

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DAMAR İÇİ İMPLANT MATERYAL YÜZEYLERİNDE ANTİTROMBOJENİK
ve ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTEYİ ARTIRMAYA YÖNELİK HEPARİN
İMMOBİLİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

Hatice Ferda ÖZGÜZAR

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Osman EROĞUL
Eş Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ebru EVREN

NİSAN 2023





TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Hatice Ferda ÖZGÜZAR



ÖZET

Doktora Tezi

DAMAR İÇİ İMPLANT MATERYAL YÜZEYLERİNDE ANTİTROMBOJENİK ve ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTEYİ ARTIRMAYA YÖNELİK HEPARİN İMMOBİLİZASYONU

Hatice Ferda ÖZGÜZAR

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Osman EROĞUL

Tarih: Nisan 2023

Geçici ya da kalıcı, dahili ya da harici olarak, tedavi ve/veya onarım gibi amaçlarla vücuda dahil edilen malzemeler implant materyalleri olarak adlandırılmaktadırlar. Günümüzde artan popülasyon ve uzun yaşam süreleri göz önüne alındığında, implant materyallerin kullanım sıklığı, miktarı ve süreleri giderek artmaktadır. Bu nedenle kullanılan implantların, kullanıldıkları bölgeye uyum sağlamaları, transplantasyon sonrası herhangi bir komplikasyon oluşmasını önleyecek şekilde tasarlanmaları gerektiği sonucuna ulaşılmaktadır. Tez kapsamında polimerik ve metalik alttaşlar olmak üzere iki farklı malzemede heparin adı verilen, klinikte güncel olarak antikoagülan ilaç olarak kullanılan biyomolekül ile yüzey modifikasyon stratejilerinin geliştirilmesi üzerine çalışılmıştır. Polipropilen (PP) tez kapsamında model polimerik malzeme olarak seçilmiş ve iki basamakta plazma polimerizasyon (PlzP) destekli yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiştir; (i) oksijen ile aşındırma ve (ii) amincezenin fonksiyonel grup oluşturma. PlzP tekniği ile geliştirilen yüzey modifikasyon parametreleri, temas açısı ölçüm, serbest yüzey enerji hesaplamaları, yüzeyde maksimum azot miktarını elde etme, yüzey pürüzlük değerinin artırılması kriterleri

kapsamında değerlendirilmiş ve optimize parametre tespit edilmiştir. Heparin immobilizasyon işlemi, saf heparin (hep) ve kovalent bağ ajanları ile destekli (hep*) çözeltiler kullanılarak 3 farklı konsantrasyon üzerinden test edilmiştir. Yüzeye tutunumu sağlanan heparin miktarı Toluidine Mavi (TB) boya ile tespit edilmiş ve maksimum heparin tutunumunun sağlandığı konsantrasyon, optimize parametre olarak belirlenmiştir. Kovalent bağ ajanları ile destekli heparin çözeltisinin iki basamakta modifiye edilen PP yüzeyler ile kovalent bağ oluşturduğu, FTIR-ATR analizinde saptanan amid I ve II pikleri ile kanıtlanmıştır. Heparin immobilizasyonu protein tutunum miktarını referans yüzeylere göre oldukça azaltmış, hemokompatibilite testleri kapsamında (platelet tutunum, hemoliz, kinetik-kan pıhtılaşma oranı) da oldukça etkili sonuçlar vermiştir. Ayrıca heparin immobilizasyonunun PP yüzeylerde antiadherent karakteristiği gram pozitif ve gram negatif bakteriler ile test edilmiş ve heparinin antibakteriyel mekanizmasının “temas ile öldürme” olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Son olarak BJ insan fibroblast hücreleri ile gerçekleştirilen testler sonucunda, geliştirilen yüzeylerin biyoyumlu oldukları ispatlanmıştır. Titanyum (Ti) tez kapsamında model metalik malzeme olarak seçilmiş ve tek basamakta alternatif akım elektroforetik depozisyon (AC-EPD) tekniği ile heparin modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Saf halde heparin depozisyonu, temas açısı ölçüm, serbest yüzey enerji hesaplamaları ve yüzey pürüzlülük değerleri kapsamında incelenmiş ve optimize parametre tespit edilmiştir. Başlangıçta yüzeye depozite edilen heparin miktarı TB boya ile takip edilmiş olmakla birlikte, ilerleyen deney basamaklarında söz konusu yaklaşımın, AC-EPD tekniği ile kaplanan heparin miktarını saptamada yetersiz olduğu saptanmıştır. Ti yüzeylerde heparin depozisyonunun etkisi, PP yüzeylerde olduğu gibi, protein tutunum miktarı, hemokompatibilite testleri, antiadherent karakteristik ve biyoyumluluk testleri kapsamında detaylı olarak araştırılmıştır. Özetle, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ile hem PP hem de Ti yüzeylerde farklı stratejilerle yüzey modifikasyonları gerçekleştirilerek heparinin mevcut antikoagulan karakteristiğinden yararlanmakla birlikte, antibakteriyel, antiadherent ve biyoyumluluk karakteristikleri de detaylı olarak çalışılmış ve literatüre kazandırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Heparin, Polipropilen, Titanyum, Plazma polimerizasyon, Alternatif akım elektroforetik depozisyon, Biyofilm oluşumu, Pıhtı oluşumu

ABSTRACT

Doctor of Philosophy

HEPARIN IMMOBILIZATION ON THE INTRAVASCULAR CATHETER

SURFACES for IMPROVING ANTITHROMBOGENICITY and

ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Hatice Ferda ÖZGÜZAR

**TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Biomedical Engineering Programme**

Supervisor: Prof. Dr. Osman EROĞUL

Date: April 2023

Implantable materials are tools that are used in the human body for temporary or permanent, internal or external, treatment or repair, and so on. Nowadays, due to the growing population and long lifetime, the rate, quantity, and duration of these materials are also increasing. Therefore, implantable materials should be biocompatible with the environment in their usage area and be designed to prevent any complications after the transplant. Within the scope of this thesis, two different materials were used as polymeric and metallic substrates for surface modification with an anticoagulation drug that is used in clinics, heparin. Polypropylene (PP) was selected as a model polymeric substrate and plasma-assisted surface modification was applied in two steps: (i) oxygen etching and (ii) amine-rich functional group creation. Surface modification parameters that were held with the plasma polymerization (PlzP) technique were analyzed with contact angle measurements, surface free energy calculations, obtaining the maximum nitrogen amount on the surfaces and increasing the surface roughness values, etc., and the parameters were optimized accordingly. Immobilization of heparin applied as pure heparin (hep) and covalent bond agent

assisted (hep*) with 3 different concentration values. The amount of immobilized heparin detected with toluidine blue (TB) dye and the parameter that produces the maximum amount of immobilized heparin were selected as optimal. Covalent bond formation between hep* and PP substrates was proven with amide I and II peaks, which were detected with FTIR-ATR analysis. Compared to the bare PP substrates, heparin immobilization provided a lower amount of adhered protein and much more efficient hemocompatibility testing (platelet adhesion, hemolysis, and kinetic blood coagulation rate) results. Also, the antiadhesive characteristics of heparin-immobilized PP surfaces were tested against both gram-positive and gram-negative bacteria strains, and the antibacterial mechanism of heparin was revealed as "contact killing". Lastly, the biocompatibility of produced surfaces was tested with the BJ human fibroblast cell line.

On the other hand, titanium (Ti) was selected as the model metallic substrate, and heparin immobilization onto the surfaces was held in one step with the alternative current electrophoretic deposition (AC-EPD) technique. Parameter optimization was achieved with contact angle measurements, free surface energy calculations, and the surface roughness values of purely deposited heparin. In the beginning, the deposited heparin amount was detected with TB dye, but according to further analysis, this procedure is not appropriate to detect the heparin amount that was deposited with the AC-EPD technique. The effect of heparin deposition on Ti substrates was examined detailedly with adhered protein amount, hemocompatibility tests, antiadhesive characteristics, and biocompatibility, respectively. In brief, within the scope of the thesis, different surface modification techniques with heparin on both PP and Ti surfaces were examined. With the help of the anticoagulant characteristic of heparin, which is already known, also its antibacterial, antiadherent, and biocompatibility characteristics were examined in detail and brought to the literature.

Keywords: Heparin, Polypropylene, Titanium, Plasma polymerization, Alternative current electrophoretic deposition, Biofilm formation, Clot formation.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarını paylaştığınız hocalarım Prof. Dr. Osman EROĞUL ve Doç. Dr. Ebru EVREN'e, kıymetli tecrübelerinden her fırsatta faydalandığım, ilgisini ve zamanını paylaşmaktan kaçınmayan hocam Prof. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN'e öncelikli olarak teşekkür etmek isterim.

Akademik kariyerime başlangıç yaptığım an itibariyle birikimini, vizyonunu, hayata bakış açısını dahi aktarmaya çalışsan, sabrına, birikimine ve desteğine oldukça sık başvurduğum, motivasyon kaynağı hocam Prof. Dr. Mehmet MUTLU'ya teşekkür ederim, buradan sonraki her adımda sizi gururlandırmaya çalışacak ve sizi hep minnetle anacağım.

Teşekkürlerime TOBB ETÜ ailemle devam edecek olursam, öncelikle mikrobiyoloji ile tanışmamı sağlayan ve söz konusu gün itibariyle daima akademik ve sosyal hayatımda yer alan, hayattaki duruşuna, bakış açısına, kariyerinde edindiği her bir tecrübeye derin saygı duyduğum emsalsiz hocam Prof. Dr. Julide Sedef GÖÇMEN'e yeteri kadar teşekkür edebileceğime inanmasam da iyi ki varsınız demek isterim. Yüksek lisansa başlamamla hayatıma giren ve o günden beri elini üzerimden hiç çekmeyen Dr. Gizem KALELİ CAN'a, mesafelerden bağımsız varlığını her daim hissettiren, sarıp sarmalayan, kıvrırcık saçları ve iç ısıtan gülümsemesi ile favori yol arkadaşım, canım Gözde KABAY'a, yüksek lisans maceramızla birlikte hertürlü engeli birlikte aştığımız, bu süreçte ağzımızın tadının kaçmasını da engelleyen biricik Pelin KÖMÜRCÜ'ye, hastalıkta sağlıkta, iyi günde kötü günde, akademi bizi ayırana dek, umuyoruz ki birbirimizi kırmadan yolumuza devam edeceğimiz, şahsına münhasır Ahmet Ersin MEYDAN'a, yalnızca okuduğu felsefi kitapları değil yemeklerini de benimle paylaşan dostum Farhad NASSEHİ'ye, hayatımda tanıdığıma en memnun olduğum, sosyalliğini gurmeliyle özdeşleştiren, hep telefonun diğer ucunda bekleyen canım Selahattin KAHRİMAN'a, enerjisine, samimiyetine, zekasına ve muhabbetine doyum olmayan İlyas BÖCEK'e sayelerinde kendimi ne kadar şanslı hissettiğimi belirtmek isterim. İstisnasız her bir kötü günde, vakti olduğunda ya da olmadığında, yalnızca terinin değil kanının da son damlasına kadar yanımda yer alan dostum Ömer Refet ÇAYLAN'a teşekkür etmeden geçmem mümkün değil. Asla sonu gelmeyen fikirleri, soruları, kahkahaları ile hayatıma dahil olan Tarık Can TÜRKOĞLU, sensiz olmazdı tabi ki.

2015 yılından günümüze, yüksek lisans ve doktora tez çalışmalarım süresince beni maddi olarak destekleyen ve tam burs sağlayan TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi'ne, 2214-A programı (1059B142100292) kapsamında tez çalışmalarımın 1 yıllık kısmını Belçika, KU Leuven'de gerçekleştirme olanağı sağlayan TÜBİTAK'a, tez çalışmalarımı genişletme imkanı sunan sayın Prof. Dr. Annabel BRAEM'e bu fırsat ve söz konusu süreçte birikimini, tecrübelerini ve zamanını paylaştığı için teşekkür ederim. Bu macera sizinle yaşandığı için çok şanslıyım. Evini, işini, zamanını ve gülcüklerini cömert bir şekilde paylaşarak adaptasyon sürecimi kolaylaştıran canım Dr. Merve AKTAN'a, soğukkanlılığı ile örnek aldığım, molalarda peşine takıldığım Berfu GÖKSEL'e, hayatımda tanıdığım en renkli karakterlerden biri olduğunu düşündüğüm, her koşulda ulaşabildiğim, iyi günde kötü günde analizlerle

birlikte boğuştuğum Mrinal Gaurav SRIVASTAVA'ya, ofis komşum, herdaim enerjik ve heyecanlı dedikodu partnerim Mia KOVAC'e içtenlikle teşekkür ederim.

Leuven ikinci evim oldu ise, bunun için özel teşekkür hakeden kahramanlarımdan bahsetmek zorundayım. Mahallemizin muhtarı, enerjisine asla yetişemediğim, her an her yerde kocaman gülümsemesi ile karşıma çıkabilen Mervenaz ŞAHİN'e ve karizması, bilirkişiliği ve "bak şimdi" ile başlayan bilgilendirme seansları ile iyi ki dedirten Barış SİHMANOĞLU'na savunma sonrası İstanbul'da görüşürüz demek istiyorum. Paralel evrende kendisinin ben olduğuma inandığım, ortak nokta ve deneyimlerin iki insanı birbirlerine ne kadar yakınlaştırabildiğine şahit olduğum, gülümsemesinin bulaşıcı olduğu Kosar HASSANNEZDAH'a, her zaman ev sahibimiz olduğu, çay molalarımızın mimarı olduğu, ellerinin lezzeti ile aklımızı başımızdan aldığı için minnettarım. Uzun boyu, temiz oda bağımlılığı ve arabesk müziğe duyduğu derin sevgi ile kendini ön plana çıkaran, bisiklet kullanımı konusunda kendisini hayal kırıklığına uğratmama rağmen beni bu şekilde kabul eden Milad SHOJAEIAN'a, ulaşım sponsorumuz, hayatımın geri kalanında kendisini baklava ile özdeşleştireceğim, enerjisini, renkli kişiliğini, azmini keyifle gözlemlediğim Ali Milad KHODAYARİ'ye, teşekkürlerimi iletmek isterim. Herşey gönlünüzce olsun, ben de şahit olmak için takipte kalacağım.

Akademiye benden çok ilgi duyan, heyecanımı ve stresimi paylaşan, yayınlarımı ve konferanslarımı takip eden, hayata bakış açısına hayran olduğum annem Kamuran ÖZGÜZAR'a, motivasyon konusunda beni sürekli tetikleyen babam Mustafa ÖZGÜZAR'a, zekasından, her şeyi biliyor oluşundan yararlandığım, hep varolmasını istediğim çekirdek ailesi ile abim Mehmet Can ÖZGÜZAR'a, şüpheyeye düştüğüm anlarda bile bana benden çok güvenen, hayatımın joker elemanı ablam Zehra Nur ÖZGÜZAR'a, sağlık sponsorumuz, aynı zamanda proje ortağım, küçük ama etkili aile üyemiz canım kardeşim Esmâ Seda ÖZGÜZAR'a, özetle canım aileme beni sorgusuz ve kesintisiz destekledikleri için içtenlikle teşekkür ederim.

Bu doktora tezi, en yakın arkadaşım, kötü gün dostum, sırtımı her daim yaslayabildiğim ve sonsuz güvendiğim, dualarıyla bugüne gelebildiğime inandığım, hayattaki en sevdiğim kadın olan anneannem Aliye YAVUZ'a ithaf edilmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
KISALTMALAR	xix
SEMBOL LİSTESİ	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1 İmplant Materyaller	5
1.1.1 Kan-implant arayüzey etkileşimi ve mekanizması	6
1.2 Heparin.....	8
1.2.1 Heparin etki mekanizması	8
1.2.2 Antikoagülan etkinliğin izlenmesi	9
1.2.3 Uygulama Dozları.....	10
1.3 Plazma Polimerizasyon (PlzP) Tekniği	10
1.3.1 Plazma ile yüzey modifikasyon teknikleri.....	11
1.3.2 Plazma polimerizasyonu etkileyen parametreler	13
1.4 Elektroforetik Depozisyon (EPD) Tekniği	15
1.4.1 Elektroforetik depozisyonu etkileyen parametreler	16
1.4.2 Alternatif akım elektroforetik depozisyon tekniği (AC-EPD).....	17
1.5 Yüzey Analiz Teknikleri.....	17
1.5.1 Ultraviyole-Görünür bölge (UV-Vis) moleküler absorpsiyon spektroskopisi	17
1.5.2 Fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FTIR) spektroskopisi	18
1.5.3 X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS)	19
1.5.4 Temas açısı (CA) ölçümleri.....	19
1.5.5 Atomik kuvvet mikroskobu (AKM)	20
1.5.6 Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	20
1.5.7 Spektroskopik elipsometri	21
2. POLİPROPİLEN (PP) YÜZEYLERDE PLAZMA POLİMERİZASYON (PlzP) DESTEKLİ HEPARİN İMMOBİLİZASYONU	23
2.1 Materyal ve Metot.....	23
2.1.1 Materyal	23
2.1.2 Metot.....	23
2.1.2.1 Polipropilen (PP) yüzeylerde plazma polimerizasyon (PlzP) ile yüzey modifikasyonu	23
2.1.2.2 Yüzey modifikasyonlarının fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu	25
2.1.2.3 Modifiye edilen PP yüzeylerde heparin immobilizasyonu ve stabilite	26

2.1.2.4 Protein tutunum çalışmaları	27
2.1.2.5 In vitro antibakteriyel çalışmalar	28
2.1.2.6 In vitro Hemokompatibilite çalışmaları	30
2.1.2.7 In vitro hücre kültürü çalışmaları	31
2.2 Bulgular ve Tartışmalar.....	32
2.2.1 PlzP modifikasyon parametrelerinin optimizasyon sonuçları.....	32
2.2.2 Yüzey modifikasyonlarının fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu	33
2.2.3 Heparin immobilizasyon ve stabilite sonuçları	36
2.2.4 Protein tutunum çalışma sonuçları	41
2.2.5 In vitro antibakteriyel çalışma sonuçları	42
2.2.6 In vitro hemokompatibilite çalışma sonuçları.....	48
2.2.7 In vitro hücre kültürü çalışma sonuçları	51
3. TİTANYUM (Ti) YÜZEYLERDE ELEKTROFORETİK DEPOZİSYON (EPD) DESTEKLİ HEPARİN İMMOBİLİZASYONU	53
3.1 Materyal ve Metot	53
3.1.1 Materyal	53
3.1.2 Metot	53
3.1.2.1 Ti yüzeylerde heparin depozisyonu	53
3.1.2.2 Ti yüzeylerde fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu	56
3.1.2.3 Protein tutunum çalışmaları	58
3.1.2.4 In vitro antiadherent çalışmalar.....	58
3.1.2.5 In vitro hemokompatibilite çalışmaları	59
3.1.2.6 In vitro hücre kültürü sonuçları.....	60
3.2 Bulgular ve Tartışmalar.....	61
3.2.1 Ti yüzeylerde heparin depozisyon parametre optimizasyonu.....	61
3.2.2 Ti yüzeylerde fiziksel ve kimyasal karakterizasyon	64
3.2.3 Protein tutunum çalışma sonuçları.....	71
3.2.4 In vitro antiadherent çalışmaları sonuçları	72
3.2.5 In vitro hemokompatibilite çalışma sonuçları	76
3.2.6 In vitro hücre kültürü sonuçları	78
4. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	81
KAYNAKLAR.....	87
EKLER.....	101
ÖZGEÇMİŞ.....	104

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1.1 : Pıhtılaşma mekanizmasının başlatılmasında intrinsek yol.....7
- Şekil 1.2 : Heparinin kimyasal yapısı.....8
- Şekil 1.3 : Heparinin etki mekanizması.....9
- Şekil 2.1 : Plazma destekli implant üretimi ve biyolojik testlere ait çoklu deney basamaklarının şematik gösterimi.....25
- Şekil 2.2 : TB boyada serbest heparin için elde edilen kalibrasyon eğrisi ($\lambda=630$ nm).....27
- Şekil 2.3 : 3 boyutlu AKM görüntüleri, (a) bare PP, (b) O₂-PP ve farklı plazma güç parametrelerinde gerçekleştirilen amince-zengin film kaplamalı NH₂-O₂-PP (c) 25 Watt, (d) 50 Watt, (e) 75 Watt ve (f) 100 Watt.....34
- Şekil 2.4 : 75 Watt plazma gücü ve 15 dakika uygulama süresi ile üretilen NH₂-O₂-PP yüzeylere ait XPS spektrumu (a) C 1s, (b) N 1s spektrumu. (c) Referans (bare PP) ve modifiye (O₂-PP, NH₂-O₂-PP, hep- NH₂-O₂-PP, hep*- NH₂-O₂-PP) PP yüzeylerin FTIR spektrumu.....36
- Şekil 2.5 : PP yüzeylerde (hep*- NH₂-O₂-PP) 30 gün boyunca Yüzey heparin stabilite çalışmaları (heparin konsantrasyonunu 30 mg/ml, HEP: (EDC:NHS) 1:1 kütlece, n=12).....38
- Şekil 2.6 : Referans (bare PP) ve heparin modifiye (hep*- NH₂-O₂-PP) yüzeylerde SSA protein tutunum çalışma sonuçları (n=9, **p<0.005).....41
- Şekil 2.7 : Heparinin *S. epidermidis* susu ile etkileşimi sonrası MİK ve MBK tayini yapılmasında kullanılan 96-kuyucuklu plak görüntüsü.....43
- Şekil 2.8 : *S. aureus*, *E. coli* ve *S. epidermidis* bakteri suşlarına ait kolonizasyon sonuçları (a) yüzeye tutunmayan (yıkama suyundan, PBS) bakterilerin eldesi ile yapılan ekimler, (b) yüzeye tutunan bakterilerin eldesi ile gerçekleştirilen ekimler (herbir bakteri suşu için 37 ° C’de inkübasyon süreleri sırası ile 24, 48 ve 72 saat, tüm ekimler TSA katı besiyerinde gerçekleştirilmiştir, n=12, *p<0.05).....46
- Şekil 2.9 : Referans (bare PP) ve heparinize (hep*- NH₂-O₂-PP) PP yüzeylerde *S. aureus*, *S.epidermidis* ve *E. coli* suşlarına karşı bakteri kolonizasyon SEM görüntüleri. Herbir SEM görüntüsü, yüzeylerin 24 saat inkübasyonu sonrası çekilmiştir. *S. aureus* inkübe (a) bare PP, (b) hep*- NH₂-O₂-PP, *E.coli* inkübe (c)bare PP, (d) hep*- NH₂-O₂-PP, *S. epidermidis* inkübe (e) bare PP, (f) hep*- NH₂-O₂-PP. Alınan tüm görüntülerde büyütme katsayısı x5000 ve x50000 değerindedir.....47
- Şekil 2.10 : Referans (bare PP) ve heparinize (hep*- NH₂-O₂-PP) PP yüzeylerde kinetik-kan pıhtılaşma test sonuçları (TCPS kontrol grubu n=6, *p<0.05, **p<0.01).....49
- Şekil 2.11 : İnsan kanından elde edilen PRP ile inkübe edilen (a.1-4) bare PP ve (b.1-4) hep*- NH₂-O₂-PP yüzeylere ait SEM görüntüleri. Büyütme değerleri (a.1, b.1) x150, (a.2, b.2) x500, (a.3, b.3) x2500, (a.4, b.4) x5000.....50

Şekil 2.12 : BJ hücreleri ile inkübe edilen serbest heparin (300 µg ve 400 µg) ve heparinize yüzeylerin (hep*- NH ₂ -O ₂ -PP) MTT sitotoksosite sonuçları (TCPS kontrol grubu, n=5, *p<0.05).....	52
Şekil 3.1 : EPD hücresinin şematik gösterimi.....	54
Şekil 3.2 : AC-EPD düzeneğinin şematik gösterimi.....	54
Şekil 3.3 : AC-EPD destekli yüzey modifikasyonu ve biyolojik testlere ait çoklu deney basamaklarının şematik gösterimi.....	57
Şekil 3.4 : AC-EPD parametrelerinin heparin depozisyon miktarına etkileri. (a,b) Akım genliğinin etkisi, (c) voltaj genliğinin etkisi (n=9, DC Offset= -0.25 mA/cm ²).....	64
Şekil 3.5 : Referans (bare Ti) ve heparinize (Ti-HEP, Ti-HEP _d) yüzeylere ait temas açısı ölçüm sonuçları. (a) Islanabilirlik, (b) serbest yüzey enerji, (c) asit-baz serbest yüzey enerji sonuçları (n=9).....	65
Şekil 3.6 : Referans (bare Ti) ve heparinize (Ti-HEP, Ti-HEP _d) yüzeylerde ıslanabilirlik ölçümleri kapsamında yıpranma hızı analiz sonuçları (n=9).....	67
Şekil 3.7 : Titanyum altaşlarda yıpranma/yaşlanma karakteristiği analiz sonuçları (a) bare Ti, (b) Ti-HEP, (c) Ti-HEP _d (n=9).....	68
Şekil 3.8 : Referans (bare Ti) ve heparinize (Ti-HEP, Ti-HEP _d) yüzeylerde (a,b,c) 3B yüzey topografi görüntüleri, (d) ortalama yüzey pürüzlülük değerleri (Ra), (e) spektroskopik elipsometri tekniği ile tespit edilen film kalınlık verileri (n=3).....	69
Şekil 3.9 : bare Ti, Ti-HEP ve Ti-HEP _d yüzeylerde XPS analiz sonuçları (a) S 2p, (b) C 1s ve (c) Ti 2p spektrum.....	70
Şekil 3.10 : bare Ti ve heparinize (Ti-HEP, Ti-HEP _d) yüzeylerde 7 gün süresince protein tutunum test sonuçları (n=6).....	71
Şekil 3.11 : <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> ve <i>E.coli</i> bakteri suşlarına ait kolonizasyon sonuçları (a) yüzeye tutunmayan (yıkama suyundan, PBS) bakterilerin eldesi ile yapılan ekimler, (b) yüzeye tutunan bakterilerin eldesi ile gerçekleştirilen ekimler (37 °C 'de 24 saat inkübasyon süresi, n=6, *p<0.05, **p<0.005).....	73
Şekil 3.12 : Referans (bare Ti) ve heparinize (Ti-HEP, Ti-HEP _d) yüzeylerde <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i> ve <i>E. coli</i> suşlarına karşı bakteri kolonizasyon SEM görüntüleri. Herbir SEM görüntüsü, yüzeylerin 24 saat inkübasyonu sonrası çekilmiştir. <i>S. epidermis</i> inkübe (a.1) bare Ti, (a.2) Ti-HEP, (a.3) Ti-HEP _d , <i>S. aureus</i> inkübe (b.1) bare Ti, (b.2) Ti-HEP, (b.3) Ti-HEP _d ve <i>E. coli</i> inkübe (c.1) bare Ti, (c.2) Ti-HEP, (c.3) Ti-HEP _d . Alınan tüm görüntüde büyütme katsayısı x2500 değerindedir.....	75
Şekil 3.13 : İnsan kanından elde edilen PRP ile inkübe edilen (a.1-4) bare Ti ve (b.1-4) Ti-HEP, (c.1-4) Ti-HEP _d yüzeylere ait SEM görüntüleri. Büyütme değerleri (a.1, b.1, c.1) x150, (a.2, b.2, c.2) x500, (a.3, b.3, c.3) x2500, (a.4, b.4, c.4) x5000.....	77
Şekil 3.14 : Fibroblast hücreleri ile inkübe edilen Ti yüzeylerin (bare Ti, Ti-HEP, Ti-HEP _d) MTT sitotoksosite sonuçları (TCPS kontrol grubu, n=5, *p<0.05).....	78
Şekil 3.15 : Fibroblast hücreler ile inkübe edilen bare Ti (a.1, a.2), Ti-HEP (b.1, b.2) ve Ti-HEP _d (c.1, c.2) yüzeylerin DAPI boya ile elde edilen floresan mikroskop görüntüleri.....	79

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Referans (bare PP) ve amince-zengin modifiye (NH ₂ -O ₂ -PP) örneklerde XPS taraması ile tespit edilen atomik yüzde değerleri.....	34
Çizelge 2.2 : bare PP ve modifiye PP (O ₂ -PP, NH ₂ -O ₂ -PP, hep- NH ₂ -O ₂ -PP, hep*-NH ₂ -O ₂ -PP) örneklerin temas açısı analiz sonuçları (n=12).....	40
Çizelge 2.3 : Serbest formdaki heparinin ATCC standart suşları üzerine MİK ve MBK konsantrasyon miktarları (heparin kütlece 1:1 oranında EDC ve NHS kovalent bağ ajanları ile muamele edilmiştir, n=6).....	43
Çizelge 3.1 : AC-EPD tekniğinde parametre optimizasyonunda kullanılan değerler.....	55
Çizelge 3.2 : Heparin çözeltisine ait karakterizasyon sonuçları.....	62
Çizelge 3.3 : XPS analizi ile elde edilen Ti, O, C, N ve S atomik yüzde değerleri...	71
Çizelge 3.4 : Pozitif kontrol, negatif kontrol, bare Ti ve heparin modifiye (Ti-HEP, Ti-HEP _d) yüzeylere ait optik yoğunluk ve hemoliz değerleri (n=5)...	76
Çizelge Ek.1: Heparin MİK ve MBK değerleri (n=6).....	101



KISALTMALAR

AA	: Akrilik Asit
AC	: Alternatif Akım
AC-EPD	: Alternatif Akım Elektroforetik Depozisyon
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
CA	: Temas Açısı
CAPP	: Soğuk Atmosferik Basınç Plazma
DPBS	: Dulbecco Fosfat Tampon Çözelti
EDA	: Etilendiamin
EDC	: N-(3-dimetil aminopropil)-N'-etilkarbodiimid
EMEM	: Eagle Minimum Gerekli Besiyeri
EPD	: Elektroforetik Depozisyon
FBS	: Fetal Sığır Albumin
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kıızıl Ötesi Spektroskopi
GA	: Gluteraldehit
KOB	: Koloni Oluşum Birimi
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoltum bromit
NHS	: N-hidroksisuksinimid
PBS	: Fosfat Tampon Çözelti
PEG	: Polietilen Glikol
PlzP	: Plazma Polimerizasyon
PP	: Polipropilen
PU	: Poliüretan
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskop
SSA	: Sığır Serum Albumin
TB	: Toluidine Boya

Ti	: Titanyum
TCPS	: Hücree Kùltürü Plaka Yüzeyi
TSA	: Triptik Soy Agar
TSB	: Triptik Soy Broth
UV-Vis	: Ultraviyole-Görünür Bölge Moleküler Absorbsiyon Spektroskopisi
XPS	: X-Işımı Fotoelektron Spektroskopisi



SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
A	Absorbsiyon
S	Saçılma
R	Yansıma
I	İletilen Işık Yoğunluğu
I_0	Gelen Işık Yoğunluğu
T	Transmitans
k_λ	Atenüasyon Katsayısı
μ	Mikro
ϵ	Molar Absorbsiyon Katsayısı
l	Optik Yol
C	Çözelti Konsantrasyonu
R_p	P-Polarize Işık
R_s	S-Polarize Işık
Ψ	Psi
Δ	Delta

1. GİRİŞ

Vücut dokularının bir kısmının fonksiyonlarını yerine getiremez duruma gelmesi, söz konusu ihtiyacı karşılayabilecek yapay olarak geliştirilen malzemelerin kullanımını gündeme getirmiştir. Geçici ya da kalıcı, dahili ya da harici olarak, tedavi ve/veya onarım gibi amaçlarla vücuda dahil edilen malzemeler implant materyalleri olarak adlandırılmaktadırlar [1]. İmplant materyallerin yüzey özellikleri, kullanıldıkları ortama sağlayacakları biyouyumluluk ve çevreye oluşturdukları cevap ile direkt olarak bağlantılıdır ve in-vivo ortamda uzun süreli kullanım ve performans parametrelerini belirlemektedir. Söz konusu nedenlerle implant materyal tasarımında öncelik, malzemenin kullanılacağı bölgeye uygun yüzey özellikleri geliştirmektedir. Harici bir materyalin kan ile etkileşime geçmesi durumunda ise, plazma proteinleri söz konusu yüzeye tutunacaklar ve pıhtılaşma faktörünü aktive edeceklerdir. Takip eden süreçte, trombositlerin aktivasyonu ve yüzeye tutunumu ile fibrin ağı oluşacak ve bu durum pıhtı oluşumuyla sonuçlanacaktır [2]. Bir diğer yandan, materyal-ilişkili enfeksiyonlar mikrobiyal adhezyona neden olmakta ve bu durum biyofilm oluşumuna sebep olmaktadır. İmplant materyallerin kullanım sıklığı ve süresi göz önüne alındığında, özellikle cerrahi müdahale ile yerleştirilen ve uzun süreli kullanımı planlanan implantlarda başarılı bir kullanım ihtimali ortadan kalkmaktadır [3,4]. Söz konusu problemleri önlemek adına, implant yüzeylerde kan ile uyumluluğu artırmaya ve aynı zamanda antimikrobiyal karakteristik kazandırmaya yönelik çok sayıda strateji geliştirilmiş ancak etkili ve klinik uygulamalara uyarlanabilecek yeni bir materyal geliştirilememiştir. Bu nedenledir ki, halen implant materyallerde yüzey modifikasyonuna yönelik farklı yaklaşımlar geliştirilmekte ve çok sayıda yayın literatüre dahil olmaktadır. Günümüzde ilk sıralarda kardiyovasküler implantların kullanımını görmektedir ve COVID-19 pandemisinin ekstra vakaya neden olduğu göz önüne alındığında hem polimerik hem de metalik implant materyallerde yüzey ve kan uyumu sağlanamaması durumunda in-vivo ortamda pıhtı oluşumu gerçekleşecek ve bu durum kişinin/hastanın hayatını tehlikeye atacaktır [5-11].

Günümüze dek korona boşalım, elektron tabanca uygulaması, x-ray ışınımı, ışıkla başlatılmış ark polimerizasyonu vb pek çok yüzey modifikasyon tekniği kullanılmıştır

[12-15]. Bunların yanı sıra, karbon bazlı nanoparçacıklar [16,17], titanyum oksit [18-21] ve amorf hidrojen bazlı karbon nanoyapılar [22,23] gibi malzemelerle implant yüzeyleri modifiye edilmiş ve sonrasında kan uyumluluk (hemokompatibilite) testleri gerçekleştirilmiştir.

Örneğin; Pandiyaraj ve arkadaşları [26] soğuk atmosferik basınç (CAPP) plazma destekli polimerizasyon tekniğini, polipropilen alttaşlarda yüzey modifikasyonu amacı ile kullanarak, PP alttaşları heparin immobilizasyonuna uygun hale getirmeyi amaçlayan bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Prekursor olarak akrilik asit (AA) ve poliethilen glikol (PEG) kimyasallarının kullanıldığı, devamında heparin immobilizasyonunun gerçekleştirildiği PP yüzeylerde in vitro antitrombojenik karakteristik platelet tutunum ve protein tutunum çalışmaları kapsamında incelenmiştir. Heparinin varlığı platelet ve protein tutunum miktarlarını sırası ile 10 ve 5 kata kadar azaltmış ancak antibakteriyel/antiadherent karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmemiştir. Kang ve arkadaşlarının [110] gerçekleştirdiği bir başka çalışmada ise, poliüretan (PU) alttaşlarda plazma polimerizasyon tekniği ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiş ve PU alttaşlar heparin immobilizasyonuna uygun hale getirilmişlerdir. Çalışma kapsamında parametre optimizasyonunun ve karakterizasyonlarının detaylı olarak çalışıldığı ve immobilize edilen heparinin yaklaşık %80'inin 100 saat boyunca stabil kaldığı deneyimlenmiştir. Ancak heparin varlığının PU alttaşlar üzerindeki biyolojik etkileri (protein tutunum, hücre canlılığına etkisi, antibakteriyel ya da antitrombojenik karakteristik) hiçbir açıdan incelenmemiştir. Literatürde yer alan en kapsamlı çalışmalardan birinde, PP tekstil ürünleri alttaş olarak kullanılmış ve akrilik asit yardımı ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Takip eden basamaklarda ise heparin ve gentamisin biyomoleküllerinin immobilizasyonu gerçekleştirilerek biyolojik testler de dahil olmak üzere detaylı olarak test edilmiştir. Hücre canlılığı ve üreme davranışı, S. aureus gram pozitif bakteri suşuna karşı antiadherent karakteristiği üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilerek, geliştirilen yüzeylerin in vivo çalışmalarda kullanım potansiyeli taşıdığı sonucuna ulaşılmıştır [123].

Ancak halen gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları sahip oldukları çeşitli dezavantajlar (uzun süreli işlemler, düşük stabilite, yüksek maliyet vb) nedeniyle idealden oldukça uzak performans sergilemekte ve araştırma skalasında kalıp kliniğe uyarlanamamaktadır. Bir diğer yandan, geliştirilen yüzeylerin insanlarda implant

materyal amaçlı kullanımında önünü açacak biyolojik testler (protein tutunumunu engelleyen, hücre canlılığına negatif etkisi bulunmayan, antibakteriyel ve antiadherent arayüzey sağlan vb) çalışılmamıştır. Ayrıca polimerik alttaşlarda sinerjik etki dışında, heparinin saf halde kullanımı üzerine kurgulanan bir başka çalışmaya da rastlanmamıştır. Söz konusu nedenler, implant materyal yüzeylerinde etkili ve uzun süreli stabil, antikoagülan, antibakteriyel ve antiadherent karakteristikte yüzey modifikasyonu gerektiği sonucunu halen vurgulamaktadır.

Yukarıda değinilen sorunların çözümü adına söz konusu tez, klinikte güncel ve yaygın olarak kullanılan antikoagülanların başında gelen “Heparin” adlı glikozaminoglikan aracılığıyla yüzey modifikasyonu üzerine kurulmuştur [24,25]. Heparin, anyonik, yüksek miktarda sülfat içeren bir mukopolisakkarit olmakla birlikte uniform olmayan bir moleküler yapıya sahiptir. Özellikle damar içi implant materyal yüzeylerin kan ile teması durumunda pıhtılaşma oluşması, klinikte damardan Heparin enjeksiyonu ile engellenmektedir. Bu yaklaşım, pek çok araştırmacının biyomalzeme yüzeyine Heparin tutunumunu sağlamaya çalışmasına neden olmuştur. Günümüze dek geliştirilen çalışmalarda implant materyallerin kan ile temas eden yüzeylerinde pıhtı oluşumunu önlemek adına, söz konusu malzemelere hemokompatibilite karakteristiği kazandırılmaya çalışılmıştır [26-30]. Örnek olarak bu amaç doğrultusunda, farklı karakteristikteki (hidrofilik, hidrofobik, zwitteriyonik, pozitif ya da negatif yüklü) çeşitli polimerden yararlanılmıştır. Bu nedenle her geçen gün uygulaması kolay, düşük maliyetli ve stabil bir Heparin immobilizasyon stratejisi geliştirilmeye çalışılmaktadır [31].

Heparin immobilizasyonu gerçekleştirilmek üzere iki grup malzeme kullanılmıştır; Polipropilen (polimerik model) ve titanyum (metalik model). Polipropilen (PP) kardiyovasküler implantlar başta olmak üzere pek çok biyomedikal uygulamada önde gelen polimer gruplarından biri olduğundan, tez kapsamında seçilen alttaşlardan biri olmuştur [32]. Titanyum (Ti) ise özellikle yüksek mekanik dayanımı sebebiyle vena-cava filtresi ve stent üretiminde yaygınlıkla kullanıldığından tez kapsamında model metalik alttaş olarak seçilmiştir [33]. Yaygınlıkla kullanılmalarına rağmen, her iki alttaşa da in-vivo kullanım söz konusu olduğunda, düşük hemokompatibilite karakteristikleri, kan ve implant materyal yüzeyin etkileşimi ile korozyon ve pıhtı oluşumuna, uzun süreli kullanımda ise implant-ilişkili enfeksiyon problemlerine yol

açmaktadır [34,35]. Söz konusu dezavantajlar, her iki alttaşı da Heparin immobilizasyonu için ideal adaylar haline getirmektedir.

