

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

POLİHİDROKSİ ETİLMETAKRİLAT KÖKENLİ
YAPAY DAMARLARIN HAZIRLANMASI VE
BİYO-UYUMLULUK ÖZELLİKLERİNİN
ARTTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

MELTEM YILMAZ

KASIM 2006

ÖZET

POLİHİDROKSİ ETİLMETAKRİLAT KÖKENLİ YAPAY DAMARLARIN HAZIRLANMASI VE BİYO-UYUMLULUK ÖZELLİKLERİNİN ARTTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

YILMAZ, Meltem

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman : Prof. Dr. M. Yakup ARICA

Kasım 2006, 90 sayfa

Bu tez çalışmasının başlıca amacı, biyolojik olarak uyumlu olan poli(hidroksietil metakrilat), pHEMA hidrojel kökenli, dolaşım sisteminde kullanılabilir, yapay bir damar geliştirmektir. Bu amaç doğrultusunda, farklı miktarlarda albumin (AL) ve heparin (HEP) tutuklanmış pHEMA-AL-HEP tüpleri hazırlandı. Çalışmanın birinci aşamasında uygun çap ve boyutlara sahip ve farklı miktarlarda insan serum albumini (HSA) içeren pHEMA-AL tüpleri 6 mm iç çapta yapay damar olarak fotopolimerizasyon yöntemi ile azoizobutironitril (AIBN) başlatıcısı varlığında sentezlendi. Albumin içeren

pHEMA-AL yapıların kan uyumluluğunu artırmak ve yüzeyinde trombus oluşumunu engellemek için karbodiimid ile aktivite edildi ve yüzeye heparin kovalent olarak bağlandı. Heparin bağlanma miktarları farklı albumin ve heparin başlangıç konsantrasyonlarında ayrıntılı olarak incelendi. pHEMA'nın biyolojik ve kan uyumluluğunu artırmak için sentez sırasında insan serum albumini matriks içi tutuklama yöntemi ile yerleştirildi ve sonrasında yüzey modifikasyonu ile heparin, pHEMA-AL yapının yüzeyine kovalent olarak bağlandı. Yapay damar olarak kullanılması planlanan yeni geliştirilen biyomateryalin, kan uyumluluk testleri kanda hemolitik aktivite, protrombin zamanı, aktive tromboplastin zamanı, kan hücrelerinin kaybı gibi parametrelerle incelendi. Ayrıca rutin analizler dışında, geliştirilen biyomateryalin, yüzey özellikleri SEM, yüzey temas açıları ve mekanik özellikleri ve kan serum proteinlerinin adsorpsiyonları detaylı olarak çalışıldı. Son olarak, optimize edilmiş koşullarda üretilen pHEMA-AL-HEP polimerik yapay damar modeli sürekli sistemde 72 saat süre ile dayanıklılık testleri yapıldı.

Anahtar Kelimeler : Vasküler biyoprotez, pHEMA, heparin, albumin, yüzey modifikasyonu, immobilizasyon.

ABSTRACT

THE PREPARATION OF POLYHYDROXY ETHYLMETHACRYLATE BASED ARTIFICIAL VESSELS AND DEVELOPMENT OF BIOCOMPATIBILITY PROPERTIES AND CHARACTERISATION

YILMAZ, Meltem

Kırıkkale University

Graduate School Of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph. D. Thesis

Supervisor : Prof. Dr. M. Yakup ARICA

November 2006, 90 pages

The main purpose of this study is to develop an artificial biocompatible vessel based on poly(hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) hydrogel which can be used in vascular system. In the direction of this purpose, different amounts of heparin (HEP) and albumin (AL) immobilized pHEMA-AL-HEP tubes were prepared. In the first stage of this study, in order to increase biocompatibility of pHEMA, human serum albumin (HSA) was placed with intramatrix entrapment method in pHEMA structure, during polymerization. The pHEMA-AL tubes having 6 mm internal diameter were synthesized as an artificial vessel with the photopolymerization method, in the presence of

azoisobutyronitrile (AIBN) initiator. In order to increase blood compatibility of pHEMA-AL structures, and to prevent formation of thrombus on the surface, polymer was activated with 1.1'-carbonyldiimidazole (CDI) and heparin was covalently immobilised on the surface. Amounts of immobilised heparin were studied in detail at the different initial concentrations of albumin and heparin. Blood compatibility tests of the newly developed biomaterial which was planned to be used as an artificial vessel, were examined with various parameters as hemolytic activity, prothrombin time, activated thromboplastin time, loss of blood cells in blood. In addition to routine analysis, surface properties of the biomaterial were studied with SEM, contact angles and surface energies, mechanical properties and adsorptions of blood serum proteins. Finally, the model of pHEMA-AL-HEP polymeric artificial vessels produced under optimised conditions, were tested for 72 h in continuous system.

Key Words: Vascular bioprosthesis, pHEMA, heparin, albumin, surface modification, immobilization.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleőtirilmesinde, her tŒrlŒ yardımı benden esirgemeyen, engin bilgisi ve tecrŒbesiyle yoluma ıŐık tutan, bŒyŒk fedakarlıklarla daima bana destek olan ve gŒsterdiđi sonsuz Œzveri ile beni teŐvik eden danıŐmanım, değerli Hocam, Sayın Prof.Dr. M. Yakup ARICA'ya, en derin sayđı ve teŐekkŒrlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tez çalışmasının bŒtŒn aŐamalarında, bana Œzverili yardımlarıyla destek veren, çok kıymetli gayretlerini ve emeklerini benden esirgemeyen, tŒm bilgi birikimi ve imkanları ile, her zaman yanımda olan, değerli Hocam, Sayın Doç.Dr. GŒlay BAYRAMOĞLU'na, sayđılarımı ve teŐekkŒrlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Meltem YILMAZ

Kasım 2006, KIRIKKALE

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOD	17
2.1. Materyaller	17
2.2. pHEMA-AL kökenli biyomateryallerin hazırlanması.....	17
2.3. pHEMA-AL vasküler protezi yüzeyine heparin tutuklanması (pHEMA-AL-HEP)	18
2.4. Polimerik Yapay Tüplerin Karakterizasyon Çalışmaları	19
2.4.1. Heparin Miktarının Tayini	19
2.4.2. FTIR Spektra	20
2.4.3. Taramalı Elektron Mikroskop Çalışmaları	20
2.4.4. Biyomateryal Yapıların Denge Su İçerikleri	20
2.4.5. Yüzey Temas Açılarının Ölçülmesi ve Yüzey Enerjisinin Hesaplanması	21
2.4.6. Mekanik Özellikler	24
2.5. Biyomateryal Üzerine Serum Proteinlerinin Adsorpsiyonu	24
2.5.1. Kesikli Sistem Deneyleri	24

2.5.2. Sürekli Sistem Deneyleri	25
2.5.3. HPLC Analizi	26
2.6. Kan Uyumluluk Çalışmaları	27
2.6.1. PT ve aPTT Zamanı Testi	27
2.6.2. Hemolitik Aktivite	28
2.6.3. Kan Hücrelerinin Yapışması	28
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	30
3.1. pHEMA-AL-HEP Temelli Biyomateryallerin Özellikleri	30
3.1.1. pHEMA-AL-HEP yüzeyi üzerindeki heparin miktarının belirlenmesi	30
3.1.2. FTIR Spektra	34
3.1.3. Taramalı Elektron Mikroskobu	37
3.1.4. Biyomateryallerin Denge Su İçerikleri	40
3.1.5. Biyomateryallerin Yüzey Özelliklerinin Temas Açısı Ölçüm Yöntemi ile İncelenmesi	42
3.1.6. Mekanik Özellikler	56
3.2. Biyomateryallerle Kan Proteinlerinin Etkileşimi	57
3.2.1. Kesikli Sistem Deneyleri	57
3.2.1.1. pH'nın Etkisi	57
3.2.1.2. Biyomateryaller Üzerine Serum Proteinlerinin Fizyolojik pH Değerinde Adsorpsiyonu	59
3.2.1.3. pHEMA-AL-HEP Yapısı Üzerine Serum Proteinlerinin Adsorpsiyonu	63
3.2.2. Sürekli Sistem Deneyleri	63
3.2.3. HPLC Analizi	64

3.3. Kan Uyumluluk Çalışmaları	67
3.3.1. PT ve aPTT Zamanı Tayini	67
3.3.2. Hemolitik Aktivite	71
3.3.3. Kan Hücrelerinin Yapışması	72
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	73
KAYNAKLAR	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

3.1. Polimerik yapılara tutuklanan albumin ve heparin miktarları.....	33
3.2. Polimerik yapıların denge su içerikleri	41
3.3. pHEMA ve pHEMA-AL-1-5 bileşimindeki membranlar için deneme sıvılarıyla ölçülen yüzey temas açıları	42
3.4. Wu (harmonik ifade), Fowkes (Geometrik ifade) ve Zisman kritik yüzey gerilimine göre, pHEMA, pHEMA-AL-1-5 membranlarının yüzey serbest enerjileri	45
3.5. van Oss'a göre pHEMA ve pHEMA-AL-1-5 membranlarının yüzey serbest enerjisi parametreleri (mJ/m^2).....	48
3.6. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP membranlarının test sıvılarıyla temas açıları ölçüm değerleri	50
3.7. Wu (harmonik ifade), Fowkes (Geometrik ifade) ve Zisman kritik yüzey gerilimine göre, pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP membranlarının yüzey serbest enerjileri	53
3.8. van Oss'a göre pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP membranlarının yüzey serbest enerjisi parametreleri (mJ/m^2)	54
3.9. Polimerik yapıların mekanik özellikleri	57
3.10. pHEMA-AL-HEP yapısına adsorplanan serum protein miktarları	63

3.11. Polimerik yapılarla temas eden plazmanın PT ve aPTT süreleri	68
3.12. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP polimerlerinin hemoliz değerleri	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

3.1. pHEMA-AL-4 yapısına bağlanan heparin miktarına başlangıç heparin konsantrasyonunun etkisi	34
3.2. A) pHEMA, B) pHEMA-AL-4, C) pHEMA-AL-HEP yapılarının FTIR Spektrumu	36
3.3. A) pHEMA polimerinin yüzeyinin B) pHEMA yüzeyinin kan ile temasından sonra SEM mikrografı	38
3.4. A) pHEMA-HEP polimerinin yüzeyinin B) pHEMA-HEP yüzeyinin kan ile temasından sonra SEM mikrografı	38
3.5. A) pHEMA-AL yüzeyinin ve B) pHEMA-AL yüzeyinin kan ile temasından sonra SEM mikrografı	39
3.6. A) pHEMA-AL-HEP yüzeyinin ve B) pHEMA-AL-HEP yüzeyinin kan ile temasından sonra SEM mikrografı	39
3.7. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP tüplerinin denge su içeriğine ulaşma zamanı	41
3.8. pHEMA ve pHEMA-AL-1-5 membranları için kritik yüzey geriliminin hesaplanması için Zisman grafiği	44
3.9. Wu ve Fowkes yöntemleri ile %Xp değerinin HSA konsantrasyonu ile değişimi	47
3.10. HSA konsantrasyonunun % polariteye etkisi	49

3.11. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP membranları için kritik yüzey geriliminin hesaplanması için Zisman grafiği	51
3.12. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL, pHEMA-AL-HEP polimerlerinin % Xp değeri değişimleri	52
3.13. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP polimerlerinin, % polarite ($\gamma^{AB}/\gamma^{AB}_{TOT} \times 100$) değerleri	56
3.14. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapılarına albumin adsorpsiyonuna pH'nın etkisi	58
3.15. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapılarına, albumin bağlanma miktarına başlangıç albumin konsantrasyonunun etkisi	59
3.16. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapılarına, fibrinojen bağlanma miktarına başlangıç fibrinojen konsantrasyonunun etkisi	60
3.17. Kesikli sistemde serumdan protein adsorpsiyonuna ait kromatogramlar, A) Başlangıç serum örneği, B) 120. dakika adsorpsiyon sonucu	65
3.18. Sürekli sistemde serumdan protein adsorpsiyonuna ait kromatogramlar, A) Protein karışımı 0.5mg/ml HSA ve 1 mg/ml IgG, B) başlangıç serum örneği, C) 24. saat adsorpsiyon sonucu, D) 72. saat adsorpsiyon sonucu	66

1. GİRİŞ

Biyomateryaller, uzun süredir, çeşitli işlevleri yerine getirmek üzere, çok farklı yapı ve bileşimde üretilerek kullanılmaktadır. Buna karşın, tanımlanmaları konusu tartışmalıdır. Geçerli tanımlamalardan biri, “Doğal bir işlevi yerine getiren, arttıran, iyileştiren canlı yapıların, biyomedikal aletlerin tamamını, bir parçasını oluşturan, doğal veya yapay her materyal, biyomateryaldir.” şeklindedir (1). Diğer bir tanımlama, canlıların çeşitli hatalı işlevlerinin iyileştirilmesi için tasarlanmış materyaller olduğu şeklindedir (2). Bu alandaki araştırmacılar tarafından yapılmış, daha çok çeşitli farklı tanımlamalar vardır.

Biyomateryal olarak tıbbi uygulamalarda metaller, alaşımlar, polimerler, seramikler, kompozitler ve cam gibi çok çeşitli tipte malzeme kullanılmaktadır. Biyomateryalin tasarımı, amaçlanan işleve ve biyolojik bölgeye bağlı olarak değişik özellikler göstermelidir. Materyallerin yığın özellikleri, kısmen bu gereksinim duyulan farklı özellikleri sağlayabilir. Tüm gereksinimleri tam anlamıyla yerine getiren biyomateryaller tasarlamak çok zor olduğundan, tercih edilen yaygın bir yaklaşım, bazı temel özelliklere sahip bir biyomateryali üretmek ve devamında, yüzey özelliklerini geliştirmek için özel muamelelere tabi tutmaktır. Bu yolla, asıl özelliklerinden ayrılan yüzeyle, ideal biyomateryaller yapılması sağlanır. Ayrıca, yüzey özellikleri, biyomateryallerin performansını geliştirmek için seçici olarak modifiye edilebilir.

Polimer teknolojisinin son yıllarda gösterdiği yüksek ivmeli gelişime paralel olarak, üretim teknikleri ve kullanım alanları hızla artmıştır. Havacılık ve uzay endüstrisinin aşırı uçlardaki gereksinimlerini karşılamak için; polimerler, diğer materyallere göre üstünlük sergilemektedir. Polimerlerin biyomateryal olarak kullanımı da giderek gelişmektedir. Son on yıldır, hemodiyaliz sistemleri, vücut dışı sirkülasyon döngüleri, kalp kapakları, kan by-pass tüpleri, prostetik cihazlar, kateterler ve insan kanıyla doğrudan temas eden tıbbi cihazların yapımında, yoğun olarak polimer kullanılmaktadır (3-6).

Kan ile yapay bir yüzey temas ettiğinde, bir seri kompleks etkileşim reaksiyonu meydana gelmektedir. Polimerik yüzeye proteinlerin adsorpsiyonu veya hücre (çoğunlukla platelet) adezyonu meydana gelir, bunun sonucunda aktivasyon-agregasyon, kan koagülasyon sisteminin aktivasyonu, tamamlayıcı aktivasyon, fibrin ve sonuçta pıhtı oluşur (7-10).

Yapılan çok sayıdaki araştırmalarda, biyomateryal olarak kullanılması planlanan polimerik biyo-materyallerin, kan ile teması sonucunda plazma proteinlerini hızlı bir şekilde adsorpladığı rapor edilmiştir (11-12). Kan ile biyomateryal yüzeyi arasındaki etkileşim sonrası, koagülasyonun başlama mekanizması, henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Genel olarak, pıhtılaşma reaksiyonlarını, biyomateryale bağlanan ya da biyomateryal tarafından adsorplanan plazma proteinlerinin başlattığı düşünülmektedir (13-14).

Koagülasyon sisteminin uyarılması ile, trombin ve fibrinojen oluşumu sonrasında, pıhtı meydana gelmektedir. Bu tür yangı olayları, koroner bypass, hemodiyaliz ve diğer ekstrakorporal uygulamalarda olumsuz

sonuçlara neden olmaktadır. Bu tür reaksiyonlara, dolaşım sistemi dışında kalan diğer dokularda yapılan implantasyonlarda, sık rastlanmadığı yapılan araştırmalar sonucu bildirilmiştir (15).

Koagülasyon mekanizması, trombositler tarafından başlatılmaktadır. İn vivoda, fibrinojen veya diğer adezyon moleküllerinin biyomateryal yüzeyine bağlanması ile trombositler aktive edilir. Vasküler yolda (intrinsik yol, kontak aktivasyon yolu); prekallikrein, yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HK), faktör XII (Hageman faktörü) ve XI'in (plazma tromboplastin antesedan), negatif yüklü aktive edici bir yüzeyle karşılaşması sonucu, bir seri reaksiyonla, faktör X (Stuart-Prower faktörü) aktive olur. Ekstrakorporal olarak ise, koagülasyonun aktivasyonunun daha farklı olduğu yapılan çalışmalar sonucu rapor edilmiştir. Çünkü, kandaki doku faktörleri aktive edilerek monositler tarafından uyarılmaktadır.

Bazı çalışmalar, ekstrakorporal sistemlerde koagülasyon mekanizmasının vücut içerisindeki uygulamalarda olduğu gibi hızlı olmadığını, 15 dakika kadar sürdüğünü göstermiştir. Trombin oluşumuna neden olan koagülasyon basamaklarında fonksiyonel kan bileşenlerindeki çeşitlilik derecesinin önemi araştırılmış ve bu çalışmalarda, kandan izole edilen saflaştırılmış bileşenler (serum, plazma, eritrosit, lökosit ya da trombositlerin fraksiyonları) kullanılmıştır (16-17).

Sentetik polimerler, meydana getirdikleri koagülasyon, trombus, emboli, doğal dokulara karşı çeşitli cevaplar ve düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin sızması gibi, olumsuz olaylara karşın, yapay kan damarları ve kalp kapakçıkları gibi implantlarda kullanılmıştır (18). Politetrafluoroetilen

(PTFE), modern vasküler protezler yapılan bir materyaldir. PTFE bir biyomateryal olarak, iyi ısıl kararlılık, yüksek kimyasal inertlik, düşük yüzey enerjisi, ve düşük sürtünme katsayısına sahiptir. Bundan dolayı, PTFE, sentetik bir materyal olarak, gereken mekanik özelliklere ve mükemmel kimyasal kararlılığa sahiptir. Buna karşın, PTFE'nin yüzeyiyle kan arasında, trombogenik reaksiyonlar meydana gelebilir ve bu küçük çaplı sentetik arteriyel protezlerde düşük performansla sonuçlanır (19).

Kanla temas eden biyomateryallerle ilgili problem, öncelikle, yapay organın yüzeyinin, kan tarafından kabul edilmemesidir. Kanın yabancı maddelerle teması sonucu (örnek olarak ekstrakorporal dolaşım tüpü), biyomateryal ile biyolojik sistem arasında çok sayıda reaksiyonlar oluşmaktadır (20). Bu ilişkiler sonucu vücut savunma sistemi uyarılmakta ve savunma içerisinde de bilindiği gibi plazma sistemleri ve kan hücreleri rol almaktadır.

Ticari, yapay damar olarak üretilen polietilenteraftalat (PET), dolaşım sistemine dahil edilmesinden bir iki hafta sonra, savunma mekanizmalarını harekete geçirmekte ve protezin uygulanması başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (21).

Örneğin, düşük sıcaklık izotropik pirolitik karbon (LTIC), genellikle, iyi kan uyumluluğu ile, degradasyona, aşınmaya ve yorgunluğa karşı yüksek dirence sahip olduğu için, genellikle yapay kalp kapakçıklarının üretiminde kullanılır. Bununla birlikte, LTIC mekanik kalp kapakçıkları protezleri için tromboembolizm, önemli bir klinik komplikasyon olma özelliğini korumaktadır (22).

Başka bir örnekte, büyük arterlerin yerine vasküler protezler kullanılmıştır. Fakat, özellikle 5mm'den daha az iç çapı olan küçük çaplı yapay damarların, yorulma hızı, etkilenen damar boyunca kanın akışını durduran, yerel daralmalar nedeniyle, klinik koşullarda yüksektir (23). Tedavi, esas olarak cerrahidir ve akışı yeniden sağlamak için etkilenen damar bölümünün by-pass yapılması gerekir. Mükemmel bir kan uyumluluğuna sahip olan bir biyomateryali, basit ve kolay çözümlerle üretmek, bilinen yöntemlerle olası gözükmemektedir. Oldukça karmaşık olan bu alandaki çalışmalar, hala emekleme aşamasındadır (24-26).

Çok sayıda araştırma, biyolojik ve kan uyumlu bir yüzey geliştirmek için, öncelikle pıhtı oluşumunu engelleyen yapay bir yüzey oluşturma düşüncesi ile başlamaktadır. Bu araştırmalar, hidrofilik, hidrofobik, negatif ve/veya pozitif yüklü, çok farklı özellikteki polimerlerin kullanımını kapsamaktadır. Tıbbi cihazlar tasarlanırken, çeşitli vücut sıvılarına maruz kaldıklarında, korozyona ve degradasyona uğrama olasılıkları, düşünülme zorundadır. Engellemek için temel olarak iki metot vardır. Bunlar, dirençli bir materyal seçmek ya da materyali korumaktır. Korumak daha sık tercih edilir (27).

Yüzey karakteristikleri bir biyomateryalin işlevselliğinde hayati bir rol oynar. Biyolojik çevre (sert ya da yumuşak doku, kan, vücut sıvısı ya da tükrük gibi) ve biyomateryaller arasındaki etkileşimler, materyal yüzeyinde yer alır. Canlı dokuların biyomateryallere karşı oluşturduğu biyolojik cevap, kimyasal kompozisyon, temizlik, doku yapısı, yüzey enerjisi, korozyon direnci ve komşu proteinleri denature etme eğilimi gibi yüzey özelliklerine bağlıdır.

Özellikle, materyalin biyouyumluluğu, implant ve biyolojik sistem arasındaki, mikrometre ve nanometre ölçekli etkileşimlerle tanımlanır (28). Kimyasal kompozisyon, ıslatılabilirlik, yüzey enerjisi, yarı iletkenlik özellikleri ve yüzey yükü gibi materyalin fizikokimyasal yüzey özellikleri, bu etkileşimlerde önemli bir rol oynar (29-34).

