

14821

T.C.
Marmara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

**POLİÜRETAN MEMBRANLARIN
FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ
VE BİYOLOJİK UYUŞABİLİRLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

(Doktora Tezi)

Mehlika PULAT

Danışman : Prof. Dr. Cemil ŞENVAR

İstanbul - 1990

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın başlangıcından bitimine kadar, bilgi ve her türlü desteği ile çok değerli katkılarda bulunan, sayın hocam Prof. Dr. Cemil ŞENVAR'a, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince, bilgi ve deneyimlerinden ve tüm laboratuvar olanaklarından yararlanabilmemi, esirgmeden sağlayan, sayın Prof. Dr. Erhan PiŞKİN'e, sonsuz şükranlarımı sunarım.

Çalışmamın başlangıcından itibaren, bilgi ve çabalarıyla, bana her türlü yardımı sağlayan, Yrd. Doç. Dr. Menemşe KİREMITÇİ'ye, sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarına, deneyimleri ile katkıda bulunan değerli arkadaşlarım Ali İhsan ŞERBETÇİ, Emir Baki DENKBAŞ, Naz OĞUZOĞLU'na en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Taramalı Elektron Mikroskopu çalışmalarım sırasında, tüm laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan, sayın Prof. Dr. Adnan TEKİN'e, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve yardımlarından yararlandığım, Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Kimya Anabilim-dalı'nın tüm üyelerine teşekkür ederim.

Mehlika PULAT

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET

SUMMARY

1. GİRİŞ ve ARAŞTIRMANIN AMACI	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyomateryaller	3
2.1.1. Biyomateryallerin Genel Özellikleri	3
2.1.2. Biyomateryallerin Temel Yapı Malzemeleri	4
2.1.3. Biyomateryallerin Kullanım Alanları	4
2.1.4. Biyomateryallerin Seçimi	5
2.2. Polimerlerle İlgili Genel Bilgiler	6
2.3. Poliüretanlar	9
2.3.1. Poliüretan Kimyası	9
2.3.2. Poliüretanların Özellikleri ve Türleri	11
2.3.3. Poliüretanların Genel Kullanım Alanları	13
2.3.4. Biyomateryal olarak Poliüretan	14
I - Yapıları ve Özellikleri	14
II- Kullanım Alanları	14
2.4. Polimerik Biyomateryaller	15
2.5. Polimerik Biyomateryallerin Özellikleri	16
2.6. Polimerik Biyomateryallerin Türleri ve Tıbbi Uygulamaları	17
2.7. Polimerik Biyomateryallerin Genel Tanımlanma Yöntemleri	21
2.7.1. Polimerik Biyomateryallerin Bulk Özellikleri	22
2.7.2. Polimerik Biyomateryallerin Çözücülerle Etkileşimi	23
2.7.3. Polimerik Biyomateryallerin Morfolojik Özellikleri	25
2.7.4. Polimerik Biyomateryallerin Yüzey Özellikleri	25
2.7.4.1. Mikroskopik İncelemeler	25
2.7.4.2. Yüzey Serbest Enerjisi-Temas Açısı İlişkisi	26

2.7.4.3. Temas Açısı Ölçüm Yöntemleri	27
I - Yapışık Damla Yöntemi	27
II- Yakalanmış Kabarcık Yöntemi	29
2.7.4.4. Temas Açısı Değerinin Hesaplanması	29
2.7.4.5. Yüzey Serbest Enerjisi Değerinin Hesaplanması	30
2.8. Polimerik Biyomateryallerin Sterilizasyonları.....	33
2.9. Polimerik Biyomateryallerin Kullanım Alanları	34
2.10. Polimerik Membranlar	35
2.10.1. Polimerik Membranların Sınıflandırılması.....	36
2.10.2. Membran Ayırma Prosesleri	37
2.10.3. Polimerik Membranların Karakterizasyonu	39
I - Kimyasal Yapı	40
II- Kristalinite	40
III-Gözenek Yapısı	40
IV- Kolloidal Morfoloji	41
V - Denge Su İçeriği	42
2.10.4. Polimerik Membranların Üretim Teknikleri.....	43
2.10.5. Polimerik Membranların Kullanım Alanları	44
I - Kan Oksijenasyonu	44
II- Yapay Böbrek	45
III- Biyolojik Olarak Aktif Madde Taşıyıcılığı	45
IV- Yara Tedavisi ve Yapay Deri.....	46
2.11. Polimerik Biyomateryal-Hücre Etkileşimi.....	48
2.11.1. Hücre Kültürü	48
2.11.2. Hücre Kültür Sistemleri	52
2.11.2.1. Tek Tabaka Hücre Kültürü	53
I - Tek Tabaka Hücre Kültüründe Hücre-Biyomater- yal Etkileşimi.....	53
II- Tek Tabaka Hücre Kültüründe Kullanılan Substratlar	56
2.11.2.2. Süspanse Hücre Kültürleri.....	58
2.11.3. Hücre Yapışma Kinetiği	58
2.11.4. Hücre Üremesi.....	60
2.11.5. Kan ve Yapısı.....	60

3. DENEYSEL ÇALIŞMA	65
3.1. Poliüretan Membranların Hazırlanması	65
3.1.1. Polimerlerin Çözünmesi	65
3.1.2. Polimer Çözeltilerinin Dökülmesi ve Membran Eldesi.....	66
3.2. Poliüretan Membranların Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	69
3.2.1. Poliüretan Membranların Temas Açısı Değerlerinin Belirlenmesi	69
3.2.2. Poliüretan Membranların Yüzey Serbest Enerjilerinin Belirlenmesi.....	70
3.2.3. Poliüretan Membranların Denge Su İçeriklerinin Belirlenmesi.....	71
3.2.4. Poliüretan Membranların Su Buharı Geçirgenliklerinin Belirlenmesi.....	71
3.2.5. Poliüretan Membranların SEM ile Yüzey ve Kesit Analizlerinin Yapılması.....	71
3.3. Hücre Kültür ve Kan Hücresi Deneysel Çalışmaları	72
3.3.1. Hücre Kültür Çalışmaları.....	72
3.3.2. BHK Hücre Kültürü.....	72
3.3.3. Hücre Kültürü Çalışma Koşulları.....	73
3.3.4. Hücre Kültüründe Kullanılan Cam Malzemenin Hazırlanması.....	74
3.3.5. Poliüretan Membranların Hücre Kültür Deneyine Hazırlanması.....	74
3.3.6. Poliüretan Yüzeylerde Hücre Yapışması.....	74
I - Hücrelerin Poliüretan Membran Yüzeyine Ekilmesi.....	75
II- Yapışan Hücrelerin Yüzeyden Koparılması.....	75
III- Yüzeye Yapışan Hücrelerin Sayılması.....	75
3.3.7. Poliüretan Yüzeylerde Hücre Yayılması.....	76
3.3.8. Poliüretan Yüzeylerde Hücre Üremesi	76
I - Hücrelerin Poliüretan Membran Yüzeyine Ekilmesi.....	77
II- Poliüretan Membran Yüzeyine Yapışan Hücre Sayısının Belirlenmesi.....	77
III- Poliüretan Membran Yüzeyinde Üreyen Hücre Sayısının Belirlenmesi.....	77
IV- Hücre Üremesinin Mikroskopik İncelenmesi.....	77

3.3.9. Kan Hücreleri Çalışmaları.....	78
4. DENEYSEL VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	79
4.1. Poliüretan Membranların Hazırlanması.....	79
4.1.1. Derişim Etkisinin İncelenmesi.....	80
4.1.2. Çözücü Etkisinin İncelenmesi.....	80
4.1.3. Çöktürücü Etkisinin İncelenmesi.....	82
4.2. Poliüretan Membranların Bazı Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi ve SEM İncelemeleri.....	83
4.2.1. Poliüretan Membranların Temas Açısı Değerlerinin İncelenmesi.....	83
4.2.2. Poliüretan Membranların Yüzey Serbest Enerjisi Değerlerinin İncelenmesi.....	86
4.2.3. Poliüretan Membranların Denge Su İçerik Değerlerinin İncelenmesi.....	88
4.2.4. Poliüretan Membranların SEM ile Yüzey ve Kesit Analizleri.....	91
4.2.5. Poliüretan Membranların Su Buharı Geçirgenlik Değerlerinin Belirlenmesi.....	100
4.3. Hücre Kültür ve Kan Hücreleri Çalışmaları Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	103
4.3.1. Hücre Yapışma Deney Sonuçları ve Değerlendirilmesi.....	103
4.3.1.1. Poliüretan Membran Yüzeylerde Hücre Yapışma Kinetiğinin İncelenmesi.....	107
4.3.1.2. Hücre Yapışma Değerlerinin Çözücü Bileşimine Göre İrdelenmesi.....	116
4.3.1.3. Hücre Yapışma Değerlerinin Temas Açısı ile Karşılaştırmalı Olarak İrdelenmesi.....	116
4.3.2. Hücre Üremesi Deney Sonuçları ve Değerlendirilmesi.....	119
4.3.3. Kan Hücreleri Deney Sonuçları ve Değerlendirilmesi.....	125
5. SONUÇLAR.....	127
KAYNAKLAR	130
EKLER	137

TABLÖLAR DİZİNİ

- TABLO 2.1. : Biyomateryal Türleri ve Tıbbi Uygulamaları.
- TABLO 2.2. : PU Sistemlerinde Görülen Farklı Hidrojen Bağlanma Şekilleri.
- TABLO 2.3. : PU Türleri.
- TABLO 2.4. : PU'ların Bazı Kullanım Alanları.
- TABLO 2.5. : Ticari Biyomedikal PU'lar.
- TABLO 2.6. : Biyolojik Olarak Parçalanabilir Polimerlere Örnekler.
- TABLO 2.7. : Önemli Polimerik Biyomateryaller.
- TABLO 2.8. : Bir Polimerik Biyomateryale Uygulanabilecek Testler.
- TABLO 2.9. : Çözünürlük Parametreleri.
- TABLO 2.10. : Polimerik Biyomateryallerin Genel Sterilizasyon Yöntemleri.
- TABLO 2.11. : Polimerik Biyomateryallerin Morfolojileri, Kompozisyonları ve Tıbbi Uygulamaları.
- TABLO 2.12. : Yara Tedavisinde Kullanılan Sentetik Membranlar.
- TABLO 2.13. : Hücre Kültürüyle Üretilen Ürünler.
- TABLO 2.14. : Hayvansal ve Mikrobiyal Hücrelerin Karşılaştırılması.
- TABLO 2.15. : Hayvansal Hücrelerin Kimyasal Bileşimi.
- TABLO 2.16. : Yüzeye Bağımlı ve Süspanse Hücrelerin Avantajları.
- TABLO 2.17. : Plazmadaki Elektrolitik Değişimi.
- TABLO 3.1. : PU Membranların Hazırlanmasında Kullanılan Çözücü Tür ve Bileşimleri.
- TABLO 3.2. : Hücre Yapışma Deneyinin Gerçekleştirildiği Durgun Kültür Koşulları.
- TABLO 4.1. : PU Membranların θ_{hava} Değerleri.
- TABLO 4.2. : PU Membranların θ_{hava} ; θ_{oktan} ve Yüzey Serbest Enerjisi Değerleri.
- TABLO 4.3. : PU Membranların Denge Su İçeriği ve θ_{hava} Değerleri.
- TABLO 4.4. : PU Membranların Gözenek Yapısı.
- TABLO 4.5. : PU Membranların Boşluk Hacmi ve Yüzey Serbest Enerjisi Değerleri.

- TABLO 4.6.** : PU Membranların SBG Değerlerinin Gözenek Yapısı ile Karşılaştırılması.
- TABLO 4.7.** : Bazı Ticari Membranların SBG Değerleri.
- TABLO 4.8.** : Hücre Yapışma Deney Sonuçları.
- TABLO 4.9.** : PU Membranların k Değerleri.
- TABLO 4.10.** : PU Membranlar İçin Elde Edilen Deneysel a ve Model a Değerleri.
- TABLO 4.11.** : Hücre Yapışma Kesrinin θ_{hava} ile Karşılaştırılması.
- TABLO 4.12.** : Hücre Üremesi Deney Sonuçları.
- TABLO 4.13.** : PU Membranlarla Temas Eden Kan Örneklerindeki Kan Hücreleri Değişim Farkları.



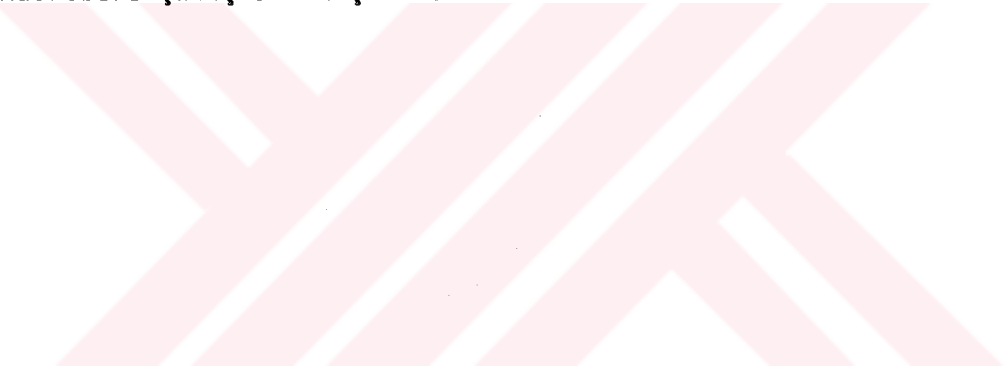
ŞEKİLLER DİZİNİ

- ŞEKİL 2.1. : Biyomateryallerin Su Etkileşim ve Mekanik Özelliklerinin Değişimi.
- ŞEKİL 2.2. : Polimerlerin Sınıflandırılması.
- ŞEKİL 2.3. : İlerleyen ve Gerileyen Temas Açısı.
- ŞEKİL 2.4. : Temas Açısının Hesaplanması.
- ŞEKİL 2.5. : Katı-Su-Okta Üçlü Faz Dengesi.
- ŞEKİL 2.6. : Membran Yapıları.
- ŞEKİL 2.7. : Membran Ayırma Prosesleri.
- ŞEKİL 2.8. : Polimerik Membranların Yapıları.
- ŞEKİL 2.9. : Genelleştirilmiş Hücre Modeli.
- ŞEKİL 2.10. : Çeşitli Yüzeylere Hücre Yapışması.
- ŞEKİL 2.11. : Hücre Yapışma ve Yayılmasının Şematik Gösterimi.
- ŞEKİL 2.12. : Normal İnsan Kanının Bileşimi.
- ŞEKİL 3.1. : Membran Üretim Aşamaları.
- ŞEKİL 3.2. : Temas Açısı Ölçüm Düzeneği.
- ŞEKİL 4.1. : PU Membranların Temas Açısı Fotoğrafları.
- ŞEKİL 4.2. : θ_{hava} - DSİ Değerleri.
- ŞEKİL 4.3. : PU-1 Membranlarının Yüzey ve Kesit SEM Fotoğrafı.
- ŞEKİL 4.4. : PU-2 Membranlarının Yüzey ve Kesit SEM Fotoğrafı.
- ŞEKİL 4.5. : PU-3 Membranlarının Yüzey ve Kesit SEM Fotoğrafı.
- ŞEKİL 4.6. : PU-4 Membranlarının Yüzey ve Kesit SEM Fotoğrafı.
- ŞEKİL 4.7. : PU-5 Membranlarının Yüzey ve Kesit SEM Fotoğrafı.
- ŞEKİL 4.8. : PU-6 Membranlarının Yüzey ve Kesit SEM Fotoğrafı.
- ŞEKİL 4.9. : BHK 21 Hücre Veriminin Sıcaklığa Bağlılığı.
- ŞEKİL 4.10. : Eşitlik 2.15'deki X-Y Değişimi.
- ŞEKİL 4.11. : Deneysel a ve Model a Değerlerinin Karşılaştırılması.
- ŞEKİL 4.12. : PU-1 Membranı Yüzeyine BHK 21 Hücre Yapışması.
- ŞEKİL 4.13. : PU-2 Membranı Yüzeyine BHK 21 Hücre Yapışması.
- ŞEKİL 4.14. : PU-3 Membranı Yüzeyine BHK 21 Hücre Yapışması.
- ŞEKİL 4.15. : PU-4 Membranı Yüzeyine BHK 21 Hücre Yapışması.

- ŞEKİL 4.16. : PU-5 Membranı Yüzeyine BHK 21 Hücre Yapışması.
- ŞEKİL 4.17. : PU-6 Membranı Yüzeyine BHK 21 Hücre Yapışması.
- ŞEKİL 4.18. : PS Kültür Kabında BHK 21 Hücre Yapışması.
- ŞEKİL 4.19. : θ_{hava} - Hücre Yapışma Kesrinin Değişimi.
- ŞEKİL 4.20. : PU-1 Membranı Yüzeyinde BHK 21 Hücre Üremesi.
- ŞEKİL 4.21. : PU-2 Membranı Yüzeyinde BHK 21 Hücre Üremesi.
- ŞEKİL 4.22. : PU-3 Membranı Yüzeyinde BHK 21 Hücre Üremesi.
- ŞEKİL 4.23. : PU-4 Membranı Yüzeyinde BHK 21 Hücre Üremesi.
- ŞEKİL 4.24. : PU-5 Membranı Yüzeyinde BHK 21 Hücre Üremesi.
- ŞEKİL 4.25. : PU-6 Membranı Yüzeyinde BHK 21 Hücre Üremesi.
- ŞEKİL 4.26. : PS Kültür Kabında BHK 21 Hücre Üremesi.



EKLER

- EK - 1 : Taramalı Elektron Mikroskopunun (SEM) Çalışma Prensipleri.
 - EK - 2 : Hücre Sayım Yöntemi.
 - EK - 3 : Hücre Kültür Çalışmalarında Kullanılan Ortam ve Çözeltiler.
 - EK - 4 : Hücrelerin Mikroskopik İncelenmesi.
 - EK - 5 : Yüzey Serbest Enerjisinin Hesaplanması.
 - EK - 6 : Hücre Yapışma Kinetiğinin İncelenmesi.
 - EK - 7 : Kan Hücreleri Çalışma Sonuçları.
- 

KISALTMALAR

PVA	:	Poli (vinil alkol)
SR	:	Silikon Rubber
PU	:	Poliüretan
PVC	:	Poli (vinil klorür)
PHEMA	:	Poli (hidroksi etil metakrilat)
PMMA	:	Poli (metil metakrilat)
PET	:	Poli (etilen teraftalat)
PP	:	Polipropilen
PTFE	:	Poli (tetrafloro etilen)
PGA	:	Poli (glikololik asid)
PE	:	Polietilen
PFEP	:	Poli (perfloro etilen-propilen)
CA	:	Selüloz asetat
CELL	:	Selüloz
PEO	:	Polietilen oksik
IUD	:	Rahim içi araç (Intrauterine device)
IOL	:	Göz içi lens (Intraocular lens)
EO	:	Etilen oksit
PU	:	Poliüretan
MF	:	Mikrofiltrasyon
UF	:	Ultrafiltrasyon
dK	:	Divalent katyonlar
YTG	:	Yüzeye Tutunan Glikoprotein
PBS	:	Fosfat Tampon Çözeltisi
DMF	:	Dimetilformamid
THF	:	Tetrahidrofuran

Ö Z E T

Sunulan çalışmada Pellethane® 2363-80 A, Up John, ticari adlı Poliüretan'dan, çözücü döküm yöntemiyle hazırlanan membranların, biyolojik uyuşabilirlikleri ile yapısal ve yüzeysel özellikleri incelenmiş ve yapay deri olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Çalışmanın ilk bölümünde, Dimetilformamid, Tetrahidrofuran ve Dioksan çözücülerinin farklı bileşimlerdeki karışımları kullanılarak altı ayrı Poliüretan membran hazırlanmıştır. Hazırlanan Poliüretan membranların yüzey ve kesit yapıları, Taramalı Elektron Mikroskobu ile incelenmiş ve çözücü tür ve bileşiminin, membranların yapısını etkilediği belirlenmiştir. Çözücü sistemine Tetrahidrofuran ilavesi az gözenekli; Dioksan ilavesi ise çok gözenekli yapıya ulaşılmasına neden olmuştur.

Çalışmanın ikinci bölümünde, hazırlanan Poliüretan membranların, "Yakalanmış Kabarcık" yöntemi ile hava ve n-oktan kabarcıkları için temas açısı değerleri, θ_{hava} ve θ_{oktan} , ölçülmüş ve bu değerler kullanılarak, membranların yüzey serbest enerjileri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, membranların θ_{hava} değerlerinin, çözücü sistemine Dimetilformamid ilavesi ile arttığını ve θ_{hava} değerlerinin, yüzey serbest enerjisi değerleri ile ters orantılı olarak değiştiğini göstermiştir.

Çalışmanın diğer bir bölümünde, Poliüretan membranların denge su içeriği ve su buharı geçirgenlik değerleri belirlenmiştir. Membranların denge su içeriği değerlerinin çözücü sistemine Dimetilformamid ilavesi ile azaldığı; θ_{hava} - denge su içeriği değerlerinin, birbiri ile ters orantılı olarak değiştiği ve membran yapısındaki gözenekliliğin artması ile membranların su buharı geçirgenliklerinin arttığı gözlenmiştir.

Çalışmanın son bölümünde, Poliüretan membranların yüzeylerinde, BHK 21 fibroblast hücrelerin yapışması ve üremesi incelenmiştir. Hücre yapışma kesri değerleri %65 ile %86 arasında değişim gösterirken, en yüksek yapışma değeri %100 Dioksan kullanılarak hazırlanan membran yüzeyinde elde edilmiştir. Çözücü sistemlerine Dimetilformamid ilavesi, hücre yapışma kesri değerlerini, göreceli olarak düşürmüştür. En yüksek hücre üreme değeri ise yine %100 Dioksan kullanılarak hazırlanan membranda gözlenmiştir. Membranların kan hücreleri ile etkileşimlerinin incelendiği deneysel çalışmalardan, kan hücrelerinin membran yüzeylerine yapışmadığı belirlenmiştir.



SUMMARY

Biocompatibility, structural and surface properties and usability as an artificial-skin of Pellethane[®] 2363-80 A, Up John, Polyurethane (PU) membranes filmed by solvent-casting method are investigated.

In the first part of this study six different types of PU membranes, filmed via different combinations of DMF-THF-Dioxane solvents, are examined for surface and cross-sectional properties by Scanning Electron Microscope. It is determined that properties of PU membranes are affected by solvent type and composition.

Addition of THF and Dioxane to the solvent system resulted to the less and more porous PU membrane structures respectively.

In the second part of the study Contact Angles of air and n-octane bubbles are measured by Captive Bubble Method and surface free energies of PU membranes are calculated via θ_{air} and θ_{Octane} values.

By adding DMF to the solvent system a proportional increase in θ_{air} values is noted which is inversely proportional with surface free energy of PU membranes.

Equilibrium Water Content (EWC) and Water Vapour Permeability values of Pu membranes are also studied. Decrease in EWC values by adding DMF to the solvent system, the inverse proportionality between θ_{air} - EWC values and an increase in Water Vapour Permeability values as a result of more porous membrane structure are also determined.

As a final study BHK 21 fibroblastic-cell attachment and growth characteristics of PU membranes are tested. While cell attachment ratios differing between 65% and 86%, the highest value is obtained on the PU membrane solvent-casted by 100% Dioxane. Including DMF to solvent systems relatively decreased the ratios. The highest growth characteristic value is marked on the PU membrane filmed by 100% Dioxane. Studies with blood cells, showed that no attachment occurs.

1. GİRİŞ VE ARAŞTIRMANIN AMACI

Biyolojik çevreyle temas halinde kullanılan materyaller "biyomateryaller" olarak adlandırılır. Yapı malzemeleri çok çeşitli olan biyomateryaller, başlıca, polimerler, metaller, seramikler, karbonlar ve doğal dokulardan üretilirler.

Biyomateryallerin en önemli grubu, polimerlerden üretilen "polimerik biyomateryaller" dir. Tıpta çok geniş bir kullanım alanına sahip olan polimerik biyomateryallerin uygulamalarına, birkaç çarpıcı örnek olarak protezler, kontrollü ilaç salım sistemleri ve çeşitli implantlar verilebilir.

Ultrafiltrasyon, mikrofiltrasyon, ters ozmoz gibi çeşitli ayırma proseslerinin vazgeçilemez parçası olan polimerik membranlar, ziraat ve eczacılık alanlarında olduğu kadar, tıpta da, yaşamsal önem taşıyan pek çok sistemin en önemli bölümünü oluşturmaktadır. Polimerik membranların, özelliklerine bağlı olarak kullanıldıkları en önemli alanlar, kan oksijenasyonu, yapay böbrek, yara tedavisi ve yapay deri olarak örneklendirilebilir.

Polimerik biyomateryallerden Poliüretanlar, yeterli biyolojik uyusabilirlikleri; fabrikasyon ve sterilizasyon kolaylıkları ve yüksek mekanik özellikleri ile en yaygın olarak kullanılan biyomateryallerden biridir.

Sunulan çalışmada, biyomedikal uygulamalar için, Up John firması tarafından geliştirilen Pellethane® 2363-80 A segmente Poliüretan'ından, çözücü döküm yöntemi ile hazırlanan membranların, biyolojik uyusabilirlikleri ile yapısal ve yüzeysel özelliklerinin incelenmesi ve yapay deri olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Araştırma ilk önce, diğer koşullar sabit tutularak (sıcaklık, çöktürme ortamı, kalınlık gibi), çözücü sistemleri değiştirilmiş ve çözücü

döküm yöntemi ile, farklı yapıda altı ayrı PU membran hazırlanmıştır.

Daha sonra, hazırlanan Pu membranların, yüzey ve kesit özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelenerek, çözücü sisteminin membran yapısına ve gözenekliliğine etkisi araştırılmıştır. Bunun yanısıra, PU membranların yüzey serbest enerjilerini belirlemek üzere, hava ve Oktan kullanılarak, temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiş ve çözücü sisteminin temas açısına etkisi incelenmiştir.

Araştırmanın diğer bir bölümünü, PU membranların denge su içerik ve su buharı geçirgenlik değerlerinin belirlenmesi oluşturmaktadır. Bu bölümde, denge su içeriği ve su buharı geçirgenlik değerlerinin, çözücü sistemiyle nasıl değiştiğinin gözlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmanın en son bölümünde, PU membranların biyolojik uyuşabilirliklerinin belirlenmesi amacıyla, "Baby Hamster Kidney" fibroblast hücrelerinin, membran yüzeyine yapışması ve üremesi incelenmiştir. Yapışma kinetiği matematiksel bir model ile ifade edilmiş ve yapışma değerlerinin membran çözücü sistemine nasıl bağlı olduğu irdelenmiştir. Ayrıca, PU membranların biyolojik uyuşabilirlikleri hakkında genel bir yoruma ulaşmak amacıyla, çeşitli kan hücreleriyle etkileşimler incelenmiştir.

Araştırma kapsamında gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçların birbirleri ile değişimi, her bölümün sonunda, ayrıca irdelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde araştırma kapsamında yapılan çalışmanın teorik temelleri, konuyla ilgili literatür bilgileri ile birlikte sunulmuştur. Öncelikle biyomateryaller ve özellikleri anlatılmış ve daha sonra da çalışmanın önemli bir bölümünü oluşturan hücre-biyomateryal etkileşimleri incelenmiştir.

2.1. BİYOMATERYALLER

Biyolojik ortamlarla temas halinde olan materyallere "biyomateryaller" denilir (1). Pek çok türü olan biyomateryaller, klinik olarak geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Bu materyallerin bir kısmı kısa süreler için kullanılırken, diğer bir kısmı, daha uzun ve bazen de bir yaşam boyu uygulama alanı bulmaktadır.

2.1.1. Biyomateryallerin Genel Özellikleri

Çeşitli özelliklere sahip olan biyomateryallerden uygun olanını seçmek için materyalin iyi tanınması gereklidir. İdeal bir biyomateryalden beklenen özellikler şöyle sıralanabilir (2):

1. Gerekli fiziksel özelliklere (dayanıklılık, esneklik, geçirgenlik, v.b.) sahip olmalıdır;
2. Kolaylıkla elde edilebilmeli, saflaştırılabilmeli, şekillendirilebilmeli ve sterillenebilmelidir;
3. Fiziksel özelliklerini ve fonksiyonlarını "in vivo" ortamda istenilen süre gerektiği gibi koruyabilmelidir (Bu süre ihtiyaca göre 1 saat, 1 yıl veya bir yaşam boyu olabilir);
4. Kan pıhtılaşması, doku nekrozu (çürüme), karsinogenez (kanser-

leşme); allerjik cevap, v.b. gibi yabancı cisim reaksiyonuna neden olmama-
lıdır.

2.1.2. Biyomateryallerin Temel Yapı Malzemeleri

Halen kullanılmakta olan ve geliştirilmesine çalışılan biyomater-
yallerin temel yapı malzemeleri çok çeşitlidir. Yapılan çalışmalarda, fark-
lı malzemeler denenerek optimum uygunluğa ulaşılmaya çalışılmaktadır. Bi-
yomateryal olarak kullanılan materyaller ve uygulanma şekilleri Tablo 2.1'
de verilmiştir (2).

<u>TÜRLERİ</u>	<u>TIBBİ UYGULAMALARI</u>
<u>Polimerler</u> (Fiberler, Kauçuklar, Plastikler)	Yumuşak ve Sert Doku implantları
<u>Metaller</u>	Yapay Organlar
<u>Seramikler</u>	Alet ve Araçlar
<u>Karbonlar</u>	(Teşhis ve/veya tedavi için)
<u>Doğal Dokular</u>	

Tablo 2.1. Biyomateryal Türleri ve Tıbbi Uygulamaları.

2.1.3. Biyomateryallerin Kullanım Alanları

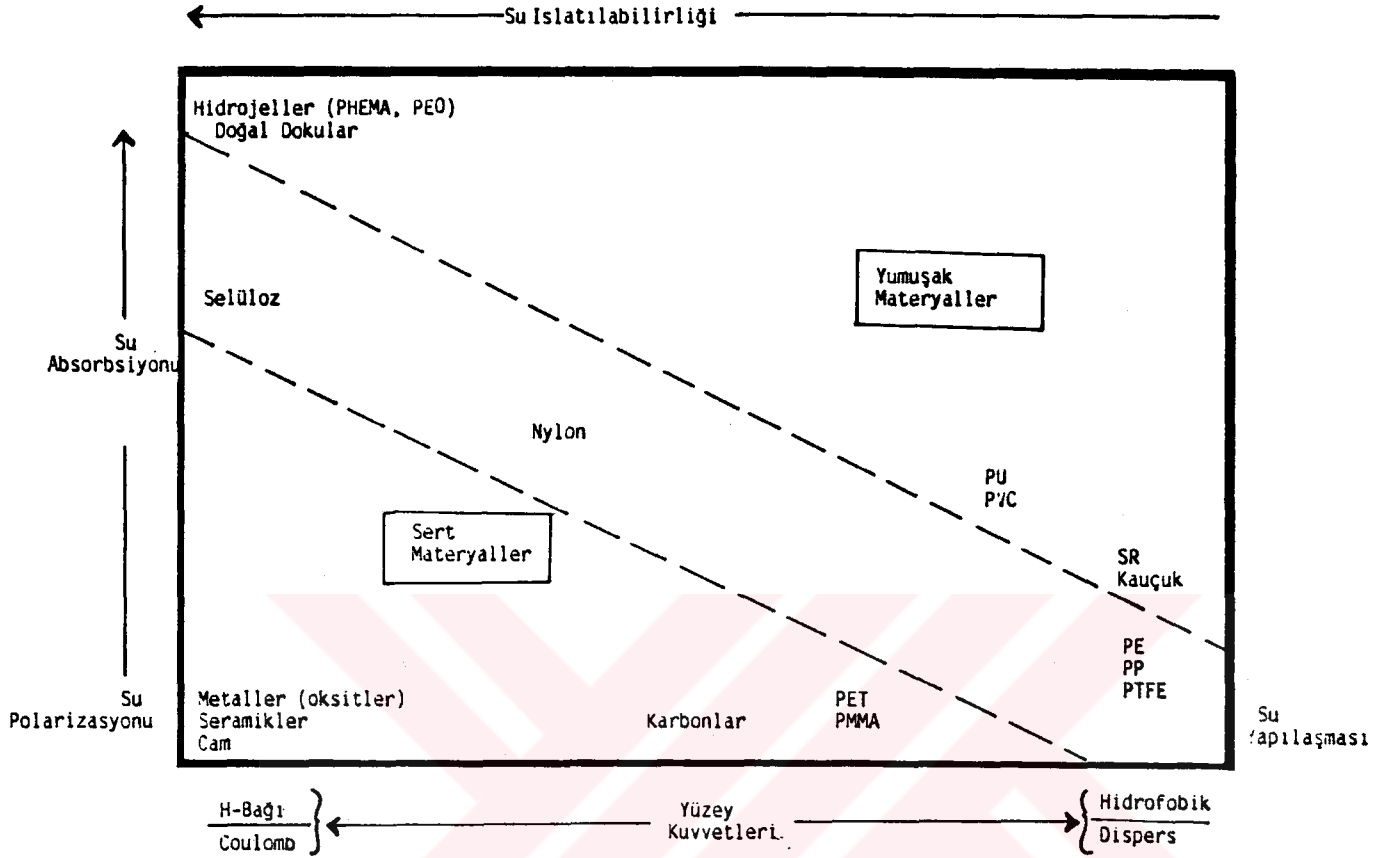
İçlerinde büyük oranda polimerik malzemelerin de yer aldığı biyo-
materyaller, pek çok tıbbi uygulama alanına sahiptirler.

Bu uygulama alanlarına örnekler şöyle verilebilir (2) :

- 1- İnvazif (vücut içi) enstrumantasyon
(Kataterler,...)
- 2- İmplant aletler
(Hidrocefal tüpler, kalp pili,...)
- 3- Kan akışlı ekstrakorporal cihazlar
(Yapay böbrek, kalp-akciğer kan oksijenatörü,...)
- 4- Tam veya kısmi sert yapı elemanları-Protezler
(Kalça eklemi, diş,...)
- 5- Tam veya kısmi organ implantları
(Kalp kapakları, kalp yardımcı araçları, deri,...)
- 6- Yumuşak doku implantları
(Kan damarları, tendon,üretar,...)

2.1.4. Biyomateryallerin Seçimi

Biyolojik çevre, esas olarak sudan oluştuğu için, su ıslatılabilirliği "water wettability" ve su absorpsiyonu, "water sorption", biyomateryallerin en önemli iki özelliğidir. Bu materyallerin uygulamadaki yararlarını belirleyen diğer bir anahtar faktör ise mekanik özelliklerdir. Bu üç faktörün çeşitli biyomateryallerde nasıl değiştiği, Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Bu şekilde, kullanım amacı ve yerine göre uygun materyalin ön seçimini yapmak mümkündür.



Şekil 2.1. Biyomateryallerin Su Etkileşim ve Mekanik Özelliklerinin Değişimi.

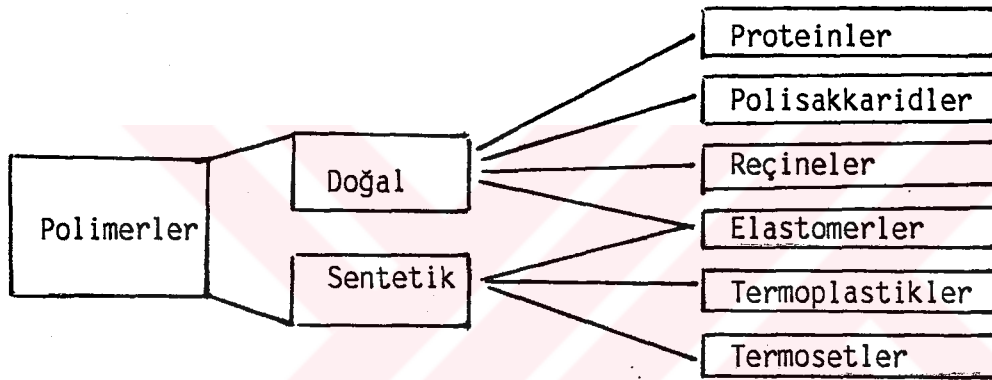
2.2. POLİMERLERLER İLGİLİ GENEL BİLGİLER

Polimerler, uygun şartlarda, farklı birimlerle birleşerek büyük moleküller oluşturulmasına yatkın fonksiyonel grupları bulunan basit moleküllerin reaksiyonu ile oluşan bileşikler olarak tanımlanırlar (3). Bir polimerin, çok sayıda tekrarlanan en basit molekülüne "monomer" denilir. Bir bileşiğin monomer olabilmesi için, iki veya daha fazla fonksiyonlu grup içermesi gerekir (4).

Polimerlerin Sınıflandırılması

Polimerler çeşitli özellikleri açısından, farklı şekillerde sınıflandırılabilir.

Polimerlerin selüloz, nişasta, agaroz, jelatin, kollajen, doğal kauçuk gibi doğada bulunabilen örnekleri, "doğal polimerler" olarak; yapay olarak elde edilenleri ise "yapay (sentetik) polimerler" olarak adlandırılır. Polimerlerin bu şekilde sınıflandırılması (Şekil 2.2) de gösterilmiştir (5).



Şekil 2.2. Polimerlerin Sınıflandırılması.

Şekil 2.2'de gösterilen "termoplastikler" ve "termosetler", işlenebilme özelliklerine göre adlandırılmış polimer türleridir. Termoplastik polimerler ısı ve basınç altında yumuşayan, tekrar tekrar eritilip şekillendirilebilen polimerlerdir. Termosetler ise, çapraz bağlı olmalarından dolayı çözünmeyen ve erimeyen polimer tipleridir.

Hem doğal, hem de yapay olanları bulunan "elastomerler", plastikler ve elyafların özelliklerinden farklı özellikleri olmayan, fakat daha esnek olan polimerik malzemelerdir.

Yaşamla ilgili birçok önemli fonksiyona sahip olan bazı doğal polimerler "Biyopolimerler" olarak adlandırılır. Bunlara proteinler, nükleik

asitler (DNA, RNA) ve karbonhidratlar örnek verilebilir (6).

Polimerler,"organik"ve"inorganik polimerler" olarak da sınıflandırılabilir. Organik polimerler,yapılarında öncelikle karbon olmak üzere hidrojen, oksijen, azot ve halojen atomlarını içerirler. İnorganik polimerlerin ise, ana zincirlerinde karbon atomu bulunmayıp, genellikle, IV-VI grup elementleri içeren polimerlerdir. İnorganik polimerlerin en tipik örneği doğal ve sentetik zeolitlerdir (6).

Polimerler içerdikleri monomer tiplerine göre şu şekilde sınıflandırılabilir:"Homopolimerler","kopolimerler"ve"terpolimerler". Homopolimerler, tek bir tür monomerden oluşmuştur. Kopolimerler, iki tür monomer karışımından oluşan polimerlerdir. Üç ayrı tür monomerden elde edilen polimerler ise, terpolimerler olarak adlandırılır (5).

Kopolimerler kendi içlerinde dört tipe ayrılır: Rasgele, dönüşümlü, blok ve aşı kopolimerleri. Bu kopolimerlerde, monomer türlerinin yerleri ve sıralanışları birbirinden farklıdır.

İki farklı monomer türü A ve B ile gösterilirse,kopolimerler şöyle şematize edilebilir:

- a) Rasgele (random) kopolimer : -A-A-B-A-B-B-A-A-A-
- b) Dönüşümlü (alternatif) kopolimer : -A-B-A-B-A-B-A-B-
- c) Blok kopolimer : -A-A-A-A-B-B-B-B-B-
- d) Aşı (graft) kopolimer : -A-A-A-A-A-A-A-
 B B
 | |
 B B
 | |
 B B

Polimerler bağlanma şekillerine göre,"doğrusal","dallanmış" ve"çapraz" bağlı polimerler olarak gruplandırılabilir.