Plazma polimerizasyon (PlzP) tekniği, homojen bir kaplama sunması, angström skalasından başlayan ince film üretimine olanak tanınması ve özellikle alttaşın yağın yağısına müdahale etmeksizin yüzey modifikasyonu sağladığı için günümüze dek yaygın olarak yüzey modifikasyonunda kullanılmaktadır [36-39]. Biyolojik bileşenlerle temas halinde olacak yüzeyler için, protein, DNA, antibadi vb biyomoleküller ile aralarında kovalent bağ oluşturmak adına amince-zengin prekursorlar yaygın olarak tercih edilmektedirler [40-43].

Elektroforetik depozisyon (EPD) tekniği özellikle son yıllarda düşük maliyetli, düşük sıcaklıkta çalışılarak yüksek saflıkta kaplama imkanı sunması nedeniyle üç boyutlu ya da karmaşık geometriye sahip alttaşlarda dahi istenilen kalınlıkta homojen kaplama sağlaması ile ön plana çıkmaktadır. EPD tekniği genel anlamda organik çözücüler, uygulanan gerilimin sıvı ortamda elektrolize neden olarak, gaz baloncukları oluşturması, elektrotlarda pH değişimine ve joule ısınmalarına sebep olmaktadır. Kullanım sınırına neden olan bu dezavantajlar son yıllarda yerini, alternatif akım uygulaması (AC-EPD) ile ortamdaki sıvı çözeltinin elektrolizini engellemekte ve dolaylı yoldan gaz baloncuk oluşumunun da önüne geçerek pH değişimini de engelleyebilmektedir [44]. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, biyomolekül ya da hücrelerin, inorganik partiküllerin atımlı ya da alternatif akım uygulanması durumunda hatasız kaplamalar yapılabilmektedir [45,46]. Bu teknik günümüze dek biyosensör uygulama alanında glukoz oksidaz (GOX) vb enzim depozisyonu için kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Çeşitli hücre ve bakteri (*E. coli*, *S.aureus*) tespitine yönelik biyosensör uygulamaları da farklı çalışmalarla gösterilmiştir [47-49].

Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda söz konusu doktora tez çalışmasında, Polipropilen (PP) alttaşlarda plazma polimerizasyon tekniği (PlzP) ile pozitif yüklü ince film kaplama işlemi, amince zengin prekursor olarak etilendiamin (EDA) ile gerçekleştirilmiştir. Yüzey modifikasyon işleminin ardından heparin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Titanyum (Ti) alttaşlarda ise alternatif akım elektroforetik depozisyon (AC-EPD) tekniği ile heparin depozisyonu gerçekleştirilmiştir. Her iki model yüzeyler de, ilerleyen basamaklarda immobilize edilen heparin miktarı, heparin

stabilitesi, protein tutunum davranışı, antibakteriyel karakteristik ve hemokompatibilite kapsamında detaylı olarak incelenmiştir.

1.1 İmplant Materyaller

Implantlar, vücut yapısını desteklemek ya da herhangi bir eksiklik/yetersizlik durumunda başvurulmuş malzemeler olarak adlandırılabilir. Diş hekimliği, ortopedi, nörocerrahi, kardiyovasküler cerrahi, üroloji, plastic ve yeniden yapılandırıcı cerrahi olmak üzere oldukça geniş bir kullanım yelpazesi bulunmaktadır. Bu denli geniş bir kullanım alanlarının bulunması şu ihtiyaçlara dayandırılabilir; yaralı, hasarlı ya da hastalıklı bölgede anatomik anlamda yenilenme gerekmesi durumunda ya da görünümdeki bir deformasyonun düzeltilmesi gerektiğinde kullanımları söz konusudur [50-54].

Kardiyovasküler hastalıklar global anlamda erken ölümün başlıca nedeni olmakla birlikte her ülke için oldukça yüklü bir finansal yük taşımaktadır [55]. Klinikte uygulanan tedavi yöntemleri halen kritik seviyede hasta olan insanlar için etkili bir tedavi sağlayamamaktadır. Ancak, kan-temaslı materyaller alanında süregelen gelişmeler, girişimsel cerrahi ve implante araçların kullanımını mümkün hale getirmekte ve klinikte hasta hayatını kurtarmaya katkı sağlamaktadır. Ayrıca, FDA onaylı çeşitli kardiyovasküler implant markaları yılda milyonlarca hastanın fayda görmesini sağlamaktadır. Ancak yine de, halen hastaların tam anlamıyla iyileşmelerini sağlayacak ideal bir araç bulunmamakta ve kardiyovasküler hastalıkların önüne geçilmesini sağlayamamaktadır [56]. Özellikle son iki yılın global sağlık sorunu olan COVID-19 pandemisi, yoğun bakım ünitelerindeki hasta yoğunluğunu öngörülemez miktarda artırmış ve damar içi implant kullanım oranını 5 kata kadar artırmıştır [57].

Örneğin, endovasküler stentler göz önüne alındığında, iltihap oluşumunu durumunda müdahale gerektirmektedir. İmplant yüzeyin kısıtlı hemokompatibilitesi, yüzeyinden toksik iyon (Cr, Ni, Co) salınımını da tetiklemektedir ki bu durum uzun süreli stent kullanımlarında hastaların ölümü ile sonuçlanabilmektedir [58]. İlaç kaplı stent (DES)'ler ise stent tasarımında son atılımlardan biri olarak değerlendirilmektedir. Ancak, söz konusu sistemdeki sorun ise uzun süreli klinik çalışmalarda kullanımının henüz mümkün olmamasıdır [59]. Yapılan bir araştırmada stent yüzeyinden salınan ilacın endotelleşme sürecini geciktirdiği ve ilerleyen süreçte trombozise neden olduğu gösterilmiştir [60]. Stentler ile benzer fonksiyonlara sahip vasküler aşılarda (graft)

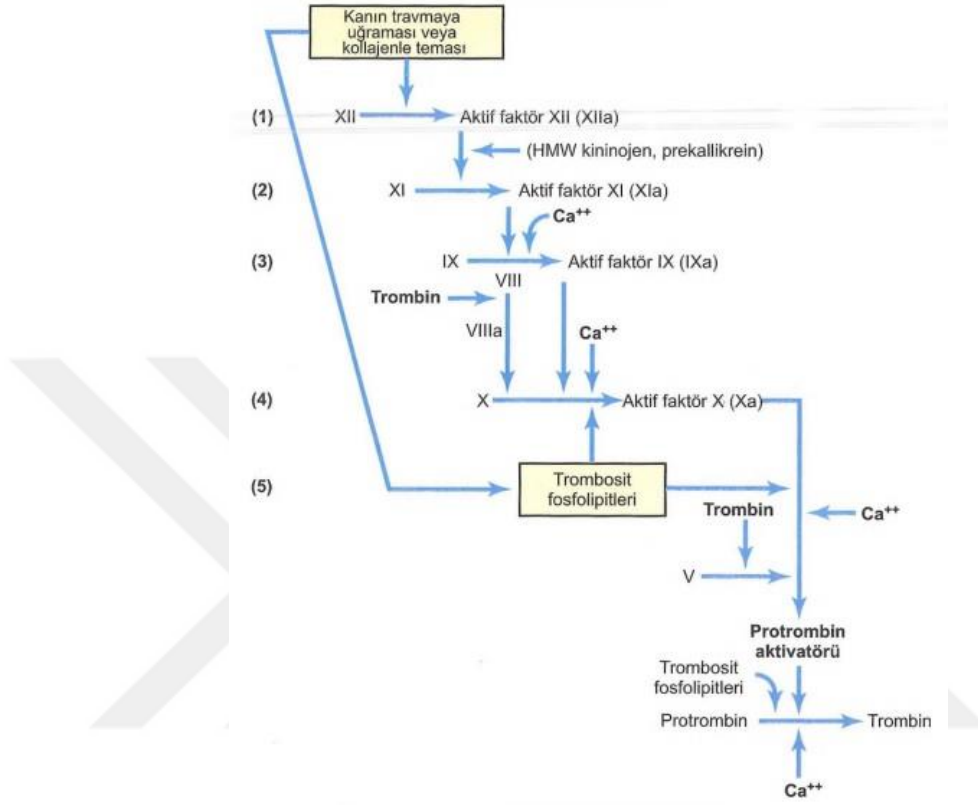
özellikle coroner arter müdahalelerinde hastalıklı damarın yenilenmesinde ya da by-pass edilmesinde kullanılmaktadır. Özellikle yarıçapı 5 mm'den küçük olan yapay grafların düşük biyokompatibiliteleri restenosis ve trombozise neden olmaktadır. Bu bağlamda, mekanik anlamda elverişli, tromboz oluşumunu engelleyebilen [61], biyouyumlu ve küçük-çaplı bypass grafları klinik uygulamalarda halen ihtiyaç duyulan öncelikle parametrelerden biridir.

1.1.1. Kan-implant arayüzey etkileşimi ve mekanizması

Özellikle kardiyovasküler araç-gereçlerde, başarısızlıkla sonuçlanan implant kullanımının başlıca nedeni, implant yüzeyinin kan-malzeme arayüzeyine uygun olmamasından kaynaklanmaktadır [62]. Kardiyovasküler sistem ile entegre edilen materyaller ya da cihazlarda istenmeyen bazı reaksiyonlar kaçınılmazdır: (i) malzeme yüzeyine protein tutunumu ve değişen konformasyonları nedeni ile biyolejik fonksiyonelliklerini yitirmeler, (ii) koagülasyon kaskadını harekete geçirmeleri ve fibrin oluşumuna neden olmaları, (iii) immün sistemin uyarılması ile birlikte tamamlayıcı pıhtılaşma kaskadının da aktive olması ve bölgesel enfeksiyon oluşması, (iv) stent ya da yapay graft gibi implantlarda, endotel hücrelerin hasar görmesi ve ilerleyen süreçte hasarın kontrolsüz artması.

Genel anlamda koagülasyon kaskadı, yapısında pozitif ileri ve geribildirim mekanizmaları bulunan, dolaşım sisteminin geliştirdiği karmaşık bir fizyolojik yanıt olarak değerlendirilmektedir [63]. Yabancı bir malzemenin kan ile temas etmesi durumunda, plazma proteinleri birkaç dakika içerisinde malzeme yüzeyine tutunur [64]. Implant yüzeyin fiziksel ya da kimyasal Yüzey karakteristiği, yüzeye tutunan proteinin dönüşüm mekanizmasını tetikleyerek proteinin aktif bölgelerine maruz kalır. Söz konusu konformasyonel değişim koagülasyon faktör XII'yi aktive eder ve bu faktör de intrinsek pıhtılaşma kaskadını başlatır [65,66]. Sonrasında ise, kanda bulunan plateletler, koagülasyon kaskadında ki trombine, hasar gören hücrelerden salınan adenosin difosfatlara ve kesme kuvveti gibi pek çok dış uyaran cevap üretir (Şekil 1.1). Bu süreç herhangi bir trombojenik yüzeyde (örneğin; hasar almış bir entodelyumda stent yardımı ile içeri girerek ve bölgeyi genişleterek, ya da yapay bir vasküler graftı vücuda yerleştirerek) sırası ile plateletlerin tutunumu, aktivasyonu ve agregasyonuna neden olur. Platelet aktivasyonu, stabil bir pıhtı oluşumuna öncülük ederek, fibrinlerin de plateletlerle etkileşimi süresince oluşan pıhtının büyümesini

sağlayarak, implant kullanımının başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olur [67,68]. Söz konusu nedenlerle platelet aktivasyonunu engelleyen ve fibrinojen deformasyonu sağlayan hemokompatibilitesi yüksek materyal yüzeyler geliştirmek, sorunun başlıca çözümü olacaktır.



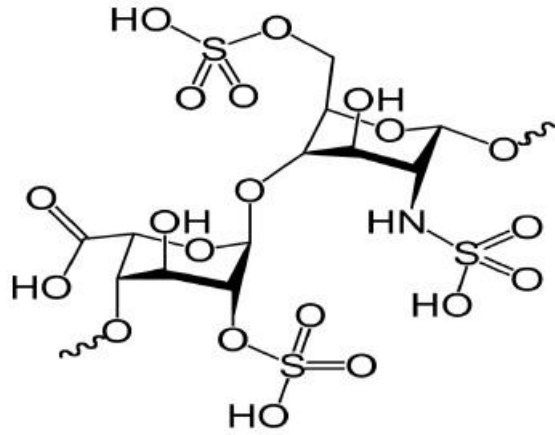
Şekil 1.1: Pıhtılaşma mekanizmasının başlatılmasında intrinsek yol [69].

Bir diğer yandan, implant-ilişkili enfeksiyon vakalarının sayısı, implant kullanım miktarına ve süresine bağlı olarak hızla artmakta, materyal yüzeyine mikrobiyal tutunumun gerçekleşmesi ile biyofilm oluşum süreci başlamaktadır. Bu durum cerrahi müdahale ile yerleştirilen implantın yeniden aynı teknikle çıkarılması ihtiyacını ortaya çıkarmakta ve biyomalzemelerin insana vücudunda başarılı bir şekilde ve süreçte kullanımını sekteye uğratmaktadır [70,71]. Implant yüzeyine bakteri tutunumunun başlaması ile birlikte, vücutta patojen kaynaklı enfeksiyonlar başlamaktadır [72]. Yüzeye tutunan hücreler, polisakkarit matriks salgılayarak, metabolik aktivitelerini sürdürmekte, büyümekte ve bölünmektedir. Söz konusu durum implant-ilişkili ya da biyofilm-ilişkili enfeksiyon olarak adlandırılmaktadır. Biyofilm oluşum süresince, akümülyasyona bağlı yeni planktonik bakteri hücreleri oluşmaya devam etmekte ve dinamik bir çevre kirliliği meydana gelmektedir [73]. Bakteri kaynaklı biyofilm oluşumu ile birlikte, hastanın antibiyotik kullanımı artacak ve söz konusu bakteri

türleri kullanılan antibiyotiğe direnç sergileyeceklerdir. Sonuç olarak, damar içi implant materyal yüzeylerinde hemokompatibilitiyi artırmak kadar, bakterilerin yüzeye tutunmasını engelleyen, hatta yüzey ile temas etmeleri durumunda öldüren yeni implant yüzeyleri geliştirmek birincil önem teşkil etmektedir.

1.2 Heparin

Heparin, düz zincir yapısında kompleks bir sülfatlı polisakkarid, bir başka deyişle glukozaminoglikandır (Şekil 1.2). Heparini oluşturan sakkarid polimerlerinin molekül ağırlıkları 3-30.000 dalton aralığındadır. Bu durum standard heparinin birbirinden oldukça farklı uzunluklarda sakkarid polimerlerinden oluşan son derece heterojen bir yapıda olduğunu göstermektedir. Yapısında yoğun miktarda sülfatlı grup bulundurması, heparini güçlü bir anyonik biyomolekül yapmaktadır. Böylelikle, heparin katyonik karakteristikteki biyomoleküller veya protein yapılar ile kolaylıkla kompleks oluşturabilmektedir [74].

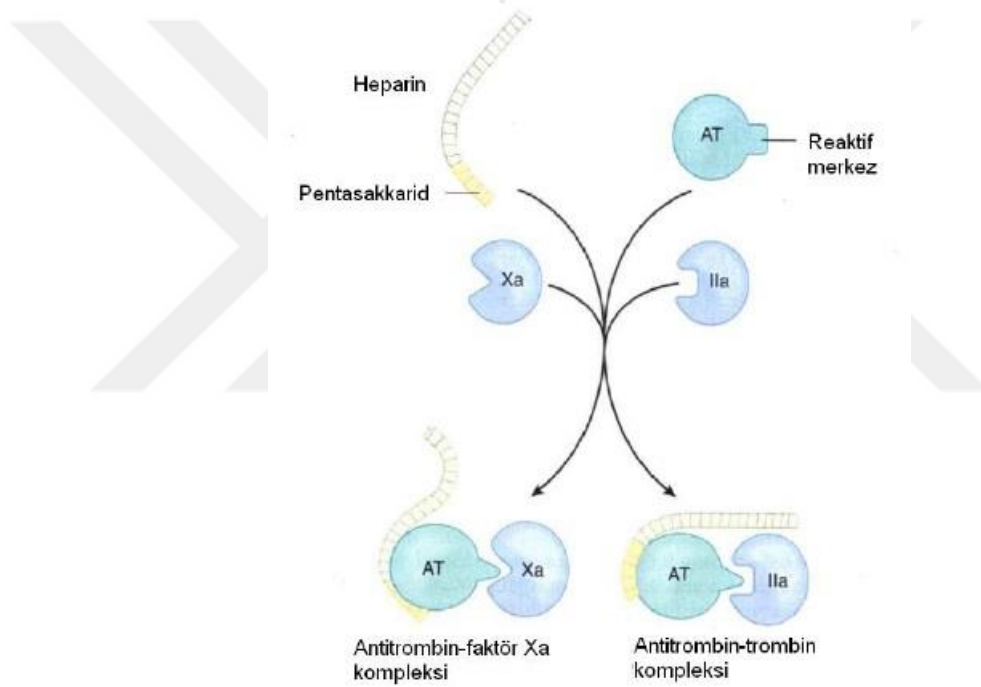


Şekil 1.2. Heparin'in kimyasal yapısı [74].

1.2.1. Heparin'in etki mekanizması

Heparin, bir yandan antithrombinin etkisini güçlendirirken bir diğer yandan da heparin-kofaktör II'yi katalizler. Heparin-kofaktör II de serpin ailesinin 66.000 Da molekül ağırlıklı bir üyesidir ve trombinin spesifik bir inhibitörüdür [75]. Heparinin, heparin kofaktör II'nin etkisini artırabilmesi için de en az 26 sakkarid ünitesinden oluşan heparin zincirleri gerekir. Bu da yaklaşık 7.800 Da moleküler ağırlığına karşılık gelmektedir [76,77]. Daha uzun heparin zincirleri kısa zincirlere göre heparin-kofaktör

II'yi daha iyi aktive eder. Bir diğey yandan, daha uzun zincirler heparin-kofaktör II'nin üçlü bir kompleks oluşturmak için trombinin de bağlayabilmektedir [78]. Söz konusu üçlü kompleksin oluşumu thrombin ile heparin-kofaktör II'yi daha yakın bir pozisyona getirir ve böylelikle etkileşimlerini güçlendirir (Şekil 1.3). Heparin'in, heparin-kofaktör II ile etkileşimi için pentasakkarid gibi yüksek afiniteli özel bir disakkarid dizisi yoktur [79]. Bu nedenle heparinin, heparin kofaktör II için afinitesi antitrombinden çok daha azdır. Heparin ancak plazmada normal miktarlarınının 10 katından yüksek konsantrasyonlarda heparin-kofaktör II üzerinden thrombinin inhibisyonunu hızlandırabilir [80].



Şekil 1.3 : Heparin'in etki mekanizması [74].

1.2.2. Antikoagulan etkinin izlenmesi

Heparinin antikoagulan etkisi hem in-vivo, hem de in-vitro koşullarda oluşur ve hemen ortaya çıkar. Bu etki temelde heparinin inaktif durumda ki bir alfa iki globulin bulduran AIII'ü aktif duruma getirmesine dayanır. AIII'e heparin kofaktörü adı da verilmektedir. Normal koşullarda plazmada 18-30 mg/dl konsantrasyonda bulunur ve yarılanma ömrü 24 ila 36 saat arasındadır. Heparinin antikoagulan etkisine yüksek katkı, trombin ve faktör Xa'nın inhibisyonudur. Heparin aktive ettiği AIII aracılığı ile

trombinin fibrinojen üzerindeki doğrudan ve aktif trombin oluşmasını azaltarak inhibe eder; sonuçta fibrinojenin fibrine dönüşmesini engeller.

Ancak heparinin en önemli yan etkisi kanamaya neden olmasıdır. Hassas kişilerde cilt altına enjeksiyon yerinde nekroza neden olabilmektedir. Erken ya da geç (klinik anlamda önem arz etmektedir ve 6-10 gün sonunda bile gelişebilir) tipte trombositopeni yapması sorun oluşturabilir. Heparin dozu, tam knada aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı (aPTZ) ve aktive edilmiş koagülasyon zamanı (aKZ) testi ile izlenir. Piyasada bulunan heparin birkaç farklı hayvan dokusunda elde edilebilmektedir. Kilogram başına 0.5-1 miligram gibi düşük dozların enjeksiyonu normalde yaklaşık 6 dakika olan pıhtılaşma süresini 30 dakika ve üzerine çıkarabilmektedir. Bu etki yaklaşık olarak 1-4 saat sürer. Enjekte edilen heparin kanda heparinaz enzimi tarafından parçalanır [74].

1.2.3. Uygulama dozları

Tedavi amaçlı heparin ve türevlerinin uygulamasını standardize etmek, erkin bir antikoagulan cevabı almak için gerekli zamanı kısaltmak amacıyla sabit dozlu olarak ve kiloya göre ayarlanmaktadır. Kiloya göre verilen heparin tedavilerinde akut koroner sendromlu hastalarda 5.000 U ya da 70U/kg intravenöz heparin verildikten sonra, infüzyon hızı 12-15 U/kg.saat olacak şekilde devam ettirilmektedir. Aksine, venöz tromboembolizmi olan hastalarda kiloya göre verilen heparin tedavilerinde 5.000 U ya da 80U/kg, devamında 18U/kg.saat infüzyon hızı ile tedavi uygulanmaktadır. Venöz tromboembolizmi olan hastalarda iki tedavi protokolü de onaylanmış ve ikisinin de terapötik cevabı elde etmek için gereken zamanı önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir [81,82,83].

1.3 Plazma Polimerizasyon (PlzP) Tekniği

Plazma, uyarılmış atom, molekül, iyon ve/veya radikallerden oluşan ve maddenin dördüncü hali olarak adlandırılan tekniktir [84,85]. Plazma fazı, mikrodalga, radyo frekans (RF) veya sıcak filament boşalımı sonucu oluşan elektronlar yardımıyla gaz fazındaki enerjik seviyeyi bir üst seviyeye çıkarılarak oluşur. Söz konusu faz, birçok plazma-yüzey reaksiyonunun gerçekleştiği alışılmış dışı reaktif bir ortam oluşturmaktadır. Plazma içerisinde yoğun miktarda bulunan iyonlar ve uyarılmış

türler, hertür alttaşın yüzey özelliklerini değiştirebilmektedir. Ayrıca, plazma teknikleri alttaşın geometrisinden bağımsız, başarılı bir yüzey modifikasyonu sağlamaktadır [86].

Plazma polimerizasyon (PlzP) tekniğinin avantajları şu şekilde sıralanabilir; malzemenin yüzey enerjisini değiştirebilme, yapışma mukavemeti ve biyouyumluluğu artırabilme vb birçok değişimi malzemenin yığın yapısından ve geometrisinden bağımsız olarak gerçekleştirebilmektedir. Yine de, bu tekniğin en önemli avantajı, malzeme yüzeyini yığın yapısına müdahale edilmeksizin, kimyasal, mekanik, biyolojik, optik ya da elektriksel yapısını yani yüzey karakteristiğini, yüksek verimle değiştirebiliyor olmasıdır. Yüzey modifikasyonunun yanı sıra, plazma tekniği yüzey sterilizasyonu ve temizliğinde, yüzeyin belirli bir desen ile modifiye edilmesinde, dolayısıyla mikroelektronik endüstrisinde de kullanılabilir.

1.3.1. Plazma ile yüzey modifikasyon teknikleri

Plazmanın oluşturulabilmesi için gaz halindeki atom veya molekülden elektron koparılmalı ya da iyonize hale getirilmelidir. İyonizasyon, atom veya molekül dışarıdan uyarılarak ya da başka bir atom ile çarpıştırılıp daha enerjik hale getirilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Gaz, metal ve lazer gibi çeşitli plazma kaynakları bulunmaktadır. Genel olarak bakıldığında gazdan plazma oluşumu, ortamdaki gazın uygulanan potansiyel etkisiyle ateşlenmesi yoluyla gerçekleşmektedir.

Doğru akım (DC), radio frekans (RF) ısıtılı boşalım ve elektron hızlandırıcı rezonans (ECR) gibi plazma kaynaklarında plazma oluşumunun düşük basınçta gerçekleştiği görülmektedir. Bunun sebebi, düşük basınçta plazma oluşum potansiyelinin atmosferik basınca kıyasla az olması ve akımın kontrol edilebilir olmasıdır. Düşük basınç plazma kaynaklarında electron yoğunluğunun kontrol edilebilmesinden dolayı geniş alanda homojen plazma oluşturulabilmekte ve bu nedenle düşük basınçlı plazma kaynakları sıklıkla tercih edilmektedir [87,88].

Bahsi geçen şekilde plazma oluşturulduktan sonra yüzeyde polimerizasyon, aktivasyon, implantasyon, temizleme, dağlama vb çeşitli değişiklikler

yapılabilmektedir. Doktora tez kapsamında, PlzP tekniği yüzeyde polimer ince film üretmek ve yüzeyde aktivasyon gerçekleştirmek amacı ile kullanılmıştır.

Plazma Birikim: Elde edilen kaplamanın yığın yapıdan bağımsız, tamamen farklı özellikler gösterebilmesi nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. İkili plazma birikimi, plazma-graft, ko-polimerizasyon, ve plazma polimerizasyonu bu yöntemin gerçekleştirilmesi için kullanılan tekniklerdir.

İkili plazma birikimi, gaz ve metal plazmaların eş zamanlı olarak sırasıyla RF ve vakum ark kaynakları kullanılarak üretilmesi ile gerçekleştirilir. İkili plazma birikimi, farklı kombinasyonlarda birkaç farklı elementten oluşan ince filmlerin oluşumuna olanak sağlamasından dolayı ince film teknolojileri arasında yaygın olarak kullanılanlardandır.

Polimerik malzemeler plazmaya maruz bırakıldığında, polimer zincirlerinde radikaller oluşmaktadır. Söz konusu radikaller, sıvı veya gaz fazdaki monomer ile karşılaştığında polimerizasyon reaksiyonunu başlatabilmektedir. Böylelikle, yüzeyde graft kopolimerizasyon gerçekleşebilmektedir. Plazma-graft kopolimerizasyonunda ise, öncelikle polimer plazmaya maruz kalarak plazmadaki elektronların elastik olmayan çarpışmaları sonucu yüzeydeki polimer zincirlerinde radikal oluşumu gerçekleşmektedir. Sonrasında, polimer yüzeyleri monomere maruz bırakılarak yüzeyde plazma-graft kopolimerizasyon gerçekleştirilebilmektedir.

Bu teknik genellikle yüzey hidrofilitatesini değiştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu doğrultuda, polimer yüzeyinde radikallerin oluşumu için öncelikle argon, helium veya azot plazmasına kısa süreliğine maruz bırakılır. Daha sonra, Yüzey yüksek sıcaklıkta monomer buharında belirli bir süre bekletilerek kaplama gerçekleştirilir.

Plazma polimerizasyon yönteminde ise, monomerden polimer sentezi plazmada bulunan enerjik elektron, iyon ve/veya radikaller yardımı ile yapılmaktadır. Plazma polimerizasyonu, iyon ve radikallerin yardımı ile gerçekleşmesinden dolayı geleneksel polimerizasyon yöntemlerine kıyasla farklıdır. Genel olarak, plazma polimerizasyonu sonucunda oluşan monomer ile polimerik ince filmin kimyasal kompozisyonu, geleneksel radikal veya iyonik polimerizasyon reaksiyonu sonucunda oluşan monomer ile elde edilen polimerden farklılık göstermektedir. Söz konusu farklılık, polimer oluşum mekanizmasından kaynaklanmaktadır. Plazma ile plazma polimerizasyonu; monomerden radikal oluşumunun plazma aktivasyonu ile sağlanması, oluşan

radikallerden rekombinasyonu ve rekombine moleküllerin yeniden etkileştirilmesi aşamalarını içermektedir. Elde edilen polimer geleneksel polimerizasyon reaksiyonları sonucu sentezlenen polimerden farklı olarak, tekrar eden monomer birimleri, çapraz bağlı, parçalı ve yeniden düzenli karmaşık birimler içermektedir [84-86].

1.3.2. Plazma polimerizasyonunu (PlzP) etkileyen parametreler

Plazma doğası gereği kaotik bir ortam olmasının yanı sıra boşalım gücü, uygulama süresi, basınç, kullanılan monomerin kimyasal yapısı, modifiye edilecek olan malzemenin reaktör içerisindeki konumu, reaktör dizaynı, sıcaklık ve kullanılan jeneratörün frekans aralığı gibi birçok değişkenden etkilenmektedir. Kullanılan cihazın dizaynına göre söz konusu değişkenlerden bazıları oluşturulan ince filme etki etmemektedir. Örneğin; bu çalışmadaki gibi tek bir düşük RF plazma sistemi üzerinden yürütülmesi durumunda, reaktör dizaynı, kullanılan jeneratörün frekans aralığı ve sıcaklık parametreleri etkisiz hale gelmektedir. Ancak boşalım gücü, uygulama süresi, monomerin kimyasal yapısı ve basınç (akış hızı) kaplama optimizasyonu süresince dikkat edilmesi gereken parametrelerin başında gelmektedir.

Boşalım Gücü:

Boşalım gücü, sıvı veya gaz haldeki monomerden plazma haline geçmek için uygulanan güçtür. Plazma hali, monomerdeki en zayıf bağın kırılmasına yetecek boşalım gücü verildiğinde oluşmaktadır. Söz konusu eşik değer geçildikten sonra boşalım gücü artırıldıkça bağ enerji sıralamasına göre düşükten yükseğe bağ kırılımı gerçekleşmektedir. Her farklı bağ kırılımı, farklı radikallerin oluşumuna sebep olacağından elde edilen ince filmlerin kimyasal yapısı birbirinden farklı olmaktadır. Bu nedenler, boşalım gücü çalışırken dikkat edilmesi gereken en önemli parametredir.

Uygulama Süresi:

Uygulama süresi ise kaplamanın kimyasal yapısına etki etmeyen ancak kaplama kalınlığı ile doğrudan bağlantılı olan bir parametredir. Uygulama süresi arttıkça ince

filmin kalınlığı artmaktadır. Bu sebeple amaca yönelik uygulama süresi optimizasyonu yapılmalıdır.

Basıncı:

Plazma işlemi sırasında kullanılan akış hızı doğrudan reaktör içerisinde ki basıncı etkilemektedir. Reaktör içi basınç ise reaktörde bulunan monomer miktarı ile ilintilidir. Basıncın yüksek olduğu durumlarda uygulanacak boşalım gücünün düşük olduğu hale göre daha yüksek olması gerekmektedir. Aksi halde, birim monomerdeki hedeflenen bağı kırmak için gerekli güç uygulanamayacak, dolayısıyla istenilen kimyasal yapıda ince film veya modifikasyon elde edilemeyecektir.

Monomer Seçimi:

Kullanılan monomerin kimyasal yapısı ise, plazma işlemi doğrudan etkileyen bir diğer parametredir. Amaca uygun monomer seçimi ve modifikasyonu sonucunda beklenen fonksiyonel grupların oluşumu monomerin kimyasal yapısına bağlıdır. Doğru monomer seçilmediği takdirde boşalım gücünü, uygulama süresini veya basıncı değiştirmek, istenilen sonuca ulaştıramamaktadır. Ayrıca seçilen monomerin yapısı (düz zincirli veya halkalı) monomerdeki bağların kırılma önceliğini yani ince filmin yapısını değiştirdiği için bu parametreye özellikle dikkat edilmelidir [89].

1.4 Elektroforetik Depozisyon (EPD) Tekniğı

Elektroforetik depozisyon (EPD), elektroforez ve depozisyon olmak üzere iki farklı sürecin kombinasyonu şeklinde tanımlanabilir. Elektroforez, bir süspansiyondaki yüklü parçacıkların elektriksel alan uygulanması halindeki hareketlerini içerir. Diğer tekniklere kıyasla sunduğu öncelikli avantaj, oldukça yüksek saflıkta malzeme birikimine olanak sağlaması ve farklı kompozisyonlardaki metal yapılar üzerine kaplama yapma olanağı sunması ve böylelikle biyomedikal uygulama alanlarında her geçen gün kullanımını artmaktadır [90]. Depozisyon ise mikro ya da nanoparçacıkların koagülasyon sonucu yoğun kütleler oluşturması şeklinde tanımlanabilir [91]. Ancak

depozisyon işleminin etkin, konformal ve homojen bir kaplama sağlayabilmesi için net yük taşıyan, kararlı bir süspansiyon gerekmektedir [92].

Elektroforetik depozisyon (EPD), kararlı bir süspansiyondan gelen yüklü parçacıkların, zıt yüklü altındaki bir substrat yüzeyinde doğru ya da alternatif (DC/AC) akım altında biriktirilmesini içeren bir tekniktir. Bu yöntem ile, toz halindeki malzemenin karmaşık yapıları elektrotlar üzerine homojen birikmesi sağlanabilir. Yığın seramiklerin oluşması durumunda, biriktirme yapılmış elektrotun depozitten ayrılması gerekir [93].

Standart bir EPD işleminde, çalışma elektrodu (alttaş materyal, working electrode) ve sayıcı elektrot (counter electrode) olmak üzere iki adet elektrot çözeltiye daldırılmalıdır. Elektriksel alan uygulandığında, yüklü parçacıklar, zıt yüklü elektroda doğru hareket etmeye başlayacaklardır ve böylelikle elektrot yüzeye depozite olarak kaplama işlemi gerçekleşecektir. EPD tekniğinin düşük-maliyet, yüksek saflık ve tekniğin basit bir şekilde uygulanması vb avantajları, söz konusu tekniğin biyomalzeme modifikasyon stratejileri arasında yer almasını sağlamıştır[90]. Bu şekilde, oldukça geniş alanda malzeme ve alttaş çeşitliliği ve geometrisi kullanılarak düşük maliyetli kaplamalar gerçekleştirilebilmektedir. EPD tekniğinde oldukça yaygın tercih edilen organik çözücüler, uygulanan gerilimin sıvı ortamda elektrolize neden olarak, gaz baloncukları oluşturmaya, elektrotlarda pH değişimine ve joule ısınmalarına sebep olmaktadır. Bu durum EPD kullanımında kısıtlara neden olduğundan, günümüzde atımlı direkt akım (pulsed direct current) ya da alternatif akım (alternative current (AC)) uygulanmasına ağırlık verilmesine neden olmuştur. Özellikle alternatif akım uygulanması durumunda ortamdaki çözeltinin elektrolizi engellenebilmekte ve dolaylı yoldan baloncuk oluşumunun önüne geçilebilmekte ve bu duruma bağlı pH değişimi de engellenebilmektedir [95].

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, biyomolekül ya da hücrelerin, inorganik partiküllerin atımlı ya da alternatif akım uygulanması durumunda sorunsuz kaplamalar yapılabilmektedir [46]. Glukoz oksidaz, beta-galaktosidaz ve glutamat oksidaz depozisyonları platin yüzeylerde gerçekleştirilerek biyosensör uygulamalarında sırası ile glukoz, laktoz ve glutamat tespitinde kullanılmışlardır [47-49]. Böylelikle AC-EPD tekniğinin biyomolekül depozisyonunu uygun yüzeylerde başarı ile gerçekleştirebildiği ispatlanmıştır [45]. Literatürde yer alan bir başka çalışmada ise

AC-EPD tekniği ile titanyum alttaşlarda hem enzim aktivitesi hem de *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı antibakteriyel karakteristik sergilemiştir [49].

1.4.1. Elektroforetik depozisyonu (EPD) etkileyen parametreler

Depozisyon Potansiyeli:

Depozisyon sũresince uygulanan potansiyel, oluşturulan ince filmin kalitesi ve stabilitesi ũzerinde ˆnemli rol oynamaktadır. Yapılan alışmalar, çeşitli gerilimlerde oluşturulan filmlerin parçacık boyutlarında farklılık oluşturduğunu gˆstermiřtir [90].

ˆzelti pH'sı:

ˆzelti içerisindeki H iyonlarının konsantrasyonu, elektrolitin pH'ını etkileyen bir diğer faktˆrdˆr. H iyonlarının artması pH değerini dˆřˆrˆrken, azalması ise pH değerinin artmasına neden olur. Bu bağlantı, pH değişiminin ince film kalitesini etkilemektedir.

Akım Yoğunluğu:

Elektrot yˆzeyinin birim alan başına, geçen akım olarak tanımlanabilir. Akım yoğunluğunun dˆřˆk ya da yˆksek olması filmin kimyasal yapısını ve yˆzey morfolojisini direkt olarak etkiler. Dˆřˆk akım yoğunluğu, kaliteli ince film tabakaları oluşturmak için avantaj olarak gˆrˆlmektedir [94].

Elektrolit Sıcaklığı:

Elektroforetik depozisyon işlemi sũresince istenmeyen faz değişimlerini engellemek amacıyla daha dˆřˆk sıcaklıklarda çalışılması gerektiği yapılan çalışmalarla desteklenmektedir [95].

ˆzeltide Kullanılan Kimyasal Maddeler:

ˆzeltinin kimyasal kararlılığını artırmak, istenen seviyede elektroforetik hareketliliği sağlamak, ince film tabakası oluşturmak ya da oluşan filmin kalitesini artırmak amacıyla elektrolit ˆzeltisi içerisine katkı maddeleri eklenebilmektedir.

1.4.2. Alternatif akım elektroforetik depozisyon (AC-EPD)

Direk akım (DC) kaynağında elektrik yˆk tek yˆnlˆ bir akış izlerken, alternatif akım (AC) kaynağında elektrik yˆkˆ pozitif ve negatif yˆnlerde periyodik olarak yˆn

değiştirir. Bu nedenle, AC alanda parçacık dinamizmi DC alana kıyasla oldukça karmaşıktır. Bu duruma bağlı olarak, AC alan ile çözeltideki partikül arasında oluşan kuvvetler sırası ile uygulanan frekans değerine, partikül büyüklüğüne, elektrolit iletkenliğine, elektrik alan dağılımına ve elektriksel çift tabaka boyunca iletilen kapasitans değeri, doğrudan elektrokimyasal tepkimeyi etkilemektedir.

Asimetrik AC dalga formunda sinyal kullanımında ise voltaj-süre sinyalinin altında kalan alan pozitif ve negatif bölgelerden oluşmaktadır. Bu durum uygulanan elektrik alan yönünün sırası ile pozitif ve negatif yükü yüklediğini ve sinyal büyüklüklerinin birbirine eşit olmaması nedeni ile net yük değerinin asla sıfır olmamasını sağlamaktadır. Böylelikle, yüklü parçacık negatif yük değerine sahip elektroda ulaşmak amacı ile sürekli hareket halinde olacaktır. Asimetrik AC sinyalin başlıca avantajı kaliteli kaplama sunmasıdır. Çünkü deney süresince partikül oryantasyonuna bağlı elektroliz gerçekleşecek ve çözeltideki yük aynı zamanda partikülün hareketine etki edecektir [46].

Bu teknik ile uygulama yaparken dikkat edilmesi gereken yalnızca birkaç madde vardır ve aşağıda sıralanmıştır:

- Kaplama esnasında yüzeyde baloncuk oluşumunu engellemek adına, sisteme uygulanan akım değeri artırılırsa, frekans değeri de eş zamanlı artırılmalıdır.
- DC akım kaynağına kıyasla, gerçekleştirilen depozisyon miktarı daha az olabileceği halde, kaplama kalitesi çok daha yüksek olacaktır (AC kaynaktan baloncuk oluşumu engellendiği için).
- Uygulanan AC alan değeri DC bileşenden güçlü ise, üretilen mikroyaou daha başarılı bir şekilde oriente olacak, yani kaplama kalitesi artacaktır.

1.5 Yüzey Analiz Teknikleri

1.5.1. Ultraviyole görünür bölge (UV-Vis) moleküler absorpsiyon spektroskopisi

Absorbans spektroskopisinin temel amacı, belirli bir malzeme tarafından emilen veya iletilen ışık miktarının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak nicel anlamda ifade edilmesidir. Böylelikle, analizi yapılan içeriğin atomik seviyede gerçekleşen elektronik geçişler hakkında bilgi edinilebilir. İzole edilmiş atomlar durumunda sadece

elektronik geçişler meydana gelirken, moleküller söz konusu olduğunda dönme ve titreşim hareketleri de gerçekleşmektedir [96].

