

**ÜÇ-BOYUTLU, BİYOBOZUNUR/BİYOBOZUNUR  
OLMAYAN POLİMERİK TAŞIYICILARIN  
BİYOSİNYALLERLE PLAZMA MODİFİKASYONU ve  
HÜCRE KÜLTÜR UYGULAMALARI**

**PLASMA MODIFICATION of 3D,  
BIODEGRADABLE/NONDEGRADABLE POLYMERIC  
CARRIERS by BIOSIGNALS and THEIR APPLICATIONS in  
CELL CULTURE**

**HİLAL TÜRKOĞLU ŞAŞMAZEL**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2007

*„„„ olanaklar sınırsızdır,„„„*

*Eşsiz annem ve babama...*

# ÜÇ-BOYUTLU, BİYOBOZUNUR/BİYOBOZUNUR OLMAYAN POLİMERİK TAŞIYICILARIN BİYOSİNYALLERLE PLAZMA MODİFİKASYONU ve HÜCRE KÜLTÜR UYGULAMALARI

Hilal Türkoğlu Şaşmazel

## ÖZ

Sunulan çalışmada, iki farklı polimerik doku iskelesinin (biyobozunur, poli-ε-kaprolakton, PCL; 3-boyutlu, biyobozunur olmayan dokunmamış poliester fabrik, NWPF) yüzeyinde düşük basınç su/O<sub>2</sub> ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu ile karboksil gruplarının eldesi/zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve ardından oksalil klorür muamelesi ile karboksil gruplarınca zenginleştirilen PCL ve NWPF doku iskeleleri insülin ve heparin biyosinyal molekülleriyle biyolojik olarak aktive edilmişlerdir. Bu doku iskelelerinin L929 fare fibroblast hücre kültürlerinde kullanımı araştırılmıştır.

Tez kapsamındaki çalışmaların ilk aşamasında, iki farklı gözenek yapıcı (PEG<sub>4000</sub> ve sakkaroz) varlığında, gözenekli PCL doku iskeleleri hazırlanmıştır. Bu doku iskelelerinin yüzey ve yığın özellikleri SEM, DSC ve FTIR analizleri ile karakterize edilmiştir. SEM fotoğrafları, gözenek yapıcı olarak PEG<sub>4000</sub> molekülü kullanıldığında mikrogözenekli PCL yapılar elde edilirken, gözenek yapıcı olarak sakkaroz kristalleri kullanıldığında makrogözenekli PCL yapılar ulaşıldığını göstermiştir. Ayrıca SEM fotoğraflarından doku iskelelerinin ortalama gözenek çapları hesaplanmış ve bu değerler % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL ve % 10 Sakkaroz/PCL doku iskeleleri için sırasıyla 40.1 µm ve 191.2 µm olarak bulunmuştur. DSC ve FTIR sonuçları doku iskelesi oluşumu sırasında PEG<sub>4000</sub>-PCL ya da sakkaroz-PCL molekülleri arasında herhangi bir kimyasal etkileşim olmadığını göstermiştir. L929 fare fibroblast hücreleri PCL doku iskeleleri üzerine ekilmiş ve hücre üremesi 7 gün boyunca takip edilmiştir. Hücre kültür sonuçları, % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelesinin sahip olduğu 3-boyutlu yapısı ve makrogözenekliliği sayesinde L929 hücrelerinin üremesi için en uygun doku iskelesi olduğunu göstermiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, PCL ve NWPF doku iskelelerinin atmosferik basınç su/hava ve düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Patentli AER (Array Electrode Reactor) reaktörü örneklerin atmosferik basınçta ve tek basamakta su/hava plazmayla modifikasyonunda kullanılmıştır. Örneklerin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifikasyonu ise üç basamakta ve silindirik, kapasitörle çalışan RF plazma reaktöründe gerçekleştirilmiştir. Modifikasyon basamakları şunlardır; su/O<sub>2</sub> plazma muamelesi, in situ veya ex situ gaz-katı reaksiyonu (oksalil klorür buharı, 500 mTorr, örneğin türüne göre belirlenen sürede) ve hidroliz (açık laboratuvar koşulları, 1 saat). Plazma proseslerinin optimizasyonu DoE (Design Expert 7, Amerika) yazılım programı ile yapılmıştır. Modifiye edilmiş yüzeylerdeki COOH ve OH fonksiyonallikleri miktarsal olarak floresan işaretleme tekniği ve UVX 300G sensör kullanılarak tayin edilmiştir. Piroliz GC/MS analizi ile modifiye edilmemiş, plazmayla modifiye edilmiş ve oksalil klorürle fonksiyonelize edilmiş % 100 PCL yapıların kimyasal yapıları hakkında bilgi edinilmiştir. Plazma modifikasyonu öncesi ve sonrası polimerik yüzeylerin bağlı yüzey atomik bileşimlerinin belirlenmesi için ESCA analizi yapılmıştır. ESCA sonuçları polimerik yüzeylerde atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu sonucu, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonuna göre daha fazla C –OH

yoğunluğu elde edildiğini, fakat prosesin NWPF yüzeyler için daha fazla dekarboksilasyona neden olduğunu göstermiştir. Modifikasyon öncesi, su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve oksalil klorür fonksiyonizasyonu sonrası PCL yüzeylerin mikro ve nano topografisini gözlemlemek için AFM analizleri yapılmıştır. PCL yüzeylerden alınan yüksek çözünürlük AFM görüntüleri (1µm × 1µm), nano desenlerin plazma modifikasyonundan daha çok etkilendiğini göstermiştir. Oksalil klorür fonksiyonizasyonu sonrası HZD fonksiyonize tipte alınan AFM görüntüleri, modifikasyon sonrası yüzeyde oluşan karboksil gruplarının matrisin merkezinden uzaklaştıkça yoğunlaştığını ortaya çıkarmıştır.

Karakterizasyon çalışmalarının ardından, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip oksalil klorürle fonksiyonize edilmiş örnekler insülin ve heparin biyosinyal molekülleriyle biyolojik olarak aktive edilmiştir. Bu biyosinyallerin immobilizasyonu uzatıcı kol PEO (polioksietilen bis amin) varlığında gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon işlemi ESCA analizi ile nitel olarak, floresan işaretleme teknikleriyle miktarsal olarak kanıtlanmıştır.

PCL ve NWPF doku iskelelerinin hücre kültür çalışmaları L929 fare fibroblast hücreleriyle (HÜKÜK NO: 92123004) gerçekleştirilmiştir. Hücre üremesi MTT metoduyla tayin edilmiştir. PCL yapılarla gerçekleştirilen kültürün sonunda, L929 hücrelerinin üremesi için en iyi yüzeyin heparin immobilize edilmiş doku iskeleleri olduğu gözlenmiştir. NWPF doku iskeleleri ile yürütülen hücre kültür çalışmalarında H<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş NWPF yapılarda en yüksek hücre verimine ulaşılmıştır. Bunun nedeninin H<sub>2</sub> plazmayla NWPF yüzeylerde oluşturulan fonksiyonel gruplar ve nanotopografi olduğu düşünülmektedir. Hücrelerin morfolojisi ve doku iskeleleri üzerindeki üremesi ışık mikroskobu ile gözlenmiştir. Ayrıca, CLSM (konfokal lazer taramalı mikroskop) analizi ile hücrelerin doku iskeleleri üzerindeki yayılma ve üremesi incelenmiştir.

Tüm çalışmaların sonucunda, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonunun özellikle PCL yüzeyler için karboksil fonksiyonizasyonunun zenginleştirilmesi açısından daha uygun olduğu bulunmuştur. Hücre kültür çalışmalarının sonuçları ise doku iskelelerine biyolojik molekül immobilizasyonunun hücre yapışma ve üremesi açısından etkin olduğunu, özellikle heparin varlığının hücre üremesini pozitif yönde etkilediğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Poli(ε-kaprolakton), NWPF, düşük basınç plazma, atmosferik basınç plazma, insülin, heparin, L929 fare fibroblast hücreleri, doku mühendisliği.

**Danışman:** Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü.



# PLASMA MODIFICATION of 3D, BIODEGRADABLE/NONDEGRADABLE POLYMERIC CARRIERS by BIOSIGNALS and THEIR APPLICATIONS in CELL CULTURE

Hilal Türkoğlu Şaşmazel

## ABSTRACT

The main purpose of this study was to obtain/enhance COOH functionalities on surface of two different polymeric tissue scaffolds (biodegradable, poly- $\epsilon$ -caprolactone, PCL; 3D, nondegradable non-woven polyester fabric, NWPF) by using atmospheric pressure water/air and low pressure water/O<sub>2</sub> plasma treatments. After low pressure water/O<sub>2</sub> plasma treatment and oxalyl chloride functionalization, COOH functionalized PCL and NWPF tissue scaffolds were biologically activated with insulin and heparin biosignal molecules. Then suitability of these scaffolds for L929 mouse fibroblast cell growth was investigated.

In the first part of study, porous PCL scaffolds were prepared by solvent-casting/particle-leaching technique in the presence of two pore formers (PEG<sub>4000</sub> molecules and sucrose crystals). The surface and bulk properties of the resulting scaffolds were studied by SEM, DSC and FTIR. SEM photographs showed that, macroporosity was obtained in the PCL structures prepared with sucrose crystals while microporous structure was obtained in the presence of PEG<sub>4000</sub> molecules. Average pore diameters calculated from SEM photographs were 40.1  $\mu$ m and 191.2  $\mu$ m for 40 % PEG<sub>4000</sub>/PCL and 10 % Sucrose/PCL scaffolds, respectively. The DSC and FTIR results confirmed that there is no any interaction between pore formers and PCL during structural formation, and both pore formers, PEG<sub>4000</sub> and sucrose, remained independently in the scaffolds. L929 mouse fibroblast cells were seeded onto PCL structures and maintained during 7 days to evaluate cell proliferation. Cell culture results showed that, 10 % Sucrose/PCL scaffold was the most promising substrate for L929 cell growth due to 3-D architecture and macroporous structure of the scaffold.

In the second part of study, atmospheric pressure water/air and low pressure water/O<sub>2</sub> plasma treatments of PCL and NWPF scaffolds were realized. The unique, patented array electrode reactor (AER) reactor was employed for atmospheric pressure water/air plasma treatment of the sample in one step. Low pressure water/O<sub>2</sub> plasma treatment of samples were carried out in a cylindrical, capacitively coupled RF-plasma-reactor in three steps: H<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>-plasma treatment; in situ or ex situ (oxalyl chloride vapors; pressure 500 mTorr; time 10-30 min according to the type of samples) gas/solid reaction to convert –OH functionalities into –COCl groups; and hydrolysis (open laboratory condition; 1 hour) for final –COOH functionalities. Optimization of plasma modification processes was done by using DoE (Design Expert 7, USA) software programme. COOH and OH functionalities on modified surfaces were detected quantitatively by using fluorescent labelling technique and an UVX 300G sensor. Chemical structural information of untreated, plasma treated and oxalyl chloride functionalized 100 % PCL samples were acquired using pyrolysis GC/MS analysis. ESCA analysis was used to evaluate the relative surface atomic compositions and the carbon and oxygen linkages located in non-equivalent atomic positions. ESCA results showed that atmospheric pressure plasma treatment increases much more C – OH

functionalities than vacuum water/O<sub>2</sub> plasma treatment, but causes more decarboxylation for NWPF samples. AFM analysis were carried out on untreated, water/O<sub>2</sub> plasma treated and oxalyl chloride functionalized PCL samples in order to observe micro and/or nano topography of surfaces. Higher resolution images (1µm × 1µm) revealed that nano patterns were more affected than micro patterns by plasma treatments. AFM images recorded with HZD functionalized tips presented that increased density of carboxylic groups at the edge of features on the carboxylic functionalized samples.

After characterization studies, low pressure water/O<sub>2</sub> plasma treated and oxalyl chloride functionalized samples were biologically activated with insulin and heparin biosignal molecules. Immobilization of these biosignals was realized by using spacer PEO (polyoxyethylene bis (amine)). Immobilization procedure was checked qualitatively with ESCA analysis. In addition, fluorescent labelling techniques were used for determination of immobilized biomolecules quantitatively.

The cell culture studies were carried out with L929 mouse fibroblasts [HUKUK (Cell Culture Collection) 92123004]] for both PCL and NWPF scaffolds. MTT method was used for evaluation of cell growth. At the end of the culture, which was performed with PCL structures, it was observed that heparin-immobilized PCL structures were the most promising substrates for L929 cell growth. According to the results of cell culture studies carried out with NWPF structures, highest cell yield was obtained on the H<sub>2</sub> plasma treated NWPF samples. It was considered that functional groups and nanotopography created by H<sub>2</sub> plasma were effective on this achievement. Cell morphology and cell growth on these scaffolds were observed with light microscope. In addition CLSM (confocal laser scanning microscope) analysis was done for observing cell spreading and cell growth.

All these studies indicated the suitability of low pressure water/O<sub>2</sub> plasma modification for carboxylic functionalization of PCL surfaces. The results of cell culture experiments showed that biological molecule immobilization onto tissue scaffolds was effective on cell adhesion and cell growth, specially, the presence of heparin affected cell growth positively.

**Keywords:** Poly(ε-caprolactone), NWPF, low pressure plasma, atmospheric pressure plasma, insulin, heparin, L929 mouse fibroblast cells, tissue engineering.

**Advisor:** Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu, Hacettepe University, Department of Chemical Engineering.

## TEŞEKKÜR

Değerli bilgi ve yardımlarıyla çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesindeki katkılarından dolayı danışmanım, sayın hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na,

Wisconsin/Madison Üniversitesi (Amerika) CPAM (Center for Plasma-Aided Manufacturing) biriminde tez çalışmamın plazma modifikasyonu ve karakterizasyonuna ait bölümünü gerçekleştirmem için bana imkanlarını sunan Dr. Frank Denes'e,

Plazma prosesi ve yüzey karakterizasyonu konusunda hayranlık uyandıran bilgilerini benimle paylaşan ve bana bilimsel konulara farklı bakış açılarından bakmayı öğreten, ayrıca Amerika'da bulunduğum süre içerisinde her konuda dostluğunu sunan yine CPAM biriminde çalışan Dr. Sorin Manolache'ye,

Doktora süresince 4 yıl, 2211-Yurt İçi Doktora Bursu ve 9 ay, 2214-Yurt Dışı Araştırma Bursu kapsamında bana burs sağlayan TÜBİTAK'a,

Akademik hayatımı her zaman destekleyen ve bana duydukları sevgi ve güveni tüm hayatım boyunca hissedeceğim eşsiz aile bireylerime,

Sevgi ve güveniyle varlığını hissettiğim, akademik hayatıma ait kararlarımda bana sınırsız bir özgürlük tanıyan ve bu konuda aldığım her karara saygı duyan sevgili eşime,

Hayatıma girdiği andan itibaren getirdiği renk, hareket ve heyecanla bende bağımlılık yaratan, sevgi yumağı biricik köpeğim Rakı'ya,

Heyecanlı, mutlu, üzgün, kararsız her türlü duygu yoğunluğumu paylaştığım, bana karşı temiz sevgi ve saygılarını hissettiğim ve aynı hisleri duyduğum sevgili Burak ve Sinan'a,

Aynı anda tez döneminde bulunduğum ve yıllar süren bir dostluğu paylaştığım sevgili Belma'ya,

Samimiyetleri ve cana yakınlıklarıyla gönlümde yer kazanan sevgili Anıl, Sezin ve Işıl'a,

*sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunuyorum.*

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER.....	xi
KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Plazma.....	6
2.1.1. Plazma hali.....	6
2.1.2. Plazma kaynakları ve plazma yüzey modifikasyon (PSM) teknikleri.....	7
2.1.2.1. Plazma kaynakları.....	8
2.1.2.1.i. Gaz plazma kaynakları.....	8
2.1.2.1.ii. Vakum ark plazma kaynağı.....	13
2.1.2.1.iii. Lazer plazma kaynağı.....	14
2.1.2.2. Plazma yüzey modifikasyon (PSM) teknikleri.....	15
2.1.2.2.i. Plazma saçılması (sputtering) ve aşınma (etching)/temizleme (cleaning).....	15
2.1.2.2.ii. Plazma implantasyonu.....	17
2.1.2.2.iii. Plazma birikim.....	18
2.1.2.2.iv. Plazmayla püskürtme (PS, plasma spraying).....	21
2.2. Biyomalzemeler ve Yüzey Modifikasyonu.....	22
2.2.1. Biyomalzemeler.....	22
2.2.2. Yüzey modifikasyonu gerekliliği.....	22
2.2.3. Proses.....	24
2.2.4. Plazma prosesinin biyomalzeme yüzey modifikasyonunda sağladığı avantajlar.....	26
2.2.4.1. Yapışmayı arttırmak.....	26
2.2.4.2. Yüzey enerjisinin kontrolü.....	27
2.2.4.3. Biyouyumluluğu arttırmak.....	27

2.2.4.4. Performansı arttırmak.....	27
2.2.4.5. Biyolojik moleküllerin immobilizasyonu.....	28
2.2.4.6. Hücre üremesini desteklemek.....	28
2.2.5. Plazma prosesinin biyomedikal uygulamaları.....	29
2.2.5.1. Biyoayırma.....	30
2.2.5.2. Sterilizasyon.....	31
2.2.5.3. Oküler Protezler.....	31
2.2.5.4. Doku kültürü.....	31
2.2.5.5. Plazma modifikasyonunun ticari avantajları.....	32
2.3. Doku İskeleleri.....	32
2.3.1. Polimerik doku iskeleleri.....	33
2.3.2. Doku iskelesi üretim teknikleri.....	35
2.3.2.1. Fiber bağlama tekniği.....	35
2.3.2.2. Çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniği.....	36
2.3.2.3. Membran laminasyon tekniği.....	38
2.3.2.4. Eriterek kalıplama tekniği.....	39
2.3.2.5. Ekstrüzyon tekniği.....	40
2.3.2.6. Üç-boyutlu baskı tekniği.....	41
2.3.2.7. Gaz köpüklendirme tekniği.....	42
2.3.2.8. Dondurarak/kurutma tekniği.....	43
2.3.2.9. Faz ayrımı tekniği.....	44
2.3.2.10. Polimer/Seramik kompozit köpük hazırlama tekniği.....	44
2.3.2.11. In situ polimerizasyon tekniği.....	45
2.3.2.12. Nano-yapılı ve biyoaktif doku iskelesi üretme tekniği..	47
2.3.2.12.i. Nano-fibröz doku iskeleleri.....	47
2.3.2.12.ii. Nano kompozit doku iskeleleri.....	49
2.3.2.12.iii. Biyoaktif doku iskeleleri.....	49
2.4. Biyosinyal Molekülleri.....	55
2.4.1. İmmobilize biyosinyal ile reseptörü arasındaki biyospesifik etkileşim.....	57
2.4.2. İmmobilize biyosinyallerin etki mekanizması.....	57
2.4.3. Biyosinyal-immobilize malzemelerin uygulamaları.....	58
3. DENEYSEL ÇALIŞMA.....	60
3.1. Kimyasal Maddeler.....	60
3.2. Çözücü-Döküm/Partikül-Uzaklaştırma Yöntemiyle Hazırlanan PCL Doku İskeleleri.....	62

3.2.1. PEG <sub>4000</sub> /PCL doku iskelelerinin hazırlanması.....	62
3.2.2. Sakkaroz/PCL doku iskelelerinin hazırlanması.....	62
3.2.3. Karakterizasyon çalışmaları.....	63
3.2.3.1. PEG <sub>4000</sub> /PCL ve Sakkaroz/PCL doku iskelelerinin kalınlıkları ve uzaklaşan PEG <sub>4000</sub> ve sakkaroz yüzdeleri.....	63
3.2.3.2. PCL doku iskelelerinin morfolojisi.....	63
3.2.3.3. DSC analizi.....	64
3.2.3.4. FTIR analizi.....	64
3.2.4. Hücre kültür çalışmaları.....	64
3.3. Doku İskelelerinin Farklı Koşullarda Oluşturulan Plazmalar İle Modifikasyonu.....	65
3.3.1. PCL doku iskelelerinin plazma ile modifikasyon çalışmaları.....	68
3.3.1.1. PCL doku iskelelerinin düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazmayla modifikasyonu.....	68
3.3.1.2. PCL doku iskelelerinin atmosferik basınç su/hava plazmayla modifikasyonu.....	69
3.3.1.3. Plazma ile modifiye edilen PCL doku iskelelerinin karakterizasyonu.....	69
3.3.1.3.i. PCL yüzeyde oluşan OH ve COOH gruplarının tayini.....	69
3.3.1.3.ii. PCL doku iskeleleri için düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu.....	71
3.3.1.3.iii. PCL doku iskeleleri için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu.....	72
3.3.1.3.iv. ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis) analizi.....	73
3.3.1.3.v. Piroliz gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi [Pyrolysis Gas Chromatography/Mass Spectroscopy (Py GC/MS)].....	73
3.3.1.3.vi. AFM (Atomic Force Microscope) analizleri.....	74
3.3.1.4. PCL doku iskelelerinin biyolojik modifikasyonu.....	75
3.3.1.4.i. PCL doku iskelelerine PEO uzatıcı kol takılması.....	75
3.3.1.4.ii. PCL doku iskelelerine insülinin immobilizasyonu.....	76
3.3.1.4.iii. PCL doku iskelelerine heparinin immobilizasyonu....	76
3.3.1.4.iv. ESCA analizi.....	77
3.3.1.5. Hücre kültür çalışmaları.....	77
3.3.2. NWPF doku iskelelerinin plazma ile modifikasyon çalışmaları.....	79
3.3.2.1. NWPF doku iskelelerinin düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazmayla modifikasyonu.....	79

3.3.2.2. NWPF doku iskelelerinin atmosferik basınç su/hava plazmayla modifikasyonu.....	80
3.3.2.3. Karakterizasyon çalışmaları.....	80
3.3.2.3.i. NWPF yüzeyde oluşan OH ve COOH gruplarının tayini.....	80
3.3.2.3.ii. NWPF doku iskeleleri için düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu.....	80
3.3.2.3.iii. NWPF doku iskeleleri için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu.....	81
3.3.2.3.iv. ESCA analizi.....	82
3.3.2.4. NWPF doku iskelelerinin biyolojik modifikasyonu.....	83
3.3.2.4.i. NWPF doku iskelelerine PEO varlığında insülin ve heparinin immobilizasyonu.....	83
3.3.2.4.ii. ESCA analizi.....	83
3.3.2.5. Hücre kültür çalışmaları.....	83
4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞILMASI.....	85
4.1. Çözücü-Döküm/Partikül-Uzaklaştırma Yöntemiyle Hazırlanan PCL Doku İskeleleri.....	85
4.1.1. PCL Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	87
4.1.1.1. Doku iskelelerinin kalınlığı ve yıkama sonrası PCL doku iskelelerinden uzaklaşan PEG <sub>4000</sub> /Sakkaroz yüzdeleri.....	87
4.1.1.2. FTIR analizi.....	88
4.1.1.3. DSC analizi.....	89
4.1.1.4. PCL doku iskelelerinin morfolojisi.....	90
4.1.2. Hücre Kültür Çalışmaları.....	92
4.2. Doku İskelelerinin Farklı Koşullarda Oluşturulan Plazmalar İle Modifikasyonu.....	94
4.2.1. PCL doku iskelelerinin plazma ile modifikasyon çalışmaları...	97
4.2.1.1. Plazma ile modifiye edilen PCL doku iskelelerinin karakterizasyonu.....	97
4.2.1.1.i. PCL yüzeyde oluşan OH ve COOH gruplarının miktarsal tayini.....	98
4.2.1.1.ii. PCL doku iskeleleri için düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu.....	99
4.2.1.1.iii. PCL doku iskeleleri için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu.....	108
4.2.1.1. iv. ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis) analizi.....	114

4.2.1.1.v. Piroliz gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi [Pyrolysis Gas Chromatography / Mass Spectroscopy (Py GC/MS)].....	116
4.2.1.1.vi. AFM (Atomic Force Microscope) analizi.....	121
4.2.1.2. PCL doku iskelelerinin biyolojik modifikasyonu.....	125
4.2.1.2.i. Biyolojik olarak modifiye edilmiş PCL yüzeylerin kantitatif analizi.....	125
4.2.1.2.ii. ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis) analizi.....	128
4.2.1.3. Hücre kültür çalışmaları.....	130
4.2.2. NWPF doku iskelelerinin plazma ile modifikasyon çalışmaları...	138
4.2.2.1. Plazma ile modifiye edilen NWPF doku iskelelerinin karakterizasyonu.....	138
4.2.2.1.i. NWPF doku iskeleleri için düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu.....	138
4.2.2.1.ii. NWPF doku iskeleleri için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu.....	148
4.2.2.1.iii. ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis) analizi.....	154
4.2.2.2. NWPF doku iskelelerinin biyolojik modifikasyonu.....	156
4.2.2.2.i. Biyolojik olarak modifiye edilmiş NWPF yüzeylerin kantitatif analizi.....	156
4.2.2.2.ii. ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis) analizi.....	159
4.2.2.3. Hücre kültür çalışmaları.....	161
5. GENEL SONUÇLAR.....	169
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	178
EKLER DİZİNİ.....	198
ÖZGEÇMİŞ.....	223



## SİMGELER ve KISALTMALAR

### SİMGELER

$W_i$	Gözenek yapıcıların uzaklaştırılması öncesi doku iskelelerinin ağırlığı
$W_s$	Gözenek yapıcıların uzaklaştırılması sonrası doku iskelelerinin ağırlığı
$\rho^*$	Doku iskelelerinin görünür yoğunluğu
$\varepsilon$	Gözeneklilik
$\rho$	Gözeneksiz doku iskelesinin yoğunluğu
$w$	Siklotron hareketinin frekansı
$e$	Elektronun yükü
$m$	Elektronun kütlesi
$B$	Manyetik alan
$T_c$	Camsı geçiş sıcaklığı
$T_e$	Erime sıcaklığı
$\Delta H_e$	Erime ısısı

## KISALTMALAR

NWPF	Dokunmamış poliestere fabrik
PCL	Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)
LTE	Yerel termal denge
n-LTE	Yerel termal dengede olmayan
PSM	Plazma yüzey modifikasyonu
DC	Doğru akım
RFGD	Radyo frekans yük boşalımı
ECR	Elektron siklotron rezonans
RF	Radyo frekans
ICP	İndükleyici olarak birleşmiş plazma
PST	Plazma püskürtme alevi
PIII	Plazma-daldırma iyon implantasyonu
LA	Lazerle kesme
PS	Plazmayla püskürtme
PHEMA	Poli(hidroksi etil metakrilat)
PVA	Poli(vinil alkol)
FDA	Food and Drug Administration
PLLA	Poli(L-laktik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PGA	Poli(glikolik asit)
FDM	Eriterek birikim modeli
SFF	Katı serbest formu
RP	Hızlı prototiplendirme
PPF	Poli(propilen fümarat)
HA	Hidroksi apatit

NVP	N-vinil prolidon
PMMA	Poli(metil metakrilat)
PVA	Polivinil alkol
PAs	Peptid amfifiller
SBF	Yapay vücut sıvısı
PET	Polietilenteraftalat
PEG	Polietilen glikol
PEO	Polioksietilen bis (amin)
MES	2-N (morfolino) etan sülfat
WSC	1-etil-3(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür
PBS	Fosfat tamponu
BSA	Bovine serum albumin
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
FCS	Fetal calf serum
PS	Polistiren
TCPS	Doku kültürü polistiren
AER	Array Electrode Reactor
DoE	Design of Experiment
ESCA	Electron spectroscopy for chemical analysis
Py GC/MS	Piroliz gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi
GC/MS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi
TIC	Toplam iyon kromatogramı
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
CAChe	Computer Analysis Chemistry

FBS	Fetal bovine serum
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
CLSM	Konfokal lazer taramalı mikroskobu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Düşük basınç gaz yük boşalımında akım-voltaj özellik diyagramı (basınç= 1 Torr).....	9
Şekil 2.2. Radyo frekans yük boşalım plazma kaynağı akım-voltaj diyagramı.	9
Şekil 2.3. Düşük basınç, indükleyici olarak birleşmiş (inductively coupled, ICP) plazma kaynağı.....	10
Şekil 2.4. ECR plazma kaynağının şematik görünümü.....	11
Şekil 2.5. Korona yük boşalım sisteminin şematik olarak görünümü.....	12
Şekil 2.6. Plazma püskürtme alevinin şematik görünümü.....	13
Şekil 2.7. Vakum ark plazma kaynağının şematik görünümü.....	14
Şekil 2.8. Lazer plazma kaynağı.....	15
Şekil 2.9. Polimerik yüzeyin aktivasyonu (a) ve plazma-aşı kopolimerizasyonu (b).....	20
Şekil 2.10. Plazma reaktöründe gerçekleşen plazma yüzey modifikasyonu..	25
Şekil 2.11. Plazma parametreleri.....	26
Şekil 2.12. Hücre üremesini arttırmak için biyomalzemenin modifikasyonu....	29
Şekil 2.13. Hücre-temelli doku mühendisliği yaklaşımı.....	33
Şekil 2.14. a) Örülmüş PLGA doku iskelesi, b) PLGA-kollajen hibrid doku iskelesi, c) PLGA-kollajen hibrid doku iskelesi üzerinde üretilmiş insan fibroblast hücreleri, 1. gün.....	36
Şekil 2.15. a) Tuz-uzaklaştırma tekniğiyle hazırlanmış PLLA köpük doku iskelesinin SEM görüntüsü (Ma, 2004), b) Akışlı kültürde PLLA doku iskelesi üzerinde üretilmiş hematoksilen-eozin (H-E) ile boyanmış hepatosit hücreleri (Török ve ark., 2001).....	38
Şekil 2.16. Membran laminasyon tekniği kullanılarak burun şeklinde hazırlanmış PLLA doku iskelesi (Mikos ve ark., 1993a).....	39
Şekil 2.17. Periferel sinir yenilenmesi için ekstrüzyon tekniği kullanılarak üretilen gözenekli PLLA doku iskelesi.....	41
Şekil 2.18. FDM ile hazırlanmış PCL/CaP doku iskeleleri üzerinde üretilmiş kemik hücreleri: a) PCL doku iskelesinde CaP partiküllerin homojen dağılımı, b) Osteoblastik hücrelerin geniş gözenek aralığında yapışması ve üremesi, c) Yaklaşık 3 hafta sonra doku iskelesi üzerinde yeni dokunun oluşumu.....	42
Şekil 2.19. NaCl ve HA kullanılarak hazırlanmış PLGA kompozit doku iskelesi (NaCl partikül boyutu 300-500 µm arasındadır): a) Ağırlıkça % 70 NaCl kullanılmış doku iskelesi, b) Ağırlıkça % 90 NaCl kullanılmış doku iskelesi.....	46

Şekil 2.20. a) Faz ayrımı tekniği kullanılarak hazırlanan PLLA/THF nano-fibröz yapılar (x500 büyütme), b) x20000 büyütme, c) Sarmal tübüler makrögözenekli PLLA nano-fibröz yapılar (x35 büyütme), (d) x250 büyütme.....	49
Şekil 2.21. Biyomimetik nano doku iskelesi.....	50
Şekil 2.22. Polietilen teraftalat (PET)'in moleküler yapısı.....	53
Şekil 2.23. Poli(ε-kaprolakton)'un kimyasal yapısı.....	55
Şekil 3.1. Paralel plaka soğuk plazma reaktörünün şematik gösterimi; (1) Gaz tankı, (2) Reaktif rezervuarı, (3) RF jeneratörü, (4) Akış kontrolörü, (5) Elektrik yalıtıcı disk, (6) Gaz karışım çemberi, (7) Merdane-tipi paslanmaz çelik üst elektrod (8) Silindirik reaksiyon çemberi, (9) Elektrikle ısıtılan alt elektrod için sıcaklık kontrolörü, (10) Kelebek vana, (11) Paslanmaz çelik sıvı nitrojen kapanı, (12) Mekanik vakum pompası.....	66
Şekil 3.2. Patentli AER reaktörünün fotoğrafı ve şematik olarak gösterimi.....	67
Şekil 3.3. Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazmayla COOH eldesi/zenginleştirilmesi.....	69
Şekil 3.4. Floresan işaretleme ajanlarıyla OH (a) ve COOH (b) fonksiyonel grupları içeren polimerik yüzeyler arasındaki kimyasal reaksiyon.....	70
Şekil 3.5. Si-temelli AFM tiplerinin SiCl <sub>4</sub> plazma modifikasyonu.....	75
Şekil 3.6. Floresamin ve birincil amin grubu arasındaki reaksiyon mekanizması.....	76
Şekil 4.1. PCL yapılara ait FTIR spektrumları: a) % 100 PCL, b) % 40 PEG <sub>4000</sub> /PCL, c) % 20 Sakkaroz/PCL.....	89
Şekil 4.2. PCL yapılara ait SEM fotoğrafları: % 100 PCL; yüzey x60 (a), kesit x500 (b); % 40 PEG <sub>4000</sub> /PCL; yüzey x50 (c), kesit x500 (d); % 10 Sakkaroz/PCL; yüzey x45 (e), kesit x125 (f).....	91
Şekil 4.3. PCL doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üremesi (İnokülasyon yoğunluğu: 5x10 <sup>4</sup> hücre/ml) A; % 100 PCL, B; % 40 PEG <sub>4000</sub> /PCL, C; % 10 Sakkaroz/PCL.....	94
Şekil 4.4. PCL yüzeyde oluşan OH (a) ve COOH (b) yoğunluğuna bağlı olarak floresan işaretleme tekniğinin değerlendirilmesi.....	99
Şekil 4.5. DoE programına göre rastgele seçilen deneysel girdilere karşı elde edilmesi planlanan OH (a) ve COOH (b) fonksiyonallitesi (PCL örneklerin düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma modifikasyonu için).....	101

Şekil 4.6. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve OH fonksiyonalitesi üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Basınç-su akış hızı ilişkisi (a), (a'); Güç-su akış hızı ilişkisi (b), (b'); Zaman-su akış hızı ilişkisi (c), (c'); Zaman-basınç ilişkisi (d), (d'); Zaman-güç ilişkisi (e), (e'); Güç-basınç ilişkisi (f), (f') (PCL örneklerin düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma modifikasyonu için).....	104
Şekil 4.7. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve COOH üzerine etkisi (2 boyutlu grafikler): Basınç-su akış hızı ilişkisi (a), (a'); Güç-su akış hızı ilişkisi (b), (b'); Zaman-su akış hızı ilişkisi (c), (c'); Zaman-basınç ilişkisi (d), (d'); Zaman-güç ilişkisi (e), (e'); Güç-basınç ilişkisi (f), (f') (PCL örneklerin düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma modifikasyonu için).....	105
Şekil 4.8. DoE programına göre rastgele seçilen deneysel girdilere karşı elde edilmesi planlanan OH (a) ve COOH (b) fonksiyonalitesi (PCL örneklerin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu için).....	110
Şekil 4.9. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve OH fonksiyonalitesi üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Akış hızı-güç ilişkisi (a), (a'); Zaman-güç ilişkisi (b), (b'); Zaman-akış hızı ilişkisi (c), (c') (PCL örneklerin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu için).....	112
Şekil 4.10. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve COOH fonksiyonalitesi üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Akış hızı-güç ilişkisi (a), (a'); Zaman-güç ilişkisi (b), (b'); Zaman-akış hızı ilişkisi (c), (c') (PCL örneklerin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu için).....	113
Şekil 4.11. PCL örnekler için yüksek çözünürlük C1s ESCA spektrumları: modifiye edilmemiş (a); atmosferik basınç su/hava plazma ile modifiye edilmiş (b); düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş (c); Oksalil klorür ile fonksiyonalize edilmiş (d). .....	115
Şekil 4.12. Kuvars tüplere kaplanmış ince PCL filmlerin piroliz GC/MS kromatogramı: 0-45 dakika, (a); 0-7.5 dakika (CO <sub>2</sub> , 2.09 dk), (b); 7-10 dakika, (c); 16-22 dakika, (d); 29-40 dakika, (e). TIC: Hilal 35.D; Modifiye edilmemiş % 100 PCL, TIC: Hilal 36.D; Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş % 100 PCL, TIC: Hilal 37.D; Oksalil klorür ile fonksiyonalize edilmiş % 100 PCL.....	117
Şekil 4.13. PCL yapı: doğrusal (a); dallanmış (b).....	120
Şekil 4.14. 4 mer (birim) ve bir yan dal içeren PCL ana zincirinin elektron yoğunluğunun CAChe (Computer Analysis Chemistry) 6 modeli.....	121

Şekil 4.15. % 100 PCL doku iskelelerinin 2 boyutlu AFM görüntüleri: Modifiye edilmemiş, Si tip, geniş alan, düzleştirilmiş topografi (a), türevsel topografi (a <sup>1</sup> ); Modifiye edilmemiş, Si tip, küçük alan, düzleştirilmiş topografi (b), türevsel topografi (b <sup>1</sup> ); Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş, Si tip, geniş alan, düzleştirilmiş topografi (c), türevsel topografi (c <sup>1</sup> ); Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş, Si tip, küçük alan, düzleştirilmiş topografi (d), türevsel topografi (d <sup>1</sup> ); Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş, HZD fonksiyonalize tip, geniş alan, düzleştirilmiş topografi (e), türevsel topografi (e <sup>1</sup> ); Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş, HZD fonksiyonalize tip, küçük alan, düzleştirilmiş topografi (f), türevsel topografi (f <sup>1</sup> ). Geniş alan tarama: 6µm × 6µm, Küçük alan tarama: 1µm × 1µm.....	123
Şekil 4.16. % 40 PEG <sub>4000</sub> /PCL doku iskelelerinin 3 boyutlu AFM görüntüleri: Modifiye edilmemiş, Si tip, geniş alan (a), küçük alan (b); Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş, Si tip, geniş alan (c), küçük alan (d); Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş, HZD fonksiyonalize tip, geniş alan (e), küçük alan (f). Geniş alan tarama: 6µm × 6µm, Küçük alan tarama: 1µm × 1µm.....	124
Şekil 4.17. PCL yüzeylere insülin ve heparinin immobilizasyonu: PCL yüzeyin WSC (suda çözünür karbodiimid, pH 5.0) ile önceden aktivasyonu (a); Aktive edilmiş PCL yüzeye uzatıcı kol PEO'nun takılması (b); Biyolojik olarak aktif moleküllerin immobilizasyonu (c).....	126
Şekil 4.18. PCL örnekler için C1s ESCA spektrumu: modifiye edilmemiş (a); PEO takılı (b); insülin immobilize (c); heparin immobilize (d).....	130
Şekil 4.19. PS petri kaplarında üremiş L929 fare fibroblast hücreleri, 2.gün...	131
Şekil 4.20. PCL doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üremesi. A; Modifiye edilmemiş % 100 PCL, B; Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş % 100 PCL, C; PEO takılı/% 100 PCL, D; İnsülin immobilize edilmiş/% 100 PCL, E; Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL.....	135



Şekil 4.21. PCL doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üremesini gösteren optik fotoğraflar; İnsülin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 2. gün, x10 (a); Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 2. gün, x20 (b); Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 2. gün, x40 (c); İnsülin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 5. gün, x20 (d); Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 5. gün, x20 (e); Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 5. gün, x40 (f).....	136
Şekil 4.22. PCL doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üremesinin konfokal lazer taramalı mikroskobu ile incelenmesi: %100 PCL üzerinde üremiş L929 fare fibroblast hücresi, 4. gün, x40 (a); Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş % 100 PCL, 4. gün, x10 (b); Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş % 100 PCL, 4. gün, x20 (c); Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 4. gün, x10 (d); Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 4. gün, x20 (e).....	137
Şekil 4.23. DoE programına göre rastgele seçilen deneysel girdilere karşı elde edilmesi planlanan OH (a) ve COOH (b) fonksiyonallitesi (NWPF örneklerin düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma modifikasyonu için)..	140
Şekil 4.24. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve OH fonksiyonallitesi üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Basınç-su akış hızı ilişkisi (a), (a'); Güç-su akış hızı ilişkisi (b), (b'); Zaman-su akış hızı ilişkisi (c), (c'); Zaman-basınç ilişkisi (d), (d'); Zaman-güç ilişkisi (e), (e'); Güç-basınç ilişkisi (f), (f') (NWPF örneklerin düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma modifikasyonu için).....	143
Şekil 4.25. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve COOH fonksiyonallitesi üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Basınç-su akış hızı ilişkisi (a), (a'); Güç-su akış hızı ilişkisi (b), (b'); Zaman-su akış hızı ilişkisi (c), (c'); Zaman-basınç ilişkisi (d), (d'); Zaman-güç ilişkisi (e), (e'); Güç-basınç ilişkisi (f), (f') (NWPF örneklerin düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma modifikasyonu için).....	145
Şekil 4.26. DoE programına göre rastgele seçilen deneysel girdilere karşı elde edilmesi planlanan OH (a) ve COOH (b) fonksiyonallitesi (NWPF örneklerin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu için).....	149
Şekil 4.27. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve OH fonksiyonallitesi üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Akış hızı-güç ilişkisi (a), (a'); Zaman-güç ilişkisi (b), (b'); Zaman-akış hızı ilişkisi (c), (c') (NWPF örneklerin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu için).....	150

Şekil 4.28. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve COOH fonksiyonlitesini üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Akış hızı-güç ilişkisi (a), (a'); Zaman-güç ilişkisi (b), (b'); Zaman-akış hızı ilişkisi (c), (c') (NWPF örneklerin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu için).....	151
Şekil 4.29. NWPF örnekler için yüksek çözünürlük C1s ESCA spektrumları: modifiye edilmemiş (a); atmosferik basınç su/hava plazma ile modifiye edilmiş (b); düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş (c); Oksalil klorür ile fonksiyonlize edilmiş (d).....	155
Şekil 4.30. NWPF örnekler için C1s ESCA spektrumu: modifiye edilmemiş (a); PEO takılı (b); insülin immobilize (c); heparin immobilize (d).....	161
Şekil 4.31. NWPF doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üretmesi. A; H <sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş NWPF, B; Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip ardından oksalil klorür ile fonksiyonlize edilmiş NWPF, C; PEO takılı/NWPF, D; İnsülin immobilize edilmiş/NWPF, E; Heparin immobilize edilmiş NWPF.....	164
Şekil 4.32. NWPF doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üretmesini gösteren optik fotoğraflar; Heparin immobilize edilmiş NWPF 2. gün, x20 (a); İnsülin immobilize edilmiş NWPF 2. gün, x20 (b); İnsülin immobilize edilmiş NWPF, 2. gün, x40 (c); Heparin immobilize edilmiş NWPF 4. gün, x10 (d); İnsülin immobilize edilmiş NWPF, 4. gün, x10 (e); İnsülin immobilize edilmiş NWPF, 4. gün, x20 (f).....	165
Şekil 4.33. NWPF doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üretmesinin konfokal lazer taramalı mikroskopu ile incelenmesi: İnsülin immobilize edilmiş NWPF, 4. gün, x10 (a); kesit, x10 (b); Heparin immobilize edilmiş NWPF, 4. gün, x20 (c); kesit, x20 (d); İnsülin immobilize edilmiş NWPF, 4. gün, x20 (e); Heparin immobilize edilmiş NWPF, 4. gün, x40 (f).....	167

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Biyomalzemelerin yüzey modifikasyon teknikleri.....	24
Çizelge 2.2. Biyomedikal alanda plazma yüzey modifikasyonunun uygulamaları.....	29
Çizelge 2.3. Üç-boyutlu doku iskelesi üretim teknikleri.....	51
Çizelge 2.4. Biyosinyal moleküllerinin (büyüme faktörlerinin) gruplandırılması..	56
Çizelge 3.1. PCL örnekler için DoE (düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma prosesi).....	71
Çizelge 3.2. PCL örnekler için DoE (atmosferik basınç su/hava plazma prosesi).....	72
Çizelge 3.3. NWPF örnekler için DoE (düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma prosesi)....	81
Çizelge 3.4. NWPF örnekler için DoE (atmosferik basınç su/hava plazma prosesi).....	82
Çizelge 4.1. Doku iskelelerinin kalınlığı ve yıkama sonrası PCL doku iskelelerinden uzaklaşan PEG <sub>4000</sub> /Sakkaroz yüzdeleri.....	88
Çizelge 4.2. PCL doku iskelelerinin camsı geçiş sıcaklığı (T <sub>c</sub> ), erime sıcaklığı (T <sub>e</sub> ) ve erime ısı (ΔH <sub>e</sub> ) değerleri.....	90
Çizelge 4.3. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan PCL yapılar.....	94
Çizelge 4.4. Su/O <sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş PCL örneklerde maksimum OH ve COOH fonksiyonlitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler.....	107
Çizelge 4.5. Su/hava atmosferik plazmayla modifiye edilmiş PCL örneklerde maksimum OH ve COOH fonksiyonlitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler.....	114
Çizelge 4.6. PCL örnekler için ESCA yüzey taraması sonucu hesaplanan kimyasal bileşimler.....	114
Çizelge 4.7. PCL yapılar için C1s bileşenlerinin alifatik pike (285.0 eV) oranla % dağılımları.....	116
Çizelge 4.8. PCL örneklerin kimyasal yapısı ve bileşenlerin TIC (toplam iyon kromatogramı) GC/MS'deki en yüksek pike (kaprolakton) oranla % dağılımı.....	118
Çizelge 4.9. % 100 PCL yapıya düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma yöntemiyle takılan PEO, ve immobilize edilen insülin/heparin miktarları.....	128
Çizelge 4.10. PCL örnekler için ESCA yüzey taraması sonucu hesaplanan kimyasal bileşimler.....	129
Çizelge 4.11. PCL örnekler için C1s bileşeninin alifatik pike (285.0 eV) oranla % dağılımı.....	130

Çizelge 4.12. Su/O <sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş NWPF örneklerde maksimum OH fonksiyonlitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler.....	146
Çizelge 4.13. Su/hava atmosferik plazmayla modifiye edilmiş NWPF örneklerde maksimum OH fonksiyonlitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler.....	152
Çizelge 4.14. NWPF örnekler için ESCA yüzey taraması sonucu hesaplanan kimyasal bileşimler.....	154
Çizelge 4.15. NWPF yapılar için C1s bileşenlerinin aromatik pike (284.7 eV) oranla % dağılımları.....	156
Çizelge 4.16. NWPF yapıya düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma yöntemiyle takılan PEO ve immobilize edilen insülin/heparin miktarları.....	158
Çizelge 4.17. NWPF örnekler için ESCA yüzey taraması sonucu hesaplanan kimyasal bileşimler.....	159
Çizelge 4.18. NWPF örnekler için C1s bileşeninin aromatik pike (284.7 eV) oranla % dağılımı.....	160

## 1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI

Doku mühendisliği, sentetik ve canlı bileşenleri kullanarak karmaşık insan doku fonksiyonlarını sürdürmeyi, yenilemeyi veya iyileştirmeyi amaçlamaktadır (Langer and Vacanti, 1993). Hücreler ve doku iskelelerinin (hücre-destek malzemesi) geliştirilmesi doku mühendisliğinin en önemli konularını oluşturmaktadır (Ma, 2004). Bu nedenle araştırmacıların çoğu, doku iskelelerini biyolojik olarak aktif moleküllerle (biyosinyal molekülleri) birleştirerek “gelişmiş hibrid doku iskeleleri” elde etmeye yönelik çalışmalara yoğunlaşmışlardır (Lee et al., 2002; Midha et al., 2003; Zhang and Ma, 2004).

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan doku iskeleleri 3-boyutlu yapıda olmalıdır, yüksek yüzey alanına ve gözenekliliğe sahip olup, gerekli yapısal dayanımı da sağlamalıdır (Hutmacher, 2000). Doğal polimerler, sentetik polimerler, seramikler, metaller ve kompozitleri doku iskelesi hazırlanmasında kullanılan malzemeler arasında yer almaktadır (Mironov et al., 2003).

Polimerik matrisler istenilen şekilde üretim kolaylığı, mekanik dayanımları, gözenek yapısının ve mekanik özelliklerinin kontrolü gibi sahip oldukları avantajları dolayısıyla doku iskelesi olarak yaygın kullanıma sahiptirler (Patric et al., 1988). Doku mühendisliği uygulamalarında, sentetik biyobozunur polimerik matrisler (fabrik yapılar v.b.) yapay doku substitüentlerinin geliştirilmesinde kullanılırken, biyobozunur olmayan matrisler hücresele biyolojik ürünlerin üretiminde tercih edilmektedir (Shalaby, 1996). Son yıllarda yapılan çalışmalar, sentetik polimerik matrisleri biyolojik olarak aktif moleküllerle (biyosinyal molekülleri) modifiye ederek hücresele fonksiyonların daha kolay kontrol edilebildiği, hücre üretimi için daha işlevsel biyomalzemeler geliştirmeye yöneliktir (Wissink et al., 2000; Biltresse et al., 2005; Larsena et al., 2006). Bu amaçla çeşitli biyosinyal molekülleri (insülin, transferin, epidermal büyüme faktörü, fibronektin, v.b.) kültür ortamında kullanılmakta ve bu yolla hücre yapışma ve üremesinin arttırıldığı bilinmektedir (Ebara et al., 2004; Klenkler et al., 2005; Hatakeyama et al., 2006). Ayrıca katı polimerik yüzeylere immobilize edilmiş biyosinyal moleküllerin, yüzeye tutunmuş ya da serbest halde kullanılan biyosinyallere nazaran daha aktif oldukları ve dolayısıyla hücre üremesini daha fazla desteklediği bulunmuştur (Ito and Imanishi, 1994). Hücre üremesi biyosinyal molekülü ile reseptörü arasındaki biyospesifik etkileşimden kaynaklanır, dolayısıyla biyosinyal molekülünün etkinliğinde

biyosinyal/reseptör kompleksinin çapraz bağlanması çok önemlidir. Biyosinyal molekülü immobilize edildiğinde, yerel konsantrasyonu artırılarak çoklu-eş zamanlı uyarılar sağlanır, dolayısıyla reseptörlerle kompleks oluşumu meydana gelir ve ardından oluşan bu kompleks yapıların çapraz bağlanması hızlanır.

Mükemmel fiziksel özelliklere sahip pek çok sentetik polimer mevcuttur, fakat bu polimerik malzemelere yukarıda bahsedilen biyosinyal moleküllerinin immobilize edilebilmesi için polimerik yapıların yüzeyinde aktif fonksiyonel grupların (amin ve karboksil grupları gibi) bulunması gerekmektedir (Ikada, 1994). Dolayısıyla bu tür polimerik yapıların yüzeylerinde fonksiyonel grup oluşturmak için spesifik yüzey modifikasyon tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Polimerlerin yüzey modifikasyonu polimerin yığın özelliklerini etkilemeden, ıslak kimya yöntemleri (asidik ortamlar gibi), fiziksel olarak uyarılmış gaz faz reaksiyonları (plazma) ve radyasyon muamelesi (lazer gibi) ile gerçekleştirilebilir (Meyer-Plath et al., 2002; Gümüşderelioğlu and Türkoğlu, 2002; Falconnet et al., 2006; Shanmugaraj et al., 2006).

Plazma modifikasyonu (kuru ortam), ıslak kimya yöntemlerine göre pek çok avantaja sahiptir. Modifikasyondaki reaksiyon mekanizması, gaz fazındaki aktif türlerin modifiye edilen substratla etkileşimine dayanır, dolayısıyla plazma modifikasyonu kuru ortamda gerçekleşmektedir. Yöntemin ıslak kimya yöntemlerine göre en önemli üstünlüğü, polimerin yığın yapısında kalarak biyolojik sistemlere zarar verebilecek polimer-türü-spesifik çözücüler gerektirmemesidir (Denes and Manolache, 2001). Ayrıca, bu proste modifikasyon için çok az miktarda başlangıç malzemesi yeterlidir. Bu da maliyeti önemli ölçüde düşürmektedir. Plazma yöntemi kullanılarak fonksiyonel olarak kontrol edilebilen çok ince kaplamalar yapılabilmektedir. Bu yöntemle istenilen kimyasal fonksiyonallitede ve morfolojide substrat elde edilebilir. Ayrıca plazma yönteminin en önemli özelliklerinden birisi, biyo-güvenli oluşu ve dolayısıyla çevre-dostu olmasıdır.

Literatürde substratların yüzey modifikasyonunda genellikle düşük basınç (1-10 Pa) ya da yüksek vakum gerektiren plazma yöntemleri kullanılmaktadır. Fakat, gerekli düşük basıncı veya yüksek vakumu sağlamak prosesi daha karmaşık hale getirmektedir. Bunun yanısıra pahalı vakum ekipmanlarının gerekliliği maliyeti farkedilir düzeyde arttırmaktadır (Romero-Sanchez and Martin-Martinez, 2005). Bu

nedenle düşük basınç plazma modifikasyonuna alternatif olarak atmosferik basınç plazma yöntemi geliştirilmiştir. Atmosferik basınç plazma yönteminin en büyük avantajı, fabrikler ve ağ yapılar gibi geniş yüzey alanına sahip malzemelerin kolaylıkla modifiye edilebilmesidir. Bunun nedeni proses için düşük basınca (vakum ekipmanına) ihtiyaç olmamasıdır (Denes and Manolache, 2004).

Polimerik yüzeylerin plazma ile aktivasyonunun/fonksiyonizasyonunun iki temel yolla gerçekleştiği bilinmektedir. Bunlardan ilki, polimerik substratın “polimer-oluşturmayan-plazma”ya maruz bırakılması, yani polimerin  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $NH_3$  gibi moleküllerle veya inert gazlarla muamele edilmesidir (Yasuda, 1985). İnter gazların kullanımı polimerik yüzeyde yeniden organizasyonu ve bozunmayı sağlarken, reaktif gazların kullanımıyla orjinal polimerik malzemede yer almayan kimyasal gruplar yüzeye takılabilir. Polimerik yapının enerji yüklü partiküllerle bombardımanı, yüzeydeki kovalent bağların kırılmasına ve böylece polimerik yüzeyde serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Yüzeyde oluşan serbest radikallerin daha sonra aktif plazma türleriyle tepkimeye girmesiyle polimerik yüzeyde kimyasal olarak aktif fonksiyonel gruplar elde edilecektir (örneğin karbonil, karboksil hidroksil ve amino grupları). Polimerik yüzeyde fonksiyonel grup oluşturmanın diğer yolu ise “plazma aracılığıyla aşılama” ya da “plazma destekli fonksiyonizasyon” olarak adlandırılan yöntemdir. Bu yöntem plazma aktivasyonunun ve klasik kimya yöntemlerinin kombinasyonu olarak tanımlanabilir. Genellikle inert gazlar kullanıldığında (argon veya helyum) polimerik yüzeyde serbest radikaller oluşturularak yüzeyin aktivasyonu sağlanır. Plazma aktivasyonunun ardından polimerik yapı doymamış monomerlerle veya istenilen fonksiyonel gruba göre gerekli kimyasallarla muamele edilmektedir (Bogaerts et al., 2002). Literatürde her iki yöneme ait pek çok çalışma mevcuttur (Gupta et al., 2002; Feng et al., 2003; Guruvenket et al., 2004).

Sunulan tez çalışmasında, düşük basınç su/ $O_2$  plazma ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonları kullanılarak iki farklı polimerik doku iskelesi (biyobozunur poli( $\epsilon$ -kaprolakton); PCL ve 3-boyutlu, biyobozunur olmayan dokunmamış poliester fabrik; NWPF) yüzeyinde karboksil gruplarının eldesi/zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, tez kapsamında öncelikli olarak iki farklı gözenek yapıcı (PEG<sub>4000</sub> ve sakkaroz) varlığında, çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniği ile biyobozunur PCL doku iskeleleri

hazırlanmıştır. Hazırlanan PCL doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmalarının ardından gerçekleştirilen L929 fibroblast hücre kültür çalışmaları ile doku iskelelerinin hücre-destek malzemesi olarak uygunluğu test edilmiştir. Çalışmada kullanılan 2214 kodlu NWPF doku iskelesi ticari olarak temin edilmiştir (Old Hickory, Amerika). Bu yapının hücre-destek malzemesi olarak uygunluğu daha önce gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarımızda kanıtlanmıştır (Aslankaraoğlu et al., 1999; Türkoğlu, 2001).

Tez çalışmasında patentli AER (Array Electrode Reactor) reaktöründe gerçekleştirilen atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu ile, PCL ve NWPF polimerik yüzeylerde sadece plazma aktivasyonu ile karboksil grupları elde edilmeye çalışılmıştır. Atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonunda su reaktif olarak, hava ise taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Hava, maliyetinin çok düşük olması ve kompresör ya da diğer basit aletlerden dağıtımının kolay olmasından dolayı çalışmada taşıyıcı olarak seçilmiştir. Ayrıca, havadan kaynaklanan oksijenin de ozon veya oksijensiz radikalleri oluşturarak modifikasyona katkıda bulunacağı düşünülmüştür.

PCL ve NWPF polimerik doku iskelelerine uygulanan düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ise plazma destekli fonksiyonizasyon grubuna girmektedir. Çünkü PCL ve NWPF doku iskeleleri su/O<sub>2</sub> plazma muamelesinin ardından, in situ veya ex situ gaz-katı reaksiyonu (oksalil klorür buharı, 500 mTorr, örneğin türüne göre belirlenen sürede) ve hidroliz (açık laboratuvar koşulları, 1 saat) işlemlerine tabi tutulmuştur. Tez çalışmasında su/O<sub>2</sub> plazmanın seçilmesinin nedeni, plazma muamelesinden hemen sonra yüzeyin hidroksil fonksiyonitesiyle son bulmasıdır. Literatürde farklı gazların kullanıldığı (argon, oksijen) pek çok düşük basınç plazma modifikasyonu uygulamaları mevcuttur (Gupta et al., 2000, Yang et al., 2002). Fakat bu plazmaların uygulandığı yüzeylerde oksijen içeren fonksiyonel grup oluşturmak için sisteme ya tekrar oksijenin gönderilmesi veya yüzeyin belirli bir süre açık havaya maruz bırakılması gerekmektedir, yani plazma prosesi sunulan çalışmada olduğu gibi tek basamakta tamamlanamamaktadır. Ayrıca çalışmada sudan gelen oksijenlerin de modifikasyona katkıda bulunacağı düşünülmüştür. Suyun kullanılmasının bir başka avantajı ise yüzeyde hareketlilik sağlanarak plazma homojenitesinin artırılmasıdır.



Düşük basınç su/O<sub>2</sub> ve atmosferik basınç su/hava plazma proseslerinin optimizasyonu DoE (Design Expert 7, Amerika) software programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plazma modifikasyonları ardından polimerik yüzeylerde oluşan OH ve COOH fonksiyonları, floresan işaretleme tekniği ve UVX-300G sensör (Edmund Optics Co., NJ) kullanılarak miktarsal olarak tayin edilmiştir. PCL ve NWPF yüzeyler plazma modifikasyonları öncesi ve sonrası bağlı yüzey atomik bileşimlerinin belirlenmesi için ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis) analizine tabi tutulmuştur. Ayrıca, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ve oksalil klorür fonksiyonizasyonu öncesi ve sonrası % 100 PCL örneklerin kimyasal yapısı hakkında bilgi edinmek amacıyla Py GC/MS (Piriliz gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi) analizi gerçekleştirilmiştir. PCL yüzeylerin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ve oksalil klorür fonksiyonizasyonu sonrası mikro ve nano topografisinde meydana gelen değişimler AFM (Atomic force microscope) analizi ile gözlenmiştir. Gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları sonucu, atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu ile düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonuna göre polimerik yüzeylerde daha fazla OH yoğunluğu elde edildiği, fakat prosesin daha fazla dekarboksilasyona neden olmasından dolayı yüzeylerde düşük COOH yoğunluğuna ulaşıldığı görülmüştür.

Tez kapsamında son olarak düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve ardından oksalil klorür muamelesi ile PCL ve NWPF yüzeyde oluşturulan karboksil grupları üzerinden uzatıcı kol (polioksietilen bis (amin), PEO) varlığında insülin ve heparin biyolojik moleküllerinin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. PCL ve NWPF yüzeylere immobilize olan biyolojik moleküller ESCA ve çeşitli floresan işaretleme teknikleriyle kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmiştir. Biyolojik olarak aktif hale getirilen ve karakterizasyon çalışmaları tamamlanan bu doku iskeleleri L929 fare fibroblast hücre kültüründe kullanılmıştır.

Yapılan çalışmaların sonucunda, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonunun biyosinyal moleküllerinin polimerik doku iskelelerine immobilizasyonu için uygun bir yöntem olduğu ve bu yöntemle hazırlanan biyosinyal immobilize doku iskelelerinden, biyobozunur olmayan NWPF yapıların doku mühendisliği alanında hücre biyolojik ürünlerin üretiminde, biyobozunur PCL yapıların ise yapay doku substitüentleri olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur.

## 2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, sunulan çalışmanın temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgisi dört ana başlık altında özetlenmiştir. İlk olarak, plazmanın tanımı yapılmış; plazma kaynakları ve yüzey modifikasyon tekniklerine değinilmiştir. İkinci bölümde, biyomalzemelere ve plazma-yüzey modifikasyonunun sağladığı avantajlara yer verilmiştir. Takip eden bölümde, polimerik doku iskeleri ve üretim teknikleri hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir. Aynı bölüm içerisinde tez çalışmasında kullanılan dokunmamış poliester fabrik (NWPF) ve poli( $\epsilon$ -kaprolakton) polimerik yapılara kısaca değinilmiştir. Son bölümde ise biyosinyal molekülleri ve immobilize biyosinyallerin etkinliği anlatılmıştır.

### 2.1. Plazma

#### 2.1.1. Plazma hali

Plazma iyonlaşmış gaz halidir ve içerisinde nötral (yüksüz) türleri, negatif ve pozitif yüklü elektronları içerir (Nasser, 1971; Venugopalan, 1971; Herman, 1988). İyonlaşma derecesi, tamamen iyonlaşmış gazlar için % 100, kısmen iyonlaşmış gazlar için ise  $10^{-4}$ -  $10^{-6}$  arasında değişebilir. Plazma, maddenin katı, sıvı, gaz halinden sonra gelen dördüncü halidir. Evrendeki görünür maddelerin çoğu plazma halindedir. Yıldızlar ve yıldızlar arası boşluklar plazma haline verilebilecek en güzel örnektir. Evrende hali hazırda var olan astro-plazmanın yanısıra, laboratuvarında oluşturulan plazma iki ana gruba ayrılabilir; yüksek-sıcaklık ya da füzyon plazma ve düşük-sıcaklık ya da gaz-yük boşalım plazması.

Genel olarak plazma, termal dengede olan plazma ve termal dengede olmayan plazma olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Termal dengede olan plazmada tüm türlerin (elektronlar, iyonlar, nötral türler) sıcaklıkları aynıdır. Füzyon plazma ve yıldızlar için termal denge söz konusudur. Termal dengede olan plazmanın oluşması için 4000 K ile 20000 K arasında değişen yüksek sıcaklıklara gereksinim duyulur (Lieberman ve Lichtenberg, 1994). Yerel termal denge (LTE, local thermal equilibrium) terimi, sınırlı bir plazma alanında tüm plazma türlerinin sıcaklıklarının aynı olduğunu ifade etmek için kullanılır. Diğer taraftan yıldızlararası plazma termal dengede değildir ve "n-LTE" (non-local thermal equilibrium) olarak adlandırılır. Başka bir deyişle, plazma ortamında elektronların sıcaklığı iyon ve atomların sıcaklığından fazladır. Plazma ortamının termal dengede olması aslında

ortamın basıncıyla ilişkilidir. Gaz basıncı yüksek olduğunda plazma ortamındaki moleküller arasında meydana gelen çarpışmalar sonucu plazma türleri arasında etkin bir enerji transferi oluşur ve termal dengeye ulaşılır. Fakat düşük gaz basıncında plazma ortamında çok az sayıda çarpışma gerçekleşeceğinden ve etkin bir enerji transferi sağlanamayacağından plazma ortamındaki türlerin sıcaklıkları farklı olacaktır. Dielektrik bariyer yük boşalımı ve atmosferik plazma bu kuralın dışındadır. Çünkü plazma ortamında sadece basınç değil, yük boşalım uzunluğu ve elektrodlar arasındaki uzaklık da önemli role sahiptir.

Son yıllarda gaz-yük boşalım (glow discharge) plazması farklı uygulama alanlarında oldukça yaygın hale gelmiştir. Bunun en önemli nedenlerinden birisi plazmanın kontrol edilebilir dış parametreleridir. Bu parametreler 6 grupta toplanabilir;

- Kimyasal girdi (çalışılan gaz; plazmadaki elektron, atom, molekül, iyon ve radikal türlerini belirler)
- Basınç (yaklaşık 0.1 Pa dan atmosferik basınca kadar)
- Elektromanyetik alanın yapısı (plazma türleri tarafından modifiye edilebilir)
- Yük boşalım konfigürasyonu (elektodlu ya da elektropsuz; boşalım hacmi: küçük hacim yüksek sürücü güç demektir ve sonucunda dengeden uzaklaşmaya neden olur)
- Zamana bağlı davranış.

Plazma ortamını oluşturmak için kullanılan plazma kaynaklarına ve literatürde yer alan plazma yüzey modifikasyon tekniklerine aşağıda ayrıntılı olarak yer verilmiştir.

### **2.1.2. Plazma kaynakları ve plazma yüzey modifikasyon (PSM) teknikleri**

Plazma modifikasyonu, biyouyumluluk ve mekanik/kimyasal özellikler gibi yüzey ve malzeme karakteristiklerini değiştirebilir. Değişik malzemelere spesifik özellikler kazandırmak için farklı PSM metotları ve plazma kaynakları kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan plazma kaynakları ve PSM metotları aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

### **2.1.2.1. Plazma kaynakları**

Plazmayı oluşturmak için gaz fazındaki atomlardan ve moleküllerden elektronları koparmak ya da iyonizasyon gereklidir. Eğer bir atom ya da molekül dışarıdan uygulanan uyarılma kaynağından yeterli enerjiyi kazanırsa ya da birbirleriyle çarpışarlarsa (etkileşime girerlerse) *iyonizasyon* meydana gelir. Pek çok plazma kaynağı mevcuttur fakat gaz, metalik ve lazer-temelli plazma kaynakları bunların en genelleridir. Elektron sıcaklığı ve yoğunluğu, iyon sıcaklığı ve homojenite gibi plazma kaynaklarının temel özellikleri aşağıda tartışılmıştır.

#### **2.1.2.1.i. Gaz plazma kaynakları**

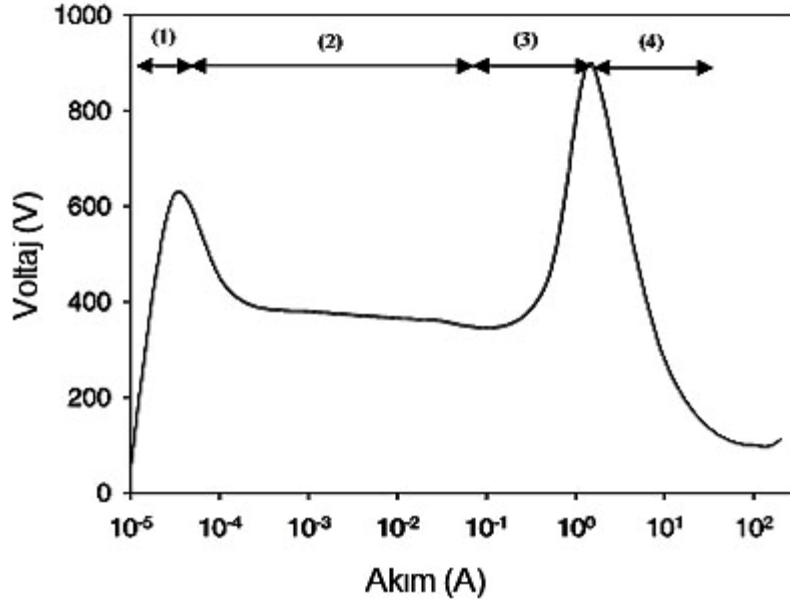
Gaz plazma genellikle gaza bir gerilim (potansiyel) uygulanarak sağlanır ve bozulma (breakdown) potansiyeli basınca ve yük boşalım boşluğunun genişliğine bağlıdır. Basınç 0.7 Torr olduğunda bozulma potansiyeli minimum değerdedir ve bu değerden sapma kritik bozulma elektrik alanının artmasına neden olur.

Düşük basınç gaz yük boşalımında, akım ve voltaj arasındaki ilişki 4 bölgede incelenebilir; 1) karanlık bölge ya da Townsend yük boşalımı bölgesi (kivılcımın tutuşmasından önceki bölge) ; 2) normal kızıl bölge; 3) anormal kızıl bölge; 4) ark yük boşalımı (plazmanın oldukça iletken olduğu bölge) (Chapman, 1980) (Şekil 2.1).

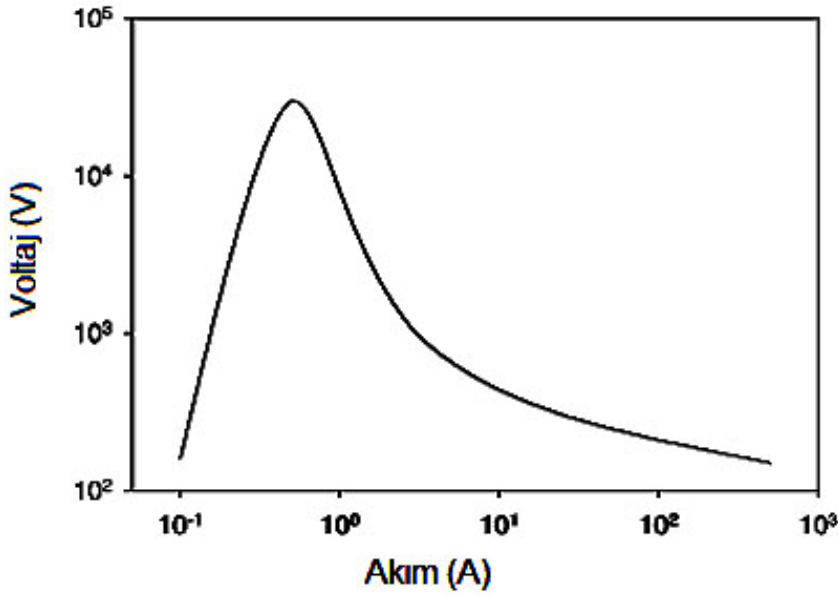
Doğru akım (dc), radyo frekans yük boşalımı (RFGD) ve elektron siklotron rezonans (ECR) gibi çoğu düşük basınç plazma kaynağı, çok düşük basınçta çalışır ve böylece akım daha kolay kontrol edilebilir ve bozulma elektrik alanı daha küçüktür. Düşük basınçta çalışan plazma kaynakları elektron yoğunluğunun iyi bir şekilde kontrol edildiği, geniş bir alanda homojen plazma ortamı oluşturabilir.

Atmosferik basınçta ise akım-voltaj özellik diyagramı Şekil 2.2'de verildiği gibidir. Yük boşalımı iki bölgeye ayrılabilir; 1) Korona yük boşalımı (yük boşalım akımı oldukça düşük); 2) Ark yük boşalımı (gazın oldukça iletken hale geldiği ve akımın artmasıyla voltajda ani düşüşler meydana geldiği durumda gerçekleşir).

Ark yük boşalımı yaygın olarak kaynak yapma, kesme ve plazma püskürtme proseslerinde kullanılmaktadır (Raizer, 1991). Ayrıca atmosferik basınçta gerçekleşen korona boşalımı ve ark plazma da biyomedikal mühendisliğinde kullanılmaktadır.



Şekil 2.1. Düşük basınç gaz-yük boşalımında akım-voltaj özellik diyagramı (basınç= 1 Torr).

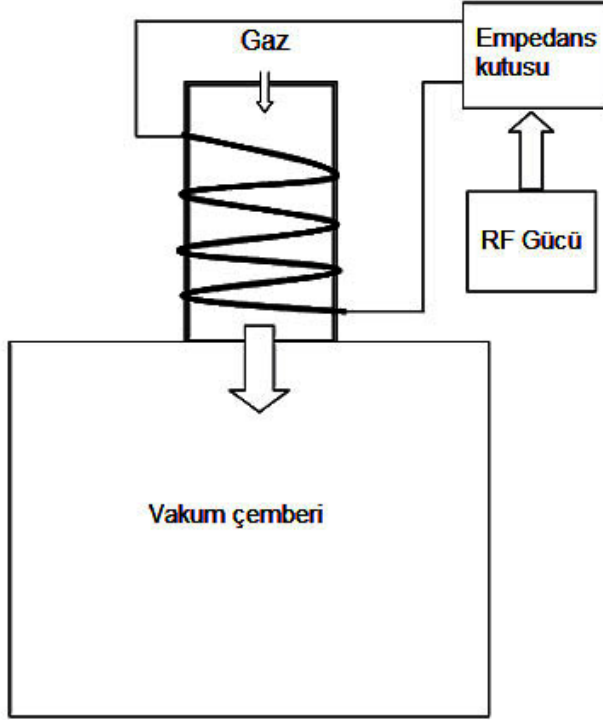


Şekil 2.2. Radyo frekans yük boşalım plazma kaynağı akım-voltaj diyagramı.

### **Radyo frekans (RF) yük boşalım plazma kaynağı**

En çok kullanılan PSM kaynağıdır çünkü geniş hacimde kararlı plazma oluşturulabilir. RF yük boşalımı RF gücünün yükle birleşme metotuna göre iki gruba ayrılabilir; Sığa (capacitive) ve indükleyici (inductive) birleşme. İki mod da iç ya da dış elektrodlarla kullanılabilir. Dış mod olarak genellikle kuvars ya da borosilikat camdan yapılan yük boşalım tübü kullanıldığında elektrod malzemesinden kaynaklanan safsızlıklar indirgenmiş olur ve bu avantajı nedeniyle

RF plazma kaynaklarında yaygın olarak kullanılan bir birleşme modudur. Şekil 2.3'de tipik düşük basınç, indükleyici olarak birleşmiş (inductively coupled, ICP) plazma kaynağı görülmektedir.



Şekil 2.3. Düşük basınç, indükleyici olarak birleşmiş (inductively coupled, ICP) plazma kaynağı.

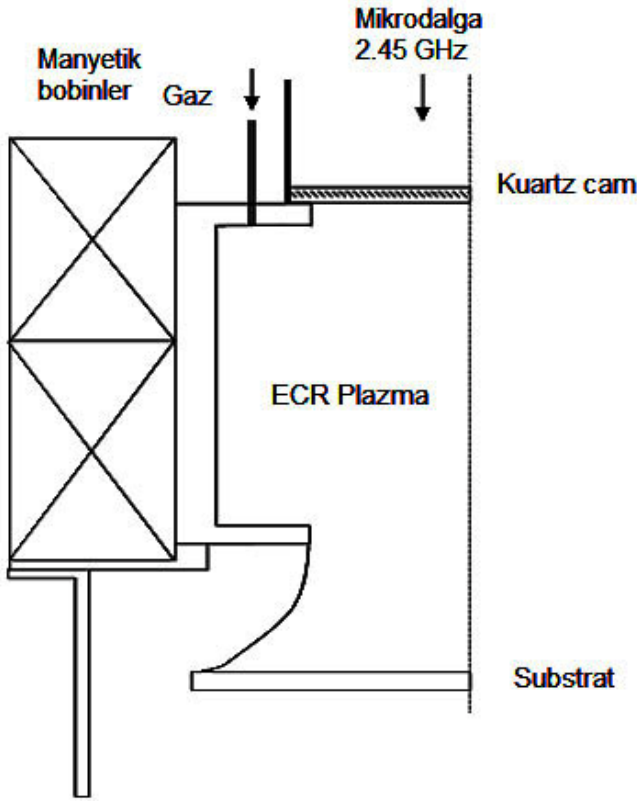
Genellikle RFGD plazmada 13.56 MHz kullanılmaktadır. Basınç, yük boşalımı boyunca  $10^{-3}$  ve 100 Torr arasındadır (Raizer et al., 1995). Düşük basınçta ( $10^{-3}$ -1Torr) elektron yoğunluğu  $10^9$ - $10^{11}$   $\text{cm}^{-3}$  aralığında iken, orta basınçta (1-100 Torr) elektron yoğunluğu  $10^{12}$   $\text{cm}^{-3}$ 'e ulaşır. Elektron sıcaklığı birkaç eV ve iyon sıcaklığı oldukça düşüktür. RF plazmanın plazma homojenitesi de oldukça iyidir.

### **Elektron siklotron rezonans (ECR) plazma kaynağı**

Yüksek yoğunluk elektron siklotron plazma düşük basınçta oluşturulabilir. Mikrodalga gücü plazma çemberine kuvars pencereden girer. Plazmaya manyetik alan uygulandığında elektronlar manyetik alan çizgileri civarında helikal yörünge oluşturacak şekilde dönmeye başlarlar. Şekil 2.4'te ECR plazma kaynağı şematik olarak görülmektedir. Elektrik alanın olmadığı durumda siklotron hareketinin frekansı,  $\omega$  aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanır.

$$\omega = eB/m \quad (2.1)$$

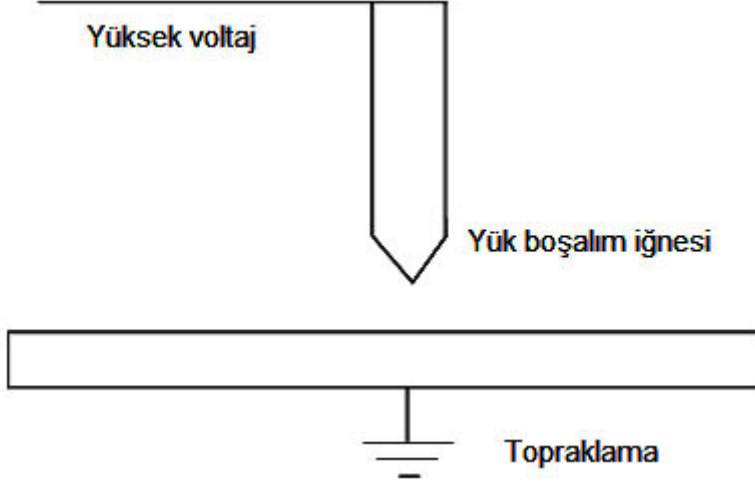
Burada sırasıyla  $e$  ve  $m$  elektronun yükü ve kütlesini,  $B$  ise manyetik alanı ifade etmektedir. Yüksek yoğunluk, plazma elektronların plazma ortamında tutuklanmasıyla elde edilen iyonizasyon etkisinin artırılmasıyla sağlanır. ECR plazma kaynağı genellikle  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  Torr basınç aralığında çalışır. Kolaylıkla  $10^{11}$   $\text{cm}^{-3}$  elektron yoğunluğuna ulaşılır. Fakat ECR plazmanın dezavantajları olarak, plazma dağılımı homojen değildir ve elektron sıcaklığı iyonunkinden daha yüksektir (Asmussen, 1989; Wilhelm, 1993; Wilhelm 1999).



Şekil 2.4. ECR plazma kaynağının şematik görünümü.

### **Korona yük boşalımı plazma kaynağı**

Korona boşalımı, Townsend yük boşalımı ya da alana ve potansiyel dağılıma bağlı negatif yük boşalımı olarak düşünülebilir. Şekil 2.5'de nokta/düzlem korona yük boşalım sistemi şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.5. Korona yük boşalım sisteminin şematik olarak görünümü.

Anodun yanındaki elektrik alanı (yüksek voltaj) oldukça güçlüdür, çünkü elektrod uzaklığıyla karşılaştırıldığında anot oldukça küçük karakteristik boyuta sahiptir. Eğer anodun karakteristik boyutu katodunkine eşdeğer olursa, kablolar arasındaki voltaj korona yük boşalımı yerine kıvılcım üretir. Anoda uygulanan voltaj birkaç kVs' den fazladır ve yük boşalım akımı  $10^{-10}$ - $10^{-4}$  A arasında değişir. İğnenin yakınlarındaki plazmada, yüklü türlerin yoğunluğu uzaklığın  $10^{13}$ - $10^9$   $\text{cm}^{-3}$  arasında değişmesiyle azalır. Plazma içindeki elektron sıcaklığı ortalama 5 eV' dur ve iyon sıcaklığı oldukça düşüktür. Tek nokta/düzlem (single point/plane) korona yük boşalımı malzeme prosesinde sınırlı uygulamaya sahiptir. Bu problemin üstesinden gelmek için elektrodların iki boyutlu dizilimi çalışmaları yapılmaktadır (Akishev et al., 2001; Cernak et al., 1998; Raizer, 1991).

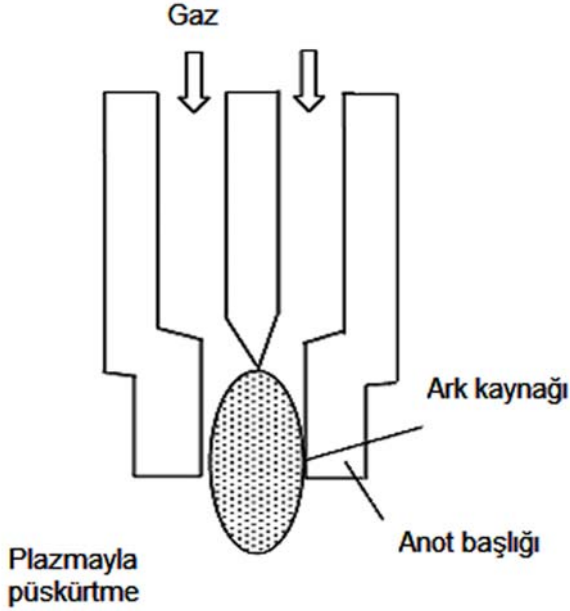
### **Atmosferik ark plazma kaynağı**

Biyomalzeme alanındaki araştırmalarda en yaygın olarak kullanılan atmosferik ark plazma kaynağı *plasma spray torch (PST, plazma püskürtme alevi)*'dir. PST daraltıcı olarak işlev gören nozzle (meme) şeklinde anot içerir. Şekil 2.6'da PST'nin şematik görünümü verilmiştir.

Plazma ateşini sağlamak için, yük boşalım akımı ve güç yoğunluğu oldukça yüksek olmalıdır. Elektriksel olarak iletken olan gaz  $T > 8000$  K ve  $10^5$  Pa 'da katot ve anot arasında plazma oluşur. Plazma ateşinde elektron yoğunluğu  $10^{16}$ - $10^{19}$   $\text{cm}^{-3}$ , elektron sıcaklığı 7.0-9.0 eV arasında değişir fakat iyon sıcaklığı 0.3-0.9 eV'un altındadır. Plazma akış hızının (yaklaşık  $1 \times 10^3$  m/s) ve sıcaklığın yüksek olmasından dolayı hemen hemen tüm katı partiküller eriyebilir ve böylece yüksek



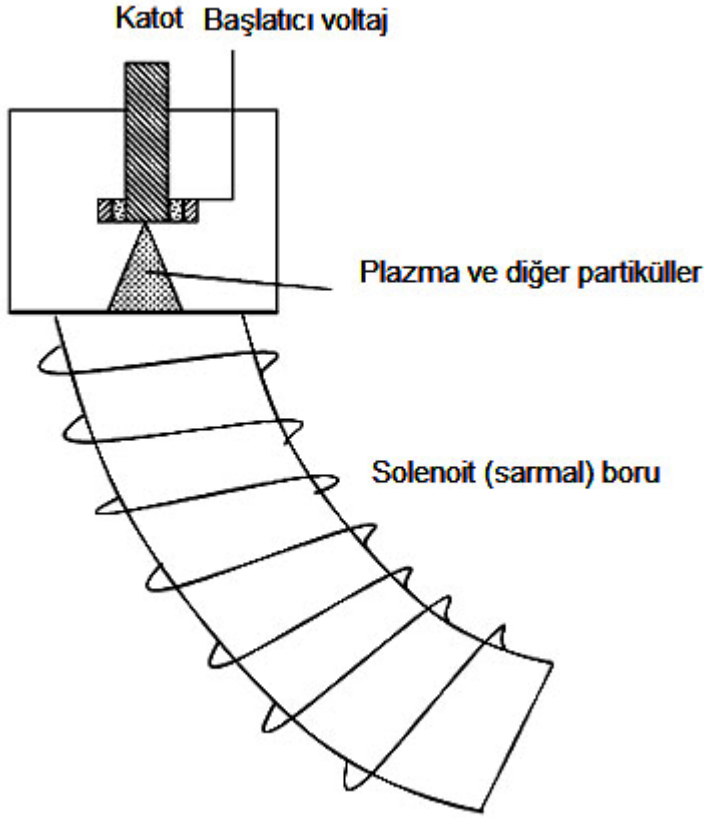
akış hızına ulaşılabilir. Bu avantajından dolayı atmosferik plazma alevi plazma püskürtmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Mac Rae, 1989; Roth et al., 2000; Goossens et al., 2001).



Şekil 2.6. Plazma püskürtme alevinin şematik görünümü.

#### 2.1.2.1.ii. Vakum ark plazma kaynağı

Genellikle vakum ark plazma kaynağı iki kısımdan oluşur; plazma üretim birimi ve makro-partikül filtre (Şekil 2.7). Tetikleyici elektroda birkaç kVs kadar yüksek bir voltaj uygulandığında katot ve anot arasındaki ark yük boşalımı tutuşur. Ark yük boşalım akımı, katot yüzeyinde oldukça yüksek yoğunlukta ( $10^{12}$  A/m), durgun olmayan katodik noktalar oluşturur. Yüksek akım yoğunluğu son derece yüksek yerel güç yoğunluğu ( $10^{13}$  W/m) ile bağlantılıdır. Son iyon hızı hafif ve ağır elementlere bağlı olarak  $0.5-2.0 \times 10^4$  m/s aralığında değişir. Katodik ark prosesinin en önemli avantajı, hemen hemen elektriksel olarak iletken her türlü malzemenin katot olarak kullanılabilmesidir. Katot bölgesindeki plazmada elektron yoğunluğu  $10^{20}$   $\text{cm}^{-3}$ 'e ulaşabilir. Fakat yüksek plazma akı hızından dolayı, aktarım prosesinde difüzyonun etkisi vardır ve plazma akısı aksiyal ve radyal doğrultuda düzenli değildir (Francis, 1956).



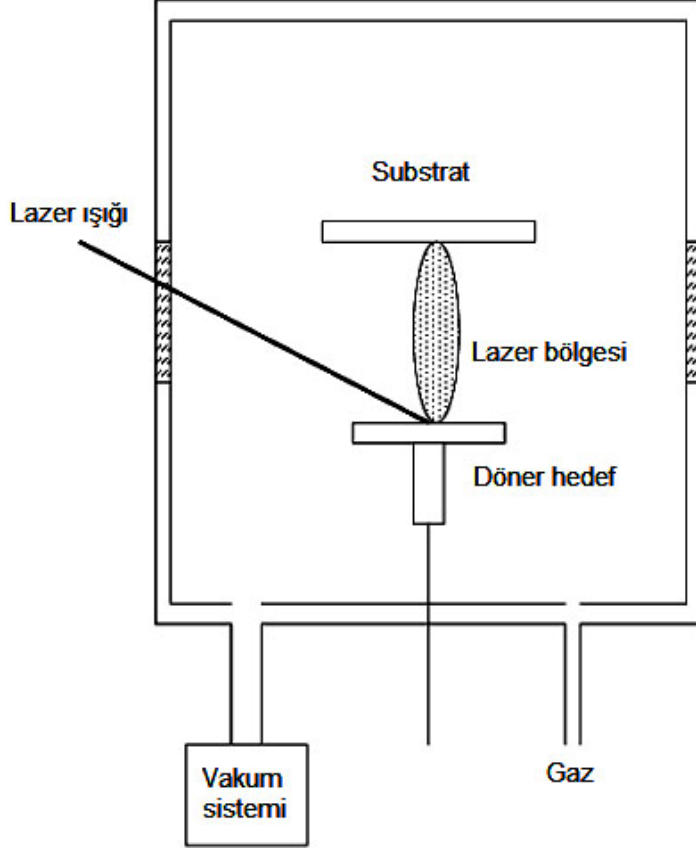
Şekil 2.7. Vakum ark plazma kaynağının şematik görünümü.

### 2.1.2.1.iii. Lazer plazma kaynağı

Plazma, yüksek yoğunluk lazer titreşimleri ve katı hedef rasındaki etkileşim sonucu oluşur. Şekil 2.8'de lazer plazma kaynağının şematik görünümü verilmiştir.

*İki türü mevcuttur:*

- 1) *Düşük lazer akışı;* Lazer titreşimleriyle üretilen buhar ince bir ortam görevi görür ve lazer tanecikleri bu buharın içinden geçer. Bu durumda, sıvı metal tarafından buharlaşma oluşturulur ve katı hedefin içindeki ısı iletimi enerji kaybına neden olur. Ultra kısa lazer titreşimlerinin akış eşik değeri  $0.1-0.2 \text{ J/cm}^2$  aralığındadır.
- 2) *Yüksek lazer akışı;* Buhar sıcaklığı uygun atomik uyarılmayı ve iyonizasyonu sağlayacak kadar yeterlidir. Bu durumda, buhar yüzeye düşen lazer ışını absorplar ve plazmanın oluşmasına neden olur. *İki tür lazer absorpsiyon mekanizması söz konusudur; Ters Bremsstrahlung (IB) ve direk foto iyonizasyon (PI).* IB kızıl ötesinde, PI ise görünür ve UV ışıktadır.



Şekil 2.8. Lazer plazma kaynağı.

Lazer absorpsiyonu boyunca lazer yoğunluğu  $10^8$ - $10^{10}$  W/cm<sup>2</sup> derecesindedir. Lazer ışını absorplayan metalik ve kompozit hedefler kullanılır. Gazın sisteme gönderilmesiyle eş zamanlı olarak gaz plazma üretilir. Hedef ve substrat arasındaki uzaklığa bağlı olarak elektron yoğunluğu logaritmik olarak azalır ve maksimum değeri  $10^{18}$ - $10^{20}$  cm<sup>-3</sup> civarındadır. Elektron sıcaklığı 1-5 eV aralığında ve iyon sıcaklığı da yaklaşık aynı civardadır. Fakat sistemin dezavantajı olarak, hedefin önündeki alanda plazma oluşumu düşüktür ve plazma akı hızı çok yüksektir, dolayısıyla geniş alanda homojen plazma elde etmek oldukça zordur (Gerstenberger et al., 1980; Wilson and Hawkes, 1987; Little, 1999; ).

