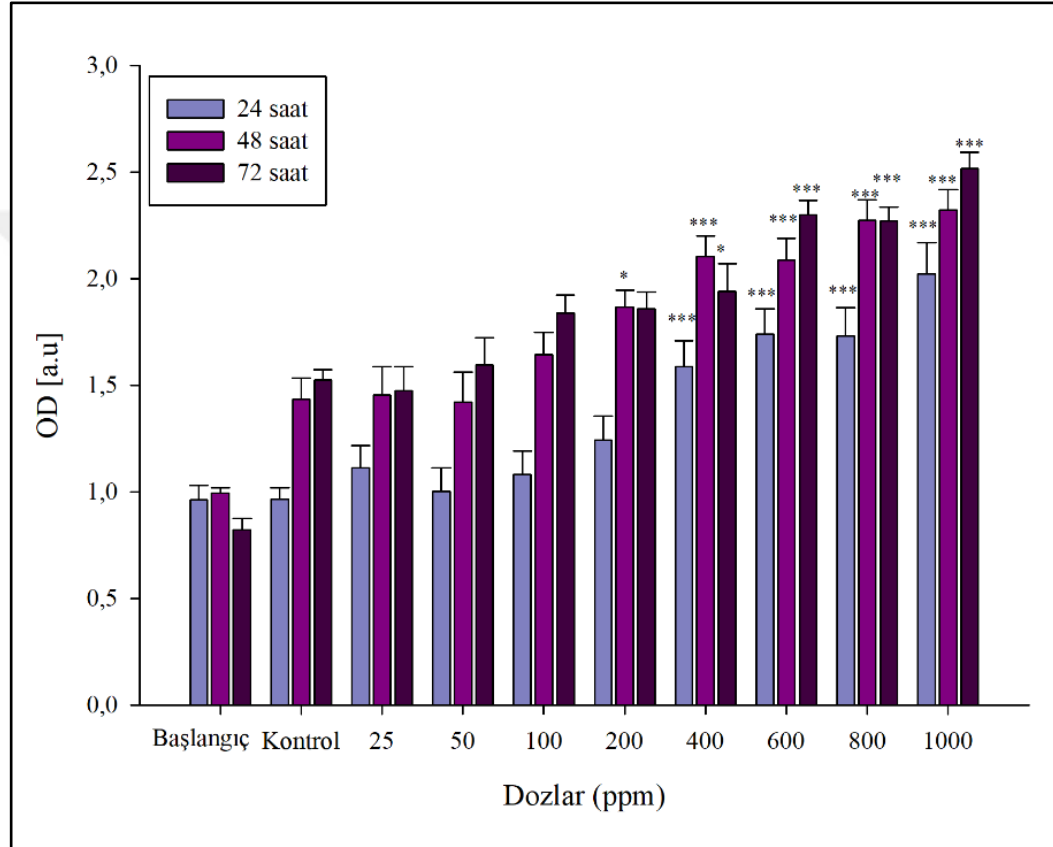
4.4. Hücre Kültürü Sitotoksikite Çalışmaları

4.4.1. 293T hücre hattı

WST-1 hücre proliferasyon testi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Küre ve çubuk formu nHA'ların sitotoksik etkileri 293T hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde WST-1 testi değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında her iki nHA grubu için 25, 50, 100, 200, 400, 800 ve 1000 ppm dozları çalışılmıştır. Tüm uygulamalar kendi içerisinde 5 tekrarlı ve birbirinden bağımsız 3 deney halinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada sitotoksikite değerlendirmesinden elde edilen sonuçlara çalışılan inkübasyon sürelerinde ve dozlarda IC50 değeri saptanmamıştır. Veriler optik yoğunluk (OD) değerleri kullanılarak Sigma Plot yazılımında grafik haline getirilmiştir.

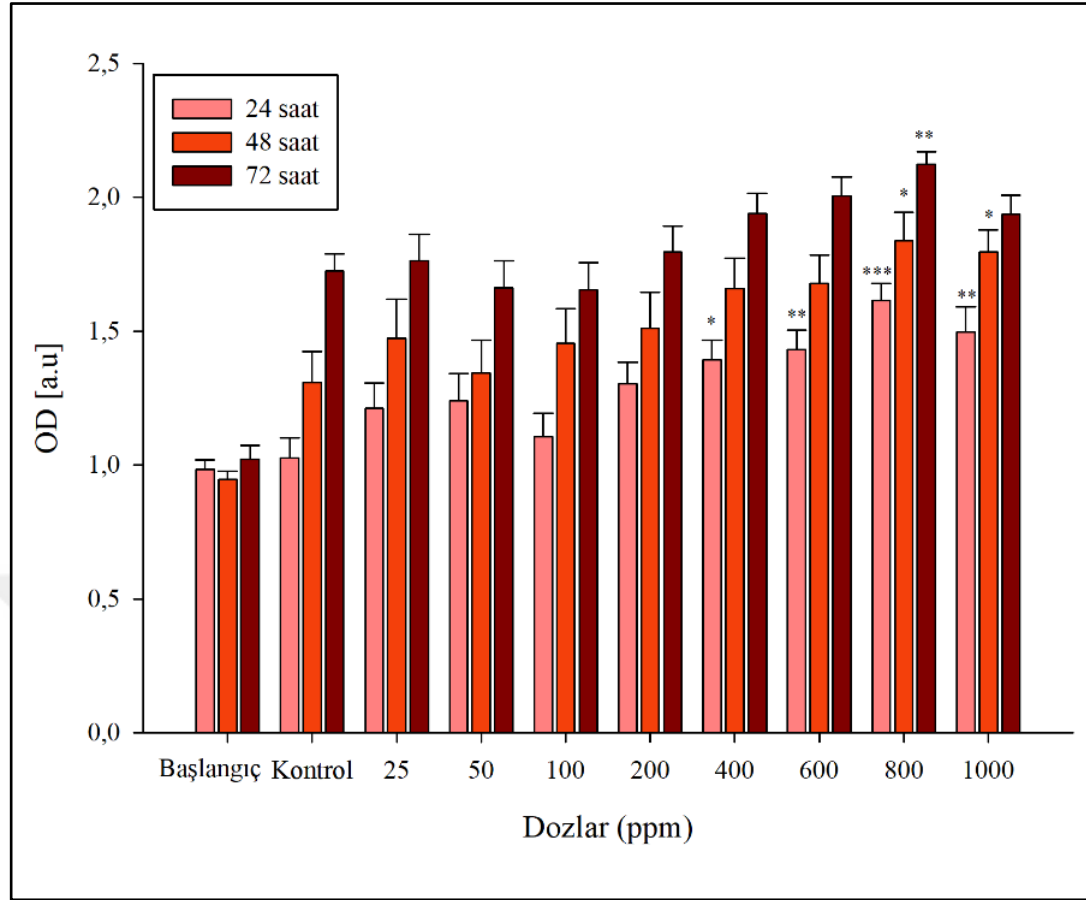
Küre formülü ve 25-1000 ppm doz aralığındaki nHA 24 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Uygulama yapılan hücrelerde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecek azalma saptanmamışken, 24 inkübasyonda 400, 600, 800 ve 1000 ppm’lik konsantrasyonlarda, 48 saatlik inkübasyonda 200, 400, 600, 800 ve 1000 ppm’lik konsantrasyonlarda, 72 saatlik inkübasyonda ise 400, 600, 800 ve 1000 ppm’lik konsantrasyonlarda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.05$, $p>0.000$) artış tespit edilmiştir (Şekil 4.21).



* $0.01 < P < 0.05$, ** $0.001 < P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Şekil 4.21. Küre formülü nHA’nın 25-1000 ppm aralığında uygulanan dozlarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerindeki sitotoksik etkileri

Çubuk formülü ve 25-1000 ppm doz aralığındaki nHA 24 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Uygulama yapılan hücrelerde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecek azalma saptanmamışken, 24 inkübasyonda 400, 600, 800 ve 1000 ppm’lik konsantrasyonlarda, 48 saatlik inkübasyonda 800 ve 1000 ppm’lik konsantrasyonlarda, 72 saatlik inkübasyonda ise sadece 800 ppm’lik konsantrasyonlarda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.05$, $p>0.001$, $p>0.000$) artış kaydedilmiştir (Şekil 4.22).



* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.22. Çubuk formu nHA'nın 25-1000 ppm aralığında uygulanan dozlarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerindeki sitotoksik etkileri

Tripan mavisi canlı/ölü hücre sayısının belirlenmesi

Tripan mavisi ile yapılan hücre canlılık testinde hücreler ışık mikroskopunda 40X büyütmede sayılmıştır. Her bir doz için 8 tekrarlı sayım gerçekleştirilmiştir. Tüm uygulamalarda ortalama ve standart hata değerleri IBM SPSS 20 yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Küre ve çubuk formu nHA'ların tripan mavisi ile elde edilen sitotoksik etkilerin ortalama ve standart hata değerleri sırasıyla Çizelge 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.

Tripan mavisi deneyinden elde edilen sonuçlara göre küre formu nHA 293T hücrelerinde 25, 50, 200 ve 400 ppm'lik konsantrasyonlarda tüm inkübasyon sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.000$) sitotoksik etki tespit edilmiştir (Çizelge 4.6.). Ek olarak çubuk formu nHA'lar 293T hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonda hiçbir dozda sitotoksik etkiye neden olmamıştır. 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda 800 ppm'lik konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.000$) sitotoksik etki saptanmıştır (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.6. Küre formülü nHA'nın 293T hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda tripan mavisi testi ile değerlendirilen sitotoksik etkinin gösterilmesi

293T Küre Form						
Dozlar	24 saat		48 saat		72 saat	
	Ortalama ± Standart Hata	p	Ortalama ± Standart Hata	p	Ortalama ± Standart Hata	p
NK	97,437 ± 0,361		98,894 ± 0,196		97,495 ± 0,433	
1000 ppm	87,183 ± 1,218 ***	0,000	96,929 ± 0,347	0,079	96,951 ± 0,439	0,999
800 ppm	95,313 ± 0,538	0,838	94,581 ± 0,797 ***	0,000	95,538 ± 0,387	0,451
600 ppm	83,856 ± 2,159 ***	0,000	96,792 ± 0,578 *	0,050	97,946 ± 0,316	1,000
400 ppm	90,523 ± 1,709 **	0,002	95,719 ± 0,677 ***	0,000	93,238 ± 0,861 **	0,003
200 ppm	90,201 ± 1,101 **	0,001	95,333 ± 0,360 ***	0,000	93,238 ± 0,861 **	0,003
100 ppm	89,142 ± 1,526 ***	0,000	97,333 ± 0,418	0,247	95,931 ± 0,419	0,699
50 ppm	86,859 ± 1,186 ***	0,000	93,428 ± 0,716 ***	0,000	90,768 ± 1,723 ***	0,000
25 ppm	88,241 ± 1,738 ***	0,000	96,357 ± 0,560 **	0,009	88,485 ± 1,172 ***	0,000
NK: Negatif kontrol; p: istatistiksel anlamlılık * 0.01 < P < 0.05 ** 0.001 < P < 0.01 *** P < 0.001						

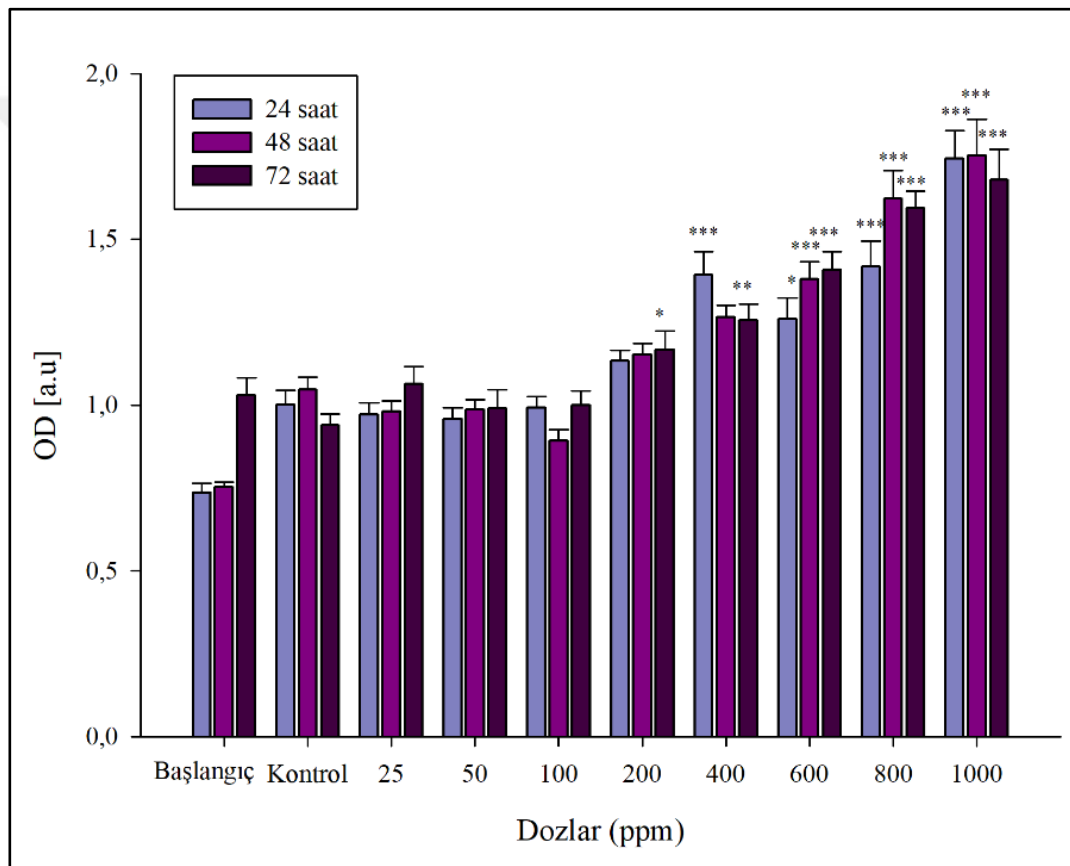
Çizelge 4.7. Çubuk formülü nHA'nın 293T hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda tripan mavisi testi ile değerlendirilen sitotoksik etkinin gösterilmesi

293T Çubuk Form						
Dozlar	24 saat		48 saat		72 saat	
	Ortalama ± Standart Hata	p	Ortalama ± Standart Hata	p	Ortalama ± Standart Hata	p
NK	90,045 ± 1,824		98,045 ± 0,469		97,495 ± 0,433	
1000 ppm	92,735 ± 0,616	0,621	97,238 ± 0,469	0,960	97,238 ± 0,359	0,971
800 ppm	88,535 ± 1,843	0,972	88,017 ± 0,358 ***	0,000	88,017 ± 1,580 ***	0,000
600 ppm	90,539 ± 1,234	1,000	97,194 ± 1,580	0,946	97,194 ± 0,370	0,961
400 ppm	87,105 ± 1,734	0,521	98,103 ± 0,370	1,000	98,103 ± 0,309	1,000
200 ppm	91,632 ± 0,934	0,963	97,642 ± 0,317	1,000	97,642 ± 0,317	1,000
100 ppm	92,787 ± 0,822	0,600	95,441 ± 0,390 *	0,043	95,441 ± 0,390	0,063
50 ppm	91,976 ± 0,877	0,894	95,673 ± 0,438	0,081	95,673 ± 0,428	0,112
25 ppm	90,702 ± 1,601	1,000	95,691 ± 0,591	0,085	95,691 ± 0,591	0,117
NK: Negatif kontrol; p: istatistiksel anlamlılık * 0.01 < P < 0.05 ** 0.001 < P < 0.01 *** P < 0.001						

4.4.2. HUVEC hücre hattı

WST-1 hücre proliferasyon testi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Küre ve çubuk formulu nHA'ların sitotoksik etkileri HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde WST-1 testi değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında her iki nHA grubu için 25, 50, 100, 200, 400, 800 ve 1000 ppm dozları çalışılmıştır. Tüm uygulamalar kendi içerisinde 5 tekrarlı ve birbirinden bağımsız 3 deney halinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada sitotoksite değerlendirmesinden elde edilen sonuçlara göre çalışılan inkübasyon sürelerinde ve dozlarda IC50 değeri saptanmamıştır. Veriler optik yoğunluk (OD) değerleri kullanılarak Sigma Plot yazılımında grafik haline getirilmiştir.

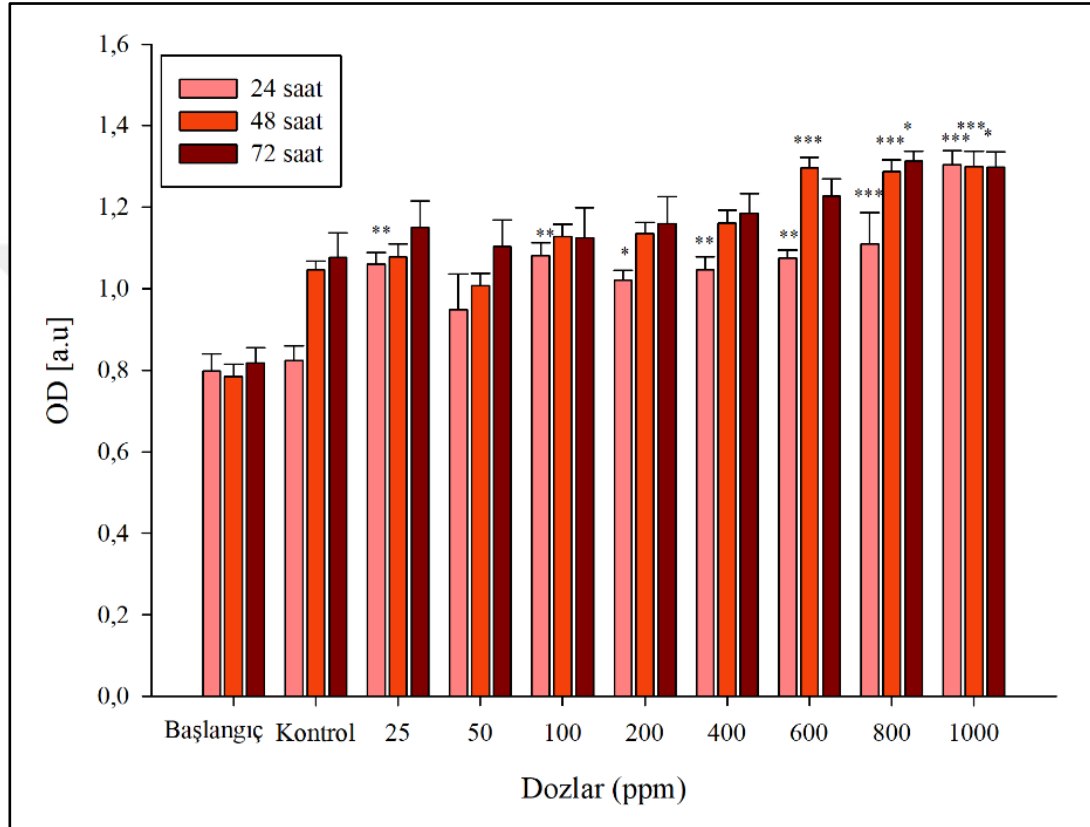


* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.23. Küre formulu nHA'nın 25-1000 ppm aralığında uygulanan dozlarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkileri

Küre formulu ve 25-1000 ppm doz aralığındaki nHA 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde HUVEC hücrelerinde sitotoksik etki sergilememiştir. Yapılan analizlerde hücre canlılığının doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p > 0.000$). Bunun yanında 24 saatlik inkübasyonda 400, 600, 800 ve 1000 ppm'lik konsantrasyonlarda, 48 saatte 600, 800 ve 1000 ppm'lik konsantrasyonlarda ve 72 saatlik inkübasyonda ise 200, 400, 600, 800 ve 1000 ppm'lik konsantrasyonlarda hücre canlılığında istatistiksel

olarak anlamlı ($p>0.05$, $p>0.001$, $p>0.000$) artış belirlenmiştir (Şekil 4.23). Çubuk formu aralığındaki nHA test edilen hiçbir dozda 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı hiçbir sitotoksik etkiye neden olmazken 24 saatlik inkübasyonda 25, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ppm'lik konsantrasyonlarda, 48 saatlik inkübasyonda 600, 800 ve 1000 ppm'lik konsantrasyonlarda ve 72 saatlik inkübasyonda ise 800 ve 1000 ppm'lik konsantrasyonlarda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir ($p>0.05$, $p>0.001$, $p>0.000$) (Şekil 4.24)



* $0.01 < P < 0.05$, ** $0.001 < P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Şekil 4.24. Çubuk formu nHA'nın 25-1000 ppm aralığında uygulanan dozlarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkileri

Tripan mavisi canlı/ölü hücre sayısının belirlenmesi

Tripan mavisi ile yapılan hücre canlılık testinde hücreler ışık mikroskopunda 40X büyütmede sayılmıştır. Her bir doz için 8 tekrarlı sayım gerçekleştirilmiştir. Tüm uygulamalarda ortalama ve standart hata değerleri IBM SPSS 20 yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Küre ve çubuk formu nHA'ların tripan mavisi ile elde edilen sitotoksik etkilerin ortalama ve standart hata değerleri sırasıyla Çizelge 4.8 ve 4.9'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre küre form HUVEC hücrelerinde 24 saatte 1000, 800, 600 ve 50 ppm'de, 48 saatte yalnızca 400 ppm'de, 72 saatlik inkübasyonda ise sadece 1000 ppm'lik konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) sitotoksik etkiye sebep olmuştur. Çubuk formda ise anlamlı sitotoksik etki gözlenmemiştir.

Çizelge 4.8. Küre formulu nHA'nın HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda tripan mavisi testi ile değerlendirilen sitotoksik etkinin gösterilmesi

HUVEC Küre Form						
Dozlar	24 saat		48 saat		72 saat	
	Ortalama ± Standart Hata	p	Ortalama ± Standart Hata	p	Ortalama ± Standart Hata	p
NK	97,683 ± 1,304		90,852 ± 1,026		91,096 ± 1,416	
1000 ppm	85,688 ± 2,236 **	0,001	85,091 ± 2,117	0,300	80,469 ± 6,087 *	0,047
800 ppm	86,210 ± 2,379 **	0,003	86,150 ± 1,591	0,586	82,621 ± 2,542	0,231
600 ppm	85,957 ± 3,464 **	0,002	86,214 ± 1,369	0,605	93,393 ± 0,674	0,999
400 ppm	90,217 ± 1,413	0,188	81,009 ± 2,015 **	0,002	93,487 ± 1,555	0,999
200 ppm	88,806 ± 2,911	0,054	90,450 ± 1,204	1,000	95,752 ± 0,574	0,905
100 ppm	90,616 ± 0,865	0,252	92,501 ± 0,831	0,999	93,545 ± 0,697	0,998
50 ppm	88,720 ± 1,185 *	0,049	92,863 ± 1,107	0,996	93,823 ± 1,079	0,997
25 ppm	95,960 ± 0,715	1,000	89,547 ± 3,008	1,000	90,972 ± 0,954	1,000
NK: Negatif kontrol; p: istatistiksel anlamlılık * 0.01 < P < 0.05 ** 0.001 < P < 0.01 *** P < 0.001						

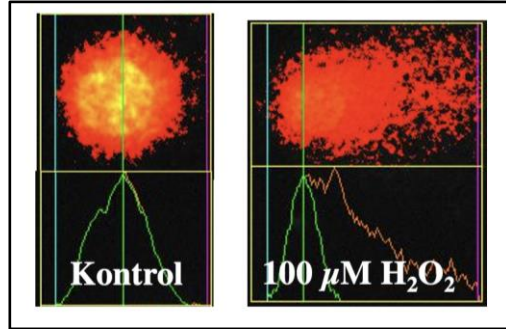
Çizelge 4.9. Çubuk formulu nHA'nın HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda tripan mavisi testi ile değerlendirilen sitotoksik etkinin gösterilmesi

HUVEC Çubuk Form						
Dozlar	24 saat		48 saat		72 saat	
	Ortalama ± Standart Hata	p	Ortalama ± Standart Hata	p	Ortalama ± Standart Hata	p
NK	89,721 ± 1,132		97,057 ± 0,753		96,488 ± 0,577	
1000 ppm	86,838 ± 1,809	0,981	93,840 ± 1,422	0,170	80,406 ± 5,314 ***	0,000
800 ppm	83,109 ± 2,814	0,294	97,135 ± 0,946	1,000	95,147 ± 2,104	1,000
600 ppm	85,833 ± 1,479	0,895	97,873 ± 0,764	0,999	96,858 ± 0,826	1,000
400 ppm	87,175 ± 2,191	0,992	97,100 ± 0,873	1,000	97,014 ± 0,699	1,000
200 ppm	84,379 ± 3,494	0,593	98,173 ± 0,639	0,992	94,598 ± 1,178	0,999
100 ppm	94,499 ± 0,987	0,730	97,828 ± 0,394	0,999	92,626 ± 1,693	0,929
50 ppm	92,225 ± 0,986	0,993	97,986 ± 0,461	0,998	94,040 ± 0,752	1,000
25 ppm	92,641 ± 0,947	0,979	97,120 ± 0,960	0,277	95,199 ± 0,655	1,000
NK: Negatif kontrol; p: istatistiksel anlamlılık * 0.01 < P < 0.05 ** 0.001 < P < 0.01 *** P < 0.001						

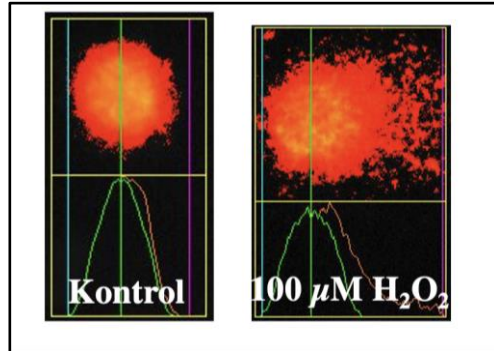
Elde edilen verilere göre küre formu nHA HUVEC hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1000, 800, 600 ve 50 ppm’lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkiye neden olmuştur. Ek olarak 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda sadece 400 ppm’lik dozda anlamlı sitotoksik etki tespit edilirken 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise sadece 1000 ppm’de anlamlı sitotoksik etki gözlenmiştir. Çubuk formu nHA’nın HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkileri incelendiğinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 800 ve 100 ppm’lik dozda, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise sadece 800 ppm’lik dozda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki sergilenmiştir.

