

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROTEİNLERİN POLİAKRİLİK ASİT İLE SUDA
ÇÖZÜNMEYEN KOMPLEKSLERİ**

Kimyager Nermin Saliha ÇİMEN

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalından
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

İSTANBUL, 2006

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	iii
KISALTMA LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
ÖNSÖZ	vii
ÖZET	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Polielektrolitler	4
2.1.1 Homopolielektrolitler	4
2.1.2 Poliamfolitler	8
2.2 İnterpolielektrolit Kompleksler	13
2.2.1 Polielektrolit-Protein Komplekslerinde Etkileşimler	17
2.2.2 Polielektrolit-Protein Komplekslerinde Fiziksel Haller	18
2.2.3 Protein-Polielektrolit Komplekslerinin Türbidimetrik Titrasyonu	19
2.2.4 Polielektrolit-Protein Kompleksleriyle İlgili Yapılan Çalışmalar	21
2.3 Histerezis	27
2.4 Kullanılan Ölçüm Yöntemleri	28
2.4.1 UV-VIS Spektroskopisi	28
2.4.2 Moleküler Eleme Kromatografisi	29
3. DENEYSEL KISIM	31
3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	31
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	31
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler	32
3.2 PAA Titrasyonu	33
3.3 BSA/PAA Kompleksleri	33
3.3.1 Kullanılan Çözeltiler	33
3.3.2 Komplekslerin Hazırlanışı	33
3.3.3 Hesaplamalar	34
3.4 PAA/BSA Kompleksleri	35
3.4.1 Komplekslerin Hazırlanışı	36
3.4.2 Hesaplamalar	36
3.5 UV-VIS Spektrofotometresi Ölçümleri	37
3.6 Moleküler Eleme Kromatografisi Ölçümleri	38
3.7 Komplekslerin pH'a Bağlı Türbidimetrik Titrasyonu	38
3.8 pH 4'te Oluşan Çökeltinin pH 7'de Çözülüp SEC'de İncelenmesi	38
4. DENEY SONUÇLARI	39
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	59
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGE LİSTESİ

g	gram
kcal	kilokalori
M	Molar
mg	miligram
ml	mililitre
M _w	ağırlıkça-ortalama molekül ağırlığı
n	mol
nm	nanometre
τ	türbidite
°C	Santigrat derece
μl	mikrolitre
Å	angström

KISALTMA LİSTESİ

Ab	Antikor
Ag	Antijen
BSA	Bovin serum albumin
CH ₃ COOH	Asetik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrate
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrate
NaN ₃	Sodyum azid
PAA	Poliakrilik Asit
PSSNa	Poli(sodyum stiren sülfonat)
QELS	“Quasielastic” ışık saçılması
RI	Kırılma İndisi
SEC	Moleküler eleme kromatografisi
UV	Ultra Violet

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Farklı pH değerlerinde (pH 4, pH 5, pH 7) PAA ve BSA'nın sahip olduğu yüklerin şematik gösterimi	2
Şekil 1.2 Eklenen antijenle oluşan antijen-antikor çökelti eğrisi	3
Şekil 2.2 (a) poli(vinilpiridinyum), (b) sodyum polistiren sülfonat, (c) poli(diallildimetilamonyum klorür) (Dautzenberg vd., 1994).....	4
Şekil 2.4 Poli(akrilik asit)in sulu çözeltideki dissosiyasyonu	5
Şekil 2.3 İki sentetik polielektrolitin kimyasal yapısı. Soldaki yapı poli(sodyum stiren sülfonat) (PSS) ve sağdaki ise poli(akrilik asit)tir (PAA). Her ikisi de negatif yüklü polielektrolitlerdir. PSS kuvvetli bir polielektrolitken PAA zayıf bir polielektrolittir [1].....	5
Şekil 2.4 (a) İntegral tipe örnek olarak lineer poli(etilen imin) ve (b) asılı tipe örnek olarak poli(vinilamin)	6
Şekil 2.5 Çözeltiye tuz ilavesi sonucu polielektrolit zincirinin yumak konformasyonunu alması [2]	6
Şekil 2.7 Poliamfolitlerin pH cevabına bağlı olarak örnek yapıları	9
Şekil 2.8 Maleik asit anhidrid ile N-metildiallilaminin kopolimerlerinin intrinsik viskozitesinin pH'la değişimi (Dautzenberg vd., 1994)	10
Şekil 2.9 Proteinlerin poliamit yapısı [3].....	10
Şekil 2.10 Proteinlerin pH'a bağlı yük durumları	11
Şekil 2.11 BSA'nın pH'a bağlı yük değişimi	11
Şekil 2.12 BSA'nın izomerik formları arasındaki ilişki	12
Şekil 2.13 Serum albuminin N, E ve F formlarının şematik gösterimi (Carter ve Ho, 1994) ..	13
Şekil 2.14 Simpleks oluşum yolları	14
Şekil 2.15 Nonstokiyometrik suda çözünebilen simplekslerin şematik gösterimi	15
Şekil 2.16 Seyreltik sistemde simpleks oluşumunun iki basamaklı mekanizması	16
Şekil 2.17 Polielektrolit-protein komplekslerinde faz ayrımı (Kokufuta, 1994).....	19
Şekil 2.18 BSA-polielektrolit kompleksinin protein/polielektrolit oranına bağlı türbidimetrik titrasyonu (Mustafaev, 2004).	20
Şekil 2.19 Farklı polielektrolitlerle BSA'nın pH'a bağlı türbidimetrik titrasyonu. +, □, ◇, ▲, Δ farklı yapılarda polianyonları, ●, o, ■ polikasyonları göstermektedir.	21
Şekil 2.20 Suda çözünen PE-protein komplekslerinin yapısı: I- Poliasitlerin polianyonlarının proteinlerle komponentler aynı (negatif) yüklendiğinde oluşan komplekslerinin yapısı, II- Lineer polielektrolitlerin zıt yüklenmiş proteinlerle $n_P/n_{PE} \leq N_i$ oranında oluşan komplekslerin yapısı "a" ve "b" - "a" (I) ve "b" (II) tipli yapıların oluşumunu şematik olarak göstermektedir.	23
Şekil 2.21 İzoelektrik noktası civarında proteinlerin pozitif ve negatif yük öbeklerinin şematik gösterimi.	25
Şekil 2.22 Protein ve poliyon içeren stokiyometrik kompleksin şematik gösterimi.	25
Şekil 2.23 Histerezisli bir sistemde uygulanan kuvvete (x eksen) bağlı olarak gözlenen değişim (y eksen)	27
Şekil 2.24 Polimer çözeltisinin agregasyonunun (ısıtma) ve çözünmesinin (soğutma) türbidimetrik olarak incelenmesi (Herrero-Vanrell, 2005).	28
Şekil 2.25 Işık, c konsantrasyonunda, b cm kalınlığında bir ortamdan geçerken, absorpsiyon nedeniyle şiddeti I_0 'dan I 'ya düşmüştür.	29
Şekil 2.26 Kolon kromatografisinde molekül büyüklüğüne göre ayrılma ve alıkonma zamanına göre oluşan kromatogram.	30
Şekil 4.1 PAA çözeltisinin NaOH ile titrasyon grafiği	39
Şekil 4.2 pH 4'de hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu ..	40
Şekil 4.3 pH 4.3'de hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu	41
Şekil 4.4 pH 5'de hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu ..	42

Şekil 4.5 pH 6'da hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu ..	43
Şekil 4.6 pH 7'de hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonları	44
Şekil 4.7 pH 4, pH 4.3, pH 5, pH 6 ve pH 7'de hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonları	45
Şekil 4.8 pH 4, pH 4.3 ve pH 5'de hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinden elde edilen çökeltilerin orana bağlı tartım grafiği	45
Şekil 4.9 BSA/PAA kompleks çözeltilerinin süpernatantlarının 280 nm'deki absorbens değerlerinin orana bağlı grafiği.....	46
Şekil 4.10 pH 4'te hazırlanan $n_{BSA}/n_{PAA}=10$ (yeşil); 30 (mavi) ve 50 (pembe) oranlarındaki çözeltilerin HPLC kromatogramları	47
Şekil 4.11 pH 5'te hazırlanan $n_{BSA}/n_{PAA}=1$ (kırmızı); 10 (yeşil) ve 30 (mavi) oranlarındaki çözeltilerin HPLC kromatogramları	48
Şekil 4.12 pH 4'de hazırlanan PAA/BSA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu	49
Şekil 4.13 pH 5'de hazırlanan PAA/BSA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu	50
Şekil 4.14 pH 7'de hazırlanan PAA/BSA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu	51
Şekil 4.15 PAA/BSA komplekslerinden tüm pH'larda elde edilen çözeltilerin orana bağlı türbidimetrik titrasyonları	52
Şekil 4.16 pH 4'de hazırlanan PAA/BSA komplekslerinin çözeltilerinden elde edilen çökeltilerin orana bağlı tartım grafiği	52
Şekil 4.17 PAA/BSA kompleks çözeltilerinin süpernatantlarının 280 nm'deki absorbens değerlerinin orana bağlı grafiği.....	53
Şekil 4.18 $n_{BSA}/n_{PAA}=1$ oranında kompleksin pH'a bağlı türbidimetrik titrasyonu	54
Şekil 4.19 $n_{BSA}/n_{PAA}=15$ oranında hazırlanan kompleks çözeltilerinin ileri ve geri pH'a bağlı türbidimetrik titrasyon grafiği. ● pH 7'deki kompleksin 1 M HCl ile titre edildiği noktaları, ■ pH 4'teki kompleksin 1 M NaOH ile titre edildiği noktaları göstermektedir.	54
Şekil 4.20 pH 4.3'te hazırlanmış kompleksten ($n_{BSA}/n_{PAA}=10$) elde edilen çökeltilerin pH 7'deki HPLC kromatogramı	55
Şekil 4.21 pH 4.3'te hazırlanmış kompleksten ($n_{BSA}/n_{PAA}=10$) elde edilen çökeltilerin pH 7'deki çözeltisinin (yeşil) ve aynı oranda pH 7'de hazırlanmış olan kompleksin (pembe) HPLC kromatogramları	55
Şekil 4.22 pH 7'de $n_{BSA}/n_{PAA}=15$ oranında hazırlanmış olan çözeltinin viscotek UV (mor) ve RI (kırmızı) kromatogramları	56
Şekil 4.23 pH 4'te hazırlanan $n_{BSA}/n_{PAA}=1$ (siyah); 15 (yeşil) ve 35 (kırmızı) oranlarındaki çözeltilerin viscotek RI kromatogramları	57
Şekil 4.24 pH 4'te hazırlanan $n_{BSA}/n_{PAA}=1$ (siyah); 15 (yeşil) ve 35 (kırmızı) oranlarındaki çözeltilerin viscotek UV kromatogramları.....	58
Şekil 5.1 pH 5'te oluşan polimer-protein kompleksi için düşünülen model	59
Şekil 5.2 pH 4 ve 4.3'te hazırlanan komplekslerin orana bağlı oluşumunda düşünülen model	60

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında bilgi ve desteği ile beni yönlendiren sayın danışmanım Yrd. Doç. Dr. Zeynep Akdeste'ye,

Engin bilgisi ve yapmış olduğu değerlendirmeleri ile çalışmamızın her yönde önünü açan, ileri laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını bizlere sağlayan ve rehberlik eden Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Mustafaev'e,

Bu tezin hazırlanmasındaki desteğinden dolayı Murat Topuzoğulları'na,

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarları'ndaki çalışmalarım sırasında arkadaşlık ve destekleri ile bana yardımcı olan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca her türlü desteğinden dolayı sevgili aileme,

Bana ve bu teze emeği geçmiş herkese teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda polielektrolit ve proteinler arasında suda çözünen ve çözünmeyen kompleks oluşumu prosesi, yapısı ve morfolojisi ile bu sistemlerde fazlar arası geçişlerin varlığı, mevcut fiziksel kimya yöntemleri ile incelenmiştir.