Işık malzemeyle temasında, malzeme etkileşim absorpsiyon (A), saçılma (S), yansıma (R) veya kırılma gibi yollarla olmaktadır. Beer-Lambert yasası tüm bu etkileşimler sonucu iletilen ışık yoğunluğunun (I) gelen ışık yoğunluğuna (I_0) oranını yani transmittansı (T) ifade etmek için kullanılır. Absorpsiyon ise, transmittans değerinin doğal logaritmasının tersi olarak hesaplanmaktadır. Eşitlik 1.1 ve 1.2 kullanılarak, analiz edilen malzemenin konsantrasyonu hesaplanmaktadır [97]. Denklemden; k_λ ; gelen ışığın dalga boyu ve malzemenin türüne bağlı bir sabit olan atenüasyon katsayısını, ϵ : molar absorpsiyon katsayısını, l : optik yolu, C ise absorpsiyon işlemi gerçekleştiren çözeltinin konsantrasyonunu ifade eder.

$$\frac{I}{I_0} = e^{-k_\lambda l} = T \quad (1.1)$$

$$-\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = A = k_\lambda l = \epsilon Cl \quad (1.2)$$

UV-Vis spektroskopisi, malzemelerin ışıkla etkileşim özelliklerinin incelenmesinde kullanılan bir tekniktir. Morötesi bölge 200-400 nm, görünür ışık bölge 400-800 nm dalga boyları arasındadır. UV-Vis spektroskopisi, bir Tungsten ya da döteryum ışık kaynağı kullanılarak üretilen ışın demetinin bir malzemeyle etkileşimi sonrasında değişiminin incelenmesini sağlamaktadır. Ayrıca iletkenlerin enerji bant değerlerinin, metallerinse oksidasyon basamaklarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır [96,98].

1.5.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FTIR) spektroskopisi

Temel çalışma prensibi, cihazın parlayan siyah gövdeli bir kaynaktan IR skalasında ışın üretmesine dayanmaktadır. Sonrasında söz konusu ışın, interferometreye geçerek orada farklı yol uzunluklarında kırışların rekombinasyonu, interferogram adlı yapıcı ve yıkıcı girişimi oluşturur. Işın numune bölmesine girerek, örnek interferogramdan numunenin karakteristiği olan spesifik dalga boyundaki enerjiyi absorblar. Ardından, dedektör tüm frekanslar için eş zamanlı olarak topladığı özel interferogram sinyallerini zamana karşılık gelen enerji şeklinde ölçer. Bu süreçte, referans örneği taranır ve son olarak, arzu edilen spektrum, numune spektrumundan arka plan

spektrumunu otomatik olarak çıkarıldıktan sonra FTIR yazılımı sayesinde bilgisayar ekranında görsel olarak ifade edilir [99].

FTIR spektrometeresi geniş spektrum aralıklarında yüksek çözünürlüklü veri toplayabilir. Elektromanyetik ışık dizininin kızıl ötesi bölgesi 14.000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır. Yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; $4.000-14.000\text{ cm}^{-1}$), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; $400-4.000\text{ cm}^{-1}$) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; $4-400\text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır [100]. FTIR cihazı ile kızıl ötesi bölgedeki absorpsiyon ya da tranmitans bandı incelenerek, molekül içerisinde spesifik fonksiyonel gruplar belirlenebilir.

1.5.3. X-Işını fotoelektron spektroskopisi (XPS)

Elektron spektroskopisinin temeli; atom ya da moleküllerin X-ışını ile bombardmanı sırasında, molekülden ya da atomdan fırlatılan elektronun kinetik enerjisinin ölçümüne dayanmaktadır. Bombardman sonrası oluşan iyon, fırlatılan elektronların, atomun iç kabuklarının herhangi birinden çıkması sebebiyle “uyarılmış iyon” olarak adlandırılmaktadır. Atomdan fırlatılan fotoelektronlara ait kinetik enerji dağılımı, örneğe gönderilen X-ışınının enerjisine ve elektronun örneğe bağlanma enerjisine bağlı olarak değişmektedir.

Bu ölçüm yöntemi katı yüzeylerin analizinde yaygınlıkla kullanılmaktadır. Örnek maddenin elektronlar ile bombardmanı sonucu elde edilen pozitif yüklü iyonlar, malzemenin yüzeyinde pozitif yük birikimine sebep olmaktadır. Bu durum ise fırlatılan elektronların kinetik enerjilerini azaltabilmekte ya da elektronların fırlatılmasını engelleyebilmektedir. Bu yöntemde, kimyasal kayma değerleri ve bağlanma enerjileri değerleri atomik skalada ölçülmektedir [101].

1.5.4. Temas açısı (CA) ölçümleri

Temas açısı ölçüm cihazı, malzemenin üst yüzeyindeki kimyasal yapı ile ilgili fikir verebilen, ucuz ve kullanımı kolay bir yüzey karakterizasyon tekniğidir. Bu cihazın çalışma prensibi, yüzeye damlatılan çözelti ile çözeltiyi çevreleyen ortam arasındaki yoğunluk farkı sonucu oluşan damlanın şekli ve damlanın katı yüzey ile arasındaki açısı üzerinden yüzey hidrofilitesi ile ilgili bilgi edinilmesine

dayalıdır. Yüzeyde hidrofilik grupların fazla olması durumunda, yüzey açısı 90°'nin altına düşmekte, hidrofobiklik arttığında ise üzerine çıkmaktadır [102].

1.5.5 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

Atomik kuvvet mikroskobu, malzeme yüzeyinin topografik özelliklerini yüksek çözünürlük ve doğruluk ile gözlemlenmesini ve ölçülmesinin sağlayan bir tekniktir. Malzemenin, diğer mikroskobik yaklaşımlarda olduğu gibi büyütülmesinden ziyade, yüzeyinin taranmasına ve yükseklik profilinin ölçülmesine olanak sağlar. Bu şekilde bir numunedeki atomların tekli düzenini ve/veya moleküllerin yapısını kristalinitesini gösteren üç boyutlu görüntülerin elde edilmesini sağlar. Ayrıca örneğe ait yüzey topografisinin yanı sıra; ince filmlerin kalınlığı, faz farkları, elektriksel iletkenlik ve manyetik alan yönündeki farklılıklar da bu teknikte saptanabilmektedir.

Yöntemde temel olarak, atomik boyutta sivriltilmiş iğne ucu kullanılarak farklı modlarla tarama yapılır ve taranan yüzeyin topografisi, yükseklik profili vb özellikleri görüntülenerek analiz edilir. Kullanılan iğne ucuyla yüzey etkileşimine bağlı olarak farklı modlarla görüntü oluşturulabilir. Bahsi geçen modlar; iğnenin yüzeye temas ettirilerek uygulandığı temas yöntemi (contact mode), iğnenin yüzeye temas etmediği (non-contact mode) ve iğnenin yüzeye vurulması şeklinde uygulandığı yöntem (tapping mode) olarak sınıflandırılmaktadır. Genellikle, topografisi belirlenecek malzemenin özellikleri ve yapılacak analizin türü mod seçimini belirlemektedir [103,104].

1.5.6. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), elektron demeti yönlendirilen numune yüzeyinden yüksek çözünürlükte üç boyutlu görüntü almayı sağlayan sistemlerdir. SEM cihazı, elektron optik kolonu, vakum sistemi, elektronik kısım ve yazılımdan oluşur. Kolon, örnek üzerindeki lensleri elektronu ince bir noktadan geçirerek örneğe odaklamak için gereklidir [105]. SEM temel anlamda, elektron tabancası ve kontrol konsolundan oluşmaktadır. Elektron kolonu, elektron tabancası ve lenslerle örnek yüzeyine hareket eden elektronların oluşumundan, hızlandırılmasından ve örnek üzerine hızlandırılan elektronların odaklanmasından sorumludur. Kontrol kolonu ise elektron demetinin kontrolünde etkilidir. Kolon üzerindeki elektron tabancası, numune

yüzeyine 1 nm çapından küçük bir noktaya odaklanmış ve 0.1-30keV enerji aralığında hızlandırılan elektron demetini üretir ve düşük basınçta (10^{-4} Pa) çalışır. İki çift elektromanyetik saptırıcı bobin kullanılarak elektron demetinin örnek üzerini süpürmesi sağlanır. İlk bobin çifti elektron demetini mikroskobun optik ekseninden dışarı iterken ikinci bobin çifti bu demeti eksene doğru bükür. Bu elektron demeti, numune üzerinde dikdörtgen bir ızgarada taranır ve elektron demeti ile etkileşen numune tarafından oluşturulan sinyallerin yoğunluğu ölçülerek kaydedilir. Bu yöntemin en büyük avantajı; ışık mikroskobuna kıyasla oldukça büyük ölçeklerde, ayrıntılı görüntü sunmasıdır. Elde edilen görüntünün siyah beyaz olması ise kaynak olarak elektron demetinin kullanılmasındandır. SEM'de morfolojik analiz yapılacak örneğin iletken olması gerekmektedir. Analizi yapılacak yüzey yalıtkan ise, ölçüm öncesi uygun kaplamalarla (Au, Pd vb) iletken hale getirilmesi gerekmektedir [105].

1.5.7. Spektroskopik elipsometri

Spektroskopik elipsometri, uzun yıllardan beri ince film analizinde öncelikli olarak tercih edilen bir tekniktir. Bu teknik, film kalınlığı, yüzey pürüzlülüğü, arayüzey pürüzlülüğü ve optik parametreler gibi geliştirilen filmin pekçok karakteristiğini analiz edebilmektedir. Ancak elde edilen verilen salt kullanılmasından ziyade, AFM vb farklı teknikler ile de desteklenmesinde fayda görülmektedir. Modelleme kapsamında, tabaka sayısı belirlenmeli ve her bir film bir tabaka olarak işleme alınmalıdır [106].

Örnekten yansımanın, gönderilen polarize ışıkta meydana getirdiği değişim p-polarize ışık (R_p) için örnek yansıma miktarının ve örnek yüzeyinden yansıyan s-polarize ışık (R_s) miktarına oranı olarak tanımlanabilir. Söz konusu oran kompleks bir sayı olacağından, genellikle ρ olarak tanımlanır ve elipsometrik parametreleri ψ (psi) ve Δ (delta) olarak adlandırılır (Eşitlik 1.3). Eşitliğe göre, $\tan(\psi)$ p- ve s- polarize ışığın yansıma oranının büyüklüğünü tanımlarken, Δ ise yansıyan p- ve s- polarize ışıkların faz değişimlerini tanımlamaktadır.

$$\rho = \frac{R_p}{R_s} = \tan \psi \cdot e^{i\Delta} \quad (1.3)$$



2. POLİPROPİLEN (PP) YÜZEYLERDE PLAZMA POLİMERİZASYON (PlzP) DESTEKLİ HEPARİN İMMOBİLİZASYONU

2.1 Materyal ve Metot

2.1.1. Materyal

Heparin sodyum tuz (>180 USP birim/mg), N-(3-dimetil aminopropil)-N'-etilkarbodiimid (EDC), N-hidroksisüksinimid (NHS), toluidin mavi boya, sitrat tampon çözelti (0.09 M), sığır serum albumin (SSA), gluteraldehit (%25 su içerisinde), polipropilen yaprak (10 m uzunluk x 0.05 mm kalınlık), minimum gerekli besiyeri (MEM), fetal sığır albumin (FBS), sodyum pirüvat çözeltisi, Dulbecco fosfat tampon çözelti (DPBS) ve 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoltum bromit (MTT) Sigma Aldrich'ten (NJ,USA) alınmıştır. L-glutamin, penisilin-streptomisin, %0.25 Tripsin ve %0.005 EDTA Biological Industries Ltd'den tedarik edilmiştir (Haemek, İsrail). Normal insan BJ deri fibroblast (ATCC CRL-2522) hücre hattı Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC, VA,USA) temin edilmiştir. Dimetilsülfoksit (DMSO) ve ethanol ise ISOLAB Laboratuvarından satın alınmıştır (GmbH, Eschau,Almanya).

2.1.2. Metot

2.1.2.1.PP yüzeylerde PlzP ile yüzey modifikasyonu

Öncelikle, PP yapraklar 1 x 1 cm²'lik yüzey alanına sahip parçalara kesilmiş ve sırası ile etanol ve ultra-saf su ile ultrasonik banyoda 30 dakika temizlenmiştir. Herbir işlem 3 defa tekrarlanmıştır. Herbir PP yüzey cam alttaşlara tutturularak desikatörde kullanıma dek muhafaza edilmiştir.

İki basamakta gerçekleştirilen yüzey modifikasyonu Radyo frekans/düşük basınç (RF/DB, 13.56 MHz) plazma cihazı kullanılarak (Pico, Diener Elektronik GmbH,Almanya) örneklerin paslanmaz çelik haznenin (150 mm çap, 320 mm uzunluk) merkezine yerleştirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Plazma işlemi öncesi, ilk olarak plazma haznesi vakumlanarak (Trivac 2.5E, Leybold Vakum GmbH,Almanya)

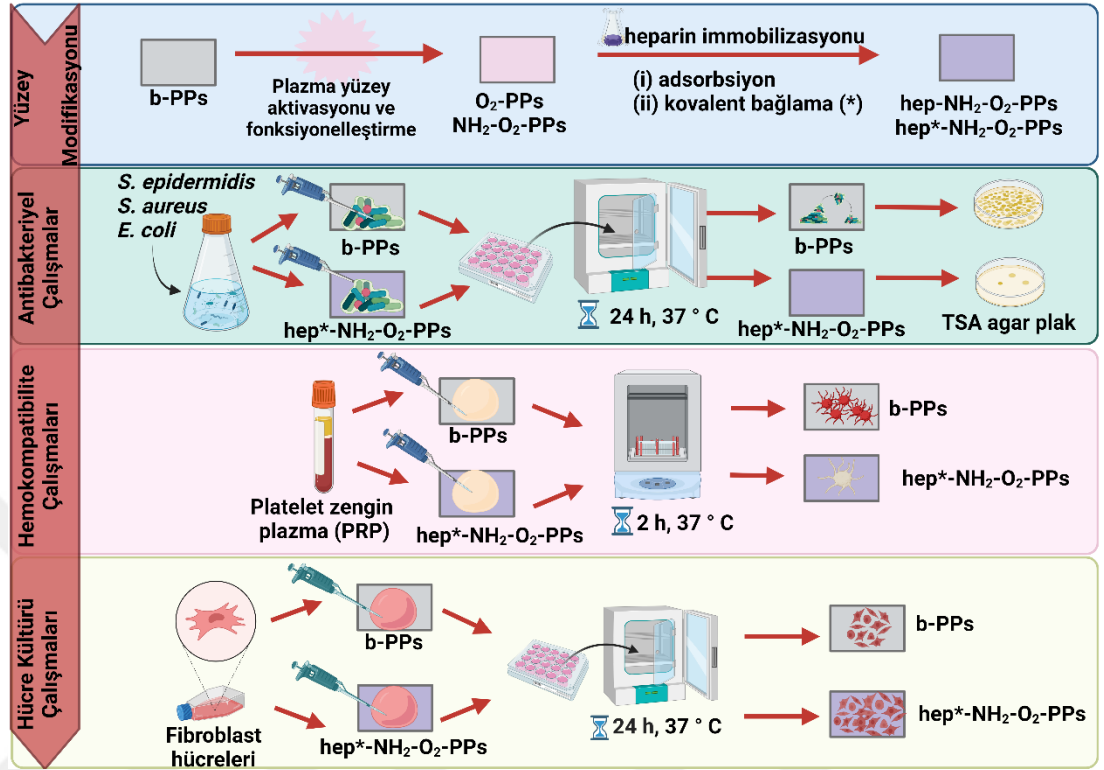
basınç değerinin 0.14 mbar seviyesine düşmesi sağlanmıştır. Kontaminasyonu önlemek adına, plazma işlemi öncesi hazne (100 Watt 15 dakika) prekursor ile (oksijen ya da amince zengin prekursor) beslenerek bir sonraki modifikasyon işlemine hazır hale getirilmiştir [107].

Referans polipropilen (bare PP) alttaşlarda yüzey aktivasyonu Oksijen plazma ile 100 Watt gücünde ve 15 dakika süresince gerçekleştirilmiştir [107]. İkinci basamakta, oksijen ile aktive edilen PP yüzeyler (O_2 -PP) etilendiamin (EDA) ve amonyak (NH_3) prekursor karışımı [EDA: NH_3 , 1:1 (h:h)] kullanılarak yeniden plazma polimerizasyon işlemi uygulanmıştır. O_2 -PP yüzeylerde amince zengin ince film (NH_2 - O_2 -PP) oluşumunun optimize edilmesi için 25-100 Watt arası plazma gücü uygulanmış ve uygulama süresi 15 dakika, plazma basıncı ise 0.14 mbar değerinde sabit tutulmuştur.

Heparin heterojenik yapıda polianyonik bir glukozaminoglikan üyesi olmakla birlikte yapısında pekçok fonksiyonel grup barındırmaktadır ($-COOH$, $-OH$ ve $-SO_3^-$). Klinikte, serbest formda heparin enjeksiyonu damaryolu ile uygulandığından solumada güçlük, kanama vb gibi immunolojik reaksiyon geliştirme riski söz konusudur. Bu nedenle etkili bir heparin immobilizasyonu geliştirilmesi damar içi implantlar için oldukça kritik ve dikkatle optimize edilmesi gereken bir yaklaşımdır [108]. Çalışma kapsamında, iki farklı immobilizasyon methodu test edilerek heparin immobilizasyon kapasitesi ve biyolojik aktivitesi araştırılmıştır: Elektrostatik adsorpsiyon ve çağraz-bağlama. Fiziksel adsorpsiyon alttaşların (NH_2 - O_2 -PP), sitrat tampon çözeltisi kullanıldığı farklı konsantrasyonlarda heparin ile (3, 10 ve 30 mg/ml, pH:7.4) direk muamelesi ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, çağraz-bağlama için EDC ve NHS karışımı (EDC:NHS, 4:1 (kütlece)), heparin çözeltisine eklenmiştir (1:1, kütlece) [109]. Söz konusu çözelti 3 saat boyunca $25^\circ C$ 'de karıştırılarak heparin yapısındaki

karboksil gruplarının aktivasyonu sağlanmış, ve bu gruplarla plazma modifiye PP yüzeylerde bulunan amin gruplarına kimyasal anlamda tutunmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, referans PP (bare PP), plazma modifiye O_2 -PP ve NH_2 - O_2 -PP alttaşlar heparin çözeltisi ile (hep: fiziksel adsorpsiyonu, hep*: çağraz bağlanmayı temsil etmektedir) 24 saat boyunca $37^\circ C$ 'de çalkalamalı inkübatör (Innova 40R, New Brunswick, Almanya) ortamında muamele edilmişlerdir. Heparin immobilizasyonu tamamlanan yüzeyler üçer defa PBS (pH:7.4) ve ultra saf-su ile yıkanarak, tutunmayan heparinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ayrıca yıkama

suyunda heparin varlığı Toluidin mavi (TB) boya ile kontrol edilmiş, yıkama suyunda heparin görülmediği aşamaya dek yıkama işlemlerine devam edilmiştir [110]. Çalışmanın bu basamağı Şekil 2.1’de detaylı olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.1: Plazma destekli biyomalzeme üretimi ve biyolojik testlere ait çoklu deney basamaklarının şematik gösterimi.

2.1.2.2.Yüzey modifikasyonlarının fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu

Plazma polimerizasyon işleminde parametre optimizasyonu için öncelikle PP alttaşların yüzey topografileri Atomik kuvvet mikroskobu (AKM, Asylum, Asylum Research, Oxford Instruments, Oxford BK) ve spektrometrik elipsometri (SE, İse Elipsometri, J.A. Woollam, ABD) teknikleri ile analiz edilmiştir. AKM analizinde ppp model tip, hafif vuruş modunda kullanılmıştır. Referans PP (bare PP) yüzeyler referans olarak alınmış, herbir ölçüm 3 kez tekrarlanmış ve $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ 'lik alan taranmıştır. Ölçümler sonrası ortalama pürüzlük değerleri (Ra) elde edilmiş, ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Sonrasında, X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS, Thermo K-Alpha, Thermo Fisher Sci, MA, ABD) PP alttaşların elemental kompozisyonlarını karakterize etmek amacı ile kullanılmıştır. Örnek yüzeyinde seçilen rastgele bir noktada, 1×10^{-9} mTorr basınç altında gerçekleştirilen XPS analizlerinde X-ışın kaynağı $400 \mu\text{m}$ 'de odaklanmıştır. XPS spektrumu 0.8 eV enerji

aralık değerlerinde kaydedilmiş ve 160 ms/data olarak belirlenen veri alım süresi, analiz enerji değeri ise 187.85 eV olarak uygulanmıştır.

Optimize plazma uygulama parametresinin belirlenmesi ve takibinde heparin immobilizasyonunun ardından, yüzeyde oluşan fonksiyonel grupların analizi Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR, Thermo Fisher Sci., MA, ABD) ile 4000-1000 cm^{-1} dalga boyları arasında gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, temas açısı (CA) ölçümleri durgun su tekniği ile araştırılmış ve yüzeylerin ıslanabilirlik karakteristikleri ve serbest yüzey enerji (SFE) değerleri Fowke eşitliği ile hesaplanmıştır. Temas açısı analizi (KSA Instruments Ltd., Finlandiya) 10 μL sabit çözelti hacminde deiyonize su (polar) ve diiodometan (apolar) kullanılarak yürütülmüştür.

Bakteriyel ve platelet tutunum çalışmaları kapsamında PP yüzeyler üzerinden görüntü almak amacıyla taramalı elektron mikroskop (SEM, SEM, FEI-Quanta 400 F, TX, ABD) kullanılmıştır. Uygulanan gerilim ve taranan çap değerleri sırası ile 5-10 kV ve 2.0 μm olarak uygulanmıştır.

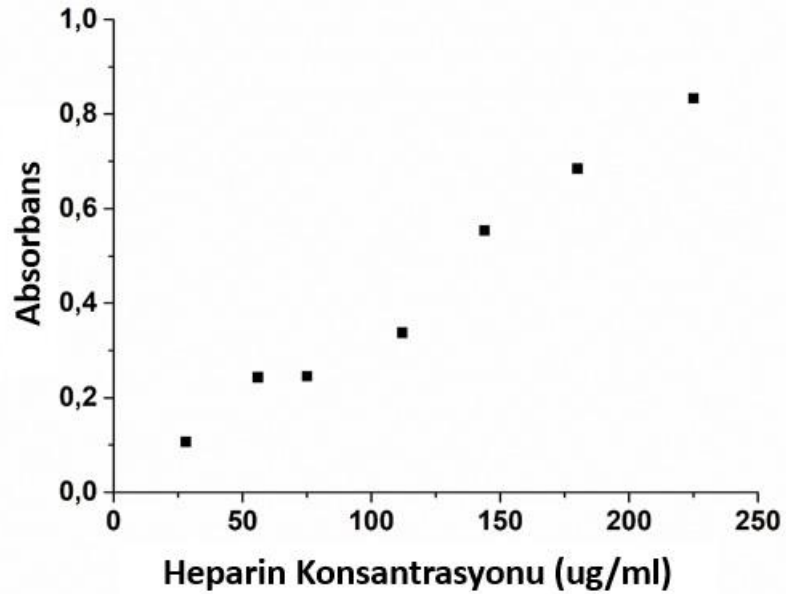
OriginLab v6 (Wellesley Hills, MA, ABD) programı veri işleme, istatistiksel analizler ve görselleştirme amacı ile kullanılmıştır. One-way ANOVA ise datasetler arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığının tespiti amacı ile kullanılmıştır (* $p < 0.05$). Tez kapsamında rapor edilen tüm ölçüm sonuçları ortalama \pm standart sapma olarak paylaşılmıştır.

2.1.2.3. Modifiye edilen PP yüzeylerde heparin immobilizasyonu

Hem fiziksel adsorpsiyon (hep-NH₂-O₂-PP) hem de çapraz-bağlama (hep*-NH₂-O₂-PP) teknikleri kullanılarak PP yüzeylere immobilize edilen heparin miktarının tayini için her bir yüzey toluidin mavi boya ile (TB, 2 mL, 7.5 ppm) muamele edilmişlerdir. Tüm alttaşlar 30 dakika boyunca çalkalamalı inkübatörde (50 rpm) çalkalanmış, takip eden bir diğer 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletilmiş ve son olarak 1 dakika süresince vortekslenerek, yüzeye immobilize olan heparinin tamamının TB boyaya geçişi sağlanmıştır. Heparin içeren TB boya, saf TB boya ile 1:2 oranında seyreltilerek UV spektroskopisi aracılığıyla 630 nm dalga boyunda analiz edilerek absorbans değerleri elde edilmiştir. Sonuç olarak, çalışma öncesinde TB çözeltide farklı konsantrasyon değerlerinde serbest formda heparin eklenerek elde edilen

kalibrasyon eğrisinin (Şekil 2.2) yardımı ile, PP yüzeylere immobilize edilen heparin miktarları tespit edilmiştir (Denklemler: $y=(x-0,0378)/-56,737$, $R^2=0.989$).

Aynı yaklaşım PP yüzeylere immobilize edilen heparinin (hep ve hep*) stabilite testleri kapsamında da kullanılmıştır. Kısaca, referans (bare PP), fiziksel adsorpsiyon (hep-NH₂-O₂-PP) ve çapraz-bağ (hep*-NH₂-O₂-PP) heparin immobilize yüzeyler 5 ml PBS (pH:7.4) daldırılarak 30 gün boyunca 50 rpm çalkalamalı inkübatör içerisinde bekletilmiştir (37°C). Farklı şekilde modifiye edilen PP örnek yüzeylerinde kalan heparin miktarı, bir başka deyişle stabil heparin miktarı öncesinde belirlenen zaman aralıklarında (24, 120, 360 ve 720 saat) incelenmiştir. PBS ortamından uzaklaştırılan PP örnekler 3 kez ultra saf su ile yıkandıktan sonra kurumaları üzere vakum fırına yerleştirilmişlerdir (37 °C, 2 saat). Örneklerin kuruması ile yukarıda aktarılan TB boya ile heparin miktarı tayini işlemleri aynı şekilde uygulanmıştır.



Şekil 2.2: TB boyada serbest heparin için elde edilen kalibrasyon eğrisi ($\lambda=630$ nm).

2.1.2.4. Protein tutunum çalışmaları

Bir biyomalzeme kan ile etkileşime geçtiğinde, malzeme yüzeyinde kan proteinlerinin (albumin, fibrinojen, globulin vb.) tutunumu yalnızca saniyeler içerisinde gerçekleşir [8]. Sonrasında ise yüzeye tutunan proteinler plateletlerin tutunumu ve aktivasyonu

için ideal bir arayüze dönüşürler. Sonuç olarak, kan-biyomalzeme arayüzeyinde fibrin oluşumu ve takibinde pıhtı formun oluşumu gerçekleşmiş olur. Bu nedenle, kan etkileşimli biyomalzemelerde protein tutunum karakteristiği kritik önem taşımaktadır. Tez kapsamında geliştirilen yüzeylerin protein tutunumuna karşı sergiledikleri karakteristikler model protein olarak belirlenen sığır serum albumin (SSA) ile test edilmiştir. Bu kapsamda modifiye edilmeyen (bare PP) ve heparin immobilize (hep-NH₂-O₂-PP , hep*-NH₂-O₂-PP) PP örnekler 1 mg/ml (0.1 M, pH:7.4, PBS tamponunda) konsantrasyonunda ki SSA çözeltisi ile muamele edilmişlerdir. Tüm örnekler 10 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde (37 °C, 50 rpm) tutulmuştur.

Belirlenen zaman aralıklarında (0, 24, 48,120 ve 240 saat), 500 µL tampon çözeltiden alınıp, yerine yeni tampon çözelti eklenmiştir. Örneklerden alınan çözeltide bulunan protein miktarı UV-vis spektroskopi ile 280 nm dalga boyunda ölçülerek tespit edilmiştir. Böylelikle başlangıçta miktarı bilinen protein miktarından, ölçümden elde edilen protein miktarı çıkarılarak, örnek yüzeylerine tutunan protein miktarının tespiti gerçekleştirilmiştir.

2.1.2.5.In vitro antibakteriyel çalışmalar

Günümüze dek gerçekleştirilen pekçok çalışmada, stent, vasküler yama vb implante materyaller bakteri kolonizasyonu ve formasyonu için ideal altaşlar olduklarından, enfeksiyona sebep olabilmektedirler [31,111]. Örneğin, *S. epidermidis* (gram pozitif, koagulaz negatif bakteri) biyomalzeme- ve hastane-ilişkili enfeksiyonlarından sorumlu birincil patojen olarak tanımlanmaktadır [112]. Bu nedenle, tez kapsamında, heparin immobilize PP yüzeyler ve serbest halde heparin ile gerçekleştirilen antibakteriyel çalışmalar üç bakteri suşu ile gerçekleştirilmiştir: gram-pozitif bakteri suşları olarak *S. epidermidis* (ATCC 35984) ve *S. aureus* (ATCC 25923), gram-negatif bakteri suşu olarak *E. coli* (ATCC 25922).

Öncelikle, serbest formda heparin çözeltisinin antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Optimize serbest heparin konsantrasyon değerleri minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) kapsamında tespit edilmiştir. Kısaca, MİK bakterinin üremesini durduran en az antibiyotik miktarı olarak tanımlanmaktadır. MBK ise bakterileri %99.9 oranında öldüren konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır. MBK değeri, MİK gözlemlenen ilk konsantrasyondan başlayarak,

daha yüksek konsantrasyonda ilaç barındıran kuyulardan, katı besi yerine (agar'a) ekim gerçekleştirilerek takip edilir. Öncelikle MİK değeri görsel olarak saptanır (besiyerinin şeffaf görüldüğü ilk ilaç konsantrasyonu). Sonrasında ise MİK değerinin gözlemlendiği ilk konsantrasyon ve iki üst konsantrasyon kuyuları katı besiyerine ekilir. Ekim gerçekleştirilen agarlar (TSA) 24 saat boyunca 37 ° C'de inkübasyona bırakılır. Sürenin dolması ile birlikte agarlar inkübatörden çıkarılarak, bakteri kaynaklı koloni oluşmayan ilk ilaç konsantrasyonu MBK olarak adlandırılır. Deney prosedüründe her bir bakteri suşu 0.5 McF bulanıklık değerine ayarlanmıştır. 1:100 oranında seyreltilerek her bir suş için kullanılan bakteri yoğunluğu 1.5×10^6 KOB/ml'dir (KOB: koloni oluşum birimi). Antibakteriyel çalışmalar, bu amaçla üretilen sıvı besiyeri Müller Hinton Broth kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney kapsamında 96 kuyucukla mikropaklar kullanılmış, her bir ilaç konsantrasyonu için 6 kuyucuk üzerinden gerçekleştirilmiştir. Söz konusu kapsamda heparinin antibakteriyel karakteristiği, referans antibiyotik olarak Ampisilin ile incelenmiştir. Herbir bakteri suş yoğunluğu sabit tutulurken, eklenen ilaç miktarları (heparin ve ampisilin) 1:2 dilüsyonlarla kullanılmıştır.

İkinci aşamada, heparin immobilize ve referans PP yüzeylerde antibakteriyel etki incelenmiş ve elde edilen veriler MİK ve MBK değerleri ile de karşılaştırılmıştır. Uygulanan prosedür şu şekilde açıklanabilir; öncelikle tüm bakteri suşları tryptic soy broth (TSB) sıvı besiyeri ile süspanse edilmiştir. Bakteri konsantrasyonunun 1.5×10^6 KOB/ml değerine kalibre edilmesi ile, bu çözülden 10 µL alınarak bare PP (negatif kontrol) ve heparin immobilize (hep-NH₂-O₂-PP , hep*-NH₂-O₂-PP) PP yüzeylere ekimi gerçekleştirilmiştir. Bakteri çözültisinin tüm yüzeye homojen dağılmasını sağlamak ve kurumalarını önlemek adına yüzeyler UV-steril asetat kağıtları ile kapatılmışlardır. Tüm örnekler 24,48 ve 72 saat süresince 37 °C (~%15 nem) de inkübe edilmişlerdir. Herbir inkübasyon süresinin sona ermesi ile birlikte, söz konusu PP örnekler asetat kağıttan uzaklaştırılmış ve PBS (1 ml, pH:7.4) ile nazikçe yıkanarak, yüzeye tutunmayan bakterilerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Canlı bakteri konsantrasyonu yıkama suyundan tryptic soy agar (TSA) katı besiyerine gerçekleştirilen ekimler ile tespit edilmiştir. Yıkama işleminin ardından, PP yüzeye tutunan bakteriler TSB besiyeri (1 ml) ile vorteksenerek, yüzeyden besiyerine geçişleri sağlanmıştır. Bakteri içeren TSB sıvı besiyeri, saf TSB ile seyreltilerek (10^{-2} , 10^{-4} ve 10^{-6}) TSA katı besiyerine ekim gerçekleştirilmiştir. Uygulanan bu yöntemle,

yüzeğe tutunan canlı bakteri miktarı ve yüzeğe tutunmayan bakterilerin canlı/ölü tespitleri ile geliştirilen yüzeğlerin antibakteriyel karakteristikleri detaylı olarak incelenmiştir: temas ile öldürme ya da yüzeğden itme [115]. Son olarak, bakteri canlılığı agar plaklarda oluşan kolonilerin sayımı ile analiz edilmiştir.

2.1.2.6. In vitro hemokompatibilite çalışmaları

Tez kapsamında gerçekleştirilen hemokompatibilite çalışmaları kapsamında, TOBB-ETU Klinik Araştırma Etik Kurul İzni alınmıştır (KA EK-118/122/18.05.2022). Klinikte, implante materyallerde hemokompatibilite testleri, söz konusu malzemelerin kan ve kan bileşenleri ile temasının sağlandığı kinetik koşullar altında test edilmektedir [116]. Geliştirilen PP örneklerin antikoagulan davranışı (hemoliz) ve kinetiğı (kinetik-kan koagulasyon testi), sitratlı tüpe alınan tam insan kanının kalsiyum klorür ile (CaCl₂) ile aktive edilmesi şeklinde test edilmiştir. Referans (bare PP) ve heparin immobilize (hep-NH₂-O₂-PP , hep*-NH₂-O₂-PP) örnekler 24 kuyulu plağa yerleştirilmiş ve herbir yüzeğ 100 µL aktif kan ile 1 saat boyunca 25 °C de muamele edilmiştir. Eritrositlerde enkapsüle olan serbest haldeki hemoglobin (Hb, oksijen ile bağlanmamış formda), Uv spektrum kullanılarak 540 nm'de karakteristik bir absorbans sergilemektedir. Bu bilgiden yola çıkarak, kinetik veriler spektrofotometrik tarama ile elde edilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında (10, 20, 40 ve 60 dakika) örneklerden alınan süspansiyonlar uygun değerlerde seyreltilerek Hb konsantrasyonu tespit edilmiştir.

Bir diğ er yandan, hemoliz testi de kinetik-kan koagulasyon testinde kullanılan prosedür ile uygulanmıştır. Burada da pıhtılaşmamış (koagule olmayan) kanda ki Hb miktarının absorbans değerleri ölçülmüştür. Mevcut mekanizma şu şekilde açıklanabilir; Kanda pıhtılaşma gerçekleşmeye başlamış ise, çözünemeyen formda fibrin oluşumu mevcuttur. Bu durumda hemoglobin yapı artık serbest halde değil, oluşan pıhtı yapısında enkapsüle haldedir. Herhangi bir çözelti içerisine dahil edilip absorbans değerinin okunması deneysel anlamda mümkün değildir. Deney akışında, pıhtılaşmayan kanda serbest halde bulunan Hb'ler ultra saf su ile patlatılan eritrositlerden elde edilebilmekte ve absorbans değerleri okunabilmektedir. Bu durum absorbans değerinin artması durumunda pıhtılaşma oranının azaldığı anlamına gelmektedir. Absorbans artışı, serbest haldeki Hb miktarının yüksek olduğu, yani pıhtılaşmanın az olduğunu ön plana çıkarmaktadır. Yüzeğlerden elde edilen herbir

çözeltiden hemoliz oranı aşağıdaki gibi hesaplanabilmektedir (Eşitlik 2.1). Denklemden A_s örnek absorbanans değerini, A_{nc} negatif kontrol grubunu (PBS ile seyreltilen kan) ve A_{pc} pozitif kontrol grubunu (ultra saf su ile seyreltilen kan) bileşenlerini temsil etmektedir.

$$\% \text{ Hemoliz Oranı} = \left[\frac{A_s - A_{nc}}{A_{pc} - A_{nc}} \right] \times 100 \quad (2.1)$$

Yüzeğe tutunan protein yapılarında yer alan amino asit sekansları platelet yüzeyinde yer alan reseptörleri aktive ederek, platelet tutunumunu, kümelenmesini, koagülasyonu ve fibrin oluşumunu tetikleyebilirler [116]. Söz konusu mekanizma kan-temaşlı biyomalzemelerin kullanım ömrünü belirlediğinden, tez kapsamına dahil edilmiştir.

Öncelikle taze insan kanı örnekleri 1000 g değerinde 15 dakika boyunca santrifüje edilerek platelet-zengin-plazma (PRP) eldesi sağlanmıştır. Sonrasında ise, PP örnekler (bare PP, hep-NH₂-O₂-PP , hep*-NH₂-O₂-PP) 24 kuyucuklu plağa yerleştirilerek, her bir yüzeğe 1 mL PRP ekilerek, 2 saat boyunca 37 °C’de inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. Sürenin sona ermesi ile birlikte her bir yüzeğe ultra saf su ile yıkanarak, yüzeğe tutunmayan PRP’lerin ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. PP yüzeylere tutunan plateletlerin fiksasyonu için, tüm yüzeyler %2.5’lik glutaraldehit (GA) ile 4°C’de 30 dakika boyunca muamele edilmişlerdir. Devamında ise, örneklerde dehidrasyon işlemi farklı konsantrasyonlarda hazırlanan etanol çözeltileri (ultra saf suda, 0%, 25%, 50%, 75% ve 100%) ile yıkanmaları ve kurumaya bırakılmaları şeklinde gerçekleştirilmiştir. PP yüzeylere tutunan plateletler SEM görüntüleri (büyütme değerleri; x150, x500, x2500, x5000, x50000 ve uygulanan voltaj, spot genişliği değerleri sırası ile 5-10 kV ve 2.0 µm) ile incelenmiştir.