Biyomateryalin yüzey modifikasyonunun mantığı, sadece en dıştaki yüzeyin modifiye edilip, asıl fiziksel özelliklerin korunmasına dayanır. Böylece, yüzey modifikasyonu gerçekleştirildiğinde, biyomedikal aletin mekanik özellikleri ve işlevselliği etkilenmez, fakat doku arayüzünde biyouyumluluk geliştirilebilir (35). Bundan dolayı, kanla temas eden inorganik materyallerin yüzey modifikasyonu, yeni bir araştırma alanıdır (20,26).

Yüzey modifikasyonu mekanizması şöyle özetlenebilir:

1. Düşük doku ve kan uyumluluğu, sadece hücresel hasar ve kan koagülasyonuna değil, başarısız nakillere de sebep olabilir. Bu durumlarda, sert, aşınmaya dirençli ve korozyona dirençli, aynı zamanda biyouyumlu olacak şekilde modifiye edilmiş bir tabaka, problemleri azaltır.

2. Biyomateryalin, yığın niteliklerini korurken, yüzey özelliklerini değiştirebilmek önemlidir.

3. Doku-biyomateryal etkileşimleri, yüzeyde meydana gelen bir olaydır ve yüzey özellikleri tarafından yönetilir. Bu etkileşimlerin, 1 nm'den daha az, sığ bir bölgede meydana geldiği düşünülmektedir (34-38). Taşıyıcı ve implant arasındaki başlangıçtaki etkileşim, serum ve diğer doku sıvılarıyla implantların şartlandırılmasını içerir, bu suretle biyomateryal yüzeyinde

kompozisyonel değişiklikler oluşur. Bundan dolayı, biyomateryal-doku arayüzündeki, davranış geliştirilmelidir.

4. Uzun ömürlülük, tıbbi implantlar için bir zorunluluktur (39). Dayanıklılık yanında, biyoyumluluk da ömür uzunluğunu belirler. Yığın özellikleri ve yüzey özellikleri arasında bir uyum meydana getirmek gereklidir.

5. Biyomateryallerin yüzey modifikasyonu, son on yılda yoğunlaşmıştır. Alternatif çözümler için gereksinimler, sadece daha iyi biyomedikal aletler değil, çok çeşitli fonksiyonellik ve biyoaktivitedir.

6. Yüzey muamelelerinin amacı, aşınmayı azaltmak, biyoyumluluğu arttırmak, biyoaktif ya da biyo inert davranış sağlamak, korozyon direncini geliştirmek, adezyonu geliştirmek, yüksek dirençlilik sağlamak ve yorgunluğa bağlı başarısızlığı azaltmaktır (40-43).

Yüzey modifikasyonu iki kategoriye ayrılır:

(1) kimyasal ya da fiziksel olarak yüzeydeki atomların, bileşiklerin ya da moleküllerin değiştirilmesi (polimer yüzeyinin oksidasyonu, fluorinasyon ve polimerik yüzeyde fonksiyonel grupların oluşturulması)

(2) farklı kompozisyona sahip bir materyalle yüzeyin kaplanması (plazma polimerizasyon yöntemi ile yüzeyin farklı bir polimer ile kaplanması, aşılama ve ince film kaplaması) (44-48).

Biyomedikal implant materyallerinin yüzey modifikasyonu ile, eklem yenilemeleri, yapay kemik, diş implantları, yapay kalp kapakları, yapay vasküler yapılar, yapay kan damarları, intraoküler lensler, yapay kornealar ve yapay kateterler gibi aletlerin modifikasyonunu içeren sayısız örnek

mevcuttur. Pek çok medikal alet firmaları, yüzey mühendisliği uygulanmış biyomateryallerin önemini kavramıştır. Kazançlı bir pazardır fakat, yüzey mühendisliği henüz bütün potansiyeline ulaşmamıştır. Biyomedikal pazarı, 50 milyar ABD Dolarını aşmıştır (49,50).

Biyoprotezlerin yüzeylerine biyolojik makromoleküllerin (albumin, heparin, fibronektin ve endotelyal hücre) aşılması ile protez olarak kullanılan biyomateryallerin kan uyumluluğunun arttığı ve savunma sistemini harekete geçirmedeği bildirilmiştir (3,6).

Son yapılan araştırmalar, kanla doğrudan temas için geliştirilen biyomateryallerin yüzeyine, heparin ve/veya albumin gibi biyolojik makromoleküllerin yeni yüzey modifikasyon yöntemleri ile aşılmasını kapsamaktadır (50-53).

Bu çalışmalara örnek olarak, stiren-bütadien-stiren (SBS) kopolimerinin kan uyumluluğunu artırmak için dimetilaminoetilmetakrilat (DMAEMA) ve/veya vinilpiridin (VP), SBS membranı yüzeyine aşılmasıdır. Bu araştırmada, modifiye edilen SBS membranlarının, kan uyumlulukları, Lee-White pıhtılaşma testi ile belirlenmiştir (53). Bu çalışmada, SBS-g-VP kopolimer membranında yer değiştiren piridin grupları iyodometan ile kuartinize edilmiş ve daha sonra heparin SBS-g-VP membranına tutuklanarak, SBS-g-VP-HEP kopolimer membranı elde edilmiştir. SBS-g-VP-HEP membranının, heparin içeriği, toluidin blue yöntemi ile belirlenmiştir. Farklı miktarlarda aşılama ve heparin içeriğine sahip, kuru ve ıslak SBS-g-VP ve SBS-g-VP-HEP membranlarının temas açısı incelenmiştir. Temas açısı verileri ve Kaelble denklemi kullanılarak, SBS-g-VP ve SBS-g-VP-HEP

membranlarının yüzey enerjileri saptanmıştır. Aşılama miktarı ve heparin içeriğinin, SBS-g-VP ve SBS-g-VP-HEP membranlarının biyouyumluluğuna etkisini belirlemek üzere, fibrinojen ve albumin protein adsorpsiyonu çalışılmıştır.

Biyomateryal olarak kullanılan polisülfon (PS), yeterli mekanik güce sahip olmasının yanında ısıya ve kimyasal ajanlara karşı da dayanıklıdır. Bu özelliklerinden dolayı, biyomedikal uygulamalarda kullanılan önemli bir polimerik biyomateryaldir. Özellikle PS hollow fiber membranları, düşükten orta büyüklükteki protein moleküllerinin geçişine ve yüksek akış diyaliz terapisine izin veren, diyaliz cihazlarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna rağmen, PS membranlarının kan uyumluluğu yetersizdir ve hemodiyalizde antikoagülant (heparin) enjeksiyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Ishihara ve arkadaşları (54) polisülfon membranlarının kan uyumluluğunu artırmak için, PS'nin yüzeyini fosfolipid karışımı ile modifiye etmişlerdir.

Baumann ve Kokott (55), PS'nin yüzeyine heparinin kovalent olarak bağlanması için karboksilik asit grupları oluşturulmasında altı farklı aktivasyon yöntemi kullanmışlardır. Higuchi ve arkadaşları (56), kan proteinlerinin PS membranların yüzeyine adsorplanmasını engellemek için propan ile PS'nin yüzeyini modifiye etmişlerdir. Polisülfon membranlarla yapılan diğer çalışmalarda, membranların yüzeyi UV, γ -ışını veya plazma ile aktive edildikten sonra akrilik asit (AAc), akrilamid (AAM), metil akrilat (MA), 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) gibi fonksiyonel gruplar içeren monomerlerle yüzeye aşı yapılmış ve sonrasında heparin yüzeye kovalent olarak bağlanmıştır (57).

Chen ve arkadaşları (1999) poliüretandan mikroporoz yapıda vasküler protez hazırlamışlar ve hazırlanan yapının morfolojik ve mekanik özelliklerini çalışmışlardır (58). Brothers ve arkadaşları (1990) faz ayırım yöntemi ile poroz yapıda vasküler protez hazırlamışlar ve polimerin karakterizasyonunu yapmışlardır (59).

Dalton ve Shoichet (2001) pHEMA'dan santrifüj kuvveti kullanarak pHEMA tüp hazırlamışlar elde edilen yapının vasküler protez ve yumuşak doku uygulamalarında kullanım olasılığını bildirmişlerdir (9).

Bos ve arkadaşları (1999) plazma polimerizasyonu ile işlem görmüş polistiren vasküler protez üzerine albumin, heparin ve fibroblast büyüme faktörü bağlamışlar ve in vitro olarak endotel hücre kültürü çalışmışlardır (26).

Duncan ve arkadaşları (2001) pHEMA filmleri üzerine heparin tutuklanmış kalp kapağı hazırlamış ve tutuklanmış heparinin antitrombojenik etkisini incelemişlerdir (60).

Christensen ve arkadaşları (2001) vasküler protez olarak hazırlanan stent yüzeyine heparin aşılamışlar ve tutuklanmış heparinin plateletler ve komplement aktivasyon sistemine etkisini incelemişlerdir (61).

Chandy ve arkadaşları, argon plazma uygulanmış PTFE (Teflon) ve polietilenteraftalata (Dacron), kollagen IV ve laminin aşılansarak modifiye edilmiş ve PGE₁, heparin ya da fosfatidil kolin gibi biyoaktif moleküllerin, karbodiimid fonksiyonelliğiyle devam eden immobilizasyonu, bir seri yüzey kaplaması hazırlamışlardır (62). Çalışma, kollagen-lamininle modifiye edilmiş

biyomateryaller üzerine, biyomoleküllerin tutuklanması yoluyla, yüzeyin sebep olduğu trombusu kontrol etmenin, mümkün olduğunu önermektedir.

Kanla temas eden protezlerde endotelial hücre ekimini geliştirmek için kullanılan, yüzey modifikasyon metotları, fibronektin, laminin, kollagen ve peptidlerin tutuklanmasını içerir. Endotelial hücrelerin küçük çaplı vasküler biyoprotezlere aşılması materyalin kan uyumluluğunu artırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı biyomateryal olarak seçilecek sentetik polimerik yapının hidrofilitesi, yüzeyinin kimyasal yapısı ve denge su içeriği protez uygulamalarının başarısını belirlemede önem kazanmaktadır (21).

Endotelial hücreler, prostasiklin (PGI_2) (63), doku plazminojen aktivatörü (t-PA) (64) ve trombomodulin (65) gibi antitrombojenik materyaller üreterek, antitrombojenik bir yüzey sunar. Bundan dolayı, endotelial hücrelerle, sentetik vasküler aşının iç yüzeyinin astarlanması, umut verici bir tekniktir (66).

Vasküler aşılarda, kültüre edilmiş endotelial hücrelerde, bir antitrombojenik fonksiyonun oluşumu, anahtar konudur. Endotelializasyonla, vasküler pıhtılaşma yolu (intrinsik yol, kontak aktivasyon yolu) ve doku faktörü yolu (ekstrinsik yol), yüzey tarafından aktive edilmez (67). Yapılan bir çalışmada (68), cam yüzeyle temas eden platelet içermeyen plazma (PFP) ve tam kanın kolayca koagüle olduğu gösterilmiştir. Cam, faktör XII (Hageman faktörü) için etkili bir aktivatör oluşturur ve faktör XII'nin aktive edilmesiyle vasküler koagülasyon reaksiyonu gelişir (69).

Kardiyovasküler biyoprotez uygulamalarında en önemli sorunlardan birisi de kireçlenmedir. Biyoprotezlerin kireçlenmesinin önlenmesi için, çeşitli yöntemler denenmiştir. Biyoprotez kapak yaprakçıklarının kireçlenmesini önleyen ajanlar, aort duvarı kireçlenmesini eşit derecede önleyememektedir (70).

Bifosfatların kontrollü salınımı ve demir klorür veya alüminyum klorür uygulamaları, yetişkin sıçanlara yerleştirilmiş, glutaraldehit çapraz bağlı allograft, aort duvarının kireçlenmesini önlemektedir (71). Kardiyovasküler cerrahide, kanallı biyoprotezlerin kireçlenmemesi gerekmektedir. Genç koyunlarla yapılan bir çalışmada, glutaraldehit çapraz bağlı domuz aortik kapak biyoprotezinin kireçlenmesi, heparin bağlanması ile önlenmiştir (72).

Kan ile temas eden yapay protezler kullanıldığında; tromboembolik komplikasyonları engellemek için, heparin, kumarin gibi antikoagülant bir ajan hastaya verilmektedir. Ancak, bu antikoagülantların doğrudan ve sistematik olarak verilmesi, hastalarda kanama riskini arttırmaktadır. Bu nedenle, tıbbi cihazların sadece kanla doğrudan temas eden bölümlerinde kullanılacak, yeni kan uyumlu materyallerin geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır (73-76).

Yaygın olarak kan koagülantı olarak heparin, antitrombin III (AT III) ve inhibe edilmiş trombin kullanılmaktadır. Trombozu azaltmada etkili bir ajan olan heparin, D-glukozaminin tekrar eden ünitelerinden ve L-iduronik ya da D-glukuronik asitten oluşan değişken sülfatlanmış polisakkarit zincirlerinin bir karışımıdır. Heparin, önemli bazı sakıncalara sahip olmasına rağmen,

antikoagülant olarak yaygın bir klinik uygulama alanına sahiptir. Önemli sayıdaki hastada heparin kaynaklı trombositopenia (HIT) oluşmaktadır.

Heparin, trombozu azaltma özelliğine sahip doğal bir heteropolisakkarittir. Heparinin, antikoagülant aktivitesi, çeşitli kan pıhtılaşma faktörleri ile güçlü kompleks oluşturma özelliğine dayanmaktadır ve böylece bu faktörlerin aktivitesi nötralize olmaktadır. Örneğin heparin, antitrombin III (AT III)'ün etkisini artırır, trombin, fibrinojen, protrombin ve IX-XII faktörleri ile etkileşimde bulunmaktadır.

Heparinin polimerlerin yüzeylerine aşılıdıktan sonra da antikoagülant aktivitesini koruduğu yapılan çalışmalar sonucu bildirilmiştir. Kim ve arkadaşları (77-79), poliüretan membran yüzeyine, hidrofilik polietilenoksit uzatıcı kolu kullanarak, heparin tutuklamışlardır. Bu yolla elde edilen biyomateryalin kan uyumluluk özelliğinde artış sağlanmıştır.

Heparin-polivinilalkol ve heparin içermeyen polivinilalkol hidrojelleri ile trombin adsorpsiyonu çalışılmış ve heparin-PVA hidrojelleri kullanıldığında trombin-antitrombin III (AT III) kompleksinin oluştuğu ve trombinin, AT III tarafından inaktive edildiği tespit edilmiştir (80-81).

Heparin, sıklıkla kullanılan bir antikoagülanttır, tek tip, düzgün moleküler yapıya sahip olmayan, anyonik, yüksek derecede sülfatlanmış, bir mukopolisakkarittir. Çok sayıda araştırmacı, biyomateryallerin yüzeyine heparin bağlanması için yeni metotlar geliştirmişlerdir.

Genel olarak, heparin içeren materyaller iki temel gruptadır:

1. *Heparinin biyomateryale matriks içi tutuklama yöntemi ile tutuklanması:*

Heparin, uygulamaya bağlı olarak, biyolojik olarak kararlı ya da parçalanabilen, polimerik materyalin içerisine tutuklanır. Heparin, kan-materyal ara yüzeyinden sürekli olarak salınarak, kanın biyomateryalle temas alanında, koagülasyonu engellenir. Bu tür sistemlerde, biyomateryalin verimliliği, heparinin salınım süresine bağlıdır. Bu sistemlerin temel olumsuzluğu, biyomateryalin kan ile teması sırasında, heparinin kısa sürede salınması ve biyomateryalin antitrombotik özelliğini bu sürenin sonunda kaybetmesidir.

2. *Heparinin biyomateryallerin yüzeyine tutuklanması:*

Antitrombin III ile kompleks yapabilen ve antikoagülant etkisini biyomateryalin yüzeyinde gösteren heparin tabakasına sahip biyomateryaller bu kategoride yer alırlar. Yüzeyine heparin tutuklanmış biyomateryaller iki ana kategoridedir:

a. Heparinin biyomateryal yüzeyine adsorpsiyonu, heparin molekülünün anyonik grupları ile (COO^- , SO_4^{-2} , NHSO_3^{-1}) biyomateryal yüzeyinde oluşturulan katyonik gruplar arasında kurulan iyonik bağlarla gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemle antikoagülant aktiviteye sahip biyomateryal hazırlamanın başlıca sakıncaları, iyonik grupların biyomateryalin yüzeyinde oluşturulması için biyomateryalin modifikasyonu ve materyalin renginin bozulmasıdır. Bu yolla aynı özellikte tek tip, antitrombojenik özellikte biyomateryal elde edilmesinin zor olmasının yanında, kullanım süresi içerisinde, heparinin adsorplanan yüzeyden

desorpsiyonu sonucu biyomateryalin kan uyumluluğu da azalmakta ya da kaybolmaktadır.

b. Yüzeyine kovalent heparin bağlı biyomateryaller, heparinin hidroksil, karboksil veya amino gruplarını kullanarak önceden yüzeyi aktive edilmiş biyomateryallerin yüzeyine tutuklanması ile elde edilir.

Dolaşım sistemine uygulanan sentetik yapay protezlerden başarılı sonuçlar alabilmek için protezlerin biyolojik uyumluluklarını artırmak gerekmektedir. Tez çalışması kapsamında, bu konu büyük bir önem arz etmektedir. Bu çalışmanın başlıca amacı, biyolojik olarak uyumlu olan poli(hidroksietilmetakrilat) pHEMA, hidrojel kökenli dolaşım sisteminde kullanılabilir bir biyomateryal geliştirmektir. pHEMA hidroجلي, çok sayıda kanla doğrudan temas eden yumuşak doku protezlerinde (kalp kapakçığı dahil) ve biyoteknolojik alanda kullanılmıştır (61,82-86).

pHEMA'nın biyolojik uyumluluğunu artırmak için hidrojel matriks içerisine, insan serum albumininin, matriks içi tutuklama yöntemiyle yerleştirilmesi düşünöldü. pHEMA ve pHEMA-AL biyomateryallerinin yüzeyinde, trombus oluşumunu ve kalsifikasyonu önlemek için, düşük moleköl ağırlıklı heparin, karbodiimid aktivasyonundan sonra yüzeye kovalent olarak bağlandı. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapısındaki polimerlerin kan uyumluluk deneyleri, yüzey özellikleri detaylı olarak çalışıldı. Polimerlerin, taramalı elektron mikroskobu analizleri, mekanik özellikleri, kan proteinleri ile etkileşimleri sulu ortamlarda ve insan serumunda incelendi. Ayrıca, biyomateryalin kan proteinleri ile etkileşimi, proteinlerinin derişimi ve pH'nın etkisi gibi faktörler göz önünde bulundurularak sürekli

sistemde çalışıldı. Adsorplanan kan serum proteinlerinin miktarsal analizleri yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) yardımı ile belirlendi. Biyomateryallerin hemolitik aktiviteleri ve kan hücrelerinin yapışması deneyleri ayrıntılı olarak incelendi.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyaller

Albumin, fibrinojen, γ -globulin ve düşük molekül ağırlıklı heparin Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD)'den elde edildi. 2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA) ve α - α -azoizobutironitril (AIBN), Fluka AG (İsviçre)'den sağlandı. Glutaraldehit Sigma Chem. Co.'dan sağlandı. 1.1'-karbonildiimidazol (CDI) ve analitik derece saflıktaki diğer kimyasallar Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi.

2.2. pHEMA-AL kökenli biyomateryallerin hazırlanması

Poli(2-hidroksietilmetakrilat) pHEMA bazlı biyomateryallerin sentezi için, 40 mg azoizobutironitril (AIBN), 4 ml, 2-HEMA (2-hidroksietilmetakrilat) monomeri içinde çözüldü ve 6 ml, pH 7.4, 50 mM fosfat tamponu ile karıştırıldı. Polimerizasyon karışımına (0-5 mg/ml) olacak şekilde, insan serum albumini (HSA) ilave edildi. Polimerizasyon çözeltisinin dengeye gelmesi için, su banyosu içerisinde, 25°C'de, 30 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda hazırlanan çözeltinin içerisinde, 5 dakika süre ile azot gazı geçirildi ve iç içe geçmiş silindir şeklindeki cam kalıplara aktarıldı. Polimerizasyon çözeltisinin silindirik cam kalıplara aktarıldıktan sonra, açık olan üst kısım, O şeklindeki halkalı conta ile kapatıldı ve etüv içerisinde yerleştirilerek, 35°C'de, UV radyasyonu altında, polimerizasyonun tamamlanması sağlandı. Bu

yöntemle, iç çapı 6 mm ve uzunluğu 10 cm olan, pHEMA ve pHEMA-AL-1-5 tüpleri elde edildi.

Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, sentezlenen tüpler, kalıptan çıkarılarak, önce damıtık su ile sonra da fosfat tamponu (50 mM, pH 7.4) içerisinde, polimerizasyon atıklarından arındırmak için, sonikatörlü banyo içerisinde, 15'er dakika, üçer kere, 30°C'de, yıkandı. pHEMA ve pHEMA-AL-1-6 tüpleri, fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içerisinde, kullanılıncaya kadar, 4°C'de muhafaza edildi.

2.3. pHEMA-AL vasküler protezi yüzeyine heparin tutuklanması (pHEMA-AL-HEP)

Alkali ortamda pHEMA ve pHEMA-AL'nin yapısında bulunan fonksiyonel hidroksil grupları, 1,1'-karbonildiimidazol (CDI) ile aktive edildi. Aktivasyon için, 0,1 M pH 8.0, fosfat tamponu içinde, 2 mg/ml CDI (1,1'-karbonildiimidazol) çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan biyomateryal CDI çözeltisi içerisinde 25°C'de 24 saat süre inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, biyomateryal çözeltiden çıkarılarak fosfat tamponuyla yıkandı. Aktive edilmiş pHEMA-AL yapısının yüzeyine, heparin kovalent olarak bağlandı.

Reaksiyon ortamındaki heparinin konsantrasyonu 1-4 mg/ml arasında olacak şekilde fosfat tamponu (pH 8.0, 0.1 M, 20 ml) içerisinde hazırlandı. Aynı tampon çözeltisi içerisinde dengeye getirilmiş olan pHEMA-AL tüpleri (0,5 cm boyunda kesilerek), heparin içeren ortama aktarıldı ve hazırlanan çözelti kapalı bir reaktör içerisinde 22°C'de 24 saat süre manyetik olarak karıştırılarak inkübe edildi. Bu reaksiyon sonunda heparin tutuklanmış,

pHEMA-AL-HEP tüpleri birkaç kez damıtık su ve son olarak ta fosfat tamponu ile sonikatörlü banyo içerisinde yıkandı.