Bu tez çalışmamızda PAA'nın BSA ile etkileşimini türbidimetrik titrasyon yöntemi ile incelenmiştir. Türbidimetrik titrasyon yönteminin, suda çözünmeyen interpolimer kompleksinin oluşumu ve bu tür komplekslerin suda çözünür hale geçişini belirlemek için en iyi yöntemlerden biri olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında gerek PAA gerekse de BSA pH değerlerine bağlı olarak farklı elektrik yükleri taşıdığından, sistem pH'a bağlı olarak; etkileşim mekanizmasının bileşenlerine de bağlı olduğu bilindiğinden dolayı orana bağlı etkileşimi incelenmiştir. Nötral pH ortamlarında tümüyle suda çözünen polimer-protein karışımı, pH değeri azaldıkça suda çözünmeyen hale geçmekte ve pH'ın değerinin izoelektrik noktasına yakın değerlerinden başlayarak düşük değerlerinde suda çözünmeyen bir karışım oluşmakta olduğu belirlenmiştir.

İlk kez tarafımızca BSA/PAA oranının sabit değerinde pH değerinin artırılması ya da azaltılmasıyla elde edilen titrasyon eğrilerinin çakışmadığı görülmüş ve sistemde bu iki eğrinin histeriziz gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: polielektrolit, poliakrilik asit, bovin serum albumin, türbidimetri

ABSTRACT

In the studies before, structure, morphology and the formation process of water-soluble and insoluble complexes of polyelectrolytes with proteins and existence of phase transition in these systems were investigated.

In this study, the interaction of PAA with BSA was investigated with turbidimetric titration method. It's known that turbidimetric titration method is one of the most suitable methods to detect the formation of insoluble interpolymer complexes and transition to soluble state. In this study, interactions were investigated at different BSA/PAA ratios and system pH's due to the fact that both PAA and BSA provide different charges depending on pH and components of the system effect the interaction mechanism. It's observed that, the complexes transform into water-insoluble at the approximate pH values to pI (isoelectric point) and below the pI, while the mixture of polymer-protein is completely water-soluble at neutral pH.

For the first time, by us, it's observed that, at a constant BSA/PAA ratio, titration curves obtained by increasing or decreasing pH were not fit into each other and detected that these two curves display hysteresis.

Key words: polyelectrolyte, polyacrylic acid, bovine serum albumin, turbidimetry

1. GİRİŞ

Son zamanlarda sentetik polielektrolitlerin fizyolojik aktifliğinin ve bunların ilaç preparatları için taşıyıcı gibi kullanılmasının gösterilmesi, böyle polimerlerin, fizyolojik etki mekanizmasının aydınlatılması için, biyosistem bileşenleri ile yapmış olduğu kimyasal reaksiyonların incelenmesini gerekli kılmaktadır.

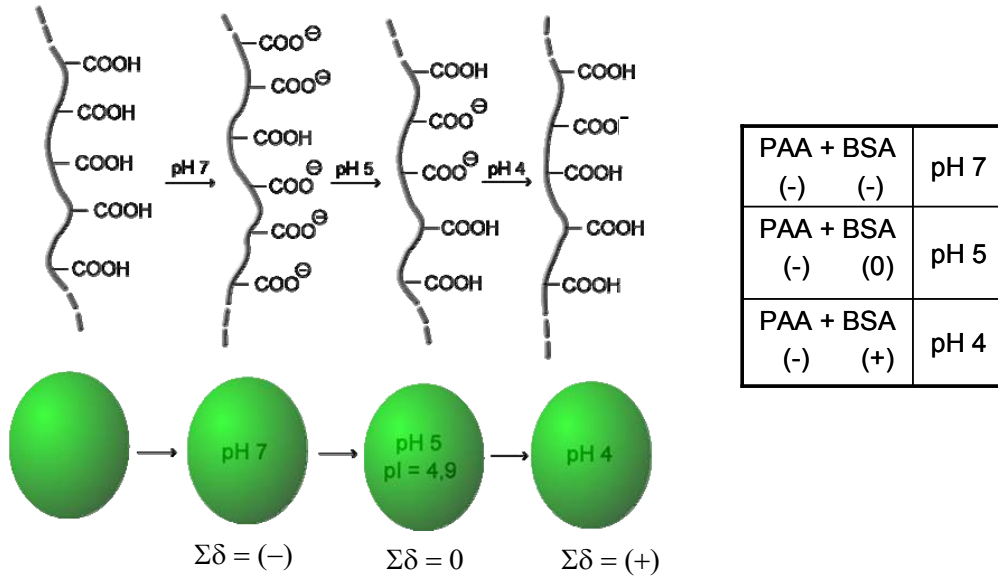
Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda polielektrolit ve proteinler arasında suda çözünen ve çözünmeyen kompleks oluşumu prosesi, yapısı ve morfolojisi ile bu sistemlerde fazlar arası geçişlerin varlığı, mevcut fiziksel kimya yöntemleri ile incelenmiştir.

Sentetik polimerlerin fizyolojik altivite mekanizmasının anlaşılması için, bunların biyosistem komponentleri ile etkileşiminin incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu polimerik maddeler içerisinde yapısında (+) ve (-) yük bulunduran makromoleküller gerek suda çözünmeleri gerekse de biyomakromoleküllerle etkileşimi açısından özel bir yeri bulunmaktadır. Canlı organizmada var olan biyomakromoleküllerin (proteinler, nükleik asitler, polisakkaritler vb.) veya organellerin (hücre membran yüzeyi, doku yüzeyleri vb.) (-) yüklerinden dolayı biyomakromoleküllerin, (-) yüklü polielektrolitlerle etkileşiminin incelenmesi çok etkin olarak yapılmaktadır.

PAA'nın BSA ile etkileşimi ilk kez Morawetz (1952) tarafından gösterilmiştir. Asidik ortamda suda çözünmeyen polikomplekslerin oluştuğu tespit edilmiş ve pH'ın 5'ten yüksek değerlerinde sistemin suda çözünür olduğu tespit edilmiştir. Bu karışımın pH'ın 5'ten yüksek değerlerinde suda çözünür hali ilk kez Mustafaev ve arkadaşları (1978) tarafından sedimentasyon yöntemi ile araştırılmış ve suda çözünebilen polimer-protein komplekslerinin var olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sistematik karakter taşımadığından dolayı yeterli derecede detaylı bilgiler var olamamaktadır.

Bu tez çalışmamızda PAA'in BSA ile etkileşimini türbidimetrik titrasyon yöntemi ile incelenmiştir. Türbidimetrik titrasyon yönteminin, suda çözünmeyen interpolimer kompleksinin oluşumu ve bu tür komplekslerin suda çözünür hale geçişini belirlemek için en iyi yöntemlerden biri olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında gerek PAA gerekse de BSA pH değerlerine bağlı olarak farklı elektrik yükleri taşıdığından (Şekil 1.1), sistem pH'a bağlı olarak; etkileşim mekanizmasının bileşenlerine de bağlı olduğu bilindiğinden dolayı orana bağlı etkileşimi incelenmiştir. Nötral pH ortamlarında tümüyle suda çözünen polimer-protein karışımı, pH değeri azaldıkça suda çözünmeyen hale geçmekte ve pH'ın değerinin izoelektrik noktasına yakın değerlerinden başlayarak düşük değerlerinde suda çözünmeyen bir karışım

oluşmakta olduğu belirlenmiştir.



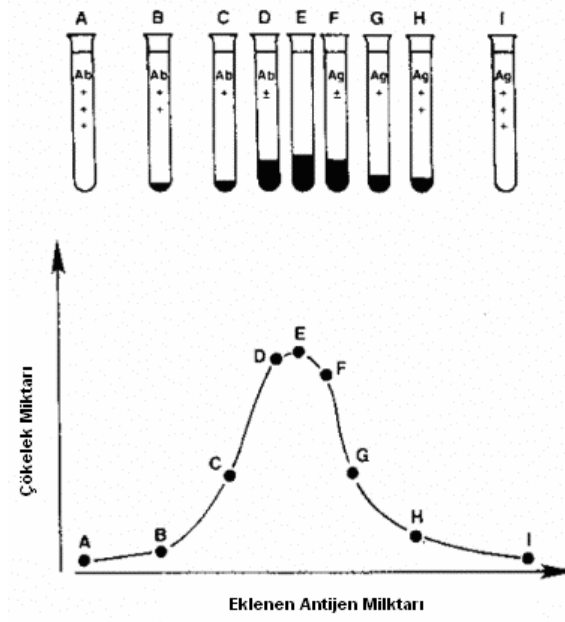
Şekil 1.1 Farklı pH değerlerinde (pH 4, pH 5, pH 7) PAA ve BSA'nın sahip olduğu yüklerin şematik gösterimi

İlk kez tarafımızca BSA/PAA oranının sabit değerinde pH değerinin artırılması ya da azaltılmasıyla elde edilen titrasyon eğrilerinin çakışmadığı görülmüş ve sistemde bu iki eğrinin histeriziz gösterdiği belirlenmiştir.

Sistemdeki faz geçişlerinin komponentlerin oranına bağlı olarak ekstremal bir değer gösterdiği bulunmuştur. Şöyle ki; pH'ın sabit değerlerinde (pH 4 ve pH 4.3), polimerin konsantrasyonunun sabit tutulduğu sistemin proteinle titrasyonu, önce suda çözünmeyen polikompleksin artışına neden olmuş, maksimum değere ulaşmış ve daha sonrasında ise sistem yeniden çözünür hale geçmesine sebebiyet vermiştir.

Bu sistemlerin matriks çözeltileri bölümde farklı yöntemlerle incelenmiş ve yapılan ortak çalışmalara dayanarak bu sistemde PAA'nın BSA ile etkileşim mekanizması hakkında literatürde belli olmayan yeni bilgiler elde edilmiştir. Tezimde asıl amaç olan suda çözünmeyen polikomplekslerin oluşumu ve bunların suda çözünmeyen hale dönüşümü, tarafımda kullanılan türbidimetrik titrasyon yöntemine dayanarak elde edilmiştir.

Bu çalışmayla sentetik polielektrolitlerin proteinlerle etkileşiminin incelenmesi Ab-Ag kompleks oluşumuna da bir model oluşturabilmektedir. Örneğin, Ab-Ag reaksiyonu oluşumu ve pratikte uygulanması.



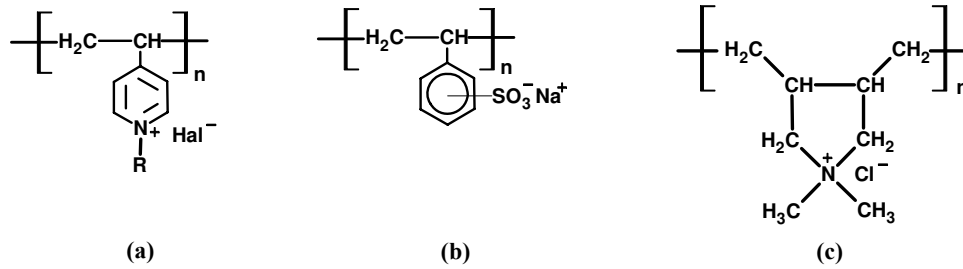
Şekil 1.2 Eklenen antijenle oluşan antijen-antikor çökelti eğrisi

Sabit antikor konsantrasyonundaki çözeltilere artan miktarlarda antijen eklendiği zaman, antijen-antikor etkileşimi sonucu artan miktarlarda çökelti oluşumu gözlenir (Şekil 1.2). Maksimum çökelti elde edildikten sonra, çökelti miktarı azalmaya başlar. Süpernatant analizleri göstermektedir ki; düşük antijen konsantrasyonlarında (antikor fazlalığında) çözeltilerde serbest bağlanmamış antikorlar bulunmaktadır. Maksimum çökelti noktasında, süpernatantta ne antijen ne de antikor saptanmıştır (eşitlik bölgesi). Yüksek antijen konsantrasyonlarında ise süpernatantta antikor saptanabilir hale gelmiştir (Virella, 2001).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Polielektrolitler

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



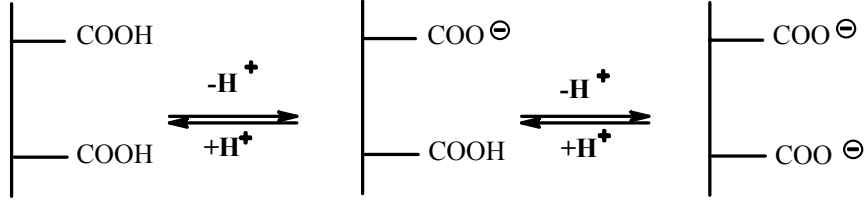
Şekil 2.2 (a) poli(vinilpiridinyum), (b) sodyum polistiren sülfonat, (c) poli(diallildimetilamonyum klorür) (Dautzenberg vd., 1994)

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

2.1.1 Homopolielektrolitler

Polielektrolitler, herbir tekrarlayan birimi (monomeri) bir elektrolit grup taşıyan polimerlerdir. Bu elektrolit gruplar sulu çözeltilerde dissosiyasyon olup polimeri yüklü hale getirirler (Şekil 2.3). Polielektrolitlerin özellikleri hem elektrolitlere (tuzlar) hem de polimerlere benzemektedir ve bazen polituzlar olarak adlandırılmaktadırlar. Çözeltileri, tuzlar gibi, elektriği iletir ve, polimerler gibi, viskozdur. Polipeptidler, proteinler, DNA gibi çoğu biyolojik molekül

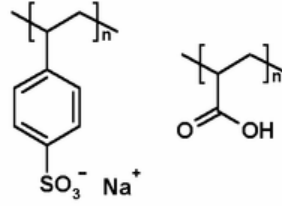
polielektrolit formundadır [1].