4.5. Hücre Kültürü KOMET Testi

293T ve HUVEC hücre hatlarında yapılan KOMET deneyi kapsamında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde 200, 400, 600, 800 ve 1000 ppm’lik dozlarda DNA hasarı incelemesi gerçekleştirilmiştir. Uygulama yapılan hücreler inkübasyon süresi bitiminde tripsinleme işlemi ile kaldırılmış ve standart alkali KOMET prosedürü uygulanmıştır. Hazırlanan preparatlardaki DNA hasarı Nikon Eclipse E200 ışık mikroskopunda KOMET Assay (Comet assay IV version 4.11, Kinetic Imaging, UK) yazılımı ile otomatik olarak ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak nHA solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan distile su, pozitif kontrol olarak da 100 μM H_2O_2 kullanılmıştır (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26) (Skórkowska-Telichowska vd. 2018). Her bir doz uygulaması için rastgele seçilen 100 hücre sayılmıştır. Hücreler kuyruk uzunluğu, kuyruk momentleri ve kuyruk yoğunluğu parametreleri bakımından değerlendirilmiştir.

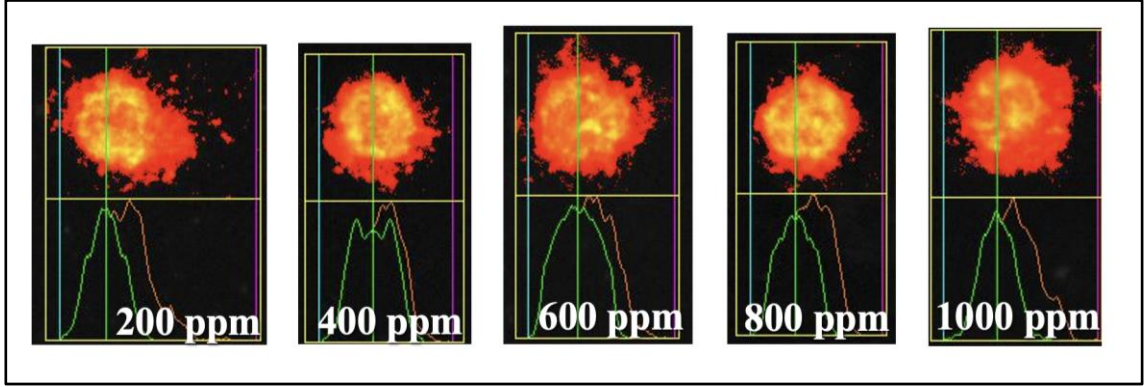


Şekil 4.25. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerindeki negatif ve pozitif kontrol gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü

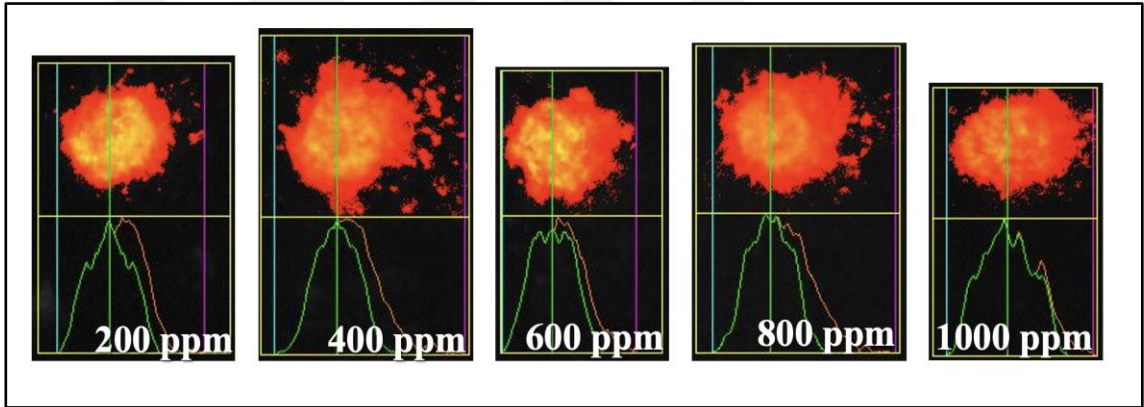


Şekil 4.26. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerindeki negatif ve pozitif kontrol gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü

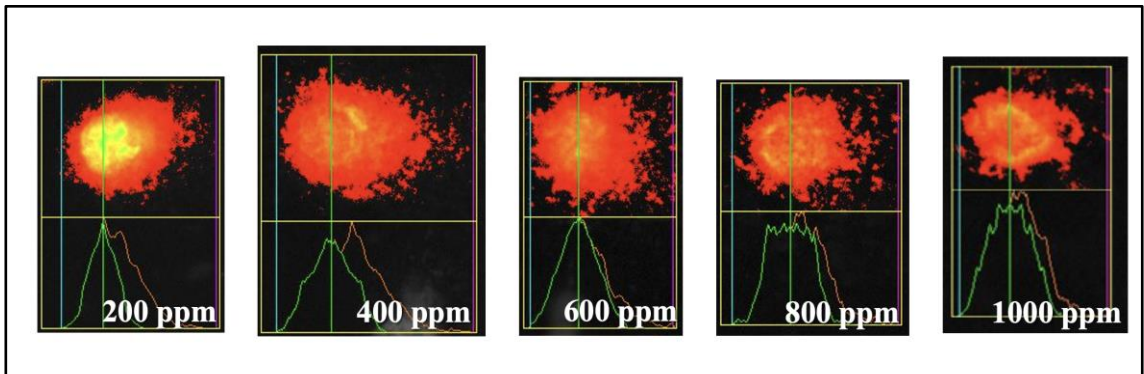
Küre formu nHA'ların 293T hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde indüklediği DNA hasarı ve buna bağlı olarak oluşan hücrelerdeki KOMET görüntüleri Şekil 4.27, Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da verilmiştir.



Şekil 4.27. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonda küre form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü

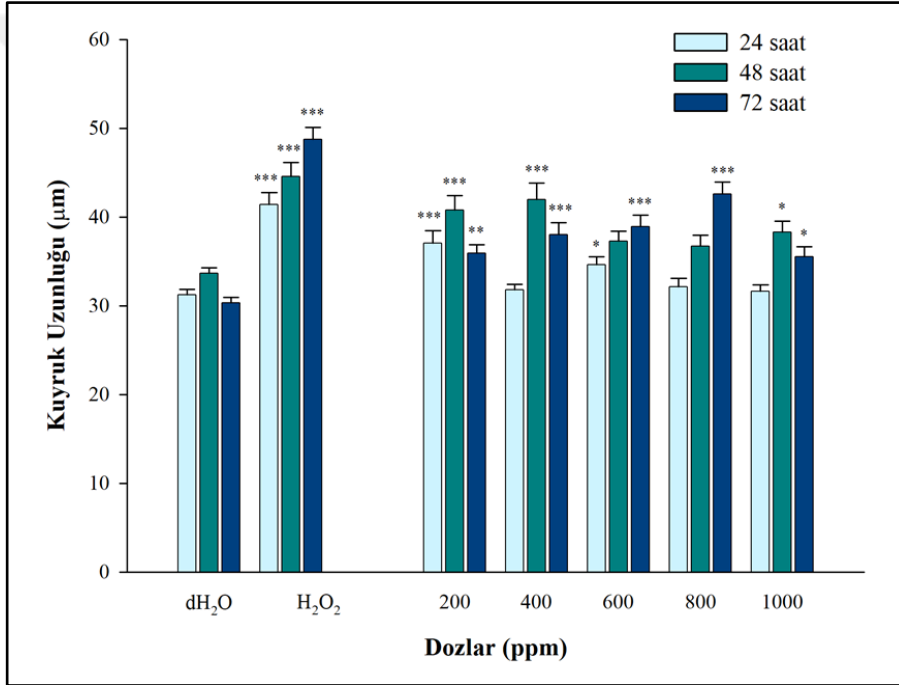


Şekil 4.28. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerinde 48 saatlik inkübasyonda küre form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü



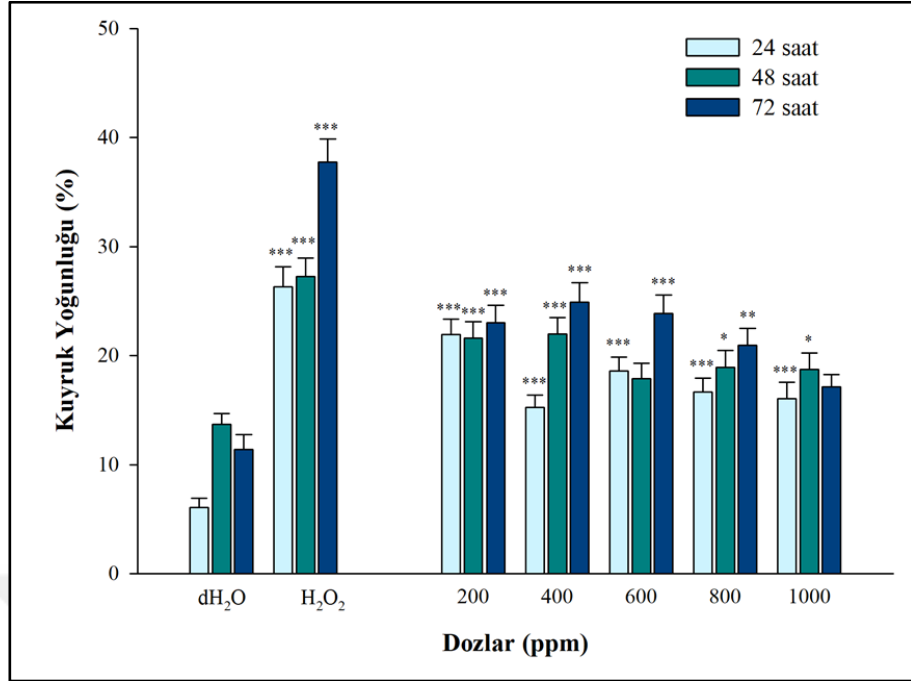
Şekil 4.29. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerinde 72 saatlik inkübasyonda küre form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü

- Elde edilen verilere göre küre formu nHA 293T hücrelerinde en düşük genotoksik etki 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda görülmüş olup, 48 saatlik inkübasyon süresinde doza bağlı olarak azalan, 72 saatlik uygulamada ise en yüksek doz olan 1000 ppm hariç doza bağlı olarak artan DNA hasarları gözlenmiştir (Şekil 4.30).
- Kuyruk yoğunluğu parametresinde genotoksik etkinin her üç inkübasyon süresinde de düşük dozlarda genotoksik etkinin daha fazla ortaya çıktığı saptanmıştır (Şekil 4.31).
- Kuyruk momenti parametresinde 24 saatlik inkübasyon süresinde tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarı gözlenmiş olup 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde 400 ppm’de en yüksek DNA hasar seviyesi belirlenmiş olup doz arttıkça bu etkinin azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.32).



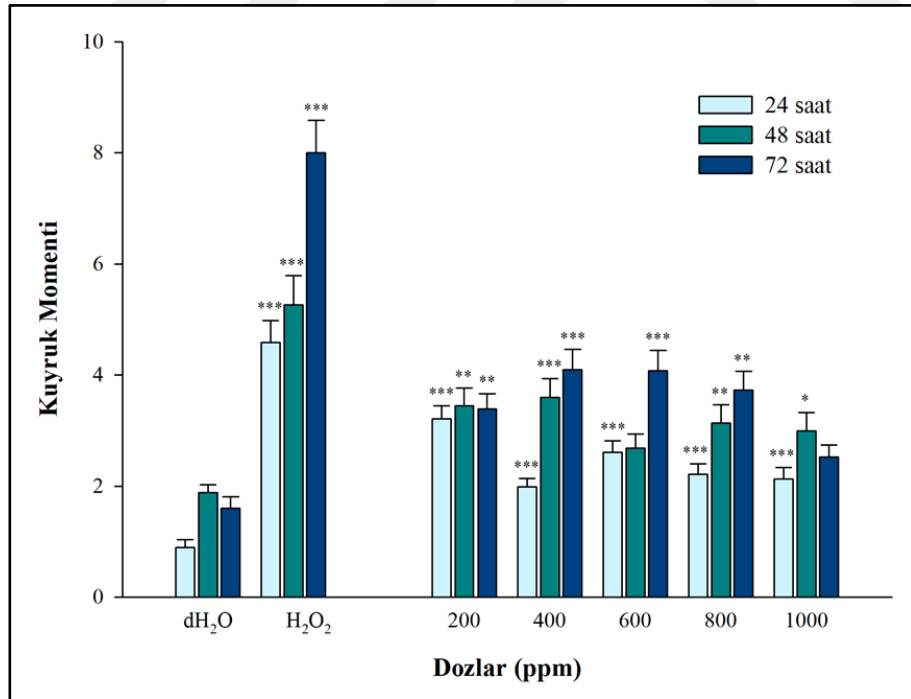
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.30. KOMET testinde küre formu nHA’nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk uzunluğu parametresinde değerlendirilmesi



* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

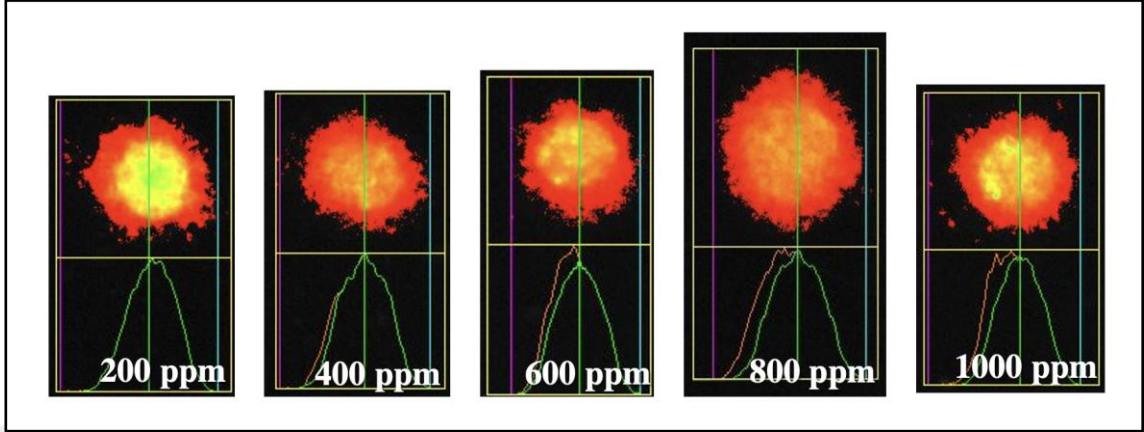
Şekil 4.31. KOMET testinde küre formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk yoğunluğu parametresinde değerlendirilmesi



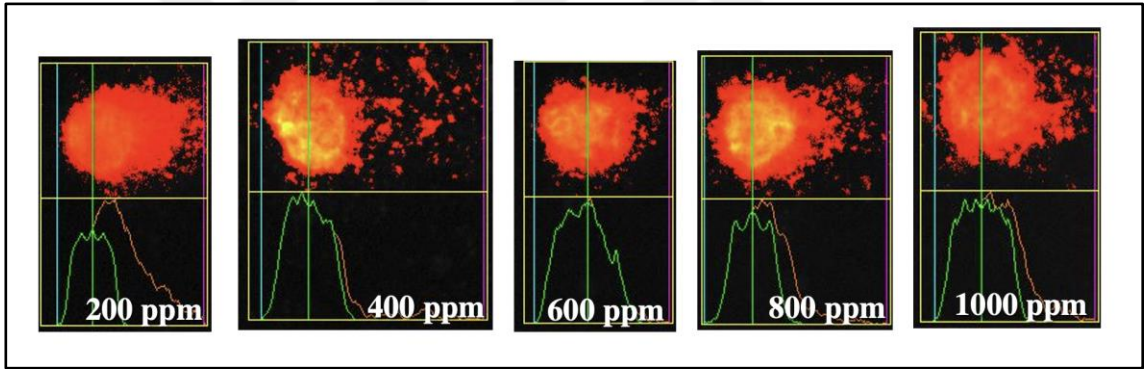
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.32. KOMET testinde küre formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk momenti parametresinde değerlendirilmesi

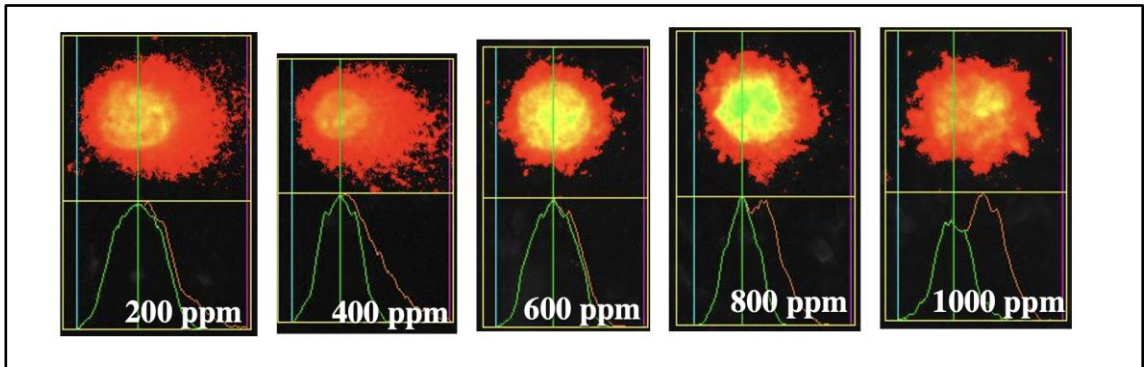
Çubuk formu nHA'ların 293T hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda indüklediği DNA hasarı sonucunda oluşan KOMET görüntüleri Şekil 4.33, Şekil 4.34 ve Şekil 4.35'te gösterilmiştir.



Şekil 4.33. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonda çubuk form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü



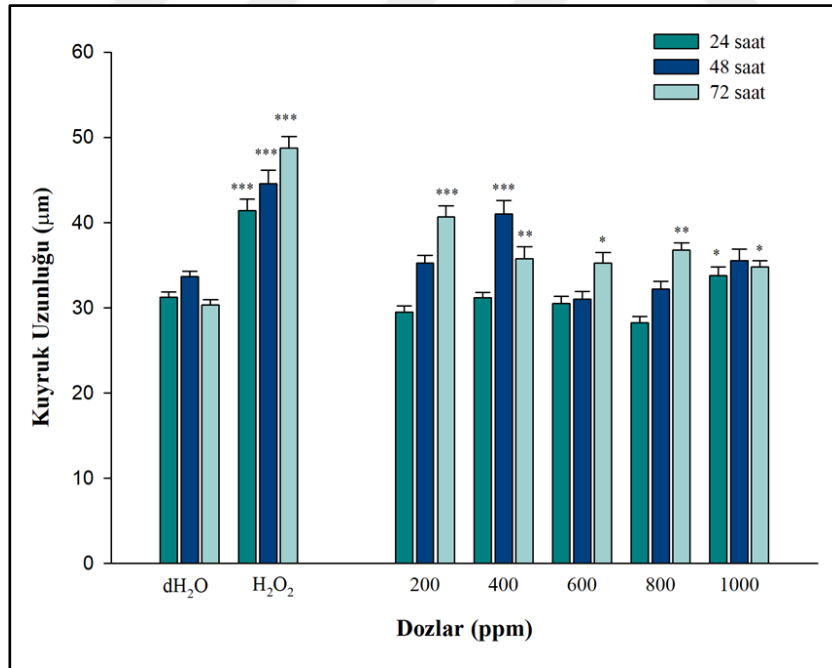
Şekil 4.34. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerinde 48 saatlik inkübasyonda çubuk form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü



Şekil 4.35. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında 293T hücrelerinde 72 saatlik inkübasyonda çubuk form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü

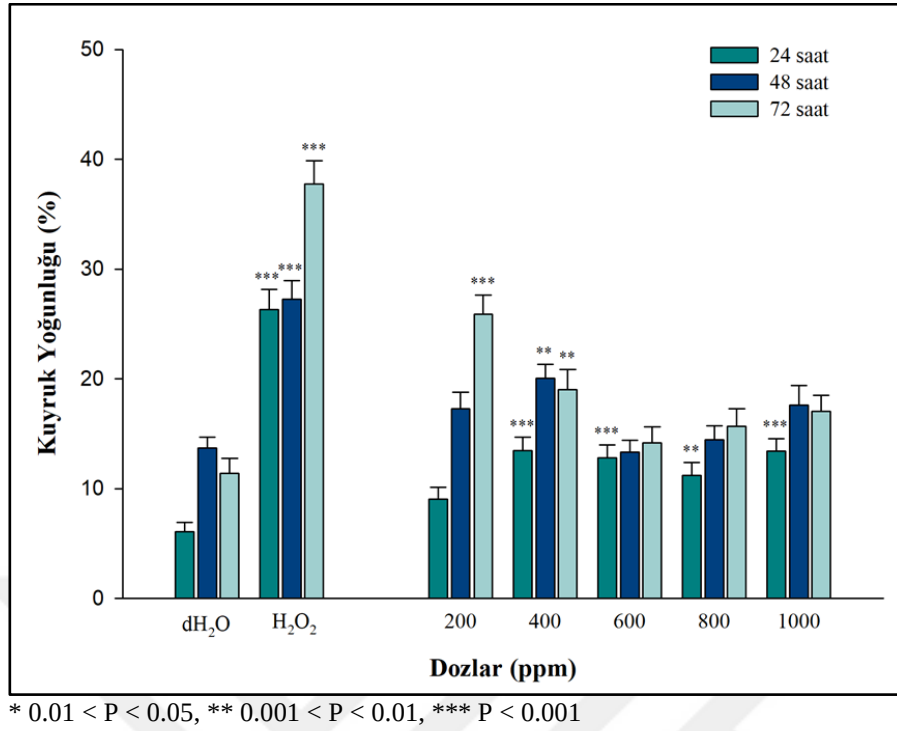
Çubuk formu nHA uygulaması yapılan 293T hücrelerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonunda oluşturdukları KOMET görüntüleri Şekil 4.33, Şekil 4.34 ve Şekil 4.35'te gösterilmiştir.

- Çubuk formu nHA'nın 293T hücrelerinde genotoksik etkileri kuyruk uzunluğu bakımından incelendiğinde 24 saatlik inkübasyon süresinde sadece en yüksek doz olan 1000 ppm'de istatistiksel açıdan anlamlı DNA hasarı gözlenmiştir (Şekil 4.36). Ek olarak 48 saatlik inkübasyon süresinde DNA hasarı en fazla 400 ppm'lik dozda görülmüş olup doz arttıkça genotoksik etkinin azaldığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde 72 saatlik uygulamada da doza bağlı olarak genotoksik etkinin azaldığı tespit edilmiştir.
- Kuyruk momenti parametresinde 24 saatlik inkübasyon süresinde en düşük doz olan 200 ppm haricindeki dozlarda istatistiksel olarak anlamlı genotoksik etki gözlenmiştir (Şekil 4.37). Bunun yanında 48 saatlik inkübasyon süresinde sadece 400 ppm'lik dozda istatistiksel olarak anlamlı genotoksik etki gözlenirken 72 saatlik inkübasyon süresinde 200 ve 400 ppm'de istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarı gözlenmiştir.
- Kuyruk momenti parametresi incelendiğinde 24 saatlik inkübasyon süresinde doza bağlı olarak artan genotoksik etki gözlenirken 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde düşük dozlarda genotoksik etkinin daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.38).