2.4. Polimerik Yapay Tüplerin Karakterizasyon Çalışmaları

2.4.1. Heparin Miktarının Tayini

pHEMA-HEP ve pHEMA-AL-HEP tüplerine bağlanan heparin miktarları, toluidin mavisi metodu kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (92). Bu yöntem, toluidin mavisi'ne bağlanan heparin miktarını kolorimetrik olarak belirlemek için kullanılmaktadır.

Metot, biyomateryal üzerindeki heparin üzerine bağlanan, toluidin mavisinin, süpernatanttaki azalmasının belirlenmesini içerir ve bu yolla tutuklu heparinin direkt olarak miktarının belirlenmesi sağlanır. Standart eğrisi elde etmek için, 250-1000 µg/ml konsantrasyonlarında, 2 ml heparin çözeltisi hazırlandı. Maksimum absorpsiyon dalga boyu 631 nm olarak belirlendi. Her deney için, 3 ml toluidin mavisi çözeltisi (25 mg toluidin mavisi, %0.2 NaCl içeren, 500 ml 0.01 N HCl içinde çözüldü) eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımı ile 30 dakika süre ile karıştırıldı. Bu sürenin sonunda, 3 ml *n*-hekzan çözeltilere ilave edilerek karıştırıldı ve faz ayırımına izin verildi. Oluşan heparin/toluidin mavisi kompleksi, *n*-hekzan fazı içerisine alındı ve konsantrasyonu spektrofotometre ile belirlendi. Bağlanan heparin miktarı hesaplandı aşağıda verildiği gibi hesaplandı.

$$\text{Heparin miktarı } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = (C_b - C_s) / A \quad (1)$$

Burada, A; polimerin yüzey alanı, C_b ve C_s ise sırasıyla, heparinin çözeltideki başlangıç ve sonuç konsantrasyonlarıdır.

2.4.2. FTIR Spektra

pHEMA, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapılarının FTIR spektrumları FTIR spektroskopi (Mattson 1000 FTIR, İngiltere) kullanılarak elde edildi. Tabletler 0.1 g kuru polimer parçası ve 0.1 g KBr karıştırılarak elde edildi ve spektrumları alındı.

2.4.3. Taramalı Elektron Mikroskop Çalışmaları

Kurutulan pHEMA, pHEMA-AL, pHEMA-AL-HEP membranları, azaltılmış basınç altında, ince film altınla kaplandı ve taramalı elektron mikroskopları, JEOL (JSM 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

2.4.4. Biyomateryal Yapıların Denge Su İçerikleri

pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapılarının denge su içerikleri %0.85, NaCl içeren, 50 mM pH 7,4 fosfat tamponunda, oda sıcaklığında gravimetrik yolla tayin edildi. pHEMA kökenli tüplerin denge su içerikleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Denge su içeriği (\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (2)$$

Burada W_s ve W_d sırasıyla, pHEMA, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP polimerik yapıların kuru ve denge su içeriğine ulaşmış ağırlıklarını ifade etmektedir.

2.4.5. Yüzey Temas Açılarının Ölçülmesi ve Yüzey Enerjisinin Hesaplanması

pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP polimerleri, membran formunda sentezlenerek, vakum etüvünde, -600 mmHg'da, 35°C'de kurutuldu ve termostatlı ütü ile düzgün yüzeyler elde edildi. Kuru örneklere, beş farklı test sıvısı (su, gliserol, etilen glikol, dimetilsülfoksit ve diiyodometan) damlatılarak, temas açısı değerleri, durgun damla metoduyla, 25°C'de, bir dijital optik temas açısı ölçer cihazı CAM 200 (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finlandiya) kullanılarak belirlendi.

Polimerler yüzeyinde, manuel bir mikro şırınga kullanılarak yukarıdan sıvının doldurulmasıyla bir damla oluşturuldu. Sağ ve sol temas açıları ve damla boyut parametreleri dijital görüntüden, otomatik olarak hesaplandı. Her damlanın, iki kenarı, substrat ve sıvı arasında yapılan ilk temas anından başlayarak, 5 saniye aralıklarla zamanın bir fonksiyonu olarak ölçüldü. Üç polimer örneği üzerinde alınan, en az 15 temas açısının ortalaması alındı.

Polimerik yapıların serbest yüzey enerjisi parametreleri, araştırılan sıvıların temas açıları kullanılarak hesaplandı. Temas açısı verilerinden

yüzey enerjisinin belirlenmesinde, en yaygın olarak kullanılan, dört yöntem uygulandı:

- a- Zisman kritik yüzey gerilimi (87),
- b- Fowkes geometrik ifadesi (88),
- c- Wu harmonik ifadesi (89) ve
- d- Van Oss asit-bazı (90).

Katı bir yüzeyin bir sıvıyla ıslatılması ve temas açısı (θ) kavramı, ilk olarak Young tarafından formüle edildi (21),

$$\gamma_l \cos \theta = \gamma_s - \gamma_{sl} \quad (3)$$

Burada γ_l sıvının yüzey enerjisi, γ_{sl} katı/sıvı arayüzeyinin arayüzey enerjisi ve γ_s katının yüzey enerjisidir.

(a) Kritik yüzey gerilimi (Zisman Yöntemi) : Kritik yüzey gerilimini (γ) belirlemek için, Zisman tarafından geliştirilen, ampirik bir yöntemdir. Bu yöntemde, farklı sıvıların temas açısının θ kosinüsü ölçülür ve eşitlik 3'e göre sıvıların yüzey gerilimine karşı grafiğe geçirilir.

$$\cos \theta = 1 - b (\gamma_l - \gamma_s) \quad (4)$$

Burada b , regresyon çizgisinin eğimidir.

Verilerin, verilen γ değerinde, $\cos \theta = 1$ 'e yaklaşan bir doğru verdiği bulundu. Bu çoğunlukla, bir sıvının, katı yüzeyini tamamen ıslatan, en yüksek yüzey gerilimi değeri olarak tanımlanır. Bu teorik "sıvı" yüzey gerilimi, γ 'ya eşittir ve katının yüzeyini karakterize etmek için kullanılır.

(b) Geometrik ifade (Fowkes yöntemi): Bu yaklaşım yüzey enerjisini dispersif ve polar olarak, iki bileşene böler ve bunların katkılarının birleştirilmesi için geometrik bir yaklaşım kullanır. Young eşitliği ile birleştirildiğinde, sonuç eşitlik şu şekildedir:

$$\gamma_l (1 + \cos \theta) = 2 [(\gamma_l^p \gamma_s^p)^{1/2} + (\gamma_l^d \gamma_s^d)^{1/2}] \quad (5)$$

Burada, θ temas açısıdır, γ_l ve γ_s sırasıyla, sıvı ve katı yüzey gerilimi ya da serbest yüzey enerjisidir. Üst indisteki d ve p ekleri, her birinin dispersif ve polar bileşenlerini göstermektedir. Katı yüzey geriliminin bileşenleri, Owens ve Wendt'e göre, $(\gamma_l^p)^{1/2} / (\gamma_l^d)^{1/2}$ 'ne karşı $\gamma_l (1 + \cos \theta) / (\gamma_l^d)^{1/2}$ grafiğinden elde edilebilir, $(\gamma_s^p)^{1/2}$ değeri eğimden, $(\gamma_s^d)^{1/2}$ değeri de kaymadan elde edilebilir.

Toplam serbest enerji (γ_s), iki bileşen kuvvetinin toplamıdır.

$$[\gamma_s = (\gamma_s^d + \gamma_s^p)] \quad (6)$$

(c) Harmonik ifade (Wu yöntemi) : Bu yöntem benzer bir yaklaşım kullanır fakat dispersif ve polar katkıların toplamı için harmonik bir ifade eşitliği kullanır. γ^d ve γ^p değerleri bilinen iki sıvı için temas açıları ölçülür. Her bir deneyin değeri, aşağıdaki eşitlikte yerine konur.

$$\gamma_l (1 + \cos \theta) = 4 [(\gamma_l^d - \gamma_s^d) / (\gamma_l^d + \gamma_s^d) + (\gamma_l^p - \gamma_s^p) / (\gamma_l^p + \gamma_s^p)] \quad (7)$$

Yüzey polaritesi şu şekilde verilir:

$$X^p = \gamma_s^p / \gamma_s \quad (8)$$

(d) Asit-baz (van Oss yöntemi) : Bu yöntemde, γ^d , γ^+ ve γ^- değerleri bilinen en az üç sıvı için temas açısı ölçülür ve üst indisler (d), (+) ve (-)

sırasıyla, dispersif, Lewis asit ve baz bileşenlerini ifade eder. Her deneyin değerleri, aşağıdaki eşitlikte yerine konur.

$$(1 + \cos \theta) \gamma_l = 2 [(\gamma_s^{LW} \times \gamma_l^{LW})^{1/2} + (\gamma_s^+ \times \gamma_l^-)^{1/2} + (\gamma_s^- \times \gamma_l^+)^{1/2}] \quad (9)$$

Toplam yüzey enerjisi γ_s Lifshitz- van der Walls ve Lewis asit ve baz bileşenlerinin toplamı olarak verilir.

$$\gamma_s = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad (10)$$

Burada, γ_s^{LW} , uzun aralıklı etkileşimleri gösteren (dispersif etkileşim, dipol-dipol etkileşim ve dipol-indüklenmiş dipol etkileşimini içerir, dispersiyon baskın durumdadır) Lifshitz-van der Walls etkileşimini belirtir, DIM ile temas açısının ölçülmesinden hesaplanmıştır ve γ_s^{AB} , hidrojen bağları gibi asit-baz etkileşimlerini belirtir ve γ^+ ve γ^- sırasıyla, proton ve elektron veren karakteri göstermektedir (85).

2.4.6. Mekanik Özellikler

pHEMA, pHEMA-AL yapılarının mekanik özellikleri membran formları hazırlanarak belirlendi. Gerilme ve kopma deneyleri Lloyd Instrument Mekanik test cihazı LS-500 kullanılarak çalışıldı.

2.5. Biyomateryal Üzerine Serum Proteinlerinin Adsorpsiyonu

2.5.1. Kesikli Sistem Deneyleri

Kan serum proteinlerinin pHEMA-AL-HEP yapısı ile etkileşimleri çalışmalarında kan serumu kullanıldı. Çalışmalarda kullanılmak üzere, taze

kan örnekleri, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesinden günlük olarak temin edildi. Kan örneklerinden, kan hücreleri, 3000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilerek ayrıştırıldı. pHEMA-AL-HEP polimerik yapısından 3 adet 0.5 cm uzunluğunda parça kesilerek, 1/5 oranında fosfat tamponunda seyreltilmiş kan serumu içerisine aktarıldı (7.5 ml, 50 mM, pH 7.4) ve 37°C'de 120 dakika manyetik karıştırmalı hücrelerde kan serumu ile temasları sağlandı. Adsorpsiyondan önce ve sonra, serum örnekleri alınarak HPLC ile analiz edildi.

2.5.2. Sürekli Sistem Deneyleri

Bu çalışmada, taze kan serumu kullanıldı. Serum, kanın 3000 devir/dakikada 20 dakika santrifüjlenmesi sonucu elde edildi. Çalışmada kullanılan biyomateryalin iç çapı 6 mm, uzunluğu 10 cm olarak hazırlandı. Her iki uç kısmına silikon tüp eklenerek, bir peristaltik pompa ile irtibatı sağlandı. Biyomateryal bölümü, pHEMA-AL-HEP polimerik yapısı % 0.85 NaCl içeren bir beher içerisine yerleştirilerek ve su banyosunda 37°C'de inkübe edildi.

Peristaltik pompanın akış hızı 40 ml/dakika olarak ayarlanarak ve 1/5 oranında seyreltilmiş serum hazırlanan sistem içerisinden 72 saat süre ile sirküle edildi. Bu süre sonunda örnek alınarak, kan proteinlerinin miktarları HPLC yardımı ile belirlendi. 24 saat süre sonunda biyomateryal sistemden uzaklaştırılarak, % 0.85 NaCl çözeltisi ile yıkandı ve tekrar kullanılıncaya kadar aynı çözelti içerisinde 4°C'de saklandı. Bu işlem aynı biyomateryal örneği ile beş kez tekrarlandı.

Bu sürenin sonunda % 2 glutaraldehit ile yüzeye adsorplanan plateletlerin sabitlenmesi sağlandı ve alınan kesitler 40°C'de vakum etüvünde kurutularak, taramalı elektron mikroskobu ile incelendi.

2.5.3. HPLC Analizi

Çalışmadaki HPLC analizleri, bir Dionex HPLC sistemi (Dionex Co., Germering, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. HPLC sistemini oluşturan üniteler;

a) Dionex Pompa serisi P580A LPG (düşük basınç gradiyent pompası),

b) Dionex UV/vis diyot-dizi dedektörü 340 S, otomatik dört dalga boyunda tayin,

c) Dionex otomatik örnek enjeksiyon ünitesi ASI-100,

d) Dionex kolon fırını STH 585 ve bütün sistem CHROMELLEON veri programı ile Windows işletim sistemi altında otomatik olarak kontrol edildi. Protein karışımının ayrıştırılmasında kullanılan kolon, Discovery BIO Wide Pore C5 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolonudur.

Proteinlerin ayrıştırılmasında, taşıyıcı faz olarak A hattında, % 75 ultra saf su ve %25 asetonitril içerisinde % 0.1 trifluorik asit (TFA) ve B hattında ise, % 25 ultra saf su ve %75 asetonitril içerisinde % 0.1 oranında TFA kullanıldı. B hattı taşıyıcı fazı oranı, 25 dakikada % 0'dan, % 100'e yükseltildi. Hareketli fazın akış hızı 1.0 ml/dakika olarak belirlendi. Kolon fırın sıcaklığı 30°C'ye ayarlandı. Her örnekten 10µl enjekte edildi. Kolondan ayrılan proteinlerin konsantrasyonu, UV/VIS Diyot-dizi dedektörü ile 220 nm'de tayin

edildi. Her bir proteinin miktarı kalibrasyon eğrilerinden CHROMELLEON veri programı kullanılarak hesaplandı.

2.6. Kan Uyumluluk Çalışmaları

2.6.1. PT ve aPTT Zamanı Testi

pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapısındaki polimerler, 0,5 cm boyunda kesilerek, %0,85 NaCl çözeltisi içinde dengeye getirildi. Sağlıklı bir bireyden alınan venöz kan örneği, 1/9 oranında olacak şekilde, sodyum sitratla karıştırıldı ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek, plazması elde edildi. Sodyum sitratlı plazmadan, 300 µl alınarak, polimer tüpleriyle temas ettirildi ve 1 saat inkübe edildi. Kontrol olarak, polimerlerle temas etmemiş plazma kullanıldı.

PT zamanı tayini için, inkübe edilen tüm plazma örneklerinden, 25 µl inkübasyon tüplerine alındı ve üzerine, 50 µl PT-S reaktifi eklendi. (PT-S reaktifi, TECO Gmbh, Lot No. 221-207, TEClot PT-S Protrombin Time Test). İnkübasyon tüpleri, 37°C'ye ısıtıldı ve pıhtılaşma süresi, otomatik olarak PT ölçüm cihazıyla, saniye olarak belirlendi.

aPTT testi için, örneklerle inkübe edilen plazmadan, 25 µl alındı, inkübasyon tüplerine kondu, üzerine 25 µl aPTT reaktifi eklendi. (aPTT reaktifi, TECO, TECLOT-APTT-P, Lot no. 320PO4). Tüpler, 5 dakika boyunca, 37°C'de ısıtıldı. Tüplere, 0,0025 M kalsiyum klorid çözeltisi (TECO, Gmbh Lot no. 355PO1, 0,025 M Calcium chloride APTT-P Reagen)

eklenmesiyle eş zamanlı olarak, otomatik olarak PT ölçüm cihazıyla, pıhtılaşma süresi okundu.

2.6.2. Hemolitik Aktivite

pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapıları 0,5 cm boyunda kesilerek, %0.85 NaCl çözeltisi içerisinde, oda sıcaklığında, 24 saat inkübe edildi ve aynı çözeltiyle yıkandı. Daha sonra 0.5 ml oksalatlı insan kanı, 4.5 ml %0.85 NaCl çözeltisi ilave edilerek, 37°C'de 1.0 saat inkübe edilerek, bu sürenin sonunda, polimer örnekleri deney tüplerinden uzaklaştırıldı. Tüplerde kalan seyreltilmiş kan 3000 devir/dakikada 20 dakika santrifüj edildi. Serbest kalan hemoglobin miktarı UV/VIS spektrofotometreyle, 545 nm'de tayin edildi. Kontrol olarak, aynı koşullarda izotonik çözeltide inkübe edilen serbest kan kullanıldı. Distile su içerisinde inkübe edilen kandan serbest bırakılan hemoglobinin oranı %100 kabul edildi.

2.6.3. Kan Hücrelerinin Yapışması

Kan hücrelerinin pHEMA-AL-HEP polimerinin yüzeyine yapışma davranışının araştırılması için, sağlıklı vericiden alınan 5 ml EDTA'lı kan örneğinin, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Laboratuvarındaki, Roche Diagnostics/ SYSMEX XT-2000i cihazıyla, tam kan sayımı (CBC) yapıldı. pHEMA-AL-HEP polimerik yapısındaki tüp parçası, fizyolojik serum içinde dengeye getirildi. Dengeye getirilen tüp, tam kan

sayımı yapılan kan örneğine batırılarak, 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, tüp kandan uzaklaştırıldı ve tekrar tam kan sayımı yapıldı. Tam kan sayımı ile, pHEMA-AL-HEP tüpüyle, inkübasyondan sonra, eritrosit, lökosit ve platelet sayısı değişimi gözlemlendi.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. pHEMA-AL-HEP Temelli Biyomateryallerin Özellikleri

Biyomateryalin hazırlanması iki ayrı aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada, insan serum albumini, monomer karışımına, farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde eklenerek, pHEMA içerisine, matriks içi tutuklama yöntemi ile tutuklandı. Yapıdan HSA sızmasının olmadığı optimum bileşimdeki pHEMA-AL-4 polimeri ile, mekanik dayanım özellikleri ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Yüzeyde trombus oluşumunun engellenmesi ve kan uyumluluğunun artırılması amacıyla, pHEMA ve pHEMA-AL-4 yapılarının yüzeyi CDI ile aktive edilerek, yüzeyine heparin kovalent olarak bağlandı. İkinci aşamada ise, pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL-4 ve pHEMA-AL-HEP polimerik yapılarının kan ile doğrudan teması sağlanarak, kan uyumluluk analizleri gerçekleştirildi. Sürekli sistemde, 72 saat boyunca, 37°C'de, polimerik yapının serumla teması sonucu HPLC analizleriyle protein adsorpsiyonu araştırıldı.

3.1.1. pHEMA-AL-HEP yüzeyi üzerindeki heparin miktarının belirlenmesi

pHEMA ve pHEMA-AL-4 kompozisyonlarına CDI aktivasyonundan sonra heparin kovalent olarak bağlandı. Toluidin mavisi yöntemi ile yapılan değerlendirme sonucu heparinin bağlanma miktarları belirlendi. pHEMA ve pHEMA-AL-4 yapılarına, tutuklanan heparin miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi.

$$\text{Heparin miktarı } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = (C_b - C_s) / A \quad (11)$$

Burada, A; polimerin yüzey alanı, C_b ve C_s ise sırasıyla, heparinin çözeltideki başlangıç ve sonuç konsantrasyonlarıdır.

Farklı miktarlarda albumin içeren polimerlerin yüzeyine tutuklanan heparin miktarı $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 3.1'de verildi. Reaksiyon ortamında heparinin başlangıç konsantrasyonunun arttırılması sonucu, biyomateryallerin yüzeyine kovalent olarak bağlanan heparin miktarlarında bir artış olduğu gözlemlendi. pHEMA-AL-4 bileşimindeki polimer ile en yüksek heparin bağlanma değerine ulaşıldı ($80,64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Sonuçlar Şekil 3.1'de sunulmuştur.

Çizelgeden görüldüğü üzere, pHEMA yapısına albumin ilavesiyle, yapıya bağlanan heparin miktarlarında artış gözlenmektedir. Albumin eklenmesinin, polimerik yapıya, CDI aktivasyonu sırasında heparin bağlanması için, daha fazla reaktif grup oluşturduğu düşünüldü.

Reaksiyon ortamındaki heparinin, başlangıç konsantrasyonunun arttırılmasıyla, 4 mg/ml heparin konsantrasyonuna kadar, yüzeye bağlanan heparin miktarı artış göstermişti. Bu değer üzerinde doyumluğa ulaştığı ve sabit kaldığı gözlemlendi.

Yüzey alanı başına tutuklanan heparin miktarları literatürde yapılan çeşitli çalışmalarla karşılaştırıldığında, sonuçların olumlu olduğu gözlenmiştir. Michanetzis ve arkadaşları, poliakrilamit aşılınmış polilaktik asit için, en yüksek tutuklanan heparin miktarını, $98 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ olarak bulmuşlardır (6). West ve arkadaşları, PVC üzerine iyonik olarak bağlanan heparin miktarının, $0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 'den az olduğunu bildirmişlerdir (91). Baumann ve arkadaşları ise,

selüloz ve silikon üzerine uzatıcı kol ile bağlı heparin miktarının, $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mertebesinde olduğunu ve iyi bir kan uyumluluğu göstermediğini bildirmişlerdir (92).

Kreitz ve arkadaşları, poli(etilen teraftalat) yüzeyine tutuklanan heparin miktarını $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak bulmuşlardır (93). Ferruti ve arkadaşları ise (94), poli(amido-amin) aşılınmış PVC için, heparin miktarını $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olduğunu bildirmişlerdir. Garred ve arkadaşları, polietilenimin-dekstran polietilenimin sülfat aşılınmış PVC polimeri için bağlanan heparin miktarını $2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak açıklamıştır (95). PVC membranlar yüzeyine heparinin kovalent olarak bağlanmasının, heparin bağlanmayan karıştlarına göre, kan uyumluluğunu önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (91).

Marconi ve arkadaşları, adipoil klorid ve heksametilen diizosiyanat aktive edilmiş etilen-vinil alkol kopolimeri için, kovalent olarak tutuklanmış heparin miktarının $0.7-50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ arasında olduğunu bildirmişlerdir (96). Lindhout ve arkadaşları ise, poliakrilamit aşılınmış poliüretan membranlar için, bağlanan heparin miktarını $0-35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak bildirmişlerdir (97).

