
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

YÜZEYDE BAŞLATILAN HALKA AÇILMASI METATEZ POLİMERİZASYONU VE TİYOL-İN KLİK TEPKİMESİ KOMBİNASYONU İLE HİBRİT POLİMER FIRÇA SENTEZİ VE DNA HİBRİDİZASYONUNDA KULLANIMI

Esra ALTAY ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARALIK 2020

Esra ALTAY ÖZTÜRK tarafından hazırlanan "YÜZEYDE BAŞLATILAN HALKA AÇILMA METATEZ POLİMERİZASYONU VE TİYOL-İN KLİK TEPKİMESİ KOMBİNASYONU İLE HİBRİT POLİMER FIRÇA SENTEZİ VE DNA HİBRİDİZASYONUNDA KULLANIMI" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Kimya Ana Bilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum. ...……

İkinci Danışman: Prof. Dr. Mehmet S. EROĞLU

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Marmara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum. ...……

Başkan: Prof. Dr. H. İbrahim ÜNAL

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum. ...……

Üye: Prof. Dr. Murat ŞEN

Kimya Ana Bilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum. ...……

Üye: Prof. Dr. Bekir SARI

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum. ...……

Üye: Prof. Dr. Pınar AKKAŞ KAVAKLI

Kimya Ana Bilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum. ...……

Üye: Doç. Dr. Gökhan DEMİREL

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylamıyorum. ...……

Tez Savunma Tarihi: 26/12/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

……..…….

Prof. Dr. Cevriye GENCER

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Esra ALTAY ÖZTÜRK

26/12/2020

YÜZEYDE BAŞLATILAN HALKA AÇILMA METATEZ POLİMERİZASYONU VE TİYOL-İN KLİK TEPKİMESİ KOMBİNASYONU İLE HİBRİT POLİMER FIRÇA SENTEZİ VE DNA HİBRİDİZASYONUNDA KULLANIMI

(Doktora Tezi)

Esra ALTAY ÖZTÜRK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2020

ÖZET

Hidroksil sonlandırılmış silisyum (Si-OH) yüzeyinde iyi tanımlanmış hiyalüronik asit aşılı poli(ekzo-7-oksabisiklo [2.2.1] hept-5-en-2,3-dikarboksilik anhidrit) [poli(EHDA)-HA] fırçaları yüzeyde başlatılan halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP) ve tiyol-in klik tepkimesi kombinasyonu ile hazırlandı. Bu işlem birbirini takip eden dört aşamada gerçekleştirildi: (i) Si-OH yüzeyine (3-aminopropil) trietoksisilanın kendinden oluşan tek tabaka yöntemi ile bağlanması (Si-APTES), (ii) EHDA monomerinin Si-APTES yüzeyine bağlanması, (iii) yüzeyde başlatılan ROMP ile poli(EHDA) fırçaların sentezi ve (iv) tiyolize hiyalüronik asitin (Th-HA) tiyol-in klik tepkimesi ile poli(EHDA) zincirlerine bağlanması. Poli(EHDA)-HA fırçaların yüzey ıslanabilirliği, yüzey morfolojisi ve kimyasal bileşimleri sırasıyla temas açısı ölçümleri, atomik kuvvet mikroskopi ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi ile karakterize edildi. Poli(EHDA) fırçaların aşılama yoğunluğu (σ, zincir nm^{-2}) ve aşılama noktaları arasındaki ortalama uzaklık (D, nm), [katalizör]/[monomer] oranından bağımsız olarak sırasıyla 0,50 zincir nm^{-2} ve 1,65 nm olarak belirlendi. Bu durum silisyum substrat yüzeyinde yüksek aşılamanın oluştuğunu gösterdi. Bununla birlikte, yüksek hacimli Th-HA moleküllerinin sterik engeller oluşturması sebebiyle düşük mol kütleli HA molekülleri poli(EHDA) zincirlerine bağlandı. Fırçaların biyouyumlu özelliği, (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) (MTT) sitotoksisite testi ile belirlendi. Poli(EHDA)-HA fırçalara önce tek iplikli RNA molekülleri bağlandı daha sonra eşlenik DNA probu ile hibridizasyonu yapıldı ve yüzey Floresans Spektrumu ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu ile incelendi. Sonuç olarak, poli(EHDA)-HA fırçalarının biyo-uyumlu özelliği, biyomoleküllerin yüzeylerdeki davranışını kontrol etmek için gelişmiş biyolojik cihazlar yapmak için yararlı bir aday olabilir.

Bilim Kodu : 20115

Anahtar Kelimeler : Ekzo-7-Oksabisiklo[2.2.1] hept-en-2,3-Dikarboksilik Anhidrit, Yüzeyde Başlatılan Halka Açılma Metatez Polimerizasyonu (ROMP), Tiyol-in Klik tepkimesi, Aşılama Yoğunluğu, DNA Hibridizasyonu

Sayfa Adedi : 106

Danışman : Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA

İkinci Danışman : Prof.Dr. Mehmet S. EROĞLU

SYNTHESIS OF HYBRID POLYMER BRUSH VIA COMBINATION OF SURFACE-INITIATED RING-OPENING METATHESIS POLYMERIZATION AND THIOL-ENE CLICK REACTION AND ITS USE IN DNA HYBRIDIZATION

(Ph. D. Thesis)

Esra ALTAY ÖZTÜRK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2020

ABSTRACT

Well-defined hyaluronated poly(exo-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarboxylic anhydride) [poly(EHDA)-HA] brushes on the hydroxyl terminated silicon (Si-OH) surface were prepared through the combination of surface-initiated ring-opening metathesis polymerization (ROMP) and thiol-ene click reaction. This process was realized in successive four steps: (i) formation of self-assembled monolayer of (3-aminopropyl)triethoxysilane on the Si-OH surface (Si-APTES), (ii) bonding of EHDA monomer to the Si-APTES surface, (iii) synthesis of poly(EHDA) brushes via surface-initiated ROMP and (iv) coupling of thiolated hyaluronic acid (Th-HA) to poly(EHDA) chains via thiol-ene click reaction. Surface wettability, surface morphology and chemical compositions of poly(EHDA)-HA brushes were characterized by contact angle measurements, atomic force, microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy, respectively. Grafting density (σ, chains nm^{-2}) and average distance between grafting points (D, nm) of the poly(EHDA) brushes were measured to be 0,50 chains nm^{-2} and 1,65 nm, independent of the [catalyst]/[monomer] ratios, which indicated that high grafting was created on the silicon substrate. However, low amounts of HA molecules were bonded to poly(EHDA) chains due to the high volume of Th-HA chains creating some steric hindrances.The biocompatibility of the brushes was determined by (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT) cytotoxicity test. First, single-stranded RNA molecules were attached to the poly(EHDA)-HA brushes, then hybridized with conjugated DNA probe and the surface was examined by Fluorescence Spectrum and Laser Scanning Confocal Microscope. As a result, the biocompatible property of poly(EHDA)-HA brushes could be useful a candidate for making advanced biological devices to control the behavior of biomolecules on surfaces.

Science Code : 20115

Key Words : Exo-7-Oxabicyclo[2.2.1] Hept-5-en-2,3-Dicarboxylic Anhyride, Surface-Initiated Ring-Opening Metathesis Polymerization (ROMP), Thiol-Ene Click Reaction, Grafting Density, DNA Hybridization

Page Number : 106

Supervisor : Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA

Co-Supervisor : Prof.Dr. Mehmet S. EROĞLU

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince bilgisini ve emeğini esirgemeyen, tez çalışmamın her aşamasıyla özenle ilgilenen ve yeni yol ve yöntemler gösteren kıymetli hocam Prof.Dr. Tuncer ÇAYKARA'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Doktora tez çalışmalarım için her türlü olanağı sağlayan, kıymetli bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren değerli hocam Prof.Dr. Mehmet S. EROĞLU'na teşekkürlerimi ve saygılarımı sunmayı bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında fikir, görüş ve desteklerini esirgemeyen ve tezimin şekillenmesine katkı sağlayan Tez İzleme Komitesi Üyesi saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Bekir SARI ve Prof. Dr. Murat ŞEN'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Benden hiçbir zaman sevgisini, güvenini eksik etmeyen ve bana her daim yardımcı olan değerli eşim Fatih ÖZTÜRK'e anlayışı ve sabrı için teşekkür ederim. Doktora sürecine beraber başladığımız ve doktora çalışmalarımın her anına şahit olan canım kızım Ayşe Sibel ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Her zaman yanıma olan, bana güvenen, destekleyen ve en zor süreçlerimde yardımını esirgemeyen canım annem ve babama çok teşekkür ederim. Ayrıca tezimle yakından ilgilenen ve her daim destekleyen değerli abime, değerli eşine ve yeğenlerime de çok teşekkür ederim.

Biyouygulama çalışmalarım için destek ve yardımlarını esirgemeyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) UME Kimya grubundan Burhanettin YALÇINKAYA'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ix

ŞEKİLLERİN LİSTESİ x

RESİMLERİN LİSTESİ xv

SİMGELER VE KISALTMALAR xvi

1. GİRİŞ 1

2. KURAMSAL BİLGİLER 5

2.1. Polimer Fırçalar 5

2.2. Halka Açılma Metatez Polimerizasyonu 8

2.2.1. ROMP mekanizması 8

2.2.2. ROMP katalizörler 13

2.2.3. ROMP ile polimer fırça sentezi 14

2.3. Tiyol-en Klik Kimyası 17

2.4. Nanolitografi 21

2.4.1. Atomik kuvvet mikroskopu (AFM) ve nanolitografi 21

2.5. Biyouyumlu Polimer Fırçalar 31

2.5.1. Hiyalüronik asit 33

2.5.2. SİTOTOKSİSİTE ve MTT testi 34

2.5.3. DNA immobilizasyonu 36

3. GEREÇ VE YÖNTEM 45

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 45

Sayfa

3.2. Furan Maleik Anhidrit Diels Alder Ürünün (Ekzo-7-Okzabisiklo[2.2.1] Hept-5en-2,3-Dikarboksilik Anhidrit) Sentezi 46

3.3. Hiyalüronik Asitin (HA) Hidroliz ile Mol Kütlesinin Düşürülmesi 46

3.4. Tiyol Uçlu HA (HA-SH) Sentezi 46

3.5. EHDA'nın Silisyum Substrata Bağlanması 47

3.6. Yüzeyde Başlatılan ROMP ile Poli(ekzo-7-Okzabisiklo[2.2.1] Hept-5en-2,3-Dikarboksilik Anhidrit) Sentezi 47

3.7. Tiyol-en Klik Tepkimesi ile Poli(EHDA) Fırçalara HA-SH Moleküllerinin Bağlanması 48

3.8. Poli(EHDA)-HA Fırçaların MTT Sitotoksisite Testi 48

3.9. DNA Molekülünün Poli(EHDA)-HA Yüzeylere İmmobilizasyonu 48

3.10. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskopu) ile Nanolitografi 49

3.11. Ölçümler 49

4. BULGULAR, TARTIŞMA VE SONUÇ 51

4.1. EHDA Monomerinin Sentezi 51

4.2. EHDAmonomerinin Silisyum Substrata Bağlanması 53

4.3. Si-EHDA Yüzeyinde Başlatılan ROMP ile Poli(EHDA) Fırça Sentezi 57

4.4. HA'nın Poli(EHDA) Zincirlerine Bağlanması 66

4.5. Poli(EHDA)-HA Yüzeylerin MTT Testi 73

4.6. AFM Nanolitografi Yöntemi ile Polimer Fırçaların Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi 74

4.7. Si-(EHDA)-HA Fırçalara DNA İmmobilizasyonu 81

4.8. DNA Hibritleşmesi 85

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 89

KAYNAKLAR 91

EKLER 103

EK-1. Grafikler 104

ÖZGEÇMİŞ 105

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler..... 45

Çizelge 4.1. Farklı sürede sentezlenen polimer yüzeylerin su değme açısı görüntüleri ve sonuçları 60

Çizelge 4.2. Poli(EHDA)'nın mol kütlesininin ve elipsometrik kalınlığının [katalizör]/[monomer] oranı ile değişimi..... 66

Çizelge 4.3. HA ile hazırlanmış pelet ve cam yüzeylerin su değme açısı görüntüleri ve sonuçları..... 68

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Polimer fırçaların şematik gösterimi : (a) Küresel partiküller üzerinde polimer fırçalar, (b) Yüzey (altın, cam, silisyum, mika vb.) üzerinde polimer fırçalar 5

Şekil 2.2. Polimer fırça hazırlama yöntemlerinin şematik gösterimi..... 6

Şekil 2.3. Polimer fırçaların klik kimyası yöntemiyle "Pasifize" silisyum yüzeylere aşılama yönteminin şematik gösterimi 7

Şekil 2.4. Katı yüzeye ve polimer zincirlerinin kovalent bağlanmasının şematik gösterimi..... 7

Şekil 2.5. Yüzeyde aşılama yönteminde yüzeye başlatıcının kovalent bağlanması ve polimer fırçaların oluşturulmasının şematik gösterimi..... 8

Şekil 2.6. ROMP'un genel gösterimi..... 8

Şekil 2.7. Siklopentenin ROMP basamakları 10

Şekil 2.8. Tipik bir ROMP tepkimesi mekanizması 11

Şekil 2.9. ROMP tepkimelerinde ikincil metatez (moleküller arası zincir transfer ve molekül içi zincir transfer) tepkimelerin örnekleri..... 12

Şekil 2.10. Olefin ROMP'da kullanılan çeşitli Rutenyum esaslı katalizörler 14

Şekil 2.11. Çeşitli Molibden esaslı Schrock katalizörleri..... 14

Şekil 2.12. Sonlandırıcı ajan molekülleri 1 ve 2'nin sentezi..... 15

Şekil 2.13. Sonlandırma ajanları 1 (pentafloroalkil ester) ve 2 (pentafloroalileter) ile yaşayan ROMP polimerlerinin son gruplarının fonksiyonlaştırılması.... 15

Şekil 2.14. Polimer 3 ve 4'ün polimer-analog tepkimeleri ve son gruplarının fonksiyonlaştırılması 16

Şekil 2.15. Yüzey fonksiyonlaştırma basamakları..... 16

Şekil 2.16. Yüzey modifikasyon süreci 17

Şekil 2.17. Tiyol-en klik Michael katılma reaksiyonu için kullanlan tiyollerin, katalistlerin şematik gösterimi..... 18

Şekil 2.18. Tiyol-Michael tepkimesi ile yan zinciri modifiye edilmiş poli(2-oksazolin)'lerin sentezi..... 19

Şekil 2.19. Radikal tiyol-en tepkime mekanizmasının şematik gösterimi..... 20

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.20. PDVB nanopartiküllerinin radikalik tiyol-en yöntemi yüzey modifikasyonunun genel gösterimi 20

Şekil 2.21. AFM'nin şematik gösterimi..... 22

Şekil 2.22. Dip-pen nanolitografisinin şematik gösterimi 24

Şekil 2.23. Elektrokimyasal AFM nanolitografinin şematik gösterimi 25

Şekil 2.24. Nanograftingin şematik gösterimi 26

Şekil 2.25. Basamaklı bimoleküler enediyen birleşmesi ve siklizasyon basamağında ara ürünlerin deneysel gözlemi 27

Şekil 2.26. DPN ve yüzeyde başlatılan ROMP' un şematik gösterimi..... 28

Şekil 2.27. Şekil 2.26'a göre hazırlanan polimer fırça nano yapıları 29

Şekil 2.28. Bileşik I-IX'un sentezi..... 30

Şekil 2.29. Bileşik III'ün PS-DVB (Gözenekli polistiren/divinil benzen kopolimerleri) yüzeye aşılanması ve ROMP'un gerçekleştirilmesi..... 30

Şekil 2.30. Hazır polimer zincirlerinin bağlanma tepkimesi ve polimer zincirlerinin yüzeyde büyütülmesinin şematik gösterimi 31

Şekil 2.31. En fonksiyonlu selülozun organokatalik sentezi ve tiyol-en klik reaksiyonu 32

Şekil 2.32. Selülozun üzerinde organokatalik olarak ε-kaprolaktonun Halka Açılma Polimerizasyonunun (ROP) şematik gösterimi 32

Şekil 2.33. HA'in kimyasal yapısının gösterimi..... 33

Şekil 2.34. Monodispers mıknatıs nanokristal üzerine homojen HA-DN'nin immobilizasyonu için sentetik süreç 34

Şekil 2.35. DNA'nın kimyasal, elektrostatik ve avidin-biyotin etkileşimiyle bağlanmasının şematik gösterimi..... 37

Şekil 2.36. Modifiye edilmiş SsDNA probu ile üretilen altın nanopartikül sentezinde yer alan adımların ve bu nanopartiküllerin farklı hedef DNA ile hibridizasyonlarının şematik gösterimi 38

Şekil 2.37. Tiyollenmiş DNA'nın proparjilaminle modifiye edilmiş yüzey üzerine foto-başlatılmış tiyol tepkimesi ile bağlanmasının şematik gösterimi..... 39

Şekil 2.38. Mikro-desenli poli(AHMA) fırçaların oluşturulması ve DNA hibridizasyonunda kullanımın basamaklı üretim sürecinin şematik gösterimi..... 40

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.39. DNA hibridizasyonlu poli(AHMA) mikro-desenli fırçaların 2D, 3D AFM görüntüleri 41

Şekil 2.40. Streptavidin-biotin etkileşimleri kullanarak DNA'ların yüzeye immobilizasyonu 42

Şekil 2.41. Streptavidin immobilize edilmiş poli(OEGA) fırçaların oluşturmanın basamaklı üretim sürecinin şematik gösterimi 43

Şekil 4.1. EHDA monomerinin FTIR spektrumu 52

Şekil 4.2. EHDA monomerinin ^{1}H-NMR spektrumu 52

Şekil 4.3. EHDAmonomerinin Si-APTES yüzeyine bağlanma mekanizmasının şematik gösterimi 54

Şekil 4.4. 2D-AFM görüntüleri (altta) ve 4 μL su damlacıklarının fotoğrafları (üstte).(a) Si-EHDA, (b) Si-poli(EHDA) ve (c) Si-poli(EHDA)-HA 55

Şekil 4.5. C1s kısmi taramalı XPS spektrumları (a) Si-EHDA, (b) Si-poli(EHDA) ve (c) Si-poli(EHDA)-HA 56

Şekil 4.6. GA-FT-IR spektrumları (a) Si-EHDA, (b) Si-poli(EHDA) ve (c) Si-poli (EHDA)-HA 57

Şekil 4.7. Grubbs III metatez katalisti 58

Şekil 4.8. Poli(EHDA)-HA fırçaların yüzeyde başlatılan ROMP ile sentezinin şematik gösterimi 59

Şekil 4.9. Farklı sürelerde a) 1 sa, b) 3 sa, c) 6 sa, d) 16 sa ve e) 24 sa hazırlanan poli(EHDA) fırçaların 2- ve 3-boyutlu AFM, yükseklik dağılım ve su damlacığı görüntüleri 61

Şekil 4.10. Farklı [katalizör]/[monomer] oranlarında sentezlenen poli(EHDA) fırçalarının 3- ve 2-boyutlu AFM ve su damlacıklarının görüntüleri 62

Şekil 4.11. Poli(EHDA)'nın GA-FTIR spektrumları, (a) Çözelti ortamında sentezlenen ve (b) [katalizör]/[monomer]=0,09, (c) [katalizör]/[monomer]=0,04, (d) [katalizör]/[monomer]=0,02, (e) [katalizör]/[monomer]=0,01 63

Şekil 4.12. Farklı [katalizör]/[monomer] oranında sentezlenen poli(EHDA)'nın farklı molekül ağırlıklarının GPC kromotogramları. ([katalizör]/ [monomer] oranları; a) 0,01, b) 0,02, c)0,04 ve d) 0,09 65

Şekil 4.13. Poli(EHDA)'nın ^{1}H-NMR spektrumu 65

Şekil 4.14. HA'nın molekül yapısı 67

Şekil 4.15. HA'nın hidrolizinden önce (a) ve sonra (b) GPC kromatogramları 67

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.16. Düşük mol kütleli HA'nın ^{1}H-NMR spektrumu 68

Şekil 4.17. Th-HA'nın ^{1}H-NMR spektrumu 69

Şekil 4.18. Si-poli(EHDA)-HA fırçaların GA-FTIR spektrumları. [katalizör]/ [monomer] oranları; a) 0,01, b) 0,02, c) 0,04 ve 0,09 70

Şekil 4.19. Si-poli(EHDA)-HA fırçaların 3- ve 2-boyutlu AFM ve su damlacığının görüntüleri [katalizör]/[monomer] oranları; a) 0,09, b) 0,04, c) 0,02 ve d)0,01 71

Şekil 4.20. Poli(EHDA) (a) ve poli(EHDA)-HA fırçaların SEM görüntüleri 72

Şekil 4.21. Poli(EHDA)-HA fırçalarının MTT test sonuçlarının gösterimi 74

Şekil 4.22. AFM ile uygulanan nanolitografi işleminin şematik gösterimi 75

Şekil 4.23. Nano desenlenmiş Si-EHDA yüzeyin 2D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri 76

Şekil 4.24. Nano desenlenmiş Si-EHDA yüzeyin 3D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri 76

Şekil 4.25. AFM nanolitografi yöntemiyle yüzey üzerinde yatay 3 çizgi çizimi üzerine dikey 3 çizgi çiziminin 2D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri 77

Şekil 4.26. AFM nanolitografi yöntemiyle yüzeyde yatay 3 çizgi çizimi üzerine dikey 3 çizgi çiziminin 3D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri 77

Şekil 4.27. AFM nanolitografi yöntemiyle yüzeyde yatay 3 çizgi çiziminin 3D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri 78

Şekil 4.28. AFM nanolitografi yöntemiyle yüzeyde yatay 3 çizgi çizimi çiziminin 3D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri 78

Şekil 4.29. AFM nanolitografi yöntemiyle Si-poli(EHDA) yüzeyinde 4 çizgi çiziminin AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri 79

Şekil 4.30. AFM nanolitografi yöntemiyle Si-poli(EHDA)-HA yüzeyinde 4 çizgi çiziminin AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri 80

Şekil 4.31. Poli(EHDA)-HA fırçalara tek zincir RNA probunun bağlanmasının şematik görünümü 83

Şekil 4.32. Farklı [katalizör]/[monomer] oranında a) 0,04, b) 0,02 hazırlanan poli (EHDA)-HA (siyah) ve poli(EHDA)-HA-prob RNA (Hoechst 33258 boyasının spektrumu) sistemlerinin floresans spektrumları 83

Şekil 4.33. Poli(EHDA)-HA-prob RNA yüzeyinin 2D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri 85

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.34. Poli(EHDA)-HA-prob RNA'nın yüzeyde hibridizasyonunun şematik görünümü 85

Şekil 4.35. İki farklı [katalizör]/[monomer] oranında a) 0,04, b) 0,02 hazırlanan poli(EHDA)-HA (siyah) poli(EHDA)-HA-probRNA (mavi), Poli(EHDA)-HA-probRNA-DNA (kırmızı) floresans spektrumları 86

Şekil 4.36. Poli(EHDA)-HA-probRNA-DNA yüzeyinin 2D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri 87

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 4.1. a) Kontrol Si-Poli(EHDA)-HA yüzeyine ait ve b) Poli(EHDA)-HA-prob RNA yüzeye ait 2-boyutlu konfokal mikroskobu görüntüleri 84

Resim 4.2. Poli(EHDA)-HA-probRNA-DNA sistemine ait konfokal mikroskobu görüntüsü 86

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
$\bar{M}_{n,GPC}$	GPC ile Belirlenen Polimerin Ortalama Mol Kütlesi
D	Aşılanma Noktaları Arasındaki Ortalama Uzaklık
h	Elipsometrik Kalınlık
N_A	Avogadro Sabiti
ρ	Yoğunluk
σ	Aşılanma Yoğunluğu (Zincir/nm^2)

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
APTES	(3-Aminopropil)Trietoksisilan
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDAC	1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)Karbodiimit
GPC	Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür
NHS	N- Hidroksisüksinimit
ROMP	Halka Açılma Metatez Polimerizasyonu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
XPS	X-Işınları Fotoelektron Spektroskopisi

1. GİRİŞ

Polimer fırçalar, genellikle bir katı substrat olan bir ara yüze bir zincir ucu ile bağlanmış olan polimer zincirlerinden oluşan ultra ince polimer kaplamalardır (Barbey, 2009). Polimer fırçalar ile yapılan yüzey modifikasyon çalışmaları, yüzeylerin kimyasal ve fiziksel özelliklerini istenilen şekilde değiştirebildikleri için oldukça dikkat çekici hale gelmiştir ve yüzey ve arayüz mühendisliğinde büyük ilerlemelere yol açmıştır (Zoppe, 2017). Yüzeylerin anlaşılması ve kontrol edilebilmesi optik ve elektronik malzemelerden (Braun, 2009; Ishii,1999), enerji depolamave üretimine (Bredas, 2009; Rolison, 2009), algılama ve biyosensör yapımına (Anker, 2008; Marx, 2003;), numune saflaştırılması ve analizine (Hennion, 1999; Svec, 1996), hücre kültürü ve doku rejenerasyonuna (Cole, 2009; Stevens, 2005), antibateriyel kaplamalara (Schierholz, 2001; Van Loosdrecht, 1990), kompozitlere (George, 2001; Judeinstein, 1996), katalistlere (Somorjai, 2006; Woll, 2007), gıda endüstrisine ve su arıtmasına (Guzey, 2006) kadar çok çeşitili uygulamalar için anahtar rol oynamıştır.

Polimer fırçaların, mikro ve nanometre ölçeğinde üretilerek, katı ve moleküler seviyede kontrol edilebilir bir fizikokimyasal özelliğe sahip olması, malzeme bilimi ve mühendisliğinin mikro ve nanoteknoloji alanlarında önemli bir ilgi görmesini sağlamıştır (Stuart, 2010).

Polimer fırçalar elde etmek için serbest-radikal polimerizasyonu (Hyun, 2001), atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) (Jones, 2002) ve halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP), (Liu, 2003; Weck, 1999) gibi yüzeyde başlatılan polimerizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu polimerizasyon yöntemleri arasında ROMP özellikle ilgi çekicidir, çünkü norbornenler ve sikloostenler gibi halka gerginliğine sahip monomerlerden türetilen, fonksiyonel grup içeren polimer fırçaların elde edildiği uygun ve verimli sentetik bir yöntemdir (Ivin, 1997; Trnka, 2001).

Yüzeyde oluşturulan polimer fırçalar ile biyomoleküllerin bu yüzeylere immobilize edilmesi çalışmaları oldukça önemlidir. Biyomoleküllerin yüzeylerdeki davranışını kontrol edebilen gelişmiş biyolojik aygıtlar, biyolojik olarak birçok problemin çözümlerini açıklamak için umut verici araçlardır ve tıbbi cihazlar ve teknolojiler açısından özellikle

ilgi çekicidir. Biyomoleküllerin özellikle DNA ve proteinlerin yüzeylere bağlanması bir biyoaygıtın yapılabilmesi için önemli araştırma alanı olarak karşımıza çıkmaktadır (Hook, 2009).

Son yıllarda, nitroksit aracılı polimerizasyon (NMP) (Andruzzi, 2005; Cimen, 2012; Cimen, 2013; Kobayaski, 2006; Matsuno, 2004; Zhao, 2006;), atom transferi radikal polimer polimerizasyonu (ATRP) (Demirci, 2010; Ejaz, 1998; Huang, 1997; Matyjaszwski, 1999; Turan, 2010), katılma-ayrılma zinciri transfer (RAFT) polimerizasyonu (Baum, 2002; Chen, 2006; Demirci, 2012; Gürbüz, 2011; Yu, 2004; Zhai, 2004) ve halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP) (Juang, 2001; Kim, 2000; Moon, 2002) gibi polimerizasyon yöntemleri çok yönlülük ve fonksiyonel grup uyumluluğu sağlamak için kullanılmaktadır. Bu polimerizasyon yöntemleri arasında, yüzeye başlatılan ROMP, halkasal olefinlerden polimer fırçalar üretmek için metatez katalizörlerinin varlığında gerçekleştirilir ve polimerizasyon sırasında korunan iki çift bağ nedeniyle diğer polimerizasyon yöntemlerinden farklılık gösterir. ROMP'nin yüksek sıcaklık gerektirmez ve ortam sıcaklığında minimum yan tepkimeler olur. Ayrıca, katı bir substrat yüzeyinde polimer zincirlerinin ucundaki çift bağlar tiyol-en-klik tepkimesi ile tiyol moleküllerinin birleştirilmesiyle polimer-biyopolimer konjugasyonları yapılabilir. Yüzeyde başlatılan ROMP vasıtasıyla polimer fırçaları sentezlemeye yönelik ilk girişimlerden biri, 2000 yılında Whitesides ve arkadaşları (Whitesides, 2000) tarafından rapor edildi ve katalitik bölgeler taşıyan silisyum substrat norbornen uçlu triklorosilan SAM'larıyla oluşturuldu. Grubbs-tipi ROMP katalizörü varlığında silisyum substrat kontrollü polimerizasyon koşulları altında yüksek film kalınlığa sahip polimer fırçalar oluşturmak için bir norbornen monomer çözeltisine yerleştirildi. Bu polimer fırçaların farklı bir monomer çözeltisine tabi tutulması, diblock kopolimer fırçaların oluşmasını sağladı. Grubbs ve arkadaşları da (Juang, 2001) monomer olarak norbornen kullanarak silisyum yüzeyinde polimer fırçalar sentezlemek için benzer bir yaklaşım uygulamıştır. Moon ve Swager (Moon, 2002), norbornen içeren bir *p*-fenil etiletilen makromonomeri kullanarak silisyum substrat yüzeyinde poli(*p*-fenil etiletilen) fırçaları sentezleyerek yüzeyde başlatılan ROMP çalışmalarına öncü katkılarda bulunmuşlardır. ROMP, diğer yaşayan polimerizasyon yöntemlerine kıyasla çift bağ fonksiyonelliklerine toleranslıdır ve zincir boyunca fonksiyonel polimerlerin oluşumuna izin verir. Monomer katı substrat yüzeyine oksijen atomu vasıtasıyla bağlanırsa, monomerdeki iki çift bağ serbesttir ve polimer zincirleri yüzeyde başlatılan ROMP'la bir yönde büyür ve doğrusal konjuge

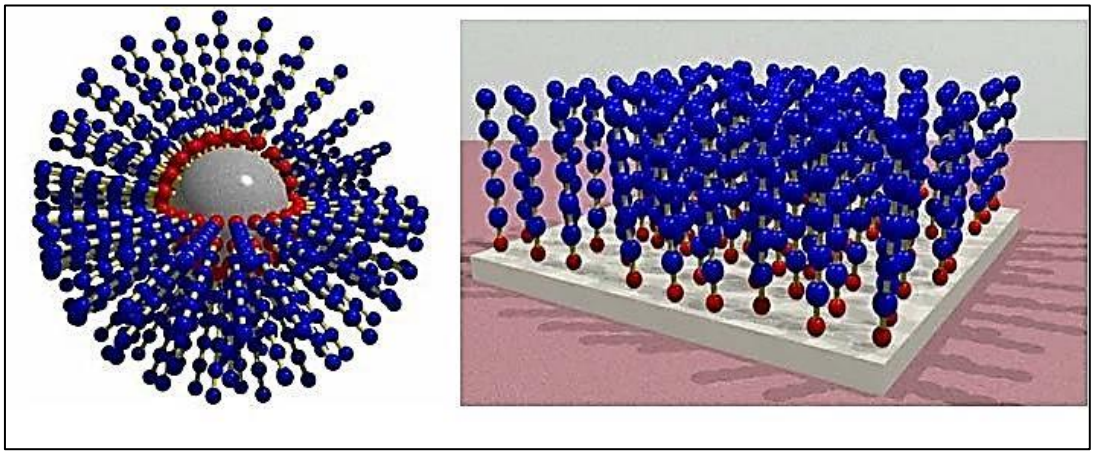
polimer fırçalar oluşur. Bu durumda polimer zincirlerindeki çift bağlar çeşitli fonksiyonel grupların veya biyomoleküllerin bağlanmasına da izin verilebilir. Bu nedenle bu çalışmada poli(ekzo-7-oksabisiklo [2.2.1] hept-5en-2,3-dikarboksilik anhidrit) [poli (EHDA)] fırçaları, yüzeyde başlatılan ROMP ile sentezlendi ve daha sonra bunlara tiyol-en klik tepkimesi ile hiyalüronik asit (HA) molekülleri bağlandı. Bu, ilk olarak biyofonksiyonel polimer fırçaların yüzeyde başlatılan ROMP ve tiyol-en klik tepkimesi kombinasyonu ile sentezlenmesi çalışmasıdır. HA, β1.3-1.4 glikozid bağları ile birbirine bağlanan *N*-asetil-glukoz amin ve *D*-glukronik asit zincirlerinden oluşur ve hücreler için önemli bir polisakarittir ve hücrelerdeki çevrenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Tokita, 1995). HA vücut içerisinde hücre çoğalmasına ve göçüne katkıda bulunur ve ayrıca tümör hücrelerinin büyümesinde rol oynayabilir. HA, tümör hücrelerinde gereğinden fazla üreyen hücre yüzeyindeki CCD44 reseptörüne seçici olarak bağlanabilir. Ayrıca, homojen HA kaplı yüzeyler gelişmiş biyouyumluluk sağlar ve kanser terapisinde aktif hedefleme için yüksek potansiyele sahip olabilir. Yüzeyde fonksiyonel gruplar arası tepkimeler ile hazırlanan HA kaplı yüzeylerle (Li, 2018; Xue, 2017) ilgili çalışmalar olmasına rağmen, yüzeyde başlatılmış ROMP ve tiyol-en klik tepkimesi kombinasyonu ile HA kaplı yüzeylerin hazırlanmasına ilişkin bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, hidroksil sonlandırılmış silisyum (Si-OH) yüzeyinde iyi tanımlanmış hiyalüronik asit aşılı poli(ekzo-7-oksabisiklo [2.2.1] hept-5-en-2,3-dikarboksilik anhidrit) [poli(EHDA)-HA] fırçaları yüzeyde başlatılan halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP) ve tiyol-in klik tepkimesi kombinasyonu ile hazırlandı. Daha sonra düşük mol kütleli tiyolize hiyalüronik asit (Th-HA) molekülleri tiyol-in klik tepkimesi ile poli(EHDA) zincirlerine bağlandı. Fırçaların biyouyumlu özelliği, (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) (MTT) sitotoksisite testi ile belirlendi. Poli(EHDA)-HA fırçalara önce tek iplikli RNA molekülleri bağlandı daha sonra eşlenik DNA probu ile hibridizasyonu yapıldı ve yüzey Floresans Spektrumu ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu ile incelendi. Sonuç olarak, poli(EHDA)-HA fırçalarının biyo-uyumlu özelliği, biyomoleküllerin yüzeylerdeki davranışını kontrol etmek için gelişmiş biyolojik cihazlar yapmak için yararlı bir aday olabilir.

2. KURAMSAL BİLGİLER

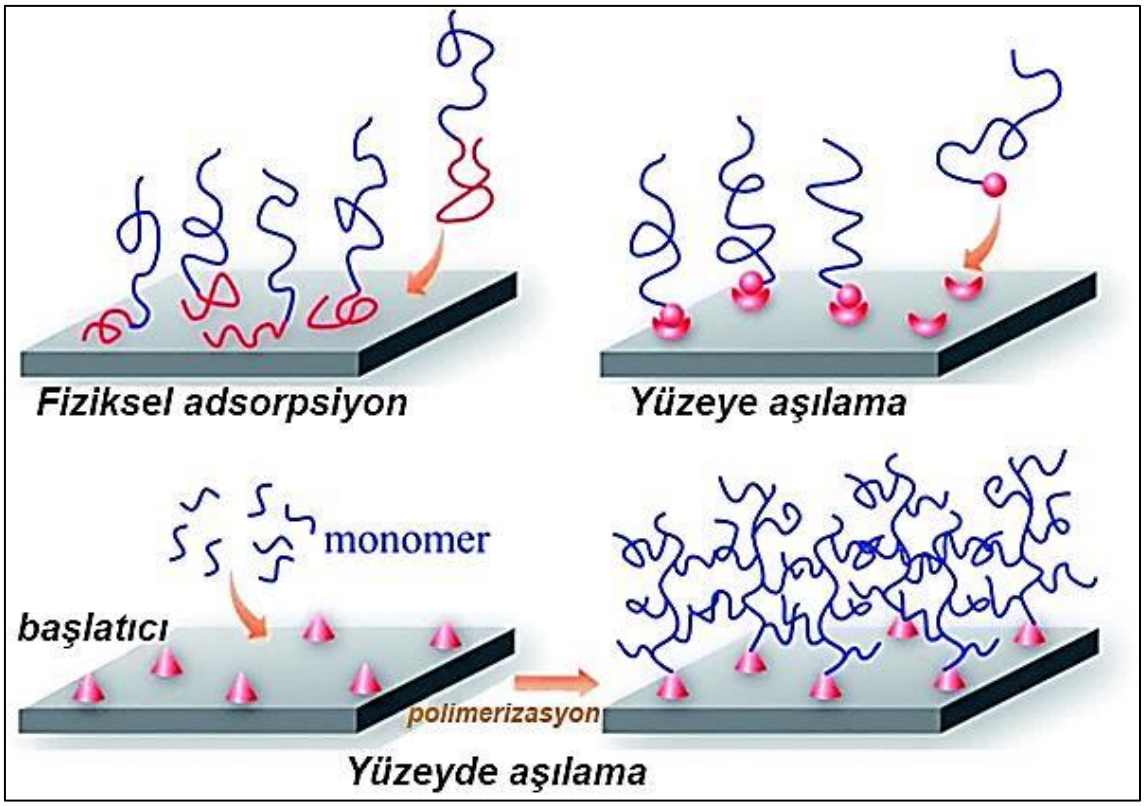
2.1. Polimer Fırçalar

Polimer fırçalar; yüzeylere kovalent olarak tutturulmuş polimer zincirlerinin oluşturduğu ince filmleridir (Şekil 2.1). Yeni karakterizasyon tekniklerinin gelişimi ile polimer fırçaların benzersiz özelliklerinin daha iyi anlaşılması sağlanmıştır. Polimer fırçalar, yüzey işlevsellikleri ve morfolojilerinin kontrol edilmesi sayesinde hücre tutunması, protein adsorpsiyonu, metal yüzeylerin kaplanması, sensörler ve yüzey ıslanabilirliklerinin ayarlanması gibi çok çeşitli uygulamalar için umut veren malzemelerdir.



Şekil 2.1. Polimer fırçaların şematik gösterimi : (a) Küresel partiküller üzerinde polimer fırçalar, (b) Yüzey (altın, cam, silisyum, mika vb.) üzerinde polimer fırçalar (Matyjaszwski, 1999)

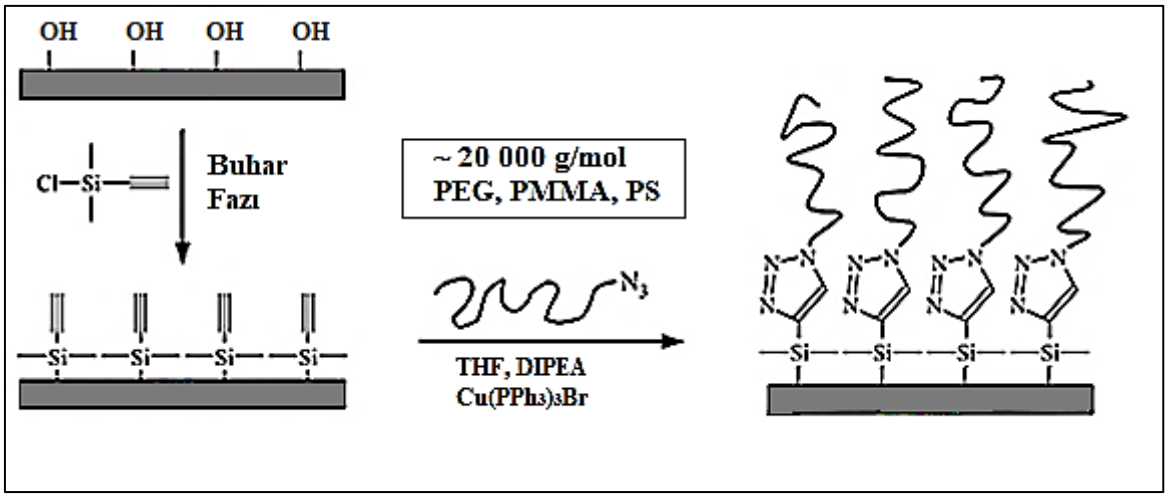
Polimer fırçalar fiziksel adsorpsiyon veya kovalent bağlanma yöntemiyle katı yüzeylere tutturulur (Şekil 2.2). Fiziksel adsorpsiyon yönteminde polimer zincirleri yüzeye Van der Waals etkileşimleri ile adsorplandığından ısıl ve çözücü etkisiyle yüzeyden kolayca ayrılabilirler (Ayres, 2010). Kovalent bağlanma yönteminde ise polimer zincirleri yüzeye kovalent bağlı olduğundan ısıl ve çözücü etkisine dayanıklıdır. Genel olarak kovalent bağlanma yönteminde polimer zincirleri yüzeye ya "yüzeye aşılama" (grafting to) ya da "yüzeyde aşılama" (grafting from) yöntemleri ile bağlanır (Li, 2014).



Şekil 2.2. Polimer fırça hazırlama yöntemlerinin şematik gösterimi (Li, 2014)

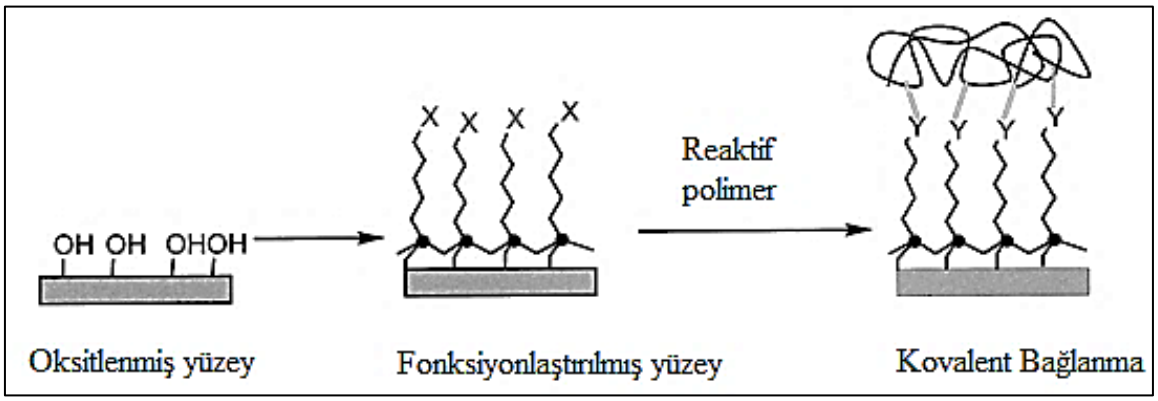
Yüzeye aşılama yöntemi: Daha önce sentezlenen fonksiyonel uç gruplu polimerler yüzeye kondenzasyon tepkimesi ile kimyasal bağlanır. Bu yöntemde polimer zincirlerinin sterik etkisi sebebiyle bağlanma yoğunluğu düşüktür.

Yüzeye aşılama yöntemiyle altın, cam, silisyum, mika gibi malzemelerin yüzeylerinin fonksiyonlaştırılması sağlanır. Ostaci ve arkadaşları klik kimyası yöntemini kullanarak silisyum yüzeyini ~20 000 g/mol mol kütlesine sahip polistiren (PS), poli(etilen oksit) (PEO) and poli(metilmetakrilat) (PMMA) polimerleri ile kaplamışlardır (Ostaci, 2008) (Şekil 2.3). Bu üç polimerin aşılanması ile yüzeye aşılama yaklaşımının çok yönlülüğünü gösteren özel fırçalar oluşturulmuştur.



Şekil 2.3. Polimer fırçaların klik kimyası yöntemiyle "Pasifize" silisyum yüzeylere aşılama yönteminin şematik gösterimi (Ostaci, 2008)

Polimer fırçaların kimyasal mikrosensörler olarak da kullanılabilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Yang ve çalışma arkadaşları kimyasal mikrosensör yapma amacıyla polimer zincirleriyle katı yüzeyinde ince bir film oluşturmuşlardır (Şekil 2.4).

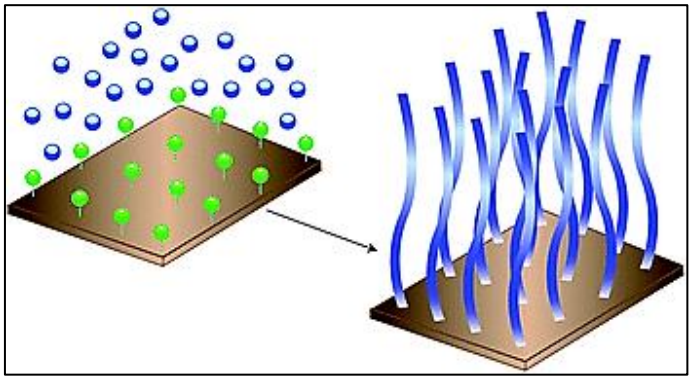


Şekil 2.4. Katı yüzeye ve polimer zincirlerinin kovalent bağlanmasının şematik gösterimi (Yang, 1998)

Polimerlerin silan ara bağlayıcı vasıtasıyla yüzeye kovalent bağlanmasıyla oluşturulan ince filmler yüksek homojenliğe, kararlılığa ve makul tekrarlanabilirliğe sahiptir. Bu tür polimer fırçalardan kararlı, homojen ve çok hassas ince film sensörler üretilmiştir (Yang, 1998).

Yüzeyde aşılama yöntemi

Yüzeyde aşılama yönteminde önce başlatıcılar yüzeye kovalent bağlanır daha sonra yüzeyde başlatılan polimerizasyon yöntemlerinden birisi kullanılarak polimer fırçalar sentezlenir (Şekil 2.5) (Zhao, 2000).