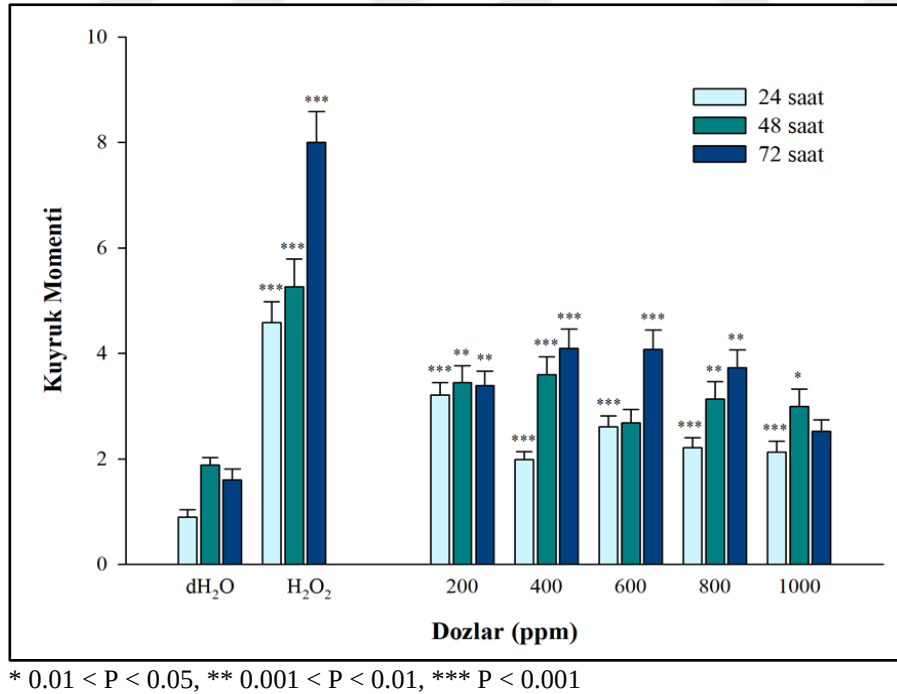


* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.36. KOMET testinde çubuk formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk uzunluğu parametresinde değerlendirilmesi

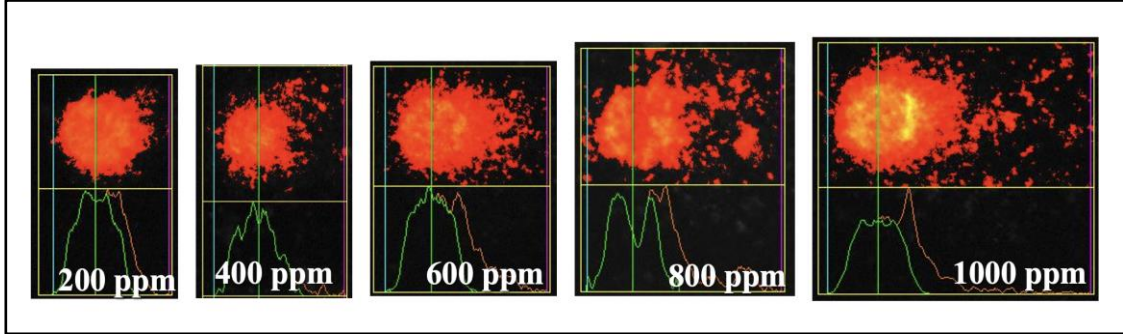


Şekil 4.37. KOMET testinde çubuk formulu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk yoğunluğu parametresinde değerlendirilmesi

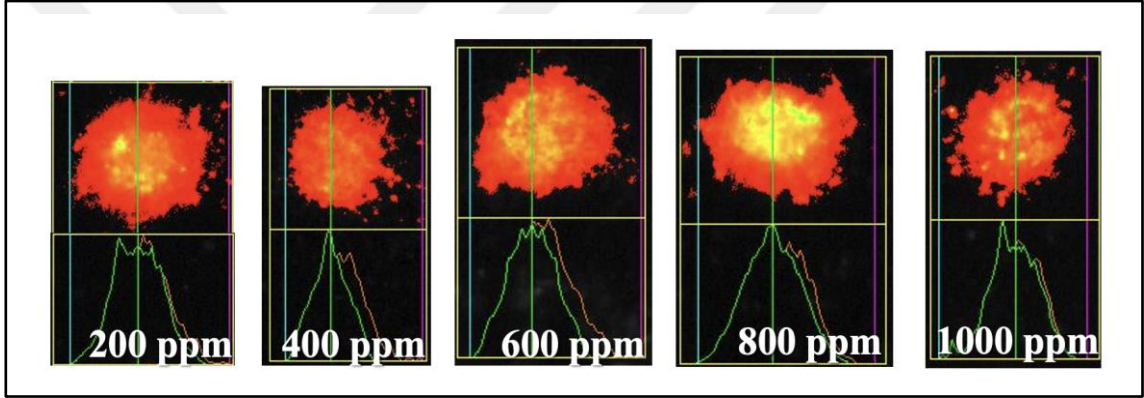


Şekil 4.38. KOMET testinde çubuk formulu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 293T hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk momenti parametresinde değerlendirilmesi

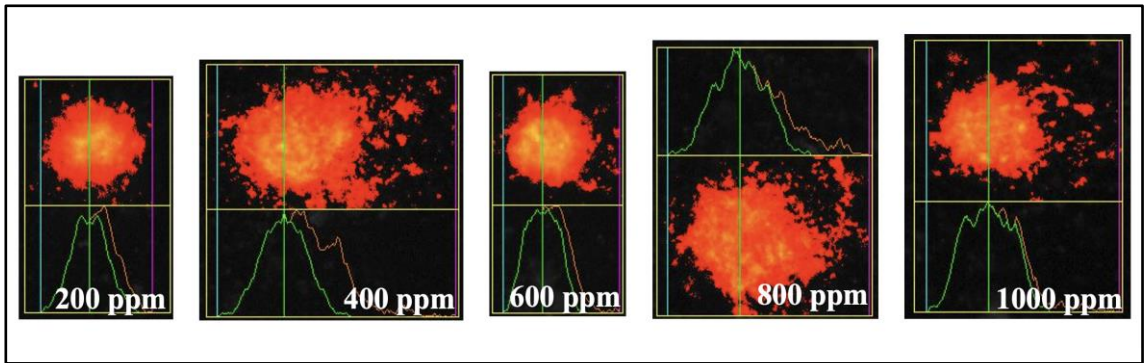
HUVEC hücrelerinde küre formlu nHA'ların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda indüklediği DNA hasarı sonucu oluşan KOMET görüntüleri Şekil 4.39, Şekil 4.40, ve Şekil 4.41'de gösterilmiştir.



Şekil 4.39. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonda küre form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü

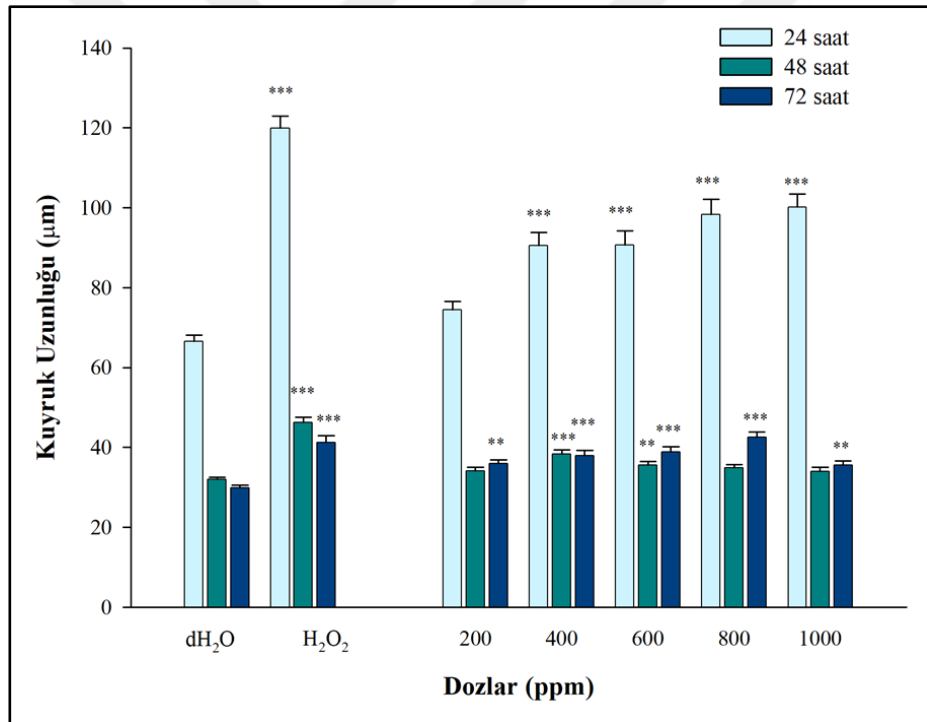


Şekil 4.40. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerinde 48 saatlik inkübasyonda küre form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü



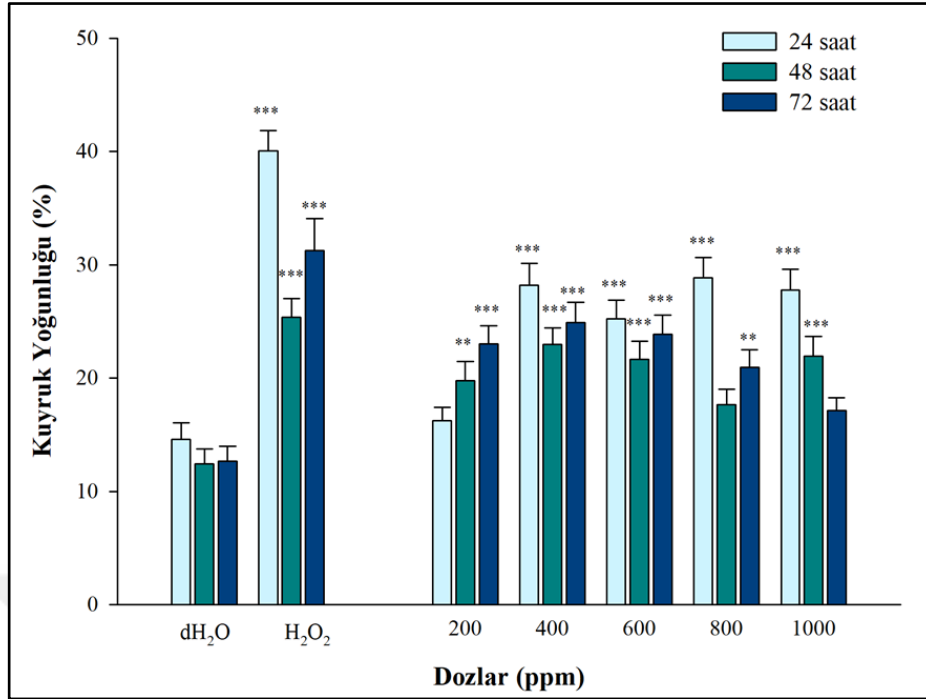
Şekil 4.41. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerinde 72 saatlik inkübasyonda küre form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü

- Küre formu nHA'nın HUVEC hücrelerindeki genotoksik etkisi 24 saatlik inkübasyon süresinde doza bağlı olarak artmış ve en düşük doz olan 200 ppm haricinde istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir. Ek olarak 48 saatlik inkübasyon süresinde 400 ve 600 ppm'lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlı genotoksik etki gözlenmiş olup, 72 saatlik inkübasyon süresinde tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarı tespit edilmiştir (Şekil 4.42).
- Kuyruk yoğunluğu parametresinde 24 saatlik inkübasyon süresinde 200 ppm, 48 saatlik inkübasyon süresinde 800 ppm ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 1000 ppm haricindeki tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarı gözlenmiştir (Şekil 4.43).
- Kuyruk momenti parametresinde en yüksek genotoksik etki 24 saatlik inkübasyon süresinde gözlenmiş olup 48 saatlik inkübasyon süresinde 800 ppm ve 72 saatlik inkübasyon süresinde 1000 ppm haricindeki tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı genotoksik etki gözlenmiştir (Şekil 4.44).



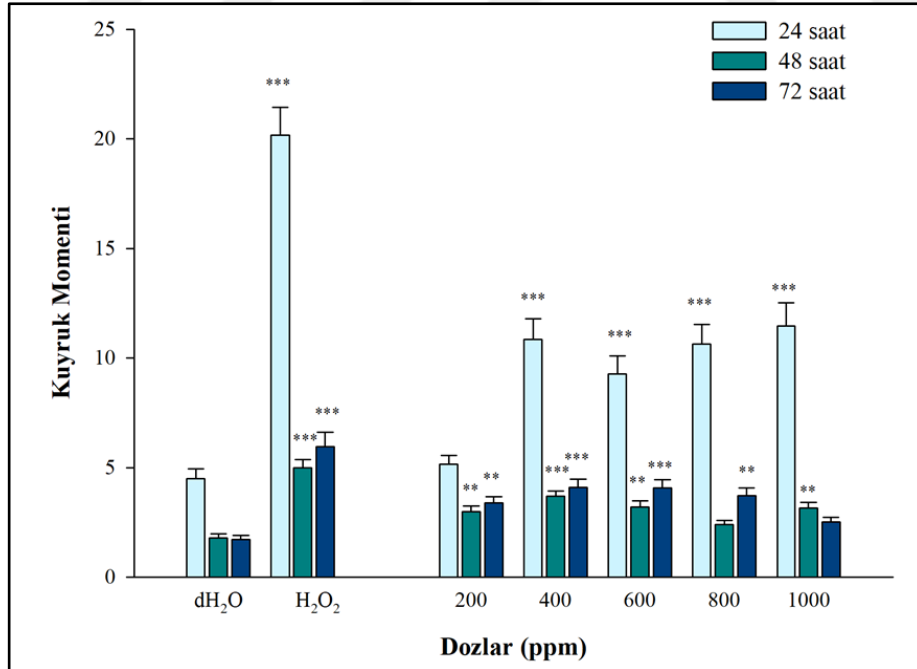
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.42. KOMET testinde küre formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk uzunluğu parametresinde değerlendirilmesi



* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

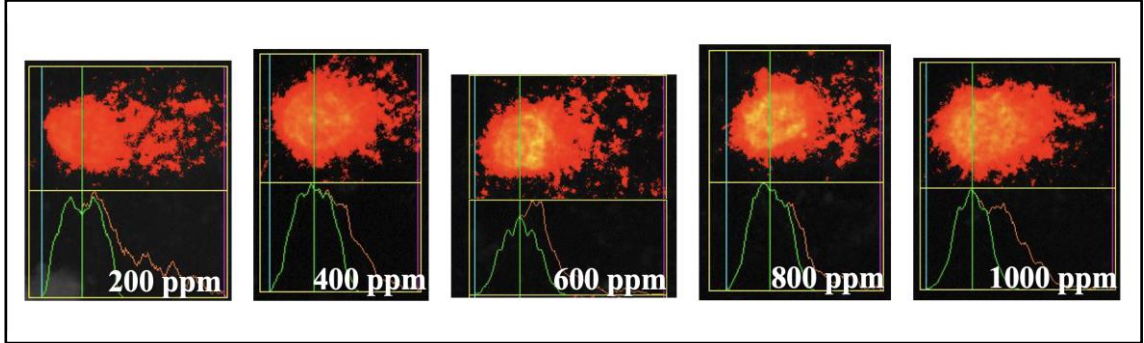
Şekil 4.43. KOMET testinde küre formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk yoğunluğu parametresinde değerlendirilmesi



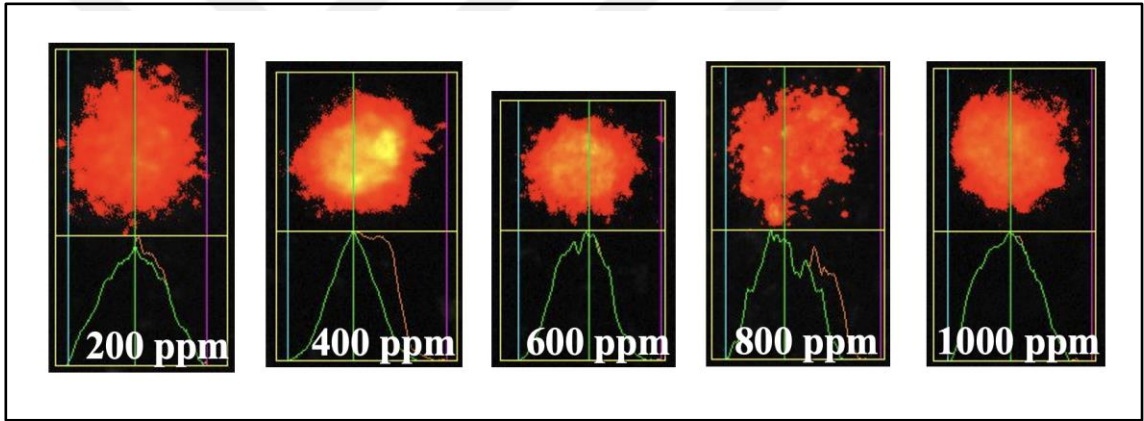
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.44. KOMET testinde küre formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk momenti parametresinde değerlendirilmesi

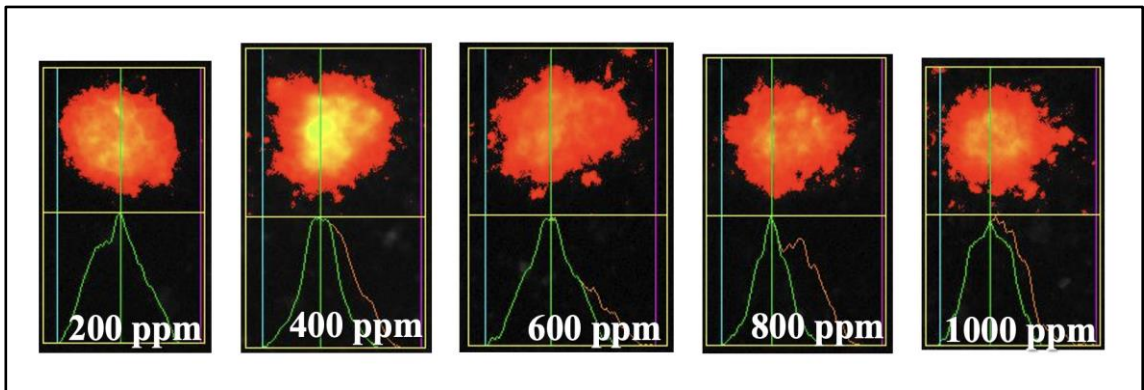
HUVEC hücrelerinde çubuk formu nHA'ların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda indüklediği DNA hasarı sonucu oluşan KOMET görüntüleri Şekil 4.45, Şekil 4.46, ve Şekil 4.47'de gösterilmiştir.



Şekil 4.45. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonda çubuk form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü

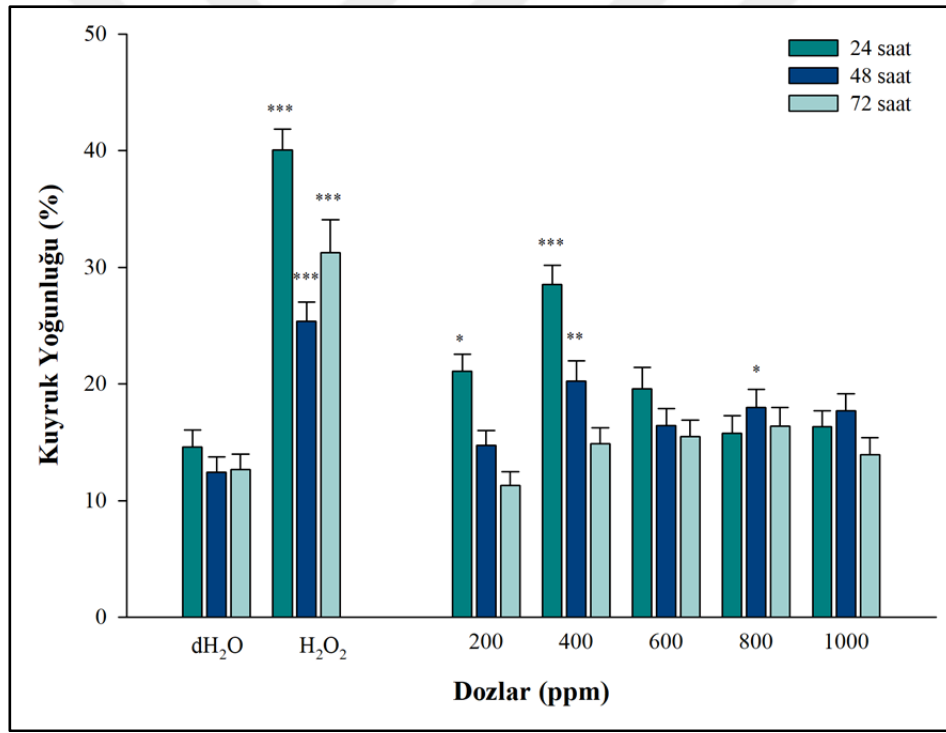


Şekil 4.46. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerinde 48 saatlik inkübasyonda çubuk form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü



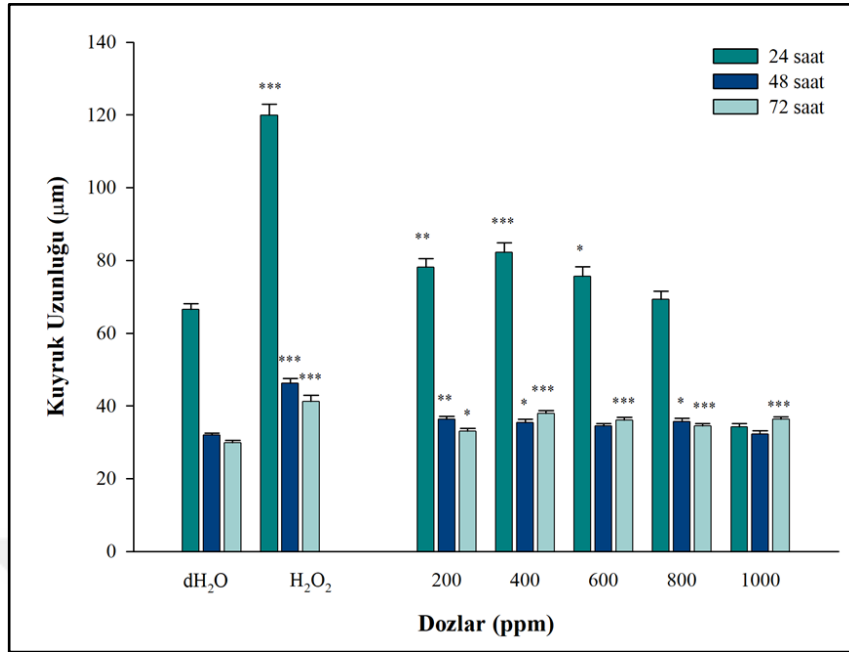
Şekil 4.47. Hücre kültürü KOMET uygulamalarında HUVEC hücrelerinde 72 saatlik inkübasyonda çubuk form nHA gruplarına ait hücrelerin KOMET görüntüsü

- Çubuk formu nHA HUVEC hücrelerinde kuyruk uzunluğu parametresinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde düşük dozlarda istatistiksel olarak anlamlı genotoksik etkiye neden olurken 72 saatlik inkübasyon süresinde tüm dozlarda istatistiksel açıdan anlamlı DNA hasarına neden olmuştur (Şekil 4.48).
- Kuyruk yoğunluğu parametresi incelendiğinde 24 saatlik inkübasyon süresinde 200 ve 400 ppm, 48 saatlik inkübasyon süresinde 400 ve 800 ppm dozlarında istatistiksel olarak anlamlı genotoksik etki gözlenmiştir. Bunun yanında 72 saatlik inkübasyon süresinde çalışılan dozların hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarı gözlenmemiştir (Şekil 4.49).
- Kuyruk momenti parametresinde 24 saatlik inkübasyon süresinde düşük dozlarda genotoksik etkinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında 48 saatlik inkübasyon süresinde 200, 400 ve 800 ppm'lik dozlarda, 72 saatlik inkübasyon süresinde ise tüm dozlarda istatistiksel açıdan anlamlı DNA hasarı gözlenmiştir (Şekil 4.50).



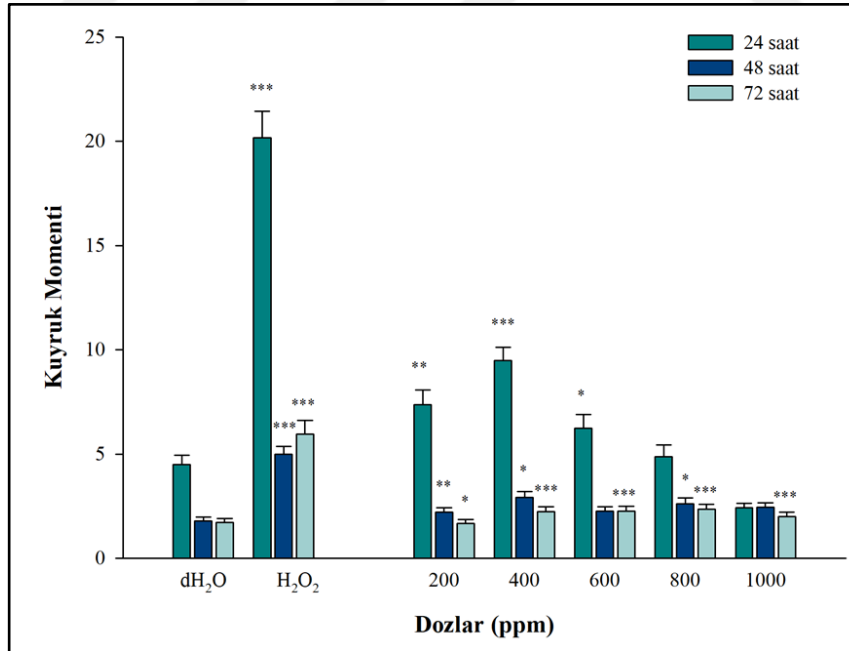
* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.48. KOMET testinde çubuk formu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarı'nın kuyruk uzunluğu parametresinde değerlendirilmesi



* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.49. KOMET testinde çubuk formulu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk yoğunluğu parametresinde değerlendirilmesi



* 0.01 < P < 0.05, ** 0.001 < P < 0.01, *** P < 0.001

Şekil 4.50. KOMET testinde çubuk formulu nHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarının kuyruk momenti parametresinde değerlendirilmesi

5. TARTIŞMA

Biyomalzemeler biyoloji ve tıpta araştırmaları alanlarında kullanılmak üzere özel maddelerin geliştirilmesi değerlendirilmesi ve uygulanmasını kapsamaktadır (Ducheyne ve Hastings 2018). Biyomalzemeler konusu kimya, kimya mühendisliği, malzeme bilimi, mekanik, yüzey bilimi, biyomühendislik, biyoloji ve tıp arasında, düzenleyici kuruluşlar ve girişimcilerden oluşan çok boyutlu bir arayüzde yer almaktadır. Biyomalzemeler ve tıbbi cihazlar endüstrisinde son 50 yıl içinde 100 milyar dolarlık bir girişim olduğu gözlemlenmiştir (Ratner ve Zhang 2020).