### **2.1.2.2. Plazma yüzey modifikasyon (PSM) teknikleri**

#### **2.1.2.2.i. Plazma saçılması (sputtering) ve aşınma (etching)/temizleme (cleaning)**

Plazmayla saçılma ve aşınma/temizleme prosesinde, yüzeydeki safsızlıklar kimyasal reaksiyonla uçucu ürünler haline getirilerek ve fiziksel saçılma ile yüzeyden uzaklaştırılır. Malzemelerin yüzeyini temizlemek için argon ve neon gibi inert gazlar kullanılır. Argon ucuz olması ve saçılma veriminin fazla olmasından

dolayı Şimdiye kadar en çok kullanılan inert gazdır. Plazma saçılması oldukça basit plazma yüzey modifikasyon metotudur. Saçılma prosesi boyunca, yaklaşık 1 kV'den birkaç kV'ye kadar negatif voltaj substrata uygulanır. RFGD ya da ECR kaynağı ile argon plazması oluşturulur. İyonlar uygulanan elektrik alanla substrata doğru hızlandırılır. Enerji çok yüksek olmadığı için argon iyonları substratın derinlerine gidemez ve malzemeyle elastik/elastik olmayan çarpışmalar sonucu enerjilerinin büyük bir kısmı yüzey atomlarına transfer edilir. Bazı yüzey atomları yeterli enerjiyi kazanacak ve substrattan kaçıp vakum çemberine gidecektir. Atomların ilk tabakası saıldıktan sonra, alttaki tabaka ortaya çıkar ve yavaş yavaş bu tabaka aşınmaya başlar. Yeterli saçılma zamanıyla yüzey kirliliği yok edilir (Grill, 1994). Bu proses, implantasyon ve birikim modifikasyonları için ön-işlem olarak uygulanabilir.

Plazma ve polimer arasındaki etkileşim yarıŐmalı iki tepkimeye yol açar; *modifikasyon ve bozunma*. Modifikasyonun etkileri baskın çıkarsa, polimerin özellikleri iyon-tanecik etkileşimi, plazma-aşı kopolimerizasyonu ve plazma polimerizasyonundan dolayı deđiŐecektir. Eğer bozunma baskın olursa, polimer yüzeyinde aşınma oluşur. AŞınma polimerin yüzeyinde meydana gelen bozunma reaksiyonudur ve polimer uzun süre plazmaya maruz kalırsa polimer yüzeyi aŐınır. Kütle kaybı polimerin doğasına olduğu kadar plazma enerjisine de bağlıdır. Eter, karboksilik asit ve ester gruplarına sahip polimerlerin plazma hassasiyeti yüksek, poliolefin gibi polimerlerin ise plazma hassasiyeti düşüktür. Polimerin i tabakalarında kütle kaybı az, st tabakalarında fazladır. Bu nedenle plazmayla aşınma prosesine tabi tutulan polimer işlem sonunda baŐlangıçtaki kimyasal ve fiziksel özelliklerine benzer özellikler sergiler. Modifiye edilen polimerin elementel bileşimi, kimyasal yapısı, polimerizasyon derecesi ve kristalinitesi hemen hemen hiç deđiŐmez ve modifiye edilmemiş polimerinkiyle benzerdir. AŞınma prosesindeki kütle kaybı polimerin bağlarının kopması ve plazma modifikasyonu sonrası polimer zincirinde oluşan serbest radikallerin tepkimesi sonucudur. Polimer plazmaya maruz kaldığında kimyasal aşınma prosesinin yanında fiziksel saçılma da sıklıkla görülmektedir (Inagaki, 1996).

### **2.1.2.2.ii. Plazma implantasyonu**

Elementler implantasyonla malzeme yüzeyine termodinamik zorlamalar olmadan takılabilir. Metaller, alaşımlar ve polimerlere plazma implantasyonu aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

#### **Plazma-daldırma iyon implantasyonu (PIII, plasma immersion ion implantation)**

Biyomalzeme mühendisliğinde özellikle metal ve alaşımlar için PIII'nın pek çok uygulaması mevcuttur. Bu yöntemin en önemli avantajı spesifik hedef manipülasyonuna gerek duymadan komplike malzemelerin homojen bir şekilde modifiye edilebilmesidir. Ayrıca, vakum ortamını bozmadan sadece enstrümantal parametreleri değiştirerek eş zamanlı ve ardışık implantasyon, birikim ve aşınma proseslerini gerçekleştirmek mümkündür. İmplantasyon genellikle düşük sıcaklıkta gerçekleştiğinden, hedef soğutulabilir ve böylece termal deformasyon minimize edilir. PIII'da gaz plazma dc, kapasitans/indüktans RFGD ve ECR plazma kaynağından üretilebilir. PIII; malzemenin korozyon direnci, yıpranma direnci ve sertliği gibi yüzey özelliklerini iyileştirmek için kullanılan etkili bir yöntemdir. Ayrıca bu proses malzeme yüzeyine film birikimi için ön basamak olarak da kullanılmaktadır. Malzemeye uygun gaz ve/veya metalik elementlerin implante edilmesiyle film yapışması artırılabilir ve en önemlisi yüzeye birikimi gerçekleştirilen malzeme ile yığın yapı arasındaki termal gerilimler azaltılabilir (Conrad et al., 1987; Grill, 1994). Tanecik-çizgi (beam-line) iyon implantasyonu ile karşılaştırıldığında PIII ile kompleks geometrilerdeki malzemelerin modifikasyonu mümkündür fakat proses optimizasyonu yapılmadığı takdirde yeterli homojenite sağlanamaz. Homojeniteyi, plazma yoğunluğu, uyarı genişliği ve uygulanan voltajla ayarlamak mümkündür (Deb et al., 1994).

#### **Polimerlerin plazma implantasyonu (yüzey aktivasyonu ve fonksiyonallazasyon)**

Polimerler plazmaya tabi tutulduğunda eğer plazma yoğunluğu ve muamele süresi uygunsa yüzeyde yoğun fonksiyonallite ya da çapraz bağlı polimer zincirleri oluşturulabilir (Kern et al., 1978; Shen et al., 1979; Agostino, 1990; Yasuda, 1990). Tipik bir plazma implantasyon prosesinde, öncelikle hidrojen molekülü polimer zincirinden ayrılır ve polimer zincirinin orta noktasında radikalleri oluşturur ve oluşan bu radikaller plazma gazı tarafından oluşturulan basit radikallerle birleşerek

yüzeyde oksijen ya da nitrojen fonksiyonallitesi oluşturur. İyonlardan ziyade plazma bölgesinde oluşturulan radikal türler implantasyon prosesinde önemli rol oynarlar. Polimerik malzemelerin plazma prosesi ile ıslatılabilirlikleri (hidrofilisite/hidrofobisite), yapışma özelliği ve biouyumlulukları ayarlanabilir (Goossens et al., 2001). İyon implantasyonu ile yüzeyde oksijen fonksiyonallitesi oluşturmak en önemli ve etkili yüzey modifikasyonu proseslerinden biridir. Polimerik yüzeyi hidrofilik hale getirmek için genellikle oksijen plazma kullanılmasına rağmen, karbondioksit, karbon monoksit, azot dioksit ve azot oksit plazma türleri de kullanılmaktadır. Hidrofilisiteyi arttırmak için yüzeyde oksijen fonksiyonallitesi oluşturmak yerine klorür grupları yaratmak için  $CF_2C$  ve  $CCl_4$  plazma da uygulanabilir. Ayrıca yüzeyin hidrofobisitesi arttırılmak istenirse  $SF_6$ ,  $CF_4$ ,  $C_2F_6$  gibi aşırı derecede florlanmış bileşenler plazma gazları olarak kullanılabilir (Inagaki, 1996).

### **2.1.2.2.iii. Plazma birikim**

Biyomalzeme mühendisliğinde önemli yer tutan plazma birikim prosesi 4 gruba ayrılabilir. Aşağıda bu prosesler hakkında ayrıntılı bilgiye yer verilmiştir.

#### **Dual plazma birikimi**

Dual plazma birikimi PIII'den türetilen yeni bir teknolojidir. Bu proseste, gaz ve metal plazma eş zamanlı olarak sırasıyla RFGD kaynağı ve vakum ark plazma kaynağı kullanılarak üretilir. Dual plazma birikimi ince film tekniği olarak pek çok avantaja sahiptir. En önemli avantajlarından biri, vakumu bozmadan farklı bileşenler içeren (gaz ve metal) filmlerin aynı sistem içerisinde oluşturulabilmesidir. Ayrıca, metal vakum ark plazma puls modunda çalıştığı için, oldukça fazla iyon yoğunluğu sağlanmakta, bu nedenle yüzeyde yüksek çekirdek yoğunluğu elde edilmektedir. Substrat, plazma ortamına daldırıldığı için çok geniş yüzeyde homojen bir plazma sağlanmış olur. Yüklü film ve substrat elektriksel olarak iletken ya da yarı iletken olduğunda dual plazma birikimi süresince iyon enerji kontrolünü sağlamak için dc voltaj uygulanabilir, eğer substrat ve film iletken ve yarı iletken değilse yük birikimini engellemek için ac ya da pulslu voltaj kullanılır. En uygun puls genişliği ve frekansı, dual plazma birikimi süresince iyon ve elektron akımı ihtiyacına göre ayarlanabilir (Konuma, 1992). Dual plazma birikimi TiN ve  $TiO_2$  kompozit ince filmlerin hazırlanmasında kullanılır. TiN filmi sentezlemek için, Ti katodlu vakum ark plazma ve azot RFGD plazma eş zamanlı

olarak çalışır. İstenilen kalınlıkta film elde edildikten sonra azot akışı durdurulur ve vakum çemberine TiO<sub>2</sub> oluşturmak için oksijen gönderilir. Film bileşimi oksijen ve azot akış hızıyla ayarlanabilir.

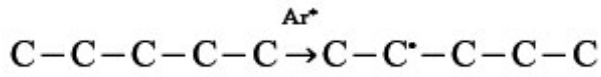
### **Plazma polimerizasyonu**

Plazma polimerizasyonunda, elektron, iyon ve radikaller gibi enerjili plazma türlerinin yardımıyla, molekül ağırlığı düşük moleküllerin (monomerlerin), molekül ağırlığı yüksek moleküllere (polimerlere) dönüşümü sağlanır (Agostino, 1990; Biederman and Osada, 1990; Goosses et al., 2001). Radikal ve iyonları içeren plazma polimerizasyonu kimyasal olarak klasik polimerizasyon türlerinden farklıdır. Aynı monomerler kullanılsa dahi plazma polimerizasyonu ile elde edilen polimerler kimyasal bileşimleri kadar kimyasal ve fiziksel özellikleriyle de klasik polimerizasyon yöntemleriyle elde edilenlerden farklıdır (Grill, 1994). Bu farklılık aslında polimerizasyon reaksiyon mekanizmasının farklı olmasından kaynaklanır. Plazma polimerizasyonunda polimer oluşumu, monomerlerin radikallere plazma aktivasyonu, oluşan radikallerin birleşmesi ve bu birleşen moleküllerin yeniden aktivasyonu basamaklarını izler (Veprek and Venugopalan, 1980). Plazma polimerleri tekrarlanan monomer birimlerini içermezler, onun yerine çapraz bağlı, parçalı ve yeniden düzenlenmiş monomer birimlerini içerir (Yasuda, 1985). Pek çok durumda plazma polimerleri yüksek elastik modülüne sahiptir ve farklı camı geçiş sıcaklığı göstermez. Metan, etan, etilen, asetilen ve benzen gibi hidrokarbonlar, hidrojenlenmiş karbon filmlerin plazma polimerizasyonunda kullanılır. Mikrosertliği, optikçe reaktiflik indeksi, aşınma direnci oldukça iyi polimerler elde edilir. Hidrofobik polimerleri elde etmek için, flor, hidrojen florür, azot florür, kükürt tetraflorür ve kükürt hekzaflorür gibi flor içeren inorganik gazlar kullanılmaktadır. Organo-silikon monomerleri kullanılarak elde edilen polimerlerin termal ve kimyasal dirençleri yüksek, elektriksel, optik ve biyomedikal özellikleri gayet iyidir. Yaygın olarak kullanılan organo-silikonlar arasında, silan, disilan, disiloksan ve disilazan sayılabilir (Inagaki, 1996).

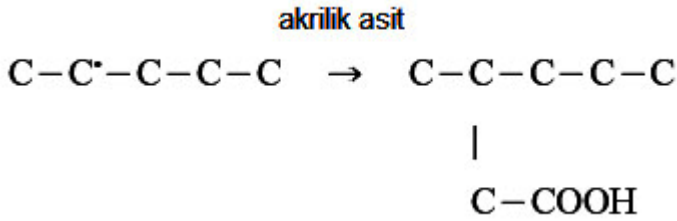
### **Plazma-aşı kopolimerizasyonu**

Polimerik malzeme plazmaya tabi tutulduğunda polimer zincirinde radikaller oluşur. Bu radikaller, sıvı ve gaz fazdaki monomerlerle etkileşime girerek polimerizasyonu başlatırlar ve sonucunda aş-kopolimerler yüzeyde oluşur (Grill,

1994). Plazma-aşı kopolimerizasyonu aslında plazma aktivasyonu ile klasik kimya tekniğinin kombinasyonu olarak düşünülebilir. Polimer önce plazmaya tabi tutulur (genellikle argon ve helyum inert gazları kullanılır), elektronlar arasında meydana gelen sert çarpışmalar sonucu polimer zincirinde serbest radikaller oluşur. Ardından polimer, monomerin buhar ya da sulu/organik çözeltilisine maruz bırakılır. Polimerin yüzeyine yakın bölgelerde serbest radikaller oluştuğu için, plazma-aşı kopolimerizasyonu yüzeye yakın bölgelerle sınırlıdır. Şekil 2.9'da bu mekanizmalar şematik olarak gösterilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 2.9. Polimerik yüzeyin aktivasyonu (a) ve plazma-aşı kopolimerizasyonu (b).

Plazma-aşı kopolimerizasyonu genellikle polimerik yüzeylerin hidrofilitelerini değiştirmek için kullanılır (Yasuda, 1990). Polimere birkaç saniye argon, helyum veya azot plazma uygulanır. Plazma işleminin sonucunda polimerik yüzeyde pek çok serbest radikal oluşur (gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, oluşan bu serbest radikallerin birkaç gün boyunca yüzeyde kalabildiğini göstermiştir). Ardından polimerik yüzey önceden belirlenen süreyle, yüksek sıcaklıkta monomerin buharına maruz bırakılır. Tüm bu işlemler sonucu polimerin ıslatılabilirliği (hidrofilite/hidrofobite) değiştirilebilir.

### **Lazerle kesme (LA, lazer ablation)**

Lazerle kesme prosesinde, lazer tanecikleri ile oluşturulan plazma substrat yüzeyine taşınarak ince bir film oluşturur. Oluşan filmin kalitesi, plazma yoğunluğuna ve kinetik enerjisine bağlıdır. Yüksek enerjili plazma film hasarına yol



açabilir. Lazerle kesme işlemiyle yüksek kalitede film elde etmek için plazma yoğunluğunun iyi bir şekilde kontrolü gerekmektedir. Optimum lazer akışı, substrat ve hedef arasındaki boşluğa ve ortam gaz basıncına bağlıdır. Genellikle substrat-hedef arası boşluk 2 cm civarındadır. Göz ardı edilmemesi gereken bir nokta da plazmanın substratla nasıl etkileştiğidir. Hedefin hazırlanması da oldukça önemlidir ve hedefin morfolojisi filmin yüzey morfolojisini etkiler. Genellikle yeni hazırlanmış yüzeylerin tercih edilmesinin nedeni, özellikle düşük akışın ve uzun süreli ışınlamanın söz konusu olduğu durumda modifiye edilen yüzeyin bileşiminin orjinal stokiyometrik bileşimden sapmasıdır (Wilson and Hawkes, 1987).

Klasik film birikim yöntemleriyle karşılaştırıldığında lazerle kesme prosesi bazı spesifik özelliklere sahiptir. Malzeme lazer ışığını absorpladığı sürece, erime noktası yüksek malzemelerin birikimi mümkündür. Isının ve filamenlerin kullanıldığı buharlaşma prosesiyle karşılaştırıldığında daha az film kontaminasyonuna neden olur. Birikim boyunca uygun parametreler seçilirse hedef bileşimi stokiyometrik olarak filme transfer olur. Fakat yine de biriktirilen film yüzeyinde çok sayıda mikron ölçeğinden daha küçük ölçekte damlacıklar gözlenebilir (Chrissey and Hubler, 1994).

#### **2.1.2.2.iv. Plazmayla püskürtme (PS, plasma spraying)**

Atmosferik basınç plazmayla püskürtmede, püskürtülecek malzemenin tozları plazma alanına gönderilir. Plazma sıcaklığının ve akış hızının fazla olmasından dolayı, tamamen ya da kısmen erimiş tozlar substrat yüzeyine kaplanır. Sıcaklığın oldukça yüksek olmasından dolayı plazmayla püskürtme her türlü metal, seramik ve farklı bileşenli malzemelere uygulanır. Malzemenin erime sıcaklığı ve bozunma/buharlaşma sıcaklığı arasında en azından 300 K kadar sıcaklık farkı varsa plazmayla püskürtme prosesi yürütülebilir (Fauchais et al., 2006).

Plazmayla püskürtme sahip olduğu avantajları nedeniyle son 30 yıl içerisinde oldukça yaygın hale gelmiştir (Heiman, 2006). Bu prosesin en önemli avantajı, karmaşık geometriye sahip malzemelerin kolaylıkla modifiye edilebilmesidir. Ayrıca, yüksek sıcaklığa ve korozyona dirençli her türlü malzemenin prosesi mümkündür. Bu prosesin tek dezavantajı, substrat ve kaplama arasındaki yapışmanın çok güçlü olmamasıdır. Plazmayla püskürtme en çok hidroksiapatit gibi biyoaktif seramiklerin cerrahi implant olarak uygulamalarında kullanılmaktadır (Dyshlovenkoa et al., 2006).

## **2.2. Biyomalzemeler ve Yüzey Modifikasyonu**

### **2.2.1. Biyomalzemeler**

Biyomalzeme, canlı yapının tamamından ya da bir parçasından veya biyomedikal aletlerden oluşan, doğal işlevleri yerine getiren, iyileştiren doğal/yapay malzemeler olarak tanımlanabilir (Enderle et al., 1999). Ratner ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer tanıma göre biyomalzeme, biyolojik sistemle etkileşim halinde olan medikal cihazlarda kullanılan cansız malzemelerdir (Ratner et al., 1996).

Metal, alaşım, polimer, seramik, kompozit ve cam biyomalzemeler kalp vanaları, yapay kalça kemikleri, diş implantları olarak kullanılmaktadır. Biyomalzeme tasarımı, beklenen işleve ve hedeflenen biyolojik bölgeye göre yapılmaktadır. Biyomalzeme araştırmaları, malzeme bilimi, fizik, biyokimya, tıp ve diğer alanları içeren disiplinlerarası bir kavramdır. Bu alandaki çalışmalar çoğunlukla biyomalzemenin mekanik özelliğini, kararlılığını ve işlevselliğini arttırmaya yöneliktir (Hill, 1998; Enderle et al., 1999). Örneğin, kalça kemiği vidaları yüksek strese dayanımlı, yapay kalp kapakçıkları antitrombojenik özelliğe sahip olmalıdır. Biyomalzemenin yığın yapısı bu tür özellikleri belirleyici bir faktördür. Biyomalzemeye biyolojik sistemin tepkisi ise genellikle yüzey kimyası ve yapısıyla kontrol edilir. Sonuç olarak biyomalzemenin işlevselliğinde yüzey özelliklerinin önemli rol oynadığı açıktır. Biyoyumlu biyomalzeme elde etmek için biyomalzemenin dış yüzeyi modifiye edilirken mekanik özellikleri ve işlevselliği etkilenmemelidir.

### **2.2.2. Yüzey modifikasyonu gerekliliği**

Biyomalzemeyle biyolojik çevre arasındaki ilk etkileşim malzeme yüzeyinde başlar ve malzemenin kimyasal bileşimi, yapısı, temizliği, yüzey enerjisi ve korozyon direnci gibi yüzey özellikleri ile doğrudan ilgilidir. Malzemenin biyoyumluluğu, implant ve biyolojik sistem arasındaki mikro ve nanometre boyutundaki etkileşimle belirlenir ve malzemenin kimyasal bileşimi, ıslatılabilirliği, yüzey yükü-enerjisi ve yarı iletkenlik gibi fizikokimyasal özellikleriyle yakından ilişkilidir (Balani et al., 2007; Grosskinsky, 2006). Biyomedikal yüzey mühendisliği üç durumda devreye girer: “iyi” yeterince iyi olmadığında, aletler işlevini tam olarak yerine getiremediğinde ve farklı ürünlere ihtiyaç duyulduğunda. Biyomalzemenin yüzey modifikasyonuna neden ihtiyaç duyulduğu aşağıda maddeler halinde tartışılmıştır.

- 1- Malzeme yüzeyi vücut içindeki canlı dokuyla doğrudan temas halindedir ve canlı dokunun biyomalzemeye cevabı onun yüzey özellikleriyle yakından ilgilidir. İyi bir biyomalzeme inflamasyon oluşturmamalıdır. Fakat ne yazık ki, hem yığın özellikleri iyi, hem de yüzey özellikleri mükemmel, klinik uygulamalarda biyouyumlu biyomalzeme çok fazla değildir. Doku ve kanla biyouyumlu olmayan biyomalzeme sadece hücrel hasara ve kan pıhtılaşmasına neden olmaz, aynı zamanda implantın yıpranmasına da yol açar. Bu durumda, aşınma direnci yüksek biyomalzemeler kullanmak en iyi çözümdür.
- 2- Biyomalzemedeki beklenen özellikler uygulama yerine göre değişmektedir. Örneğin, ortopedik malzemeler ideal mekanik özelliklere sahipken, biosensörlerin elektriksel iletkenliği oldukça iyidir. Bu nedenle, uygulama alanına göre biyomalzeme tasarımı yapılmalı ve biyomalzemenin yüzeyi modifiye edilirken yığın özelliklerini korumaya özen gösterilmelidir.
- 3- Her ne kadar yığın özellikleri biyomalzemenin mekanik özelliklerini etkilese de, doku-biyomalzeme etkileşimi daha çok biyomalzemenin yüzey özellikleriyle ilgilidir. Doku-biyomalzeme etkileşiminin yaklaşık 1 nm'den daha dar bir alanda gerçekleştiği öne sürülmektedir (Hill, 1998; Grosskinsky, 2006). Ev sahibi ile biyomalzeme arasındaki ilk etkileşim implantın serum ya da diğer doku sıvılarıyla çevrelenmesidir. Bu nedenle çalışılması gereken nokta, biyomalzeme/doku arayüzündeki doku-hücrel davranışının geliştirilmesidir.
- 4- Medikal implantlarda uzun ömürlülük de oldukça önemlidir. Metal implantlar özellikle kemik uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Metalik ortopedik implantlar dayanım ve esneklik gibi mükemmel yığın özellikleri gösterirken, aşınma direnci ve sınırlı biyouyumluluk gibi zayıf yüzey özelliklerine sahiptirler. Bu nedenle, biyomalzemenin yüzey ve yığın özelliklerinin her ikisini de iyileştirmeye yönelik çalışmalar yapılmalıdır.
- 5- Dünyada yaşanan popülasyonun artışı sonucu son on yılda biyomalzemeleri geliştirmeye yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır. Ayrıca işlevselliği ve biyoaktivitesi yüksek biyomalzeme tasarımları yapılmaktadır (Danielle et al., 2007; Reddy et al., 2006; Wang et al., 2006).

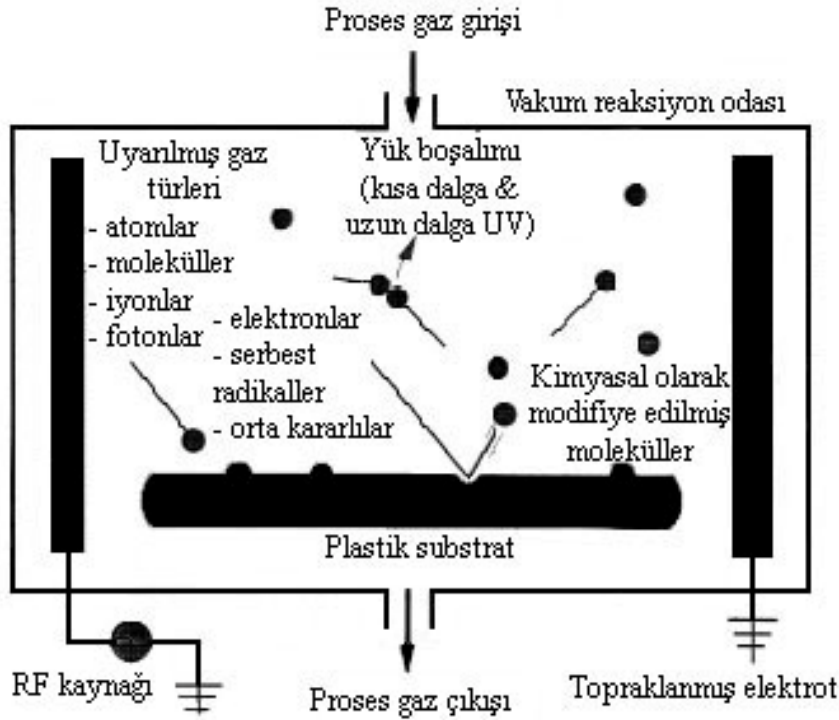
Biyomalzemenin biyolojik çevreyle etkileşimini iyileştirmek için pek çok yüzey modifikasyon metodu mevcuttur. Plazma ile modifikasyon bu metotlardan birisidir. Çizelge 2.1’de biyomalzemelerin yüzeyini modifiye etmek için kullanılan teknikler verilmiştir.

Çizelge 2.1. Biyomalzemelerin yüzey modifikasyon teknikleri.

<b>Fiziksel</b>	<b>Kimyasal</b>	<b>Radyasyon</b>
Fiziksel adsorpsiyon Langmuir-Blodgett filmi	Kuvvetli asitlerle oksidasyon Ozon ile muamele Kimyasal sorpsiyon Alev ile muamele	Plazma yük boşalımı Korona yük boşalımı Foto aktivasyon (UV) Lazer İyon tanecik bombardımanı Elektron tanecik bombardımanı $\gamma$ radyasyonu

### 2.2.3. Proses

Plazma yüzey modifikasyonunda yük-boşalım plazması, bir tankın (inert olmasından dolayı genellikle kuvars kullanılır) havasının tamamen boşaltılması ve daha sonra tankın tekrar düşük basınçlı gazla doldurulmasıyla oluşturulur. Ardından gaza, RF enerjisi, mikrodalga, direk akımın alternatif akıma çevrilmesi gibi teknikler kullanılarak enerji verilir. Gaz plazma, kısa dalga UV aralığında iyonlar, elektronlar, radikaller, orta kararlılar ve fotonlar gibi enerjik türleri içerir. Gaz plazmayla temas halindeki yüzeye, bu enerjik türler gönderilir ve sahip oldukları enerji plazmadan katı substrat içine aktarılır ve sonucunda yüzey modifiye edilmiş olur (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Plazma reaktöründe gerçekleşen plazma yüzey modifikasyonu.

Plazma prosesi, biyomalzemenin yığın özelliklerini değiştirmeden foton ve aktif türlerin biyomalzeme yüzeyiyle birkaç yüz angstromdan 10  $\mu\text{m}$ 'ye kadar tepkimesini sağlayan tek yüzey modifikasyon tekniğidir. Birçok parametre plazmanın kimyasal ve fiziksel karakteristiğini doğrudan etkileyebilir ve sonucunda plazma modifikasyonu ile elde edilen yüzey kimyası da etkilenmiş olur. Gaz tipi, işlem basıncı, gücü ve zamanı gibi proses parametreleri kullanıcı tarafından ayarlanabilir. Fakat, elektrod konumu, reaktör dizaynı, gaz girişi ve vakum gibi sistem parametreleri ise plazma ekipmanının tasarımı sırasında belirlenir. Bu geniş parametre aralığı plazma prosesine çoğu yüksek enerjili radyasyon prosesinden daha fazla kontrol imkanı verir (Şekil 2.11). Elektron yayılımı, lazer veya UV radyasyonu ve deliksiz kaplama gibi diğer tekniklerden farklı olarak plazma tekniği, çevre dostu olmasıyla bilinir. Gaz plazma modifikasyonu tipik olarak kesikli proseste gerçekleştirilmesine rağmen, fiberlerin, tübül membranların, fabrik yapıların ve filmlerin sürekli sistemde modifikasyonu yapılmaktadır. Çoğu durumda, reaktör dizaynında ekonomik durum göz önüne alınmalıdır.



Şekil 2.11. Plazma parametreleri.

#### 2.2.4. Plazma prosesinin biyomalzeme yüzey modifikasyonunda sağladığı avantajlar

Plazma prosesi, biyomalzemenin spesifik özellikler kazanmasını sağlamaktadır. Aşağıda plazma modifikasyonu sonrası biyomalzemeye kazandırılacak olan özellikler kısaca açıklanmıştır.

##### 2.2.4.1. Yapışmayı arttırmak

İki yüzey arasındaki yapışmayı arttırmak genel uygulamalar arasındadır. İyi bir yapışma, kimyasal uyumluluk ve/veya kimyasal bağla elde edilen güçlü arayüzey kuvvetlerini gerektirir (Oehr, 2003). Plazma yüzey modifikasyonu, arayüzey yapışmayı arttırıcı amin, karbonil, hidroksil ve karboksil grupları gibi kimyasal olarak aktif fonksiyonel grupların oluşmasına yardımcı olur (Weibel et al., 2006; Pompe et al., 2007).

En yaygın uygulamalar arasında, kateterlerin, şırınga bileşenlerinin, diyaliz pompa parçalarının, kan ve ilaç torbalarının ve plastik filmlerinin modifikasyonu yer almaktadır.

#### **2.2.4.2. Yüzey enerjisinin kontrolü**

Plazma prosesi substrat yüzey enerjisini kontrol etmek için de kullanılabilir (Noh et al., 2007; Alves et al., 2007). Gaz plazmayla etkileşim halindeki polimer yüzeyinde hidrofilik ve hidrofobik yüzeyler yaratılabilir. Oksijenin kullanımıyla, yüzeyde hidroksil fonksiyonitesi yaratılarak yüzeyin ıslatılabilirliği artırılabilir. Polimerik tüplerin ıslatılabilirliğini artırarak kateterlerin performansını arttırmak uygulanan metotlar arasındadır. Benzeri bir şekilde yüzeyler kan uyumluluğunu arttırmak için de modifiye edilebilmektedir.

#### **2.2.4.3. Biyouyumluluğu arttırmak**

Kan veya proteinle temas halinde olacak biyomalzemenin biyouyumluluğunu arttırmak için spesifik yüzey modifikasyonu gerekmektedir. Örneğin, amonyak plazma modifikasyonu yüzeye tutturulan amin grupları heparin gibi antikoagülantlar için sanki bir çengel işlevi görür ve böylece trombojenite azaltılmış olur (Yuan et al., 1993). Sentetik polimerik implant malzemeler, fibronektin ve laminin gibi hücre-bağlayıcı peptidlerin yüzeye kovalent bağlanmasını sağlamak için RF ile plazma modifikasyonuna tabi tutulur. Yüzeye takılan peptidler yüzeyin sağlıklı endotel hücreleri tarafından tek tabaka halinde tamamen kaplanmasını sağlayarak doğal, kan uyuşabilirliği yüksek bir yüzeyin oluşmasına neden olur. Endotel hücrelerle kaplanmış biyoimplantlar biyouyumluluğu artırırken, antijeniteyi ve trombojeniteyi azaltır (Knetsch et al., 2006).

#### **2.2.4.4. Performansı arttırmak**

Polimerlerin performansını arttırmak için en çok kullanılan yöntemlerden birisi yüzeyin çapraz bağlanmasıdır. Plazma modifikasyonu, malzeme içinde birkaç bin Å derinliğe kadar çapraz bağlanma yoğunluğu sağlar. Bunun sonucunda pek çok uygulama için gereksinim duyulan malzemenin sertliği ve kimyasal direnci artırılmış olur. Örneğin, silikon kauçuk bileşenleri yüzeyde sert bir tabaka oluşturmak amacıyla inert gaz plazmayla modifiye edilebilir. Böylece yüzey sürtünme katsayısında önemli bir düşüş sağlanır. Geliştirilen bir plazma tekniğiyle önceden kaplanmış moleküllerin polimer yüzeyine doğrudan çapraz bağlanması sağlanmıştır (Sheu et al., 1992).

#### **2.2.4.5. Biyolojik moleküllerin immobilizasyonu**

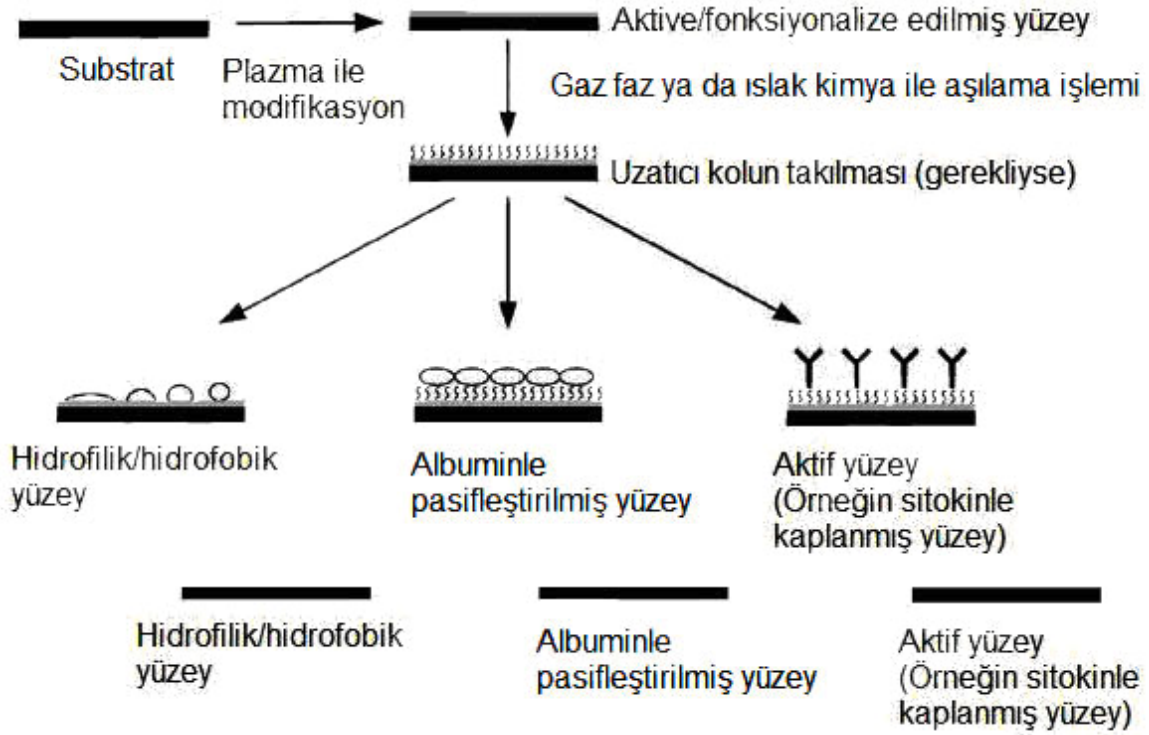
Albumin, kollajen, heparin ve heparin-benzeri moleküllerin, polimerik yüzeylere immobilize edildiklerinde yüzeye anti-trombojenik özellik kazandırdıkları bilinmektedir. Bu tür biyolojik moleküllerin immobilizasyonu için, öncelikle polimerik yüzeyin aktive edilmesi ve ardından biyolojik molekülün doğrudan ya da uzatıcı kol kullanarak yüzeye takılması gerçekleştirilir. Biyolojik molekülün hareketliliğinin, konformasyonunun ve aktivitesinin önemli olduğu durumlarda uzatıcı kolun kullanılması kaçınılmazdır (Kang et al., 2001). Plazma prosesinin tam olarak anlaşılabilmesi nedeniyle biyolojik moleküllerin immobilizasyonu için plazma ile ıslak kimya yöntemi paralel olarak kullanılmaktadır. Amonyak, oksijen ve su plazması kullanımıyla yüzeyde  $\text{NH}_3$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  grupları oluşturulabilir. Yüzey ıslatılabilirliğini arttırmak ve polimerik yüzeyde hücre üremesini desteklemek için bu tür modifikasyonlar yapılmaktadır (Balani et al., 2007; Qu et al., 2007).

#### **2.2.4.6. Hücre üremesini desteklemek**

Hücrelerin üremesi için kullanılan hücre-destek malzemelerinin (taşıyıcıların) bazı durumlarda modifiye edilmesi gerekmektedir. Hücre üretimi için kullanılan biyomalzemenin modifikasyonunda 3 önemli basamak mevcuttur (Şekil 2.12). İlk olarak yüzey geriliminin ayarlanması gereklidir. Yüzeye belirli bir hidrofilitate kazandıracak kimyasal grupların takılmasıyla bu sağlanabilir. İkinci aşamada amin ya da karboksil gruplarının yüzeyde oluşması sağlanarak çeşitli protein/protein segmentlerinin yüzeye bağlanması gerçekleştirilir. Bu yolla hücrelerin biyomalzemeyi yabancı bir madde olarak algılaması bir derece engellenmiş olur. Son aşamada ise hücre üremesini hızlandırmak için, büyüme faktörleri (sitokinler) yüzeye immobilize edilebilir. Plazma ile modifiye edilmiş malzemelerde keratinosit ve kornea gibi çeşitli hücrelerin üremesi arttırılmıştır (Klenkler et al., 2005).

Hücre kültürleriyle ilgili çalışmalar araştırmaların disiplinlerarası bir alanda sürdürülmesi gerektiğini açıkça göstermektedir. Özellikle tıp, malzeme ve hücre bilimi, mikrobiyoloji, plazma ve ara yüzey biliminin ortaklığı başarılı sonuçlar elde etmek için kaçınılmazdır.





Şekil 2.12. Hücre üremesini arttırmak için biyomalzemenin modifikasyonu.

### 2.2.5. Plazma prosesinin biyomedikal uygulamaları

Plazma yüzey modifikasyonu birçok biyomedikal uygulama için uygundur (Ratner et al., 1990; Sheu et al., 1995). Çizelge 2.2’de plazma yüzey modifikasyonunun biyomedikal alanda uygulamaları verilmiştir. Birkaç önemli uygulama aşağıda açıklanmıştır.

Çizelge 2.2. Biyomedikal alanda plazma yüzey modifikasyonunun uygulamaları.

Uygulamalar	Cihazlar	Malzemeler	Amaçlar
Biyosensör	Sensör membranları	Polikarbonat, Selüloz, Polipropilen	Biyomoleküllerin temiz yüzeylere immobilizasyonu
	Teşhis biyosensörleri	Polistiren	
Biyoyayırma	Ayırma membranları Hemodiyaliz membranları	Polipropilen, Selüloz türevleri, Polisülfon	Yüzey temizleme İslatılabilirliği arttırmak Biyouyumluluğu arttırmak

Çizelge 2.2. devam ediyor.

Kardiyovasküler	Damar greftleri Kateterler	Polietilen teraftalat, Politetra flo etilen, Polietilen, Silikon kauçuğu, Polivinil klorür, Poliüretan	Biyouyumluluğu arttırmak Islatılabilirliği arttırmak Kaplama Sürtünmeyi azaltmak Anti-mikrobiyal yüzey kaplamaları
Dental	Diş implantları	Titanyum alaşimleri	Hücre üremesini arttırmak
Temel araştırmalar		Polimerler, Metaller, Camlar, Seramikler, Kompozitler	Plazma yük boşalımı ile modifiye dilmiş yüzeylerle biyolojik etkileşimleri araştırmak
Gözle ilgili olanlar	Kontak lensler Intraoküler lensler Yapay kornealar	Polimetil metakrilat, Silikon kauçuğu, Polivinil akrilat, Polihidroksi etil metakrilat	Islatılabilirliği arttırmak Biyouyumluluğu arttırmak Anti-mikrobiyal yüzey kaplamaları Hücre üremesini arttırmak
Ortopedik	Metal implantlar Vidalar Ligamentler Kemik plakaları	Titanyum-nikel, Kobalt-krom alaşimleri  Yüksek molekül ağırlıklı polietilen, Polietilen teraftalat, Poliglikolik asit, Polilaktik asit	Yüzeyi temizlemek Hücre yapışmasını/üremesini arttırmak Biyouyumluluğu arttırmak Doku içi üremeyi arttırmak Mekanik dayanımı arttırmak
Eczacılık	Kontrollü ilaç salım cihazları	Silikon kauçuğu, Hidrojel, Poliglikolik asit, Polilaktik asit	Molekül difüzyonunu azaltmak İlaç salımı için bozunmayı kontrol etmek
Doku kültürü	Doku kültürü kapları	Polistiren, Polietilen teraftalat	Hücre yapışmasını/üremesini arttırmak Islatılabilirliği arttırmak Yüzeyi temizlemek
Diğer uygulamalar	Genel cihazlar		Sterilizasyon Yüzeyi temizlemek Yapışmayı arttırmak

### 2.2.5.1. Biyoayırma

Seçici geçirgenliğe sahip polimerik membranlar birçok biyoayırma uygulamasında kullanılmaktadır. Hemodiyaliz, proteinlerin saflaştırılması, yapay organlar ve

biyosensörler bu uygulamalar arasındadır (Zeng et al., 2001; Liang et al., 2007). Membran malzemesinin verimlilik açısından seçici geçirgen olması ve aynı zamanda geçirgenlik hızının fazla olması istenir. Çeşitli kimyasal grupların membrana takılmasıyla veya gözenek boyutunun kontrolü gibi fiziksel kısıtlamalarla membranın seçiciliği ayarlanabilir.

#### **2.2.5.2. Sterilizasyon**

Plazma teknolojisi tıbbi cihazların dezenfeksiyonu ve sterilizasyonu için de kullanılmaktadır (Akitsua et al., 2005; Tessarolo et al., 2006). Plazma modifikasyonunun en büyük avantajı, biyomedikal aletlerin fabrikasyonu sırasında yüzey modifikasyonu ve sterilizasyonun aynı anda yapılmasıdır. Plazma sterilizasyonu sıcaklığa, radyasyona ve kimyasallara duyarlı medikal implant ve aletler için oldukça uygun bir yöntemdir.

#### **2.2.5.3. Oküler protezler**

Kontak ve intraoküler lensler, protein ve hücre reddini indirmek, bakteriyel yapışmayı azaltmak, ıslatılabilirliği ve hasta konforunu arttırmak için plazma modifikasyonuna tabi tutulurlar (Karlgaard et al., 2004; Shigeta et al., 2006). PHEMA'dan üretilen yapay kornealara amonyak plazma modifikasyonu uygulanarak kornea epitel hücrelerinin yapışması ve üremesi arttırılmıştır (Spehia, 1993). Plazma ile modifiye edilmiş yüzeye fibrinojen ve fibronektin moleküllerinin immobilizasyonu ile elde edilen matrisler yara iyileşmesi boyunca kornea epitel hücrelerinin göçüne imkan vermiştir. Argon plazma modifikasyonu PVA içeren sentetik korneaların epitelizasyonunu arttırmak için kullanılmıştır (Latkany et al., 1997). Plazma ile modifiye edilmiş PVA yüzeylerde yoğun bir epitel tabakasının oluştuğu, hem organ kültür çalışmasıyla, hem de tavşanlarda gerçekleştirilen in vivo implantasyon çalışmalarıyla kanıtlanmıştır.

#### **2.2.5.4. Doku kültürü**

Petri kabı, döner şişe, mikrotayıyıcı ve membran gibi kültür substrat yüzeyleri plazma ile modifiye edilebilir. Plazma modifikasyonu ile hücre üremesi, protein bağlama/bağlamama kapasitesi, hücreye spesifik yapışma, yüzey enerjisi ve/veya yüzey elektrik yükü ayarlanabilir.

### **2.2.5.5. Plazma modifikasyonunun ticari avantajları**

Çizelge 2.1’de yüzey modifikasyon teknikleri verilmiştir. Bu yüzey modifikasyon teknikleri içerisinde yer alan plazma yüzey modifikasyonu, esnek ve etkili bir proses oluşunun yanısıra çevre dostu ve güvenli olmasıyla diğer tekniklerden ayrılır. Isıya karşı hassas biyomalzemeler plazma ile ortam sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta modifiye edilebilmektedirler. Plazma modifikasyonu malzemenin yığın özelliklerini değiştirmez, sadece substratın yüzeye yakın bölümünü modifiye eder. Ayrıca plazma ile hemen hemen her geometrideki substrat modifiye edilebilmektedir. Plazma teknolojisinin en büyük özelliği ise, kimyasal proseslerin sunmadığı yüzey fonksiyonlitesini sunabilmesidir. Fakat plazma prosesinin, vakum ortamına ihtiyaç duyulması, nispeten pahalı oluşu ve kimyasının tam olarak tanımlanamaması gibi dezavantajları da mevcuttur. Plazma birikimi ve reaksiyonunun ticari alanda kullanımında birkaç engelle karşılaşılmaktadır. Bunlardan en önemlisi FDA (Food and Drug Administration) tarafından yüzey modifikasyonunun nasıl düzenleneceğinin tam olarak açıklanmamış olmasıdır. Fakat buna karşın, özellikle akademik çalışmalarda plazma prosesinin uygulamaları yapılmakta ve prosesin tekrar kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Endüstri ve araştırma enstitülerinin işbirliği ile proses optimizasyonu ve ölçek büyütme çalışmaları yapılmalıdır. Sonuç olarak söylenebilir ki, plazma yüzey modifikasyonunun avantajları dezavantajlarına göre oldukça fazladır, çünkü en önemlisi bu teknik diğer tekniklerin sağlayamadığı pek çok modifikasyonu sağlayabilmektedir.

### **2.3. Doku İskeleleri**

Doku mühendisliği yaklaşımı ile hasarlı dokunun onarımı ya da yeni dokunun oluşumu için, doku iskelesi (scaffold)/matris, canlı hücre ve/veya biyolojik olarak aktif moleküllerin (biyosinyal) birleşimi sonucu elde edilen hibrid yapının kullanımı büyük önem arz etmektedir (Şekil 2.13). Doku mühendisliği alanında kullanılan doku iskeleleri, hücrenin farklılaşmasını, üremesini, göçünü ve kolonizasyonunu sağladığı gibi gerekli dokunun gelişimine öncülük etmekte ve hatta bazen ilaç dağıtım aracı olarak da kullanılmaktadır. Günümüzde farklı araştırma alanlarından birçok araştırmacı hücre izolasyonu ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar da dahil doku iskelesi tasarımı ve üretimi ile ilgili çalışmalara odaklanmıştır (Hutmacher, 2001; Sherwood et al., 2002; Sacholos and Czernuszka, 2003).



Şekil 2.13. Hücre-temelli doku mühendisliği yaklaşımı

Doku iskelesi tasarımında en önemli kriter malzemenin seçimidir. Doğal polimerler, sentetik polimerler, seramikler, metaller ve bunların bileşimi kullanılan malzemeler arasında yer almaktadır (Sacholos and Czernuszka, 2003; Mironov et al., 2003). Tez kapsamı içerisinde doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak polimerik doku iskeleleri geliştirilmeye çalışılmış ve dolayısıyla bu bölümde doku iskelesi üretiminde yaygın olarak kullanılan polimerik malzemeler hakkında ayrıntılı bilgiye yer verilmiştir.

### 2.3.1. Polimerik doku iskeleleri

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan polimerik doku iskeleleri 3-boyutlu yapıda olmalıdır, yüksek yüzey alanına ve gözenekliliğe sahipken aynı zamanda gerekli yapısal dayanımı da sağlamalıdır. Bu özellikler tasarlanan doku iskelesi için uygun üretim tekniğinin seçimiyle ayarlanabilir fakat bu sırada malzemenin biyouyumluluğu korunmalı, yani malzeme implante edildiğinde istenmeyen doku tepkilerine yol açmamalıdır. Günümüzde kullanılan üretim teknikleri istenilen özellikleri taşıyan doku iskelesi elde etmek için yeterlidir.

Doku mühendisliği tekniklerini kullanarak organ işlevlerinin iyileştirilmesi için geçici ve gözenekli doku iskelelerine ihtiyaç vardır. Doku iskelesinin asıl işlevi hasarlı bölgeye çevre dokulardan hücre göçünü sağlamak ya da doku iskelesinin kendi gözenekleri içerisinde hücrenin üremesine izin vermektir. Bu nedenle doku iskelesinin hücre yapışması, üremesi, farklılaşması ve göçü destekleyecek yüzey özelliklerine sahip olması beklenmektedir. Uygun malzemenin ve üretim tekniğinin seçimiyle istenilen özellikleri sağlayan doku iskelelerini üretmek mümkündür.

Birçok biyouyumlu malzeme doku iskelesi yapımında kullanılsa da, doku iskelesinin temel görevini geçici sürede yapması beklendiği için biyobozunur malzemeler doku iskelesi yapımında daha çok tercih edilir. Kollajen, poli( $\alpha$ -hidroksi esterler) ve poli(anhidritler) gibi doğal ve sentetik biyobozunur polimerler işleme kolaylığı nedeniyle doku iskelesi malzemesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Thomson et al., 1995). Poli( $\alpha$ -hidroksi esterler) arasında yer alan poli(L-laktik asit; PLLA), poli(laktik-ko-glikolik asit; PLGA) ve poli(glikolik asit; PGA) doku iskelesi malzemesi olarak yaygın kullanıma sahiptirler. Belirli klinik uygulamalar için FDA tarafından onaylanmış bu polimerler, basit hidroliz reaksiyonuyla bozunur ve biyouyumludurlar.

Doku iskelesi yapımında sadece seçilen polimerin biyouyumlu olması yeterli değildir, bunun yanısıra kullanılan üretim tekniğinin de polimerin biyouyumluluğunu bozmaması gerekmektedir. Doku iskelesinin gözenek çapı ve dağılımı da üretim tekniğinin seçiminde dikkat edilmesi gereken diğer önemli noktalar. Malzeme yüzeyinde yeterli hücre ekimini ve göçünü sağlayacak oldukça gözenekli doku iskeleleri tercih edilmektedir. Gözenek boyutu, hem hücrelerin yapışacağı iç yüzey alanını belirlemede, hem de dokunun oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Özellikle kırık ve kemik gibi sert doku onarımında doku iskelesinin mekanik özellikleri önem kazanmaktadır. Polimerin mekanik özelliklerinde, katı polimerin kendi özellikleri ve doku iskelesinin gözenek yapısı etkili olsa da polimerin işleme tekniği de önemlidir. Örneğin polimerin kristalinitesi artırılarak çekme gerilimi de artırılabilir. Bazen de polimer işleme prosesi polimerin molekül ağırlığının düşmesine neden olmakta ve polimerin mekanik özellikleri zayıflamaktadır.

Doku mühendisliği uygulamaları için doku iskelesi üretiminde kullanılacak olan teknik, polimerin özelliklerine ve hedeflenen uygulamaya yönelik olarak seçilmelidir. Literatürdeki doku iskelesi üretim teknikleri, küçük, katı polimer parçaları ya da uzun fiberler gibi ticari olarak elde edilebilen başlangıç malzemelerinin kullanılmasıyla geliştirilmiştir. Polimerin camsı geçiş sıcaklığı ya da erime sıcaklığı üzerindeki viskoz davranışı ve çeşitli organik çözücülerdeki çözünürlüğü doku iskelesi üretim tekniklerinin geliştirilmesinde kilit noktalar. Günümüzde doku mühendisliği uygulamaları için birçok yeni üretim tekniği geliştirilmiştir. Aşağıda doku iskelesi üretimi için kullanılan tekniklere yer verilmiştir.

### **2.3.2. Doku iskelesi üretim teknikleri**

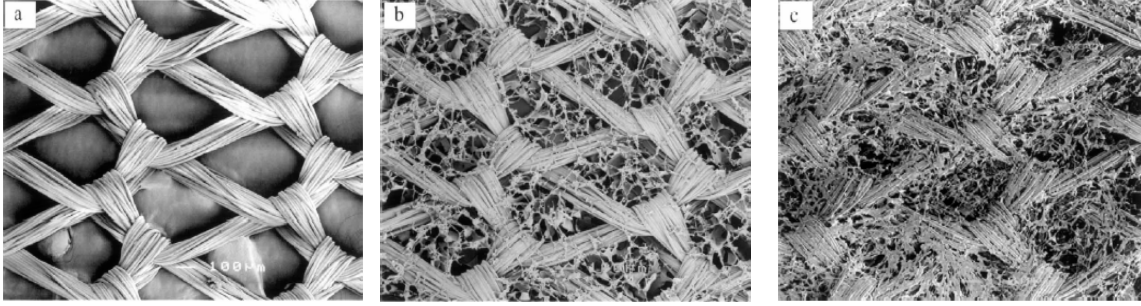
Doku mühendisliği uygulamalarında, doğrusal alifatik poliesterler grubunda yer alan poli(glikolik asit; PGA), poli(laktik-ko-glikolik asit; PLGA) doku iskeleleri yaygın olarak kullanıldığı için doku iskelesi üretim teknikleri verilirken yöntemler bu polimerler üzerinden açıklanmıştır.

#### **2.3.2.1. Fiber bağlama tekniği**

Püskül ve keçe yapısındaki PGA fiberlerinden yapılan biyomalzemeler organ yenilenmesinde kolaylık sağlamışlardır (Cima et al., 1991). Fiber ağ yapılar, fiberlerin üç boyutlu yapıda dokunması yada örülmesi ile hazırlanırlar ve farklı gözenek boyutunda olabilirler. Bu yapıların en önemli özelliği hücre yapışması için geniş yüzey alanına sahip olmalarıdır. Ayrıca hücre canlılığı ve üremesi için gerekli olan besinlerin hızlı bir şekilde difüzyonunu sağlamaktadırlar. Fakat bunun yanında, in vivo ortamda yeterli yapısal kararlılığa sahip değildirler ve bu nedenle “fiber bağlama” tekniği geliştirilmiştir. Fiber bağlama tekniği ilk kez Mikos ve arkadaşları tarafından fiberlerin birbirine bağlanmasıyla gerçekleştirilmiştir (Mikos et al., 1993a). PGA fiberleri istenilen biyomalzeme yapısına göre dizilir ve PLLA/metilen klorür çözeltisine daldırılır. Çözücünün buharlaşmasından sonra, PLLA-PGA bileşimi her iki polimerin erime sıcaklığının üstündeki sıcaklığa kadar ısıtılır. PLLA, soğutmanın ardından seçici ayrışmayla uzaklaştırılır, ayrışan PGA fiberleri fiziksel olarak çapraz noktalarda bağlanır. Tekniğin en önemli avantajı gözenek kontrolünü sağlayabilmesidir. Çözücü seçimi, iki polimerin karıştırılabilirliği ve erime sıcaklıkları proses için önemli parametreler arasındadır. Fakat, biyomalzemede artakalan çözücü atıklarının hücre ve organlara zararlı olabileceği unutulmamalıdır.

Kan damarları, intestinler ve üreterler gibi dokuların yenilenmesinde yararlı olabilecek doku iskelelerinin üretimi için alternatif bir fiber bağlama tekniği geliştirilmiştir. Bu metotta bağlanmamış PGA fiber ağı, PLLA ya da PLGA çözeltisiyle kaplanmıştır (Mooney et al., 1996a). Döner Teflon® silindire yapıştırılmış polimer ağına PLLA/PLGA polimer çözeltisi püskürtülür. Püskürtme işlemi devam ederken PGA fiberleri üzerine PLLA ya da PLGA çözeltisi kaplanır ve PGA fiberlerin çapraz noktalarında bağlar oluştururlar. Eğer püskürtme süresi uzun tutulursa PLLA birikimi nedeniyle kalın PGA fiberleri oluşur. Hücre yapışması, üremesi ve fonksiyonu PGA fiber ağından çok, PLLA ya da PLGA

kaplamayla belirlenir. Kaplama PGA fiberlerin mekanik özelliğinin gerekli olduğu durumlarda önem kazanmaktadır ancak PLLA ya da PLGA yüzey özellikleri hücre popülasyonu için daha önemlidir. Ne yazık ki bu teknik de kompleks 3-boyutlu doku iskelesi üretmek için tamamiyle mükemmel bir teknik değildir fakat içi boş (hollow) tüplerin üretiminde başarıyla kullanılmaktadır. Düz kas hücreleri ve ekstrasellüler matris (ECM) proteinlerini desteklemek için kullanılan tübüler yapıların üretiminde bu metot kullanılmaktadır (Kim et al., 1998). 7 günlük kültür sonunda, bu tüpler tamamen düz kas hücreleriyle kaplanmış, PGA ağ yapısının gözenekleri ECM proteinleriyle dolmuş ve en önemlisi tüplerin yapısı ve şekli korunmuştur. Şekil 2.14'de örülmüş PLGA doku iskelelerinin SEM görüntüsü yer almaktadır (Chen et al., 2002).



Şekil 2.14. a) Örülmüş PLGA doku iskelesi, b) PLGA-kollajen hibrid doku iskelesi, c) PLGA-kollajen hibrid doku iskelesi üzerinde üretilmiş insan fibroblast hücreleri, 1. gün.

### **2.3.2.2. Çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniği**

1994 yılında Mikos ve arkadaşları tarafından fiber bağlama tekniğinde karşılaşılan problemlerin üstesinden gelmek için çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniği geliştirilmiştir (Mikos et al., 1994). Uygun ısı muamelesiyle, istenilen özellikte alan/hacim oranına, kristaliniteye, gözenek yapısına ve boyutuna sahip sentetik biyobozunur polimerler hazırlanabilir. Mikos ve arkadaşları bu tekniği PLLA ve PLGA doku iskeleleri için geliştirmiştir ancak metot kloroform ve metilen klorür gibi çözücülerde çözünen her polimer için uygulanabilir. Yöntemin uygulanması sırasında tuz partikülleri PLLA/kloroform çözeltisinde dağıtılır ve cam yüzeye dökülür. Tuz partikülleri kloroformda çözünmez. Çözücü buharlaşmaya bırakılır ve son olarak da kalıntıların uzaklaştırılması için vakumla kurutma işlemi gerçekleştirilir. Sonuçta elde edilen PLLA/tuz bileşimine sahip membrandaki PLLA oldukça kristalin bir yapıya sahiptir. Fakat membranın kristalinitesi iki yolla kontrol



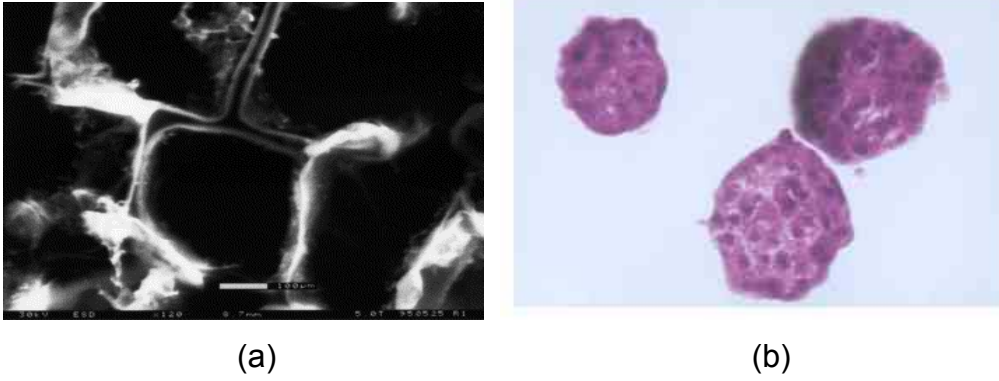
edilebilmektedir. Birinci yol, PLLA/tuz bileşimindeki membran yapısındaki tuzu uzaklaştırmak için suya daldırmaktır, bu yolla oldukça kristalin yapıda, tuzu uzaklaştırılmış PLLA membranlar elde edilebilmektedir. Alternatif yol ise, kontrollü kristaliniteye sahip PLLA membranlar üretmek için ısı muamelesinin uygulanmasıdır. PLLA/tuz bileşimindeki membran PLLA'nın erime noktasının üzerindeki bir sıcaklığa ( $>178^{\circ}\text{C}$ ) ısıtılır, buradaki amaç daha önceki proses basamaklarında oluşan polimer kristallerini tamamen eritmektir. Isıtılan PLLA/tuz membranı yavaş yavaş kontrollü bir hızla soğutularak ya yarı-kristalin yapı, ya da amorf membran elde edilebilir. En son olarak da, membran suya daldırılarak içerisindeki tuz uzaklaştırılır ve kurutulur.

Gözenekliliği % 93'e varan ve gözenek boyutu ortalama  $500\ \mu\text{m}$ 'ye yakın doku iskeleleri bu teknik kullanılarak hazırlanabilir. Farklı boyutta ve oranda tuz kullanılarak çeşitli yüzey alanı/hacim oranına sahip membranlar hazırlanabilmektedir. Yukarıda da bahsedildiği gibi istenilen uygulamaya göre membran kristalinitesi ayarlanabilmektedir. Tüm bu avantajlarına rağmen, en fazla 2 mm kalınlığa varan oldukça ince membranların üretilebilmesi tekniğin en önemli dezavantajlarından biridir.

Yukarıda bahsedilen teknikte karşılaşılan problemlerden birisi de, elde edilen doku iskelesinin kırılğan olması ve bu nedenle yumuşak doku uygulamalarında kullanılamamasıdır. Bu problemin üstesinden gelmek için, PLGA çözeltisi PEG ile karıştırılmış ve çözücü-döküm/partikül uzaklaştırma tekniği kullanılarak yumuşak köpük doku iskeleleri hazırlanmıştır (Wake et al., 1996). Polimer çözeltisindeki PEG oranı artırılarak iskelenin yumuşaklığı artırılabilir. Ayrıca çözeltinin bir tüp içerisine dökümü ile gözenek yapısına zarar vermeden tübüler yapıda köpük doku iskeleleri elde etmek mümkündür. Elde edilen bu doku iskeleleri kan damarları ve yemek borusu gibi çeşitli yumuşak dokuların yenilenmesinde kullanılmaktadır.

PLLA ve PLGA doku iskelelerine hücre ekimi yapıldığında karşılaşılan başka bir sorun ise polimerin hidrofobitesidir. Mooney ve arkadaşları PLGA doku iskelesini PVA polimer çözeltisine daldırarak polimerin hidrofobitesini arttırmışlardır (Mooney et al., 1994). Modifiye edilmiş ve edilmemiş PLGA doku iskeleleri üzerine hepatosit hücreleri ekilmiş ve hücrelerin modifiye edilmiş doku iskelelerinde daha yoğun bir şekilde ürediği gözlenmiştir.

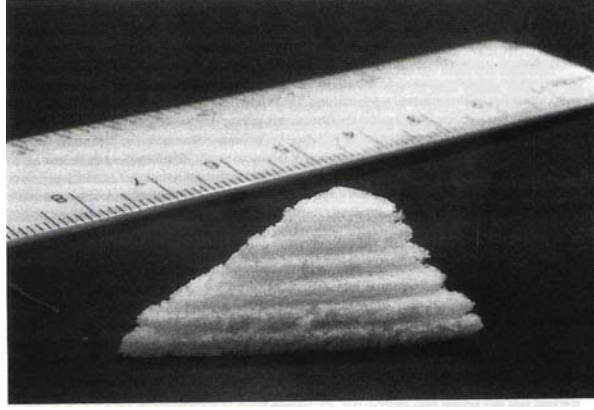
PLLA ya da PLGA doku iskelelerinde hücre ekimi için geliştirilen diğer yöntem ise, doku iskelelerinin önceden etanolle ıslatılmasıdır (Mikos et al., 1994). Bu metotda polimerik doku iskelesi 1 saat boyunca etanol çözeltisine daldırılmış ardından suyla yıkanmıştır. Böylece hava ile dolu gözeneklere su girişi sağlanmış ve suyla dolu boşluk hacim yüzdesi önemli oranlarda artırılmıştır. Hazırlanan doku iskelelerine ekilen kondrosit ve hepatosit hücreleri iskele yüzeyinde homojen bir dağılım sergilemiştir. Şekil 2.15'de tuz-uzaklaştırma tekniğiyle hazırlanmış PLLA köpük doku iskelesinin SEM görüntüsü ve akışlı kültürde PLLA doku iskelesi üzerinde üremiş hematoksilen-eozin (H-E) ile boyanmış hepatosit hücrelerine ait optik fotoğraf görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.15. a) Tuz-uzaklaştırma tekniğiyle hazırlanmış PLLA köpük doku iskelesinin SEM görüntüsü (Ma, 2004), b) Akışlı kültürde PLLA doku iskelesi üzerinde üremiş hematoksilen-eozin (H-E) ile boyanmış hepatosit hücreleri (Török et al., 2001).

### **2.3.2.3. Membran laminasyon tekniği**

Kıkırdak ve kemik gibi işlevi kısmen geometriye dayanan sert dokuların yenilenmesi için üç-boyutlu anatomik yapıda doku iskelelerine ihtiyaç vardır. Membran laminasyon tekniği kullanılarak oldukça yüksek gözenekliliğe sahip üç-boyutlu doku iskeleleri üretilmiştir (Mikos et al., 1993b). Orjinal membran homojen gözenek dağılımını koruduğu sürece laminasyon tekniği yararlıdır. Ayrıca iki tabaka arasındaki sınır bölgesi doku iskelesinin yığın yapısından ayırt edilemez şekilde olmalıdır. Bu metotda öncelikle, üç boyutlu anatomik yapının çevresi hazırlanır. Oldukça gözenekli yapıya sahip biyobozunur membranlar, çözücü-dökme/partikül uzaklaştırma tekniği kullanılarak hazırlanır. Bitişik membranlar, bağlantı bölgelerinin kloroformla kaplanmasıyla bağlanırlar. Böylece istenilen üç-boyutlu yapıdaki doku iskelesi tabaka tabaka üretilmiş olur (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Membran laminasyon tekniği kullanılarak burun şeklinde hazırlanmış PLLA doku iskelesi (Mikos et al., 1993a).

Membran laminasyon tekniği, PGA için kullanılamaz çünkü PGA sadece toksik çözücülerde çözülebilmektedir. Membran laminasyon tekniğine benzer bir metot tübüler stentlerin üretiminde kullanılmıştır (Mooney et al., 1994). Bu metotta çözücü-döküm/partikül uzaklaştırma tekniği ile gözenekli düz PLGA doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hazırlanan doku iskeleleri Teflon silindire sarılıp üst üste gelen köşeler az miktarda kloroform kullanılarak yapıştırılır. Daha sonra Teflon silindir uzaklaştırılır ve tüpün açık uçları eritilerek kapatılır. Elde edilen doku iskelesi intestin gibi tübüler dokuların yenilenmesinde kullanılmaktadır.

#### **2.3.2.4. Eriterek kalıplama tekniği**

Eriterek kalıplama tekniği üç-boyutlu doku iskelelerini hazırlamak için membran laminasyon tekniğine alternatif olarak kullanılmaktadır. PLGA tozlarının karışımı ve jelatin mikroküreler Teflon kalıplara dökülür ve polimerin camsı geçiş sıcaklığının üzerindeki sıcaklığa kadar ısıtılır. Ardından PLGA-jelatin bileşimi kalıptan uzaklaştırılır ve deiyonize suya daldırılarak jelatinin yapıdan ayrılması sağlanır böylece istenilen şekilde gözenekli PLGA doku iskelesi üretilmiş olur (Thomson et al., 1995).

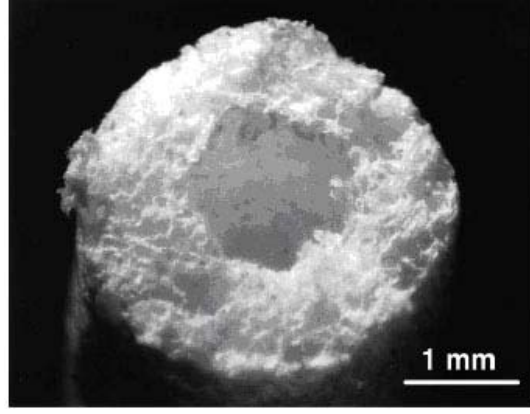
Bu metotla basit bir şekilde sadece kalıbın değiştirilmesiyle istenilen şekilde PLGA doku iskelesi üretilebilir. Ayrıca kullanılan jelatin boyutu ve miktarı değiştirilerek istenilen gözenek boyutu ve dağılımında doku iskelelerini elde etmek mümkündür. Organik çözücülerin kullanılmaması ve prosesin düşük sıcaklıkta yürütülmesinden dolayı yöntem, biyoaktif moleküllerin yüklenmesi ve kontrollü olarak dağıtımında kullanılabilir (Thomson et al., 1995). PGA için de bu yöntem uygulanabilir fakat bu

polimer yarıkristalin bir yapıya sahip olduğu için erime sıcaklığının üzerindeki bir sıcaklığa (>230°C) kadar ısıtma işlemi gereklidir. Yüksek sıcaklıkta ısıtma işlemi nedeniyle ilaç yükleme gerçekleştirilemez ve jelatin yerine gözenek yapıcı bir başka bileşeni kullanmak gereklidir çünkü ısıtma işleminin ardından jelatin suda çözünmez hale geçmektedir. Görüldüğü gibi bazı dezavantajlarının dışında yöntem istenilen özelliklerde doku iskelesi üretimi için uygundur ve jelatin dışında gözenek yapıcı olarak tuz ya da polimerik moleküller kullanılabilir.

### **2.3.2.5. Ekstrüzyon tekniği**

Ekstrüzyon tekniği endüstriyel polimerlerin işlenmesinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen doku mühendisliği uygulamaları için doku iskelesi üretiminde çok kullanılmamaktadır. Fakat 1998 yılında Widmer ve arkadaşları, çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniği ile ekstrüzyon yöntemini birleştirerek geliştirdikleri yeni bir teknikle periferal sinir yenilenmesinde kullanmaya yönelik olarak gözenekli biyobozunur yapılar üretmişlerdir (Şekil 2.17) (Widmer et al., 1998). Bu yöntem kısaca şu şekilde açıklanabilir; PLGA ve PLLA polimerleri gözenek yapıcı NaCl kullanılarak çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniğiyle ince gofret şeklinde hazırlanır. Daha sonra bu yapı istenilen boyutta kesilerek ekstrüdere yerleştirilir. Alet hidrolik basınca getirilir ve uygun işleme sıcaklığına ısıtılır. Ekstrüzyon aletinin başlık ve piston arasına basınç uygulanır ve polimer/tuz bileşimi tüp şeklinde ekstrüze edilir. Soğutma işleminin ardından suyla yıkamayla yapıdan tuzun uzaklaşması sağlanır ve son olarak doku iskelesi vakumla kurutulur.

Bu yöntemde en önemli parametre ekstrüzyon sıcaklığıdır. Ekstrüzyonu başlatmak için sıcaklık ne kadar yükselirse basıncı o kadar düşürmek gerekmektedir. Oldukça yüksek ekstrüzyon sıcaklığı kullanılmadığı sürece ürünün gözenek yapısı ekstrüzyon prosesinden etkilenmez. Yüksek ekstrüzyon sıcaklığı molekül ağırlığında azalmaya neden olacağından polimerin termal olarak bozunması gözlenebilir. Ayrıca yüksek ekstrüzyon sıcaklığında polimer viskozitesinin artışı nedeniyle gözenek çapında da azalma görülür. Fakat gözenek boyutu ve dağılımında en önemli etkenler kullanılan tuz kristalinin boyutu ve ağırlıkça oranıdır, bu parametreler değiştirilerek istenilen özellikte doku iskelesi üretmek mümkündür. Şekil 2.17'de ekstrüzyon tekniği kullanılarak hazırlanan gözenekli PLLA doku iskelesi görülmektedir (Widmer et al., 1998).

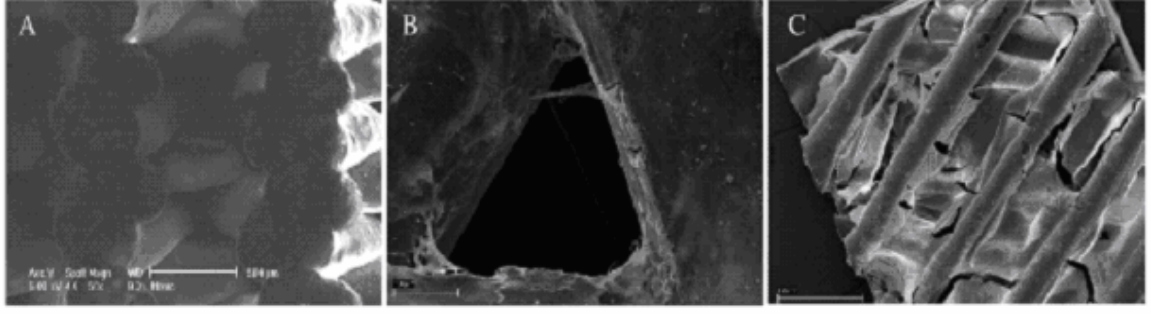


Şekil 2.17. Periferel sinir yenilenmesi için ekstrüzyon tekniği kullanılarak üretilen gözenekli PLLA doku iskelesi.

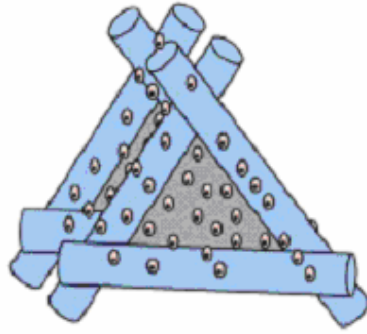
### **2.3.2.6. Üç-boyutlu baskı tekniği**

Üç-boyutlu polimerik doku iskelesi üretimi için geliştirilen en önemli tekniktir. Üç-boyutlu baskı (3DP) tekniği, steriolitografi, eriterek birikim modeli (FDM) ve lazerle sinterleme gibi teknikleri içeren genel olarak katı serbest-formu (SFF) metodu ya da hızlı prototiplendirme (RP) olarak bilinen gruba ait bir yöntemdir (Park et al., 1998). Üç-boyutlu baskı tekniğinde, ince bir tabaka halinde polimer tozu piston üzerine püskürtülür. Mürekkepli baskı makinasının başlığında polimer tozu tabakasının üzerine sıvı bağlayıcı (genellikle kloroform) gönderilir. Baskı makinasının başlığının konumu tümüyle bilgisayar-destekli tasarım ve imalat (CAD/CAM) programıyla kontrol edilmektedir. Piston indirilir ve polimer tozu ve sıvı tabaka uygulama basamakları tekrarlanır. Proses istenilen doku iskelesi yapısı elde edilene kadar sürdürülür. Bu yöntemle karmaşık yapıda, üç-boyutlu doku iskelesi 300 µm çözünürlüğe kadar tabaka tabaka üretilebilmektedir. Polimer toz yatağına tuz eklenerek gözenekli yapıda doku iskelesi üretilebilmektedir. PLLA ve PLGA doku iskeleleri bu yöntemle hazırlanmaktadır. Üç-boyutlu baskı tekniği ile hazırlanan PLLA ve PLGA doku iskelelerinin mekanik dayanımı, sıkıştırarak kalıplama tekniği kullanılarak hazırlanan doku iskeleleriyle karşılaştırılabilir düzeydedir (Giordano et al., 1996).

Bu yöntemle üretilen doku iskeleleri karaciğer dokusu çalışmalarında kullanılmıştır (Griffith et al., 1997). Üç-boyutlu baskı tekniği kullanılarak hazırlanan PLLA doku iskeleleri hücre yapışma çalışmalarında kullanılmıştır (Park et al., 1998). Şekil 2.18'de FDM ile hazırlanmış PCL/CaP doku iskeleleri üzerinde üretilmiş kemik hücreleri görülmektedir (Endres et al., 2003).



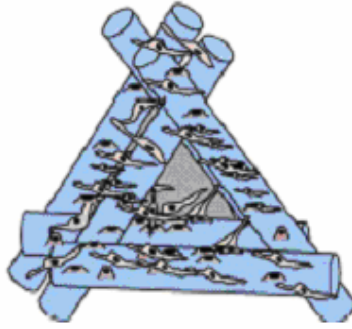
**Hücre Ekimi**



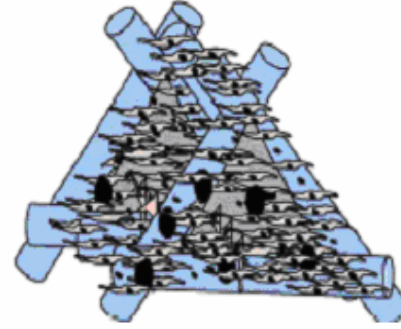
**Hücre Yapışması**



**Hücre Göçü ve Üremesi**



**Hücre Farklılaşması ve Yeni Dokunun Oluşumu**



Şekil 2.18. FDM ile hazırlanmış PCL/CaP doku iskeleleri üzerinde üretilmiş kemik hücreleri:

- PCL doku iskelesinde CaP partiküllerin homojen dağılımı,
- Osteoblastik hücrelerin geniş gözenek aralığında yapışması ve üremesi,
- Yaklaşık 3 hafta sonra doku iskelesi üzerinde yeni dokunun oluşumu.

### **2.3.2.7. Gaz köpüklendirme tekniği**

Gözenekli polimerik doku iskelesi hazırlamada kullanılan çözücü-döküm/partikül uzaklaştırma tekniği içerdiği birçok avantaja rağmen bazı dezavantajlara da sahiptir. En önemli dezavantajı proses süresince organik çözücülerin

kullanılmasıdır. Proses sonunda yapıda kalabilecek organik çözücüler in vitro ortamda toksik etkiler yaratırken in vivo ortamda enfeksiyona neden olabilir. Sözü geçen problemlerin üstesinden gelebilmek için gaz köpüklendirme tekniği geliştirilmiştir (Mooney et al., 1996b). Bu metotta, PLGA peletleri sıkıştırılarak katı disklere kalıplanır. Sıkıştırmanın ardından polimer yüksek basınç CO<sub>2</sub> ile doyunlaştırılır. Daha sonra CO<sub>2</sub> gazı basıncı atmosfer seviyesine düşürülerek termodinamik kararsızlık yaratılır ve sonucunda çözülmüş CO<sub>2</sub> yayılır ve yapıda makrogözenekler oluşur. Bu tekniğin en önemli avantajı hiç organik çözücü içermemesidir. Fakat, doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmeyen kapalı gözenek yapısında polimerik matris elde edilmektedir.

Açık gözenekli doku iskeleleri üretmek için yöntem partikül uzaklaştırma metoduyla birleştirilmiştir (Harris et al., 1998). Bu yöntemde tuz partikülleri PLGA peletleriyle karıştırılır ve karışım sıkıştırılarak katı diske dönüştürülür. Disk yüksek basınç gazla doyunlaştırılır ve basınç aniden düşürülür. Ardından tuz partikülleri uzaklaştırılır. Gaz köpüklendirme ve partikül uzaklaştırma metotlarının birleştirilmesiyle, organik çözücü kullanmadan doku iskelesi yapısında açık ve birbirleriyle bağlantılı gözenekler elde edilmektedir. Bu yöntemle üretilen doku iskeleleri üzerinde düz kas hücrelerinin yapıştığı ve ürettiği gözlenmiştir.

#### **2.3.2.8. Dondurarak/kurutma tekniği**

Farklı gözenek çapında ve dağılımında polimerik doku iskelesi elde etmek için kullanılan bir diğer yöntem ise emülsiyon/dondurarak-kurutma tekniğidir (Whang et al., 1995). Emülsiyon oluşturmak için PLGA/metilen klorür çözeltilisine su eklenir. Ardından karışım homojenize edilip bakır kalıba dökülür ve sıvı azota daldırılır. Yöntemin son basamağında polimerik doku iskelesi yapıdaki suyun ve çözücülerin uzaklaştırılması için dondurarak kurutulur. Bu metotla gözenek çapı ortalama 15-35 µm arasında ve % 90 gözenekliliğe varan doku iskeleleri elde edilmektedir. Çözücü döküm/partikül uzaklaştırma tekniği ile karşılaştırıldığında bu yöntemle daha yüksek gözenek yüzey alanına sahip ve kalınlığı 1 cm den fazla doku iskeleleri üretmek mümkündür. Fakat gözeneklerin toplam boyutu diğer yöntemdekinden daha küçüktür.

Dondurarak-kurutma tekniği ile üretilen doku iskeleleri ilaç dağıtım uygulamalarında da kullanılmaktadır (Hsu et al., 1997). PLLA, PLGA, PGA ve PLGA/poli (propilen fumarat) (PPF), kitosan, PCL polimerleri kullanılarak bu

yöntemle doku iskeleleri hazırlamak mümkündür (Tıǒlı et al., 2007). İstenilen polimer buzlu asetik asit ya da benzen içerisinde özölür ve -10°C veya -20 °C'de dondurulur. Dondurulan özelti çözücünün tamamen uzaklaşması için liyofilizer içerisinde 1 hafta boyunca dondurarak kurutulur. Elde edilen köpüğün morfolojisinde, kullanılan polimer türünün etkisi büyüktür. PLGA/PPF köpüğü tipik olarak kağıt broşür morfolojisine sahipken, PLLA, PLGA ve PGA köpükleri kapiler yapıdadır. Polimerik yapıya emdirilen ilacın salımında yine polimerin türü önemli rol oynar. PLGA/PPF köpüğü ilacı PLGA köpüğünden daha hızlı salmaktadır. PPF'nin molekül ağırlığı düştükçe yapıya daha fazla suyun girişini sağlar ve bu da ilacın köpükten difüzyonunu artırır. Fakat, bu teknikle hazırlanan polimerik köpükler içerdikleri kapalı gözenekler ve sadece ilaç salım sistemleriyle sınırlı olmaları nedeniyle doku mühendisliğı uygulamalarına çok uygun değillerdir.

#### **2.3.2.9. Faz ayrımı tekniğı**

Faz ayrımı tekniğı ilk olarak ilaç salımındaki problemleri çözmek amacıyla 1995 yılında Lo ve grubu tarafından geliştirilmiştir (Lo et al., 1995). Polimer, düşük sıcaklıkta, erimiş fenol, naftalin ya da dioksan gibi çözücülerde özölür. Sıvı-sıvı yada katı-sıvı faz ayrımı çözelti sıcaklığının düşürülmesiyle gerçekleştirilir. Ardından, süblimleşmeyle, katılaşmış "özücüyle zenginleştirilmiş faz" uzaklaştırılır ve gözenekli polimerik doku iskelesi hazırlanmış olur. Bu yöntemin en önemli avantajı, biyoaktif moleküllerin sert kimyasal yada termal etkenlerden dolayı aktivite kaybına uğramamasıdır. Fakat, polimerin türü, konsantrasyonu, çözücü/çözünmeyen oranı ve en önemlisi termal strateji gibi faktörler, gözenekli doku iskelesi morfolojisini önemli ölçüde etkilemektedir. Yöntemin dezavantajı büyük protein yapısındaki ilaçların yüklenmesi ve salımında hala aktivite kaybıyla karşılaşılmasıdır.

#### **2.3.2.10. Polimer/Seramik kompozit köpük hazırlama tekniğı**

Bilim adamları için kemik yenilenmesinde kullanılacak doku iskelesi tasarımı her zaman ilgi odağı olmuştur. Kemik için geliştirilecek doku iskelesinin dikkat çekmesinin iki ana nedeni bulunmaktadır. Öncelikli olarak kemik hasarları düzensiz şekillerde meydana geldiğı için kullanılacak doku iskelesinin üç-boyutlu fakat düzensiz bir şekle sahip olması beklenmektedir. İkincisi, geçici olarak kullanılan doku iskelesinin yenilenme gerçekleşene kadar dayanımını koruması gerekmektedir. Poli ( $\alpha$ -hidroksi ester)-bazlı doku iskeleleri birçok ortopedik



uygulamada kullanılmış fakat gözenek yapısı arttırılmaya çalışıldıkça iskelenin sıkıştırma dayanımı azalmıştır (Thomson et al., 1995).

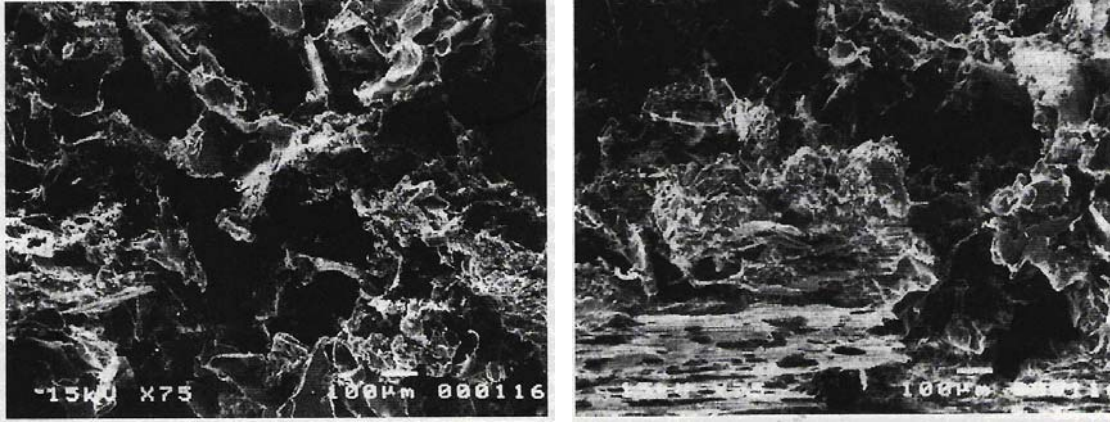
Köpük yapıdaki doku iskelesinin mekanik dayanımını arttırmak için Poli ( $\alpha$ -hidroksi ester) iskelet yapısına kısa hidroksi apatit (HA) fiberler eklenmiştir (Thomson et al., 1998). Üç-boyutlu doku iskelesi üretmek için kullanılan eritmeyle kalıplama tekniği ne yazık ki kompozit köpük üretimi için uygun değildir. Mekanik dayanım için yapıya eklenen fiberler doku iskelesi içerisinde sadece, fiber-polimer bağlantısının maksimum, fiber-fiber bağlantısının minimum düzeyde tutulduğu şekilde dağıtılırsa etkilidir.

Kısa HA fiberler ve gözenek yapıcı moleküller (jelatin mikroküreler ya da tuz partikülleri) PLGA/diklorometan çözeltisinde dağıtılır. Çözücünün uzaklaştırılması ve kurutmanın ardından sıkıştırarak kalıplamayla kompozit malzemeye üç-boyutlu şekil verilir. Gözenek yapıcının yapıdan uzaklaştırılması ile gözenekli, üç-boyutlu kompozit doku iskelesi elde edilir (Şekil 2.19).

### **2.3.2.11. In situ polimerizasyon tekniği**

Şimdiye kadar tartışılan polimer-işleme teknikleri uygun dokunun yenilenmesinde kullanılacak olan doku iskelelerinin üretimine yöneliktir. Hazırlanan bu doku iskeleleri çoğu doku mühendisliği uygulamaları için uygundur fakat bazı ortopedik ameliyatlarda mekanik dayanımın acilen sağlanması gerekmektedir. Örneğin bazı kemik hasarlarında, mekanik dayanımı sağlamak için biyobozunur olmayan PMMA kemik dolgu malzemesi kullanılmaktadır. Biyobozunur PPF (polipropilen fümarat) bazlı geçici kemik dolgu malzemeleri aynı amaçla geliştirilmiştir (Yaszemski et al., 1996; Peter et al., 1999a). Doymamış doğrusal bir poliester olan PPF, oda sıcaklığında viskoz bir sıvıdır. NVP ile katılma polimerizasyonu sonucu PPF çapraz bağlanabilir ve biyobozunur kemik dolgu malzemesi olarak kullanılabilir. Çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleştiğinde PPF sıvı viskoz yapısından macunumsu bir yapıya dönüşür ve reaksiyon tamamen bitince katı bir hal alır. Sıvı ve macunumsu yapıdayken dolgu malzemesi hasarlı yapıya enjekte edilebilir ya da dökülebilir. Çoğu katılma polimerizasyonu ekzotermiktir ve çevreye ısı yayar. In situ polimerize olan PMMA bölgesel doku nekrozuna neden olur. Daha az ısının olduğu PPF ve NVP nin çapraz bağlanması gerçekleştirilmiş (Peter et al., 1999b) ve bölgesel doku nekrozunun olmadığı çalışmalar yapılmıştır (Yaszemski et al., 1996). PPF dolgu malzemesine çapraz bağlanma sırasında gözenek oluşturmak

için sodyum klorür ve yeni kemik büyümesini indüklemek için  $\beta$ -trikalsiyum fosfat maddesi eklenmiştir.  $\beta$ -trikalsiyum fosfat ayrıca dolgu maddesinin mekanik dayanımını arttırmıştır. 1997 yılında Peter ve grubu yüksek-molekül ağırlıklı PPF ve  $\beta$ -trikalsiyum fosfat kullanarak mekanik dayanımı hemen hemen insan kemiğine yakın doku iskelesi üretmeyi başarmıştır (Peter et al., 1997; 1998). Şekil 2.19'da Thomson ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada hazırlanan NaCl/HA-PLGA kompozit doku iskelesi görülmektedir (Thomson et al., 1998).



(a)

(b)

Şekil 2.19. NaCl ve HA kullanılarak hazırlanmış PLGA kompozit doku iskelesi (NaCl partikül boyutu 300-500  $\mu$ m arasındadır):  
a) Ağırlıkça % 70 NaCl kullanılmış doku iskelesi,  
b) Ağırlıkça % 90 NaCl kullanılmış doku iskelesi.

PLGA köpük doku iskelelerini güçlendirmenin başka bir yolu da HA fiberler yerine HA partiküllerin kullanılmasıdır (Devin et al., 1996). Bu yöntemde gözenek oluşturmak için emülsiyon tekniği kullanılır. Sodyum klorür ve HA partikülleri PLGA/kloroform çözeltisinde süspanse edilir. Emülsiyon oluşturmak için sulu polivinil alkol (PVA) çözeltisi süspansiyona eklenir. Emülsiyon silindirik kalıplara dökülür ve vakumla kurutulur. Kurutulan matrisler yapıdan tuzun uzaklaştırılması için suya daldırılır ve proses sonunda gözenekli doku iskelesi elde edilmiş olur. Gözenek çapı 18-150  $\mu$ m arasında değişir ve PVA çözeltisinin konsantrasyonu ve kullanılan tuz partiküllerinin boyutu oluşan gözenek çapını belirlemede etkili parametrelerdir. HA partiküllerinin ağırlıkça yüzdesi değiştirilerek doku iskelesinin sıkıştırma dayanımı artırılabilir.