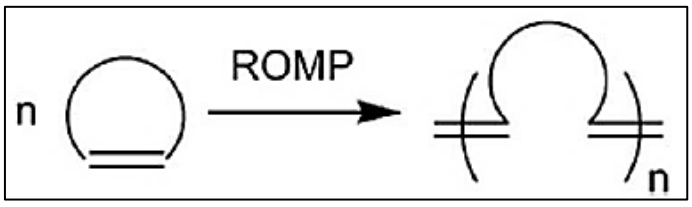
Şekil 2.5. Yüzeyde aşılama yönteminde yüzeye başlatıcının kovalent bağlanması ve polimer fırçaların oluşturulmasının şematik gösterimi (Ayres, 2010)

2.2. Halka Açılma Metatez Polimerizasyonu (ROMP)

2.2.1. ROMP mekanizması

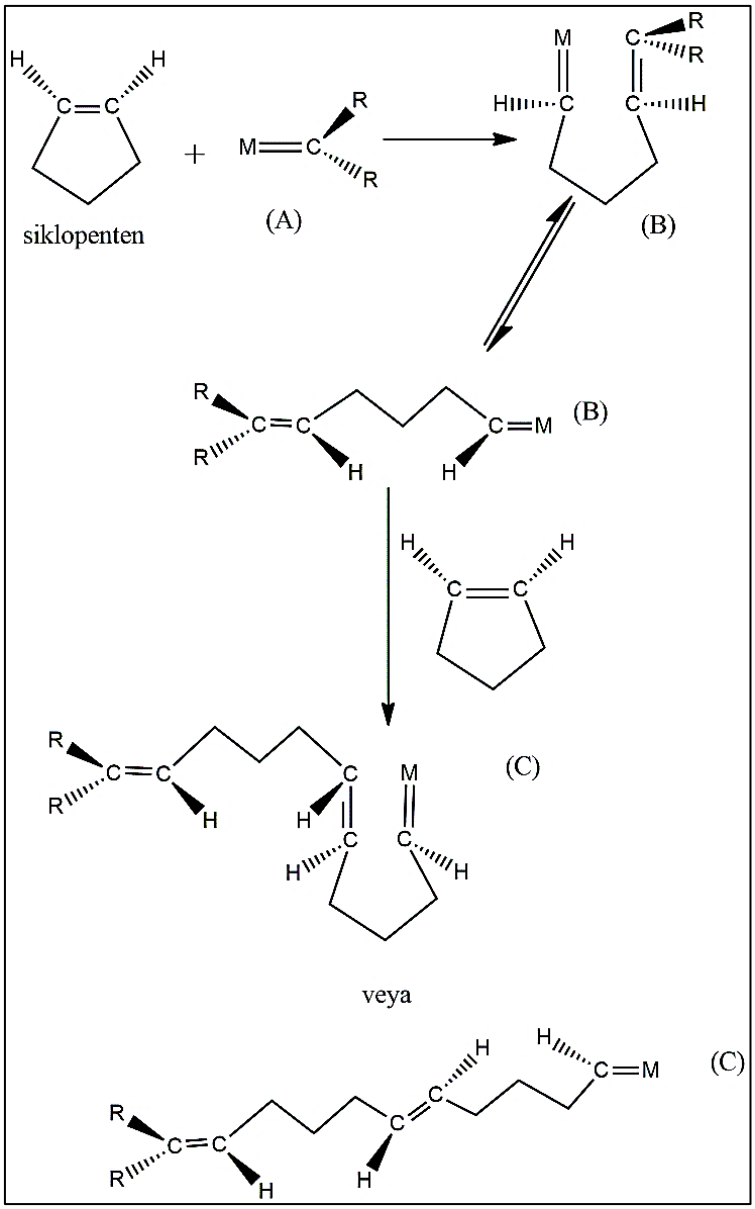
Metatez polimerizasyonu ile ilgili çalışmalar 1950 yılında başlamakla birlikte, bu yöntem 1970'li yılların sonlarında siklopentenin halka-açılma metatez polimerizasyonunun gerçekleşmesiyle ticari amaçlı üretimde uygulanmaya başlamıştır.

Halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP), halkasal olefin karışımının polimerik materyallere dönüştürüldüğü bir zincir polimerizasyon işlemidir. Şekil 2.6' da halka açılma metatez polimerizasyonunun şematik gösterimi verilmiştir (Baughman, 2005; Wagener, 1991).



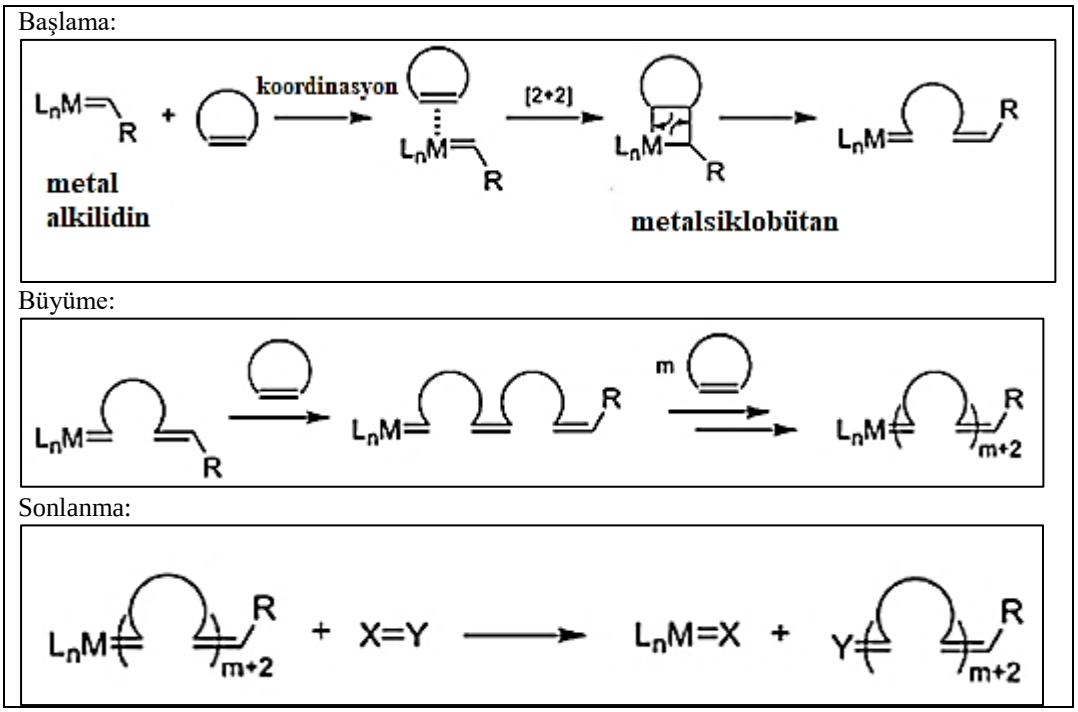
Şekil 2.6. ROMP'un genel gösterimi

ROMP'a örnek olarak Şekil 2.7'de siklopentenin polimerizasyon mekanizması gösterilmiştir. (A) Polimerizasyonu başlatmak için karbon çift bağına bağlanmış tungusten veya molibden gibi metaller kullanılır. (B) Katalizör ve siklopenten etkileşir ve bir ucunda karbon-karbon çift bağı, diğer ucunda karbon-metal çift bağı bulunan bir molekül oluşur. (C) İleri basamaklarda oluşan karbon-metal çift bağı diğer monomer molekülleriyle aynı şekilde etkileşerek zinciri büyütür. ROMP için kullanılan norbornen, siklopentenin halka-açılma metatez polimerleştirme basamaklarını gerçekleştirerek polinorbornene dönüşür. Endo-disiklopentadienin polimerizasyonunda ise ana zincir ile birlikte yan grubunda çift bağ bulunan poli(endo-disiklopentadien) polimeri sentezlenir. ROMP'un mekanizması eşsiz bir metal aracılı karbon-karbon çift bağ değişim işlemi olan olefin metatezine dayanır. Bu metatez polimerizasyonundaki en önemli özellik doymamışlığın polimere dönüştürüldüğünde de korunmasıdır. Böylece ROMP tipik olefin katılma polimerizasyonlardan ayrılır. (Örneğin; etilen-polietilen) ROMP için genel mekanizma Şekil 2.7' de gösterilen Chauvin 'in ilk önerisine dayanmaktadır (Calderon, 1972). Başlama basamağı halkasal olefin ile geçiş metali alkiliden kompleksinin koordinasyon yapmasıyla ile başlar. Daha sonra büyüyen polimer zincirinin başlangıcını etkili bir şekilde meydana getiren dört üyeli ara metalsiklobütan [2+2] siklo yapısı meydana gelir. Bu ara molekül yeni metal alkiliden oluşturmak için siklorevizyon tepkimesine uğramaktadır. Ortaya çıkan kompleks boyutu büyümesine rağmen (monomerlerin birleşmesinden dolayı), M, molibden veya Tungusten gibi bir geçiş metalini gösterir, başlatıcının halkasal olefinlere karşı aktifliği ile aynı aktiviteye sahiptir. Böylece benzer tepkimeler büyüme basamağında polimerizasyon sonuna kadar tekrar eder. Yani, tüm monomerlerin tükenmesiyle tepkime dengeye ulaşır veya tepkime sonlandırılarak polimerizasyon tamamlanır.



Şekil 2.7. Siklopentenin ROMP basamakları

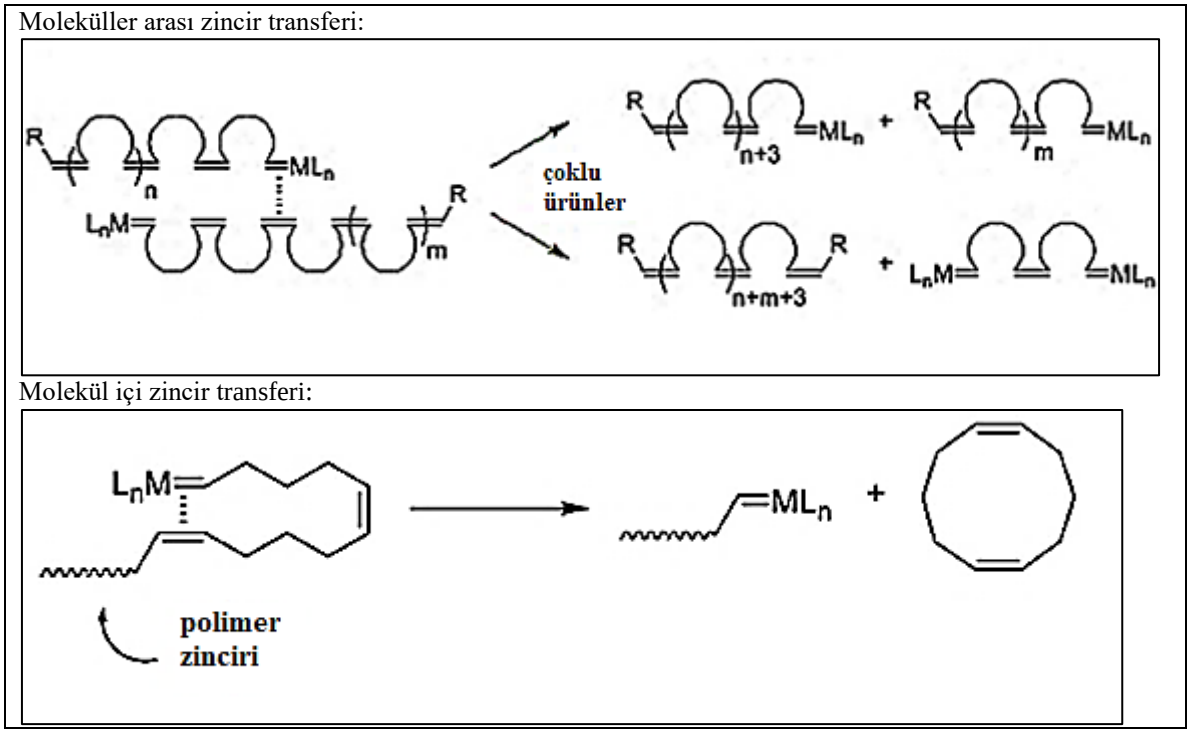
Yaşayan ROMP tepkimeleri genel olarak özel reaktiflerin dışarıdan tepkime ortamına eklenmesiyle sonlandırılır (Şekil 2.8). Bu reaktifin fonksiyonu; büyüyen zincirin sonundaki geçiş metalini kaldırması ve metalin yerine bilinen bir fonksiyonel grubun geçmesidir.



Şekil 2.8. Tipik bir ROMP tepkimesi mekanizması

Metal-aracılı ROMP tepkimeleriyle ilgili üç önemli nicelik vardır. İlk olarak, büyüyen polimer zincirlerindeki yayılan metal merkezleri, ya metalosiklobütan ya da metal alkilidin formunda yer alır. Bu fark tepkime koşullarından ziyade geçiş metallerine ve onlarla ilişkili ligantlara bağlıdır. İkinci olarak ROMP tepkimeleri de çoğu olefin metatez tepkimeleri gibi genellikle geri dönüşümlü tepkimelerdir. Bu sebeple Şekil 2.8'de gösterilen temel mekanizmadaki gibi ters yönlü de devam edebilir. Üçüncü olarak, çoğu ROMP tepkimeleri geri dönüşümlü olmasına rağmen, tepkimeler denge kontrollüdür ve denge pozisyonları (monomer-polimer) polimerizasyonun termodinamiği göz önüne alınarak tahmin edilebilir. ROMP tepkimeleri diğer halka açılma polimerizasyonları gibi halkasal olefinlerin halka gerginliğine bağlı olarak monomerden polimere dönüşümü sağlar. ROMP'da kullanılan monomerler belli bir gerginlik derecesine sahip (>20,9 kJ mol^{-1}) halkasal olefinlerdir. Bu olefinlere örnek olarak; siklobüten, siklopenten, cis-siklookten ve norbornen verilebilir (Benson, 1969). Olefinlerin içinde siklohekzen önemli bir istisnadır. Siklohekzen düşük halka gerginliğine sahip olduğu için bu halkasal olefin ROMP kullanılarak polimerleştirildiğinde çok az entalpik itici güce sahip olur. ROMP için halkasal olefinlere iyi bir örnek norbornenler verilebilir. Norbornen bileşiklerinin popüler olmasının sebebi, Diels-Alder tepkimeleri ile kolaylıkla elde edilebilme özellikleridir. Ayrıca, ROMP tepkimelerinde sıcaklık ve derişim güçlü bir etkiye sahiptir. Genellikle, başarılı ROMP tepkimeleri için en uygun koşullar mümkün olan en düşük sıcaklık en

yüksek monomer derişimidir. Şekil 2.8'de gösterilen genel ROMP mekanizmasına ek olarak (ve depolimerizasyon mekanizmasıyla ilgili) yukarıda belirtilen denge, moleküller arası zincir transferi ve molekül içi zincir transfer tepkimelerini ("geri-ısırma" (backbiting) diye de adlandırılır) içeren diğer metatez yollar ile de kurulabilir. Bu ikincil metatez tepkimelerinin örnekleri Şekil 2.9' da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. ROMP tepkimelerinde ikincil metatez (moleküller arası zincir transfer ve molekül içi zincir transfer) tepkimelerin örnekleri

Moleküller arası zincir transferi tepkimesinde son grubunda aktif metal alkiliden içeren bir polimer zinciri aynı tepkime kabında bulunan farklı bir polimer zincirinin herhangi bir olefin grubu ile tepkime verebilir. Toplam polimer zincir sayısı bu tepkimede aynı kalsa da polimerlerin mol kütlesi buna göre düşecek veya yükselecektir. Bir "molekül içi zincir transfer-geri-ısırma" tepkimesinde polimer zincirinin aktif uç grubu halkasal türler ve azalmış mol kütleli polimer zincirini serbest bırakmak için kendisiyle tepkime verir. Bu zincir transfer tepkimeleri sistemin mol kütlesi dağılımını (ya da polidispersitesini) etkili bir şekilde genişletir.

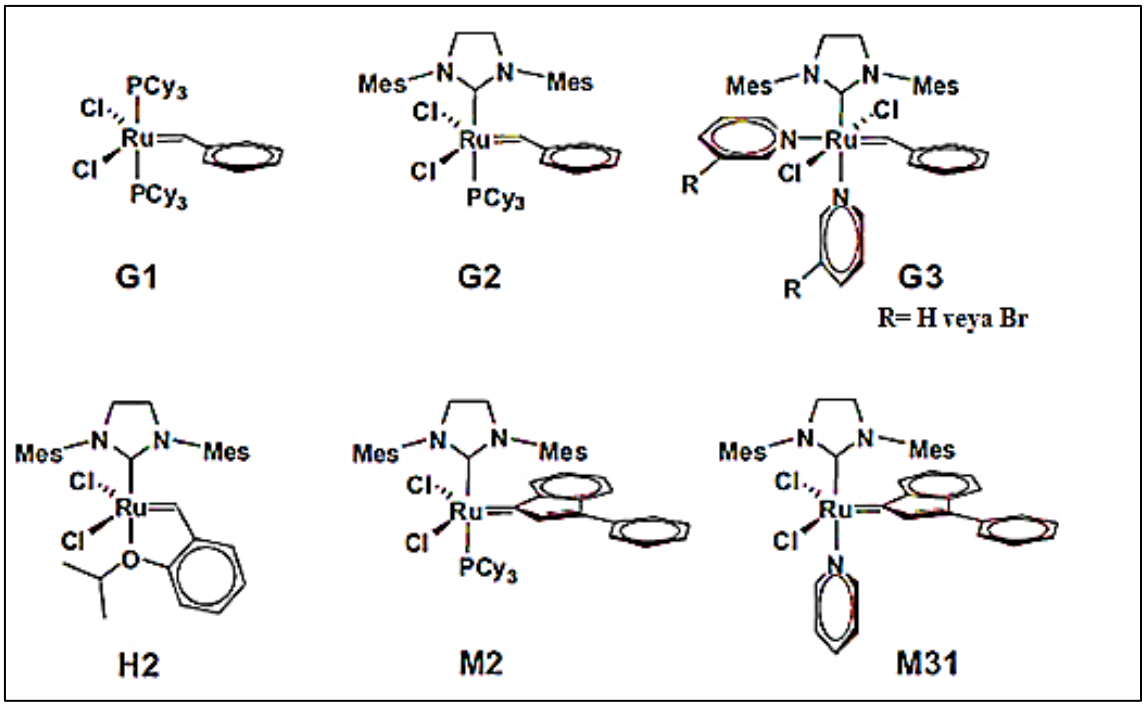
ROMP gibi denge kontrollü polimerizasyonların diğer bir sonucu halkasal oligomer oluşturma eğilimleridir. Jacobson-Stockmayer halka-zincir denge kuramına göre; halkasal oligomer oluşumu her zaman yüksek mol kütleli polimerin oluşumuna eşlik eder

(Bielawski, 2007; Jacobson, 1950). Mevcut halkasal türlerin toplam miktarı çözücü, polimer yapısının *cis*/*trans* oranı, monomerin halka gerginliği, tepkime süresi ve derişim gibi parametrelere bağlıdır. Halkasal türlerin oluşumunda yukarıda belirtilen kritik değerlere bağlılıkları ile yüksek sıcaklık ve düşük derişim tercih edilir.

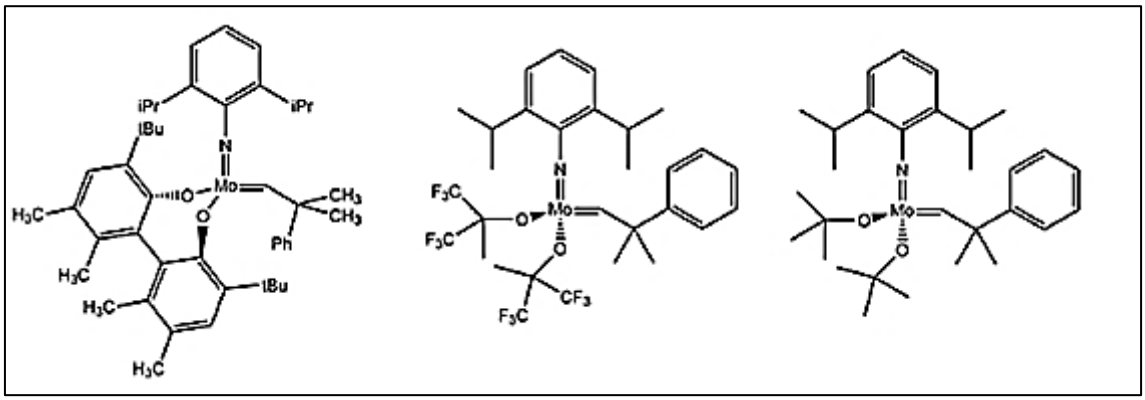
2.2.2. ROMP katalizörler

ROMP'daki gelişmeler; olefin metatezi için uygun fonksiyonel grup toleranslı, iyi tanımlanmış katalizörlerin geliştirilmesi çok sayıdaki araştırmacının büyük çabasına atfedilebilir. İlk katalizör sistemleri genellikle hava ve neme karşı aşırı hassas, karakterize edilmesi zor, sistematik olarak çalışması ve en iyi şekilde kullanımı neredeyse imkânsız olan heterojen karışımlardır. Olefin metatezinin tam verim ile kullanıma ulaşması için iyi tanımlanmış yapıdaki katalizörlerin gerekli olduğu hemen anlaşılmış ve üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Gold, 1958). Diğer olefin metatezi katalizörlerine kıyasla Grubbs' katalizörleri alkendeki diğer fonksiyonel grupları tolere ettiğinden, havaya karşı dayanıklı olduğundan ve geniş yelpazedeki çözücülerle uyumlu olduğundan özellikle tercih edilir (Trnka, 2001; Vougioukalakis, 2010). Bu katalizörlere onları ilk sentezleyen kimyager olan Robert H. Grubbs'ın ismi verilmiştir. Şekil 2.10' da çeşitli Grubbs katalizörleri de dahil olmak üzere Rutenyum esaslı katalizörler gösterilmektedir.

Şekil 2.11'de ise Chauvin, Grubbs ve Schrock'un halka açılma metatez polimerizasyonu için geliştirdikleri çeşitli "Schrock katalizörleri" gösterilmektedir. Yves Chauvin, Robert H. Grubbs ve Richard R. Schrock bugüne kadar yüksek etkili ve seçici olan bir çok katalizör buluşlarından dolayı 2005 yılında Nobel Ödülü almaya layık görülmüşlerdir (The Nobel Prize in Chemistry, 2005).



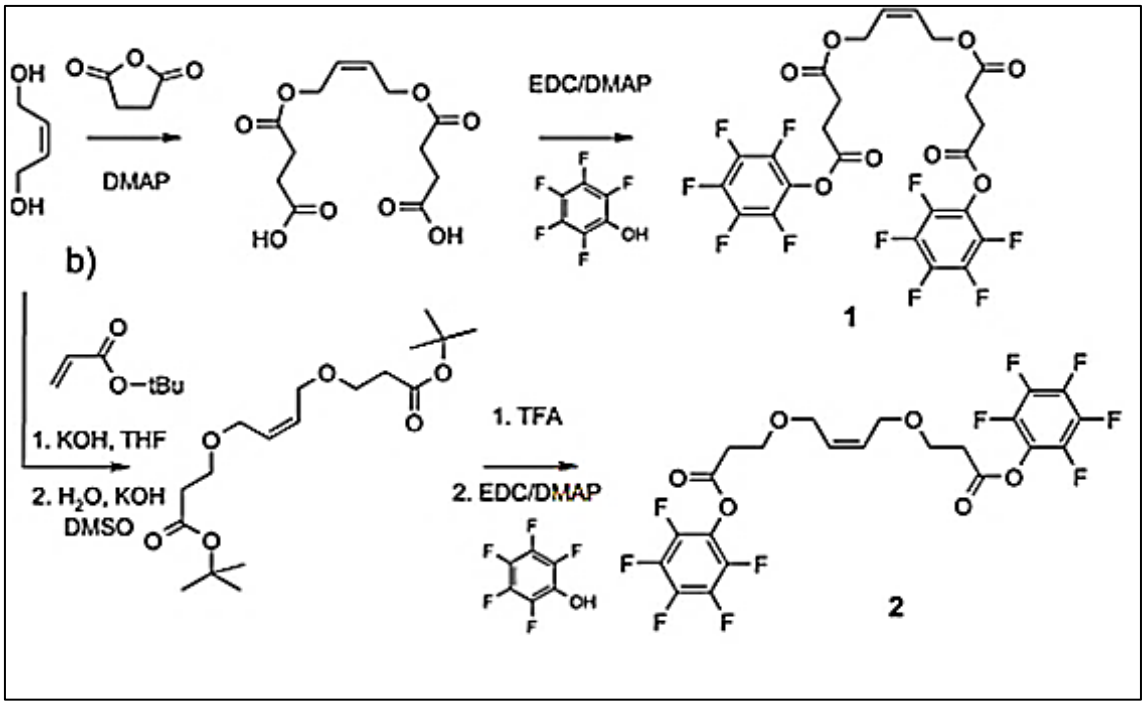
Şekil 2.10. Olefin ROMP'da kullanılan çeşitli Rutenyum esaslı katalizörler



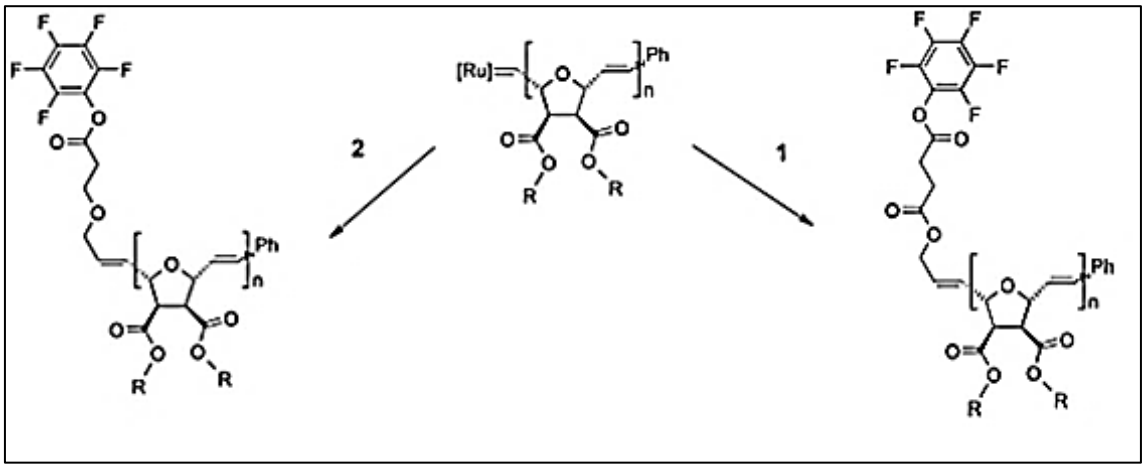
Şekil 2.11. Çeşitli Molibden esaslı Schrock katalizörleri

2.2.3. ROMP ile polimer fırça sentezi

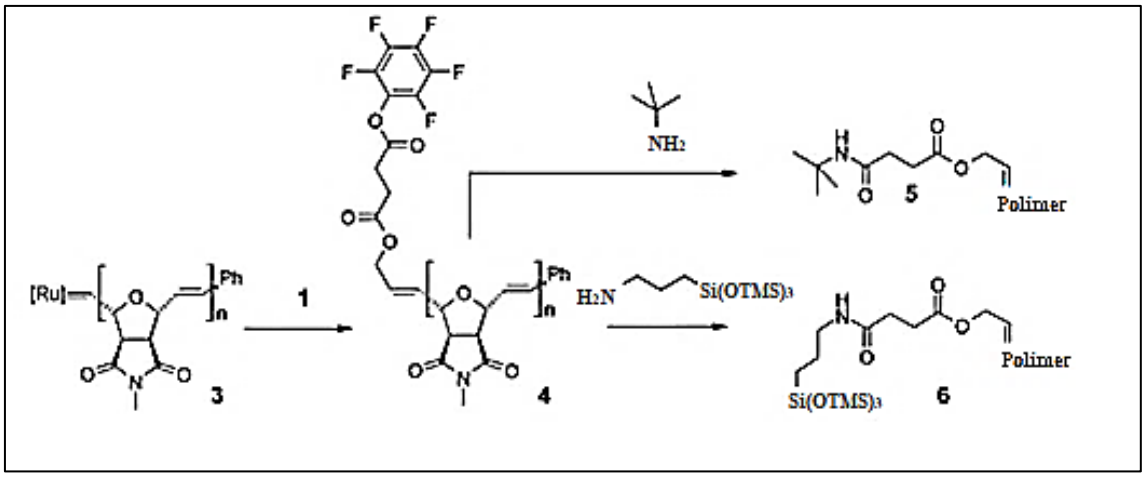
ROMP yöntemi ile katı yüzeylerde polimer fırçalar sentezlenmektedir. Madkour ve arkadaşları Grubbs'un üçüncü nesil katalizörünü kullanarak ROMP ile elde edilen polimer zincirlerini sonlandırmak için kullanılabilecek iki yeni alil bazlı sonlandırma ajanı sunmuşlardır (Şekil 2.12-14).



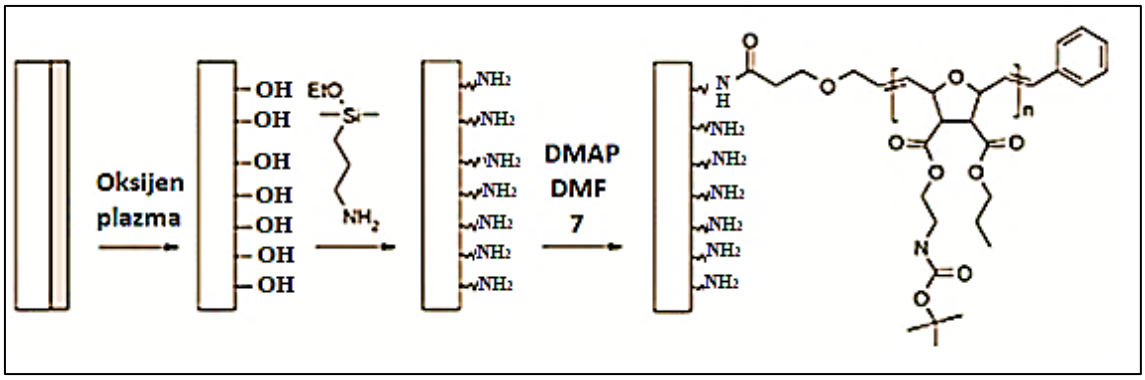
Şekil 2.12. Sonlandırıcı ajan molekülleri 1 ve 2'nin sentezi (Madkour,2010)



Şekil 2.13. Sonlandırma ajanları 1 (pentafloroalkil ester) ve 2 (pentafloroalileter) ile yaşayan ROMP polimerlerinin son gruplarının fonksiyonlaştırılması (Madkour,2010)

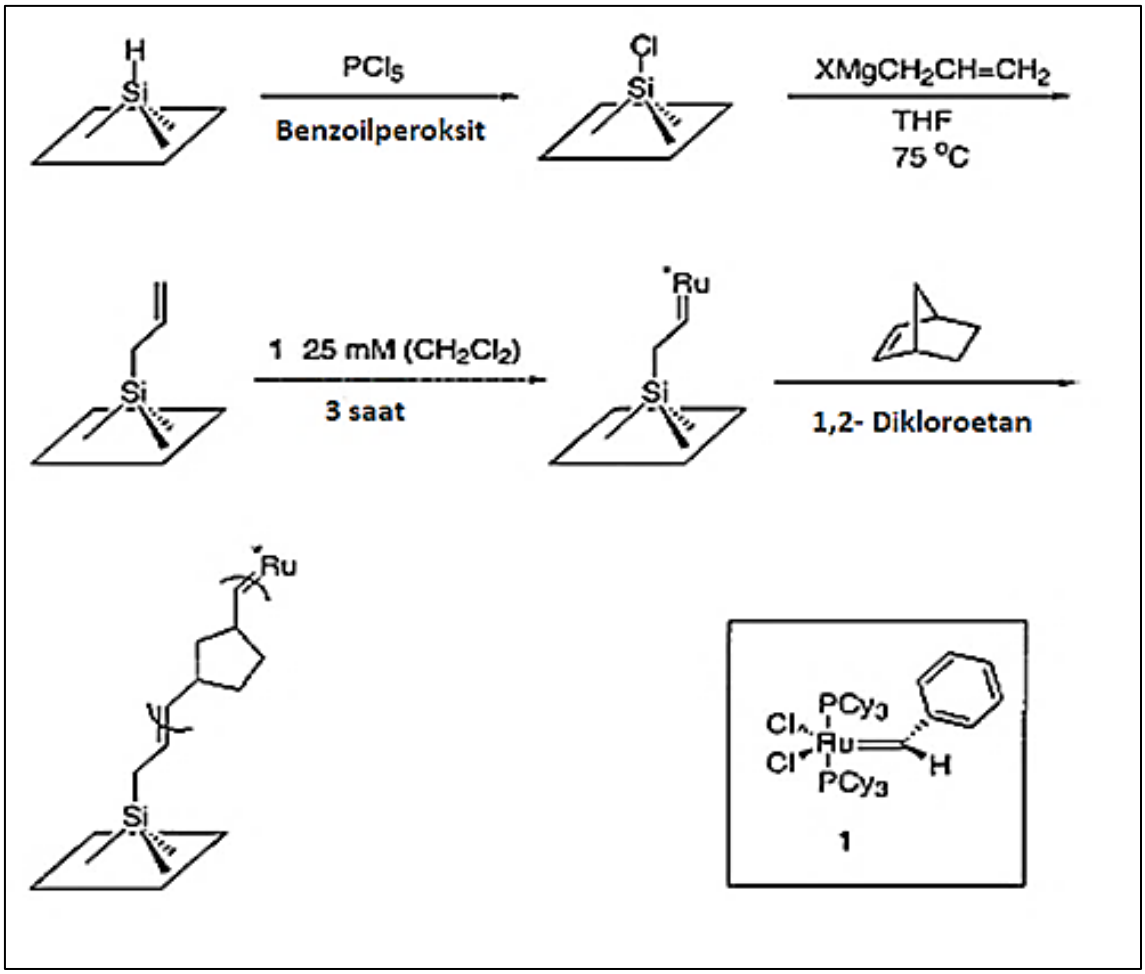


Şekil 2.14. Polimer 3 ve 4'ün polimer-analog tepkimeleri ve son gruplarının fonksiyonlaştırılması (Madkour,2010)



Şekil 2.15. Yüzey fonksiyonlaştırma basamakları (Madkour,2010)

Her iki sonlandırma ajanı kolaylıkla sentezlenebilir ve zincir ucunda kararlı, aktif ester gruplarına sahip ROMP polimerleri elde edilebilir (Şekil 2.15). Bu fonksiyonel uç grup içeren ROMP polimerleri özellikle biyomedikal alanda gelişmiş polimerik malzemeler için çekici yapı taşlarıdır. Bu uç gruplar kullanarak boya etiketleme ve aktif polimerlerin yüzeye bağlanmasıyla antimikrobiyal etki gösterdiği çalışmada vardır (Madkour,2010).



Şekil 2.16. Yüzey modifikasyon süreci (Juang, 2001)

Agnes Juang ve arkadaşları kristalin Si(111) yüzeyi üzerine tek düzen büyüyen kovalent bağlı polimerler sentezlemişlerdir. Bunun için önce H-sonlu silisyum yüzeyi klorlanıp daha sonra Gringnard tepkimelerinde kullanılan reaktif ile olefein ve klor yer değiştirmiştir. ROMP katalizörü olan Rutenyum olefein sonlu yüzey, monomer çözeltileri içerisine konularak polimer fırçalar sentezlenmiştir. Bu yöntem silisyum ve polimer arasında yüzeyi bozabilecek oksit tabakasının oluşmasını engellemiştir. Ayrıca polimer zincirinin büyümesi çözelti ortamında bulunan monomerin derişiminin değiştirilmesiyle kontrol edilmiştir. 0,9 nm ve 5500 nm arasında polimer film kalınlığı elde etmek için 0,01-2,44 M arası norbornen çözeltisi kullanılmıştır (Juang, 2001).

2.3. Tiyol-en Klik Kimyası

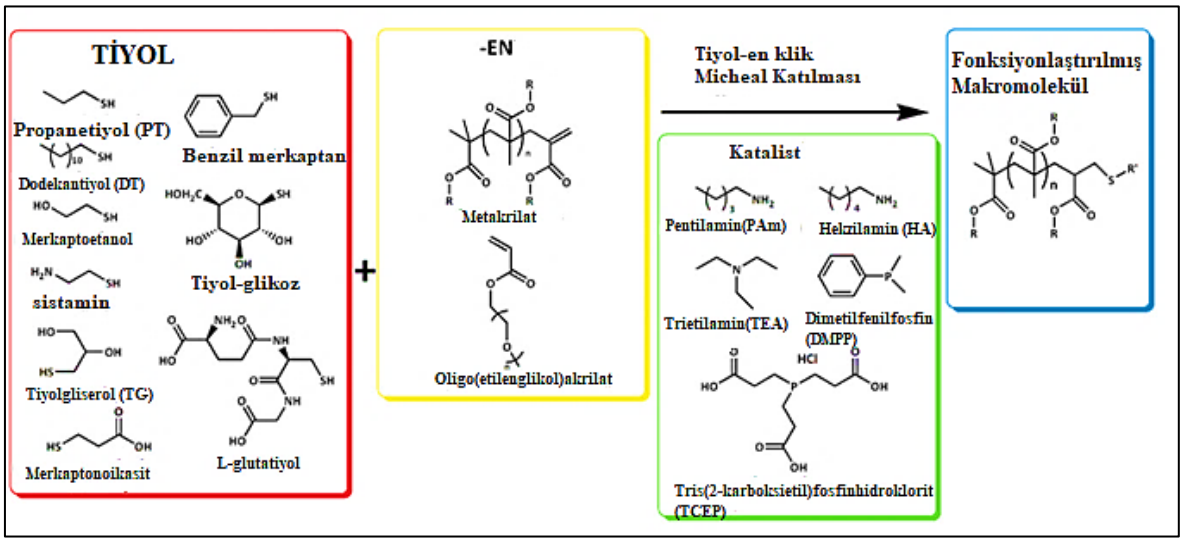
Tiyol-en tepkimesi son on yılda monomer ve polimer sentezi ve yüzey modifikasyonları için birçok uygulamalarda kullanılmıştır. Tiyol-en tepkimesi termodinamik özellikleri, çok

çeşitli reaktiflerinin olması, çözücülere karşı uyumlu olması, oksijene ve suya dayanıklı olması, ılımlı koşullar, bölgesel seçicilik gibi özelliklerinden ve tek basamakta gerçekleşmesi sebebiyle 'klik' tepkimesi olarak adlandırılmıştır (Desmet, 2017). Bu özelliklerinden dolayı Tiyol-en kimyası, yüksek performanslı polimerlerin sentezinden, optik, biyomedikal ve modifikasyon uygulamaları gibi geniş bir uygulama alanına sahiptir (Yu, 2013).

Tiyol-en klik tepkimesinin;

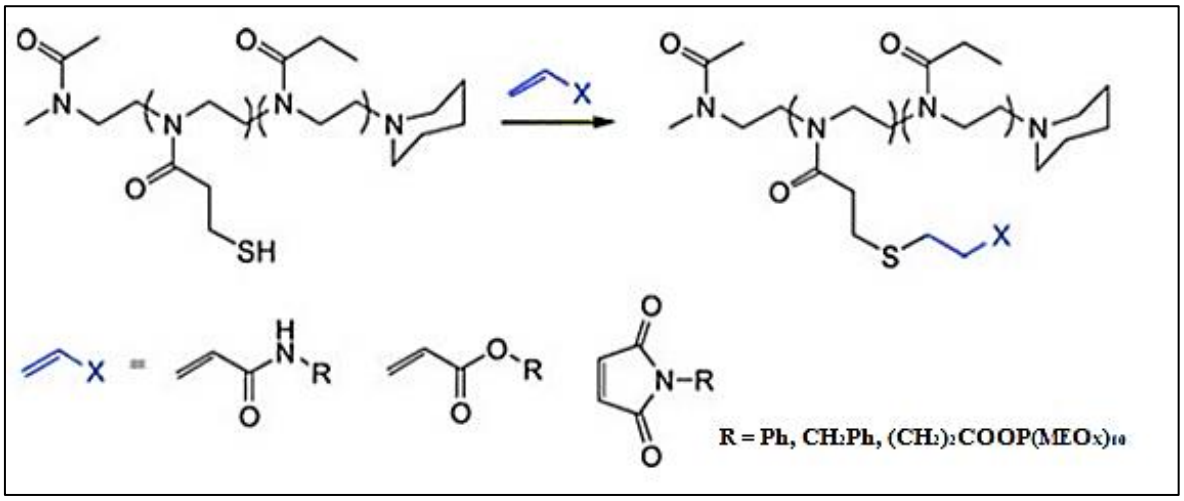
i. elektron bakımından zengin/fakir bir karbon-karbon çift bağına tiyolün radikalik katılması,
ii. elektron eksikliği olan bir karbon-karbon çift bağına tiyolün Michael katılması olmak üzere iki tipi vardır.

Michael katılma tepkimesinde C, N, O ve S atomları içeren nükleofiller ile α,β-doymamış keton, nitril, nitro ve ester bileşikleri gibi aktif olefin veya alkin grupları arasında konjuge katılmalar olur. Li ve arkadaşları farklı tiyol bileşiklerinin bazı metakrilatların dimerleri ve oligomerleri ile tepkimesi için birincil, üçüncül aminler ve fosfinler gibi farklı katalizörleri kullanarak tiyol esaslı Michael katılma tepkimesi gerçekleştirmişlerdir. Şekil 2.17'da kullandıkları kimyasallar şematik olarak gösterilmiştir (Li, 2010).



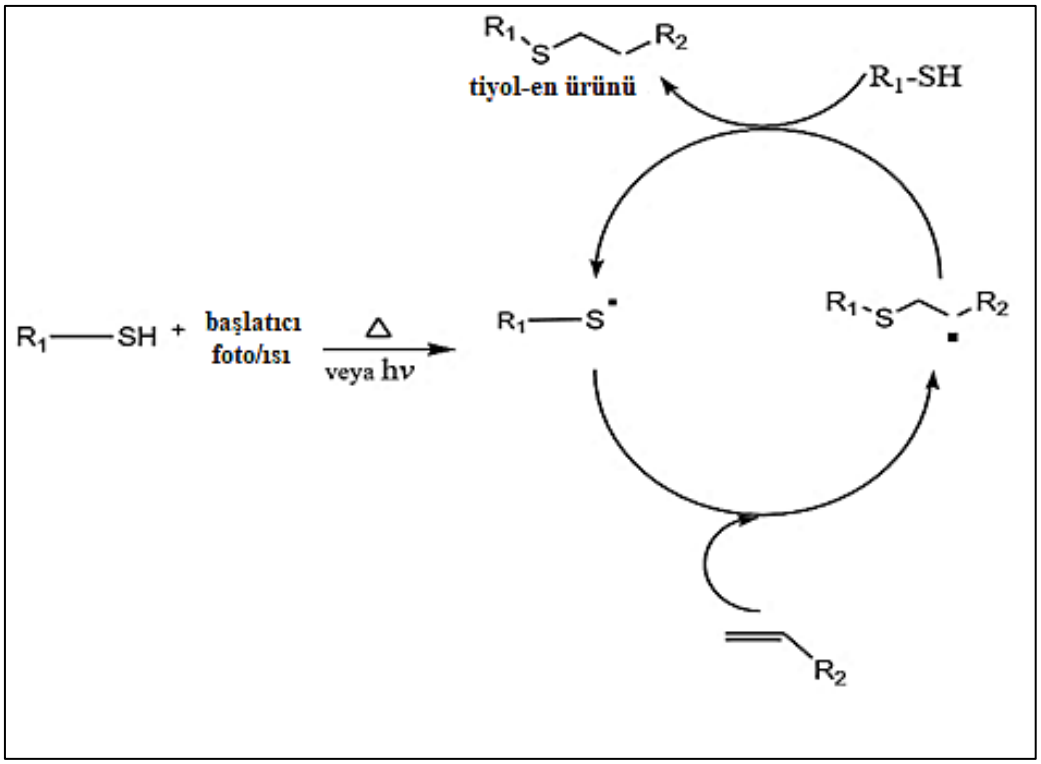
Şekil 2.17. Tiyol-en klik Michael katılma reaksiyonu için kullanlan tiyollerin, katalistlerin şematik gösterimi (Li, 2010)

Bir diğer çalışmada, Cesana ve çalışma arkadaşları. tiyol ile korunmuş bir oksazolin monomerinin, yani 2-[2-(4-metoksibenzilsülfanil)etil]-2-oksazolinin, kontrollü halka açılma metatez kopolimerizasyonu ile kopolimer sentezini gerçekleştirmişlerdir. Kantitatif korumanın kaldırılmasından sonra anisol ve tri-flüoroasetik asit karışımında serbest tiyol grupları yan zincir büyümesi ile kopolimerleri oluşumu için *N*-fenilasrilamit benzilmaleimit ile tepkimeye sokulmuştur. Ayrıca yeni aşı kopolimerler elde etmek için akrilik ve maleimit α-fonksiyonel poli (2-metil-2-oksazolin) sentezlemişlerdir (Şekil 2.18).



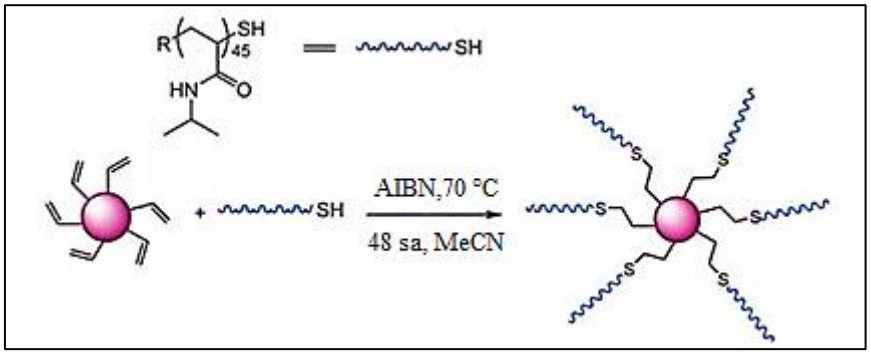
Şekil 2.18. Tiyol-Michael tepkimesi ile yan zinciri modifiye edilmiş poli(2-oksazolin)'lerin sentezi (Cesana,2007)

Radikalik tiyol-en tepkimeler fotokimyasal ya da ısıl etki ile yapılır. Tepkime mekanizması zincir transferinin başlama, büyüme ve sonlanma basamaklarından oluşmaktadır (Şekil 2.19). Önce ısı veya ışık etkisi ile S-H bağının kırılması ve tiyil radikalinin oluşmasıyla tepkime başlar. Büyüme basamağında tiyil radikalinin C=C bağına katılması ile oluşan karbon merkezli radikale ikinci bir tiyolün eklenmesi ve tiyol-en ürünü oluşturana kadar anti-Markovnikov yönlendirmeyle zincir transferi devam eder. Sonlanma basamağında ise karşılıklı radikal-radikal birleşmesi olur (Lowe, 2010).



Şekil 2.19. Radikal tiyol-en tepkime mekanizmasının şematik gösterimi (Lowe, 2010)

Radikalik tiyol-en yöntemi polimerizasyon yöntemleriyle birlikte kullanılarak fonkiyonel uçlu polimerler sentezlenmektedir. Bu kapsamda Goldmann ve arkadaşları hem tiyol-en hem de alkin-azid "klik" tepkimelerini kullanarak mikron boyutunda polidivinilbenzen (PDVB) partiküllerinin yüzey modifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Şekil 2.20' de RAFT polimerizasyonu ile sentezlenmiş S-H uçlu poli(*N*-izopropilakrilamit)'in PDVB mikro-kürelerinin yüzeyinde bulunan vinil gruplarına 70 °C'da ve AIBN' nin varlığında aşılanmasıyla PNIPAm45-PDVB nanoparçacıkları sentezi gösterilmiştir (Goldmann, 2009).



Şekil 2.20. PDVB nanopartiküllerinin radikalik tiyol-en yöntemi yüzey modifikasyonunun genel gösterimi (Goldmann, 2009)

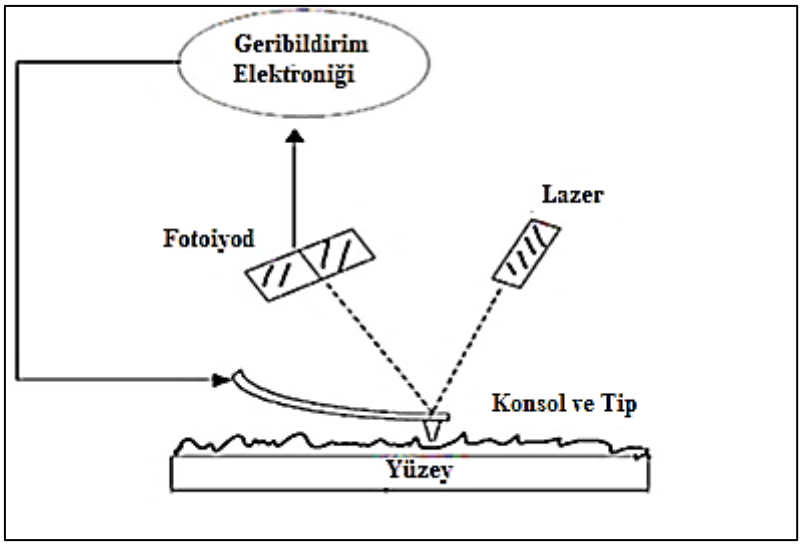
Tiyol-en klik tepkimelerinin hem radikalik hem de baz/nükleofilik formlarının makromoleküllerin sentezi için uygun bir konjugasyon aracı olduğu söylenebilir. Gelişmiş polimer malzeme sentezinde bu yöntemden yararlanmaya yönelik araştırmaların halen başlangıç aşamasında olduğu göz önüne alındığında, gerçek potansiyelinin henüz gerçekleşmemiş olması muhtemeldir (Lowe, 2010).

