T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PAA–Cu(II)–BSA BİYOKOMPLEKSİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Bahar ÇAKIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Fizikokimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN

Eş Danışman

Prof. Dr. Mesut KARAHAN

Ağustos, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PAA–Cu(II)–BSA BİYOKOMPLEKSİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Bahar ÇAKIR tarafından hazırlanan tez çalışması 05.08.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Fizikokimya Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Prof. Dr. Mesut KARAHAN Üsküdar Üniversitesi Eş–Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Mesut KARAHAN, Eş Danışman
Üsküdar Üniversitesi _____

Prof. Dr. Gülşah GÜMRÜKÇÜ KÖSE, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Dilek SALKIM İŞLEK, Üye
İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa _____

Danışmanım Prof. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan ‘PAA–Cu(II)–BSA Biyokompleksinin Sentezi ve Karakterizasyonu’ başlıklı çalışmamda veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Bahar ÇAKIR

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 2012–01–02–GEP04 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın danışmanlığını yapan, lisans ve yüksek lisans hayatım süresince bilgi birikimiyle çalışmama farklı açılardan bakmamı sağlayan, yaptığı değerlendirmelerle çalışmamın her yönüyle ilerlemesine yardımcı olan, beraber çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN'a,

Tezimde kullandığım maddelerin sentezinde, karakterizasyonunda ve tezimle ilgili birçok teorik ve pratik bilgide, bilgilendiren yararlandığım sevgili hocam Prof. Dr. Mesut KARAHAN'a,

Son olarak, hayatım boyunca yanımda olan, her türlü kararımda bana destek olup, ilgilerini üzerimden eksik etmeyen kıymetli ailem, annem Zehra ÇAKIR'a, babam Ali ÇAKIR'a, kardeşlerim Betül ÇAKIR, Ahmet ÇAKIR ve Neslihan TURHAN ÇAKIR'a sonsuz teşekkür ederim.

Bahar ÇAKIR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR iv
SİMGE LİSTESİ vii
KISALTMA LİSTESİ viii
ŞEKİL LİSTESİ ix
TABLO LİSTESİ xi
ÖZET xii
ABSTRACT xiv
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
2 GENEL BİLGİLER 4
2.1 Polielektrolitler 4
2.2 Taşıyıcı Moleküller 10
2.2.1 Protein Özellikteki Taşıyıcı Moleküller 11
2.2.2 Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller 12
2.3 İnterpolielektrolit Kompleksler 13
2.3.1 Polielektrolit – Protein Kompleksleri 16
2.3.2 Polimer – Metal Kompleksleri 17
2.3.3 Polimer – Metal – Protein Üçlü Kompleksleri 18
2.4 Aşı ve Bileşenleri 21
3 FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYON ZETASIZER ÖLÇÜMLERİ 23
3.1 Partikül Boyutu 23
3.2 Polidispersite 24
3.3 Mobilite 25
3.4 Zeta Potansiyeli 25
4 POLİAKRİLİK ASİT POLİMERİ VE BOVİN SERUM ALBÜMİN PROTEİNİ 31
4.1 Poliakrilik Asit Polimeri 31
4.2 Bovin Serum Albümin Proteini 32
5 DENEYSEL KISIM 33
5.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler 33
5.1.1 Kullanılan Cihazlar 33

5.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler 33
5.2 Biyokonjugat ve Biyokomplekslerin Sentezlenmesi 33
5.2.1 BSA Çözeltisinin Hazırlanması 33
5.2.2 PAA–BSA İkili Biyokonjugatının Sentezlenmesi 33
5.2.3 PAA–Cu^{2+}–BSA Üçlü Biyokompleksinin Sentezlenmesi: I. Yöntem 35
5.2.4 PAA–Cu^{2+}–BSA Üçlü Biyokompleksinin Sentezlenmesi: II. Yöntem 35
5.3 Zetasizer Ölçümleri 39
6 TARTIŞMA **40**
7 SONUÇ **42**
7.1 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokompleklerinin kararlılığı üzerine pH Etkisi 42
7.2 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin kararlılığı üzerine Tuz Etkisi ... 48
KAYNAKÇA **56**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **60**

SİMGE LİSTESİ

C	İletkenlik
c	Konsantrasyon
µl	Mikrolitre
µS	Mikrosiemens
mg	Miligram
ml	Mililitre
mV	Milivolt
n	Mol
M	Molar
nm	Nanometre
Nm	Newtonmetre
N	Normal
°C	Santigrat Derece
z	Zeta Potansiyeli

KISALTMA LİSTESİ

AA	Akrilik Asit
BSA	Bovin Serum Albümin
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDC	1–etil–3–(3–dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür
HSA	İnsan Serum Albümini
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
OVA	Ovalbümin
PAA	Poliakrilik Asit
PBS	Fosfat Tuzu Tamponu
PD	Polimerleşme Derecesi
PDI	Polidispersite İndeksi
PE	Polielektrolit
pI	İzoelektrik Nokta
PSS	Polistiren Sülfonat
PSSNa	Sodyum Polistiren Sülfonat
PVI	Polivinil imidazol
PVP	Poli–4–vinil piridin
SA	Serum Albümin
SPE	Sentetik Polielektrolit

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Polielektrolit polimer sistemleri …….....	**4**
Şekil 2.2	Sulu çözeltideki poliakrilik asitin dissosiyasyonu ...……..……	**5**
Şekil 2.3	PSSNa ve PAA anyonik polielektrolitlerinin kimyasal yapısı ….....	**5**
Şekil 2.4	Etkileşen grupların yapıları ……..……..	**6**
Şekil 2.5	Tuz ilavesi ile değişen polielektrolit konformasyonu ……..	**8**
Şekil 2.6	Polielektrolit ve yüksüz polimerler de viskozite–konsantrasyon değişimi.....	**9**
Şekil 2.7	pH'ın proteinlerin yüzey yüküne etkisi ……...……...	**10**
Şekil 2.8	BSA'nın pH'a bağlı yük profilinde değişiklikler ……...…….	**10**
Şekil 2.9	Oligopeptit–polimer konjugatların şematik gösterimi ……..	**12**
Şekil 2.10	Seyreltik sulu ortamda iki aşamalı bir mekanizma ile kompleks agregatların oluşumu …….	**15**
Şekil 2.11	PVP–Cu^{2+}–BSA üçlü kompleksi ……...	**19**
Şekil 2.12	PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksi …….……...……...	**20**
Şekil 2.13	Polielektrolit kompleksinin hücre yüzeyindeki antijenlerle etkileşimi ……	**22**
Şekil 3.1	Bir koloidal sistemin olası durumları …….……..	**26**
Şekil 3.2	Negatif yüklü bir partikül etrafında oluşan elektriksel potansiyel….	**28**
Şekil 3.3	Koloidal sistemin elektrostatik kararlılığı……...……...	**29**
Şekil 3.4	Koloidal sistemlerde zeta potansiyelinin pH'a bağımlılığı……	**30**
Şekil 4.1	Poliakrilik asitin monomerlerinden polimerizasyonu.....	**31**
Şekil 4.2	BSA'nın sentetik moleküllerle konjugasyonunun taşıyıcı protein olarak kullanımı…….	**32**
Şekil 5.1	EDC ile aktifleştirilen PAA–BSA ikili biyokonjugatının şematik oluşumu ……	**34**
Şekil 5.2	PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksinin kimyasal yapısı ……	**36**
Şekil 7.1	Farklı pH'larda PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksinin renk değişimi ……	**42**
Şekil 7.2	BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin partikül boyutları üzerindeki pH etkisi …….	**43**
Şekil 7.3	BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin elektroforetik mobiliteleri üzerindeki pH etkisi ……..…..……...	**45**

Şekil 7.4 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin zeta potansiyelleri üzerindeki pH etkisi …… **46**

Şekil 7.5 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin iletkenlik değişimi üzerindeki pH etkisi …… **47**

Şekil 7.6 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin partikül boyutları üzerindeki tuz etkisi …… **49**

Şekil 7.7 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin elektroforetik mobiliteleri üzerindeki tuz etkisi …… **51**

Şekil 7.8 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin zeta potansiyelleri üzerindeki tuz etkisi …… **53**

Şekil 7.9 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin iletkenlik değişimi üzerindeki tuz etkisi …… **55**

TABLO LİSTESİ

Tablo 7.1 Farklı pH'larda BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin partikül boyutları (nm) ……. **43**

Tablo 7.2 Farklı pH'larda BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin elektroforetik mobiliteleri (m^2/V.s) …….. **44**

Tablo 7.3 Farklı pH'larda BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin zeta potansiyelleri (mV) …….……... **45**

Tablo 7.4 Farklı pH'larda BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin iletkenliği (μS)..… **47**

Tablo 7.5 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin farklı tuz konsantrasyonlarında partikül boyutları (nm) ……..…….. **48**

Tablo 7.6 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin farklı tuz konsantrasyonlarında elektroforetik mobiliteleri (m^2/V.s) ……. **50**

Tablo 7.7 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin farklı tuz konsantrasyonlarında zeta potansiyelleri (mV) …….……. **52**

Tablo 7.8 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin farklı tuz konsantrasyonlarında iletkenliği (μS) ……..…….. **54**

ÖZET

PAA–Cu(II)–BSA Biyokompleksinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Bahar ÇAKIR

Kimya Anabilim Dalı

Fizikokimya Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN

Eş–Danışman: Prof. Dr. Mesut KARAHAN

Polielektrolitler (PE), metal ve proteinlerle etkileşime girerek güçlü immünojenik özelliklere sahip ve aşı adjuvanları olarak kullanılabilecek polikompleksler oluştururlar. Polikomplekslerin kararlılığı pH, tuz, metal/PE ve protein/PE oranları gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Polikomplekslerin kararlılığını değerlendirmek için partikül boyutu, polidispersite, mobilite ve zeta potansiyeli gibi zetasizer ölçümleri kullanılır. Bu parametreler, biyokullananabilirlik, çözünürlük ve immün toksisite gibi önemli faktörler göz önüne alındığında, polielektrolit–protein ikili konjugatları ve polielektrolit–metal–protein üçlü kompleksleri için de kritik önem taşır. Poliakrilik asit (PAA), güvenilirliği ve düşük toksisitesi nedeniyle aşı adjuvanlarında yaygın olarak kullanılan bir polianyonik polielektrolittir. Bu çalışmada, poliakrilik asit (PAA) ve Bovin Serum Albümin (BSA) proteini kullanılarak PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve iki farklı yönteme göre PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksleri sentezlendi ve farklı pH ve tuz konsantrasyonlarının etkisini incelemek için zetasizer ölçümleri yapılarak kararlı oldukları optimum pH ve tuz konsantrasyonu belirlendi. BSA'nın zeta potansiyel değerlerinin biyokonjugat ve I. ve II. yönteme göre hazırlanan biyokomplekslerden daha düşük olduğu ve tüm örneklerin çalışılan pH aralığında negatif yükle yüklendiği görüldü. II. Yönteme göre hazırlanan biyokompleksin diğerlerine kıyasla en yüksek zeta

potansiyel değerlerine sahip olduğu ve en kararlı çözeltinin bu yöntemle elde edildiği belirlendi. pH 7 ve pH 8 biyokonjugat ve biyokomplekslerin partikül boyutları artarken, pH 9 ve pH 11'de azalma gözlemlendi. Numunelerin iletkenliğinin artan pH ile birlikte kademeli olarak arttığı, en yüksek iletkenliğin ise biyokonjugatda olduğu gözlemlendi. Numunelerin iletkenliğinin tuz konsantrasyonu ile arttığı, I. yönteme göre hazırlanan biyokompleksin ise hiç değişmeyerek kararlı yapısını koruduğu tespit edildi. Tuz konsantrasyonunun artmasıyla birlikte BSA proteini ve biyokonjugatın partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri artarken, I. yönteme göre hazırlanan biyokompleksde çok az düştüğü ve II. yönteme göre hazırlanan biyokompleksde ise çok fazla değişmediği gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar biyokonjugat ve biyokomplekslerin, kararlı olduğu optimum pH ve tuz konsantrasyonunda yeni tür sentetik immunojenlerin geliştirilmesi amacıyla kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyokonjugat (PAA–BSA), Biyokompleks (PAA–Cu^{2+}–BSA), kararlılık, zeta potansiyeli.

ABSTRACT

Synthesis and Characterization of PAA–Cu(II)–BSA Biocomplex

Bahar ÇAKIR

Department of Chemistry
Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN

Co–supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mesut KARAHAN

Polyelectrolytes (PE) interact with metals and proteins to form polycomplexes that have strong immunogenic properties and can be used as vaccine adjuvants. The stability of polycomplexes is affected by various factors such as pH, salt, metal/PE and protein/PE ratios. Zetasizer measurements such as particle size, polydispersity, mobility and zeta potential are used to evaluate the stability of polycomplexes. These parameters are also critical for polyelectrolyte–protein binary conjugates and polyelectrolyte–metal–protein ternary complexes, considering important factors such as bioavailability, solubility, and immune toxicity. Polyacrylic acid (PAA) is a polyanionic polyelectrolyte commonly used in vaccine adjuvants due to its safety and low toxicity. In this study, PAA–BSA binary bioconjugate and PAA–Cu^{2+}–BSA ternary biocomplexes were synthesized using polyacrylic acid (PAA) and Bovine Serum Albumin (BSA) protein and PAA–Cu^{2+}–BSA ternary biocomplexes were synthesized according to two different methods, and zetasizer measurements were performed to examine the effect of different pH and salt concentrations. pH and salt concentration were determined. Zeta potential values of BSA bioconjugate and I. and II. It was observed that it was lower than the biocomplexes prepared according to the method and all samples had a negative charge in the pH range studied. II. It was determined that the biocomplex prepared according to the method

had the highest zeta potential values compared to the others and the most stable solution was obtained with this method. While the particle sizes of pH 7 and pH 8 bioconjugates and biocomplexes increased, a decrease was observed at pH 9 and pH 11. It was observed that the conductivity of the samples gradually increased with increasing pH, and the highest conductivity was in the bioconjugate. It was determined that the conductivity of the samples increased with the salt concentration, and the biocomplex prepared according to method I remained unchanged and maintained its stable structure. As the salt concentration increases, the particle size and zeta potential values of BSA protein and bioconjugate increase, while they decrease slightly in the biocomplex prepared according to method I and II. It was observed that the biocomplex prepared according to the method did not change much. The results obtained showed that bioconjugates and biocomplexes can be used to develop new types of synthetic immunogens at optimum pH and salt concentration where they are stable.

Keywords: Bioconjugate (PAA–BSA), Biocomplex (PAA–Cu^{2+}–BSA), stability, zeta potential.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Sentetik polielektrolitler (SPE), bağışıklık sistemini uyararak ve güçlendirerek hastalıklara karşı direnci arttırması (immün edici) ve adjuvan etki sağlaması nedeniyle son zamanlarda özellikle biyoteknolojik uygulamalarda oldukça sık kullanılmaktadır. Kararlı kompleks elde etmek amacıyla mikrobiyal ve viral antijenlere konjuge edilen sentetik polielektrolitler, organizmanın immün yanıtı arttırmakta ve immün koruma sağlamaktadır. Polimer yapısının kompleks oluşumunun karakterini ve kararlılığını etkilediği de göz önünde bulundurulduğunda, henüz kontrol altına alınamayan enfeksiyonlara karşı yapay aşılar üretilmeye başlandı. SPE yüzeyinin aktive edilmesi yoluyla SPE'ler metal iyonu aracılığıyla antijen ile birleşmekte ve böylece sentetik aşı modeli SPE–metal–protein üçlü kompleksleri geliştirilebilmektedir. SPE'lerin immün edici etkisi sayesinde, aşıların etkinliği artabilir, kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde yeni umutlar ortaya çıkabilir ve bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerin korunması sağlanabilir [1, 2]. Bağışıklık yanıtının arttırılmasına yardımcı olan maddeler olan aşı adjuvanlarında polianyon polimerler kullanılmaktadır. Poliakrilik asit, bir adjuvant olarak etkili ve bağışıklık sisteminin antijenlere karşı daha güçlü bir tepki vermesini sağladığından peptit taşıyıcı olarak kullanılan lineer polimerlerden biridir. PAA'nın bu özellikleri, biyouyumlu malzemeler, ilaç taşıyıcılar ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmasına yol açmaktadır [3]. Sulu çözeltideki poliakrilik asit (PAA) bir polianyondur. PAA, metal iyonları ve proteinler ile etkileşime girebilir ve bu da PAA–metal–protein üçlü biyokomplekslerinin oluşumuna yol açar. Bu komplekslerin yapısı ve özellikleri, pH ve farklı tuz konsantrasyonlarından etkilenir. Düşük pH değerlerinde PAA daha az iyonlaşır ve polikatyonik bir yapı kazanır. Bu durum, metal iyonları ile güçlü elektrostatik etkileşimlere yol açar, PAA–metal komplekslerinin oluşmasını sağlar ve elektriksel çift katman incelir. Yüksek pH değerlerinde ise PAA daha fazla iyonlaşır ve polianyonik bir yapı kazanır. Bu durum, metal iyonları ile etkileşimi zayıflatır, PAA–metal komplekslerinin ayrışmasına neden olur ve elektriksel çift katman

kalınlaşır. Tuz konsantrasyonu, PAA–metal–protein üçlü biyokomplekslerinin yapısını ve kararlılığını büyük ölçüde etkiler. Yüksek tuz konsantrasyonları, çözeltideki iyon sayısının artması ile PAA ve metal iyonları arasındaki elektrostatik etkileşimi zayıflatarak komplekslerin ayrışmasına neden olurken, protein molekülleri arasındaki hidrofobik etkileşimleri bozabilir ve proteinin denatüre olmasına yol açabilir. İyonların elektriksel çift katmana girmesi, katmanın kalınlığını azaltarak sıkılaştırabilir. Düşük tuz konsantrasyonları ile PAA'nın negatif yükünün daha belirgin hale gelerek komplekslerin yüzey yükünün değişmesi gibi etkiler elektrostatik etkilerin artmasına yol açabilir. Bazı komplekslerin kararlılığı azalırken, hidrofobik etkileşimler güçlenebilir [4]. Zetasizer ölçümleri, çözeltilerdeki partiküllerin kararlılığı ve yükü hakkında bilgi edinmek için sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Bu teknik, çözeltideki partiküllerin boyutları ve zeta potansiyelleri gibi kritik parametrelerin belirlenmesini sağlar. Zeta potansiyeli, bir partikülün yüzeyindeki elektrik potansiyelinin bir ölçüsü olup, koloidal sistemlerin kararlılığını belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Yüksek mutlak değerdeki zeta potansiyeli değerleri, partiküller arasında güçlü elektrostatik itme kuvvetlerinin varlığını gösterir. Zeta potansiyelinin mutlak değeri düştükçe, Van der Waals çekim kuvvetleri partiküllere etki eder ve partiküller arasındaki çekim, itmeyi yener. Böylece çözelti içindeki partiküllerin birleşerek agregatlar oluşturma eğilimi artar. ±30 mV'ın üzerindeki zeta potansiyeli değerleri, koloidal sistemlerin iyi bir fiziksel kararlılığa sahip olduğunu gösterir ve optimum koşul olarak kabul edilir. Bu aralığın dışında kalan zeta potansiyeli değerleri, partiküllerin bir araya gelmesine veya çökelmesine yol açabilir [5–8].

1.2 Tezin Amacı

Sentetik aşıların geliştirilmesinde, istenen elektrik yüküne, moleküler ağırlığa, yüksek moleküler yapıya veya konformasyona sahip polieletrolitlerin (PE) sentezi ve modifikasyonu önemli bir rol oynamaktadır. PE'lerin bu özellikleri, onları aşı adjuvanları olarak kullanılmaya uygun hale getirmektedir. Aşı adjuvanları, bağışıklık sisteminin antijene karşı daha güçlü bir yanıt vermesini sağlayarak aşıların etkinliğini arttırır.

Bu çalışmada, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve iki farklı yöntemle PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksleri taze olarak sentezlendi. Sentezlenen BSA, PAA–BSA

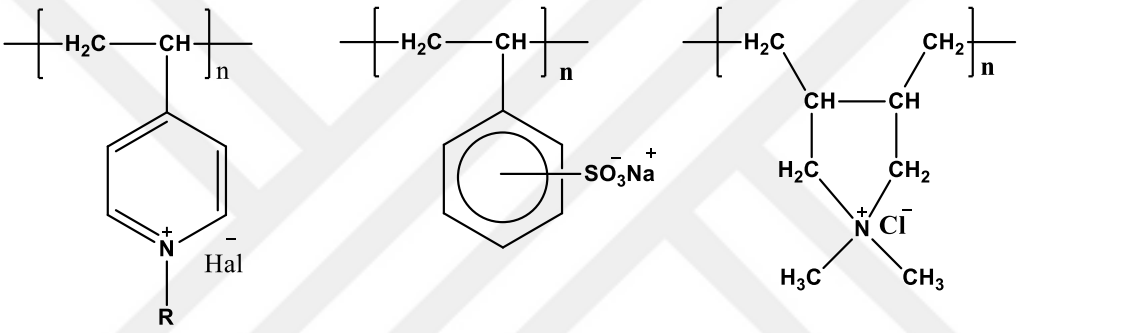
ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokomplekslerinin partikül boyutu, mobilitesi, zeta potansiyeli ve iletkenliği farklı pH ve tuz konsantrasyonlarında zetasizer cihazı ile ölçüldü ve PAA–BSA ikili biyokonjugat ve PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokomplekslerinin potansiyel aşı adjuvanı olarak değerlendirilmesinde önemli olacak kararlılığını koruduğu optimum pH ve tuz konsantrasyonları belirlendi.