Kalsiyum fosfatlar uzun yıllardır biyouyumluluk gösteren koruyucu kaplamalar olarak kullanılmaktadır. Ortofosfat grubuna ait olan kalsiyum fosfatlar dişler ve kemik gibi çeşitli biyolojik yapılarda doğal olarak meydana gelmektedir. Sentetik kalsiyum fosfatlar doğal formlara göre yüksek benzerlik göstermekte ve metalik implantların biyouyumluluğun artırılması ve implantasyon bölgesinde doku yenilenmesini artırmaktadır (Zhang vd. 2020). Doku mühendisliği alanının en yoğun araştırma konuları kemik ve diş dokuları oluşturmaktadır. Kalsiyum fosfat yapısındaki inorganik HA nanokristalleri ve kolajen matriks yapısı benzersiz bir nanokompozit materyalini oluşturmaktadır (Dvir vd. 2011).

Nanomalzemesler arasında nHA, implant kaplama malzemesi olarak kullanımının yanı sıra kemik dokusu mühendisliği için iskelelerde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Kaplamanın kalitesi sentezlenen HA'nın genel özellikleri ve nitelikleri ile doğrudan ilişkilidir. Saflık, kristal yapısı, parçacık boyutu dağılımı, parçacık morfolojisi ve yüzey alanı bu özellik ve niteliklerdendir. Ortopedik ve dental implantların hasta üzerindeki uygulama başarısını direkt olarak etkileyen bu faktörlerin geliştirilmesi için nHA'ların mekanik ve biyolojik özelliklerinin geliştirilmesinde nanoteknolojiden faydalanılmaktadır (Yousefi vd. 2014). HA'ların nano boyutta olması malzemenin daha büyük yüzey alanına sahip olmasını sağlamaktadır. Böylece kırılma azaltıp ve mekanik özellikleri geliştirilebilmektedir. Bunun yanında nanoHA mikro yapıdaki HA'lara göre daha yüksek bitoaktiviteye sahip olmaktadır. Bu nedenle klinik uygulamalarda nHA partiküllerinin kullanılmasına yönelim oluşmuştur (Zhou ve Lee 2011). Çok sayıda nanoboyutta bloktan oluşan kollajen matriks, mekanik mukavemet ve büyüme, esneklik duyarlılık gibi benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Nano yapıları HA'lar bu doğal yapıya yakın özellikler taşımakta ve osteoblastlarda adezyon, büyüme ve alkelen fosfataz sentezini artırarak sert doku hasarının tamirinde daha hızlı onarımı teşvik edebilmektedir. Bu nedenle nHA, biyomedikal uygulamalarda iyi bir aday olarak görülmektedir (Cai vd. 2007). Mekanik stres altında hedef dokudaki iyileşme sürecini azaltması ve implant yüzeyine uygun şekilde yapışma sağlaması nedeniyle nHA'ların geliştirilmesi hızlandırılmıştır (Zielinski ve Bartmanski 2020). nHA'ların nano boyutta olması nedeni ile hücre içerisine girişi daha kolay olmakta ve protein, hücre ve doku gibi biyolojik yapılar ile etkileşime girebilmektedirler. Küçük boyutları nedeni ile artan yüzey alanı ve yüzey aktivitesi, kuantum etkileri nanomalzemelerin yaratabileceği sağlık sorunları hakkında büyük endişeler de bulunmaktadır (Wang vd. 2016).

NP'lerin kullanımının artması sonucu bu materyallerin çevreye salınımlarının da artacağı düşünülmektedir. Bu materyallerin insan sağlığı üzerindeki etkileri konusunda

çalışmalara son 10 yılda hız verilmesine rağmen hâlâ cevaplandırılması gereken birçok soru ve literatürde eksik noktalar mevcuttur (Dreher 2004; Sonmez vd. 2016; Remya vd. 2017). Endüstriyel NP'ler metalik, polimerik ve biyoseramik özelliklere sahip olabilmektedir. HA gibi biyoseramik NP'ler uzun süredir tıpta kemik dokusunda kullanılmaktadır (Bahadar vd. 2016). Geleneksel seramik formülasyonları ile karşılaştırıldığında nHA'ların yüzey tanecik boyutu ve gözenek boyutu gibi özelliklerin protein etkileşimlerinde daha etkili olduğu gözlenmektedir. Bu özellikler nHA'ların kemik hücrelerinde uzun süreli fonksiyonellik kazandırmaktadır (Ferraz vd. 2004).

HA'ların *in vivo* uygulamalarında geliştirilen biyomalzemenin biyouyumluluğu, çevre dokularla olan etkileşimi ve potansiyel toksisitesi değerlendirilmektedir (Deveci vd. 2020; Ferreira-Ermita vd. 2020). Yang vd. (2009) tavşanlarda implant yüzeylerinde HA kaplamaların etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, HA kaplama yapılan implantların kaplama yapılmamış kontrol grubuna göre daha uyumlu olduğu gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada kalsiyum-fosfat kaplamaları da denenmiş olup HA'ların vücutta çözünürlüğü daha az olduğundan uzun süre yapısını koruyabildiği gözlenmiştir. Besinis vd. (2017) titanyum alaşım implantlarını nano ve mikro boyuttaki HA eklentisi ile antibakteriyel aktiviteyi ölçmüşler ve mikro ve nanoboyuttaki HA kaplanmış titanyum alaşımlar, kaplama yapılmamış kontrol grubuna göre daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Klinik uygulamalarda nHA'ların kullanımı umut verici olsa da bu kaplamalar vücutta inflamasyon ve toksisiteye sebep olabilmektedir (Pujari-Palmer vd. 2017). Biyomedikal uygulamalarda HA bazlı nanomateriyallerin kullanımına olan ilgi ile birlikte biyolojik sistemler üzerindeki etkileri büyük bir endişe kaynağı haline gelmiştir (Wei vd. 2017).

Farklı NP'lerin (Fe, Zn, Si, Ce, Ti, Au, Ag gibi çeşitli NP'ler) genotoksik potansiyellerinin belirlenmesinde model organizma olarak *Drosophila* kullanımı her geçen yıl artmaktadır (Ong vd. 2015; Alaraby vd. 2016; Baeg vd. 2018; Pappus ve Mishra 2018; Dan vd. 2019). *Drosophila*, çok sayıda yavru vermesi, yaşam döngüsünün kısa olması ve kültürünün ekonomik olması sebebiyle araştırmacıların genotoksik ve antigenotoksikite çalışmalarında tercih ettiği bir ökaryotik model organizma haline gelmiştir. 1900'lü yılların sonunda Graf vd. tarafından geliştirilen SMART deneyi ile mutasyonların geniş bir spektrumda araştırılabilmesine olanak sağlanmaktadır. *Drosophila* SMART yöntemi larval dönemde imajinal disklerde oluşan genetik değişimler sonucunda heterozigotluğun kaybı ve bunun sonuçlarının fenotipte gözlenmesi temeline dayanmaktadır. Bu test yöntemi ile pestisitlerin, çevresel kirleticilerin, radyoaktivitenin, mikro ve nano boyutlu parçacıkların ve çeşitli ilaçların mutajenik ve rekombinojenik etkileri uzun yıllar boyunca araştırılmıştır. Bu test ile genotoksik ajanların larval imajinal disklerde meydana getirdiği rekombinasyon ve mutasyonlar (delesyon, nokta mutasyonu ve ayrılma) ergin fenotipinde incelenmektedir. Bu çalışmada SMART deneyinden elde edilen sonuçlara göre *Drosophila* somatik hücrelerinde küre formu nHA için uygulanan en düşük doz olan 25 ppm'lik konsantrasyon haricinde istatistiksel olarak anlamlı genotoksikiteye neden olmuştur. Çubuk formu nHA ise çalışılan hiçbir dozda genotoksikiteye neden olmamıştır.

Bu çalışmada *Drosophila* hemositlerinde 25-200 ppm aralığındaki 4 farklı dozda uygulanan küre ve çubuk formu nHA'lar kuyruk uzunluğu parametresinde anlamlı genotoksik etki göstermemiştir. Benzer şekilde kuyruk momenti parametresinde de gözlenen genotoksik etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kuyruk yoğunluğu

parametresinde ise hem çubuk formda hem de küre formda 100 ppm’lik dozda istatistiksel olarak anlamlı genotoksisite gözlenmiştir. KOMET testi yapılan çalışmalarda kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentinin değerlendirilmektedir (Sunjog vd. 2013). Bu parametreler en uygun değerlendirme parametresinin kuyruk yoğunluğu ya da kuyruk momentinin dikkate alınarak değerlendirme yapılması tavsiye edilmektedir (Olive vd. 1990; Collins 2004). Kuyruk momentinde nHA’ların göstermiş olduğu genotoksik etki; biyouyumluluğu bilinen bu malzemenin aynı zamanda toksik etkiye sahip olabileceği konusundaki endişelerin yerinde olabileceğini göstermektedir. *Drosophila* KOMET sonuçlarında hem çubuk hem de küre formda 200 ppm’lik dozda kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti sonuçlarında azalan genotoksisite tespit edilmiştir. Yüksek dozda gözlenen bu düşüşün katı bir malzeme olan HA’ların kümelenme gösterip larvalarda bağırsaktan emilimin yapılamamış olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

nHA’ların *Drosophila*’daki genotoksik etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Pantaleão vd. (2017) nHA’ların normal ve yüksek metabolik aktiveye sahip *Drosophila*’lardaki genotoksik etkisini araştırdıkları çalışmalarından elde edilen verilere göre 4.16, 8.33 ve 6.66 mg/mL’lik konsantrasyonların hiç birinde istatistiksel olarak anlamlı genotoksik etki gözlenmemiştir. Ayrıca çalışmada nHA’ların karakterizasyonuna yer verilmemiş olduğundan boyut ve morfolojik yapıları hakkında bilgi bulunmaması eksiklik olarak değerlendirilmektedir. Pappus vd. (2017) *D. melanogaster*’da 40-80 nm boyutundaki küre formu nHA’nın gelişimsel ve davranışsal etkilerinin araştırmışlardır. Elde edilen bulgulara göre nHA oksidatif hasara, hücre hasarına, larval gelişimde gecikmeye ve ergin sineklerde düşük vücut ağırlığı ve yürüme bozuklukları, göz, kanat, kıllar ve toraksta fenotipik bozukluklar gözlemişlerdir. Dan vd. (2019) 20 nm boyutundaki çubuk formu 10-1000 µg/ml aralığındaki farklı konsantrasyonlardaki nHA’ların *Drosophila* lipid peroksidasyonu, ROS üretimi ile negatif jeoaksi ve larva hareketleri gibi davranışsal özellikleri incelemiş ve anlamlı toksisite gözlemlememişlerdir. *Drosophila* bağırsak hücrelerinde MTT testi ile nHA (10-1000 ppm) sitotoksitesini incelenmiş ve hücre canlılığında anlamlı bir düşüşün olmadığı gözlenmiştir (Kumar vd. 2019). Sahu ve Mishra (2020) 40-80 nm boyutundaki küre formu nHA’ların pupa ve ergin evredeki *Drosophila*’ların kanat ve göz fenotiplerinde bozukluklara neden olduğunu belirlemişlerdir. Gautam vd. (2021) 1-100 µg/mL dozlarında ve %65-85 oranında HA içeren HA-zirkonyum (zr)-boron nitrit kompozitinin *Drosophila* larval sürünme hızında (1 dakika içinde kat ettiği mesafe), kanat ve göz fenotopinde bozukluklara neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca çalışma kapsamında *Drosophila* bağırsak hücrelerinde yüksek dozlarında ROS artışı gözlenmiştir. Literatürde HA’ların *Drosophila*’daki toksik etkileri genel olarak davranış parametreleri ile incelenmiştir. Yukarıda belirtilen literatür verilerine göre küçük boyutlu ve küre yapıdaki nHA’ların toksisite mekanizmalarını indüklediği gözlenmektedir. Bu çalışmanın SMART kısmında küre formu nHA lerin çubuk formlara oranla daha yüksek genotoksisiteye sahip olduğu gözlenmiştir. Küre formu nHA lerde belirlenen yüksek genotoksisitenin muhtemelen şekilleri itibari ile hücresel ortama daha rahat girişlerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca önceki yapılan çalışmalarda nHA lerin oksidatif hasarı artırmış olması meydana gelen hasarın oksidatif hasar kaynaklı olduğunu kanısını uyandırmaktadır. Bu bağlamda daha önce yapılmış çalışmalar SMART deneyinden elde edilen bulgular ile paralellik göstermektedir.

Apoptotik hücre; hacim kaybı, plazma membranında girinti çıkıntılarının oluşumu, nüklear kondensasyon, DNA'nın nükleozomal fragmentasyonu ve apoptotik cisimciklerin oluşmasıyla karakterize edilmektedir. Tüm bu değişiklikler apoptoz mekanizmasını oluşturan proteinlerin, bir dizi hücresel sinyalin ve kaspazlardan oluşan bir yolun işlemesiyle gerçekleşmektedir (Serbes 2009). Apoptoz, gelişimsel süreçte ve doku homeostazının sağlanmasında oldukça kritik bir noktada bulunduğundan nörodejenerasyon, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi çeşitli patolojik durumların düzenlenmesinde kaspazlar yer almaktadır (Wu vd. 2016). Kaspaz-9 aktivasyonu sonucunda mitokondriden kaspaz-3 aktivasyonunu sağlayacak olan apoptozun salınması gerçekleştiğinden apoptozun gözlenmesinde kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktiviteri öncelikli olarak çalışılmaktadır (Ahamed vd. 2010). İçsel ve dışsal apoptotik yolların başlatıcı kaspazlarının (kaspaz-8 ve kaspaz-9) substratları efektör kaspazlar olan kaspaz-3 ve kaspaz-7'dir (Olsson ve Zhivotovsky 2011). Apoptoz sürecinde çalışan kaspazlar insan ve *Drosophila* arasında yaklaşık %50 oranında korunmuş durumdadır (Crawford vd. 2012). *Drosophila* kaspazları, embriyonik dönemde, başkalaşım ve ergin bireylerin korunma mekanizmalarında çalışan programlı hücre ölümünün araştırılmasında direkt bir kanıt olarak çalışılmaktadır (Mills vd. 2005; Waldburger vd. 2005). *Drosophila*'da gelişimsel ve stres indüklü apoptozun gerçekleşmesi için kaspaz-2 ve kaspaz-9 homoloğu olan başlatıcı kaspaz DRONC aktivitesi gerekmektedir (Dorstyn ve Kumar 2008). Efektör kaspaz olarak görev yapan kaspaz-3'ün *Drosophila*'daki homoloğu DICER gelişimsel apoptozla ilişkilendirilmiştir (Fan ve Bergmann 2010). Bunun yanında DECAY kaspaz-3 ve kaspaz-7 ile memeli üyeleri ile yüksek derecede homoloji göstermektedir (Dorstyn vd. 1999). İçsel apoptotik yollara bağlı genlerin oldukça iyi korunduğu *Drosophila*, apoptotik hücre ölümünün başlatılması ve uygulanması sırasında çalışan kaspazların rollerinin incelenmesinde iyi bir model organizmadır (Fogarty ve Bergmann 2014). *Drosophila*'da ifade edilen DREDD memeli sistemlerde kaspaz-8 ile homoloji göstermektedir ve embriyonik dönemdeki programlı hücre ölümünde görev almaktadır (Dorstyn vd. 1999).

Bu çalışmada *Drosophila* hemositlerinde kaspaz-3/7, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivasyonu incelenerek nHA'ların indüklediği apoptotik yollar araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre farklı NP şekillerinde farklı kaspaz ifadelerine neden olduğu belirlenmiştir. Çubuk formu nHA kaspaz-3/7 ve kaspaz-9 aktivitesinde azalmaya neden olurken kaspaz-8 aktivitesinde artışa neden olmuştur. Küre formu nHA'lar kaspaz-3/7 ve kaspaz-9 aktivitesinde artışa kaspaz-8 aktivitesinde ise azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. NP'lerin farklı şekil, boyut ve kompozisyonuna bağlı olarak oluşturdukları kaspaz aktiviteri değişebilmektedir (Sohaebuddin vd. 2010). Chen vd. (2007) çalışmalarında insan mide kanseri hücre hattında (SGC-7901) 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde 50 nm HA'nın kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunu artırdığını gözlemlemişlerdir. Çalışmalarında kaspaz-8 aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmadan elde edilen verilere göre 50 nm HA mitokondrial apoptotik yolağı aktive etmiştir ancak HA'ların karakterizasyon sonuçları verilmediğinden morfolojik yapının apoptoz üzerine etkisi tartışılmamaktadır. Kaspaz-3/7 aktivitesi çubuk formda 25 ve 50 ppm'lik konsantrasyonlarda kontrol grubu olan distile suya göre istatistiksel olarak artmıştır. Kaspaz-9 aktivitesi çubuk formda tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. Hem kaspaz-3/7'de hem de kaspaz-9 da konsantrasyonlarda doza bağlı olarak azalan bir eğim gözlenmektedir. Bu proteinlerin ekspresyonunda benzerlik gözlenmesi çubuk formun düşük dozlarının içsel apoptotik

yolakların aktivasyonuna neden olduğunu göstermektedir. Çubuk formun yüksek dozları olan 100 ve 200 ppm'lik konsantrasyonlarda anlamlı kaspaz-3/7 aktivitesi gözlenmezken 50, 100 ve 200 ppm'lik konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı kaspaz-8 aktivitesi gözlenmiştir. Kaspaz-8 aktivitesinin yüksek dozlarda artması hücre içine giremeyen NP'lerin hücre zarında meydana getirdiği stres kaynaklı sonucunda oluşabileceği düşünülmektedir. Mitokondriyal apoptotik yolak başlatıcı olan kaspaz-9 aktivitesi çubuk formun tüm dozlarında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Buna göre çubuk formun hem hücre içi hem de hücre dışından alınan sinyallerle hücre ölüm yolaklarını aktive edebilmektedir. Küre formu nHA kaspaz-3/7 ve kaspaz-8 aktivitesinde 200 ppm'lik konsantrasyonda, kaspaz-9 aktivitesinde 100 ve 200 ppm'lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir. Bu bağlamda nHA yüksek dozlarda hem içsel hem de dışsal apoptotik yolak kaskadlarının aktivasyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Hücre içinde oluşan ROS mitokondriyal sinyal yolaklarını aktive ederek kaspaz-9 ve kaspaz-3 aracılı hücre ölümünü tetikleyebilmektedir (Sinha vd. 2013). Hücre dışından gelen sinyaller ile kaspaz-8 aracılı ölüm yolakları aktive edilmektedir (Bayır ve Kagan 2008). Literatürden elde edilen bilgiler nHA'ların oksidatif hasar yaratma potansiyelinde olduğunu göstermektedir (Sonmez vd. 2016; Pappus vd. 2017). Elde edilen sonuçlara göre küçük boyutlu ve hücre içine girebilme potansiyeli olan küre formu nHA'ların düşük dozlarının hücre içi ROS kaynaklı ölüm yolaklarını aktive edebileceği, çubuk formu yüksek dozlarda dışsal apoptotik yolak başlatıcıların aktive olduğu gözlenmektedir. Bu durum da hücre içinde giremeyen nHA'ların hücrede yaratabileceği stres kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Bexiga vd. (2010) insan astrositoma hücre hattında polistren NP'lerinin kaspaz-3/7 ve kaspaz-9 aktivasyonunu indüklediğini tespit etmişlerdir. Seryum oksit NP'lerinin BEAS-2B (insan akciğer epitel hücre hattı) hücre hattında kaspaz-3 aktivasyonunu kontrol grubuna göre %140 oranında artırmıştır (Park vd. 2008). *Drosophila*'da antibiyotik cefotaxime, 24 ve 48 saatlik uygulamalarda kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesini artırmıştır (Rahul vd. 2015). Li vd. (2013) düşük frekanslı elektromanyetik dalga maruziyeti alan *Drosophila*'ların kaspaz-3 ifadesinin azaldığını belirtmişlerdir. *Drosophila* larvalarına 6-104µg aralığında uygulanan seryum kaspaz-3/7 ve kaspaz-9 aktivitesini artırmıştır (Wu vd. 2012). Filipiak vd. (2012) çinkonun *Drosophila*'da kaspaz-3/7, ve kaspaz-9 seviyelerinin artışa neden olduğunu bunun yanında kaspaz-8 seviyesinde değişim olmadığını belirtmişlerdir. Bakır katkılı çinko NP'lerinin etkilerinin *Drosophila*'da araştırıldığı bir çalışmada kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyelerinde değişim gözlenmemiştir (Siddique vd. 2015). *Drosophila* normalde çok düşük seviyelerde olan apoptoz, x-ray'e maruz kalmış larvalarda artış göstermektedir (Perez-Garijo vd. 2004). Programlı hücre ölümü gelişimsel sürecin önemli bir bileşeni olduğundan kaspaz seviyesindeki azalma çeşitli gelişimsel bozuklukların göstergesi olabilmektedir (Li vd. 2013). Apoptoz çok hücreli canlıların gelişiminde bağışıklık sistem tarafından kontrol edilen anormal hücrelerin yok edilmesini düzenleyen kontrollü ve düzenli hücre ölüm mekanizmasıdır. Hücre ölüm mekanizmalarında meydana gelen düzensizlikler kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve kronik kalp yetmezliği gibi çeşitli hastalıkların oluşumuna sebep olmaktadır (Pan vd. 2012).

Ökaryotik hücrelerdeki genomik stabilite endojen ve ekzojen kaynaklar tarafından stres altında bulunmaktadır. Organizmanın gelişimsel hücre döngüsü süreçlerinde DNA tamiri ve döngü kontrol noktaları tarafından genomik stabilite korunmaya çalışılır. Temel

DNA onarım yolları prokaryotlar, ilkel ve yüksek ökaryotlar arasında işlevsel olarak korunmuştur ve bu onarım süreçlerinde yer alan proteinler yüksek derece aminoasit benzerliği göstermektedir. Yapılan genom çalışmaları ile *Drosophila* bu yüksek benzerliği taşıyan model organizmalardan biri olduğu belirlenmiştir (Klovstad vd. 2008). İnsan hastalıklarında belirlenen genlerin yaklaşık %77'i *Drosophila* genleri ile homoloji göstermektedir (Reiter vd. 2001). Bu çalışma kapsamında nükleotid eksizyon tamiri, baz eksizyon tamiri, yanlış eşleşme tamiri, çift zincir kırıklarının tamiri, ATM/ATR sinyal yolları ve hücre döngüsü kontrol noktalarında çalışan genlerin ifadeleri araştırılmıştır. *D. melanogaster* genetik izlenebilirliğinin kolay olması, genotoksik streslerin organizmadaki analizinin yapılabilmesi açısından DNA hasarının tamirinin çok hücreli canlılarda araştırılması için uygun model organizmadır. DNA tamiri araştırmalarının temeli Muller'in X-ışınlarının *Drosophila* genomu üzerindeki zararlı etkilerinin yayınlandığı yaklaşık 100 yıl öncesine dayanmaktadır.

Nükleotid eksizyon onarımı (NER), zincir üzerindeki veya zincirler arasındaki çapraz bağlar ve ultraviyole (UV) hasarları gibi DNA sarmal yapısını bozan lezyonları onaran bir tamir sistemidir. NER, iki ana alt yolak aracılığıyla meydana gelebilecek hasarı tanımlama ile başlamaktadır. Bu iki yolak genomun her yerindeki lezyonları tespit eden global genom onarımı ve kopyalanmış aktif zincirdeki hasarları tanıyan transkripsiyon-bağlı onarım sistemleridir. *XPC* ve *XPE* gen aileleri bu iki yolağın ana elemanlarından (Mota vd. 2019). NER mayalardan memelilere yüksek oranda korunmuş bir tamir sistemidir (Bhui-kaur 1998). *Drosophila*, memeli hücrelerinde bulunan Nükleotid eksizyon onarımı (NER) yolunun tüm bileşenlerine sahiptir. İnsanlarda NER sisteminde görevli *XPC*, *XPG* ve *XPF* genlerinin *Drosophila*'daki ortologları sırasıyla *Xpc*, *mus201* ve *mei-9*'dur (Sekelsky 2017). *XPC* ailesine ait genler başta UV ışınlarının yarattığı DNA hasarlarının onartılmasında görev alan NER sisteminde *RAD* ve *ERCC* gen aileleri ile birlikte çalışmaktadır. xeroderma pigmentosum hastaları UV'nin indüklediği cilt kanserlerine karşı normal insanlara göre 2000 kat daha fazla hassasiyet gösterirler (Shimamoto vd. 1995). ROS gibi endojen kaynaklardan türeyen DNA lezyonlarının çoğunun onarımından sorumlu başlıca tamir yollarından biri baz kesip çıkarma yolağıdır (BER) (Markkanen 2017). Bir memeli hücresi günde tahmini 10000 adet baz değişiklikleri ve tek zincir kırıkları gibi DNA hasarı ile karşılaşmakta ve bu hasarlar büyük oranda BER sistemi ile etkisiz hale getirilmektedir (Almeida ve Sobol 2007). *APE1*, *XRCC*, *Fen1* ve *Lig1* ve *PCNA* *Drosophila* ve insan arasında korunmuş olan BER sistem genleridir. Bu çalışma kapsamında NER ve BER sistemlerine ait 13 adet gen çalışılmıştır (Çizelge 2.5 ve Çizelge 3.5).

