

**NANOPORLU ANOTLANMIŞ ALÜMİNYUM OKSİT
MEMBRANLARIN İLAÇ TAŞIMA VE SİNİR-DOKU MÜHENDİSLİĞİ
UYGULAMALARI İÇİN KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

SEVDE ALTUNTAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MİKRO VE NANOTEKNOLOĞİ ANABİLİM DALI**

**TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOĞİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2013

ANKARA

Onay sayfası

Fen Bilimleri Enstitü onayı

Prof. Dr. Necip Camuşcu
Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Turgut Baştuğ
Anabilim Dalı Başkanı

SEVDE ALTUNTAŞ tarafından hazırlanan NANO PORLU ANOTLANMIŞ ALÜMİNYUM OKSİT MEMBRANLARIN İLAÇ TAŞIMA VE SİNİR-DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Fatih Büyükserin
Tez Danışmanı

Tez Jüri Üyeleri

Başkan : Doç.Dr. Gökhan Demirel

Üye : Doç. Dr. Fatih Büyükserin

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ersin Emre Ören

Üye : Yrd. Doç. Dr. Göknur Cambaz Buke

Üye : Yrd. Doç. Dr. Birsen Can Demirdöğen

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

(İmza)
SEVDE ALTUNTAŞ

Üniversitesi : TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Enstitüsü : Fen Bilimleri
Anabilim Dalı : Mikro ve Nanoteknoloji
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Fatih Büyükseirn
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Ağustos 2013

SEVDE ALTUNTAŞ

**NANO PORLU ANOTLANMIŞ ALÜMİNYUM OKSİT MEMBRANLARIN
İLAÇ TAŞIMA VE SİNİR-DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

AAO membranlar kendine özgü kontrol edilebilen özellikleriyle biyomedikal mühendisliğinde ilaç taşıyıcılardan doku mühendisliğine kadar geniş bir alanda kullanılan popüler bir biyomalzeme sınıfıdır.

Tezin ilk kısmında yapılan çalışmalarda AAO membranlar kalıp olarak kullanılarak kalıp sentez ve sol-jel metotlarıyla SNT'ler elde edilmiştir. İç ve dış yüzeylerinin farklı zamanlarda modifikasyonuna izin veren üretim tekniği (kalıp-sentez) dikkate alınarak SNT'lerin dış yüzeyi folik asitle kaplanarak, tüpler kanser hücreleri için güdümlü hale getirilmişlerdir. İç kısımları da kanserli dokuların düşük pH'lı ortamları düşünülerek asit içerisinde salınımı fazla olan DOX içerikli jel ile doldurulmuştur. Tüplerin, FA modifikasyonunun ve AAO membranların karakterizasyonu sırasında SEM, TEM, FT-IR, XPS, Zeta potansiyeli analizleri yapılmıştır. MCF-12A ve SK BR-3 hücre hatları ile SNT'lerin sitotoksitesisi üzerine yapılan testlere ek olarak hücre yüzeyine SNT'lerin tutunumu incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda, kanserli hücrelerde sağlıklı hücelere nazaran yüksek ölüm oranları tespit edilmiştir. Düşük pH'larda salınımına izin veren jel yapısının ve FA modifikasyonunun bu sonucu tetiklediği düşünülmektedir.

İkinci bölümde detaylandırılan çalışma, sinir – doku mühendisliği için yaklaşık 100 ve 300 nm por çapına sahip iki farklı tip AAO membranın kalıp olarak kullanıldığı CNM membranların üretimi ve karakterizasyonudur. Sinir hücrelerinin bir yüzeyde gelişimleri o yüzeyin elektriksel, kimyasal ve topografik özelliklerinin optimizasyonu ile ilişkilidir. Bu çalışma ile bahsedilen üç faktöründe kontrolü yapılmaya çalışılmıştır. Topografik özellikler iki farklı por çapı ve poroziteye sahip AAO membranlar ile, elektriksel özellikler PVD yöntemi ile AAO üzerine karbon kaplama yapılarak incelenmiştir. Kimyasal özellikler ise NGF katkılıdırma çalışmaları ile incelenecektir. Elde edilen CNM'ler SEM, TEM, XPS, EDX ve DC Voltaj/Akım Kaynağı ile karakterize edilmiştir. Halihazırda devam eden çalışmalarda, PC 12 hücrelerinin hazırlanan substratlarda tutunumu incelenmektedir.

Anahtar kelimeler: AAO, SNT, Kanser, CNM, Nöron.

University : TOBB Economics and Technology University
Institute : Institute of Natural and Applied Sciences
Science Programme : Micro and Nanotechnology
Supervisor : Associate Professor Dr. Fatih Büyükserin
Degree Awarded and Date : M.Sc. – August 2013

SEVDE ALTUNTAŞ

**INVESTIGATION OF NANOPOROUS ANODIZED ALUMINIUM OXIDE
MEMBRANES FOR DRUG DELIVERY AND NEURAL TISSUE
ENGINEERING APPLICATIONS**

ABSTRACT

With specific and controllable features, AAO membranes are unique materials having wide range of biomedical applications from drug delivery to neural tissue engineering.

The first part of this thesis is related to targeted drug delivery with multifunctional composite SNTs. A template synthesis method that employs the whole interior volume of SNTs for drug loading has been utilized. Upon targeting with FA, multifunctional nanoparticles were created which showed extensive cytotoxicity towards cancers cells (SK BR-3) compared with healthy ones (MCF-12A). A prominent feature of SNTs is the greater extent of cell death with lesser effective drug concentrations. The details of SNT fabrication, modification and characterization as well as the viability studies with cancer and normal cells are described. To characterize AAO membranes, SNT and FA modification of SNT outer surface a variety of techniques involving SEM, TEM, FT-IR, XPS, Zeta Potential Measurement were utilized.

The second part of this thesis proposes the investigation of CNM prepared from AAO templates for neural tissue engineering applications by utilizing topographic, electrical and chemical cues. In order to produce CNM, first AAO with ordered array or nanopores having ~100 nm and ~300 nm pore diameter was synthesized by two or one step anodization in different electrolytes. After characterization of AAO by SEM, the membrane was coated with carbon PVD to obtain conductive CNMs. To characterize CNMs; SEM, TEM, EDX, XPS and DC current/voltage sourcemeter were used. The cell experiments are in progress which will compare the cell viability, cell adhesion and neurite extension on bare AAO films and on CNMs with or without electrical stimulus.

Key words: AAO, SNT, Cancer, CNM, Neuron.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca engin sabrı ve bilgisiyle beni yönlendiren, yetiştiren, yeni bir ufuk kazanmama vesile olan faik ve değerli hocam Doç. Dr. Fatih Büyükserin'e teşekkürlerimi sunarım.

Silika nano test tüpler ile ilgili çalışmalarımız sırasında desteğini esirgemeyen Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden Doç.Dr. Gökhan Demirel ve Arş. Gör. Hakan Erdoğan'a teşekkür ederim.

Beni fikirleri ve perspektifi ile geliştiren, destekleyen ve bana yol gösteren kıymetli hocam Yrd. Doç.Dr. Ersin Emre Ören'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini her zaman hissettiğim kıymetli hocam Prof. Dr. Turgut Baştuğ'a teşekkür ederim.

NANOTR-9 Konferansı sırasında, Erzurum da tanıştığımız ve beni Bilkent Üniversitesi-UNAM da bulunan Nanobiyoteknoloji laboratuvarına hücre kültürü çalışmaları için kabul eden Yrd. Doç.Dr. Ayşe Begüm Tekinay hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Avrupa Komisyonu Marie Curie 7. Çerçeve Programı Araştırma Programı'na "Multikompozit Silika nano test tüplerin üretimi ve ilaç taşınımındaki kullanımlarının araştırılması" adlı çalışmaya verdikleri destekten ötürü ve 111M686 "Sinir doku mühendisliği için karbon nanotüp membran kullanımının araştırılması" adlı projeye verdikleri destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Yaşama sevincim, canım kardeşim Mustafa Emir Altuntaş'a, desteğini her zaman yanımda hissettiğim ablam Zeynep Kübra Altuntaş'a ve canım kardeşim Selim Altuntaş'a, bu zorlu süreçte beni maddi manevi yalnız bırakmayan anneciğim Vesile Altuntaş'a, her zaman çok uzaklarda olsa da benimle gurur duyduğunu söyleyen canım babam İbrahim Ethem Altuntaş'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	ix
KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Çalışmanın Amacı	1
1.1.1. AAO membranlar ve özellikleri	2
1.1.2. AAO membranların biyomedikal uygulamaları	6
2. KANSER HÜCRELERİNİN SEÇİMLİ OLARAK YOK EDİLMESİ İÇİN MULTİ FONKSİYONEL KOMPOZİT SİLİKA NANO TEST TÜPLERİN (SNT) KULLANIMI	9
2.1. Giriş	9
2.1.1. Kanser ve nano ölçekte ilaç taşıyıcılar	9
2.1.2. Sol- Jel teknolojisi, yüzey sol-jel metodu ve silan kimyası	10
2.1.3. Plazma temelli olarak malzemenin yüzeyden aşındırılması	13
2.2. İlaç Taşıyıcı Olarak SNT`lerin, Biyokimyasal Modifikasyonu ve Hücre Hatları Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi	14
2.2.1. Giriş	14
2.2.2. Deneysel gereç ve yöntemler	15
2.2.3. Tartışma ve sonuçlar	26

3. SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN KARBON NANOYAPILI MEMBRAN KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI	44
3.1. Giriş	44
3.1.1. Sinir hücrelerinin yapısı ve yenilenme mekanizması üzerine yapılan çalışmalar	44
3.1.2. Fiziksel buharlaştırma metodu	49
3.2. Sinir Hücrelerinin Yenilenmesi ve Gelişimi İçin Karbon Nanoyapılı Membranların Üretimi Ve Karakterizasyonu	51
3.2.1. Giriş	51
3.2.2. Deneysel gereç ve yöntemler	52
3.2.3. Tartışma ve sonuçlar	68
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	82
5. GELECEK ÇALIŞMALAR	85
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	94

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. AAO membranların biyomedikal uygulamaları. A)AAO membranların üretimlerinde kalıp olarak kullanıldığı ilaç taşıyıcı olarak kullanılan SNT'ler [14]. B) AAO membranların substrat olarak kullanıldığı PC 12 hücre hatlarının gelişiminin incelendiği bir çalışma [15]. C) Kemik hücrelerinin AAO membranlar üzerindeki gelişiminin incelenmesi [16].....	6
Çizelge 2.1. İlaç taşınımında kullanılan jelin formülasyonu	18
Çizelge 2.2. SNT konfigürasyonları ve etken madde konsantrasyonları	20
Çizelge 2.3. Image J ve Mathcad programları kullanılarak hesaplanan süre bağımlı por çapları ve standart sapmalar	26
Çizelge 2.4. SNT'lerin Zeta Potansiyeli ölçüm sonuçları.....	32
Çizelge 2.5. İlaç taşınımında kullanılan jelin eski ve yeni formülasyonu. (% V/V Hacimce yüzde,*W/V Hacimde ağırlıkça yüzde).	39
Çizelge 2.6. Kit ile yapılan sitotoksite çalışmalarında A) SK BR-3 ve B) MCF-12A hücre hatlarının canlılık değerlerini sayısal olarak gösterimi ve standart sapmalar.	41
Çizelge 3.1. PMMA ve PS kullanılarak yapılan lam deneylerinin koşulları. Lam deneylerinde her bir örnek için 2 ml çözelti spin kaplama cihazı kullanılarak kaplanmıştır. Her örnekten 2 adet hazırlanmıştır. Örneklerden biri 0,1 M $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ + 6,1 M HCl çözeltisine diğeri ise çözeltinin hazırlandığı çözücüye daldırılmıştır	57
Çizelge 3.2. H_3PO_4 'ün elektrolit olarak kullanıldığı AAO membran sentezleme çalışmalarında standart bir membran üretimi için üzerinde çalışılan parametreler	64

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. A) Ticari olarak üretilen AAO membranların (Whatman International), B) laboratuvarında okzalik asit içinde kontrollü şekilde büyütülen AAO membranların taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri	4
Şekil 1.2. Nano porlu AAO ve kullanım alanlarının şematik gösterimi [11].	5
Şekil 2.1. AAO membranların A) 0 dakika, B) 45 dakika, C) 50 dakika, D)55 dakika ve E) 60 dakika %5 lik H ₃ PO ₄ çözeltisinde 25 °C de bekletilmesi sonucu alınan SEM görüntüleri	27
Şekil 2.2. AAO membranların 52 dakika %5 lik H ₃ PO ₄ çözeltisinde 25 °C de bekletilmesi sonucu alınan SEM görüntüleri	28
Şekil 2.3. Ticari olarak üretilen AAO membranlar kullanılarak hazırlanan SNT`lerin TEM görüntüleri	28
Şekil 2.4. SNT`lerin bağlı olduğu AAO membranın SEM görüntüsü	29
Şekil 2.5. Serbest haldeki SNT`lerin TEM görüntüsü.....	29
Şekil 2.6. A) Silika yüzeyin NH ₂ ile kaplanma prosedürü. B) NH ₂ kaplı tüplerin FA ile kaplanma prosedürü [52]	30
Şekil 2.7. SNT lerin FTIR spektrumu. ▲ SNT, ■ NH ₂ -SNT, ● FA-NH ₂ -SNT	33
Şekil 2.8. SNT`lere ait XPS spektrumu. A) Genel XPS analizi sonuçları, B) APTES kaynaklı azot piki ve bu pikin fit eğrisi, C) APTES kaynaklı azota ek olarak, FA modifikasyonu sonrası oluşan ikincil amin kaynaklı azot piki ve bu pikin fit eğrisi.	35
Şekil 2.9. Jel dolu SNT`lerin TEM görüntüsü. Çap 123 ± 14 nm, boy 820 ± 99 nm.....	36
Şekil 2.10. SK BR-3 hücre hattı üzerinde farklı testler kullanılarak DOX ile yapılan sitotoksisite çalışmaları	37

Şekil	Sayfa
Şekil 2.11. MCF-12A hücre hatları ile WST-1 Kit kullanılarak inkübasyon süresine bağlı olarak gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmaları. Bu çalışmada 53 µg/ml konsantrasyonunda SNT 2 örneği kullanılmıştır.	38
Şekil 2.12. Kit ile yapılan sitotoksisite çalışmalarına göre A)SK BR-3 ve B) MCF-12A hücre hatlarının canlılık oranları. SNT1= FA(-) Jel(-) DOX(-) SNT'ler, SNT2= FA(+) Jel(-) DOX(-) SNT'ler, SNT3= FA(+) Jel(+) DOX(-) SNT'ler, SNT4= FA(-) Jel(+) DOX(+) SNT'ler, SNT5= FA(+) Jel(+) DOX(+) SNT'ler	40
Şekil 2.13. A) SK BR-3 hücre hattına ait normal, apoptotik ve nekrotik (ek resim) hücrelerin florasan mikroskobu görüntüleri. B) SK BR-3 ve MCF 12A hücre hatlarına ait SNT 4 ve SNT 5 örneklerinin iki farklı konsantrasyonda kullanıldığı apoptotik indeks çalışmalarının sonuçları.	42
Şekil 2.14. Florasan mikroskopta SNT'lerin görüntüleri. A) İç yüzeyi amin kaplı SNT lerin uzun süreli florasan boya içerikli karışım içinde bekletme sonrası , B) Amin aktif hale getirilen florasan boyanın SNT'lerin iç yüzü ile kısa süre içinde etkileşime girmesi sonrası çekilen florasan mikroskop görüntüleri	43
Şekil 3.1. Bir sinir hücresinin temel gösterimi	45
Şekil 3.2. Hücreler arası ortam olan ekstraselüler matriksin görünümü [74]	46
Şekil 3.3. A) Nano metal çubuklardan oluşan substrat üzerinde, B) iletken polimer substrat üzerinde, C-D) düzenli olmayan karbon nanotüp substrat üzerinde nöritlerin gelişimi ile ilgili yapılan çalışmalar.....	47
Şekil 3.4. A) Okzalik asit çözeltisi B)fosforik asit çözeltisi içinde büyütülen nanoporlu AAO membranların SEM görüntüsü	49
Şekil 3.5. Fiziksel Buhar Biriktirme metodunun şematik gösterimi	50
Şekil 3.6. A) Alüminyum üzerinde oluşan AAO filmlerin ve alüminyumun kesit çizimi ve B) filmlerin alüminyumdan ayrılmasıyla elde edilen AAO membranlarda bulunan iki farklı yüz	53

Şekil	Sayfa
Şekil 3.7. AAO filmlerden birinin yüzeyinin vernik ile kaplanması ve kaplama bulunmayan AAO yüzeyin asidik CrO_3 çözeltisi kullanarak uzaklaştırılması sonucu elde edilen substrat	56
Şekil 3.8. Koruma amaçlı parafilm kullanarak AAO membran eldesi. A)Yüksek saflıktaki Al folyo. B) Al folyo ve üzerinde büyütülmüş olan AAO membranlar. C) Porlu oksit yüzeylerin biri sıcaklık artışına bağlı olarak parafilm ile kaplanması. D) Açıkta kalan yüzey 0,1 M NaOH ile yüzeyden uzaklaştırılması. E) 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisi ile Al tabaka membranın bariyer yüzünden temizlenmesi. F) Yüzeyde bağlı olan parafilm n-hekzan ile temizlenmesi. G) PVD ile karbon kaplama yapılarak CNM eldesi	64
Şekil 3.9. Vernik kullanılarak korunan AAO membranın A) ön yüz, B) arka yüz (por çapı= $58,17 \pm 3,31$ nm), PMMA kaplı AAO membranın piranha çözeltisinden sonraki durum C)ön yüz D)arka yüz (por çapı= $103,345 \pm 2,28$ nm), E-F)PMMA kaplı AAO membranın REI-1C plazma sistemi kullanılarak 170 saniye oksijen plazmaya tabi tutulduktan sonraki durumu(por çapı= $39,6 \pm 1,4$ nm), koruma amaçlı parafilm kullanarak elde edilen AAO membran G)ön yüz (por çapı= $48,04 \pm 0,69$ nm) H)arka yüz, I) okzalik asit içerisinde üretilen AAO membranın 10 nm karbon kaplandıktan sonraki durumu (Por çapı= $95,017 \pm 2,17$ nm), j) fosforik asit içerisinde üretilen AAO membranın 20 nm karbon kaplandıktan sonraki durumu (Por çapı= $290,546 \pm 8,825$ nm)	70
Şekil 3.10. AAO membran sentezi sırasında oluşan bariyer tabakanın %5 H_3PO_4 içinde membranı A)0, B)75, C)120 ve D)150 dakika bekleterek uzaklaştırılması.....	71
Şekil 3.11. Okzalik asit elektrolitinde üretilen AAO'dan CNM eldesi. AAO membran 120 dakika % 5 H_3PO_4 çözeltisinde bekletilerek çözelti yüzündeki porlar istenen büyüklüğe ulaşmış ve 10 nm C ile kaplanarak CNM elde edilmiştir. (Por çapı= $95,017 \pm 2,17$ nm). A) düşük büyütmede ve B) yüksek büyütmede SEM görüntüsü.....	72
Şekil 3.12. İkinci anodizasyon sonrası AAO membranın çözelti yüzündeki çift katlı membran yapısı.....	73
Şekil 3.13. AAO membranın A)çözelti yüzüne yakın, B) bariyer yüzüne yakın yanal kesit görüntüsü.....	73

- Şekil 3.14. Kromat çözeltisindeki H_3PO_4 derişiminin artmasına bağlı olarak yüzeyden ilk anodizasyon aşamasında oluşan AAO filmin uzaklaştırılması. A) Oluşan membranın bariyer yüzünün 75 dakika %5 H_3PO_4 bekletildikten sonraki durumu. AAO membranın bariyer yüzündeki porların derişik asit çözeltisi ile açılması. B)10 saniye, C) 5 dakika sonrasında membranın farklı bölgelerindeki porların durumu. Por çapı: $286,972 \pm 37,043$ nm Membran kalınlığı:~15 μ m. 74
- Şekil 3.15. Fosforik asit çözeltisi içerisinde tek aşamalı anodizasyon ile üretilen AAO membranın A) Kromat çözeltisi içinde bekletilmeden önce B) 30 dakika bekletildikten sonra C) 60 dakika bekletildikten sonraki SEM görüntüsü. B por çapı: $343,81 \pm 31,23$ nm, C figüründe porlar büyük oranda birleşme gösterdiğinden por çapı hesaplanamamıştır. Örnekler 5 nm Au-Pd ile kaplanmıştır..... 75
- Şekil 3.16. Fosforik asit çözeltisi içerisinde üretilen AAO membranın A) 10 nm B) 20 nm C) 50 nm karbon kaplanarak elde edilen CNM'lerin SEM görüntüsü. D) Okzalik asit çözeltisi içerisinde üretilen AAO membran 10 nm karbon kaplandıktan sonra elde edilen CNM'in SEM görüntüsü. Karbonun iletkenliği Au-Pd kaplamaya göre iletkenliği daha az olduğu için görüntülerin netliği azalmıştır..... 76
- Şekil 3.17. CNM kesit SEM görüntüleri ve EDAX analizi. A) Bariyer yüze yakın bölgedeki, B) çözelti yüzüne yakın bölgedeki SEM ve EDAX analizleri..... 77
- Şekil 3.18. A) CNM'in 280-290 eV özel aralığındaki XPS sonuçları. CNM, 0,1 M NaOH kullanılarak çözüldükten sonra ortaya çıkan CNT'lerin B) SEM ve C)EDAX analiz sonuçları 78
- Şekil 3.19. A) Nanoporlu karbon yüzey ve bu yüzeye bağlı CNT'ler. Nanoporlu karbon yüzeye bağlı CNT'lerin, B) düşük büyütme ve C) yüksek büyütmedeki görüntüleri. D) Serbest CNT TEM görüntüsü. CNM eldesi için fosforik asit içerisinde üretilmiş ve 20 nm C kaplanmış AAO membranlar kullanılmıştır 79

Şekil	Sayfa
Şekil 3.20. A) Maskeleye için kullanılan kalıp ve Au ile maskelenmiş CNM. B) Maskelenmiş CNM'in ışık mikroskobu ve C) şematik kesit görüntüsü. D) Farklı kalınlıklarda Au ve C kaplama yapılan membranların direnç değerleri. Membranlar üzerinde çalışılırken ölçümler aynı mesafeden alınmıştır. E) 20 nm C kaplanarak elde edilmiş CNM ve herhangi bir kaplama bulunmayan AAO membran	80
Şekil 3.21. Substrat ile ilgili ön çalışma sırasında hazırlanan 0,8 cm çaplı, 0,4 cm derinlikte 0,2 cm ³ hacimdeki bir bölgede fosforik asitte büyütülen AAO membranın aktif alan görüntüsü	81
Şekil 5.1. Hücre tutunumu ve nörit uzaması için kullanılacak substrat düzeneği CVD tekniği ile kaplanan ticari AAO membranların kullanıldığı elektroosmotik akış yönünün kontrolü için hazırlanan düzeneden esinlenerek [89] hazırlanan bu düzenede gerek sade AAO, gerekse CNM'ler 150 °C de parafilmle erimesiyle iki cam arasında sabitlenecektir. Düzeneğin sterilizasyonundan sonra hücre tutunum ve nörit uzama deneyleri için mikropilaka görevi görecektir. Açıkta kalan aktif alan kullanılacaktır. Elektriksel özelliklerin test edileceği uygulamalarda, anot ve katodun çözeltiyle etkileşimi söz konusu değildir.....	86

KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
AAO	Anotlanmış Alüminyum Oksit
AEM	2-aminoetilmetakrilat
APTES	3-aminopropiltrioksilan
CNM	Karbon Nanoyapılı Membran
CNT	Karbon nanotüp
CVD	Kimyasal Buhar Kaplama Metodu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOX	Doksorubisin-HCl
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EtOH	Etanol
FA	Folik asit
FBS	Fatal Bovin Serum
FITC	Florasın isosiyanat
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HEMA	Hidroksietilmetakrilat
IPA	2-propanol
MTT	(3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-Difeniltetrazolium Bromid
NHS	N-hidroksisüksinimid
NGF	Nöron büyüme faktörü
PBS	Tamponlanmış Fosfat Solusyonu
PEG-EEM	Poly(etilen glikol) etileter metakrilat
PMMA	Poli(metil metakrilat)
PS	Poli(stiren)
PVD	Fiziksel Buhar Kaplama Metodu
RIE	Reaktif İyon Aşındırıcı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SNT	Silika Nano Test Tüp
SSG	Yüzey Sol - Jel Metodu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TEOS	Tetra Etoksi Silan
TMOS	Tetra Metoksi Silan
XPS	X-Ray Fotoelektron Spektrometresi

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Çalışmanın Amacı

Nano herhangi bir ölçü biriminin milyarda birini belirtmek için kullanılan ifadedir. Biyolojik yapılar hücresel bazda incelendiğinde, pek çok mekanizmanın nano boyutlarda dizayn edilmiş moleküllerle çalıştığı görülür. Bu sebeple **BİYOTEKNOLOJİ** ve **NANOTEKNOLOJİ** uygulamalarının bir arada yürütüldüğü çalışmalar önem kazanmaktadır.

Nanoteknolojik çalışmaların 1959 da Richard Feynman tarafından yapılan “Aşağıda Daha Çok Yer Var” isimli konuşma ile başladığı kabul edilmektedir. Feynman’dan tam 15 yıl sonra 1974 yılında Norio Taniguchi tarafından bir makalede nanoteknoloji kelimesini kullanmasıyla gelişimi ivme kazanan bu yeni, inter disiplinler ve gelişmeye açık bilim, 21. yüzyılda uzay teknolojisinden hastalıkların tedavisine kadar birçok alanda kendine yer buldu. Hatta bugün günlük yaşantımızda o kadar fazla ürün nanoteknoloji kullanılarak üretilmeye ya da hizmete sunulmaya başladı ki çoğu hükümet nanoteknolojinin bilimsel olarak öncelikli bir alan olmasının yanında belli düzenlemelere tabi tutulması gerektiğini düşünüyor.

Nanoteknoloji nedir sorusuna verilebilecek en basit yanıt maddenin bir boyutu 100 nm altında olan malzemeleri inceleyen bilim dalı olsa da nanoteknolojiyi tanımlarken bu kadar dar düşünmemek gerektiğine inanıyorum. Nanoteknoloji, bir malzemenin atom atom, molekül molekül işlenmesi, parçalanması veya taşınması ile ilgilenen, elde ettiği verileri insanoğlunun en etkin biçimde kullanabilmesi için doğru mekanizmaları diğer bilim dallarından da destek alarak tasarlamaya çalışan bilim dalıdır.

Nanoteknolojinin beraber çalışıldığı bilim dallarından biri olan biyoteknoloji ise canlı ve cansız bütün sistemlerden faydalanarak canlıların ekosistem içindeki yerlerinin korunmasından genetik yapılarının incelenmesine kadar geniş bir alanı

tarayan bilim dalıdır. Biyoteknolojinin ilgilendiği konulardan biri de hastalıkların canlıya en az zararı verecek şekilde uygun tedavi yöntemleri ile tedavi edilebilmesi için, gerek hücre bazda çalışmalarla gerekse doğrudan hayvan ve bitki kullanımının olduğu çalışmalarla desteklenen araştırmalardır. Bu aşamada hücre zarındaki reseptörlere ve hücre davranışına uygun olarak tasarlanan kanser tedavisinde kullanılan nano ilaç taşıyıcılar, sinir yenilenmesinde kullanılan nano özellikli platformlar veya nano sensörler sayesinde hücre üzerinde istenilen etkinin oluşturulabileceği görülmüştür.

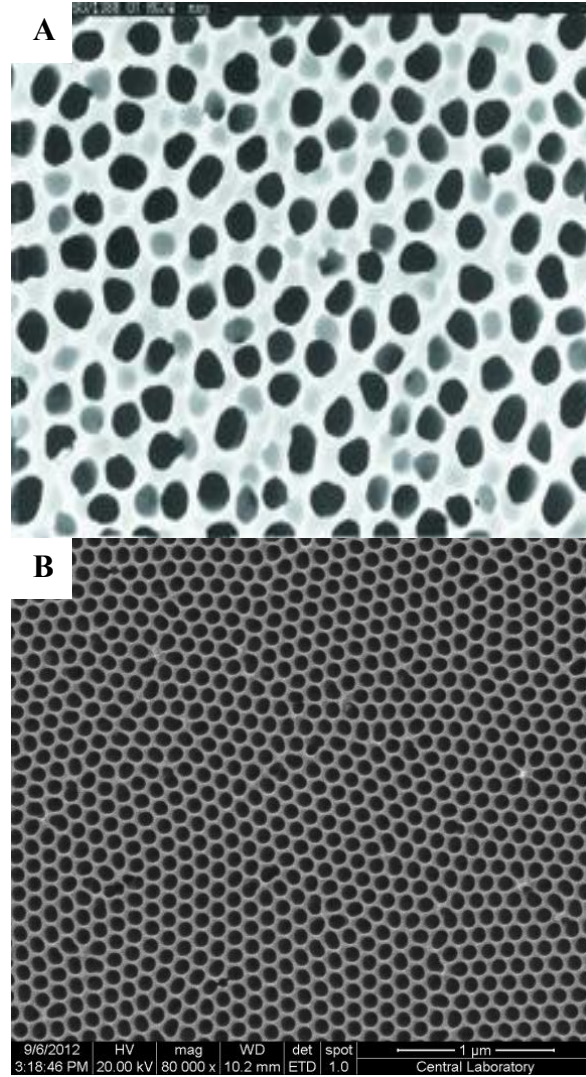
Bu çalışmada 21. yüzyıla damgasını vurması beklenen nano ilaç taşıyıcıların üretimi, karakterizasyonu ve kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin incelemesinin yanında nano özellikli platformların üretilmesi, karakterizasyonu ve sinir hücrelerinin hazırlanan yüzeyler üzerindeki gelişimlerinin incelenmesi üzerinde durulmaktadır. Belirtilen amaçlar için üretilen mekanizmaların üretiminde temelde anotlanmış nano porlu alüminyum oksit yüzeyler kullanılmıştır.

1.1.1. AAO membranlar ve özellikleri

Anodik alüminyum oksit yüzeyler (AAO) yüksek saflıktaki alüminyum tabakaların elektrokimyasal olarak oksitlenmesi sonucu oluşur. Yüzyıldan fazla süredir dekorasyondan medikal alana kadar pek çok alanda kullanımları araştırılmaktadır. Son 10 yıldır benzer özellikteki nano parçacıkların üretilmesi için bu yüzeylerin nano porlu ve düzenli yapısının kalıp olarak kullanıldığı çalışmalar yapılmaktadır [1-5]. Bunun yanında, bu malzeme üzerine buharlaştırma ya da yüzeyden uzaklaştırma yöntemleri ile başka malzemelerin aktarılması suretiyle elde edilen nanotüpler, nanoçubuklar, nano özellikli yüzeyler, nano noktalar ile yapılan çalışmalar mevcuttur [6-8]. Yüzeyler üzerindeki porların çapı kullanılan asit türü, uygulanan voltaj değeri, sıcaklık ve elektrolitin derişimine bağlı olarak 50-400 nm arasında değişmektedir. Anodizasyon süresine bağlı olarak da membranın kalınlığı kontrol edilebilmektedir. Por yoğunluğu da yaklaşık 10^{10} por/cm²'dir. Ticari amaçla üretilen AAO yüzeyler yaklaşık 60 µm kalınlıkta 20, 100 ve 200 nm por çapına sahiptir (Whatman International, Maidstone, England) [9]. Ancak bu yüzeylerin sıralı ve benzer

olmayan por yapıları çalışmaların tekrarlı olarak yapılmasını engelleyeceğinden nanobiyoteknoloji araştırmalarında ticari membranlar kolay kolay tercih edilmemektedir. (Şekil 1.1-A) Bu sebeple yapacağımız çalışmalar için uygun por düzen ve yapısına sahip AAO membranlar daha önce belirtilen koşullar kontrol altında tutularak üretilmiştir.(Şekil 1.1-B)

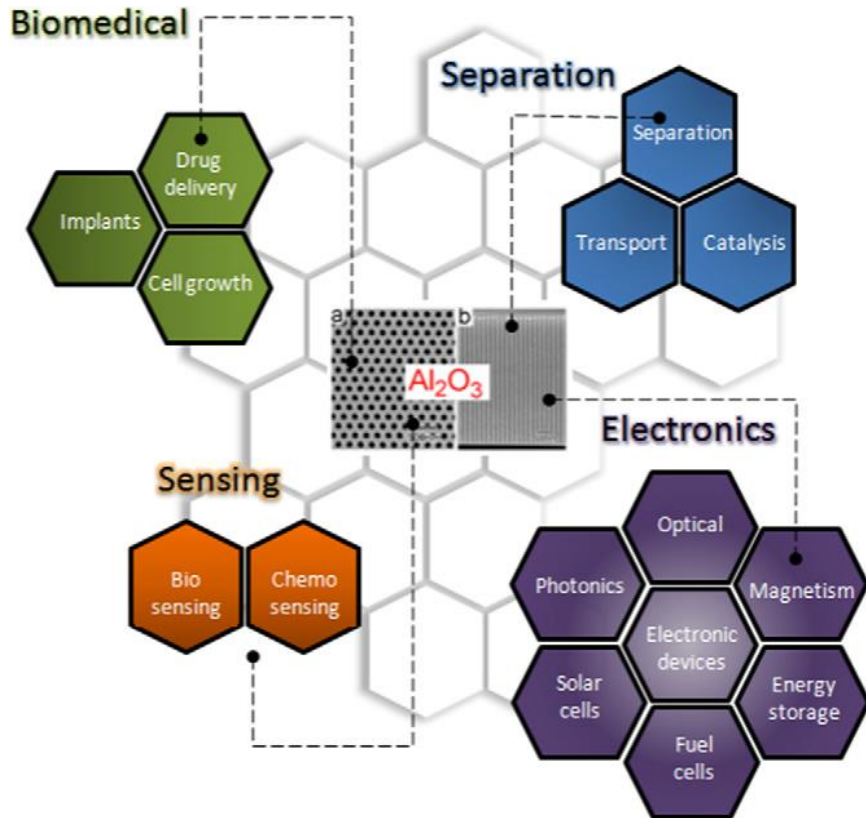
Şekil 1.1-B de gösterilen AAO membranın elde edilmesi için %99,9998 safliktaki alüminyum mekanik olarak zımpara kağıdıyla temizlendikten sonra derişik asit çözeltisi içerisinde 15 V voltaj altında kurşunun katot olarak kullanıldığı elektrokimyasal süreçte parlatılmaktadır. Ardından istenilen por çapına bağı olarak Al tabakalar asit çözeltileri içinde belli voltajlar altında sabit sıcaklıkta anodizasyona tabi tutulmaktadır. Anodizasyon süresine bağı olarak kalınlık da kontrol edilebilmektedir. Düzenli porlara sahip AAO membranların oluşumu için çoğunlukla Masuda ve Fukuda tarafından geliştirilen iki aşamalı anodizasyon tekniğı kullanılmaktadır [10].



Şekil 1.1. A) Ticari olarak üretilen AAO membranların (Whatman International), B) laboratuvarında okzalik asit içinde kontrollü şekilde büyütülen AAO membranların taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri.