2.4. Nanolitografi

Mikro ve nanometre ölçeklerde katılar üzerine, moleküler düzeyde kontrol edilebilir bir fiziko-kimyasal özellikle polimer fırça sentezi, mikro ve nanoteknoloji, malzeme bilimi ve mühendislik gibi alanların odağı haline gelmiştir. Yüzeyde başlatılan polimerizasyondaki son gelişmelerle birlikte ışınlama (foto-girişim litografisi, elektron ışını litografisi), mekanik temas (tarama problu litografi, yumuşak litografi, nanobaskılama litografi) ve yüzey kuvvetlerine (kılcal kuvvetli litografi, kolloidal litografi, Langmuir-Blodgett litografi) dayalı olarak tüm uzunluk ölçeklerinde desenli polimer fırçaları oluşturmak mümkündür (Chen, 2012).

2.4.1. Atomik kuvvet mikroskopu (AFM) ve nanolitografi

Temas modunda kuvvet; yay sabiti ve konsolun Hooke kanununa göre yer değiştirmesiyle hesaplanabilir. Tipin yerinin değişmesi tipik olarak tipin arkasından bir konuma duyarlı fotodiyot detektörüne bir lazer ışınının saptırılmasıyla ölçülür. Sinyal bir geri besleme döngüsü aracılığıyla kuvvet sabit bir ayarda tutularak, eksenel doğrultu boyunca uzanan veya geri çekilen bir piezoelektrik kademeyi kontrol etmek için kullanılır. Tapping modunda, tip kendi rezonans frekansının yakınında sürülür. Uç ve yüzey arasındaki etkileşim kuvvetlerine bağlı olarak salınım kayması genliği ve faz frekansındaki değişimleri hesaplar. Uç ve yüzey arasındaki etkileşimin tipine bağlı olarak AFM, topografya, sürtünme, yük dağılımı, iş fonksiyonu, yerel manyetik alan, elektronik döndürmeler ve ısıl iletkenlik gibi materyallerin bir dizi fiziksel özelliklerini görüntüleyebilir. Kenar kuvvet mikroskopisi (LFM), elektrostatik kuvvet mikroskopisi (EFM) (Butt, 1991), Kelvin sonda kuvvet mikroskopisi (KPFM) (Nonnenmacher, 1991) manyetik kuvvet mikroskopisi (MFM) (Rugar, 1990) manyetik rezonans kuvvet mikroskopisi (MRFM) ve taramalı termal mikroskopi (SThM) (Majumdar, 1999) gibi AFM'nin birçok çeşidi bulunmaktadır.



Şekil 2.21. AFM'nin şematik gösterimi (Rosa,2009)

AFM günümüzde, görüntüleme aracı olarak, özellikle nanometre ölçeğinde, malzemenin doğrudan açıklanmasının ötesine geçmiştir (Hu, 1998). AFM'yi litografik bir araç olarak kullanmak için birçok başarılı girişim vardır. Böylece seçilen yüzeylerde ultra yüksek çözünürlüklü yüzey üretimi için bir yol sağlanmıştır. AFM nanolitografi, nano-izdüşüm ve dip-pen nanolitografisi üzerine yayınlanan ilk makalelerden başta özellikle 1997'de Xu (Xu, 1997) tarafından yayınlanan "eş zamanlı olarak nanokürecilik ve moleküllerin kendiliğinden yönlenmesi ile nanometre ölçeğinde üretim" ve 1999'da Dip Piner (Piner, 1999) tarafından yayınlanan "Dip-pen nanolitografi" uygulanarak on yıl içinde 850'yi aşkın makaleye yol açarak oldukça popüler olduğunu kanıtlanmıştır. Bu süre içinde, birkaç nanometreden yüz nanometreye kadar değişen özelliklere sahip nanoyapıların üretimi ve küçük organik moleküller, polimerler, nanopartiküller, büyük biyomoleküller ve inorganik malzemeler gibi metallerin veya yalıtkan yüzeylerde çeşitli maddelerin biriktirilmesi için AFM nanolitografi geliştirilmiştir.

AFM nanolitografisi, bir substratın nano-ölçekteki bir bölgesinde bir AFM ucuyla doğrudan yazma tekniği olarak da kullanılabilir. AFM nanolitografisi, nanofabrikasyon yetenekleri nedeniyle, moleküler elektronikler, biyomoleküler diziler, biyosensörler ve yumuşak organik yapıda geliştirilmiş uygulamalara sahip çeşitli ortam koşullarında gerçekleştirilebilen bir yöntemdir, ayrıca burada ortam suyunun varlığı madde aktarımında ve DNA ve proteinler gibi biyomoleküllerin korunmasında rol oynamaktadır (Liu, 2002). Ortam koşullarının yanı sıra, AFM nanolitografisini gerçekleştirmek için tip-substrat sistemini organik çözücüler, su veya tamponlar gibi sıvılar içine daldırmak suretiyle

modifiye edilebilir. AFM nanolitografi çeşitli araştırmalar için başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Iwanaga, 2005). Örneğin, inorganik, organik veya biyolojik materyal içinde iki boyutlu modeller yapmak, DNA hibridizasyonunu nano ölçekte tespit etmek, novo proteinleri altın yüzeylere immobilize etmek, üç boyutlu yüzeysel biyolojik kompleksleri kurmak, nanoskopik elastikiyet araştırmak, sürtünme ve organik ince filmlerin güç modülasyonunu mekanik olarak cevaplamak için kullanılmıştır. Ayrıca, AFM tiplerinin şeklini karakterize etmek ve nanograftaj koşulları altında tiyollerin kinetiklerini ölçmek için de kullanılmıştır.

AFM nanolitografisi basit bir nanofabrikasyon tekniğidir (Liu, 2000). Ancak temel fiziki mekanizmalar prosesi hala tartışmalıdır. Bu gibi komplikasyonların temel nedenleri, nanofabrikasyon için kullanılan maddelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, yüzey bileşimi, su menisküs oluşumu, uç malzemesi ve şekli, temas alanı, uçtaki sürtünmeden kaynaklanan ısı transferi, sıcaklık, tarama hızları ve konsol-yüzey arasında uygulanan kuvvetler ile ilgilidir (Park, 2004). Oluşan tip-yüzey menisküs ya hidrofobik-hidrofilik bir alt tabaka ya da çevre bağıl nemi tarafından etkilenir. Dolayısıyla menisküs boyutunun ve şeklinin değiştirilmesi malzemenin alt tabakaya aktarım hızını değiştirir. Tipten yüzeye malzeme transferinin genel bir resmi de tartışılmıştır. Çeşitli incelemelerden anlaşılacağı gibi, sıvı menisküs köprüsü oluşumu, özellikle daldırma kalemi nanolitografisinde, tipten materyal transferini hızlandırırken, AFM nanolitografide nano-aşılama gibi diğer yöntemler için sıvılara daldırılmış olarak gerçekleştirildiğinde, nanoyapı büyüklüğündeki bölgeye malzeme transfer mekanizmasında difüzyonun baskın olduğu açıktır.

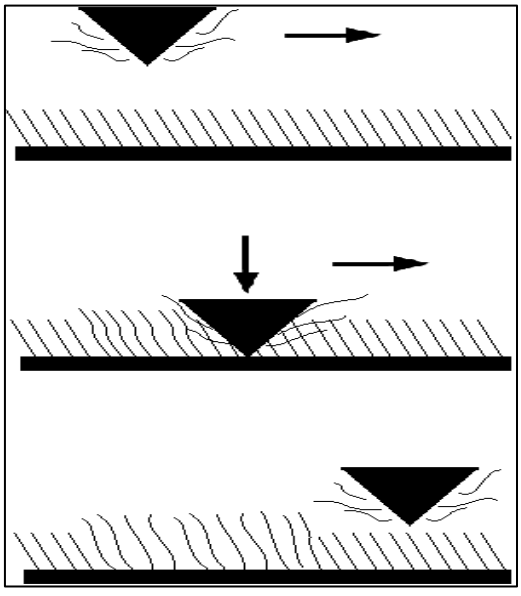
AFM nanolitografi düzeneği

AFM ana bileşeni, örnek yüzeyini taramak için kullanılan, genellikle 10-20 nm'lik ortalama uç çapına ve keskin bir uca sahip bir tiptir; Şekil 2.21. AFM tipi tipik olarak silisyumdur veya silisyum nitrürdür. Uç bir numune yüzeyinin yakınına getirildiğinde, uç ve numune arasındaki kuvvetler, Hooke yasasına göre konsolda bir sapmaya yol açar. Örnek görüntüsü tipik olarak konsol üst yüzeyinden fotodiyot dizisine doğru bir lazer noktasının saptırılmasıyla üretilir. AFM, uygulamaya bağlı olarak bir dizi modda çalıştırılabilir. Genel olarak, olası görüntüleme modları statik (temas) modlarına ve konsolun titreştiği çeşitli dinamik veya temassız modlara ayrılır. Nano-yapı ve görüntüleme genellikle aynı AFM ve uç kullanılarak gerçekleştirilir.

AFM nanolitografi: 'yazmanın' farklı yolları

Dip-pen nanolitografi

Mirkin ve arkadaşları tarafından 1999'da yayınlanan ilk yayından beri, dip-pen nanolitografisi (DPN) en popüler AFM nanolitografi tekniklerinden biri olmuştur. Burada başlangıçta uç üzerindeki malzemeler statik veya dinamik modda tarama yaparken yüzeye aktarılır (Şekil 2.22). DPN aslında kalemle yazma kavramının nano ölçeğe nakledilmesidir. Bu yöntemde, AFM probu 'mürekkep' kaynağı olarak işlev görür. DPN çeşitli 'mürekkep-altlık' kombinasyonları ile başarıyla uygulanır. DPN için kullanılan mürekkepler, küçük organik moleküllerden büyük organik ve biyolojik polimerlere ve koloidal parçacıklara kadar değişirken, substratlar çeşitli yüzeylere adsorbe edilen metaller, yarı iletkenler, yalıtkanlar veya çeşitli işlevsel tek tabaka olabilirler. Yüksek erime noktalı mürekkep malzemeleri için, ısıtılmış bir uç, moleküllerin hareketliliğini arttırmak için kullanılabilir. Aktarılan moleküller substrat üzerine fiziksel olarak adsorbe edebilir veya yüzey türleri ile tepkimeye girerek kimyasal bağlar oluşturabilir (Ginger, 2004).



Şekil 2.22. Dip-pen nanolitografisinin şematik gösterimi (Ginger, 2004)

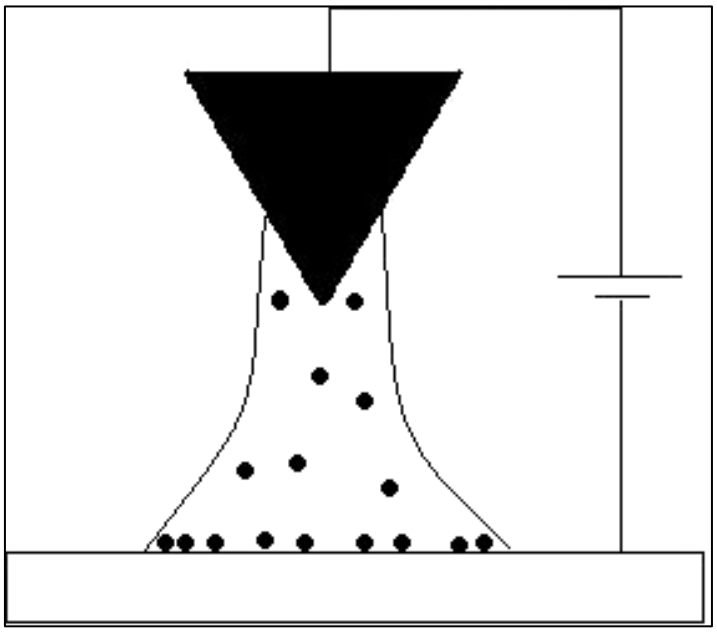
Elektrokimyasal AFM nanolitografi

AFM probu ve substrat arasındaki elektriksel bir sapma, temas bölgesinde yüzey türleri üzerinde redoks tepkimelerine neden olabilir (Şekil 2.23). Silisyum, bor, elmas, tungsten,

tungstenli karbür ve altın veya platin kaplı silisyum nitrür gibi çeşitli malzemelerden yapılmış iletken uçlar bu deneylerde kullanılabilir. İkili yan oksidasyon tepkimesi ile genel tepkime şemasının aşağıdaki gibi özetlenebildiği gibi bir dizi metal ve yarı iletkenlere uygulanmıştır.

$$M + xH_2O \rightarrow MO_x + 2xH^+ + 2xe^- \quad (3)$$
$$2H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^- \quad (4)$$
$$2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2OH^- \quad (5)$$

Burada substrat yüzeyinde anodik tepkimeler (denklem (3)) ve (denklem (4)) oluşur ve uçta katodik tepkime (denklem (5)) oluşur. Örneğin, bir silisyum levha üzerinde bir 18-nonadeseniltriklorosilan (NTS) mono tabakanın terminal vinilik grupları veya oktadesiltriklorosilanın (OTS) metil grupları, uygulanan ön gerilimli bir iletken AFM ucu ile karboksilik asit gruplarına yükseltgenebilir. Tepkime alanı daha sonra yanal kuvvet mikroskobu (LFM) ile görüntülenerek veya elde edilen karboksil grubunu üstte ikinci bir tek tabaka ile birleştirerek teyit edilebilir. LFM uyarınca, oksitlenmiş bölge herhangi bir topografik kontrast göstermez, ancak sürtünme sinyalinde bir artış, yerel yüzey polaritesindeki değişikliklerden dolayı gözlemlenebilir. Başka bir yaklaşımda, elektrik potansiyeli önce ucu üzerindeki fonksiyonel kaplamada kimyasal tepkime başlatır ve bu da yüzey üzerinde bir sonraki tepkimeyi tetikler ve litografi işlemini tamamlar.



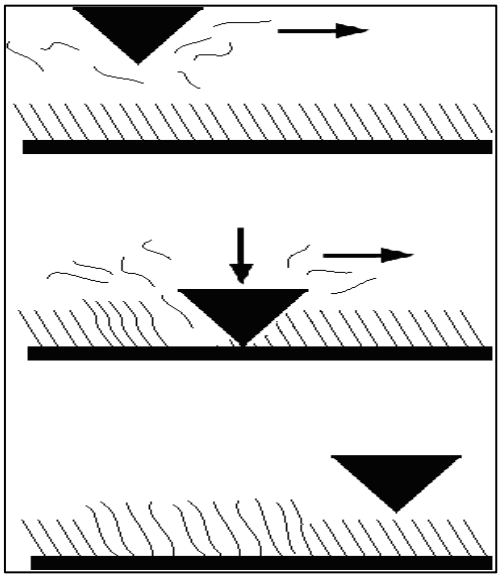
Şekil 2.23. Elektrokimyasal AFM nanolitografinin şematik gösterimi (Mart´ın, 2005)

Isıl AFM nanolitografisi

Isıl desenlendirme, üzerinde bir lazer ışını odaklanarak veya bir dirençli ısıtıcının kantilevir içine entegre edilerek gerçekleştirilebilen, ısıtılmış bir uç gerektirir. Bir poli(metil metakrilat) (PMMA) filmi ile temas halinde olan ısıtılmış bir uç, yumuşama noktasından daha yüksek bir sıcaklığa eriştiğinde, ucu şekli olan bir filmde girinti oluşur. Desen hızı ve okuma hızı, çok uçlu sistemlerin geliştirilmesiyle önemli ölçüde arttırılabilir (Mart´ın, 2005).

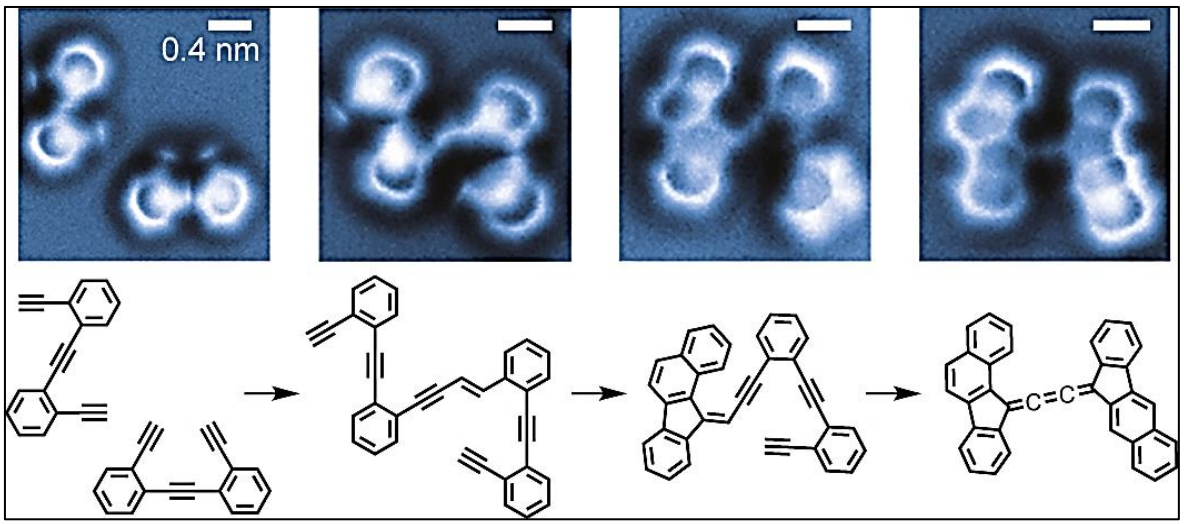
Nanoaşılama

Nanoaşılama (Şekil 2.24), yüzeylerde nanoyapıların oluşumu için bir AFM nanolitografi tekniğidir. Nanoaşılama, iki önemli aşamada gerçekleştiği şeklinde tanımlanabilir. Birinci aşama, ince bir filmin nanometre-ölçekli seçilmiş bölümlerinin yer değiştirmesinin (çoğunlukla, Au(111) üzerindeki tiyollerin SAM katmanlarını kullanarak) dikkatle seçilmiş bir kuvvetin uygulanmasıyla gerçekleştirildiği nano-tıraşı'ı içerir. Çözünmüş moleküller uç yüzey temas bölgesinden atılır, çünkü moleküllerin etanol veya bütanol gibi bir çözücü içindeki çözünürlüğü yeterince yüksektir. Nanoaşılama ardından, çözeltiden yeni elde edilen açık nanoyapı, yüzeye hızlı kendi kendine montajı veya birikimi gerçekleştirilen ve yeni bir tek tabakanın yeniden yapılandırılmasına yol açan ikinci bir adım izlenir. Deneysel nano-aşı oluşturma teknikleri son yıllarda önemli ölçüde ilerlemiş ve nano elektron cihazları, protein desenlendirme ve biyosensörler için nano-aşı uygulamaları yapılmıştır.



Şekil 2.24. Nanograftingin şematik gösterimi (Mart´ın, 2005)

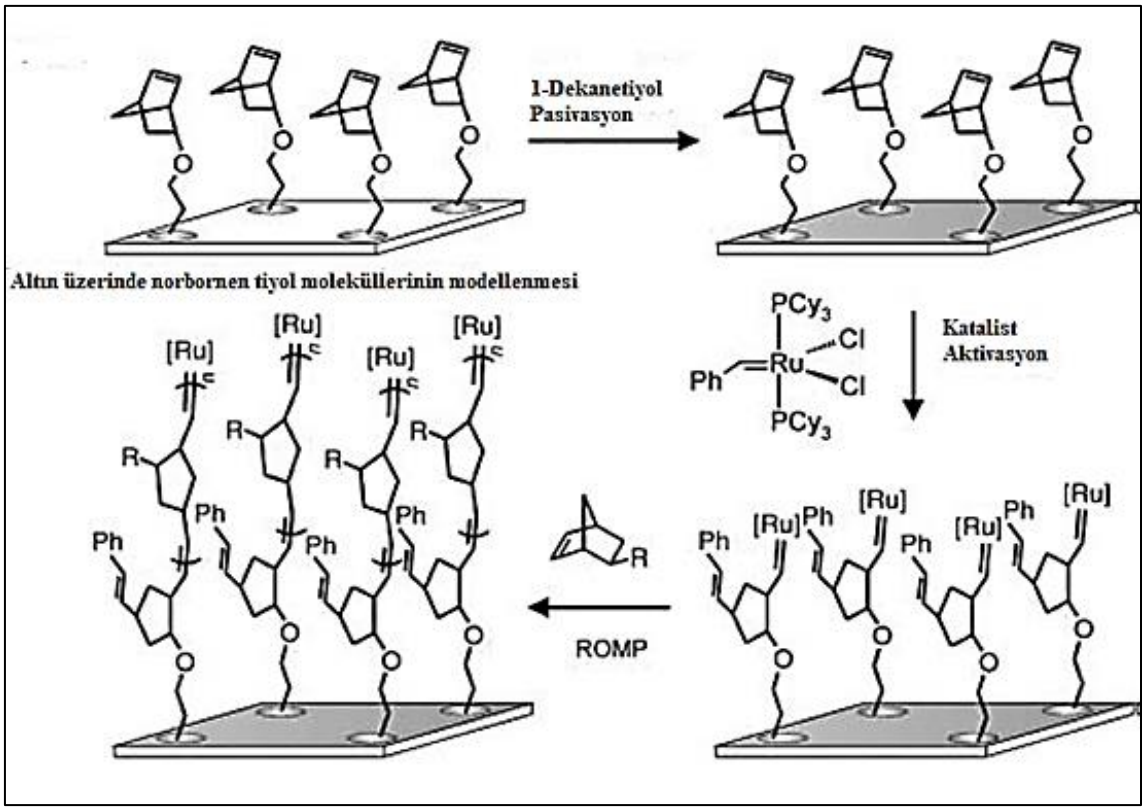
Aşağıdaki fotoğrafta University of California bilim insanlarının yaptığı çalışma sonucunda elde edilen ve bazı bileşiklerin tepkime öncesi ve sonrasındaki hallerini gösteren AFM görüntüleri verilmiştir (Riss, 2016).



Şekil 2.25. Basamaklı bimoleküler enediyen birleşmesi ve siklizasyon basamağında ara ürünlerin deneysel gözlemi (Riss, 2016)

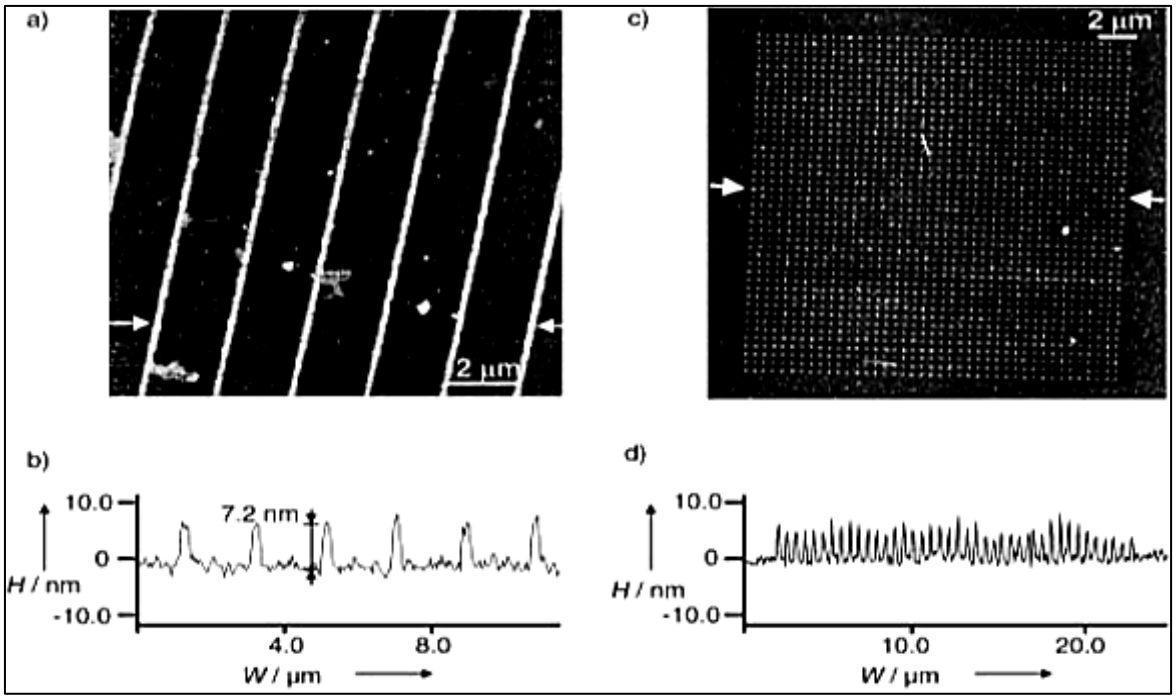
Desenli polimerik yapılar, sensörlerin, katalizörün ve optik cihazların geliştirilmesinde olası uygulamalar için önemlidir. Şimdiye kadar, polimer üretmek için fotolitografi, elektron ışınlı litografi ve mikro kontakt baskı esaslı birkaç strateji geliştirilmiştir.

Liu, DPN ve ROMP temelli nano-ölçekli polimer fırça dizilerini sentezlemek için yöntem geliştirmiştir. Öncelikle bir DPN desenli şablonundan artan polimerlere dayalı bir yaklaşım geliştirmiştir. Bu yolun geçerliliğini test etmek için, norborneniltiyol ile kaplanmış bir ucun alt tabaka ile temas ettirilerek, altın bir alt tabaka üzerinde 10 (ekso-5-norbornen-2-oksi) dekan-1-tiyol molekülleri desenlemiştir. ROMP tepkimesini optimize etmek için karşılık gelen endo izomerden ziyade ekso izomer kullanmıştır (Liu, 2003).



Şekil 2.26. DPN ve yüzeyde başlatılan ROMP' un şematik gösterimi (Liu, 2003)

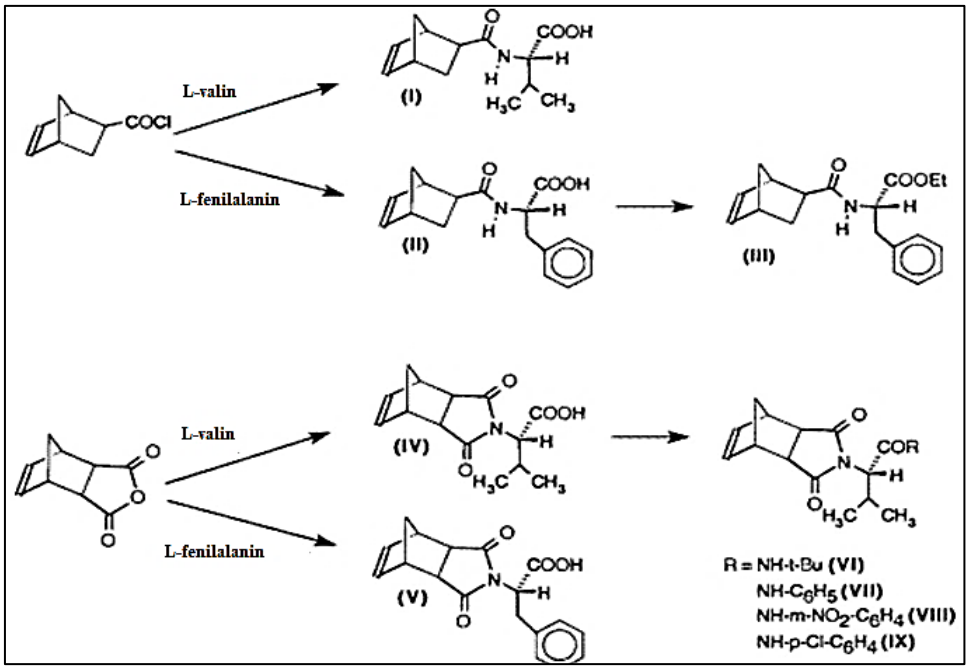
Ekso-5-norbornen-2ol'den oluşan polimer fırçaların çizgi ve nokta dizileri, Şema 1'deki yönteme göre yapılandırılmıştır. Topoğrafik AFM görüntüleri (Şekil 27 a ve Şekil 27 c), polimer yapılarının yüksekliğini göstermektedir ve polimer büyüme sürecinin tekdüzeliğine ilişkin fikir vermektedir (Şekil 27b ve Şekil 27d).



Şekil 2.27. Şekil 2.26'a göre hazırlanan polimer fırça nano yapıları (Liu, 2003)

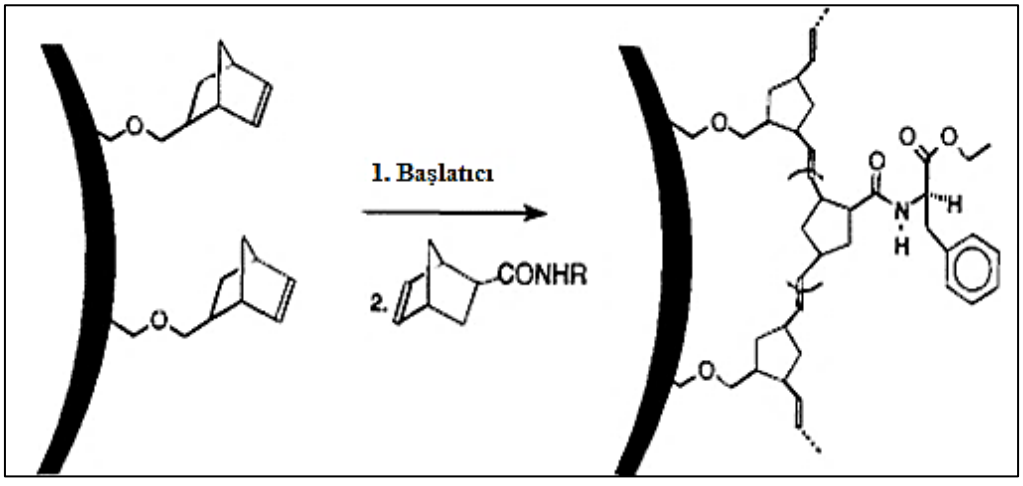
Polimer fırça hatlarının topografik AFM görüntüsü Şekil 2.27a'da verilmiştir. Norbornenylthiol birikimi, polimerizasyon süresi ve ölçülen ortalama yarı genişliğin tam genişlik (FWHM) değerleri sırasıyla 0.02 mms1, 60 dk ve 480 nm'dir; b) Şekil 2.27a'dan seçilen bir hat için enine kesit topografyası izi; c) bir polimer fırça nokta dizisinin topografik AFM görüntüsü verilmiştir. Norbornenylthiol birikimi ve polimerizasyon süreleri sırasıyla 1 s ve 30 dk'dır; d) Şekil 2.27c'den seçilen bir çizgi için kesitsel topografya izi gösterilmiştir. Örneğin, her polimer fırça noktasının ortalama çapı 78 (4) nm ve ortalama yüksekliği 5 nm'dir (Şekil 2.27d) (Liu, 2003).

Farklı bir çalışmada yüzeye-aşılama ile polimer fırça hazırlanmasında ROMP yöntemi kullanılmıştır. Bir dizi norbornen esaslı L-valin ve L-fenilalanin içeren kiral monomerler hazırlanmıştır. Norborn-2-ene-5-karboksilik asit klorür ve norborn-2-ene-5,6-dikarboksilik anhidrid'den başlayarak, N- (norborn-2-ene-5-karboksil) -L-valin (I), N- (norborn -2-en-5-karboksil) -L-fenilalanin (II), N- (norborn-2-ene-5-karboksil) -L-fenilalanin etil ester (III), N, N- (norborn- 2- NBDCI-L-fenilalanin (V), NBDCI-L-valin-tert-butilamid (VI), NBDCI-L-valin (IV), NBDCI- -anilid (VII), NBDCI-L-valin-m-nitroanilid (VIII) ve NBDCI-L-valin-p-kloroanilit (IX) sentezlenmiştir. Bileşikler I-IX her iki molibden (Mo (N-2,6-Me2-C6H3) (CHCMe2Ph) (OCMe (CF3) 2) 2) ve (Cl2Ru (CHPh-pF) (PCy3) 2, Cy) sikloheksil) rutenyum esaslı başlatıcılar kullanılarak ROMP ile polimerize edilmiştir.



Şekil 2.28. Bileşik I-IX'un sentezi (Buchmeiser, 2000)

Polimerler, optik rotasyonun yanı sıra *cis*/*trans* yapısı açısından karakterize edilmiştir (Buchmeiser, 2000). Norborn-2-en-türetilmiş silisyum bazlı destekler, norborn-2-ene-5-iltriklorosilan kullanılarak hazırlanmıştır. Norbornen ile modifiye edilmiş desteklerin III, VI ve VII monomerleriyle yüzeye bağlanması ROMP kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hem Schrock tipi hem de Grubbs tipi başlatıcılar bu amaca uygun bulunmuştur.



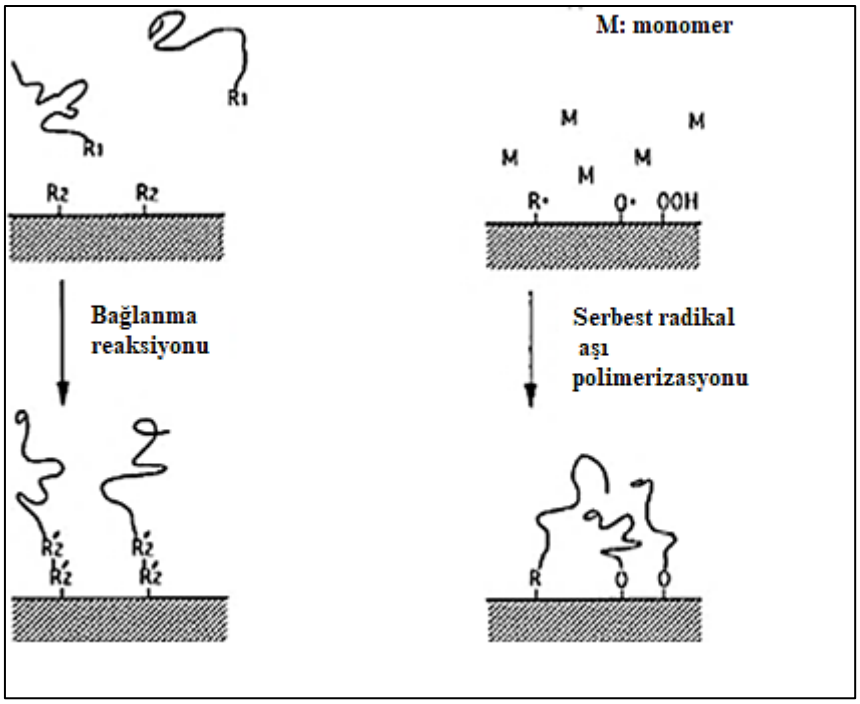
Şekil 2.29. Bileşik III'ün PS-DVB (Gözenekli polistiren/divinil benzen kopolimerleri) yüzeye aşılanması ve ROMP'un gerçekleştirilmesi (Buchmeiser, 2000)

Seçilen monomerler, yüzeye aşılanmış desteklerin hazırlanması için polimerleştirilebilirliklerine dayanarak seçilmiştir.

2.5. Biyouyumlu Polimer Fırçalar

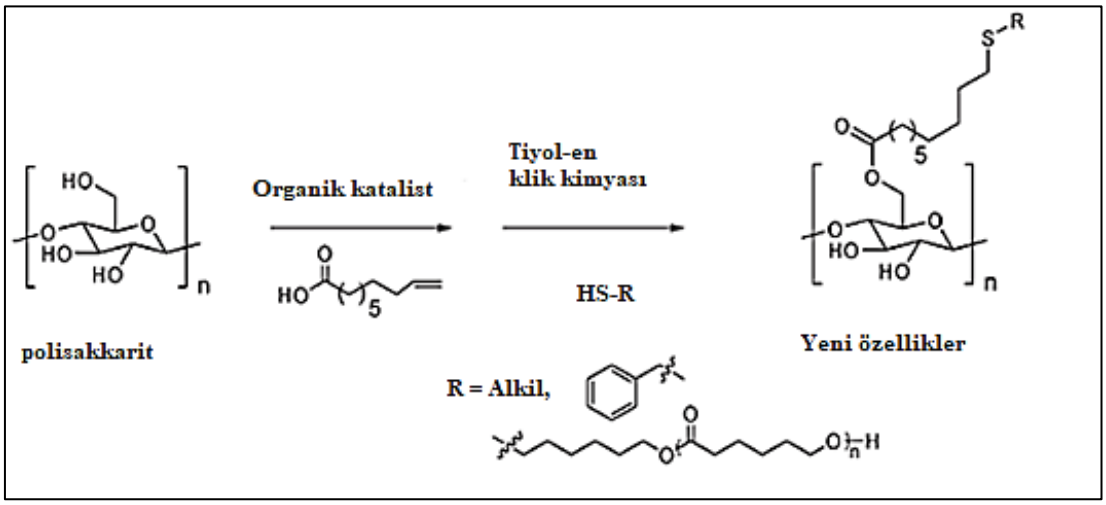
Doğada canlı organizmalar tarafından sentezlenen doğal polimerik yapılar olarak adlandırılan biyopolimerler, sentetik polimerlerle beraber günümüzde pek çok endüstri sahasında kullanım alanı bulmaktadır ve ticari olarak büyük kazançlar sağlamaktadırlar. Son zamanlarda, özellikle mikroorganizmalar tarafından üretilen polisakkarit yapıdaki biyopolimerler (mikrobiyal polimerler), tıp alanı başta olmak üzere, biyoteknolojik araştırmaların en önde gelen konusu olmuştur (Jeong, 2004).

Biyopolimerlerin çoğu, biyomateryaller olarak kullanıldığında hem yüzeyleri hem de yığın özellikleri nedeniyle talep edilen istekleri karşılamamaktadır. Bu nedenle klinik olarak uygulanabilir bir biyomateryal geliştirmek için, hali hazırda mükemmel biyo-işlevselliğe ve kütle özelliklerine sahip olan malzemenin yüzey üzerine modifiye edilmesi gerekmektedir. Aşılanmış yüzey hazırlamak, ya monomerlerin aşı polimerizasyonu ya da mevcut polimer moleküllerinin substrat yüzeyine kovalent bağlanma tepkimesi ile üretilebilir. Bu değiştirilen ana yüzey özelliği iki çeşit biyo-uyumluluk içermelidir. Biri en az yan tepkime ortaya çıkaran yüzey özelliği, diğeri ise hücre ve doku bağlama kapasitesidir. Buna ek olarak, örneğin fizyolojik olarak aktif seçici absorbe yeteneği olan yüzeyler gerekli olabilir.



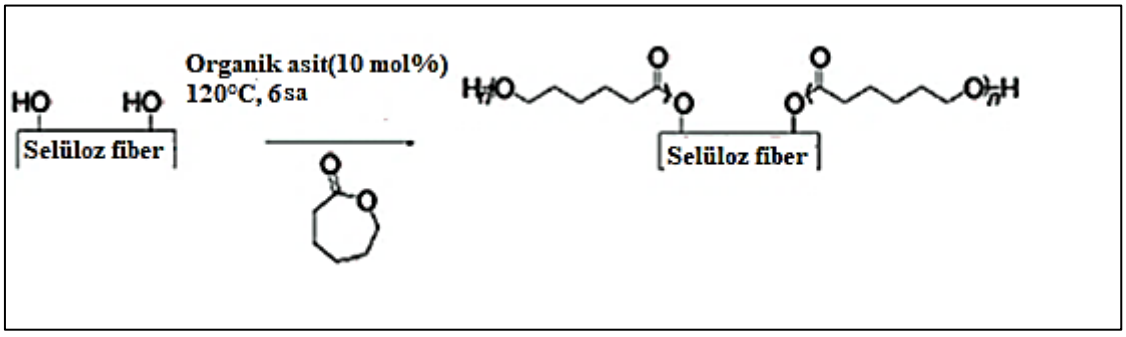
Şekil 2.30. Hazır polimer zincirlerinin bağlanma tepkimesi ve polimer zincirlerinin yüzeyde büyütülmesinin şematik gösterimi (Ikada,1994)

Şekil 2.30'da görüldüğü gibi, bağlama tepkimesi için kullanılacak olan polimer zincirleri için substrat polimer yüzeyi üzerinde mevcut olan fonksiyonel gruplara reaktif olan bir terminal bir grup gerekliyken, aşı polimerizasyon yönteminde ise radikal polimerizasyonu başlatmak için substrat polimer üzerinde aktif türlere ihtiyaç duyulmaktadır (Ikada,1994). Bununla birlikte, doğal lifleri kullanarak ucuz ve çevre dostu modifikasyonlar için katı selüloz gibi doğal polimerlerinde yüzeylerini modifiye eden çalışmaların yapıldığı görülmektedir.



Şekil 2.31. En fonksiyonlu selülozun organokatalik sentezi ve tiyol-en klik reaksiyonu (Zhao, 2010)

Gui-Ling Zhao ve arkadaşları katı polisakkaritlerin modifikasyonu için yeni bir metot sunmuşlardır. Bu metot, organik asit-katalist kombinasyonu ile esterifikasyon veya eterifikasyon tepkimesine ve heterojen polisakkaritlerin fotokimyasal tiyol-en klik tepkimesine dayanmaktadır. Bu "organoklik" metotuyla katı selüloz aril, alkil ve poliester gruplarıyla modifiye edilmiştir (Zhao, 2010).

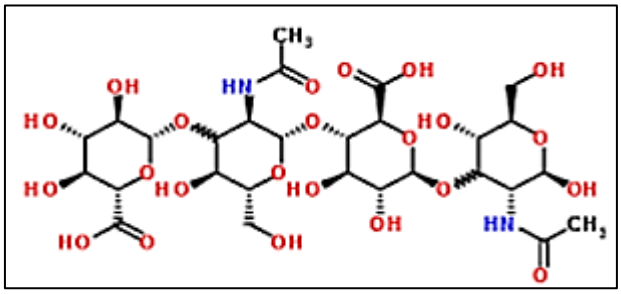


Şekil 2.32. Selülozun üzerinde organokatalik olarak ε-kaprolaktonun Halka Açılma Polimerizasyonunun (ROP) şematik gösterimi (Hafre´n, 2005)

Jonas Hafre´n ve arkadaşları pamuk ve selülozun üzerinde organokatalik olarak ε-kaprolaktonun Halka Açılma Polimerizasyonunu (ROP) geliştirmişlerdir. Selüloz fiber yüzeyinde ROP ile Polikaprolakton (PCL) modifiye edilmiş ve selüloza dayalı biyo-uyumlu nanometaryeller için yeni bir yol göstermişlerdir (Hafre´n, 2005).

2.5.1. Hiyalüronik asit

Hiyalüronik asit (HA), yunanca hyalos (camsı, cam gibi) ve üronik asit kelimelerinin birleşmesi ile türetilmiştir (vikipedi). HA yüksek mol kütlesine sahip doğrusal yapıda bir polisakkarittir. HA birbirine β1.3 -1.4 glikozid bağlarıyla bağlı ve tekrarlayan *N*-asetil-glukoz amin ve *D*-glukuronik asit zincirlerinden oluşmaktadır (Tikuta, 1995).

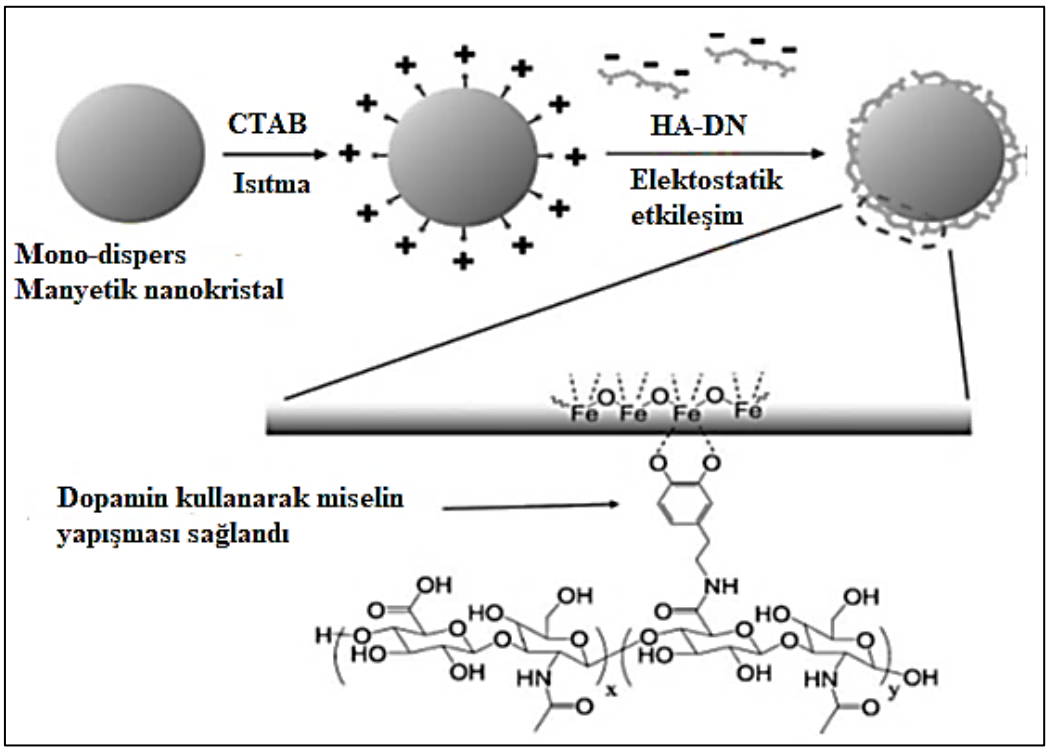


Şekil 2.33. HA'in kimyasal yapısının gösterimi (http://www.pharmetic.org/bilgi-bankasi/hyaluronic-acid.pdf)

HA, başta bağ dokusunun ekstrasellülermatriksi (ECM) olmak üzere derinin epidermis ve dermiş tabakalarında da doğal olarak bulunan, yüksek mol kütleli, biyolojik olarak parçalanabilen, doğrusal bir polisakkarittir. Kimyasal olarak glikozaminoglikan (GAG) adı verilen bağ dokusu proteinleri grubunun en basit ve sülfat içermeyen tek üyesidir. Yaşlanan deride HA miktarı azalır. Bunun sonucu olarak da derinin su tutma yeteneği düşer ve deride kırışıklıklar belirir. HA, kozmetik amaçla yaşlanmaya bağlı kırışıklıkları azaltmak için dolgu maddesi olarak ya da nemlendirici etkisi nedeniyle cilt bakım ürünlerinde kullanılabilir (Karaman, 2011).

By Yuhan Lee ve arkadaşları, HA zincirine dopaminin konjugasyonunu sağlamışlardır ve daha sonra HA-DN yüzeyine monodispers mıknatıs nanokristalin bağlanmasını sağlayarak hedefe özel geliştirilmiş MR görüntüleme ve tümör hücreleri için hücresel alımda önemli bir yöntem kaydetmişlerdir. Sonuç olarak, CD44-HA reseptör-ligand etkileşimleri ile

kanser hücrelerini hedefleme kabiliyetine sahip, sulu çözelti içinde monodispers mıknatıs nanokristalleri üzerinde HA'nın homojen ve kuvvetli bir şekilde kaplanması için misel esinli bir yöntem sunmuşlardır (Lee, 2008).