Polimer/seramik kompozitlerin hazırlanmasında kullanılan alternatif bir yöntem de faz geçiş tekniğidir (Zhang and Ma, 1999). Bu metotda HA tozları PLGA/dioksan

çözeltisine eklenir. Faz ayrımını sağlamak için karışım birkaç saat dondurulur ve ardından çözücünün süblimleşmesi için dondurarak kurutulur. Oluşan kompozit köpük birbiriyle bağlantılı, düzensiz gözenekleri içerir. Saf PLGA polimerik yapıdan elde edilen köpüklerin sıkıştırma dayanımı bu yöntemle elde edilenden oldukça zayıftır. Polimer konsantrasyonu, HA miktarı, çözücü tipi ve faz-ayrımı sıcaklığı değiştirilerek gözeneklilik, gözenek çapı ve yapısı kontrol edilebilmektedir. Bu yöntemle 30-100 µm gözenek boyutuna sahip, % 95 gözenekliliğe varan kompozit köpükleri üretmek mümkündür.

### **2.3.2.12. Nano-yapılı ve biyoaktif doku iskelesi üretme tekniği**

Biyolojik olarak aktif moleküller ve hücre-dışı matris bileşenleri hücrelerle nano-ölçekte etkileşim halindedir. Bu nedenle günümüzde nano-yapılı doku iskelelerinin tasarımı can alıcı hale gelmiştir.

#### **2.3.2.12.i. Nano-fibröz doku iskeleleri**

Hücre-dışı matrisin temel bileşeni olan kollajenden ortalama 50-500 nm fiber çapına sahip fibröz yapılar elde etmek mümkündür (Hay, 1991; Elsdale and Bald, 1972). Nano-yapılı doku iskelesi üretimi için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Aşağıda bu tekniklerden kısaca bahsedilecektir.

#### **Elektrostatik eğirme (Electrospinning)**

Electrospinning tekniği 1930'lu yıllardan önce endüstriyel uygulamalar ve ev için gerekli dokunmamış fabrik yapıların üretimi için geliştirilmiştir (Formhals, 1934). Son on yılda teknik, doku mühendisliği uygulamaları için mikrometre ya da nanometre boyutunda fiber çapına sahip biyobozunur ve/veya biyouyumlu ipliksi yapıların üretimi için geliştirilmiştir. Polimer çözeltisi başlık/uç kısımda polimer damlacığı oluşacak şekilde kapiler boyunca gönderilir. Uç kısımla topraklanmış toplama bölgesi arasına yüksek voltaj uygulanır. Eğer elektrik alan gerilimi damlacığın yüzey geriliminin üzerindeyse polimer çözelti fiskiyesi toplama bölgesine doğru hızlandırılır. Fiskiye havada yol aldıkça yapıdan çözücü uzaklaşır ve toplama bölgesinde dokunmamış fabrik yapı oluşur. Eğer yönlendirilmiş ve tübüler yapılar hazırlanmak istenirse toplama bölgesi olarak topraklanmış döner silindir kullanılabilir. Kollajen ve fibrinojen gibi doğal makromoleküller ve PCL, PGA, PLGA, ve sentetik polipeptitler gibi sentetik polimerler kullanılarak doku mühendisliği uygulamaları için dokunmamış fibröz yapıları elde etmek mümkündür

(Mathews et al., 2002; Luu et al., 2003; Wnek et al., 2003). Fakat hala bu yöntemle karmaşık, üç-boyutlu ve gözenek ağ yapısına sahip iskeleleri üretmede problemlerle karşılaşmaktadır. En önemli dezavantaj ise ECM fiberlerinden daha büyük çapta fiberlerin eldesidir, hatta bazen fiber çapı mikrometre boyutunda olmaktadır.

### **Kendiliğinden yapılanma (Self-assembly)**

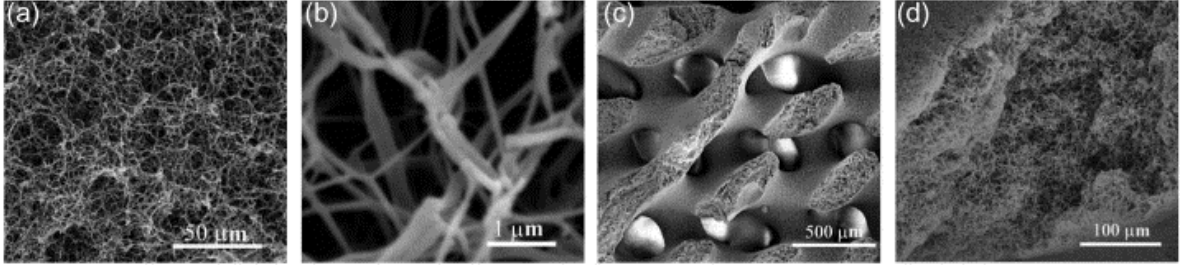
Nano-boyutlu/desenli yapılar hazırlanmak istendiğinde kullanılan diğer bir teknik “self-assembly” metodudur. Basit olarak self-assembly, bileşenlerin insan müdahalesi olmadan kendiliğinden organize olmasıdır (Whitesides, 2002).

Kollajenin üçlü heliks yapısını taklit etmek için peptid amfifiller (PAs) sentezlenmiştir (Yu et al., 1997; Fields et al., 1998; Yu et al., 1999). Kollajen peptid baş grup içeren PA uzun ester lipidleriyle bağlıdır. Peptid baş grubu kollajen gibi üçlü heliks formunu oluştururken, lipid kuyruk kısmi hidrofobik etkileşimler yoluyla üç-boyutlu yapıyı korur. Fakat hala çok moleküllü fiber yapı tam olarak anlaşılammıştır.

Çok moleküllü fiber yapılar elde etmek için daha karmaşık yapısal bölgeler içeren PA molekülleri sentezlenmiştir (Hartgerink et al., 2001; Hartgerink et al., 2002). Bu yöntemle merkezinde hidrofobik kuyrukları, dış kısmında hidrofilik başları içeren silindirik misel tüp şeklinde, 5-8 nm çapında ve 1µm'den uzun PA yapıları hazırlanabilmektedir. Yapı disülfid bağlarıyla stabilize edilir (Hartgerink et al., 2001). Farklı hidrofobik amino asitleri ve iyonik segmentleri içeren oligopeptidler sentezlenmiştir (Zhang et al., 2002; Zhang, 2003). 10 nm fiber çapına sahip bu yapılar heliks yapı yerine β-tabaka yapısını içermektedir.

### **Faz ayrımı**

Polimerlerin faz ayrımı bir self-assembling prosesi olarak da düşünülebilir. Yeni geliştirilen faz ayrımı tekniğiyle sentetik biyobozunur polimerlerden nano-fibröz yapılar elde edilmiştir (Ma and Zhang, 1999; Ma and Zhang, 2000; Zhang and Ma, 2001). Örneğin PLLA çözeltileri kullanılarak faz ayrımı ve jel oluşumu yöntemiyle polimerce zenginleştirilmiş nano-fibröz ağ yapılar elde edilmiştir (Ma and Zhang, 2000) Şekil 2.20'de faz ayrımı tekniği kullanılarak hazırlanmış PLLA-bazlı doku iskeleleri görülmektedir.



Şekil 2.20. a) Faz ayrımı tekniği kullanılarak hazırlanan PLLA/THF nano-fibröz yapılar (x500 büyütme), b) x20000 büyütme, c) Sarmal tübüler makrogözenekli PLLA nano-fibröz yapılar (x35 büyütme), (d) x250 büyütme.

Üç-boyutlu nano-fibröz yapıları geliştirmeye yönelik olarak önceden tasarlanmış makrogözenekli ağlar kullanılmıştır (Zhang et al., 2000; Ma and Zhang, 2000). Şeker molekülünden hazırlanmış, suda çözünür fiberler (çapları 100 µm'den 1 mm ye kadar) üç-boyutlu yapı oluşturacak şekilde birleştirilir. PLLA çözeltisi hazırlanan üç-boyutlu yapıya dökülür, termal olarak faz ayrımı sağlanır ve bu yöntemle nano-fibröz yapı elde edilmiş olur. Çözücünün uzaklaştırılmasının ardından, yıkamayla şeker molekülü yapıdan uzaklaştırılır ve istenen sarmal tübüler gözenek ağ yapısı hazırlanmış olur. Benzer bir şekilde hazırlanan küresel makro gözenekler içeren nano-fibröz yapıların hücre yapışmasını ve üremesini desteklediği görülmüştür (Woo et al., 2003; Chen and Ma, 2004).

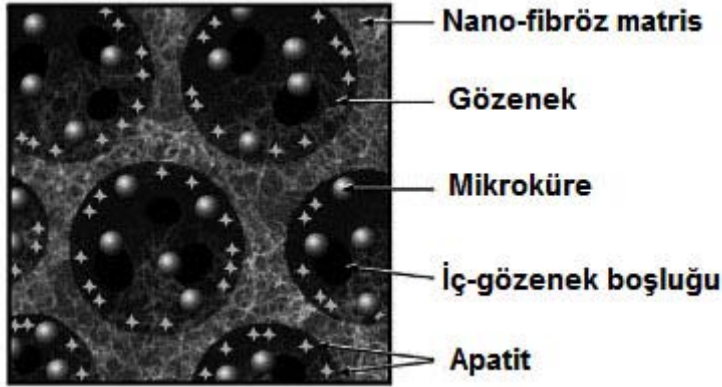
### **2.3.2.12.ii. Nano kompozit doku iskeleleri**

Mineralize doku mühendisliği uygulamaları için polimer/inorganik kompozit malzemeler geliştirilmiştir. Mineralize dokulardaki ve kemikteki mineral kristallerin boyutunu taklit etmek için nano boyutlu-HA molekülü sentetik ya da doğal makromoleküllerle birleştirilip nano-kompozit doku iskeleleri elde edilmektedir (Du et al., 1999; Liu and Ma, 2004). Nano-HA/polimer kompozit doku iskeleleri sadece polimerik doku iskelelerinin mekanik dayanımını arttırmamış, mikro-HA/polimer doku iskelelerine nazaran protein adsorpsiyonunun da artmasına neden olmuştur. Dolayısıyla hücre yapışması ve fonksiyonu da arttırılmıştır (Woo et al., 2003).

### **2.3.2.12.iii. Biyoaktif doku iskeleleri**

İdeal bir doku iskelesinin en önemli gereksinimi hücre yapışması, üremesi, farklılaşması ve göçüne olanak sağlamasıdır. Doku iskelesi-hücre etkileşimini istenilen düzeyde tutmak için polimerik malzemenin yüzey ve yığın özellikleri modifiye edilmeye çalışılmaktadır (Cook et al., 1997; Hubbell, 1999; Zhang and

Ma, 1999; Shi and Ratner, 2000). Polimer zincirine fonksiyonel grup takılarak ya da kopolimerizasyonla polimerin yığın özelliği değiştirilebilir, dolayısıyla hazırlanan doku iskelesinin işleme özellikleri ve mekanik dayanımı değiştirilmiş olur (Barrera et al., 1993; Cook et al., 1997; Hubbell, 1999). Gözenekli doku iskelesinin eldesinden sonra, plazma yüzey modifikasyonu ile doku iskelesi modifiye edilebilir (Nitscheke et al., 2002; Hu et al., 2003). Bu tür modifikasyon teknikleri iki-boyutlu yapılar ya da oldukça ince üç-boyutlu doku iskeleleri için uygundur. Karmaşık, gözenekli üç-boyutlu doku iskelelerinde ise yüzey sadece iskelenin dış bölgesi değil, üç-boyutlu iç kısmını da içermektedir. Yapay vücut sıvısı (SBF, synthetic body fluid) üç-boyutlu gözenekli yapının iç kısmını kimyasal olarak modifiye etmek için kullanılmaktadır (Zhang and Ma, 1999; Ma and Zhang, 2001). Doku mühendisliği uygulamaları için biyolojik olarak aktif molekülleri ve genleri içeren üç-boyutlu biyomimetik doku iskeleleri geliştirilmiştir (Whang et al., 2000; Mahoney and Saltzman, 2001; Lee et al., 2002; Midha et al., 2003; Zhang and Ma, 2004; Wei et al., 2004). Şekil 2.21’de örnek bir biyomimetik doku iskelesi görülmektedir.



Şekil 2.21. Biyomimetik nano doku iskelesi.

Yukarıda ayrıntılı olarak bahsedilen doku iskelesi üretim tekniklerinin her biri kendi içinde avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Çizelge 2.3’de üç-boyutlu doku iskelesi hazırlamak için kullanılan yöntemler özetlenmiştir. Herhangi bir teknik için “her türlü doku onarımı ya da yenilenmesi için uygundur” demek tamamıyla yanlıştır. Bu durumda ideal bir doku iskelesi üretim tekniğinden bahsedilemez. Sonucunda, hedeflenen uygulama ve kullanılacak polimerik malzemeye göre üretim tekniğini belirlemenin en doğru olduğu söylenebilir.

Çizelge 2.3. Üç-boyutlu doku iskelesi üretim teknikleri.

Üretim Teknikleri	İşleme için Gerekli Malzeme Özellikleri	Doku İskelesi Tasarımı ve Üretilirliği	Elde Edilen Gözenek Boyutu ( $\mu\text{m}$ )	Gözeneklilik (%)	Elde Edilen Doku İskelesi Özellikleri
Çözücü-döküm/partikül uzaklaştırma	Çözünür olmalıdır	Kullanıcı gereklidir, malzeme ve teknik hassastır	30-300	20-50	Küresel formda gözenekler elde edilir, doku iskelesinin içerisinde tuz partikülleri kalır
Membran laminasyon	Çözünür olmalıdır	Kullanıcı gereklidir, malzeme ve teknik hassastır	30-300	< 85	Düzensiz gözenek yapısı elde edilir
Dokunmamış fabrik üretimi	Fiber formunda olmalıdır	Makine kontrollüdür	20-100	< 95	Mekanik dayanımı yetersizdir
Eriterek kalıplama	Termoplastik yapıda olmalıdır	Makine kontrollüdür	50-500	< 80	
Ekstrüzyon/partikül uzaklaştırma	Termoplastik yapıda olmalıdır	Makine kontrollüdür	< 100	< 84	Küresel formda gözenekler elde edilir, doku iskelesinin içerisinde tuz partikülleri kalır
Emülsiyon/dondurarak kurutma	Çözünür olmalıdır	Kullanıcı gereklidir, malzeme ve teknik hassastır	< 200	< 97	Birbiriyle bağlantılı oldukça mikrogözenekli yapı elde edilir
Faz ayrımı	Çözünür olmalıdır	Kullanıcı gereklidir, malzeme ve teknik hassastır	< 200	< 97	Birbiriyle bağlantılı oldukça mikrogözenekli yapı elde edilir
Süperkritik-akışkan	Amorf yapıda olmalıdır	Malzeme ve teknik hassastır	< 100	10-30	Birbiriyle bağlantılı olmayan mikrogözenekli yapı elde edilir
Süperkritik-akışkan/partikül uzaklaştırma	Amorf yapıda olmalıdır	Malzeme ve teknik hassastır	Mikrogözenekler < 50 Makrogözenekler < 400	< 97	Mikrogözenekliği düşük yapılar elde edilir
Üç-boyutlu baskılama	Çözünür olmalıdır	Makine ve bilgisayar kontrollüdür	45-150	< 60	Tamamen birbiriyle bağlantılı makrogözenekler içeren yapı elde edilir
Eriterek birikim modeli	Termoplastik yapıda olmalıdır	Makine ve bilgisayar kontrollüdür	> 150	< 80	Tamamen birbiriyle bağlantılı makrogözenekler içeren yapı elde edilir

Doku iskelesi yapımında yaygın olarak kullanılan polimerleri; sentetik-biyobozunur polimerler; doğal makromoleküller ve hidrojel olarak üç ana başlık altında toplamak mümkündür. Sentetik-biyobozunur polimerler içinde, doğrusal alifatik poli esterler grubunda yer alan poli(glikolik asit; PGA) ve poli(laktik-ko-glikolik asit; PLGA) doku iskelesi yapımında en yaygın olarak kullanılan polimerlerdir (Pachence and Kohn, 2000; Zhang and Ma, 2001; Ma, 2004). Kollajen, glikozaminoglikanlar ve polisakkaritler polimerik doku iskelesi yapımında kullanılan doğal makromoleküllere örnek olarak verilebilir (Shapiro and Cohen, 1997; Mueller et al., 1999; Badylak, 2002). Aljinat, kollajen, fibrin ve poli(etilen glikol; PEG) hidrojel de üçüncü gruba girmektedir (Kuo and Ma, 2001; Laurencin et al., 2001).

Sunulan tez çalışmasında polimerik doku iskelesi tasarımında sentetik biyobozunur poli( $\epsilon$ -kaprolakton) ve biyobozunur olmayan dokunmamış poliester fabrik (NWPF) kullanılmıştır. Bu nedenle bu iki polimerik yapı hakkında ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir.

### **Dokunmamış poliester fabrik (NWPF)**

Fabriklerin biyomalzeme olarak kullanımı, geleneksel olarak dokunmuş ve örülmüş tekstil yapılarının yaygın şekilde uygulaması olarak karşımıza çıkmıştır. Polietilenteraftalat (PET) bazlı damar greftlerinin geliştirilmesinden önce dokunmuş, dokunmamış ve örgülü selüloz fabrikler, sağlık endüstrisi tarafından kullanılan, fiber-bazlı malzemelerin önemli türü olarak gösterilmişlerdir (Williams and Roaf, 1973; Hoffman, 1977). Son yıllarda ise, daha ileri polimer ve fiber işleme tekniklerinin geliştirilmesiyle, geleneksel olmayan fabrik yapıları ve fabrik benzeri fiber-bazlı ürünler ortaya çıkmıştır. Bunlar biyomalzeme olarak çeşitli uygulamalarda başarıyla kullanılmıştır (Boretos and Edeen, 1984).

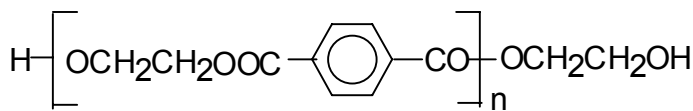
Dokunmamış poliester yapı, polietilen teraftalat (PET) fiberlerin üç-boyutlu ve rastgele yerleştirilmesiyle hazırlanmıştır. Teraftalik asit veya onun dimetil esteri etilen glikol ile reaksiyona girer ve PET'e polimerize olan bir diester monomer oluşturur. Moleküler yapı Şekil 2.22'deki gibidir.

Sentezlenen polimer bir spinneretten geçirilerek bükülüp eğilir ve oluşan PET lifler ısı etkisiyle birbirine ilştirilerek dokunmamış yapıyı oluşturur. NWPF biyolojik ortamda bozunmayan, güneş ışığına ve aşınmaya karşı dirençli, dolaşmaz ve



sökülmez bir yapıya sahiptir. Fabrik yüksek gerilime sahiptir ve yırtılmaya karşı dayanıklılık gösterir. Ayrıca birçok temizleyici çözücülere, yüzey aktif maddelerine, bilinen tekstil kimyasallarına ve kuvvetli olmayan asit ve bazlara karşı yüksek kimyasal direnç gösterir. Bu özellik NWPF'nin kullanımdan önce temizlenmesine olanak sağlar. NWPF 205°C'daki sıcaklıklara kadar dirençli olduğundan otoklavlanabilme özelliğine de sahiptir. Bu da sterilizasyon kolaylığı açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır. NWPF'yi çeşitli gözenek büyüklüğünde, farklı kalınlık ve yoğunlukta piyasada bulmak mümkündür (Davis and Hill., 1986; Bohak et al.,1987).

NWPF diskler, yüzeye-bağımlı hücreler için ve istenilen ürün hücre tarafından salgılanan bir madde olduğunda uygun yüzey sağlar. Poliester fiberlerin üç-boyutlu düzeni, küçük fiber çapları (10-20µ ) ve fiber yakınlığı, hazırlanan disklerin çok geniş "yüzey alanı/hacim" oranına sahip olmasını sağlar. Bu özellik de genellikle döner şişeler, dekstran tanecik mikrotasıyıcılar, gözenekli cam boncuklar ve diğer bilinen metotlardakinden daha yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılmasına olanak sağlar. Hücreler döner şişelerde ve mikrotasıyıcılarda olduğu gibi, aynı yöntemle NWPF diskler üzerine inoküle edilir. Diskler, jel taneciklerdeki gibi kültür öncesi hücrelerin kapsüllenmesini gerektirmeksizin hidrodinamik kayma etkilerinden korunmayı sağlar ve sadece son hücre yoğunluğunun %2-5'i gibi nispeten küçük hücre yoğunluklarıyla inoküle edilebilirler. Diskler genellikle protein kaplanmasını gerektirmediğinden, disk fiberlerine tutunan hücreler, yapıştıkları yüzeyi bozmazlar (Bohak et al.,1987; Kadouri et al., 1989; Baker et al.,1991; Kompier et al.,1991; Wang et al.,1992). Aslankaraoğlu, (2006) doktora tez çalışması kapsamında üç boyutlu dokunmamış poliester fabrik (NWPF) destekli dolgulu reaktörlerde hibridoma kültürü yapmış ve monoklonal antikor üretmiştir. Şaşmazel ve arkadaşları (2007), NWPF diskleri insülin ve heparin ile modifiye ederek düşük serum ortamında L929 fare fibroblast hücre üretiminde kullanmışlardır. Çetinkaya ve arkadaşları (2007), fare embriyonik kök hücre üretimi için LIF-immobilize NWPF diskler geliştirmiştir.



Şekil 2.22. Polietilen teraftalat (PET)'in moleküler yapısı.

## **Poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL)**

Alifatik bir poliester olan poli ( $\epsilon$ -kaprolakton), biyomalzeme olarak kullanımına yönelik olarak yoğun biçimde araştırılmaktadır (Pitt, 1990). PCL'nin moleküler yapısı Şekil 2.23'de görüldüğü gibidir. PCL'nin mikroorganizmalar tarafından bozunabileceğinin keşfinden sonra bu polimerin biyobozunur ambalaj malzemesi olarak kullanımı gündeme gelmiştir (Pitt, 1990). Ardından PCL'nin fizyolojik koşullarda hidroliz mekanizmasıyla da bozunabileceği keşfedilmiştir (Pitt et al., 1981a). Belirli koşullarda, çapraz-bağlı PCL enzimatik yüzey erozyonu mekanizmasıyla enzimatik olarak bozunabilir (Pitt et al., 1981b; Li et al., 2003). PCL'nin düşük molekül ağırlıklı parçalarının makrofajlar tarafından hücre içine alınıp diğer poli (hidroksi asitlere) benzer bir şekilde bozunduğu kaydedilmiştir (Pitt et al., 1984). Poli(glikolik asit; PGA) ya da poli(laktik asit; PLA) ile karşılaştırıldığında PCL'nin bozunma hızının oldukça yavaş olduğu görülmektedir. Bu nedenle PCL, uzun süreli implante edilen sistemler için uygundur. 1 yıl boyunca implante edilen doğum kontrol aleti Capronor® buna en güzel örnektir (Pitt, 1990).

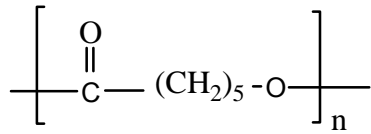
Poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) diğer alifatik poliesterlerde görülmeyen özellikler sergiler. Bunlardan en önemlileri, -62 °C olan düşük camsı geçiş sıcaklığı ve 57°C olan erime sıcaklığıdır. Diğer farklı özelliği ise yüksek sıcaklık dayanımıdır. Alifatik poli esterlerin bozunma sıcaklığı 235 ile 255°C aralığında iken, PCL'nin bozunma sıcaklığı ise daha çok poli (orto ester)'ler için alışılmış olan 350°C'dir (Engelberg and Kohn, 1991). PCL yarı kristalin bir polimerdir ve düşük camsı geçiş sıcaklığına sahip olduğu için oda sıcaklığında her zaman kauçuğumsu haldedir. Bu özellik de alifatik poliesterler için alışılmış değildir. PCL sahip olduğu bu ayrıcalık dolayısıyla, çoğu terapötik ilaç uygulamalarında yüksek geçirgenlik sergiler (Sosnik and Cohn, 2003).

PCL'nin diğer polimerlerle uyumlu karışımlar oluşturması da önemli bir avantajdır (Koleske, 1978). Ayrıca  $\epsilon$ -kaprolakton, etilen oksit, kloropren, tetrahidrofuran, d-valerolakton, 4-vinilanisol, sitiren, metil metakrilat, vinil asetat gibi monomerlerle kopolimerleştirilebilir. Örneğin,  $\epsilon$ -kaprolakton ve laktik asidin kopolimeri yağın olarak çalışılmaktadır (Honda et al., 2003; Sarazin et al., 2004; Cho et al., 2004). Daha önce bahsedilen doğum kontrol aleti Capronor dolayısıyla PCL'nin toksik etki testleri yapılmıştır. Gerçekleştirilen pek çok testin sonucunda,  $\epsilon$ -kaprolakton

monomerinin ve PCL polimerinin toksik olmayan ve doku-uyumlu malzemeler olduğu bulunmuştur. Capronor FDA tarafından klinik uygulamalar için onay almıştır (Pitt, 1990).

Çok yönlü özelliklere sahip olmasına rağmen PCL şimdiye kadar çoğunlukla kontrollü ilaç salım sistemlerine ait uygulamalarda kullanılmıştır. Avrupa'da araştırmacılar PCL'nin medikal alanda başka uygulamalar için yer bulacağına inanmaktadır. Bugüne kadar geniş çapta PCL araştırmaları Pitt ve grubu tarafından gerçekleştirilmiştir (Pitt, 1990).

Son yıllarda PCL doku mühendisliği uygulamalarına yönelik kullanımıyla da dikkati çekmektedir (Wei et al., 2005; Sarkar et al., 2006). Özellikle taşıdığı mekanik özellikler nedeniyle PCL osteoblast ve kondrosit hücre kültürü çalışmaları için tercih edilmektedir (Ciapetti et al., 2003; Honda et al., 2003). Ayrıca Serrano ve arkadaşları (2004), PCL doku iskelelerinin L929 fare fibroblast hücrelerinin yapışması ve üremesi için son derece uygun olduğunu kanıtlamışlardır.



Şekil 2.23. Poli(ε-kaprolakton)'un kimyasal yapısı.

#### 2.4. Biyosinyal Molekülleri

Hücre fonksiyonları hücre-hücre, hücre-ECM (hücre dışı matris) ve hücre-biyosinyal molekülleri arasındaki etkileşimler olmak üzere üç yolla düzenlenir (Gumbiner and Yamada, 1995). Katerin ailesi hücre-hücre etkileşimine bir örnektir. Kollajen ise tipik bir ECM proteindir ve bu bileşenler çözünmemiş halde, heterojen olarak hücre fonksiyonlarını kontrol ederler. Öte yandan, hücre fonksiyonları hormonlar tarafından çözülmüş halde, homojen olarak kontrol edilir. Çizelge 2.4'de biyosinyal molekülleri (büyüme faktörleri) sınıflandırılmıştır.

Çizelge 2.4. Biyosinyal moleküllerinin (büyüme faktörlerinin) gruplandırılması.

Üstgrup	Grup	Örnek
Transforming growth factor $\beta$ (TFG $\beta$ )	Transforming growth factor $\beta$ İnhibin Bone morphogenetic protein	TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3 İnhibin A, İnhibin B, Aktivin A hBMP-2, hBMP-3
Platelet derived growth factor (PDGF)	Platelet derived growth factor Vascular permeability factor Connective tissue growth factor	PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB VPF, VEGF, PIGF CTGF, CEF-10
Epidermal growth factor (EGF)	Epidermal growth factor	EGF, TGF- $\alpha$ , AR
Yok	Fibroplast growth factor	aFGF, Bfgf, INT-2
Yok	İnsulin-like growth factor	İnsulin, IGF-1, IGF-2

*Biyosinyal molekülleri iki ana gruba ayrılır;*

- Molekül ağırlığı düşük olanlar; Bu gruba steroid hormonları örnek olarak verilebilir. Bu tür biyosinyal molekülleri hücre membranını geçip hücre çekirdeği ile doğrudan etkileşime girerler.
- Molekül ağırlığı yüksek olanlar; Bu gruba polipeptid büyüme faktörleri örnek olarak verilebilir. Bu tür biyosinyal molekülleri hücre membranını geçmektense reseptörleriyle etkileşimi gerçekleştirirler. Molekül ağırlığı yüksek olan biyosinyal molekülleri reseptörleriyle hedeflenen hücre yüzeyine bağlanır ve oluşan biyosinyal-reseptör kompleksi hücre içindeki lizozomda ayrılır ve parçalanır. Serbest kalan reseptörlerden bazıları hücre yüzeyine geri taşınır ve bu olay “endositozis” olarak adlandırılır. Bunun yanında, hala endositozisin polipeptid biyosinyaller için gerekliliği kesinlik kazanmamıştır.

Eğer biyosinyal molekülü çözünmez formda kullanılırsa ya da biyomalzemeye immobilize edilirse biyosinyal-reseptör kompleksi oluştuktan sonra bu kompleks

hücre içine yerleşmez. Yukarıda da bahsedildiği gibi biyosinyalizasyon için endositozisin gerçekleşmesi kesin ve şart değildir.

#### **2.4.1. İmmobilize biyosinyal ile reseptörü arasındaki biyospesifik etkileşim**

Hücre üremesi immobilize biyosinyal molekülü ile reseptörü arasındaki biyospesifik etkileşimden kaynaklanır. Bu etkileşim için aşağıda verilen yaklaşımlar öne sürülmektedir.

- a) Hücre üreme faktörlerinin dışında immobilize edilen diğer proteinler hücre üremesini hızlandırmamaktadır. Örneğin albumin,  $\gamma$ -globulin, fibrinojen ve fibronektin serumsuz ortamda hücre üremesini arttırmazken, serumlu ortamda hücre yapışma faktörü olan fibronektinin hücre yapışmasını ve üremesini arttırdığı gözlenmiştir (Ito and Imanishi, 1987).
- b) İnsülinin immobilize edildiği biyomalzemelerde ortamda anti-insülin antikor kullanılırsa hücre üremesi inhibe edilmiş olur (Cuatrecasas, 1969). Bunun nedeni antikorun immobilize insülinle reseptörü arasındaki biyospesifik etkileşimi inhibe etmesidir.
- c) İmmobilize insülin sadece yüzeye bağımlı hücrelerde üremeyi hızlandırır, hidridoma gibi yüzeye bağımlı olmayan hücrelerde etkili değildir (Liu et al., 1993). Hatta insülinin immobilize edilerek kullanıldığı fare hidridoma hücre kültüründe hücre üreme hızının daha düşük olduğu gözlenmiştir. Çünkü hidridoma hücreleri matris yüzeyine yapışmaz ve hücrelerin immobilize insülinle etkileşimi muhtemelen serbest insülinle etkileşiminden daha azdır.

#### **2.4.2. İmmobilize biyosinyallerin etki mekanizması**

İmmobilize edilmiş biyosinyal moleküllerin, yüzeye tutunmuş ya da serbest halde kullanılan biyosinyallere nazaran hücre üremesini daha fazla desteklemesinin nedenleri aşağıda verilmiştir.

- a) İnsülin immobilize edildiğinde yerel konsantrasyonu artırılmış olur. Bu artış çoklu-eş zamanlı uyarılara yol açar, reseptörlerle kompleks oluşumu sağlanır ve ardından oluşan bu kompleks yapıların çapraz bağlanması hızlanmış olur. Sinyal geçişinde komplekslerin çapraz bağlanması çok önemlidir, bu prosesin hızlanmasında immobilize biyosinyallerin rolü büyüktür.

- b) Biyosinyal molekülünün immobilizasyonu ile hücre yüzeyindeki reseptör sayısı azalır ve güçlü uyarılara karşı hassasiyet azalır dolayısıyla “down regulation” inhibe edilmiş olur. Down regulation, hücre-içi reseptörlerin bozunmasıdır. İmmobilize biyosinyal molekülüyle devamlı sinyalizasyon sağlanmaktadır.
- c) Bazı raporlara göre bilinmeyen ve biyospesifik olmayan etkileşimler dikkate alınmalıdır. Örneğin, spesifik olmayan etkileşimler biyosinyal molekülünün reseptörüyle etkileşimini kolaylaştırabilir ve bu da biyosinyalin etkinliğinin artırılması demektir.

İmmobilize biyosinyallerin etki mekanizmasını arttırmak için iki yaklaşım öne sürülmektedir;

- a) Daha önce bahsedildiği gibi biyosinyal/reseptör kompleksinin çapraz bağlanması çok önemlidir. Uzaticı kol kullanımı ile immobilize biyosinyal molekülünün esnekliği artırılabilir. Fibroblast hücre üremesinin uzaticı kol yardımıyla artırıldığı gözlenmiştir (Liu et al., 1992).
- b) Hücre iletişimi için birçok biyosinyal molekülü vardır. Bu biyosinyal molekülleri hücrel homeostazisi sürdürmek için kompleks ağlar oluşturur. Bu durum düşünüldüğünde farklı biyosinyal moleküllerinin koimmobilizasyonu ile hücre yapışma ve üremesinin artırılabilceği öne sürülebilmektedir (Ito et al., 1997).

#### **2.4.3. Biyosinyal-immobilize malzemelerin uygulamaları**

Biyosinyaller immobilize edilerek in vivo ve in vitro çalışmalarda kullanılmıştır. İlk uygulamalar yapay organlar üzerine, sonrakiler ise hücre kültür çalışmaları için gerçekleştirilmiştir.

- a) Sentetik malzemelerle organların hibridleştirilmesi yapay organlar için son derece umut vericidir. Hibrid yapay organa verilebilecek en güzel örnek yapay kan damarıdır. Kan damarı endotel hücreleriyle kaplı plastik tüpten yapılmıştır. İnsülin ve kollajen gibi biyosinyal moleküllerinin immobilizasyonu ile endotelizasyon artırılmıştır (Auger et al., 1998).
- b) Memeli hücre kültürü, hem teknolojik araştırmalar, hem de biyolojik malzemelerin geniş çapta endüstriyel olarak üretimleri açısından büyük

önem taşır. Hücre kültürü çalışmalarında hücre üremesini desteklemek için serum ya da serum bileşenleri kullanılmaktadır. Fakat serum kullanımı maliyeti arttırmakta ve kültür ortamından çeşitli ürünlerin ayrımı sırasında serum proteinleri nedeniyle zorluklar meydana gelmektedir. Bu nedenle, immobilize biyosinyal molekülleri kullanılarak serumsuz ortamda hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmektedir (Ito et al., 1996; Gümüşderelioğlu and Türkoğlu, 2002).

Literatür çalışmalarında şimdiye kadar, immobilize biyosinyal moleküllerinin yararları araştırılmıştır. Immobilize insülinin etkisinin biyospesifik bir etkileşime dayandığı bilinmesine karşın mekanizma tam olarak anlaşılmış değildir. Bundan sonraki çalışmalarda biyosinyal mekanizmasının biyokimyasal açıdan daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

Yukarıda bahsedildiği gibi immobilize biyosinyal molekülleri sadece yüzeye bağımlı hücreler için üremeyi arttırmaktadır. Fakat gelecek çalışmalarda immobilize biyosinyal sistemlerinin yüzeye bağımsız hücreleri de kapsayan her tür hücre tipi için uyarlanması düşünülebilir. Bunun için Ito ve Imanishi (Ito and Imanishi, 1994) biyomalzemenin hücre için tasarımını değil de, hücrenin biyomalzeme için tasarımı görüşünü öne sürmektedir.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir. Çalışmada iki farklı yapıda doku iskelesi kullanılmıştır. Kullanılan doku iskelelerinden ilki çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniği ile hazırlanan PCL yapılar, ikincisi ise NWPF (dokunmamış poliestere fabrik) yapılarıdır. Çalışma iki ana bölümde gerçekleştirilmiştir.

İlk bölümde, iki farklı gözenek yapıcı (PEG<sub>4000</sub> ve sakkaroz) varlığında, çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniği ile PCL doku iskelelerinin hazırlanışına yer verilmiştir. Ardından doku iskelelerinin yapısal ve morfolojik olarak karakterizasyonu ele alınmıştır. Son olarak ise bu doku iskelelerinin hücre-destek malzemesi olarak uygunluğunu test etmek için L929 fibroblast hücre hattı ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarına değinilmiştir.

İkinci bölümde ise PCL ve NWPF doku iskelelerinin düşük basınç su/O<sub>2</sub> ve atmosferik basınç su/hava plazma yöntemleri ile modifikasyonu verilmiştir. Plazma proseslerinin optimizasyonu yazılım programı kullanılarak yapılmıştır. Proses optimizasyonunun ardından düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifikasyonu tamamlanan PCL ve NWPF doku iskeleleri oksalil klorür ile muamele edilerek polimerik yüzeylerde karboksil grupları oluşturulmuştur. Takibinde PCL ve NWPF yapıları karboksil grupları üzerinden PEO uzatıcı kol varlığında insülin ve heparin biyolojik moleküllerinin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Modifikasyon öncesi ve sonrasında PCL doku iskelelerinin çeşitli spektroskopik veya kimyasal yöntemler kullanılarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve tamamlanan karakterizasyon çalışmaları ayrıntılı olarak bu bölümde verilmiştir. Son olarak PCL ve NWPF doku iskelelerinin L929 fare fibroblastları ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları sunulmuştur.

#### 3.1. Kimyasal Maddeler

PCL doku iskelelerinin hazırlanması aşamasında kullanılan poli ε-kaprolakton (lineer, molekül ağırlığı=80000 g/gmol) Aldrich (Almanya) ve gözenek yapıcı olarak kullanılan polietilen glikol (PEG<sub>4000</sub>, ortalama molekül ağırlığı=3300-4000 g/gmol) BDH (İngiltere) firmalarından temin edilmiştir. Sakkaroz kristalleri (ortalama boyut=2.16±0.32 × 1.34±0.16 mm, 100'den fazla sakkaroz kristalinin bilgisayarda tarayıcıda görüntüleri alınmış ve Sigma Scan Pro 5, Sigma software programı



kullanılarak kristal boyutları hesaplanmıştır) ve çözücü olarak kullanılan diklorometan Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

PCL (PEG<sub>4000</sub>/PCL, sakkaroz/PCL) ve NWPF polimerik doku iskelelerinin plazma ile modifikasyonundan sonra, polimerik yüzeylerde karboksil gruplarının eldesi/zenginleştirilmesi aşamasında kullanılan oksalil klorür (molekül ağırlığı=126.93 g/gmol) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Plazma modifikasyonu ve oksalil klorür fonksiyonizasyonu sonrası yüzeyde oluşan OH ve COOH fonksiyonitesinin belirlenmesi için işaretleyici ajan olarak kullanılan 9-antrasen karboksilik asit (222.24 g/gmol) ve 9-antrasen metanol (208.06 g/gmol) ise yine Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Argon ve oksijen gazları Linde Gaz LLC (Amerika) firmasından sağlanmıştır.

PCL ve NWPF polimerik doku iskelelerinin immobilizasyon aşamasında kullanılan polioksietilen bis (amin) (PEO, ortalama molekül ağırlığı=3350 g/gmol), insülin (molekül ağırlığı= 5733.5 g/gmol) ve heparin (sodyum tuzu, 181 ünite/mg) Sigma (Amerika) firmasından temin edilmiştir. Yine immobilizasyonda kullanılan aktivasyon ajanı; 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (WSC, molekül ağırlığı=191.7 g/gmol), tampon çözeltileri; 2-N (morfolino) etan sülfat (MES, molekül ağırlığı= 217.2 g/gmol) ve sodyum sitrat (molekül ağırlığı=294.1 g/gmol), süksinik asit (molekül ağırlığı=118.1 g/gmol) ve fosfat tampon tabletleri (PBS tableti, pH=7.4) Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Polimerik doku iskelelerine takılan PEO ve immobilize edilen insülin miktarının tayininde kullanılan floresamin (molekül ağırlığı=278.26 g/gmol) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Polimerik doku iskelelerinin hücre kültürü çalışmasının ardından hücrelerin konfokal lazer taramalı mikropskopa görüntülenmesi için uygulanan boyama tekniği aşamasında kullanılan Triton X-100 (molekül ağırlığı=646.85 g/gmol) Acros (Amerika) firmasından satın alınmıştır. Yine aynı aşamada kullanılan Aleksa flor 488 palloidin (molekül ağırlığı=1320 g/gmol) Invitrogen (Amerika) firmasından; BSA (bovine serum albumin, % >96 albumin), glutaraldehit çözeltisi (% 25) ve propidyum iyodür (% 95) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

## **3.2. Çözücü-Döküm/Partikül-Uzaklaştırma Yöntemiyle Hazırlanan PCL Doku İskeleleri**

### **3.2.1. PEG<sub>4000</sub>/PCL doku iskelelerinin hazırlanması**

PEG<sub>4000</sub>/PCL doku iskeleleri çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma metoduyla hazırlanmıştır. PCL (ağırlıkça % 7.5) ve farklı ağırlık yüzdelerinde PEG<sub>4000</sub> (% 0, 10, 20, 30, 40, 50, 55) diklorometanda çözülmüş, manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmış ve karışım (5 ml) oda sıcaklığında Petri kaplarına (7 mm çap) dökülmüştür. Örnekler iki gün ağızları alüminyumla kaplı Petri kaplarında bekletildikten sonra 17 saat boyunca 40°C deki inkübatöre koyulmuş, bu süre sonunda inkübatörden alınan örnekler kalan çözücülerin uzaklaşması için tekrar 3 gün boyunca oda sıcaklığında kurutulmuş ve ağırlıkları kaydedilmiştir ( $W_i$ ). Herbir örnek 14 gün boyunca 75 ml'lik deiyonize su içerisine konulmuş ve yapıdaki PEG'i uzaklaştırmak için suları hergün değiştirilmiştir. 14 günün sonunda deiyonize sudan çıkarılan örnekler 1 gün oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3 gün boyunca vakum etüvünde kurutulmuş ve son olarak da kurutma işlemi tamamlanan örneklerin tartımları gerçekleştirilmiştir ( $W_s$ ).

### **3.2.2. Sakkaroz/PCL doku iskelelerinin hazırlanması**

İki farklı ağırlık yüzdesinde (% 10 ve 20) sakkaroz içeren Sakkaroz/PCL doku iskelelerinin hazırlanmasında daha önce PEG<sub>4000</sub>/PCL doku iskelelerinin hazırlanmasında kullanılan çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma metodu kullanılmıştır. Cam Petri kaplarına (7 mm çap) konulan sakkaroz kristalleri % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelesi için 5 ml, % 20 Sakkaroz/PCL doku iskelesi için ise 10 ml hacimde ve ağırlıkça % 7.5 PCL içeren diklorometan çözeltisi ile tamamen ıslatılmıştır. Çözücünün yapıdan tamamen uzaklaşması için 3 gün boyunca oda sıcaklığında bekletilen doku iskeleleri 3. günün sonunda tartılmışlardır ( $W_i$ ). Hazırlanan her bir doku iskelesi 3 gün boyunca 75 ml'lik deiyonize su içerisine konulmuş ve yapıdaki sakkarozu uzaklaştırmak için suları hergün değiştirilmiştir. 3. günün sonunda deiyonize sudan çıkarılan örnekler 1 gün oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 saat boyunca vakum etüvünde kurutulmuş ve ardından 3 gün boyunca labotaruvar ortamında kurumaya bırakılmışlardır. Son olarak da kurutma işlemi tamamlanan örneklerin tartımları gerçekleştirilmiştir ( $W_s$ ).

### 3.2.3. Karakterizasyon çalışmaları

#### 3.2.3.1. PEG<sub>4000</sub>/PCL ve Sakkaroz/PCL doku iskelelerinin kalınlıkları ve uzaklaşan PEG<sub>4000</sub> ve sakkaroz yüzdeleri

PEG<sub>4000</sub>/PCL ve sakkaroz/PCL doku iskelelerinin kalınlıkları mikrometreyle ölçülmüş ve ortalama kalınlık aynı seri altındaki 6 farklı doku iskelesinin kalınlıklarının ortalamasının alınmasıyla hesaplanmıştır.

Gözenekli PCL doku iskelelerinden uzaklaştırılan PEG<sub>4000</sub> ve sakkaroz yüzdesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Uzaklaştırılan PEG}_{4000} \text{ veya sakkaroz yüzdesi (\%)} = \frac{(W_i - W_s) / \text{ağırlıkça yüklenen PEG}_{4000} \text{ veya sakkaroz}}{\text{veya sakkaroz}} \times 100 \quad (3.1)$$

Burada  $W_i$  ve  $W_s$  değerleri sırasıyla, gözenek yapıcılarının uzaklaştırılması öncesi ve sonrası doku iskelelerinin ağırlığıdır.

#### 3.2.3.2. PCL doku iskelelerinin morfolojisi

Sunulan çalışmada hazırlanan doku iskelelerinin yüzey ve kesit yapısı taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) (Leo 435 VP, UK) ile incelenmiştir. Vakum ortamında yüzeyleri altınla kaplanarak iletken hale getirilen örneklerin yüzey ve kesitinden alınan SEM fotoğrafları Bölüm 4.1.1.4'de sunulmuştur. SEM incelemeleri Türkiye Çimento Müstahsilleri Birliği (Ankara) laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca, gözenek boyutu ve dağılımı da SEM analizi ile değerlendirilmiş ve her bir SEM fotoğrafından yaklaşık 50 adet gözenek çapı hesaplanarak ortalama gözenek çapı bulunmuştur.

Doku iskelelerinin görünür yoğunluğu ve gözenekliliği aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\rho^* \text{ (g/cm}^3\text{)} = m \text{ (g)}/V \text{ (cm}^3\text{)} \quad (3.2)$$

$$\varepsilon = 1 - \rho^*/\rho \times 100 \quad (3.3)$$

Eşitliklerde kullanılan  $\rho^*$  doku iskelelerinin görünür yoğunluğunu,  $\varepsilon$  gözenekliliği,  $\rho$  ise gözeneksiz PCL doku iskelesinin yoğunluğunu ( $\rho = 0.210 \pm 0.036 \text{ g/cm}^3$ ) ifade etmektedir.

### **3.2.3.3. DSC analizi**

Hazırlanan PCL yapıların camsı geçiş sıcaklığı (T<sub>c</sub>) ve erime sıcaklığı (T<sub>e</sub>) değerlerinin ölçülmesi için DSC (Shimadzu-50, Japonya) cihazı kullanılmıştır. PCL bazlı doku iskelelerinin karakterizasyonu için yaklaşık 5 mg örnekler alüminyum örnek kaplarına yerleştirilerek preslenmiştir. Örneklerin termogramı 20°C/dak ısıtma hızında ve -100°C ile +100°C sıcaklık aralığında 100 ml/dak akış hızıyla beslenen N<sub>2</sub> atmosferinde alınmıştır.

### **3.2.3.4. FTIR analizi**

Hazırlanan örneklerin FTIR spektrumları, FTIR-8101 (Shimadzu) cihazı ile alınmıştır. PEG<sub>4000</sub>/PCL doku iskelelerinin FTIR spektrumu, ağırlıkça (% 0, 10, 20, 30, 40, 50, 55) PEG içeren PCL polimerik çözeltilerinin KBr tuzuna dökülmesiyle elde edilen peletlerden çekilmiştir. Ayrıca saf PEG<sub>4000</sub> ve sakkaroz a ait FTIR pikleri de toz örneklerle hazırlanan KBr disklerden alınmıştır. Sakkaroz/PCL doku iskelelerinin FTIR spektrumu için örnekler 1 cm çapındaki diskler şeklinde kesilmiştir. Tüm örneklerin FTIR ölçümü 400-4000 cm<sup>-1</sup> dalgaboyu aralığında alınmıştır.

### **3.2.4. Hücre kültür çalışmaları**

Çalışmalarda kullanılan L929 fare fibroblast hücreleri Ankara Şap Enstitüsü, Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir (HÜKÜK No: 92123004). Yüzeğe-bağımlı olarak üreyebilen bu hücreler "monolayer kültürler"de çoğaltılmaktadır.

L929 hücreleri % 10 (hacimce) fetal calf serum (FCS, Sigma, Amerika) içeren "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" (DMEM, Sigma, Amerika) besi ortamı kullanılarak 25 cm<sup>2</sup> ve 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda kültür edilmişlerdir. Ayrıca, antibiyotik olarak % 1 (hacimce) penisilin (100 U/ml, Sigma, Amerika) ve streptomisin (100 µg/ml, Biological Industries) ilavesi yapılmıştır. İnkübasyon ortamı olarak ise % 95-98 nem, % 5 CO<sub>2</sub> ve % 95 hava içeriğine sahip CO<sub>2</sub> etüvü (Heraus, Instruments, Almanya) kullanılmıştır. Etüv sıcaklığı 37±0.5°C'dir.

Hücre kültür çalışmaları, her bir gözü 1.5 cm çapa sahip 24-gözlü PS hücre kültür kaplarındaki (Costar, Amerika) durgun koşullarda ve % 10 fetal calf serumla yürütülmüştür. Petri kaplarının her gözü parafilm ile kaplanarak hücrelerin Petri kabına değil, PCL doku iskelelerine yapışmasına izin verilmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak boş PS Petri yüzeyi (TCPS, doku kültürü polistiren) kullanılmıştır.

Karakterizasyon çalışmalarının sonuçları değerlendirilmiş ve hücre kültür deneylerinin 3 tür PCL doku iskelesi ile yapılmasına karar verilmiştir. Bunlar; % 100 PCL, % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL, % 10 Sakkaroz/PCL doku iskeleleridir. Çalışma öncesi parafilm kaplı Petri kapları % 95 etanol içerisine daldırılmış ve 45 dakika süreyle UV ışınıyla sterilize edilmiştir. PCL doku iskeleleri 30°C'de etilen oksit sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Sterilizasyonu gerçekleştirilen doku iskeleleri (5 mm çapında) her bir göze 3'er adet olmak üzere 24-gözlü Petri kaplarına (1.5 cm çaplı) yerleştirilmiştir. Flaskda "confluent layer" oluşturduğu gözlenen hücreler (yani logaritmik üreme fazında bulunan aktif hücreler), tripsin (DIFCO, ABD) ile muamele edilerek flask yüzeyinden koparılmış ve Petri kaplarına yerleştirilen PCL doku iskelelerinin üzerine ekilmiştir. Herbir göze 1 ml,  $5 \times 10^4$  hücre/ml derişimdeki hücre çözeltisi koyulmuştur. Polimerik yüzeylere yapışan hücreler % 25 tripsin (DIFCO, ABD) kullanılarak yüzeyden ayrılmış ve toplam hücre sayısı hemositometrik sayım (Bürker) yöntemiyle kaydedilmiştir. Hücre sayım yöntemi Ek 1'de açıklanmıştır.

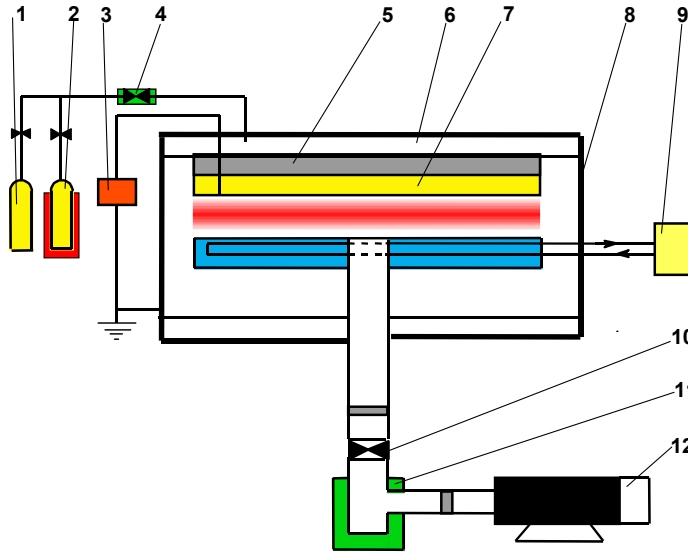
Hücrelerin üremesini ve aynı zamanda fizyolojik/patolojik değişimlerini gözlemek için örnekler ışık misroskobu (Olympus, Amerika) altında farklı büyütmelerde incelenmiştir.

### **3.3. Doku İskelelerinin Farklı Koşullarda Oluşturulan Plazmalar İle Modifikasyonu**

Çalışma 2 farklı doku iskelesi ile yürütülmüştür. Bunlar, Reemay firmasından temin edilen 2214 kodlu NWPF (Amerika) ve ilk bölümde çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniğiyle hazırlanan PCL (PEG<sub>4000</sub>/PCL, sakkaroz/PCL) doku iskeleleridir. Söz konusu iki farklı polimerik doku iskelesinin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla (vakum reaktör) ve atmosferik basınç su/hava plazmayla (AER; Array Electrode Reactör) modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar Amerika Birleşik Devletleri Wisconsin/Madison Üniversitesi CPAM (Plazma Destekli Üretim Merkezi) biriminde yürütülmüştür. Bu bölümde öncelikli olarak, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmanın gerçekleştirildiği vakum ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonunun gerçekleştirildiği AER (Array Electrode Reactor) reaktörleri hakkında bilgi verilmiştir.

## Vakum reaktör

Silindirik, paslanmaz çelik, 40 kHz güç kaynağı içeren, kapasitörle çalışan RF (radyo frekans) plazma reaktörü kullanılmıştır. Paralel plaka soğuk plazma reaktörü olarak da adlandırılan reaktör, disk şeklinde paslanmaz çelik elektrodlardan oluşmuştur (çap 20 cm), elektrotlar arası boşluk 3 cm dir (Denes et al., 1995). Ayrıca sistemde basınç (MKS 600 Series), su ve oksijen kütle akış (MKS M100B/247C) kontrolörü bulunmaktadır. Şekil 3.1’de, reaktör şematik olarak görülmektedir.



Şekil 3.1. Paralel plaka soğuk plazma reaktörünün şematik gösterimi;

(1) Gaz tankı, (2) Reaktif rezervuarı, (3) RF jeneratörü, (4) Akış kontrolörü, (5) Elektrik yalıtıcı disk, (6) Gaz karışım çemberi, (7) Merdane-tipi paslanmaz çelik üst elektrod (8) Silindirik reaksiyon çemberi, (9) Elektrikle ısıtılan alt elektrod için sıcaklık kontrolörü, (10) Kelebek vana, (11) Paslanmaz çelik sıvı nitrojen kapağı, (12) Mekanik vakum pompası.

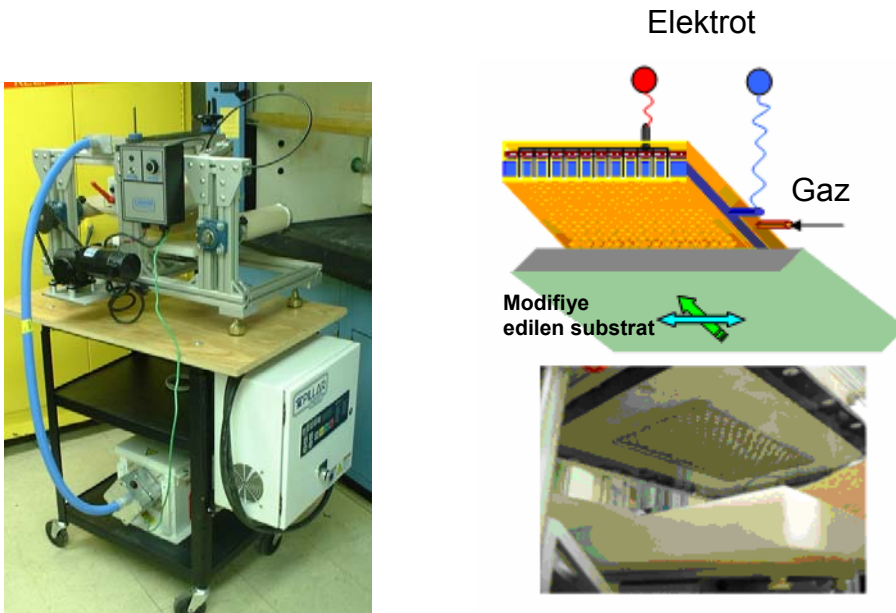
## AER reaktör (Array Electrode Reactor)

AER plazma reaktörü, çoklu-silindir/kablo elektrot donanımından oluşan ve kesikli ya da sürekli akış sistem operasyon modunda, atmosferik basınçta gaz yada gaz karışımlarının prosesini ve yüzeyin plazmayla modifikasyonunu sağlayan bir sistemdir. Elektrot array sistemi farklı elektrot sistemlerinden oluşmuştur. Topraklanmış çoklu-delikli elektrot merkezden yalıtılmıştır ve gerilimli-kablo elektrot yüksek dielektrik seramik tüplerden oluşmaktadır. Seramik tüpler paslanmaz çelik blok elektrodun alt ve üst yüzeyini kaplamaktadır ve onların da üst

ve alt bölümleri silikon kauçukla kaplanmıştır. Tüm gerilimli elektrotlar piring plakayla bağlantılıdır, ayrıca bu plaka silikon kauçukla topraklanmış elektrot dan yalıtılmıştır. Bu elektrot konfigürasyonu sayesinde gaz ve gaz karışımlarının silindirik tüplerdeki homojen akışı sağlanmış olur. Array elektrot sistemi, elektrotların kablo/silindir (nokta/düzlem) konfigürasyonu sayesinde kararlı bir plazma ortamı sunmaktadır. Ayrıca özel silindirik elektrot array konfigürasyonu sayesinde plazmanın substrat yüzeyine belirli sınırlarda, doğrudan gönderilmesi sağlanır.

Sistemdeki çoklu/delik topraklanmış elektrot ve elektriğe bağlı kablo elektrot arasında potansiyel farkı oluşturulur. Bu potansiyel farkından dolayı oluşan elektrik alana su buharı ve hava gönderilerek plazma ortamı oluşturulur. Substrat yüzeyinde bulunan kimyasal kontaminantların ve bakterilerin bu sistemle üstesinden gelinebilmektedir.

AER reaktörü spesifik olarak tasarlanmış elektrot sistemi sayesinde diğer atmosferik basınç gaz-faz tekniklerinin dezavantajlarını ortadan kaldırmıştır. Elektrod sistemi ve modifiye edilecek substrat arasındaki uzaklık oldukça azdır ve bu şekilde substratın modifikasyon verimliliği artırılmış olur. İletken ve dielektrik yüzeyler (cam, kağıt, polimer) homojen olarak plazmayla modifiye edilebilmektedir. Patentli AER reaktörünün fotoğrafı ve şematik olarak görünümü Şekil 3.2' de verilmiştir.



Şekil 3.2. Patentli AER reaktörünün fotoğrafı ve şematik olarak gösterimi.

### **3.3.1. PCL doku iskelelerinin plazma ile modifikasyon çalışmaları**

Düşük basınç su/O<sub>2</sub> ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonları ile tüm PCL yapıların yüzeyinde COOH fonksiyonalitesinin eldesi/zenginleştirilmesi hedeflenmiştir.

#### **3.3.1.1. PCL doku iskelelerinin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifikasyonu**

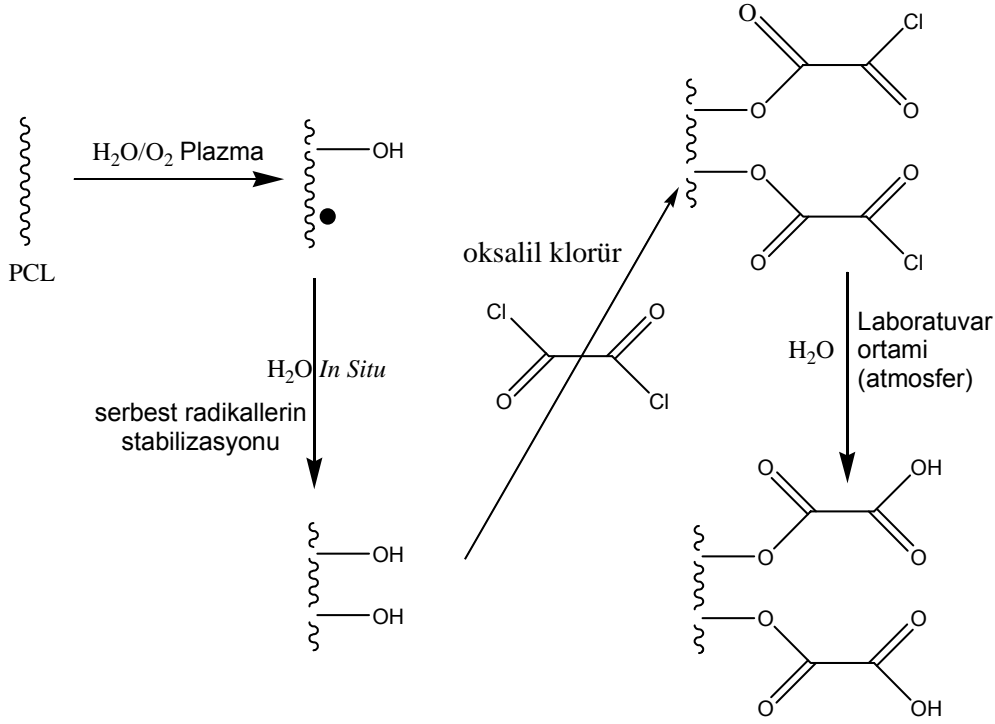
##### **PCL doku iskelelerinin hazırlanması**

PCL doku iskeleleri (% 100 PCL, % 20 PEG<sub>4000</sub>/PCL, % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL, %10 Sakkaroz/PCL ve % 20 Sakkaroz/PCL) çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma yöntemi ile hazırlanmış ve yöntemin ayrıntıları Bölüm 3.2'de verilmiştir. Hazırlanan PCL doku iskeleleri, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu için dikdörtgen (2 × 2 cm<sup>2</sup>) yada disk (1.25 cm çaplı) şeklinde kesilmiştir.

##### **Modifikasyon**

Hazırlanan örnekler RF plazma reaktörünün topraklanmış alt elektrodunun üzerine yerleştirilmiş ve çemberin başlangıç basıncı sağlanana kadar havası boşaltılmıştır. Bu sırada belirlenen akış hızlarında su ve oksijenin sisteme girişiyle istenen basınç elde edildikten sonra, önceden belirlenen RF gücünde ve süresinde plazma uygulanmıştır. Plazma işleminin ardından yüzeyde oluşan serbest radikallerin stabilizasyonunu sağlamak için örnekler yaklaşık 1 saat kadar düşük su akışına maruz bırakılmıştır. Sistem tekrar başlangıç basıncı elde edilene kadar vakumlanmış, ardından Ar ile yıkanmış ve son olarak plazma modifikasyonu sonucu yüzeyde oluşan OH fonksiyonalitesini COOH fonksiyonalitesine dönüştürmek için 500 mTorr basınç altında örnek türüne göre (% 100 PCL için 30 dakika; % 20 PEG/PCL ve % 40 PEG/PCL için 15 dakika; %10 Sakkaroz/PCL ve % 20 Sakkaroz/PCL için 10 dakika) belirlenen süreyle sisteme oksalil klorür gönderilmiştir. Proses sonunda reaktör yine başlangıç basıncına getirilmiş ve ardından Ar ile yıkanmıştır. Örnekler reaktörden alınmış ve hidroliz işleminin gerçekleşmesi için açık laboratuvar koşullarında en az 1 saat kadar bekletilmiştir (Şekil 3.3).





Şekil 3.3. Düşük basınç su/ $O_2$  plazmayla COOH eldesi/zenginleştirilmesi.

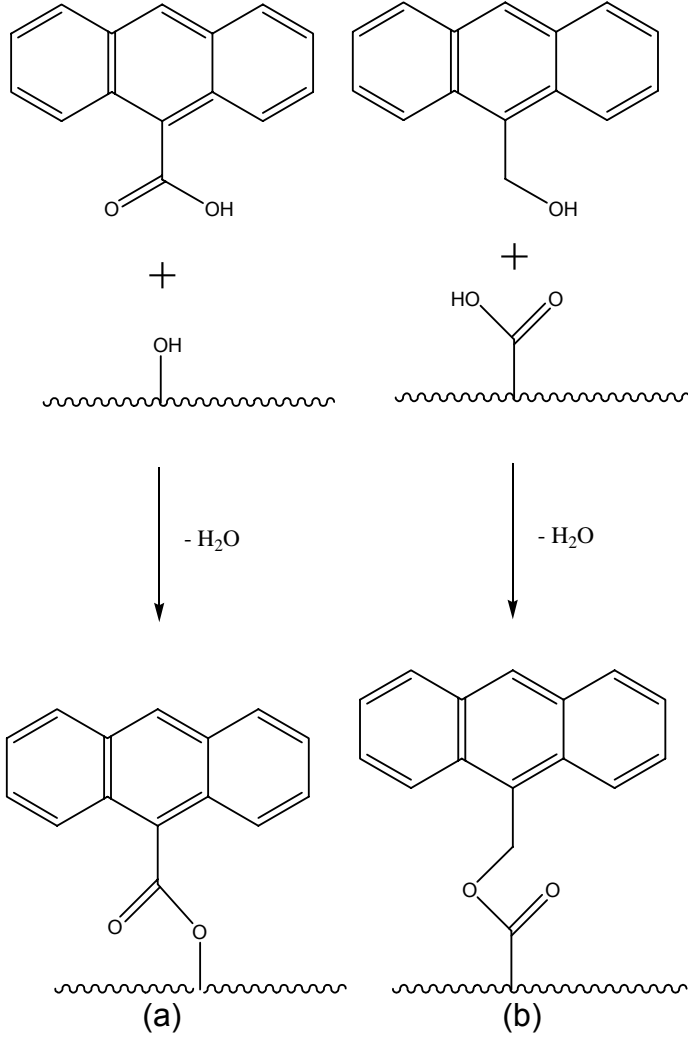
### **3.3.1.2. PCL doku iskelelerinin atmosferik basınç su/hava plazmayla modifikasyonu**

Düşük basınç su/ $O_2$  plazma ile modifikasyon bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanan PCL doku iskeleleri AER plazma reaktörüne yerleştirilmiş ve 500 W güç kaynağı (0.5 – 25 kHz, 10 kV) altında ve medikal hava ile atmosferik ortamda plazmayla modifiye edilmiştir.

### **3.3.1.3. Plazma ile modifiye edilen PCL doku iskelelerinin karakterizasyonu**

#### **3.3.1.3.i. PCL yüzeyde oluşan OH ve COOH gruplarının tayini**

OH fonksiyonlitesinin kantitatif tayini için 9-antrasen karboksilik asit, COOH fonksiyonlitesinin kantitatif tayini için ise 9-Antrasen metanol floresan işaretleme ajanları kullanılmıştır. Floresan işaretleme ajanlarıyla, plazmayla modifiye edilmiş polimerik yüzeyler arasındaki kimyasal reaksiyon Şekil 3. 4'de verildiği gibidir.



Şekil 3.4. Floresan işaretleme ajanlarıyla OH (a) ve COOH (b) fonksiyonel grupları içeren polimerik yüzeyler arasındaki kimyasal reaksiyon.

% 100 PCL diskler (12.5 mm çapında) (modifiye edilmemiş, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma veya atmosferik basınç su/hava plazmayla modifiye edilmiş ve düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma sonrası oksalil klorür ile fonksiyonelize edilmiş) 5ml 9-antrasen metanol ya da 9-antrasen karboksilik asit/eter çözeltisine (2.36 mg/ml) 15 dakika daldırılmış ve ardından 5 ml eter ile 3 kez yıkanmıştır. İşaretli örnekler kurutulduktan sonra örneklerin UV floresanı UVX-300G sensor ile ölçülmüştür [uzaklaştırılabilir başlık (UV LED 370 nm) (EMX Inc., Cleveland, OH), kuvars odaklama lensi (3 mm ışık alanı) ve 450 nm filtre (80 nm bant genişliği) (Edmund Optics Co., Barrington, NJ)]. İşaretleme ajanları 389, 411, 434 and 460 nm'de emisyon spektrumlarına sahiptir ve son üç dalga boyu kullanılan filtre aralığına girmektedir.

% 100 PCL polimerik yüzeylerde düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma, atmosferik basınç su/hava plazma ve düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ardından oksalil klorür ile fonksiyonizasyon sonrası elde edilen OH ve COOH fonksiyonitelerinin miktarsal olarak tayini için kullanılan kalibrasyon yöntemleri ve grafikleri sırasıyla Ek 2, Ek 3 ve Ek 4'de verilmiştir.

### **3.3.1.3.ii. PCL doku iskeleleri için düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu**

PCL örnekler için düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesinin optimizasyonu DoE (Design Expert 7, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, Amerika) software programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon için su akış hızı (0 – 20 cm<sup>3</sup>/dk), basınç (100 – 500 mTorr), güç (20 - 80 W) ve süre (0.5 – 4.5 dk) olmak üzere 4 parametre seçilmiştir. Plazma prosesi boyunca toplam akış hızı 20 cm<sup>3</sup>/dk'dir.

PCL örnekler için DoE software programına göre rastgele seçilen 30 deneyin parametreleri Çizelge 3.1'de sunulmuştur. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılmış ve kuadratik regresyonları hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. PCL örnekler için DoE (düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesi).

Deney	Su akış hızı (cm <sup>3</sup> /dk)	Basınç (mTorr)	Güç (W)	Süre (dk)	OH Floresanı		COOH Floresanı	
					(mV)	(µmol/cm <sup>2</sup> )	(mV)	(µmol/cm <sup>2</sup> )
1	5.10	400.00	65.00	1.50	210	0.000235559	215	0.0388859
2	5.10	200.00	65.00	1.50	633	0.147724	227	0.0636692
3	5.10	400.00	35.00	3.50	512	0.0382807	-260	0.210762
4	14.90	200.00	35.00	1.50	382	0.00578167	371	2.1359
5	9.70	300.00	50.00	2.50	317	0.00189434	268	0.272005
6	14.90	400.00	65.00	3.50	212	0.000245613	266	0.255528
7	9.80	300.00	50.00	0.50	482	0.025768	239	0.101084
8	5.00	200.00	65.00	3.50	397	0.00735977	186	0.0104001
9	14.90	400.00	35.00	3.50	538	0.0528984	212	0.0342111
10	5.00	400.00	35.00	1.50	252	0.000553912	335	1.34543
11	14.90	200.00	35.00	3.50	272	0.000818498	320	1.02252
12	9.80	300.00	50.00	2.50	294	0.00124208	202	0.0220143
13	15.00	400.00	65.00	1.50	367	0.0045145	275	0.336228
14	10.00	100.00	50.00	2.50	782	0.453235	407	2.56945
15	4.90	200.00	35.00	3.50	437	0.0135986	357	1.84432

Çizelge 3.1. devam ediyor.

16	9.90	300.00	50.00	4.50	381	0.00568816	341	1.48142
17	9.80	300.00	80.00	2.50	271	0.000802878	237	0.0937893
18	19.80	300.00	50.00	2.50	454	0.0174239	451	2.20976
19	9.90	500.00	50.00	2.50	288	0.00110997	<del>385</del>	<del>2.37196</del>
20	9.90	300.00	50.00	2.50	301	0.00141447	357	1.84432
21	14.90	200.00	65.00	1.50	468	0.0212451	524	0.689837
22	5.10	200.00	35.00	1.50	272	0.000818498	395	2.49156
23	9.80	300.00	20.00	2.50	624	0.135431	475	1.70913
24	9.80	300.00	50.00	2.50	454	0.0174239	453	2.17316
25	9.80	300.00	50.00	2.50	<del>275</del>	0.000867063	<del>559</del>	<del>0.263429</del>
26	9.80	300.00	50.00	2.50	474	0.0230921	275	0.336228
27	5.10	400.00	65.00	3.50	552	0.0624887	302	0.690309
28	14.90	400.00	35.00	1.50	<del>387</del>	<del>0.00627022</del>	291	0.524741
29	0.00	300.00	50.00	2.50	263	0.000687523	314	0.903947
30	14.80	200.00	65.00	3.50	242	0.000453835	377	2.24555

\*Çizelgede üzeri çizili değerler DoE yazılım programı tarafından otomatik olarak elimine edilen değerleri simgelemektedir.

### **3.3.1.3.iii. PCL doku iskeleleri için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu**

PCL örnekler için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin optimizasyonu da DoE software programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon için su akış hızı (100 – 900 cm<sup>3</sup>/dk), güç (30 – 200 W) ve süre (1 – 5 dk) olmak üzere 3 parametre seçilmiştir. PCL örnekler için DoE software programına göre rastgele seçilen 20 deneyin parametreleri Çizelge 3.2’de sunulmuştur. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılmış ve kuadratik regresyonları hesaplanmıştır.

Çizelge 3.2. PCL örnekler için DoE (atmosferik basınç su/hava plazma prosesi).

Deney	Güç (W)	Su akış hızı (cm <sup>3</sup> /dk)	Süre (dk)	OH Floresanı		COOH Floresanı	
				(mV)	(µmol/cm <sup>2</sup> )	(mV)	(µmol/cm <sup>2</sup> )
1	70.00	262.00	1.81	858	0.513927	247	0.135233
2	70.00	262.00	4.19	1258	1.29637	283	0.422925
3	170.00	738.00	4.19	<del>1515</del>	<del>1.98107</del>	0	<del>3.05482x10<sup>-008</sup></del>
4	170.00	262.00	1.81	1392	1.63561	224	0.0564482
5	170.00	262.00	4.19	1181	1.11895	0	<del>3.05482x10<sup>-008</sup></del>
6	120.00	500.00	3.00	1374	1.58779	318	0.982204
7	170.00	738.00	1.81	1269	1.32276	241	0.108853

Çizelge 3.2. devam ediyor.

8	120.00	500.00	3.00	1285	1.36161	322	1.06359
9	120.00	500.00	3.00	<del>1647</del>	<del>2.38809</del>	<del>219</del>	<del>0.0459895</del>
10	120.00	500.00	1.00	<del>439</del>	<del>0.0641513</del>	205	0.0251837
11	200.00	500.00	3.00	1037	0.821438	268	0.272005
12	120.00	100.00	3.00	1381	1.60631	258	0.197318
13	120.00	500.00	3.00	<del>823</del>	<del>0.461871</del>	383	2.34271
14	120.00	900.00	3.00	<del>655</del>	<del>0.24876</del>	382	2.32747
15	120.00	500.00	3.00	<del>419</del>	<del>0.0521449</del>	307	0.775286
16	30.00	500.00	3.00	1005	0.761394	342	1.50426
17	70.00	738.00	1.81	835	0.479421	299	0.642211
18	70.00	738.00	4.19	1112	0.970814	307	0.775286
19	120.00	500.00	5.00	907	0.591241	318	0.982204
20	120.00	500.00	3.00	<del>2030</del>	<del>3.78162</del>	375	2.21028

\*Çizelgede üzeri çizili değerler DoE yazılım programı tarafından otomatik olarak elimine edilen değerleri simgelemektedir.

#### **3.3.1.3.iv. ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis) analizi**

Plazma modifikasyonu öncesi ve sonrası tüm polimerik yüzeylerin bağlı yüzey atomik bileşimlerinin belirlenmesi için Electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA, Perkin Elmer Physical Electronics 5400 küçük alan sistemi; Mg kaynağı, 15 kV, 300 W, 45° ayrılma açısı) sistemi kullanılmıştır.

#### **3.3.1.3.v. Piroliz gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi [Pyrolysis Gas Chromatography/Mass Spectroscopy (Py GC/MS)]**

% 100 PCL örneklerin kimyasal yapısı hakkında bilgi edinmek amacıyla, piroliz kuvars tüp % 3 PCL/diklorometan çözeltisi ile kaplanmış ve piroliz GC/MS analizine tabi tutulmuştur. Su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş örnekler, Piroprob 2000 (CDS Analitik, Inc., Oxford, PA) ile, 400°C, 600°C, 800°C ve 1000°C de 10 sn süreyle (piroliz çemberinde; 250°C) pirolize edilmiştir. Piroliz süresince oluşan gaz ürünü belirlemek ve miktarsal olarak tayin etmek için, Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi (GC-MS) tekniği (HP 5973 Kütle Seçici Dedektör ve HP 6890 Serisi GC Sistemi, Hewlett-Packard Co.) kullanılmıştır (Deneysel Parametreler; kapiler kolon: HP-PLOT Q 30.0 m × 320.00 µm × 0.2 µm HP 19091P-Q04; taşıyıcı gaz: kromatografik helyum; sabit akış: 2.3 ml/dk; giriş sıcaklığı 300°C; aralık oranı; 10:1; ilk 3 dakikada fırın sıcaklığı 30°C, daha sonra fırın sıcaklığı dakikada 20°C artırılarak 110°C'ye, ardından dakikada 15°C

arttırılarak 170°C'ye getirilmiş ve son olarak dakikada 10°C arttırarak 260°C'ye çıkartılmıştır; toplam süre: 30 dk; son çalıştırma: 260°C, 5 dk; MSD transfer ısıtıcı: 280°C; iyonizasyon çember sıcaklığı: 230°C; kuadrupol sıcaklığı: 150°C; MSD tarama modu 10-600 amu; 0 dk çözücü gecikmesi).

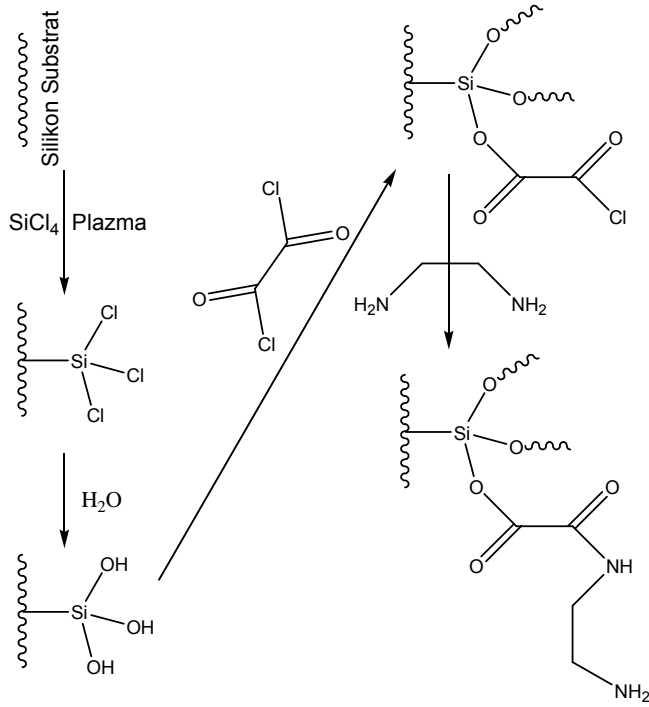
### **3.3.1.3.vi. AFM (Atomic Force Microscope) analizleri**

Su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş ve edilmemiş tüm PCL yüzeylerin mikro ve nano topografisini gözlemek için AFM analizleri gerçekleştirilmiştir. AFM analizleri (Molecular Imaging PicoSPM cihazı; temas modu; silikon ve hidrazin HZD fonksiyonalize tipler), su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş, oksalil klorür fonksiyonalize ve modifiye edilmemiş; % 100 PCL, % 20 PEG<sub>4000</sub>/PCL, % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL, % 10 Sakkaroz/PCL, % 20 Sakkaroz/PCL örnekleri ve Sakkaroz kristalleri için gerçekleştirilmiştir.

### **Fonksiyonel birincil amin grubu içeren AFM tiplerin hazırlanması**

PCL yüzeylerinde, su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve ardından oksalil klorür ile muamele edilerek oluşturulan karboksil gruplarının gözlenmesi amacıyla Si-temelli AFM tipleri, yüzeylerinde birincil amin grubu elde etmek için SiCl<sub>4</sub> plazma modifikasyonuna tabi tutulmuştur (Şekil 3.5). SiCl<sub>4</sub> plazma modifikasyonu ICP (inductively coupled plasma) reaktöründe gerçekleştirilmiştir. Reaktöre 3.7 dakika boyunca, 110 mTorr basınç altında, 5 cm<sup>3</sup>/dk akış hızında SiCl<sub>4</sub> gaz buharı (Aldrich 215120, Almanya) gönderilmiştir. Modifikasyon boyunca substrat sıcaklığı 25 °C, güç 200 W, frekans 13.56 MHz, voltaj 150 V değerlerinde tutulmuştur.

Plazma modifikasyonu sonrası tipler, SiCl gruplarının hidrolizi için bir gece boyunca sulu amonyak çözeltisine daldırılmıştır. Tipler su kalıntılarının yapıdan uzaklaştırılması için 3 kez susuz etanolle (Aldrich 459836, Almanya) yıkanmıştır. Ardından tipler 10 dakika boyunca oksalil klorür (Sigma-Aldrich O8801, Almanya), 30 dakika boyunca etilen diamin (Sigma-Aldrich E26266, Almanya) çözeltisine daldırılmıştır. Modifikasyonu tamamlanan tipler 3 kez suyla ve 1 kez etanolle yıkanmıştır.



Şekil 3.5. Si-temelli AFM tiplerinin SiCl<sub>4</sub> plazma modifikasyonu.

Tiplere takılan birincil amin gruplarının varlığı, NWPF ve PCL polimerik yüzeylerde uygulanan floresan işaretleme tekniği ile değerlendirilmiştir. Yöntemin ayrıntıları, floresan işaretleme ajanıyla, tiplerde oluşturulan birincil amin grupları arasındaki kimyasal reaksiyon ayrıntılı olarak NWPF ile ilgili bölümde verilmiştir.

### 3.3.1.4. PCL doku iskelelerinin biyolojik modifikasyonu

Bu bölümdeki çalışmalar yalnızca % 100 PCL diskler ile yürütülmüştür.

#### 3.3.1.4.i. PCL doku iskelelerine PEO uzatıcı kol takılması

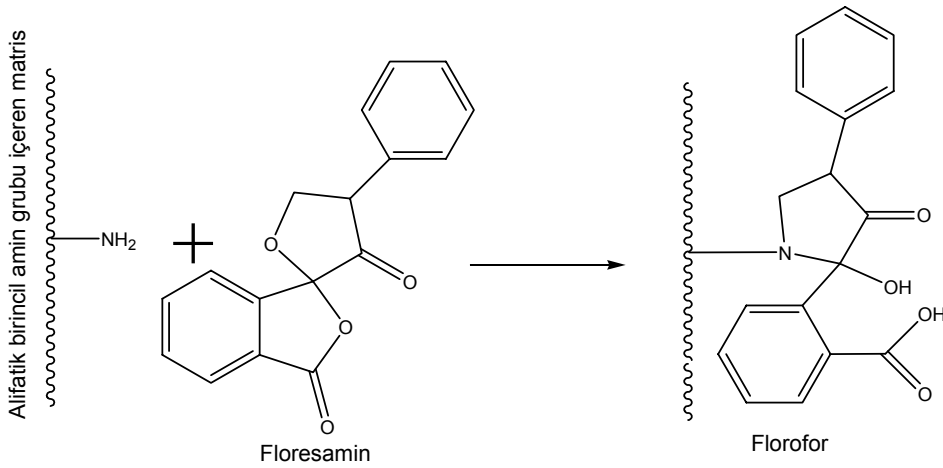
Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonunun ardından karboksil gruplarınca zenginleştirilen % 100 PCL diskler WSC (suda çözünür karbodiimid) ile aktive edilmiştir. Diskler WSC'nin (ağırlıkça %10, pH=5.0) sulu çözeltisine 4°C sıcaklıkta, 2 saat boyunca daldırılmıştır. Bu şekilde aktive edilen örnekler, iki kere distile edilmiş suyla yıkanmış ve ardından PEO'nun (0.005 M, pH=6.5) sulu çözeltisine 4°C sıcaklıkta, 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Son olarak da diskler, tekrar iki kere distile edilmiş suyla yıkamanın ardından, süksinik asidin sulu çözeltisine (ağırlıkça %5, pH=7.0) daldırılmış ve atmosferde kurutulup laboratuvar ortamında saklanmıştır (Şaşmaz et al., 2007).

### 3.3.1.4.ii. PCL doku iskelelerine insülinin immobilizasyonu

İnsülin immobilizasyonu iki-basamakta (two-step method) gerçekleştirilmiştir (Liu et al., 1992). PEO-takılı PCL diskler WSC içeren (ağırlıkça %10) MES tampon (pH=5.0) içerisinde 4°C sıcaklıkta, 2 saat boyunca inkübatöre konulmuştur. İnkübasyonun ardından iki kere distile edilmiş suyla yıkanan diskler, 200 µg/mL insülin içeren MES tampon (pH=7.0) içerisine 4°C sıcaklıkta, 24 saat boyunca daldırılmıştır. Örnekler immobilizasyon işleminin ardından 10 dakika boyunca PBS çözeltisi (pH=7.4) ile yıkamaya tabi tutulmuşlardır. Son olarak da diskler %75 (hacimce) etanol ile dezenfekte edilip, atmosferde kurutulmuştur.

### PCL yüzeylere immobilize edilen PEO ve insülin miktarının tayini

PEO/takılı ve insülin/immobilize polimerik yapılardaki birincil amin fonksiyonlitesi floresan işaretleme tekniği ile değerlendirilmiştir. Modifiye edilmiş ve edilmemiş örnekler, kromatografik şırınga kullanılarak 3 kere ardarda 100 µL floresamin çözeltisi (50 mg floresamin/100 ml kuru aseton, Sigma-Aldrich) ile muamele edilmiştir. İşaretli örnekler kurutulmuş ve UVX-300G sensör kullanılarak UV floresanları ölçülmüştür. İşaretleyici ajan floresamin ve yüzeydeki birincil amin grupları arasındaki reaksiyon mekanizması Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6. Floresamin ve birincil amin grubu arasındaki reaksiyon mekanizması.

% 100 PCL polimerik yapılara takılı PEO ve immobilize insülin miktarının kantitatif olarak tayininde kullanılan metodun kalibrasyonu için uygulanan yöntem ve çizilen kalibrasyon grafiği EK 5'te verilmiştir.



### **3.3.1.4.iii. PCL doku iskelelerine heparinin immobilizasyonu**

Sodyum sitrat tamponda (pH=4.7) çözülen heparin (1 mg/ml), 1 mg WSC ile karıştırılarak, heparinin karboksil gruplarını aktive etmek için 4°C sıcaklıkta, 5 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra PEO-takılı diskler, WSC ile aktive edilmiş heparin içeren sodyum sitrat çözeltisine 4°C sıcaklıkta, 24 saat boyunca daldırılmıştır. Immobilizasyon işlemini takiben diskler 10 dakika boyunca PBS çözeltisi (pH=7.4) ile ve ardından 5 dakika boyunca distile suyla yıkanmış ve son olarak atmosferde kurutulmuştur.

### **PCL yüzeylere immobilize edilen heparin miktarının tayini**

Heparin/immobilize % 100 PCL örnekler, 5 ml 9-antrasen metanol/eter çözeltisine (2.36 mg/ml) 15 dakika daldırılmış ve ardından 5 ml eter ile 3 kez yıkama yapılmıştır. İşaretle örnekler kurutulduktan sonra örneklerin UV floresanı UVX-300G sensör ile ölçülmüştür. PCL polimerik yüzeylere immobilize edilen heparin miktarının kantitatif olarak tayininde kullanılan metodun kalibrasyonu için uygulanan yöntem ve çizilen kalibrasyon grafiği EK 6'da verilmiştir.

### **3.3.1.4.iv. ESCA analizi**

PCL yüzeylerin bağıl yüzey atomik bileşimlerinin belirlenmesi için PCL örnekler biyolojik modifikasyon öncesi ve sonrası Bölüm 3.3.1.3.iv'de özellikleri verilen ESCA sistemi ile analiz edilmiştir.

### **3.3.1.5. Hücre kültür çalışmaları**

Hücre kültür çalışmaları Bölüm 3.2.4'de kullanılan L929 fare fibroblast hücre hattı ve yine aynı bölümde izlenen prosedüre göre yürütülmüştür. Yalnız bu bölümdeki hücre kültür çalışmalarında % 10 (hacimce) FBS (fetal bovine serum) kullanılmıştır.

Beş tür PCL doku iskelesi kullanılarak hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunlar; % 100 PCL, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş/PCL, PEO immobilize edilmiş/PCL, insülin immobilize edilmiş/PCL ve heparin immobilize edilmiş/PCL doku iskeleleridir. PCL doku iskeleleri sterilizasyon için % 70 etanol içerisine 75 dakika boyunca daldırılmış ve PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Sterilizasyon işlemi tamamlanan PCL doku iskeleleri (1.27 cm çapındaki diskin 4'te biri) 24-gözlü Petri kaplarına (1.5 cm çaplı) yerleştirilmiştir. Flaskda "confluent layer" oluşturduğu gözlenen L929 fare

fibroblast hücreleri yine Bölüm 3.2.4'te açıklanan tripsinizasyon yöntemi uygulanarak flask yüzeyinden koparılmış ve Petri kaplarına yerleştirilen PCL doku iskelelerinin üzerine ekilmiştir. Her bir göze 1 ml  $1 \times 10^4$  hücre/ml derişimdeki hücre çözeltisi koyulmuştur. Hücre üremesi 1., 2., 3., 4., 5., ve 6. gündeki kültür ortamından çekilen fotoğraflarla görüntülenmiş ve hücre verimi MTT metoduyla tayin edilmiştir. İnokülasyondan sonraki günlerde hücreler aktif durumda iken doku iskelesi yüzeyine kuvvetlice yapışmış olduklarından, hücrelerin proteolitik enzimlerle yüzeyden ayrılması yeterli olmamış ve hücre yoğunluğunu belirlemede indirekt bir yöntem olan ve aşağıda açıklanan MTT yöntemi uygulanmıştır.

### **MTT yöntemi**

MTT yöntemi basit ve tekrarlanabilir sonuçların alındığı kolorimetrik bir yöntemdir ve tetrazolium tuzunun canlı hücrenin mitokondriye ait bazı enzimleri tarafından, hücre içinde çözünmeyen mor renkli "formazan" maddesine dönüşmesi esasına dayanır. Formazan asidik izopropanol içerisinde çözünür ve 540 nm dalga boyunda optik yoğunluğu kaydedilir. Hücre sayısı bilinen farklı hücre kültür örnekleri için optik değerler kaydedilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir (MTT yöntemine ait ayrıntılı bilgi Ek 7'de verilmiştir).