Yanlış eşleşme tamir sistemi genomik stabilitenin korunmasında önemli rol oynayan ve evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş bir yoldur. DNA replikasyonu ve rekombinasyonu sırasında oluşan baz uyumsuzlukları ve insersiyon/delesyonun tamirinde çalışan bir sistemdir. Ayrıca hücrelerde DNA hasarının tespitinde ve tamir yollarının uyarılmasında sinyalizasyonda görev almaktadır (Li 2008)(Li 2008). Pek çok ökaryotta MMR başlatıcı kompleksleri *MSH2-MSH6* (yanlış eşleşme bölgelerinde) ve *MSH2-MSH3* olarak iki set halinde çalışmaktadır. *Drosophila*'da *MSH2* ortoloğu *spellchecker1/spell* geni tarafından kodlanır (Sekelsky 2000; Song 2005; Sekelsky 2017; Kovalchuk ve Kovalchuk 2021). *Spell* mutalarının metilmetan sülfonat MMS, gama radyasyona karşı hassas oldukları belirlenmiştir. Somatik mutasyon ve kromozomal alterasyonların birikimi sonucu oluşan kanser tiplerinde MMR sisteminin eksikliği

gözlenmektedir. *Spell* mutatlarının metilmetan sülfonat MMS, gama radyasyon indüklü DNA hasarına karşı hassas oldukları belirlenmiştir (Flores ve Engels 1999). Mikrosatellitler genomun farklı noktalarında bulunabilen nükleotid tekrar dizileridir. Kritik büyüme düzenleyici genlerin ekzonlarında mikrosatelit bölgeleri bulunmaktadır ve çerçeve kayması mutasyonlarından etkilenecek çeşitli tümörlerin oluşumunu tetikleyebilmektedir. İnsanda mikrosatelit bölgelerindeki dengesizlik sonucu *ACVR2* geninde çerçeve kayması mutasyonları oluşması ve yanlış eşleşme tamir sistemindeki kusurlar sonucu kolon kanseri tümörleri oluşmaktadır (Chung vd. 2010). *Punt/put* geni *Drosophila*'da orta bağırsağın homeostazında görevlidir ve insan *ACVR2* geni ile homoloji göstermektedir (Gesualdi ve Haerry 2007). Bu çalışma kapsamında MMR sistemine ait 7 adet gen çalışılmıştır (Çizelge 2.4 ve Çizelge 3.5).

Çift zincir kırıkları, ROS'ların DNA'ya verdiği zararlar ve UV veya iyonize radyasyon stres kaynakları sonucunda DNA hasarı oluşabilmektedir. Bu faktörlerle baş edebilmek için bakteri, maya, *Drosophila* ve memeliler arasında yüksek oranda korunmuş DNA tamir sistemleri bulunmaktadır (Andersen vd. 2009). Çift zincir kırıkları, genomik kararsızlığın temel nedenlerinden biri olup, mutasyonlar, kanser gelişimi, hücre ölümü ile doğrudan ilişkilidir. Çift zincir kırıkları tamirinde (DSBR) ökaryotlarda yüksek oranda korunmuş iki önemli mekanizma vardır. Bunlar; homolog olmayan uç birleştirme (NEJR) ve homolog rekombinasyondur (HR) (Le Guen vd. 2015). Çift zincir kırıklarının tamirinde *BRCA2*, *RAD51*-ilişkili homolog rekombinasyonu yönetmektedir. *BRCA2* yokluğunda hataya açık şekilde sentez tamamlanmaktadır ve kanserleşme süreçleri harekete geçmektedir. DSBR ve ilişkili süreç bileşenleri/komponentleri memeliler ve *Drosophila* arasında iyi korunmuştur. *Drosophila rad51/spindle (dmrad51)* insan *RAD51* geni ile yüksek sekans benzerliği göstermektedir. *Dmrad51* mutant sinekler Xray ışınlarına ve MMS'ye karşı hassasiyet göstermektedir (Brodsky vd. 2004). *Rad51* homolog rekombinasyon tamir sisteminde DNA'nın serbest halde bulunan tek iplikli 3' ucunu tanır ve bağlanır. Hasarlı bölgenin rekombinasyonunda görev alır (Anderson 2009). DNA zincirleri arasındaki çapraz bağlanmaların son derece yüksek sitotoksik ve mutajenik sonuçları olmaktadır. Fankoni anemi bu bozuklukla karakterize edilmiş nadir görülen bir genetik olgu olup hastalarda genomik kararsızlık ve artan kanser riski gözlenmektedir. *FANCD* gen alesi ökaryotlarda yüksek oranda korunmuş DNA tamir sistemi elemanlarından. Homolog rekombinasyon tamirinde *FANCD2*, *Brca2* ve *Rad51* ile kompleks oluşturarak DNA polimerazın aktivitesini sağlamaktadır (Timmers vd. 2001; Marek vd. 2008). *Hus1-like* hücre döngüsünün S fazında DNA hasar kontrol noktasında çift zincir kırıklarının tanınmasında kritik rol almaktadır (Shaposhnikov vd. 2015). Bu çalışma kapsamında çift zincir kırıkların tamir sistemine ait 10 adet gen çalışılmıştır (Çizelge 2.5 ve Çizelge 3.5).

Ökaryotik hücrelerde DNA sentezinin gerçekleşmesi için çok sayıda DNA polimeraz çalışmaktadır. DNA sentezi için translezyon (TLS) sentezi ve DNA tamiri için özelleşmiş DNA polimerazlar gereklidir. TLS sistemi replikasyon sırasında görülen önceki kalıntı DNA lezyonlarının replikasyon sürecinin bozulmadan bypass edilmesini sağlamaktadır. *Zeta*, *eta*, *Rev1* bazı özel TLS polimerazları arasında yer almaktadır. Polimeraz *eta* UV radyasyon sonucu oluşan siklobütan pirimidin dimerlerinin, 7,8-dihidro-8-oxyguanine lezyonlarının ve abazik bölgelerinin kontrolünün atlanmasını sağlamaktadır. *Rev1* deoksitil transferaz olarak görev alır. Kalıp DNA olmadan bir veya iki dCTP ekleyebilmektedir. DNA polimerazlar 1990'larda klonlanmaya başlanmış olup

2000'lerde *Drosophila* genom sekansının oluşmasıyla tamamlanmıştır. *Eta/PolH* mutantları UV radyasyona karşı aşırı hassasiyet göstermektedirler. Ayrıca *polH* çift zincir kırıkların tamirine de katkı sağlamaktadır. İnsanda UV ışın sonucu oluşan xeroderma pigmentosum ve cilt kanseri tiplerinde *polH* mutasyonu gözlenmektedir (Marygold 2020). Bu çalışma kapsamında DNA polimerazların regülasyonlarını sağlayan çok sayıda gen çalışılmıştır (Çizelge 2.4 ve Çizelge 3.5).

ATM ve *ATR* genleri mayadan insana kadar korunmuş olup, tüm DNA tamir yollarının merkezinde görev almaktadır. Ek olarak hücre döngüsü kontrol noktalarında ve *p53* ile birlikte apoptoz yollarında görev almaktadırlar (Bi vd. 2005). Bunun yanında *ATM-ATR* sistemi mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olan telomer füzyonunun önlenmesinde görev almaktadır. Telomeri koruma fonksiyonu insan ve *Drosophila*'da korunmuş *ATM*, *ATR*, *p53* ve *Rad* gen aileleri görev almaktadır (Song vd. 2005). *Drosophila*'da *Mei-41* tam olarak kopyalanmamış veya hasar görmüş DNA varlığında hücre döngüsü ilerlemesini geciktiren evrimsel olarak korunmuş bir kontrol noktasının bileşenleridir. Bunun yanında *Drosophila* göz disklerinde yapılan incelemelerde *mus304*'ün de kontrol noktalarında çalışan genlerden biri olduğu belirlenmiştir (Lee ve Orr-Weaver 2003). Bu çalışma kapsamında *ATM-ATR* sinyal yolları, hücre döngüsü kontrol noktaları ve apoptozda görevli 24 adet gen çalışılmıştır (Çizelge 2.4 ve Çizelge 3.5).

Bu çalışmada küre formu nHA 25 ppm'lik konsantrasyonda *Mlh1* ve *Brca2* genlerinde, 200 ppm'lik konsantrasyonda *Mlh1* geninin ifadesinde artışa neden olmuştur. Çubuk formu nHA 25 ppm'lik konsantrasyonda *mus101* ve *Mlh1* genlerinin ifadesinde artışa neden olurken 200 ppm'lik konsantrasyonda anlamlı artış gözlenmemiştir. *Mlh1* geni, endonükleaz aktivitesine sahip MutLalpha kompleksinin çalışmasında görev aldığı düşünülen ve yanlış eşleşme tamirinde görev alan bir gendir (Jiricny 2006; Vimal vd. 2019). *Mlh1* geni nokta mutasyonlarının onarılmasında yanlış eşleşme tamir sisteminde çalışmaktadır (Sia vd. 2020). Bu çalışmada küre formun her iki konsantrasyonunda ve çubuk formun düşük konsantrasyonunda *Mlh1* geninin ifadesi artmıştır. *Drosophila*'da yapılan genotoksite testlerinde küre formda SMART yöntemi ile toplam klon parametresinde artış gözlenmiştir. Rekombinasyon, delesyon, nokta mutasyonu ve ayrılmanın araştırıldığı SMART yönteminde gözlenen bu genotoksitenin nokta mutasyonlarının sebep olabileceğini göstermektedir. *Brca2* geni homolog rekombinasyon tamir sisteminde ve mitotik hücrelerin bölünmelerinde hücre döngüsü kontrol noktalarında görev almaktadır (Lee vd. 1999). *Drosophila* KOMET testinden elde edilen bulgulara 25 ve 200 ppm'lik konsantrasyonlarda istatistiksel açıdan anlamlı genotoksik etki saptanmamıştır. Bu durum DNA'da iplik kırıklarının meydana gelmediğini göstermektedir. Bu nedenle *Brca2* genindeki artışın homolog rekombinasyon tamirindeki görevinden ziyade hücre döngüsü kontrol noktasındaki aktivitesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca hücre döngüsü kontrol noktasında görevli olan bir başka gen *mus101*'in ifadesi de istatistiksel olarak anlamlı şekilde artması bu durumu destekler niteliktedir.

Küre formda 25 ppm'lik dozda *spell*, *Rad51C*, *dap*, *MCPH1*, *Rad51D*, *Rad1*, *Pms2*, *mu2*, *Sir2* genlerinde, 200 ppm'lik dozda ise *Fen1*, *Rad9*, *Fancd2*, *Rad51C*, *Hus1-like*, *dap*, *DNA-ligI*, *MCPH1*, *Rad51D*, *Ercc1*, *Rev1*, *Pms2*, *tefu*, *RpLP2* genlerinde azalma meydana gelmiştir. Küre formun 25 ppm ve 200 ppm'lik dozunda yanlış eşleşme tamir sisteminde ait genlerde hem artma (*Mlh1*) hem de azalma gözlenmiştir (*spell* ve

Pms2). *spell* ve *Pms2* genlerinde meydana gelen düşüş ve SMART testinde gözlenen mutasyon indüklü toplam klon sayısındaki artış yanlış eşleşme tamirinin düzgün çalışmadığını göstermektedir. Taverna vd. (2000) 60 farklı tümör hücre hattında *Mlh1* ve *Msh2* (*Drosophila* ortoloğu *spell*) genlerinin farklı ifade değerleri gösterdiğini belirlemişlerdir. Çalışmada yanlış eşleşme tamir sistemindeki bozuklukların tümörlü dokuların hayatta kalma oranını etkilediği belirlenmiştir. *Rad9*, *Rad1* ve *Hus1* genlerinin oluşturduğu kompleks 9-1-1 adını almakta ve DNA hasarından sonra kontrol noktası sinyal yollarını düzenleyen bir komplekstir. Bu genlerde meydana gelen azalma DNA hasarının varlığını sürdürmesine neden olmuştur. Bu durumun sonuçları da SMART testinde artan klon sayılarında gözlenmektedir. Apoptotik yollarda görev alan genler *dap*, *sir2* ve *tefu*'nun küre formu nHA uygulamalarında ifadelerinin azaldığı belirlenmiştir. Belirtilen 3 gen de apoptozun baskılanmasında görev almaktadır. Kaspaz sonuçların elde edilen verilerde yüksek dozda hem içsel hem de dışsal apoptotik yolların çalıştığına işaret etmektedir. Apoptozu baskılayan genlerin ifadesinin azalması ve kaspaz aktivitelerinin artması küre formu nHA'ların apoptozu indüklediğini göstermektedir.

Çubuk formda 25 ppm'lik konsantrasyonda *spell*, *Fen1*, *PCNA*, *Rad51C*, *dap*, *CG9601*, *MCPH1*, *Rad51D*, *Ercc1*, *Rev1*, *Pms2*, *mu2*, *Sir2*, *RpLP2*, *stg* genlerinde, 200 ppm'lik konsantrasyonda ise *Xpac*, *spell*, *Fen1*, *Rad9*, *Tbp*, *Cdk7*, *DNApol-eta*, *Fancd2*, *XRCC1*, *Rad51C*, *Hus1-like*, *Ogg1*, *dap*, *DNA-lig1*, *CG9601*, *mei-41*, *MCPH1*, *put*, *Rad51D*, *Rev1*, *Rad17*, *Rad1*, *Pms2*, *mu2*, *tefu*, *RpL32*, *Sir2*, *RpLP2*, *stg* ve *SdhA* genlerinin ifadelerinde azalma meydana gelmiştir. *Rad51D* zincir kırıklarının tamirinde homolog rekombinasyon tamirinde görev almaktadır (Bozas vd. 2009). *Drosophila* hemositlerinde yapılan KOMET sonuçlarına bakıldığında kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinde 25 ve 200 ppm'lik konsantrasyonlarda tek zincir kırıklarının oluşmadığı gözlenmektedir. Tek ve çift zincir kırıklarının tamirinde görev alan *Xpac*, *Ercc*, *CG9601*, *Rev1*, *Rad51C*, *Rad51D*, ve *mu2* genlerinin ifadesi de çubuk formu 25 ve 200 ppm'lik konsantrasyonda azalmıştır. *Drosophila* larvalarında yapılan kaspaz aktiviteleri incelendiğinde 200 ppm'lik konsantrasyonlarda her iki formda ve tüm kaspazlarda (Kaspaz-3/7'deki 200 ppm'lik konsantrasyon haricinde) istatistiksel olarak anlamlı aktivasyon gözlenmiştir. Yapılan gen ifadeleri analizine göre çubuk formu nHA'ların 25 ve 200 ppm'lik konsantrasyonlarında *tefu*, *sir2*, *dap* geninde azalma meydana gelmiştir. *tefu*, *ATM* homoloğu olup DNA çift zincir kırıklarının tamiri için hücre döngüsünü durdurmakta ve hücrenin apoptoza gitmesine engel olabilmektedir (Pedersen vd. 2010; Joyce vd. 2011). *dap* geni ise *p53* ilişkili apoptozun baskılanmasında görev almaktadır ve gen ifadeleri analizinde azalma göstermiştir (Fan vd. 2010). Küre forma benzer olarak çubuk formda da apoptozu baskılayan genlerin inhibe edildiği bunun yanında kaspaz aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar küre ve çubuk formu nHA'ların içsel ve dışsal apoptotik yollar aracılığı ile apoptoza neden olduğunu göstermektedir. Apoptozu tetikleyen mekanizmaların tam olarak aydınlatılması için ileri düzeyde yapılacak olan çalışmalar gerekmektedir.

Günümüzde nanomateriyallerin potansiyel toksik etkileri tartışma konusu olmakta ve üretilen biyomalzemelerin güvenilirliğinin belirlenmesi için farklı test sistemleri ile çalışmalar yapılması gerekmektedir. Doku mühendisliği uygulamalarındaki önemli bir konular nHA'ların hedef ve çevre dokular arasındaki etkileşimi ve potansiyel toksik etkileridir. Nanomalzemelerin boyutu, konsantrasyonu ve morfolojik özellikleri bu

toksosite mekanizmalarını tetikleyebilmektedir. Bunun yanında farklı hücre tiplerinde NP'lere karşı farklı seviyelerde toksik yanıt oluşabilmektedir (Zhou vd. 2013)

Nanotoksikoloji çalışmalarında çeşitli vücut dokularına özgü hücre hatları ile araştırmalar yapılmaktadır. Epitel hücre hatları insan vücudunda birçok doğal bariyerin temelini oluşturduğu için bu çalışmalar arasında yerini almaktadır (Clift vd. 2011) Buna karşın nHA'ların epitel doku üzerindeki potansiyel toksisitesini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Böbreklerde oluşan taşların %80'ini kalsiyum bileşikleri ve HA'lar oluşturmaktadır (Liu vd. 2013). Bu nedenle böbrek epitel hücrelerinde HA'ların potansiyel toksik etkileri araştırılmaktadır. Escobar vd. (2007) sıçan böbrek epitel hücrelerinde (NRK-52E) $67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ - $133 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ yoğunluğundaki HA varlığında hücrelerde oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve apoptotik etki saptanmıştır. (Sun vd. 2020) HK-2 hücrelerinde 40-200 nm boyut aralığındaki HA'ların oksidatif strese, mitokondrial membranda bozukluklara, hücre içi kalsiyum seviyesi değişimlerine ve nekroza neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Anjiyogenez dokuların büyümesi, gelişmesi ve onarımında anahtar rol oynamaktadır. Biyomalzemelerin hedef doku ile başarılı bir şekilde etkileşime girebilmesi için anjiyojenik sinyal yollarını ve bazı önemli büyüme faktörlerini düzenleyebilme yeteneğinin olması gerekmektedir. nHA'ların kan damarlarının oluşumu, canlılığı, morfolojik yapıları ve işlevselliğinin sürdürülmesinde olumlu katkıları bulunmaktadır (Pezzatini vd. 2007). nHA'ların kan hücreleri ve vasküler sistemdeki hücreler üzerindeki etkileşimi ve olumsuz etkileri, nHA'ların vasküler hastalık riskini artırabileceğini ve kan dolaşımı yoluyla organizmadaki ana dokulara potansiyel olarak zarar verebileceğini düşündürmektedir (Wang vd. 2016).

nHA'ların yüzey morfolojisi ve partikül boyutları kemik gelişimini etkileyebilmektedir (Tavakol vd. 2012). Farklı hücre hatlarında nHA'ların hücre çoğalması üzerine etkileri değişiklik gösterebilmektedir (Bal vd. 2020). Osteoblast, fibroblast ve endotelyal hücre hatlarında karşılaştırmalı olarak nHA ve mikro boyutlu HA'ların hücre canlılığına olan etkileri Webster vd. (2020) tarafından araştırılmıştır. Hücre canlılığı en fazla osteoblast hücre hattında gözlenmiş olup bunu fibroblast ve endotelyal hücre hatları takip etmiştir. Boyutsal olarak bakıldığında ise osteoblastlarda nHA'nın hücre canlılığına olumlu etkisi bulunurken fibroblast ve endotelyal hücre hatlarında bu durumun aksine hücre canlılığı azalmaktadır.

Bu çalışmada 293T hücre hattında (insan embriyonin böbrek hücre hattı) küre formu nHA'ların mitokondrial dehidrojenaz enzim aktivitesine bağlı olarak çalışan WST-1 testinde sitotoksositeye neden olmadığı gözlenmiştir. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda 400, 600, 800 ve 1000 ppm'lik konsantrasyonlarda hücre canlılığının istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0.000$) şekilde arttığı kaydedilmiştir. Çubuk formda 400, 600, 800 ve 1000 ppm'lik konsantrasyonlarda hücre canlılığı 24 ($p<0.000$), 48 ($p>0.5$) ve 72 ($p>0.01$) saatlik inkübasyonlarda hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çubuk formu nHA'ların hücre canlılığını küre forma göre daha olumsuz etkilediği belirlenmiştir. HUVEC hücre hattında (İnsan endotel hücre hattı) yapılan incelemelerde hem küre hem de çubuk formdaki tüm nHA inkübasyonlarda hücre canlılığındaki istatistiksel olarak anlamlı artışın daha düşük dozlarda başladığı gözlenmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı artan hücre canlılığı küre

formda 200 ppm ($p>0.05$), çubuk formda 25 ppm ($p>0.01$)'lik konsantrasyonlarda gözlenmeye başlamıştır.

Tripan mavisi testi ile elde edilen sonuçlarına göre 293T hattında çubuk formda 24 saatte 1000, 600, 400, 200, 100, 50 ve 25, 48 saatte 800, 600, 400, 200, 50 ve 25 ppm, 72 saatte 400, 200, 50 ve 25 ppm'lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki gözlenmiştir ($p<0.000$). Elde edilen sonuçlara göre inkübasyon süresi arttıkça sitotoksik etkinin azaldığı gözlenmektedir. Çubuk formdaki sitotoksik etki incelendiğinde 24 saatte 1000, 800, 600 ve 50 ppm 48 saatte 400 ppm, 72 saatte 1000 ppm'lik konsantrasyonda istatistiksel açıdan anlamlı sitotoksik etki saptanmıştır ($p<0.000$). Küre forma benzer olarak çubuk formda da inkübasyon süresi arttıkça sitotoksik etkinin azaldığı gözlenmektedir. HUVEC hücre hattı ile yapılan değerlendirmede 24 saatte hem küre hem de çubuk formda anlamlı sitotoksik etki gözlenmemiştir. 48 saatte yalnızca küre formda 800 ve 1000 ppm, 72 saatte küre formda 800 çubuk formda 1000 ppm'lik konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki tespit edilmiştir ($p<0.000$).

Elde edilen verilere göre tripan mavisi testinde epitel hücrelerin endotel hücrelere göre nHA'ya karşı daha hassas olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar tez çalışması kapsamında kullanılan iki farklı hücre canlılık testinin birbiri ile korelasyon göstermediğini ortaya koymaktadır. Pek çok çalışmada potansiyel sitotoksitenin belirlenmesi için farklı test sistemleri bir arada kullanılmaktadır. İki test sistemi arasında hücresel organel hasarındaki özgülük bakımından farklar bulunmaktadır. WST-1 testi mitokondriyal bozukluklardan veya hasarlardan dolayı oluşabilecek ölümü gösterirken tripan testi için organel bazında özgülük söz konusu değildir (Seth vd. 2004). mavisi testinde elde edilen sonuçlar nekrotik yollar sonucunda gözlenen ölümü gösterebilmektedir (Cummings ve Schnellmann 2004). İki farklı hücre canlılık testinde gözlenen sonuçlar arasındaki farklılık ajanların farklı hücre ölüm yollarını tetikleyerek ölüme neden olduğunu düşündürmektedir. Bu konunun aydınlatılması için hücre ölüm yollarının belirleneceği ileri düzey moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Musa vd. (2012) insan akciğer fibroblast (MRC-5) hücrelerinde 0.00005 g/mL-0.1 g/mL konsantrasyon aralığındaki nHA-silika kompozitinin doza bağlı olarak artan sitotoksositeye neden olduğunu belirlemişlerdir. Ek olarak çalışmada KOMET testi ile yapılan genotoksosite değerlendirmesinde istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarı saptanmamıştır. Milhan vd. (2017) insan osteoblast benzeri hücre hattında (MG63) 0.25-1 mm boyutlarındaki HA'ların MTT testi ile sitotoksositeye neden olmadığını, mikronukleus testi ile de genotoksik potansiyeli bulunmadığını belirtmişlerdir. Coello vd. (2019) nHA süspansiyon ve süpernatantının birbirleriyle karşılaştırılmasında 200 ppm in metabolik aktivite apoptotik indeks ve sitotoksitede anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bunun yanında 2, 4 ve 6 saatlik uygulamalarda ROS seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmemiştir. Prado vd. (2021) yaptıkları çalışmalarında fare osteoblast hücre hattında (MC3T3) 24 saatlik inkübasyon süresinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki gözlenmezken 72 ve 144 saatlik inkübasyon sürelerinde anlamlı sitotoksosite tespit edilmiştir. Yukarıda verilen bilgilere göre farklı hücre hatları ile yapılan çalışmalarda nHA'ların mitokondriyal aktivitede bozukluklarına bağlı olarak sitotoksik potansiyelinin bulunduğu görülmektedir. Yukarıda verilen çalışmalarda nanopartiküllerin karakterizasyon analizleri detaylı şekilde verilmemiştir. Bu durum nanopartiküller arasındaki toksiste mekanizmalarının tartışılmasında güçlük yaratmaktadır. NP'lerin genotoksosite mekanizmaları, parçacıkların boyut ve şekil gibi

karakteristik özellikleri ile yakından ilişkilidir (Doak ve Dusinska 2017). Bu nedenle nanotoksikoloji çalışmalarında parçacıkların karakterizasyonlarının yapılması etkili ve doğru toksisite değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir.

Ding vd. (2012) fare fibroblast hücre hattında (L929) 24 saatlik inkübasyon süresinde 50 nm'den büyük ve küçük nHA'ların sitotoksitesini MTT testi ile değerlendirmiş ve boyut arttıkça sitotoksik etkinin azaldığı belirlenmiştir. İnsan lenfositlerinde yapılan başka bir çalışmada 10-50 nm boyutlarındaki çubuk yapılı nHA'ların 5-1000 ppm doz aralığındaki uygulaması sonucunda 300, 500 ve 1000 ppm LDH miktarında artışa, MTT testi sitotoksositeye neden olmuştur (Turkez vd. 2014). Bu tez çalışması kapsamında yapılan WST-1 verileri ile farklı nanoboyutların sitotoksik mekanizmalarını etkilediği desteklenmektedir. Özellikle 293T hücrelerinde yapılan incelemeler çubuk formda bir diğer deyişle büyük boyutlarda küçük boyutlara göre hücre canlılığındaki istatistiksel olarak anlamlı artışın azaldığı gözlenmektedir. Bu durum NP'lerin küçük boyutlarda sitotoksik etkisinin artmasının bir kanıtı olarak gösterilebilmektedir.

Fare osteoblast hücre hattında (MC3T3-E1) çubuk formu 20-80 nm nHA'ların 10, 20, 30 ve 40 ppm'lik konsantrasyonlarında 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) sitotoksikite, ROS ve SOD artışı, 40 ppm'de apoptoz ve DNA hasarında artış gözlenmiştir (Jin vd. 2016). Oksidatif stres ve apoptotik artışın hem mitokondrial hem de lizozomal hasar sonucu olduğu tespit edilmiştir. Osteoblastlar kemik gelişiminde mineralizasyonun sağlanması amacıyla fazla sayıda lizozom içermektedir. Elde edilen bu sonucun endositoz ile hücre içine giren ve lizozomlarda biriken küçük boyutlu nHA'lar tarafından indüklenmiş olabileceği düşünülmektedir (Iwayama vd. 2019).