Şekil 2.34. Monodispers mıknatıs nanokristal üzerine homojen HA-DN'nin immobilizasyonu için sentetik süreç (HA-DN/MNC) (Lee, 2008)

HA ilaç, dermatoloji, kozmetik alanlarında kullanılmaktadır (Liao, 2005; Neudetker, 2000). HA katarakt ameliyatlarında nesiç iyileştirmeye yönelik göze enjekte edilir, kozmetik alanında su tutma kapasitesi özelliğinden dolayı iyi bir nemlendirici olarak (Rieger, 1998) ve hem yaşlılık belirtilerinin, hem de istenmeyen mimik çizgilerinin giderilmesi için dolgu maddesi olarak kullanılır (Meyer, 1994). Dermatoloji alanında özellikle yaraların iyileşmesi ve herhangi bir iz bırakmaması (Maibach, 1996) için kullanılmaktadır.

2.5.2. SİTOTOKSİSİTE ve MTT testi

Sitotoksisite; canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranını ifade eder. Bir maddenin biyolojik davranışının değerlendirilebilmesi için hücreler üzerindeki toksik ya da non-toksik etkisinin belirlenmesi gereklidir (Tokur, 2017). Sitotoksisite testleri, toksik profili

araştırılan maddelerin değerlendirilmesi amacıyla, uygun hücre kültüründe, hücre çoğalma oranı ve hücre üzerindeki toksik etkisi dikkate alınarak değerlendirme yapılan testlere denir. Kullanılan bu test sistemleri; hücresel hasarın morfolojik açıdan gözlenmesi, hücresel hasarın farklı ölçüm yöntemleri ile tespit edilmesi, hücresel çoğalmanın belirlenmesi, hücresel metabolizmada ortaya çıkan değişikliklerin tespitinin yapılması için kullanılmaktadır.

Sitotoksisite testleri invivo veya invitro olmak üzere iki şekilde yapılabilmektedir. İnvitro testlerinde, hücrelere toksik özelliği araştırılan maddeden artan konsantrasyonlarda muamele edilir. Bunun sonucunda hücrelerin yaşama oranları ve hücre morfolojisi tespit edilerek, hücreler üzerinde bu maddenin etkisi saptanır.

Sitotoksisite 5 farklı yöntem kullanılarak ölçülebilir, bunlar;

1. MTT yöntemi [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]
2. Tripan mavisi yöntemi
3. Sülforodamin B yöntemi
4. WST yöntemi (2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium, monosodyum tuzu)
5. Klonojenik yöntem

MTT yöntemi

MTT (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür) testi, sitotoksisite veya hücre canlılığını değerlendirmek için en yaygın kullanılan kolorimetrik analizlerinden biridir (Mosmann,1983). Bu test esas olarak, süksinat dehidrojenaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktivitesini ölçerek hücrelerin mitokondriyal fonksiyonunun belirlenmesi yoluyla hücre canlılığını belirler (Stone, 2009). Bu yöntem yukarıda belirtilen yöntemlerinden çok daha üstündür çünkü kullanımı kolaydır, güvenlidir, tekrarlanabilirliği yüksektir ve hem hücre canlılığı hem de sitotoksisite testlerini belirlemek için yaygın olarak kullanılır (Aslantürk, 2017).

MTT testinin çalışma mekanizması 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromürün formazana indirgenmesi ve bu esnada oluşan renk değişiminin kolorimetrik

olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısını verir. MTT yönteminin amacı hücrelerin metabolik aktivitilerini göstermek ve araştırılan maddenin sitotoksisitesini ölçmektir.

2.5.3. DNA immobilizasyonu

DNA (deoksiribonükleik asit) ve RNA (ribonükleik asit) canlıların kalıtımını sağlayan ayrıca hücrelerde metabolik olayların kontrolünü gerçekleştiren temel yapı taşı molekülleridir. Nükleik asitler, nükleotit (pürin/pirimidin bazı + 5 karbonlu bir şeker + bir fosfat grubu) olarak adlandırılan basit birimlerden oluşurlar. DNA dizilimi, nükleik asit moleküllerindeki bu nükleotit bazlarının (adenin, guanin, sitozin, timin ve urasil) sırasının belirlenmesi ile oluşur. Farklı yöntemlerle özgün DNA dizisi belirlenmesi biyomedikal alanda çok önemlidir (Thayer, 1999).

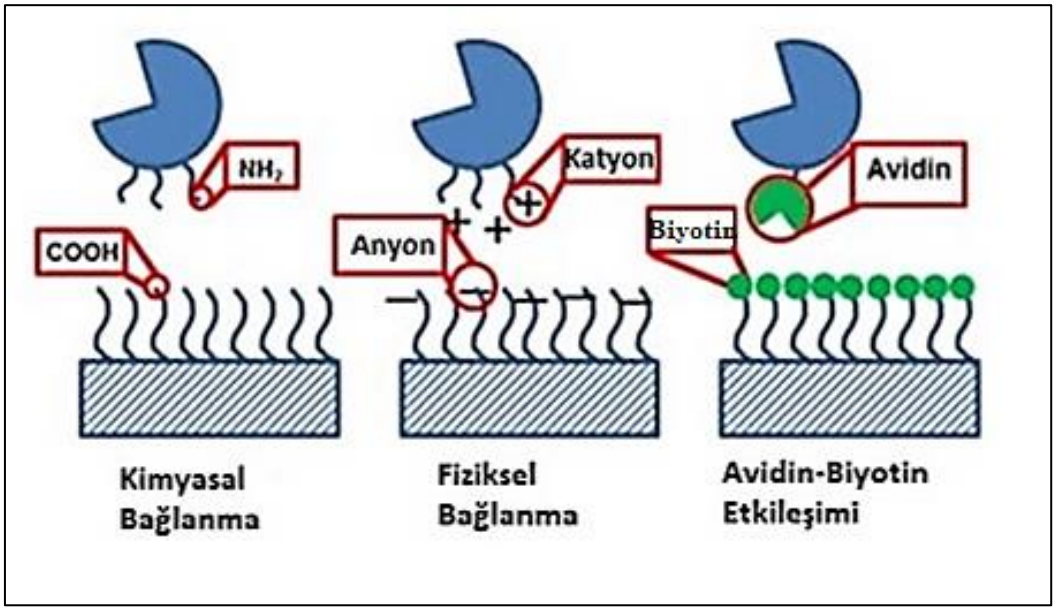
Son yıllarda DNA'nın katı bir desteğe bağlanması ile yapılan çalışmalar biyoteknoloji ve moleküler biyoloji alanında oldukça ilgi çekici olmuştur (Linford, 1995). Yapılan çalışmalarda DNA'yı, lateks boncuklar (Kremski, 1987), polistiren (Rasmussen,1991), optik elyaf (Piunno,1994), karbon elektrot (Millan, 1992), altın (Frutos, 1997) ve silisyum (Yang, 1998) gibi substratlara başarıyla bağladıkları görülmektedir. Mikroüretim ve entegre cihazların seri üretimi ile oldukça uyumlu bir malzeme olan silisyum, optik cihazların (Chan, 2000) ve biyosensörlerin (Zheng, 2005) üretimi için idealdir.

DNA immobilizasyonunda kullanılacak yüzeylerin; a) kimyasal olarak homojen ve yüzey pürüzsüzlüğüne sahip olması, b) yüzeyin polarite ve pH ile kontrol edilebilmesi, c) DNA hibridizasyonuna uygun olması, d) yüzeye bağlanan DNA yoğunluğunun kontrol edilmesi, e) ısıl ve kimyasal olarak kararlı olması, f) tekrarlanabilir olması gibi özelliklere sahip olması beklenmektedir (Strother, 2000).

DNA parçasının katı yüzeye tutturulabilmesi ve daha sonra bu probun hedefi ile hibridizayonun sağlanması hedeflenmektedir, böylece oluşan DNA parçasının fiziksel veya kimyasal etkenlerden etkilenip yüzeyden kopması gibi olumsuz etkilerin ortadan kalkması sağlanacaktır. Bu kapsamda katı yüzeye DNA bağlanma (modifikasyon, immobilizasyon) tekniklerini, a) Fiziksel adsorpsiyon, b) Kimyasal bağlanma ve c) (Strept)-Avidin-Biyotin etkileşimi yoluyla immobilizasyon olmak üzere üç başlık altında inceleyebiliriz.

DNA’nın yüzeye fiziksel adsorpsiyonu

Fiziksel adsorpsiyon; moleküller arası polar, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler ile taşıyıcıların yüzeye immobilize edilmesi yöntemidir. Kovalent bağlanmaya göre daha kolay ancak daha kararsızdır.



Şekil 2.35. DNA’nın kimyasal, elektrostatik ve avidin-biyotin etkileşimiyle bağlanmasının şematik gösterimi

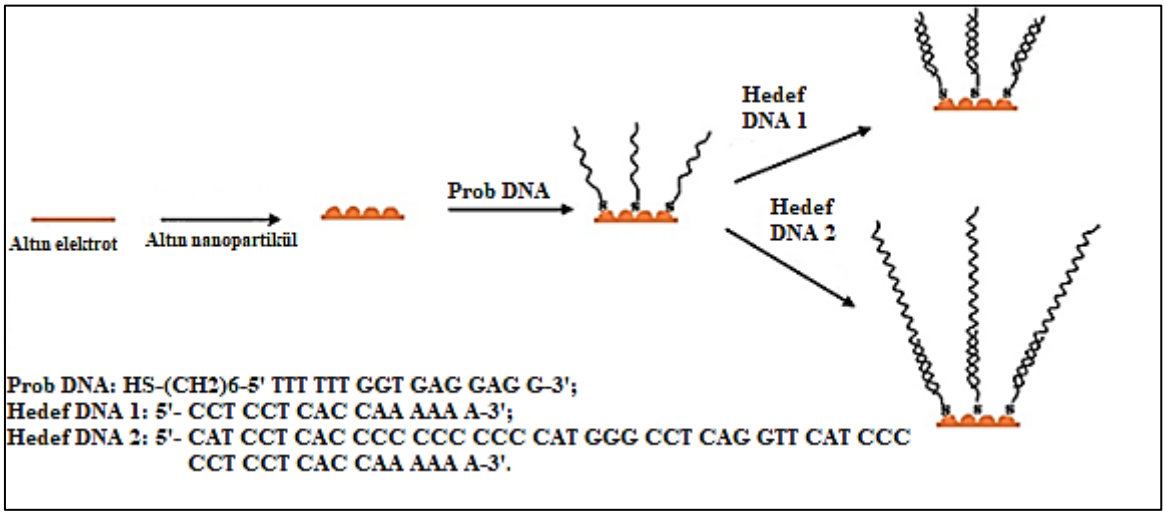
Ayrıca fiziksel adsorpsiyon yönteminde DNA moleküllerinin yüzeyde rastgele yönlenmesi ve DNA’ların yüzeye zayıf bağlanması da dezavantajdır. Bazı tamponlar veya yüzey aktif maddeleri varlığında zayıf bağlanma nedeniyle DNA probları tahlil sırasında yüzeyden ayrılabilir. Bu durum alınan sinyallerin yanlış hesaplanması ve yanlış patojenik enfeksiyonların saptanmasına da sebep olabilir.

Kimyasal bağlanma yöntemi ile biyomolekül adsorpsiyonu

DNA’nın katı yüzeylere elektrostatik özelliğini kullanarak immobilizasyonunda; iyonik kuvvet, pH ve sıcaklık gibi çevresel değişiklikler adsorbe edilen DNA problarının desorpsiyonuna neden olabilir. Bu nedenle, iyi bir stabilite ve yüksek bağlanma mukavemeti elde etmek için DNA problarının immobilizasyonunda kovalent bir bağlantı yolunu seçmek daha avantajlı ve kolaydır (Cai, 2002; Dupont-Filliard,2001; Pan,2005; Xu,2001).

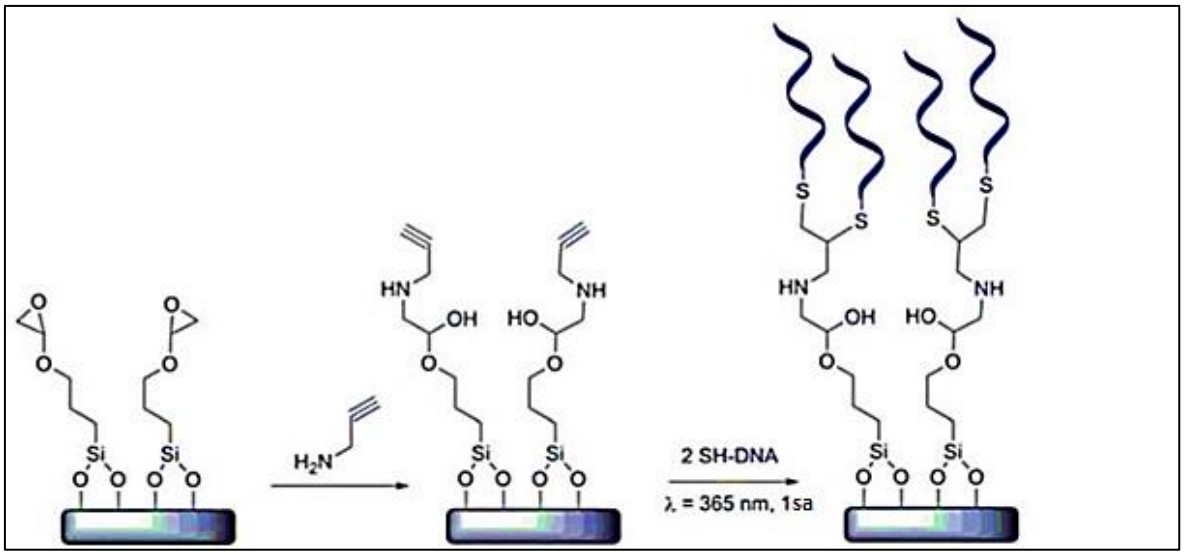
DNA'ların yüzeye immobilizasyonu için iki ortak kovalent bağlanma yöntemi vardır, bunlar kemisorpsiyon ve kovalent bağlanmadır.

Tiyol grupları, kükürt ve altın atomları arasında kovalent bağ oluşumuna izin veren metal yüzeylere karşı güçlü afinite gösteren gruplardır. Bu prensibe dayanarak, kimyasal adsorpsiyon, DNA problarının tiyol veya disülfit gruplarıyla modifiye edilerek altın yüzeylere immobilizasyonunda kullanmaktadır.



Şekil 2.36. Modifiye edilmiş SsDNA probu ile üretilen altın nanopartikül sentezinde yer alan adımların ve bu nanopartiküllerin farklı hedef DNA ile hibridizasyonlarının şematik gösterimi (Liu,2005)

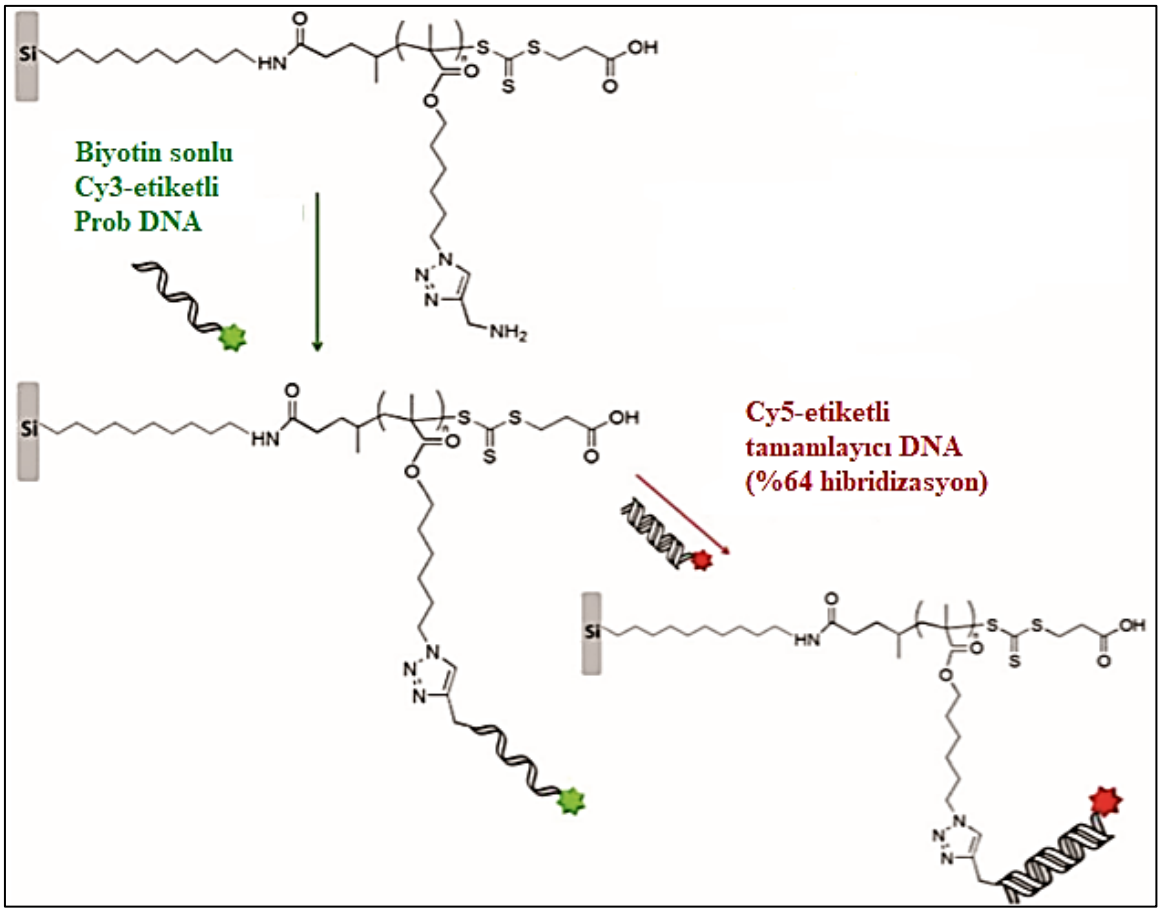
Liu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ilk olarak altın elektrotlar üzerine elektrodepozisyonu ile altın nanoparçacıkların düzlemsel olarak yerleşmesini sağlamışlardır ve böylece nano altın elektrodu elde etmişlerdir. Altın nanopartiküllere tiyol grup ile modifiye edilmiş DNA probunun kovalent olarak bağlanması ile tek sarmallı DNA (ssDNA) probunun immobilizasyonu sağlanmıştır ve bu modifiye edilmiş altın nanopartiküllere farklı hedef DNA'lar kullanarak hibridizasyon işlemini gerçekleştirmişlerdir (Liu,2005).



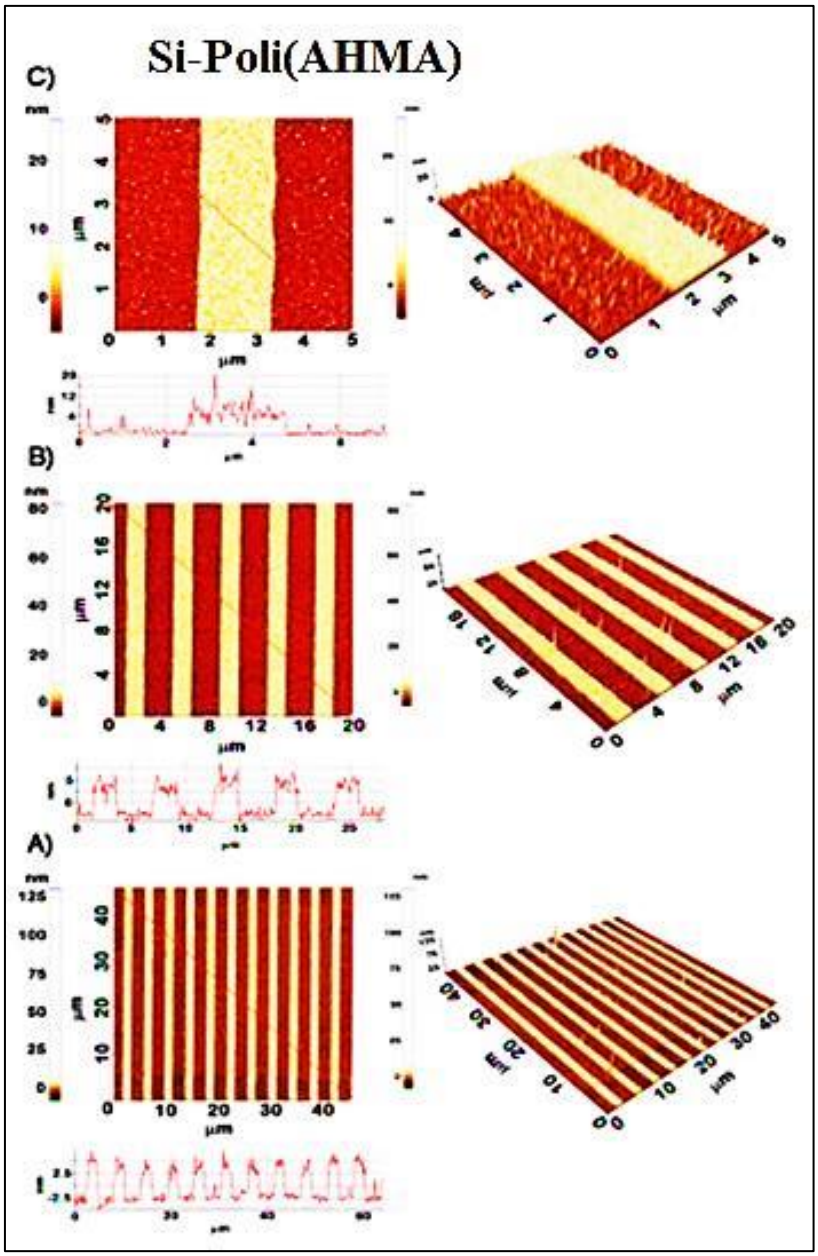
Şekil 2.37. Tiyollenmiş DNA'nın proparjilaminle modifiye edilmiş yüzey üzerine foto-başlatılmış tiyol tepkimesi ile bağlanmasının şematik gösterimi (Escorihuela, 2014)

Escorihuela ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında silisyum yüzey üzerinde hızlı ve verimli DNA mikrodizileri oluşturmak için tiyol tepkimesinin kullanımı incelenmiştir. Tiyol-en tepkimesi, iki tiyol sonlu molekülün bir alkile kovalent olarak bağlanmasına izin verdiği için yüzey üzerinde yüksek yoğunluğa sahip prob elde edilmesini sağlamıştır ve böylece tiyol-endoligonükleotitler doğrudan yüzeye tutturulmuştur (Escorihuela, 2014).

Grubumuzda yapılan bir çalışmalarında mikro-desenli poli(6-azidoheksilmetakrilat) [poli(AHMA)] fırçalar sentezlemiş ve DNA hibridizasyonunda kullanılmış ve % 64 hibridizasyon belirlenmiştir (Şekil 2.38-39) (Çimen, 2015).



Şekil 2.38. Mikro-desenli poli(AHMA) fırçaların oluşturulması ve DNA hibridizasyonunda kullanımın basamaklı üretim sürecinin şematik gösterimi (Çimen, 2015)

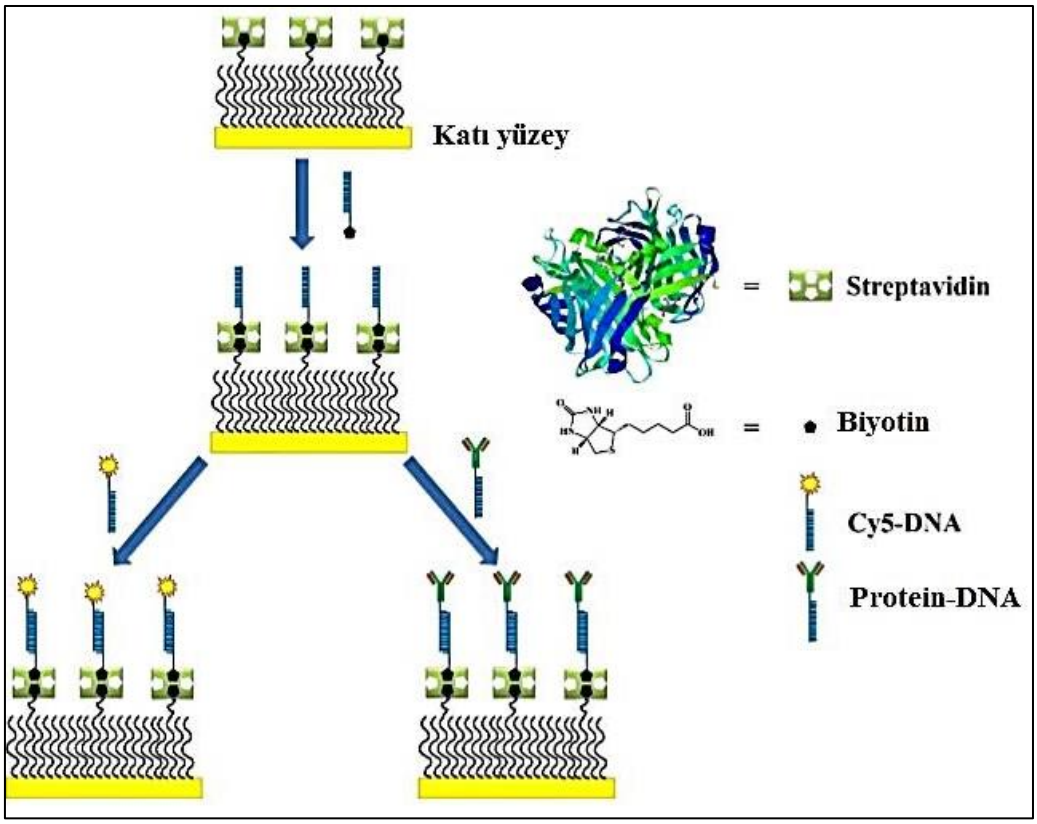


Şekil 2.39. DNA hibridizasyonlu poli(AHMA) mikro-desenli fırçaların 2D, 3D AFM görüntüleri (Boyutlar: 45 x 45 μm^2, (B) 20 x 20 μm^2 ve (A) 45 x 45 μm^2 (C) 5 x 5 μm^2) (Çimen, 2015)

Avidin-biyotin etkileşimi ile DNA immobilizasyonu

Strepavidinin katı yüzeylere immobilizasyonu ile ilgili çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Streptavidin ve biotin kompleksinin oluşumu yüzey uygulamaları için oldukça uygundur (Glidle, 2003). Streptavidin ve biotinin spesifik bağlanması, Şekil 2.40'da gösterildiği gibi yüzeyler üzerinde DNA'yı hareketsizleştirmek için büyük ölçüde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem iki aşamalıdır; ilk olarak katı yüzey biyotinile edilir, ardından bir streptavidin

ilave etme aşaması ile devam eder. Biotin, avidin veya streptavidin bağlanma bölgelerine çok yüksek afinite ile bağlanan küçük bir moleküldür (Ka = 10^{15} M^{-1}). Ayrıca, avidin ve streptavidin, biyotin dört özdeş bağlanma bölgesine sahip tetramerik proteinlerdir (Wilchek, 1988).

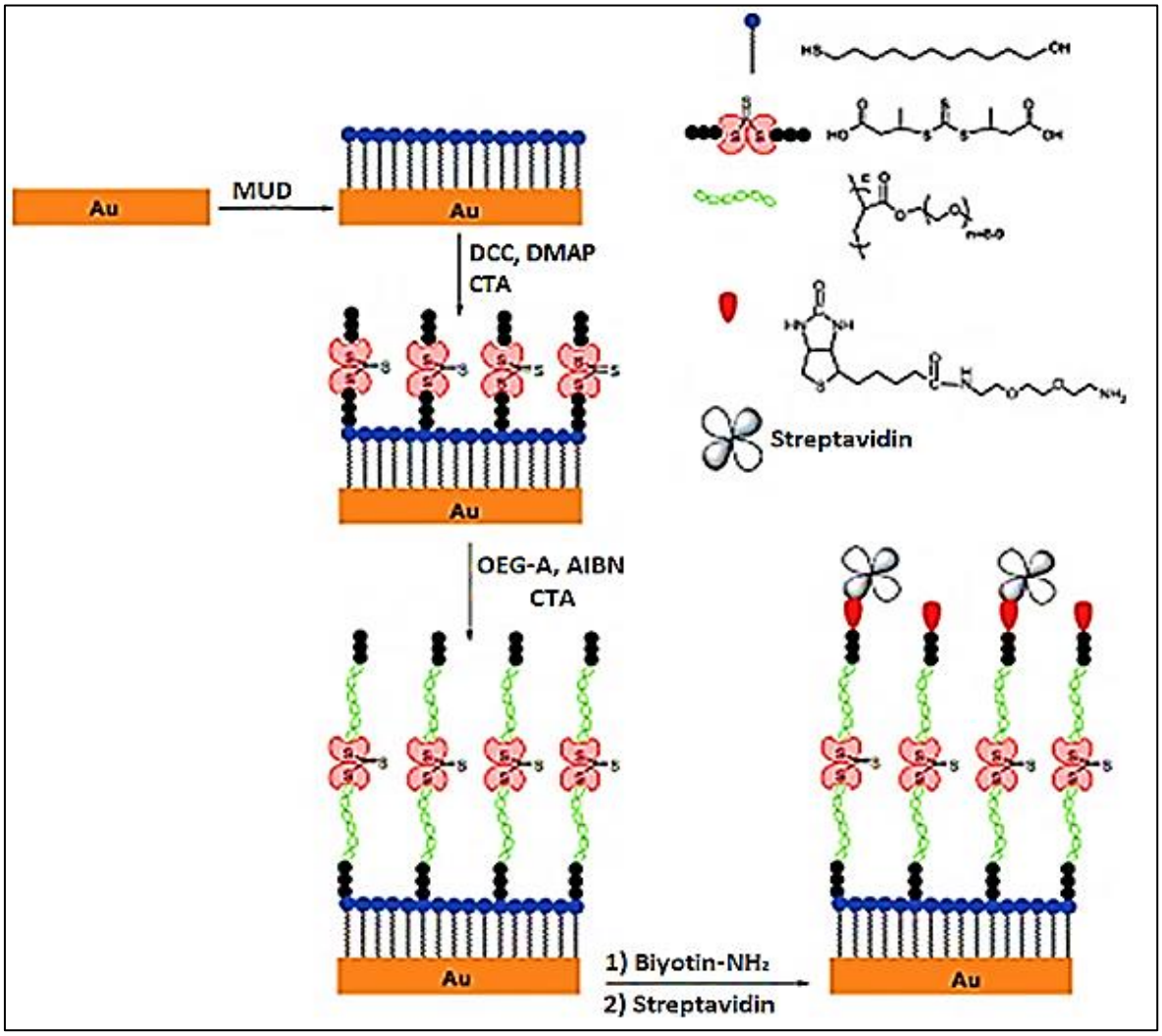


Şekil 2.40. Streptavidin-biotin etkileşimleri kullanarak DNA'ların yüzeye immobilizasyonu (Pan, 2005)

Avidin (veya streptavidin)-biyotin etkileşimi sıklıkla DNA mikrodizileri elde etmek için kullanılır. Pan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, DNA probları, streptavidin-biotin etkileşimleri yoluyla SAM 2-merkaptoetanol ve 11-merkaptoundekanoik aside başarıyla bağlanmıştır. Burada, işaretlenmiş biyotenlenmiş moleküller yüzeye bağlanmadan önce avidin silis yüzeye immobilize edilmiştir (Şekil 2.40). Avidin'deki dört bölgeden üçü, biyotinlenmiş DNA probları ile etkileşime girme eğilimindedir (Pan, 2005).

Tiyollerin altın yüzeyler için yüksek afinitesi arayüz aracılı RAFT polimerizasyonu ile polimer fırçaların oluşturulmasını mümkün kılar. Grubumuzda yapılan bir çalışmada arayüz aracılı RAFT polimerizasyonu ile poli[(oligoetilen glikol) metil eter akrilat] [poli

(OEGA)] fırçaların sentezlenmiş ve streptavidin proteinlerini seçici olarak immobilize etmek için kullanılmıştır (Şekil 2.41).



Şekil 2.41. Streptavidin immobilize edilmiş poli(OEGA) fırçaların oluşturmanın basamaklı üretim sürecinin şematik gösterimi (Zengin, 2012)

Bununla birlikte Avidin-biyotin etkileşimi ile DNA immobilizasyonunun bazı dejavantajları bulunmaktadır, örneğin streptavidin çeşitli yüzeylerde kolayca immobilize edilmesine rağmen, bağlama kapasitesi zamanla azalmaktadır. Ayrıca, streptavidin ile immobilize edilmiş yüzeylerin sentezi, yüzeyin sentetik modifikasyonu, streptavidinin immobilizasyonu ve bloke edilmesi dahil olmak üzere birçok adımı içerir. Burada gerçekleşen her adım hem üretim süresini hem de maliyetini arttırır. Dahası, streptavidin veya biyotinin su içerisinde yüzey immobilizasyonu, immobilize edilmiş proteinlerin stabilitesinin bozunmasına ve spesifik olmayan etkileşimlere uğraması gibi dezavantajları da ortaya çıkarır (Duggan, 1999).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Temin Edilen Üretici Firma
Silisyum diskler (100, *n*-tipi, çapları 10 mm, özdirençleri 10-30 Ω cm, kalınlıkları 500-550 μm ve bir yüzü parlaktır)	Shin-etsu (Handoutai, Japan)
Etil alkol (%99,8)	Sigma-Aldrich
Hidrojen peroksit (%30,0)	Sigma-Aldrich
Hidroklorik asit (%37,8)	Sigma-Aldrich
(3-Aminopropil)trietoksisilan (APTES, %99,0)	Sigma-Aldrich
Toluen (%99,8)	Sigma-Aldrich
Furan (% 99)	Sigma-Aldrich
Maleik anhidrit (% 99)	Sigma-Aldrich
Sodyum asetat (% 99)	Sigma-Aldrich
Asetik anhidrit (% 99,5)	Sigma-Aldrich
N,*N*-dimetilasetimit (% 99)	Sigma-Aldrich
Etil asetat (% 99,8)	Merck
Diklorometan (%99,8)	Merck
Etilvinileter (% 99)	Sigma-Aldrich
Sodyum nitrit (% 97)	Sigma-Aldrich
Asetik asit (% 99,85)	Sigma-Aldrich
1-etil-3-(3-dimetillaminopropil)karbodiimit (EDAC, %98)	Sigma-Aldrich
N- hidroksisüksinimit (NHS % 98)	Sigma-Aldrich
Sisteamin hidroklorür (%98)	Sigma-Aldrich
Etil asetat (% 99,8)	Merck
Hiyalüronik asit	Sangherb
Sodyum nitrit	Sigma-Aldrich
Asetik asit	Sigma-Aldrich
(Trisikloheksilfosfin) (1,3-dimesitilmidazolidin-2-lidin) benzilidenerutenyum klorür, Grubbs ikinci jenerasyon katalisti	Sigma-Aldrich

Merck firmasından alınan etil asetat (% 99,8), diklorometan (%99,8) ve etilivinileter (Sigma Aldrich) distile edilerek kullanıldı. Hiyalüronik asit saflaştırılma işlemi yapıldıktan sonra kullanıldı.

Polimer sentezi için kullanılan Grubbs üçüncü jenerasyon katalisti, prosedürlere uygun şekilde hazırlandı (Love, 2002).

DNA hibridizasyonu için kullanılan tek zincir RNA primeri MtDNA'ya özgü MT16520F24 ileri (5'- CATAAAGCCTAAATAGCCCACACG- 3') Macrogen'de sentezletildi. Gen Bank, NC_012920 numaralı sekansı kayıtlı mitokondriyal DNA' nın 7S bölgesinde kısa bölge çoğaltıldı ve MtDNA-16084-35 (CATAAAGCCTAAATAGCCCACACGTTCCCCTTAAATAAGACATCACGATGGATCACAGGTCTATCACCCTATTAACCACTCACGG) hedef dizisi elde edildi.

3.2. Furan Maleik Anhidrit Diels Alder Ürünün (Ekzo-7-Okzabisiklo[2.2.1] Hept-5en-2,3-Dikarboksilik Anhidrit) Sentezi (EHDA)

20 g (200 mmol) maleik anhidrit, THF içerisinde çözüldükten sonra 12,43 mL (181 mmol) furan ortama pipet ile eklendi. 5 dakika karışım yapıldıktan sonra tepkime durduruldu ve oda sıcaklığında 4 gün bekletildi. Dört günün sonunda maleik anhidrit furan ürünü olan beyaz okzanorbornen kristalleri oluştu. Kristaller soğuk THF ile yıkanarak saflaştırıldı. Tepkime verimi %78'dir.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 6,95 (CH=CH trans); 6,46 (CH=CH cis); 5,0 (=CH-CH-O); 4,44 (HC-C=O).

3.3. Hiyalüronik Asitin (HA) Hidroliz ile Mol Kütlesinin Düşürülmesi

3 g yüksek mol kütleli HA (~ 9,80x 10^5 g mol^{-1}) 150 mL su içerisinde oda sıcaklığında bir gece bekletilerek çözüldü ve 3 mL asetik asit ilave edildi. 0,7 g sodyum nitrit ($NaNO_2$) 12 mL su içerisinde çözülerek HA çözeltisine eklendi ve sıcaklık 60 °C 'ye yükseltilerek 5 gün ısıtıldı. Karışıma 1,0 M Na_2NO_3 eklenerek pH 7'ye ayarlandı ve 2 gün diyaliz işlemi uygulandı. Diyaliz edilen karışım -80 °C'da liyaflizatörde kurutuldu. Kurutulan HA'nın mol kütlesi GPC ile belirlendi.

3.4. Tiyol Uçlu HA (HA-SH) Sentezi

Düşük mol kütleli HA (~ 58000 g mol^{-1}) 20 mL su içerisinde oda sıcaklığında çözüldü ve 0,287 g (1,5 mmol) EDAC ve 0,172 g NHS ilave edildi. Karışıma pH 4-5 oluncaya kadar 4,0 M HCl eklendi ve 2 saat karıştırıldı. Daha sonra karışıma 0,337 g sisteamin hidroklorür eklendi. Karışım 2 gün karıştırıldı ve diyaliz edildi. Diyaliz çözeltisine 4,0 g/L NaCl eklenerek

pH 6-7 olması sağlandı. Daha sonra 4,0 M HCl ile pH 5'e ayarlandı ve 1 gün diyaliz edildi ve -80 °C'da liyafilizatörde kurutuldu. Kurutulan örneklerin NMR ölçümleri alındı.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): H1(4,3), H1'(4,4) (anomerik hidrojen pik), H13 (2,7) (–CH_2-SH), H11(1,9)

3.5. EHDA'nın Silisyum Substrata Bağlanması

Silisyum yüzeyler üzerindeki organik kirliliklerin uzaklaştırılması için etil alkol içerisinde ultrasonik banyoda 10 dk bekletildi. Daha sonra yüzeyler derişik sülfürik asit ve hidrojen peroksit (% 30)'den oluşan pirana çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Etanol ile yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutuldu ve hidroksil sonlu silisyum yüzeyler (Si-OH) elde edildi. Si-OH yüzeyler önce % 1,0'lik APTES çözeltisine kondu ve manyetik karıştırıcı varlığında azot atmosferinde APTES molekülleri yüzeye SAM yöntemiyle bağlandı (Si-APTES). Daha sonra 2,5 mL(6 mmol) APTES, 1,92 g (11 mmol) furan maleik anhidrit ve 6 mL *N,N* dimetilasetimit tepkime balonuna konularak 60 °C sıcaklıkta 20 dk süreyle azot gazı altında karıştırma işlemi gerçekleştirildi. Ayrı bir erlende katalitik miktarda sodyum asetat (0,5 g, 5 mmol), 12 mL asetik anhidrit ile çözülerek ve karışıma eklendi, tepkime sıcaklığı 90 °C'ye yükseltilerek ve 2 saat karıştırıldı. Ardından karışım oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra etil asetat ile seyreltildi ve ardından tuzlu su ile ekstrakte edildi ve soğuk hekzan ile çöktürüldü ve EHDA bağlı silisyum substrat (Si-EHDA) azot gazı ile kurutuldu.

3.6. Yüzeyde Başlatılan ROMP ile Poli(ekzo-7-Okzabisiklo[2.2.1] Hept-5en-2,3-Dikarboksilik Anhidrit) Sentezi

Si-EHDA substrat ve yeni hazırlanmış 3. jenerasyon Grubbs katalist 0,5 mL diklorometan içerisinde çözülerek DMF içerisinde çözülmüş EHDA çözeltisine eklendi. Polimerizasyon oda sıcaklığında, azot atmosferinde farklı sürelerde (1, 3, 6, 16 ve 24 sa) yapıldı. Her tepkime süresi sonunda 0,5 mL etilvinileter eklenerek polimerizasyon sonlandırıldı. Si-poli(EHDA) substrat dietil eter ile yıkanarak azot gazı ile kurutuldu. Oluşan serbest polimer dietileter eklenerek çöktürüldü. Açık kahverenkli serbest poli(EHDA) yıkanıp süzüldükten sonra vakumda kurutuldu.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): –CH-CH- (3,1-3,6 ppm); =CH-CH-O (4,9 ppm); -C=C- (5,8ppm)

3.7. Tiyol-en Klik Tepkimesi ile Poli(EHDA) Fırçalara HA-SH Moleküllerinin Bağlanması

0,1 g HA-SH 10 mL dimetilformamid ve 5 mL su içerisinde çözüldü. Poli(EHDA) bağlı silisyum substrat UV ışınını geçiren özel tüplere konuldu ve üzerine HA-SH çözeltisinden 5 mL eklendi. Bu tüpler foto reaktöre konuldu ve 4 gün 365 nm UV ışığı altında bırakıldı ve daha sonra poli(EHDA)-HA yüzeyler çözeltiden çıkarıldı ve ilk olarak su ile 3 kez yıkandı ve sonra metanol ile yıkanarak azot gazı ile kurutuldu.

3.8. Poli(EHDA)-HA Fırçaların MTT Sitotoksisite Testi

Kolorometrik bir yöntem olan MTT sitotoksisite testi, canlı hücrelerde mitokondride metabolik değişikliğe uğrayarak indirgenen bir boya olan MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] testidir. HA uçlu poli(EHDA) fırçalı yüzeylerinin MTT testi için Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC) elde edilen SaOS-2 insan kemik osteosarkom hücre dizisi kullanıldı. Hücreler % 10 Fetal bovin serumu (FBS, Gibco) ve% 1 penisilin/streptomisin ile modifiye Eagle (DMEM, Gibco) ortamında % 5 C02 ile nemlendirilmiş bir hava inkübatöründe 37 °C'de tutularak yetiştirildi. Test edilecek poli(EHDA)-HA yüzeyleri 3 mL taze ortam bulunan tüplere yerleştirildi ve inkübatörde tutuldu. Yüzeyler şartlandırılmış ortamdan 3 gün sonra ekstrakte edildi ve daha sonra sitotoksisite testlerinde kullanıldı. MTT deneyleri 96 kuyulu plakalarda yapıldı. 3 gün sonra, süpernatanlar çıkarıldı ve her bir oyuğa, 10 µL 3- {4,5-dimetiltiazol-2il} -2,5-difenil-2H-tetrazolyum-bromür (MTT-5mg / ml-Sigma) çözeltisi ilave edildi. Hücre canlılığı, mitokondriyal NADH / NADHP' ye bağlı dehidrojenaz aktivitesini belirleyerek ölçüldü. MTT aktif hücreler tarafından alınmış ve mitokondri içinde çözünmeyen bir mor formazan granülüne indirgendi (Mosmann, T., 1983). Daha sonra, süpernatan atıldı ve çöken formazan, dimetil sülfoksitte (oyuk başına 100 µL) eritildi ve çözeltinin optik yoğunluğu, 570 nm dalga boyunda bir mikroplaka spektrofotometresi (Kayto RT-2100C) kullanılarak değerlendirildi.

3.9. DNA Molekülünün Poli(EHDA)-HA Yüzeylere İmmobilizasyonu

poli(EHDA)-HA fırçalara tek zincir RNA probu Mt20f (ACATCTGTACCCACGCCTTC) bağlamak için 10 mM EDAC ve 10 mM NHS içeren pH=6,1 asetat tamponunda bekletildi. poli(EHDA)-HA fırçalara RNA bağlanması floresans mikroskopu ve Lazer Taramalı Konkofal Mikroskobu ile incelendi. Daha sonra DNA immobilizasyonu için RNA kaplı

yüzey, eşlenik DNA probları ile hibritleştirildi. Bu işlem için önce tek zincir RNA bağlı yüzeyler eşlenik DNA varlığında 95 °C' da 5 dak ısıtıldı ısıtıldı ve daha sonra 60 °C'da 5 dak soğutuldu ve bu ısıtma-soğutma işlemi bir kez daha tekrarlandı. Bu işlemden sonra yüzeyler çözeltiden çıkartıldı ve yüzeye bağlanmayan DNA probları su ve metanol ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve yüzeyler argon gazı ile kurutuldu. Bu çalışmada DNA ile etkileşimde floresans özellik gösteren Hoechst 33258, Pentahidrat (bis-Benzimit) kullanıldı. Kontrol işlemi için poli(EHDA)-HA yüzey, tek zincirli RNA bağlı poli(EHDA)-HA yüzey ve eşlenik DNA probları ile hibritleştirilmiş poli(EHDA)-HA yüzey kullanıldı. Bu yüzeylere PBS çözeltisinde hazırlanan Hoechst 33258, pentahidrat (bis-Benzimit) ile muamele edildi ve değişiklikler floresans mikroskopu ve Lazer Taramalı Konkofal Mikroskobu ile ile incelendi.

3.10. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskopu) ile Nanolitografi

Nanolitografi çalışmaları, öncelikle yüzeyler üzerinde temassız modda AFM tekniği kullanılarak çizilecek yüzeyin belirlenmesiyle başlanıldı. Çalışma kapsamında 10 mikron ve 1mikron alan taraması yapıldı ve çizimler bu büyüklükteki alanlarda gerçekleştirildi. Bu kapsamda 10 μm boyutunda olan Si-EHDA yüzeyin üzerinde yaklaşık 1 mikron genişliğinde oyuk çizimi gerçekleştirilerek yüzey üzerinde bağlı bulunan EHDA monomerinin yüzeyden kaldırılması sağlandı. İlk olarak yatay üç çizgi çizilerek EHDA monomerinin bu yüzeylerden kaldırılması sağlandı ve üç yatay çizgi içeren desen elde edildi, bu yüzey 90^{o} derece çevrilerek aynı yüzeye dik 3 çizgi çizildi ve desenli yüzeylerin görüntüsü elde edildi. İkinci olarak nanolitografi çalışmamıza 1 mikron boyutunda yüzey taraması ile devam edildi ve yüzey üzerinde yaklaşık 200 nm genişliğinde oyuklar açıldı ve yüzey üzerinde nano desen oluşumu gerçekleştrildi. Böylece Si-EHDA yüzeyi üzerinde 200 nm genişliğinde EHDA monomerinin kaldırılmasıyla yüzey üzerinde nano kanalların açılması sağlandı. Aynı zamanda Si-poli(EHDA), Si-poli(EHDA)-HA yüzeylerin üzerinde de AFM nanolitografi yöntemiyle çizgi çizimi gerçekleştirildi ve nanokanalların oluşumu sağlanarak yüzeylerin kalınlık ölçümleri belirlendi.