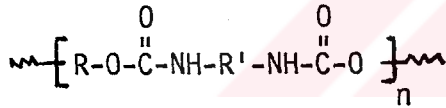
a) Doğrusal polimerler : -A-A-A-A-A-A-A-

b) Dallanmış polimerler :
$$\begin{array}{ccccccc} & & & & A & & \\ & & & & | & & \\ -A & -A & -A & -A & -A & -A & -A- \\ & | & & | & & & \\ & A & & A & & & \\ & & & A & & & \end{array}$$

c) Çapraz bağlı polimerler :
$$\begin{array}{ccccccc} -A & -A & -A & -A & -A & -A & - \\ & | & & | & & | & \\ & B & & B & & B & \\ & | & & | & & | & \\ -A & -A & -A & -A & -A & -A & - \end{array}$$

2.3. POLİÜRETANLAR

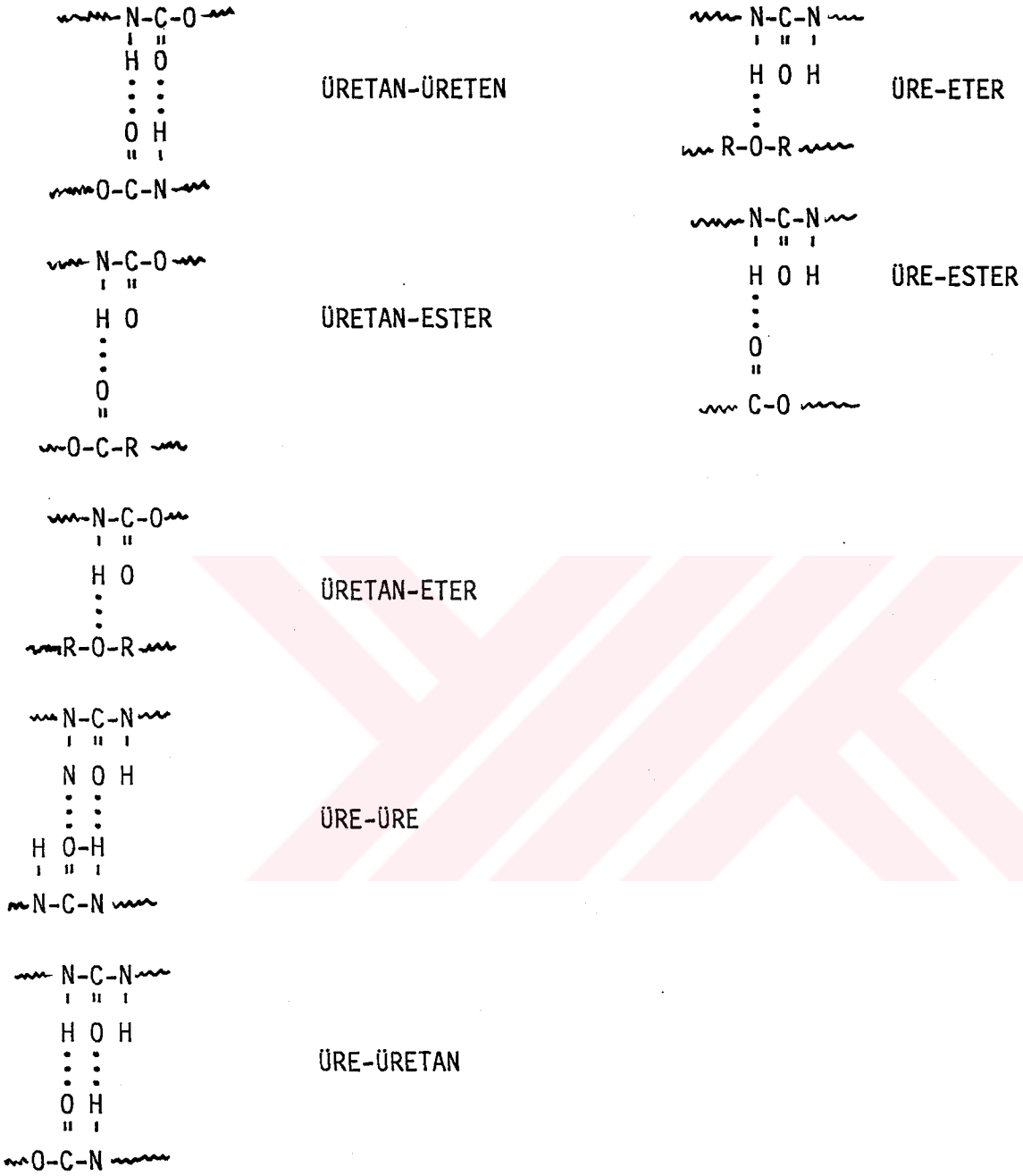
Poliüretanlar (PU), ilk kez 1937 yılında Bayer ve arkadaşları tarafından, diizosiyanatın katılma polimerizasyonu kullanılarak hazırlanmıştır (7,8). Poliüretanlar, yalnızca tek bir belirli üretan grubu değil, pek çok farklı üretan grubu içeren polimerlerdir. Poliizosiyanatlar ile polieter, poliester, hint yağı ve glikoller gibi polihidroksi bileşiklerin tepkimelelerinden elde edilen poliüretanlara ait genel bir yapı



şeklinde verilebilir.

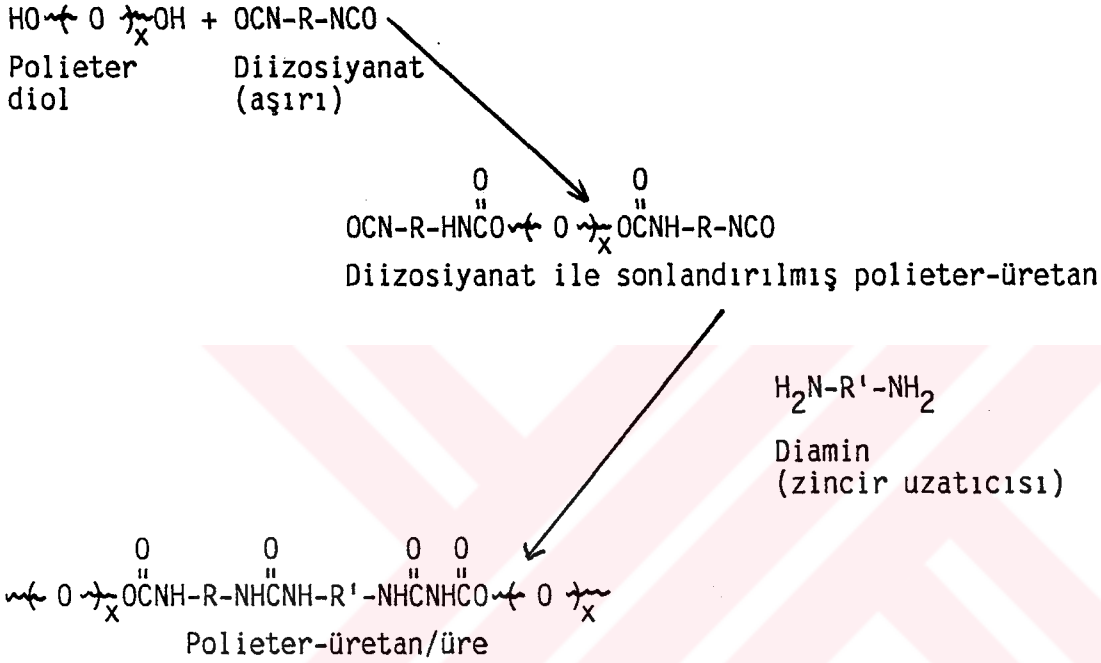
2.3.1. Poliüretan Kimyası

Genel olarak, üretan kimyası, izosiyanat kimyasının bir bölümüdür. Kullanılan monomer grubuna göre farklı tipte poliüretan üretilebilmektedir. Bu tiplerde, birbirinden farklı hidrojen bağlarının varlığı söz konusudur (9,10). Tablo 2.2'de, Poliüretan sistemlerindeki olası hidrojen bağlanma türleri verilmektedir.



Tablo 2.2. PU Sistemlerinde Görülen Farklı Hidrojen Bağlanma Şekilleri.

Biyomateryal olarak kullanılan blok kopolimer yapısındaki PU'lar, çeşitli düzenleyici moleküllerin bulunduğu ortamda, genellikle polieter kökenli bir diol ile tepkimeye giren fazla miktardaki izosiyanottan üretilirler. Örnek bir tepkime şu şekilde verilebilir (2).



2.3.2. Poliüretanların Özellikleri ve Türleri

PU'nın belli başlı dört ürün tipi vardır:

- Köpükler
- Fiberler
- Elastomerler
- Kaplama malzemeleri

PU köpükler çapraz bağ içerirler. Polimerin yapısına ve elde edilen çapraz bağın tipine bağlı olarak, istenilen yumuşaklıkta veya sertlikte PU köpük üretilir.

PU fiberler çok esnek bir malzemedirler ve bu nedenle yaygın bir kullanıma sahiptirler.

PU elastomerler, izosiyanat grubunun glikol, diamin, diasit veya amino alkollerle reaksiyona girmesiyle vulkanize olabilirler. Çok uzun ömürlüdürler.

PU kaplama malzemeleri, pek çok metal yüzeye çok iyi yapışma özelliği gösterip fırçayla veya püskürtmeyle uygulanabilmektedir (11).

Farklı monomerlerden çıkarak değişik özelliklere sahip PU'lar elde edilebilir. Tablo 2.3'de bellibaşlı PU türleri ve kullanılan monomer ve kimyasallar verilmiştir.

Monomer ve kimyasallar	PU Ürün Türü
Polimerik metilen difenil izosiyanat (PMDI) Polieter polioller	Sert PU köpük
Metilen difenil izosiyanat (MDI) Polieter veya Polyester makroglikol	PU elastomerler
Toluen diizosiyanat (TDI) Köpük Polieter polioller Su	Yumuşak PU

Tablo 2.3. PU Türleri.

2.3.3. Poliüretanların Genel Kullanım Alanları

PU'lar sahip oldukları özelliklerden dolayı çok geniş bir kullanım alanına sahiptirler. PU'ların, özelliklerine bağlı olarak, kullanım alanlarının bazıları Tablo 2.4'de özetlenmiştir (11).

Özellikleri	Ürün Tipi	Kullanım Yerleri
Sağlam; dayanıklı; düşük yoğunlukta; kolay üretilir.	Yumuşak PU köpük	Otomobil ve mobilya koltuk minderleri
Sıkışmaya dirençli; ısı iletkenliği düşük; petrol ve benzine dirençli; su absorblamayan	Sert PU köpük	İçi boş sistemleri, minimum ağırlıkla destekleyip kuvvetlendirmek; prefabrik inşaat endüstrisi; soğutucularda termal yalıtım malzemesi
Esnek	PU fiber	Çok hafif giysiler; mayo ve deniz giysileri
Aşınmaya dirençli; çok esnek; yağa, petrole ve çözücülere dirençli	PU elastomerler	Yüksek ayakkabı topukları; küçük endüstriyel tekerlekler
Aşınmaya ve çarpmaya dirençli; esnek	PU kaplama malzemeleri	Jimnastik ve dans salonları taban kaplaması; denizcilik malzemeleri ve açık havada kullanılan malzemelerin kaplanması.

Tablo 2.4. PU'ların Bazı Kullanım Alanları.

2.3.4. Biyomateryal Olarak PU

I - Yapıları ve Özellikleri

PU'lar en çok kullanılan biyomateryallerden biridir. Yeterli kan uyuşabilirlikleri ve yüksek mekanik özelliklere sahip olmaları, bu tercihe neden olmaktadır (12). Ayrıca, fabrikasyon ve son şekillendirme kolaylıkları, sterilize edilebilmeleri ve toksik gruplar içermemeleri, biyolojik amaçlı kullanım alanlarını genişletmektedir.

PU'lar blok kopolimerler olup, camsı veya yarı kristalin sert faz üretan grupları, viskoz veya jelimsi yumuşak makroglikol yapı içinde dağılmış durumdadır. Sert ve yumuşak fazlara yapısındaki bu uyumlu dağılımı, PU'lara üstün fiziksel ve mekanik özellikler kazandırmıştır (13).

PU'lara biyolojik parçalanabilirlik açısından bakıldığında, yapılan çalışmalardan çıkarılan sonuçlar, bir miktar enzimatik ve oksidatif parçalanmanın söz konusu olduğu, ancak bu parçalanmanın minimum düzeyde kaldığı şeklindedir (14). Dolayısıyla PU, uzun süreli implant olarak kullanımlar için çok uygun bir malzemedir.

II - Kullanım Alanları

Yukarıda söz edilen üstün özellikleri ile PU'lar biyolojik uygulamalarda çeşitli kullanım olanakları bulmuşlardır. Özellikle laboratuvar ve klinik amaçlı uygulamalarda, yapay damar, yapay kalp, kalp pili kaplama maddeleri gibi özel üretim alanlarında, vazgeçilmez bir ana madde konumuna erişmişlerdir (15-22).

Üretanlardan yararlanılarak elde edilen materyallerin kullanım alanları şu şekilde sıralanılabilir :

Endotrakeal tüpler (23)

Aortik Greft (24)

Arteriyal venöz, vasküler tüpler (25-27)

Kalp yardımcı ve by-pass araçları (28-29)

Diyaliz membranları (30,31)

Kalp kapakları (32,33)

Kemik yapıştırıcıları (34,35)

Koruyucu ve onarıcı dişçilik (36)

Yapay kalp ve kan pompa tüpleri (37)

Piyasada bulunan çeşitli biyomedikal PU'ların ticari adları ve kaynakları Tablo 2.5'de verilmiştir (38).

Ticari Adı	Kaynak
S.R.I.	STANFORD RESEARCH INSTITUTE
Biomer	ETHICON
Renathane	RENAL SYSTEMS
Avcothane	AVCO-EVERETT
Erythrothane	BIOSEARCH
Pellethane	UPJOHN
Estane	GOODRICH
Texin	MOBAY
Bellco	BELLCO

Tablo 2.5. Ticari Biyomedikal PU'lar.

2.4. POLİMERİK BİYOMATERYALLER

Biyomateryaller içinde en geniş uygulama alanı bulan sınıf, sentetik polimerlerdir. Sentetik polimerler, çok değişik bileşim ve özelliklerde elde edilebilirler. Şekillendirilmeleri diğer materyallere göre çok daha kolay olup, istenilen karmaşık geometrilerde hazırlanabilirler. Polimerik biyomateryallerin yalnız bulk yapıları değil, yüzey özellikleri de fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal olarak kolaylıkla ve istenilen yönde modifiye edilebilir.

2.5. POLİMERİK BİYOMATERYALLERİN ÖZELLİKLERİ

Polimerler, biyolojik fonksiyonu olan moleküllerle birlikte çok değişik uygulamalarda kullanılmaktadır.

Polimer-biyolojik ajan kompozit sistemlerinde yer alan biyoaktif ajanlara örnekler şunlardır:

Antibiyotikler
Antikoagulantlar (pıhtılaşmayı engelleyen)
Anti-kanser ilaçlar
Antikorlar
Antagonistler (birbirine zıt etkili ilaçlar)
Enzimler
Kontraseptifler (koruyucular)
Antibakteriyal ajanlar
Hücreler
Dokular ve doku bölümleri

Bu sistemler, aktif maddenin kontrollu olarak salımını sağlayacak şekilde dizayn edilirler. Bu fonksiyonu yerine getirmek üzere dizayn edilen sistemler şöyle sıralanabilir:

- a) Difüzyon kontrollu polimerik membran içeren sistemler,
- b) Aktif maddeyi içinde tutarak dışarıya kontrollu olarak salan matriks sistemler,
- c) Diğerleri.

Polimerik biyomateryaller aşınmak ve parçalanmak üzere de dizayn edilebilirler. Özellikle bir seri biyolojik olarak parçalanabilir polimer, aktif maddeyi vücut içine, aşındıkça ve parçalandıkça salacak şekilde hazırlanmaktadır. Tablo 2.6'da bu tip biyolojik olarak parçalanabilir polimerlere örnekler verilmiştir.

Biyolojik olarak parçalanma reaksiyonları, bazı durumlarda, polimerin toksik maddeler oluşturmaya yol açmaktadır. Bazen de, polimerin kendisi toksik maddeleri içermektedir. Bu durum polimerlerin, diğer biyomateriyallere oranla en önemli dezavantajıdır.

$\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{NH} \end{array} \right]$	Poliamidler, Polipeptidler
$\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{O} \end{array} \right]$	Poliesterler
$\left[\begin{array}{c} \text{O}-\text{C}-\text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R}' \quad \text{OR} \end{array} \right]$	Poliortoesterler
$\left[\begin{array}{c} \text{O}-\text{C}-\text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R}' \quad \text{R} \end{array} \right]$	Poliasetaller
$\left[\begin{array}{c} \text{CO}_2\text{H} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH} \quad \text{CH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array} \right]$	Polisakkaridler
$\left[\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{CN} \\ \diagdown \text{CO}_2\text{CH}_3 \end{array} \right]$	Poli (metil siyanoakrilit)

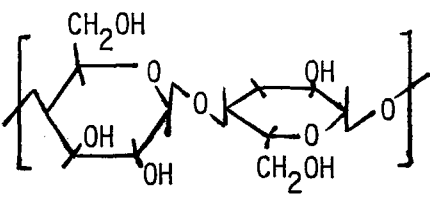
Tablo 2.6. Biyolojik Olarak Parçalanabilir Polimerlere Örnekler.

2.6. POLİMERİK BİYOMATERİYALLERİN TÜRLERİ VE TIBBİ UYGULAMALARI

Pekçok sentetik polimer, biyomateriyal olarak kullanılabilir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan gruplara örnekler, Tablo 2.7'de, tıbbi uygulamaları ve temel kimyasal yapılarıyla birlikte verilmiştir.

Jenerik Polimer	Formül	Tıbbi Uygulamaları
Silikonlar	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{-(Si-O)-} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Doku alternatifleri, kalp yardımcı cihazları, ilaç salım araçları, implant veya ilgili cihaz kaplama malzemeleri, yapıştırıcılar, tüpler, kontak lensler.
Poliüretanlar	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{-(O-R-O)-} \\ \text{O} \\ \\ \text{C-(NH-R''-NH)-} \end{array}$	Kan pompaları, tüpler, kan depolama torbaları, balon yardımcı cihazları, kalp pili.
Poli (vinil klorür)	$\begin{array}{c} \text{-(CH}_2\text{-CH)-} \\ \\ \text{Cl} \end{array}$	Tüpler, kan depolama torbaları.
Kauçuk	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{-(CH}_2\text{-C=CH-CH}_2\text{)-} \end{array}$	Tüpler.

Tablo 2.7-a. Önemli Yumuşak veya Lastikimsi Polimerik Biyomateryaller.

Jenerik Polimer	Formül	Tıbbi Uygulamalar
Poliesterler	$\left\{ \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}- \right\}$ Poli(etilen teraftalat)	Yapay damar, kalp kapak dikme halkaları, implantları sabitleştirmek ve kaplamak için kullanılan dokumalar, ameliyat ipliği.
Floropolimerler	$\left\{ \text{OCH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}- \right\}$ Poliglikolik asit $\left\{ \text{CF}_2-\text{CF}_2- \right\}$ Poli(tetrafloro etilen)	Parçalanabilir ameliyat ipliği.
Nylonlar	$\left\{ \text{HN}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}- \right\}$	Yapay damar, kan oksijenatör membranları.
Polietilen	$\left\{ \text{CH}_2-\text{CH}_2- \right\}$	Ameliyat ipliği, pansuman malzemeleri.
Selülozlar	 Selüloz (veya kısmen hidrolize edilmiş selüloz asetat)	Sentetik eklem, rahim içi cihazlar, ilaç salım cihazları.
		Diyaliz membranları, ilaç salım sistemleri, kontak lensler.

Tablo 2.7-b. Önemli Yarı-Kristalin Polimerik Biyomateryaller.

Jenerik Polimer	Formül	Tıbbi Uygulamalar
Poli(metil metakrilat)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \{ \text{CH}_2 - \text{C} \} \\ \\ \text{COOCH}_3 \end{array}$	Sert ve yumuşak kontak lens, diş dolgu malzemeleri, kemik çimentosu, göz içi lens.
Poli(hidroksi etil metakrilat) (Çapraz bağlı)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \{ \text{CH}_2 - \text{C} \} \\ \\ \text{COOC}_2\text{H}_4\text{OH} \end{array}$	Yumuşak kontak lens, yapay deri, ilaç salım matriksleri.
N-vinil pirolidon	$\begin{array}{c} \{ \text{CH}_2 - \text{CH} \} \\ \\ \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{ } \quad \quad \text{O} \end{array}$	Yumuşak kontak lens bileşenleri, kan plazması genişleticisi.
Poli(siyanoalkil akrilatlar)	$\begin{array}{c} \text{CN} \\ \\ \{ \text{CH}_2 - \text{C} \} \\ \\ \text{COO}(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_3 \end{array}$	Doku yapıştırıcıları, damar tıkayıcıları.
Akrilamid	$\begin{array}{c} \{ \text{CH}_2 - \text{CH} \} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Biyoelektrodlar, yumuşak kontak lens bileşenleri.

Tablo 2.7-c. Akrilik ve Akrilik Bağlantılı Polimerik Biyomateryaller.

2.7. POLİMERİK BİYOMATERYALLERİN GENEL TANIMLANMA YÖNTEMLERİ

Son yıllarda, pek çok yeni uygulama alanı bulan polimerik biyomateriyallerin yapısal ve yüzeysel özelliklerini tanımlamak, hem geliştirilen materyalleri sınıflandırmak, hem de geliştirilecek materyaller için standartlar belirlemek açısından önemlidir. Her biyomateryalden, kullanım yerine göre farklı özellikler beklenmesine karşın, bazı genel özelliklere sahip olması da gereklidir. Polimerik biyomateryallerin bütün özelliklerinin saptanması için çeşitli testler geliştirilmiştir. Tablo 2.8'de bu testler toplu olarak verilmiştir. Bu testlerin tümünün yapılması için oldukça iyi donanımlı bir laboratuvar ortamı gerekmektedir. Ancak özel olarak seçilecek birkaç test uygulanarak, polimerik biyomateryal ile ilgili genel bazı ipuçları elde edilebilir (39).

Polimerik bir biyomateryalin özellikleri, sentez ve polimerizasyon sırasında fabrikasyon basamaklarından birinde, paketlenme, sterilizasyon, yükleme veya depolama gibi işlemler sırasında pekçok farklı uygulama ile karşıkarşıya kalacağından, değişikliğe uğrayabilir. Bu nedenle materyalin özelliklerinin sürekli olması çok önemlidir.

Polimerik biyomateryallerin çeşitli özelliklerinin belirlenmesi için yapılabilecek incelemeler, bu bölümün alt bölümlerinde kısaca verilmiştir.

Yığın Özellikleri	Yüzey Özellikleri
. Polimerik kimlik belirleme . Infrared Spektrum . NMR Spektrum . Sertlik . Yoğunluk . Gerilim-gerinim ilişkileri . Çözücülere tepkisi . Elementel bileşimi . Ekstrakte edilebilirliği . Molekül ağırlığı dağılımı . Isıl karakterizasyonu . X - ışınları spektrum . Optik sapma . Morfolojisi (SEM) . Elektriksel iletkenliği . Gerilim gevşemesi . Osilasyon cevabı.	. Işık mikroskopuyla yapılan morfolojik inceleme . Infrared Spektrum . Temas açısı . SEM ile yapılacak morfolojik inceleme . Yüzey kimyasal bileşimi . Protein adsorbsiyonu.

Tablo 2.8. Bir Polimerik Biyomateryale Uygulanabilecek Testler.

2.7.1. Polimerik Biyomateryalin Yığın (Bulk) Özellikleri

Polimerik bir biyomateryalin yığın özelliklerinin bilinmesi, hem yüzey analiz sonuçlarının yorumlanmasına temel oluşturması, hem de, mekanik özelliklerine korele edilebilecek parametrelerin sağlanması bakımından oldukça önemlidir. Yığın özelliklerinin tanımlanması için gerekli bilgiler şunlardır:

1- Hazırlama sırasında kullanılan monomerin ve monomer veya polimer saflaştırılmasında kullanılan yöntemlerin tanımlanması;

2- Polimerizasyon sırasında kullanılan genel yöntemin tanımlanması;

3- Polimerizasyonun kontrolü için, ortama başka bir madde katılmış ise bu maddenin tanımlanması;

4- Saflaştırma veya izolasyon sırasında kullanılan çözücülerin tanımlanması.

2.7.2. Polimerik Biyomateryalin Çözücülerle Etkileşimi

Polimerik bir biyomateryalin çözünürlüğü ile ilgili bilgilere şu iki nedenden dolayı ihtiyaç vardır:

1- Doğru fabrikasyon ve temizleme tekniklerinin seçilmesi,

2- Polimerin kimyasal bağlanma yapabilme kapasitelerinin tanımlanabilmesi.

Polimerlerin çözünürlükleriyle ilgili saptamalar yapmak için Hildebrand Çözünürlük Parametresi, δ , kullanılır. δ , polimerik yapıdaki ikincil kuvvetlerin şiddetini gösteren kohesiv enerji yoğunluğunun, (KEY), kareköküne eşittir ve birimi, genellikle, $(\text{cal/cm}^3)^{0,5}$ olarak kullanılır.

Çeşitli çözücü ve polimerler için çözünürlük parametreleri değerleri, δ_1 ve δ_2 , Tablo 2-9'da verilmiştir. δ değeri düşük olan yapılar apolar, yüksek olanlar ise, yüksek dipol momentine sahip ve hidrojen bağı yapmaya uygun polar yapılardır. Genel bir kural olarak, δ değerleri birbirine yakın olan polimer-çözücü sistemlerinin uygun oldukları söylenebilir. Bir polimerin bir çözücünde çözünebilmesi için, $(\delta_1 - \delta_2)$ farkının 2'den küçük olması gereklidir (40).

Çözücü	δ_1 (cal/cm ³) ^{0.5}	Polimer	δ_2 (cal/cm ³) ^{0.5}
Aseton	10,0	Kauçuklar	
Anilin	11,8	Butadien-akrilonitril	9,4
Benzen	9,2	Butadien-stiren	8,1
n-Butanol	11,4	Poliizopren	8,3
n-Dekan	6,6	Polikloropren	9,2
Dietileter	7,4	Polibutadien	8,6
n-n'-Diformalpiperazin	15,4	Poliizobutilen	8,1
n-n'-Dimetilformamid	12,1	Etilen-propilen	8,0
n-n-Dimetilasetamid	10,8	Polidimetilsilokson	7,3
Dimetilsülfoksit	13,0	Polisülfidler	9,4
1,4 Dioksan	9,9	Naylon 66	13,6
Etanol	12,8	Poliakrilonitril	15,4
Etilbenzen	8,8	Polietilen	7,9
Etilenglikol	14,6	Polipropilen	8,1
Etileter	9,9	Polietilentereftalat	10,7
Formamid	19,2	Polimetilmetakrilat	9,5
Furfurol	11,2	Polivinilasetat	9,4
Gliserin	16,5	Polivinilklorür	9,7
Hegzan	7,3	Polivinilidinklorür	12,2
İzopropilalkol	11,5	Polistiren	9,1
Karbondisülfid	10,0	Politetraflorsetilen	6,2
Karbontetraklorür	8,6	Selüloz türevleri	
Klorbenzen	9,5	Selüloz dinitrat	10,6
Kloroform	9,3	Selüloz nitrat	11,5
Ksilen	8,8	Selüloz diasetat	10,0
Metanol	14,3	Etilselüloz	10,3
Metiletilketon	9,3	<u>Poliüretan</u>	10,7
Nitrobenzen	10,0		
Pentan	7,0		
Piridin	10,7		
Siklohegzan	8,2		
Su	23,5		
Tetrahidrofuran	9,1		
Toluen	8,9		

Tablo 2.9. Çözünürlük Parametreleri.

2.7.3. Polimerik Biyomateryallerin Morfolojik Özellikleri

Polimerik malzemenin morfolojik incelemeleri, malzemenin yüzeyi, dokusu ve kesit yapısı ile ilgili bilgiler vereceğinden, malzemenin tanımlanabilmesi açısından çok önemlidir. Morfolojik incelemelerde, ışık mikroskobu veya Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılabilir. SEM ile ilgili ayrıntılı bilgi yüzey özellikleri ile ilgili bölümde anlatılmıştır.

2.7.4. Polimerik Biyomateryallerin Yüzey Özellikleri

Polimerik bir biyomateryalin yüzey özelliklerinin tanımlanması, materyalin yüzeyi, biyolojik ortamla temas halinde olacağı için önemlidir. Bu ise materyalin pek çok hücre ve doku ile vücut sıvısı, kan ve su gibi maddeler ile karşılıklı kalması demektir. Polimerik biyomateryalin, bu yoğun etkileşim sırasında nasıl davranacağı ile ilgili ipuçları malzemenin yüzey özelliklerinin bilinmesi ile elde edilebilir.

Polimerik bir biyomateryalin yüzey özelliklerinin incelenmesinde, hangi yöntemlerin kullanılabileceği önceki bölümde verilmiştir (Tablo 2.8).

Bu yöntemlerden SEM ve Temas Açısı incelemeleri, bu çalışmada da kullanıldığı için kısaca anlatılacaktır.

2.7.4.1. Mikroskopik İncelemeler

Bir biyomateryalin yüzey özellikleri mikroskopik olarak incelenebilir. Bu tip bir incelemeden yüzeyin homojen veya heterojen olduğu belirlenebilir. Bundan başka yüzeydeki deformasyonlar da saptanabilir.

Yüzey özellikleri, optik bir mikroskop kullanılarak veya Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelenebilmektedir. SEM ile bazı malzemelerin kesit yapılarını araştırmak da mümkün olmaktadır.

SEM ile, yüzeyin gözenekliliği hakkında bilgi elde edilebilir. Ayrıca kesit incelemeleri ile kesitteki boşluklar ve boşluk tipleri de saptanabilir. Böylece malzemenin diğer özellikleri, yüzey ve kesit morfolojisi ile birlikte değerlendirilebilir.

SEM'in çalışma prensibi ile ilgili ayrıntılı bilgi EK-1'de verilmiştir (41).

2.7.4.2. Yüzey Serbest Enerjisi-Temas Açısı İlişkisi

Bir sıvının temas açısı kavramını tartışan ilk bilim adamı Thomas Young olmuştur (42). Young, bir sıvının, bir katı yüzeyini ıslatmasının ve bu yüzey üzerinde yayılmasının, temas açısı ile ilişkisini tanımlamada, ilk doğru yaklaşımı sağlayan bilim adamıdır.

Temas açısı, kısaca, bir sıvının, katı bir yüzey ile yaptığı açı olarak tanımlanır. Bu açı, yüzey özelliklerine bağlı olarak değişmektedir.

1960'ların başlarında, biyomedikal materyallerin yüzey özelliklerinin incelenmesinde, yüzeyin hidrofilik ya da hidrofobik niteliğinin belirlenmesi gerekliliğinin ortaya çıkmasıyla, temas açısı değerlerinin kullanılması düşüncesi önem kazanmıştır.

Temas açısı, yüzey serbest enerjisi ve yüzeyin ıslatılabilirliği ile ilgili kolay ve çabuk bilgi veren bir yöntemdir (43). Belli bir miktar sıvının bir katı yüzey üzerindeki yayılma ve yapışma eğilimi arttıkça, temas açısı, θ , azalacağı için, temas açısı, ıslatılabilirliğin bir ölçütüdür.

Organik polimerlerin "tek-sıvılı temas açısı" yöntemi aracılığı ile yüzey serbest enerjisi analizlerinin yapılması, Fowkes (44,45), Dahlquist (46) ve Wu (47,48) tarafından önerilmiştir. Bu araştırmacıların yaklaşımına göre, bir polimerin yüzey serbest enerjisi, polar (dipol-hidrojen bağlanma) ve London dağılım (dispersiyon) bileşenlerinin bir

toplamıdır. Yüzey serbest enerjisinin belirlenmesi için "iki-sıvı" yöntemi de kullanılmaktadır (49).

Temas açısı değerlerinden, kültür ortamındaki hücrelerin yüzeyle olan ilişkilerine geçilebilmesi, bu yöntemin biyomateryaller ile yapılan çalışmalarda da kullanılmasını sağlamıştır. Çeşitli dokulardan izole edilmiş hücrelerin, yabancı yüzeylerle temasında, hücrelerin yapışma ve yayılmalarının, katı yüzey enerjisinin bir fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Taylor (50) ve Weiss (51), serumsuz ortam kullanarak, hücrelerin, cam gibi, yüksek γ_c değerli (kritik yüzey gerilimi) materyallere daha istekle; teflon ve silikon kaplı yüzeyler gibi düşük γ_c değerli materyallere ise, çok daha az istekle yapıştıklarını göstermişlerdir. Ayrıca cam, silika, alüminyum, metal, metal oksitler, selüloz, polisakkaritler, polipeptitler ve proteinler gibi yüksek enerjili pek çok katının, suyu kolaylıkla absorbladığı bilinmektedir.

Temas açısı ile ilgili bu veriler birbirlerine bağlandığında, şu sonuçlar elde edilir: Bir biyomateryalin, yüzey enerjisi arttıkça,

- ıslatılabilirliği artar;
- sıvı ile yaptığı temas açısı azalır.

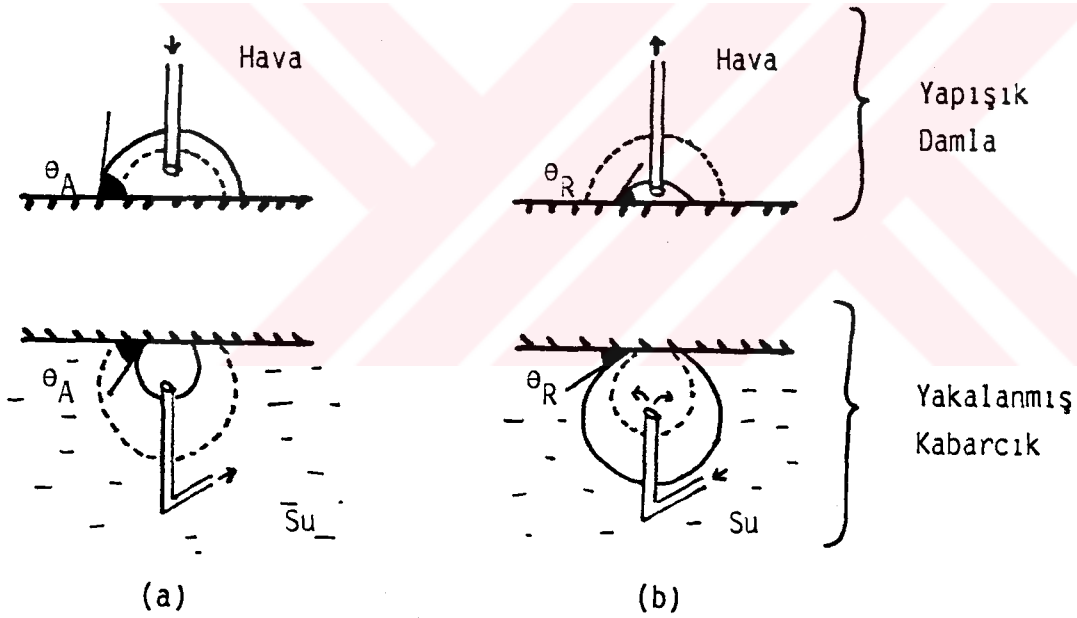
2.7.4.3. Temas Açısı Ölçüm Yöntemleri

Temas açısı, oynar başlıklı paralel bir mikroskop kullanılarak çekilecek fotoğraflardan hesaplanabileceği gibi, Gonyometre ile direkt olarak ölçülebilir. Kullanılan teknik hangisi olursa olsun, temas açısının belirlenmesinde iki ayrı yöntem kullanılmaktadır: "Yapışık Damla" ve "Yakalanmış Kabarcık" yöntemleri. Bu bölümde anlatılacak bu iki yöntemden Yakalanmış Kabarcık yöntemi, bu çalışmada da kullanılmıştır.

I - Yapışık Damla Yöntemi

Bu yöntemde bir damla sıvı, bir katı yüzeye kapılar bir pipet (iğne)

yardımıyla yerleştirilir. İğne ile damlanın teması kesildikten sonra damlanın, katı yüzey ile yaptığı açı belirlenir. İğnenin, damla ile teması kesilmeden de temas açısını saptamak mümkündür. Bu durumda iki tür temas açısı söz konusu olur. Birincisi, damla yavaşça büyümekte iken belirlenen "ilerleyen" temas açısı. İkincisi ise, iğnenin hafifçe damladan dışarı çekilmesiyle elde edilen "gerileyen" temas açısı. Bu iki tip temas açısı Şekil 2.3'de gösterilmiştir (52).



Şekil 2.3. Hava-Katı-Su Sistemlerinin

a) İlerleyen Temas Açısı, (θ_A)

b) Gerileyen Temas Açısı, (θ_R)

II - Yakalanmış Kabarcık Yöntemi

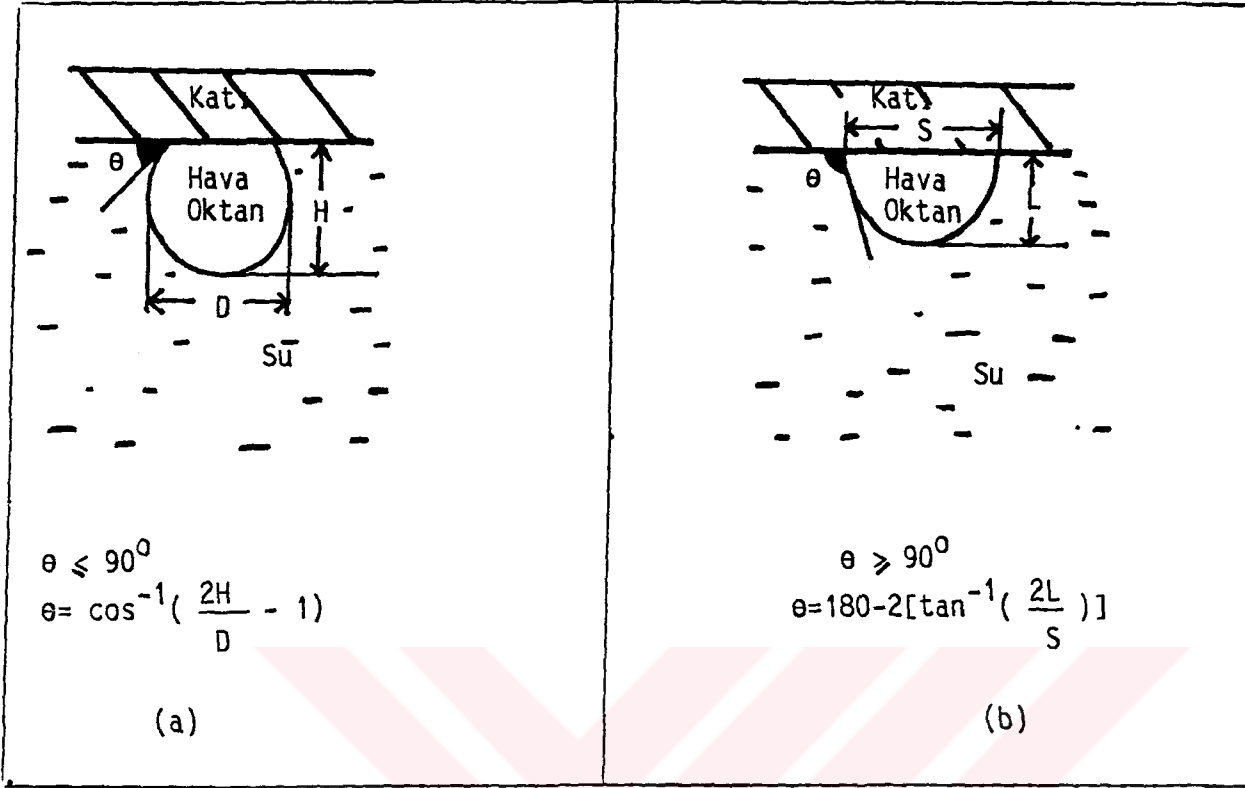
Bu yöntemde katı yüzey suya tamamen batırılır ve küçük bir hava kabarcığı, bir iğne aracılığıyla katının alt yüzeyine yollanır. Bu kabarcığın küçülmesi veya büyümesi sırasında ilerleyen veya gerileyen temas açıları ölçülebilir. Diğer bir yol ise, iğneyi damladan tamamen geri çekip, damlayı belli bir süre kendi haline bırakmak ve daha sonra temas açısını belirlemektir.

Yakalanmış Kabarcık yönteminde hava yerine n-Okta da kullanılabilir. n-Okta verilerini korelatif olarak kontrol etmek üzere Dodekan da sıklıkla kullanılmaktadır.

Temas açısı ölçümlerinde kullanılan bu iki yöntemden, birinin diğerine üstün olduğu söylenemez. Her iki yöntem de, çalışılan prosesi anlamak ve optimal korelasyonu yapmak için önemli ve gereklidir (53).

2.7.4.4. Temas Açısı Değerinin Hesaplanması

Katı bir yüzeyle, sıvı damlası (okta, v.b.) veya gaz kabarcığı arasındaki açı, Gonyometre ile direkt olarak okunabilir. Eğer sıvı damlasının veya kabarcığın, yüzey ile temas sırasındaki kesit fotoğrafı elde edilmiş ise, bu durumda, açının hesaplanmasıyla ilgili olarak verilmiş eşitliklerden uygun olan biri seçilerek, açı hesabı yapılabilir. Bu eşitliklerden bir tanesi damlacık/kabarcığın yükseklik ve genişlik değerlerini içermektedir. Açının 90° den büyük veya küçük olması durumuna göre eşitlik iki farklı şekilde uygulanmaktadır. Bu çalışmadaki temas açılarının hesaplanmasında da kullanılan bu eşitlik Şekil 2.4'de verilmiştir (39).



Şekil 2.4. a) Temas açısının 90° den küçük
b) Temas açısının 90° den büyük
Olduğu Durumlar İçin Hesaplanması.