2.1.2.7. In vitro hücre kültürü çalışmaları

BJ insan deri fibroblast hücre hattı (ATCC, CRL-2522) ile gerçekleştirilen deneylerde, serbest halde heparin (çözelti formda), bare PP ve heparin immobilize PP (hep-NH₂-O₂-PP , hep*-NH₂-O₂-PP) yüzeyler MTT analizi ile test edilmiştir. Özetle BJ hücreleri, %10 FBS, %1 sodyum piruvat, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içerikleri ile EMEM besiyerinde kültür edilmiştir. Fibroblast hücreleri 37 °C, %5 CO₂ atmosferik ortamda inkübe edilmiştir (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD). Devamında hücreler %0.25 tripsin-%0.05 EDTA çözeltisi kullanılarak deney

şişesinin yüzeyinden kaldırılmış ve santrifüj edilerek ekim öncesi yeniden zenginleştirilmiş besiyeri ile süspansiyon edilmiştir. Deney kapsamında, kuyu başı ~10000 BJ hücre ekimi gerçekleştirilmiş ve 24 saat boyunca inkübe edilerek tek katmanlı kültür ortamı oluşturulmuştur. Sonrasında besiyeri ortamdaki uzaklaştırılarak ölü/tutunmayan hücreler DPBS ile yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Serbest formda heparin (300-400 µg), bare PP ve heparin immobilize (hep-NH₂-O₂-PP, hep*-NH₂-O₂-PP) yüzeyler kuyucuklara aktarılarak EMEM besiyeri ortamında 24 saat inkübe edilmişlerdir. Heparin içermeyen EMEM besiyeri ve bare PP örnekler sırası ile serbest heparin ve plazma modifiye PP örneklerin negatif kontrol grupları olarak kullanıldı. 24 saatlik inkübasyon süresinin sona ermesi ile birlikte, besiyeri ortamdaki uzaklaştırıldı ve hücreler DPBS ile yeniden nazikçe yıkanmıştır. Kuyucuklara FBS içermeyen, 0.5 mg/ml MTT içeren EMEM kuyucuklara aktarılmış ve hücreler 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin dolması ile birlikte, besiyerleri nazikçe ortamdaki uzaklaştırılarak kuyucuklar yeniden DPBS ile yıkanmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesi amacı ile, DMSO'da çözünen formazan kristalleri optik yoğunluklarının belirlenmesi amacı ile spektrofotometrik yöntemle (Thermo Scientific, Multiskan GO) 540 nm dalga boyunda ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

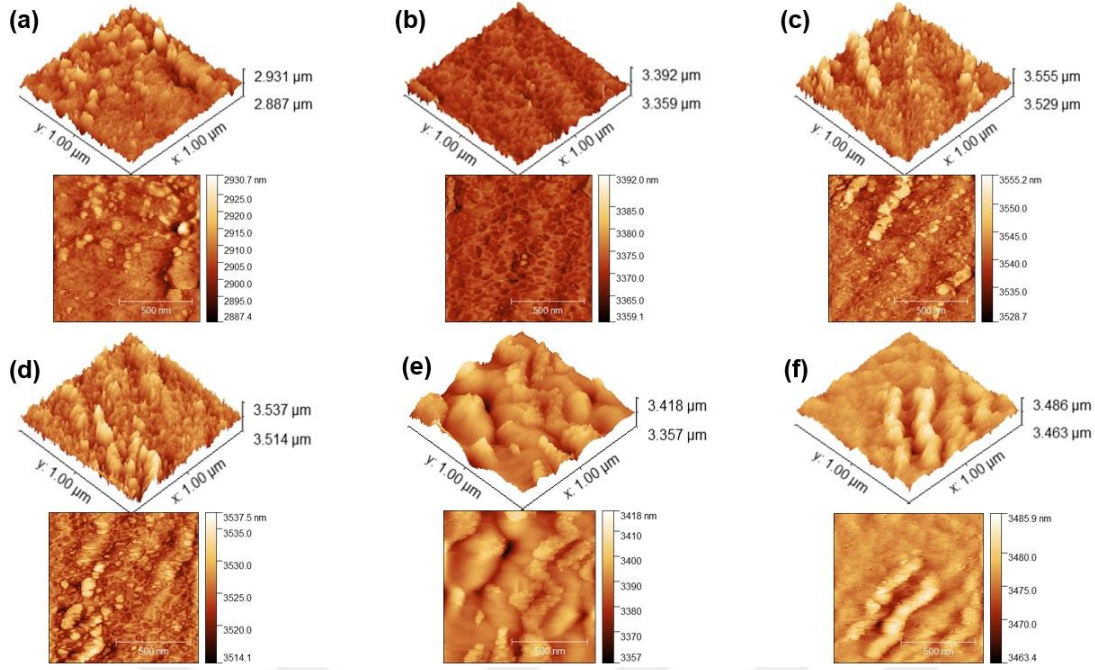
2.2. Bulgular ve Tartışma

2.2.1. Plazma polimerizasyon (PlzP) modifikasyon parametrelerinin optimizasyon sonuçları

Polipropilen (PP), kan-etkileşimli materyal üretiminde sıklıkla kullanılan polimer türlerinden biridir. Tez kapsamında, plazma destekli iki basamakta PP alttaşılarında yüzey modifikasyonu gerçekleştirilerek hemokompatibilite ve antibakteriyel karakteristiklerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. İlk basamakta PP örnekler “oksijen aşındırma” işlemine maruz bırakılarak yüzeylerinde negatif yüklü radikaller oluşturulmuştur. Böylelikle, O₂-PP alttaşılarında hidrofilik ve pürüzlü bir yüzey (yüksek yüzey alanı) elde edilmesi de sağlanmıştır. İkinci basamakta ise, yüzeyde amin fonksiyonel gruplar oluşturmak amacı ile amince-zengin (EDA:NH₃) bir prekursor karışımı kullanılmıştır. Farklı parametreler (25-100 Watt) kullanılarak optimize edilen bu basamakta, referans ve heparin modifiye PP örnekler temas açısı ölçümleri, AFM, XPS ve FTIR-ATR analizleri ile detaylı olarak incelenmiştir.

2.2.2. Yüzey modifikasyonlarının fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu

AKM analizinden elde edilen verilere göre (Şekil 2.3), oksijen ile aşındırma (O_2 -PP) işlemi gerçekleştirilen bare PP yüzeylerin pürüzlük değerleri 2.45 ± 0.80 nm değerinden 5.81 ± 1.92 nm değerine yükselmiştir. Amince zengin (EDA: NH_3) ikinci basamak modifikasyonunu sonrası 25 ve 50 Watt plazma gücü kullanılan parametrelerde yüzeyler, O_2 -PP yüzeylere kıyasla daha az pürüzlü hale gelmişlerdir (sırası ile 1.97 ± 0.59 nm ve 2.83 ± 0.69 nm). Bu durum amince-zengin film kaplamasının oksijen ile aşındırılan yüzeylerde ki çukıntı ve çukurlara akümüle olduğunu belirtmektedir. Plazma gücünün 100 W değerine yükseltilmesi ile birlikte NH_2 - O_2 -PP yüzeylerde R_q değerinin oldukça düşerek 1.52 ± 0.71 nm değerine ulaştığı ve O_2 -PP ($R_q=5.81 \pm 1.92$ nm) yüzeylere kıyasla 4 kata kadar azaldığı tespit edilmiştir. Optimizasyon kapsamında incelenen 75 Watt plazma güç değerinde ise yüzey pürüzlük değerinin 5.84 ± 1.72 nm'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. 25,50 ve 100 W plazma gücü uygulanan parametrelerde meydana gelen yüzeyin pürüzlük miktarının azalması, halihazırda C içerikli yığın yapıda bulunan PP yüzeylerde, amince zengin yüzey modifikasyonu uygulaması esnasında karbonca zengin yeni fonksiyonel grupların oluşumunun tetiklendiği şeklinde yorumlanmaktadır (Çizelge 2.1). Bu nedenle üretilen NH_2 - O_2 -PP yüzeyler arasında 75 W plazma gücüne sahip parametre optimize parametre olarak kabul edilerek, çalışmanın geri kalan kısmında kullanılmıştır.



Şekil 2.3: 3 boyutlu AKM görüntüleri, (a) bare PP, (b) O₂-PP ve farklı plazma güç parametrelerinde gerçekleştirilen amince-zengin film kaplamalı NH₂-O₂-PP (c) 25 Watt, (d) 50 Watt, (e) 75 Watt ve (f) 100 Watt.

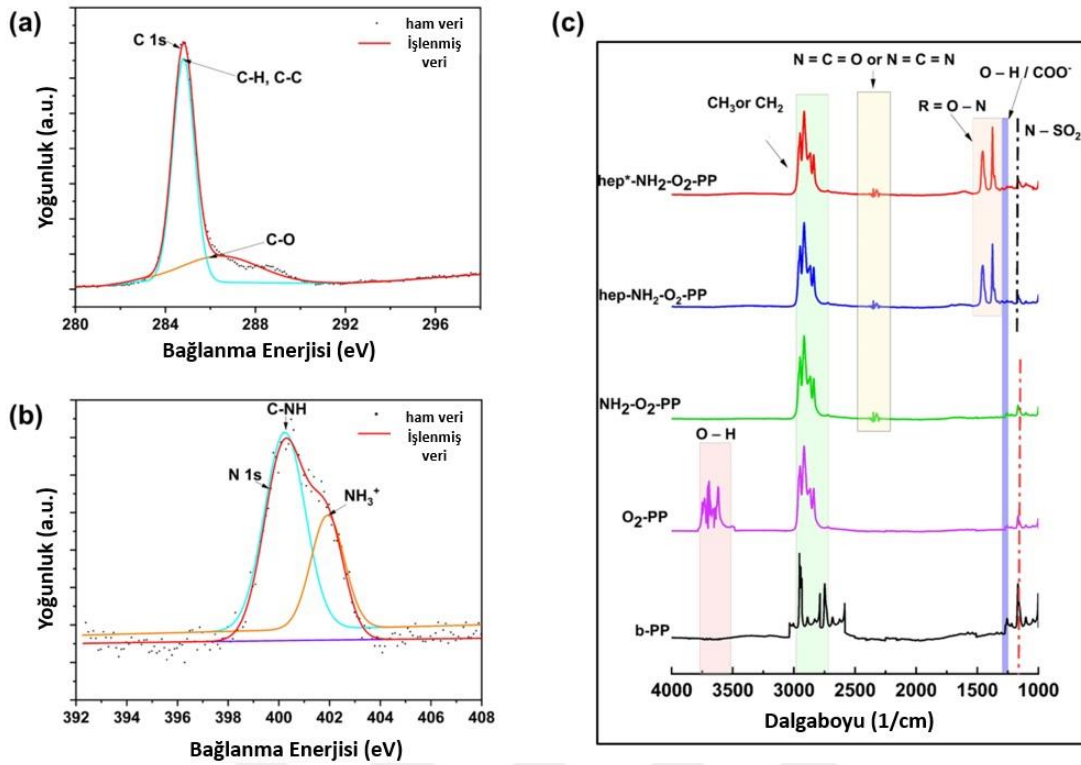
Çizelge 2.1: Referans (bare PP) ve amince-zengin modifiye (NH₂-O₂-PP) örneklerde XPS taraması ile tespit edilen atomik yüzde değerleri.

Örnek İsmi	Plazma Gücü (W)	Element (%)		
		C	O	N
Bare PP	-	75.18	-	-
	25	70.27	14.89	1.82
NH ₂ -O ₂ -PP	50	71.05	18.19	2.25
	75	69.37	21.83	3.71
	100	70.82	11.27	1.68

XPS analizi plazma modifiye PP ve referans PP örneklerin kimyasal kompozisyonlarını incelemek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Spektrum taraması sonrası data eldesi ve işlenmesi, bağlanma enerjileri ve sorumlu oldukları spesifik bağların saptanmasını sağlamıştır (Şekil 2.4). C 1s spektrumu incelendiğinde (Şekil 2.4a) 285.0 eV ve 286.4 eV değerlerinde iki adet dekonvolüsyon piki olduğu ve sırası ile C-C/C-H ve C-O bağlarını temsil ettiği gözlemlenmektedir. C-O bağlarının oluşumları oksijen ile aşındırma işlemi ile gerçekleşmiş, ikinci basamakta amince-zengin yüzey modifikasyonu sonrası yüzeyde Oksijen içerikli bağ piki gözlemlenmemiştir (Şekil 2.4b). N 1s spektrumu ise iki adet dekonvolüsyon pikine sahiptir. 400.5 eV bağlanma

enerjisi değerinde gözlemlenen pik C-NH gruplarının varlığını, 401.4 eV'de gelen pik ise birincil amin (NH_3^+) gruplarının varlığını temsil etmektedir. Gerçekleştirilen analiz ile amince-zengin ince film modifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği de ispatlanmıştır [117].

Ayrıca, elde edilen elemental kompozisyon analizleri de göz önüne alındığında (Çizelge 2.1) özellikle 75 Watt plazma gücü kullanılan parametrede amin-kaynaklı filmin depozisyonu ile C içeriğinin azalması beklenmektedir ve sonuçlar ile örtüşmektedir. Bir diğer yandan 75 Watt plazma gücü ile elde edilen yüzeylerde, diğer tüm parametrelere kıyasla en yüksek azot içeriği tespit edilmiştir (%3.71). Ancak, azot yüzdesi plazma gücünün artarak 100 Watt kullanıldığı parametrede azalmıştır. Perdeleme etkisi adı verilen ve burada 75 Watt plazma gücünün üzerine çıkılması durumunda gözlemlenen durum, amin gruplarının oluşumunun plazma değerinden daha düşük plazma gücü uygulanması durumunda O_2 -PP yüzeylerine depozite edilen amin grup miktarının yükselmesini sağladığı sonucuna ulaşılmıştır. Özetle plazma gücünün artırılması durumunda, EDA yapısında bulunan moleküller, C-kaynaklı bağlarını yıkararak/kopararak C-kaynağında zengin PP yüzeylerine depozit olmakta ve NH_2 grupları ile biyomalzeme yüzeyinde çıkıntılar oluşturmaktadır (perdeleme etkisi) [119]. 75 ve 50 Watt plazma güçlerinin uygulandığı NH_2 - O_2 -PP altaşlardan alınan verilere göre oksijen bileşen miktarında artışlar gözlemlenmiş ve bu durum post oksidasyona sebep olarak benzer miktarda amino gruplarının yüzeye immobilize edilmesini sağlamıştır [120]. Yukarıda bahsi geçen tüm analiz sonuçlarından yola çıkarak, bare PP yüzeylerde amince-zengin film kaplama parametresi 75 Watt plazma gücünün uygulandığı parametre olarak optimize edilmiştir.



Şekil 2.4: 75 Watt plazma gücü ve 15 dakika uygulama süresi ile üretilen NH₂-O₂-PP yüzeylere ait XPS spektrumu, (a) C 1s, (b) N 1s spektrumu. (c) Referans (bare-PP) modifiye (O₂-PP, NH₂-O₂-PP, hep-NH₂-O₂-PP, hep*-NH₂-O₂-PP) PP yüzeylerin FTIR spektrumu.

2.2.3. Heparin immobilizasyon ve stabilite sonuçları

Heparin, moleküler ağırlığı 15-20 kDa aralığında değişen (120-180 USP birim/mg) bir glukozaminoglikan türüdür. Yapısında pekçok fonksiyonel grup (amino, karboksil, hidroksil ve sülfon gibi) barındırmaktadır ve bilinen en yüksek negatif yüke sahip biyomoleküldür (~50 mV) [121].

Heparinizasyon implant materyallerin yüzeyi ile muamele edilerek pıhtı oluşumu, sepsis ve enfeksiyon gibi pekçok riskin önlenmesi amacı ile uygulanmaktadır. Klinikte güncel olarak, biyomalzemeler kullanım öncesi direkt heparin çözeltisine daldırılıp sonrasında hastada kullanılmaktadır. Biyomalzemeler rutinde 24 saat aralıklarla yenilenmekte ve uzun süreli kullanımları durumunda günlük 3 doza kadar (20-40 mg/doz) heparin, hastalara damaryolu ile verilmektedir. Burada amaç daldırma tekniği ile yüzeye fiziksel tutunumu sağlanan heparin stabilitesinin oldukça düşük olmasından kaynaklanabilecek riskleri azaltmak adına, damar yolu ile de kana heparin takviye

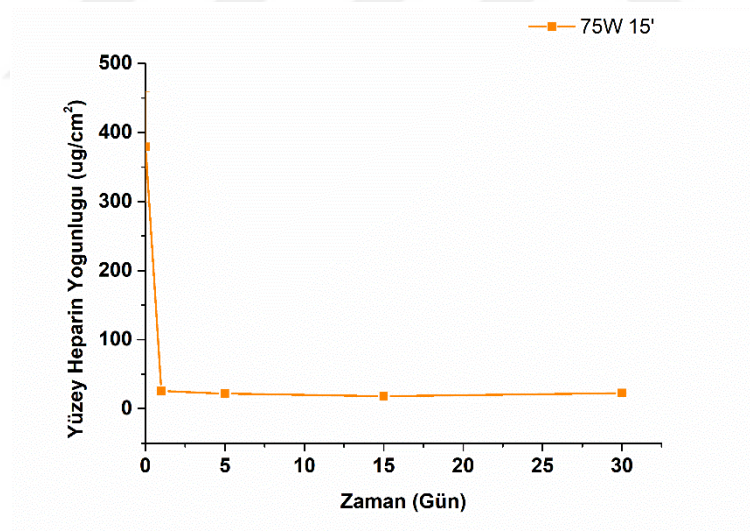
etmektedir. Ancak bu yaklaşımda da farklı riskler ortaya çıkabilmekte ve bu durum güvenli bir şekilde uzun süreli biyomalzeme kullanımını kısıtlamaktadır. Dozaşımı ve buna bağlı anormal kanama ya da trombositopeni (kanda anormal trombosit azlığı) öncelikli karşılaşılan risklere örnek verilebilir [120]. Bahsi geçen problemlerin çözümü adına, PP altaşlarda plazma destekli yüzey modifikasyon stratejisi uygulanarak PP yüzeyleri heparin immobilizasyonuna uygun hale getirmek amaçlanmıştır. Bu doğrultuda PP yüzeylere heparin immobilizasyonu iki farklı strateji ile gerçekleştirilmiştir: (i) fiziksel adsorpsiyon, (ii) çapraz bağlama. Her iki immobilizasyon tekniğinin de etkisi, heparin immobilizasyon kapasitesi ve stabilitesi kapsamında karşılaştırılmıştır.

Toluidin mavi (TB), heparin gibi polianyonik bileşenlere geridönüştürülemez şekilde bağlanarak biyokompleks oluşturmaktadır. Ayrıca saf halde heparin UV-görünür olmadığından, TB boyanın 630 nm dalga boyunda sahip olduğu parmakizi niteliğindeki sinyalleri ile görünür hale getirilebilmektedir. Saf halde TB boya ile heparin biyokompleksi oluşması durumunda TB boyanın absorban değeri düşecektir, çünkü serbest halde TB miktarı azalacaktır. Buradan yola çıkarak, heparin immobilize edilmiş her bir yüzey TB boya ile muamele edilerek, absorban değerlerindeki düşüş miktarlarının yardımıyla barındırdıkları heparin miktarları tespit edilmiştir. Tez kapsamında, optimize (75 W-15 dakika) $\text{NH}_2\text{-O}_2\text{-PP}$ yüzeylerde elektrostatik ($\text{hep-NH}_2\text{-O}_2\text{-PP}$) ve çapraz bağ ($\text{hep}^*\text{-NH}_2\text{-O}_2\text{-PP}$) yaklaşımları ile 3 farklı heparin konsantrasyonu kullanılmıştır (3, 10 ve 30 mg/ml).

Öncelikle, amince-zengin film kaplama yüzeylerde ($\text{NH}_2\text{-O}_2\text{-PP}$) elektrostatik etkileşimle gerçekleştirilen heparin immobilizasyonu TB görüntüleme ile takip edilmiştir. Sırası ile 30 mg/ml, 10 mg/ml ve 3 mg/ml heparin konsantrasyonları için yüzeye tutunan heparin miktarları: $207.19 \pm 34.33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $61.48 \pm 8.03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $28.17 \pm 5.77 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ şeklinde hesaplanmıştır. En yüksek heparin tutunumunun gerçekleştiği 30 mg/ml heparin konsantrasyonu, çapraz bağlama tekniğinde de tercih edilen miktar olmuştur. Kütlece 1:1 oranında heparin:(EDC/NHS) içeren çözelti ile $\text{NH}_2\text{-O}_2\text{-PP}$ yüzeylerinde bulunan amin grupları ile, heparinde açık uçlu hale getirilen karboksil grupları arasında bağ kurulması sağlanmıştır. Söz konusu yaklaşımla yüzeye immobilize edilen heparin miktarı $440.41 \pm 69.52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak hesaplanmıştır. Klinikte damar yolu ile uygulanan heparin miktarı 20-40 mg civarında olmakla

birlikte, yapılan hesaplamaları göre yaklaşık 20 santimetrelik bir katater yüzeyine bu teknik ile yaklaşık 27 mg heparin immobilizasyonu gerçekleştirilebilecektir. Uzun süreli kullanım durumunda günde 3 kez damardan uygulanabilen heparin (20-40 mg) miktarı göz önüne alındığında, geliştirilen teknikle yüzeye immobilizasyonu sağlanan heparin miktarı herhangi bir riske sebep olmayacaktır. Ayrıca tahmin edildiği üzere, çapraz bağlama yaklaşımı ile NH₂-O₂-PP yüzeylere çok daha yüksek miktarda heparin tutunumu/immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Yüzeye tutunumu sağlanan heparinin stabilite çalışmaları kapsamında, yüzeyler (hep-NH₂-O₂-PP ve hep*-NH₂-O₂-PP) 30 gün boyunca inkübe edilmiş ve yüzeyde kalan heparin miktarı yeniden TB boya ile tespit edilmiştir. Her ne kadar hep*-NH₂-O₂-PP yüzeyler sahip oldukları heparin miktarının neredeyse %90'ını ilk 24 saat sonunda salmış olsalar da, takip eden 29 gün süresince yüzeyde kalan heparin miktarı $28.99 \pm 3.17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ değerinde sabit kalmıştır (Şekil 2.5). İlk 24 saat sonunda yüzeyden salınan heparin miktarının yaklaşık $400 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ değerinde olmasına rağmen, literatürde ve tez kapsamında belirlenen toksik doz değerinden oldukça düşük olduğu da belirtilmelidir.



Şekil 2.5: PP yüzeylerde (hep*-NH₂-O₂-PP) 30 gün boyunca yüzey heparin stabilite çalışmaları (heparin konsantrasyonu: 30 mg/ml, HEP:(EDC:NHS) 1:1 kütlece, n=12).

Modifiye edilen yüzeylerde detaylı analizler gerçekleştirilerek, her bir modifikasyon basamağının etkileri incelenmiştir. FTIR-ATR (Şekil 2.4c) analizi bare PP yüzey kimyasında meydana gelen değişimleri açık bir biçimde göstermektedir. Bare PP

2700-2900 cm^{-1} dalgaboyu aralığından alınan veriler, imza pikleri olan simetrik ve asimetrik CH_3 ve CH_2 gruplarını temsil etmektedir. Oksijen ile aşındırma işlemi (O_2 -PP) 3550-3700 cm^{-1} aralığında O-H gerinim bağıını temsil eden pik oluşturmuştur. Amince-zengin yüzey modifikasyonu sonrası NH_2 - O_2 -PP yüzeylerde 2300 cm^{-1} dalga boyunda birincil amin gruplarının ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$, $\text{N}=\text{C}=\text{N}$) varlığına rastlanmıştır ki bu durum O_2 -PP yüzeylerde amin modifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin bir başka kanıtıdır. Ayrıca, hep- NH_2 - O_2 -PP ve hep*- NH_2 - O_2 -PP yüzeydeki heparin varlığı da 1350 ve 1370 cm^{-1} dalgaboylarında açığa çıkan SO_2 (asimetrik) ve N- SO_2 titreşimleri ile ispat edilmiştir. Eş zamanlı olarak hep- NH_2 - O_2 -PP ve hep*- NH_2 - O_2 -PP yüzeyler arasında da farklılıklar olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre söz konusu yüzeyler arasında 3 farklı pik varlığı saptanmıştır. 1301-1252 cm^{-1} aralığında gözlemlenen ilk pik, karboksilik asit grupları ile ilintili -OH ve C-O gruplarını, 1168 cm^{-1} de gözlemlenen ikinci pik ise C-O gerinim ya da N-sulfatlı gruplarını, en önemli pik ise 1400-1500 cm^{-1} ve 1250-1350 cm^{-1} aralığında gözlemlenen sırası ile amid-I ve amid-II gruplarını ve dolayısı ile covalent bağ oluşumunu temsil etmektedir [123].

Temas açısı (CA) ölçümleri ıslanabilirlik ve serbest yüzey enerji (SFE) ölçüm ve hesaplamaları için yaygınlıkla kullanılan bir teknik olduğundan, referans (bare PP), plazma modifiye (O_2 -PP ve NH_2 - O_2 -PP) ve heparin immobilize (hep- NH_2 - O_2 -PP ve hep*- NH_2 - O_2 -PP) PP alttaşların analizinde de kullanılmıştır. Bare PP yüzeyler alttaşın yığın yapısında bulunan C-H/C-C gruplarının yoğunluğu nedeni ile hidrofobik ($79.35^\circ \pm 6.06$) karakteristik sergilemiştir (Çizelge 2.2). Oksijen aşındırma işlemi ile, bare PP yüzeyler oldukça hidrofilik ($6.50^\circ \pm 0.67$) karakteristik kazanmış ve PP yapısındaki içmoleküler bağlara yeni polar grupları (C-O, C=O gibi) eklendiğinden SFE değeri de 36.62 mJ/m^2 'den 80.27 mJ/m^2 'e yükselmiştir. Ancak bir sonraki basamak olan amin fonksiyonelleştirme işlemi sonrası NH_2 - O_2 -PP yüzeylerin temas açısı $34.72^\circ \pm 5.92$ olarak ölçülmüştür. Yine de, amince-zengin ince film kaplaması PP alttaşların aktif yüzey alanlarını artırdığı gibi (heparin immobilizasyonu gerçekleşecek alan) bare PP yüzeylere kıyasla halen hidrofilik karakteristiğini korumaktadır. Bir diğer yandan, plazma ile oluşturulan parçacıkların bare PP yapısındaki C-C/C-H bağlarını kırarak, SFE değeri oldukça enerjik serbest radikaller yardımı ile 65.91 mJ/m^2 yükselmiştir. Söz konusu radikal gruplar heparin immobilizasyonunu da

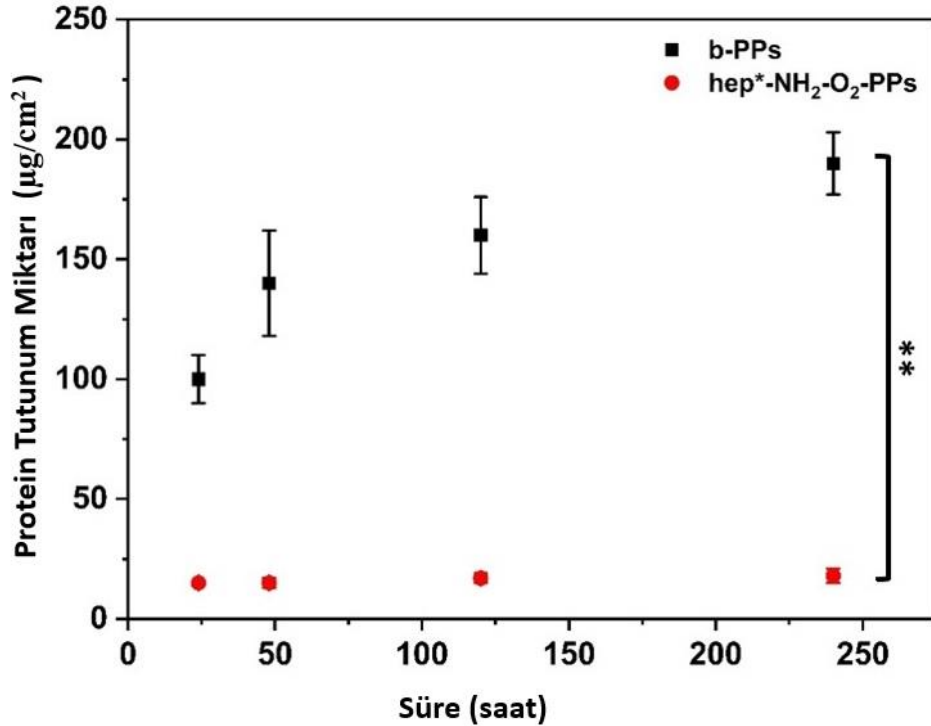
mümkün kılarak, heparin katmanı oluşumunu da sağlayacaklardır. Akabinde NH₂-O₂-PP yüzeylere heparin immobilizasyonu gerçekleştirilmesi ile temas açısı değerlerinde düşüşler tespit edilmiştir. Fiziksel adsorpsiyon uygulanan hep-NH₂-O₂-PP yüzeylerde temas açısı 40.58°±2.89 (SFE: 56.01 mJ/m²) iken, hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde söz konusu değer 32.95°±2.07 olarak (SFE: 50.34 mJ/m²) olarak ölçülmüştür ve her iki yüzeyin de bare PP yüzeylere kıyasla hidrofilik karakteristik sergilediği tespit edilmiştir. hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerin (hep-NH₂-O₂-PP kıyasla) daha yüksek hidrofilisite sergilemesinin nedeni oldukça polar C-O, C=O, C-H ve O-C=O fonksiyonel gruplarının mevcudiyeti ile ilişkilendirilebilir. Ek olarak kimyasal analizlerle paralel bir şekilde, hep*-NH₂-O₂-PP hidrofilisitesinde ki artış yüksek sayıda ve polar aynı zamanda yüklü -COOH ve -SO₃ gruplarının varlığıyla da ilişkili olduğu unutulmamalıdır [124]. Gerçekleştirilen analizler ve elde edilen veriler ışığında, çalışmanın geri kalan basamaklarında (protein tutunum, antibakteriyel çalışmalar ve sitotoksitesite çalışmaları) hep*-NH₂-O₂-PP örnekler ve kontrol grupları kullanılmıştır.

Çizelge 2.2: bare PP ve modifiye PP (O₂-PP , NH₂-O₂-PP , hep-NH₂-O₂-PP ve hep*-NH₂-O₂-PP) örneklerin temas açısı analiz sonuçları (n=12).

Örnek	Islanabilirlik (°)	Dispersif Bileşen (mJ/m²)	Polar Bileşen (mJ/m²)	Toplam SFE (mJ/m²)
b-PP	79.35 ± 6.06	31.89	4.73	36.62
O₂-PP	6.50 ± 0.67	49.04	31.23	80.27
NH₂-O₂-PP	34.72 ± 5.92	38.53	27.38	65.91
hep-NH₂-O₂-PP	40.58 ± 2.89	41.65	14.36	56.01
hep*-NH₂-O₂-PP	32.95 ± 2.07	39.13	11.21	50.34

2.2.4. Protein tutunum çalışmaları

Biyomalzeme yüzeyine protein tutunum karakteristiği direkt olarak biyomalzeme yüzeyinin hidrofilitate, pürüzlük ve yüzey yükü gibi karakteristiklerine bağlıdır. Literatürde albumin ve fibrinojen protein yapılarının pH:7.4'te heparine bağlanma afinitesi olmadığı gösterilmiştir. Çalışma kapsamında bare PP ve hep*-NH₂-O₂-PP 10 gün boyunca sığır serum albumin (SSA) ile muamele edilmişlerdir. Elde edilen verilere göre bare PP yüzeylerde tutunan protein miktarı 190±13 µg/cm² olarak ölçülürken, hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde bu miktar neredeyse 15 kat azalarak 13±3 µg/cm² olarak ölçülmüştür (Şekil 2.6). Bu durumun nedeni heparinin pH 4'ten büyük değerlerde, albuminin ise pH 4.8'den büyük değerlerde negatif yüklü olması ve her iki kimyasalın pH 7.4'te negatif yüklü olmaları nedeni ile birbirlerini itme eğilimleri olmasıdır. SSA tutunumunun bu denli azalmasının bir diğer nedeni ise heparinin yapısı itibari ile oldukça yüksek oranda negatif yüklü oluşu ve kimyasal karakterizasyonlarda da görüldüğü üzere örnek yüzeylerinde yine oldukça negatif yüklü karboksilik asit ve sülfon grupları bulundurmasıdır [125].



Şekil 2.6: Referans (bare PP) ve heparin modifiye (hep*-NH₂-O₂-PP) yüzeylerde SSA protein tutunum çalışma sonuçları (n=9, **p>0.005).

2.2.5. In vitro antibakteriyel çalışma sonuçları

İmplant materyallerin sebep olduğu bakteri kaynaklı enfeksiyonlar, bakteri türüne bağlı olmakla birlikte tedavi kapsamında antibiyotik direncinin gelişmesi, başarısız implantasyona ya da hasta ölümüne neden olabilmektedir [126]. Örneğin, implante edilen materyallerin yaklaşık %45'i nozokomial enfeksiyona neden olduğundan, ki bu tip enfeksiyonlar antibiyotiğe ve immün sisteme karşı oldukça dirençlidir, başarısız implant kullanımı olarak saptanmakta ve vücuttan çıkarılmaktadır [127]. Bu nedenlerle implant materyal ve farklı bakteri türleri arasındaki etkileşimin incelenmesi kritik öneme sahip olduğu gibi, klinik uygulamalarda güvenli kullanımını da sağlamaktadır.

Antibakteriyel çalışma kapsamında öncelikle, herbir bakteri suşu için (gram pozitif: *S. epidermidis*, *S. aureus* ve gram negatif: *E. coli*) serbest formdaki heparin çözeltileri ile MİK ve MBK değerleri saptanmıştır (Çizelge 2.3). Genel anlamda antibakteriyel çalışma sonuçlarına bakıldığında, *S. aureus* ve *E. coli* standart suşları için heparinin saf ve kovalent bağ ajanı ile muamele edilen versiyonları, aynı etkiyi göstermiştir. *S. epidermidis* standart suşunda ise katkılı Heparin, MİK değerinde aynı etkiyi sergilemiş, nitekim MBK sonuçlarında ise yaklaşık 2 kat daha düşük bir performans sergilemiştir. Bu durum *S. epidermidis* ve model bakteri suşları (*S.aureus* ve *E.coli*) arasında ki muhtemel farklılığa dikkat çekmektedir.

Bu durum şu şekilde açıklanabilir; implant materyaller ile etkileşim imkanı bulan bakteriler, bol miktarda slime (polisakkarit ve proteinden oluşan bir çeşit ekstrasellüler matriks) üreterek, bu tabaka ile kendilerini antibiyotiklerin etkisinden koruyabilmektedirler. Slime faktör (difüzyon bariyeri olarakta adlandırılmaktadır), bakterileri fagositozdan koruyarak, çeşitli yöntemlerle (kemotaksisi önleyerek, nötrofil etkisini inhibe ederek, lenfosit aktivitesini azaltarak) bakteri virülansının (bir patojen ya da mikroorganizmanın konak canlıda hasar meydana getirebilme yeteneği) artmasına neden olur. *S. epidermidis* izolatları metisilin, Ampisilin vb günümüzde sık kullanılan antibiyotiklere karşı artan oranlarda direnç göstermeleri nedeni ile de sorun oluşturmaktadır. Bu durum, *S. epidermidis*'te antibiyotik üretme miktarı nedeniyle kolonizasyonda üstünlük sağlamasına neden olmakta, bir başka deyişle diğer gram pozitif bakteri türlerine kıyasla antibiyotiklere karşı daha dirençli olması anlamına gelmektedir [128-130].

Çizelge 2.3: Serbest formdaki heparinin ATCC standart suşları üzerine MİK ve MBK konsantrasyon miktarları (heparin kütlece 1:1 oranında EDC ve NHS kovalent bağ ajanları ile muamele edilmiştir, n=6).

Bakteri suşu	MİK ($\mu\text{g/mL}$)	MBK ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. epidermidis</i>	[1600– 3200]	[12500–25000]
<i>S. aureus</i>	[1600– 3200]	[6250–12500]
<i>E. coli</i>	[1600– 3200]	[6250–12500]



Şekil 2.7: Heparinin *S. epidermidis* suşu ile etkileşimi sonrası MİK ve MBK tayini yapılmasında kullanılan 96-kuyucuklu plak görüntüsü.

MİK ve MBK konsantrasyonlarının tespitinin ardından, bir sonraki basamakta yüzeydeki heparinin aynı bakteri suşlarına karşı yapışma önleyici (anti-adherent) karakteristikleri test edilmiştir. Herbir bakteri koloni miktarı kantitatif olarak koloni

oluşum birimi (KOB) birim hacim (KOB/ml) üzerinden hesaplanarak hazırlanmıştır. Yüzeyle bakteri ekimi öncesi, bakteri canlılığı ve kullanılan besi yerinin kontamine olup/olmadığını kontrol etmek üzere, her bir çözültiden TSA katı besiyerine ekimler gerçekleştirilmiş ve 24 saat inkübasyon sonrası kontrolleri gerçekleştirildikten sonra deneylere başlanmıştır.

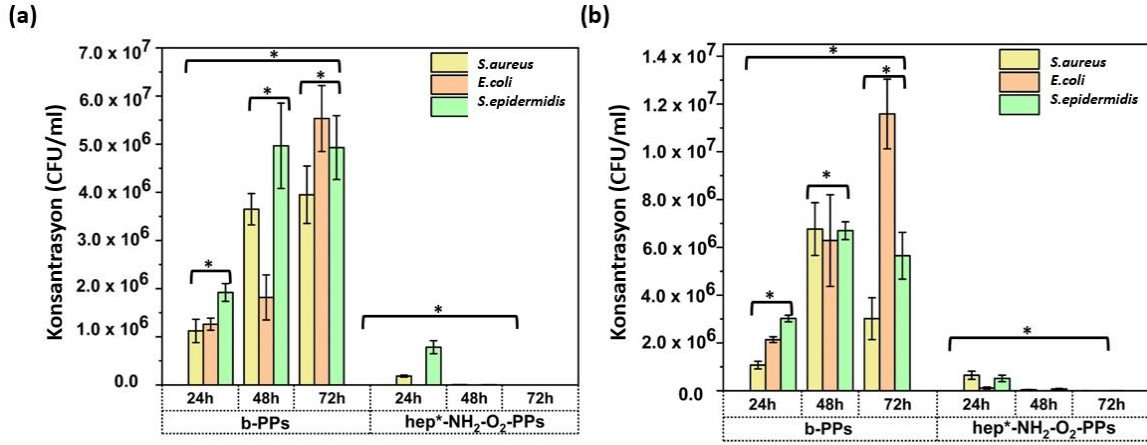
S. epidermidis gram pozitif ve koagülaz negatif, Staphylococcus cinsinin bir üyesidir. Spesifik bir implant nozokimal enfeksiyona neden olursa, bu bakteri suşu hastanın dolaşım sistemine girerek sepsis vb istenmeyen pek çok etkileşime sebep olabilir ve bu durum erken teşhis edilemezse mortalitenin sona ermesi ile sonuçlanabilir [127]. Bu neden tez kapsamında öncelikli olarak incelenen bakteri suşu *S. epidermidis* olarak belirlenmiştir. Şekil 2.8’de görülebileceği üzere bare PP yüzeye tutunan canlı bakteri konsantrasyonu ilk 24 saatin sonunda 3×10^6 (KOB/ml) civarında iken, inkübasyon süresinin uzaması ile birlikte bu sayı 6×10^6 (KOB/ml) dek çıkmaktadır. Bir diğer yandan hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylere tutunan canlı bakteri konsantrasyonu başlangıçta 5×10^5 (KOB/ml) civarında iken, 48 saat inkübasyon sonrası birkaç yüz koloni, 72 saat sonunda ise hiçbir koloni tespit edilmemiştir. Bu durum yüzeye tutunan *S. epidermidis* bakterilerinin 24 saat inkübasyon süresi sonrası canlılıklarını koruyamadıkları anlamına gelmektedir. İlk 24 saat süresinde de hep*-NH₂-O₂-PP yüzeye tutunan bakteri konsantrasyonu bare PP yüzeylere kıyasla 4 kat daha az olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerin yapışma karşıtı (anti-adherent) karakteristiklerinin mekanizmasını saptamak adına, aynı yüzeylerin yıkama işleminde kullanılan PBS tamponundan da TSA katı besiyerlerine ekimler gerçekleştirilmiştir. Böylelikle yüzeye tutunamayan bakterilerin canlı olup olmadıkları saptanmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresinin tamamlanması ile birlikte bare PP yüzeylere tutunamayan canlı bakteri konsantrasyonu neredeyse 2×10^6 KOB/ml iken, inkübasyon süresinin artması durumlarında söz konusu konsantrasyon değeri yaklaşık 5×10^6 KOB/ml olarak saptanmıştır. hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde ise başlangıçta bu konsantrasyon değeri 1×10^6 az iken, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonrasında herhangi bir koloniye rastlanmamıştır. Bu durumda hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerin *S. epidermidis* bakteri suşuna karşı “temas ile öldürme” karakteristiği sergilediği deneysel olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde, referans (bare PP) yüzeylere kıyasla ilk 24 saat inkübasyon süresi sonunda yıkama suyundaki

canlı bakteri sayısı 4 kattan fazla azaltılmış ve sonrasında hiçbir canlı bakteri kolonisi oluşmamıştır.

S. aureus suşunda ise, bare PP yüzeye tutunan canlı bakteri konsantrasyonu 24 saat sonunda yaklaşık 1×10^6 KOB/ml olarak saptanmış, 48 saat inkübasyon süresi sonrası ise bu değer 7×10^6 KOB/ml değerine dek artmıştır. Ancak 72 saat inkübasyon süresi sonrasında canlı bakteri konsantrasyon değeri 3×10^6 KOB/ml değerine dek gerilemiştir. Bu durum, inkübasyon süresinin uzaması ile birlikte, yüzeydeki bakterilerin ürettiği metabolik atıkların toksik bir ortam oluşturarak bakteri canlılığını olumsuz yönde etkilemesi ile açıklanabilir [126]. hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde ise yalnızca 24 saat inkübasyon sonrası canlı bakteri tespit edilmiş ve söz konusu konsantrasyon değeri 4×10^5 KOB/ml olarak belirlenmiştir. İnkübasyon süresinin artması ile birlikte hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylere tutunan canlı bakteri kolonisine rastlanmamıştır. Eş zamanlı olarak yürütülen, yıkama suyu ile gerçekleştirilen ekim sonuçlarına göre ise, bare PP yüzeylerde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonrasında tespit edilen canlı bakteri konsantrasyonu sırası ile 1×10^6 , 3.5×10^6 ve 3.8×10^6 KOB/ml olarak saptanmıştır. hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde ise söz konusu konsantrasyon değeri yalnızca ilk 24 saat inkübasyon süresinde tespit edilmiş ve yaklaşık 1×10^5 KOB/ml şeklindedir. Referans (bare PP) ve heparin immobilize (hep*-NH₂-O₂-PP) yüzeyler yapışma önleyici karakteristikleri kapsamında karşılaştırılırlarsa, bu bakteri suşu için de hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerin mekanizması “temas ile öldürme” olarak sonuçlanmış olacaktır.