Geleneksel iki aşamalı anodizasyon metodunda, ilk anodizasyon aşamasında oluşan porların yapısal düzenliliğini ve yüzey üzerindeki dağılımlarının homojenitesini artırmak amaçlanmaktadır. İlk anodizasyon sonrası oluşan oksit tabaka Krom (VI) Oksit içerikli fosforik asit çözeltisi ile çözüldüğünde Al yüzey üzerinde porların izleri kalmaktadır. Bu izler birinci anodizasyon ile aynı koşullarda gerçekleştirilen ikinci anodizasyon basamağında por oluşumunun başlama noktası olduğundan düzenli ve benzer por sıraları elde edilebilmektedir.

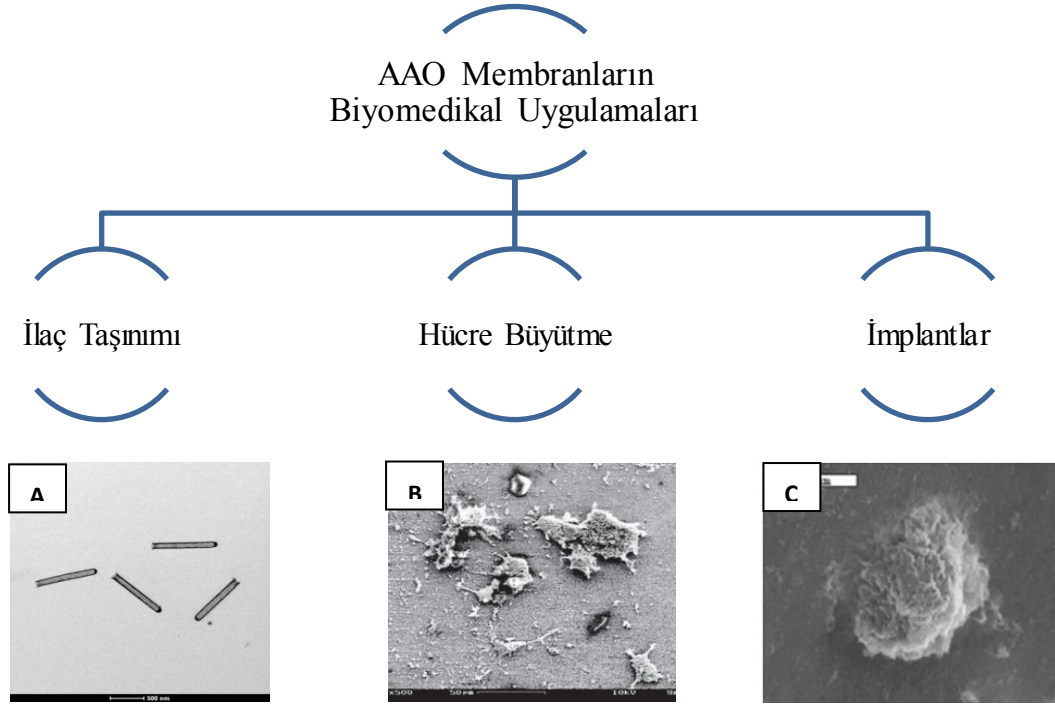
Kontrol edilebilir fiziksel ve kimyasal özellikleri ile AAO yüzeyler biyomedikal uygulamalardan, sensör, filtreleme ve elektroniğe kadar pek çok alanda kullanıma sahiptir (Şekil 1.2). Bu alanların dışında AAO membranlar yakıt pillerinde, güneş pillerinde, moleküler bağlanma (junction) ve fotonik kristaller ile ilgili çalışmalarda gün geçtikçe artan bir ilgi ile takip edilmektedir. Örneğin, AAO tabanlı metal-yalıtkan-metal (MIM) enerji depolama için kullanılacak nanokapasitörler Banerjee ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [11]. AAO membranların geniş alanlarda üretiminin kolaylığı nedeniyle, güneş pillerinde kullanımı da yaygınlaşmaktadır. Hupp ve ark. tarafından yapılan çalışmada atomik katman kaplama (ALD) metodu ile AAO membranlar ZnO ile kapanmış ve geniş alanlarda düzenli ve konformal polikristalin bir film elde edilmiştir. Bu malzemenin verimliliği %1,6 olarak rapor edilmiştir [12].



Şekil 1.2. AAO membranlar ve kullanım alanlarının şematik gösterimi [13].

1.1.2. AAO membranların biyomedikal uygulamaları

Çizelge 1.1. AAO membranların biyomedikal uygulamaları. A) AAO membranların üretimlerinde kalıp olarak kullanıldığı ilaç taşıyıcı olarak kullanılan SNT'ler [14]. B) AAO membranların substrat olarak kullanıldığı PC 12 hücre hatlarının gelişiminin incelendiği bir çalışma [15]. C) Kemik hücrelerinin AAO membranlar üzerindeki gelişiminin incelenmesi [16].



Bu tezin takip eden kısımlarında anlatılacak olan AAO membranların biyomedikal uygulamaları son yıllarda gittikçe artan bir popülariteye sahiptir (Çizelge 1.1) [13]. Bu uygulamalardan biri olan ve bu tezin ikinci kısmını oluşturan ilaç taşıyıcı son yıllarda nano boyutlu malzemelerin kullanımına olanak verecek doğrultuda gelişmektedir. İlaç taşıyıcılarla ilgili sorunlar incelediğinde ilacın salınımı ve ortam içinde limitli çözünümlü, ilaç taşıyıcıların yüzey modifikasyonlarına bağlı olarak seçiciliklerinin çok az olması gibi elverişsiz farmakokinetik durumlarla karşılaşmıştır [17]. İlaç taşıyıcılar arasında nanoporlu ve nanotüp taşıyıcılar düşük maliyetli üretimleri, kontrol edilebilir por ve tüp boyutları, kolay modifiye olabilen yüzeyleri ile diğer ilaç taşıyıcılardan ayrılmaktadır. Elektrokimyasal proseslerle üretilen ve ilaç taşıyıcı için kullanılan pSi, TNT, AAO yüzeyler incelendiğinde mekanik özellikleri, kimyasal olarak inaktiflik, biyouyumluluk, kontrol edilebilir por

çapı ve hacmi ve kolaylıkla modifiye edilebilen yüzeyiyle AAO membranlar ilaç taşıyıcı olarak ciddi bir biçimde ön plana çıkmaktadır. Simovic ve ark. tarafından yapılan çalışma da AAO membranların kontrollü olarak ilaç salınımı için kullanımı plazma ile polimerlerin membran ağzlarına yerleştirilmesi ile sağlanmıştır. Bu dizayna sahip membranlar kemik implantların da düşük dozlarda ilaç salınımı ile tedavi için kullanılmıştır [18]. Bunun dışında kontrollü salınım mekanizması geliştiren bir diğer grupta Jeon ve arkadaşlarıdır. İletken polimerler kullanılarak geliştirilen ilaç salınım mekanizmasında akım varlığına bağlı olarak ilaç salınımı gerçekleşmekte ve böylece hastanın durumuna göre doğru dozda ilaç verilebilmektedir. Bu şekilde ilaç dozunun önemli olduğu migren, hormon hastalıkları ve metabolik sendromlarla ilgili tedavilerde ilerlemeler kaydedileceği düşünülmektedir [19]. Membranlar kalıp olarak kullanılarak elde edilen nanotüpler de ilaç ve gen taşıyıcısı olarak değişik çalışmalarda kullanılmıştır [20, 21]. AAO membranların ilaç taşınımı uygulamalarından biri de kalıp sentez metodu [22] kullanılarak üretilen SNT'lerdir. İlaç/gen taşınımı [23-25], biyomoleküllerin ayrıştırılması [2], hücre etiketleme [26] ve hücre görüntüleme [27] gibi birçok alanda kullanımları mevcuttur. Bu tüpler bir ucu kapalı bir ucu açık yapılarıyla, iç ve dış yüzeylerinin ayrı ayrı fonksiyonel hale gelmesine izin veren üretim teknikleriyle ve biyoyumlu kompozisyonlarıyla ilaç taşınımı çalışmaları için dikkat çekici bir aday olmuştur.

Tezin üçüncü kısmında detaylandırılan çalışma, AAO yüzeylerin kullanıldığı biyomedikal uygulamalarından biri olan doku mühendisliği ile ilgilidir. Özellikle kemik hücrelerinin doğal seramik yapısı ile AAO yüzeylerin uyum gösterdiği tespit edilmiştir. Bu seramik yapının 100 nm boyutlarında ekstra düzenli organik ve mineral fazlardan meydana geldiği düşünülünce, okzalik asit içerisinde büyütülen AAO membranların kemik hücreleri ile olan uyumu daha iyi anlaşılmaktadır [9, 16, 28]. Ayrıca kemik hücrelerinin AAO yüzeylerde amorf alümina, cam ve Al yüzeylerden daha fazla gelişim gösterdiği de tespit edilmiştir [9]. Kemik hücreleri ile yapılan çalışmaların dışında sıçan kökenli nöronal hücrelerle ilgili AAO membranların modifikasyonuna dayanan çalışmalarda bulunmaktadır. Wolfrum ve ark. tarafından yapılan çalışma da AAO membran Poli-L-Lisin, ekstraselüler matriks

jel ve konkanavalin olmak üzere 3 farklı tipte malzeme ile kaplanmış ve yüzeydeki hücre tutunumu incelenmiştir. ECM jelin bulunduğu ortamda hücrelerin çok daha iyi yapıştığı gözlemlenmiştir [29]. Prasad ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise Poli-L-Lisin ile kaplanmış AAO membran elektriksel olarak aktif hale getirilmiş ve hücrelerin elektriksel uyarıma bağlı olan gelişimleri incelenmiştir [30]. Ancak literatürde sinir hücrelerinin AAO membranlar üzerinde topografik, kimyasal ve elektriksel faktörler açısından eş zamanlı olarak incelenmesini konu edinen bir çalışma bizim bilgimiz dahilinde mevcut değildir.

Porlu oksit tabakaların üretimi için literatür incelendiğinde elektrolit olarak sülfürik asit, fosforik asit ve okzalik asitin kullanıldığı gözlemlenmiştir [10, 31-33]. Bu tezin ilk bölümünde, okzalik asit kullanılarak üretilen membranlar kanser hücrelerinin güdümlü olarak tedavisi ile ilgili çalışmalarda kullanılmıştır. İkinci bölümde ise, okzalik asit içinde üretilen membranlara ek olarak fosforik asit kullanılarak üretilen AAO membranlar sinir-doku mühendisliğinin bir uygulamasında substrat olarak kullanılmıştır.

Bunların dışında AAO membranların bir uygulaması da implant teknolojisi ile ilgilidir. AAO membranlar nanotopografik yapıları nedeniyle bu tip uygulamalar hücre-materyal etkileşimini artırmak amacıyla araştırılmaktadır. Bunun yanında toksik olmayan yapılarıyla da AAO membranlar hücrelerin kolaylıkla tutunabileceği uygun yüzeyler olduklarını göstermişlerdir [16].

2. KANSER HÜCRELERİNİN SEÇİMLİ OLARAK YOK EDİLMESİ İÇİN MULTİ FONKSİYONEL KOMPOZİT SİLİKA NANOTEST TÜPLERİN KULLANIMI

2.1. Giriş

2.1.1. Kanser ve nano ölçekte ilaç taşıyıcılar

Normal hücreler genel yaşam döngüleri içerisinde ne zaman ve ne miktarda bölüneceklerini bilirler. Ancak gerek genetik faktörlerin gerekse çevresel faktörlerin etkisiyle bazı hücreler bu yaşam döngüsünün dışına çıkar. Kontrolünü kaybeden bu hücreler aşırı şekilde bölünmeye başlar ve kanserli dokuyu oluştururlar. Metastaz yapıda denilen kanserli hücreler buldukları dokudan çok uzakta bile bölünmeye devam edebilirler. Bu tip kötü huylu, kanserleşme gösteren hücrelerin en temel özelliklerinden biride hücre zarlarında ortaya çıkan yapısal değişikliklerdir. Bu yapısal değişiklikler dikkatle takip edilerek kanser hücrelerinin seçimli olarak yok edilmesi mümkün olmaktadır [34].

Hücrelerin zarlarındaki nanoboyutlu biyomolekülleri tanıyan güdümlü nano taşıyıcıların kullanımı ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. Bu alanda metallere kadar pek çok malzeme fonksiyonel hale getirilip ilaç taşınımında kullanılabilir [34, 35]. Yeni nesil tanı-tedavi özellikli (teranostik) ilaç taşıyıcılar kimyasal olarak fonksiyonel hale getirilerek adrese teslim parçacıklar haline getirilebilmektedir. Bu aşamada ilaç taşıyıcılar için karşımıza temelde 3 sorun çıkmaktadır.

1. Etkin dozda ilaç konsantrasyonunun belirlenmesi.
2. Doğru şekilde taşıyıcı yüzeyinin aktive edilmesi ve tanı-tedavi uygulamasının doğru biçimde gerçekleştirilmesi.
3. Hücre ile etkileşime geçen taşıyıcı içindeki ilacın aktif bir biçimde salınması.

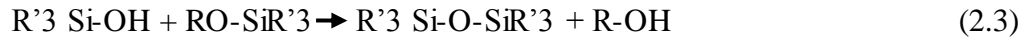
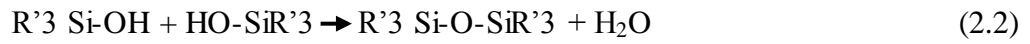
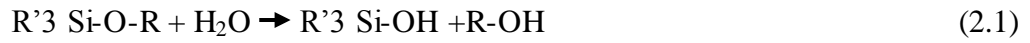
Son yıllarda yaygınlaşmaya başlayan ilaç taşıyıcılardan bazıları da silika tabanlı porlu küreler [36], porlu nonoçubuklar [37] ve nanotüplerdir [1]. Kimyasal modifikasyona izin veren yapılarının yanında hücreler için toksik etki göstermemesi bu malzemenin ilaç taşınımında yaygınlaşmasının sebebidir. Yeni nesil silika tabanlı ilaç taşıyıcılardan biri olan silika tabanlı nano test tüplerin de (SNT) ilaç taşıyıcıların yukarıda bahsi geçen sorunlarına çözüm üretebileceği düşünülmektedir. Charles Martin ve araştırma grubu tarafından geliştirilen bu malzeme [27] ayarlanabilir hacmi ile yeteri miktarda ilaç taşınımı yapabilme potansiyeline sahiptir. Bunun yanında iç ve dış yüzeylerinin ayrı ayrı fonksiyonel hale getirilebiliyor olması ise tanı-tedavi ikilisinin eş zamanlı olarak yapılmasına olanak vermektedir. Bunun yanında ilaç salınımının da kontrollü bir biçimde yapılabilmesi için tüplerin ağzları nanoküre polimer kapakçıklarla kapatılabilir. Aynı grup tarafından geliştirilen bu çalışma ile ilacın hastalıklı dokuya varmadan salınımı engellenmiş olur ve etkin ilaç konsantrasyonunun minimizasyonu sağlanır [38]. Nano test tüplerin ağzlarının kapatılması ile ilgili bir diğer çalışma da altın nanokürelerle Lee ve ark. tarafından yapılmıştır [39]. Bu çalışmada da ilk defa, dış yüzeyleri FA ile modifiye edildikten sonra, bu SNT'ler metastaz kanser hücrelerinde çok daha fazla miktarlarda bulunan FA reseptörleriyle [34] etkileşime geçecek şekilde kanserli hücrelere güdümlü hale getirilmişlerdir.

2.1.2. Sol-jel teknoloji, yüzey sol-jel metodu ve silan kimyası

İnorganik seramiklerle ve cam materyallerle 18. yüzyılın ortalarında başlayan sol-jel teknoloji pek çok yönden avantajlara sahiptir. Oluşan yüzeyin yüksek saflık ve homojenite değerlerine sahip olması, işlemlerin cam eritme ya da seramik işleme süreçlerinden çok daha düşük sıcaklıklarda yapılması ve kimyasal süreç sırasında farklı kimyasallarında kolaylıkla sisteme dâhil edilebilmesi bunlardan bazılarıdır [40].

Sol-jel sentezlerinde çözülebilir başlatıcı moleküller koloidal parçacıkların oluşumu için hidrolize edilir (sol). Dahası bu reaksiyon sol partikülleri arasında bağ oluşumuna neden olur ve jel oluşur [41]. Sonrasında jel ısıtılarak istenilen malzeme

elde edilir. Koloit parçacıkların oluşumu için organometalik bileşikler başlatıcı olarak kullanılır. Bu işlem için tetrametoksisilane (TMOS) ve tetraetoksisilan (TEOS) gibi alkol-silan başlatıcılar da kullanılmaktadır [42, 43]. Alkol-silanlar su varlığında hidrolize olarak silanole dönüşür (2.1). Sonrasında silanoller arasında polikondenzasyon tepkimesi gerçekleşir. Burada su kondenzasyonu (2.2) ve alkol kondenzasyonu (2.3) olmak üzere iki tür polimerleşme mekanizmasından bahsetmek gerekir. Su kondenzasyonunda iki silanol birleşip açığa su çıkarırken, alkol kondenzasyonunda alkol açığa çıkar [44, 45].



Kondenzasyon ve hidroliz eş zamanlı olarak ve kendiliğinden gerçekleşen reaksiyonlardır. İki ya da daha fazla fonksiyonel gruba sahip silanoller birleşerek jel formunu oluşturur. Reaksiyonların kinetiğini pek çok faktör etkilemektedir [40]. Bu faktörlerden bazıları sıcaklık, elektrolit tipi ve konsantrasyonu, çözücü tipi ve başlatıcı olarak kullanılan alkoksidin tipidir. Su miktarı ve sıcaklık arttıkça jelleşme oranı artmaktadır. Yüksek ya da düşük pH'larda çalışılarak reaksiyon hızı artırılabilir. Son olarak alkoksit grupları uzun süre durduğunda reaksiyon hızı düşmektedir.

Hiperkritik veya ortam koşulları kullanılarak jel silikaya dönüştürülebilir. Açığa çıkan su veya alkol gaz fazında kritik kurutma sıcaklığına dikkat edilerek ortamdan uzaklaştırılırsa jel ağı stabilitesini korur ve düşük yoğunluklu aerojel elde edilmiş olur. Eğer sıvı termal buharlaştırma ile yüzeyden ani bir biçimde uzaklaştırılırsa yapı üzerinde çatlaklar oluşur ve bu yoğun hemen hemen boşluksuz yapı xerojel olarak adlandırılır [40].

Farklı şekil ve büyüklükteki materyaller elde etmek için, çözelti sıvı formdayken (sol) kalıp kullanma veya yüzey kaplama yapılabilir. Kalıp sol içine daldırılarak yüzey kaplama yapılır daha sonra solun jelleşmesi sağlanır. Böylece kullanılan kalıp ile aynı şekle sahip malzeme elde edilir. TiO_2 , ZnO , WO_3 , MnO_2 , Co_3O_4 , V_2O_5 ve SiO_2 nanotüpler [22, 41, 46, 47] bu yolla elde edilebilir. Literatürde sıkça kullanılan ve ana membran kalıbın, oluşan 1 boyutlu nanoparçacıkların özelliklerini belirlediği bu metoda kalıp-sentez metodu denilmektedir [40].

Geleneksel sol-jel metodu kullanıldığında nanotüplerin kalınlık ve morfolojik yapılarının kontrollünün zor olduğu görülmüştür [48]. Daha kontrollü ve kaliteli ince film elde etmek için katman katman yüzeye malzemenin kaplanması uygun olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonrasında bu yöntem yüzey sol-jel metodu (SSG) olarak adlandırılmıştır. SSG tekniği iki farklı aşamadan oluşur. Bunlar, başlatıcı molekülün yüzeye kaplanması aşaması ve bir sonraki katmanın yüzeye bağlanabilmesi hidroliz aşamasıdır. Ayrıca yıkama aşamasında da bağlanmamış ya da zayıf bağlanmış moleküllerin yüzeyden uzaklaştırılması sağlanır [49]. SSG tekniği ideal bir biçimde katmanların oluşumunu kontrol etse de pratikte ilk katmanın diğerlerinden kalın olduğu gözlenmektedir [49, 50]. Bunun yanında nanometre veya sub-nanometre boyutunda kaplama kalınlığının kontrolüne izin vermesiyle bu yöntem geleneksel yöntemden ayrılmaktadır [48].

Organosilanlar silikat alüminat ve borat gibi silisyum malzemelerle kovalent bağ kurabilirler. İki fonksiyonel grup barındıran, organosilanların genel formülü $R_nSiX_{(4-n)}$ şeklindedir. X hidrolize olabilen halojen, asiloksi, alkoloksi veya amin olabilir. Hidroliz aşamasından sonra reaktif silanol grupları oluşur. Bu gruplar diğer silanol gruplarının kondenzasyonunu etkiler. Hidrolize olmayan radikal gruplar sayesinde de kaplanan yüzeyde istenilen fonksiyonel grupların açıkta kalması sağlanır. Bu fonksiyonel gruplara proteinler, floroforlar ya da genetik materyaller bağlanabilir [1, 2].

2.1.3. Plazma Temelli Olarak Malzemenin YüzeYden Aşındırılması

Nanoteknoloji çalışmalarında önemli kilometre taşlarından biride yüzeYden nano kalınlıktaki malzemenin istenilen şekilde aşındırılmasıdır. Bu aşamada iki tip yüzeYden aşındırma metodundan bahsedilebilir. İlki kuru aşındırma diğeri solüsyon temelli aşındırma yöntemidir. Kuru yöntemlerin solüsyon temelli yöntemlere göre daha kontrollü olduğu bilinmektedir.

Kuru yüzeYden kaldırma metodu ile katı yüzeYinden fiziksel olarak iyon bombardımanıYla, kimyasal reaksiyonlarla ya da hem kimyasal hem fiziksel olarak gaz fazında malzeme kaldırılması mümkündür. Plazma temelli yüzeYden kaldırma metodu iki kategoride incelenebilir. İlk substrat ve plazmanın aynı vakum alanında olduğu elektriki boşalma (glow discharge) diğeri substrat ve plazmanın farklı ortamlarda olduğu iyon demeti (ion beam) yöntemidir [51].

Fiziksel olarak aşındırma metodunda momentum transferi söz konusudur. Enerjiye sahip iyonlar (Ar^+) substrat yüzeYine çarparak yüzeYden malzeme kaldırır. Bu metotta seçicilik çok az olduğu için izotropik olmayan yapılar elde edilebilir. Kimyasal yollarla aşındırma metodunda seçicilik fazla ve istenilen ürünün oluşum hızı yavaş olsa da izotropik olan yapılar elde edilebilir. En önemli kuru aşındırma tekniği reaktif iyon aşındırma metodudur [51]. Bu metotta yüksek seçicilik ve yüksek ürün oluşum hızı fiziksel ve kimyasal metotların birleşiminin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır.

Plazma, ortamdaki gazın uygun şekilde ayrışarak nötron, enerjik iyonlar, fotonlar, elektronlar ve reaktif radikallere dönüştüğu yüksek enerjili elektrik veya manyetik alandır [51]. Basit bir plazma reaktörü düşük basınçta bir alan içerisinde paralel iki elektrot içerir. Argon plazmada, elektronlar var olan elektrik alan içerisinde hızlandırıldığında, gazın elektriksiz bozunumu bu reaktör içinde gerçekleşir. Argonun son katmanlarında bulunan elektronlara transfer edilen kinetik enerjinin nötr Argon atomlarındaki enerjiden fazla olması gerekir. Yeteri miktarda enerjiye sahip elektronlar Argon atomlarına çarptıklarında son katmanlarından elektron

koparırlar. Bu kopan elektronlar ikincil elektronlar olarak adlandırılır. İkinci elektronlarda diğer uyarılmamış atomlara çarparak bir iyon-elektron çığı meydana getirir. Sonuç olarak, Ar gazının iyon ve kopan elektronlarının bir arada bulunduğu plazma durumu oluşur. Bu aşamada gaz mavi bir renk alır.

2.2. İlaç Taşıyıcı Olarak Silika Nano Test Tüplerin Üretilmesi, Biyokimyasal Modifikasyonu ve Hücre Hatları Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

2.2.1. Giriş

Çeşitli biçimlerde fonksiyonel hale getirilebilen farklı şekillerdeki nanopartiküllere malzeme mühendisliğinden biyomedikal alanına kadar pek çok alanda gittikçe artan bir ilgi vardır [52]. Bu partiküller arasında bir boyutlu yapılarıyla silika nanotüpler ve nano test tüpler (SNT) biyomedikal alanda bir malzemede aranılan kolay sentezlenme, kolay modifiye olma, boşluklu geometrik yapı, düşük toksisite değerleri ve sıvı içinde kolay dağılma gibi özellikleri bünyesinde toplamıştır. SNT'lerin biyosensörler, biyomolekül ayrıştırılması [2], hücre etiketleme [26], hücre tanıma [27] ve ilaç/gen taşınımı [23-25] gibi biyolojik uygulamaları vardır. Kısa zaman önce, Sang Bok Lee ve çalışma arkadaşları SNT'leri kullanarak kanser hücrelerinin tedavisi üzerine çalışmalarını rapor etmiştir [32]. Bu avantajlarına rağmen, SNT'lerin ilaç taşıyıcı olarak kullanımı oldukça sınırlıdır. Gerçekleştirilen bu çalışmalarda da ilaç yükleme stratejisi olarak yalnızca iyonik etkileşimler kullanılmış bu da yetersiz yüklenme ve ani salınım gibi negatif sonuçlar oluşmasına yol açmıştır.

Bu çalışmada kalıp-sentez yoluyla üretilen multi fonksiyonel SNT'ler ilk kez ilaç taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Tüplerin dış yüzeyi FA kaplanarak kanser hücreleri için tüpler özgül hale getirilmiştir. İlacın direk hücrelere verildiği yüksek konsantrasyonlu çalışmalara nazaran, tüpler kullanılarak düşük ilaç konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerde kanser hücrelerinde ölüm oranı oldukça yüksek çıkmıştır.

2.2.2. Deneysel gereç ve yöntemler

2.2.2.1. Materyal

% 99,9998 saflıktaki alüminyum, NHS ve 2,2-dietoksiasetofenon Alfa Aesar firmasından; HEMA, PEG-EEM, AEM, trimetilopropanetoksilan triakrilat, florasan-o-akrilat, DOX, APTES, EDC, n-hekzan Sigma-Aldrich firmasından; okzalik asit Acros Organic firmasından; H₃PO₄ BDH Polabo firmasından; H₂SO₄, CrO₃ Fluka firmasından; SiCl₄, FA, EtOH ve IPA Merck firmasından; McCoy's 5a W/O Serum, PBS (pH 7,4), L-Glutamine, Dulb 0,11g/L Na Pyr W/O L-Glut, Horse Serum, DMSO, Trypan Blue Stain, Trypsin %0,25 EDTA, FBS, Penicillin Streptomycin çözeltisi İnvitrogen firmasından temin edilmiştir. 18 MΩ resistanstaki tip II kalitedeki saf su Sartorius su temizleme sistemi kullanılarak elde edilmiştir.

2.2.2.2. AAO membran eldesi

Nano porlu alüminyum oksit membranların eldesinde iki basamaklı elektrokimyasal anodizasyon metodu [10] kullanılmıştır. 10 cm² alana sahip 1 mm kalınlığındaki alüminyum tabaka elektrokimyasal yöntemlerle temizlenmeden önce zımparalanıp yüzeyde bulunabilecek organik maddelerden kurtulmak amacıyla aseton ile yıkanmıştır. 200 °C fırında 30 dakika boyunca kurutulan tabaka, elektrokimyasal yöntemlerle temizlendikten sonra, okzalik asit çözeltisi içinde birinci anodizasyon aşamasına tabi tutulmuştur. Bu aşama sonucu oluşan alüminyum oksit tabaka asidik CrO₃ çözeltisi içinde çözülmüş ve birinci anodizasyonda çalışılan koşullar kullanılarak ikinci anodizasyon aşaması gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada alüminyum tabakanın her iki yüzünde de sıralı nanoporlu AAO membran oluşmuştur.

Anodizasyon süresi oluşacak membranın kalınlığını etkilediğinden SNT'lerin üretiminde kalıp olarak kullanılacak AAO membranlar ikinci anodizasyon aşaması 6 dakika olacak şekilde üretilmiş ve tüp boyunun yaklaşık 0,7 µm olması sağlanmıştır.

Elde edilen AAO membran silika nano test tüplerin üretiminde kalıp olarak kullanılmıştır. Başlangıç por çapı silika test tüplerin yapımı için yeterli olmadığından porlar 25 °C de %5'lik H₃PO₄ çözeltisinde bekletilerek por çapı artırılmıştır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak membranların karakterizasyonu yapılmıştır.

2.2.2.3. SNT yapımı

Alüminyum oksit membranlar kullanılarak iki farklı sol-jel yöntemiyle SNT elde edilmiştir. İlk yöntem geleneksel sol-jel yöntemidir [38]. Bu yöntemde, hacimce 50:5:1 oranında sırasıyla etanol, TEOS, 1 M'lık HCl karıştırılarak çözelti hazırlanmıştır. Çözeltinin hidrolizi için 30 dakika boyunca beklenilmiştir. Ticari olarak edinilen alüminyum oksit membranlar çözelti içine 5 dakika boyunca bekletildikten sonra membranlar 2 dakika atmosfer ortamında, 3 saat boyunca da 180 °C fırında kurutulmuştur. Silika kaplanmış membranlar 0,1 M NaOH çözeltisi içinde çözülmüştür. Santrifüj kullanılarak elde edilen tüpler Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan FEI Technai Biotwin marka geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak görüntülenmiştir.

İkinci yöntem ise yüzey sol-jel yöntemidir [53]. Bu yöntem için, üretilen 93,43 ± 2,1 nm por çaplı 700 nm kalınlığındaki membran kullanılmıştır. Bu yöntem de silika kaynağı olarak SiCl₄ kullanılmıştır. SiCl₄ içinde 1 dakika bekletilen membran hızlı bir şekilde heksan içine alınmıştır. 1 dakika boyunca heksanda bekletilen membran yıkama amaçlı ikinci heksan beherine atılmıştır. Membran, 1 dakika sonra üçüncü heksan beherine alınmıştır. Bu aşamaya kadar olan işlemler azot ortamında gerçekleştirilmiştir. Üçüncü heksan beherinde 5 dakika bekletilen membran hacimce 2:3 oranındaki heksan: metanol karışımına atılmıştır (1 dakika). Membran daha sonra sırasıyla 2 dakika süreyle etanol, 5 dakika süreyle saf su ve 1 dakika süreyle metanol içinde bekletilmiştir. Membran etanolde ve metanolde bekletildikten sonra azot gazı ile kurutulmuş ardından silika ile kaplanmış AAO membran 120 °C fırında 2 saat boyunca tekrar kurutulmuştur. Membranın yüzeyinde bulunan silika film Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan SAMCO

RIE-1C plazma sistemi kullanılarak kaldırılmıştır [53]. Plazma koşulları 13.56 MHz, 140W, 20 Pa, Ar gazı akım oranı = 8 sccm şeklindedir. Membran, %5`lik H₃PO₄ çözeltisinde bekletilerek, por ağzlarının açılması sağlanmıştır. Üzerine tüplerin bağlı olduğu membran Bilkent Üniversitesi-UNAM da bulunan Quanta 200 FEG marka taramalı elektron mikroskobu (E-SEM) ile görüntülenmiştir.

Bu aşamadan sonra tüplerin dış yüzeylerinin karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Tüpleri AAO membrandan ayırmak için, membran 0,1 M NaOH çözeltisi içinde 4 saat 30 dakika bekletilmiştir. SNT`ler polimer membran üzerine filtrelenerek birkaç kez su ve etanol ile yıkanmıştır. Geçirimli elektron mikroskobunda (TEM) görüntüleme yapabilmek için polimer membran üzerindeki SNT`ler etanol içine dağıtılmıştır. TEM gridleri üzerine tüplerin bulunduğu etanol damlatılarak TEM için örnek hazırlanıp görüntüleme yapılmıştır.

2.2.2.4. SNT`lerin dış yüzeylerine amin ve FA modifikasyonu

Serbest haldeki içi boş SNT`leri FA ile kaplamak için EDC-NHS reaksiyonu kullanılmıştır. Bu reaksiyonun amacı, FA da bulunan karboksil gruplarını aktif hale getirmektir [54].

Reaksiyondan önce tüplerin yüzeyi amin ile kaplanmış ve silika tüplerin normalde negatif olan yüzeyi amin grupları ile pozitif hale getirilmiştir. Hacimce 18:1:1 (etanol: APTES : asetat tamponu (50 Mm, pH 5,2)) oranları kullanılarak belirtilen çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti hidroliz için 20 dakika beklendikten sonra SNT`lerin bulunduğu çözelti ilk çözeltime ilave edilip amin modifikasyonu için 80 dakika karıştırma yapılmıştır. Son olarak yüzleri amin kaplanmış test tüpler polimer membran üzerine filtrelenmiştir. Tüpler 3 kere etanol, 2 kere su ile yıkanıp, polimer membran üzerindeki amin kaplı tüpler 24 saat vakum fırınında 40 °C kurutulmuştur.

Yüzeylerini FA kaplamak için yukarıda bahsedilen prosedürle amin kaplanmış tüpler, 1 ml 10mM PBS (pH 7.4) içine dağıtılmıştır. Bir cam vial içinde 7,5 mg EDC, 2,25 gram NHS ve 3,025 mg FA 58,1 ml PBS [55, 56] içinde çözülüp, bu çözelti

FA'nın aktive olması için 45 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. PBS içindeki amin kaplı tüpler, kontrollü bir biçimde FA çözeltisine aktarıldıktan sonra, 3 saat boyunca FA modifikasyonu için karıştırma yapılmıştır. Ardından çözelti filtrelenip ve 3 kere PBS ile yıkanmıştır. Tüplerin karakterizasyonu FT-IR, XPS, Zeta potansiyeli ölçümleri ile yapıldıktan sonra hücrelere tutunum oranı ve sitotoksosite ile ilgili çalışmalara geçilmiştir.

2.2.2.5. SNT'lerin jel ile doldurulması

Üretilen SNT'lerin yüzeyleri hücre yüzeyindeki reseptörlere uygun olarak kaplandıktan sonra içleri DOX içerikli jel matrisi ile doldurulmuştur. DNA enterkalasyonu ile hücre ölümünü tetikleme amaçlı jel matrisine DOX ilave edilmiştir. Jel matrisi Çizelge 2.1 de belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 2.1. İlaç taşımında kullanılan jelin formülasyonu.

JEL İÇERİĞİ	FORMÜLASYON	
HEMA	6.5 ml	TÜP 1
PEG-EEM	90 µl	
Trimetiloilpropanetoksilat triakrilat	45 µl	
AEM	75 mg	TÜP 2
Su	450 µl	
2,2-dietoksiasetofenon	150 µl	TÜP 3
Isopropanol	300 µl	
Doksorubisin HCl	10 mg	TÜP 4
Su	0,3 ml	

Jel matrisi hazırlanırken tüp 1, tüp 2, tüp 3 ve tüp 4 sırasıyla karıştırılmıştır. Tüp 3 ve tüp 4 ışık bozunumlu materyal içerdiği için gerekli önlem alınmıştır. Jel matrisinde bulunan HEMA polimerin şişmesinden ve ilaç salınım mekanizmasından, PEG-EEM boyut kontrolüne izin vermesiyle salınım hızını kontrol etmesinin yanında hafif hidrofobik ortamıyla DOX çözünürlüğünü artırmaktan, AEM asidik ortamda jelin

şişme oranının artmasından sorumludur. Bunun dışında 2,2-dietoksiasetofenon fotobaşaltıcı , su ve izopropanol çözücü olarak jelin içerisinde bulunmaktadır.