### **Giemsa ile boyama tekniği**

Hücrelerin PCL doku iskelelerine yapışması ve yayılması mikroskopik olarak incelenmiştir. Hücrelerin yapışma ve yayılmasını açık ve net bir şekilde gözlemleyebilmek için diskler Giemsa (Merc, Almanya) ile boyanmıştır (Giemsa ile boyama tekniği Ek 8'de verilmiştir). Hücre kültür ortamından alınan diskler kısa bir süre (1-2 dakika) havada kurumaya bırakıldıktan sonra, 10-15 saniye süreyle boya çözeltisinin içerisine daldırılmıştır. Fazla boyanın akması için 15-30 saniye distile su içerisinde yıkanan diskler, birkaç kere daha taze distile su ile yıkanmış ve hava ortamında kurumaya bırakılmıştır. Boyama işlemi tamamlanan diskler 2., 4., 5., ve 6. gün kültür sonrası ışık mikroskobu ile farklı büyütmelelerde (Olympus, Amerika) çekilen fotoğraflarla gözlenmiştir.

### **Konfokal lazer taramalı mikroskopi (CLSM) ile analiz**

PCL doku iskelelerindeki hücrelerin canlılığı ve yoğunluğu floresan esasına dayanan bir analiz tekniği olan konfokal lazer taramalı mikroskopi yöntemi ile

gözlemlenmiştir. Bu amaçla dört günlük kültür sonunda PCL doku iskelelerine immünofloresan boyama tekniği uygulanmıştır. PCL doku iskeleleri oda sıcaklığında 3 defa PBS (pH 7.4) ile yıkanmış ve % 2.5 (hacimce) glutaraldehit içeren 0.1 M PBS (pH 7.4) içerisinde 10 dakika bekletilerek hücrelerin fiksasyonu sağlanmıştır. Hücre geçirgenliğini arttırmak için doku iskeleleri %1'lik Triton X-100 tamponu içerisinde 5 dakika süreyle bekletilmiştir. Hücrelerin aktin filamentleri (F-aktin) PCL doku iskelelerinin % 2.5 (hacimce) Fluor 488 phalloidin içeren PBS (pH 7.4) çözeltisine 20 dakika süreyle daldırılması sonucu boyanmıştır. Hücre çekirdeğini boyamak için doku iskeleleri 5 dakika boyunca 10µg/ml propidyum iyodür ile muamele edilmiştir. Boyama tekniği hakkında ayrıntılı bilgi Ek 9'da verilmiştir. Boyama işlemi tamamlanan PCL doku iskeleleri konfokal lazer taramalı mikroskopu (CLSM, Leica, Almanya, ODTÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarı) ile incelenmiştir.

### **3.3.2. NWPF doku iskelelerinin plazma ile modifikasyon çalışmaları**

#### **3.3.2.1. NWPF doku iskelelerinin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifikasyonu**

##### **NWPF doku iskelelerinin hazırlanması**

Üç-boyutlu hücre destek malzemesi olarak, Reemay Inc. (Old Hickory, TN, Amerika) tarafından üretilen style no. 2214 şeklinde numaralandırılan, dokunmamış (nonwoven) poliester fabrik (NWPF) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan NWPF diskler 1200 cm<sup>2</sup>/g yüzey alanı, 2.7 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>s hava geçirgenliği ve 0.23 mm kalınlığa sahiptir. 1.5 cm çapa sahip (24'lük Petri kabında kullanılan) bir NWPF diskin alanı, diskin yüzey alanının (1200 cm<sup>2</sup>/g) ortalama ağırlığıyla (0.0076 g) çarpımı sonucu 9.12 cm<sup>2</sup> olarak bulunmuştur.

Dokunmamış poliester yapı, polietilen tereftalat (PET) fiberlerin üç boyutlu ve rastgele yerleştirilmesiyle hazırlanmıştır. Tereftalik asit veya onun dimetil esteri etilen glikol ile reaksiyona girer ve PET'e polimerize olan bir diester monomer oluşturur. Sentezlenen polimer bir spinneretten geçirilerek bükülüp eğilir ve oluşan PET lifler ısı etkisiyle birbirine iliştilerle dokunmamış yapıyı oluşturur. NWPF doku iskeleleri bu matrisden dikdörtgen (2 × 2 cm<sup>2</sup>) yada disk (1.25 cm çaplı) şeklinde kesilerek plazma modifikasyonu için hazırlanmıştır.

## **Modifikasyon**

Hazırlanan NWPF doku iskeleleri ESCA analizinde görülen silisyum kontaminasyonunu gidermek için öncelikle H<sub>2</sub> plazmayla sterilize edilmiştir. Kontaminasyonu giderilen örnekler Bölüm 3.3.1.1'de PCL doku iskelelerinin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifikasyonu kısmında anlatıldığı şekilde RF plazma reaktöründe modifiye edilmiştir. Plazma modifikasyonun ardından yüzeyde oluşan OH fonksiyonalitesini COOH fonksiyonalitesine dönüştürmek için sisteme 500 mTorr basınç altında 30 dakika süreyle oksalil klorür gönderilmiştir. Proses sonunda reaktör yine başlangıç basıncına getirilmiş ve ardından Ar ile yıkanmıştır. Örnekler reaktörden alınmış ve hidroliz işleminin gerçekleşmesi için açık laboratuvar koşullarında en az 1 saat kadar bekletilmiştir. NWPF polimerik yüzeylerde düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla COOH eldesi/zenginleştirilmesi mekanizması, PCL ile ilgili bölümde şematik olarak Şekil 3.3'de verilmiştir.

### **3.3.2.2. NWPF doku iskelelerinin atmosferik basınç su/hava plazmayla modifikasyonu**

Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifikasyon bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanan NWPF doku iskeleleri, AER plazma reaktörüne yerleştirilmiş ve 500 W güç kaynağı (0.5 – 25 kHz, 10 kV) altında ve medikal hava ile atmosferik ortamda plazmayla modifiye edilmiştir.

### **3.3.2.3. Karakterizasyon çalışmaları**

#### **3.3.2.3.i. NWPF yüzeyde oluşan OH ve COOH gruplarının tayini**

Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma, atmosferik basınç su/hava plazma ve düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ardından oksalil klorür ile fonksiyonalizasyon sonrası elde edilen OH ve COOH fonksiyonalitelerinin tayini için, PCL polimerik yüzeylere uygulanan yöntem izlenmiştir. Yöntemin ayrıntıları ve floresan işaretleme ajanlarıyla polimerik yüzeylerde oluşturulan fonksiyonel gruplar arasındaki kimyasal reaksiyon ile ilgili gerekli açıklamalar ayrıntılı olarak PCL ile ilgili bölümde (Bölüm 3.3.1.3.i) verilmiştir.

#### **3.3.2.3.ii. NWPF doku iskeleleri için düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu**

NWPF örnekler için düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesinin optimizasyonu yine DoE software programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Su akış hızı (0 – 20

cm<sup>3</sup>/dk), basınç (100 – 500 mTorr), güç (20 – 140 W) ve süre (0.5 – 4.5 dk) olmak üzere 4 parametre optimizasyon için seçilmiştir. Plazma prosesi boyunca toplam akış hızı 20 cm<sup>3</sup>/dk'dır.

NWPF örnekler için DoE software programına göre rastgele seçilen 30 deneyin parametreleri Çizelge 3.3'de sunulmuştur. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılmış ve kuadratik regresyonları hesaplanmıştır.

Çizelge 3.3. NWPF örnekler için DoE (düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesi).

Deney	Su akış hızı (cm <sup>3</sup> /dk)	Basınç (mTorr)	Güç (W)	Süre (dk)	OH Floresan sinyali (mV)	COOH Floresan sinyali (mV)
1	14.30	200.00	110.00	3.50	272	168
2	9.80	300.00	80.00	2.50	200	229
3	14.40	400.00	50.00	1.50	175	242
4	5.20	200.00	110.00	1.50	205	186
5	9.40	300.00	80.00	2.50	235	191
6	14.30	200.00	110.0	1.50	184	191
7	9.40	300.00	20.00	2.50	195	211
8	5.10	200.00	50.00	3.50	250	191
9	4.70	400.00	110.00	1.50	195	198
10	14.80	400.00	50.00	3.50	196	221
11	9.70	300.00	80.00	2.50	237	188
12	5.10	400.00	50.00	3.50	250	216
13	9.80	300.00	80.00	2.50	243	215
14	0.00	300.00	80.00	2.50	255	191
15	14.80	200.00	50.00	1.50	205	186
16	14.80	400.00	110.00	1.50	235	190
17	9.80	300.00	80.00	0.50	200	205
18	9.80	500.00	80.00	2.50	176	162
19	5.10	200.00	110.00	3.50	222	200
20	5.20	200.00	50.00	1.50	196	176
21	9.80	300.00	80.00	2.50	226	191
22	10.00	300.00	80.00	2.50	212	177
23	14.70	400.00	110.00	3.50	233	176
24	10.00	300.00	140.00	2.50	255	169
25	10.00	300.00	80.00	4.50	212	195
26	14.70	200.00	50.00	3.50	240	187
27	10.10	100.00	80.00	2.50	233	163
28	5.20	400.00	50.00	1.50	242	192
29	19.80	300.00	80.00	2.50	237	199
30	4.60	400.00	110.00	3.50	188	190

\*Çizelgede üzeri çizili değerler DoE yazılım programı tarafından otomatik olarak elimine edilen değerleri simgelemektedir.

### **3.3.2.3.iii. NWPF doku iskeleleri için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu**

NWPF örnekler için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin optimizasyonu DoE software programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Su akış hızı (100 – 900

cm<sup>3</sup>/dk), güç (30 – 200 W) ve süre (1 – 5 dk) olmak üzere 3 parametre seçilmiştir. NWPF örnekler için DoE software programına göre rastgele seçilen 20 deneyin parametreleri Çizelge 3.4'de sunulmuştur. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılmış ve kuadratik regresyonları hesaplanmıştır.

Çizelge 3.4. NWPF örnekler için DoE (atmosferik basınç su/hava plazma prosesi).

Deney	Güç (W)	Su akış hızı (cm <sup>3</sup> /dk)	Süre (dk)	OH Floresan sinyali (mV)	COOH Floresan sinyali (mV)
1	70.00	262.00	1.81	181	212
2	70.00	262.00	4.19	161	442
3	170.00	738.00	4.19	165	195
4	170.00	262.00	1.81	201	165
5	170.00	262.00	4.19	<del>495</del>	203
6	120.00	500.00	3.00	206	219
7	170.00	738.00	1.81	175	225
8	120.00	500.00	3.00	<del>478</del>	204
9	120.00	500.00	3.00	202	213
10	120.00	500.00	1.00	235	187
11	200.00	500.00	3.00	232	211
12	120.00	100.00	3.00	<del>269</del>	182
13	120.00	500.00	3.00	<del>268</del>	476
14	120.00	900.00	3.00	237	192
15	120.00	500.00	3.00	199	235
16	30.00	500.00	3.00	223	233
17	70.00	738.00	1.81	267	219
18	70.00	738.00	4.19	220	224
19	120.00	500.00	5.00	257	216
20	120.00	500.00	3.00	218	195

\*Çizelgede üzeri çizili değerler DoE yazılım programı tarafından otomatik olarak elimine edilen değerleri simgelemektedir.

### 3.3.2.3.iv. ESCA analizi

Plazma modifikasyonu öncesi ve sonrası NWPF yüzeylerin bağıl yüzey atomik bileşimlerinin belirlenmesi için Electron spectroscopy for chemical analysis sistemi kullanılmıştır. Kullanılan ESCA sisteminin özellikleri Bölüm 3.3.1.3.iv'de verilmiştir.

### **3.3.2.4. NWPF doku iskelelerinin biyolojik modifikasyonu**

#### **3.3.2.4.i. NWPF doku iskelelerine PEO varlığında insülin ve heparinin immobilizasyonu**

Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonunun ardından, PEO uzatıcı kol varlığında insülin veya heparin biyolojik moleküllerinin NWPF doku iskelelerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmayla modifiye edilen NWPF polimerik yüzeylere, ıslak kimya yöntemiyle PEO uzatıcı kolun takılması ve ardından insülin ve heparin biyolojik moleküllerin immobilizasyonu için, % 100 PCL polimerik yüzeylere uygulanan yöntem izlenmiş ve yöntemin ayrıntıları PCL ile ilgili bölümde verilmiştir.

#### **NWPF yüzeylere immobilize edilen PEO ve insülin miktarının tayini**

PEO/takılı ve insülin/immobilize NWPF doku iskelelerindeki birincil amin fonksiyonlitesi, % 100 PCL polimerik yüzeylere uygulanan floresan işaretleme tekniği ile değerlendirilmiştir. Yöntemin ayrıntıları, floresan işaretleme ajanlarıyla polimerik yüzeylerde oluşturulan birincil amin grupları arasındaki kimyasal reaksiyon ve kullanılan kalibrasyon grafiği ile ilgili gerekli açıklamalar ayrıntılı olarak PCL ile ilgili bölümde verilmiştir.

#### **NWPF yüzeylere immobilize edilen heparin miktarının tayini**

NWPF örneklere immobilize edilen heparinin kantitatif olarak tayini için, heparin immobilize edilen % 100 PCL örneklere uygulanan 9-antrasen metanol floresan işaretleme tekniği kullanılmıştır. Uygulanan yöntemin ayrıntıları ve kullanılan kalibrasyon grafiği ile ilgili gerekli açıklamalar PCL polimerik yapılar ile ilgili bölümde verilmiştir.

#### **3.3.2.4.ii. ESCA analizi**

NWPF yüzeylerin bağıl yüzey atomik bileşimlerinin belirlenmesi için NWPF örnekler biyolojik modifikasyon öncesi ve sonrası Bölüm 3.3.1.3.iv'de özellikleri verilen ESCA sistemi ile analiz edilmiştir.

### **3.3.2.5. Hücre kültür çalışmaları**

Hücre kültür çalışmaları Bölüm 3.2.4'de kullanılan L929 fare fibroblast hücre hattı ve yine aynı bölümde izlenen prosedüre göre yürütülmüştür. Ayrıca bu bölümdeki

hücre kültür çalışmalarında Bölüm 3.3.1.4.iv'de olduğu şekilde % 10 (hacimce) FBS kullanılmıştır.

Beş tür NWPF doku iskelesi ile hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunlar; temiz/NWPF (düşük basınç H<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş/NWPF), düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş/NWPF, PEO takılı/NWPF, insülin immobilize edilmiş/NWPF, heparin immobilize edilmiş/NWPF doku iskeleleridir. Biyolojik molekül takılı NWPF disklerin sterilizasyonu 10 dakika süreyle UV ışını altında gerçekleştirilmiştir. Biyolojik molekül takılı olmayan NWPF doku iskeleleri ise sterilizasyon amacıyla 30 dakika süreyle UV ışınına maruz bırakılmışlardır. Sterilizasyon işlemi tamamlanan NWPF diskler (1.27 cm çapındaki diskin 4'te biri) 24-gözlü petri kaplarına (1.5 cm çaplı) yerleştirilmiş ve flaskda "confluent layer" a ulaştığı gözlenen L929 fare fibroblast hücreleri yine Bölüm 3.2.4'te açıklanan tripsinizasyon yöntemi uygulanarak flask yüzeyinden koparılmış ve Petri kaplarına yerleştirilen NWPF doku iskelelerinin üzerine ekilmiştir. Her bir göze 2 ml 5x10<sup>4</sup> hücre/ml derişimdeki hücre çözeltisi koyulmuştur. Hücre üremesi Bölüm 3.3.1.4.iv'de olduğu gibi 1., 2., 3., 4., 5., ve 6. gündeki kültür ortamından çekilen fotoğraflarla görüntülenmiş ve hücre verimi MTT metoduyla tayin edilmiştir. Uygulanan MTT metodu Bölüm 3.3.1.4.iv'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Hücrelerin NWPF disk yüzeyine yapışma ve yayılma davranışını net bir şekilde gözlemleyebilmek için diskler Giemsa (Merc, Almanya) ile boyanmış ve ardından mikroskopik olarak incelenmiştir. Giemsa ile boyama tekniği Bölüm 3.3.1.4.iv'de verilmiştir.

NWPF disklerde üreyen hücrelerin canlılığı ve yoğunluğu yine Bölüm 3.3.1.4.iv'de ayrıntıları verilen konfokal lazer taramalı mikroskopi yöntemi ile gözlemlenmiştir.



#### **4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞILMASI**

Sunulan tez çalışmasında, düşük basınç su/O<sub>2</sub> ve atmosferik basınç su/hava plazma yöntemleri ile iki farklı yapıda doku iskelesinin (PCL ve NWPF) yüzeyinde karboksil gruplarının eldesi/zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ve oksalil klorür modifikasyonu ardından karboksil gruplarınca zenginleştirilen yüzeylere uzatıcı kol PEO varlığında insülin ve heparin biyolojik moleküllerinin immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve hazırlanan bu doku iskelelerinin L929 fare fibroblast hücre kültürü çalışmalarına uygunluğu değerlendirilmiştir. Sonuçlar iki ana başlık altında toplanmıştır. İlk bölümde, iki farklı gözenek yapıcı (PEG<sub>4000</sub> ve sakkaroz) varlığında, çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniği ile hazırlanan PCL doku iskelelerinin yapısal ve morfolojik olarak karakterizasyon çalışmaları sunulmuş ve elde edilen sonuçlar üzerinde tartışmalar yapılmıştır. Ardından bu doku iskelelerinin hücre-destek malzemesi olarak uygunluğunu test etmek için gerçekleştirilen L929 fibroblast hücre kültür çalışmaları verilmiştir. İkinci bölümde ise PCL ve NWPF doku iskelelerinin düşük basınç su/O<sub>2</sub> ve atmosferik basınç su/hava plazma yöntemleri ile modifikasyonu ardından polimerik yüzeylerde oluşan OH ve COOH fonksiyonallitelerinin kalitatif ve kantitatif olarak tayini ile ilgili sonuçlara yer verilmiştir. Takibinde, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ve oksalil klorür muamelesi gerçekleştirilen doku iskelelerinin insülin ve heparin molekülleriyle biyolojik modifikasyonuna ait sonuçlar verilmiş ve bu sonuçlar üzerinde gerekli tartışmalar yapılmıştır. Son olarak, PCL ve NWPF doku iskelelerinin L929 fare fibroblast hücre kültür çalışmaları ve sonuçları sunulmuştur.

##### **4.1. Çözücü-Döküm/Partikül-Uzaklaştırma Yöntemiyle Hazırlanan PCL Doku İskeleleri**

Hidrofobik, biyobozunur alifatik bir poliester olan poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL), -60°C civarında camsı geçiş sıcaklığına ve 60°C'de erime noktasına sahiptir (Chandra ve Rustgi, 1998). PCL, biyobozunurluk çalışmalarında substrat (Nam ve Park, 1999) ve kontrollü ilaç salım sistemlerinde matris olarak (Ge et al., 2002; Zhou et al., 2003; Cho et al., 2004) kullanılmaktadır. PCL'nin in vivo ortamda bozunması poli( $\alpha$ -hidroksi asit)'den daha yavaş olduğu için 1-2 yıla varan uzun süreli kontrollü salım cihazı olarak kullanımı daha caziptir (Chandra and Rustgi, 1998). PCL genellikle  $\epsilon$ -kaprolaktonun halka-açılma polimerizasyonu ile hazırlanır (Lundberg et al., 1969). Özellikle lipaz türü enzimler varlığında PCL polimerinin in vitro

ortamda enzimatik olarak bozunması araştırılmaktadır (Li et al., 2003). PCL'nin ilaç salım sistemleri dışındaki çalışmalarda kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Bunlar arasında doku mühendisliği ile yapay deri üretimi (düz film halinde), üretal stentlerin kaplanması, kas-iskelet doku mühendisliği uygulamaları ve en önemlisi osteoblast ve fibroblast hücre üremesi için destek malzemesi (doku iskelesi) olarak kullanımı sayılabilir (Agrawal and Ry, 2001; Jones et al., 2002; Ciapetti et al., 2003; Serrano et al., 2005).

Fiber bağlama, çözücü-döküm, membran laminasyon, eriterek kalıplama, yüksek-basınç gaz köpüklendirme ve faz ayrımı teknikleri klasik doku iskelesi üretim teknikleridir (Hutmacher, 2000). Dondurarak kurutma tekniğiyle üretilen PCL doku iskelelerinin kondrosit hücre kültüründe kullanımı şu an için dikkati çeken doku mühendisliği uygulamaları arasındadır (Honda et al., 2003). Son zamanlarda yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere elektrostatik eğirme tekniği ile PCL fiberler üretilmiştir (Wei et al., 2005). Serrano ve grubu, ısıyla baskılama tekniği ile hazırladıkları PCL filmler üzerinde L929 hücre yapışma ve üremesinin çok iyi olduğunu gözlemlemişlerdir (Serrano et al., 2004). Sarkar ve arkadaşları (2006), ısıyla baskılama ve partikül uzaklaştırma tekniğiyle gözenekli, mikro/desenli PCL doku iskeleleri hazırlamış ve geliştirdikleri bu doku iskelelerini damar doku mühendisliği uygulamalarında kullanmışlardır. Ciapetti ve grubu (2003), osteoblast hücre kültürü için faz değişimi, çözücü-döküm ve partikül uzaklaştırma yöntemlerini birleştirerek PCL doku iskeleleri hazırlamıştır.

Doku iskelesi üretiminde kullanılan klasik yöntemler arasında çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniği, üretilen doku iskelesinin gözenek yapısının kolay kontrol edilebilmesi açısından avantaj sağlamaktadır. Bu teknik üç basamaktan oluşur; polimer çözeltisinin ve gözenek yapıcının karıştırılarak kalıba dökülmesi, karışımın kurutulması, gözenek yapıcının uzaklaştırılarak (genelde su kullanılır) yapıda gözeneklerin oluşturulması. Gözenek yapıcı olarak tuz ve karbonhidrat gibi suda-çözünür partiküller veya hidrofobik moleküller kullanılmaktadır.

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde, gözenek yapıcı olarak PEG<sub>4000</sub> ve sakkaroz molekülleri kullanılarak çözücü-döküm/partikül uzaklaştırma metodu ile PCL doku iskeleleri hazırlanmıştır. Öncelikle kullanılan gözenek yapıcıların PCL

doku iskelelerinin yığın yapısına etkisi araştırılmış, ardından hazırlanan doku iskeleleri üzerinde fibroblast hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

#### **4.1.1. PCL Doku İskelelerinin Karakterizasyonu**

Çözücü-döküm/partikül uzaklaştırma metodu ile hazırlanan PCL doku iskelelerinin yüzey ve yığın özellikleri karakterize edilmiş ve gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

##### **4.1.1.1. Doku iskelelerinin kalınlığı ve yıkama sonrası PCL doku iskelelerinden uzaklaşan PEG<sub>4000</sub>/Sakkaroz yüzdeleri**

Hazırlanan PCL doku iskelelerinin kalınlığı ve yıkama sonrası gözenekli PCL doku iskelelerinden uzaklaşan PEG<sub>4000</sub>/sakkaroz yüzdeleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Gözenekli PEG<sub>4000</sub>/PCL doku iskelelerinin kalınlığı  $76.2 \pm 2.5 \approx 101.2 \pm 2.5 \mu\text{m}$  aralığındadır. % 100 PCL doku iskelelerinin  $W_i$  ve  $W_s$  değerleri arasındaki ağırlık farkı hesaplanmış ve bu farkın % 0.4 civarında oldukça düşük bir değer olduğu görülmüştür. Bu da yıkama sonrası doku iskelelerinde görülen ağırlık kaybının yapıdan uzaklaşan PEG<sub>4000</sub>'den kaynaklandığını göstermektedir. Ayrıca, PCL doku iskelelerine eklenen PEG<sub>4000</sub> miktarı arttıkça, yıkama sonrası yapıdan uzaklaşan PEG<sub>4000</sub> yüzdesinin de arttığı görülmüştür. PCL doku iskelelerine az miktarda PEG<sub>4000</sub> molekülü eklendiğinde, bu molekülün hidrofobik PCL molekülleriyle çevrelenme olasılığı artmakta ve böylece suyun PEG<sub>4000</sub> molekülüyle etkileşmesi ve PEG<sub>4000</sub>'in yapıdan uzaklaştırılması zorlaşmaktadır. Sonuç olarak, PEG<sub>4000</sub> yüzdesinin 10'dan 40'a artırılmasıyla uzaklaşan PEG<sub>4000</sub> miktarında 2 katlık bir artışın meydana geldiği görülmüştür (Çizelge 4.1).

Gözenekli sakkaroz/PCL doku iskelelerinin kalınlığı ise  $1525.0 \pm 4.5 \approx 3030.0 \pm 1.1 \mu\text{m}$  aralığındadır. Sakkaroz kristallerinin kullanıldığı durumda makrogözenekli yapı nedeniyle daha kalın doku iskeleleri elde edilmiştir. Sakkarozun sudaki çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle (25°C'de 2g/ml) (International Labor Organization, 2003), yıkama sonrası PCL doku iskelelerinden uzaklaşan sakkaroz miktarının uzaklaşan PEG<sub>4000</sub> miktarından fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca, PCL doku iskelelerine eklenen sakkaroz miktarı arttıkça, yıkama sonrası yapıdan uzaklaşan sakkaroz yüzdesinin de arttığı görülmüştür. Sakkaroz/PCL doku iskeleleri 10 gün boyunca yıkanmış ve farklı periyotlar için uzaklaşan sakkaroz

yüzdeleri hesaplanmıştır. Fakat 3. günden sonra uzaklaşan sakkaroz yüzdeleri arasında çok önemli bir fark görülmemiştir.

Çizelge 4.1. Doku iskelelerinin kalınlığı ve yıkama sonrası PCL doku iskelelerinden uzaklaşan PEG<sub>4000</sub>/Sakkaroz yüzdeleri.

Doku İskelesi	Eklenen PEG <sub>4000</sub> /Sakkaroz (%)	Kalınlık (µm)	Uzaklaşan PEG <sub>4000</sub> /Sakkaroz (%)
% 100 PCL		76.2 ± 2.5	
% 10 PEG <sub>4000</sub> /PCL	10	88.8 ± 2.5	35.3 ± 0.8
% 40 PEG <sub>4000</sub> /PCL	40	99.5 ± 3.3	67.8 ± 1.2
% 10 Sakkaroz/PCL	10	1525.0±4.5	39.0 ± 1.7
% 20 Sakkaroz/PCL	20	3030.0 ±1.1	73.9 ± 2.1

#### 4.1.1.2. FTIR analizi

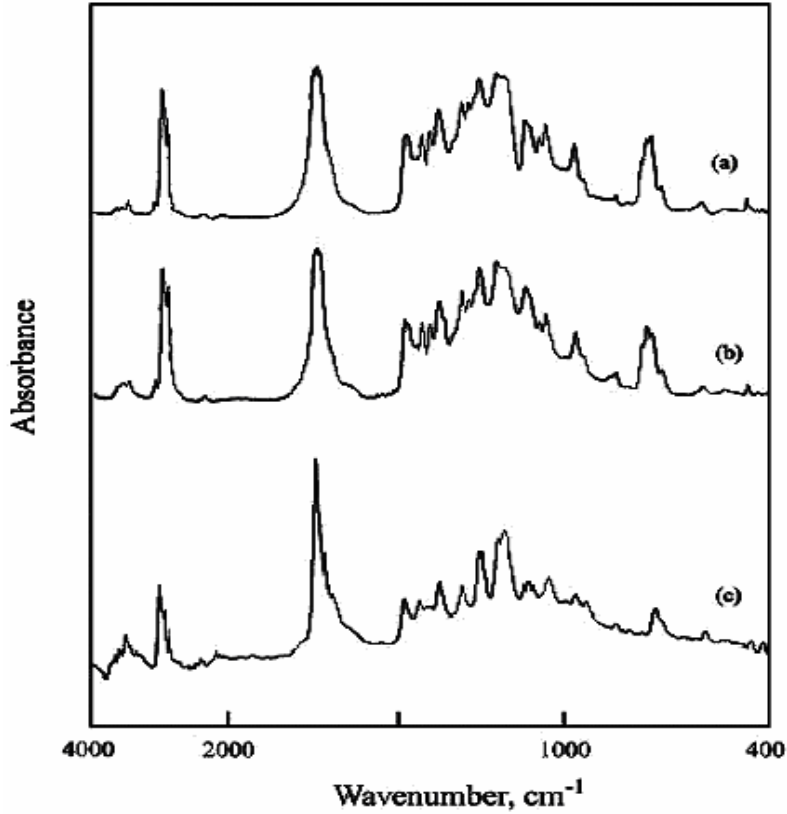
% 100 PCL, % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL ve % 20 Sakkaroz/PCL yapıları ait yüzey spektrumları Şekil 4.1a, b ve c'de sırasıyla verilmiştir.

1738.1 cm<sup>-1</sup>'de yer alan absorpsiyon bandı ester karbonil gruplarının C=O gerilimini göstermektedir. 1367.7-1419.8 cm<sup>-1</sup>, 1192.2-1244.2 cm<sup>-1</sup> ve 2866.6-2945.7 cm<sup>-1</sup>'de görülen pikler ise sırasıyla PCL'nin karakteristik CH<sub>3</sub> grup katlanmalarına, C-O-C gerilim titreşimlerine ve CH gerilim bandlarına aittir (Şekil 4.1a). % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL yapıya ait spektrum da % 100 PCL yapıya ait karakteristik pikleri içermektedir. Fakat, 3418.3 cm<sup>-1</sup>'de yer alan absorpsiyon bandı PEG molekülünün sonundaki hidroksil gruplarını göstermektedir (Şekil 4.1b). Bu da yıkama sonrası yapıda hala PEG kaldığına işarettir.

Ayrıca, doku iskelelerindeki PEG<sub>4000</sub> miktarı (ağırlıkça) % 10 dan % 55'e artırıldığında 1738.1 cm<sup>-1</sup>'de yer alan absorpsiyon bandında önemli bir kayma gözlenmemiştir. Bunun sonucunda PCL ve PEG<sub>4000</sub> arasında herhangi bir kimyasal etkileşim olmadığı söylenebilir. Bölüm 3.2.3.3'de izlenen deneysel prosedüre göre alınan DSC sonuçları ve daha önceden Wen-Jen Lin ve grubu tarafından elde edilen bulgular bu sonucu doğrulamaktadır (Lin et al., 2002). PEG ve PCL moleküllerinin polariteleri birbirinden oldukça farklıdır dolayısıyla iki

molekölün doku iskelesi hazırlama işlemi süresince aralarında hidrojen bağı oluşturacak şekilde yakınlaşmaları imkansızdır.

% 20 Sakkaroz/PCL doku iskelelerine ait FTIR spektrumu yine doku iskelelerinin iyice yıkanması sonucu sakkaroz moleküllerinin yapıdan uzaklaştırılmasının ardından alınmıştır (Şekil 4.1c). Elde edilen spektrum Şekil 4.1a'da görülen PCL polimerine ait karakteristik pikleri sergilemektedir.



Şekil 4.1. PCL yapılarına ait FTIR spektrumları:

- a) % 100 PCL,
- b) % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL,
- c) % 20 Sakkaroz/PCL.

#### 4.1.1.3. DSC analizi

Hazırlanan PCL doku iskelelerinin camsı geçiş sıcaklığı ( $T_c$ ), erime sıcaklığı ( $T_e$ ) ve erime ısı ( $\Delta H_e$ ) değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2'den açıkça görüldüğü üzere, yıkama sonrası PCL yapıların  $T_c$ ,  $T_e$  ve  $\Delta H_e$  değerleri başlangıçta eklenen PEG<sub>4000</sub> ve sakkaroz miktarlarından hemen hemen bağımsızdır. Bu sonuç, doku iskelesi oluşumu sırasında PEG<sub>4000</sub> ve PCL

ya da sakkaroz ve PCL molekülleri arasında herhangi bir kimyasal etkileşim olmadığını göstermektedir.

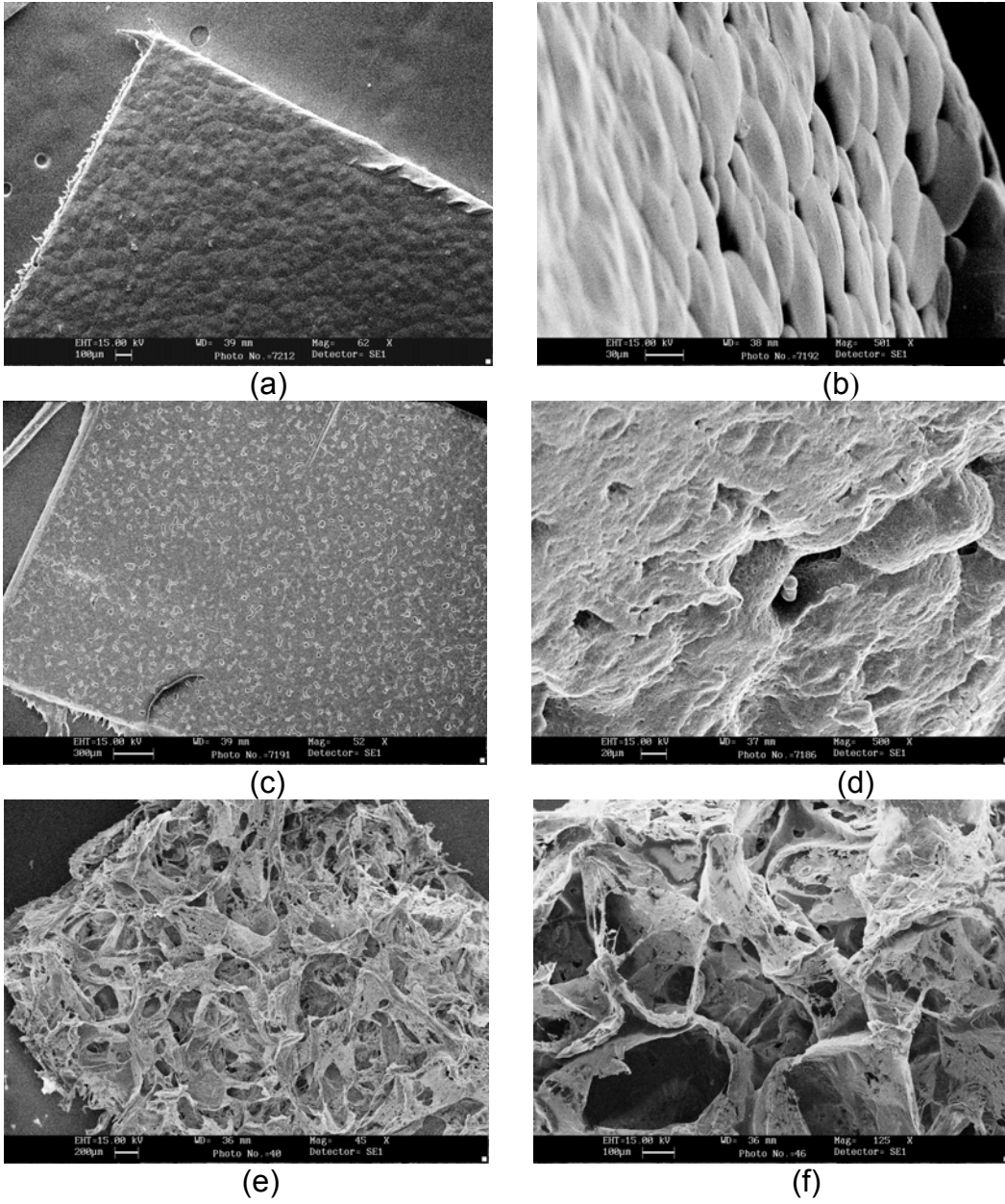
Çizelge 4.2. PCL doku iskelelerinin camsı geçiş sıcaklığı ( $T_c$ ), erime sıcaklığı ( $T_e$ ) ve erime ısısı ( $\Delta H_e$ ) değerleri.

Doku İskelesi	$T_c$ (°C)	$T_e$ (°C)	$\Delta H_e$ (J/g)
% 100 PCL	-59.20	62.24	68.00
% 100 PEG <sub>4000</sub>	–	63.06	171.53
% PEG <sub>4000</sub> /PCL			
10	-53.58	62.13	63.46
40	-55.34	61.99	87.99
% Sakkaroz/PCL			
10	-62.06	63.14	81.77
20	-63.25	63.23	82.42

#### **4.1.1.4. PCL doku iskelelerinin morfolojisi**

PCL doku iskelelerinin yüzey ve kesit yapısı taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniği ile hazırlanmış tüm örneklerin SEM fotoğrafları Şekil 4.2’de verilmiştir. % 100 PCL yapı küçük tepelik ve vadileri içeren hemen hemen pürüzsüz bir yüzey sergilemektedir (Şekil 4.2a). Fakat, Şekil 4.2b’ye bakıldığında % 100 PCL’in kesit yapısının düz değil, fabrik-benzeri bir yapı olduğu görülmektedir. Gözenek yapıcı olarak PEG<sub>4000</sub> molekülü kullanıldığında, PEG<sub>4000</sub> miktarının % 20’den % 40’a artışıyla ortalama boyutu ~20 µm ve ~40 µm arasında değişen, düzensiz, küre-benzeri gözenekler elde edilmiştir (Şekil 4.2c). Ayrıca, başlangıçta eklenen PEG<sub>4000</sub> miktarı artırıldığında doku iskelelerinde oluşan gözenek sayısının da arttığı gözlenmiştir. % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL doku iskelesinin kesit yapısından görüldüğü üzere elde edilen doku iskelesinde gözenekler arası bağlantı oldukça zayıftır (Şekil 4.2d). Gözenek yapıcı olarak sakkaroz kristalleri kullanıldığında ise PCL yapılarda makrogözenekliliğe ulaşıldığı görülmüştür (Şekil 4.2e). % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelesi, ortalama gözenek çapı 180 µm ile 200 µm arasında değişen, birbiriyle bağlantılı gözenek yapısı sergilemektedir (Şekil 4.2f). Bu doku iskelelerinin gözenekliliği Bölüm 3.2.3.1’de

verilen Eşitlik (3.1)'e göre hesaplanmış ve elde edilen gözenekliliğin (% 92) literatürde faz ayrımı ve katı serbest-form fabrikasyon teknikleriyle hazırlanan doku iskelelerinin gözeneklilik değerinden fazla olduğu görülmüştür (Hutmacher, 2000). Sakkaroz yüzdesinin % 10'dan % 20'ye arttırılmasıyla, hemen hemen aynı gözeneklilik (% ~91) elde edilmiştir. Fakat % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelelerinde gözenekler arası bağlantının daha iyi olduğu görülmüş ve bu nedenle hücre kültür çalışmalarının % 10 Sakkaroz/PCL doku iskeleleri ile gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.2. PCL yapıları aitt SEM fotoğrafları:

% 100 PCL; yüzey x60 (a), kesit x500 (b); % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL; yüzey x50 (c), kesit x500 (d); % 10 Sakkaroz/PCL; yüzey x45 (e), kesit x125 (f).

#### 4.1.2. Hücre Kültür Çalışmaları

L929 fare fibroblast hücre kültürü çalışmaları % 100 PCL, % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL ve % 10 Sakkaroz/PCL doku iskeleleri olmak üzere 3 tür PCL yapı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü sonuçları Şekil 4.3 ve Çizelge 4.3'e göre değerlendirilmiştir.

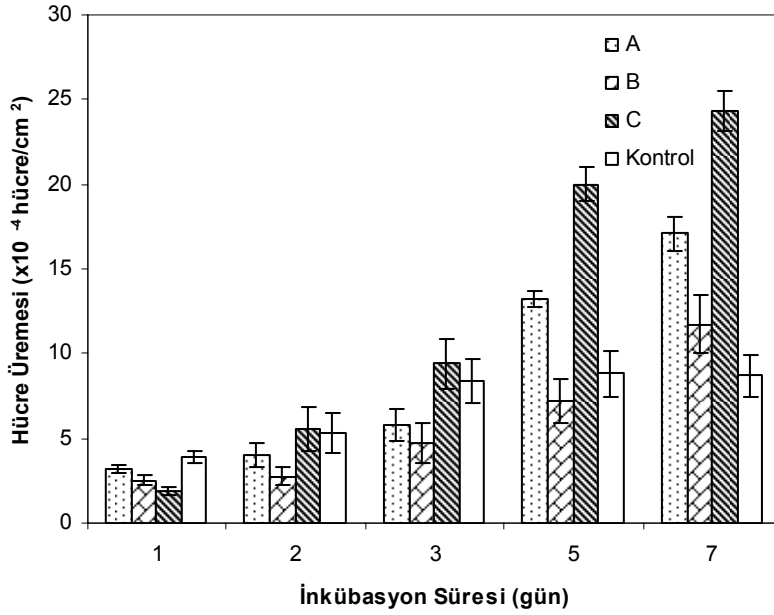
PCL doku iskeleleri ve kontrol yüzeyi üzerinde zamana bağlı olarak hücre üremesi Şekil 4.3'de görülmektedir. Birim alan başına hücre sayısı olarak ifade edilen üreme değerleri hemositometrik sayımla elde edilmiştir. Çalışmalarda kontrol grubu olarak PS (polistiren) doku kültür kabı kullanılmıştır. Hücrelerin tutunma/yapışma ve yayılma davranışı hücre/doku iskelesi etkileşiminin ilk aşamasında meydana gelmekte ve bu aşama hücrelerin doku iskelesi üzerinde üreme kapasitesini etkilemektedir (Serrano, 2004). Kültürün en erken dönemlerinde (ekimden 1 gün sonra), hücreler tüm PCL doku iskeleleri üzerinde kontrol grubuna nazaran daha düşük bir üreme davranışı sergilemiştir. Buna ilaveten, % 100 PCL yapı üzerinde hücre üremesinin çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma metodu ile hazırlanmış % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL ve % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelelerindeki hücre üremesinden çok az yüksek olduğu görülmüştür. Bu küçük farkın % 100 PCL yapının ıslatılabilirlik özelliğinden ve yüzey morfolojisinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Tang ve araştırma grubu (2004), farklı çözücüler kullanılarak çözücü-döküm metodu ile hazırlanmış PCL filmler için temas açısı değerlerini ölçmüşlerdir. PCL filmlerin temas açısı çözücü türüne bağlı olarak 85° ile 103° arasında bulunmuştur. Bu çalışmada % 100 PCL yapı için ölçülen temas açısı değeri 69.0 ± 1.4 derecedir (Çizelge 4.3). Örneklerin su temas açısı değerleri Advancing Surface Science System (Krüss, Almanya) kullanılarak sessile drop temas açısı ölçümü ile bulunmuştur. % 100 PCL ve % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL yapıların temas açısı değerleri arasında önemli bir fark görülmemiştir. Fakat, % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelesinin sahip olduğu yüzey topografyası nedeniyle bu doku iskelesi için daha yüksek bir su temas açısı değeri (100.4 ± 2.4 derece) elde edilmiştir. PCL hidrofobiktir ve bu da hücre üremesi için istenmeyen bir özelliktir (Chandra and Rustgi, 1998). Buna karşın, literatürde PCL doku iskelelerinin çeşitli hücrelerin üremesini pozitif yönde etkilediğini gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Hutmacher et al., 2001; Darling and Sun, 2004; Williams et al., 2005).



Üçüncü günün sonunda, L929 fibroblast hücrelerinin iki-boyutlu kontrol yüzeyinde üremelerini tamamen tamamladığı (confluency) görülürken, aynı hücrelerin hazırlanan PCL doku iskeleleri üzerinde üremelerine devam ettiği gözlenmiştir. Uzun süreli kültür için, doku iskelelerinin üç-boyutlu yapısının ve gözenekliliğinin ne derece önem taşıdığı buradan açıkça görülmektedir.

Kültür sonunda, L929 hücrelerinin üremesi için en uygun doku iskelesinin % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelesi olduğu görülmüştür. Muhtemelen % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelesinin birbiriyle bağlantılı makrogözenekleri ( $191.2 \pm 11.0 \mu\text{m}$ ) ve yüksek gözenekliliği (% 92) hücrelerin bu doku iskelesi üzerinde daha iyi üremesine neden olmuştur. Bu sonuç, kültürün son basamaklarında hücrelerin üremek için (özellikle üç-boyutlu olarak) geniş boşluklara ve yüksek gözenekliliğe ihtiyaç duyduklarını göstermiştir. En düşük hücre üremesi % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL doku iskeleleri üzerinde elde edilmiştir. Bunun nedeni olarak, % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL doku iskelesinin düzensiz mikrogözenek yapısı ve gözenekler arası bağlantının oldukça zayıf olması düşünülmektedir. Fakat yine de, tüm PCL doku iskeleleri sahip oldukları üç-boyutlu yapı nedeniyle L929 hücre üremesini kontrol yüzeyinden (TCPS; doku kültürü polistiren) daha fazla desteklemiştir.

Fibroblastların düşük yüzey gerilimlerine sahip pürüzsüz yüzeylere daha iyi yapıştığı ve ürettiği daha önceden bilinmektedir (Tang et al., 2004). Diğer yandan, kısmen ıslatılabilir yüzeylerin hücre yapışması ve üremesi için tercih edildiği bilinmektedir (Gümüşderelioğlu and Türkoğlu, 2002). % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelesi yüksek hidrofobisiteye sahip olmasına rağmen hücre üremesini oldukça iyi bir şekilde desteklemiştir. Bu sonuç, % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelesinin yüzeyinin oldukça pürüzlü olması ve bu pürüzlülüğün hücreler için pek çok bağlanma bölgesi sunması ve dolayısıyla daha güçlü tutunmanın/yapışmanın gerçekleşmesi sonucuyla açıklanabilir (Gerçek et al., 2007).



Şekil 4.3. PCL doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üremesi (İnokülasyon yoğunluğu:  $5 \times 10^4$  hücre/ml)  
A; % 100 PCL, B; % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL, C; % 10 Sakkaroz/PCL.

Çizelge 4.3. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan PCL yapılar.

PCL yapılar	Ortalama gözenek boyutu (µm)	Gözeneklilik (%)	Su temas açısı (derece)
% 100 PCL	–	–	69.0 ± 1.4
% 40 PEG <sub>4000</sub> /PCL	40.1 ± 7.0	taayin edilemedi	70.4 ± 1.7
% 10 Sakkaroz/PCL	191.2 ± 11.0	92	100.4 ± 2.4

## 4.2. Doku İskelelerinin Farklı Koşullarda Oluşturulan Plazmalar İle Modifikasyonu

Biyobozunur ve biyobozunur olmayan sentetik, biyoyumlu polimerik doku iskeleleri hücre kültüründe kullanılmaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında, biyobozunur polimerik matrisler (özellikle fabrikler) yapay doku substitüentlerinin geliştirilmesinde kullanılırken, biyobozunur olmayan matrisler hücresel biyolojik ürünlerin üretiminde tercih edilmektedir (Shalaby, 1996). Polimerik matrisler üretim kolaylığı, gözenek yapısının ve mekanik özelliklerinin kontrolü dolayısıyla doku iskelesi olarak yaygın kullanıma sahiptirler. Fakat, bu tür polimerik doku iskelelerini tek başına kullanarak hücresel işlevleri kontrol etmek kolay değildir. Bu nedenle

literatürdeki araştırmacılar sentetik polimerlerle biyolojik olarak aktif molekülleri birleştirerek hücre üretimi için işlevsel biyomalzemeler geliştirme yollarına gitmişlerdir (Shin et al., 2003; Biltresse et al., 2005; Larsena et al., 2006). İnsülin, transferin, epidermal büyüme faktörü, fibronektin ve jelatin gibi biyolojik moleküllerin kültür ortamında kullanımıyla hücre yapışma ve üremesinin arttırıldığı bilinmektedir (Underwood et al., 2001; Man and West, 2002; Ebara et al., 2004; Klenkler et al., 2005; Hatakeyama et al., 2006). Ayrıca bu tür biyomoleküllerin katı polimerik yüzeylere immobilize edilerek kullanıldıklarında daha aktif oldukları bulunmuştur (Ito and Imanishi, 1994). Polimerik doku iskelelerine yukarıda sözü edilen biyolojik olarak aktif moleküllerin immobilize edilebilmesi için polimerik yapıların yüzeylerinde amin ve karboksil grupları gibi fonksiyonel gruplar taşımaları gerekmektedir (Oehr, 2003). Dolayısıyla bu tür polimerik yapıların yüzeylerinde fonksiyonel grup oluşturmak için spesifik yüzey modifikasyon tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Polimerlerin yüzey modifikasyonu polimerin yığın özelliklerini etkilemeden, ıslak kimya yöntemleri (asidik ve alkali ortamlar), plazma yöntemi (kuru ortam) ve radyasyon muamalesi (ultraviyole radyasyon ve lazer) ile gerçekleştirilebilir (Gupta et al., 2000; Gümüşderelioğlu and Türkoğlu, 2002; Falconnet et al., 2006; Shanmugharaj et al., 2006). Plazma modifikasyonunun ıslak kimya yöntemine göre sağladığı pek çok avantaj vardır. Plazma yöntemi ile yapısal ve fonksiyonel olarak kontrol edilebilen kaplamalar yapılabilir. Plazma halinin yüzeyle kontrollü etkileşimi sayesinde yüzey karakteristikleri (kimyasal fonksiyonallikler) ve morfolojisi değiştirilebilir. Hatta inert substratların (Teflon, silika v.b. gibi) bile plazmayla modifikasyonu mümkündür. Plazma modifikasyonunda reaksiyon mekanizması, gaz fazındaki aktif türlerin modifiye edilen substratla etkileşimine dayanır dolayısıyla modifikasyon kuru ortamda gerçekleşmektedir. Ayrıca bu proste modifikasyon için çok az miktarda başlangıç malzemesine gereksinim vardır. Islak kimya yöntemlerinin genellikle polimerin yığın yapısında kalarak biyolojik sistemlere zarar verebilecek polimer-türü-spesifik çözücüler gerektirmesi plazma prosesine göre en büyük dezavantajı olarak sayılabilir (Denes and Manolache, 2001). Son yıllarda plazma yöntemi ile polimerik malzemelerin modifikasyonu büyük önem taşımaktadır (Chu et al., 2002). Yüzey modifikasyonunda kullanılan plazma yöntemlerinin çoğu düşük basınç (1-10 Pa) veya yüksek vakum gerektirmektedir. Bu da prosesi daha karmaşık hale getirmesinin yanısıra proses maliyetini arttırmaktadır. Düşük basınç

plazma modifikasyonuna alternatif olarak atmosferik basınç plazma yöntemi geliştirilmiştir. Atmosferik basınç plazma modifikasyonu vakum ekipmanı gerektirmez ve dolayısıyla geniş yüzey alanına sahip malzemelerin (örneğin filmler, fabrikler ve ağ yapılar) prosesini kolaylaştırmaktadır (Denes and Manolache, 2004).

Sunulan tez çalışmasının bu kısmında düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonları kullanılarak biyobozunur PCL ve 3-boyutlu, biyobozunur olmayan NWPF (dokunmamış poliester fabrik) doku iskeleleri yüzeyinde karboksil gruplarının eldesi/zenginleştirilmesi hedeflenmiştir. Kullanılan doku iskeleleri hakkında ayrıntılı bilgi tez kapsamında daha önce verilmiştir (PCL için Bölüm 3.2, NWPF için Bölüm 2.3.2.12.iii). Literatürde polimerik yüzeylerin plazma ile aktivasyonunun/fonksiyonizasyonunun iki ana yolla gerçekleştiği bilinmektedir. Bunlardan birincisi polimerik yapının O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> gibi moleküllerle veya inert gazlarla muamele edilip yüzeyinde serbest radikallerin oluşturulmasıdır. Yüzeyde oluşan serbest radikallerin daha sonra aktif plazma türleriyle tepkimeye girmesiyle polimerik yüzeyde kimyasal olarak aktif fonksiyonel gruplar elde edilecektir (örneğin karbonil, karboksil hidroksil ve amino grupları). Polimerik yüzeyde fonksiyonel grup oluşturmanın diğer yolu ise “plazma aracılığıyla aşılama” ya da “plazma destekli fonksiyonizasyon” olarak adlandırılan yöntemdir. Bu yöntem plazma aktivasyonunun ve klasik kimya yöntemlerinin kombinasyonu olarak tanımlanabilir (Bogaerts et al., 2002). Tez çalışmasında atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu ile PCL ve NWPF yüzeylerde sadece plazma aktivasyonu ile karboksil gruplarının eldesi hedeflenmiştir. Plazma modifikasyonu atmosferik basınçta ve patentli AER (Array Electrode Reactor) reaktöründe gerçekleştirilmiştir. Reaktör hakkında ayrıntılı bilgi Bölüm 3.3’de verilmiştir. Atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonunda su reaktif olarak, hava ise taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Taşıyıcı olarak havanın seçilmesinin nedeni ise maliyetinin çok düşük olması ve havanın kompresör yada diğer basit aletlerden dağıtımının kolay olmasıdır. Hava taşıyıcı olarak seçilse de havadan kaynaklanan oksijenin de ozon veya oksijensiz radikalleri oluşturarak modifikasyona katkıda bulunacağı düşünülmüştür. PCL ve NWPF polimerik doku iskelelerine uygulanan düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ise plazma destekli fonksiyonizasyon grubuna sokulabilir. Modifikasyon üç basamakta gerçekleştirilmiştir. Bunlar; su/O<sub>2</sub>

plazma muamelesi, in situ veya ex situ gaz-katı reaksiyonu (oksalil klorür buharı, 500 mTorr, örneğin türüne göre belirlenen sürede) ve hidroliz (açık laboratuvar koşulları, 1 saat) işlemleridir. Literatürde argon ve oksijen plazmanın çoğunlukta olduğu pek çok düşük basınç plazma modifikasyonu uygulamaları mevcuttur (Uyama et al., 1998; Gupta et al., 2000, Yang et al., 2002). Fakat argon plazma uygulanan yüzeylerde oksijen içeren fonksiyonel grup oluşturmak için sisteme ya tekrar oksijenin gönderilmesi veya yüzeyin belirli bir süre açık havaya maruz bırakılması gerekmektedir. Bu da prosesin tek basamakta tamamlanamamasına ve modifikasyon süresinin uzamasına neden olmaktadır. Sunulan çalışmada su/O<sub>2</sub> plazmanın seçilmesinin nedeni, plazma muamelesinden hemen sonra yüzeyin hidroksil fonksiyonallitesiyle son bulmasıdır. Ayrıca sudan gelen oksijenler de modifikasyona katkıda bulunacak ve en önemlisi suyun kullanımı ile yüzeyde hareketlilik sağlanacak, dolayısıyla plazmanın homojenitesi artacaktır. Plazma modifikasyonunun ardından sisteme oksalil klorür gönderilmesindeki amaç ise yüzeydeki OH fonksiyonallitesinin –COCl gruplarına dönüştürülmesidir. Son basamakta açık laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen hidroliz işlemiyle yüzeyde oluşturulan bu –COCl grupları COOH fonksiyonallitesine çevrilmiştir. Tez kapsamında son olarak düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ile PCL ve NWPF yüzeyde oluşturulan bu karboksil grupları üzerinden uzatıcı kol PEO varlığında insülin ve heparin biyolojik moleküllerinin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyolojik olarak aktif hale getirilen bu doku iskeleleri L929 fare fibroblast hücre kültüründe kullanılmıştır. Polimerik yüzeylere immobilize edilen biyolojik moleküllerin etkinliği hücre kültürü çalışmaları bölümünde ayrıntılı olarak tartışılmıştır (Bölüm 4.2.1.3). Öncelikli olarak PCL doku iskelelerinin plazma ile modifikasyon çalışmalarının sonuçları verilmiş ve tartışılmış, ardından NWPF doku iskelelerine geçilmiştir.

#### **4.2.1. PCL doku iskelelerinin plazma ile modifikasyon çalışmaları**

Bu kısımda, PCL yapıların yüzeyinde COOH fonksiyonallitesinin eldesi/zenginleştirilmesi amacıyla düşük basınç su/O<sub>2</sub> ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonları gerçekleştirilmiştir.

##### **4.2.1.1. Plazma ile modifiye edilen PCL doku iskelelerinin karakterizasyonu**

Plazma modifikasyonlarının ardından PCL doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

#### **4.2.1.1.i. PCL yüzeyde oluşan OH ve COOH gruplarının miktarsal tayini**

Bölüm 3.3.1.6.i'de verilen floresan işaretleme yönteminin izlenmesiyle, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma, atmosferik basınç su/hava plazma ve düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ardından oksalil klorür ile fonksiyonallizasyon sonrası elde edilen OH ve COOH fonksiyonalliteleri miktarsal olarak tayin edilmiştir. Floresan işaretleme tekniğinin hassasiyetinin belirlenmesi için veriler Anova istatistiksel analizi ile değerlendirilmiş ve floresan işaretleme sonrası PCL yüzeylerde oluşan OH ve COOH yoğunluğunu logaritmik olarak 2'li tabanda (ln) ifade eden eşitlikler aşağıda verilmiştir.

$$\ln(\text{miktar}) = -13.34145 + 0.026580 \times \text{OH Floresan sinyali} - 1.34671 \times 10^{-5} \times \text{OH Floresan sinyali}^2 \quad (4.1)$$

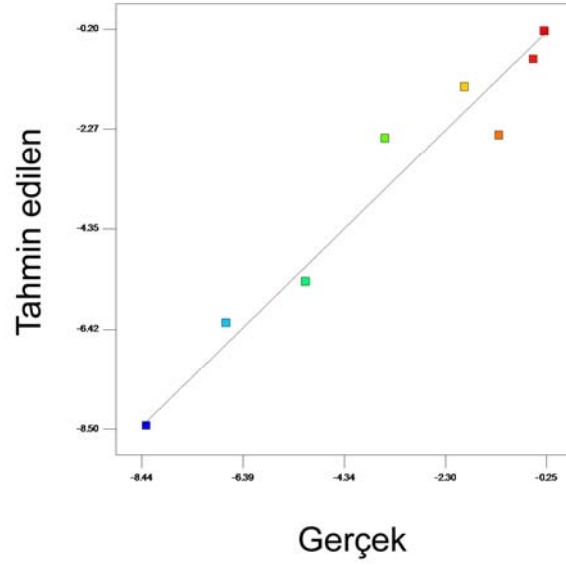
$$\ln(\text{miktar}) = -17.30396 + 0.088388 \times \text{COOH Floresan sinyali} - 1.07011 \times 10^{-4} \times \text{COOH Floresan sinyali}^2 \quad (4.2)$$

Şekil 4.4 (a) ve (b)'de sırasıyla PCL yüzeyde oluşan OH yoğunluğuna ve COOH yoğunluğuna bağlı olarak floresan işaretleme tekniğinin değerlendirilmesi verilmiştir. Her iki grafikte de OH ve COOH yoğunluğuna bağlı olarak saptanan deneysel verilerle elde edilmesi beklenen değerler arasında doğrusal bir ilişki elde edilmiştir. Bunun yanısıra kullanılan floresan tekniğinin hassaslığını simgeleyen açık renklerin çokluğu önem teşkil etmektedir.

OH ve COOH yoğunluğuna bağlı olarak floresan işaretleme tekniğinin hassasiyeti belirlendikten sonra, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonunun optimizasyonuna geçilmiştir.

Design-Expert® Software  
Ln(Quantity)

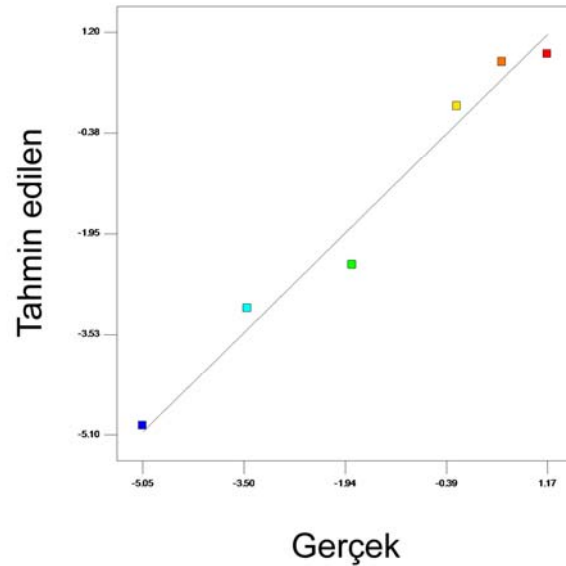
Color points by value of  
Ln(Quantity):



(a)

Design-Expert® Software  
Ln(Quantity)

Color points by value of  
Ln(Quantity):



(b)

Şekil 4.4. PCL yüzeyde oluşan OH (a) ve COOH (b) yoğunluğuna bağlı olarak floresan işaretleme tekniğinin değerlendirilmesi.

#### **4.2.1.1.ii. PCL doku iskeleleri için düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu**

PCL doku iskeleleri için düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesinin optimizasyonu Bölüm 3.3.1.3.ii'de açıklandığı şekilde su akış hızı, basınç, güç ve zaman olmak üzere 4 parametre dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin istatistiksel olarak

değerlendirilmesi ve kuadratik regresyonların hesaplanması sonucu yüzeyde oluşan OH ve COOH miktarı için elde edilen son eşitlikler aşağıdaki gibidir:

$$\begin{aligned}
 \text{OH miktarı } (\mu\text{mol}/\text{cm}^2) &= \\
 +0.12289 & \\
 +0.023077 & \quad \times \text{ su akış hızı} \\
 +2.45565 \times 10^{-4} & \quad \times \text{ basınç} \\
 -8.21267 \times 10^{-3} & \quad \times \text{ güç} \\
 -0.034713 & \quad \times \text{ zaman} \\
 -1.03192 \times 10^{-5} & \quad \times \text{ su akış hızı} \times \text{ basınç} \\
 -1.78198 \times 10^{-4} & \quad \times \text{ su akış hızı} \times \text{ güç} \\
 -3.97337 \times 10^{-3} & \quad \times \text{ su akış hızı} \times \text{ zaman} \\
 -5.17831 \times 10^{-8} & \quad \times \text{ basınç} \times \text{ güç} \\
 +8.43403 \times 10^{-5} & \quad \times \text{ basınç} \times \text{ zaman} \\
 +6.69114 \times 10^{-4} & \quad \times \text{ güç} \times \text{ zaman} \\
 +3.18106 \times 10^{-5} & \quad \times \text{ su akış hızı}^2 \\
 -4.57546 \times 10^{-7} & \quad \times \text{ basınç}^2 \\
 +6.93121 \times 10^{-5} & \quad \times \text{ güç}^2 \\
 +2.57533 \times 10^{-3} & \quad \times \text{ zaman}^2
 \end{aligned} \tag{4.3}$$

$$\begin{aligned}
 \text{COOH miktarı } ((\mu\text{mol}/\text{cm}^2)) &= \\
 +8.54956 & \\
 -0.088303 & \quad \times \text{ su akış hızı} \\
 -5.97399 \times 10^{-3} & \quad \times \text{ basınç} \\
 -0.15808 & \quad \times \text{ güç} \\
 -0.89563 & \quad \times \text{ zaman} \\
 -4.65461 \times 10^{-4} & \quad \times \text{ su akış hızı} \times \text{ basınç} \\
 +4.86758 \times 10^{-3} & \quad \times \text{ su akış hızı} \times \text{ güç} \\
 +1.91993 \times 10^{-3} & \quad \times \text{ su akış hızı} \times \text{ zaman} \\
 +1.18109 \times 10^{-4} & \quad \times \text{ basınç} \times \text{ güç} \\
 +1.45658 \times 10^{-5} & \quad \times \text{ basınç} \times \text{ zaman} \\
 +0.019375 & \quad \times \text{ güç} \times \text{ zaman}
 \end{aligned} \tag{4.4}$$

ANOVA veri analizi sonucu, güç, güç x su akış hızı ve zaman x su akış hızı olmak üzere üç parametrenin OH ve COOH fonksiyonalitesinde önemli etkilerinin olduğu görülmüştür. Ayrıca basıncın COOH yoğunluğu üzerinde son derece önemli olduğu da anlaşılmıştır.

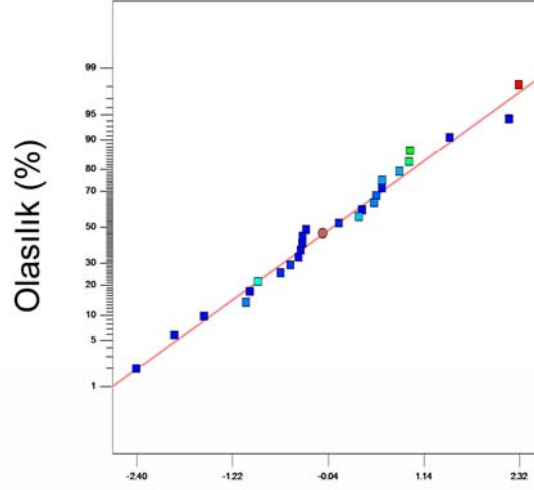
Şekil 4.5 (a) ve (b)'de PCL doku iskelelerinin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonunun DoE ile optimizasyonu için, DoE programına göre rastgele seçilen deneysel girdilere karşı elde edilmesi beklenen OH ve COOH fonksiyonalitesi görülmektedir. Her iki grafikte de girilen deneysel verilerle elde edilmesi beklenen OH ve COOH fonksiyonalitesi arasında doğrusal bir ilişki saptanmıştır. Şekil 4.5 (b)'de elde edilen doğrusal ilişkinin yanısıra, sonuç yüzeydeki oldukça yüksek COOH fonksiyonalitesini simgeleyen açık renklerin



çokluğu ve düşük COOH fonksiyonlitesini gösteren mavi renklerin azlığı dikkat çekicidir.

Design-Expert® Software  
OH Quantity

Color points by value of  
OH Quantity:  
0.135431  
0.000235559

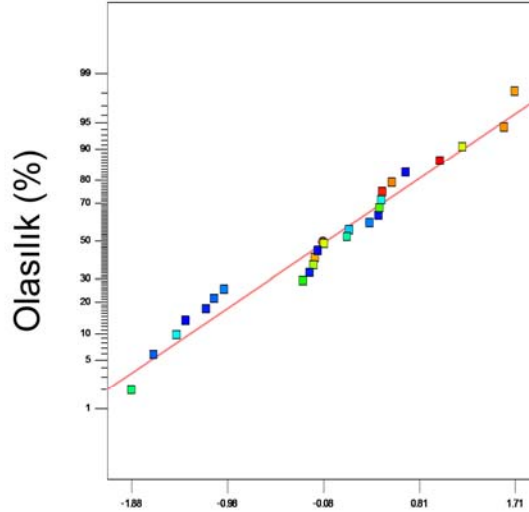


Gerçek

(a)

Design-Expert® Software  
COOH Quantity

Color points by value of  
COOH Quantity:  
2.56945  
0.0104001



Gerçek

(b)

Şekil 4.5. DoE programına göre rastgele seçilen deneysel girdilere karşı elde edilmesi planlanan OH (a) ve COOH (b) fonksiyonlitesi (PCL örneklerin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu için).

Plazma prosesi boyunca zaman, basınç, su akış hızı ve güç gibi deneysel parametrelerin birbiri üzerine ve OH/COOH fonksiyonlitesi üzerine etkisini gözlemlemek için DoE programı kullanılarak Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilen

grafikler çizilmiştir. Grafiklerde OH ve COOH fonksiyonallitesi üzerine sırasıyla basınç-su akış hızı, güç-su akış hızı, zaman-su akış hızı, zaman-basınç, zaman-güç, güç-basınç ilişkilerinin etkisi görülmektedir. Verilen grafiklerde parametrelerin farklı çalışma aralıkları üst işaretiyle (a, a' gibi) simgelenmiştir.

PCL yüzeyde oluşan OH ve COOH yoğunluklarının basınç-su akış hızı diyagramına göre, polimer zincirlerin hidrolizinin düşük basınçta gerçekleştiği ve hem OH hem de COOH yoğunluğunun yüksek su akışında arttığı görülmektedir. Yüksek basınçta moleküler zincirlerin yavaş oksidasyonu sonucu OH fonksiyonallitesi oluşmaktadır.

Karboksil fonksiyonallitesi, oksidasyon mekanizmasını takiben düşük güç-su akış hızında meydana gelmektedir. Yüksek basınç değerlerinin, elde edilen COOH yoğunluğunun azalmasıyla sonuçlanacak dekarboksilasyonun başlamasına neden olacağı söylenebilir. Su/O<sub>2</sub> karışımında oksijen içeriğinin artırılması belli güç aralığında güçlü oksidasyona neden olmakta ve sonuçtaki OH yoğunluğunu azaltmaktadır.

Zaman, plazma prosesi boyunca karboksil fonksiyonallitesini yavaşça arttırmaktadır. Zamanın OH yoğunluğunu sadece düşük su akış hızlarında arttırdığı görülmektedir. Uzun süreli yüksek su akışındaki plazma prosesinin, muhtemelen peroksitler aracılığıyla ketonların oluşumunu sağlayarak OH yoğunluğunu azalttığı söylenebilir.

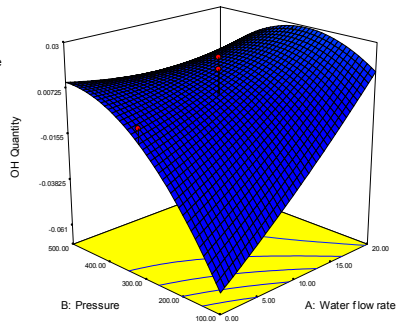
Zaman-basınç diyagramından su akış hızı ve güç değeri merkezde olduğunda, uzun süreli modifikasyon sonucu COOH yoğunluğunun azaldığı, OH yoğunluğunun ise arttığı görülmektedir.

Ayrıca, su akış hızı ve basıncın merkezi değerleri için, düşük güç ve zaman, OH ve COOH yoğunluğunu arttırmaktadır.

Gücün ve basıncın düşük olması yüzeydeki karboksil fonksiyonallitesini arttırmaktadır. OH yoğunluğu, güç-su akış hızı diyagramında olduğu gibi basınçla yavaşça artmaktadır.

Design-Expert® Software

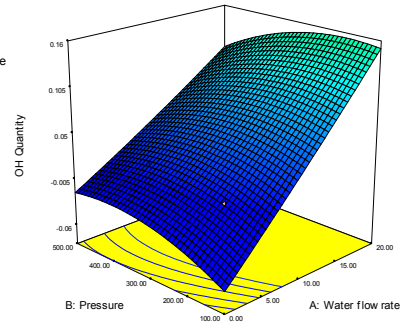
OH Quantity  
0.453235  
0.000235559  
X1 = A: Water flow rate  
X2 = B: Pressure  
Actual Factors  
C: Power = 50.00  
D: Time = 2.50



(a)

Design-Expert® Software

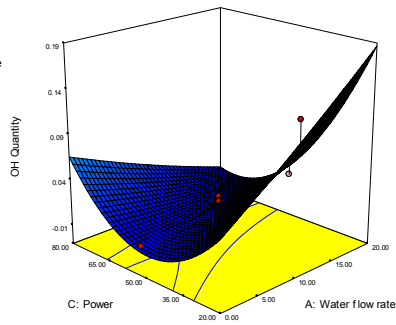
OH Quantity  
0.453235  
0.000235559  
X1 = A: Water flow rate  
X2 = B: Pressure  
Actual Factors  
C: Power = 35.00  
D: Time = 1.50



(a')

Design-Expert® Software

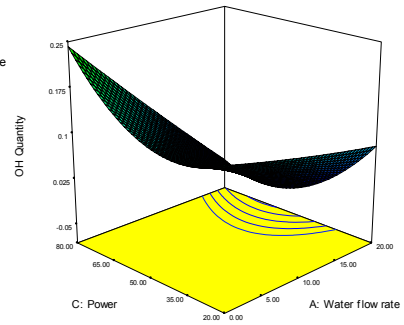
OH Quantity  
0.453235  
0.000235559  
X1 = A: Water flow rate  
X2 = C: Power  
Actual Factors  
B: Pressure = 300.00  
D: Time = 2.50



(b)

Design-Expert® Software

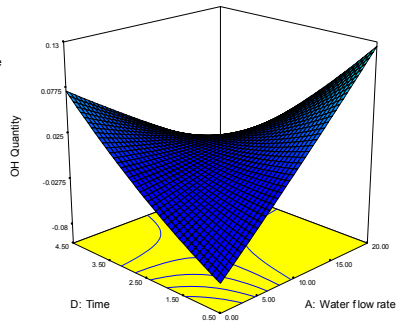
OH Quantity  
0.453235  
0.000235559  
X1 = A: Water flow rate  
X2 = C: Power  
Actual Factors  
B: Pressure = 500.00  
D: Time = 4.50



(b')

Design-Expert® Software

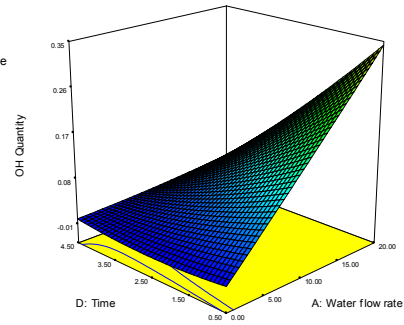
OH Quantity  
0.453235  
0.000235559  
X1 = A: Water flow rate  
X2 = D: Time  
Actual Factors  
B: Pressure = 294.59  
C: Power = 50.00



(c)

Design-Expert® Software

OH Quantity  
0.453235  
0.000235559  
X1 = A: Water flow rate  
X2 = D: Time  
Actual Factors  
B: Pressure = 100.00  
C: Power = 20.00



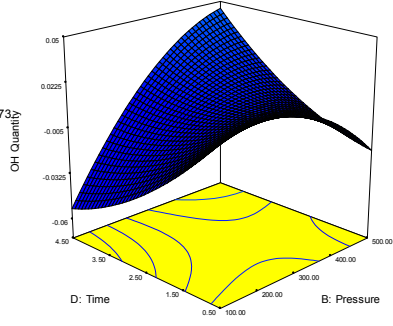
(c')

Design-Expert® Software

OH Quantity  
0.453235  
0.000235559

X1 = B: Pressure  
X2 = D: Time

Actual Factors  
A: Water flow rate = 9.73  
C: Power = 50.81



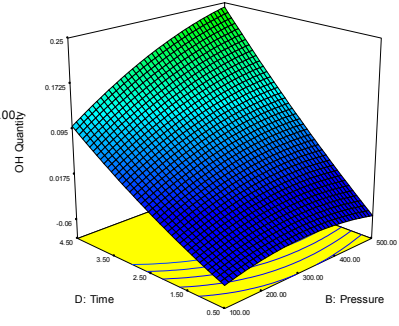
(d)

Design-Expert® Software

OH Quantity  
0.453235  
0.000235559

X1 = B: Pressure  
X2 = D: Time

Actual Factors  
A: Water flow rate = 0.00  
C: Power = 80.00



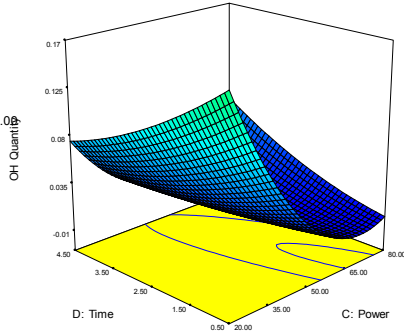
(d')

Design-Expert® Software

OH Quantity  
0.453235  
0.000235559

X1 = C: Power  
X2 = D: Time

Actual Factors  
A: Water flow rate = 10.00  
B: Pressure = 300.00



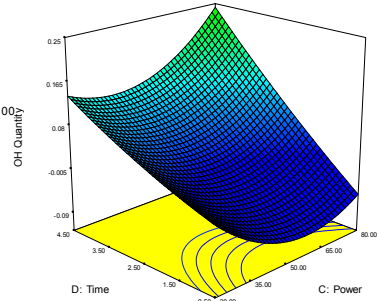
(e)

Design-Expert® Software

OH Quantity  
0.453235  
0.000235559

X1 = C: Power  
X2 = D: Time

Actual Factors  
A: Water flow rate = 0.00  
B: Pressure = 500.00



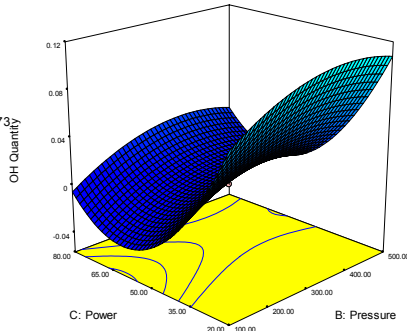
(e')

Design-Expert® Software

OH Quantity  
0.453235  
0.000235559

X1 = B: Pressure  
X2 = C: Power

Actual Factors  
A: Water flow rate = 9.73  
D: Time = 2.50



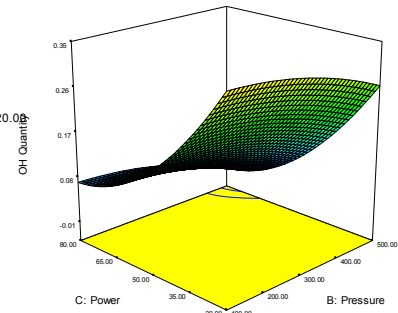
(f)

Design-Expert® Software

OH Quantity  
0.453235  
0.000235559

X1 = B: Pressure  
X2 = C: Power

Actual Factors  
A: Water flow rate = 20.00  
D: Time = 0.50



(f')

Şekil 4.6. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve OH fonksiyonitesi üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Basınç-su akış hızı ilişkisi (a), (a'); Güç-su akış hızı ilişkisi (b), (b'); Zaman-su akış hızı ilişkisi (c), (c'); Zaman-basınç ilişkisi (d), (d'); Zaman-güç ilişkisi (e), (e'); Güç-basınç ilişkisi (f), (f') (PCL örneklerin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu için).

Design-Expert® Software

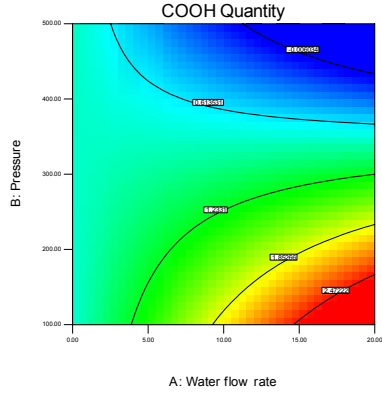
COOH Quantity

2.56945

0.0104001

X1 = A: Water flow rate  
X2 = B: Pressure

Actual Factors  
C: Power = 50.41  
D: Time = 2.50



(a)

Design-Expert® Software

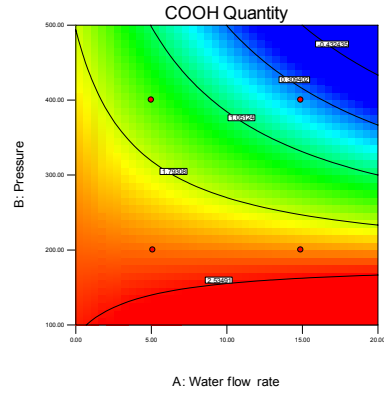
COOH Quantity

2.56945

0.0104001

X1 = A: Water flow rate  
X2 = B: Pressure

Actual Factors  
C: Power = 35.00  
D: Time = 1.50



(a')

Design-Expert® Software

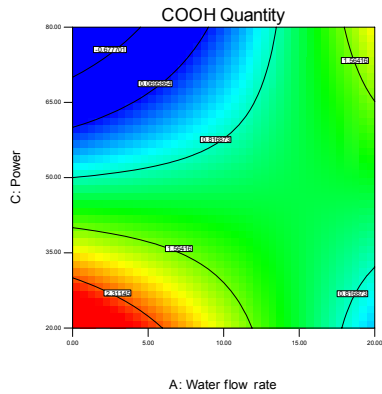
COOH Quantity

2.56945

0.0104001

X1 = A: Water flow rate  
X2 = C: Power

Actual Factors  
B: Pressure = 300.00  
D: Time = 2.47



(b)

Design-Expert® Software

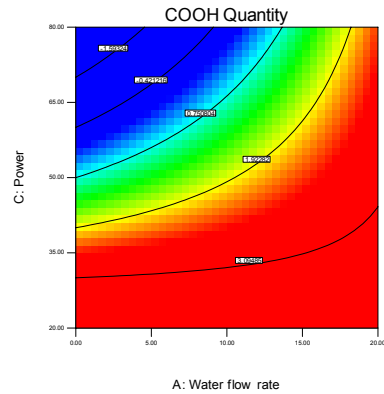
COOH Quantity

2.56945

0.0104001

X1 = A: Water flow rate  
X2 = C: Power

Actual Factors  
B: Pressure = 100.00  
D: Time = 1.50



(b')

Design-Expert® Software

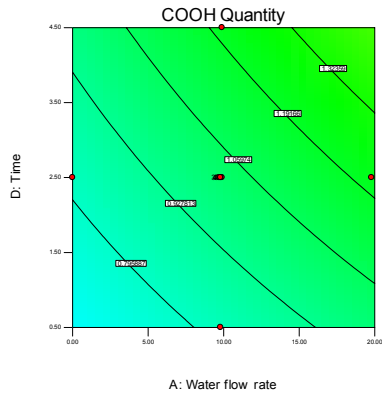
COOH Quantity

2.56945

0.0104001

X1 = A: Water flow rate  
X2 = D: Time

Actual Factors  
B: Pressure = 300.00  
C: Power = 50.00



(c)

Design-Expert® Software

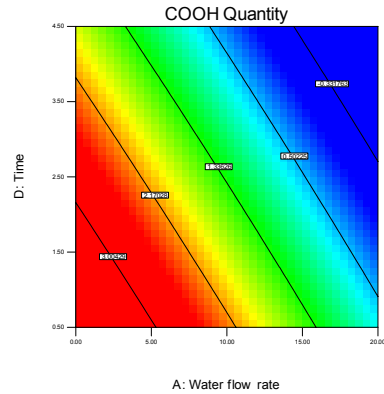
COOH Quantity

2.56945

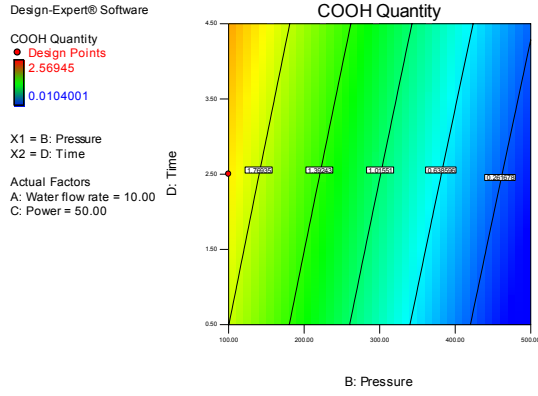
0.0104001

X1 = A: Water flow rate  
X2 = D: Time

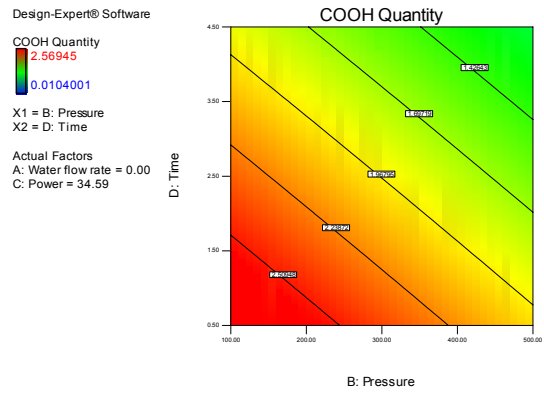
Actual Factors  
B: Pressure = 359.46  
C: Power = 20.00



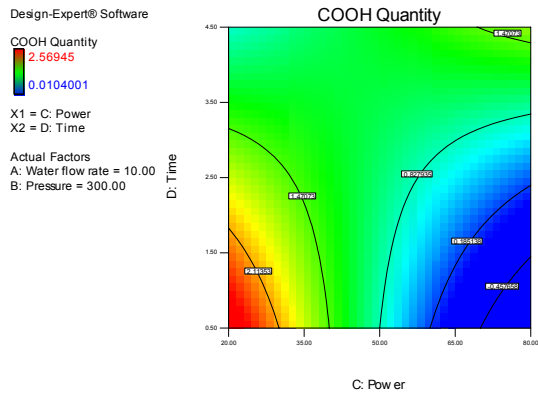
(c')



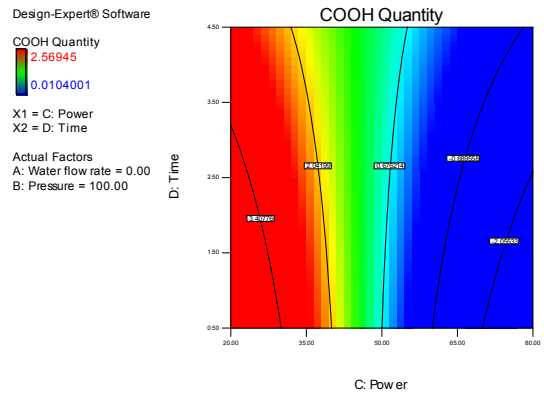
(d)



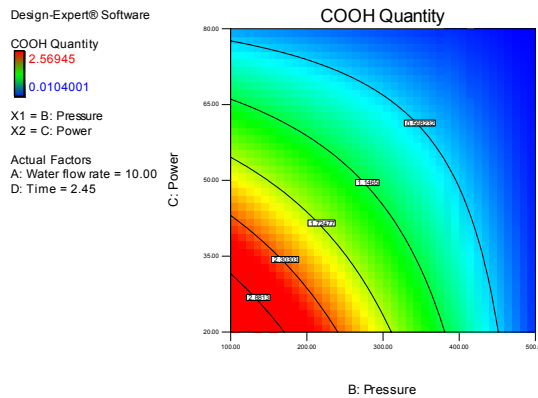
(d')



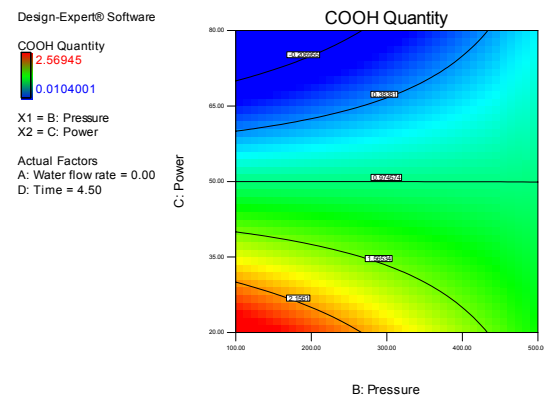
(e)



(e')



(f)



(f')

Şekil 4.7. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve COOH fonksiyonlitesi üzerine etkisi (2 boyutlu grafikler): Basınç-su akış hızı ilişkisi (a), (a'); Güç-su akış hızı ilişkisi (b), (b'); Zaman-su akış hızı ilişkisi (c), (c'); Zaman-basınç ilişkisi (d), (d'); Zaman-güç ilişkisi (e), (e'); Güç-basınç ilişkisi (f), (f') (PCL örneklerin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu için).

Tüm bu istatistiksel ve grafiksel değerlendirmelerin ardından, su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş PCL örneklerde maksimum OH ve COOH fonksiyonlitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler DoE programı ile belirlenmiş ve Çizelge 4.4'de verilmiştir. DoE programına göre, OH ve COOH floresan sinyallerini

maksimum düzeyde elde edebilmek için 1 nolu deney önerilmiştir. Fakat ileriki çalışmalar için 18 nolu deney parametreleri seçilmiştir. Bunun nedeni ise, seçilen parametreler ile OH yoğunluğu azaltılmadan COOH fonksiyonlitesinin arttırılabilmesidir.

Çizelge 4.4. Su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş PCL örneklerde maksimum OH ve COOH fonksiyonlitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler.

Deney	Su akış hızı (cm <sup>3</sup> /dk)	Basınç (mTorr)	Güç (W)	Süre (dk)	OH Floresan sinyali (mV)	COOH Floresan sinyali (mV)	İstek	
1	15.00	200.29	49.32	1.50	624.009	472.434	0.921	<b>Önerilen</b>
2	14.99	202.39	49.18	1.50	624.001	469.834	0.916	
3	15.00	200.00	50.39	1.50	615.157	475.512	0.916	
4	15.00	200.00	47.57	1.50	638.93	468.134	0.914	
5	15.00	202.77	48.23	1.54	623.999	464.759	0.908	
6	15.00	208.38	48.88	1.50	624	463.152	0.906	
7	14.79	200.00	45.57	1.50	647.924	459.624	0.900	
8	15.00	200.00	53.54	1.51	586.184	482.972	0.894	
9	15.00	203.16	43.98	1.50	667.669	455.675	0.893	
10	15.00	200.60	42.42	1.50	682.019	454.123	0.891	
11	15.00	200.00	41.43	1.50	690.465	452.103	0.887	
12	14.96	200.31	40.29	1.50	698.538	448.421	0.881	
13	15.00	200.00	40.33	1.52	695.726	448.187	0.881	
14	15.00	200.03	39.00	1.50	711.033	445.738	0.877	
15	15.00	200.00	35.11	1.50	743.64	435.594	0.859	
16	15.00	200.07	38.56	1.74	669.464	433.017	0.855	
17	13.36	200.00	41.66	1.50	624.001	432.483	0.854	
<b>18</b>	<b>5.00</b>	<b>400.00</b>	<b>35.01</b>	<b>3.50</b>	<b>523.423</b>	<b>509.683</b>	<b>0.851</b>	<b>Seçilen</b>
19	5.00	400.00	35.23	3.50	523.535	508.221	0.850	
20	5.01	398.70	35.00	3.50	522.572	508.906	0.849	
21	15.00	200.00	36.90	1.75	679.386	428.048	0.846	
22	14.32	208.35	53.07	1.50	567.514	460.071	0.837	
23	13.05	200.27	35.00	1.50	657.661	421.156	0.834	
24	5.00	400.00	36.75	3.50	521.849	496.913	0.832	
25	5.00	386.54	35.00	3.50	514.513	501.86	0.829	
26	15.00	204.77	35.00	1.79	687.843	417.839	0.828	
27	14.99	202.03	35.00	1.84	678.164	417.706	0.828	

Çizelge 4.4. devam ediyor.