Hücre kültüründe yapılan KOMET testinde 293T hücrelerinde küre formda incelenen her üç parametrede de (kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk moment) doza bağlı olarak azalan DNA hasarı gözlenmiştir. Çubuk formda ise 24 saatte doza bağlı olarak DNA hasarının arttığı gözlenirken bu etkinin 72 saatte doza bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. HUVEC hücre hattında küre formda en yüksek DNA hasarı 24 saatte gözlenmiştir. Buna ek olarak tüm inkübasyon sürelerinde DNA hasarının indüklendiği saptanmıştır. Küre forma benzer olarak çubuk formda da en yüksek DNA hasarı 24 saatte görülmüş olup kuyruk moment parametresinde doza bağlı olarak azalmıştır.

KOMET testi ile nHA genotoksik potansiyeli araştırılan bir çalışmada hamster akciğer fibroblast hücre hattında (V79) doza bağlı olarak artan DNA hasarı gözlenmiştir (Jantova vd. 2008). Opacic-Galic vd. (2013) üç farklı donörden aldığı insan periferik lenfositlerinde KOMET yöntemi ile küre ve oval formu 117-477 nm boyutlarındaki silikat-HA'ların genotoksitesini 0.05-50 mg/mL doz aralığında düşük genotoksik etki gözlemlenmiştir. Turkez vd. (2014) insan lenfositlerinde 10-50 nm boyutlarındaki çubuk yapılı nHA'ların genotoksik etkisini 5-1000 ppm aralığında çalışmış ve 500 ppm'lik dozda kromozomal aberasyonlar, mikronukleus ve kardeş kromatid değişimi gözlenmiştir. Sonmez vd. (2016) 30 ve 100 nm boyuttaki HA'ların toksisitesini primer rat hepatosit hücre hattı ile çalıştıkları çalışmada DNA eklentileri miktarı, kromozomal hasar ve oksidatif stres parametreleri değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlara göre artan boyutlarda hücre canlılığının azaldığını, 8-OH-dG miktarını, kromozomal hasarı ve

oksidatif stresin arttığı gözlemlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı hücre hatları ile yapılan genotoksisite değerlendirmelerinde nHA'ların genetik hasar yaratma potansiyelinin olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda hem 293T hem de HUVEC hücrelerinde farklı inkübasyon sürelerinde küre ve çubuk formu nHA indüklü DNA hasarı yapılan çalışmaları destekler niteliktedir.

nHA'ların boyutlarından dolayı yol açabildiği toksik etkilerin yanında farklı şekil formlarındaki nHA'ların da toksik potansiyellerinin araştırılması önem taşımaktadır. Rat osteoblast hücre hattında yapılan *in vitro* çalışmada 4 farklı nHA türünün (iğne, yuvarlak, ince çubuk ve uzun çubuk şeklinde) (10-40 nm) (20-100 mg L⁻¹) apoptotik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda doza bağlı olarak artan sitotoksisite ve apoptoz gözlenmiştir. Bunun yanında toksik etkinin en çok iğne şeklindeki partiküllerde, en düşük de uzun çubuk yapıdaki NP'lerde gerçekleştiği gözlenmiştir (Xu vd. 2012). Osteoblast primer hücre kültüründe kısa çubuk ve mikro küre formlarındaki nHA'ların ROS artışına sebep olduğu ve bunun yanında komet testi ile DNA hasarına neden olduğu belirlenmiştir (Dai vd. 2014). Rao vd. (2014) böbrek epitel hücrelerinde (HK-2) küre, iğne, çubuk ve plaka formlarındaki HA'ların 63-500 ppm aralığındaki tüm dozlarında sitotoksite, ROS ve LDH seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bunun yanında hücre morfolojilerinde bozulma ve Annexin V testi ile nekroz tespit edilmiştir.

nHA'lar mikro boyutlu HA'lara göre daha geniş yüzey alanı ve mekanik güç, daha biyoaktif yapıda olmaktadır. Ayrıca hedef dokuya yapısal ve fonksiyonel olarak daha etkili şekilde bağlanmaktadır. Hedef dokudaki biyoaktivasyon açısından daha fazla Ca salınımı gerçekleştiren nHA öne çıkmaktadır (Webster vd. 2000). Han vd. (2012) HA yüzeyinde yapılan yüzey yükü modifikasyonlarının hücrelerle olan etkileşimi etkilediğini belirlemişlerdir. Kültür ortamında erkek tavşanlardan alınan kırmızı kan hücrelerinin negatif yüklü HA'lar tarafından yayılımının engellendiği tespit edilmiştir. nHA'lara yapılan heparin modifikasyonu ile parçacıklar pozitif yüklü hale getirildiğinde hücre yayılımının arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada hem *Drosophila*'da *in vivo* yürütülen deneylerde hem de 293T ve HUVEC hücreleri ile birlikte *in vitro* ortamda yürütülen araştırmalarda küre formu nHA'nın potansiyel toksisitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Nanopartiküllerin toksisitelerinin değerlendirilmesinde boyut farklılıklarının önemli bir faktör olduğu literatürde yapılan diğer çalışmalarla da korelasyon göstermektedir (Park vd. 2011; Kaygisiz ve Cigerci 2017; Sukhanova vd. 2018). NP'lerin hücre içine girişi hücre y ve partikül yapısına bağlı olarak değişmekle birlikte küçük boyutlu partiküllerin hücre içine girişi daha kolay olduğundan toksisite yaratma potansiyeli de yüksektir. HA'ların boyut, şekil ve sentez süresinde sahip olduğu özellikleri biyolojik tepkiler üzerine etki etmektedir. Hücrelerin nHA'ları tanıması ve tepki mekanizmalarının belirlenmesi ile ilişkili verilerin elde edilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Yousefi vd. 2014).

nHA'ların etkilerinin *in vitro* koşullarda araştırıldığı bir çalışmada insan karaciğer kanser hücre hattında (BEL-7402) 20-200mg/L dozlarında hücre büyümesini inhibe ettiği ve apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (Liu vd. 2003). Fu vd. (2005) insan kemik tümörü hücre hattında (U-2 OS) nHA'nın hücre proliferasyonunu mikro boyutlu HA'lara göre daha etkin şekilde inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. HA'lar Ca salınımı yapmaktadır ve kanserli hücreler ortamdaki Ca iyonu varlığından etkilenmektedir. Kanserli hücre yüzeyinde artan kalmodulin reseptörleri ile hücre içine Ca girişi gerçekleşmektedir. Artan

Ca seviyesi hücre ölümüne neden olarak kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyebilmektedir. Kemikten tümörlü dokunun uzaklaştırılmasından sonra nHA uygulaması yapılması hem kemik gelişimine katkı sağlamakta hem de yeni tümörlü dokusunun önüne geçilmesini sağlayabilmektedir. nHA'ların insan umbilikal kordon kanından elde edilen kök hücreleri osteoblast hücre hatlarında yapılan RT²-PCR ile yapılan gen ifadeleri analizinde osteoblast gelişimi ile ilişkili *RUNX2*, *ALP*, *Osteonectin* ve *Osteocalcin* gen ifadelerinde kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir (Tavakol vd. 2012).

nHA'lar medikal kullanımlarının yanında sucül ve karasal sistemlerden, atıksulardan ağır metal kirliliğinin giderilmesinde de kullanılmaktadır (Corami vd. 2007). Bu nedenle çevredeki potansiyel toksisitesinin değerlendirilmesi amacıyla bitkilerde nHA uygulamaları yapılmaktadır (Ramesh vd. 2007; He vd. 2013). Huang vd. (2017) kadmiyum prinç kök uçlarına 20 ve 40nm boyutundaki nHA uygulamış ve TEM incelemelerinde nHA'ların hücre içine girdiklerini belirtmişlerdir. Jin vd. (2016) kontamine topraklarda fitoremediasyon yöntemi ile nHA'ların kurşunun topraktan uzaklaştırmada etkili olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmaların toprak veya sudaki belirli bir kontaminantı elemine etmek için HA kullanıma yönelik olduğu gözlenmektedir. Ancak NP'lerin de bir çevresel kirletici olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu materyalin veya kalıntılarının organizmalar için potansiyel risk oluşturduğu göz önünde bulundurulmalıdır (Baalousha vd. 2016; Patil vd. 2016).

6. SONUÇLAR

Biyomalzemeler, hücreler ve sinyal molekülleri ile birlikte doku mühendisliğinin temel bileşenleri olarak kurulmuştur. Son yıllarda, fizik, kimya ve biyoloji disiplinlerinin bir araya geldiği araştırmalarda biyomalzemelerin geliştirilmesinde önemli aşamalar kat etmiştir. Yüzey topografyası, gözeneklilik, malzeme sertliği, hücre davranışı, malzemelerin genel kimyasal bileşimi, hedef doku yenilenmesini ve değiştirilmesi, malzemenin bozunabilirliği ve biyoaktivasyonu bu disiplinler arasında yürütülen çalışmalarla aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Kim vd. 2021).

Biyomalzemeler alanındaki yaklaşık 50 yıllık araştırma deneyimi hedef dokudaki biyoyumluluğun en önemli faktör olduğunu göstermiştir. Doku mühendisliği, diş hekimliği, rejenatif tıp, hedefe yönelik ilaç dağıtımı gibi kritik uygulamalarda hedef doku ile etkileşime girebilecek biyomalzemelerin üretimine ihtiyaç duyulmaktadır. Her geçen gün yeni verilerin elde edildiği bu alanda biyoyumluluk mekanizmalarının aydınlatılması ve cevaplanmamış soruların yanıtlanması amacıyla ileri düzey araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Mozafari 2020).

Bu çalışmadan elde edilen verilere göre *Drosophila* SMART deneyinde küre formu nHA'lar 50, 100 ve 200 ppm'lik konsantrasyonlarda toplam klon bakımından istatistiksel olarak anlamlı genotoksik etkiye neden olmuştur. *Drosophila* KOMET deneyinde 100 ppm çubuk ve küre formu nHA'lar istatistiksel olarak anlamlı genotoksik hasara sebep olmuştur. *Drosophila* kaspaz aktiviteleri deneyinde her iki nanoformlu HA'nında apoptotik sinyal yollarında bulunan kaskadların (Kaspaz-3/7, kaspaz-8, kaspaz-9) aktivitesini indüklediği belirlenmiştir. *Drosophila*'da gerçekleştirilen DNA tamir yollarında görevli genlerin analizinde toksisite değerlendirmesi yapılan testlerle olası ilişkiler kurulmuştur. Bu çalışma farklı DNA tamir sistemleri yollarında görevli 36 genin (*Brca2*, *Cdk7*, *CG9601/PNKP*, *dap*, *DNA-lig1*, *DNAPol-eta*, *Ercc*, *Fancd2*, *Fen1*, *Hus1-like*, *mei-41*, *Mlh1*, *Mus101*, *mu2*, *Ogg1*, *PCNA*, *Pms2*, *PNKP*, *put/punt*, *p53*, *Rad1*, *Rad17*, *Rad51C*, *Rad51D*, *Rad51D*, *Rad9*, *Rev1*, *RpLP2*, *Sir2*, *spell*, *stg*, *tefu/dATM*, *Xpac/Dxpa*, *XRCC1*) *in vivo* ortamda değerlendirildiği ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

Diğer taraftan, hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda 293T ve HUVEC hücrelerinde yapılan WST-1 ve tripan mavisi hücre canlılık testlerinde yapılan değerlendirmelerde farklı hücre ölüm yollarının nHA tarafından tetiklenebileceği hakkında bulgular sağlamıştır. Ayrıca hücre hatlarında yapılan DNA hasarı değerlendirmelerinde nHA'ların potansiyel genotoksik etkileri de ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar *in vivo* ve *in vitro* ortamda farklı test sistemlerinde küre ve çubuk formu nHA'ların toksik etkileri olduğunu göstermiştir. Bunun yanında nanopartikül şekil ve boyut gibi özelliklerinin bu toksisite mekanizmalarını farklı seviyelerde indüklediği de belirlenmiştir.

Yeni nesil tıbbi uygulamalarda biyoyumluluğun artırılması amacıyla seramik-seramik, seramik-polimer, seramik metalik gibi kompozit kaplamalar kullanılmaktadır. Gelecekte yapılacak olan araştırmalar kısa uzun vadede sitotoksik etki göstermeyen, antibakteriyel etkiye sahip, hücre çoğalmasını ve aktivasyonunu artıran, hedef doku ile uyumlu, mekanik olarak dirençli ve güçlü, çevre dostu ve ekonomik malzemelerin geliştirilmesine yönelik olacaktır (Zielinski ve Bartmanski 2020).

Bu çalışmadan elde edilen veriler nHA'ların insan sağlığı açısından risk oluşturma potansiyelini vurgulamaktadır. Elde edilen veriler doğrultusunda sol-jel yöntemi ile üretilen küre ve çubuk formu nHA'ların klinik uygulamalarda güvenli kullanımı için yeni stratejiler geliştirilmesi gerekmektedir. Sentez yöntemlerinde yapılacak olan yenilikler ve fonksiyonel grupların bağlanması gibi geliştirmelerle uzun ömürlü ve olası sorunların en aza indirildiği implantların kullanılması sağlanabilecektir.

Nanoteknoloji endüstrisi insan ve çevre sağlığını attırmak için her geçen gün yeni ürünler ortaya koyarken bu ürünlerin yaratabileceği potansiyel toksisitesinin de araştırılması oldukça önem taşımaktadır. Biyomalzemelerin insan açısından önemli kullanım alanları olması sebebi ile günümüzde biyomedikal uygulama alanlarını daha da yaygınlaştırmak, yeni biyomalzeme geliştirme veya mevcut biyomalzemelerin yapısını ve kompozisyonunu manipüle ederek kullanılabilirliğini ve güvenilirliğini daha da artırma üzerine yapılan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Biyomalzeme olarak kullanımı giderek yaygınlaşan nHA'ların farklı model organizmalar ve ileri moleküler düzeyde yapılacak olan çalışmalarla genotoksik ve kanserojenik etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T. J., Nielsen, M., Hussain, S. M. Rowe, J. J. 2010. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol Appl Pharmacol* 242(3): 263-269.
- Alaraby, M., Annangi, B., Marcos, R. Hernandez, A. 2016. *Drosophila melanogaster* as a suitable *in vivo* model to determine potential side effects of nanomaterials: A review. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* 19(2): 65-104.
- Aldaz, S., Escudero, L. M. Freeman, M. 2010. Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(32): 14217-14222.
- Almeida, K. H. Sobol, R. W. 2007. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)* 6(6): 695-711.
- Amini, S., Salehi, H., Setayeshmehr, M. Ghorbani, M. 2021. Natural and synthetic polymeric scaffolds used in peripheral nerve tissue engineering: Advantages and disadvantages. *Polymers for Advanced Technologies* 32(6): 2267-2289.
- An, J., Chua, C. K., Yu, T., Li, H. Q. Tan, L. P. 2013. Advanced nanobiomaterial strategies for the development of organized tissue engineering constructs. *Nanomedicine* 8(4): 591-602.
- Andersen, S. L., Bergstralh, D. T., Kohl, K. P., LaRocque, J. R., Moore, C. B. Sekelsky, J. 2009. *Drosophila* MUS312 and the vertebrate ortholog BTBD12 interact with DNA structure-specific endonucleases in DNA repair and recombination. *Mol Cell* 35(1): 128-135.
- Araujo, S. J. Kuraoka, I. 2019. Nucleotide excision repair genes shaping embryonic development. *Open Biol* 9(10): 190166.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M. Paknikar, K. M. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies. *Toxicol Lett* 179(2): 93-100.
- Arora, S., Rajwade, J. M. Paknikar, K. M. 2012. Nanotoxicology and *in vitro* studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology* 258(2): 151-165.
- Auerbach, C. 1949. Chemical Mutagenesis. *Biological Reviews* 24(3): 355-391.
- Augustyniak, M., Gladysz, M. Dziewiecka, M. 2016. The Comet assay in insects Status, prospects and benefits for science. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 767: 67-76.
- Baalousha, M., Yang, Y., Vance, M. E., Colman, B. P., McNeal, S., Xu, J., Blaszcak, J., Steele, M., Bernhardt, E. Hochella, M. F., Jr. 2016. Outdoor urban nanomaterials: The emergence of a new, integrated, and critical field of study. *Sci Total Environ* 557-558: 740-753.

- Baeg, E., Sooklert, K. Sereemaspun, A. 2018. Copper Oxide Nanoparticles Cause a Dose-Dependent Toxicity via Inducing Reactive Oxygen Species in *Drosophila*. *Nanomaterials (Basel)* 8(10).
- Bahadar, H., Maqbool, F., Niaz, K. Abdollahi, M. 2016. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran Biomed J* 20(1): 1-11.
- Bajpayee, M., Kumar, A. Dhawan, A. 2016. Chapter 1. The Comet Assay: A Versatile Tool for Assessing DNA Damage. *The Comet Assay in Toxicology*: 1-64.
- Bal, Z., Kaito, T., Korkusuz, F. Yoshikawa, H. 2020. Bone regeneration with hydroxyapatite-based biomaterials. *Emergent Materials* 3(4): 521-544.
- Barik, B. K. Mishra, M. 2019. Nanoparticles as a potential teratogen: a lesson learnt from fruit fly. *Nanotoxicology* 13(2): 258-284.
- Bartl, R. Bartl, C. 2017. Bone Disorders _ Biology, Diagnosis, Prevention, Therapy
- Bayer, F. E., Zimmermann, M., Preiss, A. Nagel, A. C. 2018. Overexpression of the *Drosophila* ATR homologous checkpoint kinase Mei-41 induces a G2/M checkpoint in *Drosophila* imaginal tissue. *Hereditas* 155: 27.
- Bermudez, V. P., Lindsey-Boltz, L. A., Cesare, A. J., Maniwa, Y., Griffith, J. D., Hurwitz, J. Sancar, A. 2003. Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4): 1633-1638.
- Besinis, A., Hadi, S. D., Le, H. R., Tredwin, C. Handy, R. D. 2017. Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings. *Nanotoxicology* 11(3): 327-338.
- Bexiga, M. G., Varela, J. A., Wang, F., Fenaroli, F., Salvati, A., Lynch, I., Simpson, J. C. Dawson, K. A. 2011. Cationic nanoparticles induce caspase 3-, 7- and 9-mediated cytotoxicity in a human astrocytoma cell line. *Nanotoxicology* 5(4): 557-567.
- Bhat, S. Kumar, A. 2013. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter* 3(3).
- Bi, X., Srikanta, D., Fanti, L., Pimpinelli, S., Badugu, R., Kellum, R. Rong, Y. S. 2005. *Drosophila* ATM and ATR checkpoint kinases control partially redundant pathways for telomere maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(42): 15167-15172.
- Bonilla-Represa, V., Abalos-Labruzzi, C., Herrera-Martinez, M. Guerrero-Perez, M. O. 2020. Nanomaterials in Dentistry: State of the Art and Future Challenges. *Nanomaterials* 10(9).
- Bonilla, B., Hengel, S. R., Grundy, M. K. Bernstein, K. A. 2020. RAD51 Gene Family Structure and Function. *Annual Review of Genetics*, Vol 54, 2020 54: 25-46.

- Boudemagh, D., Venturini, P., Fleutot, S. Cleymand, F. 2019. Elaboration of hydroxyapatite nanoparticles and chitosan/hydroxyapatite composites: a present status. *Polymer Bulletin* 76(5): 2621-2653.
- Bozas, A., Beumer, K. J., Trautman, J. K. Carroll, D. 2009. Genetic Analysis of Zinc-Finger Nuclease-Induced Gene Targeting in *Drosophila*. *Genetics* 182(3): 641-651.
- Brodsky, M. H., Weinert, B. T., Tsang, G., Rong, Y. S., McGinnis, N. M., Golic, K. G., Rio, D. C. Rubin, G. M. 2004. *Drosophila melanogaster* MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage. *Mol Cell Biol* 24(3): 1219-1231.
- Cai, Y. R., Liu, Y. K., Yan, W. Q., Hu, Q. H., Tao, J. H., Zhang, M., Shi, Z. L. Tang, R. K. 2007. Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. *Journal of Materials Chemistry* 17(36): 3780-3787.
- Cama, G. 2014. Calcium phosphate cements for bone regeneration. Biomaterials for Bone Regeneration. P. Dubruel and S. Van Vlierberghe. UK, Elsevier.
- Cao, Y., Gong, Y., Liu, L. L., Zhou, Y. W., Fang, X., Zhang, C., Li, Y. N. Li, J. 2017. The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an *in vitro* model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. *Journal of Applied Toxicology* 37(12): 1359-1369.
- Carmona, E. R., Inostroza-Blancheteau, C., Obando, V., Rubio, L. Marcos, R. 2015. Genotoxicity of copper oxide nanoparticles in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 791: 1-11.
- Carmona, E. R., Inostroza-Blancheteau, C., Rubio, L. Marcos, R. 2016. Genotoxic and oxidative stress potential of nanosized and bulk zinc oxide particles in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol Ind Health* 32(12): 1987-2001.
- Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P. Karagin, P. H. 2020. Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji* 24(3): 103-111.
- Cesur, S., Küçüköksel, Y., Taşdemir, Ş. Ürkmez, A. Ş. 2018. Polycaprolactone-hydroxy apatite composites for tissue engineering applications. *Journal of Vinyl and Additive Technology* 24(3): 248-261.
- Chandran, P., Riviere, J. E. Monteiro-Riviere, N. A. 2017. Surface chemistry of gold nanoparticles determines the biocorona composition impacting cellular uptake, toxicity and gene expression profiles in human endothelial cells. *Nanotoxicology* 11(4): 507-519.
- Chen, L. J., Al-Bayate, S., Khurshid, Z., Shavandi, A., Brunton, P. Ratnayake, J. 2021. Hydroxyapatite in Oral Care Products-A Review. *Materials* 14(17).

- Chen, X., Deng, C., Tang, S. Zhang, M. 2007. Mitochondria-dependent apoptosis induced by nanoscale hydroxyapatite in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Biol Pharm Bull* 30(1): 128-132.
- Clift, M. J., Gehr, P. Rothen-Rutishauser, B. 2011. Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not *in vitro* testing is a valid alternative. *Arch Toxicol* 85(7): 723-731.
- Coelho, C. C., Grenho, L., Gomes, P. S., Quadros, P. A. Fernandes, M. H. 2019. Nano-hydroxyapatite in oral care cosmetics: characterization and cytotoxicity assessment. *Sci Rep* 9(1): 11050.
- Collins, A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair - Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26(3): 249-261.
- Collins, A. R. 2015. The comet assay: a heavenly method! *Mutagenesis* 30(1): 1-4.
- Collins, A. R., Ma, A. G. Duthie, S. J. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 336(1): 69-77.
- Corami, A., Mignardi, S. Ferrini, V. 2007. Copper and zinc decontamination from single- and binary-metal solutions using hydroxyapatite. *Journal of Hazardous Materials* 146(1-2): 164-170.
- Crawford, E. D., Seaman, J. E., Barber, A. E., 2nd, David, D. C., Babbitt, P. C., Burlingame, A. L. Wells, J. A. 2012. Conservation of caspase substrates across metazoans suggests hierarchical importance of signaling pathways over specific targets and cleavage site motifs in apoptosis. *Cell Death Differ* 19(12): 2040-2048.
- Cui, D., Tian, F., Ozkan, C. S., Wang, M. Gao, H. 2005. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol Lett* 155(1): 73-85.
- Cummings, B. S. Schnellmann, R. G. 2004. Measurement of cell death in mammalian cells. *Curr Protoc Pharmacol* Chapter 12: Unit 12 18.
- Dai, C., Duan, J., Zhang, L., Jia, G., Zhang, C. Zhang, J. 2014. Biocompatibility of defect-related luminescent nanostructured and microstructured hydroxyapatite. *Biol Trace Elem Res* 162(1-3): 158-167.
- Dan, P., Sundararajan, V., Ganeshkumar, H., Gnanabarathi, B., Subramanian, A. K., Venkatasubu, G. D., Ichihara, S., Ichihara, G. Mohideen, S. S. 2019. Evaluation of hydroxyapatite nanoparticles - induced *in vivo* toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Applied Surface Science* 484: 568-577.
- Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jerome, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O. Preat, V. 2009. Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Journal of Controlled Release* 133(1): 11-17.