2.7.4.5. Yüzey Serbest Enerjisi Değerinin Hesaplanması

Yüzey serbest enerjisini hesaplamada, organik sıvılar, polimerler ve su için en iyi yaklaşım, "Harmonik Ortalama Eşitliği" ile sağlanır(47). Bu eşitliğin Oktan-su-hava sistemi için uygulandığı aşağıda verilmiştir(54):

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 4 \left(\frac{\gamma_1^d \gamma_2^d}{\gamma_1^d + \gamma_2^d} \right) - 4 \left(\frac{\gamma_1^p \gamma_2^p}{\gamma_1^p + \gamma_2^p} \right) \quad (2.1)$$

γ = arayüzey gerilimi

1,2=fazlar

d=dağılım bileşenleri

p=polar bileşenler

Şekil 2.5. gözönüne alınarak hava için;

$$\gamma_{SV} = \gamma_S - \pi_e = \gamma_{SW} + \gamma_{WV} \cdot \cos \theta_{\text{hava}} \quad (2.2)$$

ve oktan için;

$$\gamma_{SV} = \gamma_S - \pi_e = \gamma_{SL} + \gamma_{WL} \cdot \cos \theta_L \quad (2.3)$$

eşitlikleri yazılabilir. Bu eşitliklerde

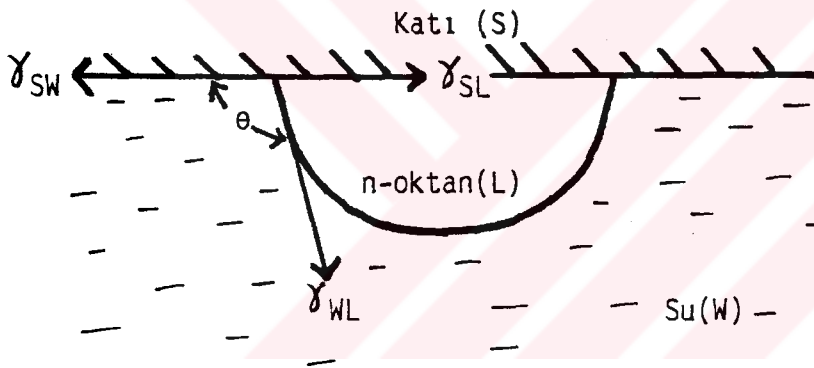
s: katı

v: su buharı

π_e : yayılma basıncı

w: su

L: suyla karışmayan sıvıdır.



Şekil 2.5. Katı-su-Oktan Üçlü Faz Dengesi.

Eşitlik 2.1. Oktan-su-katı sistemi için, (Sistem 1),

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SV} + \gamma_{LV} - 4 \left(\frac{\gamma_{SV}^d \gamma_{LV}^d}{\gamma_{SV}^d + \gamma_{LV}^d} \right) - 4 \left(\frac{\gamma_{SV}^p \gamma_{LV}^p}{\gamma_{SV}^p + \gamma_{LV}^p} \right) \quad (2.4)$$

ve hava-su-katı sistemi için, (Sistem 2),

$$\gamma_{SW} = \gamma_{SV} + \gamma_{WV} - 4 \left(\frac{\gamma_{SV}^d \gamma_{WV}^d}{\gamma_{SV}^d + \gamma_{WV}^d} \right) - 4 \left(\frac{\gamma_{SV}^p \gamma_{WV}^p}{\gamma_{SV}^p + \gamma_{WV}^p} \right) \quad (2.5)$$

şeklinde yazılır.

ÖZEL DURUM : Oktan için,

$$\gamma_{LV}^p = 0 \quad \text{ve}$$

$$\gamma_{LV}^d = \gamma_{WV}^d$$

olduğundan, su buharının, oktan üzerindeki yayılma basıncı değeri sıfır olarak varsayılır (55). Bu nedenle, yüzey serbest enerjisinin polar bileşeni için,

$$\gamma_{SV}^p = \frac{K_1 \gamma_{WV}^p}{\gamma_{WV}^p - K_1} \quad (2.6)$$

eşitliği yazılabilir.

Hava için,

$$\gamma_{LV}^d = \gamma_{LV}^p = 0$$

olduğundan,

$$\gamma_{SV}^d \left(\frac{\gamma_{WV}^d}{\gamma_{SV}^d + \gamma_{WV}^d} \right) + \gamma_{SV}^p \left(\frac{\gamma_{WV}^p}{\gamma_{SV}^p + \gamma_{WV}^p} \right) = K_2 \quad (2.7)$$

eşitliği verilmektedir.

Temas açısı terimleri yerine konulduğunda K_1 ve K_2 değerleri aşağıdaki eşitliklerden hesaplanmaktadır.

$$K_1 = \frac{\gamma_{OW} \cos \theta_1 + \gamma_{WV} - \gamma_{OV}}{4} \quad (2.8)$$

$$K_2 = \frac{\gamma_{WV} (1 - \cos \theta_2)}{4} \quad (2.9)$$

Yüzey serbest enerjisinin dağılım bileşeni K_2 'den yararlanılarak,

$$\gamma_{SV}^d = \frac{\gamma_{WV}^d K_2 - \gamma_{SV}^p \left\{ \gamma_{WV}^d \gamma_{WV}^p / (\gamma_{SV}^p + \gamma_{WV}^p) \right\}}{\gamma_{WV}^d - K_2 + \gamma_{SV}^p \left\{ \gamma_{WV}^p / (\gamma_{SV}^p + \gamma_{WV}^p) \right\}} \quad (2.10)$$

eşitliği ile verilir.

Katı yüzey serbest enerjisi, γ_{SV} , ise polar ve dağılım bileşenlerinin toplamıdır.

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SV}^d + \gamma_{SV}^p \quad (2.11)$$

2.8. POLİMERİK BİYOMATERYALLERİN STERİLİZASYONLARI

Polimerik bir biyomateryalin üretimindeki en önemli ve zorunlu aşama, materyalin sterilizasyonudur. Sterilizasyon işleminde dikkat edilecek iki önemli konu vardır: Birincisi, sterilizasyon işlemi, materyalin fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özelliklerini etkilememelidir. İkincisi, materyal, bakterileri veya bakteri sporlarını, sterilizasyondan sonra, içinde bulundurmamalıdır. Bu ikinci durum, özellikle gözenekli materyaller için daha önemli ve dikkat edilmesi gereken bir konudur. Bu nedenlerden dolayı, sterilizasyon işleminden sonra, sterilizasyonun tam olduğundan ve materyalin özelliklerinin değişmediğinden emin olunmalıdır.

Sterilizasyon yöntemleri fiziksel ve kimyasal olmak üzere ikiye ayrılır. Fiziksel yöntemler, ısı ve iyonizasyon radyasyonudur. Kimyasal yöntemler ise gaz veya sıvı maddelerle yapılan sterilizasyonlardır. Tablo 2.10'da, polimerik biyomateryaller için önerilen genel sterilizasyon yöntemleri özetlenmiştir (56).

<u>Polimerler</u>	<u>Yorumlar</u>
PMMA	100°C'nin üstünde ısıtma bozulmaya sebep olur. ED iyi fakat materyalin her tarafına difüzlenmez. İyonizasyon renksizleştirir.
PS	PMMA yorumlarının aynısıdır.
PVA	120°C'nin altında ısıtmak uygundur. İyot ve formaldehit ile reaksiyon verir.
PVC	Otoklavlamak uygulanabilir. Radyasyon HCL açığa çıkararak renksizleşmeye sebep olabilir. ED uygundur.
PU	Otoklavlamak, radyasyon ve ED yöntemlerinin hepsi de uygulanabilir.
Nylon	Otoklavlamak fiziksel özelliklerini değiştirebilir. Radyasyon kullanılabilir. Formaldehitten kaçınılmalıdır.
PE	Materyal yüksek yoğunlukta değil ise ısı uygulamaktan kaçınılmalıdır.
PTFE	Isı güvenlikle kullanılabilir.
Doğal Kauçuk	Isı uygundur. Radyasyondan kaçınılmalıdır.
Poliester	ED ve otoklavlamak mükemmel sonuç verir. Radyasyon renksizleşmeye sebep olabilir.

Tablo 2.10. Polimerik Biyomateryallerin Bazılarının Sterilizasyon Yöntemleri.

2.9. POLİMERİK BİYOMATERYALLERİN KULLANIM ALANLARI

Biyomateryaller içinde geniş bir yer tutan katı polimerik biyomateryallerin özellik ve kullanım alanları Tablo 2.11'de topluca özetlenmiştir.

<u>KATI POLİMERİK BİYOMATERYALLER</u>		
<u>ÖZELLİKLERİ</u>	<u>ÖRNEK</u>	<u>KULLANIMI</u>
a) Yumuşak		
-Düşük Su Absorbsiyonlu	SR,PU,PVC	Tüpler, implantlar, yapıştorocılar, kan torbaları, diyaframlar, kaplamalar, kalp pilleri.
-Yüksek Su Absorbsiyonlu	PHEMA	Kontak lens, yanık yarası pansumanı, kaplama.
b) Amorf, sert	PMMA	Kontak lens, diş ve ortopedik semenler, IDL.
c) Yarı Kristalin		
-Düşük Su Absorbsiyonlu	PET,PP,PTFE	Yapay deri, ameliyat iplikleri.
	NYLON,PGA	Ameliyat iplikleri (Biyo-lojik olarak parçalanabilir)
	PE	IUD, eklemler,
	PFEP	Kateterler,
	CA	Hollow Fiber Diyalizi, Kontak Lensler.
-Orta Su Absorbsiyonlu	CELL	Diyaliz Membranı

Tablo 2.11. Polimerik Biyomateryallerin Morfolojileri, Kompozisyonları ve Tıbbi Uygulamaları.

2.10. POLİMERİK MEMBRANLAR

Polimerik membranlar ince yarıgeçirgen polimerik filmlerdir. Membranlara, canlı hücreleri çevreleyen hücre zarlarından, gaz ayırım cihazlarında kullanılan ve tamamiyle sentetik olan silikon polimerik filmlere kadar çok değişik örnekler vermek mümkündür.

2.10.1. Polimerik Membranların Sınıflandırılması

Polimerik membranları, yapılarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırmak mümkündür (57):

- HETEROJEN

-Simetrik

-Asimetrik

-Integral

-Homojen Dokuda

-Heterojen Dokuda

-Kompozit

-Homojen Dokuda

-Heterojen Dokuda

- HOMOJEN

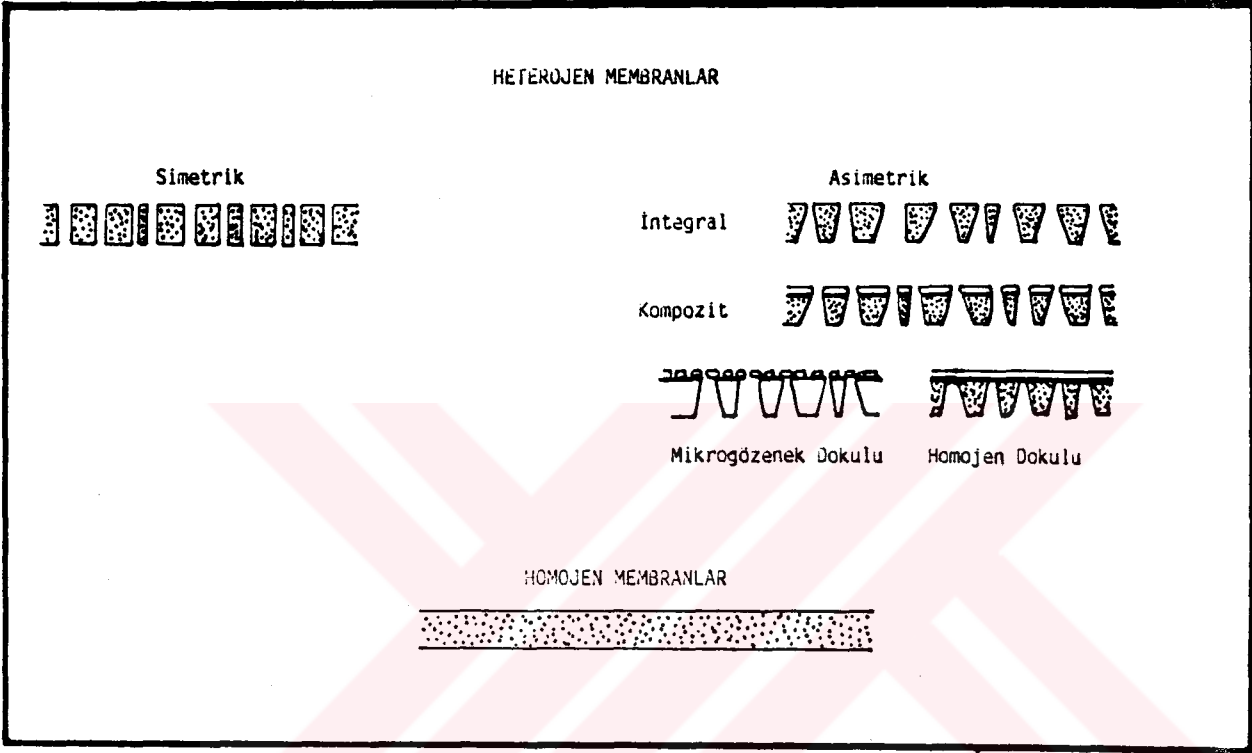
Heterojen membranlarda, mikron boyutlarında, elektron mikroskopuyla gözlenebilen boşluklar (gözenekler) vardır. Boyutları bu boşluklardan küçük olan maddeler, membrandan geçebilirler.

Homojen membranlarda ise, maddelerin membrandan geçebilmesi için, önce yapıda çözünmesi gerekir. Daha sonra konsantrasyon farkı yönünde, polimerik yapının amorf bölgelerindeki moleküller arasından geçerek, membrandan difüze olurlar. Katı veya sıvı olabilen homojen membranlar, cam gibi inorganik materyallerden veya çok çeşitli polimerlerden hazırlanabilmektedir.

Homojen ve heterojen membranların yapıları ile ilgili şematize bir şekil, Şekil 2.6'da verilmiştir.

Gözenek çapları (5-50) nm. arasında değişen katı matriksler olarak da tanımlanabilen heterojen membranlar, simetrik ve asimetrik olarak hazırlanabilirler. Gözenek çapının membranın bir yüzünde dar, diğer yüzünde geniş olduğu asimetrik membranlar, integral ve kompozit olarak iki grup

altında toplanır. Kompozit membranlar, iki farklı polimer tabakasından oluşur. Bu tabakalar homojen veya mikrogözenekli bir dokuda olabilir.



Şekil 2.6. Membran Yapıları.

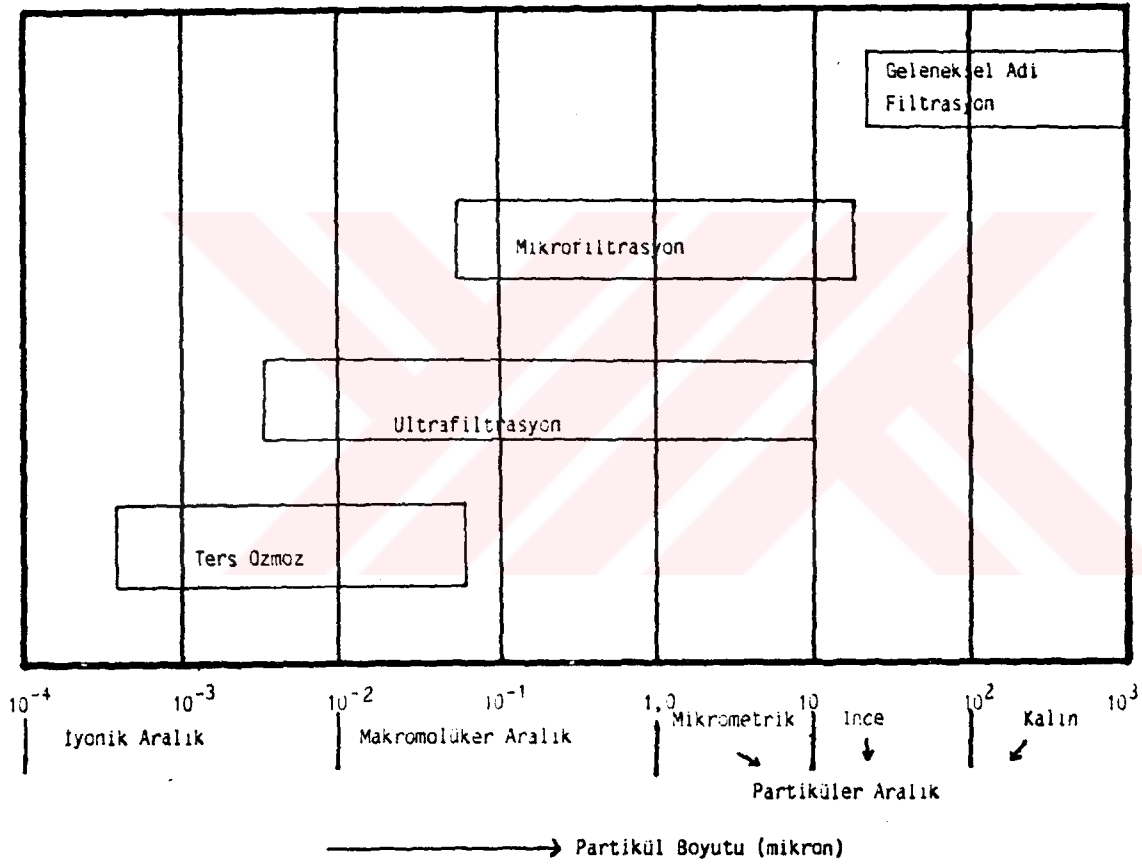
2.10.2. Membran Ayırma Prosesleri

Membranlar, son yıllarda geliştirilen birçok ayırma, saflaştırma, v.b. gibi, laboratuvar ve endüstriyel düzeyli işlemlerde kullanılmaktadır. Şekil 2.7'de en yaygın olarak kullanılan üç membran ayırma yöntemi karşılaştırmalı olarak verilmiştir (58).

Membran proseslerine örnekler aşağıda tanıtılmıştır.

Ultrafiltrasyon (UF) : Ultrafiltrasyon, $(10^{-3}-10)_\mu$ boyutlarında

partiküllerin filtrasyonunun, heterojen membranlar aracılığıyla yapıldığı bir membran ayırma prosesidir. Önceleri sınırlı termal, kimyasal ve fiziksel kararlılığa sahip olan UF membranlar, polimer kimyası ve membran teknolojisinin gelişmesiyle geniş bir kullanım alanı bulmuştur. UF membranları, sellüloz türevleri, polisulfon, poliamidler, polivinilklorür, polikarbonat, poliakrilidler gibi (59,60) çok çeşitli polimerlerin kullanılmasıyla hazırlanmaktadır.



Şekil 2.7. Membran Ayırma Prosesleri.

Mikrofiltrasyon (MF) : Mikrofiltrasyon, $(0,2-10)\mu$ boyutlarında gözenekler içeren simetrik membranlar aracılığıyla yapılan bir membran ayırma prosesidir. MF için, sellülozik membranların yanısıra, polipropilen,

polikarbonat, akrilik kopolimerler, poliamid, politetrafloroetilenden üretilen membranlar da kullanılmaktadır. MF proseslerinden, ultrasaf su üretimi, tıbbi ve biyolojik maddelerden arındırma, gaz ve sıvı buharlarının partiküllerden temizlenmesi gibi çeşitli işlemlerde yararlanılmaktadır.

Ters Ozmoz : Ters ozmoz tekniği, 1930'lara kadar dayanmakla beraber bu membran ayırma tekniği ilk defa Reid ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (61). Ters ozmoz da bir membran ayırma prosesidir. Burada ince bir homojen sınır tabakası içeren, gözenekli membranlar kullanılır. Membran yalnız suyu geçirir. Deniz suyu saflaştırılması bu tekniğe bir örnek olarak verilebilir. Bu işlemde, tuz içeren tarafa basınç uygulanırken, ozmoz olayının ters yönünde, membran üzerinden su akışı sağlanır ve böylece saf su elde edilir. Bu proseste yüksek basınç uygulandığından, polimerik membranın mekanik özellikleri ön planda tutulmalıdır.

Diyaliz : Diyaliz kavramı, ilk kez 1981'de Thomas Graham tarafından önerilmiştir (62). Diyaliz, çok büyük moleküllerin (kolloidler), küçüklerden, sıvılar arasındaki kimyasal potansiyel farklılığına dayanılarak ayrıldığı bir membran ayırma prosesidir (63). En yaygın kullanım alanı, yapay böbrek sistemidir.

Elektrodiyaliz : Elektrodiyaliz, elektrolit çözeltilerinden iyonları ayırmak için, iyon seçici membranlardan yararlanılarak uygulanan bir membran ayırma prosesidir (64). Ağırlıklı olarak, kuyu suyunun saflaştırılmasında kullanılan bu proses, son yıllarda deniz suyunun demineralizasyonunda kullanılmaktadır.

2.10.3. Polimerik Membranların Karakterizasyonu

Membran karakterizasyonu, membranın yapısına ve fonksiyonlarına göre yapılabilir. Bjerrum ve Manegold, bir membranın en önemli üç karakteristik özelliğini kalınlık, su içeriği ve geçirgenlik olarak sıralamıştır (65).

Bu listeye kimyasal (moleküler) ve mikrokristalin yapı, gözenek

boyutu (66), gözenek boyutu dağılımı (67), gözenek yoğunluğu (68) boşluk tipi (açık veya kapalı hücreli) (69), hidroliz (70) ve mikrobiyal parçalanabilme (71) özellikleri katılmalıdır. Ayrıca geçirgenliğe ilave olarak, difüzyon katsayısı (72), sıcaklık ve basınç (73), membran/çözelti arayüzündeki katı madde konsantrasyonu (74) membran karakterizasyonunu belirlemede kullanılan önemli parametreler arasındadır.

Aşağıda, membran karakterizasyonunda kullanılan membran özelliklerinden bazıları anlatılmıştır.

I - Kimyasal Yapı

Polimerik membranların kimyasal yapısı, sonuç ürün özellikleri yönünden önemlidir. Kimyasal bileşim sonucu ortaya çıkan polarite, hidrojen bağı yapma kabiliyeti, sterik engellemeler gibi etkenler, polimer molekülleri arasındaki etkileşimleri ve yığın yapı içinde yerleşme düzenini, dolayısıyla polimerik yapının hem mekanik hem de ayırma prosesleri yönünden transport özelliklerini etkiler.

II - Kristalinite

Polimerik membranlarda transport, kristalin bölgeler değil, amorf bölgeler üzerinden gerçekleşir. Bu nedenle, polimerik bir membranın kristal morfolojisinin bilinmesi önemlidir. Madde transportuna olan etkisine ilaveten, kristalinite, çeşitli kimyasal ve mekanik özellikleri de etkilemektedir. Kristalinitesi yüksek polimerik membranlar, genellikle, amorf olanlara göre daha az geçirgendir (75). Buna karşın kristalinite, membranın mekanik özelliklerini önemli oranda geliştirir (76).

III - Gözenek Yapısı

Daha önce de söz edildiği gibi, heterojen membranlarda transport, gözenekler üzerinden gerçekleşir. Bu nedenle polimerik membranların gözenek yapısının tanımlanması önemlidir. Bununla ilgili geliştirilen yöntemlerle, membranın gözenek yoğunluğu, boşluk hacmi, gözenek boyutu ve

boyut dağılımı değerleri elde edilebilir.

i. Gözenek Yoğunluğu : Membran yüzeyinin cm^2 'sindeki gözenek sayısı, "gözenek yoğunluğu", (n) , olarak tanımlanır. n direkt olarak mikroskopik incelemelerden elde edilebilir, $(n_{\text{gözlenen}})$. Ancak, filtrasyon sırasında iş gören etkin gözenek sayısının (n_{etkin}) , n gözlenen değerinden daha farklı olduğu not edilmelidir (58).

ii. Boşluk Hacmi : Boşluk hacmi (V) veya gözeneklilik, polimer substratı tarafından doldurulmamış olan hacmin, membran hacmindeki kesridir. Boşluk hacmi, kuru ve ıslak membran ağırlıkları arasındaki farkın, su yoğunluğuna oranından hesaplanabilir (58).

IV - Kolloidal Morfoloji

Polimerik membranların geçirgenlik ve mekanik dayanıklılık gibi özelliklerinin tahmininde, kolloidal morfoloji de kullanılmaktadır. Ardenne (77) ve Pietsch (78), elektron mikroskobu ile, membranların ultra yapısını incelemeyi başaran ilk iki bilim adamıdır. Sonraları, mikroskopik çalışmaların karbon veya metal kaplama tekniği ile geliştirilmesi sonucu daha hassas çalışmalar mümkün olmuştur (79).

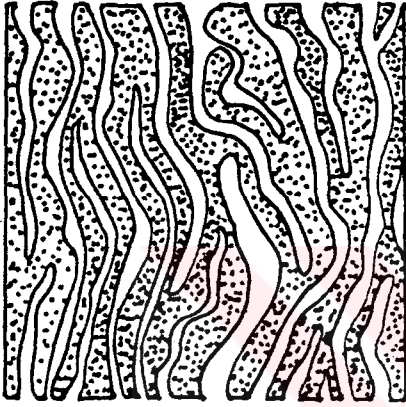
Polimerik membranlarda şu iki uç kolloidal yapı söz konusudur (Şekil 2.8):

1. Parmaksı yapı
2. Süngerimsi yapı

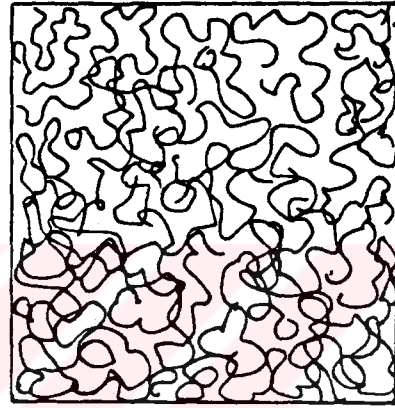
Parmaksı yapıda, boşluk hacmi çok yüksektir. Ancak çoğu kez gözeneklerin çoğu kapalı olduğundan bu membranların geçirgenlikleri düşüktür. Süngerimsi membranlarda ise açık gözenek yapısı vardır. Bu membranlar, ayrıca, mekanik olarak daha güçlüdür. Hazırlama koşulları değiştirilerek, bu iki uç yapı arasında istenilen yapıların elde edilmesi mümkündür.

Ters ozmoz gibi yüksek basınç proseslerinde ve yüksek seçicilik is-

tendiğinde her iki gözenek yapısı da asimetrik olarak oluşturulabilmektedir.



Parmaksı Yapı



Süngerimsi Yapı

Şekil 2.8. Polimerik Membranların Yapıları.

V. Denge Su İçeriği

Polimerik membranlar, genellikle, çözücü olarak suyun bulunduğu ortamlarda kullanıldıklarından, su ile temas halindeki durumları tanımlanmalıdır. Bir polimerik membranın su ile temasında, dengeye ulaştığı andaki su içeriğini veren "Denge Su İçeriği", DSİ, değeri aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir (80):

$$DSİ = \frac{w - w_0}{w_0} \cdot 100$$

w: Yaş ağırlık

w₀: Kuru ağırlık

2.10.4. Polimerik Membranların Üretim Teknikleri

Sentetik membranlar, genellikle polimerler olmak üzere, çeşitli materyallerden değişik tekniklerle üretilirler. Membrana yapısal özellikler kazandırmakta da etkin olan hazırlama yöntemleri aşağıda verilmiştir.

- . Çözücü döküm (faz dönüşümü)
- . Sinterleme
- . Germe-uzatma
- . Işınlama-aşındırma
- . Plazma polimerizasyonu

Çözücü döküm (faz dönüşümü) : Bu yöntemde membranı oluşturacak polimer uygun bir çözücüde çözülür ve hazırlanan çözelti ince bir film halinde yayılır. Çözücü buharlaştırılarak veya başka bir çözücüyle ekstrakte edilerek uzaklaştırılır ve polimerik materyal, film halinde çöker. Oluşan membranın yapısı, hazırlama şartlarına bağlı olarak değişmektedir (81,83). Bu parametreler, polimer çözelti derişimi, çözücü türü, çöktürme ortamı ve bu ortamın derişimi, polimer çözeltisinin çökme ortamından çökme hızı, ortam nemliliği ve sıcaklığıdır. Bu parametrelerin etkisiyle, membran gözenekliliği, gözeneklerin tipi (parmaksı, süngerimsi), membranın seçiciliği, mekanik özellikleri ve geçirgenlik değerleri değişmektedir. Bu araştırmada kullanılan membranlar bu yöntem ile elde edilmiştir.

Sinterleme : Üretim için genellikle polimer, metal veya metaloksitleri kullanılır (84). Toz halinde öğütülmüş materyal düz bir yüzeye yayılır ve erime noktasının altında ısıtılarak, basınç altında sıkıştırılır. Bu yöntemle hazırlanan membranların gözenekliliği düşük olup, düzensiz bir gözenek yapısı vardır.

Germe - Uzatma : Bu teknik gözenekli simetrik membranların hazırlanmasında kullanılır (85). Önce polimer partiküllerin ekstrüzyonu ile homojen membranlar hazırlanır. Daha sonra bu membranlar ekstrüzyon yönüne dik yönde gerilerek gözenekli membranlar elde edilir. Hazırlanan membranların göze-

nekliliği çok yüksek olup, gözenek dağılımı oldukça homojendir.

Işınlama - Aşındırma : Düzgün gözenekli membranların hazırlanmasında kullanılan yeni bir tekniktir (86). Homojen membranlar α -partikülleriyle ışınlanarak yapı zayıflatılır ve zayıflayan noktalar kimyasal yolla aşındırılarak heterojen-simetrik membranlar elde edilir. Hazırlanan membranların bükümlülüğü 1 olup, gözenek boyut dağılımı mükemmeldir.

Plazma Polimerizasyonu : Son yıllarda geliştirilmiş yeni bir teknik olup daha çok kompozit membranların üretiminde kullanılmaktadır. Plazma polimerizasyonu ile, diğer yöntemlerle hazırlanan polimerik membranların yüzey özelliklerinin geliştirilebilmesi de mümkündür.

2.10.5. Polimerik Membranların Kullanım Alanları

Polimer bilimi ve membran teknolojisinin sağladığı olağanüstü avantajlardan yararlanılmasıyla, membran içeren pek çok alet ve cihazın geliştirilmesi mümkün olmuştur. Daha önce, Bölüm 2.10.2'de, membran ayırma proseslerinin bazıları anlatılmıştı. Bu bölümde ise, membran içeren sistemlerin en yeni ve çarpıcı uygulamalarından bazıları, alt başlıklarda anlatılacaktır (87).

I - Kan Oksijenasyonu

Yaşayan tüm hücreler, CO_2 'i atmak için O_2 'ne gereksinim duyarlar. İnsanlarda, gerekli miktardaki O_2 'ni dokulara sağlayıp, CO_2 gibi metabolik artıkları dışarı atmaktan kan dolaşımı ve solunum sistemleri sorumludur. Bu sistemlerin devre dışı olduğu açık kalp ameliyatları gibi cerrahi operasyonlarda, yapay oksijenatörlerin kullanımı zorunludur.

Yapay oksijenasyon kavramı, 1860'lara kadar dayanmakla beraber, ticari boyutlarda kullanılabilir hale gelmesi, 100 yıldan daha fazla bir zaman almıştır.

Membran oksijenatörlerinde, yarı geçirgen bir membran, kan ve gaz

fazı arasında yer alır. Kan yönünde O_2 , ters yönde de CO_2 geçirilerek kanın oksijenlenmesi ve artık CO_2 'nin uzaklaştırılması sağlanır. Membran oksijenatörlerinde Selofan (88), polietilen (89), etil selüloz (90) membranlar denenmiştir. Bunların çoğu yetersiz gaz transferi nedeniyle başarısız olmuştur. Son yıllarda geliştirilen gözenekli polipropilen ve Teflon membranlar ile sorun çözülmüştür (91-94).

II - Yapay Böbrek

Böbrek, bir boşaltım organıdır. Vücutta biriken üre, ürik asit, kreatinin ve diğerleri gibi metabolizma artıklarını dışarı atarak, elektrolit ve su kaybını düzenler. Böbreğin fonksiyonlarını yürütemediği durumlarda, hasta hayatının devamını sağlamak için, bu fonksiyonları üstlenen çeşitli yapay böbrek sistemleri geliştirilmiştir. "Hemodiyaliz" bu yaklaşımların en önemlisidir.

Hemodiyaliz, hasta kanının, yarıgeçirgen bir membran içeren diyaliz ünitesinden pompalandığı bir ekstrakorporal sistemdir. Hemodiyalizin, hayvanlar üzerinde denendiği 1913 (95) yılından sonra ilk klinik başarı, Kolff tarafından, Selofan tüp kullanılarak elde edilmiştir (96). Daha sonraları ise Teflon (97), Kaprofan (98), polimetilmetakrilat (99), polietilen, polietere-üretan (100), poliaminoasit (101) ve kollojen (102) membranlar kullanıma sunulmuştur. Günümüzde, hemodiyaliz konusundaki çalışmalar ve gelişmeler devam etmektedir.

III - Biyolojik Olarak Aktif Maddelerin Taşıyıcılığı

Antibiyotik, amino asit, hormonlar v.b. çeşitli maddeleri üretebilen enzimler ve mikro organizmalar gibi biyoaktif ajanların, serbest haldeki kullanımlarında ortaya çıkabilecek sakıncalarından kaçınmak için, çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (103-105). Bu tekniklerden bazılarında, çeşitli yarı geçirgen polimerik membranlar kullanılmaktadır.

Polimerik membranlar, kontrollü salım sistemlerinin en önemli par-

çasıdır. Bu sistemde, biyolojik olarak aktif maddeler, çevreye kontrol edilebilir bir hızla salınırlar. Kimyasalların veya ilaçların kontrollu salımları, tıpta ilaçla tedavi alanında kullanıldığı kadar, ziraat, gıda teknolojisi ve biyoteknolojide de çokça kullanılmaktadır (106-109).

IV - Yara Tedavisi ve Yapay Deri

Yara tedavisinde gazlı beze alternatif olarak geliştirilen membranlar, yara yüzeyinde çeşitli süreler için kullanılmaktadır. Klinik olarak, etkin bir yapay deriden beklenen özellikler şöyle sıralanabilir (110):

- Antigenisitesi olmamalıdır;
- Doku kompatibilitesi yüksek olmalıdır;
- Lokal ve sistemik toksisite yaratmamalıdır;
- Su buharı geçirgenliği normal deriye benzemelidir;
- Vücut dışından gelecek enfeksiyon nedeni mikroorganizmaları geçirmemelidir;
- Yara yüzeyine hızla yapışmalı ve yapışkanlığı sürekli olmalıdır;
- İç yüzey yapısı fibrovascular dokunun üremesine izin vermelidir;
- Düzgün olmayan yara yüzeyine uyum sağlamak için esnek ve katlanabilir olmalıdır;
- Altta kalan vücut dokusunun hareketlerine izin verecek kadar elastik olmalıdır;
- Doğrusal ve çapraz gerilimlere dirençli olmalıdır;
- Yara yüzeyinin florasının çoğalmasını önlemeli ve yaradaki bakteri yoğunluğunu azaltmalıdır;
- Gerilim direnci olmalıdır;
- Biyolojik olarak parçalanabilmelidir (kalıcı implantlar için önemli),
- Sterillenebilmelidir;
- Maliyeti düşük olmalıdır;
- Raf ömrü uzun olmalıdır;
- Minimum stoklama koşulları gerektirmelidir.

Yapay deriden beklenen en önemli özelliklerden biri, bakterilerin yara yüzeyinde üremelerini engellemesidir. Bunun için yaraya iyi ve düz-

gün yapışması ve istenildiğinde de yara yüzeyinden kolaylıkla alınabilmesi gerekmektedir. Yaraya iyi yapıştığı yerlerde, bakteri popülasyonu yoğunluğu düşer. Böylece mikrobiyal kontrole katkıda bulunur.

Membranların yaraya kendiliğinden yapışması, yapışma için başka bir yapıştırıcının kullanılmaması tercih edilir.

Yapay deri olarak yara tedavisinde kullanılan bu tip membranların mikroorganizmalara bir engel oluşturması, gözenek boyutları ile sağlanmaktadır. Bu amaçla gözenek çapı en fazla 80 μ olmalıdır (111).

Yara yüzeyini kapatan bir membran, yaradan dışarıya ısı ve su kaybını önlemelidir. Ayrıca fiziksel bir koruma da sağlayarak yeni oluşan dokunun zarar görmesini engellemelidir. Şeffaf olması yaranın gidişatını izlemek açısından tercih edilmektedir.

Yara tedavisi ve yapay deri ile ilgili tanımlamalar doğrultusunda, çok çeşitli araştırmalar yapılmış ve oldukça fazla sayıda ürün elde edilmiştir. Yara tedavisinde kullanılan membranların bir listesi Tablo 2.12' de verilmiştir (111,112-114). Yara ve yanık tedavisi konusunda yapay derinin kullanılması, halen yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (115,116).

Membranın Ticari Adı	Kaynak
OMİDERM	Omikron Scientific Ltd. Rehovot, İsrail.
DUODERM	Squibb, Amerika
OP-SITE	Parke-Davis, Amerika
OP-SITE	Smith and Nephew, Ltd.
BIOOCLUSIVE	Johnson & Johnson, Amerika
BIOBRANE	Woodroof Labs
XEROFORM	Johnson & Johnson, Amerika.

Tablo 2.12. Yara Tedavisinde Kullanılan Sentetik Membranlar.

2.11. POLİMERİK BİYOMATERYAL - HÜCRE ETKİLEŞİMİ

Sunulan çalışmada, PU kullanılarak üretilen membranların, "biyolojik uyuşabilirliğinin" belirlenmesi için, çeşitli hücrelerle etkileşimi incelenmiştir.

Bu bölümde, önce, hücre kültürü ve fibroblast hücre-substrat etkileşimleri anlatılmış, ardından kan ve kan hücreleri-polimerik biyomateryal etkileşimleri hakkında özet bilgi verilmiştir.

2.11.1. Hücre Kültürü

Hücre biyoteknolojisinin temeli, kompleks doku veya organlardan izole edilen hücrelerin, suni besi ortamlarında üretilmesi ve üretilen hücrelerin de in vitro koşullarda farklı organizmalar olarak davranmasına dayanır. Hücre kültürleri, hücrelerin yapısal olarak farklılaşmasına, dejenerasyonuna veya trasformasyonuna neden olur. Bu durum, yeni ortamda, doku ya da organdakinden farklı bir yapısal düzenin varlığından kaynaklanmaktadır. Eğer hücre popülasyonu, histolojik düzende gerçekleştirilebilirse, hücre fonksiyonları aynen devam eder ki bu doku kültürünün gerçek tanımıdır. Hücre kültüründe ise, dokular farklı hücrelere parçalandığından, histolojik organizasyon bozulmakta ve bunun sonucu olarak da hücre fonksiyonları farklılaşmaktadır.

Biyolojik düşüncenin bir parçası olan doku kültürü yapımı çok eskilere dayanır. Önceleri sadece inceleme şeklinde yürütülen çalışmalar, yirminci yüzyılın ortalarına doğru hızlandırılmış, plazma ve embriyo sıvısı kullanılarak çeşitli dokuların üretilmesi tekniği, bir kısım araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Araştırmacılar bazıları da, çeşitli hücrelerin üretilmesi için, besi ortamlarının geliştirilmesi üzerinde çalışmışlar ve hayvansal doku hücrelerinin üretilbileceğini göstermişlerdir.

Hücre teknolojisinde modern anlamdaki gelişmeler, 30 yıllık bir

geçmişe sahiptir. Çeşitli hücreler için, uygun besi ortamlarının hazırlanmasıyla, hücrelerin ve hücreyel ürünlerin üretimi mümkün olmuştur. Tablo 2.13'de hücre kültürleri ile üretilen ürünlerden bazıları verilmiştir.

Doğrudan doku veya organ olarak kullanılacak hücrelerin üretilmesi konusunda yoğun çalışmalar yapılmakta ve bu çalışmalar klinik uygulamalar için büyük bir gelecek vaat etmektedir. Hücre kültürleri ile üretilen biyolojik ürünler arasında, aşılar ön sırayı almaktadır.

Hücre teknolojisinde son 10 yıl içerisinde yapılan çalışmalarda, üretim kapasitesinin, endüstriyel boyutlara çıkarılması ağırlık kazanmıştır. Seçilen hedef, hayvansal hücreler için de, mikrobiyal hücrelerdeki ne benzer endüstriyel fermentasyon proseslerinin geliştirilmesidir. Ancak, her iki tür hücre için de, aynı temel kavramlar geçerli olmasına rağmen, aralarındaki önemli yapısal farklılıklar, hayvansal hücre kültürleri için daha değişik proseslerin tanımlanmasını gerekli kılmıştır. İki hücre türü arasındaki farklılıklar Tablo 2.14'de özetlenmiştir.