Bu çalışma, PAA–BSA biyokonjugat ve PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokomplekslerinin aşı adjuvanı olarak potansiyellerini araştırmaya yönelik çalışmalardan biridir. Elde edilen bulgular, sentetik aşıların geliştirilmesinde yeni ve etkili adjuvanlar tasarlanması çalışmaları açısından önem taşımaktadır.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Polielektrolitler

Polielektrolitler, tekrarlanan birimleri elektrolit özellik taşıyan polimerlerdir. Hem polimerik hem elektrolit özelliklere sahiptirler. Suya veya çeşitli iyonlaştırıcı çözücülere konulduklarında yüksek yüklü polimerik moleküllere ayrışırlar (Şekil 2.1). Ayrışmaya polimer zincirinin tekrar eden polielektrolit birimleri üzerinde taşıdığı elektrik yükünden daha küçük, zıt yüklü karşıt iyonlar eşlik eder.

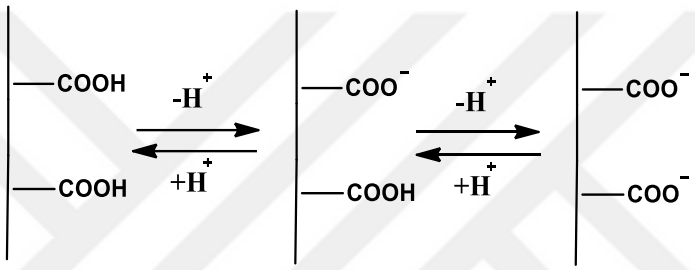


Şekil 2.1 Polielektrolit polimer sistemleri

Çözünür polielektrolitler suda çözünür ve homojen çözelti oluştururken, çözünmez polielektrolitler suda çözünmez ve çökelti veya koloidal süspansiyon oluşturur. Polielektrolitlerin çözücü içerisindeki çözünürlükleri, taşıdığı polimerin fonksiyonel grubu, karşıt iyonlar, çözücünün pH'ı gibi birçok faktöre bağlıdır. Düşük iyon kuvvetli çözeltilerde, her bir fonksiyonel grup, karşıt yüklerin molekül içi itilmesi sebebiyle genişler ve sarılmamış formda bulunur. Çözeltinin iyonik şiddeti arttırıldığında, çözeltideki karşıt iyonlar yoğun tuz nedeniyle sarmal eğiliminde bulunur. Polielektrolitler genellikle suda çözünür ve su gibi polar çözücüler içerisinde çözülen polielektrolitlerin iyonlaşabilen fonksiyonel gruplarının ayrışması sonucu yüklü polimer zincirleri ve karşıt iyonlar çözeltiye karışır. Bu yükler arasındaki etkileşim polielektrolit çözeltilerde eşsiz özelliklere neden olur. Tam tersi şekilde, uygun bir pH'da çözünür olarak herhangi bir polimer zincirine iyonik grup bağlanmasıyla da elde edilebilirler. Polipeptitler, proteinler,

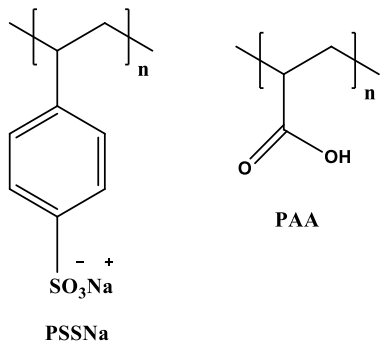
DNA gibi birçok biyolojik molekül ve poliakrilik asit (PAA), polistiren sülfonat (PSS), ve bu maddelerin tuz çözeltileri birer polielektrolittir. Hem doğal hem de sentetik polielektrolitlerden akademik, teknolojik ve endüstriyel alanlarda yararlanılmaktadır.

Polielektrolitlerin tekrarlanan birimlerinde bulunan iyonik gruplar sulu çözeltide disosiye olur ve polimer yüklü hale gelir (Şekil 2.2). Polielektrolitlerin çözelti içerisindeki davranışlarını asit–baz kuvveti, yük yoğunluğu, yüklerin geometrik yeri ve iyon türü etkiler. Nötr partiküllerin yüzey yükünü etkileyerek sulu çözelti içinde dağılmalarını sağladıklarından su arıtımı, yağ geri kazanımı, ilaç dağıtım sistemi, gibi malzemelerde kullanılırlar.



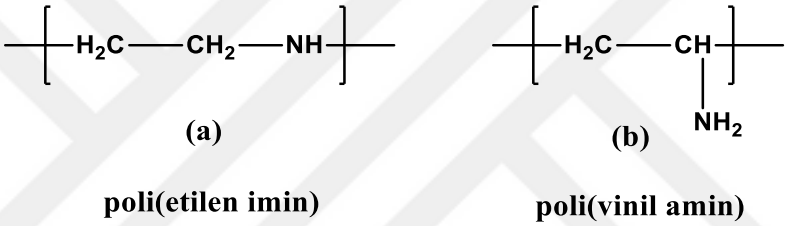
Şekil 2.2 Sulu çözeltideki poliakrilik asitin dissosiyasyonu

Polielektrolitler, taşıdıkları iyonik grupların pozitif veya negatif yüklü olmasına göre sınıflandırılır. Pozitif yüklü fonksiyonel grup içeren polimer birimlerine katyonik polielektrolitler, negatif yüklü fonksiyonel grup içeren polimer birimlerine ise anyonik polielektrolitler denir. Sodyum polistiren sülfonat (kuvvetli), poliakrilik asit (zayıf), sodyum poliakrilat ve polivinilsülfonat anyonik polielektrolitken, polietilenimin, polivinilpiridin ve poliakrilamid ve kopolimerleri katyonik polielektrolitlerdir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 PSSNa ve PAA anyonik polielektrolitlerinin kimyasal yapısı

Zıt yüklü iki polielektrolit karıştırıldığında elektrostatik çekim kuvvetleri aracılığıyla polielektrolit kompleksleri meydana getirirler. Yüksek yük yoğunluğu ve seçici geçirgenlik (özellikle ilaç taşıma sistemlerinde) gibi özelliklere sahip olduğu için birçok bilimsel ve teknolojik alanda önemlidir. İki polieletrolit arasındaki etkileşim, fonksiyonel grupların iyonlaşma derecesi ve yük yoğunluğu, polimer zincirinin uzunluğu, polielektrolitin konsantrasyonu gibi birçok özelliğe bağlıdır. Şekil 2.4 (a)'da gösterildiği gibi etkileşen grup ana zincirde ise lineer yapıda, (b)'de gösterildiği gibi yan zincirde ise asılı yapıda polielektrolit kompleksi ortaya çıkar. Lineer yapıda, polimer zincirleri birbirine sıkıca bağlıdır ve kompleksler suda çözünür veya çözünmez olabilir. Asılı yapıda ise etkileşen gruplar yan zincirde olduğundan polimer zincirleri birbirine daha gevşek bağlıdır ve kompleksler suda çözünür olma eğilimi gösterir.



Şekil 2.4 Etkileşen grupların yapıları

Polielektrolit kompleksleri deney koşullarında pH, sıcaklık, tuz ayarlamaları, polielektrolitlerin eklenmesiyle sistemin birleşiminin değiştirilerek ayarlanması ile oluşturulabilir. İki polielektrolit arasındaki kompleksleşme reaksiyonları, elektrostatik çekim kuvvetleri ile iyonik kompleksleşme, hidrofobik gruplar arasındaki Van der Waals kuvvetleri ile polar gruplar arasındaki hidrojen bağlarına dayanır [9].

Polielektrolit komplekslerin oluşumu ve özellikleri, yük yoğunluğu ve konsantrasyonu, fonksiyonel grupların yapısı ve konumu, zıt yüklerin oranı (katyonik grupların anyonik gruplara molar oranı), makromoleküllerin molekül ağırlığı, fiziksel şartlar (pH, sıcaklık, vd.) gibi faktörlere bağlıdır. Yük yoğunluğu az olan kompleks kolay disosiye olurken, yük yoğunluğu fazla olan kompleks kararlıdır. Polielektrolit kompleksler yüksek dielektrik sabiti ve yalıtım direnci sahiptir. Biyouyumludur ve toksik değildir. Suda çözünür veya çözünmez olabilir. Çözünürlüğü, kullanılan polielektrolitlerin türüne ve iyonik güce bağlıdır. Bazı komplekler suda çözünürken, bazıları ise organik çözücülerde çözünür. En önemli

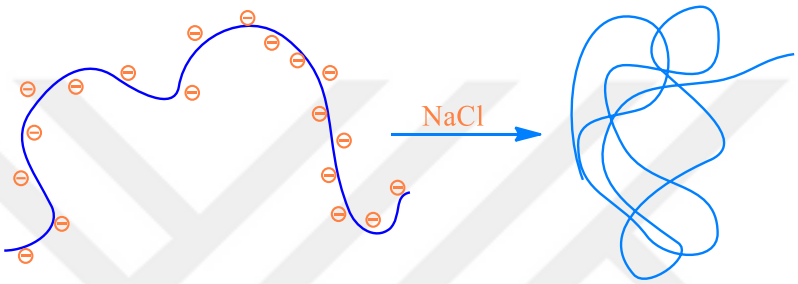
özelliği ise içindeki katyon ve anyon grupların molar oranı yani kompleksin stokiyometrisidir.

Zıt yük taşıyan polielektrolitlerin sulu çözeltideki termodinamik, kinetik ve reaksiyon mekanizmasının incelenmesi, iki farklı tip polielektrolit kompleksi türü olduğunu ortaya koymaktadır. Birincisi çözünür stokiyometrik olmayan polielektrolit komplekslerdir ve bu kompleksler kararlı, optik olarak şeffaf çözeltiler oluşturur. İkincisi ise çözünmez stokiyometrik polielektrolit komplekslerdir ve bu kompleksler ise suda çökelti (katı) oluşturur veya faz ayrımı olmadan homojen bulanık koloidal süspansiyonlar (homojen karışım) halinde var olurlar. Stokiyometrik polielektrolit kompleksler eşit miktarda zıt yüklü grup içerir ve yükleri sıfırdır ve faz ayrımları gözlemlenebilirdir. Stokiyometrik olmayan polielektrolit komplekslerde bu durumun aksi geçerlidir. Ayrıca zayıf polielektrolit içeren komplekslerin güçlü polielektrolit içerenlere göre daha az agregasyon gösterdiği tespit edilmiştir.

Poliakrilik asit ve türevleri üzerinde yapılan çalışmalarda, çeşitli faktörlere bağlı olarak stokiyometrik veya stokiyometrik olmayan polielektrolit kompleksler elde edilmiştir. PAA'nın moleküler ağırlığı, monomer bileşimi, karşıt polielektrolitin türü ve yük yoğunluğu kompleksleşme türünü ve gücünü etkilediği, çözeltideki tuz konsantrasyonunun PAA'nın iyonlaşma derecesini ve yük yoğunluğunu etkilediği, düşük pH'ın kompleksleşmeyi arttırdığı ve sıcaklık arttıkça kompleksleşmenin arttığı görülmüştür [10].

Polielektrolit kompleksler; geçiş metal iyonlarının anyonik komplekslerinin ayrılması, deniz suyundan içme suyu elde edilmesi (ters ozmoz), biyolojik sıvıların ayrışması (kan, idrar gibi biyolojik sıvıların ultrafiltrasyonu), membranlar (yarı–geçirgen zarlar), yapay böbrekler (hemodiyaliz), yapay karaciğer (hemoksijenasyon), kontakt lensler, pil ayırıcılar, iyon değiştiriciler (örneğin, ısıtma ve aydınlatmada yüksek iletkenlik gösteren filmler), katkı maddesi (gıda, ilaç ve kozmetik ürünlerinde emülgatör, stabilizatör ve kıvam arttırıcı), katalizör (oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarında), genetik materyal taşıyıcısı (DNA, RNA gibi genetik materyalleri taşımada), ilaç taşıma sistemleri, biyosensötler, su arıtma (sudan ağır metalleri, organik kirleticileri gidermede) gibi birçok uygulama alanı bulunmaktadır [9].

Polielektrolitin sulu çözeltideki karakteristik konformasyonu; yapısı, çözelti ve konsantrasyon gibi faktörlere bağlı olarak elektrostatik ayrışma ve elektrostatik birleşme ile meydana gelir. Seyreltik sulu çözeltilerde polielektrolitler lineer benzeri gevşek halde iken, konsantre, tuzsuz ve tuz çözeltisinde ise yumak halde bulunurlar. Bunun bir diğer açıklaması da yüklerin birbirlerini coulomb itmesini azaltıcı lineer konformasyonda viskozitesi yüksek, tuzun yani iyonik şiddetin artmasıyla yüklerin arasındaki coulomb itmesinin engellenmesi sonucu viskozitenin düşmesi ve iyonik şiddete bağlı olarak (daha da arttırıldığında) yüksüz molekül davranışı sergilemesidir (Şekil 2.5).



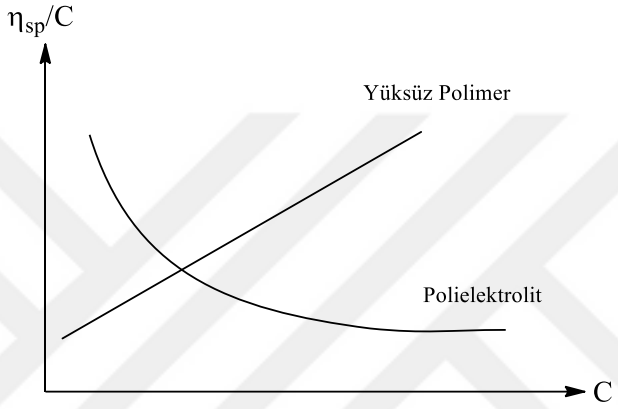
Şekil 2.5 Tuz ilavesi ile değişen polielektrolit konformasyonu

Polielektrolit çözeltileri tuzlar gibi iletken özellik gösterir. İletkenlik ölçümleri polielektrolit çözeltisinin hakkında bilgi vermekle birlikte polielektrolitlerin elektrostatik alanında bulunan hareketli karşıt iyonların hareketiyle çözeltinin iletkenliği artar.

Polielektrolitler, iyonlaşma derecesine göre de güçlü ve zayıf olarak sınıflandırılabilirler. Güçlü polielektrolitler uygun pH değerlerinde çözelti içinde tamamen iyonlarına ayrışarak sabit bir iyonizasyon derecesi sergilerken zayıf polielektrolitler pH'a bağlı iyonizasyona sahiptir. Zayıf polielektrolitler genellikle orta pH değerlerinde (pH 2–10) ayrışma sabiti vardır ve o pH değerlerinde kısmen iyonlarına ayrışır. Güçlü polielektrolitlerde polimerdeki yükler zincir boyunca sabittir. Zayıf polieletrolitlerde ise iyonlaşma derecesi polielektrolitte bulunan iyonlaşabilen fonksiyonel grupların kimyasal özelliklerine bağlıdır ve çözeltinin pH'ı, iyonik şiddeti, sıcaklık gibi şartlara göre ayarlanabilir. İyonizasyon derecesi, polielektrolitin özelliklerini etkiler. Dolayısıyla polielektrolit ve düşük moleküler ağırlıklı tuzdan kaynaklanan karşıt iyonlar da çözeltinin iyonik şiddetini ve bu da elektriksel iletkenlik gibi diğer özelliklerini etkiler. Karşılıklı itme zincirin

genişlemesine neden olur. Zincire bağlanan iyonik yükler yüksek yoğunluklu bölgeler iyonların aktivite katsayılarını ve özelliklerini etkiler.

Polielektrolitler katkı maddesi olarak sulu çözeltilerin fiziksel özelliklerini değiştirmek için kullanılmaktadır. Çözeltileri polimer gibi viskoz olduğundan sağlık, kişisel bakım ve kağıt endüstrisinde viskozite arttırıcı, koyulaştırıcı, topaklaştırıcı gibi uygulama alanları vardır. Polielektrolitlerde derişim azalırken pozitif ve negatif yüklerin birbirlerini itmeleri ve polielektrolitin şişmesi sonucu viskozite artarken (Şekil 2.6), polimerlerde ise derişim artarken viskozite artar [9].

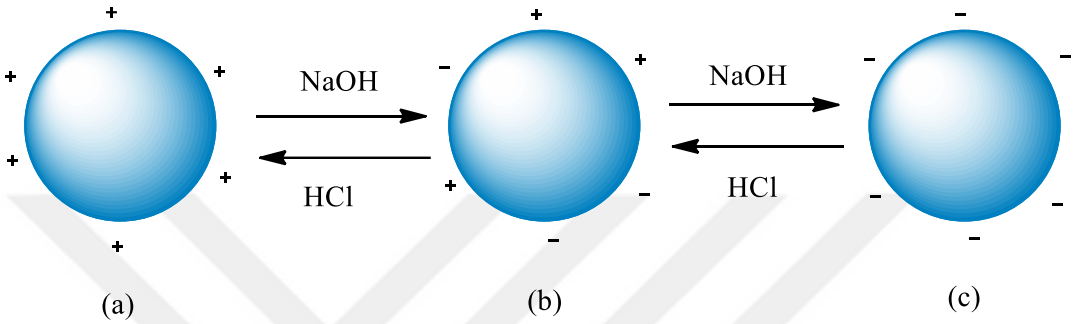


Şekil 2.6 Polielektrolit ve yüksüz polimerlerde viskozite–konsantrasyon değişimi

Polimerleşme derecesi (PD), polimer zincirindeki monomer birimlerinin sayısını ifade eder ve polielektrolitin birçok özelliğini etkiler. Yüksek PD'li polielektrolitler, düşük PD'li polielektrolitlere kıyasla daha yüksek molekül ağırlığına, daha fazla kompleks oluşumuna, daha fazla bağlanma miktarına ve daha fazla elektrokimyasal özelliğe sahip olma eğilimindedir [11].

Proteinler, amino asit adı verilen monomerlerin peptit bağları ile bir araya gelmesi sonucu oluşan doğal polimerlerdir. Bu amino asitlerin yan zincirlerinde asidik ve bazik fonksiyonel gruplar bulunması sebebiyle amfoterik özellik göstermekte olup bu monomerler arasındaki elektrostatik çekme kuvvetleri tarafından yönlendirilirler. Kısacası proton alarak veya proton vererek yüklenirler. Şekil 2.7'de küreler proteinleri temsil etmektedir. (a)'da proteinler asidik ortamda (ekstra protona sahip) bulunduğundan net bir pozitif yüke sahiptir ve (+) yüklüdür. (c)'de proteinler bazik ortamda bulunduğundan net bir negatif yüke sahiptir ve (–) yüklüdür. (b)'de ise proteinler net elektrik yüklerinin sıfır olduğu pH derecesinde bulunurlar ve bu pH derecesine izoelektrik nokta (pI) denilir. Protein izoelektrik

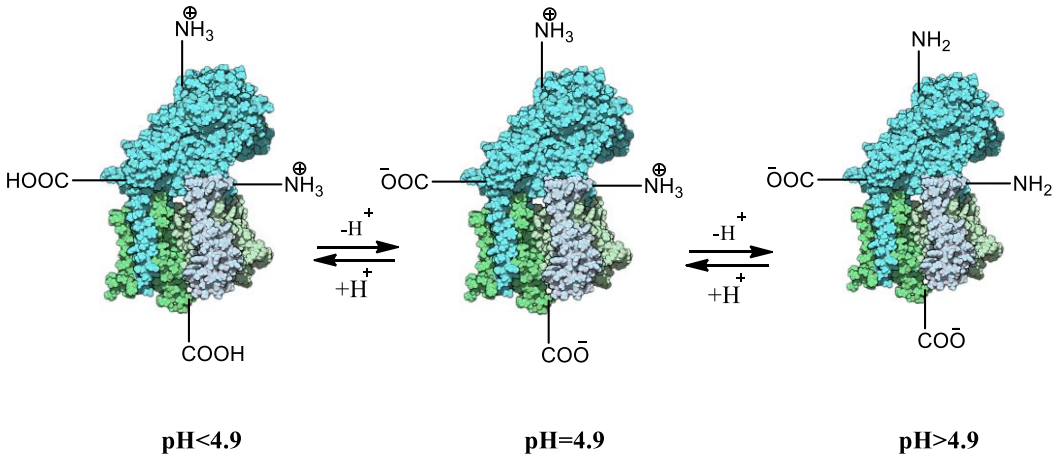
noktası, proteinlerin elektroforetik mobilitesinin sıfır olduğu, viskozitenin minimum olduğu ve çözünürlüğün en düşük olduğu, çökelme eğiliminin ise en yüksek olduğu bir noktadır. Proteinin iyonize grupları arasındaki güçlü elektrostatik çekim kuvvetleri, proteinin yoğun ve kompakt bir yapı oluşturmasına yol açar. Nötral pH civarında izoelektronik noktaya sahip proteinlerin asidik ve bazik amino asit sayıları genellikle birbirine eşittir. Proteinlerin izoelektrik noktaları birbirinden farklıdır [12].



Şekil 2.7 pH'ın proteinlerin yüzey yüküne etkisi

Proteinler, monomerleri amino asitler gibi titrasyon edilse de kompleks yapıda olduklarından pH eğrileri bölgelere ayrılarak incelenir [12].