Hücre çalışmaları için 5 farklı silika nano test tüp konfigürasyonu ve buna ek olarak da etken madde 3 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. SNT konfigürasyonları ve etken madde konsantrasyonları.

Örnek kodu	Açıklama	Konsantrasyon
EM	Serbest DOX	2 µg/ml
		0,2 µg/ml
		0,02 µg/ml
SNT 1	FA (-) Jel(-) DOX(-) SNT	$2,9 \times 10^{10}$ SNT/ml
		$0,6 \times 10^{10}$ SNT/ml
		$0,06 \times 10^{10}$ SNT/ml
SNT 2	FA (+) Jel(-) DOX(-) SNT	$2,9 \times 10^{10}$ SNT/ml
		$0,6 \times 10^{10}$ SNT/ml
		$0,06 \times 10^{10}$ SNT/ml
SNT 3	FA (+) Jel(+) DOX(-) SNT	$2,9 \times 10^{10}$ SNT/ml
		$0,6 \times 10^{10}$ SNT/ml
		$0,06 \times 10^{10}$ SNT/ml
SNT 4	FA (-) Jel(+) DOX(+) SNT	$2,9 \times 10^{10}$ SNT/ml
		$0,6 \times 10^{10}$ SNT/ml
		$0,06 \times 10^{10}$ SNT/ml
SNT 5	FA (+) Jel(+) DOX(+) SNT	$2,9 \times 10^{10}$ SNT/ml
		$0,6 \times 10^{10}$ SNT/ml
		$0,06 \times 10^{10}$ SNT/ml

Derişim hesaplamaları yapılırken jel içermeyen tüplerin etkin konsantrasyonundaki tüp sayısı dikkate alınmıştır. Çünkü ağırlık kullanılarak hazırlanacak derişimlerde ciddi uygulama hataları olduğu görülmüştür. Örneğın 2,9 cm² AAO'nun kalıp olarak kullanıldığı jel içeriği olmayan tüplerde toplam ağırlık yaklaşık 53 µg olurken toplam tanecik sayısı 2,9 × 10¹⁰ olmaktadır. Aynı ağırlığı elde etmek için jel içerikli tüpler kullanıldığında kullanılan AAO alanı yaklaşık 0,9 cm² olmaktadır ve tüp sayısında da % 68'lik bir azalma olmaktadır. Tüp sayısındaki azalmaya bağlı olarak ilaç miktarında da azalma görülmektedir. Bu dezavantajdan kurtulmak amacıyla konsantrasyon çalışmaları birim alanda 10¹⁰ tane tüp olduğu düşünülerek yapılmıştır. En büyük derişim 2,9.10¹⁰ SNT/ml olarak alınmıştır.

Jel içeriği olmayan tüpler hazırlanırken örnekler direkt olarak 0,1 M NaOH içine çözülmüş ve belirtilen yöntemle dış yüzeyin kaplaması yapılmıştır. Jel içeriği bulunan tüpler hazırlanırken ise önceden bahsedilen yöntemle jel hazırlanmıştır. SNT'lerin bağlı olduğu membranların üzerine 2 ml ön polimer çözeltisi eklenmiş ve 3 saat boyunca 30 dakikada bir 5 dakika boyunca sonikleme yapılarak membran üzerindeki SNT'lere çözeltinin etkin bir şekilde dolması ve nanoporların içinde oluşan hava kabarcıklarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra jelin tüpler içinde çapraz bağlanması için hazırlanan her örnek 10 dakika UV ye tabi tutulmuştur. Üzeri jel kaplı membranlar 24 saat karanlık ortamda su içinde bekletilmiştir. Böylelikle su ile jelin şişmesi sağlanmıştır. Bu işlemin ardından jelin fazla olan kısmı yüzeyden sıyrılıp, membranların arka yüzü epoksi ile kaplanmıştır. Epoksi kaplı yüzey 24 saat oda sıcaklığında kurutulmuş ve jel içeriği bulunan SNT'lerin bağlı olduğu bu membranlar %21'lik fosforik asit çözeltisine bırakılarak tüpler serbest hale getirilmiştir. Yüzeydeki AAO'nun uzaklaşması için NaOH yerine H₃PO₄ kullanılmıştır çünkü jel içinde bulunan ilaç bazık ortamda bozulmaktadır. Elde edilen tüpler filtrelenmiş ve 2 kere distile su ile yıkanmıştır. APTES kaplanacak tüpler etanol ile yıkanmış ve 1 ml etanol içine dağtılmıştır. Jel ile ilgili işlemlerin karanlık ortamda yapılmasına özen gösterilmiştir.

2.2.2.6.Silika nano test tüplerin SK BR-3 ve MCF-12A hücre hatları üzerinde uygulanması

Çalışmanın bu kısmında TOBB ETÜ'de üretilen içi jelli kompozit SNT'lerin toksisite çalışmaları Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Prof. Dr. Belma Aslım gözetiminde yapılmıştır.

SK BR-3 hücre hattının geliştirilmesi

DMEM içerisine %10 fetal bovine serum ve %1 antibiyotik katılarak hazırlanan besi yeri içerisine alınan hücreler T-25 flasklara, 2×10^5 hücre yoğunluğunda alınarak 37 °C'de, %5 karbondioksitli etüvde geliştirilmiştir. İki günde bir flasklardaki hücrelerin besi yeri değiştirilip %80 gelişim gösterdiğinde hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 96'lık mikrolakalara her kuyuda 1×10^4 hücre yoğunluğu olacak şekilde pasajlanmıştır. İki gün sonra ise SNT'ler hücrelere verilip gerekli testler yapılmıştır.

MCF-12A hücre hattının geliştirilmesi

MCF- 12A hücre hattı, DMEM içerisine %5 at serumu, 20 ng/ml insan epidermal büyüme faktörü, 0.01 mg/ml bovine insülin ve 500 ng/ml hidrokortizon katılarak hazırlanan medya içerisinde, T-25 flasklara 2×10^5 hücre yoğunluğunda alınarak 37 °C' de, %5 karbondioksit inkübatöründe geliştirilmiştir. Bununla birlikte, iki günde bir besi yeri değiştirilmiştir. Hücreler, %80 gelişim gösterdiğinde Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 96'lık mikrolakalara her kuyuda 1×10^4 hücre yoğunluğu olacak şekilde pasajlanmıştır. İki gün sonra ise SNT'ler hücrelere verilip gerekli testler yapılmıştır. Hücrelerin SNT'ler uygulandıktan sonraki ölüm oranlarını görmek için Tripan mavisi ile boyama, MTT testi ve kit uygulamaları yapılmıştır.

Tripan boyası ile ölü hücrelerin belirlenmesi

Ölü hücrelerin belirlenmesi için tripan mavisi ile boyama yapılmıştır. Metoda göre 96'lık plaklarda 1×10^4 hücre yoğunluğu bulunan kuyucukların her birine

konsantrasyonu ayarlanmış olan örneklerden ilave edilerek 37 °C'lik % 5'lik CO₂'li etüvde, 16 saat bekletilmiştir. Sonrasında Trypan boyasından 50 µl alınarak her bir kuyucuğa ilave edilmiştir. 15 dakika 37 °C'lik CO₂'li etüvde bekletilmiştir. PBS ile yıkamalar yapıldıktan sonra her bir kuyuya 200 µl SDS konularak 590 nm'de ELISA okuyucuda absorbans değerleri ölçülmüştür [57].

Hücre ölümü aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Ölüm} = - \left[\frac{\text{Ortalama OD kontrol} - \text{Ortalama OD örnek}}{\text{Ortalama OD kontrol}} \right] \times 100 \quad (2.4)$$

MTT yöntemi

MTT yöntemi, hücre canlılığının belirlenebilmesi için, indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan hücre kültürü esasına dayanan bir testtir. MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid), canlı hücrenin mitokondriyal süksinat dehidrogenaz ile koyu mavi formazan rengini vermesini sağlayan bir substrattır.

Bu çalışmada Mosmann (1983)'ın kullanmış olduğu yöntem baz alınmıştır [58]. Bu metoda göre 96'lık plaklarda 1×10⁴ hücre bulunan kuyucukların her birine konsantrasyonu ayarlanmış olan örneklerden ilave edilerek 37 °C'lik CO₂'li etüvde 16 saat bekletilmiştir. Sonrasında hazırlanmış olan MTT çözeltisinden her bir kuyucuğa ilave edilerek 4 saat 37 °C'lik CO₂'li etüvde bekletilmiştir. Sonrasında 550 nm'de ELISA okuyucuda absorbans değerleri ölçülmüştür [59].

Hücre canlılığı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \left[\frac{\text{Ortalama OD örnek}}{\text{Ortalama OD kontrol}} \right] \times 100 \quad (2.5)$$

WST-1 kit yöntemi

WST-1 Kit, canlı hücrelerin belirlenebildiği güvenilir bir testtir. 96'lık plaklarda 1×10^4 hücre bulunan kuyucukların her birine konsantrasyonu ayarlanmış olan örneklerden ilave edilerek 37 °C'lik, CO₂'li etüvde 48 saat bekletilmiştir. Sonrasında 10 µl kit içerisindeki maddelerle hazırlanmış olan WST-1 karışımından her bir kuyucuğa eklenmiş ve mikrolaka orbital çalkalayıcıda 1 dakika kadar bekletilmiştir. Bu işlemden sonra mikrolaka 2 saat boyunca 37 °C'lik, CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tekrar orbital çalkalayıcıya alınan plaka, 450 nm'de ELISA okuyucuda değerlendirilmiştir.

Hücre canlılığı 2.5'te belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

2.2.2.7.SNT'lerin florasan boya ile boyanması ve hücreler üzerindeki tutunumlarının incelenmesi

Hazırlanan nanopartiküllerin, SK-BR3 göğüs kanseri hücrelerindeki ve MCF-12A sağlıklı göğüs hücrelerindeki tutunumlarını incelemek amacıyla Florasan-iso siyanat (FITC) boyası kullanılmıştır. Amin aktif bu florasan boyanın yüzeye bağlanması için iki farklı yöntem izlenmiştir. İlk yöntem, tüpler henüz AAO üzerinde bağlıken önceden de belirtilen metotla tüplerin iç yüzeyi amin kaplanmıştır. Bu aşamadan sonra membran etanol ile yıkanmış ve 40° C de vakum fırınında 1 gece bekletilmiştir. Amin kaplı tüplerin bulunduğu membran 1ml DMSO ve 1 mg FITC boyasının [60] bulunduğu bir çözeltide bir gün boyunca karanlık ortamda bekletildikten sonra, çözeltiden çıkarılan membran 10 dakika etanol içinde bekletilerek yüzeydeki boya kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Son olarak membran 0,1 M NaOH içinde çözülerek tüpler serbest hale getirilmiştir. Filtreleme yapıp, polimer membran üzerindeki tüpler 2 kere su ve 1 kere PBS ile yıkanp, tüpler 1 ml PBS içine dağıtılmıştır. Son olarak hücrelere verilmeden önce partiküller Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan Leica DMI3000B marka florasan mikroskop ile incelenmiştir.

İkinci yöntemde ise ilk olarak 1,5 mg FITC 0,75 ml DMSO içinde çözüldü ve 5 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu çözeltiliye süre bitiminde 10 µl APTES eklenmiş ve karanlık ortamda çözelti 1 saat daha karıştırılmıştır. Daha önce belirtilen amin kaplama prosedüründe APTES yerine bu çözelti kullanılarak, 20 dakika aktifleşme süresinin sonunda amin grupları ile FITC de bulunan isosiyanat grupları kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. Konkav biçimde çözeltiliye yerleştirilen tüplerin bağlı olduğu AAO membran 80 dakika boyunca karanlık ortamda manyetik karıştırıcı üzerinde bekletilmiş ve silika gruplarının amin-FITC ile bağlanması sağlanmıştır. Son olarak membran 0,1 M NaOH içinde çözülerek tüpler serbest hale getirilmiştir. Filtreleme yapıp, polimer membran üzerindeki tüpler 2 kere su ve 1 kere PBS ile yıkanmıştır. Tüpler, 1 ml PBS içine dağıtılmıştır. Hücrelere verilmeden önce partiküller florasan mikroskop ile incelenmiştir. Bu yöntem aynı zamanda dış yüzeyleri FA bağlı tüpler için gerçekleştirilmiştir.

Hücre üzerinde florasan parçacıkların daha belirgin olması adına, çalışmanın bu kısmında 5 mikron uzunluğundaki tüpler belirtilen yöntem kullanılarak florasan boya ile kaplanmıştır. 5 mikronluk tüplerin üretimi için kalıp olarak kullanılan alüminyum oksit membran ikinci anodizasyon aşamasında 6 dakika yerine yaklaşık 15 dakikada büyütülmüştür. MCF-12A sağlıklı göğüs hücreleri üzerinde tutunum çalışmaları Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Prof. Dr. Belma Aslım gözetiminde yapılmıştır. Sağlıklı hücreler %5 at serumu, %10 fetal bovine serum ve %1 penisilin içeren DMEM besi ortamında 37° C'de %5 CO₂'li ortamda geliştirilmiştir. Hücre ortamı her gün kontrol edilerek, gün aşırı besi ortamı değiştirilmiştir. Flasklarda tam yayılma gösteren hücreler Tripsin/EDTA kullanılarak kaldırılmış ve sayım yapıldıktan sonra pasajlanmıştır. Hücreler yeterli olgunluğa eriştiğinde tutunum deneyleri için 6'lık kuyucuklara alınarak PBS içine dağıtılmış floresan parçacıklar ¼ oranında DMEM ile seyreltilerek hücrelere verilmiştir. 1 saatlik inkubasyondan sonra boya kalıntısından ve tutunmayan parçacıklardan kurtulmak için hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. 1 mg/ml akridin oranj çözeltisinden 3 ml alınarak 97 ml PBS ile karıştırılmıştır. Her kuyuya 20 ml bu karışımdan eklenmiş ve 10 dakika inkübatörde hücreler bekletilmiştir. Bu aşamadan

sonra floresan mikroskopla MCF-12A hücreleri üzerine SNT'lerin tutunumu incelenmiştir. Sağlıklı hücre hatlarından sonra tutunum çalışmaları kanser hücreleri ile yapılmak istenmiş ancak mikoplazma sorunu ile karşılaşmıştır.

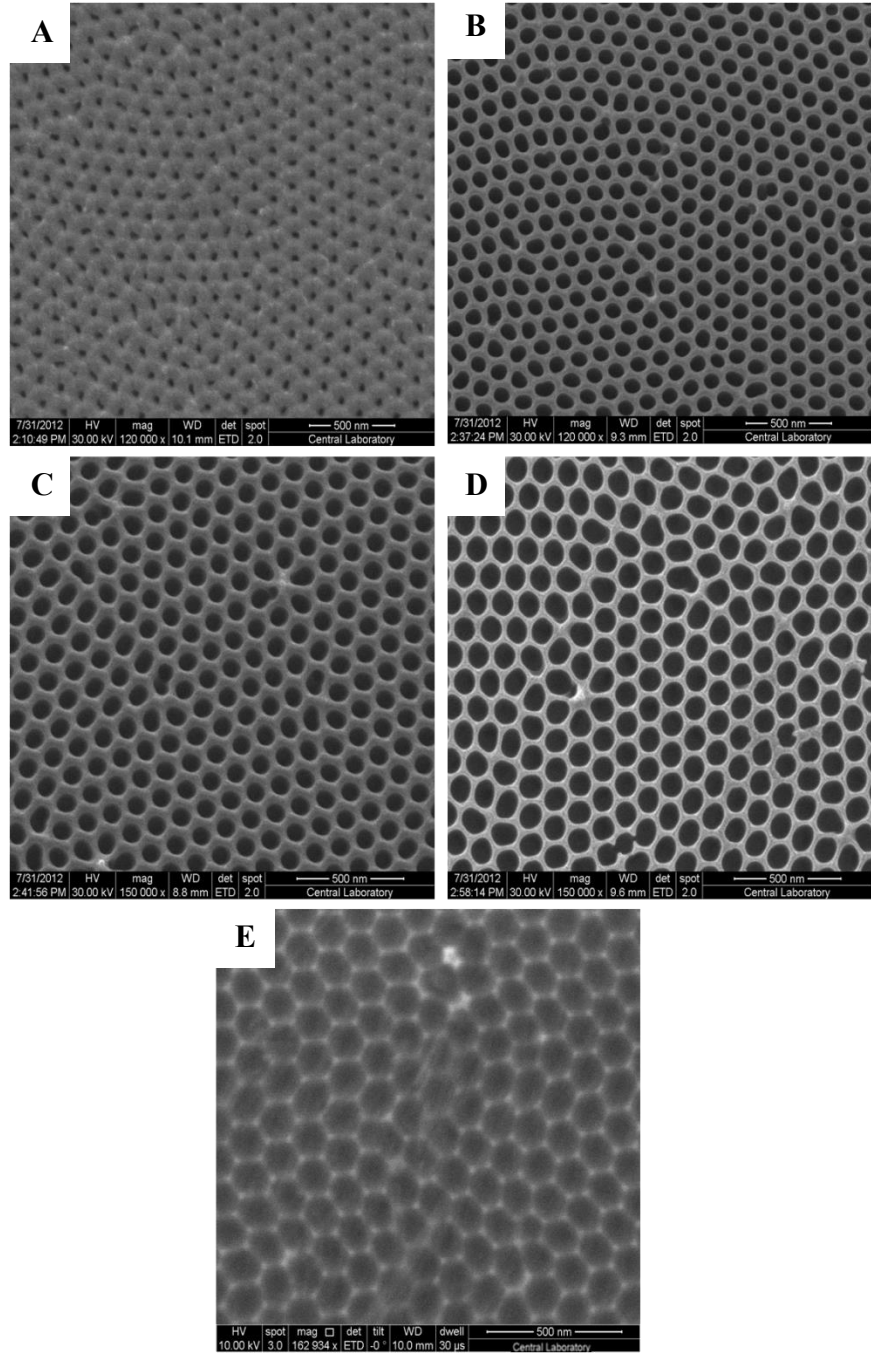
2.2.3. Tartışma ve sonuçlar

2.2.3.1. AAO membran eldesi

Membranların başlangıç por çapı SNT üretimi için yeterli olmadığından membranlar 45, 50, 55 ve 60 dakika boyunca %5'lik H_3PO_4 içerisinde tutulmuştur (Şekil 2.1). Çizelge 2.3 de por çapları ile ilgili hesaplamaların sonuçları gösterilmektedir.

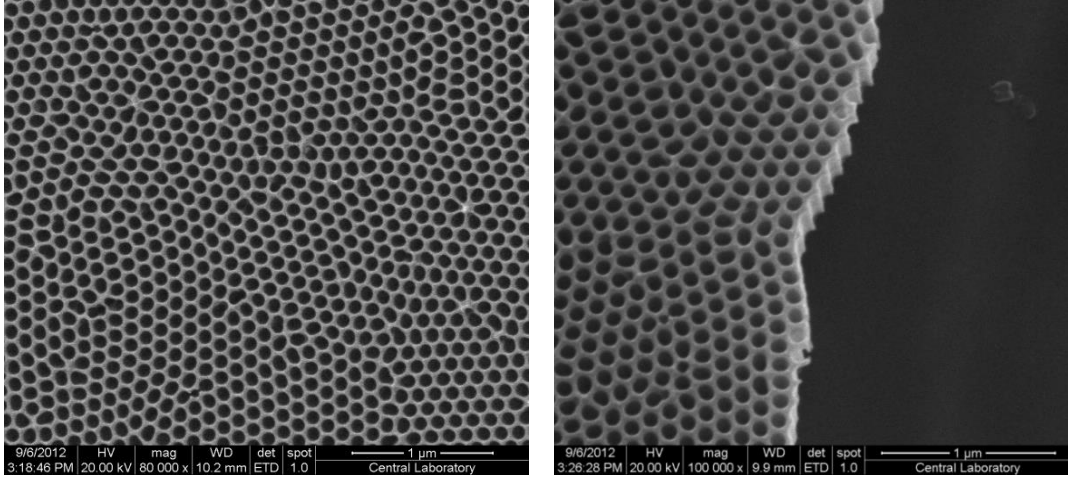
Çizelge 2.3. Image J ve Mathcad programları kullanılarak hesaplanan süre bağımlı por çapları ve standart sapmalar.

MEMBRANIN %5'LİK H_3PO_4 ÇÖZELTİSİNDE TUTULMA SÜRESİ (DAKİKA)	POR ÇAPI	STANDART SAPMA
0	64,8 nm	\pm 2,194
45	84,9 nm	\pm 2,151
50	83,8 nm	\pm 2,845
55	103,9 nm	\pm 4,206
60	108,2 nm	\pm 37,370



Şekil 2.1. AAO membranların A) 0 dakika, B) 45 dakika, C) 50 dakika, D)55 dakika ve E) 60 dakika %5'lik H_3PO_4 çözeltisinde 25 °C de bekletilmesi sonucu alınan SEM görüntüleri.

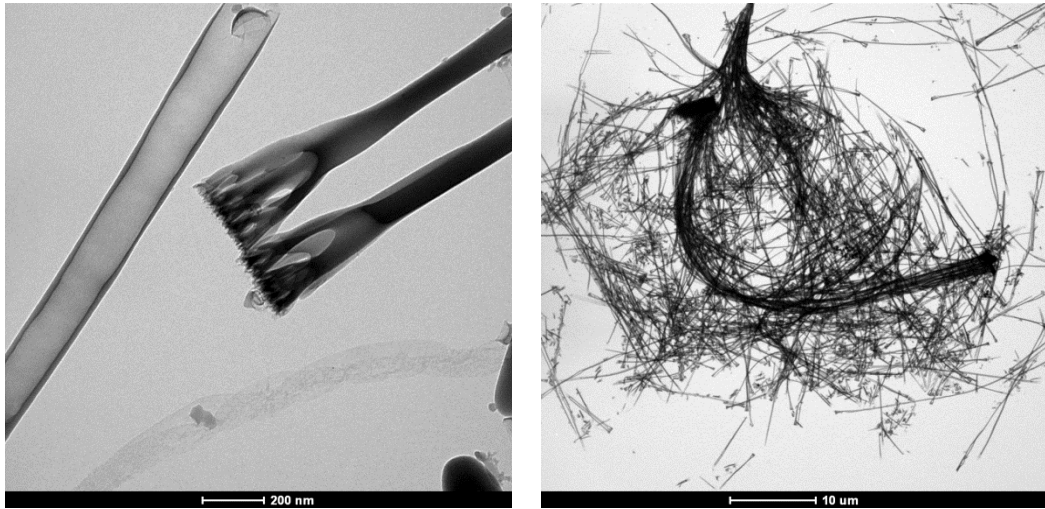
Yapılan por çapı standartlaştırma çalışmaları sonucunda 52 dakika %5'lik H_3PO_4 çözeltisinde 25 °C de bekletilmesine karar verilmiştir. Ortalama por çapı yaklaşık $93,43 \pm 2,1$ nm olmuştur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. AAO membranların 52 dakika %5`lik H_3PO_4 çözeltisinde $25^\circ C$ de bekletilmesi sonucu alınan SEM görüntüleri.

2.2.3.2. SNT yapımı

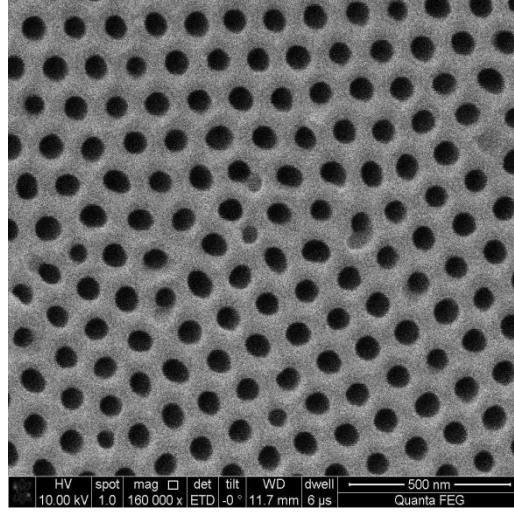
Geleneksel sol-jel yöntemi ile ticari AAO membranlar kullanılarak üretilen tüplerin benzer yapıda olmadıkları, birbirlerine yapışma eğilimleri olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca TEM analizleri sırasında bu çalışmada ihtiyaç duyulan boşluklu yapının ve açık tüp ağzlarının bu yöntemle elde edilemeyeceği görülmüştür (Şekil 2.3).



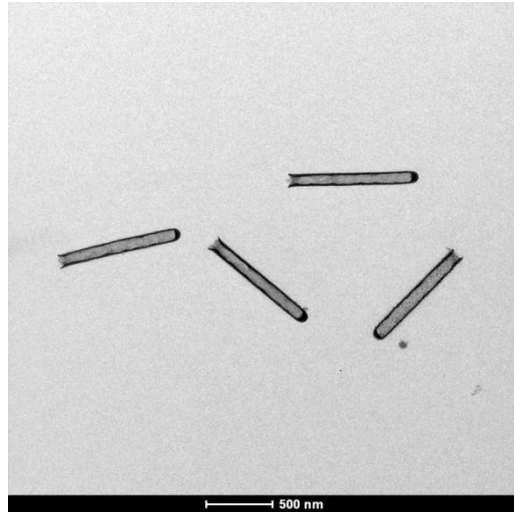
Şekil 2.3. Ticari olarak üretilen AAO membranlar kullanılarak hazırlanan SNT`lerin TEM görüntüleri.

Yüzey sol-jel yöntemi ile üretilen silika nano test tüplerin birbirine benzer olduğu, açık ağzlı ve boşluklu yapıda oldukları gözlemlenmiştir. SNT`lerin AAO membran

üzerinde bağlı iken çekilen SEM görüntüleri tüplerin ağızlarının tamamen açık olduğunu göstermiştir (Şekil 2.4). Bunun yanında TEM görüntülerinde serbest haldeki SNT'lerin boşluklu yapıda olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2.5). FA modifikasyonu çalışmalarında yüzey özelliklerine bakıldığında daha kolay ve daha ucuza yapılabilen ticari AAO tabanlı SNT'ler kullanılmıştır.



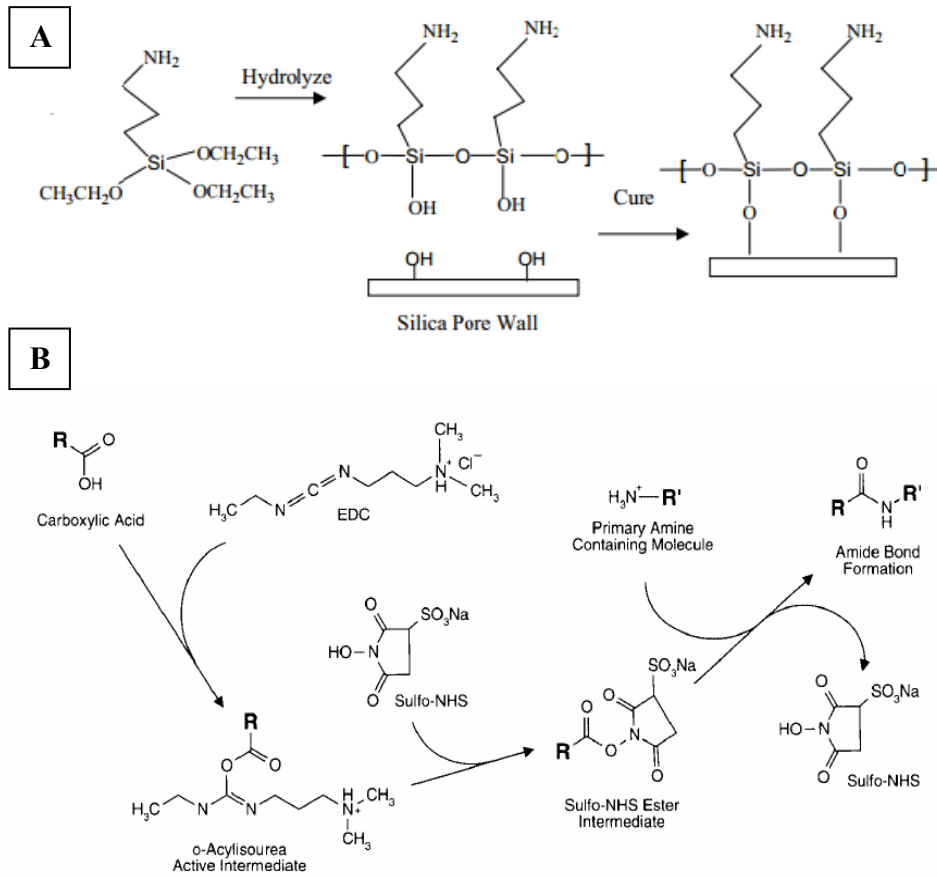
Şekil 2.4. SNT'lerin bağlı olduğu AAO membranın SEM görüntüsü.



Şekil 2.5. Serbest haldeki SNT'lerin TEM görüntüsü.

2.2.3.3. Silika nano test tüplerin dış yüzeylerine amin ve FA modifikasyonu

İki farklı fonksiyonel grup barındıran APTES molekülleri silan grupları ile hidrolize olarak yüzeye kovalent olarak bağlanmıştır (Şekil 2.6-A). Açıkta kalan amin grupları FA'nın karboksilli asit grupları ile birleşerek yüzeyi kovalent olarak FA ile modifiye etmiştir. Belirtilen kaplama yapılırken EDC-NHS reaksiyonlarında faydalanılmıştır (Şekil 2.6-B). Bu kaplamalar sonrası yüzey karakterizasyonu FT-IR, Zeta Ölçümleri ve XPS kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 2.6. A) Silika yüzeyin NH_2 ile kaplanma prosedürü [61] B) NH_2 kaplı tüplerin FA ile kaplanma prosedürü [54].

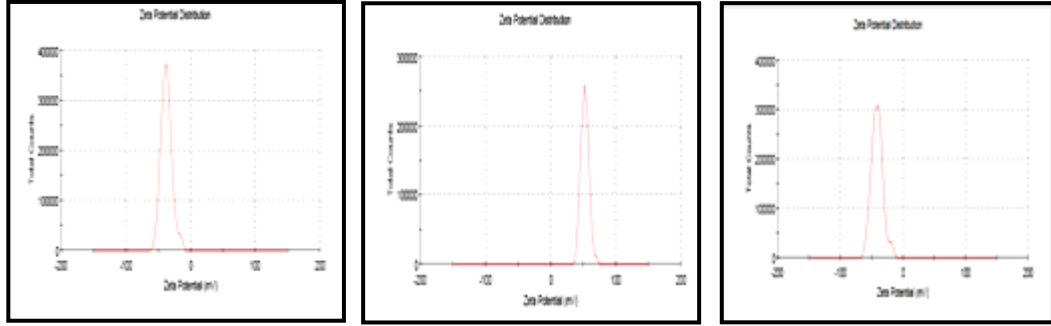
Zeta potansiyeli ölçümleri

Yüklü bir parçacık polar bir çözelti içine atıldığında etrafını aksi yükteki iyonlar sarar. Stern tabaka olarak adlandırılan bu katmanın etrafında kayma düzlemi denilen merkezdeki parçacıkla hareket eden bir katman daha vardır. Bu katmanın dışında ise iyonlar serbest halde hareket edebilir. Zeta potansiyeli, kayma düzlemindeki elektrik potansiyeli olarak adlandırılabilir [62]. Silika test tüplerimizin başlangıçta negatif bir zeta potansiyeline sahip olduğu ve kaplama aşamaları sırasında yüzey yükünün değiştiği dikkate alınrsa, kaplamaların karakterizasyonu için zeta potansiyeli ölçümlerinin yapılmasının uygun olduğu görülür.

Örnekler, 1:9 oranında 10 mM NaCl ile seyreltilerek 1ml'lik kısmı polimer küvetler içine konularak Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Malvern-NanoSizer DLS cihazı ile ölçümler alınmıştır. Örnek hazırlama aşamasında küvet içerisinde hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edilmiştir. Ölçüm için uygun sıcaklık 25 °C olarak belirlenmiştir. Her örnek için ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır. Alınan ölçümlerin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Kaplama bulunmayan SNT'lerin negatif zeta potansiyeli nötral pH ortamında deprotone olmuş silanol gruplarının bir sonucudur. Yapılan ölçüm sonucu, negatif yüklü silika yüzey amin ile kaplandıktan sonra pozitif yüklü hale gelmiş olduğu görülmüştür. Tüp yüzeyleri amin ile modifiye edilince beklenildiği gibi primer aminin yüksek pKa değerine bağlı olarak yüzey yükü artmıştır [38]. FA kaplama reaksiyonlarından sonra tekrar açığıdaki negatif silanol grupları sayesinde net yüzey yükü negatif hale gelmiştir [63]. FA kaplaması gerçekleştikten sonra yüzey yükü tekrar negatif döner çünkü amin grupları amid formuna dönüşür ve yüzeyin neredeyse tamamı FA ile kaplanır [64].

Çizelge 2.4. SNT'lerin Zeta Potansiyeli ölçüm sonuçları.

SNT	NH ₂ -SNT	FA-NH ₂ -SNT
- 36.8 ± 2.30 mV	+ 51.9 ± 0.75 mV	-40.7 ± 2.00 mV

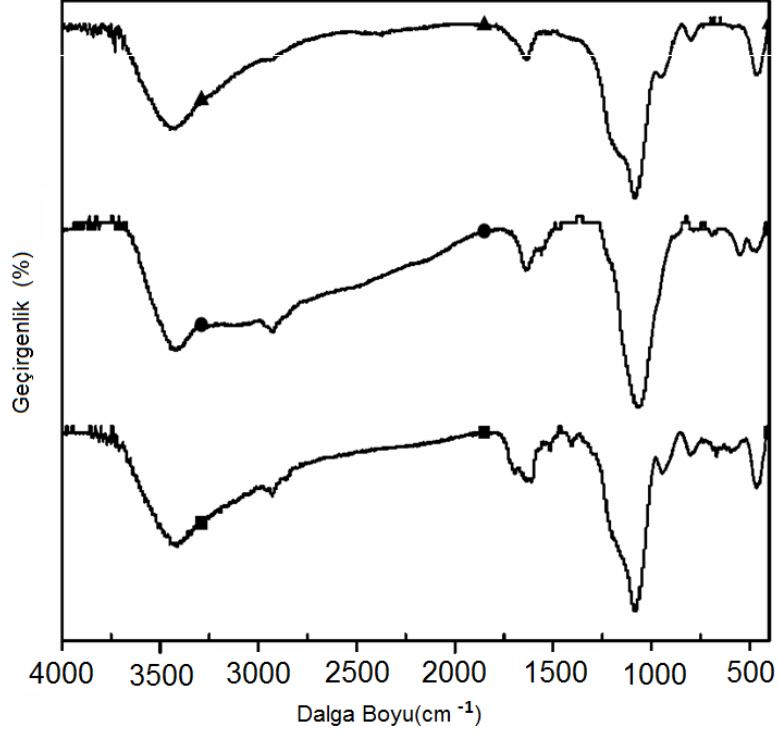


Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

FT-IR spektroskopisinde çeşitli moleküller için grup analizi yapılır. FT-IR de asıl amaç bir bileşiğin yapısını incelemek ve yapısında gerçekleşen değişimleri gözlemlemektir. Bir molekülün, IR ışımasını absorblayabilmesi için dipol momentinin değişmesi gerekir. IR nin frekansı ile molekülün titreşim frekansı eşit olduğunda absorblanma gerçekleşir. Kaplama yaptığımız yüzey de spektrumun farklı bölgelerinde yüzeye bağlanan fonksiyonel grupları her aşamada ayrı ayrı tespit edebileceğimizden, FT-IR *KBr Pellet* ile yüzeyin kimyasal karakterizasyonunun yapılması uygun bulunmuştur.

