

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METAL İÇEREN FONKSİYONEL BİYOPOLİMER
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

Yüksek Kimyager Mesut KARAHAN

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı : Yrd. Doç.Dr. Zeynep AKDESTE (YTÜ)

İSTANBUL, 2009

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	xvii
ÖNSÖZ	xviii
ÖZET	xix
ABSTRACT	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Polielektrolitler	3
2.1.1 Homopolielektrolitler	3
2.1.2 Poliamfolitler	7
2.2 İnterpolielektrolit Kompleksler	13
2.2.1 Polielektrolit-Protein Komplekslerinde Etkileşimler	18
2.2.2 Polielektrolit-Protein Komplekslerinde Fiziksel Haller	20
2.2.3 Polielektrolit-Protein Kompleksleriyle İlgili Yapılan Çalışmalar	21
2.3 Polimer-Metal Kompleksleri	26
2.3.1 Polimer-Metal Komplekslerinin Sınıflandırılması	30
2.3.1.1 Polimerik Ligandın Metal İyonu ile Kompleksleşmesi	31
2.3.1.2 Çok Fonksiyonlu Ligandların Bir Metalle Kompleksleşmesi	33
2.3.1.3 Metal İçeren Monomerin Polimerizasyonu	35
2.3.2 Polimer-Metal Kompleksleri İle İlgili Bazı Çalışmalar.....	36
2.4 Üçlü Polimer-Metal-Protein Kompleksleri	36
2.4.1 Asit Ortamında.....	36
2.4.2 Nötral Su Ortamında Kompleksleşme	37
2.5 Polimer-Protein Komplekslerinin Fonksiyonel Etkileri ve Bunların Pratikte Uygulama Alanları.....	40
2.5.1 İmmünolojide Polielektrolit Kompleksleri	40
2.5.1.1 İmmünojen Polielektrolit Kompleksinin Çalışma Modeli	45
2.5.2 Polielektrolit Kompleksler ve Yapay Aşılar	47
2.5.2.1 Üçlü Polielektrolit Kompleksler	48
2.6 Protein Özellikteki Taşıyıcı Moleküller	50
2.6.1 BSA'nın Taşıyıcı Protein Olarak Kullanıldığı Çalışmalar	51
2.7 Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller.....	52
3. KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ	56

3.1	UV-VIS Spektroskopisi	56
3.2	FT-IR Spektroskopisi	57
3.3	Fluoresans Spektroskopisi	60
3.3.1	Ayna Görüntüsü Kuralı.....	61
3.3.2	Stokes Kanunu	62
3.3.3	Fluoresans Ömrü ve Kuantum Verimi.....	62
3.3.4	Protein ve üçlü Polimer-Metal-Protein Moleküllerinin Fluoresans Özelliklerinden Yararlanılarak İncelenmesi.....	63
3.4	Dinamik Işık Saçılması Tekniği ile Parçacık Boyut Analizi.....	67
3.4.1	Eşdeğer Küre Teoremi	67
3.4.2	Dinamik Işık Saçılması.....	69
3.4.3	Kümülant Analizi.....	73
3.4.4	Hidrodinamik Çap	76
3.5	Elektroforetik Işık Saçılması Tekniği ile Zeta Potansiyeli Analizi	77
3.5.1	Zeta Potansiyeli	77
3.5.2	Lazer Doppler Elektroforezi	82
3.6	Atomik Kuvvet Mikroskobu.....	87
4.	DENEYSEL KISIM	92
4.1	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	92
4.1.1	Kullanılan Cihazlar.....	92
4.1.2	Kullanılan Kimyasallar Maddeler.....	93
4.2	Poliakrilik Asit Polimeri	94
4.2.1	PAA-Cu ²⁺ İkili Komplekslerinin Hazırlanması	94
4.2.1.1	Kullanılan Çözeltiler.....	94
4.2.1.2	Komplekslerin Hazırlanması	94
4.2.1.3	Hesaplamalar	94
4.2.2	PAA-Cu ²⁺ İkili Komplekslerine Ait Analiz Sonuçları	96
4.2.3	PAA-Cu ²⁺ -BSA Üçlü Komplekslerinin Hazırlanması	102
4.2.3.1	Kullanılan Çözeltiler.....	102
4.2.3.2	Komplekslerin Hazırlanması	102
4.2.3.3	Hesaplamalar	102
4.2.4	PAA-Cu ²⁺ -BSA Üçlü Komplekslerine Ait Analiz Sonuçları	104
4.2.5	FTIR Ölçümleri	118
4.2.5.1	Kullanılan Çözeltiler.....	118
4.2.5.2	Deneyin Yapılışı	118
4.2.6	PAA, BSA ve Üçlü PAA-Cu ²⁺ -BSA kompleksinin Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Görüntülenmesi.....	124
4.2.6.1	Deneyin Yapılması	124
4.2.7	PAA, PAA-Cu ²⁺ ve Üçlü PAA-Cu ²⁺ -BSA kompleksinin L929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi	127
4.2.7.1	MTT Deneyinin Hazırlanması.....	127
4.3	Metil vinil eter-maleik Anhidrit Kopolimeri	130
4.3.1	PMVEMA-Cu ²⁺ İkili Komplekslerinin Hazırlanması	130
4.3.1.1	Kullanılan Çözeltiler.....	130
4.3.1.2	Komplekslerin Hazırlanması	130
4.3.1.3	Hesaplamalar	130
4.3.2	PMVEMA-Cu ²⁺ İkili Komplekslerine Ait Analiz Sonuçları.....	132
4.3.3	PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA Üçlü Kompleksleri	138
4.3.3.1	Kullanılan Çözeltiler.....	138

4.3.3.2	Komplekslerin Hazırlanması	138
4.3.3.3	Hesaplamalar	138
4.3.4	PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA Üçlü Komplekslerine Ait Analiz Sonuçları	140
4.3.5	FTIR Ölçümleri	156
4.3.5.1	Kullanılan Çözeltiler.....	156
4.3.5.2	Deneyin Yapılışı	156
4.3.6	PMVEMA, BSA ve Üçlü PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA kompleksinin Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Görüntülenmesi	162
4.3.6.1	Deneyin Hazırlanması	162
4.3.7	PMVEMA, PMVEMA-Metal ve Üçlü PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA kompleksinin L929 fare fibroblast hücrelerine Etkisinin İncelenmesi.....	165
4.3.7.1	MTT Deneyinin Hazırlanması	165
5.	SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	167
5.1	Bakırın Kullanılmasının Nedenleri ve Avantajları	167
5.2	PAA-Cu ²⁺ İkili Komplekslerine Ait Sonuçlar	168
5.3	Üçlü PAA-Cu ²⁺ -BSA Komplekslerine Ait Sonuçlar.....	173
5.4	PMVEMA-Cu ²⁺ İkili Komplekslerine Ait Sonuçlar	182
5.5	Üçlü PAA-Cu ²⁺ -BSA Komplekslerine Ait Sonuçlar.....	186
5.6	Çalışmanın Çıktılarının Tartışması.....	198
KAYNAKLAR		201
ÖZGEÇMİŞ.....		208

SİMGE LİSTESİ

M_w	Ağırlıkça-Ortalama Molekül Ağırlığı
$\text{\AA}$	Angström
k	Boltzman Sabiti
dak	Dakika
λ	Dalgaboyu
Da	Dalton
ε	Dielektrik Sabiti
D	Difüzyon Katsayısı
g	Gram
F (ka)	Henry Fonksiyonu
η_{sp}	İntrinsik Viskozite
mg	Miligram
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
mV	Milivolt
M	Molar
n	Mol
T	Mutlak Sıcaklık
ns	Nanosaniye
nm	Nanometre
Γ	Ortalama Bozulma Hızı
$G_2(\tau)$	Otokorelasyon fonksiyonu
θ	Saçılma Açısı
s	Saniye
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
cm	Santimetre
cm^3	Santimetre Küp
η	Viskozite
τ	Zaman Farkı
z	Zeta Potansiyeli

KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ATR	Attenuated Total Reflection
BSA	Bovin Serum Albumin
C	Konsantrasyon
CP	Kopolimer
Çİ	Çoklu Dağıtkanlık İndisi
DLS	Dinamik Işık Saçılması
FT-IR	Fourier Transform Infrared
IS	Işık Saçılması
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
MVP	Metil–vinil-piridin
NIPAA	Poli-N-isopropilakrilamit
OVA	Ovalbumin
PAA	Poliakrilik asit
PBS	Fosfat Tamponu (Phosphate Buffer Saline)
PE	Polielektrolit
PEG	Poli Etilen Glikol
PEO	Polietilen Oksit
PMAA	Polimetakrilik asit
PMK	Polimer-Metal Kompleksi
PMVEMA	Metil vinil eter-maleik anhidrit kopolimeri
PNO	Poli-N-etilpiperazinoksit
PVA	Polivinil Alkol
PVI	Polivinilimidazol
PVP	Poli-4-vinilpiridin
QELS	Quasielastic Işık Saçılması
SA	Serum Albumin
SP	Sentetik Peptid
SPM	Taramalı Prob Mikroskobu
STM	Taramalı Tünel Mikroskopisi
UV	Ultra Violet
Vis	Viskozite

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Akrilik asit (AA) ve N-vinilpirolidon kopolimeri (VPD) [CP(AA-VPD)].....	2
Şekil 1.2 Anyonik polielektrolitler, (a) Metil vinil eter-maleik anhidrit kopolimeri (b) Poliakrilik Asit	2
Şekil 2.1 (a) poli(vinilpiridinyum), (b) sodyum polistiren sülfonat, (c) poli(diallildimetilamonyum klorür) (Dautzenberg vd., 1994)	3
Şekil 2.2 Poliakrilik asitin sulu çözeltideki dissosiyasyonu	4
Şekil 2.3 İki sentetik polielektrolitin kimyasal yapısı. Soldaki yapı poli(sodyum stiren sülfonat) (PSS) ve sağdaki ise poli(akrilik asit)tir (PAA). Her ikisi de negatif yükli polielektrolitlerdir. PSS kuvvetli bir polielektrolitken PAA zayıf bir polielektrolittir [1].....	4
Şekil 2.4 (a) İntegral tipe örnek olarak lineer poli(etilen imin) ve (b) asılı tipe örnek olarak poli(vinilamin)	5
Şekil 2.5 Çözeltiye tuz ilavesi sonucu polielektrolit zincirinin yumak konformasyonunu alması [2]	5
Şekil 2.6 Yüksüz polimerlerde ve polielektrolitlerde viskozite-derişim ilişkisi	6
Şekil 2.7 Poliamfolitlerin pH cevabına bağılı olarak örnek yapıları	8
Şekil 2.8 Maleik asit anhidrit ile N-metildiallilaminin kopolimerlerinin intrinsik viskozitesinin pH'la değışimi (Dautzenberg vd., 1994).....	9
Şekil 2.9 Proteinlerin poliamit yapısı [4]	9
Şekil 2.10 Proteinlerin pH'a bağılı yük durumları	10
Şekil 2.11 BSA'nın pH'a bağılı yük değışimi	10
Şekil 2.12 BSA'nın izomerik formları arasındaki ilişki	11
Şekil 2.13 Serum albuminin N, E ve F formlarının şematik gösterimi (Carter ve Ho, 1994)..	12
Şekil 2.14 Taşıyıcı protein olarak BSA'nın sentetik peptidlerle oluşturduğu konjugat.....	12
Şekil 2.15 Simpleks oluşum yolları	14
Şekil 2.16 Nonstokiyometrik suda çözünebilen simplekslerin şematik gösterimi	15
Şekil 2.17 Seyreltik sistemde simpleks oluşumunun iki basamaklı mekanizması	15
Şekil 2.18 Polielektrolit-protein komplekslerinde faz ayrımı.	20
Şekil 2.19 Suda çözünen PE-protein komplekslerinin yapısı: I- Poliasitlerin polianyonlarının proteinlerle komponentler aynı (negatif) yüklendiğinde oluşan komplekslerinin yapısı, II- Lineer polielektrolitlerin zıt yüklenmiş proteinlerle $n_P/n_{PE} \leq N_i$ oranında oluşan komplekslerin yapısı "a" ve "b" - "a" (I) ve "b" (II) tipli yapıların oluşumunu şematik olarak göstermektedir.	22

Şekil 2.20 İzoelektrik noktası civarında proteinlerin pozitif ve negatif yük öbeklerinin şematik gösterimi.	24
Şekil 2.21 Protein ve poliyon içeren stokiometrik kompleksin şematik gösterimi.	25
Şekil 2.22 Çok ligandlı polimer-metal kompleksleri	32
Şekil 2.23 Moleküller arası, molekül içi köprülü polimer-metal kompleksleri	33
Şekil 2.24 Çok fonksiyonlu ligandların bir metalle kompleksleşmesi	34
Şekil 2.25 Metal içeren monomerin polimerizasyonu.....	35
Şekil 2.26 Fare karaciğer hücrelerinde antikör oluşturan hücrelerin (AFC) miktarında artışın 4 değerli polikonidin (PC) tuzlarının (a) 1-PC-C ₂ H ₅ ; 2-PC-C ₂ H ₅ -CH ₂ C ₆ H ₅ ve (b) Poliakrilik asidin (PAA) polimerleşme derecesine olan bağıllığı. Polielektrolitin konsantrasyonu 50 mg/kg; 5x10 ⁻⁶ eritrosit hücre miktarı (Mustafaev, 1996a, 2004).	41
Şekil 2.27 a ve b Suda çözünen PE-Yüzey aktif madde kompleksleri.....	42
Şekil 2.28 Polimer-metal komplekslerinin [Me]/[PE] <<1(I) ve [Me]/[PE]>>1 (II) oranlarında oluşan yapı	42
Şekil 2.29 Aynı polimerleşme derecesine ve aynı kimyasal yapıya sahip olan PE kompleksleri (a) Lineer yapıda PE kompleksi (b) Kompakt yapıda PE kompleksinin hücre yüzeyindeki antijenlerle karşılıklı etkileşiminin şematik gösterimi (Mustafaev, 1996a).	43
Şekil 2.30 Poli-4-vinilpiridin (PVP)- BSA Kompleksi ve PAA-BSA kompleksinin yapısı (Mustafaev, 1996a, 2004).	44
Şekil 2.31 Yüksek (I) ve düşük immünojen (II) etkili antijen-PE komplekslerin modellerinin yapısı (Mustafaev, 1996a).....	45
Şekil 2.32 İmmün cevap oluşturan antijen-hücre komplekslerinin hipotetik şeması. a- T-Bağımlı cevap. b- T-Bağımsız cevap (Mustafaev, 1996a)	46
Şekil 2.33 CP makromolekülünün ve SA fonksiyonel gruplarının Cu ²⁺ iyonları vasıtasıyla kompleks oluşumunun şematik gösterilmesi ve oluşan üçlü PMC'nin yapısı..	49
Şekil 2.34 Saf BSA ve BSA*B konjugatına ait (a) UV spektrumları (b) HPLC kromatogramları, (1=>BSA, 2 => BSA*B konjugatı).....	51
Şekil 2.35 Saf BSA ve BSA*B konjugatına ait Floresans spektrumu, spektrumda 1 numaralı örnek BSA, 2 numaralı örnek ise BSA*B konjugatıdır (Mustafaev vd., 2002a)	52
Şekil 2.36 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Katyonik Polielektrolitler.....	53
Şekil 2.37 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Anyonik Polielektrolitler.....	54
Şekil 2.38 Sistein içeren peptidin polimerle oluşturduğu konjugatın şematik gösterimi	

(Hoffman, 2000)	55
Şekil 2.39 Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi (Mustafaev, 1996a, 2004).....	55
Şekil 3.1 Işık, c konsantrasyonunda, b cm kalınlığında bir ortamdan geçerken, absorpsiyon nedeniyle şiddeti I_0 'dan I 'ya düşmüştür.	56
Şekil 3.2 Moleküldeki titreşim hareketlerinin gösterimi.	58
Şekil 3.3 CH_3OH 'daki gerilme ve eğilme titreşimleri.....	59
Şekil 3.4 Modern bir FT-IR spektrometresinin genel gösterimi.	59
Şekil 3.5 Jablonski Diyagramı.....	61
Şekil 3.6 Floresans emisyonunda ayna görüntüsü.....	61
Şekil 3.7 Floresans özellik gösteren aminoasitler	64
Şekil 3.8 Aromatik aminoasitlerin floresans emisyon spektrumları.....	65
Şekil 3.9 Aromatik aminoasitlerin absorpsiyon spektrumları	65
Şekil 3.10 BSA (A) ve PE(N-izopropilakrilamit-akrilik asit kopolimeri 1:1) + BSA karışımı (B) çözeltilerine farklı konsantrasyonda Cu^{2+} eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu. Cu^{2+} konsantrasyon (mM): 1) 0; 2) 0,15; 3) 0,3; 4) 0,45; 5) 0,6; 6) 0,9; 7) 1,2; 8) 1,5 (Filenko vd., 2001).	66
Şekil 3.11 BSA proteininin üç boyutlu yapısı görülmektedir. Proteini oluşturan her bir aminoasidi bir köşe olarak kabul edersek, herhangi uzak iki köşeyi birleştiren bir doğru BSA'ya ait bir boyut olacaktır.	68
Şekil 3.12 Bir kürenin $2R$ çapı bilindiğinde yüzey alanı ve hacmi gibi diğer özellikleri hesaplanabilmektedir: yüzey alanı $= 4\pi R^2$, hacim $= (4/3)\pi R^3$	68
Şekil 3.13 İki parçacıktan saçılan ışınların, detektör yüzeyinde yaptıkları girişim görülmektedir. (a)'da yapıcı girişim sonucu aydınlık bölge, (b)'de ise yıkıcı girişim sonucu karanlık bölge oluşmuştur.	70
Şekil 3.14 Bir lazer kaynağından gelen ışık dalgalarının çözelti içindeki parçacıklardan saçılması.....	71
Şekil 3.15 Detektörün ölçtüğü ışık şiddetinin zamana bağlı grafiği.....	71
Şekil 3.16 Eşit zaman aralıklarıyla bakıldığında, bir çözeltideki daha küçük parçacıklar daha büyük olanlara kıyasla daha hızlı hareket ettiklerinden daha çok yer değiştirirler.....	72
Şekil 3.17 İki görüntü tamamen aynıyken korelasyon tam 1'dir, zaman geçtikçe azalır ve mili saniyeler sonra sıfıra iner. Dolayısıyla görüntüler arasında hiçbir benzerlik kalmaz.	72

Şekil 3.18 Saçılan ışığın şiddetinin zamana bağlı grafiğinde büyük ölçekte bakıldığında rastgelelik görülürken, küçük zaman aralıkları için değişim düzgün ve süreklidir.	73
Şekil 3.19 Bir partikülün; (a) tuzlu ortamdaki, (b) deiyonize su ortamındaki, (c) Polimere bağlıyken ki hidrodinamik çapları.	77
Şekil 3.20 Bir koloidal sistemin olası durumları görülmektedir. (a)'da kararlı olan sistemde flokülasyon süreciyle (b)'de floklar oluşur. Koagülasyon süreciyle (c)'de floklar büyür ve sonunda sedimentasyonla (ç)'de tüm madde yüzeye çöker. Çökme olayı en başta da olabilirdi ki (d)'de bu durum görülmektedir; önce sedimentasyonla yüzeye çökme olur, flokülasyonla (e)'de floklar oluşur ve (f)'de koagülasyonla tüm madde bir araya gelerek yüzey üzerinde bir çökelti tabakası oluşur [7].	78
Şekil 3.21 Parçacıklar arasındaki çift tabaka itme enerjisi ve Van der Waals çekim enerjilerinin bir toplamı olarak net enerji grafiği.	79
Şekil 3.22 Negatif yüklü bir parçacığın çevresinde oluşturduğu elektrik potansiyeli (Zetasizer Nano Series User Manual).	80
Şekil 3.23 Negatif yüklü bir parçacığın zeta potansiyelinin pH'ye bağlı değişim grafiği görülmektedir (Zetasizer Nano Series User Manual).	81
Şekil 3.24 a yarıçaplı parçacığın etrafında gri renkte elektrik çift tabakası görülüyor. Bu tabakanın uzunluğu $1/k$ olup k parametresi denklemdaki potansiyel alanın sınır koşullarından gelir.	83
Şekil 3.25 Bir kapiler kuvvet (Zetasizer Nano Series User Manual).	83
Şekil 3.26 Zetasizer cihazının iç yapısı (Zetasizer Nano Series User Manual).	84
Şekil 3.27 Şekilde noktasal bir kaynaktan yayılan dairesel dalgalar görülmektedir. (a)'da hem kaynak hem de gözlemci durgundur, dolayısıyla dalgaboyu da değişmemektedir. (b)'de ise kaynak, gözlemciye doğru hareket ettiğinden, dalga boyu değişmektedir.	86
Şekil 3.28 Bütün taramalı prob mikroskoplarının temel prensibi şematik olarak gösterilmiştir. Probun geometrisi ve numune-prob etkileşim mesafesi mikroskop çözünürlüğünü ve görüntü kalitesini belirler (Nuno ve Miguel, 2004).	88
Şekil 3.29 AFM donanımının bileşenleri şematik olarak gösterilmiştir (Nuno ve Miguel, 2004).	89
Şekil 3.30 İki AFM tarama şeklinin kıyaslanması: “tapping mode” (a) ve “contact mode” (b). Genellikle birincisi numune deformasyonunu azaltabilmektedir [2].	90

Şekil 4.1 PAA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı 400 nm'deki optik yoğunlukları:	
0 ≤ n _{Cu} ²⁺ / n _{AA} ≤ 2.....	96
Şekil 4.2 n _{Cu} ²⁺ / n _{AA} ≥ 0,5 oranlarında ikili komplekslerde oluşan çöken madde miktarı (g).	97
Şekil 4.3 PAA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı viskozite grafiği.	98
Şekil 4.4 PAA'din üzerine bakırın eklenmesiyle elde edilen ikili komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PAA (a); n _{Cu} ²⁺ / n _{AA} : 0,1 (b); 0,2 (c); 0,3 (d); 0,4 (e); 0,5 (f); 1 (g); 1,5 (h); 2 (i).	99
Şekil 4.5 PAA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı çap grafiği.....	100
Şekil 4.6 PAA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı zeta potansiyel grafiği.....	101
Şekil 4.7 Protein, protein-polimer ve polimer-metal-polimer kompleksleri (n _{Cu} ²⁺ / n _{AA} : 0,4; n _{BSA} / n _{PAA} : 2) çözeltilerinin 280 nm'deki optik yoğunlukları.....	104
Şekil 4.8 PAA-Cu ²⁺ -BSA üçlü komplekslerinin 400 nm'deki farklı protein/polimer oranlarına göre zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri: n _{Cu} ²⁺ / n _{AA} : 0,4 oranında n _{BSA} / n _{PAA} : 0,2; 0,5; 1; 2 oranları.	105
Şekil 4.9 BSA ve PAA-Cu ²⁺ ikili kompleksinin (n _{Cu} ²⁺ / n _{AA} : 0,4) (PMK) (oranlar birbirine eşit) zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri.	106
Şekil 4.10 PAA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{AA} : 0,4) ikili kompleksinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu: BSA a; n _{BSA} / n _{PAA} : 0,5 b; 1 c; 1,5 d; 2 e, 2,5 f; 3 g.	107
Şekil 4.11 PAA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{AA} : 0,3) ikili kompleksinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu: BSA a; n _{BSA} / n _{PAA} : 0,5 b; 1 c; 1,5 d; 2 e, 2,5 f; 3 g.	107
Şekil 4.12 PAA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen floresans şiddeti değerlerinin n _{BSA} /n _{PAA} oranı ile değişim grafiği.	108
Şekil 4.13 PAA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin n _{BSA} /n _{PAA} oranı ile değişim grafiği.	109
Şekil 4.14 PAA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{AA} : 0,1) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.	110
Şekil 4.15 PAA-Metal (n _{Cu} ²⁺ / n _{AA} : 0,1) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PAA (a); BSA (b); n _{BSA} /n _{PAA} : 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).....	111
Şekil 4.16 PAA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{AA} : 0,2) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle	

elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.	112
Şekil 4.17 PAA-Cu ²⁺ ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,2$) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PAA (a); BSA (b); n_{BSA}/n_{PAA} : 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).....	113
Şekil 4.18 PAA-Cu ²⁺ ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,3$) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.	114
Şekil 4.19 PAA-Cu ²⁺ ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,3$) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PAA (a); BSA (b); n_{BSA}/n_{PAA} : 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).....	115
Şekil 4.20 PAA-Cu ²⁺ ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,4$) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.	116
Şekil 4.21 PAA-Cu ²⁺ ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,4$) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PAA (a); BSA (b); n_{BSA}/n_{PAA} : 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).....	117
Şekil 4.22 BSA proteininin FT-IR spektrumu (numune katı halde).....	119
Şekil 4.23 PAA polimerinin FT-IR spektrumu (numune sıvı halde).	120
Şekil 4.24 CuSO ₄ .5H ₂ O'nun FT-IR spektrumu (numune katı halde).	121
Şekil 4.25 PAA-Cu ²⁺ ikili kompleksinin FT-IR spektrumu (numune katı halde).....	122
Şekil 4.26 PAA-Cu ²⁺ -BSA üçlü kompleksinin FT-IR spektrumu (numune katı halde).	123
Şekil 4.27 BSA'nın (500 x 500 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.....	124
Şekil 4.28 BSA'nın (1000 x 1000 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.....	125
Şekil 4.29 PAA'nın (500 x 500 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.	125
Şekil 4.30 Üçlü PAA-Cu ²⁺ -BSA (1000 x 1000 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.....	126
Şekil 4.31 PAA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin L929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x), a) Kontrol, b) $n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,2$ oranındaki ikili kompleks, c) $n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,3$, d) $n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,4$	128
Şekil 4.32 PAA-Cu ²⁺ -BSA üçlü komplekslerinin L929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x), a) $n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,4$, n_{BSA}/n_{PAA} : 2; b) CuSO ₄ .5H ₂ O ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,4$ oranındaki bakır konsantrasyonu ile aynı) 129	
Şekil 4.33 PMVEMA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı 400 nm'deki optik yoğunlukları: $0 \leq n_{Cu^{2+}} / n_{MVEMA} \leq 2$	132
Şekil 4.34 $n_{Cu^{2+}} / n_{MVEMA} > 0,5$ oranlarında oluşan ikili komplekslerde çöken madde miktarı (g).	133

Şekil 4.35 PMVEMA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı viskozite grafiği.....	134
Şekil 4.36 PMVEMA kopolimeri üzerine Bakırın eklenmesiyle elde edilen ikili komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PMVEMA (a); n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,1 (b); 0,2 (c); 0,3 (d); 0,4 (e); 0,5 (f); 1 (g); 1,5 (h); 2 (i).....	135
Şekil 4.37 PMVEMA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı çap grafiği.....	136
Şekil 4.38 PMVEMA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı zeta potansiyel grafiği.....	137
Şekil 4.39 Protein, protein-polimer ve polimer-metal-protein çözeltilerinin (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,5; n _{BSA} / n _{PMVEMA} : 2) 280 nm'deki optik yoğunlukları.	140
Şekil 4.40 PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA üçlü komplekslerinin 400 nm'deki protein/polimer oranlarına göre zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri: n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,5 oranında n _{BSA} / n _{PMVEMA} : 0,2; 0,5; 1; 2 oranları.....	141
Şekil 4.41 BSA ve PMVEMA-Cu ²⁺ ikili kompleksinin (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,5) (PMK) (oranlar birbirine eşit) zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri.....	142
Şekil 4.42 Polimer-Metal (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,4; 0,5) ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu: (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,4 için) BSA a; n _{BSA} / n _{PMVEMA} : 0,5 b; 1 c; 1,5 d; 2 e, 2,5 f; 3 g; (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,5 için) 0,5 i; 1 i; 1,5 k; 2 l; 2,5 m; 3 n.....	143
Şekil 4.43 Polimer-Metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen floresans şiddeti değerlerinin n _{BSA} /n _{PMVEMA} oranı ile değişim grafiği.....	144
Şekil 4.44 Polimer-Metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin n _{BSA} /n _{PMVEMA} oranı ile değişim grafiği.....	145
Şekil 4.45 PMVEMA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,1) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.	146
Şekil 4.46 PMVEMA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,1) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PMVEMA (a); BSA (b); n _{BSA} /n _{PMVEMA} : 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).....	147
Şekil 4.47 PMVEMA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,2) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.	148
Şekil 4.48 PMVEMA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,2) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PMVEMA (a); BSA (b); n _{BSA} /n _{PMVEMA} : 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3	

(h).....	149
Şekil 4.49 PMVEMA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,3) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.	150
Şekil 4.50 PMVEMA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,3) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PMVEMA (a); BSA (b); n _{BSA} /n _{PMVEMA} : 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).....	151
Şekil 4.51 PMVEMA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,4) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.	152
Şekil 4.52 PMVEMA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,4) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PMVEMA (a); BSA (b); n _{BSA} /n _{PMVEMA} : 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).....	153
Şekil 4.53 PMVEMA-Cu ²⁺ (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,5) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PMVEMA (a); BSA (b); n _{BSA} /n _{PMVEMA} : 0,5 (c); 1 (d).	154
Şekil 4.54 PMVEMA-Cu ²⁺ - BSA üçlü kompleksin (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,5) n _{BSA} /n _{PMVEMA} oranlarına bağlı çap grafiği.	155
Şekil 4.55 PMVEMA-Cu ²⁺ - BSA üçlü kompleksin (n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,5) n _{BSA} /n _{PMVEMA} oranlarına bağlı zeta potansiyel grafiği.....	155
Şekil 4.56 BSA proteininin FT-IR spektrumu (numune katı halde).....	157
Şekil 4.57 PMVEMA kopolimerinin FT-IR spektrumu (numune katı halde).....	158
Şekil 4.58 CuSO ₄ .5H ₂ O'nun FT-IR spektrumu (numune katı halde).	159
Şekil 4.59 PMVEMA-Cu ²⁺ ikili kompleksinin FT-IR spektrumu (numune katı halde).....	160
Şekil 4.60 PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA üçlü kompleksinin FT-IR spektrumu (numune katı halde)	161
Şekil 4.61 BSA'nın (500 x 500 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.....	162
Şekil 4.62 BSA'nın (1000 x 1000 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.....	163
Şekil 4.63 PMVEMA'nın (1000 x 1000 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.	163
Şekil 4.64 Üçlü PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA'nın (1000 x 1000 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.	164
Şekil 4.65 PMVEMA kopolimerinin ikili ve üçlü komplekslerinin L929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x), a) Kontrol, b) n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,4 ikili kompleksi, c) n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,5 ikili kompleksi, d) n _{Cu} ²⁺ / n _{PMVEMA} : 0,5 n _{BSA} /n _{PMVEMA} : 2 üçlü kompleksi.	166

Şekil 5.1 PAA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı 400 nm'deki optik yoğunlukları: $0 \leq n_{Cu^{2+}} / n_{AA} \leq 2$	169
Şekil 5.2 $n_{Cu^{2+}} / n_{AA} \geq 0,5$ oranlarında ikili komplekslerde oluşan çöken madde miktarı (g).	169
Şekil 5.3 PAA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı viskozite grafiği.	170
Şekil 5.4 PAA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı çap grafiği.....	171
Şekil 5.5 PAA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı zeta potansiyel grafiği.....	172
Şekil 5.6 PAA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin düşünülen yapı modeli.....	172
Şekil 5.7 Protein, protein-polimer ve polimer-metal-polimer kompleksleri ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA}$: 0,4, n_{BSA} / n_{PAA} : 2) çözeltilerinin 280 nm'deki optik yoğunlukları.....	174
Şekil 5.8 PAA-Cu ²⁺ -BSA üçlü komplekslerinin 400 nm'deki protein/polimer oranlarına göre zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri: $n_{Cu^{2+}} / n_{AA}$: 0,4 oranında (bakır oranı sabit) n_{BSA} / n_{PAA} : 0,2; 0,5; 1; 2 oranları.	174
Şekil 5.9 BSA ve PAA-Cu ²⁺ ikili ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA}$: 0,4; n_{BSA}/n_{PAA} : 2) komplekslerinin (PMK) (oranlar birbirine eşit) zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri.	175
Şekil 5.10 Polimer-Metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen floresans şiddeti değerlerinin n_{BSA}/n_{PAA} oranı ile değişim grafiği.	176
Şekil 5.11 Polimer-Metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin n_{BSA}/n_{PAA} oranı ile değişim grafiği.	176
Şekil 5.12 PAA-Metal ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA}$: 0,4) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PAA (a); BSA (b); n_{BSA}/n_{PAA} : 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).....	178
Şekil 5.13 FT-IR spekturumları, siyah: PAA, mavi : BSA, kırmızı : CuSO ₄ .5H ₂ O, yeşil : PAA-Cu ²⁺ ikili kompleksi, turkuaz : PAA-Cu ²⁺ -BSA üçlü kompleksi.....	180
Şekil 5.14 a) BSA (1000 x 1000 nm), b) PAA (500 x 500 nm), c) Üçlü PAA-Cu ²⁺ -BSA (1000 x 1000 nm) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.....	181
Şekil 5.15 PMVEMA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı 400 nm'deki optik yoğunlukları: $0 \leq n_{Cu^{2+}} / n_{MVEMA} \leq 2$	182
Şekil 5.16 $n_{Cu^{2+}} / n_{MVEMA} > 0,5$ oranlarında oluşan ikili komplekslerde çöken madde miktarı (g).	183
Şekil 5.17 PMVEMA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı viskozite grafiği.....	183
Şekil 5.18 PMVEMA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı çap grafiği.	184
Şekil 5.19 PMVEMA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı zeta potansiyel grafiği.....	185

Şekil 5.20 PMVEMA-Cu ²⁺ ikili komplekslerinin düşünülen yapı modeli.....	185
Şekil 5.21 Protein, protein-polimer ve polimer-metal-polimer çözeltilerinin ($n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA}$: 0,5; n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 2) 280 nm'deki optik yoğunlukları.	186
Şekil 5.22 PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA üçlü komplekslerinin 400 nm'deki protein/polimer oranlarına göre zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri: $n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA}$: 0,5 oranında n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 0,2; 0,5; 1; 2 oranları.....	187
Şekil 5.23 BSA ve PMVEMA-Cu ²⁺ ikili kompleksinin ($n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA}$: 0,5; n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 2) (PMK) (oranlar birbirine eşit) zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri.....	188
Şekil 5.24 Polimer-Metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen floresans şiddeti değerlerinin n_{BSA} / n_{PMVEMA} oranı ile değişim grafiği.....	189
Şekil 5.25 Polimer-Metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin n_{BSA} / n_{PMVEMA} oranı ile değişim grafiği.....	189
Şekil 5.26 PMVEMA-Cu ²⁺ - BSA üçlü komplekslerinin n_{BSA} / n_{PMVEMA} orana bağlı çap grafiği.	191
Şekil 5.27 PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA üçlü komplekslerinin n_{BSA} / n_{PMVEMA} orana bağlı zeta potansiyel grafiği.	191
Şekil 5.28 FT-IR spekturumları, siyah: PMVEMA, mavi: BSA, kırmızı: CuSO ₄ .5H ₂ O, yeşil: PMVEMA-Cu ²⁺ ikili kompleksi, turkuaz: PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA üçlü kompleksine aittir.....	193
Şekil 5.29 a) BSA (1000 x 1000 nm), b) PMVEMA (1000 x 1000 nm), c) Üçlü PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA (1000 x 1000 nm) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.....	194
Şekil 5.30 PAA, PAA-Cu ²⁺ ve PAA-Cu ²⁺ -BSA komplekslerinin L929 hücre canlılığına etkisi, 1) kontrol, 2) PAA, 3) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}} / n_{PAA}$: 0,1), 4) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}} / n_{PAA}$: 0,2), 5) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}} / n_{PAA}$: 0,3), 6) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}} / n_{PAA}$: 0,4), 7) üçlü kompleks ($n_{Cu^{2+}} / n_{PAA}$: 0,4; n_{BSA} / n_{PAA} : 2).	195
Şekil 5.31 PMVEMA, PMVEMA-Cu ²⁺ ve PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA komplekslerinin L929 hücre canlılığına etkisi, 1) kontrol, 2) PMVEMA, 3) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA}$: 0,1), 4) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA}$: 0,2), 5) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA}$: 0,3), 6) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA}$: 0,4), 7) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA}$: 0,5), 8) üçlü kompleks ($n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA}$: 0,5, n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 2) ..	196
Şekil 5.32 Üçlü Polimer-Cu ²⁺ -BSA komplekslerinin düşünülen yapı modeli (Mustafaev, 1996a, 2004; Karahan, 2002).....	197

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 Serbest BGG, tüberkülozun protein türevi (PPD) ve bunların PVP (R2, R16) kompleksleriyle immünize edilmiş farelerin dalağındaki antikor oluşturan hücrelerin (AOH) miktarı.	47
Çizelge 2.2 Ovalbumine (OA) karşı olan Ig-E'nin miktarı (Fareler OA ve OA' nın PEK si ile immünize edilmişler)	47
Çizelge 2.3 Normal ve timusu olmayan farelere SA, GG ve bunların kuaternleşmiş poli (4-vinil-piridin) ile kompleksleri verildiğinde oluşan immünolojik aktiflik.	48
Çizelge 2.4 Farelerde ikinci immünizasyondan sonra serum albumine karşı oluşan immün cevap	48
Çizelge 2.5 Farelerde proteine spesifik olan ikinci immün cevap.....	49
Çizelge 6.1 Sentetik Peptit Aşı Örnekleri.....	199
Çizelge 6.2 Yapay Polimerik Aşıların Avantajları	200

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın uygulamasını yönlendiren ve değerlendirilmesini sağlayan, her konuda bilgilendiren ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Zeynep AKDESTE' ye ve doktora çalışmama başladığım andan vefatına kadar tez danışmanlığımı yapan, tez konumu belirleyen, tez çalışmalarım süresince yaptığı değerlendirmeler ile çalışmamın her yönü ile ilerlemesinde yardımcı olan, bu gelişmiş teknoloji ile çalışmama olanak sağlayan 14 Haziran 2007'de aramızdan ayrılan, Biyomühendislik Bölümü Kurucu Başkanı Prof.Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE' ye içten teşekkür ederim.

Tez izleme komitemde olan ve engin bilgileriyle beni yönlendiren Prof.Dr. İnci ARISAN ve Doç.Dr. Cemal ÖZEROĞLU'na teşekkür ederim.

Sağladığı desteklerden dolayı YTÜ Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanı Prof.Dr. Sabriye PİŞKİN ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof.Dr. Huriye KUZU' ya teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Araş.Gör. Mustafa Kemal GÜMÜŞ'e, Araş.Gör. Eray DALGAKIRAN'a, Araş.Gör.Dr. Melda ALTIKATOĞLU'na, Araş.Gör.Dr. Zafer Ömer ÖZDEMİR'e, Araş.Gör. Yasemin Budama BATTAL'a, Araş.Gör.Dr. Banu MANSUROĞLU'na, Araş.Gör. Kadriye KIZILBEY'e, Araş.Gör. Serap DERMAN'a, Nermin ÇİMEN'e, Yeliz BAŞARAN'a, hücre çalışmalarındaki katkılarından dolayı Prof.Dr. Adil ALLAHVERDİYEYEV ve grubuna teşekkür ederim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca her türlü desteği sağlayan sevgili ailem; babam Şemsettin KARAHAN'a, annem Mercan KARAHAN'a, kardeşlerim Turgut ve Yusuf KARAHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bana ve bu teze emeği geçen adını sayamadığım herkese çok teşekkür ederim.

ÖZET

Fonksiyonel biyopolimer sistemler olarak suda çözünen ve çözünmeyen protein-polielektrolit kompleksleri (PPC); protein saflaştırılması, enzim immobilizasyonu ve sentetik aşı geliştirilmesi gibi bir çok çalışmalara konu olan polimer-protein bileşiklerinin bir sınıfıdır. PPC oluşumunda esas kuvvet elektrostatik etkileşim olmasına karşın bununla birlikte hidrofobik etkilerin ve hidrojen bağlarının katkısı da mümkündür. Sulu çözeltilerde polielektrolit ile proteinin arasındaki etkileşimleri pH, iyonik şiddet ve protein/polielektrolit oranlarına bağlı olduğu bulunmuştur. Bu polikompleksler güçlü immün cevap ve yüksek seviyede immünolojik koruma sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında; sulu yada tampon çözeltide (pH:7) bakır iyonlarının varlığında (Cu^{2+}) anyonik polielektrolitlerin [poliakrilik asit (PAA) ve metil vinil eter-maleik anhidrit kopolimeri (PMVEMA)] ve sıgır serum albumin (BSA) arasındaki etkileşim UV-visible, Floresans, Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması, FT-IR ve Atomik Kuvvet Mikroskobu ölçümleri ile araştırıldı. Ayrıca komplekslerin toksiteleri de incelendi. Bileşenlerin oranı, metal iyonlarının yapısı ve çevre koşulları geçiş metal iyonlarının varlığında anyonik PE'ler ve negatif yüklü BSA arasında çözünen yada çözünmeyen üçlü PE-metal-BSA kompleksleri oluşmasını etkilemektedir. PE- Cu^{2+} -BSA üçlü komplekslerinin oluşumunda bileşenlerin oranına ve karıştırma sırasına bağlı olarak, kompleks oluşumları ve hızları incelenmiş ve $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}} = 0,4$ ve $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{MVEMA}} = 0,5$ oranlarında hazırlanan suda çözünen üçlü polikomplekslerin en kararlı olduğu gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar ışığında komplekslerin model yapıları önerildi. Metal iyonlarının aracılığıyla kompleks oluşumunda üçlü polikompleks partikülleri, protein molekülünün pratik olarak çözelti ile etkileşimde olduğu çok hassas yapılardır. Bu sonuçlar yeni türde immünojenlerin geliştirilmesinde oldukça önemlidir (Yapay Polimerik Aşı).

Anahtar kelimeler: Polielektrolit, Üçlü Polimer-Metal-Protein Kompleksleri, Floresans, Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması, Atomik Kuvvet Mikroskobu, Polimerik Yapay Aşı

DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL BIOPOLYMER SYSTEMS CONTAINING METAL

Water-soluble and insoluble protein-polyelectrolyte complexes (PPC) as functional biopolymer systems represent a specific class of polymer-protein compounds which are the subject of many studies such as protein purification, enzyme immobilization and development of synthetic vaccines. Electrostatic interactions are the main forces in PPC formations however, hydrophobic effects and hydrogen bonding are also possible. The interactions of polyelectrolytes (PE) with proteins in aqueous solutions are found to be dependent on pH, ionic strength and protein/polyelectrolyte ratios. Some of these polycomplexes reveal strong immune response and provide a high level of immunological protection.

In the thesis study; the interaction between anionic polyelectrolytes [polyacrylic acid (PAA) and copolymer of methyl vinyl ether and maleic anhydride (PMVEMA)] and bovin serum albumin in the presence of Cu^{2+} ions in aqueous or buffer (phosphate buffered saline, PBS) solution (pH: 7) were investigated by the measurements of UV-visible, Fluorescence, Dynamic and Electrophoretic Light Scattering, Fourier Transform Infrared (FT-IR) and Atomic Force Microscopy (AFM). Also the toxicities of polycomplexes were investigated. The ratio of ingredients, nature of metal ions and environmental conditions effect the formation of soluble and insoluble ternary PE-metal-BSA complexes between negatively charged BSA and PE in the presence of transition metal ions. Depending on the ratios of components, and sequence of mixing of components in the formation of ternary complexes of PE- Cu^{2+} -BSA, complex formations and formation rates were examined and it was observed to be the most stable of water soluble ternary polycomplexes prepared on the ratios of $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}} = 0,4$ and $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{MVEMA}} = 0,5$.

On the basis of the obtained results, we can suggest following hypothetical model. At the complex formation via metal ions, the ternary polycomplex particles have more friable structures in which protein molecules are practically exposed to solution. These results are important because they can be used for developing new type of synthetic immunogens (Artificial Polymeric Vaccine).

Key words: Polyelectrolyte, Ternary Polymer-Metal-Protein Complexes, Fluorescence, Dynamic and Electrophoretic Light Scattering, Atomic Force Microscopy, Artificial Polymeric Vaccine

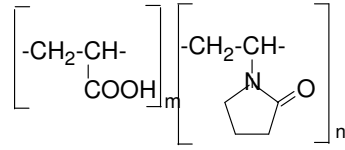
1. GİRİŞ

Biyomakromoleküllerin (protein, polisakkarit vb.) sentetik polielektrolitlerle (PE) oluşturduğu suda çözünen ve çözünmeyen komplekslerinin mekanizması ve fonksiyonel özellikleri incelenmiştir (Mustafaev, 1996a). Suda çözünen polimerler son zamanlarda gerek teorik polimer kimyası gerekse pratik uygulama olarak geniş çalışma alanı bulmuştur. Özellikle, suda çözünen sistemlerin (polimerler, polikompleksler ve diğer polimer modifikasyonları) fizyolojik aktif maddeler olarak kullanılabilmesi, immünolojik açıdan büyük bir kazanç olarak görülmektedir. Bu amaçla fizikokimyasal yöntemler ile bu sistemlerin yapısı hakkında daha geniş bilgi elde edebilmek için çalışmalar sürmektedir.

Bu tip sentetik polimerler son zamanlarda tıp ve biyolojik temelli bilimlerin önemli uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Örnek olarak; sentetik polimerlerin adjuvant etkisi (organizmanın bağışıklığını arttırmak için antijenlerle birlikte organizmaya girebilen yardımcı kimyasal maddeler), kanın dolaşımını engelleyen tortuların çözülmesi etkisi (antitrombojen), antimikrobiyal etkisi, ilaçların etken maddelerinin uzun zaman organizmada saklanması etkisi (prolongation), ilaç salınım sistemleri (organizma içindeki ilacın yavaş yavaş serbest bırakılması) gibi etkileri gösterilmiştir.

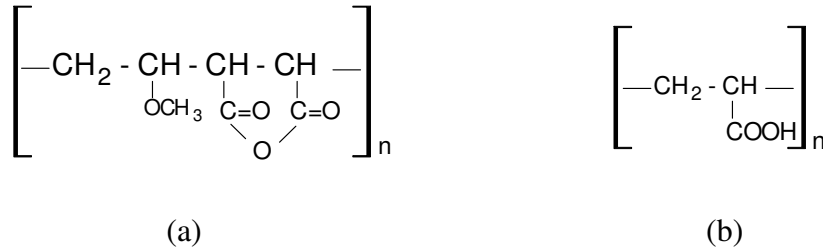
Zayıf immünojenik antijenlerin (haptenler, proteinler, polisakkaritler) farklı kökenli sentetik polielektrolitlerle (PE) bağlanması sonrasında organizmada antijen-PE'ye karşı bağışıklığın arttığı gösterilmiştir (Mustafaev, 1996a, 2004; Petrov vd., 1985). Fizyolojik şartlar altında oldukça sağlam olan kompleksler en yüksek immünolojik aktiviteyi gösterir (Kabanov vd., 1978). Kompleks içeren sistemler, bileşenlerin fonksiyonel gruplarının kovalent bağlarla bağlandığı yerlerde PE'nin parçaları ve antijen molekülleri arasındaki elektrostatik ve hidrofobik etkileşim ile sağlanmıştır (dengeye gelmiştir). Ayrıca polimer antijenle konjuge edildiği zaman, kovalent bağ oluşumunda kendi katılımlarının bir sonucu olarak antijenik determinantın (belirtgen) kimyasal yapısında kısmi bir değişiklik olabilir. Bu durum teknolojik uygulamalar için uygun değildir. Çünkü ana reaksiyon ürünü ile birlikte serbest bileşenler oluşur. Bu bileşenlerde ana üründen ayrılması gerekir, ayrılmadığı takdirde sistemde polimer ile antijenin çapraz bağlanması esnasında kalır. Bu istenmeyen durum araştırmalara başka bir boyut kazandırmıştır. Böylece polielektrolitler ile antijenleri metal varlığında bağlamışlardır, taşıyıcı polimerin ve antijenin yapısında çok önemli değişiklikler olmaması yanında istenmeyen serbest bileşenlerde oluşmamıştır (Mustafaev ve Kabanov, 1981). Ayrıca PE'ler [1.)N-vinilpirolidon ile akrilik asit kopolimer] ile protein (Bovine serum

albumin) antijenlerinin metal (Cu^{2+}) varlığında oluşturulan üçlü ve suda çözünen yapılar immünolojik açıdan yüksek koruma sağlamıştır (Mustafaev ve Norimov, 1990a).



Şekil 1.1 Akrilik asit (AA) ve N-vinilpirolidon kopolimeri (VPD) [CP(AA-VPD)]

Bu çalışmada; sığır serum albuminin iki tür anyonik polielektrolitle (PE) (poliakrilik asit ve metil vinil eter-maleik anhidrit kopolimeri) geçiş metali (Cu^{2+}) varlığında sulu çözeltideki etkileşimler uv-visible, fluoresans, dinamik ve elektroforetik ışık saçılması, FT-IR ve atomik kuvvet mikroskobu ölçümleri ile incelenmiştir ve ayrıca toksiteleri de incelenmiştir.



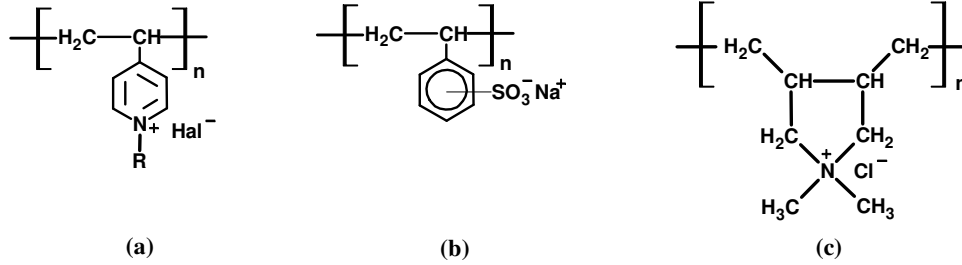
Şekil 1.2 Anyonik polielektrolitler, (a) Metil vinil eter-maleik anhidrit kopolimeri
(b) Poliakrilik Asit

Anyonik PE negatif yüklü BSA ile metal varlığında ortamın şartlarına, bileşenlerin oranına ve metalin doğasına bağlı olarak suda çözünebilir veya çözünemeyen üçlü PE-metal-BSA kompleksleri oluşturduğu kanıtlanmıştır. Bakır iyonları suda çözüldüğünde ve çözeltinin pH: 7'ye ayarlandığında bir çökme gözlenmesine rağmen, gerek poliakrilik asit gerekse metil vinil eter-maleik anhidrit kopolimeri çözeltisine bakır iyonları ilave edildiğinde (polimer-metal ikili kompleksi) ve çözeltinin pH:7'ye ayarlandığında belirli oranlarda ($n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}} \leq 0,4$; $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{MVEMA}} \leq 0,5$) komplekslerde çökme gözlenmemiştir. PE- Cu^{2+} -BSA üçlü komplekslerinin oluşumunda bileşenlerin oranına ve karıştırma sırasına bağlı olarak kompleks oluşumları ve hızları incelenmiş ve $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}=0,4$ ve $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{MVEMA}}=0,5$ oranları suda çözünen üçlü kompleksin en kararlı oranları olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmadaki amacımız ikili ve üçlü komplekslerin oluşum mekanizması ve düşünülen yapı modelleri aydınlatılarak, üçlü polimer-metal-protein yapılarını “Polimerik Yapay Aşı Sistemleri” nin geliştirilmesinde kullanabilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Polielektrolitler

Polielektrolit terimi kovalent olarak bağlı anyonik veya katyonik grupları ve bu gruplara bağlı “counter” iyonları olan polimer sistemleri için kullanılmaktadır (Şekil 2.1) (Dautzenberg vd., 1994). Tüm monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip polielektrolitlere homopolielektrolit adı verilmektedir. Hem anyonik hem de katyonik grupların kovalent olarak bağlı bulunduğu makromoleküller ise poliamfolitler olarak isimlendirilmektedirler. Doğada bol miktarda protein yapılı poliamfolit olmakla birlikte sentetik yollarla da poliamfolitler elde edilebilir. Poliamfolitlerin izoelektrik noktalarında molekül üzerindeki net yük toplamı sıfıra eşittir.



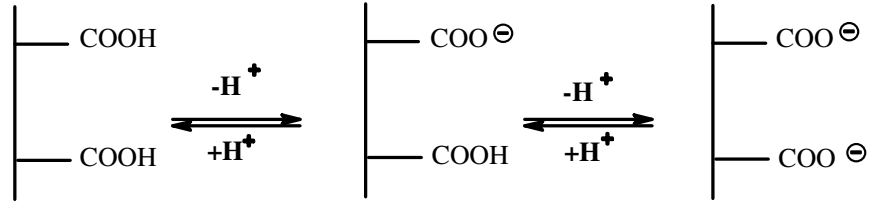
Şekil 2.1 (a) poli(vinilpiridinyum), (b) sodyum polistiren sülfonat, (c) poli(diallildimetilamonyum klorür) (Dautzenberg vd., 1994)

Prensipite, herhangi bir kimyasal yapının polimer zincirine uygun sayıda iyonik grup kovalent olarak bağlayıp yapıyı uygun bir pH’da suda çözünür hale getirerek bir polielektrolit elde edilebilir. Polielektrolitler genelde bir katılma veya kondenzasyon polimerleşme reaksiyonlarıyla elde edilebilir. Ayrıca polielektrolit yapıdaki pektin gibi anyonik polisakkaritler ve çok sayıda proteinler doğadan edinilebilir. Nişasta ve selüloz gibi noniyonik doğal polimerler kimyasal modifikasyonla polielektrolite dönüştürülebilir. Polifosfatlar ve polisilikatlar da inorganik polielektrolitler olarak sayılabilir (Dautzenberg vd., 1994).

2.1.1 Homopolielektrolitler

Polielektrolitler, her bir tekrarlayan birimi (monomeri) bir elektrolit grup taşıyan polimerlerdir. Bu elektrolit gruplar sulu çözeltilerde dissosiyasyon olup polimeri yüklü hale getirirler (Şekil 2.2). Polielektrolitlerin özellikleri hem elektrolitlere (tuzlar) hem de polimerlere benzemektedir ve bazen polituzlar olarak adlandırılmaktadırlar. Çözeltileri, tuzlar gibi elektriği iletir ve polimerler gibi ise viskozdur. Polipeptidler, proteinler, DNA gibi çoğu

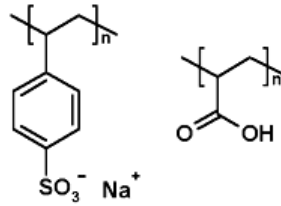
biyolojik molekül polielektrolit formundadır [1].



Şekil 2.2 Poliakrilik asitin sulu çözeltideki dissosiyasyonu

Polielektrolitin çözeltideki davranışlarından sorumlu iyonik grupların çeşidi yukarıda anlatılan polielektrolit zinciri yapılarının çeşidinden çok daha azdır. Polielektrolitlerin içindeki davranışlarını etkileyen başlıca dört faktörden söz edilebilir:

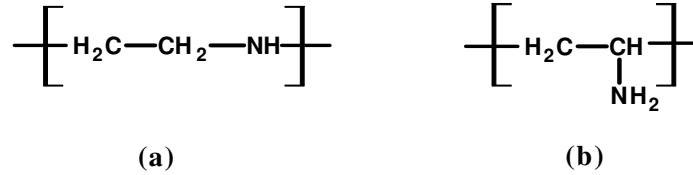
1. Polimere bağlı yüklü gruplar anyonik ve katyonik olarak sınıflandırılır. Bu gruplar da güçlü ve zayıf asitler ve bazlar olarak ikiye ayrılabilir. Kuvvetli bir polielektrolit çözeltide tüm iyonlarına ayrışabilir. Bunun aksine, zayıf bir polielektrolit tüm iyonlarına ayrışamaz. Bu sebeple, zayıf polielektrolitler çözelti içinde tamamen yüklü değildirler ve pH değiştirilerek üzerlerindeki yük dağılımı ayarlanabilir.



Şekil 2.3 İki sentetik polielektrolitin kimyasal yapısı. Soldaki yapı poli(sodyum stiren sülfonat) (PSS) ve sağdaki ise poli(akrilik asit)tir (PAA). Her ikisi de negatif yüklü polielektrolitlerdir. PSS kuvvetli bir polielektrolitken PAA zayıf bir polielektrolittir [1].

2. Bununla birlikte, iyonik grubun asit ve baz kuvvetlerinin yanında polimer zinciri boyunca uzanan bitişik anyonik ve katyonik yükler arasındaki ortalama uzaklık polielektrolit davranışının tayininde önemli bir parametredir. Bu yük yoğunluğu, iyonik kısımlar arasındaki ortalama uzaklık olarak tanımlanabilir. Bu ortalama yük yoğunluğunun yanında zincir boyunca uzanan iyonik grupların dağılımı da polielektrolit özelliklerini önemli ölçüde etkileyebilmektedir, örneğin çözünübilirlik. Bir kural olarak, eğer bir kopolimerde her on monomerik birimin birden fazla iyonik kısmı varsa tipik polielektrolit davranışı beklenir.

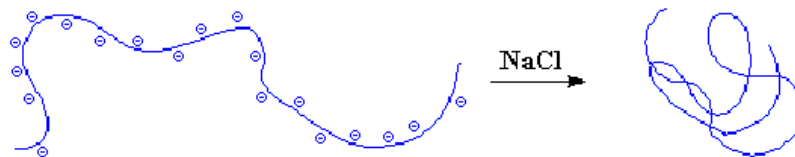
3. Asit-baz kuvveti ve yük yoğunluğuna ek olarak, polielektrolit özelliklerinin saptanmasında, makro iyonun molekül geometrisinde yüklü kısımların yerleşimi üçüncü önemli noktadır. Şekil 2.4'e göre, iyonik gruplar ya polimerin ana zincirinin bir birimi olarak (integral tip) ya da bir spacer ile ana zince asılı olarak (yan zincirlerde) bulunur. Yüklü grupların geometrik yeri özellikle polianyon-polikasyon kompleksi oluşumu ile ilgilidir.



Şekil 2.4 (a) İntegral tipe örnek olarak lineer poli(etilen imin) ve (b) asılı tipe örnek olarak poli(vinilamin)

4. Düşük molekül ağırlıklı “counter” iyonların türünün çözeltideki tüm sistemin özellikleri üzerinde güçlü bir etkisi vardır, özellikle çözünürlük ve yapı oluşumunda. Bu iyonların önemini anlamak için şu örneği verebiliriz: poli(dialildimetilamonyum) polikasyonunun klorürlü hali suda kolayca çözünürken, iyodürlü hali daha zor çözünür (Dautzenberg vd., 1994).

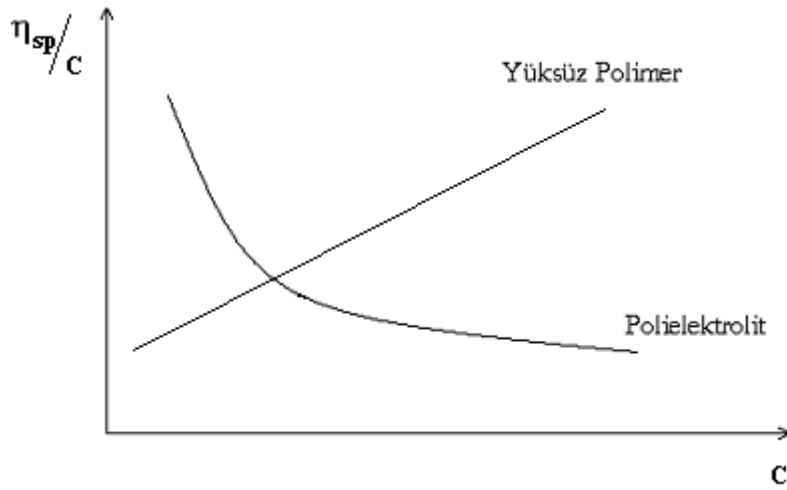
Herhangi bir polimerin konformasyonu çeşitli etkenlere bağlıdır, özellikle polimerin yapısına ve çözeltiyle ilişkisine. Çözelti içindeki yüksüz bir lineer polimer zinciri rasgele yumak konformasyonu gösterirken, lineer polielektrolit üzerindeki yükler birbirini iter (Coulomb itmesi) ve eksi yüklerin birbirlerini itmesini azaltıcı en uygun konformasyon olan lineer halde bulunmaya eğilim gösterir (Şekil 2.5). Bu düzenleme, polielektrolit çözeltilerinin viskozitesinin yükselmesine yol açar. Polielektrolit çözeltilerinin özellikleri sulu ortamın iyonik şiddetine bağlıdır. İyonik şiddetin artmasıyla viskozitenin değişmesi makroiyondaki elektrik yükleri arasındaki itme kuvvetinin engellenmesinden dolayı gerçekleşir ve iyonik şiddet daha fazla arttığında yüksüz makromoleküllere benzer davranış göstermeye başlar (Çimen, 2006).



Şekil 2.5 Çözeltiye tuz ilavesi sonucu polielektrolit zincirinin yumak konformasyonunu alması [2]

İyonik şiddetin yanında, ortamın pH'ı da zayıf polielektrolitlerin özelliklerini etkiler. Çünkü iyonik grupların dissosiyasyon derecesi ve polielektrolitin yük yoğunluğu değişir. Polielektrolit çözeltilerinin diğer bir özelliği ise yüksek iyonik iletkenlikleridir. Elektrik alanı altında, küçük molekül ağırlıklı iyonlardan daha yavaş olmakla birlikte makroiyonlar göç etmektedirler (Dautzenberg vd., 1994).

Polimerlerde derişim arttıkça viskozite artarken, polielektrolitlerde derişim azalırken viskozite artar (Şekil 2.6). Bunun nedeni azalan derişimle artı ve eksi yüklerin birbirlerini itmeleri ve polielektrolitin şişmesidir.



Şekil 2.6 Yüksüz polimerlerde ve polielektrolitlerde viskozite-derişim ilişkisi

70'li yılların başlarında immünolog ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı polielektrolitlerin bağışıklık yanıtına kuvvetli etkisi aydınlatılmış ve yapay polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu belirlenmiştir. Çünkü bu polielektrolitlerin sentezi ve modifikasyonu daha kolaydır, istenen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek olasıdır. Suda iyi çözünürler ve bilinen yapılarda çeşitli kompleksleri sentezlemek mümkündür.

Polielektrolitlerde molekül ağırlığı polimerleşme derecesi ile orantılıdır. Polimerleşme derecesinin artması istenilen kompleksin oluşumunu destekleyici yönde etki eder ve polimerin bağlanma miktarında artış gözlenir. Bunun yanı sıra polielektrolit çözeltilerinin elektrokimyasal özellikleri genellikle poliiyonun zincir boyuna bağlıdır; yani polikompleksin çökmesi vb. özellikler polimerin polimerleşme derecesine bağlıdır (Mustafaev, 1996a).

2.1.2 Poliamfolitler

Polimer iskeletindeki ya da asılı olarak bulunan iyonik gruplar, polinükleotidler ve proteinler gibi makromoleküllerin sınıflandırılmasında oldukça önem taşımaktadır. Polimerler iyon içeriğine göre polielektrolitler ve poliamfolitler olarak iki gruba ayrılabilirler. Polielektrolitler katyonik veya anyonik grupları içerirken, poliamfolitler katyonik ve anyonik grupların her ikisini bulundurur.

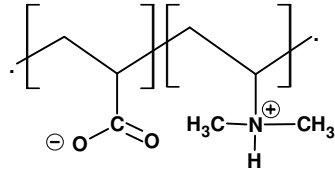
Polielektrolitlerin karakteristik bir özelliği düşük konsantrasyonlarda deiyonize suda geniş bir hidrodinamik hacme ulaşabilmesidir. Bu etkiye polimer zinciri boyunca yer alan yüklü gruplar arasındaki coulombik itme kuvveti neden olur ve zincirin çubuğa benzer bir konformasyonda bulunmasını sağlar. Elektrolit eklenmesiyle ya da pH değişimiyle, coulombik itme kuvvetleri engellenir. Bunun sonucunda zincirin hidrodinamik hacmi azalır ve entropik olarak daha uygun konformasyona geçer.

Polielektrolitlerin aksine, poliamfolitlerin yapı özellikleri anyonik ve katyonik monomer birimleri arasındaki coulombik çekme kuvvetleri tarafından yönlendirilmektedir. Anyonik veya katyonik gruplar yeteri kadar fazla olduğunda ($\geq 10-15$ mol%), yüklü grupların itme gücü, polielektrolitlerin tipik davranışlarında olduğu gibi zincir konformasyonunda gerilmelere neden olur. Anyonik ve katyonik grupların molar oranı birbirine yaklaştıkça coulombik etkileşimler globular konformasyona neden olurlar ve bir çok durumda deiyonize suda çözünmezler. Elektrolit eklenmesiyle ya da pH'ın değiştirilmesiyle düzensiz bir yumak konformasyonu gözlemlenebilir ve çözünmesi kolaylaştırılabilir. Bu davranış çoğunlukla “antipolielektrolit etkisi” olarak adlandırılmaktadır ve elektrolitlerin varlığında viskozitede bir artışa neden olmaktadır. Bu davranışı açıklamak üzere çeşitli teoriler ortaya atılmıştır (Merle, 1987; Higgs ve Joanny 1991).

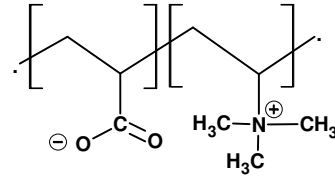
Yük dengesi etkilerine ek olarak, monomer birimlerine eklenmiş iyonik grupların doğası poliamfolitlerin davranışını etkilemektedir. En açık etki pH ayarlaması yapılarak iyonik grupların nötralize edilmesi ile gözlemlenebilir. Aslında, poliamfolitler pH cevabına bağlı olarak dört sınıfa ayrılır.

Poliamfolitler nötralize edilmiş katyonik ve anyonik grupların her ikisini içerebilir (Şekil 2.7). Bu sistemler tipik olarak, anyonik bir tür olan karboksilat grubunu ve katyonik grup olarak da amin hidrohalojenürü içerirler (yapı 1). İkinci olarak, katyonik grup pH'a duyarsızken (kuaternar alkil grupları gibi), anyonik gruplar nötralize olabilir (yapı 2). Sülfonat gruplarında olduğu gibi anyonik grup pH'a duyarsızken katyonik gruplar nötralize olabilir (yapı 3). Son

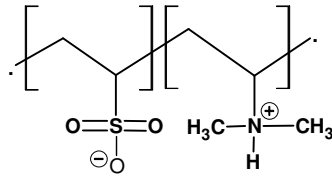
olarak, uygun pH'da baştan başa anyonik ve katyonik gruplar yüklü kalabilir (yapı 4). pH etkisinin yanında, yüklü grupların hidrate olması ve karşıt yüklü gruplar arasındaki gerilim gibi diğer önemli faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır.



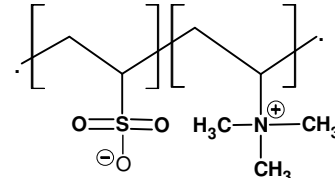
Yapı 1



Yapı 2



Yapı 3

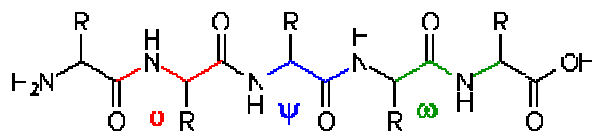


Yapı 4

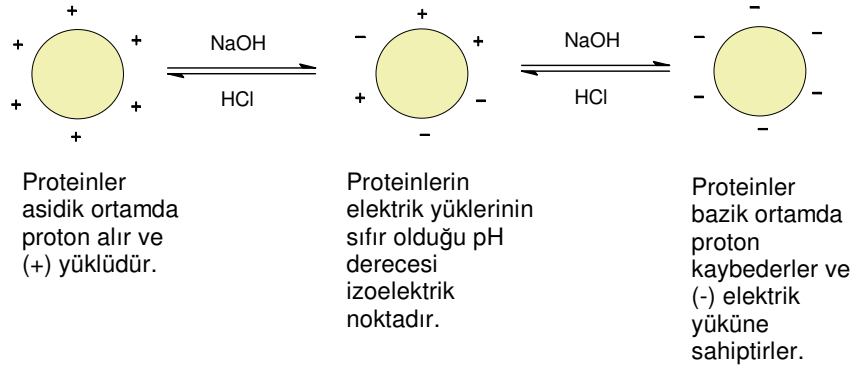
Şekil 2.7 Poliamfolitlerin pH cevabına bağlı olarak örnek yapıları

Bu sistemlerin keşfinin ardındaki mantık proteinler gibi biyolojik moleküllerin sulu çözeltideki davranışlarını derinlemesine anlaşılmasını sağlamaktır. Bir çok sentetik sistem, elektroforetik mobilitesinin olmadığı ve minimum viskoziteyle saptanmış pH değerinde bir izoelektrik noktaya sahiptir (Şekil 2.8) (Higgs, 1991). Ayrıca izoelektrik noktanın altında veya üstündeki pH değerlerinde viskozitede artış gözlenmektedir. İzoelektrik noktada yüklü gruplar arasındaki güçlü çekim sayesinde polimer intramoleküler olarak bir araya toplanmaktadır ve oldukça kompakt bir yapı meydana gelmektedir. pH izoelektrik noktanın altına veya üstüne çekildiğinde bazik veya asidik gruplar nötralleşir, benzer yüklü gruplar arasındaki coulombik itme gücü nedeniyle polimer zinciri gerilir ve viskozitede artış gözlemlenir. İzoelektrik noktada çözücünün niteliğinin, elektrolit eklenmesi sonucu arttığı gösterilmiştir. Ayrıca çözünürlük ve pH cevabı mikroyapılara da bağlıdır, asidik ve bazik grupların kuvvetini etkileyen yakın komşu etkileşimleri örnek olarak verilebilir [3].

Sülfonat grubuna bağlı olarak anyonik türdeki poliamfolitler incelenmiştir. Karboksilat gruplarından daha zayıf baz olan sülfonat grupları uygun pH aralığının üzerinde sulu çözeltide iyonize olurlar. Bu sistemlerle ilgili çalışmalar elektrolitlerin varlığında elektrostatik etkileşimler üzerine odaklanmıştır. Katyonik ve anyonik yük oranı birbirine yaklaştırmaya başladığında kopolimer bazı nedenlerden dolayı deiyonize suda çözünmez hale gelir ve çözünür olabilmesi için kritik bir konsantrasyonda tuz ilavesi gerektirmektedir. Daha fazla tuz eklenmesi üzerine viskozitedeki artıştan anlaşılabileceği gibi bu sistemler “antipolielektrolit” davranış gösterirler. Bu tip poliamfolitler deiyonize suda intermoleküler olarak toparlanmaya eğilim gösteren noniyonik bir hidrofilik termonomeri de kapsamaktadır. Bu toparlanmalar elektrolit ilavesi ile bozulabilir (McCormick ve Salazar, 1992). Proteinler poliamfolit sınıfına girerler ve poliamit yapılarındadırlar.



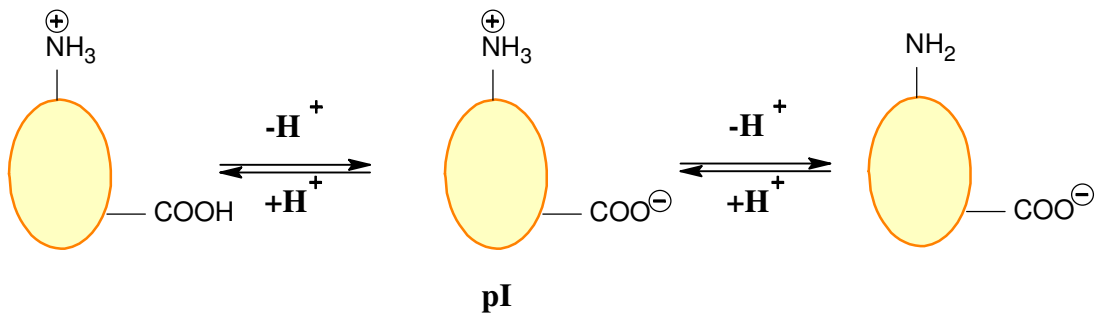
Proteinlerin yapısında asidik ve bazik amino asitler vardır. Bundan dolayı da amfoterik özellik göstermektedirler. Bu proteinler proton verecekler veya proton alacaklardır. Asidik ortamlarda proteinler ekstra protona sahip olduklarından net pozitif bir yüke, bazik ortam koşullarında ise net bir negatif yüke sahip olacaklardır. Amino asitlerin net elektrik yüklerinin sıfır olduğu pH derecesine ise izoelektrik nokta adı verilmektedir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Proteinlerin pH'a bağlı yük durumları

Eğer bir protein izoelektrik noktasının pH koşullarında bulunuyorsa en az çözünür haldedir ve en kolay çöktürülebilir durumdadır. İzoelektrik noktası nötral pH civarında bulunan pek çok proteinde asidik ve bazik amino asit sayısı birbirine eşit durumda demektir (Çimen, 2006).

Proteinler de tek amino asitler gibi titre edilebilmektedir, çünkü onlarda titre edilebilecek pek çok yan grup ihtiva etmektedir. Fakat titrasyon eğrileri oldukça kompleks bir durum göstermektedir. Proteinlerin genel titrasyon eğrilerini üç pH bölgesine ayırarak incelemek mümkündür. Örneğin pH 1.5-6 arası karboksil grubunun iyonize olduğu sınırları belirtmektedir. pH 6-8.5 arası ise histidin amino asidine ve α -amino grubuna atfedilmektedir. pH 8.5 dan yukarısı ise lizinin ϵ -amino grubunun, tirozinin fenolik hidroksil grubunun ve sisteinin sulfidril (-SH) grubunun iyonize olduğu pH sınırları olarak kabul edilmektedir (Gözükara, 1997).



Şekil 2.11 BSA'nın pH'a bağlı yük değişimi

BSA proteini de bir poliamfolittir ve şu özelliklere sahiptir:

Albumin genelde serum albumini veya plazma albumini anlamında kullanılır. Albumin kan dolaşımında en çok bulunan proteindir ve kanın kolloid osmotik basıncının % 80'ini

oluşturmaktadır (Carter ve Ho, 1994). Serum albuminin kan pH'ını ayarlayan başlıca sorumlu olduğu düşünülmektedir. Memelilerde albumin preproalbumin olarak karaciğerde sentezlenir (Figge vd., 1991). Sinyal peptidlerinin uzaklaştırılmasından sonra oluşan proalbuminin N-terminal ucundaki altı peptid uzaklaştırılır. Kan dolaşımına verilen albuminin yarılanma ömrü 19 gündür.

Yapılan hidrodinamik deneyler ve düşük açılı X-ışını saçılması deneylerine dayalı sonuçlar albuminin 140x 40 Å boyutlarında bir elips olduğunu göstermiştir. Daha sonraki çalışmalar da bu şekli desteklemiş ve albuminin bir puro şeklinde olduğunu ortaya koymuştur. Ama ¹H NMR ile yapılan çalışmalar yapının elips şeklinde olamayacağını, albuminin daha doğrusu kalp şeklinde bir yapı olduğunu göstermiştir.

Albumin molekülünün birincil yapısında yükler tek dağılım göstermezler. Nötral pH'de BSA'nın I, II ve III numaralı "domain"leri sırasıyla -10, -8 ve 0 net yüke sahiptirler. Birincil yapıdaki asimetrik yük dağılımına karşın, üçüncül yapıdaki yükler uniform özellik gösterirler (Carter ve Ho, 1994).

Protein çözeltisinin viskozitesi, proteinin molekül kütlesi, boyutu, hacmi, yüzey yükü ve deforme olma gibi karakteristik özelliklerine bağlıdır. Viskozite, ayrıca pH, sıcaklık, iyonik şiddet, iyon tipi ve ısı değişimi gibi çevresel etkenlere de bağlıdır. Serum albuminin 3,7-4,2 ml/g intrinsik viskozite değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Peters, 1985). BSA'nın disülfit bağları kırıldığında viskozitesi artmaktadır. BSA çözeltilerinin viskozitesi 65 mg/ml'ye kadar doğrusal olarak artar ve daha büyük derişim değerlerinde üstel olarak artar.

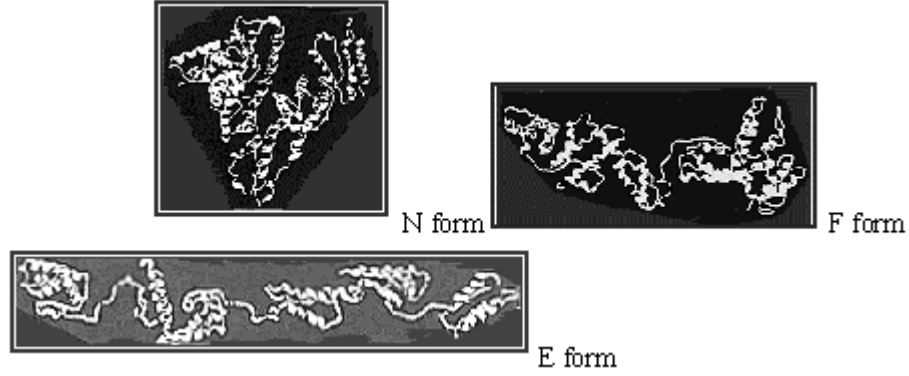
pH değiştiğinde BSA tersinir konformasyonel izomerizasyona uğrar.

	E	<----->	F	<----->	N	<----->	B	<----->	A
pH of transition:		2.7		4.3		8		10	
Name:	Expanded		Fast		Normal		Basic		Aged
% Helix:	35		45		55		48		48

Şekil 2.12 BSA'nın izomerik formları arasındaki ilişki

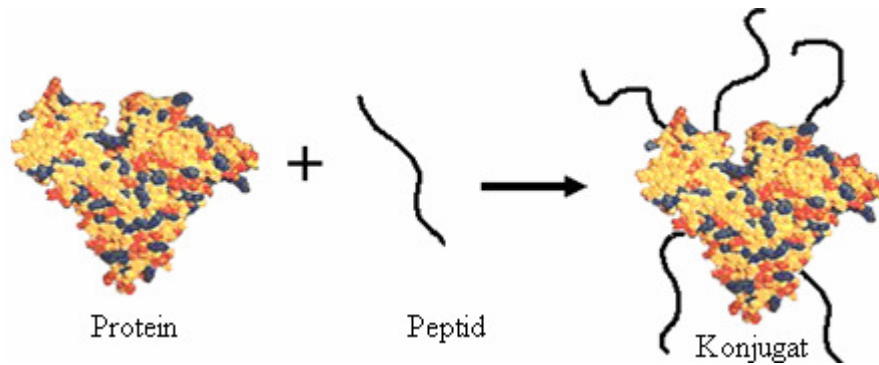
N-F geçişi "domain" III'ün açılmasını içerir. F formu viskozitedeki büyük artışla, çözünürlükteki düşüşle ve heliksel içerikteki büyük azalmayla tanımlanır. pH:4'ten daha düşük olduğunda, "domain" II'nin heliks 1'ne bağlı "domain" I'in helikslerinin ve "domain"

III'ün heliks 1'ine bağlı "domain" II'nin helikslerinin azalmasından dolayı albumin genişler (yapı açılır) (Şekil 2.13). İntrinsik viskozitesi daha yüksek ve hidrodinamik eksen oranı 4'ten 9'a çıkmış olan bu açılmış form E formu olarak bilinir. pH:9'da, albumin bazik form konformasyonuna geçer. Albumin çözeltileri pH:9'da ve düşük iyonik şiddette 3 °C'de 3-4 gün tutulursa, A formu olarak bilinen izomerizasyon gerçekleşir [5].



Şekil 2.13 Serum albuminin N, E ve F formlarının şematik gösterimi (Carter ve Ho, 1994)

Bovin Serum Albumin (BSA) antikor oluşumda konjugasyon için genel olarak en yaygın kullanılan taşıyıcı proteindir. Serum proteinlerinden albumin alt sınıfına aittir ve plazmadaki toplam proteinin yaklaşık yarısını albuminler oluşturmaktadır. Bu da albuminlerin plazmadaki en kararlı ve en yüksek çözünürlükteki protein olduğunu göstermektedir. BSA ise kolay erişilebilirliği, çözünürlüğü vb. avantajlarından dolayı; deneysel çalışmalarda oldukça sık kullanılmaktadır. Yapısında taşıdığı çeşitli fonksiyonel gruplarından dolayı da konjugasyon reaksiyonlarında çeşitli moleküller, proteinler ya da haptenler için taşıyıcı olarak tercih edilmektedir (Friedli, 1996).



Şekil 2.14 Taşıyıcı protein olarak BSA'nın sentetik peptidlerle oluşturduğu konjugat

BSA'nın diğ er bir taşıyıcı protein olan Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)'e göre oldukça küçük ve ona göre hem daha yüksek     n rl  e sahip hem de daha imm nojeniktir. BSA yapısında 60 adet lizin içeren ve 30-35 adet primer amin bölgesine sahip, zayıf antijenik moleküller için oldukça sık kullanılan taşıyıcı bir proteindir (Acar, 2006).

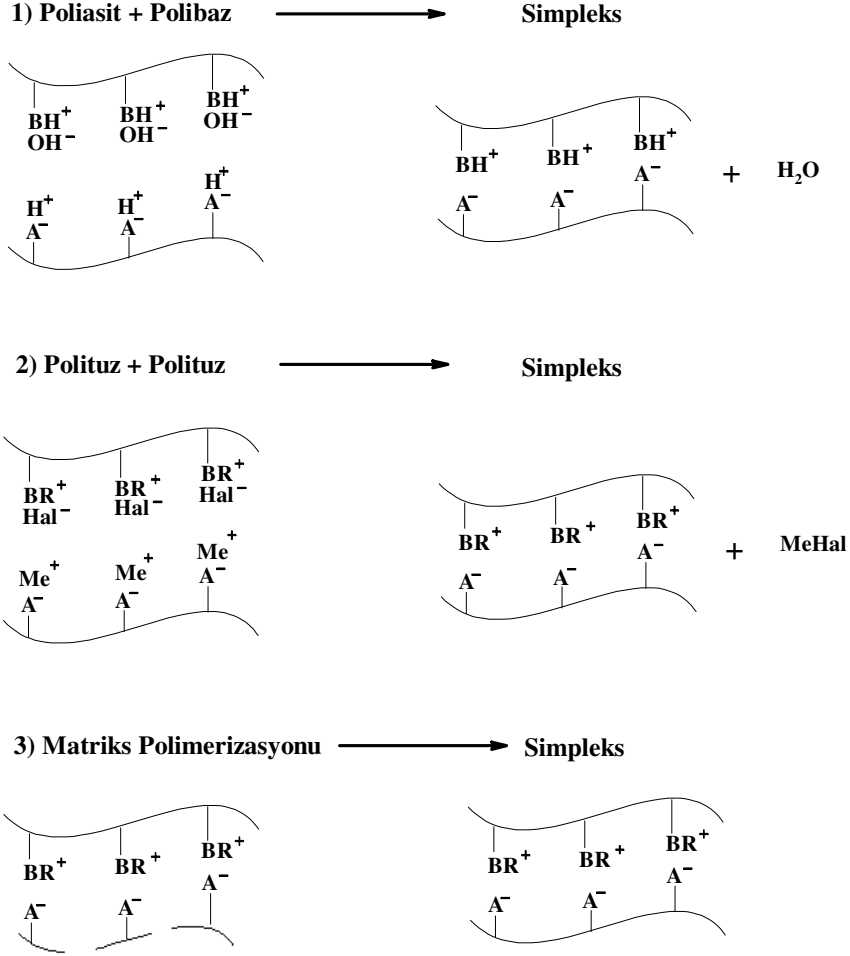
2.2 İnterpolielektrolit Kompleksler

Polielektrolit kompleksler karşıt yüklü makromoleküllerin sulu çözeltide baskın olarak coulombik kuvvetlerin etkisiyle oluşurlar. Diğ er intermoleküler etkileşimler hidrojen bağları, yük transferi ve dipol kuvvetler veya hidrofobik etkileşimlerdir. Bu etkiler agregat oluşumunda çok önemli bir rol oynamaktadır ve sulu çözeltide kompleksin kolloidal davranışını saptamaktadır. Polielektrolit komplekslerinde birincil olarak, en azından karşıt yüklü gruplar arasındaki etkileşimler yer alır. Makromoleküllerin sulu çözeltide iyonize olabilen grupları arasındaki etkileşimleri basit olarak şu şekilde gösterilebilir.