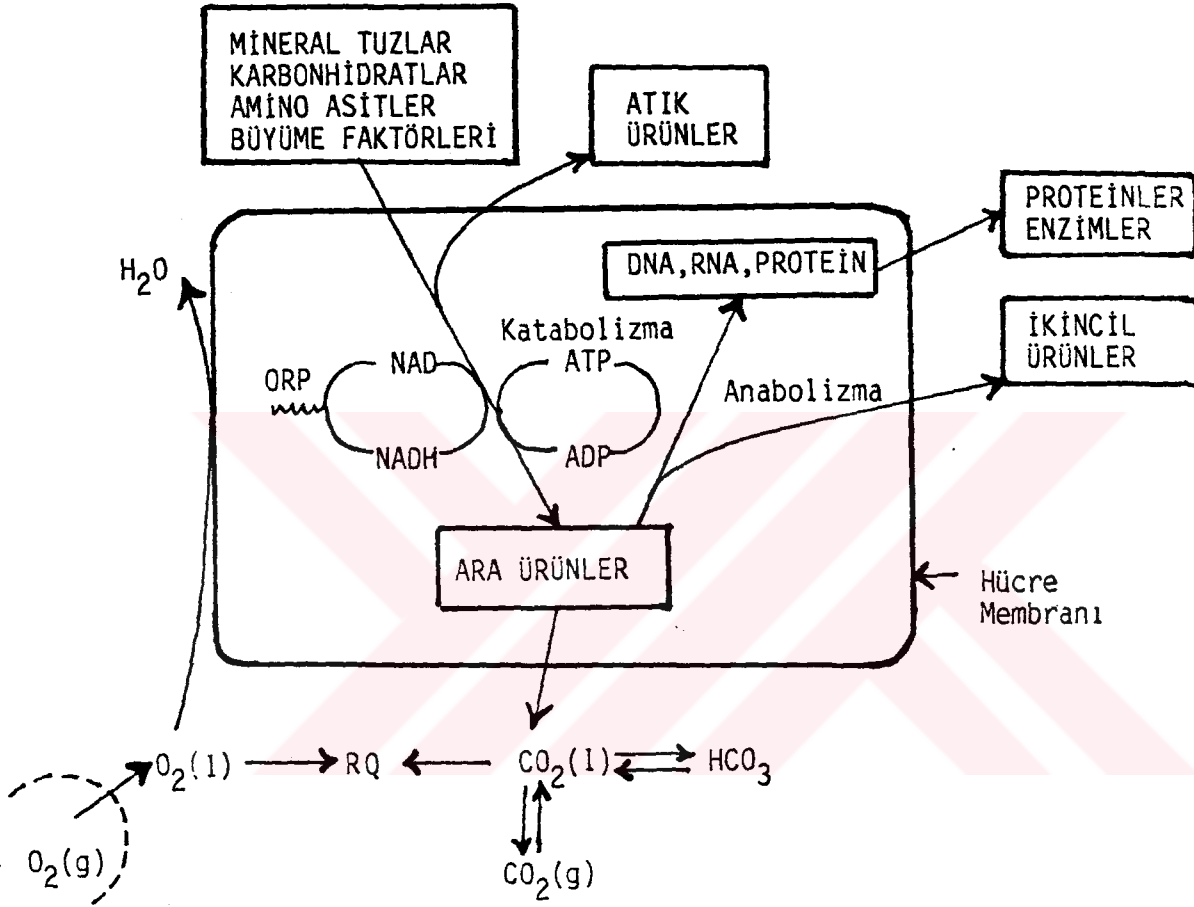
Grup I. Hücreler	Grup II. Hücreyel Ürünler
Yapay Deri Yapay Organlar β -İşlet Hücreleri (Pankreas) Hepatositler (Karaciğer) Kemik iliği Limfositler	Büyüme Faktörleri Epidermal Büyüme Faktörü Sinirsel Büyüme Faktörü Kan Faktörleri Monoklonal Antikadiler İnterferonlar Proteazlar (Ürokinaz, vb.) Aşılar Hormonlar İnsan Büyüme Hormonu İnsülin Paratiroid Hormonu

Tablo 2.13. Hücre Kültürüyle Üretilen Ürünler.

Özellik	Mikrobiyal Hücre	Hayvansal Hücre
Boyut (Çap)	1 - 10 μ	10 - 100 μ
Üreme hızı	İkilenme süresi 0.2-2 saat	İkilenme süresi 10-72 saat
Metabolizma	İnternal olarak düzenlenir. Yüksek metabolik aktivite	İnternal ve eksternal (Hormonal) olarak düzenlenir, düşük metabolik aktivite
Yapı	Sert hücre duvarı	Sadece kolay parçalanan plazma membranı
Çevre	Süspanse kültürde tipik büyüme	Bazı hücreler büyümek için uygun yüzey gerektirir.

Tablo 2.14. Hayvansal ve Mikrobiyal Hücrelerin Karşılaştırılması.

Mikrobiyal hücreler için üreme ortamı bileşimi esnektir ve toksik metabolit birikimi için tolerans mevcuttur. Oysa ki, hayvansal hücrelerin üremesi, çevre koşullarına çok bağlı olup, bu koşulların (örneğin pH, çözülmüş oksijen, v.b.) mükemmel kontrolünü gerektirir. Hayvansal hücre kültür ortamı, ozmotik olarak dengelenmiş vitamin, mineral ve amino asitlerin karışımından oluşur. Son yıllarda, serumsuz ortamda da çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, genellikle ortam, hayvansal serumla desteklenir. Kimyasal olarak tanımlanmış ortam, büyüme faktörleri, hormonlar, proteinler ve metal tuzlarından oluşur ve çok sayıda hücrenin üremesini sağlar (117-119). Genellikle hayvansal hücreler, CO₂/hava (örneğin %5/%95) atmosferinde ürerler. Şekil 2.9'da hayvansal hücreler için genelleştirilmiş hücre modeli görülmektedir. Hayvansal hücrelerin kimyasal bilemişi ise Tablo 2.15'de verilmiştir.



Şekil 2.9. Genelleştirilmiş Hücre Modeli.

Bileşenler	pg/hücre	Değer Aralığı	% Bileşim
Yaş Ağırlık	3500	3000-6000	-
Kuru Ağırlık	600	300-1200	-
Protein	250	200-300	10-20
Karbonhidrat	150	20-200	10-5
Lipid	120	100-200	-2
DNA	10	8-10	0.3
RNA	25	20-40	0.7
Su	-	-	80-85
Hacim	$4 \times 10^{-9} \text{ cm}^3$	-	

Tablo 2.15. Hayvansal Hücrelerin Kimyasal Bileşimi.

2.11.2 Hücre Kültür Sistemleri

Hücre kültür sistemleri, hücre popülasyon yoğunluğuna ve hücrenin bir substrat yüzeyine tutunması veya süspanse halde üremesine bağlı olarak, çeşitli alt gruplara ayrılırlar. Hücre yoğunluğunun düşük olduğu ($<10^4$ hücre/ml) durumdaki üreme, "klonal üreme" olarak adlandırılır. Klonal üreme, substrata yapışarak üreyen hücrelerin yanısıra, yumuşak agar gibi yarıkatı bir ortamda süspanse olarak üreyen hücrelerde de görülebilen bir üreme şeklidir.

Hücrelerin bir substrata yapışarak ürettiği yoğun kültürler, "tek tabaka hücre kültürü" olarak adlandırılır. Bu tür kültürlerde üreyebilen hücreler de yüzeye bağımlı hücrelerdir ve hücresel verimlilik substratın yüzey alanıyla sınırlıdır. Süspanse kültür durumunda ise, hücreler herhangi bir yüzeye yapışmaksızın sürekli karıştırılan fermentörlerde ürerler. Tablo 2.16'da, bu iki tür hücrenin avantajları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Aşağıda tek tabaka hücre kültürü daha ayrıntılı olmak üzere, her iki kültür sistemi açıklanmıştır.

Yüzeye Bağımlı Hücreler	Süspanse Hücreler
Çeşitli türleri mevcuttur Primer hücreler Diploid hücreler Hat hücreler Virüs türlerine duyarlıdırlar Tumorjenik özellik göstermezler Yapısal kararlılık gösterirler Fibroblastik interferon Üretiminde kullanılırlar	Yüksek kapasitede üretilirler Sistemlerin işletmeye alınması ve kontrolu kolaydır Sürekli kültürlerde üretilebilirler Tripsinizasyon gerektirmezler Monoklonal antibadı Limfoblastoid interferon ve Şap virüsünün ticari üretiminde kullanılırlar

Tablo 2.16. Yüzeye Bağımlı ve Süspanse Hücrelerin Avantajları.

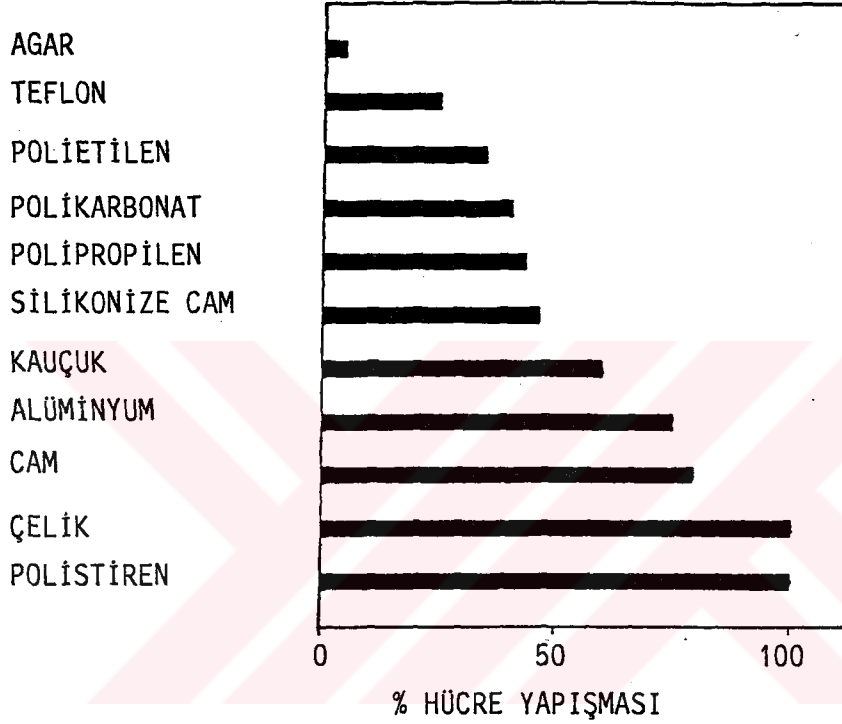
2.11.2.1. Tek Tabaka Hücre Kültürü

Tek tabaka hücre kültürleri, organ kısımlarının enzimatik parçalanmasıyla elde edilen tek hücre süspansiyonlarından hazırlanırlar. Hücre preparatı, kültür ortamı içeren kültür kabına aşılır ve koşulları kontrol edilen bir ortamda inkübe edilerek, birincil hücre kültürü oluşturulur. Laboratuvar çalışmalarında, tek tabaka hücre kültürleri, birincil kültürlerden izole edilerek veya hazır hücre suşları olarak çeşitli organizasyonlardan (örneğin American Type Culture Collection ve Institute for Medical Research gibi) temin edilir.

I - Tek Tabaka Hücre Kültüründe Hücre-Biyomateryal Etkileşimi

Tek tabaka hücre kültürlerinde temel basamak, hücrelerin kültür kabının yüzeyine yapışmasıdır. Hücre yayılma ve üremesi ancak uygun yüzeye yapışma gerçekleştikten sonra başlar. Bu nedenle en önemli faktör, hücre-substrat yüzey etkileşimidir. Hücreler tüm yüzeylere yapışamayacağı gibi, yapışmanın gerçekleştiği yüzeyler de üremeyi inhibe edebilir. Yüzeydeki makromoleküler organizasyon, yük türü ve yoğunluğu, ıslatılabilirlik

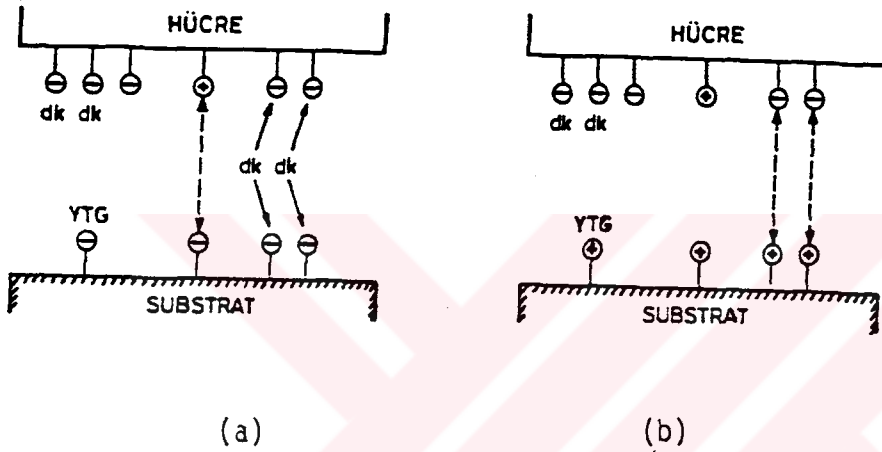
ve fiziksel yapı, hücre etkileşimini etkileyen önemli substrat özellikleri olarak sıralanabilir.



Şekil 2.10. Çeşitli Yüzeylere Hücre Yapışması.

Yüzeyler, taşıdıkları yüzey serbest enerjisine bağlı olarak yüksek veya düşük enerjili yüzeyler olarak adlandırılırlar. Metaller, metal oksitler ve cam yüksek enerjili; organik yüzeyler ise düşük enerjili yüzeylerdir. Orijinal yüzey, fiziksel veya kimyasal işlemlerle modifiye edilebilir. Böylelikle, örneğin polistirende olduğu gibi, düşük enerjiye sahip yüzey, yüksek enerjili duruma getirilir. Şekil 2.10'da da görüldüğü gibi, hücreler yüksek enerjili yüzeylere daha iyi yapışmaktadır (120). Yapılan çalışmalar, hücre yapışmasının negatif ya da pozitif yüzeylerde gerçekleşebileceğini; yük polaritesinden çok, yük yoğunluğunun yapışma ve yayılma da etken olduğunu göstermiştir.

Hayvansal hücreler negatif yüzey yüküne sahiptirler. Klasik kültür yüzeyleri de cam veya plastik olup negatif yüklüdürler. Böylece, iki negatif yük arasındaki elektrostatik itme sonucunda, iyonik etkileşimler ve protein köprüleriyle hücre-yüzey bağlantısı gerçekleşir (121, 122). Pozitif yüklü substrat durumunda ise, elektrostatik kuvvetlerle bağlantı sağlanır. Her iki mekanizma da birbirine benzer olup, hücre-substrat etkileşimi, fibronektin gibi bir amfoterik protein ve/veya Ca^{++} , Mg^{++} gibi



Şekil 2.11. Hücre Yapışma ve Yayılmasının Şematik Gösterimi

a)Negatif, b)Pozitif Yüklü Hücre Kültür Substratları

YTG:Yüzeye Tutunan Glikoprotein, dk:divalent katyon.

divalent katyonlar tarafından oluşturulan köprülerle sağlanır. Şekil 2.11' de bu etkileşim şematik olarak gösterilmiştir.

Hücre yapışmasında etkin olan proteinler, hücre tarafından sentezlenebileceği gibi, kültür ortamındaki serumun yapısında da bulunmaktadır. Kültür ortamındaki plazma proteinleri ve serum, hücresel yapışmada son derece etkin olup, yüzey tarafından absorplanırlar ve yüzeyin kimyasal özelliklerini değiştirirler. Protein absorpsiyonu ise substratın ıslatılabilirliği ile yakından ilgilidir. Genelde hidrofob substratlar hücre yapışmasını desteklemez. Çalışmalar, substrat ıslatılabilirliğinin artmasıyla, hücre yapışma ve yayılmasının mükemmelleştiğini göstermektedir (123,124). Ancak, ıslatılabilirlik dereceleri yüksek olmasına rağmen, hücre yapışmasına izin

vermeyen iki substrat, agar ve poli (HEMA), bu durumun dışında kalmaktadır (125).

Hücre yapışmasında etkin diğer bir parametre, substratın yapısıdır. Hücreler, katı yüzeylere yapışırlar. Çalışmalar, sıvı fosfolipid yüzeylerde yapışma olmadığını göstermiştir (126). Bu durum hücrelerin substrat yüzeyinde etkileşebileceği, küçük, yoğun ve sert katı bağlanma noktalarının varlığıyla açıklanmıştır (127). Akışkan substratlarda, bu tür kararlı bağlanma noktaları yoktur.

II - Tek Tabaka Hücre Kültüründe Kullanılan Substratlar

Daha önce de söz edildiği gibi, tek tabaka kültürlerdeki hücreler, üremeleri için uygun bir substrata yapışma eğilimindedirler. Seçilecek ideal yüzey toksik olmamalı, biyolojik açıdan inert ve şeffaf olmalıdır. Tüm bunların ötesinde, hücre yapışmasına ve üreme sırasındaki hücre hareketliliğe izin vermelidir. Bu özellikler dikkate alınarak seçilmiş çeşitli substratlar mevcut olup, bunları doğal ve yapay substratlar olarak 2 grupta toplamak mümkündür.

Doğal Substratlar : İn vivo koşullarda hücrelerin yapıştığı diğer hücre veya yapılar "hücre dışı matriks" olarak adlandırılır. Söz konusu matriks, hücre için sadece bir destek materyal olmakla kalmayıp, aynı zamanda, hücre metabolizması ve farklılaşmasını da etkiler (128). Hücre dışı matriksin yapısında bulunan bileşenlerin önemlileri aşağıda kısaca özetlenmiştir.

i) Kollojenler : Kollojenler, üçlü sarmal yapıdaki proteinler olup, yüksek glisin, prolin ve hidrokisprolin içeriğine sahiptirler. Tekrarlanan yapı Gly-X-Y şeklindedir. Genetik açıdan 5 farklı türde kollojen mevcuttur. I.Deri, kemik ve tendonlarda; II.Epitel hücrelerin membranında; III.Deri, placentada ve kasda; IV.Kan damarları ve iç organların parankimasında bulunan; V.Kartuş. Bunlardan, I,IV ve V fibrillar yapıdadır. II.tür ise fibrillar olmayıp hücreler için uygun yüzeyi sağlar.

ii) Proteoglikanlar : Bu yapılar, merkezi proteine yapışmış çok sayıdaki glikozaminoglikanlardan oluşur. Glikozaminoglikanlar ise, hekzoamin ve diğer bir şeker molekülü içeren tekrarlanabilir disakkarit birimlerinden oluşan, uzun polianyonik zincirlerdir. 4 önemli türü mevcuttur. Hyaluronik asit, kondrotin sulfat, keratin sulfat ve heparan sulfat. Tüm yapılar son derece kompleksdir ve merkezi proteine yapışmış glikozaminoglikan türünün değişimiyle, farklı yapıdaki hücreler için uygun substratlar sağlanır.

iii) Diğer proteinler: Hücre dışı matriksin yapısında bulunan diğer proteinler, fibronektin, laminin, elastin, entaktin, kondronektin ve çok sayıdaki isimsiz glikoproteinlerdir. Glikoproteinlerin bileşimi ve miktarlarındaki değişimlerle, farklı hücre dışı matriksler elde edilir ve bunlar değişik tür hücreler için hücreyel yapışmayı sağlarlar. Örneğin fibroblastlar için fibronektin, epitel hücreler için laminin yapışmada etkindir(129).

Özetlemek gerekirse, hücre dışı matriks son derece karmaşık yapıda olup, hücre yapışma ve üremesini desteklemek amacıyla bu matriksin çeşitli bileşenleri, yapay substratların yüzeyinde kullanılır. Kollojen kaplı yüzeylerin kullanımı, çeşitli hücre hatları için denenmiştir (130). Bu doğal yapılarla gerçekleştirilen çalışmalar, hücre üremesi ve farklılaşmasında matriksin rolünün anlaşılmasını sağlamıştır. Ancak ticari boyutlardaki çalışmalar için teminleri son derece zor ve pahalı olduğundan bu tür uygulamalarda, doğal substratların yerini alacak yapay substratlar geliştirilmiştir.

Yapay Substratlar : Bu gruptaki substratlar cam ve plastikler olmak üzere iki türdür.

i) Cam: Cam yüzeyler, soda camı (normal cam) ve alüminyum borosilikat camı olarak iki gruba ayrılır. Hücreler soda camında üreyebilir fakat özellikle sterilizasyon sırasındaki yüksek sıcaklıklarda, yapıdaki alkalinin ortama salınması, hücre üzerinde toksik etkiye neden olur. Alkali oksit içeriğinin soda camından 10 kat daha düşük olması ve yüksek hidrolitik direnci nedeniyle, alüminyum borosilikat camı hücreler için daha uygundur (131). Ayrıca, Selofan, karbon veya kollojen kaplı cam yüzeyler de geliştirilmiştir.

ii) Plastik : Hücreler, değişik kimyasal yapıdaki plastik yüzeylere, örneğin, polistiren, polietilen, polikarbonat, polipropilen, polivinilklorür, Teflon, selüloz asetat, Selofan ve diğerlerine yapışır ve ürerler. Ancak ticari olarak mevcut plastik yapıların bazıları, hücre kültürü için uygun değildir ve hücreler bu tür yüzeylere yapışmazlar. Bakteriyolojik polistiren petri kapları bu türdür. Çeşitli kimyasal ve fiziksel tekniklerle, polistiren yüzeyler, hücre kültürü için uygun duruma getirilmiş ve piyasa sunulmuştur (132-135).

2.11.2.2. Süspanse Hücre Kültürleri

Tümör hücreleri, örneğin HeLa hücreleri ve Limfoblastoid'ler üremeleri için bir yüzey gerektirmeyen süspanse hücreler olup, bakteriyal fermentasyondakine benzer ekipmanlarda üretilirler. Süspanse kültürlerde, hücre üreme kinetiği karakteristiktir.

2.11.3. Hücre Yapışma Kinetiği

Hücrelerin substrat yüzeyine yapışması, yüzeyde bulunan katı tutunma noktalarının varlığıyla gerçekleşmektedir. Yüzey özelliklerine bağlı olarak bu noktaların sayısı değişmekte, dolayısıyla yüzeye yapışan hücre sayısı artmakta veya azalmaktadır.

Sunulan çalışmada hücre yapışması, Kiremitçi (136) tarafından önerilen matematiksel model kullanılarak incelenmiştir.

Matematiksel Modelin Tanımı

Hücre yapışmasının matematiksel olarak tanımlanmasında, yüzeyde bulunan katı tutunma noktalarının varlığı kavramı gözönüne alınarak

$$\frac{da}{dt} = kx(1 - \frac{a}{a_{max}}) \quad (2.12)$$

eşitliği türetilir.

Bu eşitlikte,

x = Herhangi bir t anında ortamda bulunan serbest hücre derişimi (hücre/ml)

a = Herhangi bir t anında yüzeye yapışan hücre derişimi (hücre/ml)

$a_{\max}$ = Yüzeydeki tutunma noktası sayısı (hücre/ml)

k = Başlangıç özgül yapışma hızı (dakika^{-1}) dir.

Serbest hücre derişimi $x=x_0-a$ olarak tanımlanarak Eşitlik 2.12

$$\frac{da}{dt} = k(x_0 - a) \left(1 - \frac{a}{a_{\max}}\right) \quad (2.13)$$

durumuna gelir. Burada,

x_0 = Başlangıç hücre derişimidir (hücre/ml).

Eşitlik 2.13., yüzeydeki her bir tutunma noktasına, tek bir hücrenin yapıştığını ve başlangıçta hızlı bir şekilde gerçekleşen yapışmanın, zamanla yüzeyde bulunan tutunma noktalarının hücreler tarafından işgal edilerek azalması sonucu yavaşladığını ifade etmektedir. Yüzeyde boş nokta kalmadığı durumda tutunma sözkonusu değildir.

Eşitlik 2.13. aşağıdaki sınır koşulları kullanılarak integre edildiğinde;

$$\begin{array}{ll} t=0 & a=0 \\ t=t & a=a \end{array}$$

$$\frac{a_{\max}}{x_0 - a_{\max}} \left[\ln\left(\frac{x_0 - a}{x_0}\right) - \ln\left(\frac{a_{\max} - a}{a_{\max}}\right) \right] = kt \quad (2.14)$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitlik yeniden düzenlenerek,

$$\frac{a_{\max}}{x_0 - a_{\max}} \left[\ln \frac{(x_0 - a)/x_0}{(a_{\max} - a)/a_{\max}} \right] = kt \quad (2.15)$$

şekline dönüşür.

Zamana karşı $(a_{\max}/x_0 - a_{\max}) \ln \{ [(x_0 - a)/x_0] / [(a_{\max} - a) / a_{\max}] \}$ terimi grafiğe alınarak, elde edilen doğrunun eğiminden, k değeri bulunur.

2.11.4. Hücre Üremesi

Hücre kültüründe yüzeye yapışan hücreler, ortam koşulları uygun olduğu sürece yayılıp üreyebilirler. Substrat yüzeyinde hücre üremesinin gerçekleşebilmesi, yüzeydeki yapışma değerine bağlı olup, yüzeyde üreme, yapışma kesri değerlerinin % 50'nin üzerine çıktığı durumlarda mümkün olmaktadır (137). Hücre üremesinden, hücrelerin "ikilenme sürelerinin" (doubling time) hesaplanması mümkündür. Sunulan çalışmada ikilenme süresi,

$$d = \frac{t}{(\ln C_t - \ln C_0) 3.3219} \quad (2.16)$$

eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır (138).

Bu eşitlikte;

C_t = Üreme süresi sonunda ulaşılan hücre derişimi (hücre/ml)

C_0 = Hücre inokülasyon yoğunluğu (hücre/ml)

t = İnkübasyon süresi (saat)

d = İkilenme süresi (saat)

dir.

2.11.5. Kan ve Yapısı

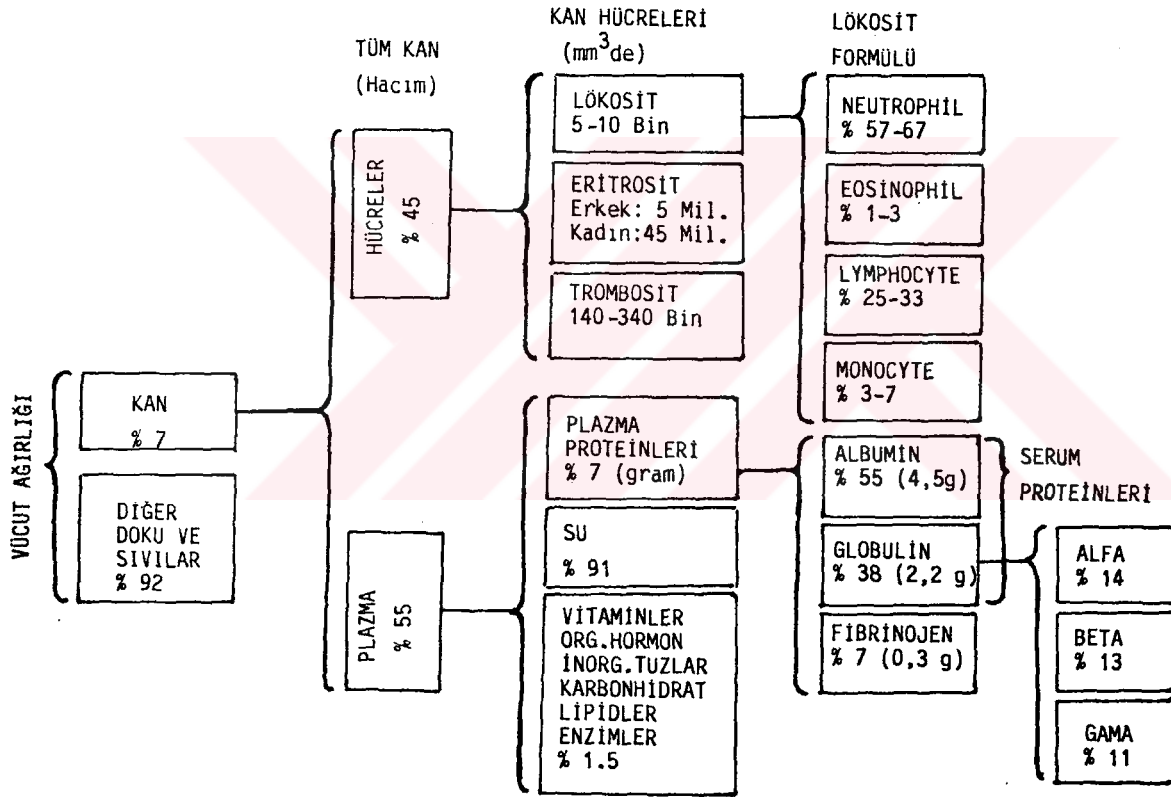
Normal insan kanı, plazma içinde asıltı halinde bulunan hücresel elemanlardan oluşmuştur. Plazma, inorganik tuzlar ve organik moleküllerin sulu çözeltisi olarak tanımlanabilir (139-141).

Asıltı halindeki hücreler şunlardır:

Eritrositler (Alyuvarlar)
Lökositler (Akyuvarlar)
Trombositler (Plateletler)

Eritrositler normal olarak kanın hacimce %45-50 sini oluştururlar.
Diğer hücrelerin hepsi, toplam kan hacminin ancak % 1'i kadardır.

Normal insan kanının bileşimi Şekil 2.12'de gösterilmiştir (142).



Şekil 2.12. Normal İnsan Kanının Bileşimi.

Aşağıda kan plazması ve hücresel elemanlarla ilgili kısa bilgi verilmiştir.

Kan Plazması : Kan santrifuj edildiğinde, plazma ve hücreler olmak üzere iki kısma ayrılır. Plazmanın ağırlıkça %90'ı su, %7'si plazma proteinleri ve geri kalanı da organik ve inorganik maddelerdir. Plazmanın ozmotik basıncı, içerdiği serbest molekül ve iyonlardan dolayı 8 atm. dolayındadır. Bu da ağırlıkça %0,9'luk NaCl çözeltisinin ozmotik basıncına eşittir. Plazmadaki elektrolitlerin derişimi, Tablo 2.17'de gösterilmiştir. Plazma proteinleri, albumin, globulin, fibrinojen ve lipoproteinlerdir.

Katyonlar				Anyonlar				
Türü :	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Diğer	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	Fosfatlar	Diğer
Deri- şimi : 140 (mmol/l)		4	5	6	103	29	2	21

Tablo 2.17. Plazmadaki Elektrolit Derişimi.

Eritrositler : Normal insan kırmızı kan hücresi (eritrosit), durgun halde ortalama çapı yaklaşık 8 µ olan çift, iç bükey bir diske benzer. Bu diskin maksimum kalınlığı 2 mikron, minumum kalınlığı ise 1 mikrondur. Çok esnek olan kırmızı kan hücreleri, akış sırasında, özellikle küçük yarıçaplı damarlardan geçerken kolaylıkla şekil değiştirebilir (143,144). Deniz seviyesinde normal insan kanınının mm³'ünde yaklaşık olarak 5 milyon kırmızı hücre vardır. Kandaki kırmızı hücrelerin hacimsel yüzdesine "Hematokrit" adı verilir. Kaza gibi dış etkiler veya hastalıklar sonucu, hematokrit değişebilir.

Normal bir insan kırmızı hücresinin ömrü 113-141 gün arasındadır. Kırmızı hücrelerin yaklaşık olarak %70'i su ve %25'i hemoglobinden oluş-

muştur. Geri kalan yaklaşık %5'lik kısım ise, proteinler (çoğu hücre zarında varolan) ve Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- gibi iyonları içerir.

Kırmızı hücre zarı, yüksek molekül ağırlıklı maddelerin geçmesini engelleyen, küçük molekülü maddelerin ise hücre içine ve dışına difüzyonuna izin veren yarıgeçirgen bir zardır. Bir kırmızı hücre süspansiyonu, su ile seyreltildiğinde ozmotik basınç gradiyentinden dolayı hücre içine su taşınmasıyla, hücre şişer ve küresel hale gelir. Hacim %30-40 kadar arttığı zaman, hücre, zorlanmaya dayanamayarak yırtılır ve hemoglobin hücre dışına akar. Bu olaya "Hemoliz" adı verilir.

Kırmızı hücrelerin görevi esas olarak akciğere solunum yoluyla alınan oksijeni, dokulara taşımaktır. Bu oksijen-hemoglobin kompleksi aracılığıyla olur.

Lökositler : Erişkin bir insan kanının mm^3 'ünde yaklaşık olarak 7000 akyuvar (lökosit) vardır. Beyaz hücrelerin miktarı ve dağılımı çok kolaylıkla değişebilir. Örneğin, derin bir nefes bile, hücre miktarını 6-7 kat kadar arttırabilmektedir. Dokuların tahrip olduğu durumlarda ve bazı hastalıklarda, akyuvar sayısı normal miktarının 50 katına kadar çıkabilmektedir.

Beyaz hücreler, 8-15 μ çapında küresel ve çok kolay şekil değiştirebilen esnek yapıda hücrelerdir. Esneklikleri dolayısıyla, kendilerinden daha küçük çaptaki kılcal damarlardan geçtikleri gibi, damar yüzeyinde bulunan gözeneklerden de kolaylıkla dışarı çıkabilirler.

Beyaz hücrelerin içi, kırmızı hücrelerden daha karmaşık yapıdadır. Çekirdek, sitoplazma ve plazma içindeki çeşitli iyonları içeren beyaz hücrelerde, ayrıca yüksek konsantrasyonlarda çeşitli enzimler bulunur.

Beyaz hücre zarı, kırmızı hücre zarından daha esnek olup, hacim artışı uygulanıp tekrar eski hacmine indirildiğinde bile, şeklinde bir değişiklik oluşmaz.

Lökositler, vücudun immünolojik sisteminde, yabancı materiyalden ko-

runma konusunda önemli rol oynar.

Plateletler : Trombosit olarak da adlandırılan plateletlerin, hem çekirdekleri, hem de belirli bir sınırları yoktur. 1-3 μ arasında değişen boylarda olan trombositler, normal olarak kanın mm³'ünde 400.000 kadar bir sayıda bulunurlar. Bunlar kan-biyomateryal etkileşmesinde önemli rol oynarlar.

Pıhtılaşma : Kan, dolaşım sistemi içinde olduğu sürece pıhtılaşma olmaz. Pıhtılaşma karışık ve tersinmez bir mekanizma sonucudur. Kanın içinde yabancı bir madde olduğu zaman, şekilsiz elemanlar çatlayarak etrafa kimyasal madde salarlar. Bu maddeler, bir seri kimyasal tepkime başlatarak, protein prothrombini enzim thrombin haline çevirirler. Oluşan thrombin, plazma proteinlerinden fibrinojenin tersinmez polimerizasyonla katı yapıdaki fibrin ağına dönüşmesine sebep olur.

Pıhtılaşma mekanizmasının yürümesi için, kalsiyum iyonlarının bulunması gerektiği gösterilmiştir. İnsan veya hayvandan alınan taze kanın pıhtılaşmasında, kanın temas ettiği yabancı materyalin etkisinin de büyük olduğu gösterilmiştir (145). Cam gibi, bazı maddelerin yüzeyinde negatif yük olmasının, yüzeyde yüksek oranda kalsiyum bulunmasına sebep olduğu ve yüzeyde bulunan kalsiyumdan dolayı pıhtılaşmanın hızlı olduğu sonucuna varılmıştır. Silikonize edilmiş yüzeylerde ise, kana karşı daha inert bir davranış saptanmıştır.

Deney aletlerinde geçerli ölçümlerin yapılabilmesi için pıhtılaşma önlenmelidir. Bu üç şekilde gerçekleştirilebilir:

- 1) Kana pıhtılaşmayı engelleyen maddeler ilave edilir (Heparin gibi antikoagulantlar),
- 2) Kalsiyum iyonları uzaklaştırılır,
- 3) Oluşan fibrin ortamdan uzaklaştırılır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

Sunulan çalışmanın deneysel kısmını üç ana başlık altında toplamak mümkündür:

- Poliüretan membranların hazırlanması;
- Poliüretan membranların bazı fizikokimyasal özelliklerinin tayini;
- Poliüretan membranların hücre etkileşimlerinin incelenmesi;

3.1. POLİÜRETAN MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI

Bu çalışmada kullanılan Poliüretan (PU) membranlar, çözücü döküm yöntemiyle hazırlanmıştır. Membranların hazırlanması sırasında uygulanan işlemler aşağıdaki alt bölümlerde anlatılmıştır.

3.1.1. Polimerlerin Çözünmesi

Çalışmada kullanılan PU, Up John (İsveç) firmasının Pellethane® 2363-80 A ticari adıyla bilinen granüle bir ürünü olup, bağış yoluyla temin edilmiştir. Biyomedikal uygulamalar için özel olarak üretilen Pellethane' in Gel Permeation Chromatography (GPC) yöntemiyle bulunan molekül ağırlığı değeri;

$$\overline{M}_w = 5,6 \cdot 10^5 \text{ dir (146).}$$

Çözücü döküm yöntemiyle membran hazırlanmasında, çözücü türünün, membranın tüm özelliklerini etkilediği bilinmektedir. Bu durum gözönüne alınarak yapılan çalışmada, N,N, Dimetilformamid (DMF), (Merck, B.Almanya); 1,4, Dioksan (BDH, İngiltere); Tetrahidrofuran (THF), (Merck, B.Almanya) çözücüleri ile bu çözücülerin farklı bileşimlerindeki karışımları kullanılmış ve 6 değişik PU çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan PU çözeltileri için kullanılan çözücü tür ve bileşimlerine ait liste Tablo3.1.'de verilmiştir.

Membran No	Kullanılan Çözücü Tür ve Bileşimleri
PU- 1	% 100 THF
PU- 2	% 10 DMF, % 90 THF
PU- 3	% 50 THF, % 50 Dioksan
PU- 4	% 10 DMF, % 45 THF, % 45 Dioksan
PU- 5	% 10 DMF, % 90 Dioksan
PU- 6	% 100 Dioksan

Tablo 3.1. : PU Membranların Hazırlanmasında Kullanılan Çözücü Tür ve Bileşimleri.

Çözücü döküm yönteminde polimer çözeltilerinin konsantrasyonu, elde edilecek membranın özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Düşük konsantrasyonlu çözeltilerden elde edilen membranlar, istenilen mekanik özelliklere sahip olmamakta, membranda küçük delikler, yırtılmalar oluşabilmektedir. Yüksek konsantrasyonlu çözeltilerde ise membranın istenen kalınlıkta kolayca hazırlanmasında zorluklar ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmadaki çözelti konsantrasyonu % 8 (gram polimer / % 100 ml çözelti) olarak seçilmiştir. Çözeltiler, yaklaşık 700 devir/dk. dönme hızına sahip mekanik karıştırıcı (Model Q2, Grant Ins., İngiltere) ile çözeltinin 5 saat karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

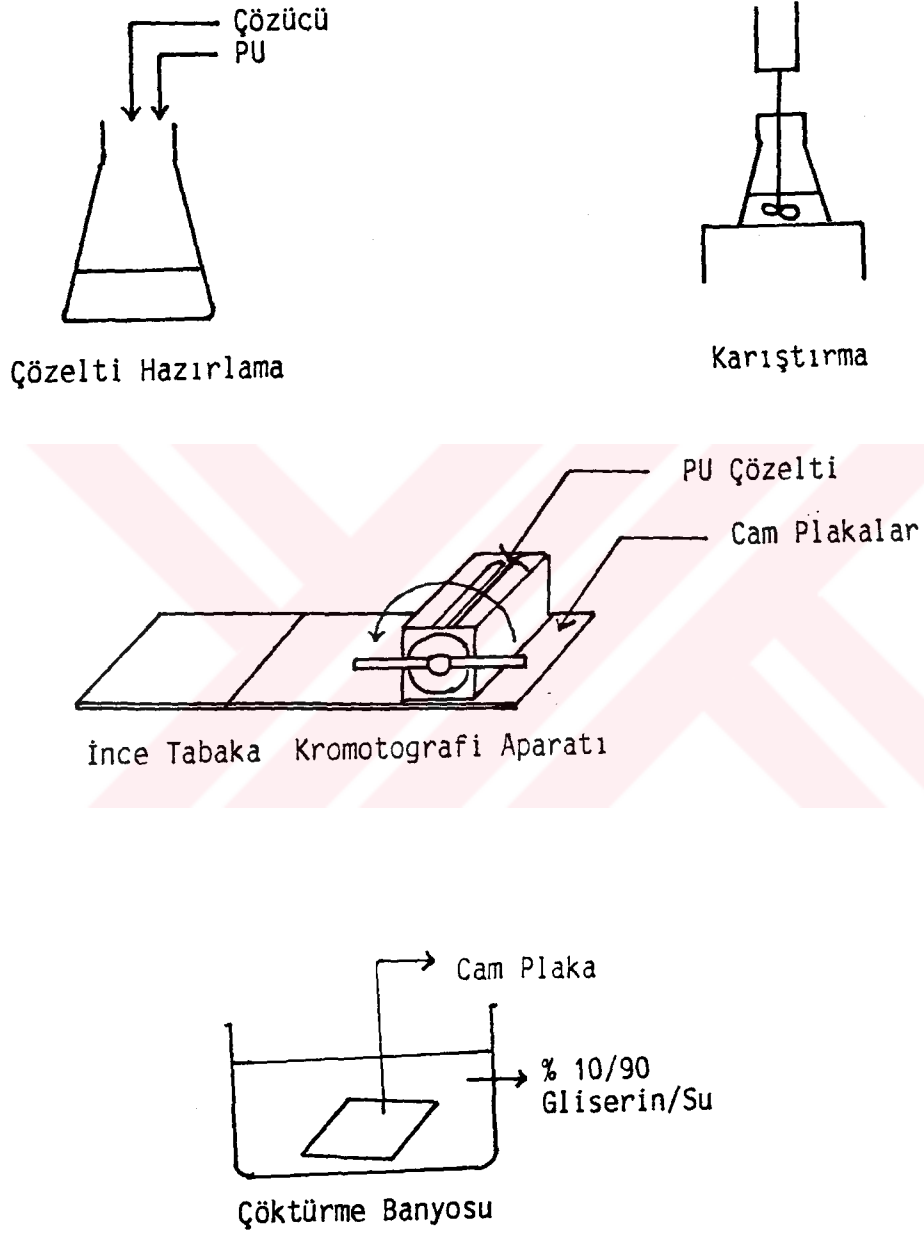
3.1.2. Polimer Çözeltilerin Dökülmesi ve Membran Eldesi

PU membranların istenilen kalınlıkta hazırlanabilmesi için, DESEGA marka İnce Tabaka Kromatografi aparatı kullanılarak aşağıdaki işlem sırası izlenmiştir (Şekil 3.1.).