Heparin tabakasının antitrombojenik aktivitesinin, tutuklanan heparin miktarıyla, orantılı olduğu bildirilmiştir. Lindhout ve arkadaşları (97), biyomateryal yüzeyinin heparin içeriğini $0-35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ arasında değiştirerek, heparinin çok noktadan bağlanması ile modifiye edilmiş, poliakrilamit aşılınmış poliüretan tabakalarının, antitrombin aktivitesini çalışmışlardır.

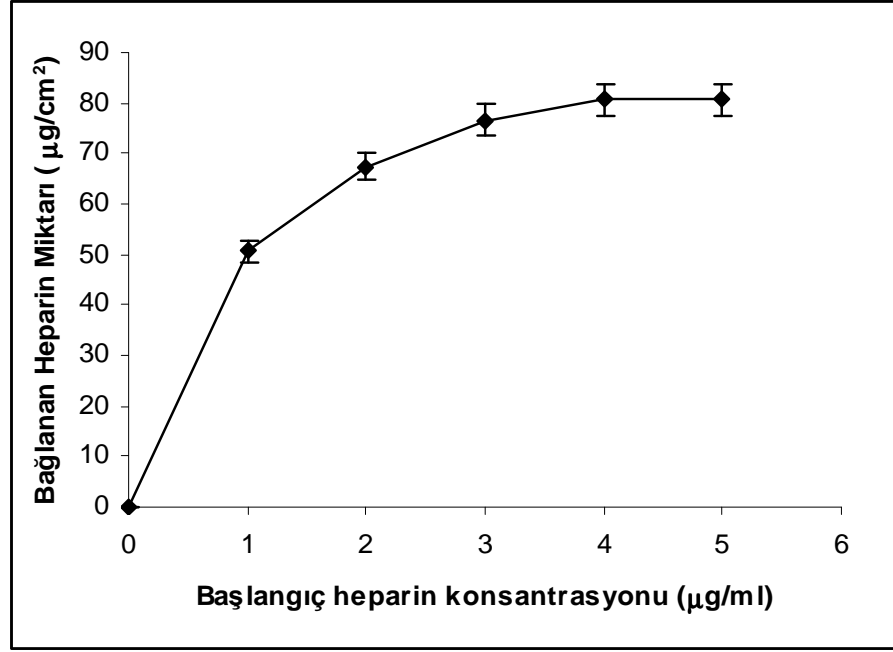
Düşük heparin içeriğinde ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 'den az) polimer yüzeyindeki trombin aktivasyonunun oranı, trombinin transfer sınırından aşağıya düşmüş ve trombin inaktivasyon oranının yüzeyin heparin içeriğiyle orantılı olduğunu

bildirmişlerdir. Moreria ve arkadaşları, biyomateryallerin kanla temas eden bütün yüzeylerinin düzgün bir şekilde heparinle kaplanmasının çok önemli olduğunu bildirmişlerdir (98). Heparinle kaplanmamış yüzeylerde koagülasyonun daha yüksek olduğu, biyomateryal yüzeyinde heparin kaplanmamış bölgelerin bulunmasının ise, platelet yapışmasına ve agregasyona yol açtığı bildirilmiştir.

Heparin tabakasının düzgün kaplanmış ya da kaplanmamış olması, materyal yüzeyine heparin molekülünün bir kısmının bağlanması, heparin molekülünün konformasyonu, heparin molekülü ve biyomateryallerin yüzeyi arasındaki adezyon kuvvetleri, heparinle kaplanan biyomateryalin kan uyumluluğunda çok önemli bir rol oynamaktadır (Li ve arkadaşları,99).

Çizelge 3.1. Polimerik yapılara tutuklanan albumin ve heparin miktarları

	Albumin miktarı (mg/ml)	Heparin miktarı ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
pHEMA	0.0	23.09 \pm 1.58
pHEMA-AL-1	1.0	41.36 \pm 4.14
pHEMA-AL-2	2.0	61.00 \pm 3.1
pHEMA-AL-3	3.0	78.58 \pm 1.04
pHEMA-AL-4	4.0	80.64 \pm 2.07

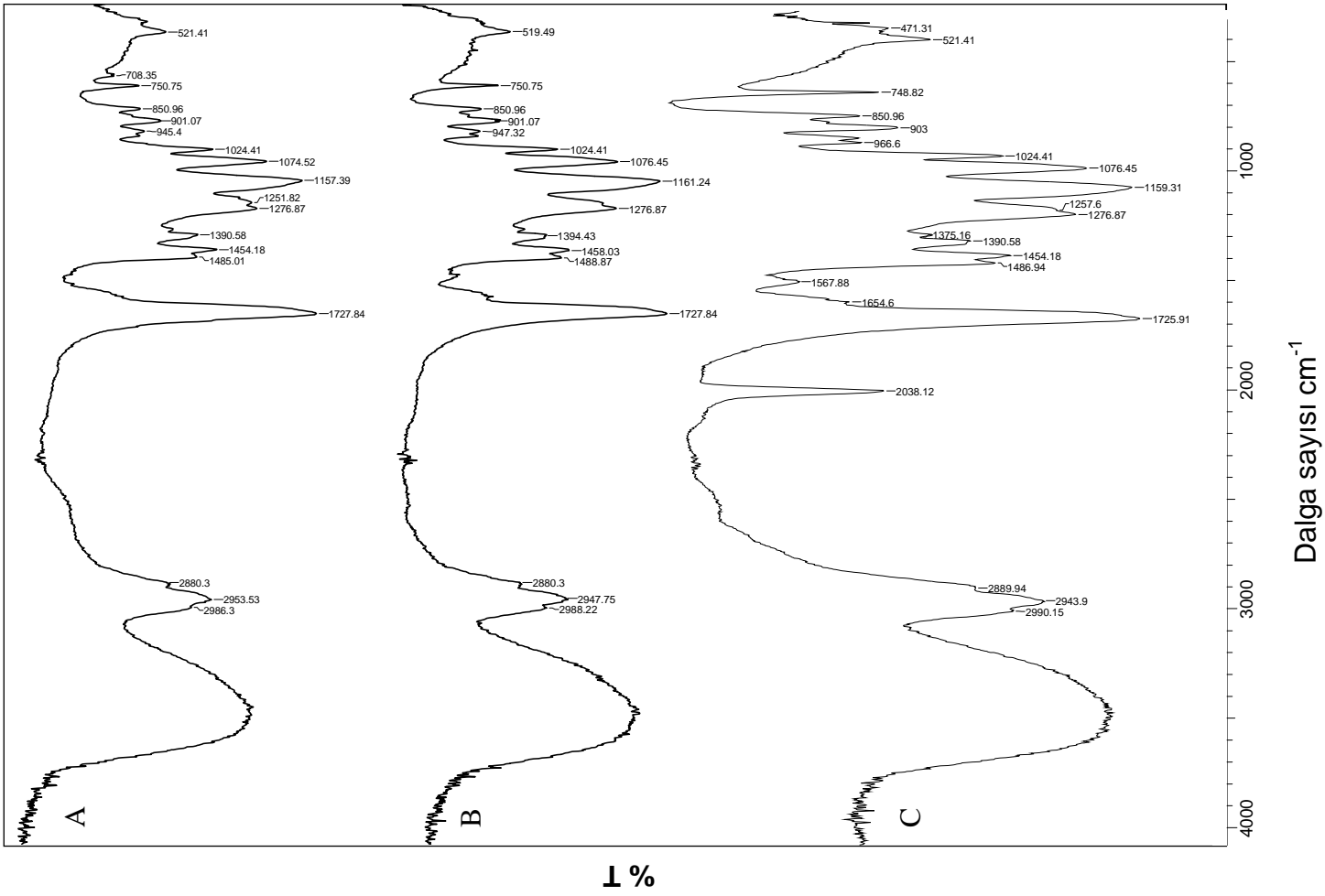


Şekil 3.1. pHEMA-AL-4 yapısına bağlanan heparin miktarına başlangıç heparin konsantrasyonunun etkisi

3.1.2. FTIR Spektra

pHEMA, pHEMA-AL-4 ve pHEMA-AL-HEP polimerik yapılarının FTIR spektrası elde edildi ve Şekil 3.2.'de sunuldu. pHEMA-AL-4 ve pHEMA polimerinin FTIR spektrumunda, 3350 cm^{-1} 'de $-\text{OH}$ grubundan dolayı gerilim titreşim bandı ve $-\text{OH}$ grubunun 2950 cm^{-1} 'deki alifatik gerilim bandı görülmektedir. HSA içermeyen pHEMA örneğinin FTIR spektrumunda, amid ve amin bölgesinde ($1700\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$) herhangi bir pik görülmemiştir, fakat, HSA içeren pHEMA-AL-4 yapısının bu bölgesinde, 1654 ve 1569 cm^{-1} 'de iki küçük pik görülmüştür. Bu pikler, primer amin, NH titreşimini ($1650\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$) yansıtmaktadır ve albuminin pHEMA yapısına dahil olduğunu

göstermektedir. pHEMA-AL-HEP polimerinin FTIR spektrumunda, pHEMA ve pHEMA-AL polimerlerinde görülmeyen, 2038 cm^{-1} 'de, bir pik bulunmaktadır. Bu pik, heparinin yapısındaki sülfamat gruplarından kaynaklanmaktadır ve heparinin yapıya bağlandığını göstermektedir.



Şekil 3.2. A) pHEMA, B) pHEMA-AL-4, C) pHEMA-AL-HEP yapılarının FTIR Spektrumu

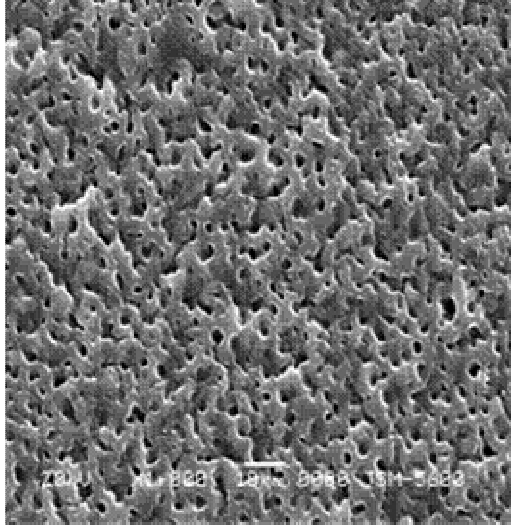
3.1.3. Taramalı Elektron Mikroskobu

pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapılarının taramalı elektron mikroskobu görüntüleri elde edilerek, polimerlerin mikroyapısı incelendi. SEM mikrograflarında, pHEMA yüzeyinin, gözenekli bir yapıda olduğu görüldü (Şekil 3.3. A). Şekil 3.3. B'de, pHEMA materyalinin, kanla temasından sonraki SEM mikrografı verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere, kan hücreleri ve plateletler, polimer yüzeyine yapışmıştır.

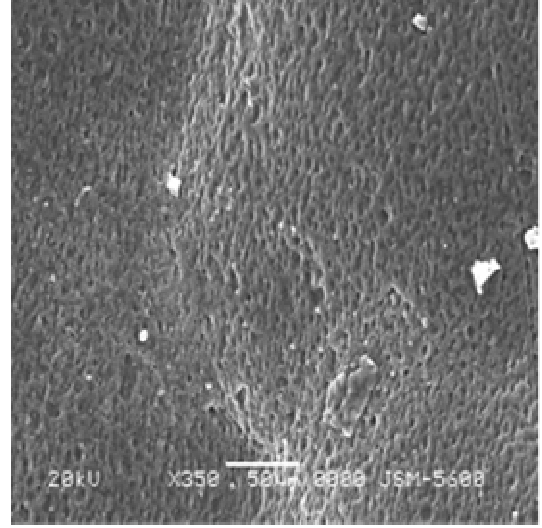
Heparin kaplı olan pHEMA-HEP yüzeyinin, pHEMA yüzeyine göre daha az gözenekli ve pürüzsüz bir özellik sergilediği ve kanla temasından sonra, yüzeyine daha az kan hücrelerinin yapıştığı görüldü (Şekil 3.4. A ve B).

pHEMA-AL, pHEMA yapısına HSA girmesi sonucu, biyomateryalin gözeneklerinin boyutunda bir küçülmeye neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.5. A ve B).

pHEMA-AL-HEP yüzey yapısı diğer karıştırlarına göre mukayese edildiklerinde, yüzeyin daha pürüzsüz olduğu veya gözeneklerin kapalı bir görünümde olduğu ve çok daha pürüzsüz bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.6. A ve B). Biyomateryalin, yüzeyinin pürüzsüz, düzgün olması, platelet ve bakteri adezyonunu zorlaştıran temel özelliklerden birisini oluşturmaktadır. Görüldüğü gibi, pHEMA'nın yapısına albumin ve heparin ilavesi sonucu pHEMA-AL-HEP biyomateryal kompozisyonunun yüzeyine platelet yapışması çok önemli derecede azalmasını sağlamıştır.

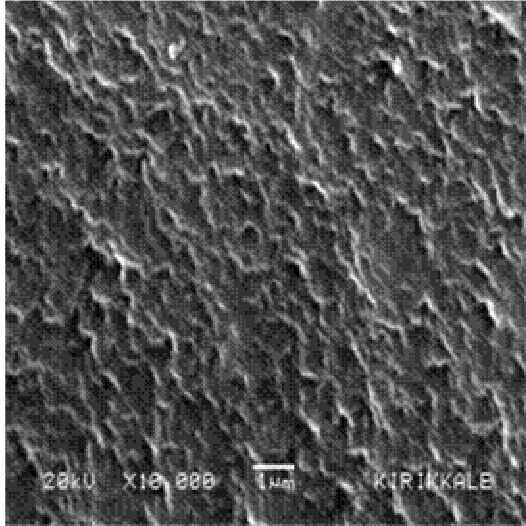


A

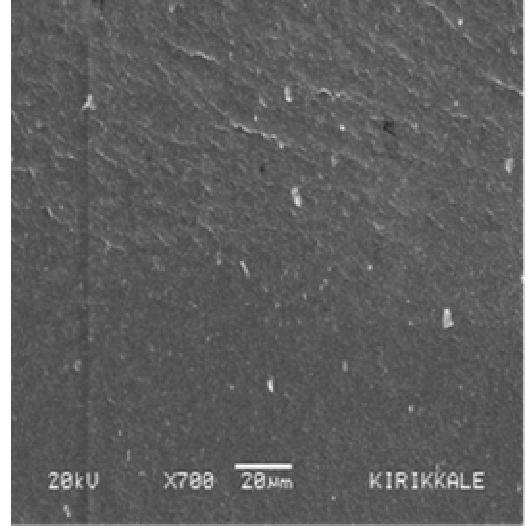


B

Şekil 3.3. A) pHEMA polimerinin yüzeyinin B) pHEMA yüzeyinin kan ile temasından sonra SEM mikrografı

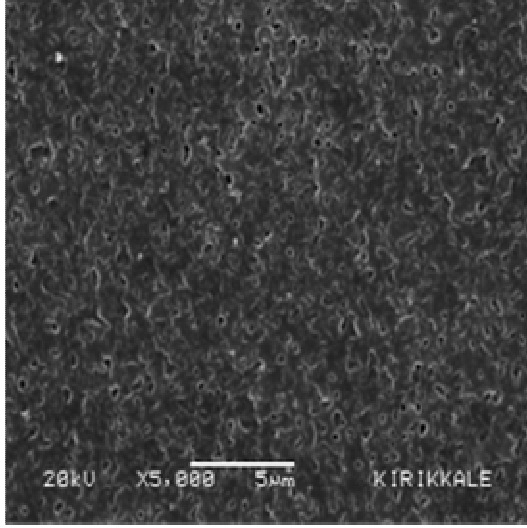


A

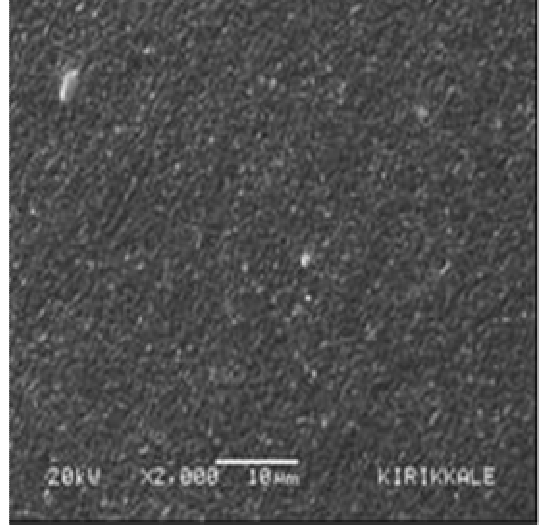


B

Şekil 3.4. A) pHEMA-HEP polimerinin yüzeyinin B) pHEMA-HEP yüzeyinin kan ile temasından sonra SEM mikrografı

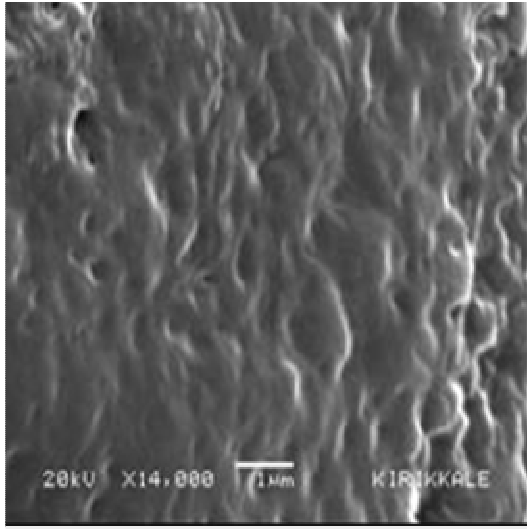


A

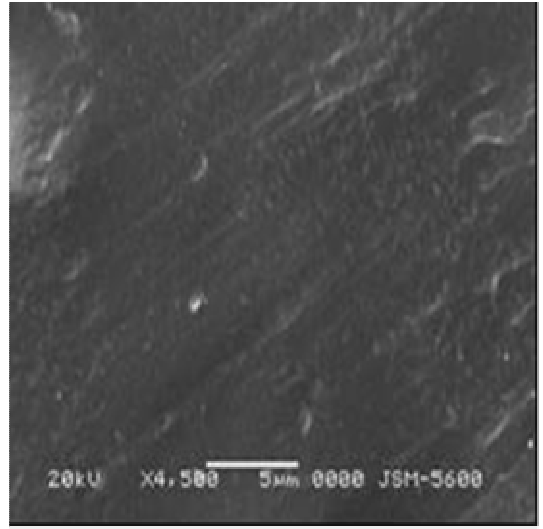


B

Şekil 3.5.A) pHEMA-AL yüzeyinin ve B) pHEMA-AL yüzeyinin kan ile temasından sonra SEM mikrografı



A



B

Şekil 3.6.A) pHEMA-AL-HEP yüzeyinin ve B) pHEMA-AL-HEP yüzeyinin kan ile temasından sonra SEM mikrografı

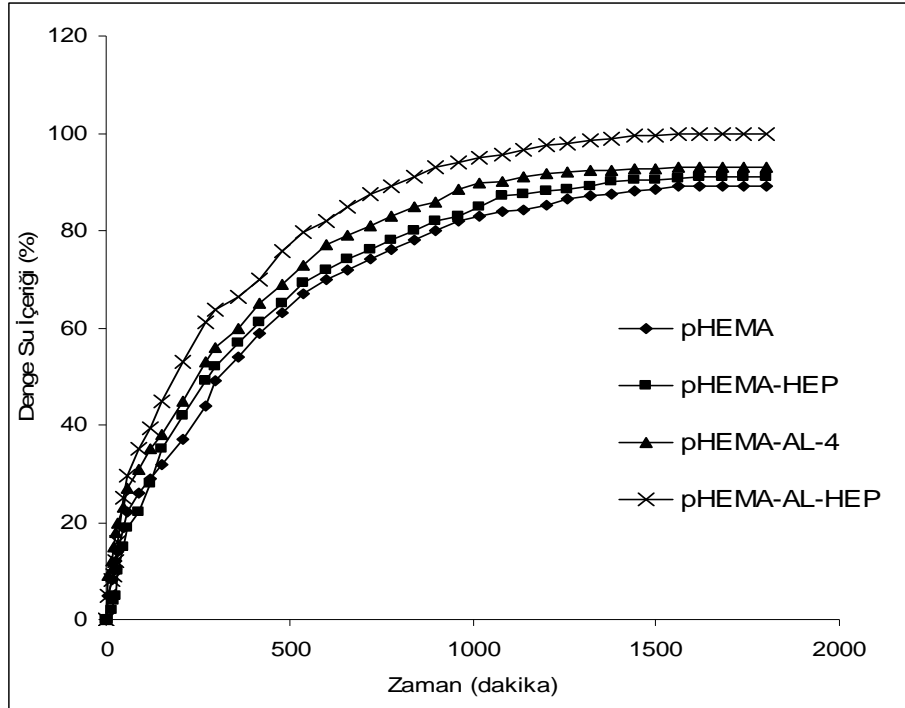
3.1.4. Biyomateryalerin Denge Su İçerikleri

pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapılarının denge su içerikleri, polimerik tüplerden, 0.5 cm uzunluğunda bir parça materyal, fizyolojik tuz çözeltisi (%0.85, NaCl) içerisinde oda sıcaklığında gravimetrik yolla tayin edildi. Sonuçlar Çizelge 3.2'de sunuldu. Polimerlerin oldukça hidrofilik bir yapıda oldukları gözlemlendi. Çizelgeden görüldüğü üzere, pHEMA yapısına albuminin girmesiyle, denge su içeriğinde bir artış görülmüştür. Bu artış, hidrofilik bir hidrojel olan pHEMA'nın yapısına daha fazla hidrofilitesi olan albuminin girmesinden kaynaklanabilir. Bunun yanında, denge su içeriğinin artması, HSA'nın pHEMA yapısına ilave edilmesiyle, polimerin zincir uzunluğunun azalmasından da kaynaklanabilir.

pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP polimerlerinin, denge su içeriğine ulaşma zamanları, Şekil 3.7.'te sunulmuştur. Şekilden görüldüğü gibi, polimerik yüzeylere heparinin kovalent bağlanması sonucu, denge su içeriği arttırmıştır. Su içeriğinin artışı, heparinin yapısındaki, farklı hidrofilik ve yüklü grupların varlığından kaynaklanabilmektedir. Elde edilen sonuçlar, literatürle uyum içerisindedir (4,107)

Çizelge 3.2. Polimerik yapıların denge su içerikleri

Polimer tipi	% Denge su içeriği
pHEMA	89.59 ± 3.06
pHEMA-HEP	90.20 ± 2.80
pHEMA-AL-4	92.33 ± 0.79
pHEMA-AL-4-HEP	99.83 ± 0.16



Şekil 3.7. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP tüplerinin denge su içeriğine ulaşma zamanı

3.1.5. Biyomateryallerin Yüzey Özelliklerinin Temas Açısı Ölçüm Yöntemi ile İncelenmesi

Farklı kompozisyonlardaki “pHEMA, pHEMA-AL-1, pHEMA-AL-2, pHEMA-AL-3, pHEMA-AL-4 ve pHEMA-AL-5” biyomateryalin beş farklı test sıvısı (su, gliserol, etilen glikol, dimetilsülfoksit ve diiyodometan) damlatılarak, temas açısı değerleri, durgun damla metoduyla belirlendi. Polimerler için ölçülen yüzey temas açıları, Çizelge 3.3’de sunuldu.