5 µm uzunluğundaki SNT ile yapılan FT-IR çalışmasında, silika yüzeyine bağlanan fonksiyonel grupların analizi Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi'nde bulunan Mattson 1000 marka FT-IR cihazı kullanılarak yapılmıştır. Her üç malzemenin de IR spektrumları incelendiğinde, 1083 cm⁻¹ de görülen pikin Si-O bandına ait olduğunu gözlemlenmiştir. Amin kaplı tüplerin IR bandı incelendiğinde ise Si-O pikine ek olarak 1562 cm⁻¹ de NH- grubuna ve 2920 cm⁻¹ de APTES kaynaklı -CH₂ ve -CH₃ gruplarına ait titreşimlerin olduğu gözlemlenmiştir [65]. Son olarak FA bağlı tüpler incelendiğinde ise 1514 cm⁻¹ ve 1406 cm⁻¹ değerlerinde fenil ve piterin halkasına ait

piklerin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2.7). Elde edilen veriler doğrultusunda yüzeye FA'nın doğru biçimde bağlandığı gözlemlenmiştir [63].



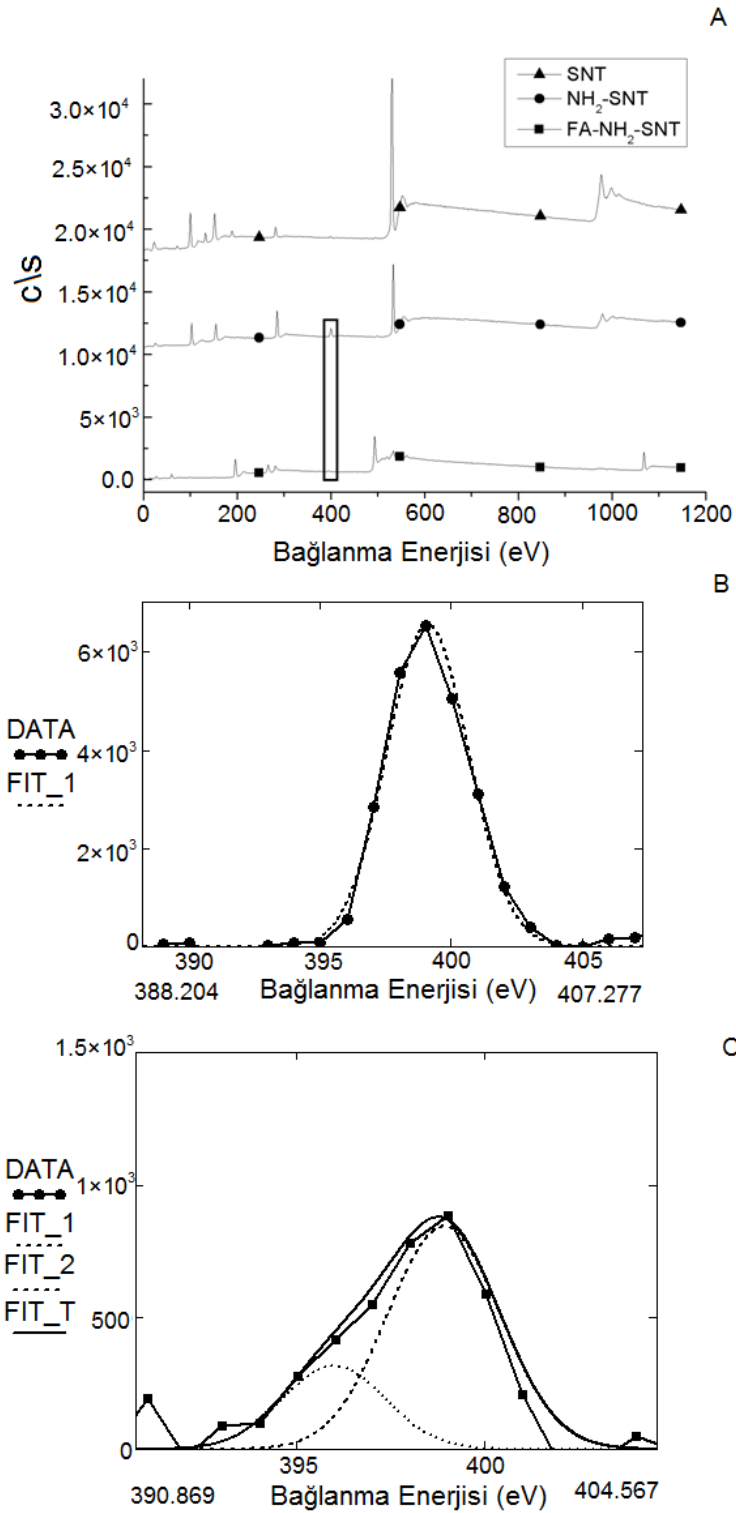
Şekil 2.7. SNT'lerin FT-IR spektrumu. ▲ SNT, ■ NH₂-SNT, ● FA-NH₂-SNT.

X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS)

Yüzey analizinde kullanılan XPS temelde yüzey atomlarının iç kabuklarında bulunan elektronların fotoelektrik olay sonucu uyarılmasına dayanır. Uyarılma sonucu oluşan fotoelektronların kinetik enerjilerinden, Einstein prensibince bağlanma enerjileri hesap edilebilir. Sonuç olarak da yüzey hakkında nitel ve nicel bilgi verebilen spektrumlar elde edilir.

Bilkent Üniversitesi-UNAM da bulunan K-Alpha, Thermo Scientific marka XPS cihazı kullanılarak tüplerin yüzeylerine bağlanmış olduğumuz fonksiyonel grupların analizi yapılmıştır. Origin programından elde edilen Gaussian denklemi, Mathcad programında düzenlenerek azot kaynakları hakkında detaylı bilgi veren grafikler çizilmiştir (Şekil 2.8). Bu analiz sonucu oluşan spektrumlar incelendiğinde amin

kaplı SNT'lerde APTES kaynaklı primer amin azotu görülürken, FA kaplı SNT'lerde APTES kaynaklı primer aminin azotu yanında FA kaynaklı sekonder aminlerin azotuna da rastlanmıştır. NH₂-SNT'lere ait 399 eV deki pik tek bir Gaussian eğrisi ile gösterilmiştir (Şekil 2.8-B). Diğer yandan, FA-NH₂-SNT'lere ait iki ayrı eğri çizdirilmiştir. 397 eV de tespit edilen pik amid fonksiyonel gruplarındaki azota ve N=C denk gelirken, 399 eV de tespit edilen pik primer amine karşılık gelir (Şekil 2.8-C) [66].

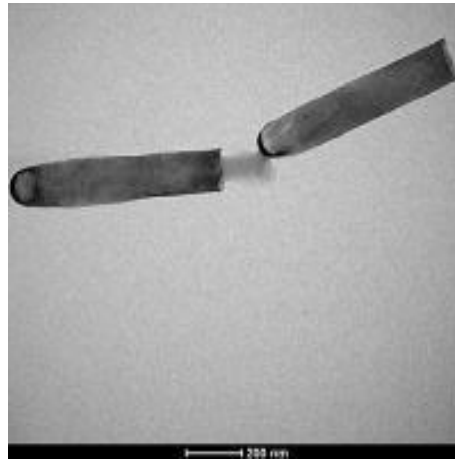


Şekil 2.8. SNT'lere ait XPS spekturumu. A) Genel XPS analizi sonuçları, B) APTES kaynaklı azot piki ve bu pikin fit eğrisi, C) APTES kaynaklı azota ek olarak, FA modifikasyonu sonrası oluşan ikincil amin kaynaklı azot piki ve bu pikin fit eğrisi.

2.2.3.4. SNT'lerin jel ile doldurulması

Alkalin ortamda (pH=7,6) yaşamını sürdüren sağlıklı hücreler, çevre ve genetik faktörlerin etkisiyle asidik ortamda yaşama yetisi kazanır. Bu aslında doku üzerinde birikmiş toksik maddelerin hücre DNA'sına zarar vermesi ile ilgili bir durumdur. Çoğu zaman ortamın pH değeri değiştiğinde hücreler ölür. Ancak bazen malign denilen kanserli hücre tipleri bu asidik ortama ayak uydurur ve kontrolsüz biçimde bölünmeye başlar. Bunun yanında kanser hücreleri yaşam faaliyetleri sonrası ortama laktik asit salgılar ve asidik ortam varlığını kanser hücreleri yok olana dek sürdürür [67]. Bu sebeple SNT'lerle ilaç salınımı çalışmaları yapılırken asidik ortamda ilacın salınmasının sağlıklı hücreleri koruma adına bir önlem olduğu düşünülmüştür. Dolayısıyla jel matriksi hazırlanırken düşük pH değerlerinde ilaç salınımı yapması için özen gösterilmiştir. Bu amaçla jel matriksi hazırlanırken baz içerisinde salınımı az, asit ortamı içerisinde salınımı fazla olan AEM maddesi eklenmiştir. Aynı zamanda ilaç salınımı için polyHEMA'nın su içerisinde şişme mekanizması kullanılmıştır.

İlacın çözünürlüğünü artırmak içinde ortama PEG-EEM eklenmiştir. UV aktif çapraz bağlayıcılar (Trimetilolpropanetoksilat triakrilat) kullanılarak da jelin tüp içindeki stabilitesi sağlanmıştır (Şekil 2.9). Başlatıcı olarak da 2,2-dietoksiasetofenon kullanılmıştır.

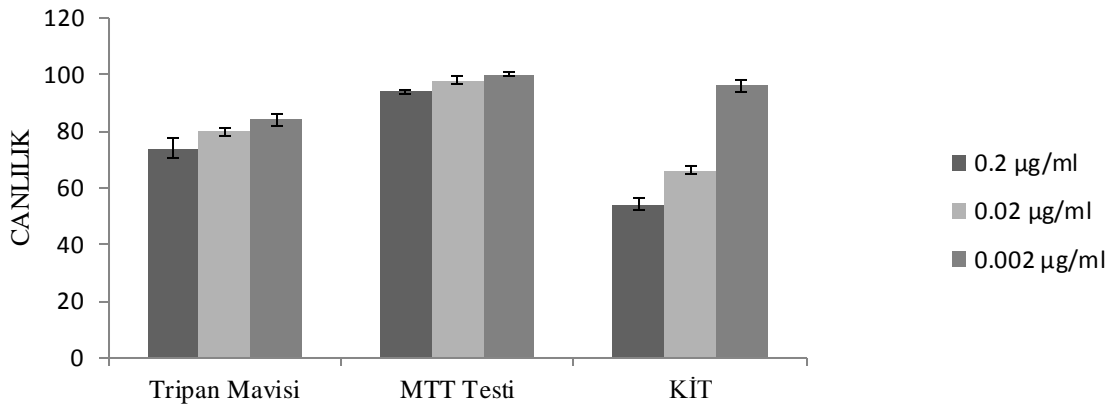


Şekil 2.9. Jel dolu SNT'lerin TEM görüntüsü. Çap 123 ± 14 nm, boy 820 ± 99 nm.

DOX DNA'nın ikili sarmal yapısını bozarak kanser hücrelerinin yok olmasında görev aldığından esasında düşük dozlarla çalışılması uygundur. Çünkü yüksek dozlar kanser hücrelerinin ilaç direncini artırmasının yanında, sağlıklı hücrelere zarar verebilir. Tüplerin içini dolduran jel yapısında asidik ortamda daha çok salınabilecek DOX içermektedir ve bu salınımın bir sonraki kısımda anlatıldığı üzere hücre öldürmede etkin olduğu görülmektedir.

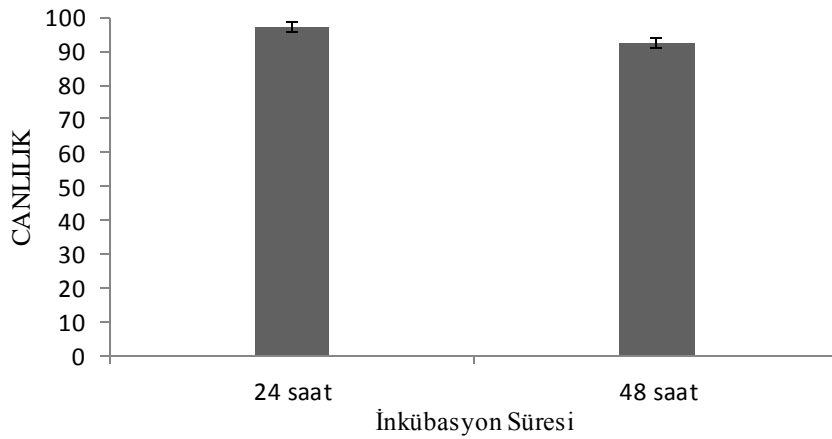
2.2.3.5. SNT'lerin SK BR-3 ve MCF-12A hücre hatları üzerinde uygulanması

Çalışmada kanserleşmiş SK BR-3 ve sağlıklı MCF-12A olmak üzere iki farklı hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatları ile ilgili çalışmalarda önce etkin ve daha kesin sonuç veren sitotoksosite testinin seçilebilmesi için çalışmalar yapılmıştır. 3 farklı test kullanılarak hücrelerin ilaçlı tüplerle etkileşimleri sonrası ölüm oranları incelenmiş ve elde edilen veriler doğrultusunda seçilen test ile sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır. Tripan boyası ile boyama, MTT Testi ve WST-1 Kiti kullanılarak sitotoksosite çalışmaları için uygun yöntem bulunmaya çalışılmıştır. Serbest ilaç kullanılarak yapılan testlerde yüksek dozda (200ng/ml) bile düşük ölüm oranları veren tripan boyası ile boyama ve MTT Test teknikleri çalışma için uygun bulunmamıştır. WST-1 kiti ile çalışılarak sitotoksiste deneylerinin standart prosedürler üzerinden kolaylıkla yürütülebileceği görülmüştür (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. SK BR-3 hücre hattı üzerinde farklı testler kullanılarak DOX ile yapılan sitotoksosite çalışmaları.

SNT'lerle yapılan deneylerde konsantrasyon aralığını belirleyebilmek için literatür incelenmiş ve ~50 µg/ml tüp konsantrasyonu en yüksek konsantrasyon olarak uygun görülmüştür [68]. Çalışmanın bu aşamasında FA kaplı SNT 2 örneği ve MCF-12A hücre hattı kullanılmıştır. Burada amaç, sitotoksik olmayan maksimum ilaç içermeyen tüp konsantrasyonunun tespitidir. Tüplerin toksik etkisinin minimizasyonu ile beraber ilaç içerikli tüplerle yapılacak deneylerde sadece ilacın toksik etkisinin görülmesi amaçlanmıştır. Literatürün aksine [68], yapılan ilk çalışmalarda 24 saat inkübasyon süresinde 53 µg/ml tüp konsantrasyonu ile yapılan göz ardı edilebilecek bir ölüm oranı ile karşılaşılmıştır. İnkübasyon süresinin hücre ölümleri için yeterli süreyi karşılamadığı düşünülerek bu süre 48 saate uzatılmıştır. Bu artışla beraber hücre canlılık oranı $97 \pm 2,8$ den $92 \pm 2,3$ e düşmüştür (Şekil 2.11). Bu değerler üzerindeki konsantrasyonlar incelenmemiştir çünkü tüp sitotoksitesinin ilacın etkisini gölgelemesi istenmemektedir. Ayrıca, bu çalışma öncesinde 53 µg/ml konsantrasyonunda FA kaplama yapılmış tüplerin kullanıldığı yüksek hücre canlılığı ile ilgili bir çalışmanın rapor edilmediği görülmüştür.



Şekil 2.11. MCF-12A hücre hatları ile WST-1 Kit kullanılarak inkübasyon süresine bağlı olarak gerçekleştirilen sitotoksite çalışmaları. Bu çalışmada 53 µg/ml konsantrasyonunda SNT 2 örneği kullanılmıştır.

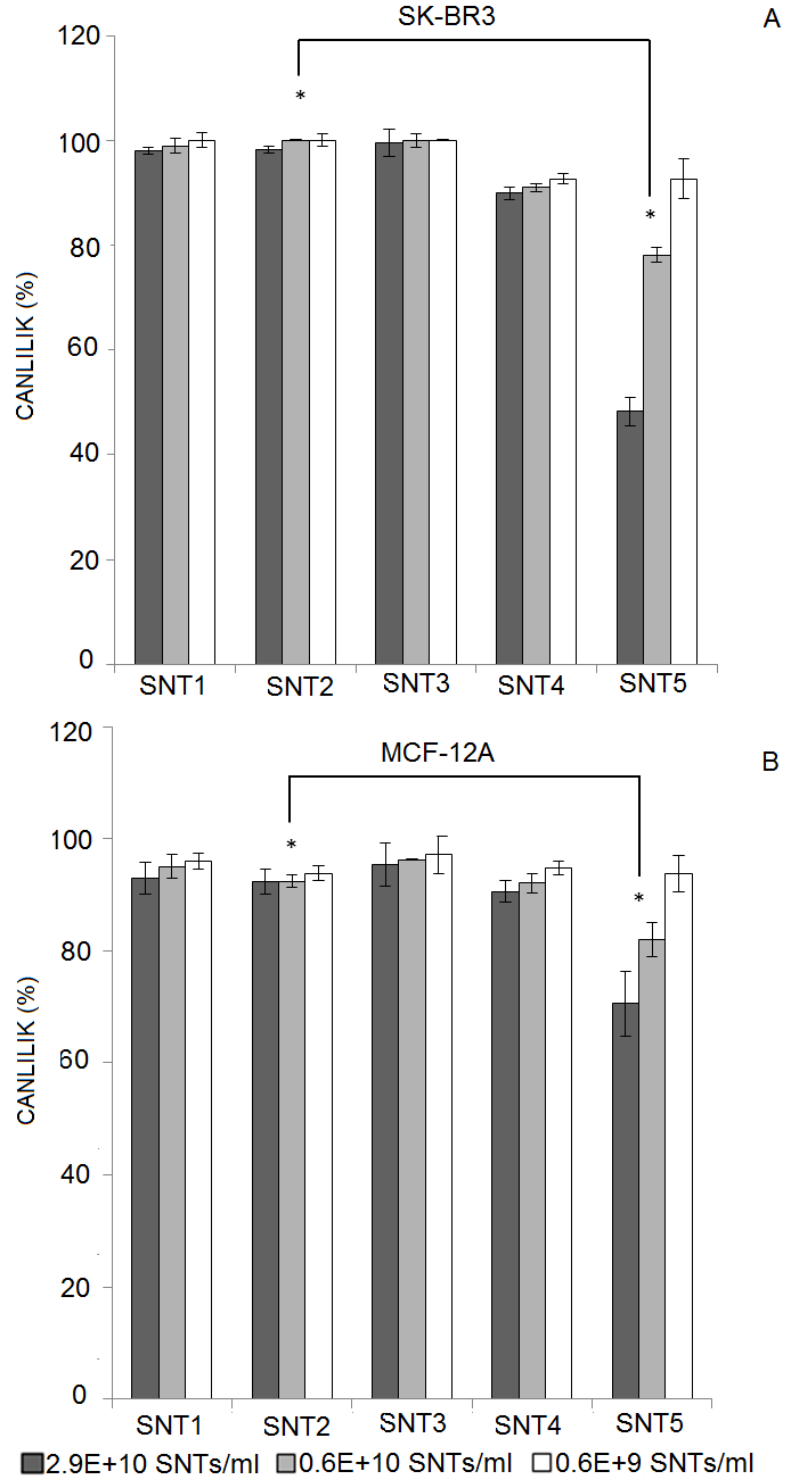
Benzer bir problemde ilaç içerikli jel ile doldurulmuş SNT'lerde yaşanmıştır. 48 saat inkübasyon süresi ve ilaç varlığına rağmen hücrelerin canlılık oranının %93 ten fazla olması hazırlanan jelin iki aşamalı modifikasyona tabi tutulması ile aşılmıştır. İlk aşamada polimer matriksi içindeki ilaç konsantrasyonu artırılmıştır. İkinci aşamada polimer matriksindeki çapraz bağlayıcı konsantrasyonu azaltılmıştır. Yeni oluşan jel

formulasyonu eski ile karşılaştırmalı olarak Çizelge 2.5 te verilmiştir. Bu değişiklikler sayesinde hücrelerin ölüm değerleri mantıklı bir çerçeveye oturmuştur.

Çizelge 2.5. İlaç taşınımında kullanılan jelin eski ve yeni formulasyonu. (% V/V Hacimce yüzde, * % W/V Hacimde ağırlıkça yüzde).

JEL İÇERİĞİ	FORMÜLASYON ESKİ (% V/V,* % W/V)	FORMÜLASYON YENİ (% V/V,* % W/V)
HEMA	76,06	82,96
PEG-EEM	1,14	1,15
Trimetilolpropanetoksilat triakrilat	5,70	0,58
Su	11,40	9,57
2,2-dietoksiasetofenon	3,80	3,83
Isopropanol	1,0	1,0
AEM*	1,90	1,91
DOX*	0,12	1,28

İlaç içerikli tüpler FA ile modifiye edildiğinde etkin bir biçimde meme kanseri hücrelerini öldürmüştür. Kanser hücreleri için bu partiküllerin öldürme oranı önemli ölçüde yüksektir. Sağlıklı hücrelerde canlılık değerlerinin düşmesi az da olsa yüzeylerinde barındırdıkları FA reseptörleri ile açıklanmaktadır [69]. İlaç içerikli jel yüklü SNT'lerin yüzeyinde bulunan FA kaplamının, hücre – partikül etkileşimi artırdığı dolayısıyla da sağlıklı hücrelerde belirtilen ölümlerin gerçekleştiği görülmüştür. Ölüm oranının kanser hücre zarlarında artan FA reseptörlerine bağlı olarak kanser hücrelerinde daha fazla olduğu gözlemlenmiştir [36]. Ayrıca pH duyarlı olarak hazırlanan jel matrisinin de kanser hücrelerinin asidik ortamında daha iyi salındığı dolayısıyla da kanserli hücrelerde ölüm oranının sağlıklı hücrelere göre daha yüksek çıktığı görülmüştür (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Kit ile yapılan sitotoksosite çalışmalarına göre A) SK BR-3 ve B) MCF-12A hücre hatlarının canlılık oranları. SNT 1= FA(-) Jel(-) DOX(-) SNT'ler, SNT 2= FA(+) Jel(-) DOX(-) SNT'ler, SNT 3= FA(+) Jel(+) DOX(-) SNT'ler, SNT 4= FA(-) Jel(+) DOX(+) SNT'ler, SNT 5= FA(+) Jel(+) DOX(+) SNT'ler. (*P<0,05)

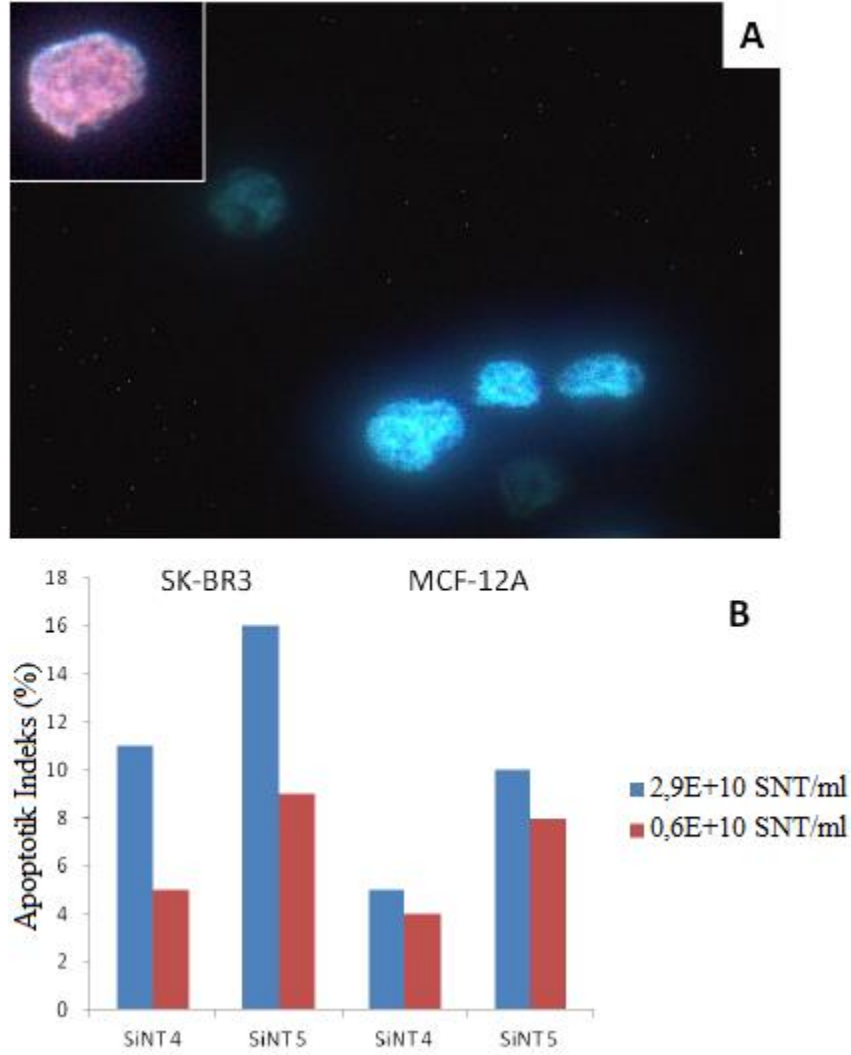
Şekil 2.12 de gösterilen canlılık değerlerinin sayısal değerleri Çizelge 2.6 gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. Kit ile yapılan sitotoksosite çalışmalarında A) SK BR-3 ve B) MCF-12A hücre hatlarının canlılık değerlerini sayısal olarak gösterimi ve standart sapmalar.

A			
KONSANTRASYON	2,9E+10 SNT/ ml	0,6E+10 SNT / ml	0,6E+9 SNT/ ml
SNT 1	98 ± 0,5	99 ± 1,2	100 ± 1,3
SNT 2	98,3 ± 0,7	100 ± 0,1	100 ± 1,2
SNT 3	99,5 ± 2,6	100 ± 1,3	100 ± 0,1
SNT 4	89,9 ± 1,2	91 ± 0,7	92,7 ± 0,7
SNT 5	48,3 ± 2,7	78,1 ± 1,4	92,7 ± 3,7

B			
KONSANTRASYON	2,9E+10 SNT / ml	0,6E+10 SNT / ml	0,6E+9 SNT/ml
SNT 1	93 ± 2,8	95 ± 2,1	96 ± 1,4
SNT 2	92,3 ± 2,3	92,4 ± 1,1	93,8 ± 1,3
SNT 3	95,4 ± 3,8	96,2 ± 0,1	97,1 ± 3,3
SNT 4	90,6 ± 2,0	92,1 ± 1,7	94,8 ± 1,7
SNT 5	70,6 ± 5,8	82 ± 3,1	93,7 ± 3,2

Kit kullanılarak yapılan sitotoksosite çalışmalarını desteklemek amacıyla, SNT 4 ve SNT 5 örneklerinin kullanıldığı çalışmalarda apoptotik indeks değerleri ölçülmüştür. Her iki hücre tipinde 48 saat iki farklı konsantrasyonda tüplerle inkübe edilmiş ve çift boyama protokolü [70] izlenerek Hoechst veya Propidium Iodid boyaları ile boyama yapılmıştır. Apoptotik indeks değeri belirli alandaki apoptotik hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı ile tespit edilmiştir. Şekil 2.13-A`da gösterilen floresan mikroskop görüntülerinde parlak mavi apoptotik hücelere, soluk mavi canlı hücelere ve oranj nekrotik hücelere karşılık gelmektedir. Ayrıca apoptotik indeks değerleri de Şekil 2.13-B`de gösterilmiştir. Sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında kanser hücreleri sitotoksosite çalışmalarına paralel olarak daha yüksek apoptotik indeks değerine ulaşmıştır. Ayrıca tüp konsantrasyonuna bağlı olarak apoptotik indeks değerinin de arttığı gözlemlenmiştir.

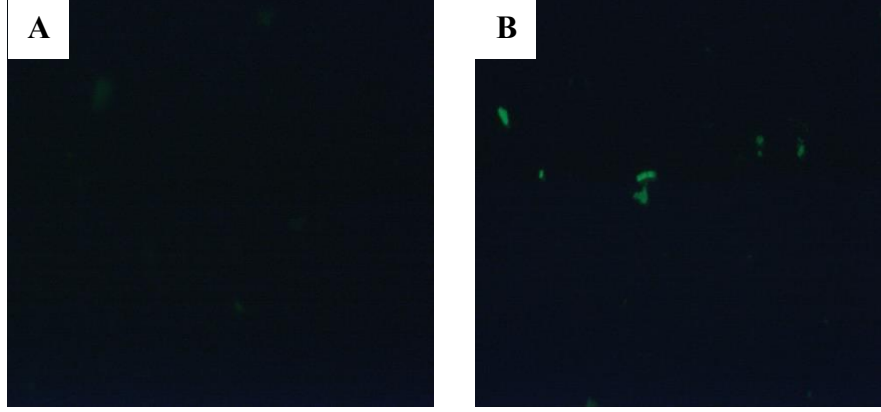


Şekil 2.13. A) SK BR-3 hücre hattına ait normal, apoptotik ve nekrotik (ek resim) hücrelerin florasan mikroskobu görüntüleri. B) SK BR-3 ve MCF 12A hücre hatlarına ait SNT 4 ve SNT 5 örneklerinin iki farklı konsantrasyonda kullanıldığı apoptotik indeks çalışmalarının sonuçları.

2.2.3.6. SNT'lerin florasan boya ile boyanması ve hücreler üzerindeki tutunumlarının incelenmesi

SNT'lerin iç ve dış yüzeyleri birbirinden bağımsız olarak kimyasal olarak aktif hale getirilebilir. Malzemenin bu özelliğinden yararlanarak iç yüzey florasan boya ile dış yüzey FA ile kaplanmıştır. Böylece hücre yüzeyinde kültür ortamında yıkama yapıldıktan sonra tutunabilen tüp miktarı gözlenmeye çalışılmıştır. Sağlıklı hücrelerle

yapılan deneylerde FA ile dış yüzeyleri kaplanmış olan tüplerin yüzeye daha fazla tutunduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanında yeterli kalitede florasana görüntüleri almak amacıyla tüplerin iç yüzeyi iki farklı yöntemle boyanmıştır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Florasan mikroskopta SNT'lerin görüntüleri. A) İç yüzeyi amin kaplı SNT'lerin uzun süreli florasana boya içerikli karışım içinde bekletme sonrası , B) Amin aktif hale getirilen florasana boyanın SNT'lerin iç yüzü ile kısa süre içinde etkileşime girmesi sonrası çekilen florasana mikroskop görüntüleri.

Florasana mikroskop görüntüleri incelendiğinde kısa süre içinde amin aktif florasana boya ile yapılan çalışmanın hücre tutunum deneyleri için uygun olduğuna karar verilmiştir. İlk uygulamada amin grupları süre bağımlı olarak amid forma dönüştüğü için boyanın bağlanamadığı düşünülmektedir. İkinci metotta amin aktif hale getirilen boyanın kısa sürede membranla etkileşime sokulması sonucu daha kaliteli görüntü elde edildiği görülmüştür. İncelenen örneklerin değişik alanlarında yapılan taramalar bu sonucu doğrular niteliktedir.

FA reseptörlerine kanser hücrelerine nazaran çok az miktarda da olsa sağlıklı hücrelerde de rastlanır [71]. Çalışmamızın bu aşamasında bahsedilen bilgiyi kullanarak FA bağlı tüplerin kanser hücreleri ve sağlıklı hücreler üzerinde tutunumunun incelenmesi amaçlanmıştır. Ancak sağlıklı hücrelerde kaliteli görüntü elde edilemediğinden ve kanser hücrelerinde de mikoplazma sorunu ile karşılaşıldığından bu çalışma tamamlanamamıştır.

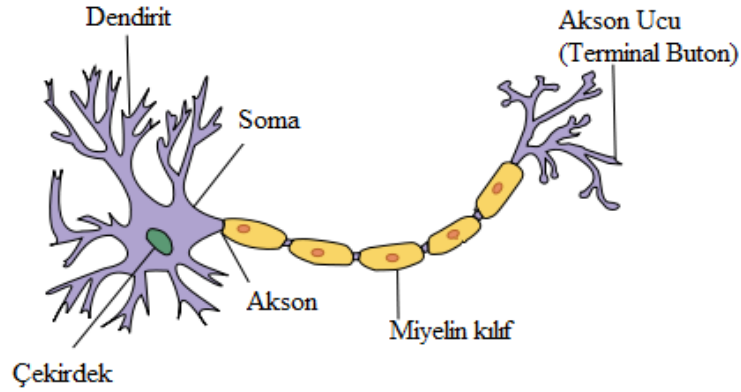
3. SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN KARBON NANOYAPILI MEMBRAN KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

3.1. Giriş

3.1.1. Sinir hücrelerinin yapısı ve yenilenme mekanizması üzerine yapılan çalışmalar

Canlı bir hücrenin temel özelliklerinden biri, her hücreye özgü olmak şartıyla, çevreden gelen uyarılara tepki verme ve bu tepkiyi iletmedir. Bu özelliğin oldukça gelişmiş olduğu nöronlar canlı vücudunda farklı yapı ve görevleri ile diğer hücre gruplarından kolaylıkla ayırt edilebilen hücre gruplarıdır. Canlı vücudunda diğer bütün doku ve organlar arasındaki iletişimi bu hücreler sağlar. Sinir hücreleri ve bu hücelere desteklik sağlayan glia hücreleri ektodermden farklılaşan nöroektoderm tarafından üretilir ve sinir doku oluşur. Sinir hücreleri gelişirken embriyonik aşamada ulaşabilecekleri maksimum erginliğe ulaştıklarından olgunluk döneminde bu hücrelerde bölünme görülmez. Özellikle santral sinir sisteminde oluşan derin yaralanmaların bu sebeple tedavisi oldukça güçtür.

