

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

POLİELEKTROLİT-PROTEİN KOMPLEKSLERİ

Kimya Mühendisi M.Serap ARUNTAŞ

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalından
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. M. Mustafa AKDESTE (YTÜ)**
Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE (YTÜ)

İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖNSÖZ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. POLİELEKTROLİT TANIMI ve GENEL AÇIKLAMA	1
1.1 Genel Giriş.....	1
1.2 Çözeltide Polielektrolitlerin Bazı Özellikleri	5
2. POLİELEKTROLİTLERİN SENTEZİ	8
2.1 Giriş	8
2.2 Sentetik Polielektrolitler	9
2.2.1 Serbest-Radikal Polimerizasyonu ile Sentez	9
2.2.1.1 Prensipler ve Proses	9
2.2.1.2 Katyonik Polielektrolitlerin Serbest-Radikal Polimerizasyonu ile Sentezi	12
2.2.1.3 Anyonik Polielektrolitlerin Serbest-Radikal Polimerizasyonu ile Sentezi	13
2.2.1.4 Poliamfolitlerin Serbest-Radikal Polimerizasyonu ile Sentezi	14
2.2.1.5 Polielektrolitlerin Serbest-Radikal Polimerizasyonu ile Sentezinin Özellikleri....	15
2.2.2 İyonik Polimerizasyon ile Sentez	16
2.2.2.1 Prensipler	16
2.2.2.2 Katyonik Polielektrolitlerin İyonik Polimerizasyon ile Sentezi	17
2.2.3 Basamaklı Polimerizasyon ile Sentez	17
2.2.3.1 Prensipler	17
2.2.3.2 Polielektrolitlerin Polikondenzasyon ve Poliadisyon ile Sentezi	17
2.2.4 Sentetik Polimerlerin Kimyasal Modifikasyon ile Sentezi	18
2.2.4.1 Prensipler	18
2.2.4.2 Katyonik Polielektrolitlerin Polimer Modifikasyonu ile Sentezi	19
2.2.4.3 Anyonik Polielektrolitlerin Polimer Modifikasyonu ile Sentezi	20
2.2.4.4 Poliamfolitlerin Polimer Modifikasyonu ile Sentezi	20
2.2.5 Hidrofobik Olarak Modifiye Edilmiş Polielektrolitlerin Sentezi	21
2.3 Doğal Polielektrolitler	22
2.3.1 Nükleik Asitler	22
2.3.2 Taykoik Asit	24
2.3.3 Polipeptid ve Protein Bazlı Polielektrolitler	24
2.3.4 Polisakkarid Bazlı Polielektrolitler	24

2.3.4.1	Doğal Polisakkaridik Polielektrolitler	24
2.3.4.2	Önceden Oluşmuş İyonik Bölgelerin Serbest Bırakılmasıyla Doğal Polimer Ürünlerinden Elde Edilen Polielektrolitler	27
2.3.4.3	Substitüye Edilmemiş Polisakkaridlerin Türevlendirilmesiyle Polielektrolit Hazırlanması	28
2.3.4.3.1	Selüloz Bazlı Polielektrolitler	28
2.3.4.3.2	Ksilan Bazlı Polielektrolitler	28
2.3.4.3.3	Nişasta Bazlı Polielektrolitler	28
2.3.4.3.4	Dekstran Bazlı Polielektrolitler	30
2.3.5	Lignin Bazlı Polielektrolitler	30
3.	POLİELEKTROLİT-PROTEİN KOMPLEKSLERİNİN OLUŞUMU ve YAPISI	31
3.1	Giriş	31
3.2	Yapı-Özellik ilişkisi	31
3.3	Kuvvetler (etkileşimler)	32
3.4	Hidrofobik Etkiler	33
3.5	Polielektrolit-Protein Komplekslerinin Fiziksel Durumu	34
3.6	Diğer Araştırmalar	35
3.7	Son Gelişmeler	35
4.	PROTEİN-POLİELEKTROLİT KOMPLEKSLERİNİN KARAKTERİZASYON TEKNİKLERİ	36
4.1	Giriş	36
4.2	Mikroskopik Teknikler	36
4.2.1	Atomik Kuvvet Mikroskopi (AFM)	36
4.2.2	Elektron Mikroskopi (EM)	36
4.2.3	Optik Mikroskopi (OM)	37
4.3	Saçılma Teknikleri	38
4.3.1	Dinamik Işık Saçılması (DLS)	38
4.3.2	Statik Işık Saçılması (SLS)	38
4.3.3	Küçük Açılı X-Işını Saçılması (SAXS)	38
4.3.4	Elektroforetik Işık Saçılması (ELS)	39
4.3.5	Yayılma Dalga Spektroskopisi (DWS)	39
4.4	Spektroskopik Teknikler	39
4.4.1	UV-Görünür Spektrofotometre	39
4.4.2	Infrared Spektroskopisi (IR)	40
4.4.3	Floresan	40
4.4.4	Dairesel Dikroizm (CD)	40
4.5	Titrimetrik Teknikler	41
4.5.1	Potansiyometri (pH Titrasyonu)	41
4.5.2	Bulanıklık Ölçümü	41
4.6	Kalorimetrik Teknikler	41
4.6.1	Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC)	41
4.6.2	İzotermal Titrasyon Kalorimetrisi (ITC)	42
4.7	Ayırma Teknikleri	42
4.7.1	Moleküler Eleme Kromatografisi (SEC)	42
4.7.2	Afinite Kromatografisi	42
4.7.3	Frontal Analiz Sürekli Kapiler Elektrofez (FACCE)	42
4.7.4	Afinite Koelektroforez (ACE)	42

4.8	Reflektometrik Teknikler	43
4.8.1	Tarama Açısı Reflektometrisi (SAR)	43
4.8.2	X-Işını ve Nötron Reflektometri.....	43
4.9	Floresan Fotoğrafma Geri Kazanımı (FPR).....	43
4.10	Optik Dalga Tarayıcılı Işık Modu Spektroskopi (OWLS)	44
4.11	Kuvars Kristal Mikrobals Terazi (QCM).....	44
4.12	Yüzey Plasmon Rezonans (SPR).....	44
4.13	Reoloji	44
5.	UYGULAMALAR	46
5.1	Protein Taşınması ve Hapsedilmesi İçin İyonik Hidrojeller	46
5.1.1	Protein Salım Kontrolü	46
5.1.2	Sistem, Kullanımları ve Örnekleri.....	47
5.2	Enzim İmmobilizasyonu	47
5.2.1	Kolloid Katalizörler	47
5.2.2	Biyosensörler	48
5.3	Protein Ayrıştırması.....	49
5.4	Protein-Polielektrolit Koaservatlar Kullanarak Mikroenkapsulasyon.....	49
5.5	İmmunolojide Polielektrolit Kompleksleri	50
5.5.1	Polielektrolit Komplekslerinin İmmunojenliği.....	51
5.5.2	Polielektrolit Kompleksleri-Yapay Aşılar	66
5.5.2.1	Tüberküloz Enfeksiyonu Modelinde PEK'ler	68
5.5.2.2	Grip Enfeksiyonu Modelinde PEK'ler	71
5.5.2.3	Antiferil Etkili PEK'leri	73
5.6	Diğer Uygulamalar	74
6.	SONUÇ.....	76
	KAYNAKLAR.....	80
	ÖZGEÇMİŞ.....	86

SİMGE LİSTESİ

c	Konsantrasyon
ΔH	Entalpi değişimi
ΔS	Entropi değişimi
I_r	İmmun respons
MA	Molekül ağırlığı
n	protein molekülü sayısı
η_{spec}/c	spesifik vizkozite
P_η	polimerleşme derecesi
Z_p	Polielektrolit yükü
Z_{pr}	Protein yükü
Z_T	İntrapolimer kompleksinin net yükü
B	Kuaternleşme derecesi
ξ	Elektrofobik potansiyel
τ	Bulanıklık

KISALTMA LİSTESİ

AA	Akrilik asit
ACE	Afinite koelektroforez
AF	Freund adjuvanı
AFM	Atomik Kuvvet Mikrokopi
AGU	Anhidroglukoz birimi
AOH	Antikor oluşturuucu hücre
ATR-FTIR	Hafifletilmiş toplam yansıtma Fourier dönüşümlü infra red spektroskopisi
BLG	β -laktoglobulin
BSA	Bovin serum albumin
CD	Dairesel dikroizm
CP	Kopolimer
CP(AA-MVP)	Akrilik asit ve 2-metil 5-vinil-piridin kopolimeri
DADMAC	Diallildimetilamonyum klorür
DH	Dalak hücresi
DLS	Dinamik ışık saçılması
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Diferansiyel tarama kalorimetrisi
DWS	Yayılma dalga spektroskopisi
EK	Elektrostatik kompleks
ELS	Elektroforetik ışık saçılması
EM	Elektron mikroskopi
FACCE	Frontal analiz sürekli kapiler elektrofez
FITC	Floresan izotiyosiyanat
FPR	Floresan fotoağarma geri kazanımı
GAG	Siklosaminoglikan
GG	Gammaglobulin
HA	Hemaglutinin
HSA	İnsan serum albumin
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
IgG	İmmunoglobulin G
IgM	İmmunoglobulin M
IR	İnfrared
ITC	Izotermal titrasyon kalorimetri
KK	Kovalent konjugat
KE	Koyun eritrositleri
KPVS	Potasyum polivinilsülfonat
LSCM	Lazer tarayıcılı konfokal mikroskopi
MA	Maleik asit
MAA	Metakrilik asit
mEosFP	İmmobilize floresan protein
NA	Nevzaminidaza
OA	Ovalbümin
OM	Optik mikroskopi
OWLS	Optik dalga tarayıcılı ışık mod spektroskopisi
PAA	Poliakrilik asit
PAH	Poliallilamin hidroklorür
PCPP	Polidikarboksilatophenoksifosfazen
PDADMAC	Polidialildimetilamonyum klorür
PE	Polielektrolit

PEI	Polietilenimin
PEK	Polielektrolit kompleks
PGA	Poliglutamik asit
PLL	Poli L-lisin
PMMA	Polimetil metakrilat
PMK	Polimer-metal kompleksleri
PPD	Tüberkülozun protein antijeni
PS	Polisitiren
PSS	Polistirensülfonat
PVP	Polivinilpiridin
PVI	Polivinilimidazol
PT	Tod metoduyla elde edilen protein antijeni
QCM	Kuvartz kristal mikrobals terazi
RNA	Ribonükleik asit
SA	Serum albumin
SAR	Tarama açısı reflektometrisi
SAXS	Küçük açılı X-ışını saçılması
SEC	Boyut eleme kromatografisi
SLS	Statik ışık saçılması
SPR	Yüzey plazmon rezonans
TE	Triton ekstratı
TIRF	Toplam internal yansımali floresan mikroskopi
TNF	Tümör nekrozis faktör
TPT	Topotekan

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	a) Sodyum polistiren sülfonat ve b) polidiallildimetil-amonyum klorür, 9(poli-DADMAC)' un kimyasal yapısı	1
Şekil.1.2	Zayıf polielektrolitlerin dengedeki ayrışmaları a) poliakrilik asit ve b) polietilen imin.....	2
Şekil 1.3	Maleik asit- diallilamin kopolimerinin kimyasal yapısı	2
Şekil 1.4	İntegral ve pendant tipli PE a) Doğrusal polietilenimin-integral tipli b) polivinilamin- pendant tipli	5
Şekil 1.5	Farklı iyonik şiddetlerdeki Na-karboksimetilselüloz' un sulu çözeltisinde polimer konsantrasyonu c'nin η_{spec}/c bağımlılığı:	6
Şekil 1.6	Maleik asit ve N-metildiallilamin' in değişken kopolimerlerinin sulu çözeltilerinin $\eta_{\text{spec}} - \text{pH}$ grafiği.....	6
Şekil 1.7	Polianyon-polikasyon polituzlarının şematik oluşumu	7
Şekil 2.1	Ters emülsiyon polimerizasyonu	11
Şekil 2.2	Metakrilik ve akrilik asitten türevlendirilmiş polimerik kuaternize amonyum tuzları	12
Şekil 2.3	Zayıf asidik polielektrolitler (I) Poliakrilik asit; (II) Polimetakrilik asit; (III) Poliitakonik asit; (IV) Polikratonik asit; (V) Poli 3-akrilamido-3-metilbutanoik asit; (VI) Poli 3-metakrilamido-3-metilbutanoik asit	13
Şekil 2.4	Poliamfolitler (I) Akrilik asit ve dimetilaminoetil-metakrilat' tan tesadüfi olarak oluşan kopolimer; (II) Bir iyon çiftinden oluşan kopolimer; (III) Bir betain monomerinden oluşan polimerik sülfobetain.....	14
Şekil 2.5	N-karboksi- α -amino asit anhidritlerinin anyonik halka açılma polimerizasyonu ile sentezi	16
Şekil 2.6	Dihalidler ve tersiyer aminlerin poliadisyonu ile iyononların sentezi (I), aminoalkilhalidlerin reaksiyonu ile iyononların sentezi (II).....	18
Şekil 2.7	Poliakrilamidin modifikasyonu.....	19
Şekil 2.8	Polimerik karboksilik asitlerin hidroliz ile sentezi	20
Şekil 2.9	Poliamfolitlerin polimer modifikasyonu ile elde edilmesi.....	21
Şekil 2.10	DNA' nın kimyasal yapısı: (sol) DNA' nın tekli dizisinin şematik yapısı; (sağ) timin, sitozin, adenin ve guaninin kimyasal formülleri	23
Şekil 2.11	Poliipeptid oluşumu	24
Şekil 2.12	Karaginin yapısı	25
Şekil 2.13	Agar (E406)' nın yapısı	25
Şekil 2.14	Hyaluronik asit' in yapısı.....	26
Şekil 2.15	Heparin' in yapısı.....	27
Şekil 2.16	Lineer ksilanın kimyasal yapısı	28
Şekil 2.17	Amilopektinin ve amilozun şematik yapısı.....	29
Şekil 5.1	Poli-2-metil 5-vinil-piridin ve trinitrofenol kompleksi.....	51
Şekil 5.2	PE-BSA karışımı ile immunlaştırılmış farelerin dalak hücrelerindeki BSA-spesifik AOH' lerinin birbirlerine göre miktarları;.....	52
Şekil 5.3(a)	Saf BSA veya [BSA+PVP(R_2, R_{16})] ile immunlaşmış farelerin dalak hücrelerinde AOH' ların yığılma kinetiği.....	53
Şekil 5.3(b)	BSA-PE kompleksi ile immunlaşmış farelerin dalak hücrelerinde BSA-spesifik AOH' ların yığılma kinetiği.....	53
Şekil 5.3(c)	BSA(1) ve PVP (R_2, R_{16})-BSA(2) ile immunlaşmış tavşanların kan serumunda toplanmış AOH' lerin kinetiği.	54

Şekil 5.4	BSA+PVP (R ₂ , R ₁₆) ile immunlaşmış farelerin dalak hücrelerindeki AOH'ların spesifikliğin analizi	54
Şekil 5.5	Saf BGG (1) ve bunun CP-3 (2), CP-2 (3), CP-1 (4)'lerle karışımları ile immunlaştırıldığında oluşan immün cevabı (AOH)	55
Şekil 5.6	Proteinlerin CP(III), PMP-I (I) ve PMP-2 (II) ile komplekslerinin yapısının şematik gösterimi.	55
Şekil 5.7	BSA'nın çeşitli polimerleşme derecelerinde PVP (R ₂ -R ₁₆) polikasyonu ile kompleksinin yapısı	56
Şekil 5.8a	Polikompleks oluşum reaksiyonları	58
Şekil 5.8b	Kovalent PAA-BSA konjugatının yapısının PAA'nın polimerleşme derecesine bağlı olarak şematik gösterimi	58
Şekil 5.9	Kovalent PAA-BSA konjugatı ile immunlaşmış farelerin kanındaki antikör titrelerinin (-log ₂ 7) (konsantrasyon) polimer zincirinin uzunluğuna (n) bağlılığı:	59
Şekil 5.10 a	Suda çözünen üçlü PAA-(BSA-TNF) kompleksi yapısının şematik gösterimi	59
Şekil 5.10 b	TNF-BSA(1), (TNF-BSA)-AF(2), (TNF-BSA)-PAA(3), konjugatları farelere verildikten sonra TNF gruplarına göre oluşan AOH' lerin miktarının TNF gruplarının miktarına bağlılığı. (AF-Freund adjuvanı: yağ karışımları).....	60
Şekil 5.11	Elektrostatik kompleksin (EK;a) ve kovalent konjugatın (KK;b) heparinle karşılıklı etkisinin şematik gösterimi	61
Şekil 5.12	Bireysel PEK-1 (a) ve PEK-2 (b) ve karışım (PEK-1+PEK-2) (c) komplekslerinin hipotetik yapısının şematik gösterimi	64
Şekil 5.13a	BSA (1), BGG (1'), bireysel kompleksler PEK1 (2), PEK2 (2') ve bunların mekanik karışımı ile (PEK1 + PEK2) immunlaşmış farelerin dalağındak AOH hücrelerinin değerleri	65
Şekil 5.13b	(BSA + BGG (1,1'), (PEK1-PEK2) (II,II') ve (PEK1 + PEK2) (III,III') ile immunlaşmış farelerdeki AOH.	65
Şekil 5.14	Mycobacteria hücrelerinin yüzeyinden alınmış proteinlerin (Triton ekstratı) ve PAA komplekslerinin hipotetik şeması	69
Şekil 5.15	β OLH hormonu üçlü polimer metalik kompleksleri ile immunlaştırıldıktan sonra oluşan immün cevabı.....	74

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1	Polielektrolitlerin seçimli sınıflandırılması.....	3
Çizelge 1.2	Polielektrolitin iyonik bölgelerinin yapısı	4
Çizelge 2.1	Tipik iyonik vinil monomerleri.....	10
Çizelge 5.1	Serbest SA-GG ve bunların Poli-N-vinilimidazolle polimer metal komplekslerinin enjeksiyonundan elde edilen antikor oluşturan hücrelerin (AOH) miktarı.....	56
Çizelge 5.2	Serbest SA ile SA' nın yan hidrofob setil radikalleri ile yüklenmiş poli-4-vinil piridin kompleksinin enjeksiyonundan elde edilen AOH' lerin miktarı.....	57
Çizelge 5.3	Immunojen çözeltilerle bağışıklanmış farelerin heparinin vücuda verilme zamanına bağlı olarak dalakta tayin edilen AOH' lerin göreceli miktarı	62
Çizelge 5.4	Dalak hücrelerinin-DH ovalbününün (OA) çeşitli PE ile kompleksinin karışımında floresan DH' nin miktarı	63
Çizelge 5.5	OA' nın ve OA-PE kompleksinin dalak hücrelerinde adsorpsiyonu	63
Çizelge 5.6	Serbest BGG, tüberkülozun protein türevi (PPD) ve bunların PVP (R ₂ , R ₁₆) kompleksleriyle immünize edilmiş farelerin dalağındaki antikor oluşturan hücrelerin (AOH) miktarı.	66
Çizelge 5.7	Ovalbumine (OA) karşı olan Ig-E'nin titresi (miktarı).....	67
Çizelge 5.8	Normal ve timusu olmayan farelere SA, GG ve bunların kuaternleşmiş poli (4-vinil-piridin) ile kompleksleri verildiğinde oluşan immunolojik aktiflik. ...	67
Çizelge 5.9	Farelerde serum albumine karşı olan ikinci immun cevabı	68
Çizelge 5.10	TPT proteini ve bunun kuaternleşmiş poli 4-vinil pirdin ile kompleksi ile immünize edilmiş farelerde TPT spesifik antikor oluşturan hücrelerin miktarı.....	69
Çizelge 5.11	TPT proteini ve bunun PAA ile konjigatı ile bağışıklanmış farelerin tabanındaki tüberküline göre reaksiyon	70
Çizelge 5.12	Farelerin Tüberküloz antijeni ve bunların PAA türevleriyle aşılmasından sonra ortalama yaşama süresi.....	70
Çizelge 5.13	BCG protein fraksiyonunun üçlü polimer metal kompleksinin koruyucu aktifliği.....	71
Çizelge 5.14	Grip virüsünün yüzey antijenlerinin karışımının üçlü polimer-metal komplekslerinin immunojenliği	72
Çizelge 5.15	Yüzey antijenler karışımı ve üçlü polimer metal kompleksleri ile immünize edilmiş farelerin ciğerindeki Pr ₉₄ patojen virüsünün üreme sıklığı.	72

ÖNSÖZ

Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimimden bugüne kadar bilgi birikimi ve tecrübesiyle tez çalışmamda her türlü yardımı sağlayan ve önerileriyle beni yönlendiren merhum hocam, Biyomühendislik A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Mustafa AKDESTE'ye;

Tüm üzüntüsüne rağmen beni sınavımda yalnız bırakmayan ve hocamın eksikliğini hissettirmeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE' ye;

Araştırmalarım sırasında bana fikirleri ile yardımcı olan Yrd. Doç. Dr Sevil DİNÇER'e; Yrd. Doç. Dr. Sevil YÜCEL'e; çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen ve motivasyonumu hep üst seviyede tutan tüm iş ve okul arkadaşlarıma;

Master programım sırasında göstermiş oldukları anlayış, hoşgörü ve destekleri için çalıştığım firmam Bilim İlaç San. ve Tic. A.Ş' ye;

Eğitim ve öğretimimde hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme ve değerli arkadaşlarıma;

Ve her an yanımda olduğu için sevgili eşime,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Günümüzde polielektrolit ve protein kompleksleri pek çok alanda kullanılmaktadır. Özellikle bu bileşikler, biyolojik açıdan önemli mekanizmaların oluşturulmasında ve biyomedikal uygulamalarda, kullanım potansiyeline sahiptirler. Proteinlerin işlevsel özellikleri, polimerler ile komplekleştirme yoluyla arttırılabilmektedir. En önemli veriler, komplekslerin immunolojide kullanımıyla elde edilmiştir. İmmunojenliği arttırılmış proteinler ve virüsler güçlü aşı sistemlerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Yapay antijen kullanıldığında, immun cevabı almak için adjuvan kullanılması gerekmez. Timusu olan veya olmayan hayvanlarda antikör oluşumunun uyarılması sağlanır.

Bu çalışmada, öncelikle polielektrolit kavramına açıklık getirilmiştir. Polielektrolitlerin yapıları, sınıflandırılmaları hakkında bilgiler verilmiş, serbest radikal polimerizasyonu, iyonik polimerizasyon, basamaklı polimerizasyon ve kimyasal modifikasyon ile sentez yöntemleri anlatılmıştır. Doğal veya sentetik sınıflı polielektrolitlerin, proteinler ile komplekslerinin oluşumları, yapı-özellik ilişkileri, etkileşimleri ve uygulamaları hakkında incelemeler yapılmıştır. Oluşan komplekslerin AFM, EM, OM, DLS, ELS, IR, potansiyometri, DSC, SEC, ACE vb. gibi karakterizasyon teknikleri detaylı olarak açıklanmış, literatürdeki uygulamaları hakkında bilgiler sunulmuştur.

Bu çalışmada ayrıca komplekslerin immunolojide kullanımı ile ilgili yapılmış deneysel çalışmalardan bahsedilmiştir. BSA' nın PVP, PAA ve PSSNa gibi polielektrolitlerle karışımının sulu çözeltilerinin immunolojik olarak incelenmesinden elde edilen sonuçlar verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, karışımların immunojenliği polielektrolitlerin yapısına ve oluşan komplekslerin kararlılığına bağlıdır.

Ayrıca, yapay antijenlerden yapay aşılara geçme yolları aranarak, tüberküloz ve grip gibi infeksiyonlarda, PEK nin immunolojik etkileri incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Polielektrolit, polimerizasyon, Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elektron mikroskobu (EM), BSA, SEC, immunoloji, antijen

ABSTRACT

Nowadays polyelectrolyte and protein complexes are used in many areas. These complexes have a high potential of usage in terms of composing biologically important mechanisms and biomedical applications. Functional properties of proteins can be improved by creating complexes by polymers. The most important results have been obtained by usage of the complexes in immunology. Immunological improved proteins and viruses have provided to develop strong vaccine systems. When artificial antigen is used, it is not needed to use adjuvant to get an immune response. Stimulation of antibody formation is provided in animals with timus or without timus.

In this study polyelectrolyte concept is firstly was clarified. Information about of structures and classification of polyelectrolytes was given. Synthesis methods with free-radical polymerization, ionic polymerization, stepwise polymerization and chemical modification were explained. Examinations about developments of natural and syntetical classified polyelectrolytes, formation of proteins and complexes, their structure – property relations, interactions and applications were made. Characterization technics of the formed complexes like AFM, EM, OM, DLS, ELS, IR, potantiometry, DSC, SEC, ACE, etc. were explained in detail and informations about their applications on literature were represented.

Moreover on this work, experimental studies about the usage of complexes in immunology were given. The results of examinations on aqueous solutions of BSA mixtures with polyelectrolyte like PVP, PAA and PSSNa were given. According to these results immugenity of mixtures depends on the strustures of polyelectrolyte's and stability of the established complexes.

Furthermore, immunological effects of polyelectrolyte complexes are examined on infections like tuberculosis and influenza by searching the ways to pass from artificial antigens to artificial vaccinees.

Key words: Polyelectrolyte, polymerization, atomic force microscopy (AFM), electron microscopy (EM), BSA, SEC, immunology, AFM, EM, BSA, SEC, immunoloji, antigen.

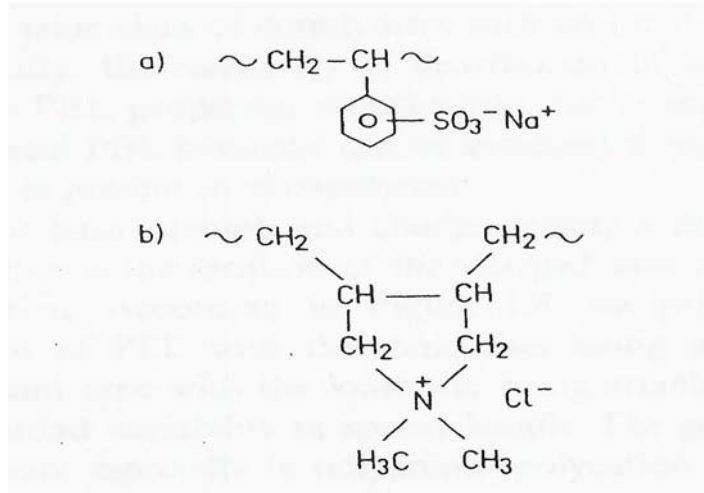
1. POLİELEKTROLİT TANIMI ve GENEL AÇIKLAMA

1.1 Genel Giriş

“Polielektrolit” terimi “makroiyon” (kovalent olarak bağlı anyonik veya katyonik grupları taşıyan makromolekül) ve elektronötralliyeti sağlayan düşük-moleküler “zıt yüklü iyon” lardan oluşan polimer sistemleri için kullanılmaktadır. Anyonik ve katyonik polielektrolit (PE) örnekleri Şekil 1.1’de gösterilmiştir (Dautzenberg vd.,1994).

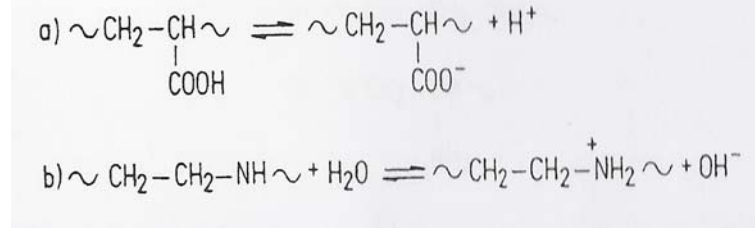
Na-polistiren sülfonat ve polidiallildimetilamonyum klorür, 0-14 pH aralığındaki sulu çözeltilerde makroiyon ve zıt yüklü iyonla dönüşmektedir. Aynı zamanda poliakrilik asit veya polietilenimin gibi polimerler, kısıtlı bir pH aralığında poliiyon-zıt yüklü iyon sistemi oluşturmalarına karşın, genellikle polielektrolit olarak sınıflandırılırlar ve asidik ortamda ayrılmamış poliasit olarak veya bazik ortamda ayrılmamış polibaz olarak kalırlar (Şekil 1.2); bu, zayıf polielektrolitler için tipik bir davranıştır ve zayıf moleküler elektrolitlerde de oldukça benzer davranışlar görülür (Dautzenberg vd.,1994).

Diğer yandan, seyreltik sulu sistemlerde polimerlerin OH grupları, 0-14 pH aralığında iyonize olmadığı için son derece alkali koşullarda ($\text{pH} > 14$) kısmen selülosat anyonlarına ve zıt yüklü katyonlarına ayrışma yeteneğinde olan selüloz gibi bir polimer polielektrolit olarak sınıflandırılmaz (Dautzenberg vd.,1994).

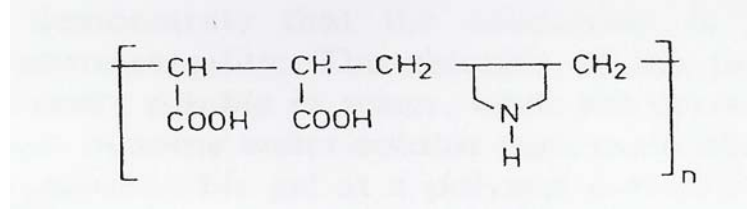


Şekil 1.1 a) Sodyum polistiren sülfonat ve b) polidiallildimetil-amonyum klorür, 9(poli-DADMAC)’ un kimyasal yapısı

Polielektrolitler için özel bir durum olan, makromoleküle kovalent olarak bağlı hem anyonik hem de katyonik grupları taşıyan “poliamfolitler” doğada bol miktarda bulunan proteinlerle temsil edilirler ama aynı zamanda çeşitli sentetik yollarla da elde edilebilirler. Bu moleküllere bir örnek Şekil 1.3’te gösterilmiştir. Tipik bir poliamfolit olarak bu kopolimer asidik ortamda katyonik ve bazik ortamda anyonik özellik kazanırken, “izoelektrik nokta” denilen noktada (örnekte yaklaşık pH 4) makromolekülde serbest net yük bulunmaz.



Şekil.1.2 Zayıf polielektrolitlerin dengesdeki ayrışmaları a) poliakrilik asit ve b) polietilen imin



Şekil 1.3 Maleik asit- diallilamin kopolimerinin kimyasal yapısı

Prensip olarak, uygun sayıdaki iyonik grup, polimer ana zincirine kovalent olarak bağlanarak makromoleküler kimyasal yapıları polielektrolit yapıya dönüştürülebilir; bunlar da yeterli miktarda iyonik grup sokulduktan sonra uygun pH’a sahip sulu ortamlarda çözünür bileşimlerde lineer veya dallanmış makromoleküllere dönüşürler ancak çapraz bağlı polimer durumunda sulu ortamlardaki şişme özelliği PE’e dönüşümle artırılır. Çizelge 1.1’de çok geniş sayıdaki polielektrolit sınıfı listelenmiştir. Günümüzün ticari polielektrolitleri ağırlıklı olarak polimerizasyon, polikondenzasyon veya poliadisyon işlemleriyle elde edilmektedir. Anyonik polisakkarid grubuna ait pektin veya proteinlerin yaygın temsilcisi olarak jelatin gibi sayısız PE’de aynı zamanda doğadan çıkmaktadır.

Çizelge 1.1 Polielektrolitlerin seçimli sınıflandırılması

Anyonik ve katyonik polisakkaridler ve polisakkarid türevler;

Nükleik asitler

Jelatin

Lignosülfonik asit

Poliakrilik ve polimetakrilik asit ve kopolimerleri

Maleik asit anhidrit kopolimerleri

Polistiren sülfonik asit

Polietilen imin

Poliaminler veya poliamidler

İyonlar

Polidiallildimetilamonyum klorür

Katyonik akrilik asit esterlerinin homo-ve kopolimerleri

Bundan başka pratik önemi olan bazı PE' ler, selüloz veya nişasta gibi noniyonik doğal polimerlerin kimyasal değişimiyle oluşmaktadır.