Şekil 2.4 Poli(akrilik asit)in sulu çözeltideki dissosiyasyonu

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

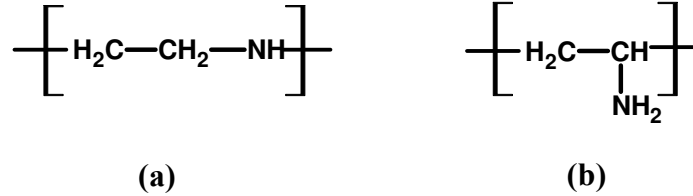
1. Polimere bağlı yüklü gruplar anyonik ve katyonik olarak sınıflandırılır. Bu gruplar da güçlü ve zayıf asitler ve bazlar olarak ikiye ayrılabilir. Kuvvetli bir polielektrolit çözeltide tüm iyonlarına ayrışabilir. Bunun aksine, zayıf bir polielektrolit tüm iyonlarına ayrışamaz. Bu sebeple, zayıf polielektrolitler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



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

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

üçüncü önemli noktadır. Şekil 2.4'e göre, iyonik gruplar ya polimerin ana zincirinin bir birimi olarak (integral tip) ya da bir spacer ile ana zincire asılı olarak (yan zincirlerde) bulunur. Yüklü grupların geometrik yeri özellikle polianyon-polikasyon kompleksi oluşumu ile ilgilidir.



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

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

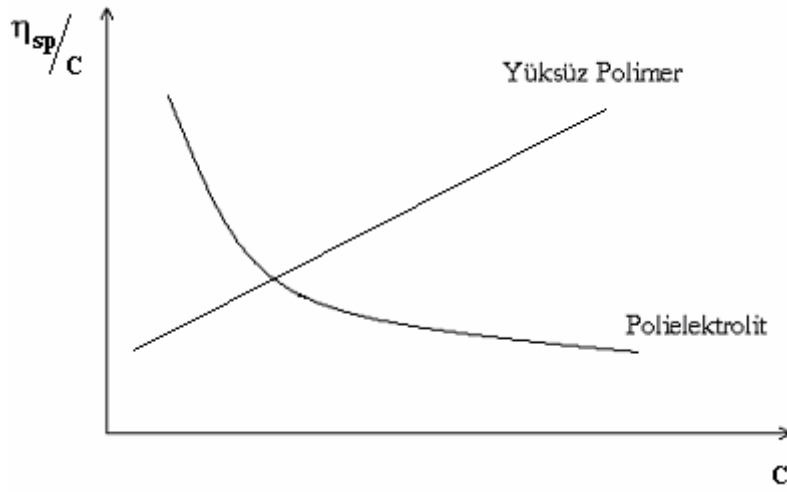
Herhangi bir polimerin konformasyonu çeşitli etkenlere bağlıdır, özellikle polimerin yapısına ve çözeltiyle ilişkisine. Çözelti içindeki yüksüz bir lineer polimer zinciri rasgele yumak konformasyonu gösterirken, lineer polielektrolit üzerindeki yükler birbirini iter (Coulomb itmesi) ve eksi yüklerin birbirlerini itmesini azaltıcı en uygun konformasyon olan uzanmış halde bulunmaya eğilim gösterir (Şekil 2.5). Bu düzenleme, polielektrolit çözeltilerinin viskozitesinin yükselmesine yol açar. Polielektrolit çözeltilerinin özellikleri sulu ortamın iyonik şiddetine bağlıdır. İyonik şiddetin artmasıyla viskozitenin değişmesi makroiyoandaki elektrik yükleri arasındaki itme kuvvetinin engellenmesinden dolayı gerçekleşir ve iyonik şiddet daha fazla arttığında yüksüz makromoleküllere benzer davranış göstermeye başlar [1].



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

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

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



Şekil 2.6 Yüksüz polimerlerde ve polielektrolitlerde viskozite-derişim ilişkisi

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

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

2.1.2 Poliamfolitler

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

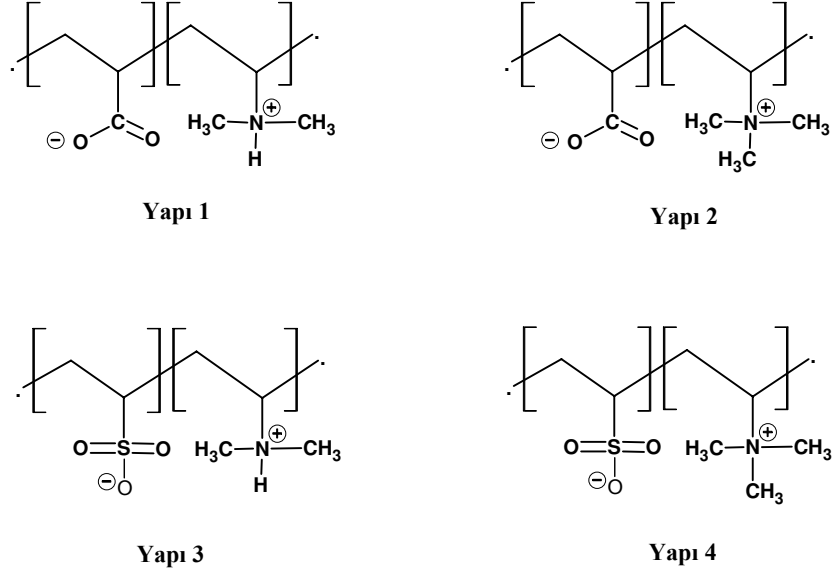
Polielektrolitlerin karakteristik bir özelliği düşük konsantrasyonlarda deiyonize suda geniş bir hidrodinamik hacme ulaşabilmesidir. Bu etkiye polimer zinciri boyunca yer alan yüklü gruplar arasındaki coulombik itme kuvveti neden olur ve zincirin çubuğa benzer bir konformasyonda bulunmasını sağlar. Elektrolit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

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

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

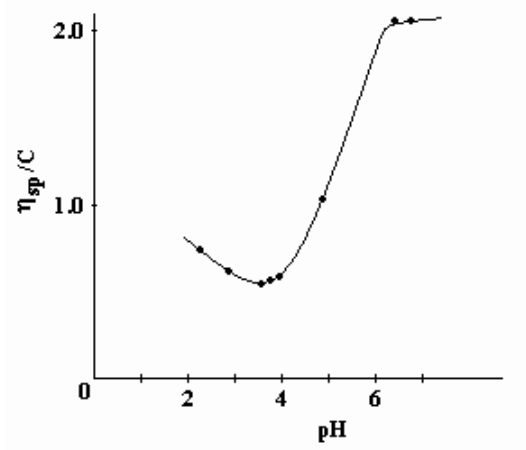
Poliamfolitler nötralize edilmiş katyonik ve anyonik grupların her ikisini içerebilir (Şekil 2.7). Bu sistemler tipik olarak, anyonik bir tür olan karboksilat grubunu ve katyonik grup olarak da amin hidrohalojenürü içerirler (yapı 1). İkinci olarak, katyonik grup pH'a duyarsızken (kuaternar alkil grupları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

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



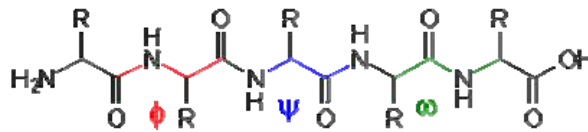
Şekil 2.7 Poliamfolitlerin pH cevabına bağlı olarak örnek yapıları

Bu sistemlerin keşfinin ardındaki mantık proteinler gibi biyolojik moleküllerin sulu çözeltideki davranışlarını derinlemesine anlaşılmasını sağlamaktır. Hakikaten, bir çok sentetik sistem, elektroforetik mobilitesinin olmadığı ve minimum viskoziteyle saptanmış pH değerinde bir izoelektrik noktasına sahiptir (Şekil 2.8) (Higgs, 1991). Ayrıca izoelektrik noktanın altında veya üstündeki pH değerlerinde viskozitede artış gözlenmektedir. İzoelektrik noktada yüklü gruplar arasındaki güçlü çekim sayesinde polimer intramoleküler olarak bir araya toplanmaktadır ve oldukça kompakt bir yapı meydana gelmektedir. pH izoelektrik noktanın altına veya üstüne çekildiğinde bazik veya asidik gruplar nötralleşir, benzer yüklü gruplar arasındaki coulombik itme gücü nedeniyle polimer zinciri gerilir ve viskozitede artış gözlemlenir. İzoelektrik noktada çözücünün niteliğinin, elektrolit eklenmesi sonucu arttığı gösterilmiştir. Çözünürlük ve pH cevabı mikroyapılara da bağlıdır. Örneğin, asidik ve bazik grupların kuvvetini etkileyen yakın komşu etkileşimler [5].



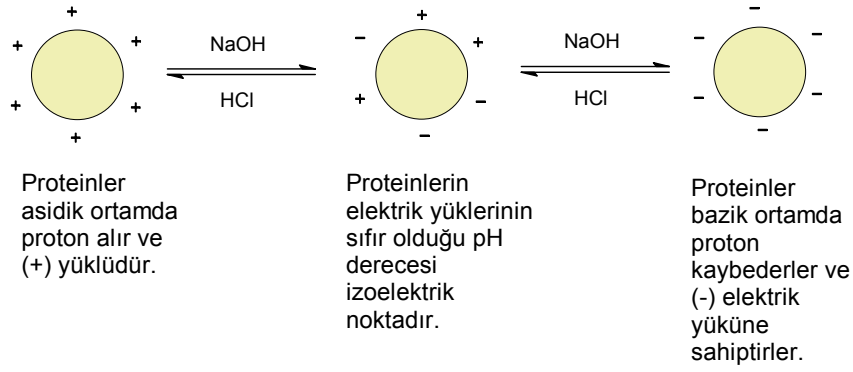
Şekil 2.8 Maleik asit anhidrid ile N-metildiallilaminin kopolimerlerinin intrinsik viskozitesinin pH'la değişimi (Dautzenberg vd., 1994)

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



Şekil 2.9 Proteinlerin poliamit yapısı [3]

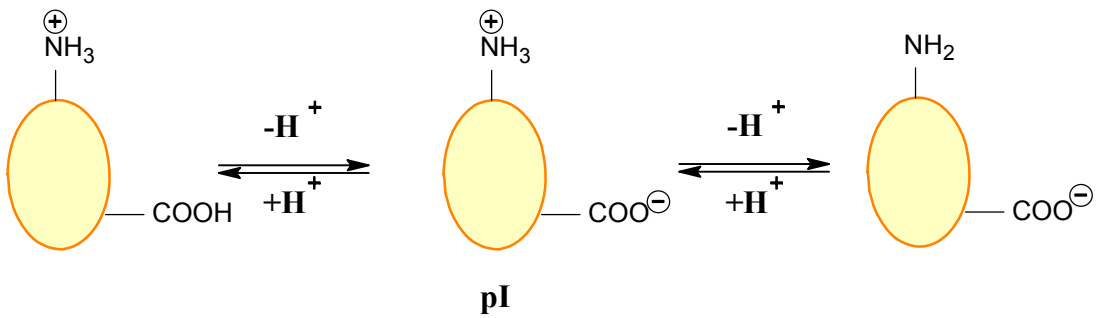
Proteinlerin yapısında asidik ve bazik amino asitler vardır. Bundan dolayı da amfoterik özellik göstermektedirler. Bu proteinler proton verecekler veya proton alacaklardır. Asidik ortamlarda proteinler ekstra protona sahip olduklarından net pozitif bir yüke, bazik ortam koşullarında ise net bir negatif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



Şekil 2.10 Proteinlerin pH'a bağlı yük durumları

Eğer bir protein izoelektrik noktasının pH koşullarında bulunuyorsa en az çözünür haldedir ve en kolay çöktürülebilir durumdadır. Tabloda görüldüğü gibi proteinlerin izoelektrik noktaları birbirinden oldukça farklıdır. İzoelektrik noktası nötral pH civarında bulunan pek çok proteinde asidik ve bazik amino asit sayısı birbirine eşit durumda demektir.