Çekme aparatının ağız açıklığı, çekilecek çözelti kalınlığı 75μ olacak şekilde ayarlanır. Aparatın haznesi, PU çözeltisi ile hava kabarcığı olmayacak şekilde doldurulur. Yüzeyi pürüzsüz özel cam plakalar, Aseton ile temizlenir. Haznesi çözelti dolu çekme aparatı, cam plakalar üzerinden sabit bir hızla kaydırılarak PU çözeltisi bir film halinde cam yüzey üzerine yayılır.

Cam plakalar üzerine yayılan polimerik sıvı filmler daha sonra, hacimce %10/%90 gliserin/su içeren çöktürme banyolarına daldırılır ve böylece filmlerin katılaşarak cam yüzeyden ayrılması sağlanır. Çöktürme banyosundan alınan membranlar birkaç kez saf su ile yıkanır ve daha sonra 25°C sabit sıcaklık odasında, sabit tartıma gelene kadar kurutulur.





Şekil 3.1. : Membran Üretim Aşamaları.

3.2. POLİÜRETAN MEMBRANLARIN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Bu bölümde, sunulan çalışmada hazırlanan PU membranların bazı fiziko-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla izlenen yöntemler anlatılmıştır.

3.2.1. Poliüretan Membranların Temas Açısı Değerlerinin Belirlenmesi

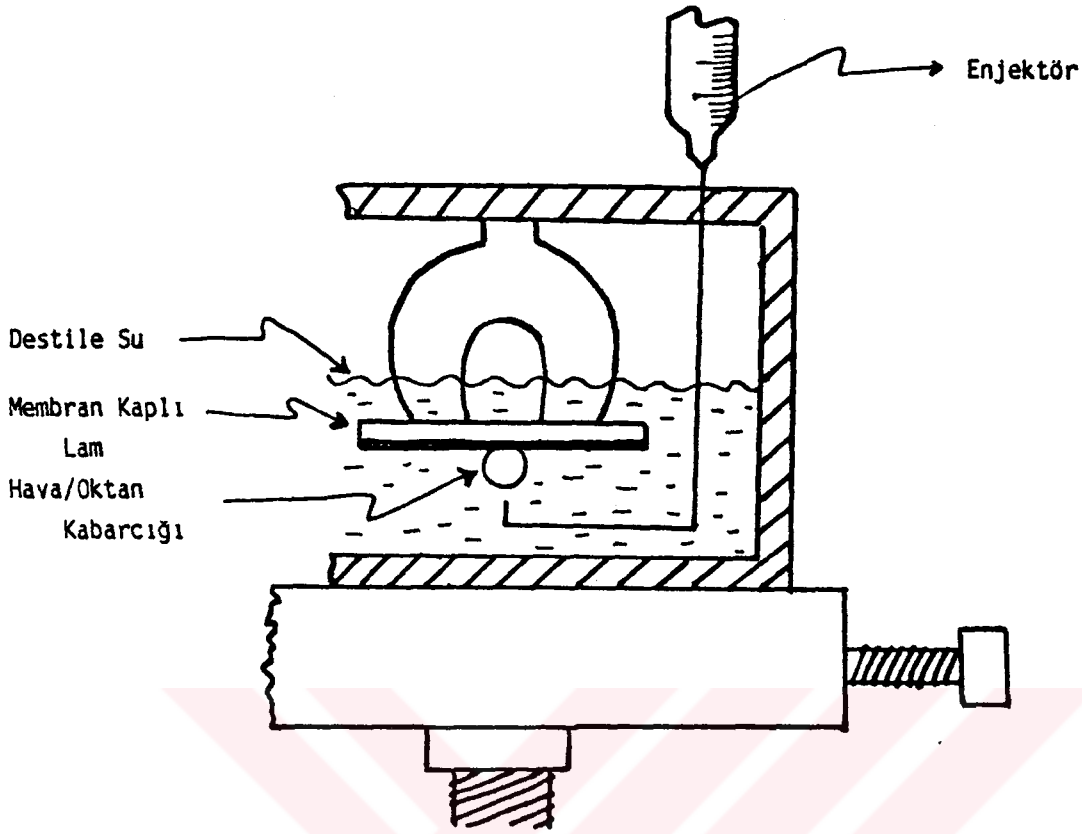
Temas açısı değerleri, "Yakalanmış Kabarcık" yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde, sıvı faz olarak iki kez destillenmiş su kullanılmış ve suya tamamen batırılmış olan polimer örnek üzerindeki, hava ve n-oktan kabarcıklarının temas açısı değerleri, θ_{hava} ve θ_{Oktan} saptanmıştır. Yöntem şu şekilde uygulanmıştır:

Camdan hazırlanan bir küvet içerisine iki kez destillenmiş su doldurulur. Daha önceden temizlenen membran, bir lam yüzeye gerildikten sonra, küvetin içerisine tamamen batmış olacak şekilde yerleştirilir (Şekil 3.2.).

Kullanılan n-oktan (BDM, İngiltere) yaklaşık %99 saflıktadır.

Hava ve n-oktan kabarcıkları, Pu örnek yüzeyine (μl) ölçekli u şeklinde bir enjektör kullanılarak ulaştırılır. Kabarcıklar, enjektörün ucunda şekillendirildikten sonra, enjektör gövdesine hafifçe vurularak, kabarcığın iğne ucundan kurtulması ve örnek yüzeyine gönderilmesi sağlanır. Kabarcık hacmi yaklaşık $0,2 \mu\text{l}$ 'dir.

Temas açısı değerleri için gerekli ölçümler, 160X objektife sahip Olympus marka mikroskopa monte edilen bir fotoğraf makinesi yardımıyla çekilen fotoğraflardan yararlanılarak yapılmıştır.



Şekil 3.2. : Temas Açısı Ölçüm Düzeneği.

Temas açısı değerleri, Bölüm 2.7.4.4.'de anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

3.2.2. Poliüretan Membranların Yüzey Serbest Enerjilerinin Belirlenmesi

Çalışmada hazırlanan PU membranların yüzey serbest enerjisi değerleri, Bölüm 3.2.1.'de anlatılan deneysel yöntemle saptanan θ_{hava} ve θ_{oktan} değerleri kullanılarak ve Bölüm 2.7.4.5.'de açıklanan hesaplama yönteminden yararlanılarak bulunmuştur.

3.2.3. Poliüretan Membranların Denge Su İçeriklerinin Belirlenmesi

Pu membranların denge su içerikleri aşağıda anlatılan yöntem izlenerek belirlenmiştir:

Belirli büyüklüklerde kesilen PU membranlar 24 saat oda sıcaklığında saf suda bekletilir. Bu sürenin sonunda su içinden alınan membranlar nemi alındıktan sonra tartılır (w). Daha sonra $60,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sabit sıcaklıktaki bir ortamda 24 saat kurutulur ve tekrar tartılır (w_0). Tartımlar, Sartorius marka elektronik terazide $\pm 0,0001$ g. hassaslıkta yapılmıştır. Bu ölçümlerden elde edilen sonuçlardan, Bölüm 2.10.3'de anlatılan yöntem izlenerek membranların boşluk hacimleri ve denge su içerik değerleri hesaplanmıştır.

3.2.4. Poliüretan Mebranların Su Buharı Geçirgenliklerinin Belirlenmesi

PU membranların su buharı geçirgenlik değerleri aşağıda anlatılan yöntem izlenerek yapılmıştır:

İçleri saf su ile doldurulmuş 6 cm. ağız çaplı cam kaplarının ağızları, suyla temas etmeyecek şekilde membranla kapatılır. Tartımları alınan örnekler $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sabit sıcaklık ortamında ve %60 bağıl nemlilikte 24 saat bekletilir ve tekrar tartımları alınır. Tartımlar, Sartorius marka elektronik terazi ile $\pm 0,0001$ g. hassaslıkta yapılmıştır.

Cam kaplarının ağız alanları hesaplandıktan sonra, PU membranların su buharı geçirgenlikleri $\text{g/m}^2 \cdot 24$ saat biriminde bulunmuştur.

3.2.5. Poliüretan Membranların SEM ile Yüzey ve Kesit Analizlerinin Yapılması

Çalışmada hazırlanan PU membran örneklerin yüzey ve kesitleri, 300 Å kalınlığında altınla kaplanarak iletken hale getirildikten sonra,

İ.T.Ü. Kimya-Metalurji Fakültesi Araştırma Laboratuvarında bulunan JEOL-ISM-T 330 marka SEM ile, yüzey ve kesit fotoğrafları çekilmiştir.

3.3. HÜCRE KÜLTÜR ve KAN HÜCRESİ DENEYSEL ÇALIŞMALARI

Sunulan araştırmanın bu bölümünde, PU membranların biyolojik uyuşabilirliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan hücre kültür ve kan hücresi deneysel çalışmaları anlatılmıştır.

3.3.1. Hücre Kültür Çalışmaları

Bu bölümde "Baby Hamster Kidney" (BHK 21) hücre hattı kullanılarak yapılan deneysel çalışmalar ayrıntılı olarak anlatılmıştır. İlk olarak, BHK hücre kültürünün hazırlanması açıklanmış daha sonra PU membranlarla gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarının deneysel yöntemleri verilmiştir. Hücre kültür çalışmalarının ön denemeleri, İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Hücre Kültür Laboratuvarında yürütülmüş, daha sonra, çalışma Ankara Şap Enstitüsü Kontrol Laboratuvarında tamamlanmıştır. Çalışmada model hücre olarak kullanılan, tipik fibroblastik üreme özelliğine sahip Baby Hamster Kidney (BHK) hücreleri, halen Ankara Şap Enstitüsünde şap aşısı hazırlanmasında kullanılmaktadır.

3.3.2. BHK Hücre Kültürü

Hücre kültür çalışmaları, "Syrian Hamster Kidney" hücre hattı (BHK 21) ile yapılmıştır. Söz konusu hücreler "Pirbright Virolojik Araştırma Enstitüsü"nden (İngiltere) Ankara Şap Enstitüsüne gönderilmiş olup, 29. pasajda ve ortalama ikilenme süresi yaklaşık 12 saattir. Fibroblastik yapıdaki bu hücre hattı yalnızca tek tabaka kültürde üreyebilmektedir.

Çalışmalarda, döner şişelerdeki stok hücre kültürlerinden alınan hücreler kullanılmıştır. Bu işlem şu şekilde gerçekleştirilir: Döner şişedeki hücre kültürü, hacimce %0.2 oranında tripsin (DIFCO, ABD) içeren fosfat tampon çözeltisiyle (PBS) tripsinize edilerek, hücrelerin cam şişe yüzeyinden

kopması sağlanır ve %0,1'lik (ağırlık/hacim) trypan bue (BDH,ABD) çözeltisiyle hücre canlılığının kontrolundan sonra, hemositometreyle (Bürker) hücre sayımı yapılır. Hemositometreyle hücre sayım yöntemi EK.2'de verilmiştir. Yeni hazırlanacak hücre kültüründe istenilen inokülasyon yoğunluğuna ulaşılması için gerekli sayıdaki hücre, steril haldeki kültür ortamına aktarılarak çalışma başlatılır.

Çalışmalar "Dulbecco's Modified Essential Medium" (GIBCO,ABD), vasatı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ortamın zenginleştirilmesinde %50 (hacimce) sığır serumu (Ankara Mezbahası) kullanılmıştır. Ayrıca antibiyotik olarak 100µg/ml Gentamycin ilavesi yapılmıştır. DME ortamının bileşimi EK-3'de verilmiştir.

Kültür ortamının sterilizasyonu 0,2µ boyutundaki Sartorius filtrelerle gerçekleştirilmiştir. Araştırma kapsamındaki, steril ortam gerektiren çalışmaların tümü, laminar akışlı steril hücrede (Vertical, ESI, Kat.1, Fransa) yapılmıştır.

3.3.3. Hücre Kültürü Çalışma Koşulları

Hücre kültür ortamına, kontaminasyon riskini azaltmak üzere, çalışma süresince antibiyotik ilavesi yapılmıştır. Hücre kültür ortamının %50'i, her 48 saatte bir yenilenmiş ve kültür ortamının pH değeri çalışma süresince 7,2-7,6 değerleri arasında tutulmuştur.

Hücre yapışma deneyinin süresi 2 saat olarak seçilmiş ve ölçümler 0,60,90 ve 120 inci dakikalarda yapılmıştır.

Hücre üreme deney süresi ise 96 saat olarak belirlenmiştir.

Tamamı 37±0,5°C'de yürütülen çalışmalarda Polistiren (PS) doku kültür kapları (Falcon,ABD) kontrol amacıyla kullanılmış ve PU yüzeylerde hücre yapışması ve üremesi PS yüzeylerle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

3.3.4. Hücre Kültüründe Kullanılan Cam Malzemenin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan her türlü cam malzeme (petri kapları, kültür reaktörleri, şişeler, pipetler, vb.) önce deterjanlı su ile yıkanıp çalkalandıktan sonra en az iki kere destile su ile tekrar yıkanmıştır. Ağızları pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılan cam malzemeler 120°C, 20 psi buhar basıncında otoklavda (VEB MLW, Medizinische Geräte, Berlin) yarım saat süre ile sterillemiştir.

3.3.5. Poliüretan Membranların Hücre Kültür Deneyine Hazırlanması

PU Membranların hücre kültür deneyine hazırlanması sırasında izlenen yöntem aşağıda anlatılmıştır.

Hazırlanan 6 farklı PU membranın herbirinden 5'er cm. çaplı daireler halinde, altışar örnek kesilir. Örnekler 6 gözlü 6 ayrı bakteriyolojik polistiren (PS) kültür kabına (Costar, USA) yerleştirilir. Kullanılan kültür kaplarının gözlerinin çapları 35 mm. yükseklikleri 10 mm.'dir. İçinde yerleştirilmiş membran örnekleri bulunan kültür kapları alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra, Co⁶⁰ - kaynağında (Gamma-Cell 220 marka X kaynağı, doz hızı: 0,15 MRad/saat) 17 saatte toplam 2,5 MRad doza ulaşılacak şekilde ışınlanarak sterillemiştir.

Pu membranların, yukarıda anlatıldığı gibi kültür kaplarının içine yerleştirilip, sterillemiştir. hazırlanması işlemi, bir kez hücre yapışma deneyleri ve bir kez de hücre üreme deneyleri için gerçekleştirilmiştir.

3.3.6. Poliüretan Yüzeylerde Hücre Yapışması

BHK hücrelerin PU membran yüzeyine durgur kültür koşullarında yapışması, inokülasyondan sonra 2 saat süresince her 30 dakikada bir yapılan hücre sayımlarıyla incelenmiştir. Çalışma koşulları Tablo 3.2.'de özetlenmiştir. Hücre yapışma deneyinde izlenen yöntem aşağıda basamaklar halinde anlatılmıştır.

I - Hücrelerin PU Membran Yüzeyine Ekilmesi

$2,5 \cdot 10^5$ hücre/ml inokülasyon yoğunluğundaki hücre kültüründen 3'er ml, kültür kabının gözlerine yerleştirilmiş olan membranlar üzerine konulur. Daha sonra kültür kapları $37,0 \pm 0,5$ °C'deki CO₂ etüvüne (LEEC Model GA3, İngiltere) bırakılır.

II - Yapışan Hücrelerin Yüzeyden Koparılması

İlk 30 dakikanın sonunda etüvden alınan ilk örnek üzerindeki kültür ortamı ve hücreler, pipetlenerek uzaklaştırılır. %0,1 (ağırlık/hacim) oranında tripsin içeren PBS çözeltisi membran üzerine konulur ve 37°C'de 15 dakika bekletilerek inkübe edilir. Daha sonra, ortam pipetlenerek hücrelerin yüzeyden tamamen kopması sağlanır.

III - Yüzeye Yapışan Hücrelerin Sayılması

Yüzeyden koparılmış olan hücreler, trypan blue çözeltisi ile boyanarak hemositometrede canlı hücre sayımı yapılır. Bu yöntem EK-2'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Yapışan hücrelerin sayımı, diğer membran örnekleri kullanılarak 60, 90 ve 120 inci dakikalarda da yapılmış ve hücre yapışma kinetiği incelenmiştir. 6 gözlü kültür kabında kalan diğer örnekler ise, deney süresince yapışmış olan hücrelerin fotoğrafının çekilmesi için kullanılmıştır.

Hücre	:	BHK 21
Kültür Kabı	:	Bakteriyolojik PS Kültür Kabı (35x10 mm)
Kültür Ortamı	:	DME + %15 Sığır Serum
Hücre İnokülasyon		
Yoğunluğu	:	$2,5 \cdot 10^5$ hücre/ml
Toplam Hacim	:	3,0 ml
Toplam Hücre Sayısı	:	$7,5 \cdot 10^5$
Deney Süresi	:	2 saat
İnkübasyon Ortamı	:	CO ₂ etüvü (%95-98 nem, %5 CO ₂ + %95 hava)
PH	:	7,2-7,6
Sıcaklık	:	37,0 $\pm$ 0,5°C

Tablo 3.2. : Hücre Yapışma Deneyinin Gerçekleştirildiği Durgun Kültür Koşulları

3.3.7. Poliüretan Yüzeylerde Hücre Yayılması

Hücrelerin membran yüzeyine yayılması, mikroskopik olarak incelenmiş ve belirli zaman aralıklarında çekilen optik fotoğraflarla tespit edilmiştir.

Mikroskopik incelemeler ve fotoğraf çekilmesi sırasında izlenen yöntem EK-4 'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.3.8. Poliüretan Yüzeylerde Hücre Üremesinin İncelenmesi

Pu membran yüzeyleri üzerinde, durgun kültür koşullarında BHK üremesi, 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda yüzeyde üremiş olan hücrelerin, hemositometre ile sayılması yoluyla incelenmiştir. Ayrıca, yüzey üzerinde üremiş hücrelerin optik fotoğrafları çekilmiştir.

Hücre üreme deneyinde izlenen yöntem aşağıda anlatılmıştır:

I - Hücrelerin Poliüretan Membran Yüzeyine Ekilmesi

Hücre üreme deneylerinde de, hücre yapışma deneylerinde olduğu gibi, 6 gözlü bakteriyolojik kültür kapları kullanılarak membranlar Bölüm 3.3.5.' de anlatıldığı şekilde hazırlanır. Her bir PU membran örneğinden kesilerek hazırlanan 6 örnekten 4 tanesi hücre üreme deneyi, 2 tanesi ise fotoğraf çekimi için kullanılır.

$2,5 \cdot 10^5$ hücre/ml inokülasyon yoğunluğundaki hücre kültüründen 3'er ml alınarak, kültür kaplarının gözlerine yerleştirilmiş olan membranlar üzerine ekim yapılır. Örnekler $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'deki CO_2 etüvüne bırakılır.

II - Poliüretan Membran Yüzeyine Yapışan Hücre Sayısının Belirlenmesi

PU yüzeyler üzerine ekilen hücreler, 2 saat CO_2 etüvünde tutulduktan sonra etüvden çıkarılır. Membran üzerinde kalan ortam pipetle alınarak, bu ortamdaki hücrelerin hemositometrik sayımı yapılır. Böylece yüzeye yapışmayan hücrelerin sayısı belirlenir. Daha sonra bu sayıdan, membran yüzeyine yapışmış olan hücre sayısı hesaplanır.

III - Poliüretan Yüzeyinde Üreyen Hücre Sayısının Belirlenmesi

Membran üzerine yapışmış olarak kalan hücrelerin üzerine 3 ml. taze kültür ilave edilerek kültür kapları tekrar CO_2 etüvüne yerleştirilir. 96 saat sonunda membran üzerindeki ortam uzaklaştırıldıktan sonra, 3 ml. %0,1 (ağırlık/hacim) oranında tripsin içeren PBS çözeltisi ilave edilir ve CO_2 etüvünde 15 dakika inkübe edilir. Daha sonra, yüzeyden koparılan hücrelerin hemositometrik sayımı EK-2'de anlatıldığı gibi yapılarak üreme süresi sonundaki hücre sayısı bulunur. Hücre sayımı, her PU membran örneği için 4 kez tekrarlanarak ortalama değer hesaplanır.

IV - Hücre Üremesinin Mikroskopik İncelenmesi

Üreme için ayrılan 96 saatlik sürenin sonunda CO_2 etüvünden alınan

membranların üzerindeki ortam uzaklaştırılır. Membranlar, üzerlerine %0,1 oranında kristal viyole içeren 1 ml. 0,1 M sitrik asit çözeltisi ilave edilerek, 1 saat 37°C de bekletilir. Daha sonra, kültür kaplarıyla beraber mikroskop altına alınan örneklerdeki üreme, fotoğrafları çekilerek saptanır.

Hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi için izlenen yöntem EK-4 de verilmiştir.

3.3.9. Kan Hücreleri Çalışmaları

PU membranların kanla temasları sırasında kan hücrelerine karşı davranışlarının belirlenmesi amacıyla kan deneyleri yapılmıştır. BU deney grubunda çalışılan kan örnekleri 0,5 ml. hacminde insan kanıdır. Yöntem şu şekilde uygulanmıştır :

Eşit hacimdeki kan örnekleri kan hücresi sayıcı aletinin özel cam tüplerine yerleştirilir. Kan hücreleri sayımları sayıcıda yapıldıktan sonra, 1 cm² yüzey alanlı membranlar örnek kanlarının bulunduğu tüplere daldırılarak tüp kapakları kapatılır. Karıştırıcıya yerleştirilen örneklerin 1 saat süreyle membran-kan temasları sağlanır. BU periyot sonunda, kan örneklerinin hücre sayımları tekrar yapılır ve her bir PU membran için çalışılan ikişer örneğin ortalamaları alınarak sonuçlar elde edilir.

Antikoagülant olarak EDTA kullanılan bu grup çalışma, Coulter JS (Chan AD) marka hücre sayıcısı ile otomatik olarak gerçekleştirilmiştir.

4. DENEYSEL VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Poliüretan polimerik filmlerin, yapay deri olarak kullanılabilirliğinin araştırıldığı çalışmanın bu bölümünde, çözücü döküm yöntemiyle hazırlanan, değişik yapısal özelliklerdeki PU membranlarla ilgili deneysel çalışmaların sonuçları sunulmuş ve tartışılmıştır.

Burada, sırasıyla PU membranların hazırlanması ile ilgili izlenen yöntem ve bu yöntemin membran özelliklerine etkileri; membranların fiziko-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi için yapılan deneysel çalışmaların sonuçları ve hücre çalışmalarından elde edilen sonuçlar, üç ayrı bölüm altında sunulmuş ve tartışılmıştır.

4.1. POLİÜRETAN MEMBRANLARIN HAZIRLANMASI

Bu çalışmada geliştirilen membranlar Poliüretandan (PU) hazırlanmıştır. PU'nın seçiminde, bu materyalin yüksek biyolojik uyuşabilirlik ve çok üstün mekanik özelliklere sahip olması gözönünde tutulmuştur. PU'lar, sözkonusu özelliklerinden ötürü, özellikle yapay kalp ve yapay damar uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (147,148).

Araştırmada kullanılan PU, Uş John firması'nın biyomedikal uygulamalar için özel olarak geliştirildiği Pollethane® 2363-80 A ticari adıyla bilinen bir üründür.

Bu çalışmada elde edilen PU membranlar, çözücü döküm yöntemiyle hazırlanmıştır. Membran hazırlama sırasında değiştirilen veya sabit olarak alınan parametrelerin belirlenmesine, ön çalışmalar ışık tutmuştur.

Genel olarak, çözücü döküm yöntemi ile mikrogözenekli membran hazırlanmasında, sonuç membran yapısının, döküm çözeltisindeki polimer konsantrasyonu, çözücü türü, çöktürücü ortamı ve ortam koşullarına (sıcaklık vb.)

bağlı olduğu bilinmektedir (149). PU membranların hazırlandığı bu çalışmada da, sözü geçen değişkenlerin, membran yapısına etkilerini belirlemek için yapılan çalışmalar ve sonuçları aşağıda tartışılmıştır.

4.1.1. Konsantrasyon Etkisinin İncelenmesi

PU membranların hazırlanması için yapılan ön çalışmalarda çeşitli konsantrasyonlarda polimer çözeltileri (%5-10) denenmiştir. Bu deneyler sonunda, düşük konsantrasyonlarda (%5-6) polimer çözeltileri kullanıldığında, film çekme işlemi sırasında membranda kopmalar ve yırtılmalar gibi hataların ortaya çıktığı gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda ise (%9-10) hem çözünme zorlukları, hem de yüksek viskozite nedeniyle, membran içinde, membranın kütle transfer ve mekanik özelliklerini olumsuz yönde etkileyen jelleşmenin olduğu belirlenmiştir. BU sebeplerden, sunulan bu çalışmada, polimer çözeltisinin konsantrasyonu %8 olarak seçilmiş ve tüm PU membranlar aynı konsantrasyon'daki çözeltilerden hazırlanmıştır.

4.1.2. Çözücü Etkisinin İncelenmesi

İstenilen özellikteki mikrogözenekli membranların hazırlanmasında, etkin olan ikinci faktör, kullanılan çözücünün türüdür. Çözücü döküm yöntemi ile hazırlanan polimerik membranların yapısının, çözücü türüne göre değiştiği, birçok çalışmada gösterilmiştir (150). Bu sonuç, çözücü türünün, polimerik yapı üzerindeki etkisiyle açıklanabilir. Polimerler, çözücülerle temas edince, polimerik yapıda, polimer-polimer etkileşmesi kırılarak, polimer-çözücü etkileşmesi başlar. Oluşan polimer-çözücü etkileşmesi çözücü türüne göre değişir ve bu etkileşmenin gücü, çözücünün, incelenen polimere karşı gücünü belirler. Polimer-çözücü etkileşmesinin incelenmesinde en yaygın olarak, Hildebrand çözünürlük parametresi (δ) kullanılır. δ değeri küçük olan yapılar hidrofobik (apolar), büyük olanlar ise hidrofilik (polar) yapılardır. Çözünürlük parametresinde, polimer-çözücü ve polimer-polimer molekülleri arasındaki çekim kuvvetleri dikkate alınır. Genel bir kural olarak, δ değerleri birbirine yakın olan polimer-çözücü sistemlerinin uygun sistemler olduğu söylenebilir. Bu

çalışmada kullanılan PU'nın δ değeri yaklaşık $10,7 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2}$ 'dir.

Sunulan çalışmada, membran hazırlamada kullanılan çözücülerin seçiminde, δ değerleri gözönünde tutulmuştur. δ değerleri sırasıyla 12,1; 9,1 ve 9,9 $(\text{cal/cm}^3)^{1/2}$ olan DMF, THF ve Dioksan'ın, PU için iyi birer çözücü oldukları düşünülerek bu çözücüler ve karışımları, PU membranların üretiminde kullanılmıştır.

Yapılan ön çalışmalarda, tek çözücü kullanıldığında, çökme hızının THF>DMF>Dioksan şeklinde olduğu belirlenmiştir. BU verinin teorik sebebi şu şekilde açıklanabilir:

PU'nın δ değeri ile, seçilen çözücülerin δ değerleri arasındaki mutlak farklar ;

THF-PU	: 1,6
DMF-PU	: 1,4
Dioksan-PU	: 0,8

şeklinde. Bu sonuçlara göre, PU için, göreceli olarak, en iyi çözücünün Dioksan ve en kötü çözücünün de THF olduğu ortaya çıkar. Böylece oluşturulan membranlardan, çökme sırasında en hızlı olarak THF, daha sonra DMF ve en yavaş olarak da Dioksan ayrılacak yani çökme hızı; THF>DMF>Dioksan şeklinde olacaktır.

Çökme hızının yavaşlamasıyla daha gözenekli bir yapıya ulaşılabildiği bilindiğinden (151) saf çözücü kullanmak yerine, %10 DMF katılmış çözücü karışımları kullanılarak membran hazırlaması yoluna gidilmiştir. Ancak DMF oranının %10 dan daha fazla olması durumunda, membran yapısının bozulduğu, istenmeyen iğne delikleri ve diğer yapısal hataların oluştuğu, ön çalışmalardan belirlendiği için, bu oranın üzerine çıkılmamıştır. DMF içermeyen çözücü veya çözücü karışımları da kullanılarak, membran hazırlaması yoluna gidilmiş ve böylece çözücü değişimin, membran özelliklerine etkisinin incelenmesi mümkün olmuştur.

4.1.3. Çöktürücü Etkisinin İncelenmesi

Polimer çözeltisi cam yüzeye yayılarak sıvı polimerik film oluşturulduktan sonra, çöktürme işlemine geçmeden uygulanan işleminin, sonuç membranın yapısal özelliklerini, dolayısı ile geçirgenliğini etkilediği bilinmektedir. Bekleme süresi ve bekleme sırasındaki ortam koşulları, membran yapısını değiştirmektedir. Örneğin polimer film, çöktürme ortamına alınmadan önce uzun süre oda koşullarında bekletilirse, membranda gözeneksiz yapılara ulaşılmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada hatasız ve kontrollü gözenek yapısına sahip membranlar elde etmek üzere, polimerik filmler, çöktürme ortamına alınmadan önce, 25°C de, 1-3 dakika bekletilmiş ve bu işlem bütün PU membranların hazırlanmasında aynı şekilde uygulanmıştır.

Polimerik membranların, çözücü döküm yöntemiyle hazırlanmasında gözenek yapısını etkileyen önemli faktörlerden biri de, çöktürme ortamıdır. Bu aşamada cam plaka üzerine film halinde çekilmiş bulunan polimer çözeltisi, çöktürme ortamına daldırılarak, polimerin sertleşmesi (jelleşmesi) sağlanır. Çökme, çözelti içindeki polimer-çözücü etkileşmesinin kırılmasıyla, çözücünün uzaklaşması ve polimer zincirlerinin yapı içinde yeniden şekillenmesi olayıdır.

Çöktürme ortamı, çökme (jelleşme) hızını doğrudan etkilemektedir. Çökme hızı, çözücü ve çöktürücünün, polimere karşı ne kadar güçlü olduğu ile ilgilidir. Genel olarak, bir polimer için kötü bir çözücü olan madde, aynı polimer için iyi bir çöktürme ortamı oluşturur. Bu çalışmada, çöktürme ortamı olarak, PU için kötü bir çözücü olan su ($\delta = 23,5$) denenmiştir. Ancak saf su kullanıldığında, çökme çok hızlı gerçekleştiği için, çökme hızını yavaşlatmak üzere, hacimce %10'luk gliserin-su çözeltisi kullanılmıştır.

Çöktürme ortam sıcaklığı olarak, 25°C seçilmiş ve tüm çalışmalar bu sıcaklıkta yürütülmüştür.

4.2. POLİÜRETAN MEMBRANLARIN BAZI FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ ve SEM İNCELEMELERİ

Bu bölümde PU'dan hazırlanan membranların fizikokimyasal özellikleri ile ilgili olarak yapılan deneylerin sonuçları ve hesaplanan değerler ile SEM incelemelerinden elde edilen veriler birbirleri ile ilişkili olarak tartışılmıştır.

4.2.1. Poliüretan Membranların Temas Açısı Değerlerinin İncelenmesi

Polimerik biyomateryallerin yüzey özelliklerinin belirlenmesinde, temas açısı değerleri kullanılabilir. Temas açısı tekniği ile ilgili genel bilgiler Bölüm 2.7.4.3.'de, ölçümlerin nasıl yapıldığı ile ilgili bilgiler ise, Bölüm 3.2.1.'de verilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde, üretilen 6 farklı PU membran için "Yakalanmış Kabarcık" yöntemi ile belirlenen, hava kabarcıklarının temas açısı değerleri verilmiştir.

Temas açıları Bölüm 2.7.4.4.'de de anlatıldığı gibi;

$$\theta = \cos^{-1} \left(\frac{2H}{D} - 1 \right) \quad \theta \leq 90^\circ$$

$$\theta = 180 - 2 \left[\tan^{-1} \left(\frac{2L}{S} \right) \right] \quad \theta \geq 90^\circ$$

eşitlikleri kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir örnek için üç ayrı hesaplama yapılmış ve ortalama değerler bulunmuştur.

θ değerlerinin belirlenmesinde aşağıdaki varsayımlar yapılmıştır:

- Membran yüzeyi rijit, uniform, homojen ve hareketsizdir;

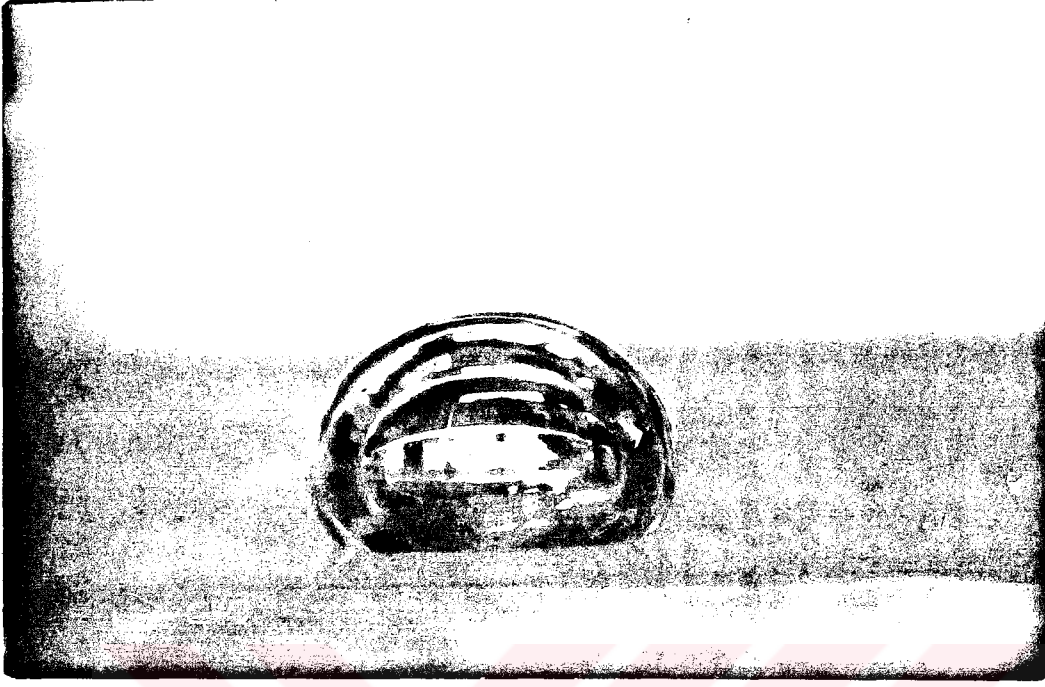
- Membran yüzeyi düzgündür (Yüzey pürüzlülüğü $0,1 \mu$ düzeyinde ise bu varsayım yapılabilir);
- Yüzey elastik modülü $3,5 \cdot 10^5 \text{ dyn/cm}^2$ 'den büyüktür;
- Sıvının yüzey gerilimi, deney boyunca sabit kalır;
- Membrandan sıvıya herhangi bir madde geçişi söz konusu değildir;
- Sıvı, membranı şişirmez. Sıvı buharı membran yüzeyinde adsorblanmaz.

Yukarıda sıralanan varsayımlar gözönüne alınarak yapılan hesaplamalardan elde edilen θ_{hava} değerleri Tablo 4.1.'de θ_{oktan} değerleri ise Tablo 4.2.'de verilmiştir. Temas açısı hesaplamalarında kullanılan fotoğraflardan seçilen iki örnek ise Şekil 4.1.'de sunulmuştur.

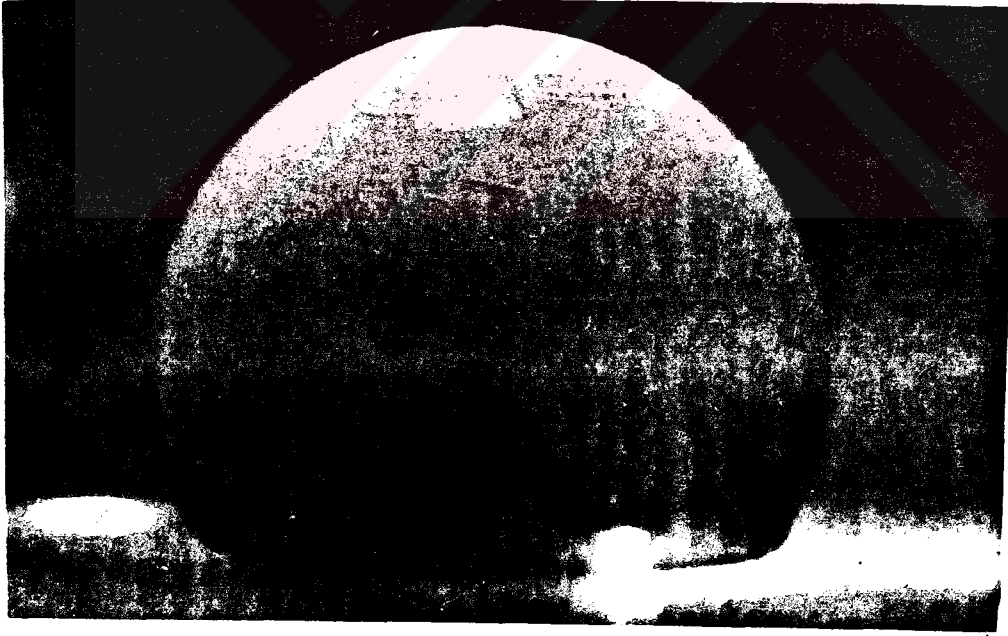
Membran No	Çözücü Sistem Türü ve Bileşimi	$\theta_{\text{hava}} (^{\circ})$
PU-1	THF	76,11
PU-2	%10 DMF - %90 THF	78,70
PU-3	%50 THF - %50 Dioksan	59,20
PU-4	%10 DMF - %45 Dioksan - %45 TMF	64,85
PU-5	%10 DMF - %90 Dioksan	73,94
PU-6	Dioksan	66,84

Tablo 4.1. : PU Membranların θ_{hava} Değerleri.

Tablo 4.1.'de görüldüğü gibi θ_{hava} değerleri çözücü sistemine bağlı olarak $59,20^{\circ}$ ile $78,70^{\circ}$ arasında değişmektedir. Bu verilere göre, çözücü sistemlerine DMF ilavesi θ_{hava} değerlerini arttırmıştır.



(a)



(b)

Şekil 4.1. : PU-5 Membranının Temas Açısı Fotoğrafları;

a) Hava Kabarcığı.

b) n-oktan Kabarcığı.

Temas açısı değerlerinin, PU membranlarla ilgili olarak elde edilen diğer deneysel sonuçlarla karşılaştırmalı olarak tartışılması sonraki bölümlerde yapılmıştır.

4.2.2. PU Membranların Yüzey Serbest Enerjisi Değerlerinin İncelenmesi

Polimerik biyomateryallere ait bir çok özellik, polimerik materyalin yüzey özellikleri ile açıklanmaktadır. Yüzey özelliklerini tanımlamada kullanılan önemli bir parametre, yüzey serbest enerjisidir.

Sunulan çalışmanın bu bölümünde PU membranların yüzey serbest enerjilerinin belirlenmesi anlatılmıştır. Yüzey serbest enerjisinin belirlenmesinde kullanılan θ_{hava} ve θ_{oktan} değerlerinin hesaplanması Bölüm 4.2.1. de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

PU membranların yüzey serbest enerjileri, Bölüm 2.7.4.2.'de verilen eşitlikler kullanılarak ve;

$$\gamma_{\text{wv}} = 72,1 \quad \text{erg/cm}^2$$

$$\gamma_{\text{ov}} = 21,6 \quad \text{erg/cm}^2$$

$$\gamma_{\text{wv}}^{\text{d}} = 21,6 \quad \text{erg/cm}^2$$

$$\gamma_{\text{wv}}^{\text{p}} = 50,5 \quad \text{erg/cm}^2$$

$$\gamma_{\text{ow}} = 50,5 \quad \text{erg/cm}^2$$

alınarak hesaplanmıştır (54). Örnek bir hesaplama EK.5'de verilmiştir.