Polimer zincir yapısının çeşitliliğine karşılık, çözelti içindeki PE'in kendine özgü davranışından sorumlu katyonik veya anyonik bölgelerin değişik kimyasal yapılarının sayısı oldukça azdır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2 Polielektrolitin iyonik bölgelerinin yapısı

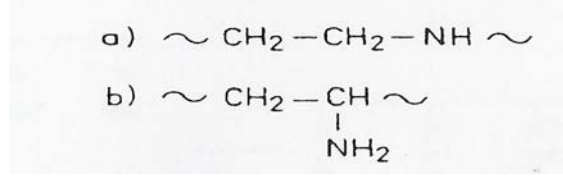
-COO ⁻	-NH ₃ ⁺
-CSS ⁻	=NH ₂ ⁺
-A.SO ₃ ⁻	≡NH ⁺
-SO ₃ ⁻	-NR ₃ ⁺
-PPO ₃ ⁻²	

Bu iyonik gruplar genellikle anyonik ve katyonik olarak sınıflandırılır; bunlar zayıf ve güçlü asit- baz gruplarıdır. Sülfonat, sülfanat yarı-ester ve tetraalkilamonyum grupları “güçlü PE” denilen grubun temsilcileridir.

İyonik bölgenin asit ve baz gücünün yanında, polimer zinciri boyunca komşu anyonik ve katyonik yükler arasındaki ortalama uzaklık, PE davranışını (özellikle çözünme durumunda) belirlemede sonuca götüren bir parametredir.

Bu yük taşıma yoğunluğu veya yük yoğunluğu, zincir bağ geometrisi dikkate alınarak, iyonik bölgeler arasındaki ortalama uzaklık olarak veya kopolimerler durumunda monomer birim başına ortalama iyonik bölge sayısı olarak tanımlanır; Ortalama yük yoğunluğu yanında zincir boyunca iyonik bölgelerin dağılım düzeni de PE özelliklerini önemli derecede etkileyebilir (örn. çözünürlüğe göre). Bir kopolimer içinde 10 monomerik birimde birden fazla iyonik bölge bulunursa tipik PE davranışı beklenebilir.

Asit veya baz gücünün ve yük yoğunluğunun yanında, PE özelliğini belirlemede üçüncü önemli nokta yüklü bölgelerin makroiyonun moleküler geometrisi içindeki yerleridir. Şekil 1.4’e göre iyonik bölgelerin polimer zincirinin bir parçası olduğu integral tipli PE ile yan zincir olarak ana zincirine eklenen iyonik bölgeci pendant tipi ara uzunluğundaki geniş çeşitlilikle ayırt etmekteyiz. Yüklü bölgelerin geometrik pozisyonu özellikle polianyon-polikasyon kompleks oluşumuyla ilişkilidir.

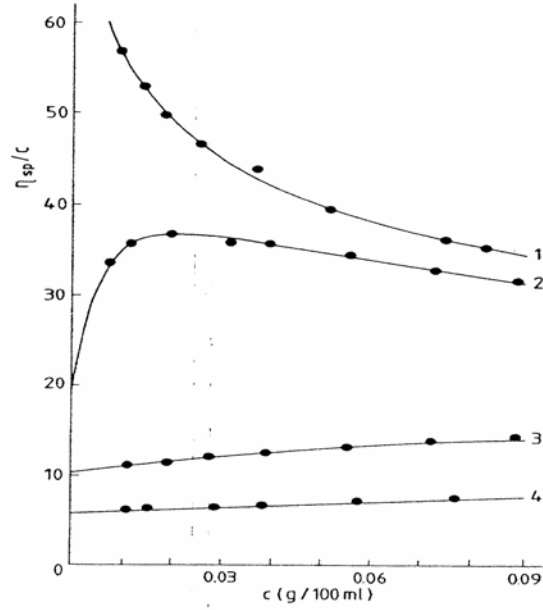


Şekil 1.4 İntegral ve pendant tipli PE a) Doğrusal polietilenimin-integral tipli
b) polivinilamin- pendant tipli

Makroiyonları tanımlayan bu üç parametrenin yanında, düşük moleküler türlerin, çözelti içindeki tüm sistemin özellikleri (özellikle çözünürlük ve yapı oluşumu) üzerinde önemli bir etkisi vardır. Bu, iki örnekle açıklanabilir ve zıt yüklü iyonların sadece elektronötralliteyi koruyan rastgele partiküller olmadığı gösterilebilir. Polidialildimetilamonyum polikasyonun klorürü suda kolayca çözünürken buna karşılık iyodür oldukça az çözünür. Suda çözünür yüksek moleküler selüloz sülfatın K^+ tuzu %1 ve %2 arası polimer konsantrasyonunda katı, kesilebilir ısıltersinir jel oluştururken aynı konsantrasyondaki aynı numunenin Na^+ tuzu beklenen viskozitede tümüyle normal polimer çözeltisi oluşturur.

1.2 Çözeltide Polielektrolitlerin Bazı Özellikleri

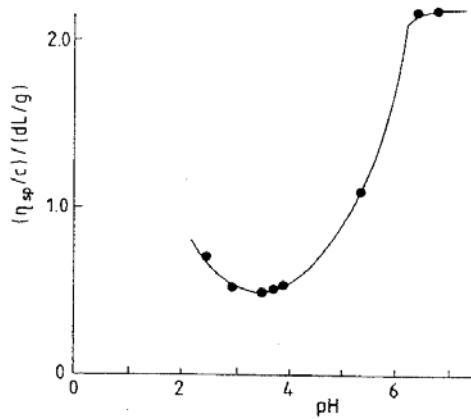
PE çözeltilerinin özellikleri, viskozite gibi, sulu ortamın iyonik gücüne bağlıdır. İyonik gücün artışıyla birlikte viskozite yönünde oluşan değişikliğin nedeni temel olarak makroiyondaki elektrik yüklerinin elektrostatik olarak korunmasıdır; Şekil 1.5'te Na-karboksimetil selüloz' un polimer konsantrasyonu c 'nin η_{spec}/c bağımlılığında gösterildiği gibi iyonik güç daha çok “normal” yüksüz makromolekül davranışına yaklaşmaktadır.



Şekil 1.5 Farklı iyonik şiddetlerdeki Na-karboksimetilselüloz' un sulu çözeltilerinde polimer konsantrasyonu c 'nin η_{sp}/c bağımlılığı:

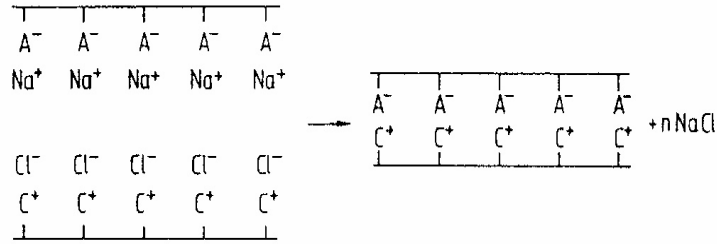
(1) eklenen NaCl, (2) 2.5×10^{-4} mol NaCl/litre, (3) 5×10^{-3} mol NaCl/litre ve (4) 5×10^{-2} mol NaCl/litre

Verilen iyonik bir grubun ayrışma derecesini ve söz konusu PE'in gerçek yük yoğunluğunu, pH belirlediği için iyonik gücün yanında, ortamın pH'ı da çözelti içindeki zayıf polielektrolitin özelliklerini önemli ölçüde etkiler. Bu etki, zayıf asit ve zayıf baz grubu içeren poliamfolitin $\eta_{sp} - pH$ grafiğiyle gösterilmektedir; izoelektrik noktanın pH değerinde, grafik minimum viskoziteye işaret etmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 Maleik asit ve N-metildiallilamin' in değişken kopolimerlerinin sulu çözeltilerinin $\eta_{sp} - pH$ grafiği

Yüklü makromoleküller ve zıt yüklü makroiyonlar, yüzey aktif maddeler veya kolloid partiküller arasında oluşan PE komplekslerine, birçok PE uygulaması içinde bilimsel anlamda ilgi duyulmakta ve pratik anlamda önem verilmektedir. Şekil 1.7’de verilen şemaya uygun olarak stokiyometrik polituzların hazırlanması deneysel PE araştırmalarında bir kilometre taşı kabul edilebilir. Değişik anyonik yüklü kolloid türlerin çok büyük miktarının topaklanma ve çökme yeteneği bugünün atık su işleminde vazgeçilemezdir ve büyük miktarda suda çözünür katyonik PE üretimi teşvik edilmektedir. Ancak, makroiyonların zıt yüklü türlerle etkileşimleri, çoğunlukla elektrostatik etkileşimler ile olur.



Şekil 1.7 Polianyon-polikasyon polituzlarının şematik oluşumu

Çözelti içindeki PE’in özellikleriyle ilişkili olarak belirtilmesi gereken üçüncü nokta oldukça yüksek iyonik iletkenlikleridir; iyonik iletkenlik makroiyonların ve aynı zamanda yüklü polimer kolloidlerin elektrikli bir alanda düşük moleküler iyonik türlerin hızından tabii ki daha düşük bir hızda göçüyle sonuçlanır. İyonik iletkenlik aynı zamanda, sistemdeki su miktarına son derece bağlı olan, PE jellerinde ve su emmiş katı durumdaki PE de de görülür. PE-su sistemlerinin bu elektrokimyasal özellikleri kısaca yaygın PE karakterizasyon tekniklerinin yanında önemli uygulama alanlarının temelini de oluşturmaktadır.

2. POLİELEKTROLİTLERİN SENTEZİ

2.1 Giriş

Bu bölümde polielektrolit hazırlama ve ortaya çıkan polimerlerin kimyasal yapısı üzerinde durulmaktadır.

İlk olarak, çok iyi bilinen polimer kimyası metotlarıyla yürütülebilen sentetik polielektrolitlerin sentezi açıklanacaktır: homojen ve heterojen fazda serbest-radikal polimerizasyonu, iyonik polimerizasyon, polikondenzasyon, poliadisyon ve polimer modifikasyonu. Bölümün ikinci kısmında doğal polimerler temel alınarak izolasyon, hazırlama ve polielektrolit yapıları tartışılacaktır. Burada, önceden oluşturulmuş polielektrolitlerin olağan ayırma tekniğiyle doğal ürünlerden izolasyonu, izole edilmiş noniyonik biyopolimerin kimyasal modifikasyonu ve bu iki metodun kombinasyonu göz önüne alınmıştır. İlk durumda, sentetik yollar çok çeşitlilikte kimyasal yapı ve özelliklere sahip çok sayıda polimer ortaya çıkarmaktadır. Bunun nedeni kısıtlı sayıdaki katyonik veya anyonik grupların bilinen herhangi bir polimer ana zincirine pratik olarak eklenebilmesi gerçeğidir. Buna ek olarak, farklı miktarlarda iyonik ve noniyonik monomerik birim içeren kopolimerlerin senteziyle kimyasal yapı değiştirilebilir. Bu, kopolimerlerde katı yüzeyler üzerinde ve çözelti içindeki moleküllerle etkileşim olasılıkları ve çok değişik çözelti özellikleri belirten hidrofilik ve hidrofobik komonomerleri kapsamaktadır.

Doğal polimerlerden polielektrolit hazırlanmasında başlangıç biyopolimer sınıfı çok önemlidir ve kısıtlı sayıdaki deneysel teknikleri belirlemektedir. Bu nedenle, bölümün ikinci kısmı içerilen polimerlerin dahil oldukları sınıflara uygun olarak yapılandırılmıştır.

Oluşan polielektrolitler temel olarak elektrokimyasal düşüncelerle sınıflandırılmıştır: yük yoğunluğu ve dağılımı, yüklerin makromoleküldeki yerleşimleri, poliamfolitlerde katyonik yüklerin anyoniklerle ilişkisi dahil olmak üzere yük tipi. Tıpkı diğer polimerler gibi, polielektrolitlerin özellikleri de makromoleküllerin mimarisıyla belirlenmektedir, örn. Lineer veya dallanmış yapı.

Polielektrolitlerin büyük çoğunluğu moleküllerin istatistiksel dağılımı, elektrokimyasal, kimyasal ve moleküler-geometrik parametrelerle tanımlanır.

2.2 Sentetik Polielektrolitler

Sentetik polielektrolitler zincir büyümesi yanında adım büyümesi mekanizmalarıyla ve önceden oluşmuş polimerlerin modifikasyonlarıyla hazırlanabilir. Birincisi daha çok ticari olarak önemli olan polimerlerin üretiminde kullanılır ve böylece serbest radikal başlangıcıyla fonksiyonlaştırılmış alkenleri ve iyonik mekanizmalarla gergin halka sistemi içeren monomerleri polimerleştirir. Zincir büyüme polimerleşme teknikleri ile homopolimerlerin yanında, rastgele, değişken, blok veya graft kopolimerler sentezlenir.

Bu polielektrolitlerin kimyasal yapı ve moleküler mimarisi monomerin özellikleri ile ve polimerleştirme metodlarıyla kontrol edilebilir; Polimerizasyonda, başlatıcı tipi ve reaksiyon koşulları en önemli değişkenlerdir.

Basamak-büyüme yoğunlaşma reaksiyonları esas olarak polipeptid veya polinükleotidlerin sentezinde kullanılmaktadır; bunlar Bölüm 2.3'te tartışılacaktır.

2.2.1 Serbest-Radikal Polimerizasyonu ile Sentez

2.2.1.1 Prensipler ve Proses

Yüklü vinil monomerlerin serbest-radikal homo- ve kopolimerleştirilmeleri homojen çözeltiler yanında heterojen sistemlerde de yürütülebilir. Çizelge 2.1 bu amaçla kullanılan bazı tipik monomerleri özetlemektedir. Sulu sistemlerde polielektrolitlerin sentezi için tercih edilen çözelti polimerleştirilmesi üç adımdan oluşan olağan radikal zincir polimerleştirme mekanizmasını takip eder: başlangıç, yayılma ve son. Reaksiyon serbest radikallerin, elektrik olarak nötr veya yüklü türlerin paylaşılmamış elektronla etkileşimleriyle başlar.

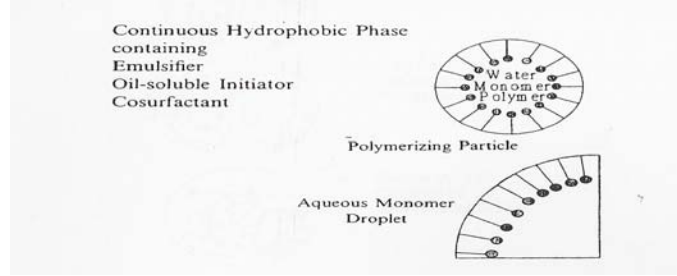
Sulu ortamlarda çözelti polimerleşmesi, organik çözeltilere göre daha yüksek moleküler kütleye sahip polimerler meydana getirir. Bunun nedeni, suya zincir transferinin çok düşük olması ve yayılan polimer radikali etrafında güçlü bir şekilde bağlı olan hidrasyon kabuğudur; hidrasyon kabuğu radikal merkezi korur ve sonlanmayı engeller (Hamilton ve Tighe, 1989). Ancak, elde edilen yüksek dereceli dönüşüm sonunda, nihai polimer çözeltisindeki çözelti polimerleşmesi yüksek viskozite nedeniyle bir dereceye kadar düşük monomer konsantrasyonlarıyla sınırlıdır. Bu zorluklar, sürekli kuşak üzerinde radyasyon-uyarılı başlangıçla oldukça yüksek konsantre monomer çözeltisinin polimerleşmesiyle üstesinden gelinebilir. Reaksiyon sonunda elde edilen yüksek miktardaki katı içerik polimerin son kurutma işlemine yardımcı olur.

Çizelge 2.1 Tipik iyonik vinil monomerleri

Katyonik (tert-aminler ve kuaterner amonyum tuzları)	
Diallildimetilamonyum klorür	$(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{Cl}^-$
Dimetilaminoetil akrilat	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COO}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Dimetilaminoetil metakrilat	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{COO}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Dimetilaminopropilmetakrilamid	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Dimetilaminometilakrilamid	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Akriloksietiltrimetilamonyum klorür	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COO}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$
Metakriloksietiltrimetilamonyum klorür	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{COO}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$
Metakrilamidopropiltrimetilamonyum klorür	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$
3-Metakriloksi(2-hidroksi)propiltrimetilamonyum klorür	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{COO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$
(3-Akrilamido-3-metil) baytiltrimetilamonyum klorür	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$
Anyonik (asitler ve onların tuzları)	
Akrilik asit	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$
Metakrilik asit	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{COOH}$
İtakonik asit	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{COOH}$
Kratonik asit	$\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$
Sitirensülfonik asit	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_3\text{H}$
Etilensülfonik asit	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{SO}_3\text{H}$
2-Metakriloksietilsülfonik asit	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{COO}-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_3\text{H}$
3-Metakriloksi-2-hidroksi propilsülfonik asit	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$
2-Akrilamido-2-metilpropilsülfonik asit	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$

Heterojen sistemlerde iyonik vinil monomerlerin polimerleşmesi hem bilimsel hem de ticari anlamda ilgi çekicidir. Bu reaksiyonlar organik sürekli fazda ters emülsiyon veya mikroemülsiyonla veya su ve organik çözücüler kullanılarak çökme işlemi olarak yürütülebilir.

Bugünün ticari polielektrolitleri büyük çapta ters emülsiyon işlemiyle elde edilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Ters emülsiyon polimerizasyonu

Burada, sulu monomer çözeltisi parafin veya ksilen gibi polar olmayan organik çözücü içinde esas olarak sorbitan monoolat gibi düşük hidrofilik-liyofilik dengeli iyonik olmayan yüzey aktif madde kullanılarak dağıtılır.

Ters emülsiyon polimerleşme kinetik işlemi, genellikle geleneksel emülsiyon polimerleşmesini veya bunun bazı kısımlarını kullanır ama geleneksel emülsiyon polimerleşme mekanizması bir dereceye kadar daha az anlaşılmıştır. Nedenlerinden biri, ters kafesin daha az stabil olması ve çok geniş bir partikül boyut dağılımına sahip olmasıdır ve kinetik çalışmalarda çok yararlı olan monodispers tohum kafeslerinin kolloid-kimyasal nedenlerle geleneksel kafesler için geniş çapta bulunamamasıdır.

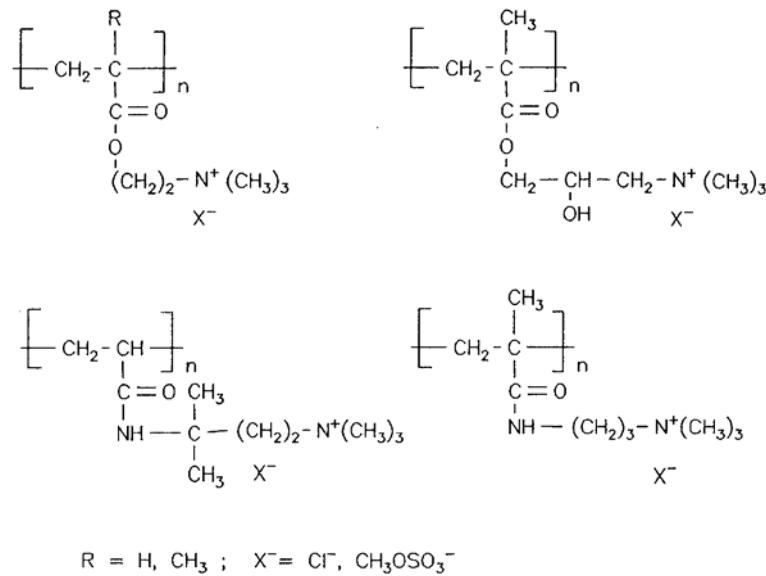
Çözelti polimerleştirmeyele karşılaştırıldığı zaman ters emülsiyon işleminin bazı önemli avantajları vardır:

1. Damlacıklardaki yüksek monomer konsantrasyonu nedeniyle yüksek moleküler kütleli polimer üretimi
2. Reaktördeki mükemmel ısı transferi ve dağılımın göreceli olarak düşük viskozitesi nedeniyle son reaksiyon ürünündeki yüksek polimer miktarı (%25 – 40 ağırlık)
3. Ters kafeslerin kolay işlenmesi
4. Uygulamadan önce fazla miktardaki su içinde invert edilerek seyreltik sulu polimer çözeltisinin direkt olarak hazırlanması

2.2.1.2 Katyonik Polielektrolitlerin Serbest-Radikal Polimerizasyonu ile Sentezi

Poliamin ve polimerik kuaterner amonyum tuzları, sentetik katyonik polielektrolitlerdir ama polimerik sulfonyum ve fosfonyum bileşikleri de bilinmektedir. Ticari polimerler, yüksek konsantrasyonlarda ve yüksek dönüşüm oranında hazırlanırlar. Ayırma işlemlerindeki işlem yardımları gibi katyonik polielektrolit alanındaki temel uygulama alanları, yüksek molekül ağırlığına sahip polimerleri gerektirir (örn. 10^6 g/mol). Monomerler dikkatli bir şekilde saflaştırıldığında yüksek molekül ağırlıklarına erişilebilir. Düşük ısı polimerleşmesinde inhibitörler, zincir transferi ve çapraz bağ ajanlarından kesin olarak sakınılır. Sonuncusu bu derecelerde etkili olan başlatıcılara ihtiyaç duyar, katyonik azo bileşikleri veya redoks sistemleri gibi. Yüksek moleküler ağırlığına sahip bileşiklerin oluşumunu destekleyen özel kinetikler ve polimerleştirme ısısının etkin dağılımı nedeniyle tercih edilen teknik, ters fazlarda polimerleştirmedir.

Katyonik esterlerden ve metakrilik asit ile akrilik asidin aminlerinden türevlendirilmiş katyonik polielektrolitler çok önemlidir. Her iki asidin de 150 den fazla alkilaminoalkil türevi bilinmektedir (Luskin, 1974) ve bunlardan bazıları Çizelge 2.1' de verilmiştir. Homopolimerler olarak sadece kuaternize türevleri Şekil 2.2' de verilmiştir.

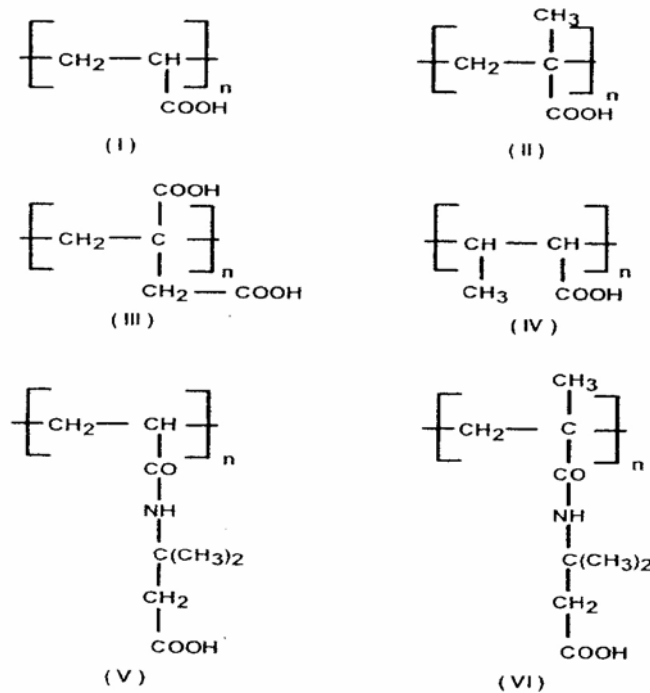


Şekil 2.2 Metakrilik ve akrilik asitten türevlendirilmiş polimerik kuaternize amonyum tuzları

Sulu çözeltide akrilik ve metakrilik asidin tersiyer amino esterlerinin ve tersiyer amino amidlerinin polimerleştirilmesi işlemi, aminleri protonlandırılarak çözünürlüğü sağlamak ve aminlere zincir aktarımını engellemek için, temel olarak düşük pH değerlerinde devam eder.

2.2.1.3 Anyonik Polielektrolitlerin Serbest-Radikal Polimerizasyonu ile Sentezi

Anyonik polielektrolitler, yüklü bölgenin kimyasal yapısına bağlı olarak zayıf asidik polikarboksilik asit ve kuvvetli asidik polisulfonik asit olarak ayrılabilirler. Akrilik asit (AA) ve metakrilik asidin (MAA) lineer polimerleri (Şekil. 2.3) diğer vinil monomerleri için kullanılan genel serbest radikal başlangıç sistemiyle birleştirilebilir; bu da esas olarak ataktik polimerlere yol açar. Poliasitlerin hazırlanması ve özellikleri ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma mevcuttur (Nuyken ve Latterman, 1992).

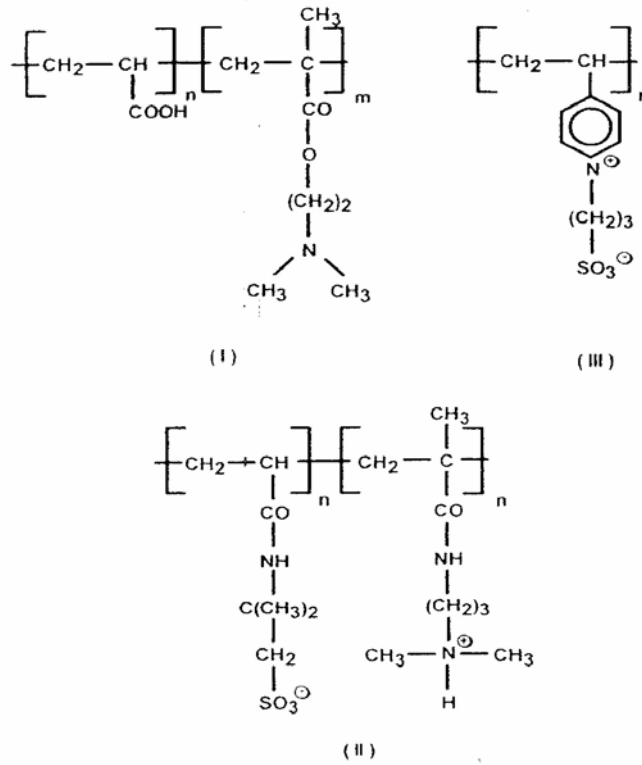


Şekil 2.3 Zayıf asidik polielektrolitler (I) Poliakrilik asit; (II) Polimetakrilik asit; (III) Poliitakonik asit; (IV) Polikratonik asit; (V) Poli 3-akrilamido-3-metilbutanoik asit; (VI) Poli 3-metakrilamido-3-metilbutanoik asit

Polimerleştirme, asitlerle veya onların tuzlarıyla yürütülebilir. Polimerleştirme temel olarak sulu çözeltilerde ilerler; ancak susuz ortam ve ters emülsiyon veya ters süspansiyon teknikleri de kullanılabilir. %20'den daha düşük konsantrasyonlardaki sulu çözeltilerde asit reaksiyonları kolayca kontrol edilir. Ancak polimerleştirmenin yüksek ısı, yüksek konsantrasyonlardaki polimerleştirmenin kontrolünü zorlaştırır. Bu koşullar altında reaksiyon çapraz bağlı polimerle sonuçlanabilir. Saf monomerik asidin çok dikkatli bir şekilde işlenmesi gerekir çünkü sulu halde büyük bir hızla kendiliğinden polimerleşirler ve polimerin parçalandığı sıcaklık değerlerine büyük bir hızla erişirler.

2.2.1.4 Poliamfolitlerin Serbest-Radikal Polimerizasyonu ile Sentezi

Poliamfolitler serbest-radikal polimerleştirme yöntemi ile kolaylıkla hazırlanır. Hem anyonik hem de katyonik yüklerin varlığı bu polimerlerin çözelti ve katı hal özellikleri üzerinde etkilidir. pH, yoğunluk, iyonik güç ve eklenen tuzların tipiyle konsantrasyonu çözelti içindeki amfolitik polimerin hidrodinamik hacmini etkiler. Düşük moleküler elektrolitlerin yokluğunda poliamfolitlerin büyük bir miktarı sulu çözeltilerde çözünmez ama hidrojel olarak bulunurlar.



Şekil 2.4 Poliamfolitler (I) Akrilik asit ve dimetilaminoetil-metakrilat' tan tesadüfi olarak oluşan kopolimer; (II) Bir iyon çiftinden oluşan kopolimer; (III) Bir betain monomerinden oluşan polimerik sülfobetain

Serbest-radikal polimerleşmesiyle poliamfolitlerin sentezi (Salamone ve Rice, 1989) aşağıda belirtilen yolu takip eder (Şekil 2.4):

1. Akrilik asit ve dimetilaminoetilmetakrilat gibi asidik ve bazik vinil monomerlerin kopolimerizasyonu rasgele kopolimerlerle sonuçlanır. pH'taki değişiklikler, içerikteki iyonize olabilen monomerlerin reaktifliğinde değişikliklere yol açar; örneğin çözünmeyen akrilik asit ve karboksilat anyon. Bu nedenle klasik iki-bileşenli kopolimer denklemi uygulanamaz.

2. Çözelti veya emülsiyon içinde amfolitik iyon-çifti komonomerlerinin polimerleştirilmesi. Bu monomerin amfolitik çiftleri, vinilik katyon monomerin karşılığı olan vinilik anyon monomerlerden oluşur. Polimerize olamayan iyonlar burada yoktur. Monomer çifti izole edilip nitelendirilebilir. Bu iyon çiftlerinin polimerleştirilmesi, tek tek polimerize olabilen vinil parçaları bulunan monomerin homopolimerleştirilmesinde tartışılmıştır (Salamone vd., 1980). Sonuç polimer yığınının, polimer zinciri boyunca asılı olan katyonik ve anyonik yüklerden molar olarak eşit miktarda bulunur. Yığın boyunca yük dağılımı rastlantısaldir çünkü polimerler değişken değildir ve ilave olarak her bir polimer zincirinde eşit miktarda katyonik ve anyonik birimin bulunması gerekli değildir.
3. Sulfobetain veya karbobetain monomerlerinin polimerleştirilmesi. Ortaya çıkan polimerlerin iyi tanımlanmış iyonik yük yerleşimi vardır. Sulfobetainler karbobetainlere göre daha fazla ilgi uyandırmışlardır çünkü bu zwitteriyonlar daha geniş bir pH aralığında diiyonik formlarında kalır. Her bir monomer grup aynı asılı grup üzerinde hem anyonik hem de katyonik bölgeleri bulundurur. Bu monomerler sulu çözeltilerde kolayca polimerleşirler. Tabii ki, her iki yük de bir asılı grupta sabit olduğu için sonuç polimer zincirlerinden herhangi bir tanesi pozitif ve negatif yükler açısından eşittir. Polimerik sulfobetainlerin çoğu suda çözünmez; hidrojel özellikleri gösterir. Bu özellik katyonik ve anyonik yüklerin moleküller içinde ve arasında iyonik etkileşimlerin nedenini açıklayabilir. Basit tuz eklenmesi polimerlerin sudaki çözünürlüğünü artırır. Polielektrolitlerin davranışlarına karşılık polimerik zwitteriyon çözeltilerinin viskozitesi tuz konsantrasyonunun artışına paralel olarak artar.

2.2.1.5 Polielektrolitlerin Serbest-Radikal Polimerizasyonu ile Sentezinin Özellikleri

Yüklü vinil monomerlerin serbest radikal polimerleşmesi yüksüz monomere göre bazı özellikler göstermektedir. Özelliklerin çoğu, yüklerin ve ters yüklü iyon (counterionların) varlığı nedeniyle oluşan moleküller içi ve arası etkileşimlerle ortaya çıkar. Zayıf asit veya zayıf bazların polimerleşme hızı ortamın pH'ından etkilenebilir. Metakrilik asitte görüldüğü gibi vinil karboksilik asit ve ilgili anyonların değişik reaktivliği bunun nedenidir. Doymamış aminlerde, yükün çift bağ reaktivliği üzerine etkisi belirtilmemiştir ancak protonlanmamış amin çok aktif bir zincir transfer ajanıdır. İyonize olabilen monomerlerin kopolimerleşme üzerine etkisi de pH ile değişir. Bu değişim, pH bağımlı monomer reaktivlik oranları değişiklikleriyle gösterilmiştir.