Çizelge 3.3. pHEMA ve pHEMA-AL-1-5 bileşimindeki membranlar için deneme sıvılarıyla ölçülen yüzey temas açıları

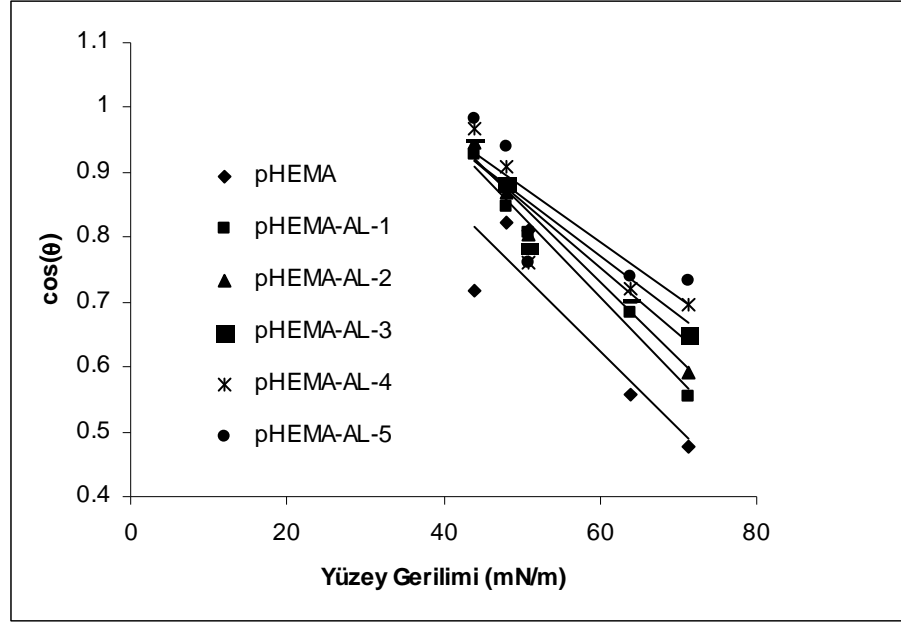
Membran tipi	pHEMA	pHEMA-AL-1	pHEMA-AL-2	pHEMA-AL-3	pHEMA-AL-4	pHEMA-AL-5	Yı
Test sıvısı	θ (°)	θ (°)	θ (°)	θ (°)	θ (°)	θ (°)	θ (°)
Su	61.49	56.27	53.84	49.56	45.88	42.74	71.3
Gliserol	56.2	46.74	44.93	44.39	43.84	42.46	64.0
DIM	35.76	36.28	36.47	38.73	40.34	40.48	50.8
Etilen glikol	34.86	32.14	29.59	27.96	24.63	20.19	48.0
DMSO	31.58	21.92	18.82	16.2	15.01	10.9	44.0

Young eşitliğine göre, daha küçük yüzey gerilimli deneme sıvıları ile ölçülen temas açısı, daha küçük olmalıdır. Buna uygun olarak, bütün polimerler için, en yüksek temas açısını su, en düşük temas açısını DMSO vermiştir. Çizelgeden görüldüğü üzere, polimer bileşimindeki HSA konsantrasyonunun artışıyla, su ile polimerlerin verdiği temas açıları, azalma göstermiştir. Hidrofobik sıvı olarak kullanılan diiodometan (DIM) ile ölçülen temas açıları ise artış göstermiştir. Buna göre, yapıdaki HSA konsantrasyonunun artması, polimerlerin hidrofilitelerini arttırmaktadır. HSA yapısında çok miktarda hidrofilik fonksiyonel grup bulunmaktadır.

Polimerik yapıların serbest yüzey enerjisi parametreleri, araştırılan sıvıların temas açıları kullanılarak hesaplandı. Temas açısı verilerinden yüzey enerjisinin belirlenmesinde, en yaygın olarak kullanılan, dört yöntem uygulandı :

- a- Zisman kritik yüzey gerilimi (87),
- b- Fowkes geometrik ifadesi (88),
- c- Wu harmonik ifadesi (89) ve
- d- Van Oss asit-bazı (90).

Membran örneklerinin temas açılarıyla, Zisman kritik yüzey enerjisi değeri hesaplandı. Şekil 3.8'de, membranların karşılaştırılmalı Zisman grafiği görülmektedir.



Şekil 3.8. pHEMA ve pHEMA-AL-1-5 membranları için kritik yüzey geriliminin hesaplanması için Zisman grafiği

Kritik yüzey gerilimi, bir sıvının, katı yüzeyini tamamen ıslatan, en yüksek yüzey gerilimi değeri olarak tanımlanır. Zisman yöntemiyle elde edilen kritik yüzey enerjisi değerleri, Wu ve Fowkes yöntemleriyle elde edilen serbest yüzey enerjisinden daha azdır (Çizelge 3.4).

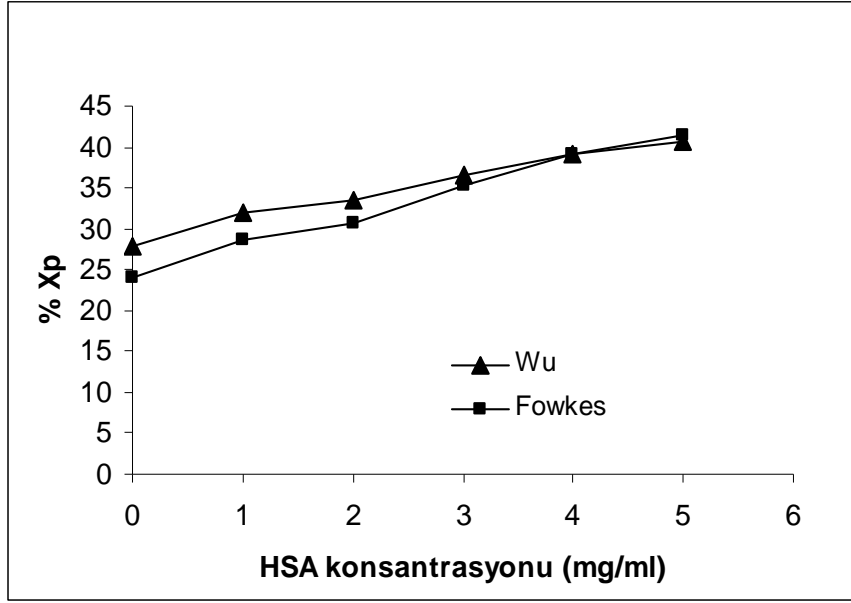
Çizelge 3.4. Wu (harmonik ifade), Fowkes (Geometrik ifade) ve Zisman kritik yüzey gerilimine göre, pHEMA, pHEMA-AL-1-5 membranlarının yüzey serbest enerjileri

Membran tipi	Yaklaşım	γ (mN/m ²)	γ^p (mN/m ²)	γ^d (mN/m ²)	Xp
pHEMA	Wu	47.62	13.27	34.35	0.279
	Fowkes	44.31	10.65	33.66	0.240
	Zisman γ_c (mN/m ²)	35.70			
pHEMA-AL-1	Wu	50.87	16.22	34.65	0.319
	Fowkes	47.49	13.64	33.85	0.287
	Zisman γ_c (mN/m ²)	36.81			
pHEMA-AL-2	Wu	51.94	17.36	34.58	0.334
	Fowkes	48.58	14.96	33.63	0.308
	Zisman γ_c (mN/m ²)	37.40			
pHEMA-AL-3	Wu	52.80	19.28	33.52	0.365
	Fowkes	49.59	17.54	32.05	0.354
	Zisman γ_c (mN/m ²)	36.00			
pHEMA-AL-4	Wu	53.77	21.01	32.76	0.391
	Fowkes	50.72	19.84	30.89	0.391
	Zisman γ_c (mN/m ²)	34.95			
pHEMA-AL-5	Wu	55.08	22.40	32.68	0.407
	Fowkes	52.14	21.55	30.59	0.413
	Zisman γ_c (mN/m ²)	35.74			

Çizelgeden görüldü üzere, biyomateryalin, bileşimindeki HSA konsantrasyonu arttıkça, yüzey enerjisinin polar bileşeni (γ^p) değerleri artış göstermektedir. Aynı zamanda, polimerlerin hem Wu, hem de Fowkes'a göre hesaplanan, toplam yüzey enerjileri de artış göstermiştir.

Wu yöntemiyle, yüzey enerjisinin polar (γ^p) ve dispersif bileşenleri (γ^d) Fowkes'a göre daha yüksek olarak elde edilmiştir. Wu ve Fowkes'la elde edilen sonuçlara göre, tüm polimerler için, yüzey serbest enerjisine ana katkıyı dispersif bileşen yapmaktadır. Polar bileşenin (γ^p) katkısı % 24.0-41.3 arasında değişmektedir. HSA konsantrasyonunun artmasıyla birlikte polar bileşenin katkısı artmaktadır.

Ölçülen açılara ve hesaplanan polarite (X_p) değerlerine göre, polimerlerin hidrofiliteleri değerlendirildi. Membranların bileşimindeki HSA miktarına göre, polimerlerin % X_p değişimi grafiğe geçirildi (Şekil 3.9). Wu harmonik ve Fowkes geometrik ifadesine göre, hesaplanan X_p değerleri, polimerlerin HSA konsantrasyonu arttıkça artmıştır.



Şekil 3.9. Wu ve Fowkes yöntemleri ile %Xp değerinin HSA konsantrasyonu ile değişimi

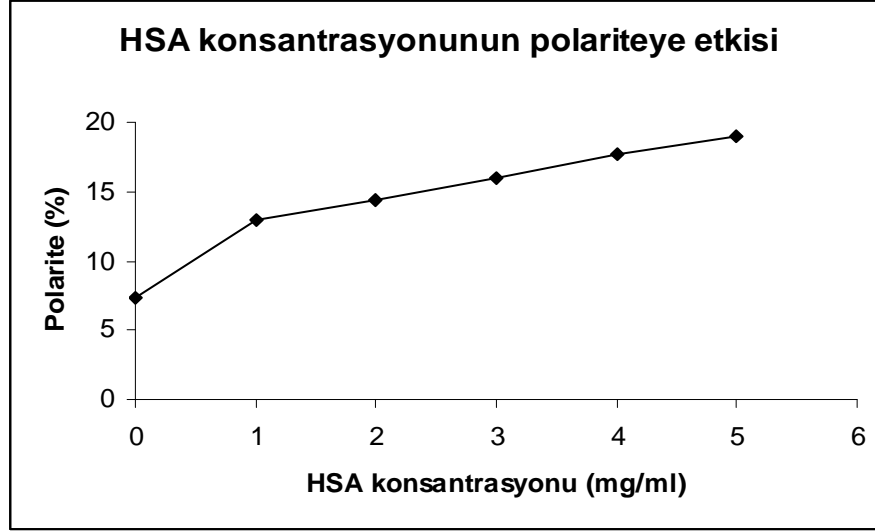
pHEMA ve pHEMA-AL-1-5 membranlarının, toplam yüzey serbest enerjisi (γ^T), van Oss yöntemi kullanılarak hesaplandı. van Oss (asit-baz) metodundan elde edilen sonuçlar, daha güvenilir ve daha aydınlatıcı bilgi vermektedir. Çizelge 3.5.'den görüldüğü gibi, araştırılan bütün membranların, HSA konsantrasyonlarının değiştirilmesi sonucu, van Oss yöntemine göre elde edilen toplam yüzey enerjilerinde (γ^T) ve asit-baz bileşenlerinde (γ^{AB}), farklılıklar gösterdiği gözlenmiştir. Farklı miktarlarda HSA içeren biyomateryal örnekleri için, su ile temas açılarının azalması, (γ^{AB}) değerinin ve onun bileşenlerinin artmasına yol açmaktadır. Bunun yanında, Lifshitz-van der Waals bileşeninin (γ^{LW}) HSA konsantrasyonunun artmasıyla, hafif bir azalma eğiliminde olduğuda gözlenmiştir. Ancak (γ^{LW}) bileşenindeki azalma oranı

oldukca düşük seviyelerde iken buna kıyasla asit-baz bileşenindeki (γ^{AB}) artışın çok yüksek olduğu gözlenmiştir. Test edilen bütün biyomateryal örnekleri için, dispersif bileşen, asit-baz bileşeninden daha büyük olduğu Çizelge 3.5 de görülmektedir. Benzer şekilde, baz bileşeninin (γ^-), membranın asit bileşeninden (γ^+), daha yüksek olduğu aynı çizelgede gözlenmektedir. pHEMA'nın yüzeyinde -OH grupları bulunmaktadır. HSA'nın yapıya ilave edilmesi sonucu, karboksilik ve amino grubu gibi, asidik ve bazik gruplar, yüzeyde açığa vurulmaktadır.

Çizelge 3.5. van Oss'a göre pHEMA ve pHEMA-AL-1-5 membranlarının yüzey serbest enerjisi parametreleri

Polimer tipi	γ^{LW} (mN/m ²)	γ^+ (mN/m ²)	γ^- (mN/m ²)	γ^{AB} (mN/m ²)	γ^{Toplam} (mN/m ²)	Polarite (%)
pHEMA	40.53	0.38	4.24	3.23	43.75	7.38
pHEMA-AL-1	40.22	0.66	4.57	5.99	46.22	12.96
pHEMA-AL-2	40.15	0.70	4.77	6.72	46.86	14.34
pHEMA-AL-3	39.23	0.71	5.23	7.46	46.69	15.98
pHEMA-AL-4	38.49	0.74	5.59	8.26	46.74	17.67
pHEMA-AL-5	38.43	0.77	5.82	9.01	47.44	18.99

Şekil 3.10'da, HSA'nın biyomateryallerin yapısına ilave edilmesi sonucu, biyomateryallerin yüzde polarite değerindeki ($\gamma^{AB}/\gamma^{AB}_{TOT} \times 100$) değişimler görülmektedir.



Şekil 3.10. HSA konsantrasyonunun % polariteye etkisi

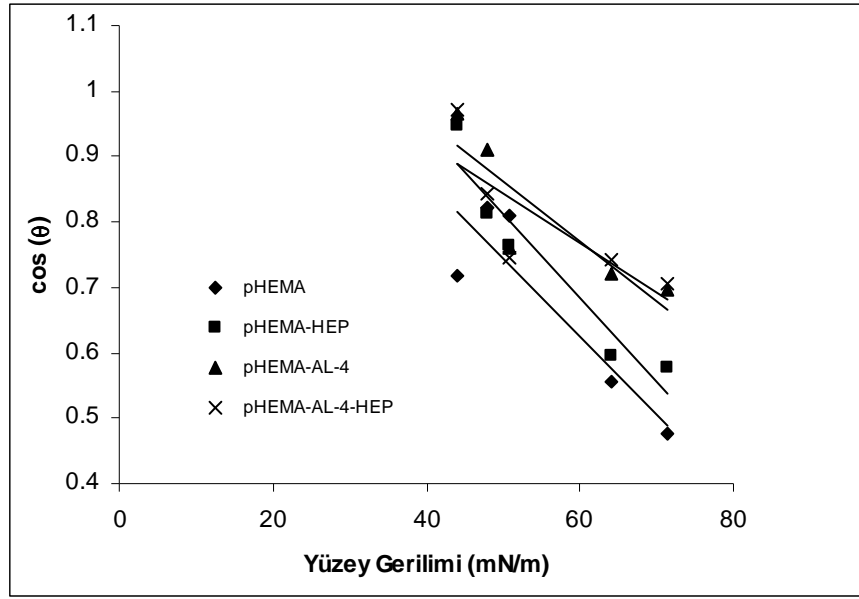
Polimerlerin heparin kaplanmasıdan sonra, membranlarının yüzey özellikleri araştırıldı. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP bileşimindeki membranların, test sıvılarıyla ölçülen temas açıları Çizelge 3.6'da sunulmuştur.

Çizelge 3.6. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP membranlarının deneme test sıvılarıyla temas açıları ölçüm değerleri

Membran	pHEMA	pHEMA-HEP	pHEMA-AL-4	pHEMA-AL-HEP	γl
Test sıvısı	θ (°)	θ (°)	θ (°)	θ (°)	
Su	61.49	54.67	45.88	45.09	71.3
Gliserol	56.2	53.49	43.84	42.21	64.0
DİM	35.76	40.17	40.34	41.95	50.8
Etilen glikol	34.86	35.66	24.63	32.41	48.0
DMSO	31.58	18.80	15.01	13.41	44.0

Young eşitliğine uygun olarak, bütün polimerler için, en yüksek temas açısını en yüksek yüzey gerilimli sıvı olan su, en düşük temas açısını da en düşük yüzey gerilimli sıvı olan DMSO vermiştir. Heparin miktarının artışıyla, su ile polimerlerin temas açıları, azalmıştır. Hidrofobik sıvı olarak kullanılan diiodometan ile ölçülen temas açıları ise artış göstermiştir. Elde edilen sonuçlardan, yapıya bağlanan heparin miktarındaki artış sonucu, polimerlerin yüzey hidrofilitelerinde artışlar gözlenmektedir.

Membran örneklerinin karşılaştırılmalı Zisman'a göre, kritik yüzey enerjisi değerinin belirlenmesi, Şekil 3.11.'de verilmiştir.



Şekil 3.11. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP

membranları için kritik yüzey geriliminin hesaplanması için Zisman grafiği

Zisman yöntemiyle elde edilen kritik yüzey enerjisi değerleri, Wu ve Fowkes yöntemleriyle elde edilen serbest yüzey enerjisinden daha azdır. (Çizelge 3.7)

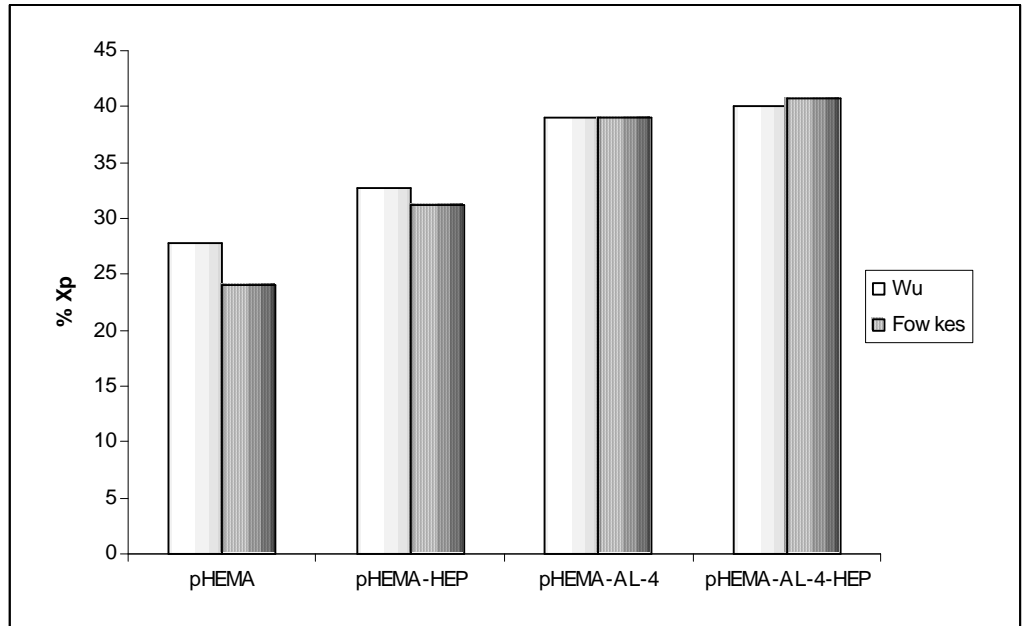
Polimerlerin, yüzeyindeki heparin miktarı arttıkça, γ^p değerleri artış göstermiştir. Wu yöntemiyle, yüzey enerjisinin polar ve dispersif bileşenleri Fowkes'a göre daha yüksek olarak elde edilmiştir. Wu ve Fowkes'la elde edilen sonuçlara göre, tüm polimerler için, yüzey serbest enerjisine ana katkıyı dispersif bileşen yapmaktadır.

Heparin miktarının artmasıyla birlikte polar bileşenin katkısı artmaktadır. Çizelge 3.7'den görüldüğü üzere, polimerlerin, yüzeyindeki bağlı

heparin miktarı arttıkça, yüzey enerjisinin polar bileşeni (γ^p) değerleri artış göstermiştir. Aynı zamanda toplam yüzey enerjileri de artış göstermiştir.

Polar bileşenin (γ^p) katkısı %24.0-40.7 arasında değişmektedir. Heparin konsantrasyonunun artmasıyla birlikte polar bileşenin katkısı artmaktadır.

Wu ve Fowkes yöntemine göre hesaplanan %Xp ($\gamma^p/\gamma \times 100$) değerleri Şekil 3.12'de verilmiştir. Xp değerleri, polimerlerin heparin miktarı arttıkça artmıştır.