28	5.01	400.00	37.21	3.50	521.263	493.25	0.827	
29	5.00	400.00	35.01	3.41	511.24	503.39	0.827	
30	5.75	400.00	35.66	3.50	519.071	487.524	0.816	
31	6.02	400.00	35.09	3.50	518.707	484.989	0.812	
32	12.14	203.24	35.03	1.50	616.588	412.852	0.812	
33	15.00	200.00	35.03	2.10	627.057	407.064	0.809	
34	5.07	370.33	35.00	3.50	503.027	490.669	0.799	
35	15.00	208.45	35.00	2.12	624	400.004	0.796	
36	5.00	366.36	35.00	3.50	500.453	489.64	0.794	
37	5.00	399.98	40.47	3.50	517.714	469.255	0.789	
38	5.00	400.00	40.69	3.49	516.09	466.936	0.784	
39	12.56	245.25	35.00	1.50	624.001	387.256	0.772	
40	15.00	226.92	35.00	2.46	560.705	372.777	0.684	
41	5.00	295.82	35.00	3.50	451.973	447.253	0.672	
42	5.01	399.86	35.00	2.73	422.071	456.79	0.641	
43	14.95	200.00	35.00	2.72	506.094	377.935	0.637	
44	11.10	317.56	35.00	2.22	505.446	350.795	0.590	

#### **4.2.1.1.iii. PCL doku iskeleleri için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu**

Bölüm 3.3.1.3.iii'de açıklandığı şekilde su akış hızı, güç ve zaman olmak üzere 3 parametrenin seçilerek DoE yazılım programının kullanılmasıyla PCL doku iskeleleri için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve kuadratik regresyonların hesaplanması sonucu yüzeyde oluşan OH ve COOH miktarı için elde edilen son eşitlikler aşağıdaki gibidir:

$$\begin{aligned}
 \text{OH miktarı } (\mu\text{mol/cm}^2) &= \\
 -4.45598 & \\
 +0.043924 & \quad \times \text{ güç} \\
 +1.55913 \times 10^{-003} & \quad \times \text{ akış hızı} \\
 +2.00505 & \quad \times \text{ zaman} \\
 -9.25185 \times 10^{-006} & \quad \times \text{ güç} \times \text{ akış hızı} \\
 -6.14341 \times 10^{-003} & \quad \times \text{ güç} \times \text{ zaman} \\
 -4.00220 \times 10^{-004} & \quad \times \text{ akış hızı} \times \text{ zaman} \\
 -8.16458 \times 10^{-005} & \quad \times \text{ güç}^2 \\
 -0.18449 & \quad \times \text{ zaman}^2
 \end{aligned} \tag{4.5}$$



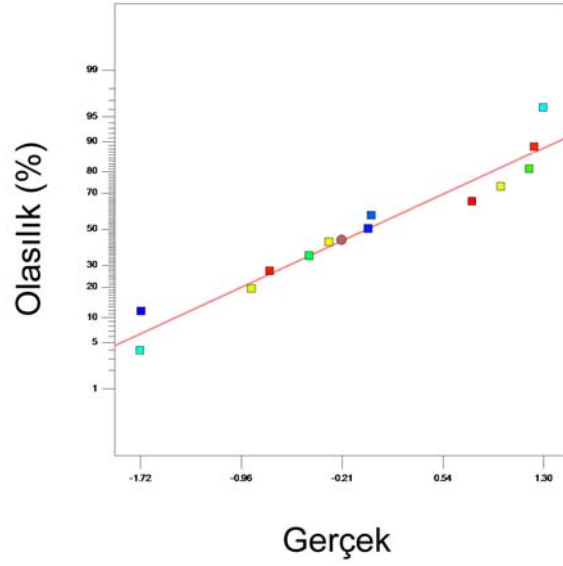
$$\begin{aligned}
\text{COOH miktarı } (\mu\text{mol/cm}^2) &= \\
-4.51727 & \\
+0.022978 & \quad \times \text{ güç} \\
+4.70067 \times 10^{-003} & \quad \times \text{ akış hızı} \\
+2.03715 & \quad \times \text{ zaman} \\
-1.16007 \times 10^{-004} & \quad \times \text{ güç}^2 \\
-3.03015 \times 10^{-006} & \quad \times \text{ akış hızı}^2 \\
-0.31079 & \quad \times \text{ zaman}^2
\end{aligned} \tag{4.6}$$

ANOVA veri analizi sonucuna göre, güç<sup>2</sup>, zaman<sup>2</sup> ve güç× zaman olmak üzere üç parametrenin OH yoğunluğunda, akış hızı ve zaman<sup>2</sup> parametrelerinin ise COOH fonksiyonlitesinde önemli etkilerinin olduğu görülmüştür.

PCL doku iskelelerinin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonunun DoE ile optimizasyonu için, DoE programına göre rastgele seçilen deneysel girdilere karşı elde edilmesi beklenen OH ve COOH fonksiyonlitesi Şekil 4.8 (a) ve (b)'de görülmektedir. Şekil 4.8 (a)'da görüldüğü üzere girilen deneysel verilerle elde edilmesi beklenen OH fonksiyonlitesi arasında doğrusal bir ilişki sağlanmıştır. Ayrıca, grafikte dikkati çeken bir diğer nokta, sonuç yüzeydeki orta ve yüksek düzeydeki OH fonksiyonlitesini simgeleyen açık renklerin çokluğu ve düşük OH fonksiyonlitesini gösteren mavi renklerin yok denecek kadar az oluşudur. Şekil 4.8 (b)'ye bakıldığında ise girilen deneysel verilerle elde edilmesi beklenen COOH fonksiyonlitesi arasında doğrusal bir ilişkinin sağlanamadığı hatta noktaların dağınık olduğu görülmektedir. Bunun yanısıra sonuç yüzeydeki düşük COOH fonksiyonlitesini simgeleyen mavi renklerin çokluğu da gözden kaçmamaktadır. Sonuç olarak, atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonunun PCL yüzeylerdeki OH fonksiyonlitesini arttırmasına karşın daha fazla dekarboksilasyona neden olmasından dolayı prosesin düşük COOH fonksiyonlitesiyle sonuçlandığı söylenebilir.

Design-Expert® Software  
OH/PCL Quantity

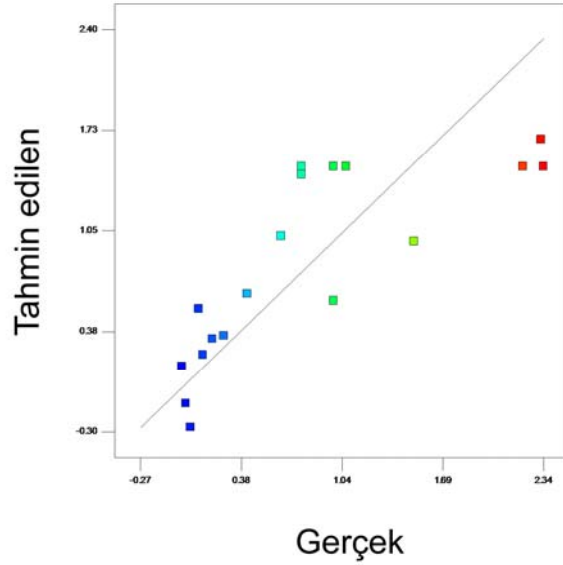
Color points by value of  
OH/PCL Quantity:



(a)

Design-Expert® Software  
COOH/PCL Quantity

Color points by value of  
COOH/PCL Quantity:



(b)

Şekil 4.8. DoE programına göre rastgele seçilen deneysel girdilere karşı elde edilmesi planlanan OH (a) ve COOH (b) fonksiyonlitesi (PCL örneklerin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu için).

Plazma prosesi boyunca akış hızı, güç ve zaman gibi deneysel parametrelerin birbiri üzerine ve OH/COOH fonksiyonlitesi üzerine etkisini gözlemlemek için DoE programı kullanılarak Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilen grafikler çizilmiştir. Grafiklerde OH ve COOH fonksiyonlitesi üzerine sırasıyla akış hızı-güç, zaman-

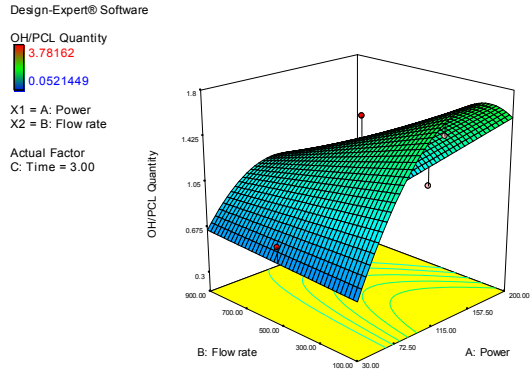
güç ve zaman-akış hızı ilişkilerinin etkisi görülmektedir. Verilen grafiklerde parametrelerin farklı çalışma aralıkları üst işaretiyle (a, a<sup>1</sup> gibi) simgelenmiştir.

PCL yüzeyde oluşan OH yoğunluğunun akış hızı-güç diyagramına göre, özellikle düşük hava akış hızında ve güç yaklaşık 130 W civarında iken PCL yüzeyde maksimum OH yoğunluğunun elde edilebileceği görülmektedir. Yüksek akış hızlarında moleküler zincirlerin hidrolizi sonucu karboksil fonksiyonallitesi artmaktadır.

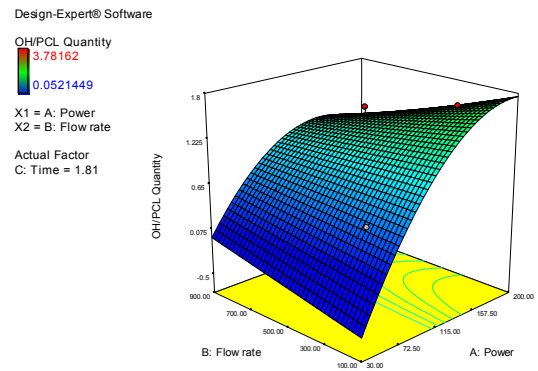
Zamanın ve gücün ayrı ayrı artırılmasıyla OH yoğunluğu artmıştır. Fakat gücün yüksek tutulması ve uzun süreli modifikasyon uygulanmasıyla muhtemelen OH fonksiyonallitesinin oksidatif bozunması sonucu yüzeydeki OH yoğunluğunun yavaşça azaldığı görülmüştür. COOH yoğunluğu aynı zamanda meydana gelen hidroliz (uzun süre ve/veya güç) ve dekarboksilasyon (kısa süre ve/veya güç) mekanizmaları sonucu zaman/güç bölgesinin iç kısmında maksimum değerleri sergilemektedir.

Zaman-akış hızı diyagramında zamana bağımlı olarak maksimum OH ve COOH yoğunluğu gözlenmiştir. Akış hızının artırılmasıyla görülen karboksilik fonksiyonallitesinin artması daha fazla hidrolizin meydana gelmesi sonucudur.

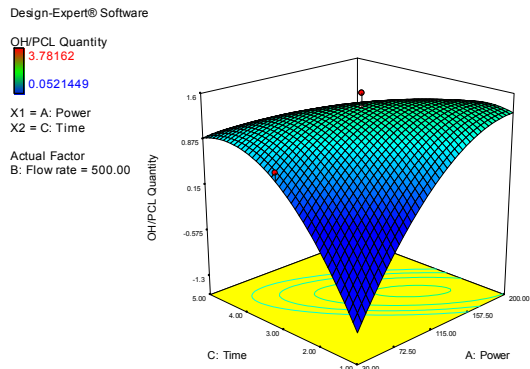
Tüm bu istatistiksel ve grafiksel değerlendirmelerin ardından, atmosferik basınç su/hava plazmayla modifiye edilmiş PCL örneklerde maksimum OH ve COOH fonksiyonallitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler DoE programı ile belirlenmiş ve Çizelge 4.5'te verilmiştir. Bölüm 3.3.1.3.iii'deki Çizelge 3.2'de yer alan 6 nolu deneysel parametreler ileri çalışmalar için seçilmiştir. Bunun nedeni ise 6 nolu deneysel parametrelerin program tarafından önerilen parametrelere oldukça yakın olmasıdır.



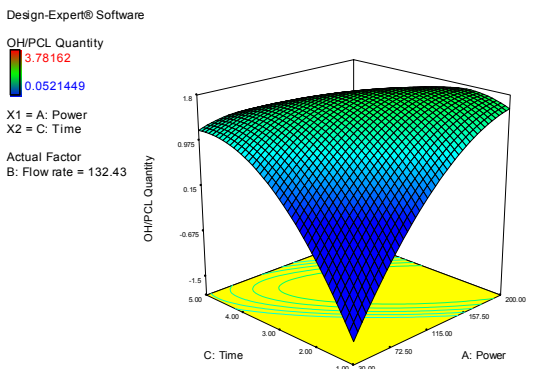
(a)



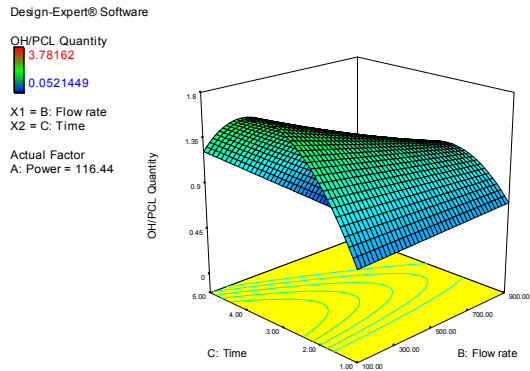
(a')



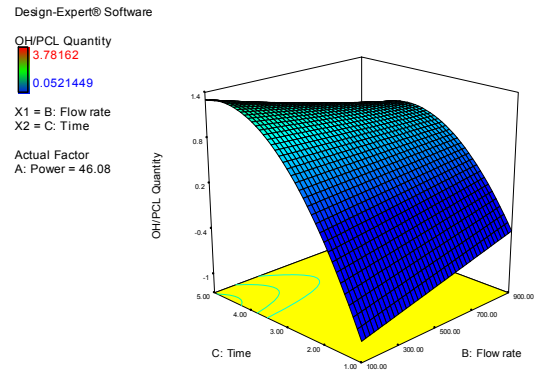
(b)



(b')



(c)



(c')

Şekil 4.9. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve OH fonksiyonitesi üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Akış hızı-güç ilişkisi (a), (a'); Zaman-güç ilişkisi (b), (b'); Zaman-akış hızı ilişkisi (c), (c') (PCL örneklerin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu için).

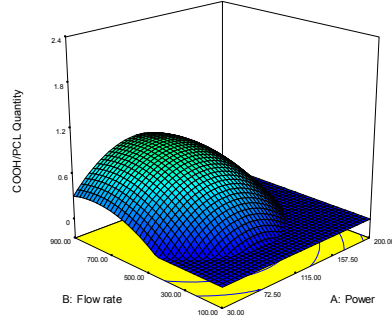
Design-Expert® Software

COOH/PCL Quantity

2.34271  
3.05482E-008

X1 = A: Power  
X2 = B: Flow rate

Actual Factor  
C: Time = 4.95



(a)

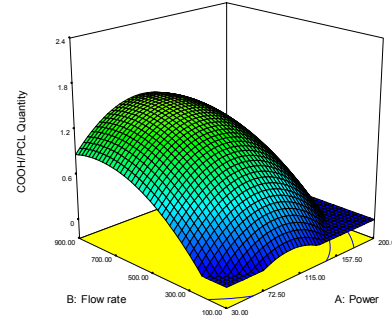
Design-Expert® Software

COOH/PCL Quantity

2.34271  
3.05482E-008

X1 = A: Power  
X2 = B: Flow rate

Actual Factor  
C: Time = 4.24



(a')

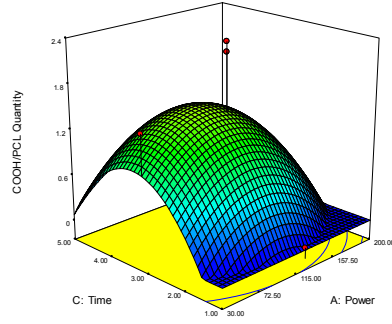
Design-Expert® Software

COOH/PCL Quantity

2.34271  
3.05482E-008

X1 = A: Power  
X2 = C: Time

Actual Factor  
B: Flow rate = 500.00



(b)

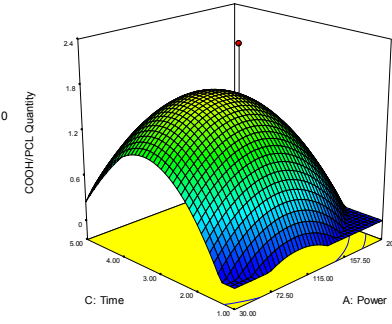
Design-Expert® Software

COOH/PCL Quantity

2.34271  
3.05482E-008

X1 = A: Power  
X2 = C: Time

Actual Factor  
B: Flow rate = 900.00



(b')

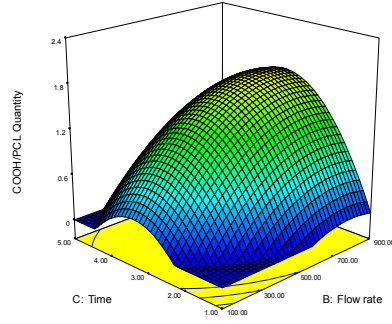
Design-Expert® Software

COOH/PCL Quantity

2.34271  
3.05482E-008

X1 = B: Flow rate  
X2 = C: Time

Actual Factor  
A: Power = 115.00



(c)

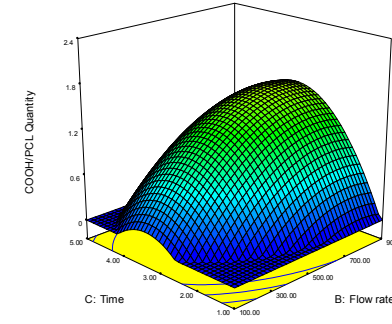
Design-Expert® Software

COOH/PCL Quantity

2.34271  
3.05482E-008

X1 = B: Flow rate  
X2 = C: Time

Actual Factor  
A: Power = 57.57



(c')

Şekil 4.10. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve COOH fonksiyonlitesini üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Akış hızı-güç ilişkisi (a), (a'); Zaman-güç ilişkisi (b), (b'); Zaman-akış hızı ilişkisi (c), (c') (PCL örneklerin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu için).

Çizelge 4.5. Su/hava atmosferik plazmayla modifiye edilmiş PCL örneklerde maksimum OH ve COOH fonksiyonlitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler.

Deney	Güç (W)	Akış hızı (cm <sup>3</sup> /dk)	Süre (dk)	OH Floresan sinyali (mV)	COOH Floresan sinyali (mV)	İstek	
1	113.74	490.17	3.27	1292.19	345.558	0.805	Önerilen

#### 4.2.1.1. iv. ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis) analizi

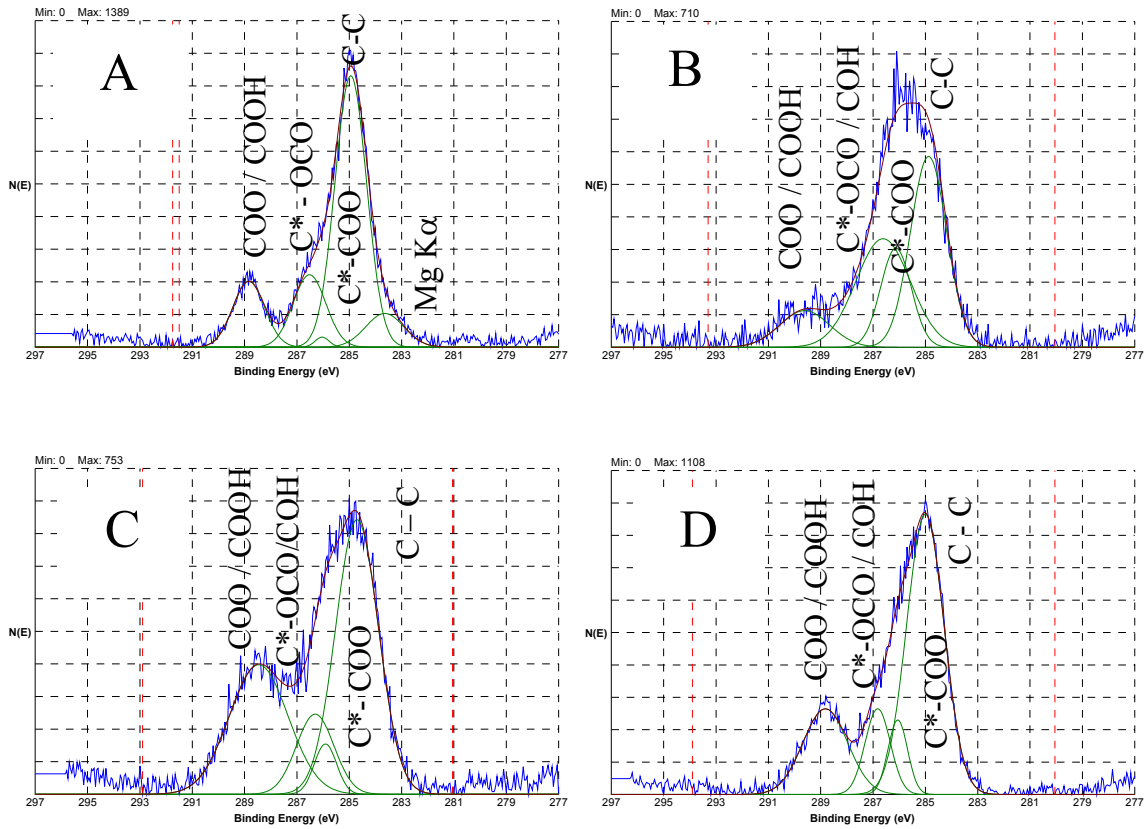
% 100 PCL yapıların modifikasyon öncesi ve sonrası ESCA analizi yapılarak yüzey tarama spektrumları alınmış ve spektrumlar Ek-10, Ek-11, Ek-12 ve Ek-13'te verilmiştir. Çizelge 4.6, % 100 PCL yapıların ESCA yüzey tarama spektrumlarından hesaplanan kimyasal bileşimlerini göstermektedir. Çizelge 4.6'dan görüldüğü gibi modifiye edilmemiş PCL için C1s ve O1s atomik yüzdeleri sırasıyla 74.2 ve 25.8'dir. PCL'in ESCA yüzey spektrumundan hesaplanan bu değerler literatürle uyum içindedir (Kahlrot et al., 2006). Her iki plazma modifikasyonu ve oksalil klorür fonksiyonlasyonu sonucu başlangıç C1s atomik yüzdesi azalırken, O1s atomik yüzdesinin arttığı görülmektedir. C1s ve O1s atomik yüzdelerindeki bu değişim plazma modifikasyonu sırasında oksijenin polimerik yapıya katıldığını açıkça göstermektedir.

Çizelge 4.6. PCL örnekler için ESCA yüzey taraması sonucu hesaplanan kimyasal bileşimler.

PCL	Atomik yüzde (%)	
	C 1s	O 1s
Modifiye edilmemiş	74.2	25.8
Atmosferik basınç su/hava plazma ile modifiye edilmiş	60.8	39.2
Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş	57.2	42.8
Oksalil klorür ile fonksiyonlize edilmiş	65.4	34.6

Şekil 4.11'de modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş PCL yapılar için C1s yüksek çözünürlük ESCA spektrumları görülmektedir. Ayrıca PCL yapılar için C1s

bileşenlerinin alifatik pike oranla % dağılımları hesaplanmış ve değerler Çizelge 4.7'de verilmiştir. PCL yüzeylerde atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu sonucu, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonuna göre daha fazla C –OH yoğunluğu elde edilmiştir. Fakat C –OH'ın bağlanma enerjisi PCL'de var olan C\* – O – CO grubunun bağlanma enerjisine oldukça yakın olduğundan yüzeydeki alkol fonksiyonlitesini değerlendirmek oldukça zordur. Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesi boyunca PCL deki dekarboksilasyonun ihmal edilebilir boyutta olduğu GC/MS analiziyle doğrulanmıştır. Fakat yüksek çözünürlük C1s spektrumunda serbest karboksil ve ester gruplarının örtüşmesi nedeniyle serbest karboksil gruplarını belirlemek ve miktarlandırmak için floresan işaretleme prosedürünün gerekliliği ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.11. PCL örnekler için yüksek çözünürlük C1s ESCA spektrumları: modifiye edilmemiş (a); atmosferik basınç su/hava plazma ile modifiye edilmiş (b); düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş (c); Oksalil klorür ile fonksiyonlize edilmiş (d).

Çizelge 4.7. PCL yapılar için C1s bileşenlerinin alifatik pike (285.0 eV) oranla % dağılımları.

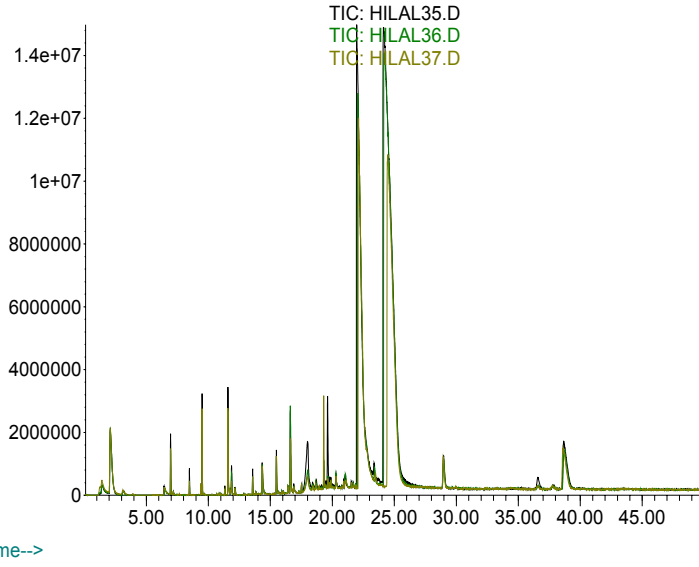
PCL	C 1s (%)		
	COO, COOH (288.83 eV)	C-O, C* - OCO (286.6 eV)	C* – COO (285.6 eV)
Modifiye edilmemiş	24.45	27.66	1.69
Atmosferik basınç su/hava plazma ile modifiye edilmiş	26.34	85.67	43.73
Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş	64.47	25.55	9.58
Oksalil klorür ile fonksiyonelize edilmiş	36.58	20.68	13.84

#### **4.2.1.1.v. Piroliz gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi [Pyrolysis Gas Chromatography / Mass Spectroscopy (Py GC/MS)]**

Modifiye edilmemiş, su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş ve oksalil klorürle fonksiyonelize edilmiş % 100 PCL yapıların kimyasal yapıları hakkında bilgi edinmek amacıyla Bölüm 3.3.1.3.v'de ayrıntıları verilen piroliz GC/MS analizi gerçekleştirilmiştir. Kuvars tüpe kaplanan ince PCL filmlerin GC/MS kromatogramları Şekil 4.12'de verilmiş ve analiz sonucu miktarsal olarak hassas değişimler gösteren bileşenler Çizelge 4.8'de özetlenmiştir.

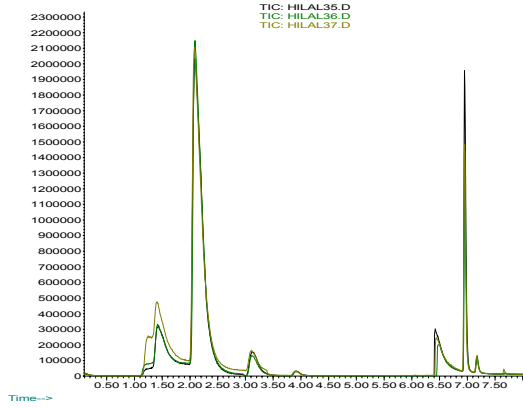


Abundance



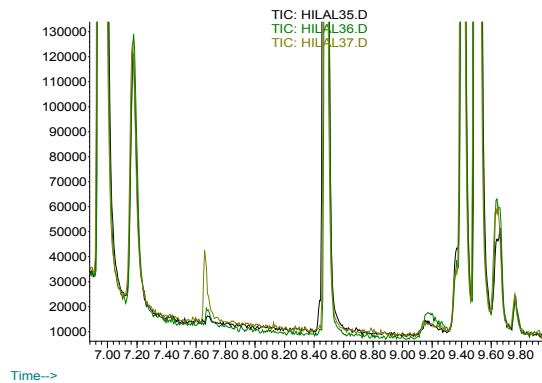
(a)

Abundance



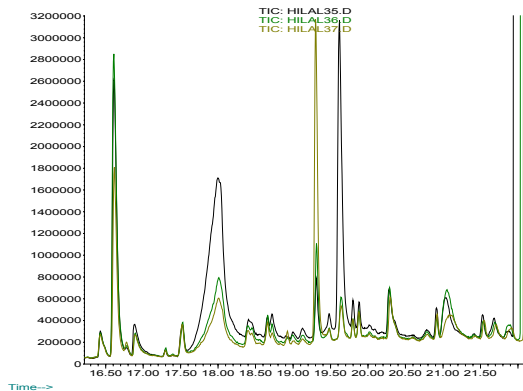
(b)

Abundance



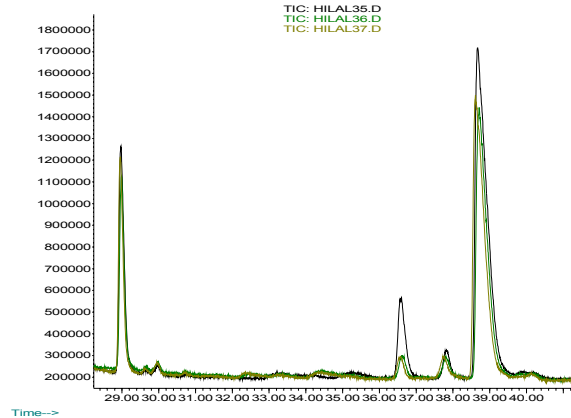
(c)

Abundance



(d)

Abundance



(e)


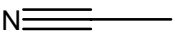
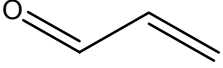
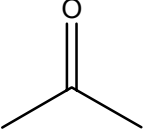
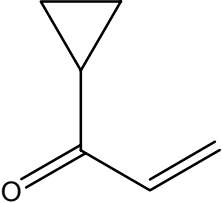
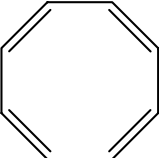
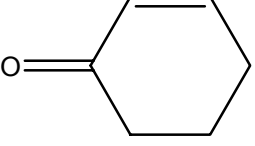
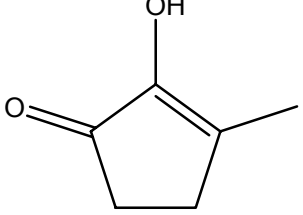
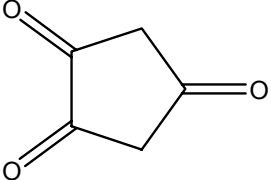
Şekil 4.12. Kuvars tüplere kaplanmış ince PCL filmlerin piroliz GC/MS kromatogramı: 0-45 dakika, (a); 0-7.5 dakika (CO<sub>2</sub>, 2.09 dk), (b); 7-10 dakika, (c); 16-22 dakika, (d); 29-40 dakika, (e).

TIC: Hilal 35.D; Modifiye edilmemiş % 100 PCL,

TIC: Hilal 36.D; Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş % 100 PCL,

TIC: Hilal 37.D; Oksalil klorür ile fonksiyonize edilmiş % 100 PCL.

Çizelge 4.8. PCL örneklerin kimyasal yapısı ve bileşenlerin TIC (toplam iyon kromatogramı) GC/MS'deki en yüksek pike (kaprolakton) oranla % dağılımı.

Alıkonma zamanı (dk)	Bileşen	Yapı	TIC GC/MS % Oranları		
			Modifiye edilmemiş	Su O <sub>2</sub> / plazma ile modifiye edilmiş	Oksalil klorür ile modifiye edilmiş
2.09	Karbon dioksit	CO <sub>2</sub>	3.86	4.26	7.19
7.66	Hidrosiyanik asit		0.000702	0.00192	0.02
10.29	Asetonitril		0.00154	0.00483	0.01
10.69	2-Propenal		0.01	0.01	0.02
11.02	2-Propanon		0.01	0.02	0.03
18.00	1- Siklopropil-2-propen-1-bir		4.16	1.87	2.42
19.31	1,3,5,7-Siklooktatetraen		0.40	0.56	2.81
19.62	2-Sikloheksen-1-bir		2.05	0.43	0.65
21.03	2-Hidroksi-3-metil-2-siklopenten-1-bir		0.59	0.94	1.06
36.58	1,2,4-Siklopentantri on		0.81	0.22	0.42

Her üç PCL örneğın GC/MS analizi sonucu elde edilen bileşenleri ve % değişimleri ele alınıp değerlendirilmiş ve aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Piroliz sonucu oksalil klorür ile fonksiyonalize edilmiş örneklerdeki CO<sub>2</sub> artışı, PCL yüzeylerdeki etkin karboksil fonksiyonalitesini göstermektedir. Ayrıca oksalil klorürün PCL yüzeyle tepkimesi su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu sonucu yüzeyde oluşan OH gruplarının varlığına işarettir. Plazma prosesinin ardından az da olsa CO<sub>2</sub> artışı görölmüştür. Bu da ihmal edilebilir düzeyde dekarboksilasyonu ve karbonil ve/veya karboksil gruplarının oluşumunu göstermektedir.

2-Propenal piroliz boyunca, C 1 – O ve C 3 – C 4 tekli bağlarının kırılması sonucu oluşabilir. Oksalil klorür fonksiyonalizasyonunun ardından 2-propenal miktarında görölen az miktardaki artış C 4 ve/veya C 5 bölgelerindeki kimyasal reaksiyonlar ile açıklanabilmektedir (şekil 4.13a).

Her modifikasyon basamağından sonra 2-propanonda görölen artış, C 3 ve C 5 'in herhangi birindeki OH ya da karbonil fonksiyonalitesinin oluşumunu göstermektedir (şekil 4.13a).

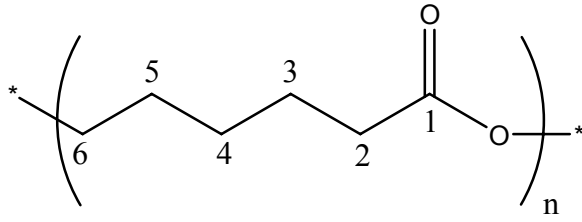
2-Siklohekzen-1-bir C 1 – O bağının kırılması ve C 5'deki kararsız gruplar sonucu oluşmuştur (şekil 4.13a).

1,3,5,7-Siklooktatetraen'in varlığı, piroliz boyunca eş zamanlı olarak C 1 – C 2 ve C 1' – C 2' bağlarının kırılmasıyla meydana gelen dekarboksilasyon mekanizması ve C 4 – C 5 bağının kırılması sonucu yapıda küçük dallanmaların oluştuğunu göstermektedir (şekil 4.13b). Oksalil klorür ile fonksiyonalizasyon sonrası elde edilen fazla miktardaki 1,3,5,7-Siklooktatetraen, proses sonrası oluşan kararsız C 4 – C 5 bağı ile açıklanabilir (şekil 4.14; yüksek reaktifliğe sahip C 5).

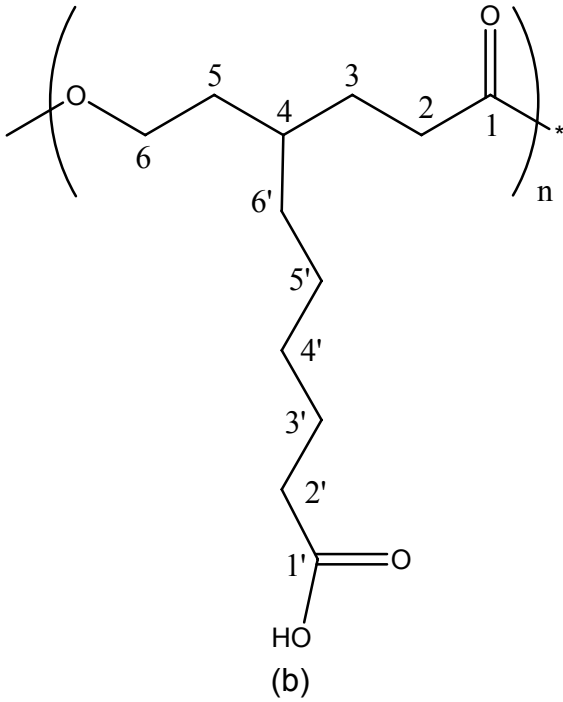
Su/O<sub>2</sub> plazma ile modifikasyon ve oksalil klorürle fonksiyonalizasyon sonrası PCL örneklerde görölen 2-Hidroksi-3-metil-2-siklopenten-1-bir'deki artış C 5'de OH gruplarının oluştuğunu ve C 4'deki küçük dallanmaları göstermektedir (C 5–C 6, C 5'–C 6' ve C 1–O bağlarının kırılması sonucu) (şekil 4.13b).

1- Siklopropil-2-propen-1-bir piroliz boyunca C 3 – C 4, C 3' – C 4' ve C 5 – C 6 bağlarının kırılması sonucu oluşmuştur.

1,2,4- Siklopentantrion'un, ana zincirdeki C 4 –C 5 bağının ve C – O bağlarının kırılmasıyla karboksil grubunun oksijenine bağlı C 2 ve C 4 bölgelerinde oluşan küçük dallanmaları içeren PCL'in pirolizi sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonunun ve oksalil klorür fonksiyonizasyonunun ardından PCL örneklerde görülen 1,2,4- Siklopentantrion ve 1- Siklopropil-2-propen-1-bir miktarlarındaki azalma modifikasyon sonrası yapıdan küçük dalların ayrıldığını göstermektedir.

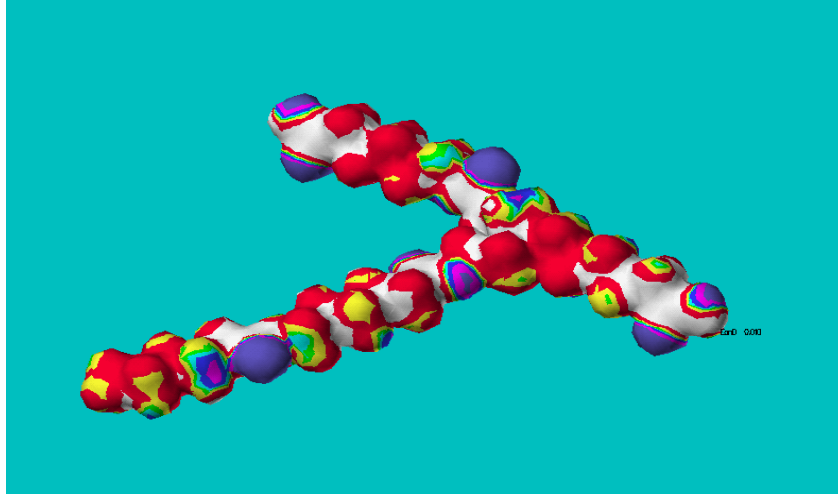


(a)



(b)

Şekil 4.13. PCL yapı: doğrusal (a); dallanmış (b).

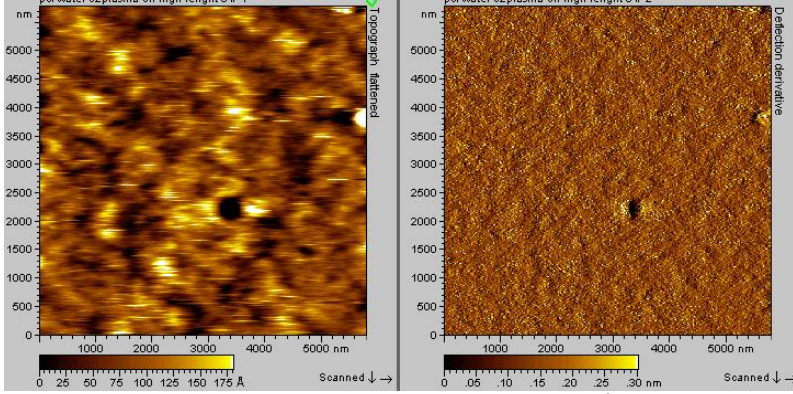


Şekil 4.14. 4 mer (birim) ve bir yan dal içeren PCL ana zincirinin elektron yoğunluğunun CAChe (Computer Analysis Chemistry) 6 modeli.

#### **4.2.1.1.vi. AFM (Atomic Force Microscope) analizi**

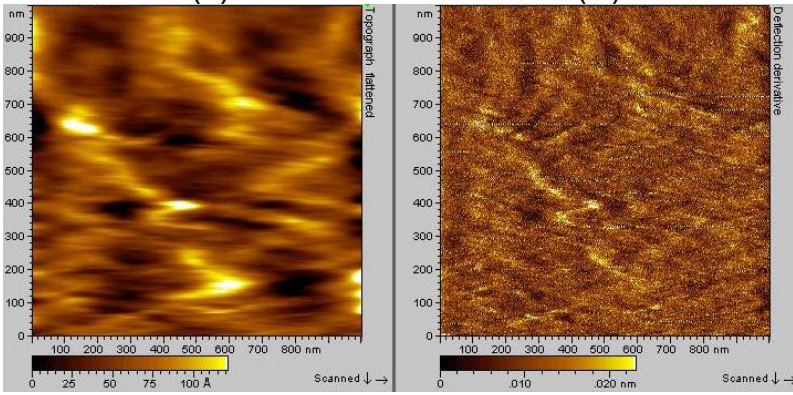
Yüzeyin mikro ve nano topografisinin hücre yapışma ve üremesine etkisi bilinmektedir (Ohl and Schröder, 1999). Modifikasyon öncesi, su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve oksalil klorür fonksiyonizasyonu sonrası olmak üzere her 3 aşamanın ardından % 100 PCL yüzeylerin topografik değişimlerini gözlemlemek amacıyla AFM analizi yapılmıştır. Analiz sonucu % 100 PCL yüzeylere ait elde edilen 2 boyutlu görüntüler Şekil 4.15'de verilmiştir. Modifiye edilmemiş % 100 PCL yüzey küçük kabarcıkları içermesine rağmen hemen hemen düz bir yüzey sergilemiştir (Şekil 2.15a, a' ve Şekil 2.15b, b'). Fakat, su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu sonrası yüzeyde keskin çizgiler oluşarak pürüzlülüğün arttığı görülmüştür (Şekil 2.15c, c' ve Şekil 2.15d, d'). Plazma modifikasyonu sonucu yüzeyde bu tür mikroyapıların oluşması, modifikasyon sonrası yüzeyde oluşan radikallerin yoğunluğu ve oryantasyonu, aktif bölgelerin sıklığı gibi yük-boşalım plazma prosesinin özelliklerine bağlıdır (Favia et al., 2003; Detomaso et al., 2005). Yapılan tez çalışması kapsamında plazma modifikasyon süresinin yüzey topografisine etkisi incelenmemiştir, fakat Gupta ve arkadaşları (2000) tarafından proses süresinin yüzey pürüzlülüğü üzerine etkisi kanıtlanmıştır. Su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonun ardından gerçekleştirilen oksalil klorür fonksiyonizasyonu sonrası PCL yüzeylerden alınan AFM görüntüleri, PCL yüzeyde oluşan karboksil gruplarının kendilerine has bölgeler oluşturarak farklı bir topografi sergilediklerini göstermiştir. HZD fonksiyonize tiplerle alınan AFM görüntüsünde, yüzeydeki

karboksil gruplarının granüler şekilde ve ara ara agregatlar oluşturacak şekilde bir morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.15e, e' ve Şekil 2.15f, f').



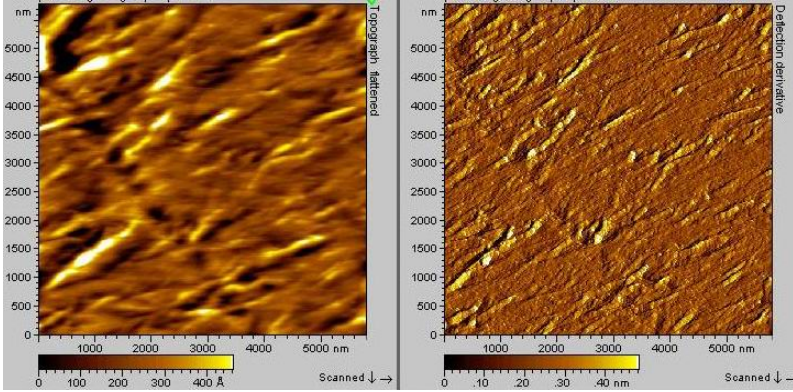
(a)

(a')



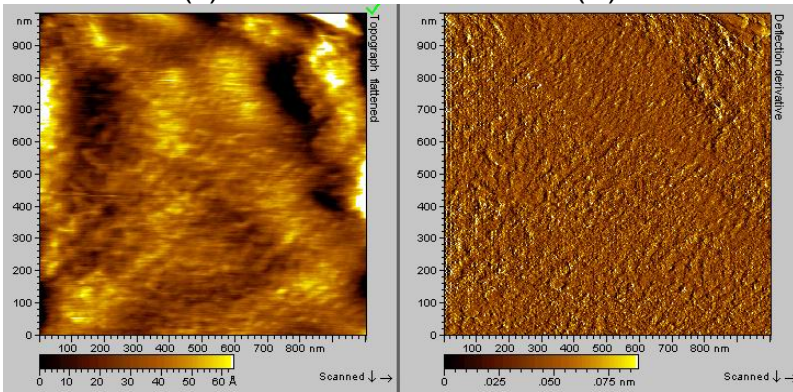
(b)

(b')



(c)

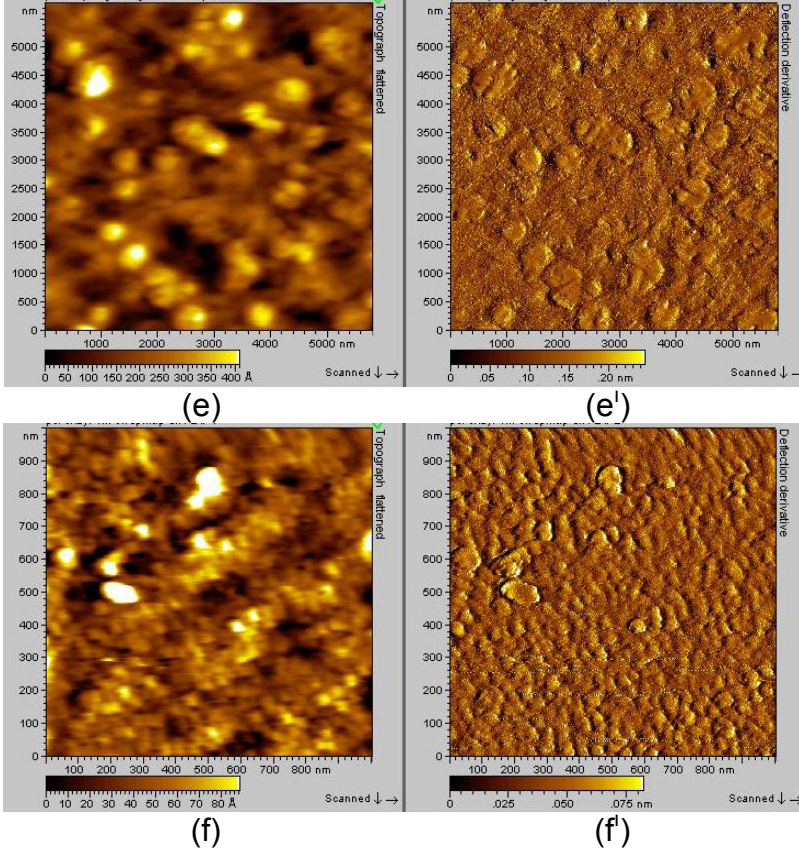
(c')



(d)

(d')

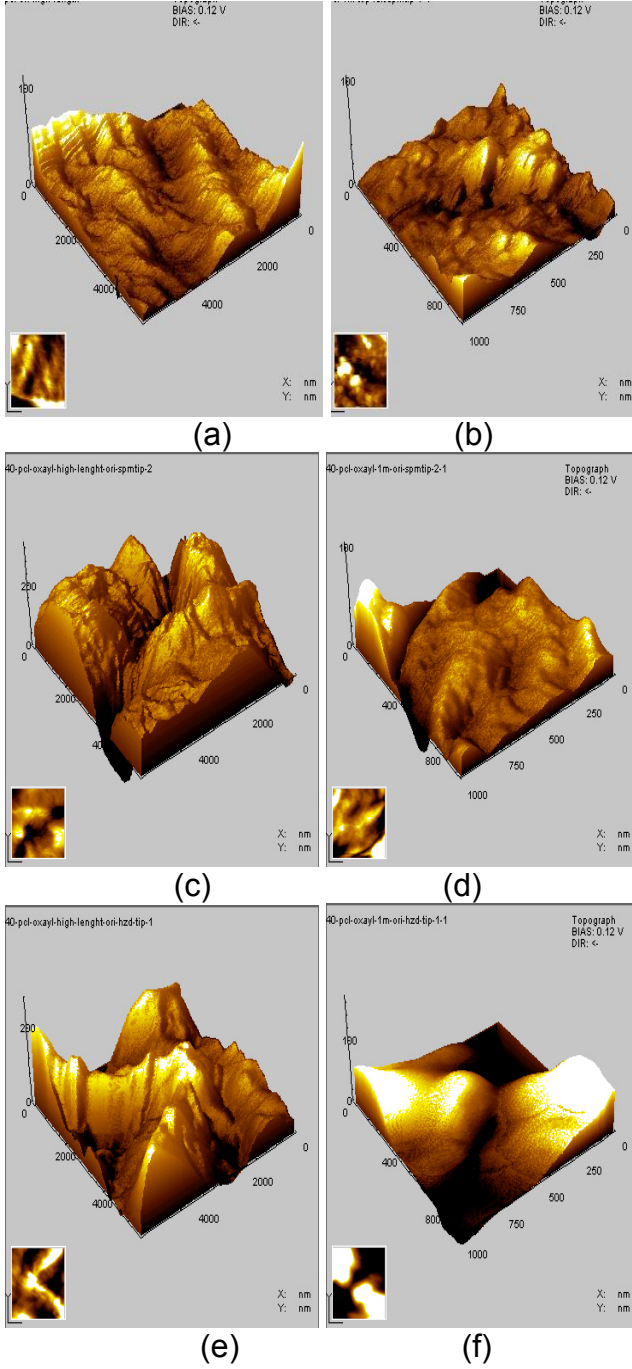




Şekil 4.15. % 100 PCL doku iskelelerinin 2 boyutlu AFM görüntüleri: Modifiye edilmemiş, Si tip, geniş alan, düzleştirilmiş topografi (a), türevsel topografi (a<sup>1</sup>); Modifiye edilmemiş, Si tip, küçük alan, düzleştirilmiş topografi (b), türevsel topografi (b<sup>1</sup>); Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş, Si tip, geniş alan, düzleştirilmiş topografi (c), türevsel topografi (c<sup>1</sup>); Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş, Si tip, küçük alan, düzleştirilmiş topografi (d), türevsel topografi (d<sup>1</sup>); Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş, HZD fonksiyonelize tip, geniş alan, düzleştirilmiş topografi (e), türevsel topografi (e<sup>1</sup>); Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş, HZD fonksiyonelize tip, küçük alan, düzleştirilmiş topografi (f), türevsel topografi (f<sup>1</sup>).

Geniş alan tarama: 6 μm × 6 μm,  
Küçük alan tarama: 1 μm × 1 μm.

% 40 (ağırlıkça) PEG<sub>4000</sub> gözenek yapıcı içeren PCL yapının modifikasyon öncesi ve oksalil klorür fonksiyonelizasyonu sonrası AFM görüntüleri alınmış ve alınan görüntüler Şekil 4.16'da verilmiştir. Fakat bu kısımdaki görüntüler üç boyutlu olarak ve HZD fonksiyonelize tipin etkinliğini gözlemlemek için normal (Si tip) ve HZD fonksiyonelize tiple alınmıştır.



Şekil 4.16. % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL doku iskelelerinin 3 boyutlu AFM görüntüleri: Modifiye edilmemiş, Si tip, geniş alan (a), küçük alan (b); Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş, Si tip, geniş alan (c), küçük alan (d); Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş, HZD fonksiyonelize tip, geniş alan (e), küçük alan (f).

Geniş alan tarama: 6µm × 6µm,

Küçük alan tarama: 1µm × 1µm.



% 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL yapı içerdiği mikrogözenekler dolayısıyla % 100 PCL yapıya oranla tepe-vadi şeklinde keskin çıkıntılar içeren daha pürüzlü bir yüzey sergilemiştir (Şekil 4.16a, b). Oksalil klorür modifikasyonu sonrası modifiye edilmemiş yüzeyde var olan bu keskin çıkıntıların daha yumuşak hatlara çevrildiği ve sanki yüzeyde sönümlenmelerin yer aldığı görülmektedir (Şekil 4.16c, d). Bunun nedeninin, plazma modifikasyonu sonucu yüzeyde oluşan serbest radikallerin yüzeyin hemen altında yer alanlarının oksalil klorürle tepkimeye girerek karboksil gruplarının yüzeyde oluşmasını sağlaması olabilir. Tepkime sonucu yüzey tabakasında şişme meydana gelecek ve yüzey daha yumuşak bir görüntü sergileyecektir. Alınan görüntüler literatürle uyum içindedir (Gupta et al., 2001). % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL yüzeylerin oksalil klorür fonksiyonallasyonu sonrası HZD fonksiyonallate tiple alınan AFM görüntüleri, modifikasyon sonrası yüzeyde oluşan karboksil gruplarının köşelerde daha yoğun olarak bulunduğunu göstermektedir (Şekil 4.16e, f).

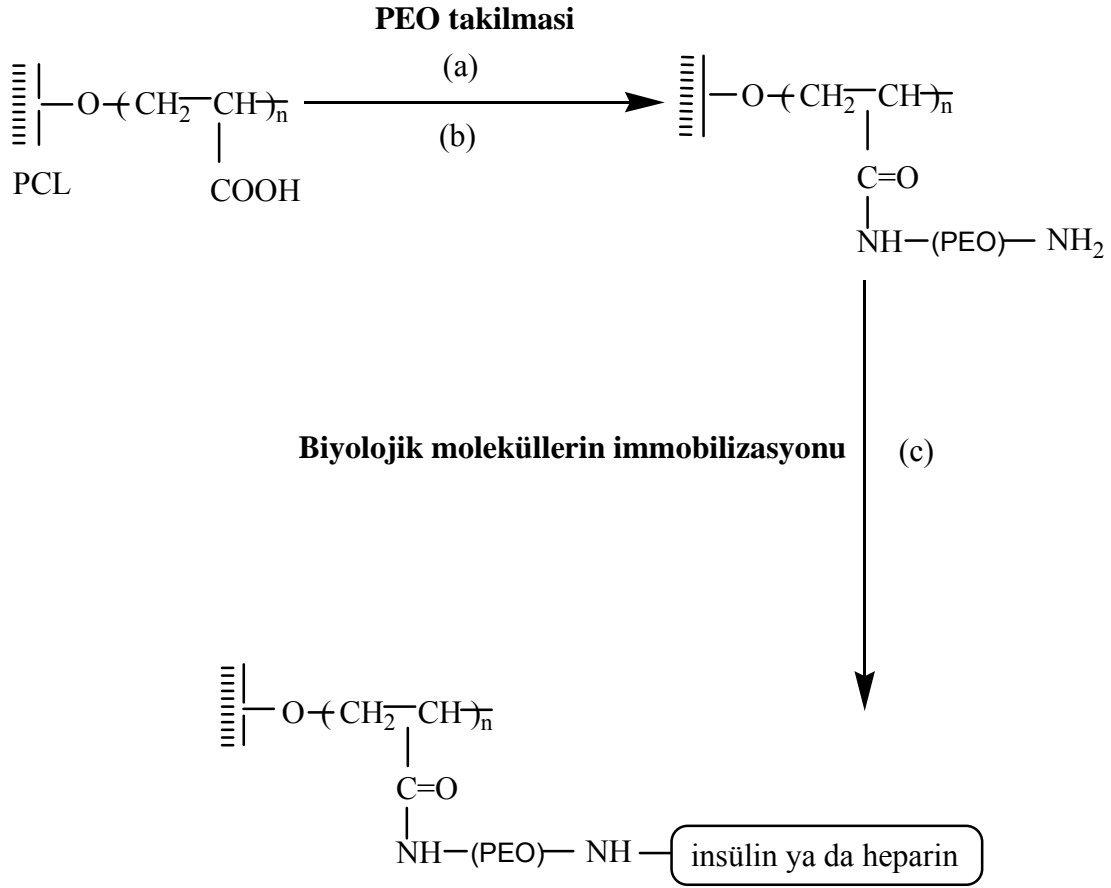
Ayrıca PCL yüzeylerden alınan tüm yüksek çözünürlük AFM görüntüleri (1µm × 1µm), nano desenlerin plazma modifikasyonundan daha çok etkilendiğini açıkça göstermektedir.

#### **4.2.1.2. PCL doku iskelelerinin biyolojik modifikasyonu**

Tez çalışmasının bu kısmında düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve ardından oksalil klorür fonksiyonallasyonu sonucu yüzeyinde karboksil grupları oluşturulan % 100 PCL yapılara uzatıcı kol PEO takılmış ve takılan bu uzatıcı kol varlığında insülin ve heparin biyolojik moleküllerinin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyolojik modifikasyonu tamamlanan PCL yüzeylerin karakterizasyon çalışmaları sonucu elde edilen sonuçlar aşağıda tartışılmıştır.

##### **4.2.1.2.i. Biyolojik olarak modifiye edilmiş PCL yüzeylerin kantitatif analizi**

PCL yüzeylerde düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla karboksil gruplarının eldesi şematik olarak Şekil 3.3'de (Bölüm 3.3.1.1) verilmiş ve yüzeyde oluşan karboksil grupları üzerinden gerçekleştirilen immobilizasyon işlemi Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



#### Biyolojik olarak aktif hale getirilmiş PCL

Şekil 4.17. PCL yüzeylere insülin ve heparinin immobilizasyonu: PCL yüzeyin WSC (suda çözünür karbodiimid, pH 5.0) ile önceden aktivasyonu (a); Aktive edilmiş PCL yüzeye uzatıcı kol PEO'nun takılması (b); Biyolojik olarak aktif moleküllerin immobilizasyonu (c).

Şekil 4.17'den görüldüğü üzere, plazma-destekli modifikasyonun (su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve oksalil klorür fonksiyonizasyonu) ardından PCL yüzeylere insülin ve heparin biyolojik moleküllerinin immobilizasyonu uzatıcı kol PEO'nun varlığında gerçekleştirilmiştir. Uzatıcı kol PEG'nin (polietilen glikol) biyolojik moleküllerin immobilizasyonu aşamasında biyomolekülleri arayüzeylerde stabilize ettiği ve dolayısıyla proteinlerin spesifik olmayan adsorpsiyonunu indirgediği bilinmektedir (Chen et al., 2005). Yapılan literatür taramasının ardından PEO immobilizasyonu için başlangıç PEO konsantrasyonu 0.05 M olarak belirlenmiştir (Ito et al., 1993; Kim et al., 2000). PCL yüzeylere takılan PEO miktarı (0.52 µmol/cm<sup>2</sup>) Bölüm 3.3.1.4.ii'de verilen yöntemle göre tayin edilmiştir (Çizelge 4.9).

PCL yüzeylere insülinin immobilizasyonunda aktivasyon ve immobilizasyon basamaklarının ardışık olarak gerçekleştirildiği iki-basamaklı metod kullanılmıştır.

Başlangıç insülin konsantrasyonunun ve immobilizasyon süresinin immobilizasyon prosedürüne etkisi önceki çalışmalarımızda belirlenmiştir (Türkoğlu, 2001; Gümüşderelioğlu and Türkoğlu, 2002). Önceki çalışmalarda, immobilize insülin miktarının ilk bir saat boyunca arttığı, fakat immobilizasyon süresi 1 saati aştığında bu miktarın değişmediği görülmüş dolayısıyla immobilizasyon prosesi için süre 1 saat olarak seçilmiştir. Başlangıç insülin konsantrasyonu 200 µg/ml olarak seçildiğinde maksimum immobilize insülin değeri elde edilmiş, bu nedenle çalışmada insülinin başlangıç konsantrasyonunun 200 µg/ml olmasına karar verilmiştir. Çizelge 4.9'dan görüldüğü üzere, plazma destekli modifikasyonun ardından yukarıda açıklanan koşullar altında ve PEO varlığında gerçekleştirilen insülin immobilizasyonu sonucu yüzeye immobilize olan insülin miktarı 219.23 nmol/cm<sup>2</sup> (1256.95 µg/cm<sup>2</sup>) olarak bulunmuştur. Islak kimya yöntemleri kullanılarak PEO varlığında gerçekleştirilen insülin immobilizasyonunun etkinliği Şaşmazel ve arkadaşları (2007) tarafından kanıtlanmıştır.

Ayrıntılı literatür taramasının ardından heparin immobilizasyonu için başlangıç konsantrasyonu 1 mg/ml olarak belirlenmiştir (Kang et al., 1996; Sasisekharan ve Venkataraman, 2000). Daha önceki çalışmalar, heparinin uzatıcı kol PEG varlığında immobilize edildiğinde doğrudan immobilizasyonuna göre aktivitesinde artış olduğunu göstermiştir (Chen et al., 2005). Bu nedenle heparinin PCL yüzeylere doğrudan değil de PEO varlığında immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.3.1.4.iii'deki verilen yöntemin kullanılmasıyla PCL yüzeylere immobilize olan heparin miktarı 271.20 nmol/cm<sup>2</sup> olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9).

Literatürde PCL yüzeylerin ıslak kimya veya plazma modifikasyonunu ve ardından insülin ve heparin biyolojik moleküllerinin immobilizasyonunu içeren bir çalışma yer almamaktadır. Tez çalışması bu yönüyle orjinalliğini korumaktadır. Fakat literatürde benzeri bir çalışmanın yer almaması biyolojik moleküllerin immobilizasyon verimliliklerinin literatürle karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Kim ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, poliester tipi bir polimer olan PET yüzeyin oksijen plazma modifikasyonu ve ardından yapıya akrilik asidin takılması gerçekleştirilmiş ve son olarak PEO, insülin ve heparin moleküllerinin immobilizasyonu yapılmıştır. Immobilizasyon miktarları PEO ve insülin için nmol/cm<sup>2</sup> düzeyinde bulunmuştur. Bu çalışmadaki değerlerin sözü edilen araştırmacılarinkinden oldukça yüksek olduğu açıktır. Gerçekleştirilen başka bir

çalışmada, plazma modifikasyonu ile PHA'lara immobilize olan PEO ve insülin miktarlarının çalışmada bulunan değerlerden sırasıyla yaklaşık 37 ve 430 kat daha az olduğu görülmüştür (Kang et al., 2001). Çalışmada bu derece yüksek immobilizasyon değerlerine ulaşılmasının nedeninin, uygulanan su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve oksalil klorür fonksiyonizasyonu sonucunda PCL yüzeylerde elde edilen yoğun karboksil fonksiyonelliği olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.9. % 100 PCL yapıya düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma yöntemiyle takılan PEO ve immobilize edilen insülin/heparin miktarları.

Doku İskelesi	İmmobilize olan miktar (nmol / cm <sup>2</sup> )		
	PEO	İnsülin	Heparin
PCL	520.74± 0.05	219.23±0.09	271.20±0.12

#### 4.2.1.2.ii. ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis) analizi

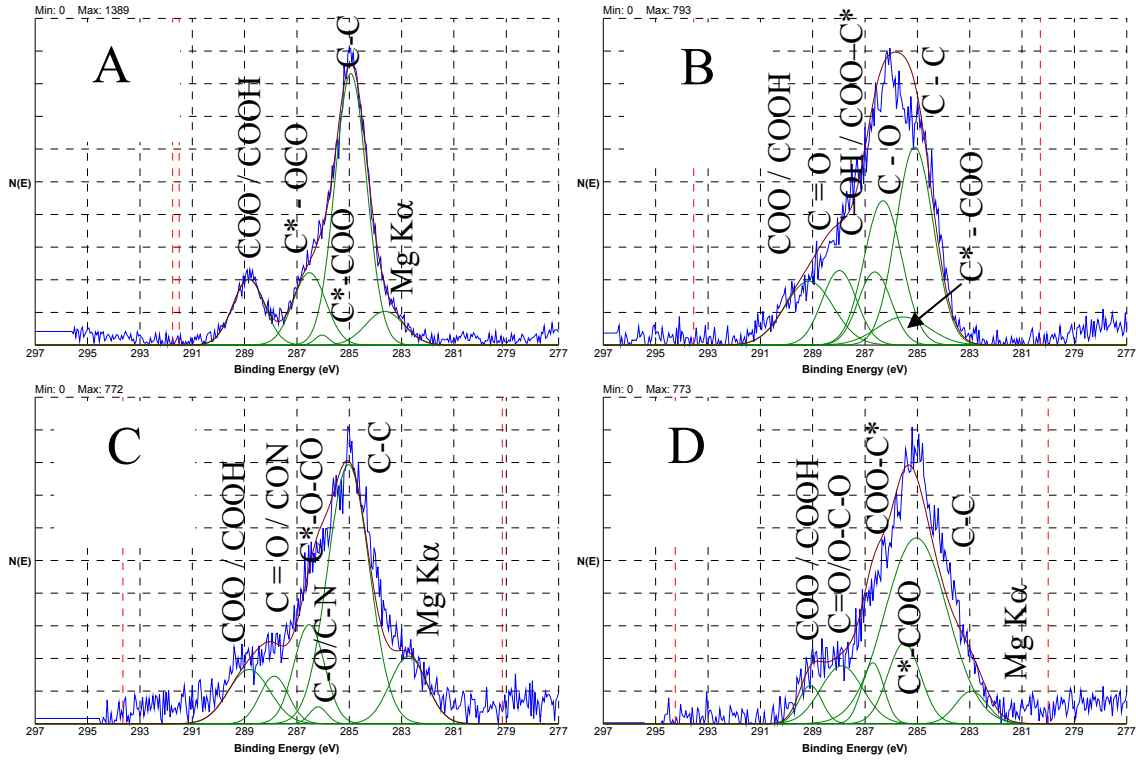
% 100 PCL yapıların, biyolojik moleküllerin (PEO, insülin ve heparin) immobilizasyonu öncesi ve sonrası ESCA analizi yapılarak yüzey tarama spektrumları alınmış ve spektrumlar Ek-10, Ek-14, Ek-15 ve Ek-16'da verilmiştir. Tahmin edildiği üzere modifiye edilmemiş PCL, ESCA yüzey tarama spektrumunda C1s (bağlanma enerjisi, 285 eV) ve O1s (bağlanma enerjisi, 532 eV) olmak üzere iki ana pik vermiştir. PCL yapıya biyolojik moleküllerin immobilizasyonu sonrası spektrumda iki yeni pik görülmüştür. Bunlar; N1s (bağlanma enerjisi, 400 eV) ve S2p (bağlanma enerjisi, 165 eV) pikleridir. PCL yapıda oluşan bu yeni pikler, biyolojik moleküllerin başarılı bir şekilde immobilizasyonunu kanıtlamaktadır. Çizelge 4.10, % 100 PCL yapıların ESCA yüzey tarama spektrumlarından hesaplanan kimyasal bileşimlerini göstermektedir. PCL yapıya uzatıcı kol PEO'nun takılmasıyla yüzeyin oksijen içeriği % 25.8'den % 34.4'e arttırılmıştır. PCL-PEO yüzeyde görülen azot bileşeni PEO'in ucunda yer alan amin gruplarından kaynaklanmaktadır. PCL yapıya insülinin immobilizasyonundan sonra PEO takılı PCL yüzeydeki oksijen içeriği % 30.2'ye düşmüş, fakat yapıdaki azot içeriğinin % 2.1'den 8.3'e yükseldiği görülmüştür. Azot içeriğindeki bu artış insülindeki amid bağını simgelemektedir. Ayrıca insülin immobilize PCL yapıda insülinde yer alan disülfid bağlarından kaynaklanan % 1.2 oranında kükürt görülmüştür. Heparin immobilize edilmiş PCL yapıda oksijen

içeriği PEO takılı PCL yüzeydekinden daha düşüktür (% 27.1). Oksijen içeriğindeki bu azalma yine heparin immobilizasyonu ile PCL yapıya katılan N1s ve S2p piklerinden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.10. PCL örnekler için ESCA yüzey taraması sonucu hesaplanan kimyasal bileşimler.

PCL	Atomik yüzde (%)			
	C 1s	O 1s	N 1s	S 2p
Modifiye edilmemiş	74.2	25.8	-	-
PEO takılı	63.5	34.4	2.1	-
İnsülin immobilize	60.2	30.2	8.3	1.2
Heparin immobilize	68.0	27.1	4.4	0.5

Şekil 4.18'de modifiye edilmemiş ve biyolojik molekül immobilize edilmiş PCL yapılar için C1s yüksek çözünürlük ESCA spektrumları görülmektedir. Ayrıca PCL yapılar için C1s bileşenlerinin alifatik pike oranla % dağılımları hesaplanmış ve değerler Çizelge 4.11'de verilmiştir. PEO takılı PCL yüzeyde yüzeye bağlanan etilen oksit zincirlerinden kaynaklanan oldukça yoğun C – O piki görülmüştür. İnsülin immobilize edilmiş PCL yapının C1s pikinde 288.00 eV'da protein zincirinin amid fonksiyonalitesinden gelen bir omuz görülmektedir. Fakat aynı bölgede karbonil fonksiyonalitesi de bulunmaktadır. Ayrıca, 286.0 eV'daki amin fonksiyonalitesi uzatıcı kol PEO 'den gelen 286.2 eV'daki C – O pikine çok yakın olduğu için spektrumlardan bu fonksiyonaliteleri değerlendirmek oldukça zordur. Heparin immobilize edilmiş PCL yüzeyler heparinin sahip olduğu glukan yapısından gelen O – C – O bağı nedeniyle farklı bir C1s spektrumu sergilemiştir. Kükürt oksijenle glukan ana zincirine bağlı olduğundan C1s pikinde görülememiştir, fakat oldukça geniş olan O1s spektrumunda görülebileceği beklenmektedir. Biyolojik moleküllerin immobilizasyonu öncesi ve sonrası PCL yapılardan elde edilen ESCA yüzey tarama ve yüksek çözünürlük C1s spektrumlarının incelenmesinden sonra, biyolojik moleküllerin PCL yüzeylere immobilizasyonu kanıtlanmıştır.



Şekil 4.18. PCL örnekler için C1s ESCA spektrumu: modifiye edilmemiş (a); PEO takılı (b); insülin immobilize (c); heparin immobilize (d).

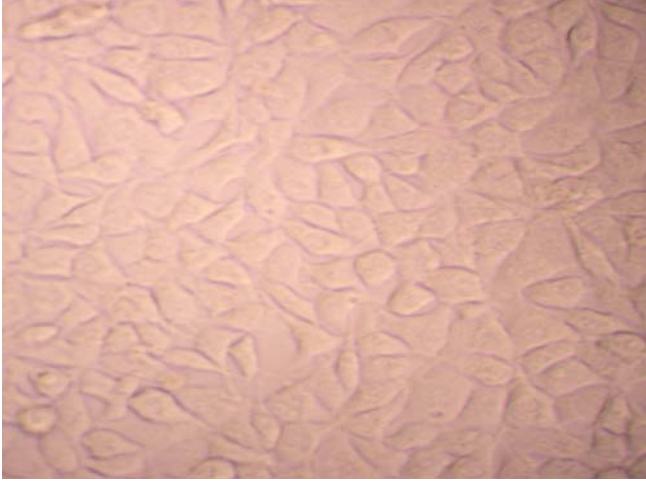
Çizelge 4.11. PCL örnekler için C1s bileşeninin alifatik pike (285.0 eV) oranla % dağılımı.

PCL	C 1s (%)				
	COO, COOH (288.7 eV)	C=O, CON, O-C-O (288.0 eV)	C*-O-CO, C-OH (286.6 eV)	C - O, C-N (286.2 eV)	C*-COO (285.6 eV)
Modifiye edilmemiş	24.45	-	27.66	-	1.69
PEO takılı	41.69	17.37	16.31	36.56	9.82
İnsülin immobilize	20.75	12.71	27.85	2.80	-
Heparin immobilize	7.56	20.96	11.51	-	23.02

#### 4.2.1.3. Hücre kültür çalışmaları

Sunulan çalışmada, tek tabaka kültürde üreme özelliğine sahip, L929 olarak kodlanan fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücreler belirlenen kültür ortam koşullarında (Bölüm 3.2.4), PS (polistiren) Petri kaplarında üretildikten sonra Giemsa ile boyanarak optik fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.19). Hücrelerin Petri

kabına ekimlerinden 2 gün sonra çekilen fotoğrafta hücrelerin tipik fibroblastik morfolojileri açıkça görülmektedir.



Şekil 4.19. PS petri kaplarında üremiş L929 fare fibroblast hücreleri, 2.gün.

#### **Hücre üremesi (MTT yöntemi)**

Bu bölümdeki çalışmalar, % 100 PCL, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş/PCL, PEO immobilize edilmiş/PCL, insülin immobilize edilmiş/PCL ve heparin immobilize edilmiş/PCL olmak üzere beş tür PCL doku iskelesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Hücre üremesi MTT yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Hücre canlılığının ve üremesinin belirlendiği hızlı ve hassas kalorimetrik tayin metodu olan MTT, hücre sayısı ile doğrudan orantılı olan renkli ve çözünmez formazan tuzunun oluşması esasına dayanmaktadır. Bu metod, mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin indirgeme reaksiyonuyla sarı renkli, suda çözünür tetrazolyum tuzunu (3-[4,5-dimetiltiazol-2]-difeniltetrazolyum bromid, MTT) mor renkli çözünmez formazan ürününe dönüştürme kapasitesine bağlıdır. Bu nedenle, metabolik olarak hala aktif fakat üremeyen hücrelerin bu testle tayin edilmesi mümkündür.

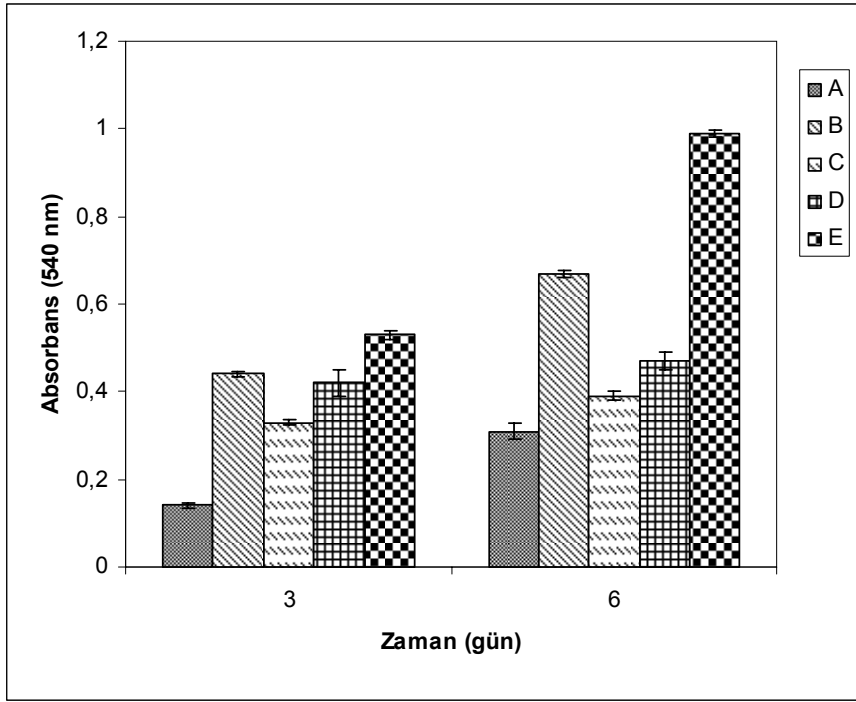
Şekil 4.20, formazanın absorbansıyla ilişkili olarak 3. ve 6. günün sonunda PCL doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblastlarının üremesini göstermektedir. Hücre kültür çalışmalarında modifiye edilmemiş % 100 PCL yapı, modifiye edilmiş PCL doku iskelelerinin kontrol grubu olarak kullanılmıştır. İki-boyutlu yüzeylerde fibroblast hücrelerinin, kültürün üçüncü gününün sonunda üremelerini tamamen tamamladığı (confluency) bilinmektedir. Fakat Şekil 4.20'den görüldüğü üzere L929 fibroblast hücreleri tüm PCL doku iskeleleri üzerinde 3. günden sonra da

üremeye devam etmiştir. Modifiye edilmiş PCL yüzeylerde bu fark daha belirgindir. Hücreler 3. ve 6. günün sonunda, modifiye edilmemiş % 100 PCL yapılarda en az, heparin immobilize edilmiş % 100 PCL doku iskelelerinde en iyi olmak üzere aynı üreme davranışını sergilemişlerdir. Hücre yapışma ve üremesi için arzu edilmeyen hidrofobik karakteri taşıyan PCL'nin bu özelliğine rağmen özellikle osteoblast ve fibroblast üremesini desteklediğini gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Hutmacher et al., 2001; Woei et al., 2001; Serrano et al., 2004). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada modifiye edilmemiş PCL'nin düz kas hücrelerinin yapışma ve üremesinde sınırlı da olsa belirli bir kapasiteye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Chong et al., 2007). Bu çalışmada da modifiye edilmemiş % 100 PCL yapıların modifiye PCL doku iskelerine oranla daha az da olsa L919 fare fibroblast hücre üremesini desteklediği gözlenmiştir. Yüzey modifikasyon tekniklerinden biri olan plazma yöntemi, polimerik yüzeylerin kimyasını ve morfolojisini modifiye etmekte kullanılan oldukça cazip bir metottur (Inagaki, 1996). Ayrıca plazma modifikasyon tekniği malzeme yüzeyine amin ve karboksil gibi fonksiyonel grupların takılmasında kullanılmaktadır (Oehr, 2003). Plazmayla modifiye edilerek yüzeylerinde oksijen içeren gruplar oluşturulan polimerler genellikle protein ve hücre yapışmasını desteklemektedir. Hücrelerin bazen yüzey kimyasındaki ufak değişimlerden etkilenebileceği bilinmektedir (Boyan et al., 1996). Kim ve grubu (1999), hücre üremesinin ve ekspresyonunun matrisin kimyasal özellikleriyle düzenlenebileceğini kanıtlamıştır. Plazma modifikasyonu sonucu polimerik yüzeyde oluşturulan hidroksil, karbonil, karboksil v.b. gibi grupların hücre yapışma ve üremesine bireysel olarak etkisi araştırılmaktadır fakat araştırmalar henüz son bulmuş değildir. Negatif yüke sahip gruplar (örneğin karboksil) "hücre yapışmasını destekleyiciler" olarak tanımlanmaktadır (Maroudas, 1975). Fakat, Gupta ve grubu (2002), Ar plazma modifikasyonunun ardından poli(akrilik asit) (PAA) aşıladıkları PET yüzeylerde insan düz kas hücrelerini kültüre etmeye çalışmışlar ama başarılı olamamışlardır. Bunun nedeni olarak PAA'nın hücreler üzerine toksik etkisini göstermişlerdir. Buna karşın literatürde yüzeydeki karboksil gruplarının hücre üremesine pozitif etkisini gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Örneğin, endotel hücrelerinin özellikle karboksil ve/veya hidroksil gruplarınca zengin yüzeyleri tercih ettiği bilinmektedir (Tidwell et al., 1997). France ve arkadaşları (1998), akrilik asit ve oktadien plazmayla oluşturdukları kaplamalar üzerinde keratinosit yapışmasını çalışmışlar ve hücrelerin ısrarla karboksil grubu içeren ilk kaplamayı



(akrilik asit) tercih ettiklerini görmüşlerdir. Daw ve grubu (1998), osteoblast-benzeri hücrelerin üremesi için aynı kaplamalar üzerindeki optimum karboksil grubu konsantrasyonunu belirlemişlerdir. Ertel ve grubu (1991), yüzeydeki karbonil grubuna bağlı olarak sıgır aortik endotel hücre üremesinin değişimini araştırmıştır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, farklı yüzeylere amonyak plazma modifikasyonunun ardından akrilik asit kaplanmış ve insan fibroblast hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda akrilik asit kaplı yüzeylerin fibroblast hücre yapışmasını aktive ettiği görülmüştür (Detamaso et al., 2005). Sunulan çalışmada düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edildikten sonra oksalil klorürle tepkimeye sokularak yüzeyinde karboksil grupları oluşturulan % 100 PCL yüzeyde 3. ve 6. günün sonunda oldukça iyi L929 fare fibroblast üremesi gözlenmiştir. Hatta plazma modifikasyonu aracılığıyla fonksiyonelleştirilen bu yüzeyin hücrelerin üremesi için ikinci en iyi yüzey olduğu söylenebilir. Modifiye edilen yüzeyde bu derece iyi hücre üremesi gözlenmesinin nedeninin yüzeydeki karboksil gruplarından ve en önemlisi modifikasyon sonrası yüzey topografisinde görülen değişimden (pürüzlülük ve granüler yapıların oluşması) kaynaklandığı düşünülmektedir. Bölüm 4.2.1.1.vi'da verilen AFM görüntüleri modifikasyon sonrası % 100 PCL yapıların yüzey topografisinde meydana gelen değişimleri açıkça sergilemektedir. Modifiye edilmemiş % 100 PCL yapıdaki L929 hücre üremesi PEO molekülünün yapıya takılmasıyla arttırılmıştır. PEO, polimerik malzemelere immobilize edilerek yüzeyin hidrofilitesi arttırılmakta bu da polimerik malzemenin kan uyumluluğunu etkilemektedir. Ayrıca PEO immobilize polimerik yüzeylerin hidrofilik özelliklerinden dolayı hücre yapışma ve üremesi için oldukça uygun yüzeyler olduğu bilinmektedir (Kim et al., 2000). % 100 PCL-PEO yüzeylere insülinin immobilizasyonu ile L929 hücre üremesi daha da arttırılmıştır. Literatürde insülinin serbest, adsorbe ve immobilize olarak kullanıldığı pek çok çalışma mevcuttur, fakat immobilize insülinin hücre üremesini daha çok desteklediği kanıtlanmıştır (Ito and Imanishi, 1994). İnsülin immobilize edildiğinde yerel konsantrasyonu arttırılmış olur. Bu artış çoklu-eş zamanlı uyarılara yol açar, reseptörlerle kompleks oluşumu sağlar ve ardından oluşan bu kompleks yapıların çapraz bağlanması hızlanmış olur. Sinyal geçişinde komplekslerin çapraz bağlanması çok önemlidir, bu prosesin hızlanmasında immobilize insülinin rolü büyüktür. Immobilize insülinin başka bir avantajı da “down regulation”ı inhibe etmesidir. Down regulation, hücre-içi reseptörlerin bozunmasıdır. Biyosinyal

molekölünün immobilizasyonu ile hücre yüzeyindeki reseptör sayısı azalır ve güçlü uyarılara karşı hassasiyet azalır dolayısıyla “down regulation” inhibe edilmiş olur. İmmobilize biyosinyallerin etki mekanizması Bölüm 2.4.2’de ayrıntılı olarak verilmiştir. İnsülin immobilizasyonunda uzatıcı kol olarak PEO’nun kullanımı, insülinin reseptörüyle kompleks oluşumunu hızlandırarak ve oluşan insülin/reseptör kompleksine esneklik sağlayarak yoğun sinyal geçişini sağlamaktadır. Bunun sonucunda, PEO aracılığıyla insülin immobilize edilmiş yüzeyler hücre üremesini fazlasıyla desteklemektedir. Ito ve grubu (1993), PEO-insülin immobilize edilmiş matrislerin fare fibroblast hücre hattının üremesini arttırdığını göstermiştir. Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorürle fonksiyonalize edilmiş % 100 PCL yüzeylerde, PEO-insülin immobilize yüzeylerden daha iyi hücre üremesi gözlenmiştir. Fakat, hücre fonksiyonların ve doku oluşumunun hedeflendiği uzun süreli kültürlerde immobilize insülin gibi biyosinyal moleküllerinin gerekliliğinin tartışılmayacağı açıktır. Heparin immobilize % 100 PCL yüzeylerde en yüksek hücre üremesi elde edilmiştir. Heparin tekrarlanan üronik asit birimlerinden oluşan doğrusal bir polisakkarittir (Sasisekharan and Venkataraman, 2000). Heparin sahip olduğu yapısı ve yüzey yük dağılımı sayesinde farklı proteinlerle özel etkileşime geçebilme yeteneğini gösterir. Heparinin biyolojik aktivitesi (özellikle kan pıhtılaşma faktörleriyle etkileşimi) bu glukozaminoglikanı pek çok araştırmacının odak noktası yapmıştır (Young et al., 1999; Hirsh et al., 2001). Literatürdeki çalışmaların çoğu heparinin antikoagulant etkisine yönelik olsa da, bu molekülün hücre üremesini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Fibroblastların mitogenezini teşvik eden bFGF büyüme faktörü özellikle heparine bağlanarak fibroblast üremesini gerçekleştirmektedir (McGeachie and Tennant, 1997). Benoit ve arkadaşları (2007), heparin fonksiyonalize hidrojelilerin insan mezenkimal kök hücrelerinin canlılığını ve osteojenik farklılaşmasını arttırdığını bulmuştur.

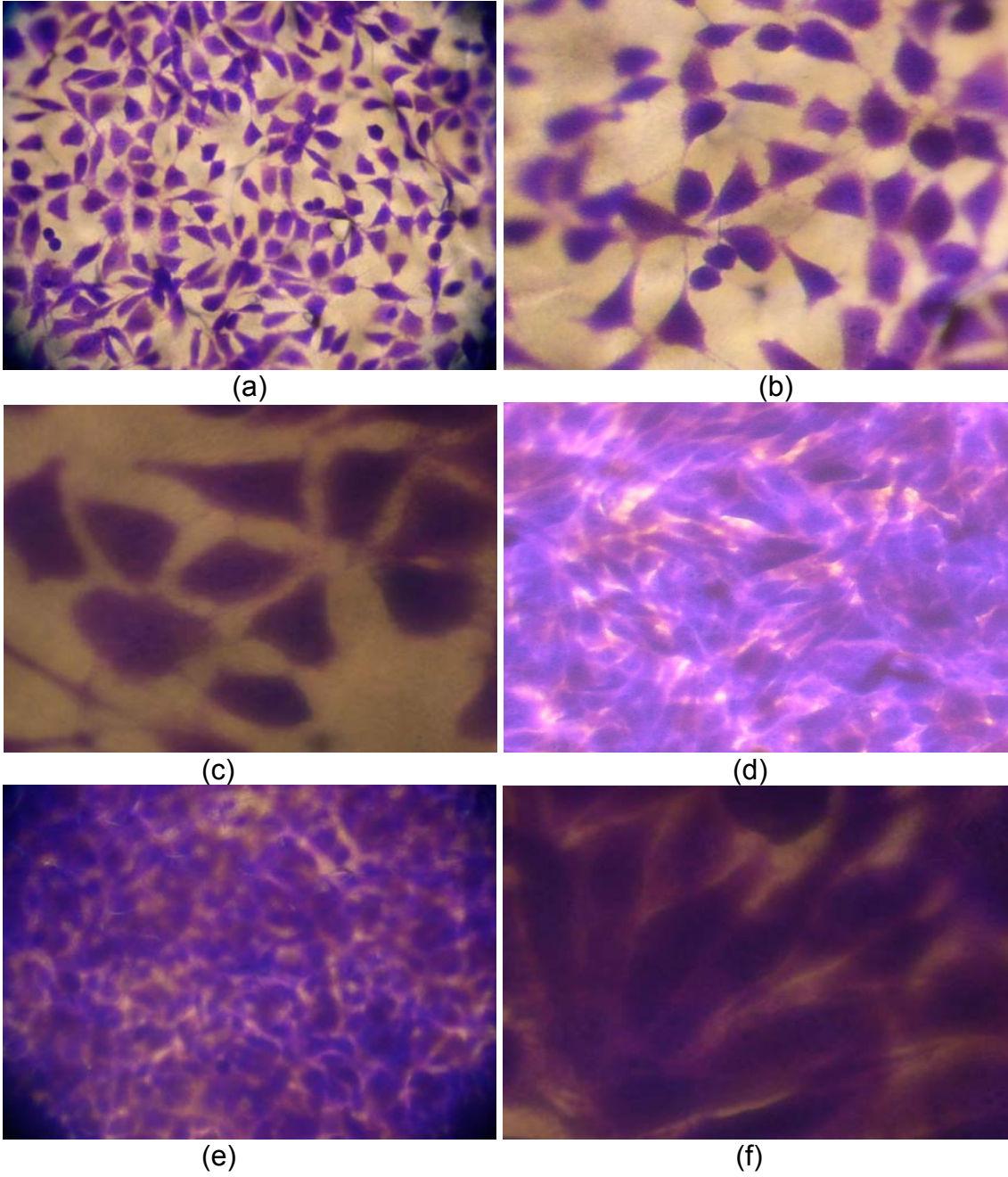


Şekil 4.20. PCL doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üremesi. A; Modifiye edilmemiş % 100 PCL, B; Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş % 100 PCL, C; PEO takılı/% 100 PCL, D; İnsülin immobilize edilmiş/% 100 PCL, E; Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL.

### **Hücre yapışma ve üremesinin mikroskopik olarak gözlenmesi**

#### **Işık mikroskobu ile inceleme**

Hücrelerin kültür boyunca morfolojik değişimleri ve PCL doku iskelelerine yapışma/üremesi ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Doku iskeleleri mikroskopik incelemeden önce Bölüm 3.3.1.4.iv ve Ek 8'de ayrıntıları verilen Giemsa tekniği ile boyanmıştır. Kültürün 2. ve 5. gününde insülin ve heparin immobilize PCL doku iskelelerinden alınan optik fotoğraflar Şekil 4.21'de görülmektedir. 2. günde bazı hücrelerin küresel morfolojilerini korudukları ve matris yüzeyinde boşlukların çokluğu dikkati çekmektedir (Şekil 4.21a, b, c). Kültür sonuna doğru hücrelerin PCL yüzeyleri hemen hemen tamamen kapladıkları görülmektedir (Şekil 4.21 d, e). Ayrıca hücrelerin morfolojisi incelendiğinde, L929 fare fibroblast hücrelerinin insülin immobilize yüzeyde tipik fibroblastik morfoloji (i-şeklinde, uzun) sergiledikleri görülürken (Şekil 4.21d), heparin immobilize yüzeylerde daha farklı bir morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.21f). L929 hücreleri heparin immobilize PCL yüzeylerde biraz daha dolgun ve yayvan bir şekil almıştır.