Reaksiyon koşullarına ve kullanılan bileşenlerin doğasına bağlı olarak, kompleks oluşumu prosesi ve komplekslerin özellikleri fazlaca şişmiş hidrojellerle kompakt çökelekler arasında değişmektedir [3].

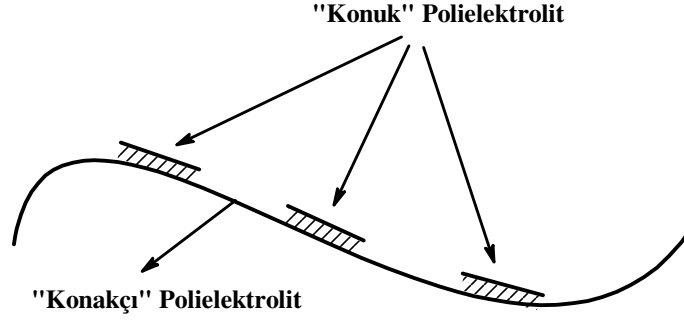
Kompleks oluşumu asit-baz kavramına dayanmaktadır. Kompleks oluşumunda genel olarak başlıca    yol bilinir: poliasit-polibaz etkileşimi, polituz-polituz etkileşimi ve matriks polimerizasyonu.



Şekil 2.15 Simpleks oluşum yolları

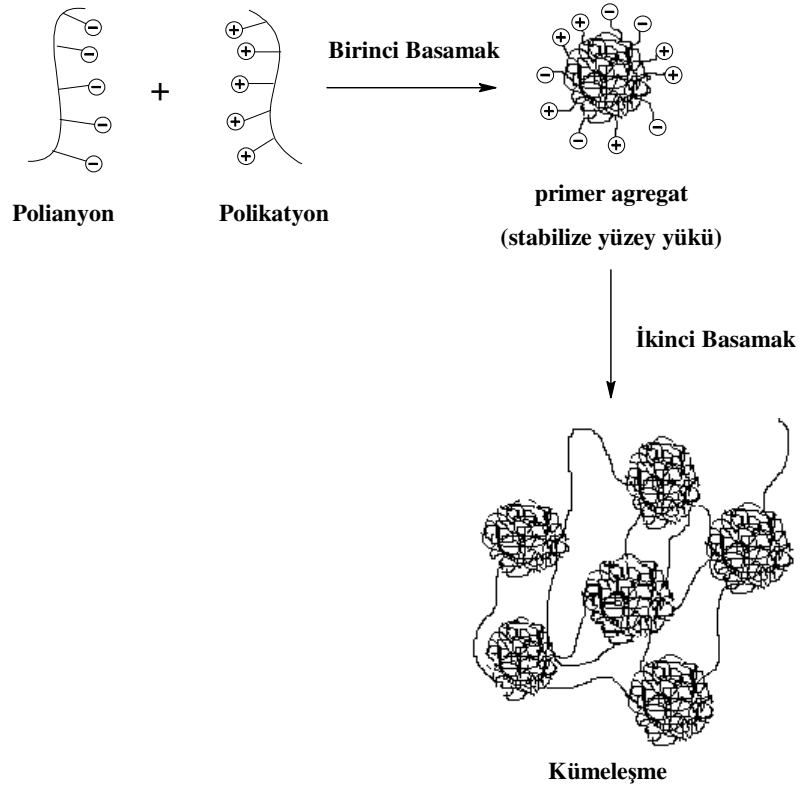
Sadece birincisinde nötralizasyon söz konusudur ve ekzotermik bir reaksiyondur (reaksiyon ısısı 2 kcal/mol) (Falb vd, 1968). Kooperatif etkiler kompleks oluşumunu desteklediğinden ilk iyon eşleşmesinden sonra daha fazla çapraz bağlanmalar gerçekleşir. Düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin kompleksleri ile makromoleküllerin kompleksleri arasındaki en önemli fark; polimerin intra veya intermoleküler olarak etkileşimde bulunan uzun kısımları arasındaki bu kooperatif etkileşimlerdir.

Kompleks oluşum prosesi çok hızlıdır. Oldukça uzun polielektrolit (konakçı) ile kısa bir polielektrolitin (misafir) birleşmesiyle ardışık nonstokiyometrik suda çözünebilir simpleksler oluşabilir (Şekil 2.16) (Tsuchida, 1974; Osada, 1972). Kabanov (1984) çeşitli reaksiyon koşullarında suda çözünebilir simplekslerin oluşumunu kapsamlı bir şekilde incelemiştir. Konakçı ve misafir polielektrolit arasındaki daha zayıf bağlanmalar bu sistemler için karakteristik gibi gözükmemektedir ve yeniden düzenlenmeler ile çözünebilir halden çözünemez hale dönüşümler gözlemlenmiştir.



Şekil 2.16 Nonstokiyometrik suda çözünebilen simplekslerin şematik gösterimi

Elektroforetik ve viskozimetrik ölçümler simpleks partiküllerinin poliamfolite benzer bir özellikte olduğunu göstermiştir. Seyreltik sulu sistemlerde simpleks oluşumu prosesi için iki basamaklı bir mekanizma önerilmiştir (Şekil 2.17). Birinci basamakta (az miktarda titrant eklendiğinde), iyon eşleşmeleri prosesi ufak simpleks agregatların oluşumuna sebep olmaktadır. Bu primer agregatların yüzey yükü kararlıdır. İkinci basamakta, 1:1 stokiyometrisi için gerekli miktarın % 70'inden fazla titrant eklendiğinde, primer agregatların birbirleri ile agrege olması sonucu daha büyük partiküller oluşur [3].



Şekil 2.17 Seyreltik sistemde simpleks oluşumunun iki basamaklı mekanizması

Me^{+n} iyonları aynı yüklü iki farklı yapılı polimer makromolekölünün bağlanmasında arabulucu olması, yanı sıra zıt yüklü iki polimer molekülünden oluşan polimer-polimer (protein) interkomplekslerine katılarak bu komplekslerin stabilitesini arttırabilme özelliği taşımaktadır. İnter polimer komplekslerinin oluşumu, makromoleküller arasındaki etkileşmenin incelenmesi, makromolekül bileşikleri kimyasının yoğun gelişim gösterdiği yeni bir çalışma alanını oluşturmuştur. Bu çalışmalar bilimsellik ve pratik uygulamaları bakımından büyük önem taşımaktadır. İki polimer zinciri arasındaki etkileşimden dolayı yeni kararlı bir yapı oluşur. Bu olaya inter polimerleşme, oluşan moleküle ise interpolimer kompleks denir. Kompleksler kendilerini oluşturan bileşiklerden çok farklı özellikler göstermektedirler. Son 25 yıl içersinde interpolimer kompleksleri üzerinde yoğun çalışmalar gerçekleştirilmiş ve birçok çalışma temel düzenlemelerin nasıl gerçekleştiği ile kimyasal ve yapısal olarak birbirlerini tamamlayabilen makromoleküllerin oluşturdıkları etkileşmelerin özel niteliklerini açıklayabilmek için gerçekleştirilmiştir.

İnterpolimer kompleksi oluşturmaın temel iki yolu vardır: 1) Kompleksin daha önce var olan kimyasal ve yapısal olarak birbirini tamamlayabilen makromoleküller tarafından oluşturulması 2) Reaksiyon ortamına katılan matriks makromoleküller yüzeyinde monomerin polimerleşmesi. Birinci durumda kimyasal reaksiyon, reaktif zincirlerin rastgele çarpışması sonucu kompleks oluşumu ile gerçekleşir. Daha sonra zincir büyümesi gerçekleşir. Matriks polimerleşmesinde ise kompleks, ard arda monomerin zincir boyunca eklenmesiyle oluşur. Bu şekilde eklemeler çift zincir oluşturur (Zip-up). Çift zincir oluşumu polimerleşmenin matriks tarafından kontrolü sağlanır.

İki polimer makromolekölünden biri biyomolekül olabilir. Örneğin, polimer-protein komplekslerindeki heterojen gruplar arasında gerçekleşen karşılıklı etkileşmeler yapı olarak birbirinden farklı olabilir. Bunlar, Van der Waals ve elektrostatik kuvvetler, hidrofobik etkileşme, hidrojen ve koordine bağlar olabilir. Kimyasal ve yapısal olarak birbirini tamamlayan makromoleküller arasında gerçekleşen etkileşim genellikle birliktelik karakteri taşır. Belki de bu birliktelik karakteri aynı anda iki veya daha fazla bağın oluşmasını (örnek: iyonik ve hidrojen bağlarının) mümkün kılar. Hidrofobik etkileşmenin; sentez ve doğal polielektrolit komplekslerinin ve yine hidrojen bağı ile oluşmuş komplekslerin stabilizasyonunda önemli bir rolü vardır.

Polimer zincirinin tamamlayıcı makromoleküller üzerinde büyümesi interpolimer kompleks oluşumunun bir yoludur. Matriks oluşum hızını, oluşan makromolekölün yapısını ve özelliklerini etkiler. Büyüyen radikalın yapısı kısmen matriksle bütünleşmiştir ve oluşan

polimerin izomerik bileşimi ile molekül ağırlığı matriks uzunluğu ve mikroyapısı tarafından belirlenebilir.

İki farklı yüklü polielektrolitten oluşan interpolimer komplekslerine polielektrolit kompleksleri denir. Polielektrolit komplekslerinin özelliklerinin sistematik olarak araştırılması yapılmıştır (Bixler ve Michaels, 1969) ve sodyum poli(stiren sülfanat) ve poli(vinilbenziltrimetilamonyum klorür) gibi kuvvetli zıt yüklere sahip polielektrolitlerin kompleksleri incelenmiştir. Polielektrolit kompleksinin orijinal fiziko-kimyasal özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Polielektrolit kompleksler yüksek dielektrik sabitine sahiptirler. Suyu, gazlara, düşük molekül ağırlıklı maddelerin çözeltilerine karşı geçirgen, büyük taneciklere karşı geçirgen değildir.

Poliiyonik komplekslerin çeşitli pratik uygulamaları vardır. Poliiyonik komplekslerle yapılmış filmlerin, sıcaklık ve nem ile değişmeyen yüksek elektrik iletkenlikleri vardır (10^{-2} - 10^{-5} ohm/cm). Isıtma ve aydınlatma amacıyla kullanılabilen şeffaf iletken yüzeylerin yapımında plastik ile cam arasında poliiyonik filmler kullanılabilir. Poliiyonik kompleks filmleri galvanik pillerde ayırıcı olarak kullanılır (Bixler ve Michaels, 1969). Bu ayırıcılar değişik asit (sülfirik ve fosforik) ortamında ve bazik ortamlarda orta dereceli sıcaklıklarda kararlıdır ve düşük iç dirençleri vardır.

İnterpolimer kompleksler kimyasal kasların yapımında da kullanılabilirler (Osada ve Saito, 1975). Kimyasal enerji, elektrik ve mekanik enerjiye bilinen modellerden daha iyi bir performansla polivinil alkol ve poliakrilik asit ile gerçekleştirilmiştir (Kuhn vd., 1960). Polielektrolit komplekslerin en önemli kullanım alanlarından biri de, belirli geçirgenliği ve seçiciliği olan yarı-geçirgen zarların yapımıdır (Zezin ve Eltsefon, 1976; Sato vd., 1979). Bu zarlar deniz suyunun tuzunun ayrılması işlemi için ters osmozis olarak kullanılabilirler. Bu zarlar biyolojik sıvıların (kan, idrar) ultrafiltrasyonu için kullanılabilir. Hemodiyaliz için yapay böbrek ve hemoksijenasyon için yapay karaciğer olarak kullanılır.

Supramoleküler yapı geçiş metal iyonları ile kompleks oluşturularak değiştirilir. Böyle iyonlar az yüklü veya nötral polimer molekülleri ile birleşerek, polimer zincirlerinin çözeltide konformasyonunu düzenleme imkanı vermektedir. Örneğin Cu^{2+} iyonlarının yüksek konsantrasyonunda intermakromoleküler agregasyonu (yığılma) oluşur ve partiküller asimetrik yapıya yakın bir formda olurlar. Bu olay polimer bilimcilerine çalışmalarında yardımcı olabilir (iki polimeri metalle bağlayıp agregasyon oluşturabilirler) ve ayrıca polimer antijen bağlanıp metal varlığında agregasyon oluşturulup (yapının çapı ve yüzeyi artar)

immünojenliği arttırılabilir (Mustafaev, 1996d).

Bir polielektrolit kompleksi oluşumunun gidişatı yüklü grupların etkileşimlerine (iyonizasyon-dissosiasyon gibi) öncülük eden olaylara bağlıdır. Polielektrolit üzerindeki yük yoğunluğu, kompleksin hem oluşumunda hem de özelliklerinde etkilidir. Yük yoğunluğu az olan polielektrolitlerin oluşturduğu kompleksler daha kolay dissosiyeye olurken yük yoğunluğu yüksek polielektrolitler daha stabil kompleksler oluştururlar. Koetz ve arkadaşları (1986) polielektrolitlerin kimyasal yapısının ve yük yoğunluğunun kompleks oluşumunu önemli derecede etkilediğini göstermiştir.

Proteinler de polielektrolit özelliğindedir. Hem sentetik hem de doğal polimerlerle güçlü bir şekilde etkileşime girerek polielektrolit kompleksleri oluşturmaktadırlar (Sacco, 1988; Dellacherie, 1991). Proteinlerin, izoelektrik noktalarının altında ve üstünde, polianyonlara ve polikasyonlara bağlanması hakkında bir çok çalışma yapılmıştır. Bu etkileşimler, çözünebilir komplekslerle, koaservat oluşumuyla (Lenk, 1987; Veis, 1991) veya amorf çökelti oluşumuyla sonuçlanabilir (Nguyen, 1986; Kokufuta, 1981). Bu faz değişimlerinin sonuçları; proteinleri ayırmada polielektrolitlerin kullanımını, polielektrolit komplekslerde enzimlerin immobilizasyonu veya stabilizasyonunu ve protein substrat affinitesinin modifikasyonunu içermektedir (Shieh, 1991). Bu durum şüphesiz ki hücrelerde oldukça önemlidir. Bazik histonlarla DNA'nın coulombik etkileşimi nükleik asitlerin "yığılmasına" neden olmaktadır ve polilizin gibi bazik polipeptidlerin DNA'nın davranışında son derece etkili olduğu düşünülmektedir. Protein ve nükleik asitler arasındaki benzer elektrostatik etkileşimler transkripsiyon prosesinde rol almaktadır.

Yapılan çalışmalarla polikomplekslerin bileşimini tam makromoleküler seviyede anlamak mümkün olmuştur. Polimer-protein karışımlarının homojen çözeltilerine basit fizikokimyasal metodların uygulanması polikomplekslerin yapısı hakkında güvenilir sonuçlar verme imkanı sağlamıştır (Dubin, 1992).

2.2.1 Polielektrolit-Protein Komplekslerinde Etkileşimler

Temel olarak kovalent olmayan etkileşimlerin bir çoğu polimer ve proteinler arasında kompleks oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Proteinler ve poli(vinilpirolidon) veya diğer hidrofilik noniyonik polimerler arasındaki etkileşim hidrojen bağı ile oluşur ve donör gibi görev yapan karboksilik asit gruplarının varlığını gerektirmektedir. Bütün çözünenler suya göre daha hidrofobiktir. Bu sebeple polikomplekslerdeki hidrofobik etkileşimlerin varlığı yok

sayılamaz. Hidrofobik etkileşimler için en güçlü kanıt sistematik yapısal değişimlerle ortaya çıkar veya hidrofobik etkileşimlerin karakteristiği olan assosiyasyon entropisine ve entalpisine bağlı sıcaklık değişimi ile bulunabilir, ancak uygun bir ölçüm yöntemi bulunmamaktadır. Elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğu genel olarak kabul edilmiştir. Tuzsuz çözeltilerde ve kuvvetli polielektrolitlerle kompleks oluşumu sırasında stokiyometrik çökeltme gözlenir. Çökelek oluşumu sabit protein/polielektrolit oranında pH'a bağlıdır. Bu davranış polielektrolit kolloid titrasyonuna benzemektedir (Thies vd., 1994). Kabanov ve arkadaşları (2004) zıt yüklü polielektrolitler temeline dayanan interpolielektrolit kompleksleşme modeli üzerine çalışırken, protein ve polielektrolit arasında oluşan stokiyometrik tuz bağlarının, proteinin iyonik birimlerinden sadece birkaç fraksiyonunu gerektirdiğini bildirdiler. Bütün yüklü birimlerin ya serbest olduğu ya da tuz bağlarına tutunduğu tüm yüklü birimleri içeren iki türlü model bir denge durumunun olduğunu gösterir ve proteinin ya da polielektrolitin diğer bir makro iyonu yerine geçtiği yer değiştirme reaksiyonlarını kantitatif olarak açıklamakta kullanıldı.

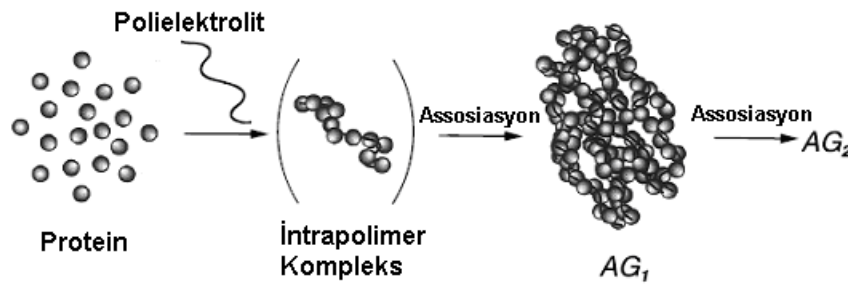
Elektrostatik kuvvetler zıt yüklü grupları içeren tüm etkileşimleri esnek bir şekilde tanımlasa da, proteinin etrafındaki dielektrik alanında bulunan tuz köprülerini de bu kuvvetlere dahil etmeliyiz. Bu özel etkileşimler diğer kısa mesafeli kuvvetleri tamamlamaktadır. Klasik biyokimya modelinde, protein-ligand arasındaki spesifik etkileşim yapısal olarak kusursuz ligand-konakçı komplekslerinin oluşumunu sağlayan spesifik kısa mesafeli kuvvetlerden ortaya çıkar. Ama esas olarak, bağlanma enerjisi protein ve polielektrolitlerin sabit yükleri arasındaki itme ve çekme coulomb kuvvetlerinin bir toplamıdır .

Proteinlerle hidrofobik olarak etkileşecek polimerler spesifik olarak tasarlanabilir. Ancak önemli olan nokta, hidrofobik etkileşimlerin ciddi bir katkı yapmadığı hallerin bilinmesidir (Radeva, 2001). Bütün proteinlerin değişen miktarlarda hidrofobik bölgeleri bulunduğundan ve tüm vinil polimerlerin ana zinciri hidrofobik olduğundan bu tip etkileşimlerin incelenmesi önemlidir. Diğer taraftan bu kuvvetlerin uzun mesafeli doğasından dolayı kuvvetli elektrostatik kararlılığın olması için çözünme de dikkate alınmalıdır. Hidrofobik etkileşimler bazı karakteristik belirtilere sahiptir. Yüksek tuz konsantrasyonunda daha kuvvetli hale gelirler. Hidrofobik yan zincirler takılmış polielektrolitlerin proteinlerle kompleksleri çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bunlara göre metil ve etil yan zincirleri içeren polielektrolitlerin bağlanmasının yaklaşık aynı olduğu görülmüştür. Karbon sayısı 2-6 arasında olan yan zincirlere sahip polielektrolit protein komplekslerinde bağlanma karbon sayısı ile birlikte artmaktadır. Karbon sayısı 8-10 arasında olan yan zincirlere sahip

polielektrolitlerde ise bağlanma azalmaktadır. Sonuç olarak C1 ve C2 yan zincirleri proteinin hidrofobik bölgelerine ulaşamamıştır ve C8-C10 yan zincirli polielektrolitlerde ise intrapolimer miselleşme polielektrolit-protein kompleksine reaksiyonu ile yarışmaktadır. Yapılan çalışmalar elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin birbirlerine katkıda bulunduklarını göstermektedir.

2.2.2 Polielektrolit-Protein Komplekslerinde Fiziksel Haller

Polielektrolit-protein komplekslerinin fiziksel halleri çözünürlük derecelerine bağlıdır. Çözünür kompleksler çok miktarda su molekülüyle kuşatılmıştır ve genelde proteinin pI değerine yakın pH değerlerinde oluşmaktadırlar. Polikompleksin toplam net yükü $Z_T = Z_{\text{Polimer}} + Z_{\text{Protein}}$ formülü ile gösterilebilir. Z_T sıfıra yaklaştıkça (polianyonlar için $\text{pH} < \text{pI}$ olduğu durumlarda) ufak moleküllü iyonların tutulması azalır ve polikompleks daha az su molekülü ile kuşatılmıştır. Polimerin daha fazla yük içermesi, pH'ın proteinin pI değerinden çok uzak olması ve tuz derişiminin az olması gibi daha güçlü etkileşimler var olduğunda faz ayrımı gerçekleşir ve çökelek oluşur. Bu tip faz ayrımı Kokufuta tarafından (1981) keşfedilmiştir ve şematik olarak şekil 2.18'de gösterilmiştir



Şekil 2.18 Polielektrolit-protein komplekslerinde faz ayrımı.

Diğer bir katı hal ise polielektrolit multitarakalarıdır. Bu yapılarda proteinler ya bir polielektrolitin yerini alır ya da ilave bir bileşen olur. Son olarak, proteinlerin polielektrolit jellerinin içinde tutulduğu iki durum bulunmaktadır. İlkinde, önceden hazırlanmış polielektrolit jeliyle protein birleşerek yapıyı oluştururlar. İkinci durumda ise, proteinin kendisi jel oluşumu prosesine katılır (Kabanov, 2004).

2.2.3 Polielektrolit-Protein Kompleksleriyle İlgili Yapılan Çalışmalar

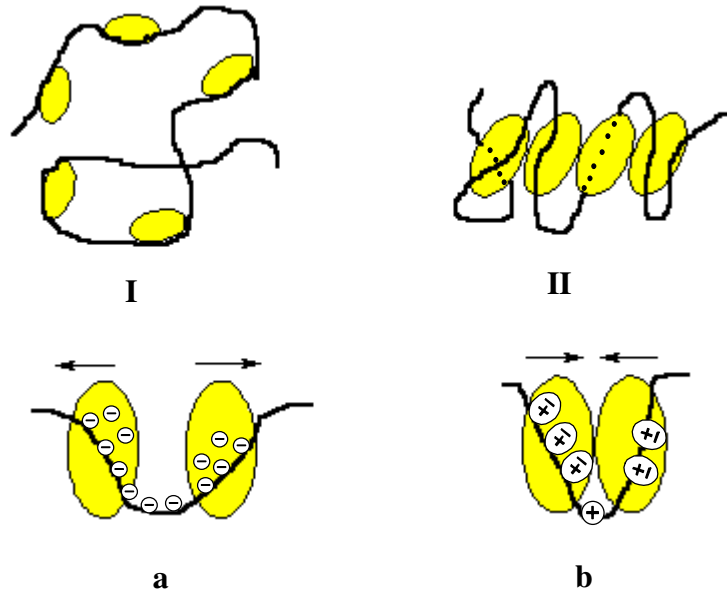
Sentetik polielektrolitlerin proteinlerle kompleksleri ilk olarak Morawetz (1952) tarafından çalışılmıştır. Morawetz bu çalışmasında farklı pH, iyonik şiddet, polimer/protein oranı değerlerinde BSA'nın polielektrolitlerle kompleks oluşumunu türbidimetrik olarak incelemiştir ve daha çok çökelek oluşumu üzerinde durmuştur. Maksimum çökelek oluşumu için kritik bir oran bulunduğunu göstermiştir. Bileşenlerden birisinin eklenmesiyle, antijen-antikor reaksiyonlarında olduğu gibi, çökelekler çözünür kompleksler oluşturmaktadır. Ayrıca bu çalışmada, çökelek oluşumu dengesinde polimerin molekül ağırlığının etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Ancak daha sonraki yıllarda Mustafaev ve arkadaşları (1978) polimerin molekül ağırlığının ve dar dağılımlı olmasının kompleks oluşumu üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Morawetz küçük molekül ağırlıklı iyonların BSA'nın polivinilaminle çökelek oluşturduğu pH'ı değiştirdiğini de göstermiştir. Morawetz ve arkadaşları polimetilmetakrilik asit (PMAA), SA ve oksihemoglobin karışımının reaksiyonunu incelemiştir. Bahsedilen proteinlerin izoelektrik noktaları aralığına uygun olan pH değerinde oksihemoglobinin seçici olarak çöktüğü gözlenmiştir. Çalışmada polimetakrilik asit, gamaglobulin ile SA ve insan albumini ile bunun antikor karışımını ayırdığı gösterilmiştir.

Kabanov, Mustafaev ve arkadaşları (1978) lineer polielektrolitlerin (poliasitlerin polianyonları, poliamfolitler, polikasyonlar ve onların türevleri) aynı yüklü (pozitif veya negatif) globular proteinlerle karşılıklı etkisini incelemişler ve çok miktarda suda çözünebilir polimer-protein kompleksleri yapmışlardır. Yapmış oldukları bazı çalışmalara göre; PAA-BSA çözeltilerinin pH:7'de alınmış sedimentogramları iki pik ile karakterize olmaktadır. Piklerden birinin sedimentasyon sabiti poliasit çözeltisinin sedimentasyon sabitine uygunken diğer pikin ise serbest proteine uygun olduğu bulunmuştur. Proteini ilave ettikçe protein pikinin alanı artarken, diğer pikin alanı ise sabit kalmaktadır. Bu sonuç pH:7'de PAA ile BSA'nın kompleks oluşturmadığını gösterir. pH:7'de protein ve poliasit negatif yüklenmişlerdir. Buna göre de aynı yüklenmiş partiküllerin birbirini elektrostatik itmesi kompleks oluşumunu engellemektedir.

PAA-BSA sisteminde pH azaldığı zaman (pH:6) karşılıklı etkinin karakteri değişmektedir. Bu sistemin sulu çözeltilerinin sedimentogramlarında yalnız bir pik görülür. Protein ilave ettikçe bunun alanı ve sedimentasyon sabiti artmaktadır. Bu farklar çözeltideki bileşenler arasında kompleks oluşumunu göstermektedir. pH 6'da protein ve polielektrolit önce olduğu gibi aynı yüklüdürler. pH:7'ye nispeten genel negatif yük her ikisinde biraz azdır. Başka bir deyişle önce olduğu gibi elektrostatik karşılıklı etki kompleks oluşumuna engel teşkil etmektedir.

Ancak proteinin lineer polielektrolitle adsorbsiyonuna neden olan başka faktörleri yok edememektedir. Böyle faktörlerden hidrojen bağlarını ve polar olmayan karşılıklı etkiyi göstermek olasıdır.

Yapılan çalışmalar sonucunda proteinin kompleksleşmesi sırasında sarmallık seviyesinin değişmediğini göstermektedir. Bu sonuca göre proteinin polianyon üzerine adsorbsiyonu ile küresel yapısının fazla değişmediğini söylemek mümkündür. Polielektrolit makromoleküllerinin zincirinin uzunluğunun küresel proteinlerin çapından fazla olduğu dikkate alınarak her bir zincirin ardışık olarak birkaç protein molekülünü bağladığını söylemek mümkündür ve kompleksin yapısı şekildeki gibi gösterilebilir.



Şekil 2.19 Suda çözünen PE-protein komplekslerinin yapısı: I- Poliasitlerin polianyonlarının proteinlerle komponentler aynı (negatif) yüklendiğinde oluşan komplekslerinin yapısı, II- Lineer polielektrolitlerin zıt yüklenmiş proteinlerle $n_P/n_{PE} \leq N_i$ oranında oluşan komplekslerin yapısı "a" ve "b" - "a" (I) ve "b" (II) tipli yapıların oluşumunu şematik olarak göstermektedir.

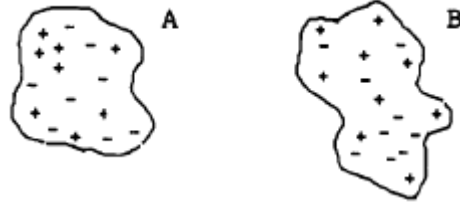
Bu yapıda (I) protein molekülleri istatistik yumak konformasyonunda olan polielektrolit zinciri boyunca rastgele dağılmıştır. Sistemin kompleks oluşumunda spesifik viskozitesinin nispeten az değişimi bu yapıya uygundur. "I" yapısı, protein partiküllerinin polikasyonlarla nötral su ortamında oluşturdukları çözünen komplekslerinin yapısından prensip olarak farklıdır. Küresel proteinlerin polianyonlarla kompleks oluşumunun karşılaştırmalı analizi bu şekilde açıklanabilmektedir. Her iki durumda küresel proteinler negatif yüklüdürler, yani elektrostatik faktör bunların temasta olmasını engellemektedir. Proteinlerin polikasyonlarla adsorbsiyonunda yukarıda söylenildiği gibi pozitif yüklü polikasyon monomerleri ile negatif

yüklü protein grupları arasında elektrostatik bağların oluşması esastır. Buna göre proteinin negatif yükleri kapanmakta ve adsorpsiyon olmuş kürelerin temasta olmasına engel olmamaktadır. Yani polar olmayan karşılıklı bir etki gözlenmektedir. Aynı zamanda polikasyonun yükleri yeteri kadar kapanarak “II” yapısının yığılması yolu ile ayrı ayrı bölümlerinin yaklaşmasına imkan vermektedir. Proteinlerin polianyonlarla adsorpsiyonunda durum tamamıyla başkadır. Negatif yüklü kürelerin polielektrolitlerle bağlanması elektrostatik itmenin tersi olarak oluşmaktadır. Her bir adsorbe olan proteinin efektif negatif yükü buna bağlı polianyon monomerinin miktarına göre artabilmektedir. Buna göre kompleks partiküllerinde küresel proteinlerin temasta olması menfaatli değil ve bunlar birbirlerine aralıklı olarak yerleşerek “II” tipli yapıyı oluşturmaktadırlar. Böylelikle küresel proteinler lineer polielektrolitlerle iki tip çözünen kompleks oluşturabilmektedir. Proteinlerin polikasyonlarla kompleksleri açık bir şekilde ifade olunan kooperatif karakterde ve kendisine bağlı yapı meyili olması ile karakterize olurlar. Proteinin az miktarında bunlar için küresel proteinlerin polielektrolit zincirleri arasında beraber olmayan dağılması görülmektedir. Proteinle maksimum yüklenmiş polikasyonlar pratik olarak, yüklenmemiş polikasyonlarla aynı zamanda bulunmaktadır. Silindire benzer partiküllerin kendisine bağlı yığını oluşur. Bu sistemlerin tam aksi olarak proteinlerle polianyonların çözünen kompleksleri bunlarda küresel proteinlerin beraber absorpsiyonu yolu ile oluşmaktadır. Böylece sistemde istatistik yumak konformasyonunda olan çözünen kompleks partikülleri oluşmaktadır. Bütün bunlara bağlı olarak proteinlerin amfoter kopolimerlerle komplekslerinin incelenmesi çok önemlidir. Bu sistemlerde genellikle bir tip bağlanmadan başka tip bağlanmaya geçmek mümkündür.

Elektrostatik itme faktörünün elimine edilmesi BSA proteinin sodyum poli(stirensülfonat) PSSNa ile etkileşiminde daha iyi görülmektedir. PSSNa sulu ortamlarda tüm olarak polianyona ve sodyum katyonuna ayrılmış kuvvetli polielektrolittir. BSA-PSSNa sulu çözeltileri proteinin çeşitli konsantrasyonlarında sedimentogramlarla ancak şiddetli dar bir pikle karakterize edilmiştir. Bunun alanı ve sedimentasyon sabiti sistemde protein miktarı arttıkça çoğalır. Bu sonuçlar çok büyük ihtimalle pH:7.5'te proteinle polielektrolit arasında kararlı polikompleks oluşmasını göstermektedir. Aynı yüklü partiküllerin birleşmesinde, proteinin PSSNa poliiyonunun hidrokarbonları ile karşılıklı hidrofobik etkinin baskın olduğu gösterilmiştir (Mustafaev, 1996a).

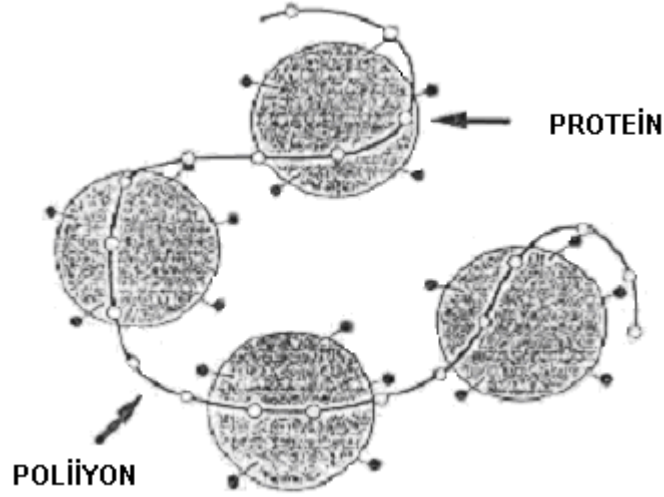
Diğer bir çalışmada, Dubin ve arkadaşları (1991) protein polielektrolit komplekslerinde proteinin yüklerinin heterojen dağılımının etkisini tanımlamışlardır. Globular proteinler ve sentetik polielektrolitler arasındaki etkileşimler 0.10 M NaCl çözeltisinde türbidimetrik ve

“quasielastic” ışık saçılması (QELS) teknikleri ile incelenmiştir. pH titrasyonları, farklı izoelektrik noktalı üç monomerik proteininin (bovin serum albumin, lizozim, bovin pankreas ribonükleazı) belli miktarda yük yoğunluğuna sahip katyonik ve anyonik polielektrolitlere bağlanmasını sağlamakta kullanılmıştır. Protein-polianyon çözeltisine HCl ya da protein-polikasyon çözeltisine NaOH ekleyerek, her bir polimer-protein çifti için assosiyasyonun olduğu ilk pH değeri tespit edilmiştir. QELS ya da türbidimetri ile saptanabilen bu kritik pH değeri çözünür polianyon-protein kompleksi oluşumuna karşılık gelir ve bunu, pH daha fazla değiştirildiğinde, faz ayrımı takip eder. Bilinen protein pH titrasyon eğrileri kullanılarak bu kritik şartlardaki proteinin net yükü (Z_c) hesaplanabilmiş ve Z_c ‘nin polielektrolit üzerindeki yükün işareti ile aynı işarete sahip olduğu gösterilmiştir. Proteinler için bilgisayar modellemeleri sonuçlarında da gösterildiği gibi RNAz, sulu çözeltisinde hem pozitif hem de negatif yüklü bölgelere sahiptir. Proteindeki bu yük öbeğinin, polielektrolit ve globular protein arasındaki itme kuvvetinin üstesinden gelebilecek daha güçlü bir çekme kuvveti sağladığı bulunmuştur. Bu sebeple negatif yüklü globular proteinlerle polianyonların kompleks oluşturması, proteindeki yük öbekleri ve polielektrolit arasındaki bölgesel etkileşimlerin var olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.20 İzoelektrik noktası civarında proteinlerin pozitif ve negatif yük öbeklerinin şematik gösterimi.

Thies (1994), insan veya sığır hemoglobini ve sığır tripsininin poli(diallildimetilamonyum klorür) ve potasyum poli(vinilalkol sülfat)’la kompleksleşmelerini incelemiştir. Elde edilen sonuçlara göre stokiyometrik protein-polielektrolit komplekslerinin modelini vermiştir. Bu modelde polielektrolit, bütün poliyon yükleri zıt yüklü proteinler tarafından nötralize edilecek şekilde protein ile kompleks oluşturur. Birbirlerine gevşek bir şekilde bağlanmış polielektrolit iyonları ile birkaç adet esnek olmayan globular protein moleküllerininin oluşturduğu kompleksin şematik gösterimi şu şekildedir:



Şekil 2.21 Protein ve poliyon içeren stokiyometrik kompleksin şematik gösterimi.

Amorf çökelek oluşturacak şekilde kompleksin yapısını birarada tutan tuz bağları çok gevşektir, çünkü pH'nın değişimi veya poliyon ilavesi tuz bağlarının bir kısmını, özellikle proteinin imidazolil grubu ile polimerin sülfat grubu arasındakini, kırar. Bağların gevşek olması protein ve poliyon moleküllerinin stokiyometrik olarak nötralleşmesini veya zıt yüklü grupların 1:1 oranında bağlanmasını mümkün kılabilir.

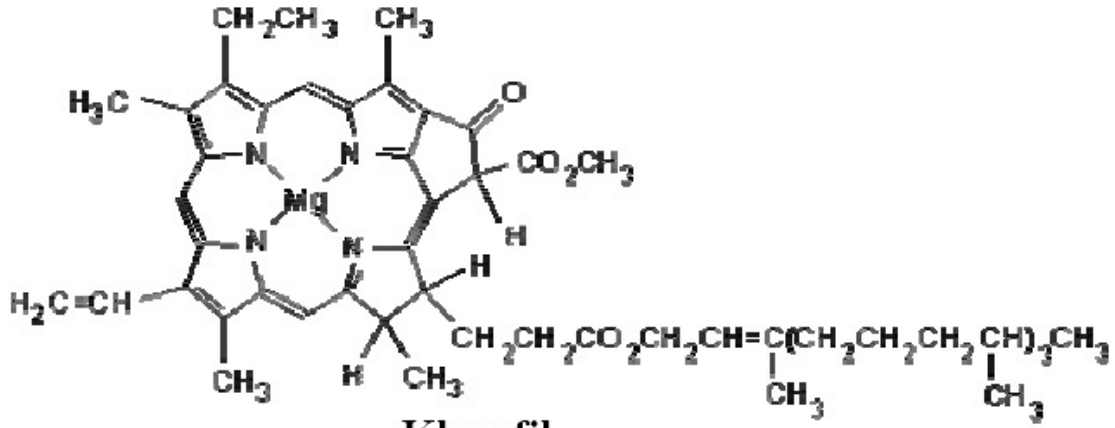
Andrianov ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada pH:7'de BSA-poli[di-(karboksilat-fenoksi) fosfozen] kompleksinin oluşumunu ve immünolojik etkilerini incelemişlerdir. Oluşan kompleksin molekül ağırlığının polimerin tek başına olduğu halden daha ağır olduğunu ama kompleksin boyutunun polimerden önemli derecede farklı olmadığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, makromoleküler yapının daha kompakt bir hal aldığı ortaya konulmuştur.

Son on yılda yapılan çalışmalarda temel olarak şu üç faktörün üzerinde durulmuştur: uygulamalar, enstrümantel çalışmalar ve simulasyonlar. Polielektrolit multi tabakaları ile protein-polielektrolit kompleksleri üzerine yapılan çalışmaların bir arada sürdürülmesi; glukoz, kolesterol ve antikörlerin saptanmasında kullanılan biyosensörlerin dayanımını ve stabilitesini arttırmaya yönelik protein-elektrolit tabakalarının elde edilmesi için önemli olanaklar sağlamıştır. Yüzey karakterizasyonu için optik "waveguide" lazer spektroskopisi, yüzey plazmon rezonans (SPR) ve dar açı reflaktometrisi kullanılarak uygulanan yeni teknikler bu multibakaların incelenmesine yardımcı olmaktadır. Protein-polielektrolit komplekslerinin karakterizasyonunda uygulanabilen yeni teknikler kapiler elektroforez ve affinite esaslı ayırma metodlarıdır. Son on yılda komplekslerin faz davranışları ve yapısının iç yüzünün anlaşılmasını sağlamada bu simulasyonlar büyük yankı uyandırmıştır. Polielektrolit-

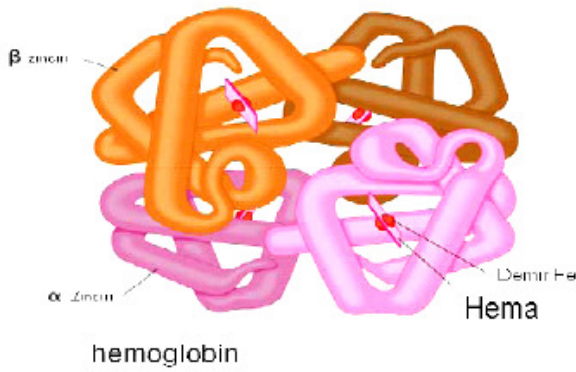
protein kompleks koaservat fazlarının çökelek ve süspansiyonlardan ayrı ve farklı olarak kabul edilmesi nm-µm ölçekli yeni mikroskopik tekniklerin geliştirilmesinde fayda sağlamıştır. Son olarak polielektrolitler, proteinler için koaservat ve mikrokapsüller içinde ılıman immobilizasyon koşulları sağladığı için, farmasötik uygulamalarda proteinlerin taşınması ve tutulması (entrapment) için polielektrolitlerin jel veya “brush” olarak kullanılması şaşırtıcı değildir. Bu alanlardaki çalışmalar 1995’den önceki literatüre dayanmaktadır. Biyokimya, malzeme bilimi, polimer ve kolloid kimyası ile diğer disiplinlerin bir araya gelmesi önümüzdeki yıllarda bu alanda daha yaratıcı ve geniş kapsamlı bilimsel çalışmaların temelini atmış olacaktır.

2.3 Polimer-Metal Kompleksleri

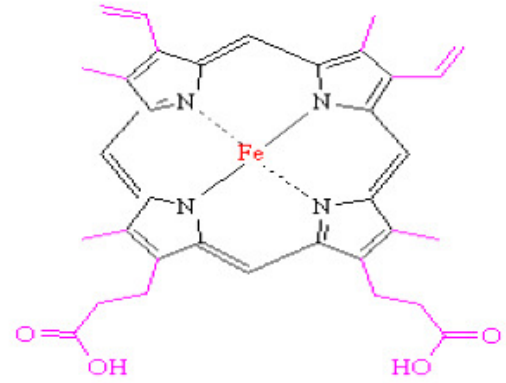
Bir koordinasyon bileşiği, genellikle sayıları karşılık gelen merkez atom yada iyonun oksidasyon sayısını geçen iyon yada moleküllere tutunmuş merkezi bir atom yada iyon içeren bileşikler olarak tanımlanabilir. Merkezi metal yada iyon simetrik olarak yerleşecek tarzda koordinasyon yada koordinasyon-kovalent bağla bağlanan grup “ligand” olarak adlandırılır. Koordinasyon bileşikleri kimyası şu sıralarda çeşitli disiplinlerde çabuk ilerlemeler kaydetmektedir. Bu alandaki ilerleme zorluğu polimer-metal komplekslerinin pek çok biyolojik özelliklerinden kaynaklanmıştır. Metal kelatları yaşayan maddede temel roller oynayabilir. Örneğin klorofil Mg (II) ve hemoglobin Fe (II) kompleksidirler (Vermon ve Seely, 1966). Biyolojik öneme sahip pek çok metal proteinleri ve metal kompleksleri ile çalışılmıştır.



Klorofil

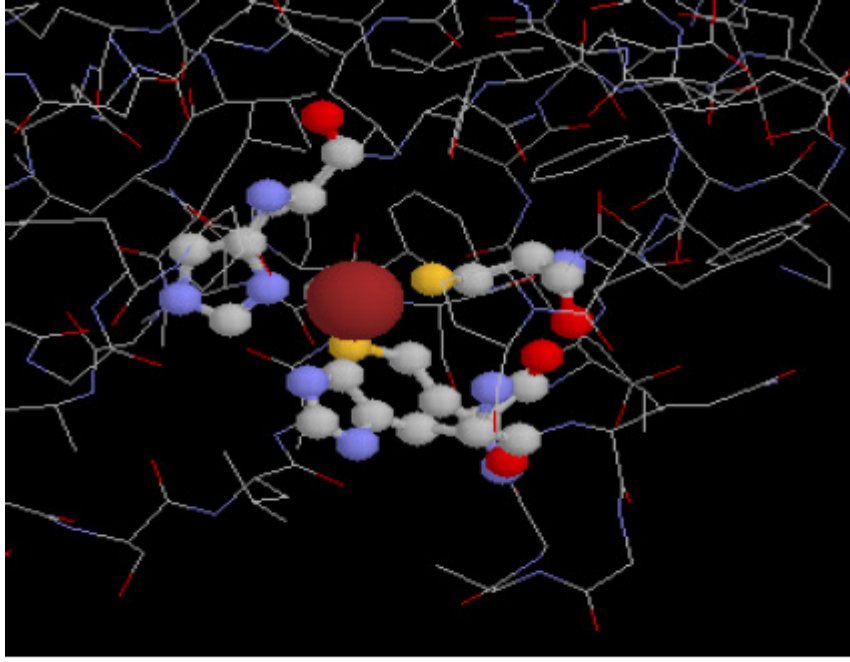


hemoglobin



HEM

Metaloenzim, doğada metal iyonlarının belli bir üç boyutlu yapıdaki bir protein molekülü tarafından sarıldığı bir çeşit polimer-metal kompleksidir. Yapısı belirlenmiş böyle bir metaloenzime plastosinin (bir çeşit mavi bakır proteini) tipik bir örnektir. Plastosiyaninde bakır iyonu bozulmuş bir terahedral yapı gösterir ve metioninin sülfür atomu ile koordinasyon bağı ile bağlanır. Bu düşük molekül ağırlıklı metal komplekslerinde normal bir durum değildir. Bu anormal koordinasyon davranışı ve bakır iyonu etrafında çok büyük protein molekülü tarafından oluşturulan hidrofobik çevre bakır iyonunun alışılmamış indirgen davranışına neden olur. Genellikle metaloenzimdeki protein sadece kimyasal yapıyı değil aynı zamanda kendi polimer zincirinde konformasyon değişimi yoluyla allosterik etkiye neden olur. Metali çevreleyen proteinin yapısına ışık tutabilmek için yapay polimer-metal kompleksleri üzerinde çalışmalara başlanmıştır.



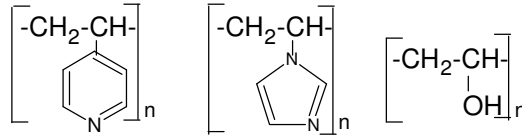
Plastosiyanın

Biyolojik alan dışında kimya endüstrisinde de polimer-metal kompleksleri temel roller oynar. Örneğin 1963'te Nobel ödülü K. Ziegler ve G. Natta'ya alüminyum ve titanyum içeren yeni bir metal kompleksi katalizörü geliştirdikleri için verilmiştir. Bu katalizör polimer sentezinde bir devrim olmuştur (Kurşun, 2005).

Metal iyonlarının biyolojik proseslerde çok önemli rolleri vardır (Manko vd., 1991; Kendirch vd., 1992). Polimer-metal komplekslerinin benzersiz özellikleri onların fizikokimyasal özelliklerinin tek başına polimer ve metalden daha farklı olmalarına dayanır. Son zamanlarda çıkan birçok yayın, metal bağlantılı komplekslerden oluşmuş ilaç yapısı, doğal polielektrolit ve antijenlerin biyokonjugatları üzerinedir. Bu modellerin kullanılması ile doğal polimerlerin mekanizması ve metal iyonları varlığındaki davranışları ile ilgili daha fazla bilgi edinilmiştir. Polimer-metal komplekleri çok geniş çeşitlilikte biyomedikal hazırlıklarının yapılandırılmasında kullanılmıştır. Düşük molekül ağırlıklı bileşikler gibi geçiş metal iyonlarında, nötral veya zayıf yüklenmiş suda çözünen polimerleri kendine bağlama özellikleri vardır. Böylece polimer bileşenleri yüzeylerle kompleks oluşturma özelliği kazanmış olur. Birçok çalışmada Cu, Zn, Fe gibi metal iyonlarının önemli rolü gösterilmiştir. Demir eksikliği Hemopoiesis ve Lymphopoiesis'in önlenmesinin engellenmesine ve timusta morfolojik (biçim) değişiklikler ile dalaktaki T ve B bağımlı bölgelerde hücre azalmasına neden olur (Mustafaev, 1996a).

Çeşitli pH değerinde kararlı olan PMK poli-4-vinil-piridin (PVP) ve iki değerlikli bakır

iyonları için asit ve su-alkol karışımlarında incelenmiştir. PVP-Cu²⁺ karışımlarında tetrapiridinat komplekslerinin oluşumu gösterilmiştir. Nötral sulu ortamlarda incelenen polikomplekslere örnek olarak polivinilimidazol'ün (PVI), polivinilpiridin'in alkil türevlerinin, polivinilamin'in metalik kompleksleri gösterilebilir. Poliakrilik asit (PAA), polimetakrilik asit (PMAA) ve bunların metilvinilpiridin ile olan kopolimerlerinin iki değerlikli bakır iyonu ile kompleksleri de incelenmiştir.



poli-4-vinilpiridin (PVP), polivinilimidazol (PVI), polivinilalkol (PVA)

PMK'lerine ait literatür araştırılması aslında metal iyonlarının polielektrolitlerin fonksiyonel grupları seviyesinde karşılıklı etkileşimi ile sınırlandırılmıştır. Çözünen ve çözünmeyen komplekslerin oluşumunu metalik iyonların yüksek konsantrasyonlarında incelenmiştir. Aynı zamanda bağlama mekanizmasını anlamak ve makromolekül yapısındaki değişimleri izlemek için metal iyonlarının makromoleküller arasında dağılımını incelemek çok önemlidir. Karşılıklı etkileşmenin metalik iyonların çok düşük konsantrasyonunda araştırılması, yapısında az miktarda metal olan PMK'lerin sentezi için önemli rol oynar. Bu tip PMK'lerinde polielektrolitin yapısı pratik olarak değişmez ve biyolojik aktifliği korunur. Aynı zamanda metal iyonlarının miktarı üçlü polimer-metal-protein komplekslerinin sentezi için yeterli olmalıdır.

Kabanov vd., su-alkol ortamında sedimantasyon metodu ile PVP'nin iki değerlikli bakır iyonları ile kompleks oluşumundan dağılım karakterini incelemişlerdir. Polikasyon yumaklarının arasında metalik iyonların homojen olmayan dağılımı gösterilmiştir. Bu tip homojen olmayan dağılım Rh³⁺-polietilenimin sisteminde de gösterilmiştir.

Son 10 yıl içinde polimer-polimer kompleksleri konusunda ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır ve çeşitli defalar bu olayın genel doğası ile kimyasal ve yapısal bakımından birbirini tamamlayıcı makromoleküller arasında gerçekleşen karşılıklı etkileşmenin özel nitelikleri araştırılmıştır. Polimetakrilik asit (PMAA) gibi poliasitlerle, proton çekici polimerler olan polivinilpirolidon (PVP) veya polietilen oksit (PEO) eşit mol oranlarında birbirleri ile hidrojen bağıyla etkileşirler. Bu etkileşmenin sonunda suda çözünmeyen polikompleks oluşur.

PAA ve PVP arasında meydana gelen kompleks oluşumunun Cu^{2+} iyonu katılmasıyla nasıl etkilendiği türbidimetrik ölçümlerle (Subotic vd., 1989) belirlenmiştir. PAA ile PVP'nin kompleks oluşturması iki farklı çözücü(su ve etanol-su) ortamında gerçekleştirilip Cu^{2+} iyonunun etkisi türbidimetrik ölçümlerle gözlenmiştir. Her iki çözücü ortamında da Cu^{2+} iyonunun katılması kompleksleşme kinetiğini etkilemiştir. Su ile etanol-su çözücülerin de gerçekleşen kompleksleşme hızlarından Cu^{2+} katıldığında artış miktarı suda hidrofobik etkileşmeden dolayı daha fazla olmuştur. Her iki çözücü ortamında Cu^{2+} ilave edilince kompleksleşme hızı zamanla artarak bir dengeye ulaşıyor. Bu sonuçlar Cu^{2+} iyonunun bulunmasının etkileşmenin ilk hızını arttırdığını, dolayısıyla Cu^{2+} iyonunun kompleks oluşumuna katıldığını göstermektedir. Kısa bir süre içinde kompleks oluşumunun durması Cu^{2+} iyonlarının etkileşmeye katıldığını göstermektedir. Türbidimetrik sonuçların incelenmesi sonucu ilk 5 s içinde türbiditede keskin artışın hem suda hem de etanol-su çözücü ortamında olduğu gözlenmiştir. Bu da PAA ile PVP arasındaki kompleks oluşum hızının Cu^{2+} iyonu tarafından büyük oranda arttırıldığı sonucunu vermektedir.

Cu^{2+} iyonunun kompleksleşme üzerine etkisinin anlaşılabilmesi için polimer-metal kompleks yapılarının incelenmesi gerekir. Polimer-metal kompleksleri sentetik polimerler ve metal iyonları içerirler. Metal iyonları polimer ligandlara koordine bağlarla bağlıdır (Tsuchida ve Nishide, 1977). Cu^{2+} iyonu polimer ligand çözeltisi ile karıştırılır karıştırılmaz, polimer- Cu^{2+} kelatı hemen oluşur. Polimer- Cu^{2+} kelatında Cu^{2+} iyonu polimer zincirleri tarafından örtülmüş kafes içinde absorbe edilerek kararlı hale geçmiştir ve Cu^{2+} iyonlarının çözeltiye geçişi çok zordur.

Son zamanlarda, çeşitli sentetik PE'lerin metal iyonlarının çok düşük konsantrasyonlarında ($[\text{Me}^{+n}]/[\text{PE}] \ll 1$) suda çözünen PMK'lerini sentezlemiş ve oluşma mekanizmasını incelemişlerdir. Düşük yüklü kopolimerler-polibazlar metal iyonları ile kompleks oluşumunda sistemdeki metalik iyonlar, makromoleküller arasında heterojen olarak dağılırlar. Yani birkaç makromolekül tüm iyonları bağlar, diğerleri ise serbest olarak kalır (Mustafaev, 2004).

2.3.1 Polimer-Metal Komplekslerinin Sınıflandırılması

Polimer-metal kompleksleri hazırlama yöntemi ile belirlenen metalin işgal ettiği konuma göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Yöntem, polimer örgüsüne tutunmuş bir ligand fonksiyonu ile metal iyonu arasındaki kompleksleşmeyi, çok fonksiyonlu ligandın metal iyonu ile tepkimesini ve metal içeren monomerlerin polimerleşmesini kapsar (Kurşun, 2005).

2.3.1.1 Polimerik Ligandın Metal İyonu ile Kompleksleşmesi

Normalde bir metal iyonu suda hidratlı bir iyon yada pek çok anyonla assosiyasyonundaki kompleks bir tür olarak ve kelatlayıcı polimere aktarılacak için çok az yada hiçbir eğilim taşımayacak şekilde bulunurlar. Metal iyonunu ekstrakte edilebilir bir türe dönüştürebilmek için yükü nötrallenmeli ve su hidratlarının bir kısmı uzaklaştırılmalıdır. Ayrıca çözeltideki metal iyonları ile kompleks oluşturma yeteneğine sahip donör atom yada fonksiyonel grupların doğası da çok önemlidir ve kelatlayıcı polimerleri bu temelde sınıflamak gerekir (Kantipuly vd., 1990).

Bu tür polimer-metal kompleksleri ligand içeren polimerin metal iyonları ile reaksiyonu sonucu oluşur.

Genellikle, polimerik ligandın bir metal iyonu yada bir koordinasyon kısmı boş kalmış kararlı bir metal kompleksi ile tepkimesi, asılmış yada moleküller arası-molekül içi köprülü polimer-metal kompleksleri olarak sınıflandırılabilir farklı yapılarla sonuçlanır (Tsuchida vd.,1977).

i-) Asılmış Metal Kompleksleri

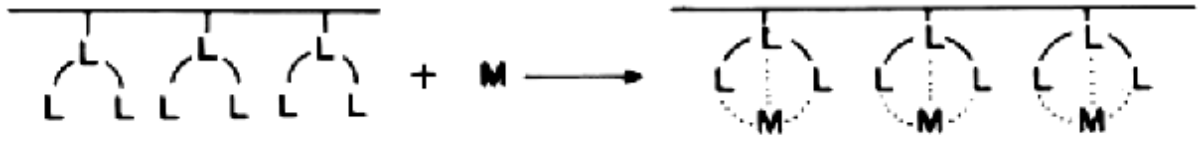
Asılmış polimer-metal kompleksi, polimer zincirine iliştirilmiş bir ligand fonksiyonuna tutturulmuş metal iyonundan oluşan bir komplekstir. Ligandın kelatlama yeteneğine bağlı olarak, asılmış kompleksler tek dişli ve çok dişli polimer-metal kompleksleri olarak sınıflandırılırlar.

Monodentat polimer-metal kompleksleri boş kalan bir koordinasyon kısmı dışında merkez metal iyonunun düşük molekül ağırlıklı bir ligand tarafından hali hazırda maskelendiği metal yada kararlı metal komplekslerinden oluşur. Bu komplekslerde, polimer zincirlerinin etkileri açıkça görülür ve polimer metal kompleksleri çözünürlüğü azaltan köprülü yapıları daha az içerdiklerinden genellikle suda ve organik çözücülerde çözünürler.

Metal iyonu yada metal kompleksi iki yada daha fazla ligand içerse de uygun reaksiyon koşullarının seçilmesiyle monodentat kompleks oluşturulması olasıdır. Metal iyonu veya metal kompleksi ile polimerik ligand arasındaki reaksiyon metal iyonunun veya metal kompleksinin fazlası ile gerçekleştirildiğinde, metal iyonunun ikinci ligandının yer değiştirmesi nadir gerçekleşir ve bu baskın olarak monodentat tipin oluşması ile sonuçlanır (Kurimara vd., 1971).

Polimer iskeleti çoklu liganlar içerdiğinde polimer-metal kompleksinin koordinasyon yapısı

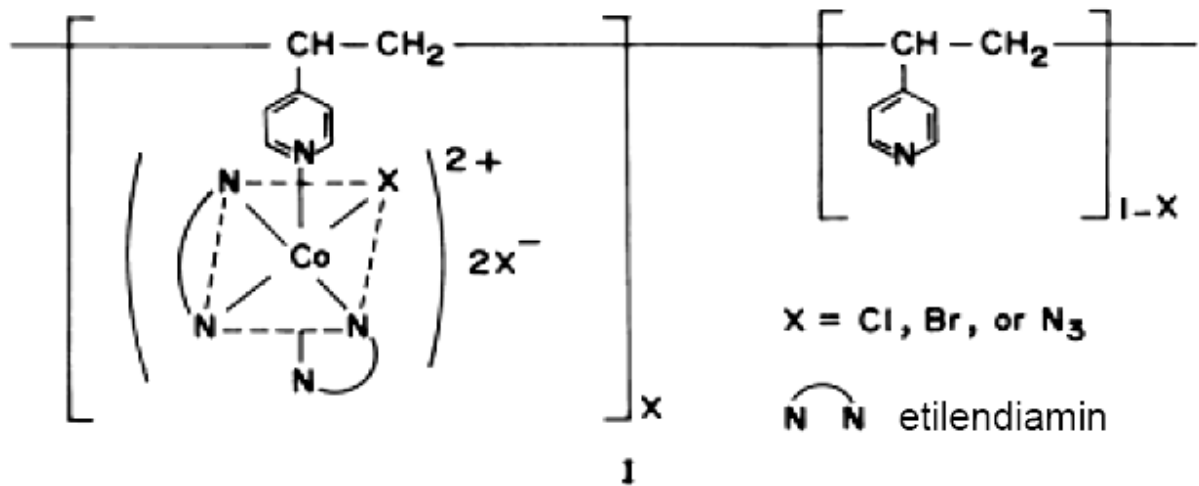
Şekil 2.22'deki gibi olur.



L= koordine edici atom yada grup

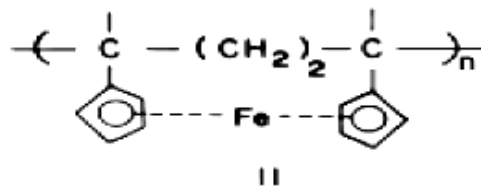
M= Metal iyonu

Şekil 2.22 Çok ligandlı polimer-metal kompleksleri



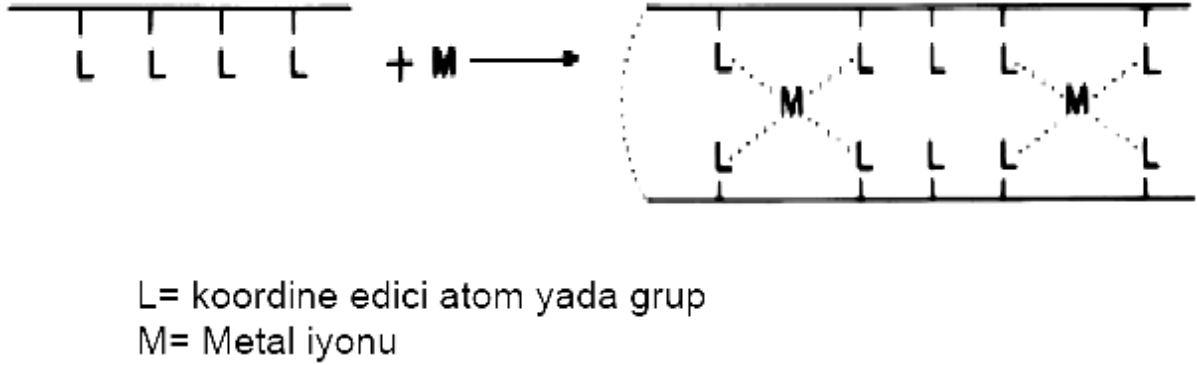
Örnek olarak verilebilir.

Çok dişli ligandlar genellikle köprülü yapıda kararlı metal komplekslerinin oluşumunu (II) gerçekleştirir (Vernon ve Seely, 1966) . Kelatlayıcı reçinelerin pek çoğu bu gruba girer. İyi tanımlanabilen koordinasyon sayısı ile betimlenirler, burada belirleyici olan polimer zincirinin etkisidir .



ii) Moleküller Arası, Molekül İçi Köprülü Polimer-Metal Kompleksleri

Polimer ligandı, genellikle dört yada altı koordinasyon bağlama bölgesi olan metal iyonu ile doğrudan karıştırıldığında polimer-metal kompleksi polimer içi kelat türü yada polimerler arası kelat tipinde olabilir.



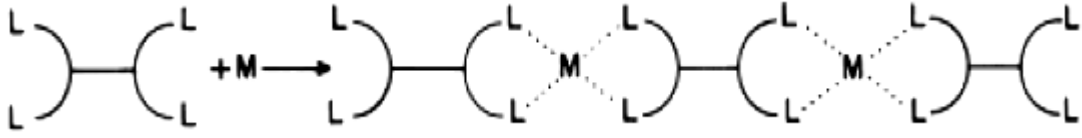
Şekil 2.23 Moleküller arası, molekül içi köprülü polimer-metal kompleksleri

Bu tür polimer-metal kompleksinde koordinasyon yapısı açık değildir ve moleküller arası ve molekül içi köprülenmeyi birbirinden ayırmak zordur. Polimer-metal kompleksinin özellikleri incelenirken polimerin etkisini açıklamak zordur. Polimer içi metal kompleksi bazen çözünebilir iken polimerler arası metal kompleksi poli(akrilik asit)-Cu(II) kompleksleri ile örneklendiği gibi doğrusal polimer-metal komplekslerinin çökmesi ile sonuçlanır (Tsuchida vd., 1974).

2.3.1.2 Çok Fonksiyonlu Ligandların Bir Metalle Kompleksleşmesi

Koordinasyon polimerleri çok uzun yıllardan beri kullanılmakla birlikte son zamanlarda fark edilmişlerdir. Örneğin, derilerin tabaklanması postu oluşturan proteinlerin metal iyonları ile koordinasyonuna dayanır. Protein-metal kompleksleri, tabaklanmamış derilerin uğradığı hava etkisi ile bakteriyel bozunmaya karşı direnir. Proteinleri de içeren doğal polimerlere bağlanan metaller pek çok enzimatik ve hücre zarı etkileşimini etkiler (Vallee ve Riordan, 1978).

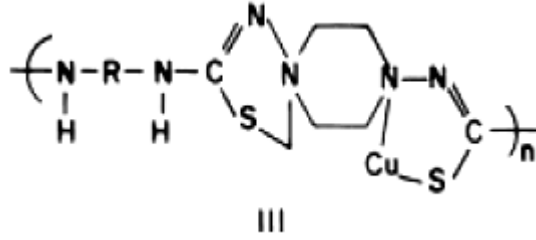
Moleküllerinin her iki ucunda çok fonksiyonlu ligandlar içeren düşük molekül ağırlıklı bileşikler ağ yapılı doğrusal polimerler oluştururlar. Polimer zinciri koordinasyon bağlarından oluşur ve ligand şemada gösterildiği gibi köprü oluşturunca birimdir.



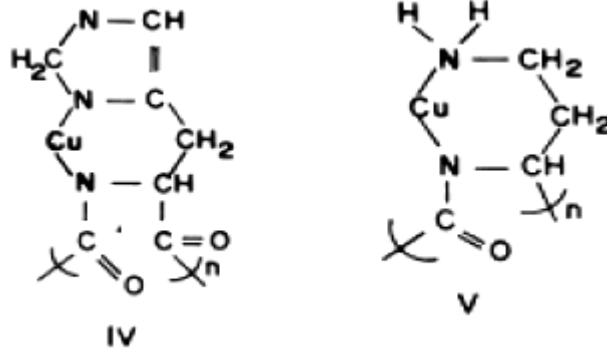
Şekil 2.24 Çok fonksiyonlu ligandların bir metalle kompleksleşmesi

Bu tür koordinasyon polimerleri oluşturma yeteneğine sahip çok fonksiyonlu ligandlar, doğrusal koordine polimerler ve ağ yapıda koordine polimerler olarak sınıflandırılır.

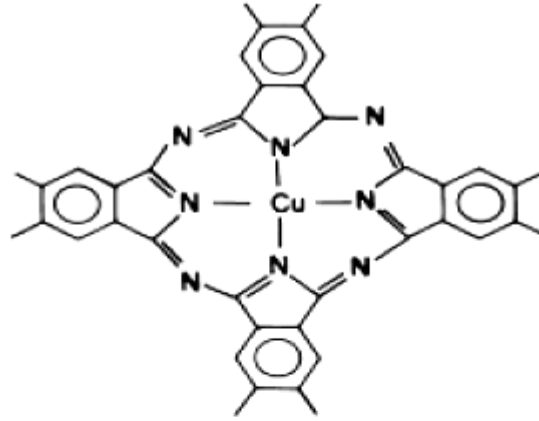
Doğrusal koordine polimerler iki tür olabilir. İlk durumda polimer zinciri poli(tiosemikarbazid)'in bakır kompleksinde (III) olduğu gibi çift fonksiyonlu bir ligand ve metal iyonundan oluşur (Tomic ve Campbell, 1962 ve Donaruma vd.,1979)].



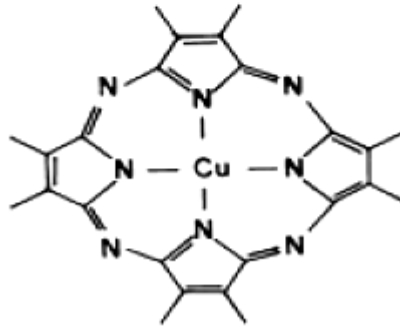
Diğer durumda, basit bir bileşik yada atom köprü iyonu olarak işlev görüp poli(α -amino asitler)in bakır komplekslerinde (IV,V) olduğu gibi polimerik yapıya hayat verir (Palumbo vd.,1978).



Ağ yapıli koordine polimerler; metalin tamamen gömülü olduğu yassı, ağımsı organic makromoleküllerdir. (VI) (VII) kompleksleri en bilinen örneklerdir. Bu polimerler ısıli dayanıklılıkları, potansiyel elektriksel özellikleri ve kan proteinlerine benzerlikleri sebebi ile önemlidirler (Sharpe, 1976).



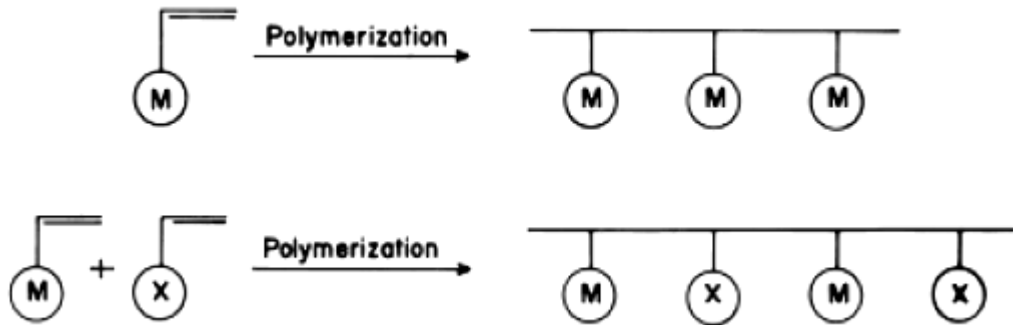
VI



VII

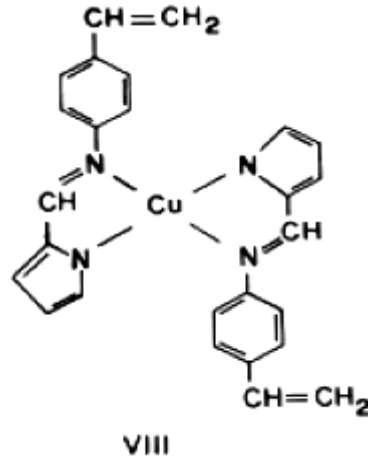
2.3.1.3 Metal İçeren Monomerin Polimerizasyonu

Bu tür polimer-metal kompleksleri açık koordinasyon yapıları ile bilinirler. Polimerizasyon radikal yada iyonik başlama ile olup yüksek molekül ağırlıklı polimerin oluşmasıyla sonuçlanır.



Şekil 2.25 Metal içeren monomerin polimerizasyonu

Vinil grubu içeren Schiffbazı ligandlı bir bakır kompleksi bildirilmiştir (Tsuchida vd.,1974)



2.3.2 Polimer-Metal Kompleksleri İle İlgili Bazı Çalışmalar

Sebastian ve arkadaşları (1998) poliakrilik asidin çeşitli metallerle komplekslerini sentezlemiş ve bu komplekslerin karakterizasyonu ile birlikte termogravimetrik incelemesini yapmıştır. Bu inceleme sonucunda polimer-metal komplekslerinin oluşumu $\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Fe(III)} > \text{Zn(II)} > \text{Co(II)}$ olarak saptanmıştır. Bakır iyonun kompleksleşmesinin diğerlerinden yüksek olması, ligand dağılımının Cu(II) kompleksleşmesi için en iyi stereokimyasal gereksinimleri karşılaması ile açıklanmıştır.

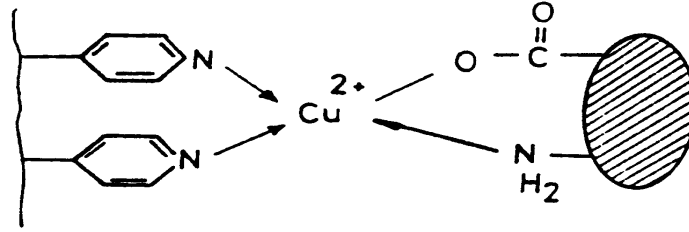
2.4 Üçlü Polimer-Metal-Protein Kompleksleri

2.4.1 Asit Ortamında

Üçlü polimer-metal-protein komplekslerinin incelenmesi Morawetz'in çalışmalarıyla (1952) başlamıştır. Özellikle BSA (Bovine Serum Albumin)'nın fraksiyonsuz PAA ve Ba^{2+} varlığındaki çözünmeyen kompleksler Morawetz tarafından incelenmiştir.

Öncelikle asit ortamında yani protein ve polimer bileşenlerinin pozitif yüklendiği ve birbiri ile bağlanmayan şartlarda metalik iyonların katılmasıyla üçlü komplekslerin oluşum şartları ve mekanizması verilmiştir. Sulu asetik ortamında pH:4.2'de serum albumin poli-4-vinil-piridin ile kompleks oluşturmazlar. Bu şartlarda hem protein hemde PVP pozitif yüklüdür. Aynı yüklü küresel ve lineer zincirler arasındaki elektrostatik itme kuvveti kompleks oluşumunu engeller. Polimer-protein karışımına $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ilave edildiğinde sistemde faz geçişi meydana gelir. Protein miktarına bağlı olarak, kritik protein konsantrasyonunda sistem tamamen suda çözünmüş hale gelir. Çöktürler santrifüj yöntemi ile ayrılarak süzüntü sedimentasyon metodu ile analiz edilir. pH:4.2 değerinde sistemde bakır iyonları yokken

polimer ile proteinin bağlanmadığını düşünerek, Cu^{2+} iyonlarının aynı pozitif yüklü küresel proteinler ile polikasyon zincirleri arasında bağlayıcı görevini üstlendiği söylenebilir. Yani sistemde çözünen üçlü BSA- Cu^{2+} -PVP kompleksinin oluşumu görülür (Mustafaev ve Kabanov, 1981). Örnek olarak; protein ile polikasyon'un Cu^{2+} iyonları ile birleşimi aşağıdaki tiptedir. Burada Cu^{2+} iyonları merkezi atomdur



Yapısında poliaminler (polivinilpridin, polietilenimin) ve PAA bulunan çözünen üçlü polimer metalik komplekslerin oluşumunda Cu^{2+} iyonlarının benzer fonksiyon taşıdığı son zamanlarda yapılan araştırmalardan anlaşılmaktadır.

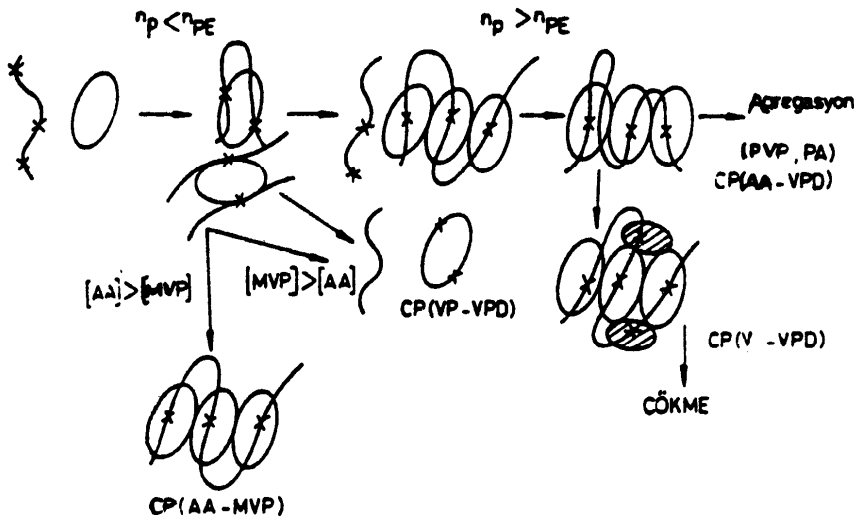
2.4.2 Nötral Su Ortamında Kompleksleşme

PAA, PVI, akrilikasitin vinil piridin ve vinil pirolidon ile kopolimerleri, vinil imidazol, vinil piridin ve diğer monomerlerin vinil pirolidon ile kopolimerleri v.b. polimerlerle üçlü komplekslerin nötral su ortamında oluşması araştırılmıştır. Protein olarak serum albumin, ovalbumin ve veba hastalığının proteini (F1) kullanılmıştır. Geçiş metal iyonu olarakta Cu^{2+} kullanılmıştır.

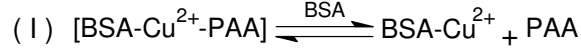
Üçlü karışımların homojen çözeltilerinin analizi, kompleks oluşumunun bazı kanunlarını ve protein partiküllerini adsorblayan polimer molekülleri arasında dağılımını incelemeye imkan vermiştir. PVI ile bakır iyonlarının reaksiyonu metalin homojen olmayan dağılımı ile oluşur. Bu tip sistemin, proteinin düşük konsantrasyonundan başlayarak SA proteini ilave edildiğinde sistemde faz geçişi meydana gelir. Süzütünün sedimentasyon analizi ancak serbest PVI'ye uygun olduğunu gösterir. Çökeltide ise, suda çözünmeyen üçlü kompleks bulunur. Protein/polimer oranı arttıkça çökelti miktarı artarak, maksimum değere gelir.

Kopolimer (VI-VPD)- Cu^{2+} -SA ve poli-N-etilpiperazinoksit (PNO)- Cu^{2+} -SA karışımlarının çözeltilerinin sedimentasyon analizi sistemde iki fraksiyonun olduğunu gösterir. Bu fraksiyonlar serbest polimer Me^{+n} kompleksine ve üçlü polimer- Me^{+n} -protein sistemine uygundur. Buda, kompleks oluşumuna protein moleküllerini adsorblayan poliiyonlar arasında

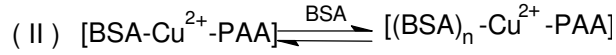
heterojen olarak dağıldığını gösterir. Ancak maksimum çökmeye uygun olan oranlar arttıkça protein ilavesiyle oluşan çözünmeyen üçlü komplekslerin kısmen yada tamamen çözünmesi mümkündür. Çöküntünün miktarı orana bağlı olarak değişmekte olduğu saptanmıştır. Sistemin optikçe sıklığını polimer/protein oranının basit olmayan karakterini aşağıdaki şekilde açıklamak mümkündür. Protein/polimer oranının optik sıklıkla değişiminde maksimum değerden (N_m) sonra sistemde kompleks oluşumunu iki faktör etkiler. Birincisi, maksimum N_m değerinden sonra sistemde protein partikülleri bunları adsorblayan PE arasında heterojen olarak dağılırlar ve böylece stokiometrik yapılmayan polikompleksler oluşurlar. Diğer bir deyişle bir polimer molekülü ile çok miktarda protein molekülü bağlanır. Bu ise kompleksin suda çözünmesine neden olur. İkincisi, protein molekülünün konsantrasyonu arttıkça, protein metal iyonlarını daha kuvvetli adsorplanmasıyla çözünemeyen üçlü komplekslerin parçalanması mümkündür. Böylece sistemde polimer ve protein-metal kompleksi oluşur. Mustafaev vd. tarafından PE'in kimyasal yapısına bağlı olarak, bu iki faktörün hangisinin etkili olduğunu çeşitli polimerler için incelenmiştir. Metal iyonları ile kuvvetli polimer-metal kompleksi veren poliasit ve polibazlar PAA, PMAA, PVP, PVP alkil türevleri, PVI v.b.'dir. Uygun şartlarda birinci faktörün etkisiyle polikompleks oluşur. Polielektrolit zincirinin metal iyonları ile kompleks oluşturmeyen monomerler ile seyreltilmesi (örneğin pirolidon ilavesiyle oluşan kopolimer) ikinci faktörün etkisinin daha fazla rolünü göstermektedir. Diğer bir deyişle protein/polimer oranının maksimum değeri aşıldığında ($N > N_m$) üçlü kompleks parçalanır. Buna göre incelenen sistemler, karışım biyolojik sistemlerde biyopolimerler arasında karışım metal iyonları ilavesi ile oluşan uygun prosesleri modelleştirebilir. Örnek olarak, nükleik asitlerin ve polisakkaritlerin biyosistemlerde aynı yüklü bileşenlerin metal iyonları ilavesi ile kompleks oluşumu, antijen antikor reaksiyonu v.b. (Mustafaev, 1996a).



Poliakrilik asit (PAA) ve BSA (Bovine Serum Albumin) arasında Cu^{2+} li kompleks oluşumu nötral suda çalışılmıştır. Cu^{2+} konsantrasyonuna bağlı olarak, PAA- Cu^{2+} ve BSA arasındaki kompleks, iki farklı şekilde sonuçlanabilir. Düşük Cu^{2+} konsantrasyonlarında ($n_{\text{Cu}}/n_{\text{AA}} < 0,15$), BSA konsantrasyonundaki fazlalık kompleksin aşağıdaki mekanizma gibi kırılmasına neden olur.



Yüksek Cu^{2+} konsantrasyonlarında ($n_{\text{Cu}}/n_{\text{AA}} > 0,15$), BSA konsantrasyonundaki fazlalık non-stokiyometrik komplekslerin oluşmasına neden olur.



İyonize olmuş poliakrilik asit ve diğer polielektrolitler Cu^{2+} iyonu varlığında, spektroskopik ve diğer metodlarla analiz edilmiştir ve bu çalışmalar kararlı kompleks oluşumunu göstermişlerdir (Mustafaev ve Narimov, 1990a; Saraç vd., 1995; Mustafaev vd., 1996b; Tabaka vd., 1999). Poli(N-izopropilakrilamit-co-akrilik asit) ve BSA'nın Cu^{2+} varlığında kompleks oluşumu nötral, fizyolojik tuz çözeltisinde incelenmiştir. Stabilite bağımlılığı, spektrofotometrik titrasyon ve jel filtrasyon kromatografisi ile çalışılmıştır (Mustafaev vd., 1998a). Çözünen ve çözünmeyen Cu^{2+} varlığındaki farklı protein ve polianyonların oluşturduğu üçlü kompleks, iyon değişimi kromatografisi ve voltametrisi tarafından da incelenmiştir (Mustafaev vd., 1996c).

Cu^{+2} etkisiyle BSA ile anyonik polielektrolitlerle [Poliakrilik asit (PAA), Poli(N-isopropilakrilikamit [Poli(NIPAA)], N-isopropilakrilikamit ve akrilik asidin kopolimeri sulu ortamda floresans tekniği ve HPLC analizleri ile incelenmiştir. Etkileşimin karakteri monomerin bileşimi ($r = [\text{COOH}]/[\text{NIPAA}]$), $[\text{Cu}^{+2}]/[\text{PE}]$ ve $[\text{BSA}]/[\text{PE}]$ oranları ve çözeltinin pH'ına bağlıdır. Üçlü polikompleks partikülünün iki tipi kopolimerin r monomer bileşimine bağlı olarak oluşturulur. r 'de 1/3'den 1/1'e, üçlü polikompleks yapısındaki protein molekülü polimer tarafından sıkı bir şekilde sarmalanıyor ve uygulamada suyla ilişkisi azalıyor. $r \geq 3/1$ 'de ise üçlü polikompleks (PAA- Cu^{+2} -BSA) partikülünde protein molekülleri çözeltinin daha fazla etkisindedir (Filenko vd., 2001).

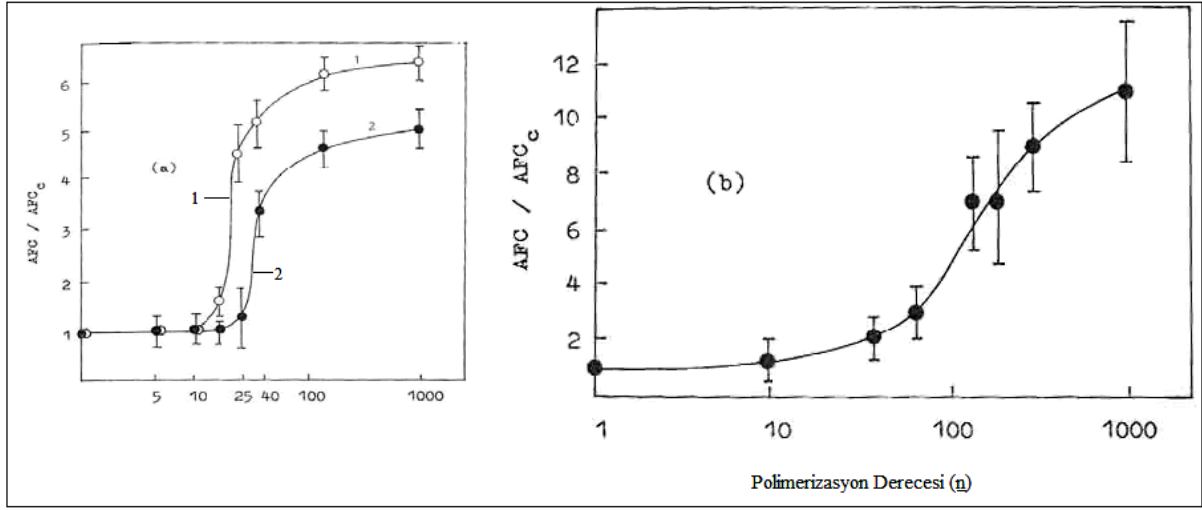
2.5 Polimer-Protein Komplekslerinin Fonksiyonel Etkileri ve Bunların Pratikte Uygulama Alanları

Doğal olmayan polielektrolitlerin organizmaya verildiğinde komplemant sisteme, hemopoiesise (Hemopoiesis), kan pırtılaşma sistemine etki ederek yüksek biyolojik aktiflik sağladığı bilinmektedir (Mustafev, 1996a). Polielektrolitlerin (PE) biyolojik etkilerinin temeli biyosistem komponentleri (hücreler, proteinler v.s) ile kooperatif etkileşimde bulunmalarına dayanmaktadır.