Bovin serum albümin (BSA)'in pH'a bağlı yük profilindeki değişiklikler Şekil 2.8'de örnek olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.8 BSA'nın pH'a bağlı yük profilinde değişiklikler

2.2 Taşıyıcı Moleküller

Zayıf immünojenik özellikte ve yeterli büyüklükte moleküler boyuta sahip olmayan moleküller, konjugasyon bağıyla antikor oluşturmak ve antikor üretiminde

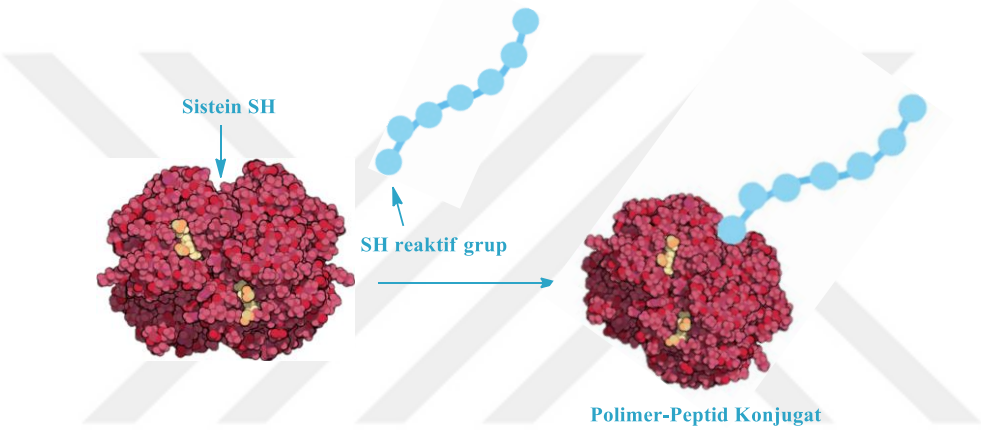
immünojenliği arttırmak için yeterli büyüklükte molekül boyutuna sahip protein veya lineer özellikteki polimerlere bağlanırlar [13].

2.2.1 Protein Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

Büyük molekül boyutuna sahip BSA (Bovin Serum Albümini), HSA (İnsan Serum Albümini), KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) ve OVA (Ovalbümin) gibi proteinler, antikor üretiminde yaygın olarak taşıyıcı proteinler olarak kullanılmaktadır. Bu proteinlerin büyük molekül boyutları, bağışıklık sisteminin dikkatini çekerek antikor üretimini teşvik eder. Kararlı kovalent bağlarla peptitlere konjugasyon için yaygın olarak kullanılan taşıyıcı moleküller, BSA ve KLH proteinleridir. Bu konjugasyon işlemi, peptitlerin immünojenikliğini ve antikor üretimini önemli ölçüde arttırır. Peptitler, BSA veya KLH proteinlerinin C– ucu, N– ucu veya içerisindeki fonksiyonel gruplara (karboksil (–COOH), sülfidril (–SH) ya da amino ($–NH_2$) uçları gibi) kovalent bağlarla bağlanabilir. Bağlanma bölgesi, peptitin immünogenikliğini ve antikor bağlanma özelliklerini etkileyebileceğinden, konjugasyon dizaynı oldukça önemlidir. Antikor üretiminde optimal sonuçlar elde etmek için, peptitin antijenik özelliklerini en üst düzeye çıkaran ve taşıyıcı proteine uygun konjugasyon stratejisi seçilmelidir. Etkili bir antikor tepkisini tetiklemek için peptit dizilimi bağışıklık sistemi tarafından tanınmalı ve antikor üretimini tetikleyecek kadar immünojenik olmalı, istenen antikor türünü üretecek şekilde tasarlanmalı ve istenmeyen dokuya zarar vermeden hedef hücrelere veya dokuya bağlanan antikorların üretilmesini sağlamalıdır. Peptit dizilimi seçildikten sonra, taşıyıcı proteine bağlanacak şekilde konjugasyon dizaynı yapılmalıdır. Konjugasyon dizaynı, bağlanma bölgesini, bağlanma yöntemi ve konjugasyon reaksiyonu belirlemektedir. Doğru taşıyıcı protein ve antijenik peptit dizilimi seçimi ve uygun konjugasyon dizaynı ile daha etkili ve hedefli antikorlar üretilebilir [14].

Peptit–protein konjugasyonunda kullanılan bağlanma yöntemi, peptitlerin taşıyıcı protein üzerindeki konumlanmasını ve immün yanıtını önemli ölçüde etkiler. Sisteine dayalı bağlanma yöntemleri serbest –SH grubunun kovalent etkileşiminden kaynaklanmakta olup maleimidler ile yapılmaktadır. Maleimidler, peptitlerdeki sistein kalıntılarının tiolleriyle reaksiyona girerek tioester bağları oluşturur. Şekil 2.9'da kısa zincirli peptit (oligopeptit) moleküllerine kovalent bağlarla bağlanan lineer ve uzun zincirli polimerlerin konjugatları gösterilmiştir. Diğer bağlanma

yöntemleri için ise glutaraldehit ya da N–Hidroksisüksinimid gibi reaktif gruplar da peptit–protein konjugasyonu için kullanılabilir. Bu reaktif gruplar, peptitlerdeki amin grupları ile proteinlerdeki amino veya karboksil grupları ile reaksiyona girerek amid veya imid bazlı bağlar oluşturabilir. Antikor üretiminde daha etkili ve hedefli sonuçlar elde etmek için klasik bağlanma yöntemleri (peptit dizilimine sistein bağlanması gibi) yerine spesifik bağlanma yöntemlerinin kullanılması önemlidir. Spesifik bağlanma yöntemleri peptitlerin taşıyıcı proteinin belirli bölgelerine daha güçlü bağlanmasını sağlar ve spesifik olmayan bağlanma reaksiyonlarından kaynaklanan yan etkileri azaltır [13–15].



Şekil 2.9 Oligopeptit–polimer konjugatların şematik gösterimi

2.2.2 Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

Büyük moleküler polimerler (Poliakrilik asit, Poli(N–isopropilakrilamit), Poli(N–vinilprolidon) gibi), proteinlerin konjugasyonunda lineer taşıyıcılar olarak kullanılabilir. Bu polimerler, kovalent bağlar aracılığıyla proteinlere bağlanabilir ve proteinlerin özelliklerini değiştirebilir. Proteinlerde olduğu gibi bağlanma yani konjugasyon bölgesi dizinin C– ucu, N– ucu ya da içerisindeki herhangi bir fonksiyonel grup (karboksil (–COOH), sülfidril (–SH) ya da amino ($–NH_2$) uçları gibi) olmakla birlikte peptit dizilimine ve konjugasyon tipine bağlı olarak seçilir.

Polielektrolit konjugasyonu, proteinlerin, antijenlerin veya ilaç etken maddelerinin istenmeyen özelliklerini (düşük çözünürlük, kararsızlık, küçük molekül boyutu, düşük antijenik özellik, toksisite gibi) değiştirmek ve aşı performansını iyileştirmek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte, suda çözünebilir polimerler proteinlere, antijenlere veya ilaç etken maddelerine kovalent bağlarla bağlanır. Bu konjugasyon,

peptitlerin kimyasal modifikasyonunu, hidrofobik peptitlerin suda çözünürlüğünü, bölgesel etkilerin potansiyelini, immünojenik ve immünoreaktif özelliklerin geliştirilmesini ve canlı organizmalarda daha uzun süreli etkiyi sağlayarak önemli faydalar sunmaktadır. Polielektrolit konjugasyonlarının yüksek çözünürlük, kararlılık, yüksek molekül boyutu, yüksek antijenik özellik, biyouyumluluk gibi özellikleri kullanımını arttırmıştır.

Klasik kimyasal yöntemler kullanarak suda çözünür makromoleküllerin fonksiyonel grupları aktive edilerek protein–lineer ve peptit–lineer polielektrolit kovalent konjugatları sentezlenmiştir. Bu sentez işlemi iki basamaklı kovalent konjugasyon reaksiyonu ve karbodiimid aktivasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Birinci basamakta polimerin karboksil grupları karbodiimid ile aktif hale getirilir, karboksil grupları karbodiimide saldırır ve o–açilisoüre ara ürünü oluşur. İkinci basamakta ise protein veya peptitteki amino grupları ile karboksil grupları arasında kondenzasyon reaksiyonu gerçekleşir ve kararsız bir ara ürün oluşur. Bu ara ürün, peptit veya proteindeki amino grupları tarafından saldırıya uğrayarak lineer polimer ile peptit veya protein arasında kovalent çapraz bağlar oluşur ve yüksek immünolojik özelliğe sahip konjugatlar sentezlenir [16].

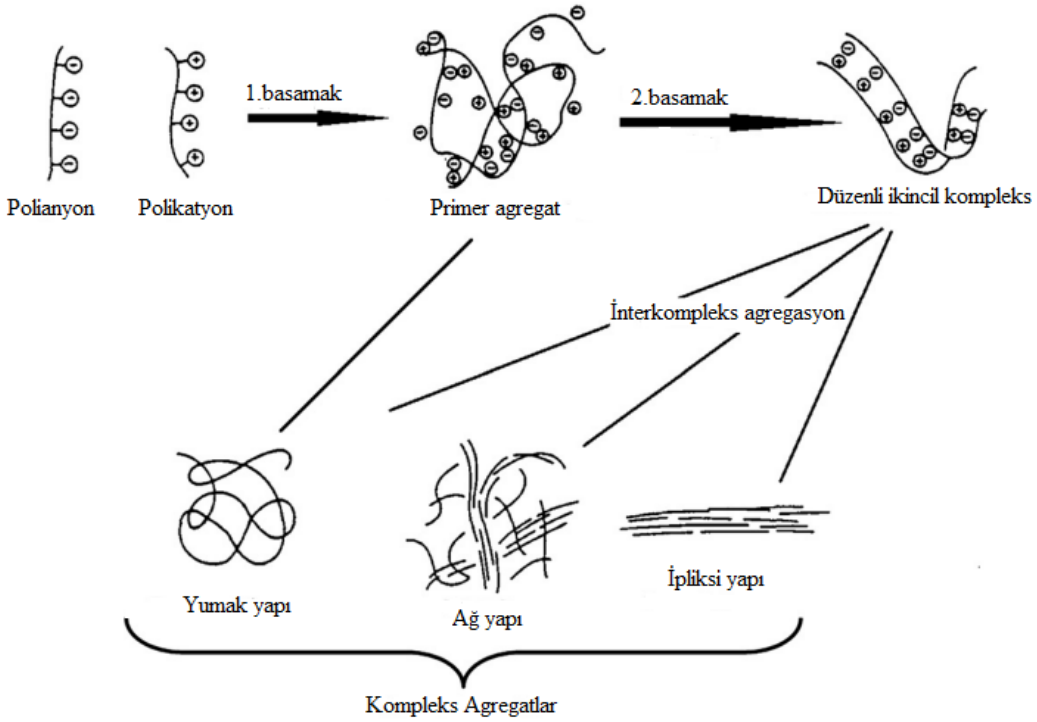
2.3 İnterpolielektrolit Kompleksler

İnterpolielektrolit kompleksler ve polielektrolit kompleksler, elektriksel olarak zıt yüklü polimerlerin etkileşimiyle oluşan supramoleküler yani iki veya daha fazla molekülün moleküllerarası etkileşimlerle bir araya gelerek oluşturduğu yapılardır. Bazı önemli farklılıkları vardır: Polielektrolit komplekslerde elektrostatik etkileşimlerle oluşurlar. İnterpolielektrolit komplekslerin oluşumu ise kovalent bağlar ve elektrostatik etkileşimlerin kombinasyonu ile oluşur. Kovalent bağ oluşumu iki polimer zinciri arasındaki reaktif gruplar arasındaki kimyasal reaksiyonlar yoluyla gerçekleşirken, elektrostatik etkileşimler zıt yüklü polimer zincirleri arasındaki çekim kuvvetlerinden kaynaklanır. Bu kovalent bağlar, komplekslere daha fazla kararlılık kazandırır. Özellikleri, kullanılan polielektrolitlerin türüne, iyonize edilebilir grupların oranına ve çözücüye bağlı olarak değişebilir ve yüksek çözünürlük, termal kararlılık, mekanik dayanıklılık ve biyouyumluluk gibi özelliklere sahip olabilir. Yapıları, kullanılan polimerlerin türüne ve sentez yöntemlerine bağlıdır. Küresel, tabakalı, lifli veya karmaşık

morfolojiler gibi çeşitli yapılara sahip olabilirler. Biyomalzemeler, ilaç taşıyıcıları, katalizörler, membranlar ve katı elektrolitler gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır.

İnterpolielektrolit kompleksler koloidal çözeltilerde partiküllerin kararlılığını arttırmak amacıyla kullanılır. Zıt yüklü polimer zincirleri arasındaki elektrostatik çekim kuvvetleri, partiküllerin bir araya gelmesini ve çökelmesini önler. Ayrıca viskoziteyi arttırmak veya azaltmak için, toksik maddelerin taşınmasını ve salınmasını kontrol etmek için ve partiküllere yeni fonksiyonlar kazandırmak için (katalitik aktivite veya biyoduyarlılık) kullanılabilir [17].

Kompleks agregat partiküller, polielektrolitlerin elektrostatik etkileşimler yoluyla birleşerek oluşturduğu yapılardır. Polielektrolitlerdeki iyonik gruplar arasındaki elektrostatik çekim kuvvetleri, polielektrolitlerin bir araya gelerek kompleks agregat partikülleri oluşturmasına neden olur. Elektroforetik ve viskozimetrik ölçümler kompleks agregat partiküllerin boyutunu, şeklini ve yüzey yükünü belirlemek için kullanılan yöntemler olmakla birlikte poliamfolite benzediğini göstermiştir. Poliamfolitler, hem pozitif hem de negatif yüklü iyonik gruplara sahip polimerlerdir. Kompleks agregat oluşumu, seyreltik sulu ortamlarda iki aşamalı bir mekanizmayla gerçekleşir (Şekil 2.10). İlk aşamada, az miktarda titrant ilavesi, iyon eşleşmeleri yoluyla küçük kompleks agregatlarının oluşumuna yol açar. Titrant, polielektrolitlerin iyonik gruplarından biriyle reaksiyona girerek iyon çifti oluşturur. Bu iyon çifti, diğer polielektrolitlerin iyonik gruplarıyla çekim kuvvetleri oluşturarak kompleks agregatların oluşmasına neden olur. Oluşan primer agregatların yüzey yükü kararlıdır. Bu, agregatların net yükünün sıfır olmadığı anlamına gelir. Agregatların yüzeyindeki iyonik gruplar, su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturabilir. Bu hidrojen bağları, agregatların yüzey yükünün korunmasına yardımcı olur. İkinci aşamada ise 1:1 stokiyometrik orana ulaşılıncaya kadar titrantın %70'inden fazlası eklendiğinde, primer agregatlar birbiriyle birleşerek daha büyük partiküller oluşturur. Bu agregasyon, elektrostatik çekim kuvvetleri ve hidrojen bağları aracılığıyla gerçekleşir. Titrantın konsantrasyonu arttıkça, agregatların boyutu ve yüzey yükü de artar [18].



Şekil 2.10 Seyreltik sulu ortamda iki aşamalı bir mekanizma ile kompleks agregatların oluşumu [18]

İnterpolimer komplekslerin sentezi için kullanılan iki ana yöntem, kimyasal sentez ve matriks polimerizasyondur. Hangi yöntemin kullanılacağı, sentezlenmek istenen interpolimer komplekslerin türüne ve istenilen özelliklere bağlıdır. Kimyasal sentez yönteminde, önceden sentezlenmiş ve yapısal olarak uyumlu makromoleküller kullanılır. Reaksiyon ortamında, bu makromoleküller rastgele çarpışarak reaktif zincirler oluşturur. Bu zincirler, monomerlerin eklenmesiyle uzayarak ve birbirleriyle bağlanarak interpolimer kompleksleri oluşturur. Matriks polimerizasyonu yönteminde ise monomerlerin polimerleşmesi, reaksiyon ortamına katılan matriks makromoleküllerin yüzeyinde gerçekleşir. Matriks makromoleküller, monomerlerin bağlanma yerlerini, yeni zincirlerin uzamasını ve çift zincirlerin birbirine bağlanmasını belirleyerek polimerleşmenin kontrolünü sağlar. Bu sayede, istenilen yapıya ve özelliklere sahip interpolimer komplekslerin elde edilmesi kolaylaşır.

Metaller, interpolimer komplekslerin oluşumunda ve özelliklerinde önemlidir. Me^{+n} iyonları, zıt yüklü polimer makromoleküllerinin bağlanmasını sağlayarak kompleks oluşumunu kolaylaştırır, polielektrolit komplekslerinin kararlılığını arttırır ve komplekslerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirir. Sodyum polistiren

sülfonat gibi negatif, poli(vinilbenziltrimetilamonyum klorür) gibi pozitif, iki zıt yüklü polielektrolitlerin kompleksleri, metallerin katkısıyla daha kararlı hale gelir [19].

2.3.1 Polielektrolit – Protein Kompleksleri

Proteinler amino asitlerden, polimerler ise monomerlerden oluşan makromoleküllerdir. Hidrofilik noniyonik polimerler (poli(vinil pirolidon) gibi) dahil olmak üzere çeşitli polimer türleri, proteinlerle etkileşime girebilir.

Proteinler ve polimerler arasında kovalent olmayan etkileşimlerin çoğu kompleks oluşumuna katkıda bulunabilir. Proteinlerdeki karboksilik asit grupları ve polimerlerdeki hidroksil veya amin grupları arasındaki etkileşimler hidrojen bağı ile oluşur. Poli(vinil pirolidon), hidroksil grupları proteinlerdeki karboksilik asit gruplarıyla hidrojen bağı oluşturur. Oluşan hidrojen bağları, protein–poli(vinil pirolidon) komplekslerinin kararlılığına katkıda bulunur. Proteinler ve polimerler, iyonize gruplar içerdikleri için elektrostatik etkileşimlere girebilirler. Bu etkileşimler, protein–polimer komplekslerin oluşumunu ve kararlılığını etkileyebilir. Örneğin, zıt yüklü gruplar arasındaki elektrostatik çekim, protein–poli(vinil pirolidon) komplekslerinin oluşumuna yol açabilir. Genellikle elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğu kabul edilen polikompleks sistemlerinde, tüm çözünenlerin suya göre daha hidrofobik (suyu iten) olması nedeniyle, hidrofobik etkileşimler göz ardı edilemez. Proteinler ve polimerler, hidrofobik gruplar içerdikleri için hidrofobik etkileşimlere girebilirler. Bu etkileşimler, sulu ortamdaki protein–polimer komplekslerinin oluşumunu ve kararlılığını etkileyebilir. Proteinlerle hidrofobik etkileşimlerin ciddi bir katkı yapmadığı polimerler spesifik olarak tasarlanabilir [20].

Polielektrolit özelliği olan proteinler, sentetik ve doğal polimerlerle güçlü elektrostatik etkileşimler kurarak polielektrolit kompleksleri oluştururlar [21]. Bu etkileşimler, çözünebilir kompleksler, koaservat oluşumu, [22] amorf çökeltiler, enzim immobilizasyonu, stabilizasyonu, protein substrat afinitesi modifikasyonu ve faz değişimi gibi çeşitli sonuçlara yol açabilir [23]. Bu durum hücrelerde, bazik histon proteinleri DNA ile coulombik etkileşimler kurarak yoğun bir yapı oluşturur. Bu yoğunlaşma, DNA'nın düzenlenmesine ve transkripsiyonunun kontrolüne yardımcı olur. Polilizin gibi bazik polipeptitler, DNA ile etkileşime girerek

DNA'nın davranışını etkileyebilir. Proteinler ve nükleik asitler arasındaki elektrostatik etkileşimler, hücrelerin işleyişi için kritik öneme sahiptir. Bu etkileşimler, DNA'nın transkripsiyonunun kontrolünü ve diğer birçok önemli biyolojik süreci düzenler.

Polikomplekslerin bileşiminin makromoleküler seviyede anlaşılması ve polikomplekslerin yapısı hakkında güvenilir sonuçlar elde edilmesi için yapılan çalışmalar polimer–protein karışımlarının homojen çözeltilerine fizikokimyasal metotların uygulanması ile sağlanmıştır [24].

2.3.2 Polimer–Metal Kompleksleri

Poliakrilik asit, çeşitli metal iyonlarıyla kompleksler oluşturabilen sentetik bir polimerdir. Yapılan çalışmada, PAA'nın Co(II), Cu(II), Fe(III), Ni(II) ve Zn(II) metalleriyle kompleksleri sentezlenmiş ve termogravimetrik yöntemi ile karakterizasyonu araştırılmıştır. PAA ve metal tuzlarının sulu çözeltilerinin karıştırılması ve çökeltilmesi yoluyla sentezlenen kompleksler, kurutulduktan sonra termogravimetrik yöntemi ile komplekslerin kütleleri sıcaklık arttıkça zamanla nasıl değiştiği incelenmiştir. Termogravimetrik analizlerine göre, komplekslerin termal kararlılığı metal türüne göre değişmiştir. Cu(II) kompleksi en yüksek termal kararlılığa sahipken, Co(II) kompleksi en düşük termal kararlılığa sahip olmuştur. Bu bulgu, komplekslerin oluşum sırasının Cu(II) > Ni(II) > Fe(III) > Zn(II) > Co(II) olduğunu göstermiştir. Cu(II) iyonunun ligandlarla oluşturduğu komplekslerin yüksek kararlılığı, ligandların Cu(II) iyonunun stereokimyasal gereksinimlerini en iyi şekilde karşılamasından kaynaklanır [25].

Sitozan, biyouyumlu, biyobozunur, toksik olmayan, kanser tedavisinde, ilaç taşıma sisteminde ve antitümör ajan olarak kullanılan bir polisakkarit, bakır ise antimikrobiyal, antienflamatuar ve antioksidan özellikte bir metaldir. Sitozan–bakır komplekslerinin DNA'ya bağlanarak ve DNA hasarına yol açarak tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engelleyebileceği, hücrelerde oksidatif stresi arttırarak tümör hücrelerinin ölümüne yol açabileceği, tümör hücrelerinde apoptozu (programlanmış hücre ölümü) indükleyebileceği ve tümörlerin yeni kan damarlarının oluşumunu engelleyerek tümörün büyümesini ve beslenmesini zorlaştırabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla hazırlanan sitozan–bakır

kompleksl erinin sitozan ve $CuSO_4$'ten tek başına daha yüksek antitümör etkinlik gösterdiği, yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır [26].