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



Şekil 2.11 BSA'nın pH'a bağlı yük değişimi

BSA proteini de bir poliamfolittir ve şu özelliklere sahiptir:

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

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

Yapılan hidrodinamik deneyler ve düşük açılı X-ışını saçılması deneylerine dayalı sonuçlar albuminin 140x40 Å boyutlarında bir elips olduğunu göstermiştir. Daha sonraki çalışmalar da bu şekli desteklemiş ve albuminin bir puro şeklinde olduğunu ortaya koymuştur. Ama ^1H NMR ile yapılan çalışmalar yapının elips şeklinde olamayacağını, albuminin daha doğrusu kalp şeklinde bir yapı olduğunu göstermiştir.

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

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

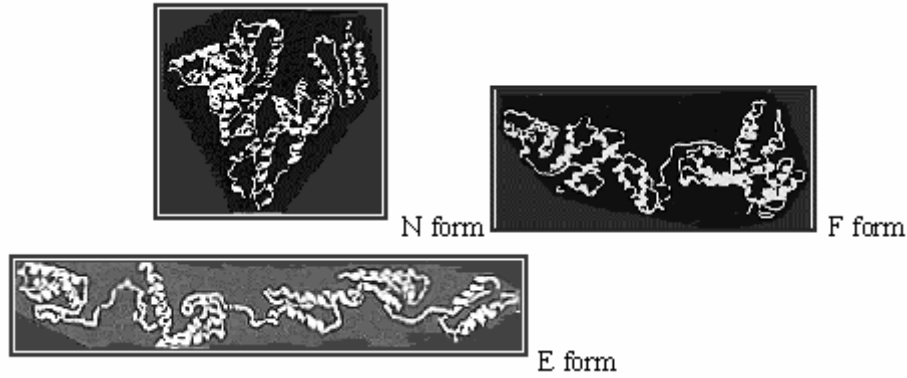
pH değiştiğinde BSA tersinir konformasyonal izomerizasyona uğrar.

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

Şekil 2.12 BSA'nın izomerik formları arasındaki ilişki

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

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



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

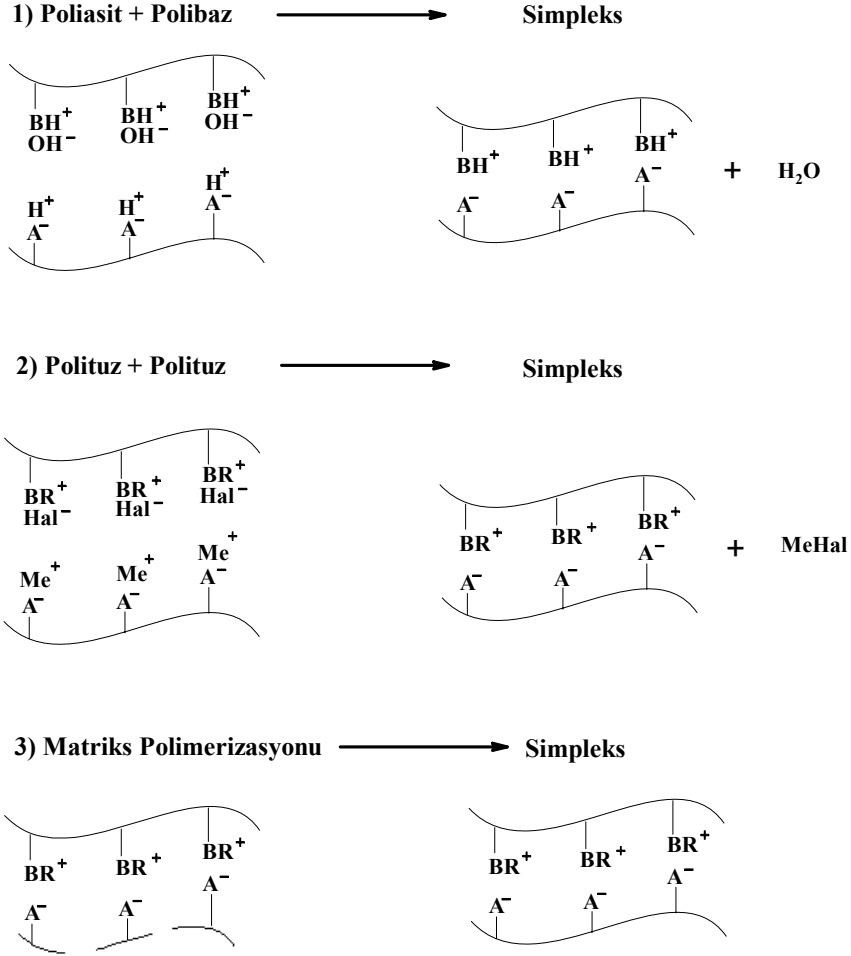
2.2 İnterpolielektrolit Kompleksler

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



Reaksiyon koşullarına ve kullanılan bileşenlerin doğasına bağlı olarak, kompleks oluşumu prosesi ve komplekslerin özellikleri fazlaca şişmiş hidrojellerle kompakt çökelekler arasında değişmektedir [5].

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

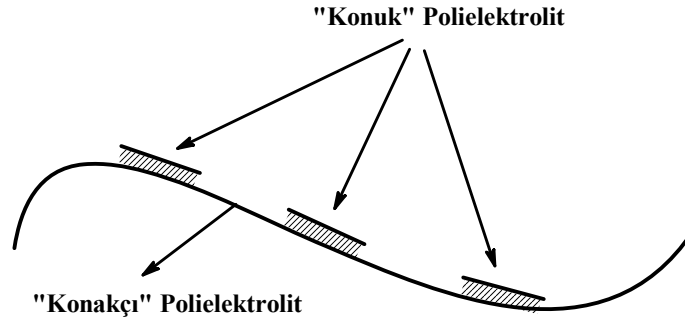


Şekil 2.14 Simpleks oluşum yolları

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

Kompleks oluşum prosesi çok hızlıdır. Oldukça uzun polielektrolit (konakçı) ile kısa bir polielektrolitin (misafir) birleşmesiyle ardışık nonstokiyometrik suda çözünebilir simpleksler oluşabilir (Şekil 2.15) (Tsuchida, 1974; Dautzenberg, 1985; Osada, 1972). Kabanov (1984) çeşitli reaksiyon koşullarında suda çözünebilir simplekslerin oluşumunu kapsamlı bir şekilde incelemiştir. Konakçı ve misafir polielektrolit arasındaki daha zayıf bağlanmalar bu sistemler için karakteristik gibi gözükmemektedir ve yeniden düzenlenmeler ile çözünebilir halden

çözünemez hale dönüşümler gözlemlenmiştir.



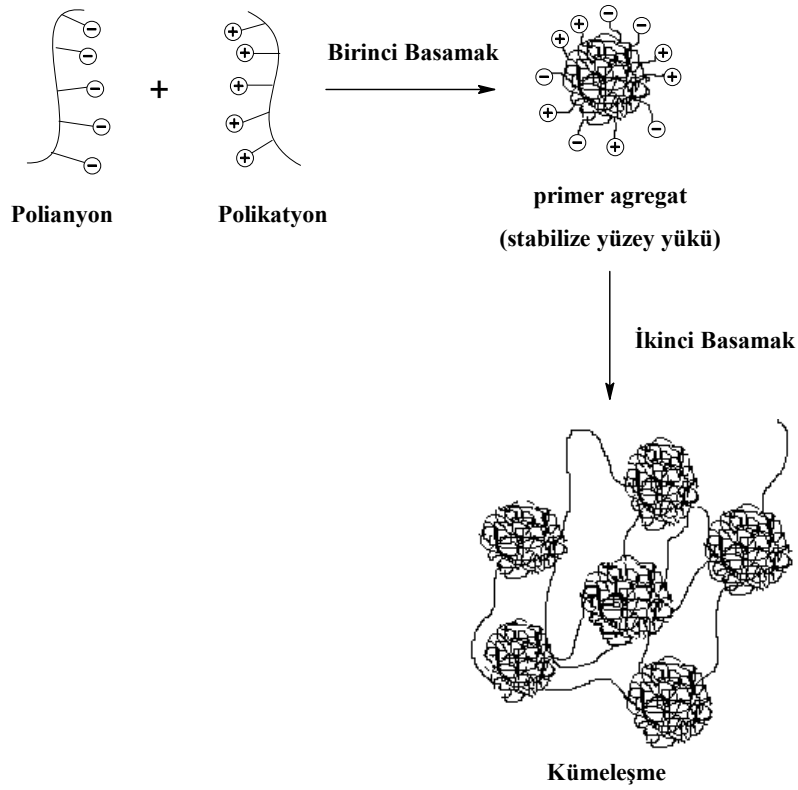
Şekil 2.15 Nonstokiyometrik suda çözünebilen simplekslerin şematik gösterimi

Tek fazlı homojen sistemlerle faz ayrımının gerçekleştiği sistemleri birbirinden ayrılmalıdır. Makroskobik homojen sistemler üç yolla elde edilebilir:

- Çok düşük polimer konsantrasyonlarında küçük simpleks agregatların oluşumu
- Bileşenlerden birinin aşırısında ardışık çözünebilen kompleks oluşumu
- Yüksek polimer konsantrasyonlarında komplekslerin disagregasyonu.

Faz ayrılması bulanık simpleks dağılımını, simpleks yumağı ve polimerce zengin ve az koaservatlaşmayı içermektedir. Makroskobik homojen sistemler ve bulanık sistemler olarak simpleksleri ikiye ayıracak keskin bir çizgi yoktur. Çünkü insan gözündeki yanılmalardan dolayı bu ayrım fiziksel değildir.

Elektroforetik ve viskozimetrik ölçümler simpleks partiküllerinin poliamfolite benzer bir özellikte olduğunu göstermiştir. Seyreltik sulu sistemlerde simpleks oluşumu prosesi için iki basamaklı bir mekanizma önerilmiştir (Şekil 2.16). Birinci basamakta (az miktarda titrant eklendiğinde), iyon eşleşmeleri prosesi ufak simpleks agregatların oluşumuna sebep olmaktadır. Bu primer agregatların yüzey yükü kararlıdır. İkinci basamakta, 1:1 stokiyometrisi için gerekli miktarın %70'inden fazla titrant eklendiğinde, primer agregatların birbirleri ile agrege olması sonucu daha büyük partiküller oluşur [5].