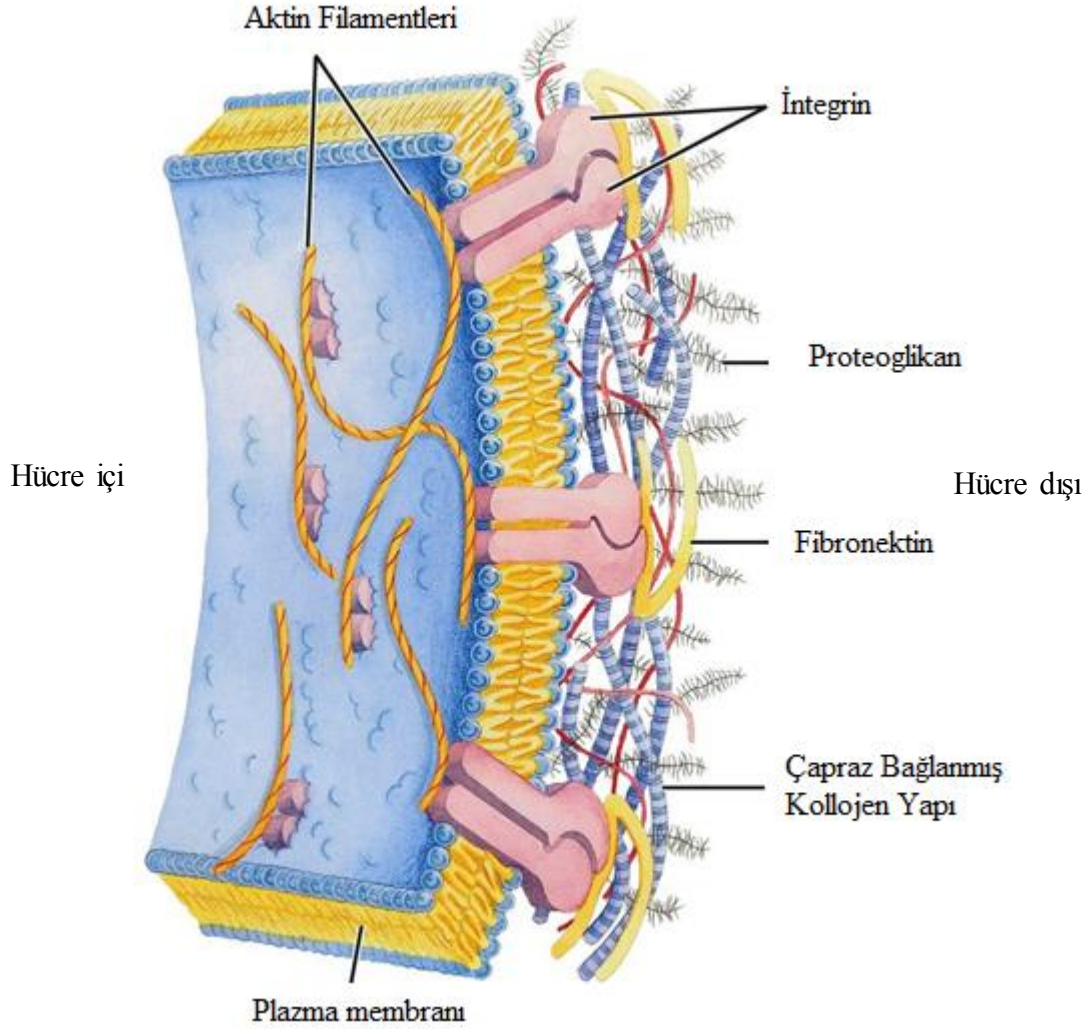
Sinir hücreleri yapısal olarak incelendiğinde temelde 4 kısımdan oluşurlar. Bunlar, hücrenin çekirdeği taşıyan dolayısıyla yaşamsal faaliyetlerin sürdürülmesinden sorumlu olan *soma*, nöronal iletişimin önemli alıcılarından *dendritler*, hücre gövdesinden alınan bilgiyi terminal butonlara taşımakla sorumlu *akson* ve son olarak da aksonların ince uçlarında bulunan kese biçimli ve iki sinir hücresi arasındaki iletişimi sağlayan nörotransmitter maddelerin salınımından sorumlu *terminal butonlardır*. Bunların dışında akson üzerinde iletinin iletim hızını doğrudan etkileyen miyelin kılıf ve onun üretiminden sorumlu şivan hücreleri bulunmaktadır (Şekil 3.1) [72].



Şekil 3.1. Bir sinir hücresinin temel gösterimi.

Çevresel sinir sistemi yaralanmalarını tedavi etmek amacıyla her yıl on binlerce çalışma yapılmaktadır [73]. Bu çalışmalar temelde, nöronların kendilerini yenilemeleri ve görevlerini eskisi gibi yerine getirmeleri için çalışan sinir-doku mühendisliğinin ilgi alanıdır [74]. Nörorejenerasyon, bir nöronun yeniden oluşmasını ya da hasarlı kısmının tamir edilmesine takiben bu hücrelerin kendilerini yenilemelerini ifade eder. Bir sinir hücresinin hasarlanma sonrası kendini yenileyebilmesi soma kısmının bu yaralanmadan ne kadar etkilendiği ile doğrudan ilintilidir. Soma yaralanma sonrasında da varlığını sürdürüyorsa akson ve dendritlerin tamiri kolayca gerçekleşir. Bu sebeple hücre bazda yapılan sinir rejenerasyonu çalışmalarında somatik yapıya benzer özellikteki PC-12 hücre hatları kullanılmaktadır. Bu hücreler nöron geliştirme faktörü ile etkileşime girdiklerinde aynı nöronlar gibi bölünme özelliklerini kaybedip dendrit benzeri filopodya denilen yapıları oluşturmaktadır [15]. Bunun yanında farklılaşan hücreler elektriksel açıdan da aktif hale gelmektedirler [75].

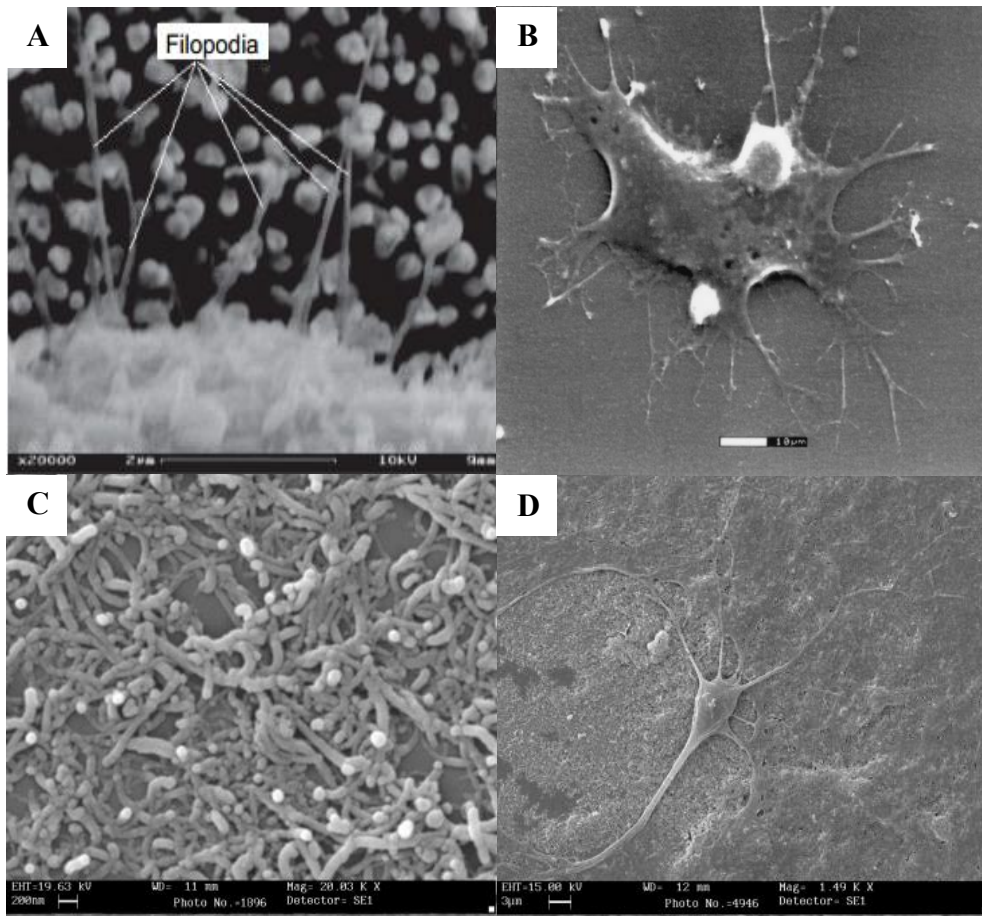
Gerek sinir hücreleri gerekse canlılarda bulunan diğer hücreler buldukları yüzeylere tutunma eğilimindedirler. Bu sebeple, bir doku üzerinde hücreler tek başına bulunmaz. Hücrelerin yanında, dokularda hacimsel olarak önemli bir yer tutan, lokal olarak üretilen protein ve polisakkaritlerden oluşan, hücrelerin buldukları yüzeye ve birbirlerine tutunumlarını sağlayan ekstraselüler matriks bulunmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Hücreler arası ortam olan ekstraselüler matriksin görünümü [76].

Ekstraselüler matriksin yüzey alanını artırmaya yönelik olarak dizayn edilmiş nanotopografik öğeler içeren yapısı düşünüldüğünde bu hücrelerin tutunabilecekleri ortamın doğru biçimde taklit edilebilmesinin nanoteknolojinin imkânlarından faydalanmakla mümkün olacağı görülür. Bu aşamada sinir-doku mühendisliğinde yapılan araştırmalar yapay sinir kılavuzlarının üretimi ve sinir hücrelerinin yenilenmesini artırıcı, tetikleyici ve yönlendirici özgün substrat yüzeylerin geliştirilmesi olarak iki dalda incelenebilir. İlk olarak otolog sinir nakillerinde yaşanan olumsuzlukları gidermek ve geniş doku boşluklarındaki yenilenme sorunlarını etkin biçimde çözebilmek için üretilen sinir kılavuzları genelde biyoyumlu polimerlerden üretilen iskeleler olarak ön plana çıkmaktadır [77]. İkinci

olarak, polimerden metallere pek çok yüzey sinir hücrelerinin yönlendirme, geliştirme veya yenileme özelliklerini incelemek için substrat olarak kullanılmaktadır [78, 79]. İkinci tip çalışmaların yapılmasında bir diğer amaç hücre-malzeme arayüz etkileşiminin yetersizliğinden kaynaklanan protez-doku uyum sorunlarını en aza indirmektir. Bu çalışmalarda kullanılan malzemeler arasında en belirgin olanlar karbon nanotüpler [79, 80], iletken polimerler [77, 81] ve gözenekli veya nanokolonlu malzemelerdir [15, 29, 82] (Şekil 3.3).



Şekil 3.3.A) Nano metal çubuklardan oluşan substrat üzerinde, B) iletken polimer substrat üzerinde, C-D) düzenli olmayan karbon nanotüp substrat üzerinde nöritlerin gelişimi ile ilgili yapılan çalışmalar.

Bahsedilen iki tip çalışma için de çalışılan malzemenin *topografik*, *kimyasal* ve *elektriksel* özelliklerinin optimize edilmesi gerekir [83, 84]. Örnek vermek gerekirse normalde hücrelerin tutunmalarının olmadığı yüzeyler, yalnızca yüzey topografisi ile oynanarak hücreler için etkin hale getirilebilmektedir [85]. Ayrıca önceden

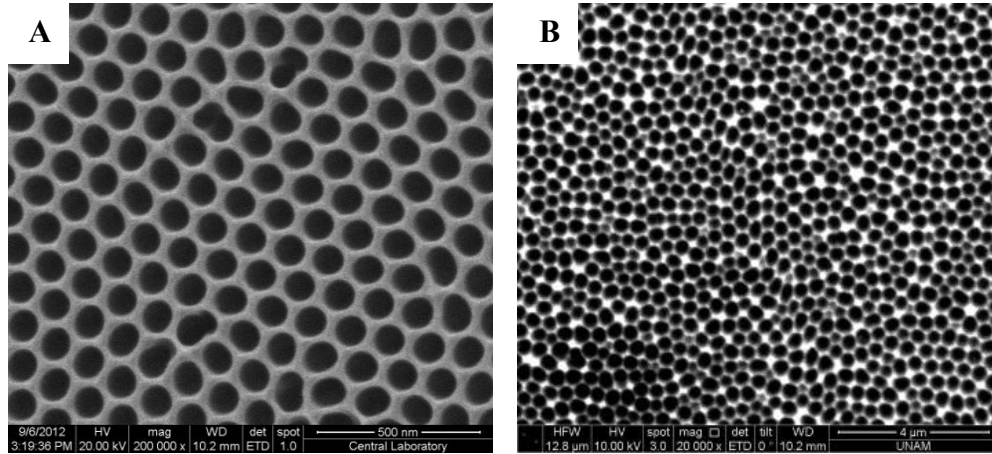
belirlenmiş şekil düzenine sahip yüzeyler kullanılarak sinir hücrelerinin yönelimi sağlanabilmektedir [86, 87]. Bu sebeple son yıllarda nanotopografik yüzeylere olan ilgi artmıştır [81, 88]. Bu ilgi artışındaki temel etken, ekstraselüler matriks ile bu nanotopografiye sahip yüzeylerin birbirlerine benzemeleridir. Yapılan çalışmalar nano özellikli yüzeylerde, sinir hücrelerinin yüzeye tutunumlarının ve hücre dışı matriks proteinlerinin yapışmasının normal yüzeylere nazaran çok daha fazla olduğunu göstermiştir [89, 90]. Bu durum nanoplatformlarda artan yüzey alanı ve hücre zarındaki proteinlerin bu yüzeylere daha fazla uyum göstermesi ile açıklanabilir [91].

Topografik özelliklerin yanında bu yüzeylerin kimyasal özellikleri de sinir hücrelerinin gelişimini etkileyen bir diğer faktördür [82]. Kullanılan bazı kimyasallarla sinir hücrelerinin gelişimleri ve nörit oluşumu kontrol edilebilmektedir. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda yüzeyler ekstraselüler matriks proteinleriyle ya da nöroaktif peptidlerle kaplanabildiği gibi nanoporlu malzemelerde ilaç ve büyüme faktörü gibi biyokimyasallarla katkılanılabilmektedir [88]. Böylece hücreler kendi topografilerine benzer, uygun kimyasallarla modifiye edilmiş bir ortamda gelişim imkânı bulmaktadır. Kimyasal etkileşime ek olarak elektriksel uyarımın da sinir hücrelerinin gelişiminde önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır ve bu durum sinir hücrelerinin iletken yüzeyler üzerinde çalışılmasının önünü açmıştır [77, 81]. Elektrik iletkenliği yüksek olan polipirol kullanılarak yapılan yığın [77, 81], gözenekli [82] ve nano iplikçik [88] şeklinde sentezlenen biyopolimer yapıları iskeleler nörit gelişim ve yönelimde oldukça başarılı sonuçların alınmasında önemli rol oynamışlardır. Bu alandaki diğer dikkate değer çalışmalar karbon nanotüp bazlı substratlarla yapılmaktadır. Biyodayanıklı ve üstün iletken özellikleri ile karbon nanotüp malzemeler sinir-doku mühendisliğinde önemli bir potansiyele sahip olarak görülmektedir [78-80].

Nanogözenekli anotlanmış oksit (AAO) yüzeyler kontrol edilebilir topografileriyle (por çapı, por derinliği ve porozite (por sayısı/cm²)), kimyasal modifikasyon ve katkılanırmaya izin veren boşluklu yapısı ile kemik-doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan biyomalzemelerdir [9, 92, 93]. Bu malzemenin bir diğer ilgi çeken yönü

de kalıp sentez metodu kullanılarak, nano çubuk, nano tel ve nanotüp yapılarının oluşturulmasına olanak vermesidir. Örneğin; kimyasal buharlaştırma metodu (CVD) ile biyoalgılayıcılar, alan yayıcılar ya da elektroosmotik akış yönünün kontrolü gibi birçok alanda kullanılabilecek karbon tüplerin yapılmasında AAO yüzeyler kalıp olarak kullanılabilmektedir [94-96]. Bahsedilen önemli özelliklerine rağmen AAO membranların sinir-doku mühendisliğinde kullanımı düzenli olmayan porlu membranların sinir hücreleri üzerindeki etkisi ile sınırlı kalmıştır [15, 29]. Bu çalışmada ise farklı porozite ve por çapına sahip AAO membranlar (Şekil 3.4) kalıp olarak alınarak üretilen karbon nanoyapılı membranlar (CNM) topografik, kimyasal ve elektriksel özellikleri bakımından karakterize edilmiş ve sinir hücreleri ile üretilen substratların etkileşimi üzerinde çalışılması amaçlanmıştır.

CNM üretimi sırasında literatürden farklı olarak CVD tekniği [94-96] yerine bir ilk olarak fiziksel buharlaştırma tekniği (PVD) kullanılmıştır.



Şekil 3.4.A) Okzalik asit çözeltisi B)fosforik asit çözeltisi içinde büyütülen nanoporlu AAO membranların SEM görüntüsü.

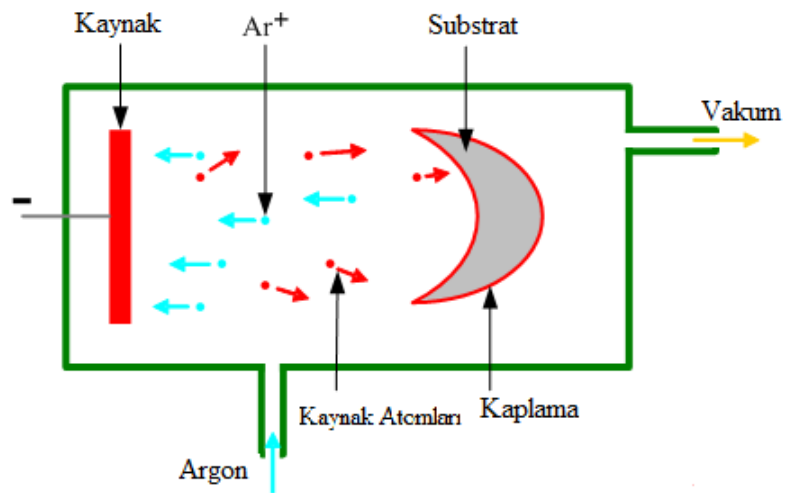
3.1.2. Fiziksel buharlaştırma metodu

Fiziksel buharlaştırma metodu, katı ya da sıvı bir kaynaktaki atom ya da moleküllerin vakum ya da düşük basınç altında bir alt taş üzerine ince film şeklinde kaplanması için kullanılan atomik boyutta yüzey kaplama tekniğidir. Tipik olarak bu metotla birkaç nanometreden binlerce nanometreye kadar kaplama yapılabilir. Vakum

teknolojisinin gelişmesine bağlı olarak CVD den farklı olarak PVD metodunda düşük sıcaklıklarda kaplama yapılabilir. Bu sebeple kaplama yapılan yüzeyde oluşacak deformasyon CVD tekniğine göre oldukça azdır. Vakum teknolojisine gelişmesine paralel olarak gelişen PVD metotları son 10 yılda kaplama teknolojisine gelişimine büyük katkı sağlamıştır.

Temelde PVD tekniğinde iyon bombardımanı ya da buharlaştırma ile katı yüzeyden ayrılır. İyon bombardımanına maruz kalan kaynaktan kopan atomlar vakum vasıtasıyla alt taşa yönlendirilir ve yüzeyde sık bir kaplama yapılır (Şekil 3.5).

PVD yöntemi buharlaştırmaya ve sıçratmaya dayalı olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Bu teknikler kullanılarak üretilen buhar, yüksek hız ve enerjiye sahip parçacıklardan oluşur (plazma). Bu enerjik parçacıkların eldesi için kaplama yapılacak yüzeye negatif potansiyel (bias voltajı), kaplama malzemesine (buhar) pozitif potansiyel uygulanır. Böylece ortamdaki iyonların hız ve enerjileri artırılmış olur. Belirli bir bias voltajı kullanılarak kısmi olarak iyonize olmuş metal buharının kullanımına dayalı olarak yapılan kaplama işlemine genel olarak iyon kaplaması (iyon plating) denilmektedir [97].



Şekil 3.5. Fiziksel buhar biriktirme metodunun şematik gösterimi.

3.2. Sinir hücrelerinin yenilenmesi ve gelişimi için karbon nanoyapılı membranların üretimi ve karakterizasyonu

3.2.1. Giriş

Canlının en temel birimi olarak tanımlanan hücrelerin yaşayabilmesi için optimum şartların sağlanmış olması gerekir. Bu şartlardan bir tanesi de hücrenin bulunduğu ortam ile ilişkisidir. Bulduğu yüzeye bağlanma eğilimi göstermeyen hücreler belli bir süre sonra canlılıklarını kaybetmektedir. Hücrelerin doğal ortamlarında tutundukları ekstraselüler matriks nanoboyutta hücre tutucular içerdiğinden, bu ortamı nanoteknolojinin de imkânlarından faydalanarak taklit etmek yaraların iyileştirilmesinden [98] sinir rejenerasyonuna [99] kadar pek çok alanda değişik araştırmalara kapı açmaktadır.

Sinir hücrelerinin yenilenme prosedüründe bu zamana kadar pek çok yüzey kullanılmıştır. Ancak AAO membranların kullanımı, kontrol edilebilir morfolojik özelliklerine rağmen oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada AAO membranların morfolojik avantajlarının yanında, PVD metodu ile yüzey ince bir karbon tabaka ile kaplanarak CNM'ler elde edilmiş, yüzey iletkenliği sağlanmış ve böylece hücrenin nanoporlu AAO yüzeye tutunumu artırılmış ve membranın boşluklu yapısından faydalanarak büyüme faktörü veya ilaç gibi biyokimyasallarla ve iletkenlik faktörünün de etkisiyle hücre farklılaşmasına yön verilebileceği ön görülmüştür. Üretilen AAO ve CNM'lerin karakterizasyonu SEM, TEM, XPS, EDX ve DC Voltaj/Akım Kaynağı kullanılarak yapılmıştır.

Uygun substratların hazırlanmasındaki kritik sorun alüminyum tabakanın tam olarak hücre malzeme etkileşiminden önce yüzeyden uzaklaştırılmasıdır. Esasında Al tabakanın yüzeyden uzaklaştırılmasına özen gösterilmesinin nedeni hücreler üzerindeki toksik etkisinden kaynaklanmaktadır [100]. Bu aşamada literatürde $HgCl_2$ [101] veya $CuCl_2 \cdot 2H_2O + HCl$ [102] kullanılarak metalin yüzeyden uzaklaştırılmasının mümkün olduğu görülmüştür. Cıva bileşiklerinin çok daha zararlı olduğu göz önünde bulundurularak bu çalışmada $CuCl_2 \cdot 2H_2O + HCl$ kullanılmıştır.

Al tabakayı uzaklaştırırken kullanılan asidik CuCl_2 çözeltisi aynı zamanda AAO membranın da incelmeye, erimesine yol açtığı gözlemlendiğinden, literatürde bulunan pek çok yol deneyerek serbest AAO membranların eldesi için çalışılmıştır. Ancak literatürde bahsedilen AAO membranın vernik korunması [103], cila ile korunması [104] ya da polimer yardımıyla korunması [105] kesinlikle istenilen sonucun elde edilmesini sağlamamıştır. Bu sebeple serbest membranların eldesi için basit, ucuz ve tekrarlanabilir bir yol bulunarak serbest AAO membranlar elde edilmiştir. Elde edilen membranlar PVD ile uygun kalınlıkta karbon ile kaplanmış ve CNM'ler oluşturulmuştur.

İstenilen standartlarda serbest AAO membran eldesi sağlandıktan sonra hücrelerin gelişiminin gözlenmesi için uygun substrat tasarımı hücre plakalarındaki kuyu hacmi dikkate alınarak yapılmıştır. Malzeme üretimi ve karakterizasyonun ardından sitotoksikite ve tutunum deneyleri için gerekli çalışmalara başlanmıştır ve bununla ilgili çalışmalar halihazırda devam etmektedir.

Değişik malzeme kombinasyonları üzerindeki canlılık, tutunum ve nörit uzatma performansları takip eden doktora tezinin konusu olacaktır.

3.2.2. Deneysel gereç ve yöntemler

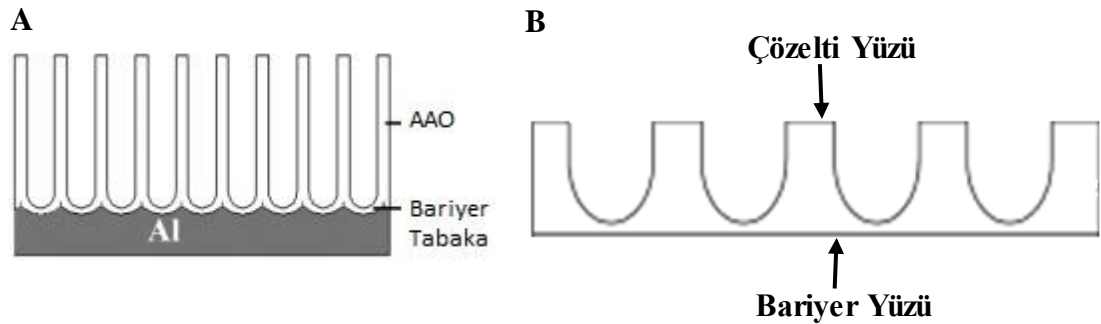
3.2.2.1. Materyal

% 99,9998 saflıktaki alüminyum, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Alfa Aesar firmasından; n-hekzan Sigma-Aldrich firmasından; okzalik asit Acros Organic firmasından; H_3PO_4 BDH, NaOH Prolabo firmasından; H_2SO_4 , CrO_3 Fluka firmasından; EtOH, HCl (%37) Merck firmasından; parafilm Bemis firmasından temin edilmiştir. 18 M Ω rezistanstaki tip II kalitedeki saf su Sartorius su temizleme sistemi kullanılarak elde edilmiştir.

3.2.2.2.Serbest AAO membran eldesi

Okzalik asit kullanarak AAO membran eldesi

Serbest AAO membran eldesi için çalışmanın ilk aşamasında önceki çalışmadan deneyimli olduğumuz okzalik asit elektroliti ile sistem kurulmuştur. Elektrokimyasal parlatmanın ardından, AAO filmler, ağırlıkça %5'lik okzalik asit sulu çözeltisi içinde 50 V DC voltaj ile 5 °C sıcaklıkta alüminyum üzerinde büyütülmüştür. Birinci basamakta üretilen film asidik CrO_3 çözeltisinde çözülmüş ve ikinci basamak anodizasyon gerçekleştirilip düzgün sıralı porlara sahip AAO filmler elde edilmiştir [27]. Serbest AAO membran eldesi için metalik alüminyumdan kurtulmak gerekmektedir ancak bu aşamada değişik sorunlarla karşılaşmış ve bu sebeple farklı metotlar denenerek uygun şekilde AAO membran elde edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen serbest membranların Al tabakaya bakan yüzüne bariyer yüz, çözeltiliye bakan ve ilk oluşan düzensiz porların bulunduğu yüzüne ise çözeltili yüzü denilmektedir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. A) Alüminyum üzerinde oluşan AAO filmlerin ve alüminyumun kesit çizimi ve B) filmlerin alüminyumdan ayrılmasıyla elde edilen AAO membranlarda bulunan iki farklı yüz.

Yapılan literatür taramalarında serbest AAO membran eldesinde, 4 farklı yöntemle karşılaşılmıştır.

1. AAO film büyütülen alüminyum yüzeyin koruma olmaksızın 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılması ve alüminyumun uzaklaştırılarak AAO membran eldesi [106].

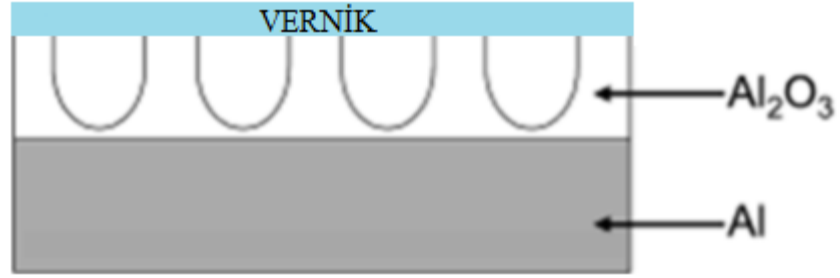
AAO filmler iki aşamalı anodizasyon metodu kullanılarak ve her iki aşamada da 24'er saat anodizasyona tabi tutularak oluşturulmuştur. Her iki tarafında da AAO film büyütülen alüminyum substrat 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılmıştır. Oda sıcaklığında 7-8 saat içinde alüminyum yüzey ile birlikte AAO filmler de çözülmüş ve eriyerek kaybolmuştur.

2. Alüminyumun iki tarafında büyüyen AAO filmlerden birinin yüzeyinin tırnak cilası ile korunarak 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılması. Böylelikle korunmayan AAO film ve alüminyumun çözeltide çözünmesi ve korunan yüzeyden AAO membran eldesi [103].

Yapılan literatür taraması sonucu, iki aşamalı anodizasyon metodu kullanılarak, her iki aşamada da 24'er saat anodizasyona tabi tutulan alüminyum üzerindeki AAO filmlerden birinin yüzü tırnak cilası ile kaplanmıştır ve tırnak cilası kaplı yüzey oda sıcaklığında 2-3 saat kurutulmuştur. Tırnak cilasının, bulunduğu AAO film yüzeyinin asit ile temasını engelleyeceği düşünülmüştür. Asit çözeltisi ile temas eden korunmamış AAO filmin ise bir süre sonra çözüneceği, ardından metalik alüminyumun çözülerek kaybolacağı ve bir yüzü cila ile kaplı serbest AAO membran elde edileceği öngörülmüştür. Gözlemlerimiz göstermiştir ki, daha çözünme gerçekleşmeden asit çözeltisi içinde tırnak cilası AAO film yüzeyine yeterince tutunamamış ve kaplanan yüzeyin de açtaki yüzey gibi çözünmesine neden olmuştur.

3. Alüminyumun iki tarafında büyüyen AAO filmlerden birinin yüzeyinin vernik ile korunarak 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılması. Böylelikle korunmayan AAO film ve alüminyumun çözeltide çözünmesi ve korunan yüzeyden AAO membran eldesi [104].

İki aşamalı anodizasyon metodu kullanılarak üretilen AAO filmlerden birinin yüzeyi vernik ile kaplanmıştır ve vernik kaplı yüzey oda sıcaklığında 24 saat kurutulmuştur. Önceki uygulamada da bahsedildiği gibi verniğin AAO yüzeyi koruyacağı düşünülmüştür. Vernik asit çözeltisi içinde tırnak cılasına göre daha uzun süre dayanmış ancak, daha kaplama bulunmayan AAO film yüzeyi asit çözeltisinde çözünmeden vernik yüzeyden kalkmış ve her iki yüzdeki AAO film de çözelti içinde zamanla eriyip kaybolmuştur. Çalışma 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisinde vernik AAO film üzerinde uzun süre dayanabilmiş ancak alüminyum yüzey ile çözeltinin temasının kısıtlı olması bu sürenin alüminyumunu uzaklaştırmak için yeterli olmadığını göstermiştir. Yani bu kısıtlı süre içinde, sadece korunmayan yüzey uzaklaştırılabilmiş ve alüminyumun çözünmesi için yeterli vakit kalmamıştır. Bunun üzerine, vernikle yapılan diğer çalışmada alüminyum folyo üzerinde iki taraflı olarak oluşturulan filmlerden birinin yüzü vernikle kaplandıktan sonra 24 saat kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.7). Korunmayan AAO film, 2 saat boyunca 75°C sıcaklıktaki asidik CrO_3 asit çözeltisinde çözünmüştür. (Metalik alüminyum bu çözeltiden etkilenmemektedir). Bu sırada diğer tarafta bulunan verniğin yüzeyde aşırı sıcaklık nedeniyle şekil değiştirdiği gözlemlenmiştir. Bir tarafında alüminyum, diğer tarafında vernik kaplı 5 cm^2 alana sahip AAO film bulunan substrat, 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılmış ve yaklaşık 30 dakika sonra bütün metalik alüminyumun yüzeyden kaybolduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.7. AAO filmlerden birinin yüzeyinin vernik ile kaplanması ve kaplama bulunmayan AAO yüzeyin asidik CrO₃ çözeltisi kullanarak uzaklaştırılması sonucu elde edilen substrat.

Bu şekilde bir tarafı vernik kaplı serbest AAO membran elde edilmiştir. Yüzeyden verniği uzaklaştırmak için örnekten alınan iki parçadan biri asetonunda diğeri toluen içinde 3 gün boyunca belli aralıklarla ultrasonik temizlemeye maruz bırakılarak bekletilmiş, ancak membran yüzeyindeki vernik tabakasından kurtulmak mümkün olmamıştır.

4. Alüminyumun iki tarafında büyüyen AAO filmlerden birinin yüzeyinin Poli(metil metakrilat) (PMMA) ile korunarak 0,1 M CuCl₂.2H₂O + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılması. Böylelikle korunmayan AAO film ve alüminyumun çözeltide çözünmesi ve korunan yüzeyden AAO membran eldesi [105].

AAO yüzeylerde verniğin olumsuz etkileri görüldükten sonra, kaplama materyalinin değiştirilmesine karar verilmiş ve kaplama materyali olarak literatürde kullanılan PMMA'nın uygun olduğu düşünülmüştür [105]. Bu bağlamda, uygun görülen çözücüler ve konsantrasyonlar Çizelge 3.1`de belirtildiği şekilde kullanılmış ve elde edilen sonuçlardan ayrıntılı bir şekilde bahsedilmiştir. Buna ek olarak, PMMA kaplamada karşılaşılan bazı sorunlar nedeniyle Poli (stiren) kaplama ve PMMA-PS karışımı da farklı konsantrasyonlarda denenmiştir. Membran üretiminin maliyeti ve üretim süresi dikkate alındığında polimerlerin asit dayanımı ve uygun çözücüde uzaklaştırılması deneylerinin öncelikle lamalar üzerinde yapılmasına karar verilmiştir.

Deney No 1 (Çizelge 3.1 deki sırayla): PMMA çözeltisi 10 ml aseton kullanılarak belirtilen konsantrasyonda 40 °C de hazırlanmıştır. 30 dakikalık kurutma süresinden sonra polimer kaplı lam 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine daldırılmıştır. Bu çözelti içinde PMMA tabaka hızlı bir şekilde lam üzerinden uzaklaşmıştır. Polimer kaplı lamın aseton içerisindeki davranışı incelendiğinde polimerin yüzeyden uzaklaşırken akışkan bir hal aldığı ve tam olarak camın temizlenmediği gözlemlendi. Bu durumun AAO üzerinde porların tıkanmasına neden olacağı ve aseton kullanarak yüzeyin tam olarak polimerden temizlenemeyeceği anlaşılmıştır.

Deney No 2: Çözücüye değiştirmenin sorunu çözüp çözmediğini görmek amacıyla aynı konsantrasyon toluen ile hazırlanmıştır. PMMA çözeltisi 10 ml toluen kullanılarak belirtilen konsantrasyonda 40 °C de hazırlanmış ve 30 dakikalık kurutma süresinden sonra lam 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılmıştır. Bu çözelti içinde PMMA tabaka hızlı bir şekilde lam üzerinden uzaklaşmış ve asidik çözeltiye dayanıklılık gösterememiştir. Çözücü davranışını incelemek için polimer kaplı lam, toluen içerisine bırakılmış ve polimerin camdan yine tam temizlenemediği gözlemlenmiştir.