2.3.3 Polimer – Metal – Protein Üçlü Kompleksleri

Polimer–metal–protein üçlü kompleksleri, polimerler, metal iyonları ve proteinlerin kimyasal veya fiziksel etkileşimiyle oluşan biyokomplekslerdir. Polimer–metal–protein üçlü komplekslerinin sentezi, çeşitli yöntemler ile yapılabilir. Polimerler ve proteinler genellikle zıt yüklü olduğundan, elektrostatik etkileşim yoluyla metal iyonları ile kompleks oluşturabilir, polimerler ve proteinler, metal iyonlarıyla kovalent bağlar oluşturmak için fonksiyonelleştirilebilir veya metal iyonları ile kompleks oluşturabilen ligandlar, polimerlere veya proteinlere bağlanarak üçlü komplekslerin oluşumunu sağlayabilir. Bu kompleksler, hedeflenmiş biçimde etki etmede ilaç taşıma, katalizör, biyomalzeme alanlarında önemlidirler. Fakat polielektrolitler uygun olmayan fonksiyonel gruplara sahipse kimyasal modifikasyon gerekeceği için polimerin biyolojik etki tayfında zehirlilik gibi istenmeyen değişikliklere yol açabilir.

Geçiş metal iyonları, polimer–protein komplekslerinin oluşumunda ve kararlılığında önemli rol oynar. Polimer ve protein molekülleri arasında oluşan bağlar, kompleksleri stabilize etmeye ve onlara yeni ve istenen özellikler kazandırmaya yardımcı olabilir. Geçiş metal iyonlarının kullanımı, çeşitli uygulamalarda kullanılabilecek yeni ve gelişmiş polimer–protein komplekslerinin geliştirilmesine olanak tanır [27].

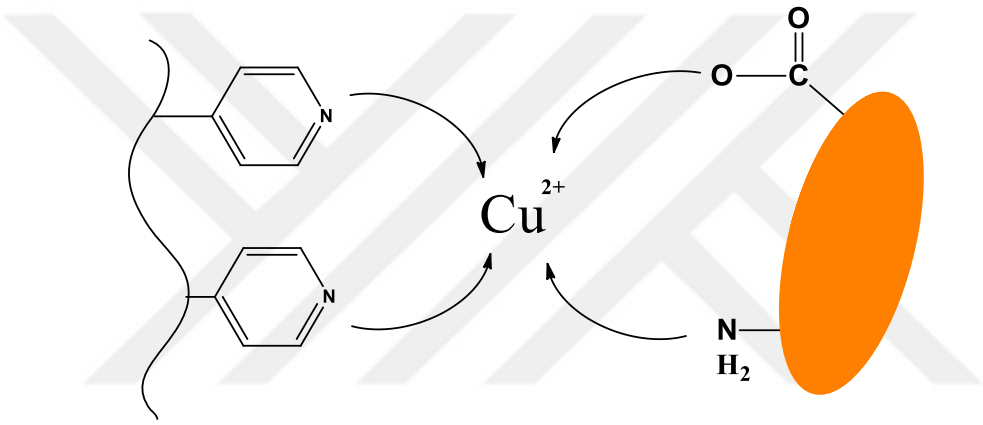
Üçlü polimer–metal–protein kompleksleri asit ortam ve nötral sulu ortam olmak üzere 2 yöntemle hazırlanmaktadır.

2.3.3.1 Asit Ortamda Kompleksleşme

Asit ortamda protein ve polimerlerin pozitif yüklü olması ve elektrostatik itme kuvvetinin etkisiyle birbirleriyle kompleks oluşturamazlar. Bu durumlarda, metal iyonları eklenerek üçlü komplekslerin oluşumu sağlanabilir [27]. Bu çalışmada, asit ortamda poli–4–vinil piridin (PVP), serum albümin (SA) ve Cu^{2+} iyonları kullanılarak üçlü komplekslerin oluşumu ve mekanizması araştırılmıştır. SA ve PVP'in, pH 4.2'de sulu asetik asit ortamında kompleks oluşturamadığı ve her ikisinin de pozitif yüklü olduğu gözlemlenmiştir. SA–PVP karışımına $CuSO_4.5H_2O$ eklenmesi, kritik protein konsantrasyonunda protein miktarına bağlı faz geçişine ve

suda tam çözünürlüğe yol açar. Santrifüj ile ayrılan çökeltiler sedimantasyon ile incelendiğinde tek bir pik gözlemlenmiştir. Bu pikin SA ve PVP'nin birleşme ürününe ait olduğu, SA'nın sedimantasyon sabitinin çok düşük olması, proteinin bakır iyonları ile agrege olmaması ve PVP–Cu^{2+} kompleksinin deney koşullarında çözünmemesi ile kanıtlanmıştır. Yapılan çalışma ile asit ortamda SA ve PVP'in bakır iyonları ile kompleks oluşturarak üçlü kompleksler oluşturabildiği gösterilmiştir.

Asit ortamda (pH 4.2), Cu^{2+} katyonları, elektrostatatik çekim kuvvetleri aracılığıyla zıt yüklü küresel protein ve polikatyon zincirlerini bir araya getirerek, suda çözünür üçlü SA–Cu^{2+}–PVP komplekslerinin oluşumunu teşvik eder (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 PVP–Cu^{2+}–SA üçlü kompleksi

2.3.3.2 Nötral Sulu Ortamlarda Kompleksleşme

Nötral sulu ortamlarda polimerler, proteinler ve geçiş metal iyonları arasında oluşan üçlü kompleksler çeşitli uygulamalar için önemli taşımaktadır. Bu çalışmada, poliakrilik asit (PAA), poli(vinil imidazol) (PVI), serum albümin (SA), ovalbümin (OVA) ve bakır iyonu (Cu^{2+}) kullanılarak nötral sulu ortamda üçlü komplekslerin oluşumu incelenmiştir.

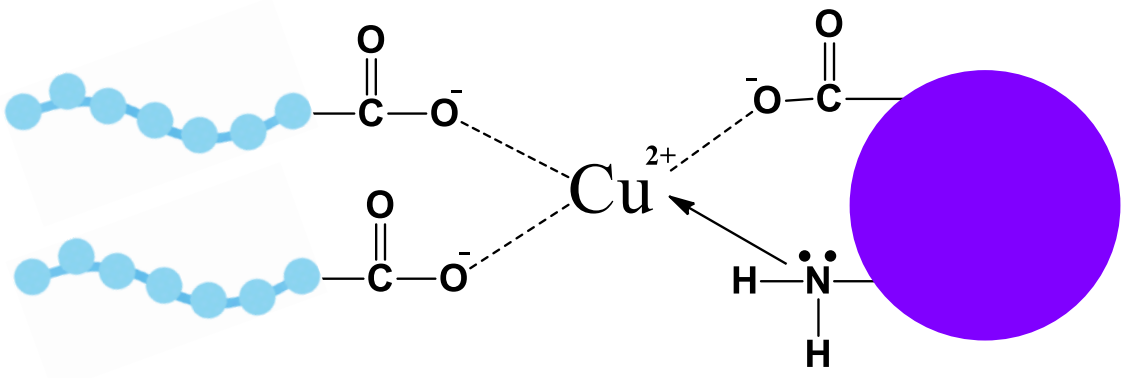
Yapılan çalışmada, PAA, PVI ve proteinlerin nötral sulu ortamda Cu^{2+} iyonları ile kompleks oluşturarak üçlü kompleksler oluşturabildiği gösterilmiştir. Metalin heterojen dağılımı PVI ile Cu^{2+} iyonlarının reaksiyonu ile gerçekleşir. Düşük protein konsantrasyonundan başlanarak konsantrasyon arttırıldıkça (SA proteini eklendikçe) sistemde faz geçişi olur. Süzüntü sedimantasyon ile incelendiğinde sadece PVI'ya uygun olduğu görülür. Suda çözünmeyen üçlü kompleksler,

protein/polimer oranı arttıkça artan bir eğilimle çökeltide birikir ve maksimum bir konsantrasyona ulaşır [11].

Nötr sulu ortamda Cu^{2+} iyonlarının PAA ve BSA ile kompleksleşme davranışı araştırılmıştır (Şekil 2.12). Metal konsantrasyonunun PAA–Cu^{2+} ve BSA arasındaki kompleks oluşumunu nasıl etkilediği incelenmiştir. PAA ve BSA'nın nötral sulu çözeltilerine farklı Cu^{2+} konsantrasyonları eklenmiştir. Kompleks oluşumu, spektroskopik ve viskozimetrik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. nCu^{2+}/nAA oranı 0.15'ten düşük olduğunda, aşırı BSA varlığı Cu^{2+} iyonlarının PAA'dan ayrılmasına ve kompleks bozulmasına yol açmıştır. Bu durum, BSA'nın Cu^{2+} iyonları ile yüksek etkileşimi olmasından kaynaklanmaktadır. Yüksek Cu^{2+} konsantrasyonlarında ise BSA fazlalığı stokiyometrik olmayan komplekslere yol açmıştır. Bu durum, Cu^{2+} iyonlarının PAA ve BSA ile birden fazla bağ oluşturabilmesinden kaynaklanmaktadır [11].

Farklı monomer bileşim oranlarına sahip PAA kopolimerleri sentezlenmiştir. Bu kopolimerler, Cu^{2+} iyonları ve BSA proteinleri ile karıştırılarak üçlü kompleksler oluşturulmuştur. Monomerlerin bileşim oranları ve çözeltinin pH'ı, üçlü komplekslerin özelliklerini nasıl etkilediğini belirlemek için değiştirilmiştir.

PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksinin iki türü olduğu ve bu türlerin kopolimerin r(monomer bileşim oranı)'na bağlı olarak oluştuğu gözlemlenmiştir. r'nin 1/3'ten 1/1'e kadar arttıkça PAA–Cu^{2+}–BSA yapısındaki protein molekülünün polimer tarafından sıkıca sarmalanıp suyla ilişkisi azaldığı, r'nin 3/1'den büyük değerlerde ise PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksinde protein moleküllerinin çözeltinin etkisinde daha fazla kaldığı gözlemlenmiştir [11].



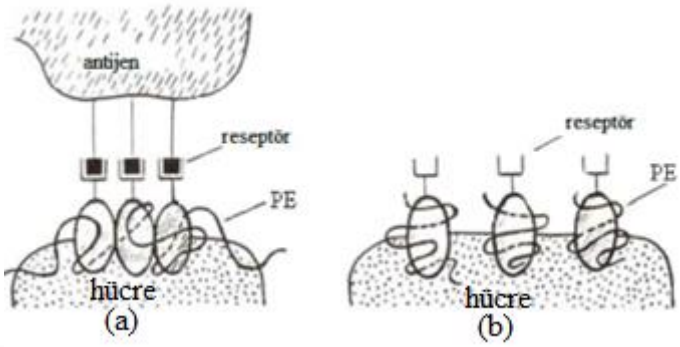
Şekil 2.12 PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksi

2.4 Aşı ve Bileşenleri

Aşı, enfeksiyona karşı bağışıklık sağlamak için hazırlanmış, vücuda çeşitli yollarla verilen biyolojik ürünlere denir. Aşı, insanları hastalıklardan ve hastalıkların neden olduğu sonuçlardan koruyabilmek için sağlam ve risk altındaki kişilere uygulanır. Vücut bu şekli ile kendisine zarar vermeyen mikrop ya da toksinleri tanır ve onlara karşı bir savunma geliştirir. Böylece vücut mikropla karşılaştığında önceden geliştirdiği savunma sistemini kullanarak mikropla savaşır ve kişi hastalığa yakalanmaz. Aşılar, bağışıklık gelişmesini sağlayan ve antijen olarak isimlendirilen maddelerin yanında adjuvan, stabilizatör ve koruyucu maddeleri de ihtiva etmektedir. Genel olarak aşılarda adjuvan olarak alüminyum hidroksit, koruyucu olarak thiomersal (civa içeren bileşik) ile antibiyotikler (neomisin, kanamisin, eritromisin) ve stabilizatör olarak da magnezyum klorür bulunmaktadır. Adjuvanlar aşıların vazgeçilmez bileşenleridir. İmmünolojide adjuvan, bir aşıya karşı bağışıklık tepkisini arttıran veya modüle eden bir maddedir [28]. Adjuvan, yardım etmek veya yardımcı olmak demektir. İmmünolojik bir adjuvan, spesifik aşı antijenleri ile birlikte kullanıldığında antijene özgü bağışıklık tepkilerini hızlandıran, uzatan veya geliştiren herhangi bir madde olarak tanımlanır [29]. Antijen (bağıştıran), vücuda girdiğinde bağışıklık sistemi tarafından antikor üretimine yol açan yabancı moleküllerdir. Antijenler genellikle protein ve polisakkarit yapısında canlı organizma kısımları ya da büyük moleküllü proteinler ve bunlara bağlanmış karbonhidratlar, nükleik, lipidik kısımları ya da ürünleridir. En önemli antijenler bakterilerin yapısına girenlerdir. Bir antijen iki elementten oluşur: protein bir madde ve hapten. Antijen–antikor tepkimeleri vücuda zararlı mikroplarla savaş gibi birçok olayda rol alır. Bağışıklık ya da hastalığa direnç gösterme, vücuda giren antijenleri antikorlarla yok edebilme yeteneğidir [30].

Polielektrolit–protein, polielektrolit–metal–protein komplekslerinin güçlü ümmin cevap ve yüksek seviyede immünolojik koruma sağladıkları yapılan çalışmalarla gösterilmiş ve yapay polimerik aşı gibi immünajenlerin geliştirilmesine önayak olmuştur [31]. PE kompleksinin immün sistemi taklidi, hücre reseptörleri ve antijen reseptörleri arasında çoklu nokta etkileşimlerini mümkün kılar. Bu etkileşim, polielektrolit komplekslerin lineer veya kompakt yapısından etkilenebilir. Şekil 2.13 (a)'da lineer yapıda bulunan polielektrolit kompleksler, (b)'de ise kompakt yapıda bulunan polielektrolit komplekslerin hücre yüzeyindeki antijenlerle

etkileşimi gösterilmiştir. Polimer zincirleri uzanmış ve esnek yapıdaki lineer polielektrolit kompleksler, polimer zincirleri birbirine sıkıca bağlı ve küresel yapıdaki kompakt polielektrolit komplekslere göre hücre yüzeyine daha kolay erişebilme ve antijenlerle daha fazla temas yüzeyi oluşturabilme avantajına sahiptir.



Şekil 2.13 Polielektrolit kompleksinin hücre yüzeyindeki antijenlerle etkileşimi [32]

3
FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYON ZETASIZER ÖLÇÜMLERİ

3.1 Partikül Boyutu

Hücresel yapılar, biyomoleküller, polimerler nanoskala boyuta sahiptir ve partiküllerin molekül boyutlarının etkisi biyolojik açıdan oldukça farklıdır. Doğal yapıların fonksiyonları boyutlarına göre değil, yapılarına göre değişkenlik gösterirken sentetik yapıların biyolojik yapılar ile etkileşimi sadece yapılarına göre değil boyut özellikleriyle de ilişkilidir. Cilt ve kan damarları geçirgenliği, kandaki dolaşım süresi, hücreiçi lokalizasyonu, organlardaki dağılım oranı gibi farmakolojik etkenliği üzerinde partikül boyutu oldukça önemlidir. Partiküllerin toksisitesi de partikül boyutuna göre belirlenebilir. Nanoskala partiküllerin kullanımına ilişkin bilgiler vermektedir. Örneğin 1.4 nm boyutundaki altın nanopartiküller, DNA'daki ana boşluklara girerek hücre ölümlerine sebep olduğu için diğer boyutlarına nazaran en yüksek toksisite oranına sahiptir [33].

Dinamik Işık Saçılımı (DLS), çözeltideki moleküllerin boyut dağılımlarını ve hareketlerini incelemek için kullanılan bir optik tekniktir. Bu yöntem, nanoskala partiküller, biyomoleküller ve polimerler gibi çeşitli malzemelerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. DLS, partiküllerin boyut dağılımlarını ölçer, şekli ve yüzey özellikleri hakkında bilgi verir ve geniş bir partikül boyutu aralığında kullanılabilir. Fakat partiküllerin konsantrasyonundan ve çözücü viskozitesinden etkilenir ve çok küçük boyutlu partikülleri ölçmekte zorlanabilir.

DLS yöntemi, tek ve sabit dalga boyu olan yani monokromatik ışık kaynağının bir çözeltiye gönderilmesine ve saçılan ışığın yoğunluğunun zamana göre ölçülmesine dayanır. Makromoleküller, ışığı saçarak farklı açılarda dağılım gösterir. Doppler etkisi nedeniyle, saçılan ışığın frekansı, moleküllerin hareket hızı ile doğrudan ilişkilidir. Hareketli moleküller tarafından saçılan ışık, sabit dalga boyundan daha geniş bir dalga boyu aralığına sahip olur ve bu genişleme, doppler genişlemesi olarak bilinir. DLS'de, saçılan ışığın yoğunluğu zamana göre otokorelasyon

işlemine tabi tutulur. Bu işlem, moleküllerin hareketlerinden kaynaklanan rasgele dalgalanmaları analiz eder ve moleküllerin difüzyon katsayılarını hesaplamaya olanak tanır. Difüzyon katsayısı (Dτ), bir molekülün rastgele hareketinin hızını ölçer. Stokes–Einstein eşitliği, difüzyon katsayısı ve hidrodinamik yarıçap (Rh) arasındaki ilişkiyi verir:

$$D_\tau = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \tag{3.1}$$

Eşitlikte k_B: Boltzmann sabiti (1.380×10^{-23} $kg.m^2.s^{-2}.K^{-1}$), T: sıcaklık (K), η: dinamik viskozite ($kg.m^{-1}.s^{-1}$), R_h: hidrodinamik yarıçap (m) ve Dτ: difüzyon katsayısı ($m^2.s^{-1}$) olarak tanımlanır.

Moleküllerin hareketleriyle doğrudan ilişkili olan DLS yönteminde ölçümler, makromoleküllerin şekline, çözücü viskozitesine ve sıcaklığa bağlıdır [34].

3.2 Polidispersite

Koloidal sistemler, sıvı bir ortamda dağılmış nanometre boyutlarda partiküllerden oluşur. Bu partiküllerin boyutları polimer moleküllerinin uzunluklarına benzer şekilde bir dağılım gösterir. Bu dağılıma partikül boyutu dağılımı denir. Polidispersite, partikül boyut dağılımının genişliğini ifade eden genel bir terimdir. Polidispersite indeksi (PDI) ise bu dağılımın genişliğini ifade eden bir parametredir ve 0 ile 0.7 arasında bir değer alır. Bu aralıkta olduğunda tüm partiküllerin aynı boyutta olduğu yani monodispers sistem olduğu anlamına gelir. PDI 0.7 den büyük olduğunda ise partikül boyutları arasında bir dağılım olduğu, yani polidispers bir sistem olduğu anlamına gelir. PDI değeri küçüldükçe, dağılım daralır ve partikül boyutları birbirine yaklaşır. PDI büyüdükçe partikül boyutları arasında çok geniş bir dağılım olduğu anlamına gelir. Bu durumda sistemde çok küçük ve çok büyük partiküller bir arada bulunur. Koloidal sistemlerin kararlılığı için dar bir partikül boyutu dağılımı (düşük PDI) esastır. Düşük PDI yüksek homojenliği, yüksek PDI ise geniş bir dağılımı ve düşük homojenliği gösterir.

Polidispersite indeksi (PDI), sadece partikül boyutlarının farklılığını değil, aynı zamanda bu farklılıkların dağılım şeklini de ifade eder. Örneğin, bir sistemde tüm partiküller ortalama bir boyutun etrafında dar bir dağılım gösteriyorsa, PDI değeri düşük olur. Ancak, bazı partiküller çok büyük, bazıları çok küçükse ve bu

farklılıklar rastgele dağılıyorsa, PDI değeri yüksek olur. PDI, dinamik ışık saçılımı gibi teknikler kullanılarak deneysel olarak belirlenebilir [35].

3.3 Mobilite

Bir elektrik alanında hareket eden koloidal partiküllerin veya polielektrolitlerin hızını ölçen bir parametreye elektroforetik mobilite denir. Elektrostatik dağılımın kontrolü ve elektroforez mekanizmaları hakkında bilgi edinmek için kullanılır.

Çözücü içinde süspansiyon haline getirilen partiküller, yüzeylerindeki elektrik yükleri nedeniyle elektrik alanlardan etkilenir. Bu etkileşim, partiküllerin elektrik alan yönünde hareket etmesine neden olur. Bu harekete elektroforez, hareket hızına ise elektroforetik mobilite denir.

Elektroforetik mobilite, partiküllerin boyutu, şekli ve yüzey yükü, elektrik alan (daha güçlü bir elektrik alanı, daha yüksek mobilite), sıcaklık (arttıkça mobilite artar) ve çözücü (viskozitesi ve dielektrik sabiti etkiler) gibi çeşitli faktörlerden etkilenir.

Elektroforetik mobilite, aşağıdaki eşitlik ile hesaplanır:

$$\mu_e = \frac{v}{E} \tag{3.2}$$

Eşitlikte, μe: elektroforetik mobilite ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$), v: kayma hızı ($m.s^{-1}$) ve E: elektrik alan şiddeti ($V.m^{-1}$) olarak tanımlanır.