3.11. Ölçümler

Su temas açısı ölçümleri flaş kamera aksesuarlı Krüss DSA-100 marka otomatik ganiometre ile yapıldı. Substrat üzerine 5 μL hacminde saf su damlatılıp, hızlıca

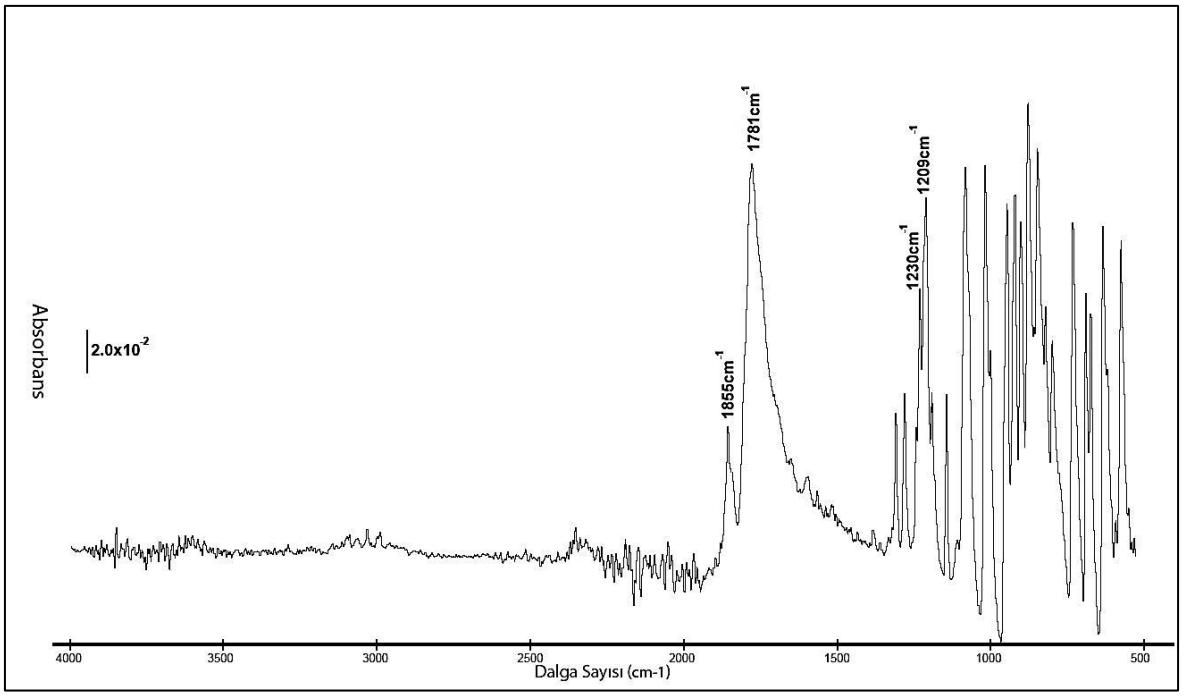
fotoğrafları çekilerek DSA3 program yardımıyla su temas açıları belirlendi. Her bir yüzeyde üç ayrı damla kullanılıp, bu damlaların temas açılarının ortalaması alındı. Substratların yüzey bileşimi bir Mg Kα X-ışını kaynaklı SPECS XPS spektrometre ile belirlendi. Polimer fırçaların yapısal karakterizasyonunda Grazing Angle aksesuarlı Fourier transform infrared (GA-FTIR) spektroskopisi kullanıldı. Spektrumlar Thermo Nicholet 6700 marka FTIR spektrofotometresi ile alındı. Örnekler 4 cm^{-1} ayırıcılıkta 64 kez tarama yaptırılarak 400-4000 cm^{-1} arasında spektrumları elde edildi. Polimer fırçaların kalınlıkları Jobin Yvon-Horiba, model DRE, EL X20C Elipsometre ile belirlendi. Tüm ölçümler 632,8 nm dalga boyunda ve 75^{o}'lik açıda gerçekleştirildi. Polimer fırçaların yüzey morfolojilerinin ve yüzey pürüzlülüğünün belirlenmesinde Hitachi 5100 AFM kullanıldı. Ölçümler, temassız modda bir SI-DF3P3 tipi konsol (Mikro Konsol) kullanılarak gerçekleştirildi. Normal yay sabiti ve konsolun frekansı sırasıyla 2,4 $N\ m^{-1}$ ve 77 KHz idi. Numune ve uç arasındaki kuvvet 0,87 nN' dur. Poli (EHDA) -HA fırçalarının yüzey morfolojisi, 3,0 kV hızlanma voltajında bir Hitachi SU 5000 VP-FEG-SEM cihazı kullanılarak belirlendi. Poli(EHDA) numunelerin mol kütlesi, Perkin Elmer serisi 200 GPC pompası, enjektör, seri bağlı bir kolon sistemi (koruyucu sütun + Styragel HR2 + Styragel HR 3 + Styragel HR 4E + Styragel HR 5E), diferansiyel kırılma indeksi detektörü (Optilab rEX, 654 nm), çok açılı statik ışık saçılımı (LS) dedektörü ile donatılmış GPC-LS sistemi ile ölçüldü. Mobil faz olarak 25°C'de 0,7 mL min^{-1} akış hızı ile THF kullanıldı. Tüm numuneler (0,5-1,0 $g.mL^{-1}$) kullanımdan önce 0,2 um ile filtrelendi. Buna ek olarak, HA'in mol kütlesi ve mol kütle dağılımı, Perkin Elmer serisi 200 GPC pompa, enjektör, seri bağlı dört su kolonu (Ultrahidrojel 120 + Ultrahidrojel 250 + Ultrahidrojel 500 + Ultrahidrojel 1000), 654 nm'de Wyatt Optilab diferansiyel kırılma indeksi detektörü (RI) ve Dawn Heleos çok açılı statik ışık saçılımı (LS) detektörü kullanılarak belirlendi. Mobil faz olarak, 25 °C'de 1,0 mL/dak akış hızına sahip su ile hazırlanan 0,1 M sodyum nitrat çözeltisi ($NaNO_3$) kullanıldı. Poli (EHDA)–HA fırçalarının DNA hibridizasyonun incelenmesi amacıyla Zeiss, LSM 700 Lazer Taramalı konfokal mikroskopisi ve Floresans Spektroskopisi kullanıldı.

4. BULGULAR, TARTIŞMA VE SONUÇ

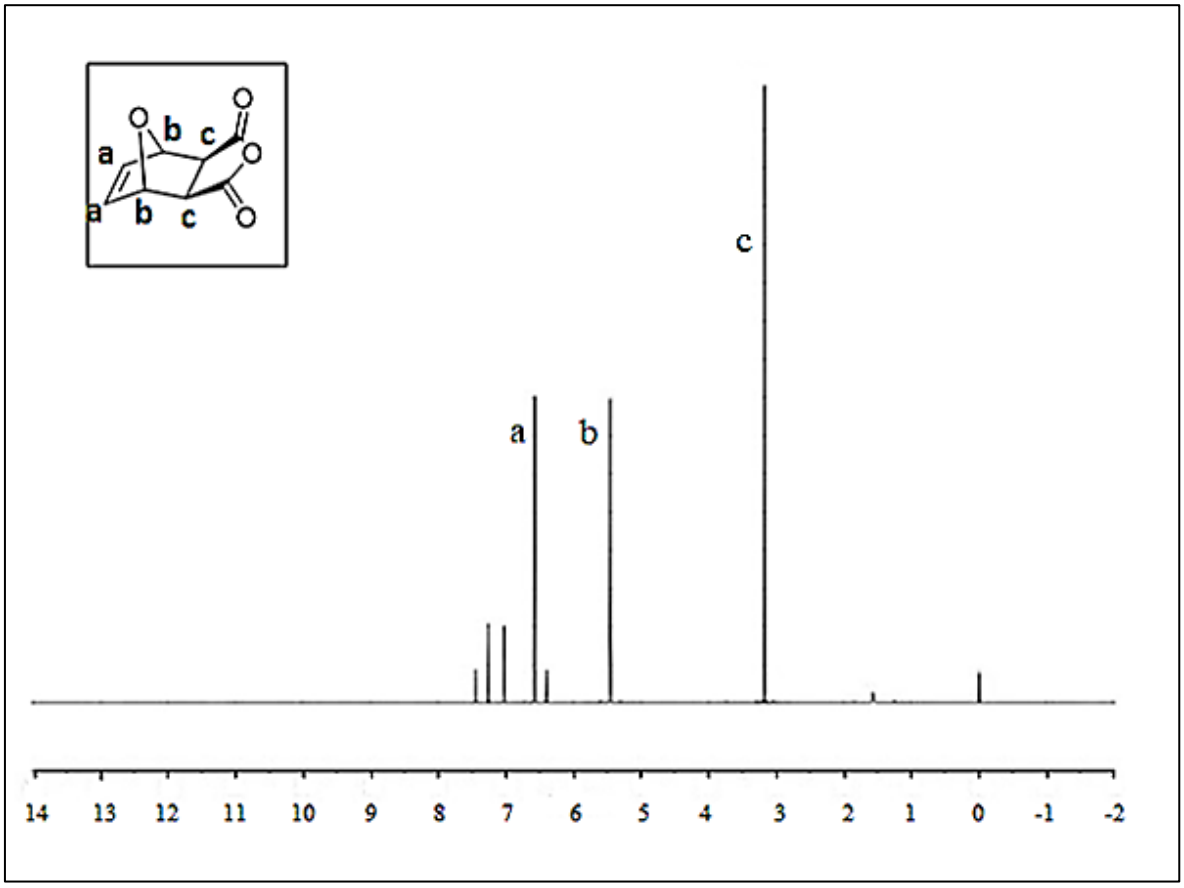
Son yıllarda, nitroksit aracılı polimerizasyon (NMP) (Andruzzi, 2005; Cimen, 2012; Cimen, 2013; Kobayaski, 2006; Matsuno, 2004; Zhao, 2006;), atom transferi radikal polimer polimerizasyonu (ATRP) (Demirci, 2010; Ejaz, 1998; Huang, 1997; Matyjaszwski, 1999; Turan, 2010), katılma-ayrılma zinciri transfer (RAFT) polimerizasyonu (Baum, 2002; Chen, 2006; Demirci, 2012; Gürbüz, 2011; Yu, 2004; Zhai, 2004;) ve halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP) (Juang, 2001; Kim, 2000; Moon, 2002) gibi polimerizasyon yöntemleri çok yönlülük ve fonksiyonel grup uyumluluğu sağlamak için kullanılmaktadır. Bu polimerizasyon yöntemleri arasında, yüzeye başlatılan ROMP, halkasal olefinezden polimer fırçalar üretmek için metatez katalizörlerinin varlığında gerçekleştirilir ve polimerizasyon sırasında korunan iki çift bağ nedeniyle diğer polimerizasyon yöntemlerinden farklılık gösterir. ROMP'nin yüksek sıcaklık gerektirmez ve ortam sıcaklığında minimum yan tepkimeler olur. Ayrıca, katı bir substrat yüzeyinde polimer zincirlerinin ucundaki çift bağlar tiyol-en-klik tepkimesi ile tiyol moleküllerinin birleştirilmesiyle polimer-biyopolimer konjugasyonları yapılabilir.

4.1. EHDA Monomerinin Sentezi

EHDA monomeri norbornen halkası varlığı ile ROMP için önemli bir monomerdir. Maleik anhidrit ve furan THF içinde çözülüp 4 gün oda sıcaklığında tutulmasıyla sentezlendi. EHDA'nın FTIR spektrumunda 1855 cm^{-1}'de –C=O gerilmesine ait tekli band, 1781 cm^{-1}'de –C=O karbonil gerilme bandı, 1230 cm^{-1} ve 1209 cm^{-1}'de -C-O gerilmelerine ait bandlar görüldü (Şekil 4.1). ^{1}H NMR spektrumunda –CH=CH- grubuna ait protonlar 6,6 ppm'de, -CH-O-CH grubuna ait protonlar 5,5 ppm'de ve -CH-CH- grubuna ait protonlar ise karbonil grubuna yakınlığı nedeniyle 3,2 ppm'de bulunmaktadır ve elde edilen pikler literatürle uyum içerisindedir (Yang, 2017) (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. EHDA monomerinin FTIR spektrumu

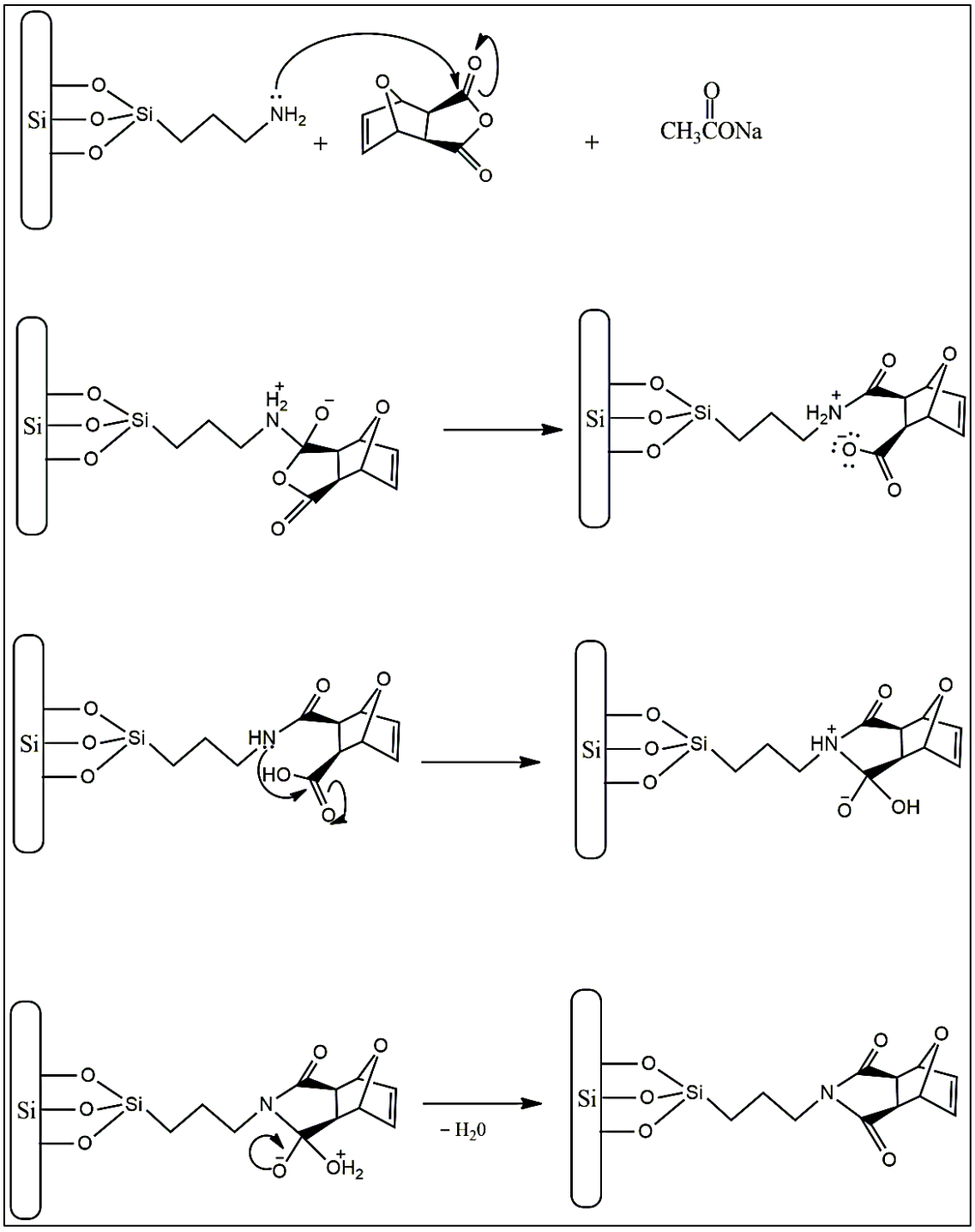


Şekil 4.2. EHDA monomerinin ^{1}H-NMR spektrumu

4.2. EHDAmonomerinin Silisyum Substrata Bağlanması

Saf kristal silisyum, saydam olmayan koyu gri renkli, parlak, sert ve kırılgan olup örgü yapısı elmasa benzemektedir. Saf kristal silisyum özel bir tür yüzey merkezli kübik yapıya sahiptir ve bu kristal yapıların özellikleri sahip oldukları doğrultu ve düzlemlere göre farklılık gösterir. Kristalleri oluşturan bu tanecikler, üç boyutlu bir kristal örgüsü içinde belirli bir düzende sıralanmışlardır ve bu kristal yapı analizleri için her bir düzlem indisler ile belirlenmektedir. Kristal kafes düzlemleri üç Miller indisi ile (h k l) şeklinde belirtilir. Burada; h, k ve l sırasıyla düzlemin x, y ve z eksenlerine ait indisleridir. Kübik kristallerde bir doğrultu kendisi ile aynı indise sahip düzleme diktir. Silisyumun genel olarak Si(111) ve Si(100) düzlemsel yapılarında kullanılmaktadır. Tez çalışmamızda Si(100) düzlemsel yapıya sahip silisyum disk yüzeyleri kullanıldı.

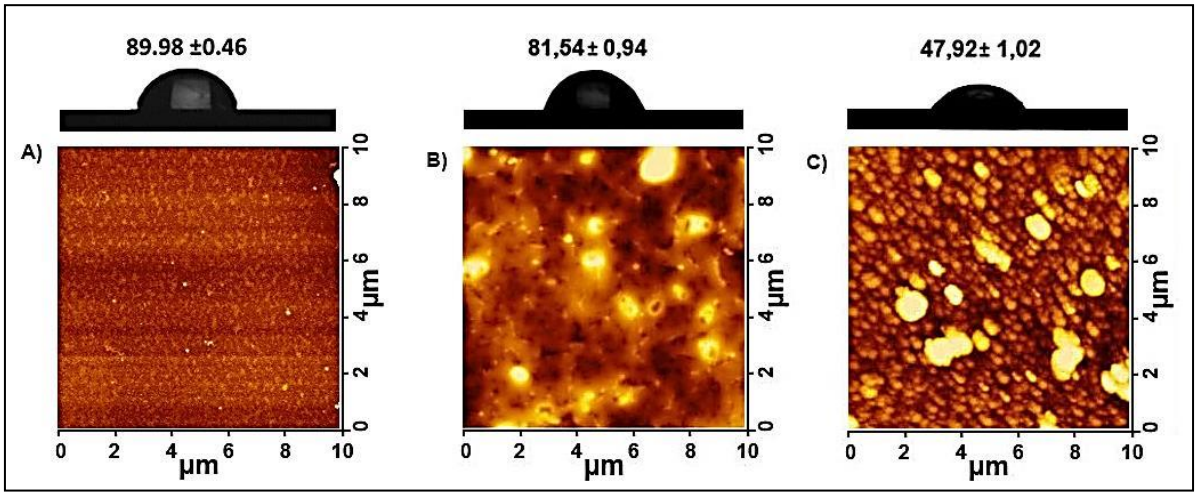
Silisyum disk UV-ozon işlemiyle organik kirliliklerden arındırıldıktan sonra pirana çözeltisinde bekletilerek hidroksil sonlu (Si-OH) yüzey elde edildi. APTES ara bağlantı molekülleri, SAM koşulları altında silisyum yüzeyine immobilize edildi (Zengin,2013). Si-APTES yüzeyinin su temas açısı yaklaşık olarak 58° olarak belirlendi, bu sonuç literatürdeki değerlerle uyumludur (Zengin, 2013). Daha sonra Si-APTES substrat, furan maleik anhidrit ve *N,N* dimetilasetimit tepkime balonuna konularak 60 °C sıcaklıkta azot atmosferinde karıştırıldı ve asetik anhidrit içinde katalitik miktarda sodyum asetat çözülerek karışıma eklendi. Sonuçta EHDA bağlı silisyum substrat (Si-EHDA) elde edildi. EHDA monomerinin Si-APTES yüzeyine bağlanma mekanizması Şekil 4.3'de şematik olarak gösterildi.



Şekil 4.3. EHDAmonomerinin Si-APTES yüzeyine bağlanma mekanizmasının şematik gösterimi

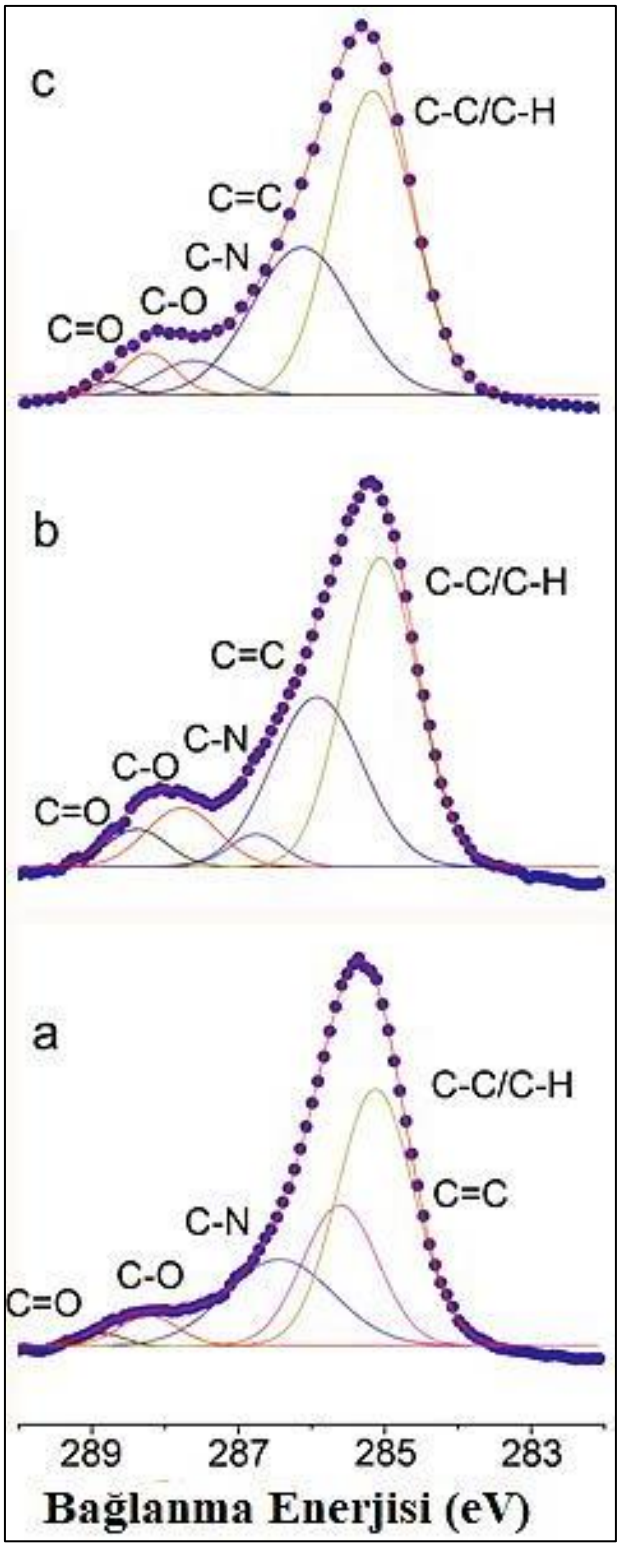
EHDA monomerinin Si-APTES yüzeyine bağlanmasından sonra (Şekil 4.4a) su temas açısı 89 °'ye yükseldi, bu, monomerin yüzeye immobilizasyonunun gerçekleştirdiğini işaret etmektedir. Si-EHDA yüzeyinin elipsometrik film kalınlığının 2 nm' den az olduğu belirlendi. Elipsometrik film kalınlığı yüzeyin üç ayrı bölgesinden elde edilen değerlerin ortalaması alınarak elde edildi. Si-EHDA yüzeye ait 2-boyutlu AFM görüntüleri, su değme

açısı sonucu ve oluşan su damlacığının (10 µL) görüntüsü Şekil 4.4a'da gösterildi. Si-EHDA yüzeyin pürüzlülüğünün bir ölçüsü olan rms değerinin yaklaşık 0,8 olarak belirlenmesi monomerin yüzeye homojen bir şekilde dağılımla bağlandığını göstermektedir (Şekil 4.4a). Yüzeyin homojenliği düzgün bir zincir büyümesi olabileceğini de işaret etmektedir.



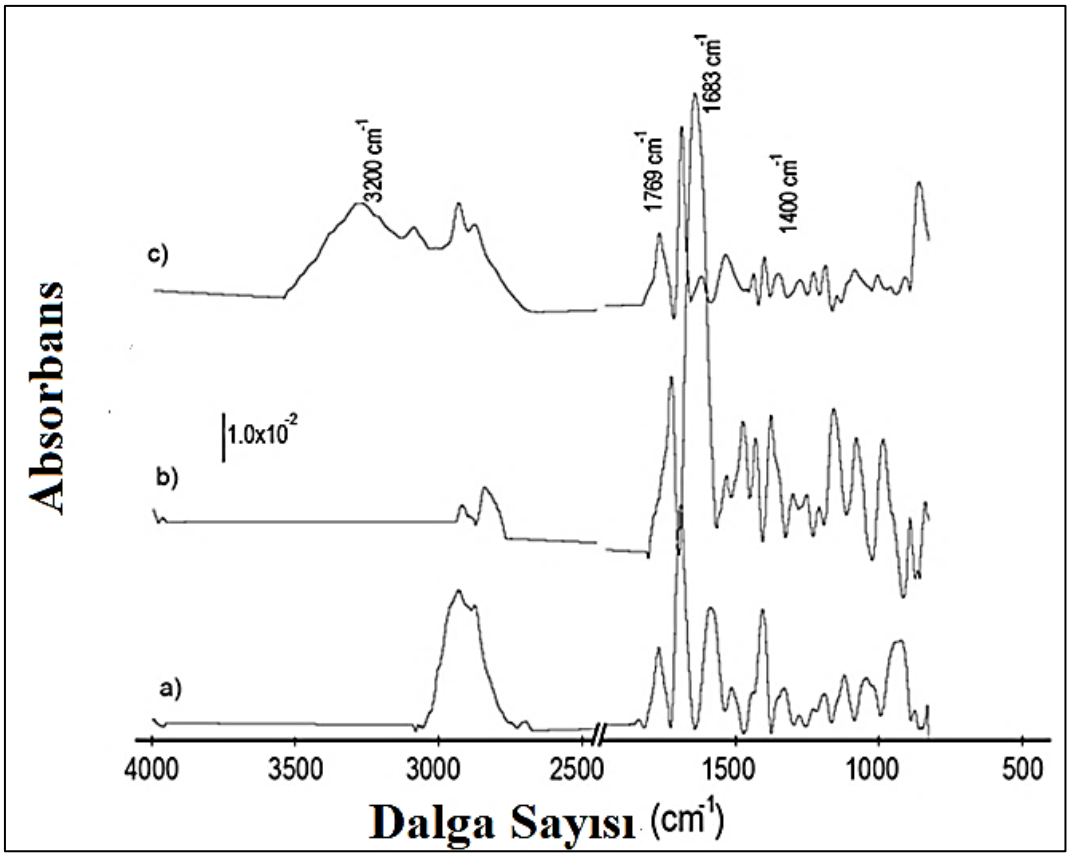
Şekil 4.4. 2D-AFM görüntüleri (altta) ve 4 □L su damlacıklarının fotoğrafları (üstte).(a) Si-EHDA, (b) Si-poli(EHDA) ve (c) Si-poli(EHDA)-HA

Si-EHDA'nın kısmi taramalı C 1s XPS spektrumunda beş farklı kimyasal çevreye sahip 285,1 eV (C-C/C-H), 285,7 eV (C=C), 286,5 eV (C-N), 288,1 eV (C-O) ve 288,9 eV (C=O) pik gözlemlendi (Şekil 4.5a).



Şekil 4.5. C1s kısmi taramalı XPS spektrumları (a) Si-EHDA, (b) Si-poli(EHDA) ve (c) Si-poli(EHDA)-HA

Si-EHDA'nın GA-FTIR spektrumunda 1683 cm^{-1}'de –C=O gerilmesine ait band, 1769 cm^{-1}'de –C=O karbonil gerilme bandı ve 1400 cm^{-1}'de -C-O gerilme bandının görülmesi EHDA monomerinin Si-APTES yüzeyine bağlandığını göstermektedir (Şekil 4.6a).



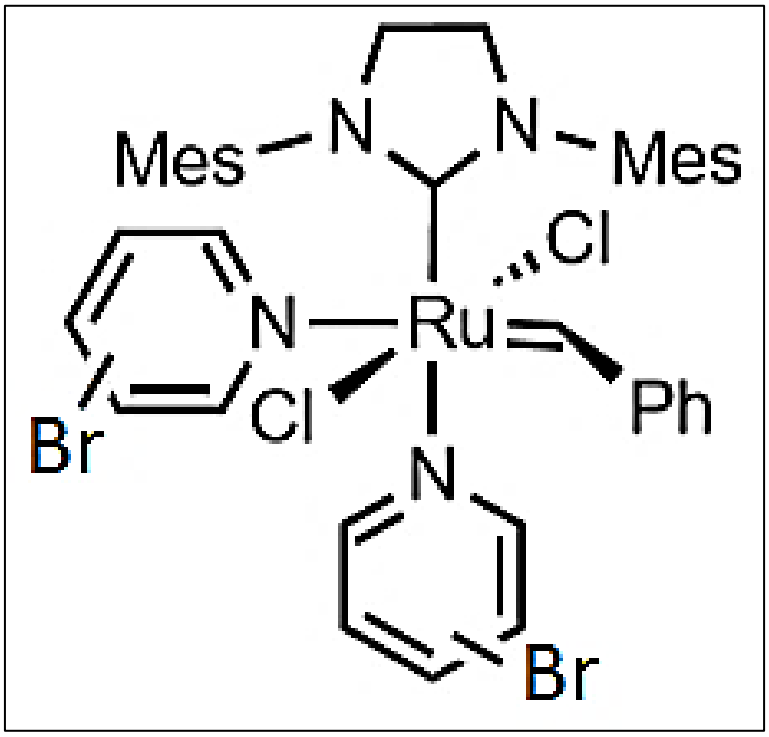
Şekil 4.6. GA-FT-IR spektrumları (a) Si-EHDA, (b) Si-poli(EHDA) ve (c) Si-poli(EHDA)-HA

4.3. Si-EHDA Yüzeyinde Başlatılan ROMP ile Poli(EHDA) Fırça Sentezi

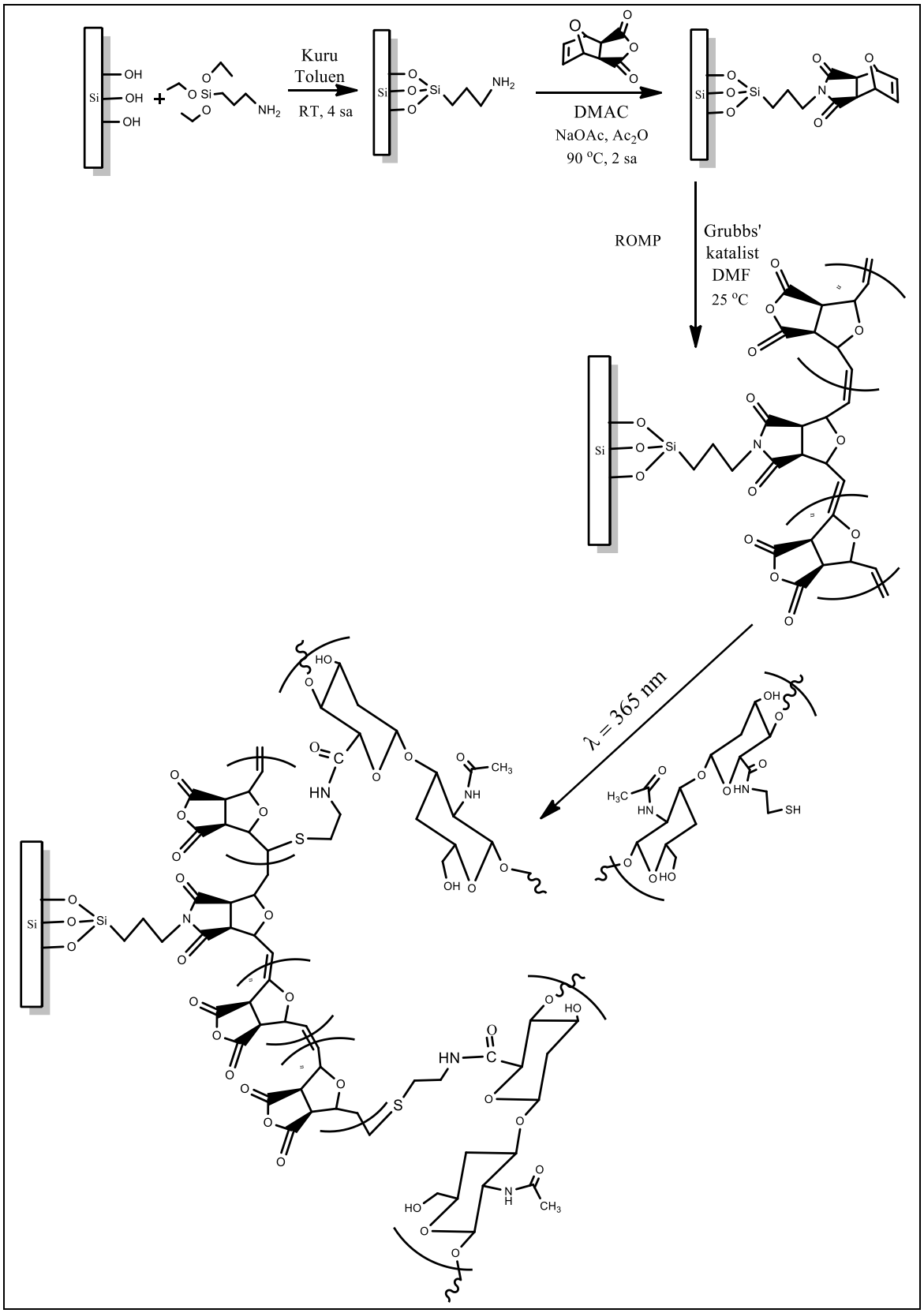
Si-EHDA yüzeylerin ROMP ile polimerizasyonu gerçekleştirildi. ROMP polimerizasyonu için Grubs III katalisti [$(H_2IMes)(3\text{-Br-py})_2(Cl)_2Ru{=}CHPh$] kullanıldı (Şekil 4.7). EHDA'nın yüzeyde başlatılan ROMP ile sentezi, Si-EHDA substratı varlığında DMF içinde farklı katalizör/monomer oranlarında (katalizör/monomer (mmol/mmol): (0,09, 0,04, 0,02 ve 0,01) oda sıcaklığında gerçekleştirildi (Şekil 4.8). Sentezlenen polimer yüzeylerin GA-FTIR, AFM, su değme açısı ölçümü, XPS ve elipsometri ölçümleri ile karakterize edildi.

Literatürde EHDA monomerinin Grubs III katalisti ile yüzeyde başlatılan ROMP polimerizasyonuyla ilgili deneysel çalışma yoktur, bu nedenle optimum sürenin belirlenmesi için farklı sürelerde yüzeyde polimerleşme sağlandı. Polimerizasyon süresinin belirlenmesinde [katalizör]/[monomer]=0,04 kullanılarak sentezlenen poli(EHDA) fırça yüzeyi kullanıldı. Böylece, aynı miktarda Grubbs III katalizörü kullanılarak yüzeyde başlatılan ROMP'la polimer fırçalar sentezlendi ve farklı sürelerde (1, 3, 6, 16 ve 24 saat)

sonlandırma yapılarak optimum sürenin belirlenmesi sağlandı. Ayrıca çözelti de ROMP'la aynı koşulllarda polimerler sentezlendi. Yüzeyde başlatın ROMP'la sentezlenen polimer fırçaların AFM ve su değme açısı ölçümleri alındı. Su değme açıları Çizelge 4.1'de verildi. Si-EHDA yüzeyin su değme açısı ($89,98^{o}$ ±0,46) göz önüne alındığında farklı sürelerde sentezlenen polimerlerin su değme açılarının değiştiği görülmektedir.

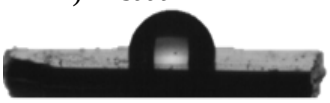
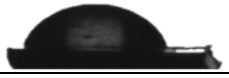


Şekil 4.7. Grubbs III metatez katalisti (Mes=2,4,6-trimetilfenil)

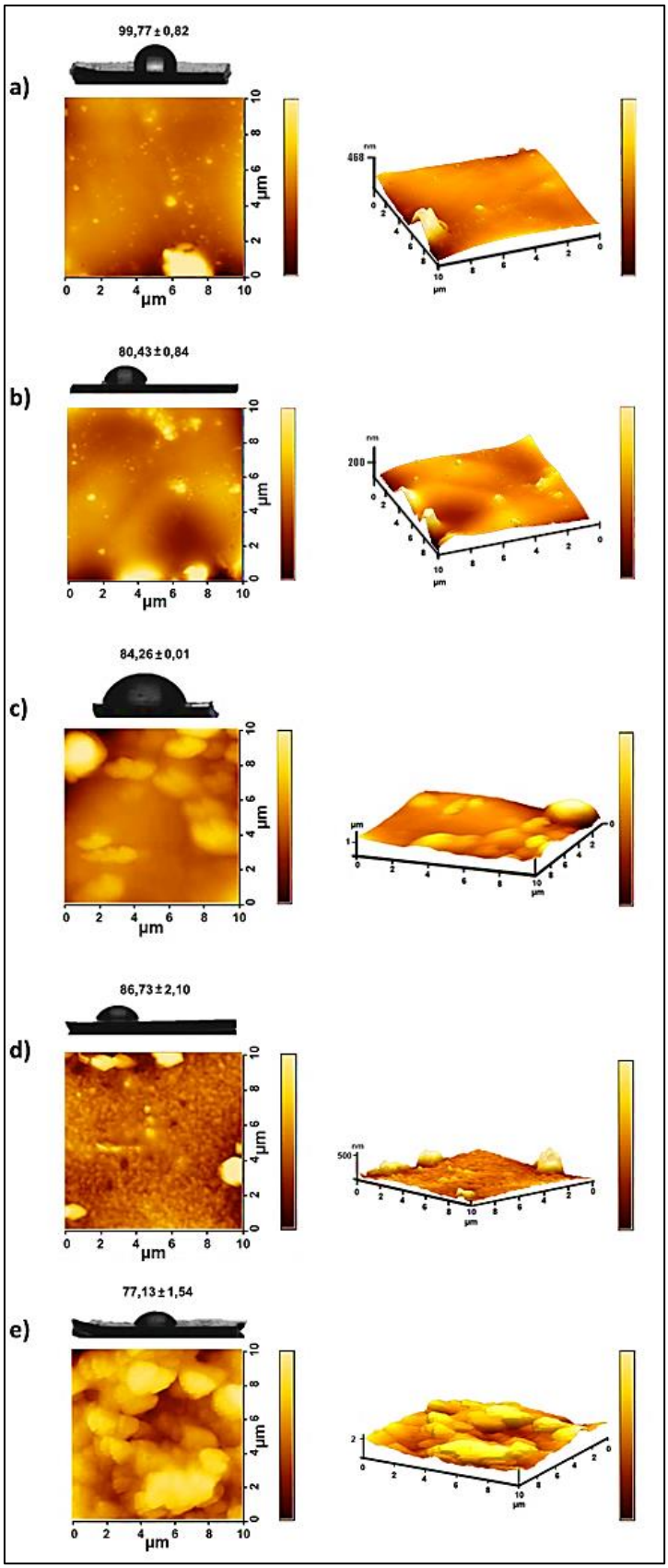


Şekil 4.8. Poli(EHDA)-HA fırçaların yüzeyde başlatılan ROMP ile sentezinin şematik gösterimi

Çizelge 4.1. Farklı sürede sentezlenen polimer yüzeylerin su değme açısı görüntüleri ve sonuçları

	Su Değme Açısı (^{o})	İlerleme Açısı (θi)	Gerileme Açısı (θg)	Histerizi (θ i - θ g)
A) 1 saat 	99,77±0,82	99,0	100,6	1,6
B) 3 saat 	80,43±0,84	81,3	79,6	0,7
C) 6 saat 	84,26±0,01	84,3	84,2	0,1
D) 16 saat 	86,73±2,10	84,6	88,8	2,2
E) 24 saat 	77,13±1,54	78,7	75,6	3,1

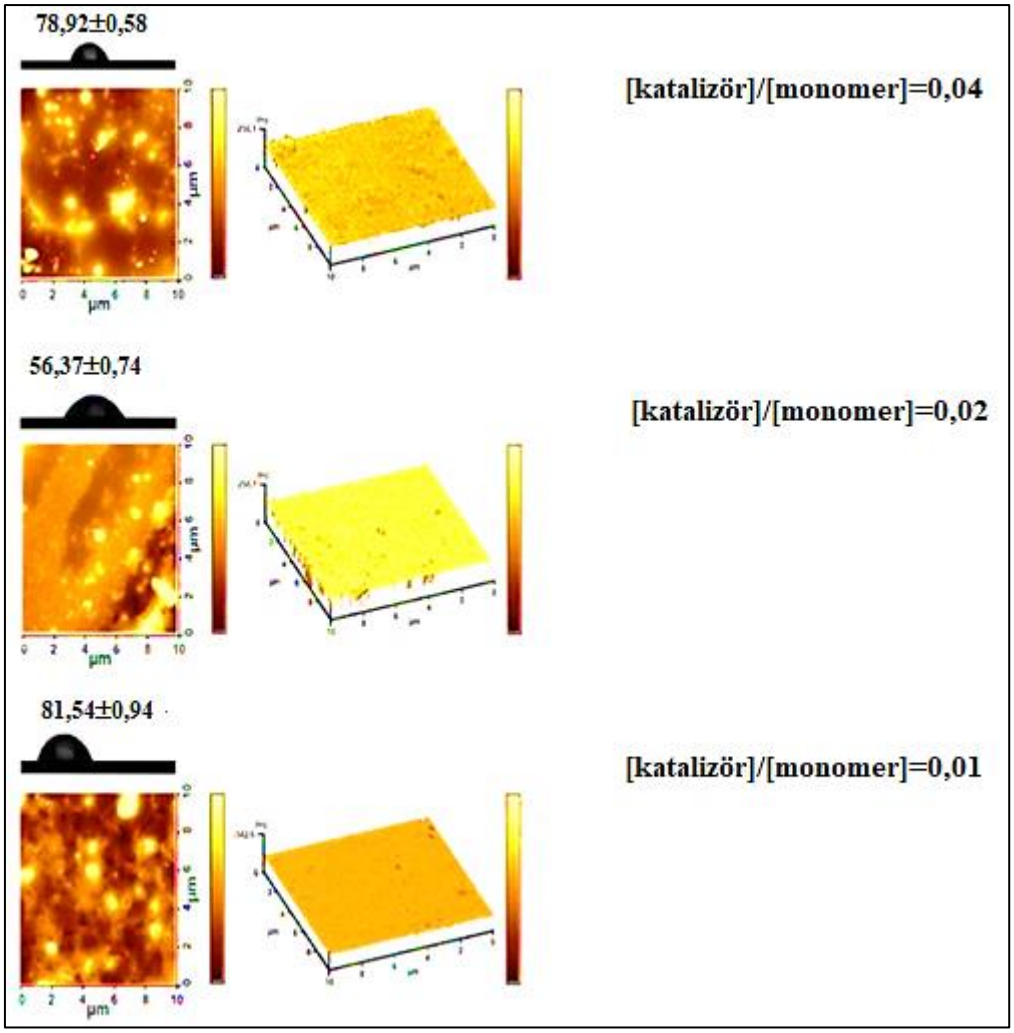
Farklı sürelerde sentezlenen polimer fırçaların ([katalizör]/[monomer]=0,04) AFM görüntüleri alındı. Her bir sürede sentezlenen polimer yüzeylerin yüzey pürüzlülüğü (Root Mean Square [rms]) alındı; 1 saat süreyle gerçekleştirilen polimerizasyon ile elde edilen polimer fırçanın yüzey pürüzlülüğünün ölçüsü olan rms değeri 21,24 nm olarak ölçüldü. Polimerleşme süresi 6 saat olan yüzeyin AFM görüntüsü incelendiğinde ise rms değeri 6,149 nm olarak ölçüldü ve yüzeyin homojen görünümde olduğu belirlendi. Polimerleşme süresi 24 saat olduğunda ise rms değeri 79,6 nm'ye yükseldiği belirlendi ve kısmen polimer yığınların oluştuğu söylenebilir. AFM ve su değme açısı ölçümlerinden elde edilen sonuçlar incelendi ve polimerizasyon süresi 6 saat olarak belirlendi, bundan sonra yapılan yüzeyde başlatılan ROMP polimerizyon çalışmaları 6 saatte gerçekleştirildi.



Şekil 4.9. Farklı sürelerde a) 1 sa, b) 3 sa, c) 6 sa, d) 16 sa ve e) 24 sa hazırlanan poli(EHDA) fırçaların 2- ve 3-boyutlu AFM, yükseklik dağılım ve su damlacığı görüntüleri

Si-EHDA substratı varlığında DMF içinde farklı katalizör/monomer oranlarında (katalizör/monomer (mmol/mmol): (0,01, 0,02, 0,04 ve 0,09) oda sıcaklığında 6 saatte gerçekleştirilerek elde edilen polimer fırçaların GA-FTIR, AFM, su değme açısı ve elipsometri ölçümleri yapıldı.

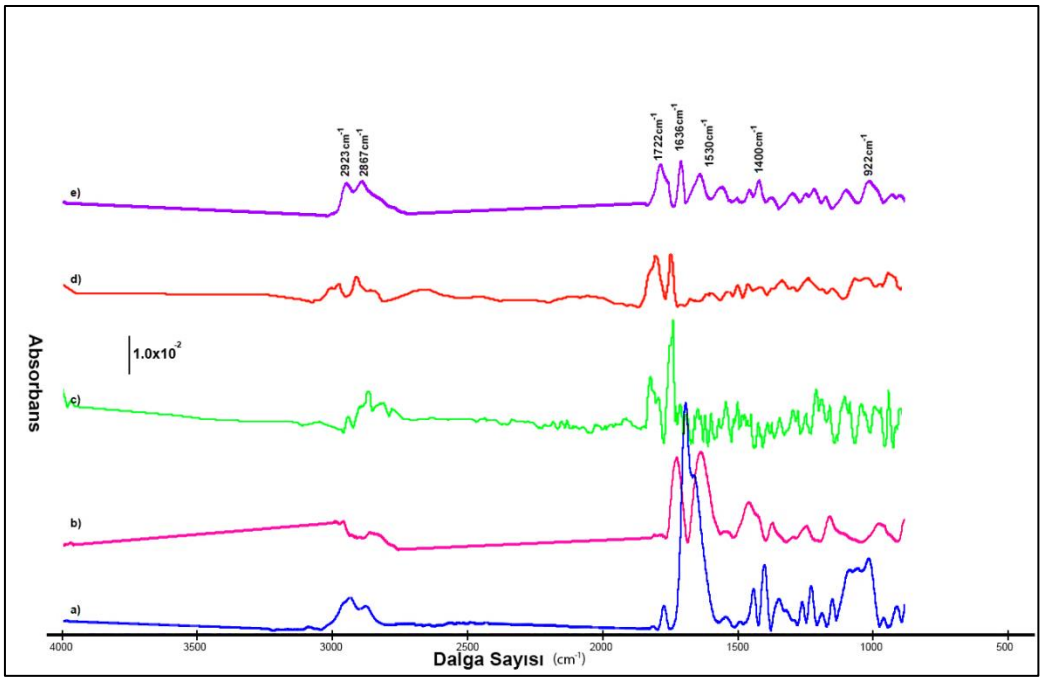
[katalizör]/[monomer]=0,04 kullanılarak sentezlenen poli(EHDA) fırçaların yüzey pürüzsüzlüğünün ölçüsü olan rms değeri 6,149 nm iken, [katalizör]/[monomer]=0,01 kullanılarak sentezlenen polimer fırçanın rms değeri ise 9,682 nm'ye yükseldi. Polimer mol kütlesi arttığı için rms değerinin arttığı tespit edildi.



Şekil 4.10. Farklı [katalizör]/[monomer] oranlarında sentezlenen poli(EHDA) fırçalarının 3- ve 2-boyutlu AFM ve su damlacıklarının görüntüleri

Farklı [katalizör]/[monomer] oranlarında sentezlenen Poli(EHDA) fırçaların GA-FTIR ve çözelti ortamında sentezlenen serbest polimerin GA-FTIR spektrumları Şekil 4.11'de

verildi. Spektrumlar incelendiğinde yaklaşık 2923 cm^{-1} civarında gözlenen alifatik gruplara ait gerilmeler görülmektedir, yine ölçümü yapılan yüzeylerin gergin C=0 karboksil grubuna ait 1722 cm^{-1} ve 1636 cm^{-1} pik değerleri belirlendi, ayrıca tüm yüzeylerin 1400 cm^{-1} civarında halka açılmasından kaynaklanan C=C gerilimleri ölçüldü.