Son olarak *E. coli* bakteri suşu (çalışma kapsamında kullanılan tek gram negatif bakteri türü olarak) çalışılmıştır. Bare PP yüzeylere tutunan canlı bakteri konsantrasyonu ilk günün sonunda yaklaşık 2×10^6 KOB/ml olarak saptanmış ve inkübasyon süresinin uzaması ile birlikte 6×10^6 ve 11×10^6 KOB/ml değerlerine dek yükselmiştir. hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde ise yalnızca 24 saat inkübasyon süresi sonrası yapılan ekimlerde canlı bakterilere rastlanmıştır. Mevcut bakteri konsantrasyonu 5×10^5 KOB/ml skalasında olup, test edilen diğer iki gram pozitif bakteri suşunda olduğu gibi ilerleyen inkübasyon sürelerinde herhangi bir canlı bakteri kolonisine rastlanmamıştır. Yüzeye tutunmayan bakterilerde canlılık tespitine yönelik yapılan çalışma sonuçlarına göre ise ilk gün yaklaşık 1.2×10^6 KOB/ml bakteri konsantrasyonu saptanırken sürenin uzaması ile söz konusu konsantrasyon değerleri 1.7×10^6 ve 5.5×10^6 KOB/ml olarak tespit edilmiştir. Test edilen diğer bakteri suşlarında olduğu gibi *E. coli* suşunda da

yıkama suyunda da 24 saat sonrası inkübasyon sürelerinde canlı bakteriye rastlanmamıştır. Yeniden yapışma önleyici mekanizma “temas ile öldürme” olarak saptanmıştır.

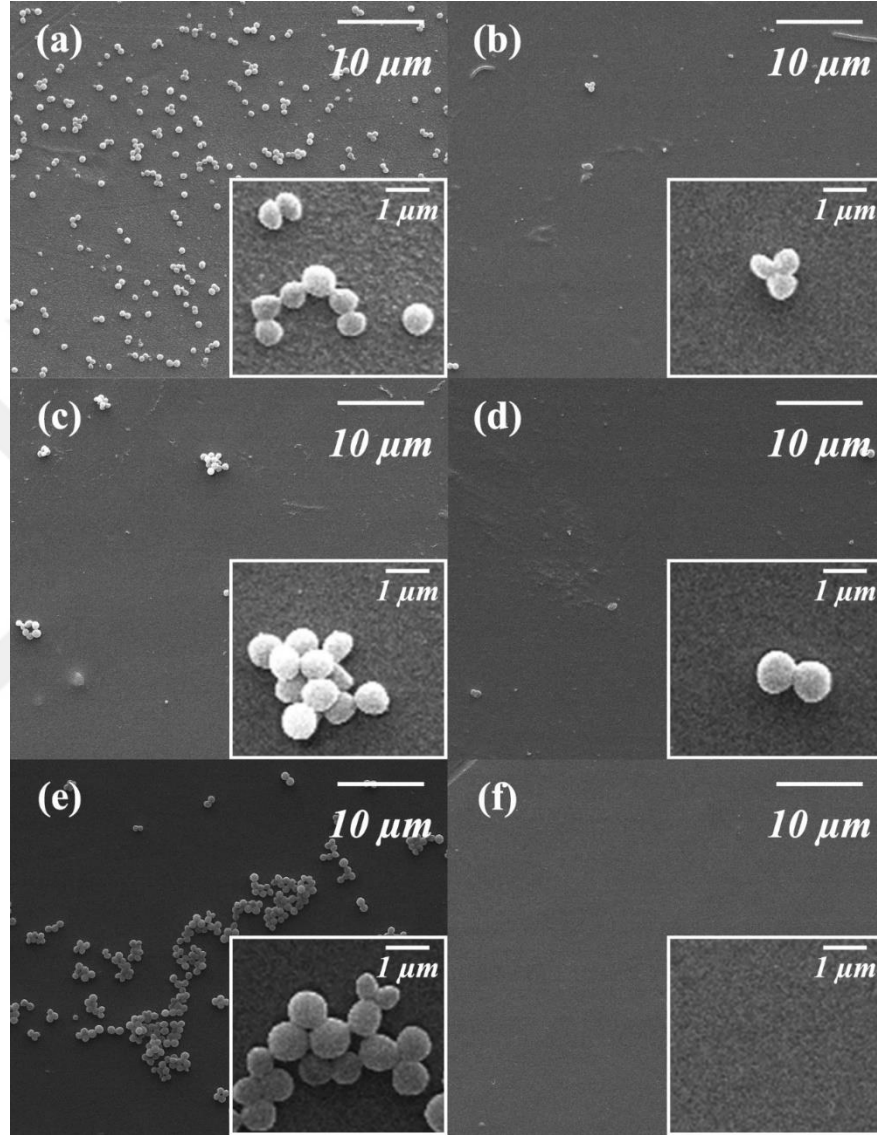


Şekil 2.8: *S. aureus*, *E. coli* ve *S. epidermidis* bakteri suşlarına ait kolonizasyon sonuçları (a) Yüzeye tutunmayan (yıkama suyundan, PBS) bakterilerin eldesi ile yapılan ekimler, (b) yüzeye tutunan bakterilerin eldesi ile gerçekleştirilen ekimler (herbir bakteri suşu için 37°C’de inkübasyon süreleri sırası ile 24, 48 ve 72 saat, tüm ekimler TSA katı besiyerinde gerçekleştirilmiştir, n=12, *p<0.05).

Genel anlamda her üç bakteri suşu için de yapışma önleyici mekanizmayı “temas ile öldürme” olarak tespit edilmiş ve sebebi şu şekilde açıklanmıştır: Heparin modifikasyonu, özellikle yapısındaki sulfon gruplarının yardımı ile PP alttaşlara yüksek polarite ve negatif yük kazandırmıştır. Sulfon gruplarına dikkat çekilmesinin nedeni, heparinin yapısındaki diğer negatif yüklü fonksiyonel gruplara nazaran (karboksil, hidroksil vb) katyonlarla kolaylıkla etkileşime geçebilmesi ve şelat oluşturabilmesidir. Bu durum bakteri çevresindeki stabil hidrojen bağlarının stabilitesinin bozulmasına yol açarak bakteri hücre duvarı bütünlüğünün de bozulması ve takibinde bakteri ölümüne neden olması şeklinde açıklanabilir [131-133].

Elde edilen veriler ile paralel sonuçlar gözlemlemek adına, bare PP ve hep*-NH₂-O₂-PP yüzeyler herbir bakteri suşu ile 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra yüzeydeki bakteri miktarlarını gözlemlemek adına taramalı elektron mikroskop görüntüleri alınmıştır. Şekil 2.9’da rahatlıkla görülebileceği üzere, bare PP yüzeyler test edilen tüm bakterilerin tutunumu için ideal yüzeyler olmakla birlikte hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde oldukça yüksek miktarda tutunum engelleyici yaklaşım saptanmıştır. Elde edilen görüntüler heparinize yüzeylerde bakteri tutunumunun ne kadar düşük oranda

olduğunu göstermekte ve Şekil 2.8’de gösterilen sonuçlar ile örtüşmektedir. Bir diğer yandan SEM görüntüleri, hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde canlı bakteri kolonilerine rastlanan tek parametrenin 24 saat inkübasyon parametresi olması ve diğer inkübasyon sürelerinde hiçbir canlı bakteri kolonisine rastlanılmamasını gözler önüne sererek desteklemektedir.



Şekil 2.9: Referans (bare PP) ve heparinize (hep*-NH₂-O₂-PP) PP yüzeylerde *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *E. coli* suşlarına karşı bakteri kolonizasyon SEM görüntüleri. Herbir SEM görüntüsü, yüzeylerin 24 saat inkübasyonu sonrası çekilmiştir. *S.aureus* inkübe (a) bare PP, (b) hep*-NH₂-O₂-PP, *E. coli* inkübe (c) bare PP, (d) hep*-NH₂-O₂-PP, *S. epidermidis* inkübe (e)bare PP (f) hep*-NH₂-O₂-PP. Alınan tüm görüntülerde büyütme katsayısı x5000 ve x50000 değerindedir.

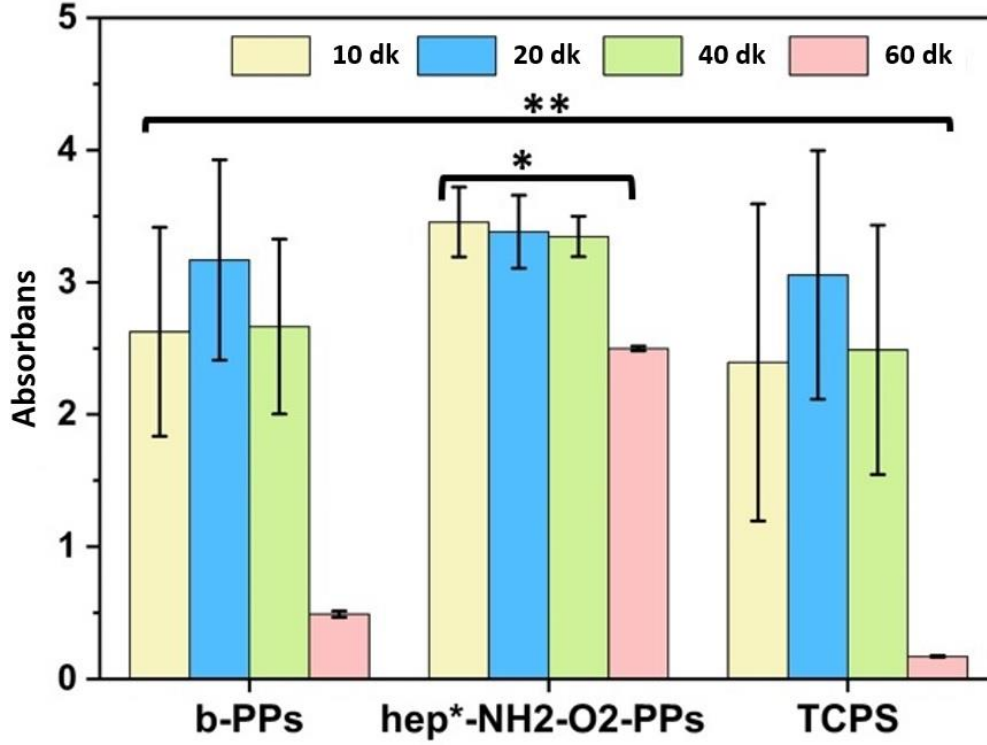
Geniş zaman aralıklarında inkübasyon sürelerinin uygulanması (48 ve 72 saat) heparinize yüzeyler ile bakteri temas süresini de uzatmak anlamına gelmektedir ve bu durum “temas ile öldürme” ihtimalini süreç boyunca artırmaktadır. Böylelikle yıkama suyunda %99’un üzerine çıkan bakteri inhibisyon oranı geliştirilen hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerin bakteri tutunumuna ne kadar dirençli olduğunu vurgulamaktadır. Elde edilen inhibisyon oranlarının bir diğer sebebi de yüzeye immobilize edilen heparin miktarının ~400 µg/cm² olması ve inkübasyon süresince yüzeyden salınan heparinin test edilen tüm bakteriler için MBK değerini sağlamasıdır. MİK ve MBK çalışmalarında kullanılan bakteri konsantrasyonu ve bare PP, hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylere inkübe edilen bakteri konsantrasyonları arasında ki ilişki sayısal olarak hesaplanıp, ayrıca doğrulanmıştır (EK-1, Hesaplama 1).

2.2.6. In vitro hemokompatibilite çalışma sonuçları

Hemoliz, kırmızı kan hücrelerinin yıkımı ile plazmaya hemoglobin salınımının gerçekleşmesi olarak tanımlanabilir. Buradan yola çıkılarak çalışma kapsamında bare PP ve hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerin kırmızı kan hücreleri ile etkileşimi deneysel olarak test edilmiştir (n=6). İki PP yüzey tipi de dört farklı sağlıklı gönüllüden alınan taze kanlar ile 1 saat boyunca muamele edilmiştir. Sürenin sonunda bare PP yüzeylerde hemoliz oranı %2.18 ± 0.04, hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde ise %0.45 ± 0.02 olarak hesaplanmıştır. ISO-10993-4 kriterlerine göre implant materyallerde maksimum hemoliz oranı %5 olmalıdır, aksi takdirde implant kullanımı yasal olmayacaktır [134].

Kinetik-kan pıhtılaşma testinde de benzer bir yaklaşım uygulanmıştır; hemoliz testi ile arasındaki tek fark kinetik-kan pıhtılaşma testinde 10, 20, 40 ve 60 dakika olmak üzere 4 farklı zamanda bare PP ve hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerin test edilmiş olmasıdır (TCPS kontrol grubu, n=16, Şekil 2.10). Belirlenen inkübasyon süresinin dolması ile birlikte, kan örnekleri ultra saf su ile etkileştirilerek, pıhtılaşmamış kanda serbest haldeki hemoglobinin absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu nedenle, UV-vis spektrumda okunan absorbans değerleri direkt olarak serbest haldeki hemoglobin miktarı ile bağlantılıdır. Geriye kalan hemoglobin, pıhtı oluşumuna katıldığından artık serbest halde olamayacaktır. Çünkü pıhtı oluşumunun son basamağında çözünmeyen fibrin oluşmaktadır. Bir başka deyişle, absorbans değerinin artması, serbest haldeki hemoglobin miktarının yüksek olduğunu göstermektedir ki dolaylı yoldan pıhtı oluşum miktarının da az olduğu anlamına gelmektedir. Elde edilen verilere göre ilk 40

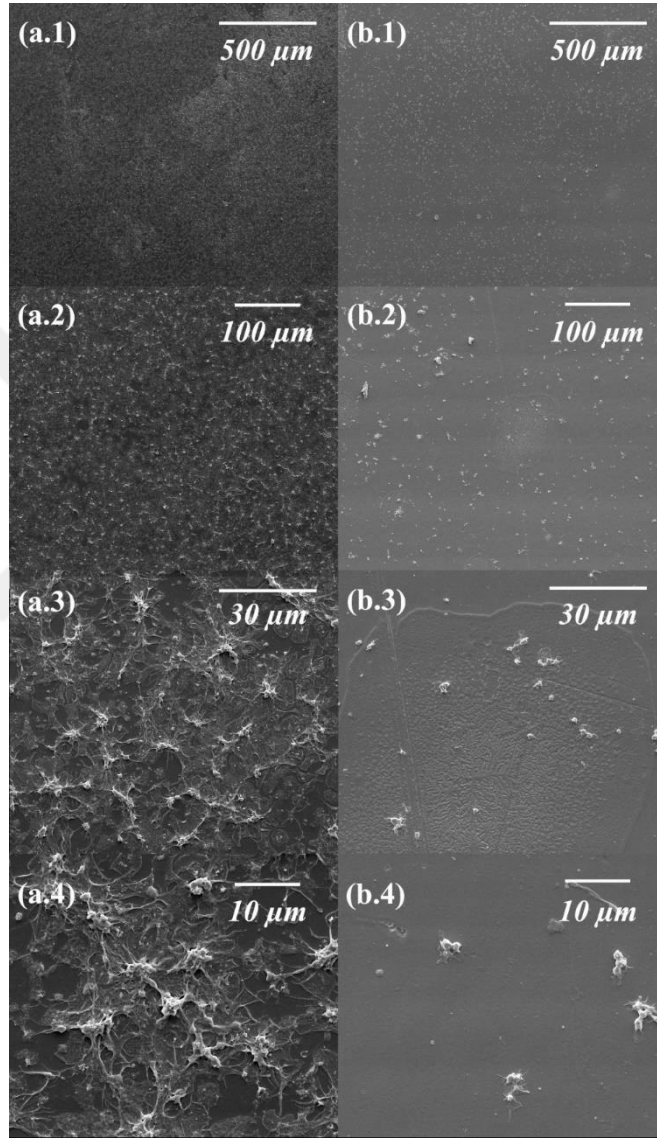
60 dakika inkübasyon süresince bare PP ve hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylere ait absorbans değerlerinde farklılıklar olsa da, 60 dakikanın sonunda hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde pıhtılaşma oranı bare PP yüzeylere kıyasla 5 kat daha azdır. Kinetik kan pıhtılaşma test sonuçları da, bahsi geçen yüzeylerin hemoliz yüzdeleri arasındaki ilişki ile paralel sonuçlar vermiştir.



Şekil 2.10: Referans (bare PP) ve heparinize (hep*-NH₂-O₂-PP) PP yüzeylerde kinetik-kan pıhtılaşma test sonuçları (TCPS kontrol grubu, n=6, *p<0.05, **p<0.01).

Platelet tutunumu pıhtı oluşumunu tetiklediğinden, implant-kan arayüzeyi hasta için risk oluşturmaktadır. Bu nedenle hemokompatibilite çalışmaları kapsamında, model implant yüzeylerde platelet tutunum ve aktivasyon özelliklerinin araştırılması elzemdir. Platelet tutunum testleri kapsamında 4 sağlıklı gönüllüden tam kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örneklerinin santrifüje edilmesi ile (1000 g, 15 dakika) elde edilen plateletçe zengin plazma (PRP, 1ml) ile her bir yüzey iki saat boyunca inkübe edilmiştir (n=3, 25°C). SEM aracılığı ile elde edilen görüntülere bakıldığında (Şekil 2.11), bare PP yüzeylerde platelet tutunumu ve akümülyasyonu gerçekleştiği gözlemlenmektedir. Ayrıca plateletlerin birbirleriyle ile iletişim/etkileşim halinde oldukları da plateletler arasındaki ağın oluşumuyla ispatlanmış durumdadır. Referans

yüzeylerin aksine, hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde platelet tutunum miktarında oldukça azalma gözlemlenmiş, plateletlerde kümeleşme olmadığı gibi, aralarında iletişim/etkileşim ağının oluşmadığı da ortaya çıkmıştır. Bu durum heparinin yapısındaki fonksiyonel grupların, özellikle karboksil ve sulfon gruplarının doğaları gereği, plateletleri oldukça etkili bir şekilde yüzyeden ittikleri şeklinde açıklanabilir [112].

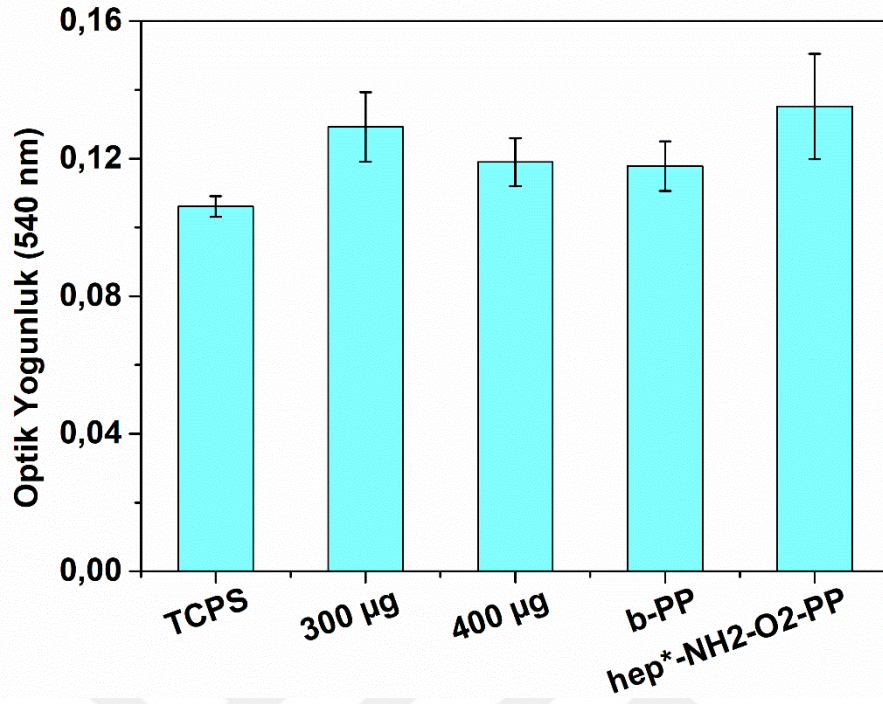


Şekil 2.11: İnsan kanından elde edilen PRP ile inkübe edilen (a.1-4) bare PP ve (b.1-4) hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylere ait SEM görüntüleri. Büyütme değerleri (a.1,b.1) ×150, (a.2,b.2) ×500, (a.3,b.3) ×2500, (a.4,b.4) ×5000.

2.2.7. In vitro hücre kültürü sonuçları

Polipropilen, klinikte yaygın olarak kullanılan polimerik bir malzeme olduğundan, ISO-10993-5 standartları uyarınca sitotoksik olmayan bir malzeme olması beklenmektedir [131]. İmplant malzemeleri hasta üzerinde kullanılacağından, biyoyumluluk ve güvenlik gibi pekçok standard sağlayarak gerekli mercilerden onay almalıdır. Bu nedenlerle, heparinize hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerin biyoyumlulukları BJ hücreleri kullanılarak test edilmiştir. Hücreler hem serbest formdaki heparin çözeltileri (300 ve 400 µg) ile hem de bare PP yüzeylere immobilize haldeki heparin ile test edilmiştir. TCPS malzemenin kontrol grubu olarak kullanıldığı test kapsamında (0.1061 ± 0.0030) optik yoğunluk verileri bare PP ve hep*-NH₂-O₂-PP yüzeyler için sırası ile 0.1178 ± 0.0072 ve 0.1352 ± 0.0153 olarak sonuçlanmıştır (Şekil 2.12). Böylelikle, elde edilen optik yoğunluk verilerine göre hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerin BJ hücrele canlılığına negatif bir etkisi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çalışmanın son kısmında ise, hep*-NH₂-O₂-PP yüzeylerde heparin salım miktarının oldukça yüksek değerlerde gerçekleşmesinden dolayı, serbest haldeki heparin çözeltileri ile BJ hücrelerinin etkileşimi incelenmiştir. 300 ve 400 µg iki farklı heparin konsantrasyonu kullanılarak BJ hücreleri ile 24 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. Elde edilen optik yoğunluk değerleri sırası ile 0.1292 ± 0.0101 ve 0.1190 ± 0.0070 olarak saptanmıştır (TCPS kontrol grubu). Özetle, yapılan çalışmalar göstermiştir ki, geliştirilen hep*-NH₂-O₂-PP yüzeyler hücrelerde inhibisyon etkisine sebep olmamaktadır. Ayrıca, literatürde yer alan birkaç çalışmanın da öne çıkardığı gibi heparin yapısındaki sülfon gruplarının hücre canlılığını pozitif anlamda tetiklediği de raporlanmıştır [113,114].



Şekil 2.12: BJ hücreleri ile inkübe edilen serbest heparin (300 µg ve 400 µg) ve heparinize yüzeylerin (hep*-NH₂-O₂-PP) MTT analizi sonuçları (TCPS kontrol grubu, n=5, *p<0.05).

3. TİTANYUM (Ti) YÜZEYLERDE ELEKTROFORETİK DEPOZİSYON (EPD) DESTEKLİ HEPARİN İMMOBİLİZASYONU

3.1. Materyal ve Metot

3.1.1. Materyal

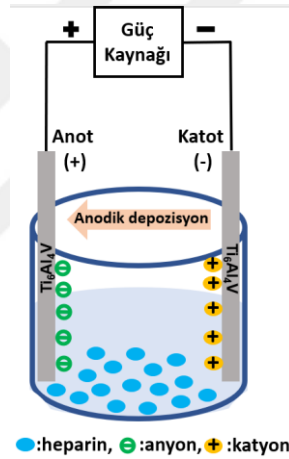
Ti₆Al₄V alaşım yüzeyler (sınıf 5, kalınlık 1mm, Salomon's Metalen) 10 mm x 25 mm levhalar şeklinde kesilmiştir. Tüm örnekler otomatik zımparalama makinesi ile (LaboForce-100/LaboPol-30, Struers) iki basamakta zımparalanmıştır: (i) kristal zımpara diski ile (MD-Mezzo 220 ve MD Largo, Struers), (ii) zımparalanan yüzeyleri parlatma işlemi (polishing) hacimce 70:30 oksit polishing çözeltisi (OPS, koloidal silika, MİKrodiamant GmbH) ve hidrojen peroksit (kütlece %35'lik çözelti, Chem-Lab). Temizleme işleminin tamamlanmasının ardında tüm örnekler ultrasonik banyoda (model 2510, Branson) 30 dakikalık sürelerde sırasıyla aseton (>%99, Cehm-Lab) ve ultra saf su (milliQ, 18.2 µS/cm, Merck Millipore) ile üçer kez yıkanarak, kullanıma hazır hale getirilmişlerdir.

3.1.2. Metot

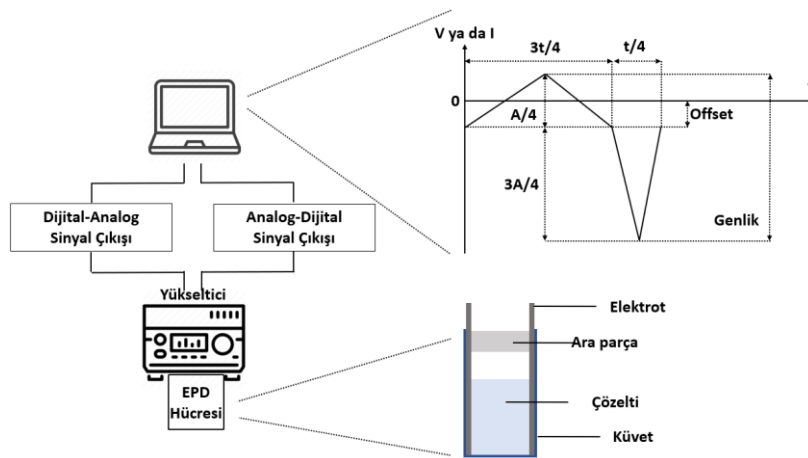
3.1.2.1. Titanyum (Ti) yüzeylerde heparin deposizyonu

Heparin (≥180 USP units/mg, milliQ, 18.2 µS/cm) çözeltisi 0.5 mg/ml konsantrasyonunda milliQ saf su ile hazırlanarak karakterize edilmiştir. Deney stratejisini belirlemek amacıyla, öncelikli olarak saf heparin çözeltisinin iletkenlik ve pH değerleri ölçülmüştür (InLab 751-4 mm: Mettler Toledo, USA). Heparin zeta potansiyel ölçümleri ise elektroforetik ışık saçılma cihazı ile (ELS, Litesizer 500, Anton Paar GmbH) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) heparin denatürasyonunu ve joule ısınmasını engellemek amacıyla, hızlı alan ters-dönme modunda (fast field reversal mode) gerçekleştirilmiştir.

Depozisyon hücresi, tek kullanımlık küvette (1 mL polisitren, VWR) elektrotların karşılıklı olarak aralarında 8 mm mesafe (PTFE ara parça) bulunacağı şekilde yerleştirilerek kullanılmaktadır (Şekil 3.1). Oda koşullarında, akım-kontrollü olarak AC-EPD işlemi gerçekleştirilmiştir. Yüksek çözünürlüklü dijital-analog sinyal üretici (NI9269, National Instruments) çift fazlı sinyal yükselticiye (PZD 700 M/S, Trek Inc.) bağlanarak sinyal üretimi gerçekleştirilmiştir. AC-EPD esnasında farklı frekans değerleri (25-50-75-100 Hz) ve DC offset içeren/içermeyen üçlü asimetrik AC sinyal kullanılmıştır (Şekil 3.2). Analog-dijital sinyal çıkış modülü (NI9223, National Instruments) sinyal yükseltici monitörüne bağlanarak deney süresince bilgisayar üzerinden akım, voltaj ve sıcaklık takibi yapılmıştır. İşlemin sona ermesi ile Ti alttaşlar küvetten çıkarılarak milliQ ile yıkanmış ve böylelikle yüzeye depozit edilemeyen biyomoleküller uzaklaştırılarak yüzeyler oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 3.1: EPD hücresinin şematik gösterimi.



Şekil 3.2: AC-EPD düzeneğinin şematik gösterimi [49].

Çalışma kapsamında AC-EPD tekniği ile heparin depozisyon işleminin optimizasyonunda test edilen parametreler Çizelge 3.1’de yer almaktadır. Uygulanan frekans (Hz) değerinin belirli bir değere kadar artması depozisyon miktarını artırmakla birlikte, eşik değeri geçmesi durumunda depozisyon işleminin sekteye uğrayarak homojen bir kaplama gerçekleştirilmesini engelleyecektir. Söz konusu eşik değeri, kullanılan kimyasala, çözücüye, çözelti pH’sına ve çevre koşullarına (sıcaklık, nem vb) bağlı değişkenlik gösterecektir. Uygulama süresi (dakika), atırdıkça kaplama kalınlığının da artması beklenmektedir. Ancak, sürenin uzaması ile birlikte çözeltiye uygulanan elektrik alan ve akım genlik miktarının etkisiyle çözelti de Ph, sıcaklık vb değişimler meydana gelecek ve öncelikle kaplama kalitesi ve homojenitesi bozulacak, devamında ise çözelti içerisindeki partiküller hareket kabiliyeti, mobilite vb parametreler kapsamında negatif etkilenecektir. Akım genliği (mA/cm^2) artırılması durumunda baloncuk oluşumunu (suyun elektrolizini) engellemek adına frekans değeri de artırılmalıdır. DC offset (mA/cm^2) AC-EPD tekniğine etkisi ise şu şekilde açıklanabilir. AC alan uygulanması durumunda elektrik alanın artı ve eksi bileşenleri uygulanan sinyale bağlı farklı elektrotlara yüklenirler. Yani birebir aynı olan iki elektrot, uygulanan AC sinyalin pozitif alanda olduğu ve negatif alanda olduğu anlarda anot ya da katot olarak karakteristik değiştireceklerdir. DC kaynak kullanımında ise elektrotlar süreç boyunca anot ya da katot olarak sabit birer kimlik edinmiş olacaklardır. AC sinyal uygulanırken DC bileşenin de sürece dahil edilmesi ile sabit bir elektrik alan uygulaması sağlanır ve yüklü parçacıklar hem AC kaynağın hem de DC kaynağın etkisinde hareket ederek kaplama gerçekleştirirler [46].

Çizelge 3.1: AC-EPD tekniğinde parametre optimizasyonunda kullanılan değerler.

Optimize Edilen Parametreler	Birim
Frekans	Hz (25, 50, 75, 100)
Süre	Dakika (1,5,10)
Akım Genliği	mA/cm^2 (2.5 , 5, 10, 25)
DC Offset	mA/cm^2 (0 , -0.25, -0.5, -1)

AC-EPD tekniği akım-kontrol modunda gerçekleştirilmiştir. Birbirinin tıpa tıp aynısı iki adet Ti plak kuvet içerisine yerleştirilerek depozisyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırma amacı ile, aynı konsantrasyonda (0.1 mg/ml) heparin ezeltisi kullanılarak ve AC-EPD uygulama suresi bire bir aynı şekilde uygulanarak klasik “daldırma” tekniği tercih edilmiştir. Tezin geri kalanında, referans örnekler “bare Ti”, AC-EPD ile heparin depozisyonu gerçekleştirilen rnekler “Ti-HEP”, daldırma tekniği ile heparin immobilizasyonu gerçekleştirilen yüzeyler ise “Ti-HEP_d” olarak adlandırılacaktır (şekil 3.3).

3.1.2.2. Titanyum (Ti) yüzeylerde fiziksel ve kimyasal karakterizasyon

Tez kapsamında gerçekleştirilen fiziksel karakterizasyonlar şu şekilde sıralanabilir; yüzey ıslanabilirlik açıları ve serbest yüzey enerji (SFE) hesaplamaları Temas Açısı (CA) lümü ile gerçekleştirilmiştir (OCA 15EC, Dataphysics).

Yüzey enerjisi (SFE) ve bileşenleri kullanılarak incelenmiş ve durgun-su methodu ile statik olarak llmüştur (OCA 15 EC, Dataphysics, Germany). SFE bileşenleri, örneğin apolar (dispersif Lifshitz-van der Waal; γ_s^{LW}) ve polar (asit γ_s^+ , baz γ_s^-) van Oss, Chaudhury ve Good (vOCG) eşitliği kullanılarak SCA 20 yazılımı ile hesaplanmıştır [137].

$$\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+} = 0.5 \gamma_{lv} (1 + \cos \theta) \quad (3.1)$$

Polar bileşen, γ^{AB} ve toplam yüzey enerjisi γ^{tot} , eşitlik 3.2 ve 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır [138].

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+ \gamma^-} \quad (3.2)$$

$$\gamma^{tot} = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (3.3)$$

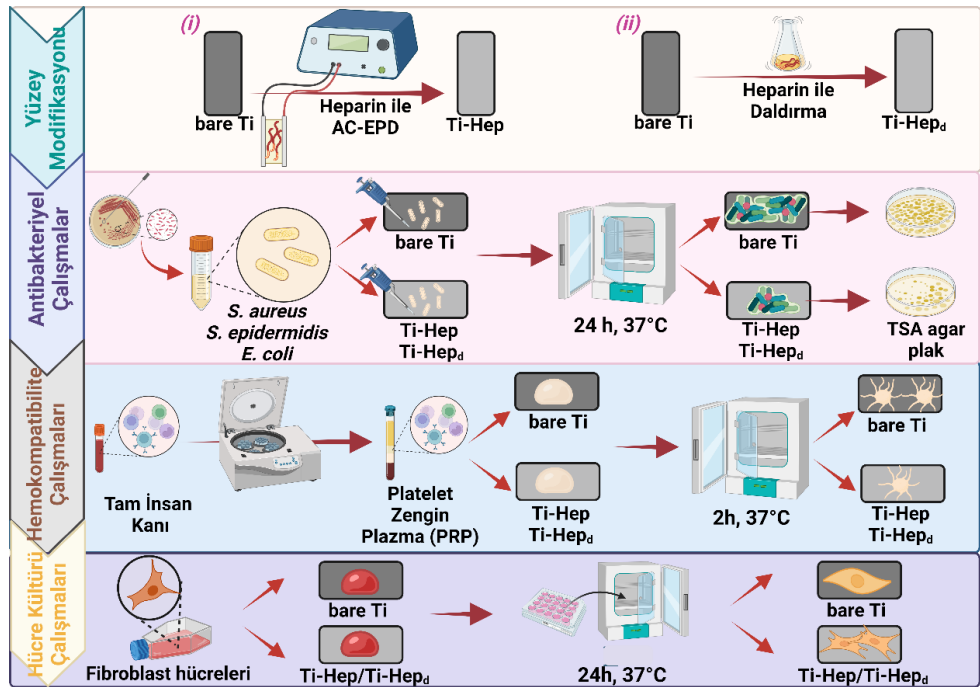
Hesaplamalar için her gruptan 9 örnek analiz edilmiştir.

Yüzey topografi analizleri ve görüntüleri Atomik kuvvet mikroskop (AFM, Asylum, Asylum Research, Oxford Instruments, Oxford, UK) tekniği ve Taramalı elektron

mikroskop (SEM, FEI-Quanta 400 F, TX,USA) ile gerçekleştirilmiştir. Ti yüzeylerde gerçekleştirilen kaplama kalınlıklarının tayini için ise Spektroskopik elipsometri (İse Ellipsometer, J.A. Woollam, version 5.2) tekniği kullanılmıştır.

Ti yüzeylere depozite edilen heparin miktarının tayini için, tüm Ti örnekler 4 ml 30 ppm Toluidine mavi (TB) boya içine daldırılmıştır. Proses şu şekilde gerçekleştirilmiştir: örnekler 1 saat boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur ve takip eden süreçte 5 dakika boyunca vortekslenmiştir. Ti yüzeylerin TB boyasından uzaklaştırılması ile, elde edilen çözelti heparin miktarının tespit edilmesi amacıyla incelenmiştir. ELISA tekniği ile 630 nm dalga boyunda gerçekleştirilen ölçümler ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve ilerleyen süreçte yüzeydeki heparin miktarı söz konusu eğriden elde edilen denklem ile hesaplanmıştır ($y = (x+0.5843)/-0.1359$, $R^2=0.97$).

Kimyasal analiz, XPS (ThermoFisher Scientific, East Grinstead, UK) ile gerçekleştirilmiştir. Veri analizi ve eldesi için Thermo Avantage software kullanılmıştır. Tüm yüzeyler Al K α hattı üzerinde analiz edilmiş, X-ışını kaynağı monokromatik uygulanmıştır (400 μ m nokta çapı, elektron enerjisi 8 eV) [139].



Şekil 3.3: AC-EPD destekli yüzey modifikasyonu ve biyolojik testlere ait çoklu deney basamaklarının şematik gösterimi.

3.1.2.3. Protein tutunum çalışmaları

Çalışma kapsamında model protein olarak sığır serum albümin (Sigma Aldrich, SSA) tercih edilmiştir. Protein çözücüsü olarak ise fosfat tampon çözelti (PBS) kullanılmıştır. Deney süreci, 1 mg/ml (PBS, pH:7.4) konsantrasyon değerinde SSA kullanılarak yürütülmüştür. AC-EPD tekniği ile heparin kaplama gerçekleştirilen (Ti-HEP), daldırma tekniği ile heparin kaplama gerçekleştirilen (Ti-HEP_d) ve referans Ti alttaş (bare Ti) yüzeyler 10 mL SSA çözeltisine daldırılarak, 7 gün boyunca 37 °C 'de 50 rpm çalkalamalı inkübatör ortamında mufahaza edilmiştir. Belirlenen sürelerin dolması ile (24-72-168 saat) çözeltiden örnek alınarak UV spektrofotometri ile ortamdaki SSA miktarları tayin edilmiştir. Yüzeğe tutunan protein miktarı, stok çözeltinin konsantrasyon değerinden (1 mg/ml), SSA çözelti konsantrasyonunun çıkarılması ile elde edilmiştir.

3.1.2.4. In vitro antiadherent çalışmalar

Çalışmanın bu kısmında üç tip Titanyum yüzey (Ti-HEP, Ti-HEP_d, bare Ti) ile devam edilmiştir.

Antiadherent çalışma prosedür akışı aşağıda paylaşılmaktadır;

- Triptik Soy Broth (TSB, sıvı besiyeri) içerisinde 0.5 McF (1.5×10^8 KOB/ml) bulanıklığa ayarlanan *S.epidermidis/E.coli/S.aureus* bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır.
- Ekim yapılmak üzere, hazırlanan süspansiyon 1:100 seyreltilerek, 1.5×10^6 KOB/ml bulanıklık değeri ile deneyler gerçekleştirilmiştir.
- 1 cm² birim alan başına (Ti-HEP, Ti-HEP_d, bare Ti), 10 µL bakteri ekimi gerçekleştirilmiştir.
- İnkübasyon süresi boyunca, bakteri süspansiyonunun hava ile temasını kesmek ve süspansiyonun tüm yüzeye homojen olarak dağılmasını sağlamak amacı ile UV-steril asetat kağıtları ile Polipropilen yüzeyler kapatılmıştır.
- Ti-HEP, Ti-HEP_d, bare Ti yüzeyler 37°C de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince nem oranı $\%15 \pm 2$ değerinde sabitlenmiş ve düzenli olarak kontrol edilmiştir.

- İnkübasyon süresi tamamlanan yüzey, öncelikle asetat kağıdından ayrılmıştır.
- PBS (pH:7.4) çözeltisi ile 1 kez yıkanan yüzeylerden, yüzeye tutunmayan bakteriler uzaklaştırılmıştır.
- Yüzeye tutunan bakterileri, yüzeyden uzaklaştırarak ekimlerini gerçekleştirebilmek üzere, TSB sıvı besiyeri ile yüzeyler vortekslenmiştir.
- Sırası ile direkt ekim (seyreltilmemiş), 10^{-2} ve 10^{-4} katlarında seyreltilen bakteri süspansiyonu Triptik Soy Agar (TSA, katı besiyeri)'a alınarak 24 saat boyunca 37°C 'de inkübe edilmiştir.
- Sürenin tamamlanması ile agarda oluşan koloniler sayılarak çalışma tamamlanmıştır.