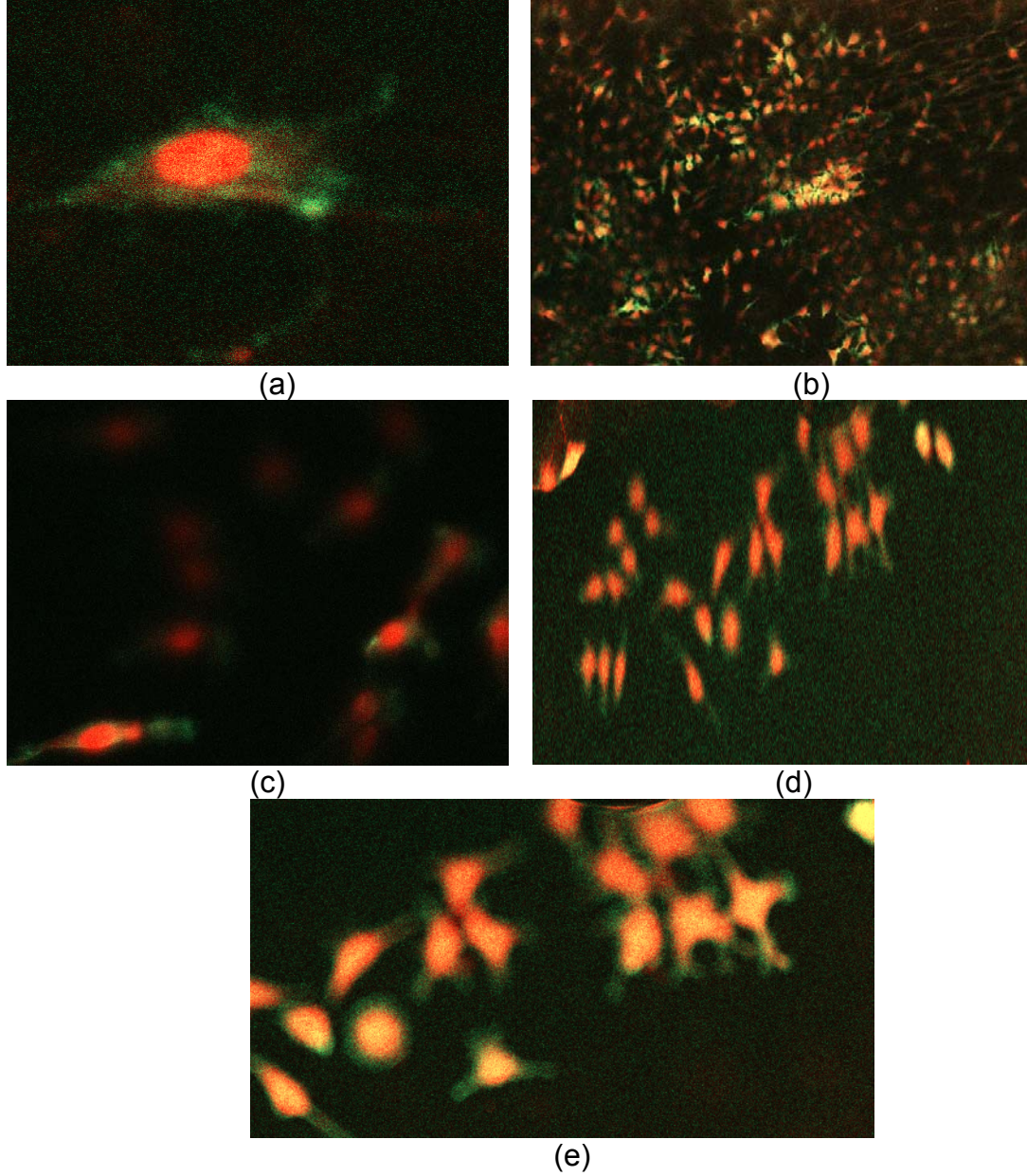
Şekil 4.21. PCL doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üremesini gösteren optik fotoğraflar; İnsülin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 2. gün, x10 (a); Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 2. gün, x20 (b); Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 2. gün, x40 (c); İnsülin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 5. gün, x20 (d); Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 5. gün, x20 (e); Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 5. gün, x40 (f).

#### **Konfokal lazer taramalı mikroskopi (CLSM) ile analiz**

PCL doku iskelelerindeki hücrelerin canlılığı ve yoğunluğu konfokal lazer taramalı mikroskopi ile gözlenmiştir. Bu amaçla dört günlük kültür sonunda PCL doku iskelelerine immünofloresan boyama tekniği uygulanmıştır. Uygulanan boyama



prosedürünün ayrıntıları Bölüm 3.3.1.4.iv ve Ek 9'da verilmiştir. Boyamanın ardından kültürün 4. gününde PCL doku iskelelerinin konfokal lazer taramalı mikroskop ile görüntüleri alınmış ve alınan görüntüler Şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.22. PCL doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üremesinin konfokal lazer taramalı mikroskopu ile incelenmesi: %100 PCL üzerinde üremiş L929 fare fibroblast hücresi, 4. gün, x40 (a); Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş % 100 PCL, 4. gün, x10 (b); Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş % 100 PCL, 4. gün, x20 (c); Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 4. gün, x10 (d); Heparin immobilize edilmiş/% 100 PCL, 4. gün, x20 (e).

Kırmızı renk hücrelerin çekirdeğini, yeşil renk ise aktin filamentini (F-aktin, sitoiskeletini) göstermektedir. Şekil 4.22a'da %100 PCL üzerinde üremiş tek L929 fare fibroblast hücresi görüntülenmiştir. Fotoğraftan hücrenin diğer hücrelere ve yüzeye tutunmak için iskeletini her yöne kollar şeklinde yaydığı açıkça görülmektedir. Hücreler düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş % 100 PCL yüzeyi neredeyse tamamen kaplayacak şekilde üremiştir (Şekil 4.22b). Ayrıca, L929 fibroblast hücrelerinin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş % 100 PCL yüzeyde i-benzeri morfoloji sergilerken (Şekil 4.22c), heparin immobilize edilmiş PCL yüzeyde hücre çekirdeğinin daha geniş ve tombul olduğu farklı bir morfolojiye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.22d, e). PCI doku iskelelerindeki hücre yoğunluğunu anlamak için yüzeyler tabaka tabaka incelenmiş ve her tabakada yoğun hücre varlığı gözlenmiştir. PCL yüzeylerden dilimler alınarak elde edilen ve hücre yoğunluğunu gösteren üç-boyutlu görüntüler elde edilmiştir.

#### **4.2.2. NWPF doku iskelelerinin plazma ile modifikasyon çalışmaları**

Bu bölümde, NWPF yapıların yüzeyinde COOH fonksiyonalesinin eldesi/zenginleştirilmesi amacıyla düşük basınç su/O<sub>2</sub> ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonları gerçekleştirilmiştir.

##### **4.2.2.1. Plazma ile modifiye edilen NWPF doku iskelelerinin karakterizasyonu**

Düşük basınç su/O<sub>2</sub> ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonlarının ardından NWPF doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

##### **4.2.2.1.i. NWPF doku iskeleleri için düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu**

NWPF doku iskeleleri için düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesinin optimizasyonu Bölüm 3.3.2.3.ii.'de açıklandığı şekilde yapılmıştır. Optimizasyon için su akış hızı, basınç, güç ve zaman olmak üzere 4 parametre seçilmiştir. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve kuadratik regresyonların hesaplanması sonucu yüzeyde oluşan OH ve COOH fonksiyonelleri için elde edilen son eşitlikler aşağıdaki gibidir:

$$\begin{aligned}
\text{OH Floresanı (mV)} &= \\
+119.14655 & \\
-4.14948 & \quad \times \text{ su akış hızı} \\
+0.41139 & \quad \times \text{ basınç} \\
+0.045918 & \quad \times \text{ güç} \\
+42.82701 & \quad \times \text{ zaman} \\
-0.020999 & \quad \times \text{ su akış hızı} \times \text{ basınç} \\
+0.14345 & \quad \times \text{ su akış hızı} \times \text{ güç} \\
-0.24210 & \quad \times \text{ su akış hızı} \times \text{ zaman} \\
-1.99376 \times 10^{-3} & \quad \times \text{ basınç} \times \text{ güç} \\
-0.051419 & \quad \times \text{ basınç} \times \text{ zaman} \\
-0.23427 & \quad \times \text{ güç} \times \text{ zaman}
\end{aligned} \tag{4.7}$$

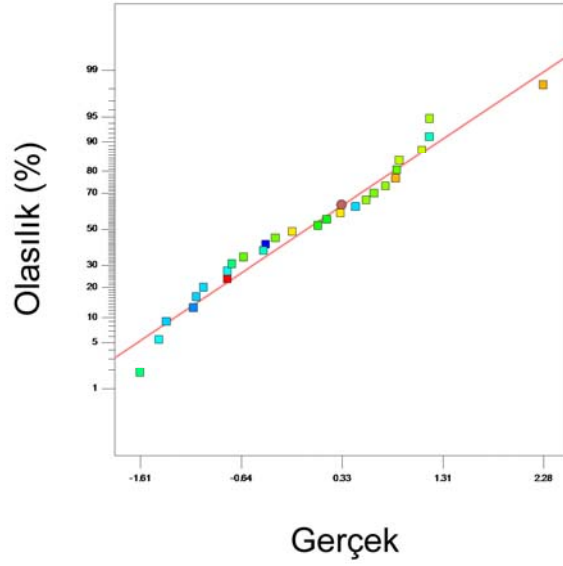
$$\begin{aligned}
\text{COOH Floresanı (mV)} &= \\
-5.45709 & \\
+5.10874 & \quad \times \text{ su akış hızı} \\
+0.70043 & \quad \times \text{ basınç} \\
+1.37729 & \quad \times \text{ güç} \\
+17.41380 & \quad \times \text{ zaman} \\
+7.28637 \times 10^{-3} & \quad \times \text{ su akış hızı} \times \text{ basınç} \\
-0.049555 & \quad \times \text{ su akış hızı} \times \text{ güç} \\
-1.32097 & \quad \times \text{ su akış hızı} \times \text{ zaman} \\
-2.55150 \times 10^{-3} & \quad \times \text{ basınç} \times \text{ güç} \\
-0.017126 & \quad \times \text{ basınç} \times \text{ zaman} \\
-0.10802 & \quad \times \text{ güç} \times \text{ zaman} \\
+9.76492 \times 10^{-3} & \quad \times \text{ su akış hızı}^2 \\
-7.79089 \times 10^{-4} & \quad \times \text{ basınç}^2 \\
-8.15524 \times 10^{-4} & \quad \times \text{ güç}^2 \\
+1.59831 & \quad \times \text{ zaman}^2
\end{aligned} \tag{4.8}$$

ANOVA veri analizi sonucu, basınç, güç ve güç x su akış hızı parametrelerinin OH ve COOH fonksiyonalitesinde önemli etkilerinin olduğu görülmüştür. COOH fonksiyonalitesi basınç  $\times$  güç parametresinden son derece etkilenmektedir.

Şekil 4.23 (a) ve (b)'de NWPF doku iskelelerinin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonunun DoE ile optimizasyonu için, DoE programına göre rastgele seçilen deneysel girdilere karşı elde edilmesi beklenen OH ve COOH fonksiyonalitesi görülmektedir. Her iki grafikte de girilen deneysel verilerle elde edilmesi beklenen OH ve COOH fonksiyonalitesi arasında doğrusal bir ilişki sağlanmıştır. Ayrıca grafiklerde dikkati çeken bir diğer nokta, sonuç NWPF yüzeylerdeki yüksek OH ve COOH fonksiyonaliteleri simgeleyen açık renklerin çokluğudur.

Design-Expert® Software  
OH Fluorescence

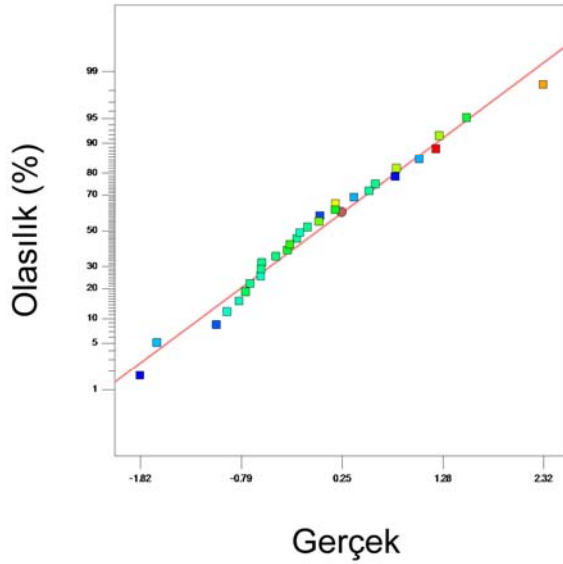
Color points by value of  
OH Fluorescence:



(a)

Design-Expert® Software  
COOH Fluorescence

Color points by value of  
COOH Fluorescence:



(b)

Şekil 4.23. DoE programına göre rastgele seçilen deneysel girdilere karşı elde edilmesi planlanan OH (a) ve COOH (b) fonksiyonalitesi (NWPf örneklerin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu için).

Plazma prosesi boyunca basınç, su akış hızı güç ve zaman gibi deneysel parametrelerin birbiri üzerine ve OH/COOH fonksiyonalitesi üzerine etkisini gözlemlemek için DoE programı kullanılarak Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'de verilen grafikler çizilmiştir. Grafiklerde OH ve COOH fonksiyonalitesi üzerine sırasıyla basınç-su akış hızı, güç-su akış hızı, zaman-su akış hızı, zaman-basınç, zaman-



güç, güç-basınç ilişkilerinin etkisi görülmektedir. Verilen grafiklerde parametrelerin farklı çalışma aralıkları üst işaretiyle (a, a' gibi) simgelenmiştir.

PCL örneklerin aksine NWPF örneklerde, düşük ve yüksek basınç değerlerinde düşük COOH yoğunluğuna neden olan dekarboksilasyon gerçekleşmiştir. OH fonksiyonallitesi sadece düşük basınçta su akış hızıyla artmaktadır. Yüksek basınç ve su akış hızı peroksit mekanizmasını hızlandırır ve sonucunda düşük OH yoğunluğuna sebep olur (Şekil 4.24a, a', Şekil 4.25a, a').

Gücün ve su akış hızının düşük ve yüksek değerlerinin her ikisinde de yüksek OH yoğunluğu elde edilmektedir. Bunun iki mekanizma sonucu olabileceği düşünülmektedir; oksijen radikalleri aracılığıyla (düşük değerlerde) ve HO ve/veya HOO aracılığıyla (yüksek güç ve su akış hızında). NWPF'nin dekarboksilasyonu muhtemelen aynı parametreler etkisiyle gerçekleşmektedir (Şekil 4.24b, b', Şekil 4.25b, b').

Zaman, su/O<sub>2</sub> plazma prosesi boyunca OH fonksiyonallitesini yavaşça arttırmaktadır. COOH yoğunluğunu ise sadece düşük su akış hızlarında arttırmaktadır. Dekarboksilasyon prosesinden dolayı, yüksek su akış hızında gerçekleştirilen uzun süreli plazma modifikasyonu elde edilen COOH yoğunluğunu azaltmaktadır (Şekil 4.24c, c', Şekil 4.25c, c').

OH yoğunluğu düşük basınç değerlerinde zamanla artmaktadır. Fakat, dekarboksilasyon 350 mTorr'un altında gerçekleşmektedir (Şekil 4.24d, d', Şekil 4.25d, d').

NWPF yüzeylerde güç ve zamanın her ikisi de OH yoğunluğunu arttırmaktadır. Fakat yüksek güçte uzun süreli modifikasyonun COOH yoğunluğunu azalttığı dolayısıyla dekarboksilasyonu arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.24e, e', Şekil 4.25e, e').

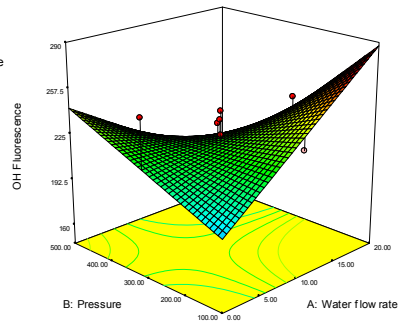
Düşük basınçta gücün artırılmasıyla yüksek OH yoğunluğu elde edilmektedir. Düşük basınç değerlerinde görülen yüksek dekarboksilasyon nedeniyle basıncın, karboksil fonksiyonallitesinde güçten daha etkin olduğu söylenebilir (Şekil 4.24f, f', Şekil 4.25f, f').

Design-Expert® Software

OH Fluorescence  
272  
175

X1 = A: Water flow rate  
X2 = B: Pressure

Actual Factors  
C: Power = 80.00  
D: Time = 2.50



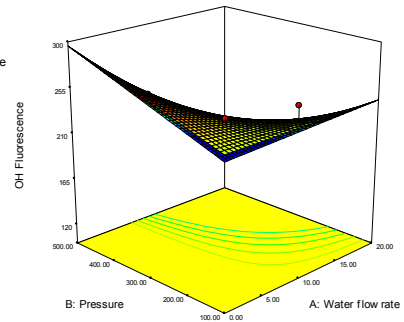
(a)

Design-Expert® Software

OH Fluorescence  
272  
175

X1 = A: Water flow rate  
X2 = B: Pressure

Actual Factors  
C: Power = 50.00  
D: Time = 3.50



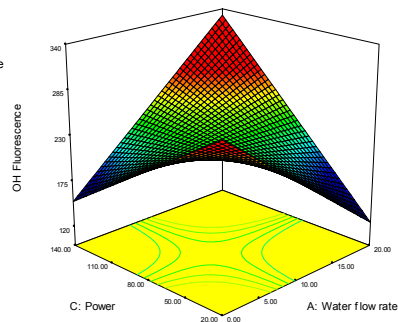
(a')

Design-Expert® Software

OH Fluorescence  
272  
175

X1 = A: Water flow rate  
X2 = C: Power

Actual Factors  
B: Pressure = 300.00  
D: Time = 2.53



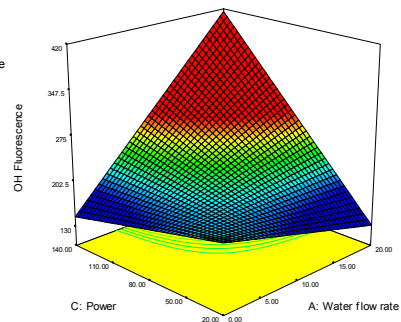
(b)

Design-Expert® Software

OH Fluorescence  
272  
175

X1 = A: Water flow rate  
X2 = C: Power

Actual Factors  
B: Pressure = 100.00  
D: Time = 1.50



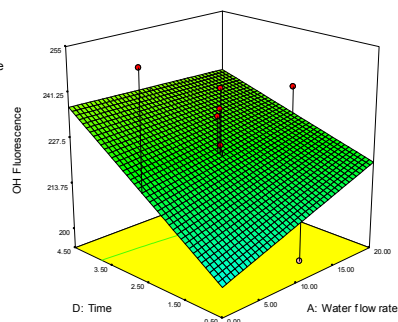
(b')

Design-Expert® Software

OH Fluorescence  
272  
175

X1 = A: Water flow rate  
X2 = D: Time

Actual Factors  
B: Pressure = 300.00  
C: Power = 80.00



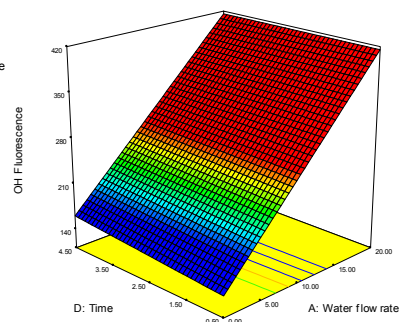
(c)

Design-Expert® Software

OH Fluorescence  
272  
175

X1 = A: Water flow rate  
X2 = D: Time

Actual Factors  
B: Pressure = 100.00  
C: Power = 140.00



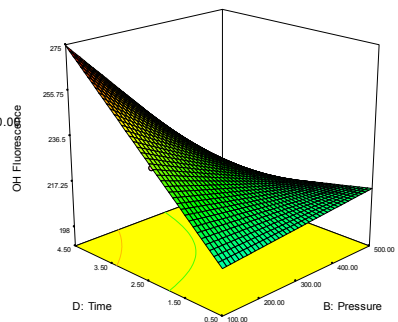
(c')

Design-Expert® Software

OH Fluorescence  
272  
175

X1 = B: Pressure  
X2 = D: Time

Actual Factors  
A: Water flow rate = 10.00  
C: Power = 80.00



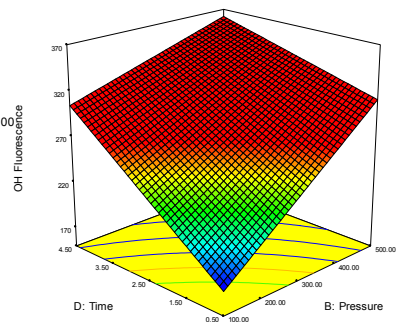
(d)

Design-Expert® Software

OH Fluorescence  
272  
175

X1 = B: Pressure  
X2 = D: Time

Actual Factors  
A: Water flow rate = 0.00  
C: Power = 20.00



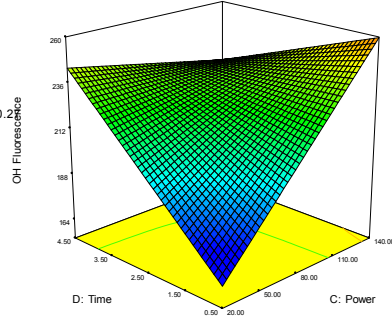
(d')

Design-Expert® Software

OH Fluorescence  
272  
175

X1 = C: Power  
X2 = D: Time

Actual Factors  
A: Water flow rate = 10.2  
B: Pressure = 305.41



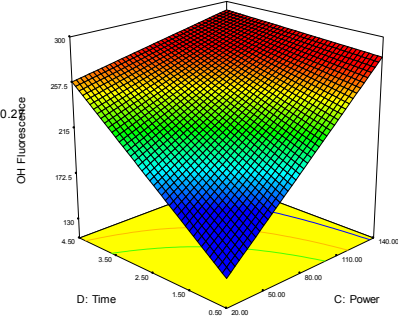
(e)

Design-Expert® Software

OH Fluorescence  
272  
175

X1 = C: Power  
X2 = D: Time

Actual Factors  
A: Water flow rate = 10.2  
B: Pressure = 100.00



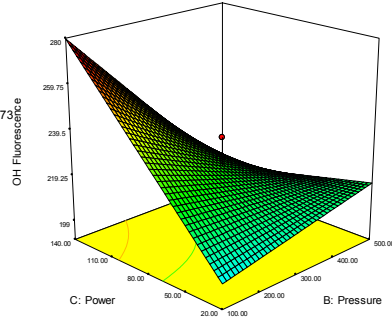
(e')

Design-Expert® Software

OH Fluorescence  
272  
175

X1 = B: Pressure  
X2 = C: Power

Actual Factors  
A: Water flow rate = 9.73  
D: Time = 2.50



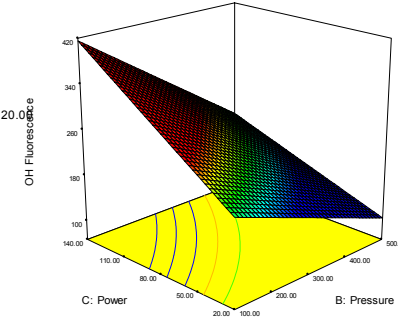
(f)

Design-Expert® Software

OH Fluorescence  
272  
175

X1 = B: Pressure  
X2 = C: Power

Actual Factors  
A: Water flow rate = 20.00  
D: Time = 4.50



(f')

Şekil 4.24. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve OH fonksiyonitesi üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Basınç-su akış hızı ilişkisi (a), (a'); Güç-su akış hızı ilişkisi (b), (b'); Zaman-su akış hızı ilişkisi (c), (c'); Zaman-basınç ilişkisi (d), (d'); Zaman-güç ilişkisi (e), (e'); Güç-basınç ilişkisi (f), (f') (NWPf örneklerin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu için).

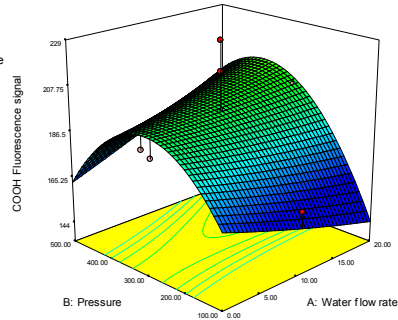
Design-Expert® Software

COOH Fluorescence signal



X1 = A: Water flow rate  
X2 = B: Pressure

Actual Factors  
C: Power = 80.00  
D: Time = 2.50



(a)

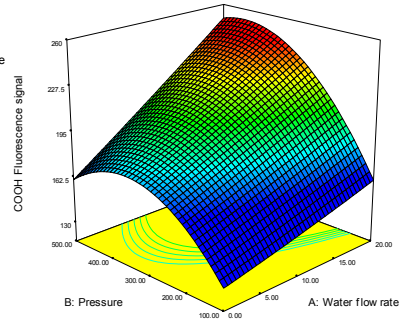
Design-Expert® Software

COOH Fluorescence signal



X1 = A: Water flow rate  
X2 = B: Pressure

Actual Factors  
C: Power = 51.62  
D: Time = 1.50



(a')

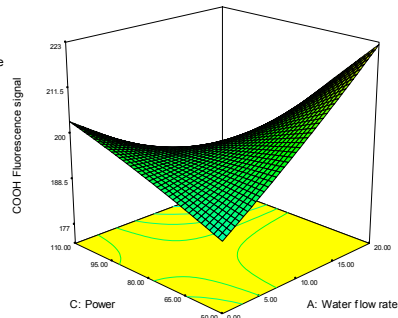
Design-Expert® Software

COOH Fluorescence signal



X1 = A: Water flow rate  
X2 = C: Power

Actual Factors  
B: Pressure = 289.19  
D: Time = 2.47



(b)

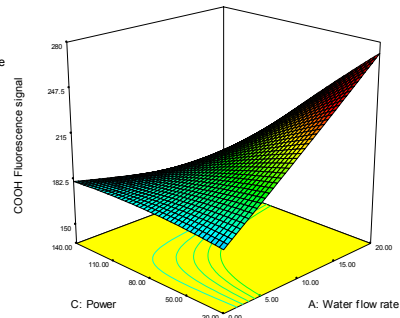
Design-Expert® Software

COOH Fluorescence signal



X1 = A: Water flow rate  
X2 = C: Power

Actual Factors  
B: Pressure = 397.30  
D: Time = 1.91



(b')

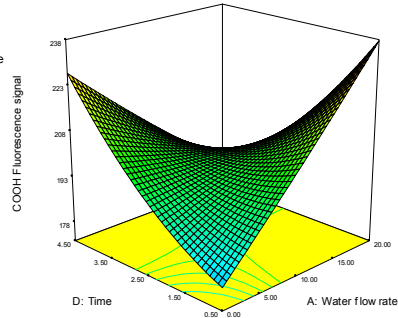
Design-Expert® Software

COOH Fluorescence signal



X1 = A: Water flow rate  
X2 = D: Time

Actual Factors  
B: Pressure = 289.19  
C: Power = 76.76



(c)

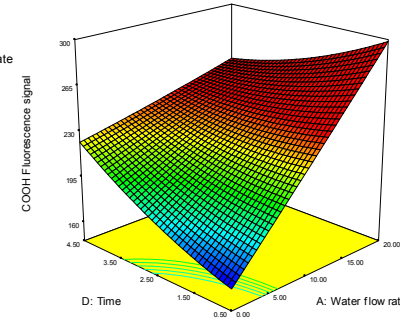
Design-Expert® Software

COOH Fluorescence signal



X1 = A: Water flow rate  
X2 = D: Time

Actual Factors  
B: Pressure = 445.95  
C: Power = 20.00



(c')

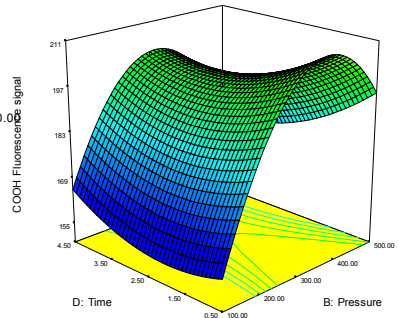
Design-Expert® Software

COOH Fluorescence signal



X1 = B: Pressure  
X2 = D: Time

Actual Factors  
A: Water flow rate = 10.00  
C: Power = 80.00



(d)

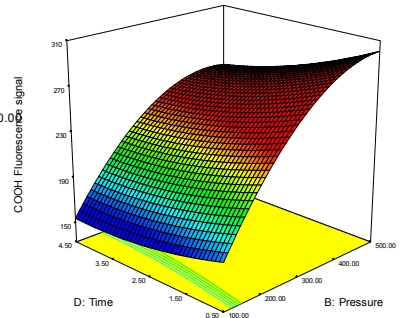
Design-Expert® Software

COOH Fluorescence signal

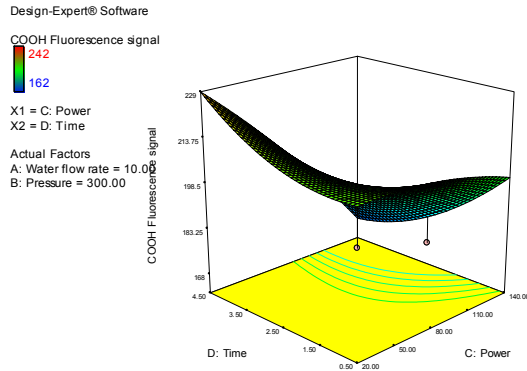


X1 = B: Pressure  
X2 = D: Time

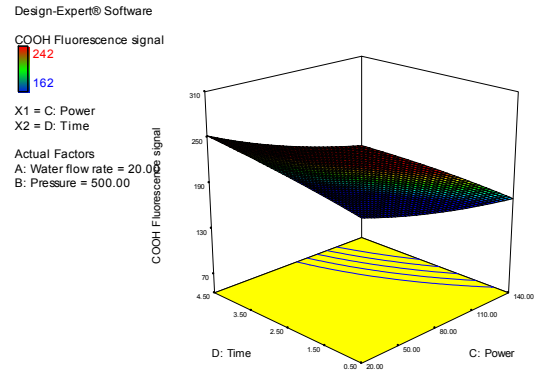
Actual Factors  
A: Water flow rate = 20.00  
C: Power = 20.00



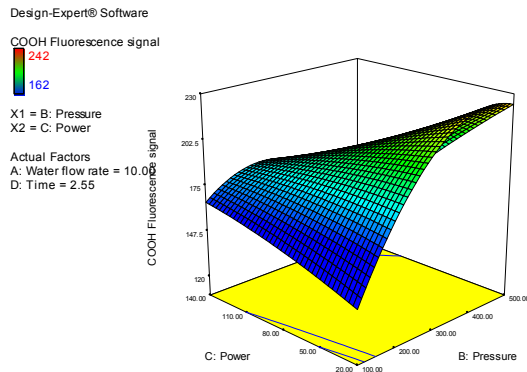
(d')



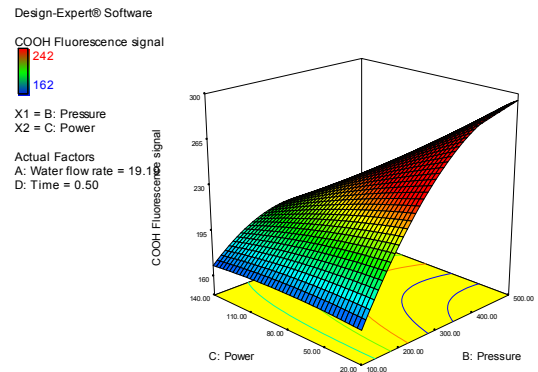
(e)



(e')



(f)



(f')

Şekil 4.25. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve COOH fonksiyonlitesini üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Basınç-su akış hızı ilişkisi (a), (a'); Güç-su akış hızı ilişkisi (b), (b'); Zaman-su akış hızı ilişkisi (c), (c'); Zaman-basınç ilişkisi (d), (d'); Zaman-güç ilişkisi (e), (e'); Güç-basınç ilişkisi (f), (f') (NWPf örneklerin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu için).

Tüm bu istatistiksel ve grafiksel değerlendirmelerin ardından, su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş NWPf örneklerde maksimum OH fonksiyonlitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler DoE programı ile belirlenmiş ve Çizelge 4.12'de verilmiştir. DoE programına göre, OH floresan sinyalini maksimum düzeyde elde edebilmek için 1 nolu deney önerilmiştir. Fakat 3 numaralı deney parametreleri ileriki çalışmalar için seçilmiştir. Bunun nedeni ise, 3 nolu deney parametrelerinin daha önce DoE programı tarafından rastgele seçilerek yürütülen Çizelge 3.3'de (Bölüm 3.3.2.3.ii) verilen 1 nolu deney parametreleriyle aynı oluşu ve bu parametrelerde en yüksek OH floresan sinyaline ulaşılmasıdır (Çizelge 4.12). Ayrıca çizelgeden görüldüğü gibi, DoE programına göre belirlenen ilk 27 deneyin

İstek katsayısı 1'dir, yani ileriki çalışmalar için ilk 27 deneyin herhangi birisinin seçilmesi sonucu çok farklılaştırmayacaktır.

Çizelge 4.12. Su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş NWPf örneklerde maksimum OH fonksiyonlitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler.

Deney	Su akış hızı (cm <sup>3</sup> /dk)	Basınç (mTorr)	Güç (W)	Süre (dk)	OH Floresan sinyali (mV)	İstek	
1	14.66	225.41	109.79	3.20	274.55	1.000	<i>Önerilen</i>
2	14.91	236.30	109.55	3.36	272.936	1.000	
<b>3</b>	<b>14.30</b>	<b>200.00</b>	<b>110.00</b>	<b>3.50</b>	<b>280.455</b>	<b>1.000</b>	<i>Seçilen</i>
4	14.90	200.84	105.00	3.48	279.227	1.000	
5	14.30	200.00	110.00	1.50	273.833	1.000	
6	14.27	208.82	108.80	2.25	272.778	1.000	
7	14.41	209.12	108.62	2.27	273.43	1.000	
8	14.68	213.59	109.89	1.54	273.84	1.000	
9	14.46	204.41	108.40	1.62	272.362	1.000	
10	14.85	202.53	108.76	2.78	279.765	1.000	
11	14.43	210.53	108.24	2.25	272.768	1.000	
12	14.79	220.33	108.50	2.58	273.95	1.000	
13	14.97	221.01	107.23	2.62	273.515	1.000	
14	14.50	219.89	105.93	3.45	272.282	1.000	
15	14.69	217.65	105.54	3.24	272.889	1.000	
16	14.95	215.19	106.38	3.32	276.165	1.000	
17	14.44	214.08	108.17	2.35	272.261	1.000	
18	14.57	215.22	106.72	2.73	272.374	1.000	
19	14.61	202.91	101.91	3.15	272.46	1.000	
20	14.42	219.05	109.21	3.02	273.84	1.000	
21	14.98	237.78	109.60	2.78	272.196	1.000	
22	14.77	203.48	105.58	3.33	277.644	1.000	
23	14.81	206.24	106.95	1.66	272.506	1.000	

Çizelge 4.12. devam ediyor.

24	13.71	210.07	108.67	3.43	272.537	1.000	
25	14.54	207.54	106.86	2.22	272.372	1.000	
26	14.93	216.00	109.88	2.64	277.627	1.000	
27	14.63	201.70	102.93	2.84	272.474	1.000	
28	15.00	234.75	110.00	1.50	271.828	0.998	
29	15.00	239.90	110.00	1.50	270.797	0.988	
30	14.99	247.51	110.00	2.98	270.237	0.982	
31	15.00	243.29	110.00	1.50	270.115	0.981	
32	15.00	261.40	110.00	1.50	266.493	0.943	
33	15.00	293.85	110.00	1.50	260.007	0.876	
34	14.99	310.29	110.00	1.50	256.685	0.842	
35	15.00	320.63	110.00	1.50	254.647	0.821	
36	5.00	399.99	50.09	3.50	251.836	0.792	
37	5.02	400.00	50.04	3.42	251.02	0.784	
38	5.00	357.74	50.00	3.50	250.783	0.781	
39	5.00	353.14	50.00	3.50	250.657	0.780	
40	5.00	330.05	50.00	3.50	250.043	0.774	
41	5.00	315.32	50.05	3.50	249.613	0.769	
42	5.00	275.38	50.00	3.50	248.581	0.759	
43	5.00	278.73	50.54	3.50	248.34	0.756	
44	5.00	256.59	50.00	3.49	247.968	0.752	
45	5.00	399.54	50.00	3.02	247.443	0.747	
46	5.09	200.00	50.00	3.50	246.374	0.736	
47	13.44	200.00	71.65	3.50	245.828	0.730	
48	5.00	200.00	52.79	3.50	245.285	0.725	
49	15.00	200.00	59.13	3.50	235.268	0.621	
50	5.00	400.00	50.00	1.63	234.502	0.613	

#### **4.2.2.1.ii. NWPF doku iskeleleri için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin DoE ile optimizasyonu**

Bölüm 3.3.2.3.iii'de açıklandığı şekilde su akış hızı, güç ve zaman parametrelerinin seçilmesiyle DoE yazılım programı kullanılarak NWPF doku iskeleleri için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve kuadratik regresyonların hesaplanması sonucu yüzeyde oluşan OH ve COOH fonksiyonallikleri için elde edilen son eşitlikler aşağıdaki gibidir:

$$\begin{aligned} \text{OH Floresanı (mV)} &= \\ +41.64378 & \\ +0.65335 & \quad \times \text{güç} \\ +0.54082 & \quad \times \text{akış hızı} \\ -6.14284 & \quad \times \text{zaman} \\ -3.05611 \times 10^{-3} & \quad \times \text{güç} \times \text{akış hızı} \\ +0.29629 & \quad \times \text{güç} \times \text{zaman} \\ -0.053413 & \quad \times \text{akış} \times \text{zaman} \end{aligned} \quad (4.9)$$

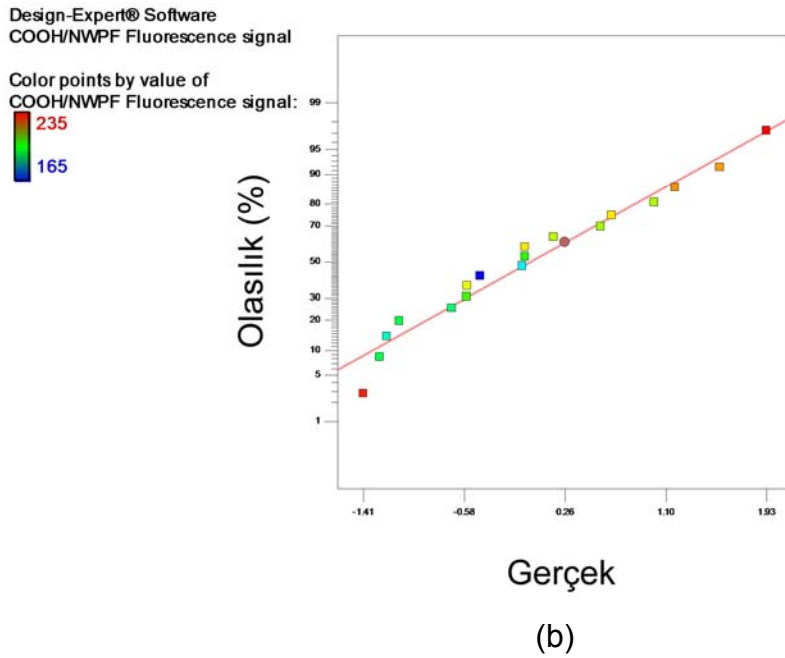
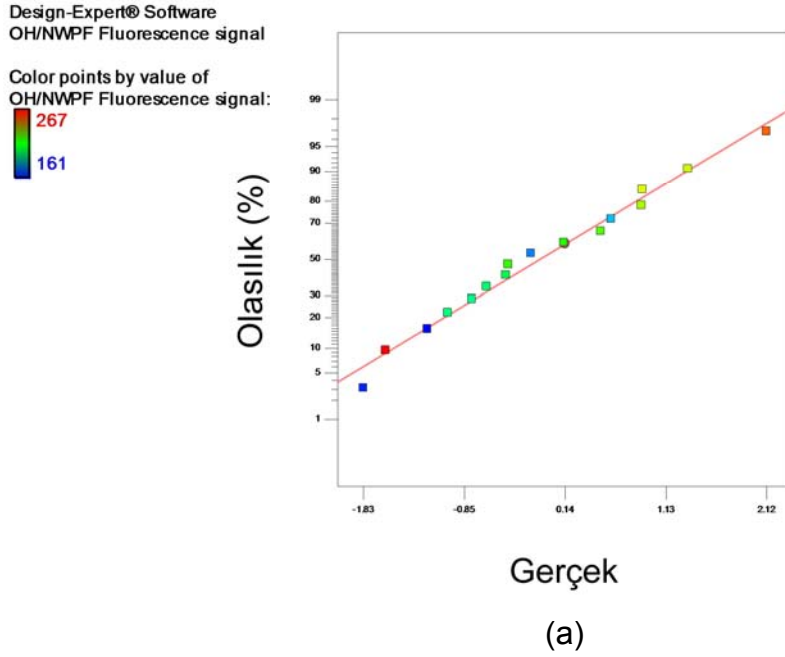
$$\begin{aligned} \text{COOH Floresanı (mV)} &= \\ +179.71024 & \\ -0.92230 & \quad \times \text{güç} \\ +0.19146 & \quad \times \text{akış hızı} \\ +25.17058 & \quad \times \text{zaman} \\ +6.23946 \times 10^{-4} & \quad \times \text{güç} \times \text{akış hızı} \\ -0.039483 & \quad \times \text{akış hızı} \times \text{zaman} \\ +1.71218 \times 10^{-3} & \quad \times \text{güç}^2 \\ -1.28980 \times 10^{-4} & \quad \times \text{akış hızı}^2 \end{aligned} \quad (4.10)$$

ANOVA veri analizi sonuçlarına göre, OH yoğunluğu üzerine güçxhava akış hızı ve güçxzaman, COOH yoğunluğu üzerine ise zamanxhava akış hızı, akış hızı<sup>2</sup> parametrelerinin önemli etkileri olduğu görülmüştür.

NWPF doku iskelelerinin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonunun DoE ile optimizasyonu için, DoE programına göre rastgele seçilen deneysel girdilere karşı elde edilmesi beklenen OH ve COOH fonksiyonallitesi Şekil 4.26 (a) ve (b)'de görülmektedir. Grafiklerden, girilen deneysel verilerle elde edilmesi beklenen OH ve COOH fonksiyonallikleri arasında doğrusal bir ilişki sağlandığı görülmektedir. Ayrıca, grafiklerde düşük OH ve COOH fonksiyonallilerini simgeleyen mavi renklerin yok denecek kadar az oluşu, fakat yüksek fonksiyonalliteyi gösteren açık renklerin fazlalığı dikkati çekmektedir. Özellikle ikinci

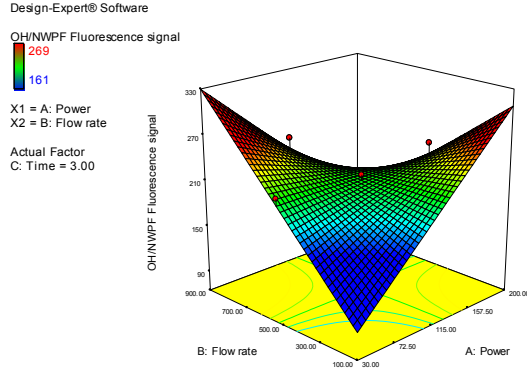


grafikte oldukça yüksek COOH fonksiyonlitesini gösteren çok sayıda kırmızı renk yer almıştır.

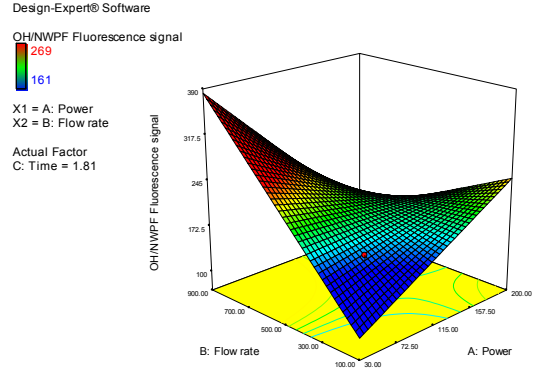


Şekil 4.26. DoE programına göre rastgele seçilen deneysel girdilere karşı elde edilmesi planlanan OH (a) ve COOH (b) fonksiyonlitesi (NWPF örneklerin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu için).

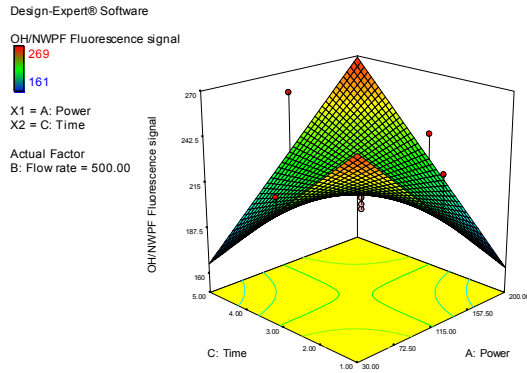
Plazma prosesi boyunca akış hızı, güç ve zaman gibi deneysel parametrelerin birbiri üzerine ve OH/COOH fonksiyonlitesi üzerine etkisini gözlemlemek için DoE programı kullanılarak Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de verilen grafikler çizilmiştir.



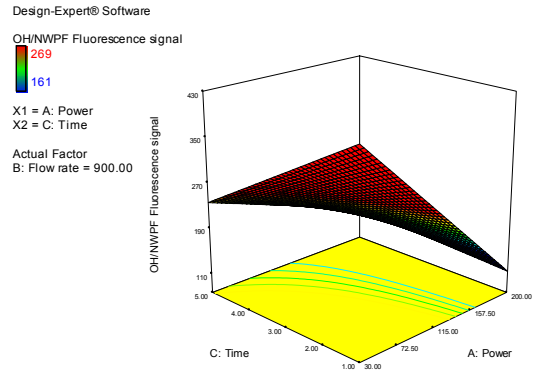
(a)



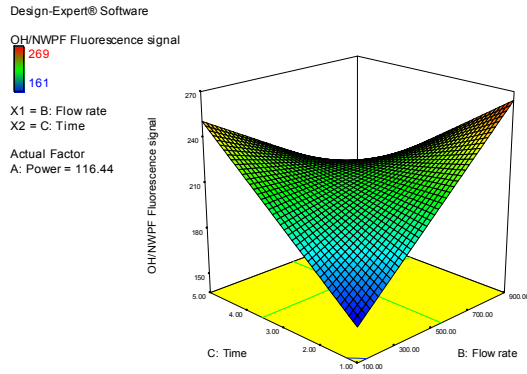
(a')



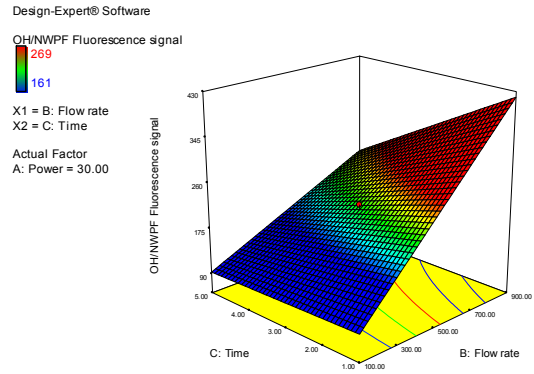
(b)



(b')

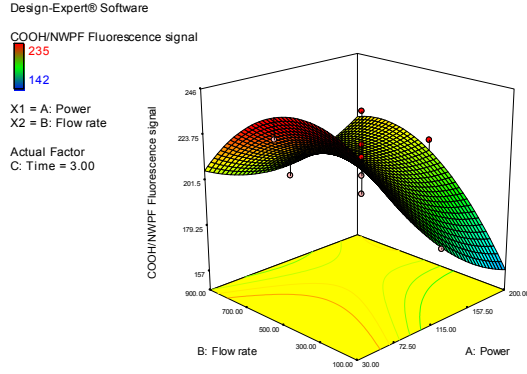


(c)

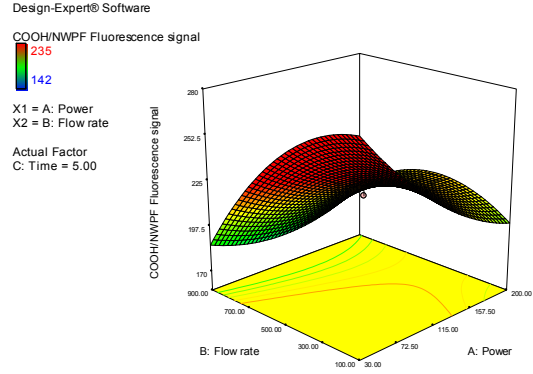


(c')

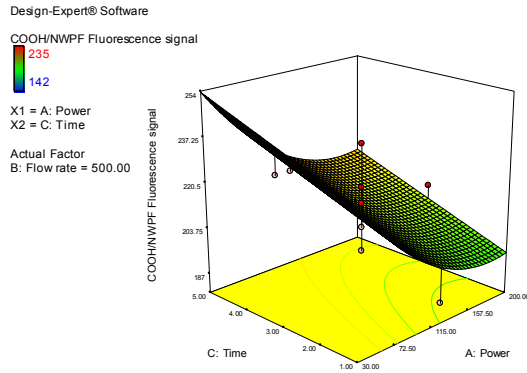
Şekil 4.27. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve OH fonksiyonlitesine üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Akış hızı-güç ilişkisi (a), (a'); Zaman-güç ilişkisi (b), (b'); Zaman-akış hızı ilişkisi (c), (c') (NWPF örneklerin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu için).



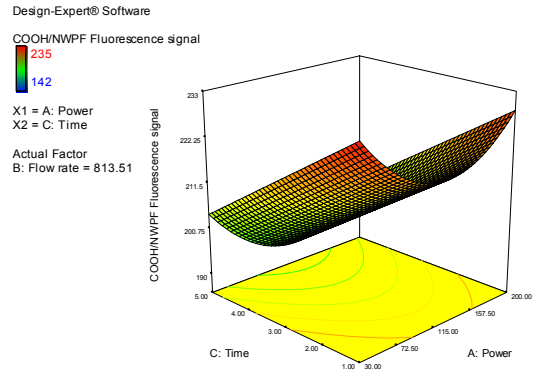
(a)



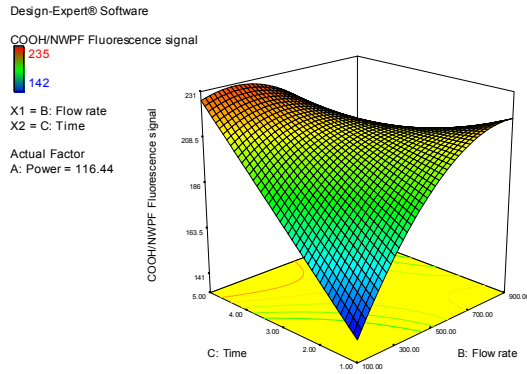
(a')



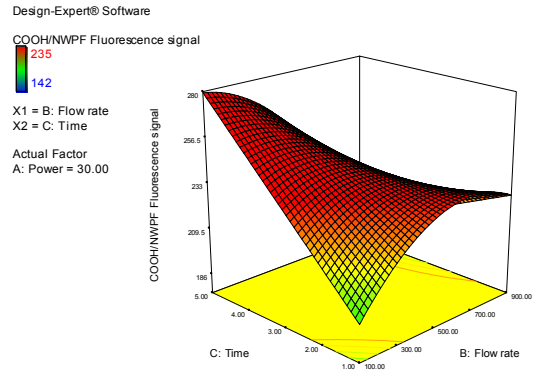
(b)



(b')



(c)



(c')

Şekil 4.28. Plazma parametrelerinin birbiri üzerine ve COOH fonksiyonlitesi üzerine etkisi (3 boyutlu grafikler): Akış hızı-güç ilişkisi (a), (a'); Zaman-güç ilişkisi (b), (b'); Zaman-akış hızı ilişkisi (c), (c') (NWPF örneklerin atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu için).

Grafiklerde OH ve COOH fonksiyonlitesi üzerine sırasıyla akış hızı-güç, zaman-güç ve zaman-akış hızı ilişkilerinin etkisi görülmektedir. Verilen grafiklerde parametrelerin farklı çalışma aralıkları üst işaretleriyle (a, a' gibi) simgelenmiştir.

Gücün ya da akış hızının yüksek olması OH yoğunluğunu arttırmakta, fakat aynı anda her ikisinin de yüksek olduğu değerlerde bunun geçerli olmadığı görülmektedir. COOH fonksiyonallitesi, hava akış hızıyla maksimum, güçle minimum değerler sergilemektedir (Şekil 4.27a, a', Şekil 4.28a, a').

Hava akış hızı 500 cm<sup>3</sup>/dk olduğunda gücün ve zamanın OH yoğunluğu üzerine aynı etkiyi gösterdiği gözlenmiştir. Yüksek güçte ve/veya uzun süreli modifikasyonda düşük OH fonksiyonallitesi elde edilmektedir. Fakat düşük güçte ve kısa süreli modifikasyonda muhtemelen alifatik zincirlerin oksidasyon mekanizması sonucu oldukça yüksek OH yoğunluğuna ulaşılmaktadır. Kısa süreli modifikasyonlarda COOH yoğunluğu azalmaktadır (Şekil 4.27b, b', Şekil 4.28b, b').

OH ve COOH yoğunluğu zaman ve akış hızıyla artmaktadır, fakat çok yüksek değerlere çıkıldığında OH ve COOH yoğunluğunda bozunma sonucu azalma görülür (Şekil 4.27c, c', Şekil 4.28c, c').

Tüm bu istatistiksel ve grafiksel değerlendirmelerin ardından, atmosferik basınç su/hava plazmayla modifiye edilmiş NWPF örneklerde maksimum OH fonksiyonallitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler DoE programı ile belirlenmiş ve Çizelge 4.13'de verilmiştir. DoE programına göre, OH floresan sinyalini maksimum düzeyde elde edebilmek için 1 nolu deney önerilmiştir. Fakat 8 numaralı deney parametreleri ileriki çalışmalar için seçilmiştir. Bunun nedeni ise, 8 nolu deney parametrelerinin daha önce DoE programı tarafından rastgele seçilerek yürütülen Çizelge 3.4'te (Bölüm 3.3.2.3.iii) verilen 17 nolu deney parametreleriyle aynı oluşudur. Ayrıca Çizelge 4.13'de görüldüğü gibi, DoE programına göre belirlenen tüm deneylerin istek katsayısı 1'dir.

Çizelge 4.13. Su/hava atmosferik plazmayla modifiye edilmiş NWPF örneklerde maksimum OH fonksiyonallitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler.

Deney	Güç (W)	Akış hızı (cm <sup>3</sup> /dk)	Süre (dk)	OH Floresan sinyali (mV)	İstek	
1	62.03	854.41	3.13	277.606	1.000	<b>Önerilen</b>
2	138.63	205.70	4.77	270.462	1.000	
3	83.06	816.05	1.40	295.057	1.000	
4	185.48	114.10	3.35	302.939	1.000	
5	84.54	809.48	1.26	294.972	1.000	
6	54.81	664.18	1.26	293.532	1.000	

Çizelge 4.13. devam ediyor.

7	159.67	313.33	4.33	268.386	1.000	
<b>8</b>	<b>70.00</b>	<b>738.00</b>	<b>1.81</b>	<b>283.681</b>	<b>1.000</b>	<b>Seçilen</b>
9	58.17	838.82	2.41	302.889	1.000	
10	190.46	176.57	2.84	274.654	1.000	
11	51.82	745.61	2.65	279.649	1.000	
12	187.16	179.01	3.87	312.145	1.000	
13	170.00	262.00	4.19	284.941	1.000	
14	62.44	844.67	3.30	269.954	1.000	
15	181.96	415.04	4.77	276.239	1.000	
16	184.24	294.87	3.76	278.411	1.000	
17	85.55	887.07	1.61	300.055	1.000	
18	53.20	813.91	3.17	276.784	1.000	
19	184.31	257.47	3.30	270.841	1.000	
20	73.06	763.71	2.27	274.476	1.000	
21	49.69	807.35	1.10	350.236	1.000	
22	156.80	198.85	4.71	296.11	1.000	
23	145.90	214.51	4.44	271.05	1.000	
24	158.51	222.06	3.84	269.043	1.000	
25	31.11	896.03	1.83	379.224	1.000	
26	56.02	876.60	3.15	287.726	1.000	
27	169.09	235.51	3.73	274.727	1.000	
28	133.61	174.92	4.93	270.876	1.000	
29	52.19	892.16	3.44	284.071	1.000	
30	72.06	881.10	2.88	279.599	1.000	
31	171.72	130.64	3.70	295.653	1.000	
32	199.39	127.39	2.61	283.691	1.000	
33	199.85	269.91	3.58	291.762	1.000	
34	181.02	330.89	3.94	273.342	1.000	
35	67.38	726.27	2.32	270.92	1.000	
36	81.58	813.43	1.82	285.786	1.000	
37	141.65	169.07	4.29	267.479	1.000	
38	194.84	382.48	4.88	300.203	1.000	
39	138.28	107.09	4.71	281.681	1.000	
40	179.56	200.94	3.52	285.243	1.000	
41	69.24	719.04	1.19	294.915	1.000	
42	58.65	828.15	3.10	277.172	1.000	
43	175.98	201.85	3.23	271	1.000	
44	98.32	835.24	1.30	278.45	1.000	
45	57.60	766.60	2.79	275.017	1.000	

#### 4.2.2.1.iii. ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis) analizi

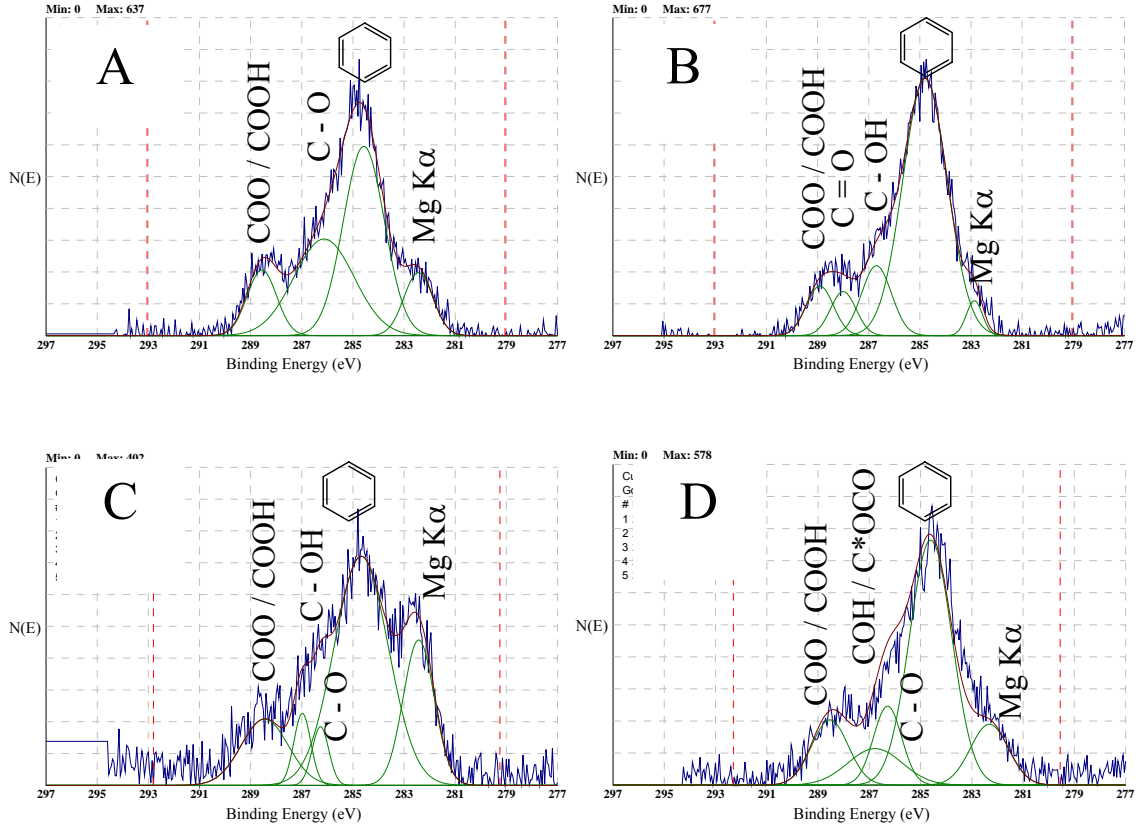
NWPF yapıların düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonları öncesi ve sonrası ESCA analizleri yapılarak yüzey tarama spektrumları alınmış ve spektrumlar Ek-17, Ek-18 , Ek-19 ve Ek-20'de verilmiştir. Çizelge 4.14, NWPF yapıların ESCA yüzey tarama spektrumlarından hesaplanan kimyasal bileşimlerini göstermektedir. Çizelge 4.14'den görüldüğü gibi modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş NWPF yapıların hepsi C1s ve O1s olmak üzere iki ana pik içermektedir. Çalışmaya başlamadan önce modifiye edilmemiş NWPF yapıda görülen silikon kontaminasyonunu gidermek için NWPF örnekler hidrojen plazmayla muamele edilmiştir. Hidrojen plazma modifikasyonu sonucu NWPF yapıdaki Si kontaminasyonu giderilmiş, fakat orjinal yapıdaki C1s (63.7) ve O1s (27.1) yüzde değerlerinin korunamadığı görülmüştür. Bu nedenle plazma modifikasyonlarının ardından yapıdaki C1s ve O1s yüzde değişimlerini değerlendirmek güçtür.

Çizelge 4.14. NWPF örnekler için ESCA yüzey taraması sonucu hesaplanan kimyasal bileşimler.

NWPF	Atomik yüzde (%)	
	C 1s	O 1s
Modifiye edilmemiş	60.5	39.5
Atmosferik basınç su/hava plazma ile modifiye edilmiş	61.6	38.4
Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş	67.1	32.9
Oksalil klorür ile fonksiyonalize edilmiş	61.2	38.8

Şekil 4.29'da modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş NWPF yapılar için C1s yüksek çözünürlük ESCA spektrumları görülmektedir. Ayrıca NWPF yapılar için C1s bileşenlerinin aromatik pike oranla % dağılımları hesaplanmış ve değerler Çizelge 4.15'de verilmiştir. ESCA analizleri sonucu, NWPF polimerinin PCL'e göre dekarboksilasyona karşı daha hassas olduğu gözlenmiştir. NWPF yüzeylerde atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu sonucu, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonuna göre daha fazla C –OH fonksiyonalitesi elde edilmiştir.

Fakat, prosesin daha fazla dekarboksilasyona neden olduğu açıktır (Şekil 4.29 ve Çizege 4.15). Ayrıca, C –OH'in bağlanma enerjisi C \* – O – CO grubunun bağlanma enerjisine oldukça yakın olduğundan NWPF gibi poliestер türü yüzeyler için bu durumda alkol fonksiyonitesini değerlendirmek oldukça zordur. Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonunun ardından gerçekleştirilen oksalil klorür fonksiyonizasyonu NWPF yüzeydeki OH gruplarını karboksil fonksiyonitesine dönüştürmektedir. Fakat, serbest karboksil grupları ve ester grupları hemen hemen aynı bağlanma enerjisine sahip olduğundan bu grupların yüksek çözünürlük C1s spektrumundan değerlendirilmeleri doğru değildir. Serbest karboksil gruplarını belirlemek için tez kapsamında floresan işaretleme prosedürü kullanılmıştır.



Şekil 4.29. NWPF örnekler için yüksek çözünürlük C1s ESCA spektrumları: modifiye edilmemiş (a); atmosferik basınç su/hava plazma ile modifiye edilmiş (b); düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş (c); Oksalil klorür ile fonksiyonize edilmiş (d).

Çizelge 4.15. NWPF yapılar için C1s bileşenlerinin aromatik pike (284.7 eV) oranla % dağılımları.

NWPF	C 1s (%)		
	COO, COOH (288.56 eV)	C – O (286.13 eV)	C- OH (286.69 eV)
Modifiye edilmemiş	24.79	74.6	-
Atmosferik basınç su/hava plazma ile modifiye edilmiş	11.73	9.85	18.26
Düşük basınç su/O <sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş	25.05	7.87	9.8
Oksalil klorür ile fonksiyonalize edilmiş	23.04	21.56	19.14

#### 4.2.2.2. NWPF doku iskelelerinin biyolojik modifikasyonu

Sunulan tez çalışmasının bu kısmında düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve ardından oksalil klorür fonksiyonalizasyonu sonucu yüzeyinde karboksil grupları oluşturulan NWPF doku iskelelerine uzatıcı kol PEO takılmış ve takılan bu uzatıcı kol varlığında insülin ve heparin biyolojik moleküllerinin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyolojik modifikasyonu tamamlanan NWPF yüzeylerin karakterizasyon çalışmaları sonucu elde edilen sonuçlar aşağıda tartışılmıştır.

##### 4.2.2.2.i. Biyolojik olarak modifiye edilmiş NWPF yüzeylerin kantitatif analizi

Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ve oksalil klorür fonksiyonalizasyonu sonrası NWPF yüzeylere uzatıcı kol PEO varlığında insülin veya heparin biyolojik moleküllerinin immobilizasyonu şematik olarak Şekil 4.17'de (Bölüm 4.2.1.2.i) verilmiştir. Immobilizasyon düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ve oksalil klorür fonksiyonalizasyonu sonrası NWPF yüzeylerde oluşturulan/zenginleştirilen karboksil grupları (Bölüm 3.3.1.1, Şekil 3.3) üzerinden yürütülmüştür.

Uzatıcı kol kullanımı ile immobilize biyosinyal molekülünün esnekliği artırılabilir. Liu ve grubu tarafından (1992), fibroblast hücre üremesinin uzatıcı kol yardımıyla artırıldığı gözlenmiştir. Ayrıca, uzatıcı kol PEG (polietilen glikol) kullanılarak biyolojik moleküllerin immobilizasyonu aşamasında



biyomoleküller arayüzeylerde stabilize edilmiş ve böylece proteinlerin spesifik olmayan adsorpsiyonu bir miktar azaltılmıştır (Van de Vondele et al., 2003). Uzatici kol kullanımının biyolojik moleküllerin immobilizasyonu ve hücre üremesindeki pozitif etkisi göz önüne alınarak, sunulan tez çalışmasında insülin ve heparin biyolojik moleküllerinin plazma-destekli modifikasyonunun (su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve ardından oksalil klorür fonksiyonizasyonu) ardından NWPF yüzeylere immobilizasyonu uzatici kol PEO varlığında gerçekleştirilmiştir. PEO immobilizasyonu için başlangıç PEO konsantrasyonunu belirlerken PCL ile ilgili bölümde (Bölüm 4.2.1.2.i) belirtildiği gibi geniş bir literatür taraması yapılmış ve immobilizasyon için fazla miktarda PEO (0.05 M) kullanılmasına karar verilmiştir (Ito et al., 1993; Kim et al., 2000). NWPF yüzeylere takılan PEO miktarı Bölüm 3.3.1.4.ii'de verilen yöntemle göre tayin edilmiş ve 264.77 nmol/cm<sup>2</sup> (0.26 µmol/cm<sup>2</sup>) olarak bulunmuştur (Çizelge 4.16).

İnsülinin NWPF yüzeylere immobilizasyonu PCL yüzeylerde olduğu gibi iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Bunlar PEO takılı NWPF yüzeylerin WSC (suda çözünür karbodiimid) ile aktivasyonu ve ardından insülinin immobilizasyonu basamaklarıdır. Önceki çalışmalarımızda başlangıç insülin konsantrasyonu ve immobilizasyon süresi olmak üzere iki parametrenin immobilizasyon prosedürüne etkisi belirlenmiş (Türkoğlu, 2001; Gümüşderelioğlu and Türkoğlu, 2002) ve ayrıntılı bilgi Bölüm 4.2.1.2.i'de verilmiştir. 200 µg/ml başlangıç insülin konsantrasyonu kullanıldığında plazma destekli modifikasyonun ardından NWPF yüzeylere PEO varlığında immobilize edilen insülin miktarı 146.09 nmol/cm<sup>2</sup> (837.61 µg/cm<sup>2</sup>) olarak bulunmuştur (Çizelge 4.16). Şaşmaz ve arkadaşları (2007) tarafından, PEO'nun, ıslak kimya yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilen insülin immobilizasyonunda etkinliği kanıtlanmıştır.

PCL ile ilgili bölümde (Bölüm 4.2.1.2.i) söylendiği gibi, ayrıntılı literatür taramasının ardından heparin immobilizasyonu için başlangıç konsantrasyonu 1 mg/ml olarak belirlenmiştir (Kang et al., 1996; Sasisekharan and Venkataraman, 2000). Tarafımızdan heparinin uzatici kol kullanmadan polimerik yüzeylere immobilizasyonu daha önce araştırılmamıştır. Fakat, literatürde gerçekleştirilen çalışmalar heparinin uzatici kol PEG (polietilen glikol) varlığında immobilize edildiğinde doğrudan immobilizasyonuna göre aktivitesinde artış olduğunu göstermiştir (Chen et al., 2005). Bu nedenle heparinin NWPF yüzeylere doğrudan

değil de PEO varlığında immobilizasyonu tercih edilmiştir. NWPF yüzeylere immobilize olan heparin miktarı ( $4.81 \text{ nmol/cm}^2$ ) Bölüm 3.3.1.4.iii'de verilen yöntemin kullanılmasıyla tayin edilmiştir (Çizelge 4.16).

Grubumuz tarafından ıslak kimya yöntemleri kullanılarak NWPF yapılara PEO varlığında insülin immobilize edilmiş ve immobilize olan insülin miktarı  $84.45 \mu\text{g/cm}^2$  olarak bulunmuştur (Şaşmaz et al., 2007). Aynı NWPF yapılara plazma destekli fonksiyonizasyon tekniğinin kullanılmasıyla, PEO varlığında immobilize edilen insülin miktarında önceki değerimizden yaklaşık 10 kat artış sağlanmıştır. Ayrıca literatürde oksijen plazma modifikasyonu uygulanıp ardından akrilik asit takılan PET yapılara immobilize edilen PEO ve insülin miktarları da sunulan çalışmada bulunan değerlerden oldukça düşüktür (Kim et al., 2000). Elde edilen bu yüksek immobilizasyon değerleri NWPF yüzeylere uygulanan su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonunun ve oksalil klorür fonksiyonizasyonunun etkinliğini göstermektedir.

Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve oksalil klorür fonksiyonizasyonunun ardından NWPF ve PCL yüzeylere immobilize olan biyolojik moleküllerin miktarlarına bakıldığında, değerlerin PCL yüzeyler için daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni, su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu sonucu PCL yüzeylerde NWPF yüzeylerden daha yüksek OH fonksiyonitesi elde edilmesidir (Bölüm 4.2.1.1.ii, Çizelge 4.4 ve Bölüm 4.2.2.1.i, Çizelge 4.12). Plazma modifikasyonu sonucu yüzeylerde elde edilen OH fonksiyonitesi hedeflenen COOH fonksiyonitesini etkileyecek ve sonuç COOH fonksiyonitesindeki değişim, immobilize olan biyolojik moleküllerin miktarlarına yansacaktır.

Çizelge 4.16. NWPF yapıya düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma yöntemiyle takılan PEO, ve immobilize edilen insülin/heparin miktarları.

Substrat	İmmobilize olan miktar (nmol / cm <sup>2</sup> )		
	PEO	İnsülin	Heparin
NWPF	264.77±0.03	146.09±0.07	4.81±0.14

#### 4.2.2.2.ii. ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis) analizi

Biyolojik moleküllerin (PEO, insülin ve heparin) immobilizasyonu öncesi ve sonrası, NWPF yapıların ESCA analizleri yapılarak yüzey tarama spektrumları alınmış ve spektrumlar Ek-17, Ek-21, Ek-22 ve Ek-23'de verilmiştir. Beklenildiği gibi, modifiye edilmemiş NWPF ESCA yüzey tarama spektrumunda C1s (bağlanma enerjisi, 285 eV) ve O1s (bağlanma enerjisi, 532 eV) olmak üzere iki ana pik görülmüştür. NWPF polimerik yapıya biyolojik moleküllerin immobilizasyonu sonrası, C1s ve O1s piklerine ek olarak spektrumda N1s (bağlanma enerjisi, 400 eV) ve S2p (bağlanma enerjisi, 165 eV) pikleri gözlenmiştir. NWPF'de gözlenen bu yeni pikler, hedeflenen immobilizasyonların başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. NWPF yapıların ESCA yüzey tarama spektrumlarından hesaplanan kimyasal bileşimleri Çizelge 4.17'de görülmektedir. PEO takılı NWPF yüzeyde görülen azot bileşeni PEO'in ucunda yer alan amin gruplarından kaynaklanmaktadır. NWPF yapıya insülinin immobilizasyonundan sonra PEO takılı NWPF yüzeydeki oksijen içeriği düşmüş, fakat yapıdaki azot içeriğinin % 2.6'dan 6.7'ye yükseldiği görülmüştür. Azot içeriğindeki bu artış, insülindeki amid bağına simgelemektedir. Ayrıca insülin immobilize NWPF yapısında insülinde yer alan disülfid bağlarından kaynaklanan % 2.3 oranında kükürt görülmüştür. Heparin immobilizasyonundan sonra NWPF'deki oksijen içeriğinin PEO takılı NWPF yüzeydekinden daha düşük olduğu görülmüştür (% 23.4). Oksijen içeriğindeki bu düşüş yine heparin immobilizasyonu ile NWPF'ye katılan N1s ve S2p piklerinden kaynaklanmaktadır.

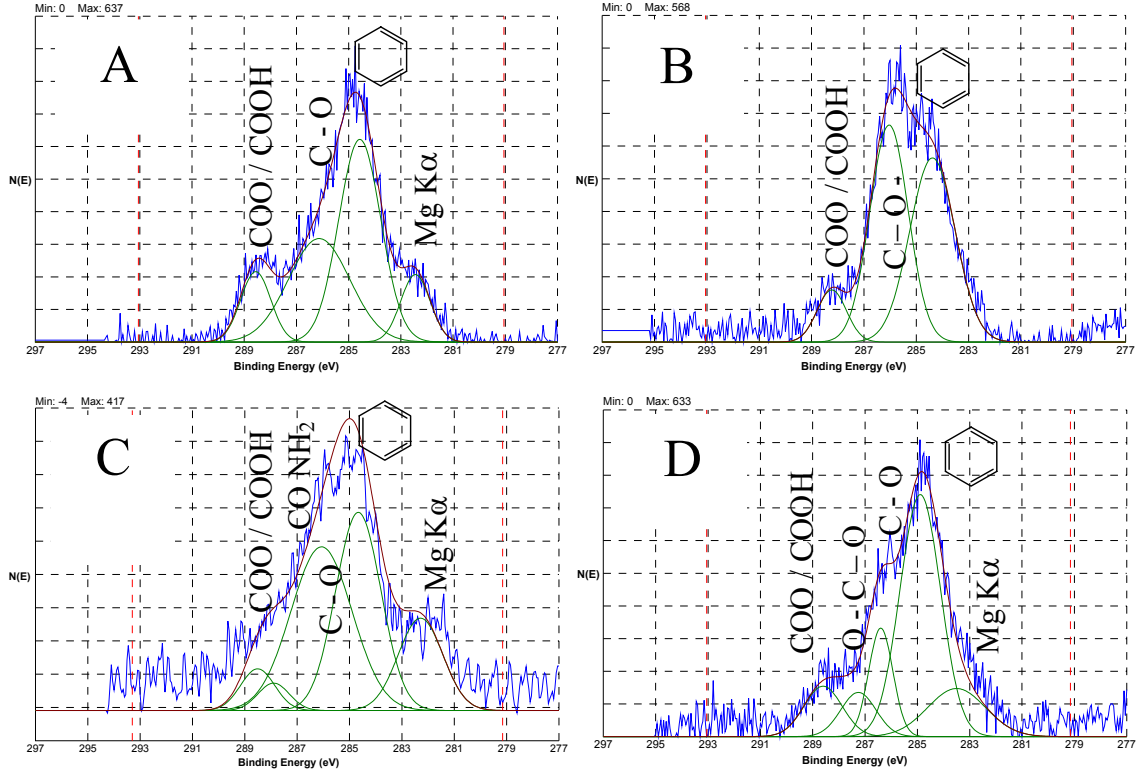
Çizelge 4.17. NWPF örnekler için ESCA yüzey taraması sonucu hesaplanan kimyasal bileşimler.

NWPF	Atomik yüzde (%)			
	C 1s	O 1s	N 1s	S 2p
Modifiye edilmemiş	60.5	39.5	-	-
PEO takılı	58.4	39.0	2.6	-
İnsülin immobilize	53.9	37.1	6.7	2.3
Heparin immobilize	63.2	23.4	11.5	1.9

Şekil 4.30'da biyolojik moleküllerin immobilizasyonu öncesi ve sonrası NWPF yapılar için C1s yüksek çözünürlük ESCA spektrumları görülmektedir. Ayrıca NWPF yapılar için C1s bileşenlerinin aromatik pike oranla % dağılımları hesaplanmış ve değerler Çizelge 4.18'de verilmiştir. NWPF yüzeylere bağlanan etilen oksit zincirlerinden dolayı PEO takılı NWPF yüzeylerde oldukça yoğun C – O piki görülmüştür. İnsülin immobilize edilmiş NWPF yapıların C1s pikinde 288.00 eV'da muhtemelen protein zincirinin amid fonksiyonalitesinden gelen bir omuz görülmektedir. Fakat aynı bölgede karbonil fonksiyonalitesi de bulunmaktadır. Ayrıca, 286.0 eV'daki amin fonksiyonalitesi PET yapısından gelen C– O pikine (286.2 eV) çok yakın olduğu için spektrumlardan bu fonksiyonaliteleri değerlendirmek oldukça zordur. Heparin immobilize edilmiş NWPF yüzeyler heparinin sahip olduğu glukon yapısından kaynaklanan O – C – O bağı nedeniyle farklı şekilde bir C1s spektrumu sergilemiştir. Kükürt, oksijenle glukon ana zincirine bağlı olduğundan C1s pikinde görülememiştir, fakat oldukça geniş olan O1s spektrumunda görülebileceği beklenmektedir. Biyolojik moleküllerin immobilizasyonu öncesi ve sonrası NWPF yapılardan elde edilen ESCA yüzey tarama ve yüksek çözünürlük C1s spektrumları ile biyolojik moleküllerin NWPF yüzeylere immobilizasyonu kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.18. NWPF örnekler için C1s bileşeninin aromatik pike (284.7 eV) oranla % dağılımı.

NWPF	C 1s (%)		
	COO, COOH (288.7 eV)	O-C-O, CON (288.0 eV)	C – O (286.2 eV)
Modifiye edilmemiş	24.79	-	74.64
PEO takılı	21.01	2.80	156.02
İnsülin immobilize	17.78	25.26	77.06
Heparin immobilize	19.62	15.81	26.67



Şekil 4.30. NWPF örnekler için C1s ESCA spektrumu: modifiye edilmemiş (a); PEO takılı (b); insülin immobilize (c); heparin immobilize (d).

#### 4.2.2.3. Hücre kültür çalışmaları

Hücre kültür çalışmaları % 10 (hacimce) FBS varlığında Bölüm 4.2.1.3'de kullanılan L929 fare fibroblast hücreleri ile yürütülmüştür. PCL ile ilgili bölümde (Bölüm 4.2.1.3) Şekil 4.19'da PS petri kaplarında üremiş L929 fare fibroblast hücrelerinin 2.gün sonunda çekilmiş optik fotoğrafı verilmiştir.

#### Hücre üremesi (MTT yöntemi)

Bu bölümdeki çalışmalar beş tür NWPF doku iskelesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunlar; temiz/NWPF (düşük basınç H<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş/NWPF), düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş/NWPF, PEO takılı/NWPF, insülin immobilize edilmiş/NWPF, heparin immobilize edilmiş/NWPF doku iskeleleridir. NWPF doku iskelelerinde üreyen L929 fibroblastlarının mitokondriyal redoks aktiviteleri, MTT'nin mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından formazana indirgenmesiyle değerlendirilmiştir. MTT'nin formazana indirgenmesi hücre metabolizmasını yansıtmaktadır. Şekil 4.31, beş tür NWPF doku iskelesine ait kültürün farklı günlerindeki formazan absorbanlarını göstermektedir. Çalışma öncesi yapılan ESCA analizi sonucu NWPF yapılarda görülen Silisyum

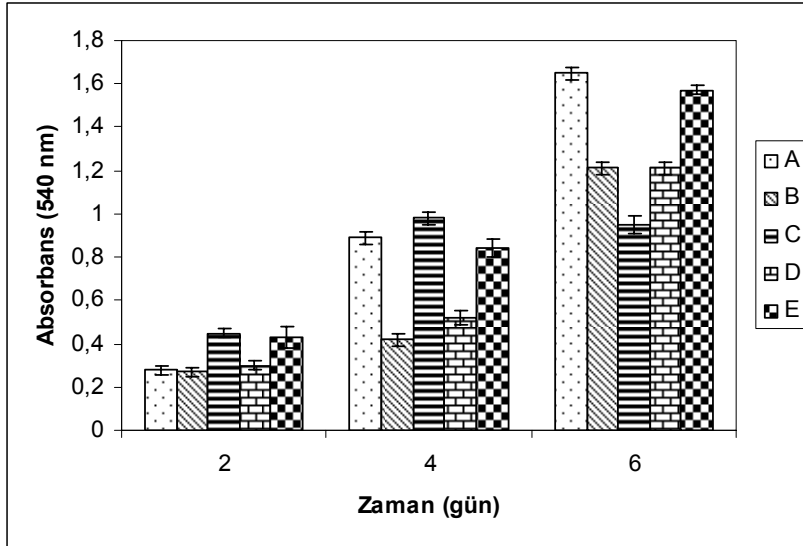
kontaminasyonunu gidermek için örnekler H<sub>2</sub> plazma ile sterilize edilmiştir (10 mTorr basınç altında, 2 dakika süreyle). Kültürün erken dönemlerinde (2.gün), sterilizasyon amacıyla düşük basınç H<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş NWPF ve düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip ardından oksalil klorürle fonksiyonalize edilmiş NWPF doku iskelelerindeki hücre üremesinin birbirine çok yakın olduğu görülmüştür. Literatürde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit) gaz plazmayla sterilizasyon yaygın olarak kullanılmaktadır (Akitsu et al., 2005; Tessarolo et al., 2006). Çalışmada H<sub>2</sub> plazmayla muamele edilen NWPF yüzeyler plazma prosesinin ardından açık laboratuvar koşullarına maruz bırakıldığı için yüzeylerde hidrojen peroksitlerin oluşması mümkündür. Cheung ve grubu (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonu sonucu geçici olarak hücre membranında oluşan hidrojen peroksitlerin B lenfositlerde bulunan çeşitli proteinlerin sinyal aktarımlarındaki ve işlevselliklerindeki pozitif etkisi kanıtlanmıştır. Plazma modifikasyonunun polimerik substratların kimyasını ve topografisini değiştirdiği bilinmektedir (Inagaki, 1996). Ayrıca plazma tekniği ile modifiye edilen yüzeylere çeşitli fonksiyonel gruplar takılabilmektedir (Oehr, 2003). Ar, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> plazma gibi çeşitli plazmalarla modifiye edilen yüzeylerde modifikasyon sonrası genellikle açık hava ile temas sonucu oksijen içeren gruplar oluşturulmaktadır. Bu yüzeylerin protein ve hücre yapışmasını desteklediği bilinmektedir (Detomaso et al., 2005). Ertel ve grubu (1990), polistiren ve PET substratlarda RF plazma ile biriktirilen oksijen içeren filmlerin endotel hücrelerin üremesini arttırdığını bulmuştur. Hsu ve Chen (2000), plazma yoluyla poliüretan yüzeylere aşılanan L-laktat yüzeylerde (çok fazla karboksil grubu içeren) modifiye edilmemiş yüzeylere nazaran oldukça yüksek fibroblast ve endotel hücre yapışma hızına ulaşmışlardır. Ayrıca, literatürdeki pek çok araştırmacı tarafından karboksil grubu içeren polimerik yüzeylerin hücre yapışmasındaki önemi kanıtlanmıştır (Ramsey et al., 1984; van Wachem et al., 1985; van Wachem et al., 1987; Vogler and Bussian, 1987; Lee and Lee, 1993). Kim ve arkadaşları (1999), hücre üremesinin ve ekspresyonunun substratın kimyasal özellikleriyle düzenlenebileceğini göstermiştir. Düşük basınç H<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilip ardından oksalil klorür ile fonksiyonalize edilmiş NWPF yüzeylerde görülen iyi hücre üremesinin, plazma prosesleri sonucu NWPF yüzeylerde oluşan fonksiyonel gruplardan ve yüzey topografisindeki değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. L929 fare fibroblast hücre üremesi PEO

molekölünün NWPF yapıya takılmasıyla daha çok arttırılmıştır (Kültürün 2. ve 4. günleri). PEO immobilize polimerik yüzeylerin hidrofilik özelliklerinden dolayı hücre yapışma ve üremesi için oldukça uygun yüzeyler olduğu bilinmektedir (Kim et al., 2000). Tarafımızdan (Şaşmaz et al., 2007) yapılan çalışmada, klasik kimya yöntemleri kullanılarak NWPF yapılara insülin immobilize edilmiş ve düşük serum ortamında (% 5 FBS) gerçekleştirilen L929 fibroblast kültürünün erken dönemlerinde insülin immobilize NWPF yüzeylerin hücre üremesini dikkati çekecek boyutta stimüle ettiği gözlenmiştir. Fakat % 10 FBS ile gerçekleştirilen bu çalışmada insülin immobilize NWPF yapılarda böyle bir fark görülmemiştir.

NWPF doku iskeleleri üzerinde gerçekleştirilen L929 fare fibroblast hücre kültürünün son gününde (6. gün), H<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş NWPF yapılarda en yüksek hücre üremesine ulaşılmıştır. Bu doku iskelesinin hücre yapışma ve üremesini desteklemesine ilişkin gerekli açıklamalar yukarıda verilmiştir. H<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş NWPF doku iskelelerine en yakın hücre üremesi heparin immobilize edilmiş NWPF doku iskelelerinde gözlenmiştir. Antikoagulant olarak bilinen heparin, karbonhidratların glukozaminoglikan ailesinin bir üyesidir ve yapısında tekrarlanan disakkarit birimlerini içermektedir. Hücre dışı matrisin (ECM) yapısal bir bileşeni olan glukozaminoglikanlar ise hücrelerin yapışması, üremesi ve göçünde gereklidir (Jackson et al., 1991; Fager et al., 1992). Heparinin immobilize biyolojik molekül olarak uygulaması genellikle polimerik malzemelerin trombosit yapışma direncini arttırmak içindir (Chen et al., 2005). Fakat literatürde, heparinin fibroblast hücre üremesini (McGeachie and Tennant, 1997) ve mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını (Benoit et al., 2007) arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Heparin immobilizasyonunun endotel hücrelerinin üremesini arttırdığına yönelik çalışmalar olduğu gibi (Bos et al., 1998), inhibe ettiğini gösterir (Nojiri et al., 1987) çalışmalar da literatürde yer almaktadır. NWPF doku iskelelerine uzatıcı kol PEO varlığında insülin immobilize edilerek hazırlanan doku iskelelerindeki hücre üremesinin, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip ardından oksalil klorürle fonksiyonize edilen NWPF yüzeylerdeki hücre üremesiyle hemen hemen aynı olduğu gözlenmiştir. İnsülinin yüzeye-bağımlı hücrelerin, özellikle serumsuz ortamda, kültüre edilmesinde immobilize biyolojik molekül olarak kullanıldığı bilinmektedir (Gümüşderelioğlu and Türkoğlu, 2002; Hatakeyama et al., 2005). İnsülinin immobilize formunun ve PEO'nun hücre

üremesindeki etkinliğine dair gerekli açıklamalar Bölüm 2.4.2 ve Bölüm 4.2.1.3'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Kültürün son gününe bakıldığında, biyolojik molekül takılı NWPF yüzeylerde beklenen derecede hücre üremesinin sağlanamadığı görülmektedir. Fakat kültür sonuçları değerlendirilirken, çalışmanın hem serum destekli (% 10 FBS), hem de kısa süreli kültürde gerçekleştirildiği göz önüne alınmalıdır. Serumsuz ya da düşük serum ortamında yürütülen hücre kültür çalışmalarında, insülin gibi hücre üreme faktörü olarak bilinen biyosinyal moleküllerinin etkili olacağı bilinmektedir. Ayrıca, uzun süreli kültürlerde hücresel fonksiyonların devamı ve doku oluşumu için immobilize biyosinyal moleküllerinin gerekliliği açıktır.



Şekil 4.31. NWPF doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üremesi. A; H<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş NWPF, B; Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilip ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş NWPF, C; PEO takılı/NWPF, D; İnsülin immobilize edilmiş/NWPF, E; Heparin immobilize edilmiş NWPF.