Şekil 2.16 Seyreltik sistemde simpleks oluşumunun iki basamaklı mekanizması

Oluşan materyalin özelliklerini saptayan ilk faktörlerden biri de yük-yük etkileşiminin stokiyometrisidir. Stokiyometrik kompleksler “koaservatlar” ve “çökeltiler” şeklinde de adlandırılmaktadırlar. Oluştukları ortamda çözünür olmayabilirler (Commandur, 1989). Ayrıca yükler nötralize olsa bile çözünebilen komplekslerin oluşumu için düşük konsantrasyonlar yeterli olabilmektedir. Bunun aksine nonstokiyometrik polielektrolit kompleksler yüklerinin bazıları iyonize olduğu için farklı olarak çözünebilen partiküller bulundurmaktadır.

Bir polielektrolit kompleksi oluşumunun gidişatı yüklü grupların etkileşimlerine (iyonizasyon-dissosiasyon gibi) öncülük eden olaylara bağlıdır.

Polielektrolit üzerindeki yük yoğunluğu, kompleksin hem oluşumunda hem de özelliklerinde etkilidir. Yük yoğunluğu az olan polielektrolitlerin oluşturduğu kompleksler daha kolay dissosiyasyon olurken yük yoğunluğu yüksek polielektrolitler daha stabil kompleksler oluştururlar. Koetz ve arkadaşları (1986) polielektrolitlerin kimyasal yapısının ve yük yoğunluğunun kompleks oluşumunu önemli derecede etkilediğini göstermiştir.

Proteinler de polielektrolit özelliğindedir. Hem sentetik hem de doğal polimerlerle güçlü bir şekilde etkileşime girerek polielektrolit kompleksleri oluşturmaktadırlar (Sacco, 1988;

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

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

2.2.1 Polielektrolit-Protein Komplekslerinde Etkileşimler

Temel olarak kovalent olmayan etkileşimlerin bir çoğu polimer ve proteinler arasında kompleks oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Proteinler ve poli(vinilpirolidon) veya diğer hidrofilik noniyonik polimerler arasındaki etkileşim hidrojen bağı ile oluşur ve donör gibi görev yapan karboksilik asit gruplarının varlığını gerektirmektedir (Kokufuta, 2003). Bütün çözünenler suya göre daha hidrofobiktir. Bu sebeple polikomplekslerdeki hidrofobik etkileşimlerin varlığı yok sayılamaz. Hidrofobik etkileşimler için en güçlü kanıt sistematik yapısal değişimlerle ortaya çıkar veya hidrofobik etkileşimlerin karakteristiği olan assosiyasyon entropisine ve entalpisine bağlı sıcaklık değişimi ile bulunabilir, ancak uygun bir ölçüm yöntemi bulunmamaktadır. Elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğu genel olarak kabul edilmiştir. Tuzsuz çözeltilerde ve kuvvetli polielektrolitlerle kompleks oluşumu sırasında stokiyometrik çökeltme gözlenir. Çökelek oluşumu sabit protein/polielektrolit oranında pH'a bağlıdır. Bu davranış polielektrolit kolloid titrasyonuna benzemektedir (Thies vd., 1994). Kabanov ve araştırmacıları (2004) zıt yüklü polielektrolitler temeline dayanan interpolielektrolit kompleksleşme modeli üzerine çalışırken, protein ve polielektrolit arasında oluşan stokiyometrik tuz bağlarının, proteinin iyonik birimlerinden sadece birkaç fraksiyonunu gerektirdiğini bildirdiler. Bütün yüklü birimlerin ya serbest olduğu ya da tuz

bağlarına tutunduğu tüm yüklü birimleri içeren iki halli model bir denge durumunun olduğunu gösterir ve proteinin ya da polielektrolitin diğer bir makro iyonu yerine geçtiği yer değiştirme reaksiyonlarını kantitatif olarak açıklamakta kullanıldı (Kabanov vd., 2004).

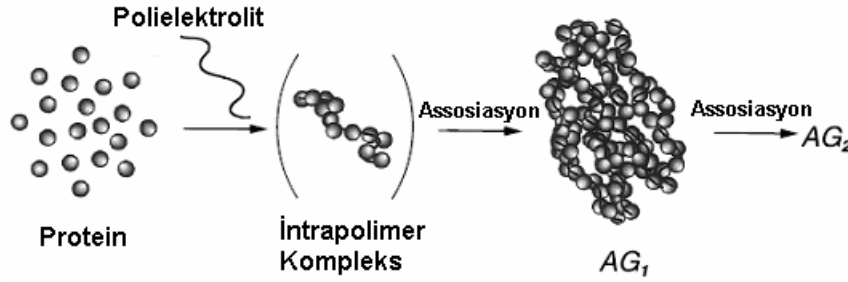
Elektrostatik kuvvetler zıt yüklü grupları içeren tüm etkileşimleri esnek bir şekilde tanımlasa da, proteinin etrafındaki dielektrik alanında bulunan tuz köprülerini de bu kuvvetlere dahil etmeliyiz. Bu özel etkileşimler diğer kısa mesafeli kuvvetleri tamamlamaktadır. Klasik biyokimya modelinde, protein-ligand arasındaki spesifik etkileşim yapısal olarak kusursuz ligand-konakçı komplekslerinin oluşumunu sağlayan spesifik kısa mesafeli kuvvetlerden ortaya çıkar. Ama esas olarak, bağlanma enerjisi protein ve polielektrolitlerin sabit yükleri arasındaki itme ve çekme coulomb kuvvetlerinin bir toplamıdır (Dubin, 2005).

Proteinlerle hidrofobik olarak etkileşecek polimerler spesifik olarak tasarlanabilir. Ancak önemli olan nokta, hidrofobik etkileşimlerin ciddi bir katkı yapmadığı hallerin bilinmesidir (Radeva, 2001). Bütün proteinlerin değişen miktarlarda hidrofobik bölgeleri bulunduğundan ve tüm vinil polimerlerin ana zinciri hidrofobik olduğundan bu tip etkileşimlerin incelenmesi önemlidir. Diğer taraftan bu kuvvetlerin uzun mesafeli doğasından dolayı kuvvetli elektrostatik kararlılığın olması için çözünme de dikkate alınmalıdır. Hidrofobik etkileşimler bazı karakteristik belirtilere sahiptir. Yüksek tuz konsantrasyonunda daha kuvvetli hale gelirler. Hidrofobik yan zincirler takılmış polielektrolitlerin proteinlerle kompleksleri çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bunlara göre metil ve etil yan zincirleri içeren polielektrolitlerin bağlanmasının yaklaşık aynı olduğu görülmüştür. Karbon sayısı 2-6 arasında olan yan zincirlere sahip polielektrolit protein komplekslerinde bağlanma karbon sayısı ile birlikte artmaktadır. Karbon sayısı 8-10 arasında olan yan zincirlere sahip polielektrolitlerde ise bağlanma azalmaktadır. Sonuç olarak C1 ve C2 yan zincirleri proteinin hidrofobik bölgelerine ulaşamamıştır ve C8-C10 yan zincirli polielektrolitlerde ise intrapolimer miselleşme polielektrolit-protein kompleksme reaksiyonu ile yarışmaktadır. Yapılan çalışmalar elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin birbirlerine katkıda bulunduklarını göstermektedir (Schreiber vd., 2000).

2.2.2 Polielektrolit-Protein Komplekslerinde Fiziksel Haller

Polielektrolit-protein komplekslerinin fiziksel halleri çözünürlük derecelerine bağlıdır. Çözünür kompleksler çok miktarda su molekülüyle kuşatılmıştır ve genelde proteinin pI değerine yakın pH değerlerinde oluşmaktadırlar. Polikompleksin toplam net yükü $Z_T = Z_{\text{Polimer}^+} + Z_{\text{Protein}}$ formülü ile gösterilebilir. Z_T sıfıra yaklaştıkça (polianyonlar için $\text{pH} < \text{pI}$

olduğu durumlarda) ufak molekülü iyonların tutulması azalır ve polikompleks daha az su molekülü ile kuşatılmış olan koaservat haline geçer. Polimerin daha fazla yük içermesi, pH'ın proteinin pI değerinden çok uzak olması ve tuz derişiminin az olması gibi daha güçlü etkileşimler var olduğunda faz ayrımı gerçekleşir ve çökelek oluşur (Dubin, 2005). Bu tip faz ayrımı Kokufuta tarafından keşfedilmiştir ve şematik olarak şekil 2.17'de gösterilmiştir

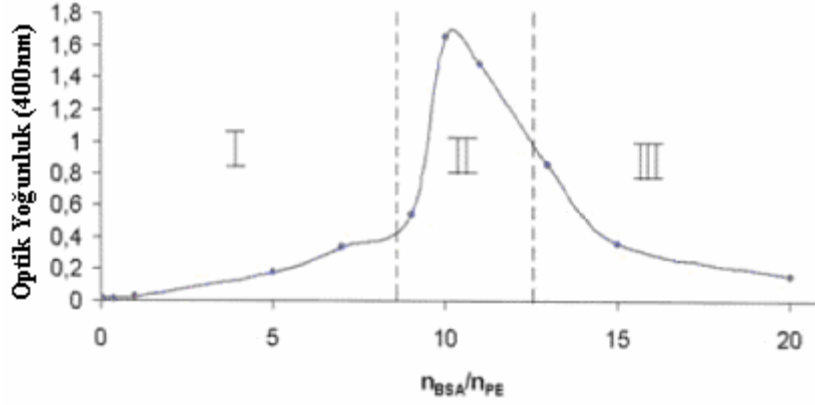


Şekil 2.17 Polielektrolit-protein komplekslerinde faz ayrımı (Kokufuta, 1994)

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

2.2.3 Protein-Polielektrolit Komplekslerinin Türbidimetrik Titrasyonu

Türbidimetrik titrasyon, iki şekilde yapılabilir. Türbidimetrik titrasyonlardan birinde çok seyreltik protein çözeltisine artan konsantrasyonlarda polielektrolit eklenir ve saçılan ışığın şiddeti veya kompleks/çökelek oluşumundan dolayı meydana gelen türbidite eklenen polielektrolitin bir fonksiyonu olarak ölçülür. Diğer türbidimetrik yönteminde ise protein polielektrolite eklenebilir. Kolloid titrasyonunda τ (türbidite) titrant hacmini bir fonksiyonu olarak kaydedilir (genelde tuzsuz sistemlerde) ve maksimum türbiditenin olduğu değer kompleks oluşum stokiyometrisini belirlemekte kullanılmaktadır (Dubin, 2005). Jiang ve Zhu (2001) PAA/jelatin kompleks oluşumunu incelemek için kolloid titrasyonunu kullandılar ve Tsuboi ve arkadaşları (1996) papainin potasyum poli(vinilsülfonat)'la kompleksleşmesini araştırmak için bu tekniği kullandılar.

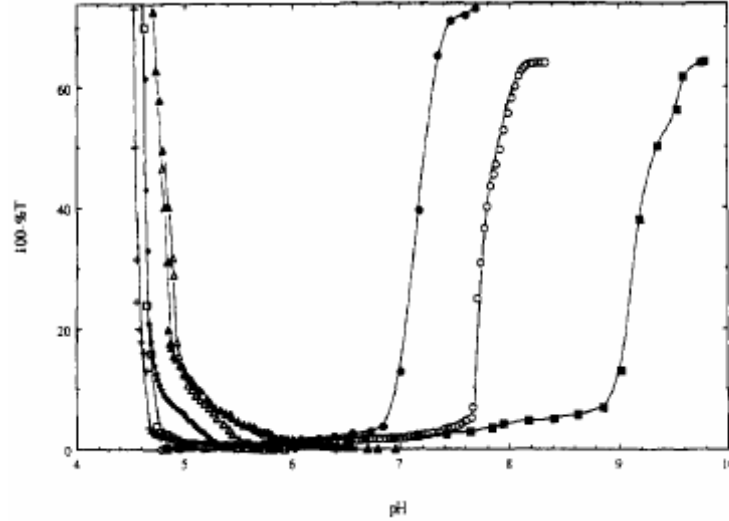


Şekil 2.18 BSA-polielektrolit kompleksinin protein/polielektrolit oranına bağlı türbidimetrik titrasyonu (Mustafaev, 2004).