2.5.1 İmmünolojide Polielektrolit Kompleksleri

1970’li yılların başlarında immünolog ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı polielektrolitlerin immün sistem üzerine etkisi aydınlatılmış ve yapay polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu belirlenmiştir. PE’lerin bu özelliklerini aydınlatmak amacıyla yapay polielektrolitlerle koyun eritrositlerinin kompleksleri oluşturulmuş ve bu kompleksler hayvanlara immünize edilerek, immün cevabın yükselmesinde PE’lerin etkili oldukları gösterilmiştir. PE’lerin bakteri, virüs tabiatlı yapay antijenler için taşıyıcı olarak kullanılması sonucu immün cevabın artması ve devamlı bir immün koruyuculuk sağlaması sentetik aşı tasarlama fikrini ortaya çıkarmıştır (Mustafaev, 1996a). Yüklü olmayan ve su ortamında yüklenmeyen polimerlerle (polivinil alkol, poli-N-vinil pirilidon, polietilen glikol) eritrositlerin kompleksleri yapılmış, fakat bu kompleksler immün cevapta artış sağlayamamışlardır yani bu tür yapılı polimerler adjuvant (yardımcı) özelliği taşımamaktadırlar. Bu bilgiler ışığında yüksek molekül ağırlıklı sentetik polielektrolitlerin (PE), (negatif ve pozitif yüklenmiş veya ortamın fizyolojik şartlarına göre yüklenebilen polimerler; polianyonlar, polikasyonlar ve bunların kopolimerleri) monomerlerinin kimyasal yapılarından bağımsız olarak adjuvant etkisi (immüniteyi stimüle eden) gösterdiği sonucu ortaya çıkmıştır (Mustafaev 1996b, 1996c, 1996d, 1996e, 1998a, 1998b; Başalp, 1996; Özeroğlu, 1996; Güney, 1997; Saraç, 1995; Mansuroğlu, 2007). Bunun nedeni şu şekilde açıklanmıştır: Bu polielektrolitlerin sentezi ve modifikasyonu daha kolaydır, istenen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek mümkündür. Suda iyi çözünürler ve bilinen yapılarda çeşitli kompleksleri sentezlenebilmektedir. Polielektrolitlerde molekül ağırlığı polimerleşme derecesi ile orantılıdır. Polimerleşme derecesinin artması istenilen kompleksin oluşumunu destekleyici yönde etki eder ve polimerin bağlanma miktarında artış gözlenir. Bunun yanı sıra polielektrolit çözeltilerinin elektrokimyasal özellikleri genellikle poliiyonun zincir boyuna bağlıdır; yani polikompleksin çökmesi vb. özellikler polimerin polimerleşme derecesine

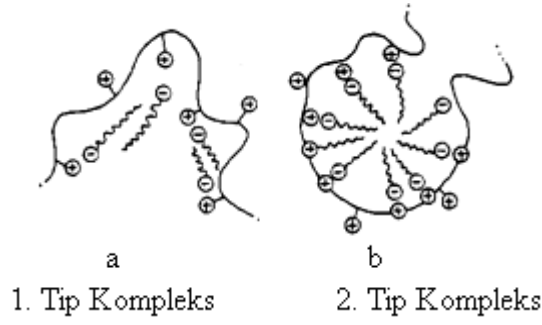
bağlıdır (Mustafaev, 1996a).



Şekil 2.26 Fare karaciğer hücrelerinde antikor oluşturan hücrelerin (AFC) miktarında artışın 4 değerli polikonidin (PC) tuzlarının (a) 1-PC-C₂H₅; 2-PC-C₂H₅-CH₂C₆H₅ ve (b) Poliakrilik asidin (PAA) polimerleşme derecesine olan bağlılığı. Polielektrolitin konsantrasyonu 50 mg/kg; 5x10⁻⁶ eritrosit hücre miktarı (Mustafaev, 1996a, 2004).

Bu konuda yapılan bu ve diğer fizikokimyasal ve immünolojik çalışmalar; immün sistemin uyarılmasında, PE'lerin immün hücrelerin yüzeyi ile etkileşimindeki kooperatif adsorbsiyonun önemli rolü olduğunu ve timusa bağlı olmayan polimer yapılı yapay immünojenlerin oluşum prensibini açıklamaya imkan vermektedir.

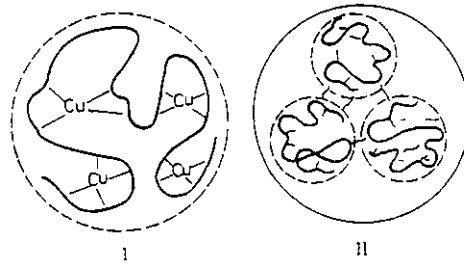
PE moleküllerinin sulu ortamlarda supramoleküler yapısının değişmesinin birinci yolu hidrofoblaşmasıdır. Bunun için poliyon zincirlerinin yüzey aktif maddelerle yüklenmesi gerekmektedir. PE'in yüzey aktif maddelere kovalent bağlanması veya yüzey aktif maddelerle PE'in arasında elektrostatik bağlarla kompleks oluşması ile PE'ler hidrofoblaştırılmaktadır. Polimer molekülü ile yüzey aktif maddeler (sodyum dodesil sulfat, sodyumdezoksi kelat, setil trimetil, amonyum bromür v.s.) arasında elektrostatik kompleks oluşumundan meydana gelen komplekslerin yapısı yüzey aktif madde/PE oranına bağlıdır (Mustafaev, 1996a)



Şekil 2.27 a ve b Suda çözünen PE-Yüzey aktif madde kompleksleri

Şekil 2.27 a'da yüzey aktif madde/PE oranının küçük olduğu değerlerde oluşan 1. Tip Kompleks, Şekil 2.27 b'de ise yüzey aktif maddenin konsantrasyonunun artması durumunda oluşan 2. Tip Kompleks görülmektedir. Yüzey aktif madde konsantrasyonunun artırılması ile birinci tip intramoleküler komplekste karşılıklı etkinin artması sonucu 2. Tip elektrostatik kompleks oluşur. 2. Tip kompleksin kompaktlığı 1. Tip komplekse göre daha fazladır.

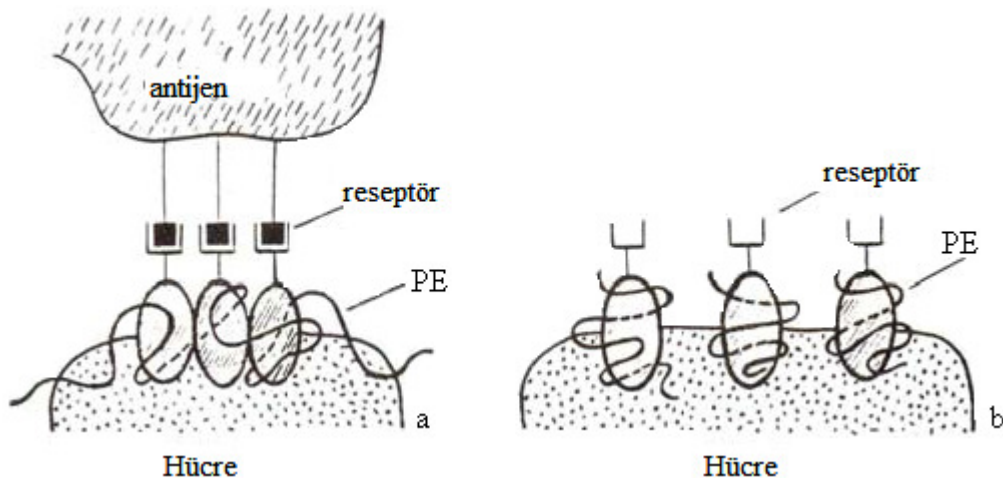
Supramoleküler yapının değişmesinin ikinci yolu, PE'lerin geçiş metal iyonları ile kompleks oluşturmalarıdır. Bu metal iyonları az yüklü veya nötral polimer molekülleri ile birleşerek, bu polimerlerin hem komplementer yüzeylerle kompleks oluşturma etkisini, hem de polimer zincirlerinin çözeltideki konformasyonunun düzenlenmesini sağlamaktadır. Örneğin Cu^{+2} iyonlarının yüksek konsantrasyonlarında intramoleküler agregasyon oluşturur ve partiküller asimetrik yapıya yakın bir forma geçerler.



Şekil 2.28 Polimer-metal komplekslerinin $[\text{Me}]/[\text{PE}] \ll 1$ (I) ve $[\text{Me}]/[\text{PE}] \gg 1$ (II) oranlarında oluşan yapı

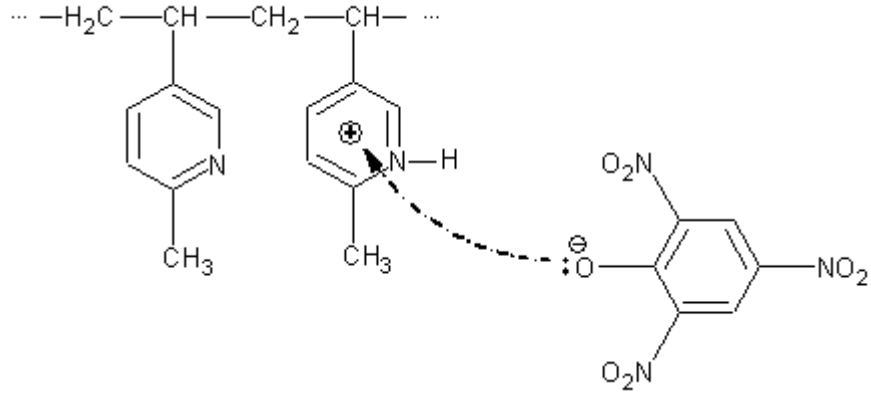
PE-Metal kompleks bileşenlerinin oranlarının sabit değerlerinde oluşan PE komplekslerinin yapısı çözeltideki PE'in başlangıç konsantrasyonuna bağlıdır. Fazla seyreltilmiş çözeltilerde PE-Metal kompleksleri kompakt yapıdadır. Polimerin başlangıç konsantrasyonu arttıkça metal iyonları ile makromoleküller arasında çapraz bağlar oluşur ve sistemde assosiye olmuş asimetrik partiküller meydana gelir (Mustafaev, 1996a).

PE-Metal ve PE-Yüzey aktif madde komplekslerinin immün sistem üzerine etki mekanizması genelde aynıdır ve PE kompleksinin kimyasal yapı çevrimlerine bağlıdır. Kimyasal olarak açık yapı ile karakterize edilen PE kompleksleri immün sistemi güçlü uyaranlardandır. PE kompleksleri kompaktlaştığında ya immün sistemi uyarmazlar ya da immüniteyi yatıştırıcı olarak çalışırlar. PE'lerin immünolojik aktifliğinin oluşmasında protein faktörü önemli bir rol oynamaktadır. Öyke ki; kana enjekte edilmiş PE makromolekülleri kanda plazma proteinleri ve ya hücre yüzeyindeki proteinlerle karşılıklı etkileşimde bulunabilirler ve makrofajlar tarafından adsorbe edilebilirler. Ayrıca; PE kompleksinin immün sistemi stimule etmesi; PE kompleks bileşiminin hem polimer zincir uzunluğuna, hem de kompleksin kompaktlığına bağlıdır. Stokiometrik olmayan PE kompleksleri antijen reseptörleri ile hücre reseptörleri arasında birden fazla noktada etkişim imkanı sağlamaktadır (Şekil 2.29a). Stokiometrik PE komplekslerinde ise antijen reseptörleri ile hücre reseptörleri arasında karşılıklı etkileşim ihtimali azalmakta ve birbirinden izole olmuş kompleksler oluşmaktadır (Şekil 2.29b) (Mansuroğlu, 2007).

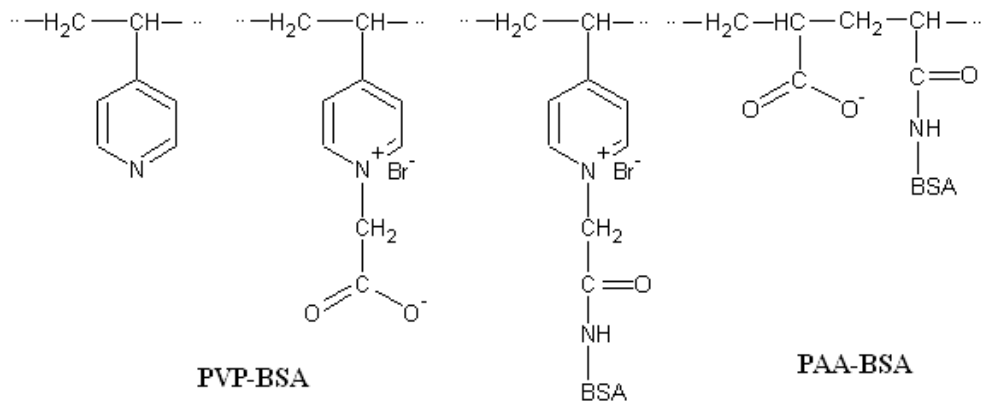


Şekil 2.29 Aynı polimerleşme derecesine ve aynı kimyasal yapıya sahip olan PE kompleksleri
(a) Lineer yapıda PE kompleksi (b) Kompakt yapıda PE kompleksinin hücre yüzeyindeki antijenlerle karşılıklı etkileşiminin şematik gösterimi (Mustafaev, 1996a).

Doğal olmayan PE olarak sentezlenmiş ilk suni antijen poli-2-metil-5-vinil-piridin trinitrofenol ile elektrostatik kompleksidir.



Bu suni antijen organizmaya immünize edildiğinde immün cevap oluşturmaları için bir adjuvanta (yardımcı) ihtiyaç göstermez ve timus organı olan veya olmayan hayvanlarda antikor oluşumunu artırır. Doğal olmayan ikinci tip antijen ise; kooperatif, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerle kararlı hale getirilen proteinlerin PE-Protein kompleksleridir. Bu kompleksler proteine spesifik antikorların sentezini uyarmışlar ve immün cevabın oluşmasının immün cevap genlerine ve timusa bağlı olmadığını göstermişlerdir. Aynı zamanda protein antijenlerinin PE'lerle olan kompleksleri efektif aşı özelliği göstermektedir. PE komplekslerinin yapısı ile (stabilitesinin, yükünün, konformasyonunun ve diğer fizikokimyasal özelliklerinin) immünojenlik aktivite arasındaki bağlar analiz edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında polimer bileşimli immünojenlerin model yapısı ortaya konulmuştur (Mustafaev, 1996a, 2004).



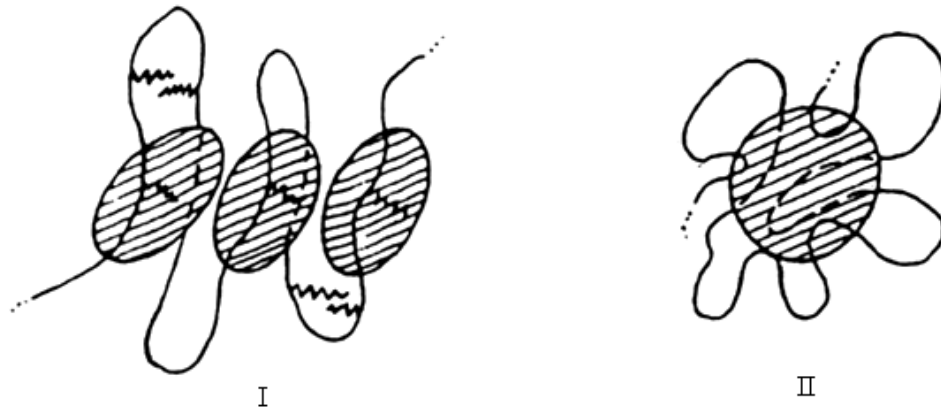
Şekil 2.30 Poli-4-vinilpiridin (PVP)- BSA Kompleksi ve PAA-BSA kompleksinin yapısı (Mustafaev, 1996a, 2004).

Poli-4-vinilpiridin (PVP) ve PAA polimeri ile BSA'nın kompleksleri oluşturup bu PE-Protein komplekslerinin immünojenliği incelenmiştir. Tüm bu deneylerden elde edilen sonuçlar immünojenliğin PE'lerin kimyasına bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışmalar; PE-

protein komplekslerinin organizma şartlarında kararlı olmasının, bu komplekslerin immün sistemi aktive etmesinin en önemli şartı olduğunu göstermiştir. Bu prosesin mekanizmasını anlamak için spesifik antikor oluşturan hücrelerin oluşum kinetiği incelenmiştir (Mustafaev, 1996a).

2.5.1.1 İmmünojen Polielektrolit Kompleksinin Çalışma Modeli

Polielektrolit kompleksleri immünolojik etki göstermesi için optimum şekilde yapılmalıdırlar. İmmünolojik aktif (veya “pasif”) polielektrolit kompleksleri için aşağıdaki model gösterilmiştir (Şekil 2.31). Gösterilen yüksek immünojen etkili polielektrolit kompleks modelinin ayrı ayrı çizgilerini ifade eden en önemli fizikokimyasal kriterleri şu şekilde yeniden açıklayabiliriz (Petrov vd., 1992; Mustafaev vd., 1990b, 1996a).



Şekil 2.31 Yüksek (I) ve düşük immünojen (II) etkili antijen-PE komplekslerinin modellerinin yapısı (Mustafaev, 1996a).

- 1) Antijen ve polimer molekülleri fizyolojik şartlarda parçalanmayan stabil bağlarla (çok noktalı elektrostatik ve hidrofob karşılıklı etki, iyon koordinasyon ve kovalent bağlama) birleşmelidir.
- 2) Stokiyometrik yapıya sahip olmayan PEK’leri antijenin birkaç epitopunu içermelidir.
- 3) Yapısında “ilmik” olan PEK’lerin (polimerin bükülebilen serbest bölümlerinin olması) hem protein yüzeyine yapışmış hem de serbest “ilmik”te bulunan ilave olarak iyonlanmış grupları, PEK yüzeyinde kompleks partiküllerinin çözeltide kalmasına yardım eden yayılmış hidrofil bölge yaratır.
- 4) Antijen moleküllerinden toplanmış ve polimer taşıyıcısı ile stabilleşmiş sert silindir

(çubuk) tipli yapı; hem antijen determinantlarının uygun yerleşmesini hem de büyük yüzey oluşmasını sağlar.

5) PEK'in biyosistem komponentleri ile (proteinler, immün hücreler v.b.) çok noktalı kooperatif karşılıklı etkileşimde olma kabiliyeti; yapısında olan "ilmik"lerdeki serbest polimer fonksiyonel gruplarına göre oluşur. Yüksek immünojen etkili PEK'ler biyosistem komponentleri ile yüksek kompleks oluşma kabiliyetine sahiptir.

6) Antijen determinantlarının uygun yerleşmesi ve antijen hücre reseptörleri ile çok noktalı karşılıklı etkisi için daha önemli sterik şartlara uygun olan yapılı kompleks. Bu nedenle polivalent aşılar yapmak için polielektrolit kompleksinin mekanik karışımı daha önemlidir.

Şekil 2.32 a'da scannig elektron mikroskobu ile sığır eritrositlerinin immünolojik etkiye sahip olan polimerlerle ve bunların protein kompleksleri ile karşılıklı etkisinden oluşan polimer-hücre komplekslerinin incelenmesinden alınan sonuçlar verilmiştir. Görüldüğü gibi hem polimerler hem de polimerlerin kompleksleri hücre ile interpolimer kompleks oluştururlar ve bunların agregasyonuna neden olurlar. Yukarıda açıkladığımız gibi hem saf polimer hem de polimer-protein kompleksleri T-hücrelerine bağlı olmadan immün cevap oluştururlar. Alınmış fizikokimyasal sonuçlar T-hücrelerine bağlı olmayan immün cevabın başlaması için antijen hücre kompleksinin hipotetik şemasını gösterme imkanı sağlamıştır (Şekil 2.32 b).



Şekil 2.32 İmmün cevap oluşturan antijen-hücre komplekslerinin hipotetik şeması. a- T-Bağımlı cevap. b- T-Bağımsız cevap (Mustafaev, 1996a)

T hücrelerine bağlı olmayan immün cevapta antijen B-lenfosit reseptörü ile yapı-spesifik kontaktın oluşumuna katılır (birinci spesifik sinyal). İkinci sinyal B-lenfositin yüzeyinde absorpsiyon oluşmuş polimerden ileri gelir.

2.5.2 Polielektrolit Kompleksler ve Yapay Aşılar

Son yıllarda yapılmış araştırmalar model antijenlerin yanı sıra (GG, SA-OA v.s.) mikrop ve bakteri antijenlerinin polielektrolit komplekslerinin fazla immünolojik aktifliğe sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 2.1; 2.2). Örnek olarak tüberkülozun protein antijeni (PPD), H-antijeni, Salmonel, grip antijeni, menenjit mikrobunun B-polisakkariti, α -fetoprotein ile (kanser antijeni) polikasyonların kompleksleri serbest antijenlerden karşılaşırsa daha yüksek immünolojik aktiviteye sahiptirler (Petrov vd., 1992; Mustafaev vd., 1990a, 1990b, 1996a). PEK'ler timusa bağlı antijenleri timusa bağlı olmayan immünojenlere çevirme imkanı sağlamaktadırlar. (Çizelge 2.3). Bir kat enjekte edildikten sonra ilave yardımcılarından yararlanmadan güvenli immünolojik hafıza meydana getirirler (Çizelge 2.4). Böyle PEK'ler aynı zamanda yüksek koruyucu aktifliğe sahiptirler ve bunlar temel alan yapay aşının sentezlenmesinde büyük olanak sağlarlar.

Çizelge 2.1 Serbest BGG, tüberkülozun protein türevi (PPD) ve bunların PVP (R2, R16) kompleksleriyle immünize edilmiş farelerin dalağındaki antikor oluşturan hücrelerin (AOH) miktarı.

1) PREPARAT	2) AOH	3) FARE SAYISI
4) BGG	6) 5000±5.35	8) 18
5) PVP(R2, R16)-BGG	7) 100000±15000	9) 18
10) PPD	12) 25±5.0	14) 18
11) PVP(R2,R16)-PPD	13) 25000±2000	15) 18

Çizelge 2.2 Ovalbumine (OA) karşı olan Ig-E'nin miktarı (Fareler OA ve OA' nın PEK si ile immünize edilmişler)

16) SAYISAL	17) IgE'nin titri (log-/T)	
18) Oran 19) N_{OA}/N_{PE}	20) PVP (R ₂ ,R ₁₆)-OA* 21) $\beta \approx 5$ mol %	22) PVP (R ₂ ,R ₁₆)-OA* 23) $\beta \approx 7$ mol %
24) 2.0	25) 6.6	26) 7.8
27) 3.8	28) 5.6	29) 5.5
30) 4.0	31) 4.0	32) 5.1
33) 5.0	34) 3.4	35) 4.0
36) 6.0	37) 4.0	38) 3.5
39) 8.0	40) 3.0	41) 4.8

(*) serbest ovalbumin için Ig-E'nin titri 4.0'a eşittir.

Çizelge 2.3 Normal ve timusu olmayan farelere SA, GG ve bunların kuaternleşmiş poli (4-vinil-piridin) ile kompleksleri verildiğinde oluşan immünolojik aktiflik.

42) Farelerin gen tipi	43) İmmünojen	44) Dalakta protein spesifik antikorların	45) Farelerin sayısı
46) C57BL/6(+/+) 47) C57BL/6(+/+)	48) BSA 49) BSA-PVP(R₂,R₁₆)	50) 25±10 51) 2500±400	52) 6 53) 6
54) Nude (nu/nu) 55) Nude (nu/nu)	56) BSA 57) BSA-PVP(R₂,R₁₆)	58) - 59) 600±100	60) 3 61) 5
63) C57BL/6(+/+) 64) C57BL/6(+/+)	65) BGG 66) BSA-PVP(R₂,R₁₆)	67) 2500±400 68) 3500±200	69) 6 70) 6
72) Nude (nu/nu) 73) Nude (nu/nu)	74) BGG 75) BSA-PVP(R₂,R₁₆)	76) 200±20 77) 20000±2500	78) 5 79) 5

Çizelge 2.4 Farelerde ikinci immünizasyondan sonra serum albumine karşı oluşan immün cevap

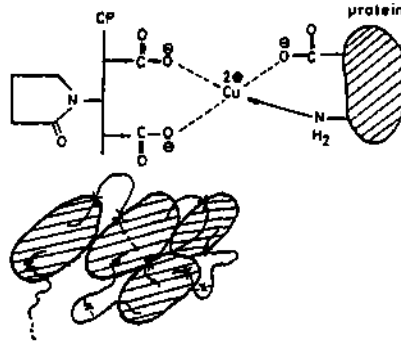
İmmünlaştırma	Farelerin sayısı	Birinci veya ikinci immünlaştırmadan 7 gün sonra AOH miktarı Farelerin sayısı
Birinci İkinci		25IgM IgG
BSA -	18	23,5±2 5,5±2
BSA BSA	11	20 ±4 6±2
PVP(R₂,R₁₆)-BSA -	15	3840±470 3990±300
PVP(R₂,R₁₆) -	14	5920±720 7450±680

2.5.2.1 Üçlü Polielektrolit Kompleksler

Yukarıdaki bilgilerden elde edilen sonuçlara göre, stabil yapıli kompleksler (veya konjugatlar) en fazla immünolojik aktifliğe sahiptirler. Böyle sistemlere örnek olarak PE ve antijen moleküllerinin (fragmentlerinin) kooperatif elektrostatik ve hidrofob karşılıklı etkisiyle stabilleşmiş kompleksleri veya fonksiyonel grupları kovalent bağla bağlanmış komponentlerden oluşan konjugatları göstermek mümkündür. Ancak PE'ler veya antijen molekülleri birbiriyle bağlanmak için uygun fonksiyonel gruplar veya hidrofob radikallere sahip değillerse bunların kimyasal modifikasyon problemi ortaya çıkar. Bu ise polimerlerin biyolojik etkisinin geniş boyutta değişmesine neden olur.

Doğal PE'ler ve metal iyonları esasında ilaç preparatlarının alınma metodu bir seri

araştırmalarda gösterilmiştir (Mustafaev vd., 1990a, 1990b, 1996a). Mikroplar yoluyla oluşmuş hastalıkların tedavisinde polisakkarit-protein karışımı bazı metallerin katkısıyla kullanılabilir. Günümüzde BN meninjit için spesifik olan proteinle polisakkaritin farmakolojik metalle üçlü kompleksi pratik olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda çeşitli protein antijenlerinin sentetik PE'lere metal katılmasıyla oluşan üçlü kompleksler esasında yüksek etkili immünojenler elde edilmiştir (Mustafaev ve Norimov, 1990a). Bu sistemlerin önemi, PE-protein karışımına çok az miktarda metal iyonu ilave edilmesiyle stabil üçlü kompleks oluşmasıyla anlaşılmaktadır. Proses teknolojik açıdan çok basittir ve komponentlerin kimyasal yapısının değişmemesi açısından oldukça önemlidir. Küçük molekülü "ilaveler" veya mediyatörler (ara bağlayıcılar) gibi yüzey aktif maddeler ve geçiş metal iyonları (Cu^{2+} , Al^{3+} , Pt^{4+} , Fe^{3+} ve diğerleri) kullanılmıştır.



Şekil 2.33 CP makromolekülünün ve SA fonksiyonel gruplarının Cu^{2+} iyonları vasıtasıyla kompleks oluşumunun şematik gösterilmesi ve oluşan üçlü PMC'nin yapısı.

Çizelge 2.5'de böyle sistemlerden birisi için örnek değerler verilmiştir. Tablodan görüldüğü gibi üçlü kompleksler serum albumine karşı hem birinci hem ikinci immün cevabını çok fazla miktarda arttırmaktadır.

Çizelge 2.5 Farelerde proteine spesifik olan ikinci immün cevap

Preparat	Farelerin sayısı	İkinci cevap IgM	Anti SA miktarı IgG
BSA	18	23.5 ± 2.1	5.5 ± 2.3
BSA	11	20 ± 4.2	6 ± 2.1

BA-CP1	10	10 ± 4.0	5 ± 2.0
BSA-Cu⁺²-CP1	15	22400 ± 1570	14720 ± 1200
BSA-CP2	10	20 ± 4.0	6 ± 2.0
BSA-Cu⁺²-CP2	15	2400 ± 1670	10500 ± 750
BSA-Cu⁺²	10	20 ± 4.0	5.5 ± 2.3
PVP(R₂,R₁₆)-BSA	14	5960 ± 724	7446 ± 678

Çizelgeden görüldüğü gibi üçlü komplekslerin immün cevabı ikili elektrostatik komplekslere göre daha fazladır.

2.6 Protein Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

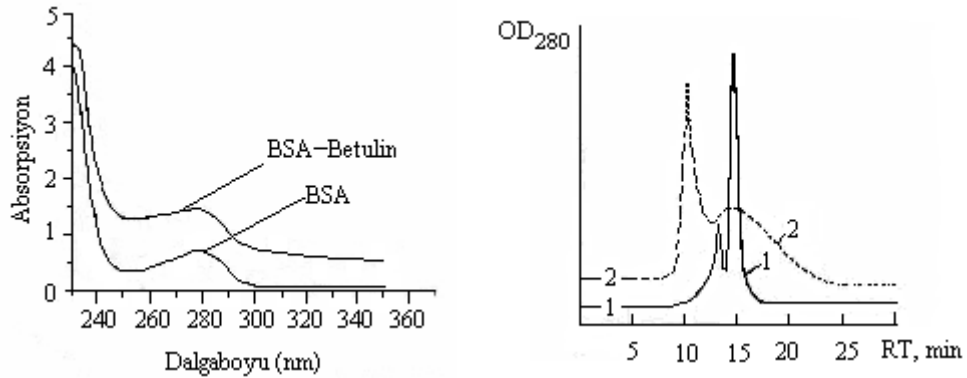
Hem kısa (10-12) hem de uzun aminoasit zincirlerine sahip sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, peptidlere karşı antikor üretiminde immünojenliği arttırmak için peptidlerin daha büyük molekül boyutuna sahip taşıyıcı proteinlere bağlanması gerekmektedir (Deen vd., 1990). Büyük moleküler boyutlardaki BSA, Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), Ovalbumin (OVA) gibi globular proteinler, peptidler için taşıyıcı olarak kullanılmakta ve küçük boyutlu peptidlerin in-vivo sistemde antikor oluşumu prosesinde tanınmasını sağlamaktadırlar.

BSA ve KLH genel olarak en sık kullanılan taşıyıcı proteinlerdir ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar. Bağlanma (konjugasyon) bölgesi, peptid dizilimine bağlı olarak; dizinin N- ucu, C- ucu ya da içerisindeki herhangi bir nokta olabilir. Peptidler içerdikleri aminoasit kompozisyonuna göre N- ucundan, C- ucundan ya da dizinin içerisindeki herhangi bir fonksiyonel grubundan konjugasyona girebilirler. Konjugasyon noktası karboksil (-COOH), amino (-NH₂) ya da sülfidril (-SH) uçları olabilir. Antijenik peptid dizilimi taşıyıcı proteine (BSA, KLH, OVA vb.) bağlanacağı göz önünde bulundurularak sentezlenmelidir [6]. Antikor oluşumunda iyi sonuçlar elde etmek için uygun antijenik peptid dizilimini seçmek ve buna bağlı olarak konjugasyonun dizaynını yapmak oldukça kritik noktalardır. Peptidin taşıyıcı protein yüzeyinde konumlanması ve yerleşimi seçilen bağlanma yönteminden etkilenmektedir. Sisteine dayalı aminoasit spesifik bağlanma yöntemleri genel olarak maleimidler ile yapılmakta ya da serbest -SH grubunun kovalent

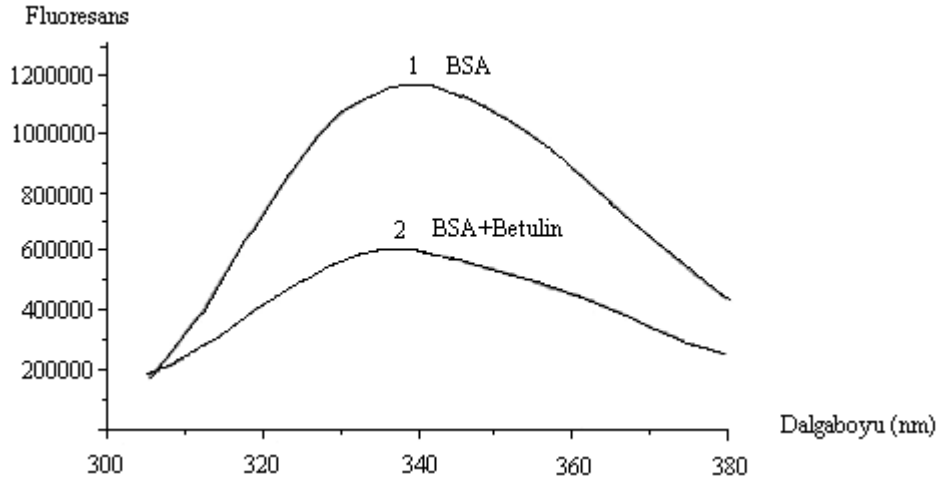
olarak etkileşmesine dayanmaktadır. Diğer bağlanma yöntemleri ise genel olarak serbest amino grupları için glutaraldehit ya da N-Hidroksisüksinimid reaktif grupları kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Peptidler antikor oluşturmak amacı ile immünizasyon için proteinlerle bağlanacağı zaman konjugasyon için spesifik bağlanma yöntemlerinin kullanılması, peptid dizilimine sistein eklenmesi gibi klasik yöntemlerden kaçınılması gerekmektedir (Deen vd., 1990; Acar, 2006).

2.6.1 BSA'nın Taşıyıcı Protein Olarak Kullanıldığı Çalışmalar

Mustafaev ve arkadaşları (2002a) tarafından yapılan ve düşük immünolojik özellikteki Betulin (B) molekülünün taşıyıcı protein olan BSA'ya % 90 verimle kovalent olarak bağlandığı çalışmada BSA*B konjugatları 1-etil3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür kullanılarak sentezlenmiştir. Suda çözünebilir özellikteki BSA*B konjugatlarının UV analizi sonucu agregat oluştuğu gözlemlenmiştir. HPLC analizinde elde edilen kromatogramda ise BSA'ya ait pik ve alıkonma zamanı 1 olarak gösterilirken 2 numaralı örnek BSA*B konjugatına aittir ve bu kromatogramda iki pik görülmüştür. Konjugatın alıkonma zamanının (RT)'da saf BSA'ya göre kaydığı gösterilmiştir. BSA*B konjugatına ait kromatogramdaki ilk pik konjugata ikinci pik ise ortamda bulunan ve reaksiyona girmemiş serbest BSA'ya ya da birkaç Betulin molekülüne bağlanmış BSA'ya aittir.



Şekil 2.34 Saf BSA ve BSA*B konjugatına ait (a) UV spektrumları (b) HPLC kromatogramları, (1=>BSA, 2 => BSA*B konjugatı).



Şekil 2.35 Saf BSA ve BSA*B konjugatına ait Fluoresans spektrumu, spektrumda 1 numaralı örnek BSA, 2 numaralı örnek ise BSA*B konjugatıdır (Mustafaev vd., 2002a)

Deen ve arkadaşlarının (1990) düşük orandaki hidroliz özelliğinden dolayı konjugasyon reaktifi olarak 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC)'i seçtikleri konjugasyon çalışmasında, taşıyıcı protein olarak içlerinde BSA'nın da bulunduğu çeşitli moleküllerin, sentetik peptidler (SP) ile konjugatları sentezlenmiştir. N-metil imidazol (NMI)'ün kullanıldığı konjugasyon reaksiyonundan elde edilen konjugatlar ile standart EDC bağlanma reaksiyonu karşılaştırılmış ve NMI'nin bağlanma reaksiyonu ve konjugatın immünojenliği üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda NMI ile oluşturulan konjugatların serbest peptidlere karşı daha spesifik immün cevaplar oluşturduğu saptanmıştır (Deen vd., 1990,).

2.7 Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

Zayıf immünojenik özellikteki sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, peptidlere karşı antikor üretiminde immünojenliği arttırmak için peptidler, proteinlerin yanı sıra lineer özellikteki polimerlere de bağlanabilmektedir. Poliakrilikasit (PAA), PoliN-isopropilakrilamit (NIPAA), PoliN-vinilprolidon (VP), Polivinilpiridin-Polisetilpiridin kopolimeri ve Polivinilpirilidon-Poliakrilikasit (VP-AA) kopolimerleri vb. genel olarak kullanılan lineer taşıyıcılardır ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar (Gürhan vd., 2002).

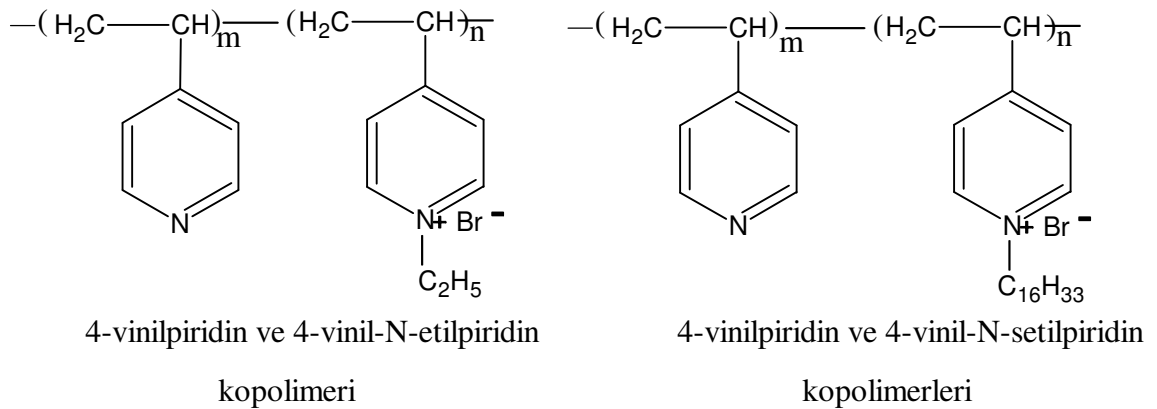
Konjugasyon bölgesi proteinlerde olduğu gibi peptid dizilimine bağlı olarak; dizinin N- ucu, C- ucu ya da içerisindeki bir nokta olabilir. Konjugasyon noktası karboksil (-COOH), amino (-NH₂) ya da sülfidril (-SH) uçları olabilir. Aşı olarak kullanıldığında önemli bir etki

oluşturan sentetik peptidler, haptenerler vb. moleküller spesifik antikor oluşturmak için günümüzde oldukça yaygın kullanılmaktadırlar. Ancak tedavi edici ajanların ve sentetik peptidlerin ya da haptenerlerin; düşük çözünürlüğü, kararsızlığı, küçük molekül boyutlarından dolayı antijenik özelliklerinin düşük olması, biyouyumlu ve spesifik olmayışı ya da toksisitesi gibi istenmeyen özellikleri onların etki yeteneklerini oldukça azaltmıştır. Ancak proteinlerin, antijenlerin ya da ilaç etken maddelerinin suda çözünebilir polimerler ile konjugatlarının oluşturulması, tedavi edici ajanların özelliklerini ve immünojenliğini önemli ölçüde değiştirmektedir. Antijenik peptidlerin suda çözünebilir polimere bağlanması çok yönlü etkilere sahiptir. Bunlardan bazıları;

- Peptidlerin modifikasyonu sağlamak,
- Hidrofobik özellikte olanların suda çözünebilirliğini arttırmak,
- Bölgesel etkilerini yükseltmek,
- İmmünojenik etkilerini ve immünoreaktifliklerini arttırmak ve
- Canlı organizmada daha uzun süre etkili olmasını sağlamaktır (Mustafaev ve Mustafaeva, 2002b)

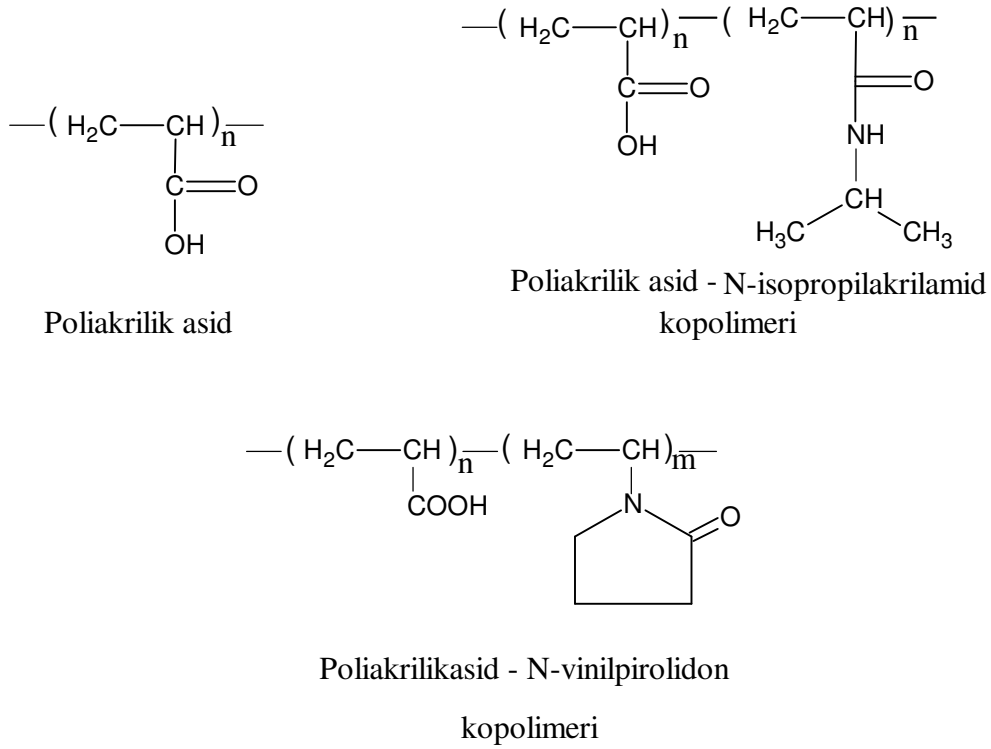
Polimerik konjugatların bu eşsiz özellikleri tedavi edici etkilerini de arttırmaktadır. Böylece klasik adjuvantlara en iyi alternatiflerden bir tanesi olarak da pozitif ya da negatif olarak yüklü, immünolojik olmayan sentetik polielektrolit kullanımıdır (Mustafaev, 1996a). Polimerik taşıyıcı olarak kullanılan bazı polielektrolitlerin genel gösterimi aşağıda verilmiştir (Mustafaev ve Mustafaeva, 2002b).

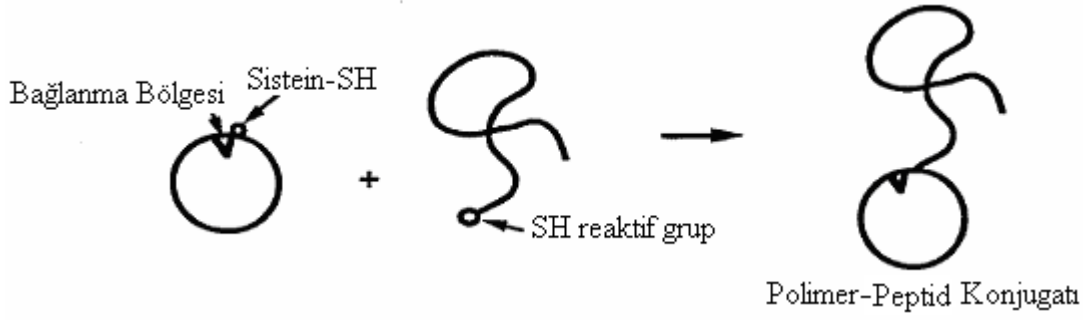
➔ Katyonik Polielektrolitler



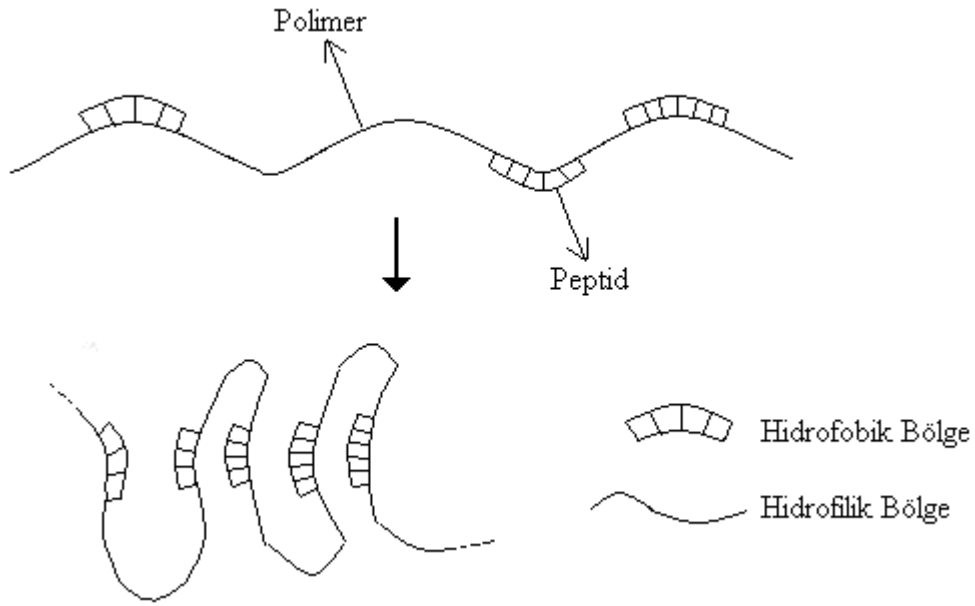
Şekil 2.36 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan Katyonik Polielektrolitler

→ Anyonik Polielektrolitler





Şekil 2.38 Sistein içeren peptidin polimerle oluşturduğu konjugatın şematik gösterimi (Hoffman, 2000)



Şekil 2.39 Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi (Mustafaev, 1996a, 2004)

Yukarıda anlatıldığı gibi karbodiimid kullanılarak peptidlerin taşıyıcı polimerlerle kovalent konjugasyonu sonucu sentezlenen konjugatların yüksek immünolojik özelliğe sahip olduğu Yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ve konjugatın yüksek immünolojik özelliğinin polimerin adjuvant etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir (Mustafaev, 2004).

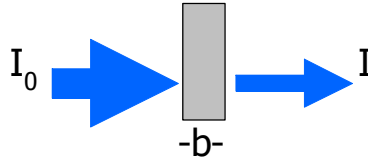
3. KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

3.1 UV-VIS Spektroskopisi

Tek renkli ve I_0 şiddetindeki ışık demeti kalınlığı 1 cm olan bir tüpte bulunan çözeltideki moleküller tarafından absorplandığında şiddeti azalır ve tüpü I şiddetinde terk eder. Bu azalma Lambert-Beer eşitliği ile ifade edilir.

$$\log I_0 / I = \epsilon bc = A \quad (3.1)$$

Burada c mol/l't cinsinden derişimi, ϵ lt/mol.cm cinsinden molar sönümlenme katsayısını ve b de cm cinsinden örnek kabının kalınlığını temsil etmektedir. A'ya ise absorbans ya da optik yoğunluk denir.



Şekil 3.1 Işık, c konsantrasyonunda, b cm kalınlığında bir ortamdan geçerken, absorpsiyon nedeniyle şiddeti I_0 'dan I'ya düşmüştür.

Geçirgenlik;

$$T = I/I_0 \quad (3.2)$$

Absorbans;

$$A = \log I_0/I \quad (3.3)$$

Absorbans ile derişim arasındaki bu ilişkiden analitik olarak yararlanılır. Ancak bu çalışmamızda proteinlerin belli dalga boyunda (280 nm) absorbans piki verdikleri gerçeğine dayanarak UV-VIS moleküler absorpsiyon spektroskopisi yöntemini tanıma amaçlı olarak kullanıldı. Ayrıca türbidimetrik titrasyon çalışmaları sırasında görünür bölgede 400 nm'de çözeltilerin absorbansını ölçmede kullanıldı.

3.2 FT-IR Spektroskopisi

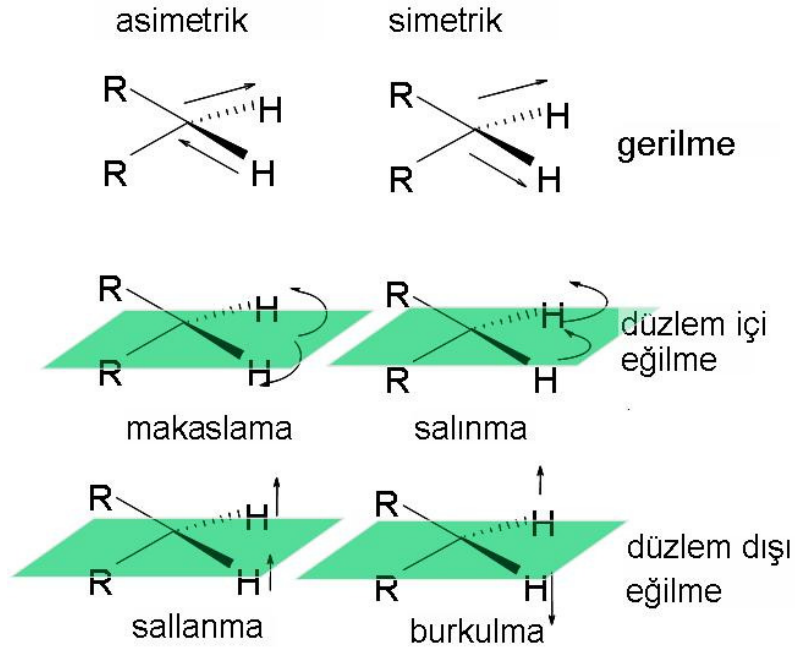
Elektromanyetik spektrumun dalga boyu $0.75\ \mu\text{m}$ ile $1000\ \mu\text{m}$ arasında kalan bölgeye *infrared bölgesi* adı verilir. İnfrared bölgesini, yakın ($0.75\ \mu\text{m}$ - $2.5\ \mu\text{m}$), orta ($2.5\ \mu\text{m}$ — $15\ \mu\text{m}$) ve uzak ($15\ \mu\text{m}$ — $1000\ \mu\text{m}$) infrared olarak üçe ayırabiliriz.

İnfrared absorpsiyon spektroskopisine titreşim spektroskopiside diyebiliriz Bunun sebebi infrared ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından absorplanmasıdır. Çünkü infrared ışıması UV ve görünür bölge ışıması gibi elektronik geçişleri sağlayacak kadar yüksek enerjili değildir. Ancak moleküldeki dönme ve titreşim düzeyleri arasındaki geçişleri sağlayabilir.

Bir molekülün infrared ışımasını absorplayabilmesi için dipol momentinde bir değişim olması gerekmektedir. Molekül üzerine gönderilen infrared ışımasının frekansı, molekülün titreşim frekansına eşit olduğu zaman ancak bir absorpsiyon söz konusu olabilir. Bunu HCl molekülü üzerinde açıklamaya çalışırsak Cl elektronegatif bir element olduğu için H-Cl arasındaki bağ elektronları Cl atomu tarafından çekilecektir. Yani simetrik bir yük dağılımı olmayacak, elektronlar Cl atomu etrafında yoğunlaşacaktır. Bu nedenle HCl, polardır ve net bir dipol momentten bahsedilebilir. O_2 , N_2 Cl_2 gibi homonükleer moleküllerde titreşim ve dönme hareketleri sırasında net bir dipol moment değişimi olmadığı için bu moleküller infrared ışımasını absorplayamazlar. Polar olmayan bağlar (organik moleküllerdeki C-C ve C-H bağlarının çoğu) zayıf soğurmaya neden olurlar. Buna karşılık, polar bağlar (C=O gibi) kuvvetli soğurma gösterirler.

Moleküllerin hareketlerini titreşim ve dönme olarak sınıflayabiliriz. Dönme hareketi, asimetrik bir molekülde, moleküllerin ağırlık merkezi etrafında dönmesiyle dipol momentte bir değişiklik olmasıdır.

Titreşim hareketi ise gerilme ve eğilme titreşimleri olarak ikiye ayrılır. Gerilme titreşimleri, iki atom arasındaki bağların simetrik veya asimetrik gerilmesi sonucunda (bağ uzaması veya kısalması) ortaya çıkmasıdır. Eğilme titreşimleri ise yana sallanma, makaslama, bükülme ve öne arkaya sallanma olarak 4'e ayırabiliriz.



Şekil 3.2 Moleküldeki titreşim hareketlerinin gösterimi.

Kovalent bağlarla bağlı atomların çekirdekleri bir yayla birbirine bağlı iki topunkine benzer şekilde titreşir ya da salınırlar. Moleküller infrared ışığı soğurdukları zaman, soğurulan enerji, bağlı atomların titreşim genliklerinde bir artmaya neden olur. O zaman molekül uyarılmış titreşim halindedir. Molekül temel hale dönerken soğurulan enerji ısı olarak açığa çıkar.

Bağların titreşim halleri, sabit ya da paketlenmiş enerji seviyelerinde oluşur. Belirli bir bağ türünün belirli bir dalgaboyundaki soğurması temel hal ve uyarılmış hal arasındaki enerji farkına bağlıdır. Bu nedenle, farklı bağ türleri (H-H, C-C, O-H ve diğerleri) infrared ışınını farklı karakteristik dalgaboylarında soğururlar.

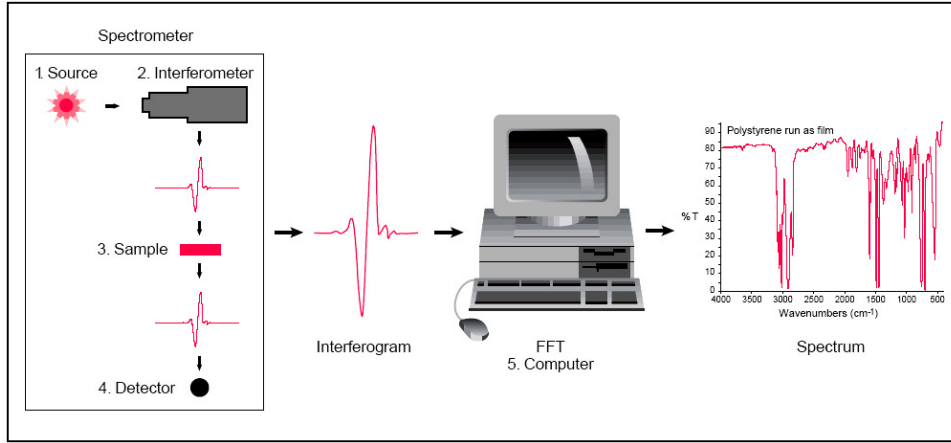
İnfrared spektrumlarının çoğu dalgaboyu ya da frekansı %T'ye karşılık verir. Bir moleküldeki bir bağ farklı salınımlar gösterebilir; bu nedenle belirli bir bağ birden fazla dalgaboyunda enerji soğurabilir. Örneğin bir O-H bağı 3300 cm^{-1} ($3.0\text{ }\mu\text{m}$) dolayında enerji soğurabilir. Bu dalgaboyundaki enerji O-H bağında artan gerilme titreşimlerine neden olur. O-H bağı 1250 cm^{-1} ($8.0\text{ }\mu\text{m}$) dolayında da soğurabilir; bu dalgaboyundaki enerji artan eğilme titreşimlerine neden olur. Bu farklı titreşim türleri farklı temel titreşim modları diye bilinir.



Şekil 3.3 CH_3OH 'daki gerilme ve eğilme titreşimleri.

Bir bağın soğurduğu enerji miktarı, bağ yapan atomlar titreştikçe bağ momentindeki değişikliğe bağlıdır. Bağ momentindeki daha büyük bir değişiklik daha büyük miktardaki enerji soğurmasıyla sonuçlanır.

Modern infrared düzenekleri spektrum elde etmek için hızlı bir Fourier analizi uygular ve Fourier transform infrared (FT-IR) spektrometreleri olarak bilinirler.



Şekil 3.4 Modern bir FT-IR spektrometresinin genel gösterimi.

İnfrared ışınımı iki demete ayrılır. Bir demet durağan kalırken, diğeri hareketli bir demet oluşturmak üzere hareketli bir aynaya yönelir. Daha sonra bu iki demet değişken bir demet elde etmek üzere birleşirler. Belirli bir dalga boyunda, değişken demette ya daha çok ışık enerjisi (yapıcı girişim) ya da daha az ışık enerjisi (yıkıcı girişim) olacaktır. Değişken demet örnekten geçirilir, sayısal hale getirilir ve bir bilgisayarla infrared spektruma Fourier-dönüştürümlü hale getirilir.

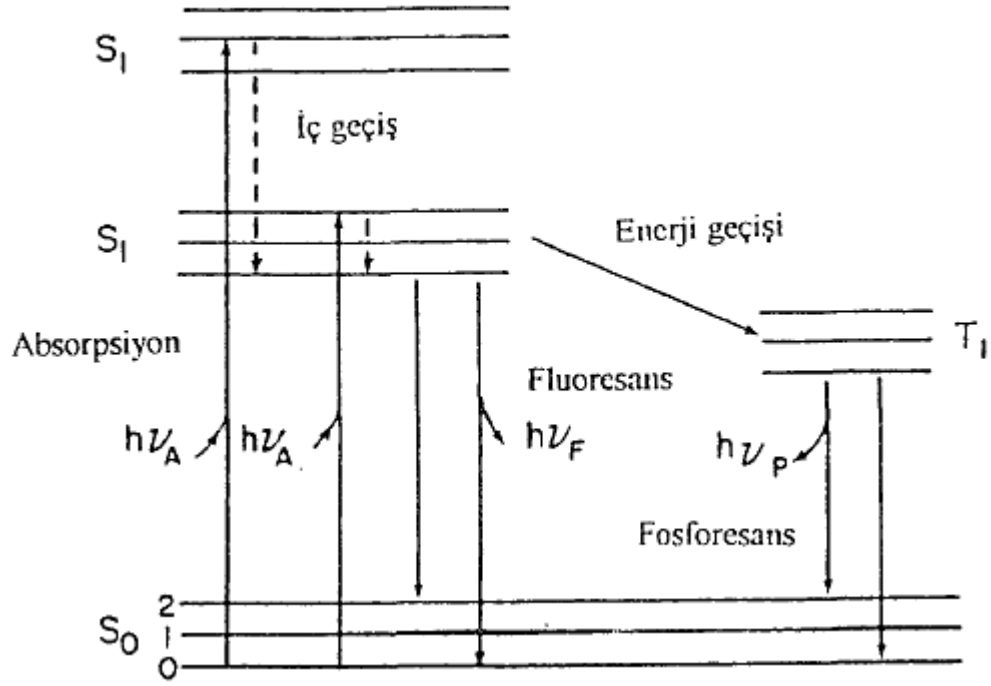
3.3 Fluoresans Spektroskopisi

Bir molekülün enerjisi, elektronik (E_o), vibrasyonal (E_v) ve rotasyonal (E_r) enerjilerin toplamından oluşmaktadır. Her bir elektronik enerji seviyesi bir seri vibrasyonal seviye bulundurmaktadır. Vibrasyonal seviyeler de birbirine oldukça yakın olarak yer alan rotasyonal seviyeler içermektedir. Genel bir kural olarak, oda sıcaklığında moleküllerin çoğunun temel elektronik halin en düşük vibrasyonal seviyelerinde bulunduğu kabul edilmektedir. Moleküler orbitalde spinleri antiparalel olarak yerleşmiş elektron çiftinin durumu singlet hal olarak adlandırılır. Bu elektronların spinlerinin paralel olduğu durum ise triplet hal şeklinde ifade edilmektedir.

Işık enerjisi absorplandığında temel hal S_o 'dan yukarı doğru enerji geçişleri meydana gelmektedir. Absorpsiyon spektrumunda birbirine çok yakın olarak yer alan rotasyonal seviyeler arası geçişler algılanamaz. Bazı moleküllerde vibrasyonal seviyelerin yerleşimi çok karmaşık değildir. Bu moleküllerdeki vibrasyonal seviyeler absorpsiyon spektrumunda bir seri maksimum noktası şeklinde izlenebilir.

Herhangi uyarılmış (excite) halin üst vibrasyonal seviyelerinde bulunan bir elektron, fazla vibrasyonal enerjisini çevresindeki moleküller ile çarpışma sırasında verebilir. Bu işlem vibrasyonal relaksasyon olarak adlandırılmaktadır. Bir molekülün, yüksek elektronik seviyenin düşük vibrasyonal seviyesinden, düşük elektronik seviyenin üst vibrasyonal seviyelerine geçişi ise "iç geçiş"(vibrational relaxation) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 3.5). Kural olarak molekülün en düşük uyarılmış hali S_1 'in, en düşük vibrasyonal seviyesine geçişi gerçekleşir. S_1 uyarılmış halde kalma süresi (lifetime of S_1 state) 10^{-9} s dolayında iken daha üst seviyelerde 10^{-12} s kadar olmaktadır.

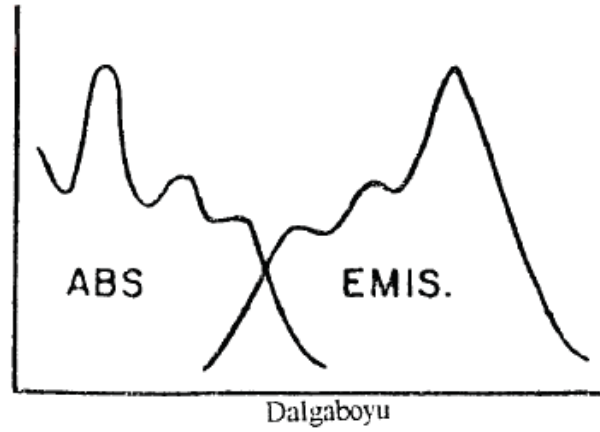
Uyarılmış singlet hal S_1 'in en düşük vibrasyonal seviyesinden temel hal S_o 'ın herhangi vibrasyonal-rotasyonal seviyelerine geçişte verilen emisyon fluoresans olarak adlandırılmaktadır. Triplet halden temel hale geçişte oluşan emisyon ise fosforesans denilmektedir (Şekil 3.5). Fluoresans maddenin uyarılmış halde kalma süresi fluoresans ömrü (lifetime) şeklinde isimlendirilir. Emisyonun yüksek hızda gerçekleştiği fluoresansta ömür 10^{-8} s-10ns kadardır. Fosforesansta emisyon fluoresansa göre daha uzun sürede gerçekleşmekte ve ömür milisaniye düzeyinde olmaktadır (Lakowich, 1986; Demchenko, 2000).



Şekil 3.5 Jablonski Diyagramı

3.3.1 Ayna Görüntüsü Kuralı

Bir molekülün absorpsiyon spektrumu elektronik olarak uyarılmış halin vibrasyonel seviyelerini yansıtmaktadır. Genellikle elektronik uyarma vibrasyonel seviyelerin yerleşim durumunu değiştirmedüğinden, emisyon spektrumu molekülün absorpsiyon spektrumunun ayna görüntüsüne çok yakındır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Fluoresans emisyonunda ayna görüntüsü

3.3.2 Stokes Kanunu

Enerjide meydana gelen kayıp nedeniyle, fluoresansın dalga boyu uyaran (excitation) ışığın dalga boyundan daima daha büyüktür. Kural olarak buhar fazındaki atomlar hariç, absorpsiyona göre emisyonda daima daha düşük dalga boylarına doğru bir kayma izlenir. Bu durum ilk defa 1852 yılında Stokes tarafından izlendiği için “Stokes shift” adını almıştır. Solvent etkisi ve uyarılmış halde gerçekleşen reaksiyonlar nedeniyle Stokes shift daha kapsamlı boyutta gerçekleşebilir (Lakowicz, 1986; Demchenko, 2000).

Stokes shiftinin, indol molekülleri çevresinde yer alan çözücü moleküllerinin yerleşim düzeninin eksite halde hızla değişerek farklı bir durum almasından ileri geldiği sonucuna varılmıştır (Szabo ve Rayner, 1980).

3.3.3 Fluoresans Ömrü ve Kuantum Verimi

Kuantum verimi birim zamanda, “steady-state” sistemde yayınlanan foton sayısının, absorplanan foton sayısına oranına denir. Hız sabitleri Γ ve k uyarılmış hali azaltır. Kuantum verimi,

$$\phi = \Gamma / (\Gamma + k) \quad (3.4)$$

formülü ile ifade edilmektedir.

Fluoresans emisyonundaki duruma benzer örnek oluşturan radyoaktif bozunmada deaktivasyonun radyasyon hızı, radyoaktif bozunma hızından daha küçük ise ($k \ll \Gamma$) kuantum verimi 1'e yaklaşabilir. Hesaplamalarda kolaylık sağlaması açısından tüm olası bozunma prosesleri tek hız sabiti k ile ifade edilerek, tek bir grup olarak değerlendirilmektedir.

Fluoresans ömrü (lifetime) ise, molekülün uyarılmış halde kaldığı ortalama süredir. Genellikle bu süre 10ns dolayındadır. Ömür,

$$\tau = 1 / (\Gamma + k) \quad (3.5)$$

eşitliği ile verilmektedir.

Bazı moleküller $t = \tau$ anında fotonlarını yayarlar. Bir tek eksponensiyel bozunmada $t = \tau$ 'den önce molekülün % 63 'ü ve $t > \tau$ anında da % 37'si değişime uğramaktadır.

Fluoresans emisyonu gerçekleşirken, ışıma dışında iç geçişler v.b. ile enerji kayıpları

meydana gelmediğinde hesaplanan fluoresans ömrüne “intrinsic” fluoresans ömrü denir ve

$$\tau_0 = 1 / \Gamma \quad (3.6)$$

formülü ile ifade edilir. Kuantum verimi ile fluoresans ömrü arasındaki bağlantı ise

$$\phi = \tau / \tau_0 \quad (3.7)$$

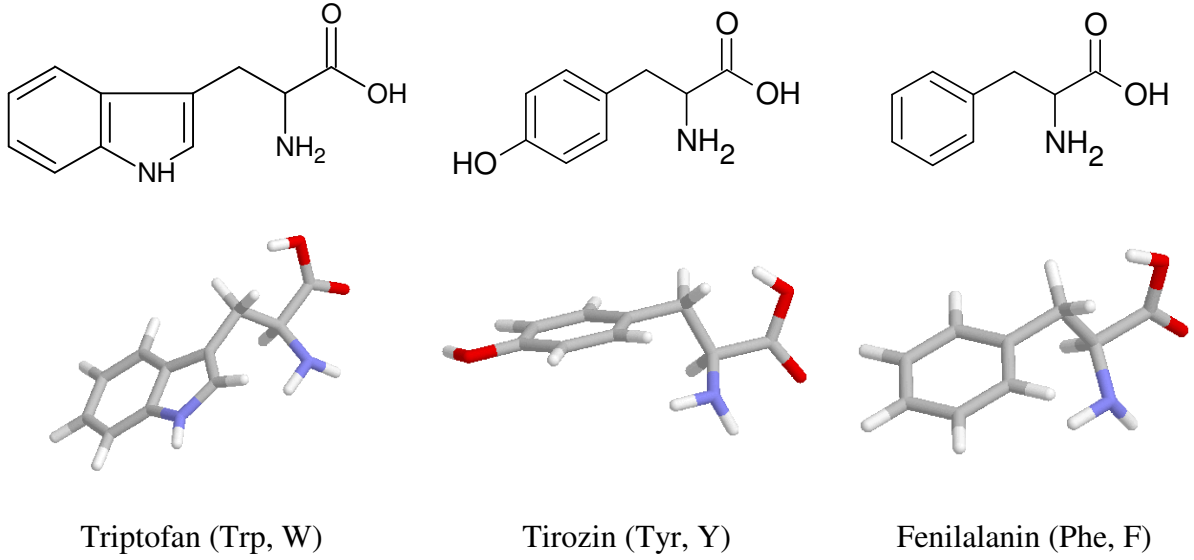
formülü ile verilmektedir (Lakowicz, 1986).

Kuantum verimi, oda sıcaklığındaki sıvı çözeltide son derece küçük değerdedir. Triplet halden singlet hale geçişler simetri nedeniyle engellenmiştir ve emisyon hızı yaklaşık 10^3 dak^{-1} veya daha küçük olmaktadır. k değeri yaklaşık 10^9 dak^{-1} olduğundan fosforesans kuantum verimi de oda sıcaklığında düşük değerdedir (Lakowich, 1986; Demchenko, 2000).

Triptofan ve triptofan türevlerinin fluoresans bozunmaları (decay) tek eksponensiyal kinetik tarzına uymaktadır. Triptofanın 20°C 'de fluoresans ömrü (lifetime) yaklaşık 3ns kadardır. Tek foton sayma fluoresans teknikleri (single photon counting fluorescence techniques) ile elde edilen sulu çözeltilerdeki triptofanın fluoresans bozunma grafiklerinden fluoresans ömrünün hesaplanmasında, iki eksponensiyal kinetikler kullanılmıştır. Bu şekilde 335 nm'deki maksimum emisyon ile ilk lifetime 0,5 ns, 350 nm'deki maksimum ile diğer lifetime 3,1 dolayında bulunmuştur. Birden fazla triptofan içeren proteinlerde multi eksponensiyal kinetikler kullanılmaktadır ve bileşenlerin değeri dalga boyuna bağlıdır (Szabo ve Rayner, 1980).

3.3.4 Protein ve üçlü Polimer-Metal-Protein Moleküllerinin Fluoresans Özelliklerinden Yararlanılarak İncelenmesi

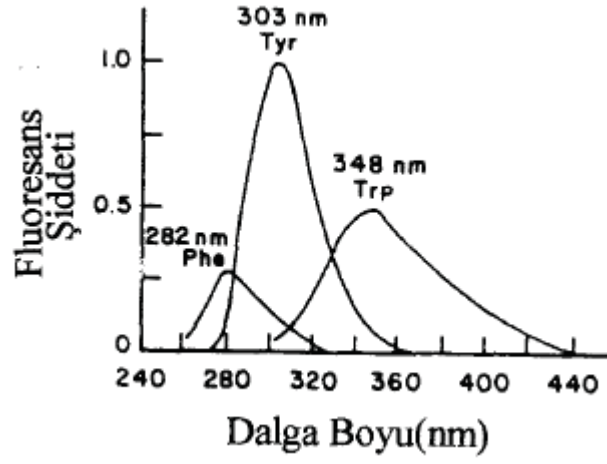
Spektroskopi, elektromagnetik dalga ile moleküllerin etkileşmesini inceleyen deneysel tekniklerin en önemlilerinden biridir. Fluoresans spektroskopisi ise maddenin fluoresans özelliği üzerine kurulmuştur ve absorpsiyon spektroskopisine benzemektedir ancak absorpsiyon spektroskopisine göre daha hassastır. Fluoresans spektroskopisi ile birçok madde milyonda birin altındaki hassasiyetle tayin edilebilir. Fluoresans özelliği gösteren maddelerin sayısının az olması yöntem için bir dez avantaj olsa da metodun seçiciliğinin yüksek olması yöntemin önemli avantajlarından bir tanesidir. Proteinlerin ve peptidlerin yapısında bulunan amino asitlerden Triptofan (Trp, W), Tirozin (Tyr, Y) ve Fenilalanin (Phe, F) fluoresans özellik gösterirler. Bunların içinde Triptofan en yüksek fluoresansa sahip amino asittir.



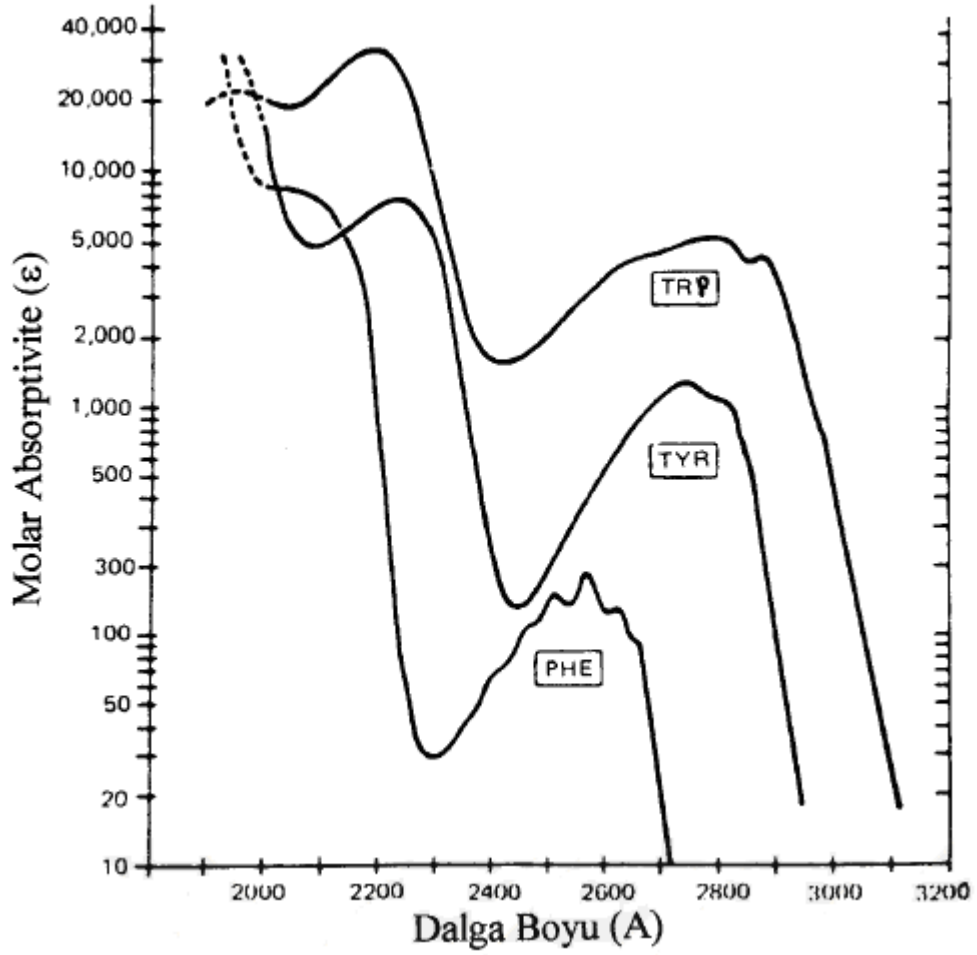
Şekil 3.7 Floresans özellik gösteren aminoasitler

Bu aminoasitlerin absorpsiyon spektrumları Şekil 3.9'de gösterilmiştir. Ancak proteinlerde fenil alaninin kuantum verimi düşük değerde olduğundan, bu aminoasit artığından ileri gelen emisyon ihmal edilebilir olarak alınır. Floresans vermesi için proteinler genellikle 280 nm dolayında dalga boyunda ışık ile uyarılmaktadırlar. Proteinlerin 280 nm'de absorpsiyonu tirozin ve triptofan artıklarından ileri gelmektedir. Proteinlerde yalnızca triptofanın verdiği floresansı elde etmek için 290 nm'den büyük dalga boyunda uyarma yapılmalıdır (Şekil 3.8, Şekil 3.9).

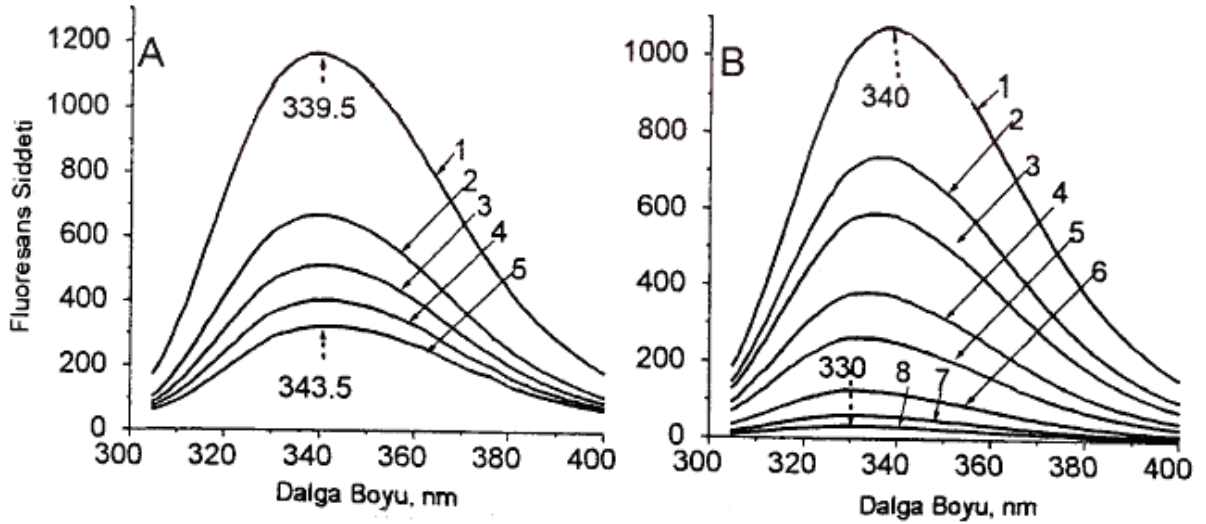
Floresans spektroskopisi protein molekülünün çözeltideki durumu hakkında bilgi vermektedir. Proteinlerin verdiği floresans çözeltinin pH değeri, çözücünün dielektrik sabiti, sıcaklık gibi faktörlerden etkilenmektedir. Alınan floresans spektrumları, protein moleküllerinin substrat ile etkileşimi, elektron alışverişi, birleşme reaksiyonları, denatürasyon v.b. izlenmesine de olanak tanımaktadır (Lakowicz, 1986).



Şekil 3.8 Aromatik aminoasitlerin fluoresans emisyon spektrumları



Şekil 3.9 Aromatik aminoasitlerin absorpsiyon spektrumları



Şekil 3.10 BSA (A) ve PE(N-izopropilakrilamit-akrilik asit kopolimeri 1:1) + BSA karışımı (B) çözeltilerine farklı konsantrasyonda Cu²⁺ eklenmesi sonucu elde edilen fluoerans spektrumu. Cu²⁺ konsantrasyon (mM): 1) 0; 2) 0,15; 3) 0,3; 4) 0,45; 5) 0,6; 6) 0,9; 7) 1,2; 8) 1,5 (Filenko vd., 2001).

BSA'nın iki tane triptofanı vardır, birincisi sınıf 2 ($\lambda_{\max}=340-342$ nm ve yarı genişlik $\Delta\lambda = 53-55$ nm) BSA'nın hidrofobik yarı bölgesinde vardır. İkincisi ise sınıf 3 ($\lambda_{\max}=350-352$ nm yarı genişlik $\Delta\lambda = 59-61$ nm) düşük kuantum verimli (BSA'nın toplam fluoeransının 1/5'ini teşkil eder), sulu çözücü tarafından erişilebilir triptofandır (Burstein vd., 1973).

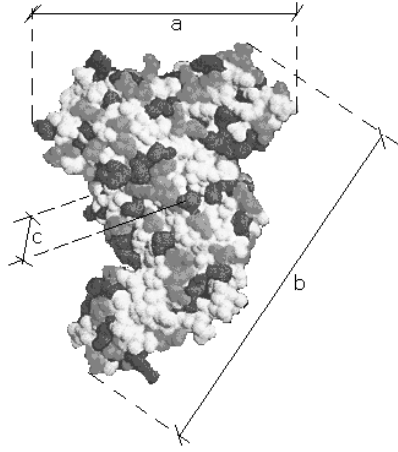
Şekil 3.10 A'da BSA'nın fluoerans şiddeti Cu²⁺ iyon konsantrasyonu arttıkça düşüyor. Bu demek oluyor ki BSA ile Cu²⁺ iyonları etkileşime giriyor. Ayrıca dalga boyu artıyor (kırmızı bölgeye doğru kayıyor). Burada çok az etki altındaki sınıf 2 triptofan söndürülmesi arka plandadır, asıl olan sınıf 3 triptofan söndürülüyor. Sonuç olarak sınıf 3 triptofan BSA içinde etkin olan triptofandır ve metal ilavesi ile BSA'nın emisyon spektrumu uzun dalga boyuna kayar. Şekil 3.10 B'de ise PE-BSA karışımına Cu²⁺ iyon konsantrasyonu ilavesi arttıkça fluoerans şiddeti düşer ve dolayısıyla üçlü kompleks oluşumu sağlanmış olur. Dalga boyu ise düşer (mavi bölgeye kayar). Buradan çıkan sonuç ise polimer proteini sarmalamıştır ve suda çözünen kararlı üçlü PE-Me⁺ⁿ-BSA kompleksi oluşmuştur (Filenko vd., 2001).

3.4 Dinamik Işığın Saçılması Tekniğı ile Parçacık Boyut Analizi

3.4.1 Eşdeğer Küre Teoremi

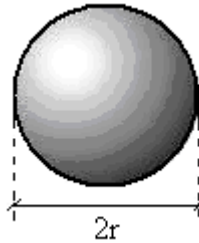
Moleküllerin veya daha genel olarak parçacıkların boyutlarını ölçmek için çeşitli teknikler vardır. Bununla birlikte böyle bir tekniğı geçmeden önce, bir parçacığın boyutu ifadesiyle neyin kastedildiğini iyi anlamak gerekir. Parçacık boyutunun ne olduğunun parçacık analizinde farklı yanıtları vardır (Rawle). Örneğın bir kibrit kutusunun boyutları bir cetvel yardımıyla ölçülsün. Ölçüm sonucu olarak kutu 4 cm x 2 cm x 1 cm'dir denilebilir. Fakat sadece 4 cm'dir denilirse pek doğru olmaz; zira bu, gerçek boyutların sadece bir tanesidir. Bu durum, bir kum tanesi veya proteinler gibi karmaşık şekilli parçacıklar için daha da karışık, çünkü boyut olarak verilebilecek sayıların miktarı daha da artmaktadır. Örneğın Şekil 3.11'da üç boyutlu yapısı görülen BSA'nın her bir amino asidi bir köşe kabul edilirse, her iki amino asit arası uzaklık BSA'ya ait bir boyut belirleyecektir. Şekilde bunlardan sadece üç tanesi örnek olarak gösterilmiştir ancak onlarcası daha vardır. Benzer olarak, üç boyutlu şekilleri sadece tek bir sayıyla belirtmek mümkün değildir. Oysa pratikte tek bir sayı istenir ki ilgilenilen süreçte parametre olarak sadece bu sayı kullanılsın. O halde çok miktardaki bu sayılardan hangisinin seçileceğine karar vermek gerekir.

Diyelim 100 tane kibrit kutusunun boyutlarının ölçülmesi istensin. Birkaç saat uğraşılsa da sonunda hepsinin boyutları tek tek ölçülebilir ve hatta ortalama değerleri hesaplanabilir. Oysa bir fabrikada bu kutulardan binlercesi üretilir ve fabrika müdürünün üretilen kutuların ortalama boyutlarını bilmek istediğini düşünürsek bu iş nasıl yapılabilir? Teker teker ölçmek mümkün olsa da bu çok zaman alacaktır. İlgilenilen nesneler molekül veya parçacık düzeyine indiğinde işler bir kez daha zorlaşır, çünkü ilgilenilen sistemde bu boyutlardaki parçacıklardan milyarlarçası bulunur! Örneğın, eğer tüm parçacıklarının çapı 1µm olsa, yoğunluğu 2,5 g/cm³ olan silikanın 1 gramında yaklaşık 800 milyar tane parçacık bulunur (Rawle). Şu halde bu kadar çok parçacık nasıl ölçülmelidir?



Şekil 3.11 BSA proteininin üç boyutlu yapısı görülmektedir. Proteini oluşturan her bir aminoasidi bir köşe olarak kabul edersek, herhangi uzak iki köşeyi birleştiren bir doğru BSA'ya ait bir boyut olacaktır.

Çok miktardaki boyutlardan hangisini kullanmak gerektiği sorusu, bu noktada ölçme tekniğiyle ilgili bir soruna dönüşmüş olur. Her ne kadar mikroskopla parçacıklar görünür hale getirilebilir ve dolayısıyla boyutları ölçülebilir olsa da, milyarlarca parçacık tek tek incelenemez, bu iş aylar hatta yıllar sürebilir. Demek ki bir şekilde hem çok sayıdaki parçacık uygun bir sürede ölçülebilmelidir, hem de boyut olarak iyi tanımlanmış mantıklı bir sayı seçilmelidir. İşte bunun için eşdeğer küre teoremi kullanılmaktadır. Eşdeğer küre teoremi, parçacığın boyutları dışında başka bir özelliğinin ölçülmesi ve bu parçacığın gerçek şekli ne olursa olsun, parçacığı küreymiş gibi varsayarak ölçülen özellikten parçacık çapının hesaplanmasıdır. Parçacığı küre varsaymanın nedeni ise, tek bir sayıyla tam olarak ifade edilebilen tek şeklin küre olmasıdır. Kürenin çapı bilirse, yüzey alanı ve hacim gibi diğer özellikleri de hesaplanabilmektedir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 Bir kürenin $2R$ çapı bilindiğinde yüzey alanı ve hacmi gibi diğer özellikleri hesaplanabilmektedir: yüzey alanı $= 4\pi R^2$, hacim $= (4/3)\pi R^3$.

Eşdeğer küre teoreminin kullanılarak parçacık boyutunun hesaplanabilmesi için parçacığın başka bir özelliğinin ölçülmesi gerekir ki bunun için değişik yöntemler geliştirilmiştir.

Örneğin lazer difraksiyonu, mikroskop, sedimentasyon ve ışık saçılması (Rawle). Her bir teknik, parçacıkların farklı bir özelliğini ölçmekte olup buna bağlı olarak her bir teknikle hesaplanan parçacık boyutu diğerlerinden bir miktar farklılık gösterir. Bu tez çalışmasında, dinamik ışık saçılması tekniği kullanılmıştır.

3.4.2 Dinamik Işık Saçılması

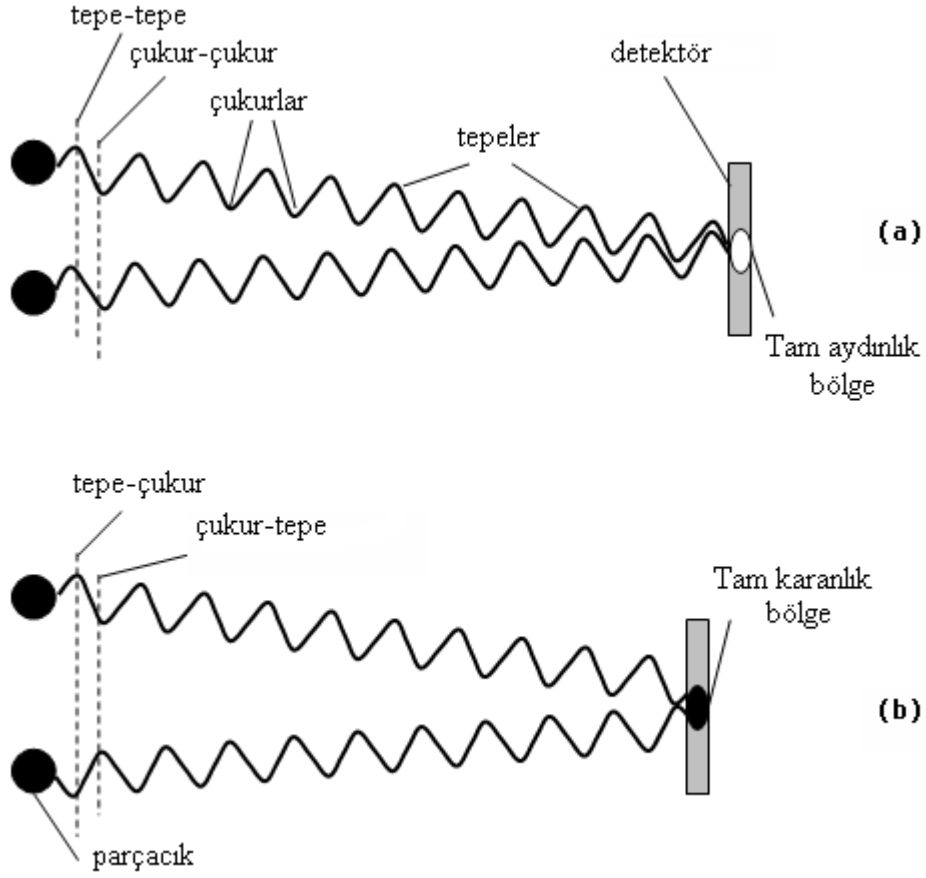
Bir çözelti içinde çözünmüş halde bulunan parçacıkların boyutunu ölçmek için kullanılan tekniklerden bir tanesi dinamik ışık saçılmasıdır. Bu tekniğe farklı isimler verilmiştir ancak hepsi de aynı yöntemi ifade etmektedir:

- Dinamik Işık Saçılması (Dynamic Light Scattering - DLS)
- Foton Korelasyon Spektroskopisi (Photon Correlation Spectroscopy - PCS)
- Yarı Elastik Işık Saçılması (Quasi-Elastic Light Scattering - QELS)

DLS tekniğinde, parçacıklarda Brownian hareketi sonucu görülen hız değişimleri dolaylı olarak ölçülür ve bu bilgidен boyut hesaplanır. Brownian hareketi, bir sıvı ortam içindeki parçacıkların, çevredeki diğer parçacıkların bombardımanı (sürekli çarpışmaları) sonucu yaptıkları rastgele harekettir (Zetasizer Nano Series User Manual, 2005). DLS tekniğinin kullanılabilmesi için Brownian hareketinin varlığı bir şarttır ve Brownian hareketin olmadığı sistemlerde DLS tekniği kullanılamaz!

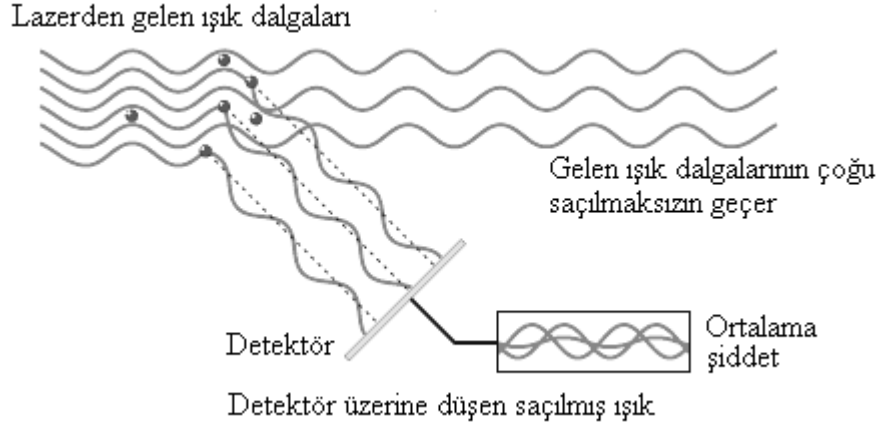
DLS tekniğinde, numune üzerine lazer ışığı gönderilir ve numune içindeki parçacıklardan saçılan ışık bir detektör üzerine düşürülür. Farklı yönlerde saçılan ışığın girişim yapması sonucu detektör üzerinde bir girişim deseni ortaya çıkar. Girişim, iki ya da daha fazla dalganın bir noktada üst üste gelmesi sonucu, dalgaların birleşerek tek bir dalga gibi davranması olayıdır (Hecht, 1999). Girişim sonucu dalgalar birbirini kuvvetlendirebilir ki buna yapıcı girişim denir veya birbirlerini zayıflatabilirler ki bu duruma da yıkıcı girişim denir. İki ışık dalgasının yapıcı girişime uğradığı nokta daha aydınlık olur; yıkıcı girişim olan nokta ise daha karanlık olur. Şekil 3.13'te sadece iki parçacıktan saçılan ışınların bir detektör üzerine düşmesi ve burada aydınlık veya karanlık bölgelerin oluşması gösterilmiştir; Şekil 3.13 (a)'daki dalgaların tepeleri ve çukurları ayrı ayrı birbirlerinin karşısında yer almakta ve böylece yapıcı girişim oluşmaktadır. Yapıcı girişim sonucu detektörün o bölgesi aydınlık görülür. Şekil 3.13 (b)'deki dalgalarda ise tepelerin karşısında çukurlar, çukurların karşısında tepeler yer almaktadır. Sonuçta yıkıcı girişim meydana gelir ve detektörün o bölgesi karanlık görülür. Şekildeki bölgeler tam aydınlık ve tam karanlık olarak gösterilmiştir. Ama çoğu zaman dalgalar girişim yaptığında ne birbirlerini tam olarak kuvvetlendirirler ne de tam olarak

sönümlerler, sonuçta da tam aydınlık ve tam karanlık bölgeler yerine aradaki tonlar oluşur.



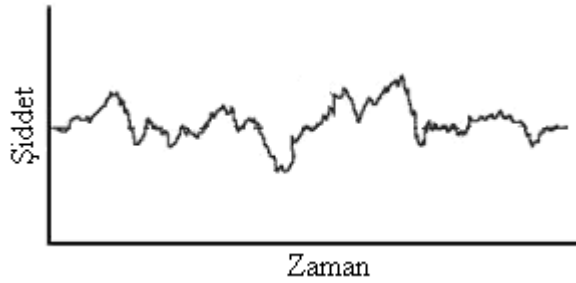
Şekil 3.13 İki parçacıktan saçılan ışınların, detektör yüzeyinde yaptıkları girişim görülmektedir. (a)'da yapıcı girişim sonucu aydınlık bölge, (b)'de ise yıkıcı girişim sonucu karanlık bölge oluşmuştur.

Şekil 3.14'te çok sayıda parçacıktan saçılan ışınların oluşturduğu bir desen görülmektedir. Bir lazer kaynağından gelen ışık, çözelti içindeki parçacıklardan saçılmaya uğrarken gelen ışık dalgalarının çoğu saçılmadan geçse de bir kısmı parçacıklardan saçılarak detektör üzerine düşer.



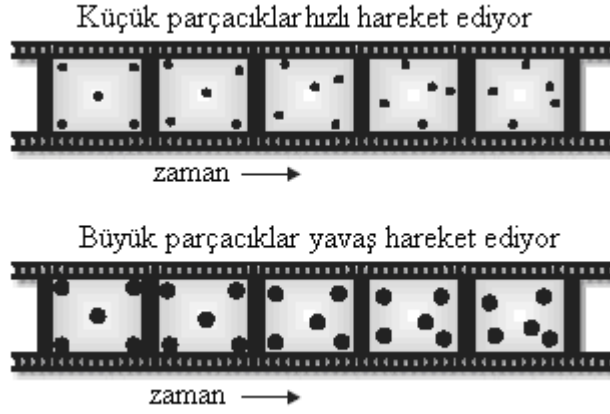
Şekil 3.14 Bir lazer kaynağından gelen ışık dalgalarının çözelti içindeki parçacıklardan saçılması.

Işığın şiddeti, detektör üzerinde belli bir anda belli bir değerdedir. Parçacıklar Brownian hareketi sonucu sürekli hareket ettiklerinden, saçılan ışık da sürekli değişir. Saçılan ışığın değişmesiyle girişim sonucu detektör üzerindeki ışık şiddeti de sürekli değişir. Bu nedenle detektörün algıladığı ışık şiddetinin zamana bağlı bir grafiği çizilirse, ışık şiddetinin zamanla değiştiği görülür (Şekil 3.15).



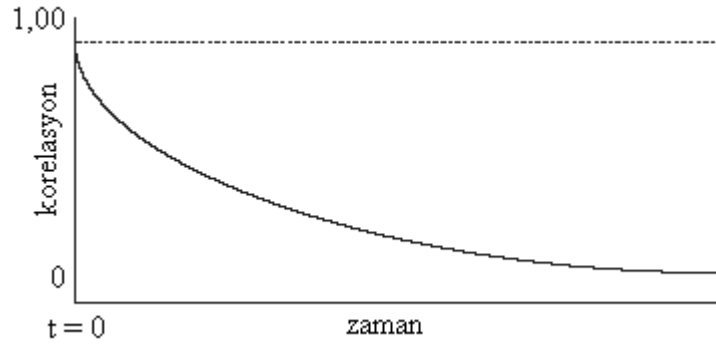
Şekil 3.15 Detektörün ölçtüğü ışık şiddetinin zamana bağlı grafiği.

Brownian hareketi nedeniyle hareket etmekte olan parçacıklar için şöyle bir kural vardır: Daha küçük parçacıklar, daha büyük olanlarına kıyasla daha hızlı hareket ederler (Einstein, 1905). Örneğin eşit zaman aralıklarıyla bakıldığında, bir çözeltideki daha küçük parçacıklar daha büyük olanlara kıyasla daha hızlı hareket ettiklerinden daha çok yer değiştirirler (Şekil 3.16).



Şekil 3.16 Eşit zaman aralıklarıyla bakıldığında, bir çözeltideki daha küçük parçacıklar daha büyük olanlara kıyasla daha hızlı hareket ettiklerinden daha çok yer değiştirirler.

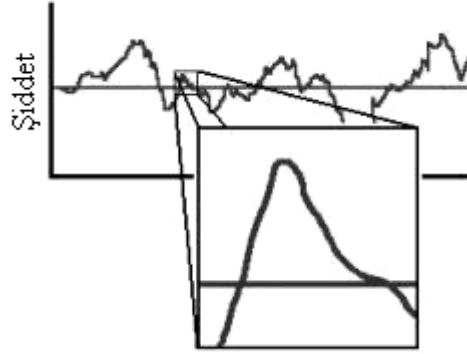
Şekil 3.16'daki komşu iki karedeki görüntüler birbirine ne kadar benziyorsa, aralarındaki korelasyon (uyum) o kadar yüksek demektir. Korelasyonun zamana bağlı bir grafiği çizilirse, $t = 0$ anında korelasyon 1 olacaktır ve zaman geçtikçe azalarak bir süre sonra sıfıra gidecektir (Şekil 3.17). Parçacıklar için korelasyonun tamamen bozulması (yani sıfırlanması) için gerekli süre mili saniyeler mertebesinde.



Şekil 3.17 İki görüntü tamamen aynıken korelasyon tam 1'dir, zaman geçtikçe azalır ve mili saniyeler sonra sıfıra iner. Dolayısıyla görüntüler arasında hiçbir benzerlik kalmaz.

DLS tekniğinde, parçacıkların Brownian hareketinden dolayı yaptıkları hareketi ölçmek için saçılan ışığın detektörde algılanan ışık şiddetinin değişmesine bakılır. Parçacıklar ne kadar küçükse saçılan ışığın şiddetinde görülen değişimler de o kadar hızlı olur. Şiddet-zaman grafiğine büyük ölçekte bakıldığında, bir rastgelelik olduğu gözlenir. Fakat küçük zaman aralıklarında bakıldığında, değişimin düzgün ve sürekli olduğu görülür. Yani, parçacıklar ilk konumlarına göre çok az yer değiştirmişlerdir ve bir parçacığın başlangıç anındaki konumu

geriye gidilerek bulunabilir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18 Saçılan ışığın şiddetinin zamana bağlı grafiğinde büyük ölçekte bakıldığında rastgelelik görülürken, küçük zaman aralıkları için değişim düzgün ve sürekli.

DLS tekniğinde, ışık saçılmasıyla oluşan ışık şiddetinin zamanla değişmesi ölçülerek ham veri elde edilir. Bu ham veri kullanılarak boyuta geçmek için çeşitli hesap yöntemleri vardır. Bu hesap yöntemlerinden bazıları şöyledir: NNLS (Lawson ve Hanson, 1974; Morison vd., 1985), kümülan analizi (Koppel, 1972), CONTIN (Provencher, 1982), REPES (Jakes, 1995) vb.

3.4.3 Kümülan Analizi

Kümülan analizi yöntemi ile iki parametre hesaplanır: ortalama parçacık boyutu (hidrodinamik çap) ve çoklu dağıtıklılık indisi* (Çİ). Tipik bir DLS deneyinde araştırılan dağıtma, dar monokromatik ve uyumlu bir kaynakla aydınlatılır, yani vakumda tek dalgaboylu (λ_0) bir lazer demetiyle. Dağılmış parçacıklar tarafından saçılan ışık, gelen radyasyon doğrultusuna göre bir θ açısında uyumlu olarak ölçülür. Dağılmış parçacıklar Brownian ve/veya termal hareketlerinde sürekli oldukları için, gözlenen saçılmış şiddet $I(t)$ zamanla dalgalanmalar gösterecektir. Bu yüzden, bu şiddet dalgalanmalarının zamanın fonksiyonu olarak analizi dağılmış parçacıkların hareketi hakkında bilgi sağlayacaktır. Bir DLS deneyinde zaman analizleri, saçılma şiddetinin $G_2(\tau)$ otokorelasyon fonksiyonunu;

$$G_2(\tau) = \langle I(t).I(t + \tau) \rangle \quad (3.8)$$

şeklinde oluşturan bir korelatörle gerçekleştirilir (ISO Standard Document 13321:1996 E,

* İngilizcesi: polydispersity index (PDI).

1996). Bu korelasyon fonksiyonu sadece zaman farkı τ 'ya bağlıdır ve $G_2(\tau)$ değerlendirmesinin başladığı keyfi seçilen t zamanından bağımsızdır. $\langle \dots \rangle$ sembolü değişik t zamanlarındaki $I(t).I(t+\tau)$ çarpımının ortalama değerini gösterir. V ölçme hacmindeki Brownian hareketi yapan çok sayıdaki tek cins dağılmış parçacıklar için, $G_2(\tau)$ aslında zaman farkı τ 'nın üstel bozulma fonksiyonudur.

$$G_2(\tau) = A.[1 + B.\exp(-2\Gamma\tau)] \quad (3.9)$$

Prensipte, (3.9) eşitliğindeki A , burada taban çizgisi olarak adlandırılan zaman ortalamalı saçılma şiddeti $\langle I \rangle$ 'nin karesi ile orantılı ve zamandan bağımsız bir sabittir. B , $B \leq 1$ şartıyla cihaz faktörü olarak göz önüne alınabilir. Bu faktör, otokorelasyon faktörünün keşişmesi olarak tanımlanabilir. Bozulma hızı Γ , Brownian hareketi yapan izotropik küresel parçacıkların ötelenme difüzyon katsayısı D 'ye aşağıdaki gibi bağlıdır.

$$\Gamma = Dq^2 \quad (3.10)$$

burada q saçılma vektörünün modülüdür.

$$q = \frac{4\pi.n}{\lambda_0} \sin(\theta/2) \quad (3.11)$$

saçılma vektörü, gelen ve saçılan dalga vektörleri sırasıyla, $\mathbf{k}_i$ ile $\mathbf{k}_s$ 'nin arasındaki vektör farkı olarak tanımlanır: $\mathbf{q} = \mathbf{k}_s - \mathbf{k}_i$. $\mathbf{k}_i$ ve $\mathbf{k}_s$ 'nin her ikisinin büyüklükleri $2\pi n/\lambda_0$ 'a eşittir. Burada n , süperpozisyon sıvısının kırılma indisidir. DLS ile parçacık boyutu değil difüzyon katsayısının tayin edilmektedir. İkinci nicelik ise sadece difüzyon katsayısının parçacık boyutuyla ilişkilendirmek suretiyle tayin edilebilir. Difüzyon katsayısı D ve viskozitesi η olan bir ortamda dağılmış birbirleriyle etkileşmeyen küresel şekilli parçacıklar için difüzyon katsayısı D , parçacık çapı x ile Stokes-Einstein eşitliğindeki gibi ilişkilendirilir.

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta x} \quad (3.12)$$

Burada, k Boltzman katsayısı, T ise mutlak sıcaklıktır. Denklem, partikül çapını, ortalama kinetik enerji ile ortamın viskozitesi ve difüzyon katsayısına bağlamaktadır.

Önceki eşitliklerin kullanımı prensipte küresel izotropik parçacıklarla sınırlı olmasına rağmen öteleme ve dönme difüzyon işleminin her ikisinin mevcut olduğu küresel olmayan ve homojen olmayan parçacıklar bu eşitlikler tarafından analiz edilebilir. Bu durumda (3.10) ile (3.12) eşitlikleri ve (3.20) eşitliği eşdeğer küresel bir yarıçap tanımlar. Çoklu dağıtılan

numunelerin uygulamaları için (3.9) eşitliği;

$$G_2(\tau) = A.[1 + B.g_1^2(\tau)] \quad (3.13)$$

olarak yazılır. Burada yer alan otokorelasyon fonksiyonunun büyüklüğü $g_1(t)$ bozulma oranının normalize edilmiş dağılım fonksiyonuyla ilişkilidir.

$$g_1(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) \cdot \exp(-\Gamma \tau) d\Gamma \quad (3.14)$$

Burada $\int_0^{\infty} G(\Gamma) d\Gamma = 1$ 'dir. (3.14) eşitliğindeki $G(\Gamma) d\Gamma$, bozulma hızları Γ ve $\Gamma + d\Gamma$ aralığında olan parçacıklar tarafından saçılan şiddet kesri ile orantılıdır. Bozulma hızlarının dağılımı iki parametre tarafından karakterize edilir:

$$a) \langle \Gamma \rangle = \int_0^{\infty} \Gamma G(\Gamma) d\Gamma \quad (3.15)$$

ile tanımlanan ortalama bozulma hızı

b) Boyutsuz bir çoklu dağıtkanlık indisi $\check{C}\check{I}$, yani

$$\check{C}\check{I} = \frac{\mu_2}{\langle \Gamma \rangle^2} \quad (3.16)$$

ile tanımlanan dağılım genişliğinin bir ölçüsüdür. Burada,

$$\mu_2 = \int_0^{\infty} (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^2 G(\Gamma) d\Gamma \quad (3.17)$$

şeklindedir.

$\langle \Gamma \rangle$ ortalama bozulma hızı ve σ standard sapmalı bozulma hızlarının Gauss dağılımı gösterdiğine dikkat edilmelidir, yani;

$$G(\Gamma) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^2}{2\sigma^2}\right] \quad (3.18)$$

$\check{C}\check{I}$ ve σ ile

$$\check{C}\check{I} = \frac{\mu_2}{\langle \Gamma \rangle^2} = \frac{\sigma^2}{2 \langle \Gamma \rangle^2} \quad (3.19)$$

eşitliğindeki gibi ilişkilidir.

Stokes-Einstein çapı bozulma hızıyla (Eşitlik 3.10 ve eşitlik 3.12) ters orantılı olduğu için, bu standartta ortalama DLS çapı x_{DLS} nin tanımlanması için ayrıca 3.15 eşitliği kullanıldı:

$$\frac{1}{x_{DLS}} = \int_0^{\infty} \frac{1}{x} G[\Gamma(x)] d\left(\frac{1}{x}\right) \quad (3.20)$$

(3.20) eşitliğindeki $G[\Gamma(x)]d(x)$, x ve $x+dx$ aralığında çapa sahip parçacıklar tarafından saçılan şiddetin bir kesrini temsil ettiği için, (3.20) eşitliğinde tanımlanan ortalama DLS çapı x_{DLS} , harmonik şiddet ortalamalı bir çaptır.

Bu ortalama çap genellikle bir ağırlık-ortalamalı çaptan daha geniş olduğu not edilmelidir. Bu ayrıca lazer ışık saçılması (düşük açılı) veya kırınımıyla tayin edilen ortalama çaplardan farklıdır.

Kümülatif toplamlar metodunda 3.14 eşitliğindeki $\exp(-\Gamma\tau)$ faktörü, gecikme zamanına bağlı bir polinom veren $\exp(-\langle\Gamma\rangle\tau)$ civarında açılabilir. Bu polinomu ikinci derece teriminden itibaren kesmek suretiyle 3.13 eşitliği yaklaşık olarak;

$$G_2(\tau) = A.[1 + B.g_1^2(\tau)] = A.[1 + B.\exp(-2\langle\Gamma\rangle\tau)(1 + \mu_2\tau^2)] \quad (3.21)$$

veya

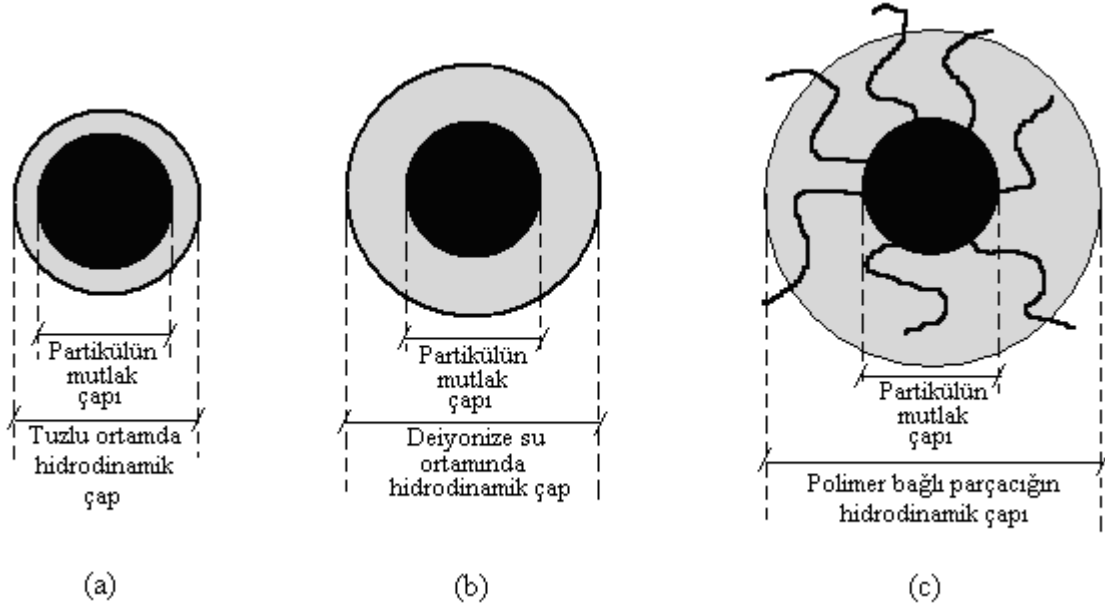
$$G_2(\tau) = A.[1 + B.\exp(-2\langle\Gamma\rangle\tau) + \mu_2\tau^2] \quad (3.22)$$

olur. Bu eşitlik, $\langle\Gamma\rangle$ ortalama bozulma hızı, μ_2 ve böylece ortalama çap, x_{DLS} ile çoklu dağıtıklılık indisi χ^2 'nin tayini için bir temel oluşturur.

3.4.4 Hidrodinamik Çap

DLS yönteminde boyutu dolaylı olarak hesaplamak için ölçülen nicelik ışık şiddetidir. Işık şiddeti dağılımının zamanla değişmesinden korelasyon fonksiyonu hesaplanır, bu fonksiyondan difüzyon katsayısı bulunur ve en son da difüzyon katsayısı Stokes-Einstein denkleminde kullanılarak boyut hesaplanır. O halde DLS tekniği için parçacık boyutunun anlamı, parçacığın ölçülen hızıyla difüz eden kürenin çapıdır. Bu çap difüzyon katsayısından hesaplandığından, difüzyonu etkileyen faktörler, sonucu da etkiler. Örneğin parçacık yüklüyse, çözücü ortamdaki parçacığa zıt yüklü bir miktar iyon parçacık yüzeyine tutunur ve bir elektrik çift tabakası oluşur; ölçülen çapa bu elektrik çift tabakası da dahildir. Hidrodinamik çap, ortam pH'sine de bağlıdır. Aynı parçacığın deiyonize su ortamıyla, iyonların bol olduğu bir ortamda yapılan ölçümleri farklı sonuç verir (Şekil 3.19 (a) ve (b)). Veya parçacığa polimerler bağlanmış ise, yine ölçülen çapa bu polimerlerin etkisi olur, çünkü polimer bağlı parçacığın difüzyon hızı değişecektir. Bu şekilde verilen çapa, hidrodinamik çap denir (Şekil 3.19 (c)). Tuzlu ortamdaki iyonlar, elektrik çift tabakasını daralttığından

ölçülen hidrodinamik çap, deiyonize su ortamındakinden daha küçüktür; dolayısıyla da mutlak çapa daha yakındır. DLS yöntemi ve kümülant analizin kullanılması ile bulunan hidrodinamik çap, partikülün mutlak çapına eşit değildir!

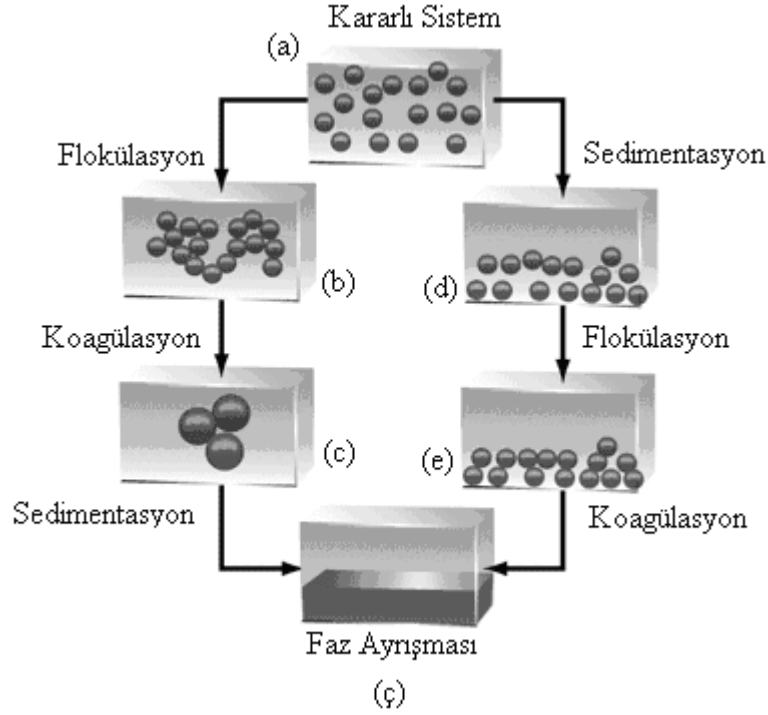


Şekil 3.19 Bir partikülün; (a) tuzlu ortamdaki, (b) deiyonize su ortamındaki, (c) Polimere bağliken ki hidrodinamik çapları.

3.5 Elektroforetik Işık Saçılması Tekniğı ile Zeta Potansiyeli Analizi

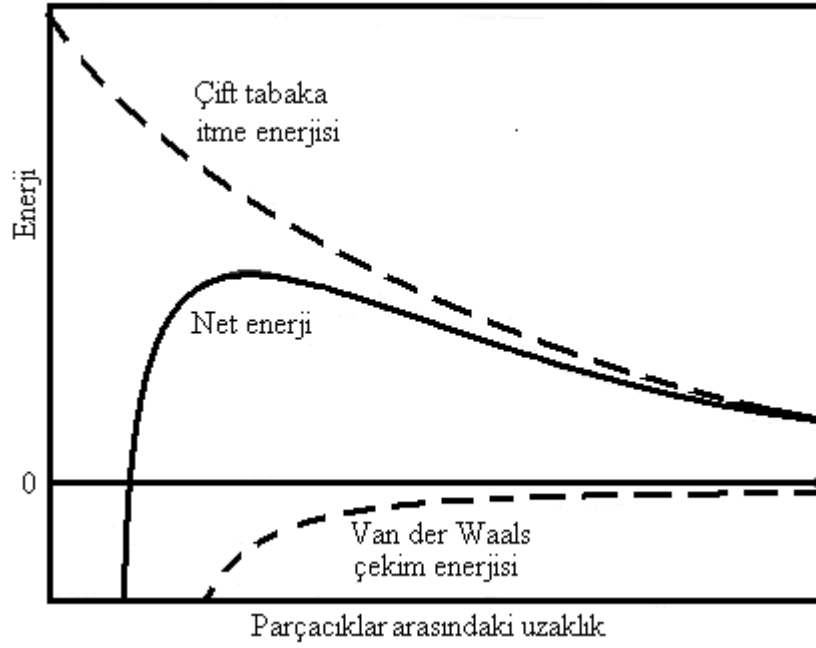
3.5.1 Zeta Potansiyeli

Bir kolloidal sistemle ilgili önemli bir bilgi, sistemin kararlı olup olmadığıdır. Sistemin kararlı olması demek, çözücü ortam içindeki parçacıkların bir araya gelip agregasyon meydana getirmemeleri ve çökmemeleri demektir. Şekil 3.20’de bu durumlar gösterilmiştir. Şekildeki kutucuklarda küreler parçacıkları göstermektedir. (a)’da sistem henüz kararlıdır, çünkü bütün parçacıklar birbirlerinden bağımsız olarak hareket etmektedir. (b)’de parçacıklar agreg olmaya başlamıştır, bu sürece flokülasyon, oluşan bu ilk kümeye de flok adı verilir. (c)’de görüldüğü gibi eğer agregasyon daha da artar ve flok daha da büyürse, bu sürece koagülasyon denir. (ç)’de ise oluşan bu büyük kümeler sedimentasyonla yüzeye çökmüştür. Çökme olayı en başta da olabilirdi ki (d)’de bu durum görülmektedir; parçacıklar önce sedimentasyonla yüzeye çökerler, flokülasyonla parçacıklar toplaşmaya başlar (e), koagülasyonla parçacıklar tamamen bir araya gelirler ve (ç)’deki gibi yüzey üzerinde bir çökelti tabakası oluşur.



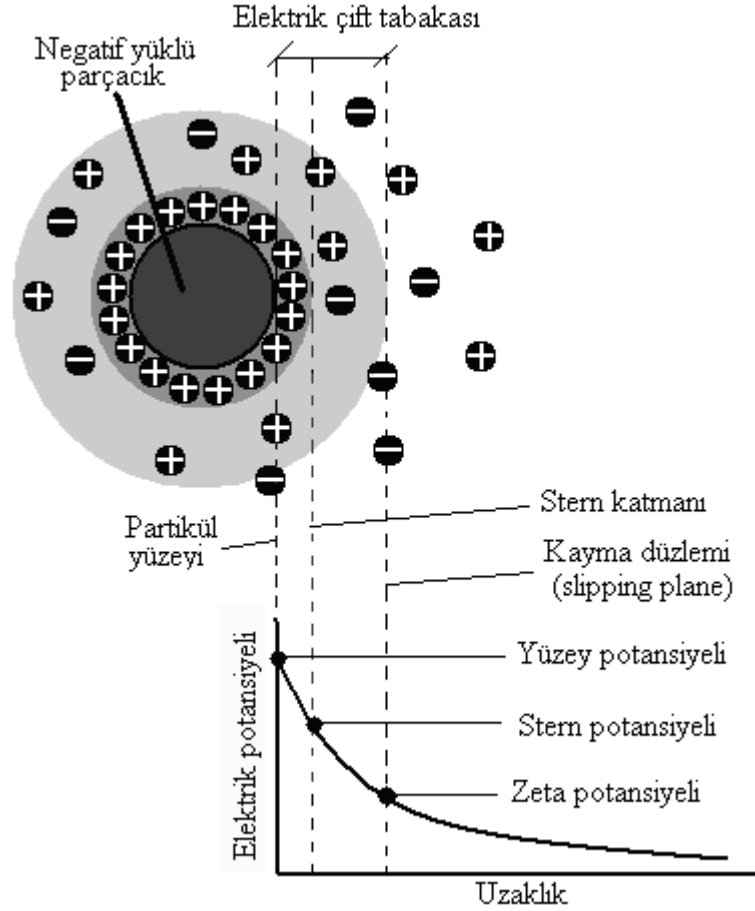
Şekil 3.20 Bir koloidal sistemin olası durumları görülmektedir. (a)'da kararlı olan sistemde flokülasyon süreciyle (b)'de floklar oluşur. Koagülasyon süreciyle (c)'de floklar büyür ve sonunda sedimentasyonla (ç)'de tüm madde yüzeye çöker. Çökme olayı en başta da olabilirdi ki (d)'de bu durum görülmektedir; önce sedimentasyonla yüzeye çökme olur, flokülasyonla (e)'de floklar oluşur ve (f)'de koagülasyonla tüm madde bir araya gelerek yüzey üzerinde bir çökelti tabakası oluşur [7].

1940'lı yıllarda Derjaguin, Landau, Verwey ve Overbeek, DLVO TEORİSİ olarak bilinen ve kolloidal kararlılıkla ilgili bir teori geliştirmişlerdir [8]. Teori, bir kolloidal sistemin kararlılığının, elektriksel çift tabakalı itici ve parçacıkların birbirine yaklaştıkça maruz kaldıkları Van der Waals çekici kuvvetleri tarafından belirlendiğini söylemektedir; başka bir ifadeyle, itici kuvvetler nedeniyle ortaya çıkan bir enerji bariyeri, iki parçacığın birbirine yaklaşmasını ve biraraya toplanmasını engellemektedir. Ancak eğer parçacıklar bu bariyeri aşacak kadar yeterli bir enerji ile birbirlerine çarparsa, çekici kuvvet, bunları birbirleriyle sürekli olarak temas edecek ve geri çevrilmeyecek biçimde birbirlerine kuvvetli bir şekilde bağlayacaktır (Şekil 3.21).



Şekil 3.21 Parçacıklar arasındaki çift tabaka itme enerjisi ve Van der Waals çekim enerjilerinin bir toplamı olarak net enerji grafiği.

Parçacıklar arasında itme kuvveti oluşturan bu elektrik çift tabakasının yapısı, adı üzerinde, elektrik yüklerinden oluşur. Örneğin negatif yüklü bir parçacığımız olsun (Şekil 3.22). Negatif yüklü bu parçacık, ortamda bulunan iyonlarla elektrostatik etkileşime girer ve pozitif iyonları çekerken negatif iyonları iter. Parçacık yüzeyinin hemen dışında, pozitif iyonların yüzeye sıkı bağlı olduğu bir tabaka bulunur. Bu tabakaya Stern katmanı denir. Stern katmanından sonra bir difüz bölgesi mevcuttur ki iyonlar bu bölgede hareket etmektedirler. Difüz bölgesinde öyle kavramsal (hayali) bir düzlem vardır ki, bu düzlemin içinde kalan pozitif iyonlar, parçacıkla birlikte hareket etmeye zorlanırlar, dışında kalanlarsa bağımsız olarak hareket edebilirler. Bir başka ifadeyle, düzlemin içinde olsun dışında olsun, bir iyon hem parçacığın hem de diğer iyonların etkisi olur; fakat düzlemin içindeki pozitif iyonların üzerinde negatif parçacığın çekim kuvveti baskındır ve iyonu kendiyle birlikte harekete zorlar; düzlemin dışında ise iyon üzerinde diğer iyonların etkisi baskındır ve parçacık o bölgeden gitse bile iyonu beraberinde sürükleyemez. Bu hayali yüzeye kayma düzlemi (slipping plane) denir. Stern katmanındaki elektrik potansiyeline Stern potansiyeli, kayma düzlemi üzerindeki elektrik potansiyeline de zeta potansiyeli denir. Kayma düzleminin yeri kesin değil ancak yaklaşıktır.

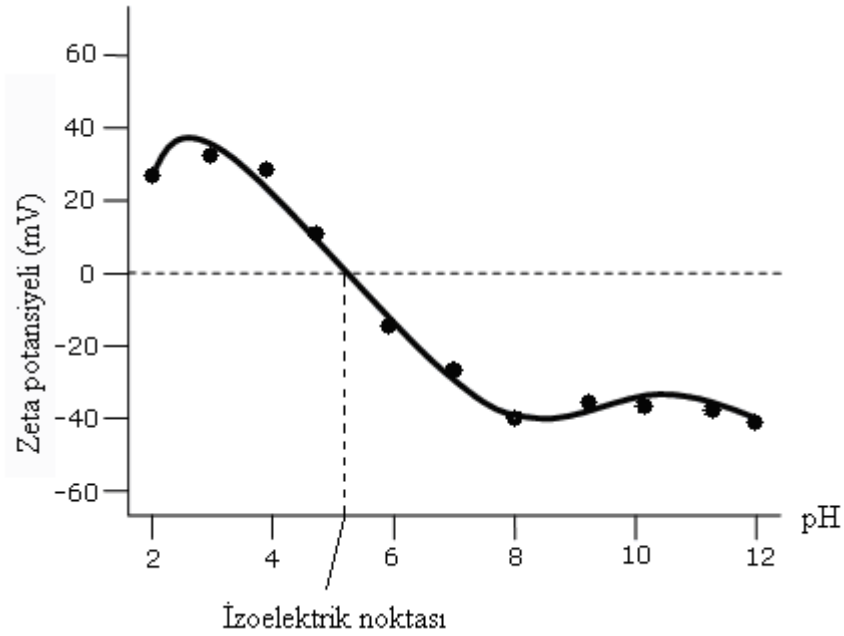


Şekil 3.22 Negatif yüklü bir parçacığın çevresinde oluşturduğu elektrik potansiyeli (Zetasizer Nano Series User Manual).

Zeta potansiyelinin değeri, kolloidal bir sistemin kararlılığının bir ölçüsüdür. Zeta potansiyelinin değeri +30 mV'tan daha pozitif veya -30 mV'tan daha negatif olan kolloidal sistemler karardır. Zeta potansiyeli 30 mV'tan büyük olduğunda, bu demektir ki parçacıklar arasındaki elektriksel itme kuvveti büyüktür ve baskındır, Van der Waals çekim kuvvetleri bu itmeyi yenemez, dolayısıyla da parçacıklar bir araya gelemeyiz. Zeta potansiyeli 30 mV'tan küçükse de bu demektir ki, parçacıklar elektriksel itmeyi yenebilir ve bir araya toplanabilirler. 30mV değeri yaklaşık bir değer olup, zeta potansiyeli 30 mV'tan ne kadar büyükse sistem o kadar daha karardır, 30 mV'tan ne kadar küçükse de o kadar agregasyon ve sedimentasyon olmaya meğillidir.

Zeta potansiyeline hem parçacık yüzey yükü, hem de düzlemle parçacık arasında kalan bölgedeki (yani elektrik çift tabakasındaki) iyonların katkısı olur. Partikülün yüzey yükünün, parçacığın doğasına ve çevresindeki ortama bağlı olarak çeşitli kaynakları vardır. Bunlardan en önemlileri, çeşitli yüzey aktif maddelerin (sümfaktantların) adsorblanması ve yüzey

gruplarının disosiasyonudur. Örneğin katyonik yüzey aktif maddelerin yüzeye adsorblanması sonucu pozitif, anyonik yüzey aktif maddelerin adsorblanması sonucu da negatif bir yüzey elde edilir. Yine yüzeyde bulunan asidik grupların disosiasyonu ile negatif yüklü bir yüzey elde edilirken, bazik grupların disosiasyonu ile de pozitif yüklü bir yüzey elde edilir. (Örneğin proteinlerin yükleri, genel olarak karboksil ve amin gruplarının disosiasyonu ile belirlenir.) Yüzey gruplarının disosiasyonu ve elektrik çift tabakasındaki iyon konsantrasyonu, ortamın pH'sine bağlı olup, zeta potansiyelini etkileyen en önemli faktör pH'dir. Şekil 3.23'de negatif yüklü bir parçacığın zeta potansiyelinin pH'ye bağlı değişim grafiği görülmektedir. pH'nin 7 olduğu noktada (yani ortamdaki pozitif ve negatif yük miktarları eşit olduğunda) zeta potansiyeli yaklaşık -30 mV'tur. Ortama asit eklendikçe zeta potansiyeli değeri sıfıra doğru yaklaşır, belli bir yerde sıfır değerini alır, ortama daha da asit ilave edilirse pozitif değer almaya başlar. Tam tersine alkali (baz) eklenirse zeta potansiyeli bir miktar daha negatif değer kazanır, fakat belli bir yerden sonra yaklaşık aynı kalır; çünkü olabilecek bütün disosiasyonlar olup bitmiştir ve artık yük miktarı değişmemektedir, veya parçacık da iyonlar da negatif olduklarından, birbirlerini itecekler ve partikül etrafında daha fazla negatif iyon birikemeyecektir. Zeta potansiyelinin sıfır olduğu pH noktasına izoelektrik nokta denir (yani pozitif ve negatif yükler eşit sayıdadır).



Şekil 3.23 Negatif yüklü bir parçacığın zeta potansiyelinin pH'ye bağlı değişim grafiği görülmektedir (Zetasizer Nano Series User Manual).

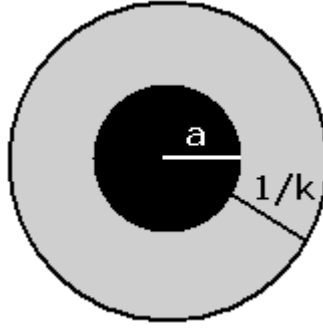
3.5.2 Lazer Doppler Elektroforezi

Lazer Doppler elektroforez tekniği, aslında iki ayrı yöntemin birleştirilmesiyle geliştirilmiştir: lazer Doppler hız ölçümü ve elektroforez. Bir elektroforetik ışık saçılması tekniğidir. Elektroforez, bir elektrolite elektrik alan uygulandığında, elektrolit içinde bulunan parçacıkların kendilerine ters işaretli elektrotlara çekilmeleridir. Viskoz kuvvetler, parçacıkların bu hareketine karşı koyarlar. Bu zıt kuvvetler arasında denge oluştuğunda, parçacıklar sabit bir hızla hareket etmeye başlarlar. Bu hız, uygulanan elektrik alanın şiddetine, ortamın dielektrik sabiti ile viskozitesine ve zeta potansiyeline bağlıdır. Bütün bu değişkenler birbirine Henry denklemiyle bağlanır. Henry denklemi şöyledir:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\xi f(ka)}{3\eta} \quad (3.23)$$

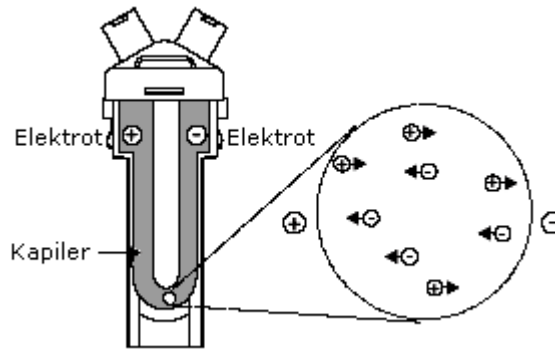
Burda U_E , elektroforetik mobilite; ε , ortamın dielektrik sabiti; ξ , zeta potansiyeli; $f(ka)$, Henry fonksiyonu; η ise ortamın viskozitesidir. Parçacıkların bir elektrik alan altındaki hızlarına özel olarak elektroforetik mobilite denir. Dielektrik sabiti ise, bir ortamın (veya genel olarak bir maddenin), uygulanan elektrik alanını geçirgenliğinin ölçüsüdür.

Henry denklemi, Şekil 3.22’de gösterilen sistemin matematiksel modellemesinin çözülmesiyle elde edilir ve Henry fonksiyonu da bu çözümde kendiliğinden ortaya çıkar. Henry fonksiyonu $f(ka)$ ’daki “k” parametresinin tersi olan $1/k$ değeri, elektrik çift tabakanın genişliğidir ve Debye uzunluğu adını alır (Şekil 3.24). “a” parametresi ise parçacığın kendi yarıçapıdır. Bu fonksiyonla ilgili genel olarak iki yaklaşım yapılır: Fonksiyonun değerini polar ortamlar için Smoluchowski, apolar ortamlar için de Hückel çeşitli yaklaşımlarla hesaplamışlardır. Smoluchowski yaklaşımında $f(ka)=1,5$, Hückel yaklaşımında ise $f(ka)=1$ olarak bulunmuştur. Dolayısıyla adı her ne kadar fonksiyon da olsa, Henry denkleminde ya 1,5 ya da 1 değeri bir sabit gibi kullanılır.



Şekil 3.24 a yarıçaplı parçacığın etrafında gri renkte elektrik çift tabakası görülüyor. Bu tabakanın uzunluğu $1/k$ olup k parametresi denklemdeki potansiyel alanın sınır koşullarından gelir.

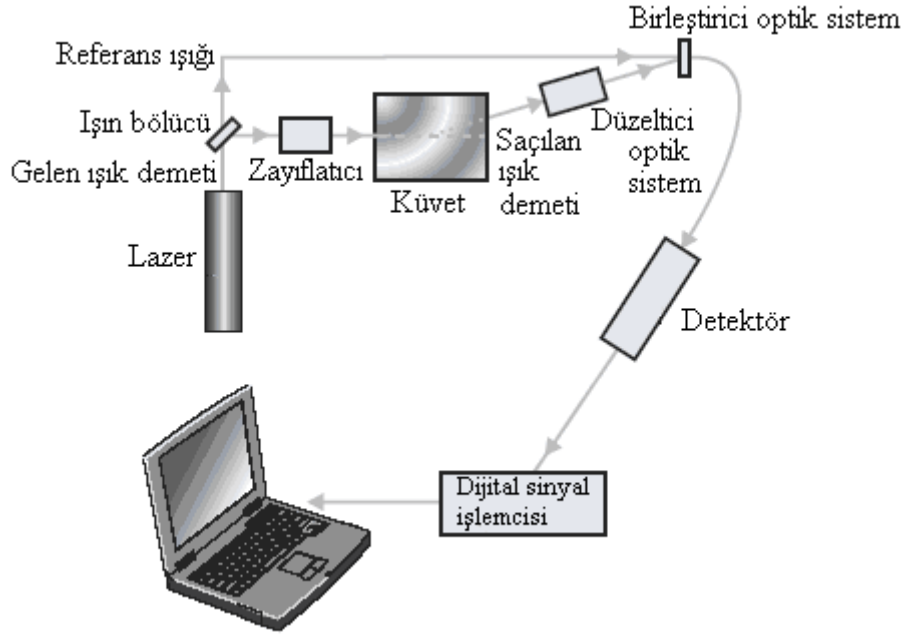
Henry denkleminde sadece elektroforetik mobilite ve zeta potansiyeli değişkendir. Böylece elektroforetik mobilite ölçülebilirse, denklemden zeta potansiyeli hesaplanabilir. Elektroforetik mobilitenin ölçülmesi için, partiküllere elektrik alan uygulanır. Bu yüzden, numune bu iş için özel olarak yapılmış bir tür kapiler küvete konur. Küvetin iki ucunda elektrotlar vardır ve bu elektrotlar sayesinde numuneye elektrik alan uygulanır (Şekil 3.25). Numune, U şeklindeki gri renkli kısımda yer alır. Elektrotlara kutupları sürekli değişen bir elektrik akımı uygulanır. Şekilde, soldaki elektrot pozitif, sağdaki elektrot negatiftir ancak ölçüm sırasında işaretler sürekli değişir. Bu değişim, saniyede 50 kereye kadar çıkar. Böylece numune içindeki yüklü parçacıklar, kendilerine zıt işaretli elektrotlara doğru çekilirler ve bu çekilme de, kutupların yer değiştirmesine paralel olarak sürekli yön değiştirir. Yani parçacıklar bir sağa bir sola hareket ederler yani salınım yaparlar.



Şekil 3.25 Bir kapiler küvet (Zetasizer Nano Series User Manual).

Parçacıkların bu salınımı sırasındaki hızları (yani elektroforetik mobiliteleri) ölçülür. Bu ölçüm için, Lazer Doppler Hız Ölçümü yöntemi kullanılır. Şekil 3.26'de Zetasizer cihazının

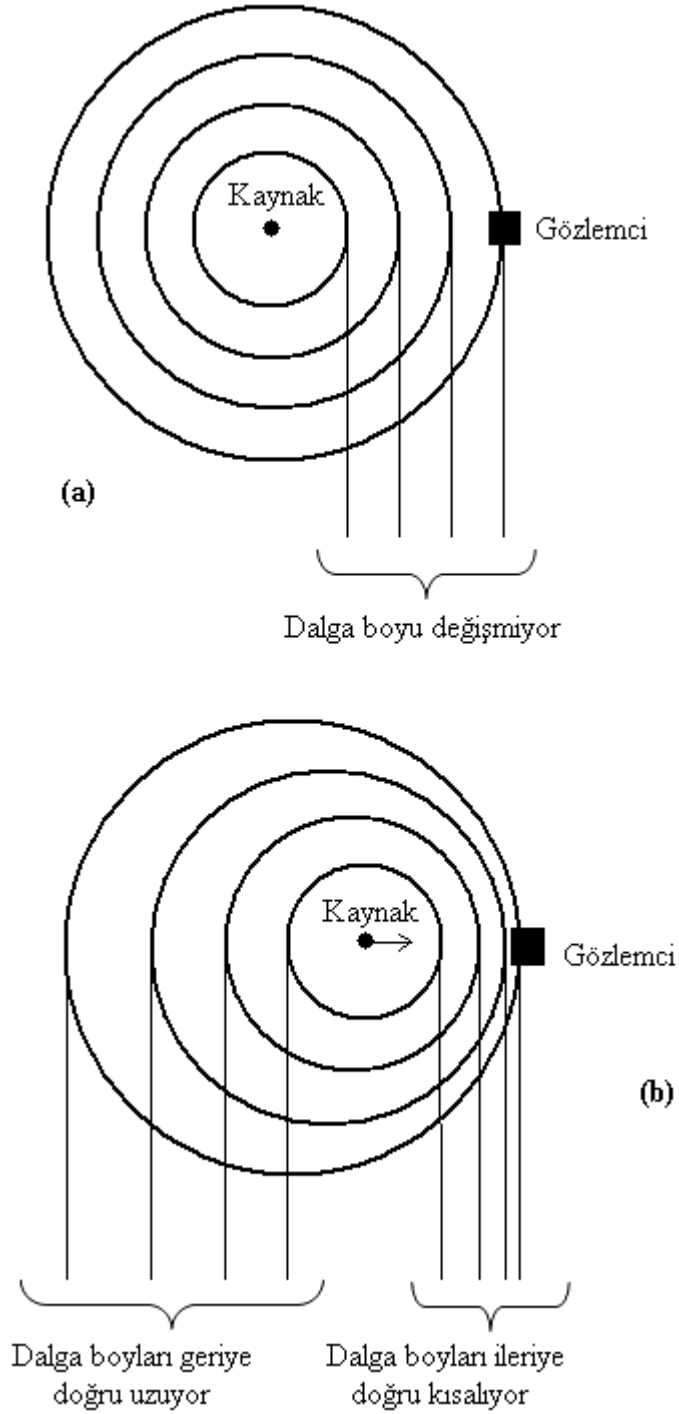
iç yapısı görülmektedir. Zeta potansiyeli ölçümünde önce lazer kaynağından bir lazer ışın demeti çıkar. Bu demet, ışın bölücüden geçerken ikiye ayrılır; gelen ışığın bir kısmı referans ışığı olarak doğrudan birleştirici optik sisteme gönderilir, diğer kısmı ise zayıflatıcıdan geçerek küvetin üzerine düşürülür. Zayıflatıcının görevi, numune üzerine ölçüm için uygun şiddette ışık düşmesini sağlamaktır. Daha sonra, ışık numune içinden geçerken saçılmalar olur ve 13° 'lik açıyla saçılan ışınlar bir düzeltici optik sisteme gelir. Düzeltici optik sistem, dispersantın kendisinden olabilen saçılmaları ayıklamak için kullanılır. Daha sonra bu ışınlarla referans ışınlar birleştirilir ve detektöre gönderilir. Detektörde ışınlar elektriksel sinyallere çevrilir ve bu sinyaller dijital sinyal işlemcisinde analiz edilir. Sonuçlar da bilgisayarda görüntülenir.



Şekil 3.26 Zetasizer cihazının iç yapısı (Zetasizer Nano Series User Manual).

Demek ki numuneye bir yandan elektrik alan uygulanıp yüklü partiküllerin salınım yapması sağlanıyor, bir yandan da bu partiküllerden saçılan ışık analiz ediliyor. Bu analizin anahtar noktası, ışığın frekansındaki Doppler kaymasıdır. Doppler kayması, dalgalara özgü bir özellik olup, kaynak veya gözlemcinin en az birinin hareket etmesiyle gerçekleşir (Şekil 3.27). Doppler kayması (ya da olayı), kaynakla gözlemci arasında bağıl bir hareket olduğunda, gözlemcinin algıladığı dalga'nın frekansının, kaynaktan çıkan dalga'nın frekansından farklı olmasıdır. Şekilde noktasal bir kaynaktan yayılan dairesel dalgalar görülmektedir. İççe çizili

her bir çember, dalganın tepe noktasını temsil etmektedir. İki tepe noktası arası (yani iki çember arası) uzaklık, dalga boyudur. (a)'da hem kaynak hem de gözlemci durgundur, dolayısıyla dalgaboyu da değişmemektedir. (b)'de ise kaynak, gözlemciye doğru hareket etmektedir. Kaynaktan çıkan bir dalga tepesi ilerlerken, kaynağın kendisi de hareket etmektedir ve böylece kaynaktan çıkan bir sonraki dalga tepesiyle önceki dalga tepesi arası uzaklık yani dalga boyu değişmektedir. Bunun sonucu olarak, kaynağın ilerleme yönünde dalga boyları kısalmakta, kaynağın ilerleme yönünün tersinde ise dalga boyları uzamaktadır. Dalga boyu ile frekans ters orantılıdır. Dalga boyu değiştiğinde frekans da değişir.



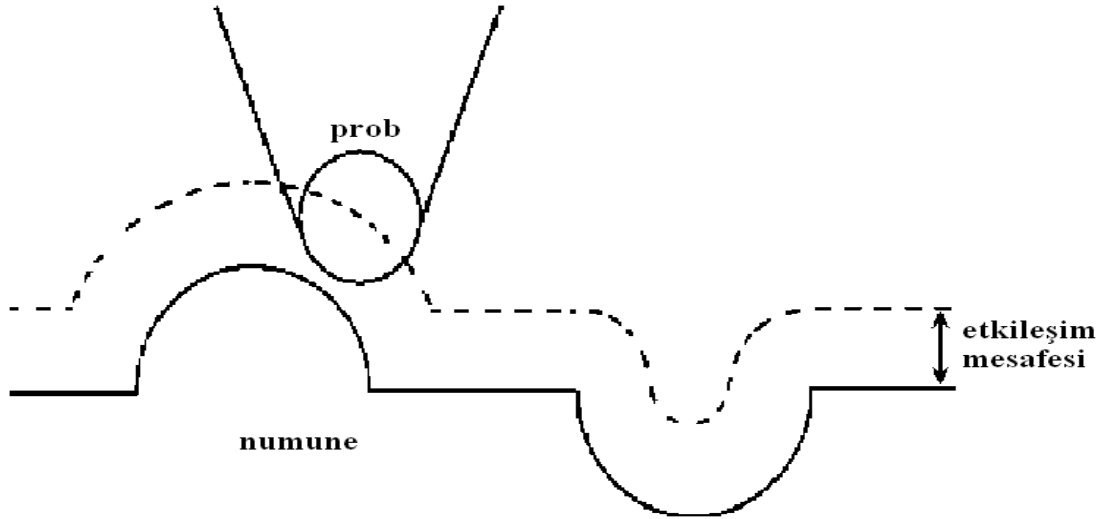
Şekil 3.27 Şekilde noktasal bir kaynaktan yayılan dairesel dalgalar görülmektedir. (a)'da hem kaynak hem de gözlemci durgundur, dolayısıyla dalgaboyu da değişmemektedir. (b)'de ise kaynak, gözlemciye doğru hareket ettiğinden, dalga boyu değişmektedir.

Özetlersek, kapiler hücre içinde, yüklü parçacıklara yönü sürekli değişen bir elektrik alan uygulanıp, parçacıkların salınım yapması sağlanıyordu. Parçacıkların yükleri ne kadar büyükse, elektrik alandan o kadar çok etkilenecek ve bir o kadar daha hızlı hareket

edeceklerdir. Bir yüklü parçacığın, kendisine zıt işaretli elektrot tarafından çekilme kuvveti, parçacığın yükü ile doğru orantılıdır. Çekilme kuvveti ne kadar büyükse, partikülün hızı da o kadar büyük olur. Salınım yapmakta, yani hızları sürekli olarak değişmekte olan bu parçacıklara frekansı bilinen bir lazer ışığı düşürülmekte, ve parçacıklardan saçılan ışık, referans ışığıyla karşılaştırılarak analiz edilmektedir. Eğer parçacık hareket etmiyor olsa, saçılan ışığın frekansı değişmezdi. Fakat parçacık hareket ediyorsa, bu parçacıktan saçılan ışıpta yukarıda anlatıldığı üzere Doppler kayması görülür. Parçacıkların hız değişimleri ne kadar büyükse, ölçülecek Doppler kayması da o kadar büyük olacaktır. Partiküllerin hızları da yük miktarlarına bağlı olduğundan dolayı, frekanstaki kaymanın ölçümüyle, parçacıkların hız değişimleri bulunabilir, buradan da Henry denkleminden zeta potansiyeli hesaplanabilir (Dalgakıran, 2006).

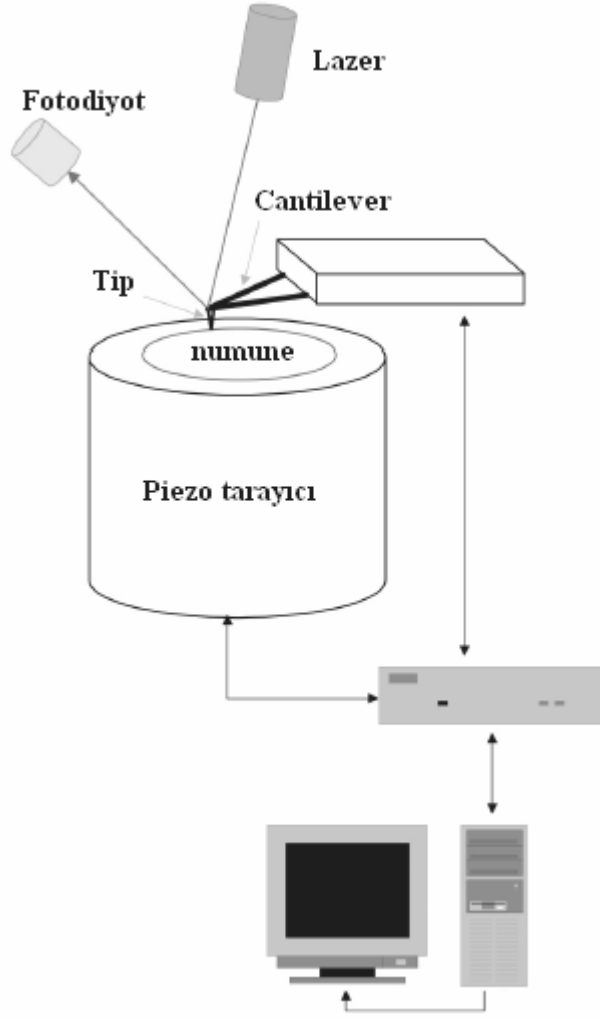
3.6 Atomik Kuvvet Mikroskobu

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) taramalı prob mikroskop (SPM) ailesinin bir üyesidir (Douglas ve Marilyn, 2008). Bütün bu tekniklerde numune yüzeyi bir prob tarafından paralel hatlar takip edilerek taranır. Bu tarama esnasında yakın-alan bölgesindeki yerel bir etkileşim ölçülür ve her bir pozisyon için bu değer kaydedilir (Şekil 3.28). Bu nedenle prob bu tür mikroskopların çözünürlüğünü geliştiren/sağlayan en temel bileşendir. Bu aile içerisindeki bütün teknikler 1982 de taramalı tünel mikroskopi (STM) tekniğinin bulunmasından sonra gelişmiştir. Bundan 4 yıl sonra Binnig, Quate ve Gerber ilk AFM'yi geliştirmişlerdir. AFM ve STM'nin sadece en çok kullanılan SPM teknikleri olduğu vurgulanmalıdır. AFM itici ve çekici yüzey kuvvetlerinin belirlenmesine, STM ise elektron tünel etkisinin belirlenmesine dayanan yöntemlerdir. Bu iki teknik dışında yüzey üzerindeki bir nokta ile manyetik prob arasındaki etkileşimlerin belirlenmesine dayalı "taramalı magnetik mikroskopi" tekniği gibi daha farklı SPM teknikleri de mevcuttur.



Şekil 3.28 Bütün taramalı prob mikroskoplarının temel prensibi şematik olarak gösterilmiştir. Probun geometrisi ve numune-prob etkileşim mesafesi mikroskop çözünürlüğünü ve görüntü kalitesini belirler (Nuno ve Miguel, 2004).

Yukarıda da bahsedildiği gibi, bütün SPM teknikleri numune yüzeyi ile bu yüzeye çok yakın bir mesafede bulunan prob arasındaki etkileşimlerin ölçülmesine dayanmaktadır. AFM’de bu etkileşim numune atomları ile bu numuneyi tarayan ince “tip”in atomları arasındaki kuvvettir. Tip son derece esnek bir kirişin (cantilever) altına birleştirilmiştir (Şekil 3.29). Bu kiriş basit ya da üçgen şeklinde olabilmektedir, genellikle 23-300 μm uzunluğunda, 10-30 μm genişliğinde ve 0,5-3 μm kalınlığındadır. En yaygın olarak kullanılanları silisyum nitrid (Si_3N_4)’ ten yapılmışlardır, kuvvet sabitleri 0,01-100 N aralığında değişmektedir. Son birkaç yılda AFM tipleri olarak karbon nanotüpler de büyük oranda kabul görmektedir. Bunun en önemli sebepleri ise yüksek çözünürlük sağlamaları, küçük boyutta olmaları, yapılarının iyi belirlenmiş olması, mekanik sağlamlıkları ve benzersiz kimyasal özelliklerdir.



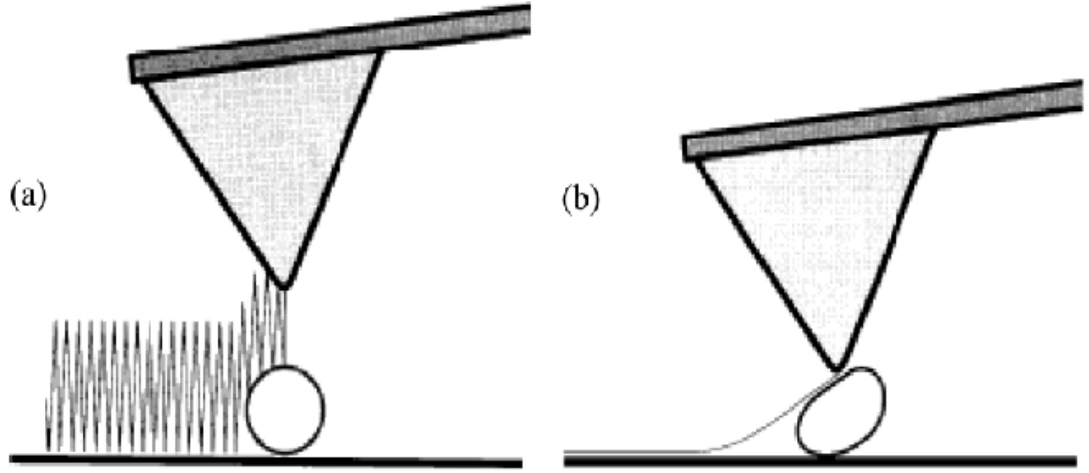
Şekil 3.29 AFM donanımının bileşenleri şematik olarak gösterilmiştir (Nuno ve Miguel, 2004).

Tip ve numune arasındaki her bir etkileşim kırışte (cantilever) bir bükülmeye sebep olmaktadır. Eğer bükülme çok aşırı derecede keskin değil ise bu bükülme etkileşim kuvveti ile orantılı olacaktır. Bu bükülmeyi belirleyebilmek amacıyla AFM, kırış'ın uç noktasına odaklanmış küçük bir lazer kullanmaktadır. Yansıyan lazer ışını bir fotodiyoda odaklanmıştır. Yansıyan ışının fotodiyod üzerindeki odak noktasında meydana gelen değişiklik ile kırış'ın her bir küçük bükülmesi ve böylece de tip ile numune arasındaki etkileşim ölçülür. Bu optik mekanizma genellikle 10^{-7} ve 10^{-12} N arasındaki kuvvetlerin belirlenmesini mümkün kılar.

AFM'de tarama probun hareketi ya da numunenin kendisinin hareketi ile gerçekleştirilebilir. Numune bir piezoelektrik destek (piezo tarayıcı) üzerine birleştirilmiştir. Bu piezo tarayıcı örneğin sadece xy düzlemi boyunca yer değiştirmesinden değil z ekseni boyunca hareketinden

de sorumludur. Tip numune yüzeyinde bir yükselti ya da çukura ulaştığında etkileşim kuvvetinde bir değişim meydana gelir. Bir geri-besleme (feedback) mekanizması ile bu değişiklik numunenin tipten uzaklaştırılmasına ya da yaklaştırılmasına neden olur. Bu yolla tarama numune ve prob arasında yaklaşık olarak sabit bir mesafe bırakılarak gerçekleştirilir. Her bir xy çifti için bir z değeri belirlenir. Bu değerler bilgisayar tarafından kaydedilir ve numunenin yalancı-üçboyutlu (pseudo-threedimensional) görüntüsünü oluşturmak için kullanılır.

Yukarıda anlatılan geleneksel “contact mode”un yanı sıra atomik kuvvet mikroskoplarının son jenerasyonları “tapping mode” olarak adlandırılan diğer bir tarama şekli de kullanılmaktadırlar.



Şekil 3.30 İki AFM tarama şeklinin kıyaslanması: “tapping mode” (a) ve “contact mode” (b). Genellikle birincisi numune deformasyonunu azaltabilmektedir [2].

Bu tarama şeklinde tip önceden belirlenmiş yükseklik “baseline”i, frekans ve genlik ile akustik olarak işletilir (Şekil 3.30). Bu parametrelerde numune ile etkileşime bağlı olarak meydana gelen değişiklikler numunenin topografisinin bir fonksiyonudur. “Contact mode” da olduğu gibi bilgisayar bu verileri numune yüzeyinin yalancı-üçboyutlu görüntüsünü oluşturmak için kullanır. Genlik (20 nm ye kadar) ve frekans (normal olarak 10 ve 40 kHz arasında, sulu çözeltiler içerisindeki ölçümler için, ancak 650 kHz’e kadar çıkabilmektedir) gibi deneysel verileri tanımlama güçlüğüne rağmen çoğu çalışmalarda “tapping mode” daha yüksek çözünürlük sağlamaktadır, yumuşak numunelere verilen hasarı da azaltmaktadır.

AFM ile sulu çözeltiler içerisinde ölçüm alma imkanının olması biyolojik numunelerin

alışılmasında son derece önemlidir. Atomik kuvvet mikroskopisinde bu, sıvı hücrelerinin kullanılması ile sağlanmaktadır. Sıvı hücrelerinin yapısı üretici firmaya göre değişiklik göstermektedir ancak genel olarak, numune çevresinde bir conta (o-ring) kullanılır ve bu sistem piezo tarayıcının geçirgen olmayan başına yerleştirilir (nem cihazın geri kalan kısmına zarar verebilmektedir). Sıvı hücresinin st kısmı lazer ışınına karşı geçirgen olan bir yüzey kullanılarak oluşturulmuştur. Ayrıca sıvı değişimini sağlayabilmek için giriş ve çıkış hatları vardır.

Görüntülerin iyi kalitede ve ardı ardına kayıt edilebildiği yüksek hızlı atomik kuvvet mikroskoplarının geliştirilmesi daha hızlı biyolojik olayların takibini mümkün kılmaktadır. Pek çok diğer deneysel yöntemde olduğu gibi atomik kuvvet mikroskobu da diğer mikroskopi yöntemleri ile birleştirilmeye çalışılmıştır. AFM'nin fluoresans teknikleri, optik mikroskopisi, ya da taramalı elektrokimyasal mikroskopisi ile eşleştirilmesi ile bazı önemli sonuçlar elde edilmiştir.

4. DENEYSEL KISIM

4.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

4.1.1 Kullanılan Cihazlar

Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre

FT-IR (Perkin Elmer Spektrum One)

PTI QM-4/2003 Steady State Fluoresans Spektrometre

Malvern Zetasizer Nano ZS

Shimadzu SPM-9600 Atomik Kuvvet Mikroskopi (AFM)

Agilent Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC)

Mikroskop Olympus CKX41 (İnvert)

Viskozimetre (Ostwald, Ubbelohde)

Heildolph MR 3001 Isıticılı Manyetik Karıştırıcı

Precisa XB 220A Hassas Terazî

Sartorius CP225D Hassas Terazî

Binder Vakum Etüvü

Finnpipette Micropipet (1-10 ml, 100-1000 µl, 5-50 µl)

Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı

IKAMAG Çoklu Karıştırıcı

Milipore-Q Gradient Saf su Cihazı

Sartorius MiniSart RC Enjektör filtresi, 0.22 µm

WTW pH level 1 pH metre

Hanna pH221 pH metre

4.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Kullanılan Kimyasal Madde	Kimyasal Maddenin Üretildiği Firma
Poliakrilik Asit	Aldrich 523925
Metil vinil eter-maleik anhidrit Kopolimeri	Gantrez AN-139
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma A 7030
Bakır Sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Merck 102788
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)	Riedel-de Haen 04361
Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Fluka 71647
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Fluka 71687
Etil Alkol	Merck K33723886-436
Sodyum Klorür (NaCl)	Fluka 71376
Thiazoly blue tetrazolium bromide (MTT)	Sigma M 5655

4.2 Poliakrilik Asit Polimeri

Poliakrilik asit (PAA) : Molekül ağırlığı 100.000 Da'dır.

Poliakrilik asit iyonlaşma derecesi, pH ve sulu çözeltinin iyonik gücüne bağlı olan zayıf bir polielektrolittir. PAA, düşük pH'da hemen hemen disosiyasyon olmamasına karşın $\text{pH} \geq 7$ 'de tamamen yüklü bir zincire sahiptir. Poliakrilik asit, proton alabilen iyonik olmayan çeşitli polimerler, onların türevleri ve katyonik polielektrolitlerle sulu yada organik çözelti ortamında interpolimer kompleks oluşturur.

Kompleks oluşumunda, ortamda karşısındaki ile iletişim içerisinde bulunan polimerin doğası ve molekül ağırlığı gibi bazı parametrelerin yanı sıra çözücü, pH, çözeltinin iyonik gücü, sıcaklık ve polimerin konsantrasyonu önemli etkiye sahiptir. Bunun için metal iyonlarının yüklü makromoleküller ile ilişkisi, herhangi bir ortamda ve biyolojik sistemlerde sergiledikleri fizikokimyasal davranışları anlamak bakımından önemlidir. Poliakrilik asitler bir çok ticari isim halinde (Karbopol, Karbomer, vd.) karşımıza çıkmasının yanı sıra kozmetik, ev ürünleri ve farmasotik preparatlarda da kullanılmaktadır.

4.2.1 PAA-Cu²⁺ İkili Komplekslerinin Hazırlanması

4.2.1.1 Kullanılan Çözeltiler

PAA stok çözeltisi 3 mg/ml olacak şekilde ve CuSO₄.5H₂O stok çözeltisi ultra saf suda oda sıcaklığında hazırlandı.

4.2.1.2 Komplekslerin Hazırlanması

Her bir çözeltideki PAA miktarı sabit olacak şekilde (8 adet farklı $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$ oranında) hazırlanan stoktan toplam 10 ml çözelti için 3333 µl (9,999 mg) PAA alınarak değişik oranlarda CuSO₄.5H₂O eklenerek oluşturulan ikili kompleksler 1 gece oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra pH:7'ye 1N NaOH çözeltisi ile ayarlanır.

4.2.1.3 Hesaplamalar

PAA konsantrasyonu sabit tutularak hazırlanan PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerine ait hesaplamalar şu şekildedir:

$$\frac{n_{\text{Cu}^{2+}}}{n_{\text{AA}}} = \frac{C_{\text{CuSO}_4} \cdot M_{\text{AA}}}{C_{\text{PAA}} \cdot M_{\text{CuSO}_4}} = 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 1,5; 2$$

C_{CuSO_4} : CuSO_4 konsantrasyonu

C_{PAA} : PAA polimerinin konsantrasyonu (tüm $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$ oranları için sabittir % 0,1'dir)

M_{AA} : PAA polimerinin monomerinin molekül ağırlığı

M_{CuSO_4} : CuSO_4 molekül ağırlığı

1) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 0,1 olan 10 ml PAA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : $0,0222 \text{ g}/100\text{ml} = 0,222 \text{ mg}/\text{ml} = 2,22 \text{ mg}/10\text{ml}$

2) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 0,2 olan 10 ml PAA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : $0,0444 \text{ g}/100\text{ml} = 0,444 \text{ mg}/\text{ml} = 4,44 \text{ mg}/10\text{ml}$

3) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 0,3 olan 10 ml PAA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : $0,0666 \text{ g}/100\text{ml} = 0,666 \text{ mg}/\text{ml} = 6,66 \text{ mg}/10\text{ml}$

4) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 0,4 olan 10 ml PAA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : $0,0888 \text{ g}/100\text{ml} = 0,888 \text{ mg}/\text{ml} = 8,88 \text{ mg}/10\text{ml}$

5) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 0,5 olan 10 ml PAA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : $0,111 \text{ g}/100\text{ml} = 1,11 \text{ mg}/\text{ml} = 11,1 \text{ mg}/10\text{ml}$

6) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 1 olan 10 ml PAA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : $0,222 \text{ g}/100\text{ml} = 2,22 \text{ mg}/\text{ml} = 22,2 \text{ mg}/10\text{ml}$

7) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 1,5 olan 10 ml PAA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

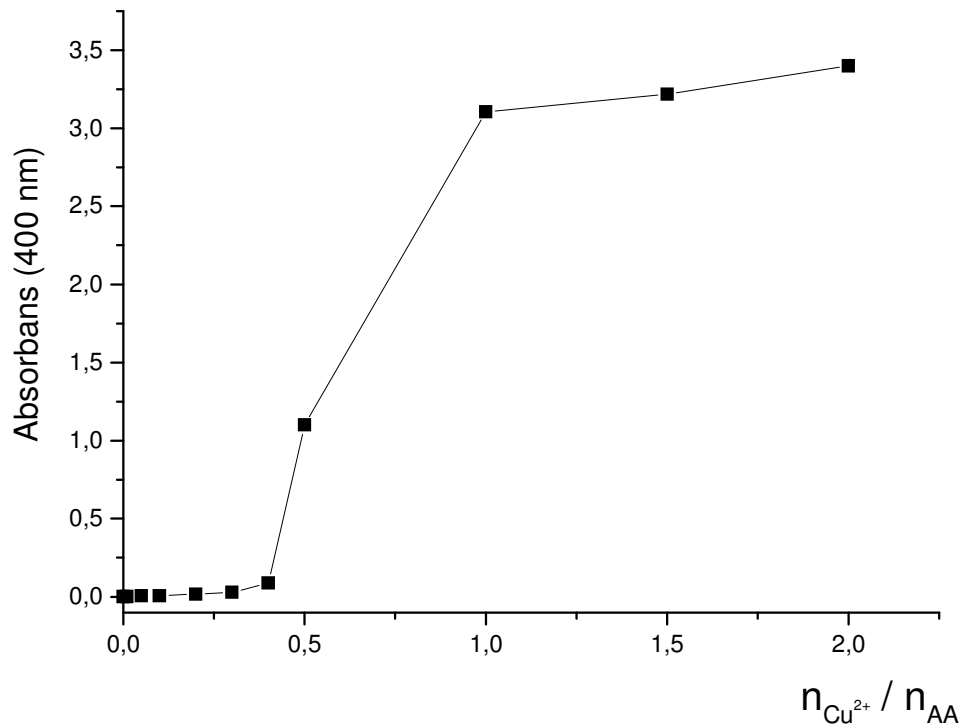
C_{CuSO_4} : $0,333 \text{ g}/100\text{ml} = 3,33 \text{ mg}/\text{ml} = 33,3 \text{ mg}/10\text{ml}$

8) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 2 olan 10 ml PAA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : $0,444 \text{ g}/100\text{ml} = 4,44 \text{ mg}/\text{ml} = 44,4 \text{ mg}/10\text{ml}$

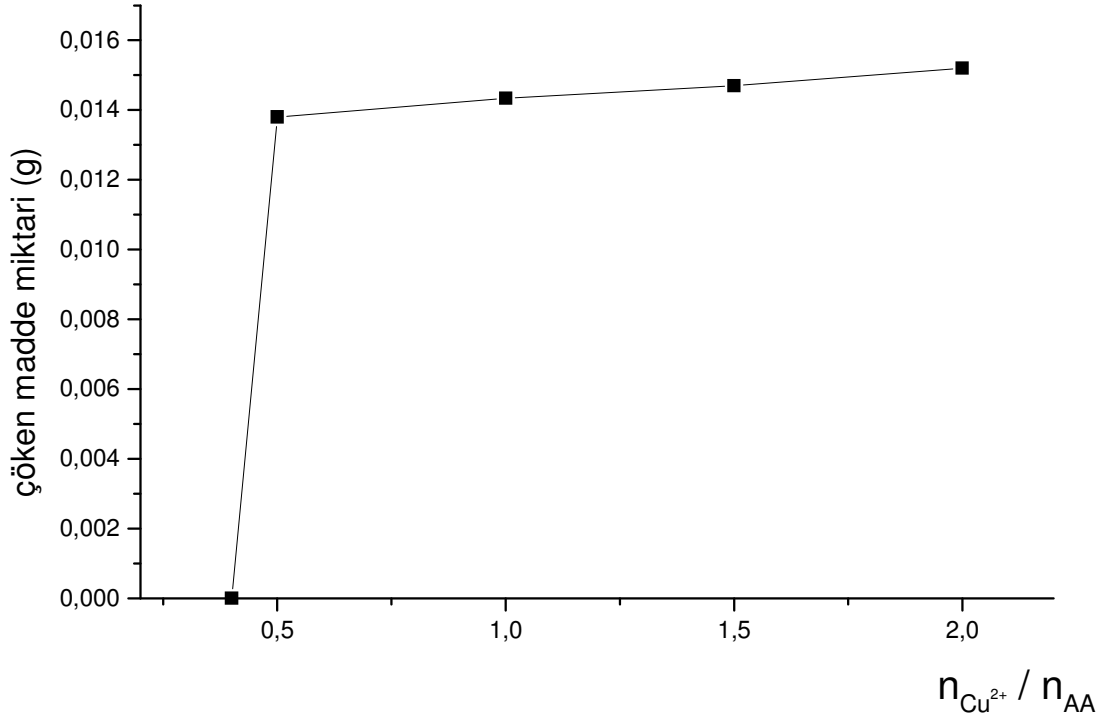
4.2.2 PAA-Cu²⁺ İkili Komplekslerine Ait Analiz Sonuçları

Hazırlanan ikili komplekslerin 400 nm dalga boyunda absorpsanları ölçüldükten sonra, viskozitesi ve son olarakta boyut ve zeta potansiyeli ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} \geq 0,5$ oranlarında oluşan çökeltiler santrifüj yöntemi ile ayrılarak süzütünün ölçümü alınmıştır) ölçüldü. Çeşitli miktardaki bakır sülfat çözeltisi, poliakrilik asit polimerine (PAA) ilave edildiğinde ve pH:7'ye ayarlığında belirli oranlara kadar sistemde çökme görülmemektedir. Öte yandan bakır sülfatın kendisi suda çözündüğünde ve çözeltinin pH:7'ye ayarlandığında çökmektedir. Ayrıca spektrofotometrik ölçümler PMK'nın oluşturduğunu göstermektedir.



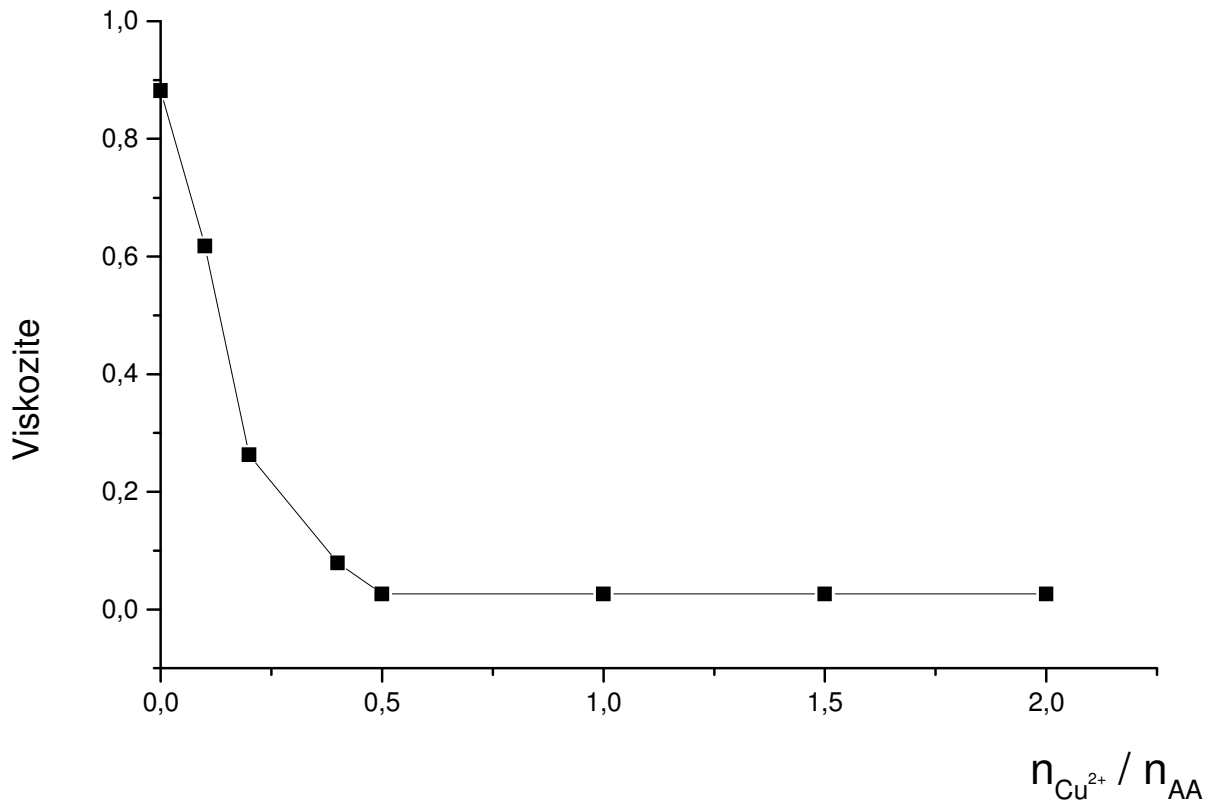
Şekil 4.1 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı 400 nm'deki optik yoğunlukları:
 $0 \leq n_{Cu^{2+}} / n_{AA} \leq 2$.

İkili komplekslerde belirli orandan sonra ($n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{AA}} \geq 0,5$) çöken madde miktarı tespit edilmiştir



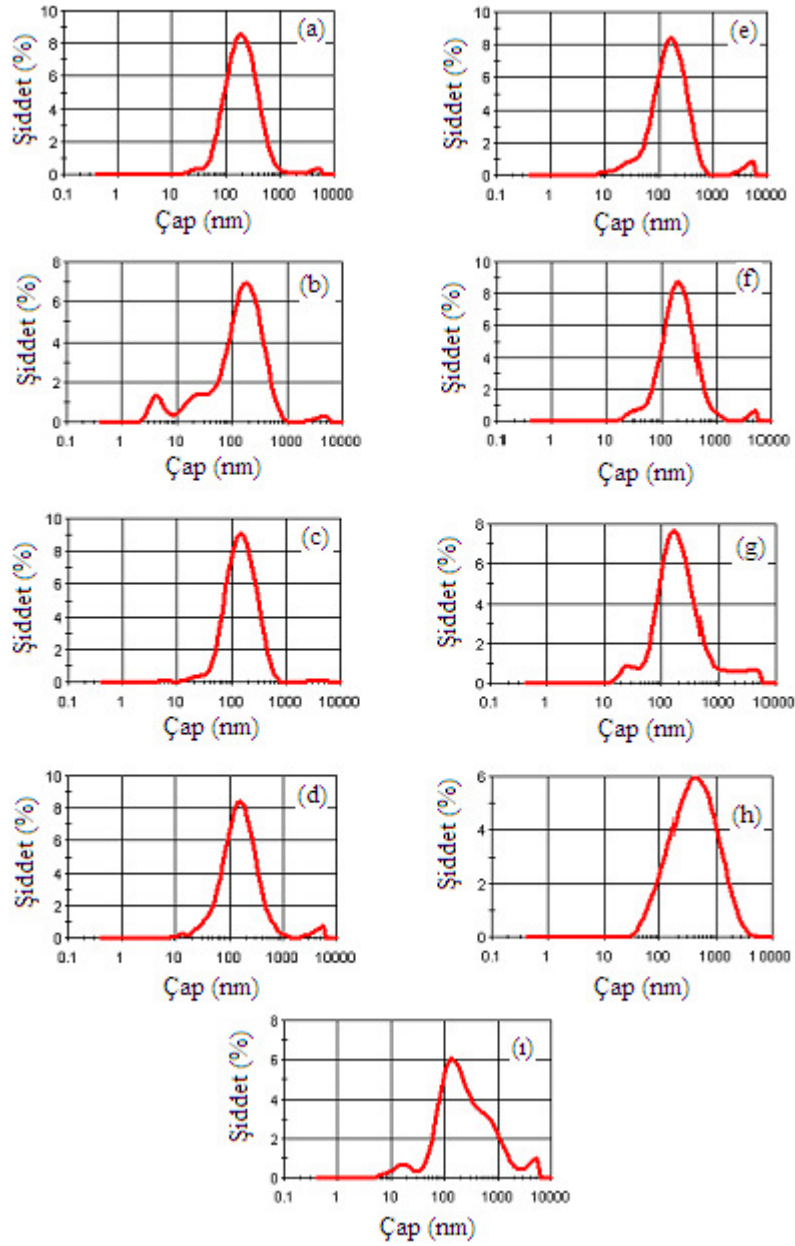
Şekil 4.2 $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{AA}} \geq 0,5$ oranlarında ikili komplekslerde oluşan çöken madde miktarı (g).

Polimer ve polimerlerin metal iyonlarıyla oluşturduğu komplekslerin viskozitesi (spesifik özgül viskozite, birimi poise'dir) Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Viskozite eğrisi oldukça düştükten sonra sabit şekilde devam etmektedir.

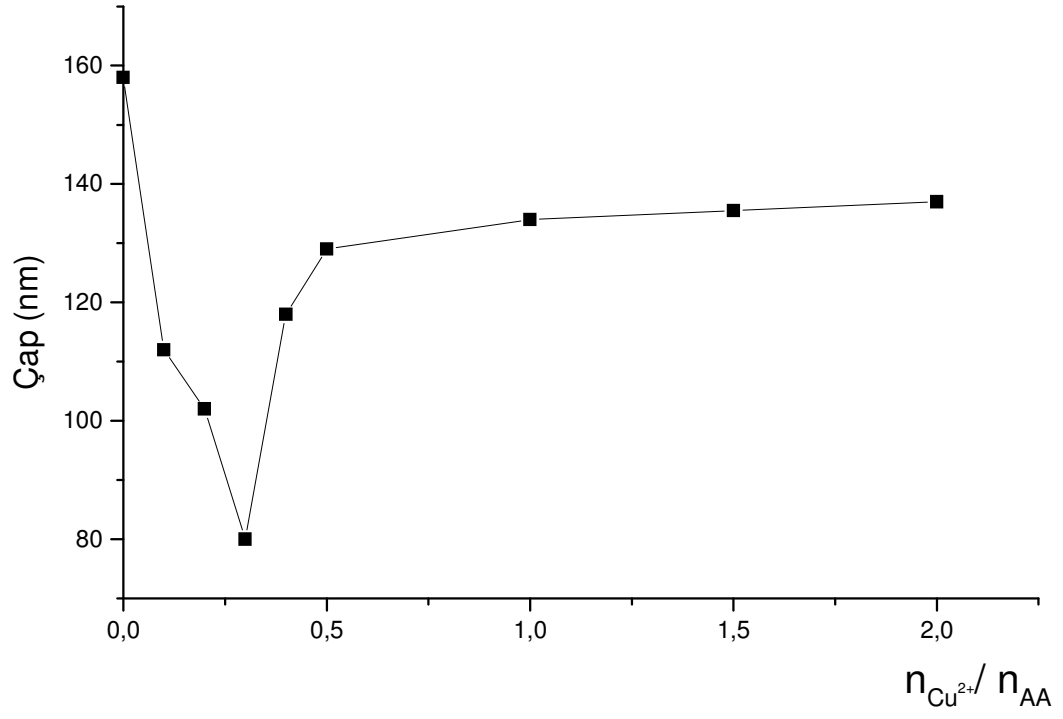


Şekil 4.3 PAA- Cu^{2+} ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı viskozite grafiği.

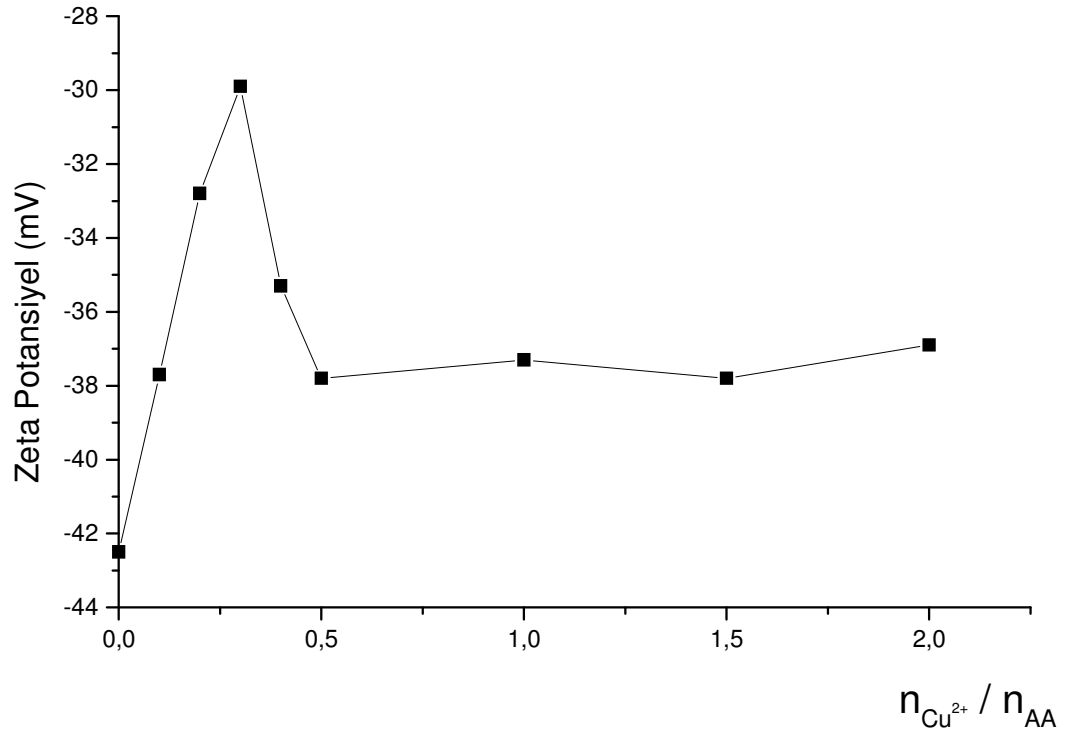
Polimer-metal ikili komplekslerin Zetasizer cihazı ile ölçümü alınmıştır (Şekil 5.4).



Şekil 4.4 PAA'din üzerine bakırın eklenmesiyle elde edilen ikili komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PAA (a); $n_{Cu^{2+}} / n_{AA}$: 0,1 (b); 0,2 (c); 0,3 (d); 0,4 (e); 0,5 (f); 1 (g); 1,5 (h); 2 (i).



Şekil 4.5 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı çap grafiği.



Şekil 4.6 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı zeta potansiyel grafiği.

4.2.3 PAA-Cu²⁺-BSA Üçlü Komplekslerinin Hazırlanması

4.2.3.1 Kullanılan Çözeltiler

PAA stok çözeltisi 3mg/ml olacak şekilde, CuSO₄.5H₂O çözeltisi ve BSA stok çözeltisi yine ultra saf suda oda sıcaklığında hazırlanmıştır.

4.2.3.2 Komplekslerin Hazırlanması

Her bir çözeltideki PAA miktarı sabit olacak şekilde (4 adet farklı n_{Cu²⁺}/n_{AA} oranında) hazırlanan stoktan toplam 10 ml çözelti için 3333 µl (9,999 mg) PAA alınarak değişik oranlarda CuSO₄.5H₂O eklenerek oluşturulan ikili kompleksler 1 gece karıştırıldıktan sonra pH:7'ye 1N NaOH çözeltisi ile ayarlanır. BSA stok çözeltisi yavaş yavaş PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin üzerine eklenerek karıştırılmış ve sonuçta üçlü PAA-Cu²⁺-BSA kompleksleri elde edilmiştir (pH: 7 olduğu kontrol edildi).

4.2.3.3 Hesaplamalar

Öncelikle, n_{Cu²⁺}/n_{AA} = 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 herbir oran için n_{BSA}/n_{PAA} hesaplanır. Ancak üçlü komplekslerde PAA ve BSA miktarları bütün oranlar için değişmezken sadece Cu²⁺ iyonlarının miktarı değişir. Üçlü komplekse ait hesaplamalar şu şekildedir:

$$\frac{n_{BSA}}{n_{PAA}} = \frac{C_{BSA} \cdot M_{PAA}}{C_{PAA} \cdot M_{BSA}} = 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3$$

C_{BSA} : BSA konsantrasyonu

C_{PAA} : PAA polimerinin konsantrasyonu (tüm n_{BSA}/n_{PAA} oranları için sabittir % 0,1'dir)

M_{PAA} : PAA polimerinin molekül ağırlığı (100.000 Da)

M_{BSA} : BSA molekül ağırlığı (66.000 Da)

1) n_{Cu²⁺}/n_{AA}: 0,1 ve n_{BSA}/n_{PAA} : 0,5 olan 10 ml PAA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi çözeltisi

$$C_{BSA} : 3,3 \cdot 10^{-2} \text{ g/100ml} = 3,3 \cdot 10^{-1} \text{ mg/ml} = 3,3 \text{ mg/10ml}$$

2) n_{Cu²⁺}/n_{AA}: 0,1 ve n_{BSA}/n_{PAA} : 1 olan 10 ml PAA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi çözeltisi

$$C_{BSA} : 6,6 \cdot 10^{-2} \text{ g/100ml} = 6,6 \cdot 10^{-1} \text{ mg/ml} = 6,6 \text{ mg/10ml}$$

3) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 0,1 ve $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}$: 1,5 olan 10 ml PAA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi çözeltisi

$$C_{\text{BSA}} : 9,9 \cdot 10^{-2} \text{ g/100ml} = 9,9 \cdot 10^{-1} \text{ mg/ml} = 9,9 \text{ mg/10ml}$$

4) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 0,1 ve $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}$: 2 olan 10 ml PAA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi çözeltisi

$$C_{\text{BSA}} : 13,2 \cdot 10^{-2} \text{ g/100ml} = 13,2 \cdot 10^{-1} \text{ mg/ml} = 13,2 \text{ mg/10ml}$$

5) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 0,1 ve $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}$: 2,5 olan 10 ml PAA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi çözeltisi

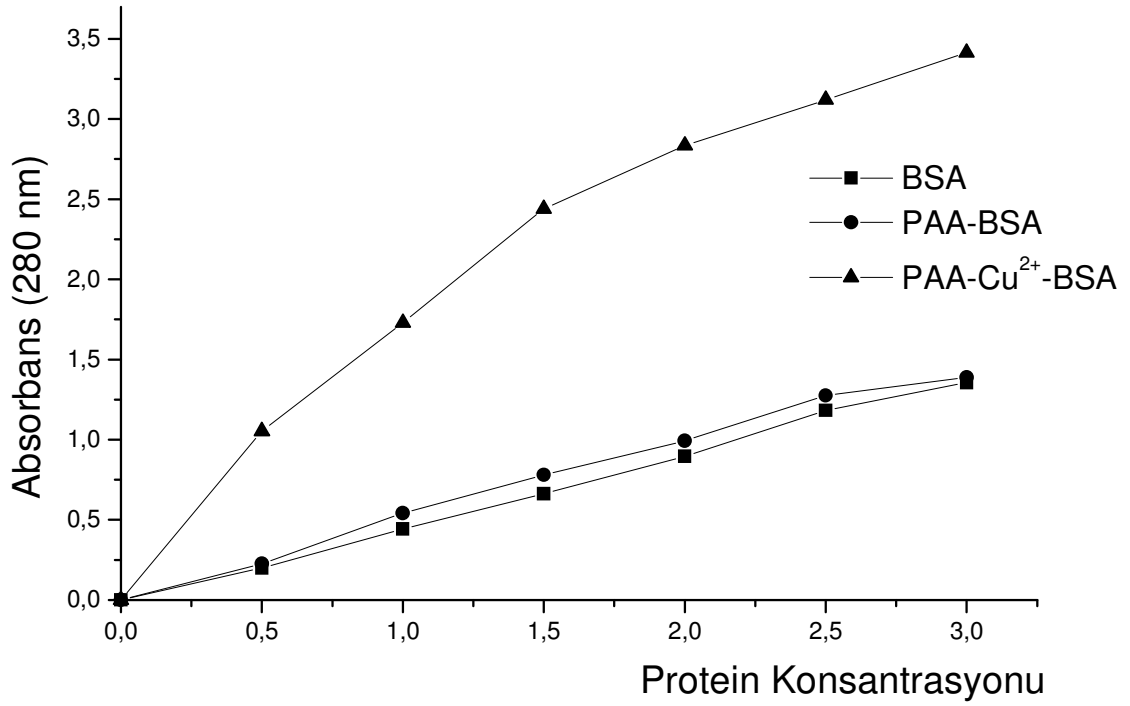
$$C_{\text{BSA}} : 16,5 \cdot 10^{-2} \text{ g/100ml} = 16,5 \cdot 10^{-1} \text{ mg/ml} = 16,5 \text{ mg/10ml}$$

6) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 0,1 ve $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}$: 3 olan 10 ml PAA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi çözeltisi

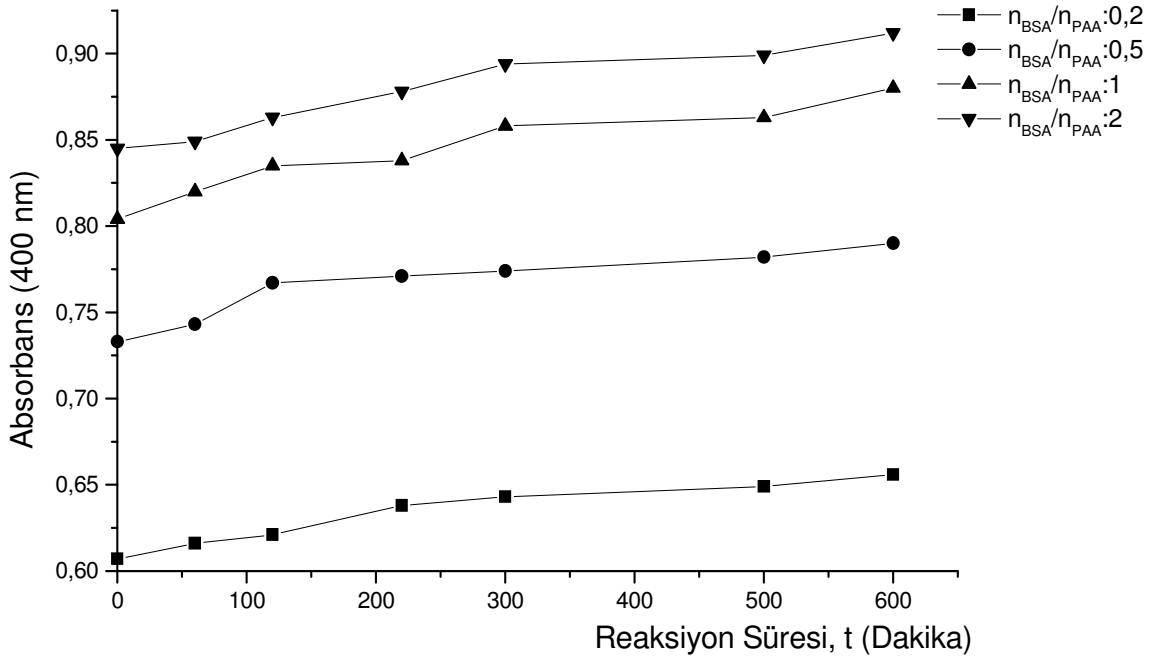
$$C_{\text{BSA}} : 19,8 \cdot 10^{-2} \text{ g/100ml} = 19,8 \cdot 10^{-1} \text{ mg/ml} = 19,8 \text{ mg/10ml}$$

4.2.4 PAA-Cu²⁺-BSA Üçlü Komplekslerine Ait Analiz Sonuçları

Farklı miktarlarda protein içeren protein çözeltilerinin (BSA) ve aynı konsantrasyonda protein çözeltisi içeren polimer çözeltileri (PAA-BSA) ve polimer-metal (PAA-Cu²⁺-BSA) çözeltileriyle karıştırılarak 280 nm'deki absorbans ölçümleri alındı.



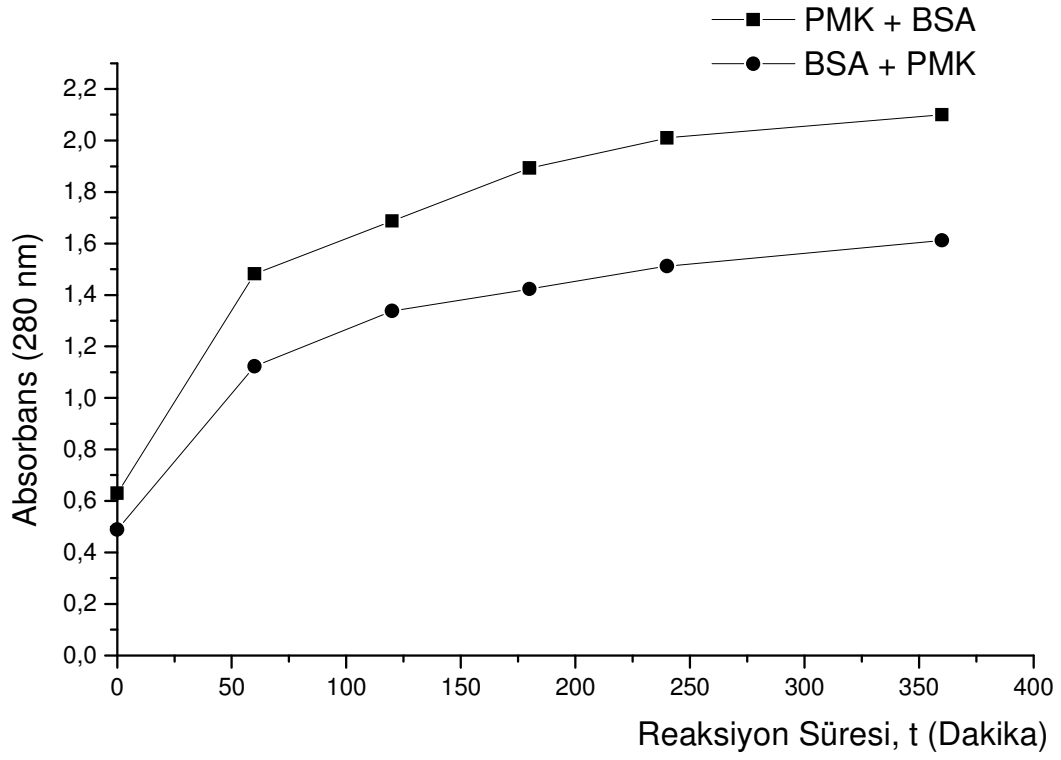
Şekil 4.7 Protein, protein-polimer ve polimer-metal-polimer kompleksleri ($n_{Cu^{2+}} / n_{PAA}$: 0,4; n_{BSA} / n_{PAA} : 2) çözeltilerinin 280 nm'deki optik yoğunlukları.



Şekil 4.8 PAA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerinin 400 nm'deki farklı protein/polimer oranlarına göre zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri: $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$: 0,4 oranında n_{BSA}/n_{PAA} : 0,2; 0,5; 1; 2 oranları.

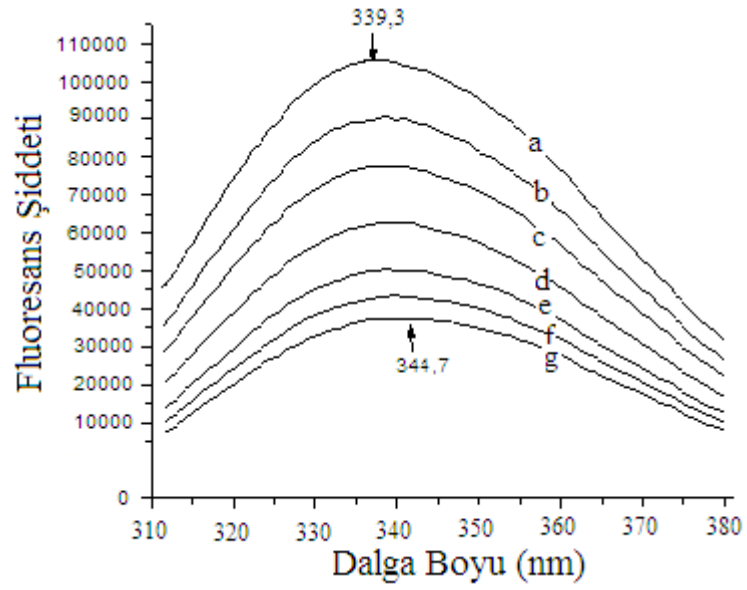
Şekil 4.8'de gösterildiği üzere üçlü karışım, PMK ($n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$: 0,4) çözeltisine proteinin ilavesiyle hazırlanmıştır. n_{BSA}/n_{PAA} : 0,2; 0,5; 1; 2 olarak dört değerde PAA-Cu²⁺-BSA karışımları hazırlanmıştır. Protein konsantrasyonu artışıyla reaksiyon hızı artmakta, limit değere ulaşmakta ve daha sonra sabit hale gelmektedir.

BSA ve PMK karışımlarının zamana bağlı 280 nm’ deki spektrofotometrik ölçümleri değişimi Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Burada hazırlama yönteminin etkisi incelenmiştir.

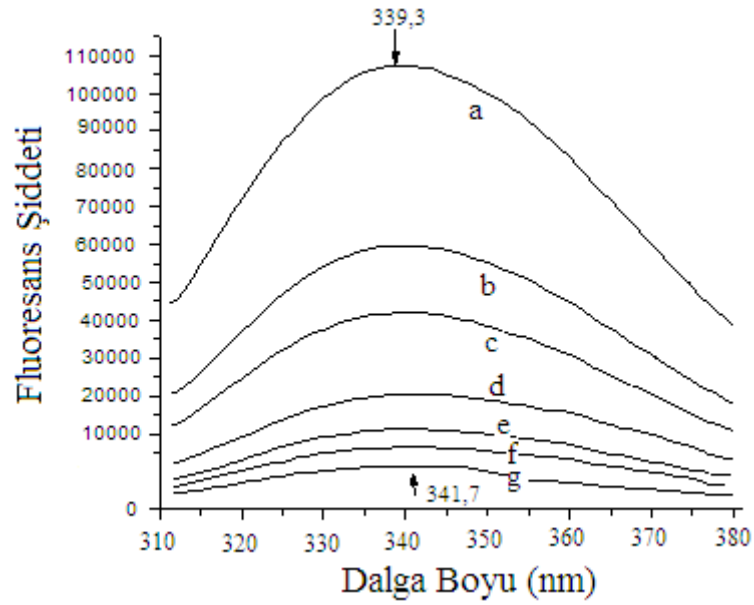


Şekil 4.9 BSA ve PAA-Cu²⁺ ikili kompleksinin ($n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$: 0,4) (PMK) (oranlar birbirine eşit) zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri.

Üçlü PAA-Cu²⁺-BSA komplekslerinin floresansı ölçülmüştür.

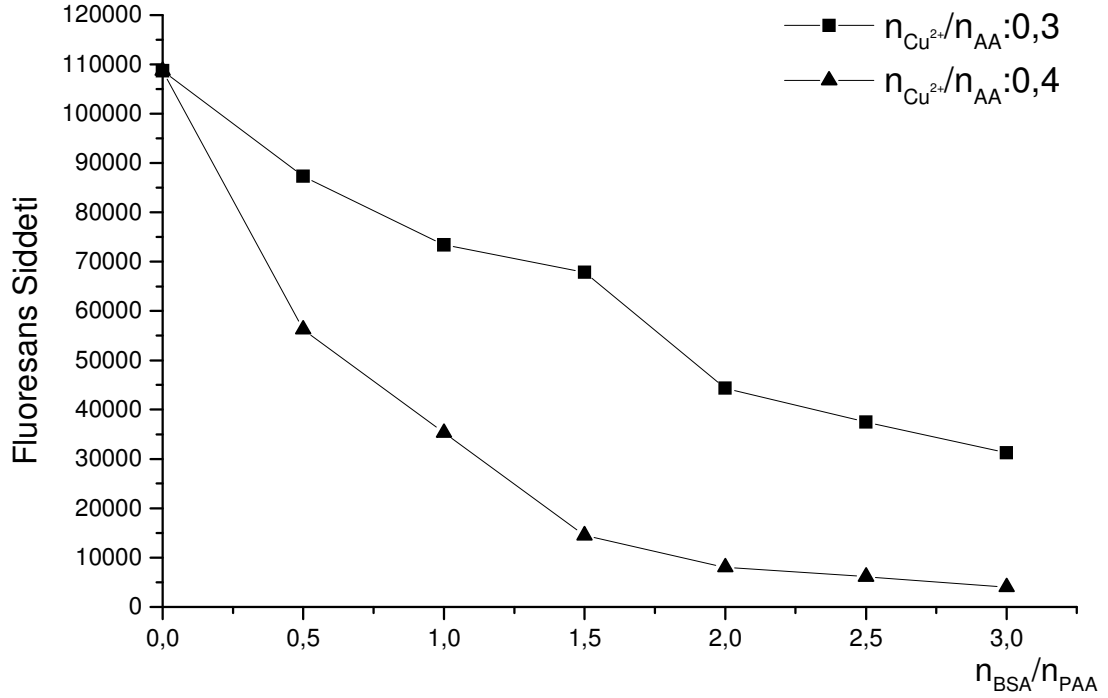


Şekil 4.10 PAA-Cu²⁺ ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA}$: 0,4) ikili kompleksinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu: BSA a; n_{BSA} / n_{PAA} : 0,5 b; 1 c; 1,5 d; 2 e, 2,5 f; 3 g.

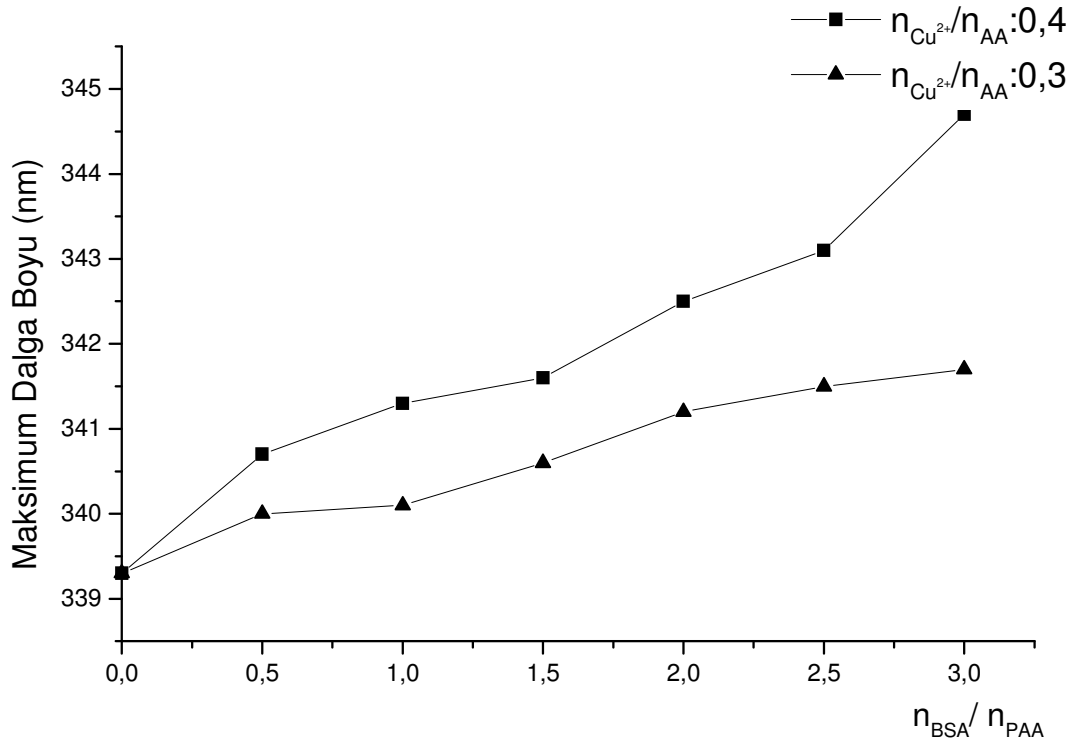


Şekil 4.11 PAA-Cu²⁺ ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA}$: 0,3) ikili kompleksinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu: BSA a; n_{BSA} / n_{PAA} : 0,5 b; 1 c; 1,5 d; 2 e, 2,5 f; 3 g.

n_{BSA}/n_{PAA} değerlerini x eksenine, fluoresans şiddeti ve maksimum dalga boyu değerlerini de y eksenine konarak aşağıdaki grafikler elde edilmiştir.

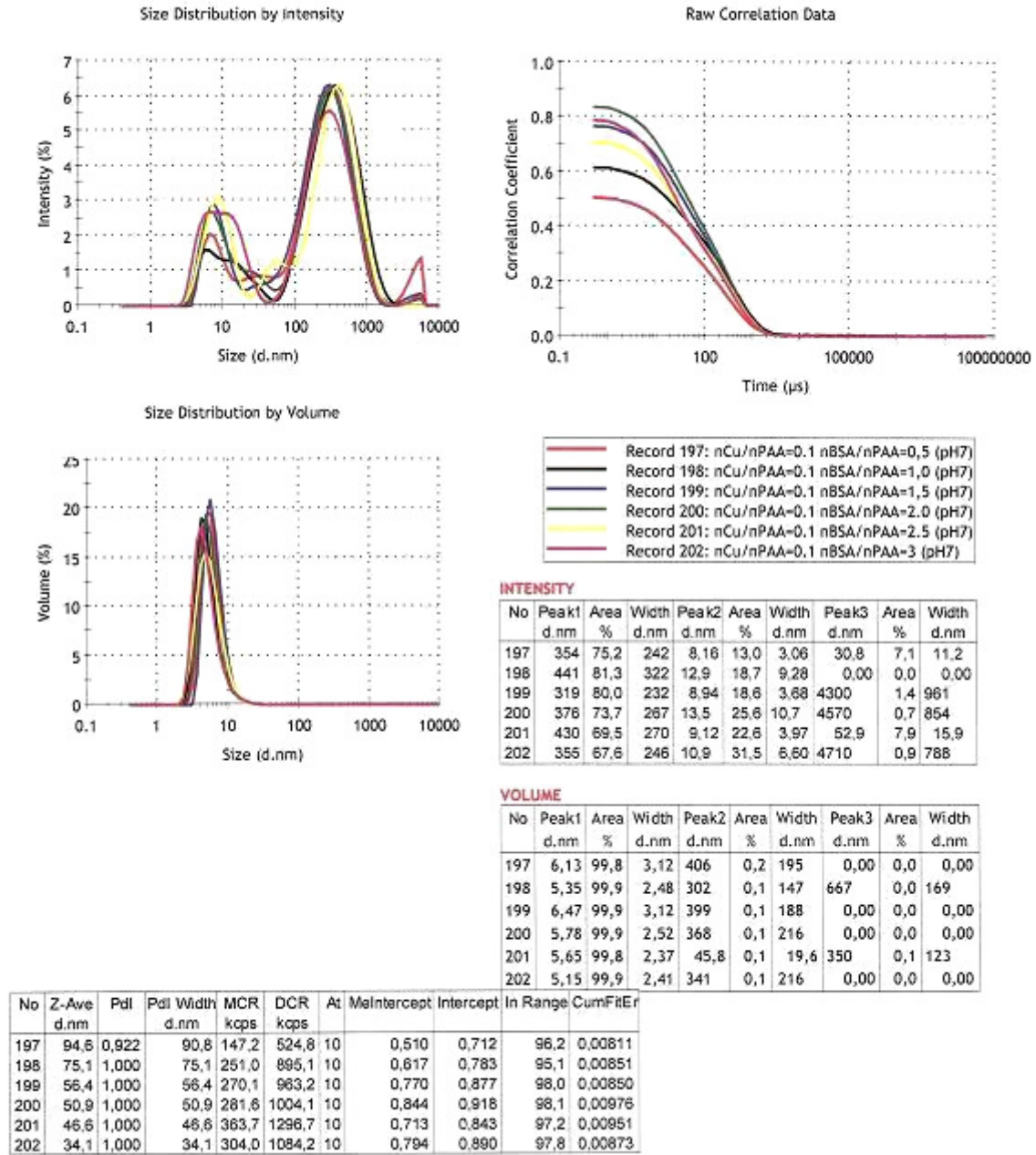


şekil 4.12 PAA- Cu^{2+} ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumlarından elde edilen fluoresans şiddeti değerlerinin n_{BSA}/n_{PAA} oranı ile değişim grafiği.

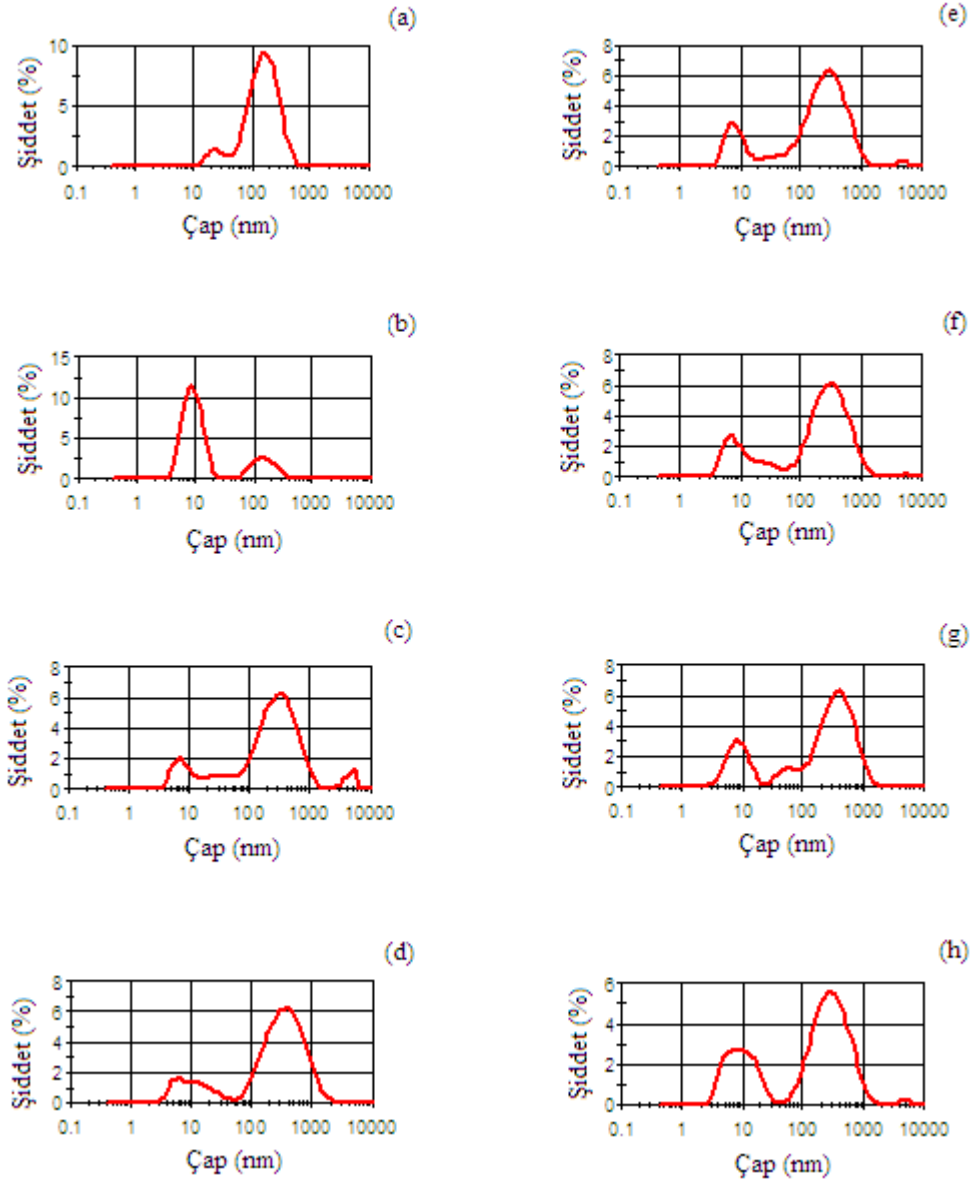


Şekil 4.13 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin n_{BSA}/n_{PAA} oranı ile değişim grafiği.

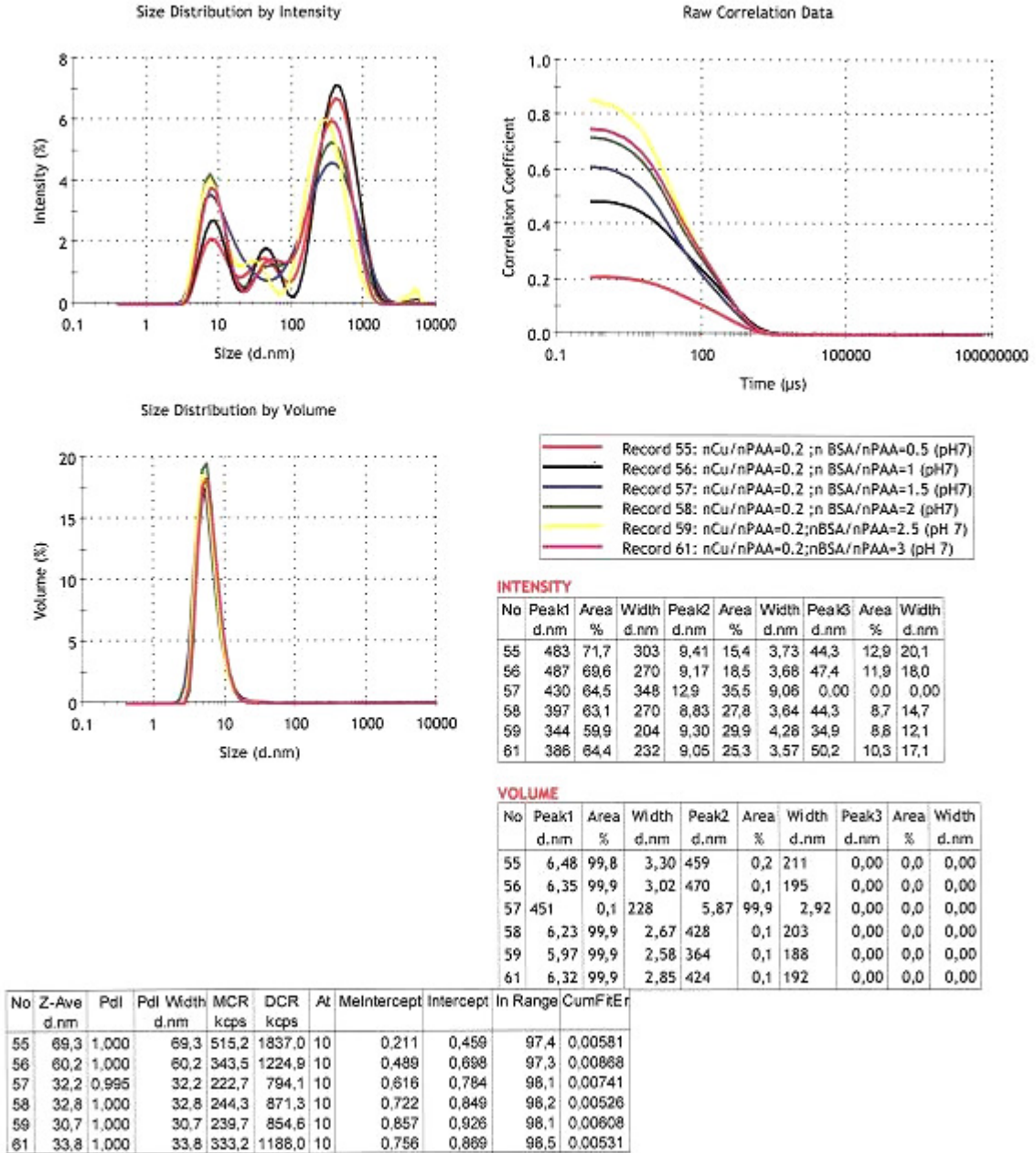
PAA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerin Zetasizer cihazı ile ölçümleri alınmıştır.



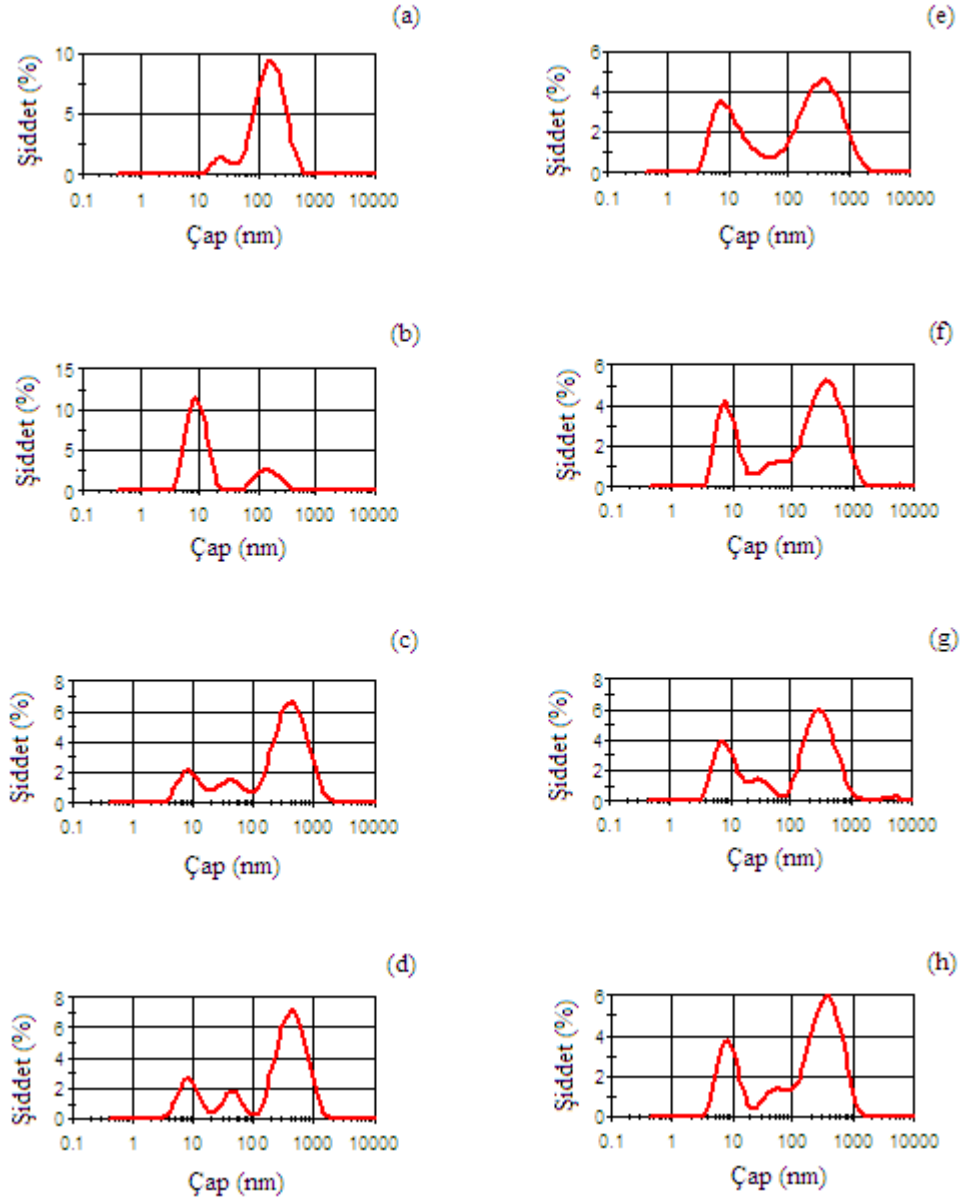
Şekil 4.14 PAA-Cu²⁺ (n_{Cu}²⁺ / n_{AA} : 0,1) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.



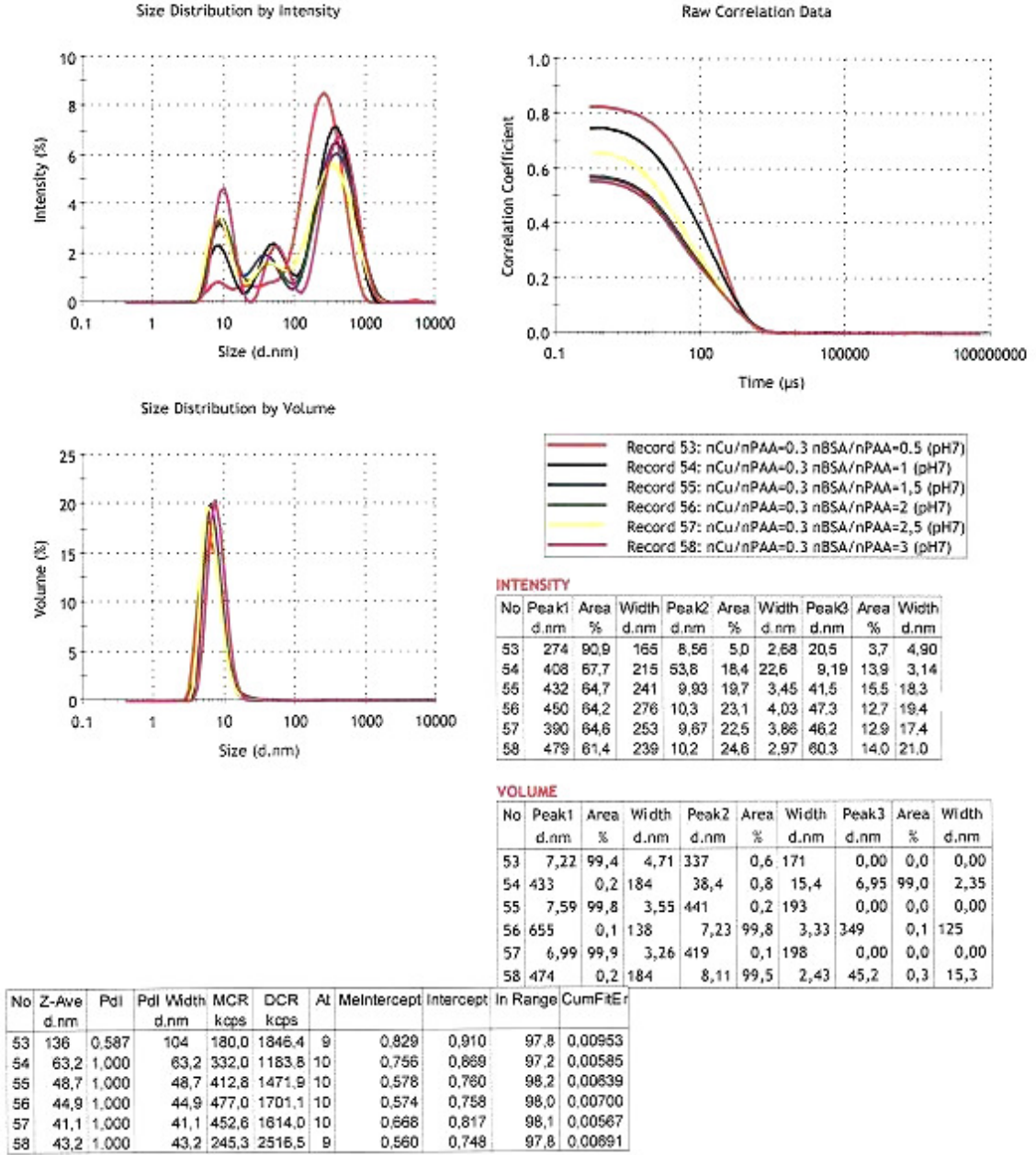
Şekil 4.15 PAA-Metal ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,1$) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PAA (a); BSA (b); $n_{BSA}/n_{PAA} : 0,5$ (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).



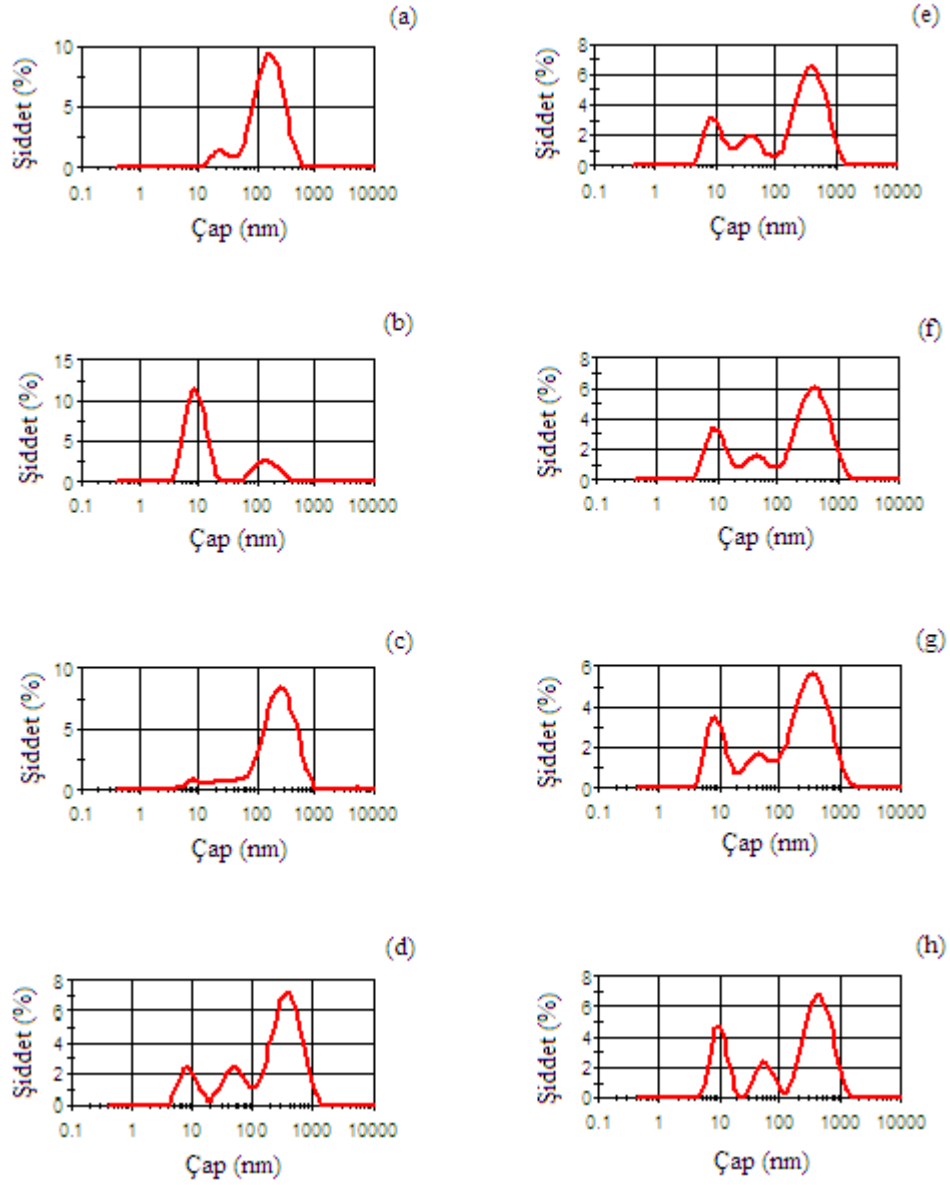
Şekil 4.16 PAA-Cu²⁺ (n_{Cu}²⁺ / n_{AA} : 0,2) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.



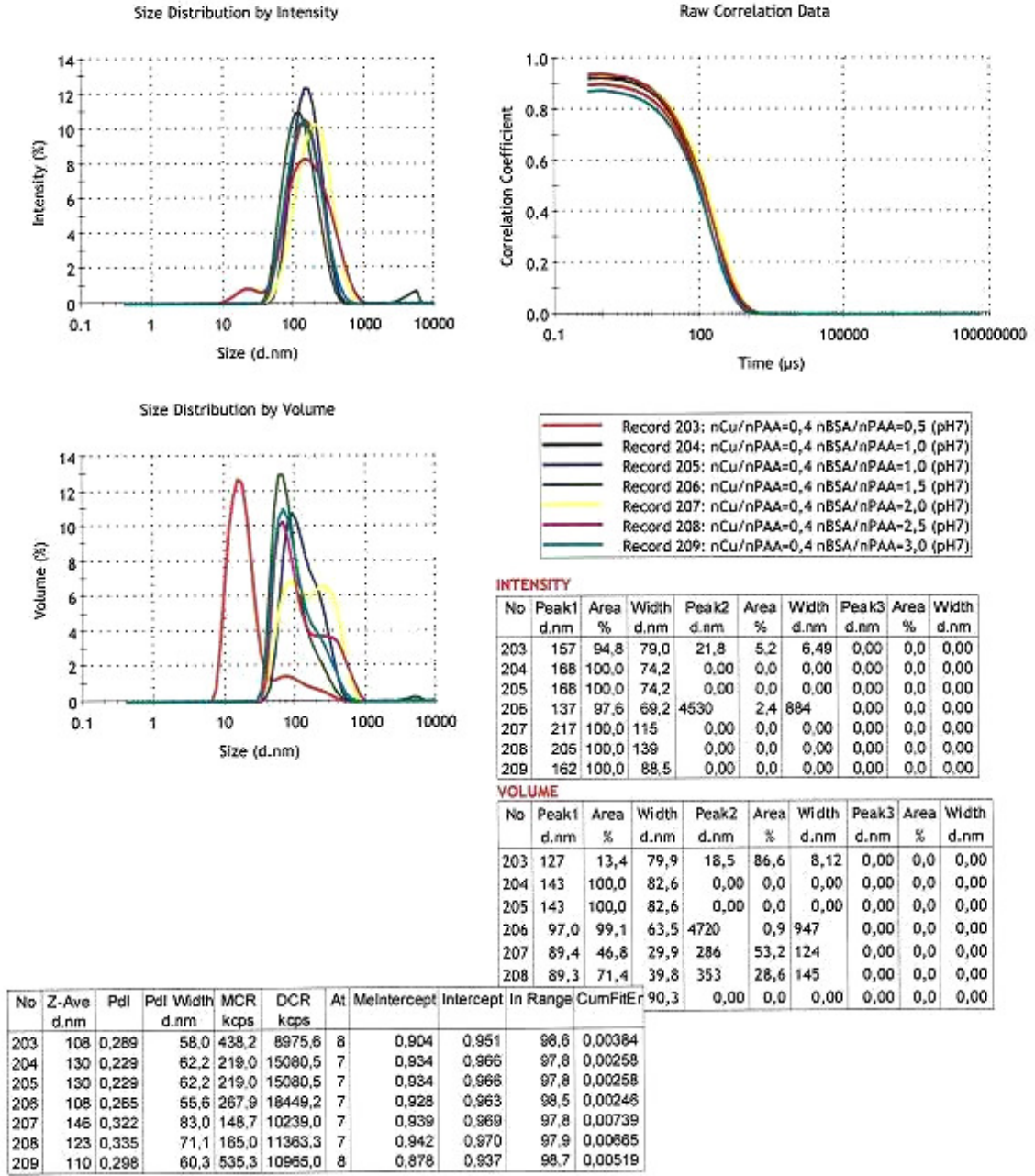
Şekil 4.17 PAA-Cu²⁺ ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,2$) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PAA (a); BSA (b); $n_{BSA}/n_{PAA} : 0,5$ (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).



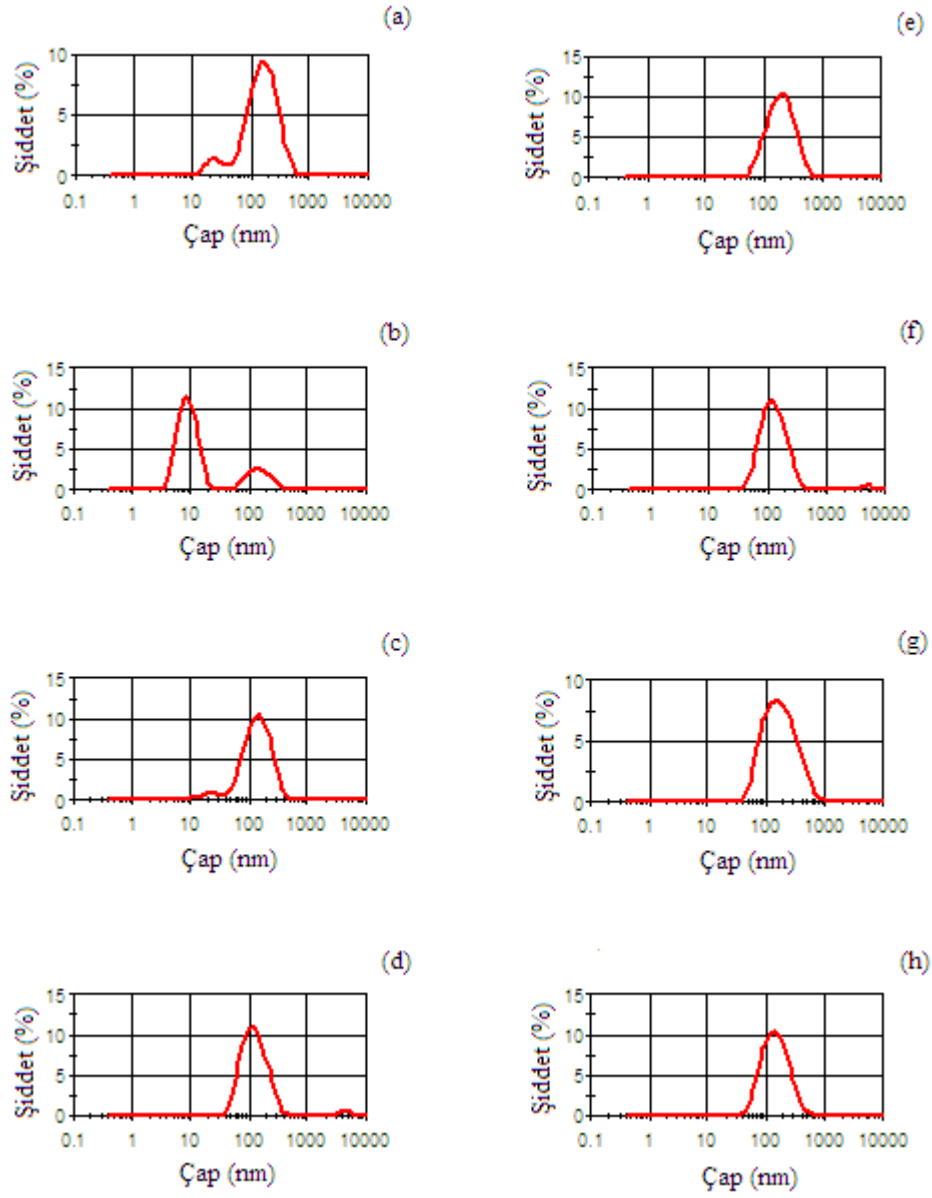
Şekil 4.18 PAA-Cu²⁺ (n_{Cu}²⁺ / n_{AA} : 0,3) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.



Şekil 4.19 PAA-Cu²⁺ ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,3$) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PAA (a); BSA (b); n_{BSA}/n_{PAA} : 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).



Şekil 4.20 PAA-Cu²⁺ (n_{Cu}²⁺ / n_{AA} : 0,4) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.



Şekil 4.21 PAA-Cu²⁺ ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,4$) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PAA (a); BSA (b); $n_{BSA}/n_{PAA} : 0,5$ (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).

4.2.5 FTIR Ölçümleri

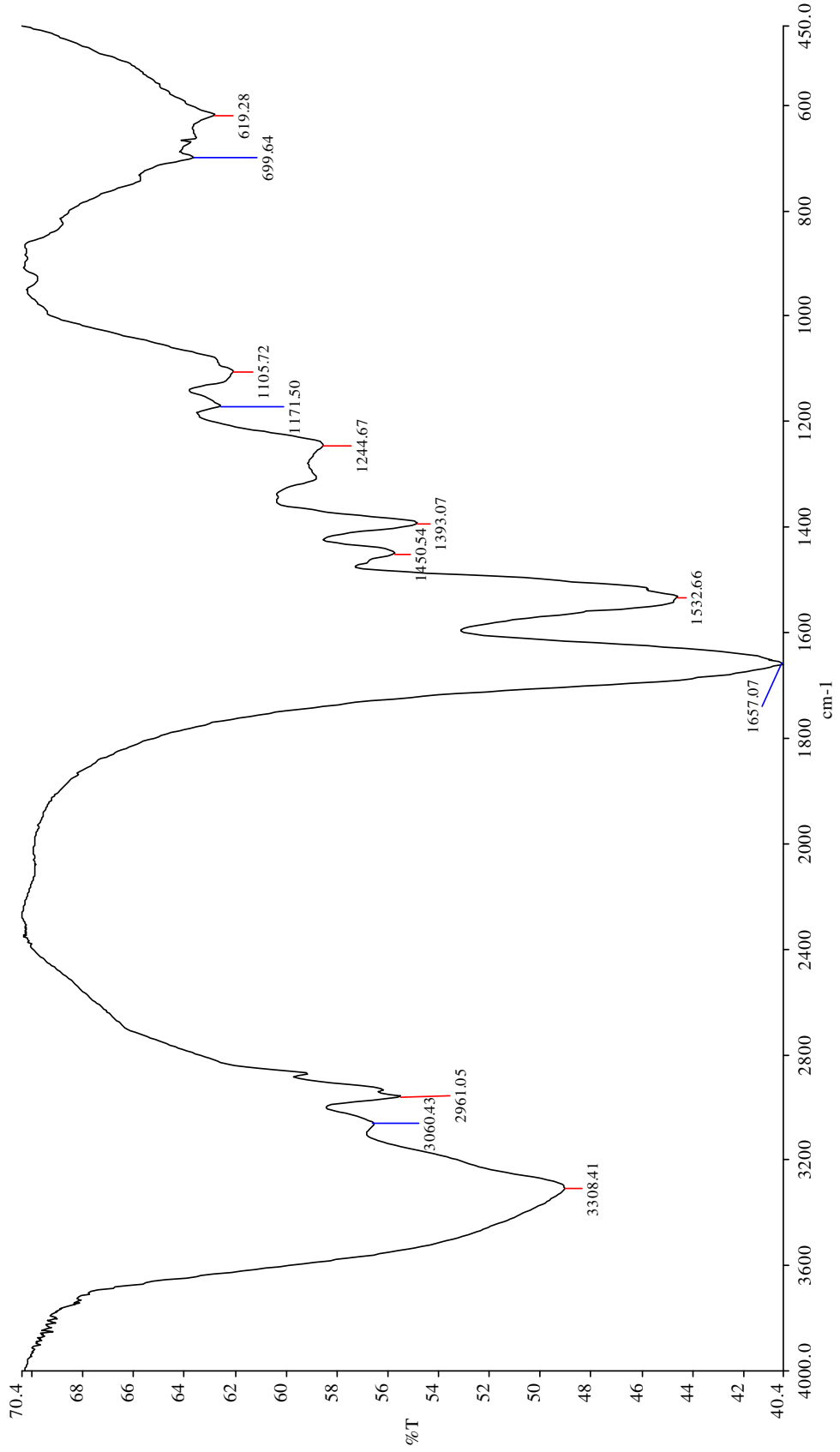
4.2.5.1 Kullanılan Çözeltiler

PAA stok çözeltisi 3mg/ml olacak şekilde, ayrıca $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ stok çözeltisi ve BSA stok çözeltisi ultra saf suda hazırlandı.

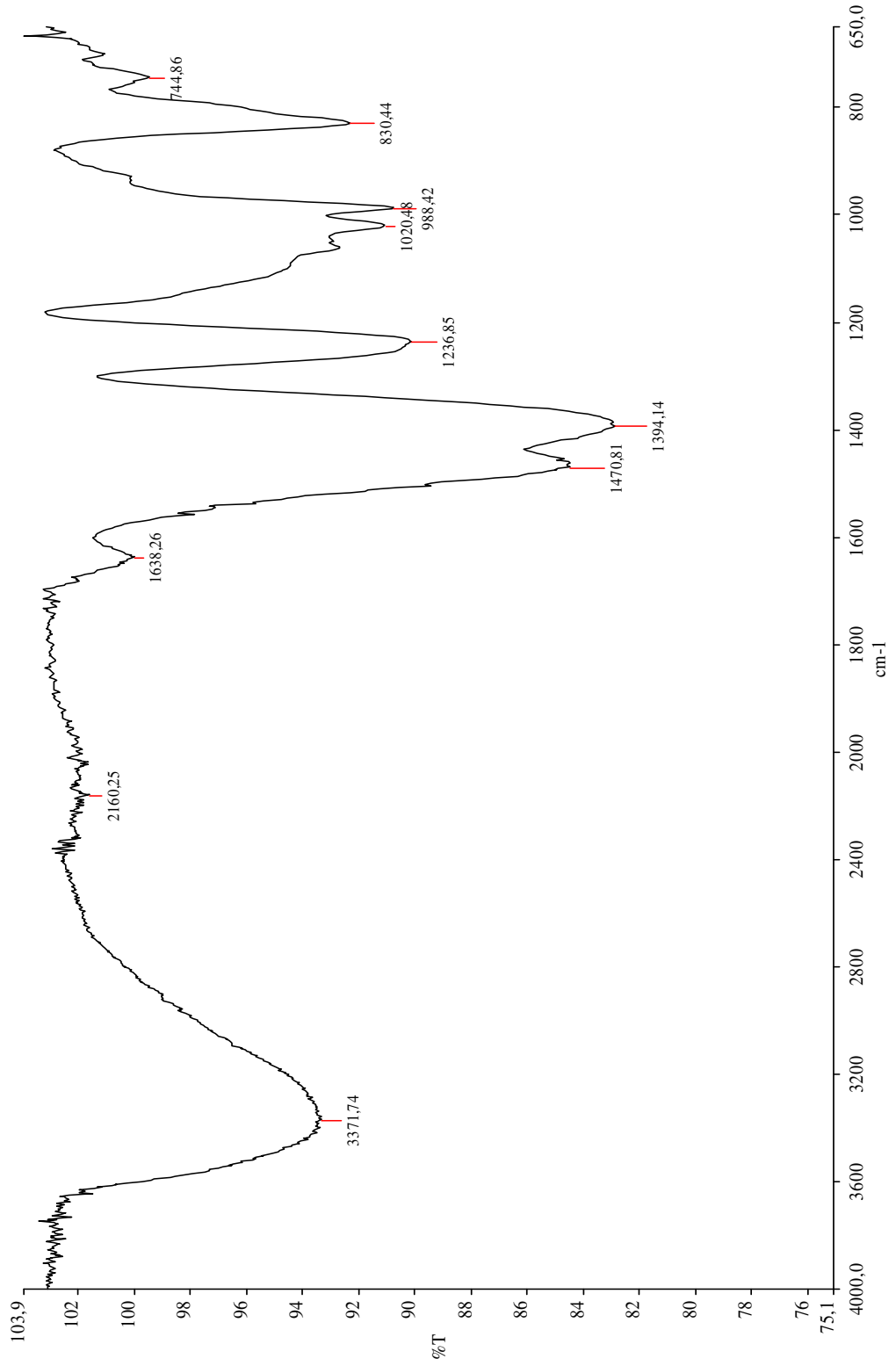
4.2.5.2 Deneyin Yapılışı

Her bir çözeltilerdeki PAA miktarı sabit olacak şekilde ($n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{AA}}$: 0,4 oranında) hazırlanan stoktan toplam 10 ml çözelti için 3333 μl (9,999 mg) PAA alınarak, orana uygun olarak $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ eklenerek oluşturulan ikili kompleksler 1 gece karıştıktan sonra 1N NaOH çözeltisi ile pH:7'ye ayarlanır (ikili polimer-metal kompleksi). Üçlü PAA- Cu^{2+} -BSA kompleksi ise, ikili kompleksin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi ile elde edilir daha sonra pH kontrol edilir (pH:7). Çözeltilerin hazırlanmasından sonra her bir çözeltiye çözelti hacminin en az 4 katı hacimdeki etanole boşaltılır, oluşan ikili ve üçlü komplekslerin çökmesi için buzdolabında bekletilir. Çökelti bir kaç defa dekante edilir ve alkolün kalan kısmı vakum etüvünde kurutulur.

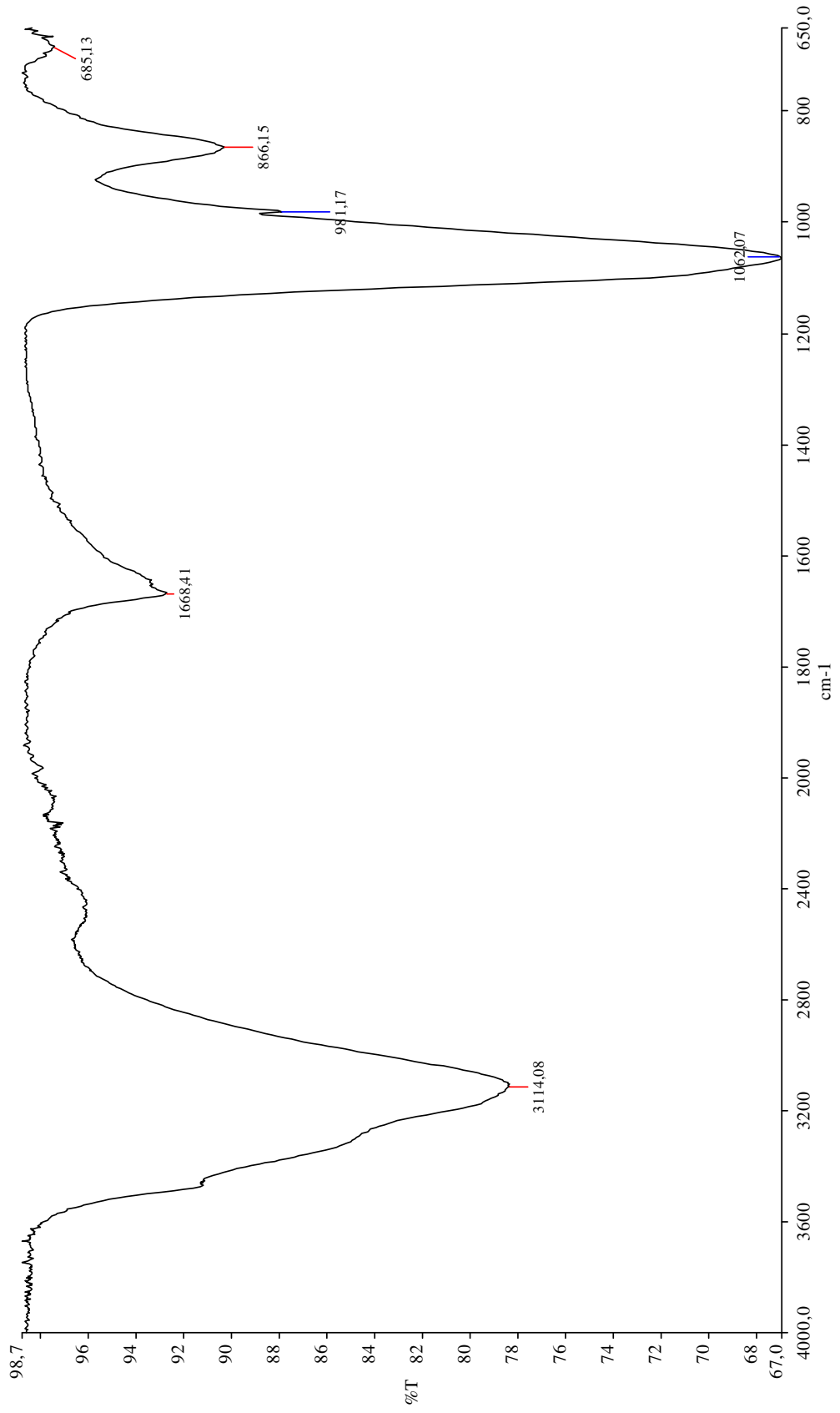
PAA, BSA, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, PAA- Cu^{2+} ikili kompleksi ve PAA- Cu^{2+} -BSA üçlü kompleksi FT-IR spektrumları gösterilmiştir (tüm ölçümler ATR ile alınmıştır).



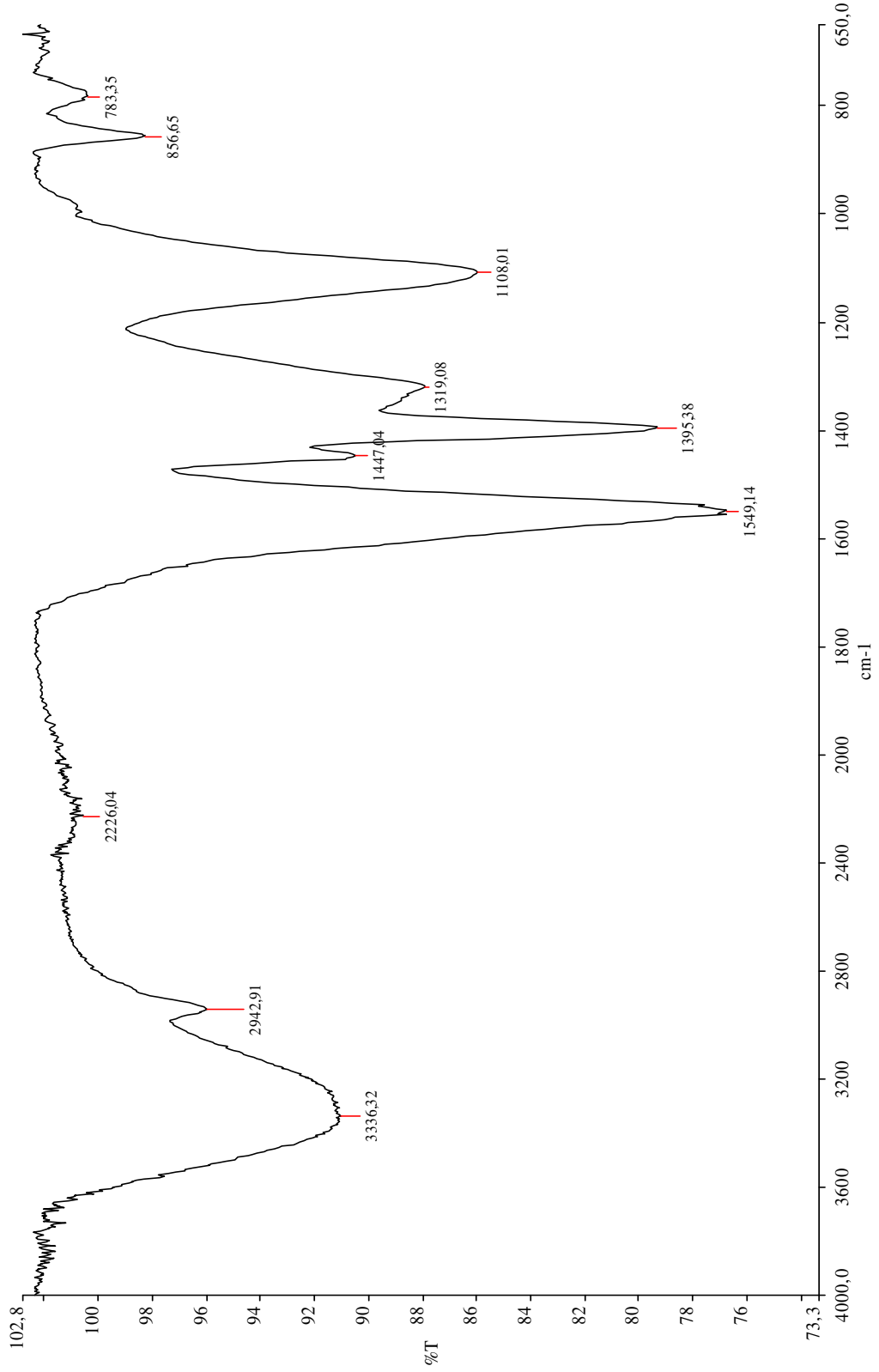
Şekil 4.22 BSA proteininin FT-IR spektrumu (numune katı halde).



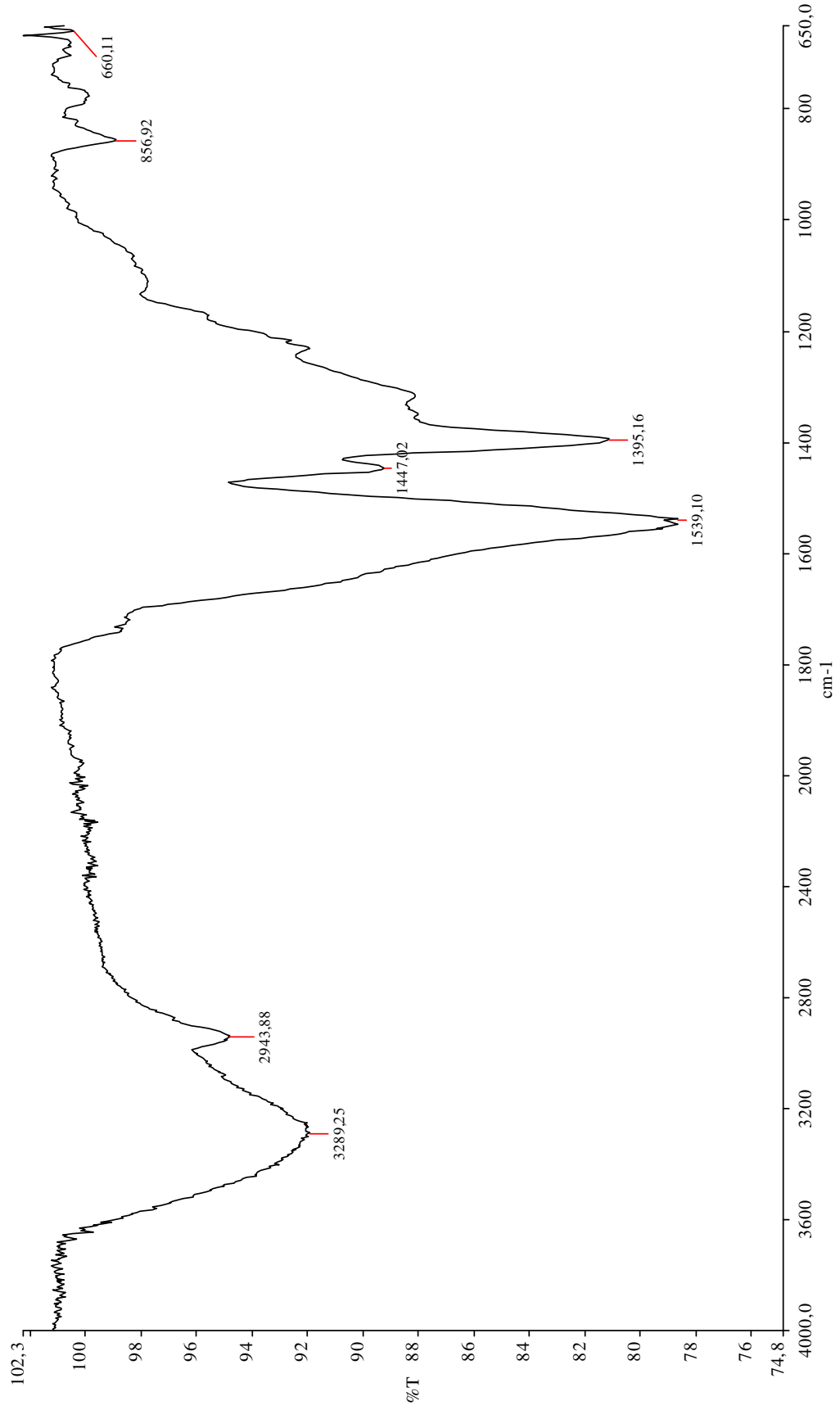
Şekil 4.23 PAA polimerinin FT-IR spektrumu (numune sıvı halde).



Şekil 4.24 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 'nun FT-IR spektrumu (numune katı halde).



Şekil 4.25 PAA-Cu²⁺ ikili kompleksinin FT-IR spektrumu (numune katı halde).

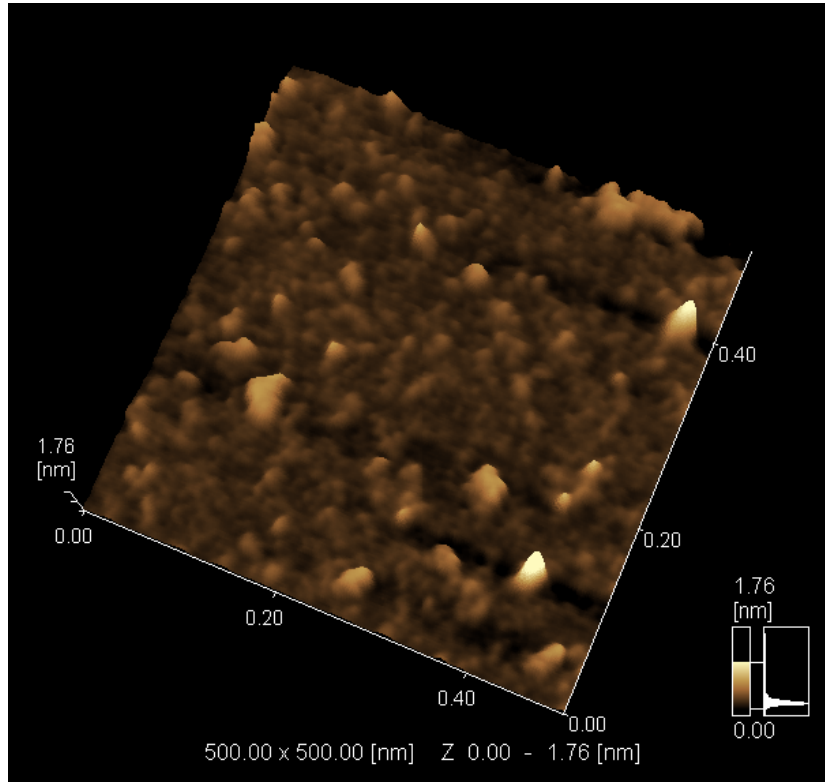


Şekil 4.26 PAA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksinin FT-IR spektrumu (numune katı halde).

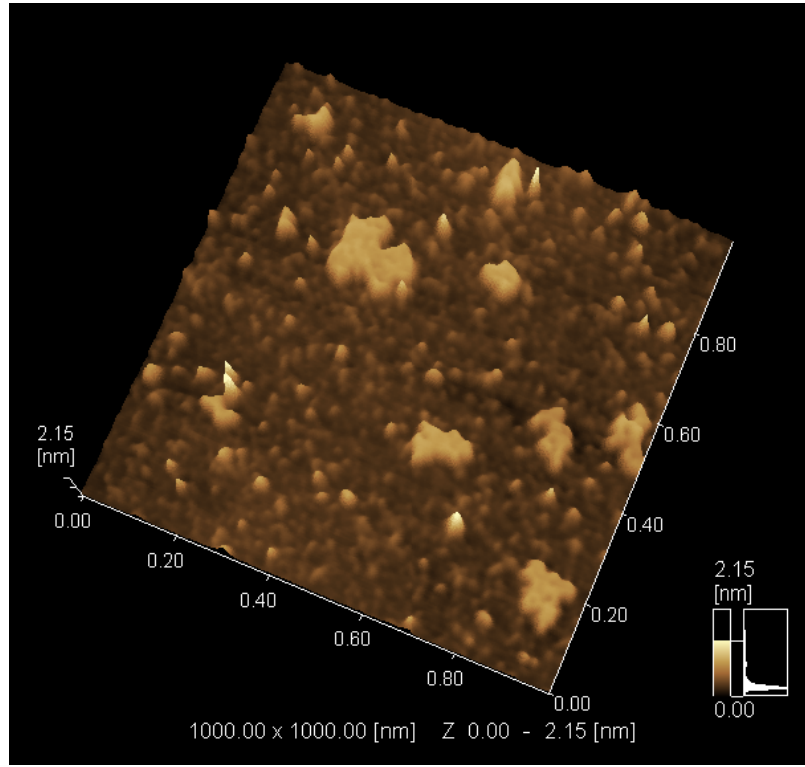
4.2.6 PAA, BSA ve Üçlü PAA-Cu²⁺-BSA kompleksinin Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Görüntülenmesi

4.2.6.1 Deneyin Yapılması

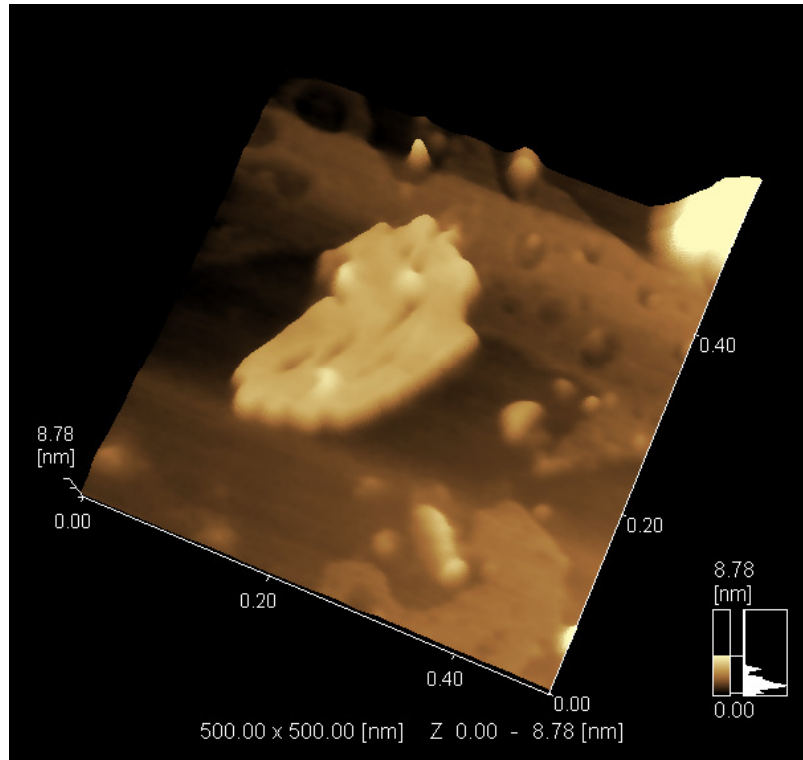
PAA (0,15µg/1ml), BSA (0,15µg/1ml) ve üçlü kompleksin (BSA 0,15µg/1ml olacak şekilde) çözeltisi ultra saf suda hazırlandı. Negatif yüklü Mika K⁺ iyonu ile dengelenmiştir, Mika'nın üzerine bant yapıştırılıp çekilince K⁺ iyonu bantta kalır ve Mika negatif yüklü olarak kullanıma hazır hale gelir. Çözeltiler Mika üzerine damlatılır ve oda sıcaklığında kurutulup (5 dak.) görüntüleme yapılır [AFM ölçümleri "Phase Mode" ta silicon, non-contact mode SPM sensor (Nano world), kantilever kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekillerde verilen AFM görüntüleri yükseklik sinyaline ait görüntülerdir].



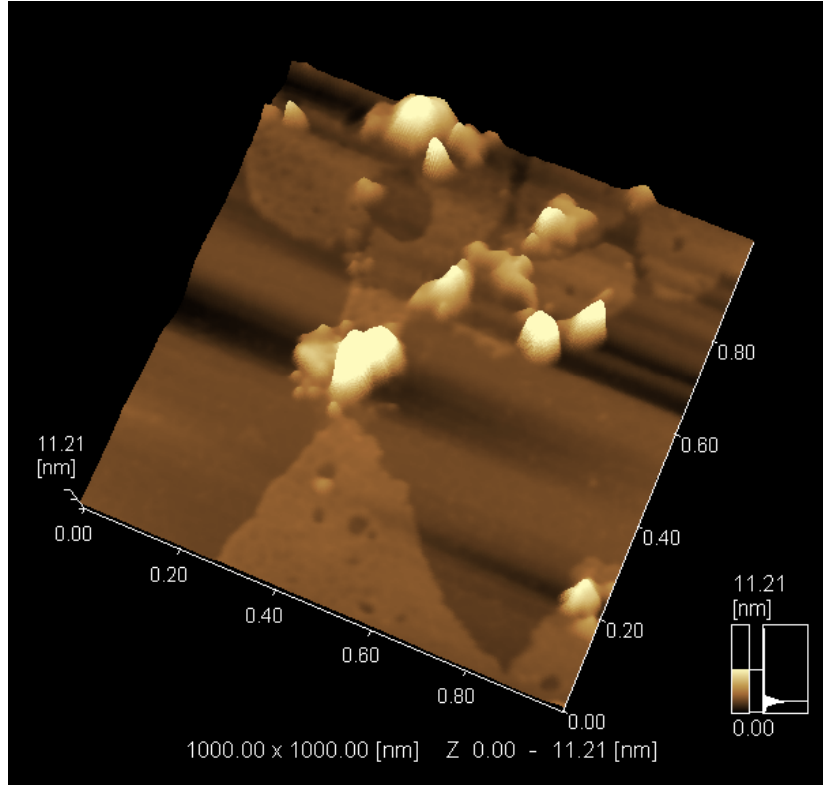
Şekil 4.27 BSA'nın (500 x 500 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.



Şekil 4.28 BSA'nın (1000 x 1000 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.



Şekil 4.29 PAA'nın (500 x 500 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.



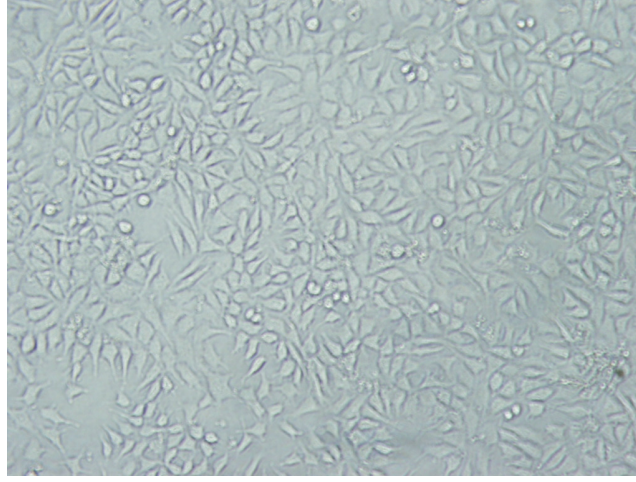
Şekil 4.30 Üçlü PAA-Cu²⁺-BSA (1000 x 1000 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.

4.2.7 PAA, PAA-Cu²⁺ ve Üçlü PAA-Cu²⁺-BSA kompleksinin L929 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

PAA, PAA-Cu²⁺ ve Üçlü PAA-Cu²⁺-BSA kompleksinin hücre canlılığı ölçüldü. L929 hücreleri 10000 hücre/ml konsantrasyonda düz tabanlı 96 kuyucuklu plaklara ekim yapıldı. Yüzey kaplamasını tamamlandıktan sonra sırasıyla her bir kuyucuğa 10 µl polimer, polimer-bakır, polimer-metal-protein çözeltisinden ve kontrol grubuna 10 µl ultra saf su ilave edildi. 48 saat inkübasyonun ardından 10 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37 °C’de 4 saat inkübe edildi. MTT durdurucu solüsyondan 100 µl eklendi 30 dak. oda sıcaklığında beklenip formazan kristallerinin çözündüğü kontrol edildi. Aynı işlemler polimer besiyeri etkileşimini kontrol etmek amacıyla, hücre bulunmayan sadece besiyeri ilave edilmiş 96 kuyucuklu plaklarda da yapıldı. Son olarak optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 570 nm dalga boyuna ayarlanmış ELIZA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı (Çakır, 2008). Ancak deneyler sadece bir kere yapıldığı için bu çalışmaların tekrar yapılması gerekmektedir. Elde edilen bulgular ön çalışma niteliği taşımaktadır ve mutlaka tekrarlanması gerekmektedir.

4.2.7.1 MTT Deneyinin Hazırlanması

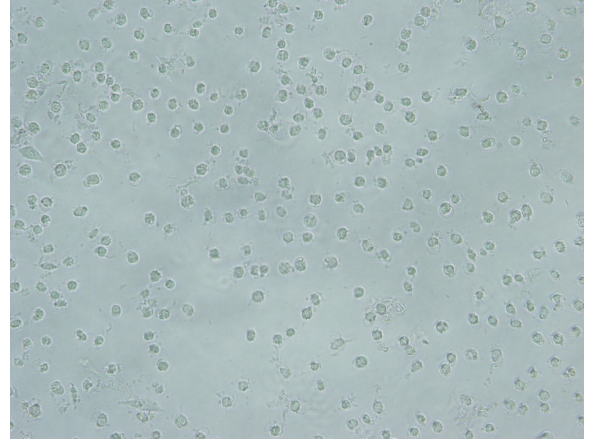
Thiazoly blue tetrazolium bromide (MTT) (Sigma M5655) çözeltisi 10 mg/ml hazırlandı. Hassas terazide 10 mg/ml MTT çözeltisi için 50 mg toz MTT tartılıp PBS ile 5 ml’ye tamamlandı. Önce vortekste çalkalanarak iyice çözüldükten sonra steril edilmek üzere önce 0, 45 µl daha sonra 0,22 µl’lik 38 (CS) filtreden geçirilerek steril edildi.



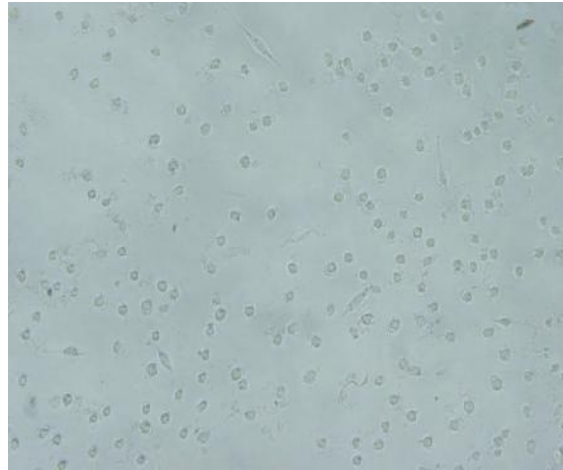
(a)



(b)

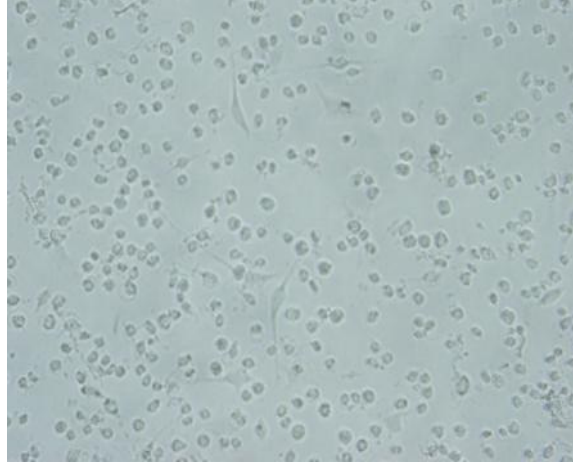


(c)

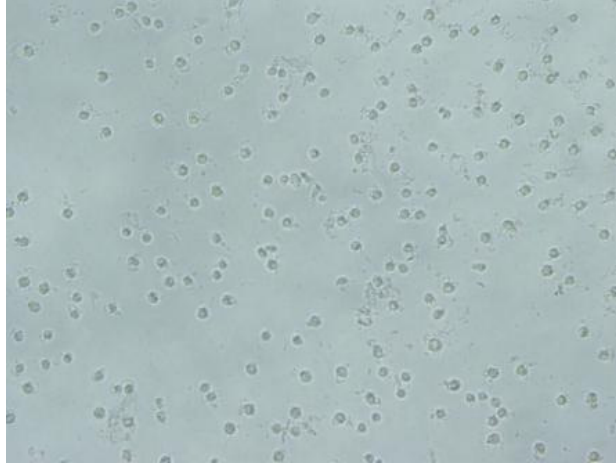


(d)

Şekil 4.31 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin L929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x), a) Kontrol, b) $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{AA}} : 0,2$ oranındaki ikili kompleks, c) $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{AA}} : 0,3$, d) $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{AA}} : 0,4$.



(a)



(b)

Şekil 4.32 PAA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerinin L929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x), a) $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{AA}} : 0,4$, $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}: 2$; b) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{AA}} : 0,4$ oranındaki bakır konsantrasyonu ile aynı)

4.3 Metil vinil eter-maleik Anhidrit Kopolimeri

Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ölçümleri; 0,3 ml/dak akış hızında elüent olarak THF ile birlikte üç yüksek çözünürlüklü kolon (60S, 300S ve 1000S) kullanılarak, bir pompa (Agilent 1100) ve refraktif indeks dedektörü (Agilent 1100s) varlığında yapılmıştır. Molekül ağırlıklarının belirlenmesi için polistiren standartları kullanılmıştır. PMVEMA kopolimerinin molekül ağırlığı 70.000 Da olarak bulunmuştur.

4.3.1 PMVEMA-Cu²⁺ İkili Komplekslerinin Hazırlanması

4.3.1.1 Kullanılan Çözeltiler

a) 0.01 mol/lit'lik PBS Tamponu (pH:7)

1.1998g NaH₂PO₄ (Mw=119.98 g/mol) tartılarak 500ml ultra saf suda çözülür. Aynı zamanda 2.6807g (Mw = 268.07 g/mol) tartılarak yine 500 ml ultra saf suda çözülür. Bu iki çözeltiden NaH₂PO₄ çözeltisi Na₂HPO₄ çözeltisinin üzerine eklenir. Bu karışıma 8.766 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. 1 M NaOH pH ayarlanır.

b) PMVEMA kopolimeri stok çözeltisi 3 mg/ml olacak şekilde ultra saf su ve PBS tamponunda hazırlandı. Dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemiyle tampon çözeltide hazırlanan komplekslerin daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla PMVEMA kopolimeriyle ilgili tüm deneylerde PBS tamponu kullanılmıştır. Ultra saf suda ise sadece CuSO₄.5H₂O çözeltisi hazırlandı.

4.3.1.2 Komplekslerin Hazırlanması

Her bir çözeltideki PMVEMA miktarı sabit olacak şekilde (8 adet farklı $n_{Cu^{2+}}/n_{PMVEMA}$ oranında) hazırlanan stoktan toplam 10 ml çözelti için 3333 µl (9,999 mg) PMVEMA alınarak değişik oranlarda CuSO₄.5H₂O eklenerek oluşturulan ikili kompleksler 1 gece oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra pH: 7'ye 1N NaOH çözeltisi ile ayarlandı

4.3.1.3 Hesaplamalar

PMVEMA konsantrasyonu sabit tutularak hazırlanan PMVEMA-Cu²⁺ ikili komplekslerine ait hesaplamalar şu şekildedir:

$$\frac{n_{\text{Cu}^{2+}}}{n_{\text{PMVEMA}}} = \frac{C_{\text{CuSO}_4} \cdot M_{\text{PMVEMA}}}{C_{\text{PMVEMA}} \cdot M_{\text{CuSO}_4}} = 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 1,5; 2$$

C_{CuSO_4} : CuSO_4 konsantrasyonu

C_{PMVEMA} : PMVEMA polimerinin konsantrasyonu (tüm $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$ oranları için sabittir % 0,1'dir)

M_{PMVEMA} : PMVEMA polimerinin monomerinin molekül ağırlığı

M_{CuSO_4} : CuSO_4 molekül ağırlığı

1) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,1 olan 10 ml PMVEMA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : 0,006 g/100ml = 0,06 mg/ml = 0,6 mg/10ml

2) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,2 olan 10 ml PMVEMA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : 0,012 g/100ml = 0,12 mg/ml = 1,2 mg/10ml

3) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,3 olan 10 ml PMVEMA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : 0,018 g/100ml = 0,18 mg/ml = 1,8 mg/10ml

4) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,4 olan 10 ml PMVEMA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : 0,024 g/100ml = 0,24 mg/ml = 2,4 mg/10ml

5) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,5 olan 10 ml PMVEMA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : 0,03 g/100ml = 0,3 mg/ml = 3 mg/10ml

6) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 1 olan 10 ml PMVEMA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : 0,06 g/100ml = 0,6 mg/ml = 6 mg/10ml

7) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 1,5 olan 10 ml PMVEMA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

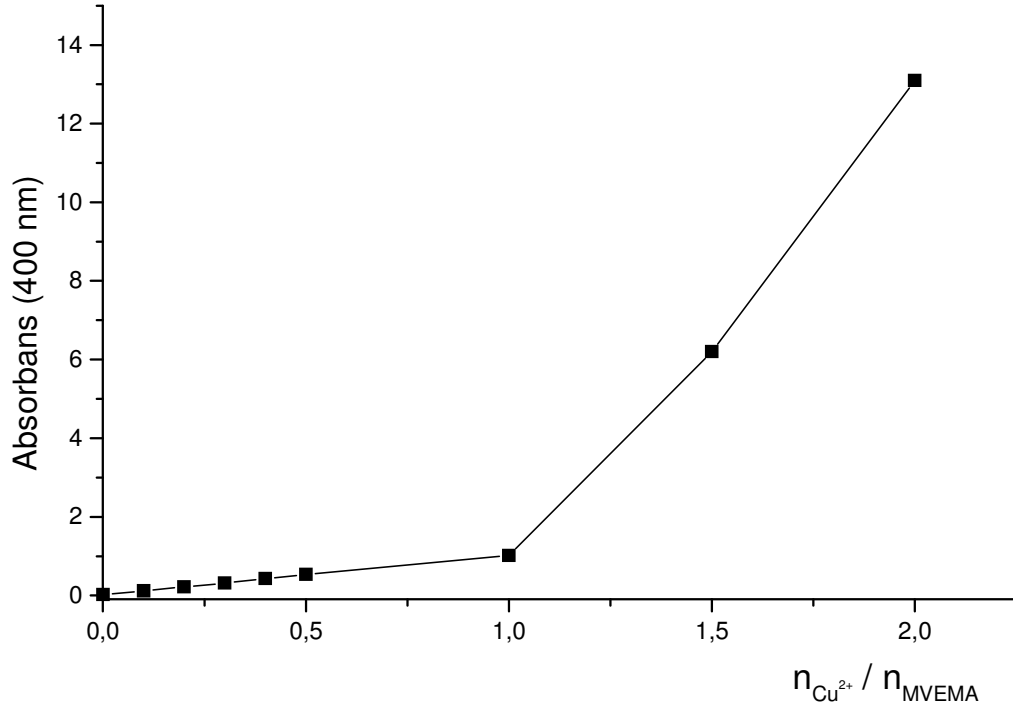
C_{CuSO_4} : 0,09 g/100ml = 0,9 mg/ml = 9 mg/10ml

8) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 2 olan 10 ml PMVEMA- Cu^{2+} ikili kompleksi çözeltisi

C_{CuSO_4} : 0,12 g/100ml = 1,2 mg/ml = 12 mg/10ml

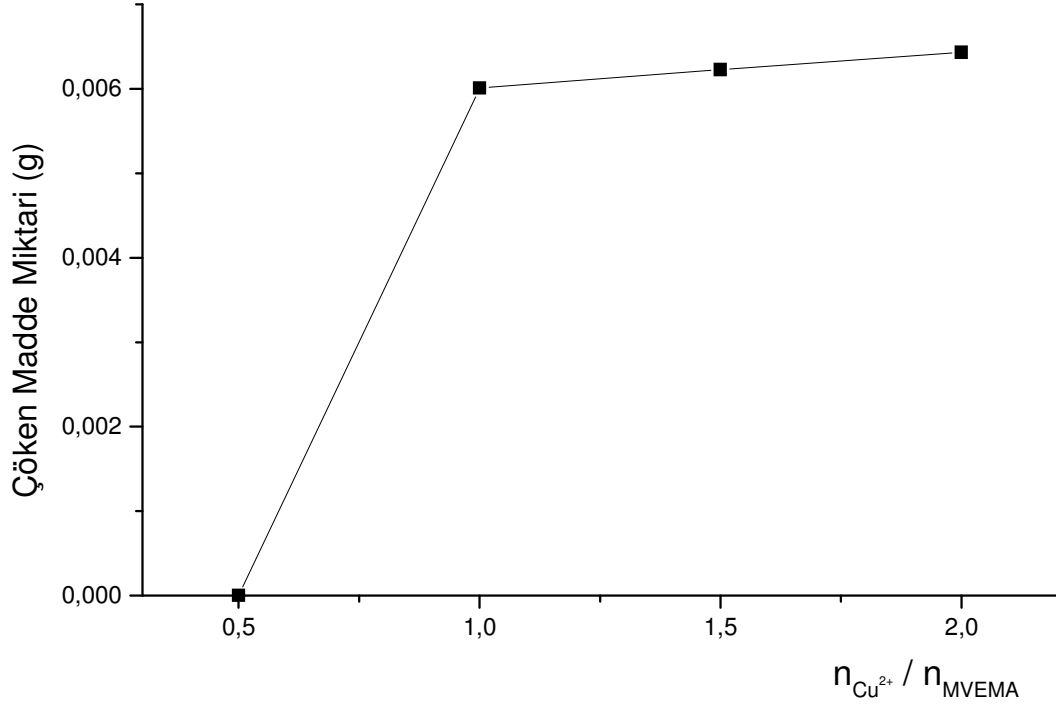
4.3.2 PMVEMA-Cu²⁺ İkili Komplekslerine Ait Analiz Sonuçları

Çeşitli miktardaki bakır sülfat çözeltisi, metil vinil eter-maleik anhidrit kopolimeri (PMVEMA) ilave edilip pH:7'ye ayarlığında sistemde PAA'da olduğu gibi çökme görülmemektedir ($0 \leq n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} \leq 0,5$).



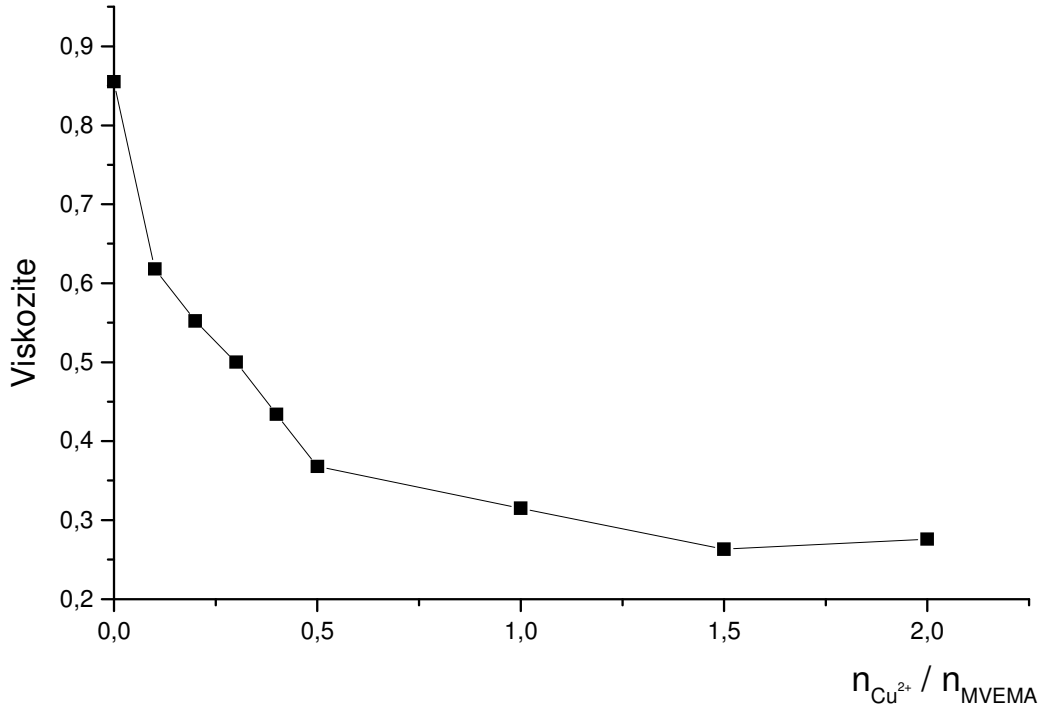
Şekil 4.33 PMVEMA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı 400 nm'deki optik yoğunlukları: $0 \leq n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} \leq 2$.

İkili komplekslerde belirli bir orandan sonra ($n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} > 0,5$) çöken madde miktarı (g) tespit edilmiştir.



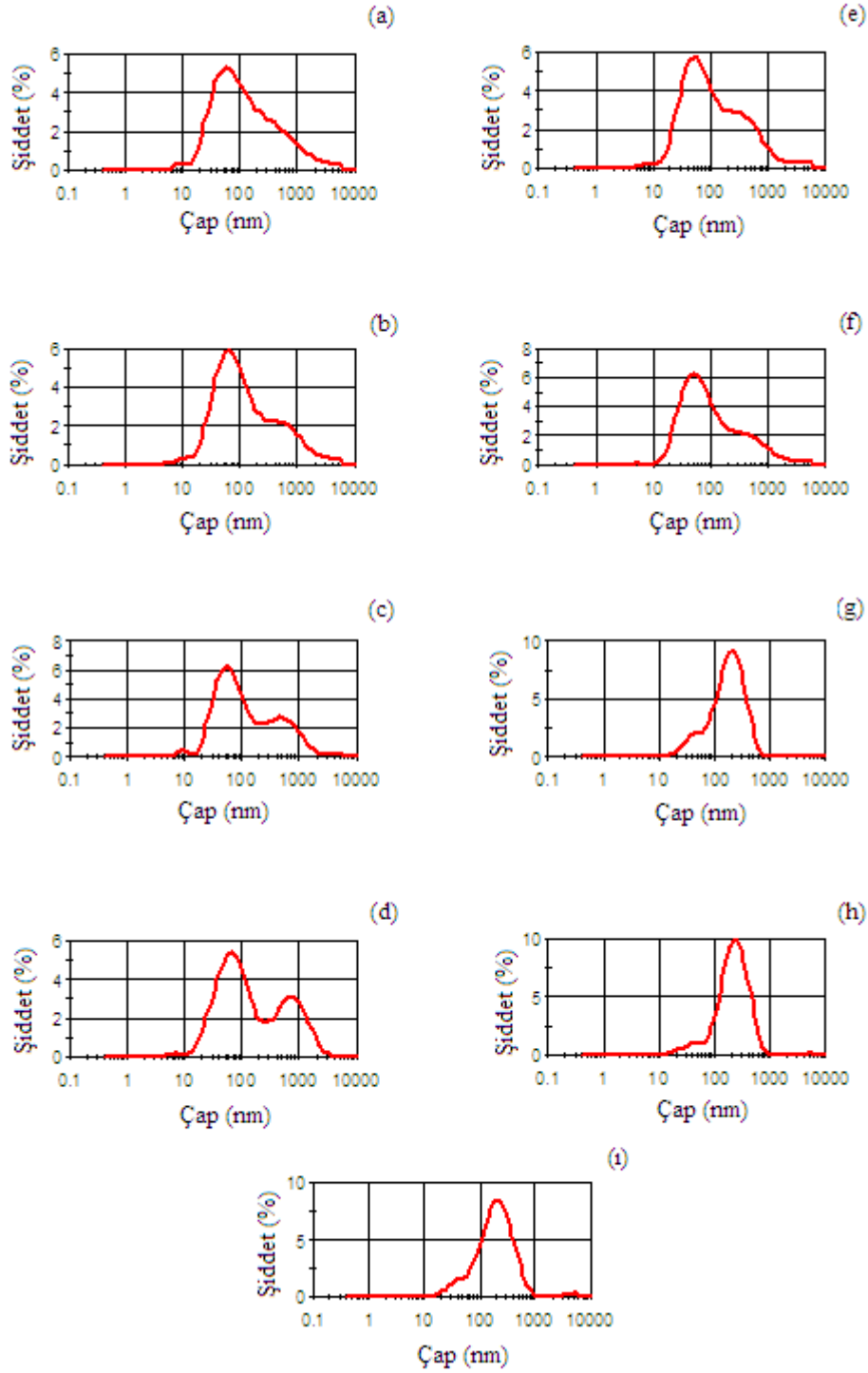
Şekil 4.34 $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} > 0,5$ oranlarında oluşan ikili komplekslerde çöken madde miktarı (g).

PMVEMA kopolimeri ve kopolimerlerin metal iyonlarıyla oluşturduğu komplekslerin viskozitesi (spesifik özgül viskozite, birimi poise'dir) aşağıda gösterilmiştir. Viskozite eğrisi oldukça düşer ve sonra $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} \geq 1,5$ oranından sonra sabit şekilde devam eder ($n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} \geq 1$ oranlarında oluşan çökeltiler santrifüj yöntemi ile ayrılarak süzütünün ölçümü alınmıştır).

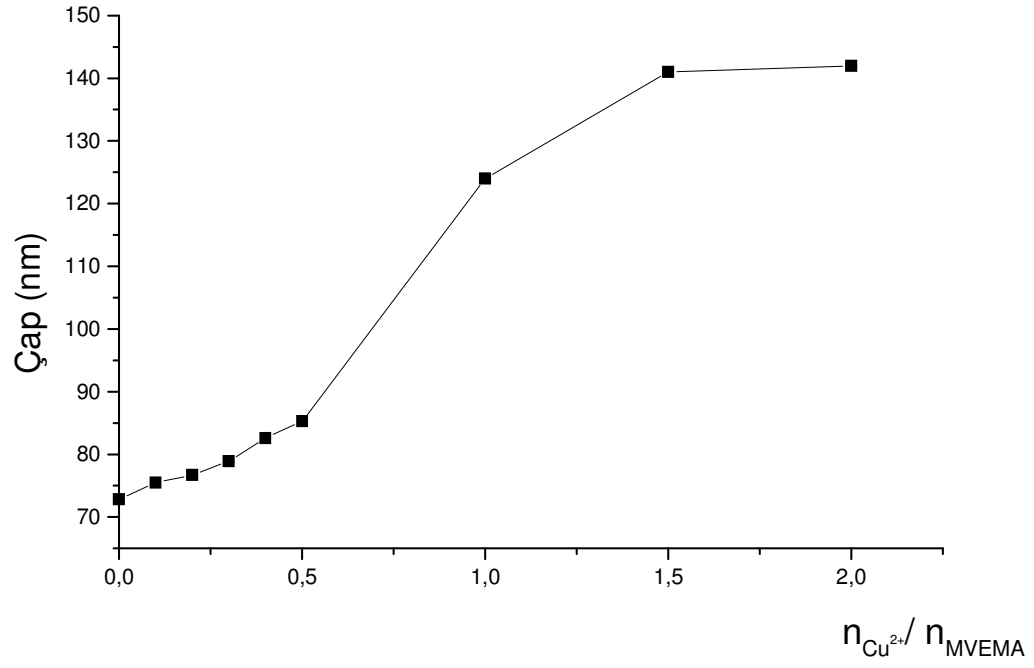


Şekil 4.35 PMVEMA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı viskozite grafiği.

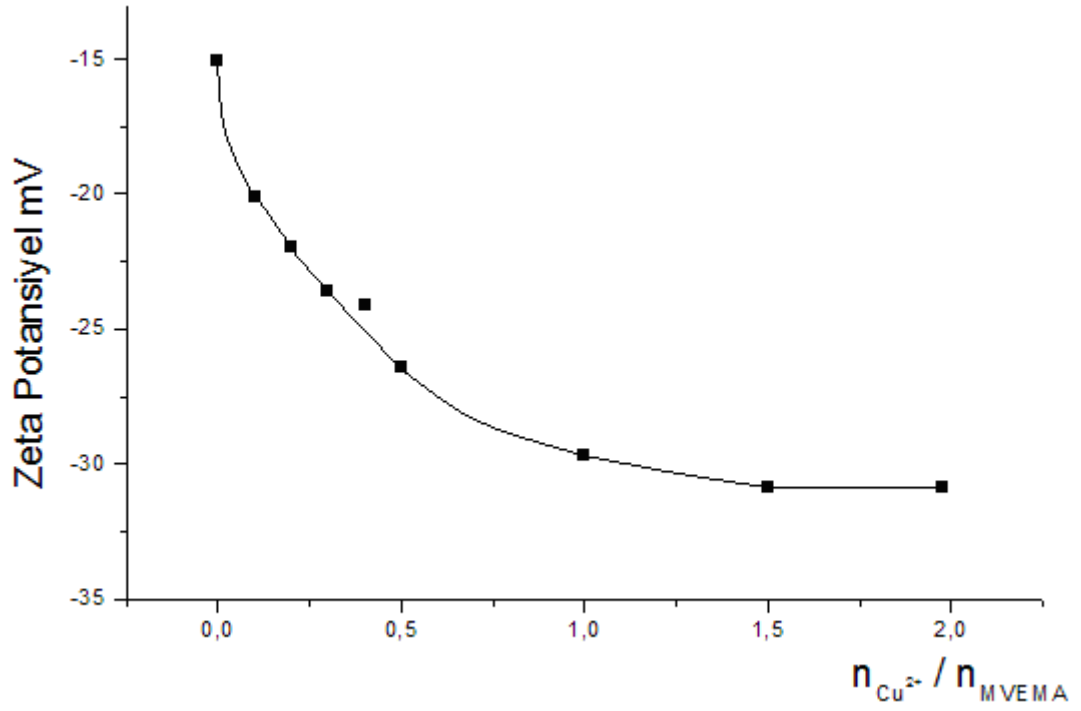
Polimer-metal ikili komplekslerin Zetasizer cihazı ile ölçümü alınmıştır ($n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{PMVEMA}} \geq 1$ oranlarında oluşan çöktürler santrifüj yöntemi ile ayrılarak süzütünün ölçümü alınmıştır).



Şekil 4.36 PMVEMA kopolimeri üzerine Bakırın eklenmesiyle elde edilen ikili komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PMVEMA (a); $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{PMVEMA}}$: 0,1 (b); 0,2 (c); 0,3 (d); 0,4 (e); 0,5 (f); 1 (g); 1,5 (h); 2 (i).



Şekil 4.37 PMVEMA- Cu^{2+} ikili komplekslerinin orana bağlı çap grafiği.



Şekil 4.38 PMVEMA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı zeta potansiyel grafiği.

$n_{Cu^{2+}} / n_{MVEMA}$ oranı arttıkça zeta potansiyelde bir düşme yani negatife doğru bir kayma gözlenmektedir.

4.3.3 PMVEMA-Cu²⁺-BSA Üçlü Kompleksleri

4.3.3.1 Kullanılan Çözeltiler

PMVEMA kopolimeri stok çözeltisi 3mg/ml olacak şekilde PBS tamponunda hazırlandı. CuSO₄.5H₂O çözeltisi ultra saf suda hazırlandı. BSA stok çözeltisi yine tamponda hazırlanmıştır.

4.3.3.2 Komplekslerin Hazırlanması

Her bir çözeltideki PMVEMA miktarı sabit olduğuna göre (5 adet farklı n_{Cu²⁺}/n_{PMVEMA} oranında) hazırlanan stoktan toplam 10 ml çözelti için 3333 µl (9,999 mg) PMVEMA alınarak değişik oranlarda CuSO₄.5H₂O eklenerek oluşturulan ikili kompleksler 1 gece karıştırıldıktan sonra pH: 7'ye 1N NaOH çözeltisi ile ayarlanır. BSA stok çözeltisi yavaş yavaş PMVEMA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin üzerine eklenerek karıştırıldı ve üçlü PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksleri oluşturuldu (pH: 7 olduğu kontrol edildi).

4.3.3.3 Hesaplamalar

Öncelikle, n_{Cu²⁺}/n_{PMVEMA} = 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 herbir oran için n_{BSA}/n_{PMVEMA} hesaplanır. Ancak üçlü komplekslerde PMVEMA ve BSA miktarları bütün oranlar için değişmezken sadece Cu²⁺ iyonlarının miktarı değişir. Üçlü komplekse ait hesaplamalar şu şekildedir:

$$\frac{n_{BSA}}{n_{PMVEMA}} = \frac{C_{BSA} \cdot M_{PMVEMA}}{C_{PMVEMA} \cdot M_{BSA}} = 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3$$

C_{BSA} : BSA konsantrasyonu

C_{PMVEMA} : PMVEMA polimerinin konsantrasyonu (tüm n_{BSA}/n_{PMVEMA} oranları için sabittir % 0,1'dir)

M_{PMVEMA} : PMVEMA polimerinin molekül ağırlığı (70.000 Da)

M_{BSA} : BSA molekül ağırlığı (66.000 Da)

1) n_{Cu²⁺}/n_{PMVEMA}: 0,1 ve n_{BSA}/n_{PMVEMA} : 0,5 olan 10 ml PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi çözeltisi

C_{BSA} : 0,047 g/100ml = 0,47 mg/ml = 4,7 mg/10ml

2) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,1 ve $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 1 olan 10 ml PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi çözeltisi

$$C_{\text{BSA}} : 0,094 \text{ g/100ml} = 0,94 \text{ mg/ml} = 9,4 \text{ mg/10ml}$$

3) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,1 ve $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 1,5 olan 10 ml PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi çözeltisi

$$C_{\text{BSA}} : 0,141 \text{ g/100ml} = 1,41 \text{ mg/ml} = 14,1 \text{ mg/10ml}$$

4) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,1 ve $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 2 olan 10 ml PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi çözeltisi

$$C_{\text{BSA}} : 0,188 \text{ g/100ml} = 1,88 \text{ mg/ml} = 18,8 \text{ mg/10ml}$$

5) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,1 ve $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 2,5 olan 10 ml PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi çözeltisi

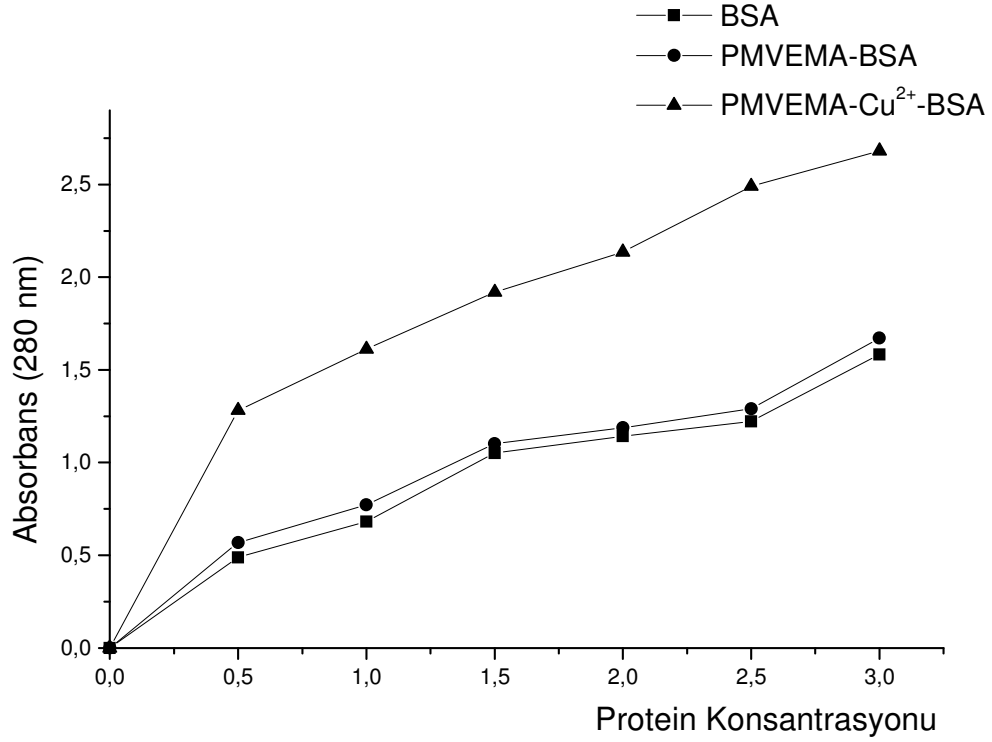
$$C_{\text{BSA}} : 0,235 \text{ g/100ml} = 2,35 \text{ mg/ml} = 23,5 \text{ mg/10ml}$$

6) $n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,1 ve $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 3 olan 10 ml PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi çözeltisi

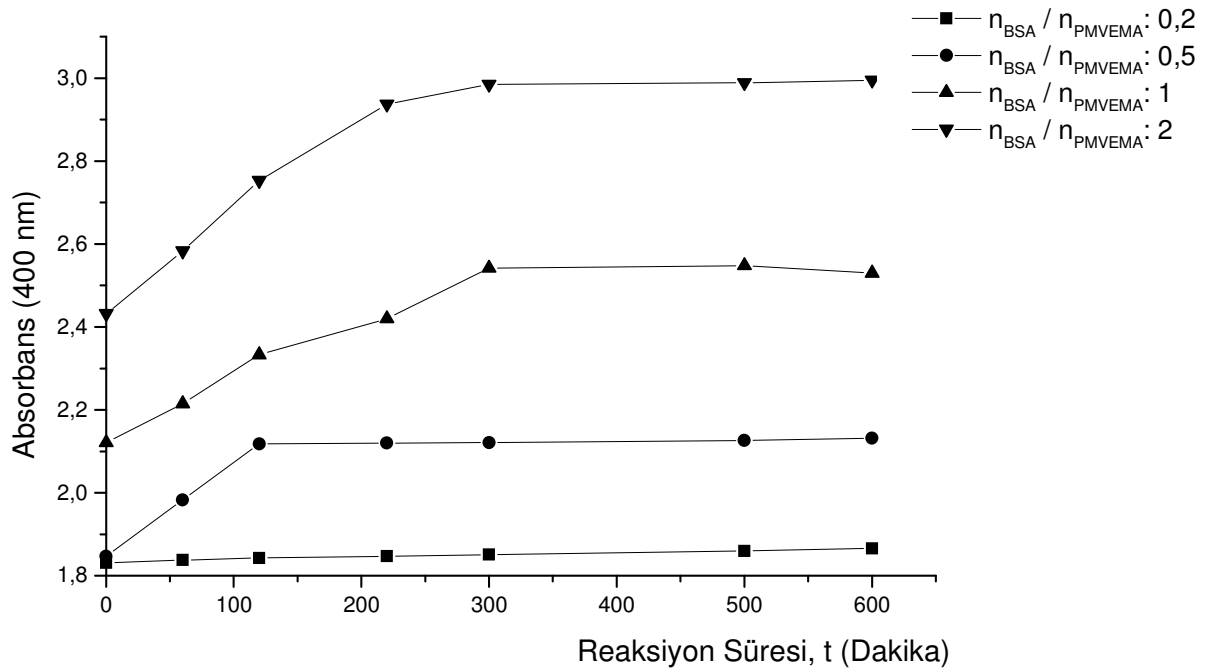
$$C_{\text{BSA}} : 0,282 \text{ g/100ml} = 2,82 \text{ mg/ml} = 28,2 \text{ mg/10ml}$$

4.3.4 PMVEMA-Cu²⁺-BSA Üçlü Komplekslerine Ait Analiz Sonuçları

Farklı miktarlarda protein içeren protein çözeltilerinin (BSA) ve protein çözeltileri sabit miktarda polimer içeren polimer çözeltileri (PMVEMA-BSA) ve polimer-metal çözeltileriyle karıştırılarak (PMVEMA-Cu²⁺-BSA) 280 nm'deki absorbans ölçümleri alındı.



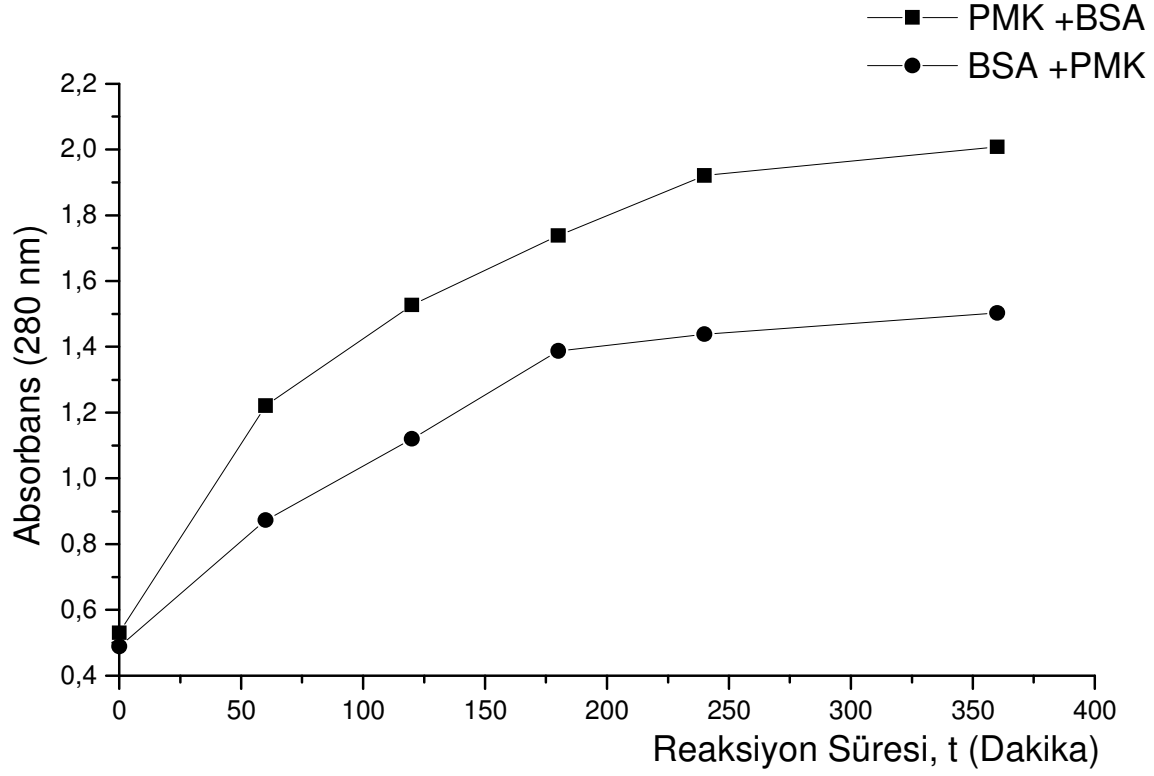
Şekil 4.39 Protein, protein-polimer ve polimer-metal-protein çözeltilerinin ($n_{Cu^{2+}}/n_{PMVEMA}$: 0,5; n_{BSA}/n_{PMVEMA} : 2) 280 nm'deki optik yoğunlukları.



Şekil 4.40 PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerinin 400 nm'deki protein/polimer oranlarına göre zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri: $n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA} : 0,5$ oranında $n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 0,2; 0,5; 1; 2$ oranları.

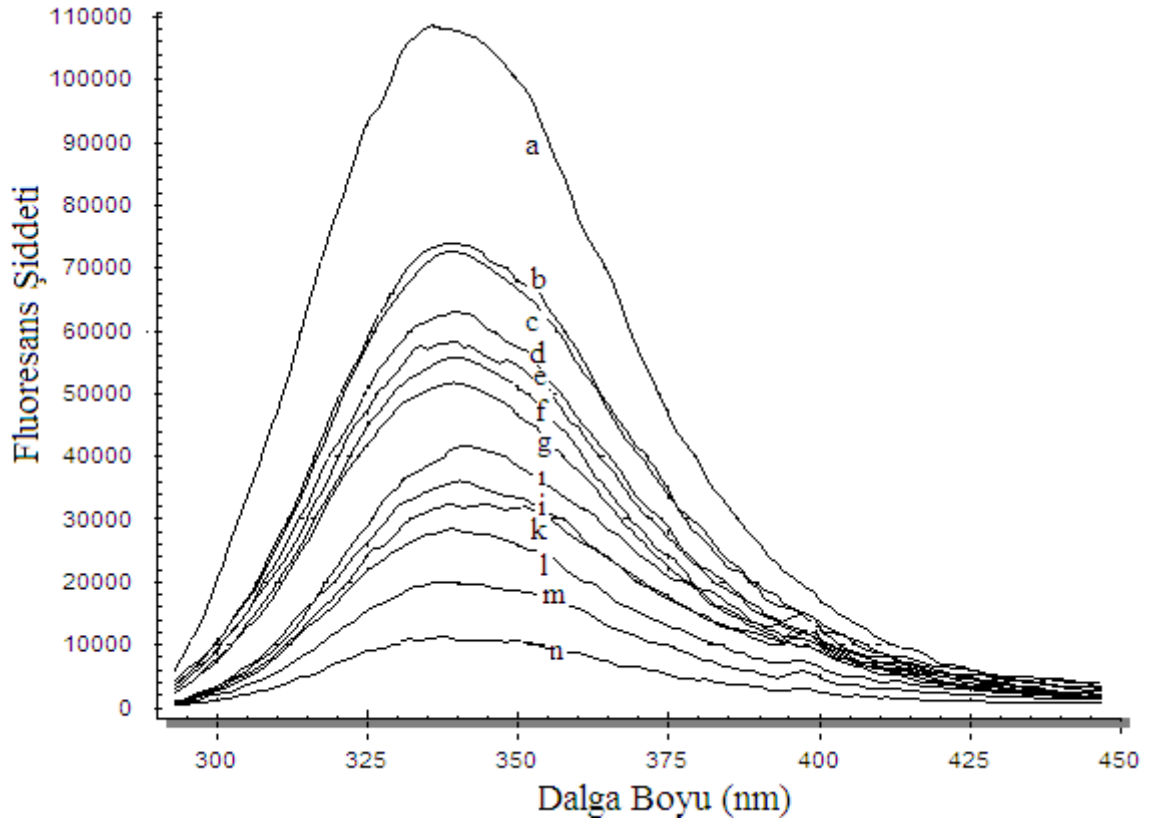
PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü karışımının 400 nm deki spektrofotometrik ölçümlerinin protein/polimer oranlarına bağlılığı Şekil 4.40'de gösterilmiştir. Üçlü karışım, PMK çözeltisine proteinin ilavesiyle hazırlanmıştır. $n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 0,2; 0,5; 1; 2$ olarak dört değerde PMVEMA-Cu²⁺-BSA karışımları hazırlanmıştır. Protein konsantrasyonu artışıyla reaksiyon hızı artmakta ($n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 0,5; 1; 2$), limit değere ulaşmakta ve daha sonra sabit hale gelmektedir.

BSA ve PMK karışımlarının zamana bağlı 280 nm’ deki spektrofotometrik ölçümleri değişimi Şekil 4.41’de gösterilmiştir. Burada hazırlama yönteminin etkisi incelenmiştir.



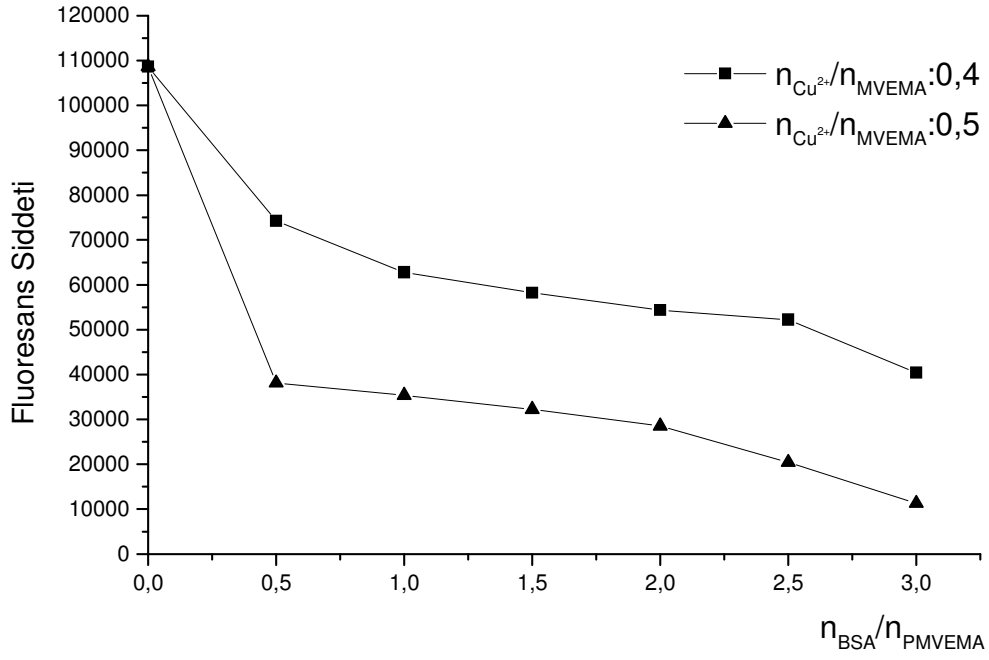
Şekil 4.41 BSA ve PMVEMA-Cu²⁺ ikili kompleksinin ($n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{PMVEMA}}$: 0,5) (PMK) (oranlar birbirine eşit) zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri.

Üçlü PMVEMA-Cu²⁺-BSA komplekslerinin fluoresansı ölçülmüştür.

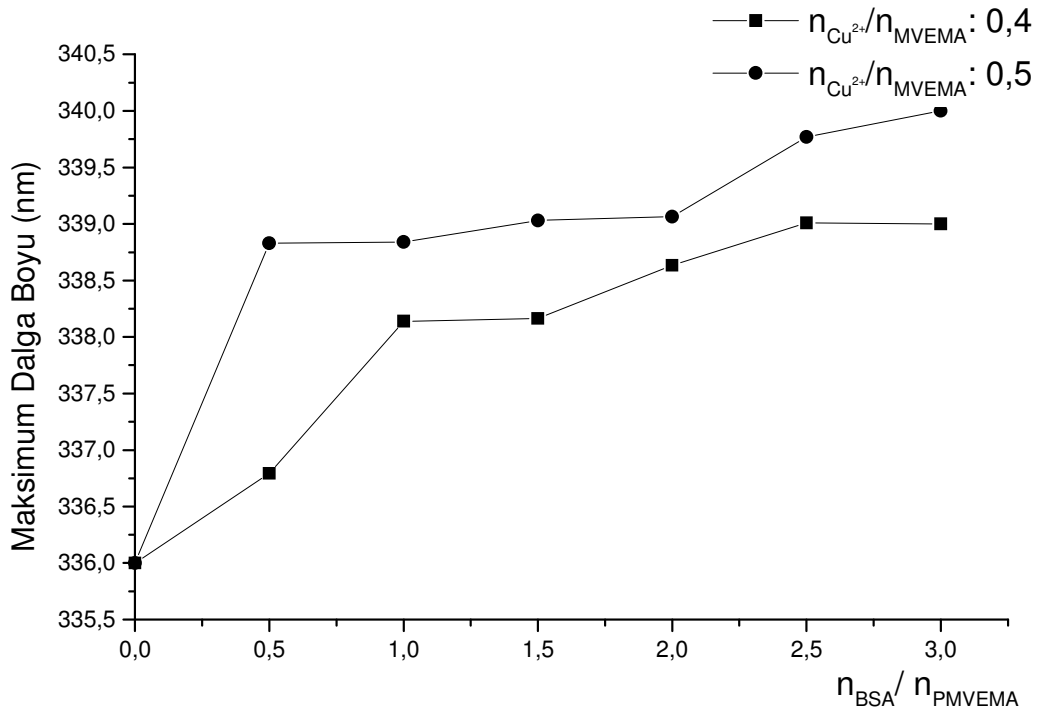


Şekil 4.42 Polimer-Metal ($n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,4; 0,5) ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu: ($n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,4 için) BSA a; $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,5 b; 1 c; 1,5 d; 2 e, 2,5 f; 3 g; ($n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,5 için) 0,5 ı; 1 i; 1,5 k; 2 l; 2,5 m; 3 n.

n_{BSA}/n_{PMVEMA} değerlerini x eksenine fluoerans şiddeti ve maksimum dalga boyu değerlerini de y eksenine koyarak aşağıdaki grafikler elde edilmiştir.

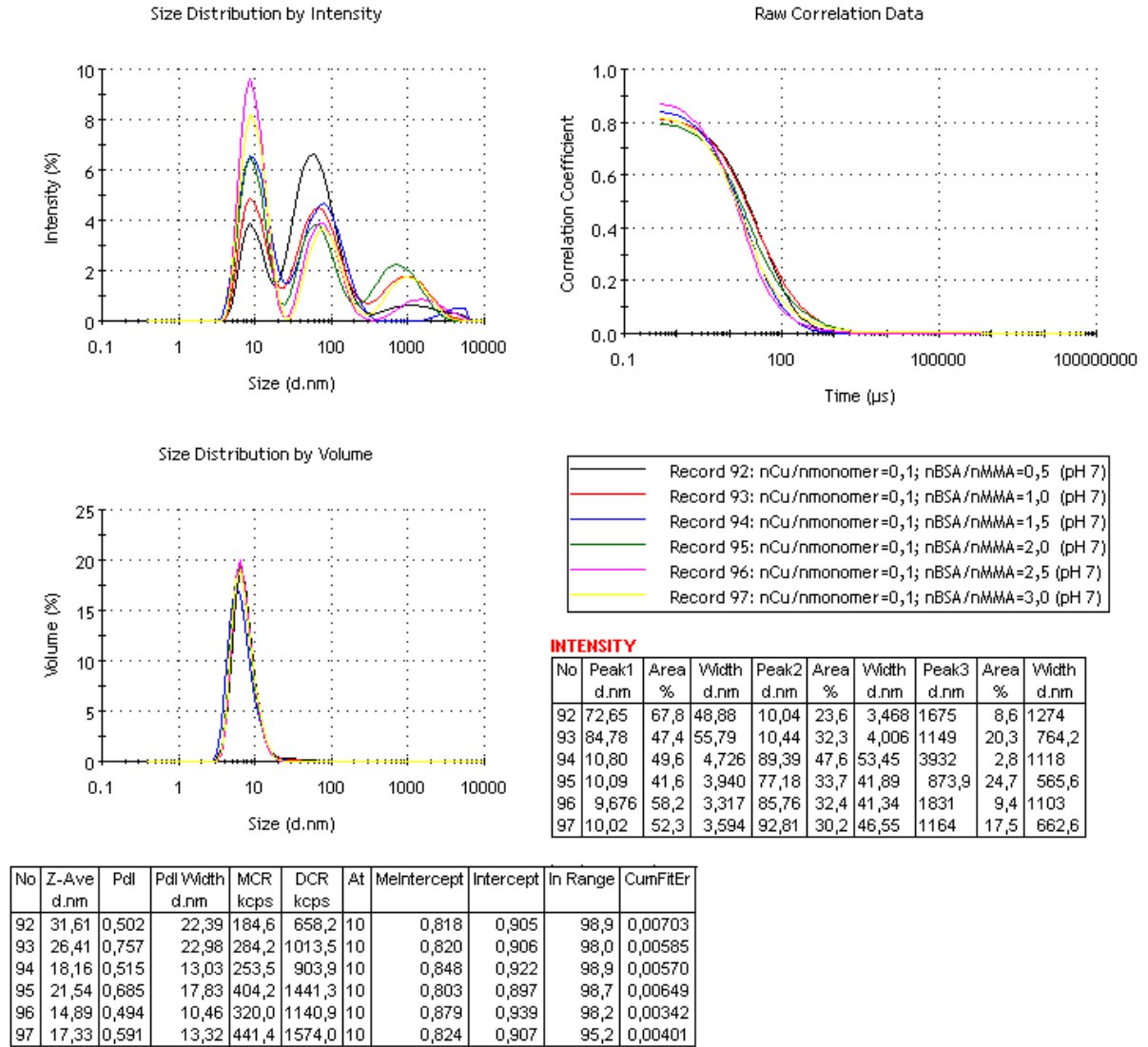


Şekil 4.43 Polimer-Metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoerans spektrumlarından elde edilen fluoerans şiddeti değerlerinin n_{BSA}/n_{PMVEMA} oranı ile değişim grafiği.

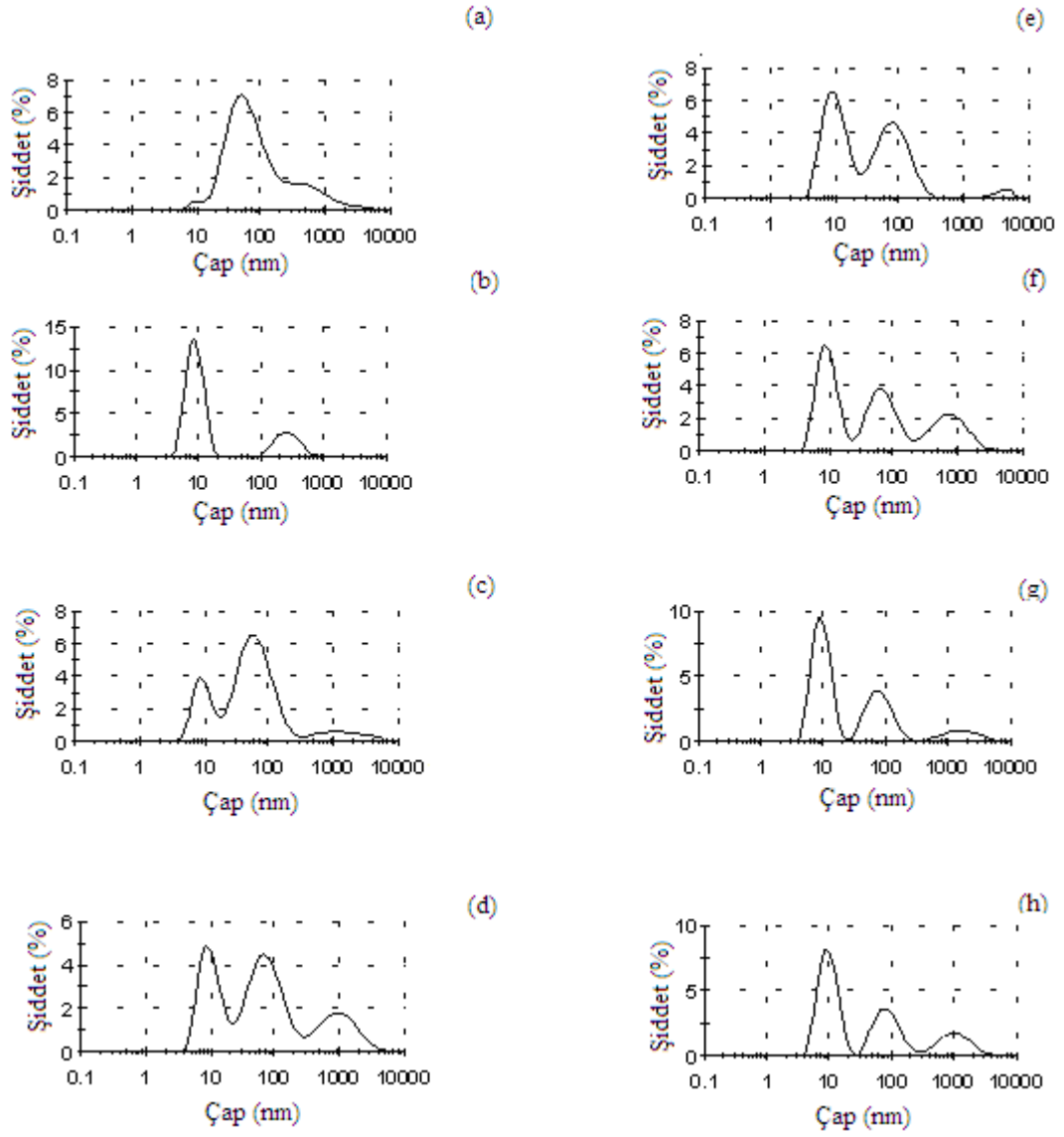


Şekil 4.44 Polimer-Metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin n_{BSA}/n_{PMVEMA} oranı ile değişim grafiği.

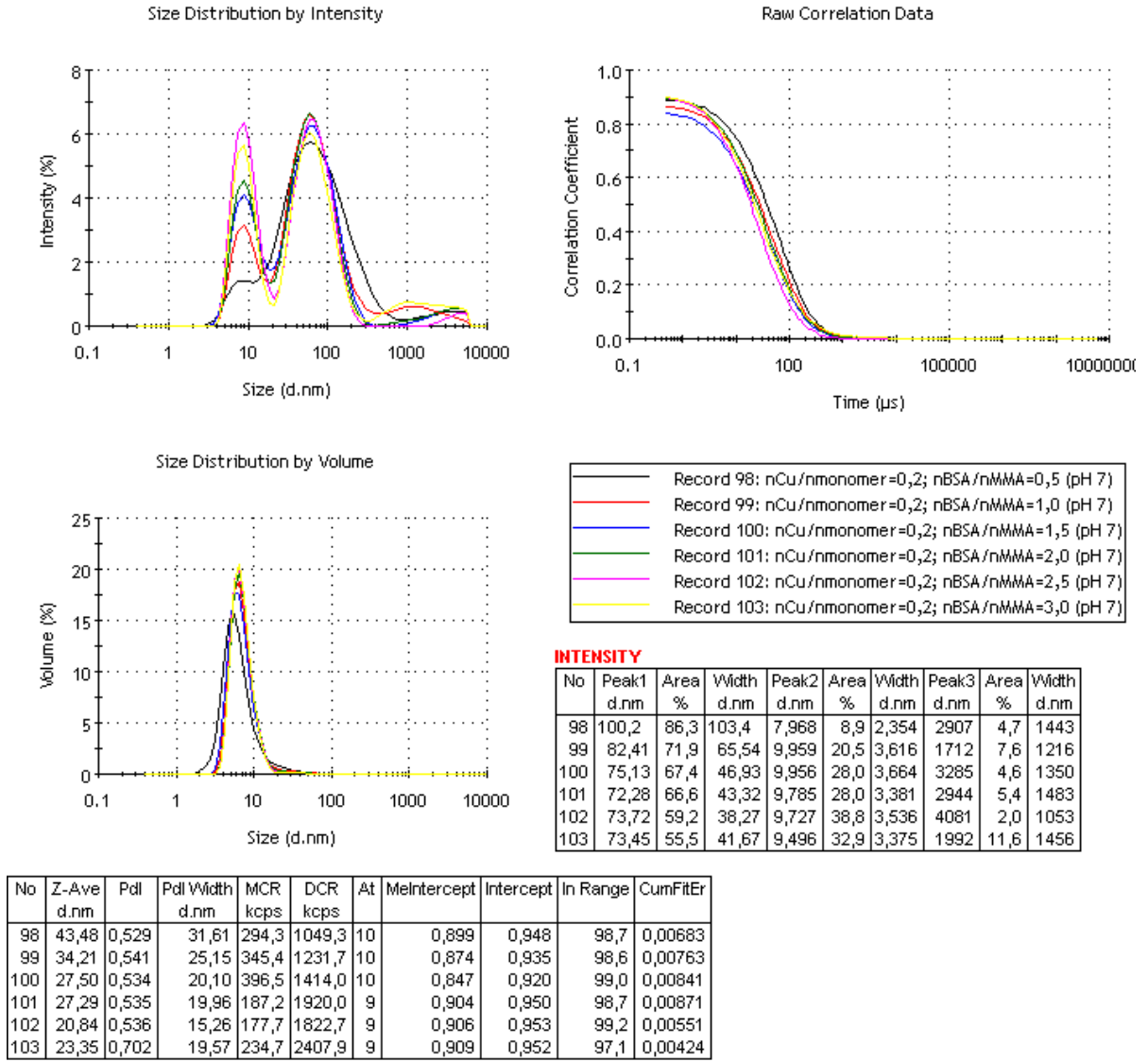
PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerin Zetasizer cihazı ile ölçümleri alınmıştır.



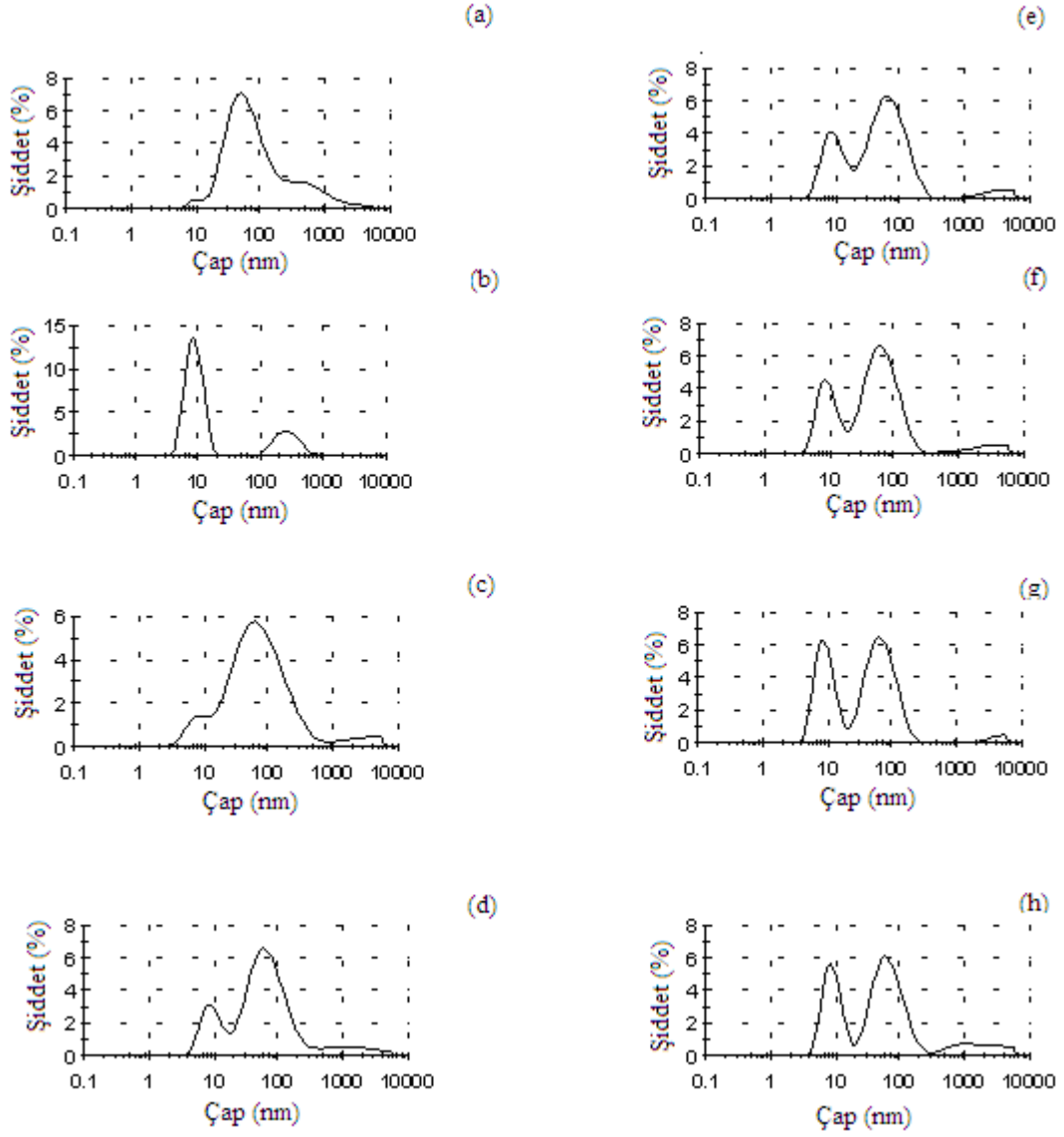
Şekil 4.45 PMVEMA-Cu²⁺ (n_{Cu²⁺} / n_{PMVEMA} : 0,1) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.



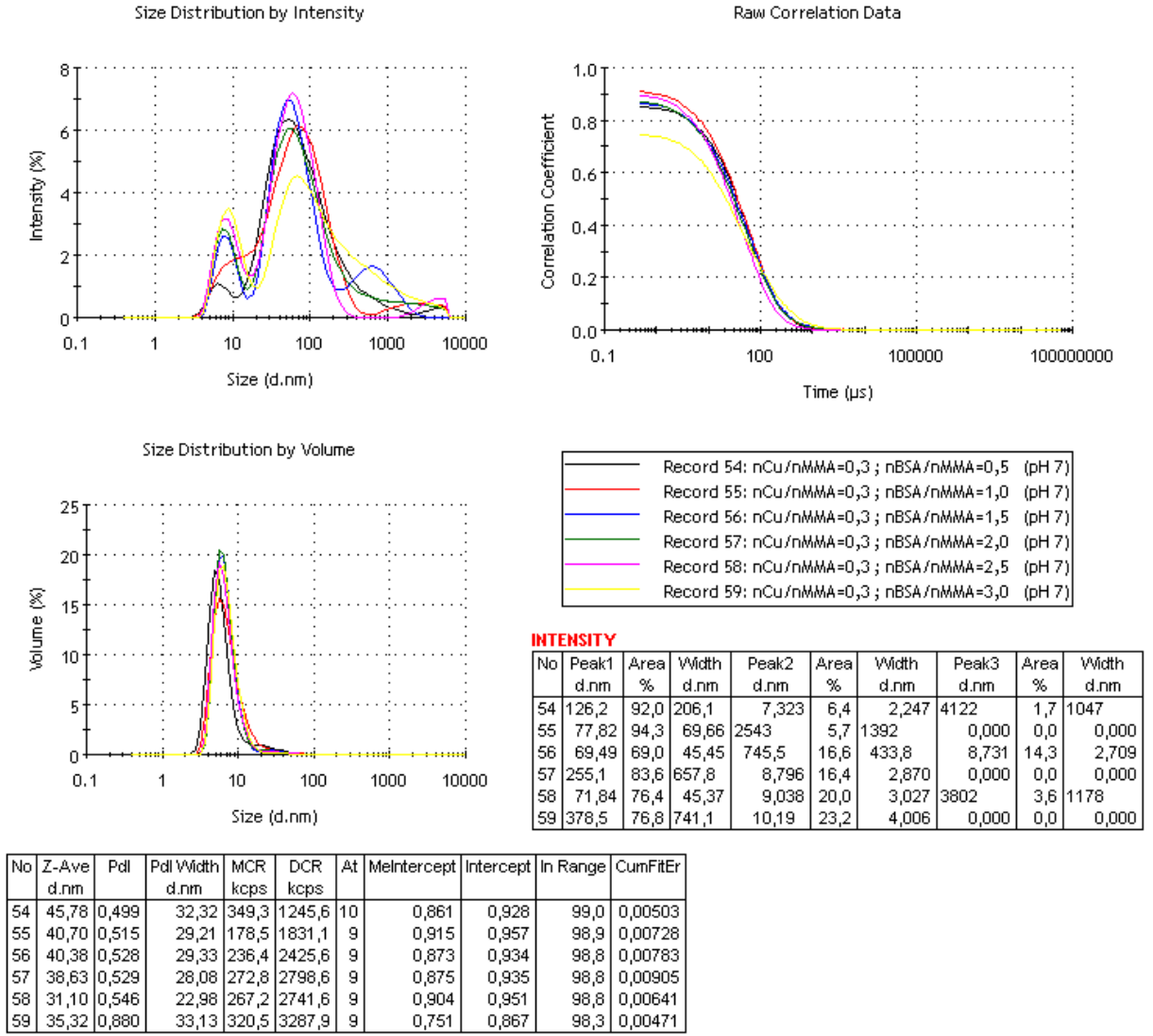
Şekil 4.46 PMVEMA-Cu²⁺ ($n_{Cu^{2+}}/n_{PMVEMA} : 0,1$) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PMVEMA (a); BSA (b); n_{BSA}/n_{PMVEMA} : 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).



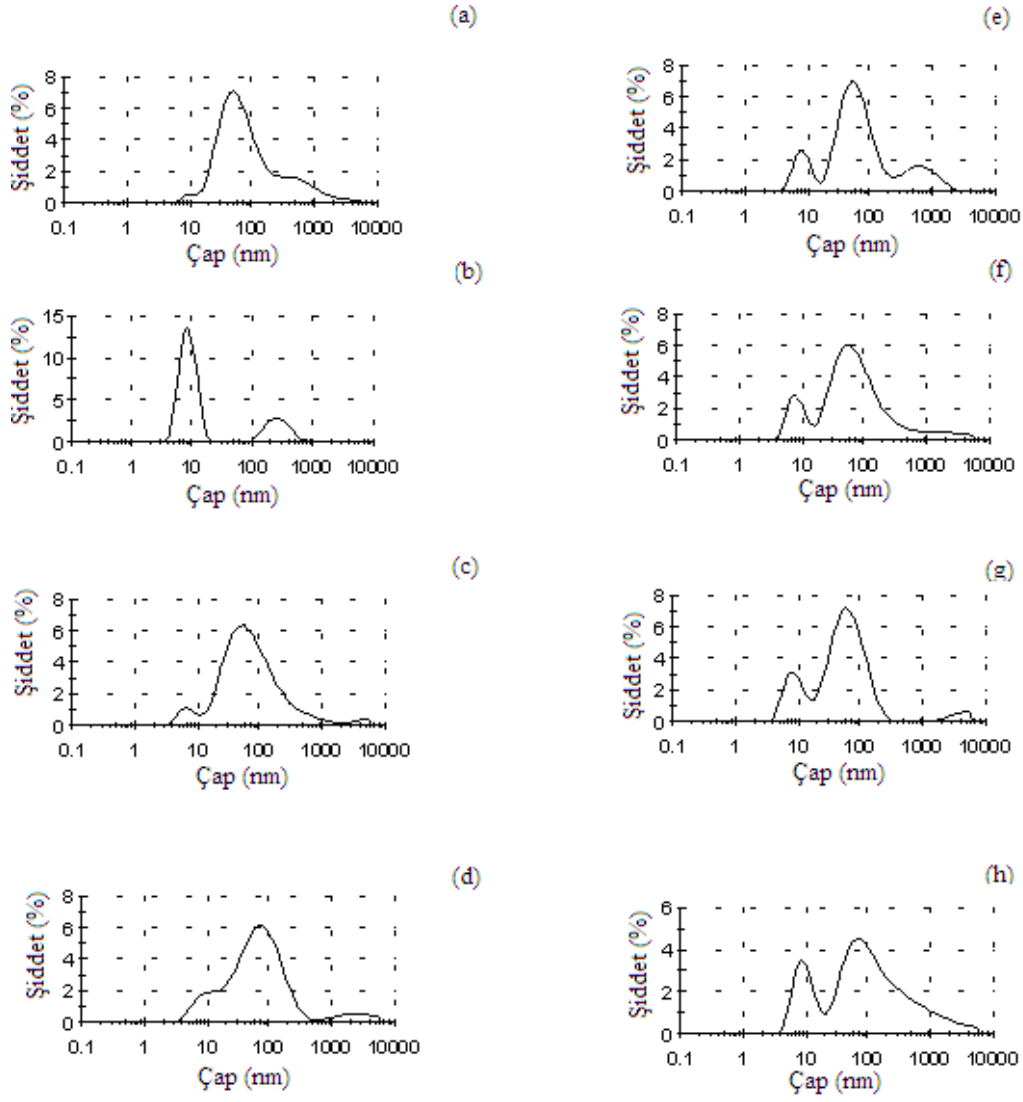
Şekil 4.47 PMVEMA-Cu²⁺ (n_{Cu}²⁺ / n_{PMVEMA} : 0,2) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.



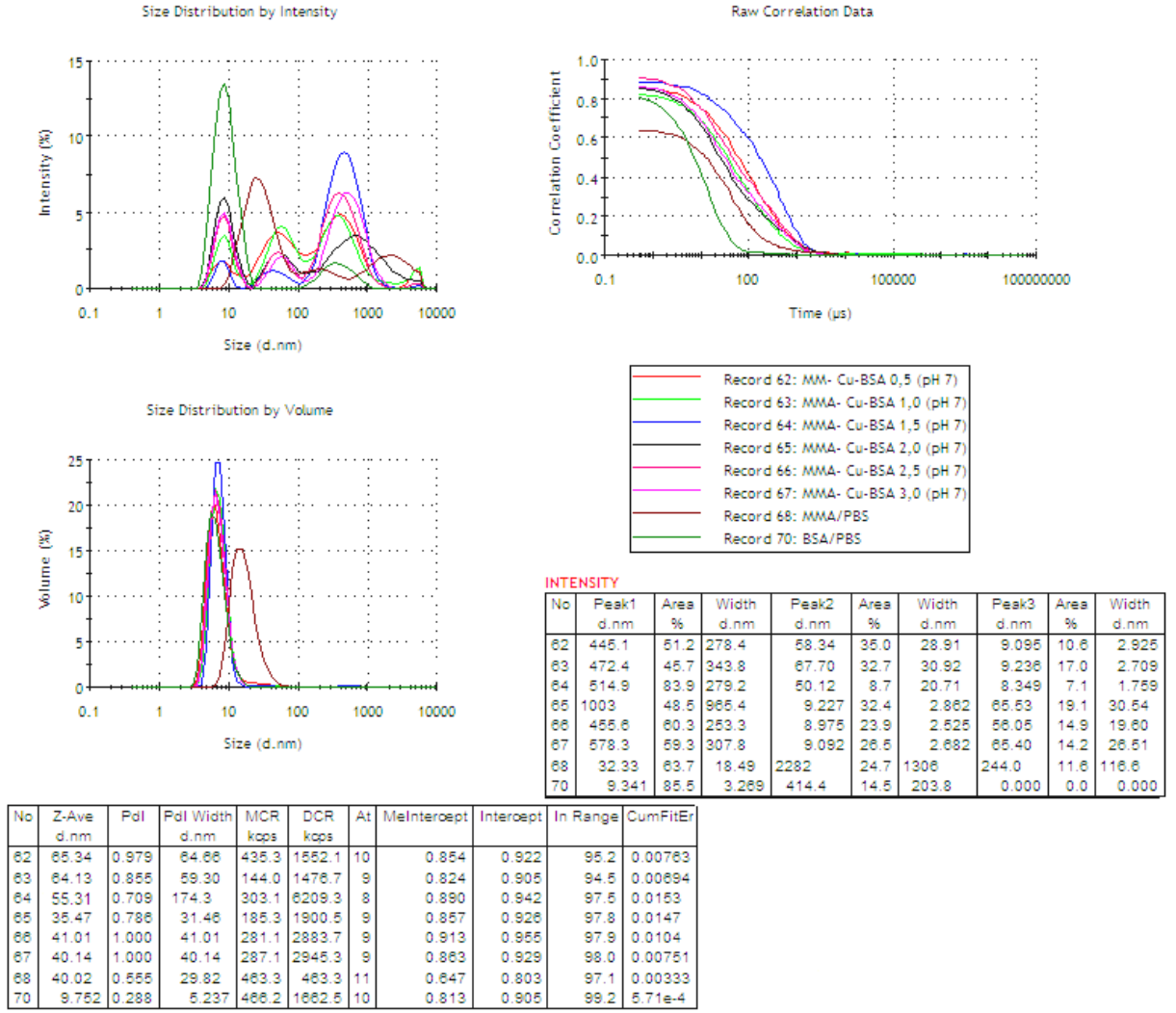
Şekil 4.48 PMVEMA- Cu^{2+} ($n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{PMVEMA}} : 0,2$) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PMVEMA (a); BSA (b); $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).



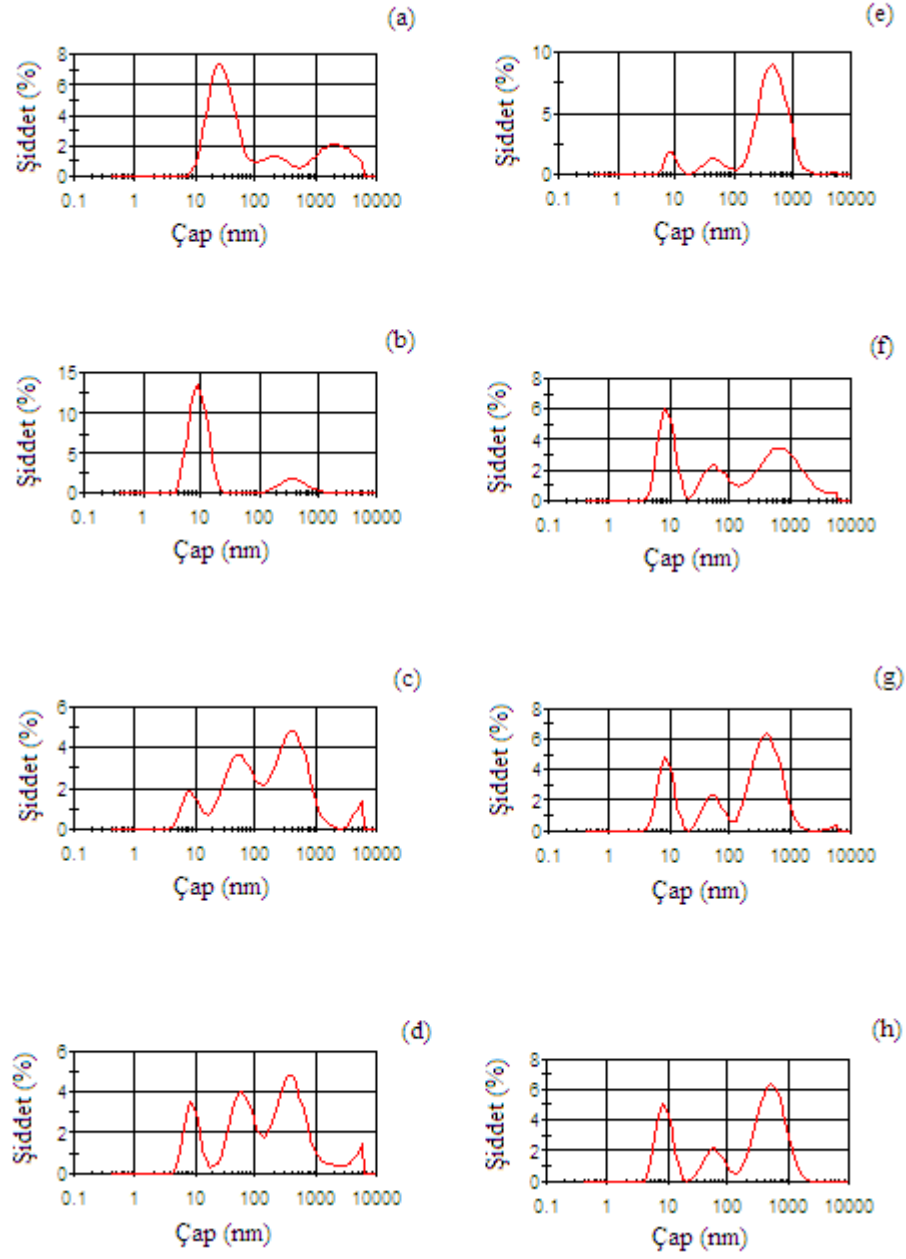
Şekil 4.49 PMVEMA-Cu²⁺ (n_{Cu}²⁺ / n_{PMVEMA} : 0,3) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.



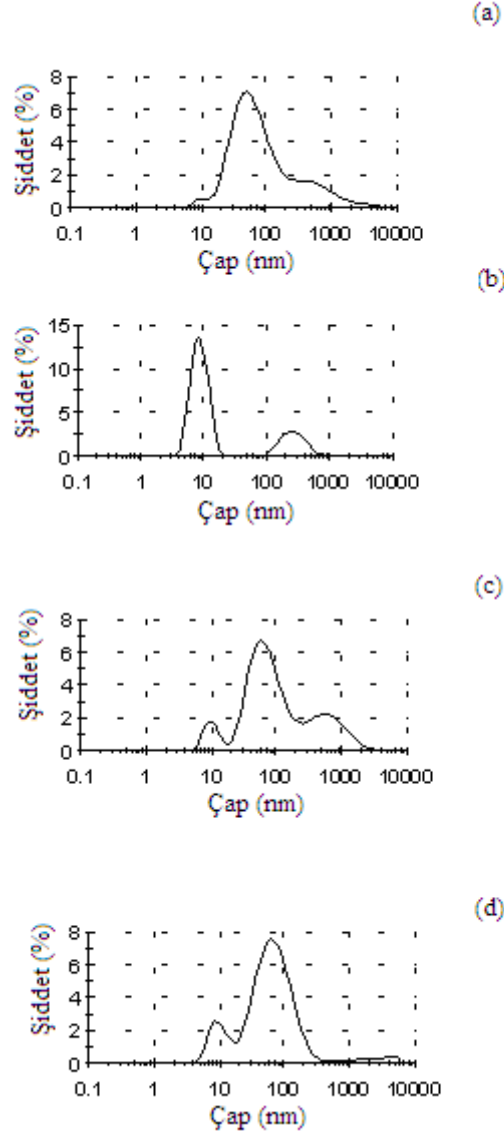
Şekil 4.50 PMVEMA-Cu²⁺ ($n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{PMVEMA}} : 0,3$) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PMVEMA (a); BSA (b); $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).



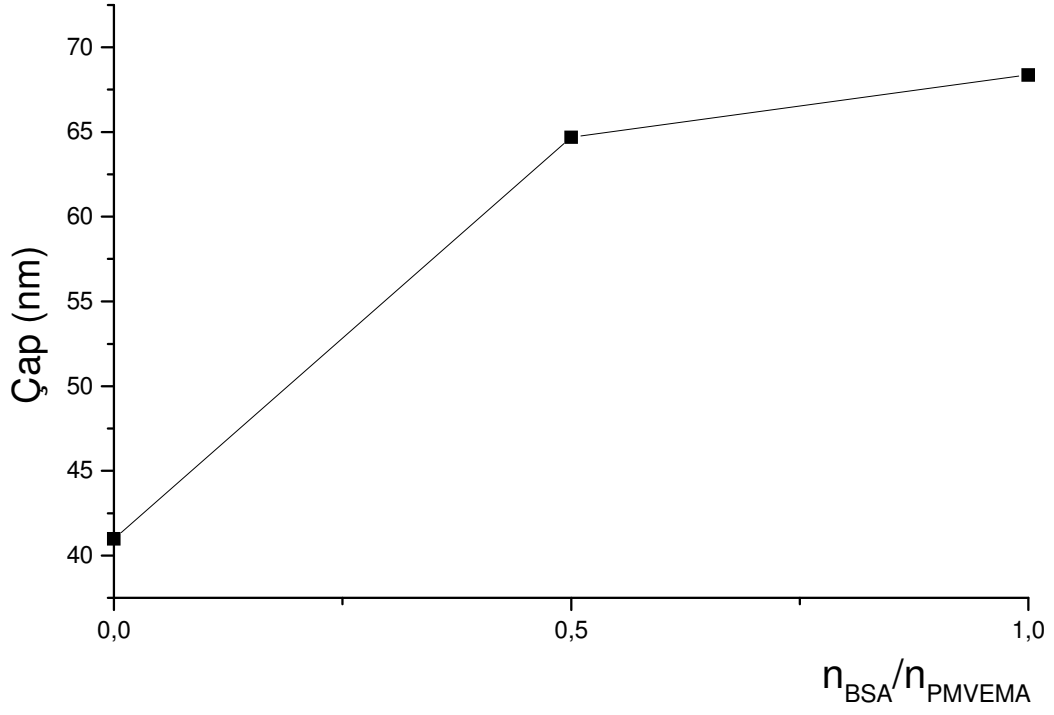
Şekil 4.51 PMVEMA-Cu²⁺ ($n_{Cu^{2+}} / n_{MVEMA} : 0,4$) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslere ait Zeta-Sizer grafikleri.



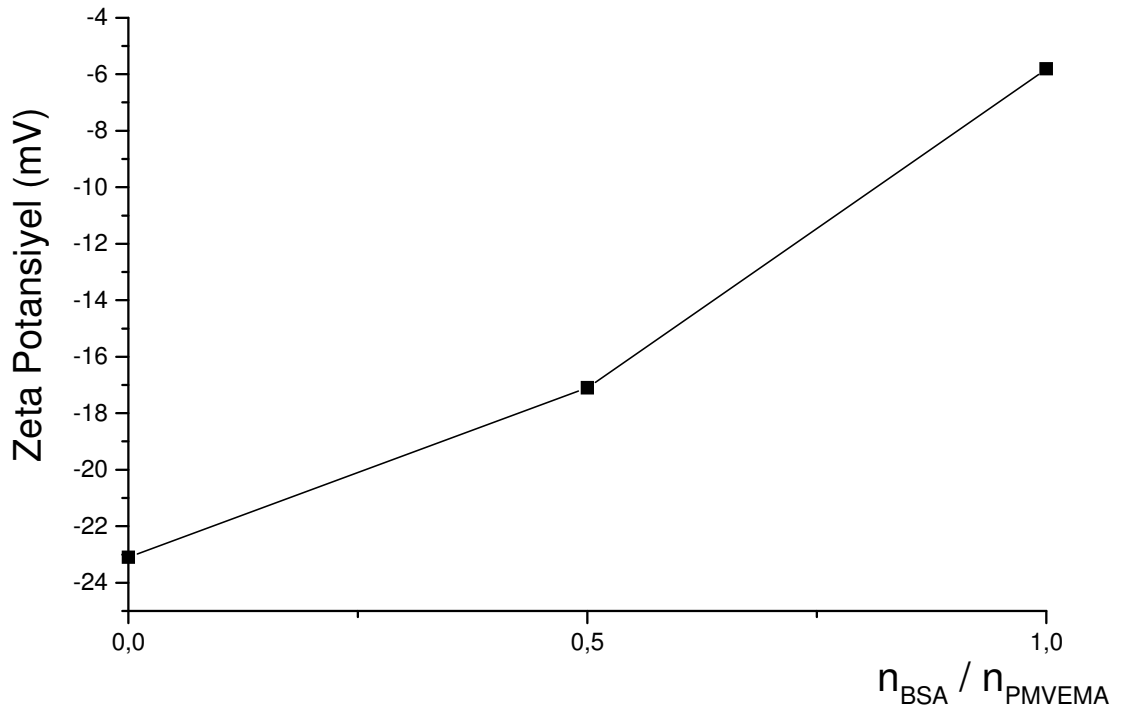
Şekil 4.52 PMVEMA-Cu²⁺ ($n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{PMVEMA}} : 0,4$) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PMVEMA (a); BSA (b); $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).



Şekil 4.53 PMVEMA-Cu²⁺ ($n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{PMVEMA}} : 0,5$) ikili kompleksi üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PMVEMA (a); BSA (b); $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,5 (c); 1 (d).



Şekil 4.54 PMVEMA-Cu²⁺ - BSA üçlü kompleksin ($n_{Cu^{2+}}/n_{MVEMA} : 0,5$) n_{BSA}/n_{PMVEMA} oranlarına bağlı çap grafiği.



Şekil 4.55 PMVEMA-Cu²⁺ - BSA üçlü kompleksin ($n_{Cu^{2+}}/n_{MVEMA} : 0,5$) n_{BSA}/n_{PMVEMA} oranlarına bağlı zeta potansiyel grafiği.

4.3.5 FTIR Ölçümleri

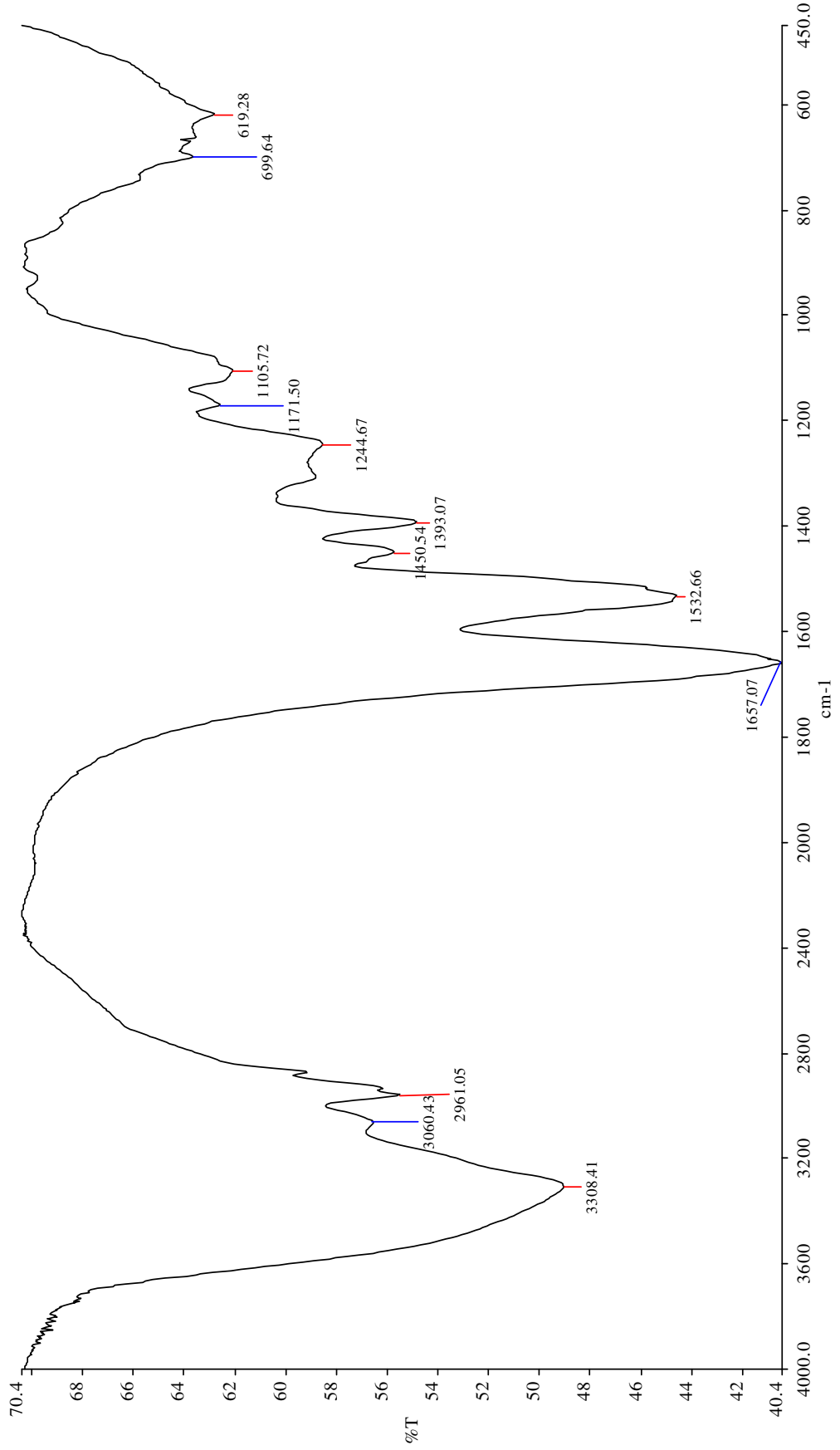
4.3.5.1 Kullanılan Çözeltiler

PMVEMA stok çözeltisi 3mg/ml olacak şekilde, ayrıca BSA stok çözeltisi PBS tamponda hazırlandı. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ stok çözeltisi ise ultra saf suda hazırlandı.

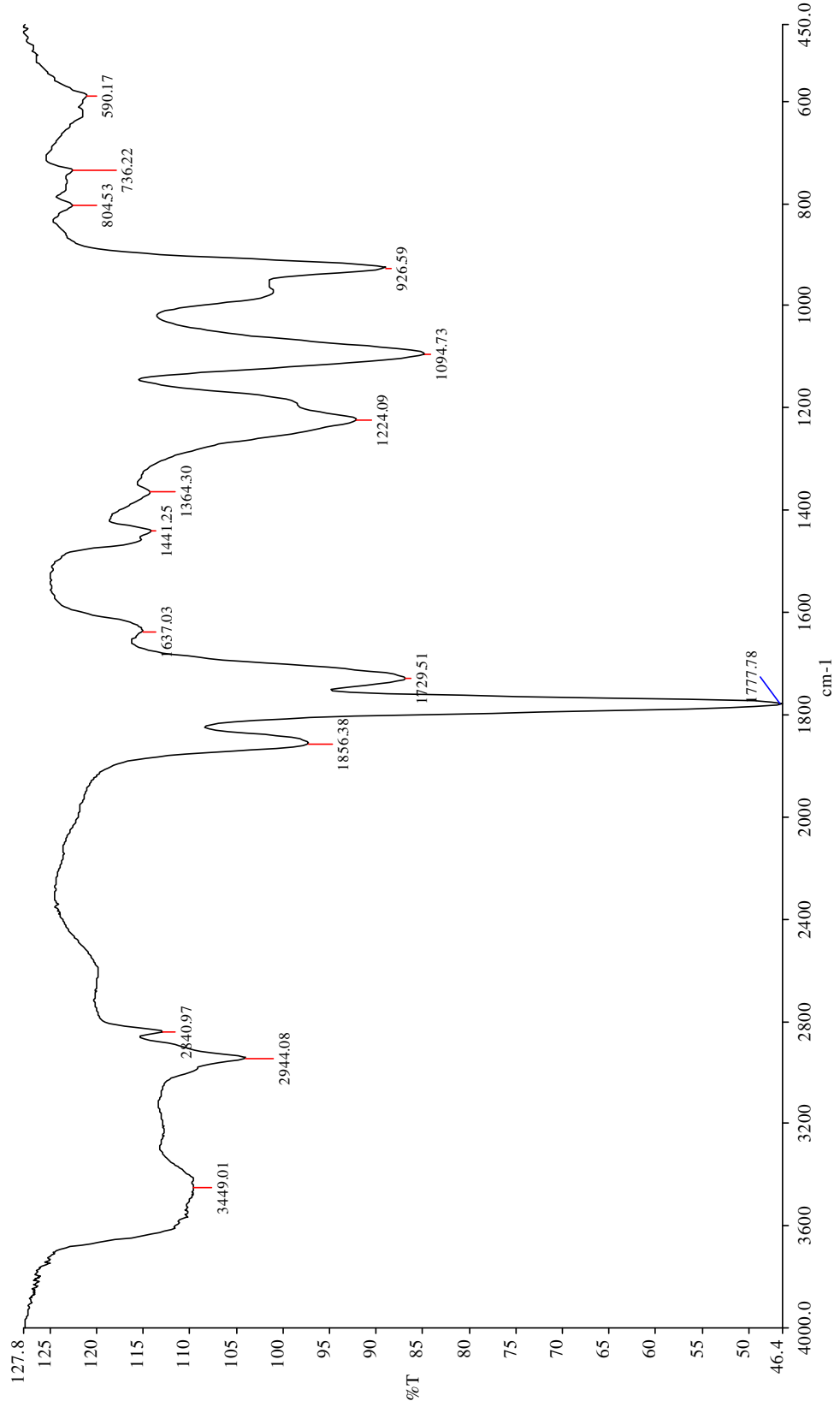
4.3.5.2 Deneyin Yapılışı

Her bir çözeltideki PMVEMA miktarı sabit olacak şekilde ($n_{\text{Cu}^{2+}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 0,5 oranında) hazırlanan stoktan toplam 10 ml çözelti için 3333 μl (9,999 mg) PMVEMA alınarak orana uygun olarak $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ eklenerek oluşturulan ikili kompleksler 1 gece karıştıktan sonra 1N NaOH çözeltisi ile pH: 7'ye ayarlanır (ikili polimer-metal kompleksi). Üçlü PMVEMA- Cu^{2+} -BSA kompleksi ise, ikili kompleksin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi ile elde edilir daha sonra pH kontrol edilir (pH: 7). Çözeltilerin hazırlanmasından sonra her bir çözeltiye çözelti hacminin en az 4 katı hacimdeki etanole boşaltılır, oluşan ikili ve üçlü komplekslerin çökmesi için buzdolabında bekletilir. Çökelti bir kaç defa dekante edilir ve alkolün kalan kısmı vakum etüvünde kurutulur.

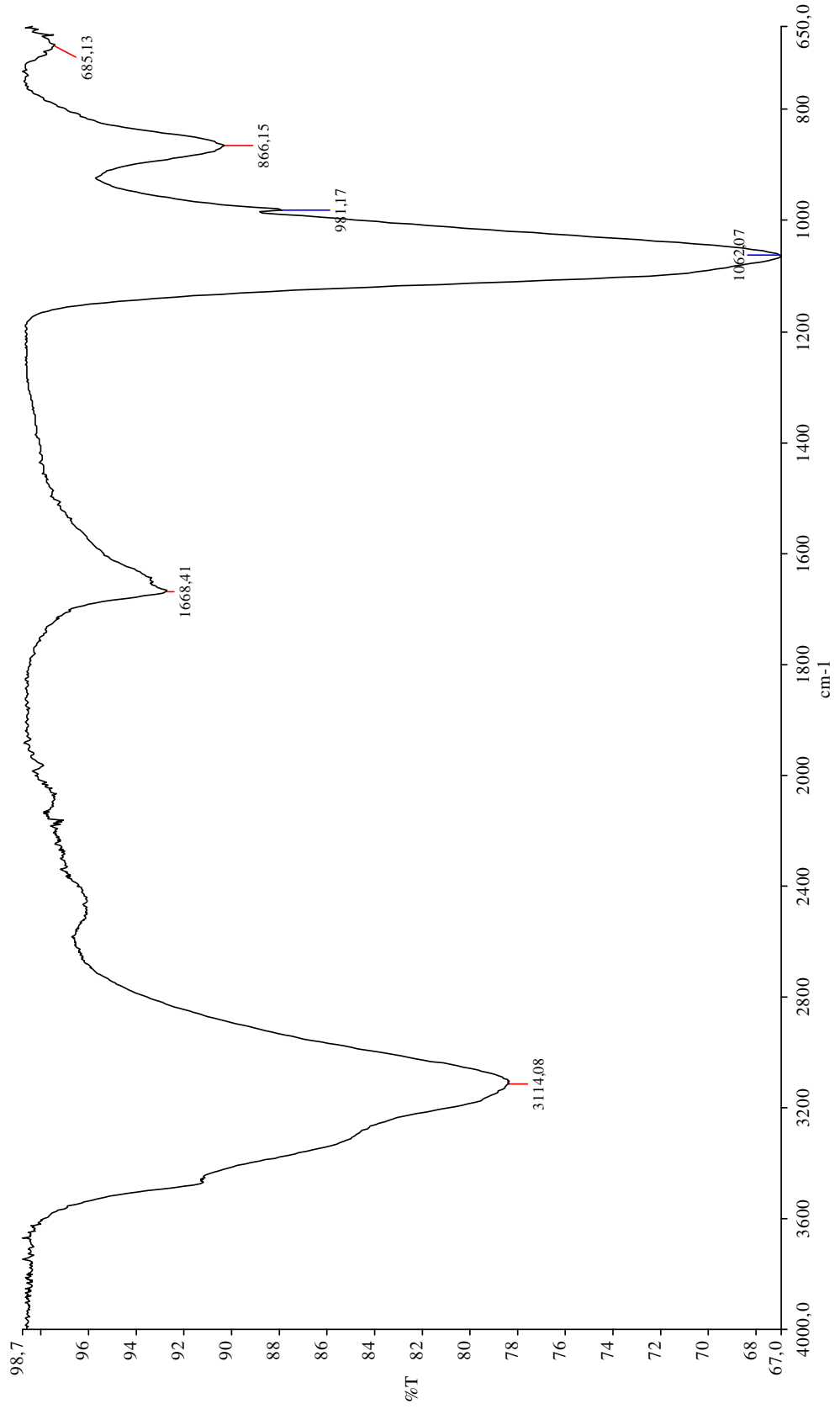
PMVEMA, BSA, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, PMVEMA- Cu^{2+} ikili kompleksi ve PMVEMA- Cu^{2+} -BSA üçlü kompleksi FT-IR spektrumları aşağıda gösterilmiştir (tüm ölçümler ATR ile alınmıştır).



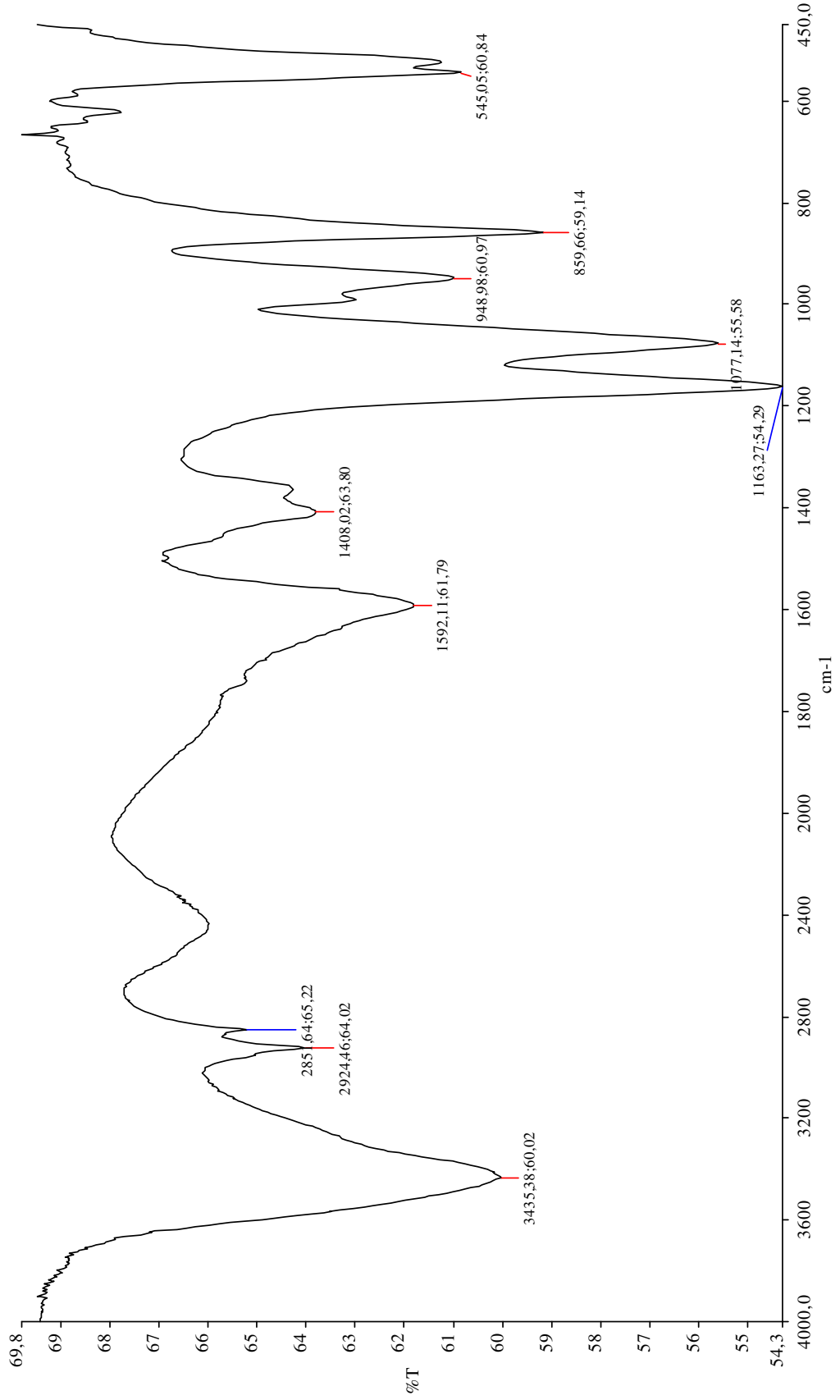
Şekil 4.56 BSA proteininin FT-IR spektrumu (numune katı halde).



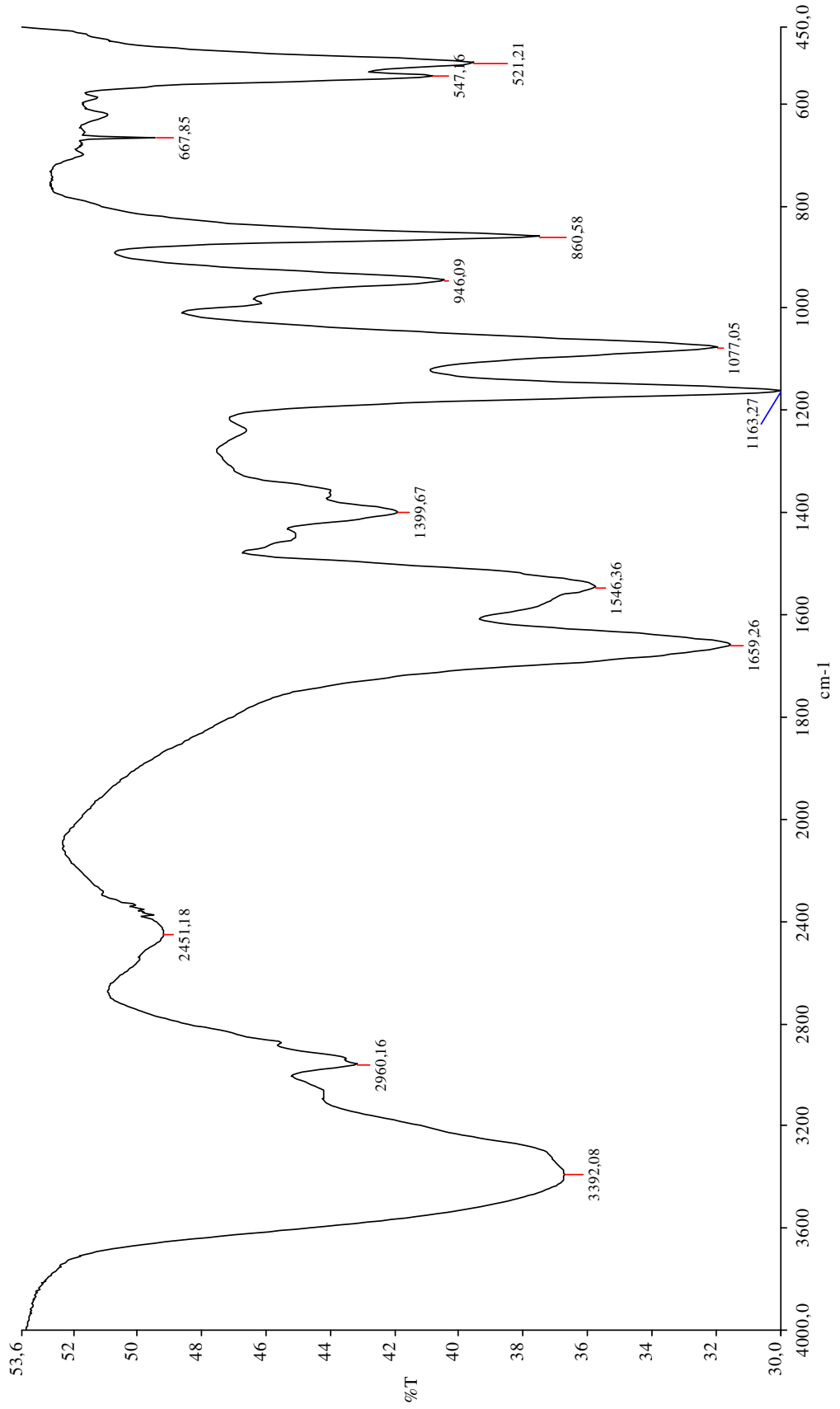
Şekil 4.57 PMVEMA kopolimerinin FT-IR spektrumu (numune katı halde).



Şekil 4.58 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 'nun FT-IR spektrumu (numune katı halde).



Şekil 4.59 PMVEMA-Cu²⁺ ikili kompleksinin FT-IR spektrumu (numune katı halde).

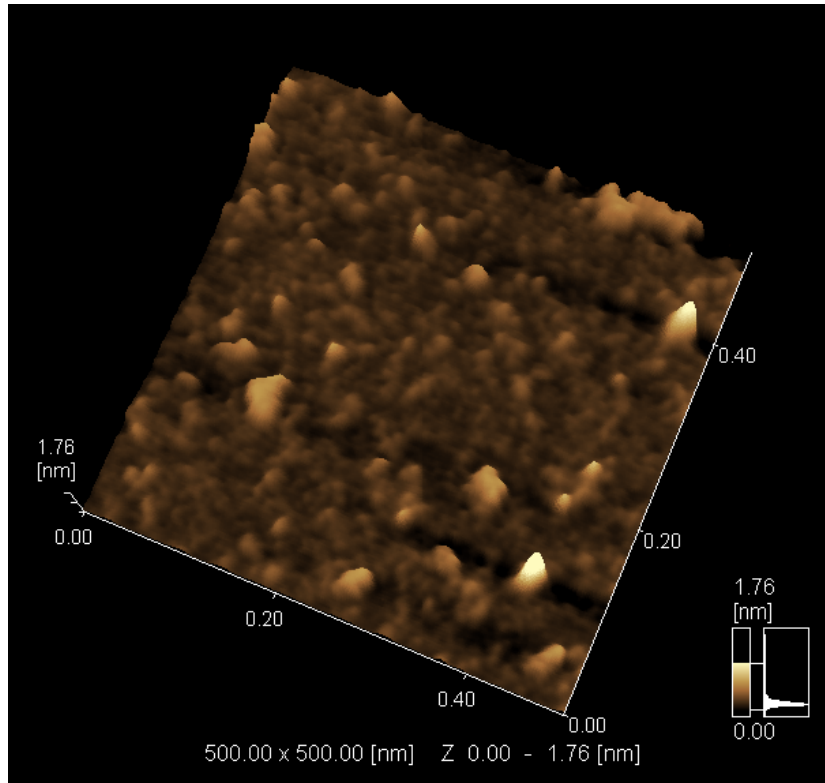


Şekil 4.60 PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksinin FT-IR spektrumu (numune katı halde).

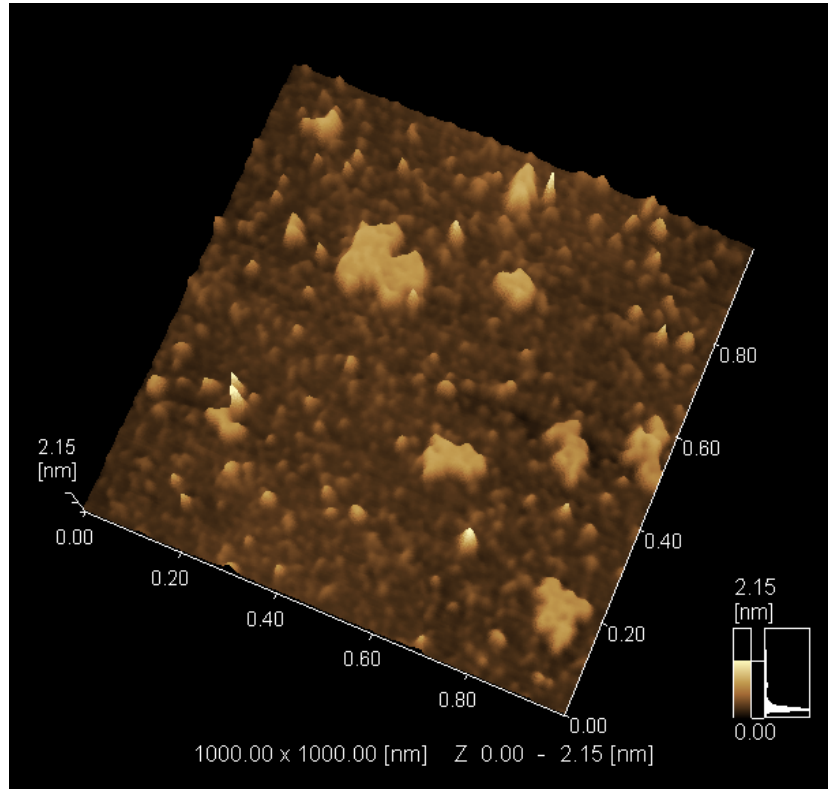
4.3.6 PMVEMA, BSA ve Üçlü PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksinin Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Görüntülenmesi

4.3.6.1 Deneyin Hazırlanması

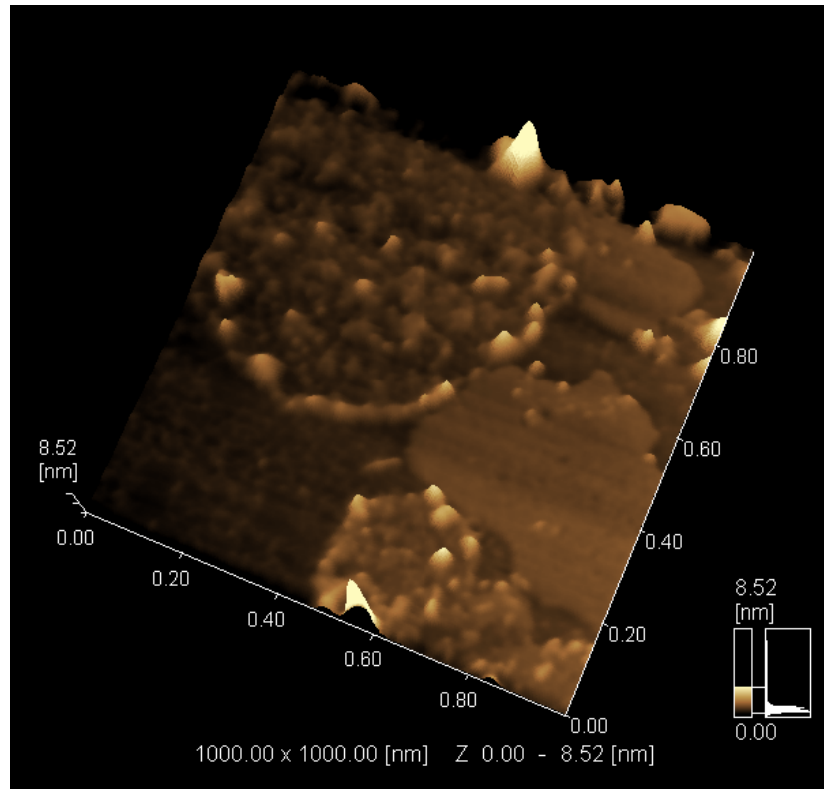
PMVEMA (0,15µg/1ml), BSA (0,15µg/1ml) ve üçlü kompleksin (BSA 0,15µg/1ml olacak şekilde) çözeltisi tamponda hazırlandı. Negatif yüklü Mika K⁺ iyonu ile dengelenmiştir, Mika'nın üzerine bant yapıştırılıp çekilince K⁺ iyonu bantla beraber ayrılır ve Mika negatif yüklü olarak kullanıma hazır hale gelir. Çözeltiler Mika üzerine damlatılır ve oda sıcaklığında kurutulup (5 dak.) görüntüleme yapılır yapılır [AFM ölçümleri "Phase Mode" ta silicon, non-contact mode SPM sensor (Nano world), kantilever kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekillerde verilen AFM görüntüleri yükseklik sinyaline ait görüntülerdir].



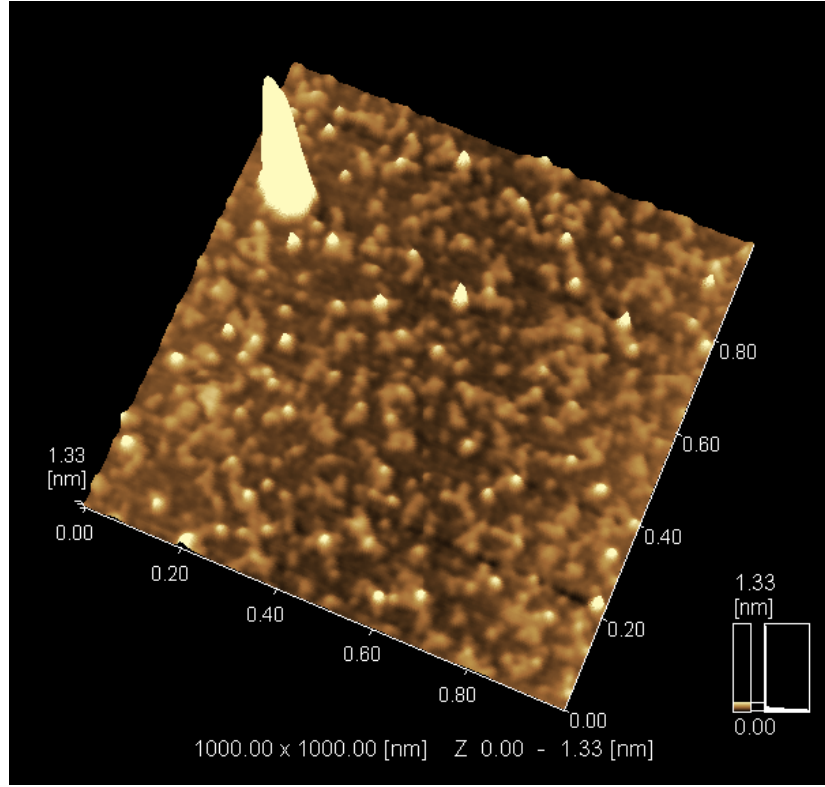
Şekil 4.61 BSA'nın (500 x 500 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.



Şekil 4.62 BSA'nın (1000 x 1000 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.



Şekil 4.63 PMVEMA'nın (1000 x 1000 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.



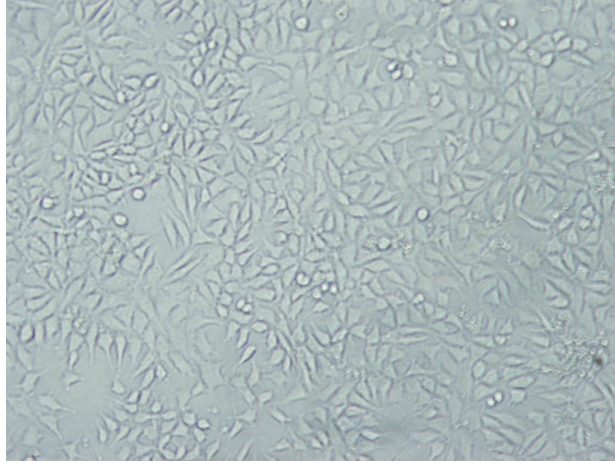
Şekil 4.64 Üçlü PMVEMA-Cu²⁺-BSA'nın (1000 x 1000 nm boyutunda) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.

4.3.7 PMVEMA, PMVEMA-Metal ve Üçlü PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksinin L929 fare fibroblast hücrelerine Etkisinin İncelenmesi

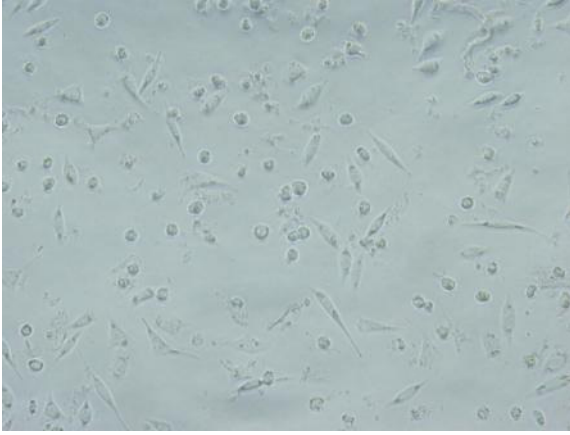
PMVEMA, PMVEMA-Cu²⁺ ve Üçlü PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksinin hücre canlılığı ölçüldü. L929 hücreleri 10000 hücre/ml konsantrasyonda düz tabanlı 96 kuyucuklu plaklara ekim yapıldı. Yüzey kaplamasını tamamlandıktan sonra sırasıyla her bir kuyucuğa 10 µl polimer, polimer-bakır ve polimer-bakır-protein çözeltisinden ve kontrol grubuna 10 µl PBS ilave edildi. 48 saat inkübasyonun ardından 10 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37 °C’de 4 saat inkübe edildi. MTT durdurucu solüsyondan 100 µl eklendi 30 dak. oda sıcaklığında beklenip formazan kristallerinin çözündüğü kontrol edildi. Aynı işlemler polimer besiyeri etkileşimini kontrol etmek amacıyla, hücre bulunmayan sadece besiyeri ilave edilmiş 96 kuyucuklu plaklarda da yapıldı. Son olarak optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 570 nm dalga boyuna ayarlanmış ELIZA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı (Çakır, 2008). Ancak deneyler sadece bir kere yapıldığı için bu çalışmaların tekrar yapılması gerekmektedir. Elde edilen bulgular ön çalışma niteliği taşımaktadır ve mutlaka tekrarlanması gerekmektedir.

4.3.7.1 MTT Deneyinin Hazırlanması

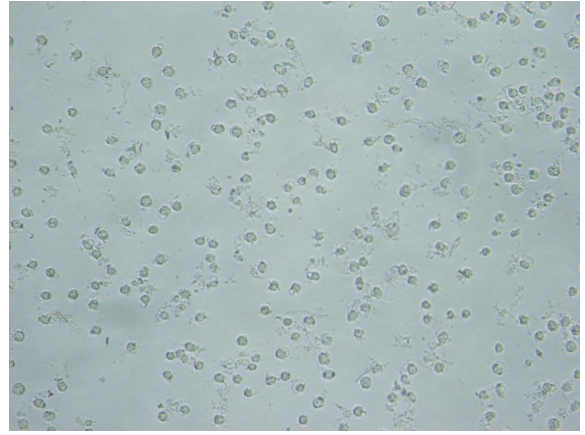
Thiazoly blue tetrazolium bromide (MTT) (Sigma M5655) çözeltisi 10 mg/ml hazırlandı. Hassas terazide 10 mg/ml MTT çözeltisi için 50 mg toz MTT tartılıp PBS ile 5 ml’ye tamamlandı. Önce vortekste çalkalanarak iyice çözüldükten sonra steril edilmek üzere önce 0, 45 µl daha sonra 0,22 µl’lik 38 (CS) filtreden geçirilerek steril edildi.



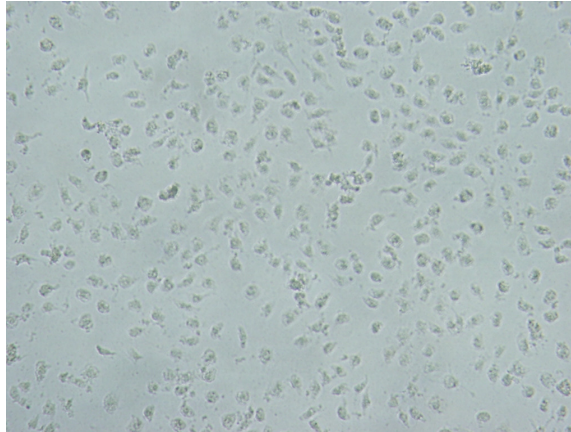
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.65 PMVEMA kopolimerinin ikili ve üçlü komplekslerinin L929 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x), a) Kontrol, b) $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} : 0,4$ ikili kompleksi, c) $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} : 0,5$ ikili kompleksi, d) $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} : 0,5$ $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}: 2$ üçlü kompleksi.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Bu çalışmadan elde edilen sonuçları özet halinde şu şekilde sıralayabiliriz;

1. Geçiş metali olarak bakırın kullanılmasının nedenleri ve avantajları.
2. Poliakrilik asit polimeri ile Cu^{2+} iyonlarının oluşturduğu ikili komplekslerin yapısının aydınlatılması.
3. Üçlü PAA- Cu^{2+} -BSA komplekslerin oluşturulması ve yapılarının aydınlatılması.
4. Metil vinil eter-maleik anhidrit kopolimeri ile Cu^{2+} iyonlarının oluşturduğu ikili komplekslerin yapısının aydınlatılması.
5. Üçlü PMVEMA- Cu^{2+} -BSA komplekslerin oluşturulması ve yapılarının aydınlatılması.
6. Poliakrilik asit ve Metil vinil eter-maleik anhidrit kopolimerinin ikili ve üçlü komplekslerin toksitesinin incelenmesi.

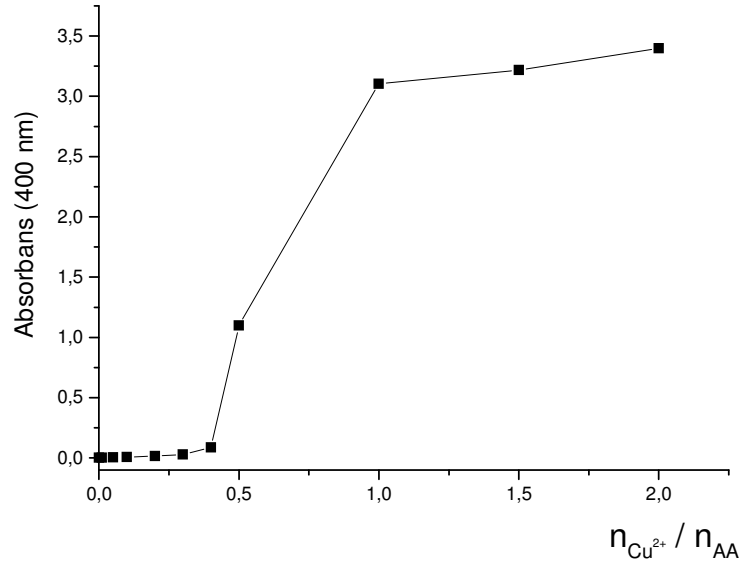
5.1 Bakırın Kullanılmasının Nedenleri ve Avantajları

Anyonik polielektrolitlerin (PE) [poliakrilikasit (PAA) ve dextran sülfat (DX)] geçiş metal iyonları (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ve Mn^{2+}) varlığında sığır serum albumini (BSA) ile sulu çözeltideki etkileşimi floresans ve uv-visible spektrofotometrik yöntemlerle incelenmiştir. Uv-visible spektrofotometrik yöntemle Cu^{2+} , Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının daha kararlı kompleks oluşturduğu gözlenmiş ayrıca floresans etkinliklerinden de bu sonuçlar desteklenmiştir. Bu üç iyon, protein yapısındaki triptofanın floresansını söndürür ve maksimum dalga boyu uzunluğu (λ_{max}) sağa doğru (red shift) kayar. Bu sonuçlara dayanarak Cu^{2+} , Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları varlığında oluşan polikomplekslerin yapısı hakkında şunlar söylenebilir; bu iyonlar polianyon makromoleküllerini proteinle bağlayarak üçlü polikompleks oluştururlar ve oluşan partiküllerin yapısındaki albumin globülleri çözelti ile etkileşebilen bir formda bağlanmaktadır, bu durum yapay aşı sistemleri için idealdir. Diğer iyonlar ise (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ve Mn^{2+}) polianyonlarla zayıf kompleks oluşturma özelliği taşırlar. Bu etkileşim sonucu protein molekülü daha da kompakt hale gelerek triptofanın su molekülleri ile etkileşimini azaltırlar, maksimum dalga boyu uzunluğu sola doğru (blue shift gösterir) kayar. Bu sistemlerde Cu^{2+} , Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları kararlı yapılu üçlü polikompleksler oluştururlar (Mustafaev, 1996a, Sebastian, 1998; Karahan, 2002). Gerek yapılan çalışmalardan gerekse de literatürden yapılan araştırmalar ışığında en kararlı yapıyı Cu^{2+} iyonları sağladığı bulunmuş ve geçiş metali olarak Cu^{2+} iyonu seçilmiştir.

Geçiş metali kullanılarak kompleks oluşumunun birçok avantajı vardır. 1) İki negatif molekül (polimer-protein ve polimer-polimer) birbirine bağlar. 2) Polimer antijenle konjüge edildiği zaman, kovalent bağ oluşumunda kendi katılımlarının bir sonucu olarak antijenik determinantın (belirtgen) kimyasal yapısında kısmi bir değişiklik olabilir. Bu durum teknolojik uygulamalar için uygun değildir. Çünkü ana reaksiyon ürünü ile birlikte serbest bileşenler oluşur. Bu bileşenlerde ana üründen ayrılması gerekir, ayrılmadığı takdirde sistemde polimer ile antijenin çapraz bağlanması esnasında kalır. Bu istenmeyen durum araştırmalara başka bir boyut kazandırmıştır. Böylece polielektrolitler ile antijenleri metal varlığında bağlamışlardır, taşıyıcı polimerin ve antijenin yapısında çok önemli değişiklikler olmadığı gibi istenmeyen serbest bileşenler oluşmamış olur (Mustafaev ve Kabanov, 1981). 3) Ayrıca elektrosatik bağlı toksik olmayan PE'ler [N-vinilpirolidon ile akrilik asit kopolimeri] ile protein (BSA) antijenlerinin Cu^{2+} iyonları varlığında oluşturulan üçlü ve suda çözünen yapılar immünolojik açıdan yüksek koruma sağlamıştır (Mustafaev ve Norimov, 1990a). Dolayısıyla oluşturulacak yeni komplekslerde de bu tür çalışmalara yapmak mümkündür. 4) Bakır çözeltisinin pH:4'tür ve pH:7'ye getirildiğinde çöker ancak oluşturulan üçlü polimer- Cu^{2+} -protein kompleksinin pH: 7'ye ayarlandığında çözünür haldedir. Yani amaca uygun olarak bakır bu pH'ta çözünür halde kullanılabilir. 5) Geçiş metali kompleksler radyasyona karşı koruma sağlar (Mustafaev vd., 2001; Bayülken vd., 2004).

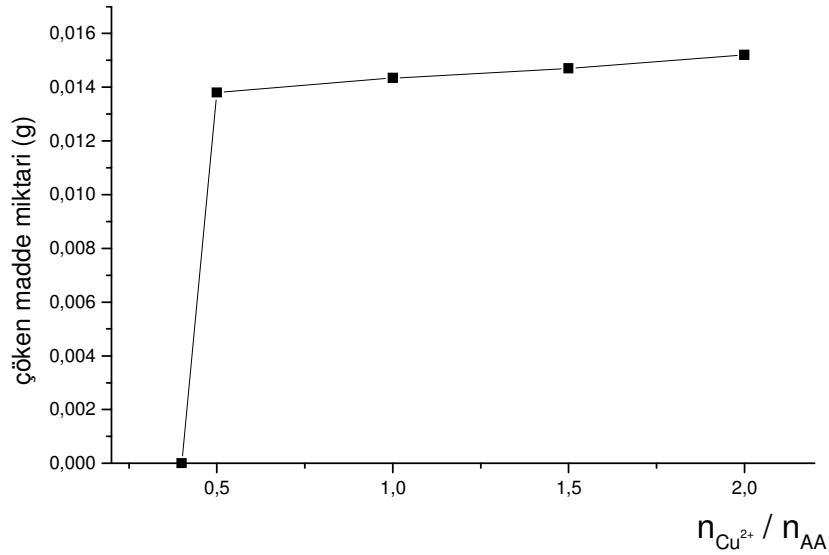
5.2 PAA- Cu^{2+} İkili Komplekslerine Ait Sonuçlar

İlk olarak poliakrilik asite değişik miktarlarda bakır iyonları bağlayarak 400 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Amaç ikili kompleksin suda çözünen oranlarını bularak bu oranlarda çalışmaktır. Şekil 5.1'de görüldüğü gibi farklı oranlarda metal poliakrilik asit ilave edildiğinde ve pH: 7'ye ayarlığında polimer-metal komplekslerinin 400 nm' deki absorbans değerleri, $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{AA}} \leq 0,4$ oranına kadar polimer-metal ikili kompleksi metalin konsantrasyonu arttıkça belli bir orana kadar yavaş bir şekilde artış gösterirken (suda çözünen kısım), $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{AA}} > 0,4$ oranından sonra daha büyük artışlar görülmektedir, bu orandan sonra çökmenin olduğu gözlenmektedir. Buradan $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{AA}} \leq 0,4$ oranına kadar suda çözünen PAA-Metal ikili komplekslerinin (PMK) oluşabileceği sonucu çıkar.



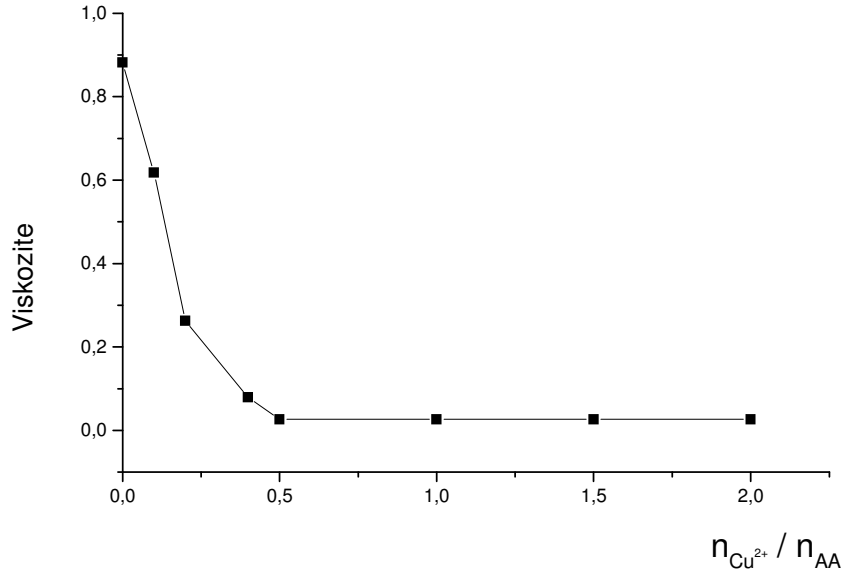
Şekil 5.1 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı 400 nm’deki optik yoğunlukları:
 $0 \leq n_{Cu^{2+}} / n_{AA} \leq 2$.

İkili komplekslerde belirli orandan sonra ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} \geq 0,5$) çökme olmaktadır. Çöken kompleksin kurutulup tartılmasıyla, eklenen bakır miktarı arttıkça çökelti miktarının artmakta olduğu görülmektedir.



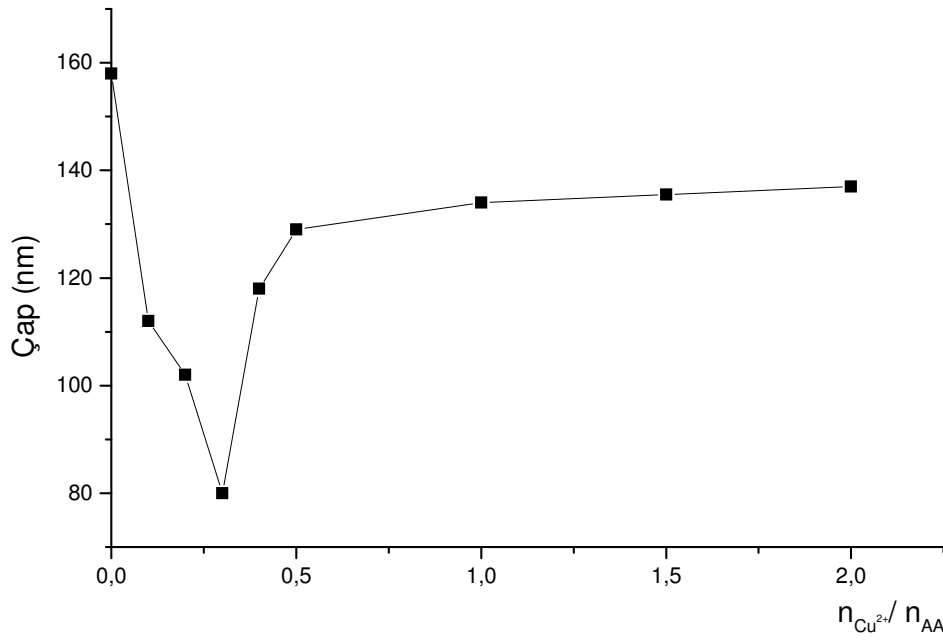
Şekil 5.2 $n_{Cu^{2+}} / n_{AA} \geq 0,5$ oranlarında ikili komplekslerde oluşan çöken madde miktarı (g).

İkili polimer-metal komplekslerinin viskozitesine bakılmıştır. Poliakrilik asit pH:7’de negatif yüklü lineer bir polimerdir, bakır ilave ettikçe viskozite düşmekte, belirli bir orandan sonra sabit kalmaktadır. Bunun nedeni ise polimere metal ilave edildikçe polimer kompakt hal almaktadır ve dolayısıyla viskozite düşmektedir, belli bir orandan sonra metal eklenmesine rağmen yapıda bir değişim olmadığı için viskozite sabit kalır.



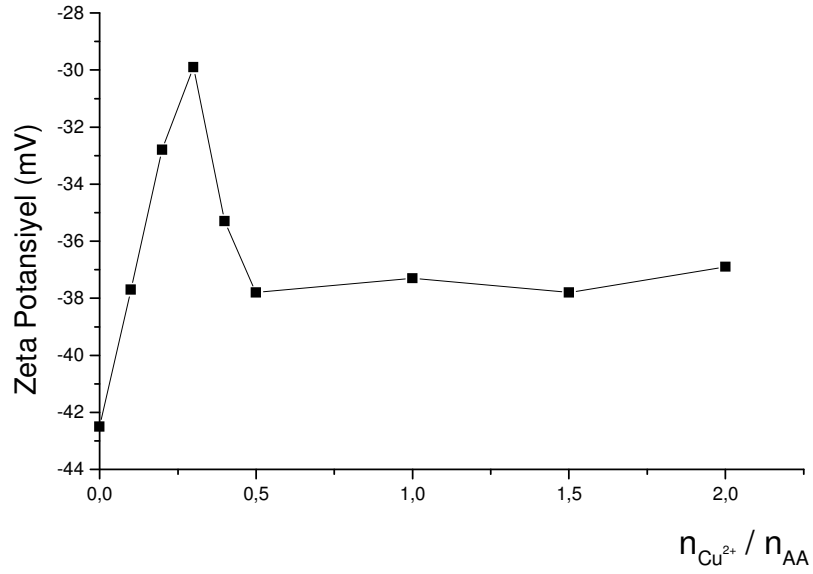
Şekil 5.3 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı viskozite grafiği.

Polimere bakır eklendikçe hidrodinamik çap azalmakta, sonra artışa geçip sabit bir şekilde devam etmektedir. Polimere bakır ilave edildikçe; viskozite grafiğinden de anlaşıldığı gibi kompaktlaşma meydana gelmekte ve hidrodinamik çap azalmaktadır. Daha sonra bakır oranı arttıkça çap artar (polimerler arası etkileşim) bakırın fazlası eklendiğinde etkileşime sebep olmayarak hidrodinamik çapın sabit olarak devam etmesini sağlar.

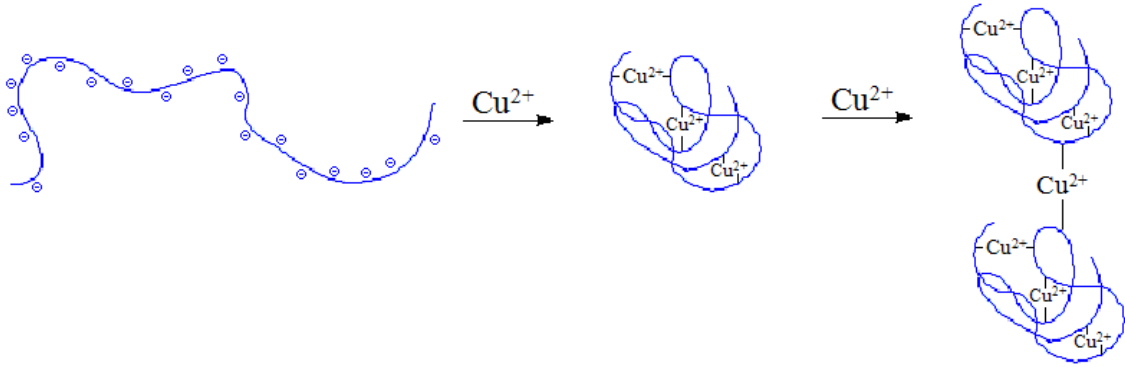


Şekil 5.4 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı çap grafiği.

Şekil 5.5’de $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}$ oranı arttıkça zeta potansiyelinin pozitif (+) değerlere yaklaştığı görülmektedir. Bu da kompaktlaşmanın meydana geldiğini gösterir. Bakır oranı arttıkça kompaktlaşan polimerler arasında etkileşimi sağlayarak zeta potansiyelde bir düşme yani daha negatife doğru kayma izlenmiştir. Bakır ilavesine devam edildiğinde, zeta potansiyelin sabit kaldığı ve polimer ile etkileşimin olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 5.5 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı zeta potansiyel grafiği.

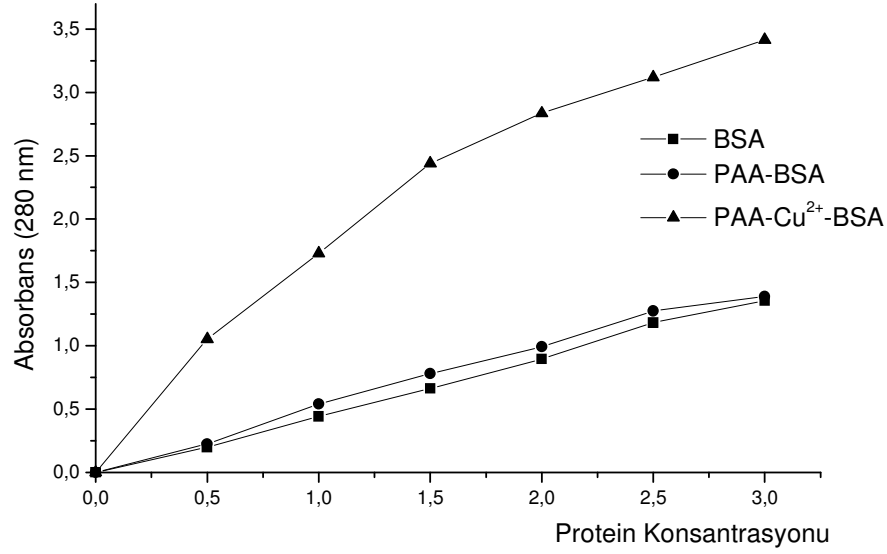


Şekil 5.6 PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin düşünülen yapı modeli.

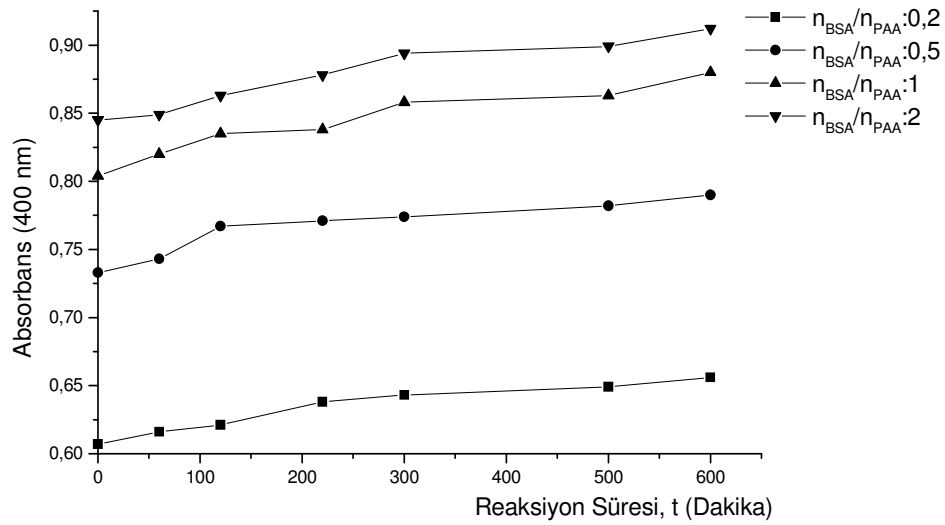
Sonuç olarak; lineer haldeki poliakrilik asit üzerine bakır ilave edildiğinde, lineer polimerde kompaktlaşma meydana gelmektedir. Bakır miktarı arttıkça kompaktlaşmış polimerler birbirine bağlanmaktadır. Bakırın fazlasında ise kompleks yapısında bir değişiklik olmamaktadır. Elde edilen sonuçlar ışığında PAA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin yapı modeli ortaya çıkarılmıştır.

5.3 Üçlü PAA-Cu²⁺-BSA Komplekslerine Ait Sonuçlar

Farklı miktarlarda protein içeren protein çözeltilerinin (BSA) ve aynı konsantrasyonda protein çözeltisi içeren polimer çözeltileri (PAA-BSA) ve polimer-metal (PAA-Cu²⁺-BSA) çözeltileriyle karıştırılarak 280 nm'deki absorbans ölçümleri alındı. Şekil 5.7'de görüldüğü gibi protein çözeltilerinin ve protein-polimer çözeltilerinin absorbansı lineer olarak artmaktadır. Fakat absorbans artışı birbirine çok yakındır. Buda bize polimer ile protein arasında metal iyonu olmaksızın bir etkileşim olmadığını göstermektedir. Protein çözeltileri PMK çözeltilerine ilave edildiğinde 280 nm' deki absorbans artışı protein ve protein polimer karışımındaki absorbans artışından çok daha fazladır. Bu olay ortamda metal iyonu bulunduğu zaman üçlü polimer-metal-protein kompleksinin oluştuğunu göstermektedir.



Şekil 5.7 Protein, protein-polimer ve polimer-metal-polimer kompleksleri ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA}: 0,4$, $n_{BSA} / n_{PAA}: 2$) çözeltilerinin 280 nm'deki optik yoğunlukları.

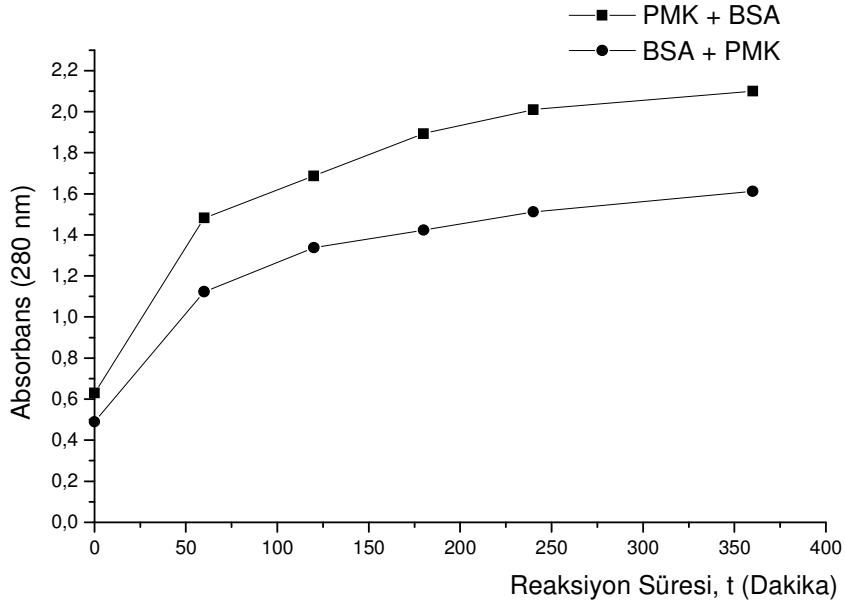


Şekil 5.8 PAA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerinin 400 nm'deki protein/polimer oranlarına göre zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri: $n_{Cu^{2+}} / n_{AA}: 0,4$ oranında (bakır oranı sabit) $n_{BSA} / n_{PAA}: 0,2; 0,5; 1; 2$ oranları.

Şekil 5.8'de üçlü komplekslerin, PMK ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA}: 0,4$) çözeltisine proteinin ilavesiyle hazırlanmıştır. $n_{BSA} / n_{PAA}: 0,2; 0,5; 1; 2$ olarak dört değerde PAA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksleri hazırlanmıştır. Protein konsantrasyonu artışıyla reaksiyon hızı artmakta, 300.

dakikada hızlı bir şekilde artmakta ve daha sonra çok küçük artışla devam etmektedir.

BSA ve PMK karışımlarının zamana bağlı 280 nm’ deki spektrofotometrik ölçümleri değişimi Şekil 5.9’da gösterilmiştir.



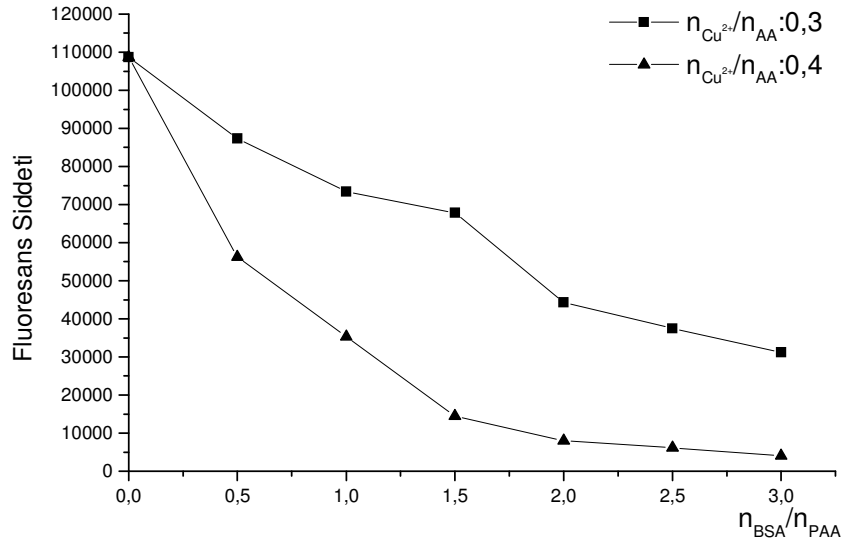
Şekil 5.9 BSA ve PAA-Cu²⁺ ikili ($n_{Cu^{2+}} / n_{PAA} : 0,4$; $n_{BSA} / n_{PAA} : 2$) komplekslerinin (PMK) (oranlar birbirine eşit) zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri.

Burada hazırlama yönteminin etkisi incelenmiştir. Buna göre,

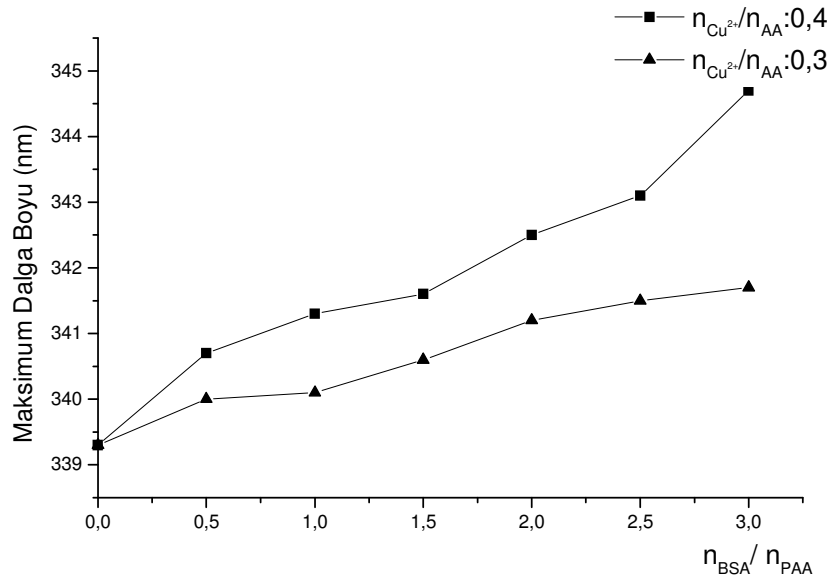
■ BSA çözeltisi PMK çözeltisine ilave edildiğinde (1)

● PMK çözeltisi BSA çözeltisine ilave edildiğinde (2)

Şekil 5.9’da görüldüğü gibi 1 ve 2 karışımlarının 280 nm’deki absorbansları reaksiyon süresi arttıkça artmaktadır ve bir limit değere ulaşmaktadır. Başlangıç anındaki noktaların oluşturduğu doğruların eğiminden [reaksiyon hızı (dA/dt)] elde edilen sonuca göre 1. reaksiyon 2. reaksiyondan daha hızlıdır. PMK çözeltisi BSA çözeltisine ilave edildiğinde başlangıçta protein konsantrasyonu daha yüksektir. PMK çözeltisinin ilave edilen miktarı arttıkça kompleks partikülleri arasında polimer zincirinin dağılımı suda çözünmeyen kompleks oluşumunu zorlaştırır ve bu yüzden ikinci durumda absorbans daha yavaş olarak artmaktadır.

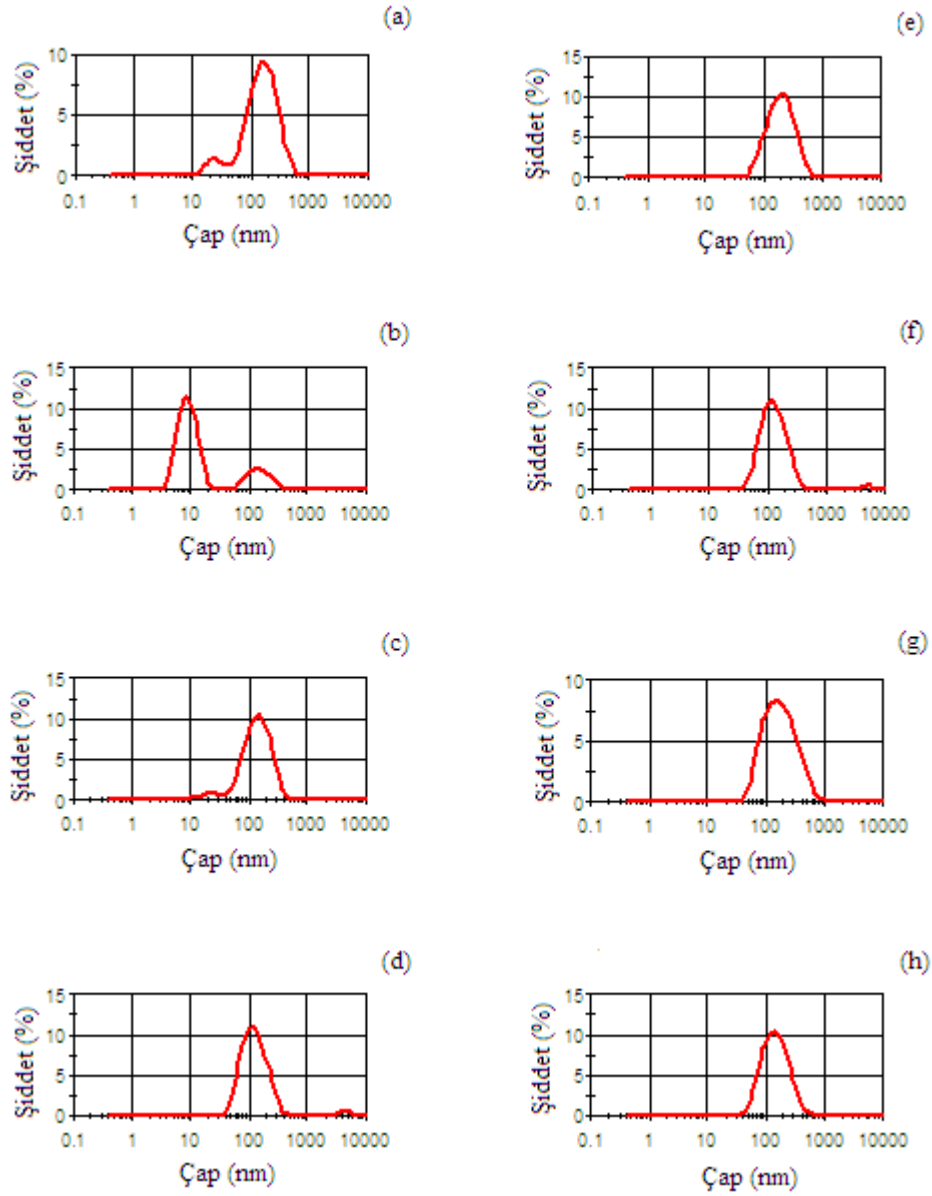


Şekil 5.10 Polimer-Metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen floresans şiddeti değerlerinin n_{BSA}/n_{PAA} oranı ile değişim grafiği.



Şekil 5.11 Polimer-Metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin n_{BSA}/n_{PAA} oranı ile değişim grafiği.

Şekil 5.10’da görüldüğü gibi polimer-metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisi eklendiğinde floresans şiddetinde büyük bir azalma izlenmiştir (polimer-metal oranı 0,4 0,3’e göre daha büyük düşüş gösterir). Üçlü komplekste poliakrilik asit Cu^{2+} iyonları vasıtasıyla BSA ile tercihi olarak BSA’nın triptofan kısmına bağlanarak triptofan floresansını söndürmektedir. BSA’nın emisyon şiddetindeki bu sönüm etkisi polimerin protein ile etkileşimden kaynaklanan proteinin konformasyon değişikliğinden dolayıdır. Buda bize metal iyonu konsantrasyonu arttıkça metal, PAA-BSA sistemlerinde çapraz bağlayıcı özelliği kazandığını ve üçlü komplekslerin oluştuğunu göstermiştir. Şekil 5.11’de maksimum dalga boyu (λ_{max}) sağa doğru (red shift), yani daha uzun dalga boyuna kaydığı görülmüştür. Bu durum BSA yapısının açıldığı ve su ile daha fazla etkileşime girdiğini göstermektedir (polimer proteini sarmamıştır). Floresans ölçümü sonuçlarına göre; Cu^{2+} iyonları ile kararlı kompleksler oluşmaktadır.

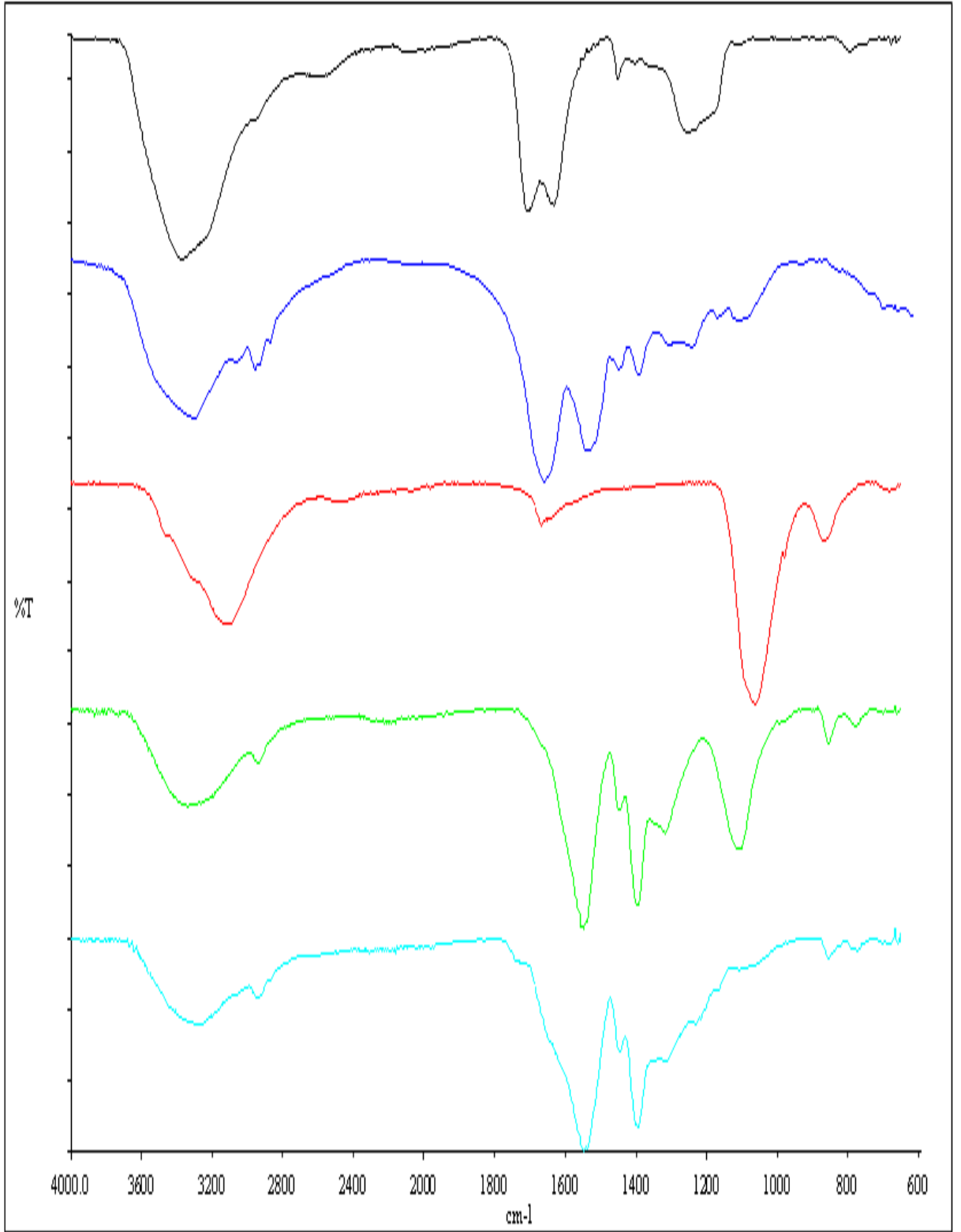


Şekil 5.12 PAA-Metal ($n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,4$) ikili kompleksinin üzerine BSA' nın eklenmesiyle elde edilen üçlü komplekslerin orana bağlı boyut dağılımları: PAA (a); BSA (b); n_{BSA}/n_{PAA} : 0,5 (c); 1 (d); 1,5 (e); 2 (f); 2,5 (g); 3 (h).

Suda çözünen üçlü komplekslerin Zetasizer cihazı ile çapları ölçülmüştür. Bu ölçümler ışığında polimer-metal ikili komplekslerinin üzerine BSA eklenmesi ile elde edilen komplekslerden, $n_{Cu^{2+}} / n_{AA} : 0,4$ oranıyla oluşturulan PAA- Cu^{2+} -BSA üçlü kompleksler en kararlılardır.

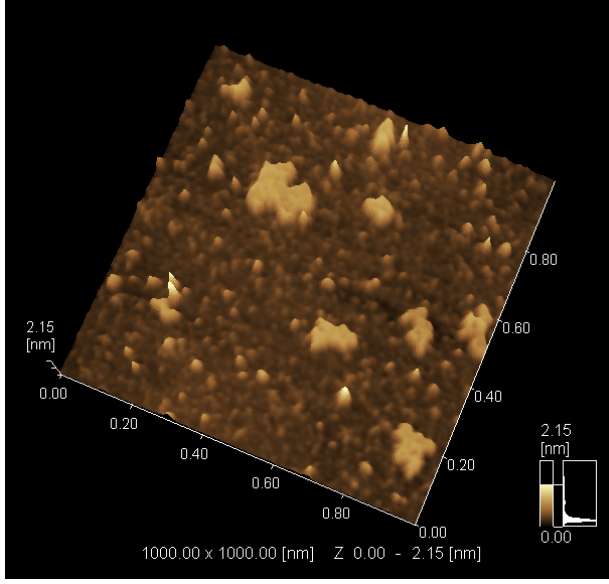
PAA, BSA, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, PAA-Cu^{2+} ve $\text{PAA-Cu}^{2+}\text{-BSA}$ üçlü kompleksleri FT-IR spektrumları aşağıda gösterilmiştir.

Bakırın kendisine has 1062 cm^{-1} bandı ve PAA'da parmak izi bölgesinde $1470\text{-}744\text{ cm}^{-1}$ aralığında bandlar mevcuttur. PAA-Cu^{2+} ikili kompleksinin spektrumunda hem PAA hemde $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ karakteristik bandları ($1549\text{-}783\text{ cm}^{-1}$ ve 1108 cm^{-1}) spektrumda görülmektedir. Üçlü $\text{PAA-Cu}^{2+}\text{-BSA}$ kompleksin spektrumunda ise, bakır iyonları polimer ile proteini bağladığı için, bakıra ait karakteristik band kaybolmuştur. Ayrıca bu üçlü komplekste BSA ve PAA'nın parmak izi bölgesindeki bandları tamamen karakteristik özelliklerini kaybederek yeni formlara dönüşmüştür. Bu sonuçlar, üçlü kompleksin oluştuğunu göstermektedir.

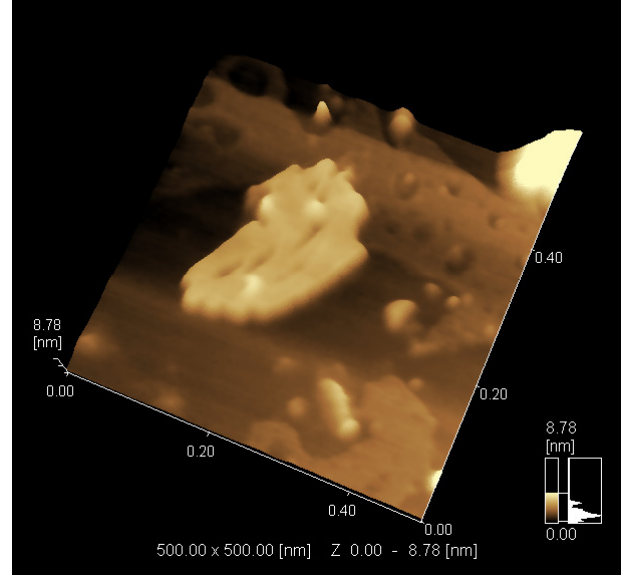


Şekil 5.13 FT-IR spekturumları, siyah: PAA, mavi: BSA, kırmızı: CuSO₄·5H₂O, yeşil: PAA-Cu²⁺ ikili kompleksi, turkuaz: PAA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksi

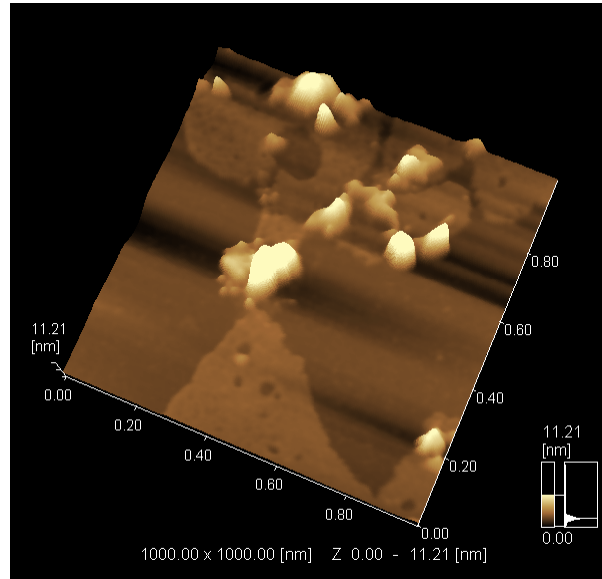
AFM ile yapılan ölçümlerde lineer haldeki PAA ile globüler BSA proteini metal varlığında, üçlü PAA-Cu²⁺-BSA kompleksinin oluştuğu görüntülenmiştir.



(a)



(b)

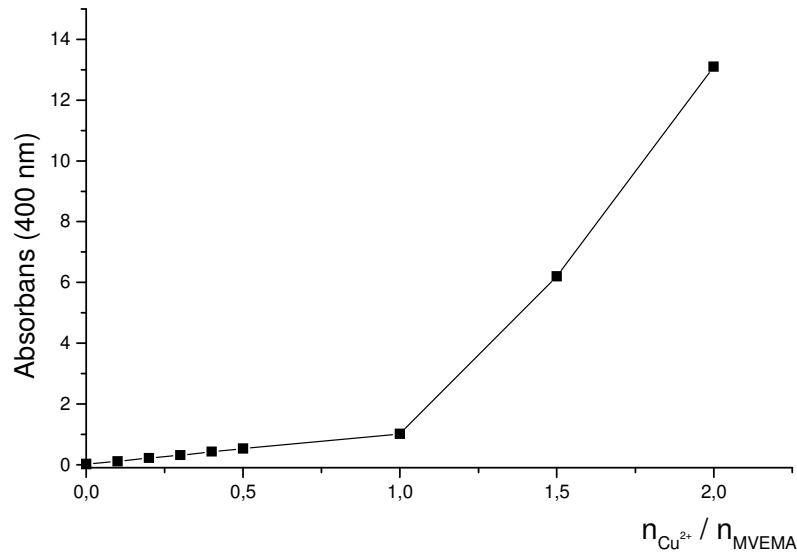


(c)

Şekil 5.14 a) BSA (1000 x 1000 nm), b) PAA (500 x 500 nm), c) Üçlü PAA-Cu²⁺-BSA (1000 x 1000 nm) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.

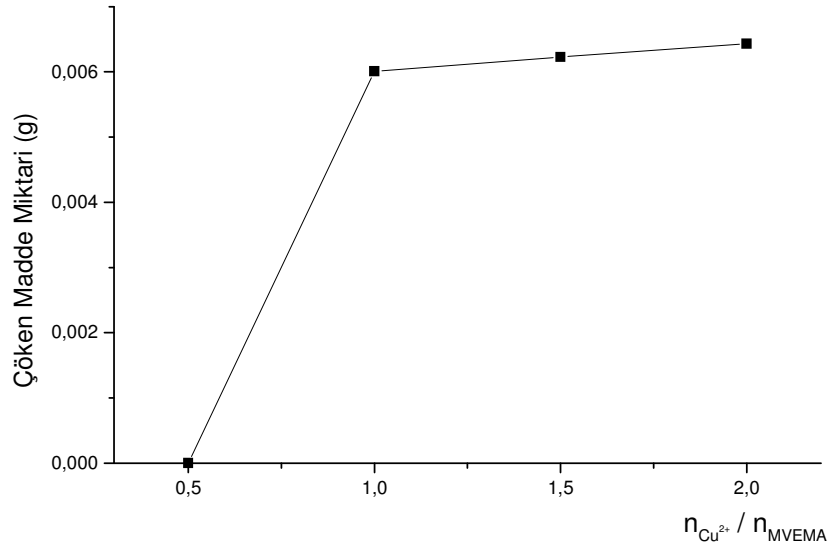
5.4 PMVEMA-Cu²⁺ İkili Komplekslerine Ait Sonuçlar

Çeşitli miktarlarda bakır çözeltisi, metil vinil eter-maleik anhidrit kopolimeri (PMVEMA) ilave edildiğinde ve pH: 7'ye ayarlığında sistemde PAA'da olduğu gibi belirli bir orana kadar çökme görülmemektedir ($0 \leq n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} \leq 0,5$). Şekil 5.15'de görüldüğü gibi farklı oranlarda metal, PMVEMA'ya ilave edildiğinde (pH: 7) polimer-metal komplekslerinin 400 nm' deki absorbands değerleri $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} \leq 0,5$ oranına kadar daha yavaş bir şekilde artarken (suda çözünen kısım), $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} > 0,5$ oranından sonra daha büyük artışlar görülmüştür. Bu sonuçlar, ikili komplekste çökmenin gerçekleştiğini ve $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} \leq 0,5$ oranlarında suda çözünen PMVEMA-Metal ikili komplekslerinin (PMK) oluştuğunu göstermektedir.



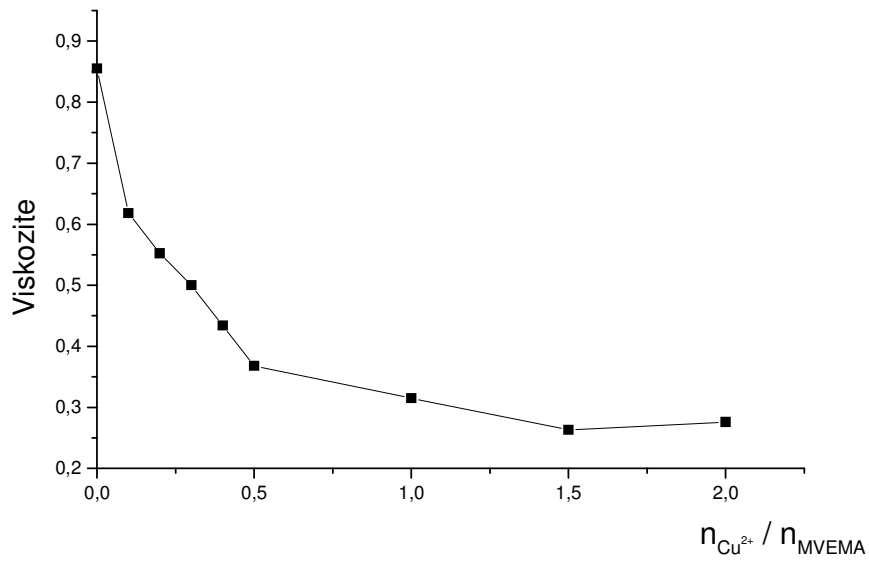
Şekil 5.15 PMVEMA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı 400 nm'deki optik yoğunlukları: $0 \leq n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} \leq 2$.

$n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} > 0,5$ oranlarında ikili komplekslerde çökme olmaktadır. Çöken kompleksin kurutulup tartılmasıyla, eklenen bakır miktarı arttıkça çökelti miktarının artmakta olduğu gözlenmektedir.

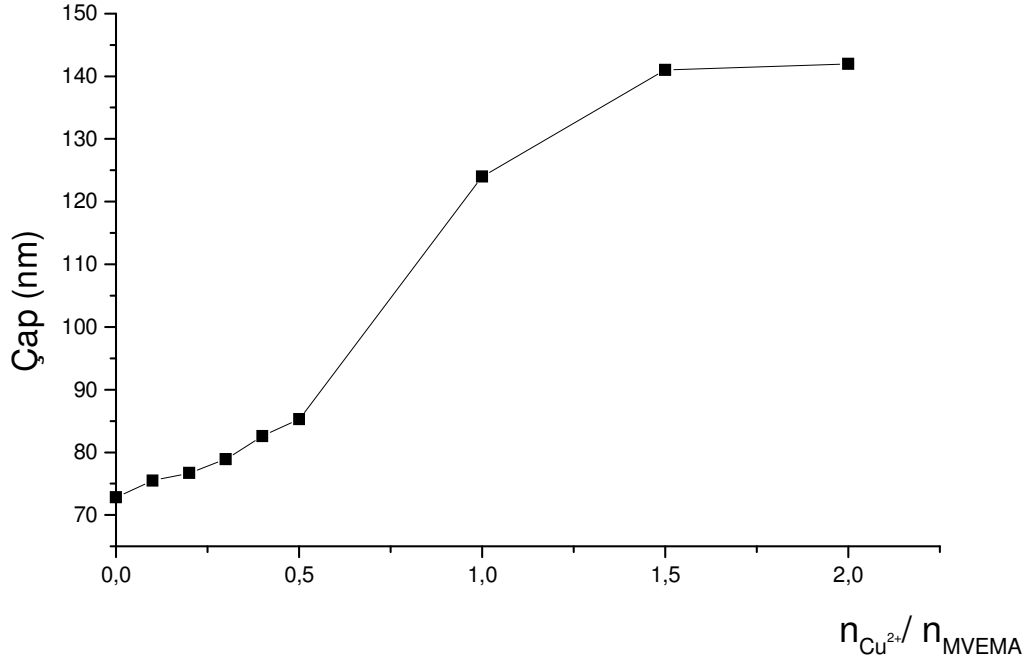


Şekil 5.16 $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} > 0,5$ oranlarında oluşan ikili komplekslerde çöken madde miktarı (g).

PMVEMA kopolimeri ve kopolimerin metal iyonlarıyla oluşturduğu komplekslerin viskozitesi aşağıda gösterilmiştir. Viskozite eğrisi önce düşer, sonra $n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}} \geq 1,5$ oranından sonra sabit şekilde devam eder. Polimer pH: 7' de negatif yüklüdür bakır ilavesi ile polimerde bir kompaktlaşma olur ilaveye devam ettikçe kompaktlaşma artmakta ve viskozite düşmektedir. Bakır ilavesine devam edildiğinde, yapıda değişmeye yol açmadığı için viskozite sabit kalmaktadır.

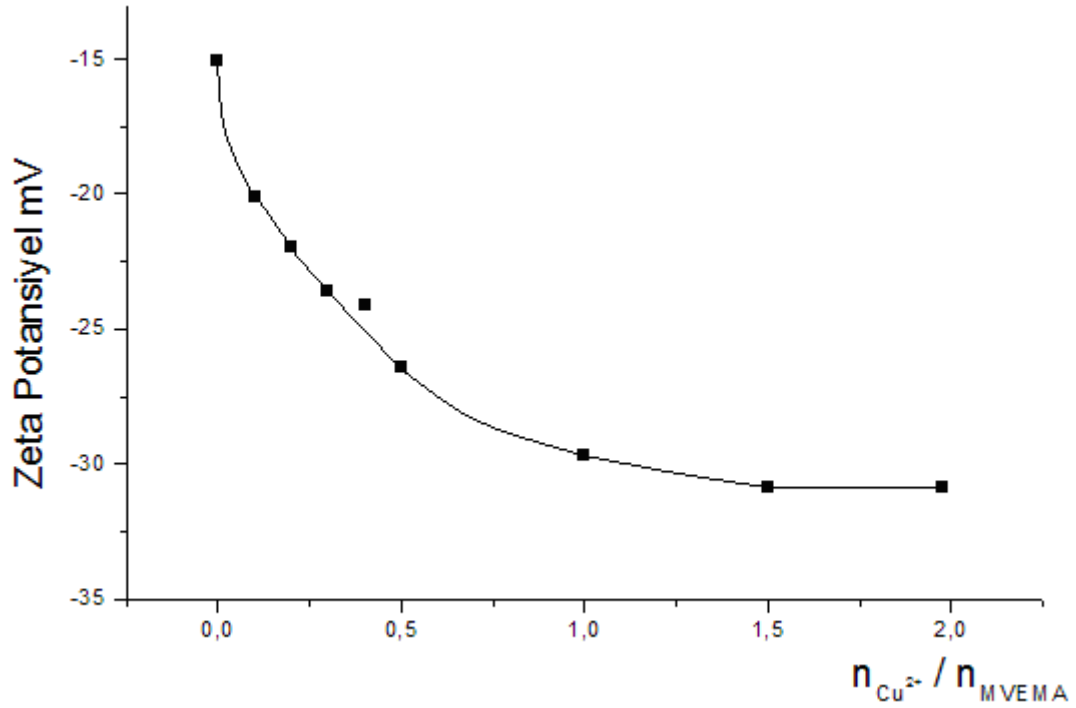


Şekil 5.17 PMVEMA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin (PMK) orana bağlı viskozite grafiği.



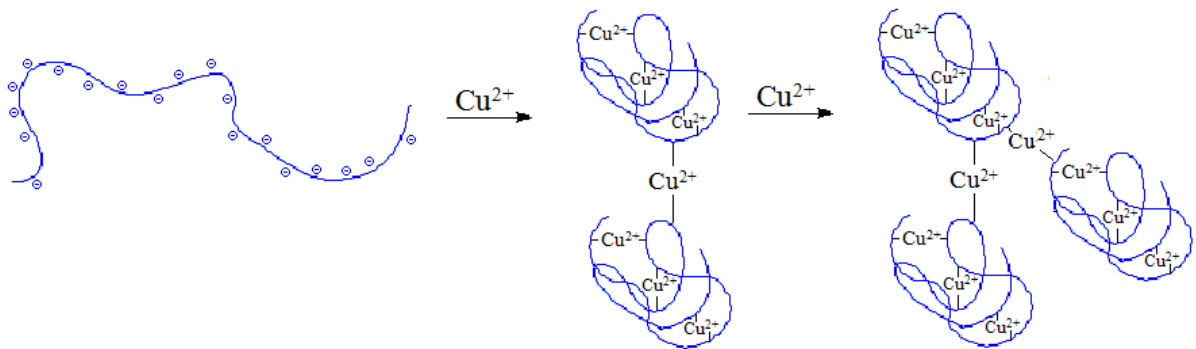
Şekil 5.18 PMVEMA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı çap grafiği.

Bakır oranı arttıkça molekülün hidrodinamik çapı artmaktadır. Çünkü bakır iyonları polimerin kompaktlaşmasını sağlarken aynı zamanda polimerlerin birbirine bağlanmasına da sebep olur. Bakır iyonlarının fazlası, etkileşime girmediği için çap değişmemektedir.



Şekil 5.19 PMVEMA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin orana bağlı zeta potansiyel grafiği.

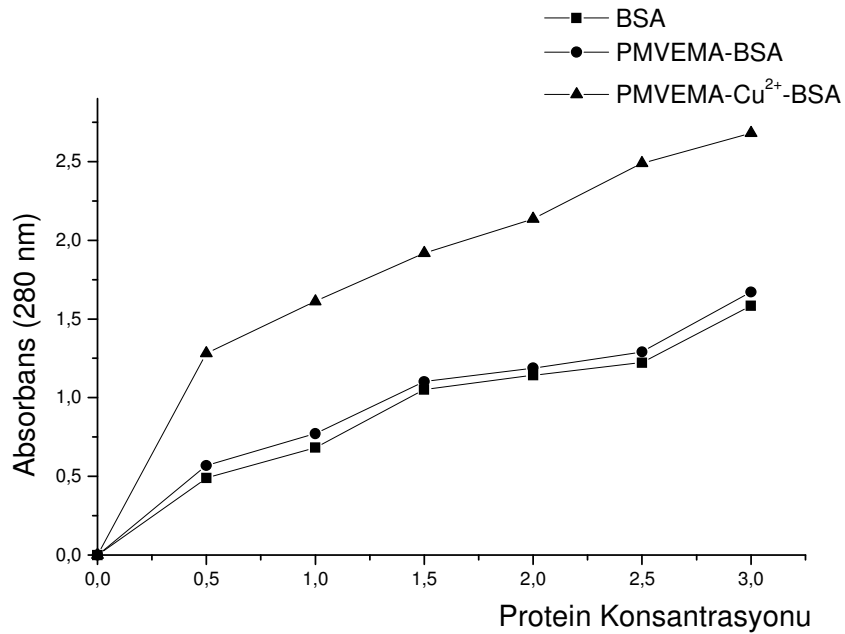
$n_{\text{Cu}^{2+}} / n_{\text{MVEMA}}$ oranı arttıkça zeta potansiyelinde negatif (-) değerlere doğru bir kayma gözlenmektedir. Bakır iyonu polimerler arasında etkileşimi sağlayarak, polimerleri birbirine bağlamaktadır. Bakır ilavesine devam edildiğinde zeta potansiyelin sabit kaldığı ve polimer ile etkileşimin olmadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak; PMVEMA kopolimeri PAA'dan farklı bir mekanizma üzerinden ikili kompleksler oluşturmuştur.



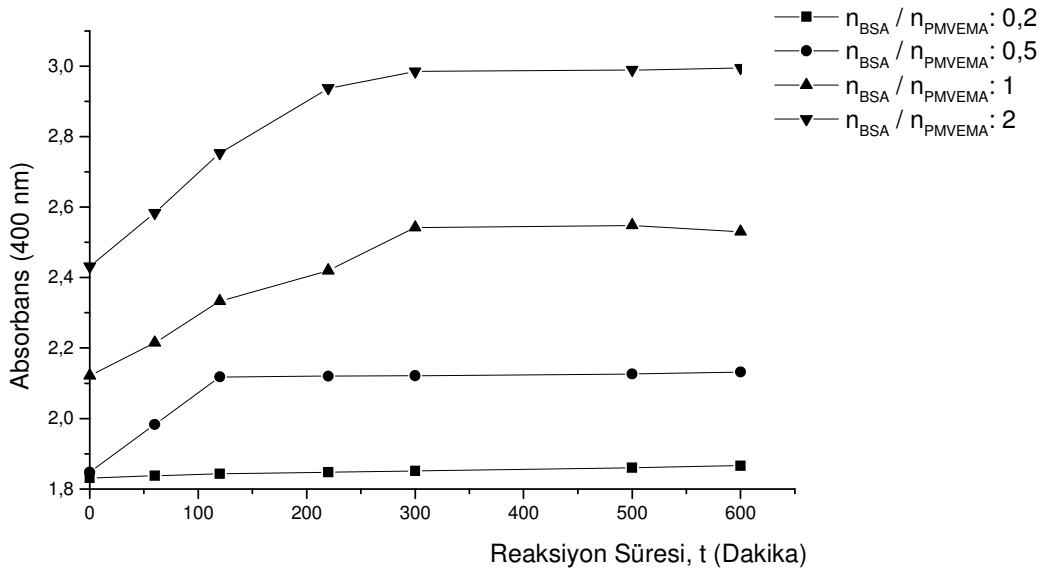
Şekil 5.20 PMVEMA-Cu²⁺ ikili komplekslerinin düşünülen yapı modeli.

5.5 Üçlü PAA-Cu²⁺-BSA Komplekslerine Ait Sonuçlar

Farklı miktarlarda protein içeren protein çözeltilerinin (BSA) ve protein çözeltileri sabit miktarda polimer içeren polimer çözeltileri (PMVEMA-BSA) ve polimer-metal çözeltileriyle karıştırılarak (PMVEMA-Cu²⁺-BSA) 280 nm'deki absorbans ölçümleri alındı. Şekil 5.21'de görüldüğü gibi protein çözeltilerinin ve protein-polimer çözeltilerinin absorbansı lineer olarak artmaktadır. Fakat absorbans artışı birbirine çok yakındır. Buda bize polimer ile protein arasında metal iyonu olmaksızın bir etkileşim olmadığını göstermektedir. Protein çözeltileri PMK çözeltilerine ilave edildiğinde 280 nm'deki absorbans artışı protein ve protein polimer karışımındaki absorbans artışından çok daha fazladır. Bu olay ortamda metal iyonu bulunduğu zaman üçlü polimer-metal-protein kompleksinin oluştuğunu göstermektedir.

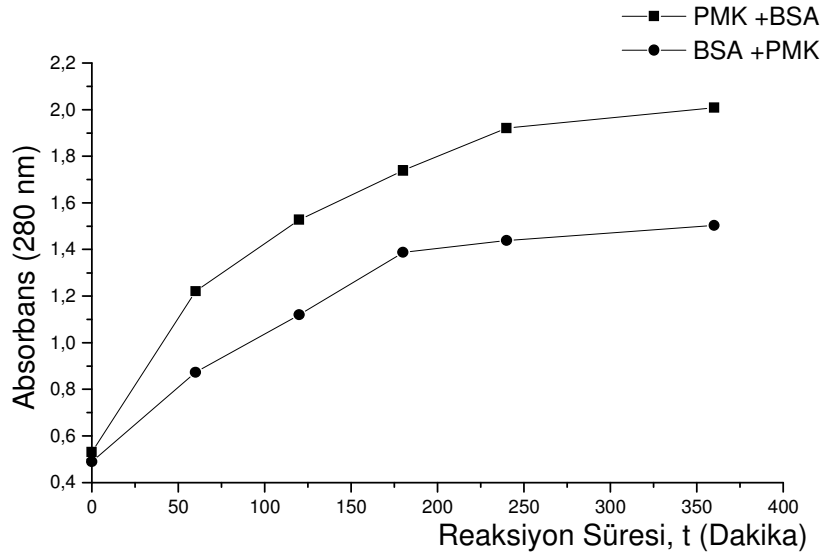


Şekil 5.21 Protein, protein-polimer ve polimer-metal-polimer çözeltilerinin ($n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA}$: 0,5; n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 2) 280 nm'deki optik yoğunlukları.



Şekil 5.22 PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerinin 400 nm'deki protein/polimer oranlarına göre zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri: $n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA} : 0,5$ oranında $n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 0,2; 0,5; 1; 2$ oranları.

PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerin 400 nm'deki spektrofotometrik ölçümlerinin protein/polimer oranlarına bağlılığı Şekil 5.22'de gösterilmiştir. Üçlü karışım, PMK çözeltisine proteinin ilavesiyle hazırlanmıştır. $n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 0,2; 0,5; 1; 2$ olarak dört değer PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksleri hazırlanmıştır. Protein konsantrasyonu artışıyla reaksiyon hızı artmakta ($n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 0,5; 1; 2$), limit değere ulaşmakta ve daha sonra sabit hale gelmektedir. $n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 0,5$ oranında 120. dakikada, $n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 1; 2$ oranlarında 300. dakikada limit değere ulaşmıştır. $n_{BSA} / n_{PMVEMA} : 0,2$ 'de ise yatay bir şekilde devam etmektedir.

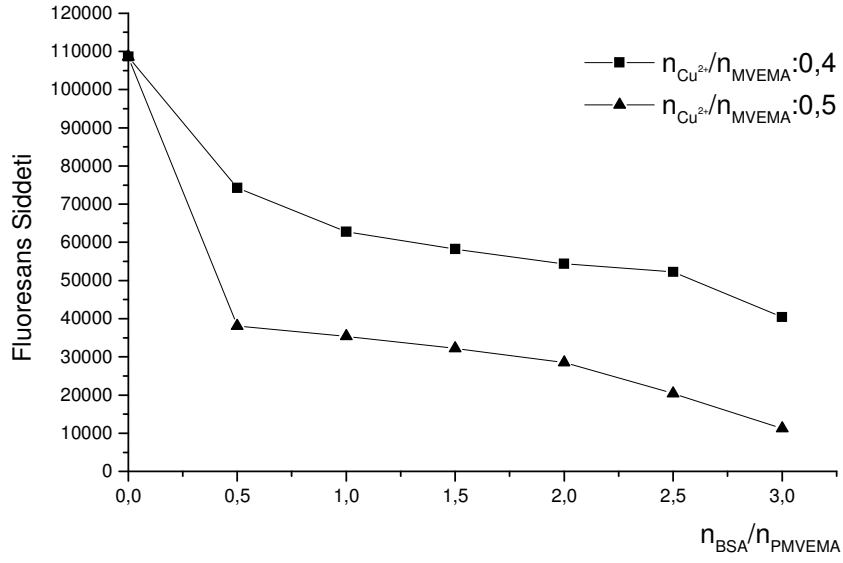


Şekil 5.23 BSA ve PMVEMA-Cu²⁺ ikili kompleksinin ($n_{Cu^{2+}}/n_{MVEMA}: 0,5; n_{BSA}/n_{PMVEMA}: 2$) (PMK) (oranlar birbirine eşit) zamana bağlı spektrofotometrik ölçümleri.

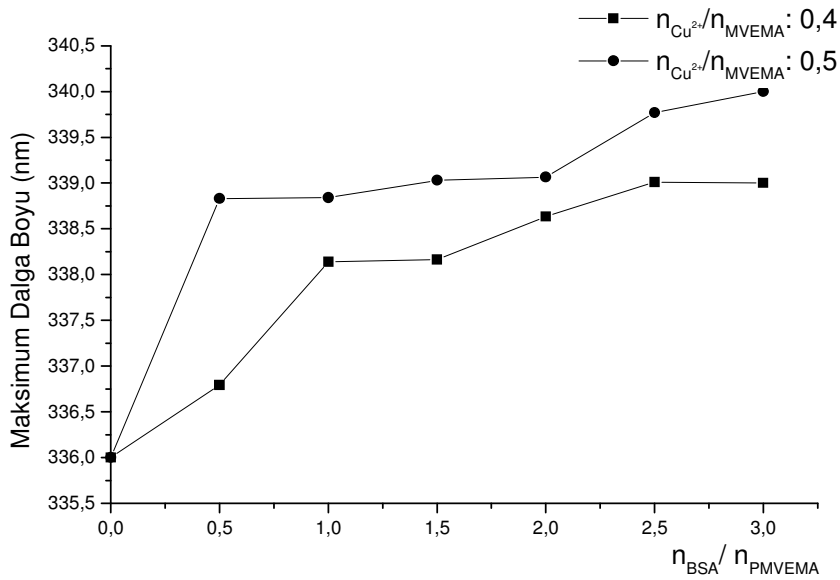
BSA ve PMK karışımlarının zamana bağlı 280 nm’deki spektrofotometrik ölçümleri değişimi şekil 5.23’de gösterilerek, hazırlama yönteminin etkisi incelenmiştir. Buna göre,

- BSA çözeltisi PMK çözeltisine ilave edildiğinde (1)
- PMK çözeltisi BSA çözeltisine ilave edildiğinde (2)

Şekil 5.23’de görüldüğü gibi 1 ve 2 karışımlarının 280 nm’deki absorbansları reaksiyon süresi arttıkça artmaktadır ve bir limit değere ulaşmaktadır. Başlangıç anındaki noktaların oluşturduğu doğruların eğiminden [reaksiyon hızı (dA/dt)] elde edilen sonuca göre 1. reaksiyon 2. reaksiyondan daha hızlıdır. PMK çözeltisi BSA çözeltisine ilave edildiğinde başlangıçta protein konsantrasyonu daha yüksektir. PMK çözeltisinin ilave edilen miktarı arttıkça kompleks partikülleri arasında polimer zincirinin dağılımı suda çözünmeyen kompleks oluşumunu zorlaştırır ve bu yüzden ikinci durumda absorbans daha yavaş olarak artmaktadır.



Şekil 5.24 Polimer-Metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen floresans şiddeti değerlerinin $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$ oranı ile değişim grafiği.

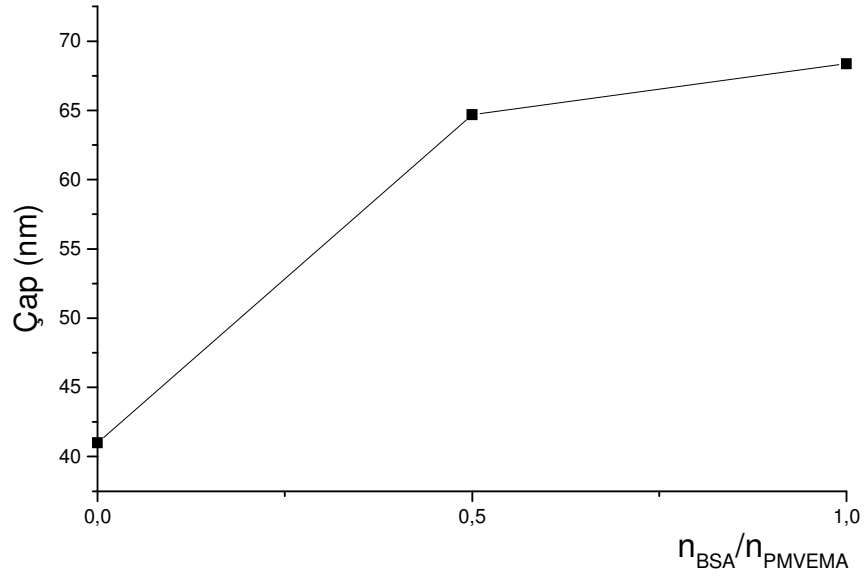


Şekil 5.25 Polimer-Metal ikili komplekslerinin üzerine BSA çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumlarından elde edilen maksimum dalga boyu değerlerinin $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$ oranı ile değişim grafiği.

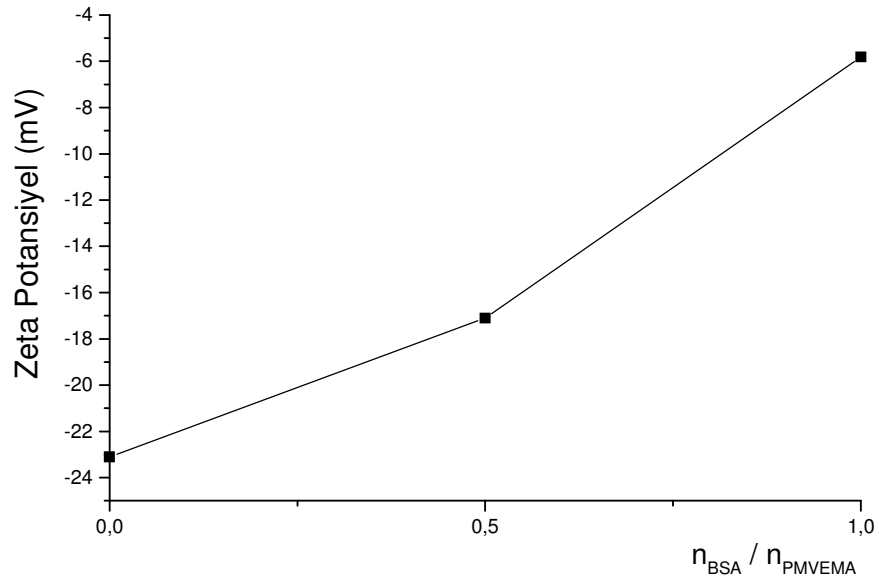
Şekil 5.24'te üçlü komplekste bakır iyonlarının artışı ile floresans şiddetinde büyük bir azalma izlenmiştir. Üçlü komplekste metil vinil eter-maleik anhidrit kopolimeri Cu^{2+} iyonları vasıtasıyla BSA ile tercihi olarak BSA'nın triptofan kısmına bağlanarak triptofan floresansını söndürmektedir. BSA'nın emisyon şiddetindeki bu sönüm etkisi polimerin protein ile etkileşimden kaynaklanan proteinin konformasyon değişikliğinden dolayıdır. Buda bize metal iyonu konsantrasyonu arttıkça metal, PMVEMA-BSA sistemlerinde çapraz bağlayıcı özelliği kazandığını ispatlar, dolayısıyla üçlü kompleksler meydana gelmiştir. Şekil 5.25'te maksimum dalga boyunun (λ_{max}) sağa doğru (red shift), yani daha uzun dalga boyuna kaydığı görülmektedir. Bu durum BSA yapısının açıldığı ve su ile daha fazla etkileşime girdiğini göstermektedir (polimer proteini sarmamıştır). Floresans ölçümü sonuçlarına göre; Cu^{2+} iyonları kararlı kompleksler oluşturur.

$n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$: 1 oranında kadar bakır iyonları polimer ile BSA'yı birbirine bağlayıp ve üçlü kompleksi oluşturduğu için hidrodinamik çap artmaktadır (Şekil 5.26).

$n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$ oranı arttıkça zeta potansiyel pozitifeye doğru yaklaşmaktadır dolayısıyla bakır iyonları polimer ile BSA'yı birbirine bağlamakta ve üçlü kompleksi oluşturmaktadır (Şekil 5.27).

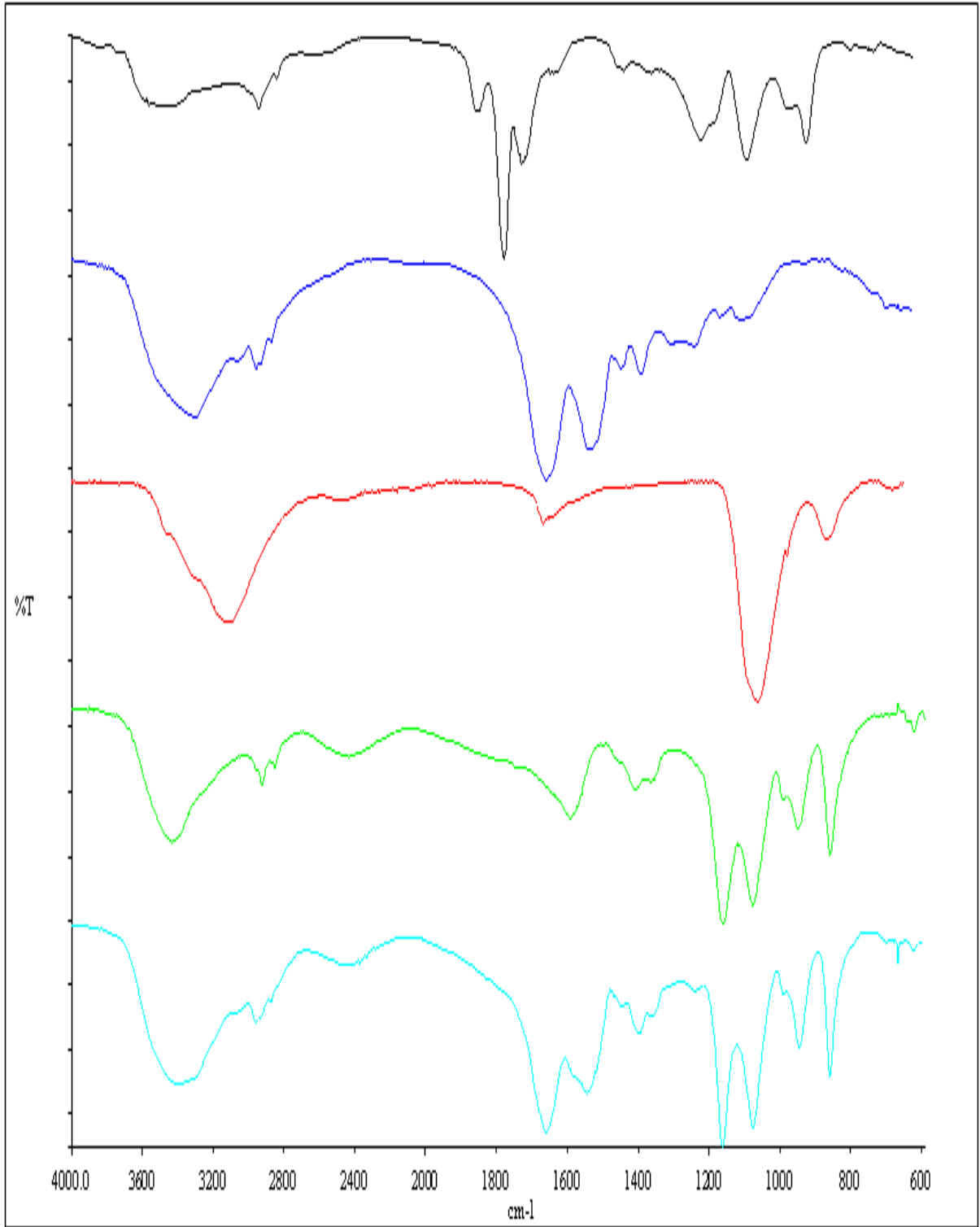


Şekil 5.26 PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerinin $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$ orana bağlı çap grafiği.



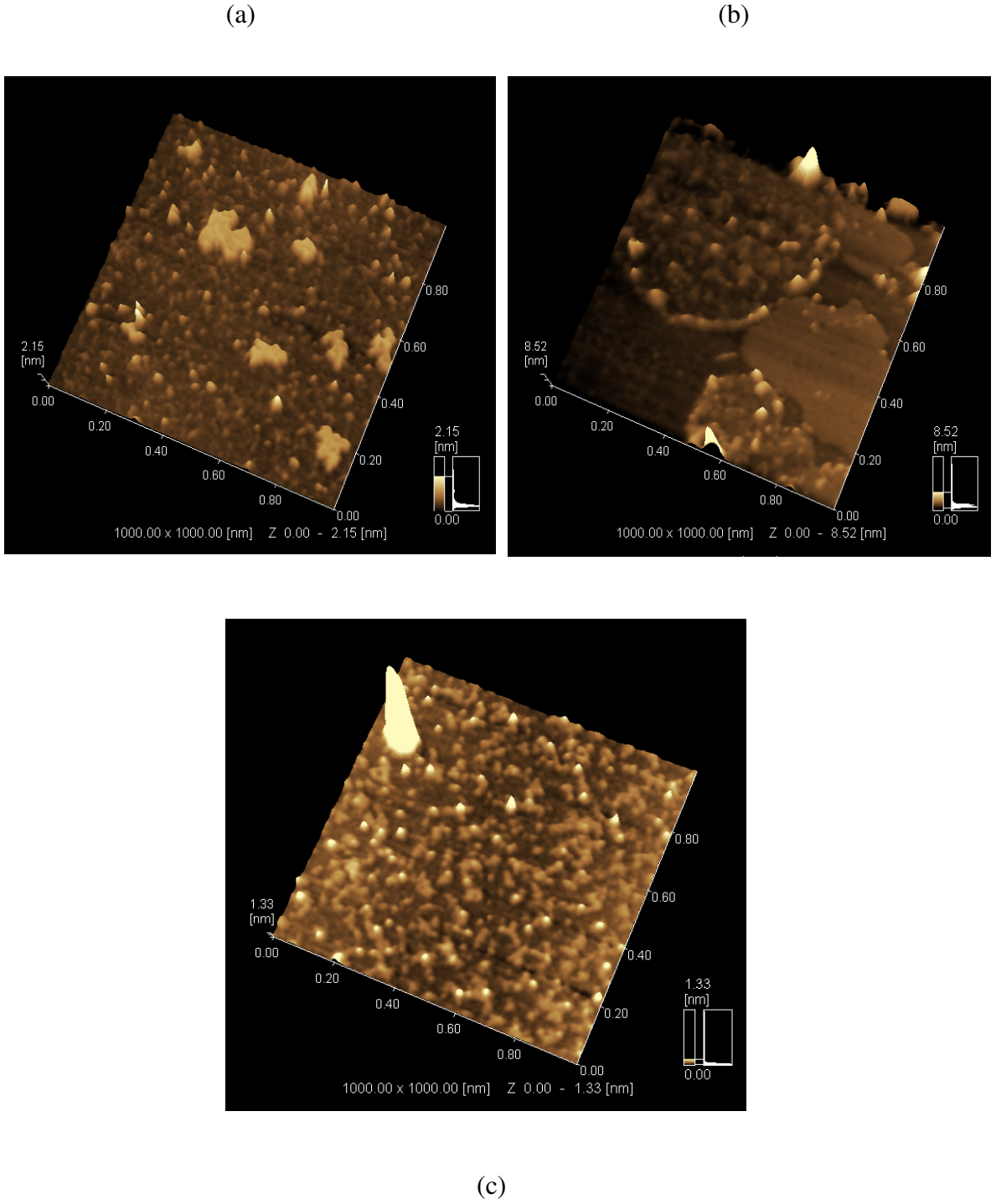
Şekil 5.27 PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü komplekslerinin $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PMVEMA}}$ orana bağlı zeta potansiyel grafiği.

PMVEMA kopolimeri, BSA, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, PMVEMA- Cu^{2+} ikili ve PMVEMA- Cu^{2+} -BSA üçlü komplekslerinin FT-IR spektrumları aşağıda gösterilmiştir. PMVEMA kopolimerinin 1777 cm^{-1} 'deki karakteristik bandı mevcuttur. İkili komplekste kopolimer ve bakırın karakteristik bandları tamamıyla değişmiştir (ikili kompleks oluşmuştur). Bu ikili komplekste kopolimerin 1777 cm^{-1} 'deki ve bakırın 1062 cm^{-1} 'deki karakteristik bandlarının kaybolmasına karşın, parmak izi bölgesinde yeni bandlar oluşmuştur. Kopolimere ait 1094 cm^{-1} 'de gözlenen band ikili komplekste görülmeye (1077 cm^{-1}) devam etmektedir. Üçlü kompleks oluştuğu için; BSA'nın 1662 cm^{-1} 'deki bandı, bakırın ve kopolimerin karakteristik bandları kaybolmuştur. Elde edilen bu sonuçlar ışığında üçlü kompleksin oluştuğu söylenebilmektedir.



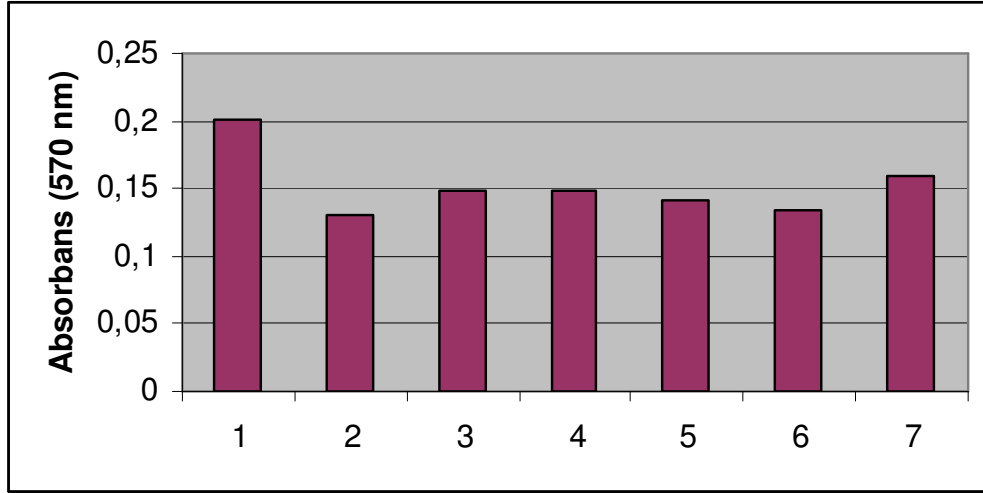
Şekil 5.28 FT-IR spekturumları, siyah: PMVEMA, mavi: BSA, kırmızı: CuSO₄·5H₂O, yeşil: PMVEMA-Cu²⁺ ikili kompleksi, turkuaz: PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksine aittir.

AFM ile yapılan ölçümlerde PMVEMA kopolimeri ile globüler BSA proteini metal varlığında PAA'e göre daha homojen üçlü PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksinin oluştuğu görüntülenmiştir.



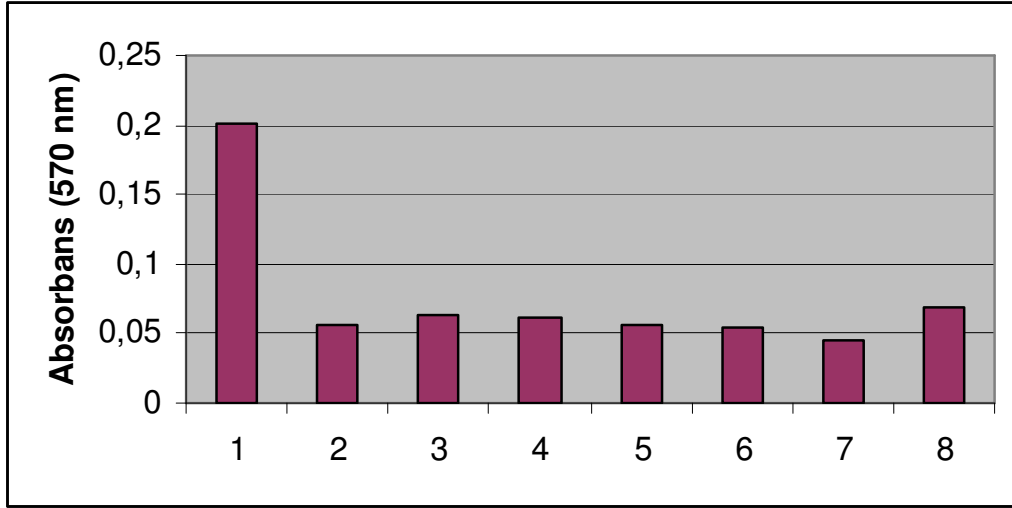
Şekil 5.29 a) BSA (1000 x 1000 nm), b) PMVEMA (1000 x 1000 nm), c) Üçlü PMVEMA-Cu²⁺-BSA (1000 x 1000 nm) AFM ile alınan üç boyutlu görüntüsü.

Hücre kültür laboratuvarında yapılan çalışmalar sonucunda, yalnız PAA'ye göre ikili komplekslerin toksititelerinin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Elde edilen en önemli bulgu ise gerek polimer gerekse de polimer-metal ikili komplekslerine göre üçlü komplekslerden $n_{Cu^{2+}}/n_{AA}:0,4$; $n_{BSA}/n_{PAA}:2$ oranına sahip üçlü kompleks en az toksisiteye sahip olduğudur.



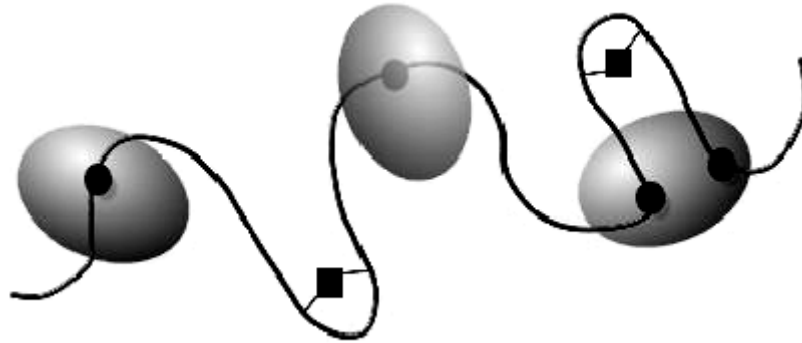
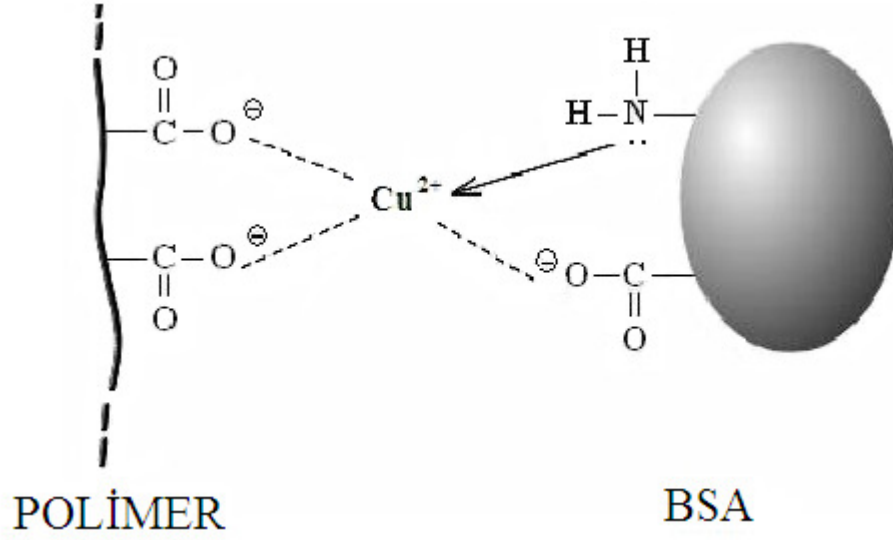
Şekil 5.30 PAA, PAA-Cu²⁺ ve PAA-Cu²⁺-BSA komplekslerinin L929 hücre canlılığına etkisi, 1) kontrol, 2) PAA, 3) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}}/n_{AA}:0,1$), 4) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}}/n_{AA}:0,2$), 5) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}}/n_{AA}:0,3$), 6) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}}/n_{AA}:0,4$), 7) üçlü kompleks ($n_{Cu^{2+}}/n_{AA}:0,4$; $n_{BSA}/n_{PAA}:2$).

Mevil vinil eter-maleik anhidrit kopolimerinde ise $n_{Cu^{2+}}/n_{MVEMA}:0,2$ oranına sahip ikili kompleks ve $n_{Cu^{2+}}/n_{MVEMA}:0,5$ $n_{BSA}/n_{PMVEMA}:2$ oranlarına sahip üçlü kompleksin diğer komplekslere oranla en az toksisiteye sahiptir. Özellikle $n_{Cu^{2+}}/n_{MVEMA}:0,5$ oranına sahip ikili kompleks çözeltisinin L929 hücreleri üzerinde kontrole göre canlılığın en çok azaldığı görülmüştür. Hücreler morfolojik olarak atipik olup, uzantılarını kaybetmişlerdir. Bu bulgular ön çalışma sonuçları olup mutlaka tekrar edilmesi gerekmektedir.



Şekil 5.31 PMVEMA, PMVEMA-Cu²⁺ ve PMVEMA-Cu²⁺-BSA komplekslerinin L929 hücre canlılığına etkisi, 1) kontrol, 2) PMVEMA, 3) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}}/n_{PMVEMA}:0,1$), 4) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}}/n_{PMVEMA}:0,2$), 5) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}}/n_{PMVEMA}:0,3$), 6) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}}/n_{PMVEMA}:0,4$), 7) ikili kompleks ($n_{Cu^{2+}}/n_{PMVEMA}:0,5$), 8) üçlü kompleks ($n_{Cu^{2+}}/n_{PMVEMA}:0,5$, $n_{BSA}/n_{PMVEMA}:2$) .

Elde edilen tüm analiz sonuçlarına dayanarak üçlü Polimer- Cu^{2+} -BSA kompleksleri için düşünülen model yapıları daha önceki çalışmalara da dayanarak gösterilmiştir.



- Metal varlığında polimer-protein fonksiyonel gruplarının bağlanması
- Metal varlığında iki COO^- grubu arasındaki bağlanma

Şekil 5.32 Üçlü Polimer- Cu^{2+} -BSA komplekslerinin düşünülen yapı modeli (Mustafaev, 1996a, 2004; Karahan, 2002)

5.6 Çalışmanın Çıktılarının Tartışması

Bu çalışmada;

- Poliakrilik asit polimerinin oluşturduğu üçlü metal kompleksleri daha önceki çalışmalarda kısmen; UV-Vıs, Viskozimetre, FT-IR ve Floresans cihazları kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmamızda ise üçlü ve ikili metal komplekslerinin bu yöntemlerle incelemenin yanında reaksiyonun mekanizmaları ve oluşan ikili ve üçlü metal komplekslerinin yapılarının ayrıntılı olarak incelenmesi amacıyla bunlara ek olarak;

Zeta-Sizer cihazı ile Çap (hidrodinamik) ve Zeta Potansiyel, Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile yüzey taraması yapılarak ayrıntılı biçimde incelendi.

- İlk defa kullanılan PMVEMA kopolimerinin ikili ve üçlü metal kompleksleri (UV-Vıs, viskozimetre, floresans, dinamik ve elektroforetik ışık saçılması, FT-IR ve Atomik Kuvvet Mikroskobu ölçümleri) oluşturularak yapıları ayrıntılı olarak incelendi.
- İkili polimer-metal ve üçlü polimer-metal-protein komplekslerinin, deney sonuçlarımıza ve daha önceki çalışmalara da dayanılarak düşünülen yapı modeli verildi.
- Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarında her iki polimerin, ikili (polimer- Cu^{2+}) ve üçlü (polimer- Cu^{2+} -BSA) komplekslerinin toksiteleri incelenmiştir.

Geçmişte yapılmış tüm bu çalışmalar ve tez çalışmamızdan çıkan sonuçlar ışığında komplekslerin fonksiyonel özelliklerine bağlı olarak pratik kullanımı ortaya çıkarmaktır: 1) Yapay polimerik aşılar yapmak amacıyla immünolojide; 2) PAA, PMVEMA ve polimer- Cu^{2+} ikili komplekslerinin antitümör etkinliğinin araştırılmasında; 3) Enzimlerin aktifliğini kararlı kılmak amacı ile mühendislik enzimolojisinde.

1) Klasik pasteur aşıları, devamlı hücre kültürlerinde çoğaltılan virüs veya bakterilerin inaktivasyonu ve bir adjuvant (alüminyum hidroksit ve/veya yağ adjuvantı-saponin) ile birleştirilmesi yoluyla hazırlanmaktadır. Söz konusu adjuvantlar varlığında hazırlanan aşıların içerdikleri önemli dezavantajları bilinmektedir. Geleneksel alüm ve yağ adjuvantlarının yüksek viskozitesi, enjeksiyon yerindeki lokal reaksiyonları, yüksek toksititesi, allerji oluşturma özellikleri ve karışımın stabilitesinin az olması bunların pratikte kullanılmasını engellemektedir. Alüminyum hidroksit genellikle yeterli seviyede immün koruma etkisi de göstermemektedir. Aynı zamanda bu adjuvantlar varlığında antijen formülasyonundaki zorluklar, yapı-işlev ilişkilerinin bilinmemesi, ancak T hücresine bağımlı (T-dependent) immün yanıt oluşturmaları, son yıllarda bir seri yeni türde adjuvantların geliştirilmesini

gündeme getirmiştir. Doğal olmayan polielektrolitlerin (negatif veya pozitif yüklü polimerler) organizmanın immün yanıtına kuvvetli etkisinin bulunması, bu PE'lerin mikrop veya virüs antijenleri için taşıyıcı matriks (ve adjuvant) olarak kullanılması, yüksek antijen-spesifik immünojenik konjugatlar (ve kompleksler) sentezleme olanağı sağlamıştır.

Çizelge 6.1 Sentetik Peptit Aşı Örnekleri

Antiviral Aşılar:

1) Foot-and-mouth Disease Virus (Şap Hastalığı Virüsü)
2) Hepatitis B (Hepatit B Virüsü)
3) Influenza Virus (Grip Virüsü)
4) Poli Virus (poliomyelitis, çocuk felci)
5) Human Immunodeficiency Virus (HIV)

Antibakteriyel Aşılar:

1) Diphtheria Toxin
2) Cholera Toxin
3) Antiparasitic Immunogens for Prevention of Malaria

Polimerlerin adjuvant özelliğinin olması, T hücrelerine bağımlı immün yanıtın T hücrelerine bağımlı olmayan forma çevrilmesi, ucuz teknolojisi, kolaylıkla modifikasyonu ve amaca uygun formda sentezlenmesi, yeni türde etkili aşıların geliştirilmesi için büyük olanaklar sağlamaktadır. Bu şekilde antijen ve polimer içeren konjugatların (komplekslerin) yüksek immünojenik özelliği, polielektrolit makromoleküllerin hücre membranı ile etkileşimi (interpolimer-hücre kompleks oluşumu) sonucu antijen-reseptör bağlanmasına katkıda bulunması ile açıklanmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda taşıyıcı olarak protein ve klasik adjuvantlar yerine sentetik polimerlerin kullanılması çalışmaları hızlandırılmıştır. Söz konusu polimerler aynı zamanda hem taşıyıcı ve hemde adjuvant rolünü üstlenmektedirler. Çizelge 6.2'de yapay polimerik aşıların avantajları verilmiştir.

Çizelge 6.2 Yapay Polimerik Aşıların Avantajları

• Toksik Değillerdir
• Ucuz ve teknolojik bir yöntemle hazırlanırlar
• Lineer sentetik epitopların oldukça kolay üretimi ve var olan mutasyona uygun gelen dizinin sentez sırasında yapılma olasılığıdır
• T hücrelerinden bağımsız immün cevap oluşturmaları
• Güvenli olması (canlı virüs içermemektedir), sıcaklığa karşı kararlıdır
• Basit Aşı formülasyonu
• Yapı-işlev ilişkilerinin bilinmesi
• Enfeksiyonlara karşı aşı özelliğinin yanısıra, yapısında bakır geçiş metalini bulunduran kompleksler radyasyona karşı koruma özelliğine sahiptir (Mustafaev vd., 2001; Bayülken vd., 2004).

Bu çalışmanın çıktıları ile üçlü polimer-metal-protein model sistemleri oluşturularak, polimerik yapay aşı prototipi geliştirme çalışmalarına büyük katkı sağlamıştır.

2) Sitozan'ın ve sitozan-bakır kompleksleri hazırlamış ve antitümör etkinliği araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre sitozan-bakır ikili kompleksi sitozanın ve CuSO_4 'ün tek başına gösterdiği etkinin kat kat fazlasını göstermiştir (Zheng vd., 2006). Yapılacak çalışmalardan biri de, PAA ve PMVEMA ikili komplekslerinin antitümör etkinliğinin araştırılmasıdır.

3) Enzimler canlı organizmada izole edildikten sonra kısa bir sürede aktivitelerini kaybederler. Alkoldehidrojenaz enzimi uygun bir polimere bağlanarak 1,5 yıl aktivitesini korumuştur. Dolayısıyla yapılacak çalışmalarda enzim ile aynı yüke sahip bir polimeri metal vasıta ile bağlayarak aktivitesini koruması sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Acar, S., (2006), “Peptid-Protein Kovalent Konjugasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü.
- Andrianov, A.K., Marin, A., Roberts B.E., (2005), “Polyphosphazene Polyelectrolytes: A Link between the Formation of Noncovalent Complexes with Antigenic Proteins and Immunostimulating Activity”, *Biomacromolecules*, 6: 1375-1379.
- Başalp, A., Bermek, E., Çirakoğlu, B., Coka, V., Mustafaev, M.I., Saraç, A.S., (1996), “Immune Response to 17 beta-estradiol in Polyelectrolyte Complex: Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones”, *Hybridoma*, 15 (3): 233-238.
- Bayülken, S., Yüce, G., Erkol, A.Y., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M., (2004), “Effect of copper ions on the radiostability of protein-polyelectrolyte mixtures”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 259 (2): 315-319.
- Bixler, H.J. ve Michaels, A.S., (1969), “Polyelectrolyte Complexes in Encyclopedia of Polymer Science and Technology”, John Wiley and Sons, 10: 765, New York.
- Burstein, E.A., Vedinkina, N.S., Ivkova, M.N., (1973), “Flourescence and the Location of Tryptophan Residues inProtein Molecules ”*Photochem. Photobiol.*, 18: 263-279.
- Carter, D. C., Ho, J. X. (1994), “Structure of Serum Albumin”, *Adv. Protein Chem.*, 45: 153-203.
- Çakır, R., (2008), “Polimerlerin Toksititesinin İncelenmesinde Yeni Kültür Modelinin Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü.
- Çimen, N.S., (2006), “Proteinlerin Poliakrilik Asit ile Suda Çözünmeyen Kompleksleri”, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü.
- Dalgakıran, E., (2006), “Poliakrilik Asidin Bovin Serum Albumin ile Etkileşiminin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Yöntemleri ile Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü.
- Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötz, J. (1994), *Polyelectrolytes: Formation, Characterization, and Application*, Hanser Publishers, Munich.
- Deen, C., Claasen, E., Gerritse, K., Zegers, D.N., Boersma, J.A.W., (1990), “A Novel Carbodiimide Coupling Method for Synthetic Peptides Enhanced Anti-peptide Antibody Responses”, *J. Immunol. Methods.*, 129: 119-125.
- Dellacherie, E. (1991), *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)*, 32 (1): 602.
- Demchenko, A. P., (2000), “Fluorescence Probes in Molecular and Cellular Biophysics”, Lecture 1, TUBITAK, Marmara Research Center, Gebze.
- Donaruma,L.G., Kitoh, S., Walswork,G., Depinto, J.V., Edzwald, J.K., (1979), *Macromolecules*, 12: 435-438.
- Douglas J. Taatjes, Marilyn P. Wadsworth, Anthony S. Quinn, Jacob H. Rand, Edwin G. Bovill, Burton E. Sobel, (2008), “Imaging Aspects of Cardiovascular Disease at the Cell and Molecular Level”, *Histochem Cell Biol*, 130: 235–245.

- Dubin, P.L. ve Rigsbee, D.R., (1991), "Quasi-elastic and Electrophoretic Light-Scattering Studies of Polyelectrolyte-micelle Complexes", *Photon Correlation Spectroscopy: Multicomponent Systems*, 1430: 203-215.
- Dubin, P., Park, J.M., Muhoberac B.B., Xia, J., (1992), *Macromolecules*, 25: 290.
- Einstein, A., (1905), *Ann. D. Phys.*, 17: 549.
- Falb, R. D., Grode, G. A., Takahashi, M. vd. (1968), *Characteristics of Heparinized Surfaces*, *Advances in Chemistry* 87, American Chemical Society, Washington.
- Figge, J., Rossing, T. H., Fencel, V. (1991), "The Role of Serum-Proteins in Acid-Base Equilibria", *J. Lab. Clin. Med.* 117: 453-467.
- Filenko, A., Demchenko, M., Mustafaeva, Z., Yoshihito, O. ve Mustafaev, M. I., (2001), "Fluorescence Study of Cu^{2+} -Induced Interaction Between Albumin and Anionic Polyelectrolytes", *Biomacromolecules*, 2(1): 270.
- Frahks, H. S. And Evans, M. W. (1945), "Free Volume and Entropy in Condensed Systems III. Entropy in Binary Liquid Mixtures", *J. Chem. Phys.*, 13: 507-532.
- Friedli, G.L., (1996), "Interaction Of Deamidated Soluble Wheat Protein (SWP), With Other Food Proteins And Metals", A Thesis Presented For The Award Of Doctor Of Philosophy To The University Of Surrey.
- Güney, O., Saraç. S.A., Mustafaev, M.I., (1997), "Fluorescence and Turbidimetry Study of Complexation of Human Serum Albumin with Polycations", *Journal of Bioact. And Compat. Polymers*, 12: 231.
- Gürhan, Deliloğlu S.I., Akdeste, M.M., Akdeste, Z.M., Aynagöz, G., Unver, G., Unal, N., Celik, N., (2002), "Preparation of Synthetic Peptide FMDV Vaccine with Newly Developed Antigen-Polymere Conjugates be Used as Immunogen and Vaccine in Veterinary Medicine", In: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Appendix, 41: pp.349-357, FAO.
- Hecht, E., (1999), *Optik*, Çev. Edt: Armağan, N., Can, N., Akademi Yayın Hizmetleri, ISBN: 975-6885-02-5.
- Higgs, P.G., Joanny, J.F. (1991), "Theory of Polyampholyte Solutions", *J. Chem. Phys.*, 94 (2): 1543.
- Hoffman, A.S., (2000), "Bioconjugates of Intelligent Polymers and Recognition Proteins for Use in Diagnostics and Affinity Separations", *Clinical Chemistry*, 46 (9): 1478–1486.
- ISO Standard Document 13321:1996 E.
- Jakes. J., (1995), *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 60: 1781.
- Kabanov, V.A., Mustafaev, M.I., Belova, V.V., Evdakov, V.P., (1978a), *Mol. Biol.(Moscow)*, 12: 1264.
- Kabanov, V. A., Zezin, A. B. (1984), *Pure Appl. Chem.*, 56: 343.
- Kabanov, V.A., Skobeleva, V.B., Rogacheva, V.B., Zezin, A.B. (2004), "Sorption of Proteins by Slightly Cross-Linked Polyelectrolyte Hydrogels: Kinetics and Mechanism", *J. Phys. Chem., B* 108: 1485-1490.

- Kantipuly, C., Katragadda, S., Chow, A., Gesser, H.D., (1990), *Talanta*, 37: 491-517.
- Karahan, M., (2002), “Üçlü Polimer-Metal-Protein Komplekslerinin Yapı Modelleri”, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, FBE Biyokimya Anabilimdalı.
- Kendirch, M. J., May, M. T., Philshica M. J. ve Dobinson, K. D., (1992), “Metal in Biological Systems”, Ellis Harwood, N. Y.
- Koetz, J., Linow, K. J., Burkart, P., Li Ping, H. (1986), “Effects of Charge Density and Structure of Side-Chain Branching on the Composition of Polyanion-Polycation Complexes”, *Polymer*, 27 (10): 1574.
- Kokufuta, E., Shimizu, H., Nakamura, I. (1981), “Salt Linkage Formation of Poly(diallyldimethylammonium chloride) with Acidic Groups in the Polyion Complex between Human Carboxyhemoglobin and Potassium Poly(vinyl alcohol) Sulfate”, *Macromolecules*, 14: 1178.
- Koppel, D.E., (1972), *J. Chem. Phys.*, 57: 4814.
- Kurimara, Y., Tsuchida, E., Kaneko, M.J., (1971), *J. Polym. Sci. Polym Chem*, 2: 381-392.
- Lakowicz, J.R., (1986), “Principles of Fluorescence Spectroscopy”, Plenum Pres, New York.
- Lawson, C.L., Hanson, R.J., (1974), *Solving Least Squares Problems*; Prentice Hall Inc.: Englewood Cliffs, NJ.
- Lenk, T., Thies, C. (1987), In *Coulombic Interactions In Macromolecular Systems*, Eisenberg, A., Bailey, F. E., Eds., American Chemical Society, Washington, DC, Böl. 8.
- Manko, B. M., Sokolava, E. A., Gajiev, P. J. Ve Mustafaev, M. I., (1991), “THA Role of two Types of Supramolecular Structure of Polyelectrolyte Complexes in Their Immunomodulating Activity”, *Immunologiya*, 1: 75.
- Mansuroğlu, B., (2007), “Biyohibrid Yapılı Polimer Peptid Konjugatlarının Geliştirilmesi”, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, FBE Biyokimya Anabilimdalı.
- McCormick, C.L., Salazar, L.C. (1992), “Water Soluble Copolymers: 44. Ampholytic Terpolymers of Acrylamide with Sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulphonate and 2-acrylamido-2-methylpropanetrimethyl-ammonium chloride”, *Polymer*, 33: 4384.
- Merle, Y. (1987), “Synthetic Polyampholytes. 5. Influence of Nearest-Neighbor Interactions on Potentiometric Curves”, *J. Phys. Chem.*, 91: 3092-3098.
- Morawetz, H., Hughes, W. L. J. (1952), “The Interaction of Proteins with Synthetic Polyelectrolytes. I. Complexing of Bovine Serum Albumin”, *J. Phys. Chem.*, 56: 64-69.
- Morison, I.D., Grabowski, E.F., Herb, C.A., (1985), *Langmuir*, 1: 496.
- Mustafaev, M.I., (1996a) “Biyopolimerler” (Biopolymers), TUBİTAK, Gebze/Kocaeli, Türkiye.
- Mustafaev M., (2004), “Functionally Biopolymer Systems” Sigma, Journal of Engineering and Natural Sciences ISSN: 1304-7191, Printed in Yıldız Technical University, 34349, İstanbul.
- Mustafaev, M., Bayülken, S., Ergen, E., Erkol, A.Y., Ardagil, N., (2001), “Radiation-induced Formation of Polyacrylic acid-protein Covalent Conjugates”, *Radiation Physics and*

Chemistry, 60: 567-575.

Mustafaev M., Çirakoglu B., Saraç S., Öztürk S., Yücel F, Bermek E., (1996c), "Soluble and Insoluble Ternary Complexes of Serum Proteins with Polyanions in the presence of Cu^{2+} in Water", Journal of Applied Polymer Science, 62 (1): 99-109.

Mustafaev, M.I., Kabanov, V.A., Belova, V.V., Evdakov, V.P. (1978), Biophys., 23: 789.

Mustafaev, M.I., Kabanov, V.A., (1981), Vysocomol. Soedin Ser A, 23A: 271.

Mustafaev, M., Mustafaeva, Z., Ergen, E., (2002a), "Novel-Betulin-Containing Polyelectrolyte Conjugates", Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 17: 251-269.

Mustafaev M. ve Mustafaeva Z., (2002b), "Novel Polypeptide-Comprising Biopolimer Systems", Technology and Health Care, 10: 217-226.

Mustafaev, M.I., Norimov; A.Sh., (1990a), "Polymer-Metal Complexes of Protein Antigens-New Highly Effective Immunogens". Biomed.Sci. 1(3) :274-278.

Mustafaev, M.I., Osada, Y., Endo, T., (1998b), "Advanced Biopolymer Systems", First Japanese-Turkish Workshop Materials. TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi, pp: 1-76.

Mustafaev M.I., Osada Y., Başalp A., Mustafaeva Z., Çirakoğlu B., Bermek E., (1998a), "New Temperature-Responsive Immunogens by Poly(N-isopropyl-acryamide)-modified Bovine Serum Albumin", Recent Advances in Peptide and Protein Delivery, Editions de Sante, 145-162.

Mustafaev M.I., Romanova R.Y., Norimov A.Sh., Filatova E.D., (1990b), "On the role of Chemical Nature of the Polymeric Carrier in the Immunogenic and Protective Activities of Polyelectrolyte Complexes of BGG Mycobacteria Cell Envelope Antigens in a Model of Tuberculosis Infection". Immunologiya (Immunology), 6: 35-40.

Mustafaev M.I., Saraç A.S., Erkol A.Y., (1996e), "Effects of Cu^{2+} on Stability and Composition of Water Soluble Ternary Polyacrylic Acid- Cu^{2+} -Protein Complexes Against Radiation Damage", Polymer Bulletin, 36 (5): 623-627.

Mustafaev M.I., Yucel F., Ozturk S., Çirakoglu B., Bermek E., (1996b), " Cu^{2+} -mediated Complex Formation Between Polyacrylic Acid (PAA) and Bovine Serum Albumin", Journal of Immunological Methods, 197 (1-2): 31-37.

Mustafaev M., Yucel F., Çirakoglu B., Bermek E., (1996d), "Immune Response to Progesterone Involved in Cu^{2+} -mediated Polyanion-Protein Complex-Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma clones", Immunology Letters, 52 (2-3): 63-68 .

Nguyen, T.Q. (1986), "Interactions of Human Hemoglobin with High-Molecular-Weight Dextran Sulfate and Diethylaminoethyl Dextran", Makromol. Chem., 187(11): 2567-2578.

Nuno C. S., Miguel A.R.B.C., (2004), "An Overview of the Biophysical Applications of Atomic Force Microscopy", Biophysical Chemistry, 107: 133-149.

Osada, Y., Tsuchida, E., Sanada, K. (1972), "Interaction of Poly(styrene sulfonate) with Polycations Carrying Charges in the Chain Backbone", J. Polym. Sci. A-1, 10, 11: 3397-3404.

Ozeroğlu, C., Namazova, N., Mustafaev, M.I., Saraç, A.S., (1996), "The Complex Formation Between Polyacrylamide Containing Glycine end Groups and Bovin Serum Albumin in the Presence of Copper (II) in Neutral Aqueous Media", 274: 418-427.

- Peters, T., Jr. (1985), "Serum Albumin", *Adv. Protein Chem.*, 37: 161-245.
- Petrov, R.V., Khaitov, R.M., Zhanovt, V.M., Sinyakov, M.S., Norimov, A.Sh., Nekrasov, A.V., Podchernyaev, R.Y., Kharitonenkovi, I.G. ve Schipanovat, M.V., (1985), "Influenza Virus Antigens Conjugated with A Synthetic Polyelectrolte: A Novel Model Of Vaccines", *Vaccine*, 3, 393.
- Petrov, R.V., Mustafaev, M.I., Norimov, A.Sh., (1992), "Physico-Chemical Criteria for The Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on the Basis of Polyelectrolyte Complexes", *Harwood Acad. Pub.*, UK.
- Plumbo, M., Cosani, A., Terbojevich, M., (1978), *Macromolecules*, 10: 813-820.
- Provencher, S.W., (1982), *Comput. Phys. Commun.*, 27, 229.
- Radeva, T. (2001), *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Rawle, A., "Basic Principles of Particle Size Analysis", Technical Paper, Malvern Instruments, Ltd.
- Sacco, D., Bonneaux, F., Dellacherie, E. (1988), "Interaction of Hemoglobin with Dextran Sulphates and the Oxygen-Binding Properties of the Covalent Conjugates", *Int. J. Biol. Macromol.*, 10, 305.
- Saraç, S., Özeroğlu, C., Mustafaev, M.I., (1995), "The Ternary Complexes of Bovine Serum Albumine and Polyacrylamide Derivatives in the Presence of Copper ions in Natural Water", *Bioact. Complet. Poly.*, 10: 121.
- Sato, H., Meada, M. ve Nakaj, M. A. A., (1979), *J. Appl. Polym. Sci.*, 23: 1759.
- Sebastian, N., George, B., Mathew, B., (1998), "Metal Complexes of Poly(acrylic acid): Synthesis, Characterization and Thermogravimetric Studies", *Polymer Degradation and Solubility*, 60: 371-375.
- Sharpe, A.G., (1976), "The Chemistry of Cyano Complexes Transition Metals", *Academic Pres New York*.
- Shieh, J., Glatz, C.E. (1991), *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)*, 32 (1): 606.
- Subotic, D. V., Fergusson, T. ve Warren, B. C. H., (1989), *Eur. Polm. J.*, 25: 1233.
- Szabo, A. G. ve Rayner, D. M., (1980), *Journal of the American Chemical Society*, 102(2): 554.
- Tabaka, Y., Noda, Y., Matsui, Y., Ikada, Y., (1999), "Targeting of Necrosis Factorto Tumor use of Dextran and Metal Coordination", *J. Controlled Release*, 59(2): 187.
- Thies, C. vd. (1994), *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Tomic, E.A., Campbell, A., (1962), *J. Polymer Science*, 62: 379-86
- Tsuchida, E., Nishide, H., (1977), *Adv. Polym. Sci.*, 24: 59-73
- Tsuchida, E., Osada, Y. (1974), "The Role of the Chain Length in the Stability of Polyion Complexes", *Makromol. Chem.*, 175, 2, 593-601.

- Vallee, B.L., Riordan, J.F., (1978), "Proceedings of the International Symposium on Proteins", Academic Press, New York.
- Veis, A. (1991), Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.), 32 (1): 596.
- Vernon, F., (1976), Anal Chem Acta, 87: 491-493.
- Vernon, L.P, Seely, G.R., (1966) "The Chlorophylls", Academic Press, New York.
- Virella, G. (2001), Medical Immunology: Fifth Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker Incorporated, New York, NY, USA.
- Zetasizer Nano Series User Manual, MAN0317, Issue 2.2, Malvern Instruments, Ltd., March 2005.
- Zezin, A. B. ve Eltsefon, B. S., (1976), In Itogi Nauki, Chimiya; Tekhnologiya Vysokomol Soedin, 10: 96, Moscow.
- Zheng, Y., Yi, Y., Qi, Y., Wang, Y., Weian, Z., Du, M., 2006, "Preparation of Chitosan-Copper Complexes and Their Antitumor Activity", Bioorganic of Medicinal Chemistry Letters, 16: 4127-4129.

INTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyelectrolyte>
- [2] <http://www.pslc.ws/macrog/electro.htm>
- [3] <http://www.polymersnetbase.com/pme>
- [4] <http://www.chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Dihedral.jpg>
- [5] <http://www.friedli.com/research/PhD/bsa>
- [6] <http://www.worthington-biochem.com/OA/cat.html>
- [7] http://www.malvren.co.uk/LabEng/industry/colloids/colloids_definition.htm
- [8] http://www.malvren.co.uk/LabEng/industry/colloids/dlvo_theory.htm

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 20.08.1977

Doğum yeri İstanbul

Lise 1991-1994 Pertevniyal Lisesi

Lisans 1995-1999 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak.
Kimya Bölümü

Yüksek Lisans 1999-2002 Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilimdalı, Biyokimya Programı

Çalıştığı Kurum:

2001- Devam ediyor YTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Araştırma Görevlisi