Hesaplamalardan elde edilen temas açısı ve yüzey serbest enerjisi değerleri Tablo 4.2.'de topluca sunulmuştur.

Tablo 4.2.'den θ_{oktan} değerlerinin, θ_{hava} değerleri ile uyum içinde

olduğu söylenebilir. Bu doğrultuda yaptıkları bir araştırmada Pitt ve arkadaşları da, PU bir yüzey üzerinde belirledikleri θ_{hava} ve θ_{oktan} değerlerinin birbiri ile aynı olduğu sonucuna ulaşmışlardır (152).

Membran No	θ_{hava} ($^{\circ}$)	θ_{oktan} ($^{\circ}$)	$\gamma_{\text{sv}}^{\text{p}}$ (erg/cm 2)	$\gamma_{\text{sv}}^{\text{d}}$ (erg/cm 2)	γ_{sv} (erg/cm 2)
PU-1	76,11	80,0	20,97	11,57	32,54
PU-2	78,70	79,0	21,40	9,35	30,75
PU-3	59,20	55,40	32,55	11,40	43,95
PU-4	64,85	61,40	29,62	10,39	40,01
PU-5	73,94	76,50	22,52	11,34	33,86
PU-6	66,84	78,20	21,72	17,09	39,61

Tablo 4.2. : PU Membranların θ_{hava} ; θ_{oktan} ve Yüzey Serbest Enerjisi Değerleri.

Young-Dupre eşitliğine göre, temas açısı ile yüzey serbest enerjisi arasında bir ilişki vardır ve bu ilişki θ_{hava} değerlerinin artmasıyla, yüzey serbest enerjisinin, göreceli olarak azalması şeklinde açıklanabilmektedir (153). Tablo 4.2.'de sunulan değerler bu veriye uymaktadır. θ_{hava} değerlerinin 78,70 $^{\circ}$ den 59,20 $^{\circ}$ ye azalmasıyla, yüzey serbest enerjisi değerleri, γ_{sv} , 30,75 erg/cm 2 den 43,95 erg/cm 2 'ye artmıştır. Bu sonuçlara dayanılarak, PU-3 ve PU-4 membranlarının, diğerlerine göre daha yüksek yüzey serbest enerjisine sahip oldukları belirlenmiştir.

4.2.3. Poliüretan Membranların Denge Su İçerik Değerlerinin İncelenmesi

PU membranların Denge Su içeriği (DSİ) değerleri Bölüm 3.2.3.'de anlatıldığı gibi yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlara dayanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar, membranların kuru (w_0) ve yaş (w) ağırlıkları arasındaki farkın, kuru ağırlığa oranının yüzde olarak ifade edildiği;

$$D.S.İ. = \frac{w-w_0}{w_0} \cdot 100$$

eşitliğinden hesaplanmıştır.

Sonuçlar Tablo 4.3.'de θ_{hava} değerleri ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Membran No	D.S.İ. (%)	θ_{hava}	Çözücü Sistemi
PU - 2	0,75	78,70	%10 DMF - %90 THF
PU - 1	2,60	76,11	THF
PU - 5	7,00	73,94	%10 DMF - %90 Dioksan
PU - 6	10,00	66,84	Dioksan
PU - 4	16,58	64,85	%10 DMF - %45 Dioksan - %45 THF
PU - 3	23,71	59,20	%50 THF - %50 Dioksan

Tablo 4.3. : PU Membranların Denge Su İçeriği ve θ_{hava} Değerleri.

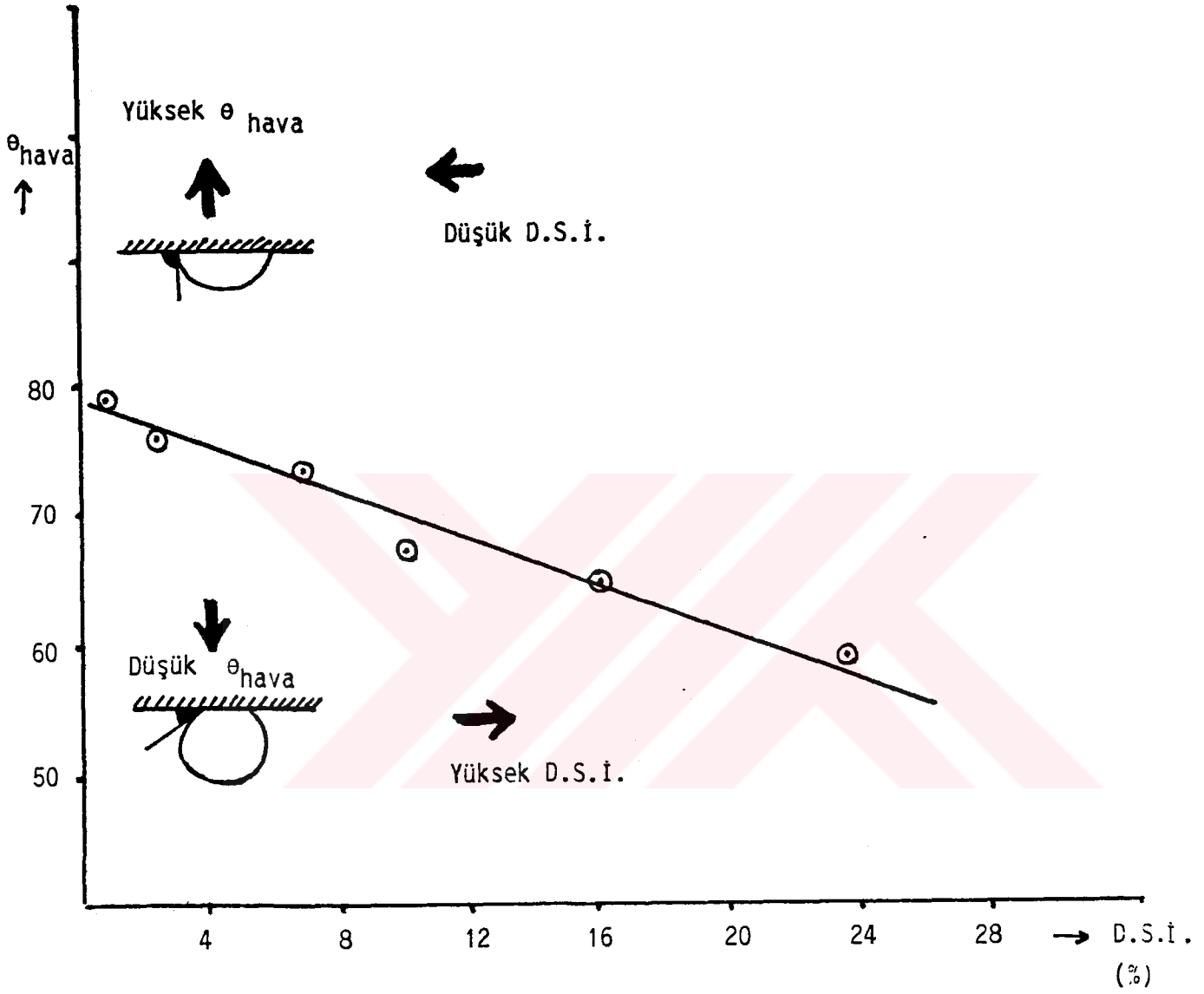
Tablo 4.3.'de de görüldüğü gibi, DSİ değerleri %(0,75-23,71) arasında değişmektedir. Bu sonuca, PU membranların farklı yapılarda oluşmasını sağlayan değişik çözücü sistemleri neden olmaktadır. En yüksek DSİ değeri %50 THF - %50 Dioksan ile hazırlanan PU-3 membranında elde edilmiştir.

Tablo 4.3.'ün sonuçlarına bakılarak, DMF'in kullanıldığı sistemlerde, DSİ değerlerinin düştüğü söylenebilir. %100 THF sisteminde %2,60 olan DSİ değeri, (%10 DMF - %90 THF) sisteminde %0,75'e kadar düşmüştür. Aynı şekilde (%50 THF - %50 Dioksan) sisteminde %23,71 olan DSİ değeri, sisteme %10 oranında DMF katılmasıyla % 16,58'e düşmüştür. Ayrıca %100 Dioksan sisteminin %10'luk DSİ değeri de, %10 DMF ilavesiyle %7,00'ye düşmüştür.

%100 THF sisteminin, tek çözücülü sistemlerin en düşük DSİ değeri olan %2,60'ı verdiği ve tek başına kullanıldığında %10,00 DSİ değeri veren Dioksan çözücüsünün THF ile birlikte kullanıldığında, DSİ değerini katlayarak arttırdığı, Tablo 4.3.'nin verdiği diğer bir sonuçtur.

Bütün bu sonuçlar değerlendirilerek, PU membranların DSİ değerlerini, Dioksan'ın arttırıcı yönde DMF'in ise azaltıcı yönde etkilediği söylenilebilir. Sonuçlar şu şekilde toparlanabilir:

θ_{hava} değerleri ile DSİ değerleri arasında, beklenildiği gibi sıkı bir ilişki elde edilmiştir. θ_{hava} değerleri $78,70^0$ 'den $59,20^0$ 'ye azalırken, DSİ değerleri %0,75'den %23,71'e artmıştır. θ_{hava} değerlerindeki artışın, yüzey serbest enerjisinin azaldığına işaret ettiği gözönüne alındığında, belirlenen θ_{hava} -DSİ değerlerinin, birbirleriyle ters orantılı olarak değişmesinden, deneysel verilerin, teori ile uyum içinde olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Bu durum Şekil 4.2.'de açıkça görülmektedir.



Şekil 4.2. : θ_{hava} - DSİ Değerleri

(Yüzey serbest enerjisi arttığı için su içeriği artmış ve θ_{hava} ise azalmıştır.)

4.2.4. Poliüretan Membranların SEM ile Yüzey ve Kesit Analizleri

Bu bölümde, Pu membranların, SEM incelemeleri sonunda elde edilen yüzey ve kesit fotoğraflarından belirlenen yapısal özellikleri ile ilgili veriler sunulmuş ve bu verilerin ışığı altında diğer deneysel sonuçlar tartışılmıştır.

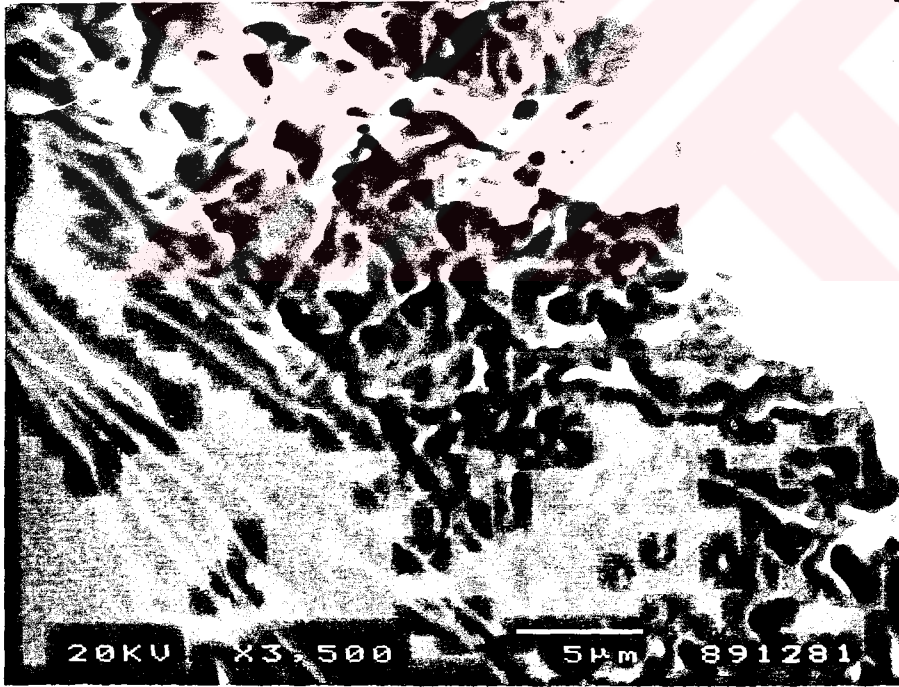
SEM'den elde edilen yüzey ve kesit fotoğrafları Şekil 4.3.; 4.4.; 4.5.; 4.6.; 4.7.; 4.8.'de sunulmuştur.

PU Membranların Gözenek Yapısı

Pu membranların gözenek yapısı ile ilgili hesaplamalar Bölüm 2.10.3'de anlatıldığı şekilde yapılmış ve membranların gözenekliliğiyle ilgili tüm veriler, Tablo 4.4.'de toplanmıştır.



(a)



(b)

Şekil 4.3. : PU-1 Membranının ;

a) Yüzey

b) Kesit

SEM Fotoğrafı.



(a)

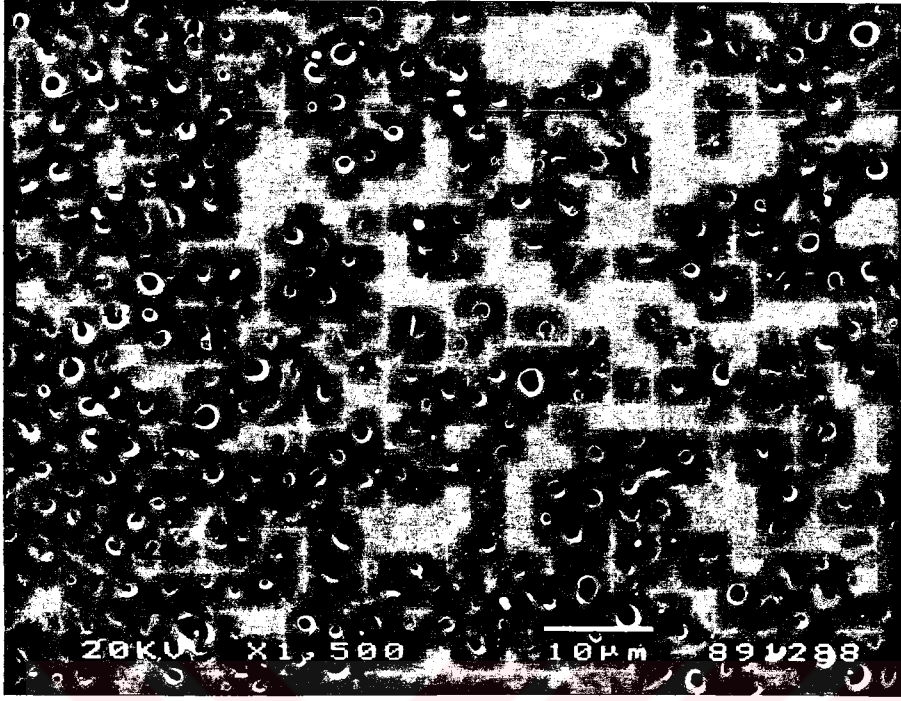


(b)

Şekil 4.4. : PU-2 Membranının ;

a) Yüzey

b) Kesit SEM Fotoğrafı.



(a)

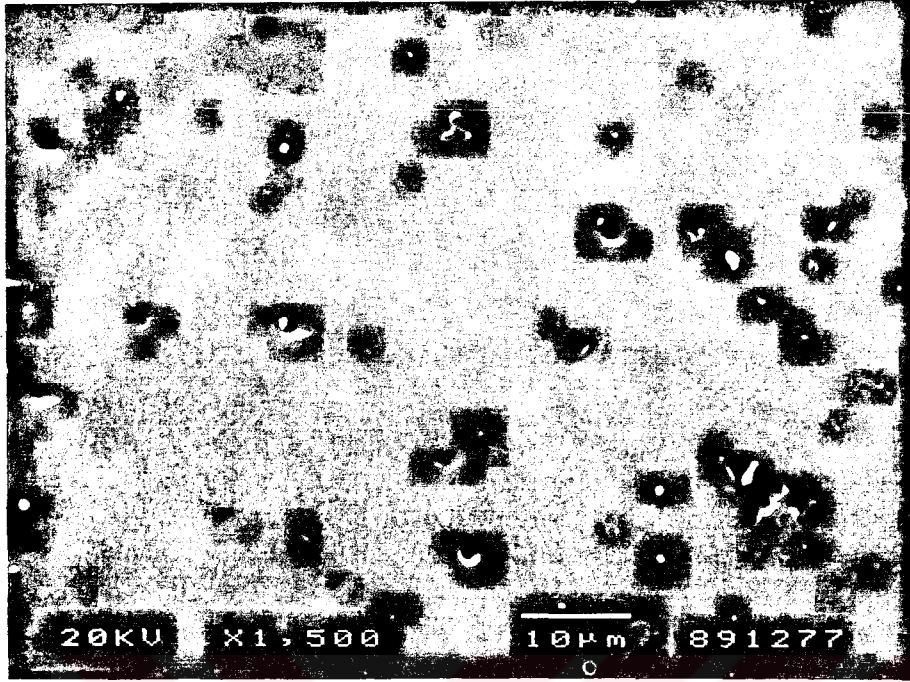


(b)

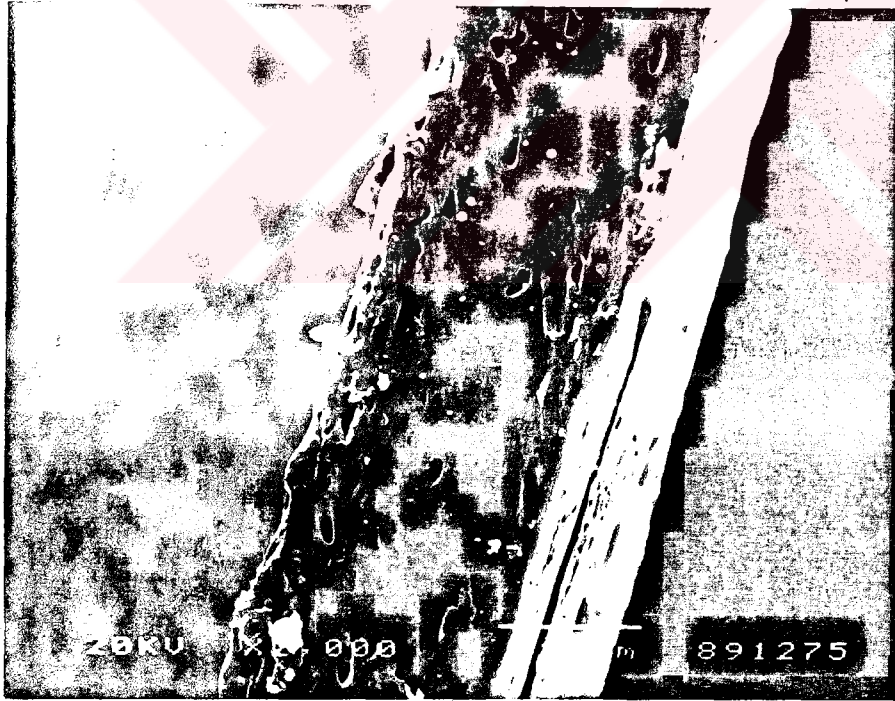
Şekil 4.5. : PU-3 Membranının;

a) Yüzey

b) Kesit SEM Fotoğrafı.



(a)



(b)

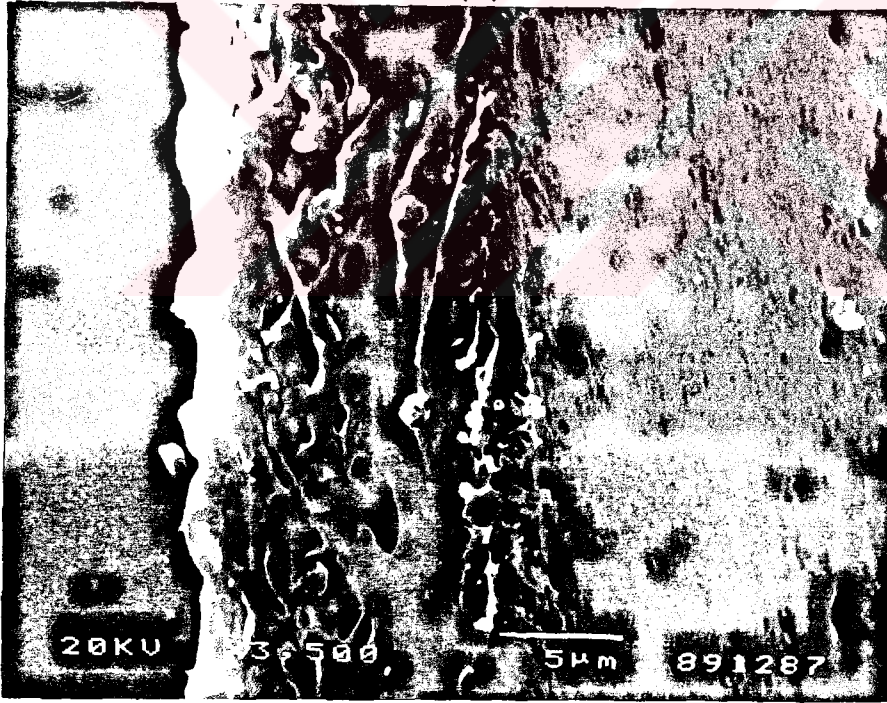
Şekil 4.6. : PU-4 Membranının ;

a) Yüzey

b) Kesit SEM Fotoğrafı.

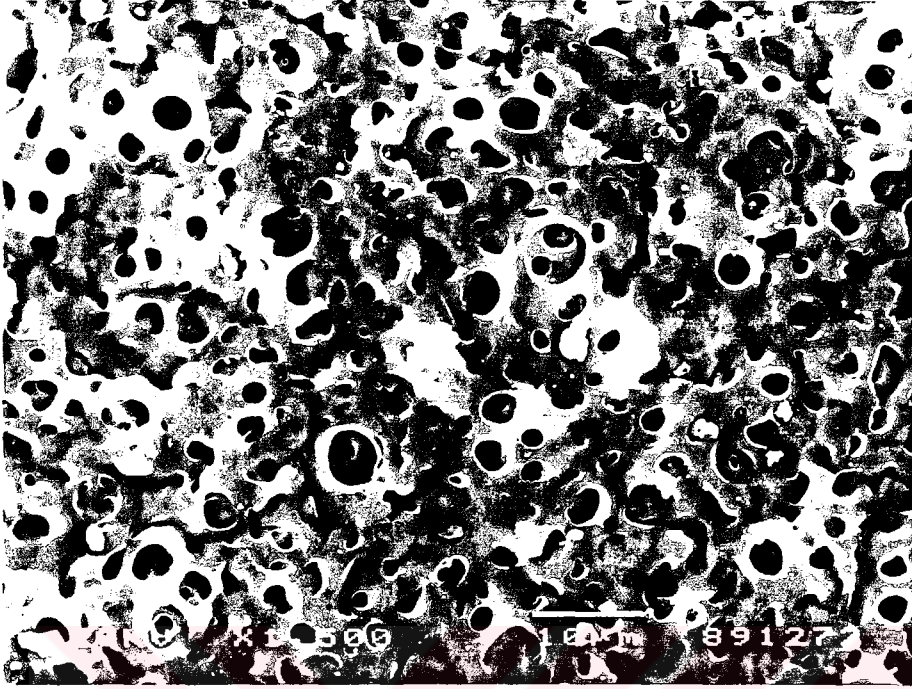


(a)



(b)

Şekil 4.7. : PU-5 Membranının ;
a) Yüzey
b) Kesit SEM Fotoğrafı.



(a)



(b)

Şekil 4.8. : PU-6 Membranının ;
a) Yüzey
b) Kesit SEM Fotoğrafı.

Membran No	Gözenek Yoğunluğu (*) (Gözenek/cm ²)	Ortalama Gözenek (*) Çapı (μ)	Gözenek Tipi	Çözücü Sistem	Boşluk Hacmi (g/ml)
PU-1	2,2.10 ⁵	1,0	Yayvan krater tipi oyuklar, çok seyrek gözenekler	THF	1,3.10 ⁻³
PU-2	6,7.10 ⁵	2,5	Seyrek ve dağınık gözenekli	%90 THF %10 DMF	0,5.10 ⁻³
PU-3	55,6.10 ⁵	1,3	Küçük çaplı sık gözenekler	%50 THF %50 DMF	11,5.10 ⁻³
PU-4	3,2.10 ⁵	1,4	Küçük çaplı ve çok az gözenekli	%45 THF %10 DMF %45 Dioksan	9,7.10 ⁻³
PU-5	42,2.10 ⁵	3,9	Sık ve büyük çaplı	%10 DMF %90 Dioksan	3,4.10 ⁻³
PU-6	46,7.10 ⁵	4,5	Çok sık ve büyük çaplı	Dioksan	6,9.10 ⁻³

Tablo 4.4. : PU Membranların Gözenek Yapısı.

(*) Sonuçlar farklı alanlarda yapılan 3'er sayımın ortalamasıdır.

Tablo 4.4.'de sunulan verilerin irdelenmesi şu şekilde yapılmıştır:

- i) Çökme hızının THF>DMF>Dioksan şeklinde olması nedeniyle, %100 THF ile hazırlanan PU-1 membranda en gözeneksiz yapıya; %100 Dioksan ile hazırlanan PU-6 membranında ise en yüksek gözeneklilikteki yapıya ulaşılmıştır. PU-6 membranının gözenek yoğunluğu (GY) değeri en yüksek ikinci, gözenek çapı (GÇ) değeri ise maksimum değerdedir.
- ii) Çözücü sistemlerine DMF ilavesi, THF ile hazırlanan membranların gözenekliliğinin artmasına; Dioksan ile hazırlanan membranların ise gözenekliliğinin azalmasına sebep olmuştur.
- iii) Çözücü sistemlerine DMF ilavesi, THF ile hazırlanan membranların GÇ değerlerinin artması, Dioksan ile hazırlanan membranların ise GÇ değerlerinin azalması sonucunu doğurmuştur. %50 THF, %50 Dioksan ile hazırlanan PU-5 membranı ile, %45 THF - %45 Dioksan - %10 DMF ile hazırlanan PU-6 membranının GÇ değerlerinde ise önemli bir değişme olmamıştır.
- iv) Boşluk hacmi, Bölüm 2.10.3.'de anlatıldığı gibi membranların ıslak ve yaş ağırlıkları arasındaki farktan, suyun yoğunluğu 1 g/ml alınarak hesaplanmıştır ve ıslatılabilirliğin (DSİ) bir ölçüsüdür. Bu nedenle boşluk hacmi yalnız GY ve GÇ 'na göre değil, aynı zamanda, yüzey serbest enerjisine bağlı olarak da değerlendirilmelidir. Bu açıdan bakıldığında, PU-2 membranında, PU-1 membranına göre, gözenekliliğin artması ile boşluk hacminin azalması çelişkisi açıklanabilir. Aynı değerlendirmeye dayanılarak, PU-3 , PU-4 membranları arasındaki büyük GY değeri farkının, boşluk hacminde fazla bir farka sebep olmaması çelişkisi de anlaşılabilir olmaktadır. Tablo 4.5.'de, boşluk hacmi değerleri yüzey serbest enerjisi değerleri ile birlikte verilmiştir. Bu Tablo'da da, membranların boşluk hacimlerinin, yüzey serbest enerjisi değerleri ile doğru orantılı olarak değiştiği görülmektedir.

Membran No	Boşluk Hacmi.10 ³ (g/ml)	Yüzey Serbest Enerjisi (erg/cm ²)
PU - 3	11,5	43,95
PU - 4	9,7	40,01
PU - 6	6,9	39,61
PU - 5	3,4	33,86
PU - 1	1,3	32,54
PU - 2	0,5	30,75

Tablo 4.5. : PU Membranların Boşluk Hacmi ve Yüzey Serbest Enerjisi Değerleri.

4.2.5. Poliüretan Membranların Su Buharı Geçirgenlik Değerlerinin İncelenmesi

Membranların tanımlayıcı özelliklerinden biri olan, su buharı geçirgenlik değerleri (SBG), sunulan çalışmada üretilen Pu membranlar için Bölüm 3.2.4.'de anlatılan yöntemle belirlenmiş ve bu değerler (g/m².24 saat) biriminde hesaplanarak düzenlenmiştir. Bu birime geçişte önce membranın su buharıyla temas eden yüzey alanı, cam buharlaştırma kabının daire şeklindeki ağzının yarı çapı kullanılarak bulunmuştur. Daha sonra, bu alan başına buharlaşan su buharının gram miktarından, m² başına buharlaşacak miktara, hesap yoluyla geçilmiştir. SGB değerleri, Tablo 4.6.'da Gözenek Yoğunluğu (GY) ve Gözenek Çapı (GÇ) değerleri ile birlikte sunulmuştur. Bu verilerin ışığında, her bir membran için yapılan irdelemeler şu şekilde sıralanabilir:

En hızlı çökme hızına sahip THF çözücüsü ile hazırlanan PU-1 membranında en az gözenekli yapıya ulaşılmıştır. Buna bağlı olarak da SBG değeri en düşüktür.

THF çözücüsüne %10 DMF katılarak hazırlanan PU-2 membranında GY ve GÇ değerleri PU-1 membranına göre bir miktar artmış ve böylece SBG değeri de artmıştır.

%50 THF-%50 Dioksan karışımından hazırlanan PU-3 membranında GY maksimum değere ulaşırken, GÇ fazla değişmemiş, ancak yüksek GY değeri, SBG değerinin çok yüksek bir değere ulaşmasına sebep olmuştur.

PU-4 membranında ise %10 DMF ilavesi ile GY değeri çok büyük bir düşüş göstermiş ve bu sonuç SBG değerini de etkileyerek, PU-3 membranına ait SBG değerinin altında bir değere ulaşılmasına yol açmıştır.

En düşük çökme hızına sahip Dioksan çözücüsü ile hazırlanan PU-6 membranında çok yüksek GY ve en büyük GÇ değerlerinin elde edilmesi, SBG değerinin en yüksek değere ulaşmasını sağlamıştır.

Dioksan'a %10 DMF eklenerek hazırlanan PU-5 membranında ise, GY ve GÇ değerlerine bağlı olarak daha düşük bir SBG değeri elde edilmiştir.

Buharlařma Yüzey Alanı = 28,26 cm ² r = 3 cm			
Örnek No	SBG (2/m ² .24.saat)	Gözenek Yoğunluğu (gözenek/cm ²)	Ortalama Gözenek Çapı (μ)
PU-1	1205	2,2.10 ⁵	1,0
PU-2	1562	6,7.10 ⁵	2,5
PU-3	1677	55,6.10 ⁵	1,3
PU-4	1417	3,2.10 ⁵	1,4
PU-5	1641	42,2.10 ⁵	3,9
PU-6	1682	46,7.10 ⁵	4,5

Tablo 4.6. : PU Membranların SBG Değerlerinin Gözenek Yapısı ile Karşılaştırması.

Literatürde normal bir insan derisinden su kaybının 240 g/m².24 saat ve yaralı bir yüzeyden su kaybının da 3400-5200 g/m².24 saat olduğu bildirilmektedir (154). Bu nedenle, yara tedavisinde kullanılan membranın, su toplanmasının engellenmesi amacıyla, su buharı geçirgenliğinin yüksek olması istenmektedir. Behar ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada (155), yara tedavisinde kullanılan üç ticari membran için saptanan su buharı geçirgenliği Tablo 4.7.'de verilmiştir.

Membran (Ticari Adı)	SBG (g/m ² .24 saat)
Omiderm	5000
Biobrane	1400
Op site	500

Tablo 4.7. : Bazı Ticari Membranların SBG Değerleri.

Sunulan çalışmada üretilen Pu membranların SBG değerlerinin, literatürde verilen değerlere yakın olması, bu membranların, belirlenen diğer özellikleri de göz önüne alındığında, yara tedavisi için düşünülüp, geliştirilerek kullanılabileceği düşüncesini ön plana çıkarmaktadır.

4.3. HÜCRE KÜLTÜR VE KAN HÜCRELERİ ÇALIŞMALARI SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Sunulan çalışmanın bu bölümünde, araştırmanın önemli bir kısmını oluşturan hücre kültür ve kan hücreleri çalışmalarının sonuçları verilmiş ve bu sonuçlar Bölüm 4.1. ve 4.2.'den elde edilen verilere dayanılarak yorumlanmıştır.

4.3.1. Hücre Yapışma Deney Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Kültür ortamı her hücre için, o hücrenin beslenme, yaşama ve üreme ihtiyaçlarını karşılamak üzere özel olarak seçilen maddelerin karışımından oluşmaktadır. Bu nedenle, yapılan çalışmada kullanılan hücre kültür ortamı, BHK 21 hücre soyuna uygun olduğu daha önceki çalışmalarla belirlenmiş olan DME ortamıdır. DME ortamı, Dulbecco tarafından daha zengin bir bileşime sahip olabilmesi için modifiye edilmiş MEM ortamıdır.

Kültür ortamı hacimce %15 oranında sığır serumu ile zenginleştirilmiştir. Serum ilavesinin belli başlı sebepleri şunlardır :

- Hücrenin yüzeye yapışması için gerekli faktörler sağlar;
- pH tamponu olarak davranır;
- Hücre fonksiyonları ile ilgili hormon ve büyüme faktörlerini içerir;
- Hücre metabolizması için gerekli olan besin maddelerinin bir kısmını sağlar.

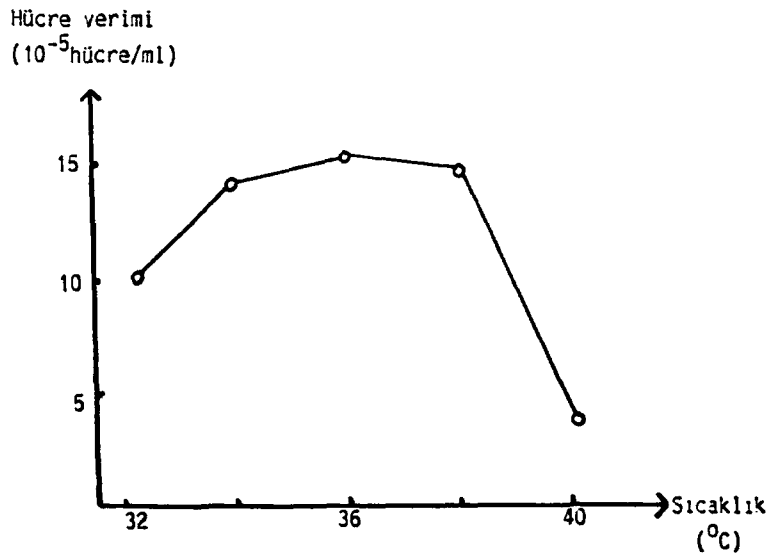
Araştırma süresince kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla, hücre kültür ortamına, antibiyotik ilave edilmiştir. Ayrıca, hücre üremesi sonucu, sürekli azalan besin maddelerinin karşılanması, büyümeyi geciktirici

metabolizma ürünlerinin ortamdan uzaklaştırılması ve pH kontrolünün sağlanması için 48 saatlik aralıklarla, eski ortamın %50'si, yenisi ile değiştirilerek yenilenmiştir.

Çalışma ortamının pH değeri, ilgili literatürlerde belirtilen 7,2-7,6 aralığı olarak seçilmiş ve pH ayarı NaHCO_3 tamponuyla yapılmıştır.

Çalışma ortam sıcaklığı ise, BHK 21 hücre hattı ile petri kabında yapılan ön çalışmalarla belirlenmiş ve $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ olarak seçilmiştir. Bu sıcaklığın seçilmesinin sebebi, insan vücut sıcaklığının 37°C olmasıdır. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için, BHK hücreleri ile yapılmış ön çalışmadan elde edilen grafik, Şekil 4.9.'da verilmiştir. Bu şekilde de görüldüğü gibi, hücre verimi, $33-38^\circ\text{C}$ sıcaklıkları arasında en yüksek değerlerinde bulunmakta iken, 38°C den sonra oluşan hücre ölümleri ile aniden düşmektedir.

Hücre yapışma deneyinin çalışma periyodu, daha önce yapılan çalışmaların önerileri doğrultusunda, yapışma kesrinin sabit bir değere ulaştığı 2 saat olarak seçilmiştir. Ölçümler 0,60,90 ve 120 inci dakikalarda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.9. : BHK 21 Hücre Veriminin Sıcaklığa Bağlılığı.

BHK 21 hücre soyundan fibroblast hücrelerin, Pu membran yüzeylerine yapışmalarının incelenmesini amaçlayan deneyler, Bölüm 3.3.6.'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş ve elde edilen deneysel sonuçlar Tablo 4.8.'de topluca verilmiştir.



	PU - 1	PU - 2	PU - 3	PU - 4	PU - 5	PU - 6
t= 0	a.10 ⁻⁵	7,500	7,500	7,500	7,500	7,500
	A	0	0	0	0	0
t= 60	a.10 ⁻⁵	4,650	4,880	4,830	3,933	5,026
	A	0,620	0,650	0,644	0,524	0,670
t= 90	a.10 ⁻⁵	4,800	5,024	5,270	4,340	5,415
	A	0,640	0,670	0,700	0,578	0,722
t= 120	a.10 ⁻⁵	5,690	5,243	5,895	4,845	5,955
	A	0,760	0,699	0,786	0,646	0,794
						0,856

Tablo 4.8. : Hücre Yapışma Deney Sonuçları.

a : Yapışan Hücre Sayısı (Hücre/3ml.)

A : Yapışma Kesri (%)

t : Zaman (dakika)

4.3.1.1. Poliüretan Membran Yüzeylerde Hücre Yapışma Kinetiğinin İncelenmesi

Araştırma kapsamında, Pu membran yüzeylerine BHK hücrelerinin in vitro koşullarda yapışması incelenmiş ve yapışma kinetiği Bölüm 2.11.3.' de anlatıldığı gibi, Kiremitçi tarafından önerilen bir matematiksel modele dayanılarak irdelenmiştir. Bu amaçla Eşitlik 2.15;

$$\underbrace{\frac{a_{\max}}{X_0 - a_{\max}} \left[\ln \frac{(X_0 - a)/X_0}{(a_{\max} - a)/a_{\max}} \right]}_Y = \underbrace{kt}_X$$

kullanılmış ve Tablo 4.8.'de verilmiş olan t ve a değerleri, aynı eşitlikte yerine konularak her bir membran için k değerleri bulunmuştur. PU-2 için yapılmış örnek hesaplama EK-6'da sunulmuştur.

Tablo 4.9. PU Membranlar için bulunan k değerlerini, Şekil 4.10 ise, tüm membranları X-Y grafiklerini vermektedir.

Hücre yapışma kinetiğinin, uygulanan matematiksel modelle uyuşumunun belirlenmesi için, bulunan k değerleri kullanılarak, model a değerleri hesaplanmıştır. Bir örnek hesaplama EK-6'da sunulmuştur.

Deneyssel olarak ve model yardımıyla bulunan a değerleri Tablo 4.10'da verilmiştir. Şekil 4.11'de ise tüm membranlar için belirlenmiş olan deneyssel ve model a değerleri, karşılaştırmalı olarak grafiğe alınmıştır. Bu grafikte de görülebileceği gibi tüm membranlar için model a ve deneyssel a değerleri arasında iyi bir uyum olup yalnız 120 inci dakika için bir miktar sapma söz konusudur.

Membran No	X	Y	k	r^*
PU - 1	0	0	0,0305	0,98
	60	2,300		
	90	2,626		
PU - 2	0	0	0,0348	1,00
	60	2,088		
	90	3,132		
PU - 3	0	0	0,0420	0,99
	60	2,500		
	90	3,800		
PU - 4	0	0	0,0284	0,99
	60	1,704		
	90	2,556		
PU - 5	0	0	0,0480	0,98
	60	2,880		
	90	4,320		
PU - 6	0	0	0,0963	1,00
	60	5,776		
	90	8,669		

Tablo 4.9. : PU Membranların k Değerleri.