Aseton ve toluenin uygun çözücü olmadığı anlaşıncaya Çizelge 3.1 de belirtilen koşullar kullanılarak kloroform ile farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler lam üzerinde 100 °C ve 120 °C sıcaklıklarda 60 dakika boyunca kurutulmuştur. Konsantrasyon olarak sırasıyla 0,002 g/ml, 0,005 g/ml ve 0,01 g/ml kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. PMMA ve PS kullanılarak yapılan lam deneylerinin koşulları. Lam deneylerinde her bir örnek için 2 ml çözelti spin kaplama cihazı kullanılarak kaplanmıştır. Her örnekten 2 adet hazırlanmıştır. Örneklerden biri 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine diğeri ise çözeltinin hazırlandığı çözücüye daldırılmıştır.

Deney No	Kullanılan Polimer Türü	Konsantrasyon (g/ml)	Çözücü	Çözünme Sıcaklığı (°C)	Kurutulma sıcaklığı (°C)	Kurutulma süresi (dakika)
1	PMMA	0.005	Aseton	40	120	30
2	PMMA	0.005	Toluen	40	120	30
3	PMMA	0.002	Kloroform	50	100	60
4	PMMA	0.002	Kloroform	50	120	60
* 5	PMMA	0.005	Kloroform	50	100	60
6	PMMA	0.005	Kloroform	50	120	60
7	PMMA	0.01	Kloroform	50	100	60
8	PMMA	0.01	Kloroform	50	120	60
9	PS	0.005	Kloroform	50	100	60
10	PMMA-PS	%10 PS - %90 PMMA	Kloroform	50	100	60
11	PMMA-PS	%40 PS - %60 PMMA	Kloroform	50	100	60

Deney No 3: PMMA çözeltisi 10 ml kloroform kullanılarak belirtilen konsantrasyonda 50 °C de hazırlanmıştır. 100 °C deki 60 dakikalık kurutma süresinden sonra polimer kaplı lam 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılmıştır. Bu çözelti içinde PMMA tabaka hızlı bir şekilde lam üzerinden uzaklaşmıştır. Polimerin çözücü içindeki davranışı incelendiğinde polimerin yüzeyden kolayca uzaklaştığı gözlemlenmiş ancak bu konsantrasyonda asit çözeltisine polimerin dayanamamış olması koşulların uygun olmadığını göstermiştir.

Deney No 4: PMMA çözeltisi 10 ml kloroform kullanılarak belirtilen konsantrasyonda 50 °C de hazırlanmıştır. 120 °C deki 60 dakikalık kurutma süresinden sonra lam 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılmıştır. Bu çözelti içinde PMMA tabaka kısa bir süre dayanabilse de yüzeyden kalkmıştır. Polimerin çözücü içindeki davranışı incelendiğinde, polimerin akışkan bir hal aldığı ve yüzeyden deney 3 teki koşullara göre daha zor uzaklaştığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, bu konsantrasyonda polimerin, asit çözeltisine dayanamamış olması ve çözücüsü içindeki davranışı koşulların AAO membran eldesi için uygun olmadığını göstermiştir.

Deney No 5: PMMA çözeltisi 10 ml kloroform kullanılarak belirtilen konsantrasyonda 50 °C de hazırlanmıştır. 100 °C deki 60 dakikalık kurutma süresinden sonra lam 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılmıştır. Bu çözelti içinde PMMA tabaka önceki koşullara göre daha iyi bir dayanım göstermiştir. Polimerin çözücü içindeki davranışı incelendiğinde, polimerin akışkan bir hal aldığı, ancak cam yüzeyden zamanla uzaklaştığı gözlemlenmiştir. Deney 5'in sonuçları Deney 4'ün sonuçları ile karşılaştırıldığında konsantrasyonun artması polimerin asit dayanımını artırırken, 100 °C de yapılan kurutma ise çapraz bağlanmayı azalttığından polimerin çözücü içinde çözünmesini kolaylaştırmıştır. Bundan sonraki AAO membran deneylerinde ***Deney 5 koşulların kullanılmasına karar verilmiştir.*** Bununla beraber, paralel yürüyen diğer lam deneylerin sonuçları da aşağıda belirtilmiştir.

Deney No 6: PMMA çözeltisi 10 ml kloroform kullanılarak belirtilen konsantrasyonda 50 °C de hazırlanmıştır. 120 °C deki 60 dakikalık kurutma süresinden sonra lam 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılmıştır. Bu çözelti içinde PMMA tabaka iyi bir dayanım göstermiştir. Polimerin çözücü içindeki davranışı incelendiğinde, polimerin akışkan bir hal aldığı, ancak cam yüzeyden uzaklaşmadığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, bu konsantrasyonda asit çözeltisine dayanım gösteren polimerin, çözücüsü içindeki davranışı bu koşulların AAO membran eldesi için uygun olmadığını göstermiştir. Yüksek sıcaklıkta yapılan kurutma sebebiyle artan çapraz bağlanmalar çözücü etkileşimini kısıtlamakta ve polimer lamdan tam olarak temizlenememektedir.

Deney No 7: PMMA çözeltisi 10 ml kloroform kullanılarak belirtilen konsantrasyonda 50 °C de hazırlanmıştır. 100 °C deki 60 dakikalık kurutma süresinden sonra lam 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılmıştır. Bu çözelti içinde PMMA tabaka iyi bir dayanım göstermiştir. Polimerin çözücü içindeki davranışı incelendiğinde, polimerin akışkan bir hal aldığı, ancak cam yüzeyden uzaklaşmadığı gözlemlenmiştir. Konsantrasyon artışının polimerin asit dayanımını artırırken çözünme hızını azalttığı söylenebilir.

Deney No 8: PMMA çözeltisi 10 ml kloroform kullanılarak belirtilen konsantrasyonda 50 °C de hazırlanmıştır. 120 °C deki 60 dakikalık kurutma süresinden sonra lam 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılmıştır. Bu çözelti içinde PMMA tabaka iyi bir dayanım göstermiştir. Polimerin çözücü içindeki davranışı incelendiğinde, polimerin akışkan bir hal aldığı, ancak cam yüzeyden uzaklaşmadığı gözlemlenmiştir. Konsantrasyon ve kurutma sıcaklığı artışının polimerin asit dayanımını artırırken çözünme hızını azalttığı sonucu yine burada ortaya çıkmaktadır.

Deney No 9: Farklı bir polimer kullanımının, polimerin asit dayanımına ve çözücü içindeki çözünürlüğüne etkisini araştırmak amacıyla poli (stiren) (PS) kullanılmıştır. PS 10 ml kloroform kullanılarak belirtilen konsantrasyonda 50 °C de hazırlanmıştır. 100 °C deki 60 dakikalık kurutma süresinden sonra lam 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M

HCl çözeltisine bırakılmıştır. Bu çözelti içinde PS hızlı bir şekilde yüzeyden kalkmıştır. Polimerin çözücü içindeki davranışı incelendiğinde, çözücü içinde çok hızlı bir biçimde çözüldüğü gözlemlenmiştir.

Elde edilen veriler ışığında, PMMA ve PS karışımının yüzeyi, 100 °C de kurutma sonrasında, asit çözeltisinde koruyacağı ve aynı zamanda karışımdaki PS varlığı sebebiyle çözücü içindeki çözünmenin daha hızlı olacağı düşünülmüştür. Bu deneylerde homojen polimer filmler için PMMA konsantrasyonunun her zaman PS den fazla olmasına özen gösterilmiştir [107].

Deney No 10: Ağırlıkça %10 PS ve %90 PMMA kullanılarak 10 ml kloroform içinde 0,005 g/ml konsantrasyonda çözelti 50 °C de hazırlanmıştır. 100°C deki 60 dakikalık kurutma süresinden sonra lam 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılmıştır. Bu çözelti içinde PS-PMMA karışımı yüzeyde bir süre kalmayı başarmıştır. Ancak dayanım süresi deney 5 teki duruma göre çok kısa olduğu için bu koşulların AAO membran üretimi için uygun olmadığına karar verilmiştir. Çözücüsü içine bırakıldığında polimer karışımı PMMA ile yakın özellikler göstermiştir. Akışkan bir hal alıp deney 5 teki duruma göre daha hızlı bir biçimde yüzeyden uzaklaşmıştır.

Deney No 11: Ağırlıkça %40 PS ve %60 PMMA kullanılarak 10 ml kloroform içinde 0,005 g/ml konsantrasyonda çözelti 50 °C de hazırlanmıştır. 100°C deki 60 dakikalık kurutma süresinden sonra lam 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılmıştır. Bu çözelti içinde PS-PMMA karışımı yüzeyden kısa sürede uzaklaşmıştır. Çözücüsü içine bırakıldığında polimer karışımı PS ile yakın özellikler gösterdiğinden hızlı bir şekilde yüzeyden uzaklaşmıştır.

Deney 10 ve Deney 11 deki koşullar dikkate alındığında ortamdaki PS varlığının polimerin asit dayanımını azalttığını, çözünme hızını artırdığı gözlemlenmiştir. Ancak asit dayanımının %10`luk PS varlığında dahi önemli ölçüde düştüğünün gözlenmesi PMMA-PS karışımının AAO membran üretiminde kullanılacak doğru bir metot olmadığını göstermiştir. Yapılan bu lam deneyleri sonucunda, Çizelge 3.1 de

verilen deney 5 koşullarının AAO membran üretiminde kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1. Alüminyumun iki tarafında büyüyen AAO filmlerden birinin yüzeyinin Deney 5 koşulları kullanılıp korunarak 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılması. Böylelikle korunmayan AAO film ve alüminyumun çözeltide çözünmesi ve korunan yüzeyden AAO membran eldesi.

Alüminyum folyo üzerinde büyütülen AAO filmlerden birinin yüzeyi deney 5 te belirtilen koşullarla hazırlanan PMMA spin kaplama cihazı kullanılarak kaplanmıştır. Yüzeydeki polimer kurutulduktan sonra bu substrat 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine bırakılmıştır. Çözelti içinde ince PMMA tabakasının, kaplama bulunmayan AAO film daha asit içinde çözünmeden, yüzeyden kalktığı ve zamanda Al folyonun her iki yüzünde bulunan AAO filmlerin yüzeyden eriyip kaybolduğu gözlemlenmiştir.

Bunun üzerine spin kaplama cihazı ile kaplama yapmak yerine polimer çözeltisi damlatılarak alüminyum folyo üzerindeki AAO filmlerden birinin yüzeyinde aynı konsantrasyonda kalın bir PMMA tabakası oluşturulmuştur. Bu tabakanın, kapladığı AAO filmi, asidik CuCl_2 çözeltisinde efektif bir şekilde koruduğu gözlemlenmiştir. Kaplama olmayan AAO film ve metalik alüminyum yaklaşık 30 dakika içinde çözünerek kaybolmuş ve bir yüzü PMMA ile kaplı serbest AAO membran elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra AAO membran yüzeyindeki polimerin uzaklaşması için membran 50 °C de kloroforma bırakılmıştır. Membranın yüzeyinden polimerin akışkan bir hal alarak kısmen uzaklaştığı gözlemlenmiştir. Bunun üzerine aynı koşullarda hazırlanmış AAO membran organik kalıntılardan kurtulmada etkin olan piranha çözeltisine (3:1(V/V) $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$) bırakılmıştır. Ancak polimer kaplamının yüzeyden uzaklaştırılmasında başarılı olunamamıştır.

Benzer koşullarda hazırlanan bir yüzü PMMA kaplı başka bir AAO membran piranha çözeltisinde yaklaşık bir gün boyunca bekletildiğinde polimer yüzeyin hala tam olarak temizlenemediği ancak membranın bariyer tarafının asidik piranha

çözeltilisinin etkisiyle çözüldüğü ve bu taraftaki porların ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Piranha çözeltilisine tabi tutulan membranlarda ayrıca ciddi incelleme gözlemlenmiş ve ilerleyen çalışmalar için kullanılamaz hale gelmiştir.

4.2. AAO film yüzeyinin Deney 5 koşulları kullanılarak korunması ve elde edilen bir yüzü PMMA kaplı AAO membrandan polimer tabakanın oksijen plazma kullanılarak temizlenmesi.

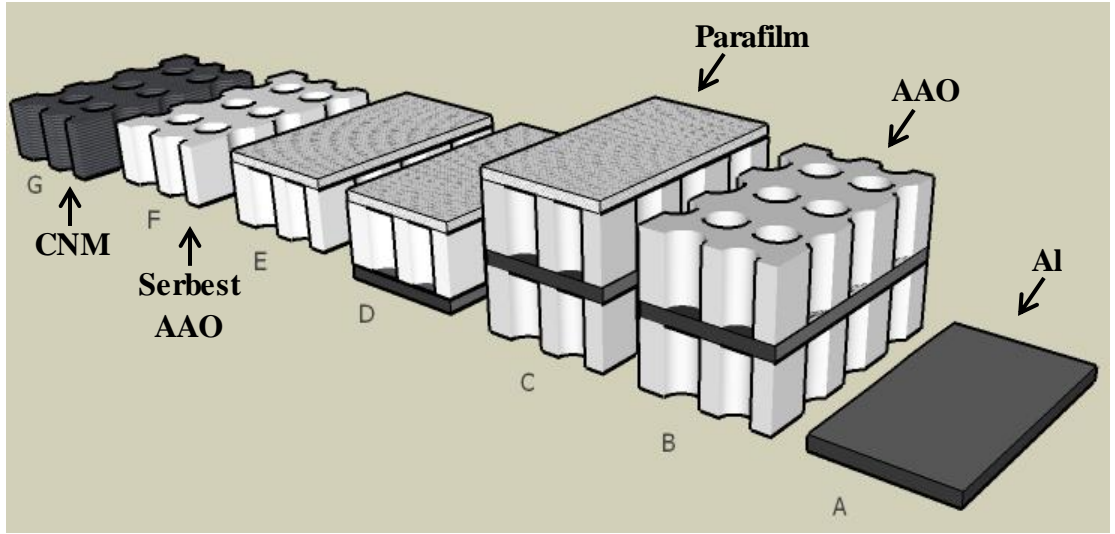
AAO membran yüzeyindeki polimerin çözücü ve piranha çözeltisi kullanılarak uzaklaştırılmayacağı anlaşılınca farklı yöntemler kullanılarak, polimer yüzeyden uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Bu bağlamda Al folyonun her iki tarafında oluşan AAO filmlerden birinin yüzeyi deney 5 te belirtilen koşullar altında PMMA ile korunmuştur. Kaplama olmayan AAO film ve metalik alüminyum yaklaşık 30 dakika içinde 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisinde çözülmüş ve bir yüzü PMMA kaplı AAO membran elde edilmiştir. AAO membranın yüzeyini kaplayan PMMA'nın uzaklaştırılması için SAMCO RIE-1C plazma sistemi kullanılmıştır (140 W RF gücü, 20 sccm akı, 20 pa basınç altında). Ancak yüzeyin başarılı bir biçimde temizlenemediği gözlemlenmiştir.

5. Alüminyum folyo üzerinde oluşturulan AAO filmin parafilm ile korunması ve serbest AAO membran eldesi.

Yapılan literatür araştırmaları ve ilgili yöntemler, iki tarafı da açık porlara sahip temiz bir AAO membranın elde edilmesinde başarılı olamamıştır. Bunun üzerine literatürde rastlanmamış basit ve ucuz bir yöntemle AAO membranın eldesi üzerine çalışılmış ve başarılı olunmuştur (Şekil 3.8).

İki aşamalı anodizasyon ile üretilen AAO membranların bir yüzü parafilm ile kapatıldıktan sonra, membranlar 0,1 M NaOH içine atılmıştır. Açıkta kalan oksit yüzeyin çözünmesinin ardından membranlar yıkamaya tabi tutulmuş ve 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisine atılmıştır. Parafilm hem asit içerikli çözeltilide hem de baz içerikli çözeltilide altında kalan oksit tabakayı başarı ile korumuştur. Al

tabaka yüzeyden kısa bir sürede uzaklaştırıldıktan sonra membran n-hekzan içine atılmış ve parafilm yüzeyden uzaklaştırılmıştır. Sonrasında membranın çözelti yüzüne bakan kısmi istenilen kalınlıkta karbon ile Bilkent-UNAM da bulunan GATAN PECS (Presicion Etching&Coating System) cihazı kullanılarak kaplanmıştır ve CNM'ler elde edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Koruma amaçlı parafilm kullanarak AAO membran eldesi. A)Yüksek saflıktaki Al folyo. B) Al folyo ve üzerinde büyütülmüş olan AAO membranlar. C) Porlu oksit yüzeylerin biri sıcaklık artışına bağlı olarak parafilm ile kaplanması. D) Açıkta kalan yüzey 0,1 M NaOH ile yüzeyden uzaklaştırılması. E) 0,1 M CuCl₂.2H₂O + 6,1 M HCl çözeltisi ile Al tabaka membranın bariyer yüzünden temizlenmesi. F) Yüzeyde bağlı olan parafilm n-hekzan ile temizlenmesi. G) PVD ile karbon kaplama yapılarak CNM eldesi.

Ayrıca, iki basamaklı anodizasyonla elde edilen bu AAO membranın bariyer yüzünde bulunan porların henüz ortaya çıkmadığı gözlemlendiğinden, AAO membranın çözelti içinde çok kısa süre kaldığını ve bariyer yüzeydeki porlar açılmadan metalik alüminyumun uzaklaştığı gözlemlenmiştir. Böylece membranın asidik CuCl₂ çözeltisi içindeki incelme sorunu da asgari seviyeye indirgenmiştir. Serbest AAO membran eldesi ile ilgili sorun aşıldıktan sonra por çapı standartlaştırma çalışmalarına geçilmiştir.

Membran % 5'lik H₃PO₄ içerisinde por açımı için bekletilmiştir. 120 dakikanın sonunda membranın çözelti yüzündeki porların çalışma için istenildiği gibi ~ 100 nm

apa ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu aşamadan sonra okzalik asit içinde büyütülen AAO membranlar CNM eldesi için 10 nm karbon ile kaplanmış ve karakterizasyonları yapılmıştır.

Fosforik asit kullanarak AAO membran eldesi

Çalışmanın ikinci aşamasında yaklaşık 300 nm çapında düzgün sıralı gözeneklere sahip AAO membranlar fosforik asit elektroliti içinde üretilmiştir. Elektrokimyasal parlatmanın ardından bu kez folyolar iki basamakta da 160 V DC voltaj altında ve 0°C de anodizasyona tabi tutulmuşlardır [108]. Membran retimi sırasında elektrolit ve yüksek voltaj kaynaklı sorunlarla karşılaşılmıştır. Bu sorunların çözümü için değişik çözümler üretilmiştir.

Fosforik asit içerisinde sentezlenen AAO membranların kalınlık, por düzenliliği ve porluluk oranı açısından standart bir görünüme kavuşması için sentezi etkileyen ve izelge 3.2’de gösterilen bazı parametrelerin takibi yapılmıştır.

Çizelge 3.2. H₃PO₄’n elektrolit olarak kullanıldığı AAO membran sentezleme çalışmalarında standart bir membran üretimi için üzerinde çalışılan parametreler.

No	Parametreler
1	Elektrolit konsantrasyonu
2	Anodizasyon süresi & Kalınlık
3	Por düzenliliği
4	Eş zamanlı olarak alüminyum tabakayı yüzeyden uzaklaştırma
5	Bariyer tabakanın uzaklaştırılması için farklı asit & baz zeltelerinin değişik konsantrasyonlarda kullanılması
6	Membranların zelti yüzeyinden parafilm tam olarak uzaklaştırılması

1. Elektrolit olarak ağırlıkça %10`luk H₃PO₄ çözeltisi kullanılarak AAO membran eldesi.

Başlangıçta ağırlıkça %10`luk H₃PO₄ çözeltisi elektrolit olarak hazırlanmıştır [108]. Bu çözelti soğutucu vasıtasıyla 0°C ye kadar soğutulmuş ve voltaj cihazı 160 Volta ayarlanmıştır. AAO membran üretim prosedürü gereği önceden elektrokimyasal olarak parlatılmış Al folyo, çelik katot ile birlikte çözelti içine 1. anodizasyon aşaması için yerleştirilmiştir. 160 V luk voltaj membrana uygulanmaya başladığında çözeltinin kabarcıklar oluşturarak kaynadığı gözlemlenmiştir. Oluşan bu durumun ardından alüminyum membranın yüzeyinde değişimler gözlemlenmiştir. Literatür kaynağının [108] bu işlem için çelik yerine Pt katot kullandığı öğrenerek, katot materyal platinyuma çevrilmiş ancak yukarıda bahsedilen koşullarda yine çözelti kaynadığı görülmüştür.

2. Elektrolit olarak ağırlıkça %5`lik H₃PO₄ çözeltisi kullanılarak AAO membran eldesi.

Kaynama esnasında okunan yüksek akımları düşürme hedefiyle direnci daha yüksek elektrolit kullanmaya karar verilmiştir. Bunun üzerine ağırlıkça %5`lik H₃PO₄ çözeltisi hazırlanıp elektroparlatma gerçekleştirilmiş Al folyo, 1. anodizasyon için 0°C ye soğutulmuş çözelti içine yerleştirilmiştir. Voltaj cihazı 160 V ayarlanmış ve İlk durumda olduğu gibi, 160 V luk voltaj membrana uygulanmaya başladığında çözeltinin kısa sürede kaynadığı gözlemlenmiştir. Bunun üzerine sıcaklık artışı gözlemlenen çözelti tekrar 0°C ye kadar soğutulup, voltaj 1 dakikada 100 V dan 160 V a kadar hızlı bir biçimde yükseltilmiştir. Çözelti başlangıçta kaynama eğilimi göstermemiş olsa da ilerleyen zaman içinde kaynama gerçekleşmiştir. Dolayısıyla kütüğe %5`lik çözelti kullanarak standart membran oluşumun sağlanamayacağı görülmüştür.

Kaynamanın sebebi ile ilgili olarak literatürü incelediğinde, oksit tabakasındaki hızlı iyon transferi ve elektrolit/elektrot arayüzünde düşük polarizasyona bağlı olarak

akımın değerlerinde görülen yükselmenin ani sıcaklık artışı tetiklediği gözlemlenmiştir [109].

Aynı zamanda, membranın por yapısının sıralı olmaması, değiştirilen farklı parametrelere rağmen sonuç alınmamış olması bizi farklı yöntemlerin denenmesini zorunlu kılmıştır. Bunun üzerine, sonraki çalışmalarda 160 V altında elektrolit derişimini literatür incelenerek [110] kütlece %4'e düşürmeye karar verilmiştir.

3. Elektrolit olarak ağırlıkça %4'lük H₃PO₄ çözeltisi kullanılarak AAO membran eldesi.

Ağırlıkça %4'lük H₃PO₄ çözeltisi ile kullanılarak iki aşamalı anodizasyon prosedürü takip edilmek istenmiştir. Ancak asidik kromat çözeltisi içinde ilk anodizasyon aşamasında oluşan ince opak membran tam olarak Al yüzeyden uzaklaştırılmadığı için, tek aşamalı anodizasyon prosedürü izlenmiştir. Çünkü iki basamaklı anodizasyon sonucu çift katlı ve oldukça düzensiz por yapısı ile karşılaşmıştır. Bu aşamada AAO membran % 4'lük H₃PO₄ çözeltisinde 18,5 saat tek basamak olarak büyütülmüş ve standart metotla serbest hale getirilmiştir.

Çalışmanın bu aşamasında bariyer yüzde oluşan porların daha düzenli olacağı düşünüldüğünden porların bu taraftan açılması için derişik ve farklı tipte asit çözeltileri kullanılmış ancak bariyer yüzdeki porlar açılmamıştır. Membranların, hazırlanacak substrata uygun olarak, kalın olması gerektiğinden uzun süreli anodizasyona bağlı olarak bariyer tabaka kalınlığının arttığı gözlemlenmiştir. Bunun üzerine tek aşamalı anodizasyonla üretilen membranlar 30 ve 60 dakika süreyle asidik kromat çözeltisine tabi tutulmuştur. Böylece membran oluşumunun ilk anlarında meydana gelen düzensiz tabaka yüzeyden uzaklaştırılmış ve nispeten daha düzenli olan por yapısı ortaya çıkarılmıştır. Bu çözelti içerisinde por çapları da eş zamanlı olarak genişlediğinden ayrıca bir por çalışması yapılmasına gerek kalmamıştır. Ayrıca, tek aşamalı anodizasyonda porların daha düzenli bir görünüm alması için başlangıçta alüminyum tabaka ~ 400°C de tavlannmıştır [111]. Bu işlemlerin ardından AAO membranlar 20 nm karbon ile Bilkent-UNAM da bulunan

GATAN PECS (Presicion Etching & Coating System) cihazı kullanılarak kaplanmış ve CNM'ler elde edilmiştir.

3.2.3. Tartışma ve sonuçlar

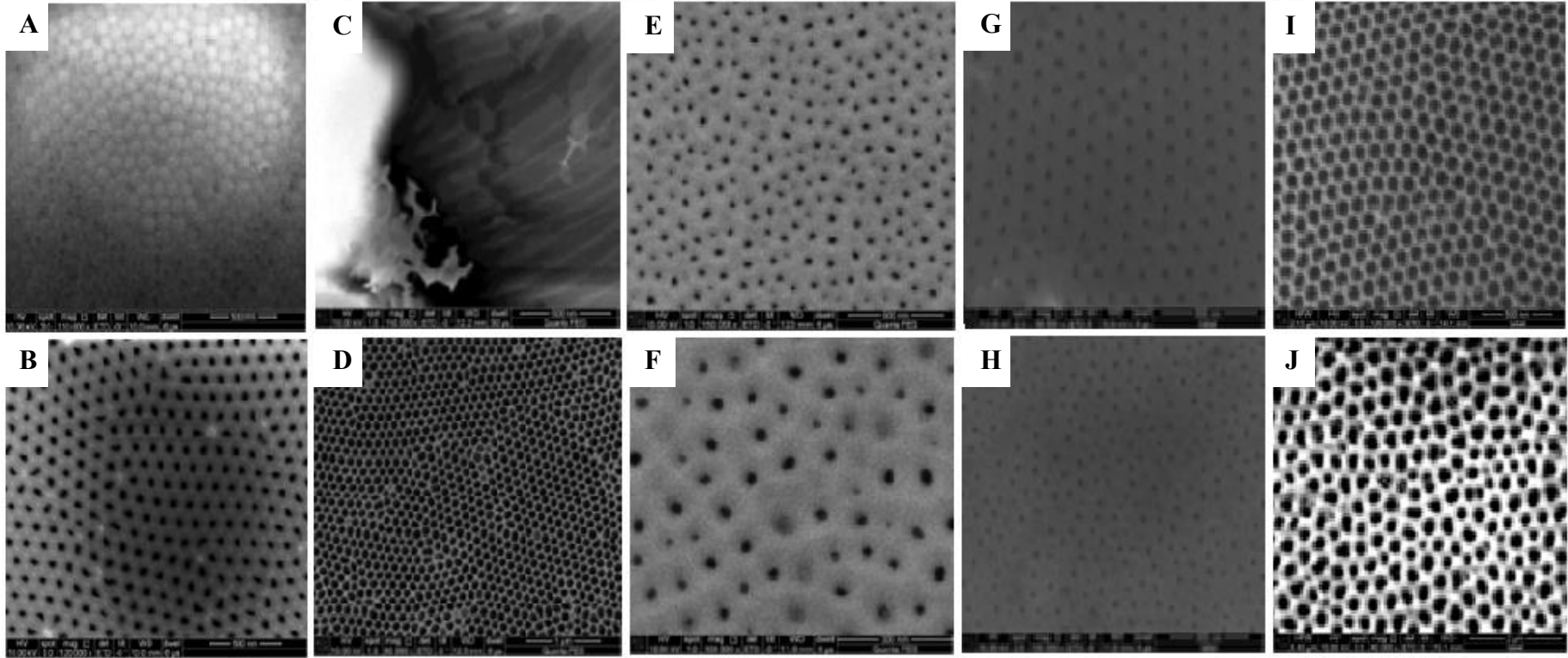
Serbest AAO membran eldesi

Önceki çalışmadan edinilen tecrübe çerçevesinde okzalik asit içerisinde iki aşamalı anodizasyonla Al tabaka üzerinde büyütülen membranlar, hücrelerin Al tabakanın sitotoksik etkisine maruz kalmaması için bu tabaka uzaklaştırıldıktan sonra kullanılmıştır. Al tabakanın uzaklaştırılması ile ilgili birçok makale incelenmiş ve belirtilen prosedürler uygulanarak bu tabakanın oksit tabakadan ayrılması için çalışılmıştır. Ancak literatürde rastlanan tırnak cilası, vernik ya da polimer kaplama ile koruma teknikleri istenilen sonucu elde etmede başarılı olamamıştır. 0,1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6,1 M HCl çözeltisi içinde bekletilen herhangi bir koruma tabakası ile kaplanmamış olan membranın asit varlığı sebebiyle inceliş zamanla daha Al tabaka çözülmeye başlamadan eriyip kaybolduğu gözlemlenmiştir. Koruma tabakası olarak tırnak cilası ya da vernik kullanılsa da bu malzemelerin membranı korumada yeterli olmadığı ya da membran eldesi sonucu uzaklaştırılamadığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.9-A/B). Bu koruma materyallerinin asit dayanımı oldukça düşüktür. Ayrıca, polimer tabaka kullanılarak seri halinde lam üzerinde yapılan çalışmalarda Deneme 5 te belirtilen koşullarda istenilen sonucun elde edildiği düşünülmüş ancak AAO membranların porlu yapısını dikkate alındığında PS ve PMMA gibi polimerler ile çalışmanın da uygun olmadığına karar verilmiştir. Çünkü polimer uygulanarak alüminyumdan kurtulmuş, serbest AAO membranların eldesi mümkün olsa da sonrasında kullanılacak nanoporlu yüzeydeki polimer tabakası piranha çözeltisi kullanılsa bile uzaklaştırmak mümkün olmamıştır (Şekil 3.9-C/D). Piranha çözeltisi uygulamasına bağlı olarak oksit membranda inceleme de gerçekleştiğinden membranların bu çalışma için aranılan kalınlık değerleri kaybettiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bahsi geçen koruma uygulamaları serbest AAO membranların eldesi konusunda yetersiz kalmıştır. Bu yöntemlerin dışında Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan SAMCO RIE-1C plazma

sistemi kullanılarak yüzeydeki polimer temizlenmeye çalışılmıştır. Ancak por ağzları açılmış olsa da AAO membranların yüzeyinden polimer tabakayı tam olarak uzaklaştırmak mümkün olmamıştır (Şekil 3.9-E/F). Polimerin hazırlandığı çözücüsünde çözünmemesi, Al tabaka artan sıcaklığın etkisi ile polimer tabakanın çapraz bağlanması ile açıklanmaktadır. Bununla beraber AAO yüzeyin porlu yapısı da polimerin yüzeydeki kalıcılığını artırıcı yönde etki etmektedir.

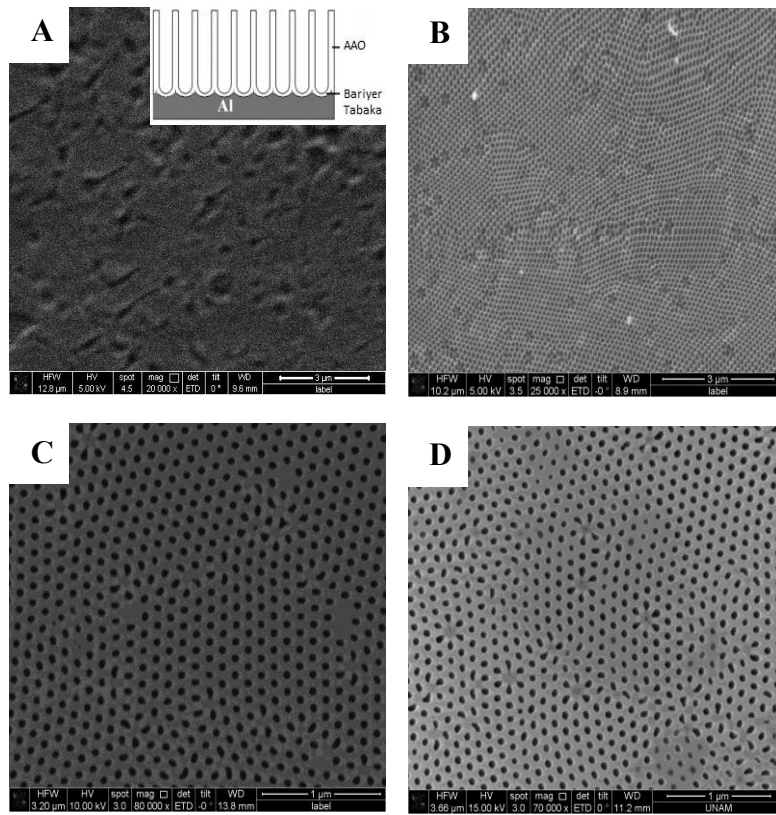
Karşılaşılan bu zorluklar, istenilen kalitede serbest AAO membranların eldesi için bir metot geliştirilmesini zorunlu kılmış ve bu başarıyla gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen bu basit, ucuz ve tekrarlanabilir metotta membranın asidik medya ile teması tamamen kesildiği için kalınlık kaybı ve membran bütünlüğünde bir bozulma yaşanmamıştır. Koruma materyali olarak kullanılan parafilm n-hekzan içerisinde kolay çözünebilir bir madde olması ve ısı etkisiyle por içlerine doğru girmeden sadece yüzeysel olarak membrana tutunması yüzeydeki kalıntıları uzaklaştırmada kolaylık sağlamıştır (Şekil 3.9-G/H).

Sağlıklı membran eldesi sağlandıktan, AAO yüzeyler Şekil 3.9-I/J de belirtilen kalınlıklarda karbon ile PVD yöntemi vasıtasıyla kaplanmıştır.



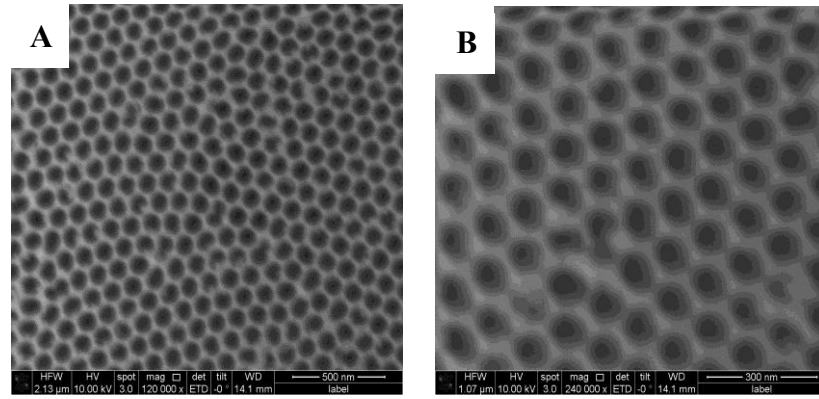
Şekil.3.9. Vernik kullanılarak korunan AAO membranının A) ön yüz, B) arka yüz (Por çapı= $58,17 \pm 3,31$ nm), PMMA kaplı AAO membranının piranha çözeltisinden sonraki durum C)ön yüz D)arka yüz (Por çapı= $103,345 \pm 2,28$ nm), E-F)PMMA kaplı AAO membranının REI-1C plazma sistemi kullanılarak 170 saniye oksijen plazmaya tabi tutulduktan sonraki durumu(Por çapı= $39,6 \pm 1,4$ nm), koruma amaçlı parafilm kullanarak elde edilen AAO membran G)ön yüz (Por çapı= $48,04 \pm 0,69$ nm) H)arka yüz, I) okzalik asit içerisinde üretilen AAO membranının 10 nm karbon kaplandıktan sonraki durumu (Por çapı= $95,017 \pm 2,17$ nm), j) fosforik asit içerisinde üretilen AAO membranının 20 nm karbon kaplandıktan sonraki durumu (Por çapı= $290,546 \pm 8,825$ nm).