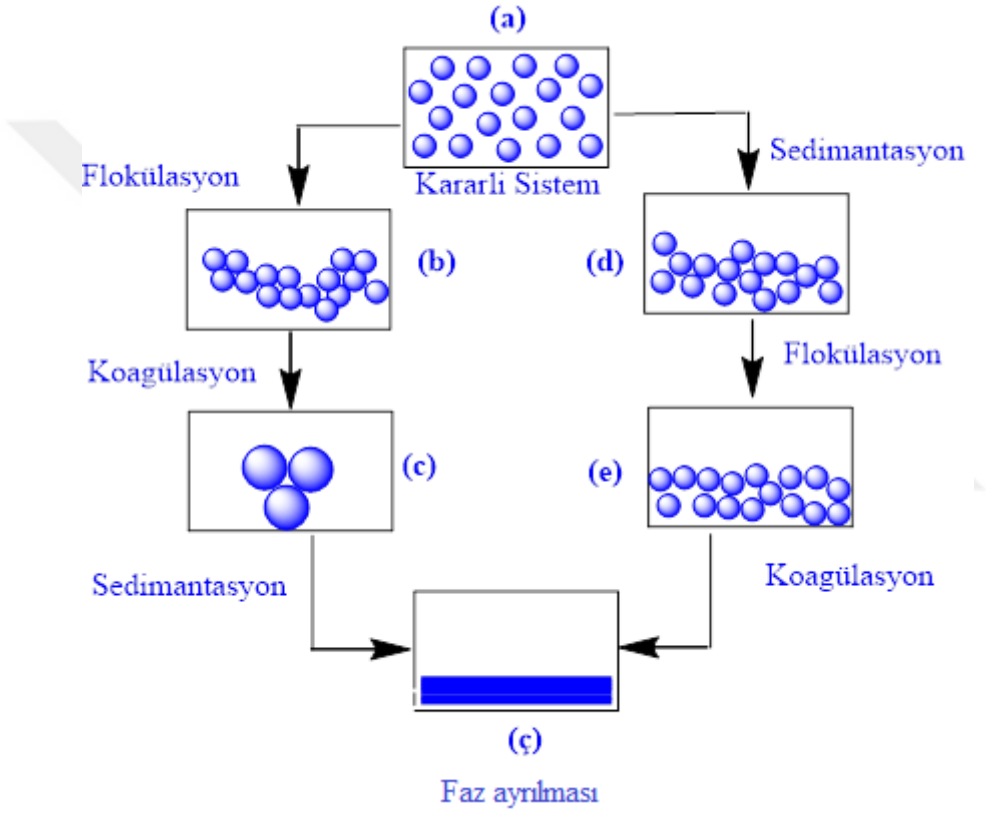
Elektroforetik mobilite, koloidal sistemlerin ve polielektrolitlerin karakterizasyonunda önemli bir araçtır. Mobilite ölçümleri, partiküllerin boyutunu, şeklini, yüzey yükünü ve zeta potansiyelini belirlemek için kullanılabilir. Ayrıca elektroforez, proteinlerin ve nükleik asitlerin ayrıştırılmasında ve analizinde de kullanılır [36].

3.4 Zeta Potansiyeli

Maddenin üç halinden (katı, sıvı, gaz) birisi diğeri içerisinde dağılmışsa koloidal sistem, koloidal sistemin kararlılığının ölçüsü de zeta potansiyeli değeridir. Sistemin kararlılığı, dağılım içindeki partiküllerin agregasyon yoluyla çökelmeye yol açmayacak şekilde topaklanmadan birbirine yapışmamasını, yer çekimine karşı

direnç gösterip dağılım halinde kalmasını ifade eder. Şekil 3.1'deki kutucuklarda küreler partikülleri temsil etmektedir ve olası durumlar gösterilmiştir.

(a)'da dispersiyon halindeki kararlı sistemde partiküller bağımsız hareket halindeyken, (b)'de flokülasyon ile agregasyon başlar ve flok oluşur, (c)'de koagülasyon ile agregasyon artar ve flok büyür ve (ç)'de sedimantasyon ile büyük kümeler çöker. (d)'de önce sedimantasyon ve sonra flokülasyon/koagülasyon ardı ardına gerçekleşir ve (e)'de koagülasyon ile tam birleşme ve geri dönüşümsüz çökelti oluşur.



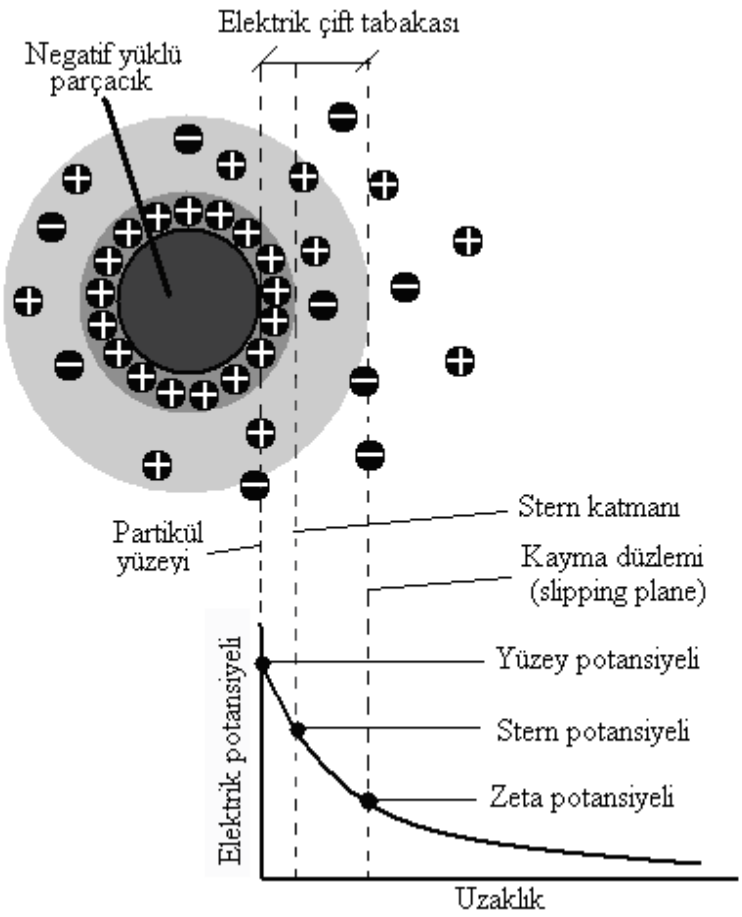
Şekil 3.1 Bir koloidal sistemin olası durumları

Koloidal kararlılıkla ilgili olarak DLVO (Derjaguin, Landau, Verway, ve Overbeek tarafından) TEORİSİ geliştirilmiştir [37]. DLVO teorisi, koloidal kararlılığın, elektriksel çift taban ve Van der Waals kuvvetlerinin dengesine bağlı olduğunu ve elektrostatik itici kuvvetlerin oluşturduğu enerji bariyerinin, partiküllerin bir araya gelmesini engellediğini, ancak bu bariyer aşıldığında çekici Van der Waals kuvvetlerinin kalıcı agregasyona yol açtığını savunur.

Partikül zeta potansiyeli, partikül yüzey yükü (disosiyasyon, adsorpsiyon gibi) ve elektrik çift tabakasındaki (düzlemle partikül arasında kalan bölge) iyonların

etkileşimiyle belirlenir. Yüzey yükü, yüzey aktif madde adsorpsiyonu ve yüzey grubu dissosiasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla partikülün doğasına ve çevresindeki ortama bağlı olarak oluşur. Yüzeydeki asidik ve bazik grupların dissosiyasyonu veya katyonik ve anyonik yüzey aktif maddelerin adsorpsiyonu gibi mekanizmalar, partikül yüzey yükünü ve zeta potansiyelini etkileyerek negatif veya pozitif yüklü bir yüzey oluşturabilir (proteinlerdeki karboksil/amin grupları gibi).

Katı partiküllerin yüzey yükü ve iyon adsorpsiyonu, iletken sıvı ile temas halindeyken Stern ve Difüz tabakaları oluşturarak zeta potansiyeli ve elektriksel çift tabakası meydana getirir, bu da katı–sıvı arayüzündeki potansiyel farkını ve elektrostatik etkileşimleri belirler. Partikül yüzey yükü ve çevre arasındaki elektrostatik etkileşimler (itme–çekme ve Van der Waals kuvvetleri), zeta potansiyeli ve yüzey yük yoğunluğunun belirlenmesine yol açarak yüzeyin yapısını ve elektrostatik etkileşimlerin kantitatif analizini sağlar. Negatif yüklü bir yüzeyin elektrolit ile teması sonucunda çözeltideki pozitif iyonları elektrostatik çekim kuvvetleri aracılığıyla kendine adsorplanması ile yüzey ve iyonlar arasında Stern tabakası arayüzünü oluşturur (Şekil 3.2). Stern tabakası, negatif yüklü partikül yüzeyine yakın, yüksek konsantrasyonda pozitif iyonlardan oluşan sınırlı bir tabakadır. Stern tabakasına bitişik olarak dağılım gösteren Difüz tabakasıdır ve iki tabaka arasındaki iyon dağılımı ortamda potansiyel fark oluşturduğundan elektronötraliteyi sağlayan tabakadır. Elektrostatik denge ve termal hareketler, iyon dağılımını belirleyerek Stern ve Difüz tabakalarından oluşan elektriksel çift tabakayı oluşturur. Katı yüzey ile yığın arasında oluşan potansiyel fark, potansiyel eğri oluşturur. Bunun nedeni, Stern tabakasında uzaklık mesafesiyle doğrusal azalırken, difüz tabakasında bu azalmanın üstel olmasıdır. Kayma düzlemi, partikülün sıvı içinde hareket etmesi sonucunda stern tabasının kaymasıyla oluşur. Bu düzlemin içinde kalan pozitif iyonlar partiküllle beraber hareket etmeye zorlanırken, düzlemin dışında kalan iyonlar ise bağımsız olarak hareket edebilmektedir. Molekülün Stern katmanındaki elektrik potansiyeline Stern Potansiyeli, Kayma düzlemindeki elektrik potansiyeline ise Zeta Potansiyeli denir ve yüzeyin elektriksel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılır [38].



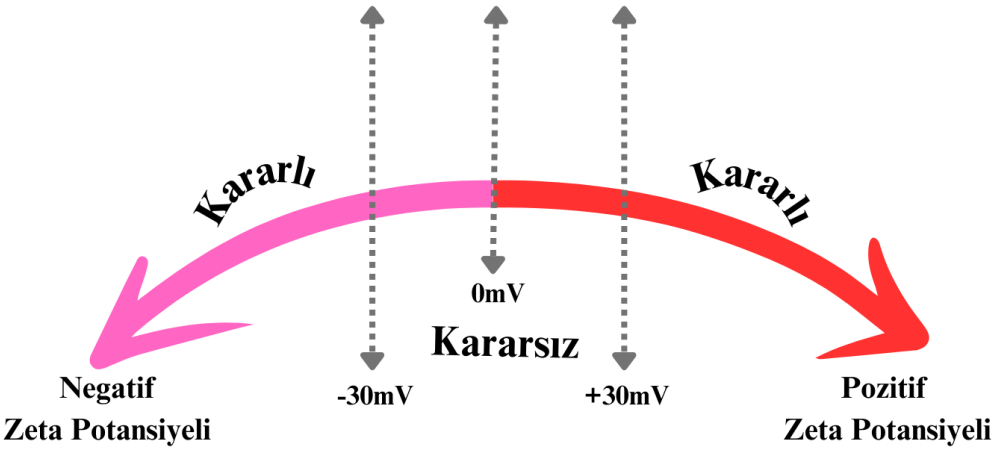
Şekil 3.2 Negatif yüklü bir partikül etrafında oluşan elektriksel potansiyel

Smoluchowski yaklaşımı, ölçülen elektroforetik mobiliteyi zeta potansiyeline dönüştürmek için yaygın olarak tercih edilen bir denklemdir.

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_e \zeta}{\eta} \tag{3.3}$$

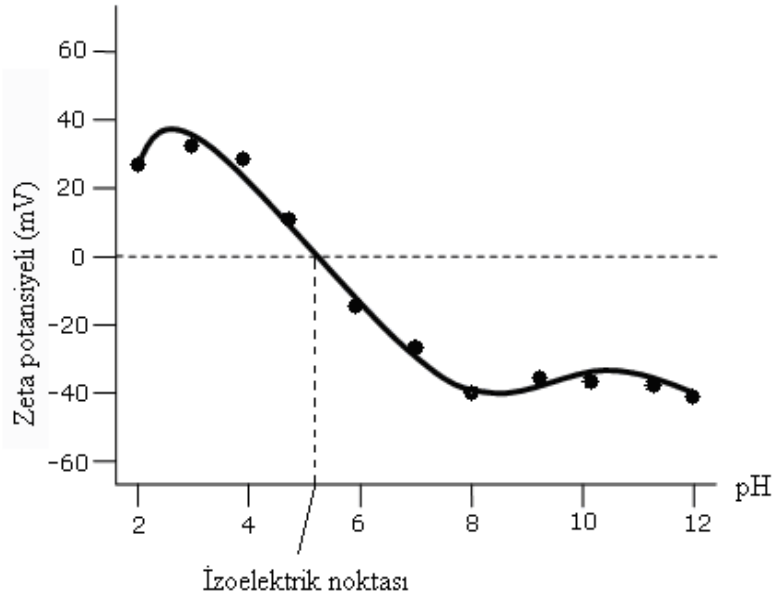
Eşitlikte, μ_e: elektroforetik mobilite ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$), ε: çözücünün dielektrik sabiti, η:viskozite ($kg.m^{-1}.s^{-1}$) ve ζ:zeta potansiyeli (mV) olarak tanımlanır.

Zeta potansiyeli, bir koloidal sistemdeki partiküllerin etrafındaki elektriksel çift tabakanın potansiyelini temsil eden bir ölçüdür. Zeta potansiyeli mutlak değeri (|ζ|) 30 mV'dan büyük olduğunda, partiküller arasındaki elektriksel itme kuvvetleri Van der Waals çekim kuvvetlerini aşar ve partiküllerin agregasyona uğramasını önler. Bu durum, koloidal sistemin kararlı olduğunu gösterir. Zeta potansiyeli mutlak değeri 30 mV'dan küçük olduğunda ise Van der Waals çekim kuvvetleri elektriksel itme kuvvetlerini aşabilir ve partiküllerin agregasyona uğramasına yol açabilir. Bu durum, koloidal sistemin kararsız olduğunu gösterir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Koloidal sistemin elektrostatik kararlılığı

Koloidal sistemlerde yer alan elektrik çift tabakasının dış kenarındaki potansiyel farkı ölçen ve bu partiküllerin kararlılıklarını ve davranışlarını belirlemede önemli rol oynayan zeta potansiyeli, partikül yüzeyindeki yük dağılımı, ortamın iyonik gücü ve ortamın pH'ından etkilenir. Bu etki, partikül yüzeyindeki kimyasal grupların dissosiyasyonundan ve elektrik çift tabakasındaki iyon konsantrasyonunun pH'a bağlı olarak değişmesinden kaynaklanır. Negatif yüklü koloidal partiküllerin zeta potansiyeli, pH'a bağlı olarak değişir (Şekil 3.4) ve izoelektrik noktada sıfıra iner. Bu noktada, partükülün net yükü sıfırdır ve partiküller elektrostatik kararlılıklarını kaybederler (belirli pH değerinde zeta potansiyelinin sıfır olması partikülün türüne, yüzey gruplarına ve ortamın iyonik gücüne bağlı olarak değişir). Zeta potansiyeli sıfıra yaklaştıkça partikül ve iyonlar arasında elektrostatik çekim kuvvetleri ortaya çıkabilir ve partikül etrafında negatif iyon birikimi devam edebilir. Bu durum, partikül ve iyonların türlerine, yüzey gruplarına, ortamın pH'ına ve iyonik gücüne bağlı olarak değişir. Ortama asit eklendikçe, H^+ iyonlarının konsantrasyonu artar ve zeta potansiyelinin azalmasına yol açar. Bir noktada zeta potansiyeli sıfıra ulaşır ve bu noktadan sonra asit eklenmeye devam edilirse zeta potansiyeli pozitif değer almaya başlar. Ortama baz eklendiğinde ise OH^- iyonlarının konsantrasyonu artar ve zeta potansiyelinin daha da negatif değerlere ulaşmasına yol açar. Ancak, bir noktadan sonra zeta potansiyeli sabitlenir. Bunun sebebi, olabilecek bütün dissosiyasyonların gerçekleşmiş olması ve yük miktarının değişmeyecek olmasıdır [5].



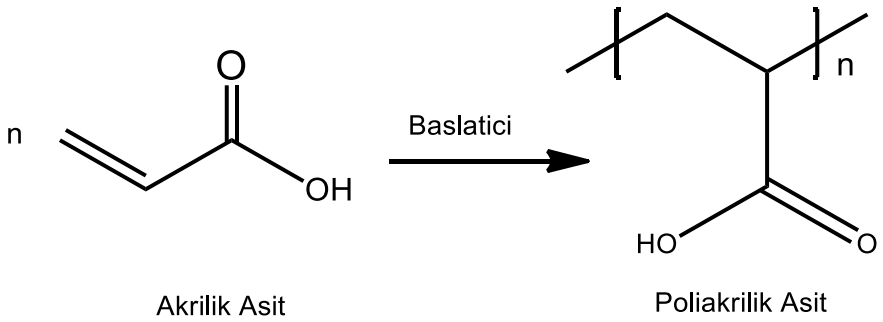
Şekil 3.4 Koloidal sistemlerde zeta potansiyelinin pH'a bağımlılığı [5]

4
POLİAKRİLİK ASİT POLİMERİ VE BOVİN SERUM ALBÜMİN PROTEİNİ

4.1 Poliakrilik Asit Polimeri

Poliakrilik asit (PAA), karboksilik grup içeren akrilik asit (AA) monomerlerinin polimerize edilmesiyle ve genellikle bir başlatıcı kullanılarak serbest radikal polimerizasyonuyla oluşturulur (Şekil 4.1). Poli (1–karboksi etilen) olarak da bilinen PAA, düşük maliyetli, yüksek molekül ağırlıklı, suda çözünebilen, mekanik dayanımı ve şeffaflığı olan, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen, biyouyumlu, çevre dostu, su moleküllerini çekme ve tutma özelliğine sahip higroskopik ve polianyon bir polimerdir. Akrilik asit bileşeni sayesinde çok iyi bir adsorban polimerdir. Çapraz bağlı formlarında kararlı bir yapı oluşturur, mekanik özelliklerini arttırır ve yüksek su emme kapasitesine sahip olur. Poliakrilamid, polietilen oksit, selüloz gibi polimerlerle hidrojen bağlı kompleksler oluşturabilir veya diğer polimerlerle kopolimerize edilebilir.

Yüzeylere iyi yapışma özelliği gösterdiğinden yapıştırıcılarda, su çekme ve tutma özelliğine sahip olduğundan çocuk bezi üretiminde, mukavemet özelliğine sahip olduğundan ambalajlamada, yüksek yoğunlukta karboksilik asit içeriği sebebiyle karışımın hidrofilikliğini arttırdığından biyomedikal alanlarda olmak üzere birçok uygulama alanı vardır [39].

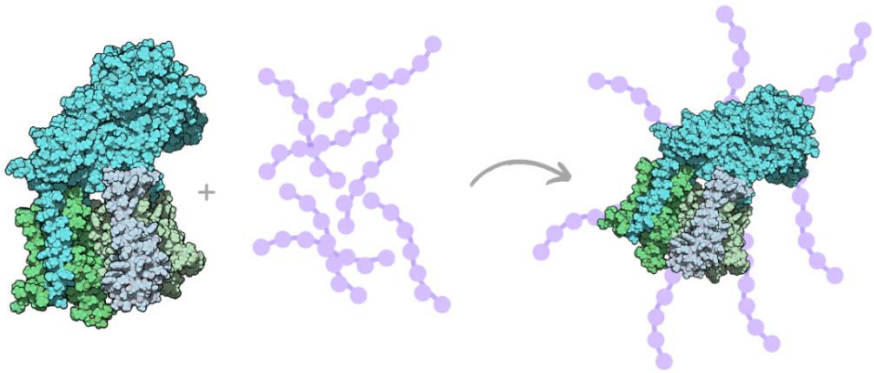


Şekil 4.1 Poliakrilik asitin monomerlerinden polimerizasyonu

4.2 Bovin Serum Albümin Proteini

Albümin; plazmada en çok bulunan, kan ozmotik basıncını ve pH'ı kontrol etmede önemli, karaciğerde üretilen çözünebilir bir proteindir. İnsan serum albümini (HSA), Sığır/Bovin serum albümini (BSA), sıçan serum albümini (RSA) ve at serum albümini (ESA) albüminlerden bazılarıdır.

Biyofiziksel, biyokimyasal, biyoklinik, biyomedikal gibi biyolojik çalışmalarda en çok kullanılan protein modellerinden biri Bovin Serum Albümin (BSA)'dır. Kan plazmasındaki en yaygın proteindir ve yapısında amino asit, tirozil, sistein, triptofan bulunur. BSA'nın temel yapı taşları alt alanın üç uzun sarmalıdır ve birbirine bağlı olan bu sarmallar paralel uzanmaktadır. Merkezdeki sarmal çukur gibi (Y) normalden biraz daha aşağıda olduğundan kalp şeklinde üç boyutlu bir yapıya sahiptir. Bu şekil diğer proteinlerle karşılaştırıldığında BSA'nın yapısını eşsiz kılar. Ayrıca çeşitli moleküllerin, polimerlerin, bileşiklerin ve ligantların bağlanmasına uyum sağlayan, şeklini geri kazandırabilen güçlü ve esnek bir proteindir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 BSA'nın sentetik moleküllerle konjugasyonunun taşıyıcı protein olarak kullanımı

BSA, koloit ozmotik basıncın korunmasından sorumludur. Taşıyıcı bir proteindir. Sülfidril grupları albüminde bulunur ve serbest radikalleri temizler. Plazmada yüksek konsantrasyonda negatif yüke sahip bulunabilir böylece asit–baz dengesi sağlar. Strese maruz kalındığında kılcal damarların geçirgenliğindeki artışa bağlı olarak sızıntıyı önlemeye yardımcı olup damar geçirgenliği sağlar. Bu nedenle antioksidan, antibakteriyel, antimikrobiyal ve antikanser ve uygulamaları ile biyomedikal uygulamaları geliştirmek için insan hücrelerine karşı etkileşimini incelemek önemlidir [40].