- De Stefani, A., Bruno, G., Preo, G. Gracco, A. 2020. Application of Nanotechnology in Orthodontic Materials: A State-of-the-Art Review. *Dent J (Basel)* 8(4).
- Dee, K. C., Puleo, D. A. Bizios, R. 2002. An Introduction To Tissue Biomaterial Interactions. New Jersey, A John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Deveci, M. Z. Y., Gönenci, R., Canpolat, İ. Kanat, Ö. 2020. *In vivo* biocompatibility and fracture healing of hydroxyapatite-hexagonal boron nitride- chitosan-collagen biocomposite coating in rats. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 44(1): 76-88.
- Ding, T., Xue, Y., Lu, H., Huang, Z. Sun, J. 2012. Effect of particle size of hydroxyapatite nanoparticles on its biocompatibility. *IEEE Trans Nanobioscience* 11(4): 336-340.
- Do, A. T. LaRocque, J. R. 2015. The role of *Drosophila* mismatch repair in suppressing recombination between diverged sequences. *Scientific Reports* 5.
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W. Borm, P. J. A. 2004. Nanotoxicology. *Occupational and Environmental Medicine* 61(9): 727-728.
- Dore, A. S., Kilkenny, M. L., Rzechorzek, N. J. Pearl, L. H. 2009. Crystal structure of the rad9-rad1-hus1 DNA damage checkpoint complex--implications for clamp loading and regulation. *Mol Cell* 34(6): 735-745.
- Dorstyn, L. Kumar, S. 2008. A biochemical analysis of the activation of the *Drosophila* caspase DRONC. *Cell Death and Differentiation* 15(3): 461-470.
- Dorstyn, L., Read, S. H., Quinn, L. M., Richardson, H. Kumar, S. 1999. DECAY, a novel *Drosophila* caspase related to mammalian caspase-3 and caspase-7. *J Biol Chem* 274(43): 30778-30783.
- Dreher, K. L. 2004. Health and environmental impact of nanotechnology: Toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicological Sciences* 77(1): 3-5.
- Dronamraju, R. Mason, J. M. 2011. MU2 and HP1a regulate the recognition of double strand breaks in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 6(9): e25439.
- Dubruel, P. Van Vlierberghe, S. 2014. Biomaterials for Bone Regeneration. Novel Techniques and Applications.
- Eliaz, N. Metoki, N. 2017. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *MATERIALS* 10(4).
- Escobar, C., Byer, K. J. Khan, S. R. 2007. Naturally produced crystals obtained from kidney stones are less injurious to renal tubular epithelial cells than synthetic crystals. *Bju International* 100(4): 891-897.

- Faghihzadeh, F., Anaya, N. M., Schiffman, L. A. Oyanedel-Craver, V. 2016. Fourier transform infrared spectroscopy to assess molecular-level changes in microorganisms exposed to nanoparticles. *Nanotechnology for Environmental Engineering* 1(1).
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L. Oneill, K. L. 1995. The Comet Assay - a Comprehensive Review. *Mutation Research-Reviews in Genetic Toxicology* 339(1): 37-59.
- Fan, Y. Bergmann, A. 2010. The cleaved-Caspase-3 antibody is a marker of Caspase-9-like DRONC activity in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation* 17(3): 534-539.
- Fan, Y., Lee, T. V., Xu, D., Chen, Z., Lamblin, A. F., Steller, H. Bergmann, A. 2010. Dual roles of *Drosophila* p53 in cell death and cell differentiation. *Cell Death Differ* 17(6): 912-921.
- FDA, F. a. D. A. (2020). Use of International Standard ISO 10993-1, "Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process": Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff.
- Ferraz, M. P., Monteiro, F. J. Manuel, C. M. 2004. Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. *J Appl Biomater Biomech* 2(2): 74-80.
- Ferreira-Ermita, D. A. C., Valente, F. L., Carlo-Reis, E. C., Araújo, F. R., Ribeiro, I. M., Cintra, C. C. V. Borges, A. P. B. 2020. Characterization and *in vivo* biocompatibility analysis of synthetic hydroxyapatite compounds associated with magnetite nanoparticles for a drug delivery system in osteomyelitis treatment. *Results in Materials* 5.
- Filipiak, M., Tylko, G. Pyza, E. 2012. Zinc induces caspase-dependent mitochondrial pathway of the programmed cell death in haemocytes of *Drosophila melanogaster*. *Biometals* 25(3): 507-516.
- Flecknell, P. 2002. Replacement, reduction and refinement. *Altex* 19(2): 73-78.
- Flores, C. Engels, W. 1999. Microsatellite instability in *Drosophila* spellchecker1 (MutS homolog) mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2964-2969.
- Fogarty, C. E. Bergmann, A. 2014. Detecting caspase activity in *Drosophila* larval imaginal discs. *Methods Mol Biol* 1133: 109-117.
- Frankel, S., Ziafazeli, T. Rogina, B. 2011. dSir2 and longevity in *Drosophila*. *Exp Gerontol* 46(5): 391-396.
- Fregoso, M., Laine, J. P., Aguilar-Fuentes, J., Mocquet, V., Reynaud, E., Coin, F., Egly, J. M. Zurita, M. 2007. DNA repair and transcriptional deficiencies caused by mutations in the *Drosophila* p52 subunit of TFIIH generate developmental defects and chromosome fragility. *Mol Cell Biol* 27(10): 3640-3650.

- Frei, H. Würgler, F. E. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research* 334: 247-258.
- Frohlich, E., Samberger, C., Kueznik, T., Absenger, M., Roblegg, E., Zimmer, A. Pieber, T. R. 2009. Cytotoxicity of nanoparticles independent from oxidative stress. *Journal of Toxicological Sciences* 34(4): 363-375.
- Fu, Q., Zhou, N., Huang, W., Wang, D., Zhang, L. Li, H. 2005. Effects of nano HAP on biological and structural properties of glass bone cement. *J Biomed Mater Res A* 74(2): 156-163.
- Furlanetto, M. P., Grivicich, I., Dihl, R. R., Lehmann, M., de Souza, D. S. Plentz, R. D. M. 2018. *In vivo* Analysis of Photobiomodulation Genotoxicity Using the Somatic Mutation and Recombination Test. *Photomed Laser Surg* 36(10): 536-540.
- Gartel, A. L. Tyner, A. L. 2002. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1(8): 639-649.
- Gautam, A., Gautam, C., Mishra, M., Sahu, S., Nanda, R., Kisan, B., Gautam, R. K., Prakash, R., Sharma, K., Singh, D. Gautam, S. S. 2021. Synthesis, structural, mechanical, and biological properties of HAP-ZrO₂-hBN biocomposites for bone regeneration applications. *Ceramics International* 47(21): 30203-30220.
- Gesualdi, S. C. Haerry, T. E. 2007. Distinct signaling of *Drosophila* Activin/TGF-beta family members. *Fly (Austin)* 1(4): 212-221.
- Gibson, I. R. 2020. Natural and Synthetic Hydroxyapatites. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. UK, Matthew Deans, Academic Press, Elsevier: 307-317.
- Goguitchaichvili, A., Ortega, V., Archer, J., Morales, J. Guerrero, A. T. 2017. Absolute geomagnetic intensity record from pre-Columbian pottery dates elite Tlailotlacan Woman in ancient Teotihuacan. *Journal of Archaeological Science-Reports* 14: 146-151.
- Goodman, M. F. Woodgate, R. 2013. Translesion DNA polymerases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(10): a010363.
- Graf, U. Singer, D. 1992. Genotoxicity Testing of Promutagens in the Wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 8(1): 15-27.
- Graf, U. Vanschaik, N. 1992. Improved High Bioactivation Cross for the Wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila-Melanogaster*. *Mutation Research* 271(1): 59-67.
- Graf, U., Wurgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B. Kale, P. G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6(2): 153-188.

- Guzman-Rincon, J., Ramirez-Victoria, P. Benitez, L. 2001. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila* used for biomonitoring of environmental pollutants. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2: A Handbook* 56: 221-237.
- Han, Y. C., Wang, X. Y., Dai, H. L. Li, S. P. 2012. Nanosize and Surface Charge Effects of Hydroxyapatite Nanoparticles on Red Blood Cell Suspensions. *Acs Applied Materials & Interfaces* 4(9): 4616-4622.
- Hao, C. F., Hao, W. D., Wei, X. T., Xing, L. N., Jiang, J. J. Shang, L. Q. 2009. The role of MAPK in the biphasic dose-response phenomenon induced by cadmium and mercury in HEK293 cells. *Toxicology in vitro* 23(4): 660-666.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V. Tice, R. R. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18(1): 45-51.
- Hasırcı, V. Hasırcı, N. 2018. Fundamentals of Biomaterials, Springer.
- He, M., Shi, H., Zhao, X., Yu, Y. Qu, B. 2013. Immobilization of Pb and Cd in Contaminated Soil Using Nano-Crystallite Hydroxyapatite. *Procedia Environmental Sciences* 18: 657-665.
- Hildebrand, H. F. 2013. Biomaterials – a history of 7000 years. *BioNanoMaterials* 14(3-4).
- Huang, Y. W., Cambre, M. Lee, H. J. 2017. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 18(12).
- Huri, P. Y., Hasırcı, N. Hasırcı, V. 2010. Kemik Doku Mühendisliği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 19(4).
- Ignjatovic, N. L., Markovic, S., Jugovic, D., Uskokovic, V. Uskokovic, D. P. 2020. From molecules to nanoparticles to functional materials. *Journal Of The Serbian Chemical Society* 85(11): 1383-1403.
- Irving, P., Ubeda, J. M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J. A., Hetru, C. Meister, M. 2005. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cellular Microbiology* 7(3): 335-350.
- Iwayama, T., Okada, T., Ueda, T., Tomita, K., Matsumoto, S., Takedachi, M., Wakisaka, S., Noda, T., Ogura, T., Okano, T., Fratzl, P., Ogura, T. Murakami, S. 2019. Osteoblastic lysosome plays a central role in mineralization. *Sci Adv* 5(7): eaax0672.
- Jantova, S., Theiszova, M., Letasiova, S., Birosova, L. Palou, T. M. 2008. *In vitro* effects of fluor-hydroxyapatite, fluorapatite and hydroxyapatite on colony formation, DNA damage and mutagenicity. *Mutat Res* 652(2): 139-144.

- Jin, Y., Liu, W., Li, X.-l., Shen, S.-g., Liang, S.-x., Liu, C. Shan, L. 2016. Nano-hydroxyapatite immobilized lead and enhanced plant growth of ryegrass in a contaminated soil. *Ecological Engineering* 95: 25-29.
- Jiricny, J. 2006. MutLalpha: at the cutting edge of mismatch repair. *Cell* 126(2): 239-241.
- Joyce, E. F., Pedersen, M., Tiong, S., White-Brown, S. K., Paul, A., Campbell, S. D. McKim, K. S. 2011. *Drosophila* ATM and ATR have distinct activities in the regulation of meiotic DNA damage and repair. *Journal of Cell Biology* 195(3): 359-367.
- Kasimoglu, Y., Tabakcilar, D., Guclu, Z. A., Yamamoto-Nemoto, S., Tuna, E. B., Ozen, B., Tuzuner, T. Ince, G. 2020. Nanomaterials and Nanorobotics in Dentistry: A Review. *Journal of Dentistry Indonesia* 27(2): 77-84.
- Kastenbaum, M. A. Bowman, K. O. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9(5): 527-549.
- Kaya, B. 2000. Bazi Pestisitlerin *Drosophila Melanogaster* Hatlarında Mutajenik ve Rekombinojenik Etkilerinin Araştırılması Akdeniz Üniversitesi. Antalya 151.
- Kaygisiz, S. Y. Cigerci, I. H. 2017. Genotoxic evaluation of different sizes of iron oxide nanoparticles and ionic form by SMART, Allium and comet assay. *Toxicology and Industrial Health* 33(10): 802-809.
- Kazarian, S. G., Chan, K. L. A., Maquet, V. Boccaccini, A. R. 2004. Characterisation of bioactive and resorbable polylactide/Bioglass((R)) composites by FTIR spectroscopic imaging. *Biomaterials* 25(18): 3931-3938.
- Khanna, P., Ong, C., Bay, B. H. Baeg, G. H. 2015. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. *Nanomaterials* 5(3): 1163-1180.
- Kiefer, J., Grabow, J., Kurland, H. D. Muller, F. A. 2015. Characterization of Nanoparticles by Solvent Infrared Spectroscopy. *Anal Chem* 87(24): 12313-12317.
- Kim, H., Kumbar, S. G. Nukavarapu, S. P. 2021. Biomaterial-directed cell behavior for tissue engineering. *Curr Opin Biomed Eng* 17.
- Kim, H. S., Kumbar, S. G. Nukavarapu, S. P. 2021. Biomaterial-directed cell behavior for tissue engineering. *Current Opinion in Biomedical Engineering* 17.
- Kleppa, L., Mari, P. O., Larsen, E., Lien, G. F., Godon, C., Theil, A. F., Nesse, G. J., Wiksen, H., Vermeulen, W., Giglia-Mari, G. Klungland, A. 2012. Kinetics of endogenous mouse FEN1 in base excision repair. *Nucleic Acids Res* 40(18): 9044-9059.
- Klovstad, M., Abdu, U. Schupbach, T. 2008. *Drosophila* brca2 is required for mitotic and meiotic DNA repair and efficient activation of the meiotic recombination checkpoint. *Plos Genetics* 4(2).

- Koutsopoulos, S. 2012. Molecular fabrications of smart nanobiomaterials and applications in personalized medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64: 1459-1476.
- Kovalchuk, İ. Kovalchuk, O. 2021. Genome Stability. UK, Elsevier.
- Kreller, T., Sahm, F., Bader, R., Boccaccini, A. R., Jonitz-Heincke, A. Detsch, R. 2021. Biomimetic Calcium Phosphate Coatings for Bioactivation of Titanium Implant Surfaces: Methodological Approach and *In vitro* Evaluation of Biocompatibility. *Materials (Basel)* 14(13).
- Kumar, P., Choonara, Y. E., Khan, R. A. Pillay, V. 2017. The Chemo-Biological Outreach of Nano-Biomaterials: Implications for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Current Pharmaceutical Design* 23(24): 3538-3549.
- Kumar, S., Gautam, C., Mishra, V. K., Chauhan, B. S., Srikrishna, S., Yadav, R. S., Trivedi, R. Rai, S. B. 2019. Fabrication of Graphene Nanoplatelet-Incorporated Porous Hydroxyapatite Composites: Improved Mechanical and *in vivo* Imaging Performances for Emerging Biomedical Applications. *ACS Omega* 4(4): 7448-7458.
- Kumar, S. S. D. Abrahamse, H. 2020. Advancement of Nanobiomaterials to Deliver Natural Compounds for Tissue Engineering Applications. *International Journal Of Molecular Sciences* 21(18).
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P. Jha, A. N. 2009. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* 25(1): 53-64.
- Lappas, C. M. 2015. The immunomodulatory effects of titanium dioxide and silver nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology* 85: 78-83.
- LaRocque, J. R. 2007. Dna Damage Response in *Drosophila melanogaster*: Orchestrating Repair with Cell Cycle Checkpoints. Doktora Tezi The University of North Carolina at Chapel Hill. Chapel Hill 121.
- Le Guen, T., Ragu, S., Guirouilh-Barbat, J. Lopez, B. S. 2015. Role of the double-strand break repair pathway in the maintenance of genomic stability. *Mol Cell Oncol* 2(1): e968020.
- Lee, H., Trainer, A. H., Friedman, L. S., Thistlethwaite, F. C., Evans, M. J., Ponder, B. A. J. Venkitaraman, A. R. 1999. Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, Brca2. *Molecular Cell* 4(1): 1-10.
- Lee, L. A. Orr-Weaver, T. L. 2003. Regulation of cell cycles in *Drosophila* development: intrinsic and extrinsic cues. *Annu Rev Genet* 37: 545-578.
- Lewinski, N., Colvin, V. Drezek, R. 2008. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 4(1): 26-49.

- Lewis, E. B. 1960. A new standard food medium. *Drosophila Information Service* 34: 118-119.
- Li, G. M. 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18(1): 85-98.
- Li, S. S., Zhang, Z. Y., Yang, C. J., Lian, H. Y. Cai, P. 2013. Gene expression and reproductive abilities of male *Drosophila melanogaster* subjected to ELF-EMF exposure. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 758(1-2): 95-103.
- Liddiard, K., Ruis, B., Kan, Y., Cleal, K., Ashelford, K. E., Hendrickson, E. A. Baird, D. M. 2019. DNA Ligase 1 is an essential mediator of sister chromatid telomere fusions in G2 cell cycle phase. *Nucleic Acids Res* 47(5): 2402-2424.
- Lin, K. L., Chang, J., Cheng, R. M. Ruan, M. L. 2007. Hydrothermal microemulsion synthesis of stoichiometric single crystal hydroxyapatite nanorods with monodispersion and narrow-size distribution. *Materials Letters* 61(8-9): 1683-1687.
- Lin, Y. C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., Drmanac, R., Chen, J., Speleman, F., Lambrechts, D., Van de Peer, Y., Tavernier, J. Callewaert, N. 2014. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature Communications* 5.
- Lindsley, D. L. Zimm, G. G. 1992. The Genome of *Drosophila melanogaster*.
- Liu, X. Y., Vinson, D., Abt, D., Hurt, R. H. Rand, D. M. 2009. Differential Toxicity of Carbon Nanomaterials in Drosophila: Larval Dietary Uptake Is Benign, but Adult Exposure Causes Locomotor Impairment and Mortality. *Environmental Science & Technology* 43(16): 6357-6363.
- Liu, Y., Qu, M., Carter, R. E., Leng, S., Ramirez-Giraldo, J. C., Jaramillo, G., Krambeck, A. E., Lieske, J. C., Vrtiska, T. J. McCollough, C. H. 2013. Differentiating calcium oxalate and hydroxyapatite stones *in vivo* using dual-energy CT and urine supersaturation and pH values. *Acad Radiol* 20(12): 1521-1525.
- Liu, Z. S., Tang, S. L. Ai, Z. L. 2003. Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human hepatoma BEL-7402 cells. *World J Gastroenterol* 9(9): 1968-1971.
- Livak, K. J. Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Lopez-Lorente, A. I. Mizaikoff, B. 2016. Mid-infrared spectroscopy for protein analysis: potential and challenges. *Anal Bioanal Chem* 408(11): 2875-2889.
- Malysheva, A., Lombi, E. Voelcker, N. H. 2015. Bridging the divide between human and environmental nanotoxicology. *Nature Nanotechnology* 10(10): 835-844.

- Manivasagam, G., Dhinasekaran, D. Rajamanickam, A. 2010. Biomedical Implants: Corrosion and its Prevention - A Review~!2009-12-22~!2010-01-20~!2010-05-25~! *Recent Patents on Corrosion Science* 2(1): 40-54.
- Mantovani, D. 2000. Shape Memory Alloys: Properties and Biomedical Applications. *JOM* 52: 36-44.
- Marcos, R. Carmona, E. R. 2013. The Wing-Spot and the Comet Tests as Useful Assays Detecting Genotoxicity in *Drosophila*. *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols* 1044: 417-427.
- Marek, L. R., Kottemann, M. C., Glazer, P. M. Bale, A. E. 2008. MEN1 and FANCD2 mediate distinct mechanisms of DNA crosslink repair. *DNA Repair (Amst)* 7(3): 476-486.
- Marin, E., Boschetto, F. Pezzotti, G. 2020. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *J Biomed Mater Res A* 108(8): 1617-1633.
- Markkanen, E. 2017. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 59: 82-105.
- Marques, C., Ferreira, J. M. F., Andronescu, E., Fikai, D., Sonmez, M. Fikai, A. 2014. Multifunctional materials for bone cancer treatment. *International Journal Of Nanomedicine* 9: 2713-2725.
- Marygold, S. J., Roote, J., Reuter, G., Lambertsson, A., Ashburner, M., Millburn, G. H., Harrison, P. M., Yu, Z., Kenmochi, N., Kaufman, T. C., Leever, S. J. Cook, K. R. 2007. The ribosomal protein genes and Minute loci of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol* 8(10): R216.
- McCully, M., Sanchez-Navarro, M., Teixido, M. Giralt, E. 2018. Peptide Mediated Brain Delivery of Nano- and Submicroparticles: A Synergistic Approach. *Curr Pharm Des* 24(13): 1366-1376.
- McKim, J. M., Wilga, P. C., Pregoner, J. F. Blakemore, W. R. 2015. The common food additive carrageenan is not a ligand for Toll-LikeReceptor 4 (TLR4) in an HEK293-TLR4 reporter cell-line model. *Food and Chemical Toxicology* 78: 153-158.
- Medina-Leyte, D. J., Domínguez-Pérez, M., Mercado, I., Villarreal-Molina, M. T. Jacobo-Albavera, L. 2020. Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. *Applied Sciences* 10(3).
- Milhan, N. V. M., Carvalho, I. C. S., Prado, R. F. d., Trichês, E. D. S., Camargo, C. H. R. Camargo, S. E. A. 2017. Analysis of indicators of osteogenesis, cytotoxicity and genotoxicity of an experimental β -TCP compared to other bone substitutes. *Acta Scientiarum. Health Sciences* 39(1).

- Mills, K., Daish, T. Kumar, S. 2005. The function of the *Drosophila* caspase DRONC in cell death and development. *Cell Cycle* 4(6): 744-746.
- Mishra, N., Srivastav, R., Agrawal, U. R. Tewari, R. R. 2017. An insight into the genotoxicity assessment studies in dipterans. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 773: 220-229.
- Mitragotri, S. Lahann, J. 2009. Physical approaches to biomaterial design. *Nat Mater* 8(1): 15-23.
- Moller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, E., Koppen, G., Bonassi, S., Milic, M., Gajski, G., Costa, S., Teixeira, J. P., Costa Pereira, C., Dusinska, M., Godschalk, R., Brunborg, G., Gutzkow, K. B., Giovannelli, L., Cooke, M. S., Richling, E., Laffon, B., Valdiglesias, V., Basaran, N., Del Bo, C., Zegura, B., Novak, M., Stopper, H., Vodicka, P., Vodenkova, S., de Andrade, V. M., Sramkova, M., Gabelova, A., Collins, A. Langie, S. A. S. 2020. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nat Protoc* 15(12): 3817-3826.
- Moller, P., Loft, S., Ersson, C., Koppen, G., Dusinska, M. Collins, A. 2014. On the search for an intelligible comet assay descriptor. *Front Genet* 5: 217.
- Mota, M. B. S., Carvalho, M. A., Monteiro, A. N. A. Mesquita, R. D. 2019. DNA damage response and repair in perspective: *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*. *Parasit Vectors* 12(1): 533.
- Mozafari, M. 2020. Handbook of Biomaterials Biocompatibility (Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Kidlington,, Elsevier, Woodhead Publishing
- Mozaffarieh, M., Schoetzau, A., Sauter, M., Grieshaber, M., Orgul, S., Golubnitschaja, O. Flammer, J. 2008. Comet assay analysis of single-stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. *Mol Vis* 14: 1584-1588.
- Mukhopadhyay, I., Chowdhuri, D. K., Bajpayee, M. Dhawan, A. 2004. Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 19(2): 85-90.
- Musa, M., Kannan, T. P., Masudi, S. M. Ab Rahman, I. 2012. Assessment of DNA damage caused by locally produced hydroxyapatite-silica nanocomposite using Comet assay on human lung fibroblast cell line. *Molecular & Cellular Toxicology* 8(1): 53-60.
- Nagyne-Kovacs, T., Studnicka, L., Kincses, A., Spengler, G., Molnar, M., Tolner, M., Lukacs, I. E., Szilagyi, I. M. Pokol, G. 2018. Synthesis and characterization of Sr and Mg-doped hydroxyapatite by a simple precipitation method. *Ceramics International* 44(18): 22976-22982.
- Naves, M. P. C., de Moraes, C. R., Silva, A. C. A., Dantas, N. O., Spano, M. A. de Rezende, A. A. A. 2018. Assessment of mutagenic, recombinogenic and

- carcinogenic potential of titanium dioxide nanocrystals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology* 112: 273-281.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E. Oberdorster, J. 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 113(7): 823-839.
- Oksel Karakus, C., Bilgi, E. Winkler, D. A. 2021. Biomedical nanomaterials: applications, toxicological concerns, and regulatory needs. *Nanotoxicology* 15(3): 331-351.
- Olive, P. L., Banath, J. P. Durand, R. E. 1990. Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal-Cells Measured Using the Comet Assay. *Radiation Research* 122(1): 86-94.
- Olsson, M. Zhivotovsky, B. 2011. Caspases and cancer. *Cell Death and Differentiation* 18(9): 1441-1449.
- Ong, C., Yung, L. Y. L., Cai, Y., Bay, B. H. Baeg, G. H. 2015. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology* 9(3): 396-403.
- Opacic-Galic, V., Petrovic, V., Zivkovic, S., Jokanovic, V., Nikolic, B., Knezevic-Vukcevic, J. Mitic-Culafic, D. 2013. New nanostructural biomaterials based on active silicate systems and hydroxyapatite: characterization and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Int Endod J* 46(6): 506-516.
- Oshida, Y., Tuna, E. B., Aktoren, O. Gencay, K. 2010. Dental Implant Systems. *International Journal Of Molecular Sciences* 11(4): 1580-1678.
- Ostling, O. Johanson, K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123(1): 291-298.
- Osuchukwu, O. A., Salihi, A., Abdullahi, I., Abdulkareem, B. Nwannenna, C. S. 2021. Synthesis techniques, characterization and mechanical properties of natural derived hydroxyapatite scaffolds for bone implants: a review. *SN Applied Sciences* 3(10).
- Overbergh, L., Giulietti, A., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. C., M. 2003. The Use of Real-Time Reverse Transcriptase PCR for the Quantification of Cytokine Gene Expression. *J Biomol Tech.* 14: 33-43.
- Owsley, D. W. Jantz, R. L. 2014. Kennewick Man: The Scientific Investigation of an Ancient American Skeleton-Texas A&M University Press
- Pai, S., Kini, M. S. Selvaraj, R. 2021. A review on adsorptive removal of dyes from wastewater by hydroxyapatite nanocomposites. *Environ Sci Pollut Res Int* 28(10): 11835-11849.