Polielektrolit çözeltilerine, zıt yüklü protein eklendiğinde kompleks oluşumu meydana gelir. Sistem geniş bir protein/polielektrolit oranı aralığında homojen kalır ve oluşan kompleksler çözünürdür. Polielektrolitin polimerleşme derecesine bağlı olarak birkaç kritik protein komsantrasyonunda sistemde faz ayrımı gerçekleşir. Protein miktarının artırılması türbiditeyi düşürerek çözünür polikomplekslerin olumuna sebep olur.

Protein çözeltileri, zıt yüklü polielektrolit ile titre edildiğinde daha farklı bir davranış gözlenir. Karışımındaki polimer miktarının artırılması türbiditeyi artırarak çözünmeyen kompleks oluşumuna sebep olur. Polielektrolit miktarlarının daha da artırılması çözünür kompleks oluşumunu sağlar. Çözeltideki bileşenlerin oranı bazı kritik değerlere ulaştığında sistem tekrar homojen hale gelir ve daha fazla polielektrolit eklense bile faz hali değişmez. Buna göre protein ve polielektrolitin farklı yollarla karıştırılması karışımındaki bileşenlerin oranına bağlı olarak ara hallerle birbirinden ayrılır (Mustafaev, 2004).

Türbidimetrik titrasyonun diğer bir formunda ise pH değiştirilir (polielektrolit, protein ve tuz derişimi sabit) ve türbidite-pH grafiğinde eğimin sıfırdan farklı olduğu değerler kaydedilir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19 Farklı polielektrolitlerle BSA'nın pH'a bağlı türbidimetrik titrasyonu. +, □, ◇, ▲, Δ farklı yapılarda polianyonları, ●, ○, ■ polikasyonları göstermektedir.

Bu yöntem çözünür kompleks oluşumunun ve faz değişimlerinin gerçekleştiği kritik koşulların belirlenmesinde önemli bilgiler verir (Dubin, 1991).

2.2.4 Polielektrolit-Protein Kompleksleriyle İlgili Yapılan Çalışmalar

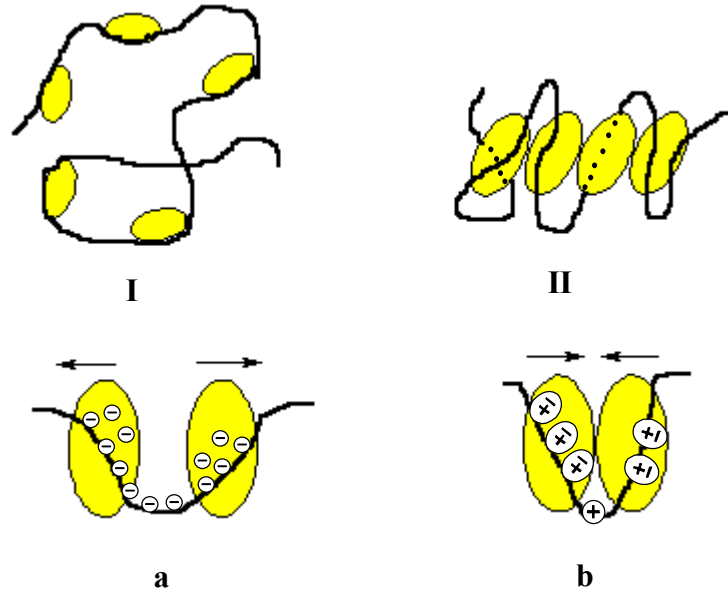
Sentetik polielektrolitlerin proteinlerle kompleksleri ilk olarak Morawetz (1952) tarafından çalışılmıştır. Morawetz bu çalışmada farklı pH, iyonik şiddet, polimer/protein oranı değerlerinde BSA'nın polielektrolitlerle kompleks oluşumunu türbidimetrik olarak incelemiştir. Daha çok çökelek oluşumu üzerinde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

Kabanov, Mustafaev ve araştırmacıları (1978) lineer polielektrolitlerin (poliasitlerin

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

PAA-BSA sisteminde pH azaldığı zaman (pH 6) karşılıklı etkinin karakteri değişmektedir. Bu sistemin sulu çözeltilerinin sedimentogramlarında yalnız bir pik görülür. Protein ilave ettikçe bunun alanı ve sedimentasyon sabiti artmaktadır. Bu farklar çözeltideki bileşenler arasında kompleks oluşumunu göstermektedir. pH 6'da protein ve polielektrolit önce olduğu gibi aynı yüklüdürler. pH 7'ye nispeten genel negatif yük her ikisinde biraz azdır. Başka bir deyişle önce olduğu gibi elektrostatik karşılıklı etki kompleks oluşumuna engel teşkil etmektedir. Ancak proteinin lineer polielektrolitle adsorbsiyonuna neden olan başka faktörleri yok edememektedir. Böyle faktörlerden hidrojen bağlarını ve polar olmayan karşılıklı etkiyi göstermek olasıdır.

PAA-BSA kompleksleri "circular dichroism" ve optik çevrilme metodu ile incelenmiştir. Sonuçlar proteinin kompleksleşmesi sırasında sarmallık seviyesinin değişmediğini göstermektedir. Bu sonuca göre proteinin polianyon üzerine adsorbsiyonu ile küresel yapısının fazla değişmediğini söylemek mümkündür. Polielektrolit makromoleküllerinin zincirinin uzunluğunun küresel proteinlerin çapından fazla olduğu dikkate alınarak her bir zincirin ardışık olarak birkaç protein molekülünü bağladığını söylemek mümkündür ve kompleksin yapısı şekildeki gibi gösterilebilir.



Şekil 2.20 Suda çözünen PE-protein komplekslerinin yapısı: I- Poliasitlerin polianyonlarının proteinlerle komponentler aynı (negatif) yüklendiğinde oluşan komplekslerinin yapısı, II- Lineer polielektrolitlerin zıt yüklenmiş proteinlerle $n_P/n_{PE} \leq N_i$ oranında oluşan komplekslerin yapısı “a” ve “b” - “a” (I) ve “b” (II) tipli yapıların oluşumunu şematik olarak göstermektedir.

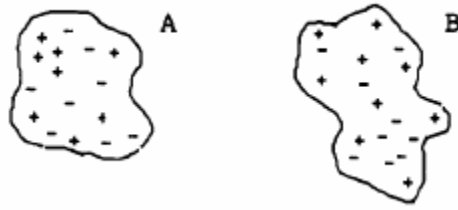
Bu yapıda (I) protein molekülleri istatistik yumak konformasyonunda olan polielektrolit zinciri boyunca rasgele dağılmıştır. Sistemin kompleks oluşumunda spesifik viskozitesinin nispeten az değişimi bu yapıya uygundur. “I” yapısı, protein partiküllerinin polikasyonlarla nötral su ortamında oluşturdukları çözünen komplekslerinin yapısından prensip olarak farklıdır. Küresel proteinlerin polianyonlarla kompleks oluşumunun karşılaştırmalı analizini bu şekilde açıklanabilmektedir. Her iki durumda küresel proteinler negatif yüklüdürler, yani elektrostatik faktör bunların temasta olmasını engellemektedir. Proteinlerin polikasyonlarla adsorbsiyonunda yukarıda söylenildiği gibi pozitif yüklü polikasyon monomerleri ile negatif yüklü protein grupları arasında elektrostatik bağların oluşması esastır. Buna göre proteinin negatif yükleri kapanmakta ve adsorpsiyon olmuş kürelerin temasta olmasına engel olmamaktadır. Yani polar olmayan karşılıklı bir etki gözlenmektedir. Aynı zamanda polikasyonun yükleri yeteri kadar kapanarak “II” yapısının yığılması yolu ile ayrı ayrı bölümlerinin yaklaşmasına imkan vermektedir. Proteinlerin polianyonlarla adsorpsiyonunda durum tamamıyla başkadır. Negatif yüklü kürelerin polielektrolitlerle bağlanması elektrostatik itmenin tersi olarak oluşmaktadır. Her bir adsorbe olan proteinin efektif negatif yükü buna bağlı polianyon monomerinin miktarına göre artabilmektedir. Buna göre kompleks partiküllerinde küresel proteinlerin temasta olması menfaatli (veya az menfaatli) değil ve bunlar birbirlerine aralıklı olarak yerleşerek “II” tipli yapıyı oluşturmaktadırlar. Böylelikle

küresel proteinler lineer polielektrolitlerle iki tip çözünen kompleks oluşturabilmektedir. Proteinlerin polikasyonlarla kompleksleri açık bir şekilde ifade olunan kooperatif karakterde ve kendisine bağlı yapı meyili olması ile karakterize olurlar. Proteinin az miktarında bunlar için küresel proteinlerin polielektrolit zincirleri arasında beraber olmayan dağılması görülmektedir. Proteinle maksimum yüklenmiş polikasyonlar pratik olarak, yüklenmemiş polikasyonlarla aynı zamanda bulunmaktadır. Silindire benzer partiküllerin kendisine bağlı yığını oluşur. Bu sistemlerin tam aksi olarak proteinlerle polianyonların çözünen kompleksleri bunlarda küresel proteinlerin beraber absorpsiyonu yolu ile oluşmaktadır. Böylece sistemde istatistik yumak komformasyonunda olan çözünen kompleks partikülleri oluşmaktadır. Bütün bunlara bağlı olarak proteinlerin amfoter kopolimerlerle komplekslerinin incelenmesi çok önemlidir. Bu sistemlerde genellikle bir tip bağlanmadan başka tip bağlanmaya geçmek mümkündür.

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

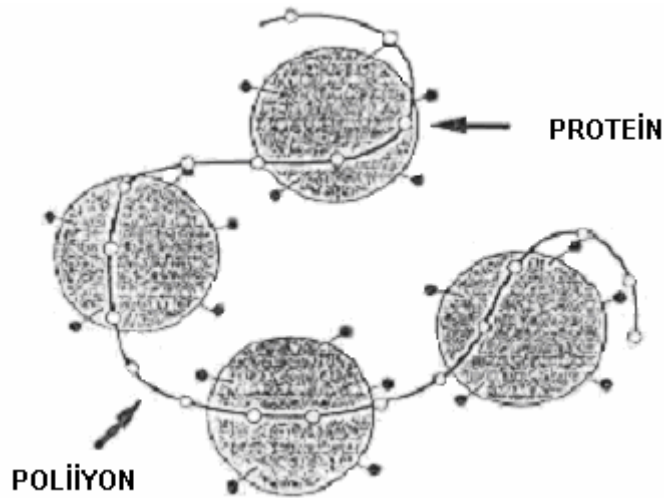
Diğer bir çalışmada, Dubin ve arkadaşları (1991) protein polielektrolit komplekslerinde proteinin yüklerinin heterojen dağılımının etkisini tanımlamışlardır. Globular proteinler ve sentetik polielektrolitler arasındaki etkileşimler 0.10 M NaCl çözeltisinde türbidimetrik ve "quasielastic" ışık saçılması (QELS) teknikleri ile incelenmiştir. pH titrasyonları, farklı izoelektrik noktalı üç monomerik proteininin (bovin serum albumin, lizozim, bovin pankreas ribonükleazı) belli miktarda yük yoğunluğuna sahip katyonik ve anyonik polielektrolitlere bağlanmasını sağlamakta kullanılmıştır. Protein-polianyon çözeltisine HCl ya da protein-polikasyon çözeltisine NaOH ekleyerek, her bir polimer-protein çifti için assosiyasyonun olduğu ilk pH değeri tespit edilmiştir. QELS ya da türbidimetri ile saptanabilen bu kritik pH değeri çözünür polianyon-protein kompleksi oluşumuna karşılık gelir ve bunu, pH daha fazla değiştirildiğinde, faz ayrımı takip eder. Bilinen protein pH titrasyon eğrileri kullanılarak bu kritik şartlardaki proteinin net yükü (Z_c) hesaplanabilmiş ve Z_c 'nin polielektrolit üzerindeki

yükün işareti ile aynı işarete sahip olduğu gösterilmiştir. Proteinler için bilgisayar modellemeleri sonuçlarında da gösterildiği gibi RNAz, sulu çözeltisinde hem pozitif hem de negatif yüklü bölgelere sahiptir. Proteindeki bu yük öbeğinin, polielektrolit ve globular protein arasındaki itme kuvvetinin üstesinden gelebilecek daha güçlü bir çekme kuvveti sağladığı bulunmuştur. Bu sebeple negatif yüklü globular proteinlerle polianyonların kompleks oluşturması, proteindeki yük öbekleri ve polielektrolit arasındaki bölgesel etkileşimlerin var olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.21 İzoelektrik noktası civarında proteinlerin pozitif ve negatif yük öbeklerinin şematik gösterimi.