Şekil 3.12. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL, pHEMA-AL-HEP polimerlerinin % Xp değeri değişimleri

Çizelge 3.7. Wu (harmonik ifade), Fowkes (Geometrik ifade) ve Zisman kritik yüzey gerilimine göre, pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP membranlarının yüzey serbest enerjileri

Membran tipi	Yaklaşım	γ (mN/m ²)	γ_p (mN/m ²)	γ_d (mN/m ²)	X_p
PHEMA	Wu	47.62	13.27	34.35	0.279
	Fowkes	44.31	10.65	33.66	0.240
	Zisman γ_c (mN/m ²)	35.70			
pHEMA-HEP	Wu	49.27	16.16	33.11	0.328
	Fowkes	46.12	14.35	31.77	0.311
	Zisman γ_c (mN/m ²)	35.30			
pHEMA-AL-4	Wu	53.77	21.01	32.76	0.391
	Fowkes	50.72	19.84	30.89	0.391
	Zisman γ_c (mN/m ²)	34.95			
pHEMA-AL-4- HEP	Wu	53.56	21.50	32.06	0.401
	Fowkes	50.46	20.56	29.90	0.407
	Zisman γ_c (mN/m ²)	29.52			

pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP membranlarının, toplam yüzey serbest enerjisi (γ^{Toplam}), van Oss yöntemi kullanılarak hesaplandı. (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. van Oss'a göre pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP membranlarının yüzey serbest enerjisi parametreleri

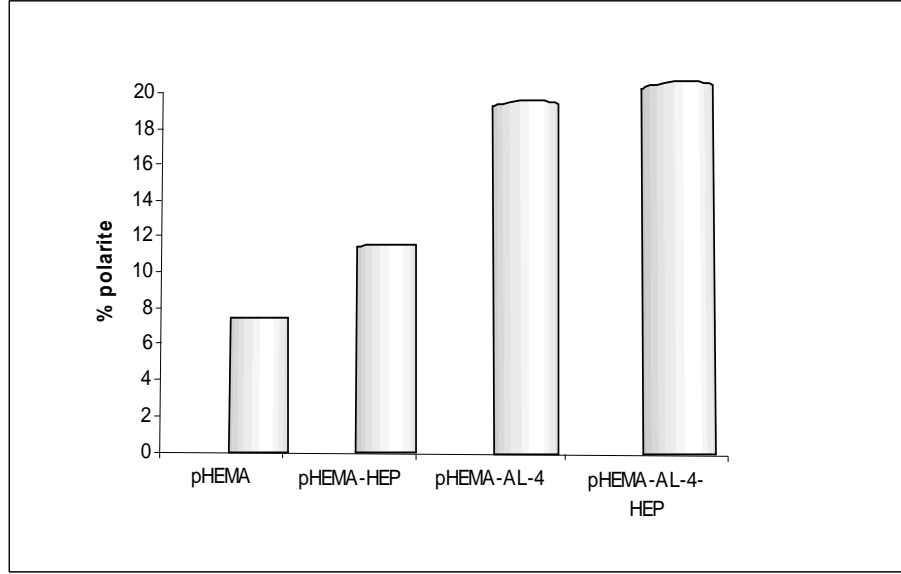
Polimer tipi	γ^{LW} (mN/m ²)	γ^+ (mN/m ²)	γ^- (mN/m ²)	γ^{AB} (mN/m ²)	γ^{Toplam} (mN/m ²)	Polarite (%)
pHEMA	40.53	0.38	4.24	3.23	43.75	7.38
pHEMA-HEP	39.09	0.49	4.91	4.81	43.90	10.96
pHEMA-AL-4	38.49	0.74	5.59	8.26	46.74	17.67
pHEMA-AL-4- HEP	37.83	0.71	5.74	8.18	46.02	17.77

Çizelgeden görüldüğü gibi, bütün polimer tiplerinde hesaplanan baz bileşeni (γ^-) bileşeni, asit bileşeninden (γ^+) bileşeninden daha büyüktür. pHEMA'nın yüzeyinde –OH grupları bulunmaktadır. Heparinin yüzeye bağlanmasıyla, yüzeyde çok sayıda yeni –OH gruplarının oluşturulmasının yanında, COOH gibi asidik karakterdeki gruplarda, yüzeyde yer almış bulunmaktadır. pHEMA'ya, heparin bağlanmasıyla birlikte, γ^- bileşeninde bir artış olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde, pHEMA-AL-4 yapısına da heparin

bağlanması sonucu da, γ^- bileşeninde bir artışa neden olmuştur. Heparin bileşimindeki SO_3^- ve COO^- grupları, yüzeyin anyonik özellikte olmasını sağlar.

Elde edilen sonuçlardan, yüzeye bağlanan heparin, yüzeyin Lewis baz değerlerinde bir artışa neden olmaktadır. pHEMA-HEP'in, γ^- bileşeni artışı, pHEMA'ya göre, 1.16 kat iken, pHEMA-AL-HEP'in, γ^- bileşeni artışı, pHEMA-AL-4'e göre, 1.03 kattır. Artış miktarının azalması, yapıya heparin bağlanması, sonucu biyomateryalin bazik karakterdeki gruplarının, kullanıldığını göstermektedir. pHEMA'ya, heparin bağlanmasıyla birlikte, γ^+ bileşeninde, oldukça büyük bir artış gözlenmiştir. Ancak, bu sonucun tersine olarak, pHEMA-AL-4 yapısına, heparin bağlanınca, γ^+ bileşeninde önemli sayılmayacak derecede bir azalma gözlenmiştir. Buradan, pHEMA'ya bağlanan heparinin, pHEMA yapısındaki, -OH gruplarını, kullandığı ve yüzeyde asidik karakterdeki grupları sergilediği düşünülmektedir.

pHEMA'daki -OH grupları, bazik karakterdedir, ancak, heparinde bulunan -OH fonksiyonel grupları asidik karakterdedir. Heparin miktarının artmasıyla, diiodometan ile temas açıları artmakta ve polimerlerin γ^{LW} 'sinde bir azalma meydana gelmektedir. Bu durum dispersif, dipol-dipol ve dipol indüklenmiş dipol etkileşimlerinin, zayıfladığını göstermektedir. Heparinin yüzeye bağlanmasıyla, % polarite değerinin ($\gamma^{AB}/\gamma^{AB}_{TOT} \times 100$) arttığı görülmüştür. (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP polimerlerinin, % polarite ($\gamma^{AB}/\gamma^{AB}_{TOT} \times 100$) değerleri

3.1.6. Mekanik Özellikler

pHEMA-AL-HEP tüplerinin ıslak kalınlığının 0.1 cm ve yoğunluğunun 1.26 g/cm^3 olduğu, sırasıyla dijital kumpas ve piknometre kullanılarak belirlendi. pHEMA ve pHEMA-AL yapılarının gerilme ve kopma testleri polimerik yapıların denge su içeriklerinde gerçekleştirildi. pHEMA'nın yapısına albumin yüklenmesi sonucunda yüklenen albumin miktarına bağlı olarak elastik modülünde bir azalma gözlemlendi. Bunun nedeninin, pHEMA'nın ağ yapısı içerisine giren albuminin, polimerik yapının polimerleşmesi sırasında, zincir uzunluğunu ve kristalinitesini azaltması ve sonuç olarak ta pHEMA'nın mekanik gücünü azaltması olarak düşünüldü (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Polimerik yapıların mekanik özellikleri

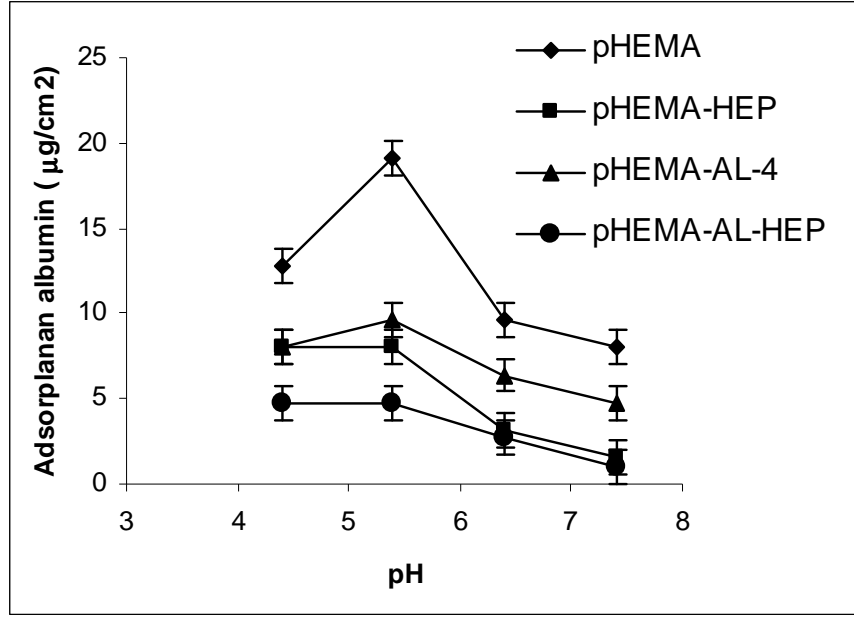
	Gerilme gücü (KPa)	Gerilmede kopma değeri (%)
pHEMA	167±7	461±12
pHEMA-AL-1	152±5	384±09
pHEMA-AL-2	126±11	310±09
pHEMA-AL-3	115±5	271±14

3.2. Biyomateryallerle Kan Proteinlerinin Etkileşimi

4.2.1. Kesikli Sistem Deneyleri

4.2.1.1. pH'nın Etkisi

pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP biyomateryal yapılara albuminin adsorpsiyonuna pH'nın etkisi, 4.4 ile 8.4 arasındaki pH değerlerinde araştırıldı. Başlangıç protein konsantrasyonu 1 mg/ml, adsorpsiyon ortamının sıcaklığı 37°C, karıştırma hızı 100 rpm olarak seçildi. pH 4.4 ve pH 5.4'te, 50 mM asetat tamponu; pH 6.4 ve pH 7.4'te ise 50 mM fosfat tamponu kullanıldı. Şekil 3.14.'te polimerik yapılar üzerine adsorplanan, albumin miktarları verilmiştir.

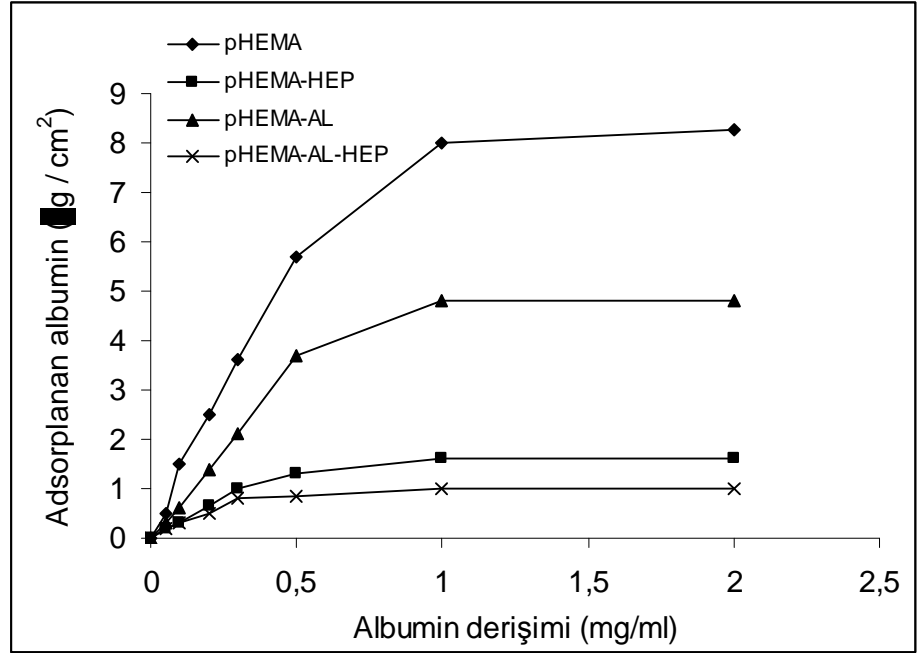


Şekil 3.14. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapılarına albumin adsorpsiyonuna pH'nın etkisi

Grafikten de görüldüğü üzere, en yüksek albumin adsorpsiyonu pH 5.4'te, en düşük adsorpsiyon ise, pH 7.4'te elde edilmiştir. İnsan serum albuminin pl noktası 5.0'dir, bu pH değerinin üstünde, HSA dolaşım sistemi içinde anyoniktir. Polimerik yüzey, üzerine heparinin kovalent bağlanması ile, fizyolojik pH değerinde SO_3^- ve COO^- gruplarından dolayı, heparin kaplı yüzey de anyonik olur. Kan proteinleri ile heparinin aynı yükü taşımalarından dolayı, pH 7.4'te adsorpsiyon en azdır. Bunun yanında polimerik yapılar üzerine kan proteinlerinin maksimum adsorpsiyonları pl değerleri civarında (pH 5.4) elde edilmiştir.

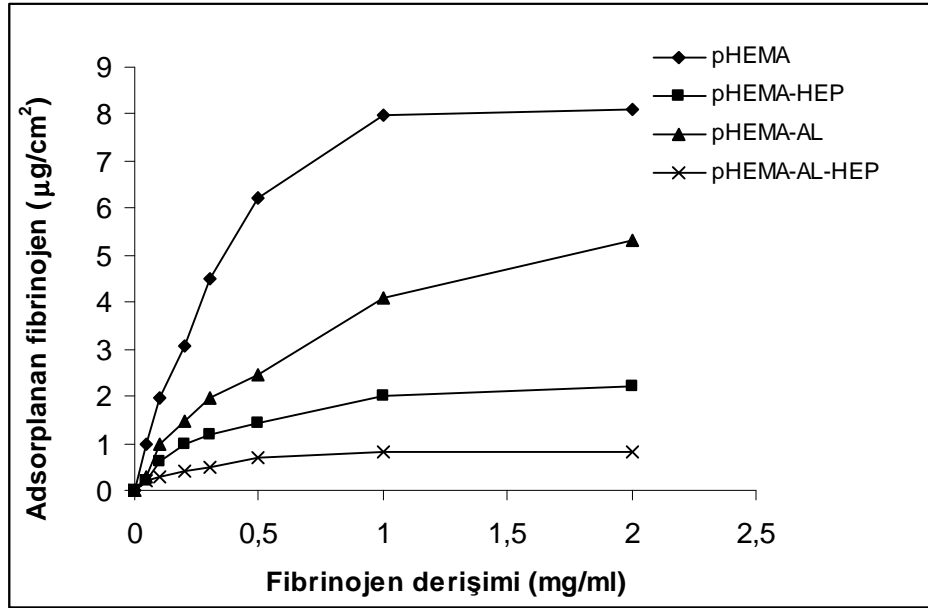
4.2.1.2. Biyomateryaller Üzerine Serum Proteinlerinin Fizyolojik pH Değerinde Adsorpsiyonu

Serum proteinlerinin polimerik yapılar üzerine adsorpsiyonu, fizyolojik pH değerinde (pH 7.4), farklı albumin ve fibrinojen başlangıç konsantrasyonlarında, kesikli sistemde çalışıldı. Şekil 3.15'te ve Şekil 3.16'da, pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapılarına, yedi farklı konsantrasyondaki (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/ml) sırasıyla, albumin ve fibrinojen adsorpsiyon sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.15. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP

yapılarına, albumin bağlanma miktarına başlangıç albumin konsantrasyonunun etkisi



Şekil 3.16. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP

yapılarına, fibrinojen bağlanma miktarına başlangıç fibrinojen konsantrasyonunun etkisi

Şekillerden görüldüğü gibi, yüzeye adsorplanan albumin ve fibrinojen miktarları, pHEMA'ya kıyasla, diğer polimer tiplerinde daha düşüktür. pHEMA-HEP ve pHEMA-AL-HEP bileşimindeki, heparin kaplı polimerler, heparin içermeyen polimerlerden daha düşük miktarda protein adsorplamıştır.

Heparinle kaplanan polimerik yapılara albumin adsorpsiyonu, hazırlanan biyomateryalin biyolojik uyumluluğunu artırması açısından önemlidir. Bunun yanında, biyomateryal yüzeyine fibrinojen adsorpsiyonu hazırlanan biyomateryalin biyolojik uyumluluğunu azaltmaktadır. Albumin trombo dirençli bir özelliğe sahiptir ve bu nedenle trombositlerin biyomateryal yüzeyine yapışmasını engeller. Fibrinojen, biyomateryal yüzeyine

trombositlerin yapışmasını başlatıcı özelliğe sahiptir. Bu nedenle, hazırlanan biyomateryale matriks içi tutuklama yöntemiyle albumin yerleştirilerek, biyomateryalin kan uyumluluğunda bir artış sağlanması amaçlandı. pHEMA-HEP ve pHEMA-AL-HEP yapılarına, fibrinojen adsorpsiyonundaki azalma, heparinin polimer yüzeyine kovalent bağlanması sonucu, kan uyumluluk özelliğinde bir artış sağladığını işaret eder. Ayrıca, albuminin pHEMA'nın yapısına yerleştirilmesi ile membran yüzeyindeki hidrofilik fonksiyonel grup sayısında sağlanan artış, bağlanan heparin miktarında bir artışa da neden olmuştur.

Amiji (100) ve Winterton (101), heparin tutuklanmış polimerik yüzeylere fibrinojen ve albumin gibi plazma proteinlerinin adsorpsiyonunu çalışmışlardır ve fizyolojik pH değerinde fibrinojenin ve albuminin heparine bağlanma afinitesi göstermediklerini bildirmişlerdir.

pHEMA ve pHEMA-AL polimerik yapılara heparinin kovalent bağlanması sonucu, heparinin yapısında bulunan, SO_3^- ve COO^- grupları, trombosit adezyonu ve protein adsorpsiyonunu azaltmıştır. pHEMA yapılara bağlanan heparin miktarının albumin içeriğine bağlı olarak, arttığı yapılan çalışmalar sonucunda gözlenmiştir. pHEMA polimerik yapılara yerleştirilen albuminin, yapıya daha çok fonksiyonel grup sağlamasının yanında, uzatıcı bir kol gibi de davrandığı da düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar, Park ve Kim tarafından (77) rapor edilen sonuçlarla uyum sağlamaktadır, yaptıkları araştırmalarında tutuklanmış heparinin biyoaktivitesinin polietilenoksit (PEO) uzatıcı kolunun uzunluğuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Han ve arkadaşları (102, 103), farklı moleküler ağırlıkta PEO ile aşılınmış poliüretan

membranları ile çalışmışlardır ve PEO zincir uzunluğundaki artış ile membran yüzey hidrofilitesinde ve hareketliliğinde önemli derece bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak pHEMA yapısına göre, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapıların yüzeyine adsorplanan kan serum protein miktarlarının azaldığı görülmüştür ve elde edilen sonuçlar literatürde rapor edilen sonuçlarla uyum sağlamaktadır (101). pHEMA-AL-HEP yapıda bulunan kovalent bağlanmış heparin zincirlerinin kan proteinleri ile teması sonucu daha önceden rapor edildiği gibi yeniden düzenlendiği düşünülmektedir. pHEMA ve pHEMA-AL membranına göre, pHEMA-HEP ve pHEMA-AL-HEP polimerik yapıların yüzey temas açısının azalması ve denge su içeriklerinin ve yüzey enerjisinin artması bu sonucu doğrulamaktadır.

Sonuç olarak, pHEMA ve pHEMA-AL polimerik yapıların yüzeyine CDI aktivasyonundan sonra heparin kovalent olarak bağlandı. Heparin, pHEMA ve pHEMA-AL polimerik yapılarının üzerine, pHEMA'nın hidroksil, albuminin serbest hidroksil ve amin gruplarına kovalent olarak bağlanmaktadır. Heparin tutuklanmış pHEMA ve pHEMA-AL biyomateryallerinin kan ile teması sonucu protein adsorpsiyonları azalmaktadır. Bu yöntemle, pHEMA ve pHEMA-AL'in yüzeyine heparinin tutuklanması ile hazırlanan malzemelerin hidrofilitesinde ve kan uyumluluklarında bir artış sağlanmıştır. Ayrıca, heparin tutuklanmış pHEMA-HEP ve pHEMA-AL-HEP polimerik yapılara adsorplanan fibrinojen miktarının, heparinsiz pHEMA ve pHEMA-AL karışıtlarına oranla önemli derecede azaldığı gözlenmiştir. Ticari Foley kateteri ve silikon yara örtüsü ile, aynı deneysel koşullarda, HSA ve γ -globulin adsorpsiyonu çalışılmış ve materyallerin proteinleri adsorplamadıkları gözlenmiştir.

3.2.1.3. pHEMA-AL-HEP Yapısı Üzerine Serum Proteinlerinin Adsorpsiyonu

Kan serum proteinlerinin pHEMA-AL-HEP yapısı üzerine adsorpsiyon çalışmalarında kan serumu kullanıldı. pHEMA-AL-HEP polimerik yapısına adsorplanan serum protein miktarları Çizelge 3.10'da verildi.

Çizelge 3.10. pHEMA-AL-HEP yapısına adsorplanan serum protein miktarları

	Albumin miktarı ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	γ -globulin miktarı ($\mu\text{g cm}^{-2}$)
pHEMA-AL-HEP	1.36	1.25

pHEMA-AL-HEP polimerinin yüzeyine adsorplanan serum proteini miktarı çok düşüktür. Polimer yüzeyine, insan serum albumini, gama globulinden daha fazla adsorplanmıştır.

3.2.2. Sürekli Sistem Deneyleri

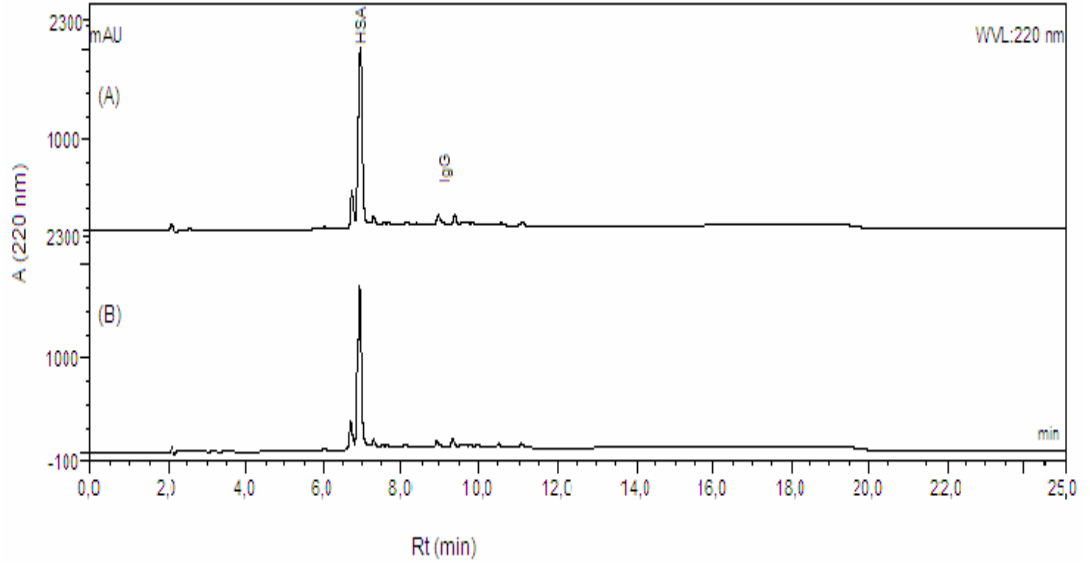
Bu çalışmada, taze kan serumu kullanıldı. Yapay damar olarak tasarlanan biyomateryalin bir peristaltik pompa ile irtibatı sağlandı. Peristaltik pompanın akış hızı 40 ml/dakika olarak ayarlandı, 1/5 oranında seyreltilmiş serum hazırlanan sistem içerisinde 72 saat süre ile sirküle edildi. Bu süre

sonunda örnek alınarak, kan proteinlerinin miktarları HPLC yardımı ile belirlendi. 72 saat süre sonunda, pHEMA-AL-HEP biyomateryali yüzeyine adsorplanan toplam albumin miktarı $1.32 \mu\text{g cm}^{-2}$ ve γ -globulin miktarı $1.34 \mu\text{g/cm}^2$, olarak belirlendi. Bu süre sonunda polimerik yapıda herhangi bir deformasyon gözlenmedi.