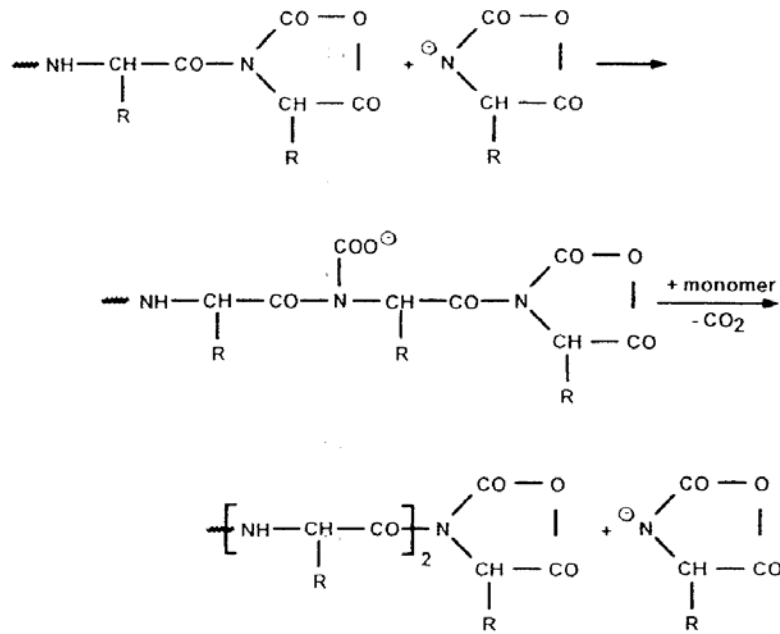
2.2.2 İyonik Polimerizasyon ile Sentez

2.2.2.1 Prensip

İyonik polimerizasyon, serbest-radikal polimerizasyon gibi zincir büyüme mekanizmasıyla yürür ama büyüyen zincir sonları katyon veya anyondur. Buradaki önemli nokta ters yüklü iyonların elektrostatik olarak büyüyen zincir sonlarında tutulmalarıdır ve böylece monomer birimlerinin eklenmesinde sterik etki uygulayabilir. Büyüyen zincir sonları aynı yükleri taşıdıklarından bimoleküler bir sonlandırma reaksiyonu yer almaz. Bu nedenle iyonik polimerleşme serbest radikal polimerleşmesine göre daha yüksek miktarlardaki aktif merkezlerle ve $10^4 - 10^5$ oranında daha hızlı devam eder.

Anyonik halka açılma polimerleşmesine örneklerden biri, normal nükleofilik bileşen kullanarak üç üyeli oksiran halkası içeren monomer polimerleşmesi ve kuvvetli baz başlangıçlarıyla N-karboksi- α -amino asit anhidrit (oksazolidin-2,5-diyon) polimerleşmesidir.

Diğer bir örnek, amino asitlerin fosgenle reaksiyonuyla monomerin sentezi sonrasında α -amino asitten hazırlanan polipeptid hazırlığıdır (Şekil. 2.5).



Şekil 2.5 N-karboksi- α -amino asit anhidritlerinin anyonik halka açılma polimerizasyonu ile sentezi

Katyonik halka açılma polimerizasyonu, siklik esterler, siklik aminler, siklik laktonlar ve siklik asetaller gibi pekçok monomer ile yürütülebilir. Aminlerin reaksiyonu, suda çözünebilir polimerik aminler ve amonyum tuzlarına sebep olabilir.

2.2.2.2 Katyonik Polielektrolitlerin İyonik Polimerizasyon ile Sentezi

Poliaminlerin çok büyük bir miktarı, gergin halka sistemli veya aktif çift bağlı monomerlerin katyonik veya anyonik polimerleşme reaksiyonlarından elde edilir. Üç veya dört üyeli siklik iminlerle (aziridan ve azetidanlar) beş veya altı üyeli iminoester monomerlerin (2-oksazolin ve 2-oksazinler) polimerleşmesiyle ilgili mükemmel bir araştırma yayınlanmıştır (Tomalia, 1992). Bu monomerlerin gelişmiş tekniklerle çok çeşitli polimerleşmesi ve sentetik stratejiler sadece uzun zamandır bilinen rasgele dallanmış polimerlere değil aynı zamanda tasarlanmış mimariye sahip makromoleküllere de yol açmıştır (örn. lineer, yıldız dallanmış, starburst dallanmış homopolimerler, makrosiklik oligomerler yanında rastlantısal, değişken, graft ve blok kopolimerler).

2.2.3 Basamaklı Polimerizasyon ile Sentez

2.2.3.1 Prensip

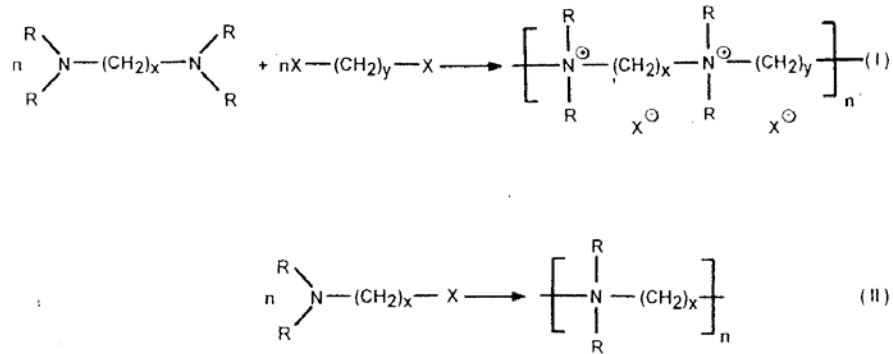
Basamak polimerleşmesi, stabil ara maddeler yoluyla adım adım ve bağımsız olarak reaksiyona giren en azından bifonksiyonel monomerlerin reaksiyonu olarak nitelendirilir. Zincir büyüme polimerleşmesinin aksine bu ara maddeler, monomerlerle aynı reaktivliği gösterir. Bu nedenle değişik temel reaksiyonlar arasında mekanik olarak bir ayırım yapmaya gerek yoktur. Bu sebeple, zincir büyümesi sadece monomer ilavesiyle değil oligomerlerin veya makromoleküllerin birbiri ile reaksiyonu ile ilerler. Polimer, oligomer ve monomerlerin bir arada bulunduğu karışımda reaksiyon bir denge halindedir.

2.2.3.2 Polielektrolitlerin Polikondenzasyon ve Poliadişyon ile Sentezi

Marvel ve Littmann (1930,1933) lineer katyonik polielektrolit üretmek için ω -bromoalkil dietilamin'in kendi kendine yoğunlaşmasını bildirdiklerinden beri, ana zincirinde azot bulunan polimerik kuaterner amonyum bileşikler bilinmektedir. Bu tip polimerler için jenerik isim olarak genellikle "İyonon" kullanılmaktadır. İyononlar ya detersiyer aminlerle dihalidlerin Menshutkin reaksiyonu veya aminoalkilhalid'lerin lineer kuaterner polielektrolit oluşturmak üzere kendileriyle reaksiyonu ile sentezlenebilir (Şekil 2.6). Dihaloalkenlerin detersiyer aminoalken'lerle reaksiyonu kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. x ve y, 3'ten küçük olduğu sürece hiçbir polimer oluşmamıştır. x ve y 3'e eşit veya 3'ten büyük

olduğu zaman 40.000 g/mol ortalama moleküler kütleye sahip polimerler elde edilebilir.

Katı iyonların özellikleri, genellikle yük yoğunluğuna bağlı olarak çok değişiktir. Yüksek yük yoğunluğuna sahip iyonlar inorganik tuzlar gibi güçlü iyonik etkileşim gösterir ve tek kristaller elde edilebilir. Ancak, düşük yük yoğunluğuna sahip iyonlar daha camsı, organik polimer maddeleri özelliklerini gösterir (Dominguez vd., 1989).



Şekil 2.6 Dihaliidler ve tersiyer aminlerin poliadişyonu ile iyonların sentezi (I), aminoalkilhalidiin reaksiyonu ile iyonların sentezi (II)

2.2.4 Sentetik Polimerlerin Kimyasal Modifikasyon ile Sentezi

2.2.4.1 Prensipier

Sentetik polimerlerin kimyasal modifikasyonu, klasik organik kimyanın herhangi bir reaksiyonuyla ilerleyebilir ama reaktanların küçük moleküller mi yoksa makromoleküller mi olduğuna bağlı olarak reaksiyonun mekanizması ve kinetiği oldukça değişebilir. Polimer içindeki fonksiyonel grupların reaktifliği, komşu grupların niteliklerine, zincirin niteliğine, uzunluğuna, düzenine, polimerin morfolojisine ve deney koşullarına bağlıdır.

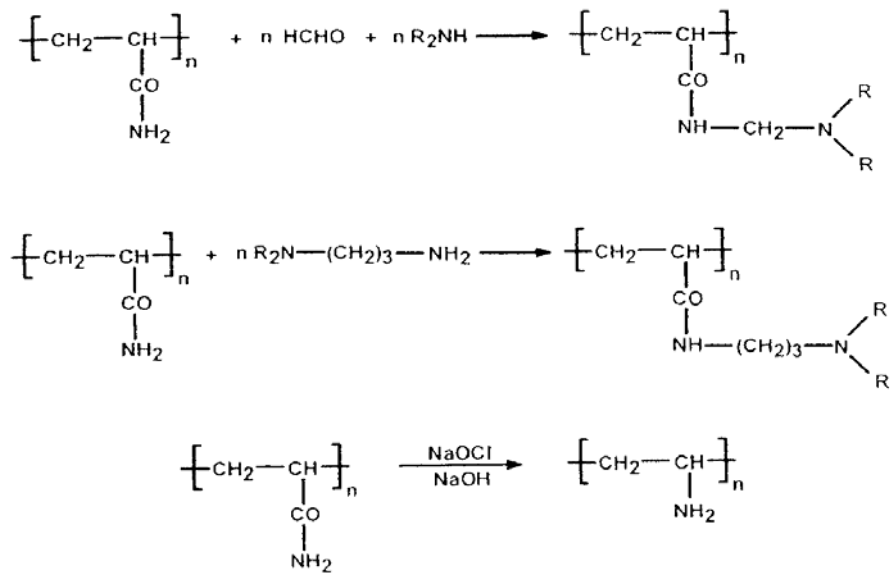
Makromolekülün fonksiyonel gruplarının lokal konsantrasyonlarının seyreltik çözeltilerde bile yüksek olduğu göz önüne alınırsa komşu etkilerinin çok önemli olması oldukça açık olarak anlaşılabilir. Polimerik esterlerin veya amidlerin hidrolizi sırasındaki elektostatik ve hidrofobik etkileri buna örnektir.

Modifikasyon reaksiyonları, homojen ve heterojen fazlarda gerçekleşebilir. Reaksiyonun başında ortam çözeltilinde çözünebilen bir polimerin çözünürlüğünün, reaksiyon arttıkça azaldığı sıklıkla gözlenir. Bu sebeplerle, reakte olmamış grupların elde edilebilirliği engellenir ve hız düşer veya reaksiyon tamamen sonlanır. Reaksiyon ortamında çözünmeyen polimerlerin modifikasyonu, kristal yapıları göz önünde bulundurularak tanımlanır.

Sentetik polimerlerin kimyasal modifikasyonu genel olarak yerine koyma, ekleme, eliminasyon ve izomerizasyon reaksiyonlarını kapsar. Polielektrolitlerin sentezi genellikle hidroliz, aminasyon, kuaternizasyon, sülfonasyon, halka açma Mannich reaksiyonlarıyla devam eder. Bu reaksiyonlar kullanılarak tek tek polielektrolitlerin çok büyük miktarı sentezlenmiştir.

2.2.4.2 Katyonik Polielektrolitlerin Polimer Modifikasyonu ile Sentezi

Katyonik polielektrolitler poliakrilamidlerden aşağıda belirtilen reaksiyonlarla elde edilebilir (Şekil 2.7); birinci reaksiyonun ticari önemi vardır:

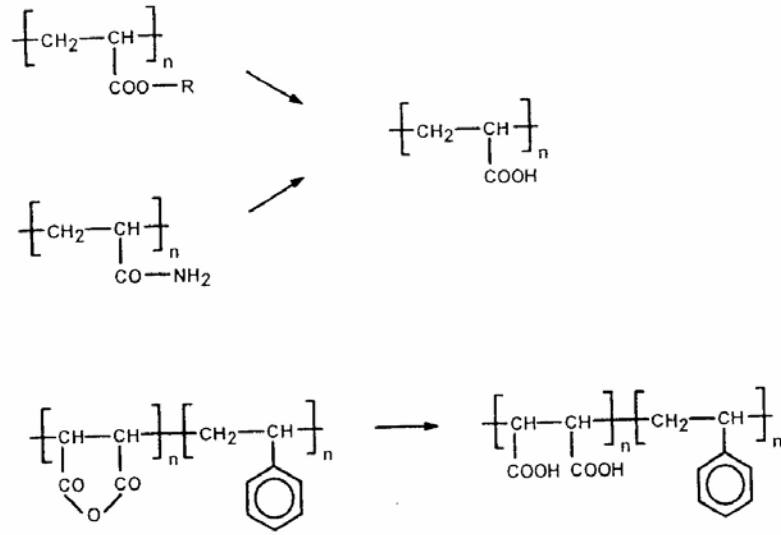


Şekil 2.7 Poliakrilamidin modifikasyonu

1. Formaldehid ve dimetilamin'in poliakrilamid ile asılı tersiyer amin gruplar elde etmek üzere baz katalizörlü Mannich reaksiyonu. Bu polimer ara ürün metilol türevinin varlığıyla ve nihai polimerde bu gruptan küçük bir miktardaki artık nedeniyle oluşan çapraz bağlara karşı duyarlıdır. Stabil polimerler amin fonksiyonlarının ardı ardına gelen kuaternizasyonu ile ortaya çıkar.
2. Tekrar asılı tersiyer amin gruplu poliaminle sonuçlanan poliakrilamidin birincil ve tersiyer amin fonksiyonlarına sahip aminlerle reaksiyonu.
3. Bazik hipoklorit kullanarak poliakrilamidler üzerinde Hoffman reaksiyonu. Amin grubu sokmak için olan bu yaklaşım polivinilaminlerle sonuçlanır.

2.2.4.3 Anyonik Polielektrolitlerin Polimer Modifikasyonu ile Sentezi

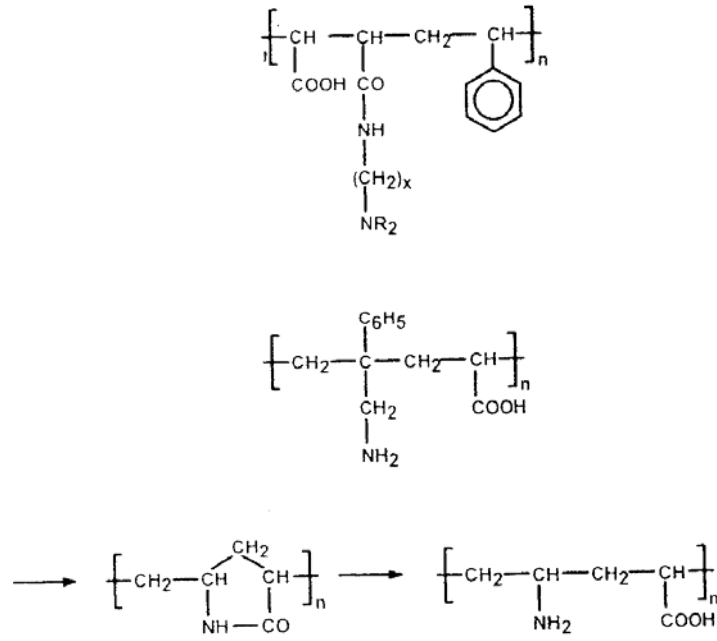
Polielektrolit içeren karboksilik grupların sentezlenmesinde kullanılan en yaygın ve ticari yol, monomerik asit işlemenin tehlikelerini ortadan kaldıran polimerik ester veya amidlerin hidrolizidir (Şekil 2.8). Poliakril esterlerinin hidrolizi, anyonik poliakrilik asit elde etmek için akrilik asidin polimerleştirilmesine alternatif bir metottur. Hız, çözücüye bağlıdır ama genellikle düşük moleküler kütleli esterlerin hidroliz hızından daha yavaştır. Başlangıç maddesine bağlı olarak değişik toksiteye sahip polimerik asitler elde edilebilir. Sindiyotaktik esterlerin hidrolizi sonucunda sindiyotaktik tuzlar ve izotaktik esterlerin hidrolizi sonucunda izotaktik tuzlar elde edilir.



Şekil 2.8 Polimerik karboksilik asitlerin hidroliz ile sentezi

2.2.4.4 Poliamfolitlerin Polimer Modifikasyonu ile Sentezi

Çeşitli değişik modifikasyon reaksiyonları poliamfolitlerle sonuçlanır. Aşağıda tipik bir örnek özetlenmiştir (Şekil 2.9). Maleik anhidrid, değişken kopolimerlerin aşırı diaminlerle aminoliz reaksiyonları sonucunda amin ve karboksilik gruplar içeren düzenli poliamfolitlerin oluşumuna yol açar. Halkada amid bağları bulunan, siklopolimerleşmeyle kolayca hazırlanan, siklik polimerlerinin hidrolizi düzenli poliamfolitlerle de sonuçlanır. Önceden oluşturulmuş polimerlerde yapılan Curtius-, Lossen-, ve Hoffmann-tipi düzenlemeler sırasında komşu fonksiyonel grupların etkileşimi oldukça düzenli bir sıralamayla poliaminokarboksilik asit oluşumuna yol açabilir.



Şekil 2.9 Poliamfolitlerin polimer modifikasyonu ile elde edilmesi

2.2.5 Hidrofobik Olarak Modifiye Edilmiş Polielektrolitlerin Sentezi

Hidrofobik grup içeren suda çözünen polimerler, hidrofobik etkileşimler nedeniyle kendi kendilerine düzenleme yapabilir. Hala izotropik olarak çözünür ise, homojen olarak çözünen polielektrolitlerle tek katman ve veziküller gibi kapsamlı bir şekilde kendi kendilerini organize eden ama faz olarak ayrılmış sistemler arasında bir pozisyona sahip olurlar. Bu son derece farklı sistemler arasında derece derece farklı özellikleri olan geçişler vardır. Az sayıda hidrofobik grubu olan polielektrolitler moleküller arası agregasyon nedeniyle gelişmiş petrol üretiminde bilinen kalınlaştırıcılar.

2.3 Doğal Polielektrolitler

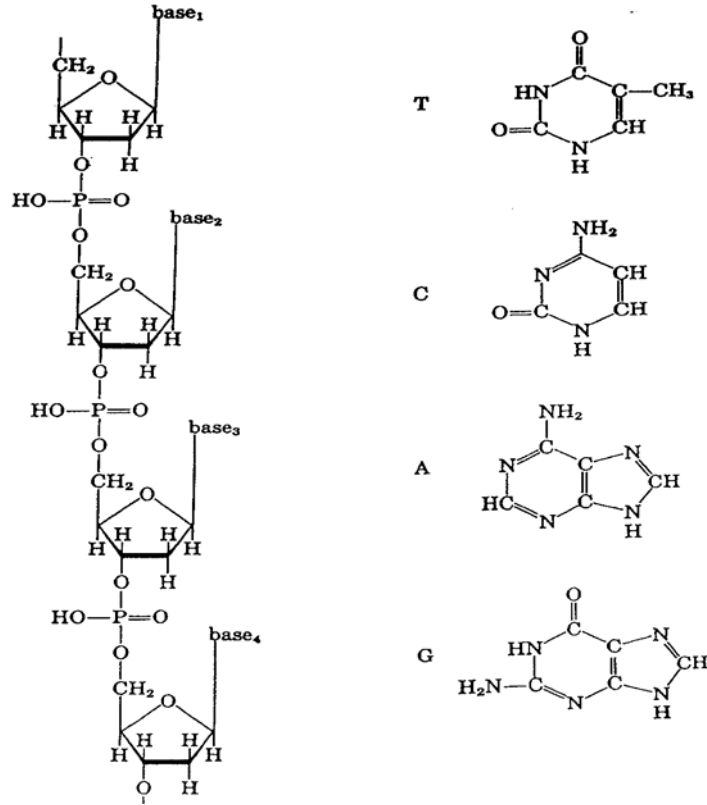
Suda çözünür PE hazırlamak için ilgili doğal polimer sınıfları polisakkaridler, proteinler, nükleik asit ve lignindir. Başlangıç maddesine ve istenen PE yapısına bağlı olarak, PE bu biyopolimerlerden birkaç yolla elde edilebilir:

1. Daha önceden oluşmuş bir PE'in ekstraksiyon/çöktürme tekniğiyle doğal üründen ayrılması.
2. Çözünür bir PE elde etmek amacıyla daha önceden oluşmuş iyonojenik grubu serbest bırakmak ve/veya doğal ürünü bozmak için ekstraksiyon ve kimyasal modifikasyonun bileşimiyle ayrılma
3. Ayrılmış noniyonik polimerin anyonik veya katyonik PE'ye türevlendirilmesi.

Doğal polimerden PE hazırlamadaki genel problemlerden biri, doğal polimerlerin türe bağımlı olarak kompozisyonunda değişiklik göstermesidir.

2.3.1 Nükleik Asitler

Polielektrolitler tarafından bakıldığında nükleik asitler, amfolitik polielektrolittir; örn. fosforik asit ve deoksiriboz, riboz birimlerinin sırasıyla heterosiklik zayıf baz ekli karbohidrat birimiyle oluşan integral tip poliestерler. Sulu sistemlerde, asidik fonksiyona sahip bu nükleik asitler genellikle, fosforik aside zıt yüklü iyon olarak davranan Na^+ iyonlarıyla birlikte, anyonik PE olarak davranır. Şekil 2.10' da bu prensibi gösteren, DNA' nın yapısı verilmektedir.



Şekil 2.10 DNA' nın kimyasal yapısı: (sol) DNA' nın tekli dizisinin şematik yapısı; (sağ) timin, sitozin, adenin ve guaninin kimyasal formülleri

Nükleik asit yapısının çok çeşitliliğini sağlayanlar:

1. Ana zincirin şeker parçasına eklenmiş heterosiklik zayıf N-baz adenin, guanin, timin, sitosin ve urasil tipinin ve sıralamasının seçimi.
2. Şeker birimi seçimi; örn. ribonukleik asitte (RNA) riboz, deoksiribonukleik asitte (DNA) deoksiriboz.
3. Eklenmiş heterosiklik bazdan meydana gelmiş H-bağları tarafından dengelenen zincir yapılanması.

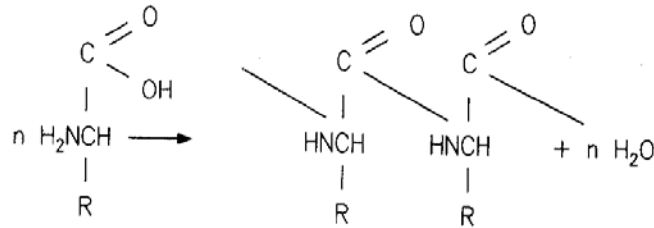
Genetik kodu depolayan DNA, 10^8 'e kadar varan molar kütleyle sahiptir. Tanımlı baz sıralamasına sahip nükleik asitler günümüzde otomatikleştirilmiş bir işlemle sentezlenirler. Polielektrolitler tarafından bakılırsa bu bileşenler model maddeler olarak gittikçe artan oranda ilgi çekmektedir. Bunun yanında, maya üretiminde son ürünlerdeki nükleik asit miktarını ekstraksiyon-çöktürme işlemiyle sabit bir seviyenin altına indirme gereksinimi doğmaktadır.

2.3.2 Taykoik Asit

Taykoik asit sırasıyla fosforik asitle gliserolden, diyol olarak davranan ve yan grup olarak şeker ve amino asit taşıyan ribitol birimlerinden oluşur. Suda çözünür bu polimerlerin anyonik özellikleri, nukleik asite analog ester bağlantısında bulunmayan fosforik asidin serbest asit özelliğinden gelmektedir. Taykoik asitler çeşitli mikroorganizmalarda, örneğin, *Lactobacillus cerabiosus*' ta bulunur ve bunlardan ayrılabilir (Dutton, 1989).

2.3.3 Polipeptid ve Protein Bazlı Polielektrolitler

Bu biyopolimerlerin monomer birimleri, peptid bağlarıyla bağlı $R-CHNH_2-COOH$ genel formüllü α -amino karbonik asitlerdir; amino ile bitişik karboksilik grup arasındaki amid bağları Şekil 2.11' de gösterilmiştir. Monomer, ilave asit veya bazik fonksiyonlara sahipse anyonik, katyonik veya amfoterik polipeptid ve proteinler elde edilir. Jelatin gibi, polipeptid ve protein bazlı çözünür bir PE, bir yandan fizikokimyasal araştırmalarda model bileşikler olarak kullanılabilir homopolimer polipeptiddir, diğer yandan da bozunmuş ve deamidlenmiş kolajendir. Poli-L-lisin veya poli-L-glutamik asit gibi iyi belirtilmiş bazı homopolimer polipeptidler de bugün ticari olarak bulunmaktadır.



Şekil 2.11 Polipeptid oluşumu

2.3.4 Polisakkarid Bazlı Polielektrolitler

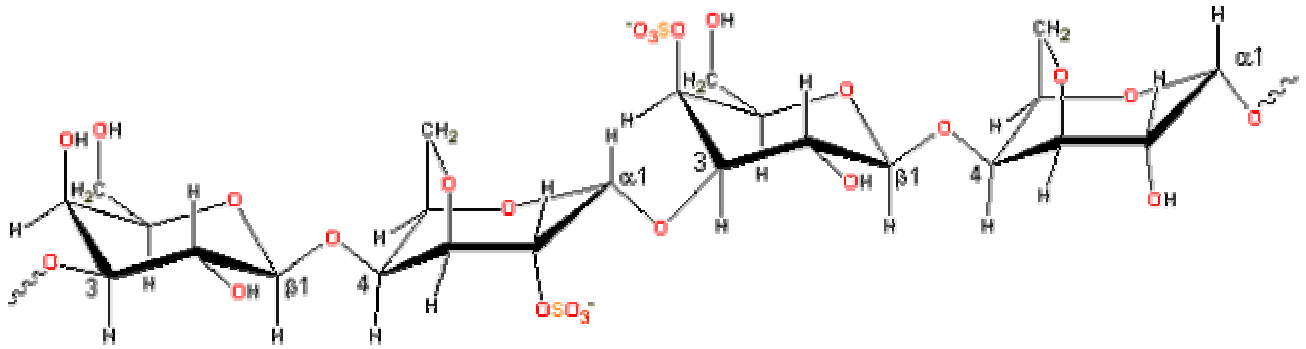
Doğal polimer bazlı çözünür PE'in çoğunda, iyonik grupların yan grup olarak eklendiği ve PE'in askılı tipi temsil ettiği polisakkarid omurgası veya iskeleti bulunur. Çok az bir istisnaıyla anyonik PE yüklü bölge olarak karboksilat veya sülfat yarı ester gruplarını içerir.

2.3.4.1 Doğal Polisakkaridik Polielektrolitler

Sayısız anyonik grupların bulunduğu çeşitli suda çözünür polisakkaridler (sakız), bitkiler tarafından üretilir ve öz, tohum veya kök reçineden elde edilir. Bunun yanında benzer özelliklere sahip polisakkaridler hayvan doku sıvılarından elde edilebilir veya mikrobiyal

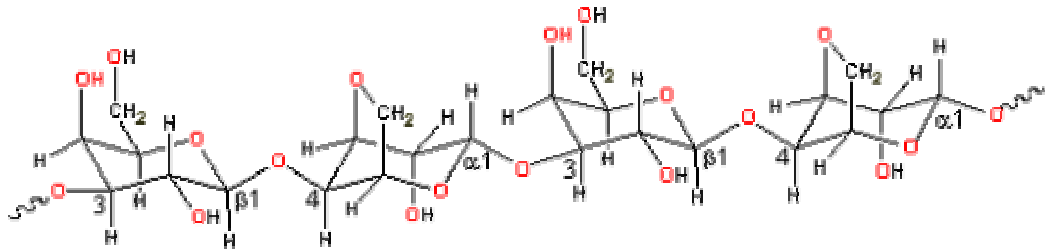
ürün olarak bulunabilir. Tüm bu polimerler moleküler şekil, glukozidik bağ ve şeker kompozisyonu (galaktoz ve manoz birimleri sık görülen bileşenlerdir) açısından çok büyük farklılıklar gösterirler. Oldukça kullanışsız ve komplike izolasyon ve saflaştırma işlemiyle ama söz konusu polisakkaridin kovalent kimyasal modifikasyonu olmadan, doğal üründen elde edilebilirler.

Kırmızı yosunun değişik türlerinin alkalın ön işleminden sonra su ekstraksonu ile elde edilen karaginin, değişken α -1,3 ve β -1,4 glukozidik bağlarla lineer zincire bağlanan substituye veya substituye edilmemiş D-galaktan birimlerden oluşur (Dautzenberg vd.,1994). Yapısı Şekil 2.12' de verilmiştir.



Şekil 2.12 Karaginin yapısı

Agar, kırmızı yosunun değişik türlerinin sulu alkalilerinin yüksek sıcaklıklarda ekstraksiyonu ve daha sonra sıcaklığın düşürülerek çöktürülmesiyle elde edilir. Agarın noniyonik ve aniyonik poligalaktanların karmaşık bir karışımı olduğu düşünülmektedir; kimyasal bileşimi biraz hasat mevsimine bağlıdır. Bugünkü bilgimize dayanarak agar noniyonik agaroz ve agaropektin (agarozdan kitosan PE oluşumu sonucunda ayrılabilir) içeren sulfat yarı-ester gruplarından oluşur (Dautzenberg vd.,1994).Yapısı Şekil 2.13' de verilmiştir.



Şekil 2.13 Agar (E406)' nın yapısı

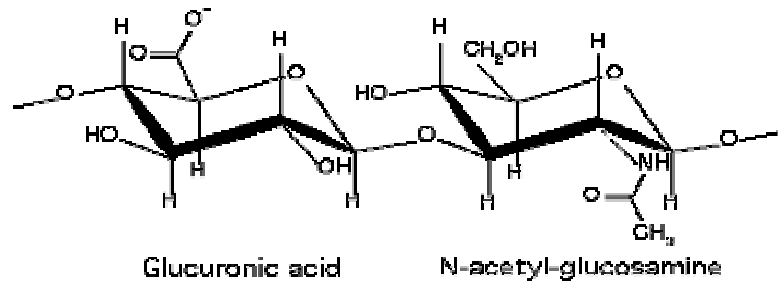
Algin, suda çözünmeyen Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ , K^+ tuzlarıyla alginik asit karışımı olarak kahverengi yosunda bulunur ve iyon değiştirici özelliği vardır. Alginik asit β -1,4-D-mannuronik asit, α -1,4-D-guluronik asit bloklarından ve mannuronik asit ve guluronik asit birimlerinin değişik sıralamalı bloklarından oluşan lineer çok bloklu kopolimerdir (Dautzenberg vd.,1994).

Traganth, değişik sakkarid birimlerinden (arabinoz, galaktoz, fukoz ve ksiloz) bağlanan galakturonik asitten oluşur.

Arap zambkı akasya ağacının kabuk eksudatından yılda ve ağaç başına 250 g olarak elde edilir; 5000 yıl önce Mısır'da madeni boya koyulaştırıcı ve mumya hazırlığında yapıştırıcı olarak kullanılmıştır.

Çeşitli meyvelerin ekstraksiyonlarından elde edilen pektinler, temel olarak meyvenin narenciye olması durumunda, büyük ölçüde metanolla esterleşen yalnızca poli- α -D-galakturonik asitten oluşur. Ticari üretimde doğal pektinin izolasyonu son kullanıma yönelik olarak bu esterlin sabunlaşmasıyla birleştirilir.