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



Şekil 2.22 Protein ve poliyon içeren stokiyometrik kompleksin şematik gösterimi.

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

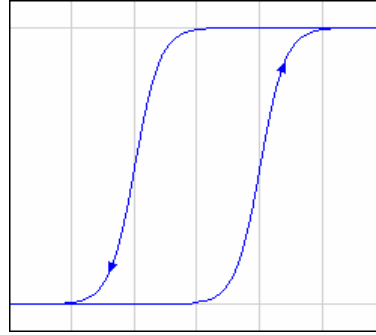
Andrianov ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada pH 7'de BSA-poly[di-(carboxylatophenoxy) phosphazene] kompleksinin oluşumunu ve immunolojik etkilerini incelemişlerdir. Oluşan kompleksin molekül ağırlığının polimerin tek başına olduğu halden daha ağır olduğunu ama kompleksin boyutunun polimerden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

Son on yılda yapılan çalışmalarda temel olarak şu üç faktörün üzerinde durulmuştur: uygulamalar, enstrümantel çalışmalar ve simulasyonlar. Polielektrolit multi tabakaları ile protein-polielektrolit kompleksleri üzerine yapılan çalışmaların bir arada sürdürülmesi; glukoz, kolesterol ve antikörlerin saptanmasında kullanılan biyosensörlerin dayanımını ve stabilitesini artırmaya yönelik protein-elektrolit tabakalarının elde edilmesi için önemli olanaklar sağlamıştır. Yüzey karakterizasyonu için optik "waveguide" lazer spektroskopisi, yüzey plazmon rezonans (SPR) ve dar açılı reflaktometrisi kullanılarak uygulanan yeni teknikler bu multitablekaların incelenmesine yardımcı olmaktadır. Protein-polielektrolit komplekslerinin karakterizasyonunda uygulanabilen yeni teknikler kapiler elektroforez ve affinite esaslı ayırma metodlarıdır. Son on yılda komplekslerin faz davranışları ve yapısının iç yüzünün anlaşılmasını sağlamada bu simulasyonlar büyük yankı uyandırmıştır. Polielektrolit-protein kompleks koaservat fazlarının çökelek ve süspansiyonlardan ayrı ve farklı olarak kabul edilmesi nm-µm ölçekli yeni mikroskopik tekniklerin geliştirilmesinde fayda sağlamıştır. Son olarak polielektrolitler, proteinler için koaservat ve mikrokapsüller içinde ılıman immobilizasyon koşulları sağladığı için, farmasötik uygulamalarda proteinlerin taşınması ve tutulması (entrapment) için polielektrolitlerin jel veya "brush" olarak kullanılması şaşırtıcı değildir. Bu alanlardaki çalışmalar 1995'den önceki literatüre dayanmaktadır. Biyokimya, malzeme bilimi, polimer ve kolloid kimyası ile diğer disiplinlerin bir araya gelmesi önümüzdeki yıllarda bu alanda daha yaratıcı ve geniş kapsamlı bilimsel çalışmaların temelini atmış olacaktır (Dubin, 2005).

2.3 Histereziz

Histereziz, üzerlerine uygulanan kuvvete anında cevap vermeyen, yavaşça tepki veren yada ilk hallerine dönmeyen fiziksel sistemlerin özelliğidir. İlk defa James Alfred Ewing tarafından şu şekilde tanımlanmıştır: “M ve N isimli iki nicelikten N döngüsel değişimi M döngüsel değişimine sebep olduğunda, M değişimi N’den daha yavaş ilerliyorsa, M ve N bağıntısında histereziz olduğu söylenebilir.”. Günümüzde histereziz kelimesi birçok alanda kullanılmaktadır: mekanik, fizik (ferromanyetik histereziz), faz geçişleri, hidroloji ve ekonomi [7].

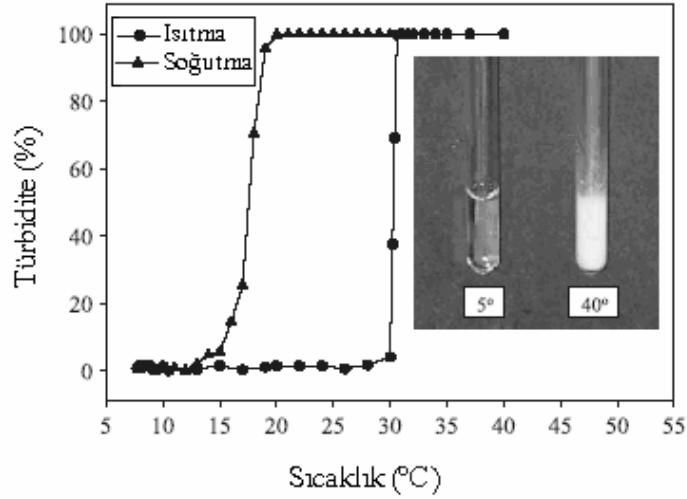
Histerezizli bir sistemin uygulanan kuvvete karşı grafiği çizilecek olursa, elde edilen eğri tek bir çizgi değil de bir ilmik şeklinde olacaktır (Şekil 2.23)



Şekil 2.23 Histerezizli bir sistemde uygulanan kuvvete (x eksen) bağlı olarak gözlenen değişim (y eksen)

Histereziz olayı, katı-sıvı faz geçişlerinde de görülür. Örneğin, agar 85 °C ‘de erirken 40 °C ‘ye soğutulana kadar katı faza geçmez. Bu sebeple, agar 40-85 °C arasında daha önceki fazına bağlı olarak sıvı veya katı olabilir [6].

Herrero-Vanrell ve arkadaşları (2005) poli(VPAVG) polimerinin sıcaklık değiştiğinde yapısında meydana gelen histereziz olayını incelemişlerdir. Bu polimer kritik bir sıcaklıktan (30°C) daha yukarıya ısıtıldığında suda çözünmeyen partiküller oluştururken, polimer geri soğutulduğunda 12-15°C ‘ye kadar çözünür hale geçmemektedir. Bu durum türbidimetrik olarak incelenmiştir (Şekil 2.24).



Şekil 2.24 Polimer çözeltisinin agregasyonunun (ısıtma) ve çözünmesinin (soğutma) türbidimetrik olarak incelenmesi (Herrero-Vanrell, 2005).

2.4 Kullanılan Ölçüm Yöntemleri

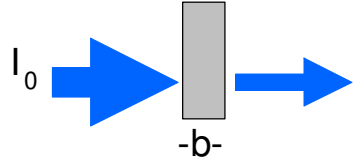
2.4.1 UV-VIS Spektroskopisi

Protein ve nükleik asitlerin konsantrasyonlarının hesaplanmasında UV-VIS spektroskopisinin kullanımı oldukça bilinen bir yöntemdir. Bomberg (2001) insülinin poliakrilik asit ile etkileşiminden sonra artık konsantrasyonunu hesaplamada kullanmıştır. Jiang ve Zhu (2001), PMAA- ve PAA-jelatin kompleks jellerindeki miyogloblin, sitokrom c ve pepsin “entrapment”ını saptamada kullanmışlardır. (Dubin, 2005)

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

$$\log I_0 / I = \epsilon bc = A \quad (2.2)$$

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



Şekil 2.25 Işık, c konsantrasyonunda, b cm kalınlığında bir ortamdan geçerken, absorpsiyon nedeniyle şiddeti I_0 'dan I 'ya düşmüştür.

Geçirgenlik;

$$T = I/I_0 \quad (2.3)$$

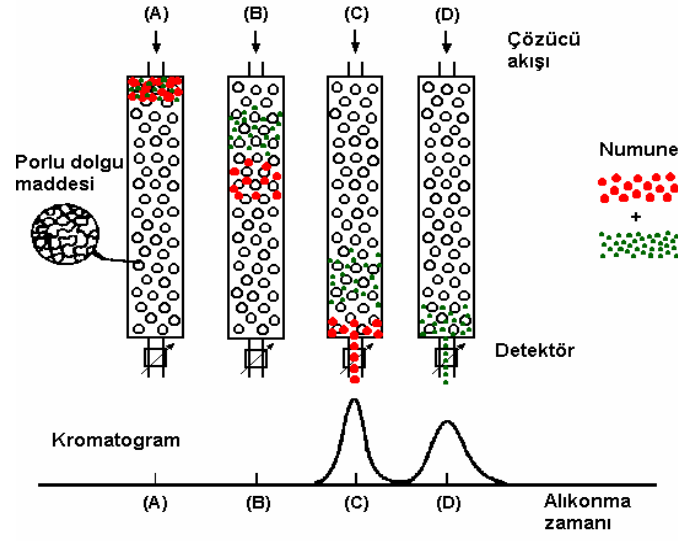
Absorbans;

$$A = \log I_0/I \quad (2.4)$$

Absorbans ile derişim arasındaki bu ilişkiden analitik olarak yararlanılır. Ancak bu çalışmamızda proteinlerin belli dalga boyunda (280 nm) absorbans piki verdikleri gerçeğine dayanarak UV-VIS moleküler absorpsiyon spektroskopisi yöntemini tanıma amaçlı kullandık. Ayrıca türbidimetrik titrasyon çalışmaları sırasında görünür bölgede (500 nm) çözeltilerin absorbansını ölçmekte kullandık.

2.4.2 Moleküler Eleme Kromatografisi

Polimerlerin HPLC'de ayrılmasında kullanılmaktadır. Bu kromatografi türünde sabit faz olarak belli büyüklükte gözenekleri olan çapraz bağlı polimerler kullanılır. Polimerler farklı boylardaki moleküllerin bir karışımıdır. Polimer karışımı çözelti haline getirildiğinde herbir polimer molekülü boyutuna bağlı olarak farklı hidrodinamik çaplara sahip olacaktır. Ufak moleküller gözeneklerde daha uzun süre kalacakları için kolonu geç terk edeceklerdir. Molekül çapı büyüdükçe kolonda kalma süresi kısılacak ve sistemden daha çabuk ayrılacaklardır. Detektör de farklı zamanlarda çıkan molekülleri saptayıp kromatograma dönüştürecektir. Bu yöntemin en önemli özelliği ayırmanın tamamen fiziksel olarak yapılmasıdır. Diğer tüm HPLC tekniklerinde ayırma kimyasal etkileşimlere dayanmaktadır.



Şekil 2.26 Kolon kromatografisinde molekül büyüklüğüne göre ayrılma ve alıkonma zamanına göre oluşan kromatogram.

Moleküler eleme kromatografisinde UV, RI, ışık saçılması ve viskozite detektörleri kullanılabilmektedir.

3. DENEYSEL KISIM

3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- WTW pH level 1 pH metre
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre
- Viscotek 4 Dedektörlü GPC (SEC) Sistemi (Viscotek TDA 302 üçlü dedektör dizisi, Viscotek Model 2501 UV dedektörü, Viscotek GPCmax VE2001 örnek modülü kısımlarından oluşur.)
- Precisa XB 220A Hassas Terazî
- Heildolph MR 3001 Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı
- Binder Vakum Etüvü
- Finnpiette Micropipet (1-10 ml, 100-1000 µl, 5-50 µl)
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Shimadzu HPLC Sistemi
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)
Sodyum klorür (NaCl)	Asetik Asit (CH_3COOH)
HCl	NaOH
Poliakrilik asit (PAA)	Bovin serum albumin (BSA)
Sodyum azid (NaN_3)	

3.2 PAA Titrasyonu

2 mg/ml konsantrasyonda 25 ml PAA çözeltisi saf su ile hazırlandı. HCl ilave ederek pH 2'ye ayarlandı. 1N NaOH çözeltisinden 15'er μ l eklenerek titre edildi. Her NaOH çözeltisi ilavesinden sonra çözeltinin pH değeri okundu. Okunan pH ile NaOH sarfiyatı arasında grafik çizildi.