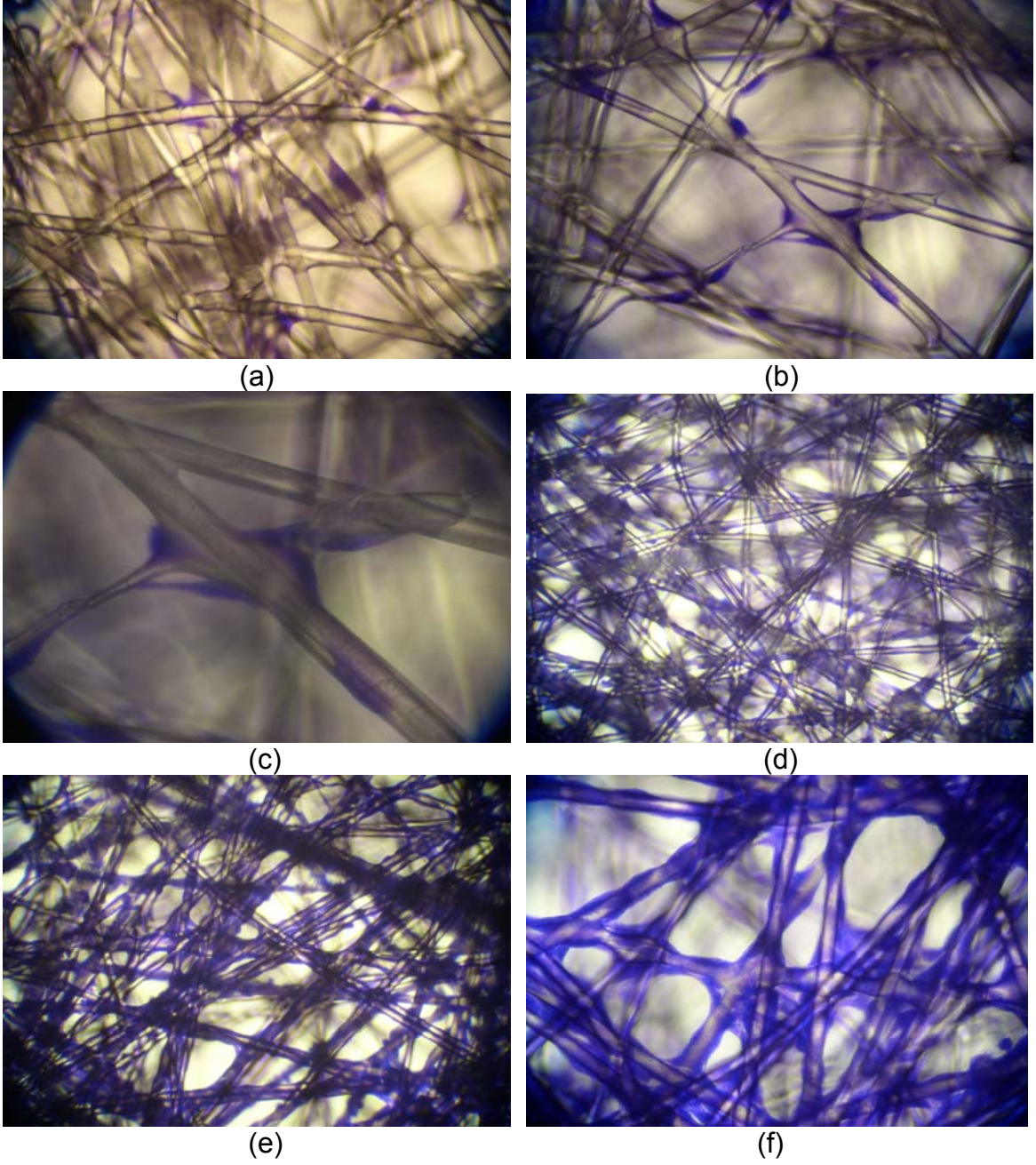
### **Hücre yapışma ve üremesinin mikroskopik olarak gözlenmesi**

#### **Işık mikroskobu ile inceleme**

Kültür boyunca hücrelerin morfolojik olarak değişimleri ve NWPF doku iskelelerine yapışması/üremesi ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Bu amaçla kültür ortamından alınan doku iskeleleri Giemsa ile boyandıktan sonra ışık mikroskobuna monte edilmiş fotoğraf makinasıyla farklı bölgelerden fotoğraflar çekilmiştir. Boyama tekniği ile ilgili ayrıntılı bilgi Bölüm 3.3.1.4.iv ve Ek 8'de verilmiştir. Şekil 4.32'de,



kültürün 2. ve 4. gününde heparin ve insülin immobilize edilmiş NWPF doku iskelelerinden alınan optik fotoğraflar görülmektedir.



Şekil 4.32. NWPF doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üremesini gösteren optik fotoğraflar; Heparin immobilize edilmiş NWPF 2. gün, x20 (a); İnsülin immobilize edilmiş NWPF 2. gün, x20 (b); İnsülin immobilize edilmiş NWPF, 2. gün, x40 (c); Heparin immobilize edilmiş NWPF 4. gün, x10 (d); İnsülin immobilize edilmiş NWPF, 4. gün, x10 (e); İnsülin immobilize edilmiş NWPF, 4. gün, x20 (f).

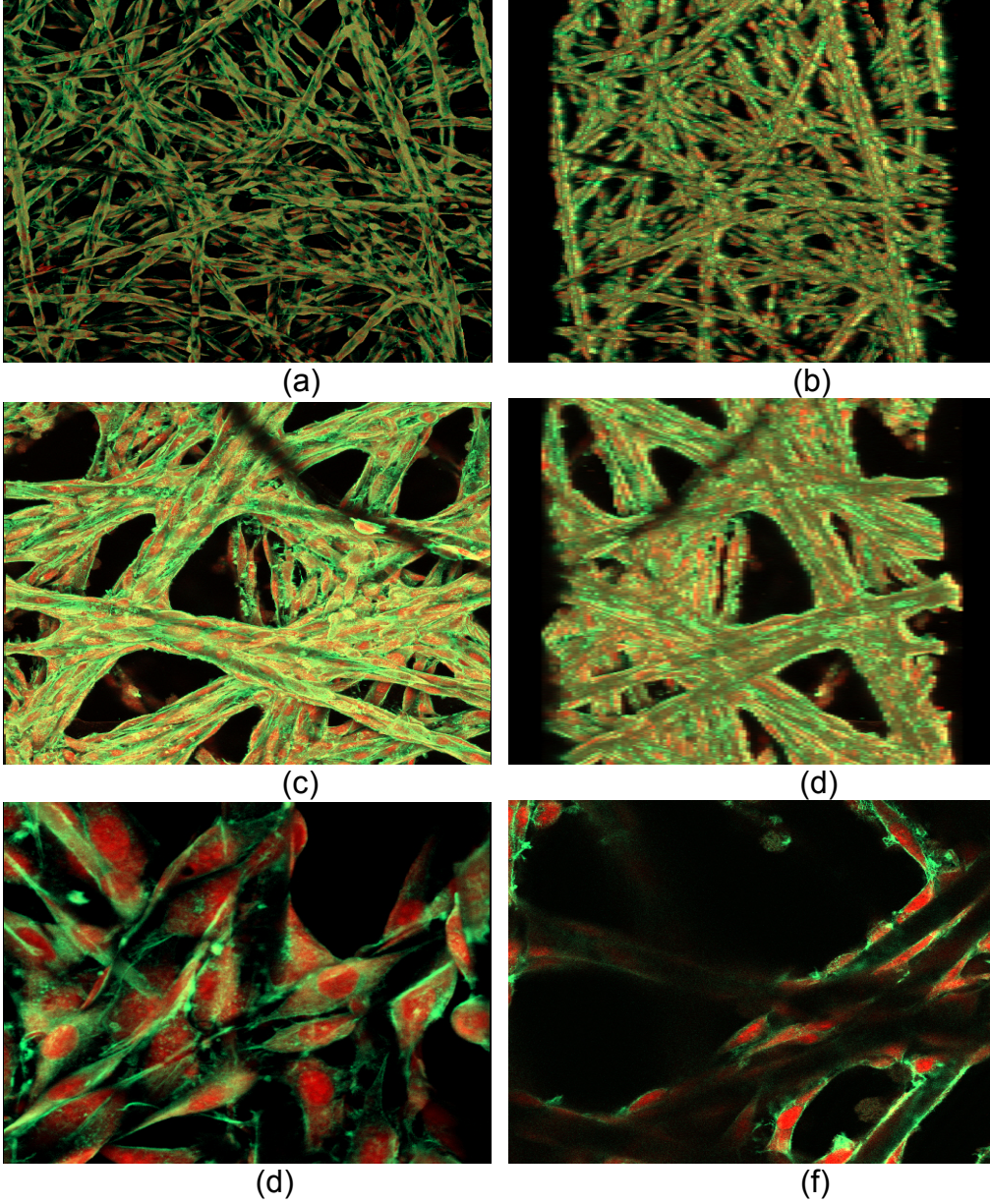
Fotoğraf çekilirken NWPF matrisin katmanlarında yer alan fiberler görüntüyü kısmen engellediği için, yalnızca üst tabaka netleştirilerek görüntüler alınmıştır. İnokülasyon sonrası, hücrelerin fiberler arasında seyrek olarak yerleştiği görülmektedir (Şekil 4.32a, b). İnsülin immobilize yüzeylerde L929 fare fibroblast hücreleri daha belirgin fibroblastik morfoloji (i-şeklinde, uzun) sergilemiştir (Şekil 4.32c). Kültürün dördüncü gününden itibaren, hücrelerin NWPF yüzeylerde hemen hemen her bölgeye yayıldığı ve hatta fiberler arası boşlukları kaplamaya başladıkları görülmektedir (Şekil 4.32d, e). İnsülin immobilize NWPF yüzeylerden daha büyük büyütmeyle (x20) alınan fotoğraftan, hücrelerin 4. günden itibaren ağ yapılar oluşturmaya başladıkları gözlenmiştir (Şekil 4.32f).

### **Konfokal lazer taramalı mikroskopi (CLSM) ile analiz**

Hücre canlılığını ve yoğunluğunu gözlemlemek için NWPF doku iskeleleri konfokal lazer taramalı mikroskop ile incelenmiştir. Bu amaçla, dört günlük kültür sonunda NWPF doku iskelelerine Bölüm 3.3.1.4.iv ve Ek 9'da ayrıntıları verilen immünofloresan boyama tekniği uygulanmıştır. Şekil 4.33'de, kültürün 4. gününde NWPF doku iskelelerinin konfokal lazer taramalı mikroskop ile alınan görüntüleri verilmiştir.

Kırmızı renk hücrelerin çekirdeğini, yeşil renk ise aktin filamentini (F-aktin, sitoiskeletini) göstermektedir. İnsülin veya heparin immobilize edilmiş NWPF yüzeylerdeki aşırı hücre yoğunluğu dikkati çekmektedir. Ayrıca hücrelerin aktin filamentleriyle birbirleri arasında veya fiberler arasında ağ yapılar oluşturarak üredikleri görülmektedir (Şekil 4.33a, b, c, d). Fotoğraflardan L929 fare fibroblast hücrelerinin çekirdekleri ve fibroblast morfolojileri net bir şekilde gözlenmiştir. İnsülin immobilize edilmiş NWPF yüzeylerde L929 hücrelerinin tipik uzun i-şeklindeki morfolojileri görülmektedir (Şekil 4.33e, f). NWPF doku iskelelerindeki hücre yoğunluğunu anlamak için yüzeyler tabaka tabaka incelenmiş ve her tabakada yoğun hücre varlığı gözlenmiştir. NWPF yüzeylerden dilimler alınarak elde edilen ve hücre yoğunluğunu gösteren üç-boyutlu görüntüler elde edilmiştir.





Şekil 4.33. NWPF doku iskeleleri üzerinde L929 fare fibroblast hücre üremesinin konfokal lazer taramalı mikroskobu ile incelenmesi: İnsülin immobilize edilmiş NWPF, 4. gün, x10 (a); kesit, x10 (b); Heparin immobilize edilmiş NWPF, 4. gün, x20 (c); kesit, x20 (d); İnsülin immobilize edilmiş NWPF, 4. gün, x20 (e); Heparin immobilize edilmiş NWPF, 4. gün, x40 (f).

Sunulan tez çalışması kapsamında, PCL ve NWPF polimerik doku iskeleleri yüzeyinde COOH fonksiyonel grubunun eldesi/zenginleştirilmesi hedef alınmıştır. Bu hedefe yönelik olarak polimerik yüzeylere düşük basınç su/O<sub>2</sub> ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonları uygulanmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları (ESCA, GC/MS, floresan işaretleme) sonucu, atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu ile polimerik yüzeylerde düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonuna göre daha fazla OH yoğunluğu elde edildiği, fakat

prosesin daha fazla dekarboksilasyona neden olmasından dolayı yüzeylerde düşük COOH yoğunluğuna ulaşıldığı görölmüştür. Özellikle NWPF doku iskeleri için atmosferik su/hava plazma prosesi ardından oldukça yüksek dekarboksilasyon gözlenmiştir (ESCA). Fakat düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesi boyunca her iki polimerik yüzeyde (özellikle PCL yüzeylerde) dekarboksilasyonun ihmal edilebilir boyutta olduğu görölmüştür.

Tamamlanan tez çalışmasında, belirlenen hedefler doğrultusunda plazmanın belirli yüzeyler için (PCL ve NWPF polimerik yüzeyler) özelleştirilebileceği gösterilmiştir. Literatürde polimerik yüzeylerin fonksiyonizasyonu için, plazma aktivasyonu ve ardından istenilen fonksiyonluluğu bağlı olarak gerekli kimyasallar kullanılarak ıslak kimya yöntemlerinin uygulandığı pek çok çalışma yer almaktadır. Sunulan tez çalışmasının literatürden en önemli farkı, polimerik yüzeylerin karboksil fonksiyonizasyonu için düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonunun ardından vakum ortamında oksalil klorür buharının kullanılmasıdır. Oksalil klorürün buhar halinde kullanılması oldukça pahalı ve toksik olan bu kimyasalın çok az miktarıyla birçok örneğin fonksiyonizasyonunu mümkün kılmış, dolayısıyla maliyeti önemli ölçüde azaltmıştır.

Ulaşılan sonuçlar ışığında, PCL ve NWPF polimerik yüzeylere farklı düşük basınç plazma modifikasyonları (H<sub>2</sub>O/CO<sub>2</sub> vb.) uygulanarak plazma modifikasyonu ardından herhangi bir kimyasal işleme tabii tutulmadan modifiye edilen yüzeylerde doğrudan COOH fonksiyonluluğunun oluşturulabileceği düşünölmektedir. Ayrıca tez kapsamında gerçekteştirilen hücre költür çalışmalarından, heparin immobilize ve H<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş yüzeylerin hücre üremesini desteklemesi açısından oldukça başarılı olduğu görölmüştür. Bu nedenle gelecek çalışmaların, plazmayla polimerik yüzeylerde elde edilen nanotopografik değişimlerin ve heparin biyolojik molekölünün hücre üremesine etkisinin araştırılmasına yönelik olmasına karar verilmiştir.

## 5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında iki farklı polimerik doku iskelesinin (biyobozunur PCL ve 3-boyutlu, biyobozunur olmayan NWPF) yüzeyinde düşük basınç su/O<sub>2</sub> ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu ile karboksil gruplarının eldesi/zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve ardından oksalil klorür muamelesi ile yüzeylerinde karboksil grupları elde edilen/zenginleştirilen PCL ve NWPF doku iskelelerine uzatıcı kol PEO varlığında insülin ve heparin biyolojik molekülleri immobilize edilmiş ve hazırlanan bu doku iskelelerinin L929 fare fibroblast hücre kültürlerinde kullanımı araştırılmıştır. Çalışma boyunca elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- NWPF yapıların üç-boyutlu düzeni, küçük fiber çapı (10-20 µm) ve fiber yakınlığı göz önüne alınarak çalışmada biyobozunur olmayan polimerik doku iskelesi olarak 2.7 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>sn hava geçirgenliği, 1200 cm<sup>2</sup>/g yüzey alanı, 0.23 mm kalınlığa sahip Reemay-2214 kodlu NWPF diskler kullanılmıştır.
- Çalışmada kullanılan biyobozunur doku iskeleleri, üretilen doku iskelesinin gözenek yapısının kolay kontrol edilebilmesi avantajından dolayı çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniği ile iki farklı gözenek yapıcı "PEG<sub>4000</sub> ve sakkaroz" varlığında hazırlanmıştır.
- Kullanılan çözücü-döküm/partikül-uzaklaştırma tekniği ile, kalınlığı 76.2 ± 2.5 ≈ 101.2 ± 2.5 µm aralığında değişen PEG<sub>4000</sub>/PCL doku iskeleleri ve kalınlığı 1525.0 ± 4.5 ≈ 3030.0 ± 1.1 µm aralığında değişen sakkaroz/PCL doku iskeleleri elde edilmiştir. Yıkama sonrası PCL doku iskelelerinden uzaklaşan sakkaroz miktarının uzaklaşan PEG<sub>4000</sub> miktarından fazla olduğu görülmüştür. FTIR ve DSC analizleri, doku iskelesi oluşumu sırasında PEG<sub>4000</sub> ve PCL ya da sakkaroz ve PCL molekülleri arasında herhangi bir kimyasal etkileşim olmadığını göstermiştir. PCL doku iskelelerinin SEM analizi sonucu, gözenek yapıcı olarak PEG<sub>4000</sub> molekülü kullanıldığında, ortalama boyutu ~20 µm ve ~40 µm arasında değişen, düzensiz, kürebenzeri gözenekler elde edildiği gözlenmiştir. Gözenek yapıcı olarak sakkaroz kristalleri kullanıldığında ise PCL yapılarda makrogözenekliliğe ulaşıldığı görülmüştür. % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelesi, ortalama gözenek

çapı 180 µm ile 200 µm arasında değişen, birbiriyle bağlantılı gözenek yapısı sergilemiştir.

- % 100 PCL, % 40 PEG<sub>4000</sub>/PCL ve % 10 Sakkaroz/PCL doku iskeleleri olmak üzere 3 tür PCL yapı ile L929 fare fibroblast hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kültür sonunda, L929 hücrelerinin üremesi için en uygun doku iskelesinin % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelesi olduğu görülmüştür. Muhtemelen % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelesinin birbiriyle bağlantılı makrogözenekleri (191.2 ± 11.0 µm) ve yüksek gözenekliliği (% 92) hücrelerin bu doku iskelesi üzerinde daha iyi üremesine neden olmuştur. Ayrıca, % 10 Sakkaroz/PCL doku iskelesinin yüzeyinin oldukça pürüzlü olması ve bu pürüzlülüğün hücreler için pek çok bağlanma bölgesi sunması ve dolayısıyla daha güçlü tutunmanın/yapışmanın gerçekleşmesi beklenen bir sonuçtur.
- Hücre-destek malzemesi olarak uygunluğu test edilen PCL doku iskelelerinin ve daha önce grubumuz tarafından hücre çalışmalarında başarıyla kullanılan NWPF doku iskelelerinin düşük basınç su/O<sub>2</sub> ve atmosferik basınç su/hava plazma ile modifikasyonları gerçekleştirilmiştir.
- Tez çalışmasında atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu ile PCL ve NWPF yüzeylerde sadece plazma aktivasyonu ile karboksil gruplarının eldesi hedeflenmiştir. Atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu patentli AER (Array Electrode Reactor) reaktöründe gerçekleştirilmiş ve proste su reaktif olarak, hava ise taşıyıcı olarak kullanılmıştır.
- PCL ve NWPF polimerik doku iskelelerinin düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu plazma-destekli fonksiyonizasyon olarak adlandırılan yöntemle gerçekleştirilmiştir. Polimerik doku iskeleleri öncelikle su/O<sub>2</sub> plazma muamelesine ardından in situ veya ex situ gaz-katı reaksiyonuna (oksalil klorür buharı, 500 mTorr, örneğin türüne göre belirlenen sürede) ve son olarak da hidroliz (açık laboratuvar koşulları, 1 saat) işlemlerine tabi tutulmuştur.
- Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma, atmosferik basınç su/hava plazma ve düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ardından oksalil klorür ile fonksiyonizasyon sonrası PCL ve NWPF yüzeylerde elde edilen OH ve COOH fonksiyoniteleri

floresan işaretleme tekniği kullanılarak tayin edilmiştir. Kullanılan tekniğin hassasiyetinin belirlenmesi için veriler ANOVA istatistiksel analizi ile değerlendirilmiş ve floresan işaretleme sonrası PCL ve NWPF yüzeylerde oluşan OH ve COOH yoğunluğunu ifade eden eşitlikler bulunmuştur.

- PCL ve NWPF örnekler için düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma prosesinin optimizasyonu DoE (Design Expert 7, Amerika) software programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve kuadratik regresyonların hesaplanması sonucu yüzeylerde oluşan OH ve COOH fonksiyonlitesini ifade eden eşitlikler bulunmuştur.
- ANOVA veri analizi sonucu, PCL örnekler için; güç, güçxsu akış hızı ve zamanxsu akış hızı olmak üzere üç parametrenin OH ve COOH fonksiyonlitesinde önemli etkilerinin olduğu görülmüştür. Ayrıca basıncın COOH yoğunluğu üzerinde son derece önemli olduğu da anlaşılmıştır. NWPF örnekler için; basınç, güç ve güçxsu akış hızı parametrelerinin OH ve COOH fonksiyonlitesinde önemli etkilerinin olduğu görülmüştür. COOH fonksiyonlitesi basınç × güç parametresinden son derece etkilenmektedir.
- Yapılan tüm istatistiksel ve grafiksel değerlendirmelerin ardından, su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş PCL ve NWPF örneklerde maksimum OH ve COOH fonksiyonlitesini elde etmek için gerekli optimum parametreler DoE programı ile belirlenmiş ve ileriki çalışmalar için en uygun plazma proses parametreleri seçilmiştir.
- PCL ve NWPF örnekler için atmosferik basınç su/hava plazma prosesinin optimizasyonu da yine DoE software programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve kuadratik regresyonların hesaplanması sonucu yüzeylerde oluşan OH ve COOH yoğunluğunu ifade eden eşitlikler bulunmuştur.
- ANOVA veri analizi sonucuna göre, PCL örnekler için; güç<sup>2</sup>, zaman<sup>2</sup> ve güç× zaman olmak üzere üç parametrenin OH yoğunluğunda, akış hızı ve zaman<sup>2</sup> parametrelerinin ise COOH fonksiyonlitesinde önemli etkilerinin olduğu görülmüştür. NWPF örnekler için; OH yoğunluğu üzerine güçxhava akış hızı ve güçxzaman, COOH yoğunluğu üzerine ise zamanxhava akış hızı, akış hızı<sup>2</sup> parametrelerinin önemli etkileri olduğu görülmüştür.

- Yapılan istatistiksel ve grafiksel değerlendirmelerin ardından, atmosferik basınç su/hava plazmayla modifiye edilmiş PCL ve NWPF örneklerde maksimum OH ve COOH fonksiyonaltelerini elde etmek için gerekli optimum parametreler DoE programı ile belirlenmiş ve ileriki çalışmalar için en uygun plazma proses parametreleri seçilmiştir.
- % 100 PCL ve NWPF yapıların modifikasyon öncesi ve sonrası ESCA analizi yapılarak yüzey tarama spektrumları alınmıştır. Ayrıca, C1s bileşenlerinin PCL yapılar için alifatik pike, NWPF yapılar için aromatik pike oranla % dağılımları hesaplanmıştır. Fakat, yüksek çözünürlük C1s spektrumlarında serbest karboksil ve ester gruplarının örtüşmesi nedeniyle serbest karboksil gruplarını belirlemek ve miktarlandırmak için floresan işaretleme prosedürünün gerekliliği ortaya çıkmıştır.
- Modifiye edilmemiş, su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş ve oksalil klorürle fonksiyonaltize edilmiş % 100 PCL yapıların kimyasal yapıları hakkında bilgi edinmek amacıyla piroliz GC/MS analizi gerçekleştirilmiştir. Her üç PCL örneğin GC/MS analizi sonucu elde edilen bileşenleri ve % değişimleri değerlendirilmiştir. Piroliz sonucu oksalil klorür ile fonksiyonaltize edilmiş örneklerdeki CO<sub>2</sub> artışı, PCL yüzeylerdeki etkin karboksil fonksiyonaltitesini göstermektedir. Ayrıca oksalil klorürün PCL yüzeyle tepkimesi su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu sonucu yüzeyde oluşan OH gruplarının varlığına işaretler. Plazma prosesinin ardından az da olsa CO<sub>2</sub> artışı görülmüştür. Bu da ihmal edilebilir düzeyde dekarboksilasyonu ve karbonil ve/veya karboksil gruplarının oluşumunu göstermektedir.
- Modifikasyon öncesi, su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve oksalil klorür fonksiyonaltizasyonu sonrası olmak üzere her 3 aşamanın ardından % 100 PCL yüzeylerin topografik değişimlerini gözlemlemek amacıyla AFM analizi yapılmıştır. Su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu sonrası % 100 PCL yüzeyde pürüzlülüğün arttığı görülmüştür. Su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonun ardından gerçekleştirilen oksalil klorür fonksiyonaltizasyonu sonrası PCL yüzeylerden alınan AFM görüntüleri, PCL yüzeyde oluşan karboksil gruplarının kendilerine has bölgeler oluşturarak farklı bir topografi sergilediklerini göstermiştir. HZD fonksiyonaltize tiplerle alınan AFM görüntüsünde,



yüzeydeki karboksil gruplarının granüler şekilde ve ara ara agregatlar oluşturacak şekilde bir morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir.

- % 40 (ağırlıkça) PEG<sub>4000</sub> gözenek yapıcı içeren PCL yapının modifikasyon öncesi ve oksalil klorür fonksiyonizasyonu sonrası AFM görüntüleri alınmıştır. Bu yapılar içerdiği mikrogözenekler dolayısıyla % 100 PCL yapıya oranla daha pürüzlü bir yüzey sergilemiştir. Oksalil klorür modifikasyonu sonrası modifiye edilmemiş yüzeyde var olan keskin çıkıntıların daha yumuşak hatlara çevrildiği ve sanki yüzeyde sönümlenmelerin yer aldığı görülmüştür. Örneklerin oksalil klorür fonksiyonizasyonu sonrası HZD fonksiyonize tipte alınan AFM görüntüleri, modifikasyon sonrası yüzeyde oluşan karboksil gruplarının köşelerde daha yoğun olarak bulunduğunu göstermektedir.
- PCL yüzeylerden alınan tüm yüksek çözünürlük AFM görüntüleri (1µm × 1µm), nano desenlerin plazma modifikasyonundan daha çok etkilendiğini açıkça göstermektedir.
- Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve ardından oksalil klorür fonksiyonizasyonu sonucu yüzeyinde karboksil grupları oluşturulan % 100 PCL ve NWPF yapılara uzatıcı kol PEO takılmış ve takılan bu uzatıcı kol varlığında insülin ve heparin biyolojik moleküllerinin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyolojik modifikasyonu tamamlanan yüzeylerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.
- PCL yüzeylere takılan PEO miktarı 0.52 µmol/cm<sup>2</sup> olarak bulunmuştur. PEO varlığında gerçekleştirilen insülin immobilizasyonu sonucu yüzeye immobilize olan insülin miktarı 219.23 nmol/cm<sup>2</sup> (1256.95 µg/cm<sup>2</sup>), PCL yüzeylere immobilize olan heparin miktarı ise 271.20 nmol/cm<sup>2</sup> olarak tayin edilmiştir. Literatürde PCL yüzeylerin ıslak kimya veya plazma modifikasyonunu ve ardından insülin ve heparin biyolojik moleküllerinin immobilizasyonunu içeren bir çalışma yer almamaktadır. Fakat, farklı polimerik yapılara immobilize edilen biyolojik moleküllerin miktarına bakıldığında çalışmada bu derece yüksek immobilizasyon değerlerine ulaşılmasının nedeninin, uygulanan su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve oksalil

klorür fonksiyonizasyonu sonucunda PCL yüzeylerde elde edilen yoğun karboksil fonksiyonizasyonu olduğu düşünülmektedir.

- NWPF yüzeylere takılan PEO miktarı  $264.77 \text{ nmol/cm}^2$  ( $0.26 \text{ } \mu\text{mol/cm}^2$ ) olarak bulunmuştur. NWPF yüzeylere PEO varlığında immobilize edilen insülin miktarı  $146.09 \text{ nmol/cm}^2$  ( $837.61 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$ ) ve heparin miktarı ( $4.81 \text{ nmol/cm}^2$ ) olarak tayin edilmiştir. Literatürle karşılaştırıldığında elde edilen bu yüksek immobilizasyon değerleri NWPF yüzeylere uygulanan su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonunun ve oksalil klorür fonksiyonizasyonunun etkinliğini göstermektedir.
- Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu ve oksalil klorür fonksiyonizasyonu ardından NWPF ve PCL yüzeylere immobilize olan biyolojik moleküllerin miktarlarına bakıldığında, değerlerin PCL yüzeyler için daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni, su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu sonucu PCL yüzeylerde NWPF yüzeylerden daha yüksek OH fonksiyonizasyonu elde edilmesidir.
- % 100 PCL ve NWPF yapıların, biyolojik moleküllerin (PEO, insülin ve heparin) immobilizasyonu öncesi ve sonrası ESCA analizleri yapılarak yüzey tarama spektrumları alınmış ve polimerik yapılara biyolojik moleküllerin immobilizasyonu sonrası alınan spektrumlarda N1s ve S2p olmak üzere iki yeni pik görülmüştür. Spektrumlarda gözlenen bu yeni pikler, biyolojik moleküllerin yüzeylere başarılı bir şekilde immobilizasyonunu kanıtlamaktadır. Ayrıca, polimerik yapıların ESCA yüzey tarama spektrumlarından hesaplanan kimyasal bileşimlerdeki değişimler de immobilizasyonların başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir.
- PCL doku iskelelerinin L929 fibroblast hücre kültür çalışmaları % 100 PCL, düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş/PCL, PEO immobilize edilmiş/PCL, insülin immobilize edilmiş/PCL ve heparin immobilize edilmiş/PCL olmak üzere beş tür PCL doku iskelesi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve hücre üremesi MTT yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir.

- Kùltürün 3. ve 6. gününün sonunda, heparin immobilize edilmiş % 100 PCL doku iskelelerinin hücre üremesini en iyi destekleyen yüzeyler olduğu görölmüştür.
- Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edildikten sonra oksalil klorürle tepkimeye sokularak yüzeyinde karboksil grupları oluşturulan % 100 PCL yüzeyde 3. ve 6. günün sonunda oldukça iyi L929 fare fibroblast üremesi gözlenmiştir. Hatta plazma modifikasyonu aracılığıyla fonksiyonelleştirilen bu yüzeyin hücrelerin üremesi için ikinci en iyi yüzey olduğu söylenebilir. Modifiye edilen yüzeyde bu derece iyi hücre üremesi gözlenmesinin nedeninin yüzeydeki karboksil gruplarından ve en önemlisi modifikasyon sonrası yüzey topografisinde görülen değişimden (pürüzlülük ve granüler yapıların oluşması) kaynaklandığı düşünölmektedir.
- Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorürle fonksiyonalize edilmiş % 100 PCL yüzeylerde, PEO-insülin immobilize yüzeylerden daha iyi hücre üremesi gözlenmiştir. Fakat, hücre sel fonksiyonların ve doku oluşumunun hedeflendiği uzun süreli kùltürlerde immobilize insülin gibi biyosinyal moleküllerinin gerekliliğinin tartışılmayacağı açıktır.
- Hücrelerin kùltür boyunca morfolojik değişimleri ve PCL doku iskelelerine yapışma/üremesi ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Ayrıca, PCL doku iskelelerindeki hücrelerin canlılığı ve yoğunluğu konfokal lazer taramalı mikroskopi ile gözlenmiştir. Her iki mikroskopik inceleme sonucu PCL yüzeylerin L929 fare fibroblast üremesini desteklediği görölmüştür.
- NWPF doku iskelelerinin L929 fare fibroblast hücre kùltür çalışmaları temiz/NWPF (düşük basınç H<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş/NWPF), düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ile modifiye edilmiş ve ardından oksalil klorür ile fonksiyonelleştirilmiş/NWPF, PEO takılı/NWPF, insülin immobilize edilmiş/NWPF, heparin immobilize edilmiş/NWPF doku iskeleleri olmak üzere beş tür NWPF doku iskelesi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve hücre üremesi MTT metodu ile tayin edilmiştir.
- Kùltürün erken dönemlerinde (2.gün), sterilizasyon amacıyla düşük basınç H<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş NWPF ve düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazmayla

modifiye edilip ardından oksalil klorürle fonksiyonalize edilmiş NWPF doku iskelelerindeki hücre üremesinin birbirine çok yakın olduğu görülmüştür.

- NWPF doku iskeleleri üzerinde gerçekleştirilen L929 fare fibroblast hücre kültürünün son gününde (6. gün), H<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş NWPF yapılarında en yüksek hücre üremesine ulaşılmıştır.
- Kültürün son gününe bakıldığında, biyolojik molekül takılı NWPF yüzeylerde beklenen derecede hücre üremesi sağlanamadığı görülmektedir. Fakat kültür sonuçları değerlendirilirken, çalışmanın hem serum destekli (% 10 FBS), hem de kısa süreli kültürde gerçekleştirildiği göz önüne alınmalıdır. Serumsuz ya da düşük serum ortamında yürütülen hücre kültür çalışmalarında, insülin gibi hücre üreme faktörü olarak bilinen biyosinyal moleküllerinin etkili olacağı bilinmektedir. Ayrıca, uzun süreli kültürlerde hücre fonksiyonlarının devamı ve doku oluşumu için immobilize biyosinyal moleküllerinin gerekliliği açıktır.
- Kültür boyunca hücrelerin morfolojik olarak değişimleri ve NWPF doku iskelelerine yapışması/üremesi ışık mikroskobu ile, doku iskelelerindeki hücre canlılığı ve yoğunluğu ise konfokal lazer taramalı mikroskop ile incelenmiştir. Mikroskopik incelemeler sonucu kültürün dördüncü gününden itibaren, hücrelerin NWPF yüzeylerde hemen hemen her bölgeye yayıldığı ve hatta fiberler arası boşlukları kaplamaya başladıkları görülmüştür. NWPF doku iskelelerindeki hücre yoğunluğunu anlamak için yüzeyler tabaka tabaka incelenmiş ve her tabakada yoğun hücre varlığı gözlenmiştir. NWPF yüzeylerden dilimler alınarak elde edilen ve hücre yoğunluğunu gösteren üç-boyutlu görüntüler elde edilmiştir.
- Sunulan tez çalışmasının literatürden en önemli farkı, polimerik yüzeylerin karboksil fonksiyonizasyonu için düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonunun ardından vakum ortamında oksalil klorür buharının kullanılmasıdır. Oksalil klorürün buhar halinde kullanılması oldukça pahalı ve toksik olan bu kimyasalın çok az miktarıyla birçok örneğin fonksiyonizasyonunu mümkün kılmış, dolayısıyla maliyeti önemli ölçüde azaltmıştır.

- Ulaşılan sonuçlar ışığında, PCL ve NWPF polimerik yüzeylere farklı düşük basınç plazma modifikasyonları (H<sub>2</sub>O/CO<sub>2</sub> vb.) uygulanarak plazma modifikasyonu ardından herhangi bir kimyasal işleme tabi tutulmadan modifiye edilen yüzeylerde doğrudan COOH fonksiyonlitesinin oluşturulabileceği düşünölmektedir. Ayrıca tez kapsamında gerçekleştirilen hücre költür çalışmalarından, heparin immobilize ve H<sub>2</sub> plazmayla modifiye edilmiş yüzeylerin hücre üremesini desteklemesi açısından oldukça başarılı olduğu görölmüşür. Bu nedenle gelecek çalışmaların, plazmayla polimerik yüzeylerde elde edilen nanotopografik değışimlerin ve heparin biyolojik molekülünün hücre üremesine etkisinin araştırılmasına yönelik olmasına karar verilmiştir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agostino, R., 1990, Deposition, treatment and etching of polymers, Academic Press, New York, 405p.
- Agrawal, C.M., Ray, R.B., 2001, Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering, *J Biomed Mater Res*, 55, 141–150.
- Akischev, Y., Goossens, O., Callebaut, T., Leys, C., Napartovich, A., Trushkin, N., 2001, The influence of electrode geometry and gas flow on corona-toglow and glow-to-spark threshold currents in air, *J. Phys., D: Appl. Phys.* 34, 2875-2882.
- Akitsu, T., Ohkawa, H., Tsuji, M., Kimura, H., Kogoma, M., 2005, Plasma sterilization using glow discharge at atmospheric pressure, *Surface & Coatings Technology*, 193, 29– 34.
- Alves, C.M., Yang, Y., Carnes, D.L., Ong, J.L., Sylvia, V.L., Dean, D.D., Agrawal, C.M., Reis, R.L., 2007, Modulating bone cells response onto starch-based biomaterials by surface plasma treatment and protein adsorption, *Biomaterials*, 28, 307–315.
- Aslankaraoğlu, E., Gürhan, S.İ, Gümüşderelioğlu, M., 1999, Anchorage-dependent and suspended baby-hamster kidney cells on three-dimensional non-woven polyester fabric discs: comparison of growth characteristics, *Biotechnol Appl Biochem*, 30, 65-71.
- Asmussen, J., 1989, Electron cyclotron resonance microwave discharges for etching and thin-film deposition, *J. Vac. Sci. Technol. A7*, 883-895.
- Auger, F.A., Rouabhia, M., Goulet, F., Berthod, F., Moulin, V., Germain, L., 1998, Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen populated hydrated gels: clinical and fundamental applications, *Med. Biol. Eng. Comput.*, 36, 801-812.
- Badylak, S.F., 2002, The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction, *Cell and Developmental Biology*, 13, 377-383.
- Baker, D.J., Lages, A.C., Swartz, R.W., Sussman, M.V., 1991, Polyester nonwoven fabric as surfaces for mammalian tissue cell attachment and growth, *INDA Journal*, 3, 1, 44-48.
- Balani, K., Anderson, R., Laha, T., Andara, M., Tercero, J., Crumpler, E, Agarwala, A., 2007, Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro, *Biomaterials*, 28, 618-624.
- Barrera, D.A., Zlystra, E., Lansbury, Jr. P.T., Langer, R., 1993, Synthesis and RGD peptide modification of a new biodegradable copolymer: Poly(lactic acid-co-lysine), *Journal of American Chemical Society*, 115, 11010-11011.

- Benoit, D.S.W, Durney, A.R., Anseth, K.S, 2007, The effect of heparin-functionalized PEG hydrogels on three-dimensional human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation, *Biomaterials*, 28, 66-77.
- Biederman, H., Osada, Y., 1990, Plasma chemistry of polymers, in: Biederman, H., (Ed.), *Polymer Physics*, Springer-Verlag, Berlin, 57-109.
- Biltresse, S., Attolini, M., Marchand-Brynaer, J., 2005, Cell adhesive PET membranes by surface grafting of RGD peptidomimetics, *Biomaterials*, 26, 4576-4587.
- Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., Mullen, J., 2002, Gas plasmas and their applications, *Spectrochimica Acta Part B*, 57, 609-658.
- Boretos, J.W., Edeen, M. (eds.), 1984, *Contemporary Biomaterials*, Noyes Publ., Park Ridge, NJ.
- Bos, G.W., Scharenborg, N.M., Poot, A.A., Engbers, G.H.M., Beugeling, T., Aken, W.G., Feijen, J., 1998, Proliferation of endothelial cells on surface-immobilized albumin–heparin conjugate loaded with basic fibroblast growth factor, *J. Biomed. Mater. Res.*, 44, 330–340.
- Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D., Schwartz, Z., 1996, Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response, *Biomaterials*, 17, 137-146.
- Cernak, M., Hosokawa, T., Kobayashi, S., Kaneda, T., 1998, Streamer mechanism for negative corona current pulses, *J. Appl. Phys.*, 83, 2678-2689.
- Çetinkaya, G., Türkoglu, H., Arat, S., Onur, M.A., Gümüşderelioglu, M., Tümer, A., 2007, LIF Immobilized Non-Woven Polyester Fabrics for Cultivation of Murine Embryonic Stem Cells, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 81A, 911-919.
- Chandra, R. ve Rustgi, R., 1998, Biodegradable polymers, *Prog Polym Sci*, 23, 1273-1335.
- Chapman, B., 1980, *Glow discharge processes*, Wiley, New York.
- Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., 2002, Scaffold design for tissue engineering, *Macromol. Biosci.*, 2, 67-77.
- Chen, H., Chen, Y., Sheardown, H., Brook, M.A., 2005, Immobilization of heparin on a silicone surface through a heterobifunctional PEG spacer, *Biomaterials*, 26, 7418-7424.
- Chen, V.J., Ma, P.X., 2004, Nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores, *Biomaterials*, 25, 2065-2073.
- Cho, H., Chung, D., Jeongho, A., 2004, Poly(D, L-lactide-ran-ε-caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(D, L-lactide-ran-ε-caprolactone) as parenteral drug-delivery systems, *Biomaterials*, 25, 3733-3742.

- Chong, M.S.K., Lee, C.N., Teoh, S.H., 2007, Characterization of smooth muscle cells on poly( $\epsilon$ -caprolactone) films, *Materials Science and Engineering C*, 27, 309-312.
- Chrisley, D.B., Hubler, G.K., 1994, Pulsed laser deposition of thin film, Wiley, New York.
- Chu, P.K., Chen, J.Y., Wang, L.P., Huang, N., 2002, Plasma-surface modification of biomaterials, *Materials Science and Engineering R*, 270, 1-64.
- Ciapetti, G., Ambrosio, L., Savarino, L., Granchi, D., Cenni, E., Baldini, N., Pagani, S., Guizzardi, S., Causa, F., Giunti, A., 2003, Osteoblast growth and function in porous poly( $\epsilon$ -caprolactone) matrices for bone repair: a preliminary study, *Biomaterials*, 24, 3815-3824.
- Cima, L.G., Vacanti, J.P., Vacanti, C., et al., 1991, Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates, *J. Biomech. Eng.* 113, 143-151.
- Conrad, J.R., Radtke, J.L., Dodd, R.A., Worzala, F.J., Tran, N.C., 1987, Plasma source ion implantation technique for surface modification of materials, *J. Appl. Phys.*, 62, 4591-4596.
- Cook, A.D., Hrkach, J.S., Gao, N.N., et al., Johnson, Pajvani, U.B., Cannizzaro, S.M., Langer, R., 1997, Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial, *Journal Of Biomedical Materials Research*, 35, 513-523.
- Cuatrecasas, P., 1969, Interaction of insulin with the cell membrane: the primary action of insulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63, 450-457.
- Darling, A.L., Sun, W., 2004, 3D microtomographic characterization of precision extruded poly epsilon-caprolactone scaffolds, *J Biomed Mater Res*, 70B, 311-317.
- Davis, G.W., Hill, E.S., 1986, Polyester fibers, *Concise Encyclopedia of Chemical Technology*, Ed., Kirk Othmer, ed., New York: John Wiley Interscience, 294.
- Daw, R., Candan, S., Beck, A.J., Devlin, A.J., Brook, I.M., Macneil, S., Dawson, R.A., Short, R.D., 1998, Plasma copolymer surfaces of acrylic acid/1,7 octadiene: surface characterisation and the attachment of ROS 17/2.8 osteoblast-like cells, *Biomaterials*, 19, 1717-25.
- Deb, D., Siambis, J., Sysmons, R., 1994, Plasma ion implantation technology for broad industrial application, *J. Vac. Sci. Technol.*, B12, 962-968.
- Denes, F., Hua, Z.Q., Barrios, E., Young, RA., 1995, Influence of RF-cold plasma treatment on the surface properties of paper. *J Macromol Sci, Pure and Appl Chem. A*, 32 (8&9), 1405-1443.



- Denes, F., Manolache, S., 2001, Immobilization of active biopolymers from cold plasma-functionalized surfaces for the creation of molecular recognition and molecular manufacturing systems. *Polymeric Biomaterials*, Dumitriu, S. (ed.), Marcel Dekker, New York, 239-290.
- Denes, F., Manolache, S., 2004, Molecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science, *Prog Polym Sci*, 29, 815-885.
- Detomaso, L., Gristina, R., Giorgio S. Senesi, G.S., d'Agostino, R., Favia, P., 2005, Stable plasma-deposited acrylic acid surfaces for cell culture applications, *Biomaterials*, 26, 3831-3841.
- Detomaso, L., Roberto, G., Senesi, G.S., d'Agostino, R., Favia, P., 2004, Stable plasma-deposited acrylic acid surfaces for cell culture applications, *Biomaterials*, 26, 3831-3841.
- Devin, J. E., Attawia, M.A., Laurencin, C.T., 1996, Three-dimensional degradable porous polymer-ceramic matrices for use in bone repair, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7, 661-669.
- Du, C., Cui, F.Z, Zhu, X.D., Groot, K., 1999, Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture, *Journal Of Biomedical Materials Research*, 44, 407-415.
- Dyshlovenkoa, S., Pawlowskia, L., Pateyronb, B., Smurovc, I., Hardingd, J.H., 2006, Modelling of plasma particle interactions and coating growth for plasma spraying of hydroxyapatite, *Surface&Coating Tech.*, 200, 3757-3769.
- Ebara, M., Yamato, M., Aoyagi, T., Kikuchi, A., Sakai, K., Okano, T., 2004, Immobilization of cell adhesive peptides to temperature-responsive surfaces facilitates both serum-free cell adhesion and non-invasive cell harvest, *Tissue Eng*, 10, 1125-1135.
- Elsdale, T., Bard, J., 1972, Collagen substrata for studies on cell behaviour, *The Journal of Cell Behaviour*, 54, 626-637.
- Enderle, J., Blanchard, S., Bronzino, J., 1999, *Introduction to Biomedical Engineering*, Academi Press, New York.
- Endres, M., ve ark., 2003, Osteogenic induction of human bone marrow derived mesenchymal progenitor cells in novel synthetic polymer/hydrogel matrices, *Tissue Eng.*, 9 (4), 689-702.
- Engelberg, I., Kohn, J., 1991, Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study, *Biomaterials*, 12 (3), 292-304.
- Ertel, S.I., Chilkoti, A., Horbett, T.A., Ratner, B.D., 1991, Endothelium cell growth on oxygen-containing films deposited from radiofrequency plasma: the role of surface carbonyl groups, *J Biomat-Sci Polym E*, 3, 163-83.

- Ertel, S.I., Ratner B.D., Horbert, T.A., 1990, Radiofrequency plasma deposition of oxygen-containing films on polystyrene and poly(ethylene terephthalate) substrates improves endothelial cell growth, *J Biomed Mater Res*, 24, 1637-1659.
- Fager, G., Camejo, G., Olsson, U., Ostergren-Lunden, G., Bondjers, G., 1992, Heparin like glycosaminoglycans influence growth and phenotype of human arterial smooth muscle cells in vitro:II. The platelet derived growth factor A chain contains a sequence that specifically binds heparin, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 28A, 176–180.
- Falconnet, D., Csucs, G., Grandin, H.M., Textor, M., 2006, Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays, *Biomaterials*, 27, 3044-3063.
- Fauchais, P., Montavon, G., Vardelle, M., Cedelle, J., 2006, Developments in direct current plasma spraying, *Surface&Coating Tech.*, 201, 1908-1921.
- Favia, P., Cicala, G., Milella, A., Palumbo, F., Rossini, P., d'Agostino, R., 2003, Deposition of super-hydrophobic fluorocarbon coatings in modulated RF glow discharges, *Surface and Coatings Technology*, 169-170, 609-612.
- Feng, X., Zhang, J., Xie, H., Hu, Q., Huang, Q., Liu, W., 2003, The RF plasma polymer of lysine and the growth of human nrve cells on its surface, *Surface and Coatings Technology*, 171, 96-100.
- Feng, X.D., Song, C.X., Chen, W.Y., 1983, Synthesis and evaluation of biodegradable block copolymers of  $\epsilon$ -caprolactone and d,l-lactide, *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.*, 21, 593-600.
- Fields, G.B., Laure, J.L., Dori, Y., Forns, P., Yu, Y.C., Tirrell, M., 1998, Protein-like molecular architecture: biomaterial applications for inducing cellular receptor binding and signal transduction, *Biopolymers*, 47, 143-151.
- Formhals, A., 1934, Process and apparatus fo preparing artificial threads, US Patent 1, 975, 504.
- France, R.M., Short, R.D., Dawson, R.A., Macneil, S., 1998, Attachment of human keratinocytes to plasma co-polymers of acrylic acid/1,7 octadiene and allylamine/1,7 octadiene, *Mater Chem*, 8, 37–42.
- Francis, G., 1956, The glow discharge at low pressure, in: Flügge S. (Ed.), *Handbuch der Physik*, 22, Springer-Verlag, Berlin.
- Ge, H., Hu, Y., Jiang, X., Cheng, D., Yuan, Y., Bi, H., Yang, C., 2002, Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug nimodipine-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(ethylene oxide)- poly( $\epsilon$ -caprolactone) amphiphilic triblock copolymer micelles, *J Pharm Sci*, 91, 1463-1473.

- Gerçek, I., Tıǧlı, R.S., Gümüřderelioǧlu, M., 2007, A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying, *J Biomed Mater Res*, gönderildi.
- Gerstenberger, D.C., Solanki, R., Collins, G.J., 1980, Hollow cathode metal ion lasers, *IEEE J. Quant. Electron*, QE, 16, 820-834.
- Goossens, O., Dekempeneer, E., Vangeneugden, d., Van de Leest, R., Leys C., 2001, Application of atmospheric pressure dielectric barrier discharges in deposition, cleaning and activation, *surf. Coat. Technol.*, 142-144, 474-481.
- Griffith, L.G., Wu, B.M., Borland, S.W., ve ark., 1977, In vitro organogenesis of liver tissue, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 831, 382-397.
- Griffiths, B., 2000, Animal cell products, overview. Spier RE, editor. *Encyclopedia of cell technology*, New York, Wiley, 70-76.
- Grill, A., 1994, Cold plasma in materials fabrication: from fundamentals to applications, *IEEE Press*, New York.
- Grosskinsky, U., 2006, Biomaterial regulations for tissue engineering, *Desalination*, 199, 265-267.
- Gruvenket, S., Rao, G.M., Komath, M., Raichur, A.M., 2004, Plasma surface modification of polystyrene and polyethylene, *Applied Surface Science*, 236, 278-284.
- Gumbiner, B.M., Yamada, K.M., 1995, Cell-to cell contact and extracellular matrix, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 615-618.
- Gümüřderelioǧlu, M., Türkoǧlu, H., 2002, Biomodification of non-woven polyester fabrics by insulin and RGD for use in serum-free cultivation of tissue cells, *Biomaterials*, 23, 3927-3935.
- Gupta, B., Hilborn, J., Hollenstein, C.H., Plummer, C.J., Houriet, R., Xanthopoulos, N., 2000, Surface modification of polyester films by RF plasma, *Journal of Applied Polymer Science*, 78, 1083-1091.
- Gupta, B., Plummer, C., Bisson, I., Frey, P., Hilborn, J., 2002, Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films, *Biomaterials*, 23, 863-871.
- Harris, L.D., Kim, B.S., Mooney, D.J., 1998, Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming, *J. Biomed. Mater. Res.* 42, 396-402.
- Hartgerink, J.D., Beniash, E., Stupp, S.I., 2001, Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers, *Science*, 294, 1684-1688.
- Hartgerink, J.D., Beniash, E., Stupp, S.I., 2002, Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials,

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 5133-5138.

- Hatakeyama, H., Kikuchi, A., Yamato, M., Okano, T., 2005, Influence of insulin immobilization to thermoresponsive culture surfaces on cell proliferation and thermally induced cell detachment, *Biomaterials*, 26, 5167–5176.
- Hatakeyama, H., Kikuchi, A., Yamato, M., Okano, T., 2006, Bio-functionalized thermoresponsive interfaces facilitating cell adhesion and proliferation, *Biomaterials*, 27, 5069-5078.
- Hay, E.D., 1991, *Cell biology of extracellular matrix*, Plenum Press, NY.
- He, Wei., Ma, Z.W., Yong, T., Teo, W.E., Ramakrishna, S., 2005, Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth, *Biomaterials*, 26, 7606–7615.
- Heiman, R.B., 2006, Thermal spraying of biomaterials, *Surface&Coating Tech.*, 201, 2012-2019.
- Herman, H., 1988, Plasma-sprayed coatings, *Sci. Am.*, 259(3), 112-117.
- Hill, D., 1998, *Design Engineering of Biomaterials for Medical Devices*, Wiley, New York.
- Hirsh, J., Warkentin, T.E., Shaughnessy, S.G., Anand, S.S., Halperin, J.L., Raschke, R., Granger, C., Ohman, E.M., Dalen, J.E., 2001, Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety, *Chest*, 119, 64–94.
- Hoffman, A.S., 1977, Medical application of polymeric fibers, *J. Appl. Polym. Sci., Appl. Poly. Symp.*, 31, 313.
- Honda, M., Morikawa, N., Hata, K., Yada, T., Morita, S., Ueda, M., Kimata, K., 2003, Rat costochondral cell characteristics on poly(L-lactide-co-  $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds, *Biomaterials*, 24, 3511-3519.
- Hsu, S., Chen, W.C., 2000, Improved cell adhesion by plasma-induced grafting of L-lactide onto polyurethane surface, *Biomaterials*, 21, 359-367.
- Hsu, Y.Y., Gresser, J.D., Trantolo, D.J., et al., 1997, Effect of polymer foam morphology and density on kinetics of in vitro controlled release of isoniazid from compressed foam matrices, *J. Biomed. Mater. Res.*, 35, 107-116.
- Hu, Y., Winn, S.R., Krajchich, I., Hollinger, J.O., 2003, Porous polymer scaffolds surface-modified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation in vitro, *Journal Of Biomedical Materials Research. Part A*, 64, 583-590.
- Hubbell, J.A., 1999, Bioactive biomaterials, *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 123-129.

- Hutmacher, D.W. 2000, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, 21, 2529-2543.
- Hutmacher, D.W., 2001, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - State of the art and future perspectives, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 12, 107–124.
- Hutmacher, D.W., Schantz, T., Zein, I., Ng, K.W., Teoh, S.H., Tan, K.C., 2001, Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling, *J Biomed Mater Res*, 55, 203-216.
- Ikada, Y., 1994, Surface modification of polymers for medical applications, *Biomaterials*, 15, 725.
- Inagaki, N., 1996, Plasma-surface modification and plasma polymerization, Technomic Publishing Company, Inc., Pennsylvania.
- International Labor Organization, 2003. Material Safety Data Sheet (MSDS), ICSC 1507.
- Ito, Y., Imanishi, Y., 1994, A biomaterial as a strong biosignal, *Polym News*, 19, 198-202.
- Ito, Y., Imanishi, Y., Yonezawa, K., Kasuga, M., 1996, A protein-free cell culture on an artificial substrata covalently immobilized with insulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 3598-3601.
- Ito, Y., Inoue, M., Liu, S.Q., Imanishi, Y., 1993, Cell growth on immobilized cell growth factor. 6. Enhancement of fibroblast cell growth by immobilized insulin and/or fibronectin, *J Biomed Mater Res*, 27, 901-907.
- Ito, Y., Zheng, J., Imanishi, Y., 1997, Enhancement of cell growth on a porous membrane co-immobilized with cell growth and cell adhesion factors, *Biomaterials*, 197-202.
- Ito, Yoshihiro, Imanishi, Y., 1987, Attachment and proliferation of fibroblast cells on polyetherurethane urea derivatives, *Biomaterials*, 464-472.
- Jackson, R.L., Busch, S.J., Cardin, A.D., 1991, Glycosaminoglycans: Molecular properties, proteins interactions and role in physiological processes, *Physiol. Rev.*, 71, 481–539.
- Jones, D.S., Djokic, J., McCoy, C.P., Gorman, S.P., 2002, Poly (ε-caprolactone) and poly (ε-caprolactone)-polyvinylpyrrolidone-iodine blends as urethral biomaterials: characterisation of mechanical and surface properties, degradation and resistance to encrustation in vitro, *Biomaterials*, 23, 4449-4458.
- Kadouri, A., Bohak, Z., Sussman, M.V., Feldman, A.F., 1989, Nonwoven fabric microcarriers for mammalian cell culture, *Book of Papers-The*

International Non-woven Fabrics Conference, Association of the Nonwoven Fabric Industry (INDA), Philadelphia, 477.

- Kallrot, M., Edlund, U., Albertsson, A.C., 2006, Surface functionalization of degradable polymers by covalent grafting, *Biomaterials*, 27, 1788-1796.
- Kang, I.K., Choi, S.H., Shin, D.S., Yoon, S.C., 2001, Surface modification of polyhydroxyalkanoate films and their interaction with human fibroblasts, *Int J Biol Macromol*, 28, 205-212.
- Kang, I.K., Kwon, O.H., Lee, Y.M., Sung, Y.K., 1996, Preparation and surface characterization of functional group-grafted and heparin-immobilized polyurethanes prepared by plasma glow discharge, *Biomaterials*, 17, 841-847.
- Karlgard, C.C.S., Sarkar, D.K., Jones, L.W., Moresoli, C., Leung, K.T., 2004, Drying methods for XPS analysis of PureVision<sup>TM</sup>, Focus<sup>R</sup> Night&Day<sup>TM</sup> and conventional hydrogel contact lenses, *Applied Surface Science*, 230, 106–114.
- Kern, W., Vossen, J.L., 1978, *Thin film processes*, Academic Press, New York.
- Kiaei, D., Hoffman, A.S., Ratner, B.D., Horbett, T.A., Reynolds, L.O., 1988, Interaction of blood with gas discharge-treated vascular grafts, *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.*, 42, 269.
- Kim, B.S., Nikolovski, J., Bonadio, J., Smiley, E., Money, D.J., 1999, Engineered smooth muscle tissues: regulating cell phenotype with scaffolds. *Experimental Cell Research*, 251, 318-328.
- Kim, S.S., Utsunomiya, H., Koski, J.A., et al., 1998, Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels, *Ann. Surg.* 228, 8-13.
- Kim, Y.J., Kang, I.K., Huh, M.W., Yoon, S.C., 2000, Surface characterization and in vitro blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge, *Biomaterials*, 21, 121-130.
- Klenkler, B.J., Griffith, M., Becerril, C., West-Mays, J.A., Sheardown, H., 2005, EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications, *Biomaterials*, 26, 7286-7296.
- Knetsch, M.L.W., Aldenhoff, Y.B.J., Koole, L.H., 2006, The effect of high-density-lipoprotein on thrombus formation on and endothelial cell attachment to biomaterial surfaces, *Biomaterials*, 27, 2813–2819.
- Koleske, J.V., 1978, Blends containing poly- $\epsilon$ -caprolactone and related polymers. In "Polymer Blends" (Paul, O.R., Newman, S., eds.), Academic Press, New York, 369-389.

- Kompier, R., Kislev, N., Degal, I., Kadouri, A., 1991, Use of a stationary bed reactor and serum-free medium for the production of recombinant proteins in insect cells, *Enzyme Microb. Technology*, 13, 822-827.
- Konuma, M., 1992, *Film deposition by plasma techniques*, Springer, New York.
- Kuo, C.K., Ma, P.X., 2001, Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties, *Biomaterials*, 22, 511-521.
- Langer, R, Vacanti, J.P., 1993, *Tissue engineering*, Science, 260, 920-926.
- Larsena, C.C., Kligman, F., Kottke-Marchanta, K., Marchant, R.E., 2006, The effect of RGD fluorosurfactant polymer modification of ePTFE on endothelial cell adhesion, growth, and function, *Biomaterials*, 27, 4846–4855.
- Latkany, R., ve ark., 1997, Plasma surface modification of artificial corneas for optimal epithelization, *J. Biomed. Mater. Res.*, 36, 29-37.
- Laurencin, C.T., Attawia, M.A., Lu, L.Q., Borden, M.D., Lu, H.H., Gorum, W.J., Lieberman, J.R., 2001, Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells: a regional gene therapy approach to bone regeneration, *Biomaterials*, 22, 1271-1278.
- Lee, H., Cusick, R.A., Browne, F., Ho K., Ma, P.X., Utsunomiya, H., Langer, R., Vacanti, J.P., 2002, Local delivery of basic fibroblast growth factor increases both angiogenesis and engraftment of hepatocytes in tissue-engineered polymer devices, *Transplantation*, 73, 1589-1593.
- Lee, J.H., Lee, H.B., 1993, A wettability gradient as a tool to study protein adsorption and cell adhesion on polymer surfaces, *J Biomater Sci Polym Ed*, 5, 467-481.
- Li, S., Vert, M., Zhuo, R., 2003, Enzyme-catalyzed polymerization and degradation of copolymers prepared from  $\epsilon$ -caprolactone and poly(ethylene glycol), *Polymer*, 44, 5145-5151.
- Liang, S., Zhang, L., Jian Xu, J., 2007, Morphology and permeability of cellulose/chitin blend membranes, *Journal of Membrane Science*, 287, 19–28.
- Lieberman, M.A., Lichtenberg, A.J., 1994, *Principles of plasma discharges and materials processing*, Wiley, New York.
- Lin, WJ, Lu, C.H., 2002, Characterization and permeation of microporous poly( $\epsilon$ -caprolactone) films, *J Membrane Science*, 198,109-118.
- Little, C.E.,1999, *Metal vapor lasers*, Wiley, Chichester.

- Liu, S.Q., Ito, Y., Imanishi, Y., 1992, Cell growth on immobilized cell growth factor I. Acceleration of the growth of fibroblast cells on insulin-immobilized polymer matrix in culture medium without serum, *Biomaterials*, 13, 50-58.
- Liu, S.Q., Ito, Y., Imanishi, Y., 1993, Cell growth on immobilized cell growth factor. 7. Protein-free cell culture by using growth-factor-immobilized polymer membrane, *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 167-172.
- Lo, H., Ponticiello, M.S., Leong, K.W., 1995, Fabrication of controlled release biodegradable foams by phase separation, *Tissue Eng.*, 1, 15-27.
- Lundberg, R.D., Koleske, J.V., Wischmann, K.B., 1969, Lactone polymers. III. Polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone, *J Polym Sci*, 7:2915–2930.
- Luu, Y.K., Kim, K., Hsiao, B.S., Chu, B., Hadjiargyrou, M., 2003, Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers, *Journal of Controlled Release*, 89, 341-353.
- Ma P.X., 2004, Scaffolds for tissue fabrications, *Mater Today*, 7, 30-40.
- Ma, P. X., and Zhang, R., 2000, Fibrillar Matrices, US Patent 6,146, 892.
- Ma, P. X., and Zhang, R., 2001, Porous composite materials, US Patent 6, 281-257.
- Ma, P.X., 2004, Scaffolds for tissue fabrications, *Mater. Today*, 7, 30-40.
- Ma, P.X., 2004, Tissue Engineering. In: J.I. Kroschwitz, Editor, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* (3<sup>rd</sup> Edition ed.), John Wiley & Sons, NJ.
- Mac Rae, D.R., 1989, Plasma arc process systems, reactors, and applications, *Plasma Chem. Plasma Process*, 9 (1, suppl), 135S-65S.
- Mahoney, M.J., Saltzman, W.M., 2001, Transplantation of brain cells assembled around a programmable synthetic microenvironment, *Nature Biotechnology*, 19, 934-939.
- Mann, B.K., West, J.L., 2002, Cell adhesion peptides alter smooth muscle cell adhesion, proliferation, migration, and matrix protein synthesis on modified surfaces and in polymer scaffolds, *J Biomed Mater Res*, 60, 86–93.
- Maroudas, N.G., 1975, Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. *J Theor Biol*, 49, 417–42.
- Mathews, J.E., Wnek Garry, E., Simpson David, G., Bowlin Garry, L., 2002, Electrospinning of collagen nanofibers, *Biomacromolecules*, 3, 232-238.
- McGeachie, J., Tennant, M., 1997, Growth factors and their implications for clinicians: A brief review, *Aust Dent J*, 42, (6), 375-380.



- Meyer-Plath, A.A., Schröder, K., Finke, B., Ohl, A., 2002, Current trends in biomaterial surface functionalization nitrogen-containing plasma assisted processes with enhanced selectivity, *Vacuum*, 71, 391-406.
- Midha, R., Munro, C.A., Dalton, P.D., Tator, C.H., Shoichet, M.S., 2003, Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube, *Journal Of Neurosurgery*, 99, 555-565.
- Mikos, A.G., Lyman, M.D., Freed, L.E., ve ark., 1994, Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic) foams for tissue culture, *Biomaterials*, 15, 55-58.
- Mikos, A.G., Sarakinos, G., Leite, S.M., ve ark., 1993a, Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation, *J. Biomed. Mater. Res.* 27, 183-189.
- Mikos, A.G., Sarakinos, G., Leite, S.M., ve ark., 1993b, Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering, *Biomaterials*, 14, 323-330.
- Mironov, V., ve ark., 2003, Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.*, 21, 157–161.
- Mooney, D.J., Baldwin, D.F., Suh, N.P., ve ark., 1996b, Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents, *Biomaterials*, 17, 1417-1422.
- Mooney, D.J., Kaufmann, P.M., Sano, K., ve ark., 1994, Transplantation of hepatocytes using porous, biodegradable sponges, *Transplant. Proc.*, 26, 3425-3426.
- Mooney, D.J., Mazzoni, C.L., Breuer, C., ve ark., 1996a, Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering, *Biomaterials*, 17, 115-124.
- Mueller, S.M., Shortkro, S., Schneider, T.O., Breinan, H.A., Yannas, I.V., Spector, M., 1999, Meniscus cells seeded in type I and type II collagen-GAG matrices in vitro, *Biomaterials*, 20, 701,709.
- Nam, Y.S., Park, T.G., 1999, Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation, *J Biomed Mater Res*, 47, 8–17.
- Nasser, E., 1971, *Fundamentals of gaseous ionization and plasma electronics*, New York, New York, Wiley Interscience.
- Nitschke, M., Schmack, G., Janke, A., Simon, F., Pleul, D., Werner, C., 2002, Low pressure plasma treatment of poly(3-hydroxybutyrate): toward tailored polymer surfaces for tissue engineering scaffolds, *Journal Of Biomedical Materials Research*, 632-638.
- Noh, B.I., Seok, C.S., Moon, W.C., Junga, S.B., 2007, Effect of plasma treatment on adhesion characteristics at interfaces between underfill and substrate, *International Journal of Adhesion & Adhesives*, 27, 200-206.

- Nojiri, C., Noishiki, Y., Koyanagi, H., 1987, Aorta-coronary bypass grafting with heparinised vascular grafts in dogs, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 93, 867-877.
- Oehr, C., 2003, Plasma surface modification of polymers for biomedical use, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 208, 40–47.
- Ohl, A., Schröder, K., 1999, Plasma-induced chemical micropatterning for cell culturing applications: a brief review, *Surface and Coatings Technology*, 116-119, 820-830.
- Pachence, J.M., Kohn, J., 2000, Biodegradable Polymers. In: R.P. Lanza et al., *Principles of Tissue Engineering (2<sup>nd</sup> Edition ed.)*, Academic Press, San Diego, p. 263.
- Park, A., Wu, B., Griffith, L.G., 1998, Integration of surface modification and 3D fabrication techniques to prepare patterned poly(L-lactide) substrates allowing regionally selective cell adhesion, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 9, 89-110.
- Patric, C.W., Mikos, A.G., McIntire, L.V., 1988, *Frontiers in tissue engineering*, Oxford: Pergamon Press.
- Peter, S.J., Kim, P., Yasko, A.W., ve ark., 1999b, Crosslinking characteristics of an injectable poly(propylene fumarate)/ $\beta$ -tricalcium phosphate paste and mechanical properties of the crosslinked composite for use as a biodegradable bone cement, *J. Biomed. Mater. Res.*, 44, 314-321.
- Peter, S.J., Miller, S.T., Zhu, G., ve ark., 1998, In vivo degradation of a poly(propylene fumarate)/  $\beta$ -tricalcium phosphate injectable composite scaffold, *J. Biomed. Mater. Res.*, 41, 1-7.
- Peter, S.J., Nolley, J.A., Widmer, M.S., ve ark., 1997, In vitro degradation of a poly(propylene fumarate)/  $\beta$ -tricalcium phosphate injectable composite scaffold, *Tissue Eng.*, 3, 207-215.
- Peter, S.J., Suggs, L.J., Yaszemski, M.J., ve ark., 1999a, Synthesis of poly(propylene fumarate) by acylation of propylen glycol in the presence of proton scavenger, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 10, 363-373.
- Pitt, C.G., 1990, Poly- $\epsilon$ -caprolactone and its copolymers. In "Biodegradable polymers as drug delivery systems, Chasin, M., Langer, R., eds., Dekker, New York, 71-119.
- Pitt, C.G., Andrady, A.L., Bao, Y.T., Sarnuci, N.K.P., 1987, Estimation of the rate of drug diffusion in polymers, *Am. Chem. Soc.*, 348, 49-77.
- Pitt, C.G., Chasalow, F.I., Hibionada, Y.M., Klimas, D.M., Schindler, A., 1981a, Aliphatic polyesters. The degradation of poly- $\epsilon$ -caprolactone in vivo. *J. Appl. Polym. Sci.*, 28, 3779-3787.

- Pitt, C.G., Gratzl, M.M., Kimmel, G.L., Surles, J., Schindler, A., 1981b, Aliphatic polyesters. II. The degradation of poly-d,l-caprolactone, and their copolymer in vivo, *Biomaterials*, 2, 215-220.
- Pitt, C.G., Hendren, R.W., Schindler, A., Woodward, S.C., 1984, The enzymatic surface erosion of aliphatic polyesters, *J. Controlled Release*, 1, 3-14.
- Pompe, T., Kellera, K., Mothes, G., Nitschke, M., Mark Teese, M., Zimmermann, R., Werner, C., 2007, Surface modification of poly(hydroxybutyrate) films to control cell–matrix adhesion, *Biomaterials*, 28, 28–37.
- Qu, X., Cui, W., Yang, F., Min, C., Shen, H., Bei, J., Wang, S., 2007, The effect of oxygen plasma pretreatment and incubation in modified simulated body fluids on the formation of bone-like apatite on poly(lactide-co-glycolide) (70/30), *Biomaterials*, 28, 9–18.
- Raizer, Y.P., 1991, *Gas discharge physics*, Springer, New York.
- Raizer, Y.P., Schneider, M.N., Yatsenko, N.A., 1995, *Radio-frequency capacitive discharges*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ramsey, W.S., Hertl, W., Nowland, E.D., Binkowski, N.J., 1984, Surface treatments and cell attachments, *In Vitro Cell Dev Biol*, 20, 802-808.
- Ratner, B.D., Chilkoti, A., Lopez, G.P., 1990, Plasma deposition and treatment for biomedical applications, in *Plasma Deposition, treatment and Etching of Polymers*, edited by R. d'Agostino, Academic Press, San Diego, CA, p. 463-516.
- Ratner, B.D., Hoffman, F.J., Schoen, F.J., Lemons, J.E., 1996, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Vol. 2, Academic Press, New York.
- Reddy, S.T., Swartz, M.A., Hubbell, J.A., 2006, Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines, *Trends in Immunology*, 27, 573-579.
- Romero-Sanchez, M.D., Martin-Martinez, J.M., 2006, Surface modifications of vulcanized SBR rubber by treatment with atmospheric pressure plasma torch, *Int. J. of Adhesion&Adhesives*, 26, 345-354.
- Roth, J.R., Sherman, D.M., Gadri, R.B., Karakaya, F., Chen, Z., Montie, T.C., Kelly-Winterberg, K., 2000, A remote exposure reactor for plasma processing and sterilization by plasma active species at one atmosphere, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 28, 56-63.
- Sacholos, E., Czernuszka, J.T., 2003, Making tissue engineering scaffold work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur. Cell.Mater.*, 5, 29–40.
- Samuel, M.S., Cheung, J.C., Kornelson, M.A., Aaron, J.M., 2007, Regulation of phosphoinositide 3-kinase signaling by oxidants: Hydrogen peroxide

selectively enhances immunoreceptor-induced recruitment of phosphatidylinositol (3,4) bisphosphate-binding PH domain proteins, *Cellular Signalling*, 19, 902–912.

- Sarazin, P., Roy, X., Favis, B.D., 2004, Controlled preparation and properties of porous poly(L-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers, *Biomaterials*, 25, 5965-5978.
- Sarkar, S., Lee, G.Y., Wong, J.Y., Desai, T.A., 2006, Development and characterization of a porous micro-patterned scaffold for vascular tissue engineering applications, *Biomaterials*, 27, 4775-4782.
- Sasisekharan, R., Venkataraman, G., 2000, Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function, *Curr Opin Chem Biol*, 4, 626–631.
- Şaşmazel, Türkoğlu, H., Aday, S., Gümuşderelioğlu, M., 2007, baskıda, “Insulin and heparin coimmobilized 3D Polyester Fabrics for the Cultivation of Fibroblasts in Low-Serum Media”, *International Journal of Biological Macromolecules*”.
- Sedmak, J.J., and Grossberg, S.E., 1977, A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250, *Anal. Biochem.*, 79, 544-552.
- Serrano, M.C, Pagani, R., Pena, J., Portoles, M.T., 2005, Transitory oxidative stress in L929 fibroblasts cultured on poly( $\epsilon$ -caprolactone) films, *Biomaterials*, 26, 5827–5834.
- Serrano, M.C., Pagani, R., Vallet-Regi, M., Pena, J., Ramila, A., Izquierdo, I., et al., 2004, In vitro biocompatibility assessment of poly( $\epsilon$ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts, *Biomaterials*, 25, 5603–5611.
- Shalaby, S.W., 1996, Fabrics. In: Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F., editors, *Biomaterials science an introduction to materials in medicine*, San Diego, California, Academic Press, Inc., p. 118-124.
- Shanmugaraj, A.M., Kim, J.K., Ryu, S.H., 2006, Modification of rubber surface by UV surface grafting, *Appl Surface Sci*, 252, 5714-5722.
- Shapiro, L., Cohen, S., 1997, Novel alginate sponges for cell culture and transplantation, *Biomaterials*, 18, 583-590.
- Shen, M., Bell, A.T., 1979, Plasma polymerization, *ACS Symposium Series*, 108.
- Sherwood, J.K. ve ark., 2002, A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials* 23, 4739–4751.
- Sheu, M.S., Hoffman, A.S., Feijen, J., 1992, A glow-discharge treatment to immobilize poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide) surfactants for wetttable and non-fouling biomaterials, *J. Adhesion Sci.&Tech.*, 6, 995.

- Sheu, M.S., Hudson, D.M., Loh, I.H., 1995, Biomaterials surface modification using plasma gas discharge processes, in *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A. Materials*, edited by D.L. Wise, D.J., Trantolo, Altobelli, D.E., Yaszemski, M.J., J.D., Gresser, E.R., Schwartz, M., Dekker, New York, vol. 1, p. 865-894.
- Shi, H., Ratner, B.D., 2000, Template recognition of protein-imprinted polymer surfaces, *Journal Of Biomedical Materials Research*, 40, 1-11.
- Shigeta, M., Tanaka, T., Koike, N., Yamakawa, N., Usui, M., 2006, Suppression of fibroblast and bacterial adhesion by MPC coating on acrylic intraocular lenses, *J. Cataract Refract. Surg.*, 32, 859-866.
- Shin, H., Jo, S., Mikos, A.G., 2003, Biomimetic materials for tissue engineering, *Biomaterials*, 24, 4353-4364.
- Sosnik, A., Cohn, D., 2003, Poly(ethylene glycol)-poly(epsilon-caprolactone) block oligomers as injectable materials, *Polymer*, 44, 7033-7042.
- Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S., 1958, Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30, 1190-1206.
- Spehia, R., 1993, X-ray photoelectron spectroscopy studies, surface tension measurements, immobilization of human serum albumin, human fibrinogen and human fibronectin onto ammonia plasma treated surfaces of biomaterials useful for cardiovascular implants and artificial cornea implants, *Biomater. Art. Cells&Biotech.*, 21, 647.
- Tang, Z.G., Black, R.A., Curran, J.M., Hunt, J.A., Rhodes, N.P., Williams, D.F., 2004, Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly(epsilon-caprolactone) films, *Biomaterials*, 25, 4741-4748.
- Tessarolo, F., Caola, I., Nollo, G., Antolini, R., Guarrerad, G.M., Caciagli, P., 2006, Efficiency in endotoxin removal by a reprocessing protocol for electrophysiology catheters based on hydrogen peroxide plasma sterilization, *Int. J. Hyg. Environ.-Health*, 209, 557-565.
- Thomson, R.C., Yaszemski, M.J., Powers, J.M., ve ark., 1995, Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 7, 23-28.
- Thomson, R.C., Yaszemski, M.J., Powers, J.M., ve ark., 1998, Hydroxyapatite fiber reinforced poly(alpha-hydroxy ester) foams for bone regeneration, *Biomaterials*, 19, 1935-1943.
- Tidwell, C.D., Belu, A.M., Ratner, B.D., Tarasevich, B., Atre, S., Allara, D.L., 1997, *Transactions of the Society of Biomaterials*, 23rd Annual Meeting, 20, p. 203.
- Török, E., Pollok J.M., Ma, P.X., Vogel, C., Dandri, M., Petersen, J., Burda, M.R., Kaufmann, P.M., Kluth, D., Rogiers, X., 2001, *Digestive Surgery*, 18, (3), 196-203.

- Türkoğlu, H., 2001, Büyüme hormonlarıyla modifiye edilmiş NWPF disklerde hücre büyümesinin incelenmesi, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 92s.
- Underwood, P.A., Bean, P.A., Mitchell, S.M., Whitelock, J.M., 2001, Specific affinity depletion of cell adhesion molecules and growth factors from serum, *J Immuno Met*, 247, 217-224.
- Uyama, Y., Kato, K., Ikada, Y., 1998, Surface modification of polymers by grafting, *Adv Poly Sci Ser*, 137, 1-39.
- Van Wachem, P.B., Beugeling, T., Feyen, J., Bantjes, A., Detmers, J.P., van Aken, W.G., 1985, Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities, *Biomaterials*, 6, 403-408.
- Van Wachem, P.B., Hogt, A.H., Beugeling, T., Feyen, J., Bantjes, A., Detmers, J.P., van Aken W.G., 1987, Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge, *Biomaterials*, 8, 323-328.
- VandeVondele, S., Voros, J., Hubbell, J.A., 2003, RGD-grafted poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion, *Biotech Bioeng*, 83, 784-790.
- Venugopalan, M., 1971, Reaction under cold plasma conditions, New York, 1, Wiley/Interscience.
- Veprek, S., Venugopalan, M., 1980, Topics in current chemistry, Plasma chemistry III, Springer-Verlag, Berlin.
- Vogler, E.A., Bussian, R.W., 1987, Short-term cell-attachment rates: a surface-sensitive test of cell-substrate compatibility, *J Biomed Mater Res*, 21, 1197-1211.
- Wake, M.C., Gupta, P.K., Mikos, A.G., 1996, Fabrication of pliable biodegradable polymer foams to engineer soft tissues, *Cell Transplant.*, 5, 465-473.
- Wang, G., Zhang, W., Freedman, D., Eppstein, L., Kadouri, A., 1992, Modified celligen-packed bed bioreactors for hybridoma cell cultures, Presented at the Third Engineering Foundation Conference on Cell Culture Engineering, Palm Beach, Florida, February 2-8.
- Wang, Y., Kim, H.J., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L., 2006, Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials, *Biomaterials*, 27, 6064-6082.
- Wei, H., Ma, Z.W., Yong, T., Teo, W.E., Ramakrishna, S., 2005, Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth, *Biomaterials*, 26, 7606-7615.
- Weibel, D.E., Vilani, C., Habert, A.C., Achete, C.A., 2006, Surface modification of polyurethane membranes using RF-plasma treatment with polymerizable

- and non-polymerizable gases, *Surface & Coatings Technology*, 201, 4190–4194.
- Whang, K., Goldstick, T.K., Healy, K.E., 2000, A biodegradable polymer scaffold for delivery of osteotropic factors, 21, 2545-2551.
- Whang, K., Thomas, H., Healy, K.E., 1995, A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds, *Polymer*, 36, 837-841.
- Whitesides George, M., Grzybowski, B., 2002, Self-Assembly at all scales, *Science*, 295, 2418-2421.
- Widmer, M.S., Gupta, P.K., Lu, L., ve ark., 1998, Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration, *Biomaterials*, 19, 1945-1955.
- Wilheim, R., 1993, ECR plasma sources, in: Ferreira, C.M., Moisan M., (Eds.), *Microwave discharges*, NATO ASI series, series B: Physics 302, Plenum press, NY, s.161.
- Wilheim, R., 1999, ECR plasmas for thin-film deposition, in: Schlüter, H., Shivarova, A., (Eds.), *Advances technologies based on wave and beam generated plasmas*, NATO science series, vol. 67, Kluwer, Dordrecht, 111-122.
- Williams, D.F., Roaf, R., 1973, *Implants in Surgery*, Saunders, Toronto.
- Williams, J.M., Adewunmi, A., Schek, R.M., Flanagan, C.L., Krebsbach, P.H., Feinberg, S.E., et al., 2005, Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering, *Biomaterials*, 26, 4817-4827.
- Wilson, J., Hawkes, J.F.B., 1987, *Laser: Principles and applications*, Prentice Hall, New York.
- Wissink, M.J.B., Beernink, R., Pieper, J.S., Poot, A.A., Engbers, G.H.M., Beugeling, T., Aken, W.G., Feijen, J., 2000, Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation, *Biomaterials*, 22, 151-163.
- Wnek, G.E., Carr, M.E., Simpson, D.G., Bowlin, G.L., 2003, Electrospinning of nanofiber fibrinogen structures, *Nano Letters*, 3, 213-216.
- Woei, K., Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., ve ark., 2001, Evaluation of ultrathin poly(epsilon-caprolactone) films for tissue-engineered skin, *Tissue Eng*, 7, 441–5 5.
- Woo, K.M., Chen, W.J., Ma, P.X., 2003, Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment, *Journal Of Biomedical Materials Research. Part A*, 67, 531-537.

- Xiaohua, L., Ma, P.X., 2004, Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Annals Of Biomedical Engineering*, 32, 477-486.
- Yang, J., Bei, J., Wang, S., 2002, Enhanced cell affinity of poly(D,L-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage, *Biomaterials*, 23, 2607-2614.
- Yasuda, H.K., 1985, *Plasma polymerization*, Academic Press, New York.
- Yasuda, H.K., 1990, *Plasma polymerization and plasma interactions with polymeric materials*, Wiley, New York.
- Yaszemski, M.J., Payne, R.G., Hayes, W.C., et al., 1996, In vitro degradation of poly(propylene fumarate)-based composite material, *Biomaterials*, 17, 2127-2130.
- Young, E., Venner, T., Ribau, J., Shaughnessy, S., Hirsh, J., Podor, T.J., 1999, The binding of unfractionated heparin and low molecular weight heparin thrombin-activated human endothelial cells, *Thromb Res*, 96, 373-381.
- Yu, Y.C., Pakalns, T., Dori, Y., McCarthy, J.B., Tirrell, M., Fields, G.B., 1997, Construction of biologically active protein molecular architecture using self-assembling peptide-amphiphiles, *Methods in Enzymology*, 289, 571-587.
- Yu, Y.C., Roontga, V., Daragan, V.A., Mayo, K.H., Tirrell, M., Fields, G.B., 1999, Structure and dynamics of peptide-amphiphiles incorporating triple-helical protein-like molecular architecture, *Biochemistry*, 38, 1659-1668.
- Yuan, S., Szakalas-Gratzl, G., Ziats, N.P., Joacobsen, D.W., Kottke-Marchant, K., Marchant, R.E., 1993, Immobilization of high-affinity heparin oligosaccharides to radiofrequency plasma-modified polyethylene, *J. Biomed. Mat. Res.*, 27, 811.
- Zeng, R., Pang, Z., Zhu, H., 2001, Surface modification of ion exchange membrane (nafiontm) the enhancement of cation selectivity by plasma polymerization process, *Chem. J. Chin. Univ.*, 22, (4), 687-690.
- Zhang, R., Ma, P.X., 1999, Poly( $\alpha$ -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology, *J. Biomed. Mater. Res.* 44, 446-455.
- Zhang, R., Ma, P.X., 2001, Processing of polymer scaffolds: Phase separation. In: A. Atala and R. Lanza, Editors, *Methods of Tissue Engineering*, Academic Press, San Diego, p. 715.
- Zhang, R., Ma, P.X., 2004, Biomimetic polymer/apatite composite scaffolds for mineralized tissue engineering, *Macromolecular Bioscience*, 4, 100-111.



- Zhang, S., 2003, Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly, *Nature Biotechnology*, 21, 1171-1178.
- Zhang, S.W., Lan, H.Q., 2002, Developments of tribological research on ultrathin films, *Tribology International*, 35, 312-327.
- Zhou, S., Deng, X., Yang, H., 2003, Biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system, *Biomaterials*, 24, 3563-3570.

## EKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
EK 1. HÜCRE SAYIM YÖNTEMİ.....	200
EK 2. DÜŞÜK BASINÇ SU/O <sub>2</sub> PLAZMA MODİFİKASYONU SONRASI PCL YÜZEYLERDE OLUŞAN OH GRUBUNUN MİKTARSAL OLARAK TAYİNİ İÇİN KULLANILAN KALİBRASYON YÖNTEMİ ve GRAFİĞİ.....	201
EK 3. ATMOSFERİK BASINÇ SU/HAVA PLAZMA MODİFİKASYONU SONRASI PCL YÜZEYLERDE OLUŞAN OH GRUBUNUN MİKTARSAL OLARAK TAYİNİ İÇİN KULLANILAN KALİBRASYON YÖNTEMİ ve GRAFİĞİ.....	202
EK 4. DÜŞÜK BASINÇ SU/O <sub>2</sub> PLAZMA ARDINDAN OKSALİL KLORÜR MODİFİKASYONU ve ATMOSFERİK BASINÇ SU/HAVA PLAZMA MODİFİKASYONU SONRASI PCL YÜZEYLERDE OLUŞAN COOH GRUBUNUN MİKTARSAL OLARAK TAYİNİ İÇİN KULLANILAN KALİBRASYON YÖNTEMİ ve GRAFİĞİ.....	203
EK 5. POLİMERİK YÜZEYLERE İMMOBİLİZE EDİLEN PEO ve İNSÜLİN MİKTARININ TAYİNİ.....	204
EK 6. POLİMERİK YÜZEYLERE İMMOBİLİZE EDİLEN HEPARİN MİKTARININ TAYİNİ.....	205
EK 7. MTT YÖNTEMİ.....	206
EK 8. GİEMSA İle BOYAMA TEKNİĞİ.....	207
EK 9. KONFOKAL LAZER TARAMALI MİKROSKOP ile ANALİZ.....	208
EK 10. MODİFİYE EDİLMEMİŞ %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	209
EK 11. ATMOSFERİK BASINÇ SU/HAVA PLAZMA ile MODİFİYE EDİLMİŞ %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	210
EK 12. DÜŞÜK BASINÇ SU/O <sub>2</sub> PLAZMA ile MODİFİYE EDİLMİŞ %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	211
EK 13. OKSALİL KLORÜR ile FONKSİYONALİZE EDİLMİŞ %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	212
EK 14. PEO TAKILI %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	213
EK 15. İNSÜLİN İMMOBİLİZE %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	214
EK 16. HEPARİN İMMOBİLİZE %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	215

EK 17. MODİFİYE EDİLMEMİŞ NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	216
EK 18. ATMOSFERİK BASINÇ SU/HAVA PLAZMA ile MODİFİYE EDİLMİŞ NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	217
EK 19. DÜŞÜK BASINÇ SU/O <sub>2</sub> PLAZMA ile MODİFİYE EDİLMİŞ NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	218
EK 20. OKSALİL KLORÜR ile FONKSİYONALİZE EDİLMİŞ NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	219
EK 21. PEO TAKILI NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	220
EK 22. İNSÜLİN İMMOBİLİZE NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	221
EK 23. HEPARİN İMMOBİLİZE NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU.....	222

## EK 1

### HÜCRE SAYIM YÖNTEMİ

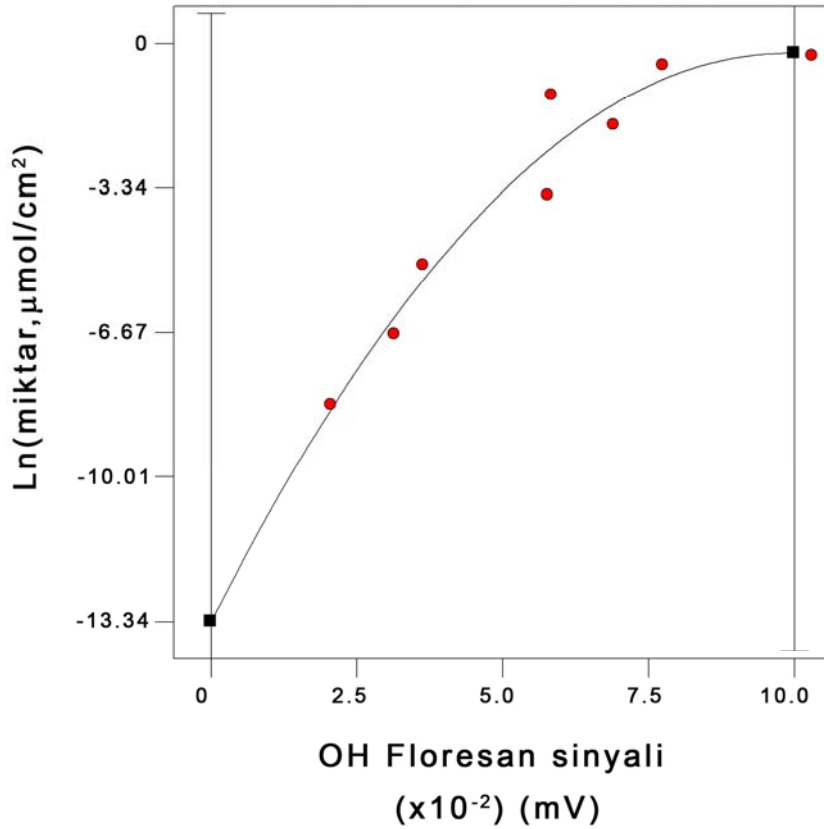
Hücre sayımının amacı, kültür ortamında bulunan hücrelerin sağlıklı olup olmadıklarının belirlenerek hücre veriminin saptanmasıdır.

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 boyanmamış hücre karışımından bir damla alınarak, hemositometrede lam ve lamel arasına konur, mikroskopta (0.4x10:400 kez büyütürek) 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 9'a bölünür, çıkan sayı  $10^{-4}$  ile çarpılır ve 1 ml'deki hücre miktarı bulunmuş olur.

## EK 2

### DÜŞÜK BASINÇ SU/O<sub>2</sub> PLAZMA MODİFİKASYONU SONRASI PCL YÜZEYLERDE OLUŞAN OH GRUBUNUN MİKTARSAK OLARAK TAYİNİ İÇİN KULLANILAN KALİBRASYON YÖNTEMİ ve GRAFİĞİ

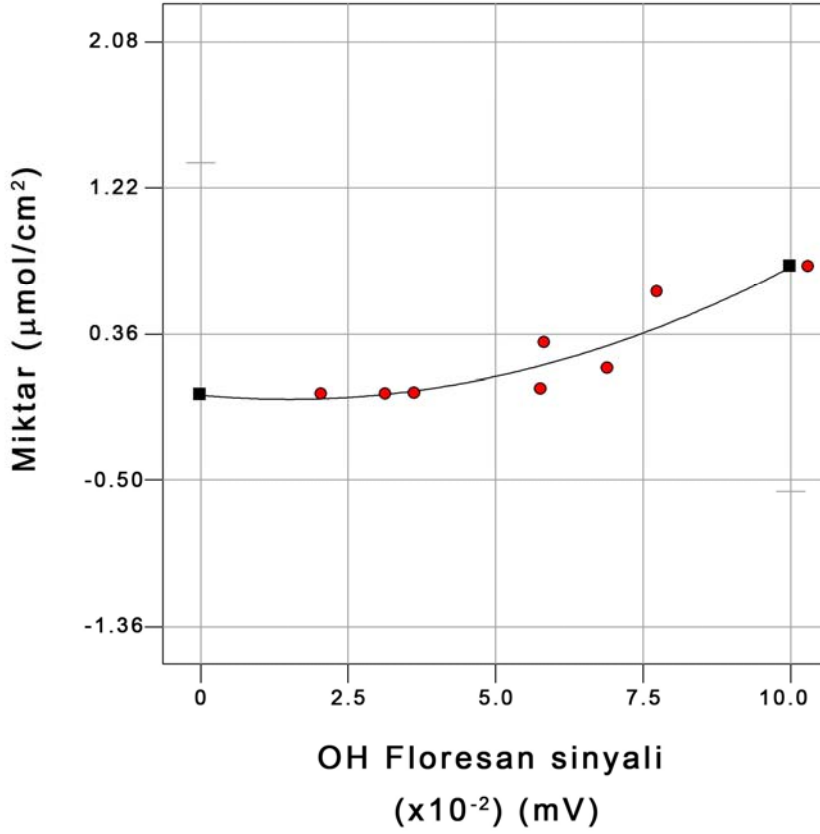
Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma modifikasyonu sonrası polimerik yüzeylerde oluşan OH grubunun tayini için gerekli kalibrasyon grafiği, PCL disklerin (12.5 mm çaplı) üzerine 3 mm lik alana yayılacak şekilde kromatografik şırınga ile (1 – 5 µL) 9-antrasen karboksilik asid/eter çözeltisinin damlatılmasıyla elde edilmiştir. OH tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir.