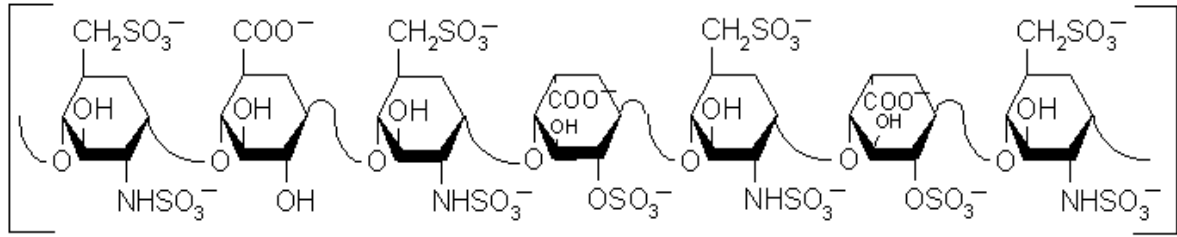
Gözün camsı kısmında bulunan hyaluronik asit, D-glukuronik asit ile 2-asetamido-2-deoksi-D-glukoz birimlerinin lineer değişken kopolimeridir. Na-hyaluronat hazırlamak için doğal ürün Na_2CO_3 sulu çözeltiyle ekstrakte edilir ve daha sonra katı toz elde etmek için işlenir. Yapısı Şekil 2.14' de verilmiştir.



Şekil 2.14 Hyaluronik asit' in yapısı

Heparin değişik hayvan bağırsaklarında, sıvılarında ve hayvan kanında bulunur. İnsanlarda tıbbi kullanım için hayvan organlarından (özellikle domuz bağırsaklarından ve sığır ciğerlerinden) ekstraksiyon/saflaştırma işlemiyle elde edilir. Heparin, mikroorganizmaları ve pirojenik maddeleri yok ederek daha emin bir tıbbi uygulama elde etmek amacıyla, ekstraktif sindirim ve daha sonra ultrafiltrasyon ve iyon-değişim adımlarından oluşan saflaştırmayla su

kabuklusu artıklarından ayrılabilir. Yapısı Şekil 2.15’de verilmiştir.



Şekil 2.15 Heparin’ in yapısı

2.3.4.2 Önceden Oluşmuş İyonik Bölgelerin Serbest Bırakılmasıyla Doğal Polimer Ürünlerinden Elde Edilen Polielektrolitler

Doğal polimer bazlı PE’e giden bu yolun temsilcileri pektin ve kitosandır.

Pektinler sayısız yüksek bitkiden özellikle çeşitli meyvelerin çekirdek ve kabuklarından alkalın veya asit ekstraksiyonu yoluyla elde edilir. Pektinler orijin ve ekstraksiyon prosedürüne bağlı olarak %20-60’a kadar metanolla esterlenen karboksil grupla α -1,4-D-galakturonik asittir (pektik asit).

20.000 – 60.000 aralığında ortalama molar kütleye sahip ürünler bazı asetil grup ve çok az miktarda sakkarid birimi içerir. Jel oluşturan pektinlerin üretiminde sulu asit sisteminin ekstraksiyonundan sonra etanolle çöktürülme tercih edilir. Koyulaştırıcı madde (viskozite yükseltici) elde etmede alkalın ekstraksiyon prosedürü daha avantajlıdır.

Kitosan, (2-amino-1,4- β -glukan) sitinin (N-asetilamino-1,4- β -glukan) deasetillemeyle elde edilir (Şekil 2.16). Sitin, selüloz ve nişasta dışında en bol bulunan doğal polimerdir ve kabukluların ve böceklerin kabuklarından ve bunların yanında mantar miselyumundan ayrılabilirler. Sitin dünya çapında yılda milyon ton ölçeğinde endüstriyel üretimi için seyreltik sulu NaOH ile kimyasal bir işlemle birleştirilmesi sırasında, son yıllarda fermantasyon işleminin maya ürünleri ve yengeç kabukları kullanılır (Sannan vd.,1976).

2.3.4.3 Substitüye Edilmemiş Polisakkaridlerin Türevlendirilmesiyle Polielektrolit Hazırlanması

2.3.4.3.1 Selüloz Bazlı Polielektrolitler

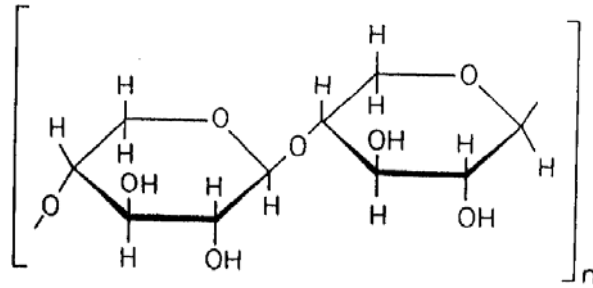
İyonik substituentler, anhidroglukoz biriminin (AGU) 2, 3 ve 6 pozisyonlarında bulunan OH gruplarının esterleşme, eterleşme veya oksitleme yoluyla selüloz 1,4-β-glukan zincirine sokulabilirler.

Bugün bilinen yaklaşık tüm selüloz tabanlı PE' ler anyoniktir. Bu aynı zamanda iki büyük ölçekli ürün (selüloz ksantogenat ve karboksimetilselüloz) için de geçerlidir.

Geniş ölçekli üretim ve birçok durumda selüloz tabanlı PE dahil olmak üzere selüloz türevlerinin laboratuvar ölçeğinde sentezi 2 faz sistemle uygulanır; selüloz başlangıçta en azından katı fazdadır (Philipp, 1993).

2.3.4.3.2 Ksilan Bazlı Polielektrolitler

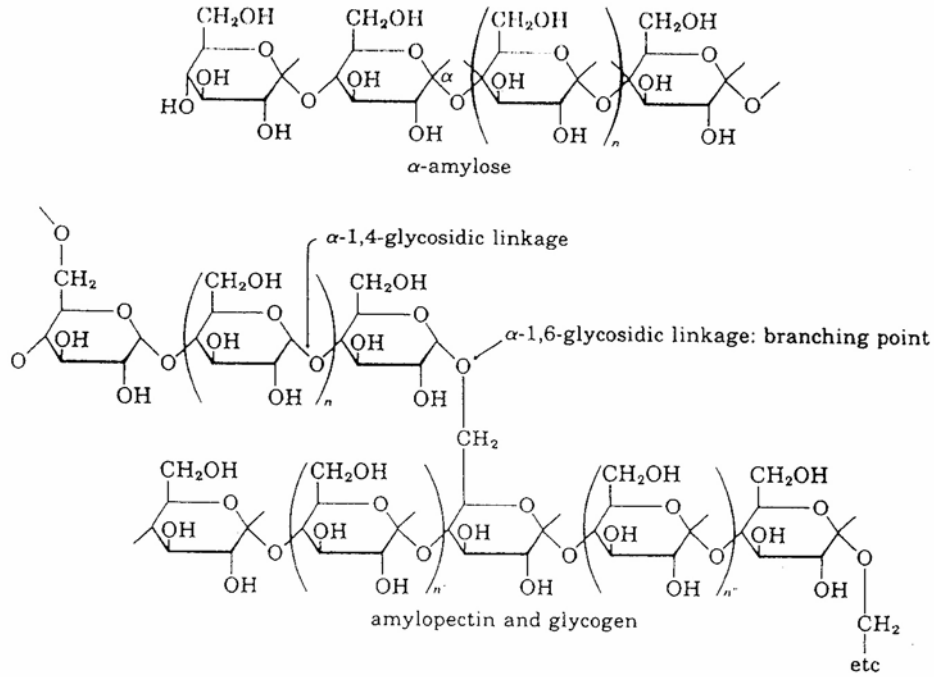
Kimyasal bakış açısıyla, lineer bir ksilan, $-\text{CH}_2\text{OH}$ grubu çıkarılmış ve bu nedenle sadece türevlendirme için iki OH grubu taşıyan bir selüloz olarak düşünülebilir. Kimyasal yapısı Şekil 2.16' da verilmiştir.



Şekil 2.16 Lineer ksilanın kimyasal yapısı

2.3.4.3.3 Nişasta Bazlı Polielektrolitler

Birçok bitkide bulunan, tahıl ve patateslerden büyük ölçeklerde ayrılabilen nişasta, iki α-bağlı poliglukan (2000 – 4000 ortalama DP'li lineer α-1,4-bağlı amiloz (Şekil 2.17)) ve $10^5 - 3 \times 10^6$ DP'li oldukça yüksek oranda dallanmış amilopektin'ten oluşur (Dautzenberg vd.,1994).



Şekil 2.17 Amilopektinin ve amilozun şematik yapısı

Prensip olarak, selülozla ilişkili olarak tartışılan tüm türevlendirme reaksiyonları (esterlendirme, eterlendirme ve oksidasyon) benzer bir yolla ve genellikle nişasta da olan benzer maddelerle uygulanabilir.

Selüloz yapı ve türevlendirme yolu ile benzerliklerinin yanısıra iki önemli farkın göz önüne alınması gerekir:

1. Türevlendirmeden önce nişastanın yüksek erişilebilirliği ve suyla afinitesi nedeniyle, 0.1 hatta daha düşük bir DS, birçok durumda özelliklerde değişiklikleri gerçekleştirmek için yeterlidir; örn. Selüloz çözünürlüğünde bir değişiklik yapmak için genellikle 0.5 DS suda çözünür türev elde etmek için yeterlidir.
2. Nişastanın büyük ölçekli türevlendirilmesi genellikle direkt olarak kuru veya çok az şişmiş hububatla uygulanır, hatta yakın bir zamanda suyla oldukça viskoz “partikül çözelti” veren akışkan yatakta yüzey modifiye edilmiş hububat parçaları elde edilmiştir.

2.3.4.3.4 Dekstran Bazlı Polielektrolitler

Dekstran α -1,6 bağı D-anhidro-glükoz birimli omurgadan oluşan, α -1,2 bağı anhidroglükoz birimleriyle dallanmış mikrobiyal bir noniyonik ama suda çözünen polisakariddir. Endüstriyel ölçekte, sukrozdan bakteriyel enzimlerle 10^5 g/mol molar kütleyle sahip olarak üretilir. AGU'nun OH grupları geleneksel yolla tercihan sulu veya kısmen sulu ortamlarda homojen reaksiyon koşullarında geleneksel yolla elde edilir.

2.3.5 Lignin Bazlı Polielektrolitler

Tahtanın temel bileşenlerinden olan lignin çapraz bağı bu nedenle de çözünmeyen aromatik polimerdir. Aril ve alkil eter bağlarıyla bağlanan işlevselleştirilmiş fenilpropan birimlerinden oluşur. Lignin tahta hamurunda daha fazla işlevselleştirilir ve çözünür parçalara bozunur. Tahta parçaları sülfite hamur işleminde içinde SO_2 , H_2SO_3 , HSO_3^- , ve sırasıyla Ca^{+2} , Mg^{+2} veya Na^+ olan sulu bir sistemle 130 - 140°C'ta esterlenir veya eterlenir.

Çözünen lignosülfonik asit , tahta hemiselülozundan çıkan düşük moleküllü sakkaridlerden ultrafiltrasyon ve daha sonra örneğin K^+ tuzlarıyla tuzlaştırır çöktürme veya alfatik amin veya katyonik PE ile tuz benzeri bir kompleks olarak çöktürme yoluyla ayrılır.

3. POLİELEKTROLİT-PROTEİN KOMPLEKSLERİNİN OLUŞUMU ve YAPISI

3.1 Giriş

Bir önceki bölümde yapay ve doğal polielektrolitlerden bahsedildi. Bu bölümde ise protein ve polielektrolitlerin oluşturduğu komplekslerden bahsedeceğiz.

3.2 Yapı-Özellik ilişkisi

Protein-polielektrolit komplekslerini tümüyle anlamak, komplekslerin tüm fizikokimyasal özelliklerini, çözelti koşullarıyla birlikte onu meydana getiren makro moleküllerin kimyasal yapılarından tahmin etme yeteneğiyle eşdeğerdir. Kompleksin tüm tanımında olması gerekenler:

1. Geniş çaplı (10-1000 nm ölçek) yapısal parametreler (polimer zinciri başına bağlanan polimer sayısı, interpolimer kompleks boyutları, agregasyon durumu (agregasyon içindeki polimer sayısı) ve proteinlerin olası multimer durumu gibi)
2. Lokal (0.5-10 nm ölçek) yapısal özellikler (polimer parçalarının “bağlı durumlarında” lokal düzenlemeleri, bağlanma işlemindeki aktif proteinin alanı (tüm proteinin eşit olarak bağlanmada yer aldığı görüşündeki fikir birliği ortadan kalkmaktadır)
3. Proteine özgü durumdaki düzensizlik
4. Küçük iyon ve hidratin alıkonma derecesi
5. Enerji bilimi: bağlanan her proteinden açığa çıkan enerji, entalpik ve entropik bileşenlerine ayrışması, bağlanmanın işbirliği
6. Elektrostatik (pK değişimi).

Polimer molekül ağırlığı, yük yoğunluğu, zincir rijitliği, protein yapısı (örn. pdb dizisi), protein ve polimer konsantrasyonları ve çözelti koşulları (pH, iyonik güç ve sıcaklık) gibi anahtar değişkenler verilirse, ön görebileceğimiz detaylar;

1. Sistemin faz durumu
2. Serbest ve bağlı polielektrolit ve protein konsantrasyonu
3. Intrapolimer kompleks MA (protein bağ sayısı)
4. Agregasyon derecesi (agregat başına birincil kompleks sayısı)
5. Elektroforetik mobilitesi
6. Polimer üzerindeki protein- bağlanma yeri ve protein üzerindeki polimer-bağlanma yeri doğası

3.3 Kuvvetler (etkileşimler)

Prensip olarak, birkaç non-kovalent kuvvet, polimerler ve proteinler arasında kompleks oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Protein ve polivinilpirolidon veya diğer hidrofilik noniyonik polimerler ve proteinler arasındaki etkileşimde birincisinin hidrojen bağ akseptörü olduğu oldukça kesindir; burada pH'ın verici olarak proteinin karboksilik asit gruplarının kullanırlığı üzerinde etkisi vardır (Matsudo vd., 2003)

Tüm çözünen maddeler suya göre hidrofobiktir; bu durumda, polielektrolit-protein komplekslerindeki hidrofobik etkileşimlerin hiç olmayacağını inkar etmek ve bu tür etkileşimleri çürütmek zordur. Hidrofobik etkileşimler için en kuvvetli kanıt, sistematik yapısal değişikliklerin etkilerinden veya hidrofobik etkileşimlerin karakteristiği olan birliğin, entropinin ve entalpinin sıcaklık bağımlılığını sergileyen termodinamik verilerden ortaya çıkmaktadır fakat bu tür ölçümler çok yaygın değildir. Elektrostatik etkileşimlerin baskınlığı, geniş çapta kabul görmüştür ama iki tartışma noktası vardır:

- 1) Protein düzgün bir şekilde yerleştiğinde daha spesifik bir hidrojen bağının üstüne yerleşen DNA-bağlı proteinlerin sergilediği “gevşek elektrostatik bağ” gibi elektrostatik etkileşimlerin bir şekilde elektrostatik olmayan kuvvetleri teşvik edip edemeyeceği, yarışan iki kuvvette bu tür sinerjinin tersinin olup olamayacağı ile her iki durumda da kısa menzilli kuvvet ve elektrostatik kuvvetlerin enerjilerinin toplanabilir olup olmayacağı.
- 2) Elektrostatik kuvvetlerin tanımı.

Genellikle “elektrostatik olarak idare edilen kompleksleşme” yorumunda şaşırtıcı bir çeşitlilik vardır. Örneğin, kompleksleşme tuzsuz olarak ve güçlü polielektrolitlerle gerçekleşmekteyse stokiyometrik çökelme görülür: çökelti, pH - bağımlı ama bununda dışında polielektrolit yükü / net protein yükü oranıyla ilişkili sabit bir protein / polielektrolit birleşme oranı gösterir. Bu davranış (tersiyonların kaybını ima eden) “polielektrolit kolloid titrasyonunu” hatırlatır ve Kokufuta (1994), tarafından birçok araştırmada model olarak kullanılmıştır.

Kabanov vd., (2004), zıt yüklü polielektrolit “interpolielektrolit kompleksleşme” bazlı bir model kullanırlarken, protein ve polielektrolit arasında oluşan stokiyometrik “tuz bağlarında” (tipik olarak dördü olan polivinilpiridin) protein iyonik birimlerinden (tipik olarak karboksilat) sadece bir bölümünün bulunduğunu bildirilmişlerdir. Protein veya polielektrolitin

başka bir makroiyonla yer değiştirdiği değişim reaksiyonları, tüm yüklü birimlerin, serbest olarak ya da tuz bağlarıyla bağlanmış olduğu iki durumlu model denge işlemine yol açar.

Benzer enerjiye sahip lokal zincir konfigürasyonlarının geniş dizisi, bağlanmış polielektrolitleri karakterize eder ve bağlanma enerjisi esas olarak proteinle polielektrolit sabit yükleri arasındaki sayısız çift Kulomb etkileşimlerinden (hem itici hem de çekici) ortaya çıkar. Yani, burada elektrostatik güçler sadece Kulomb kanunu tarafından idare ediliyor olarak tanımlanmaktadır, bu nedenle yalnızca etkin nokta yüklerine ve birbirleri arasındaki uzaklığa (yönle ilgili hiçbir belirlilik olmadan) dayandıkları söylenebilir. Ca. 4-40Å gibi karakteristik uzunluk ölçeğinin birkaç sonucu vardır: (1) hidrasyon yok olmaz : (2) kısa mesafeli kuvvetler minimal rol oynar ve dengesiz yükler arasındaki etkileşim lokal dipoller arasındakinden çok daha önemlidir; (3) etkileşimler Debye-Huckel perdeleme (“iyon değişimi” değil) nedeniyle tuz baskılamasına maruz kalmaktadır.

3.4 Hidrofobik Etkiler

Polimerler özellikle proteinlerle etkileşimde bulunmaları için tasarlanmış olabilirler ve bu tip poliamfifil bulunan sistemler, Tribet (2001) tarafından eksiksiz bir şekilde tanımlanmıştır. Ancak hidrofobik etkileşimlerin önemli bir katkıda bulunmadığı da bir gerçektir. Diğer yandan, tüm proteinlerde değişik derecelerde hidrofobik bölgeler olduğu ve bazılarının tüm vinil polimerlerin “hidrofobik omurgalarına” sahip oldukları da iddia edilmektedir.

Hidrofobik etkileşimlerin bazı karakteristik işaretleri vardır: yüksek tuzlarda (bu tür etki için gerekli olan tuz konsantrasyonu 0,5 M değerinin oldukça üstündedir, üst limit genellikle araştırılmaktadır) daha güçlü hale gelirler; ve entropi-güdümlüdürler (ama kompleksleşme üzerine ters yüklerin salımı benzer davranış özellikleri gösterebilir). Hidrofobik etkileşimler için en belirgin kanıt ya polimer yapısının sistematik değişimlerinden ya da $\Delta S - \Delta H$ için termodinamik verilerden elde edilir.

Gao ve Dubin (1999), BSA'nın maleik asit ve alkil vinil eterin bir seri kopolimerlerinin metil, etil, bütül, heksil, oktil ve desil yan zincirleriyle bağlanmalarını frontal analiz sürekli kapiler elektroforezle (FACCE) incelemiştir. Sonuçlar (1) metil ve etil benzer biçimde bağlanmaktadır, (2) bağlanma C2'den C6'ya artmış ama C8'den C10'a azalmıştır. Varılan sonuca göre; C1 ve C2 yan zincirleri BSA hidrofobik etki alanlarına erişememektedir; hidrofobların intrapolimer miselleşmesi protein polielektrolit etkileşimle yarışarak C8 ve C10'da baskın çıkmaktadırlar. Seyrek vd., (2003), FACCE ile hidrofobların K_{obs} üzerindeki

etkilerini gözlemlemiş, hidrofobik olarak değiştirilmiş poliakrilik asit (PAA) ve BSA ile daha başarılı olmuştur. $I \approx 20$ nM’de, K_{obs} ’un I bağımlılığının maksimumu görüntülenmiş ve bu kolayca hidrofobik yan zincirlerin eklenmesiyle yukarıya çıkmıştır. Gong vd., (2003), PSS bağlanmanın $I = 20$ nM’de maksimum etkiyle (belki de rastlantısal olarak çünkü apo sit c kullanılan pH 2.0 derecesinde tümüyle protonlanmıştır) apo sitokrom c’nin sarmal içeriğini (normal olarak düzensiz sargı) arttırdığını bulmuştur. Değişik sulfonasyon derecelerinde polistren kullanarak hem elektrostatik ve hidrofobik poli-elektrolit-protein etkileşimlerinin dahil olduğuna karar vermişlerdir ancak gerçekte protein, organik su çözeltisinden proteine eklendiği zaman oluşan polimerler nanopartiküllerle etkileşmektedir.

3.5 Polielektrolit-Protein Komplekslerinin Fiziksel Durumu

Polielektrolit-protein komplekslerinin fiziksel durumu, çözünürlüğün çeşitliliğine olanak verir. Çözünebilir kompleksler, mikroskopik stokiyometriye bağlı olarak (her bir polimer zincirine bağlanmış protein molekülünün sayısı, n), kompleksin hidrodinamik hacminin %5-15’ inin protein tarafından tutulabilmesiyle (polimerden dolayı daha az fraksiyon) kuvvetli bir şekilde hidratlanmışlardır. Bir intrapolimer kompleksinin net yükü, ilk yaklaşımla $Z_T = Z_p + Z_{pr}$ ’ dir. Burada Z_p , polielektroliti, Z_{pr} , proteini ifade eder. Z_T sıfıra yaklaştığında (poliionlar için bu durum sadece $pH < pI$ durumunda olur), çözeltide kendisini zıt yüklemiş diğer bir iyon ile birleştiren iyonların tutulması azalır ve interpolimer kompleksleri, %20-30 protein ve polimer içeren daha az hidratlanmış “koaservatlar” oluşturmak için birleşebilir. Kuvvetli etkileşim ve daha yüksek çekim şartlarında- yüksek yük yoğunluklu polimerler, pI dan uzak pH ve düşük tuz-katı-sıvı faz ayrımı meydana gelir (Örneğin çökme). Bu tip istemler Kokofuta (2004) tarafından araştırılmıştır. Ayrıca Kokofuta, bu tip koşullarda enzim aktivitesinin korunduğunu da raporlamıştır. İki koşulda proteinler, polielektrolit jellerdeki yumuşaklık sebebiyle bağlanmışlardır. Birinci durumda, önceden şekillenmiş jele protein katılması Skobeleva vd., (2004) tarafından gösterilmiştir. Bu durum, protein ilaçların taşınmasının kontrol edilmesini sağlayan, ayrıca protein difüzyonu çalışmaları için örnek ilginç bir sistemdir. İkincisinde ise, protein, jelleşme prosesine kendi başına katılabilir. Polimerik amfifiliklerle jelleşmeden başka, pI ’ nın düşük değerlerinde ve elektrostatik kuvvet altında çapraz-bağlı bölgeler gibi hareket eden hidrofobik protein bölgelerinin, BLG ve deniz yosununda ekstrakte yöntemiyle elde edilen kolloidal maddelerin jel karışımlarının oluşumu raporlanmıştır (Eleya ve Turgeon, 2000).

3.6 Diğer Araştırmalar

Xia ve Dubin (1994)'in araştırmasına kadar polielektrolit-protein kompleksleri üzerine hiçbir inceleme görülmemiştir. Oldukça kapsamlı ve ilgili araştırmaların çoğu yakın zamanlarda yapılmıştır. Tribet (2001), özellikle membran proteinlerine odaklanarak amfifilik polimerlerin proteinlerle ilişkilerini açıklamıştır. Bu araştırma gerçekte amfifilik polielektrolitler üzerinedir ama aslında protein-polielektrolit etkileşiminin doğası, araştırma metotları ve yapı konusundaki kuramlar hakkında birçok konuyu kapsamaktadır. Protein-polisakkarid etkileşimleri özellikle üç araştırmada çok iyi incelenmiştir (Tolstoguzov, 1997; Doblier vd., 2000; Turgeo vd., 2003). Gıda sanayinde ilgi duyulan spesifik protein-polisakarid sistemleri, Dickinson (1998) tarafından yapılan araştırmanın konusunu oluşturmaktadır.

3.7 Son Gelişmeler

Son on yıl esas olarak üç faktörde hızlı bir gelişme g r lm ştir: **uygulamalar, enstrümantasyon ve simülasyonlar**. Polielektrolit  oklu tabakaların ve protein-polielektrolit kompleks alanlarının kesişmesi, glükoz, kolesterol ve antikorların tespiti için gelişmiş saklama ve operasyonel stabiliteye sahip biyosensörlerin hazırlanması üzerine özel olarak odaklanan protein-polielektrolit tabaka-tabaka üretiminde olanaklar açmıştır.

Bu  oklu tabakalar üzerine yapılan araştırmalar, yeni optik dalga tarayıcılı lazer spektroskopi, yüzey plasmon rezonans ve küçük açı reflektometriyle yapılan yüzey karakterizasyonu tekniklerinden destek almışlardır. Çözelti içindeki protein-polielektrolit komplekslerine uygulanabilen yeni teknikler kesintisiz kapiler elektroforez ve a inite bazlı ayırma metotlarını içermektedir. Aynı zamanda son on yılda, simülasyonlar komplekslerin yapı ve faz davranışına hatırı sayılır bir bakış atarak çözelti alanlarında da büyük etki yaratmıştır.

Yapı ve dinamik üzerinde, nm- m ölçeğinde incelemeye olanak tanıyan yeni mikroskobik tekniklerin yardımıyla, polielektrolit-protein kompleks koaservat fazlarının teşhisi benzersiz olmuş, çökelti veya süspansiyonlardan farklı kabul edilmeye başlanmıştır.

Son olarak polielektrolitler koaservatlardaki ve mikrokapsüllerdeki proteinler için yumuşak immobilize bir  evre sa ladıklarından, farmasötik uygulamalarda, jel veya iplikçik şeklindeki polielektrolitlerin, proteinleri yakalayıp teslim etmek için kullanılabileceğini bulmak şaşırtıcı olmamıştır. Biyokimya, malzeme bilimi, polimer ve kolloid kimyanın bir noktada birleşerek, günümüzdeki diğer disiplinlerle birlikte gelecekte ilgili bilimin temelini oluşturmaları olasıdır.

4. PROTEİN-POLİELEKTROLİT KOMPLEKSLERİNİN KARAKTERİZASYON TEKNİKLERİ

4.1 Giriş

Bu bölümde verilen enstrümental teknikler, protein-polielektrolit komplekslerinin bağlanma davranışları, morfolojik, yapısal, optik özellikleri ve dinamikleri üzerine bilgiler sunmaktadır

4.2 Mikroskopik Teknikler

4.2.1 Atomik Kuvvet Mikroskopi (AFM)

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), numune ve prob arasındaki düşey kuvvetten dolayı alan yüksekliğini ölçer, 3 boyutlu görüntüler ile topografik bilgiler elde edilir. AFM film kalınlığının ve protein-polielektrot tabakalarının ve uçlarının yüzey yapısının tespitinde geniş kullanım alanına sahiptir. Yüzey sertliğini 5-10 nm e ye kadar tayin etmek mümkündür. Gergely vd. (2004), insan serum albumini ile etkileşimde olan poli L-lisin (PLL) ve poliglutamik asit (PGA) tabakalarının film yüzey yapısını araştırmak için AFM yi kullanmıştır. Benzer olarak, Ram vd. (2001), polistiren sülfonat (PSS) ve polietilenimin (PEI) tabakalarında gömülü kolesterol oksidazı karakterize etmek için AFM' yi kullanmışlardır. Czeslik vd. (2004), küresel poliakrilik asit (PAA) uçlarının boyutlarını, insan serum albuminin bağlamasından önce ölçmek için AFM' yi kullanmışlardır.

4.2.2 Elektron Mikroskopi (EM)

Elektron mikroskopi (EM), numunenin elektron ışınları ile aydınlatılması suretiyle görüntülenmesi için kullanılır. Böylece, boyutlarda 10 nm'den fazla mikroskopik ayırışma sağlanır. Mürekkepli ve mürekkepsiz numunelerin her ikisinde de kullanılabilir, numunenin yüzey yapısı, bileşimi ve kristallliği iyi bir şekilde görüntülenir. Pihlajamaa vd. (2004), EM kullanarak heparinin kollojen IX ile kompleksleşmesini EM ile incelemiş ve heparinin bağlanma bölgelerini tahmin etmek için bu bilgileri kullanmıştır. Burgess (1994), albumin/akasya ve jelatin/akasya koaservat zerreciklerinin stabilitesini ve şeklini tayin etmek amacıyla taramalı elektron mikroskopi yöntemini kullanmıştır. Çoklu tabakalarda, eğer kolloidler bir araya gelmişse veya yüzey üzerinde daire olmuşlarsa, EM film kalınlığını ve tabaka oluşumunu gözlemek için kuvvetli bir araçtır. Lvov vd. (1995), PEI ve PSS multikomponent protein çoklu tabakalarının film kalınlığını hesaplamak için EM yi kullanmıştır. Caruso ve Mohwald (1999), polielektrolit-yüzey-modifiye edilmiş polistiren

lateks partiküllerinin, immunoglobulin G çoklu tabakları veya bovin serum albumin (BSA) sınıflandırılmış-etiketlenmiş FITC ile uniform olarak kaplanmasını EM ile göstermiştir.

4.2.3 Optik Mikroskopi (OM)

Geleneksel optik mikroskopta, ışıklandırılan bir numuneden gelen ışık 0.2 μm çözünürlükte morfolojik bilgi sağlayan bir görüntü elde etmek için lenslerle toplanır. Özel eklemeler ve işlevsellikle optik mikroskoplar dinamik davranış hakkında da bilgi verebilir. Örneğin, tek molekül duyarlı floresan mikroskobu kullanarak partikül izleme yoluyla.

Ducel vd. (2004), optik mikroskopla akasya sakızı konsantrasyonları ve pH değişimleri üzerine protein koaservatların morfoloji ve bitki boyutu üzerine çalışmıştır. Görüntü gelişimi için değişik optik mikroskoplarla çeşitli görüntü modları kullanılabilir. Faz kontrast görüntü dağıtılan ışık fazını değiştirerek ve refraktif endeks farklarını ışık ve karanlık görüntü bölgelerine yönlendirerek lekesiz biyolojik numunelerdeki kontrastı artırır. Mekhloufi vd. (2005), asidifikasyon sırasındaki BLG ve akasya sakızı dağılımlarındaki yapısal değişiklikleri izlemek için kullanmıştır.

Konfokal mikroskopi alan derinliğini kontrol etme ve artalan gürültüyü yok etme veya azaltma yetenekleriyle geleneksel optik mikroskopiye göre bazı avantajlar sunar. Önemli bir gelişim lazer uyarımının gelişi olmuştur: Daha iyi bir yanal çözünürlüğe sahip olduğu için lazer taramalı konfokal mikroskopiyle (LSCM) optik mikroskopi karşılaştırıldığı zaman pürüzlü yüzeylerde daha iyi görüntüler elde edildiği görülmektedir. LSCM'nin temel kullanımı floresan mikroskopiyle birlikte hücrelerin 3D görüntülerini elde etmektir. LSCM, (mEosFP) tek küresel PSS iplikçiklerine floresan proteininin tersine çevrilebilir bağlanmasını göstermekte kullanılmıştır (Anikin vd., 2005).

Toplam internal yansımali fluoresans mikroskopi (TIRF), floroforların harekete geçme ve algılanlarını, kısa zamanda yok olan dalgayla teşvik edilen değişik kırılma indisine sahip iki ortam arasındaki ara yüze bitişik ince bir bölgeyle sınırlar. Ara yüzlerde ve yüzeylerde tek bir floresan molekülü gözlemek için kullanılabilir (örn. Protein) ve proteinlerin polielektrolit değiştirilmiş yüzeylere absorpsiyonunu araştırmak için kullanılmıştır (Czeslik, 2004).

4.3 Saçılma Teknikleri

4.3.1 Dinamik Işık Saçılması (DLS)

Dinamik ışık saçılması (Quasi Elastic Light Scattering veya Photon Correlation Spectroscopy olarak da bilinir) özellikle yayılma gücünden hidrodinamik yarı çap belirlemek için kullanılır. BSA'nın küresel PAA veya PSS iplikçiklerine bağlanmasındaki adsorpsiyon tabaka kalınlığını ölçmekte DLS kullanılmıştır (Rosenfeldt vd., 2004). Wang ve Dubin (1998) ise, BSA bağlamakta kullanılan kontrollü gözenekli cam üzerine adsorbe edilen polidialildimetilammonyum klorür'ü (PDAD-MAC) tanımlamakta kullanmışlardır. Seyrek vd. (2003), DLS' i BSA-heparin kompleksasyonları için olan bulanıklık titrasyonlarından elde edilen kritik pH değerlerini doğrulamak için kullanmıştır. DLS aynı zamanda, BSA-PDAD-MAC koservatları içindeki yayılma katsayılarını belirlemek için de kullanılmıştır (Bohidar vd., 2005).