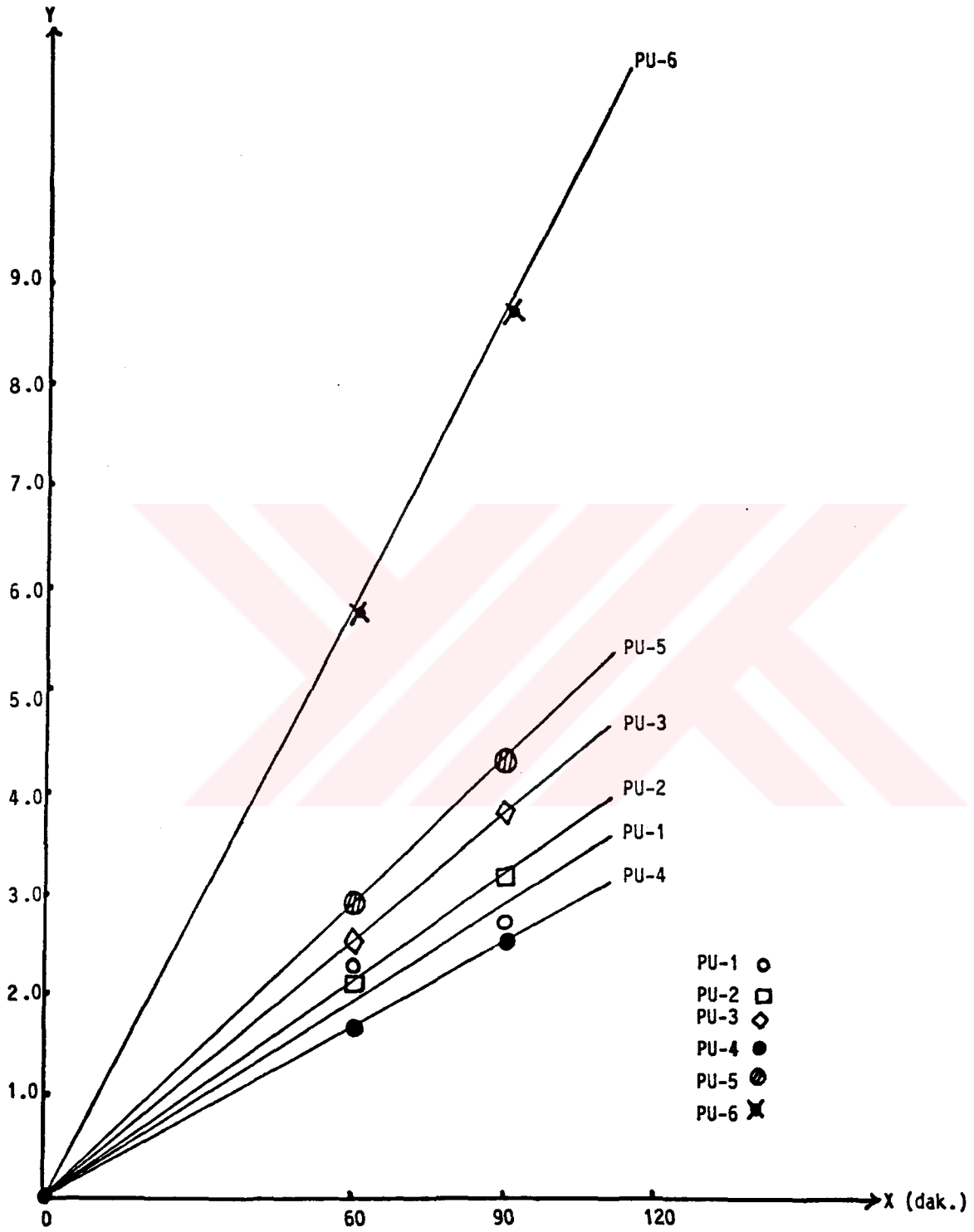
r^* = Korelasyon Katsayısı.

Hücre yapışma deneylerinden elde edilen fotoğraflar, PS kültür kabındaki kontrol ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.12.; 4.13.; 4.14.; 4.15.; 4.16.; 4.17.; ve 4.18.'de sunulmuştur.

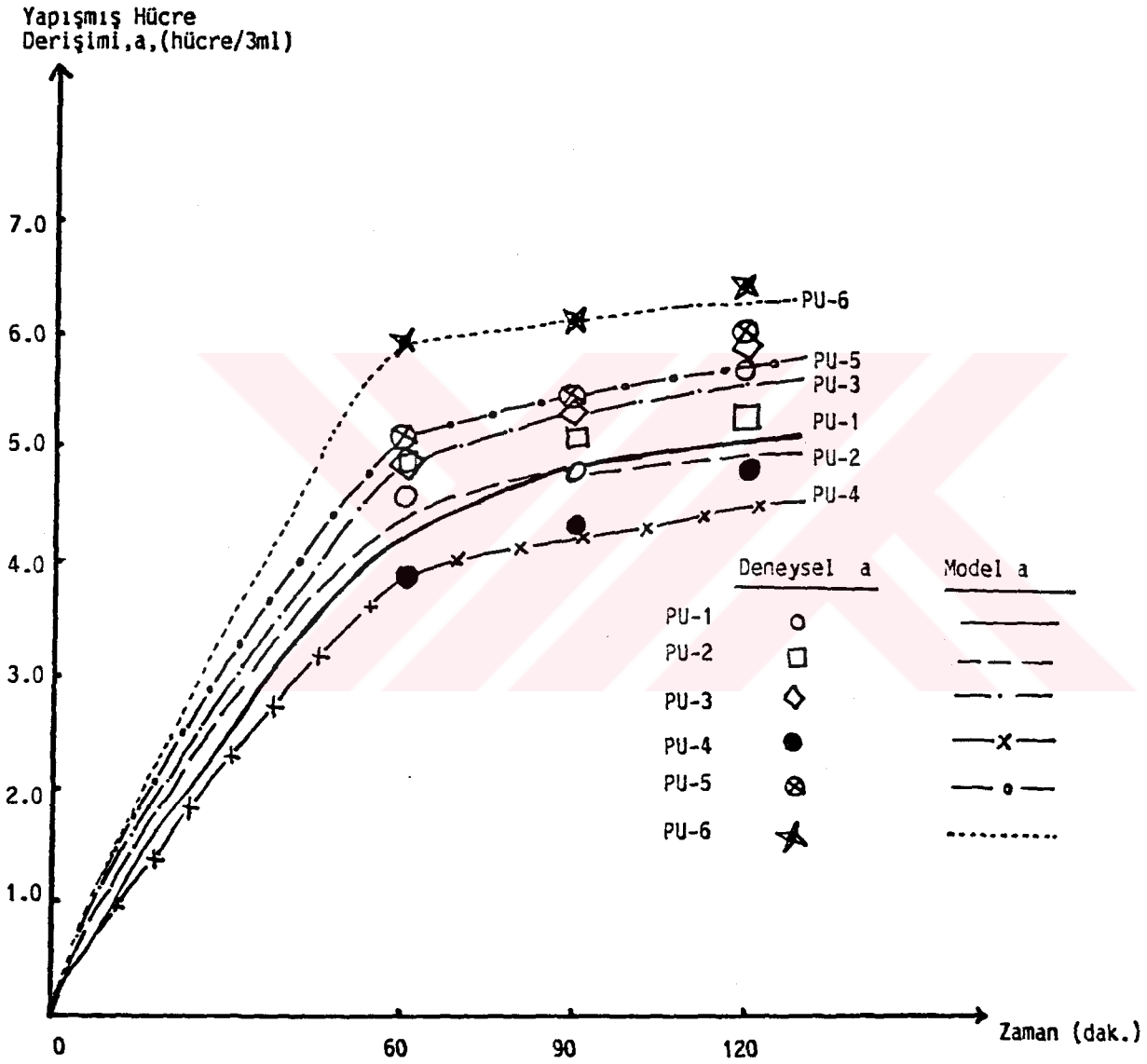
t(dak)	0	60	90	120	Membran No
Deneysel a	0	4,650	4,800	5,690	PU - 1
Model a	0	4,358	4,851	5,128	
Deneysel a	0	4,880	5,024	5,243	PU - 2
Model a	0	4,330	4,740	4,946	
Deneysel a	0	4,830	5,270	5,895	PU - 3
Model a	0	4,825	5,260	5,495	
Deneysel a	0	3,933	4,340	4,845	PU - 4
Model a	0	3,940	4,218	4,455	
Deneysel a	0	5,026	5,415	5,955	PU - 5
Model a	0	5,014	5,400	5,620	
Deneysel a	0	5,890	6,150	6,420	PU - 6
Model a	0	5,910	6,130	6,268	

Tablo 4.10. : PU Membranlar İçin Elde Edilen Deneysel a ve Model a Değerleri.

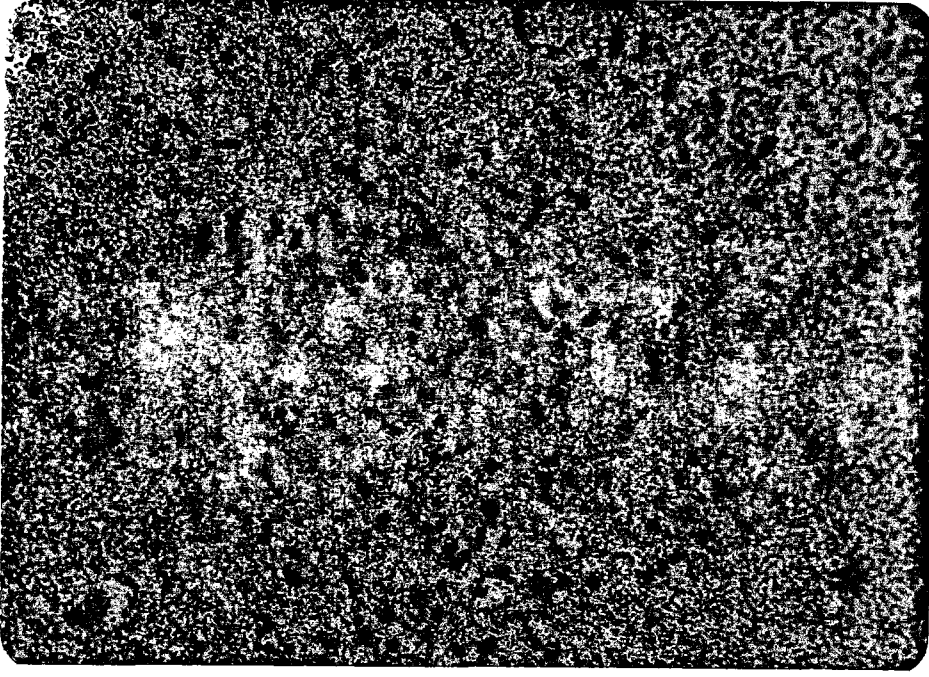
(*) Deneysel a ve Model a değerleri 10^{-5} ile çarpılarak Tabloya yerleştirilmiştir.



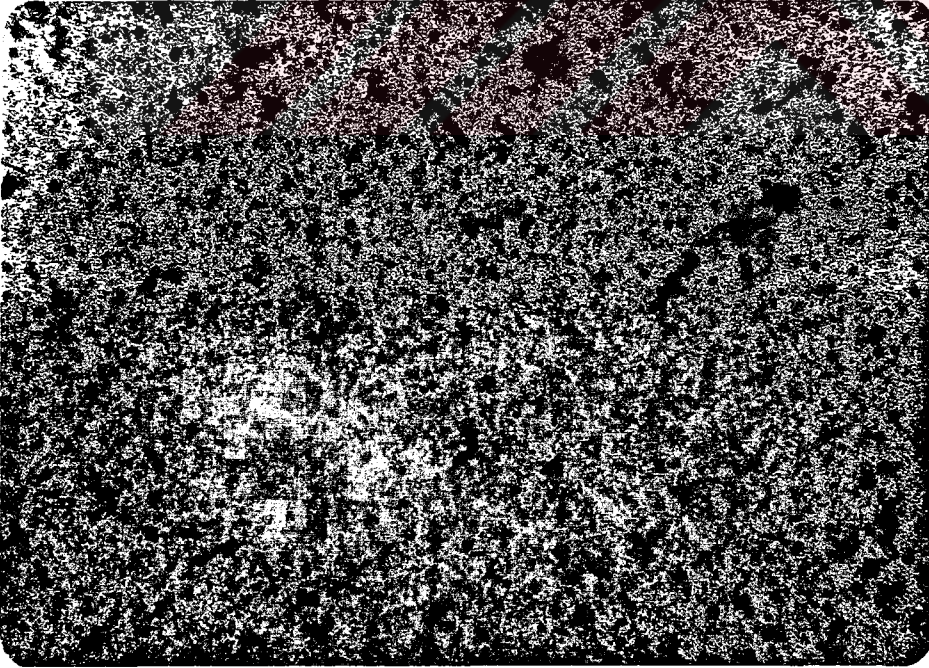
Şekil 4.10. : Eşitlik 2.15'deki X - Y Değişimi.



Şekil 4.11. : Deneysel ve Model a Değerlerinin Karşılaştırılması.



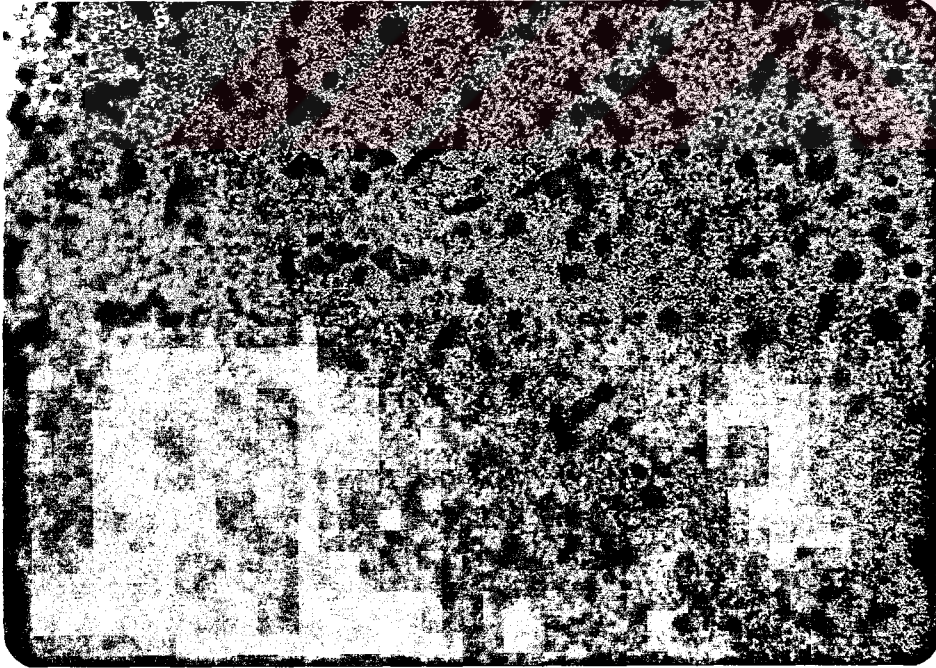
Şekil 4.12. : PU-1 Membranı Yüzeyine BHK 21 Hücre Yapışması.



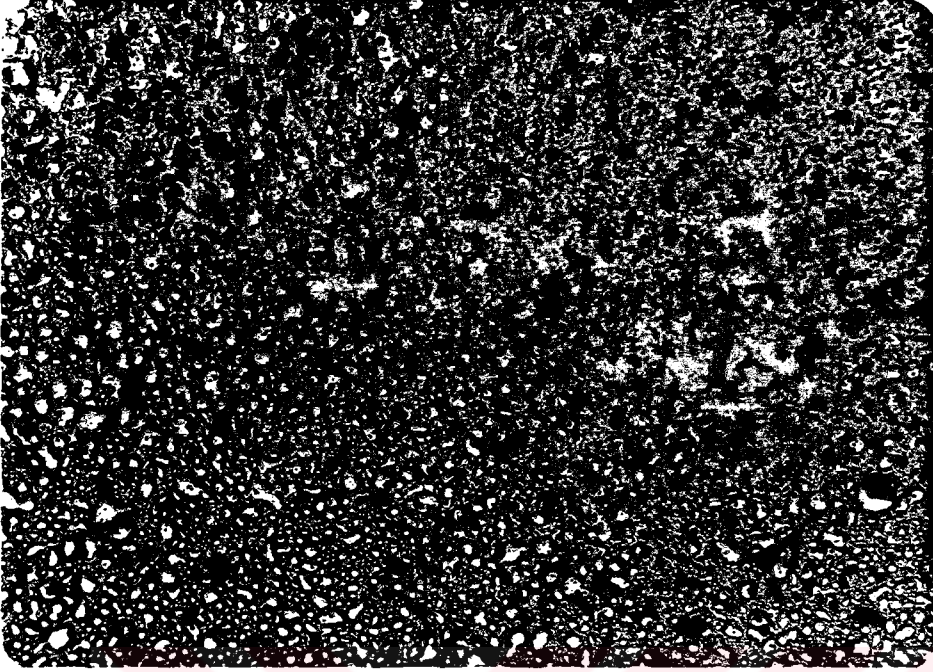
Şekil 4.13. : PU-2 Membranı Yüzeyine BHK 21 Hücre Yapışması.



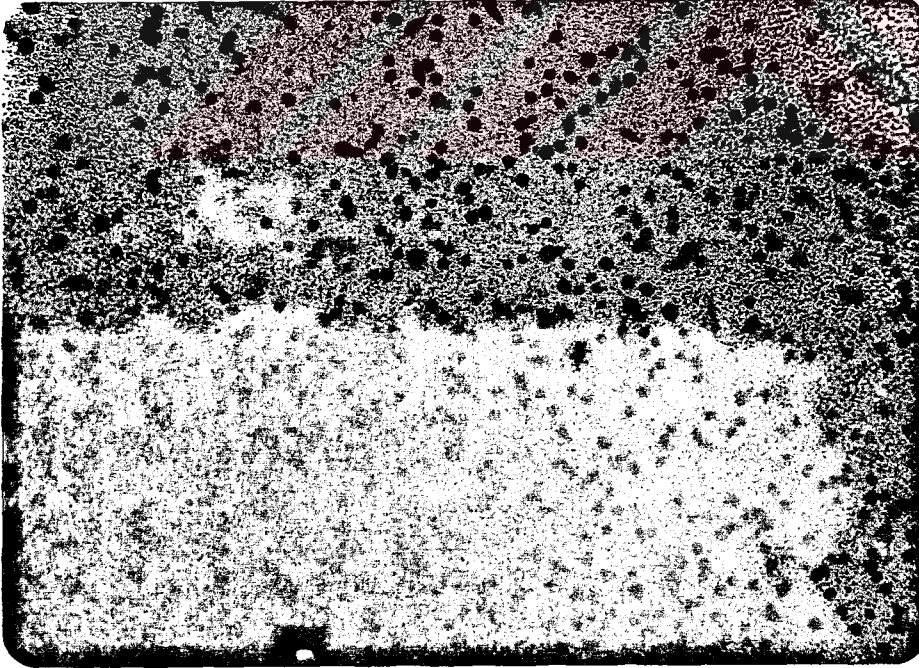
Şekil 4.14. : PU-3 Membranı Yüzeyine BHK 21 Hücre Yapışması.



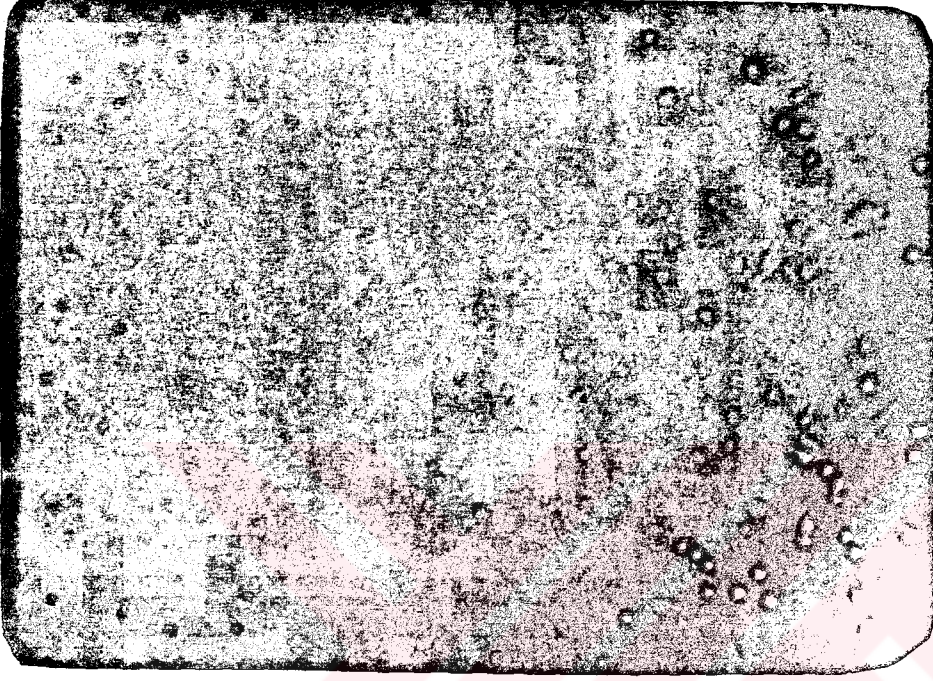
Şekil 4.15. : PU-4 Membranı Yüzeyine BHK 21 Hücre Yapışması.



Şekil 4.16. : PU-5 Membranı Yüzeyine BHK 21 Hücre Yapışması.



Şekil 4.17. : PU-6 Membranı Yüzeyine BHK 21 Hücre Yapışması.



Şekil 4.18. : PS Kültür Kabında BHK 21 Hücre Yapışması.

4.3.1.2. Hücre Yapışma Değerlerinin Çözücü Bileşimine Göre İrdelenmesi

Tablo 4.8.'de de görülebileceği gibi PU membranlar için %65-%86 arasında değişen hücre yapışma değerleri elde edilmiştir. %100 Dioksan kullanılarak hazırlanan PU-6 membranında en yüksek yapışma kesri değeri olan %86'ya ulaşılmıştır. %100 THF kullanılarak hazırlanan PU-1 membranına yapışma kesri de %76 olarak bulunmuştur. THF ve Dioksanın eşit hacimlerde kullanıldığı PU-3 membranının yapışma kesri ise, %79 olarak elde edilmiştir. Bu değer, saf THF ve Dioksan çözücüleri için elde edilen yapışma kesri değerleri olan %86 ile %76 'nın arasında bir değer olan %79 olarak elde edilmesi, beklenen bir sonuçtur. Bu durumda, Dioksan çözücüsünden elde edilen yüksek yapışma değeri ile THF çözücüsünün düşük yapışma değerinin ortak etkisi, PU-3 membranında gözlenmiştir.

PU-2 membranında THF çözücüsüne %10 oranında DMF eklenmesi söz konusudur. Bu durumda hücre yapışma kesri %76'dan %70'e düşmüştür.

PU-4 membranında, eşit hacimde kullanılan THF-Dioksan çözücü karışımına %10 oranında DMF eklendiğinde hücre yapışma kesri %79 'dan %65'e düşmüştür.

PU-5 membranında ise, Dioksan çözücüsüne %10 oranında DMF eklenmiş ve hücre yapışma kesrinin %86'dan %79'a düştüğü gözlenmiştir.

Bu sonuçlardan DMF'in, membran yapısını, hücre yapışmasını azaltıcı yönde etkilediği görülmektedir. DMF'in bu özelliğinden THF'e oranla, Dioksan'ın daha fazla etkilendiği söylenebilir.

4.3.1.3. Hücre Yapışma Değerlerinin Temas Açısı ile Karşılaştırmalı Olarak İrdelenmesi

BHK 21 hücre soyundaki fibroblast hücrelerin, PU membran yüzeyine yapışması, membranın yüzey özelliklerine bağlı olduğundan, hücre yapışması

deney sonuçlarının, diğer bir yüzey özelliği olan temas açısı deney sonuçları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi öngörülmüştür.

Literatürde de belirtildiği gibi, yüksek yüzey serbest enerjisine sahip yüzeyler, hücre yapışmasının göreceli olarak daha fazla olduğu yüzeylerdir. Yüzey serbest enerjisinin düşük olduğu yüzeylerde ise, hücre yapışması azalmaktadır (156,157). Yüzey serbest enerjisinin θ_{hava} ile ters orantılı olduğu da bilindiğine göre, θ_{hava} değerinin artmasıyla, hücre yapışma kesrinin azalması beklenmelidir.

Tablo 4.11., PU membranların θ_{hava} değerleri ile, membran yüzeyine 2 saat süre sonunda yapışan hücre kesrini vermektedir. Bu tabloda verilen sonuçlar ikili gruplar halinde incelenebilir.

PU-1 membranının θ_{hava} değeri, DMF ilaveli PU-2 membranının θ_{hava} değerinden daha küçük ve yapışma kesri daha büyüktür.

PU-3 membranının θ_{hava} değeri, DMF ilaveli PU-4 membranının θ_{hava} değerinden daha küçük ve yapışma kesri daha büyüktür.

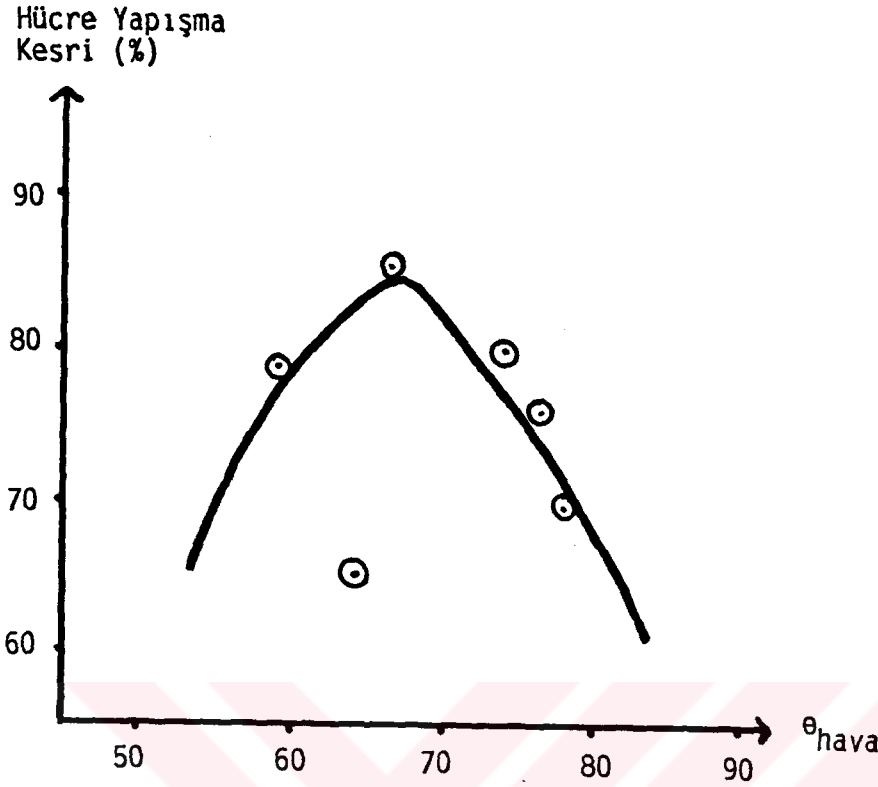
PU-6 membranının θ_{hava} değeri, DMF ilaveli PU-5 membranının θ_{hava} değerinden daha küçük ve yapışma kesri daha büyüktür.

Bu irdelemeye dayanılarak, çözücü sistemine DMF ilave edilmesinin, hazırlanan membranların yapısını, yüzey serbest enerjisini ve dolaylı olarak da hücre yapışmasını azaltıcı yönde etkilediği sonucuna varılmaktadır.

	θ_{hava}	A (Hücre Yapışma Kesri)	Çözücü Sistemi
PU-1	76,11	0,760	TMF
PU-2	78,70	0,699	%10 DMF %90 THF
PU-3	59,20	0,786	%50 THF %50 Dioksan
PU-4	64,85	0,646	%10 DMF %45 THF - %45 Dioksan
PU-5	73,94	0,794	%10 DMF %90 Dioksan
PU-6	66,84	0,856	Dioksan

Tablo 4.11. : Hücre Yapışma Kesrinin θ_{hava} ile Karşılaştırılması.

Tamada ve Ikada (158) tarafından, çeşitli polimerik yüzeyler üzerinde temas açısı-hücre yapışması değerleri incelenmiş ve bu değerlerin, maksimumdan geçer bir eğri verecek şekilde değiştiği bildirilmiştir. Bu sonuca dayanılarak, PU membranların θ_{hava} - Hücre Yapışma Kesri değerleri grafiğe alınmış ve 70° civarında maksimum noktası olan bir eğri elde edilmiştir. Bu grafiğin literatürde bildirilen şekilde olması θ_{hava} ve hücre yapışma değerlerinin güvenilirliğini desteklemiştir. Elde edilen grafik Şekil 4.19'da sunulmuştur.



Şekil 4.19. : θ_{hava} - Hücre Yapışma Kesrinin Değişimi.

4.3.2. Hücre Üremesi Deney Sonuçları ve Değerlendirilmesi

BHK 21 hücre soyuna ait fibroblast hücrelerin, PU membran yüzeyinde üreme deneyi Bölüm 3.3.8.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilen Tablo 4.12.'de sunulmuştur.

Hücre üreme deney sonuçları, hücre yapışma deney sonuçları ile uyum içindedir. Tablo 4.12.'de de görülebileceği gibi, en yüksek üreme değeri, hücre yapışması en fazla olan PU-6 membranı için elde edilmiştir. En düşük hücre yapışma değerine sahip olan PU-4 membranının hücre üreme değeri de oldukça düşüktür.

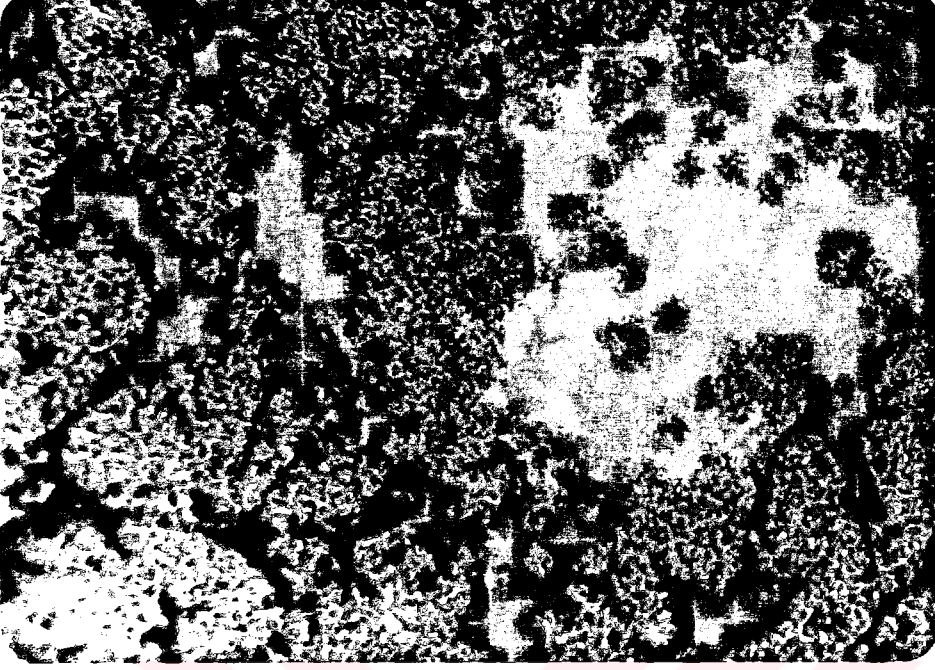
İnokülasyon Yoğunluğu = $7,5 \cdot 10^5$ hücre/3ml. ; İnkübasyon Süresi = 96 saat.					
Membran No	Başlangıç Hücre Derişimi (hücre/3ml)	Sonuç Hücre Derişimi (hücre/3ml)	Hücre Canlılığı	Hücre Morfolojisi Hücre Rejenerasyonu	İkileme Süresi
PU - 1	$4,95 \cdot 10^5$	$1,40 \cdot 10^6$	+	-	45,83
PU - 2	$5,24 \cdot 10^5$	$3,52 \cdot 10^6$	+	-	18,43
PU - 3	$5,90 \cdot 10^5$	$4,95 \cdot 10^5$	-	+	-
PU - 4	$4,85 \cdot 10^5$	$7,68 \cdot 10^5$	-	+	-
PU - 5	$5,96 \cdot 10^5$	$7,75 \cdot 10^5$	-	+	-
PU - 6	$6,42 \cdot 10^5$	$3,68 \cdot 10^6$	+	-	17,53

Tablo 4.12. : Hücre Üremesi Deney Sonuçları.

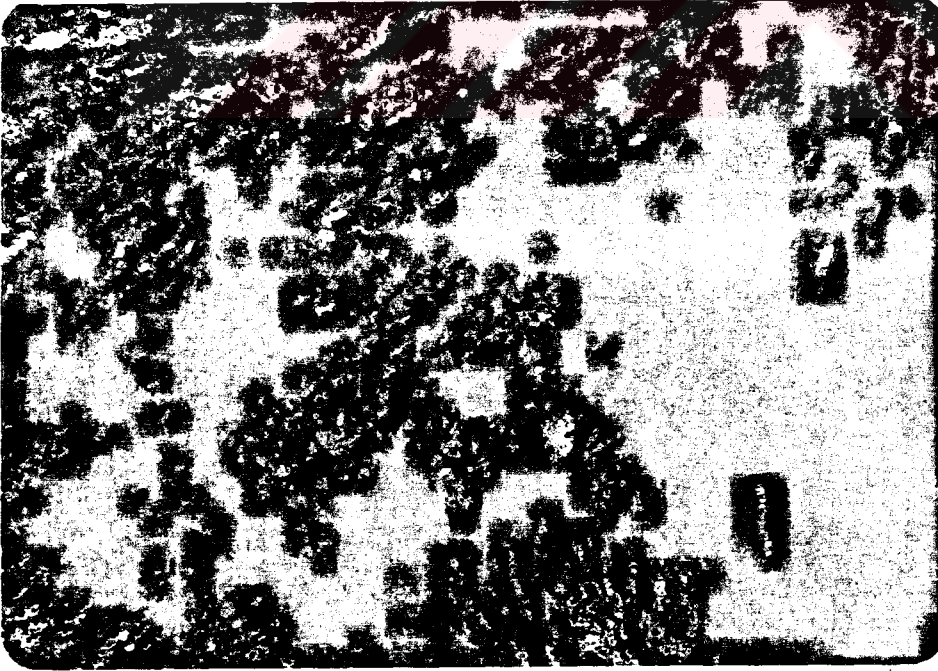
(*) = Değerler 4'er sayımın ortalamasıdır.

Hücre üremesi mikroskopik incelemelerinden elde edilen fotoğraflar,PS kültür kabındaki kontrol üreme ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.20.; 4.21.; 4.22.; 4.23.; 4.24.; 4.25. ve 4.26.'da verilmiştir. Aynı incelemelerden PU-3, PU-4 ve PU-5 membranlar üzerindeki üremelerde, hücre canlılıklarının düşük olduğu ve hücre deformasyonlarının söz konusu olduğu belirlenmiştir. Yine aynı membran örneklerinde, yapışmanın yeter derecede iyi olmasına karşın, üreme değerleri iyi değildir.

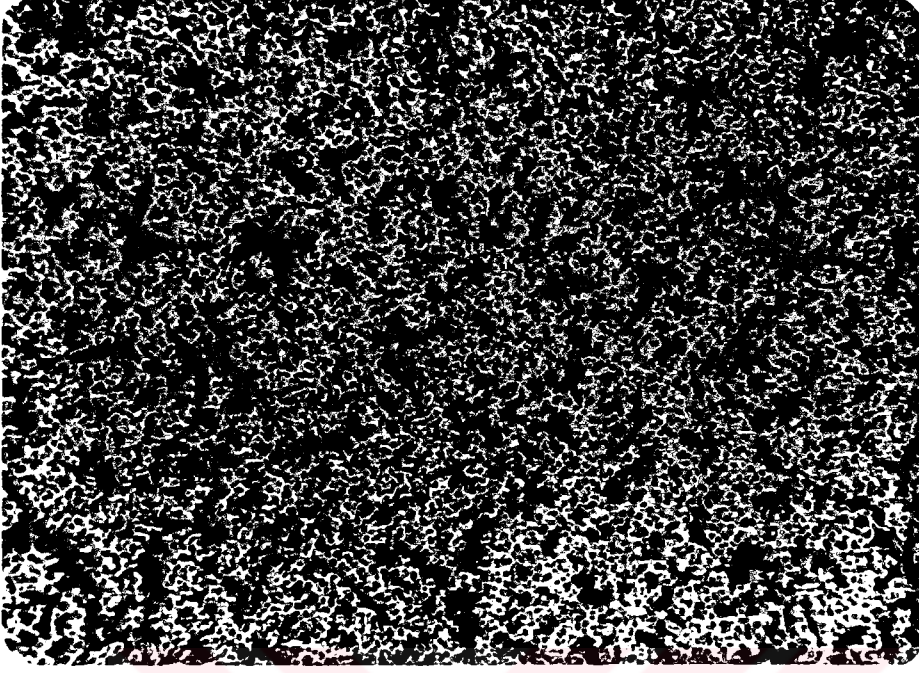
İkilenme süreleri Bölüm 2.11.4.'de anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. Ancak PU-2, PU-3 ve PU-4 membranları için elde edilen üreme değerleri sağlıklı olmadığından, bu örneklerle ait ikilenme süreleri hesaplanmamıştır. İkilenme süreleri Tablo 4.12.'de sunulmuştur. Bu sonuçlardan, PU-2 ve PU-6 membranlarında teorik ikilenme süresi olan 12 saate yaklaştığı söylenebilir.



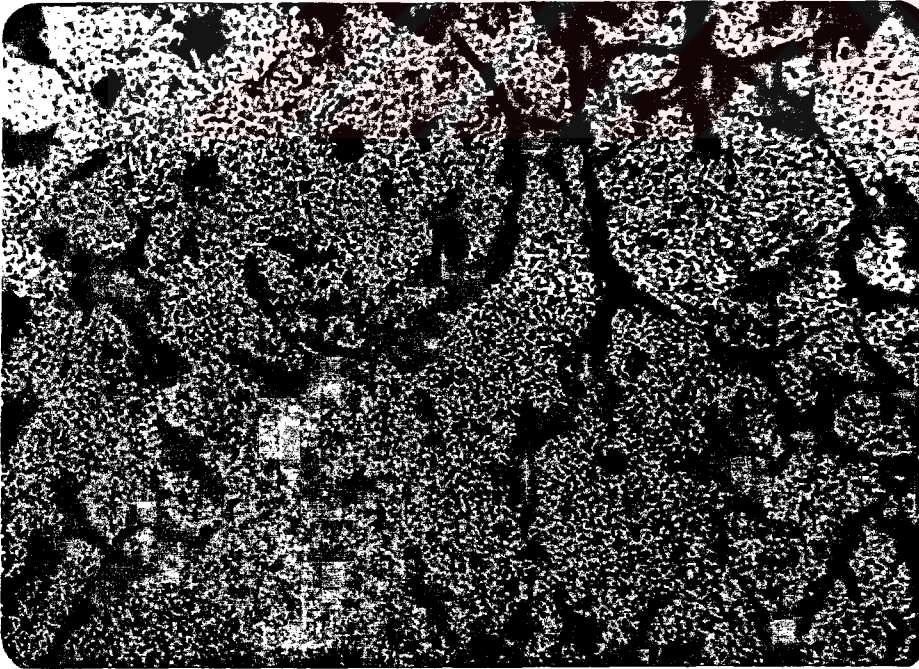
Şekil 4.20. : PU-1 Membranı Yüzeyinde BHK 21 Hücre Üremesi.



Şekil 4.21. : PU-2 Membranı Yüzeyinde BHK 21 Hücre Üremesi.



Şekil 4.22. : PU-3 Membranı Yüzeyinde BHK 21 Hücre Üremesi.



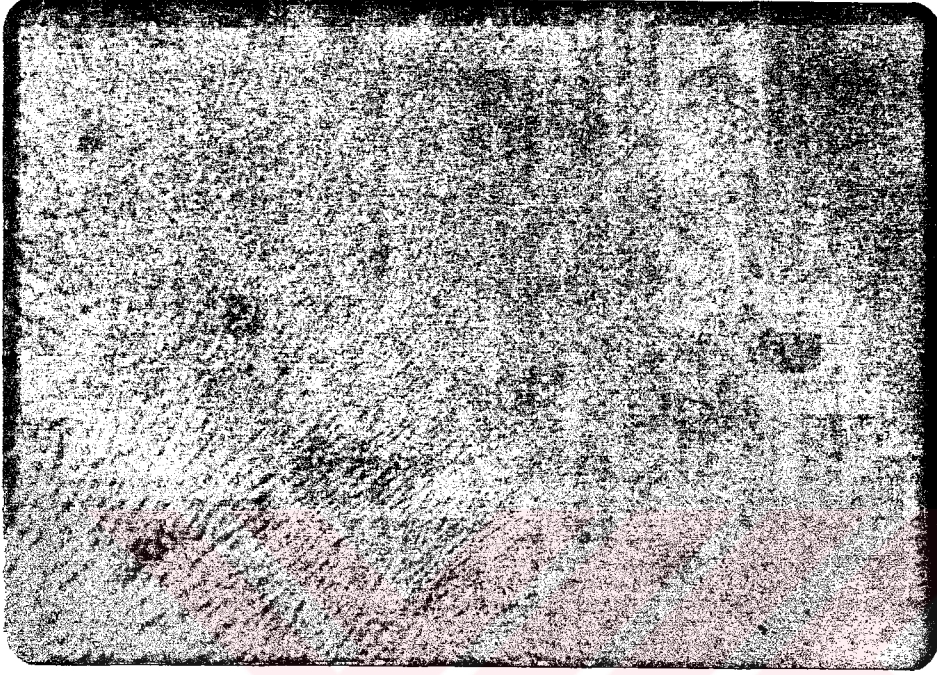
Şekil 4.23. : PU-4 Membranı Yüzeyinde BHK 21 Hücre Üremesi.