Okzalik asit kullanılarak üretilen membranlarda iki aşamalı anodizasyon sebebiyle bariyer yüzündeki por kalitesi ile çözelti yüzündeki por kalitesi hemen hemen aynıdır. Hücre çalışmaları için hazırlanacak substratların dolgu malzemesi olarak parafilmle desteklenmesi planlandığından membranın çözelti yüzü parafilmle kaplıyken bariyer yüzdeki porların açılması planlanmıştır. Ancak bariyer yüzde bulunan tabaka porların açılmasını geciktirmektedir. Burada dikkati çeken durum, yaklaşık 150 dakika bekleme süresine rağmen bariyer yüzdeki porların ancak ~ 60 nm boyutlarına ulaşabilmesidir (Şekil 3.10). Membranın kullanım kolaylığı için anodizasyon süresi artırımını ile membranların kalınlaştırılması gerekmektedir. Ancak bu kalınlık artışı bariyer tabakanın da kalınlaşmasına ve doğal olarak buradaki porların açılmasında uzun beklemeyle yol açmaktadır. Bariyer tabaka ile ilgili bir diğer gözlem de lokal pürüzlülüklerin (Figür 3.10.B, por birleşmeleriyle gözlemlenen papatya benzeri girintiler), membranın bu yüzünde daha fazla gözlemlenmesidir.



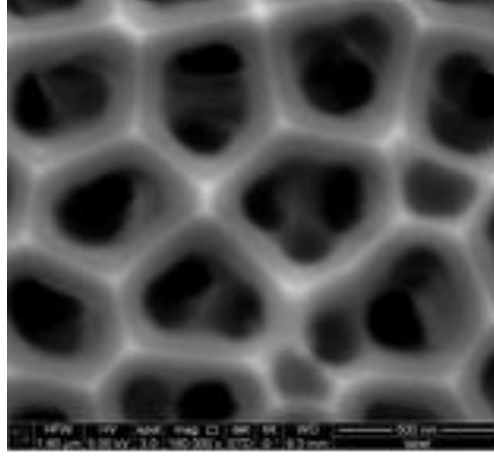
Şekil 3.10. AAO membran sentezi sırasında oluşan bariyer tabakanın %5 H₃PO₄ içinde membranı A)0, B)75, C)120 ve D)150 dakika bekleterek uzaklaştırılması.

Ön yüzün por açma işlemi sonrasında aldığı durumu gözlemek amacıyla parafilmle bağlı yüz sıcak hekzan kullanılarak açılmış ve membran gece boyunca hekzan içinde bekletilmiştir. % 5'lik H_3PO_4 içerisinde 120 dakikanın sonunda membranın çözelti yüzündeki porların raporda belirtilen ~ 100 nm çapa ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu membranlar 10 nm kalınlıkta karbon ile kaplanarak CNM'ler elde edildi ve bunlar SEM ile karakterize edildi (Şekil 3.11). Ön yüzde alınan olumlu sonuçlar dikkate alınarak ve arka yüzdeki lokal pürüzlülükler ve uzun süre gerektiren por açma işlemleri düşünülerek, okzalik asit içinde sentezlenen membranların kullanılacağı hücre deneylerinde membranların çözelti yüzünün kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi.



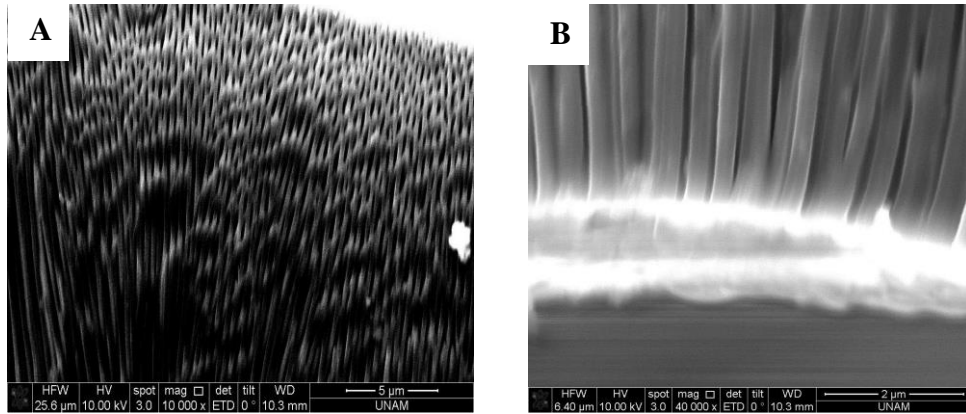
Şekil 3.11. Okzalik asit elektrolitinde üretilen AAO'dan CNM eldesi. AAO membran 120 dakika % 5 H_3PO_4 çözeltisinde bekletilerek çözelti yüzündeki porlar istenen büyüklüğe ulaşmış ve 10 nm karbon ile kaplanarak CNM elde edilmiştir. (Por çapı= $95,017 \pm 2,17$ nm). A) düşük büyütmede ve B) yüksek büyütmede SEM görüntüsü.

Okzalik asitte bu gelişmeler yaşanırken fosforik asit elektroliti varlığında, ilk anodizasyonda üretilen membranın derişik kromat çözeltisi kullanılarak bile yüzeyden tam olarak uzaklaştırılmıyor ve çift katlı membran yapısının gözlenmesi nedeniyle (Şekil 3.12), burada AAO membranlarda iki aşamalı anodizasyonun kullanımının uygun olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.12. İkinci anodizasyon sonrası AAO membranın çözelti yüzündeki çift katlı membran yapısı.

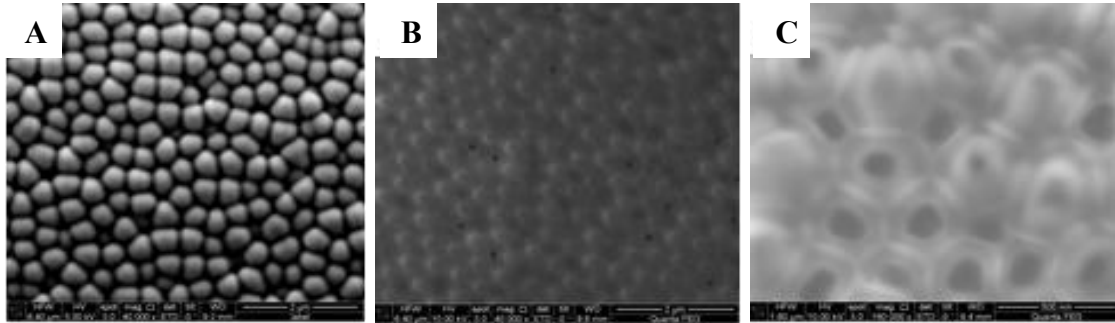
Tek basamaklı anodizasyonla üretilen membranların çözelti yüzü ve bariyer yüzü yanal kesitten SEM ile incelendiğinde (Şekil 3.13) bariyer yüzde oluşan porların daha sıralı olduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple bu membranlarda bariyer yüzün kullanılmasının uygun olduğu düşünülmüştür.



Şekil.3.13. AAO membranın A) çözelti yüzüne yakın, B) bariyer yüzüne yakın yanal kesit görüntüsü.

Ancak uzun anodizasyon süresine bağlı olarak artan bariyer tabaka kalınlığı sebebiyle porların eş zamanlı olarak açılması mümkün olmamıştır. Çeşitli asit çözeltileri kullanılarak bariyer yüzdeki porlar açılmaya çalışılmıştır. Seyreltik çözeltilerde uzun uygulama sürelerine rağmen bariyer tabakanın aşamadığı (Şekil 3.14-A), derişik çözeltilerde ise porların eş zamanlı olarak açılmamasına bağlı olarak por çapındaki standart sapmada ciddi artışlar gözlemlenmiştir. AAO membranın bazı

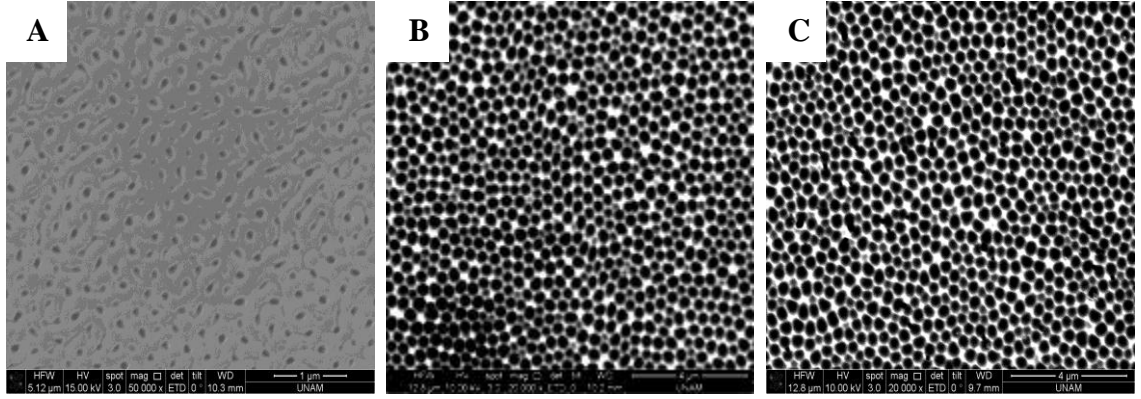
bölgelerinde porlar tamamen açılırken bazı bölgelerinde porları hala kapalı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda bariyer yüzdeki porların, derişik asit çözeltilerine ve uzun uygulama sürelerine rağmen, eş zamanlı olarak açılmaması bizi bu durumun ne ile ilgili olduğunu araştırmaya yönlendirmiştir. Yapılan incelemelerde bariyer tabaka kalınlığının membranda lokal olarak değiştii gözlemlenmiştir. Bunun yanında yapılan literatür incelenmesinde okzalik asitte üretilen membranda bariyer yüzdeki porlar açılırken, neden fosforik asit içerisinde üretilen membranda bariyer yüzdeki porların ağızlarının açılmadığı sorusuna cevap aranmış ve bu durum ile ilgili olarak okzalik asitin içerisinde üretilen membranın, diğer membrana göre hidrofilitesinin daha yüksek olması; yani su bazlı çözeltilerde daha kolay çözünebildiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 3.14-B/C) [112]. Dolayısıyla, fosforik asit içinde üretilen membranların da çözelti yüzünün belli bir optimizasyon sonrası kullanılmasının uygun olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 3.14. Kromat çözeltilisindeki H_3PO_4 derişiminin artmasına bağlı olarak yüzeyden ilk anodizasyon aşamasında oluşan AAO filmin uzaklaştırılması. A) Oluşan membranın bariyer yüzünün 75 dakika %5 H_3PO_4 bekletildikten sonraki durumu. AAO membranın bariyer yüzündeki porların derişik asit çözeltilisi ile açılması. B)10 saniye, C) 5 dakika sonrasında membranın farklı bölgelerindeki porların durumu. Por çapı: $286,972 \pm 37,043$ nm Membran kalınlığı:~15 μ m.

Bu amaçla, tek aşamada üretilen membranlar çözelti yüzünde oluşan düzensiz ince AAO katmanın yüzeyden uzaklaştırılması ve alttaki sıralı porların bulunduğu tabakaya ulaşabilmesi için kromat çözeltisi içinde belli sürelerle bekletilmiş ve SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.15). Süreye bağlı olarak por çapının da düzenlilikle birlikte arttığı ancak belli bir süreden sonra porların birleşme eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmalar anodizasyon sonrası 30 dakikalık kromat

uygulamasıyla porların yaklaşık 300 nm çapa sahip olduğunu ve ilk duruma göre nispeten daha düzenli por yapısına ulaştığını göstermiştir. Küçük bir zaman ayarlaması ile 300 nm ye daha yakın değerlerin elde edilmesi beklenmektedir.



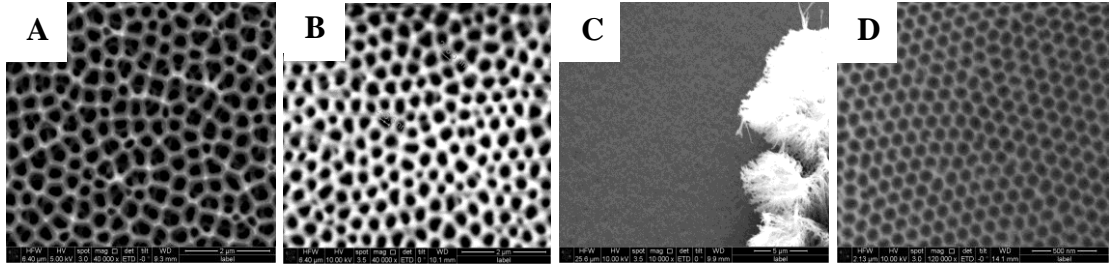
Şekil 3.15.Fosforik asit çözeltisi içerisinde tek aşamalı anodizasyon ile üretilen AAO membranın A) Kromat çözeltisi içinde bekletilmeden önce B) 30 dakika bekletildikten sonra C) 60 dakika bekletildikten sonraki SEM görüntüsü. B por çapı: $343,81 \pm 31,23$ nm, C figüründe porlar büyük oranda birleşme gösterdiğinden por çapı hesaplanamamıştır. Örnekler 5 nm Au-Pd ile kaplanmıştır.

CNM kaplama koşullarının optimizasyonu ve CNM karakterizasyonu

Okzalik asit içerisinde üretilen ve yaklaşık 100 nm por çapına sahip AAO membran 10 nm karbon ile kaplanarak, fosforik asit içerisinde üretilen ve yaklaşık 300 nm por çapına sahip AAO membran 20 nm karbon ile kaplanarak CNM'ler elde edilmiştir. PVD metodu ile elde edilen bu membranların karakterizasyonunda SEM, TEM, XPS, EDAX, DC Voltaj/Akım Kaynağı kullanılmıştır.

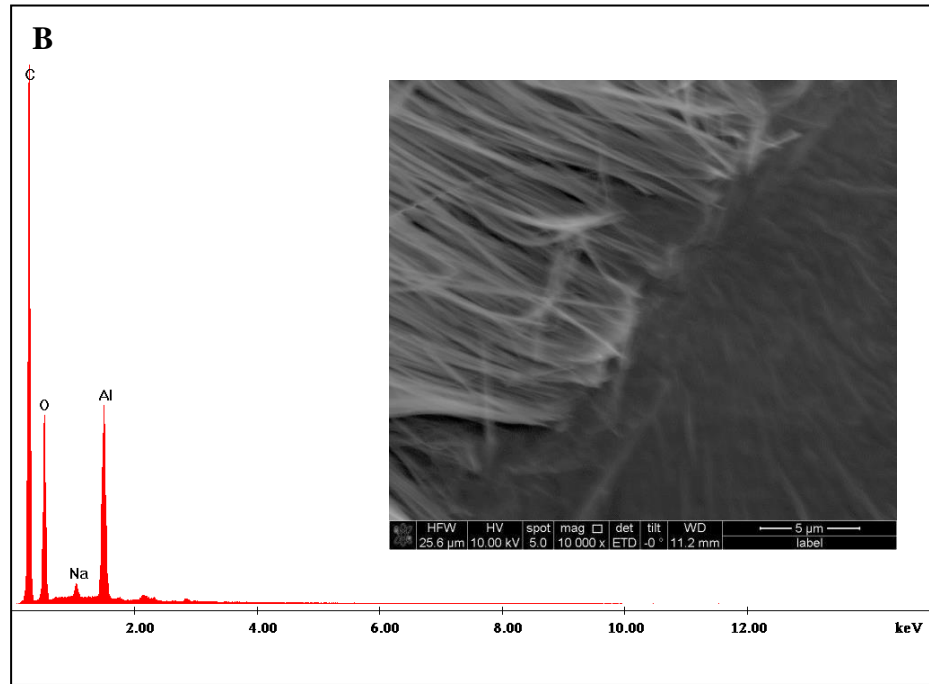
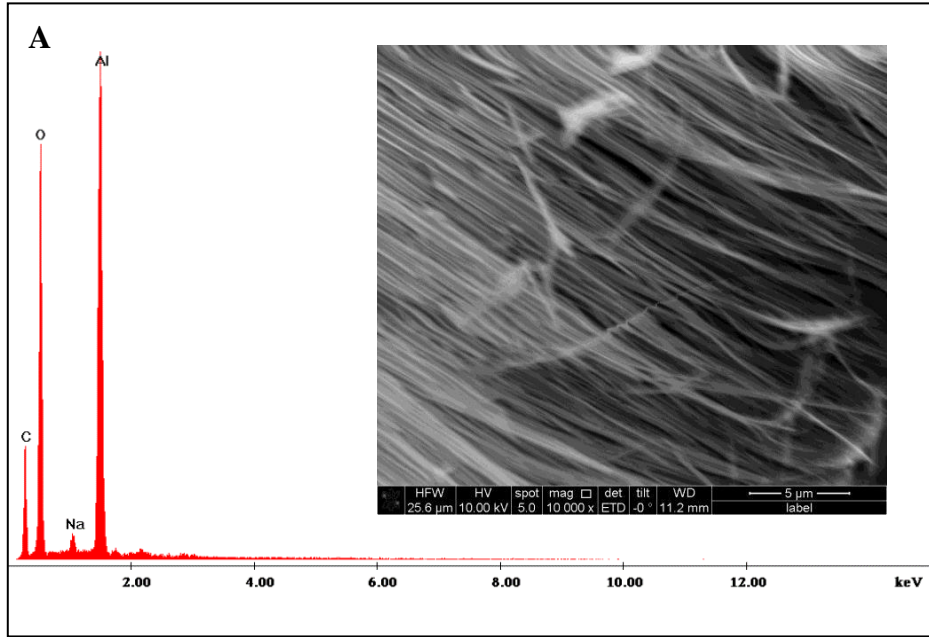
Karbon kaplama kalınlığı, AAO membranın por çapına bağlı olarak belirlenmiştir (Şekil 3.16). Okzalik asit kullanılarak üretilen membranlar yaklaşık 100 nm por çapına sahip olduğundan 10 nm karbon kaplamanın uygun olduğu görülmüştür (Şekil 3.16-D). Fosforik asit içerisinde üretilen membranlarda ise ortalama por çapı 300 nm olduğundan görüntü kalitesini arttırmak için 20 nm karbon kaplamanın uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 3.16-B). Daha geniş porları olan bu membranlarda bu kaplama kalınlığı herhangi bir kapanmaya sebep olmamaktadır. Ne var ki, daha kalın

kaplamalarda (50 nm) porlar tıkanmakta, buna bağı olarak da CNM yapısı gözlenememektedir. (Şekil 3.16-C).



Şekil 3.16. Fosforik asit çözeltisi içerisinde üretilen AAO membranın A) 10 nm B) 20 nm C) 50 nm karbon kaplanarak elde edilen CNM'lerin SEM görüntüsü. D) Okzalik asit çözeltisi içerisinde üretilen AAO membran 10 nm karbon kaplandıktan sonra elde edilen CNM'in SEM görüntüsü. Karbonun iletkenliği Au-Pd kaplamaya göre iletkenliği daha az olduğu için görüntülerin netliği azalmıştır.

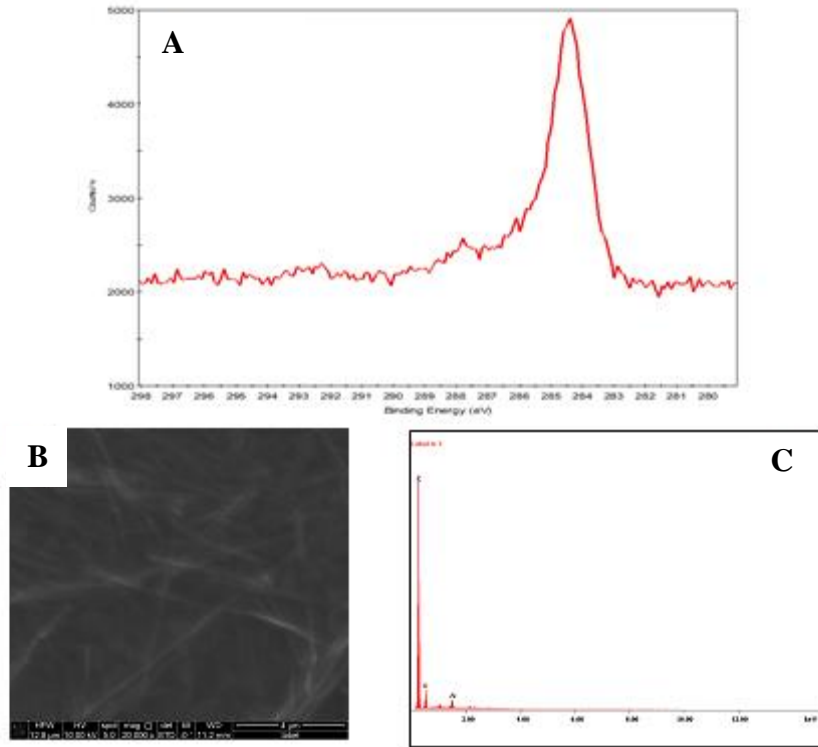
AAO kalıp üzerindeki karbon kaplamannın varlığını göstermek için, fosforik asit içinde üretilen bir AAO membranın çözelti yüzü 20 nm karbon kaplanarak CNM elde edilmiştir. Bu membranın kesit görüntüleri incelenerek karbon kaplanan yüzeyden uzak bölgelerde Al_2O_3 baskınlığı (Şekil 3.17-A), kaplanan çözelti yüzüne yaklaştıkça ise C varlığının baskınlığı (Şekil 3.17-B) SEM ve EDAX analizleriyle ortaya konmuştur.



Şekil 3.17. CNM kesit SEM görüntüleri ve EDX analizi. A) Bariyer yüzü yakın bölgedeki, B) çözelti yüzüne yakın bölgedeki SEM ve EDX analizleri.

X-Işım Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) kullanılarak CNM'lerin yapısındaki amorf karbon varlığı, membranın karbon kaplanmış çözelti yüzü 280-290 eV özel aralığında taranarak elde edilen sinyal şekline saptanmıştır [94] (Şekil 3.18-A). Bu CNM, 0,1 M NaOH içinde bekletilerek kalıp AAO tamamen çözünmüş ve örnekler

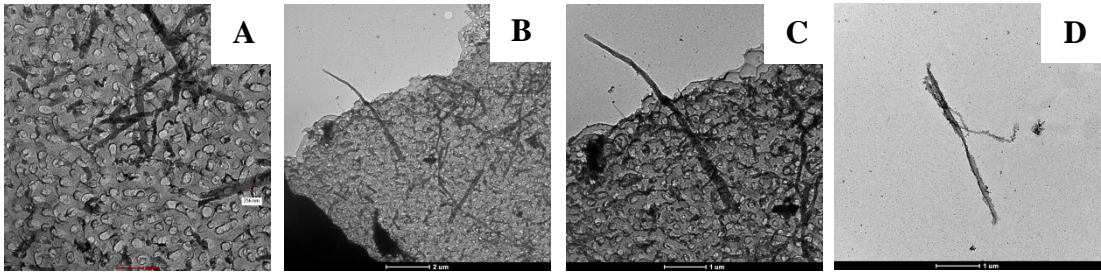
SEM ve EDAX kullanılarak incelenmiştir. Bazık çözelti içinde çözünen AAO kalıp ardında CNT'leri bırakmış ve bu SEM ile gözlemlenmiştir (Şekil 3.18-B). Tüplerin EDAX analizi yapıldığında büyük oranda karbon içerdiği, az miktarda Al varlığının da çözünen membran yapısından kaynaklandığı ve tüplerin üzerinde yetersiz yıkamadan dolayı kaldığı sonucuna varılmıştır (Şekil 3.18-C).



Şekil 3.18. A) CNM'in 280-290 eV özel aralığındaki XPS sonuçları. CNM, 0,1 M NaOH kullanılarak çözüldükten sonra ortaya çıkan CNT'lerin B) SEM ve C) EDX analiz sonuçları.

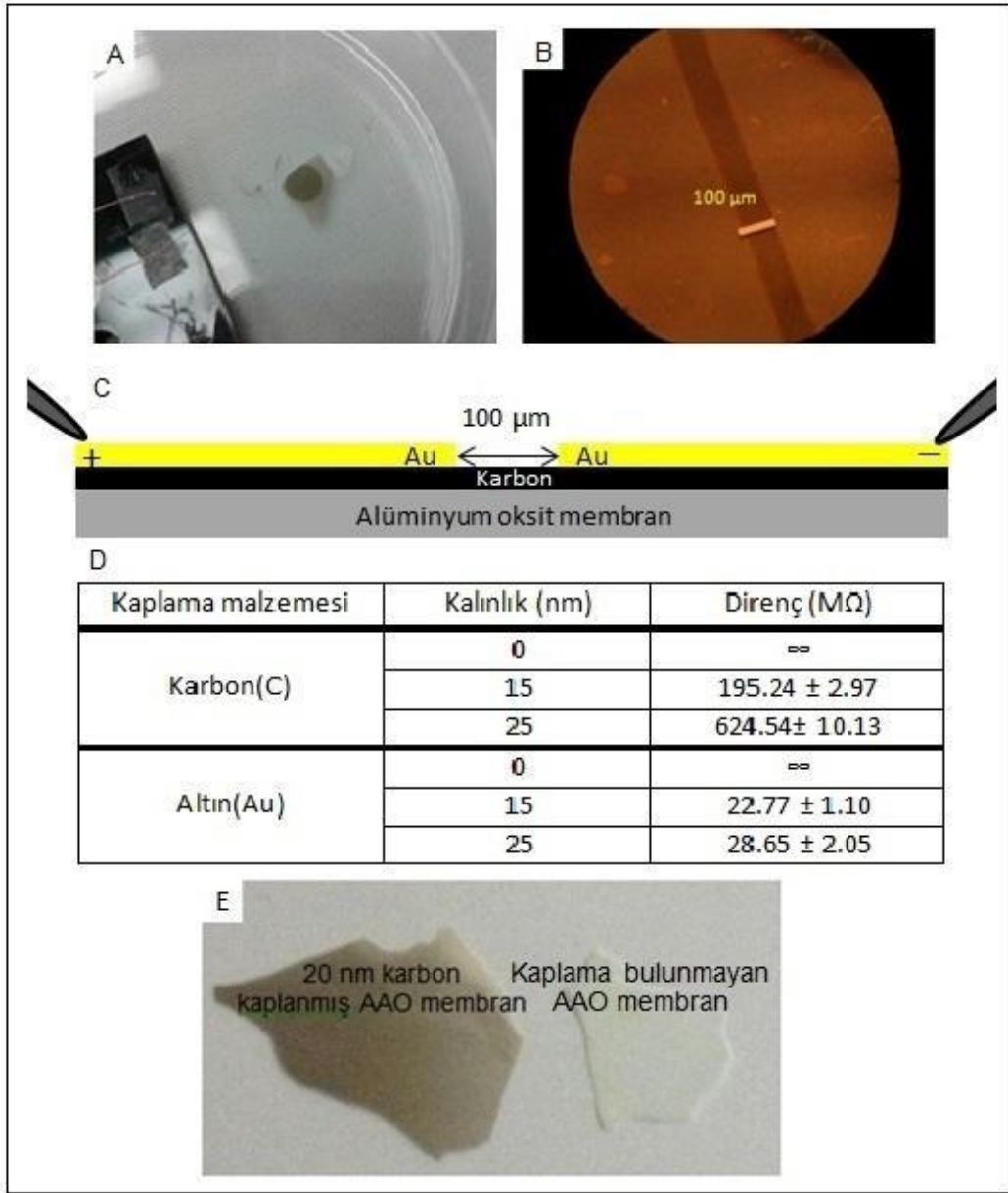
CNM yapı, kalıp olarak kullanılan AAO tamamen çözüldüğüne oluşan CNT benzeri yapılar ve nanoporlara sahip karbon film TEM aracılığı ile de karakterize edilmiştir (Şekil 3.19). Bunun için CNM 0,1 M NaOH içerisinde bekletilip kalıbın tamamen çözüldüğü gözlemlenmiş, ardından bu çözelti bir polimerik filtreden geçirilmiş ve filtre üzerinde kalan yapı etanol içerisinde dağıtılarak TEM grit üzerine damlatılmıştır. Örnekler incelendiğinde serbest ve nanoporlu karbon yapıya bağlı CNT benzeri yapılar gözlemlenmiştir. CNT benzeri yapıların membran çapıyla paralel olarak yaklaşık 250 nm'lik bir çaptan başlayarak giderek daralan huni tarzında bir yapıda olduğu görülmüştür (Şekil 3.19-C). Karbon kaplamannın derinliği

CNT benzeri yapıların boyu düşünülüğünde yaklaşık 5000 nm olarak saptanmıştır. Nanoporlu karbon yapıda por boyutları da başlangıç membranın por boyutlarına paralel olarak yaklaşık 250 nm olarak gözlemlenmiştir. Böylelikle nanoporlu karbon filmin ve PVD yardımıyla elde edilmiş CNT benzeri yapıların varlığını ilk olarak rapor etmiş bulunmaktayız.



Şekil 3.19. A) Nanoporlu karbon yüzey ve bu yüzeye bağlı CNT benzeri yapılar. Nanoporlu karbon yüzeye bağlı CNT benzeri yapıların, B) düşük büyütme ve C) yüksek büyütmedeki görüntüleri. D) Serbest CNT benzeri yapıların TEM görüntüsü. CNM eldesi için fosforik asit içerisinde üretilmiş ve 20 nm karbon kaplanmış AAO membranlar kullanılmıştır.

Kırılganlık ve karbon film yapısının kararlı olması gerektiği dikkate alınarak hazırlanan özel bir maske ile 100 μm mesafeden DC Voltaj/Akım Kaynağı (Yokogawa GS 210 sourcemeter) kullanılarak I-V eğrilerinden direnç ölçümleri alınmıştır [113] (Şekil 3.20-A/B). Ölçümler alınırken iki farklı deney seti hazırlanmıştır. İlk sette porlu yüzey farklı kalınlıklarda karbon ile kaplanmış, ardından üzerine maske yerleştirilerek Au ile kaplama yapılmıştır (Şekil 3.20-C). Maske kaplama kalınlığı 50 nm olarak belirlenmiştir. İkinci deney setinde AAO malzeme farklı kalınlıklarda Au ile kaplanmış ve üzeri yine 50 nm Au kontak ile maskelenmiştir. Şekil 3.20-D'de de görüldüğü gibi Au ile kaplı AAO membranların iletkenliği beklendiği gibi CNM'e göre oldukça yüksek çıkmıştır ve her iki durumda da kaplama kalınlığı ile direnç artışı gözlenmiştir [114]. Şekil 3.20-E, CNM ve AAO filmlerin görsel olarak da çok farklı olduklarını göstermektedir.



Şekil 3.20. A) Maskeleye için kullanılan kalıp ve Au ile maskelenmiş CNM. B) Maskelenmiş CNM'in ışık mikroskobu ve C) şematik kesit görüntüsü. D) Farklı kalınlıklarda Au ve karbon kaplama yapılan membranların direnç değerleri. Membranlar üzerinde çalışılırken ölçümler aynı mesafeden alınmıştır. E) 20 nm karbonkaplanarak elde edilmiş CNM ve herhangi bir kaplama bulunmayan AAO membran.

Son olarak, elipsometre ile PECS cihazında farklı kalınlıklarda karbon kaplanan silikon yongaların kalınlık ölçümü yapılacaktır. Bu konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Bu çalışmanın hücre çalışmaları Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Prof. Dr. Belma Aslım ile ortak olarak yürütülmektedir. Devam eden çalışmalarda bu amaçla Şekil 3.21 de gösterilen düzenek oluşturulmuştur. Buradaki hücrelerle etkileşecek alan ve hacim hesaplanırken 96 lik mikropalakaların deneysel koşulları düşünülmüştür. Hazırlanan substratlar ile hücre malzeme etkileşimi an itibariyle incelenmektedir. Burada nörit formuna döndürülmeyen PC 12 hücreleri ile yapılan ilk çalışmalarda cam yüzeye tutunmalarının kolajen gibi malzemelerle sağlandığı görülmüştür. AAO (okzalik içinde büyütülen) membranlarda ise farklı bir biçimde hücrelerin ek bir kaplamaya ihtiyaç duymaksızın tutunduğu ve membranın hücre gelişimini stimule edici olduğu gözlemlenmiştir ve deneyler aktif olarak devam etmektedir.



Şekil 3.21. Substrat ile ilgili ön çalışma sırasında hazırlanan 0,8 cm çaplı, 0,4 cm derinlikte 0,2 cm³ hacimdeki bir bölgede fosforik asitte büyütülen AAO membranın aktif alan görüntüsü.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

AAO membranlar yüksek saflıktaki alüminyumun anotlanması ile sentezlenen eşsiz bir biyomalzeme sınıfıdır [9, 38]. Dikkat çeken kontrol edilebilir fiziksel özellikleri, kolay modifiye olması yönüyle kimyasal özellikleri ve sıralı boşluklardan oluşan yapısı ile AAO membranlar biyomedikal mühendisliğinde de yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Özellikle kemik hücreleri ile yapılan çalışmalarda AAO membranların hücre gelişimi için uygun bir ortam olduğu ortaya çıkmıştır [92]. Bununla beraber, ilaç/gen taşınımı, biyomoleküllerin ayrıştırılması, biyosensör uygulamaları ve hücre etiketleme görüntüleme gibi birçok alanda kullanılan nano testtüplerin kalıp-sentez metodu üretiminde de AAO membranlar kalıp olarak kullanılmaktadır [53].

Bu tezin ilk bölümünde kalıp sentez ve sol-jel metotlarıyla AAO membranlar kullanılarak üretilen SNT'lerle göğüs kanseri hücrelerinin seçimli olarak yok edilmesi üzerinde durulmuştur. Üretilen AAO membranların, SNT'lerin, NH_2 - SNT'lerin ve FA- NH_2 - SNT'lerin karakterizasyonlarında SEM, TEM, XPS, FT-IR ve zeta potansiyeli ölçümleri kullanılmıştır. SEM analizleri sırasında düzenli AAO membran yapısı ve membranlardaki benzer por yapısının karakterizasyonu yapılmıştır. TEM analizleri ile kalıp sentez metodu ile benzer SNT'lerin yapılabildiği gözlemlenmiştir. Geleneksel sol-jel metodu ile çok miktarda uzun tüpler yapılabileceği görülmüştür. TEM analizlerinde son olarak tüplerin tam olarak jelle doldurulabildiği tespit edilmiştir. Bu şekilde önceden kullanılan ve dezavantajları bulunan iyonik etkileşim tabanlı ilaç yükleme stratejisi yerine boşlukları ilaç dolu jelle doldurulabilen kompozit nanotaşıyıcıların yapılabileceği gösterilmiştir. XPS, FT-IR ve zeta potansiyeli ölçümleri ile FA modifikasyonunun doğru bir biçimde yapıldığı tespit edilmiştir. Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi ile ortak yürütülen hücre çalışmalarında jel formülasyonunun optimizasyona ihtiyaç duyduğu belirlenmiş ve çapraz bağlayıcı miktarı azaltılıp, ilaç miktarı artırılmıştır.