3.1.2.5. In vitro hemokompatibilite çalışmaları

Hemoliz testi kapsamında, gönüllülerden alınan tam kan, 4.5 ml'lik vakumlu sodyum sitrat tüplere alınmıştır. Sodyum sitratın anti-koagülan (pıhtılaşma önleyici) özelliğinden yararlanılmış, antikoagülan:kan oranı hacimce 1:9 olarak sabitlenmiştir. Öncelikle her bir Ti yüzey, 10 mL PBS bulunan santrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 37°C 'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Sürenin sona ermesi ile birlikte, 4:5 oranında PBS ile seyreltilen antikoagülan kandan, her bir santrifüj tüpüne 200 μL eklenmiştir. 37°C 'de 1 saat boyunca inkübe edilen örnekler, sürenin sona ermesi ile birlikte 1000g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Herbir yüzey için, süpernatantlarından alınan 100 μL örnek 96 kuyucuklu plaklara aktarılmıştır. Her bir yüzeyden en az 6 kuyucuk doldurulmuştur. Kuyuların absorbans değerleri 540 nm'de okunmuştur.

Platelet tutunum testleri kapsamında ise referans (bare Ti) ve heparin modifiye Ti yüzeyler (Ti-HEP, Ti-HEP_d) kullanılmıştır. İnsandan alınan antikoagülan kan, 1000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek trombositçe zengin plazma (PRP) elde edilmiştir. Hazırlanan yüzeyler 24 kuyucuklu mikropak içerisine yerleştirilmiştir. Herbir yüzey 1 ml PRP eklenerek, 37°C 'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin tamamlanması ile birlikte yüzeyler 3 kez PBP (pH:7.4) ile yıkanmış ve yüzeye tutunmayan plateletler bu şekilde uzaklaştırılmıştır. Yüzeye tutunan plateletlerin fiksasyonu ise, hacimce %2.5'lik (PBS ile seyreltilmiş) gluteraldehit (GA) ile $+4^{\circ}\text{C}$ 'de yarım saat boyunca inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Sürenin dolması ile birlikte yüzeyler yeniden PBS ile yıkanmış ve

kurutma işlemi farklı konsantrasyonlarda (%0, %25, %50,%75 ve %100) etanol çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Etanol çözeltileri ultra saf su ile seyreltilmiş ve yüzeyler her bir konsantrasyon değerinde 5'er dakika bekletilmişlerdir. Oda sıcaklığında kurutulan yüzeylerde, farklı büyütme değerlerinde 500x, 100x ve 10x SEM analizi gerçekleştirilmiş ve her bir örnekten herbir büyütme değeri için üçer adet görüntü alınmıştır.

3.1.2.6.In vitro hücre kültürü çalışmaları

Hücre kültür çalışmaları kapsamında NCTC 929 (L cell, L-929, CCL-1™) fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hattı T75 flasklara ekilmiş ve 24 saat boyunca 37° C'de CO₂ içeren inkübatör ortamında tutulmuştur. Kullanılan besiyeri Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), %10 fetal bovine serum (FBS), %1 sodyum pirüvat, %1 L-Glutamin ve %1 penisilin-streptomik素 içerikleri ile zenginleştirilmiştir. İnkübasyon süresinin tamamlanması ile birlikte hücreler tripsin çözeltisi yardımı ile flasktan kaldırılmış ve santrifüj edilmiştir. EMEM ile yeniden süspansiyon edilerek deneyde kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

MTT Analizi:

24 kuyucuklu plağa yerleştirilen örnek yüzeylerde, kuyu başına 100.000 hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. 24 saat inkübe edilerek tek katmanlı hücre kültürünün oluşması sağlanmıştır. Hücre ile etkileşimleri öncesi her bir örnek yüzeyi ön-arka yüzey olmak üzere bir saat boyunca UV ışığı ($\lambda=254$ nm) ile sterilize edilmiştir. Tek katmanlı hücre kültür oluşumunun kontrolü gerçekleştirilmiş ve besiyeri aspire edilerek DPBS ile yıkanmıştır. Sterilize örnekler hücre kültürünün merkezine yerleştirilmiştir. Hücre kültürü ile 24 saat boyunca inkübe olan yüzeyler, sürecin sona ermesi ile inkübatörden alınmıştır. Kültür besiyeri aspire edilerek DPBS ile nazikçe yeniden yıkanmıştır.

Hücre canlılık çalışmaları kapsamında, FBS bulunmayan 0.5 mg/ml MTT içeren EMEM besiyeri kuyucuklara aktararak 3 saat boyunca 37 °C nemli atmosferde inkübe edilmiştir. Sürecin tamamlanmasının ardından, MTT çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılarak, DPBS yardımıyla kuyucuklar nazikçe yıkanmış ve formazan kristaller DMSO çözeltisinde çözdürülmüştür. Her bir örneğe ait absorbans değerleri

kolorimetrik olarak UV-Vis spektrofotometre yardımı ile 540 nm dalga boyunda okunmuştur (TCPS kontrol grubu, 690 nm referans dalga boyu).

DAPI floresans görüntüleme:

Steril örnek yüzeyler 24 kuyucuklu plaklara merkez odaklı olarak yerleştirilmiştir. Her bir örnek yüzeyine 10.000 hücre ekimi gerçekleştirilmiş ve hücrelerin yüzeye tutunmaları adına 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sürenin tamamlanması ile 1 ml tam EMEM besiyeri kültür ortamına transfer edilmiş ve 48 saat süresince 37° C’de inkübe edilmiştir (TCPS kontrol grubu).

İnkübasyon süresinin sona ermesi ile, besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırılarak örnek yüzeyleri DPBS ile nazikçe yıkanmıştır. DPBS ile seyreltilerek %3.7 yoğunluğa getirilen formaldehit (h:h DPBS) yardımı ile hücreler 4 °C’de 15 dakika süresince bekletilerek örnek yüzeylerine fikse edilmişlerdir. Fiksasyon işlemi sonrası örnek yüzeyler üç kez DPBS ile nazikçe yıkanmıştır. Hücre zarlarının DAPI boyaya geçirgen hale getirmek amacı ile %0.1 Triton-X-100 (Sigma Aldrich, DPBS ile dilusyon) çözeltisi ile 5 dakika muamele edilmiştir. Yeniden örnek yüzeyler üç kez DPBS ile nazikçe temizlenmiştir. Hücre boyama işlemi 20 µg/ml (DPBS ortamında) konsantrasyonunda DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole.2HCl, DAPI, Serva, Germany, Cat.: 18860.01) boya kullanılarak ve 15 dakika boyunca karanlık ortamda bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Hücreler yeniden DPBS ile üç kez nazikçe yıkanmıştır. DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri floresans mikroskop ile incelenmiştir (Leica, DMI 3000B, Inverted Mikroskop Leica, DM IL LED).

3.2. Bulgular ve Tartışmalar

3.2.1. Titanyum (Ti) yüzeylerde heparin depozisyonu parametre optimizasyonu

Zeta potansiyel tayini EPD için kilit faktörlerden biridir. Çözünen parçacıkların uniform yüzey yüküne sahip olması beklenir, böylelikle çözelti içerisinde stabilitelelerini (parçacıklar arası çekme ve itme kuvvetlerinin toplamı) koruyabilirler. Parçacıkların aglomere (yığın oluşturma) olmasını engellemek için, yüksek elektrostatik itme kuvveti oluşmalıdır ve bu durum yüksek parçacık yükü gerektirir. EPD için bir başka kilit faktör de iletkenliktir. EPD tekniğinde altaş yüzeye depozite

edilen parçacık miktarı uygulanan elektriksel alanın gücü ile ilişkilidir. Anot ve katot arasında uygulanan elektriksel alan, yalnızca yüklü parçacıkları değil ayrıca serbest haldeki iyonları (çözeltinin iletkenliğini belirlerler) da harekete geçirir. Örneğin, çözelti iletkenliği çok düşük bir değerde ise, çözelti direnç gösterecek ve bu durum kaplamanın stabilitesinin azalmasına neden olacaktır [140-142].

Hazırlanan heparin çözeltisinin nötr pH değerinde ~ 7.0 zeta potansiyeli -50 ± 2 mV olarak ölçülmüştür (Çizelge 3.2). Negatif zeta potansiyeli gereği, heparinin öncelikle anot olarak yüklenen elektrotta depozite olması beklenmektedir. AC-EPD için önerilen çözelti iletkenlik değeri $100 \mu\text{S}/\text{cm}$ değerini geçmemelidir [49,143]. Hazırlanan heparin stok konsantrasyonu $0.5 \text{ mg}/\text{ml}$ olarak belirlenmiştir. Ancak elde edilen verilere göre söz konusu konsantrasyon değerinde heparin iletkenliği yaklaşık olarak $245 \mu\text{S}/\text{cm}$ ölçülmüştür. Bu nedenle heparin stok çözeltisi $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$ konsantrasyona seyreltilerek yeniden ölçüm gerçekleştirilmiş ve iletkenlik değeri yaklaşık $77 \mu\text{S}/\text{cm}$ olarak saptanmıştır. Böylelikle çalışmada kullanılan heparin konsantrasyon değeri $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$ değerinde belirlenmiştir.

Çizelge 3.2: Heparin çözeltisine ait karakterizasyon sonuçları

Heparin Konsantrasyonu (mg/ml)	İletkenlik ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Ph	Zeta Potansiyel (mV)
0.5	245	7.0	-50 ± 2
0.1	77.5	7.5	

Literatürde Titanyum (Ti) altaşlarda AC-EPD tekniği ile heparin modifikasyon çalışması bulunmadığından, optimizasyon çalışmaları öncelikle AC-EPD tekniği ile heparin kaplaması referans (bare Ti) altaşlarda yürütülmüştür. Tüm parametreler (sinyal, genlik, offset sinyali, süre, frekans) Ti altaşlara depozite edilen heparin miktarı referans alınarak optimize edilmiştir.

AC-EPD cihazında akım ve voltaj kontrollü olmak üzere iki tip uygulama imkanı mevcuttur. Voltaj-kontrol modda, sabit bir elektrik alan uygulaması ile başlayan süreç, depozisyon sırasında yüzeyde direnç oluşumuna neden olmaktadır. Bu durum sistemin akım değerinde düşüslere neden olmaktadır ve stabilitesi düşük kaplama gerçekleştirilmesine neden olmaktadır. Akım-kontrol modda, sistem tarafından akım

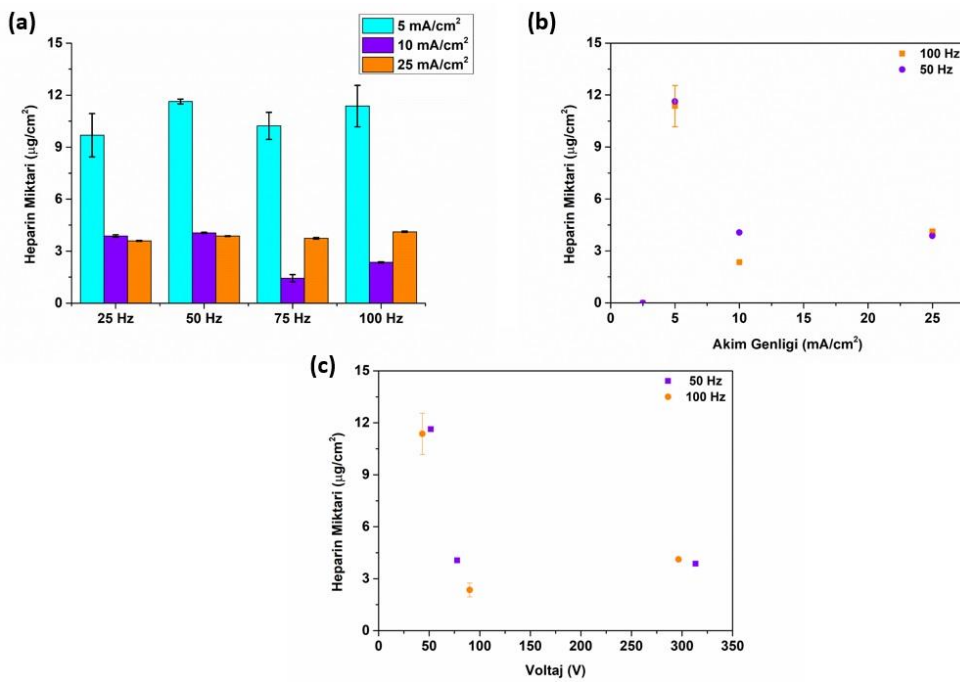
sürekli sabit tutulduğundan voltajda düşüşler yaşansa bile depozisyon (kaplama) işlemi problemsiz bir şekilde gerçekleşebilmektedir. Bu yolla elde edilen filmler yüzey boyunca homojen bir karakteristik sergileyebilmektedir [46].

Yapılan ön çalışmalarda, uygulanan EPD süresi 6. dakikayı aşması durumunda -diğer parametrelerden bağımsız- Ti elektrotların köşelerinden başlayarak devam eden süreçte tüm yüzeyde gaz baloncuklarının oluşumu gözlemlenmiş ve bu nedenle tüm AC-EPD parametreleri 5 dakika uygulama süresinde sabit tutulmuştur. Bu durumun muhtemel sebeplerinden biri, kaplama süresinin uzaması ile kaplama kalınlığının arttığı gibi aynı zamanda elektrotun elektrik alana maruz kalma süresi de artacak bu durum direkt olarak, elektrot yüzeyinde direnç oluşmasına neden olacaktır [45].

AC-EPD işlemi akım-kontrollü modda gerçekleştirildiğinden, akım genliği (I_{p-p} , mA/cm^2) optimize edilecek öncelikli parametre olarak belirlenmiştir. Akım genlik değerinin optimizasyonunda 2.5, 5, 10 ve 25 mA/cm^2 olmak üzere dört farklı değer çalışılmıştır (sırası ile sistemde ölçülen voltaj değerleri V_{p-p} 25, 45, 70 ve 300 V/cm). Literatürde yer alan, kalıcı biyomolekül/hücre tutunumunun ve depozisyonunun asimetrik AC sinyali kullanılarak gerçekleştirildiğini gösteren yayınlarda aynı zamanda net bir direkt akım (DC offset) bileşeninin söz konusu sinyale uygulanması durumunda hedef elektrota doğru net bir akış sağlandığı gözlemlenmiştir [142]. Bu nedenle DC sinyal etkisi heparin depozisyonu süresince optimize edilecek parametrelerden biri olarak belirlenmiştir. Depozisyon işlemi sonrası, Ti yüzeylerdeki heparin miktarı (Ti-HEP) TB boya kullanılarak hesaplanmıştır.

Akım genlik değerinin artması ile bare-Ti altaşlara depozite edilen heparin miktarı azalmaktadır (Şekil 3.4). Akım genliği 5 mA/cm^2 değerinde iken, tüm frekans değerlerinde en yüksek miktarda heparin depozisyonu sağlamıştır. Özellikle 50 ve 100 Hz parametrelerinde heparin miktarı ortalama 11.63 $\mu\text{g/cm}^2$ ve 11.37 $\mu\text{g/cm}^2$ olarak ölçülmüştür. Ancak, akım genlik değeri ile bare-Ti yüzeylere depozit edilen heparin miktarı arasında direkt bir bağlantı saptanmamıştır. Ayrıca en yüksek heparin miktarları 5 mA/cm^2 akım genlik değerinde elde edildiğinden, son olarak 2.5 mA/cm^2 değeri de uygulanmıştır ancak söz konusu yüzeylerde heparin varlığına rastlanmamıştır (Şekil 3.4a). Böylelikle akım genliği 5 mA/cm^2 , frekans 50 Hz olarak saptanarak, 5 dakika uygulama süresine dahil edilmiştir.

DC offset değerinin AC-EPD sürecine etkisinin incelenmesi için test edilen değerleri sırası ile 0, -0.25 ve -0.50 mA/cm² şeklindedir. Bu basamakta herbir deneyde kullanılan akım genliği 5 mA/cm² değerinde sabit tutulmuştur. DC offset uygulanmadığı durumda (0 mA/cm² iken) Ti-HEP yüzeylerde elde edilen maksimum heparin miktarı $1.99 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak 50 Hz frekans değerinde gözlemlenmiştir. DC offset değeri -0.50 mA/cm² değerine yükseltildiğinde ise, Ti yüzeylerde baloncuk oluşumuna gözlemlenmiş ve bu durum kaplama sürecini olumsuz yönde etkileyeceğinde, heparin tayini gerçekleştirilmemiştir. Böylelikle, DC offset değeri -0.25 mA/cm² olarak optimize edilmiştir.



Şekil 3.4: AC-EPD parametrelerinin heparin depozisyon miktarına etkileri. (a,b) Akım genliğinin etkisi , (c) voltaj genliğinin etkisi (n=9, DC offset= -0.25 mA/cm²)

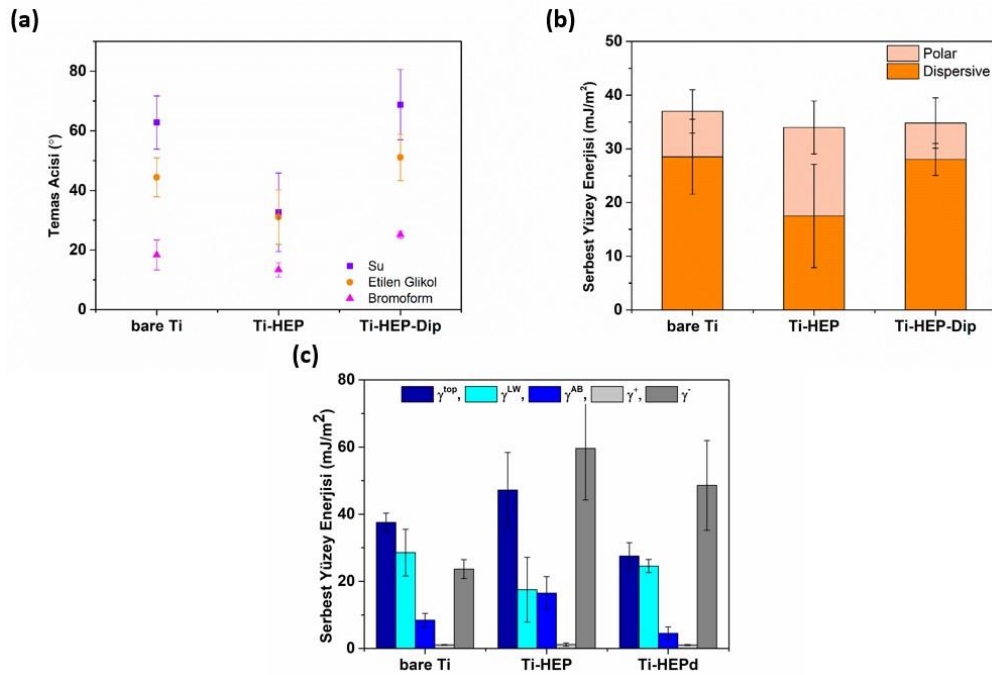
Sonuç olarak bare Ti altaşlar kullanılarak gerçekleştirilen AC-EPD tekniğinin optimize parametresi, 50 Hz frekans değeri, 5 dakika uygulama süresi, 0.5 mA/cm² akım genliği ve -0.25 mA/cm² DC offset olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Titanyum (Ti) yüzeylerde fiziksel ve kimyasal karakterizasyon

Malzemelerin serbest yüzeye enerji (SFE) değerlerinin hesaplanması biyolojik uygulamalar için oldukça önemlidir. SFE yüzeyde mevcut dengesiz moleküller arası çekim/itim kuvvetlerinin (hidrojen bağları ya da dipol-dipol etkileşimler)

varlık/yokluk tayinini mümkün hale getirir. Ayrıca SFE yüzeyin hidrofilik ya da hidrofobik karakteristiği üzerinden incelenen termodinamik bir niceliktir [145].

Çalışma kapsamında referans (bare Ti) ve heparin modifiye Ti (Ti-HEP, Ti-HEP_d) yüzeylerde temas açısı ölçümleri milliQ (saf su), etilenglikol (EG) ve bromoform (Br) ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.5a 'da görüleceği üzere bare Ti yüzeylerin 62.79 ± 8.93 ° olarak ölçülmüştür. Ti-HEP yüzeylerde ise hidrofilik karakteristiğinin arttığı ve söz konusu açının 32.66 ± 11.62 ° ye düştüğü gözlemlenmiştir. Bu durum heparinin yapısında bulunan hidrofilik grupların varlığı ile açıklanabilir. Ti-HEP_d yüzeylerde ise hidrofilik karakteristik geliştirilemediği gibi bare Ti yüzeylere oldukça yakın temas açısı değerleri saptanmıştır. Bu durum kullanılan heparin yoğunluğu (0.1 mg/ml) ile ilişkilendirilebileceği gibi daldırma işlemi sonrası yüzey yıkama basamağının yüzeye fiziksel olarak tutunan heparinin yüzeyden salınmasına neden olduğu şeklinde de yorumlanabilir [145].



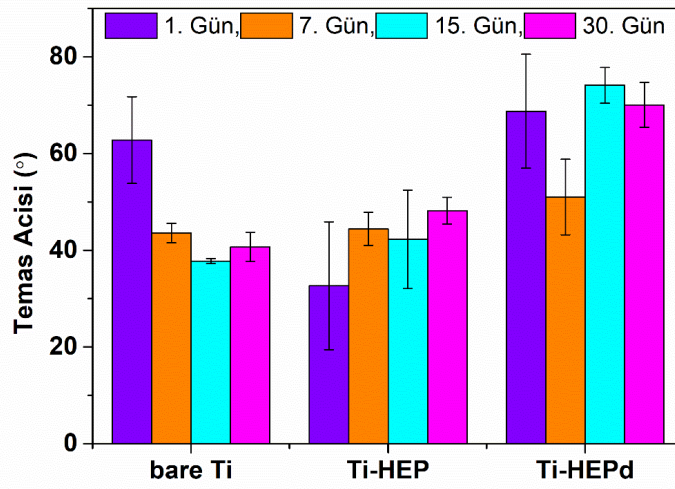
Şekil 3.5: Referans (bare Ti) ve heparinize (Ti-HEP ve Ti-HEP_d) yüzeylere ait temas açısı ölçüm sonuçları. (a) Islanabilirlik, (b) Serbest yüzey enerji, (c) asit-baz serbest yüzey enerji sonuçları (n=9).

Elde edilen sonuçlara göre, serbest yüzey enerjisi (SFE) ve bileşenleri (dispersif ve polar) hesaplanmıştır (Şekil 3.5b). Referans Ti (bare Ti) yüzeyinin serbest yüzey

enerjisi 37.56 mJ/m^2 olarak hesaplanmış ve heparin depozisyonu (Ti-HEP) ile bu değer 47.20 mJ/m^2 e yükselmiştir. Dispersif bileşen (γ^{LW}), değeri bare Ti yüzeylerde 28.55 mJ/m^2 olarak hesaplanırken, Ti-HEP yüzeylerde söz konusu değer 17.51 mJ/m^2 olarak hesaplanmıştır. SFE'nin bir diğer bileşeni olan polar enerji sonuçları ise, bare Ti ve Ti-HEP yüzeyler için sırası ile 8.43 mJ/m^2 ve 16.48 mJ/m^2 olarak hesaplanmıştır. Bu durum yüzeyin artan hidrofilik karakteristiğinin polar enerjiye etkisi olarak yorumlanabilir. Bare Ti yüzeylerin heparin ile kaplanması, yüzeyde oluşturulan C-O, C=O, C-H ve O-C=O gibi oldukça polar grupların varlığı ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca bir diğer yandan yine oldukça polar ve oldukça negatif yüklü $-\text{SO}_3^-$ ve $-\text{COOH}$ gruplarının da heparin kaplaması ile yüzeye depozite edildiği ve hem yüzey hidrofilitesini hem de polar yüzey enerji değerlerini doğrudan artırdığı yorumu yapılabilir [119]. Ti-HEP_d yüzeylerde ise dispersif ve polar enerji bileşenleri sırası ile 28.04 mJ/m^2 ve 6.77 mJ/m^2 olarak hesaplanmıştır. Bu noktada da bare Ti yüzeylere kıyasla yüzey hidrofilitesinin artırılmadığı gibi serbest yüzey enerji ve polar bileşenlerde de herhangi bir artış sağlanamamıştır.

Bir diğer yandan, toplam serbest yüzey enerjisi (γ^{tot}) ve bileşenleri (dispersif ve polar) dispersif Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}), polar asit-baz enerji bileşenleri (γ^{AB}); elektron alıcı (γ^+) ve elektron verici (γ^-) hesaplanmıştır (Şekil 3.5c). Referans Ti (bare Ti) yüzeyinin serbest yüzey enerjisi 37.56 mJ/m^2 olarak hesaplanmış ve heparin depozisyonu (Ti-HEP) ile bu değer 47.20 mJ/m^2 e yükselmiştir. Dispersif bileşen (γ^{LW}), değeri bare Ti yüzeylerde 28.55 mJ/m^2 olarak hesaplanırken, diğer tüm modifikasyon işlemleri sonrası dispersif enerjinin azaldığı ve $16.44-20.85 \text{ mJ/m}^2$ aralığında seyrettiği gözlemlenmiştir. Polar bileşen (γ^{AB}); bare-Ti yüzeylerde yaklaşık 8.43 mJ/m^2 olarak hesaplanırken, heparin depozisyonu sonrası (Ti-HEP) 16.48 mJ/m^2 değerine yükselmiştir. Polar enerji bileşeni detaylı olarak incelendiğinde ise elektron alıcı/verici karakteristikleri göz önüne alınmalıdır. γ^+ bileşeni bare-Ti yüzeylerde 1.07 mJ/m^2 olarak hesaplanırken heparin depozisyonu (Ti-HEP) sonrası 1.17 mJ/m^2 değerine yükselmiştir. Genel anlamda bare-Ti yüzeylerde heparin modifikasyonu yüzeylerin (γ^+) bileşenini, bir başka deyişle asidik karakteristiğini artırmıştır. Son olarak yüzeylerin γ^- yani elektron verici karakteristiği incelendiğinde ise söz konusu değer bare-Ti yüzeyler için 23.64 mJ/m^2 iken, heparin depozisyonu ile bu değer 59.62 mJ/m^2 ye dek yükselmiştir (Şekil 3.6),.

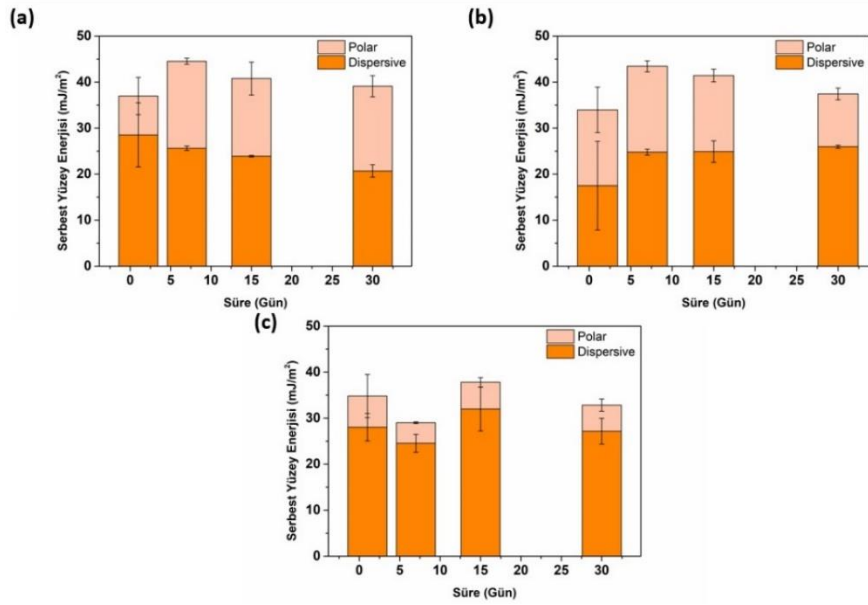
Elde edilen sonuçlara göre modifikasyon sonrası yüzeylerin bazik (elektron yönünden zengin) karakteristikleri, asidik (elektron yönünden fakir) karakteristiklerine kıyasla oldukça yüksek değerler sergilemişlerdir. Bu durum, bazik yüzey enerji bileşeninde görülen yükselmenin, oksijen atomlarında bulunan iyon çiftlerinin elektronlarından (hidroksil grupları vb.) kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir [119,145]. Ayrıca amino grupları da bazik karakteristikleri ile tanındıklarından, heparin yapısında bulunan amino gruplarının da AC-EPD işlemi sırasında yüzeye depozisyonunun gerçekleştirildiği iddia edilebilir [119]. Yeniden, AC-EPD işlemi sonrası heparinin kimyasal yapısında meydana gelen değişikliklerin detaylı analizi sonrası bu konuda da kesin yorumlar yapmak mümkün olabilecektir.



Şekil 3.6: Referans (bare Ti) ve heparinize (Ti-HEP, Ti-HEPd) yüzeylerde ıslanabilirlik ölçümleri kapsamında yıpranma hızı analiz sonuçları (n=9).

Temas açısı ölçüm ve SFE çalışmaları kapsamında her bir yüzey için yıpranma/yaşlanma çalışmaları 30 gün boyunca +4 °C’de muhafaza edilen yüzeyler ile sürdürülmüş ve sonuçları paylaşılmıştır. Referans Ti yüzeyler için başlangıçta 62.79 ± 8.93 ° olarak ölçülen temas açısı değeri 7, 15 ve 30. gün ölçümlerinde sırası ile 43.59 ± 2.01 °, 37.78 ± 0.54 ° ve 40.67 ± 3.04 ° olarak ölçülmüştür. Ti-HEP yüzeylerde başlangıçta yakalanan hidrofilik karakteristik 7. Gün itibari ile azalmaya başlayarak 30 gün sonunda 48.23 ± 2.74 ° değerlerine dek yükselmiştir. Ti-HEPd yüzeyler başlangıçta sergiledikleri hidrofobik karakteristiği sürdürerek 30 günün sonunda 70.07 ± 4.62 ° olarak ölçülmüştür. Bir diğer yandan, SFE değerleri (Şekil

3.7a) bare Ti yüzeyler için ilk gün 37.56 mJ/m^2 olarak hesaplanırken 30 günün sonunda söz konusu değer 39.06 mJ/m^2 olarak hesaplanmıştır. Polar ve dispersif bileşenler incelendiğinde ise ilk gün sırası ile 8.43 mJ/m^2 ve 28.55 mJ/m^2 olarak hesaplanan değerler 30 günün sonunda 18.43 mJ/m^2 ve 20.69 mJ/m^2 olarak hesaplanmıştır. Bu durum $+4^\circ$ de muhafaza edilen bare Ti yüzeylerde nem parametresine bağlı öncelikle hidrofilik karakteristiğin buna bağlı polar karakteristiğin de artmasına neden olduğu şeklinde yorumlanabilir [146]. Ti-HEP yüzeylerde (Şekil 3.7c) ise ilk gün 47.20 mJ/m^2 olarak hesaplanan SFE değeri 30 günün sonunda 37.27 mJ/m^2 değerine gerilemiş ve bu süreçte polar ve dispersif bileşenler sırası ile 16.48 mJ/m^2 den 11.45 mJ/m^2 e gerilerken, 17.51 mJ/m^2 den 25.99 mJ/m^2 a yükselen bir dispersif enerji değerleri söz konusudur. Mevcut durum yüzey modifikasyonu sonrası yüzeylerin yeniden dengeye gelme durumları ve stabiliteleri üzerinden yorumlanabilir. İlk gün itibari ile oldukça hidrofilik karakteristik sergilenen Ti-HEP yüzeyler 15 günün ardından %30 skalasında kayıp yaşamıştır. Ti-HEP_d yüzeyler başlangıçta sergiledikleri hidrofobik karakteristiği sürdürerek 30 günün sonunda $70.07 \pm 4.62^\circ$ olarak ölçülmüştür (Şekil 3.6).

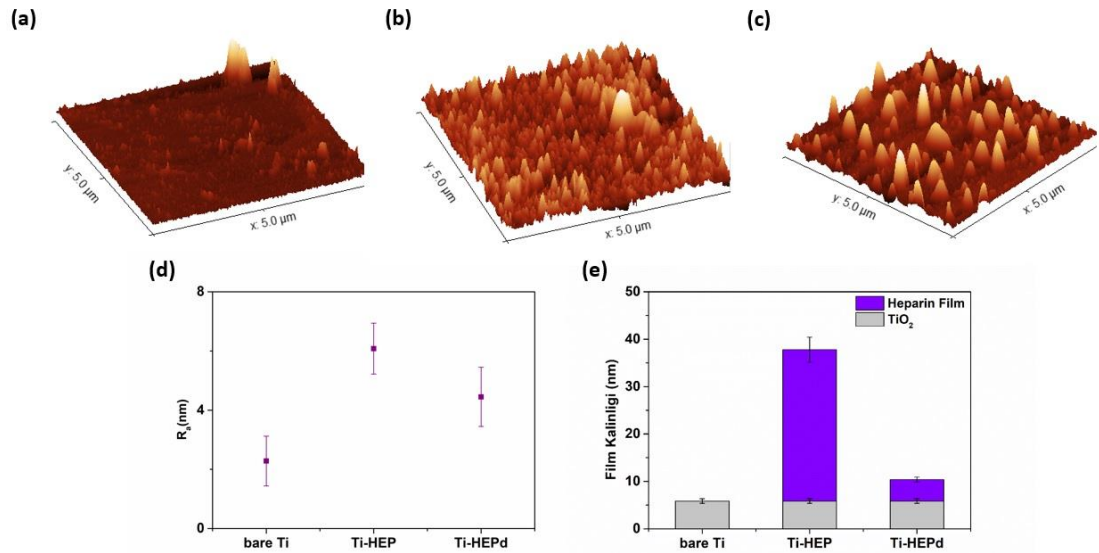


Şekil 3.7: Titanyum altaşlarda yıpranma/yaşlanma karakteristiği analiz sonuçları, (a) bare Ti, (b) Ti-HEP, (c) Ti-HEP_d (n=9).

Mevcut yüzey pürüzlülük değerlerinin ve heparin depozisyonu sonrası kalınlık ve pürüzlülük değerlerinin analizi AFM ve Elipsometri teknikleri ile analiz edilmiştir. Bare Ti yüzeylerde ortalama pürüzlülük değeri $2.28 \pm 0.84 \text{ nm}$ değerinde ölçülmüştür.

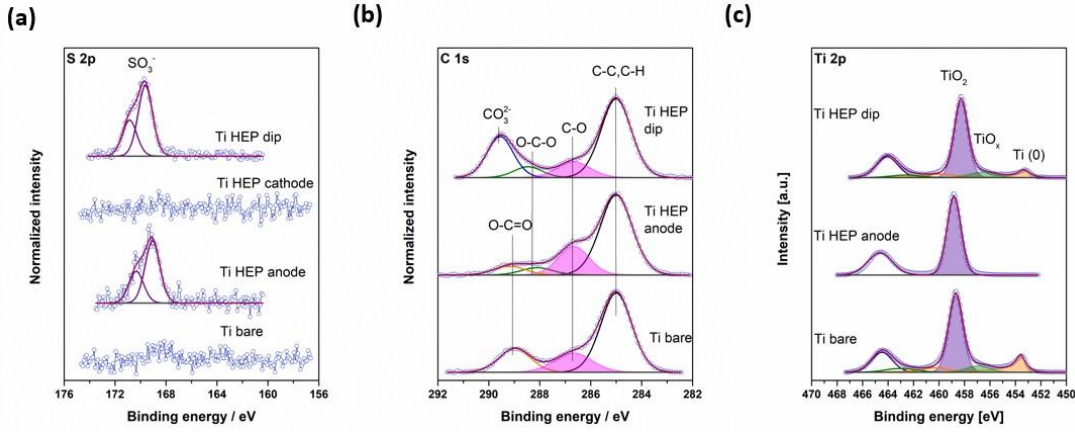
Heparin depozisyonu ile (Ti-HEP) yüzey pürüzlülük değeri 6.08 ± 0.86 nm değerine dek yükselmiştir. Daldırma tekniğinin uygulandığı yüzeylerde ise (Ti-HEP_d) 4.45 ± 1.00 nm 'lik bir pürüzlülük değeri elde edilmiştir (Şekil 3.8d). Söz konusu yüzeylere ait 3 boyutlu görseller Şekil 3.8a,b,c'de yer almaktadır. Bu noktada yüzey temizleme prosedürünü tekrarlamak önem arz etmektedir. Kullanım öncesi herbir Ti yüzey, öncelikle yüksek dereceli pürüzlülüğe sahip zımpara kağıt ile zımparalanarak sonrasında ise ayna görüntüsü elde etmek amacıyla ikinci bir zımparalama (mirror polishing) işlemine maruz bırakılmaktadırlar.

AFM ile yüzey pürüzlülük değerleri ve topografi görüntüleri elde edilen yüzeyler, heparin film kalınlıklarının tespiti için elipsometri tekniği ile yeniden analiz edilmişlerdir (Şekil 3.8e). Cauchy methodu kullanılarak gerçekleştirilen analiz yönteminde bare Ti yüzeyler ilk katman (Cauch-1) olarak tanımlanmıştır. Bare Ti katman kalınlığı 5.87 ± 0.48 nm olarak ölçülürken, heparin depozisyonu (Ti-HEP) sonrası bu değer 31.94 ± 2.65 nm ye dek yükselmiştir (Cauch-2). Daldırma tekniği ile modifiye edilen yüzeylerde ise katman kalınlığı (Cauch-2) 4.53 ± 0.53 nm olarak ölçülmüştür. Buradan hareketle AC-EPD tekniği ile heparin depozisyonu sonrası diğer örnek yüzeylerine kıyasla (bare Ti ve Ti-HEP_d) en yüksek kaplama kalınlığı ve ortalama yüzey pürüzlülük değerlerini sergilediği sonucuna varılmaktadır.



Şekil 3.8: Referas (bare Ti) ve heparinize (Ti-HEP, Ti-HEP_d) yüzeylerde (a,b,c) 3B yüzey topografi görüntüleri, (d) ortalama yüzey pürüzlülük değerleri (Ra), (e) spektroskopik elipsometri tekniği ile tespit edilen film kalınlık verileri (n=3).

Titanyum yüzeylerde heparin modifikasyonu sonrası heparinin varlığını ispatlamak ve AC-EPD tekniğinin yüzeyde hangi fonksiyonel grupları oluşturduğunu gözlemlemek adına XPS analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9). Öncelikle S 2p (Şekil 3.9a) spektrumunun incelenmesi ile Ti-HEP yüzeylerde heparin kökenli $-SO_3^-$ gruplarının varlığı tespit edilmiştir. C 1s spektrumunda ise AC-EPD ile depozite edilen Ti-HEP yüzeylerde dört dekonvolüsyon pikine rastlanmıştır. Sırası ile 285 eV, 287 eV, 287.6 eV ve 289 eV değerlerinde C-C/C-H, C-O, O-C-O ve O-C=O grupları tespit edilmiştir (Şekil 3.9b). Ti 2p spektrumunda heparin depozisyonu sonrası kaplama kalınlığının da etkisiyle alttaş olan Ti yüzeyden sinyal alınamamış (Ti(0)) ancak titanyum dioksit rastlanmıştır (TiO₂), (Şekil 3.9c).



Şekil 3.9: bare Ti, Ti-HEP ve Ti-HEPd yüzeylerde XPS analiz sonuçları, (a)S 2p spektrum, (b) C 1s spektrum ve (c) Ti 2p spektrum.