Şekil 4.11. Poli(EHDA)'nın GA-FTIR spektrumları, (a) Çözelti ortamında sentezlenen ve (b) [katalizör]/[monomer]=0,09, (c) [katalizör]/[monomer]=0,04, (d) [katalizör]/[monomer]=0,02, (e) [katalizör]/[monomer]=0,01

Çözeltilerdeki serbest polimerler ve substrat üzerindeki polimer fırçalar aynı anda sentezlendi. ROMP ile sentezlenen polimerlerin mol kütleleri Grubbs III katalist miktarının belirlenmesi ile hesaplanabilmektedir. İstenilen mol kütlesinde polimer sentezlemek için, örneğin poli(EHDA)'nın kuramsal mol kütlesinin ($\bar{M}_{n,teo}$) 10 000 g mol^{-1} olması için gerekli katalizör miktarı aşağıdaki şekilde hesaplandı. ROMP ile farklı katalizör/monomer (mmol/mmol: 0,01, 0,02, 0,04 ve 0,09) oranlarında sentezlenen Si-poli(EHDA) polimer fırçaları için gerekli olan Grubbs III miktarı bu örnekte gösterildiği gibi hesaplandı.

$\bar{M}_{n,teorik}$(10000 g mol^{-1} mol kütlesi için)

EHDA'nın mol kütlesi=370,4112 g mol^{-1}

$$\text{Polimerizasyon derecesi (DP)} = \frac{10000}{370,4112}$$

DP=26,997

EHDA= 0,05 g ($1,34x10^{-4}$ mol)

$$[\text{katalizör}]=\frac{[\text{EHDA}]}{\text{DP}}$$

$$[\text{katalizör}]=\frac{1,34x10^{-4}}{26,997}$$

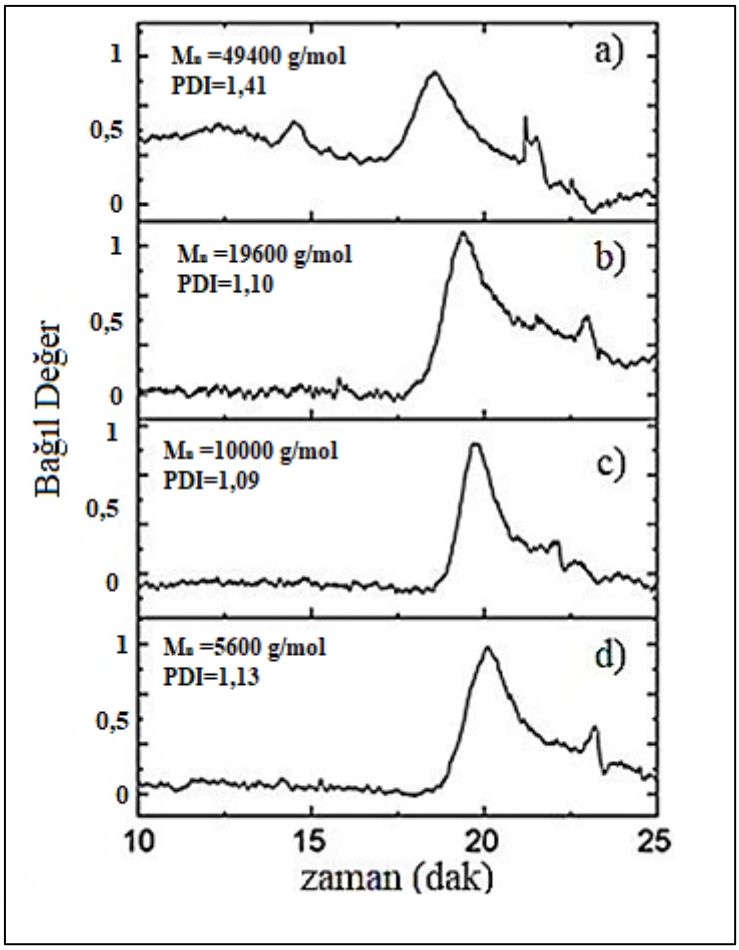
$[\text{katalizör}]=4,967x10^{-6}$mol

Grubbs III katalizörünün mol kütlesi= 884,98 g mol^{-1}

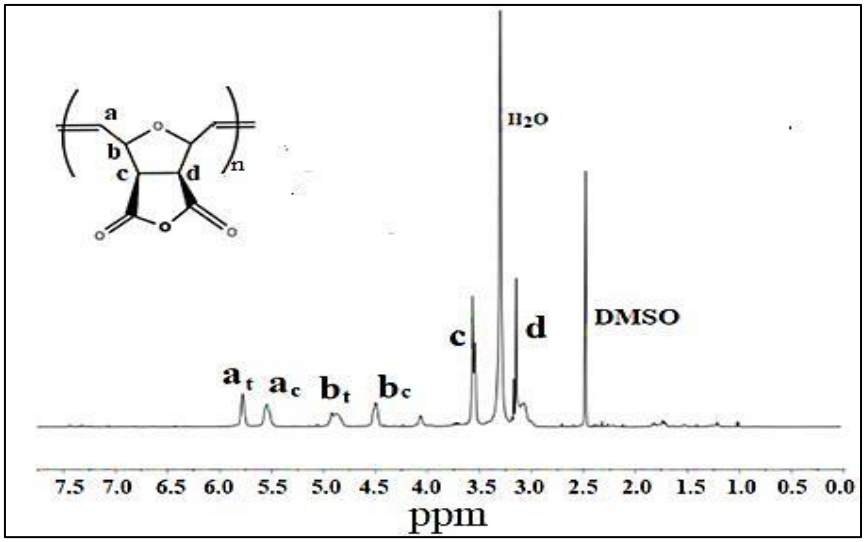
$[\text{katalizör}]= 4,967x10^{-6}x884,981$

$[\text{katalizör}]=4,39x10^{-3}$ g

Tepkime ortamı polimerizasyon işlemi süresince homojendi. Polimerizasyon sırasında polimer çökmesi gözlenmedi. EHDA'nın yüzeyde başlatılan ROMP polimerizasyonundan sonra su temas açısı hafifçe 81^{o}'ye düştüğü tespit edildi, bu da silisyum yüzeyinde kısmen hidrofilik poli(EHDA) fırçaların oluşumu anlamına gelmektedir (Şekil 4.4b). Si-poli(EHDA) yüzeyinin rms pürüzlülük değerindeki (rms = 13,07 nm, kalınlık = 10,3 nm) artış, yüzeyde (Şekil 4.4b) poli(EHDA) zincirlerinin eşit olmayan şekilde dağılmasıyla ilgili olabilir. Aynı zamanda, Si-poli(EHDA)'nın kısmi taramalı C1s XPS spektrumunda sırasıyla 285,0 eV (C-C/C-H), 286,1 eV (C=C) , 286,7 eV (C-N), 287,9 eV (C-O) ve 288,5 eV (C=O) bağlanma enerjilerinde beş farklı kimyasal çevreye sahip pik bulunmaktadır ve piklerde kısmi pik şiddeti artışı gözlemlendi (Şekil 4.5b). Si-EHDA yüzeyinin GA-FTIR spektrumunda görülen C=O, C-O ve C=C bandları polimerizasyonun bir sonucu olarak biraz daha düşük alanlara kaymaktadır (Şekil 4.6b). Bunun yanında spektroskopi ve topoloji çalışmaları bir polimerin mol kütlesi ve polidispersity indeksi (*PDI*) değerleri hakkında bilgi vermemektedir. 1,0x1,5 cm^2 gibi küçük bir silisyum yüzeyde oluşturulan polimer miktarı çok küçüktür ve GPC ile mol kütlesini belirlemek için yeterli değildir. Bu nedenle çözelti içinde oluşan serbest poli(EHDA) önce soğuk THF ile çökeltildi ve daha sonra sayıca ortalama mol kütlesi ($\overline{M}_{n,GPC}$) GPC ile belirlendi (Şekil 4.12 ve Çizelge 2). Elde edilen GPC eğrileri oldukça simetrikti ve herhangi bir omuz görülmedi. PDI değerleri 1,4'ten düşüktü. Serbest poli(EHDA)'nın ^{1}H-NMR spektrumu Şekil 4.13' de gösterildi. Poli(EHDA)'nın ^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde, okzanorbornen halkasının polimerleşmesiyle, 6,6 ppm de gelen monomer olefin proton pikinin kaybolduğu, polimer yapısında bulunan olefin proton sinyallerinin -C=C- (5,8ppm), =CH-CH-O (4,9 ppm) de geniş olarak geldiği gözlemlendi ve –CH-CH- (3,1-3,6 ppm) karakteristik pikleri görüldü.



Şekil 4.12. Farklı [katalizör]/[monomer] oranında sentezlenen poli(EHDA)'nın farklı molekül ağırlıklarının GPC kromotogramları. [katalizör]/[monomer] oranları; a) 0,01, b) 0,02, c)0,04 ve d) 0,09



Şekil 4.13. Poli(EHDA)'nın ^{1}H-NMR spektrumu (Çözücü:DMSO)

Poli(EHDA) fırçaların aşılanma yoğunluğu σ (zincir/nm^2) ve aşılanma noktaları arasındaki ortalama uzaklık (*D*, nm) aşağıdaki eşitlikler kullanılarak belirlendi (Jin, 2010).

$$\sigma = \frac{h\rho N_A 10^{-21}}{\bar{M}_{n,GPC}} \quad (4.1)$$

$$D = \left(\frac{4}{\pi\sigma}\right)^{1/2} \quad (4.2)$$

Bu eşitliklerde N_A, ρ, h ve $\bar{M}_{n,GPC}$ sırasıyla Avogadro sabiti, yoğunluk, elipsometrik kalınlık ve GPC ile belirlenen polimerin ortalama mol kütlesidir. Elipsometrik kalınlık (h, nm) ve poli(EHDA) 'nın mol kütlesi, katalizör/monomer oranına bağlı olarak değişir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.2. Poli(EHDA)'nın mol kütlesininin ve elipsometrik kalınlığının [katalizör]/[monomer] oranı ile değişimi

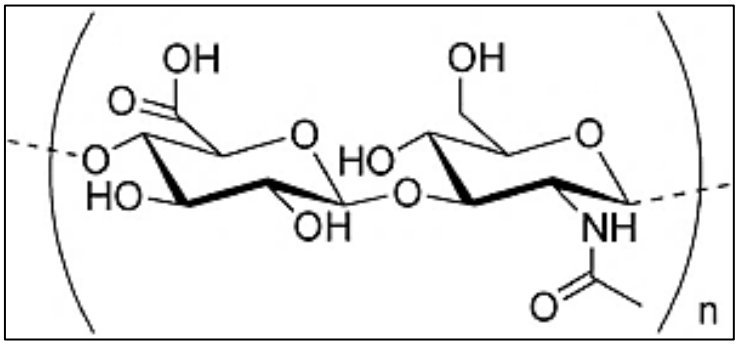
[katalizör]/[monomer]	Elipsometrik kalınlık (nm)	$\bar{M}_{n,teo}$ g mol^{-1}	$\bar{M}_{n,GPC}$ g mol^{-1}
0,09	1,7	4000	5600
0,04	6,1	10000	10000
0,02	10,3	20000	19600
0,01	31,4	50000	49400

Bununla birlikte, Si-EHDA derişimi, yani yüzeydeki aktif merkezlerin derişimi sabit olduğundan, aşılama parametreleri de (aşılanma yoğunluğu σ (zincirler/nm^2) ve aşılanma noktaları (D, nm) arasındaki ortalama uzaklık) sabit olmalıdır. Bu nedenle, katalizör/monomer oranına dayanarak hesaplanan σ (zincirler /nm^2) ve D (nm) ortalama değerlerinin sırasıyla, 0,50 zincir/nm^2 ve 1,65 nm'dir ve substrat yüzeyinde aşılanma yoğunluğunun yüksek olduğu belirlendi.

4.4. HA'nın Poli(EHDA) Zincirlerine Bağlanması

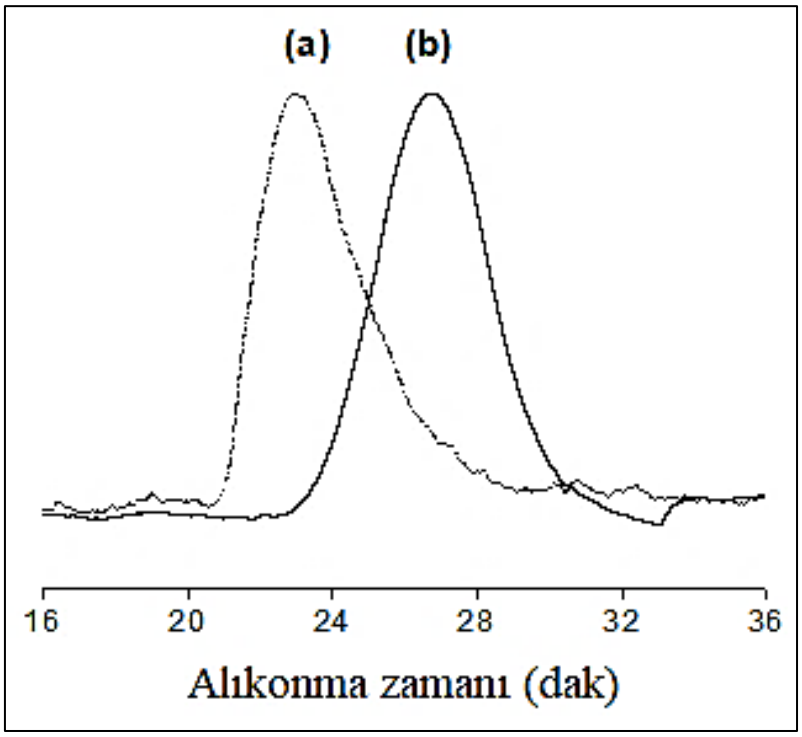
HA, insan vücudunun bağ dokusunda bağlayıcı ve koruyucu bir madde olarak görev yapan önemli bir polisakkarittir (Şekil 4.14) HA insan vücudunda üretilir. HA doğal olarak horoz ibiğinden veya inek gözünün sıvı kısmından elde edilmektedir. Ayrıca laboratuar ortamında biyosentez ile streptococcus bakterisi kullanılarak sentezlenir. HA molekülleri

yüksek mol kütlesine (~1,8x 10^6 g mol^{-1}) ve çok yüksek viskoziteye sahiptir. HA asidik hidroliz ile düşük mol kütlesine düşürülebilir.



Şekil 4.14. HA'nın molekül yapısı

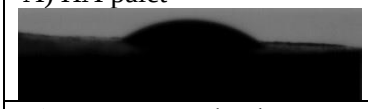
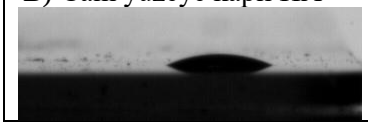
Bu çalışmada HA, $NaNO_2$ ve asetik asit karışımı içinde farklı sürelerde bekletilerek düşük mol kütleli HA molekülü (58x10^3 g mol^{-1}) elde edildi (Şekil 4.15).



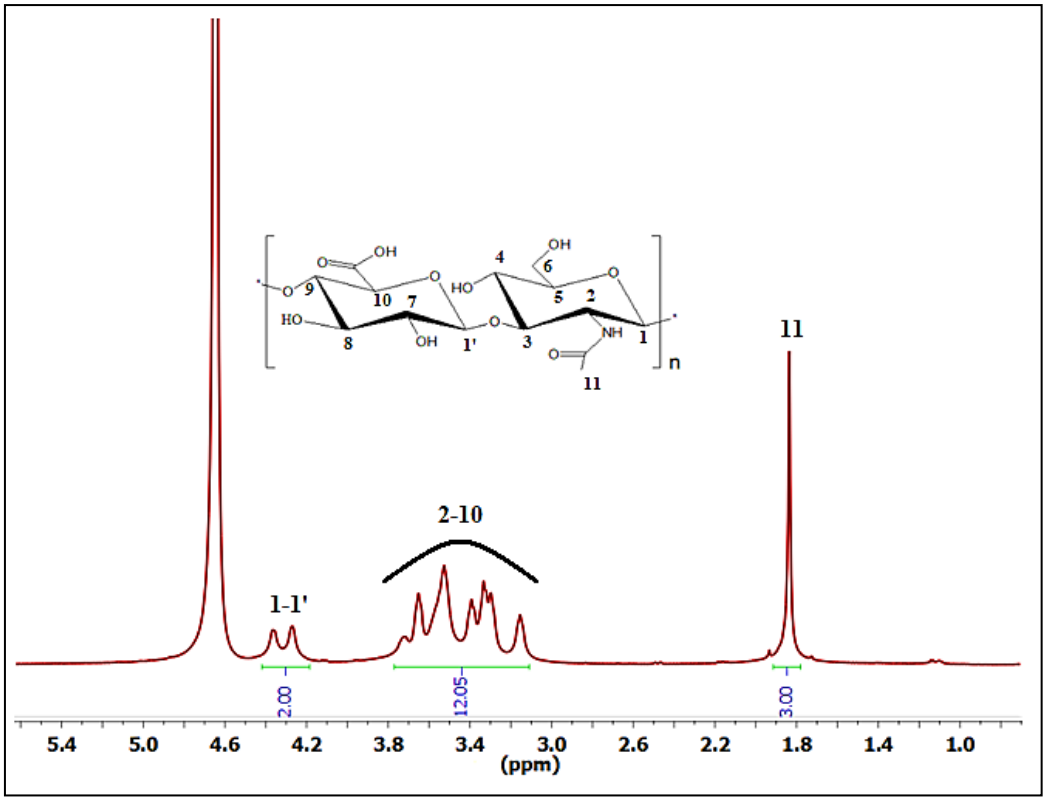
Şekil 4.15. HA'nın hidrolizinden önce (a) ve sonra (b) GPC kromatogramları

HA'nın su değme açısını belirlemek için hiyalüronik asit pelet haline getirildi ve ayrıca hiyalüronik asit çözeltisiyle cam yüzey kaplandı. HA peletinin ve kaplanan cam yüzeyin su değme açısı ölçüldü ve HA'nın oldukça hidrofilik yapıda olduğu belirlendi, su değme açısı ölçümü ve görüntüleri Çizelge 4.3'de verildi.

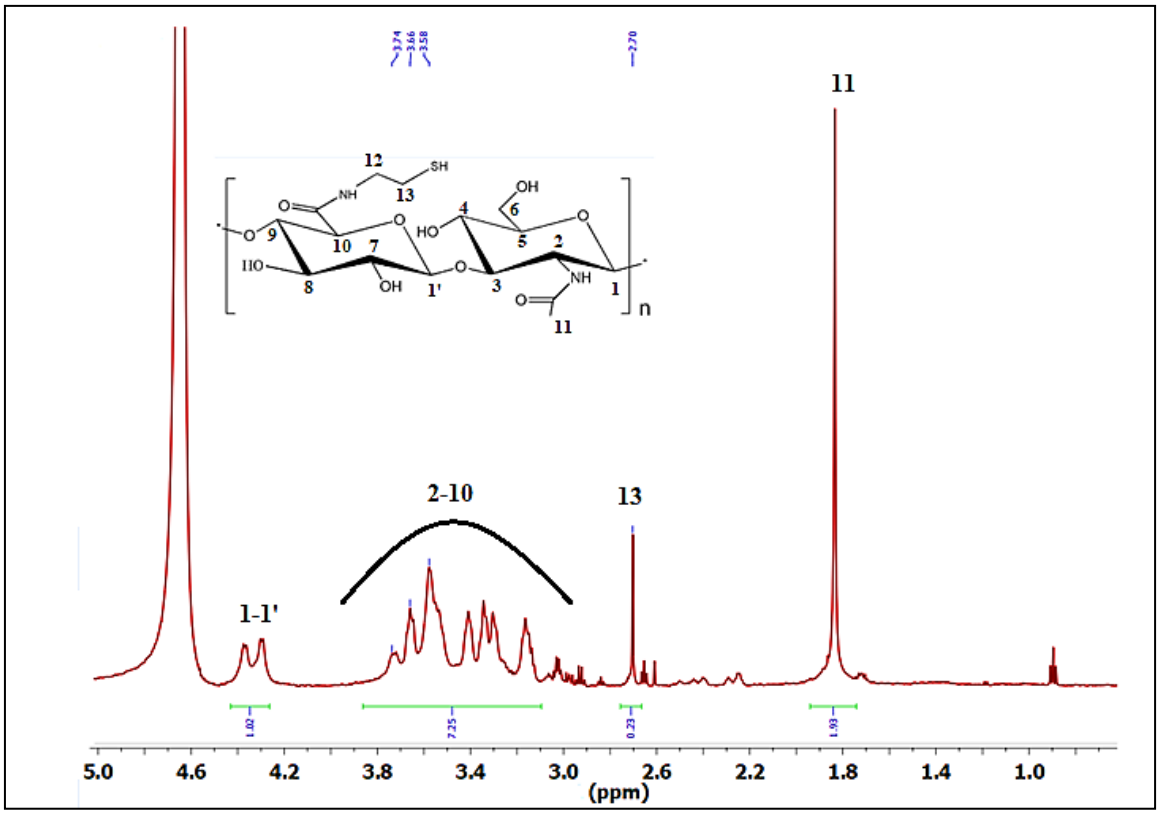
Çizelge 4.3. HA ile hazırlanmış pelet ve cam yüzeylerin su değme açısı görüntüleri ve sonuçları

	Su Değme Açısı (o)	İlerleme Açısı (θ i)	Gerileme Açısı (θ g)	Histerizi (θ i - θ g)
A) HA palet 	35,18±0,39	34,8	35,6	0,8
B) Cam yüzeye kaplı HA 	12,64±0,00	12,7	13,5	0,8

Daha sonra HA'nın karboksilik asit grubuyla sisteamin hidroklorürün tepkimesi sonucu tiyollenmiş HA (Th-HA) molekülleri sentezlendi. Düşük mol kütleli HA ve Th-HA'nın yapısal karakterizasyonu, ^{1}H-NMR spektroskopisi ile gerçekleştirildi. Düşük mol kütleli HA'nın ^{1}H NMR spektrumunda H1 (4,3 ppm), H1 '(4,4 ppm) anomerik hidrojen piki ve H11 (1,9 ppm) karakteristik pikleri görülmektedir (Şekil 4.16). Th-HA'nın ^{1}H NMR spekturumu ise Şekil 4.17'de gösterildi. Th-HA'nın ^{1}H NMR spektrumunda tiyolleme tepkimesi ile 2,7 ppm'de görülen pikin -CH_2-SH protonlarına aittir. Ayrıca 4,3 ppm, 4,4 ppm (anomerik hidrojen piki) ve 2,7 ppm'deki piklerin integrasyonundan tiyollenme derecesi % 11 olarak hesaplandı.



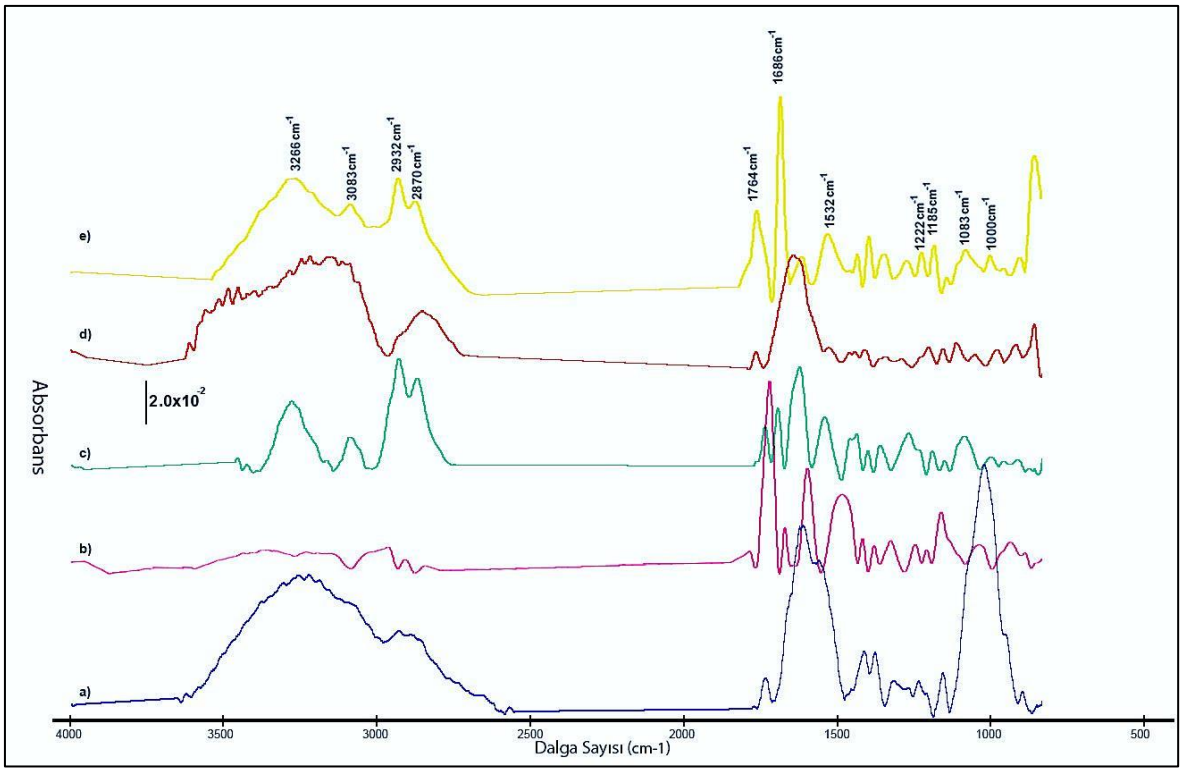
Şekil 4.16. Düşük mol kütleli HA'nın ^{1}H-NMR spektrumu



Şekil 4.17. Th-HA'nın ^{1}H-NMR spektrumu

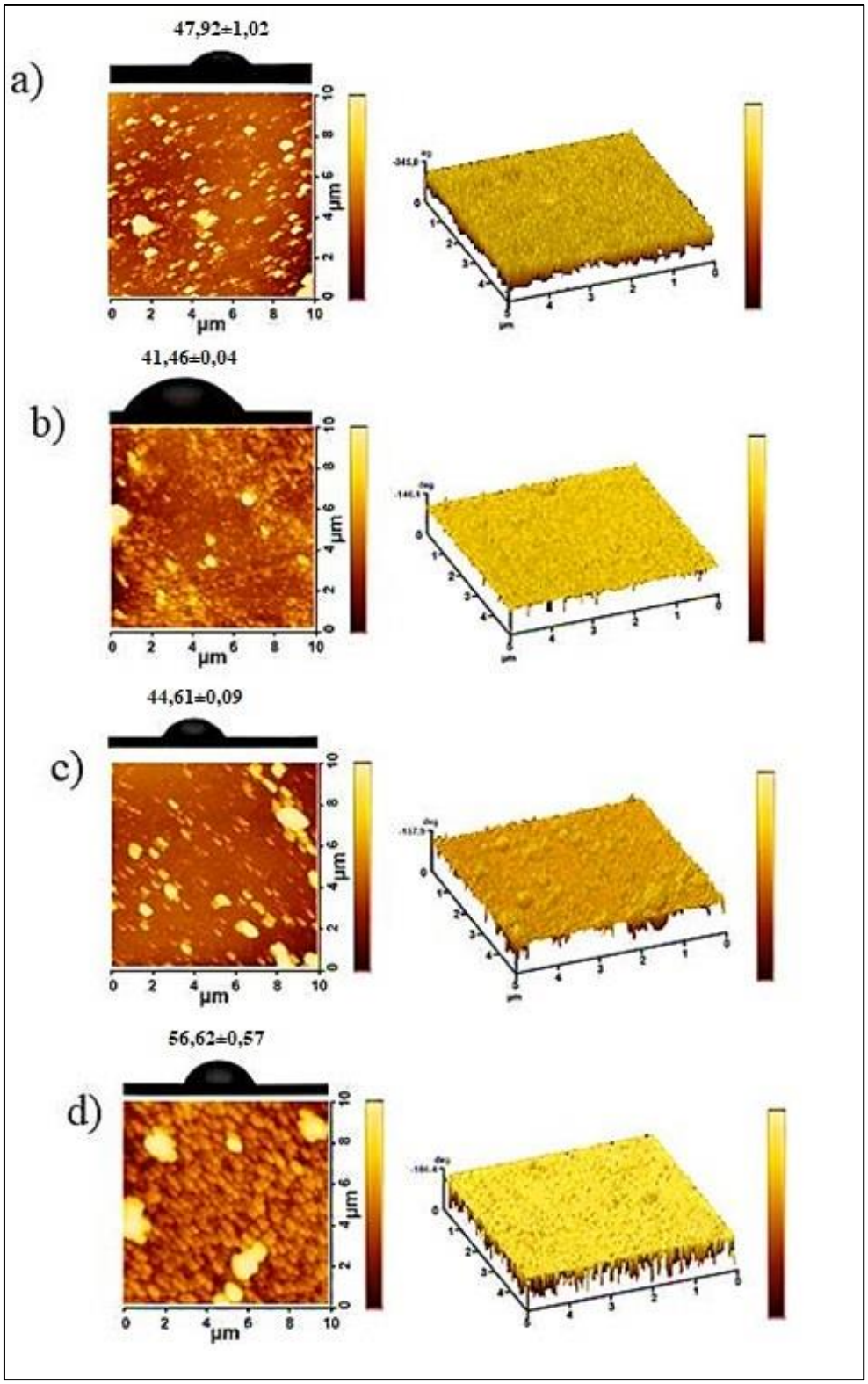
Th-HA molekülleri, tiyol-en klik tepkimesiyle silisyum substrat üzerindeki poli(EHDA) zincirlerine aşılandı. Si-poli(EHDA)-HA yüzeyinin su temas açısı hidrofilik HA moleküllerinin varlığıyla 48°'ye düştüğü belirlendi ve elipsometrik kalınlık 17,3 nm'ye yükseldi.

Farklı [katalizör]/[monomer] oranlarında sentezlenen Si-poli(EHDA) fırçalara Th-HA bağlandıktan sonra alınan GA-FTIR spektrumlarında 3200-3500 cm^{-1} arasında geniş bir hidroksil bandı görüldü (Şekil 4.6c, Şekil 4.18), ancak [katalizör]/[monomer] oranı 0,09 olan Si-poli(EHDA)-HA polimer fırçasının GA-FTIR spektrumu incelendiğinde Si-poli(EHDA) yüzeyinde sentezlenen polimer mol kütlesinin düşük (4000 g mol^{-1}) olmasından dolayı yüzeye Th-HA bağlanma etkinliğinin az olduğu belirlendi.



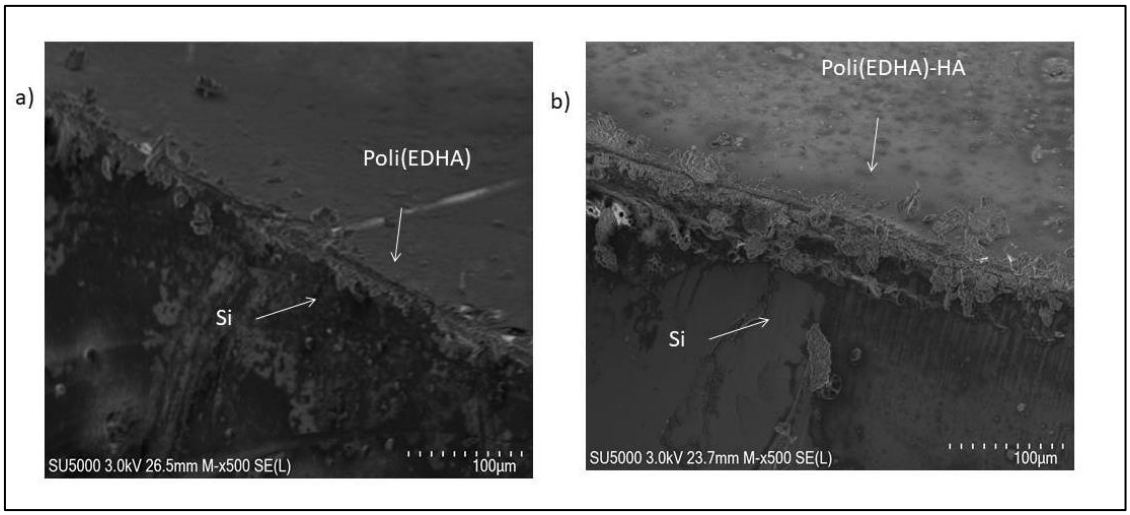
Şekil 4.18. HA ve Si-poli(EHDA)-HA fırçaların GA-FTIR spektrumları. a) HA ve (b) [katalizör]/[monomer]=0,09, (c) [katalizör]/[monomer]=0,04, (d) [katalizör]/[monomer]=0,02, (e) [katalizör]/[monomer]=0,01

Si-poli(EHDA)-HA fırçaların AFM görüntüleri alındığında [katalizör]/[monomer] oranı 0,09'dan 0,01'e düştüğünde yüzey pürüzsüzlüğü ölçüsü olan rms değerlerinin 13,07 nm'den 20,13 nm değerine yükseldiği ve su değme açısı değerlerinin ise 47,92 ±1,02^{o}'den 56,62±0,57^{o}'ye yükseldiği belirlendi.



Şekil 4.19. Si-poli(EHDA)-HA fırçaların 3- ve 2-boyutlu AFM ve su damlacığının görüntüleri [katalizör]/[monomer] oranları; a) 0,09, b) 0,04, c) 0,02 ve d) 0,01

Ayrıca kesit alanından alınan SEM görüntülerindeki belirgin kalınlık artışı da HA moleküllerinin poli(EHDA) zincirlerine bağlandığını göstermektedir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Poli(EHDA) (a) ve poli(EHDA)-HA (b) fırçaların SEM görüntüleri

Poli(EHDA)-HA C1s XPS kısmi tarama spektrumunda 287,3 eV (C=O), 287 eV (C-O), 286,7 eV (C-N) ve 285,6 eV (C-C/C-H) bağlanma enerjilerinde kimyasal çevresi farklı 4 farklı C1s piki gözlemlendi (Şekil 4.5c). Si-poli(EHDA) ve Si-poli(EHDA)-HA yüzeylerinin C1s kısmi tarama spektrumlarında bulunan C=C pik alanlarından Th-HA moleküllerinin poli(EHDA) zincirine bağlanma oranı % 2,3 olarak hesaplandı. Bu düşük bağlanma oranının nedeni yüksek hacimli Th-HA moleküllerinin bağlanma tepkimesi sırasında sterik etki oluşturması sebebiyle olabilir.

Yüzeyde başlatılan ROMP ve tiyol-en klik tepkimesi kombinizasyonuyla silisyum substrat yüzeyinde sentezlenen poli(EHDA)-HA polimer fırça ile önemli bir biyomloekül olan hiyalüronik asitin yüzey üzerine kovalent olarak bağlanması sağlandı, bu gibi aşılanmış polimer fırçalar, malzeme yüzeyinin biyoaktivitesini iyileştirmek veya kontrol etmek için hücre dışı matris (ECM) proteinleri veya fonksiyonel peptitler tarafından daha da işlevselleştirilebilen bir köprü tabakası olarak çalışırlar (Gao,2011; Tugulu,2007). Ek olarak, sınırlı ortamlarda polimer fırçaların büyümesi, protein adsorpsiyonu, kataliz ve ayırma alanlarında büyük uygulama potansiyeline sahip birçok işlevsel film hazırlamak için yerleşik bir teknik haline gelmiştir.

Polimer fırçalar ile modifiye edilmiş polimer materyallerin biyoaktivitesini ve işlevselliğini daha da iyileştirmek için, proteinler ve peptitler gibi biyomoleküller, hücre yapışma davranışını (Raynor, 2007) kontrol etmek için yaygın olarak fırçalanmış zincirlere aşılanır. Fonksiyonel biyo-konjugat gruplarının polimer fırçalara dahil edilmesi, belirlenen doku

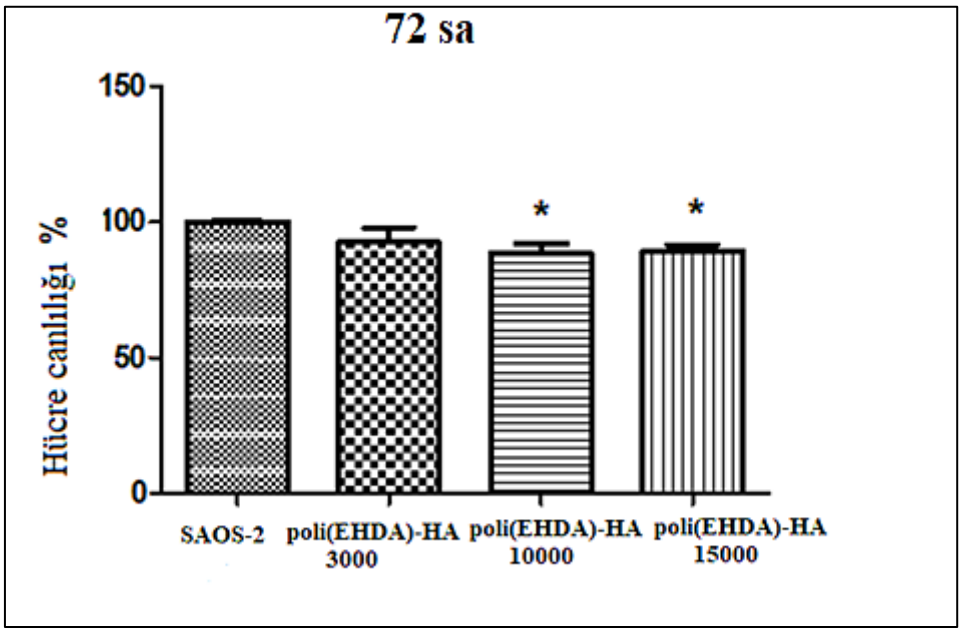
türlerine doğru hücre farklılaşmasına neden olabilir ve bu da ECM'yi daha yakından taklit etmeyi sağlar. Örneğin, Wei ve arkadaşları (Ren, 2011) titanyum yüzeylerini poli (OEGMA-r-HEMA) fırçalarla modifikasyonunu geçekleştirmişlerdir. Daha sonra, fibronektin (FN) ve rekombinant insan kemiği morfogenetik protein-2'yi (rhBMP-2) polimer fırçaların yüzeyine birleştirerek, titanyum yüzeyine iyi bir osteogenez kapasitesi kazandıran MC3T3 hücrelerinin etkili yapışmasının indüksiyonunu sağlamışlardır.

Bu kapsamda, yüzeyde başlatılan ROMP ve tiyol-en klik tepkimesi kombinizasyonuyla silisyum substrat yüzeyinde sentezlenen poli(EHDA)-HA fırçaları kanser terapisi için aktif hedeflemenin yanı sıra yüksek biyouyumluluk, düşük toksisite ve anti-enflamatuar gibi gelişmiş özelliklere sahip biyolojik cihazların yapımında çok önemli fırsatlar sunabilir.

4.5. Poli(EHDA)-HA Yüzeylerin MTT Testi

Kimyasal ve biyolojik maddeler ya da fiziksel etkenler hücreleri farklı şekillerle etkileyerek sitotoksisiteye neden olabilirler. Bir maddenin biyouyumluluğunu belirlemek için hücreler üzerindeki toksik ya da non-toksik etkisinin araştırılması gerekmektedir. *İn vitro* sitotoksisite testleri ilaç niteliği taşıyan veya toksik profili araştırılan maddelerin değerlendirilmesi amacıyla hücre kültüründe gerçekleştirilir. Sitotoksisite testleri biyouyumluluk, implantlar, kozmetik, farmakoloji, ilaç geliştirme gibi alanlarda kullanılmaktadır. Bu testlerle çok sayıda maddenin kısa sürede analizi yapılabilmekte ve hayvan deneyleri için temel veriler elde edilebilmektedir. Farklı mekanizmalara ve hassasiyetlere sahip çok sayıda sitotoksisite testi bulunmakla birlikte en yaygın kullanılan testler; tetrazolyum testleridir (MTT, MTS, XTT, WST) (TOKUR,2017). Ayrıca MTT test yöntemi, hızlı sonuç alınmasının yanı sıra maddelerin çok düşük düzeydeki toksisitelerinin görülmesine olanak sağlaması nedeniyle en güvenilir testlerden biri olarak kabul edilmektedir (Bean, 1995; Wataha, 1992). Rafaelli ve arkadaşları Lava CAD-CAM sistemi ile hazırladıkları zirkonya disklerinin sitotoksisitesini MTT yöntemi ile *in vitro* olarak incelemişlerdir ve zirkonyanın biyouyumlu bir madde olduğunu belirlemişlerdir (Raffaelli, 2008). Altun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise bakteriyel selüloz (BC) ve PMMA karışımı olan BC/PMMA fiberlerini üretmişlerdir. Bu fiberlerin biyolojik uyumluluğu belirlemek için MTT testleri yapmışlar ve biyouyumlu olduğunu belirlemişlerdir (Altun, 2018). Baran ve arkadaşları sığır hidroksiapatit (BHA) tozu ve % 5 ile % 10 doğal pomza (NP) ile karıştırılmasıyla NP-BHA kompozitlerini oluşturmuşlardır. Bu kompozitlerin

biyouyumlulukları MTT testi ile belirlenmiştir. NP-BHA kompozitlerinin kemik grefti ve implant gibi biyomedikal mühendislik uygulamaları için dikkate değer bir potansiyel oluşturduğu sonucuna varılmaktadır (Komur, 2016).



Şekil 4.21. Poli(EHDA)-HA fırçalarının MTT test sonuçlarının gösterimi

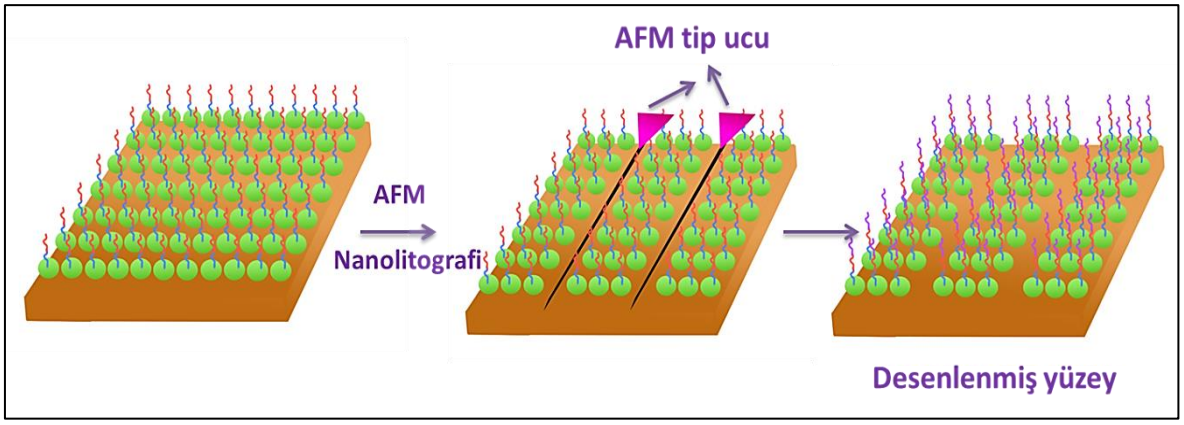
Bu çalışmada, üç farklı mol kütlesinde sentezlenen (3000 g/mol, 10000 g/mol, 15000 g/mol) poli(EHDA) ile tiyol-en klik tepkimesi ile oluşturulan poli(EHDA)-HA polimer fırçaların biyouyumluluğu MTT testi ile belirlendi (Şekil 4.21). Sitotoksisite (MTT) testleri sonucunda Si-poli(EHDA)-HA fırçaların kontrole kıyasla sitotoksik olmadığı görüldü. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olarak elde edildi ($P < 0,05$). Yüzeylerin hücre çoğalması üzerinde arttırıcı bir etkisi olmadığı anlaşıldı. Grafikte gözlenen hücre canlılığında hafif düşüş ihmal edilebilir düzeydedir. Sonuç olarak poli(EHDA)-HA fırçaların biyomedikal alanda yapılan çalışmalarda kullanılabileceği öngörüldü.

4.6. AFM Nanolitografi Yöntemi ile Polimer Fırçaların Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

Nanolitografi, nano boyutta aletler kullanarak molekül ve atom düzeyindeki malzemelerin bir yere biriktirilmesi veya oradan uzaklaştırılmasıdır. Son zamanlarda polimer yüzeylerin yapılandırılmasıyla ilgili çalışmalar oldukça ilgi görmektedir. Desenli polimer fırçalar elektron ışını kimyasal litografisi (EBCL), (Schmelmer, 2003; 2007; Steenackers, 2007), fotolitografi (Lud, 2007), dip kalem litografi (Liu,2003) ve mikro temaslı baskı (mCP)

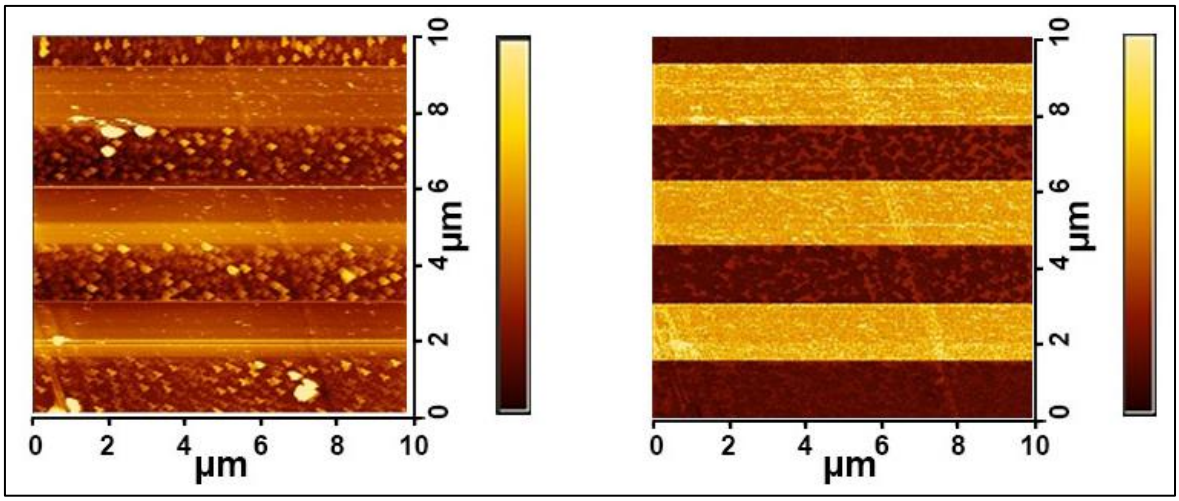
(Dronavajjala, 2006; Jones, 2002) ve Langmuir – Blodgett (LB) litografisi (Brinks, 2007) gibi yöntemler dahil olmak üzere farklı yöntemlerle elde edilmektedir. Ayrıca, bu yöntemler haricinde Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) litografisi nanometre ölçeğinde yüzey yapılandırma özelliği ile büyük ilgi görmektedir. AFM litografisinin temel stratejisi, yüzeylerde fiziksel veya kimyasal bir değişiklik meydana getirmek için AFM ucunun yüzeye lokalize kuvvet veya elektrik alan uygulamasına dayanmaktadır. Mamin ve arkadaşları (Mamin,1999), Bouchiat ve Esteve ve diğerleri (Bouchiat, 1996), yumuşak polimer yüzeyler üzerinde AFM ile mekanik girinti veya çizim ile nanokanalların ve olukların oluşumunu göstermişlerdir.

Tez çalışması kapsamında, AFM nanolitografisinden yararlanarak polimer fırça yüzeylerinde mekanik çizim gerçekleştirildi. AFM ile yapılan nanolitografi yönteminde "trace" programı kullanıldı ve yüzeyde nano boyutta kanallardan oluşan desenler oluşturuldu (Şekil 4.22).