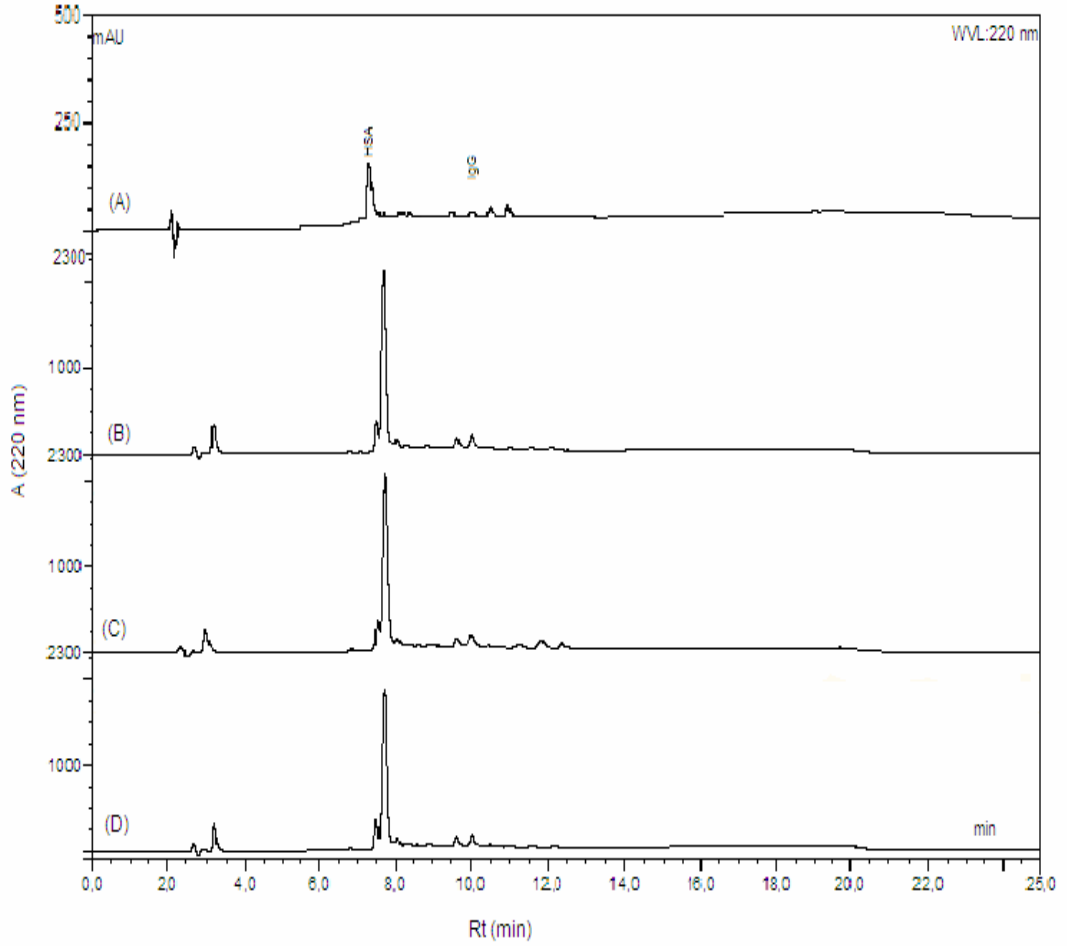
Bu sürenin sonunda % 2 glutaraldehit ile yüzeye tutunan plateletlerin sabitlenmesi yapıldı ve alınan kesitler 40°C 'de vakum etüvünde kurutularak, taramalı elektron mikroskobu ile incelendi.

3.2.3. HPLC Analizi

pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP polimerleri ile yapılan, kesikli ve sürekli sistemde, serumdan protein adsorpsiyonu deneylerinin sonuçları, HPLC analizleri ile belirlendi. Serum örneklerinin analiz edilmesinde kullanılan kolon Discovery BIO Wide Pore C5 (150 mm x 4.6 mm, 5 μm) kolonudur. Her bir proteinin miktarı kalibrasyon eğrilerinden CHROMELLEON veri programı kullanılarak hesaplandı. Albuminin alıkonma zamanı, 7.5-7.7 dakika, γ -globulinin alıkonma zamanı ise 9.3-9.9 dakikadır. Şekil 3.17'de, başlangıç serum örneği ile, kesikli sistem adsorpsiyon sonucunun kromatogramı verilmiştir. Şekil 3.18'de, başlangıç serum örneği ile, sürekli sistem adsorpsiyon deneyinin, 24. saatte ve 72. saatte alınan sonuçlarının kromatogramları görülmektedir.



Şekil 3.17. Kesikli sistemde serumdan protein adsorpsiyonuna ait kromatogramlar, A) Başlangıç serum örneği, B) 120. dakika adsorpsiyon sonucu



Şekil 3.18. Sürekli sistemde serumdan protein adsorpsiyonuna ait kromatogramlar, A) Protein karışımı 0.5mg/ml HSA ve 1 mg/ml IgG, B) başlangıç serum örneği, C) 24. saat adsorpsiyon sonucu, D) 72. saat adsorpsiyon sonucu

3.3. Kan Uyumluluk Çalışmaları

3.3.1. PT ve aPTT Zamanı Tayini

Polimerlerin, kan uyumluluk deneyleri kapsamında, protrombin zamanı (PT-S) testi ve ardından, aktive partial tromboplastin zamanı (aPTT) uygulandı. pHEMA, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapısındaki polimerler, sodyum sitratlı venöz kan örneğinin plazması ile temas ettirildi ve 1 saat inkübe edildi. Kontrol olarak, polimerlerle temas etmemiş plazma kullanıldı.

PT zamanı tayini için, inkübe edilen tüm plazma örneklerine, PT-S reaktifi eklendi, 37°C'ye ısıtıldı ve pıhtılaşma süresi, otomatik olarak PT ölçüm cihazıyla, saniye olarak belirlendi.

aPTT testi için, örneklerle inkübe edilen plazma örneklerine, aPTT reaktifi eklendi, 5 dakika boyunca, 37°C'de ısıtıldı. Tüplere, 0,0025 M kalsiyum klorid çözeltisi eklenmesiyle eş zamanlı olarak, otomatik olarak PT ölçüm cihazıyla, pıhtılaşma süresi okundu.

pHEMA, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP yapısındaki polimerlerle elde edilen PT ve aPTT süreleri, Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Polimerik yapılarla temas eden plazmanın PT ve aPTT süreleri

	PT-S (normal 10-14 saniye)	aPTT (normal 20-40 saniye)
Kontrol plazma	12.2	33.4
pHEMA	12.7	116.5
pHEMA-AL	12.3	115.3
pHEMA-AL-HEP	12.0	119.4

Çizelgeden görüldüğü üzere, PT süreleri, tüm polimerler için normal sınırlar içinde kalmıştır. aPTT süreleri ise, kontrol plazmaya kıyasla, oldukça fazla artış göstermiştir. En büyük artışı, pHEMA-AL-HEP polimeri ile inkübe edilen plazma göstermiştir.

Kanın koagülasyon kaskadını izlemekte kullanılan temel testler, protrombin zamanı (PT) ve aktif kısmi tromboplastin zamanı (aPTT) testleridir. Protrombin zamanı testi (PT) ile, doku tromboplastini varlığında, doku faktörü yolundan ve ortak yoldan meydana gelen pıhtılaşma reaksiyonları birlikte değerlendirilir. Testin uygulanmasında, sitratlı plazma örneğine kalsiyum ve tromboplastin eklenir ve doku faktörü yolundan fibrin pıhtısı oluşana kadar geçen zaman ölçülür.

Aktif kısmi tromboplastin zamanı (aPTT) testi ile, vasküler yolda ve ortak yolda bulunan faktörlerin (FV, FVIII, FIX, FX ve FXI) kalıtsal veya edinsel eksiklikleri taranır. Testin uygulanması için, kan plazmasına fosfolipid

ve kalsiyum eklenir ve kontakt faktörlerinin aktivasyonu sonrasında, vasküler yoldan pıhtı oluşana kadar geçen zaman, saniye olarak ölçülür.

Koagülasyon kaskadının doku faktörü yolunda veya ortak yolunda yer alan herhangi bir pıhtılaşma faktörünün eksikliğinde; PT süresi uzarken, vasküler ya da ortak yolda yer alan herhangi bir faktörün eksikliğinde; aPTT süresi uzamaktadır. Koagülasyon kaskadı faktörlerinden birinin fazla bulunması durumunda, pıhtılaşmaya eğilim oluşmaktadır, bunun sonucunda PT ve aPTT süreleri kısalmaktadır. PT süresinin normalden uzun, aPTT süresinin ise, normal sınırlar içinde olması, sadece FVII eksikliğinde gözlenir. PT ve aPTT süresinin her ikisinin de normalden uzun bulunması, FX, FV, protrombin ya da fibrinojen gibi ortak yolda yer alan faktörlerin eksikliklerinde meydana gelmektedir.

Heparin gibi antikoagülan ajanların etkileri, protrombin zamanını ölçen tek-basamaklı protrombin zamanı testi ile izlenir. Heparin tedavisi uygulandığında, ölçülen PT süresi normal sınırlar içinde kalırken, aPTT süresi normalden 2.0-3.5 kat uzun bulunmaktadır.

Tez kapsamında geliştirilen biyomateryelerin tümünde, PT normal sınırlardadır (pHEMA-AL-HEP için PT zamanı, 12.0 sn). Plazmanın aPTT zamanı ise, beklenildiği gibi, pHEMA-AL-HEP polimerinde, kontrol plazmasına göre 3.5 kat fazla ölçülmüştür (pHEMA-AL-HEP için 119.4 sn). Bu sonuçlar, pHEMA-AL-HEP yapısındaki polimerin, heparin etkinliğinin bulunduğunu ve polimerin, pıhtılaşma reaksiyonlarını aktive etmediğini göstermektedir.

Hemodiyaliz, hemofiltrasyon ve kardiyopulmoner bypass gibi biyomateryallerin kanla temasta olduğu uygulamalarda ve biyomateryallerin yumuşak veya sert dokulara implantasyonunda, koagölasyon mekanizması aktive edilmektedir. Bu mekanizmada trombin, fibrinojeni uyarır ve trombin reseptörü (CD42) ve aktive edilmiş proteinaz reseptörleri ile yangının oluşmasına katkıda bulunurlar. Bu reseptörler, trombosit, lenfosit, monosit, osteoblast gibi biyomateryale tepki olarak oluşan yangıda rol alan hücreler tarafından uyarılır. Trombositler, koagölasyon mekanizmasının farklı seviyelerde amplifikasyonunu sağlayabilirler. Amplifikasyon, aktive edilen trombositlere XI faktörünün trombin tarafından yapıştırılması olarak açıklanmaktadır ve trombosit aracılığı ile XI faktörünün fosforilasyonu, bu faktörün trombin ve XIIa faktörüne karşı direncini artırır. Trombositlerin, koagölasyonu ilerletmesinden önce trombinin oluşumu, diğer kan hücrelerine de bağlıdır. Eritrositler trombin oluşumunu tetikleyen önemli kan hücreleridir. Eritrosit parçalanması sonucunda membranındaki fosfolipidlerin açığa çıkması ile koagölasyon faktörleri arasında başlangıç komplekslerinin oluştuğu bildirilmiştir (104-106). Eritrositler, trombositler ve lökositler, biyomateryallerle temas sırasında membranlarından fosfatidilserini serbest bırakmaktadır. Fosfatidilserinin eritrositlerden serbest bırakılmasının nedeni ise biyomateryalle inkübasyonu sırasında hasar görmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (104-106)

Tutuklanmış heparinin, plazmadaki serbest heparine benzer antitrombojenik etki gösterdiği bildirilmiştir. Heparin, çeşitli pıhtılaşma faktörlerini, özellikle AT III'ü kapsayan, plazma proteinlerinin etkileşimlerini katalizlemektedir. Yapılan çalışmaların sonucunda (108,109) heparinin, AT

III'ü uyardığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, heparin tutuklanmış biyomateryallerin kanla temasları sağlandığında, etkili şekilde, antikoagülant aktivite göstermektedirler.

3.3.2. Hemolitik Aktivite

Hemolitik aktivite, spektrofotometrik olarak test edildi. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP polimerik yapıları, EDTA'lı insan kanı ile, 37°C'de 1.0 saat inkübe edilerek, tüplerde kalan kan örnekleri, 3000 devir/dakikada 20 dakika santrifüj edildi. Serbest kalan hemoglobin miktarı UV/VIS spektrofotometreyle, 545 nm'de tayin edildi. Kontrol olarak, aynı koşullarda izotonik çözeltide inkübe edilen serbest kan kullanıldı. Distile su içerisinde inkübe edilen kandan serbest bırakılan hemoglobinin oranı %100 kabul edildi. Elde edilen sonuçlar, Çizelge 3.12'de sunuldu.

Çizelge 3.12. pHEMA, pHEMA-HEP, pHEMA-AL ve pHEMA-AL-HEP polimerlerinin %hemoliz değerleri

	%Hemoliz
Damıtık su	100 ± 0.0
pHEMA	0.88 ± 0.2
pHEMA-HEP	0.53 ± 0.3
pHEMA-AL	0.58 ± 0.4
pHEMA-AL-HEP	0.27 ± 0.2

Çizelgeden görüldüğü gibi, pHEMA yapısına albumin ve heparin eklenmesi hemolitik aktiviteyi oldukça azaltmıştır.

3.3.3. Kan Hücrelerinin Yapışması

Diğer bir kan uyumluluk deneyi olan, kan hücrelerinin yapışması deneyi için yine tam kan sayımı yapıldı. pHEMA-AL-HEP polimerik yapısı ile inkübasyondan önce ve sonra yapılan tam kan sayımı ile, platelet sayısı değişimi gözlemlendi. Platelet yapışması oranı %7.2 ve yapışan platelet sayısı 39 platelet mm^{-2} 'dir. Bu oranlar literatüre göre çok düşüktür (1623 hücre/ mm^2) (110,111).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında, pHEMA temelli biyolojik olarak uyumlu biyomateryaller geliştirildi. Biyomateryallerin biyo-uyumluluğu polimer yapısına HSA eklenmesi ve yüzeye heparin bağlanması ile sağlandı. Heparin, 6 mm iç çapındaki pHEMA-AL polimer protezinin yüzeyine, 1,1'-karbonildiimidazol aktivasyonu ile, kovalent olarak bağlandı. pHEMA polimer yapısındaki HSA miktarının, bağlanan heparin miktarını arttırdığı gözlemlendi. pHEMA-AL-4 bileşimindeki polimer ile en yüksek heparin bağlanma değerine ulaşıldı ($80.64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Albumin eklenmesinin, polimerik yapıya, CDI aktivasyonu sırasında heparin bağlanması için, daha fazla reaktif grup oluşturduğu düşünüldü.

Hazırlanan pHEMA-AL-HEP yapısının yüzeyi, SEM analizleri ile incelendi ve diğer polimerlere göre, daha pürüzsüz olduğu veya gözeneklerin kapalı bir görünümde olduğu gözlemlenmiştir. Biyomateryalin, yüzeyinin pürüzsüz, düzgün olması, platelet ve bakteri adezyonunu zorlaştıran temel özelliklerden birisini oluşturmaktadır. pHEMA'ya albumin ve heparin ilavesi, biyomateryalin yüzeyine platelet yapışmasını önemli derecede azaltmıştır.

Polimer yapıların yüzey enerjileri hesaplandı. Polimer yapısındaki HSA konsantrasyonunun artmasının, polimerlerin hidrofilitelerini ve toplam yüzey enerjisine polar bileşenin katkısını arttırdığı görüldü. HSA yapısında çok miktarda hidrofilik fonksiyonel grup bulunmaktadır. Bunun yanında, HSA konsantrasyonunun artmasıyla, Lifshitz-van der Waals bileşenin (γ^{LW}) hafifçe azaldığı gözlemlenmiştir. Test edilen bütün biyomateryal örnekleri için,

dispersif bileşen, asit-baz bileşeninden daha büyüktür. Baz bileşeninin (γ^-), membranın asit bileşeninden (γ^+), daha yüksek olduğu aynı çizelgede gözlenmektedir. pHEMA'nın yüzeyinde -OH grupları bulunmaktadır. HSA'nın yapıya ilave edilmesi sonucu, karboksilik ve amino grubu gibi, asidik ve bazik gruplar, yüzeyde açığa vurulmaktadır.

Polimerlerin heparin kaplanmasından sonra, membranlarının yüzey özellikleri araştırıldı. Elde edilen sonuçlardan, yapıya bağlanan heparin miktarındaki artış sonucu, polimerlerin yüzey hidrofilitelerinde artışlar gözlenmektedir. Heparin miktarının artmasıyla birlikte polar bileşenin katkısı da artmaktadır. Heparin bileşimindeki SO_3^- ve COO^- grupları, yüzeyin anyonik özellikte olmasını sağlar. Elde edilen sonuçlardan, heparinin yüzeye bağlanmasıyla, % polarite değerinin de ($\gamma^{\text{AB}}/\gamma^{\text{TOT}} \times 100$) arttığı görülmüştür.

Gerçekleştirilen protein adsorpsiyonu deneylerinde, kan proteinleri ile heparinin aynı yükü taşımalarından dolayı, pH 7.4'te adsorpsiyonun en az olduğu gözlenmiştir. Heparin kaplı polimerler, heparin içermeyen polimerlerden daha düşük miktarda protein adsorplamıştır.

Albumin trombo dirençli bir özelliğe sahip olduğundan trombositlerin biyomateryal yüzeyine yapışmasını engeller. Fibrinojen, biyomateryal yüzeyine trombositlerin yapışmasını başlatıcı özelliğe sahiptir. pHEMA-HEP ve pHEMA-AL-HEP yapılarına, fibrinojen adsorpsiyonundaki azalma, heparinin kan uyumluluk özelliğinde bir artış sağladığını gösterir.

pHEMA ve pHEMA-AL polimerik yapılara heparinin kovalent bağlanması sonucu, heparinin yapısında bulunan, SO_3^- ve COO^- grupları, trombosit adezyonu ve protein adsorpsiyonunu azaltmıştır. pHEMA polimerik

yapılara yerleştirilen albuminin, yapıya daha çok fonksiyonel grup sağlamasının yanında, uzatıcı bir kol olarak davrandığı da düşünölmektedir.

pHEMA-AL-HEP polimerinin yüzeyine adsorplanan serum proteini miktarı çok düşüktür. Polimer yüzeyine, insan serum albumini ($1.36 \mu\text{g cm}^{-2}$), gama globulinden ($1.25 \mu\text{g cm}^{-2}$) daha fazla adsorplanmıştır. Elde edilen HSA/Fibrinojen adsorpsiyonu oranı da, literature göre (112) çok yüksektir (% 125).

Polimerlerin, kan uyumluluk deneyleri kapsamında, protrombin zamanı (PT) testi ve aktive kısmi tromboplastin zamanı (aPTT) uygulandı. PT süreleri, tüm polimerler için normal sınırlar içinde kalmıştır. aPTT süreleri ise, kontrol plazmaya kıyasla, oldukça fazla artış göstermiştir. En büyük artışı, pHEMA-AL-HEP polimeri ile inkübe edilen plazma göstermiştir.

Hemolitik aktivite, spektrofotometrik olarak test edildi. pHEMA yapısına albumin ve heparin eklenmesinin hemolitik aktiviteyi oldukça azalttığı gözlemlendi.

Kan hücrelerinin yapışması deneyi için yine tam kan sayımı yapıldı. pHEMA-AL-HEP polimerik yapısı ile platelet yapışması oranı %7.2 ve yapışan platelet sayısı $39 \text{ platelet mm}^{-2}$ 'dir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında hazırlanan pHEMA-AL-HEP biyomateryali, kolay sentezlenebilir, platelet adezyonu çok düşük olan, HSA/Fibrinojen adsorpsiyonu oranı yüksek, hemolitik aktivite göstermeyen, yüksek biyo-uyumluluğa sahip bir damar protezi olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

1. J. Enderle, S. Blanchard, J. Bronzino, Introduction to Biomedical Engineering, Academic Press, New York, , p. 538, 1999.
2. Stupp S.I. and Braun P.V. Science 277, 1242 (1997).
3. Yang, J-M., Wang, M.C., Hsu Y.G., Chang C.H., Lo S.K., Preparation of heparin containing SBS-g-VP copolymer membrane for biomaterial usage J. Memb. Sci., **138**, 19-27, (1998).
4. Wissink M.J.B., Beernink R., Poot A.A, Engbergs G.H.M., Beugeling T., van Aken W.G., Feijen J., Improved endothelialization of vascular grafts by local release of growth factor from heparinized collagen matrices, J. Contro. Rel. **64**, 103-114, (2000).
5. Anderheiden D., Klee D., Höcker H., Heller B., Surface modification of a biocompatible polymer based on polyurethane for artificial blood vessels, J. Mater. Sci. Mater. Med. **2**, 106-110, (1991).
6. Michanetzis G.P.A., Kaatsala, N., Missirlis Y.F., Comparison of haemocompatibility improvement of four polymeric biomaterials by two heparinization techniques, Biomaterials, **24**, 677-688, (2003).
7. Weber N., Wendel H.P., Ziemer G., Hemocompatibility of heparin-coated surfaces and the role of selective plasma protein adsorption Biomaterials, **23**, 429-439, (2002).
8. Lin J-C., Chen Y-F., Chen C-Y., Surface characterization and platelet adhesion studies of plasma polymerized phosphite and its copolymers with dimethylsulfate, Biomaterials, **20**, 1439-1447, (1999).