4.3.2 Statik Işık Saçılması (SLS)

Statik ışık saçılması tekniği, dinamik ışık saçılmasından daha zordur. Molekül ağırlık ve dönme yarıçapı üzerine bilgi sağlar ama özellikle polielektrolit-protein kompleks konsantrasyonu gerçekte bilinmediği zaman Zimm plotunu oluşturmada zorluk nedeniyle tekrarlamalı teknikler gerektirmektedir (Xia vd., 1993). Tsuboi vd. (1996), papain, insan serum albumin, lizozim, ribonükleaz, tripsin ve pepsin gibi çeşitli proteinlerle potasyum polivinil alkol sülfat arasındaki düşük tuz çözeltilerinden oluşan kompleksler için olan SLS verilerinden, Zimm plotunu oluşturmuşlardır. Sonuçlar molekül ağırlığı ve agregasyon derecesini tahmin etmek için kullanılmıştır.

4.3.3 Küçük Açılı X-Işını Saçılması (SAXS)

X-ışınları değişik elektron yoğunluğuna sahip bölgelerce yayılır; şiddet bu tür bölgelerin sayısına ve onların karışıklıklarına bağlıdır. Böylece SAXS numunenin elektron yoğunluk dağılımı hakkında bilgi sağlar ve 1-200 nm ölçekli yapıların analizinde kullanılır. Kristalize olmayan maddelerin yapısal çalışmalarında oldukça düşük çözünürlüklerde geniş çapta kullanılmaktadır ve biyolojik bilim uygulamalarında birçok çalışma alanı bulmuştur. BSA ve bovine (büyük baş hayvan) pankreatik ribonükleaz A'nın küresel PAA ve PSS iplikçiklerince adsorpsiyonu üzerine son SAXS çalışmaları bu alandaki birkaç uygulamadan birini temsil etmektedir (Rosenfeldt vd., 2004).

4.3.4 Elektroforetik Işık Saçılması (ELS)

Titreşimli elektrik alanı altındaki Brownian yayılmanın düzen bozukluğundan elektroforetik hareketlilik elde edilebilir. ELS biyokolloidler, emülsiyonlar ve yüklü polimerler için kullanılmıştır. Caruso ve Mohwald (1999), kapsız ve kaplı (PDAD-MAC/PSS/PDADMAC/FITC-BSA ve (PAH/PSS)₂/IgG)PS lateks partiküllerinin hareketliliğini ölçmüştür. Richert vd. (2002), çoklu tabaka serumla temas etmeden önce ve temas ettikten sonra PLL ve PGA değişken çoklu tabakaların ζ -potansiyellerini ölçmüştür. Xia vd. (1999), ferrihomoglobin-PDADMAC komplekslerinin protein konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak elektrofobik hareketliliğini ölçmüştür ve ayrıca albumin-akasya koaservatlarının ζ -potansiyeli Burgess vd. (1991) tarafından ölçülmüştür.

4.3.5 Yayılma Dalga Spektroskopisi (DWS)

Yayılma dalga spektroskopisi, dalga boyuyla toplam yol uzunluğundaki değişikliklerden doğan, dağılan ışıktaki dalgalanmaları ölçerek, klasik dinamik ışık yayma işlemini çoklu yayma sistemine genişletir. DWS çok küçük uzunluk ölçeklerinde partikül hareketini inceleyebilir, örn. 1 μ m boyutundaki bir partikülün <1 nm uzunluk ölçeğinde hareketi. Weinbreck vd. (2004), peynir altı suyu proteinleri /akasya sakızı koaservatlarındaki tüm yayılan partiküllerin yayılma katsayısını pH'ın bir fonksiyonu olarak DWS ile ölçmüştür.

4.4 Spektroskopik Teknikler

4.4.1 UV-Görünür Spektrofotometre

UV-görünür spektrofotometrenin protein ve nükleik asit konsantrasyonlarını ölçmede kullanımı bilinen bir yöntemdir. Bromberg (2001), spektrofotometreyi insulinin poliakrilik asitle olan etkileşiminden sonra oluşan artık konsantrasyonları ölçmekte kullanmıştır; Jiang ve Zhu (2001), spektrofotometreyi PMAA- veya PAA-jelatin kompleks jeller içindeki miyogloblin, sitokrom c ve pepsin tuzaklarını belirlemede kullanmıştır. UV-görünür spektroskopisi çoklu bileşen proteini ile PSS/PEI çoklu tabakanın birleşimini izlemekte de kullanılmıştır (Lvov vd., 1995).

4.4.2 Infrared Spektroskopi (IR)

Bazı uygulamalarda proteinlerin stabiliteleri ve aktiviteleri çok önemli olduğu için ikincil yapılarının belirlenmesi çok önemlidir. IR bu nedenle kompleks (Bromberg vd.,2001), koaservat (Van de Weert vd., 2004) ve iplikçik (Wittermann ve Ballauff, 2004) içindeki proteinler için kullanılmıştır. Hafifletilmiş Toplam Yansıtma Fourier Dönüşümlü IR Spektroskopi (ATR-FTIR) ışığın içe yansıtılmasıyla bir yüzeyi örnekleyebilir. Çoklu tabakalı filmlerde kullanılan diğer tekniklerden farklı olarak, ATR-FTIR yüzey üzerindeki tek tek bileşenleri ayırt edebilir. Müller vd. (2001), bazı değişik polielektrolit çoklu katmanlar üzerinde insan serum albuminin (human serum albumin) adsorpsiyonunu çalışmak için ATR-FTIR kullanmıştır; Schwinte vd. (2001), PAH-PSS çoklu tabakaları içine gömülü fibrinojenin ikincil yapısını çalışmış ve polielektrolit tabakalar arasında korunmakta (bozulmamış) olduğunu bulmuştur

4.4.3 Floresan

Floresan, protein yapısal değişikliklerini, protein adsorpsiyonunu ve adsorbe edilen proteinlerin hem kolloid hem de düzlemsel yüzeylerdeki dinamiğini izlemek için kullanılabilir. Caruso ve Mohwald (1999), FITC-BSA'nın PDADMAC/PSS/PDADMAC-kaplı PS lateks üzerine adsorpsiyonunu takip etmek için floresanı kullanmıştır. Anikin vd. (2005), protein bağlanmasının verimini belirlemek için mEosFP'nun bir fonksiyonu olarak tek tek PSS iplikçiklerinin floresan emisyonunu ölçmüştür. Teramoto vd. (1999), floresan spektral değişikliğini (özellikle de triptofan maksimum emisyonu) heparin veya hyaluronan kompleksleri içindeki BSA'nın konformasyonel değişikliklerini araştırmak için kullanmıştır.

4.4.4 Dairesel Dikroizm (CD)

CD (optik rotasyonun dalga boyu bağımlılığıyla ilgili) protein ikincil yapısı üzerine bilgi sağlar ve ferrihemoglobinin-PDADMAC kompleksleri, Xia vd. (1999) tarafından, BLG/akasya koaservatları ise Mekhloufi vd. (2005) tarafından konformasyonel geçişleri belirlemede kullanmıştır. Gong vd. (2003), değişik sülfonasyon derecesinde ve zincir uzunluğundaki eksi yüklü sülfonatlı polistrenin teşvik ettiği sitokrom c ve apo sitokrom c'nin yapısal dönüşümünü araştırmak için CD' yi kullanmıştır. CD aynı zamanda polielektrolit iplikçikler üzerine adsorbe edilebilen proteinlerin enzimatik aktiviteleriyle de ilişkilendirilebilir. Küresel iplikçikler güçlü yayıcılar olduğu için, adsorbe edilen proteinlerin direkt analizi mümkün değildir; ancak serbest bırakılan proteinler analiz edilebilir (Wittermann ve Ballauff, 2004).

4.5 Titrimetrik Teknikler

4.5.1 Potansiyometri (pH Titrasyonu)

pH (potansiyometrik) titrasyonu, titre edilebilir amino asitlerin (lys, arg, glu, asp) pK değerlerini sağlar; bu pK değerleri titre edilebilir grupların lokal elektrostatik çevrelerine dayandığı için protein konformasyonal değişimlerine ve prensip olarak polielektrolitlerle bağlanmaya karşı hassastırlar. Wen ve Dubin (1997), PDAMDAC' ın BSA' ya bağlanmasının, beklendiği gibi, H^+ ni serbest bıraktığını ama etkinin güç fark edildiğini, polikasyonların gevşek bağlandığını belirterek sadece düşük I değerlerinde görüldüğünü bulmuştur.

4.5.2 Bulanıklık Ölçümü

Bir tip bulanıklık titrasyonunda polielektrolit oldukça seyreltik protein çözeltisine yavaş yavaş eklenir ve saçılan ışığın yoğunluğu veya kompleks/çökelti oluşumu nedeniyle oluşan bulanıklık τ eklenen polielektrolitin bir fonksiyonu olarak ölçülür. Değişimli olarak polielektrolite protein eklenebilir. Kolloid titrasyon denilen titrasyonda, τ değeri, titre edilen çözelti hacminin (genellikle tuzsuz sistemlerde) bir fonksiyonu olarak kaydedilir ve maksimum bulanıklıkla belirlenen son nokta kompleks oluşumunun stokiometrisini tayin etmekte kullanılır. Jiang ve Zhu (2001), PAA/jelatin kompleksasyonunu araştırmak için, Tsuboi vd. (1996) ise, papainin potasyum polivinilsülfonat (KPVS) ile yaptığı kompleksasyonları çalışmakta kullanmışlardır. Bulanıklık titrasyonunun değişik bir formunda pH değiştirilir (protein, polielektrolit ve tuzun sabit konsantrasyonunda) ve τ değerinin pH bağımlılığının sıfır eğimden sapması belirlenir.

4.6 Kalorimetrik Teknikler

4.6.1 Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC)

Diferansiyel tarama kalorimetrisi, kontrollü sıcaklık değişiklikleri sırasında oluşan ısı değişikliklerini ölçer. Bu değişikliklerle ilişkili termodinamik parametreleri çalışmak ve kompleksler içindeki proteinlerin termal denatürasyonunu incelemek için kullanılmıştır. Van de Weert vd. (2004), heparin ve lizozim kompleksasyonlarına uygulamış ve protein termal stabilitesinde bir düşüş gözlemlemişlerdir. Ivinova vd. (2003), DSC' i enzimatik aktivitelerini değiştirmeden lizozim ve kimotripsinojenin termal denatürasyonunu incelemek için kullanmış ve polianyonların önemli derecede bu termal denatürasyonun başlangıcını azalttığını bildirmişlerdir.

4.6.2 İzotermal Titrasyon Kalorimetrisi (ITC)

İzotermal titrasyon kalorimetri iki türün etkileşimini, bir bağlanma ortağını diğeriyle titre ederken kalorimetri hücresindeki serbest bırakılan ısıyı ölçerek araştırır. Girard vd. (2003), ITC' i BLG ile düşük- veya yüksek-metoksi pektin arasındaki etkileşimi çalışmak için kullanmıştır. ITC için büyük miktarda numuneye ihtiyaç vardır; ancak gıda polielektrolitlerinin düşük maliyeti ve bolluğu hala kullanılmalarına olanak tanımaktadır.

4.7 Ayırma Teknikleri

4.7.1 Moleküler Eleme Kromatografisi (SEC)

SEC, moleküllerin sıvı içindeki molekül büyüklüklerine göre ayrıldıkları bir sıvı kromatografi tekniğidir. Andrianov vd. (2005), SEC ile immunostimule edici aktiviteleri saptamak ve protein-polielektrolit kompleks kompozisyonunu belirlemek için polifosfazen polielektrolitleri ve BSA kompleksasyonunu araştırmıştır.

4.7.2 Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi biyolojik fonksiyona dayanan kromatografik bir tekniktir: kolon üzerinde immobilize bir ligandla biyospesifik etkileşimi yoluyla proteinler izole edebilir ve ligand-protein bağlanma sabitini ölçmede kullanılabilir. Protein-polielektrolit kompleksleri alanında, bağlanan ligand gerçekte polielektrolit olabilir, örn. Heparin veya jelatin (Hogg vd., 1991).

4.7.3 Frontal Analiz Sürekli Kapiler Elektrofez (FACCE)

FACCE'de bir protein-polielektrolit karışımı sürekli olarak ayrılmaktadır. Serbest protein, ölçülebilen bağlanma dengesini bozmadan konsantrasyonunu elde ederek frontal şerit olarak ortaya çıkar. Çeşitli formlara uygun olan son bağlanma izotermi, bağlanmayı sabit kılar, kooperativiteyi sağlar ve polimer üzerindeki protein bağlanma alanlarının sayısını belirler. Gao vd. (1997), BLG'nin sodyum PSS' e bağlanmasını çalışmak için FACCE' i kullanmıştır.

4.7.4 Afinite Koelektroforez (ACE)

Afinite koelektroforez biyopolielektrolitlerin (glikosaminoglikanlar, GAG) ve proteinlerin denge koşullarında bağlanmalarını ölçmek için bir başka yol sağlamaktadır. Bir ligandın immobilize olduğu afinite kromatografi ve afinite elektroforeze karşılık ACE'de hem protein hem de biyopolielektrolit hareket halindedir. San Antonio ve Lander (2001), heparin-protein kompleksasyonunu çalışmak için detaylı bir ACE metodu bildirmişlerdir.

4.8 Reflektometrik Teknikler

4.8.1 Tarama Açısı Reflektometrisi (SAR)

Tarama açısı reflektometrisinde ince filmlerden (100 – 150 nm) yansıtılan ışık yoğunluğu geliş açısının bir fonksiyonu olarak ölçülür. Bu kırılma indisi, film kalınlığı ve yüzey alanı başına adsorbe edilen kütle hakkında bilgi sağlamaktadır. SAR, protein yüzey konsantrasyonları ve protein-polielektrolit çoklu katmanlarının kalınlığının belirlenmesine yardım eder. Ladam vd. (2001), PEI/PSS/PAH çoklu tabakaları üzerine son aşamada birkaç protein adsorbe edildikten sonra pH'ın bir fonksiyonu olarak film kalınlığını çalışmak için SAR'ı kullanmıştır.

4.8.2 X-Işını ve Nötron Reflektometri

X-ışını ve nötron reflektometrinin altında yatan teoriler ve deneysel ayarlar benzerdir. SAR'a karşılık bu teknikler, yüzey ara yüzüne karşı normal ara yüz yoğunluk profilleri sağlayabilir. Her iki teknik de ince filmlerin veya gömülü ara yüzlerin yüzey yapılarını çalışırken kullanılır. Aynı zamanda yüzeylerde oluşabilecek yapışma, adsorpsiyon, iç yayılma işlemleri hakkında bilgi sağlar. Bu reflektivite teknikleri özellikle çoklu tabaka tanımlaması için çok kullanışlıdır. Ama x-ışınlarının su tarafından absorpsiyonu, uygulamaların ara yüzeyler üzerindeki protein adsorpsiyonu çalışmalarıyla sınırlanmasına neden olur. Czeslik vd. (2004), düzlemsel PAA iplikçiklerine bağlanan BSA' nın yüzey kalınlığını çalışmak için her iki tekniği de kullanmıştır. Boydan boya ara yüz yoğunluk profili bulmak için nötron reflektometri kullanılmıştır.

4.9 Floresan Fotoğrafma Geri Kazanımı (FPR)

FPR kısmen ağaran numunelerin floresan geri kazanımını ölçülmesiyle, matrikste floresanla etiketlenen partiküllerin lokal hareketliliklerini ölçmek için kullanılır. Teknik neredeyse 40 yıllık olsa da protein-polielektrolit sistemlerine yaygın olarak uygulanmamıştır. FPR koaservat durumları yanında polielektrolit çoklu tabakanın içine gömülü olan veya adsorbe edilen proteinlerin yayılma gücünü ölçmekte ve HSA'nın hem PSS hem de poliallilamin hidroklorür (PAH) sonlandıran çoklu tabakalara yayılmasını ölçmekte kullanılmıştır (Szyk vd., 2001). Ayrıca florometri gibi FPR de yüzey konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılır.

4.10 Optik Dalga Tarayıcılı Işık Modu Spektroskopisi (OWLS)

OWLS doğrusal olarak polarize edilen ışık difraksiyon ızgarasıyla bir dalga tarayıcılı tabakada birleştirilir; film kalınlığı ve biriken filmler/tabakaların kırılma indisi hakkında bilgi sağlar. OWLS özellikle çoklu tabaka üzerine protein adsorpsiyon kinetiğini orijinal olarak çalışmak için uygundur. Gergeley vd. (2004) ile Szyk vd. (2001), insan serum albuminin bağımsız olarak polielektrolit çoklu tabakalara adsorpsiyonu üzerinde çalışırken bu tekniği kullanmışlardır

4.11 Kuvars Kristal Mikrobals Terazi (QCM)

QCM, yüzeyine adsorbe olan tabakanın kütlesiyle rezonans frekansı değişen, ince bir kuvars plakadan oluşur. Bu, çok ince bağlanmış tabakaların kütlelerini ölçmemize olanak tanır ve viskoelastik özellikleri hakkında bilgi sağlar. Diğer optik kütle cihazlarına karşılık, QCM'den elde edilen kütle, hidratlı tabakaları da içerir. QCM kapsüllenmiş enzimlerin miktarını belirlemede kullanılmıştır (Yu ve Caruso, 2003).

4.12 Yüzey Plasmon Rezonans (SPR)

SPR' nin temel prensibi, ışığın metal yüzeyle etkileşiminden ortaya çıkan kuantum optik-elektrik fenomenden doğar. Rezonans dalga boyu, metal yüzey tarafından yansıtılan ışık ölçülerek belirlenebilir ve sonuç olarak yüzeylerdeki kırılma indisleri incelenebilir. SPR geçmiş 10 yılda ince film ve kendiliğinden oluşan monotabakaların oluşumu ve özellikleri çalışmalarında önemli bir konuma gelmiştir. Hernaiz vd. (2000), SPR'i antitrombinin heparin sülfat modifiye biyoçip üzerine bağlanmasını araştırmada kullanmış ve aralarında düşük afiniteli bir etkileşimin varlığını bulmuştur; bu etkileşim heparin 3-O-sulfotransferaz ile modifiye edildiği zaman artmıştır. Pihlajamaa vd. (2004), SPR'i benzer bir çalışmada kullanmış ve hidrofobik sensör çiplerinin daha istikrarlı sonuçlar verdiğini bulmuştur.

4.13 Reoloji

Reoloji, deformasyon ve madde akışı çalışmaları temel olarak jellerin dinamik davranışlarını araştırmada ve koaservatların mekanik özelliklerini tanımlamakta kullanılır. Borrega vd. (1999), BSA, paparin veya lisozimle jel oluşturmak üzere kompleks meydana getiren hidrofobik olarak modifiye PAA'nın viskoelastik özelliklerini çalışmış ve bu geri döndürülebilir jeller ve kimyasal olarak çapraz bağlı moleküller arasında benzerlikler bulmuştur. Bohidar vd. (2005), BSA/PDADMAC koaservatların, düşük gerginliklerde katı

gibi olan ama makaslandıktan sonra daha iyi duruma gelen ve zayıf bir ağa sahip olan, frekans bağımlı viskoelastik modülünü ölçmüştür.

5. UYGULAMALAR

5.1 Protein Taşınması ve Hapsedilmesi İçin İyonik Hidrojeller

Hidrojeller, çok miktarda su absorbe edebilen üç boyutlu polimerik yapılardır (Bromberg ve Ron, 1998; Peppas ve Leobandung, 2004). Bu bölümde çevresel etki (örn. Sıcaklık, pH, bileşim, v.b.) yoluyla jel yapısında değişiklikleri tetikleyerek, talep halinde proteinlerin veya protein bazlı ilaçların salımının kontrolünde kullanılabilecek biraz çapraz bağlı şişmiş polielektrolit ağından oluşan iyonik hidrojeller anlatılmıştır (Bromberg ve Ron, 1998).

İyonik hidrojellerin şişmesi sıcaklık, pH, iyonik kuvvet ve polielektrolit yük yoğunluğundaki değişikliklerle yönlendirilebilir (Peppas ve Leobandung, 2004). Zincirler arası elektrostatik itme ve ağır artan hidrofilisitesi nedeniyle şişme, zayıf poliasitlerde pH artışıyla artarken zayıf polibazlarda pH azalmasıyla artar. Hidrofilik jellerin çoğunda şişme, sıcaklıkla artar ama hidrojel yapısında hidrofobik gruplar varsa şişmenin tümüyle bastırılması da dahil olmak üzere değişik davranışlar görülmektedir. Dışardan elektrik alan uygulaması şişmeyi etkileyen harici etkilere bir örnektir.

Polielektrolit hidrojellerin şişmesinin, jellerin ozmotik basıncına değişik katkıların bir sonucu olduğu farklı araştırmalar ile açıklamaya çalışılmıştır. Ogawa ve Kokufuta (2002), homojen ve heterojen olarak dağıtılmış yüklerin şişme davranışlarını karşılaştırarak osmotik basıncın hareketli iyon konsantrasyonundaki farklılıktan doğup doğmayacağını araştırmıştır. Termal olarak duyarlı katyonik jeller immobilize üreazla birlikte jel içinde yükün heterojen dağılımına neden olacak pH-eğimi yaratmakta kullanılmıştır. Jeldeki hacim değişimleri, enzim (ureaz) immobilize olduğu sırada ürün ve substratların jel içine yayılmada serbest oldukları enzimatik reaksiyonların bir sonucu olarak jel içindeki pH değişiklikleriyle idare edilebilir.

5.1.1 Protein Salım Kontrolü

İyonik hidrojellerden protein salım hızı, protein ve polielektrolitin çeşitli yapısal parametrelerinin yanında hidrojel içindeki çevresel koşullardan etkilenir. Polimer içindeki iyonize olabilir yüklü grupların (ör. Jel polielektrolitin yük yoğunluğu) konsantrasyonlarındaki bir artış, proteinin yük işaretine bağlı olarak protein salımında bir artış veya azalışa yol açabilir. Örneğin, katyonik hidrojelden salınan miyogloblin miktarının, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) homopolimeri katyonik dietil aminoetil metakrilat ve noniyonik HEMA kopolimeriyle değiştirildiği zaman arttığı bulunmuştur (Am Ende vd.,

1995). Beklenildiği gibi, düşük moleköl ağırlıklı proteinlerin salımları daha hızlıdır ve globular proteinler lifli yapıdakilerden daha hızlıdır.

5.1.2 Sistem, Kullanımları ve Örnekleri

Bromberg ve Ron (1998), protein ve peptid taşınması için etki duyarlı jellerin kullanımını gözden geçirmiştir. Protein taşıyan iyonik hidrojel­lerin ilaç taşıma sisteminde potansiyel kullanımı vardır; kronobiyolojide yeni biyouyumlu maddelerin tasarımı (örn. biyolojik olayların geçici ilişkilerinin çalışılması) ve kronobiyolojik hastalıkların tıbbi tedavisi için. Leonard vd. (2004), protein hapsedilmesi için hidrofobikal olarak değiştirilen aljinat hidrojel kullanmış ve BSA ile insan hemoglobininin kontrollü salımını göstermişlerdir. Sistem hapsolmuş aşı proteini ve enkapsüle üreazla bağışıklık kazandırmak için uygulanabilir. Jel-hapsolmuş enzimler aynı zamanda kimyasal değişim için biyokatalizör olabilir. Ogawa vd. (2001), immobilize glükoz oksidaz artı üreaz ile amfoterik jel geliştirdiler. Bu sistemler ağlar arası elektrostatik etkileşimler nedeniyle jelin şişmesi ve çekmesi yoluyla biyokimyasal enerjiyi mekanik işe çevirebilirler.

5.2 Enzim İmmobilizasyonu

Tanı ve ilaç buluşuyla ilgili birçok uygulamalar substratlar üzerinde immobilize proteinleri yardımıyla olmaktadır. Bu bölümde proteinlerin aktif katalizörler ve biyosensörler olarak immobilizasyonunu tartışılmıştır.

5.2.1 Kolloid Katalizörler

Enzimler biyokatalizör olarak iş görebilen proteinlerdir. Geniş yüzey alanları nedeniyle, küresel kolloid partikül ya içinde enzimlerin immobilize olduğu polielektrolit iplikçikler yada proteinlerin adsorbe edildiği polielektrolit çoklu tabakalarla birlikte biyokatalizörler için çok iyi bir seçimdir (Caruso vd., 2000; Anikin vd., 2005).

β -glukosidaz (β -GLS) PSS tarafından ayrılan β -GLS tabakaları yaratarak PSS tabakaları arasına sıkıştırılmıştır. İlk β -GLS tabakasının adsorpsiyonunu kolaylaştırmak için PS lateks partikülleri üzerine biriken ilk haberci PAH/PSS polielektrolit filmin dört tabakası üzerinde bir araya getirilmiştir (Caruso vd., 2000). Glükosidasyon reaksiyonunun verimi daha alt tabakalardakilerin katalitik reaksiyonlara katılımını göstererek β -GLS tabakalarının artışıyla artar. Bu aynı zamanda substrat ve dodekanolün immobilize enzimlerin aktif bölgeleriyle etkileşime girmek için polielektrlit tabakalara yayılabileceğini göstermiştir. En dış tabaka

polielektrolitse, immobilize β -GLS'in katalitik aktivitesi en dış tabakaları β -GLS olan partiküllere göre düşer. Sonuç yüzeyden çözeltiye kaybedilen enzimlere atfedilebilir. Polielektrolit tabakaca korunmazsa β -GLS'lerin bazıları glükosidasyon reaksiyonunda yer alacak yüzeyde daha az enzim bırakarak çözeltiye karışır. Ancak çözeltiye önemli bir enzim kaybı olmadığı için gömülü enzimlerde katalitik aktivite değişmez. Anikin vd., (2005), immobilize floresan proteinin (mEosFP) polielektrolit PSS iplikçikleri üzerindeki biyoaktivitelerini incelemiştir. Floresan protein moleküllerinin alım ve salımlarının yapısal bütünlüğü etkilemediğini ve biyo-fonksiyonellenin devam ettiği görülmüştür.

5.2.2 Biyosensörler

Genel olarak biyosensör, fizyolojik değişikliklerle ilgili bilgileri veya çevrede bulunan çeşitli kimyasal veya biyolojik maddelerin varlığına bir yanıt olarak onları saptayan, kaydeden ve yayınlayan bir cihaz olarak düşünülebilir. IUPAC tanımı bu cihazların dönüştürücü ögeyle – genellikle bir elektrot - direkt uzamsal temasta olan bir biyolojik tanıma elemanı içermesi gerektiğinin altını çizmektedir. Bu araştırma biyosensör olarak biyolojik duyarlı maddelere yani polielektrolit-immobilize enzimlere odaklanmaktadır.

Depolama stabilitesi (raf ömrü) ve operasyonel stabilite biyosensör hazırlığı işleminde çok önemli konulardır çünkü biyosensörlerin uzun bir süre için aktivitelerini sürdürmeleri gerekir (Gibson vd., 1996). Elektrot yüzeylerde immobilizasyon sağlamak için kullanılan polielektrotların varlığı genellikle biyosensör stabilitesini geliştirir. Yu ve Caruso (2003), elektrokimyasal biyosensörler hazırlamak için PSS/PAH enkapsüle katalaz kristallerini kullanmıştır. Kataliz kristalleri üzerinde PSS/PAH çoklu tabakası oluşturmuş ve onları da elektrotlar üzerine biriktirmişlerdir. Polielektrolit tabakalar enzim sızıntısını engellemiş ve yüzeyin geçirgenliğini kontrol ederek stabiliteyi artırmışlardır. Gibson vd. (1996), enzim immobilizasyonundan sonra elektrot yüzeyinde glükoz oksidaz-polelektrolit kompleks oluşturarak biyosensör stabilitesini artırmıştır. Polielektrolitlerin varlığında glükoz oksidazın immobilizasyonunun termal operasyonel stabiliteyi artırdığını göstermiştir. Sonuçlar akış analiz sistemlerinde kullanılan taşıyıcı çözeltilere eklenen polielektrolitlerin yararını göstermiştir.

5.3 Protein Ayırıştırması

Polielektrolitler seçici faz ayrımı (çökelme veya koaservasyon) yoluyla proteinleri karışımlarından geri kazanmakta kullanılmıştır. Göz önüne alınan özellikler: seçicilik, verim ve izleyen saflaştırma adımlarıdır. Bu faktörler Izumrudow vd. (1998), tarafından ele alınmıştır. Dainiak vd. (2000), immobilize antijen yapmak için kuaternize poli 4-vinilpiridin'i affinite ligandla (gliseraldehid-3-fosfat hidrojenaz) birleştirmiştir. Antikor parçalar bu polikasyon-antijen kompleksi kullanarak aktif ve inaktif olanlar ayrılarak saflaştırılabilir.

5.4 Protein-Polielektrolit Koaservatlar Kullanarak Mikroenkapsulasyon

Protein-polielektrolit koaservasyon yağların ve yiyeceklerle içeceklerin lezzetinde mikrokapsulasyon için yaygın olarak kullanılan bir fizikokimyasal metottur; ancak işlemin yapı ve stabilitesi daha iyi anlaşılacak ilaçları, kozmetik katkı maddelerini, pestisitleri, canlı hücreleri ve aşılarda enkapsüle etmek için de kullanılabilir.

Enkapsulasyon emülsiyon çekirdek maddesi (örn. polielektrolit veya polielektrolit-protein karışımının bir stok çözelti içindeki yağ) dağıtılarak ve bunu takiben çekirdek madde çevresindeki koaservasyonu artırmak için çözelti koşullarında (örn. pH) bir değişiklikle tamamlanır. Kompleks koaservat mikrokapsulasyon, pH, I, toplam makromolekül konsantrasyon ve albumin/akasya, bitki proteinleri/ akasya sakızı, bitki proteinleri/karboksimetilselüloz, peynir altı suyu proteini/ akasya sakızında görüldüğü kadar protein/polielektrolit oranı gibi koaservasyonu etkileyen aynı parametrelere karşı duyarlıdır (Burgess, 1994; Duce vd., 2004; Weinbreck vd., 2004). Tek dikkat edilmesi gereken şey çekirdek madde damlacığının boyutudur ve küçük yağ damlacıklarının (<50µm) büyük damlacıklara göre daha kolay enkapsüle oldukları bulunmuştur (Weinbreck vd., 2004). Çekirdek maddenin uygun enkapsulasyonu viskozitenin orta derecede yüksek olduğu maksimum koaservasyon veriminin elde edildiği pH değerinde elde edilmiştir (Burgess, 1994; Weinbreck vd., 2004).

Koaservat stabilite partikül boyutu, viskozite ve arayüzey rijitliği ile kontrol edilir ama stabilite her zaman koaservat tabakasını kimyasal veya enzimatik olarak çapraz bağlanarak artırılabilir. Ancak, glutaraldehid gibi çapraz bağlama ajanları potansiyel olarak toksik olabildikleri için koaservat damlacıklarının çapraz bağlanması biyoyumlu ve biyobozunur mikrokapsül sistemleri için önerilmemektedir (Burgess, 1994).

5.5 İmmunolojide Polielektrolit Kompleksleri

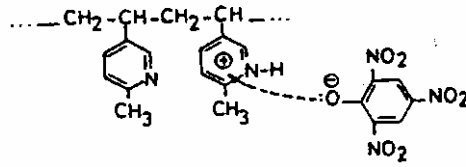
70’li yıllardan önce, kimyacılar ile immunologların birlikte çalışmaları sonucunda doğal olmayan polielektrolitlerin (polikarbonasitler, polibazlar, bunların kopolimerleri ve çeşitli türevleri) klasik bir antijen olan koyun eritrositleri (KE) ile birlikte hayvanların organizmasına verilmesi durumunda immün cevabına önemli seviyede etkide bulundukları gösterilmiştir (Ottenbrite vd., 1978; Petrov vd., 1992). (Çizelge 5.1). Bileşenleri kararlı bağlarla bağlanmış komplekslerde polielektrolitlerin model, bakteri ve virüs tabiatlı yapay antijenler için taşıyıcı gibi kullanılması immün cevabı birkaç defa çoğaltır ve devamlı immün koruyuculuk yaratır. Bu şimdiye dek korunulması mümkün olmayan hastalıklara karşı yapay aşı yaratma imkanı sağlamaktadır (Petrov vd., 1992).