5
DENEYSEL KISIM

5.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

5.1.1 Kullanılan Cihazlar

BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugat ve PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleks örneklerinin partikül boyutu, iletkenlik, elektroforetik mobilite ve zeta potansiyelleri gibi zetasizer ölçümleri Brookhaven 90 Plus–Pals/BI–MAS (Çok Açılı Parçacık Boyutlandırma) zetasizer aracılığıyla ölçülmüştür. Çalışmada, Binder marka vakum etüvü, Precisa XB 220A ve Sartorius CP225D modellerinden hassas terazi, 1–10 ml, 100–1000 μl ve 5–50 μl hacimli Finnpipette marka mikropipetler, IKAMAG marka çoklu numune karıştırıcı ve Millipore–Q Gradient marka saf su cihazı kullanılmıştır.

5.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmadan doğrudan kullanılmıştır. Aldrich marka 523925 kodlu poliakrilik asit (PAA), Sigma marka A 7030 kodlu bovin serum albümin (BSA), Merck marka 102788 kodlu bakır sülfat ($CuSO_4.5H_2O$) ve Sigma marka 1–etil–3–(3–dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) kullanılmıştır.

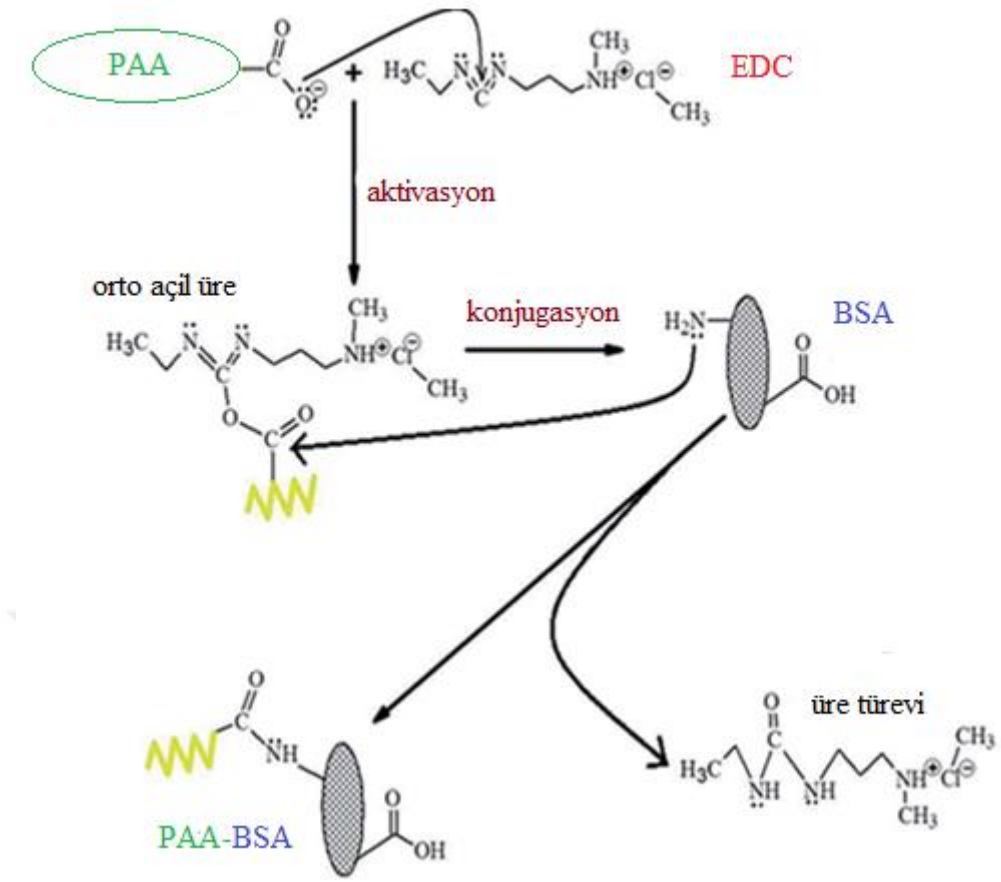
5.2 Biyokonjugat ve Biyokomplekslerin Sentezlenmesi

5.2.1 BSA Çözeltisinin Hazırlanması

BSA çözeltisi, 60 mg BSA'nın 5 ml saf suda çözülmesiyle (12 mg/ml BSA konsantrasyonuna sahip olacak şekilde) hazırlandı.

5.2.2 PAA–BSA İkili Biyokonjugatının Sentezlenmesi

PAA–BSA ikili biyokonjugatı, konvansiyonel ve mikrodalga olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak sentezlenebilir. Bu çalışmada, PAA–BSA ikili biyokonjugat sentezi için konvansiyonel yöntem tercih edilmiştir. Konvansiyonel sentez yönteminin ayrıntılı bir şeması Şekil 5.1'de yer almaktadır.



Şekil 5.1 EDC ile aktifleştirilen PAA–BSA ikili biyokonjugatının şematik oluşumu

PAA–BSA ikili biyokonjugatının sentezi için, PAA ve BSA arasında EDC kullanılarak kovalent bağ oluşturmak amaçlanmaktadır. Poliakrilik asit çözeltisi için 1 mg PAA, oda sıcaklığında 0.1 ml DMSO içerisinde çözüldü. Çeşitli formlarda misel oluşumunu önlemek ve organik maddeyi korumak yani organik fazın toplam çözeltide maksimum %5 miktarında olması için 1.9 ml PBS çözeltisi hızlıca karıştırılarak PAA çözeltisine eklendi. EDC, kopolimerden dört kat daha fazla olacak şekilde (4 mg) çözeltiye eklendi. EDC'nin reaktivitesinin en fazla olduğu 4.7 değeri elde edilene kadar çözeltiye distile su eklenerek pH ayarlandı.

Çözeltinin 3 saat karıştırılmasından sonra, reaksiyon karışımına nBSA/nPAA oranı 2.0 olacak şekilde BSA eklendi ve 12 saat daha karıştırıldı. Toplam çözelti hacmi 4 ml'ye tamamlandı ve 2 saat daha karıştırıldı. Karıştırma işlemi sırasında, ultra saf su ile hazırlanmış 1 N NaOH çözeltisi kullanılarak pH 7'ye ayarlandı. Reaksiyonun toplam süresi 17 saattir.

Moleküllerin kovalent bağlarla bağlanması için çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılmaktadır. Bu çalışmada, primer amin ve karboksil grupları içeren biyolojik moleküllerin kovalent bağlarla konjugasyonu için EDC kullanılmıştır. Biyolojik moleküllerin konjugasyonları için en sık kullanılan EDC, çapraz bağlayıcı ajandır ve yüksek reaktifliği ile bilinir. EDC mekanizması, öncelikle karboksilik asitlerle reaksiyona girerek reaktif bir o–açil üre ara ürünü oluşturmasıdır. Bu ara ürün daha sonra nükleofilik gruplar, özellikle de primer aminler ile reaksiyona girerek amid bağları oluşmasını sağlar. Literatüre göre, en aktif karbodiimid oluşumu için optimum pH 4.7–6.0 aralığıdır. Bu çalışma, EDC'nin primer amin ve karboksil grupları içeren biyolojik moleküllerin kovalent bağlarla konjugasyonu için etkili bir araç olduğunu göstermektedir. Bu yöntem, ilaç taşıyıcıları, biyosensör probları ve terapötik proteinler gibi çeşitli biyomoleküler konjugatların sentezinde kullanılabilir [41].

Bu çalışmada, poliakrilik asit polimeri varlığında PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksi Dr.Mesut Karahan'ın tezinde sunulan yöntemlere uygun olarak iki farklı şekilde taze olarak sentezlenmiştir [42].

5.2.3 PAA–Cu^{2+}–BSA Üçlü Biyokompleksinin Sentezlenmesi: I. Yöntem

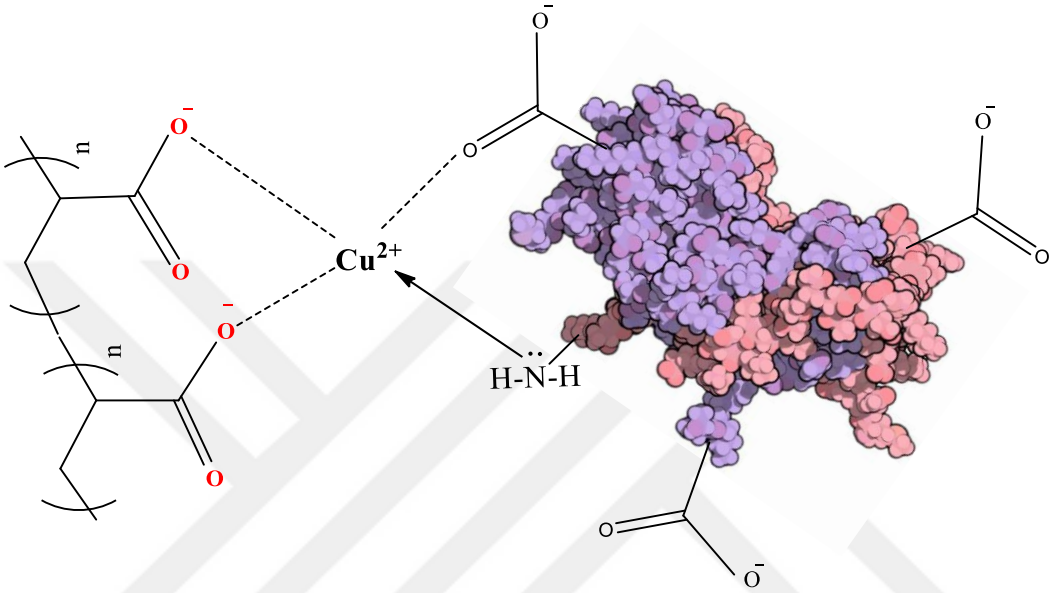
PAA çözeltisi 3 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde PBS tamponunda hazırlandı. BSA çözeltisi, fosfatlı tuzlu tampon (PBS) kullanılarak hazırlandı. $CuSO_4.5H_2O$ çözeltisi ise yüksek saflıkta suda hazırlandı.

10 mL PAA çözeltisinden 3333 µL (9,999 mg) alındı ve $CuSO_4.5H_2O$ ile karıştırılarak ikili bir biyokompleks oluşturuldu. Bu biyokompleks, bir gece oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra pH 7'ye ulaşana kadar 1N NaOH çözeltisi ile titre edildi. Hazırlanan PAA–Cu^{2+} ikili biyokonjugat çözeltisine BSA çözeltisi eklendi ve karıştırıldı (nCu^{2+}/nPAA= 0.4, nBSA/nPAA=2). pH 7 olacak şekilde 1N NaOH çözeltisi ile ayarlanarak mavi renkli PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksi elde edildi.

5.2.4 PAA–Cu^{2+}–BSA Üçlü Biyokompleksinin Sentezlenmesi: II. Yöntem

PAA çözeltisi 3 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde PBS tamponunda hazırlandı. BSA çözeltisi, fosfatlı tuzlu tampon (PBS) kullanılarak hazırlandı. $CuSO_4.5H_2O$ çözeltisi ise yüksek saflıkta suda hazırlandı.

10 mL PAA çözeltisinden 3333 µL (9,999 mg) alınarak pH 6 olacak şekilde ayarlandı ve bir gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. BSA çözeltisi PAA çözeltisine yavaş yavaş ilave edilerek bir gece daha karıştırıldı. Daha sonra $CuSO_4.5H_2O$ çözeltisi damla damla eklenerek pH 7 olacak şekilde (nCu^{2+}/nPAA=0.4, nBSA/nPAA=2) mavi renkli PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksi (Şekil 5.2) elde edildi.



Şekil 5.2 PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksinin kimyasal yapısı

PAA–Cu^{2+} ikili biyobiyokonjugatın yapısal ve çözelti özellikleri, farklı oranlarda Cu^{2+} iyonları eklenerek PAA'nın bağlayabileceği maksimum bakır miktarı, çözelti davranışı, zeta potansiyeli gibi parametreler incelenmiştir. Elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- nCu^{2+}/nAA oranı 0.4'e kadar olan PAA–Cu^{2+} ikili biyokonjugatlarının suda çözünür olduğu, bu oranı aşan bakır iyonlarının eklenmesi ile biyokonjugatın suda çözünürlüğünün azaldığı ve çökelme meydana geldiği gözlemlenmiştir.
- Çökelti miktarının, eklenen bakır miktarıyla doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür.
- pH 7 değerinde negatif yüklü lineer bir polimer olan poliakrilik aside bakır ilavesi, viskozitenin düşmesine (kompakt hal almasına) ve belirli bir orandan sonra sabit kaldığı gözlemlenmiştir.

- Polimere bakır eklendikçe hidrodinamik çapın azaldığı (kompaktlaşması), sonra artışa geçip (polimerler arası etkileşimin artması) sabit bir şekilde devam ettiği (etkileşimin durması) gözlemlenmiştir.
- Artan nCu^{2+}/nAA oranı, zeta potansiyelinin pozitif değerlere yaklaşmasına ve dolayısıyla kompaktlaşmaya neden olmuştur.
- Polimerler arasındaki etkileşimin, artan bakır oranı ile birlikte zeta potansiyelinde düşüşe yol açtığı (negatife doğru kayma) gözlemlenmiştir. Bu durum, bakırın polimer ile etkileşime girmediğini ve zeta potansiyelini sabit tuttuğunu göstermektedir.

Elde edilen bulgular sonucunda, PAA–Cu^{2+} ikili biyokonjugatının yapı modelinde;

- Liner halindeki poliakrilik asit ve bakır arasındaki etkileşim, polimerin kompaktlaşmasına yol açmıştır.
- Bakır miktarının artmasıyla birlikte kompaktlaşmış polimerler arasında bağ oluşumu gözlemlenmiştir.
- Bakır fazlasında, kompleks yapısı değişime uğramaz.

PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokomplekslerinin yapısal ve çözünürlük özellikleri, farklı BSA konsantrasyonlarına sahip protein çözeltilerinin ve aynı konsantrasyonda protein çözeltisi içeren polimer çözeltilerinin (PAA–BSA) ve polimer–metal (PAA–Cu^{2+}–BSA) çözeltilerinin karıştırılmasıyla oluşturulan üçlü protein–polimer–metal biyokomplekslerinin oluşumu ve özellikleri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- Farklı BSA konsantrasyonlarına sahip protein çözeltilerinin ve PAA–BSA çözeltilerinin absorbans ölçümleriyle yapılan analizler, metal iyonu varlığında olmadan polimer ve protein arasında herhangi bir etkileşimin olmadığını göstermiştir.
- Protein çözeltilerinin PAA–Cu^{2+}–BSA çözeltilerine eklenmesiyle absorbans değerinde gözlenen artış, protein ve protein–polimer karışımındaki absorbans artışından önemli ölçüde fazladır. Bu bulgu, metal iyonu varlığında PAA–Cu^{2+}–BSA ve BSA arasında üçlü bir biyokompleks oluştuğunu göstermektedir.

- PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokomplekslerinde reaksiyon hızı, protein konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak artmakta ve belli bir noktadan sonra daha küçük artışlarla devam etmektedir.
- Birinci yöntem yani polimer–metal çözeltisine protein çözeltisi ekleme ve ikinci yöntem yani protein çözeltisine polimer–metal çözeltisi ekleme ile hazırlanan biyokomplekslerden birinci yöntem ikinci yöntemden daha hızlıdır. Bu durum, polimer–metal çözeltisinin BSA çözeltisine eklenmesi ile başlangıçta protein konsantrasyonunun daha yüksek olması ve polimer zincirinin dağılımının suda çözünmeyen kompleks oluşumunu zorlaştırması ile açıklanabilir.
- Polimer–metal ikili biyokomplekslerine BSA çözeltisi eklenmesi, floresans şiddetinde önemli bir azalmaya yol açmaktadır. Bu durum, polimerin protein ile etkileşiminden kaynaklanan proteinin konformasyon değişikliğinden dolayı triptofan floresansının söndürülmesi ile açıklanabilir.
- Metal iyonu konsantrasyonu arttıkça PAA–BSA'nın çapraz bağlayıcı özelliği artmakta ve bu durum üçlü biyokomplekslerin oluşumunu kolaylaştırmaktadır.
- Suda çözünen üçlü komplekslerin zetasizer cihazları ile yapılan ölçümler sonucunda, nCu^{2+}/nAA oranı 0.4 olarak ayarlandığında, üçlü biyokomplekslerin en kararlı formlarının oluştuğu gözlemlenmiştir.

Elde edilen bulgular sonucunda, PAA–Cu^{2+}–BSA biyokomplekslerinin oluşum mekanizması ve metal iyonlarının protein–polimer etkileşimleri üzerindeki etkisi hakkında önemli bilgiler sunmaktadır.

PAA ve BSA gibi biyomoleküller, metal iyonları ile kompleksler oluşturabilir ve bu komplekslerin toksisiteleri, metal iyonu türüne, biyomolekül oranlarına ve diğer faktörlere bağlı olarak değişebilir. Farklı oranlara sahip ikili ve üçlü biyokomplekslerin toksisiteleri hücre kültürü çalışmaları ile analiz edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, yalnız PAA'ya kıyasla ikili biyokonjugatların toksisitesi daha düşüktür. En önemli bulgu ise, PAA ve Cu^{2+} içeren ikili komplekslere kıyasla PAA, Cu^{2+} ve BSA içeren üçlü komplekslerden nCu^{2+}/nPAA=0.4 ve nBSA/nPAA=2 orantısına sahip olanların en az toksisiteye sahip olduğudur. Bu durum, PAA ve BSA ile Cu^{2+} iyonlarının oluşturduğu üçlü komplekslerin, metal iyonu toksisitesini azaltmada potansiyel bir rol oynayabileceğini göstermektedir. nCu^{2+}/nPAA=0.4 ve

nBSA/nPAA=2 oranı, optimum toksisiteyi sağlayan ve gelecekteki araştırma ve uygulamalar için önemli bir referans noktası oluşturmaktadır [42].

5.3 Zetasizer Ölçümleri

BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin partikül boyutu, iletkenlik, elektroforetik mobilite ve zeta potansiyeli gibi fizikokimyasal özellikleri üzerine farklı pH ve tuz konsantrasyonunun etkisi incelendi. Zetasizer kullanılarak 37°C'de, 10 adet ölçüm yapılarak ortalama değerler alındı.

6
TARTIŞMA

BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokompleksleri başarılı bir şekilde sentezlenmiş ve farklı pH ve farklı tuz konsantrasyonlarındaki partikül boyutu, zeta potansiyeli ve iletkenlik gibi fizikokimyasal özellikleri zetasizer cihazı ölçümleri ile araştırılmıştır. PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin kararlılığını koruduğu optimum pH ve tuz konsantrasyonlarının belirlenmesinin amaçlandığı bu tezde, BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin çalışılan pH aralığında ve farklı konsantrasyonlardaki NaCl tuz çözeltilerinde zeta potansiyel değerlerine bakıldığında yüzeylerinin negatif yüklendiği tespit edildi. Çalışılan pH aralığında, BSA proteini PAA–BSA ikili biyokonjugat ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokompleksleri olarak çözelti ortamında bulunduğunda zeta potansiyelleri –30 mV'dan büyük olduğu için daha kararlı yapı oluşturmakta olduğu görüldü. pH değişimi ile BSA proteini (ortalama 590 nm), ikili biyokonjugat (ortalama 460 nm) ve üçlü biyokomplekslerinin (450 nm) yapı içinde daha düşük partikül boyutuna sahip olarak polilektrolit zincir yapının daha düşük partikül boyutlu yumak forma geçtiği düşünülmektedir. Çalışılan pH aralığında bakır metal iyonunun biyokomplekslerin iletkenliğini azaltıcı etkiye sahip olduğu gözlendi. Üçlü yapının bakır metali varlığında daha istiflenmiş ve kararlı olmasının PAA'nın tamamının BSA'ya bağlı olması nedeniyle olduğu düşünüldü. Genel olarak, pH'ın bir fonksiyonu olarak PAA–BSA ikili biyokonjugatının iletkenliğindeki artışın, PAA'nın serbest iyonlarından geldiği düşünülmektedir. BSA proteininin partikül boyutu ikili biyokonjugat ve üçlü biyokompleks yapılarında sulu çözeltide karşılaştırıldığında, I. yönteme göre hazırlanan PAA–Cu^{+2}–BSA üçlü biyokompleksinin partikül boyutu ikili biyokonjugata göre daha büyüktür. Ancak tuz ilavesi ile BSA, ikili biyokonjugat ve üçlü biyokomplekslerinin partikül boyutları çok değişmemektedir. BSA proteininin zeta potansiyelleri ikili biyokonjugat ve üçlü biyokompleks yapılarında sulu çözeltide karşılaştırıldığında, ikili biyokonjugat ve üçlü biyokompleks yapıda kararlığı daha iyidir. Ancak tuz

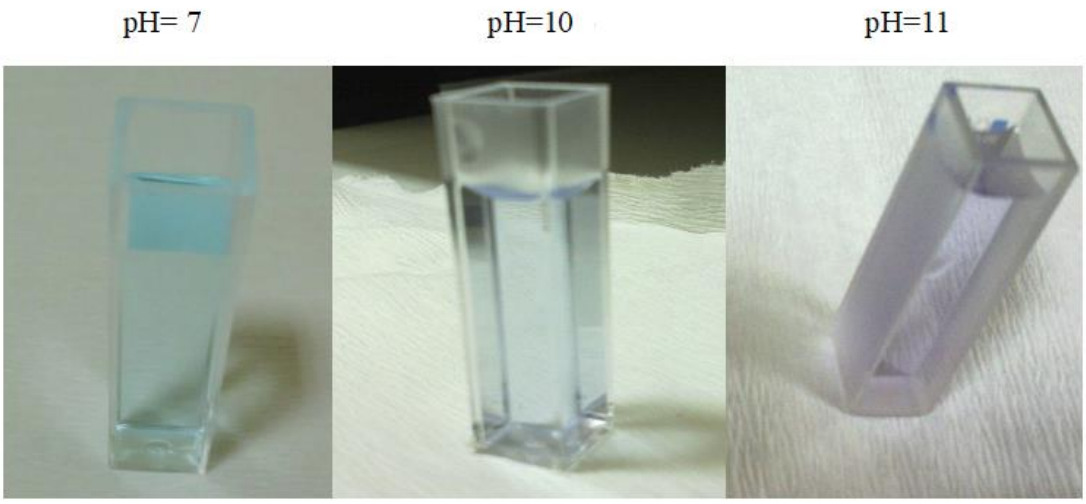
ilavesi ile BSA, ikili biyokonjugat ve üçlü biyokomplekslerin zeta potansiyelleri çok değişmemektedir. Partikül boyutlarının ve zeta potansiyellerinin tuz konsantrasyonlarından etkilenmemesi, bu moleküllerin yüksek iyonik güce karşı kararlı olduğunu göstermektedir. Negatif mobilite değerleri ise tüm örneklerin farklı tuz konsantrasyonlarında negatif yüklü olduğunu göstermektedir. Bu durum, PAA'nın karboksil gruplarının ve BSA'nın amino asitlerinin yan zincirlerinin iyonlaşması sonucu oluşan negatif yüklerine yorumlanmaktadır.

Elde edilen sonuçlar sentezlenen üçlü biyokomplekslerin yapay polimerik aşı çalışmalarında daha kararlı yapı oluşturdukları, çalışılacak pH aralığı ve tuz konsantrasyonları konusunda bilgi vermiştir.

7
SONUÇ

7.1 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokompleksinin kararlılığı üzerine pH Etkisi

BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokompleksleri taze olarak hazırlandı ve PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksinde pH'a bağlı olarak maviden mora renk değişimi gözlemlendi (Şekil 7.1).



Şekil 7.1 Farklı pH'larda PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksinin renk değişimi

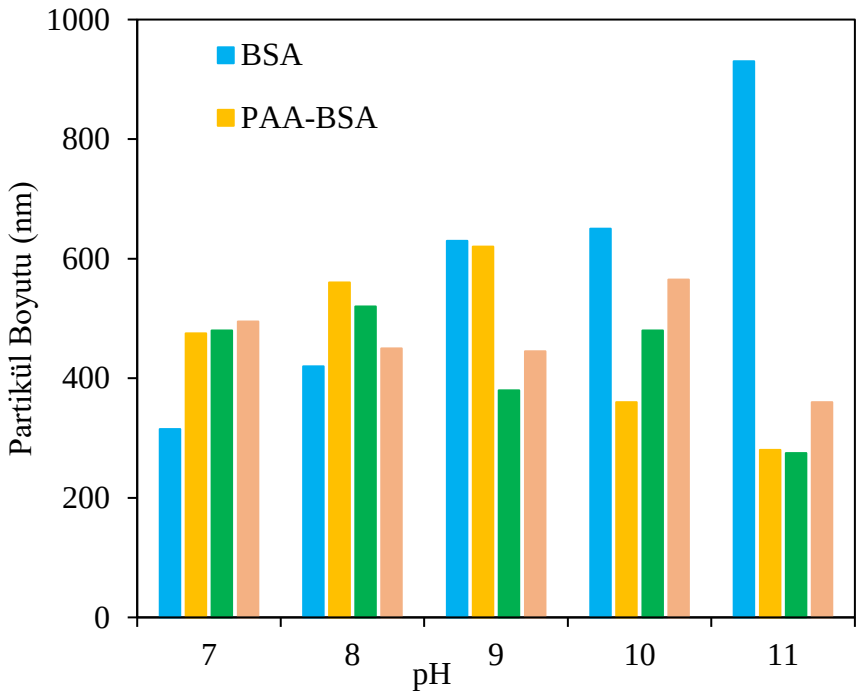
Bu mavi–mor renk değişimi, bakır iyonunun protein ile biüret reaksiyonuna girmesi sonucu oluşmaktadır. Biüret reaksiyonu, bakır iyonları ve peptit bağları içeren bileşikler arasında gerçekleşen bir kimyasal reaksiyondur ve bakır iyonlarının peptit bağlarındaki peptit grupları ile reaksiyona girmesi sonucu kompleks oluşumuna ve renginde değişime yol açar. Bu çalışmada, pH 7 ile 9 arasında mavi renk, pH 10'da ise mor renge dönüşüm gözlemlenmiştir [43]. Bu nedenle çalışmamızı pH 7–11 aralığında gerçekleştirdik.

Farklı pH'larda BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin partikül boyutları zetasizer cihazı ile dinamik

ışık saçılımı (DLS) tekniğiyle ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Tablo 7.1'de gösterilmiş ve Şekil 7.2'de grafikleştirilmiştir.

Tablo 7.1 Farklı pH'larda BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin partikül boyutları (nm)

pH	BSA	Biyokonjugat	Biyokompleks	
			I.Yöntem	II.Yöntem
7	315	475	480	495
8	420	560	520	450
9	630	620	380	445
10	650	360	480	565
11	930	280	275	360



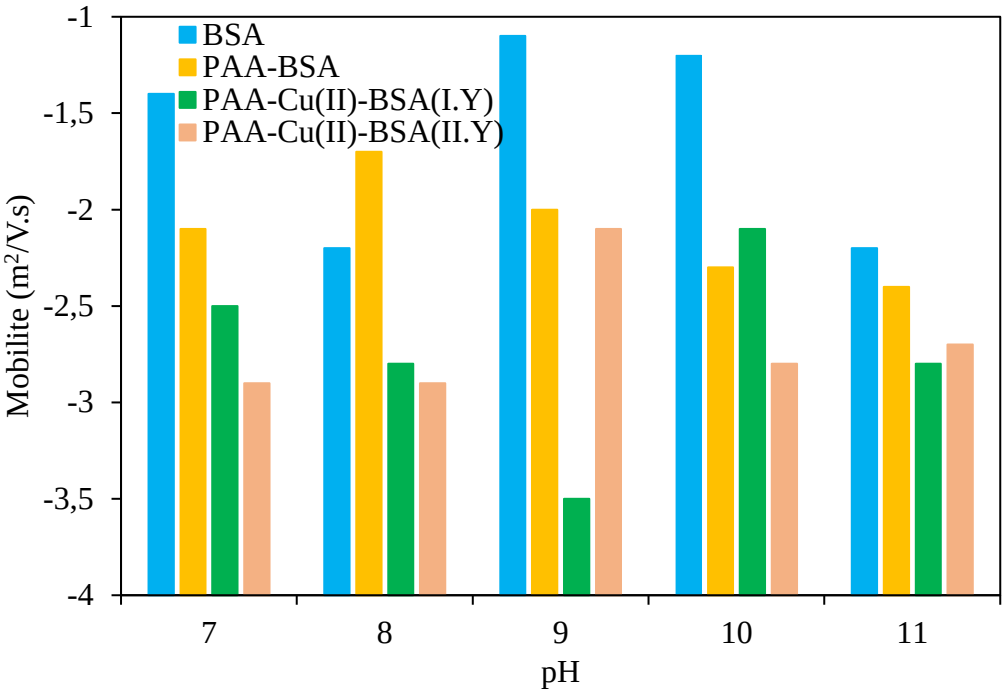
Şekil 7.2 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin partikül boyutları üzerindeki pH etkisi

BSA ile karşılaştırıldığında PAA–BSA ikili biyokonjugatının ve PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokomplekslerinin (I. ve II. Yöntem) partikül boyutları pH 7 ve pH 8'de artmaktadır. Bazik çözeltilerde (pH 9 ve 11) ise partikül boyutlarında azalma gözlemlenmiştir. Bu eğilim, BSA'nın; pH 7 ve pH 8'de PAA ve Cu^{2+} iyonları ile bağlanmasından sonra orijinal yapısının gevşediğini, pH 9 ile 11'de ise BSA'nın daraldığını göstermektedir [44].

Farklı pH'larda BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA– Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin elektroforetik mobilitesi ve zeta potansiyelleri zetasizer cihazı ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Tablo 7.2 ve 7.3'te gösterilmiş, Şekil 7.3 ve 7.4'te grafikleştirilmiştir.

Tablo 7.2 Farklı pH'larda BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin elektroforetik mobiliteleri ($m^2/V.s$)

pH	BSA	Biyokonjugat	Biyokompleks	
			I.Yöntem	II.Yöntem
7	–1.4	–2.1	–2.5	–2.9
8	–2.2	–2.6	–2.8	–2.9
9	–1.1	–2.0	–3.5	–2.1
10	–1.2	–2.6	–2.1	–2.8
11	–2.2	–2.7	–2.8	–2.7

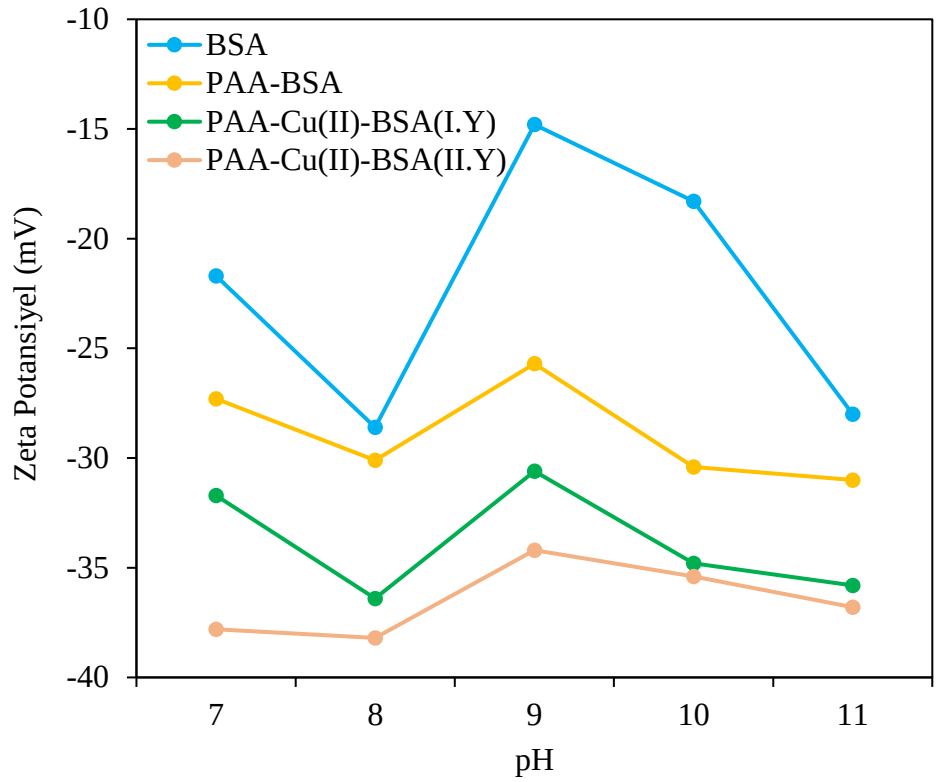


Şekil 7.3 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin elektroforetik mobiliteleri üzerindeki pH etkisi

Tablo 7.3 Farklı pH'larda BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin zeta potansiyelleri (mV)

pH	BSA	Biyokonjugat	Biyokompleks	
			I.Yöntem	II.Yöntem
7	–21.7	–27.3	–31.7	–37.8
8	–28.6	–30.1	–36.4	–38.2
9	–14.8	–25.7	–30.6	–34.2
10	–18.3	–30.4	–34.8	–35.4
11	–28.0	–31.0	–35.8	–36.8

Çözeltideki katı partiküllerin zeta potansiyeli ile elektroforetik mobilitesi doğrudan orantılıdır. Zeta potansiyeli, partiküllerin yüzey yük özelliğini ve kararlılığını gösterir. BSA proteini, amino ve karboksil grubu gibi birçok fonksiyonel grup içerir. Polimerler ve metal iyonları ile etkileşime girip kompleksler oluşturarak yüzey yükünde değişikliğe neden olur.



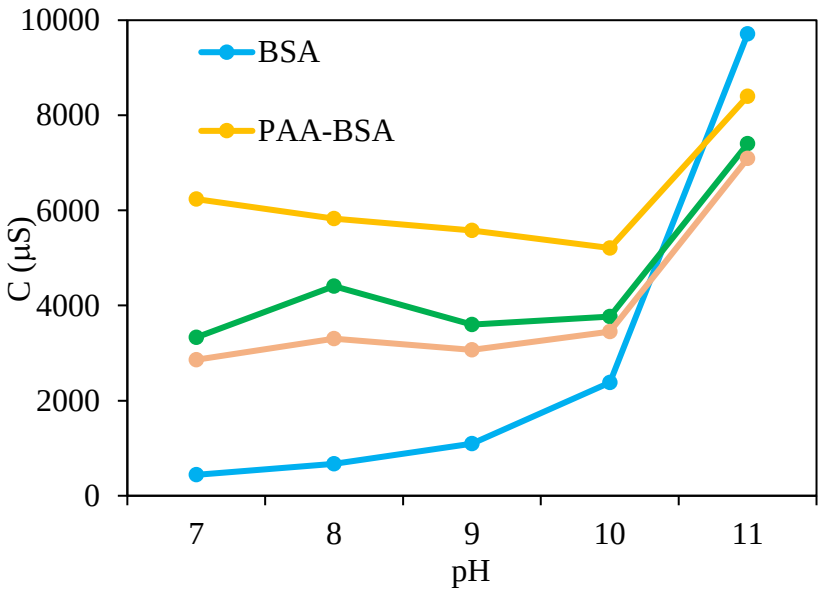
Şekil 7.4 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin zeta potansiyelleri üzerindeki pH etkisi

Farklı pH'larda BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugat ve PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokomplekslerinin zeta potansiyellerinin farklı olması önemli ölçüde dikkat çekicidir. BSA'nın zeta potansiyel değerleri, PAA–BSA ve PAA–Cu^{2+}–BSA'dan (I. ve II. Yöntem) daha düşük bulunmuştur ve çalışılan pH aralıklarında BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugat ve PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksleri negatif yüklü bir karakter sergilemiştir. Tüm numunelerin kararlılığı karşılaştırıldığında, PAA–Cu^{2+}–BSA (II. Yöntem) üçlü biyokompleksinin çalışılan pH aralığında en kararlı çözeltinin olduğu görülmüştür. Negatif zeta potansiyelindeki artış, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve Cu^{2+} iyonları arasındaki elektrostatik çekimi göstermektedir. Bu çekim, PAA–Cu^{2+}–BSA üçlü biyokompleksinin oluşumuna ve stabilizasyonuna katkıda bulunur.

BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin farklı pH'larda iletkenliği zetasizer cihazı ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Tablo 7.4'te gösterilmiş ve Şekil 7.5'te grafikleştirilmiştir.

Tablo 7.4 Farklı pH'larda BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin iletkenliği (µS)

pH	BSA	Biyokonjugat	Biyokompleks	
			I.Yöntem	II.Yöntem
7	440	6240	3330	2860
8	670	5830	4410	3300
9	1095	5580	3600	3065
10	2380	5210	3770	3450
11	9710	8400	7400	7090



Şekil 7.5 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin iletkenlik değişimi üzerindeki pH etkisi

Numunelerin iletkenliğinin artan pH ile birlikte kademeli olarak arttığı gözlemlenmiştir. Bu artış, pH'ın artmasıyla birlikte çözeltideki iyon konsantrasyonunun artmasından kaynaklanmaktadır. Numunelerin iletkenlik sırası PAA–BSA > PAA–Cu^{2+}–BSA (I. Yöntem) > PAA–Cu^{2+}–BSA (II. Yöntem) > BSA şeklindedir. pH değeri arttıkça örneklerin iletkenliği karşılaştırıldığında en yüksek iletkenlik PAA–BSA ikili biyokonjugatında görülmüştür. pH'ın bir fonksiyonu olarak PAA–BSA ikili biyokonjugatının iletkenliğindeki bu artışın, çözeltiyle daha fazla PAA iyonunun maruz kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

7.2 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin kararlılığı üzerine Tuz Etkisi

Farklı tuz konsantrasyonlarında BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin partikül boyutları, elektroforetik mobiliteleri, iletkenlikleri ve zeta potansiyelleri zetasizer cihazı ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar sırasıyla Tablo 7.5, 7.6, 7.7 ve 7.8'de gösterilmiş, Şekil 7.6, 7.7, 7.8 ve 7.9'da grafikleştirilmiştir.

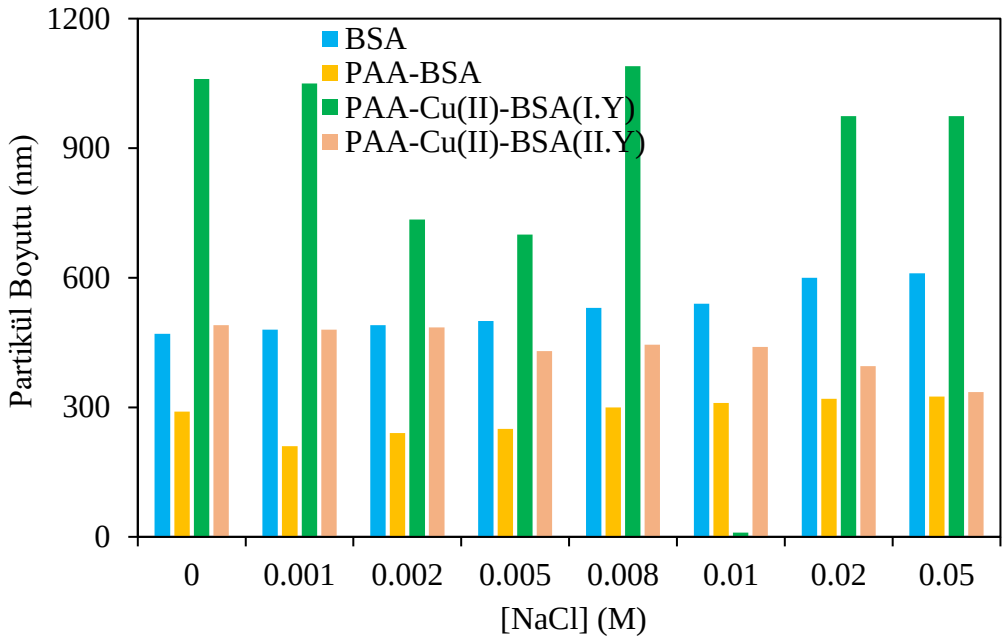
BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin farklı tuz konsantrasyonlarında polidispersite indeksi (PDI) 0.3–0.7 aralığında değişmekte olup homojen dağılım göstermektedirler**.**

Tablo 7.5 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin farklı tuz konsantrasyonlarında partikül boyutları (nm)

			Biyokompleks	
[NaCl] (M)	BSA	Biyokonjugat	I.Yöntem	II.Yöntem
0	470	290	1060	490
0.001	480	210	1050	480

Tablo 7.5 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin farklı tuz konsantrasyonlarında partikül boyutları (nm) (devamı)

[NaCl] (M)	BSA	Biyokonjugat	Biyokompleks	
			I.Yöntem	II.Yöntem
0.002	490	240	735	485
0.005	500	250	700	430
0.008	530	300	1090	445
0.01	540	310	1020	440
0.02	600	320	974	395
0.05	610	325	974	335

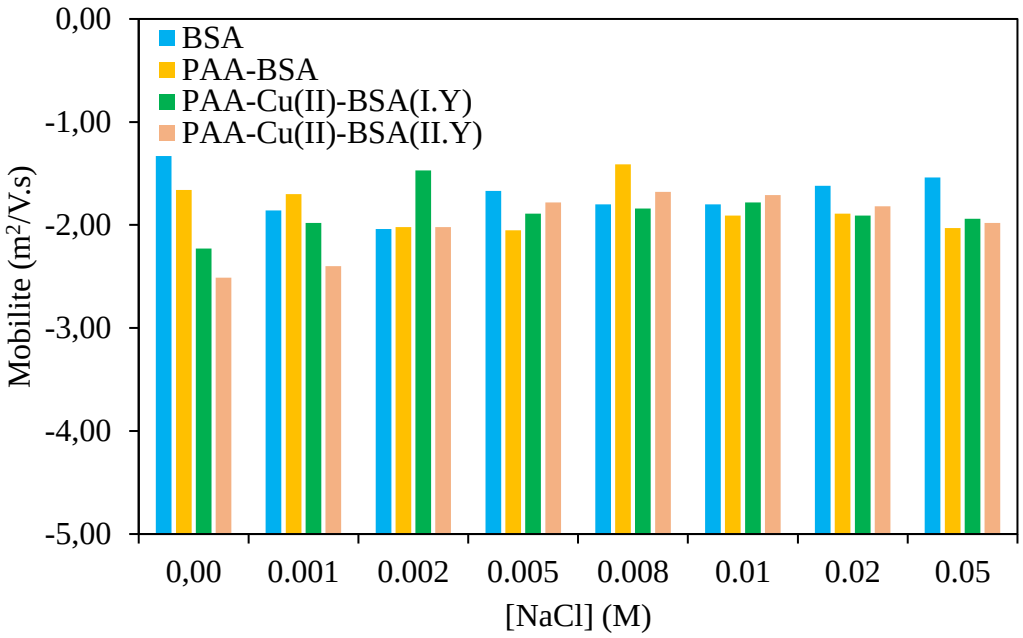


Şekil 7.6 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin partikül boyutları üzerindeki tuz etkisi

BSA ve PAA–BSA ikili biyokonjugatının partikül boyutu tuz konsantrasyonu arttıkça artmıştır. Bu durum, PAA'nın polianyonik yapısının BSA'nın hidrofobik bölgelerine bağlanması ve proteinin hidrofobik etkileşimlerini zayıflatması ile açıklanabilir. PAA–Cu^{2+}–BSA (I. Yöntem) üçlü biyokompleksinin partikül boyutu tuz ilavesi ile önce çok az düşmekte sonra ortamdaki tuz konsantrasyonu arttıkça çok fazla değişmemektedir. Bu durum, PAA–Cu^{2+}–BSA (I. Yöntem) üçlü biyokompleksinin yüksek iyonik güce karşı kararlı bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Tuz ilavesi, PAA–Cu^{2+}–BSA (II. Yöntem) üçlü biyokompleksinin yüzeyindeki elektriksel çift katmanı sıkıştırır ve partikül boyutunu çok az azaltmaktadır.

Tablo 7.6 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin farklı tuz konsantrasyonlarında elektroforetik mobiliteleri ($m^2/V.s$)

[NaCl] (M)	BSA	Biyokonjugat	Biyokompleks	
			I.Yöntem	II.Yöntem
0	–1.33	–1.66	–2.23	–2.51
0.001	–1.86	–1.70	–1.98	–2.40
0.002	–2.04	–2.02	–1.47	–2.02
0.005	–1.67	–2.05	–1.89	–1.78
0.008	–1.80	–1.41	–1.84	–1.68
0.01	–1.80	–1.91	–1.78	–1.71
0.02	–1.62	–1.89	–1.91	–1.82
0.05	–1.54	–2.03	–1.94	–1.98



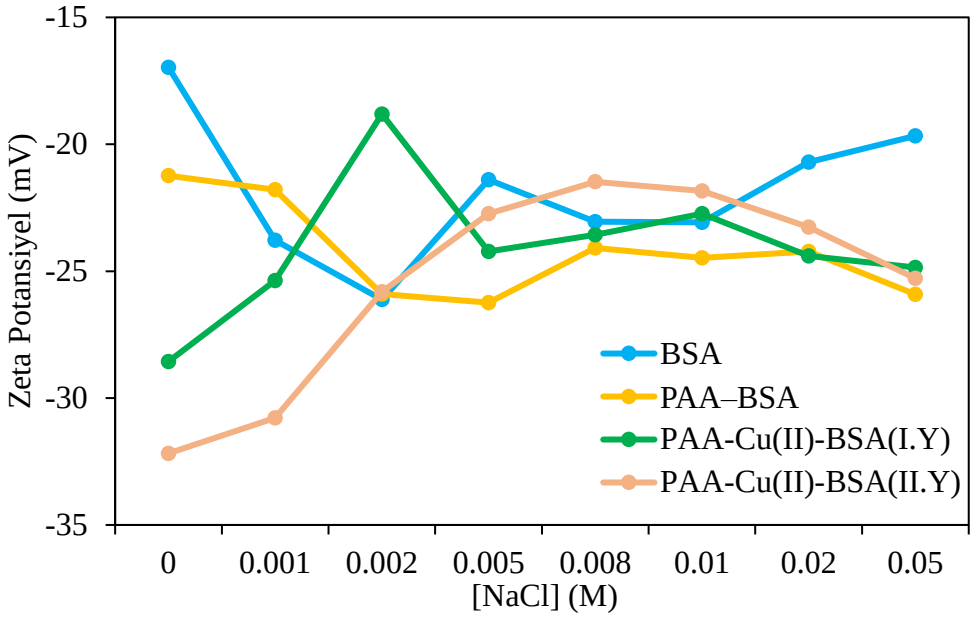
Şekil 7.7 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin elektroforetik mobiliteleri üzerindeki tuz etkisi

BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin farklı tuz konsantrasyonlarında, negatif elektroforetik mobilite değerleri, bu maddelerin çalışılan konsantrasyonlarında negatif yüklendiğini göstermektedir. BSA, tuz konsantrasyonundaki değişimlere diğer komplekslere göre daha az duyarlılık göstermektedir. Bu durum, BSA molekülünün yüzey yükünün daha az değişken olmasından kaynaklanabilir.

PAA–BSA ikili biyokonjugatı, tuz konsantrasyonundaki artışla birlikte mobilitesinde daha belirgin değişiklikler göstermektedir. Bu durum, PAA'nın çözeltideki iyonik kuvvetlere duyarlılığını yansıtmaktadır. PAA'nın iyonize olabilen grupları, çözeltideki tuz iyonlarıyla etkileşerek kompleks yapısının ve dolayısıyla yüzey yükünün değişmesine neden olmaktadır. I.ve II. yöntem ile hazırlanan üçlü biyokomplekslerde özellikle düşük tuz konsantrasyonlarında yüksek negatif mobilite değerleri dikkat çekicidir. Bu durum, bakır iyonunun kompleks içindeki konumunun ve yük dağılımının önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Bakır iyonunun eklenmesi, kompleks yapısını ve yüzey yükünü önemli ölçüde değiştirerek elektroforetik mobilite davranışını etkilemektedir.

Tablo 7.7 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin farklı tuz konsantrasyonlarında zeta potansiyelleri (mV)

[NaCl] (M)	BSA	Biyokonjugat	Biyokompleks	
			I.Yöntem	II.Yöntem
0	–16.97	–21.24	–28.56	–32.18
0.001	–23.78	–21.79	–25.37	–30.78
0.002	–26.12	–25.90	–18.81	–25.81
0.005	–21.40	–26.24	–24.23	–22.74
0.008	–23.05	–24.08	–23.57	–21.48
0.01	–23.07	–24.48	–22.73	–21.84
0.02	–20.71	–24.23	–24.40	–23.27
0.05	–19.67	–25.92	–24.85	–25.28

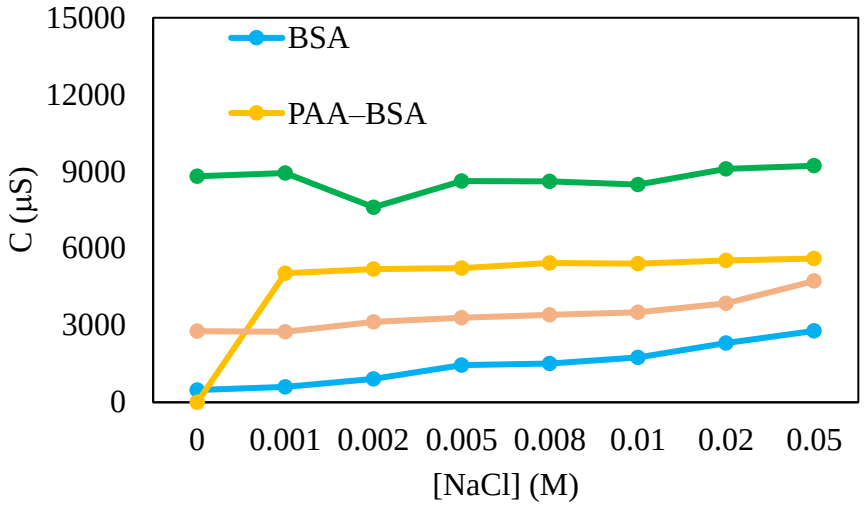


Şekil 7.8 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin zeta potansiyelleri üzerindeki tuz etkisi

BSA ve BSA–PAA ikili biyokonjugatı ortama tuz ilavesi ile daha da negatif yüklenerek yüksek zeta potansiyeli değerlerine ulaşmaktadır. Bu durum, PAA'nın karboksil gruplarının tuz ilavesi ile iyonlaşmasının artması ve proteinin yüzeyindeki net negatif yükü arttırması ile açıklanabilir. Artan net negatif yük, elektriksel çift katmanının kalınlaşmasına ve zeta potansiyelinin artmasına neden olur. PAA–Cu^{2+}–BSA (I. Yöntem) üçlü biyokompleksine tuz ilavesi ile zeta potansiyeli ani düşmektedir ve ortama yapılan tuz ilavesinden sonra tuz konsantrasyonu zeta potansiyelini değiştirmemektedir. Bu durum, PAA–Cu^{2+}–BSA (I. Yöntem) üçlü biyokompleksinin yüksek iyonik güce karşı kararlı bir yapıya sahip olduğunu ve tuz ilavesinin üçlü biyokompleksin yüzeyindeki elektriksel çift katmanını önemli ölçüde etkilemediğini gösterir. PAA–Cu^{2+}–BSA (II. Yöntem) üçlü biyokompleksinin zeta potansiyeli ortama çok az tuz ilavesi ile ani düşmektedir ve ortama yapılan tuz ilavesinden sonra sabitlenmektedir. Bu durum, PAA–Cu^{2+}–BSA (II. Yöntem) üçlü biyokompleksinin PAA–Cu^{2+}–BSA (I. Yöntem) üçlü biyokompleksine göre daha az kararlı bir yapıya sahip olduğunu ve tuz ilavesinin üçlü biyokompleksin yüzeyindeki elektriksel çift katmanını daha fazla etkilediğini gösterir.

Tablo 7.8 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin farklı tuz konsantrasyonlarında iletkenliği (μS)

[NaCl] (M)	BSA	Biyokonjugat	Biyokompleks	
			I.Yöntem	II.Yöntem
0	480	–	8817	2775
0.001	595	5029	8939	2751
0.002	917	5195	7608	3140
0.005	1445	5229	8627	3295
0.008	1515	5433	8617	3408
0.01	1746	5412	8494	3516
0.02	2308	5529	9105	3861
0.05	2785	5607	9226	4730



Şekil 7.9 BSA, PAA–BSA ikili biyokonjugatı ve PAA–Cu^{2+}–BSA (I. ve II. Yöntem) üçlü biyokomplekslerinin iletkenlik değişimi üzerindeki tuz etkisi

BSA'nın iletkenliği, tuz konsantrasyonu arttıkça artmaktadır. Bu durum, tuz ilavesi ile ortamda iyon konsantrasyonunun artması ve BSA molekülünün yüzeyindeki iyonik etkileşimlerin artması ile açıklanabilir. Artan iyonik etkileşimler, proteinin iyonik iletkenliğini ve dolayısıyla iletkenliğini arttırır. PAA–BSA ikili biyokonjugatının iletkenliği, ortama tuz ilavesi ile artmaktadır. Bu durum, PAA'nın karboksil gruplarının tuz ilavesi ile iyonlaşmasının artması ve proteinin yüzeyindeki net negatif yük miktarını arttırması ile açıklanabilir. Artan net negatif yük, elektriksel çift katmanın kalınlaşmasına ve iletkenliğin artmasına neden olur. PAA–Cu^{2+}–BSA (I. Yöntem) üçlü biyokompleksinin iletkenliği, ortama tuz ilavesi ile hiç değişmeyerek kararlı yapısını korumaktadır. Bu durum, PAA–Cu^{2+}–BSA (I. Yöntem) üçlü biyokompleksinin yüksek iyonik güce karşı kararlı bir yapıya sahip olduğunu ve tuz ilavesinin üçlü biyokompleksin yüzeyindeki elektriksel çift katmanını ve dolayısıyla iletkenliğini önemli ölçüde etkilemediğini gösterir. PAA–Cu^{2+}–BSA (II. Yöntem) üçlü biyokompleksinin iyonik iletkenliği, artan tuz konsantrasyonu ile artmıştır. Bu durum, PAA–Cu^{2+}–BSA (II. Yöntem) üçlü biyokompleksinin PAA–Cu^{2+}–BSA (I. Yöntem) üçlü biyokompleksine göre daha az kararlı bir yapıya sahip olduğunu ve tuz ilavesinin üçlü biyokompleksin yüzeyindeki elektriksel çift katmanını ve dolayısıyla iletkenliğini daha fazla etkilediğini gösterir.

KAYNAKÇA

[1] A. Filenko, M. Demchenko, Z. Mustafaeva, Y. Osada, and M. Mustafaev, "Fluorescence study of Cu^{2+}–induced interaction between albumin and anionic polyelectrolytes", *Biomacromolecules*, vol. 2, no. 1, pp. 270-277, 2001.

[2] V. A. Kabanov, "From synthetic polyelectrolytes to polymer–subunit vaccines", *Pure and Applied Chemistry*, vol. 76, no. 9, pp. 1659-1677, 2004.

[3] M. Zhou, X. Li, Z. Wang, H. Zhou, X. Chen, S. Yang, and Y. Li, "Preparation of polyacrylic acid and its activation on macrophages", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol.772, no.1, pp. 012082, 2020.

[4] M. Karahan, Z. Mustafaeva, and C. Özeroğlu, "Investigation of ternary complex formations of polyacrylic acid with bovine serum albumin in the presence of metal ions by fluorescence and dynamic light scattering measurements", *The Protein Journal*, vol. 29, no. 5, pp. 336-342, 2010.

[5] R. J. Hunter, "*Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*", Academic Press, London, 2013.

[6] C. Freitas, and R. H. Müller, "Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 168, no. 2, pp. 221-229, 1998.

[7] S. Das, and A. Chaudhury, "Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery", *AAPS PharmSciTech*, vol. 12, pp. 62-76, 2011.

[8] R. Shah, D. Eldridge, E. Palombo, and I. Harding, "Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential", *Journal of Physical Science*, vol. 25, no. 1, pp. 59-75, 2014.

[9] M. Aydın, "Polielektrolitlerin Küçük Molekül Ağırlıklı Tuzlarla Etkileşimi", *Yüksek Lisans Tezi*, Kimya Bölümü, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 2009.

[10] N. Çini, "Comparison of polyelectrolyte complex formation in bulk and at interfaces", *Yüksek Lisans Tezi*, Kimya Ana Bilim Dalı, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 2010.

[11] M. I. Mustafaev, "*Biyopolimerler (Biopolymers)*", TÜBİTAK, Ankara, Türkiye, pp. 1-253, 1996.

[12] E. M. Gözükara, "*Biyokimya 2*", Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Türkiye, 1997.

[13] C. Deen, E. Claassen, K. Gerritse, N. D. Zegers, and W. J. Boersma, "A novel carbodiimide coupling method for synthetic peptides: enhanced anti-peptide antibody responses", *J. Immunol. Methods*, vol. 129, no. 1, pp. 119-125, 1990.

[14] M. Black, A. Trent, M. Tirrell, and C. Olive, “Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on Toll-like receptor agonists”, *Expert Review of Vaccines*, 9(2), 157-173, 2010.

[15] S. Acar, “Peptid-Protein Kovalent Konjugasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 2006.

[16] M. I. Mustafaev, and Z. Mustafaeva, “Novel polypeptide–comprising biopolymer systems”, *Technology and Health Care*, vol. 10, no. 3-4, pp. 217-226, 2002.

[17] S. E. Kudaibergenov, and N. Nuraje, “Intra–and interpolyelectrolyte complexes of polyampholytes”, *Polymers*, vol. 10, no. 10, p. 1146, 2018.

[18] A. D. Kulkarni, Y. H. Vanjari, K. H. Sancheti, H. M. Patel, V. S. Belgamwar, S. J. Surana, and C. V. Pardeshi, “Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications”, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, vol. 44, no. 7, pp. 1615-1625, 2016.

[19] H. J. Bixler, and A. S. Michaels, “Polyelectrolyte complexes”, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, vol. 10, pp. 765-780, 1969.

[20] T. Radeva, “*Physical Chemistry of Polyelectrolytes*”, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2001.

[21] D. Sacco, F. Bonneaux, and E. Dellacherie, "Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and the oxygen–binding properties of the covalent conjugates", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 10, no. 5, pp. 305-310, 1998.

[22] T. Lenk, and C. Thies, “Coulombic interactions in macromolecular systems”, in *Coulombic Interactions in Macromolecular Systems*, A. Eisenberg and F. E. Bailey, Eds., vol. 302. American Chemical Society, 1987.

[23] C. Glatz, J. Shieh, D. Parker, and I. Suominen, “Precipitation of proteins with polyelectrolytes”, in *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, vol. 201, pp. 323-POLY, Apr. 1991.

[24] J. M. Park, B. B. Muhoberac, P. L. Dubin, and J. Xia, “Effects of protein charge heterogeneity in protein–polyelectrolyte complexation”, *Macromolecules*, vol. 25, no. 1, pp. 290-295, 1992.

[25] N. Sebastian, B. George, and B. Mathew, “Metal complexes of poly(acrylic acid): synthesis, characterization and thermogravimetric studies”, *Polymer Degradation and Stability*, vol. 60, no. 2-3, pp. 371-375, 1998.

[26] Y. Zheng, Y. Yi, Y. Qi, Y. Wang, W. Zhang, and M. Du, “Preparation of chitosan–copper complexes and their antitumor activity”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 16, no. 15, pp. 4127-4129, 2006.

[27] M. I. Mustafaev and V. A. Kabanov, “Soluble ternary complex of poly–4–vinylpyridine, bovine serum albumin and copper”, *Polymer Science USSR*, vol. 23, no. 2, pp. 299-304, 1981.

[28] Committee for Medicinal Products for Human Use, “Guideline on adjuvants in vaccines for human use”, European Medicines Agency, London, UK, 2005.

[29] S. Sasaki and K. Okuda, “The use of conventional immunologic adjuvants in DNA vaccine preparations”, in *DNA Vaccines: Methods and Protocols*, Humana Press, pp. 241-249, 2000.

[30] N. Chaffey, B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, “*Molecular biology of the cell* (4th ed.)”, Garland Science, New York, 2003.

[31] M. Mustafaev, “Functionally biopolymer systems”, *Sigma: Journal of Engineering and Natural Sciences*, 4, 1-200, 2004.

[32] M. I. Mustafaev, "Biyopolimerler", TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Raporu, Ankara, Türkiye, 1996.

[33] B. Beşergil, "*Polimer Kimyası*", Gazi Kitabevi, Ankara, Türkiye, 2008.

[34] S. E. Harding and K. Jumel, “Light scattering”, Current Protocols in Protein Science, vol. 11, no. 1, pp. 7-8, 1998.

[35] S. Karmakar, "Dinamik ışık saçılımına dayalı parçacık boyut dağılımı ve zeta potansiyeli: Yüklü koloidlerin kararlılığı ve yüzey dağılımını karakterize etme teknikleri", Malzeme Fiziği ve Kimyası'ndaki Son Trendler, vol. 28, pp. 117-159, 2019.

[36] J. T. G. Overbeek, "Elektroforez Teorisi - Relaksasyon Etkisi", arXiv preprint arXiv:1907.05542, 2019.

[37] G. Trefalt, and M. Borkovec, “Overview of DLVO theory”, Laboratory of Colloid and Surface Chemistry, University of Geneva, Switzerland, 2014.

[38] Y. Çanayaz, "Farklı iyonik çevrelerde ultrafiltrasyon membranların yüzey iletkenliğinin zeta potansiyeli üzerine etkileri", Yüksek Lisans Tezi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, Türkiye, 2016.

[39] A. Kausar, “Poly(acrylic acid) nanocomposites: Design of advanced materials”, J. Plast. Film Sheeting, vol. 37, no. 4, pp. 409-428, 2021.

[40] S. Behera, P. Mohanty, P. P. Dash, P. Mohapatra, L. Shubhadarshinee, R. Behura, and B. R. Jali, “Selective Binding of Bovine Serum Albumin (BSA): A Comprehensive Review”, Biointerface Res. Appl. Chem., vol. 13, pp. 555, 2023.

[41] G. T. Hermanson, “*Bioconjugate Techniques*”, Academic Press, 2013.

[42] M. Karahan, "Metal içeren Fonksiyonel Biyopolimerlerin Geliştirilmesi", Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, Doktora Tezi, 2009.

[43] T. Peters, and F. A. Blumenstock, "Copper-binding properties of bovine serum albumin and its amino-terminal peptide fragment", *J. Biol. Chem.*, vol. 242, no. 7, pp. 1574-1578, Apr. 1967.

[44] G. Yan, Y. He, G. Li, Y. Xiong, P. Song, and R. M. Wang, "Bovine serum albumin metal complexes for mimic of SOD", *Journal of Chemical Sciences*, 128, 1783–1788, 2016.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

[1] B. Çakır, D. Şakar, and M. Karahan, "Stability investigation of PAA–BSA bioconjugate and PAA–Cu^{2+}–BSA ternary biocomplex in different pHs and comparison with in different salt concentrations", in Proc. 8th Int. Conf. New Trends Chem., Istanbul, Turkey, May 16-18, 2022, Poster Session.

Makaleler

[1] B. Çakır, D. Şakar, and M. Karahan, "Stability investigation of PAA–BSA bioconjugate and PAA–Cu^{2+}–BSA ternary biocomplex at different pHs", Bulgarian Chem. Commun, vol. 54, no. 3, pp. 271-276, 2022.

Projeler

[1] Polielektrolitlerin proteinlerle çapraz bağlayıcı ajanlar varlığında konjugatlarının oluşturulması. [Grant number 2012–01–02–GEP04]. Yıldız Teknik Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Istanbul, Turkey, 2012-2014.