9. Dalton P.D., Shoichet M.S., Creating porous tubes by centrifugal forces for soft tissue application, *Biomaterials*, **22**, 2661-2669, (2001).
10. Yang J.M., Hsiue G.H., Oxygen permeation in SBS-g-VP membrane and effect of facilitated oxygen carrier, *J. Appl. Polym. Sci.* **41**, 141-148, (1990).
11. Hong J., Andersson J., Ekdahl, K.N., Elgue G., Axen N, Larsson R., Contact between a polymer and whole blood: Sequence of events leading to thrombin generation, *J. Lab. Clin. Med.*, **138**, 139-45, (1999).
12. Hsiue G.H., Yang J.M., Wu R.L., Preparation and properties of a biomaterial: HEMA grafted SBS by γ -ray irradiation, *J. Biomed. Mat. Res.*, **22**, 405-9 (1988).
13. Salzman EW, Undan J, McManama G, Ware JA, Role of fibrinogen in activation of platelets by artificial surfaces, *Ann NY Acad Sci.*, **516**, 184-95 (1987).
14. Elam JH, Nygren H. Adsorption of coagulation proteins from whole blood on to polymer materials: relation to platelet activation, *Biomaterials*, **13**, 3-8, (1992).
15. Hong J, Andersson J, Ekdahl KN, Elgue G, Axen N, Larsson R, Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: possible implications for osteogenesis, *Thromb Haemost* **82**, 58-64, (1999).
16. Arnirkhosravi A, Alexander M, May K, Francis DA, Warnes G, Biggerstaff J, The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay, *Thromb Haemost*, **75**, 87-95, (1996)

17. Lindmark E, Tenno T, Siegbahn A., Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 2322-8, (2000).
18. Favia P. and D'Agostino. Plasma treatments and plasma deposition of polymers for biomedical applications, *Surf. Coatings Technol.* **98**, 1102.-1106, (1998),
19. Formichi M.J., Guidoin R.G., Jausseran J.M., Awad J.A., Johnston K.W., King M.W., Eng P., Courbier R., Marois M., Rouleau C., Expanded PTFE prostheses as arterial substitutes in humans: late pathological findings in 73 excised grafts, *Ann. Vasc. Surg. Jan*, **2(1)**, 14-27 ,(1988).
20. Tanaka M., Motomura T., Kawada M., Anzai T., Kasori Y., Shiroya T., Shimura K., Onishi M., Mochizuki A., Blood compatible aspects of poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA)*relationship between protein adsorption and platelet adhesion on PMEA surface, *Biomaterials*, **21**, 1471-1481, (2001).
21. Pislaru S.V., Harbuzariu A., Agarwal G., Witt T., Gulati R., Sandhu N.P., Mueske C., Karla M., Simari R.D., Sandhu G.S., Magnetic forces enable rapid endothelialization of synthetic vascular grafts, *Circulation*, **4**, 114, 1314-1318, (2006).
22. Goodman S.L., Tweden K.S. and Albrecht R.M.. Platelet Adhesion and activation on low-temperaturer isotropic pyrolytic carbon, *J. Biomed. Mater. Res.* **32(2)**, 249-258, (1996).

23. Mustard J.F. and Packham M.A., the role of blood and platelets in atherosclerosis and the complications of atherosclerosis, *Thromb Diath Haemorrh Jun*, 30; **33(3)** 444-456, (1975).
24. Arica M., Hasircı V., Low molecular weight heparin-conjugated liposomes with improved stability and hemocompatibility, *Drug Delivery*, **5**, 257-264, (1998).
25. Yılmaz, M. Bayramoğlu, G., Arica M.Y., Separation and purification of lysozyme by Reactive Gren 19 immobilised membrane affinity chromatography, *Food Chemistry*, **89**, 11-18, (2005).
26. Bos G.W., Scharenborg N.M., Poot A.A., Engbergs G.H.M., Beugeling T., van Aken W.G., Feijen J., Blood compatibility of surfaces with immobilized albumin-heparin conjugate and effect of endothelial cell seeding on platelet adhesion, *J. Biomed. Mater. Res*, **47**, 279-291, (1999).
27. Hill D., *Design Engineering of Biomaterials for Medical Devices*, Wiley, New York, pp. 143–150, (1998).
28. Ohl A. and Schroder K.. Plasma-induced chemical micropatterning for cell cultring applications: a brief review, *Surf. Coatings Technol.* **116–119**: 820–830 (1999).
29. Liefeth K., Sauberlich S., Frant M., Klee D., Richter E.J., Hocker H. and Spiekermann H.. Characterization of the properties of differently modified titanium surfaces for dental implantology. 1. Methods for surface analysis *Biomed. Tech.* **43** (11) , 330-335 (1998).
30. Bos GW., Scharenborg N.M., Poot A.A., Engbergs G.H.M., Beugeling T., van Aken W.G., Feijen J., Proliferation of endothelial cells on

surface-immobilized albumin-heparin conjugate loaded with basic fibroblast growth factor, *J. Biomed. Mater. Res*, **44**, 330-340, (1999).

31. Fisher-Brandies H., Es-Souni, M., Kock N., Raetzke, K., Bock O., Transformation behavior, chemical composition, surface topography and bending properties of five selected 0.0016" x 0.022" NiTi archwires, *J. Orofac Orthop.*, Mar, **64(2)**, 88-99, (2003).

32. Chatterjee k., Vogler EA, Siedlecki, C.A., Procoagulant activity of surface immobilized Hageman factor, *Biomaterials*, Nov, **27(33)**; 5643-5650, (2006).

33. Chen J.Y., Leng, Y.X., Tian X.B., Wang, L.P., Huang N., Chu, P.K., Yang, P., Antithrombogenic investigation of surface energy and optical bandgap and hemocompatibility mechanism of Ti(Ta(+5))O₂ thin films, *Biomaterials*, Jun, **23(12)**, 2545-2552, (2002).

34. Zhao Q., Zhai G.-J., Ng D.H.L., Zhang X.-Z. and Chen Z.-Q.. Surface modification of Al₂O₃ bioceramic by NH₂⁺ ion implantation, *Biomaterials* **20(6)**, 595-599, (1999).

35. Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, New York, 105–107(1996).

36. Lan, S., Veiseh, M., Zhang, M., Surface modification of silicon and gold-patterned silicon surfaces for improved biocompatibility and cell patterning selectivity, *Biosens Bioelectron.* **20**, 1697-1708, (2005).

37. Ong J.L. and Lucas L.C.. Auger electron spectroscopy and its use for the characterization of titanium and hydroxyapatite surfaces, *Biomaterials* **19**, 455-464, (1998).
38. Cui F.Z. and Luo Z.S.. biomaterials modification by ion-Beam Processing, *Surf. Coatings Technol.* **112**, 278-285 (1999).
39. Ohl A., Schleinitz W., Meyer-Sievers A., Becker A., Keller D., Schroder K. and Conrads J.. Design of an UHV reactor system for plasma surface treatment of polymer materials, *Surf. Coatings Technol.* **116–119**, 1006-1010, (1999).
40. Sioshansi P. and Tobin E.J.. Surface treatment of biomaterials by ion beam processes, *Surf. Coatings Technol.* **83**, 175-182, (1996).
41. Ratner B.D.. Plasma deposition for biomedical applications: a brief review *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **4**, 3-11, (1992).
42. Picraux S.T. and Pope L.E.. Tailored Surface Modification by ion implantation and laser treatment, *Science* **226**, 615 (1984).
43. Van Delden CJ, Lens JP, Kooyman RPH, Engbers GHM., Feijen J., Heparinization of gas plasma-modified polystyrene surfaces and the interactions of these surfaces with proteins studied with surface plasmon resonance *Biomaterials*, **12**, 845-52, (1997).
44. Hoffman AS, Modification material surfaces to affect how they interact with blood, *Ann NY Acad Sci*, **516**,96-101, (1987).
45. Sheu MS, Hoffman AS, Ratner BD, Feijen J, Harris JM, Immobilization of polyethylene oxide surfactants for non-fouling biomaterial surfaces using an argon glow discharge treatment, *J Adhes Sci. Echnol.*, **7**, 1065-76, (1993).

46. Ratner BD., Surface modification of polymers: chemical, biological and surface analytical challenges, *Biosensors Bioelectron*, **10**, 797-804, (1995).
47. Ratner BD., Castler DG., Surface modification of polymeric biomaterials, New York, NY, Plenum Press, p.206, (1997).
48. Wagner W.C. A brief introduction to advanced surface modification technologies, *J. Oral Implantol.* ,18 (3), 231-4, (1992).
49. Brynda E., Houska M., Jirouskova M, Dyr J.E., Albumin and heparin multilayer coatings for blood-contacting material devices. *J. Biomed. Mater. Res.* **2**, 249-57, (2000).
50. Jacobs, H., Grainger D, Okano T, Kim SW, Surface modification for improved blood compatibility, *Artif Organs*, **6**, 506-7, (1988).
51. Van Delden CJ., Engbers G.H.M., Feijen J., Interaction of ATIII with surface immobilized albumin heparin conjugates, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 1317-29, (1995).
52. Cremers HFM., Kwon G., Bae Y.H., Kim S.W., Verrijh R., Noteborn H.P.J.M., Feijen J. Preparation and characterisation of albumin heparin microspheres, *Biomaterials*, **17**, 38-48, (1994).
53. Yang J.M., Hsiue G.H., Radiation-induced graft copolymer SBS-g-VP for biomaterial usage, *J. Biomed Mater Res*, 31(2); 281-6, (1996).
54. Ishihara K., Fukumoto K., Iwasaki Y., Nakabayashi N., Modification of polysulfone with phospholipid polymer for improvement of the blood compatibility. Part 2. Protein adsorption and platelet adhesion *Biomaterials*, **20**, 1553-1559, (1999).

55. Baumann H., Kokott A. Surface modification of the polymers present in a polysulfone hollow fiber hemodialyzer by covalent binding of heparin or endothelial cell surface heparan sulfate: flow characteristics and platelet adhesion, *J. Biomed. Sci. Polym. Ed.*, **11**, 245-272, (2000).
56. Higuchi A., Iwata N., Nakagawa T. Surface modification of polysulfone hollow fibers. II. Fibers having $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ segments and immersed in HCl solution, *J. Appl. Polym. Sci.* **40**, 709-717, (1990).
57. Yang, M.C., Lin, W.-C., Protein adsorption and platelet adhesion of polysulfone membrane immobilized with chitosan and heparin conjugate, *Polym. Adv. Technol.*, **14**, 103-115, (2003).
58. Chen J.-H., Laiw R.-F., Jiang S.-F., Lee Y.-D. Microporous segmented polyurethane vascular graft: 1. Dependency of graft morphology and mechanical properties on compositions and fabrication conditions, *J. Biomed. Mater. Res.* **48**, 235-245, (1999).
59. Brothers T.E., Stanley J.C., Burkel W.E., Graham L.M. Small-caliber polyurethane and polytetrafluoroethylene grafts: A comparative study in a canine aortoiliac model, *J. Biomed. Mater. Res.* **24**, 761-771, (1990).
60. Duncan A.C., Boughner D., Campbell G., Wan W.K. Preparation and characterization of a polyhydroxyethylmethacrylate biomedical hydrogel, *Europen. Polym. J.*, **37**, 1821-1826, (2001).
61. Christensen K., Larsson R., Emanuelsson, Elgue G., Larsson A., Heparin coating of stent graft-effects on platelets coagulation and compliment activation, *Biomaterials*, **22**, 349-355, (2001).
62. Chandy T., Das G.S., Wilson R.F. and Rao G.H.R. Use of plasma glow for surface-engineering biomolecules to enhance

bloodcompatibility of Dacron and PTFE vascular prosthesis, *Biomaterials* **21** , 699-712, (2000).

63. McIntyre D.E., Pearson J.D. and Gordon J.K.. Localisation and stimulation of prostacyclin production in vascular cells, *Nature* 271 549-551 (1978).

64. Loskutoff D.J. and Edgington T.E.. Synthesis of a fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 3903-7, (1977).

65. Esmon E.M., Owen W.G. and Esmon C.T.. Isolation of a membrane bound cofactor for thrombin catalyzed activation of protein C, *J. Biol. Chem.* 25, **257(2)**, 859-864, (1982).

66. Bamford CH., Al-Lamee K.G. Studies in polymer surface functionalization and grafting for biomedical and other applications, *Polymers*, **13**, 2844-52, (1994).

67. Kawakami S., Kaibara M., Kawamoto Y. and Yamanaka K.. Rheological approach to the analysis of blood coagulation in endothelial cell-coated tubes: activation of the intrinsic reaction on the erythrocyte surface *Biorheology* **32**, 521-536, (1995).

68. Kaibara M., Takahashi A., Kurotobi K. and Suzuki Y., Proliferation of endothelial cells on the plasma-treated segmented-polyurethane surface: attempt of construction of a small caliber hybrid vascular graft and antithrombogenicity, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **19**, 3, 209-217 (2000).

69. Margolis J.. Glass surface and blood coagulation *Nature* **178**, 805-806, (1956).

70. Chen W., Schoen FJ., Levy RJ. Mechanism of efficiency of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves, *Circulation*, **90**, 323-9, (1994).
71. Levy RJ, Qu X., Underwood T., Trachy J., Schoen FJ, Calcification of valved aortic allografts in rats: effects of age, crosslinking and inhibitors, *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 217-26, (1995).
72. Chanda J., Kuribayashi R., Abe T., New generation-valved conduit: An experimental study, *J. Thorac Cardiovasc. Surg.*, **114**, 218-23, (1997).
73. Toes G-J, van den Dungen J.J.A.M., Haan J., Hermens R.A.E.C., van Oeveren W., Fluorescence labeling to study platelet and leucocyte deposition onto vascular grafts in vitro *Biomaterials*, **20**, 1951-58, (1999).
74. Wyre R.M., Downes S., An in vitro investigation of the PEMA/THFMA polymer system as a biomaterial for cartilage repair *Biomaterials*, **21**, 335-343, (2000).
75. Wyre R.M., Downes S., The role of protein adsorption on chondrocyte adhesion to a heterocyclic methacrylate polymer system *Biomaterials*, **23**, 357-364, (2002).
76. van Wachem PB., Vreriks CM., Beugeling T., Feijen J., Bantjes A., Deumers J.P., van Aken W.G., the influence of protein adsorption on interactions of cultured human endothelial cells with polymers, *J. Biomed. Mater. Res.* **21**, 701-718, (1987).

77. Park K.D., Okano, T., Nojiri C., Kim S.W., Heparin immobilized onto segmented polyurethaneurea surface effect of hydrophilic spacer, *J. Biomed. Mater. Res.* **22**, 977-86, (1988).
78. Nojiri, C., Okano T., Park K.D., Kim S.W., Suppression mechanism of thrombus formation on the heparin immobilized segmented polyurethaneureas, *Trans- ASAIO*, **34**, 386-91, (1988).
79. Nojiri, C., Park K.D., Okano T., Kim S.W., In vivo protein adsorptions onto polymers: A transmission electron microscopic study, *Trans. ASAIO*, **35**, 357, (1989).
80. Goosen M.F.A., Sefton, M.W., Hatton M.W.C., Inactivation of thrombin by antithrombin III on a heparinized biomaterial, *Thromb. Res.*, **20**, 543-48, (1980).
81. Rollason G., Sefton M.V. Inactivation of thrombin in heparin-PVA coated tubes, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1**, 31-8, (1989).
82. Bayramoğlu, G., Yılmaz, M., Arıca M.Y. Affinity dye-ligand poly(hydroxyethyl methacrylate)/chitosan composite membrane for adsorption lysozyme and kinetic properties, *Biochemical Engineering Journal*, **13**, 35-42, (2003).
83. Chung C.W., Kim H.W., Kim Y.B., Rhee Y.H., Polyethylene glycol-grafted poly(3-hydroxyundecenoate) Networks for enhanced blood compatibility, *J. Biol. Macromol.*, **32**, 17-22, (2003).
84. Arıca, M.Y., Hasırcı, V., Immobilization of glucose oxidase in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) membranes *Biomaterials*, Vol. **8**, 489-495, (1987).

85. Bayramoğlu, G., Yılmaz, M. Arıca, M.Y., Evaluation of lysozyme adsorptive behaviour of pHEMA-based affinity membranes related to the surface energy and its components to be used in chromatographic fields, *Colloids and Surfaces A: Physicochem, Eng, Aspects*, **243**, 11-21, (2004).
86. Hicks, C.R., Morris, I.T., Vijayasekaran, S., Fallon, M.J., McAllister, J., Clayton, A.B., Chirila, T.V., Crawford, G.J., Constable, I.J., Correlation of histological findings with gadolinium enhanced MRI scans during healing of a PHEMA orbital implant in rabbits, *Br. J. Ophthalmol* **83**, 616-621 (1999).
87. Zisman W.A. Influence of constitution on adhesion, *Ind. Eng. Chem.* **55**, 19-38, (1963).
88. Fowkes F.M., Role of Acid-Base Interfacial Bonding in Adhesion, *J. Adhes. Sci. Technol.* 1, 7-27, (1987).
89. Wu S., Surface tension of solids: An equation of state analysis *J. Colloid Surface Sci.* **71**, 605-609, (1979).
90. van Oss C.J., Good R.J., Chaudury M.K., Additive and Nonadditive Surface Tension Components and the Interpretation of Contact Angles, *Langmuir* 4, 884, (1988).
91. West R.H., Paul A.J., Hibbert, S., Cahalan, P., Cahalan L., Verhoeven, M., Hendriks, M., Fouache, B., Correlation of the surface chemistries of polymer bioactive coatings with their biological performances, *J. Mater. Sci., Med.*, 6, 63-67, (1995).
92. Baumann H., Keller R., Which glycosaminoglycans are suitable for antithrombogenic or athrombogenic coatings or biomaterials? Part II. Covalently immobilized endothelial cell surface heparan sulfate (ESHS) and

heparin (HE) on synthetic polymers and results of animal experiments, *Semin Thromb Hemost.*, V23, 12, 215-23, (1997).

93. Kreitz M.R., Domm J.A., Mathiowitz, E., Controlled delivery of therapeutics from microporous membranes. II. In vitro degradation and release of heparin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolactide), *Biomaterials*, **24**, 1645-51, (1997).

94. Ferruti P., Barbucci R., Barozzi, C., Casini, G., Tempesti, F., Heparin adsorbing resins of poly(amido-amine) structure and surface structure of poly(amido-amines) on various materials. In: Dawids S., Banties A, editors. *Blood compatible materials and their testing*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 187-92, (1986).

95. Garred P., Mollnes T E, Immobilized heparin inhibits the increase in leukocyte surface expression of adhesion molecules, *Artif Organs*, **4**, 293-9, (1997).

96. Marconi F., Benvenuti F., Piozzi A. Covalent bonding of heparin to a vinyl copolymer for biomedical applications, *Biomaterials*, **12**, 885-90, (1997).

97. Lindhout T., Blezer R., Schoen P., Williems GM., Fonache, B., Verlidenfen, M., Hendriks M., Cahalan L., Cahalan P.T.; Antithrombin activity of surface-bound heparin studied under flow conditions, *J. Biomed. Mater. Res.*, V29, 110: 1255-66, (1995).

98. Da Luz Moreira P., Furlan Wada M.L., Novello W.P., Importance of uniform heparin coating on biopolymers, *Artif Organs*, **3**, 209-11, (2000).

99. Li H., Rief M., Gesterbelt F., Gaub H.E., Zhang X, Shen J., Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by AFM-nanomechanical fingerprint of α -(1-4)-linked polysaccharides, *Chem Phys Lett*, 305, 197-201, (1999).
100. Amiji M.M., Surface modification of chitosan membranes by complexation interpenetrating of anionic polysaccharides for improved blood compatibility in hemodialysis. *J. Biomed Sci. Polym. Ed.*, 8, 281-298, (1996).
101. Winterton L.C. Andrade ID, Feijen, J. Kim SW., Heparin interaction with protein with protein-adsorbed surfaces. *J. Coll. Interface Sci.*, **111**, 314-342, (1986).
102. Han D.K, Park, K.D., Preparation and surface characterization of PEO-grafted and heparin-immobilized polyurethane. *J.Biomed Mater Res. Appl. Biomater.*, **23**, 87-104, (1989).
103. Han D.K, Park, K.D., Kim, Y.H. Plasma protein adsorption to sulfonated poly(ethyl oxide) grafted polyurethane, *J.Biomed Mater Res.* **30**, 23-31, (1999).
104. Walsh P.N. Platelets and factor XI bypass the contact system of blood coagulation. *Thromb Haemost*, 82, 234-42, (1999).
105. Baglia F.A., Walsh P.N., Thrombin-mediated feedback activation of factor XI on the activated platelet surface is preferred over contact activation by factor XIIIa or factor XIa, *J. Biol Chem* 275, 205 14-9, (2000).
106. Helley D., Eldor A, Girot R., Ducrocq R, Guillin MC, Bezeaud A., Increased procoagulant activity of red blood cells from patients with

homozygous sickle cell disease and beta thalassemia., *Thromb Haemost.*, 76, 322-7, (1996).

107. Smith P.K., Mallia A.K., Hermanson, G.T., Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations, *Anal. Chem.* **109**, 466-473, (1980).

108. Li N., Wallen N.H., Savi, P., Herault, J.P., Herbert, J.M., Effects of a new platelet glycoprotein I_b/III_a antagonist, SR121566, on platelet activation, platelet-leukocyte interaction and thrombin generation. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **9**, 507-15, (1998).

109. Matsumoto Y., Marukawa, K., Okumura H., Adachi, T., Tani, T., Kimura, Y. Comparative study of antiplatelet drugs in vitro: distinct effects of cAMP-elevating drugs and GPIIb/IIIa antagonists on thrombin-induced platelet responses. *Thromb Res*, 95, 19-29, (1999).

110. Lin, W-C, Liu, T-Y, Yang, MC. Hemocompatibility of polyacrylonitrile dialysis membrane immobilized with chitosan and heparin conjugate *Biomaterials*, **25**, **10**, 1947-1957 (2004)

111. Dion I, Baquey, C, Candelon, B., Monties, J.R. Hemocompatibility of titanium nitride *Int. J. Artif. Organs*, **15**, 617-621, (1992).

112. Christensen K, Larsson R, Emanuelsson H, Elgue G, Larsson, A., Improved blood compatibility of a stent graft by combining heparin coating and abciximab, *Thrombosis Research*, **115**, 3, 245-253, (2005).