Bu yönde yapılan araştırmalar, immunolojide çok önemli genel prensiplerin belirlenmesini sağlamıştır: Yani immün cevabın gen düzeyinde fenotipik doğrulanmış prensipleri ve yapay antijenlerden yapay aşılara geçmenin immunolojik yolları ortaya koyulmuştur (Petrov vd., 1992). Bu güne dek doğal olmayan polimerlerin immün modüllü aktifliğinin ve polimer yapılı antijenlerin immunojenliğinin, bunların fizikokimyasal etkilerine bağlılığının incelenmesi konusunda bir çok çalışma yapılmıştır. Önceden belli etkili suni immunojenlerin yapılması ve polimer-antijen sistemlerinin çalışma mekanizmasının fizikokimyasal yönden anlaşılması için polielektrolit kompleksler (PEK) daha fazla bilgi verirler. Bu komplekslerde polimer taşıyıcılar küçük ve yüksek moleküllü ligandlarla oynak, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimle bağlanmışlardır. Düzenlenebilen yapıya ve bileşime sahip olan polielektrolit ve komplekslerin sentezi ve incelenmesi, aynı zamanda polikompleks partiküllerinin yapı-kimyasal çevrilmelerinin rolünün immunolojide analizi, bunların yüksek immunojenli preparatların sentezi için kullanılmasını sağlar. PEK’lerin teorik immunoloji için kimyasal “alet” olduğunu da belirtmek gerekir. Bu alandaki ilerlemeler, çok komponentli biyolojik sistemlerin basit polimer-antijen karışımlarında modellendirilmesiyle mümkün olmuştur.

Bu bölümde *in vitro* şartlarda PE’lerin biyopolimerlerle karşılıklı etki mekanizmasının incelenmesi ve elde edilen immunolojik sonuçların fizikokimyasal parametrelere bağlılığının karşılaştırmalı yapı analizi ve “yapı-fonksiyon” ilişkisi verilmiştir.

5.5.1 Polielektrolit Komplekslerinin İmmunojenliği

Doğal olmayan polielektrolitler olarak sentezlenmiş ilk suni antijen, poli-2-metil 5-vinil-piridin ile trinitrofenol moleküllerinin elektrostatik yolla etkileşerek oluşturduğu kompleksir.



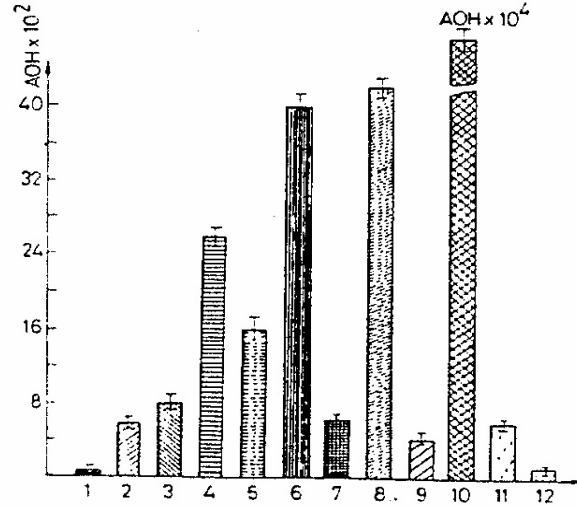
Şekil 5.1 Poli-2-metil 5-vinil-piridin ve trinitrofenol kompleksi

Bu suni antijen kullanıldığında immun cevabı algılamak için ilave yardımcıları (adjuvant) kullanılması gerekmez, timusu olan veya olmayan hayvanlarda antikor oluşumunun uyarılması sağlanır.

Doğal olmayan polielektrolit taşıyıcılarında oluşan ikinci tip yapay antijen, kooperatif elektrostatik ve hidrofob bağlarla kararlı hale gelen protein antijenlerinin polielektrolit kompleksleridir (Kabanov vd., 1978). İlave yardımcıları olmadan bir defa enjekte edildikten sonra bu kompleksler proteine spesifik antikorların sentezine uyarlanmıştır ve sonuçta immun cevabın I_r (immun respons) genlerinin kontrolüne ve timusa bağlı olmadığı görülmüştür (Petrov vd., 1992). Buna ilave olarak efektif aşı etkisi gösterilmiştir. Polielektrolit kompleksleri içerisinde zıt immunolojik etki ile karakterize edilen türler vardır. Bunlar serbest protein antijenleri ile karşılaştırıldığında çok küçük immunojenliğe sahiptirler (Petrov vd., 1992).

Bu bölümde protein antijenlerinin polielektrolit kompleksleri (PEK) esas alınarak yapay immunojenlerin oluşumunun fizikokimyasal kriterleri verilmiştir. PEK'in yapısı ile (devamlılığının-stabilitesinin, yükünün, ölçülerinin, konformasyonunun ve diğer fizikokimyasal parametrelerinin) immunolojik aktifliği arasındaki bağlar analiz edilmiş, polimer bileşimli immunojenlerin model yapısı verilmiştir. Önerilen fikirler PEK'lerin mekanizmasını açıklamakta ve önceden belli immunolojik aktifliğe sahip polielektrolit komplekslerinin sentezi için bilimsel yollar göstermektedir.

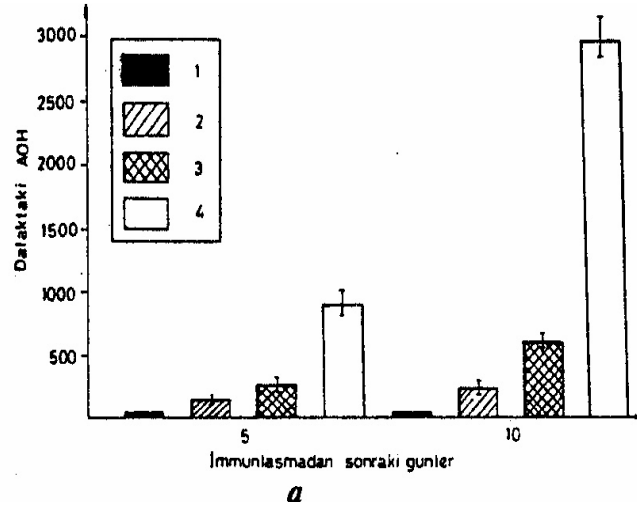
Şekil 5.2'de model protein-sığır serum albumin (BSA)'nın çeşitli PE'lerle karışımının sulu çözeltilerinin immunolojik olarak incelenmesinden elde edilen sonuçlar verilmiştir.



Şekil 5.2 PE-BSA karışımı ile immunlaştırılmış farelerin dalak hücrelerindeki BSA-spesifik AOH' lerinin birbirlerine göre miktarları;

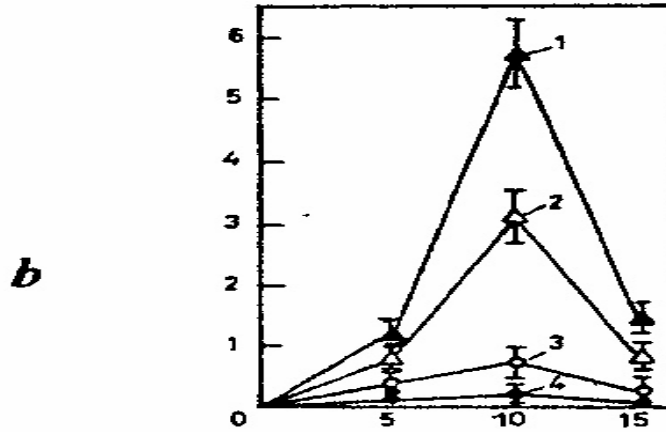
- 1) saf BSA; 2) PVP+BSA; 3)PVP-R₁₆+BSA; 4) (PVP-R₂+BSA) suda; 5) (PVP-R₂+BSA)+0.15 M NaCl;
 6) PVP(R₂,R₁₆)+BSA; 7) PVP(R₀,R_{ac})+BSA; 8) PVP(R₀,R_{ac})+BSA+karbodimid; 9) PAA+BSA;
 10) (PAA+BSA)+karbodimid; 11) PSS Na+BSA; 12) CP(AA+MVP)+BSA

Örnek olarak PVP, PAA, PSSNa ve bunların türevleri gösterilebilir. Görüldüğü gibi karışımların immunojenliği PE'lerin kimyasal yapısına bağlıdır. PE-protein karışımlarında kompleks oluşumunun fizikokimyasal uygunluklarının incelenmesinden elde edilen verilere göre, polimer-protein kompleks partiküllerinin organizma şartlarında kararlılığı, bu komplekslerin immunojenliği için en önemli şartlardan birisidir. Ayrıca prosenin mekanizmasını anlamak için spesifik AOH'nın oluşum kinetiği incelenmiştir. Şekil 5.3'de BSA-PE kompleksleri ile bağışıklanmış farelerin ve tavşanların dalağında yığılan BSA-spesifik AOH'nın kinetiği verilmiştir.



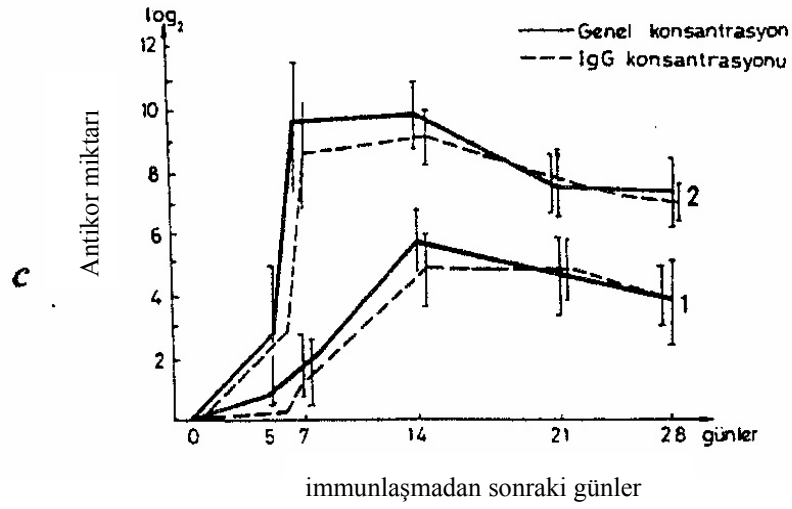
Şekil 5.3(a) Saf BSA veya [BSA+PVP(R_2, R_{16})] ile immünlaşmış farelerin dalak hücrelerinde AOH' ların yığılma kinetiği

1) BSA, 0.05-0.2 mg/hayvan; 2) PEK-1, 0.3 g/dl (0.35 g/dl PE+0.25 g/dl BSA); 3) PEK-2, 0.61 g/dl (0.72 g/dl BSA); 4) PEK-3, 1.22 g/dl (1.44 g/dl PE+1 g/dl BSA)



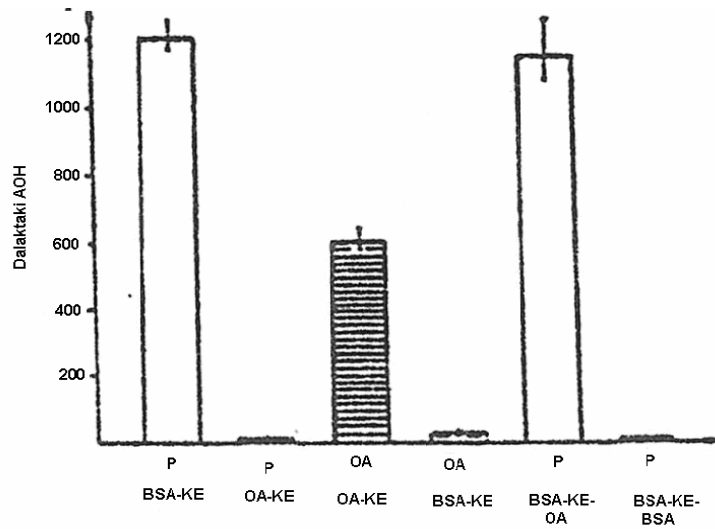
Şekil 5.3(b) BSA-PE kompleksi ile immünlaşmış farelerin dalak hücrelerinde BSA-spesifik AOH' ların yığılma kinetiği

1) BSA-PVP(R_0, R_{ac}); 2) BSA-PVP (R_2, R_{16}); 3) BSA-PVP- R_2 ; 4) Saf BSA



Şekil 5.3(c) BSA(1) ve PVP (R₂,R₁₆)-BSA(2) ile immunlaşmış tavşanların kan serumunda toplanmış AOH' lerin kinetiği.

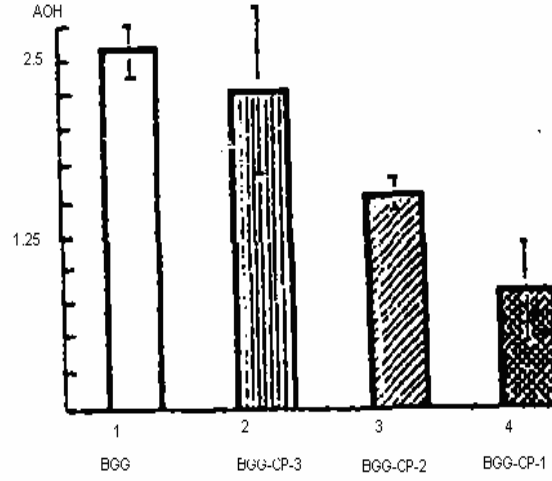
Görüldüğü gibi reaksiyonun dinamiği immünize edilmiş antijenin yapısına bağlı olarak immun cevabın genetiğinde etkisini göstermiştir ve 10 gün sonunda maksimum değer elde edilmiştir. AOH kullanılan proteine spesifiktir ve bunların tayini ancak BSA-KE'nin (OVA-KE ile oluşmaz) test antijeni olarak kullanılmasıyla mümkündür. AOH'nin aktivitesi agar üzerine BSA ilave edildiğinde tamamen yok edilebilir. Bu sonuçlar Şekil 5.4'de verilmiştir.



Şekil 5.4 BSA+PVP (R₂, R₁₆) ile immunlaşmış farelerin dalak hücrelerindeki AOH'ların spesifikliğin analizi

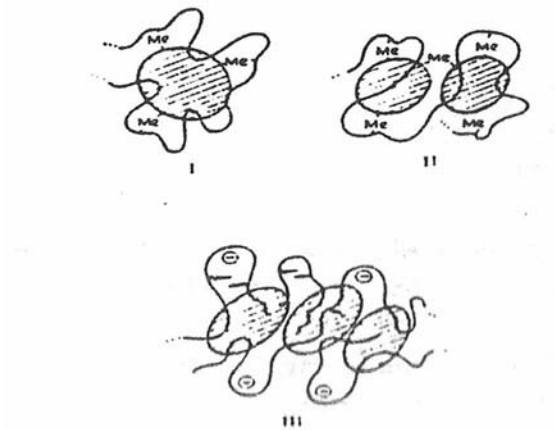
P-BSA+PVP(R₂,R₁₆), PEK-OVA Freund yardımcı ile birlikte verilmiştir.

Şekil 5.5’de protein antijenlerinin lineer poliamfolitler-akrilik asit ve metil-vinil piridin kopolimerleri-komplekslerinin immunojenliği gösterilmiştir. Proteinlerle kararlı kompleks oluşturan kopolimerler için (MVP’nin AA oranı % 55/34’tür) immun cevabının azaldığı görülmektedir.



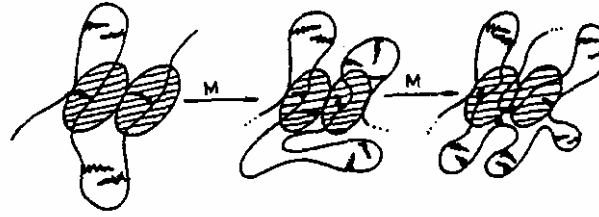
Şekil 5.5 Saf BGG (1) ve bunun CP-3 (2), CP-2 (3), CP-1 (4)’lerle karışımları ile immunlaştığında oluşan immun cevabı (AOH)

Yani bu kopolimerler immun cevabı yok etmektedirler. Bu etkiyi anlamak için sonraki araştırmalarda çeşitli supramoleküler yapılarda karakterize edilen PEK partiküllerinin rolü incelenmiştir. Şekil 5.6’da bu tür partiküllerin yapısı şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 5.6 Proteinlerin CP(III), PMP-I (I) ve PMP-2 (II) ile komplekslerinin yapısının şematik gösterimi.

İmmunolojik deneylerin sonuçları Çizelge 5.1’de verilmiştir. Görüldüğü gibi stokiyometrik yapıli olmayan kompleksler için (bir polimer molekülünde birden çok protein birleşmiştir) spesifik immun cevabın arttığı görülmektedir. Diğer bir polimer protein kompleksi için de analogik etkiler verilmiştir (Şekil 5.7).



Şekil 5.7 BSA’nın çeşitli polimerleşme derecelerinde PVP (R₂-R₁₆) polikasyonu ile kompleksinin yapısı

($\overline{P}_n \cdot 10^3$): 2,15x10³; 7,4x10³ kuaternleşme derecesi setil bromürle % 7-9 mol etil bromürle % 90 mol.

Bu tip polikompleksler hayvanlara enjekte edildiğinde alınan sonuçlar Çizelge 5.2’de görülmektedir.

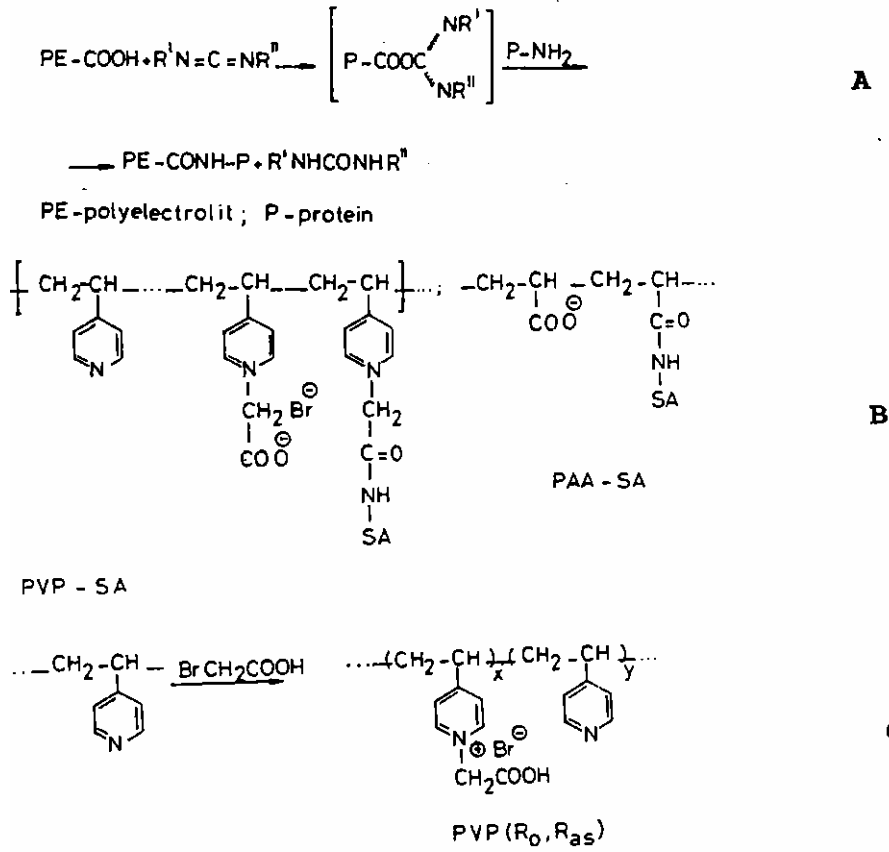
Çizelge 5.1 Serbest SA-GG ve bunların Poli-N-vinilimidazolle polimer metal komplekslerinin enjeksiyonundan elde edilen antikor oluşturan hücrelerin (AOH) miktarı.

Madde	PMK’ya göre doz mg/fare	Proteine göre doz mg/fare	Farelerin miktarı	AOH
BSA	-	0.5	16	35
PVI-Cu ²⁺ -BSA	0.01	0.5	16	incelenmemiştir
(PMCI+BSA) BGG	-	0.5	17	4400±430
PVI-Cu ²⁺ -BGG (PMC1+BGG)	0.01	0.5	16	340±30
PVI-Cu ²⁺ -BSA (PMC2+BSA)	1.0	0.5	18	5000±740
PVI-Cu ²⁺ -BGG (MC2+BGG)	1.0	0.5	18	28000±6500

Çizelge 5.2 Serbest SA ile SA' nın yan hidrofor setil radikalleri ile yüklenmiş poli-4-vinil piridin kompleksinin enjeksiyonundan elde edilen AOH' lerin miktarı

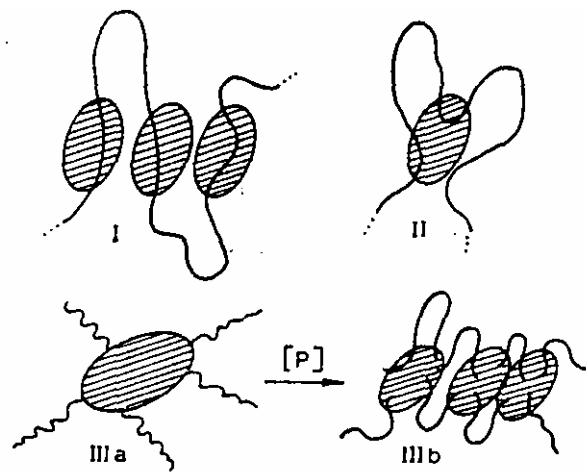
Madde	Polikasyonun (Polimerleşme Derecesi) $P_n, 10^3$	AOH	Farelerin miktarı
BSA	-	25±5.0	18
PVP (R ₂ , R ₁₆)-BSA	1.00	2800±250	17
-''-	2.15	2400±200	17
-''-	4.50	1900±180	18
-''-	7.50	2000±200	16
-''-	12.00	2100±200	18

Görüldüğü gibi yüksek immün cevabın oluşması için kompleks antijenin bileşimi çok önemlidir. Bir polimer taşıyıcısı ile fazla miktarda protein bağlanması immün cevabının artmasına neden olur. Polikompleksin yapısının, immonojenliğine etkisi, PVP-SA ve PAA-SA (B) karışımında karbodiimid ilavesiyle (A) sistematik olarak araştırılmıştır. PVP'nin PVP-CH₂COOH türevleri PVP'nin BrCH₂COOH'la kuaternleşme reaksiyonu yöntemiyle sentezlenmiştir (C) (Şekil 5.8a).



Şekil 5.8a Polikompleks oluşum reaksiyonları

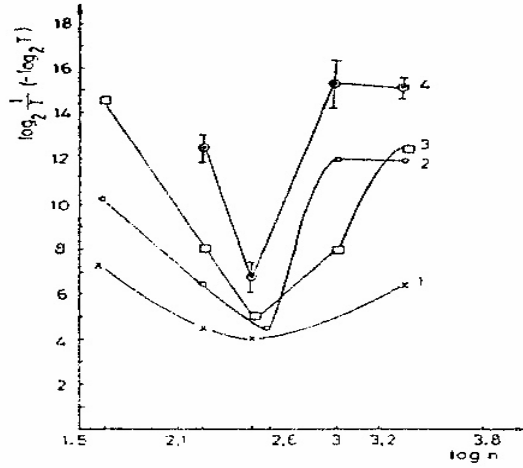
Şekil 5.8b’de bu sistemlerde oluşan kovalent komplekslerin (konjugatların) yapısı şematik olarak gösterilmiştir. Bu sistemlerin immonolojik incelemesinin sonuçları Şekil 5.9’ da verilmiştir.



Şekil 5.8b Kovalent PAA-BSA konjugatının yapısının PAA’nın polimerleşme derecesine bağlı olarak şematik gösterimi

En I 140 (I). 550 (II), 43 (III). III halinde BSA/PAA oranına bağlı olarak iki tür yapı oluşur.

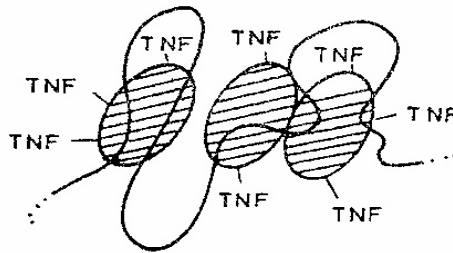
Görüldüğü gibi, stokiyometrik bileşimli konjugat minimum immunojenliğe sahiptir. Molekül ağırlığına bağlı olmaksızın yüksek epitop yoğunluğuna sahip konjugatlar ise daha fazla immunolojik aktivite göstermektedirler.



Şekil 5.9 Kovalent PAA-BSA konjugatı ile immunlaşmış farelerin kanındaki antikor titrelerinin ($-\log_2 7$) (konsantrasyon) polimer zincirinin uzunluğuna (n) bağlılığı:

- 1) Birinci immün cevabı (13 gün); 2,3,4) ikinci immün cevabı: 7(2), 11(3), 10(4) immünlaştıktan sonraki günlerdir. $n=43$ durumunda konjugatın yapısı III b' ye uygundur.

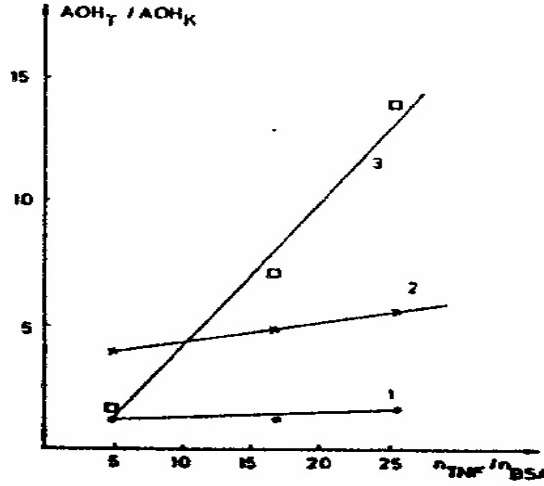
Literatürde belirtildiği gibi PMVP-TNF yapay antijeni sulu ortamlarda çözünmez. Bu sebeple araştırmalarda zorluklar ortaya çıkmaktadır. Mustafaev ve çalışma arkadaşları TNF haptenini PEK' in (PAA-SA) içine almışlar ve suda çözünen üçlü kompleks oluşturmuşlardır (Mustafaev vd., 1989). Şekil 5.10 a' da sentezlenmiş TNF bileşimli üçlü komplekslerin yapısı açıklanmıştır.



Şekil 5.10 a Suda çözünen üçlü PAA-(BSA-TNF) kompleksi yapısının şematik gösterimi

Immunolojik araştırmalar, polielektrolitlerin bu tür yapılı komplekslere göre (TNF (haptent)) yüksek epitop yoğunluğuna sahip kompleksler oluşturmak için de çok önemli olduğunu göstermektedir. TNF haptentler için örnek olarak seçilmiştir.

(Haptent-kendisi taşıyıcısız hiçbir antijenliği ve immunolojik aktifliği olmayan küçük moleküllü organik maddelerdir). TNF' e göre spesifik immün cevabın yüksek oranda arttığı görülmektedir (şekil 5.10 b).



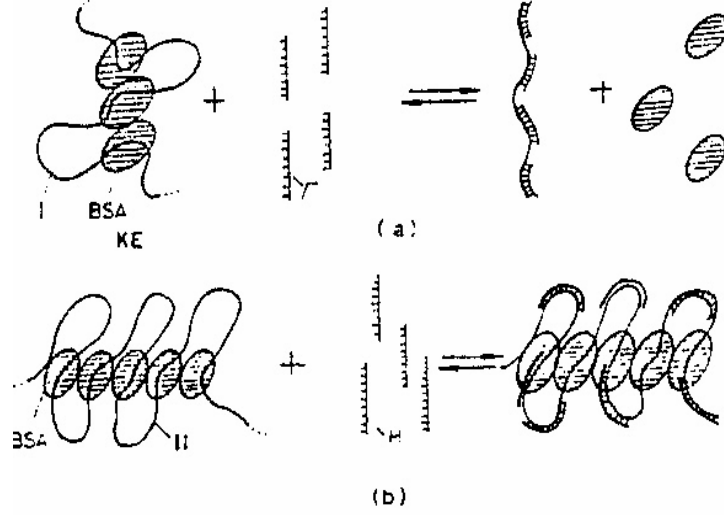
şekil 5.10 b TNF-BSA(1), (TNF-BSA)-AF(2), (TNF-BSA)-PAA(3), konjugatları farelere verildikten sonra TNF gruplarına göre oluşan AOH' lerin miktarının TNF gruplarının miktarına bağlılığı. (AF-Freund adjuvanı: yağ karışımları)

Kana verilen serbest PE' lerin veya antijen-PE komplekslerinin geleceği, bunların plazma protein hücreleri veya diğer yüklenmiş biyokomponentlerle karşılıklı etkileşim karakterine bağlıdır. Model deneylerde bunların immunolojik aktifliğinin amaca uygun şekilde düzenlenmesi oldukça önemlidir.

Bu sorunun zm için iki tür yapay immünojen seçilmiştir (Mustafaev ve Kabanov, 1980). Bunlardan birisi SA' nın PVP (R_2) ile elektrostatik kompleksi (EK), diğeri ise bu proteinin karboksimetilleşmiş PVP ile kovalent konjugatıdır (KK).

nce *in vitro* şartlarında EK ve KK' nın heparin ile birbirinden farklı şekilde karşılıklı etkileşimi olduğu gösterilmiştir. Heparin zltisi EK zltisine ilave edildiğinde heparin, proteini tam olarak EK' dan çıkarır. zltide serbest protein, çöküntüde ise heparin polikasyon kompleksi olur. Heparin zltisi KK zltisine ilave edildiğinde farklı bir durum gözlenir. KK' dan protein çıkarılması meydana gelmez. Protein ile PE arasındaki kovalent bağ

makromoleküller substitusyon reaksiyonunun oluşmasına imkan vermez. Çözeltide kovalent konjugatla heparinin polikompleksi oluşur. Şekil 5.11’ de EK ve KK’ nin heparin ile karşılıklı etkisinin mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 5.11 Elektrostatik kompleksin (EK;a) ve kovalent konjugatın (KK;b) heparinle karşılıklı etkisinin şematik gösterimi

İmmunolojik deneyler fareler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Farelere önce toplardamardan (vena) EK veya KK çözeltileri enjekte edilmiştir. Daha sonra hayvanlara çeşitli zamanlarda heparin çözeltisi verilmiştir. Kompleks veya konjugatla immunize olduktan sonra immun cevabının maksimum pikinden (9 gün sonra oluşan pik) antikor miktarı tayin edilmiştir. Çizelge 5.3’ de elde edilen sonuçlar verilmiştir. Görüldüğü gibi heparin, EK’ nın hemen arkasından veya 30 dakika sonra enjekte edildiğinde vücudun yapay antijene cevabını tam olarak yok etmektedir. Yani heparin EK’ sini vücutta “tutar” ve bunu parçalar, polikasyonla birleşerek proteini serbest hale geçirir. Bu zamanda polikomplekse yönelik immun cevabının başlaması mümkün olmaktadır.

Ancak kontrole göre (yani heparin olmadığından) birkaç kat daha zayıftır. Heparin 24 saatten sonra enjekte ettiğimizde EK’ nın immun cevabına hiçbir etkisi olmamaktadır; yani immun cevabı kontrolde olan değere karşılık gelmektedir. Çizelge 5.3’ de görüldüğü gibi zamana bağlı olmaksızın heparinin KK’ nin immun cevabına hiçbir etkisi yoktur. Gerçektende, heparin KK’ yı vücutta “tutsa” bile onunla üçlü kompleks oluşturarak KK partiküllerinin immun hücrelerinin membranları ile karşılıklı etkileşimine bir etkisi olmamaktadır.