### EK 3

#### ATMOSFERİK BASINÇ SU/HAVA PLAZMA MODİFİKASYONU SONRASI PCL YÜZEYLERDE OLUŞAN OH GRUBUNUN MİKTARSAK OLARAK TAYİNİ İÇİN KULLANILAN KALİBRASYON YÖNTEMİ ve GRAFİĞİ

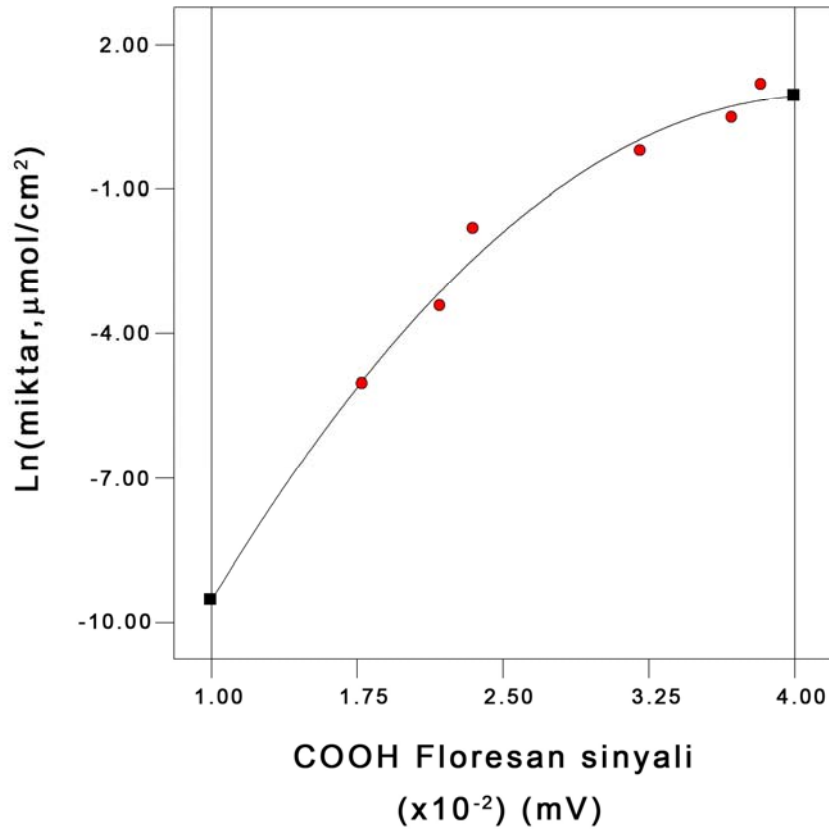
Atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu sonrası polimerik yüzeylerde oluşan OH grubunun tayini için gerekli kalibrasyon grafiği, PCL disklerin (12.5 mm çaplı) üzerine 3 mm lik alana yayılacak şekilde kromatografik şırınga ile (1 – 5 µL) 9-antrasen karboksilik asid/eter çözeltisinin (2.36 mg/ml) damlatılmasıyla elde edilmiştir. OH tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir.



#### EK 4

### DÜŞÜK BASINÇ SU/O<sub>2</sub> PLAZMA ARDINDAN OKSALİL KLORÜR MODİFİKASYONU ve ATMOSFERİK BASINÇ SU/HAVA PLAZMA MODİFİKASYONU SONRASI PCL YÜZEYLERDE OLUŞAN COOH GRUBUNUN MİKTARSAL OLARAK TAYİNİ İÇİN KULLANILAN KALİBRASYON YÖNTEMİ ve GRAFİĞİ

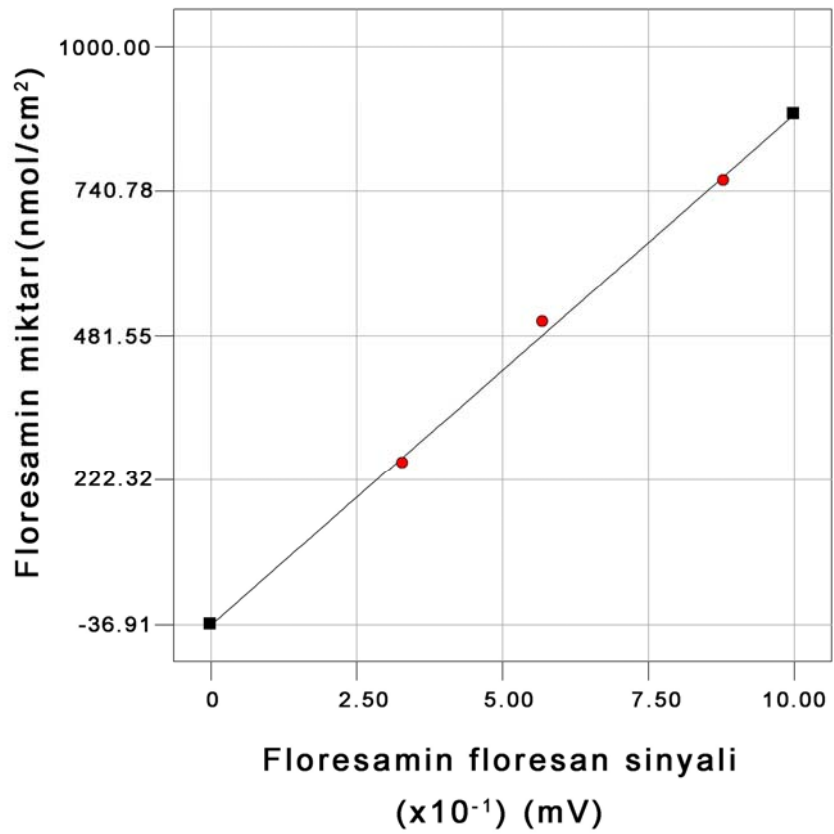
Düşük basınç su/O<sub>2</sub> plazma ardından oksalil klorür fonksiyonizasyonu ve atmosferik basınç su/hava plazma modifikasyonu sonrası polimerik yüzeylerde oluşan COOH grubunun tayini için gerekli kalibrasyon grafiği, PCL disklerin (12.5 mm çaplı) üzerine 3 mm lik alana yayılacak şekilde kromatografik şırınga ile (1 – 5 µL) 9-antrasen metanol/eter çözeltisinin damlatılmasıyla elde edilmiştir. COOH tayini için kullanılan kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir.



## EK 5

### POLİMERİK YÜZEYLERE İMMOBİLİZE EDİLEN PEO ve İNSÜLİN MİKTARININ TAYİNİ

Polimerik yapılara takılı PEO ve immobilize insülin miktarının kantitatif olarak tayininde kullanılan metodun kalibrasyonu için, PCL disklerin (12.5 mm) üzerine 3 mm'lik alana yayılacak şekilde kromatografik şırınga ile (10 – 30  $\mu\text{L}$ ) floresamin+propilamin/aseton çözeltisi damlatılmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir.

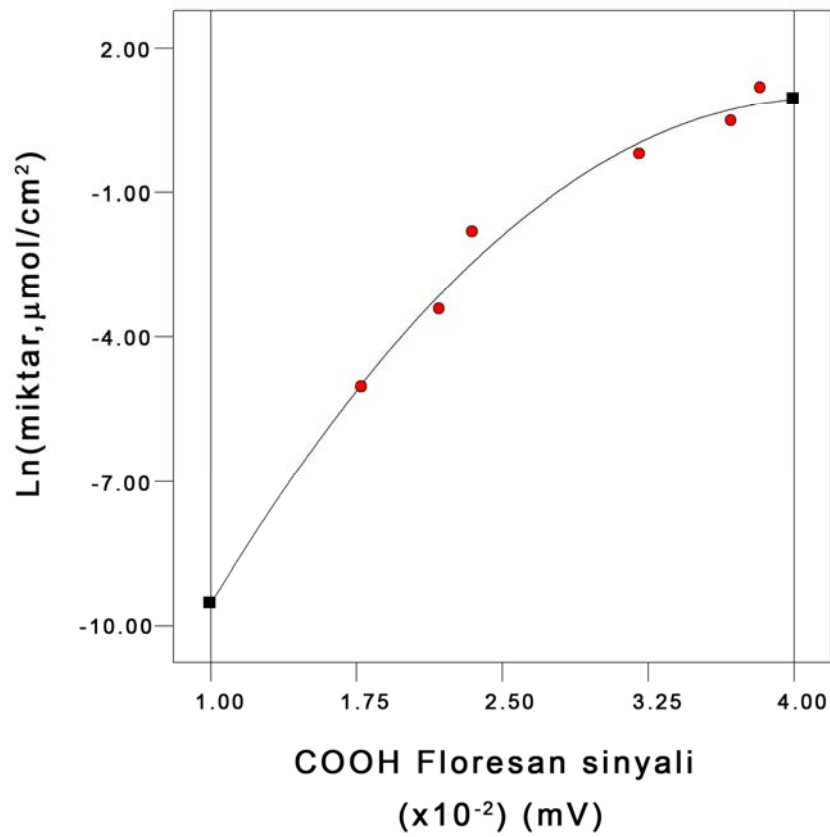




## EK 6

### POLİMERİK YÜZEYLERE İMMOBİLİZE EDİLEN HEPARİN MİKTARININ TAYİNİ

Polimerik yüzeylere immobilize edilen heparinin miktarsal olarak tayini için heparinde bulunan COOH gruplarından yararlandırılmıştır. Tayin için gerekli kalibrasyon grafiği, PCL disklerin (12.5 mm çaplı) üzerine 3 mm lik alana yayılacak şekilde kromatografik şırınga ile (1 – 5  $\mu$ L) 9-antrasen metanol/eter çözeltisinin damlatılmasıyla elde edilmiştir. Kullanılan kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir.



## EK 7

### MTT YÖNTEMİ

MTT yöntemi basit ve tekrarlanabilir sonuçların alındığı kolorimetrik bir yöntemdir ve tetrazolium tuzunun canlı hücrenin mitokondriye ait bazı enzimleri tarafından, hücre içinde çözünmeyen pembe renkli “formazan” maddesine dönüşmesi esasına dayanır. Formazan asidik izopropanol ile çözdürülür ve 540 ya da 570 nm dalga boyunda optik yoğunluğu kaydedilir. Hücre sayısı bilinen farklı hücre kültür örnekleri için optik değerler kaydedilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir.

- 2.5 mg MTT 1 ml PBS içerisinde çözülür (1 mg/ml)  
(Stok çözelti: 1 g MTT 500 ml çözelti çözdürülür).
- Örnekler inkübatörden alınıp laminar akış hücresine koyulur ve üstteki kültür ortamı atılır.
- Ölü hücrelerin ve hücre derbislerinin atılması için PBS (pH 7.4) ile yıkama işlemi gerçekleştirilir.
- Örnekler 600 µl Dulbecco's Modified Medium (DMEM) ve 60 µl MTT çözeltisi eklenerek 37°C'de 3 saat boyunca inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrası üstteki çözelti atılır ve örnekler başka petri kabına taşınır.
- 400 µl 0,04 M HCl'de çözülmüş izopropanol eklenir ve oluşan formazan kristalinin çözülmesi beklenir. Örnekler içerisinde formazan kristali kalmayacak şekilde pipetlenir.
- Boya çözeltisi 1,5 ml Ependorf tüpüne alınır ve 13000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüjlenir.
- 200 µl süpernetant alınıp 96 gözlü plate reader'a alınır.
- Mikroplate spektrofotometre kullanılarak 540 nm'de süpernetant yoğunluğu optik olarak okunur.

## **EK 8**

### **GIEMSA İle BOYAMA TEKNİĞİ**

- Boyama yapılacak örnekler  $\cong$  5 dakika havada kurumaya bırakılır.
- 10-15 saniye boyunca boyanın içine daldırılır.
- 15-30 saniye için distile veya deiyonize su içinde tutulur.
- Örnekler birkaç saniye süreyle tekrar taze distile veya deiyonize su içerisine daldırılarak yıkanır ve havayla kurumaya bırakılır.

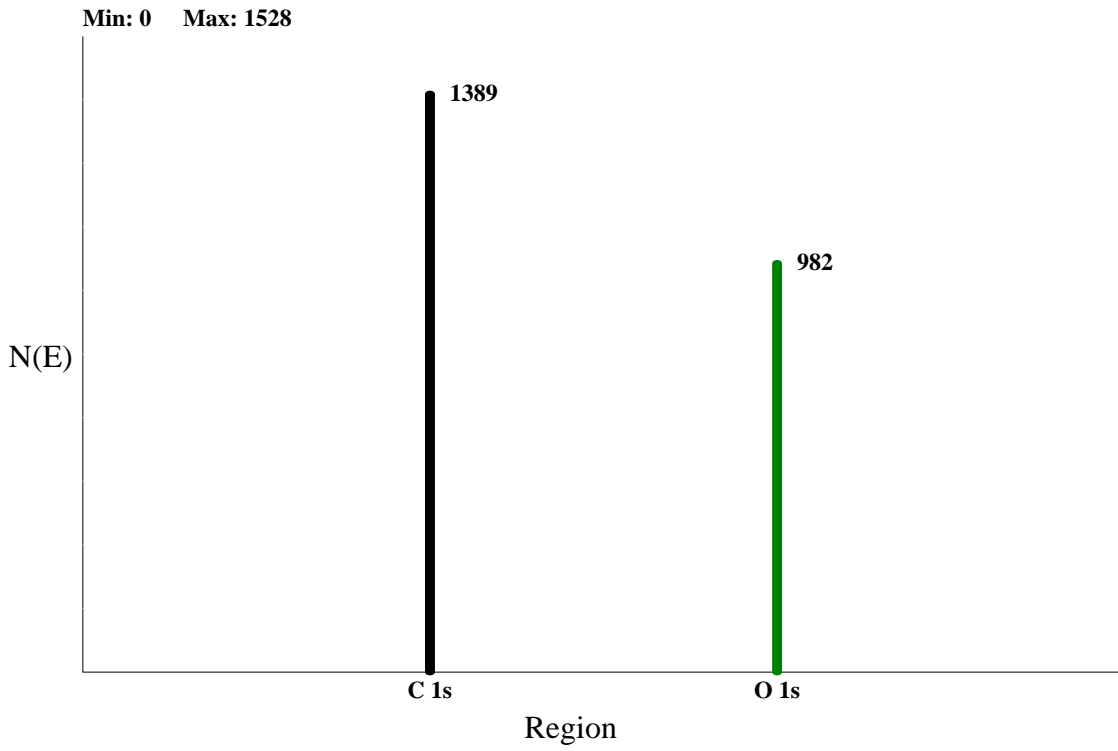
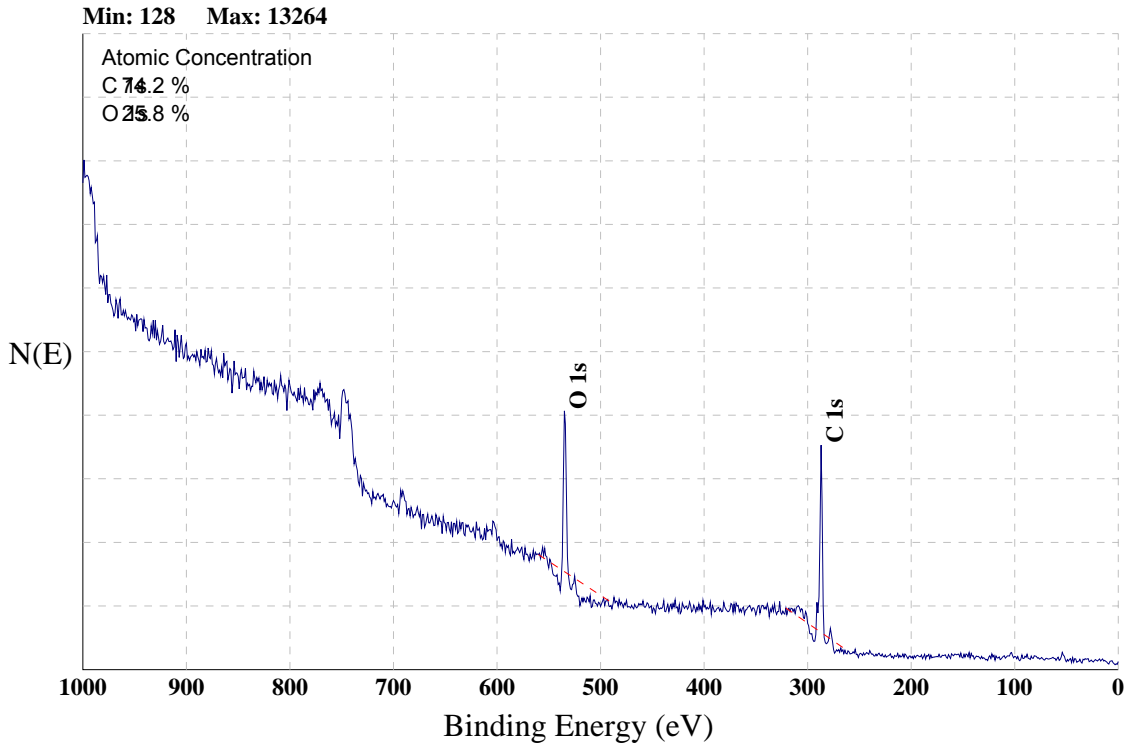
## EK 9

### KONFOKAL LAZER TARAMALI MİKROSKOP İle ANALİZ

- Görüntüleme yapılacak örneklerin bulunduğu ortamdan kültür ortamı uzaklaştırılır.
- Oda sıcaklığında PBS (pH 7.4) tamponu ile 3 defa yıkanır.
- % 2.5 (hacimce) glutaraldehit içeren PBS (pH 7.4) çözeltisine 10 dakika boyunca daldırılarak hücrelerin fiksasyon işlemi gerçekleştirilir.
- Hücre geçirgenliğini arttırmak için örnekler %1'lik Triton x-100 tamponu içerisinde 5 dakika süreyle bekletilir.
- % 2.5 (hacimce) Fluor 488 phalloidin içeren PBS (pH 7.4) çözeltisine 20 dakika süreyle daldırılarak hücrelerin aktin filamentleri (F-aktin) boyanır.
- Hücre çekirdeğini boyamak için örnekler 5 dakika boyunca 10µg/ml propidium iodide ile muamele edilir.
- % 1 (ağırlık/hacim) Bovine Serum Albumin (BSA) içeren PBS (pH 7.4) ile 3 kez yıkanır.
- Örnekler mikroskopta gözleninceye kadar karanlıkta +4°C'de saklanır.

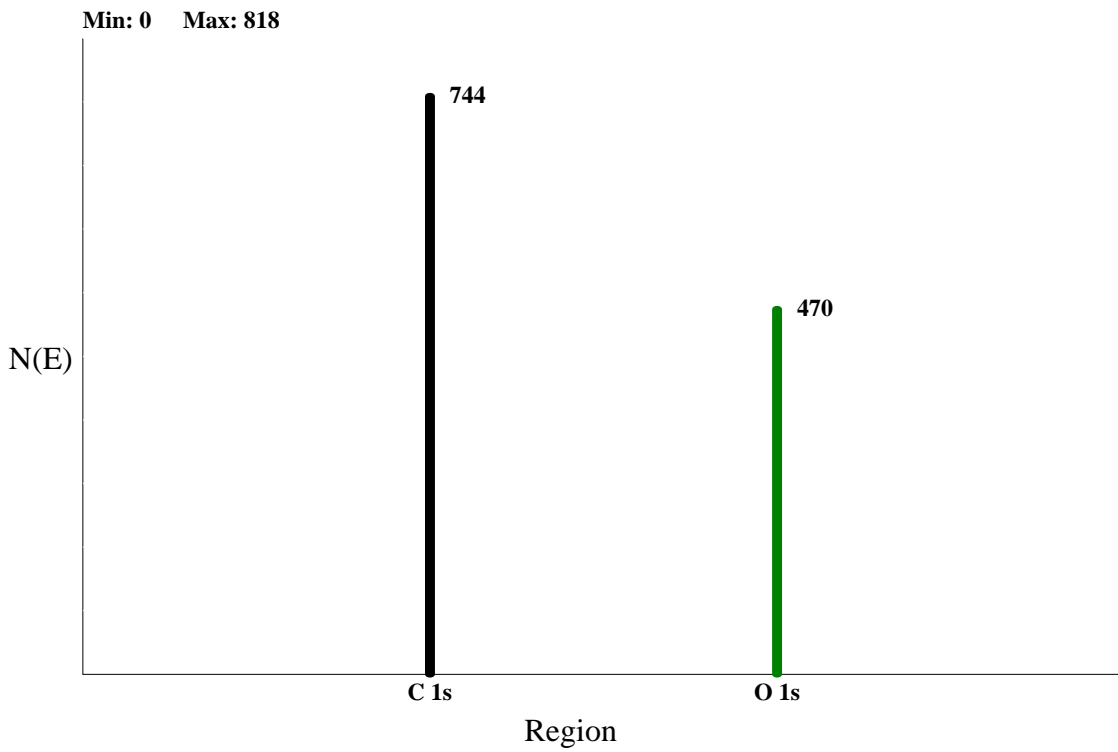
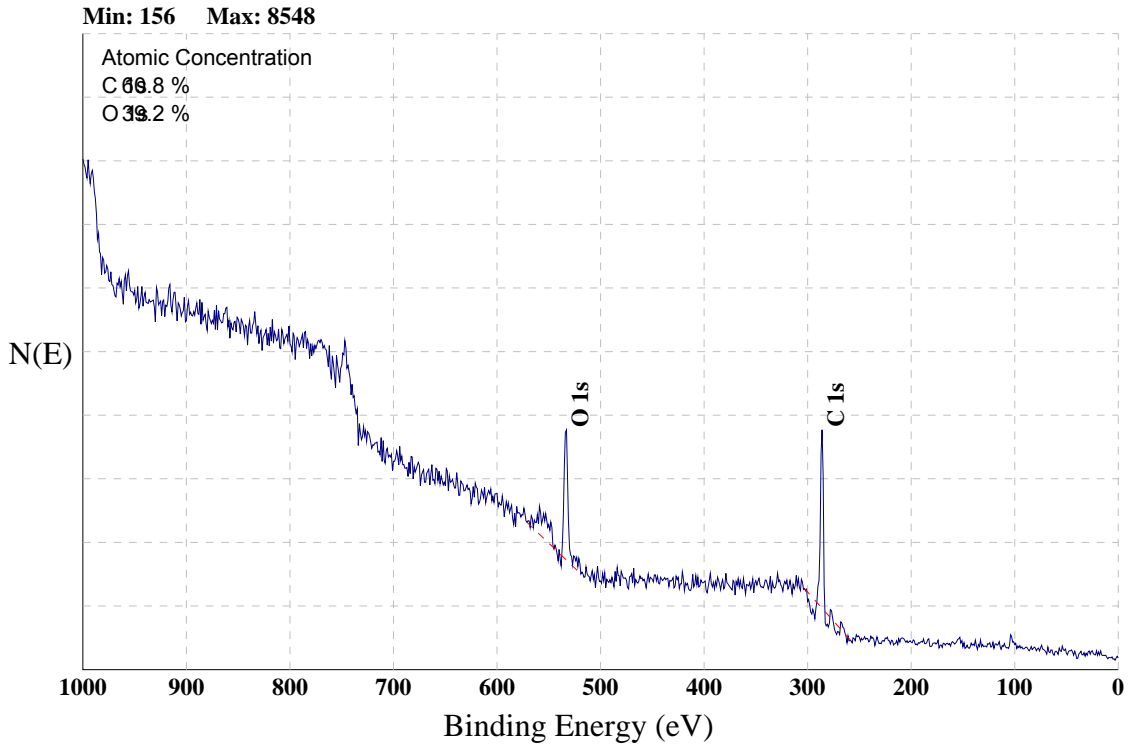
## EK 10

### MODİFİYE EDİLMEMİŞ %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU



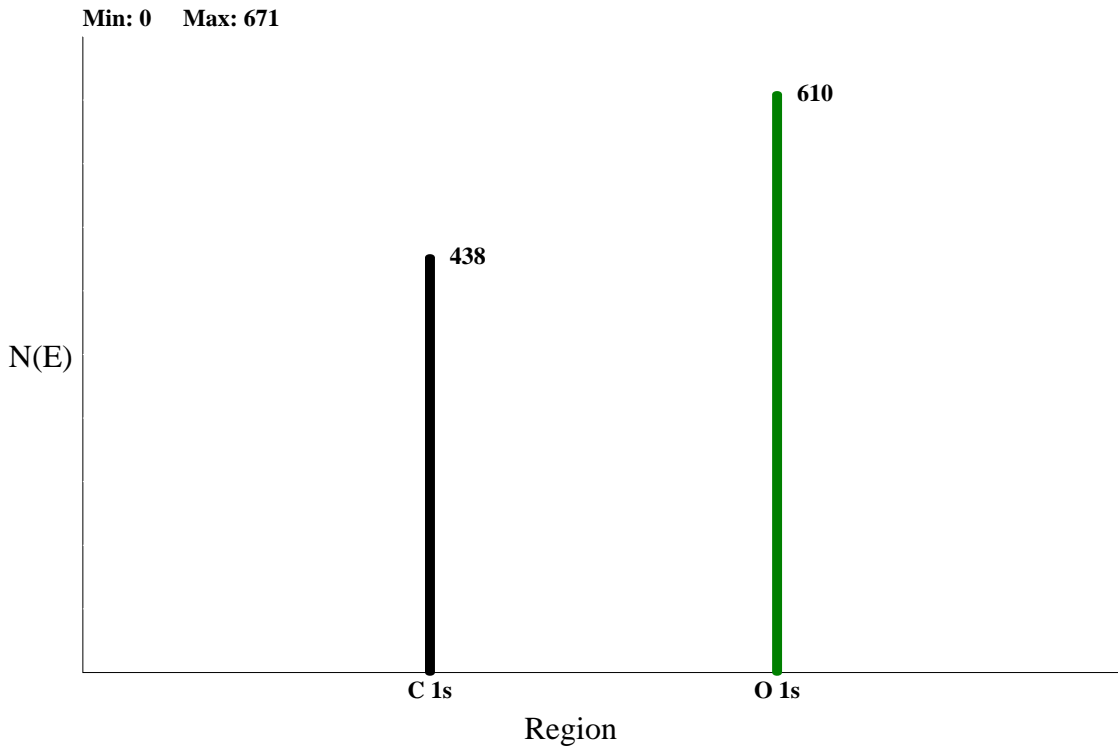
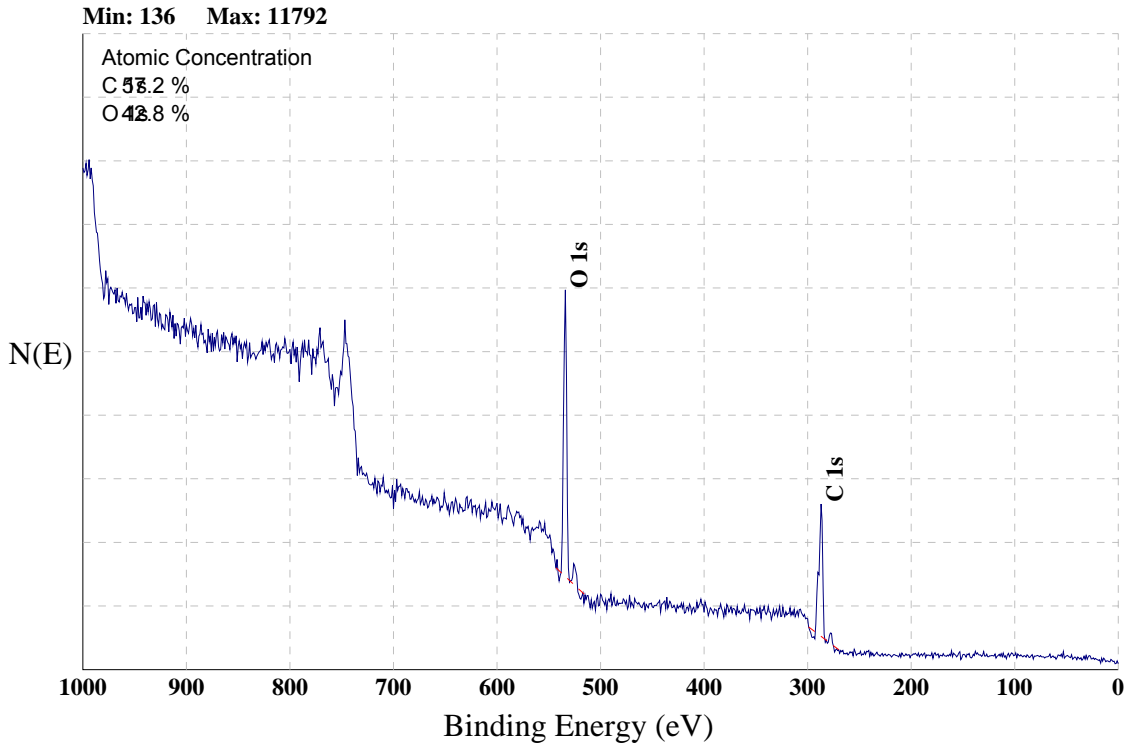
## EK 11

### ATMOSFERİK BASINÇ SU/HAVA PLAZMA ile MODİFİYE EDİLMİŞ %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU



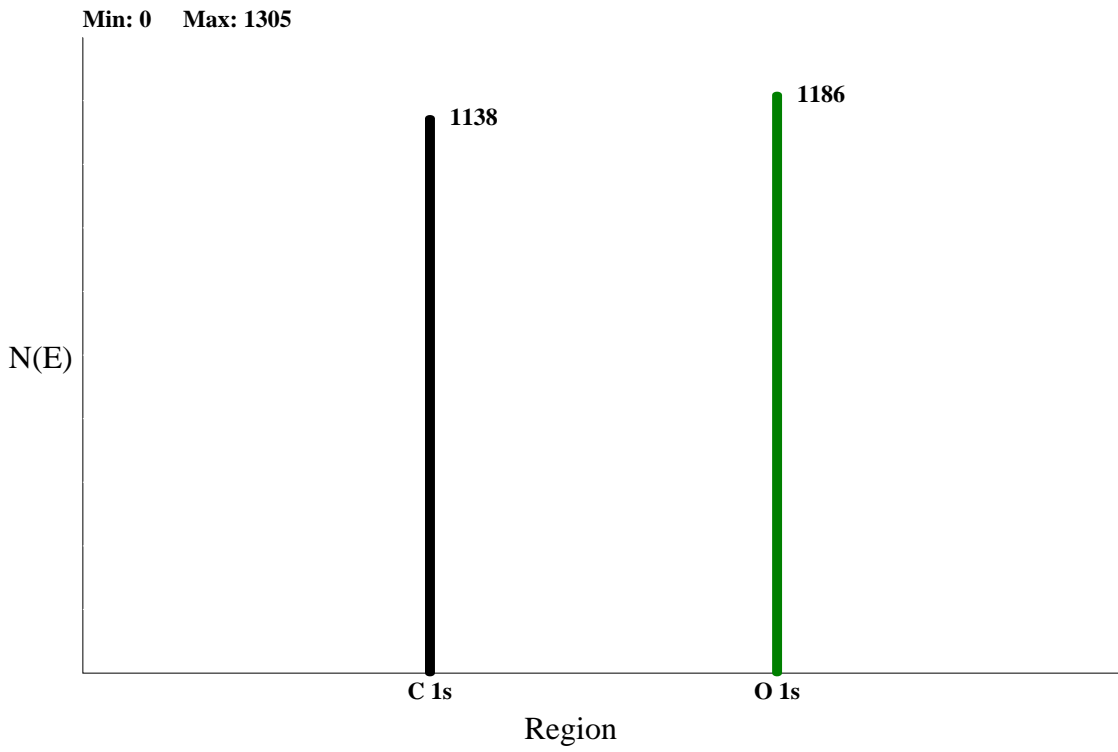
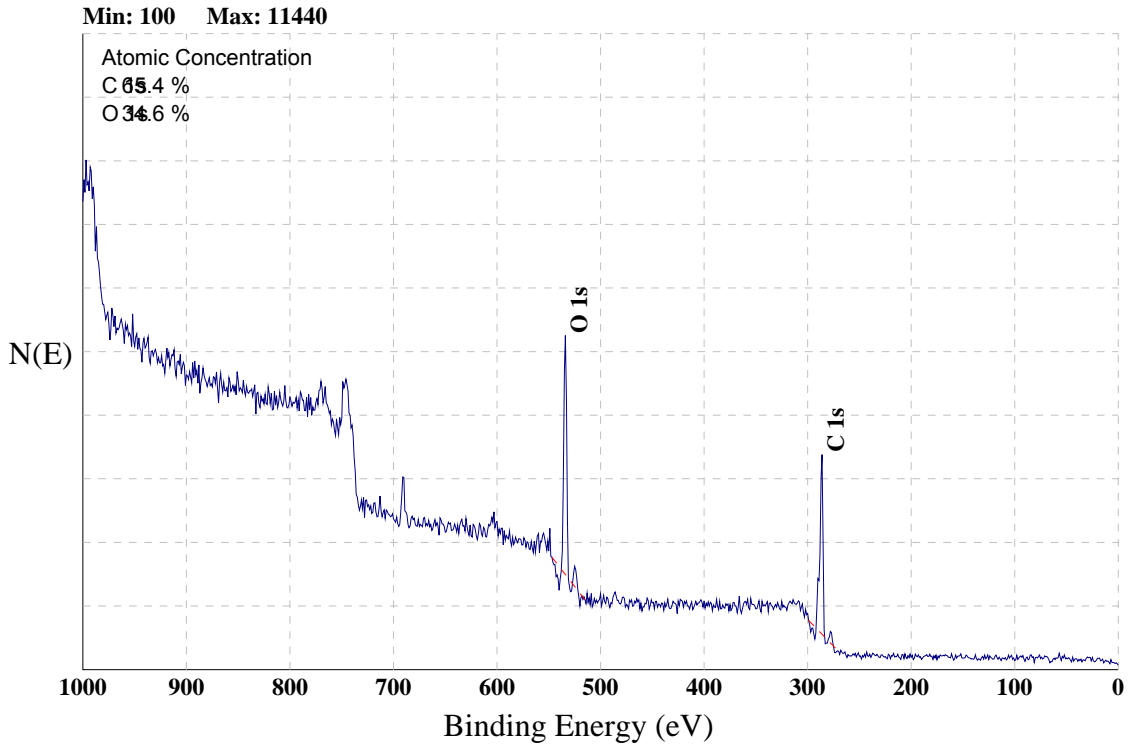
## EK 12

### DÜŞÜK BASINÇ SU/O<sub>2</sub> PLAZMA ile MODİFİYE EDİLMİŞ %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU



## EK 13

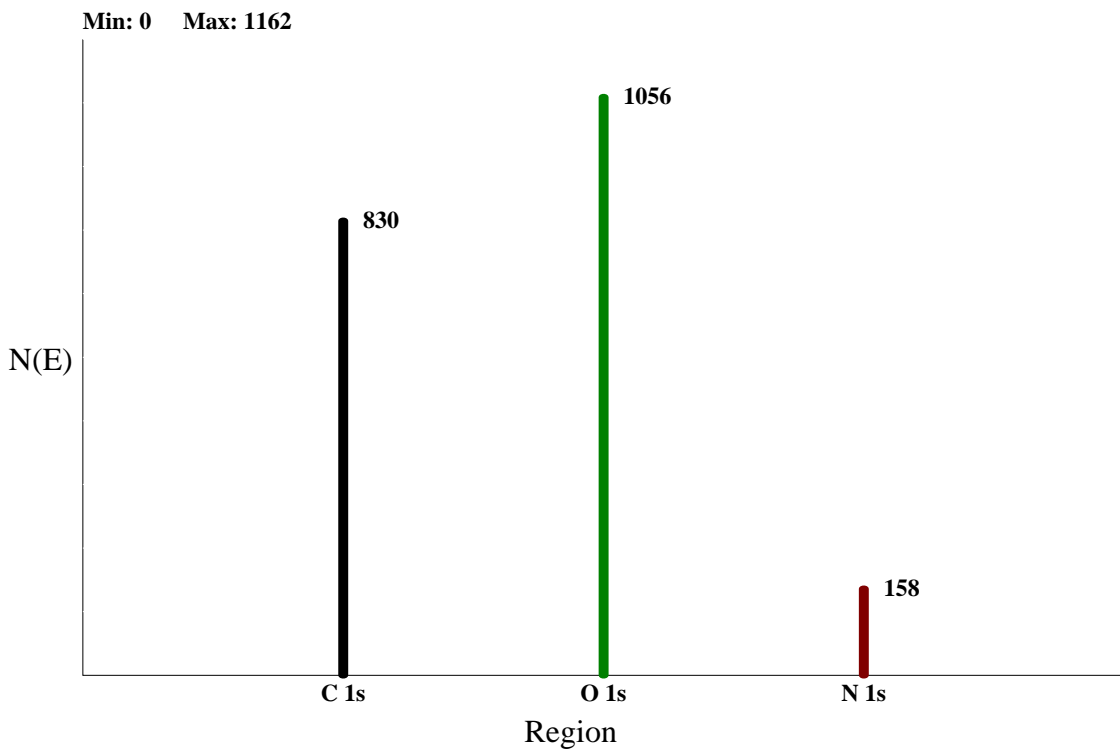
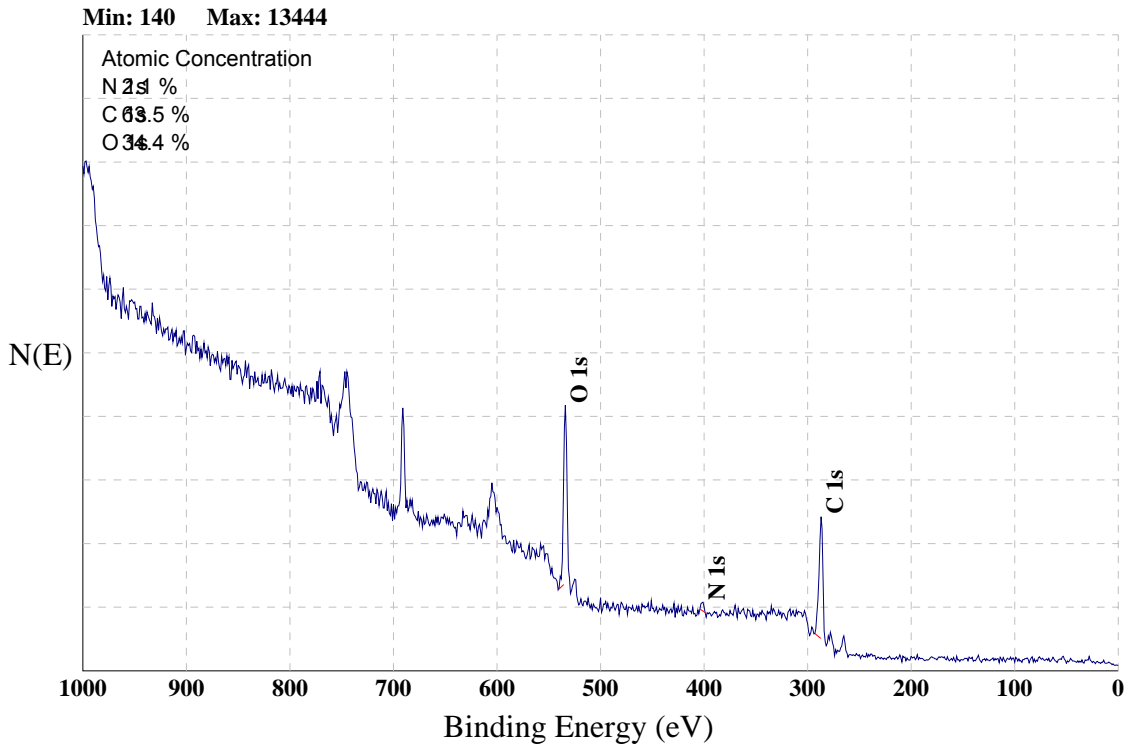
### OKSALİL KLORÜR ile FONKSİYONALİZE EDİLMİŞ %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU





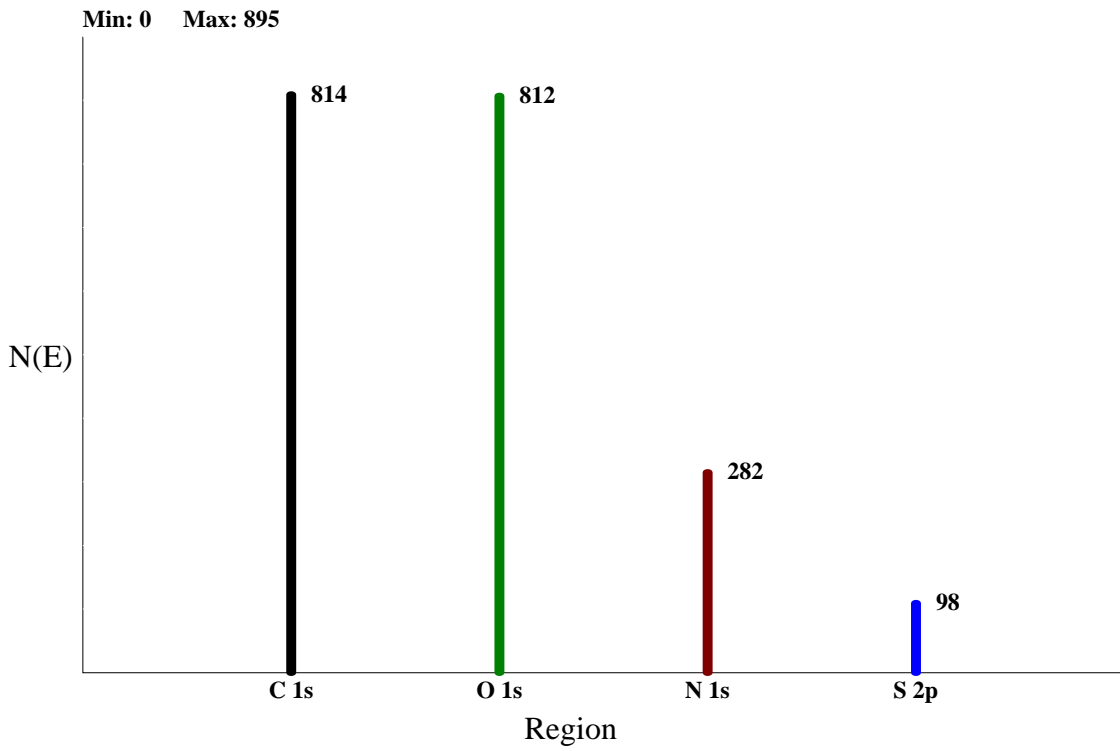
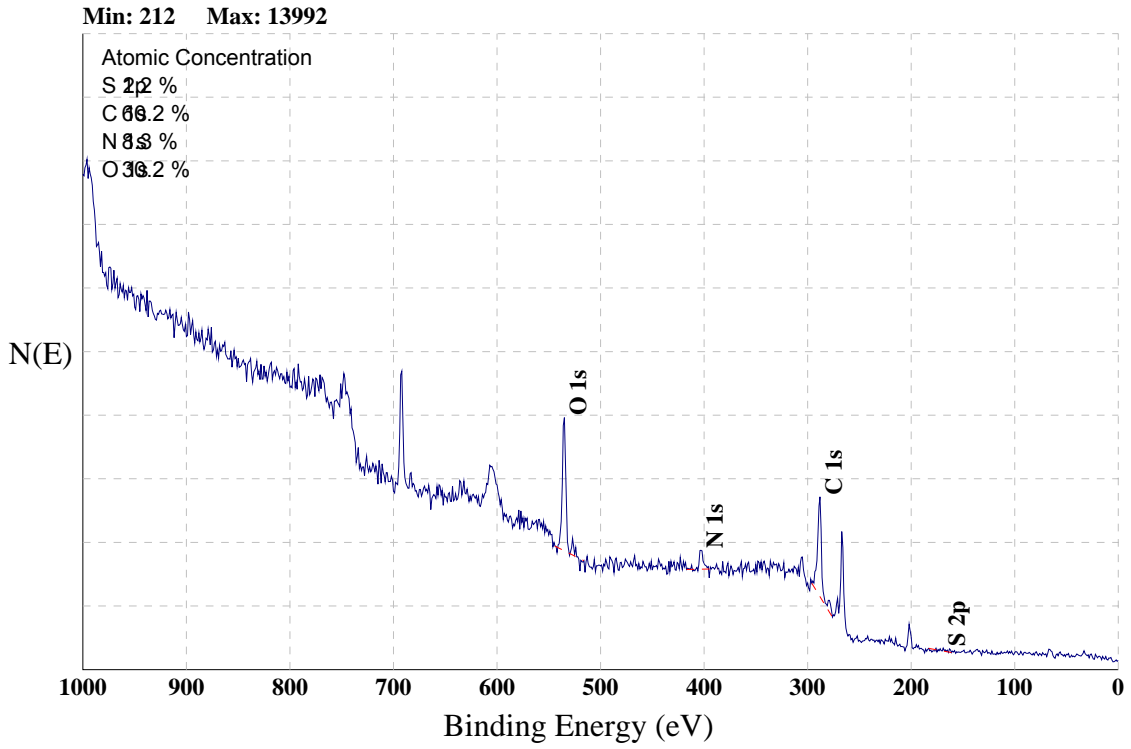
# EK 14

## PEO TAKILI %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU



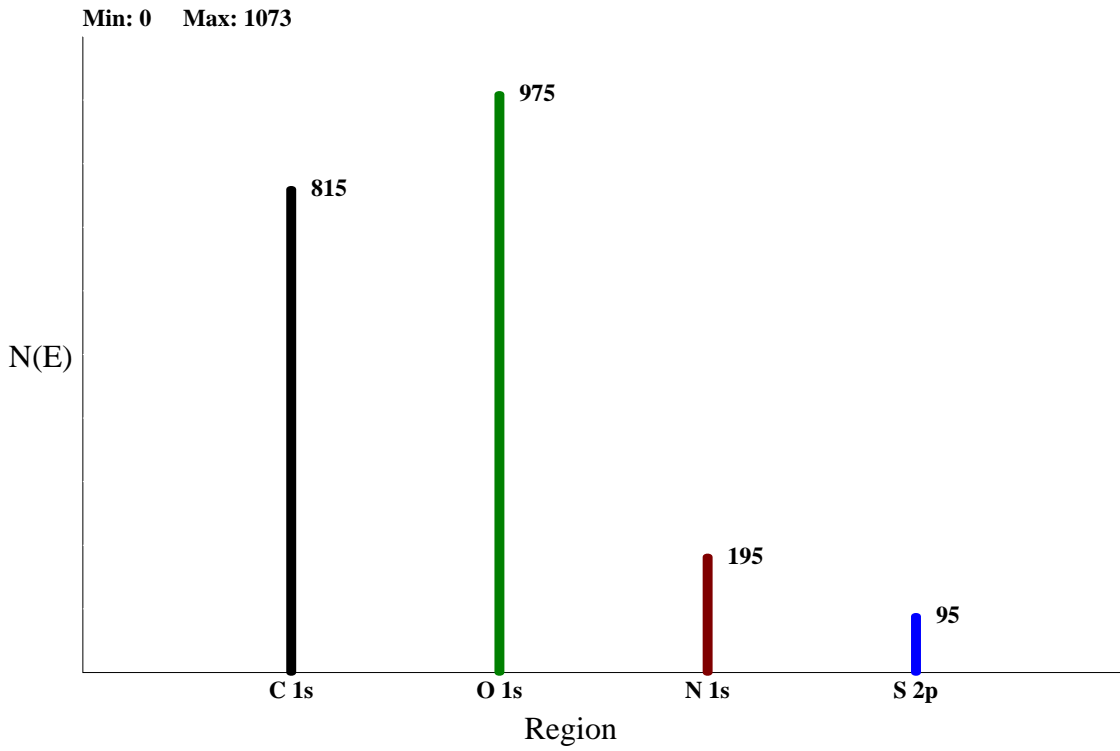
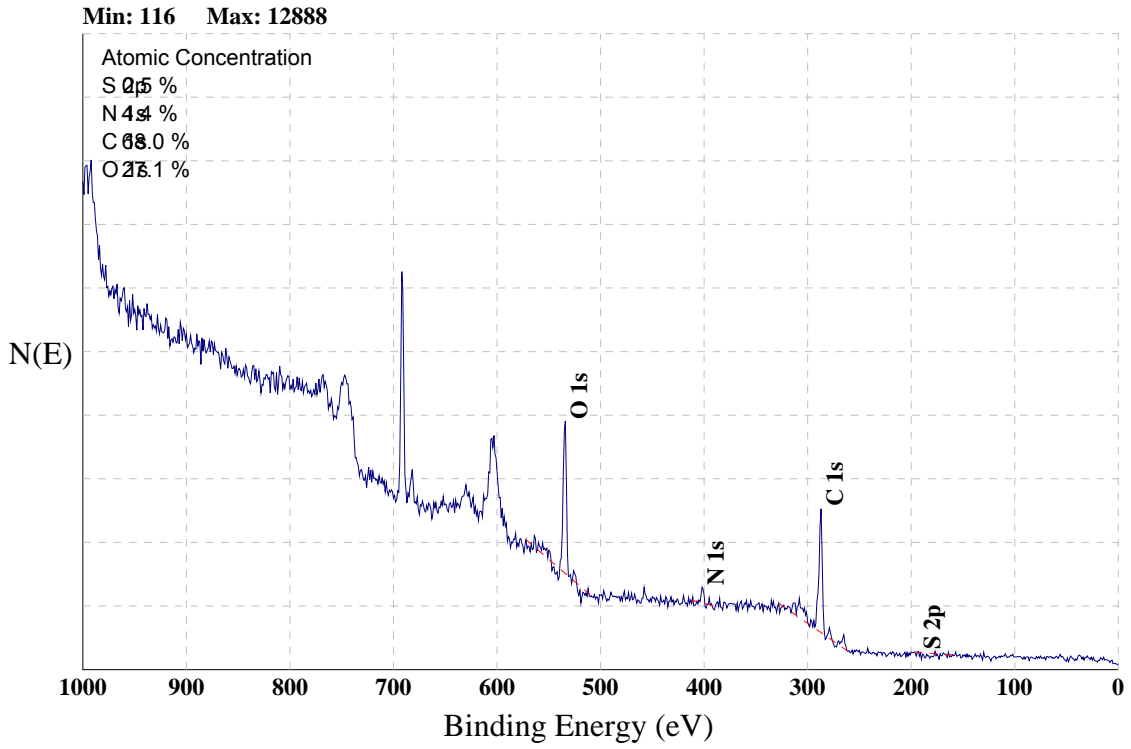
## EK 15

### İNSÜLİN İMMOBİLİZE %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU



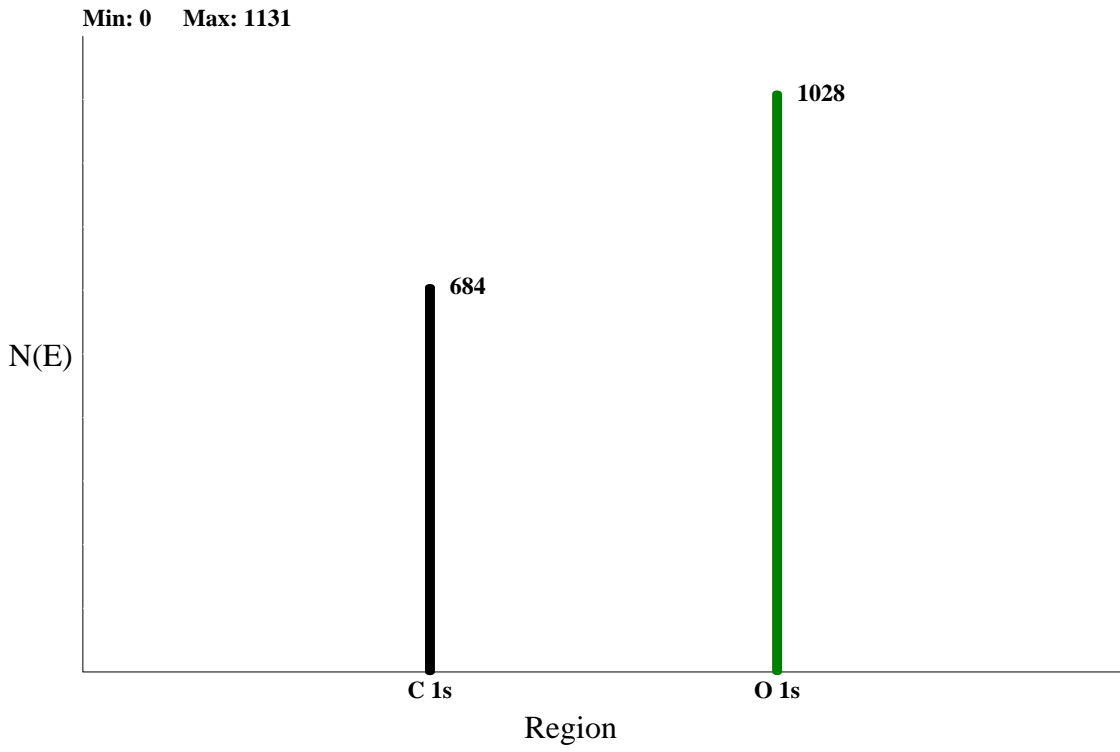
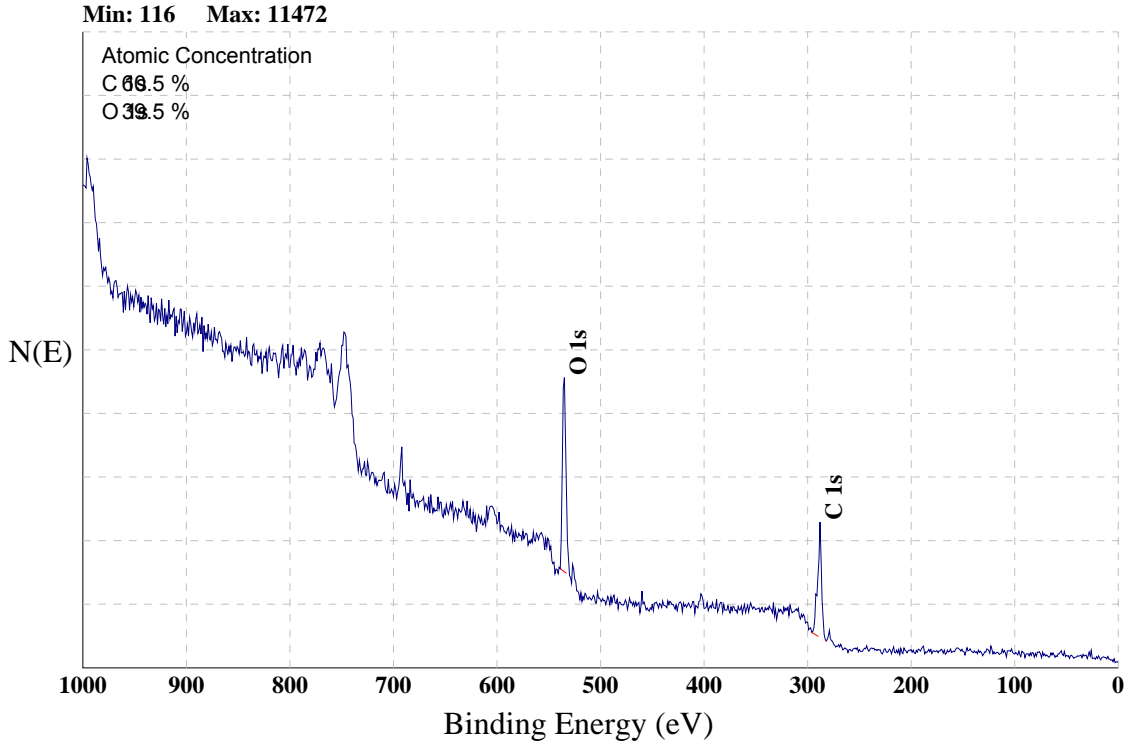
EK 16

## HEPARİN İMMOBİLİZE %100 PCL YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU



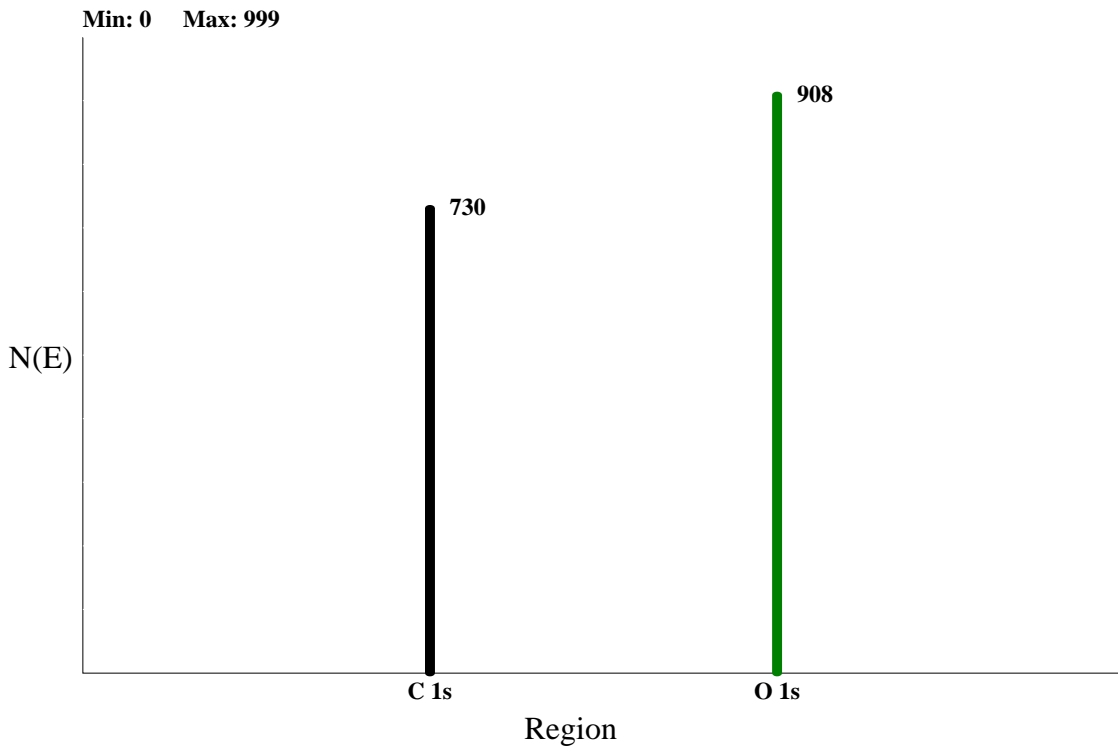
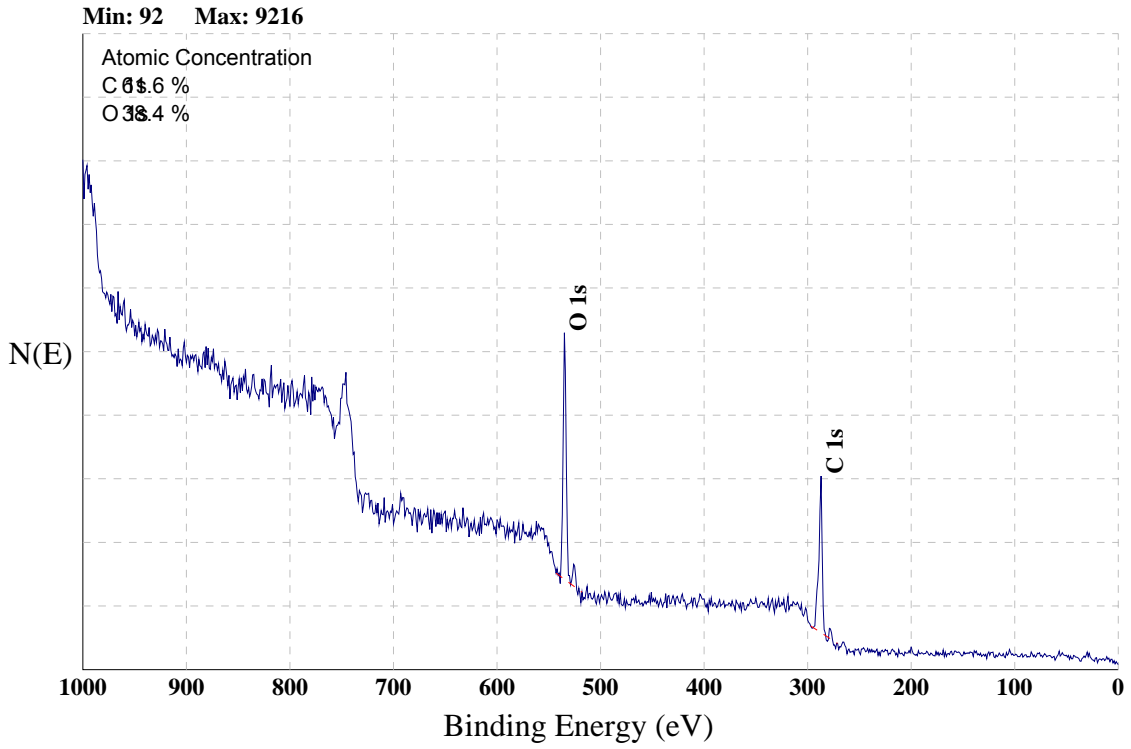
EK 17

MODİFİYE EDİLMEMİŞ NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU



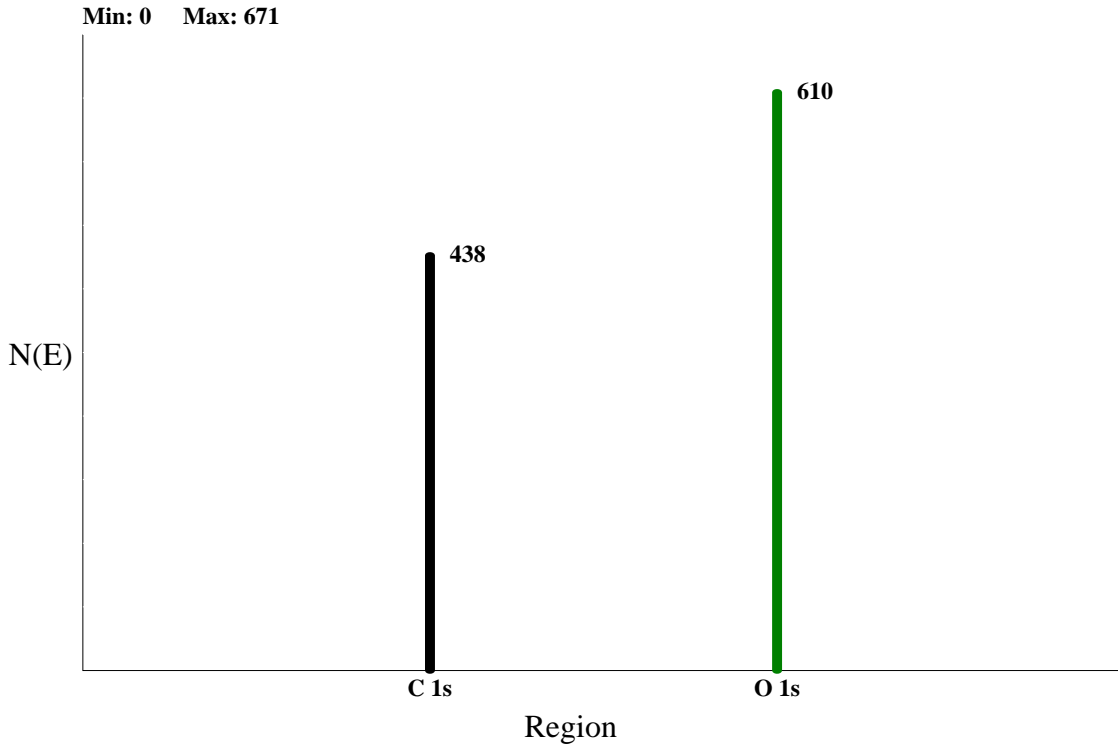
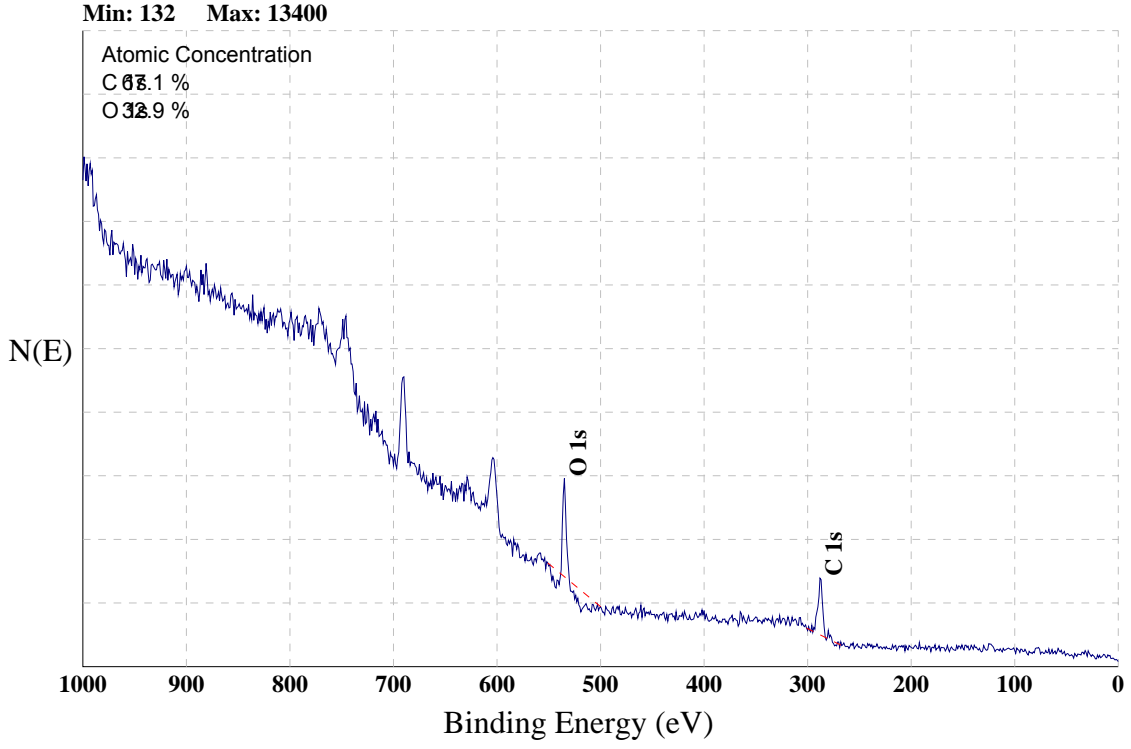
## EK 18

### ATMOSFERİK BASINÇ SU/HAVA PLAZMA ile MODİFİYE EDİLMİŞ NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU



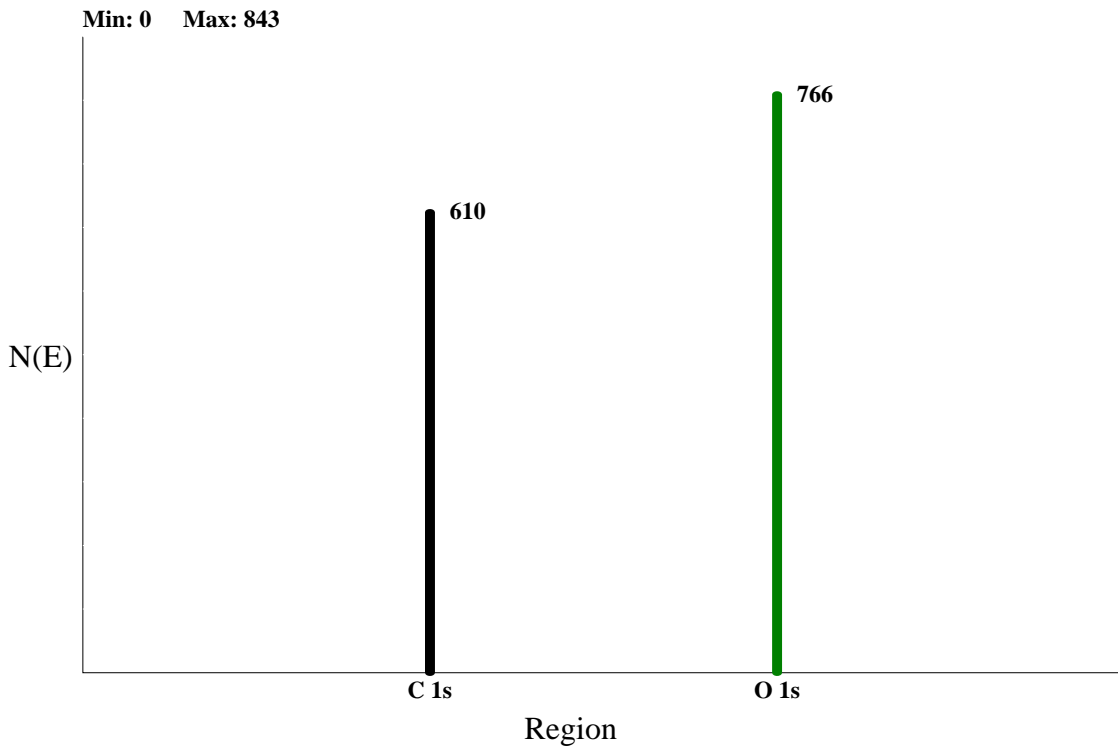
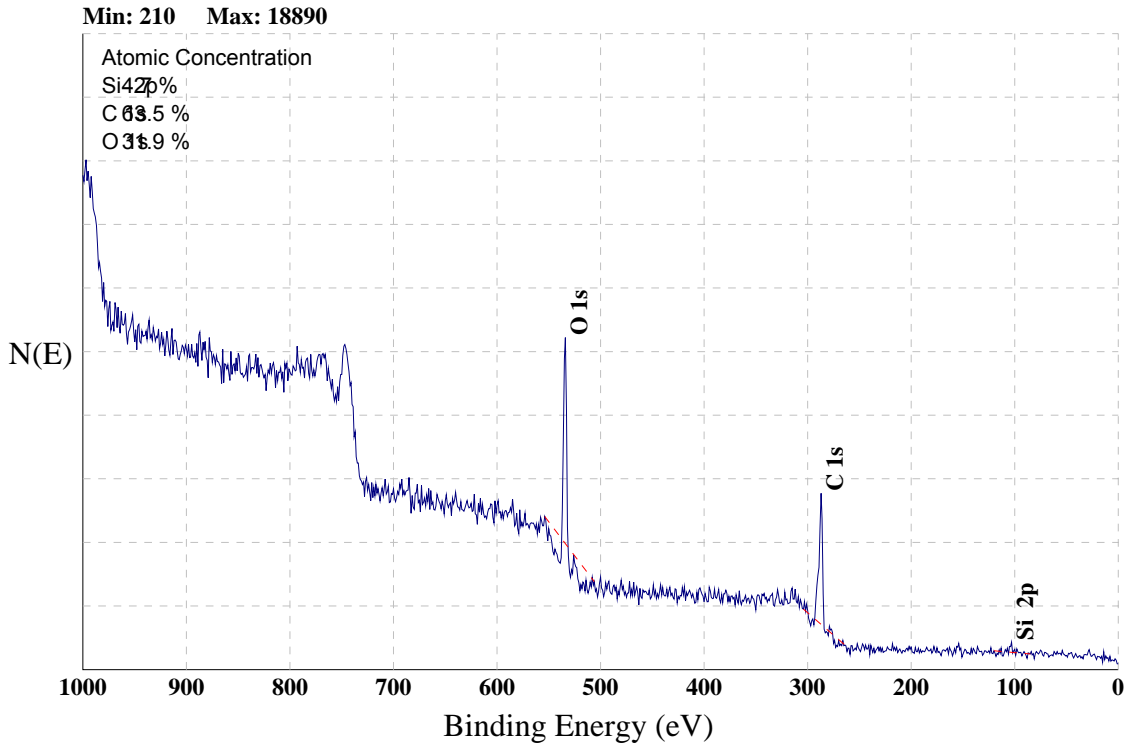
## EK 19

### DÜŞÜK BASINÇ SU/O<sub>2</sub> PLAZMA ile MODİFİYE EDİLMİŞ NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU



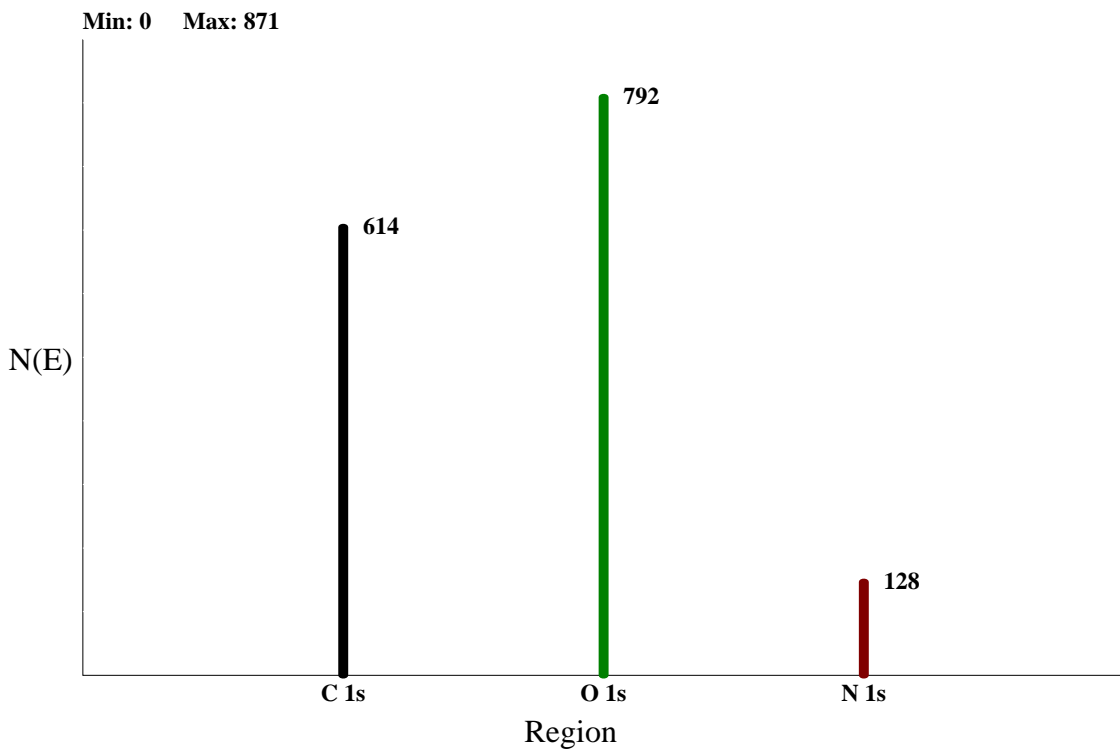
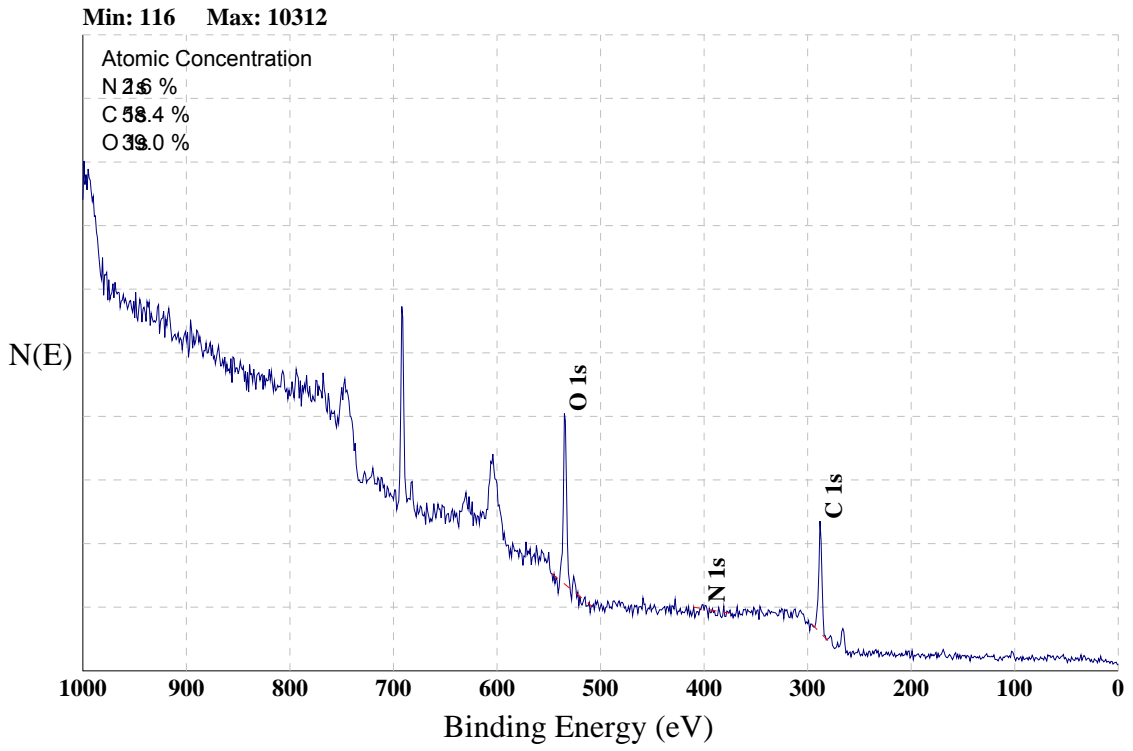
## EK 20

### OKSALİL KLORÜR ile FONKSİYONALİZE EDİLMİŞ NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU



EK 21

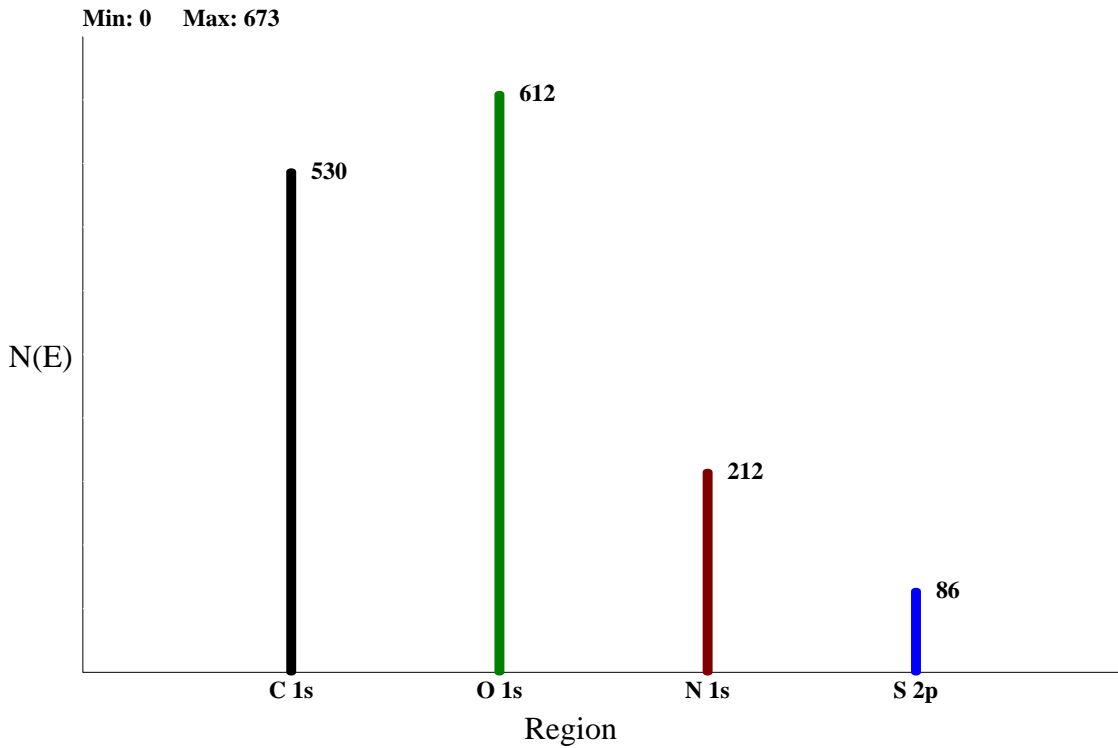
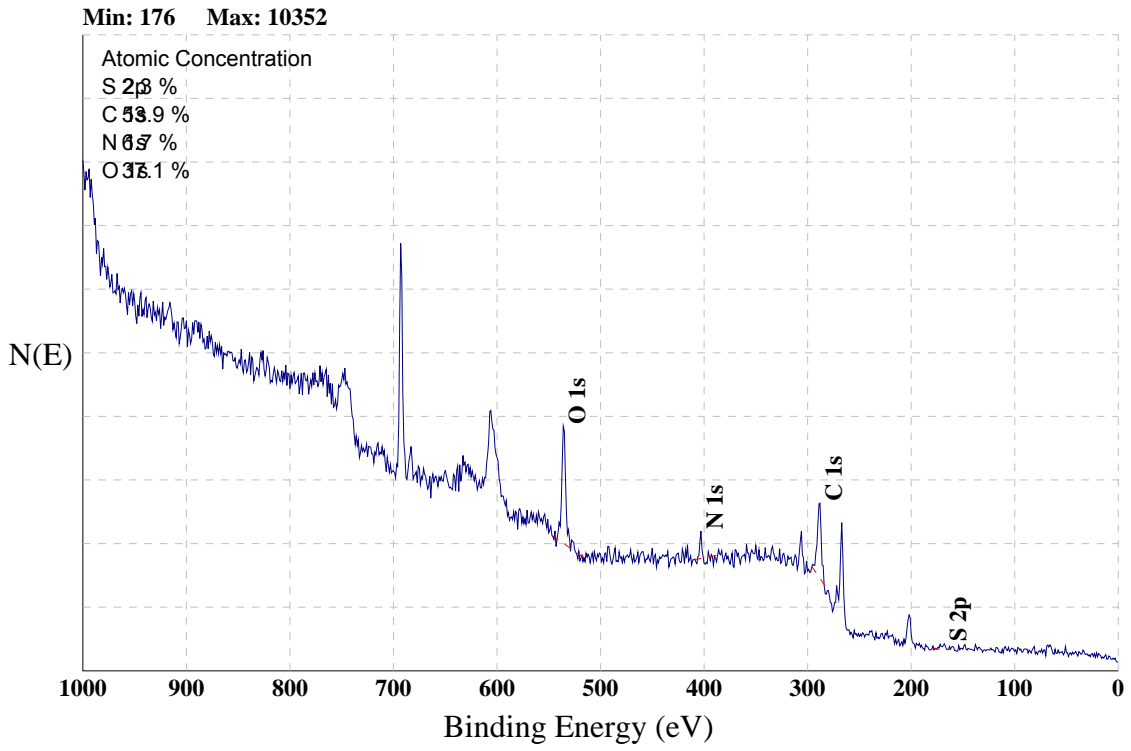
PEO TAKILI NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU





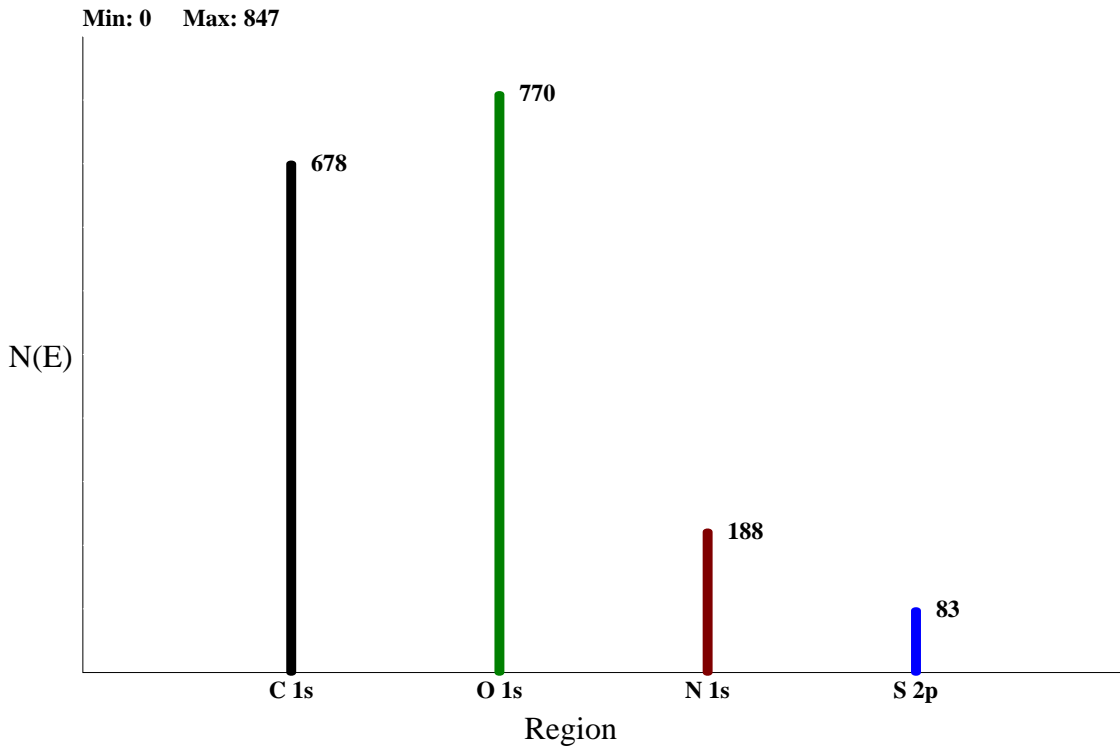
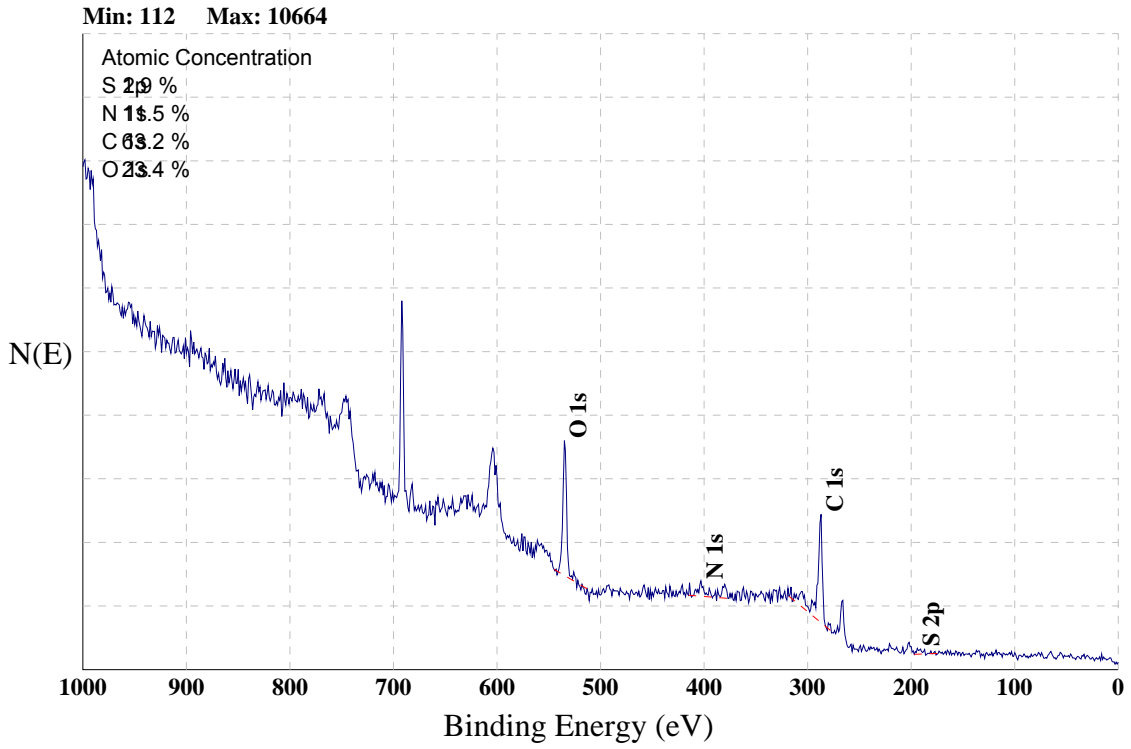
EK 22

## İNSÜLİN İMMOBİLİZE NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU



EK 23

## HEPARİN İMMOBİLİZE NWPF YAPININ ESCA YÜZEY TARAMA SPEKTRUMU



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hilal Türkoğlu Şaşmazel

Doğum Yılı : 1976

Medeni Hali : Evli

İletişim : hilalt2003@yahoo.com

### **Eğitim ve Akademik Durumu**

#### Doktora

2001-2007 Biyomühendislik Anabilim Dalı/Fen Bilimleri Enstitüsü/Hacettepe Üniversitesi

#### Yüksek Lisans

1998-2001 Biyomühendislik Anabilim Dalı/Fen Bilimleri Enstitüsü/Hacettepe Üniversitesi

#### Lisans

1994-1998 Kimya Mühendisliği Bölümü/Hacettepe Üniversitesi

#### Hazırlık Programı

1993-1994 Yabancı Diller Yüksekokulu/Hacettepe Üniversitesi

#### Lise

1990-1993 Ödemiş Lisesi/İzmir

Yabancı Diller : İngilizce ve Almanca

### **İş Tecrübesi**

#### 2000-

Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyomühendislik Anabilim Dalı/Araştırma Görevlisi

#### 1998 (Ağustos-Ekim)

Termo Yalıtım Makine ve Ürün Sanayi Ltd. Şti./ İhracat Müdürü