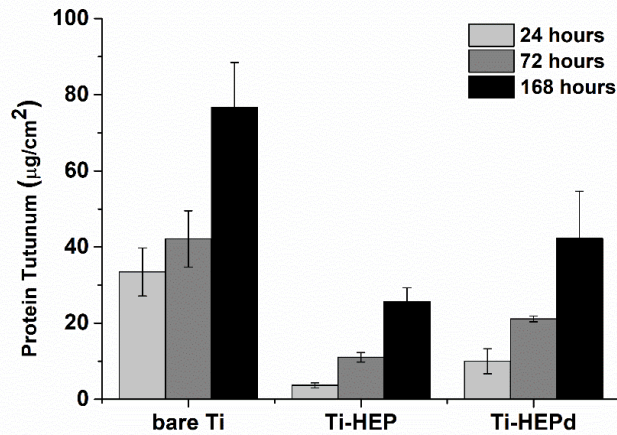
AC-EPD sonrası yüzeye depozisyonu sağlanan heparin miktarını tespit etmek üzere, Toluidine Blue (TB) boya kullanılmış ve söz konusu boyanın değişen absorbans değerleri kalibrasyon eğrisinden elde edilen denkleme yerleştirilerek mevcut heparin miktarı tespit edilmiştir. Bu noktada 2 saat boyunca TB ile sonike edilen yüzeylerde de XPS analizi gerçekleştirilmiş ve sonikasyon sonrası yüzeylerde Heparin varlığı incelenmiştir. Çizelge 3.3'de görüleceği üzere sonikasyon işlemi sonrasında da S grubu tespit edilmiş ve bu durum TB boyamanın heparin miktarını tespit etmekte AC-EPD tekniği bazında yetersiz olduğunu ispatlamıştır. Ancak bir başka bakış açısı da AC-EPD tekniği ile Ti yüzeylere depozite edilen heparinin stabilitesinin sonikasyon yöntemi ile test edildiği ve başarılı sonuç alındığı yorumudur.

Çizelge 3.3: XPS analizi ile elde edilen Ti, O, C, N, S atomik yüzde değerleri.

Örnek İsmi	Ti 2p	O 1s	C 1s	N 1s	S 2p
Bare Ti	21.0	55.7	22.8	-	-
Ti-HEP	22.9	59.5	16.7	0.6	0.4
Ti-HEP (TB sonike)	17.6	49.4	29.9	0.4	0.2
Ti-HEPd	10.5	59.4	23.9	0.4	0.3

3.3.3. Protein tutunum çalışmaları

Elde edilen sonuçlara göre (Şekil 3.10) bare Ti yüzeyler ile Ti-HEP yüzeyler arasında protein tutunum miktarı kapsamında 24 saat inkübasyon sonrası yaklaşık %90'lık bir fark gözlemlenmiştir. Bu yüzde üçüncü günün sonunda %65'e gerilemiş ve bir haftanın sonunda %60 olarak saptanmıştır. Yüzey zeta potansiyeli, hidrofilik karakteristik ve yüzey enerji değerlerinden elde edilen sonuçlarla paralellik gösteren protein tutunum çalışmalarında, heparin depozisyonu ile Ti yüzeylerde negative yüklü ve polar fonksiyonel gruplar oluşturulduğu, bu durumun da halihazırda negative yüklü bir protein olan BSA'nın yüzeye tutunumunu engellediği anlamına gelmektedir [147].



Şekil 3.10: bare Ti ve heparinize (Ti-HEP, Ti-HEPd) yüzeylerde 7 gün süresince protein tutunum test sonuçları (n=6).

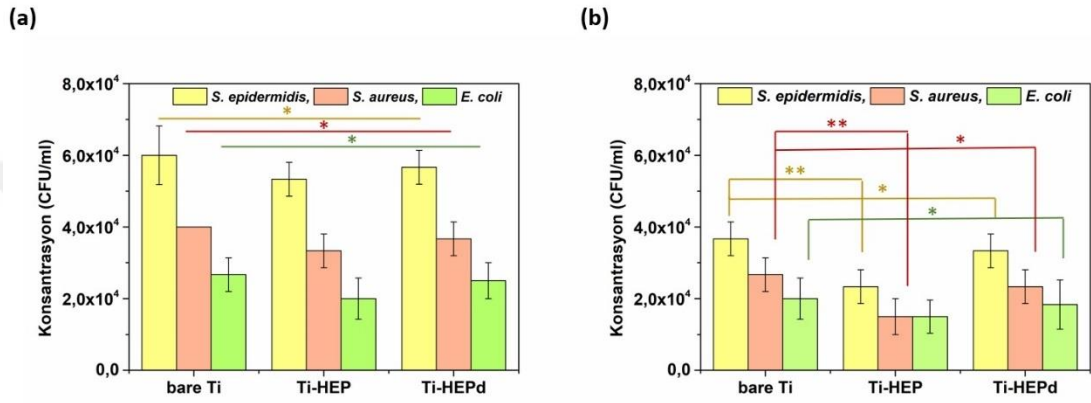
3.2.4. In vitro antiadherent çalışmaları

24 saat olarak belirlenen inkübasyon süresinin sona ermesi ile birlikte yüzeylere tutunan ve tutunmayan canlı *S. epidermidis* bakteri konsantrasyonu Triptik soy agar (TSA) plaklara yapılan ekimler ile belirlenmiştir. bare Ti yüzeylere tutunan bakteri miktarı yaklaşık 3.6×10^4 KOB/ml olarak saptanırken Ti-HEP yüzeylerde bu miktar yaklaşık 2.3×10^4 KOB/ml olmuştur (Şekil 3.11a). Bu durum yüzeye tutunan canlı bakteri miktarının heparin depozisyon işlemi ile yaklaşık %36 inhibe edildiği anlamına gelmektedir. Eş zamanlı olarak, yüzeye tutunmayan bakterilerin canlılık durumları da incelenmiştir (Şekil 3.11b). Elde edilen sonuçlara göre bare Ti yüzeylere tutunmayan canlı bakteri miktarı yaklaşık 6×10^4 KOB/ml iken, Ti-HEP yüzeylerde 5×10^4 KOB/ml değerindedir. Bu durum ise heparin depozite yüzeylerde, yüzeye tutunmayan bakteri miktarının bare Ti yüzeylere kıyasla yaklaşık %11 oranında azalttığını göstermektedir. Daldırma tekniği ile heparin immobilize edilen alttaşlarda (Ti-HEP_d) ise, yüzeye tutunan canlı bakteri konsantrasyonu 3.3×10^4 KOB/ml (%10 inhibisyon) iken, yüzeye tutunmayan canlı bakteri konsantrasyonu 5.63×10^4 KOB/ml (%6 inhibisyon) değerlerindedir.

S. aureus suşu için ise bare Ti yüzeylere tutunan bakteri miktarı yaklaşık 2.6×10^4 KOB/ml olarak saptanırken Ti-HEP yüzeylerde bu miktar yaklaşık 1.5×10^4 KOB/ml olmuştur (Şekil 3.11a). Bu durum yüzeye tutunan canlı bakteri miktarının heparin depozisyon işlemi ile yaklaşık %43 inhibe edildiği anlamına gelmektedir. Eş zamanlı olarak, yüzeye tutunmayan bakterilerin canlılık durumları da incelenmiştir (Şekil 3.11b). Elde edilen sonuçlara göre bare Ti yüzeylere tutunmayan canlı bakteri miktarı yaklaşık 4×10^4 KOB/ml iken, Ti-HEP yüzeylerde 3.3×10^4 KOB/ml değerindedir. Bu durum ise heparin depozite yüzeylerde, yüzeye tutunmayan bakteri miktarının bare Ti yüzeylere kıyasla yaklaşık %17 oranında azalttığını göstermektedir. Ti-HEP_d alttaşlarda ise, yüzeye tutunan canlı bakteri konsantrasyonu 2.3×10^4 KOB/ml (%12 inhibisyon) iken, yüzeye tutunmayan canlı bakteri konsantrasyonu 3.6×10^4 KOB/ml (%8 inhibisyon) değerlerindedir.

Son olarak *E. coli* suşu için bare Ti yüzeylere tutunan bakteri miktarı yaklaşık 2×10^4 KOB/ml olarak saptanırken Ti-HEP yüzeylerde bu miktar yaklaşık 1.5×10^4 KOB/ml olmuştur (Şekil 3.11a). Bu durum yüzeye tutunan canlı bakteri miktarının heparin depozisyon işlemi ile yaklaşık %25 inhibe edildiği anlamına gelmektedir. Eş zamanlı

olarak, yüzeye tutunmayan bakterilerin canlılık durumları da incelenmiştir (Şekil 3.11b). Elde edilen sonuçlara göre bare Ti yüzeylere tutunmayan canlı bakteri miktarı yaklaşık 3×10^4 KOB/ml iken, Ti-HEP yüzeylerde 2×10^4 KOB/ml değerindedir. Bu durum ise heparin depozite yüzeylerde, yüzeye tutunmayan bakteri miktarının bare Ti yüzeylere kıyasla yaklaşık %35 oranında azalttığını göstermektedir. Ti-HEP_d altaşlarda ise, yüzeye tutunan canlı bakteri konsantrasyonu 1.8×10^4 KOB/ml (%8 inhibisyon) iken, yüzeye tutunmayan canlı bakteri konsantrasyonu 2.5×10^4 KOB/ml (%6 inhibisyon) değerlerindedir.



Şekil 3.11: *S. epidermidis*, *S. aureus* ve *E. coli* bakteri suşlarına ait kolonizasyon sonuçları (a) yüzeye tutunamayan (yıkama suyundan, PBS) (b) yüzeye tutunan bakterilerin eldesi ile gerçekleştirilen ekimler (37°C 'de 24 saat inkübasyon süresi, $n=6$, * $p<0.05$, ** $p<0.005$).

Özetle, elde edilen verilere göre AC-EPD destekli heparin modifikasyonu Ti yüzeylerde gram pozitif (*S. epidermidis* (%36) ve *S. aureus* (%43)) ve negatif bakteri (*E. coli* (%25)) türleri için antiadherent karakteristik sergilemiştir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; Ti altaşlarda heparin modifikasyonu, yüzeylerde oldukça yüksek polarite ve negatif yük kazandırmıştır. Söz konusu kazanım karboksil ve sülfon fonksiyonel gruplarından kaynaklanmakta ancak özellikle sülfon gruplarının kolaylıkla katyonlar ile etkileşimi/şelat oluşturması bakteri büyüme mekanizması üzerinde oldukça kritik etkiye sahiptir. Bir başka ihtimal ise heparin modifikasyonunun bakteri hücre duvarındaki stabil hidrojen bağlarını bozarak/sonlandırarak bakteri ile direkt bağ kurması sebebi ile bakteri canlılığını sona erdirmesidir [119]. Yürütülen detaylı kimyasal karakterizasyonlardan elde edilen veriler, AC-EPD tekniği ile Ti yüzeylerde karboksil ve sülfon fonksiyonel gruplarının oluşturulduğu, Ti-HEP yüzeylerde sülfat miktarının Ti-HEP_d yüzeylere kıyasla daha

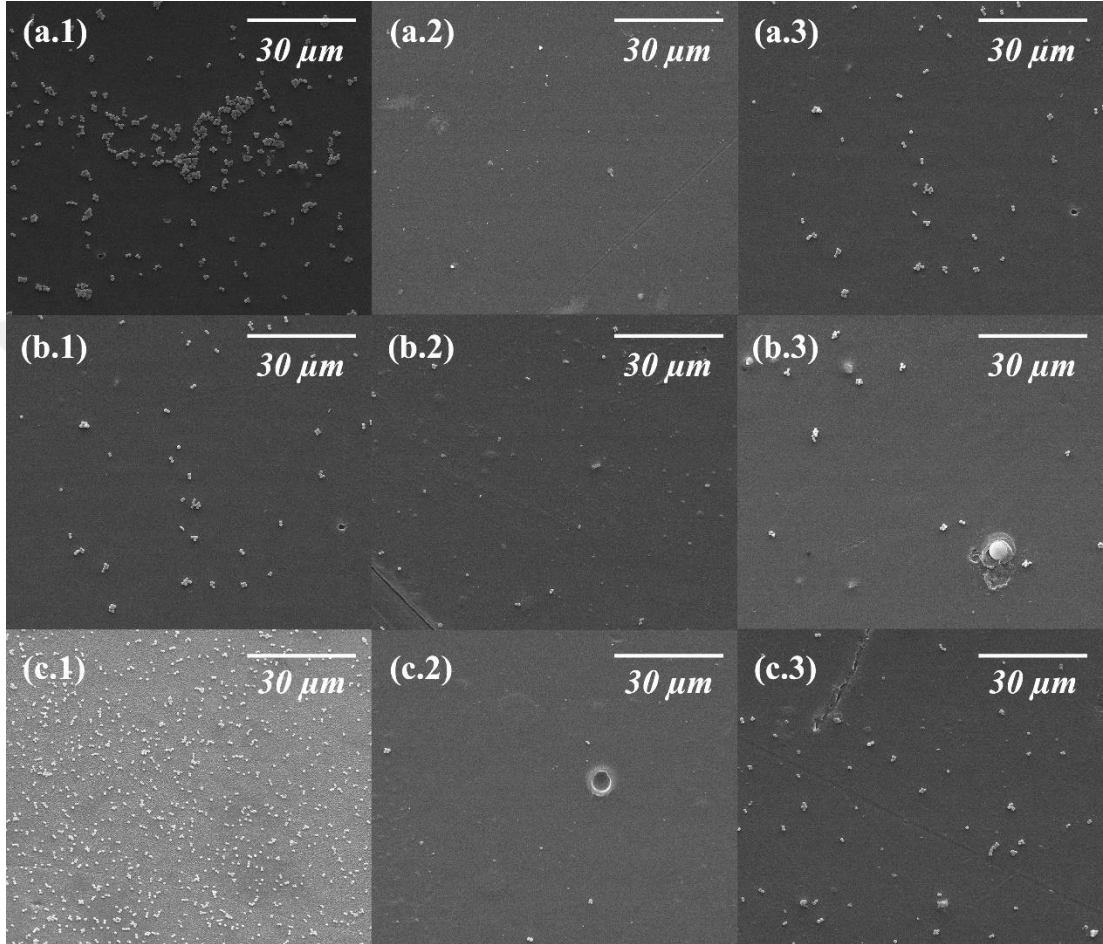
fazla miktarda olduğu ortaya çıkarak, antiadherent deney sonuçları ile paralel seyretmiştir.

Tez çalışmasının antibakteriyel karakteristik çalışmalarında elde edilen sonuçlar uyarınca heparinin “temas ile öldürme” mekanizmasına sahip olduğu tarafımızca deneysel anlamda ispatlanmıştır. PP yüzeylerde ilk 24 saatte söz konusu etkinin görülmeye başladığı ancak inkübasyon süresinin artması ile bu etkinin %99.9 değerine yükseldiği deneyimlenmiştir. Ti yüzeyler de temas ile öldürme etkisi ilk 24 saat inkübasyon süresince tespit edilmiş, sürenin uzatılması durumunda da bu etkinin artarak devam edeceği izlenimine ulaşılmıştır.

Bir diğer yandan, Ti-HEP_d örneklerde antibakteriyel etkinliğin %5-15 skalasında olmasına rağmen hala gözlemlenebilir olması şu sonuçlarla ilişkilendirilerek anlamlandırılabilir. Daldırma tekniği kullanılarak heparin immobilize edilen Ti yüzeyler (Ti-HEP_d) bare Ti yüzeylere göre %50 skalasında daha pürüzlü yüzeyler elde edilmesini sağlamış ve film kalınlığı yaklaşık 5 nm skalasında ölçülmüştür. Ti-HEP örneklerde heparin film kalınlığı yaklaşık 32 nm skalasında ölçülürken refraktif indeks 1.69 skalasında gelmiş ancak Ti-HEP_d örneklerde refraktif indeks değeri 1.19 değerlerine kadar düşmüştür. Bu durum daldırma tekniği ile geliştirilen heparin kaplamasının Ti-HEP yüzeylere kıyasla daha az homojen olduğu sonucunu göstermektedir. Bu durum klasik daldırma tekniği ile yüzeye heparin dekore edildiğini, AC-EPD tekniği ile geliştirilen yüzeylere kıyasla (Ti-HEP) oldukça az miktarda heparin içerse de, protein tutunumuna düşük skalalarda engel olabildiği, referans yüzeylere kıyasla platelet tutunumunda da az miktarda da olsa engel oluşturduğu gözlemlenmiştir. Gerçekleştirilen XPS karakterizasyonları ile yüzeyde heparin varlığı Ti-HEP_d alttaşlarda ispatlanmış ancak içerdiği Sülfat gruplarının varlığı Ti-HEP alttaşlara göre yarı yarıya azalmıştır. Söz konusu durumların antiadherent karakteristiğe de yansıdığı yorumu yapılmakla birlikte, altını çizmek gerekir ki daldırma tekniği ile yüzeye tutunumu sağlanan heparin miktarı AC-EPD ile geliştirilen tekniğe kıyasla oldukça düşük oranda olduğundan Ti-HEP örnekleri kadar efektif bir karakteristik sergileyememiştir.

Elde edilen veriler ile paralel sonuçlar gözlemek adına, bare Ti, Ti-HEP ve Ti-HEP_d yüzeyler herbir bakteri suşu ile 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra yüzeydeki bakteri miktarlarını gözlemek adına taramalı elektron mikroskop ile analiz edilerek görüntüleri alınmıştır. Şekil 3.12’de rahatlıkla görülebileceği üzere,

bare Ti yüzeyler test edilen tüm bakterilerin tutunumu için görece ideal yüzeyler olmakla birlikte özellikle Ti-HEP yüzeylerde oldukça yüksek tutunum engelleyici yaklaşım saptanmıştır. Elde edilen görüntüler heparinize yüzeylerde bakteri tutunumunun ne kadar düşük oranda olduğunu göstermekte ve Şekil 3.11’de gösterilen sonuçlar ile örtüşmektedir.



Şekil 3.12: Referans (bare Ti) ve heparinize (Ti-HEP, Ti-HEP_d) Ti yüzeylerde *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *E. coli* suşlarına karşı bakteri kolonizasyon SEM görüntüleri. Herbir SEM görüntüsü, yüzeylerin 24 saat inkübasyonu sonrası çekilmiştir. *S. epidermidis* inkübe (a.1) bare Ti, (a.2) Ti-HEP, (a.3) Ti-HEP_d, *S.aureus* inkübe (b.1) bare Ti, (b.2) Ti-HEP, (b.3) Ti-HEP_d, *E. coli* inkübe (c.1) bare Ti, (c.2) Ti-HEP, (c.3) Ti-HEP_d. Alınan tüm görüntülerde büyütme katsayısı x2500 değerindedir.

3.2.5. In vitro hemokompatibilite çalışma sonuçları

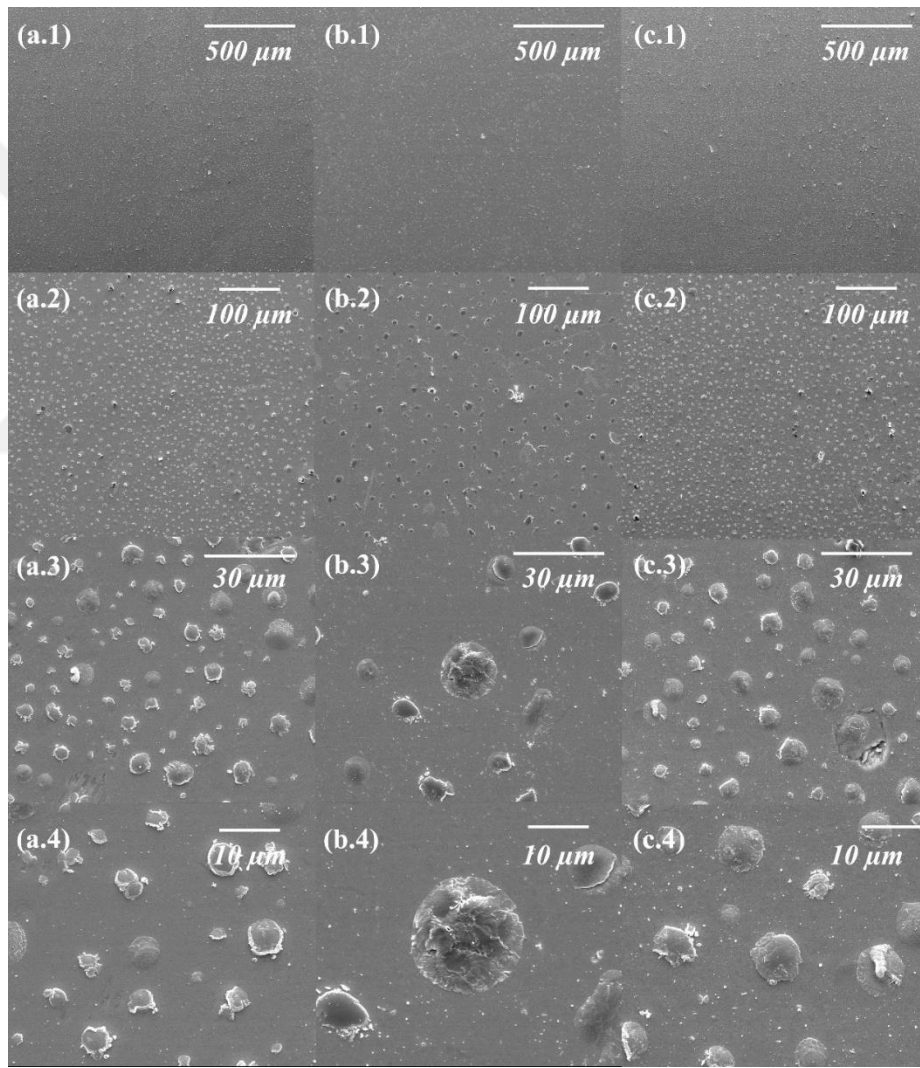
Çalışma kapsamında bare Ti ve heparin modifiye (Ti-HEP, Ti-HEP_d) yüzeylerin kırmızı kan hücreleri ile olan etkileşimi absorbans değerlerinden yola çıkılarak hemoliz oranlarının hesaplanması ile karşılaştırılmıştır. ISO-10993-4 standartları uyarınca biyomalzemelerde kullanım izni verilen hemoliz oranı %5'tir [134]. Çizelge 3.4'te görülen verilere göre bare Ti yüzeyler de dahil tüm grupların hemoliz değerleri %5'in altında bulunmuştur. Bare Ti yüzeylerde hemoliz yüzdesi 3.65 olarak hesaplanırken, AC-EPD tekniği ile depozite edilen heparin (Ti-HEP) yüzeylerde bu oran 1.82'ye, daldırma işlemi ile heparin immobilize edilen (Ti-HEP_d) yüzeylerde ise 3.19 değerlerine düşmüştür. Elde edilen sonuçlara göre AC-EPD ile heparin depozisyon uygulaması, Ti altaşlarda hemoliz yüzde oranını 2 kata kadar azaltmıştır. Daldırma tekniği ise, referans yüzeylere kıyasla bu oranı %15 skalasında azaltmış ancak aynı zamanda hata payı en yüksek olan grup olmuştur. Buradan yola çıkarak heparin depozisyonunun düşük miktarlarda bile hemokompatibiliteyi olumlu yönde etkilediği ve bu deney kapsamında potansiyeli olduğu ortaya çıkmıştır.

Çizelge 3.4: Pozitif kontrol, negatif kontrol, bare Ti ve heparin modifiye (Ti-HEP, Ti-HEP_d) yüzeylere ait optik yoğunluk ve hemoliz değerleri (n=5).

Örnek İsmi	Absorbans ($\lambda=540$ nm)	Hemoliz (%)
DIW (pozitif kontrol)	0.5589 \pm 0.0296	-
PBS (negatif kontrol)	0.0852 \pm 0.0021	-
bare Ti	0.0844 \pm 0.0034	3.65 \pm 0.15
Ti-HEP	0.0868 \pm 0.0012	1.82 \pm 0.36
Ti-HEP_d	0.0859 \pm 0.0039	3.19 \pm 0.67

ISO 10993-4 standartlarına göre, biyomalzemelerin kan uyumluluğu ve trombojenite özelliklerinin değerlendirilmesinde yer alması gereken en önemli basamaklardan biri de platelet tutunum testleridir. Platelet hücreleri ile etkileştirilen referans (bare Ti) ve Heparin modifiye (Ti-HEP, Ti-HEP_d) yüzeylere ait SEM görüntüleri Şekil 3.13'de gösterilmektedir. Bare Ti yüzeylerde yüksek miktarda platelet tutunumu gözlemlenmektedir. Özellikle 100 ve 500 μ m büyütme değerlerinde yüzeyin büyük bir bölümünü kapladıkları görülmektedir. Ancak 30 ve 10 μ m büyütme görüntülerinde ise platelet hücreleri arası agregasyonlar oluşmadığı ve tutunan plateletlerin aktif olmadığı gözlemlenmiştir [148].

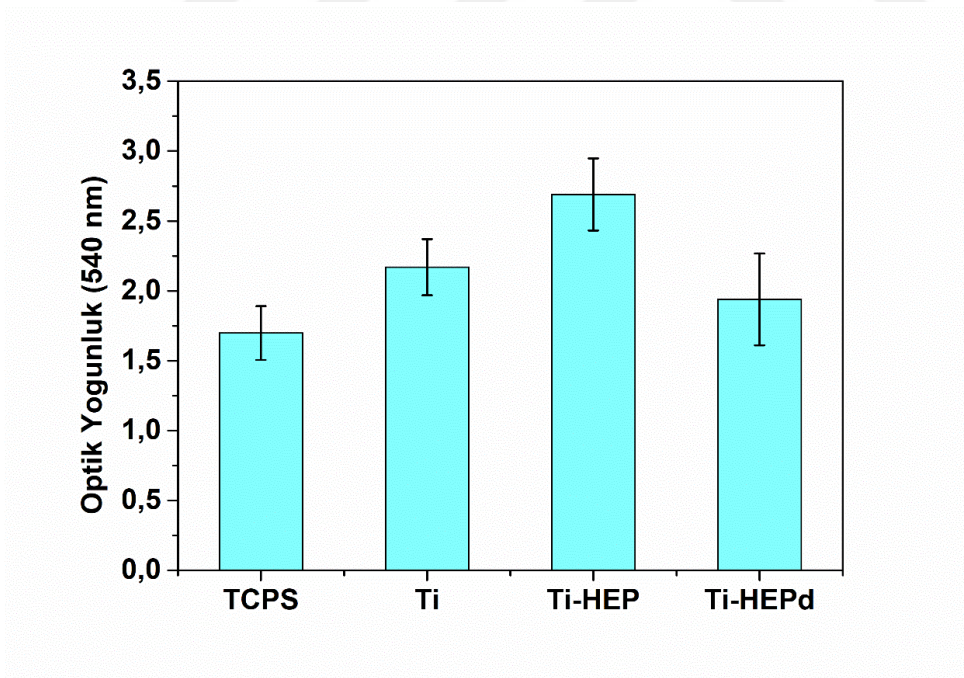
Heparin immobilize (Ti-HEP, Ti-HEP_d) yüzeylere ait SEM görüntüleri incelendiğinde ise, bare Ti yüzeylere kıyasla platelet tutunumunda bariz bir azalma gözlemlenmiştir. Özellikle 30 ve 10 μm büyütme değerlerinde birkaç adet daha çok tekli platelet hücresi gözlemlenmiştir. Fibrin doku oluşumunun neredeyse gözlemlenmediği ve bu durumun muhtemel trombojenez aşamalarının meydana gelmeyeceğini destekler nitelikte olduğu söylenebilir. Karakterizasyon çalışması içeriğinde hata payını en aza indirmek için, her büyütme değerinde yüzeylerin farklı yerlerinden (n=3) görüntü elde edilmiş ve değerlendirilirken söz konusu görüntülerin ortalaması dikkate alınmıştır [149].



Şekil 3.13: İnsan kanından elde edilen PRP ile inkübe edilen (a.1-4) bare Ti ve (b.1-4) Ti-HEP, (c.1-4) Ti-HEP_d yüzeylere ait SEM görüntüleri. Büyütme değerleri (a.1,b.1,c.1) x150, (a.2,b.2,c.2) x500, (a.3,b.3,c.3) x2500, (a.4,b.4,c.4) x5000.

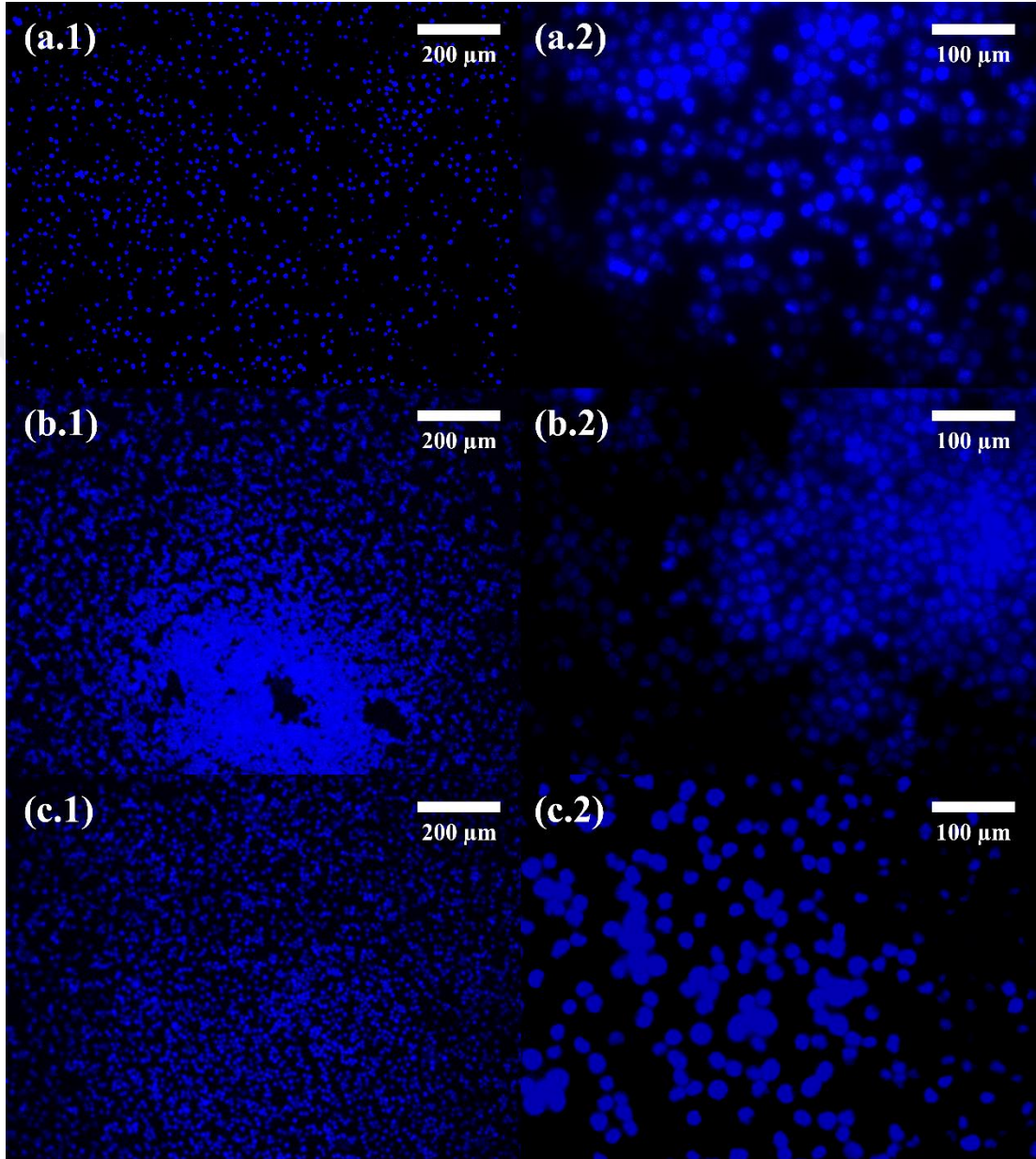
3.2.6. In vitro hücre kültürü çalışmaları

Çalışmanın son kısmında geliştirilen yüzeylerin potansiyel sitotoksikite testleri yer almaktadır. TCPS yüzeylerin negatif kontrol olarak kullanıldığı, bare Ti, Ti-HEP ve Ti-HEP_d yüzeyler fibroblast hücreleri ile 24 saat süren inkübasyon sonrası MTT tekniği ile canlılık tayini gerçekleştirilmiştir. Optik yoğunluk üzerinden elde edilen verilere göre (Şekil 3.14) özellikle AC-EPD tekniği ile heparin deposizyonu söz konusu hücre hattında herhangi bir inhibisyona sebep olmadığı gibi, yine literatürdeki çalışmalarla uyumlu bir sonuç sergileyerek, hücre optik yoğunluk değerlerinde artışa neden olmuştur [113,114]. Söz konusu değerler bare Ti, Ti-HEP ve Ti-HEP_d örnekleri için sırasıyla 2.17 ± 0.20 , 2.69 ± 0.26 ve 1.94 ± 0.33 şeklindedir. PP yüzeylerde olduğu gibi heparin varlığı AC-EPD tekniği kullanılarak oluşturulduğunda hücre canlılığını olumlu anlamda etkilemektedir. Daldırma tekniği ile heparin immobilizasyonu sağlanan yüzeylerde optik yoğunluk değerleri bare Ti yüzeylere kıyasla azalsa da ISO 10993-5 standartlarına göre hücre canlılığı halen %70'in üzerinde olduğunda, yine toksik etki gözlemlenmediği belirtilebilir.



Şekil 3.14: Fibroblast hücreleri ile inkübe edilen Ti yüzeylerin (bare Ti, Ti-HEP, Ti-HEP_d) MTT sitotoksikite sonuçları (TCPS kontrol grubu, n=4, *p<0.05).

Bir diğerk yandan, fibroblast hücrelerin yüzeye tutunum davranışları DAPI boyama ile çalışılmış ve floresan mikroskoptan elde edilen görüntüler ile yorumlanmıştır (Şekil 3.15). Homojen bir hücre kolonizasyonu görülemediği halde Ti-HEP yüzeylerde mevcut hücre sayısının gözle görülür bir biçimde arttığı sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 3.15: Fibroblast hücreleri ile inkübe edilen bare Ti (a.1, a.2), Ti-HEP (b.1, b.2) ve Ti-HEP_d (c.1, c.2) yüzeylerin DAPI boya ile elde edilen floresan mikroskop görüntüleri.



4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez kapsamında heparin ile yüzey modifikasyonu yaklaşımları iki farklı model alttaş üzerinde test edilmiştir: (i) PP; polimerik alttaş model ve (ii) Ti; metalik alttaş model.

- PP alttaşlarda yüzey modifikasyonu plazma destekli ve iki basamakta gerçekleştirilmiştir; (i) oksijen ile aşındırma, (ii) amince-zengin fonksiyonel gruplar ile yüzey dekorasyonu. Söz konusu işlemlerin ardından heparin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.
- PlzP tekniği ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyon parametreleri, temas açısı ölçüm ($37.72 \pm 5.92^\circ$), serbest yüzey enerji (65.91 mJ/m^2), yüzeyde maksimum azot miktarını ($\%3.71$) elde etme, yüzey pürüzlük değerinin ($5.84 \pm 1.92 \text{ nm}$) artırılması kriterleri kapsamında değerlendirilmiş ve 75 Watt plazma gücü, 15 dakika uygulama süresi parametresi optimize parametre olarak belirlenmiştir.
- Heparin immobilizasyon işlemi, saf heparin (hep) ve kovalent bağ ajanları ile destekli (hep*) çözeltiler kullanılarak 3 farklı konsantrasyon üzerinden (3, 10 ve 30 mg/ml) test edilmiştir. Yüzeğe tutunumu sağlanan heparin miktarı TB boya ile tespit edilmiş, maksimum heparin tutunum miktarını sağlayan parametre ($\sim 440 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$, 30 mg/ml, hep*) optimize parametre olarak belirlenmiştir.
- İki basamakta uygulanan plazma destekli yüzey modifikasyon işlemleri ile yüzeğe immobilize edilen heparin miktarı $\sim 440 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$ değerlerine dek ulaşmış ve heparinin $\text{NH}_2\text{-O}_2\text{-PP}$ yüzeylere kovalent bağ oluşturarak tutunduğu FTIR-ATR analizinde görülen amid I ve II pikleri ile kanıtlanmıştır.
- İmmobilize edilen heparinin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları sırası ile temas açısı ölçüm, serbest yüzey enerji miktarı, yüzey pürüzlük değerleri, FTIR-ATR ve XPS analizleri kapsamında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca heparin

stabilitesi 30 gün boyunca çalışılmış, bu kapsamda da TB boya ile heparin tespiti yapılmıştır.

- Heparin immobilizasyonu, protein tutunum miktarını referans yüzeylere (bare PP) kıyasla 15 kat azaltmıştır.
- Hemokompatibilite testleri kapsamında gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre heparin immobilizasyonu, kinetik-kan pıhtılaşma oranını 10 kat azaltmış, platelet tutunumunda ise gözle görülür bir düşüş sağlamıştır.
- Heparin immobilizasyonunun antiadherent karakteristiği ise, gram pozitif (*S. epidermidis* ve *S. aureus*) ve negatif (*E. coli*) bakterilerine karşı araştırılmış, “temas ile öldürme” olarak belirlenmiş ve canlı bakteri miktarı %99.9 azaltılmıştır.
- Heparin immobilizasyonu, BJ insan fibroblast hücrelere ait optik yoğunluk miktarını, referans (bare PP) yüzeylere kıyasla azaltmayarak, geliştirilen yüzeylerin biyouyumlu olduğunu da ortaya çıkarmıştır.

Sonuç olarak, bakteriyel enfeksiyona neden olabilecek hem gram pozitif hemde gram negatif bakteri suşlarında da başarılı sonuca ulaşıldığından geliştirilen yüzeylerin klinik kullanım için uygunluğu ve implant-ilişkili enfeksiyon önleyici yüzeylerin geliştirildiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Literatürde yer alan diğer çalışmalar da göz önüne alındığında, plazma-destekli iki basamakta gerçekleştirilen yüzey modifikasyon ve devamında heparin immobilizasyonu yaklaşımının, PP alttaşları hem antiadherent ve hem de kan ile uyumlu hale getirmiş ve sergilediği performans ile ön plana çıktığı kanıtlanmıştır [24-26,32,33,110,116,125]. Nihayetinde, önerilen implant modifikasyon uygulamasının, kan-ilişkili implantların güvenli şekilde kullanımı adına evrensel anlamda uygulanabilir bir strateji olduğu açığa çıkarılmıştır.

- Titanyum alaşım (Ti) alttaşlarda elektroforetik depozisyon destekli yüzey modifikasyonu tek basamakta gerçekleştirilmiştir.
- Saf halde heparin depozisyonu bare Ti yüzeylere iki kata kadar yüksek hidrofilitate (32.66 ± 11.62 °), serbest yüzey enerji değerinde %25 civarında

artış (47.20 mJ/m^2) ve 3 kata kadar artan pürüzlü bir yüzey sağlamıştır ($6.08 \pm 0.86 \text{ nm}$).

- Başlangıçta yüzeye depozite edilen heparin miktarı TB boya ile saptanırken, ilerleyen deney basamaklarında söz konusu boyama işleminin, depozite edilen heparin miktarının tamamını yüzeyden koparamadığı ve gerçekleştirilen kaplamanın 2 saat boyunca ultrasonic banyoya maruz bırakıldığı halde halen film stabilitesinin korunduğu deneysel anlamda ispatlanmıştır.
- Hidrofilisite ve serbest yüzey enerjilerinde ki değişimlerden sorumlu fonksiyonel grupların varlığı XPS analizleri ile de ispatlanmıştır. Tek basamakta uygulanan elektroforetik depozisyon destekli yüzey modifikasyon işlemi ile yüzeye depozite edilen heparin miktarı deneysel anlamda saptanamamış olsa da, spektroskopik elipsometri tekniği ile gerçekleştirilen kaplama kalınlığının $31.94 \pm 2.65 \text{ nm}$ olduğu ölçülmüştür.
- Heparin depozisyonu, protein tutunum miktarını referans yüzeylere (bare Ti) kıyasla 10 kat azaltmıştır.
- Hemokompatibilite testlerinden elde edilen sonuçlara göre Ti-HEP yüzeyler, bare Ti yüzeylere kıyasla hemoliz oranını 2 kat azaltmıştır. Bir diğer yandan, Ti-HEP yüzeyler için platelet tutunum miktarı gözle görülür bir şekilde azalmış ve tutunan plateletler kümelenemediği gibi aktive de olamamışlardır.
- Antiadherent karakteristik ise 3 bakteri suşu kullanılarak (gram pozitif: *S. epidermidis*, *S. aureus*, gram negatif: *E. coli*) test edilmiş ve yüzeye tutunan canlı bakteri konsantrasyon değerleri, bare Ti yüzeylere kıyasla, *S. epidermidis*, *S. aureus* ve *E. coli* suşları için sırasıyla %36, %43 ve %25 daha azaltılmıştır. Tez kapsamında yapılan çalışmalar heparinin antiadherent mekanizmasının “temas ile öldürme” olduğunu açığa çıkarmıştır. Ancak EPD tekniği ile yüzeye immobilize edilen heparin miktarı ve halihazırda deney kapsamında kullanılan heparin konsantrasyonunun 0.1 mg/ml olduğu göz önüne alındığında, böylesi düşük bir miktarda bile antitrombojenik ve antiadherent sağlıyor olması, deneysel anlamda ispatlanmış durumdadır.