Çizelge 5.3 Immunojen çözeltilerle bağışıklanmış farelerin heparinin vücuda verilme zamanına bağlı olarak dalakta tayin edilen AOH' lerin göreceli miktarı

(AOH deneysel/AOH kontrol)*

Preparat	Verilme zamanı, saat			
	0	0.5	2	24
Elektrostatik kompleks	0	0	0.46	1.08
Kovalent konjugat	0.96	1.04	0.94	1.0

* AOH kontrol hayvanları EK ve KK ile immunulize edildiğinde uygun olarak 3730 ± 232 ve 6276 ± 314 tür.

Bu sonuçlar kompleksin ve konjugatın in vitro şartlarında heparin ilavesiyle alınmış sonuçları ile çok iyi uyum göstermektedir. Elde edilen sonuçlar iki açıdan önemlidir: Birincisi bunlar kanın çeşitli komponentleri varlığında organizma şartlarında makromoleküller arasında substitusyon reaksiyonlarının oluşma imkanının olduğunu göstermektedir. İkincisi, bunlar immun cevabının yapay veya timusa bağlı olmayan antijenlerle bırakıldığı zaman tayin etme yöntemini sağlamaktadır.

İlave protein partikülleri ile PE komplekslerinin karşılıklı etkisine göre PEK lerini iki gruba bölmek mümkündür. Birinci grupta model deneylerde PEK çözeltilerini kanın serum proteinli çözeltileri ile karıştırdığımızda polikompleksin yapısında bulunan serbest polimer bölümleri protein moleküllerini efektif olarak bağlarlar. Böyle PEK' ler yüksek immunojenlikle karakterize edilirler. Bu gruba aynı zamanda proteinlerin aynı (negatif yüklü) PE ile komplekslerini ve konjugatlarını ilave etmek mümkündür. Ancak polikasyon komplekslerinden farklı olarak bu sistemlerde proteinin son arttırılışından sonra sistemde partiküllerin agregasyonu ve çöküntüye geçmesi meydana gelmez, bilindiği gibi böyle konjugatlarda yüksek immunojenlikle karakterize edilirler. İkinci grupta proteinlerin doğrusal poliamfolitlerle kompleksi yeralır. Böyle komplekslerin yapısında serbest polimer bölümleri negatif yüklü olduğundan ilave protein moleküllerini bağlayamazlar. İmmunoloji deneylerinin sonuçları bu tür PE komplekslerinin protein antijenlerine göre çok düşük immunojenliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Eğer önceden polikomplekslerin yapısında serbest polimer bölümlerini ilave proteinlerle "örtersek" PEK' lerin immunojenliğinin değişmesi önemli bir mesele olarak ortaya çıkmaktadır. Bu soruya cevap, polikasyonlarla veba mikrobunun model protein fraksiyonu (F1) ile oluşmuş PEK' lerin immunojenliği araştırılırken belli olmuştur. F1 proteini serum proteinlerinden farklı olarak sulu çözeltilerde intermoleküler asosiasyon oluşturur. Bu

sebepten F1 proteinin polikasyonla kompleks oluşturma mekanizması SA, GG ve diğer proteinlere göre çok farklıdır. Böyle PEK'lerin yapısında serbest polikasyon bölümleri yok demektir. İmmunolojik deneylerin sonuçları gösteriyor ki yapısı “ilmik” tipli organizasyon PE kompleksleri en yüksek immunolojik aktifliğe sahiptirler.

Kompleks partiküllerinin yapısındaki polimer taşıyıcısının protein moleküllerine göre çeşitli “yapışkanlığı” bunların hücrelerle (hayvan eritrositleri ve dalak hücreleri-DH) de karşılıklı etkileştikleri zaman ortaya çıkar (Çizelge 5.4-5.5) (Mustafaev vd., 1990).

Çizelge 5.4 Dalak hücrelerinin-DH ovalbüminin (OA) çeşitli PE ile kompleksinin karışımında floresan DH' nin miktarı

(OA-floresan grupla nişanlanmıştır)

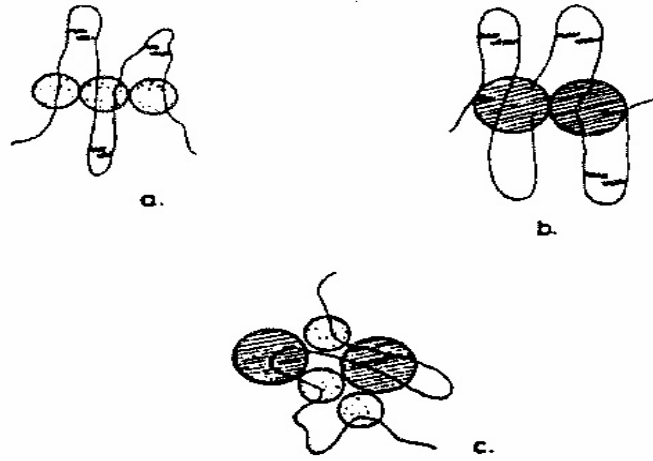
Karışım	Karışım zamanı, dakika			
	5	15	60	120
DH+[PVP(R ₂ ,R ₁₆)-OA]	68	85	90	70
DH+[CP(AA-MVP)-OA]	5	20	22	20
DH+OA	4	5	7	8

Çizelge 5.5 OA' nın ve OA-PE kompleksinin dalak hücrelerinde adsorpsiyonu

MADDE	Spektrofotometrik yöntem (Max değerine göre %)	Radyoizotop yöntemi PEK OA
OA*	55	-
PVP(R ₂ ,R ₁₆)-OA	100	27.972
CP(AA-MVP)-OA	20.33	1.08

* OA' ya göre konsantrasyon 100 pg/ml- PEK/OA adsorbe olan OA' nın PEK' nin yapısındaki miktarının adsorbe olan saf OA miktarına oranı

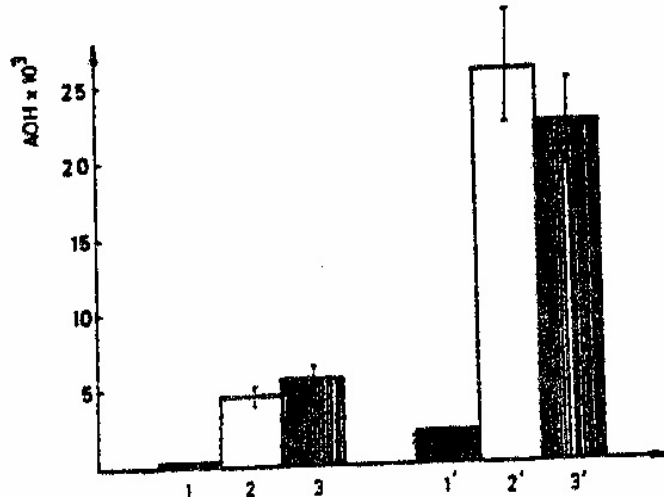
Çok komponentli yapay aşılarda sentezi, aynı zamanda birkaç enfeksiyona göre yapısında birkaç antijen olan aşı komplekslerinin oluşturulmasını gerektirir. Bu durumda polivalent aşılarda yapmak için hangi yöntemin etkin olabileceği, mekanik PEK karışımlarının mı, çok komponentli komplekslerin mi etkin olabileceği sorusu akla gelmektedir (Mustafaev vd., 1992). Bu sorunun çözümünde model antijen olarak PVP (R_2, R_{16})'nin SA ve GG ile kompleksi seçilmiştir. Bu kompleksler literatürde belirtildiği şekilde sentezlenmiştir (Şekil 5.12).



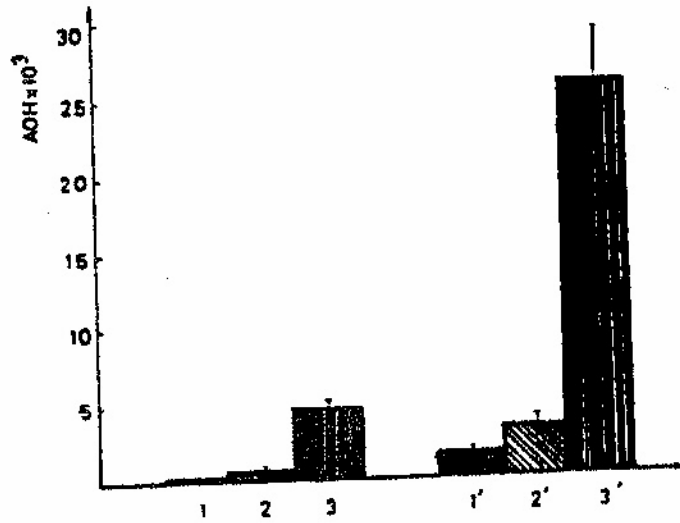
Şekil 5.12 Bireysel PEK-1 (a) ve PEK-2 (b) ve karışım (PEK-1+PEK-2) (c) komplekslerinin hipotetik yapısının şematik gösterimi

Sentezlenmiş kompleksler sonra immunolojik araştırmalar için kullanılmıştır. Bu amaçla iki PEK'nin [(SA-PE)+(GG-PE)] mekanik karışımı hazırlanmıştır.

Böyle karışımlarda her bir kompleksin kendi yapısını koruduğu görülmektedir. SA ve GG komponentlerinden oluşmuş polielektrolit kompleksi yukarıdaki gibi sentezlenmiştir. Immunolojik etkiyi görmek için, kompleksler ve bunların mekanik karışımları ile hayvanlar bağışıklanmıştır (PEK1 PE-SA kompleksini, PEK2 PE-GG kompleksini göstermektedir). Şekil 5.13a'da tek başlarına PEK1 ve PEK2 ve bunların mekanik karışımı ile bağışıklanma sonrası alınmış antikor oluşturuvcu hücrelerin miktarı verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi mekanik karışımındaki her bir PEK'nin immunojenliği pratik olarak değişmemektedir. Yani PEK'ler yapay immunojenler gibi serbest olarak işlev görmektedirler. Bu durumda antijen rekabeti oluşmaz. İki bileşenli karışım yapıları kompleks (Şekil 5.12c) enjekte edildiğinde tamamiyle farklı bir sonuç alınmıştır. Şekil 5.13.b'de bu tip komplekslerin enjeksiyonundan alınmış antikorların miktarı gösterilmiştir.



Şekil 5.13a BSA (1), BGG (1'), bireysel kompleksler PEK1 (2), PEK2 (2') ve bunların mekanik karışımı ile (PEK1 + PEK2) immunlaşmış farelerin dalağındak AOH hücrelerinin değerleri



Şekil 5.13b (BSA + BGG (1,1'), (PEK1-PEK2) (II,II') ve (PEK1 + PEK2) (III,III') ile immunlaşmış farelerdeki AOH.

Görüldüğü gibi farelere iki komponentli karışım, kompleksler ile birlikte (PE-BSA-GG) enjekte edildiği durumdaki proteinlerin immunojenliği, her bir PEK'inin mekanik karışımının verildiği durumdakine göre daha azdır. Böylece serbest PEK'nin mekanik karışımının (PEK1+PEK2) enjeksiyonunda daha fazla immun cevap görülmüştür. Alınan immünolojik sonuçların fizikokimyasal temeli, PEK'nin yapısında olan serbest polielektrolit bölümlerinin yüklü hücre membranları ile kooperatif ilişkisine uygundur. Alınan sonuçlar, aynı zamanda

çeşitli enfeksiyonlara karşı çok komponentli aşılarda yapılması ve bunların etki mekanizmasının anlaşılması açısından önem taşımaktadır.

5.5.2 Polielektrolit Kompleksleri-Yapay Aşılar

Son yıllarda yapılmış araştırmalar model antijenlerin yanı sıra (GG, SA-OA v.s.) mikrop ve bakteri antijenlerinin polielektrolit komplekslerinin fazla immünolojik aktifliğe sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 5.6; 5.7). Örnek olarak tüberkülozun protein antijeni (PPD), H-antijeni, Salmonel, grip antijeni, menenjit mikrobunun B-polisakkariti, α -fetoprotein ile (kanser antijeni) polikasyonların kompleksleri serbest antijenlerden karşılaşırsa daha yüksek immünolojik aktiviteye sahiptirler (Mustafaev ve Norimov, 1990; Petrov vd., 1992). PEK'ler timusa bağlı antijenleri timusa bağlı olmayan immünojenlere çevirme imkanı sağlamaktadırlar. (Çizelge 5.8). Bir kat enjekte edildikten sonra ilave yardımcılarından yararlanmadan güvenli immünolojik hafıza meydana getirirler (Çizelge 5.9). Böyle PEK'ler aynı zamanda yüksek koruyucu aktifliğe sahiptirler ve bunlar temel alan yapay aşıların sentezlenmesinde büyük olanak sağlarlar.

Çizelge 5.6 Serbest BGG, tüberkülozun protein türevi (PPD) ve bunların PVP (R_2 , R_{16}) kompleksleriyle immünize edilmiş farelerin dalağındaki antikor oluşturan hücrelerin (AOH) miktarı.

Preparat	AOH	Farelerin sayısı
BGG	5000±5.35	18
PVP(R_2 , R_{16})-BGG	100000±15000	18
PDD	25±5.0	18
PVP(R_2 , R_{16})-PPD	25000±2000	18

Çizelge 5.7 Ovalbumine (OA) karşı olan Ig-E'nin titresi (miktarı)
(Fareler OA ve OA' nın PEK si ile immunize edilmişler)

Sayısal	IgE' nin titri ($\log_2/T$)	
Oran N_{OA}/N_{PE}	PVP(R ₂ ,R ₁₆)-OA* $\beta \approx 5 \text{ mol}\%$	PVP(R ₂ ,R ₁₆)-OA $\beta \approx 7 \text{ mol}\%$
2.0	6.6	7.8
3.8	5.6	5.5
4.0	4.0	5.1
5.0	3.4	4.0
6.0	4.0	3.5
8.0	3.0	4.8

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

Çizelge 5.8 Normal ve timusu olmayan farelere SA, GG ve bunların kuaternleşmiş poli (4-vinil-piridin) ile kompleksleri verildiğinde oluşan immunolojik aktiflik.

Farelerin gen tipi	İmmunojen	Dalakta protein spesifik antikorların miktarı	Farelerin sayısı
C57BL/6(+/+)	BSA	25±10	6
C57BL/6(+/+)	BSA-PVP(R ₂ ,R ₁₆)	2500±400	6
Nude (nu/nu)	BSA	-	3
Nude (nu/nu)	BSA-PVP(R ₂ ,R ₁₆)	600±100	5
C57BL/6(+/+)	BGG	2500±400	6
C57BL/6(+/+)	BSA-PVP(R ₂ ,R ₁₆)	3500±200	6
Nude (nu/nu)	BGG	200±20	5
Nude (nu/nu)	BSA-PVP(R ₂ ,R ₁₆)	20000±2500	5

Çizelge 5.9 Farelerde serum albumine karşı olan ikinci immun cevabı

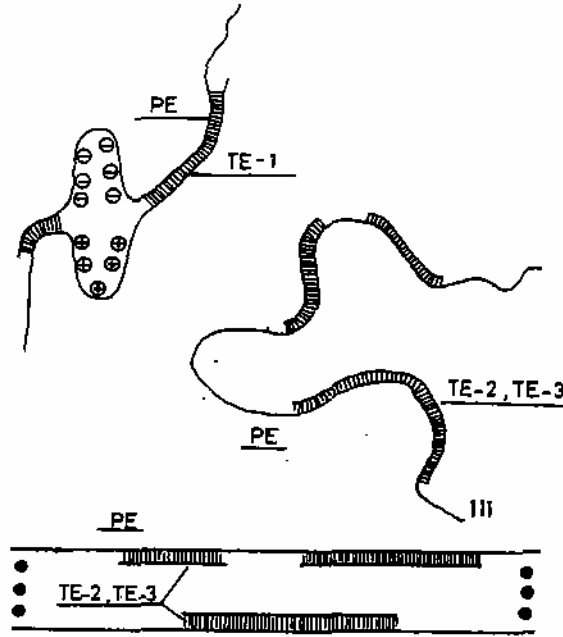
İmmunlaştırma	Farelerin sayısı	Birinci veya ikinci immünlaştırmadan 7 gün sonra AOH miktarı	
Birinci		IgM	IgG
BSA	18	23,5±2	5.5±2
BSA	11	20±4	6±2
PVP(R ₂ ,R ₁₆)-BSA	15	3840±470	3990±300
PVP(R ₂ ,R ₁₆)	14	5920±720	7450±680

Fareler önce SA ve bunun kuaternleşmiş poli-4-vinil piridin kompleksi ile immunize edilmişler.

Aşağıdaki bölümlerde pratik önemi olan antijenlerin PEK'leri esas alınarak yapay antijenlerden yapay aşılara geçme yolları ele alınmıştır.

5.5.2.1 Tüberküloz Enfeksiyonu Modelinde PEK'ler

İncelemeler için Tod metoduyla elde edilen protein antijeni (PT) ve mikrobakterilerin hücre yüzeyindeki kuru antijenler kullanılmıştır. Fraksiyonlaştırılmamış Triton ekstraktı (TE) ve bunun üç fraksiyonu 150 KD molekül ağırlıklı (TE1), 40-70 KD'lu (TE2) ve 10-30 KD (TE3). Polielektrolit taşıyıcı olarak PVP (R₂), PVP (R₂, R₁₆), PAA ve CP (AA-VPD)den yararlanılmıştır (Şekil 5.14).



Şekil 5.14 Mycobacteria hücrelerinin yüzeyinden alınmış proteinlerin (Triton ekstratı) ve PAA komplekslerinin hipotetik şeması

İmmunolojik deneylerin sonuçları Çizelge 5.10’da gösterilmiştir. Tablodan görüldüğü gibi PEK’ler ve kovalent konjugatlar her iki durumda TPT’nin immunojenliğini 10-20 kat yükseltirler.

Çizelge 5.10 TPT proteini ve bunun kuaternleşmiş poli 4-vinil pirdin ile kompleksi ile immunize edilmiş farelerde TPT spesifik antikor oluşturan hücrelerin miktarı.

Preparat	Dalakta AOH Miktarı ($M^0 \pm m, I_p=0.05$)		
	6.gün	10.gün	14.gün
TPT	364.4 ± 66.6	708.9 ± 126.0	4130 ± 152.0
PVP(R ₂)-TPT	8240 ± 190.2	3208.0 ± 256.0	1920.0 ± 256.0
PV(R ₂ ,R ₁₆)-TPT	392.4 ± 542.2	15558.0 ± 1120.0	6971.0 ± 1632.0
PVP(R ₂)	160.0 ± 42.1	132.1 ± 79.8	100.0 ± 44.0
PV(R ₂ ,R ₁₆)	226.0 ± 50.6	274.2 ± 61.6	160.0 ± 74.0
Kontrol	48.0 ± 16.2	100.0 ± 42.1	84.0 ± 12

Aynı zamanda yapısında tüberküloz antijeni olan kompleks ve konjugatla farelerin immünizasyonu sonrasında hücre immunitésinin aktif situmulasyonu görülmektedir (Çizelge 5.11).

Çizelge 5.11 TPT proteini ve bunun PAA ile konjugatı ile bağışıklanmış farelerin tabanındaki tüberküline göre reaksiyon

(fareler virulent H37 RV ile zehirlenmiştir)

Preparat	Tüberkülin ile reaksiyon, mm		
	Aşılama 2. hafta	4. hafta	6.hafta
TPT	0.1	0.4	0.1
TPT-PAA	0.5	0.8	0.35
Kontrol	0	0.35	0

Böylece yapısında tüberküloz koruyucu olan PEK ile immunlaşma, deney hayvanlarının organizmasında gerekli hücre ve humoral immun cevabı oluşturuyor. Böyle PEK'lerin hayvanların sonradan uygun değişen kültürlerle zehirlenmesinde mikroba karşı koruyucu etki gösterdikleri düşünülebilir. Immunolojik deneylerden alınan sonuçlar Çizelge 5.12'de gösterilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi sistemde polimer taşıyıcıların kullanılması, proteinlerin koruyucu etkisini % 126-127 oranında artırır. Kontrol edilen gruba göre hayvanların ortalama yaşam süresi 10-18 günü geçmektedir.

Çizelge 5.12 Farelerin Tüberküloz antijeni ve bunların PAA türevleriyle aşılmasından sonra ortalama yaşama süresi

(Fareler H37Ru mikrobakterisinin çeşitli dozlarıyla zehirlenmişlerdir)

Preparat	Doz pq	Zehirleme dozu, mg					
		0.1		0.05		0.025	
		Günler	%	Günler	%	Günler	%
Kontrol	-	17.6±0.44	-	23.67±1.3	-	26.5±4.25	-
TPT	100	-	-	24.5±1.2	101	42.33±4.12	-
PAA-TPT (Kovalent konjugat)	100	-	-	29.0±0.7	126	39.36±2.53	148
PAA-TPT	100	28.67±2.62	163	-	-	44.07±2.7	167
(Kompleks)	450	-	-	-	-	55.22±1.13	-
BCG(canlı)	450	29.8±1.11	169	-	-	-	-
PAA	450	18.7±1.8	169	-	-	-	-

Üçlü komplekslerin B-farelerde koruyucu aktifliğini incelemek için CP(AA-VPD)-Cu²⁺-BCG kompleksinden yararlanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5.13’de verilmiştir.

Çizelge 5.13 BCG protein fraksiyonunun üçlü polimer metal kompleksinin koruyucu aktifliği.

Denek grupları	İmmünizasyon için istifade edilmiş antijen mataryeli		Sağ kalan hayvanların yüzdesi
	BGG	BCG-Cu ²⁺ -CP(AA-VPD)	
B-farelerB-fareler immunlaştırılmamıştır	-	-	(0/12)0
A)	+	-	(1/15)6.6
B)	-	+	(23/27)85

2 mg canlı BCG aşısını verdikten 2 ay sonra bütün kontrol B-fareler ölmüşlerdir. Aynı zamanda üçlü kompleksle immünize edilmiş farelerin ise % 85’i sağ kalmıştır. Böylece ilk defa olarak tüberküloz protein antijeninden AA ve VP kopolimerlerinden ve Cu²⁺ iyonlarından yapılmış yüksek immunojen ve koruyucu etkisine sahip olan üçlü kompleks sentezlenmiştir.

5.5.2.2 Grip İnfeksiyonu Modelinde PEK’ler

Grip infeksiyonu modelinde PEK’lerinin koruyucu etkisini öğrenmek için antijen olarak grip virüsünün yüzey antijenleri – hemaglutinin (HA) ve nevraminidaza (NA) kullanılmıştır.

Polimer taşıyıcı olarak toksik olmayan kopolimer CP (AA-VPD), birleştirici ajan olarak ise Cu²⁺ iyonu kullanılmıştır. İmmunolojik deneyler için yukarıda gösterilen metodla sentezlenmiş suda çözünen üçlü polimer-metal kompleks CP (AA-VPD)-Cu²⁺-E (E=HA+NA) kullanılmıştır. Antijen cevabının seviyesi immune enzim metoduyla (ELISA) öğrenilmiştir. Hayvanlar zehirlenmeden iki hafta önce “peritenium” olarak hemaglutinin ve neyraminidaza veya bunların PE ile üçlü kompleksleri ile immünleştirilmiştir. Çizelge 5.14’de üçlü polimer metal komplekslerinin immunojenliği verilmiştir.

Çizelge 5.14 Grip virüsünün yüzey antijenlerinin karışımının üçlü polimer-metal komplekslerinin immunojenliği.

İmmunojenler	Antikor türleri	
	IgM	IgG
Kontrol	160	160
E=(NA-RA)	640	640
E-Cu ⁺² -CP2	10240	20960
E-Cu ⁺² -CP3	10240	20480

Tablodan görüldüğü gibi kompleksler serbest antijenlerle karşılaştırıldığında çok fazla miktarda virüs spesifik antikorlar oluşturmaktadırlar.

Çizelge 5.15’de temiz E protein karışımının ve bunun üçlü kompleksinin koruyucu etkisinin incelenmesinden alınan sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 5.15 Yüzey antijenler karışımı ve üçlü polimer metal kompleksleri ile immünize edilmiş farelerin ciğerindeki Pr₉₄ patojen virüsünün üreme sıklığı.

	Antijen materyali		Ciğerde virüsün üreme seviyesi
Deney grupları	E	CPI-Cu ⁺² -E	IgEID ₅₀
Deney (İmmünize edilmemiş hayvanlar)	+	-	8.2 1.6
İmmünize edilmiş hayvanlar			
A)	+	-	6.8 2.4
B)	-	+	2.4 0.6

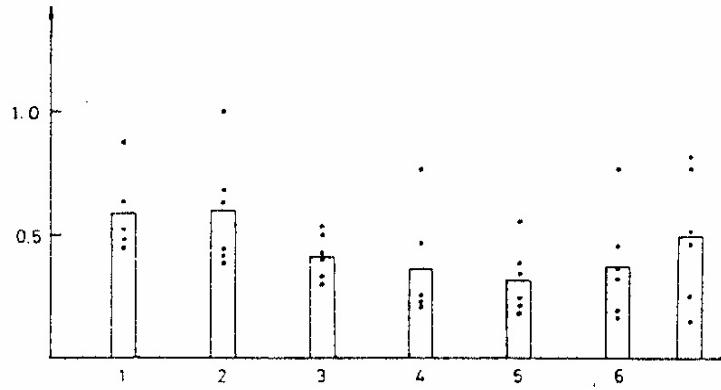
Tabloda görüldüğü gibi hayvanlar grip virüsünün yüzey glikoprotein antijenlerinin kopolimerlerle üçlü kompleksleriyle immünize edildiğinde homolitik virüsün yeniden üremesi prosesi kesin olarak engellenir.

5.5.2.3 Antiferil Etkili PEK'leri

İnsan ve hayvan doğumunun düzenlenmesi ve kontrolü için aşı preparatlarının oluşturulması problemi ve bunların etki mekanizmasının incelenmesi modern halk sağlığı açısından çok önemlidir. Bu problem Asya ve Afrika ülkelerinde ve özellikle de Hindistan ve Çin'de aktüeldir. Kontrol için yararlanılan metodlardan immün sistemiyle bağlı çareler (ilaçlar) kullanılır (İmmunocontro-septif-ilaçlar). Böyle preparatlarla insan ve hayvanı kısmen veya tam olarak (ilacın immünolojik aktifliğine bağlı olarak) sterilileştirmek mümkündür. Bundan başka böyle aşılar hormona bağlı hastalıkların tedavisi için de kullanılabilir (Talwar, 1983; Mustafaev vd., 1989).

Hindistan'ın Milli İnnünoloji Enstitüsünde hamileliğe karşı aşı yapmak için hormon preparatının alınması, kimyasal yapısının ve fonksiyonel aktivitesinin incelenmesi sayesinde büyük başarılar elde edilmiştir. Bu hormon β -PLH (ovine luteinizing hormone) ineklerin kanından elde edilir, protein yapısındadır, baz karakterdedir ve nötral su ortamlarında çok zayıf immünojenliği bunların aşı preparatı yapmak için kullanılmasını engeller. 1988-1990 yıllarında Mustafaev (Moskova, İmmünoloji Enst.) ve Talvar (Hindistan İmmünoloji Enst.)'ın birlikte ortaya çıkardıkları incelemelere göre β -OLH proteinin sentetik PE ile sentezlenmiş ikili ve üçlü kompleksleri esasında büyük ve etkili immünojenler yapılmıştır.

Kompleks oluşumu için iki tür kopolimer kullanılmıştır: CP(AA-VPD)(CP1) ve CP(MA-VPD)(CP2)(MA=Maleik anhidrit). Bu kopolimerler ve β -OLH proteini esasında Cu^{2+} katılmasıyla üçlü kompleksler sentezlenmiş ve bunların immünojenliği araştırılmıştır. Beyaz iri fareler proteine göre 0.5 mg (0.3 mL) dozda üçlü komplekslerle immünleştirilmiştir. Kontrol için β -OLH difteri toksiti konjugatı kullanılmıştır. İmmünlaşmadan dokuz gün sonra farelerden kan alınmıştır. Kandaki antikorların miktarı işaretlenmiş (belirlenmiş) antijenleri I^{125} -antijen kullanılarak radyoimmün analiz metodu ile incelenmiştir. Birinci immün cevabının incelenmesinden alınan sonuçlar Şekil 5.15'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi kullanılan bütün üçlü kompleksler için polielektrolit kompleksin yapısında olan protein hormonuna göre spesifik immün cevabı keskin olarak artmıştır.



Şekil 5.15 β OLH hormonu üçlü polimer metalik kompleksleri ile immunlaştırıldıktan sonra oluşan immün cevabı

CP1+ Cu^{+2} + β OLH; 1($\text{C}_p/\text{C}_{\text{CP}}=2$, $[\text{Cu}^{+2}]/[\text{COOH}]=0.1$); 2($\text{C}_p/\text{C}_{\text{CP}}=4$, $[\text{Cu}^{+2}]/[\text{COOH}]=0.1$); 3($\text{C}_p/\text{C}_{\text{CP}}=4$, $[\text{Cu}^{+2}]/[\text{COOH}]=0.25$), CP2+ Cu^{+2} + β OLH : 1($\text{C}_p/\text{C}_{\text{CP}}=2$; $[\text{Cu}^{+2}]/[\text{COOH}]=0.1$); 2($\text{C}_p/\text{C}_{\text{CP}}=4$; $[\text{Cu}^{+2}]/[\text{COOH}]=0.1$); 3($\text{C}_p/\text{C}_{\text{CP}}=4$; $[\text{Cu}^{+2}]/[\text{COOH}]=0.25$)

Kontrol konjugatı β OLH –TT(Titanus toksoit)

Belirtmek gerekir ki, kontrol konjugatı ile karşılaştırıldığında alınan immün cevapları eşit ya da daha yüksektir. β -OLH proteinin kendisi yüksek immunojenliğe sahip değildir, kompleks oluşumu teknolojik olarak basittir, kopolimerler toksik değildir ve düşük molekül ağırlığındadırlar ($M_w=10-30$ kDa). Bu sonuçlar göz önüne alındığında, kullanılan metot gelecekte canlı organizmaların doğum kontrolü ve düzenlenmesi için pratik antifertil aşılarda üretilmesinde önemli imkanlar sağlayabilir (Mustafaev, 1996).

5.6 Diğer Uygulamalar

Antijenlere karşı bağışıklık yanıtının artırılmasında aşı geliştirilmesi uygulamalarıyla Polidikarboksilatofenoksifosfazen (PCPP) immunostimulan polifosfozan polielektrolit örneğidir. Andrianov vd. (2005), polimerlerin antijenlerle etkileşiminde bir model sistemi olarak BSA ile PCPP arasındaki kompleksasyonu kullanmıştır. In vivo çalışmalar BSA ile hazırlanan formüllerle karşılaştırıldığı zaman BSA-PCPP kompleksleriyle hazırlanan formüllerle bağışıklık kazandırıldığı zaman serum antikor seviyelerinde bir artış göstermiştir. Lasitol, laktoz, maltilol ve süktroz gibi hidroksil içeren bileşiklerle birleşen enzim-polielektrolit komplekslerinin daha güçlü bir stabilizasyon etkisi olduğu bulunmuştur. Enzim stabilitesinin artırılması için enzim yapısının çevresinde bir elektrostatik “moleküler kafes”

önerilmiştir. Bu tür etkilerin dehidratlı enzimatik olarak aktif aşılarda üretimini geliştireceği de önerilmiştir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada sunulan verilerle, polielektrolit-protein komplekslerinin oluşumları, yapıları, kullanım alanları hakkında bilgiler sunulmuştur. Yapılar verilirken aynı zamanda, polimer yapısı doğal ve sentetik açıdan da ele alınmıştır. Kompleks oluşumların bazı özellikleri ve uygunlukları tartışılıp, sentetik bileşik modelleri önerilmiştir. Böyle sistemlerde kompleks oluşum reaksiyon çalışmaları anlatılmış ve çok çeşitli güncel fiziko kimyasal metodların uygulanabileceği gösterilmiştir.

Çeşitli proteinlerin genel bir mekanizmaya göre polielektrotlarla çözünebilen kompleks maddeler oluşturdıkları bir gerçektir. Polimerik taşıyıcının kimyasal doğasına ve çevre koşullarına bağlı olarak iki tip polimer-protein kompleksleri oluşturulabilir.