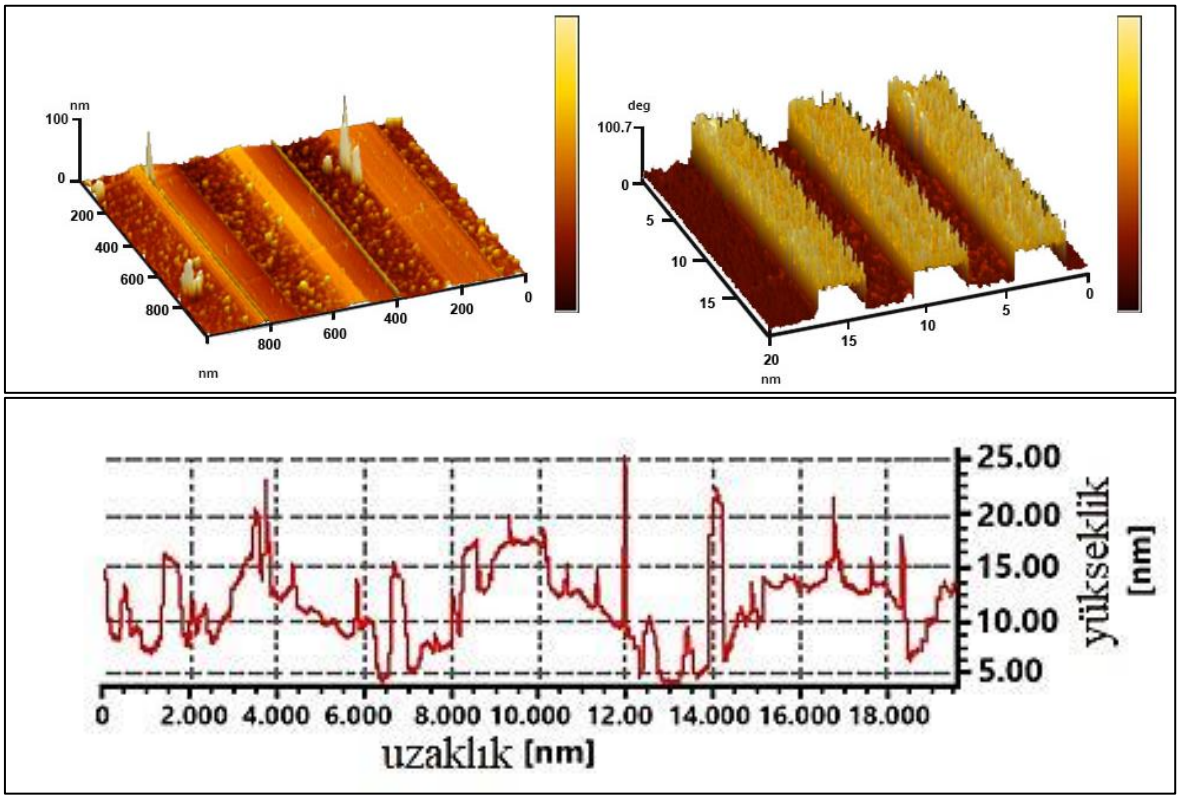


Şekil 4.22. AFM ile uygulanan nanolitografi işleminin şematik gösterimi

Bunun için önce AFM'de trace tekniği ile monomer bağlı silisyum substrat yüzeyinde 10 µ uzunluğunda ve 1 µ genişliğinde kanallar açıldı ve kanal derinliği yaklaşık olarak 13 nm olarak belirlendi. (Şekil 4.23 ve 4.24).

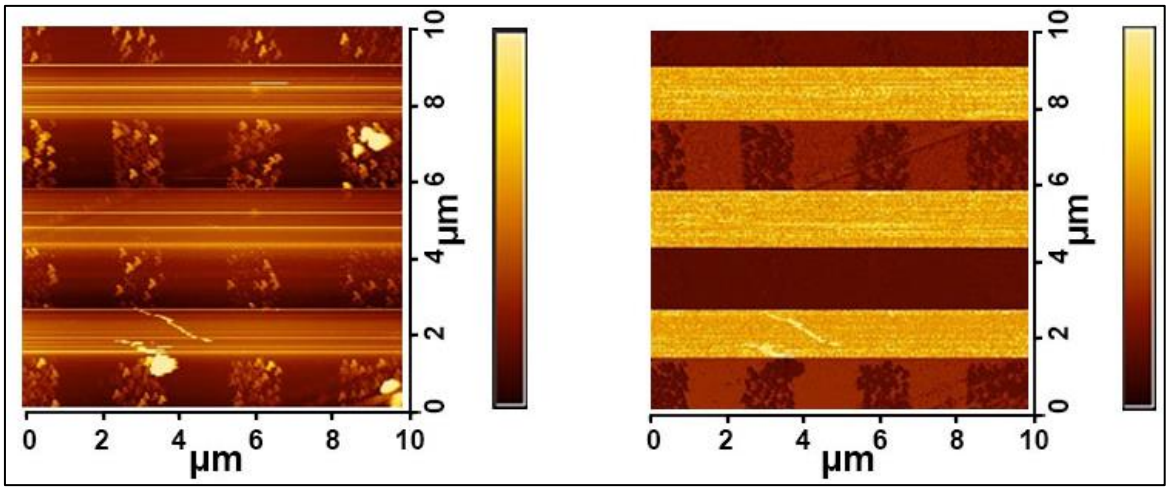


Şekil 4.23. Nano desenlenmiş Si-EHDA yüzeyin 2D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri

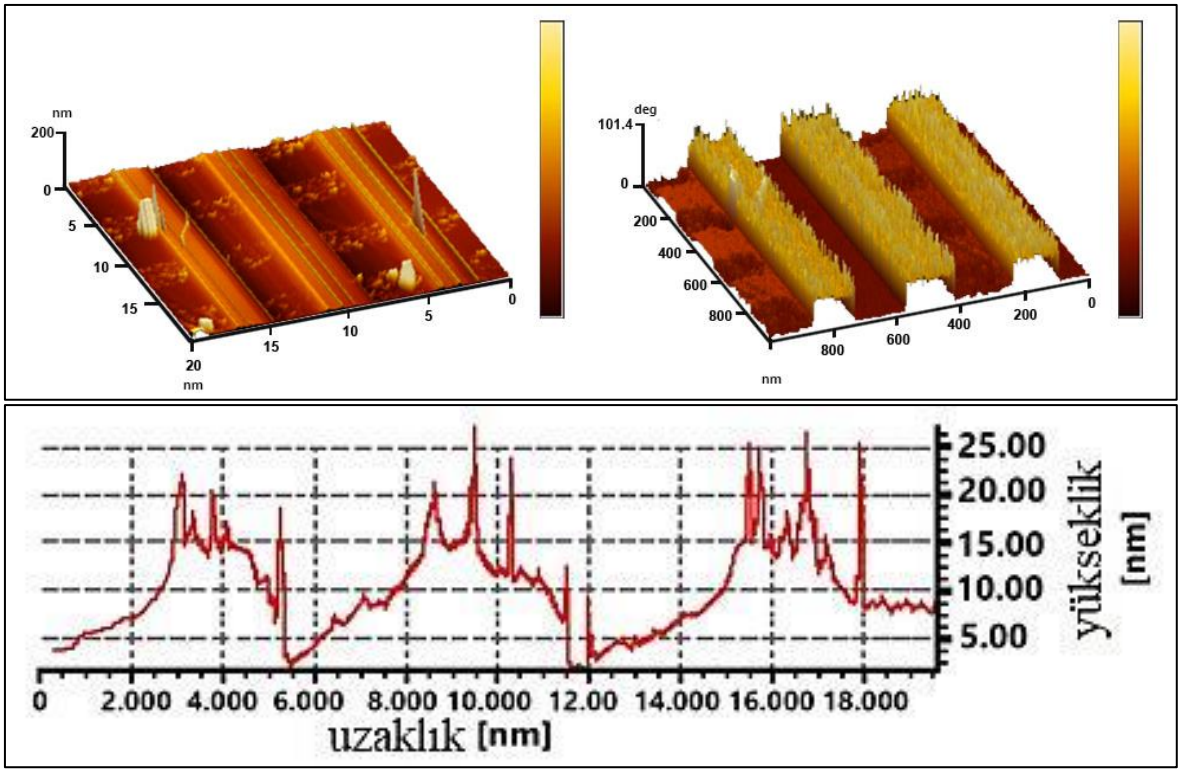


Şekil 4.24. Nano desenlenmiş Si-EHDA yüzeyin 3D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri

Si-EHDA yüzey üzerinde çizilen üç çizgili desenin bulunduğu alan dikey konuma çevrilerek dikeyde üç çizgi çizildi ve böylece 1 µ uzunluğunda yaklaşık 200 nm genişliğinde monomer yüzeyden kaldırılarak, Si-EHDA yüzeyinde kanal derinliği yaklaşık 12 nm olan kanallar açıldı (Şekil 4.25 ve 4.26).

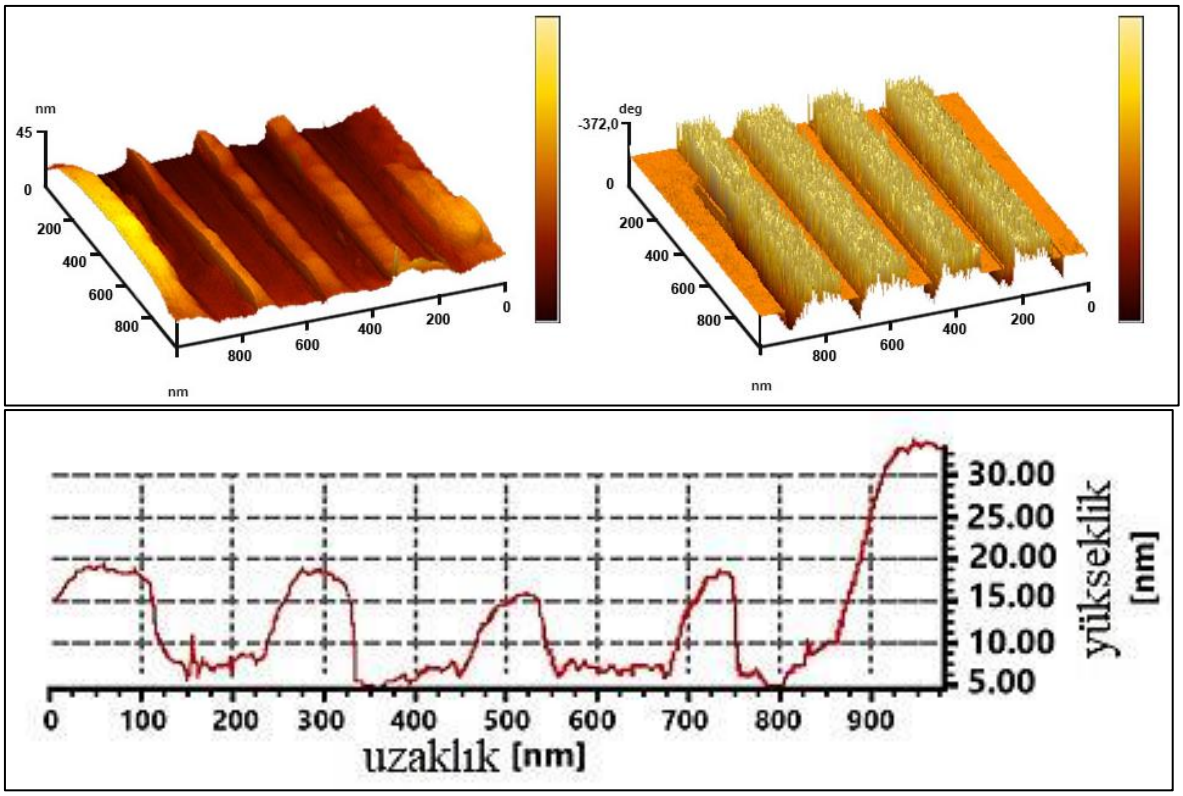


Şekil 4.25. AFM nanolitografi yöntemiyle yüzey üzerinde yatay 3 çizgi çizimi üzerine dikey 3 çizgi çiziminin 2D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri

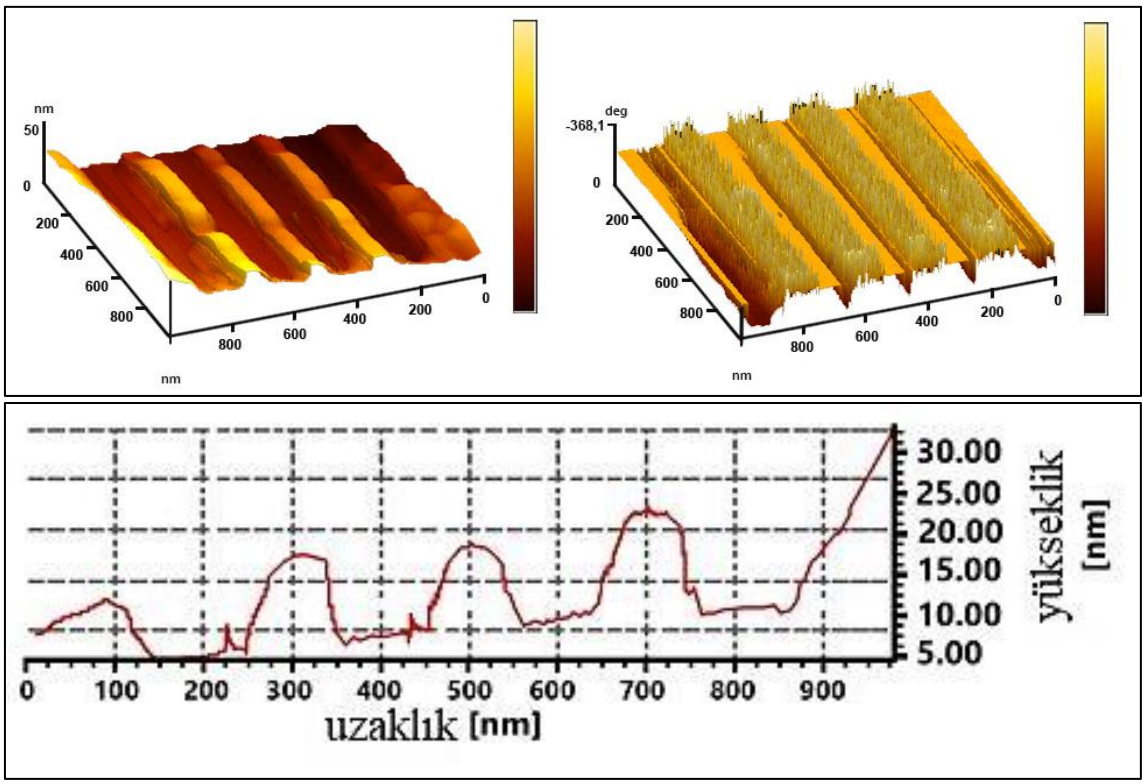


Şekil 4.26. AFM nanolitografi yöntemiyle yüzeyde yatay 3 çizgi çizimi üzerine dikey 3 çizgi çiziminin 3D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri

Si-EHDA yüzey üzerinde farklı bir alanda tekrar AFM nanolitografi kullanılarak üç çizgi çizildi ve 1 µ uzunluğunda yaklaşık 200 nm genişliğinde monomer yüzeyden kaldırılarak, kanal derinliği yaklaşık 12 nm olan kanallar Si-EHDA yüzeyinde açıldı.

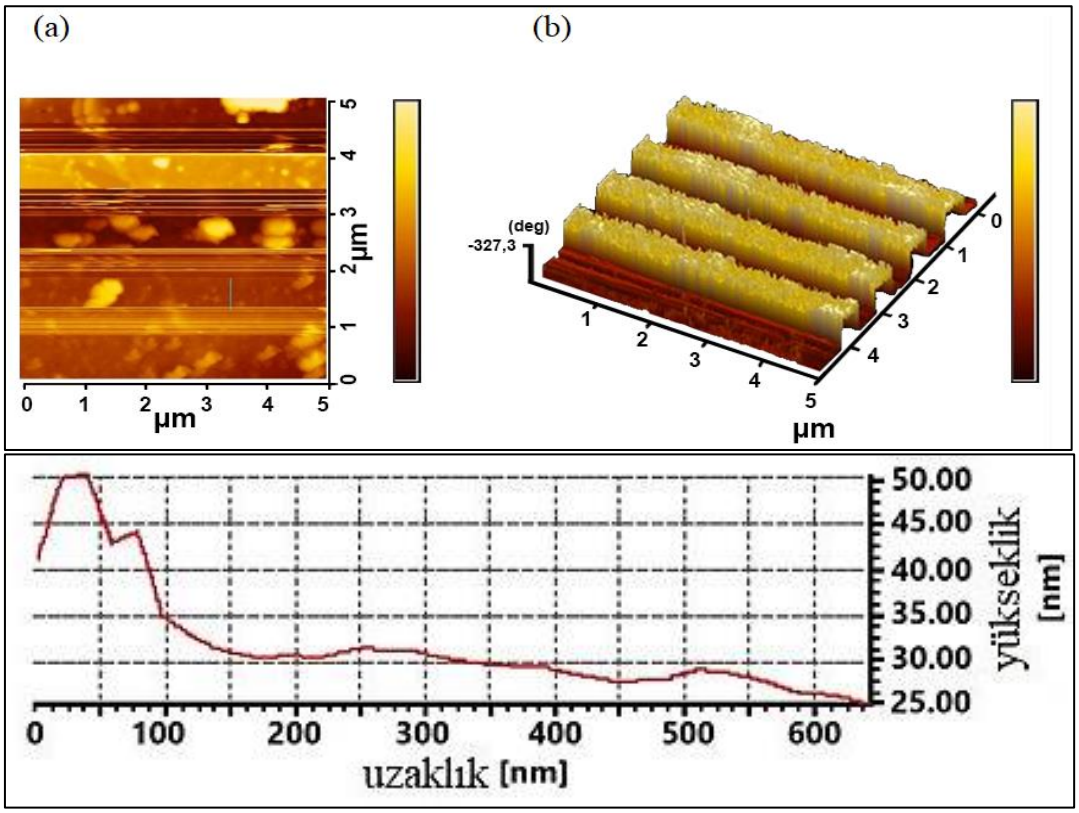


Şekil 4.27. AFM nanolitografi yöntemiyle yüzeyde yatay 3 çizgi çiziminin 3D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri



Şekil 4.28. AFM nanolitografi yöntemiyle yüzeyde yatay 3 çizgi çizimi çiziminin 3D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri

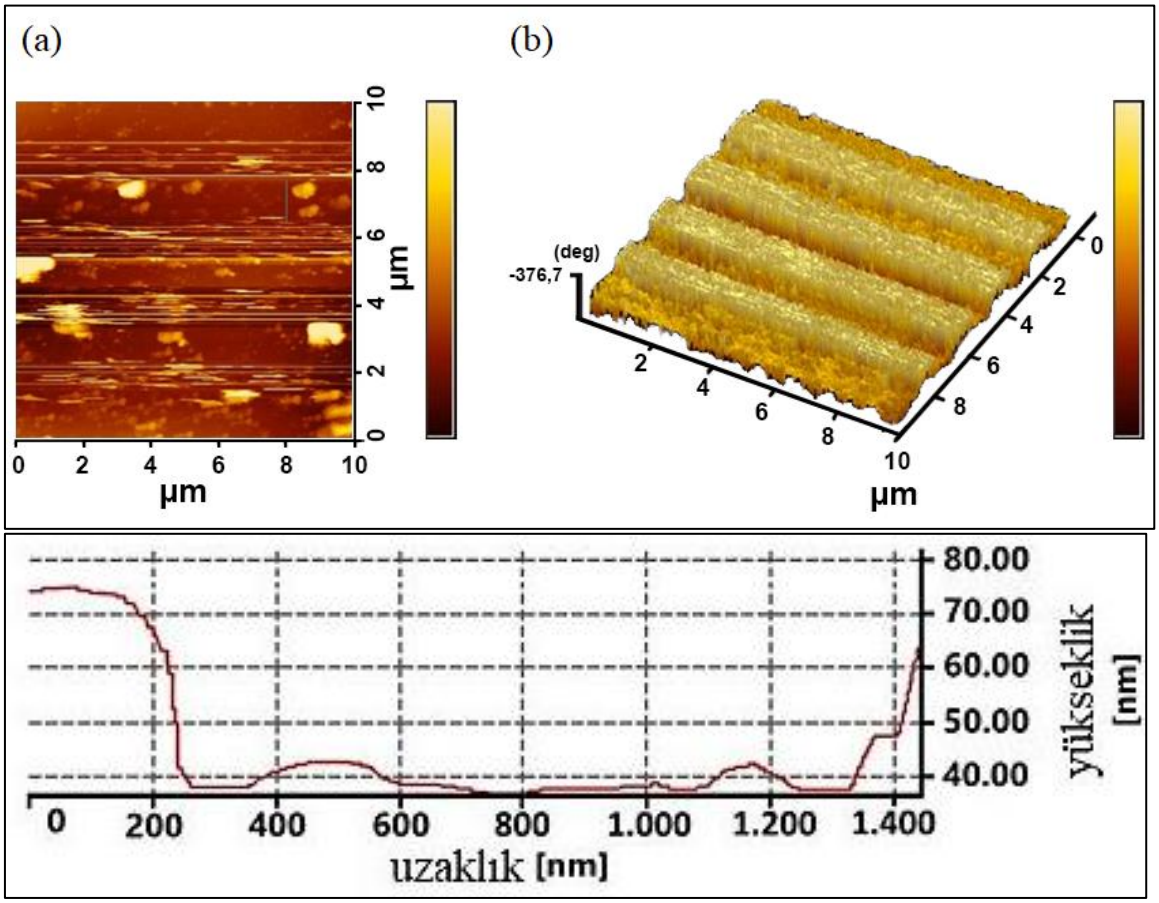
Si-EHDA polimer fırçalar 0,09; 0,04 ve 0,02 (katalizör/monomer (mmol/mmol) katalizör/monomer oranlarında oda sıcaklığında 6 saat polimerizasyondan sonra poli(EHDA) fırçalar hazırlandı. AFM nanolitografi yöntemi kullanılarak yüzey üzerinde mekanik çizim gerçekleştirilerek yüzey üzerinde nano kanal oluşumu sağlandı, desenlenmiş yüzeylerin morfolojileri hakkında bilgi edinmek amacıyla AFM görüntüleri alındı. Yüzeylerin 5x5 μm^2'lik alanları AFM ile görüntüleri alındı ve elde edilen görüntüler Şekil 4.29'da verildi.



Şekil 4.29. AFM nanolitografi yöntemiyle Si-poli(EHDA) yüzeyinde 4 çizgi çiziminin AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri

AFM görüntüleri (Şekil 4.29) incelendiğinde yüzeyler üzerinde yaklaşık olarak 25 nm'lik moleküler kanalların açıldığı ve Si-EHDA yüzeylere göre kanalların kalınlıklarının yaklaşık olarak 13 nm'lik artış meydana geldiği belirlendi. Böylece yüzey üzerinde yaklaşık olarak 25'nm lik polimer fırça tabakasının sentezlendiğini göstermektedir. Bu değer elipsometre ölçümlerinden alınan değer ile yaklaşık olarak uyum içerisindedir. Yüzeyin rms değeri ortalaması 10,56 nm olarak ölçüldü. Yüzeyde polimer fırçanın oluşumuyla yüzeyin pürüzlülüğü ölçüsünde yaklaşık olarak 6 nm'lik bir artış meydana geldiği tespit edildi.

Daha sonra tiyol-en klik tepkimesi ile poli(EHDA)-HA fırçalar elde edildi. AFM nanolitografi yöntemiyle mekanik çizim uygulandıktan sonra yüzeyin morfoloji hakkında bilgi edinebilmek amacıyla yüzey üzerinde 10x10 μm^2'lik alanları AFM ile incelendi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. AFM nanolitografi yöntemiyle Si-poli(EHDA)-HA yüzeyinde 4 çizgi çiziminin AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri

AFM görüntüleri (Şekil 4.30) incelendiğinde yüzey üzerinde oluşan kanalların derinliğininin yaklaşık olarak 32 nm olduğu belirlendi ve kanal kalınlığındaki artışın yüzeye tiyol-klik ile bağlanan hiyalünorik asitin bağlanmasını göstermektedir. Bu değer elipsometre ölçümlerinden alınan değer ile yaklaşık olarak uyum içerisindedir. Yüzeyin rms değeri ortalaması 13,07 nm olarak ölçüldü. Yüzeyde polimer fırçanın oluşumuyla yüzeyin pürüzlülüğü ölçüsünde yaklaşık 3 nm'lik bir artış meydana geldiği belirlendi.

4.7. Si-(EHDA)-HA Fırçalara DNA İmmobilizasyonu

Deoksiribonükleik asit (DNA) tüm canlı organizmaların kalıtsal bilgilerini taşıyan, gelecek nesillere aktaran yapı taşıdır. DNA veya ribonükleik asit (RNA) gibi tüm nükleik asitler şeker veya şekerin bir türevinden, fosforik asit ve bazdan oluşur ve hücre çekirdeğinde bulunur. DNA nükleotit adı verilen iki polimerden oluşurlar. Nükleik asit molekülünün tek dizilimli hali, eşleniğini tanıma ve ona bağlanmasıyla çift zincirli tek bir yapı haline gelme (hibrizide) yeteneği sayesinde biyosensörler gen problarında kullanılmaktadır (Rajendran, 2002). Biyo-sentez, inorganik nano veya makropartiküllere biyomoleküllerin (RNA veya DNA) immobilizasyonunu sağlar. DNA immobilize edilmiş nano veya makropartiküller ligand saflaştırma, manyetik rezonans, floresans görüntüleme, hücre hedefleme, teşhis tahlili ve ilaç dağıtımı gibi uygulamalarda kullanılır. DNA ile modifiye edilmiş yüzeyler, biyoteknoloji alanında önemli bir yere sahiptir (Lund, 1988; Pan, 1998). Ancak bu yüzeylerin bazı yönleri optimum olmaktan uzaktır ve yüzey kimyası zayıf bir şekilde kalmıştır. DNA ile modifiye edilecek yüzeylerde istenen özellikler;

a) Yüzey düzgünlüğü ve kimyasal homojenlik,
b) yüzey kimyasal özelliklerini (spesifik olmayan bağlanma özelliklerine güçlü bir şekilde etki eden polarite veya hidrofobiklik gibi) kontrol etme yeteneği,
c) DNA hibridizasyonuna (dubleks oluşumu) ve ligaz, polimeraz ve kısıtlama enzimleri gibi DNA değiştirici enzimlerle enzimatik manipülasyona elverişlilik,
d) DNA yüzey yoğunluğunu kontrol etme yeteneği,
e) Isıl ve kimyasal kararlılık,
f) Tekrarlanabilirlik.

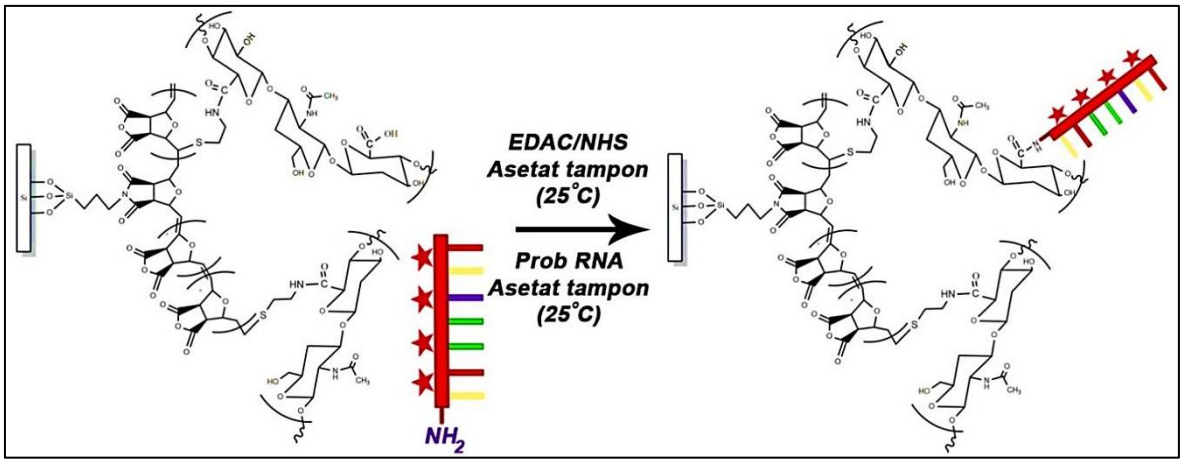
Bu kriterlerden herhangi birine uyan kimyasal yüzeyler kullanılabilir (Strother, 2000).

DNA hibridizayonu, DNA/DNA veya DNA/RNA arasında hibrit moleküller oluşturulması temeline dayanmaktadır. DNA hibridizasyonunda ilk olarak hedef nükleik asitle birleşecek bir proba ihtiyaç vardır, prob katı bir matrikse tutturulur ve prob ve hedef denatüre edilir, denatüre edilmiş prob, içerisinde hedefin bulunduğu çözeltiye konur, eğer hedef ve prob arasında homolog sekanslar varsa, prob hedefe bağlanır (hibridizasyon). Kolorimetrik, kemiluminesans ya da otoradyogafi gibi yöntemlerle hibritleşmiş probun analizi yapılır.

Tood ve arkadaşları (Strother, 2000) Si-H yüzeyini oligodeoksinükleotitlerin ile modifiye etmişlerdir. Çalışmalarında Si-H yüzeyine önce 10-undesilenik asit (UDA) molekülü, sonra elektrostatik olarak polilisin (PL) molekülü daha sonra sülfosüksinimitil 4- (N-maleimidometil)-sikloheksan-1-karboksilat (SSMCC) molekülü bağlanmıştır. Tiyol ile modifiye edilmiş DNA, SSMCC'ye molekülüne bağlanarak elde edilen DNA-modifiye silisyum yüzeyler DNA hibridizasyonu için mükemmel özgüllük ve kimyasal kararlılık sergilediği görülmüştür. Andrew ve arkadaşları, Si-H yüzeylerini 16 saat toluen içinde 4,4-dimetoksitit korumalı (DMT)-ωundesenol ile tepkimeye sokarak yüzeylerin alkilasyonunu sağlamışlar, daha sonra alkillenmiş yüzeylere DNA bağlayarak hibridizasyon işleminde kullanmışlardır (Pike, 2002).

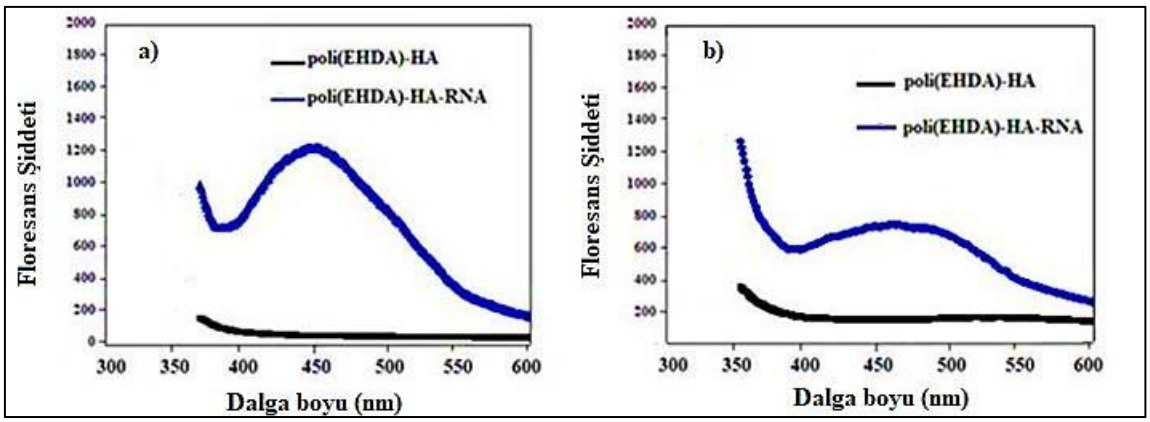
Oillic ve arkadaşları katı desteğin düşük yükleme kapasitesi ve mikroyüzeylerdeki DNA hedeflerinin problara zayıf erişimi gibi dejavantajları ortadan kaldırmak amacıyla polikristalin silisyumda nano yapı oluşturan bir çalışma yapmışlardır. Nanoyapı yoğunluğunun floresans üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Floresans yoğunluğu ile DNA mikrodizileri için substrat yüzeyinde oluşturan silisyum taneciklerinin yoğunluğu arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu silanize yapıların performansını, tamamlayıcı floresans etiketli oligonükleotit hedeflerini kullanılarak gerçekleştirilen hibridizasyon deneyleri ile belirlemişlerdir. Bu yeni yüzeylerde hedeflerin problara erişilebilirliğin daha yüksek olması ve biyomolekül yoğunluğunun artması floresans sinyalindeki yoğunluk artışı ile göstermişlerdir (Oillic, 2007). Literatürde yer alan bu çalışmalar sonucunda DNA immobilizasyonu için kullanılan istenilen uç gruplara sahip yüzeylerin kimyasal kararlılığı hakkında bilgi edinildi.

Bu çalışmada, silisyum yüzeyinde yüzeyde başlatılan ROMP ve tiyol-en tepkimesi kombinasyonu ile [katalizör]/[monomer] oranı 0,04 ve 0,02 oranında sentezlenen poli(EHDA)-HA fırçalara EDAC varlığında 6,1 pH asetat tampon çözeltisi içerisinde tek zincir RNA probu Mt20f bağlandı (Şekil 4.31).

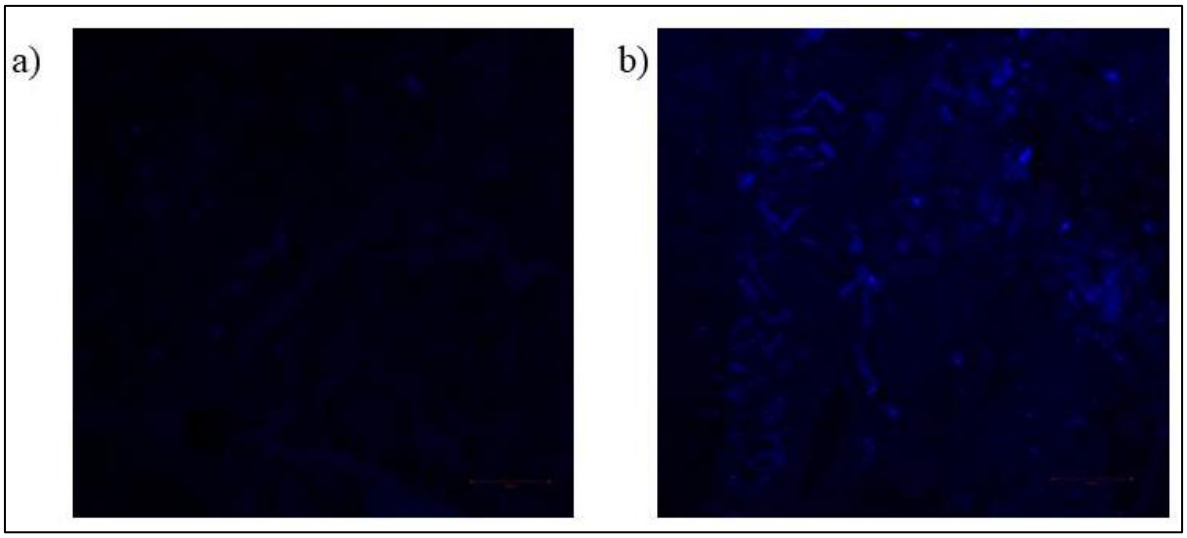


Şekil 4.31. Poli(EHDA)-HA fırçalara tek zincir RNA probunun bağlanmasının şematik görünümü

Tek zincir RNA Mt20f probu bağlı poli(EHDA)-HA fırçalar, pH 7,4 PBS çözeltisinde hazırlanan Hoechst 33258 (pentahidrat (bis-benzimit), (λ_{uyarma}=346 nm, $\lambda_{emisyon}$=460 nm) ile boyandı ve floresans spektroskopisi ve Lazer Taramalı Konkofal Mikroskop ile karakterizasyonu yapıldı. Ayrıca Floresans spektroskopisi ve Lazer Taramalı Konkofal Mikroskobu ölçümleri için DNA hibritleşmesi olmayan poli(EHDA)-HA fırça kontrol numunesi olarak kullanıldı. Hoechst 33258 boyasıyla muamele edilen poli(EHDA)-HA fırçalara ait floresans spektrumu (Şekil 4.32) ve konfokal mikroskobu görüntüleri Resim 4.1' de verildi. Spektrum ve görüntüler incelendiğinde poli(EHDA)-HA fırçalarda beklenildiği gibi floresans şiddetine rastlanmadı.



Şekil 4.32. Farklı [katalizör]/[monomer] oranında a) 0,04, b) 0,02 hazırlanan poli(EHDA)-HA (siyah) ve poli(EHDA)-HA-prob RNA (Hoechst 33258 boyasının spektrumu) sistemlerinin floresans spektrumları

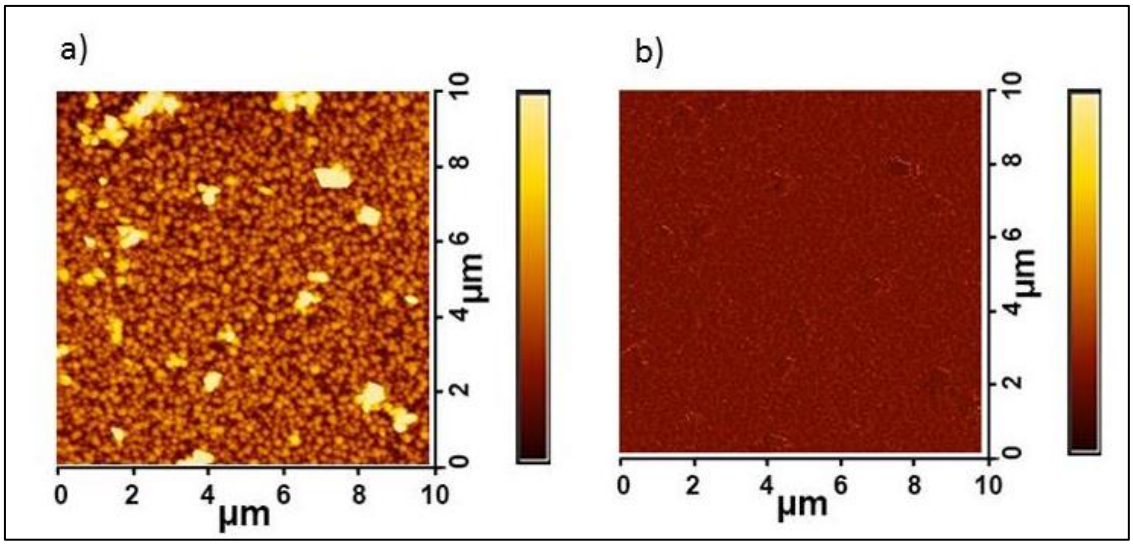


Resim 4.1. a) Kontrol Si-Poli(EHDA)-HA yüzeyine ait ve b) Poli(EHDA)-HA-prob RNA yüzeye ait 2-boyutlu konfokal mikroskobu görüntüleri

İmmobilizasyonu yapılmış Poli(EHDA)-HA-prob RNA substratının Hoechst 33258 boyasıyla elde edilen Floresans spektrumunda 450 nm'de bir absorbans gözlemlendi (Şekil 4.32). Ayrıca, konfokal mikroskopla alınan görüntüdeki floresans sinyalleri Poli(EHDA)-HA zincirlerine prob RNA moleküllerinin bağlandığını göstermektedir.

Literatürde Cesarone ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Hoechst 33258 boyası ile DNA komplekslendiğinde, 33258 Hoechst'in neden olduğu artan floresans miktarını kantitatif olarak tahmin eden DNA mikrodeterminasyon yöntemini sunmuşlardır. Spektrumda serbest boya floresansı ile DNA ile muamele edilmiş boya floresansı gösterilmiş ve DNA ile kompleksleşen boya numunesinin floresans sinyalini arttığını belirtilmiştir (Cesarone, 1980). Kim ve arkadaşları, Hoechst 33258 boyasının artiküler kıkırdakların papain özleri içindeki DNA içeriğini ölçmek için kullanılıp kullanılamayacağını belirlemek amacıyla incelemişlerdir. Bunun için incelenecek kısımlar boya çözeltisi ile karıştırılmış ve floresans emisyonu ölçülmüştür. Floresans emisyonundaki değişim DNaz'a ve RNaz'a direnç gösterdiği gibi DNA için spesifik olduğunu göstermiştir (Kim, 1988). Bu çalışmalar sonucunda Hoechst 33258 boyasının DNA ve RNA ile kompleksleştiğinde floresans sinyalinin arttığı anlaşılmaktadır.

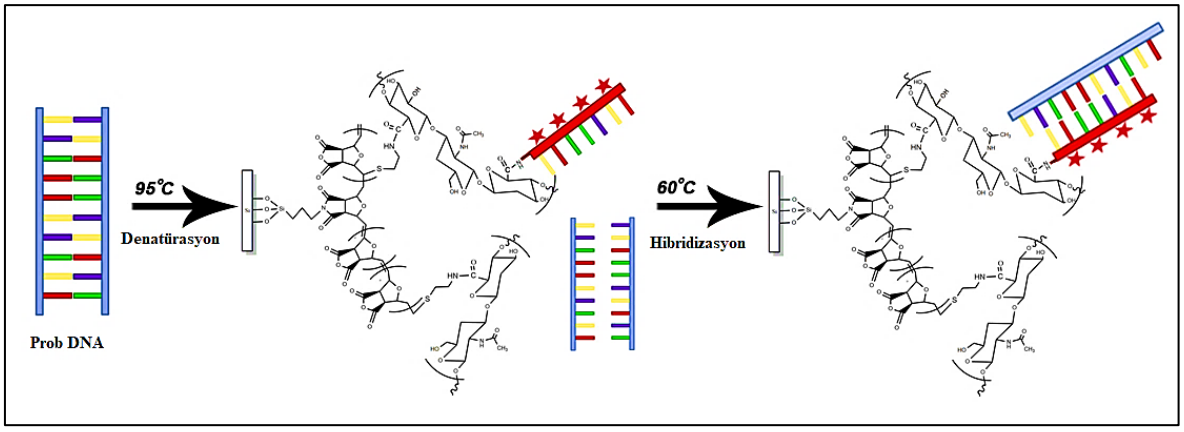
Ayrıca Poli(EHDA)-HA-prob RNA sisteminin AFM görüntüsü alındığında yüzeyin homojen görünümde olduğu görüldü ve rms değeri 14,8 nm olarak belirlendi. Buna göre yüzeyde RNA molekülünün immobilizasyonu nedeniyle rms değerinde 1,73 nm'lik bir artış meydana geldiği tespit edildi (Şekil 4.33).



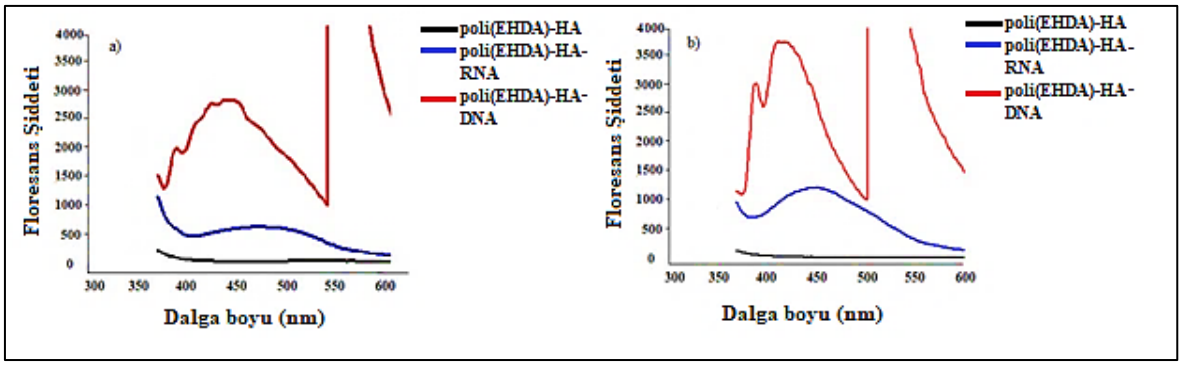
Şekil 4.33. Poli(EHDA)-HA-prob RNA yüzeyinin 2D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri

4.8. DNA Hibritleşmesi

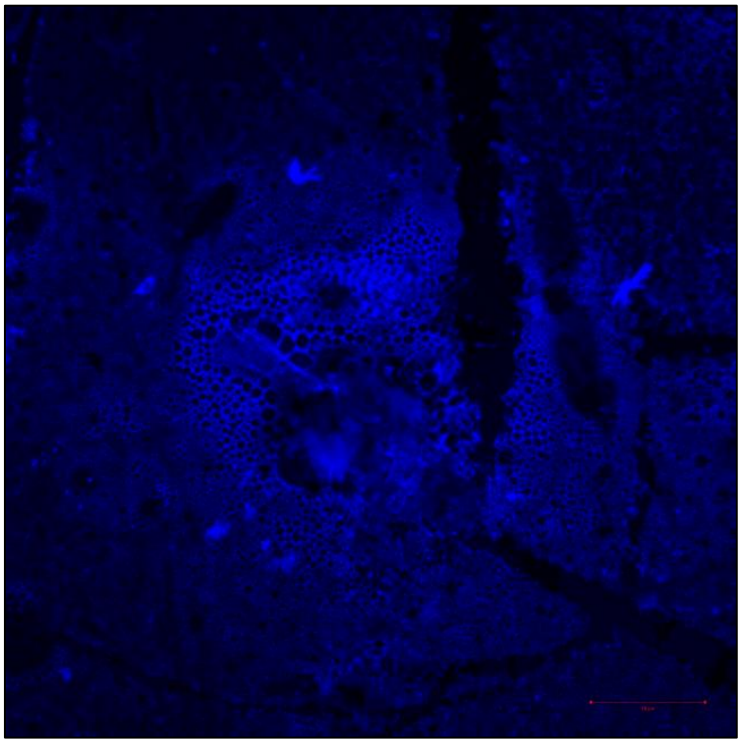
Poli(EHDA)-HA-prob RNA substratı pH 7,4 olan hedef DNA (MtDNA-16084-35 (CATAAAGCCTAAATAGCCCACACGTTCCCCTTAAATAAGACATCACGATGGATCACAGGTCTATCACCCTATTAACCACTCACGG) çözeltisinde 95 ^{o}C'ta 5 dakika süre ile bekletildi ve DNA molekülünün denatürasyonu sağlandı ve yüzeyde polimer fırçaya bağlı bulunan prob-RNA'ya hedef DNA molekülünün bağlanması sağlandı ve DNA çözeltisi daha sonra 60 ^{o}C'ye soğutularak hibridizasyonu sağlandı (Şekil 4.34). Hibridizasyonu yapılmış substrat Hoechst 33258 boyası ile boyandıktan sonra floresans spekrumu (Şekil 4.35) ve konfokal mikroskobu görüntüleri alındı (Resim 4.3).