Şekil 4.24. : PU-5 Membran Yüzeyinde BHK 21 Hücre Üremesi.



Şekil 4.25. : PU-6 Membran Yüzeyinde BHK 21 Hücre Üremesi.



Şekil 4.26. : PS Kültür Kabında BHK 21 Hücre Üremesi.

4.3.3. Kan Hücreleri Deney Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Kan hücreleri ile PU membranların etkileşimleri Bölüm 3.3.9.'da anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Yapılan çalışmada, temel kan hücreleri (lökosit, eritrosit ve trombosit) ile bu çalışmada hazırlanan PU membranların etkileşimleri incelenmiştir.

Kan hücresi-membran etkileşimleri, membran bulunmayan kontrol deneyleri ile karşılaştırmalı olarak gözlenmiştir. Membran içermeyen kontrol kan örneğindeki kan hücre derişimlerinin, 1 saatlik çalkalanma süresi sonunda bir değişikliğe uğramadığı söylenebilir. Kontrol örnekteki derişim farklılıkları, sayıcı aletin hata sınırları içerisinde girmektedir.

Aynı şekilde, PU membranların, kan örnekleri içinde bulundukları 1 saat sonunda, kayda değer bir kan hücresi yapışmasına sebep olmadıkları belirlenmiştir. Membran örneklerden kaynaklandığı söylenebilecek kan hücreleri konsantrasyon farklılıkları Tablo 4.13.'de toplu olarak verilmiştir. Bu sonuçlar, Farrar (159) ve Lannerstad (160) tarafından bulunan, PU yüzeylerde trombus birikiminin (pıhtılaşma), oluşmadığı şeklindeki in vitro ve in vivo verilerle ispatladıkları bulgularıyla, uyum içindedir.

Kan hücreleri etkileşim deneylerinde, sayıcıdan elde edilen verilerden, kontrol ve PU-5 membranına ait olanlar, EK-7'de sunulmuştur.

Membran No	$ \Delta C $ Lökosit ($10^{-9}/1$)	$ \Delta C $ Eritrosit ($10^{-12}/1$)	$ \Delta C $ Platelet ($10^{-9}/1$)
Kontrol	0	0	20
PU - 1	0	0,02	10
PU - 2	0	0,03	11
PU - 3	0	0	9
PU - 4	0,2	0	30
PU - 5	0,1	0	25
PU - 6	0	0	0

Tablo 4.13. : PU Membranlarla Temas Eden Kan Örneklerindeki Kan Hücreleri Değişim Farkları (ΔC)

5 . SONUÇLAR

PU'ın farklı çözücü sistemlerindeki çözeltilerinden çözücü döküm yöntemiyle hazırlanan membranların, başta yapay deri olmak üzere, diğer çok amaçlı biyomateryal olarak kullanımına yönelik çeşitli özellikleri belirlenmiştir. Araştırma kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

- 1) Çözücü döküm yöntemi ile hazırlanan PU membranların yapısal özellikleri, kullanılan çözücü türü ve bileşimine bağlı olarak değişmektedir.
- 2) THF ile hazırlanan membranda en gözeneksiz yapıya, Dioksan ile hazırlanan membranda ise en gözenekli yapıya ulaşılmıştır.
- 3) Çözücü sistemlerine DMF ilave edilmesi THF ile hazırlanan membranların gözenekliliğinin artmasına, Dioksan ile hazırlanan membranların ise gözenekliliğinin azalmasına sebep olmuştur.
- 4) DMF ilavesi, THF ile hazırlanan membranların ortalama gözenek çapını (GÇ) arttırmış, Dioksan ile hazırlanan membranlarınkini ise azaltmıştır.
- 5) Membranların boşluk hacim değerleri, yüzey serbest enerjisi değerleri ile doğru orantılı bir değişme göstermiştir.
- 6) Membran yapısındaki gözenekliliğin artmasıyla su buharı geçirgenliği (SBG) artmıştır.
- 7) Üretilen Pu membranların SBG değerlerinin literatür de belirtilen normlara uyduğu saptanmıştır.
- 8) Farklı çözücü sistemleri, membranların θ_{hava} değerlerinin değişmesine sebep olmuştur.

- 9) Çözücü sistemlerine DMF ilavesi θ_{hava} değerlerinin artmasına yol açmıştır.
- 10) θ_{oktan} değerleri θ_{hava} değerlerini desteklemektedir.
- 11) θ_{hava} değerleri, membranların yüzey serbest enerjisi ile ters orantılı olarak değişmektedir.
- 12) Farklı çözücü sistemleri, membranların Denge Su İçeriği (DSİ) değerlerinin değişmesine sebep olmuştur.
- 13) Çözücü sistemlerine DMF ilavesi DSİ değerlerini azaltıcı yönde etkilemiştir.
- 14) θ_{hava} değerleri ile DSİ değerlerinin birbirleri ile ters orantılı olarak değiştikleri ve θ_{hava} - DSİ değerleri grafiğe alındığında azalan bir doğru elde edildiği saptanmıştır.
- 15) BHK 21 hücrelerinin PU membran yüzeylere yapışma kesri %65 ile %86 değerleri arasında değişmiştir.
- 16) En yüksek yapışma değeri %100 Dioksan kullanılarak hazırlanan PU-6 membranı için %86 olarak elde edilmiştir.
- 17) Çözücü sistemlerine DMF ilavesi hücre yapışma kesri değerlerini düşürmüştür.
- 18) BHK 21 hücrelerinin membran yüzeylere özgül yapışma hız sabiti, Kiremitçi tarafından önerilen modele göre hesaplanmış ve bu matematiksel modele iyi bir uyum elde edilmiştir. En büyük hız sabiti değerine, en yüksek yapışma değerine sahip olan PU-6 membranı için ulaşılmıştır.

- 19) Çözücü sistemlerine DMF ilavesi θ_{hava} değerlerini arttırırken hücre yapışma kesri değerlerini azaltıcı yönde etkilemiştir. Dolayısı ile θ_{hava} değerleri ile yapışmanın ters orantılı olduğu belirlenmiştir.
- 20) θ_{hava} - Hücre Yapışma Kesri değerleri grafiğe alındığında 70° civarında maksimum noktasından geçen bir eğri elde edilmiştir. Bu eğri literatür verilerine uymaktadır.
- 21) PU membran yüzeylerinde BHK 21 hücrelerinin üremesi, BHK 21 hücrelerinin yüzeye yapışma değerlerinin yüksek olduğu membranlarda diğer membranlara göre daha fazla olmuştur.
- 22) BHK 21 hücrelerinin PU membran yüzeylerindeki ikilenme sürelerinin 17 ile 46 saat arasında değişen sürelerde oldukları belirlenmiştir.
- 23) PU membran yüzeylere kan hücrelerinin yapışmadıkları ve pıhtılaşmaya yol açmadıkları saptanmıştır.

Elde edilen tüm verilere dayanılarak, Poliüretan'dan hazırlanan membranların, geliştirilerek, yara tedavisi ve yapay deri uygulamalarında kullanılabileceği görüşüne ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1) A.S. Hoffman, Polymeric Biomaterials, 1, (1986).
- 2) Hoffman, A.S., The Past Present and Future of Artificial Organs, 1982 .
- 3) The Condensed Chemical Dictionary, G.G. Hawley, Van Nostrand Reinhold, USA, 1977.
- 4) Akar, A., Polimer Kimyasına Giriş, 2, 1982.
- 5) Şenvar, C. Kimyasal Kinetik ve Makromoleküller, İstanbul, 1986.
- 6) Pişkin, E. Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler, 8, 1989.
- 7) O. Bayer, Angew. Chem., 59, 275, 1947.
- 8) O. Bayer., et al., (to I.G. Farbenindustrie), Ger. Pat. 728, 981, 1942.
- 9) MacKnight, W.J. and Yang, M., J. Polym., Sci., Poly. Symp., 42, 817, 1973.
- 10) Tanaka, T., Yokoyoma, T., and Kaku, K., Mem. Fac. Eng., Kyushu Univ, 23, 113, 1963.
- 11) Billmeyer, F., Textbook of Polymer Science, 420-454, 1971.
- 12) Ocumpough, D.E., et.al., J. Macromol Sci., Chem., A4(3): 595-613, 1970.
- 13) Nyilas, E., and Word, R.S. Jr., J. Biomed, Mater Res., Symposium No.8: 69-84, 1977.
- 14) Ratner, B.D., Gladhill, K.W., J. Biamed. Mater. Res., Vol.22, 509, 1988.
- 15) Lau, W.Y., et al., Surgery, Gynecology and Obstetrics, 161; 291, 1985.
- 16) Wachem, P.B., Biomaterials, 6: 403, 1985.
- 17) Edward P., Plastic and Reconstructive Surgery, August 3, 285, 1988.
- 18) Davies, J.W.L., Burns, 10:104, 1983.
- 19) Boretos, J.W., J. Biomed, Mater, Res, 2, 121, 1968.
- 20) How, T.V. and D. Annis, J. Biomed. Mater. Res, 21, 1093, 1987.
- 21) Gardezi, S.A.R., et al., J.P. M.A., Sept., 219, 1983.
- 22) Medtronic, Inc., Spectrax TM-SX System Brochure, 81068.
- 23) Boretos, J.W., et al., Anesth. Analog. (Cleveland), 51, 292, 1972.

- 24) Mirkovitch, V., et al, Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs., 8, 79, 1962.
- 25) Wagner, M., et al., Surg., Gynecol., Obstet. 127, 805, 1968.
- 26) Kantrowitz, A., et al., Trans. Amer. Soc., Artif., Intern., Organs., 14, 344, 1968.
- 27) Boretos, J.W., and Pierce, W.S., Science, 158, 1481, 1967.
- 28) Pierce, W.S., et al., Surgery, 66, 1034, 1969.
- 29) Kolobow, T., et al., J. Trans. Amer., Soc., Artif., Intern., Organs., 15, 172, 1969.
- 30) Lyman, D.J., and Loo., B.H., J. Biomed. Mater., Res., 1, 17, 1967.
- 31) Brauman, S., and Fritzinger, B., J. Appl. Polym. Sci., 16, 2439, 1972
- 32) Hessel, E.A., et al., J. Thorac., Cardio. Surg., 54, 227, 1967.
- 33) Boretos, J.W., et al., J. Biomed. Mater., Res., 5, 373, 1971.
- 34) Lee, H. and Neville, K., Handbook of Biomedical Plastics, Pasadena, Technology Press, Pasadena, Calif., 1971.
- 35) Salvatore, J.E., et al., Trans. Amer. Soc., Artif. Intern., Organs., 5, 325, 1960.
- 36) Patrick, R.L., et al., J. Dent. Res., 47, 12, 1968.
- 37) Boretos, J.W. and Wagner, F.R., ibid., 5, 411, 1971.
- 38) Ulrich, H., et al., Synthetic Biomedical Polymers, Concepts and Applications, M. Szycher and W.J., Robinson ed., Technomic Pub. Co., Inc., Lancaster, 29, 1980.
- 39) Guidelines for Physicochemical Characterization of Biomaterials, U.S., Department of Health and Human Services, 1980.
- 40) Pişkin, E., Polimer Teknolojisi Giriş, 59, 1987.
- 41) Polymer Encyclopedia, Interscience, 15, 503, New York, 1969.
- 42) T. Young, Phil., Trans., Roy., Soc., London., 95, 65, 1805
- 43) R.E. Baier, E.G., Shafrin. W.A., Zisman, Science, 162, 1360, 1968.
- 44) F.M., Fowkes, Ind., Eng., Chem., 56 (12), 40, 1964.
- 45) F.M., Fowkes, Adv. Chem. Ser., 43, 99, 1964.
- 46) C.A. Dahlquist, Aspects of Adhesion, V.D.J. Alner, Ed., University of London Press, London, 183, 1969.
- 47) S. Wu., J. Adhes., 5, 39, 1973.

- 48) S. Wu., J. Macromol. Sci., C 10, 1, 1974.
- 49) Erbil, Y., J. Adhesion Sci. Technol. Vol.3, No.1, 29, 1989.
- 50) A.C. Taylor, Exp. Cell Res. Suppl, 8, 154, 1961.
- 51) L. Weiss and L.E. Blumenson, J. Cell Physiol., 70, 23, 1967.
- 52) F.J. Holly and M.F. Refejo., J. Biomed. Mat. Res., 9, 315, 1975.
- 53) Andrade J.D., Contact Angle Analysis of Biomedical Polymers, 36, 1983.
- 54) Andrade, J.D., King, R.N., Gregonis, D.E., J. Colloid and Interface Sci. Vol. 72:3, 488, 1979.
- 55) Hamilton, W.C., J. Colloid Interface Sci., 40, 219, 1972;
47, 672, 1974.
- 56) B. Bloch, G.W. Hastings, Plastics in Surgery, Charles C. Thomas
Publisher, Springfield, 145, 1967.
- 57) Pişkin, E., Polymeric Biomaterials, 96, 1986.
- 58) Kesting R.E., Synthetic Polymeric Membranes, 1971.
- 59) Keller, P.R., Membrane Technology and Industrial Separation Techniques,
Noyes Data Corp., New Jersey, 1976.
- 60) Strathmann, H.J., Memb., Sci., 9: 121, 1981.
- 61) Reid, C.E. and Kuppers, J.R., J. Appl. Polym. Sci., 2:264, 1959.
- 62) Graham, T., Phil. Trans, Roy. Soc., 151: 1836, 1861.
- 63) Lane, J.A. and Riggle, J.W., ALCH E Chem., Engr., Prog. Symp. Ser.,
No.24, 55: 127, 1959.
- 64) Lacey, R.E. and Loeb, S., Industrial Processing with Membranes,
Wiley-Interscience, New York, 1972.
- 65) N. Bjerrum and E. Manegold, Kolloid Z., 42: 97, 1927.
- 66) H. Bechhold, Z., Physik., Chem., 60: 257, 1907.
- 67) H. Karplus, cited by F. Erbe., Kolloid Z., 63 : 277, 1933.
- 68) E. Mamegold and R. Hofman, Kolloid Z., 50 : 22, 1930.
- 69) R. Kesting and A. Menefee, Kolloid, Z.Z., Polymere., 230 : 341,
1969.
- 70) K. Vos., F. Burris and R. Riley., J. Appl, Polymer Sci., 10: 825,
1966.
- 71) R. Siu, "Microbial Degradation of Cellulose" Reinhold, New York, 1965.
- 72) H. Lonsdale, U. Merten, and R. Riley, J. Appl., Polymer Sci.,
9: 1341, 1965.

- 73) S. Sourirajan, Ind., Eng., Chem., Fundamentals, 3: 206, 1964.
- 74) T. Sherwood, et al., Ind. Eng. Chem., Fundamentals, 4: 113, 1965.
- 75) Lasoski, S. and Cobbs, W., J. Polymer Sci., 36: 21, 1959.
- 76) Jones, G. and Miles, F., J. Soc. Chem. Ind., 52: T 251, 1933.
- 77) M. Von Ardenne, "Elektronenübermikroskopie", Springer-Verlag, Berlin, 1940.
- 78) H. Pietsch, dissertation, Hanover, 1949, and G. Hansmann and H. Pietsch Naturwiss., 36: 250, 1949.
- 79) J.-G. Helmeke, Zentr. Bakteriolog., 159: 308, 1953.
- 80) Hirabayashi, Y., Satoh, H., Ogawa, H., J. App., Poly, Scie., 28, 109, 1983.
- 81) Sourirajan, S., Reverse Osmosis and Synthetic Membranes, National Research Council, Ottawa, Canada, 1977.
- 82) Strathmann, H., J. Memb. Sci., 9: 121, 1981.
- 83) Loeb, S. and Sourirajan, S., Ad. Chem. Ser., 38, 117, 1962.
- 84) Nordberg, M.E., J. Amer. Chem. Soc., 27: 299, 1944.
- 85) Bierenbaum, H.S., et al., Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop., 13:2, 1974.
- 86) Fleisher, R.L., et al., Science, 149: 383, 1965.
- 87) Pişkin, E., Synthetic Polymeric Membranes, in Polymeric Biomaterials, 136, 1986.
- 88) Kolff, W.J., and Balzer, R., Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs, 1: 39, 1955.
- 89) Kolff, W.J., et al., Cleveland Clin. Quart., 23: 69, 1956.
- 90) Clowes, G.H.A., et al., Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs, 1: 23, 1955.
- 91) Clowes, G.H.A., et al., Surgery, 44: 220, 1958.
- 92) Pierce, E.C. II, Arch. Surg., 77: 938, 1958.
- 93) Esato, K. and Eiseman, B., J. Thorac. Cardiovascular Surg., 69: 690, 1975.
- 94) Product Information, Celgard Microporous Film. Celanese Corp., Charlotte, North Carolina, 1981.
- 95) Abel, J.J., et al., J. Pharm. Exp. Ther., 5: 275, 1914.
- 96) Kolff W.J. et al., Acta Med. Scand., 117: 121, 1944.

- 97) Scribner, B.H., et al., Trans. Amer. Soc. Artif, Intern, Organs. 6: 88, 1960.
- 98) Bandel, W., Chem Z. Jahrgung, 65, 1964.
- 99) Ota, K., Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc., 12: 559, 1975.
- 100) Lyman, D.J., et al., Biochemistry, 3: 985, 1964.
- 101) Bamford, C.H., Synthetic Polypeptides, Academic Press, New York, 1956.
- 102) Nishihara, T., et al., Trans. Amer. Soc. Artif, Intern. Organs, 24: 662, 1978.
- 103) Zaborsky, D.R., Immobilized Enzymes, CRC Press, Cleveland, 1973.
- 104) Thomas, D. and Kernevez, J.P., Analysis of Control of Immobilized Enzyme Systems, North-Holland, Amsterdam, 1976.
- 105) Chang, T.M.S., Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins, Vols. I and II, Plenum Press, New York, 1976.
- 106) Tanguary, A.C. and Lacey, R.E., Controlled Release of Biologically, Active Agents Plenum Press, New York, 1974.
- 107) Colbert, J.C., Controlled Action Drug Forms, Noyes Data Corp., New Jersey, 1974.
- 108) Cardarelli, N., Controlled Release Pesticide Formulations, CRC Press, Florida, 1976.
- 109) Wise, D.L., Biopolymeric Controlled Release Systems, Vols. I and II, CRC Press, Florida, 1984.
- 110) Basil, A., Arch., Surg., Vol. 119, 312, March, 1984.
- 111) Oluwasanmi, M.D., The Jour, of Trauma 16 5, 348, 1976.
- 112) Spence Reid J., J. of Biomed. Mat. Res. Vol. 19., 1181, 1985.
- 113) Golon, J., Burns, 11, 274, 1985.
- 114) Chvapil M., The Journal of Trauma, Vol. 27, No: 3, 278, 1987.
- 115) Chvapil, M., The Journ. of Trauma, 27:3, 278, 1987.
- 116) Check, W.A., JAMA, 244:5, 2493, 1980.
- 117) Ham, R.G., Mc Keehan, W.L., in Methods in Enzymology, Jakoby, W.B., and Pastan, J.H., eds., Academic Press, New York, 58, 44, 1979.
- 118) Litwin, J., Dev., Biol., Stand., 42, 37, 1979.
- 119) Eagle, H., Science, 180, 432, 1959.
- 120) Grinnel, F., Milam, M., Sirere, P.A., Arch. Biochem. Biophys., 153, 193, 1972.

- 121) Grinnel, F., *Int. Rev. Cytol.*, 53, 65, 1978.
- 122) Maroudas, N.G., *J. Theor. Biol.*, 49, 417, 1975.
- 123) Baier, R.E., *Bull. N.Y. Acad. Med.*, 2, 48, 257, 1972.
- 124) Vioman, L., *Bull. N.Y. Acad. Med.*, 2, 48, 302, 1972.
- 125) Folkman, J. and Marcona, A., *Nature*, 273, 345, 1978.
- 126) Margolis, L.B., Dyyatlovitskaya, E., and Bergelson, L.D., *Exp., Cell. Res.*, 111, 494, 1978.
- 127) Maroudas, N.G., *J. Theor. Biol.*, 79, 101, 1979.
- 128) May, E.D., *Cell Biology of the Extracellular Matrix*, Plenum Press, New York, 1981.
- 129) May, E.D., *J. Cell. Biol.*, 91, 205, 1981.
- 130) Grinnel, F., *Methods Enzymol*, 82, 499, 1982.
- 131) *European Pharmacopoeia* (Council of Europe eds), France, II, 65, 1971.
- 132) Houdkamp, J., *Costar Europe Ltd.*, 1982.
- 133) Amstein, C.F., and Hartman, P.A., *J. Clin. Microbiol*, 2, 46, 1975.
- 134) Munder, P.G., Modelell, M., and Wallach, D.F.H., *FEBS Lett.*, 15, 191, 1971.
- 135) Spier, R.E., *Adv. Biochem. Eng.*, 14, 119, 1980.
- 136) Kiremitçi, M., *Süspansiyon Polimerizasyonu ile Üretilen Akrilik ve Alkil Plazmaları ile Modifiye Edilen Polistiren Bazlı Polimerik Mikrotaşıyıcılar ile Desteklenmiş BHK Hücre Kültürü ve Şap Virüsü Üretiminin Deneysel ve Matematiksel Olarak İncelenmesi*, Doktora Tezi, Ankara, 1988.
- 137) Fleishaker, A., *Animal Cell Culture*, 1988.
- 138) William, J., Paston, I., *Methods in Enzymol*, Vol. LVIII, 150, 1977.
- 139) Bishop, C., Surgenor, D.M., *The Red Blood Cell*, Academic Press, New York, 1964.
- 140) Folkow, B., Neil, E., *"Circulation"*, Oxford Un. Press, New York, 1971.
- 141) Torunoğlu, M., *İntegre Fizyoloji ve Fizyopatoloji Ders Kitabı*, Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 1972.
- 142) Noyan, A., *Fizyoloji*, Ankara, 1980.

- 143) Branemark, P.I., Lindström, J., Biorheology, 1: 139, 1953.
- 144) Branemark, P.I., Skalak, R., Science, 163: 717, 1969.
- 145) Hubbard, D., Lucas, G., J. Appl. Physiol., 15: 265, 1965.
- 146) B.D. Ratner, et al., Jour. of. Biomed. Mat. Res., 22: 509, 1988.
- 147) Boretos, J.W., Biomed. Mater. Res., 2: 121, 1968.
- 148) How, T.V., Annis, D., J. Biomed. Mater. Res., 21: 1093, 1987.
- 149) W.L., Gore and Assoc., Inc., Membrane Division, Elkton, MD.
- 150) Cowie R. et al., Makromol, Chem., 143: 105, 1971.
- 151) R.E., Kesting, A Novel Technique for the Study of Dry Process Membranes During Their Nascent Phases, Ion Exch. Membranes, 1: 197, 1974.
- 152) Pitt, W.G., et al., Biomaterials, 9, 36, 1988.
- 153) F.J., Holly and Refojo, M.F., J. Biomed. Mat. Res., 9, 315, 1975.
- 154) Lamke, L.O., et al., Burns, 3, 159, 1977.
- 155) Behar, D., et al., J. Biomed. Mater. Res. 20: 731, 1986.
- 156) Grinnel, F., Milam, M., Sirere, P.A., Arch. Biochem. Biophys., 153, 193, 1972.
- 157) Yasuda, H., J. Biomed. Mater. Res. Vol.12, 701, 1978.
- 158) Tamada, Y., Ikada, Y., Polymers in Medicine, Miglaeresi, 1983.
- 159) Farrar, D.J., et al., J. Tharac Cardiovasc. Surg, 95: 191, 1988.
- 160) Lannerstad, O., et al., Eur. Surg. Res. 19: 6, 1987.

E K - 1

Taramalı Elektron Mikroskopunun (SEM) Çalışma Prensihi

Tungsten bir flamadan ısı etkisi ile yayınlanan elektronlar yüksek voltaj uygulanarak (1-30 kV) hızlandırılır ve elektron demeti bir seri elektromagnetik mercek ile örnek üzerine odaklanır. Yüzeyden çıkan sekonder elektronların oluşturduğu görüntü monitöre aktarılır ve istenen görüntülerin fotoğrafları alınır.

SEM ile incelenecek olan örnekler iletken malzemeler olmalıdırlar. Eğer iletken değillirse, iletken bir metalle, ince bir tabaka halinde (100-500 Å) kaplanması gerekir. Bu kaplama işlemi, yüksek vakum altında gerçekleştirilir. En uygun kaplama malzemeleri, alüminyum, karbon, altın, gümüş ve altın-palladyumdur.

E K - 2

Hücre Sayım Yöntemi

Hücre sayımının amacı, kültür ortamında bulunan hücrelerin sağlıklı olup olmadıklarının belirlenerek hücre veriminin saptanmasıdır.

Çalışmada hücre sayımı, hemositometreyle ve aşağıda verilen yöntem izlenerek yapılmıştır. Sayımı yapılacak hücre çözeltisinden bir test tüpüne 0.9 ml. konulur, üzerine %0,5'lik trypan blue çözeltisinden 0.1 ml. ilave edilerek, oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir. Bu bekleme, ölü hücrelerin veya ölmek üzere olanların boya almalarını sağlamak içindir. Bu süre içinde ölü hücreler boyanarak koyu mavi veya mavi renkte görünürler, sağlıklı ve canlı hücreler, süre ne kadar uzun olursa olsun boya almazlar, görünüşleri parlak ve düzgündür. Sayım için boyanmış hücre karışımından bir damla alınarak, hemositometrede lam ve lamel arasına konur, mikroskopta (0.4x10:400 kez büyüterek) hücrelerin sayımları yapılır. Ölü ve canlı hücreler ayrı ayrı sayılır. Sayma işlemi, ya bütün kareler veya üç büyük kare sayılarak yapılır. Çıkan sayım değeri, sayılmış kare sayısına bölünür. 9 büyük kare sayılmışsa 3'e bölünür, çıkan sayı 10^4 ile çarpılır ve 1ml 'deki hücre miktarı bulunmuş olur.

E K - 3

Hücre Kültür Çalışmalarında Kullanılan Ortam ve Çözeltiler

DME Ortamı :

DME Toz Ortam (GIBCO, ABD)	10.00 gr.
Triptoz Fosfat	10.00 ml.
1 M Tris	2.50 ml.
NaHCO ₃	0.40 ml.
Antibiyotik	0.40 ml.
HCL (1M)	0.15 ml.

PBS (Fosfat Tamponu Çözeltisi) :

NaCl	8.00 gr.
KCl	0.20 gr.
Na ₂ .HPO ₄ .12H ₂ O	2.37 gr.
KH ₂ .PO ₄	0.20 gr.
CaCl ₂	0.10 gr.
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.10 gr.
Destile su	1.00 ml.

Trypan Blue Çözeltisi (%0,5'lik):

Tyrrpan Blue	0,5 gr.
NaCl	100.0 ml.

Tripsin Çözeltisi (%1'lik) :

Tripsin	10.0 gr.
Destile su	1000 ml.

Bir gece + 4⁰C'de eritilir, süzülür, dondurulur.

TOZ DME ORTAMI :

Bileşen	Miktar	Bileşen	Miktar
<u>L-Amino Asitler</u>		<u>Vitaminler</u>	
LArginine	0.4	Choline	29.0
Cystine	0.4	Folik asit	9.1
Glutamine	40.0	İnositol	39.0
Histidine	0.2	Nikotinamid	33.2
Isoleucine	0.8	Pantothenate	17.0
Lisen	0.8	Pyridoksal	20.0
Methionine	0.2	Riboflavin	1.1
Fenilalanin	0.4	Thiamine	1.2
Threonine	0.8	<u>İnorganik Tuzlar</u>	
Tryptophan	0.08	Ca ⁺⁺	1.8
Tirosin	0.4	Mg ⁺⁺	0.8
Valine	0.8	K ⁺	5.4
Leucine	0.8	Na ⁺	160.0
Glisen	0.4	Cl ⁻	120.0
Serine	0.4	NO ₃ ⁻	0.0007
<u>Karbon Kaynağı</u>		SO ₄ ⁻²	0.9
Glukoz	5.5	PO ₄ ⁻³	0.0002

* Vitaminler dışındaki tüm bileşenler milimolar, vitaminler mikromolar olarak verilmiştir.

Hücrelerin Mikroskobik İncelenmesi

Hücre yapışma, yayılma ve üremesi mikroskopla rutin olarak incelenir. Kültür ortamından alınan örnek lam üzerinde mikroskop tablasına yerleştirilir ve uygun büyütmelerde inceleme yapılır. Kültür ortamından alınan örneğin kalıcı olması istenildiğinde, sabitleştirme işlemi uygulanır. Hücreler gerektiğinde uygun boyalarla (kristal viyole, Giemsa, Hematoksin, vb.) boyanarak daha iyi bir inceleme yapılabilir. Sabitleştirme ve boyama işlemleri, aşağıda açıklanmıştır.

Sabitleştirme İşlemi : Sabitleştirme işlemiyle, hücreler yapısal değişikliğe uğramaksızın, uzun süre muhafaza edilebilirler. En çok kullanılan sabitleştiriciler metanol ve etanol'dür, ancak en iyi sonuca glutaraldehit'le ulaşılmaktadır. İşlem şu şekildedir. Hacimce %2-5'lik glutaraldehit çözeltisi (PBS içinde) hazırlanır ve sabitleştirilecek hücreler + 4°C'de bir gece boyunca bu çözelti içerisinde bekletilir. Daha sonra çözelti uzaklaştırılır.

Boyama İşlemi : Yapılan çalışmada hücreler kristal viyole ile boyandıktan sonra mikroskobik inceleme gerçekleştirilmiştir. İşlem şu şekildedir. 1 ml. kültür örneği, vasatı uzaklaştırıldıktan sonra %0.1 oranında kristal viyole içeren 1 ml. 0.1 M sitrik asit çözeltisine ilave edilir, 37°C sıcaklıktaki etüvde 1 saat bekletildikten sonra çözelti uzaklaştırılır ve örnek PBS ile iki kez yıkanır, yıkama çözeltileri uzaklaştırılır.

E K - 5

Yüzey Serbest Enerjisinin Hesaplanması

$$\gamma_{wv} = 72,1 \text{ erg/cm}^2$$

$$\gamma_{ov} = 21,6 \text{ erg/cm}^2$$

$$\gamma_{wv}^d = 21,6 \text{ erg/cm}^2$$

$$\gamma_{wv}^p = 50,5 \text{ erg/cm}^2$$

$$\gamma_{ow} = 50,5 \text{ erg/cm}^2$$

alınarak PU-5 membranı için yüzey serbest enerjisinin hesaplanması aşağıda gösterilmiştir. Hesaplar Casio fx-3600 P marka hesap makinası kullanılarak yapılmıştır.

1 : Oktan-su-katı sistemi

2 : Hava-su-katı sistemi

$$\theta_1 = 76,50^\circ \quad \theta_2 = 73,94^\circ$$

$$K_1 = \frac{\gamma_{ow} \cdot \cos \theta_1 + \gamma_{wv} - \gamma_{ov}}{4}$$

$$K_1 = \frac{50,5 \cdot 0,233 + 72,1 - 21,6}{4} = 15,6$$

$$K_2 = \frac{\gamma_{wv} (1 + \cos \theta_2)}{4} = \frac{72,1 (1 + 0,277)}{4} = 23,0$$

$$\gamma_{sv}^p = \frac{K_1 \cdot \gamma_{wv}^p}{\gamma_{wv}^p - K_1} = \frac{15,6 \cdot 50,5}{50,5 - 15,6} = 22,52 \text{ erg/cm}^2$$

$$\gamma_{sv}^d = \frac{\gamma_{wv}^d \cdot K_2 - \gamma_{sv}^p \left\{ \gamma_{wv}^d \gamma_{wv}^p / (\gamma_{sv}^p + \gamma_{wv}^p) \right\}}{\gamma_{wv}^d - K_2 + \gamma_{sv}^p \left\{ \gamma_{wv}^p / (\gamma_{sv}^p + \gamma_{wv}^p) \right\}}$$

$$\gamma_{sv}^d = \frac{21,6 \cdot 23 - 22,52 \left\{ 21,6 \cdot 50,5 / (22,52 + 50,5) \right\}}{21,6 - 23 + 22,52 \left\{ 50,5 / (22,52 + 50,5) \right\}}$$

$$\gamma_{sv}^d = 11,34 \text{ erg/cm}^2$$

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sv}^p + \gamma_{sv}^d = 22,52 + 11,34$$

$$\gamma_{sv} = 33,86 \text{ erg/cm}^2$$

Hücre Yapışma Kinetiğinin İncelenmesi

BHK 21 hücre soyuna ait fibroblast hücrelerin PU membranların yüzeylerine yapışma kinetiğini, Bölüm 2.11.3.'de verilen matematiksel modele göre incelemek üzere yapılan hesaplamalara, PU-2 membranına ait hesaplar ve sonuçları bir örnek olarak verilmiştir.

Eşitlik 2.15'de

$$Y \equiv \frac{a_{\max}}{x_0 - a_{\max}} \ln \left[\frac{(x_0 - a)/x_0}{(a_{\max} - a)/a_{\max}} \right]$$

$$X \equiv t$$

alınarak X-Y grafiği çizilip elde edilen doğrunun eğiminden başlangıç özgül yapışma hızı k hesaplandı.

Y değerinin hesaplanmasında;

$$x_0 = 7,5 \cdot 10^5 \text{ hücre/3ml.}$$

$$a_{\max} = 5,243 \cdot 10^5 \text{ hücre/3ml.}$$

olarak alındı.

$a_{\max}$ değeri 120. dakikanın sonunda belirlenen yapışmış hücre derişimi değeridir.

$X \equiv t$ (dak)	$a \cdot 10^{-5}$ (hücre/3ml.)	Y
0	0	0,000
60	4,880	2,088
90	5,024	3,132
120	5,243	-

Tablo 6.1. : PU-2 Membranı için Hesaplanan Y Değerleri.

Tablo 6.1.'de verilen Y değerleri Casio fx - 3600 P marka hesap makinasıyla hesaplanmıştır. Daha sonra X-Y değerlerinden yararlanılarak aynı hesap makinası ile "lineer regresyon programı" uygulanmış ve PU-2 membranı için;

$$k = 0,0348 \text{ (dakika}^{-1}\text{)}$$

değeri bulunmuştur.

PU-2 Membranının 60'ıncı Dakikadaki Model a Değerinin Hesaplanması

$$\begin{aligned} k &= 0,0348 \\ a_{\max} &= 5,243 \cdot 10^5 \text{ hücre/3ml} \\ x_0 &= 7,5 \cdot 10^5 \text{ hücre/3ml} \end{aligned}$$

değerleri kullanılmış ve;

$$kt = \frac{a_{\max}}{x_0 - a_{\max}} \left[\ln \frac{x_0 - a}{x_0} - \ln \frac{a_{\max} - a}{a_{\max}} \right]$$

eşitliğinden model a değeri;

$$a = 4,330 \cdot 10^5 \text{ hücre/3ml.}$$

olarak bulunmuştur.

Kan Hücreleri Çalışma Sonuçları

Kan hücreleri derişimleri 0 ve 60'ıncı dakikanın sonunda otomatik sayıcıda sayılmıştır. Sayıcıdan alınan sonuçlar aşağıda verilmiştir.

©1987 COULTER ELECTRONICS LTD.
LUTON, BEDS., ENGLAND

©1987 COULTER ELECTRONICS LTD.
LUTON, BEDS., ENGLAND

CASS NO		LAB NO		ID	
09 / 01 / 90036					
7.2	WBC $\times 10^9/L$	NORMAL VALUES			
5.05	RBC $\times 10^{12}/L$	WBC $\times 10^9/L$			
15.8	HGB g/dL	RBC $\times 10^{12}/L$			
46.3	HCT %	HGB g/dL			
91.6	MCV fL	HCT %			
31.3	MCH pg	MCV fL			
34.2	MCHC g/dL	MCH pg			
12.4	RDW %	MCHC g/dL			
344.	PLT $\times 10^9/L$	RDW %			
8.1	MPV fL	PLT $\times 10^9/L$			
37.9	LYMPH %	MPV fL			
7.5	MONO %	LYMPH %			
54.6	GRAN %	MONO %			
2.7	LYMPH + MONO %	GRAN %			
.5	WBC + GRAN %	LYMPH + MONO %			
3.9	EOS %	WBC + GRAN %			
<.7	BASO %	EOS %			
<.2	REVIEW NCMO-GRAM	BASO %			
COMMENTS		INTERPRETIVE REPORT			
		SEG			
		BAND			
		LYMPH			

KONTROL KAN ÖRNEĞİ

t = 0

CASS NO		LAB NO		ID	
09 / 01 / 90036					
7.2	WBC $\times 10^9/L$	NORMAL VALUES			
5.06	RBC $\times 10^{12}/L$	WBC $\times 10^9/L$			
15.9	HGB g/dL	RBC $\times 10^{12}/L$			
45.4	HCT %	HGB g/dL			
89.7	MCV fL	HCT %			
31.4	MCH pg	MCV fL			
35.0	MCHC g/dL	MCH pg			
12.3	RDW %	MCHC g/dL			
309.	PLT $\times 10^9/L$	RDW %			
8.2	MPV fL	PLT $\times 10^9/L$			
43.1	LYMPH %	MPV fL			
7.1	MONO %	LYMPH %			
49.8	GRAN %	MONO %			
3.1	LYMPH + MONO %	GRAN %			
.5	WBC + GRAN %	LYMPH + MONO %			
3.6	EOS %	WBC + GRAN %			
<.7	BASO %	EOS %			
<.2	REVIEW NCMO-GRAM	BASO %			
COMMENTS		INTERPRETIVE REPORT			
		SEG			
		BAND			
		LYMPH			

t = 60



COULTER COUNTER®
Composite Patient Report Form

TBF 11/87

PATIENT COPY



COULTER COUNTER®
Composite Patient Report Form

TBF 11/87

PATIENT COPY

©1987 COULTER ELECTRONICS LTD.
LUTON, BEDS., ENGLAND

©1987 COULTER ELECTRONICS LTD.
LUTON, BEDS., ENGLAND

CASS NO			
LAB NO		177	
ID			
09/01/90		TEST NO 7	
7.8	WBC -10 ⁹ /L M 4.8-10.8 F 4.2-5.4		
4.02	RBC -10 ¹² /L M 4.7-6.1 F 4.2-5.4		
10.4	HGB g/dL M 14-18 F 12-16		
31.4	HCT % M 40-54 F 37-47		
78.1	MCV fL M 80-94 F 81-99		
25.9	MCH pg M 27-31 F 27-31		
33.1	MCHC g/dL M 33-37 F 33-37		
16.0	RDW % M 11.5-14.5 F 11.5-14.5		
697	PLT -10 ⁹ /L M 130-400 F 130-400		
6.5	MPV fL M 7.4-10.4 F 7.4-10.4		
20.8	LYMPH % M 20.5-51.1 F 20.5-51.1		
1.8	MONO % M 1.7-9.3 F 1.7-9.3		
77.4	GRAN % M 42.2-75.2 F 42.2-75.2		
1.6	LYMPH -10 ³ /L M 1.2-3.4 F 1.2-3.4		
.1	MONO -10 ³ /L M 0.11-0.59 F 0.11-0.59		
6.0	GRAN -10 ³ /L M 4-65 F 4-65		
.	EOS -10 ³ /L M 0.0-0.7 F 0.0-0.7		
<.2	BASO -10 ³ /L M 0.0-0.2 F 0.0-0.2		
COMMENTS			
PU - 5			
t = 0			

CASS NO			
LAB NO			
ID			
09/01/90		TEST NO 7	
7.8	WBC -10 ⁹ /L M 4.8-10.8 F 4.2-5.4		
4.04	RBC -10 ¹² /L M 4.7-6.1 F 4.2-5.4		
10.5	HGB g/dL M 14-18 F 12-16		
32.2	HCT % M 40-54 F 37-47		
79.7	MCV fL M 80-94 F 81-99		
26.0	MCH pg M 27-31 F 27-31		
32.6	MCHC g/dL M 33-37 F 33-37		
15.5	RDW % M 11.5-14.5 F 11.5-14.5		
667	PLT -10 ⁹ /L M 130-400 F 130-400		
6.7	MPV fL M 7.4-10.4 F 7.4-10.4		
20.8	LYMPH % M 20.5-51.1 F 20.5-51.1		
" " " "	MONO % M 1.7-9.3 F 1.7-9.3		
" " " "	GRAN % M 42.2-75.2 F 42.2-75.2		
1.6	LYMPH -10 ³ /L M 1.2-3.4 F 1.2-3.4		
" " " "	MONO -10 ³ /L M 0.11-0.59 F 0.11-0.59		
" " " "	GRAN -10 ³ /L M 4-65 F 4-65		
.	EOS -10 ³ /L M 0.0-0.7 F 0.0-0.7		
.	BASO -10 ³ /L M 0.0-0.2 F 0.0-0.2		
COMMENTS			
t = 60			



COULTER COUNTER®
Composite Patient Report Form

TBF 11/87

PATIENT COPY



COULTER COUNTER®
Composite Patient Report Form

TBF 11/87

PATIENT COPY

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi