

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

128634

ÜÇLÜ POLİMER-METAL-PROTEİN  
KOMPLEKSLERİNİN YAPI MODELLERİ

Kimyager Mesut KARAHAN

TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

F.B.E Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında  
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

128634

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Mehmet Mustafaev Akdeste

Üye

: Doç. Dr. Harize Kuzu KARŞILAZAN

Üye

: Prog. Dr. Sezer SARAÇ

İSTANBUL, 2002

*(Handwritten signatures and marks)*

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	iii
KISALTMA LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖNSÖZ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT .....	xii
1 GİRİŞ .....	1
2 TEORİK KISIM .....	3
2.1 Genel Bilgi.....	3
2.2 Polielektrolitler .....	4
2.2.1 Yapay Polielektrolit Kompleksleri .....	5
2.2.2 Doğal Polielektrolit Kompleksleri.....	6
2.2.2.1 Nükleik Asitlerin Kompleksleri.....	6
2.2.2.2 Polisakkarit Kompleksleri.....	7
2.3 Polimer-Metal Kompleksleri(PMK).....	10
2.4 Geçiş Metal İlavesiyle Oluşan Üçlü Polimer-Protein Kompleksleri.....	16
2.4.1 Asit Ortamında Kompleksleşme.....	16
2.4.2 Nötral Su Ortamında Kompleksleşme.....	17
2.5 Polielektrolit Komplekslerin İmmunolojik Aktivitesi.....	19
2.6 Dekstran ve Türevleri.....	21
2.7 Floresans Spektroskopisi.....	25
2.7.1 Ayna Görüntüsü Kuralı.....	26
2.7.2 Stokes Kanunu.....	26
2.7.3 Floresans Ömrü ve Kuantum Verimi.....	27
2.8 Protein ve Üçlü Polimer-Metal-Protein Moleküllerinin Floresans Özelliklerinden Yararlanılarak İncelenmesi.....	29
2.9 Biyomateryallerin Tıpta Kullanılması.....	31
3 DENEYSEL KISIM.....	34
3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	34
3.1.1 Kullanılan Cihazlar.....	34
3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	35
3.2 BSA(Bovine Serum Albumin)-Metal Komplekslerinin Floresans Özelliklerinin ve Absorbanslarının İncelenmesi.....	36
3.2.1 Kullanılan Çözeltiler.....	36
3.2.2 Deneyin Yapılışı.....	37
3.3 Poliakrilik Asit-Metal Komplekslerinin Absorbanslarının İncelenmesi.....	37

3.3.1	Kullanılan Çözeltiler.....	37
3.3.2	Deneyin Yapılışı.....	37
3.4	Poliakrilik Asit-Metal-BSA Üçlü Komplekslerinin Fluoresans Özelliklerinin ve Absorbanslarının İncelenmesi.....	38
3.4.1	Kullanılan Çözeltiler.....	38
3.4.2	Deneyin Yapılışı.....	38
3.5	Dekstran Sülfat-Metal Komplekslerinin Absorbanslarının İncelenmesi.....	39
3.5.1	Kullanılan Çözeltiler.....	39
3.5.2	Deneyin Yapılışı.....	39
3.6	Dekstran Sülfat-Metal-BSA Üçlü Komplekslerinin Fluoresans Özelliklerinin ve Absorbanslarının İncelenmesi.....	39
3.6.1	Kullanılan Çözeltiler.....	39
3.6.2	Deneyin Yapılışı.....	40
4	DENEYSEL SONUÇLAR.....	41
4.1	BSA(Bovine Serum Albumin)-Metal Komplekslerinin Fluoresans Özelliklerinin ve Absorbanslarının.....	41
4.1.1	Absorbans Sonuçları.....	41
4.1.2	Fluoresans Sonuçları.....	46
4.2	Poliakrilik Asit-Metal Komplekslerinin Absorbanslarının İncelenmesi.....	53
4.2.1	Absorbans Sonuçları.....	53
4.3	Poliakrilik Asit-Metal-BSA Üçlü Komplekslerinin Fluoresans Özelliklerinin ve Absorbanslarının İncelenmesi.....	54
4.3.1	Absorbans Sonuçları.....	54
4.3.2	Fluoresans Sonuçları.....	60
4.4	Dekstran Sülfat-Metal Komplekslerinin Absorbanslarının İncelenmesi.....	67
4.4.1	Absorbans Sonuçları.....	67
4.5	Dekstran Sülfat-Metal-BSA Üçlü Komplekslerinin Fluoresans Özelliklerinin ve Absorbanslarının İncelenmesi.....	68
4.5.1	Absorbans Sonuçları.....	68
4.5.2	Fluoresans Sonuçları.....	74
5	SONUÇLAR ve TARTIŞMALAR.....	81
	KAYNAKLAR.....	85
	ÖZGEÇMİŞ.....	89

## SİMGE LİSTESİ

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\lambda$	Dalga boyu
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
ml	Mililitre
$\phi$	Kuantum verimi
s	Saniye
ns	Nanosaniye
$M_x$	X'in moleküler ağırlığı
$n_x$	X'in molar konsantrasyonu
$C_x$	X'in yüzde konsantrasyonu
nm	Nanometre
mg	Miligram
mM	Milimolar
$E_o$	Elektronik enerji
$E_v$	Vibrasyonel enerji
$E_r$	Rotasyonel enerji
$S_o$	Temel hal
$S_1$	Uyarılmış singlet hal

## **KISALTIMA LİSTESİ**

DNA	Deoksi ribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
PE	Polielektrolit
TRP	Triptofan
PBS	Phosphate buffer solution
DX	Dekstran sülfat
PAA	Poliakrilik asit
PMAA	Polimetakrilik asit
PMK	Polimer-metal kompleksleri
BSA	Bovine serum albumin
SOD	Süperoksitdismutaz



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Suda çözünen protein-polisakkarit kompleksi partikülünün düşünülen yapı modeli.....	10
Şekil 2.2 Polimer-metal komplekslerinin $[Me]/[PE] \ll 1$ (I) ve $[Me]/[PE] \geq 1$ (II) oranlarında oluşan yapı.....	14
Şekil 2.3 İmmun cevabı oluşturan antijen-hücre komplekslerinin hipotetik şeması[a) T-hücresine bağımlı cevap b) T-hücresinden bağımsız cevap].....	20
Şekil 2.4 Kopolimer-Cu <sup>2+</sup> -SA üçlü polikompleksinin şematik gösterilmesi ve yapısı.....	21
Şekil 2.5 Jablonski diyagramı.....	26
Şekil 2.6 Floresans emisyonunda ayna görüntüsü.....	26
Şekil 2.7 Aromatik aminoasitlerin floresans emisyon spektrumları.....	29
Şekil 2.8 Aromatik aminoasitlerin absorpsiyon spektrumları.....	30
Şekil 2.9 BSA(A) ve PE(N-izopropilakrilamid-akrilik asit kopolimeri 1:1)+ BSA karışımı(B) çözeltilerine farklı konsantrasyonda CuSO <sub>4</sub> (Cu <sup>2+</sup> ) eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	30
Şekil 4.1 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Cu <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	41
Şekil 4.2 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Zn <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	42
Şekil 4.3 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Fe <sup>3+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	42
Şekil 4.4 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Fe <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	43
Şekil 4.5 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Cd <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	43
Şekil 4.6 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Ni <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	44
Şekil 4.7 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Co <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	44
Şekil 4.8 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Mn <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	45
Şekil 4.9 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucu 280nm'de ölçülen absorbans değerlerinin $n_{Mc}/n_{BSA}$ ile değişim grafiği.....	46
Şekil 4.10 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Cu <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	47
Şekil 4.11 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Zn <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	48
Şekil 4.12 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Fe <sup>3+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	48
Şekil 4.13 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Fe <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	49
Şekil 4.14 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Cd <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	49
Şekil 4.15 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Ni <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	50
Şekil 4.16 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Co <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	50
Şekil 4.17 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Mn <sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	51

Şekil 4.18 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucu 280nm'de uyarma ile floresans spektrumlarından okunan floresans şiddeti değerlerinin $n_{Me}/n_{BSA}$ ile değişim grafiği.....	52
Şekil 4.19 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucu 280nm'de uyarma ile floresans spektrumlarından okunan maksimum dalga boyunun $n_{Me}/n_{BSA}$ ile değişim grafiği.....	52
Şekil 4.20 PAA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucu 400nm'de ölçülen absorbans değerlerinin $n_{Me}/n_{BSA}$ ile değişim grafiği.....	54
Şekil 4.21 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Cu^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	55
Şekil 4.22 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Zn^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	55
Şekil 4.23 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Fe^{3+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	56
Şekil 4.24 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Fe^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	56
Şekil 4.25 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Cd^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	57
Şekil 4.26 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Ni^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	57
Şekil 4.27 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Co^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	58
Şekil 4.28 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Mn^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	58
Şekil 4.29 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucu 280nm'de ölçülen absorbans değerlerinin $n_{Me}/n_{BSA}$ ile değişim grafiği.....	59
Şekil 4.30 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Cu^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	61
Şekil 4.31 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Zn^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	61
Şekil 4.32 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Fe^{3+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	62
Şekil 4.33 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Fe^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	62
Şekil 4.34 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Cd^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	63
Şekil 4.35 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Ni^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	63
Şekil 4.36 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Co^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	64
Şekil 4.37 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Mn^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	64
Şekil 4.38 PAA(2mg/ml)+BSA(1mg/1ml) karışımının üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucu 280nm'de uyarma ile floresans spektrumlarından okunan floresans şiddeti değerlerinin $n_{Me}/n_{BSA}$ ile değişim grafiği.....	66
Şekil 4.39 PAA(2mg/ml)+BSA(1mg/1ml) karışımının üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucu 280nm'de uyarma ile floresans spektrumlarından okunan maksimum dalga boyu $n_{Me}/n_{BSA}$ ile değişim grafiği.....	66

Şekil 4.40 DX(1mg/1ml) çözeltisi üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucu 400nm'de ölçülen absorbans değerlerinin $n_{Me}/n_{BSA}$ ile değişim grafiği.....	68
Şekil 4.41 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Cu^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	69
Şekil 4.42 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Zn^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	69
Şekil 4.43 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Fe^{3+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	70
Şekil 4.44 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Fe^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	70
Şekil 4.45 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Cd^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	71
Şekil 4.46 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Ni^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	71
Şekil 4.47 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Co^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	72
Şekil 4.48 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Mn^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.....	72
Şekil 4.49 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucu 280nm'de ölçülen absorbans değerlerinin $n_{Me}/n_{BSA}$ ile değişim grafiği.....	73
Şekil 4.50 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Cu^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	75
Şekil 4.51 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Zn^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	75
Şekil 4.52 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Fe^{3+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	76
Şekil 4.53 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Fe^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	76
Şekil 4.54 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Cd^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	77
Şekil 4.55 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Ni^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	77
Şekil 4.56 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Co^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	78
Şekil 4.57 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine $Mn^{2+}$ iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.....	78
Şekil 4.58 DX(2mg/ml)+BSA(1mg/1ml) karışımının üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucu 280nm'de uyarma ile floresans spektrumlarından okunan floresans şiddeti değerlerinin $n_{Me}/n_{BSA}$ ile değişim grafiği.....	80
Şekil 4.59 PAA(2mg/ml)+BSA(1mg/1ml) karışımının üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucu 280nm'de uyarma ile floresans spektrumlarından okunan maksimum dalga boyunun $n_{Me}/n_{BSA}$ ile değişim grafiği.....	80
Şekil 5.1 Üçlü polimer-metal-protein kompleksi partikülünün düşünülen yapı modeli.....	84

## ÖNSÖZ

Tez çalışma konumu belirleyen, çalışmanın uygulamasını yönlendiren ve değerlendirilmesini sağlayan, her konuda bilgilendiren ve desteklerini esirgemiyen değerli hocam Prof.Dr. Mehmet Mustafaev Akdeste'ye;

Bana biyokimyayı sevdiren ve bu anabilim dalında yüksek lisans yapmamı sağlayan, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren değerli hocam Doç.Dr. Huriye Kuzu'ya;

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezinin Genetik Mühendisliği Bölümü İmmunoloji laboratuvarında bana çalışma olanağı sağlayan ve her konuda yardım eden değerli hocam Doç.Dr. Zeynep Mustafaeva Akdeste'ye;

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezinin Genetik Mühendisliği Bölümü İmmunoloji laboratuvarında deneysel çalışmalarına yardım eden Msc. Mirosława Demchenko'ya, Pelin Vural'a ve teknisyen Cem Hıdır'a;

Ayrıca eğitim ve öğretimimde hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve gösterdikleri hem maddi hem manevi desteklerini esirgemiyen sevgili Aileme;

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.



## ÖZET

Anyonik polielektrolitlerin(PE)(poliakrilik asit ve biyolojik şartlarda bozunabilen dekstran sülfat) geçiş metal iyonları( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Mn}^{2+}$ ) varlığında sığır serum albumini(SA) ile sulu çözeltideki etkileşimi floresans ve uv-visible spektrofotometrik yöntemlerle incelenmiştir. Anyonik PE negatif yüklü SA ile metal varlığında ortamın şartlarına, bileşenlerin oranına ve metalin doğasına bağımlı olarak suda çözünebilir veya çözünemeyen üçlü PE-metal-SA kompleksleri oluşturduğu kanıtlanmış ve polikompleksin stabilitesinin metalin doğasına bağımlı olarak değiştiği gösterilmiştir.

Metal iyonlarının etkili bir floresans söndürücü olduklarını düşünerek, çözülebilen üçlü polikomplekslerin yapıları, SA'nın triptofan kromoforlarının davranışlarının floresans yöntemi ile araştırılmasına dayanarak incelenmiştir. Uv-visible spektrofotometrik yöntemle  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  iyonlarının daha stabil kompleks oluşturma özellikleri, floresans etkinliklerinden de görülmektedir. Bu üç iyon, protein yapısındaki triptofanın floresansını söndürür ve maksimum dalga uzunluğu( $\lambda_{\text{max}}$ ) red shift verirler. Bu sonuçlara dayanarak  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  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. Diğer iyonlar( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Mn}^{2+}$ ) polianyonlarla zayıf kompleks oluşturma özelliği taşırlar ve daha etkin olarak protein molekülü ile etkileşime girerek tuz etkisi gösterirler. Bu etkileşim sonucu protein molekülü daha da kompakt(sıkışık) hale gelerek triptofanın su molekülleri ile etkileşimini azaltırlar( $\lambda_{\text{max}}$  blue shift gösterir). Bu sistemlerde  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  iyonlarından farklı olarak kararlı yapılı üçlü polikompleksler oluşamazlar. Alınan sonuçlar yeni türde yapay immunojenler geliştirmek için önem taşımaktadırlar.

**Anahtar Kelimeler:** Polielektrolit, üçlü polimer-metal-protein polikompleksleri, triptofan, floresans, Polikompleks.

## ABSTRACT

The interaction between anionic polyelectrolytes(PE)(polyacrylic acid and biodegradable dextran sulfate) and bovine serum albumin in the presence of transition metal ions in aqueous solution was analyzed with fluorescence and uv-visible spectrophotometric methods. It is proved that, due to the ratio of ingredients, nature of metal ions and enviromental conditions, soluble and insoluble triple PE-metal-BSA complexes have accured between negatively charged BSA and PE in the presence of transition ions. It is also shown that the stability of these complexes can be effected by the nature of the metal ions.

Because of metal ions are effective fluorescence quencher, the structure of polycomplexes are detected due to behaviors of chromophore with the uv-visible spectrophotometric method, it is shown that more stable complexes are occurred in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  which is also proved by fluometric. These three ions quench tryptophan fluorescence and the maximum wavelenght changes shift to the red region. According to these results, the below comments can be made about the structure of ternary complexes in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ . These ions ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) connects the polyanion macromolecules with proteins and makes ternary polycomplex. Albumin molecules in the structure of the complex particles is open for the interaction with the solution. The other ions( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ ) have the ability to make weak complex with polyanions. These metal ions effectively interact with proteins and shows salt characteristic. As a result of this interaction, protein molecules, becomes more compact and reduces the interaction of tryptophan with water molecules( $\lambda_{\text{max}}$  blue shift). So it can be concluded that  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$  can make stade complexes. These results are important because they can be used for developing new type of synthetic immunogens.

**Keywords:** Polyelectrolytes, ternary polymer-metal-protein complexes, tryptophan, fluorescence, Polycomplex.

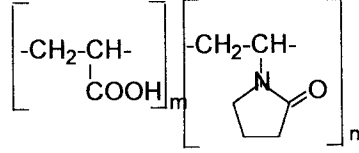
## 1.GİRİŞ

Suda çözünen polimerler son zamanlarda gerek teorik polimer kimya sahasında gerekse pratik uygulama olarak geniş çalışma alanı bulmuştur. Özellikle, suda çözünen sistemler(polimerler, polikompleksler ve diğer polimer modifikasyonları) fizyolojik aktif maddeler olarak kullanılmasının düşünülmesi, immünolojik açıdan büyük bir kazanç olarak görülmektedir. Bu amaçla fizikokimyasal yöntemler aracılığıyla bu sistemlerin yapısı hakkında geniş bilgi elde edebilmek için çalışmalar sürdürülmektedir.

Bu tip sentetik polimerler tıpta ve biyolojik temelli bilimlerin diğer sahalarında son zamanlarda pratik uygulamalar bulmuştur. 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.

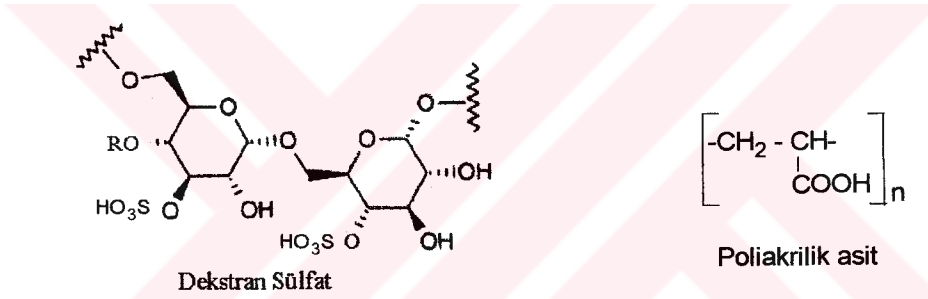
Zayıf immunojenik antijenlerin(haptenler, proteinler, polisakkaritler) farklı kökenli sentetik polielektrolitlerle(PE) bağlanması sonrasında organizmada antijen-PE'ye karşı bağışıklığın arttığı gösterilmiştir(Petrov ve Khaitov, 1988). Fizyolojik şartlar altında oldukça sağlam olan kompleksler en yüksek immünolojik aktiviteyi gösterir(Kabanov vd., 1978; Petrov vd., 1979). 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)(Petrov, 1979). Ayrıca 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 olmamış hem de istenmeyen serbest bileşenler oluşmamış olur(Mustafaev ve Kabanov, 1981). Ayrıca elektrosatik bağlı zehirli olmayan PE'ler[1.)N-vinilpirolidon ile akrilik asit kopolimer] ile protein(Bovin serum albumin)

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



#### Akrilik asit(AA) ve N-vinilpirolidon kopolimeri(VPD) [CD(AA-VPD)]

Bu çalışmada sığır serum albuminin iki tür anyonik polielektrolitlerle(biyobozunur dekstran sülfat ve biyobozunamayan poliakrilik asit) farklı geçişmetal iyonları( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Mn}^{2+}$ ) varlığında sulu çözeltideki etkileşimleri floresans ve uv-visible spektrofotometrik metodlarla incelenmiştir.



Yapılan bu incelemelerle, farklı metal varlığında sentetik anyonik polielektrolitin sığır serum albumini ile suda çözünebilir veya çözünemeyen polimer-metal-protein üçlü komplekslerin oluştuğu saptanmış ve bu üçlü kompleksin yapı modelleri geliştirilmiştir. Çalışmalar ışığında gelecekte bu üçlü kompleksteki protein yerine uygun başka bir protein, enzim veya herhangi bir hastalığın virüsünün etkin protein epitopu(sentetik olarak elde edilir) bağlanabilir. Dolayısıyla bu üçlü kompleksin fizikokimyasal özelliklerini öğrenmekle ileri de oluşturulacak yapay polimerik aşılarda önem taşımaktadır.

## 2. TEORİK KISIM

### 2.1 Genel Bilgi

Küçük molekül kompleks oluşturu ilavelerin(geçiş metalleri) varlığıyla kararlı polimer-protein komplekslerinin oluşumunun prensibi bulunmuştur(Mustafaev ve Kabanov, 1981).

Polimerle kompleksleşme, proteinlerin işlevsel özelliklerinde önemli değişikliklere yol açabilmektedir. Böylece polimere bağlı proteinler kararlılık kazanabilmekte, ayrıca proteinlerin immunojenliğinin artması mümkün olmaktadır. Bu yaklaşımla tutulan proteinler günümüzde endüstriyel süreçlerde başarıyla kullanılmakta, immunojenliği artırılmış proteinler ve virüsler ise güçlü aşı sistemlerinin geliştirilebilmesine olanak sağlamaktadır. Pasteur ile aşı preparatların yapılmasında çok önemli engeller ortaya çıktığı bilinmektedir. Zayıflatılmış mikro organizma uygulanırken çok fazla miktarda alerji verebilen gereksiz maddeler(ballast) organizmaya girerler. Uygulanan aşılar bazı hallerde yeterli sonucu vermez. Son yıllarda immunsal yolla veya gen mühendisliği yolu ile yapılmış ve içinde gereksiz maddeler olmayan aşı yapmakta da önemli engeller vardır. Böyle aşılar ilave adjuvantlar ve uygun taşıyıcılar olmayınca etkin immun cevabı oluşturamazlar. Eğer taşıyıcı gibi proteinlerden faydalanılsa bu tür konjugatların da immunitesi ve koruma özelliği zaten adjuvant katılımı ile ve organizmaya birkaç uygulandıktan sonra yapılır.

1970'li yılların başlarında kimyacılar ve immunologların bilgi alışverişiyle ilk defa tabiatta benzeri olmayan bazı sentetik polielektrolitlerin(PE) immun cevabına kuvvetli etkisi aydınlatıldı. Bu sayede yapılan araştırmalarda, timusa bağlı olmayan suni immunojenlerin yapımının yeni prensibinin verilmesi sağlanmış oldu. Birkaç doğal polimer: polisakaritler, nükleik asitler, lipoproteinler ve onların suni analogları yüksek adjuvant aktifliğine sahiptirler. Ancak sentetik PE'ler bu amaç için daha uygundur. Öyleki PE'lerin sentezi ve modifikasyonu daha basittir, istenilen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek molekül yapıda elde etmek olasıdır, suda iyi çözünürler ve çeşitli proteinlerle bilinen yapıda komplekslerini sentezlemek olasıdır. Sentetik PE'lerin katılımı ile elde edilen sonuçlar çeşitli enfeksiyonlara karşı etkili aşılar yapmanın geçerliliği hakkında büyük ümitler verir. Bu problemin en önemli güncel yararı şimdiye kadar tedavisi mümkün olmayan enfeksiyonlara karşı yeni tipli aşılar oluşturulmasıdır. Örnek olarak: paraziter enfeksiyonları, malarya, AIDS, hepatit, grip, domuzların Afrika vebası ve veteriner alanda diğer enfeksiyonlar, insanlarda ve hayvanlarda bağırsak grubuna bağlı olan enfeksiyon hastalıklarını gösterebiliriz.

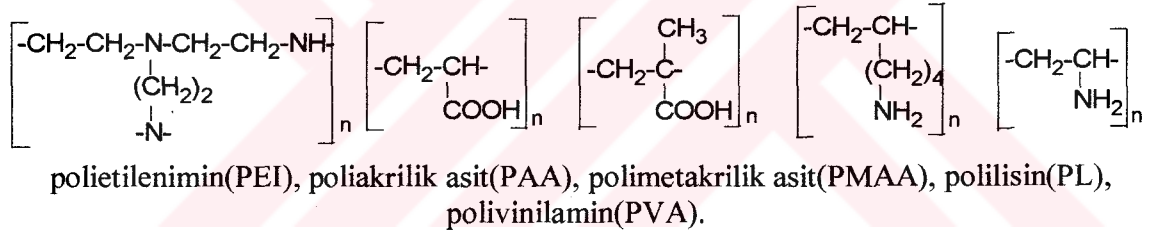
Geçiş metallere iyonları, DNA'dan histonların çıkarılması, ribozom bileşenlerinin birbiriyle veya taşıyıcı RNA ile birleşmesinde olduğu gibi çok önemli biyokimyasal işlevlerin oluşumuna katkıda bulunurlar. Böyle iyonlar reaksiyon partiküllerinin birleşmesiyle beraber onların yapısının korunmasında aktif olarak rol oynarlar. Biyopolimerlerin fonksiyonel etkilerine aktif tesir ederek metal iyonları, bunlara yeni ve karakteristik olmayan biyolojik etkiler kazandırabilirler. Platin bileşimlerinin aktif olmayan virüslere bağlanmasıyla aşı elde edilmiştir. İki değerlikli bakır esaslı makrosiklik fonksiyonel şelat ajanlar insan serumunu stabilize ederler. Üçlü kompleks, B meningococcal grubuna ait polisakkarit ile bakterilerin yüzey membran proteini, alüminyum ve rutenyum iştirakiyle elde edilmiştir. Bu üçlü kompleks bakterilerle oluşan hastalıkların(menenjet) tedavisinde kullanılır.

## 2.2 Polielektrolitler

Polielektrolitler(PE), yapısında (+) veya (-) yükler taşıyan polimerlere denir. Polielektrolitler ortamın pH'ına bağlı olarak (+) veya (-) yüklü hale getirilip arzu edilen antijene bağlanabilir. Önemli özelliklerinden biride polimerlerde konsantrasyon arttıkça viskozite artar ancak polielektrolitlerde ise konsantrasyon düşüncü viskozite artar. Çünkü polielektrolitte bulunan (+) veya (-) yükler konsantrasyon düştükçe birbirlerini iter ve böylelikle polielektrolit şişer ve viskozite artmış olur. Polielektrolitler bir adjuvant etkisi yaratan ve antijene bağışıklık gösteren immun cevapları artırır. Stabil bir kompleks oluşturmak üzere mikrobiyol ve viral antijenlere bağlanan PE'in taşıyıcı olarak kullanımı, organizmanın immun cevap verme etkisini kat kat arttırmakla kalmaz, ayrıca immun korumada da etkili olur. Bu tür sistemler, bileşenlerin fonksiyonel gruplarının kovalent bağlarla bağlı olduğu konjugatlar ve antijen molekülleri ile PE fragmantları arasındaki elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin bütünleşmesiyle stabilize olan kompleksler içerir. PE makromoleküllerinin, antijen bağlanması için uygun, elektrostatik ve hidrofobik grupları içermediği durumlarda, biyolojik sistemler üzerindeki etkisini değiştirebilecek taşıyıcı polimerlerin değiştirilmesi gerekli olabilir. Polielektrolit komplekslerini iki türde inceleyebiliriz(Mustafaev vd., 1996).

### 2.2.1 Yapay Polielektrolit Kompleksleri

Özel olmayan polielektrolitlerin proteinlerle reaksiyonlarının incelenmesi Stahmann, Katchalski ve Morawetz'in çalışmalarıyla başlamıştır. Özellikle BSA(Bovine Serum Albumin)'nın fraksiyonsuz PAA ve Ba<sup>2+</sup> varlığındaki çözünebilir kompleksler Morawetz tarafından incelenmiştir(Morawetz, 1952, 1965; Rice vd., 1954; Katchalski vd., 1954). Bu çalışmalarda esas sonuçlar kompleks oluşumunun belirlenmesi olmuştur. PE'lerin proteinlerle su ortamında kompleks oluşturması genel şekilde karşılıklı reaksiyona giren bileşenlerin birbirine zıt yükler taşıması ilkesine dayanır. Literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir ki serum albumin(SA) pH'ın izoelektrik noktasından(pl) daha düşük olduğu ortam değerleri, yani artı yüklenmiş halde poliakrilik asit (PAA) ile, polimetakrilik(PMAA), asitpolisakkaritlerle, polietilenimin(PEI) ile suda çözünmeyen kompleksler oluşturur. Tripsin ve karaciğer katalazası pH<pl halinde PAA ile, gammaglobulin PMAA ile ve protarmin(artı yükle yüklenmiş protein fraksiyonu) PMAA ile uygun formda çöktürülürler. pH> pl de, serum albuminin eksi yüklenmiş globulasi polikasyonla birleşebilir.



Buna örnek olarak polilisin(PL), polivinilamin(PVA), polidimetilaminoetil metakrilatın(PDMAEM) çökelti oluşturması verilebilir. Uygun haller başka proteinler için de geçerli olabilir. Proteinlerin hem polibazlarla ve hem depoliasitlerle çökmesi çoğunlukla pl noktası ile çeşitli uygunluklarda olan pH'ın dar aralığında görülür. Proteinlerin PE'ler ile reaksiyonu sırasında oluşan çökeltinin çözülme mekanizması daha geniş şekilde protein-polilisin sisteminde incelenmiştir. SA-PL, fibrinojen-PL ve gammaglobulin-PL sistemlerinde çözülme ortamın pH'ının, iyon gücünün ve ortamdaki polimer bileşenlerinden birinin artırılması durumunda kolaylaştığı görülmüştür.

Literatürde PE'ler ile kompleks oluşma metodunun protein karışımını fraksiyonlaştırmaya yönelik çalışmalar vardır. Morawetz vd. (1952, 1965) PMAA, SA ve oksihemoglobin ile karışımının reaksiyonunu incelemiştir. Bahsedilen proteinlerin izoelektrik noktaları aralığına uygun olan pH değerinde oksihemoglobinin seçici olarak çöktüğü gözlenmiştir. Çalışmada

polimetakrilik asit gammaglobulin ile SA, insan albumini ve bunun antikor karışımını ayırdığı gözlenmiştir.

Araştırmacılar insan albumini ile onun antikor karışımını ortamın pH'nın, bunların izoelektrik noktasından uzak değerinde PMAA ile karıştırarak ayırmak istemişler ancak bu yöntemle başaramamışlardır. Yine de PAA-(katalaza+SA) karışımına izoelektrik noktaları arasında iki değerli baryum iyonun( $Ba^{2+}$ ) ilavesi katalazanın SA'dan seçici olarak ayrılmasına imkan vermiştir(Mustafaev, 1996).

### **2.2.2 Doğal Polielektrolit Kompleksleri**

Doğal polielektrolitlerden oluşturulan polikomplekslerin canlı organizmada geniş uygulaması ve canlı organizmaların değişiminde büyük rolü vardır. Bu konu bir çok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Sentetik PE komplekslerinin yeterince araştırılmamasına rağmen doğal PE kompleksleri literatürde sistematik olarak incelenmiştir.

#### **2.2.2.1 Nükleik Asitlerin Kompleksleri:**

En çok incelenmiş kompleksler nükleik asitlerin pozitif yüklü proteinler ve polipeptitlerle olan kompleksleri yani deoksiribonükleik proteitler(DNP) ve ribonükleik proteitler(RNP)'dir. Basit DNP-RNP partikülleri(nükleoproteitler), bazı proteinlerle ve polipeptitlerle bağlanmış iyon şeklinde bir molekül DNA ve RNA içerirler. Bu kompleksler tipik polielektrolit komplekslerdir. Kompleksin oluşturulması protein ligantların pozitif yüklenmiş amin grupları nükleik asitlerin negatif yüklü fosfat grupları ile elektrostatik reaksiyonları etkisiyle uygulanır.

Doğal polikomplekslerin yapısının karakterini ve onların canlı organizmada uyumunun mekanizmasını anlamak için çok önemli bilgiler, doğal PE'lerin model biyopolimerlerle in-vitro olarak kompleks oluşturması yolu ile elde edilir. Bu sistemlerin doğal komplekslerle karşılaştırılması çok kolaydır ve araştırmalar reaksiyonun yönünün ortamın şartlarına bağımlılığını anlamamıza imkan vermiştir. Bu sayede bunlar polifonksiyonel doğal polielektrolitlerin reaksiyonunu ve yapısını öğrenme şansını arttırır. Sentetik sistemlerde araştırmalar aslında doğal nükleoproteitlerin modelini oluşturmak amacıyla yapılmıştır.

Literatürde nükleik asitlerin globular proteinlerle(SA, Libozom, RNAaza) çözülen kompleksleri araştırılmıştır(Goldwosser ve Putnam, 1950; Timasheff ve Kirkwood, 1953; Kretovich vd.,

1958). Araştırmalarda DNA'nın histonlarla ve katyonik homopolipeptitlerle karşılıklı etki mekanizması öğrenilmiştir. Nötral su ortamında bileşenleri karıştırırken hem çözünen ve hem de çözünmeyen polikompleksler oluşturulur(Olins, 1968, 1973).

Bazı araştırmacılar termik yöntem ile DNA-polipeptit sisteminde DNA molekülünün iki formda olduğunu göstermiştir. DNA'nın birkaçı polipeptit ile birleşmiş ve geri kalan kısmı polipeptitle birleşmemiştir. Ultrasantrifüjde DNA-polipeptit sistemi iki fraksiyona bölünür. Birinci fraksiyon çıplak DNA, ikinci fraksiyon ise daha yüksek ısıda erir ve komplekse uygundur. Bu etki araştırmacılar tarafından DNA matrisinin polipeptit hissecikleri ile kooperatif karakterde dolması ile açıklanır. Böylelikle ilk olarak DNA'nın bunun aksine yüklenmiş polipeptitlerle reaksiyonunda polipeptit zincirinin DNA makromolekülleri arasında "tümü veya hiçbirini(all or nothing)" prensibi ile ortaklaşmamış dağılımı gösterilmiştir(Mustafaev, 1996).

#### **2.2.2.2 Polisakkarit Kompleksleri:**

Polisakkaritler bir çok monosakkarit biriminin glikozit bağı ile bağlanmasından oluşmuştur. Asit mukopolisakkaritlerin veya polisakkarit asitlerin proteinlerle komplekslerinin fiziksel kimyası ve biyokimyasının incelenmesi çok zordur. Doğal polisakkaritler canlı organizmada protein polikompleksleri gibi yaşadıklarından ve bu formda fizyolojik fonksiyonları hayata geçirdiklerinden bunların öğrenilmesi günümüzdeki en aktüel konulardan biridir. Canlı organizmada asit mukopolisakkaritleri iki gruba ayrılabilir:

- 1)Yapısında sülfat asidi olmayanlar(hyaloran asiti ve hondroitin),
- 2)Yapısında sülfat asidi olanlar(hondroitin sülfatlar(HS), keratosülfat, heparin, heparin-sülfat)

şimdiye kadar ancak hyaloran asiti, hondroitin ve hondroitin sülfatın kimyasal yapısı öğrenilmiştir. Bunların hepsi nötral su ortamında negatif yüklenmişlerdir ve hem (+) ve hemde (-) yüklenmiş proteinlerle polielektrolit kompleksleri oluştururlar. Hyaloran asitinin su ortamında konformasyonu çok çeşitlidir; ortamın iyonik şiddetine ve başka fiziksel şartlarına bağlı olarak lineer, küresel yumak, gerilmiş v.b. yapıda olurlar. Bundan dolayı polisakkarit asitinin komplekslerini fiziko-kimyasal yöntemlerle öğrenme şansını azaltırlar. Hyaloran asitinin proteinlerle kompleksi ilk defa olarak sinaviyal sıvısından izole edilmiştir(Ogston ve Stanier, 1951).

Ogston vd. yukarıda bahsedilen kompleksi öğrenmişler ve bu kompleksin molekül ağırlığının yaklaşık  $10^7$  ve çapı 140nm olan küresel yapıda olduğunu söylemişlerdir. Daha sonraları polisakkarit-protein kompleksinin yapısının ortamın iyonik şiddetine ve pH'ına bağlı olduğunu göstermiştir. pH = 5,8 olduğunda kompleksin yapısında ancak  $\alpha$  globulin, pH = 7-8 aralığında  $\gamma$  ve  $\beta$  globulinler, pH = 10 olduğunda  $\gamma$  globulin bulunur. pH'ın artışı ile kompleksin yapısında proteinin azalması polisakkarit ile proteinin elektrostatik etkileşim ile bağlılığı göstermiştir. Daha sonra proteinin kompleksin yapısındaki miktarının ortamın iyonik şiddetine bağlı olarak arttığı bulunmuştur. Bu sonuç proteinin hyaloran misellasına adsorbe olma ihtimalini artırır. Yukarıda bahsedilen kompleks oluşmasının çok zor olduğunu gösterir ve buna göre de araştırmacıların hyaloran asitinin protein komplekslerinin yapısını aydınlatamadıkları sebebini açıklar.

Daha sistematik olarak sülfat içeren polisakkarit asitlerinin protein kompleksleri araştırılmıştır. Hondraitin sülfatlar esnek, lineer, çapraz bağlanmış ve negatif yüklerin zincir boyu aynı tür yerleşmiş polielektrolit gibi kendini gösterirler. Onların proteinlerle komplekslerinin canlı organizmanın parçasında olduğu çoktan beri bilinir. Levene protein ile polisakkarit arasında olan reaksiyonu öğrenmiş ve poliasit protein ile ester bağı ile bağlanmış olduğunu bulmuştur. Sonraları hondraitin sülfatın proteinlerle elektrostatik olarak bağlı olduğu bulunmuştur(Meyer vd., 1958). Çünkü suni olarak elde edilmiş hondraitin sülfat-protein maddesi küçük moleküllü tuzların ilavesi ile çözülebilirler. Partridge ve Elsdén hondraitin sülfat-protein komplekslerinin yapısı hakkında çok önemli sonuçlar almışlardır(Partridge ve Elsdén, 1961).

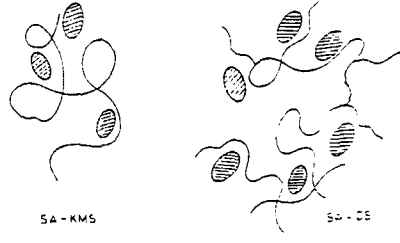
Diğer araştırmacılara göre hondraitin sülfat kompleksinde polisakkarit zinciri ve protein molekülleri ardaşık olarak yerleşmiştir. Daha sonraları hondraitin sülfat molekülünün protein molekülleri boyunca bağlandığını belirtmiştir. Burada polisakkaritin negatif yüklenmiş gruplarının elektriksel itmeleri kompleksin molekülüne sertlik verir.

Schubert ve bazı araştırmacılar hondraitin sülfatın(HS) ters yüklü proteinle(lisozimle) karşılıklı etkileşim reaksiyonunun araştırılmıştır. Protein/HS oranına bağlı olarak üç tip kompleks oluşabilir: suda çözünmeyen, süspansiyon halinde olan kompleks ve tam çözülmüş kompleks. Bunların hepsi küçük moleküllü tuzların ve karboksimetil selüloz ortamında serbest bileşenlere ayrılırlar. Bu sonuçlara göre araştırmacılar elde edilen komplekslerin elektrostatik karşılıklı etkileşimle olduğunu iddia etmişlerdir. Ancak bu sistem daha sonra sistematik araştırılmamıştır.

Literatürde bazı doğal sentetik polisakkarit anyonların(HS, sülfatlaştırılmış hyaloran asiti, dekstran, selüloz, hlikogen vb.)  $\beta$ -lipoproteinlerle kompleksleşme prosesi araştırılmıştır bileşenlerin oranına bağlı olarak araştırmacılar üç tip kompleksin yapıldığını göstermişlerdir: 1) suda çözünmeyen, 2) az dissosiyeye(ayrışma) olan suda çözünen, 3) suda çözünen ve tamamen dissosiyeye olan kompleksler. Elde edilen komplekslerin çözülmesi polianyonun molekül ağırlığına ve polimerde olan N-sülfat ve N-asetil gruplarının miktarına bağlıdır. Lineer(selüloz, amiloz) ve çok fazla çapraz bağlı yapıda olan(hlikogen) polisakkaritler proteinlerle daha iyi çözünen kompleksler oluştururlar. Polianyon-Lipoprotein komplekslerinin yapılması polianyonun negatif yüklenmiş gruplarıyla proteinin baz gruplarının elektrostatik karşılıklı etkileşmesinden oluşan komplekslere göre daha zordur.

Bazı model proteinlerin polisakkaritlerle çözünen kompleksleri aynı yüklerle(negatif) yüklendikleri zaman sentezlenebilirler. SA(serum albumin) proteininin KMS ve dekstranın iki türevi ile: dekstran sülfat ve dietilaminoetil dekstran ortamın pH'ına, çözeltinin iyon kuvvetine ve polisakkaritin molekül ağırlığına bağlı olarak suda çözünen kompleksler oluştururlar. SA, KMS ile ancak izoelektrik noktasının etrafında(pH 5.2), dekstran sülfat ise ortamın pH'ının geniş aralığında(pH 5.4-8.5) kompleks oluştururlar. Dekstranın dietilaminoetil türevi proteinle reaksiyona girmezler ve kompleks oluşturmazlar. SA-KMS sisteminde oluşan kompleksler ortamın iyonik kuvveti arttıkça parçalanırlar. Buna göre kompleks oluşmanın asıl nedeni bileşenlerin elektrostatik etkiyle reaksiyona girmesidir. Aynı zamanda dekstran sülfat-SA kompleksi ortamın pH'ının geniş aralığında ve küçük moleküllü tuzun çeşitli konsantrasyonlarında kararlı oldukları için kompleksin oluşturulmasında elektrostatik güçlerin yanında diğer spesifik kuvvetlerinde etkisi ortaya çıkar. Araştırmacılara göre böyle güçlerin oluşmasında  $-\text{SO}_3$  ve  $-\text{COO}$  grupları çok önemli rol oynarlar. Bu gruplardan  $-\text{SO}_3$  grubu  $-\text{COO}$  grubuna göre  $\text{NH}_2$  grubuyla daha güçlü kompleks oluşturur.

Pozitif yüklerin SA molekülünün yapısının yüzeyinde toplanması literatürde açıklanmıştır. Proteinin karboksil grupları globulanın içinde yerleştiğinden yapıda pozitif yük toplaması olamaz. Bu olay SA protein molekülünün çok az miktarda organik katyonların adsorbsiyonuna sebep olur. Pozitif ve negatif yüklerin albumin molekülünün oval-küresel yapısında belli bir düzende olmayan şekilde dağılması negatif yüklenmiş protein molekülü ile polisakkarit molekülü arasında kompleks oluşturmaya sebep olur. Aşağıdaki şekilde suda çözünen SA-KMS ve SA-dekstran sülfat komplekslerinin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Suda çözünen protein-polisakkarit kompleksi partikülünün düşünülen yapı modeli(Mustafaev, 1996).

Japon araştırmacılar son zamanlarda SA ve HS arasında kompleks oluşturulmasını ışığın saçılması yöntemiyle incelemiştir(Nakagaki ve Sano, 1972).

Protein moleküllerinin polielektrolit bileşiklerle etkileşimleri biyolojik açıdan önemli mekanizmaların varlığını ortaya koymakta ve biyomedikal uygulamalar için büyük potansiyel vaat etmektedir. Proteinler polielektrolit taşıyıcılara iki farklı biçimde bağlanmaktadır. Kooperatif nitelikteki birinci tür bağlanmayla ortaya çıkan yapıda, polimerin küresel protein moleküllerinin oluşturduğu bir çekirdek çevresinde dolandığı gözlenir. İkinci tür bağlanma ise polimer ile onun üzerinde dizili protein moleküllerini kapsayan bir kompleksle sonuçlanmaktadır.

Doğal PE'lerin-asit mukopolisakkaritlerin veya polisakkarit asitlerinin proteinlerle kompleksleri de çok önemli kompleks olarak bilinmektedir. Doğal polisakkaritler(gialuron asiti, hondraitin, hondraitin sülfatlar, heparin vb.) organizmada protein kompleksleri olarak mevcuttur ve bu formda kendi fizyolojik aktifliklerini hayata geçirmeleri düşünülmektedir. Aynı zamanda, belirtmek gerekir ki böyle biyopolimerlerin fiziksel kimyasının ve biyokimyasının karmaşıklığı bunların yapısının aydınlatılmasına yeterince olanak vermemiştir. Asıl sorun, doğal protein komplekslerini modelleştirebilen doğal olmayan analogların yapılmasıdır. Başka bir deyişle doğanın yarattığı makromoleküller sistemlerin tekrar düzenlenmesinden bunların prensip olarak benzerinin oluşturulmasına geçmek gerekir. Bu tekrar düzenlenme koşulları biyopolimerlere özel değil ancak karmaşık biyolojik sistemlerin işleme prensiplerine uygundur(etkinlik, amaca uygunluk v.b.).

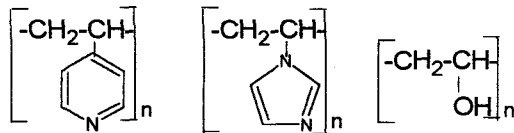
### 2.3 Polimer-Metal Kompleksleri(PMK)

Son zamanlarda geçiş metal iyonlarının sentetik polielektrolitlerle kompleks bileşimleri yoğun olarak incelenmektedir. PMK'ya büyük ilgi herşeyden önce metal iyonlarının sentetik

polielektrolitlerin fizyolojik aktifliğine büyük etkisiyle önem kazanmaktadır. Örneğin akrilik asit ve akroloein kopolimerlerinin iki değerli demirin fazla miktarındaki(yaklaşık %15) PMK’i antianemik(kansızlık) aktifliğe sahiptir ve uzatma etkisi göstermektedir. % 5 üç değerlikli demir poliakrilik asitin bileşimine ilave edildiğinde elde edilen PMK kana pıhtılaşma özelliği kazandırır.

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 kompleksleri 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, 1996).

Çeşitli pH değerinde kararlı olan PMK poli-4-vinil-piridin(PVP) ve iki değerlikli bakır iyonları için asit ve su-alkol karışımlarında incelenmiştir. PVP-Cu<sup>2+</sup> 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 aşlında 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 etkileşimin 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 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  $Rh^{3+}$ -polietilenimin sisteminde de gösterilmiştir.

$Me^{+n}$  iyonları aynı yüklü iki farklı yapılı polimer makromolekülünün bağlanmasında arabulucu olması, yanı sıra zıt yüklü iki polimer molekülünden oluşan polimer-polimer interkomplekslerine katılarak bu komplekslerin stabilitesini arttırabilme özelliği taşımaktadır. İnter polimer komplekslerinin oluşumuna bakalım. Makromoleküller arasındaki etkileşimin incelenmesi, makromolekül bileşikleri kimyasının yoğun gelişim gösterdiği yeni bir çalışma alanını oluşturmuştur. Bu çalışmalar bilimsel 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 içerisinde interpolimer kompleksleri üzerinde yoğun çalışmalar gerçekleştirilmiş ve birçok çalışma temel düzenlemelerin nasıl gerçekleştiği ile kimyasal ve yapısal olarak birbirlerini tamamlayabilen makromoleküllerin oluşturdukları etkileşmelerin özel niteliklerini açıklayabilmek için gerçekleştirilmiştir.

Interpolimer kompleksi oluşturmanın 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(Zıp-up). Çift zincir oluşumu polimerleşmenin matriks tarafından kontrolü sağlanır.

İki polimer makromolekülünden 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 makromolekülün yapısını ve özelliklerini etkiler(Kern ve Kammarer, 1967). Büyüyen radikalın yapısı kısmen matriksle bütünleşmiştir ve oluşan polimerin izomerik bileşimi ile molekül ağırlığı matriks uzunluğu ve mikroyapısı tarafından belirlenebilir.

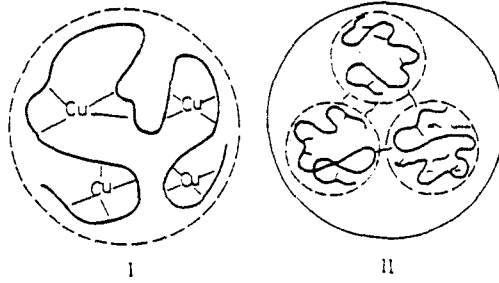
İki farklı yüklü polielektrolitten oluşan interpolimer komplekslerine polielektrolit kompleksleri denir. Polielektrolit komplekslerinin özelliklerinin sistematik olarak araştırılması yapılmıştır(Michaels vd., 1965, 1975; Bixler ve Michaels, 1969) ve sodyum poli(stiren sülfanat) ve poli(vinilbenziltrimetilamonyum 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.

Poliyonik komplekslerin çeşitli pratik uygulamaları vardır. Poliyonik 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 poliyonik filmler kullanılabilir. Poliyonik 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 kaslar'ın 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 osmoziz 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  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının yüksek konsantrasyonunda intermakromoleküler agregasyonu(yığışım) 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) immunojenliği artırılabilir(Mustafaev, 1996).



Şekil 2.2 Polimer-metal komplekslerinin  $[\text{Me}]/[\text{PE}] \ll 1$  (I) ve  $[\text{Me}]/[\text{PE}] \geq 1$  (II) oranlarında oluşan yapı(Mustafaev, 1996).

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. Poliakrilik asit(PAA) veya 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(Bekturov ve Bimendina, 1981).

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

$\text{Cu}^{2+}$  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).  $\text{Cu}^{2+}$  iyonu polimer ligand çözeltisi ile karıştırılır karıştırılmaz, polimer- $\text{Cu}^{2+}$  şelatı hemen oluşur. Polimer- $\text{Cu}^{2+}$  şelatında  $\text{Cu}^{2+}$  iyonu polimer zincirleri tarafından örtülmüş kafes içinde absorbe edilerek kararlı hale geçmiştir ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının çözeltiye geçişi çok zordur.

Son zamanlarda, çeşitli sentetik PE'lerin geçiş metalleri ile metal iyonlarının çok düşük konsantrasyonlarında( $[\text{Me}^{+n}]/[\text{PE}] \ll 1$ ) suda çözünen PMK'lerini sentezlemiş ve oluşma mekanizmasını incelemiştirler. 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 vd., 1992).

## 2.4 Geçiş Metal İyonları İlavesiyle Oluşan Üçlü Polimer-Protein Kompleksleri

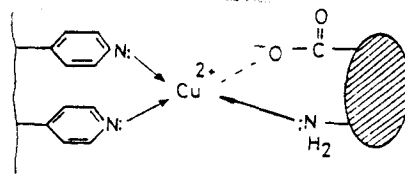
### 2.4.1 Asit Ortamında

Üçlü polimer-metal-protein komplekslerinin incelenmesi Morawetz'in çalışmalarıyla başlamıştır. Özellikle BSA(Bovine Serum Albumin)'nin fraksiyonsuz PAA ve  $Ba^{2+}$  varlığındaki çözünemez kompleksler Morawetz tarafından incelenmiştir(Morawetz, 1952, 1965).

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(Mustafaev ve Kabanov, 1981). 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  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ilave edildiğinde sistemde faz geçişi meydana gelir. Protein miktarına bağlı olarak, kritik protein konsantrasyonunda sistem tamamen suda çözünmüş hale gelir. Çökeltiler 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 SA- $Cu^{2+}$ -PVP kompleksinin oluşumu görülür.

Komplekste bulunan bakırın atom ağırlığına göre polikompleksin molekül ağırlığı  $3.8 \cdot 10^5$  olmalıdır. Işığın saçılması yöntemi ile alınan sonuca göre SA- $Cu^{2+}$ -PVP polikompleks partikülünün birleştiği anlaşılmaktadır.  $Cu^{2+}$  iyonları yardımıyla protein tanecikleri ile birleşmiş polikasyonlardan meydana gelen 6-7 kompleks partikülleri birbirleri ile birleşmiş olur. 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  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının benzer fonksiyon taşıdığı son zamanlarda yapılan araştırmalardan anlaşılmaktadır.

#### 2.4.2 Nötral Su Ortamında Kompleksleşme

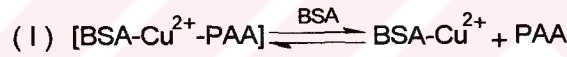
PAA, PVI, akrilasinin vinil piridin ve vinil pirolidon ile kopolimerleri, vinil imidazol, vinil piridin ve diğer monomerlerin vinil pirolidon ile kopolimerleri v.b. polimerlerle üçlü komplekslerin nötral su ortamında oluşması araştırılmıştır. Protein olarak serum albumin, ovalbumin ve veba hastalığının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

Üçlü karışımların homojen çözeltilerinin analiz, 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 sedimantasyon 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)- $\text{Cu}^{2+}$ -SA ve poli-N-etilpiperazinoksit(PNO)- $\text{Cu}^{2+}$ -SA karışımlarının çözeltilerinin sedimantasyon analizi sistemde iki fraksiyonun olduğunu gösterir. Bu fraksiyonlar serbest polimer  $\text{Me}^{+n}$  kompleksine ve üçlü polimer- $\text{Me}^{+n}$ -protein sistemine uygundur. Buda, kompleks oluşumuna protein moleküllerini adsorblayan poliyonlar 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 yapı(1:1) olmayan 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 çözünmeyen 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 oluşturmayan 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 antikör reaksiyonu v.b. (Mustafaev, 1996).

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



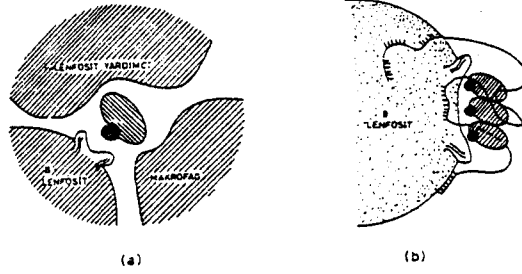
Yüksek  $\text{Cu}^{2+}$  konsantrasyonlarında( $n_{\text{Cu}}/n_{\text{AA}} > 0,15$ ), BSA konsantrasyonundaki fazlalık non-stokiyometrik komplekslerin oluşmasına neden olur(Mustafaev vd., 1996).



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



metilvinilpiridinle kopolimerleri homopolimerden farklı olarak immun cevabını keskin bir şekilde azaltmaktadır, yani immun yatıştırıcı etkisi göstermektedir. Bu farklar adjuvant olarak kullanılan polimerlerin etki mekanizmalarının kimyasal yapılarına bağlı olmadığı gösterilmiştir(Kabanov vd., 1984). Yapılan çalışmalar sonucunda poliakrilasitin, polivinilpiridin, polikanidin ve bunların dörtlü tuzlarının dar fraksiyonlarının kullanılması immunitiyi uyarıcı aktifliğinin polimer zincirinin uzunluğuna bağlı olduğu gösterilmiştir.

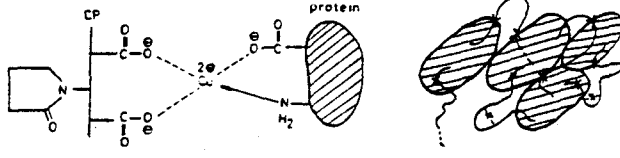


Şekil 2.3 İmmun cevabı oluşturan antijen-hücre komplekslerinin hipotetik şeması[a] T-hücreye bağımlı cevap b) T-hücreye bağımsız cevap](Mustafaev, 1996).

Yukarıdaki bilgilerden elde edilen sonuç, en fazla immunolojik aktifliğe stabil yapıya sahip kompleksler(veya konjugatlar) sahiptirler. Böyle sistemlere örnek olarak PE ve antijen moleküllerinin kooperatif, elektrostatik ve hidrofob karşılıklı etkisiyle stabilleşmiş kompleksleri veya fonksiyonel grupları kovalent bağla bağlanmış bileşenlerden oluşan konjugatları göstermek mümkündür. Ancak PE veya antijen molekülleri birbiriyle bağlanmak için uygun fonksiyonel gruplar veya hidrofob radikallere sahip değillerse bunların kimyasal modifikasyonu(değişiklik) problemi ortaya çıkar. Bu ise polimerin biyolojik etkisinin geniş boyutta değişmesine neden olur.

Doğal PE'ler ve metal iyonları esasında ilaç preparatlarının alınma metodu bir seri araştırmalarda gösterilmiştir(Mustafaev ve Norimov, 1990). Mikroplar vasıtasıyla oluşmuş hastalıkların tedavisinde polisakkarit-protein karışımı bazı metallerin katkısıyla kullanılabilir. Günümüzde BN meninjit serogrubu için spesifik olan proteinle polisakkaritin farmakolojik metalle üçlü polikompleksleri pratik olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda çeşitli protein antijenlerinin sentetik PE'lere metal katılmasıyla oluşan üçlü kompleksler esasında yüksek etkili immunojenler elde edilmiştir(Mustafaev ve Norimov, 1990). Bu sistemlerin önemi, PE-protein karışımına çok az miktarda metal iyonu ilave edilmesiyle kararlı üçlü kompleks oluşmasıyla anlaşılmıştır. İşlem teknolojik açıdan çok basittir ve bileşenlerin kimyasal yapısının değişmemesi

açısından oldukça önemlidir. Küçük moleküllü ilaveler veya ara bağlayıcılar gibi yüzey aktif maddeler ve geçiş metal iyonları kullanılmıştır.



Şekil 2.4 Kopolimer-Cu<sup>2+</sup>-SA üçlü polikompleksinin şematik gösterilmesi ve yapısı(Mustafaev,1996).

Tabloda bu tür sistemlerden birisi için örnek değerler verilmiştir. Tablodan görüldüğü gibi üçlü kompleksler serum albumine karşı hem birinci hem ikinci immun cevabını çok fazla miktarda arttırmaktadır.

Hazırlanan örnek	Farelerin sayısı	İkinci cevap IgM	Anti SA miktarı IgG
BSA	11	20±4,2	6±2,1
BSA-Cu <sup>2+</sup>	10	20±4,0	5,5±2,3
BSA-CP	10	10±4,0	5±2,0
BSA-Cu <sup>2+</sup> -CP	15	22400±1570	14720±1200

Tabloda görüldüğü gibi üçlü komplekslerin immun yanıtı ikili elektrostatik komplekslere göre iki yada dört kat daha fazladır. Diğer pratik açıdan daha önemli protein antijenleri ve üçlü kompleksleri için alınan sonuçlar bu bölümde daha sonra yeniden ele alınacaktır.

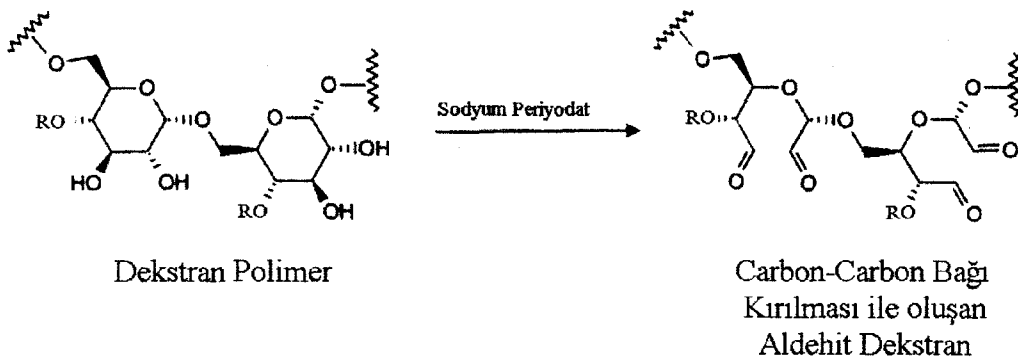
## 2.6 Dekstran ve Türevleri

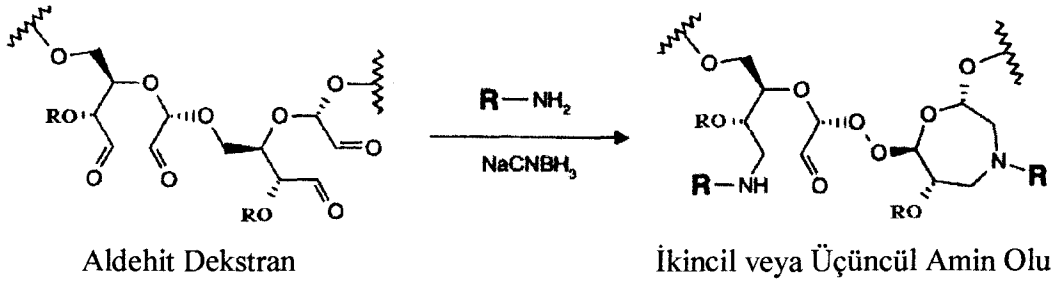
Modifiye edilmiş polisakkaritler, antijen taşıyıcıları olarak çok önem taşırlar. Bu uygulamada kullanılan polisakkaritlerden biride dekstrandır. Dekstran doğal bir polimerdir. Bu polimer tek bir glukoz molekülünün tekrar etmesiyle oluşmuştur. Dekstran hidrofiliktir ve kolay modifikasyona uğrayabilir. Dekstranın hidroksil grupları birçok kimyasal metotla aktifleştirilir ve diğer moleküllerle kolayca reaksiyona girebilecek uygun yapıya getirilir.

Çözülebilir dekstranın moleküler ağırlığı 10.000-500.000 arasındadır. Genellikle bu polimer, protein veya başka moleküller için bağlayıcı(taşıyıcı) olarak kullanılıyor(Dintzis vd., 1989; Shih vd., 1991). Hapten'e taşıyıcı olarak bağlayıp immun cevap oluşturmamız mümkündür. Ayrıca başka molekülleri dekstranla bağlamak için kimyasal yöntemler kullanılır. Protein ve enzim modifikasyonu sonucu polimer ile reaksiyona girdikten sonra protein ve enzimin karakteristik özelliği iyileşiyor(protein daha kararlı enzim ise daha aktif oluyor). Ancak bunlar arasında suda çözünen karbodimid aktivatör olarak kullanılıp kovalent bağlarla bağlanılabılır. Bu yöntemle enzimleri ve proteinleri polimere kovalent bağla bağlanabilir. Bu yöntemle bağlanan enzim ve proteinlerin aktivitesi ve termostabilitesi(sıcaklığa karşı kararlı olması) artar(Hattori vd., 1994). Enzim Taka-amilaz A[1-etil-3(3-dimetilaminopropil)] karbodimid ile karboksil dekstrana bağlandıktan sonra reaksiyona girmemiş haline nazaran daha geniş pH aralığında bozunmaya karşı kararlıdır(Kobayashi vd., 1989). Dekstran ilaç aktif madesi taşıyıcısı olarak, yüksek konsantrasyonlu farmasötiklerin(in vivo) tümör bölgelerine taşınmasında kullanılır(Heindel vd., 1990).

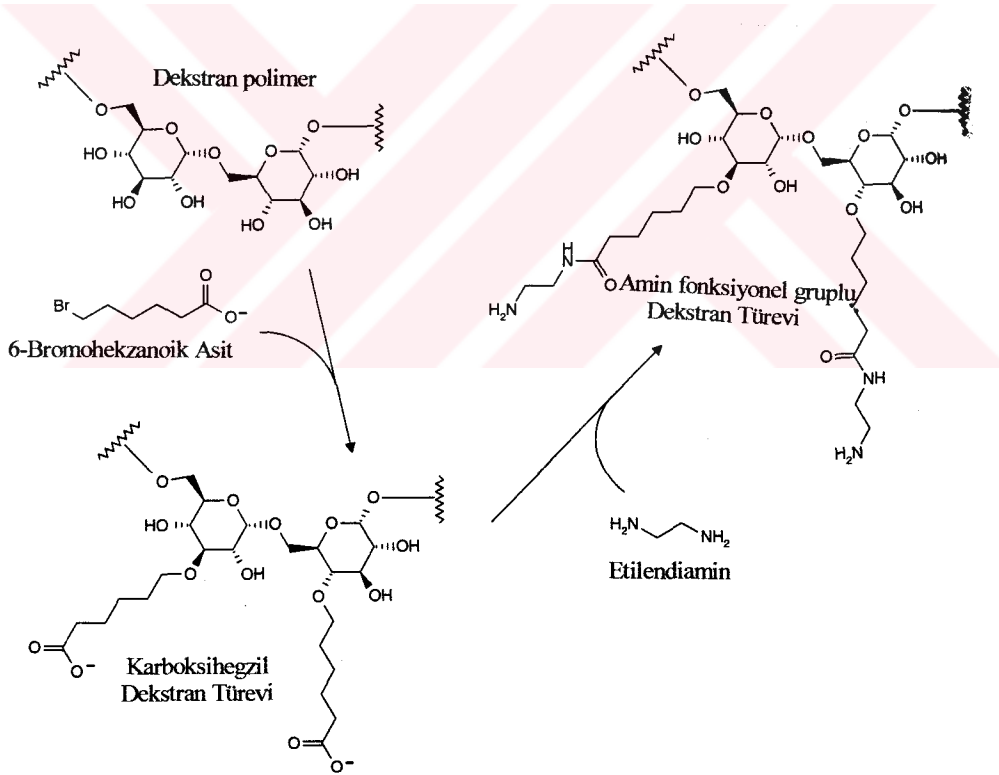
Antijenler Dekstran'a bağlandığında bu antijenlerin immünojenliği artmıştır, burada dekstran adjuvant olarak kullanılmıştır. Oluşan yapının çapı ve yüzeyi artmış dolayısıyla daha fazla antikor üretilmiştir(Schneerson vd., 1980; Anderson, 1982; Mekela vd., 1984).

Dekstran polimeri her glukoz monomerinde hidroksil grupları içerir. Sodyum periyodat oksitleyicisi ile bir adet C-C bağı kırıldıktan sonra bu diollerde aldehite çevrilirler. Bu işlem her glukoz molekülünde iki aldehit grubu oluşması ile sonuçlanır. Oksitlenmiş reaksiyon ürünü yüksek reaktiviteli, çok fonksiyonelli polimerdir ve birçok amin içeren molekülle reaksiyona girmeye müsaittir. Polialdehit dekstran amin grupları ile Schiff baz oluşumu ile konjuge edilir, sonra daha da ileri gidilerek polialdehit dekstran stabil sekonder bağların oluşması için indirgen aminasyon meydana gelir.



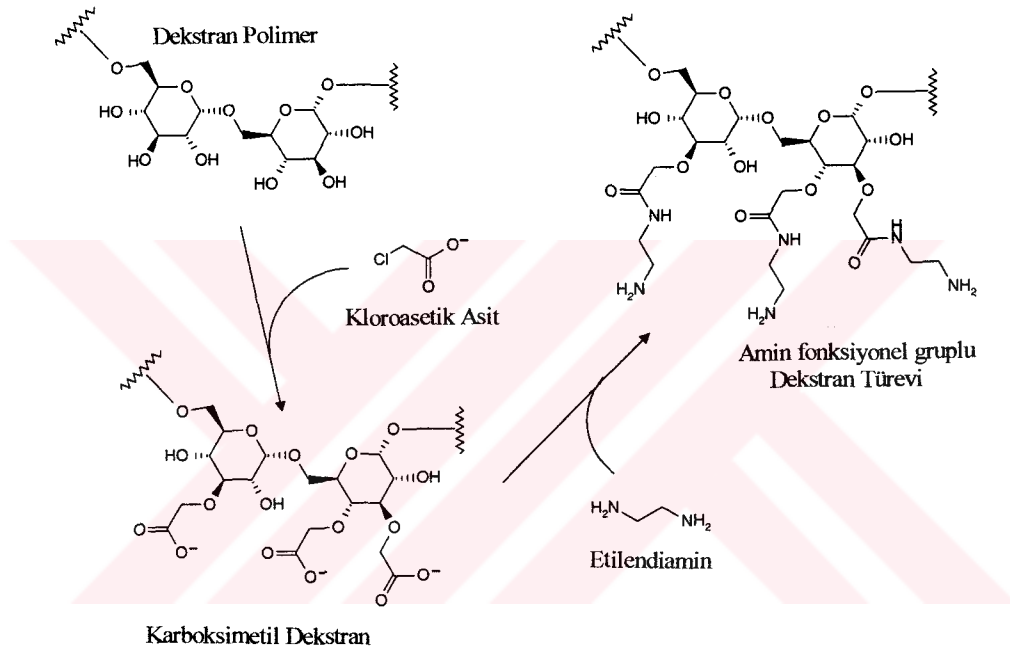


Okside edilmiş dekstran konjugasyon için daha fazla aktif bölgesi vardır. Böylece ilaç etken maddesini okside edilmiş dekstrana direkt olarak bağlamak mümkündür. Bu metod hemoglobinin kompleksleşmesinde de kullanılır(Sacco vd., 1988). Karboksil terminal dekstran türevleri oluşturmak için bazı kimyasal reaksiyonlar kullanılır. Bu türevler, 6-aminokaproik asit veya alanin gibi molekülleri polialdehit dekstrana bağlayarak mümkün olur. Dekstran alkil halojen içeren bileşiklerle de reaksiyona girer.



Ayrıca dekstranın hidroksilik gruplarını modifiye etmek için kloroasetik asit kullanılır. Böylece dekstranın karboksimetil türevi oluşur. Dekstran ve diğer polisakkarit türevleri(karboksil grubu içerenler), karbodimid aktifleştirmesiyle amid bağı oluşturarak, amino veya karboksilat içeren moleküllerle bağlanabilir.

Superoksitdismutaz(SOD), insanlarda mafsalsal iltihabi romatizması için tedavi amaçlı ajan olarak kullanılır. Fakat SOD'un deneysel ve tedavi etme potansiyeli çok zayıftır. Bunun nedeni ise SOD'un böbrekte glomerul filtrasyonla çok çabuk bir şekilde filtre edilmesindedir. SOD'un metil dekstran ile konjugasyonunun, serbest enzime oranla uzun plazma yarı ömrü olduğu gösterilmiştir. Konjugat şeklinde organizmaya verildiğinde glomerul filtrasyon ve doku etkileşimi engellenmiş olur. Bu konjugasyon periyodat yükseltgenmesi ile gerçekleştirilebilir(Fujita vd., 1992).



Bazı araştırmacılar ise, stabil enzim konjugatları hazırlamak için karboksümetil dekstranın karboksil grubundan faydalanırlar. Aktifleştirici ajan olarak da suda çözünen karbodimid kullanılır(Kobayashi vd., 1989; Hattori vd., 1994). Fakat bazı durumlarda stabil reaktif olmayan türevlerde oluşabilir(Heindel vd., 1994). İnsülin molekülü karbosümetil dekstrana amid bağı oluşturarak bağlanır. Böylece insülinin yarı ömründe çok önemli artış iken karboksümetil dekstran-insülin konjugatının ortalama absorpsiyon zamanı çözünebilir insülininden pek farklı değildir(Baudys vd., 1998).

Bovine  $\beta$ -laktoglobulin bu yöntemle katyonik polisakaritlerle(glikozamin, himopentaose ve hitozon) ile bağlanarak yapısında değişme meydana gelmiş ve böyle emülsiyon aktivitesi artmıştır. Bu yapının incelenmesi fluoresans spektroskopisi ile yapılmıştır(Hattori vd., 2000).

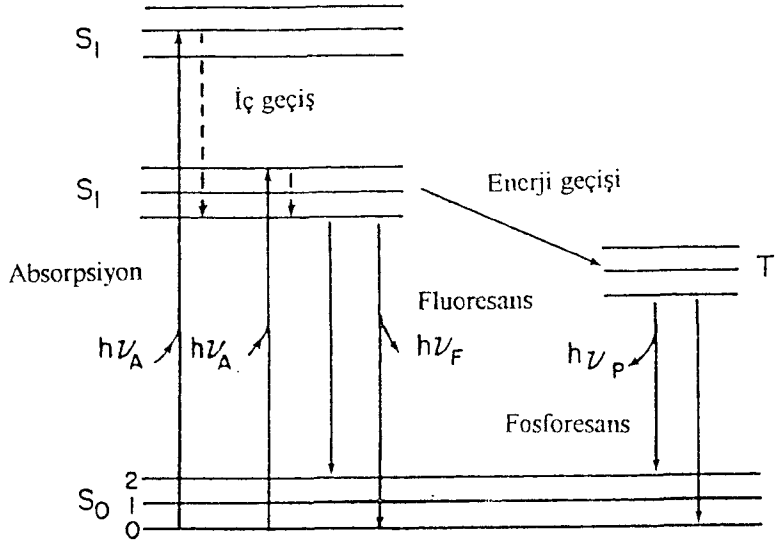
## 2.7 Floresans Spektroskopisi

Bir molekölün enerjisi, elektronik( $E_o$ ), vibrasyonel( $E_v$ ) ve rotasyonel( $E_r$ ) enerjilerin toplamından oluşmaktadır. Her bir elektronik enerji seviyesi bir seri vibrasyonel seviye bulundurmaktadır. Vibrasyonel seviyeler de birbirine oldukça yakın olarak yer alan rotasyonel seviyeler içermektedir. Genel bir kural olarak, oda sıcaklığında moleküllerin çoğunun temel elektronik halin en düşük vibrasyonel 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 rotasyonel seviyeler arası geçişler algılanamaz. Bazı moleküllerde vibrasyonel seviyelerin yerleşimi çok karmaşık değildir. Bu moleküllerdeki vibrasyonel seviyeler absorpsiyon spektrumunda bir seri maksimum noktası şeklinde izlenebilir.

Herhangi uyarılmış(excite) halin üst vibrasyonel seviyelerinde bulunan bir elektron, fazla vibrasyonel enerjisini çevresindeki moleküller ile çarpışma sırasında verebilir. Bu işlem vibrasyonel relaksasyon olarak adlandırılmaktadır. Bir molekölün, yüksek elektronik seviyenin düşük vibrasyonel seviyesinden, düşük elektronik seviyenin üst vibrasyonel seviyelerine geçişi ise "iç geçiş"(vibrational relaxation) olarak adlandırılmaktadır(Şekil 2.5). Kural olarak molekölün en düşük uyarılmış hali  $S_1$ 'in, en düşük vibrasyonel seviyesine geçişi gerçekleşir.  $S_1$  uyarılmış halde kalma süresi(lifetime of  $S_1$  state)  $10^{-9}$  saniye dolayında iken daha üst seviyelerde  $10^{-12}$  saniye kadar olmaktadır.

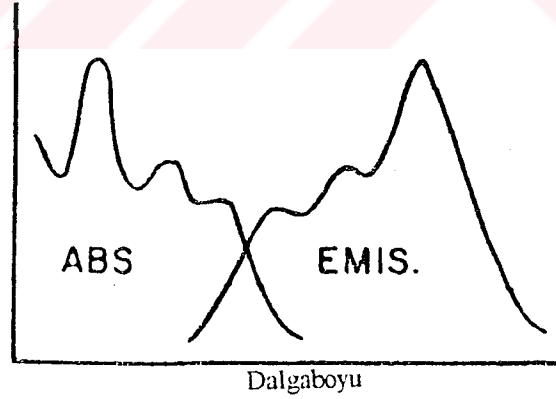
Uyarılmış singlet hal  $S_1$ 'in en düşük vibrasyonel seviyesinden temel hal  $S_o$ 'ın herhangi vibrasyonel-rotasyonel seviyelerine geçişte verilen emisyon floresans olarak adlandırılmaktadır. Triplet halden temel hale geçişte oluşan emisyon ise fosforesans denilmektedir(Şekil 2.5). Floresans maddenin uyarılmış halde kalma süresi floresans ömrü(lifetime) şeklinde isimlendirilir. Emisyonun yüksek hızda gerçekleştiği floresansta ömür  $10^{-8}$ s-10ns kadardır. Fosforesansta emisyon floresansa göre daha uzun sürede gerçekleşmekte ve ömür milisaniye düzeyinde olmaktadır(Lakowich, 1986; Demchenko, 2000).



Şekil 2.5 Jablonski diyagramı

### 2.7.1 Ayna Görüntüsü Kuralı

Bir molekülün absorpsiyon spektrumu elektronik olarak uyarılmış halin vibrasyonel seviyelerini yansıtmaktadır. Genellikle elektronik uyarma vibrasyonel seviyelerin yerleşim durumunu değiştirmedikten, emisyon spektrumu molekülün absorpsiyon spektrumunun ayna görüntüsüne çok yakındır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Fluoresans emisyonunda ayna görüntüsü

### 2.7.2 Stokes Kanunu

Enerjide meydana gelen kayıp nedeniyle, fluoresansın dalga boyu uyarıcı (excitation) ışığın dalga boyundan daima daha büyüktür. Kural olarak buhar fazındaki atomlar hariç, absorpsiyona göre

emisyonunda 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).

Polar çözücülerdeki indollerin floresans spektrumları Stokes shift'in orijini konusunda önemli bilgiler vermektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda, indol türevlerinin polaritesi farklı çözücülerde elde edilen floresans spektrumları, maksimum noktada meydana gelen Stokes shiftin çözücünün dielektrik sabiti ve kırılma indisi değerlerine bağlı olduğunu göstermektedir. (Gladchenko ve Pikulik, 1967; Andrews ve Forster, 1974; Kawski, 1974; Gryczynski ve Kawski, 1975; Sun ve Song, 1977). Bu deneysel çalışmaların sonuçları, temel hale kıyasla eksite haldeki dipol momentte önemli ölçüde değişme meydana geldiğini göstermiştir.

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).

### 2.7.3 Floresans Ömrü ve Kuantum Verimi

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

$$\phi = \Gamma / \Gamma + k \quad (2.1)$$

formülü ile ifade edilmektedir.

Floresans 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.

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

$$\tau = 1 / \Gamma + k \quad (2.2)$$

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, ışımada dışındaki iç geçişler v.b. ile enerji kayıpları meydana gelmediğinde hesaplanan fluoresans ömrüne "intrinsic" fluoresans ömrü denir ve

$$\tau_0 = 1 / \Gamma \quad (2.3)$$

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

$$\phi = \tau / \tau_0 \quad (2.4)$$

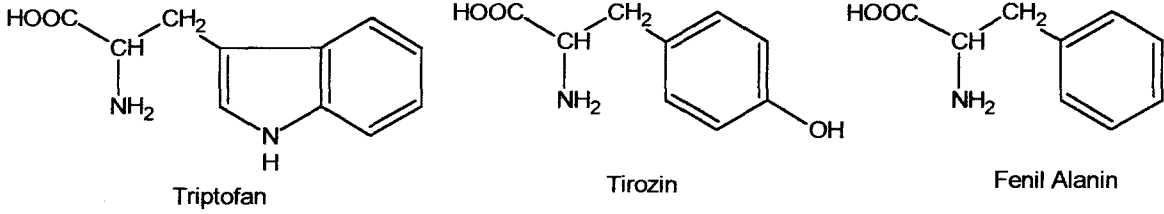
formülü ile verilmektedir (Lakowicz, 1986).

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

Triptofan ve triptofan türevlerinin fluoresans bozunmaları (decay) tek eksponensiyel kinetik tarzına uymaktadır. Triptofanın  $20^\circ\text{C}$ '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 eksponensiyel kinetikler kullanılmıştır (Ranyer ve Szabo, 1978). 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 eksponensiyel kinetikler kullanılmaktadır ve bileşenlerin değeri dalga boyuna bağlıdır (Szabo ve Rayner, 1980).

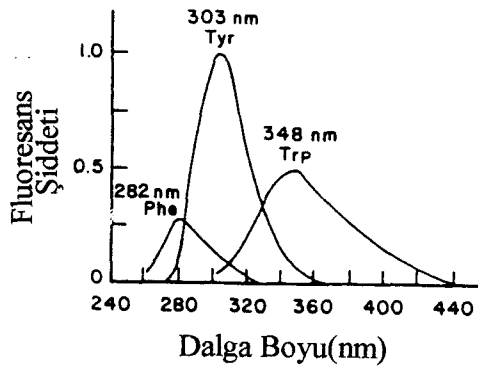
## 2.8 Protein ve üçlü Polimer-Metal-Protein Moleküllerinin Floresans Özelliklerinden Yararlanılarak İncelenmesi

Proteinlerin yapısında floresans veren üç aminoasit bulunmaktadır. Bunlar triptofan(trp) tirozin(tyr), ve fenil alanin(phe)'dir.

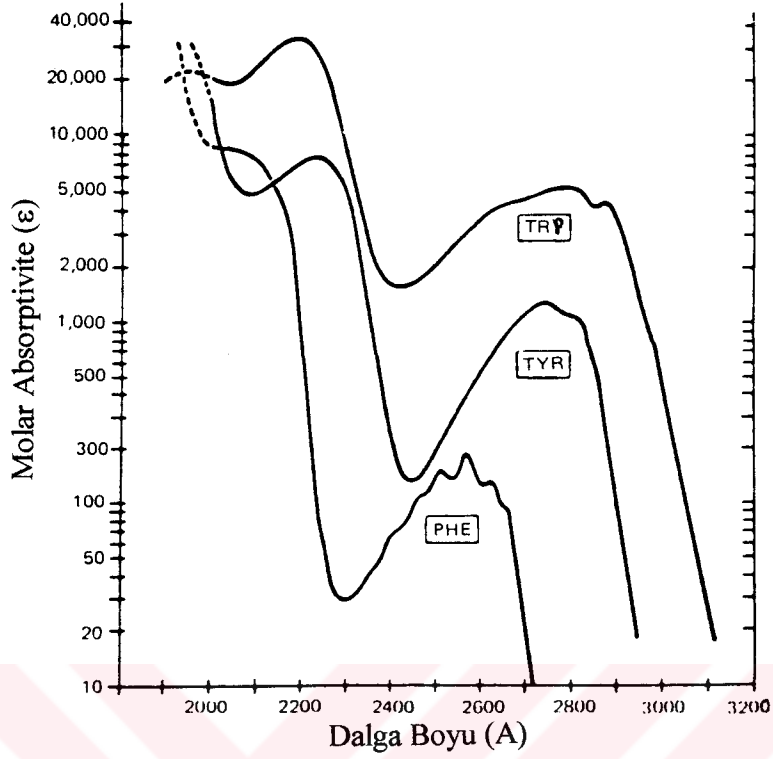


Bu aminoasitlerin absorpsiyon spektrumları Şekil 2.8'de gösterilmiştir. Ancak proteinlerde fenil alaninin kuantum verimi düşük değerde olduğundan, bu aminoasit artığından ileri gelen emisyon ihmal edilebilir olarak alınır. Floresans vermesi için proteinler genellikle 280nm dolayında dalga boyunda ışık ile uyarılmaktadırlar. Proteinlerin 280nm'de absorpsiyonu tirozin ve triptofan artıklarından ileri gelmektedir. Proteinlerde yalnızca triptofanın verdiği floresansı elde etmek için 290nm'den büyük dalga boyunda uyarma yapılmalıdır(Şekil 2.7, Şekil 2.8).

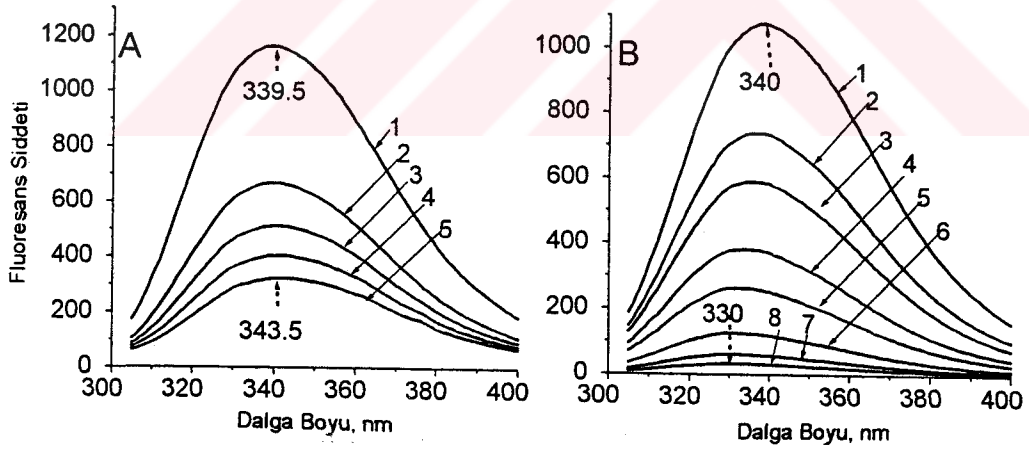
Floresans spektroskopisi protein molekülünün çözeltideki durumu hakkında bilgi vermektedir. Proteinlerin verdiği floresans çözeltilinin pH değeri, çözücünün dielektrik sabiti, sıcaklık gibi faktörlerden etkilenmektedir. Alınan floresans spektrumları, protein moleküllerinin substrat ile etkileşimi, elektron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



Şekil 2.7 Aromatik aminoasitlerin floresans emisyon spektrumları



Şekil 2.8 Aromatik aminoasitlerin absorpsiyon spektrumları



Şekil 2.9 BSA(A) ve PE(N-izopropilakrilamid-akrilik asit kopolimeri 1:1)+ BSA karışımı(B) çözeltilerine farklı konsantrasyonda  $\text{CuSO}_4(\text{Cu}^{2+})$  eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu.  $\text{CuSO}_4$  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 fluoresansının 1/5'ini teşkil eder), sulu çözücü tarafından erişilebilir triptofandır(Burstein vd., 1973).

Şekil 2.9A'da BSA'nın fluoresans şiddeti  $\text{Cu}^{2+}$  iyon konsantrasyonu arttıkça düşüyor. Bu demek oluyor ki BSA ile  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları etkileşime giriyor. Ayrıca dalga boyu artıyor(kırmızı bölgeye doğru kayıyor). Burada çok az etki altındaki sınıf 2 triptofan söndürülmesi arka plandadır, asıl olan yarıda bulunan 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 2.9B'de ise PE-BSA karışımına  $\text{Cu}^{2+}$  iyon konsantrasyonu ilavesi arttıkça fluoresans 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- $\text{Me}^{+n}$ -BSA kompleksi oluşmuştur(Filenko vd., 2001).

## 2.9 Biyomateryallerin Tıpta Kullanılması

Biyomateryal alanı emekleme aşamasını geçip insan yaşam kalitesini ciddi bir biçimde düzeltebilecek olgunluğa yaklaşmaktadır. Son zamanlarda yayınlanan, mikroplarca üretilen polimerlere aortik endotelial hücrelerin ekilmesiyle üretilen kalp kapakçıklarının in vivo koşullarda denenmesi haberleri bu gelişmenin bir örneğidir. Daha önceleri bu kalp kapakçığı ya bir ksenograft(büyük olasılıkla domuz kökenli) yada metal-pirolitik karbondan oluşan bir kompozit olurdu. Bu örnek tüm bir organı Doku Mühendisliği diye adlandırılan bir yöntem aracılığıyla üretmeye doğru büyük bir adımdır. Bu yöntem bize otolog hücreleri içine yükleyeceğimiz biyobozunur materyeller kullanarak tamir sürecini çok hızlandırma şansını vermektedir(Hasırcı, 2001).

Hidrofilik poliüretanüre(PUU) kopolimerleri kimyasal yapılarına bağlı olarak çok değişik özellikler gösteren sistemlerdir. Biyomateryal olarak yapay damar, yara bandı ve ilaçların zaman ayarlı olarak vücuda verilmesini sağlamak üzere kullanılmaktadır(Yılgör ve Yılgör, 2001).

Kemik çimentoları, kemik protezlerinin kemik içinde yerleştirilmesi amacıyla kullanılan polimerik materyallerdir. Kemik çimentosunun ana fonksiyonu vücut ağırlığını ve diğer yükleri protezden kemiğe aktarmak ve protez-kemik çimentosu-kemik sisteminin yük taşıma kapasitesini

arttırmaktır. Kemik çimentoları toz ve sıvı olmak üzere iki kısımdan oluşur. Toz kısmın başlıca elemanları önceden polimerleştirilmiş akrilat(özellikle polimetilmetakrilat), başlatıcı(genellikle benzoilperoksit) ve  $BaSO_4$  veya  $ZrO_2$ 'dir. Sıvı kısmın başlıca elemanları fazla miktarda metilmetakrilat monomeri, az miktarda bir hızlandırıcı(başlatıcıyı aktive etmek ve serbest radikal oluşturmak amacıyla, genellikle dimetil paratoluidin) ve inhibitör(polimerin kendi kendine polimerleşmesini önlemek amacıyla, genellikle hidrokinon)(Hasırcı, 2001).

Klasik adjuvantların alternatiflerinden biri immünolojik olmayan sentetik polielektrolitlerdir(PE). Bu tür polielektrolitler aynı anda taşıyıcı özellik de göstermektedirler. Farelerin PE-BSA'haptene veya PE-Cu<sup>2+</sup>-BSA'haptene polikompleksleri ile immünize edilmeleri birincil ve ikincil haptene(immünolojik özelliği olmayan ancak taşıyıcı bir moleküle bağlı olarak canlı vücuduna verildiğinde antikor oluşturan moleküldür) özgü immün cevaba sebep olmuştur. Polikompleksler, Hepatit B ve Şap antijenlerine özgü antikor oluşturdıkları gibi esteradiol, progesteron ve betuline özgü de antikor oluşumuna sebep olmaktadır(Mustafaev, 2001).

İntratekal ilaç salımı özellikle uzun ve yüksek dozda ağrı kesici gereksinimi olan kanser hastaları için yeni bir yaklaşım olarak gittikçe önem kazanmaktadır. Yapılan çalışmada poli(laktit-koglikolit) kullanılarak analjezik yada anestetik ilaç(hidromorfon, bupivakain, biphalin) içeren uzun, silindirik çubuklar hazırlanmıştır ve deneylerden oluşturulan analjezik(hidromorfon) çubukları amaca uygun olarak düşük doz ile uzun süreli etki sağlanmıştır, anestetik amaçla hazırlanan çubukların in vivo çalışmaları sürmektedir(Şendil vd., 2001).

Kitosan kontrollü ilaç salımı için ideal özelliklere sahip doğal bir polimerdir ve kitinin diasetile olmuş halidir. Gluteraldehit kullanarak değişik geçirgenlik özelliklerine sahip çapraz bağlı kitosan zarlar elde ederek bunların bir demir tutucusu olan desferal adlı ilacın kontrollü salım sistemi olarak denemeleri yapılmıştır. Sonuçta çapraz bağlı kitosanın demir tutucu ilaç desferal için uygun bir kontrollü salım sistemi olarak geliştirilebileceğini göstermiştir(Burke vd., 2001).

Kemik dokusu kayıplarında, kaybolan kemik bölgesinin  $\beta$ -TCP destekli poli(L-laktat) polimeri ile doldurulması ve bunun kemik iyileşmesine katkısı araştırılmıştır. Zamana bağlı olarak hasarlı bölgede yeni kemik şekillenmesi sağlanırken bir yandan da polimer parçalanarak ortadan kalkmaktadır. Böylece iyileşme tamamlandıktan sonra, malzemenin ikinci bir cerrahi işlemle vucüttan çıkarılmasına da gerek kalmamaktadır(Gürpınar vd., 2001).

Kanser tedavisinde ilaçların istenen etki bölgesine etkin ve hedeflendirilmiş taşınımı önem kazanmaktadır. Bu amaca ulaşmak için değerlendirilen çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler arasında biyoparçalanabilir polimerik mikroküreler dikkat çekmektedir. Beyin tümörlerinin tedavisi için antitümör bir ilaç olan mitoksantron(MTZ) yüklü poli(D,L-Laktid-ko-glikolid)(PLGA) mikroküreleri hazırlanarak partikül büyüklüğü, verim, ilaç yükleme ve salım karakteristikleri açısından in vitro şartlarda denenmiş ve MTZ mikroküreleri homojen dağılıma ve partikül büyüklüğü yaklaşık 25µm olarak belirlendi. Hazırlama verimi üretilen seriler için yaklaşık %60 idi. Salım çalışmaları sonucunda, daha düşük PLGA oranına sahip olan formülasyonlarda yüksek PLGA oranına sahip formülasyonlardan daha hızlı bir salım sağladığı belirlenmiştir(Bozdağ vd., 2001).



### **3. DENEYSEL KISIM**

#### **3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler**

##### **3.1.1 Kullanılan Cihazlar**

- “Quanta Master” PTI model spektroflore metre
- Schott CG840 model pH metre
- Cary 3 Bio UV-visible Spektrofotometre
- Kermanlar RCA marka magnetik karıştırıcı
- Sartorius Hassas Terazi
- Nüve EN500 etiv
- Jencons julabo vortex
- Costar pipet seti

**3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Dekstran sülfat	Sığır serum albumin
Sodyum hidroksit	Sodyum klorür
Potasyum hidrojen fosfat	Potasyum dihidrojen fosfat
PBS	Fosfat tamponu
Bakır sülfat	Çinko klorür
Kadmiyum sülfat	Nikel sülfat
Kobalt klorür	Mangan sülfat
Demir-3-klorür	Demir-2-sülfat

## 3.2 BSA(Bovine Serum Albumin)-Metal Komplekslerinin Floresans Özelliklerinin ve Absorbanslarının İncelenmesi

### 3.2.1 Kullanılan Çözeltiler

#### A) PBS Tamponu (pH:7,2)

52,2 gr  $K_2HPO_4$  600 ml suda çözüldü, üzerine 600 ml suda çözülmüş 27,2 gr  $KH_2PO_4$  ilave edildi ve karıştırıldı(pH: 7,2-7,4). Böylelikle fosfat tamponu hazırlanmış oldu. 8,4 gr NaCl'ün 20 ml fosfat tamponu ve 980 ml destile suda çözünmesiyle PBS tamponu hazırlandı.

#### B) BSA çözeltisi

1 mg BSA'nın 1 ml PBS tamponunda çözünmesiyle hazırlandı(pH  $\approx$ 7).

#### C) $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Co^{2+}$ ve $Mn^{2+}$ metallerinin çözeltisi

$Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ve  $Mn^{2+}$  metallerinin çözeltisinin konsantrasyonu  $0,625 \cdot 10^{-5}$  mM olacak şekilde, ancak floresans özelliğine bakıldığında  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  metallerinin eklenmesinden sonra oluşan yapının daha iyi görülmesi için bu metallerin çözeltileri ikinci kez konsantrasyonu diğerlerine nazaran on kat daha seyreltik  $0,625 \cdot 10^{-6}$  mM olacak şekilde saf suda hazırlandı. Buna göre;

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	156 mg/10 ml suda
$ZnCl_2$	83mg/10 ml suda
$CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$	160mg/10 ml suda
$NiSO_4 \cdot 7H_2O$	176,3mg/10 ml suda
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	148,7mg/10 ml suda
$MnSO_4 \cdot H_2O$	105,6mg/10 ml suda
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	168,75mg/10 ml suda
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	173,75mg/10 ml suda
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	16,875mg/10 ml suda
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	17,375mg/10 ml suda

olacak şekilde çözeltiler hazırlandı.

### 3.2.2 Deneyin Yapılışı

1mg/1ml olarak hazırlanan BSA çözeltisi ilk önce UV-visible spektrofotometre'de absorbans değerlerini okumak üzere küvete konur. Daha sonra herbir ayrı metal bu küvete 1 $\mu$ l olmak üzere eklenir(çökelti oluşuncaya kadar) ve böylelikle biz bu küvet içerisindeki BSA'yı bir nevi metallerle titre ederek absorbansı dalga boyu 280 nm'de ölçüldü. Yine aynı metodla bu sefer spektrofotometre(uyarma dalga boyu 280nm) ile floresans şiddetleri ve maksimumdaki dalga boyları(seyreltik Fe<sup>2+</sup> ve Fe<sup>3+</sup> kullanıldı) ölçüldü.

## 3.3 Poliakrilik Asit-Metal Komplekslerinin Absorbanslarının İncelenmesi

### 3.3.1 Kullanılan Çözeltiler

#### A) PBS Tamponu (pH:7,2)

52,2 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 600 ml suda çözüldü, üzerine 600 ml suda çözülmüş 27,2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ilave edildi ve karıştırıldı(pH: 7,2-7,4). Böylelikle fosfat tamponu hazırlanmış oldu. 8,4 gr NaCl'in 20 ml fosfat tamponu ve 980 ml destile suda çözülmesiyle PBS tamponu hazırlandı.

#### B) Poliakrilik Asit Polimer Çözeltisi

1 mg polimerin 1 ml PBS tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

#### C) Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> metallerinin çözeltisi

Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> metallerinin çözeltisinin konsantrasyonu 0,625.10<sup>-5</sup> mM olacak şekilde saf suda hazırlandı.

### 3.3.2 Deneyin Yapılışı

1mg/1ml olarak hazırlanan poliakrilik asit(PAA) çözeltisi ilk önce UV-visible spektrofotometre'de absorbans değerlerini okumak üzere küvete konur. Daha sonra herbir ayrı metal bu küvete 1 $\mu$ l'den başlamak üzere eklenir(çökelti oluşuncaya kadar) ve böylelikle biz bu küvet içerisindeki PAA'yı bir nevi metallerle titre ederek absorbansı, dalga boyu 400 nm'de ölçüldü.

### 3.4 Poliakrilik Asit-Metal-BSA Üçlü Komplekslerinin Floresans Özelliklerinin ve Absorbanslarının İncelenmesi

#### 3.4.1 Kullanılan Çözeltiler

##### A) PBS Tamponu (pH:7,2)

52,2 gr  $K_2HPO_4$  600 ml suda çözüldü, üzerine 600 ml suda çözülmüş 27,2 gr  $KH_2PO_4$  ilave edildi ve karıştırıldı(pH: 7,2-7,4). Böylelikle fosfat tamponu hazırlanmış oldu. 8,4 gr NaCl'ün 20 ml fosfat tamponu ve 980 ml destile suda çözünmesiyle PBS tamponu hazırlandı.

##### B) Poliakrilik Asit Polimer Çözeltisi

2 mg polimerin 1 ml PBS tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

##### C) BSA çözeltisi

2 mg BSA'nın 1 ml PBS tamponunda çözünmesiyle hazırlandı(pH  $\approx$ 7).

##### C) $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Co^{2+}$ ve $Mn^{2+}$ metallerinin çözeltisi

$Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  metallerinin çözeltisinin konsantrasyonu  $0,625 \cdot 10^{-5}$  mM olacak şekilde saf suda hazırlandı.

#### 3.4.2 Deneyin Yapılışı

Hazırlanan polimer ve protein çözeltileri birbirine karıştırıldı ve pH'ına bakıldı, pH'ın proteinin denatüre olmaması için nötr olması gerekir(pH'ı NaOH çözeltisi ile ayarlanır). Daha sonra bu karışım enaz yarım saat bekletildi. Elde edilen karışım önce ilk UV-visible spektrofotometre'de absorbans değerlerini(dalga boyu 280 nm'de) okumak üzere küvete kodu ve bu karışımın üzerine sırasıyla ayrı ayrı sekiz metal eklendi ve absorbans değerleri kayıt edildi. Yine aynı metolla floresans özelliğine(uyarma dalga boyu 280 nm) bakıldı ve sekiz ayrı metal için floresans şiddeti ve maksimumdaki dalga boyları kayıt edildi.

### 3.5 Dekstran Sülfat-Metal Komplekslerinin Absorbanslarının İncelenmesi

#### 3.5.1 Kullanılan Çözeltiler

##### A) PBS Tamponu (pH:7,2)

52,2 gr  $K_2HPO_4$  600 ml suda çözüldü, üzerine 600 ml suda çözülmüş 27,2 gr  $KH_2PO_4$  ilave edildi ve karıştırıldı(pH: 7,2-7,4). Böylelikle fosfat tamponu hazırlanmış oldu. 8,4 gr NaCl'ün 20 ml fosfat tamponu ve 980 ml destile suda çözünmesiyle PBS tamponu hazırlandı.

##### B) Dekstran Sülfat Polimer Çözeltisi

1 mg polimerin 1 ml PBS tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

##### C) $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Co^{2+}$ ve $Mn^{2+}$ metallerinin çözeltisi

$Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ve  $Mn^{2+}$  metallerinin çözeltisinin konsantrasyonu  $0,625 \cdot 10^{-5}$  mM olacak şekilde saf suda hazırlandı.

#### 3.5.2 Deneyin Yapılışı

1mg/1ml olarak hazırlanan Dekstran(DX) çözeltisi ilk önce UV-visible spektrofotometre'de absorbans değerlerini okumak üzere küvete konur. Daha sonra herbir ayrı metal bu küvete 1µl'den başlamak üzere eklenir(çökelti oluşuncaya kadar) ve böylelikle biz bu küvet içerisindeki DX'i bir nevi metallerle titre ederek absorbansı, dalga boyu 400 nm'de ölçüldü.

### 3.6 Dekstran Sülfat-Metal-BSA Üçlü Komplekslerinin Floresans Özelliklerinin ve Absorbanslarının İncelenmesi

#### 3.6.1 Kullanılan Çözeltiler

##### A) PBS Tamponu (pH:7,2)

52,2 gr  $K_2HPO_4$  600 ml suda çözüldü, üzerine 600 ml suda çözülmüş 27,2 gr  $KH_2PO_4$  ilave edildi ve karıştırıldı(pH: 7,2-7,4). Böylelikle fosfat tamponu hazırlanmış oldu. 8,4 gr NaCl'ün 20 ml fosfat tamponu ve 980 ml destile suda çözünmesiyle PBS tamponu hazırlandı.

**B) Dekstran Sülfat Polimer Çözeltisi**

2 mg polimerin 1 ml PBS tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

**C) BSA çözeltisi**

2 mg BSA'nın 1 ml PBS tamponunda çözünmesiyle hazırlandı(pH  $\approx$ 7).

**C)  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Mn}^{2+}$  metallerinin çözeltisi**

$\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Mn}^{2+}$  metallerinin çözeltisinin konsantrasyonu  $0,625 \cdot 10^{-5}$  mM olacak şekilde,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  metallerinin çözelti konsantrasyonu diğerlerine nazaran on kat daha seyreltik  $0,625 \cdot 10^{-6}$  mM olacak şekilde saf suda hazırlandı.

**3.6.2 Deneyin Yapılışı**

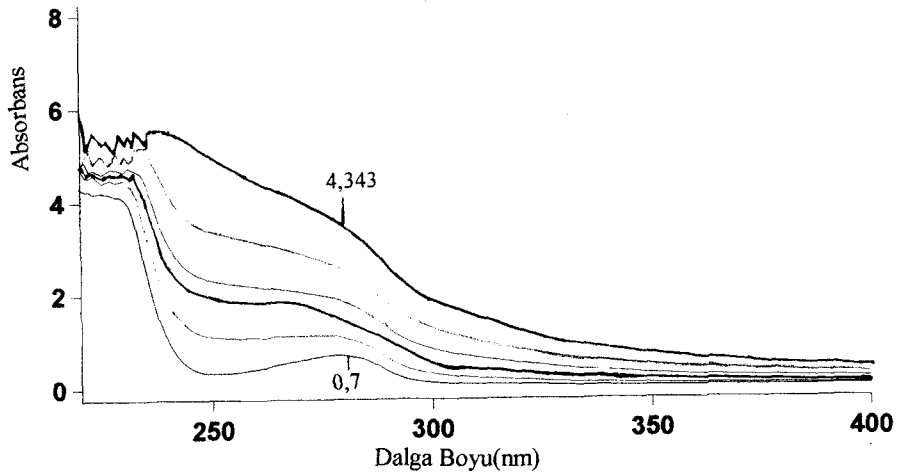
Hazırlanan polimer ve protein çözeltileri birbirine karıştırıldı ve pH'ına bakıldı, pH'ın proteinin denatüre olmaması için nötr olması gerekir(pH'ı NaOH çözeltisi ile ayarlıyoruz). Daha sonra bu karışım enaz yarım saat bekletildi. Elde edilen karışım önce ilk UV-visible spektrofotometre'de absorbans değerlerini(dalga boyu 280 nm'de) okumak üzere küvete kondu ve bu karışımın üzerine sırasıyla ayrı ayrı sekiz metal eklendi ve absorbans değerleri kayıt edildi. Yine aynı metodla floresans özelliğine(uyarma dalga boyu 280 nm) bakıldı ve sekiz ayrı metal için floresans şiddeti ve maksimumdaki dalga boyları(seyreltik  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  kullanıldı) kayıt edildi.

## 4. DENEYSEL SONUÇLAR

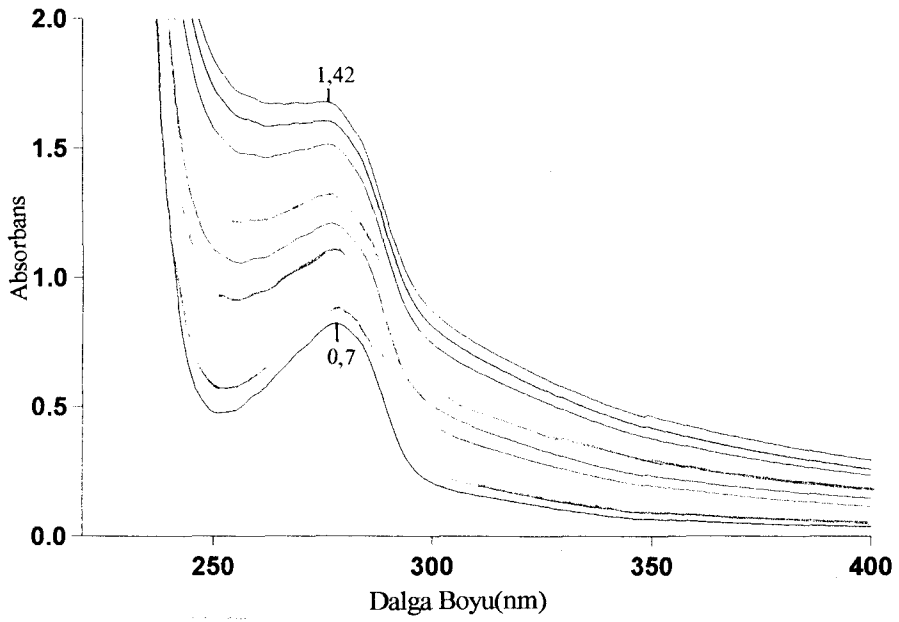
### 4.1 BSA(Bovine Serum Albumin)-Metal Komplekslerinin Absorbanslarının ve Floresans Özelliklerinin İncelenmesi

#### 4.1.1 Absorbans Sonuçları

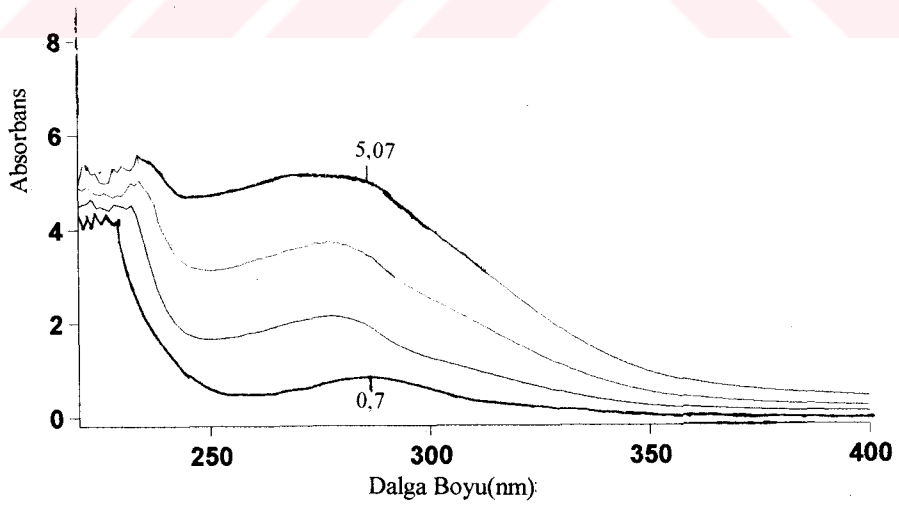
$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$	$A_{\text{Cu}}$	$A_{\text{Zn}}$	$A_{\text{Fe}^{3+}}$	$A_{\text{Fe}^{2+}}$	$A_{\text{Cd}}$	$A_{\text{Ni}}$	$A_{\text{Co}}$	$A_{\text{Mn}}$
$\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ (mM)								
0	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
$0,625 \cdot 10^{-5}$	1,12	0,8	2,15	1,04	0,772	0,75	0,75	0,8
$1,25 \cdot 10^{-5}$	1,93	0,88	3,72	3,26	1,238	0,747	0,79	1,17
$1,875 \cdot 10^{-5}$	2,577	0,98	5,07	4,46	1,64	0,74	1,00	1,51
$2,5 \cdot 10^{-5}$	3,53	1,06	...	...	2,19	0,746	1,24	2,03
$3,125 \cdot 10^{-5}$	4,343	1,12	...	...	2,67	0,747	1,93	2,42
$3,75 \cdot 10^{-5}$	...	1,334	...	...	3,25	0,756	2,3	2,79
$4,375 \cdot 10^{-5}$	...	1,42	...	...	3,5	0,766	2,66	...
$5 \cdot 10^{-5}$	...	...	...	...	...	0,78	...	...
$5,625 \cdot 10^{-5}$	...	...	...	...	...	0,8	...	...
$6,25 \cdot 10^{-5}$	...	...	...	...	...	0,85	...	...
$6,875 \cdot 10^{-5}$	...	...	...	...	...	0,89	...	...
$7,5 \cdot 10^{-5}$	...	...	...	...	...	0,92	...	...
$8,125 \cdot 10^{-5}$	...	...	...	...	...	0,98	...	...
$8,75 \cdot 10^{-5}$	...	...	...	...	...	1,02	...	...
$9,375 \cdot 10^{-5}$	...	...	...	...	...	1,06	...	...
$10 \cdot 10^{-5}$	...	...	...	...	...	1,1	...	...



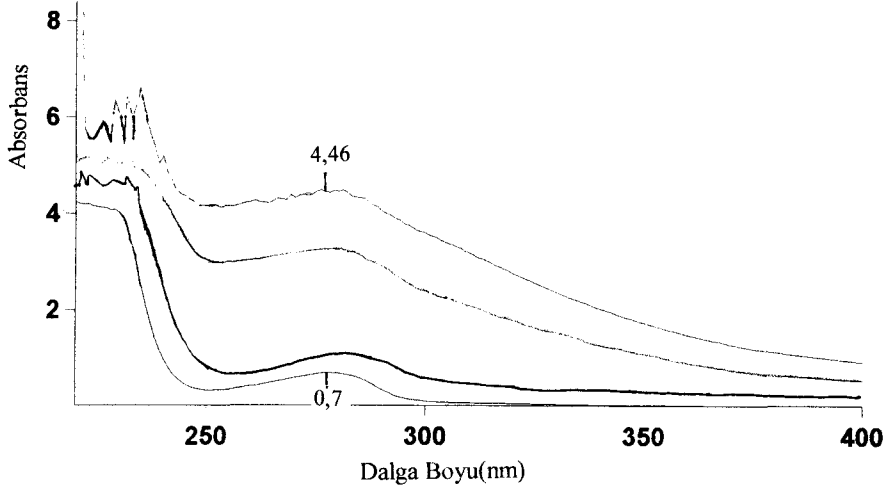
Şekil 4.1 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.  $\text{Cu}^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$  (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125.



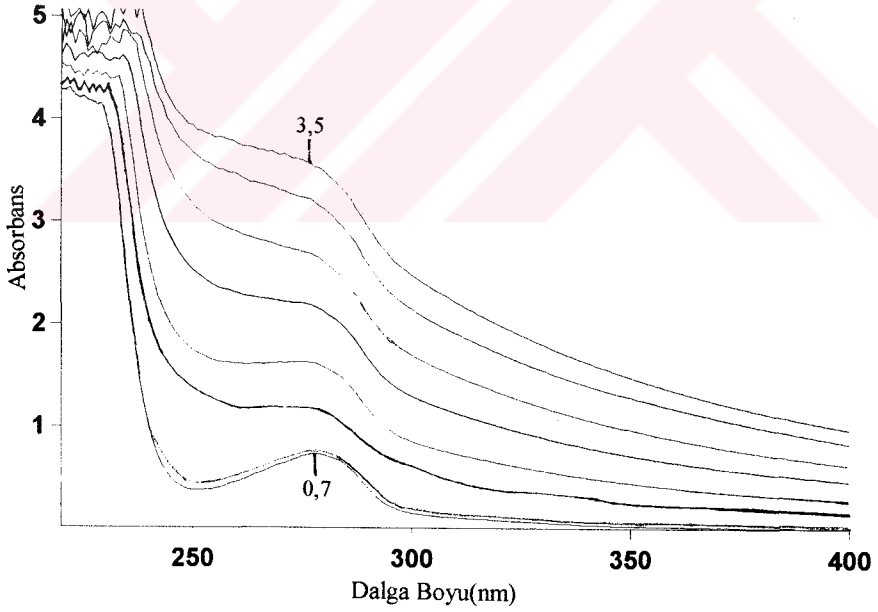
Şekil 4.2 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Zn<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Zn<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75.



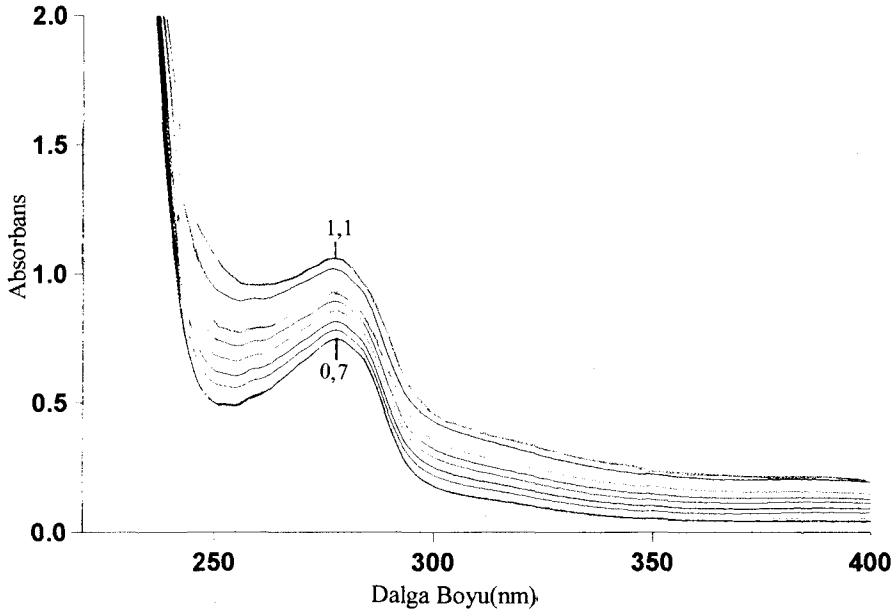
Şekil 4.3 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Fe<sup>3+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Fe<sup>3+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875.



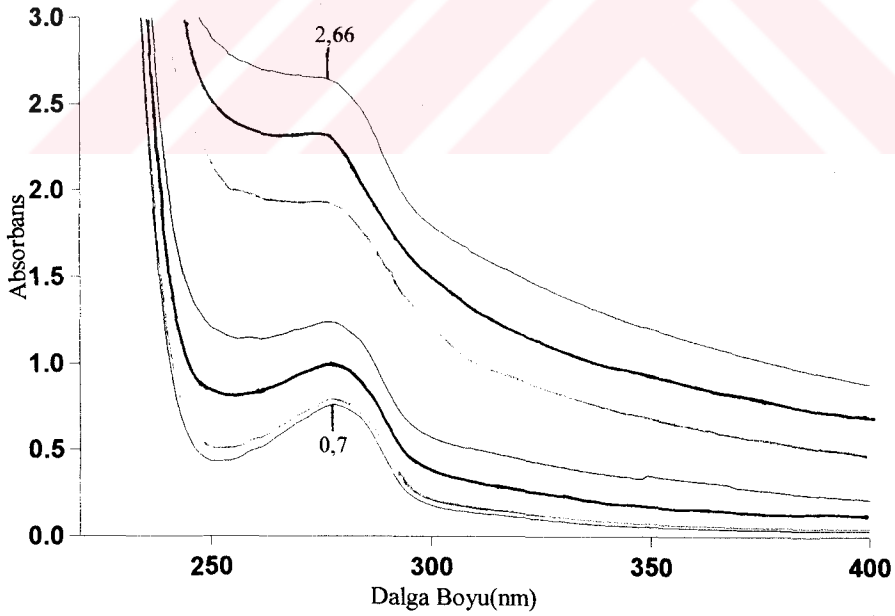
Şekil 4.4 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine  $Fe^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.  $Fe^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875.



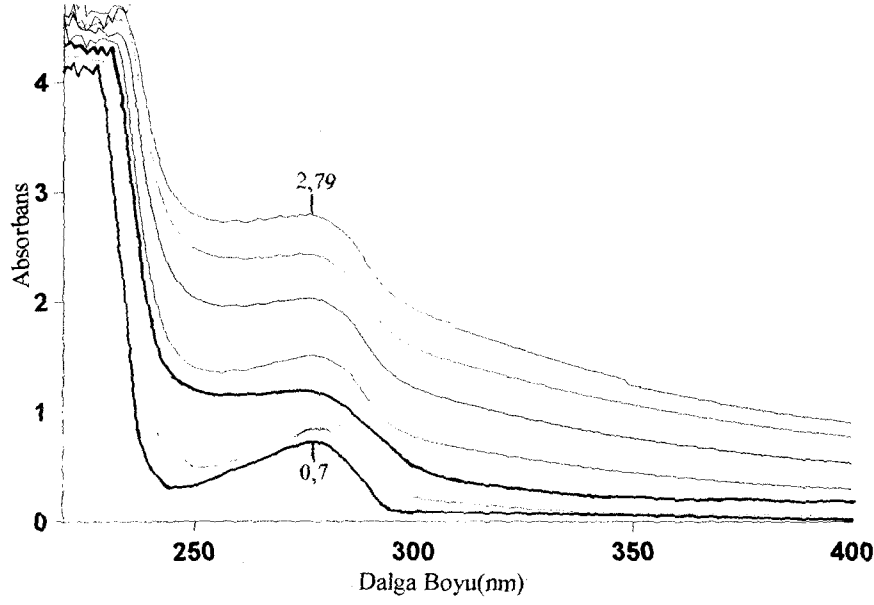
Şeki 4.5 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine  $Cd^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.  $Cd^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375.



Şekil 4.6 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Ni<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Ni<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625; 11-6,25; 12-6,875; 13-7,5; 14-8,125; 15-8,75; 16-9,375; 17-10.



Şekil 4.7 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Co<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Co<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375.



Şekil 4.8 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine  $Mn^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.  $Mn^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$  (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75.

### Hesaplamalar

$n_{Me} / n_{BSA} = C_{Me} \times M_{BSA} / C_{BSA} \times M_{Me}$  formülünden,  $n_{Me} / n_{BSA}$  oranı hesaplanır.

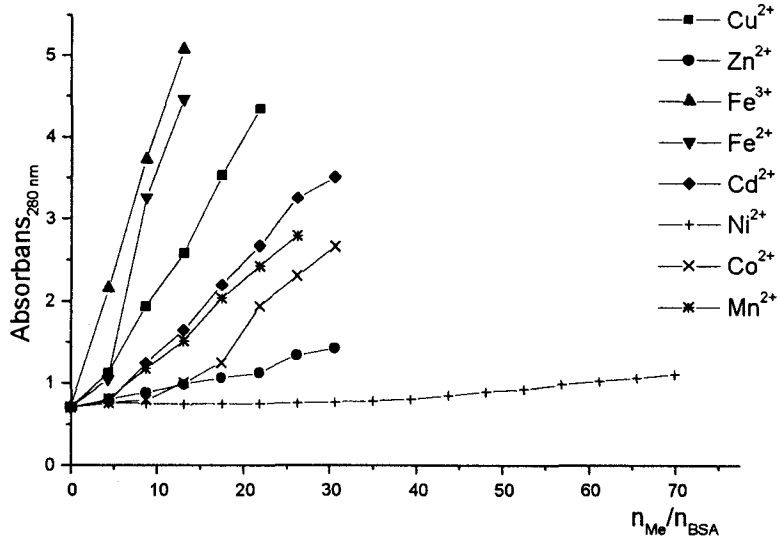
$n_{Me} = C_{Me} / M_{Me} = 0,625 \cdot 10^{-5}$  mM (1'er  $\mu$ l eklendi) kullanılan tüm metallerde aynıdır.

$C_{BSA} = 0,1$  g/ml

$M_{BSA} = 70000$  Dalton

$n_{Me} / n_{BSA} = 0,625 \cdot 10^{-5} \cdot 70000 / 0,1 = 4,375; 8,75; 13,125; 17,5; 21,875; 26,25; 30,325 \dots$

$n_{Me} / n_{BSA}$  değerlerini x-eksenine absorbans değerlerini de y-eksenine konarak aşağıdaki grafik elde edilir.



Şekil 4.9 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucunda 280nm’de ölçülen absorbans değerlerinin  $n_{Me} / n_{BSA}$  ile değişim grafiği.

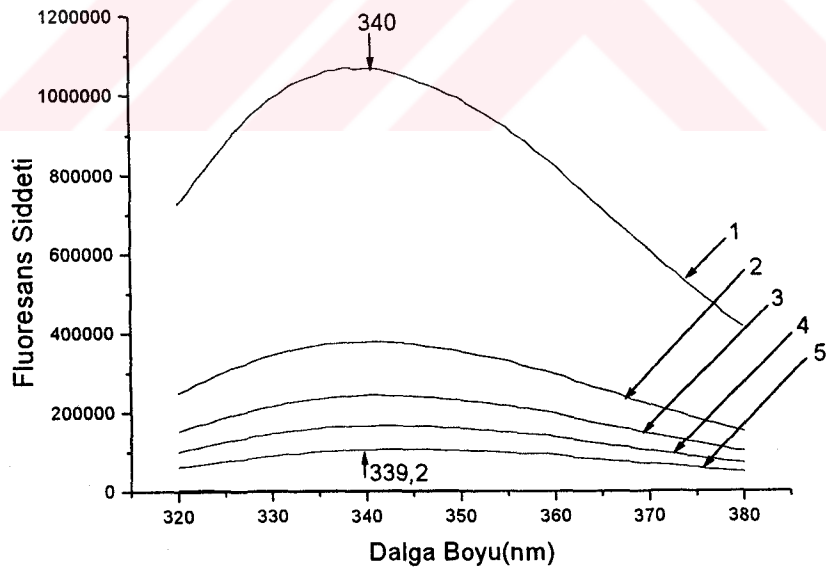
#### 4.1.2 Floresans Sonuçları

Floresans Şiddetleri.  $10^{+5}$

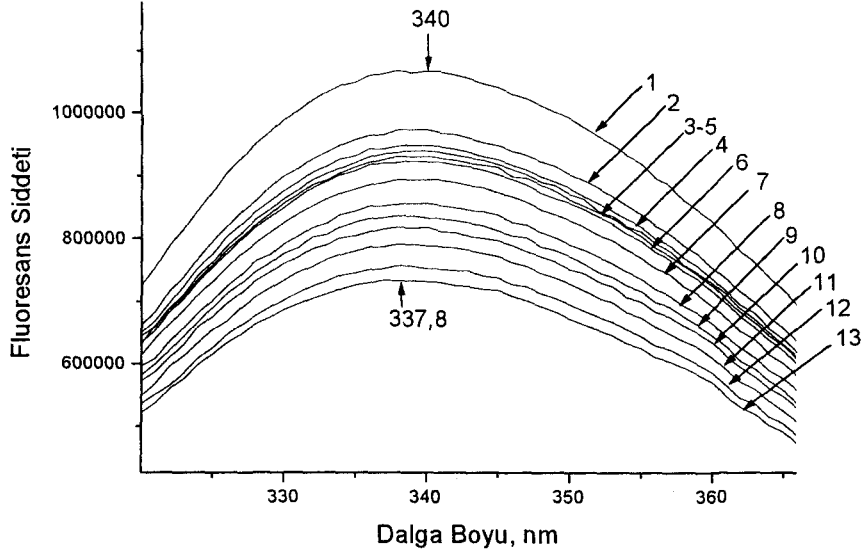
$Cu^{2+}$	$Zn^{2+}$	$Fe^{3+}$	$Fe^{2+}$	$Cd^{2+}$	$Ni^{2+}$	$Co^{2+}$	$Mn^{2+}$
10,56	10,56	10,56	10,56	10,56	10,56	10,56	10,56
3,7	9,7	10,362	10,52	10,18	10,07	9,5	10,12
2,4	9,36	10,173	10,352	9,2	9,6	9,3	9,66
1,65	9,44	9,842	10,126	8,65	9,3	9,2	9,4
1,043	9,3	9,672	9,909	8,16	9,3	8,88	8,69
...	9,2	9,351	9,653	7,65	9,1	8,5	8,5
...	8,92	9,115	9,38	6,8	8,9	7,67	7,9
...	8,55	8,917	9,143	6,3	8,78	7,26	7,6
...	8,37	8,709	8,784	6,04	8,67	6,94	7,2
...	8,2	8,52	8,633	5,75	8,55	6,67	7,1
...	7,9	8,388	8,416	...	8,3	...	7,1
...	7,36	8,133	8,293	...	...	...	...
...	7,33	...	8,104	...	...	...	...
...	...	...	8,00	...	...	...	...
...	...	...	7,89	...	...	...	...

maksimum dalga boyu(nm)

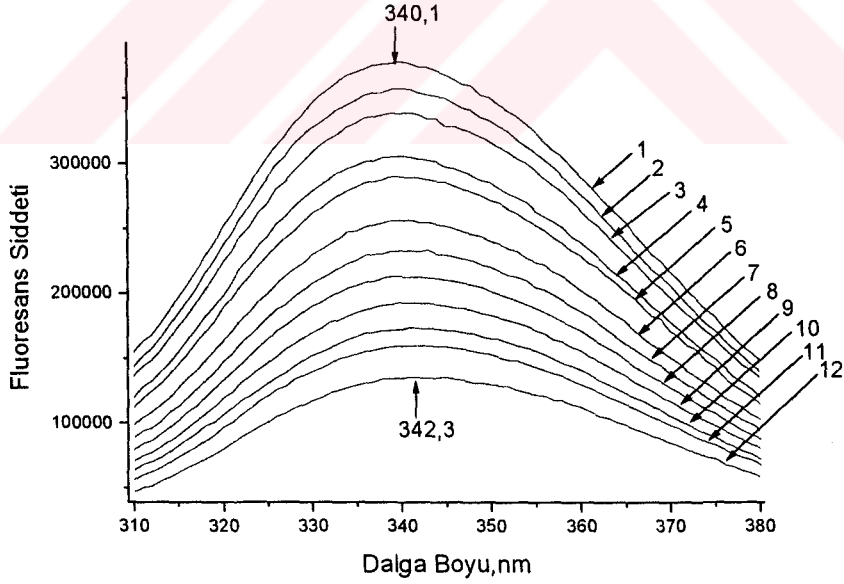
Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
340	340	340,1	340,1	340	340	340	340
340	339,3	340,3	340,1	339,9	339,7	339,2	339,9
339,9	339,3	340,7	339,5	339,7	339,2	339,2	339,5
339,6	338,9	340,9	339,5	339,6	339,1	339,1	339,2
339,2	338,7	340,9	340	338,9	339,1	339	339,1
...	339,5	340,9	340	338,8	339	339,1	339,1
...	338,9	341	340,4	338,5	339	338,9	338,8
...	338,5	341,8	340,6	338,6	339	338,9	338,8
...	338,5	341,7	340,6	338,3	339	338,8	338,4
...	338,2	342	340,7	338,2	339	338,8	338,1
...	338,1	342	340,9	...	339	...	338,1
...	338,1	342,3	341	...	...	...	...
...	337,8	...	342,2	...	...	...	...
...	...	...	342,2	...	...	...	...
...	...	...	342,4	...	...	...	...



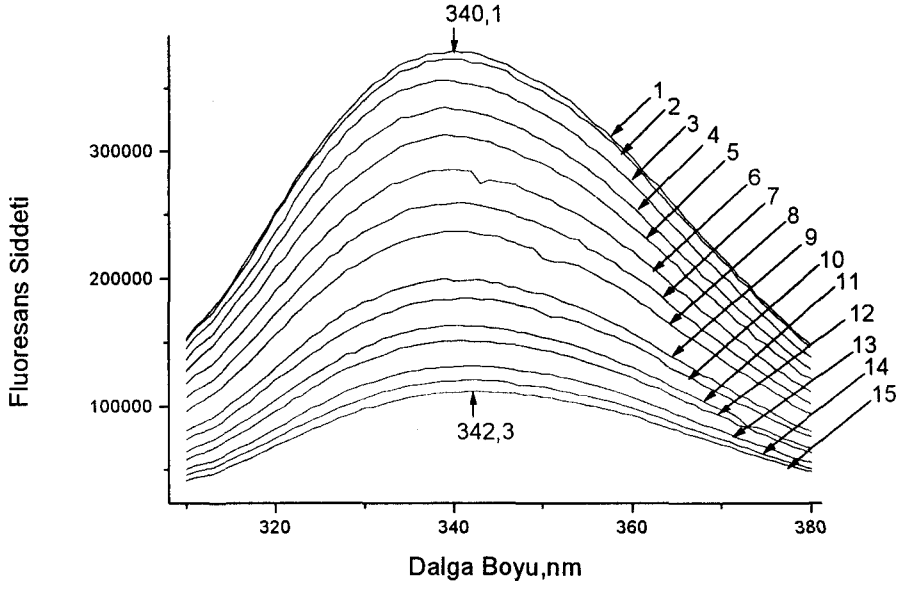
Şekil 4.10 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine Cu<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu. Cu<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5.



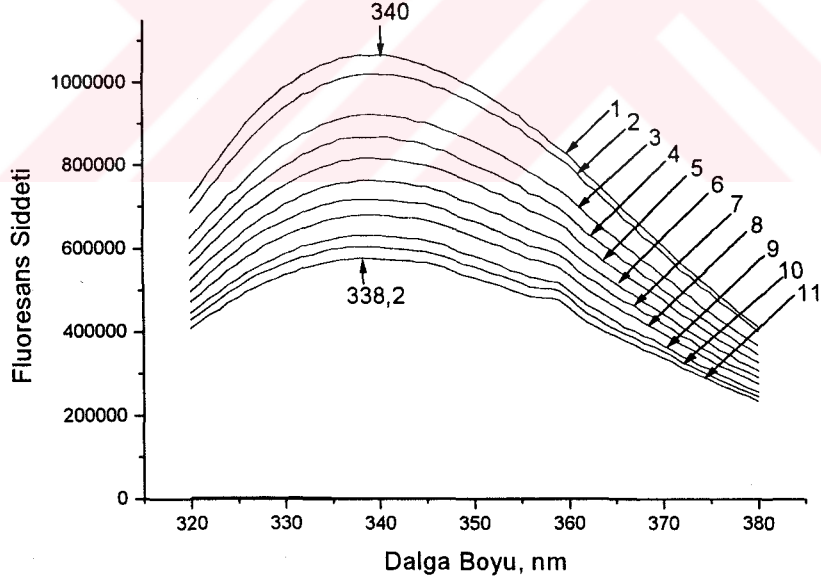
Şekil 4.11 BSA(1 mg/1ml) çözeltisi üzerine  $Zn^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.  $Zn^{2+}$  konsantrasyonu  $\cdot 10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625; 11-6,25; 12-6,875; 13-7,5.



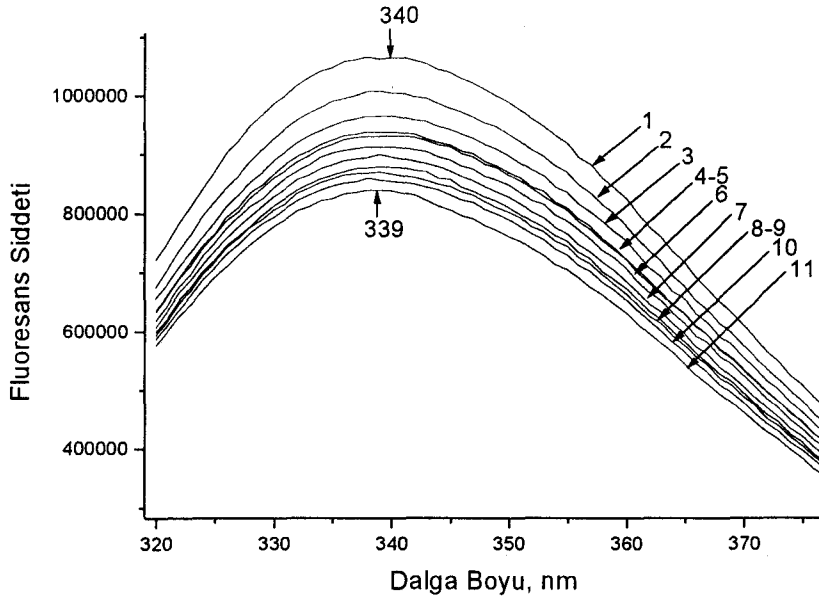
Şekil 4.12 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine  $Fe^{3+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.  $Fe^{3+}$  konsantrasyonu  $\cdot 10^{-6}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625; 11-6,25; 12-6,875.



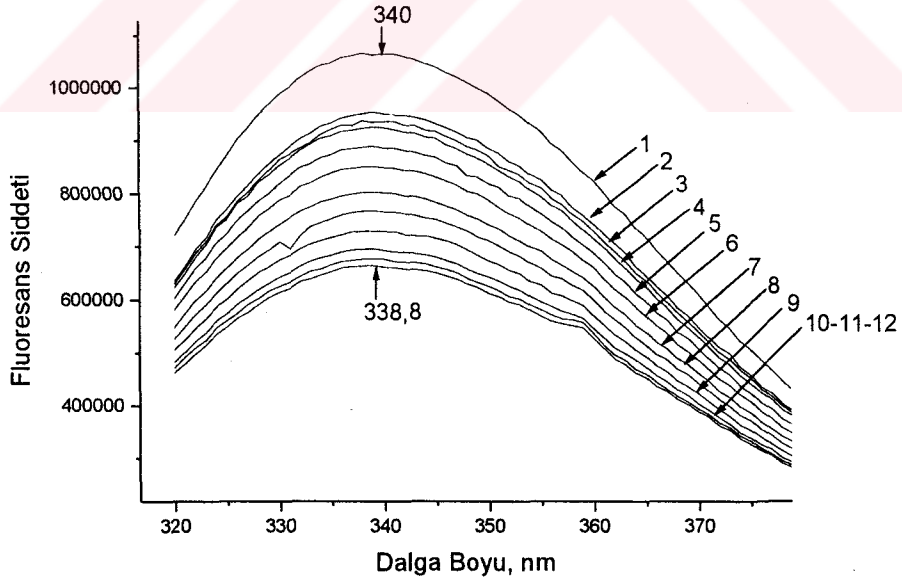
Şekil 4.13 BSA(1 mg/1ml) çözeltisi üzerine  $Fe^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu.  $Fe^{2+}$  konsantrasyonu  $\cdot 10^{-6}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625; 11-6,25; 12-6,875; 13-7,5; 14-8,125; 15-8,75.



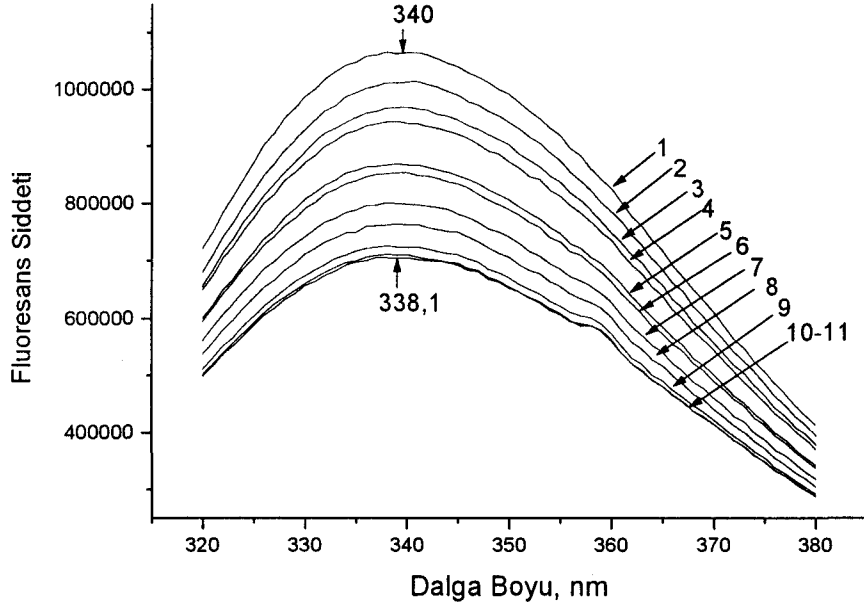
Şekil 4.14 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine  $Cd^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu.  $Cd^{2+}$  konsantrasyonu  $\cdot 10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625; 11-6,25.



Şekil 4.15 BSA(1 mg/1ml) çözeltisi üzerine  $\text{Ni}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu.  $\text{Ni}^{2+}$  konsantrasyonu  $\cdot 10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625; 11-6,25.



Şekil 4.16 BSA(1 mg/1ml) çözeltisi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu.  $\text{Co}^{2+}$  konsantrasyonu  $\cdot 10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625; 11-6,25; 12-6,875.



Şekil 4.17 BSA(1 mg/1ml) çözeltisi üzerine Mn<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu. Mn<sup>2+</sup> konsantrasyonu .10<sup>-5</sup>(mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625; 11-6,25.

### Hesaplamalar

$n_{Me} / n_{BSA} = C_{Me} \times M_{BSA} / C_{BSA} \times M_{Me}$  formülünden,  $n_{Me} / n_{BSA}$  oranı hesaplanır.

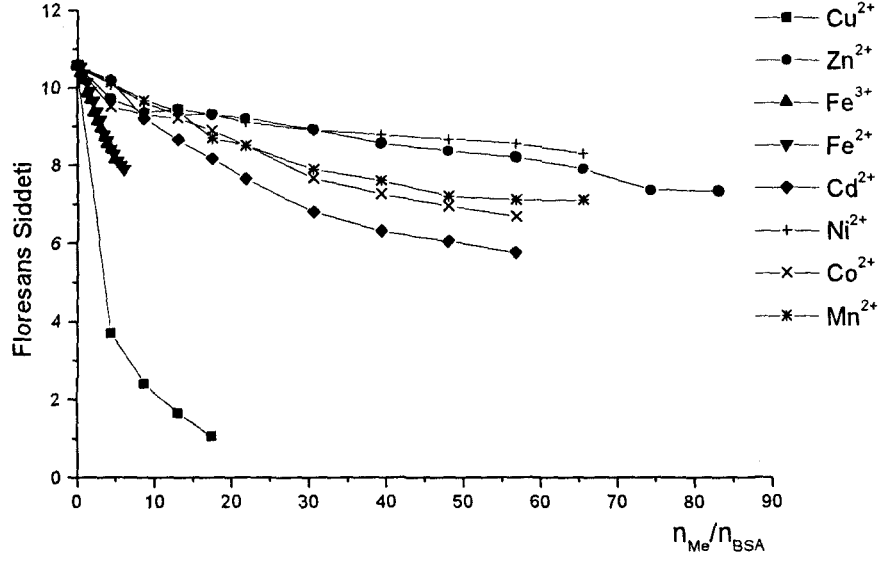
$n_{Me} = C_{Me} / M_{Me} = 0,625 \cdot 10^{-5}$  mM(1'er µl eklendi) kullanılan Fe<sup>2+</sup> ve Fe<sup>3+</sup>( $0,625 \cdot 10^{-6}$  mM) hariç diğer metallerde aynıdır.

$C_{BSA} = 0,1$  g/ml

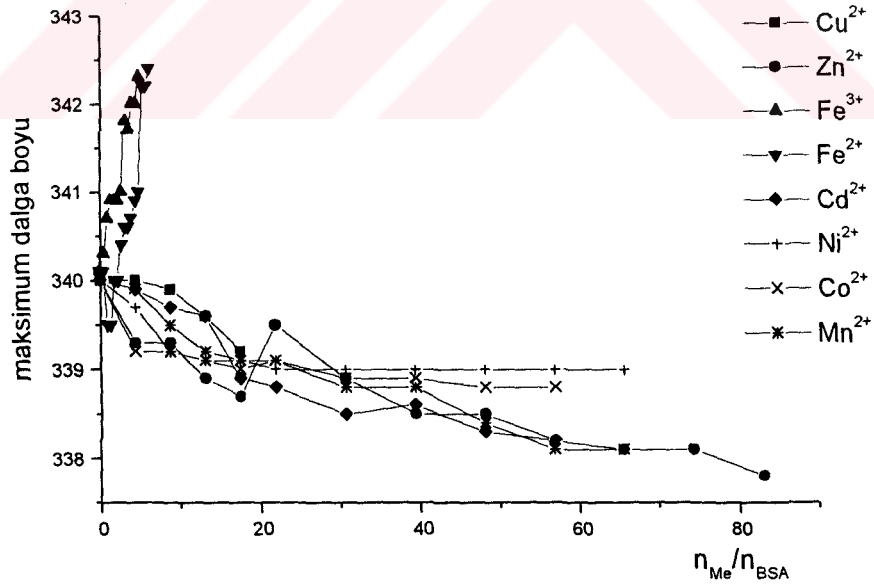
$M_{BSA} = 70000$  Dalton

$n_{Me} / n_{BSA} = 0,625 \cdot 10^{-5} \cdot 70000 / 0,1 = 4,375; 8,75; 13,125; 17,5; 21,875; 26,25; 30,325 \dots$  (Fe<sup>2+</sup> ve Fe<sup>3+</sup> için ise, 0,4375; 0,875; 1,3125; 1,75 şeklindedir).

$n_{Me} / n_{BSA}$  değerlerini x-eksenine, fluoresans şiddeti ve maksimum dalga boyu değerlerini de y-eksenine konarak aşağıdaki grafik elde edilir.



Şekil 4.18 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucunda 280nm'de uyarma ile fluoresans spektrumlarından okunan fluoresans şiddeti değerlerinin  $n_{Me}/n_{BSA}$  ile değişim grafiği.



Şekil 4.19 BSA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucunda 280nm'de uyarma ile fluoresans spektrumlarından okunan maksimum dalga boyunun  $n_{Me}/n_{BSA}$  ile değişim grafiği.

## 4.2 Poliakrilik Asit-Metal Komplekslerinin Absorbanslarının İncelenmesi

### 4.2.1 Absorbans Sonuçları

Cu <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> Cd <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Fe <sup>2+</sup> (mM)	A <sub>Cu</sub>	A <sub>Zn</sub>	A <sub>Fe<sup>3+</sup></sub>	A <sub>Fe<sup>2+</sup></sub>	A <sub>Cd</sub>	A <sub>Ni</sub>	A <sub>Co</sub>	A <sub>Mn</sub>
0	0	0,0013	0,0002	0	0,0016	0,002	0,0017	0,0012
0,625. 10 <sup>-5</sup>	0,0007	0,0026	0,0213	0	0,0021	0,0033	0,004	0,0035
1,25. 10 <sup>-5</sup>	0,0021	0,0032	0,0284	0	0,0028	0,0065	0,0045	0,0078
1,875. 10 <sup>-5</sup>	0,004	0,0054	0,0454	0,0014	0,007	0,0067	0,0067	0,0109
2,5. 10 <sup>-5</sup>	0,014	0,007	0,0559	0,0026	0,0076	0,0076	0,0075	0,0138
3,125. 10 <sup>-5</sup>	0,0101	0,0051	0,0734	0,006	0,008	0,0094	0,0081	0,0141
3,75. 10 <sup>-5</sup>	0,0134	0,0059	0,085	0,0067	0,0073	0,011	0,0082	0,0136
4,375. 10 <sup>-5</sup>	0,0148	0,0066	0,103	0,0077	0,009	0,0109	0,0083	0,0166
5. 10 <sup>-5</sup>	0,0163	0,08	0,1158	0,0138	0,0012	0,0106	0,0116	0,0174
5,625. 10 <sup>-5</sup>	0,0168	0,0079	0,133	...	0,0116	0,01	0,0118	0,0152
6,25. 10 <sup>-5</sup>	0,0186	0,0079	...	...	0,0124	0,0114	0,0139	0,0144
6,875. 10 <sup>-5</sup>	0,0199	0,0115	...	...	0,0117	...	0,131	0,0149
7,5. 10 <sup>-5</sup>	0,0211	0,0082	...	...	0,0123	...	0,13	0,0153
8,125. 10 <sup>-5</sup>	0,0217	0,0124	...	...	0,0118	...	0,127	0,0161
8,75. 10 <sup>-5</sup>	0,0255	0,0089	...	...	...	...	...	...
9,375. 10 <sup>-5</sup>	0,0241	0,0013	...	...	...	...	...	...
10. 10 <sup>-5</sup>	0,024	0,0026	...	...	...	...	...	...

### Hesaplamalar

$n_{Me} / n_{PAA} = C_{Me} \times M_{PAA} / C_{PAA} \times M_{Me}$  formülünden,  $n_{Me} / n_{PAA}$  oranı hesaplanır.

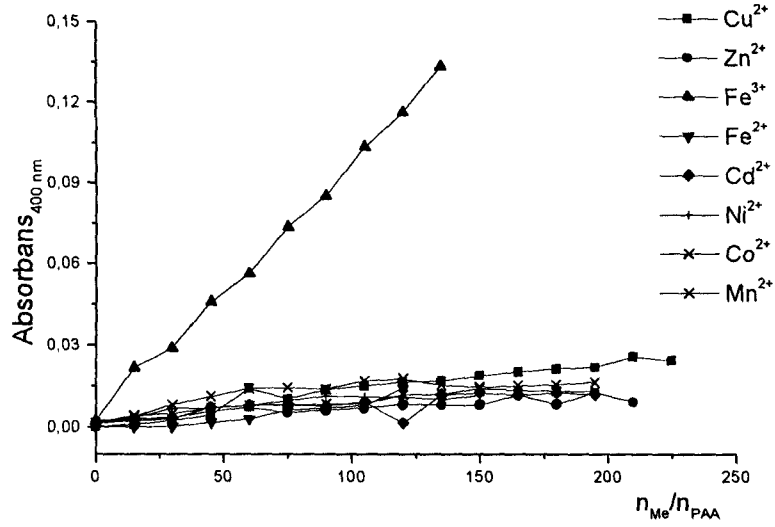
$n_{Me} = C_{Me} / M_{Me} = 0,625.10^{-5}$  mM(1'er µl eklendi) kullanılan tüm metallerde aynıdır.

$C_{PAA} = 0,1$  g/ml

$M_{Me} = 240000$

$n_{Me} / n_{PAA} = 0,625.10^{-5} \cdot 240000 / 0,1 = 15; 30; 45; 60; 75; 90; 105; 120; 135; 150; 165; 180.....$

$n_{Me} / n_{PAA}$  değerlerini x-eksenine absorbans değerlerini de y-eksenine konarak aşağıdaki grafik elde edilir.

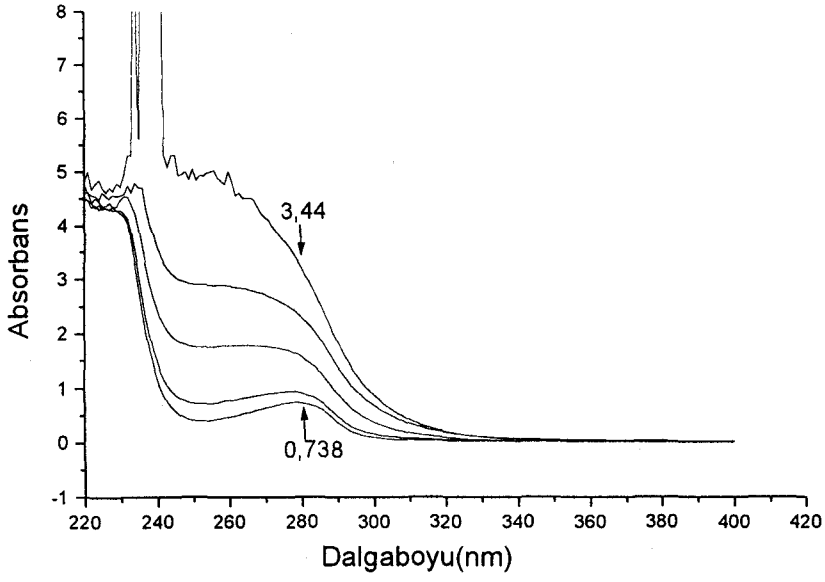


Şekil 4.20 PAA(1mg/1ml) çözeltisi üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucunda 400nm'de ölçülen absorbans değerlerinin  $n_{Me}/n_{BSA}$  ile değişim grafiği.

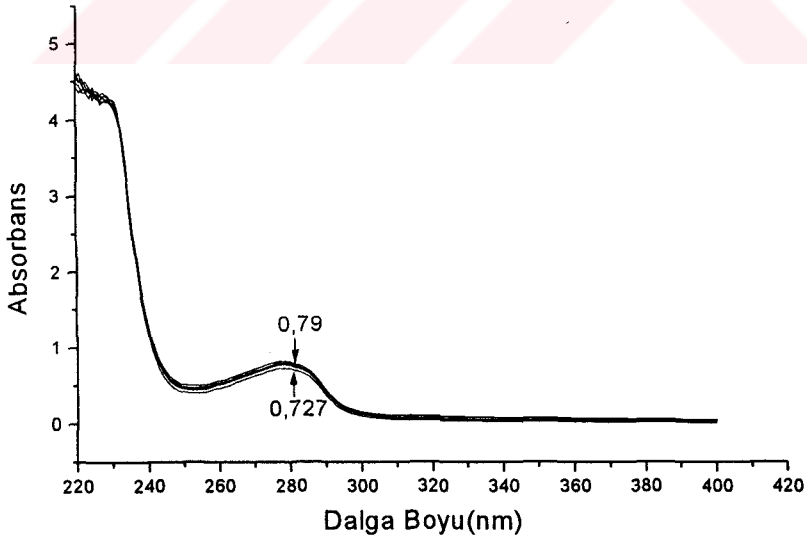
### 4.3 Poliakrilik Asit-Metal-BSA Üçlü Komplekslerinin Absorbanslarının ve Floresans Özelliklerinin İncelenmesi

#### 4.3.1 Absorbans Sonuçları

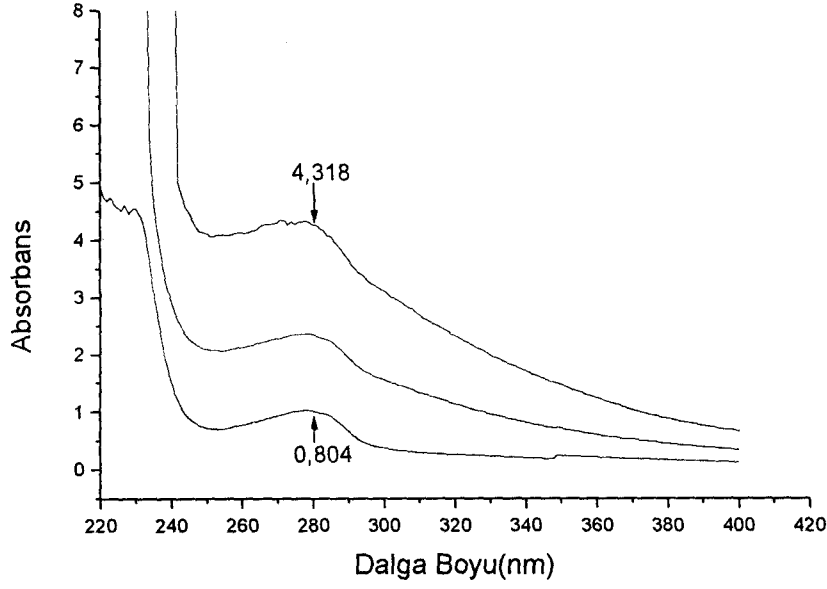
$Cu^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}$	$A_{Cu}$	$A_{Zn}$	$A_{Fe^{3+}}$	$A_{Fe^{2+}}$	$A_{Cd}$	$A_{Ni}$	$A_{Co}$	$A_{Mn}$
$Cd^{2+}, Fe^{3+}, Fe^{2+}$ (mM)								
0	0,738	0,727	0,804	0,805	0,72	0,726	0,718	0,734
$1,25 \cdot 10^{-5}$	0,929	0,818	2,36	1,598	0,72	0,721	0,769	0,723
$2,5 \cdot 10^{-5}$	1,953	0,772	4,318	2,2	0,72	0,715	0,767	0,716
$3,75 \cdot 10^{-5}$	1,641	0,774	...	3,1	0,72	0,71	0,74	0,711
$5 \cdot 10^{-5}$	2,424	0,791	...	...	0,71	0,705	0,72	0,718
$6,25 \cdot 10^{-5}$	3,44	0,790	...	...	0,70	0,806	0,719	0,728
$7,5 \cdot 10^{-5}$	...	...	...	...	0,72	0,725	0,712	...



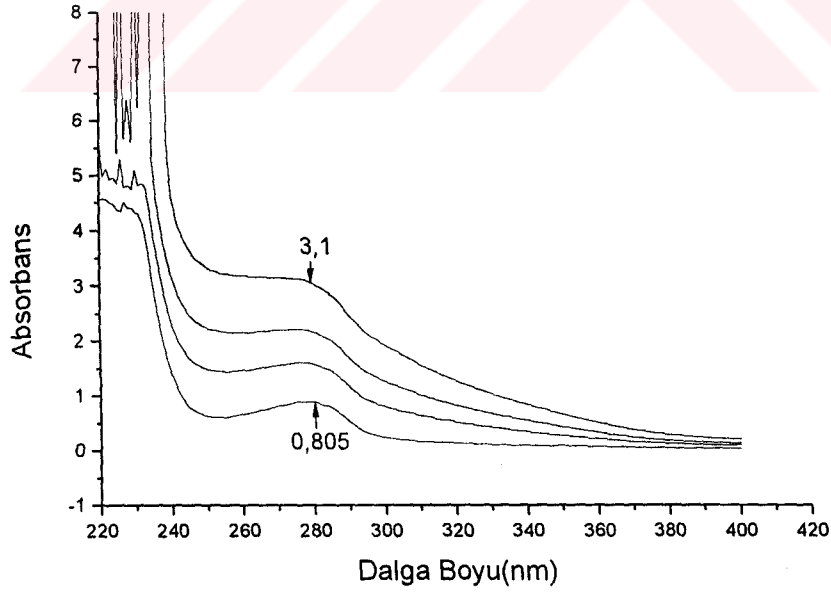
Şekil 4.21 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.  $\text{Cu}^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-1,25; 3-2,5; 4-3,75; 5-5.



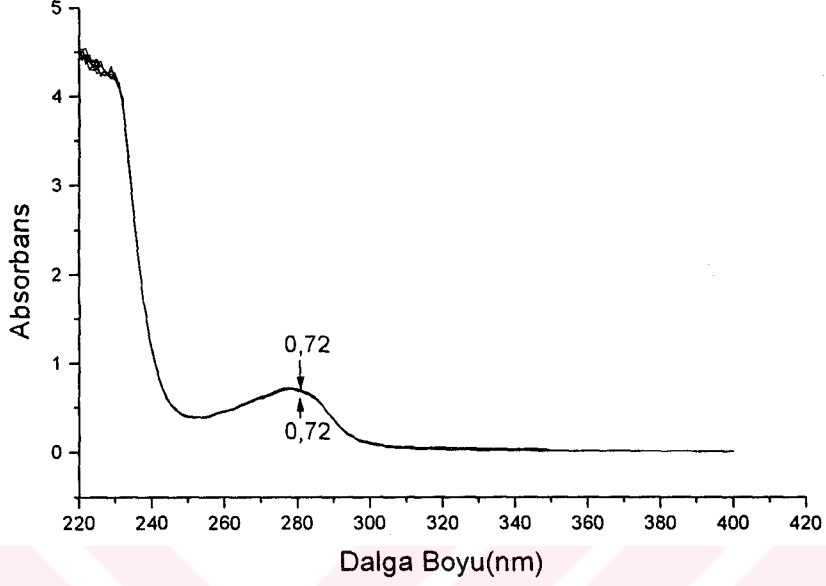
Şekil 4.22 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine  $\text{Zn}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.  $\text{Zn}^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-1,25; 3-2,5; 4-3,75; 5-5; 6-6,25.



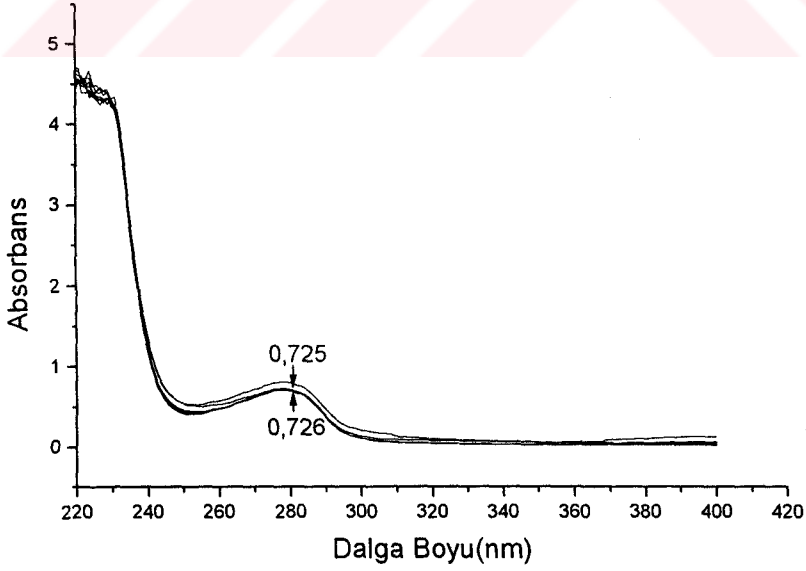
Şekil 4.23 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Fe<sup>3+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Fe<sup>3+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM):1-0; 2-1,25; 3-2,5.



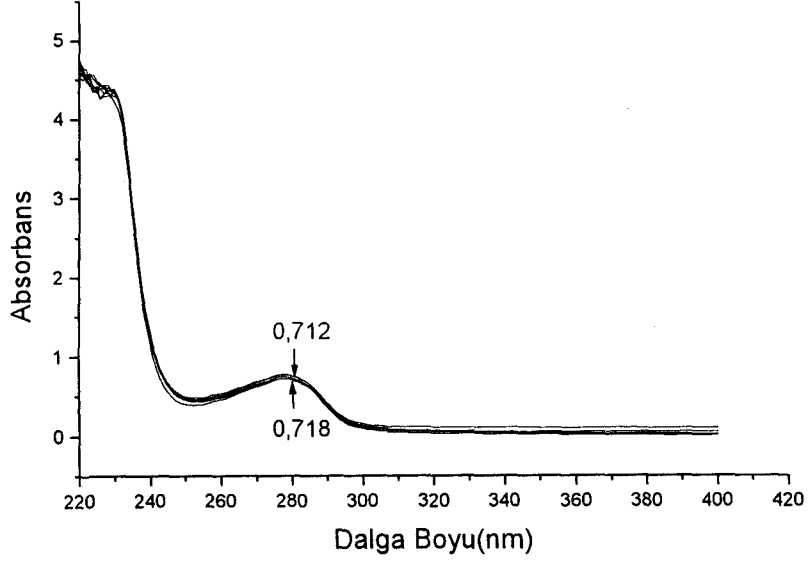
Şekil 4.24 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Fe<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Fe<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM):1-0; 2-1,25; 3-2,5; 4-3,75.



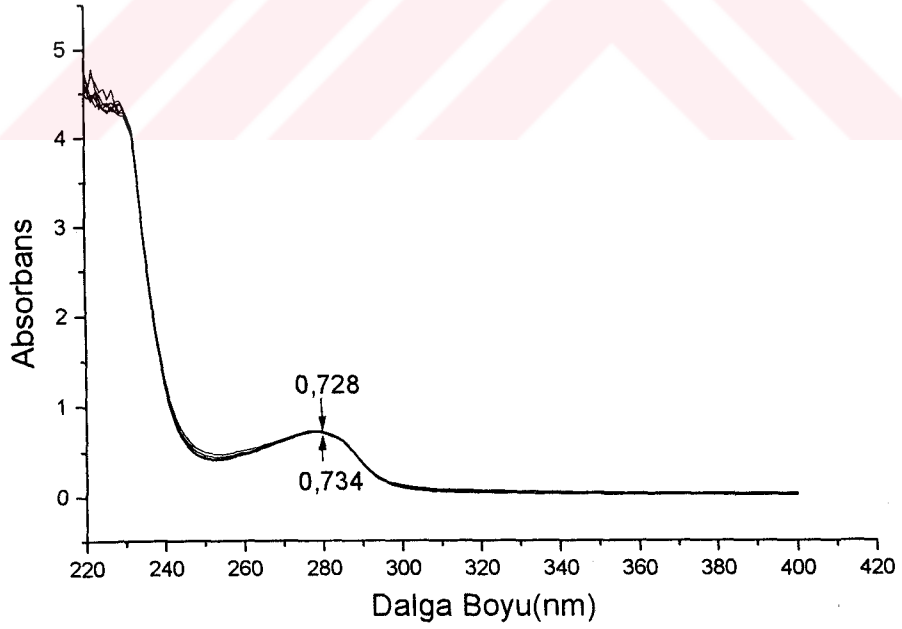
Şekil 4.25 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Cd<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Cd<sup>2+</sup> konsantrasyonu. 10<sup>-5</sup>(mM): 1-0; 2-1,25; 3-2,5; 4-3,75; 5-5; 6-6,25.



Şekil 4.26 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Ni<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Ni<sup>2+</sup> konsantrasyonu. 10<sup>-5</sup>(mM): 1-0; 2-1,25; 3-2,5; 4-3,75; 5-5; 6-6,25; 7-7,5.



Şekil 4.27 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Co<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Co<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM):1-0; 2-1,25; 3-2,5; 4-3,75; 5-5; 6-6,25; 7-7,5.



Şekil 4.28 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Mn<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Mn<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM):1-0; 2-1,25; 3-2,5; 4-3,75; 5-5; 6-6,25; 7-7,5.

## Hesaplamalar

$n_{Me} / n_{PAA} = C_{Me} \times M_{PAA} / C_{PAA} \times M_{Me}$  formülünden,  $n_{Me} / n_{PAA}$  oranı hesaplanır.

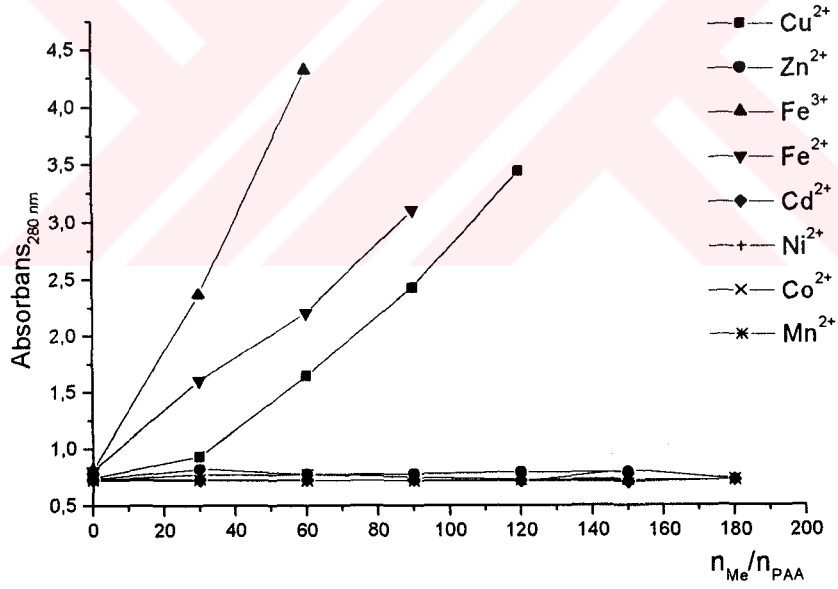
$n_{Me} = C_{Me} / M_{Me} = 2.0,625 \cdot 10^{-5} \text{ mM} = 1,2510^{-5} \text{ mM}$  (2'şer  $\mu\text{l}$  eklendi) kullanılan tüm metallerde aynıdır.

$C_{PAA} = 0,1 \text{ g/ml}$

$M_{PAA} = 240000$

$n_{Me} / n_{PAA} = 1,25 \cdot 10^{-5} \cdot 240000 / 0,1 = 30; 60; 90; 120; 150; 180 \dots$

$n_{Me} / n_{PAA}$  değerlerini x-eksenine absorbans değerlerini de y-eksenine konarak aşağıdaki grafik elde edilir.



Şekil. 4.29 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucunda 280nm'de ölçülen absorbans değerlerinin  $n_{Me} / n_{BSA}$  ile değişim grafiği.

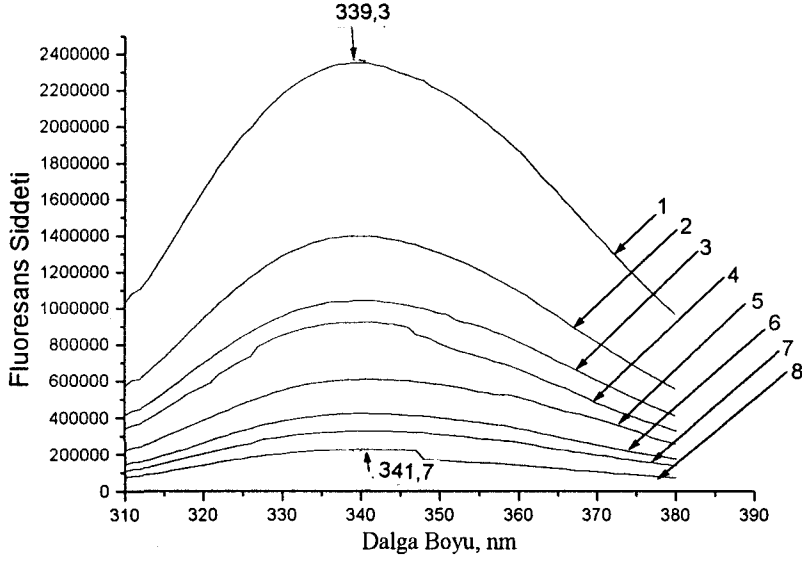
## 4.3.2 Floresans Sonuçları

Floresans Şiddetleri.10<sup>+6</sup>

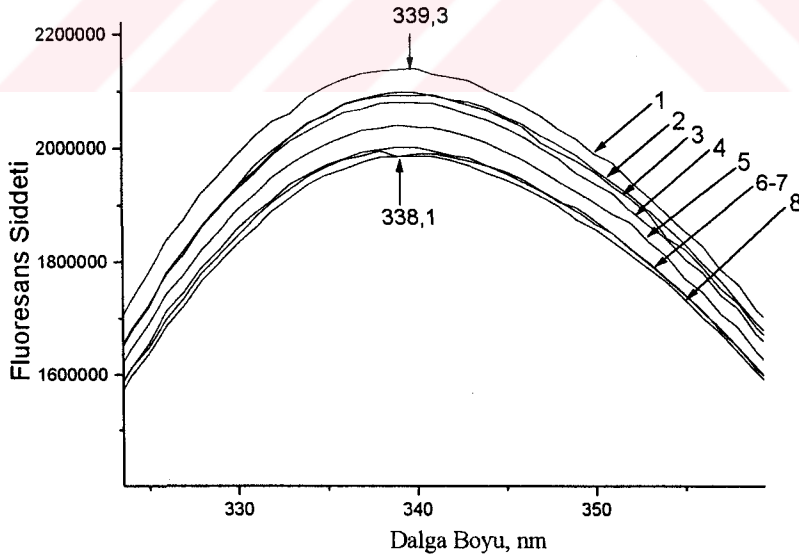
Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
2,25	2,23	2,25	2,25	2,25	2,84	2,25	2,26
1,379	2,091	1,19	1,6	2,107	2,811	2,074	2,078
1,026	2,099	0,794	0,98	2,058	2,72	2,049	2,025
0,907	2,08	0,431	0,525	2,037	2,613	1,923	1,882
0,598	2,001	...	0,22	1,992	2,5	1,873	2,025
0,409	1,982	...	...	1,959	2,334	1,82	1,975
0,315	1,989	...	...	1,775	2,334	1,755	1,882
0,214	...	...	...	1,775	2,265	...	1,857
...	...	...	...	1,644	2,334	...	1,816
...	...	...	...	1,607	2,077	...	...
...	...	...	...	...	2,035	...	...
...	...	...	...	...	2,035	...	...

maksimum dalga boyu(nm)

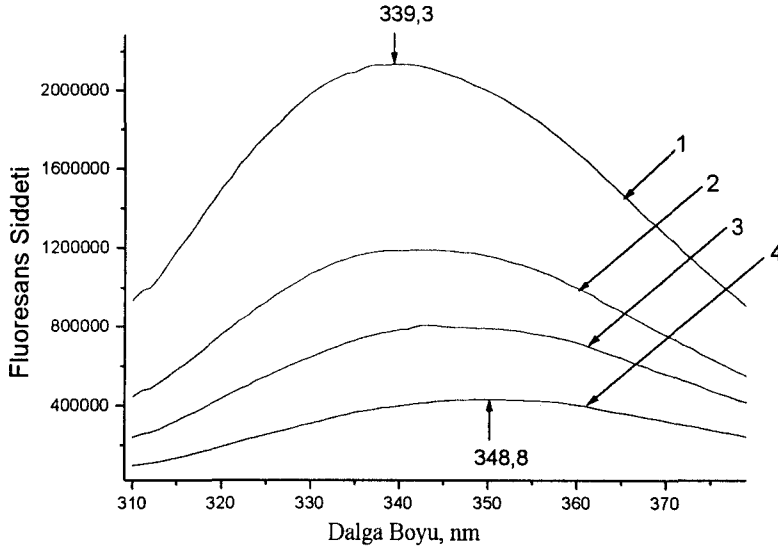
Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
339,3	339,3	339,3	339,3	339,3	339,3	339,3	339,3
340	339	342,1	339	338,9	338,9	338,7	339,2
340,1	339,2	346,3	339,8	338,9	338,7	338,6	339,2
340,6	339	348,8	340,6	338,9	337,8	338,7	339
341,2	338,9	...	342,6	338,9	337,9	339	338,2
341,2	338,7	...	...	338,9	338	338,4	338,6
341,5	338,4	...	...	338,7	338	338,9	338,2
341,7	...	...	...	339,5	337,8	...	339
...	...	...	...	339,2	337,9	...	338,9
...	...	...	...	...	337,9	...	...
...	...	...	...	...	338,1	...	...
...	...	...	...	...	338,1	...	...



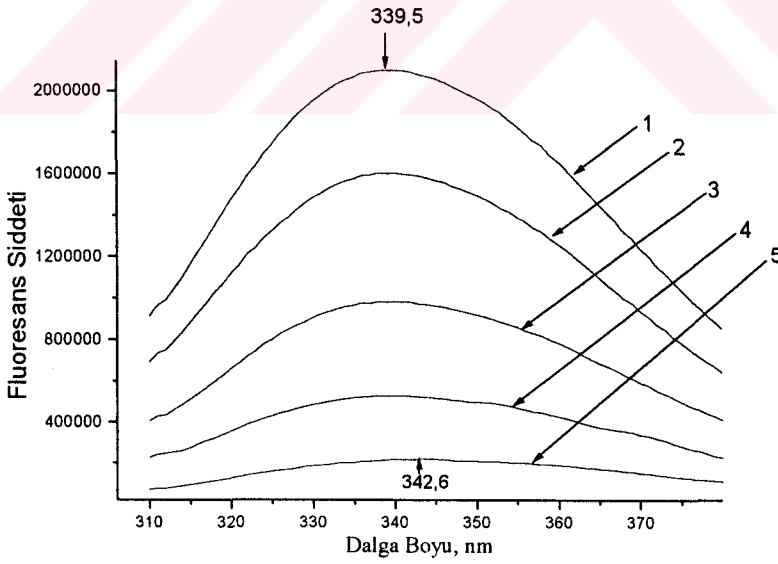
Şekil 4.30 PAA(2 mg/1ml)+BSA(2 mg/1ml) karışımının üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu.  $\text{Cu}^{2+}$  konsantrasyonu  $\cdot 10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375.



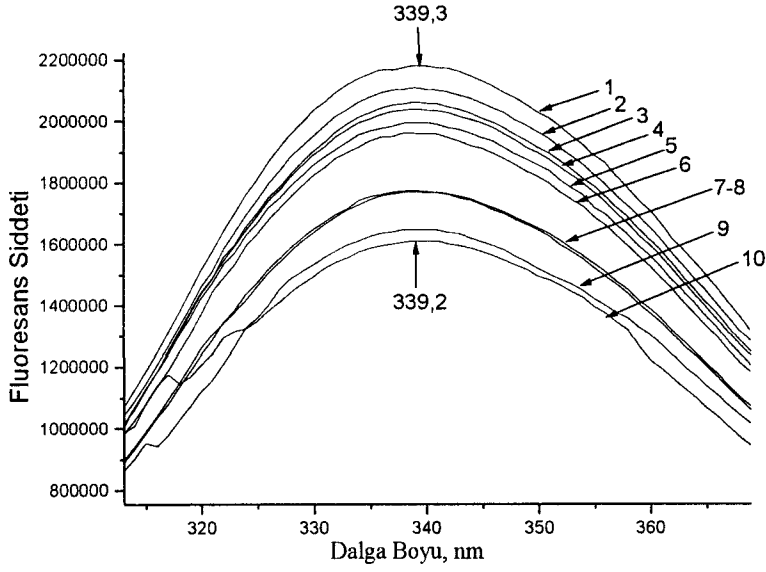
Şekil 4.31 PAA(2 mg/1ml)+BSA(2 mg/1ml) karışımının üzerine  $\text{Zn}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu.  $\text{Zn}^{2+}$  konsantrasyonu  $\cdot 10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375.



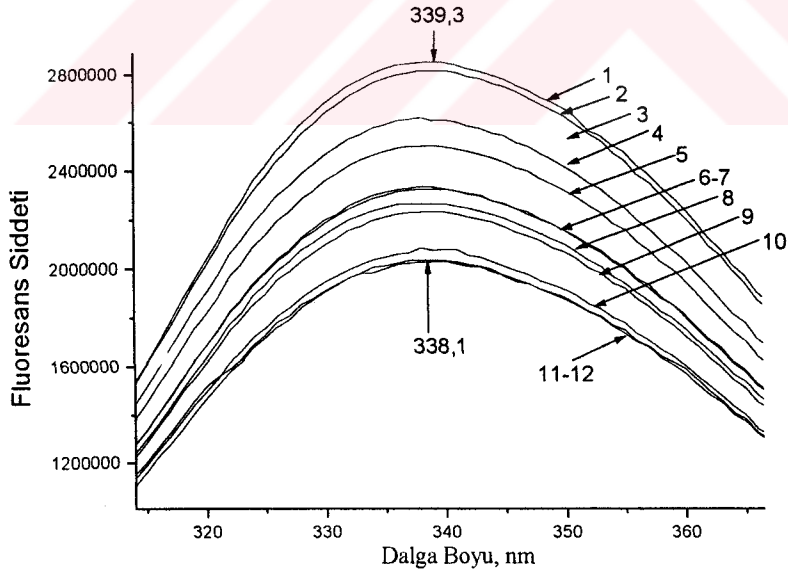
Şekil 4.32 PAA(2 mg/1ml)+BSA(2 mg/1ml) karışımının üzerine Fe<sup>3+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu. Fe<sup>3+</sup> konsantrasyonu .10<sup>-5</sup>(mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875.



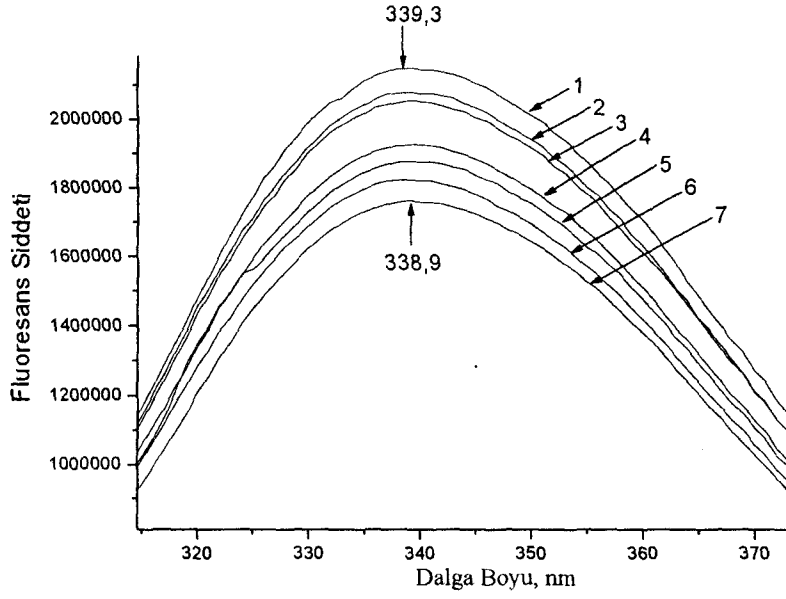
Şekil 4.33 PAA(2 mg/1ml)+BSA(2 mg/1ml) karışımının üzerine Fe<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu. Fe<sup>2+</sup> konsantrasyonu .10<sup>-5</sup>(mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5.



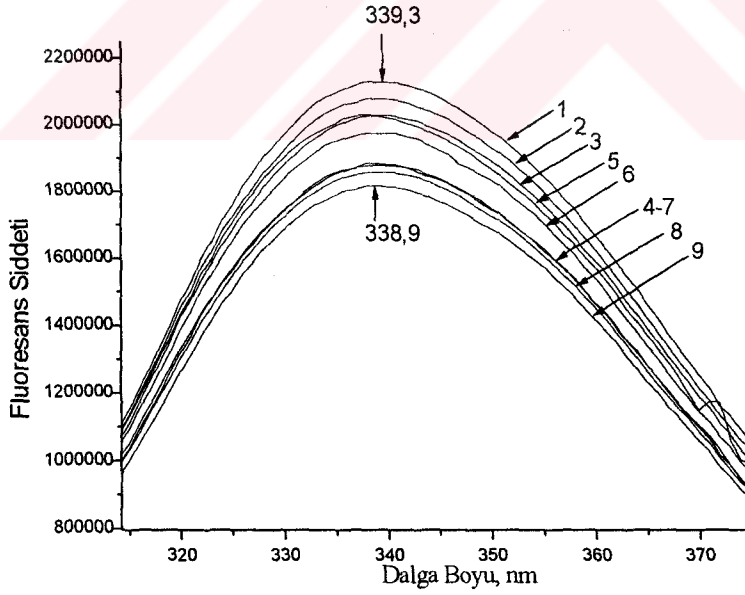
Şekil 4.34 PAA(2 mg/1ml)+BSA(2 mg/1ml) karışımının üzerine  $Cd^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.  $Cd^{2+}$  konsantrasyonu  $\cdot 10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625.



Şekil 4.35 PAA(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine  $Ni^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.  $Ni^{2+}$  konsantrasyonu  $\cdot 10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625; 11-6,25; 12-6,875.



Şekil 4.36 PAA(2 mg/1ml)+BSA(2 mg/1ml) karışımının üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.  $\text{Co}^{2+}$  konsantrasyonu  $\cdot 10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75.



Şekil 4.37 PAA(2 mg/1ml)+BSA(2 mg/1ml) karışımının üzerine  $\text{Mn}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.  $\text{Mn}^{2+}$  konsantrasyonu  $\cdot 10^{-5}$ (mM): 1-0; 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5.

**Hesaplamalar**

$n_{Me} / n_{PAA} = C_{Me} \times M_{PAA} / C_{PAA} \times M_{Me}$  formülünden,  $n_{Me} / n_{PAA}$  oranı hesaplanır.

$n_{Me} = C_{Me} / M_{Me} = 0,625 \cdot 10^{-5}$  mM(1'er  $\mu$ l eklendi) kullanılan tüm metallerde aynıdır.

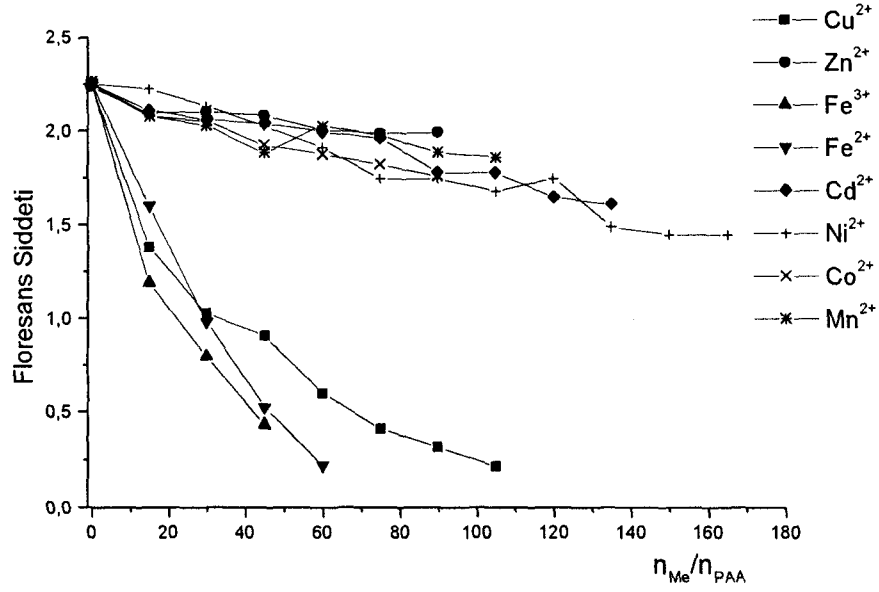
$C_{PAA} = 0,1$  g/ml

$M_{PAA} = 240000$

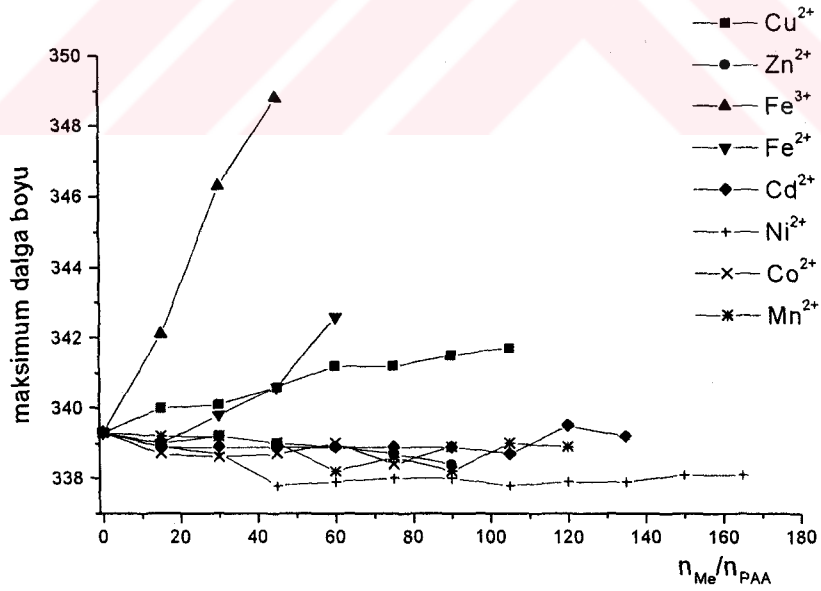
$n_{Me} / n_{PAA} = 0,625 \cdot 10^{-5} \cdot 240000 / 0,1 = 15; 30; 45; 60; 75; 90; 105; 120; 135; 150; 165; 180...$

$n_{Me} / n_{PAA}$  değerlerini x-eksenine floresans şiddeti ve maksimum dalga boyu değerlerini de y-eksenine konarak aşağıdaki iki grafik elde edilir.





Şekil 4.38 PAA(2 mg/1ml)+BSA(2 mg/1ml) karışımının üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucunda 280nm’de uyarma ile floresans spektrumlarından okunan floresans şiddeti değerlerinin  $n_{Me}/n_{BSA}$  ile değişim grafiği.



Şekil 4.39 PAA(2 mg/1ml)+BSA(2 mg/1ml) karışımının üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucunda 280nm’de uyarma ile floresans spektrumlarından okunan maksimum dalga boyunun  $n_{Me}/n_{BSA}$  ile değişim grafiği.

#### 4.4 Dekstran Sülfat-Metal Komplekslerinin Absorbanslarının İncelenmesi

##### 4.4.1 Absorbans Sonuçları

Cu <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> Cd <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Fe <sup>2+</sup> (mM)	A <sub>Cu</sub>	A <sub>Zn</sub>	A <sub>Fe<sup>3+</sup></sub>	A <sub>Fe<sup>2+</sup></sub>	A <sub>Cd</sub>	A <sub>Ni</sub>	A <sub>Co</sub>	A <sub>Mn</sub>
0	0	0	0	0	0,007	0	0	0
0,625. 10 <sup>-5</sup>	0,044	0,0302	0,0486	0,0173	0,0949	0,0008	0,0027	0,0132
1,25. 10 <sup>-5</sup>	0,1492	0,0565	0,1277	0,1791	0,3182	0,0043	0,0141	0,0308
1,875. 10 <sup>-5</sup>	0,1965	0,1031	0,234	0,473	0,3978	0,0064	0,0527	0,0572
2,5. 10 <sup>-5</sup>	0,2393	0,1442	0,4593	0,5484	0,5211	0,0125	0,0647	0,0923
3,125. 10 <sup>-5</sup>	0,2818	0,1793	0,4358	0,713	0,6788	0,0151	0,0913	0,1299
3,75. 10 <sup>-5</sup>	0,3261	0,2056	0,4451	0,8131	0,7862	0,0194	0,1046	0,1824
4,375. 10 <sup>-5</sup>	0,3739	0,2302	0,41	0,9851	0,8953	0,0244	0,1354	0,2371
5. 10 <sup>-5</sup>	0,4268	0,2718	0,43	1,2449	1,0104	0,0208	0,1735	0,2857
5,625. 10 <sup>-5</sup>	0,4729	0,2891	...	1,3705	1,1395	0,0258	0,2175	0,3399
6,25. 10 <sup>-5</sup>	0,5283	0,3267	...	1,5294	1,32	0,0315	0,3162	0,3891
6,875. 10 <sup>-5</sup>	0,5953	0,2875	...	1,5402	1,5	0,0323	0,3370	0,4472
7,5. 10 <sup>-5</sup>	0,6777	0,2642	...	1,5474	1,4874	0,0386	0,4127	0,5228
8,125. 10 <sup>-5</sup>	0,7884	0,2540	...	...	1,5187	0,0428	0,4828	0,5928
8,75. 10 <sup>-5</sup>	0,881	0,2565	...	...	...	0,0511	0,5329	0,6466
9,375. 10 <sup>-5</sup>	1,0213	0,282	...	...	...	0,0664	0,6005	0,7088
10. 10 <sup>-5</sup>	1,1665	...	...	...	...	0,0764	0,6725	0,7643
10,625. 10 <sup>-5</sup>	...	...	...	...	...	0,094	0,7368	0,8341

##### Hesaplamalar

$n_{Me} / n_{DX} = C_{Me} \times M_{DX} / C_{DX} \times M_{Me}$  formülünden,  $n_{Me} / n_{DX}$  oranı hesaplanır.

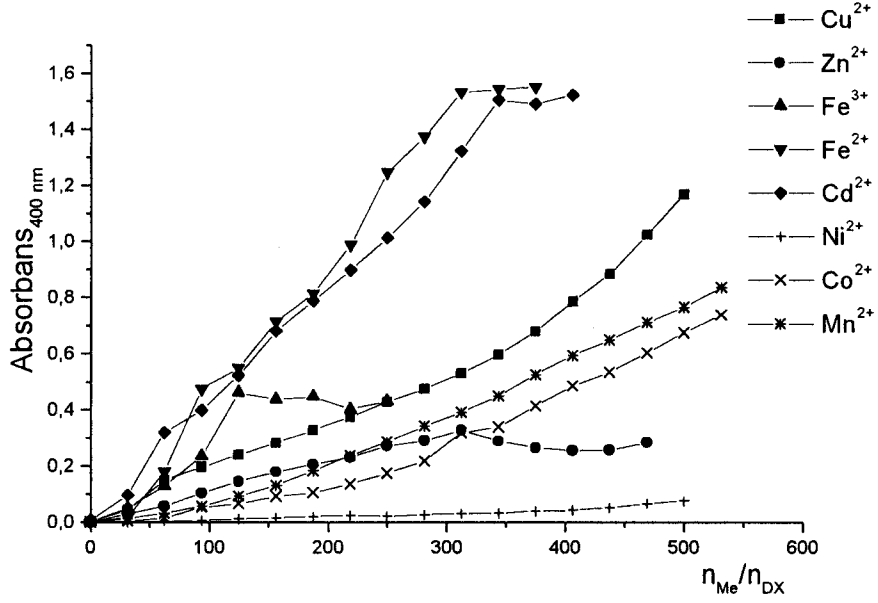
$n_{Me} = C_{Me} / M_{Me} = 0,625.10^{-5}$  mM(1'er µl eklendi) kullanılan tüm metallerde aynıdır.

$C_{DX} = 0,1$  g /ml

$M_{DX} = 500000$

$n_{Me} / n_{DX} = 0,625.10^{-5}.500000 / 0,1 = 31,25; 62,5; 93,75; 125; 156,25; 187,5; 218,75.....$

$n_{Me} / n_{DX}$  değerlerini x-eksenine absorbans değerlerini de y-eksenine konarak aşağıdaki grafik elde edilir.

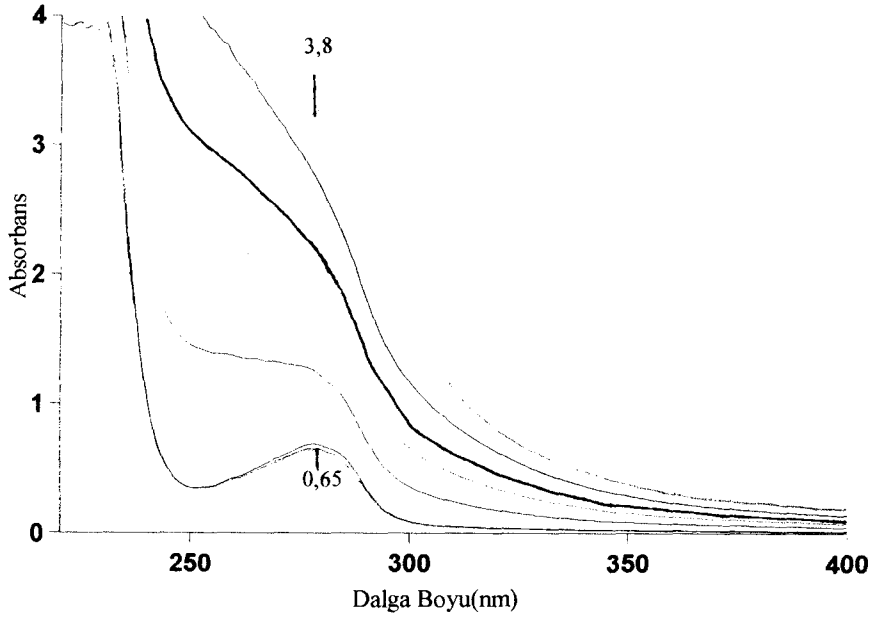


Şekil 4.40 DX(1mg/1ml) çözeltisi üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucunda 400nm'de ölçülen absorbans değerlerinin  $n_{Me} / n_{BSA}$  ile değişim grafiği.

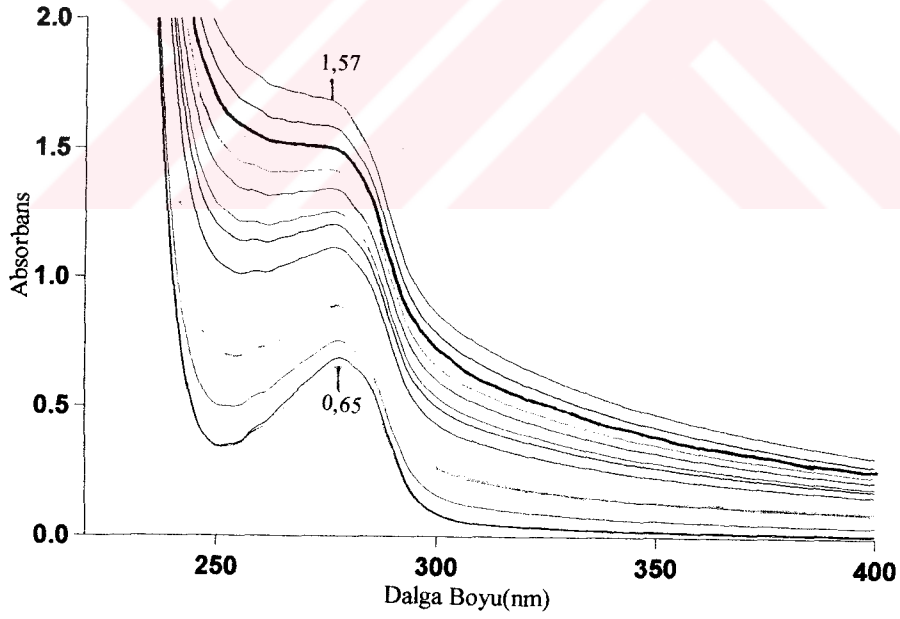
#### 4.5 Dekstran Sülfat-Metal-BSA Üçlü Komplekslerinin Absorbanslarının ve Floresans Özelliklerinin İncelenmesi

##### 4.5.1 Absorbans Sonuçları

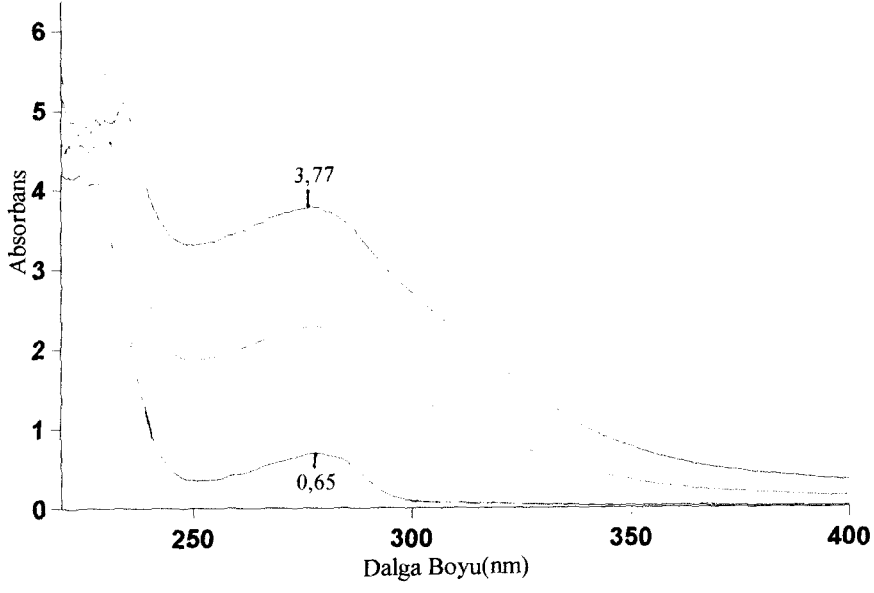
$Cu^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}$ $Cd^{2+}, Fe^{3+}, Fe^{2+}$ (mM)	$A_{Cu}$	$A_{Zn}$	$A_{Fe^{3+}}$	$A_{Fe^{2+}}$	$A_{Cd}$	$A_{Ni}$	$A_{Co}$	$A_{Mn}$
0	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
$0,625 \cdot 10^{-5}$	1,25	0,75	2,28	1,47	0,8	0,66	0,66	0,67
$1,25 \cdot 10^{-5}$	1,74	0,89	3,77	2,47	1,14	0,66	0,69	0,73
$1,875 \cdot 10^{-5}$	2,15	1,01	...	3,33	1,39	0,67	0,75	0,82
$2,5 \cdot 10^{-5}$	2,68	1,11	...	4,3	1,67	0,69	0,85	1,00
$3,125 \cdot 10^{-5}$	3,14	1,2	...	5,54	1,92	0,69	1,01	1,18
$3,75 \cdot 10^{-5}$	3,8	1,25	...	...	2,12	0,69	1,21	1,4
$4,375 \cdot 10^{-5}$	...	1,35	...	...	...	...	1,5	1,63
$5 \cdot 10^{-5}$	...	1,4	...	...	...	...	...	...
$5,625 \cdot 10^{-5}$	...	1,5	...	...	...	...	...	...
$6,25 \cdot 10^{-5}$	...	1,57	...	...	...	...	...	...



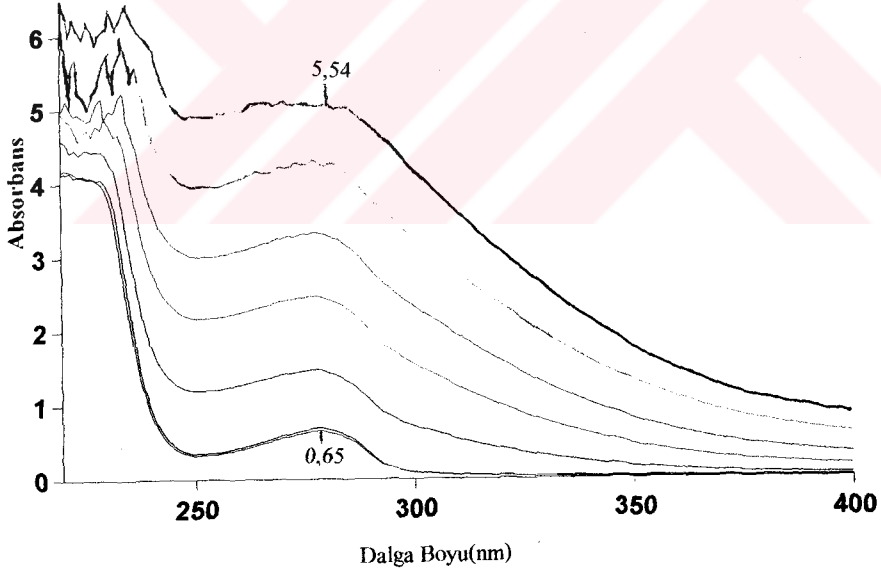
Şekil 4.41 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.  $\text{Cu}^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$ (mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75.



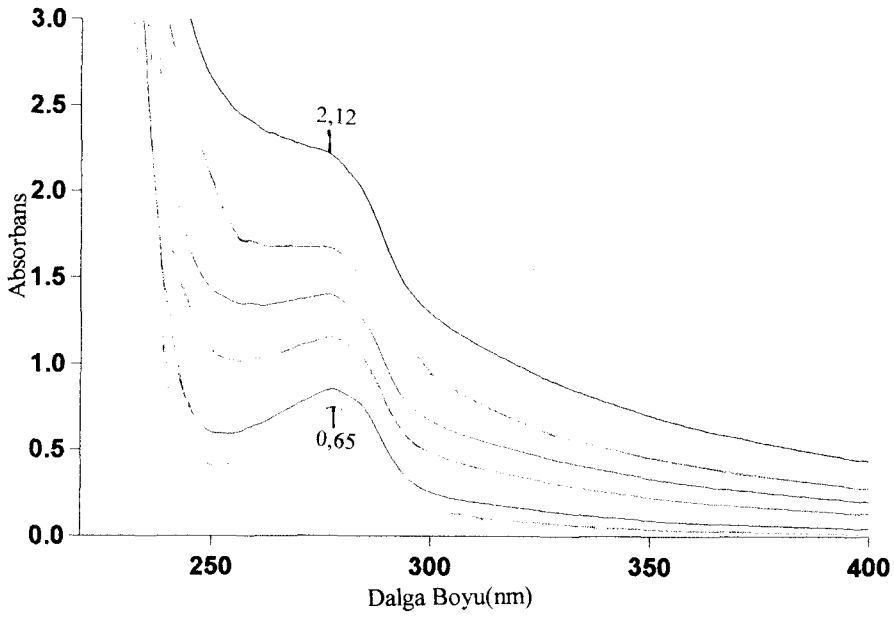
Şekil 4.42 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine  $\text{Zn}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu.  $\text{Zn}^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$ (mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625; 11-6,25.



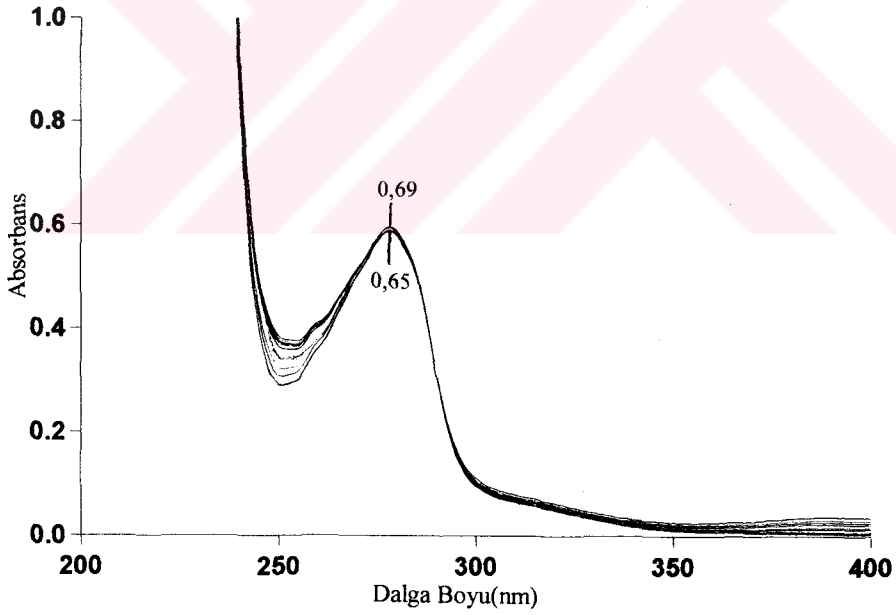
Şekil 4.43 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Fe<sup>3+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Fe<sup>3+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25.



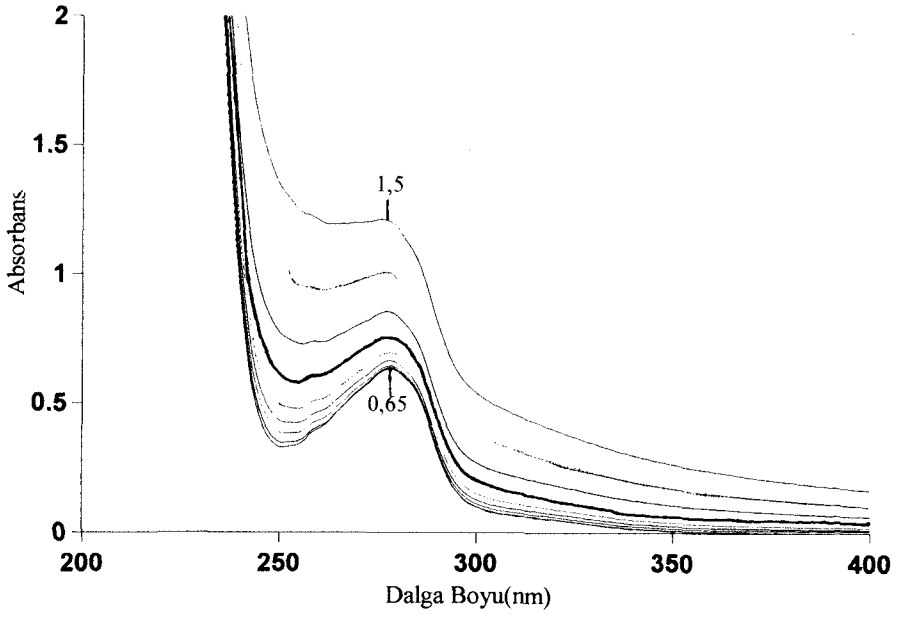
Şekil 4.44 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Fe<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Fe<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125.



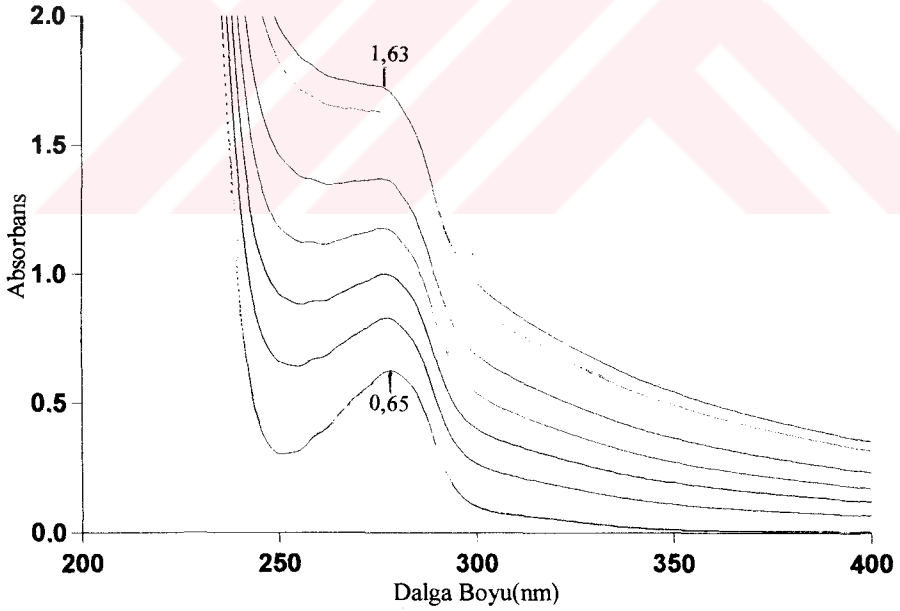
Şekil 4.45 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Cd<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Cd<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75.



Şekil 4.46 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Ni<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Ni<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75.



Şekil 4.47 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Co<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Co<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375.



Şekil 4.48 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Mn<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen absorpsiyon spektrumu. Mn<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-5</sup>(mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375.

### Hesaplamalar

$n_{Me}/n_{DX} = C_{Me} \times M_{DX} / C_{DX} \times M_{Me}$  formülünden,  $n_{Me}/n_{DX}$  oranı hesaplanır.

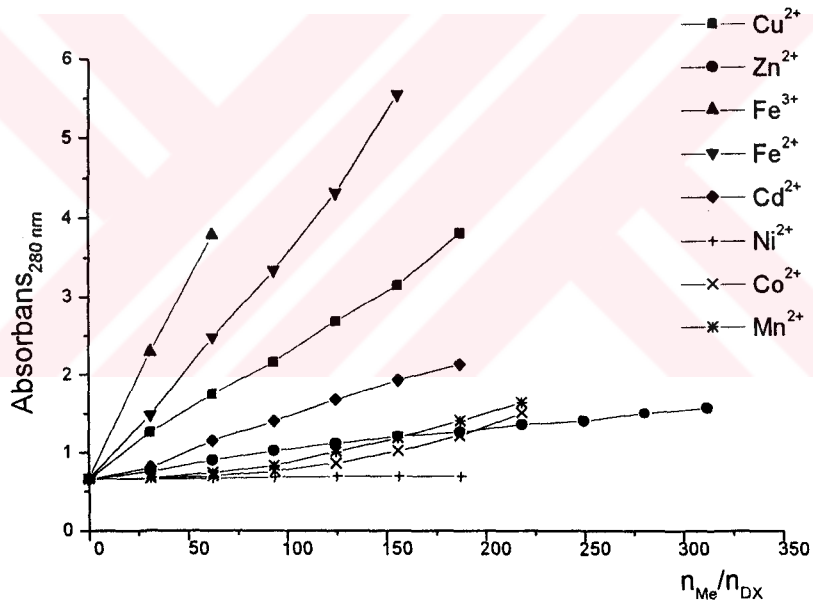
$n_{Me} = C_{Me}/M_{Me} = 0,625 \cdot 10^{-5}$  mM(1'er  $\mu$ l eklendi) kullanılan tüm metallerde aynıdır.

$C_{DX} = 0,1$  g/ml

$M_{DX} = 500000$

$n_{Me}/n_{DX} = 0,625 \cdot 10^{-5} \cdot 500000 / 0,1 = 31,25; 62,5; 93,75; 125; 156,25; 187,5; 218,75 \dots$

$n_{Me}/n_{DX}$  değerlerini x-eksenine absorbands değerlerini de y-eksenine konarak aşağıdaki grafik elde edilir.



Şekil 4.49 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucunda 280nm'de ölçülen absorbands değerlerinin  $n_{Me}/n_{BSA}$  ile değişim grafiği.

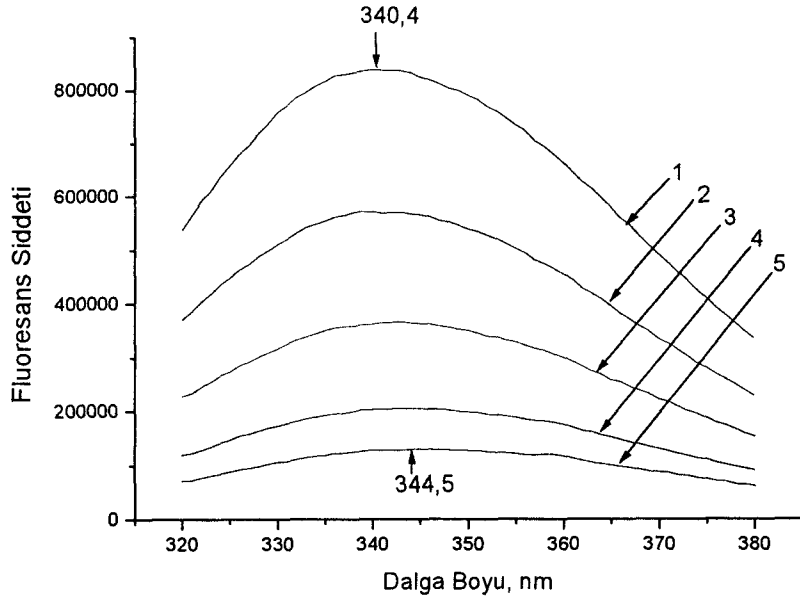
## 4.5.2 Floresans Sonuçları

Floresans Şiddetleri.10<sup>+5</sup>

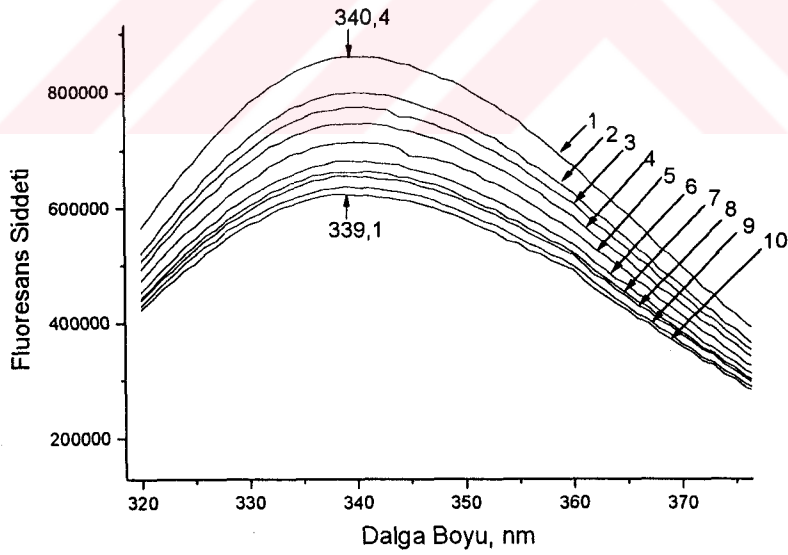
Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
8,4	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
5,73	8,0	7,54	7,585	8,2	7,8	8,1	8,4
3,66	7,76	6,66	6,59	7,45	7,5	7,88	7,99
2,042	7,46	5,61	5,52	6,16	7,3	7,67	7,6
1,3	7,13	4,74	4,57	5,67	7,1	7,3	7,1
...	6,8	4,26	3,8	5,2	6,9	7,03	6,6
...	6,6	3,84	3,19	4,8	6,9	6,6	6,3
...	6,5	3,3	2,67	...	...	6,17	...
...	6,4	2,84	2,35	...	...	...	...
...	6,2	2,48	1,986	...	...	...	...
...	...	2,12	1,74	...	...	...	...
...	...	...	...	...	...	...	...

maksimum dalga boyu(nm)

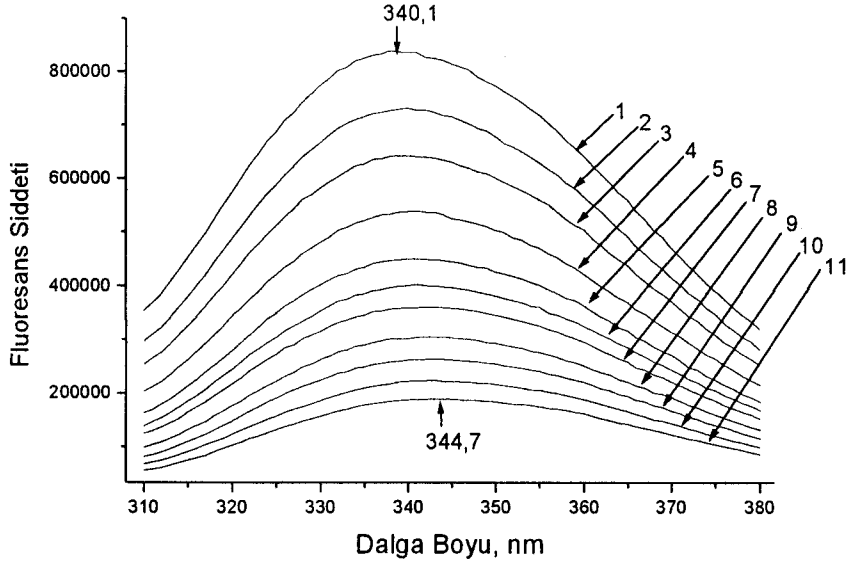
Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
340,4	340,4	340,1	340,1	340,4	340,4	340,4	340,4
342	340	340,5	340,3	340	339,6	339,9	340
343	340	340,7	340,6	339,9	339,3	339,7	339,7
343,7	339,8	341,3	340,6	339,8	339,2	338,7	339,5
344,5	339,7	341,6	340,7	339,7	339,1	339,5	339,4
...	339,5	341,9	341,3	339,6	339	339,3	339,3
...	339,3	342,5	341,7	339,3	339	339,2	339,2
...	339,2	343,1	343	...	...	339,1	339,1
...	339,1	343,7	343,7	...	...	...	...
...	339,1	344,2	345,6	...	...	...	...
...	...	344,7	346,5	...	...	...	...



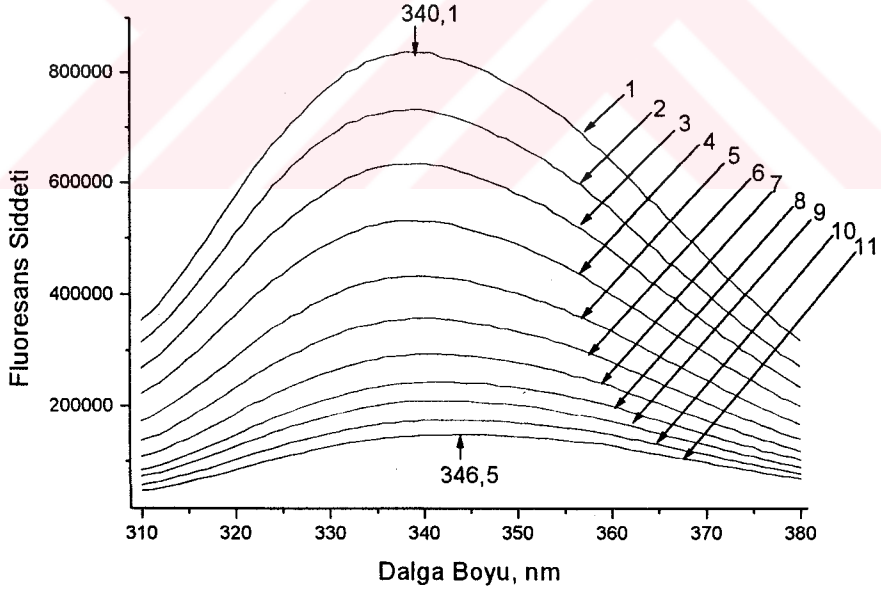
Şekil 4.50 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu.  $\text{Cu}^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$ (mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5.



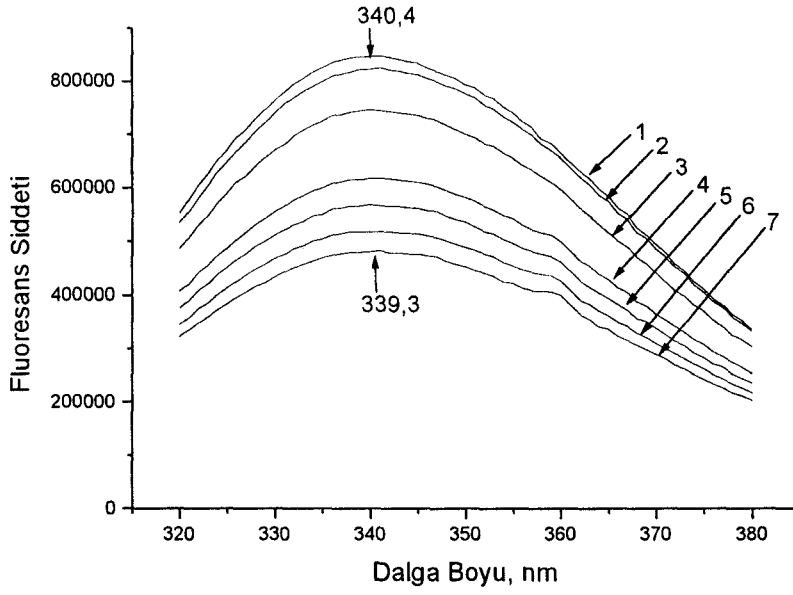
Şekil 4.51 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine  $\text{Zn}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu.  $\text{Zn}^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$ (mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625.



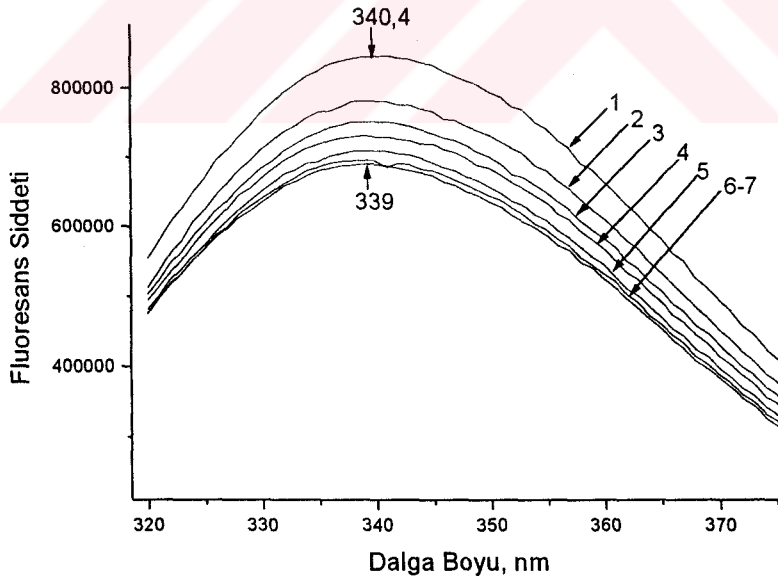
Şekil 4.52 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Fe<sup>3+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu. Fe<sup>3+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-6</sup>(mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625; 11-6,25.



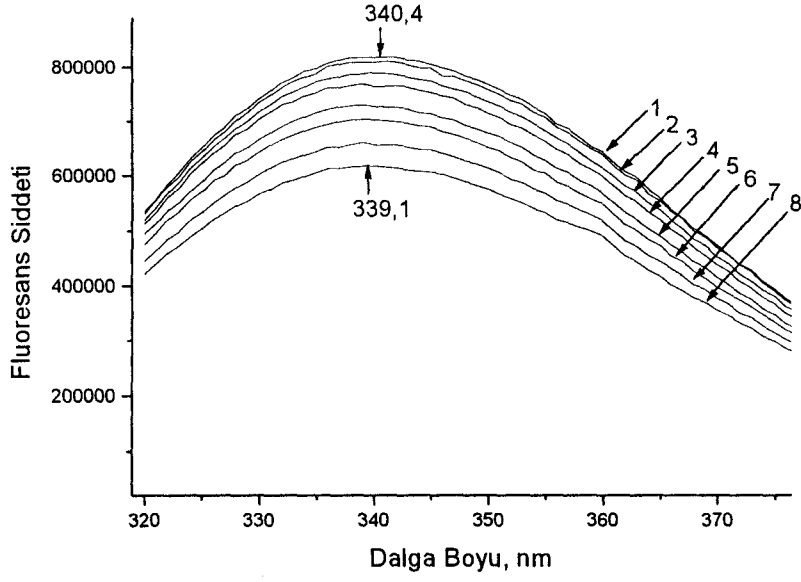
Şekil 4.53 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine Fe<sup>2+</sup> iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu. Fe<sup>2+</sup> konsantrasyonu.10<sup>-6</sup>(mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375; 9-5; 10-5,625; 11-6,25.



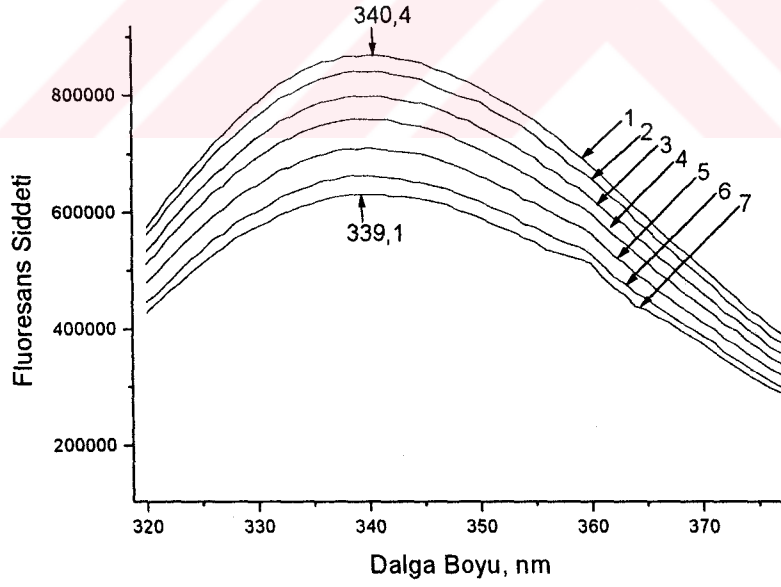
Şekil 4.54 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine  $Cd^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.  $Cd^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$ (mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75.



Şekil 4.55 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine  $Ni^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen floresans spektrumu.  $Ni^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$ (mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75.



Şekil 4.56 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu.  $\text{Co}^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$  (mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75; 8-4,375.



Şekil 4.57 DX(2mg/1ml)+BSA(2mg/1ml) karışımının üzerine  $\text{Mn}^{2+}$  iyon çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen fluoresans spektrumu.  $\text{Mn}^{2+}$  konsantrasyonu.  $10^{-5}$  (mM): 1-0, 2-0,625; 3-1,25; 4-1,875; 5-2,5; 6-3,125; 7-3,75.

**Hesaplamalar**

$n_{Me} / n_{DX} = C_{Me} \times M_{DX} / C_{DX} \times M_{Me}$  formülünden,  $n_{Me} / n_{DX}$  oranı hesaplanır.

$n_{Me} = C_{Me} / M_{Me} = 0,625 \cdot 10^{-5}$  mM (1'er  $\mu$ l eklendi) kullanılan  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  ( $0,625 \cdot 10^{-6}$  mM) hariç tüm metallerde aynıdır.

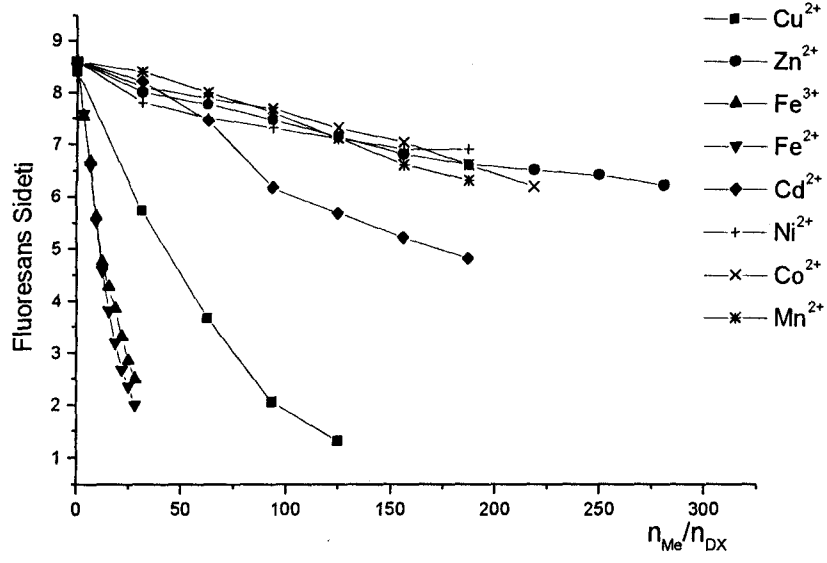
$C_{DX} = 0,1$  g/ml

$M_{DX} = 500000$

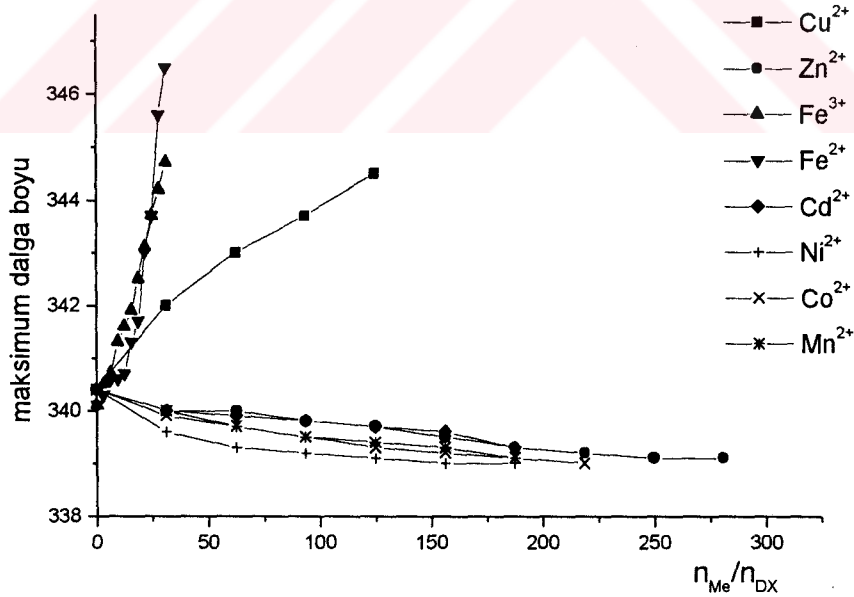
$n_{Me} / n_{DX} = 0,625 \cdot 10^{-5} \cdot 500000 / 0,1 = 31,25; 62,5; 93,75; 125; 156,25; 187,5; 218,75 \dots$  ( $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  ise, 3,125; 6,25; 9,375; 12,5 şeklindedir).

$n_{Me} / n_{DX}$  değerlerini x-eksenine floresans şiddeti ve maksimum dalga boyu değerlerini de y-eksenine konarak aşağıdaki grafik elde edilir.





Şekil 4.58 DX(2 mg/1ml)+BSA(2 mg/1ml) karışımının üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucunda 280nm'de uyarma ile floresans spektrumlarından okunan floresans şiddeti değerlerinin  $n_{Me} / n_{BSA}$  ile değişim grafiği.



Şekil 4.59 DX(2 mg/1ml)+BSA(2 mg/1ml) karışımının üzerine metallerin ayrı ayrı eklenmesi sonucunda 280nm'de uyarma ile floresans spektrumlarından okunan maksimum dalga boyunun  $n_{Me} / n_{BSA}$  ile değişim grafiği.

## 5. SONUÇLAR ve TARTIŞMALAR

1. Oluşturulan komplekslerin(metal-BSA, metal-polimer, polimer-metal-BSA) uv spektrofotometrisi Viran Bio-3 ile absorbanları ölçüldü(BSA içeren kompleksler 280nm, içermiyen komplekslerin ise 400nm'de absorbanları ölçüldü). Ayrıca  $n_{Me} / n_{polimer}$  oranı ile absorban değerleri arasında grafikler çizildi(Şekil 4.9, Şekil 4.20, Şekil 4.29, Şekil 4.40, Şekil 4.49).

A) 400 nm'de ölçülen absorban ile ilgili sonuçlar:

### -Poliakrilik asit(PAA)-Metal Kompleksi

Bütün metaller poliakrilik asit polimerine farklı ilgi göstermiştir. PAA-Metal sisteminde, optik yoğunlukta metal iyonlarının artışı ile artış gözlenir.  $Fe^{3+}$  iyonunun eklenmesi ile absorbansta en büyük artış sağlanır. Diğer metallerin ( $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$ ) eklenmesi sonucu ise, çok düşük seviyede artış olduğu gözlenir(Şekil 4.20).

### -Dekstran(DX)-Metal Kompleksi

Yine yukarıdaki gibi bu sistemde de metal iyonlarının artışı ile optik yoğunlukta artış meydana gelir. Bu artış yukarıdaki sisteme göre daha fazladır. Özellikle  $Fe^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  iyonlarını ilavesi ile absorban değeri çok fazla artmıştır.  $Ni^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  iyonları çöküntüye sebep olmaz fakat absorbsiyon çok belirsiz bir şekildedir. Diğer metaller ise orta ölçekte bir artışa sebep olur(Şekil 4.40).

B) 280 nm'de ölçülen absorban ile ilgili sonuçlar:

### -Bovine Serum Albumin(BSA)-Metal Kompleksi

Bu sistemde özellikle  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  iyonlarının artışı ile absorbsiyonda büyük artış meydana gelir. Yine  $Ni^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  iyonlarının artışı ile absorbsiyonda çok küçük artış meydana gelir.  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  orta ölçekli bir artışa sebep olur(Şekil 4.9).

### -PAA-Metal-BSA Kompleksi

Metaller PAA ve BSA ile kompleks formasyonuna farklı ilgi gösterirler. Bu üçlü komplekste  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  iyonlarının artışı ile absorbansta büyük oranda artış meydana gelir. Diğer metallerde ise, artış çok küçük hatta belirsizdir(Şekil 4.29).

### -DX-Metal-BSA Kompleksi

Yukarıdaki gibi  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  iyonlarının artışı ile absorbansta büyük oranda artış meydana gelir.  $\text{Ni}^{2+}$  iyonları çöküntüye sebep olmaz fakat absorpsiyon çok belirsiz bir şekildedir. Diğer metallerde ise, artış orta ölçeklidir(Şekil 4.49).

2. Quanta Master(steady state) spektrofotometre kullanılarak yukarıda belirtilen komplekslerin floresans emisyon spektrumu elde edildi. Alınan spektrumların maksimum noktadaki floresans şiddetleri ve bu noktaların bulunduğu dalga boyları okundu. Yine  $n_{\text{Me}} / n_{\text{polimer}}$  oranı ile floresans şiddeti ve maksimum dalga boyu arasında grafikler çizildi(Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.38, Şekil 4.39, Şekil 4.58, Şekil 4.59). Uyarılma ve emisyon monokromatörleri 2 veya 3 nm'ye ayarlanır. Uyarılma dalga boyu 280 nm'dir.

A) 280 nm uyardırda, "Steady state" spektrofotometre ile alınan sonuçlar:

### -BSA-Metal Kompleksi

BSA proteininde iki adet triptofan vardır. Bu triptofanların metallerle etkileşimlerine göre floresans spektrumlarında farklılıklar olması beklenir. BSA-metal kompleksinde diğer metallerle oranla  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  ve  $\text{Cd}^{2+}$  iyonlarının artışı ile floresans şiddeti daha fazla düşmektedir. Buda bize gösteriyor ki, BSA ile bu dört metalin etkileşimi daha fazladır. Albumin molekülündeki konformasyonel değişiklikler maksimum dalga boyundaki değişikliklerle gözlenir.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  iyonlarının artışıyla(etkili triptofan söndürücü etkisiyle) beraber maksimum dalga boyu( $\lambda_{\text{max}}$ ) sağa doğru(red shift), yani daha uzun dalga boyuna kayar. Böylelikle BSA'da yayılma gözlenerek su ile daha fazla etkileşime girmiştir. Diğer metaller için ise, gözlenen değişiklik kısa dalga boyuna kaymasıdır(blue shift), BSA'da toparlanma(kapanma) meydana gelir. Buda suda çözünen stabil komplekslerin oluşmasını sağlar(Şekil 4.18, Şekil 4.19).

### -PAA-Metal-BSA Kompleksi

Bu üçlü komplekste diğer metallerle göre  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  iyonlarının artışı ile floresans şiddetinde büyük düşüş olur. Buda bize metal iyonu konsantrasyonu arttıkça metal, PAA-BSA sistemlerinde çapraz bağlayıcı özelliği kazanıyor. Böylelikle üçlü kompleks oluşmuş oluyor. Yine bu üç metal maksimum dalga boyu( $\lambda_{\text{max}}$ ) sağa doğru(red shift), yani daha uzun dalga boyuna kayar. Böylelikle BSA'da yayılma gözlenerek su ile daha fazla etkileşime girmiştir(polimer proteini sarmamıştır). Diğer metaller için ise, gözlenen değişiklik çok az bir

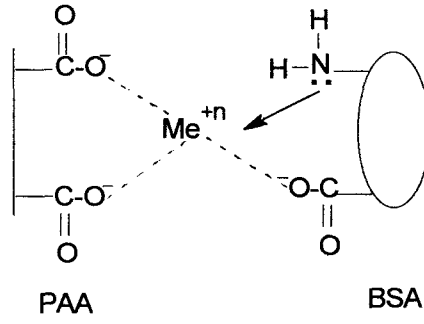
değerle kısa dalga boyuna kaymasıdır(blue shift), BSA'da toparlanma(kapanma) meydana gelir. Burada proteinin polimerle daha zayıf bağlandığı ve metal iyonlarının proteine sadece tuz etkisi gösterdiği fikrini söyleme imkanını verir. Tuz etkisi protein globulunun daha da kompakt olmasına neden olarak triptofanın su ile etkileşimini engellemektedir. Floresans ve uv-visible çalışmalarına göre  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  iyonları kararlı kompleksler oluşturur. Üçlü komplekste dekstran sülfat  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  iyonları vasıtasıyla BSA ile tercihli olarak BSA'nın triptofan kısmına bağlanır, buda triptofan floresansını söndürür(Şekil 4.38, Şekil 4.39).

#### -DX-Metal-BSA Kompleksi

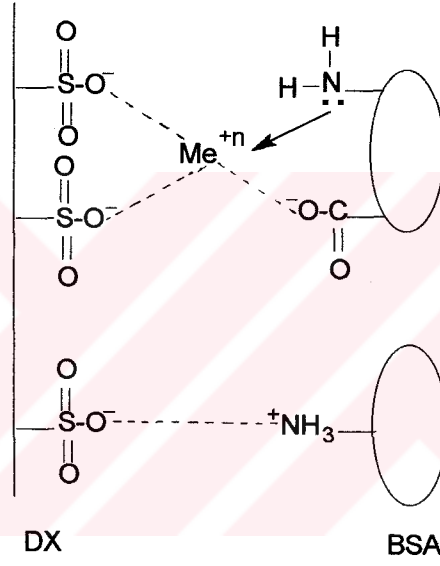
Bilindiği gibi, metal iyonlarının düşük konsantrasyonlarında etkileşimler sadece dekstranın sülfat grubu ile olur. Metal iyonu konsantrasyonu arttıkça metal, dekstran ile BSA arasında çapraz bağlayıcı görevini üstlenir. Bu üçlü komplekste diğer metallere göre  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  iyonlarının artışı ile floresans şiddetinde büyük düşüş olur. Buda bize metal iyonu konsantrasyonu arttıkça metal, DX-BSA sistemlerinde çapraz bağlayıcı özelliği kazandığını ispatlar. Böylelikle üçlü kompleks oluşmuş oluyor. Yine bu üç metal maksimum dalga boyu( $\lambda_{\text{max}}$ ) sağa doğru(red shift), yani daha uzun dalga boyuna kayar. Böylelikle BSA'da yayılma gözlenerek su ile daha fazla etkileşime girmiştir(polimer proteini sarmamıştır). Diğer metaller için ise, gözlenen değişiklik çok az bir kısa dalga boyuna kaymasıdır(blue shift). BSA'da toparlanma(kapanma) meydana gelir ve triptofanın su ile etkileşimi daha da engellenmektedir(Şekil 4.58, Şekil 4.59).

Modifiye edilmemiş dekstran sülfat, polimer zincirindeki sülfat gruplarına göre üçlü kompleks formunda kullanılabilir. Bu yapay aşı konusunda yapılacak çalışmalara yardımcı olacaktır. Floresans ve uv-visible çalışmalarına göre  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  iyonları kararlı kompleksler oluşturur.  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları bu alanda kullanılacak en uygun iyondur. Üçlü komplekste dekstran sülfat  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları vasıtasıyla BSA ile tercihli olarak BSA'nın triptofan kısmına bağlanır, buda triptofan floresansını söndürür.

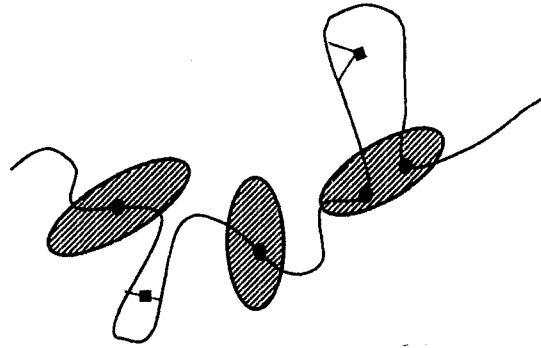
Alınmış sonuçlara dayalı üçlü komplekslerin aşağıda model yapıları gösterilmiştir.



PAA-Me-BSA Kompleksi



DX-Me-BSA Kompleksi



- Metal varlığında polimer-protein fonksiyonel gruplarının bağlanması
- Metal varlığında iki  $\text{COO}^-$  grubu arasındaki bağlanma

Şekil 5.1 Üçlü polimer-metal-protein kompleksi partikülünün düşünülen yapı modeli.

## KAYNAKLAR

- Anderson, P., (1982), "Antibody responses to *Haemophilus Influenzae* type b and diphtheria toxin induced by conjugates of oligosaccharides of the type b capsule with the nontoxic protein CRM 197", *Infect. Immun.*, 39: 233-239.
- Baudys, M., Letourneur, D., Liu, F., Tozefonvicz ve Sung Wan Kim, (1998), "Extending Insulin action in vivo by conjugation to carboxymethyl dextran", *Bioconjugate Chem.*, 9: 176.
- Bixler, H.J. ve Michaels, A.S., (1969), "Polyelectrolyte Complexes in Encyclopedia of polymer science and technology", Jhon Wiley and Sons, 10: 765, New York.
- Bozdağ, S., Çapan, Y., Vural, I., Hıncal, A. A. ve DeLuca, P. P., (2001), "Mitoxantrone Loaded Poly(DL-Lactide-co-Glycolide) Microspheres for Treatment of Brain Tumors I. Formulation and Release Characteristics", VIII. Biomedical Science and Technology Symposium, 5-8 Sep., METU, Ankara.
- Burke, A., Yılmaz, E. ve Hasırcı, N., (2001), "Desferal Release Through Crosslinked Chitosan Membranes", VIII. Biomedical Science and Technology Symposium, 5-8 Sep., METU, Ankara.
- Demchenko, A. P., (2000), "Fluorescence Probes in Molecular and Cellular Biophysics", Lecture 1, TUBITAK, Marmara Research Center, Gebze.
- Dintzis, R.Z., Okajima, M., Middleton, M.H., Greene, G. ve Dintzis, H.M., (1989), "The immunogenicity of soluble haptenated polymers is determined by molecular mass and hapten valence", *J. Immunol.*, 143: 1239-1244.
- Fileenko, A., Demchenko, M., Mustafaeva, Z., Yoshihito, O. ve Mustafaev, M. I., (2001), "Fluorescence Study of  $\text{Cu}^{2+}$ -Induced Interaction between Albumin and Anionic Polyelectrolytes", *Biomacromolecules*, 2(1): 270.
- Fujita, T., Nishikawa, M., Tamaki, C., Takakura, Y., Hashida, M. ve Sezaki, H., (1992), "Targeted delivery of human recombinant superoxide dismutase by chemical modification with mono and polysaccharide derivatives", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 263: 971.
- Gürpınar, A. Ö., Tuzlakoğlu, K., Onur, M. A., Şirin, H. T. ve Pişkin, E., (2001), "Investigation of the Effects of  $\beta$ -TCP/Poly(L-Lactide) Composite to Therapy Bone Defects", VIII. Biomedical Science and Technology Symposium, 5-8 Sep., METU, Ankara.
- Hasırcı, N., (2001), "Structure-Property Relationships of Bone Cements", VIII. Biomedical Science and Technology Symposium, 5-8 Sep., METU, Ankara.
- Hasırcı, V., (2001), "A Look at Biomaterials", VIII. Biomedical Science and Technology Symposium, 5-8 Sep., METU, Ankara.
- Hattori, M., Imamura, S., Nagasawa, K. ve Takahashi, K., (1994), "Functional changes of lysozyme by conjugating with carboxymethyl dextran", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 174-177.
- Hattori M., Numamoto, K., Kabayashi K. ve Takahashi K., (2000), "Functional changes in  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides", *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2050-2056.

- Heindel, N. D., Zhao, H., Leiby, J., VanDongen, J. M., Lacey, C. J., Lima, D. A., Shabsoug, B. ve Buzby, J. H., (1990), "Hydrazide pharmaceutical as conjugates to polyaldehyde dextran: Synthesis, characterizastion and stability", *Bioconjugate Chem.*, 1: 77.
- Kendirch, M. J., May, M. T., Philshica M. J. ve Dobinson, K. D., (1992), "Metal in biological systems", Ellis Harwood, N. Y.
- Kobayashi, M., Yanagihara, S. ve Lchishima, E., (1989), "Preparation and characterization of Taka-amylase A attached to carboxymethyl dextran by water-soluble carbodiimid", *Agric. Biol. Chem.*, 53: 3133-3138.
- Lakowicz, J.R., (1986), "Principles of Fluorescence Spectrscopy", Plenum Press, New York.
- 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.
- Mekela, O., Peterfy, F., Outschoorn, I. G., Richter, A. W. ve Seppala, I., (1984), "Immunogenic properties of  $\alpha$ -(1-6)Dextran, its protein conjugates and conjugates f its breakdown products in mice", *Scand. J. Immunol.*, 19: 541-546.
- Mustafaev, M. I., (1996), *Biyopolimer, TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi, Gebze.*
- Mustafaev, M. I., (1996), "Polyelectrolytes in Immunology: Fundamentals and Perspectives", *Tr. J. of Chem.*, 20: 126.
- Mustafaev, M. I., (2001), "Novel Hapten Comprising Biopolymer Systems", VIII. Biomedical Science and Technology Symposium, 5-8 Sep., METU, Ankara.
- Mustafaev, M. I., Çırakoğlu, B., Saraç, S., Öztürk, S., Yücel, F. ve Bermek, E., (1996), "Soluble and Insoluble Ternary Complexes of Serum Proteins with polyanions in the presense of  $\text{Cu}^{2+}$  in Water", *Journal of Applied Polymer Science*, 62: 99-109.
- Mustafaev, M. I., Mustafaeva, Z., Bermek, I. Ve Osada, Y., (1998), "New amphiplic Immunogens by  $\text{Cu}^{2+}$ -mediated complexes of water-born poly(N-isopropylacrylamide) and bovine serum albumin", *J. of Bioactive and Compatible Polymer*, 13: 33.
- Mustafaev, M. I., Yücel, F., Çırakoğlu, B. ve Bermek, E., (1996), "Immune reponse to progesteron involved in  $\text{Cu}^{2+}$ -mediated polyanion-protein complex -Antigen spesificity and affinity of hibridoma clones", *Immunol. Lett.*, 52: 63.
- Mustafaev, M. I., Yücel, F., Öztürk, S., Çırakoğlu, B. ve Bermek, E., (1996), " $\text{Cu}^{2+}$ -mediated complex formation between polyacrylic acid(PAA) and bovine serum albumin", *Journal of Immunological Methods*, 197: 31.
- Mustafaev, M. I. ve Norimov, A. S., (1990), "Polymer-metal complexes of protein antigens-new highly effective immunogens", *Biomed. Sci.*, 1: 274.
- Mustafaev, M. I., Norimov, A. S. ve Petrov, R. V., (1992), "Synthetic immunomodulators", *Nauka, Moskow.*

Osada, Y. ve Saito, Y., (1975), "Makromolecules", *Macromol. Chem.*, 176: 2761.

Petrov, R. W. ve Mustafaev, M. I., (1992), "Narimow A. Physica Chem. Criteria for the Costruction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on THA Basis of Polyelectrolyte Complexes", Harwood Acad. Publ. GmbH, London.

Sacco, D., Bonneaux, F. ve Dellacherie, E., (1988), "Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and oxygen-binding properties of the covalent conjugates", *Int. J. Biol. Macromol.*, 10: 305.

Saraç, S., Özeroğlu, C. ve Mustafaev, M. I., (1995), "The ternary complexes of bovine serum albumin and polyacrylamide derivatieves in the presence of copper ions in natural water", *J. Bioact. Complet. Poly.* 10: 121.

Sato, H., Meada, M. ve Nakaj, M. A. A., (1979), "Polyelectrolyt", *J. Appl. Polym. Sci.*, 23: 1759.

Schneerson, R., Barrera, O., Sutton, A. ve Robbins, J. B., (1980), "Preparation, characterization and immunogenicity of Hacmophilus influenzae type b polysaccharide-protein conjugates", *J. Eyp. Med.*, 152: 361-367.

Shih, L. B., Goldenberg, D. M., Xuan, H., Lu, H., Sharkey, R. M. ve Hall, T.C., (1991), "Anthracycline immunoconjugates prepared by a site-specific linkage via an aminodextran intermediate carrier", *Cancer Res.*, 51: 4192-4198.

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.

Şendil, D., Maszcynska, I., Carr, D. B., Lipkowski A. W., Wise, D. L. ve Hasırcı, V., (2001), Pain Control Via Intrathecal Polymeric Implants, VIII. Biomedical Science and Technology Symposium, 5-8 Sep., METU, Ankara.

Tabaka, Y., Noda, Y., Matsui, Y. ve Ikada, Y., (1999), "Targeting of tumor necrosis factor to tumor by use of dextran and metal coordination", *J. Control Release*, 59(2): 187.

Timasheff, S. N., (1953), *Kirkwood J. G. J. Amer. Chem. Soc.*, 75:547.

Yılğör, I. ve Yılğör, E., (2001), "Structure-Property Relations in Hydrophilic Polyurethaneureas Used as Biomaterials", VIII. Biomedical Science and Technology Symposium, 5-8 Sep., METU, Ankara.

Zezin, A. B. ve Eltsefon, B. S., (1976), "In Itogi Nauki, Chimiya", *tehnologiya vysokomol Soedin*, 10: 96, Moscow.

**ÖZGEÇMİŞ**

Doğum Tarihi	20.08.1977	
Doğum Yeri	Eminönü/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 Anabilim Dalı, Biyokimya Programı

**Çalıştığı kurum**

2002-Devam ediyor YTÜ Fen-Edebiyat Fak. Araştırma Görevlisi