Düşük pH değerlerinde salınım yapacak şekilde dizayn edilmiş jel ile doldurulan bu yeni nesil ilaç taşıyıcıların kanser hücreleri üzerinde sağlıklı hücrelerden daha etkin bir biçimde çalıştığı tespit edilmiştir. Bununla beraber dış yüzeylerine EDC-NHS reaksiyonları vasıtasıyla FA modifikasyonu yapılan SNT'ler kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere nazaran bol miktarda bulunan FA reseptörler ile daha iyi bir biçimde etkileşmiştir. Dolayısıyla, kanser hücre hatlarının, ilaç içerikli jel ile doldurulmuş FA modifikasyonuna sahip SNT 5 kodlu örnekteki ölüm oranı düşük konsantrasyonlarda bile sağlıklı hücrelerdekinden fazladır. Ayrıca, modifikasyon malzemesinin, tüplerin ya da jel içeriğinin herhangi bir sitotoksik etkisinin olmaması bu çalışmada ilaç uygulamasının hücreler üzerindeki direkt etkisini göstermiştir. Sadece ilaç kullanılarak yapılan sitotoksisite testlerindeki ölüm oranının ilaç yüklü kompozit SNT'lere göre çok daha düşük olduğu tespit edilen bir diğer durumdur. Hücrelere yüksek dozda ilaç verilmesinin hücrede ilaç direncini artırdığı düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada 20 ng/ml ilaç içeren SNT'lerin hücreleri öldürme oranının serbest halde hücrelere verilen yüksek dozdaki ilaçtan (200 ng/ml) çok daha iyi olduğu görülmüştür. SNT ile taşınan ilacın SK-BR3 hücre hattı üzerindeki ölüm etkisi % 51,7 iken, serbest haldeki ilacın ölüm oranı % 46,0 da kalmıştır. Aradaki fark hücrelerin ilaç direnci geliştirmesi ile açıklanmaktadır. Buna ek olarak, truva atı etkisi olarak bilinen yaklaşımda tek bir nano taşıyıcının hücre içine alınması ile yüzerce ilaç molekülünün içeri alınması söz konusudur. Kanser hücrelerinde fazlaca bulunan FA reseptör sebebiyle FA-SNT'lerin hücre içine alınması ve asidik medyada jel içine hapsolmuş ilacın salınması kolaylaşmaktadır [115].

Bu tezin ikinci bölümünde CNM'lerin sinir-doku mühendisliği uygulamaları üzerinde durulmuştur. Literatürde serbest AAO membran eldesi ile ilgili bahsedilen yöntemlerde kullanılan kaplamaların bir kısmında asit dayanımı olmadığı, bir kısmında da kaplamaları AAO poroz yüzeyinden ayırmanın mümkün olmadığı görülmüştür. Bu tespit akabinde, parafilm koruma kaplaması olarak kullanıldığı literatürde bahsedilmeyen, ucuz ve basit bir yöntem ile serbest AAO membranlar elde edilmiştir. Okzalik asit ve fosforik asit içerisinde iki farklı tipte AAO membran eldesi sağlanmış olup, bu membranların kalıp olarak kullanıldığı CNM'lerin üretimi

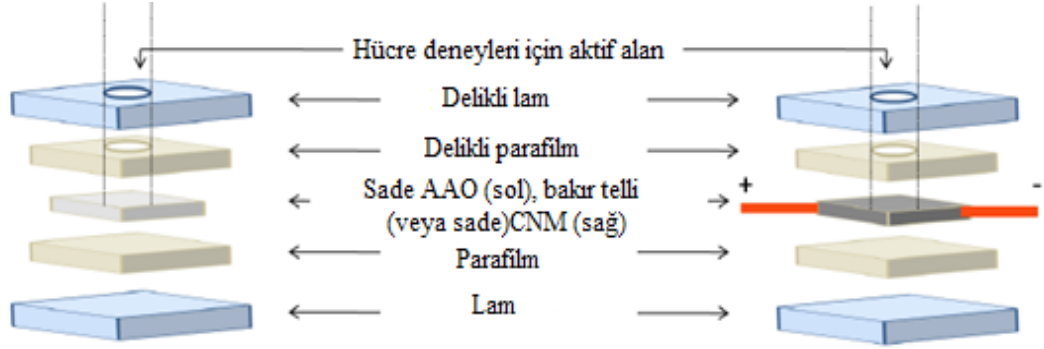
yapılmıştır. Okzalik asitte büyütülen membranlarda önceki projeden edindiğimiz tecrübeden ötürü üretim aşamasında bir sorun yaşanmamıştır. Fosforik asit içinde büyütülen membranlarda ise literatürdeki benzer çalışmalar dikkate alınarak üretim yapılmaya çalışılmış ancak kaynama problemi ve ilk AAO tabakanın yüzeyden uzaklaştırılmasının güçlüğü sebebiyle okzalik asit içinde büyütülen membranlar da kullanılan iki aşamalı anodizasyon yöntemi kullanılamamıştır. Bunun yerine tek aşamalı anodizasyon sonrası oluşan ilk AAO tabakanın kromat çözeltisi ile yüzeyden uzaklaştırılması yoluna gidilmiştir.

AAO membranların kalıp olarak kullanıldığı bu çalışmada PVD metodu ile CNM'ler elde edilmiştir. Literatürde rastlanmayan bu metotla elde edilen CNM'ler SEM, TEM, XPS, EDX ve DC Voltaj/Akım Kaynağı kullanılarak topografik, kimyasal ve elektriksel özellikleri bakımından karakterize edilmiştir. Ayrıca TEM analizleri sırasında porlu karbon nanoporlu yüzeylere rastlanmış ve bu malzemenin kullanımı ile ilgili uygun çalışma araştırılmaya başlanmıştır. Aynı TEM çalışmaları yine PVD yardımıyla AAO içerisinde CNT benzeri yapılar üretilebileceğini de teyit etmiştir. AAO – CNM substratı hazırlanmış olup, TÜBİTAK tarafından desteklenen bu çalışmada PC 12 hücre hatlarının geliştirilmesi ve sitotoksikite çalışmalarına geçilmiştir.

5. GELECEK ÇALIŞMALAR

İlk bölümde detaylandırılan, SK BR-3 ve MCF-12A hücre hatları üzerinde çalışılan, SNT'lerin ileriki dönemde farklı hücre hatları ile çalışılması gündemdedir. In-vivo performansları gerekli özgül gruplar dekore edilerek ölçülebilir. Örneğin prostat kanserinin tespitinde kullanılan prostat-özgü antijen ile modifiye edilmiş malzemeler kullanılarak teranostik uygulamaların çalışılması düşünülmektedir. Ayrıca küresel silika nano parçacıklarla kanser hücreleri üzerindeki etkileri bakımından da karşılaştırılması planlanmaktadır. Tüp ağzlarına yapılacak polimer kapakçıklarla (kork) [38] ilaç salınımının daha kontrollü hale getirilmesi de gelecek çalışmalar arasındadır. AAO membranların anodizasyon süresine bağlı olarak SNT'ler farklı boy ve çaplarda üretilip hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesi de söz konusudur. Son olarak SNT'lerin fagositik yollarla hücreye alımlarının TEM teknikleri ile tespit edilmesi ve incelenmesi planlanmaktadır.

İkinci bölümde bahsedilen CNM'lerin PC 12 hücre hatları üzerindeki etkisinin incelenmesi için uygun substratların hazırlanmasına geçilmiştir. Hazırlanan substratlar sayesinde malzemenin morfolojik, kimyasal ve elektriksel özelliklerinin kontrol edilmesi amaçlanmaktadır. Morfolojik özelliklerin kontrolünde farklı por çapı ve porozite değerlerine sahip AAO membranlar kullanılmıştır. Kimyasal olarak büyüme faktörlerinin nanoporlu substrat içerisinde varlığına dayanan bir uygulama öngörülmüştür. Son olarak da karbon kaplamanın iletkenliğinden faydalanarak belirtilen hücre hatlarındaki gelişim mekanizmasının incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu üç özelliği etkin bir biçimde ölçmemize kolaylık sağlayacak substratların tasarımı yapılmıştır ve ön çalışmalara başlanmıştır. İlerleyen dönemlerde ise hücre tutunum, canlılık ve nörit uzatma deneyleri aynı aktif yüzey alanına (Şekil 5.1) sahip 6 farklı substrat üzerinde floresan, optik ve elektron mikroskop yardımıyla gerçekleştirilecektir. Bahsi geçen 6 farklı substrat AAO, CNM ve CNM + voltaj durumlarının iki farklı gözenek çapı için incelenmesinden oluşacaktır. Karbon malzemenin karakterizasyonunda Raman Spektroskopisinden faydalanılacak olup tübüler yapıların varlığı araştırılacaktır.



Şekil 5.1. Hücre tutunumu ve nörüt uzaması için kullanılacak substrat düzeneği. CVD tekniği ile kaplanan ticari AAO membranların kullanıldığı elektroosmotik akış yönünün kontrolü için hazırlanan düzeneden esinlenerek [94] hazırlanan bu düzenede gerek sade AAO, gerekse CNM'ler 150 °C de parafilm'in erimesiyle iki cam arasında sabitlenecektir. Düzeneğin sterilizasyonundan sonra hücre tutunum ve nörüt uzama deneyleri için mikrop'lara görevi görecek olan açıkta kalan aktif alan kullanılacaktır. Elektriksel özelliklerin test edileceği uygulamalarda, anot ve katodun çözeltiyle etkileşimi söz konusu değildir.

KAYNAKLAR

- [1] Lee, S., Mitchell, D., Trofin, L., Nevanen, T., Soderlund, H., Martin, C. Antibody-based bio-nanotube membranes for enantiomeric drug separations, *Science*, 296, 2198-2200, 2002.
- [2] Mitchell, D., Lee, S., Trofin, L., Li, N., Nevanen, T., Soderlund, H., et al. Smart nanotubes for bioseparations and biocatalysis, *Journal of the American Chemical Society*, 124, 11864-11865, 2002.
- [3] Lee, W., Scholz, R., Niesch, K., Gosele, U. A template-based electrochemical method for the synthesis of multisegmented metallic nanotubes, *Angewandte Chemie-International Edition*, 44, 6050-6054, 2005.
- [4] Zhi, L., Wu, J., Li, J., Kolb, U., Mullen, K. Carbonization of disclike molecules in porous alumina membranes: Toward carbon nanotubes with controlled graphene-layer orientation, *Angewandte Chemie-International Edition*, 44, 2120-2123, 2005.
- [5] Lee, W., Ji, R., Ross, C., Gosele, U., Nielsch, K. Wafer-scale Ni imprint stamps for porous alumina membranes based on interference lithography, *Small*, 2, 978-982, 2006.
- [6] Kang, M., Yu, S., Li, N., Martin, C. Nanowell-array surfaces prepared by argon plasma etching through a nanopore alumina mask, *Langmuir*, 21, 8429-8438, 2005.
- [7] Ding, G., Zheng, M., Xu, W., Shen, W. Fabrication of controllable free-standing ultrathin porous alumina membranes, *Nanotechnology*, 16, 1285-1289, 2005.
- [8] Chik, H., Xu, J. Nanometric superlattices: non-lithographic fabrication, materials, and prospects, *Materials Science & Engineering R-Reports*, 43, 103-138, 2004.
- [9] Popat, K., Swan, E., Mukhatyar, V., Chatvanichkul, K., Mor, G., Grimes, C., et al. Influence of nanoporous alumina membranes on long-term osteoblast response, *Biomaterials*, 26, 4516-4522, 2005.
- [10] Masuda, H., Fukuda, K. Ordered Metal Nanohole Arrays Made By A 2-Step Replication Of Honeycomb Structures Of Anodic Alumina, *Science*, 268, 1466-1468, 1995.
- [11] Banerjee, P., Perez, I., Henn-Lecordier, L., Lee, S., Rubloff, G. Nanotubular metal-insulator-metal capacitor arrays for energy storage, *Nature Nanotechnology*, 4, 292-296, 2009.
- [12] Martinson, A., Elam, J., Hupp, J., Pellin, M. ZnO nanotube based dye-sensitized solar cells, *Nano Letters*, 7, 2183-2187, 2007.

- [13] Jani, A., Losic, D., Voelcker, N. Nanoporous anodic aluminium oxide: Advances in surface engineering and emerging applications, *Progress in Materials Science*, 58, 636-704, 2013.
- [14] Buyukserin, F., Altuntas, S., Aslm, B. Fabrication and Modification of Composite Silica NanoTest Tubes for Targeted Drug Delivery, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, Submitted, 2013.
- [15] Haq, F., Anandan, V., Keith, C., Zhang, G. Neurite development in PC 12 cells cultured on nanopillars and nanopores with sizes comparable with filopodia, *International Journal of Nanomedicine*, 2, 107-115, 2007.
- [16] Swan, E., Popat, K., Grimes, C., Desai, T. Fabrication and evaluation of nanoporous alumina membranes for osteoblast culture, *Journal of Biomedical Materials Research Part a*, 72A, 288-295, 2005.
- [17] Mainardes, R., Silva, L. Drug delivery systems: Past, present, and future, *Current Drug Targets*, 5, 449-455, 2004.
- [18] Simovic, S., Losic, D., Vasilev, K. Controlled drug release from porous materials by plasma polymer deposition, *Chemical Communications*, 46, 1317-1319, 2010.
- [19] Jeon, G., Yang, S., Byun, J., Kim, J. Electrically Actuable Smart Nanoporous Membrane for Pulsatile Drug Release, *Nano Letters*, 11, 1284-1288, 2011.
- [20] Losic, D., Simovic, S. Self-ordered nanopore and nanotube platforms for drug delivery applications, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6, 1363-1381, 2009.
- [21] Li, S., Mark, S., Kricka, L. Polymeric Nanotubes and Nanorods for Biomedical Applications, *Current Nanoscience*, 5, 182-188, 2009.
- [22] Lakshmi, B., Dorhout, P., Martin, C. Sol-gel template synthesis of semiconductor nanostructures, *Chemistry of Materials*, 9, 857-862, 1997.
- [23] Chen, C., Liu, Y., Wu, C., Yeh, C., Su, M., Wu, Y. Preparation of fluorescent silica nanotubes and their application in gene delivery, *Advanced Materials*, 17, 404-407, 2005.
- [24] Son, S., Reichel, J., He, B., Schuchman, M., Lee, S. Magnetic nanotubes for magnetic-field-assisted bioseparation, biointeraction, and drug delivery, *Journal of the American Chemical Society*, 127, 7316-7317, 2005.
- [25] Namgung, R., Zhang, Y., Fang, Q., Singha, K., Lee, H., Kwon, I., *et al.* Multifunctional silica nanotubes for dual-modality gene delivery and MR imaging, *Biomaterials*, 32, 3042-3052, 2011.

- [26] Bai, X., Son, S., Zhang, S., Liu, W., Jordan, E., Frank, J., et al. Synthesis of superparamagnetic nanotubes as MRI contrast agents and for cell labeling, *Nanomedicine*, 3, 163-174, 2008.
- [27] Buyukserin, F., Medley, C., Mota, M., Kececi, K., Rogers, R., Tan, W., *et al.* Antibody-functionalized nano test tubes target breast cancer cells, *Nanomedicine*, 3, 283-292, 2008.
- [28] La Flamme, K., Popat, K., Leoni, L., Markiewicz, E., La Tempa, T., Roman, B., et al. Biocompatibility of nanoporous alumina membranes for immunoisolation, *Biomaterials*, 28, 2638-2645, 2007.
- [29] Wolfrum, B., Mourzina, Y., Sommerhage, F., Offenhausser, A. Suspended nanoporous membranes as interfaces for neuronal biohybrid systems, *Nano Letters*, 6, 453-457, 2006.
- [30] Prasad, S., Quijano, J. Development of nanostructured biomedical micro-drug testing device based on in situ cellular activity monitoring, *Biosensors & Bioelectronics*, 21, 1219-1229, 2006.
- [31] Masuda, H., Hasegawa, F., Ono, S. Self-ordering of cell arrangement of anodic porous alumina formed in sulfuric acid solution, *Journal of the Electrochemical Society*, 144, L127-L130, 1997.
- [32] Jessensky, O., Muller, F., Gosele, U. Self-organized formation of hexagonal pore arrays in anodic alumina, *Applied Physics Letters*, 72, 1173-1175, 1998.
- [33] Li, A., Muller, F., Birner, A., Nielsch, K., Gosele, U. Hexagonal pore arrays with a 50-420 nm interpore distance formed by self-organization in anodic alumina, *Journal of Applied Physics*, 84, 6023-6026, 1998.
- [34] Bhattacharya, R., Patra, C., Earl, A., Wang, S., Katarya, A., Lu, L., et al. Attaching folic acid on gold nanoparticles using noncovalent interaction via different polyethylene glycol backbones and targeting of cancer cells, *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 3, 224-238, 2007.
- [35] Kwon, G., Okano, T. Polymeric micelles as new drug carriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 21, 107-116, 1996.
- [36] Lu, J., Liang, M., Li, Z., Zink, J., Tamanoi, F. Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals, *Small*, 6, 1794-1805, 2010.
- [37] Giri, S., Trewyn, B., Stellmaker, M., Lin, V. Stimuli-responsive controlled-release delivery system based on mesoporous silica nanorods capped with magnetic nanoparticles, *Angewandte Chemie-International Edition*, 44, 5038-5044, 2005.

[38] Hillebrenner, H., Buyukserin, F., Kang, M., Mota, M., Stewart, J., Martin, C. Corking nano test tubes by chemical self-assembly, *Journal of the American Chemical Society*, 128, 4236-4237, 2006.

[39] Son, S., Lee, S. Controlled gold nanoparticle diffusion in nanotubes: Platform of partial functionalization and gold capping, *Journal of the American Chemical Society*, 128, 15974-15975, 2006.

[40] Hench, L., West, J. The sol-gel process, *Chemical Reviews*, 90, 33-72, 1990.

[41] Lakshmi, B., Patrissi, C., Martin, C. Sol-gel template synthesis of semiconductor oxide micro- and nanostructures, *Chemistry of Materials*, 9, 2544-2550, 1997.

[42] Prassas, M., Phalippou, J., Zarzycki, J. Synthesis of monolithic silica-gels by hypercritical solvent evacuation, *Journal of Materials Science*, 19, 1656-1665, 1984.

[43] Pope, E. J. A., Sakka, S., Klein, E. D., *Sol-Gel Science and Technology*, *American Ceramic Society*, Columbus, 1995.

[44] Hench, L. L., *Sol-Gel Silica: Processing, Properties and Technology Transfer*, *Noyes Publications*, New York, 1998.

[45] Piccaluga, G., Corrias, A., Ennas, G., Musinu, A., *Sol-Gel Preparation and Characterization of Metal-Silica and Metal Oxide-Silica Nanocomposites*, *Trans Tech Publications Ltd.*, Switzerland, 2000.

[46] Patrissi, C., Martin, C. Improving the volumetric energy densities of nanostructured V_2O_5 electrodes prepared using the template method, *Journal of the Electrochemical Society*, 148, A1247-A1253, 2001.

[47] Zhang, M., Bando, Y., Wada, K. Silicon dioxide nanotubes prepared by anodic alumina as templates, *Journal of Materials Research*, 15, 387-392, 2000.

[48] Kovtyukhova, N., Mallouk, T., Mayer, T. Templated surface sol-gel synthesis of SiO_2 nanotubes and SiO_2 -insulated metal nanowires, *Advanced Materials*, 15, 780-785, 2003.

[49] Ichinose, I., Senzu, H., Kunitake, T. A surface sol-gel process of TiO_2 and other metal oxide films with molecular precision, *Chemistry of Materials*, 9, 1296-1298, 1997.

[50] Kovtyukhova, N., Buzaneva, E., Waraksa, C., Martin, B., Mallouk, T. Surface sol-gel synthesis of ultrathin semiconductor films, *Chemistry of Materials*, 12, 383-389, 2000.

[51] Madou, M. J., *Fundamentals of Microfabrication*, *CRC Press*, Boca Raton, 2002.

- [52] Gratton, S., Williams, S., Napier, M., Pohlhaus, P., Zhou, Z., Wiles, K., et al. The Pursuit of a Scalable Nanofabrication Platform for Use in Material and Life Science Applications, *Accounts of Chemical Research*, 41, 1685-1695, 2008.
- [53] Buyukserin, F., Martin, C. The use of Reactive Ion Etching for obtaining "free" silica nano test tubes, *Applied Surface Science*, 256, 7700-7705, 2010.
- [54] Greg H. Bioconjugate Techniques, *Academic Press*, USA, 2008.
- [55] Wissink, M., Beernink, R., Pieper, J., Poot, A., Engbers, G., Beugeling, T., et al. Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation, *Biomaterials*, 22, 151-163, 2001.
- [56] Yang, H., Zhuang, Y., Hu, H., Du, X., Zhang, C., Shi, X., et al. Silica-Coated Manganese Oxide Nanoparticles as a Platform for Targeted Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging of Cancer Cells, *Advanced Functional Materials*, 20, 1733-1741, 2010.
- [57] Magesh, V., Yuvaraj, G., M. D., Kalaichelvan, P. T. Methanolic Extract of *Indigofera Tinctoria* Induces Apoptosis in HCT116 cells, *Journal of Applied Biosciences*, 14, 768-774, 2009.
- [58] Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay For Cellular Growth And Survival - Application To Proliferation And Cyto-Toxicity Assays, *Journal Of Immunological Methods*, 65, 55-63, 1983.
- [59] Chirathaworn, C., Kongcharoensuntorn, W., Dechdougchan, T. A., L. Sanguanmoo, P. Y. P. *Myristica fragrans* Houtt. Methanolic extract induces apoptosis in a human leukemia cell line through SIRT1 mrna down regulation, *J. Med. Assoc. Thai*, 90, 2422-2428, 2007.
- [60] Xu, J., Sun, Y., Huang, J., Chen, C., Liu, G., Jiang, Y., et al. Photokilling cancer cells using highly cell-specific antibody-TiO₂ bioconjugates and electroporation, *Bioelectrochemistry*, 71, 217-222, 2007.
- [61] Buyukserin, F., 2007, Template Synthesized Membranes For Ion Transport Modulation And Silica-based Delivery Systems, *Doktora Tezi*, University Of Florida, USA.
- [62] Hunter, R. J. Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications. *Academic Press*, San Francisco, 1981.
- [63] Huang, P., Bao, L., Zhang, C., Lin, J., Luo, T., Yang, D., et al. Folic acid-conjugated Silica-modified gold nanorods for X-ray/CT imaging-guided dual-mode radiation and photo-thermal therapy, *Biomaterials*, 32, 9796-9809, 2011.

- [64] Wang, X., Morales, A., Urakami, T., Zhang, L., Bondar, M., Komatsu, M., *et al.* Folate Receptor-Targeted Aggregation-Enhanced Near-IR Emitting Silica Nanoprobe for One-Photon in Vivo and Two-Photon ex Vivo Fluorescence Bioimaging, *Bioconjugate Chemistry*, 22, 1438-1450, 2011.
- [65] McCarthy, S., Davies, G., Gun'ko, Y. Preparation of multifunctional nanoparticles and their assemblies, *Nature Protocols*, 7, 1677-1693, 2012.
- [66] Graf, N., Yegen, E., Gross, T., Lippitz, A., Weigel, W., Krakert, S., *et al.* XPS and NEXAFS studies of aliphatic and aromatic amine species on functionalized surfaces, *Surface Science*, 603, 2849-2860, 2009.
- [67] Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., *et al.* Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells, *Blood*, 109, 3812-3819, 2007.
- [68] Nan, A., Bai, X., Son, S., Lee, S., Ghandehari, H. Cellular uptake and cytotoxicity of silica nanotubes, *Nano Letters*, 8, 2150-2154, 2008.
- [69] Jhaveri, M. S., Rait, A. S., Chung, K.-N., *al.*, e. Antisense oligonucleotides targeted to the human folate receptor inhibit breast cancer cell growth and sensitize the cells to doxorubicin treatment, *Mol Cancer Ther*, 3, 1505-1512, 2004.
- [70] Ada, K., Turk, M., Oguztuzun, S., Kilic, M., Demirel, M., Tandogan, N., *et al.* Cytotoxicity and apoptotic effects of nickel oxide nanoparticles in cultured HeLa cells, *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 48, 524-529, 2010.
- [71] Vallet-Regi, M., Ruiz-Hernandez, E., Gonzalez, B., Baeza, A. Design of Smart Nanomaterials for Drug and Gene Delivery, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 1, 6-29, 2011.
- [72] Pollard, T. *Molecular Cell Biology*, 2nd edition - Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D., Nature, 346, 621-622, 1990.
- [73] Evans, G. Peripheral nerve injury: A review and approach to tissue engineered constructs, *Anatomical Record*, 263, 396-404, 2001.
- [74] Seil, J., Webster, T. Electrically active nanomaterials as improved neural tissue regeneration scaffolds, *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, 635-647, 2010.
- [75] Das, K., Freudenrich, T., Mundy, W. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures, *Neurotoxicology and Teratology*, 26, 397-406, 2004.
- [76] Nelson, D.L., Cox, M. *Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, Basingstoke, 2008.

- [77] Schmidt, C., Shastri, V., Vacanti, J., Langer, R. Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 8948-8953, 1997.
- [78] Yen, S., Hsu, W., Chen, Y., Su, H., Chang, Y., Chen, H., et al. The enhancement of neural growth by amino-functionalization on carbon nanotubes as a neural electrode, *Biosensors & Bioelectronics*, 26, 4124-4132, 2011.
- [79] Sorkin, R., Greenbaum, A., David-Pur, M., Anava, S., Ayali, A., Ben-Jacob, E., et al. Process entanglement as a neuronal anchorage mechanism to rough surfaces, *Nanotechnology*, 20, 15101 2009.
- [80] Abdullah, C., Asanithi, P., Brunner, E., Jurewicz, I., Bo, C., Azad, C., et al. Aligned, isotropic and patterned carbon nanotube substrates that control the growth and alignment of Chinese hamster ovary cells, *Nanotechnology*, 22, 2011.
- [81] Seidlits, S., Lee, J., Schmidt, C. Nanostructured scaffolds for neural applications, *Nanomedicine*, 3, 183-199, 2008.
- [82] Kang, G., Ben Borgens, R., Cho, Y. Well-Ordered Porous Conductive Polypyrrole as a New Platform for Neural Interfaces, *Langmuir*, 27, 6179-6184, 2011.
- [83] Xia, Y., Yang, P., Sun, Y., Wu, Y., Mayers, B., Gates, B., et al. One-dimensional nanostructures: Synthesis, characterization, and applications, *Advanced Materials*, 15, 353-389, 2003.
- [84] Schmidt, C., Leach, J. Neural tissue engineering: Strategies for repair and regeneration, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5, 293-347, 2003.
- [85] Fan, Y., Cui, F., Hou, S., Xu, Q., Chen, L., Lee, I. Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topograph, *Journal of Neuroscience Methods*, 120, 17-23, 2002.
- [86] Yucel, D., Kose, G., Hasirci, V. Tissue Engineered, Guided Nerve Tube Consisting of Aligned Neural Stem Cells and Astrocytes, *Biomacromolecules*, 11, 3584-3591, 2010.
- [87] Xie, J., macewan, M., Willerth, S., Li, X., Moran, D., Sakiyama-Elbert, S., et al. Conductive Core-Sheath Nanofibers and Their Potential Application in Neural Tissue Engineering, *Advanced Functional Materials*, 19, 2312-2318, 2009.
- [88] Xie, J., Macewan, M., Schwartz, A., Xia, Y. Electrospun nanofibers for neural tissue engineering, *Nanoscale*, 2, 35-44, 2010.

- [89] Webster, T., Waid, M., Mckenzie, J., Price, R., Ejiófor J. Nano-biotechnology: carbon nanofibres as improved neural and orthopaedic implants, *Nanotechnology*, 15, 48-54, 2004.
- [90] Khang, D., Kim, S., Liu-Snyder, P., Palmore, G., Durbin, S., Webster, T. Enhanced fibronectin adsorption on carbon nanotube/poly (carbonate) urethane: Independent role of surface nano-roughness and associated surface energy, *Biomaterials*, 28, 4756-4768, 2007.
- [91] Webster, T., Schadler, L., Siegel, R., Bizios, R. Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin, *Tissue Engineering*, 7, 291-301, 2001.
- [92] Walpole, A., Xia, Z., Wilson, C., Triffitt, J., Wilshaw, P. A novel nano-porous alumina biomaterial with potential for loading with bioactive materials, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90A, 46-54, 2009.
- [93] Karlsson, M., Palsgard, E., Wilshaw, P., Di Silvio, L. Initial in vitro interaction of osteoblasts with nano-porous alumina, *Biomaterials*, 24, 3039-3046, 2003.
- [94] Miller, S., Young, V., Martin, C. Electroosmotic flow in template-prepared carbon nanotube membranes, *Journal of the American Chemical Society*, 123, 12335-12342, 2001.
- [95] Kuo, T., Xu, J. Growth and application of highly ordered array of vertical nanoposts, *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 24, 1925-1933, 2006.
- [96] Jeong, S., Hwang, H., Lee, K., Jeong, Y. Template-based carbon nanotubes and their application to a field emitter, *Applied Physics Letters*, 78, 2052-2054, 2001.
- [97] Mattox, D. M. Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing: Film Formation, Adhesion, Surface Preparation and Contamination Control, *Elsevier Inc.*, Kidlington, 2010.
- [98] Archana, D., Dutta, J., Dutta, P. Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies, *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 193-203, 2013.
- [99] Yang, F., Murugan, R., Ramakrishna, S., Wang, X., Ma, Y., Wang, S. Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering, *Biomaterials*, 25, 1891-1900, 2004.
- [100] Jones, D., Kochian, L. Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity, *Febs Letters*, 400, 51-57, 1997.

- [101] Wang, Z., Su, Y., Li, H. AFM study of gold nanowire array electrodeposited within anodic aluminum oxide template, *Applied Physics a-Materials Science & Processing*, 74, 563-565, 2002.
- [102] Zhao, Y., Chen, M., Zhang, Y., Xu, T., Liu, W. A facile approach to formation of through-hole porous anodic aluminum oxide film, *Materials Letters*, 59, 40-43, 2005.
- [103] Xu, T., Piner, R., Ruoff, R. An improved method to strip aluminum from porous anodic alumina films, *Langmuir*, 19, 1443-1445, 2003.
- [104] Montero-Moreno, J., Sarret, M., Muller, C. Influence of the aluminum surface on the final results of a two-step anodizing, *Surface & Coatings Technology*, 201, 6352-6357, 2007.
- [105] Tan, L., Gao, H., Zong, Y., Knoll, W. Atomic Layer Deposition of TiO₂ to Bond Free-Standing Nanoporous Alumina Templates to Gold-Coated Substrates as Planar Optical Waveguide Sensors, *Journal of Physical Chemistry C*, 112, 17576-17580, 2008.
- [106] Matefi-Tempfli, S., Matefi-Tempfli, M., Piraux, L., Juhasz, Z., Biri, S., Fekete, E., et al. Guided transmission of slow Ne⁶⁺ ions through the nanochannels of highly ordered anodic alumina, *Nanotechnology*, 17, 3915-3919, 2006.
- [107] Ton-That, C., Shard, A., Teare, D., Bradley, R. XPS and AFM surface studies of solvent-cast PS/PMMA blends, *Polymer*, 42, 1121-1129, 2001.
- [108] Li, A., Muller, F., Birner, A., Nielsch, K., Gosele, U. Polycrystalline nanopore arrays with hexagonal ordering on aluminum, *Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films*, 17, 1428-1431, 1999.
- [109] Inguanta, R., Butera, M., Sunseri, C., Piazza, S. Fabrication of metal nanostructures using anodic alumina membranes grown in phosphoric acid solution: Tailoring template morphology, *Applied Surface Science*, 253, 5447-5456, 2007.
- [110] Bocchetta, P., Sunseri, C., Chiavarotti, G., Di Quarto, F. Microporous alumina membranes electrochemically grown, *Electrochimica Acta*, 48, 3175-3183, 2003.
- [111] Yu, W., Fei, G., Chen, X., Xue, F., Xu, X. Influence of defects on the ordering degree of nanopores made from anodic aluminum oxide, *Physics Letters a*, 350, 392-395, 2006.
- [112] Mata-Zamora, M., Saniger, J. Thermal evolution of porous anodic aluminas: a comparative study, *Revista Mexicana De Fisica*, 51, 502-509, 2005.
- [113] Ekiz, O., Urel, M., Guner, H., Mizrak, A., Dana, A., Reversible Electrical Reduction and Oxidation of Graphene Oxide, *Acs Nano*, 2475-2482, 2011.

[114] Ptchelintsev, A., de Halleux, B., Thickness and conductivity determination of thin nonmagnetic coatings on ferromagnetic conductive substrates using surface coils, *Review of Scientific Instruments*, 69, 1488-1494, 1998.

[115] Choi, M., Stanton-Maxey, K., Stanley, J., Levin, C., Bardhan, R., Akin, D., *et al.* A cellular Trojan horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors, *Nano Letters*, 7, 3759-3765, 2007.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ALTUNTAŞ, Sevde
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 09.06.1988 Ankara
Medeni hali : Bekâr
Telefon : 0 (312) 292 40 00
Faks : 0 (312) 292 40 91
e-mail : sevde.altuntas@etu.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Fen Bilgisi Öğretmenliği	2010

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
-----	-----	-------

Yabancı Dil

İngilizce

Yayımlar

Buyukserin, F., Altuntas, S., Aslım, B. Fabrication and Modification of Composite Silica Nano Test Tubes for Targeted Drug Delivery, Journal of Biomedical Nanotechnology, Gönderildi.

Sözlü Sunumları

Altuntas, S., Buyukserin, F. Fabrication of Carbon Nanotube Membranes from Anodized Alumina Films for Neural Tissue Engineering, NANOTR-9, Erzurum, TR, Haziran 25-30, 2013.

Altuntas, S., Yegenoglu, H., Aslım, B., Buyukserin, F. Composite Silica Nanotubes for Targeted Cell Death, NANOTR-9, Erzurum, TR, Haziran 25-30, 2013.

Poster Sunumları

Altuntas, S., Buyukserin, F. Use of silica nano test tubes as a multifunctional platforms for targeted delivery, 10th Chemical Physics Congress Ankara, TR, Ekim 10-12, 2012.

Altuntas, S., Buyukserin, F. Selective plasma damage for obtaining free one dimensional nanoparticles, 2nd Workshop On Physics Based Modelling Of Material Properties & Experimental Observations Antalya, TR, Mayıs 15-17, 2013.