- Pai, S. D., Kini, M. S. Selvaraj, R. 2021. A review on adsorptive removal of dyes from wastewater by hydroxyapatite nanocomposites. *Environmental Science And Pollution Research* 28(10): 11835-11849.
- Paital, S. R. Dahotre, N. B. 2009. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. *Materials Science & Engineering R-Reports* 66(1-3): 1-70.
- Pan, Y., Guo, M., Nie, Z., Huang, Y., Peng, Y., Liu, A., Qing, M. Yao, S. 2012. Colorimetric detection of apoptosis based on caspase-3 activity assay using unmodified gold nanoparticles. *Chem Commun (Camb)* 48(7): 997-999.
- Panda, R. N., Hsieh, M. F., Chung, R. J. Chin, T. S. 2003. FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 64(2): 193-199.
- Panda, S., Biswas, C. K. Paul, S. 2021. A comprehensive review on the preparation and application of calcium hydroxyapatite: A special focus on atomic doping methods for bone tissue engineering. *Ceramics International* 47(20): 28122-28144.
- Pantaleão, S. d. M., Santos, M. d., Anjos, H. A., Lima, A. D., Valadares, B. L. B., Nunes, R. Feitosa, M. B. d. J. 2017. Evaluation of mutagenic effects of pure hydroxyapatite doped with chromium (III) through the SMART Test in *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae). *Brazilian Journal of Biological Sciences* 4(8): 293-300.
- Pappus, S. A., Ekka, B., Sahu, S., Sabat, D., Dash, P. Mishra, M. 2017. A toxicity assessment of hydroxyapatite nanoparticles on development and behaviour of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Nanoparticle Research* 19(4).
- Pappus, S. A. Mishra, M. 2018. A *Drosophila* Model to Decipher the Toxicity of Nanoparticles Taken Through Oral Routes. *Adv Exp Med Biol* 1048: 311-322.
- Park, E. J., Choi, J., Park, Y. K. Park, K. 2008. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology* 245(1-2): 90-100.
- Park, M. V. D. Z., Neigh, A. M., Vermeulen, J. P., de la Fonteyne, L. J. J., Verharen, H. W., Briede, J. J., van Loveren, H. de Jong, W. H. 2011. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 32(36): 9810-9817.
- Park, S. B., Lih, E., Park, K. S., Joung, Y. K. Han, D. K. 2017. Biopolymer-based functional composites for medical applications. *Progress in Polymer Science* 68: 77-105.
- Pasinli, A. Aksoy, R. S. 2010. Yapay Kemik Uygulamaları İçin Hidroksiapatit. *BiyoTeknoloji Elektronik Dergisi* 1(1): 41-51.

- Patil, S. S., Shedbalkar, U. U., Truskewycz, A., Chopade, B. A. Ball, A. S. 2016. Nanoparticles for environmental clean-up: A review of potential risks and emerging solutions. *Environmental Technology & Innovation* 5: 10-21.
- Pedersen, M., Tjong, S. Campbell, S. D. 2010. Molecular genetic characterization of *Drosophila* ATM conserved functional domains. *Genome* 53(10): 778-786.
- Pepla, E., Besharat, L. K., Palaia, G., Tenore, G. Migliau, G. 2014. Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol (Roma)* 5(3): 108-114.
- Perez-Garijo, A., Martin, F. A. Morata, G. 2004. Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* 131(22): 5591-5598.
- Pezzatini, S., Morbidelli, L., Solito, R., Paccagnini, E., Boanini, E., Bigi, A. Ziche, M. 2007. Nanostructured HA crystals up-regulate FGF-2 expression and activity in microvascular endothelium promoting angiogenesis. *Bone* 41(4): 523-534.
- Phan, B. T. N., Nguyen, H. T., Dao, H. Q., Pham, L. V., Quan, T. T. T., Nguyen, D. B., Nguyen, H. T. L. Vu, T. T. 2017. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite in maltodextrin matrix. *Applied Nanoscience* 7(1-2): 1-7.
- Piccinini, F., Tesei, A., Arienti, C. Bevilacqua, A. 2017. Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *Biol Proced Online* 19: 8.
- Pielichowska, K. Blazewicz, S. 2010. Bioactive Polymer/Hydroxyapatite (Nano)composites for Bone Tissue Regeneration. Biopolymers: Lignin, Proteins, Bioactive Nanocomposites. A. Abe, K. Dusek and S. Kobayashi. **232**: 97-207.
- Pikula, K., Zakharenko, A., Chaika, V., Kirichenko, K., Tsatsakis, A. Golokhvast, K. 2020. Risk assessments in nanotoxicology: bioinformatics and computational approaches. *Current Opinion in Toxicology* 19: 1-6.
- Poh, T. Y., Ali, N., Mac Aogain, M., Kathawala, M. H., Setyawati, M. I., Ng, K. W. Chotirmall, S. H. 2018. Inhaled nanomaterials and the respiratory microbiome: clinical, immunological and toxicological perspectives. *Part Fibre Toxicol* 15(1): 46.
- Prado, J., Yamamura, H., Magri, A. M. P., Ruiz, P. L. M., Prado, J., Renno, A. C. M., Ribeiro, D. A. Granito, R. N. 2021. *In vitro* and *in vivo* biological performance of hydroxyapatite from fish waste. *J Mater Sci Mater Med* 32(9): 109.
- Pruitt, L. A. Chakravartula, A. M. 2011. Mechanics of biomaterials _ fundamental principles for implant design. New York, Cambridge University Press
- Pujari-Palmer, S., Lu, X. Ott, M. K. 2017. The Influence of Hydroxyapatite Nanoparticle Morphology on Embryonic Development in a Zebrafish Exposure Model. *Nanomaterials* 7(4).

- Rahul, S. J., Naz, F. Siddique, Y. H. 2015. Evaluation of the toxic potential of cefotaxime in the third instar larvae of transgenic *Drosophila melanogaster*. *Chemico-Biological Interactions* 233: 71-80.
- Ramel, C. Magnusson, J. 1992. Modulation of genotoxicity in *Drosophila*. *Mutat Res* 267(2): 221-227.
- Ramesh, S., Tan, C. Y., Hamdi, M., Sopyan, I. Teng, W. D. 2007. The influence of Ca/P ratio on the properties of hydroxyapatite bioceramics. *International Conference on Smart Materials and Nanotechnology in Engineering*.
- Rao, P. J., Pelletier, M. H., Walsh, W. R. Mobbs, R. J. 2014. Spine Interbody Implants: Material Selection and Modification, Functionalization and Bioactivation of Surfaces to Improve Osseointegration. *Orthopaedic Surgery* 6(2): 81-89.
- Ratner, B. D. Zhang, G. 2020. A History of Biomaterials. Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine. W. R. Wagner, Sakiyama-Elbert, S. E., Zhang G., Yaszemski, M. J. London, Elsevier.
- Ratner, B. D. Zhang, G. 2020. A History of Biomaterials. Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine. W. R. Wagner, Sakiyama-Elbert, S. E., Zhang G., Yaszemski, M. J. London Elsevier.
- Reddy, A. R., Reddy, Y. N., Krishna, D. R. Himabindu, V. 2010. Multi wall carbon nanotubes induce oxidative stress and cytotoxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Toxicology* 272(1-3): 11-16.
- Reis, E. M., Rezende, A. A., Oliveira, P. F., Nicoletta, H. D., Tavares, D. C., Silva, A. C., Dantas, N. O. Spano, M. A. 2016. Evaluation of titanium dioxide nanocrystal-induced genotoxicity by the cytokinesis-block micronucleus assay and the *Drosophila* wing spot test. *Food Chem Toxicol* 96: 309-319.
- Remya, N. S., Syama, S., Sabareeswaran, A. Mohanan, P. V. 2017. Investigation of chronic toxicity of hydroxyapatite nanoparticles administered orally for one year in wistar rats. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* 76: 518-527.
- Ren, F. Z., Ding, Y. H. Leng, Y. 2014. Infrared spectroscopic characterization of carbonated apatite: A combined experimental and computational study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 102(2): 496-505.
- Rimkus, S. A. Wassarman, D. A. 2018. A pharmacological screen for compounds that rescue the developmental lethality of a *Drosophila* ATM mutant. *PLoS One* 13(1): e0190821.
- Roi, A., Ardelean, L. C., Roi, C. I., Boia, E. R., Boia, S. Rusu, L. C. 2019. Oral Bone Tissue Engineering: Advanced Biomaterials for Cell Adhesion, Proliferation and Differentiation. *MATERIALS* 12: 2296.

- Ruiz-Losada, M., Gonzalez, R., Peropadre, A., Gil-Galvez, A., Tena, J. J., Baonza, A. Estella, C. 2021. Coordination between cell proliferation and apoptosis after DNA damage in *Drosophila*. *Cell Death Differ*.
- Sahu, S. Mishra, M. 2020. Hydroxyapatite nanoparticle causes sensory organ defects by targeting the retromer complex in *Drosophila melanogaster*. *NanoImpact* 19.
- Salarian, M., Solati-Hashjin, M., Shafiei, S. S., Salarian, R. Nemati, Z. A. 2009. Template-directed hydrothermal synthesis of dandelion-like hydroxyapatite in the presence of cetyltrimethylammonium bromide and polyethylene glycol. *Ceramics International* 35(7): 2563-2569.
- Salduz, A. 2010. Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçların ve Hidroksiapatit Kaplamanın Kemik Tutunumu Üzerindeki Etkileri: Biyomekanik ve Histolojik DeneySEL Çalışma. Tıpta Uzmanlık Tezi İstanbul Üniversitesi. İstanbul 98.
- Sario, S., Silva, A. M. Gaivao, I. 2018. Titanium dioxide nanoparticles: Toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster* (SMART eye-spot test and comet assay in neuroblasts). *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 831: 19-23.
- Schwartz, B. E., Larochelle, S., Suter, B. Lis, J. T. 2003. Cdk7 is required for full activation of *Drosophila* heat shock genes and RNA polymerase II phosphorylation *in vivo*. *Mol Cell Biol* 23(19): 6876-6886.
- Sekelsky, J. 2017. DNA Repair in *Drosophila*: Mutagens, Models, and Missing Genes. *Genetics* 205(2): 471-490.
- Sekelsky, J. J. 2000. DNA repair in *Drosophila*: insights from the *Drosophila* genome sequence. *J Cell Biol*. 150(2): F31-36.
- Serbes, U. 2009. HeLa Hücre Kültürlerinde Apoptoz ve Moleküler Mekanizması. Yüksek Lisans Tezi İstanbul Üniversitesi. İstanbul 77.
- Seth, R., Yang, S., Choi, S., Sabeen, M. Roberts, E. A. 2004. *In vitro* assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2. *Toxicol In vitro* 18(4): 501-509.
- Shea, L. D., Wang, D., Franceschi, R. T. Mooney, D. J. 2000. Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds. *Tissue Engineering* 6(6): 605-617.
- Shen, J., Gilmore, E. C., Marshall, C. A., Haddadin, M., Reynolds, J. J., Eyaid, W., Bodell, A., Barry, B., Gleason, D., Allen, K., Ganesh, V. S., Chang, B. S., Grix, A., Hill, R. S., Topcu, M., Caldecott, K. W., Barkovich, A. J. Walsh, C. A. 2010. Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nat Genet* 42(3): 245-249.
- Shimamoto, T., Tanimura, T., Yoneda, Y., Kobayakawa, Y., Sugawara, K., Hanaoka, F., Oka, M., Okada, Y., Tanaka, K. Kohno, K. 1995. Expression and functional

- analyses of the Dspa gene, the *Drosophila* homolog of the human excision repair gene XPA. *J Biol Chem* 270(38): 22452-22459.
- Shukla, A. K., Pragma, P. Chowdhuri, D. K. 2011. A modified alkaline Comet assay for *in vivo* detection of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 726(2): 222-226.
- Siddique, Y. H., Haidari, M., Khan, W., Fatima, A., Jyoti, S., Khanam, S., Naz, F., Rahul, Ali, F., Singh, B. R., Beg, T., Mohibullah Naqvi, A. H. 2015. Toxic potential of copper-doped ZnO nanoparticles in *Drosophila melanogaster* (Oregon R). *Toxicol Mech Methods* 25(6): 425-432.
- Sierra, L. M. Gaivão, I. 2014. Genotoxicity and DNA Repair. New York, Springer.
- Singh, G., Singh, R. P. Jolly, S. S. 2020. Customized hydroxyapatites for bone-tissue engineering and drug delivery applications: a review. *Journal Of Sol-Gel Science And Technology* 94(3): 505-530.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1): 184-191.
- Singh, R., Letai, A. Sarosiek, K. 2019. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20(3): 175-193.
- Sinha, K., Das, J., Pal, P. B. Sil, P. C. 2013. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol* 87(7): 1157-1180.
- Sirova, M., Van Vlierberghe, S., Matyasova, V., Rossmann, P., Schacht, E., Dubruel, P. Rihova, B. 2014. Immunocompatibility evaluation of hydrogel-coated polyimide implants for applications in regenerative medicine. *J Biomed Mater Res A* 102(6): 1982-1990.
- Sobczak-Kupiec, A., Malina, D., Kijkowska, R., Florkiewicz, W., Pluta, K. Wzorek, Z. 2019. Hydroxyapatite/Silver Nanoparticles Powders as Antimicrobial Agent for Bone Replacements. *Croatica Chemica Acta* 92(1): 59-68.
- Sohaebuddin, S. K., Thevenot, P. T., Baker, D., Eaton, J. W. Tang, L. 2010. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part Fibre Toxicol* 7: 22.
- Soldatow, V. Y., Lecluyse, E. L., Griffith, L. G. Rusyn, I. 2013. *In vitro* models for liver toxicity testing. *Toxicol Res (Camb)* 2(1): 23-39.
- Song, Y. 2005. A review of soil erodibility in water and wind erosion research. *Journal of Geographical Sciences* 15(2).

- Sonmez, E., Cacciatore, I., Bakan, F., Turkez, H., Mohtar, Y. I., Togar, B. Stefano, A. D. 2016. Toxicity assessment of hydroxyapatite nanoparticles in rat liver cell model *in vitro*. *Human & Experimental Toxicology* 35(10): 1073-1083.
- Stocker, H. Gallant, P. 2008. Getting started : an overview on raising and handling *Drosophila*. *Methods Mol Biol* 420: 27-44.
- Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A. Nabiev, I. 2018. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Research Letters* 13.
- Sun, X. Y., Chen, J. Y., Rao, C. Y. Ouyang, J. M. 2020. Size-Dependent Cytotoxicity of Hydroxyapatite Crystals on Renal Epithelial Cells. *Int J Nanomedicine* 15: 5043-5060.
- Sun, Y. X., Guo, G. S., Wang, Z. H. Guo, H. Y. 2006. Synthesis of single-crystal HAP nanorods. *Ceramics International* 32(8): 951-954.
- Sunjog, K., Kolarevic, S., Heberger, K., Gacic, Z., Knezevic-Vukcevic, J., Vukovic-Gacic, B. Lenhardt, M. 2013. Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of ranking differences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(14): 4879-4885.
- Szabad, J., Soos, I., Polgar, G. Hejja, G. 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. *Mutat Res* 113(2): 117-133.
- Tao, O., Wu, D. T., Pham, H. M., Pandey, N. Tran, S. D. 2019. Nanomaterials in Craniofacial Tissue Regeneration: A Review. *Applied Sciences - Basel* 9(2).
- Tavakol, S., Ragerdi Kashani, I., Azami, M., Khoshzaban, A., Tavakol, B., Kharrazi, S., Ebrahimi, S. Rezayat Sorkhabadi, S. M. 2012. *In vitro* and *in vivo* investigations on bone regeneration potential of laminated hydroxyapatite/gelatin nanocomposite scaffold along with DBM. *Journal of Nanoparticle Research* 14(12).
- Taverna, P., Liu, L., Hanson, A. J., Monks, A. Gerson, S. L. 2000. Characterization of MLH1 and MSH2 DNA mismatch repair proteins in cell lines of the NCI anticancer drug screen. *Cancer Chemother Pharmacol* 46(6): 507-516.
- Taylor, R. M., Moore, D. J., Whitehouse, J., Johnson, P. Caldecott, K. W. 2000. A Cell Cycle-Specific Requirement for the XRCC1 BRCT II Domain during Mammalian DNA Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology* 20(2): 735-740.
- Terzioğlu, G. 2014. Measurement Methods of Cell Proliferation and a Comparison of Various Commercial Proliferation Kits. *Turkish Journal of Immunology* 1(3): 74-89.
- Thomas, P. Smart, T. G. 2005. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51(3): 187-200.

- Timmers, C., Taniguchi, T., Hejna, J., Reifsteck, C., Lucas, L., Bruun, D., Thayer, M., Cox, B., Olson, S., D'Andrea, A. D., Moses, R. Grompe, M. 2001. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell* 7(2): 241-248.
- Tirrell, M., Kokkoli, E. Biesalski, M. 2002. The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science* 500(1-3): 61-83.
- Tite, T., Popa, A. C., Balescu, L. M., Bogdan, I. M., Pasuk, I., Ferreira, J. M. F. Stan, G. E. 2018. Cationic Substitutions in Hydroxyapatite: Current Status of the Derived Biofunctional Effects and Their *In vitro* Interrogation Methods. *Materials* 11(11).
- Toumey, C. 2009. Small differences. *Nature Nanotechnology* 4(5): 275-275.
- Tunçay, Ö. E. 2013. Development of Boron Containing Tissue Scaffolds by Biomimetic Method and Investigation of Their Effectiveness in Bone Tissue Engineering. Yüksek Lisans Tezi Hacettepe Üniversitesi. Ankara 132.
- Turkez, H., Yousef, M. I., Sonmez, E., Togar, B., Bakan, F., Sozio, P. Stefano, A. D. 2014. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress and genotoxic responses of hydroxyapatite nanoparticles on human blood cells. *J Appl Toxicol* 34(4): 373-379.
- van der Houwen, J. A. M., Cressey, G., Cressey, B. A. Valsami-Jones, E. 2003. The effect of organic ligands on the crystallinity of calcium phosphate. *Journal of Crystal Growth* 249(3-4): 572-583.
- Venkatesan, J. Anil, S. 2021. Hydroxyapatite Derived from Marine Resources and their Potential Biomedical Applications. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 26(3): 312-324.
- Venkatesan, J. Kim, S. K. 2014. Nano-Hydroxyapatite Composite Biomaterials for Bone Tissue Engineering-A Review. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 10(10): 3124-3140.
- Vimal, D., Kumar, S., Pandey, A., Sharma, D., Sainia, S., Gupta, S., Ram, K. R. Chowdhuri, D. K. 2018. Mlh1 is required for female fertility in *Drosophila melanogaster*: An outcome of effects on meiotic crossing over, ovarian follicles and egg activation. *European Journal of Cell Biology* 97(2): 75-89.
- Waldhuber, M., Emoto, K. Petritsch, C. 2005. The *Drosophila* caspase DRONC is required for metamorphosis and cell death in response to irradiation and developmental signals. *Mech Dev* 122(7-8): 914-927.
- Wang, J. X., Wang, L. T. Fan, Y. B. 2016. Adverse Biological Effect of TiO₂ and Hydroxyapatite Nanoparticles Used in Bone Repair and Replacement. *International Journal of Molecular Sciences* 17(6).
- Wang, Y. J., Chen, J. D., Wei, K., Zhang, S. H. Wang, X. D. 2006. Surfactant-assisted synthesis of hydroxyapatite particles. *Materials Letters* 60(27): 3227-3231.

- Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Siegel, R. W. Bizios, R. 2000. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 21(17): 1803-1810.
- Wei, Y., He, Y., Li, X. Y., Chen, H. F. Deng, X. L. 2017. Cellular Uptake and Delivery-Dependent Effects of Tb³⁺-Doped Hydroxyapatite Nanorods. *Molecules* 22(7).
- White, A. A., Best, S. M. Kinloch, I. A. 2007. Hydroxyapatite-carbon nanotube composites for biomedical applications: A review. *International Journal of Applied Ceramic Technology* 4(1): 1-13.
- Williams, D. F. 1987. Tissue - Biomaterial Interactions. *Journal of Materials Science* 22(10): 3421-3445.
- Wu, X., Shell, S. M. Zou, Y. 2005. Interaction and colocalization of Rad9/Rad1/Hus1 checkpoint complex with replication protein A in human cells. *Oncogene* 24(29): 4728-4735.
- Wu, Z. H., Yang, S. L. Wu, W. 2016. Shape control of inorganic nanoparticles from solution. *Nanoscale* 8(3): 1237-1259.
- Xu, Z. L., Liu, C. S., Wei, J. Sun, J. 2012. Effects of four types of hydroxyapatite nanoparticles with different nanocrystal morphologies and sizes on apoptosis in rat osteoblasts. *Journal of Applied Toxicology* 32(6): 429-435.
- Yamaguchi, M. Yoshida, H. 2018. *Drosophila* as a Model Organism. *Drosophila Models for Human Diseases* 1076: 1-10.
- Yamamoto, R. R., Axton, J. M., Yamamoto, Y., Saunders, R. D. C., Glover, D. M. Henderson, D. S. 2000. The *Drosophila* mus101 Gene, Which Links DNA Repair, Replication and Condensation of Heterochromatin in Mitosis, Encodes a Protein With Seven BRCA1 C-Terminus Domains. *Genetics* 156(711-721).
- Yang, G. L., He, F. M., Hu, J. A., Wang, X. X. Zhao, S. F. 2009. Effects of biomimetically and electrochemically deposited nano-hydroxyapatite coatings on osseointegration of porous titanium implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107(6): 782-789.
- Yasukawa 2015. *Drosophila* Ogg1 is required to suppress 8-oxo-guanine accumulation following oxidative stress. *Genes Genet. Syst.* 90: 11-20.
- Yavuz, E., Erdem, R., Kucuksayan, E., Akarsu, E. Akarsu, M. 2021. Preparation and Characterization of Polyethylene Glycol Functional Hydroxyapatite/Polycaprolactone Electrospun Biomembranes for Bone Tissue Engineering Applications. *Fibers and Polymers* 22(5): 1274-1284.
- Yıldız, T. 2011. Kimyasal Ve Biyomimetik Yöntemle Sentezlenmiş Hidroksiapatit Tozlarının Karakterizasyonu Ve Sinterlenebilirlik Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi YıldızTeknik Üniversitesi. İstanbul 100.

- Yongsheng, W. 2011. Sol–Gel Derived Hydroxyapatite Coatings on Metallic Implants: Characterization, *In vitro* and *In vivo* Analysis. Biological and Biomedical Coatings Handbook Applications. Boca Raton, CRC Press: 1-44.
- Yousefi, A. M., Oudadesse, H., Akbarzadeh, R., Wers, E. Lucas-Girot, A. 2014. Physical and biological characteristics of nanohydroxyapatite and bioactive glasses used for bone tissue engineering. *Nanotechnology Reviews* 3(6): 527-552.
- Zhang, B., Rotelli, M., Dixon, M. Calvi, B. R. 2015. The function of *Drosophila* p53 isoforms in apoptosis. *Cell Death Differ* 22(12): 2058-2067.
- Zhang, D., Liu, Y., Liu, Z. G. Wang, Q. 2020. Advances in Antibacterial Functionalized Coatings on Mg and Its Alloys for Medical Use-A Review. *Coatings* 10(9).
- Zhang, S. 2011. Biological and Biomedical Coatings Handbook-. USA, CRC Press.
- Zhao, D. Y., Zhu, T. T., Li, J., Cui, L. G., Zhang, Z. Y., Zhuang, X. L. Ding, J. X. 2021. Poly(lactic-co-glycolic acid)-based composite bone-substitute materials. *Bioactive Materials* 6(2): 346-360.
- Zhou, C. C., Hong, Y. L. Zhang, X. D. 2013. Applications of nanostructured calcium phosphate in tissue engineering. *Biomaterials Science* 1(10): 1012-1028.
- Zhou, H. Lee, J. 2011. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 7(7): 2769-2781.
- Zielinski, A. Bartmanski, M. 2020. Electrodeposited Biocoatings, Their Properties and Fabrication Technologies: A Review. *Coatings* 10(8).

ÖZGEÇMİŞ

Merve GÜNEŞ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2016-2022	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Programı, Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2013-2015	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Programı, Antalya
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
2006-2011	Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir

ESERLER

Ulusal ve Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Güneş, M., Güneş, A., İlbeyli, N., Kaya, B. 2017. Asbest Maruziyeti ve Etkileri. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. 10(1): 01-05.
2. Güneş, M., Yalçın, B., Ertuğrul, H., Kaya, B. 2018. Ascorbic Acid Ameliorates Genotoxic Effects of Cobalt Nanoparticles and Cobalt Chloride in in vivo *Drosophila* Assays. Fresenius Environmental Bulletin. 27: 2380-2391.
3. Ertuğrul, H., Yalçın, B., Güneş, M., Kaya, B. 2019. Ameliorative effects of melatonin against nano and ionic cobalt induced genotoxicity in two in vivo *Drosophila* assays. Drug and Chemical Toxicology. 43: 279-286.
4. Güneş, M., Ateş, K., Yalçın, B., Akkurt, S., Özen, Ş., Kaya, B. 2021. An Evaluation of the Genotoxic Effects of Electromagnetic Radiation at 900 MHz, 1800 MHz, and 2100 MHz Frequencies with a SMART Assay in *Drosophila melanogaster*. Electromagnetic Biology and Medicine. 40(2): 254-263.
5. Berber, A.A., Emre, N., Güneş, M., Yalçın, B., Pak, F., Aktaş, Ö., Bulut, C., Aksoy, H., Emre, Y., Kaya, B. 2021. Uluabat Gölü Su Kirliliğine Bağlı Olarak *Cyprinus carpio* ve *Silurus glanis*'teki Genetik Hasar Düzeyinin Belirlenmesi. Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research. 7(3): 219-232.

6. Yalçın, B., Güneş, Ciğerci, İ.H., Kaya, B. 2021. Demir (III) Oksit (Fe_2O_3) Nanopartiküllerinin Genotoksisitesinin *Drosophila* Hemositlerinde KOMET Yöntemi ile Araştırılması. Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi. 11(3): 643-652.
7. Kurşun, A.Y., Yalçın, B., Güneş, M., Tagorti, G., Kaya, B. 2021. MgO Nanopartiküllerinin *Drosophila melanogaster* Üzerindeki Davranışsal Toksisitesinin Değerlendirilmesi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi. 21: 1283-1294.