Çok iyi bilinen polimer kimyası metotlarıyla sentetik polielektrolitler sentezlenebilirler. Homojen ve heterojen fazda serbest-radikal polimerizasyonu, iyonik polimerizasyon, polikondenzasyon, poliadisyon ve polimer modifikasyonu sentez yöntemlerindendir.

Sentetik polielektrolitler hem bilimsel hem de teknik alanda gittikçe daha çok ilgi uyandırmaktadır. Polimerlerin hem etkinlik hem de özgünlüğünü geliştirmek için ürün ve proseslerin optimizasyonu gelecek endüstriyel araştırma başlıklarını oluşturmaktadır. Hem ürünün hem de prosesin ekolojik uygunluğundaki artış çok önemlidir. Bu iş pazarda bulunan polielektrolitlerden oldukça farklı olan yenilerinin geliştirilmesiyle ve heterofos polimerleşme prosesi kolloid bilimi kurallarının araştırılmasıyla bağlantılıdır.

Temel sentetik araştırmalarının en önemli amacı, iyi belirlenmiş moleküler yapıya sahip polielektrolit elde etmektir. Anyonik ve katyonik monomerin kopolimerlerinde olduğu kadar iyonik ve noniyonik monomerlerin düzenli yapıları, tanımlı iyonik ve noniyonik sıralamalı blok kopolimerleri, yükleri omurgada veya yan zincirlerde taraklı dallanmış polielektrolitler ve yıldız tipli ve yıldız patlama dallanmış polimerler gittikçe artan oranda ilgi çeken makromolekül tipleridir. Moleküler yapının sistematik değişimi, polielektrolitlerin moleküler yapılarıyla çözelti içindeki, katı durumdaki ve çözünmüş moleküllerle, askıda maddelerle veya katı yüzeylerle etkileşimleri sırasındaki anahtar özellikleri arasındaki ilişkiyi iyi bir şekilde anlamayı sağlamaktadır.

Doğal polimer bazlı PE elde edilmesi için ise, fiziksel işlemle doğal ürünlerden ayrılma, önceden oluşmuş iyonik bölgelerin “kimyasal” serbest bırakılmasıyla birleştirilmiş “fiziksel” izolasyon ve daha önceden ayrılmış ve saflaştırılmış noniyonik polimerin anyonik veya

katyonik PE'e kimyasal türevlendirilmesi gibi yollar mevcuttur.

Bu yollarla nükleik asit, protein, polisakarid ve lignin alanında elde edilmiş ürün sınıfları kısaca anlatılmıştır.

Doğal polimer bazlı PE için gelecek tahmini oldukça belirsizdir. Bir taraftan genel olarak iyi bir biyogeçimlilik, kullanımdan sonra oldukça kolay elden çıkarılabilirlik ve birçok durumda özellikle beslenme ve eczacılıkta son kullanım gereksinimlerini karşılamada vazgeçilmez kılan eşsiz özellikler sebebiyle çok çekici avantajlarla ve değerlerle karşılaşmaktayız. Diğer yandan “doğal PE” fiziksel bir ayırma işlemiyle elde edilse bile son kullanım olarak eczacılık ve beslenme amaçlanmaktaysa sadece “doğanın bir armağanı” olarak kabul edilemez; hasat, işleme ve özellikle saflaştırma için hatırı sayılır bir iş gücüne ihtiyaç vardır. Bu özelliklerle canlı sistemlerin ek bileşenleri (örneğin yüksek pazar fiyatlarının sentetik ikame araştırmalarını teşvik ettiği özel bitki sakızları ve heparin) için geçerlidir. Bunların yanında, nihai ürün kalitesinde tekdüzelik elde etme çabalarına karşılık genel olarak doğal ürünler oldukça geniş bir yapı ve ürün özellik çeşitliliğine sahiptir. Ayrıca, biyoteknolojide meydana gelecek gelişmelerin bu kusurlarla hangi ölçüde başa çıkacağı hala açıkta kalmış bir sorudur.

Gelecekte sayısız zorunlu özelliklerin sürekli olarak sağlanabilmesi için doğal PE'in fiziksel ayırımı ve saflaştırılması işlemlerine devam etmek gerekli olacaktır ama yeterli özellikte sentetik ürün rekabeti devam edecek ve hatta artacaktır. Fiziksel ayırma ve kimyasal modifikasyon işlemlerinin birleştirildiği ikinci yolda kalınlaştırıcı, jelleştirici madde veya yapışkan gibi bazı çözünür PE elde etme daha hakim olacaktır ama araştırma ve gelişmeler burada daha çok üretim işleminin kimyası yerine yapı ve özelliklerin fizikokimyasal problemleri üzerine yoğunlaşmıştır. Jelatin, pektin veya alginat örnek olarak gösterilebilir.

Üçüncü yol, ayrılmış ve saflaştırılmış doğal polimerlerin özel ve yararlı özellikte çözünür PE yeni sınıflarına türetilmesi yakın gelecekte polimer kimyasına (özellikle polisakkarid alanında) bir meydan okuma olacaktır. Selüloz burada en bilinen örnektir. Yüz yıllık bir araştırmaya rağmen reaksiyon ortamı olarak yeni selüloz çözeltisi kullanılarak, düşük moleküler organik kimyada elde edilmiş yeni bilgiler transfer edilerek ve ürün özellikleri üzerindeki sonuçlarıyla bölge seçimli türevlendirmenin potansiyelini tüketilerek PE dahil bilinmeyen türevler hazırlamak için bugün yeni yaklaşımlar ortaya çıkmaktadır. Nişasta ve hemiselüloz veya lignin gibi diğer doğal polimerlerle türevlendirme üzerine sistematik çalışmalar hala olmadığı için bu tip bir yaklaşım daha uygun kabul edilebilir. Son olarak, pazardaki ürün rekabetine rağmen doğal yanında sentetik polimer kimyasal modifikasyonu

PE sentezi bilimsel değişim ve işbirliğini teşvik eden ve bir varlık olarak polimer kimyanın bütünleyici bakış açısına katkıda bulunan birçok ortak özelliği vardır.

İki bileşenli polimer-protein sistemlerin çalışması içinde kullanılan yaklaşım ve metodoloji, çoklu bileşen sistemlerinde oluşan karşılıklı etkileşim sırasında çok önemli bir rol oynar. Kendi kendine organize olabilen çözeltilerde makromoleküler değişim ve yerine kullanmanın kompleks karışımlarda da olduğu gösterilmiştir. Bu koşullar altında reaksiyon dengesine daha çabuk, neredeyse reaktif karışımın hızında ulaşılır. Belirli bir biçimde, oluşum modu, yapı ve bileşim iyonik güç ve ortamın pH ına bağlıdır.

Bu veriler sentetik polimer-protein komplekslerin immünolojik, kimyasal ve enzimolojik çalışmalarda olduğu kadar klinik hekimliğinde de büyük oranda kullanıma elverişli olduğunu gösterir.

Polimer alt birim immunojenlerin yapımı için doğal antijenlerin polielektrolit komplekslerinin kullanımını uygulayan immünolojik çalışmalarda teşvik edici sonuçlar elde edilmiştir; hayvanların değişik enfeksiyonlardan korunmasını amaçlayan etkili aşılama bileşenleri yaratmak için bu kompleksler kaynak olarak kullanılmıştır. Böylece, kararlı komplekslerin içindeki farklı kaynaklı sonuçların polielektrolitleriyle, modelin konjugasyonu (BSA, BGG, OVA, vb), mikrobiyal ve virüslü antijenlerin (B tüberküloz antijen, grip virüsü, Salmonellanın H-antijeni, α -fetoprotein, vb) yüksek miktarda immünolojik aktiviteyle donanmış olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda Gonadotropik hormonların yüksek derecede immünolojik polielektrolit kompleksleriin senteziyle sonuçlanmıştır, ki bunun uygulanması insan ve hayvan doğum kontrolü için tasarlanmış üretkenlik karşıtı aşılar için bir perspektif oluşturacaktır. Bu polikompleksler timüsten bağımsız immünel tepkiler sağlar, immünolojik belleği harekete geçirir ve daha çok etkili bir immünolojik korunmayı oluşturur.

Günümüzün modern koşullarında immünolojideki daha perspektif eğilimlerden birisi, insana enjekte edilen iyileştirme amaçlı protein preparatların (hormonlar, plazma bileşenleri, vb) immünojenliğini hafifletmek için yollar ve araçlar araştırmaktır. Örneğin, diabet melitus hastalarına sürekli insülin enjekte edilmesi duyarlılıklarının artmasına neden olur, yani sırasıyla, ilacın biyolojik aktivitesini azaltır ve allerji gibi yan etkilere yol açar. Buna göre, ilacın biyolojik aktivitesini hafifletmenin çok önemli bir yaklaşım olduğu görülür.

Bununla önerilen polimer-antijen komplekslerin çalışma modelleri antijen polielektrolit partiküllerin “mimarisine” bağlı olarak aynı polimerik taşıyıcıların yüksek immünojenik ve zayıf immünojenik preparatların her ikisinde yapımı için kullanılabileceği gösterilmiştir.

Parçalanıp organizmadan atılabilen polimerik taşıyıcıların sentezinde önemli gelişmelere ulaşılmıştır. Böylece, toksik olmayan polielektrotların doğal antijenlerle geçici metal iyonları vasıtasıyla bağlanması ile yüksek immünojenik preparatların yapımı tanımlayıcı bir örnek oluşturur. Bu çok bilinen bir metottur ve moleküler kütleleri-kompozisyonu dikkate alınmaksızın polimerlerin farklılığının çok geniş olması esasına dayanarak polielektrolit komplekslerin sentezine ve bu şekilde immünolojik ve kliniksel amaçlı polimerlerin kullanılmasının yaygınlaşmasına izin verir.

Sentetik polielektrolitler ve biyopolimerler arasındaki kompleks oluşturma çalışmaları, yüksek derecede belirli aktivite ve kararlılık gösteren stabil enzim preparatların olduğu kadar değişik enfeksiyonlardan etkili immünolojik koruma sağlayabilen yüksek derecede immünolojik yapay antijenlerin senteziyle sonuçlanmıştır. Bu çeşit polikomplekslerin in vitro ve tüm organizmanın koşulları altında yapabileceklerinin analiz edilmesi biyoloji biliminin diğer alanlarında olduğu kadar kuramsal immünolojik ve kimyasal enzimolojik çalışmalarında yardımcı bir araç olacaktır. Böylece, bir taraftan doğal olmayan polielektrolitler ve onların polikomplekslerinin model sistemlerdeki kanın proteinimsi ve hücrel bileşenleriyle birçok noktada karşılıklı etkileşime girebilmesi, diğer taraftan in vivo fizyolojik aktiviteleri arasında direk bir bağlantı bulunmuştur. Bu buluş in vivo polimerik bileşenlerin değişik etkilerinin altını çizerek mekanizmalar üzerinde ek açıklamalar sağlar. Ancak, bu sonuçlar bu çeşit komplekslerin fizyolojik etkilerinin altını çizen mekanizmaların serum albümini gibi kan serum proteini veya model bileşikler olarak seçilen diğer biyosistem bileşenleriyle karşılıklı polielektrolit etkileşimini temel alması gerektiğini göstermez.

Şüphesiz, elde edilen in vitro ve in vivo sonuçları arasında gözlenen bağlantı, bifilik kooperatif sistemler gibi polielektrolitlerde olan çoklu karşılıklı etkileşimin altını çizerek benzer mekanizmaları dahil eder. Bu sonuçlar aynı zamanda polielektrolitlerin fizyolojik yapılarında hiç bir değişiklik olmaksızın azaltılmış toksisite nedeniyle oluşumu olarak yorumlanabilir. Bir sonraki durum uygulanabilir ilaç için anahtar önem taşır.

KAYNAKLAR

- Am Ende, M.T., Hariharan, D. ve Peppas, N.A., (1995), "Factors Influencing Drug and Protein Transport and Release From Ionic Hydrogels", *React Polym.*, 25:127-137.
- Andrianov, A.K., Marin, A. ve Roberts, B.E., (2005), "Polyphosphazene Poly-Electrolytes: a Link Between the Formation of Noncovalent Complexes With Antigenic Proteins and Immunostimulating Activity", *Biomacromolecules*, 6:1375-1379.
- Anikin, K., Röcker, C., Wittemann, A., Wittemann, J., Ballauff, M. ve Nienhaus, U., (2005), "Polyelectrolyte-Mediated Protein Adsorption: Fluorescent Protein Binding to Individual Polyelectrolyte Nanospheres", *J. Phys. Chem. B.Lett.*, 109:5418-5420.
- Bohidar, H.B., Dubin, P.L., Majhi, P.R., Tribet, C. ve Jaeger, W., (2005), "Effects of Protein-Polyelectrolyte Affinity and Polyelectrolyte Molecular Weight on Dynamic Properties of Bovine Serum Albumin-Poly(diallyl-dimethylammonium chloride) Coacervates", *Biomacromolecules*, 6:1573-1585.
- Borrega, R., Tribet, C. ve Audebert, R., (1999), "Reversible Gelation in Hydrophobic Polyelectrolyte/Protein Mixtures: an Example of Cross-Links Between Soft and Hard Colloids", *Macromolecules*, 32:7798-7806.
- Bromberg, L.E. ve Ron, E.S., (1998), "Temperature-Responsive Gels and Thermogelling Polymer Matrixes for Protein and Peptide Delivery", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 31:197-221.
- Bromberg, L.E., (2001), "Interactions Among Proteins and Hydrophobically Modified Polyelectrolytes", *J.Pharma.Pharmacol.*, 53:541-547.
- Burgess, D.J., (1994), "Complex Coaservation: Microcapsule Formation", 285-300, *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, P.L. Dubin, Bock, Davis ve Schulz (Darl.), Springer-Verlag, Berlin.
- Burgess, D.J., Kwok, K.K. ve Megremis, P.T., (1991), "Characterization of Albumin-Acacia Complex Coacervation", *J.Pharm. Pharmacol.*, 43:232-236.
- Caruso, F. ve Mohwald, H., (1999), "Protein Multilayer Formation on Colloids Through a Stepwise Self-Assembly Technique", *J.Am. Chem. Soc.*, 121:6039-6046.
- Caruso, F., Fiedler, H. ve Haage, K., (2000), "Assembly of Beta-Glucosidase Multilayers on Spherical Colloidal Particles and Their Use as Active Catalysts", *Colloids Surf., A Physicochem.Eng.Asp.*, 169:287-293.
- Chaniotakis, N.A., (2004), "Enzyme Stabilization Strategies Based on Electrolytes and Polyelectrolytes for Biosensor Applications", *Anal.BioAnal. Chem.*, 378:89-95.
- Czeslik, C., (2004), "Factors Ruling Protein Adsorption", *Z. Phys.Chem.-Int.J.Res. Phys. Chem.Chem. Phys.*, 218:771-801.
- Czeslik, C., Jackler, G., Steitz, R. ve von Grunberg, H.H., (2004), "Protein Binding to Like-Charged Polyelectrolyte Brushes by Counterion Evaporation", *J.Phys.Chem.*, B108:13395-13402.
- Czeslik, C., Jansen, R., Ballauff, M., Wittemann, A., Royer, C.A., Gratton, E. Ve Hazlett, T., (2004), "Mechanism of Protein Binding to Spherical Polyelectrolyte Brushes Studied in situ Using Two-Photon Excitation Fluorescence Fluctuation Spectroscopy", *Phys. Rev.E*69

- Dainiak, M.B., Muronetz, V.I., Izumrudov, V.A., Galaev, I.Y. ve Mattiasson, B., (2000), "Production of Fab Fragments of Monoclonal Antibodies Using Polyelectrolyte Complexes", *Anal. Biochem.*, 227:58-66.
- Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötz, J., Philipp, B., Seidel, Ch., Stscherbina, D., (1994), *Polyelectrolytes Formation, Characterization and Application*, Hanser Publication, New York.
- Dickinson, E., (1998), "Stability and Rheological Implications of Electrostatic Milk Protein-Polysaccharide Interactions", *Trends Food Sci. Technol.*, 9:347-354.
- Dominguez, L., Enkelmann, V., Meyer, W.H. ve Wegner, G., (1989), *Polymer*, 30:2030.
- Doublier, J.L., Garnier, C., Renard, D. ve Sanchez, C., (2000), "Protein-Polysaccharide Interactions", *Curr. Opin. Colloid. Interface Food Sci.*, 5:202-214.
- Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y. ve Boury, F., (2004), "Evidence and Characterization of Complex Coacervates Containing Plant Proteins: Application to the Microencapsulation of Oil Droplets, Collaids Surf", *A Physicochem Eng. Asp.*, 232:239-247.
- Dutton, G.G.S., (1989), *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Wiley, 13:130, New York.
- Eleya, M.M.O. ve Turgeon, S.L., (2000), "The Effects of pH on the Rheology of b-Lactoglobulin/k-Carageenan Mixed Gels", *Food Hydrocoll.*, 14:245-251.
- Gao, J.Y. ve Dubin, P.L., "Binding of Proteins to Copolymers of Varying Hydrophobicity", *Biopolymers*, 49:185-193.
- Gao, J.Y., Dubin, P.L. ve Muhoberac, B.B., (1997), "Measurement of the Binding of Proteins to Polyelectrolytes by Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis", *Anal. Chem.*, 69:2945-2951.
- Gergely, C., Bahi, S., Szalontai, B., Flores, H., Schaaf, P. ve Voegel, J.C., (2004), "Human Serum Albumin Self-Assembly on Weak Polyelectrolyte Multilayer Films Structurally Modified by pH Changes", *Lungmuir*, 20:5575-5582.
- Gibson, T.D., Pierce, B.L.J., Hulbert, J.N. ve Gillespie, S., (1996), "Improvements in the Stability Characteristics of Biosensors Using Protein-Polyelectrolyte Complexes", *Sens ActuatorsB, Chem*, 33:13-18.
- Girard, M., Turgeon, S.L. ve Gauthier, S.F., (2003) "Thermodynamic Parameters of Beta-lactoglobulin-pectin Complexes Assessed by Isothermal Titration Calorimetry", *J.Agric.Food Chem.*, 51:4450-4455.
- Gong, J., Yao, H.W., Jiang, M., Gu, S.H. ve Chunyu, L., (2003), "Structural Transformation of Cytochrome c and Apo Cytochrome c Induced by Sulfonated Polystyrene", *Biomacromolecules*, 4:1293-1300.
- Gong, J., Yao, P., Duan, H.W., Jiang, M., Gu, S.H. ve Chunyu, L., (2003), "Structural Transformation of Cytochrome c and Apo Cytochrome c Induced by Sulfonated Polystyrene", *Biomacromolecules*, 4:1293-1300.
- Hamilton, C.J., Tighe, B.J., (1989), *Comprehensive Polymer Science*, Pergamon Press, Oxford.

- Hernaiz, M., Liu, J., Rosenberg, R.D. ve Linhardt, R.J., (2000), "Enzymatic Modification of Heparin Sulfate on a Biochip Promotes its Interaction With Antithrombin III", *Biochem. Biophys. Biol. Res. Commun.*, 276:292-297.
- Hogg, P.J., Jackson, C.M. ve Winzor, D.J., (1991), "Use of Quantitative Affinity-Chromatography for Characterizing High-Affinity Interactions-Binding of Heparin to Antithrombin-II", *Anal. Biochem.*, 192:303-311.
- Ivinova, O.N., Izumrudov, V.A., Muronetz, V.I., Galaev, I.Y. ve Mattiasson, B., (2003), "Influence of Complexing Polyanions on the Thermo-Stability of Basic Proteins", *Macromol. Biosci.*, 3:210-215.
- Izumrudov, V.A., Galaev, I.Y. ve Mattiasson, B., (1998), "Polycomplexes-Potential for Bioseparation", 7:207-220.
- Jiang, H.L. ve Zhu, K.J., (2001), "Polyanion/Gelatin Complexes as pH-Sensitive Gels for Controlled Protein", *J.App.Polm.Sci.*, 80:1416-1425.
- Kabanov, V.A., Mustafaev, M.I. ve Norimow A., (1978), "Doklady AN SSSR Proceedings of the USSR", *Acedemy of Sciences*, 243:1130.
- Kabanov, V.A., Skobeleva, V.B., Rogacheva, V.B. ve Zezin, A.B., (2004), "Sorption of Proteins by Slightly Cross-Linked Polyelectrolyte Hydrogels: Kinetics and Mechanism", , *J.Phys. Chem., B* 108: 1485-1490.
- Kokufuta, E., (1994), "Complexation of Proteins with Polyelectrolytes in a Salt-Free System and Biochemical Characteristics of the Resulting Complexes", 301-325, *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, J. Bock, R.M. Davies, D.N. Schulz ve C.Thies (Derl.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ladam, G., Schaaf, P., Cuisinier, F.J.G., Decher, G. ve Voegel, J.C., (2001), "Protein Adsorption onto Auto-Assembled Polyelectrolyte Films", *Langmuir*, 17:878-882.
- Littmann, E.R. ve Marvel, C.S., (1930), *J. Am. Chem.Soc.*, 52:287.
- Littmann, E.R. ve Marvel, C.S., (1933), *J. Am. Chem.Soc.*, 55:753.
- Lonard, M., De Boisseson, M.R., Hubert, P., Dalencon, F. ve Dellacherie, E., (2004), "Hydrophobically Modified Alginate Hydrogels as Protein Carriers With Specific Controlled Release Properties", *J.Control Release*, 98:395-405.
- Luskin, L.S., (1974), *In Functional Monomer*, 2:555, R.H. Yocum, E.B. Nyquist (Derl.), Marcel Dekker, New York.
- Lvov, Y., Ariga, K., Ichinose, I. ve Kunitage, T., (1995), "Assembly of Multi- component Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption", *J.Am. Chem. Soc.*, 117:6117-6123.
- Matsudo, T., Ogawa, K. ve Kokufuta, E., (2003), "Complex Formation of Protein with Different Water-Soluble Synthetic Polymers", *Biomacromolecules*, 4:1794-1799.
- Mattison, K.W., (1999), Ph.D. Thesis, Perdue Univ., Indianapolis, IN.
- Mekhloufi, G., Sanchez, C., Renard, D., Guillemin, S. ve Hardy, J., (2005), "pH Induced Structural Transitions During Complexation and Coaservation of Beta-Lactoglobulin and Acacia Gum", *Langmuir*, 21:386-394.

- Muller, M., Rieser, T., Dubin, P.L. ve Lunkwitz, K., (2001), "Selective Interaction Between Protins and the Outermost Surface of Polyelectrolyte Multilayers: Influence of the Polyanion Type, pH ve tuzdur, *Macromol, Rapid Commun*, 22:390-395
- Mustafaev, M.I. ve Kabanov, V.A., (1980), "Pharmacology and Toxicology", 45:395.
- Mustafaev, M.I. ve Norimow, A.Sh., (1990), *Biomed.Sci.*, 1:274.
- Mustafaev, M.I., (1996), *Polyelectrolytes in Immunology Fundamentals and Perspectives*, Turkish J. Of Chemistry, 20:1-15.
- Mustafaev, M.I., Babakhin, A.A. ve Popov, A.N., (1990), "Molecular Biology", 24:358.
- Mustafaev, M.I., Narimow, A.Sh. ve Petrov, R.W., (1992), *Synthetic Immunomodulators*, Nauka, Moskova.
- Mustafaev, M.I., Norimow, A., Zavgorodny, S.G. ve Filatova, E.D., (1989), "Immunology", 4:88.
- Nuyken, O. ve Latterman, G., (1992), *Handbook of Polymer Synthesis*, Marcel Dekker, PartA:268, New York.
- Ogawa, K. ve Kokufuta, E., (2002), "Enzymatic Formation of pH Gradients Within Polyelectrolyte Gels With Immobilized Urease", *Langmuir*, 18:5661-5667.
- Ogawa, Y., Ogawa, K., Wang, B. ve Kokufuta, E., (2001), "A Biochemo-machanical System Consisting of Polyampholyte Gels With Coimmobilized Glucose Oxidase and Urease", *Langmuir*, 17:2670-2674.
- Ottenbrite, R.M., Regelson, W. ve Kaplan, A., (1978), "Biological Activity of Polycarboxylic Acid Polymers", 263, *Polymeric Drugs*, L.G. Donuruma ve O. Voge (Derl.), Acad. Press, NY.
- Peppas, N.A. ve Leobandung, W., (2004), "Stimuli-Sensitive Hydrogels: Ideal Carriers for Chronobiology and Chronotherapy", *J. Biomater.Sci. Polym.Ed.*, 15:125-144.
- Petrov, R.W., Mustafaev, M.I. ve Narimow, A., (1992), "Physica Chemical Criteria For the Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on the Basis of Polyelectrolyte Complexes", Harwood Acad. Publ.GmbH, London UK.
- Philipp, B., (1993), *J. Macromol.Sci, Pure Apple chem.*, A30:703
- Pihlajamaa, T., Lankinen, H., Ylostalo, J., Valmu, L., Jaalinoja, J. ve Zaucke, F., (2004), "Characterization of Recombinant Amino-Terminal NC4 Domain of Human Collagen IX - Interaction with Glycosaminogly-cans and Cartilage Oligomeric Matrix Protein", *J. Biol Chem.*, 279: 24265-24273.
- Ram, M.K., Bertoncello, P., Ding, H., Paddeu, S. ve Nicolini, C., (2001), "Cholesterol Biosensors Prepared by Layer-by-Layer Technique", *Biosens. Bioelectron.*, 16:849-856.
- Richert, L., Lavelle, P., Vautier, D., Senger, B., Stoltz, J.F. ve Schaaf, P., (2002), "Cell Interactions With Polyelectrolyte Multilayer Films", *Biomacromolecules*, 3:1170-1178.
- Rosenfedt, S., Wittemann, A., Ballauff, M., Breininger, E., Bolze, J. ve Dingenouts, N., (2004), "Interaction of Proteins with Spherical Polyelectrolyte Brushes in Solution as Studied by Small-Angle-X-Ray Scattering", *Phys. Rev. E*70

- Salamone, J.C., Rice, W.C., (1989), *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Wiley, 11:514., New York.
- Salamone, J.C., Tsai, C.C., Watterson, A.C. ve Olson, A.P., (1980), *In Polymeric Amines and Ammonium Salts*, E.Goethals, Pergamon Press, 105, New York.
- San Antonio, J.D. ve Lander, A.D., (2001), "Affinity Coelectrophoresis of Proteoglycan-Protein Complexes", *Methods Mol.Biol.*, 171:401-414, Clifton NJ.
- Sannan, T., Kurita, K. ve Iwakura, Y., (1976), *Makromol.Chem*, 177:3589
- Schwinte, P., Voegel, J.C., Picart, C., Haikel, Y., Schaaf, P. ve Szalontai, B., (2001), "Stabilizing Effects of Various Polyelectrolyte Multilayer Films on the Structure of Adsorbed/Embedded Fibrinogen Molecules: an ATR-FTIR Study", *J.Phys.Chem.*, 105:11906-11916.
- Seyrek, E., Dubin, P.L., Tribet, C. ve Gable, E.A., (2003), "Ionic Strenght Dependence of Protein-Polyelectrolyte Interactions", *Biomacromolecules*, 4:273-282.
- Seyrek, E., Dubin, P.L., Tribet, C. ve Gamble, E.A., (2003), "Ionic Strenght Dependence of Protein-Polyelectrolyte Interactions", *Biomacromolecules*, 4:273-1585.
- Szyk, L., Schaaf, P., Gergely, C., Voegel, J.C. ve Tinland, B., (2001), "Lateral Mobility of Proteins Adsorbed on or Embedded in Polyelectrolyte Multilayers", *Langmuir*, 17:6248-6253.
- Talwar, G.P., (1983), *Immunology of Contraception*, Meditsina Press.
- Teramoto, A., Takagi, Y., Hachimori, A. ve Abe, K., (1999), "Interaction of Albumin With Polysaccharides Containing Ionic Groups", *Polym. Adv. Technol.*, 10:681-686.
- Tolstoguzov, V.B.,(1997), "Protein-Polysaccharide Interactions", *Food Sci Tecnol*, 80:171-198, New York.
- Tomalia, D.A., (1992), *Handbook of Polymer Synthesis*, Marcel Dekker, PartA:743, New York.
- Tribet, C., (2001), "Complexation Between Aphiphilic Polyelectrolytes and Proteins: From Necklaces to Gels", 247-271, *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*, T.Radeva (Der.), Marcel Dekker Inc., New York.
- Tsuboi, A., Izumi, T., Hirata, M., Xia, J.L., Dubin, P.L. ve Kokufuta, E., (1996), "Complexation of Proteins With a Strong Polyanion in an Aqueous Salt-Free System", *Langmuir*, 12:6295-6303.
- Turgeon, S.L., Bealieu, M., Schmitt, C. ve Sanchez, C., (2003), "Protein-Polysaccharide Interactions: Phase Ordering Kinetics, Thermodynamic and Structural Aspects", *Curr.Opin. Colloid. Interface. Sci.*, 8:401-414.
- Van de Weert, M., Andersen, M.B. ve Frokjaer, S., (2004), "Complex Coacervation of Lysozyme and Heparin: Complex Characterization and Protein Stability", *Pharm. Res.*, 21:2354-2359.
- Wang, Y.F. ve Dubin, P.L., (1998), "Protein Binding on Polyelectrolyte-Treated Glass-Effect of Structure of Adsorbed Polyelectrolyte", *J. Chromatogr.*, A808:61-70.

- Weinbreck, F., Minor, M. ve de Kruif, C.G., (2004), "Microencapsulation of Oils Using Whey Protein/Gum Arabic Coacervates", *J. Microencapsul.*, 21:667-679.
- Weinbreck, F., Rollema, H.S., Tromp, R.H. ve Kruif, C.G., (2004), "Diffusivity of Whey Protein and Gum Arabic in Their Coacervates", *Langmuir*, 20:6389-6395.
- Wen, Y.P. ve Dubin, P.L., (1997), "Potentiometric Studies of the Interaction of Bovine Serum Albumin and Poly(dimethyldiallylammonium chloride)", *Macromolecules*, 30:7856-7861.
- Witte mann, A. ve Ballauff, M., (2004), "Secondary Structure Analysis of Proteins Embedded in Spherical Polyelectrolyte Brushes by FT-IR Spectroscopy", *Anal. Chem.*, 76:2813-2819.
- Xia, J.L. ve Dubin, P.L., (1994), "Protein-Poltelectrolyte Complexes", 247-271, *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, P.L. Dubin, Bock, Davis and Schulz (Derl.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Xia, J.L., Dubin, P.L., Kokufuta, E., Havel, H. ve Muhoberac, B.B., (1999), "Light Scattering, CD and Ligand Binding Studies of Ferrihemoglobin-Polyelectrolyte Complexes", *Biopolymers*, 50:153-161.
- Xia, J.L., Zhang, H.W., Rigsbee, D.R., Dubin, P.L. ve Shaikh, T., (1993), "Structural Elucidation of Soluble Polyelectrolyte-Micelle Complexes-Intrapolymer vs. Interpolymer Association", *Macromolecules*, 26:2769-2766.
- Yu, A.M. ve Caruso, F., (2003), "Thin Films of Polyelectrolyte-Encapsulated Catalase Microcrystals for Biosensing", *Anal. Chem.*, 75:3031-3037.

İNTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycar.html>
- [2] <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyagar.html>
- [3] <http://www.madsci.org/posts/archives/apr2001/986571103.Bc.r.html>
- [4] <http://www.people.vcu.edu/~urdesai/hep.htm#Heparin%20-%20Structure>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	17.09.1978	
Doğum yeri	Burdur	
Lise	1992-1995	Eğirdir Lisesi
Lisans	1995-2000	İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fak.Kimya Mühendisliği Bölümü
Yüksek Lisans	2004-2007	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı

Çalıştığı kurum(lar)

2002-2004	Fako İlaçları A.Ş- Kalite Kontrol Lab.
2004-2006	Bilim İlaç San. ve Tic.A.Ş-Analitik Geliştirme Lab.
2006-Devam ediyor	Bilim İlaç San. ve Tic.A.Ş-Ruhsatlandırma Md.