- Fibroblast hücreleri ile gerçekleştirilen biyouyumluluk testleri sonucunda heparinizasyonun hücre optik yoğunluk değerini düşürmediği sonucuna ulaşılmış ve bu durum geliştirilen yüzeylerin biyouyumluluğu destekleyici bir arayüz oluşturduğu da deneysel olarak ispatlanmıştır.

Literatürde EPD tekniği ile heparin (kitosan, PEG, hidroksiapatit) kompozit film kaplama çalışmaları yer almaktadır [148,149]. Söz konusu yayınlarda heparin ve kullanılan diğer biyomoleküller ile oluşturulan sinerjik filmlerin antiadherent karakteristikleri araştırılmış ve genel anlamda hemokompatibilite testlerine öncelik verilmemiştir. EPD tekniği ile saf heparin film kaplama işleminin gerçekleştirilmemiş olması dikkat çekmekle birlikte, bu teknikte harpin kullanımının kısıtları (parametre optimizasyonunda heparin çözelti konsantrasyonu, çözelti iletkenlik katsayısı, üretilen filmlerin baloncuksuz ve homojen halde eldeleri) da deneysel anlamda detaylı olarak incelenmiş durumdadır. Bir diğer yandan alternatif akım-elektroforetik depozisyon (AC-EPD) yaklaşımı kullanılarak heparin film kaplamasının ilk defa tez kapsamındaki çalışmalar ile gerçekleştirildiğini vurgulamak önem arz etmektedir. Tez kapsamında titanyum alttaşlarda AC-EPD tekniği ile saf heparin film kaplama işleminin uygulanabilirliği, antitrombojenik, antiadherent ve biyouyumluluk kapsamında değerlendirilmesi detaylı olarak incelenmiş ve çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki; titanyum ve alaşım yüzeylerde AC-EPD kullanımı ile heparin modifikasyonu göz ardı edilemez bir potansiyel taşımakta ve yalnızca 5 dakika süren işlem sonrası kullanıma hazır hale gelmektedir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ile, 2 boyutlu düz yüzeylerde polimerik alttaşlar için plazma polimerizasyon destekli, metalik alttaşlar için AC-EPD destekli yüzey modifikasyonları ile heparin immobilizasyonu/depozisyonu antitrombojenik, antibakteriyel, antiadherent ve biyouyumlu karakteristik geliştirilebileceği deneysel anlamda ispatlanmıştır. Böylelikle klinik uygulamalara uyarlanabilecek söz konusu stratejilerin potansiyeli açığa çıkarılmıştır. Söz konusu kapsamda öncelikli çalışmalar, intravasküler kateter yüzeylerde farklı uzunlukta kesitlerin heparinizasyonu üzerine olacaktır. Polipropilen alttaş kullanılarak üretilecek kateterlerde, silindirik geometriye sahip alttaşlarda plazma polimerizasyon tekniği ile yüzey modifikasyonunun sağlanmasının ardından heparin immobilizasyonu gerçekleştirilecektir. her iki süreçte, tez kapsamında optimize edilen parametreler ile hayata geçirilecektir. Geliştirilen

yüzeylerde, fiziksel ve kimyasal karakterizasyon, protein tutunum çalışmaları, antiadherent karakteristik ve hemokompatibilite aktiviteleri detaylı olarak çalışılacaktır. Böylece, ilk basamakta düz yüzeylerde gerçekleştirilen yüzey modifikasyon stratejisinin farklı geometrilere uyarlanabilirliği test edilmiş olacaktır. Devamında ise in vivo hayvan deneyleri gerçekleştirilerek bir sonraki basamak olan klinik araştırmaların önü açılmış olacaktır. Takip eden süreçte ise, patent başvurularının gerçekleştirilmesi ile başlayacak çalışmalar, üniversite-sanayi destekli ulusal ve uluslararası projeler ile gerçek implant materyallerde uygulanabilir hale getirilecektir. Implant materyallerin kullanım sıklığı ve miktarı da göz önüne alındığında, endüstriyel anlamda biyomalzeme pazarına yeni ürünler kazandırılması nihai hedef olarak belirlenmiştir.





KAYNAKLAR

- [1] **Pekşen, C., Doğan, A.,** (2009). İmplant dayanımı. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği*, 10-122.
- [2] **Guowei, Z., Yashao, C., Tao, D., & Xiaoli, W.** (2007). Surface modification of polyethylene by heparin for improvement of antithrombogenicity. *Plasma Science and Technology*, 9(2), 202.
- [3] **Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., . . . Kamil, M. A.** (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc.*, 81(1), 7-11.
- [4] **Zimmerli, W.** (2014). Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *J Intern Med.*, 276(2), 111-119.
- [5] **Pandiyaraj, K. N., Selvarajan, V., Rhee, Y. H., Kim, H. W., & Shah, S. I.** (2009). Glow discharge plasma-induced immobilization of heparin and insulin on polyethylene terephthalate film surfaces enhances anti-thrombogenic properties. *Materials Science and Engineering: C*, 29(3), 796-805.
- [6] **Sakthi Kumar, D., Fujioka, M., Asano, K., Shoji, A., Jayakrishnan, A., & Yoshida, Y.** (2007). Surface modification of poly (ethylene terephthalate) by plasma polymerization of poly (ethylene glycol). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(9), 1831-1835.
- [7] **Gebelein, C. G., Carraher, C. E., & Foster, V. R.** (1988). Overview of synthetic and modified natural bioactive polymers. *Applied Bioactive Polymeric Materials*, 1-15.
- [8] **Wang, J., Pan, C. J., Huang, N., Sun, H., Yang, P., Leng, Y. X., ... & Chu, P. K.** (2005). Surface characterization and blood compatibility of poly (ethylene terephthalate) modified by plasma surface grafting. *Surface and Coatings Technology*, 196(1-3), 307-311.
- [9] **Park, K., Shim, H. S., Dewanjee, M. K., & Eigler, N. L.** (2000). In vitro and in vivo studies of PEO-grafted blood-contacting cardiovascular prostheses. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 11(11), 1121-1134.
- [10] **Zhang, H., Zhang, Y., Wu, J., Li, Y., Zhou, X., Li, X., ... & Zhang, W.** (2020). Risks and features of secondary infections in severe and critical ill COVID-19 patients. *Emerging Mikrobles & infections*, 9(1), 1958-1964.
- [11] **Kipshidze, N., Dangas, G., White, C. J., Kipshidze, N., Siddiqui, F., Lattimer, C. R., ... & Fareed, J.** (2020). Viral coagulopathy in patients with COVID-19: treatment and care. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 26, 1076029620936776.

- [12] **Zekonyte, J., Erichsen, J., Zaporajtchenko, V., & Faupel, F.** (2003). Mechanisms of argon ion-beam surface modification of polystyrene. *Surface science*, 532, 1040-1044.
- [13] **Hillborg, H., Karlsson, S., & Gedde, U. W.** (2001). Characterisation of low molar mass siloxanes extracted from crosslinked polydimethylsiloxanes exposed to corona discharges. *Polymer*, 42(21), 8883-8889.
- [14] **Lee, W., Furusaki, S., Saito, K., & Sugo, T.** (1998). Tailoring a brush-type interface favorable for capturing MİKrobal cells. *Journal of colloid and interface science*, 200(1), 66-73.
- [15] **Xie, Y., & Yang, Q.** (2002). Surface modification of poly (vinyl chloride) for antithrombogenicity study. *Journal of applied polymer science*, 85(5), 1013-1018.
- [16] **Amin, M. S., Randeniya, L. K., Bendavid, A., Martin, P. J., & Preston, E. W.** (2009). Amorphous carbonated apatite formation on diamond-like carbon containing titanium oxide. *Diamond & Related Materials*, 9(18), 1139-1144.
- [17] **Roy RK, Choi HW, Yi JW, Moon MW, Lee KR, Han DK.** (2009). Hemocompatibility of surface-modified, silicon incorporated, diamond-like carbon films. *Acta Biomater*;5:249–56.
- [18] **Huang N, Yang P, Cheng X, Leng YX, Zheng XL, Cai GJ.** (1998). Blood compatibility of amorphous titanium oxide films synthesized by ion beam enhanced deposition. *Biomaterials*;19:771–6.
- [19] **Huang N, Yang P, Leng YX, Chen JY, Sun H, Wang J.** (2003). Hemocompatibility of titanium oxide films. *Biomaterials*;24:2177–87.
- [20] **Peng LL, Mendelsohn AD, LaTempa TJ, Yoriya S, Grimes CA, Desai TA.**(2009). Longterm small molecule and protein elution from TiO2 nanotubes. *Nano Lett*;9:1932–6.
- [21] **Brammer KS, Oh S, Gallagher JO, Jin S.** (2008). Enhanced cellular mobility guided by TiO2 nanotube surfaces. *Nano Lett*;8:786–93.
- [22] **Yang P, Huang N, Leng YX, Chen JY, Fu RKY, Kwok SCH.** (2003). Activation of platelets adhered on amorphous hydrogenated carbon (a-C: H) films synthesized by plasma immersion ion implantation-deposition (PIII-D). *Biomaterials*;24:2821–9.
- [23] **Ong SE, Zhang S, Du HJ, Too HC, Aung KN.** (2007). Influence of silicon concentration on the haemocompatibility of amorphous carbon. *Biomaterials*; 28:4033–8.
- [24] **Saltissi, D., Morgan, C., Westhuyzen, J., & Healy, H.** (1999). Comparison of low-molecular-weight heparin (enoxaparin sodium) and standard unfractionated heparin for haemodialysis anticoagulation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14(11), 2698-2703.
- [25] **Polkinghorne, K. R., McMahon, L. P., & Becker, G. J.** (2002). Pharmacokinetic studies of dalteparin (Fragmin), enoxaparin

(Clexane), and danaparoid sodium (Orgaran) in stable chronic hemodialysis patients. *American journal of kidney diseases*, 40(5), 990-995.

- [26] **Pandiyaraj, K. N., Kumar, M. R., Kumar, A. A., Padmanabhan, P. V. A., Deshmukh, R. R., Bah, M., ... & Halim, A. S.** (2016). Tailoring the surface properties of polypropylene films through cold atmospheric pressure plasma (CAPP) assisted polymerization and immobilization of biomolecules for enhancement of anti-coagulation activity. *Applied Surface Science*, 370, 545-556.
- [27] **Sodhi, R. N.** (1996). Application of surface analytical and modification techniques to biomaterial research. *Journal of electron spectroscopy and related phenomena*, 81(3), 269-284.
- [28] **Sioshansi, P.** (1987). Surface modification of industrial components by ion implantation. *Materials Science and Engineering*, 90, 373-383.
- [29] **Kim, H. I., & Kim, S. S.** (2006). Plasma treatment of polypropylene and polysulfone supports for thin film composite reverse osmosis membrane. *Journal of Membrane Science*, 286(1-2), 193-201.
- [30] **Sprang, N. B. A. U. W., Theirich, D. B. A. U. W., & Engemann, J. B. A. U. W.** (1995). Plasma and ion beam surface treatment of polyethylene. *Surface and Coatings Technology*, 74, 689-695.
- [31] **Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L., & Beachey, E. H.** (1983). Experimental foreign body infections in MIKe challenged with slime-producing *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*, 40(1), 407-410.
- [32] **Pandiyaraj, K. N., Selvarajan, V., Rhee, Y. H., Kim, H. W., & Shah, S. I.** (2009). Glow discharge plasma-induced immobilization of heparin and insulin on polyethylene terephthalate film surfaces enhances anti-thrombogenic properties. *Materials Science and Engineering: C*, 29(3), 796-805.
- [33] **Yang, Z., Wang, J., Luo, R., Maitz, M. F., Jing, F., Sun, H., & Huang, N.** (2010). The covalent immobilization of heparin to pulsed-plasma polymeric allylamine films on 316L stainless steel and the resulting effects on hemocompatibility. *Biomaterials*, 31(8), 2072-2083.
- [34] **Mani G, Feldman MD, Patel D, Agrawal CM.** (2007) Coronary stents: a materials perspective. *Biomaterials*;28:1689–710.
- [35] **Williams, D. F.** (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953.
- [36] **Tenhaeff WE, Gleason KK.** (2008) Initiated and oxidative chemical vapor deposition of polymeric thin films: iCVD and oCVD. *Adv Funct Mater*;18:979–92.
- [37] **Bhattacharyya D, Yoon WJ, Berger PR, Timmons RB.** (2008) Plasma-polymerized multistacked organic bipolar films: a new approach to flexible high-k dielectrics. *Adv Mater*;20:2383–8
- [38] **Yin Y, Wise SG, Nosworthy NJ, Waterhouse A, Bax DV, Youssef H, et al.**(2009) Covalent immobilisation of tropoelastin on a plasma

deposited interface for enhancement of endothelialisation on metal surfaces. *Biomaterials*;30:1675– 81.

- [39] **A´vila-Orta CA, Cruz-Delgado VJ, Neira-Vela´zquez MG, Me´ndez-Padilla EGH, Medellı´n-Rodrı´guez FJ.** (2009) Surface modification of carbon nanotubes with ethylene glycol plasma. *Carbon*;47:1916–21.
- [40] **Basarir F, Cuong N, Song WK, Yoon TH.** (2007).Surface modification via plasma polymerization of allylamine for antibody immobilization. *Macromol Symp*;249:61–6.
- [41] **Puleo DA, Kissling RA, Sheu MS.** (2002) A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials*;23:2079–87.
- [42] **Finke B, Luethen F, Schroeder K, Mueller PD, Bergemann C, Frantc M, et al.**(2007) The effect of positively charged plasma polymerization on initial osteoblastic focal adhesion on titanium surfaces. *Biomaterials* ;28:4521–34.
- [43] **Hook AL, Thissen H, Quinton J, Voelcker NH.** (2008). Comparison of the binding mode of plasmid DNA to allylamine plasma polymer and poly(ethylene glycol) surfaces. *Surf Sci*;602:1883–91.
- [44] **Neirinck, B., Van der Biest, O., & Vleugels, J.** (2013). A current opinion on electrophoretic deposition in pulsed and alternating fields. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(6), 1516-1526.
- [45] **Seuss, S., & Boccaccini, A. R.** (2013). Electrophoretic deposition of biological macromolecules, drugs, and cells. *Biomacromolecules*, 14(10), 3355-3369.
- [46] **Ammam, M.** (2012). Electrophoretic deposition under modulated electric fields: a review. *RSC advances*, 2(20), 7633-7646.
- [47] **Ammam, M., & Fransaeer, J. (2010).** Two-enzyme lactose biosensor based on β -galactosidase and glucose oxidase deposited by AC-electrophoresis: Characteristics and performance for lactose determination in milk. *Sensors and Actuators B: Chem*, 148(2), 583-589.
- [48] **Ammam, M., & Fransaeer, J.** (2009). AC-electrophoretic deposition of glucose oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(1), 191-197.
- [49] **Aktan, M. K., Van der Gucht, M., Hendrix, H., Velde, G. V., Baert, K., Hauffman, T., ... & Braem, A.** (2022). Anti-infective DNase I coatings on polydopamine functionalized titanium surfaces by alternating current electrophoretic deposition. *Analytica Chimica Acta*, 340022.
- [50] **Lawrence, E. L., & Turner, I. G.** (2005). Materials for urinary catheters: a review of their history and development in the UK. *Medical engineering & physics*, 27(6), 443-453.
- [51] **Timsit, J. F.** (2011). Annals of Intensive Care. *Annals of Intensive Care*, 1, 34.
- [52] **Mani, G., Feldman, M. D., Patel, D., & Agrawal, C. M.** (2007). Coronary stents: a materials perspective. *Biomaterials*, 28(9), 1689-1710.

- [53] **Varma, N., Piccini, J. P., Snell, J., Fischer, A., Dalal, N., & Mittal, S.** (2015). The relationship between level of adherence to automatic wireless remote monitoring and survival in pacemaker and defibrillator patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(24), 2601-2610.
- [54] **Paglia, E., & Carter, J.** (2017). Cardiac pacemakers. *Hospital Medicine Clinics*, 6(3), 374-396.
- [55] **Heidenreich, P. A., Trogdon, J. G., Khavjou, O. A., Butler, J., Dracup, K., Ezekowitz, M. D., ... & Woo, Y. J.** (2011). Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*, 123(8), 933-944.
- [56] **Sapirstein, W., Alpert, S., & Callahan, T. J.** (1994). The role of clinical trials in the Food and Drug Administration approval process for cardiovascular devices. *Circulation*, 89(4), 1900-1902.
- [57] **Fileti, L., Vecchio, S., Moretti, C., Reggi, A., Aquilina, M., Balducelli, M., ... & Rubboli, A.** (2020). Impact of the COVID-19 pandemic on coronary invasive procedures at two Italian high-volume referral centers. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 21(11), 869-873.
- [58] **Garg, S., & Serruys, P. W.** (2010). Coronary stents: current status. *Journal of the American College of Cardiology*, 56(10S), S1-S42.
- [59] **Martin, D. M., & Boyle, F. J.** (2011). Drug-eluting stents for coronary artery disease: a review. *Medical engineering & physics*, 33(2), 148-163.
- [60] **Joner, M., Finn, A. V., Farb, A., Mont, E. K., Kolodgie, F. D., Ladich, E., ... & Virmani, R.** (2006). Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(1), 193-202.
- [61] **De Mel, A., Bolvin, C., Edirisinghe, M., Hamilton, G., & Seifalian, A. M.** (2008). Development of cardiovascular bypass grafts: endothelialization and applications of nanotechnology. *Expert review of cardiovascular therapy*, 6(9), 1259-1277.
- [62] **Qi, P., Maitz, M. F., & Huang, N.** (2013). Surface modification of cardiovascular materials and implants. *Surface and Coatings Technology*, 233, 80-90.
- [63] **Vogler, E. A., & Siedlecki, C. A.** (2009). Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials*, 30(10), 1857-1869.
- [64] **Rabe, M., Verdes, D., & Seeger, S.** (2011). Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in colloid and interface science*, 162(1-2), 87-106.
- [65] **Golas, A., Parhi, P., Dimachkie, Z. O., Siedlecki, C. A., & Vogler, E. A.** (2010). Surface-energy dependent contact activation of blood factor XII. *Biomaterials*, 31(6), 1068-1079.
- [66] **Chen, X., Wang, J., Paszti, Z., Wang, F., Schrauben, J. N., Tarabara, V. V., ... & Chen, Z.** (2007). Ordered adsorption of coagulation factor XII on negatively charged polymer surfaces probed by sum frequency

generation vibrational spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 388(1), 65-72.

- [67] **Davie, E. W.** (2003). A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 50819-50832.
- [68] **Mackman, N.** (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 451(7181), 914-918.
- [69] **Hall, J. E., & Hall, M. E.** (2020). *Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book*. Elsevier Health Sciences.
- [70] **Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., . . . Kamil, M. A.** (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc.*, 81(1), 7-11.
- [71] **Zimmerli, W.** (2014). Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *J Intern Med.*, 276(2), 111-119.
- [72] **Park, K. D., Kim, Y. S., Han, D. K., Kim, Y. H., Lee, E. H. B., Suh, H., & Choi, K. S.** (1998). Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces. *Biomaterials*, 19(7-9), 851-859.
- [73] **Kwok, C. S., Wan, C., Hendricks, S., Bryers, J. D., Horbett, T. A., & Ratner, B. D.** (1999). Design of infection-resistant antibiotic-releasing polymers: I. Fabrication and formulation. *Journal of controlled release*, 62(3), 289-299.
- [74] **Kayaalp, O.** (1996). *Tıbbi farmakoloji*. Hacettepe-Taş.
- [75] **Tollefsen, D. M., Majerus, D. W., & Blank, M. K.** (1982). Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *Journal of Biological Chemistry*, 257(5), 2162-2169.
- [76] **Bray, B., Lane, D. A., Freyssinet, J. M., Pejler, G., & Lindahl, U.** (1989). Anti-thrombin activities of heparin. Effect of saccharide chain length on thrombin inhibition by heparin cofactor II and by antithrombin. *Biochemikal Journal*, 262(1), 225-232.
- [77] **Tollefsen, D. M., Sugimori, T., & Maimone, M. M.** (1990, October). Effect of low molecular weight heparin preparations on the inhibition of thrombin by heparin cofactor II. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 16, pp. 66-70).
- [78] **Liaw, P. C., Austin, R. C., Fredenburgh, J. C., Stafford, A. R., & Weitz, J. I.** (1999). Comparison of heparin-and dermatan sulfate-mediated catalysis of thrombin inactivation by heparin cofactor II. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27597-27604.

- [79] **Hurst, R. E., Poon, M. C., & Griffith, M. J.** (1983). Structure-activity relationships of heparin. Independence of heparin charge density and antithrombin-binding domains in thrombin inhibition by antithrombin and heparin cofactor II. *The Journal of clinical investigation*, 72(3), 1042-1045.
- [80] **Tollefsen, D. M., Pestka, C. A., & Monafu, W. J.** (1983). Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 258(11), 6713-6716.
- [81] **Geerts, W. H., Heit, J. A., Clagett, G. P., Pineo, G. F., Colwell, C. W., Anderson, F. A., & Wheeler, H. B.** (2001). Prevention of venous thromboembolism. *Chest*, 119(1), 132S-175S.
- [82] **Cruickshank, M. K., Levine, M. N., Hirsh, J., Roberts, R., & Siguenza, M.** (1991). A standard heparin nomogram for the management of heparin therapy. *Archives of internal medicine*, 151(2), 333-337.
- [83] **Raschke, R. A., Reilly, B. M., Guidry, J. R., Fontana, J. R., & Srinivas, S.** (1993). The weight-based heparin dosing nomogram compared with a standard care nomogram: a randomized controlled trial. *Annals of internal medicine*, 119(9), 874-881.
- [84] **Yasuda, H.** (1984). Plasma polymerization for protective coatings and composite membranes. *Journal of membrane science*, 18, 273-284.
- [85] **Kamińska, A., Kaczmarek, H., & Kowalonek, J.** (2002). The influence of side groups and polarity of polymers on the kind and effectiveness of their surface modification by air plasma action. *European Polymer Journal*, 38(9), 1915-1919.
- [86] **Kondyurin, A., Karmanov, V., & Guenzel, R.** (2001). Plasma immersion ion implantation of polyethylene. *Vacuum*, 64(2), 105-111.
- [87] **Chu, P. K., Chen, J. Y., Wang, L. P., & Huang, N.** (2002). Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 36(5-6), 143-206.
- [88] **Yasuda, H. K.** (2005). Some important aspects of plasma polymerization. *Plasma Processes and Polymers*, 2(4), 293-304.
- [89] **Buddhadasa, M., Vandenabeele, C. R., Snyders, R., & Girard-Lauriault, P. L.** (2017). Single source precursor vs. precursor mixture for N-rich plasma polymer deposition: Plasma diagnostics and thin film analyses. *Plasma Processes and Polymers*, 14(11), 1700030.
- [90] **Zhitomirsky, I., & Gal-Or, L.** (1997). Electrophoretic deposition of hydroxyapatite. *Journal of materials science: materials in medicine*, 8(4), 213-219.

- [91] **Sarkar, P., & Nicholson, P. S.** (1996). Electrophoretic deposition (EPD): mechanisms, kinetics, and application to ceraMİKs. *Journal of the American CeraMİK Society*, 79(8), 1987-2002.
- [92] **Maniglio, D., Bonani, W., Bortoluzzi, G., Servoli, E., Motta, A., & Migliaresi, C.** (2010). Electrodeposition of silk fibroin on metal substrates. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 25(5), 441-454.
- [93] **Dickerson, J. H., & Boccaccini, A. R.** (Eds.). (2011). *Electrophoretic deposition of nanomaterials*. Springer Science & Business Media.
- [94] **Şahin, T.** (2006). *Elektrodepozisyon tekniğiyle üretilen Co ve CoFe filmlerin, yapısal ve manyetodirenç özelliklerinin incelenmesi* (Master's thesis, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [95] **Kar, A., Raja, K. S., & Misra, M.** (2006). Electrodeposition of hydroxyapatite onto nanotubular TiO₂ for implant applications. *Surface and Coatings Technology*, 201(6), 3723-3731.
- [96] **Owen, A.** (2013). *Fundamentals of UV-visible spectroscopy*. Hewlett Packard.
- [97] **Swinehart, D.F.** (1962). The Beer-Lambert Law. *Journal of Chemical Education*. 39, 7, 333.
- [99] **Petit, S. ve Madejova, J.** (2013). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. içinde: *Dev. Clay Sci.*, Elsevier, ss. 213–231.
- [100] **Townshen, A.** (1983). Principles of Instrumental Analysis. *Analytica Chimica Acta*. 152, 314.
- [101] **Stevie, F. A., & Donley, C. L.** (2020). Introduction to x-ray photoelectron spectroscopy. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 38(6), 063204.
- [102] **Wang, K., Liu, C., & Zhou, W.** (2016). Investigation on the interfacial properties of a viscoelastic-based surfactant as an oil displacement agent recovered from fracturing flowback fluid. *RSC advances*, 6(44), 38437-38446.
- [103] **Chatterjee, S., Gadad, S. S., & Kundu, T. K.** (2010). Atomic force Microscopy. *Resonance*, 15(7), 622-642.
- [104] **Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S.**, 1993. *Enstrümantal Analiz Yöntemleri.*, Hacettepe Üniversitesi.
- [105] **Southworth, H.N.** (1975). Scanning Electron Microscopy and Mikroanalysis içinde: *Physicochem. Methods Miner. Anal.*, Springer US, Boston, MA, ss. 421–450.

- [106] **Jellison Jr, G. E., Merkulov, V. I., Poretzky, A. A., Geohegan, D. B., Eres, G., Lowndes, D. H., & Caughman, J. B.** (2000). Characterization of thin-film amorphous semiconductors using spectroscopic ellipsometry. *Thin Solid Films*, 377, 68-73.
- [107] **Dikyol, C., & Ercan, U. K.** (2022). Evaluation of Penetration Depth of Antimicrobial Effect by Cold Atmospheric Plasma Treatment In Vitro. *Plasma Medicine*, 12(1).
- [108] **Alban, S.** (2012). Adverse effects of heparin. *Heparin-a century of progress*, 211-263.
- [109] **Buyukserin, F., Altuntas, S., & Aslim, B. E. L. M. A.** (2014). Fabrication and modification of composite silica nano test tubes for targeted drug delivery. *RSC Advances*, 4(45), 23535-23539.
- [110] **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 by plasma glow discharge. *Biomaterials*, 17(8), 841-847.
- [111] **Johnson, J. A., Cogbill, T. H., Strutt, P. J., & Gundersen, A. L.** (1988). Wound complications after infrainguinal bypass: Classification, predisposing factors, and management. *Archives of surgery*, 123(7), 859-862.
- [112] **Wadström, T., Eliasson, I., Holder, I., & Ljungh, A.** (Eds.). (2012). *Pathogenesis of wound and biomaterial-associated infections*. Springer Science & Business Media.
- [113] **Guler, T., Polat, Z. A., Yayci, E., Atacag, T., & Cetin, A.** (2013). Effects of low molecular weight heparins and unfractionated heparin on viability of human umbilical vein endothelial cells. *Archives of gynecology and obstetrics*, 287, 217-222.
- [114] **Spadaccio, C., Rainer, A., Centola, M., Trombetta, M., Chello, M., Lusini, M., ... & Genovese, J. A.** (2010). Heparin-releasing scaffold for stem cells: a differentiating device for vascular aims. *Regenerative medicine*, 5(4), 645-657.
- [115] **Cheng, L., Li, R., Liu, G., Zhang, Y., Tang, X., Wang, J., ... & Qin, Y.** (2018). Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International journal of nanomedicine*, 13, 3311.
- [116] **Jin, Y., Zhu, Z., Liang, L., Lan, K., Zheng, Q., Wang, Y., ... & Wang, B.** (2020). A facile heparin/carboxymethyl chitosan coating mediated by polydopamine on implants for hemocompatibility and antibacterial properties. *Applied Surface Science*, 528, 146539.

- [117] **Ye, Q., Pang, C., Zhu, H., Li, R., & Chen, F.** (2022). Embedded gold nanoparticles in TiO₂ crystal for photonic applications. *Materials Letters*, 326, 132995.
- [118] **Choukourov, A., Biederman, H., Kholodkov, I., Slavinska, D., Trchova, M., & Hollander, A.** (2004). Properties of amine-containing coatings prepared by plasma polymerization. *Journal of applied polymer science*, 92(2), 979-990.
- [119] **Özgüzar, H. F., Evren, E., Meydan, A. E., Kabay, G., Göçmen, J. S., Büyükserin, F., & Eroglu, O.** (2022). Plasma-Assisted Surface Modification and Heparin Immobilization: Dual-Functionalized Blood-Contacting Biomaterials with Improved Hemocompatibility and Antibacterial Features. *Advanced Materials Interfaces*, 2202009.
- [120] **Manakhov, A., Nečas, D., Čechal, J., Pavliňák, D., Eliáš, M., & Zajíčková, L.** (2015). Deposition of stable amine coating onto polycaprolactone nanofibers by low pressure cyclopropylamine plasma polymerization. *Thin Solid Films*, 581, 7-13.
- [121] **Gabius, H. J., André, S., Kaltner, H., & Siebert, H. C.** (2002). The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1572(2-3), 165-177.
- [122] **Linkins, L. A., & Warkentin, T. E.** (2011, September). Heparin-induced thrombocytopenia: real-world issues. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 37, No. 06, pp. 653-663). © Thieme Medical Publishers.
- [123] **Banegas, R. S., Zornio, C. F., Borges, A. D. M., Porto, L. C., & Soldi, V.** (2013). Preparation, characterization and properties of films obtained from cross-linked guar gum. *Polímeros*, 23, 182-188.
- [124] **Lyman, D. J., Knutson, K., McNeil, B., & Shibatani, K.** (1975). The effects of chemical structure and surface properties of synthetic polymers on the coagulation of blood. IV. The relation between polymer morphology and protein adsorption. *Transactions-American Society for Artificial Internal Organs*, 21, 49-54.
- [125] **Degoutin, S., Jimenez, M., Chai, F., Pinalie, T., Bellayer, S., Vandebossche, M., ... & Martel, B.** (2014). Simultaneous immobilization of heparin and gentamicin on polypropylene textiles: A dual therapeutic activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(11), 3846-3854.
- [126] **Ahmed, W., Zhai, Z., & Gao, C.** (2019). Adaptive antibacterial biomaterial surfaces and their applications. *Materials Today Bio*, 2, 100017.

- [127] **Timbrook, T. T., Morton, J. B., McConeghy, K. W., Caffrey, A. R., & Mylonakis, E. LaPlante** (2017). The Effect of Molecular Rapid Diagnostic Testing on Clinical Outcomes in 306 Bloodstream Infections: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*, 307(64), 15-23.
- [128] **Yüce, K.** (1998). Koagülaz negatif stafilokokların neden olduğu hastane infeksiyonları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 2(3), 143-146.
- [129] **Cherifi, S., Byl, B., Deplano, A., Nonhoff, C., Denis, O., & Hallin, M.** (2013). Comparative epidemiology of Staphylococcus epidermidis isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. *Journal of clinical MİKrobiology*, 51(5), 1541-1547.
- [130] **Götz, F., Perconti, S. Popella, P., Werner, R., Schlag, M.** (2014). Epidermin and gallidermin: Staphylococcal antibiotics. *International Journal of Clinical MİKrobiology*, 304(1), 63-71.
- [131] ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity <https://www.iso.org/standard/36406.html>.
- [132] **Chandan, S., George, N., Zappala, C., Boots, R. J., & Faoagali, J.** (2007). The antiMİKrobial effect of heparin on common respiratory pathogens. *Critical Care and Resuscitation*, 9(2).
- [133] **Rosett, W., & Hodges, G. R.** (1980). AntiMİKrobial activity of heparin. *Journal of Clinical MİKrobiology*, 11(1), 30-34.
- [134] ISO 10993-4:2017 Biological evaluation of medical devices — Part 4: Selection of tests for interactions with blood <https://www.iso.org/standard/36406.html>.
- [135] **Hemeda, H., Kalz, J., Walenda, G., Lohmann, M., & Wagner, W.** (2013). Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy*, 15(9), 1174-1181.
- [136] **Pan, C. J., Hou, Y. H., Zhang, B. B., Dong, Y. X., & Ding, H. Y.** (2014). Blood compatibility and interaction with endothelial cells of titanium modified by sequential immobilization of poly (ethylene glycol) and heparin. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(7), 892-902.
- [137] **Owens, D. K.** (1969). RC: Wendt. *J. of Applied Polymer Science*, 13, 1741.
- [138] **Van Oss, C. J., Good, R. J., & Chaudhury, M. K.** (1988). Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles. *Langmuir*, 4(4), 884-891.
- [139] **Julius, L. A. N., Matter, L., Schuergers, N., Lützenkirchen, J., Trouillet, V., Gil-Díaz, T., ... & Korvink, J. G.** (2023). Surface characterisation

reveals substrate suitability for cyanobacterial phototaxis. *Acta Biomaterialia*, 155, 386-399.

- [140] **Ammam, M.** (2012). Electrophoretic deposition under modulated electric fields: a review. *Rsc Advances*, 2(20), 7633-7646.
- [141] **Henkelman, S., Rakhorst, G., Blanton, J., & van Oeveren, W.** (2009). Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials. *Materials Science and Engineering: C*, 29(5), 1650-1654.
- [142] **Neirinck, B., Fransaer, J., Van der Biest, O., & Vleugels, J.** (2009). Aqueous electrophoretic deposition in asymmetric AC electric fields (AC-EPD). *Electrochemistry Communications*, 11(1), 57-60.
- [143] **Šimek, M., Hoffer, P., Tungli, J., Prukner, V., Schmidt, J., Bílek, P., & Bonaventura, Z.** (2020). Investigation of the initial phases of nanosecond discharges in liquid water. *Plasma Sources Science and Technology*, 29(6), 064001.
- [144] **Dukhin, A. S., & Dukhin, S. S.** (2005). Aperiodic capillary electrophoresis method using an alternating current electric field for separation of macromolecules. *Electrophoresis*, 26(11), 2149-2153.
- [145] **Shirolkar, M. M., Phase, D., Sathe, V., Rodríguez-Carvajal, J., Choudhary, R. J., & Kulkarni, S. K.** (2011). Relation between crystallinity and chemical nature of surface on wettability: A study on pulsed laser deposited TiO₂ thin films. *Journal of Applied Physics*, 109(12), 123512.
- [146] **Tejido-Rastrilla, R., Ferraris, S., Goldmann, W. H., Grünwald, A., Detsch, R., Baldi, G., ... & Boccacini, A. R.** (2019). Studies on cell compatibility, antibacterial behavior, and zeta potential of Ag-containing polydopamine-coated bioactive glass-ceramics. *Materials*, 12(3), 500.
- [147] **Hattori, T., Kimura, K., Seyrek, E., & Dubin, P. L.** (2001). Binding of bovine serum albumin to heparin determined by turbidimetric titration and frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 295(2), 158-167.
- [148] **Jackson, S. P.** (2007). The growing complexity of platelet aggregation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 109(12), 5087-5095.
- [149] **Thomas, S. G.** (2019). The structure of resting and activated platelets. *Platelets*, 47-77.

- [150] **Sun, F., Pang, X., & Zhitomirsky, I.** (2009). Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite–chitosan–heparin coatings. *Journal of materials processing technology*, 209(3), 1597-1606.
- [151] **Seuss, S., & Boccaccini, A. R.** (2013). Electrophoretic deposition of biological macromolecules, drugs, and cells. *Biomacromolecules*, 14(10), 3355-3369.



EKLER

EK 1: MİK ve MBK Hesaplamaları



EKLER

EK 1

Tez kapsamında yapılan çalışma sonuçlarında heparin antibakteriyel karakteristiği aşağıda sıralanan standart suşlar üzerinde test edilmiştir (Çizelge Ek.1);

- ATCC 35984 *S. epidermidis*
- ATCC 25922 *E. coli*
- ATCC 25923 *S. aureus*

Çizelge Ek.1: Heparin MİK ve MBK değerleri (n=6).

Kullanılan Suş	MİK (µg/ml)	MBK (µg/ml)
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 35984)	[1600-3200]	[12500-25000]
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	[1600-3200]	[6250-12500]
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	[1600-3200]	[6250-12500]

Serbest heparin çözeltisi ile PP yüzeye tutunum sağlayan heparin miktarının antibakteriyel karakteristiğe etkisini karşılaştırmak gerekirse;

MİK ve MBK testlerinde kullanılan stok bakteri yoğunluğu 1.5×10^8 KOB/ml'dir. Çalışma için kullanılmak üzere stok konsantrasyon 1:100 seyreltilerek bakteri yoğunluğu 1.5×10^6 KOB/ml olarak sabitlenmiştir. Kuyu başına 100 µL bakteri süspansiyonu ve 100 µL heparin çözeltisi eklenmiştir. 24 saat inkübasyon sonrası heparin'in bakteri canlılığına etkisi çıplak gözle test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre üç bakteri suşunda da MİK değeri [1600-3200] µg/ml heparin konsantrasyonunda elde edilmiştir. MBK testlerinde ise *S. aureus* ve *E. coli* suşları için [6250- 12500] µg/ml aralığında saptanırken, *S. epidermidis* standart suşu için söz konusu değer [12500- 25000] µg/ml aralığında gelmiştir. Konu ile ilgili hesaplamalar aşağıda yer almaktadır.

MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu)

Bakteri stok konsantrasyon: 1.5×10^6 KOB/mL

1 mL=1000 µL 'de 1.5×10^6 bakteri

100 µL 'de 1.5×10^5 bakteri

1:2 seyreltildiğinde (100 µL bakteri, 100 µL heparin) **7.5×10^4 bakteri**

Heparin konsantrasyonu: 1600 µg/ml (MİK değeri)

100 µL 'de ki heparin miktarı: 160 µg

1:2 seyreltildiğinde (100 µL bakteri, 100 µL heparin) **80 µg heparin**

Heparin konsantrasyonu: 3200 µg/ml (MİK değeri)

100 µL 'de ki heparin miktarı: 320 µg

1:2 seyreltildiğinde (100 µL bakteri, 100 µL heparin) **160 µg heparin**

MİK sonuçlarına göre 7.5×10^4 bakteri inhibisyonu için gereken heparin miktarı 80-160 µg aralığındadır.

MBK (Minimum Bakterisidal Konsantrasyon)

Bakteri stok konsantrasyonu: 1.5×10^6 KOB/mL

1 mL=1000 µL 'de 1.5×10^6 bakteri

100 µL 'de 1.5×10^5 bakteri

1:2 seyreltildiğinde (100 µL bakteri, 100 µL heparin) **7.5×10^4 bakteri**

Heparin konsantrasyonu: 12500 µg/ml (MBK değeri)

100 µL 'de ki heparin miktarı: 1250 µg

1:2 seyreltildiğinde (100 µL bakteri, 100 µL heparin) **625 µg heparin**

Heparin konsantrasyonu: 25000 µg/ml (MBK değeri)

100 µL 'de ki heparin miktarı: 2500 µg

1:2 seyreltildiğinde (100 µL bakteri, 100 µL heparin) **1250 µg heparin**

MBK sonuçlarına göre 7.5×10^4 bakterinin canlılıklarını sonlandırmak için gereken heparin miktarı 625-1250 µg aralığındadır.

PP birim yüzeye (1 cm²) tutunumu sağlanan heparin miktarı: 360-380 µg

Bakteri stok konsantrasyonu: 1.5×10^6 KOB/ml

PP yüzeylere ekilen bakteri miktarı (10 µL) : **1.5×10^4 bakteri**

PP yüzeye ekilen bakteri miktarı (**1.5×10^4 bakteri**), MİK ve MBK (**7.5×10^4 bakteri**)

çalışmalarında kullanılan bakteri miktarının 5'te 1'idir.

MİK ve MBK çalışmalarında kullanılan bakteri sayısının 5te 1i için gerekli heparin miktarları sırasıyla;

16-32 µg ve 125-250 µg aralığında olmalıdır.

Sonuç olarak, polipropilen (PP) birim yüzeye tutunumu sağlanan heparin miktarı ortalama 400 µg olupėundan , MİK ve MBK testlerinde saptanan heparin miktarı aralığından fazla olduğu hesaplanmış durumdadır.



1.