Şekil 4.34. Poli(EHDA)-HA-prob RNA'nın yüzeyde hibridizasyonunun şematik görünümü

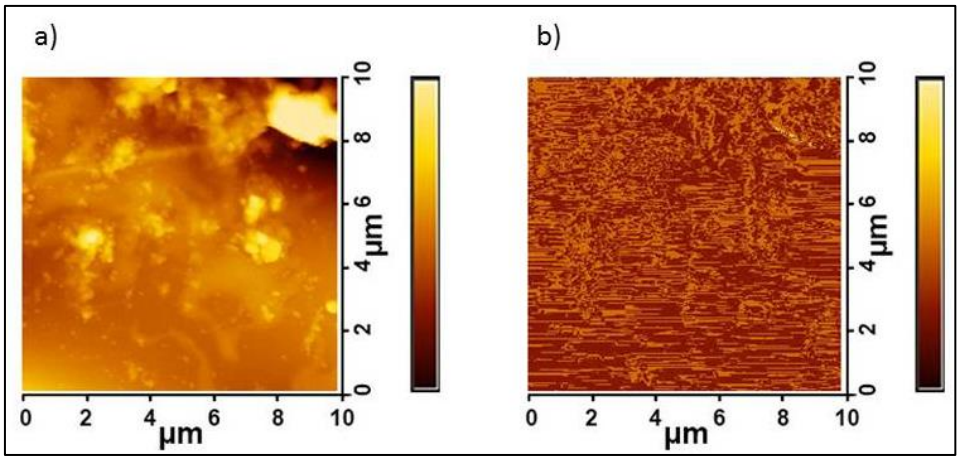


Şekil 4.35. İki farklı [katalizör]/[monomer] oranında a) 0,04, b) 0,02 hazırlanan poli(EHDA)-HA (siyah) poli(EHDA)-HA-probRNA (mavi), Poli(EHDA)-HA-probRNA-DNA (kırmızı) floresans spektrumları



Resim 4.2. Poli(EHDA)-HA-probRNA-DNA sistemine ait konfokal mikroskobu görüntüsü

DNA hibridizasyonu yapılan yüzeylere ait floresans spektrumu (Şekil 4.35) incelendiğinde, hibritleşme sonucu elde edilen yüzeylerde floresans şiddetinin arttığı görüldü. Bu durum beklenen bir sonuçtur çünkü Hoechst 33258 bisbenzimidazol floresans boyasının RNA ile gösterdiği floresans artışı, DNA ile gösterdiği floresans artışından 400 kat daha düşüktür (Telhag, 1975). Buna ek olarak yüzeyin konfokal mikroskobu görüntüleri Resim 4.2'de verildi. Görüntülerde DNA hibridizasyonu yapılan yüzeyin floresans sinyallerinin çok olduğu dolayısıyla yüksek hibridizasyonun gerçekleştiği söylenebilir.



Şekil 4.36. Poli(EHDA)-HA-probRNA-DNA yüzeyinin 2D-AFM (a) topolojik ve (b) faz görüntüleri

Ayrıca Poli(EHDA)-HA-probRNA-DNA sisteminin AFM görüntüsü alındığında yüzeyin homojen görünümde olduğu görüldü ve rms değeri 20,1 nm olarak belirlendi. Buna göre yüzeyde DNA hibridizasyonu nedeniyle rms değerinde 5,3 nm'lik bir artış meydana geldiği tespit edildi (Şekil 4.36).

Bu sonuçlar, poli(EHDA)-HA polimer fırçalar yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibirtleşmesinin literatürde var olan DNA hibritleşmelerine oranla daha karakteristik olduğunu göstermektedir. Ayrıca, fırça yüzeyinde bulunan HA molekülünün biyouyumlu olması, poli(EHDA)-HA yüzeylerinin biyometaryel olarak kullanımına da olanak sağlamaktadır. Bu nedenle elde edilen DNA-modifiye silisyum yüzeyleri, DNA hibridizasyon şartlarına bağlı olarak tekrarlanabilir şekilde hazırlanabilir ve spesifik olmayan bir bağlanma göstermez. Bu yüzeylerin aktif hedefleme özelliği kullanılarak çok faydalı biyomateryaller ve biyolojik cihazların tasarlanabileceği öngörülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Silisyum disk, UV-ozon işlemiyle üzerlerindeki organik kirliliklerden arındırıldı ve yüzeylerin pirana çözeltisinde bekletilmesiyle hidroksil sonlu (Si-OH) yüzeyler elde edildi ve SAM koşulları altında APTES molekülleri Si-OH yüzeyine bağlandı. Si-APTES yüzeyinin su değme açısı 58° olarak belirlendi.
- ROMP için uygun norbornen halkası içeren EHDA monomeri sentezlendi, FTIR ve ^{1}H NMR ölçümleri ile yapısı doğrulandı.
- Si-APTES yüzeyine EHDA monomeri bağlandı. GA-FTIR, su değme açısı ölçümleri, elipsometre, XPS ve AFM ile karakterize edildi. Si-EHDA yüzeyinin elipsometrik film kalınlığının 2 nm'den az olduğu ve su temas açısı 89° olarak belirlendi.
- Yüzeyde başlatılan ROMP ile poli(EHDA) fırçalar sentezlendi. Polimerizasyon için optimum süre 6 saat olarak belirlendi. Farklı sürelerde sentezlenen polimer fırçaların karakterizasyonu GA-FTIR, su değme açısı ölçümleri, XPS ve AFM ile yapıldı.
- Farklı katalizör/monomer oranları ([katalizör]/[monomer] (mmol/mmol): (0,01, 0,02, 0,04 ve 0,09) kullanılarak da yüzeyde başlatılan ROMP ile poli(EHDA) fırçaları sentezlendi. Elde edilen polimer fırçaların GA-FTIR, AFM, XPS, su temas açısı ve elipsometri ölçümleri yapıldı. Si-poli(EHDA) polimer fırçasının su temas açısı 81^{o} ve elipsometrik kalınlığı ise 10,3 nm olarak ölçüldü.
- Farklı [katalizör]/[monomer] oranında çözeltide oluşun serbest polimerlerin mol kütleleri ve polidispersite değeri Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (GPC) ile belirlendi. Elipsometrik kalınlık ve mol kütlesi değerleri kullanılarak poli(EHDA) fırçaların aşılama yoğunluğu (σ, zincir nm^{-2}) ve aşılama noktaları arasındaki ortalama uzaklık (D, nm), [katalizör]/[monomer] oranından bağımsız olarak sırasıyla 0,50 zincir nm^{-2} ve 1,65 nm olarak belirlendi.
- Hibrit polimer fırçalar elde etmek için poli(EHDA) zincirlerine tiyol-en klik tepkimesi ile tiyollenmiş HA (Th-HA) biyomolekülü bağlandı. Elde edilen poli(EHDA)-HA fırçasının karakterizasyonu GA-FTIR, su değme açısı ölçümleri, XPS, SEM ve AFM ile gerçekleştirildi. poli(EHDA)-HA yüzeyinin su temas açısı 48° ve elipsometrik kalınlığı 17,3 nm olarak ölçüldü.
- Farklı [katalizör]/[monomer] oranında sentezlenen Si-poli(EHDA)-HA yüzeyleri AFM, GA-FTIR ve su değme açısı ölçümleri ile incelendi ve optimum [katalizör]/[monomer] oranı 0,04 ve 0,02 olarak belirlendi.

- Si-poli(EHDA)-HA yüzeylerinin MTT ile sitotoksisite testi yapıldı ve polimer fırçalarının biyouyumlu olduğu belirlendi.
- AFM'de nanolitografi yöntemi kullanılarak poli(EHDA) ve poli(EHDA)-HA fırçaların film kalınlıkları sırasıyla 25 nm ve 32 mm olarak ölçüldü.
- DNA hibridizasyonu çalışmalarında [katalizör]/[monomer] oranı 0,04 ve 0,02 Si-poli(EHDA)-HA polimer fırçalar kullanıldı.
- Si-poli(EHDA)-HA polimer fırça yüzeyine EDAC varlığında 6,1 pH asetat tampon çözeltisi içerisinde tek zincir RNA probu immobilizasyonu yapıldı. Tek zincir RNA Mt20f probu bağlı poli(EHDA)-HA fırçalar pH 7,4 PBS çözeltisinde hazırlanan Hoechst 33258 (pentahidrat (bis-benzimit), (λuyarma=346 nm, λemisyon=460 nm) ile boyandı ve AFM, Floresans spektroskopisi ve Lazer Taramalı Konkofal Mikroskobu ile yüzeylerin karakterizasyonu yapıldı. DNA hibritleşmesi olmayan poli(EHDA)-HA fırça yüzeyi Floresans spektroskopisi ve Lazer Taramalı Konkofal Mikroskobu ölçümleri için kontrol numunesi olarak belirlendi.
- Poli(EHDA)-HA-prob RNA substratı hedef DNA çözeltisinde ilk olarak 95 ^{o}C 5 dakika süre ile bekletildi ve hedef ve probun denatürasyonu sağlandı. Hedef ve prob arasında homolog sekansların eşleşmesi gerçekleşerek, DNA çözeltisinin 60 ^{o}C'ye soğutulmasıyla yüzey üzerinde DNA hibridizasyonu sağlandı. DNA hibridizasyonu yapılmış olan yüzey Hoechst 33258 boyası ile boyandıktan sonra floresans spekrumu ve Lazer Taramalı Konkofal Mikroskobu görüntüleri alındı.
- Biyomolekül esaslı sistemlerin geliştilebilmesi için biyomoleküllerin katı yüzeyine immobilizasyonunun etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, yüzeyde kimyasal dayınımı yüksek ve iyi tasarlanmış poli(EHDA) polimer fırçalarının, mol kütlesi yüksek biyomoleküllerin immobilizasyonunda etkin bir rol oynadığı görüldü. Böylece biyomoleküllerin katı yüzeyine immobilizasyonu sırasında, yüzeye bağlı moleküllerin sıcaklıkla yüzeyden desorbe olması veya zincir esnekliği zayıf olan polimer fırçalara mol kütlesi yüksek biyomoleküllerin bağlanması sırasında rastlanan zincir kırılmaları gibi olumsuzlukların önüne geçilmesi sağlandı. Ayrıca, biyouyumlu poli(EHDA)-HA fırçalarının biyomedikal cihazların üretiminde ve tanı kiti çalışmalarında kullanılması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

Altun, E., Aydogdu, M. O., Koc, F., Crabbe-Mann, M., Brako, F., Kaur-Matharu, R., Ozen, G., Erdem Kuruca, S., Edirisinghe, U., Gunduz, O. and Edirisinghe, M. (2018). Novel making of bacterial cellulose blended polymeric fiber bandages. *Macromolecular Materials and Engineering*, 17(7), 1-7.

Andruzzi, L., Senaratne, W., Hexemer, A., Sheets, E. D., Ilic, B., Kramer, E.J., Baird, B. and Ober, C. K. (2005). Oligo(ethylene glycol) containing polymer brushes as bioselective surfaces. *Langmuir*, 21(6), 2495-2504.

Anker, J.N., Hall, W.P., Lyandres, O., Shah, N.C., Zhao, J. and Van Duyne, R.P. (2008). Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature Materials*, 7(2), 442-453.

Aslantürk, Ö.S., Aşkın-Çelik T, Karabey, B. and Karabey, F. (2017). Active phytochemical detecting, antioxidant, cytotoxic, apoptotic activities of ethyl acetate and methanol extracts of Galium aparine L. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 15(6),1-16.

Ayres, N. (2010). Polymer brushes: applications in biomaterials and nanotechnology. *Polymer Chemistry*, 2(1), 769-777.

Baughman, T. W. and Wagener, K. B. (2005). Recent advances in ADMET polymerization. *Advances in Polymer Science*, 176(1), 1-42.

Baum, M. and Brittain, W. J. (2002). Synthesis of polymer brushes on silicate substrates via reversible addition fragmentation chain transfer technique. *Macromolecules*, 35(3), 610-615.

Benson, S. W., Cruickshank, F. R., Golden, D. M., Haugen, G. R., O'Neal, H. E. and Rod-gers, A. S. (1969). Additivity rules for the estimation of thermochemical properties. *Chemical Reviews*, 69(2), 279.

Bielawski, C. W. and Grubbs, R. H. (2007). Living ring-opening metathesis polymerization. *Progress in Polymer Science*, 32(1), 8-9.

Bouchiat, V. and Esteve, D. (1996). Lift-off lithography using an atomic force microscope. *Applied Physics Letters*, 69(2), 3098.

Braun, S., Salaneck, W. R. and Fahlman, M., (2009). Energy-level alignment at organic/metal and organic/organic ınterfaces. *Advanced Materials*, 21(3),1450.

Bredas, J.-L., Norton, J. E., Cornil, J. and Coropceanu, V., (2009). Molecular understanding of organic solar cells: the challenges. *American Chemical Society*, 42(2), 1691.

Brinks, M. K., Hirtz, M., Chi, L. F., Fuchs, H. and Studer, A. (2007). Site-selective surface-ınitiated polymerization by langmuir–blodgett lithography. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(2), 5231.

Buchmeiser, M. R., Sinner, F., Mupa, M. and Wurst, K. (2000). Ring-opening metathesis polymerization for the preparation of surface-grafted polymer supports. *Macromolecules*, 33(12), 32-39.

Butt, H. J. (1991). Electrostatic interaction in atomic force microscopy – NCBI. *Biophysical Journal*, 18(3), 607-777.

Cai, H., Wang, Y., He, P. and Fang, Y. (2002). Electrochemical detection of DNA hybridization based on silver-enhanced gold nanoparticle label. *Analytica Chimica Acta*, 469(18), 165–172.

Calderon, N. (1972). Olefin metathesis reaction. *Accounts of Chemical Research*, 5(2), 127-132.

Cesana, S., Kurek , A., Baur, M. A., Auernheimer, J. and Nuyken O. (2007). Polymer-bound thiol groups on Poly(2-oxazoline)s. *Macromolecular Rapid Communications*, 28(11), 608-615.

Cesarone, C. F.. Bolognesi, C. and Santi, L. (1980). Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 hoechst. *Analytical Biochemistry*, 100(15), 188-197.

Chan, S., Fauchet, P. M., Li, Y., Rothberg, L. J. and Miller, B. L. (2000). Porous silicon microcavities for biosensing applications. *Physica Status Solid A*, 182(3), 541-546.

Chen, T., Amin, I. and Jordan, R. (2012). Patterned polymer brushes. *Royal Society of Chemistry*, 41(22), 3280-3296.

Chen, T., Ferris, R., Zhang, J. M., Ducker R. and Zauscher, S. (2010). Stimulus-responsive polymer brushes on surfaces: Transduction mechanisms and applications. *Progress in Polymer Science*, 35(2), 94-116.

Chen, Y., Sun, W., Deng, Q. and Chen, L. (2006). Controlled grafting from poly(vinylidene fluoride) films by surface-initiated reversible addition–fragmentation chain transfer polymerization. *Journal Of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 44(9), 3071-3080.

Cole, M. A., Voelcker, N. H., Thissen, H. and Griesser, H. J., (2009). Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein-surface and cell-surface interactions. *Biomaterials*, 30(3), 1827.

Çimen, D. and Caykara, T. (2012). Biofunctional oligo N-isopropylacrylamide brushes on silicon wafer surface. *Journal of Materials Chemistry*, 22(9), 13231-13238.

Çimen, D. and Caykara, T. (2013). Preparation of oligo-*N*-isopropylacrylamide brushes with -OH and -COOH end-groups via surface-initiated NMP. *Journal of Applied Polymer Science*, 129(18), 383-390.

Çimen, D. and Caykara, T. (2015). Micro-patterned polymer brushes by a combination of photolithography and interface-mediated RAFT polymerization for DNA hybridization. *Polymer Chemistry*, 6(33), 6812–6818.

Demirci, S. and Caykara, T. (2012). Controlled grafting of cationic poly[(*ar*-vinylbenzyl)trimethylammonium chloride] on hydrogen-terminated silicon substrate by surface-initiated RAFT polymerization. *Reactive and Functional Polymers*, 72(2), 588-595.

Desmet, G. B., Sabbe, M. K., D'hooge, D. R., Espeel, P., Celasun, S., Marin, G. B., Du Prez, F. E. and Reyniersa, M.F. (2017). Thiol-Michael addition in polar aprotic solvents: nucleophilic initiation or base catalysis?. *Polymer Chemistry*, 8(11), 1341-1352.

Dronavajjala, K. D., Rajagopalan, R., Uppili, S., Sen, A., Allara, D. L. and Foley, H.C. (2006). A simple technique to grow polymer brushes using in situ surface ligation of an organometallic ınitiator. *Journal of American Chemical Society,* 128(1), 130-140.

Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J.M. (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics*, 21(3), 10–14.

Dupont-Filliard, A., Roget, A., Livache, T. and Billon, M. (2001). Reversible oligonucleotide immobilisation based on biotinylated polypyrrole film. *Analytica Chimica Acta,* 449(11), 45–50.

Ejaz, M., Yamamoto, S., Ohno, K., Tsujii, Y. and Fukuda, T. (1998). Controlled graft polymerization of methyl methacrylate on silicon substrate by the combined use of the langmuir−blodgett and atom transfer radical polymerization techniques. *Macromolecules,* 31(17), 5934-5936.

Escorihuela, J., Banuls, M., Puchades, R. and Maquieira, A. (2014). Site-specific immobilization of DNA on silicon surfaces by using the thiol–yne reaction. *Journal of Materials Chemistry B,* 2(1), 8510 –8517.

Frutos, A. G., Liu, Q., Thiel, A. J., Sanner, A. M. W., Condon, A. E., Smith, L. M. and Corn, R. M. (1997). Demonstration of a word design strategy for DNA computing on surfaces. *Nucleic Acids Research,* 25(18), 4748-4757.

Gao, G. (2011). The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides. *Biomaterials*, 32(9), 3899–3909.

George, J., Sreekala, M.S. and Thomas, S. (2001). A review on ınterface modification and characterization of natural fiber reinforced plastic composites. *Polymer Engineering & Science,* 41(2), 1471-1485.

Ginger, D. S., Zhang, H. and Mirkin, C. A. (2004). The evolution of dip-pen nanolithography. *Angewandte Chemie International*, 116,30–46.

Glidle, A., Yasukawa, T., Hadyoon, C.S., Anicet, N., Matsue, T., Nomura, M. and Cooper, J.M. (2003). Analysis of protein adsorption and binding at biosensor polymer interfaces using X-ray photon spectroscopy and scanning electrochemical microscopy. *Analytical Chemistry,* 75(1), 2559–2570.

Gold, L. J. (1958). Statistics of polymer molecular size distribution for an invariant number of propagating chains. *Journal of Chemical Physics*, 28(3), 91-126.

Goldmann, A. S., Walther, A., Nebhani, L., Joso, R., Ernst, D., Loos, K., Barner-Kowollik, C., Barner, L. and Muller, A. H. E. (2009). Surface modification of poly(divinylbenzene) microspheres via thiol-ene chemistry and alkyne-azide click reactions. *Macromolecules*, 42(3), 3707-3714.

Guzey, D. and McClements, D. J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 22(7), 128−130.

Gürbüz, N., Demirci, S., Yavuz, S. and Caykara, T. (2011). Synthesis of cationic N-[3-(dimethylamino) propyl] methacrylamide brushes on silicon wafer via surface-initiated RAFT polymerization. *Journal Of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 49(2), 423-431.

Hafre´n, J. and Co´rdova, A. (2005). Direct organocatalytic polymerization from cellulose fibers. *Macromolecular Rapid Communication*, 26(2), 82–86.

Hennion, M.C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 85(6), 3-20.

Hook, A.L., Voelcker, N.H. and Thissen, H. (2009). Patterned and switchable surfaces for biomolecular manipulation. *Acta Biomaterialia*, 5(18), 2350–2370.

Hu, S., Hamidi, A., Altmeyer, S., K¨oster, T., Spangenberg, B. and Kurt, H., (1998). Novel approach to atomic force lithography. *Journal of Vacuum Science & Technology,* B, 16(3), 2822-2990.

Huang, X. and Wirth, M. (1997). Surface-initiated radical polymerization on porous silica. *Journal of American Chemical Society,* 1997, 69(22), 4577-4580.

Hyun, J. and Chilkoti, A. (2001). Surface-ınitiated free radical polymerization of polystyrene micropatterns on a self-assembled monolayer on gold. *Macromolecules*, 34(3), 5644–5652.

Ikada, Y. (1994). Surface modification medical applications. *Biomaterials*, 15(3), 10-28.

Ishii, H., Sugiyama, K., Ito, E. and Seki, K. (1999). Energy level alignment and ınterfacial electronic structures at organic/metal and organic/organic ınterfaces. *Advanced Materials*, 11(3), 605-618.

Ivin, K. J. and Mol, J. C. (1997). Ring-opening metathesis polymerization: general aspects, in Olefin Metathesis and Metathesis Polymerization. *Academic Press,* 11(2), 472-582.

Iwanaga, S. and Darling, R.B. (2005). Stable and erasable patterning of vanadium pentoxide thin films by atomic force microscope nanolithography. *Applied Physics Letters,* 86(2), 133113–133119.

Jacobson, H. and Stockmayer, W. H. (1950). Intramolecular reaction in polycondensations. i. the theory of linear systems. *Journal of Chemical Physics*, 18(3), 1600-1650.

Jeong, S.C., Yang, B.K., Ra, K.S., Maiti, T.K., Gu, Y.A. and Song, C.H. (2004). Characteristics of anti-complementary biopolymers extracted from coriolus versicolor. *Carbohydrate Polymers, Elsevier*, 55(3), 255-263.

Jin R., Teixeira, L.S. M., Krouwels, A., Dijkstra,P.J., van Blitterswijk, C.A., Karperien, M. and Feiejen, J. (2010). Synthesis and characterization of hyaluronic acid–poly(ethylene glycol) hydrogels via Michael addition: An injectable biomaterial for cartilage repair. *Acta Biomaterialia,* 6(3), 1968–1977.

Jones, D. M., Smith, J. R., Huck, W. T. S. and Alexander, C. (2002). Variable adhesion of micropatterned thermoresponsive polymer brushes: AFM ınvestigations of Poly(N-isopropylacrylamide) brushes prepared by surface-ınitiated polymerizations. *Advanced Material*, 14(3), 1130–1134.

Juang, A., Scherman, O. A., Grubbs, R. H. and Lewis, N. S. (2001). Formation of covalently attached polymer overlayers on si(111) surfaces using ring-opening metathesis polymerization methods. *Langmuir*, 17(5), 1321–1323.

Judeinstein, P. and Sanchez, C. J. (1996). Hybrid organic–inorganic materials: a land of multidisciplinarity. *Journal of Materials Chemistry*, 6(22), 511-525.

Karaman, E. F. ve Üner, M.. (2011). *Hyaluronik asit ve kozmetolojiiçin önemi.* I. Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya.

Kim, N. Y., Jeon, N. L., Choi, I. S., Takami, S., Harada, Y., Finnie, K. R., Girolami, G. S., Nuzzo, R. G., Whitesides, G. M. and Laibinis, P. E. (2000). Surface-ınitiated ring-opening metathesis polymerization on Si/SiO_2. *Macromolecules,* 33(8), 2793-2795.

Kim, Y., Sah, R. L. Y., Doong, J. H. and Grodzınsky, A. J. (1988). Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using hoechst 33258. *Analytical Biochemistry,* 174(12), 168-l 76.

Kobayaski, M., Matsuno, R., Otsuka, H. and Takahara, A. (2006). Precise surface structure control of inorganic solid and metal oxide nanoparticles through surface-initiated radical polymerization. *Science Technology Advanced Materials,* 7(7), 617-628.

Komur, B., Lohse, T., Can, H. M., Khalilova, G., Geçimli, Z. N., Aydoğdu, M. O., Kalkandelen, C., Stan, G. E., Sahin, Y. M., Sengil, A. Z., Suleymanoglu, M., Kuruca, E. S., Oktar, F. N., Salman, S., Ekren, N., Ficai, A. and Gunduz, O. (2016). Fabrication of naturel pumice/ hydroxyapatite composite for biomedical engineering. *BioMedical Engineering OnLine,* 15(3), 81-108.

Kremski, J. N., Wooters, J. L., Dougherty, J. P., Meyers, R. E., Collins, M. and Brown, E. L. (1987). Immobilization of DNA via oligonucleotides containing an aldehyde or carboxylic acid group at the 5' terminus. *Nucleic Acids Research,* 15(2), 2891-2909.

Lee, B. Y., Lee, H., Kim, Y. B., Kim, J., Hyeon, T., Park, H. W., Messersmith, P. B. and Park, T. G. (2008). Bioinspired surface ımmobilization of hyaluronic acid on monodisperse magnetite nanocrystals for targeted cancer ımaging. *Advanced Materials*, 20(3), 4154–4157.

Li, D., Zheng, Q., Wang, Y. and Chen , H. (2014). Combining surface topography with polymer chemistry: exploring new interfacial biological phenomena. *Polymer Chemistry*, 5(11), 14-24.

Li, G., Randev, R. K., Soeriyadi, A. H., Rees, G., Boyer, C., Tong, Z., Davis, T. P., Becer, C. R. and Haddleton, D. M. (2010). Investigation into thiol-(meth)acrylateMichael addition reactions using amine and phosphinecatalysts. *Polymer Chemistry*,1(2), 1196-1204.

Li, Y., Zheng, Y., Lai, X., Chu, Y. and Chen, Y. (2018). Biocompatible surface modification of nano-scale zeolitic imidazolate frameworks for enhanced drug delivery. *RSC Advances*, 8(3), 23623.

Linford, M. R., Fenter, P., Eisenberger, P. M. and Chidsey, C. E. D. (1995). Alkyl monolayers on silicon prepared from 1-alkenes and hydrogen-terminated silicon. *Journal of American Chemical Society*, 117(11), 3145-3155.

Liu, G. Y. and Amro, N. A. (2002). Positioning protein molecules on surfaces: a nanoengineering approach to supramolecular chemistry. *Proceedings of National Academy Sciences USA*, 99(22), 5165–5170.

Liu, G. Y., Xu, S. and Qian, Y. L. (2000). Nanofabrication of self-assembled monolayers using scanning probe lithography. .*American Chemical Society*, 33(3), 457–466.

Liu, X., Guo, S. and Mirkin, C. A. (2003). Surface and site-specific ring-opening metathesis polymerization ınitiated by dip-pen nanolithography. *Angewandte Chemie*, 42(4), 4785-4789.

Love, J. A., Morgan, J. P., Trnka, T. M. and Grubbs, R. H., (2002). A practical and highly active ruthenium-based catalyst that effects the cross metathesis of acrylonitrile. *Angewandte Chemie-International Edition*, 41(3), 4035-4037.

Lowe, A. B. (2010). Thiol-ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polymer Chemistry*, 1(11), 17-36.

Lund, V., Schmid, R., Rickwood, D. and Hornes, E. (1988). Assessment of methods for covalent binding of nucleic acids to magnetic beads, Dynabeads, and the characteristics of the bound nucleic acids in hybridization reactions. *Nucleic Acids Research*, 16(11), 10860-10878.

Madkour, A. E., Koch, A. H. R., Lienkamp, K. and Tew, G. N. (2010). End-functionalized ROMP polymers for biomedical applications. *Macromolecules*, 43(11), 4557–4561.

Maibach, H. I. (1996). Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging. *International Journal of Dermatology*, 35(3), 539-44.

Majumdar, A. (1999). Scanning thermal microskopy. *Annual Review of Material Science*, 29(3), 505-569.

Mamin, H. J., Ried, R. P., Terris, B. D. and Rugar, D. (1999). High-density data storage based on the atomic force microscope. *Proceedings of the IEEE,* 87(3), 1014-1019.

Mart´ın, C., Rius, G., Borris´e, X. and P´erez-Murano, F. (2005). Nanolithography on thin layers of PMMA using atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 16(2), 1016–1022.

Marx, K. A. (2003). Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution−surface ınterface. *Biomacromolecules,* 4(3), 1099-1029.

Matsuno, R., Yamamoto, K., Otsuka, H. and Takahara, A. (2004). Polystyrene-and poly (3-vinylpyridine)-grafted magnetite nanoparticles prepared through surface-initiated nitroxide-mediated radical polymerization. *Macromolecules,* 37(6), 2203-2209.

Matyjaszwski, K., Miller, P. J., Schukla, N., Immaraporn, B., Gelman, A., Luokala, B. B., Siclovan, T. M., Kickelbick, G., Vallant, T. and Hoffmann, H. (1999). Polymers at ınterfaces: using atom transfer radical polymerization in the controlled growth of homopolymers and block copolymers from silicon surfaces in the absence of untethered sacrificial ınitiator. *Macromolecules,* 32(26), 8716-8724.

Meyer, L. J. M. and Stern R. (1994). Age-dependent ghanges of hyaluronan in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 102(9), 385-396.

Millan, K. M., Spurmanis, A. J. and Mikkelsen, S. R. (1992) Covalent immobilization of DNA onto glassy carbon electrodes. *Electroanalysis,* 4(3), 929-932.

Moon, J. H. and Swager, T. M. (2002). Poly(*p*-phenylene ethynylene) brushes. *Macromolecules,* 35(16), 6086-6089.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation an cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods,* 65(1), 55-63

Neudetker, B.A., Csoka, A.B., Stair Nawy, S., Maibach, H.I. and Stern, R. (2000). Hyaluronan: biology, pathology and pharmacology. *Cosmetics&Toiletries*, 115(12), 42-58.

Nonnenmacher, M., O'Boyle, M. P. and Wickramasinghe, H. K. (1991). Kelvin probe force microscopy. *Applied Physics Letters*, 58(3), 2921-2939.

Oillic, C., Mur P., Blanquet, E., Delapierre, G., Vinet, F. and Billon, T. (2007). Silicon nanostructures for DNA biochip applications. *Materials Science and Engineering C*, 27(11), 1500–150.

Ostaci, R., Damiron, D., Capponi, S., Vignaud, G., Léger, L., Grohens, Y. and Drockenmuller, E. (2008). Polymer brushes grafted to "passivated" silicon substrates using click chemistry. *Langmuir*, 24(6), 2732–2739.

Pan, S., Castner, D. G. and Ratner, B. D. (1998). Multitechnique surface characterization of derivatization efficiencies for hydroxyl-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir*, 14(35), 45-50.

Pan, S.L. and Rothberg, L. (2005). Chemical control of electrode functionalization for detection of DNA hybridization by electrochemical impedance spectroscopy. *Langmuir*, 21(3), 1022–1027.

Park, J. and Lee, H. (2004). Effect of surface functional groups on nanostructure fabrication using AFM lithography. *Materials Science and Engineering C*, 24(2), 311–314.

Pike, A. R., Lie, L. H., Eagling, R. A., Ryder, L. C., Patole, S. N., Connolly, B. A., Horrocks, B.R. and Houlton, A. (2002). DNA on silicon devices: on-chip synthesis, hybridization, and charge transfer. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(4), 118-132.

Piner, R. D., Zhu, J., Xu, F., Hong, S. and Mirkin, C. A. (1999). "Dip-Pen" nanolithography, *NCBI*, Science, 283(3), 661–663.

Piunno, P. A. E., Krull, U. J., Hudson, R. H. E., Damha, M. J. and Cohen, H. (1994). Fiber optic biosensor for fluorimetric detection of DNA hybridization. *Analytica Chimica Acta*, 288(11), 205-214.

Raffaelli, L. (2008). Growth, viability, adhesion potential, and fibronectin expression in fibroblasts cultured on zirconia or feldspatic ceramics in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 86(4), 95968-9669.

Rajendran, M. and Ellington, A. D. (2002). Nucleic acids for reagentless biosensors. *Optical Biosensors-Present & Future, Elsevier*, 12(3), 369-396.

Rasmussen, S. R., Larsen, M. R. and Rasmussen, S. E. (1991). Covalent immobilization of DNA onto polystyrene microwells: the molecules are only bound at the 5' end. *Analytical Biochemistry*, 30(2), 138-142.

Raynor, J. E., Petrie, T. A., Garcia, A. J. and Collard, D. M. (2007). Controlling cell adhesion to titanium: Functionalization of poly [oligo (ethylene glycol) methacrylate] brushes with cell-adhesive peptides. *Advanced Materials*, 19(1), 1724–1728.

Ren, X., Wu, Y., Cheng, Y., Ma, H. and Wei, S. (2011). Fibronectin and bone morphogenetic protein-2-decorated poly (oegma-r-hema) brushes promote osseointegration of titanium surfaces. *Langmuir*, 27(11), 12069–12073.

Rieger, M. M. (1998). Hyaluronic acid in cosmetics. *Cosmeics& Toiletries*, 113(3), 35-42.

Riss, A., Paz, A. P., Wickenburg, S., Tsai, H., Oteyza, D. G. D., Bradley, A. J., Ugeda, M. M., Gorman, P., Jung, H. S., Crommie, M. F., Rubio, A. and Fischer, F. R. (2016). Imaging single-molecule reaction intermediates stabilized by surface dissipation and entropy. *Nature Chemistry*, 8(11), 2056-2078.

Rolison, D. R. Long, J. W. Lytle, J. C. Fischer, A., Rhodes, C. P., McEvoy, T. M., Bourg, M. E. and Lubers, A. M. (2009). Multifunctional 3D nanoarchitectures for energy storage and conversion. *American Chemical Society*, 38(3), 226-302.

Rosa, G. and Liang, J. (2009). Atomic force microscope nanolithography: dip-pen, nanoshaving, nanografting, tapping mode, electrochemical and thermal nanolithography. *Journal Of Physics: Condensed Matter,* 21(3), 48-98.

Rugar, D., Mamin, H. J., Guethner, P., Lambert, S. E., Stern, J. E., McFadyen, I. and Yogi, T. (1990). Magnetic force microscopy: general principles and application to longitudinal recording media. *Journal Applied Physics,* 68(3), 1169-1199.

Schierholz, J. M. and Beuth, J. J., (2001). Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *Journal of Hospital Infection*, 49(3), 87-108.

Schmelmer, U., Jordan, R., Geyer, W., Eck, W., Golzha, A., Grunze, M. and Ulman, A. (2003). Surface-initiated polymerization on self-assembled monolayers: amplification of patterns on the micrometer and nanometer scale. *Angewandte Chemie International Edition,* 42(1), 559-599.

Schmelmer, U., Paul, A., Kuller, A., Steenackers, M., Ulman, A., Grunze, A. M. and Jordan, R. (2007). Nanostructured polymer brushes. *Small,* 3(3), 459-499.

Somorjai, G. A., Contreras, A. M., Montano, M. and Rioux, R. M. (2006). Clusters: A bridge between disciplines. *Proceedings National Academy of Sciences United States of America,*103(1), 10577.

Steenackers, M., Ku¨ller, A., Ballav, N., Zharnikov, M., Grunze, M. and Jordan, R. (2007). Morphology control of structured polymer brushes. *Small,* 3(2), 1764-1986.

Stevens, M. M. and George, J. H. (2005). Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, 310(3), 1135.

Stone, V., Johnston, H. and Schins, R.P.F. (2009). Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Critical Reviews in Toxicology*, 39(7), 613-626.

Strother, T., Cai, W., Zhao, X., Hamers, R. J. and Smith, L. M. (2000). Synthesis and characterization of DNA-modified silicon (111) Surfaces. *Journal of American Chemical Society*, 122(11), 1205-1209.

Stuart, M. A. C., Huck, W. T. S., Genzer, J., Muller, M., Ober, C., Stamm, M., Sukhorukov, G. B., Szleifer, I., Tsukruk, V. V., Urban, M., Winnik, F., Zauscher, S., Luzinov I. and Minko, S. (2010). Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nature Materials*, 9(11), 101-118.

Svec, F. and Fréchet, J. M. J. (1996). New designs of macroporous polymers and supports: From separation to biocatalysts. *Science,* 273(55), 205-2011.

Telhag, I.I. and Havdrup, T. (1975). Nucleic acid in articular cartilage from rabbits of different ages. *Acta Orthopaedica Scandinavica,* 45(18), 185-189.

Thayer, A.M. (1999). Deciphering Diseases, Chemical & Engineering News. *American Chemical Society*, 19(22), 28-39.

Tokita, Y. and Okamoto, A. (1995). Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. *Polymer Degradation and Stability,* 48(2), 269-273.

Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,* 6(1), 112-118.

Trnka, T. M. and Grubbs, R. H. (2001). The development of L2X2Ru=CHR olefin metathesis catalysts: an organometallic success story. *Accounts of Chemical Research*, 34(3), 18-38.

Tugulu, S., Silacci, P., Stergiopulos, N. and Klok, H. A. (2007). Rgd-functionalized polymer brushes as substrates for the integrin specific adhesion of human umbilical vein endothelial cells. *Biomaterials*,28(3), 2536–2546.

Turan, E. and Caykara, T. (2010). Construction of hydroxyl-terminated poly(N-isopropylacrylamide) brushes on silicon wafer via surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Journal Of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 48(1), 3880-3887.

Turan, E., Demirci, S. and Çaykara, T. (2010). Synthesis of thermoresponsive poly(*N*-isopropylacrylamide) brush on silicon wafer surface via atom transfer radical polymerization. *Thin Solid Films,* 518(23), 5950-5954.

Van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W. and Zehnder, A. J. B. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiology Reviews*, 54(3), 75-93.

Vougioukalakis, G. C. and Grubbs, R. H. (2010). Ruthenium-based heterocyclic carbene-coordinated olefin metathesis catalysts (dagger). *Chemical Reviews*, 110(3), 1746-1786.

Wagener, K. B., Boncella, J. M. and Nel, J. G. (1991). Acyclic diene metathesis (ADMET) polymerization. *Macromolecules*, 24(3), 2649-2753.

Wataha, J. C., Craig, R. G. and Hanks, C. T. (1992). Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dental Materials*, 8(11), 65–70.

Weck, M., Jackiw, J. J., Rossi, R. R., Weiss, P. S. and Grubbs, R. H. (1999). Ring-opening metathesis polymerization from surfaces. *American Chemical Society*, 121(11), 4088–4089.

Wilchek, M. and Bayer, E.A. (1988). The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Analytical Biochemistry,* 171(3), 1–32.

Xu, C., Cai, H., Xu, Q., He, P. and Fang, Y. (2001). Characterization of single-stranded DNA on chitosan-modified electrode and its application to the sequence-specific DNA detection. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 369(3), 428–432.

Xu, S. and Liu, G. (1997). Nanometer-scale fabrication by simultaneous nanoshaving and molecular self-assembly. *Langmuir*, 13(11), 127–129.

Xue, P., Li, Q., Li, Y., Sun, L., Zhang, L., Xu, Z. and Kang, Y. (2017). Surface modification of poly(dimethylsiloxane) with polydopamine and hyaluronic acid to enhance hemocompatibility for potential applications in medical implants or devices. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(39), 33632-33644.

Yang J., Ren, L., and Li, Y. (2017). Ring-opening Metathesis Polymerization of Cis-5-norbornene-endo-2,3- dicarboxylic Anhydride Derivatives Using the Grubbs Third Generation Catalyst. *Chinese Journal of Polymer Science*, 35(1), 36−45.

Yang, M., Kong, R. Y. C., Kazmi, M. and Leung, K. C. (1998). Covalent immobilization of oligonucleotides on modified glass/silicon surfaces for solid-phase DNA hybridization and amplification. *Chemistry Letters*, 22(3), 257-258.

Yang, X., Shi, J., Johnson, S. and Swanson, B. (1998). Growth of ultrathin covalently attached polymer films: uniform thin films for chemical microsensors. *Langmuir*, 14(7), 1505-15007.

Yu, L., Wang, L., Hu, Z., You, Y., Wu, D. and Hong, C. (2013). Sequential michael addition thiol-ene and radicalmediated thiol-ene reactions in one-pot produce sequence-ordered polymers. *Polymer Chemistry,* 21(3), 1-6.

Yu, W. H., Kang, E. T. and Neoh, K. G. (2004). Functionalization of hydrogen-terminated Si(100) substrate by surface-ınitiated RAFT polymerization of 4-vinylbenzyl chloride and subsequent derivatization for photoinduced metallization. *Industrial Engineering Chemistry Research,* 43(17), 5194-5202.

Zengin, A. and Caykara, T. (2012). RAFT-mediated synthesis of poly [(oligoethylene glycol) methyl ether acrylate] brushes for biological functions. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry,* 50(3), 4443-4450.

Zengin, A., Yildirim, E. and Caykara, T. (2013). RAFT-mediated synthesis and temperature-induced responsive properties of poly (2-(2-methoxyethoxy) ethyl methacrylate) brushes. *Journal Of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry,* 51(11), 954–962.

Zhai, G., Yu, W. H., Kang, E. T., Neoh, K. G., Huang, C. C. and Liaw, D. (2004). Functionalization of hydrogen-terminated silicon with polybetaine brushes via surface-ınitiated reversible addition−fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization. *Industrial Engineering Chemistry Research,* 43(7), 1673-1680.

Zhao, G., Hafre´n, J., Deiana, L. and Co´rdova A. (2010). Heterogeneous ‘‘organoclick’’ derivatization of polysaccharides: photochemical thiol-ene click modification of solid cellulose. *Macromolecular Rapid Communication,* 31(3), 740–744.

Zhao, X., Lin, W., Song, N., Chen, X., Fan, X. and Zhou, Q. (2006). Water soluble multi-walled carbon nanotubes prepared via nitroxide-mediated radical polymerization. *Journal of Materials Chemistry,* 16(47), 4619-4625.

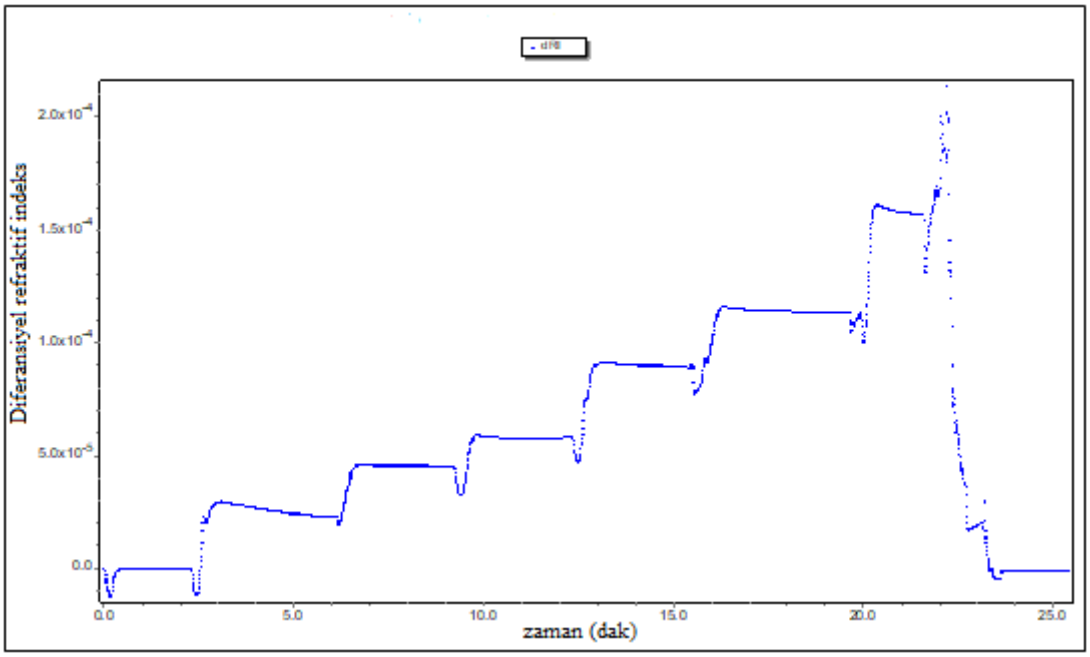
Zheng, G. F., Patolsky, F., Cui, Y., Wang, W. U. and Lieber, C. M. (2005). Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nature Biotechnology,* 23(11), 1294-1301.

Zoppe, J. O., Cavusoglu-Ataman, N., Mocny, P., Wang, J., Moraes, J. and Klok, H. (2017). Surface-ınitiated controlled radical polymerization: state-of-the-art, opportunities, and challenges in surface and ınterface engineering with polymer brushes. *American Chemical Society*, 117(13), 1105−1318.

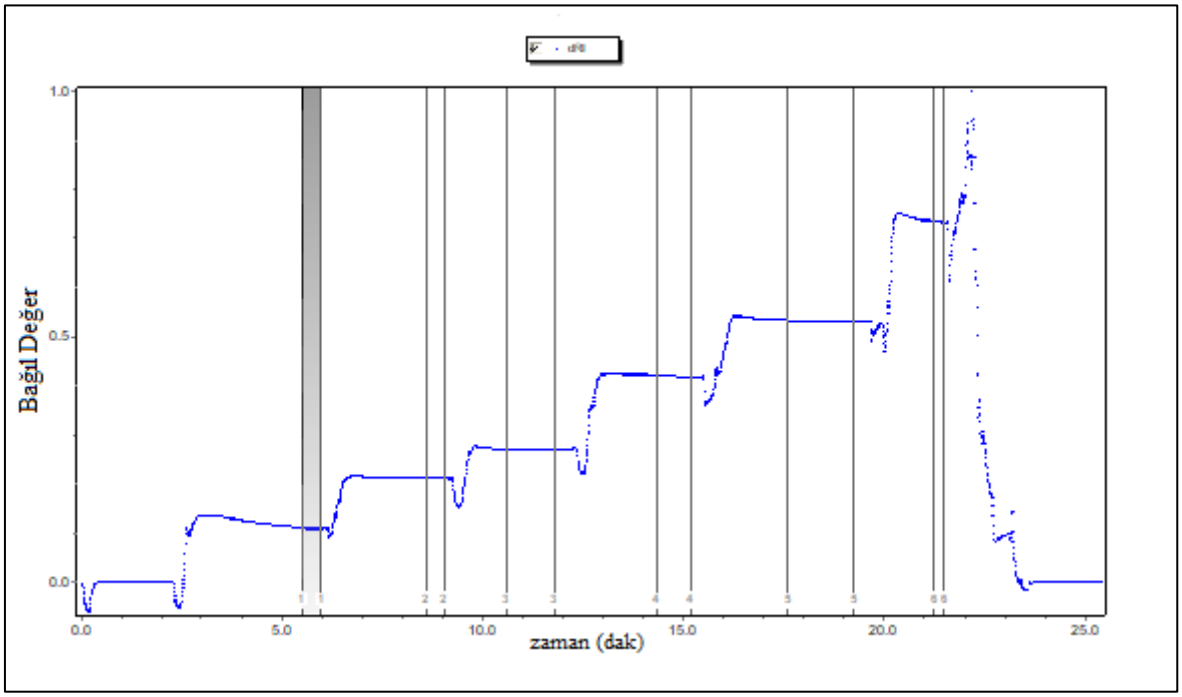
.

EKLER

EK-1. Grafikler



Şekil 1. Hiyalüronik asit kırılma indisi (dn/dc) grafiği



Şekil 2. Hiyalüronik asit kırılma indisi (dn/dc) grafiğinde belirlenen piklerin gösterimi

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ALTAY ÖZTÜRK, Esra

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 17.11.1988, ÜSKÜDAR

Medeni hali : Evli

Telefon : 05558977094

e-mail : esraaltayy@gmail.com

Eğitim

Derece	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet Tarihi**
Doktora	Gazi Üniversitesi / Kimya Ana Bilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi / Kimya Ana Bilim Dalı	2014
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi / Kimya	2011
Lise	Çamlıca Kız Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	**Yer**	**Görev**
-	-	-

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Altay, E., Altıkatoğlu-Yapaöz, M., Keskin, B., Yucesan, G. and Eren, T. (2015). Influence of alkyl chain length on the surface activity of antibacterial polymers derived from ROMP. *ELSEVIER Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 127, 73-78.

Sartinska, L. L., Voynich, E. V.., Andreeva, A. F., Kasumov, A. M., Timofeeva, I. I., Koval, A. Y., Frolov, G. A., Eren, T. and Altay, E. (2015). Properties of boron nitride synthesized under the effect of concentrated light ırradiation. *Nano Studies*, 8, 217-222.

Sartinska, L. L., Ye Voinich, V., Eren, T., Altay, E., Frolov, G. A. and László, K. (2015). Effect of moisture on the boron nitride formation from elements in a xenon high flux optical furnace. *European Chemical Bulletin*, 4(3), 165-168.

Sartinska, L., Chkhartishvili, L., Voynich, E., Eren, T., Frolov, G., Altay, E., Maisuradze, N., Tsagareishvili, O., Gabunia, D. and Maisuradze, N. (2018). Effect of concentrated light on morphology and vibrational properties of boron and tantalum mixtures. *Heliyon*, 4(3), e00585.

Hobiler

Müzik Dinlemek, Yüzmek



GAZİ GELECEKTİR..