3.3 BSA/PAA Kompleksleri

Hesaplamalardaki gibi 19 farklı oranda ve pH 4, pH 4.3, pH 5, pH 6 ve pH 7 olmak üzere 5 farklı pH da 95 tane farklı kompleks çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiler BSA ve PAA'nın fiziksel karışımlarıdır.

3.3.1 Kullanılan Çözeltiler

a) 0.01 mol/lit'lik PBS Tamponu (pH=7, pH=6)

1.1998g NaH_2PO_4 ($M_w=119.98$ g/mol) tartılarak 500ml ultra saf suda çözülür. Aynı zamanda 2.6807g ($M_w=268.07$ g/mol) tartılarak yine 500ml ultra saf suda çözülür. Bu iki çözeltiden NaH_2PO_4 çözeltisi Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine eklenir. Bu karışıma 8.766 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. 1 M NaOH veya 1 M HCl ile pH ayarlanır.

b) Asetat Tamponu (pH 5, pH 4, pH 4.3)

5.72 ml asetik asit, ultra saf su ile 2 lt'ye tamamlanır. Bir süre manyetik karıştırıcıda karıştıktan sonra 17.53 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. 1M NaOH ile pH ayarlanır.

3.3.2 Komplekslerin Hazırlanışı

PAA stok çözeltisi 3mg/ml olacak şekilde ultra saf suda hazırlandı. Her bir çözeltideki PAA miktarı sabit olduğuna göre her bir çözelti için (19 adet farklı $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranında) hazırlanan stoktan 10 ml çözelti için 3335 μ l PAA çekilerek pH 7'lik tamponda iyice karışması sağlandı. Gerekli miktarda BSA tartılarak pH 7 tamponunda çözünmesi sağlanarak BSA stoğu hazırlandı. Daha sonra PAA çözeltilerinin pH'ı kontrol edilerek (pH 7 de olması gerekli) hesaba göre gerekli miktarlardaki BSA stoktan çekilerek karışmakta olan çözeltiye yavaş yavaş ilave edildi. Çözeltinin istenilen pH'da olup olmadığı kontrol edildi. Yaklaşık 30 dk

kadar karıştırıldı. Bütün karıştırma işlemleri manyetik karıştırıcıda ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Çalışılan her pH değeri için aynı aşamalar gerçekleştirildi.

3.3.3 Hesaplamalar

PAA konsantrasyonu sabit tutularak, farklı BSA konsantrasyonlarına 19 farklı oranda kompleks çözeltisi hazırlanmıştır. Bu hesaplamalar şu şekildedir:

$$\frac{n_{BSA}}{n_{PAA}} = \frac{c_{BSA} \cdot M_{PAA}}{c_{PAA} \cdot M_{BSA}} = \frac{0.05; 0.1; 0.25; 0.4; 0.5; 0.75; 1; 2; 3; 5; 7.5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50}{30; 35; 40; 50}$$

PAA'nın çözeltideki konsantrasyonu % 0.1 dir.

$$M_{PAA} = 100\,000 \text{ Da}$$

$$M_{BSA} = 66\,000 \text{ Da}$$

1) $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.05$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{BSA} = 0.0033\text{g}/100\text{ml} = 0.033\text{mg}/\text{ml} = 0.33\text{mg}/10 \text{ ml}$$

2) $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.1$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{BSA} = 0.0066\text{g}/100\text{ml} = 0.066\text{mg}/\text{ml} = 0.66\text{mg}/10 \text{ ml}$$

3) $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.25$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{BSA} = 0.0165\text{g}/100\text{ml} = 0.165\text{mg}/\text{ml} = 1.65\text{mg}/10 \text{ ml}$$

4) $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.4$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{BSA} = 0.0264\text{g}/100\text{ml} = 0.264\text{mg}/\text{ml} = 2.64\text{mg}/10 \text{ ml}$$

5) $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{BSA} = 0.033\text{g}/100\text{ml} = 0.33\text{mg}/\text{ml} = 3.3\text{mg}/10 \text{ ml}$$

6) $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.75$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{BSA} = 0.0495\text{g}/100\text{ml} = 0.495\text{mg}/\text{ml} = 4.95\text{mg}/10 \text{ ml}$$

7) $n_{BSA}/n_{PAA} = 1$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{BSA} = 0.066\text{g}/100\text{ml} = 0.66\text{mg}/\text{ml} = 6.6\text{mg}/10 \text{ ml}$$

8) $n_{BSA}/n_{PAA} = 2$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{BSA} = 0.132\text{g}/100\text{ml} = 1.32\text{mg}/\text{ml} = 13.2\text{mg}/10 \text{ ml}$$

- 9) $n_{BSA}/n_{PAA} = 3$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi
 $c_{BSA} = 0.198\text{g}/100\text{ml} = 1.98\text{mg}/\text{ml} = 19.8\text{mg}/10\text{ ml}$
- 10) $n_{BSA}/n_{PAA} = 5$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi
 $c_{BSA} = 0.33\text{g}/100\text{ml} = 3.3\text{mg}/\text{ml} = 33\text{mg}/10\text{ ml}$
- 11) $n_{BSA}/n_{PAA} = 7.5$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi
 $c_{BSA} = 0.495\text{g}/100\text{ml} = 4.95\text{mg}/\text{ml} = 49.5\text{mg}/10\text{ ml}$
- 12) $n_{BSA}/n_{PAA} = 10$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi
 $c_{BSA} = 0.66\text{g}/100\text{ml} = 6.6\text{mg}/\text{ml} = 66\text{mg}/10\text{ ml}$
- 13) $n_{BSA}/n_{PAA} = 15$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi
 $c_{BSA} = 0.99\text{g}/100\text{ml} = 9.9\text{mg}/\text{ml} = 99\text{mg}/10\text{ ml}$
- 14) $n_{BSA}/n_{PAA} = 20$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi
 $c_{BSA} = 1.32\text{g}/100\text{ml} = 13.2\text{mg}/\text{ml} = 132\text{mg}/10\text{ ml}$
- 15) $n_{BSA}/n_{PAA} = 25$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi
 $c_{BSA} = 1.65\text{g}/100\text{ml} = 16.5\text{mg}/\text{ml} = 165\text{mg}/10\text{ ml}$
- 16) $n_{BSA}/n_{PAA} = 30$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi
 $c_{BSA} = 1.98\text{g}/100\text{ml} = 19.8\text{mg}/\text{ml} = 198\text{mg}/10\text{ ml}$
- 17) $n_{BSA}/n_{PAA} = 35$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi
 $c_{BSA} = 2.31\text{g}/100\text{ml} = 23.1\text{mg}/\text{ml} = 231\text{mg}/10\text{ ml}$
- 18) $n_{BSA}/n_{PAA} = 40$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi
 $c_{BSA} = 2.64\text{g}/100\text{ml} = 26.4\text{mg}/\text{ml} = 264\text{mg}/10\text{ ml}$
- 19) $n_{BSA}/n_{PAA} = 50$ olan 10ml BSA-PAA Kompleks Çözeltisi
 $c_{BSA} = 3.3\text{g}/100\text{ml} = 33\text{mg}/\text{ml} = 330\text{mg}/10\text{ ml}$

3.4 PAA/BSA Kompleksleri

Hesaplamalardaki gibi 15 farklı oranda ve pH 4, pH5 ve pH 7 olmak üzere 3 farklı pH da 45 tane farklı kompleks çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiler BSA ve PAA'nın fiziksel karışımlarıdır.

3.4.1 Komplekslerin Hazırlanışı

BSA stok çözeltisi 3mg/ml olacak şekilde tamponda hazırlandı. Her bir çözeltideki BSA miktarı sabit olduğuna göre her bir çözelti için (15 adet farklı n_{PAA}/n_{BSA} oranında) hazırlanan stoktan 10 ml çözelti için yapılan hesaba göre gerekli miktarda PAA çekilerek pH 7'lik tamponda iyice karışması sağlandı. Daha sonra PAA çözeltilerinin pH'ı kontrol edilerek (pH 7 de olması gerekli) hazırlanan stoktan 5000µl BSA çekilerek karışmakta olan çözeltiye yavaş yavaş ilave edildi. Çözeltinin istenilen pH'da olup olmadığı kontrol edildi. Yaklaşık 30 dk kadar karıştırıldı. Bütün karıştırma işlemleri manyetik karıştırıcıda ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Çalışılan her pH değeri için aynı aşamalar gerçekleştirildi.

3.4.2 Hesaplamalar

BSA konsantrasyonu sabit tutularak, farklı PAA konsantrasyonlarına 15 farklı oranda kompleks çözeltisi hazırlanmıştır. Bu hesaplamalar şu şekildedir:

$$\frac{n_{PAA}}{n_{BSA}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{BSA}}{c_{BSA} \cdot M_{PAA}} = \begin{matrix} 0.02; & 0.025; & 0.0286; & 0.033; \\ 0.04; & 0.05; & 0.066; & 0.1; & 0.133; \\ 0.2; & 0.3; & .5; & 1; & 1.33; & 2 \end{matrix}$$

BSA'nın çözeltideki konsantrasyonu % 0.15'tir.

$$M_{PAA}=100\ 000\ Da$$

$$M_{BSA}=66\ 000\ Da$$

- 1) $n_{PAA}/n_{BSA} = 0.02$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.0045g/100ml = 0.045mg/ml = 0.45mg/10\ ml$
- 2) $n_{PAA}/n_{BSA} = 0.025$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.00568g/100ml = 0.0568mg/ml = 0.568mg/10\ ml$
- 3) $n_{PAA}/n_{BSA} = 0.0286$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.0065g/100ml = 0.065mg/ml = 0.65mg/10\ ml$
- 4) $n_{PAA}/n_{BSA} = 0.033$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.0075g/100ml = 0.075mg/ml = 0.75mg/10\ ml$
- 5) $n_{PAA}/n_{BSA} = 0.04$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi

- $c_{PAA} = 0.0091\text{g}/100\text{ml} = 0.091\text{mg}/\text{ml} = 0.91\text{mg}/10\text{ ml}$
- 6) $n_{PAA}/n_{BSA} = \mathbf{0.05}$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.0114\text{g}/100\text{ml} = 0.114\text{mg}/\text{ml} = 1.14\text{mg}/10\text{ ml}$
- 7) $n_{PAA}/n_{BSA} = \mathbf{0.066}$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.0151\text{g}/100\text{ml} = 0.151\text{mg}/\text{ml} = 1.51\text{mg}/10\text{ ml}$
- 8) $n_{PAA}/n_{BSA} = \mathbf{0.1}$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.0227\text{g}/100\text{ml} = 0.227\text{mg}/\text{ml} = 2.27\text{mg}/10\text{ ml}$
- 9) $n_{PAA}/n_{BSA} = \mathbf{0.133}$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.030\text{g}/100\text{ml} = 0.30\text{mg}/\text{ml} = 3.00\text{mg}/10\text{ ml}$
- 10) $n_{PAA}/n_{BSA} = \mathbf{0.2}$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.0455\text{g}/100\text{ml} = 0.455\text{mg}/\text{ml} = 4.55\text{mg}/10\text{ ml}$
- 11) $n_{PAA}/n_{BSA} = \mathbf{0.3}$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.0682\text{g}/100\text{ml} = 0.682\text{mg}/\text{ml} = 6.82\text{mg}/10\text{ ml}$
- 12) $n_{PAA}/n_{BSA} = \mathbf{0.5}$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.1140\text{g}/100\text{ml} = 1.14\text{mg}/\text{ml} = 11.4\text{mg}/10\text{ ml}$
- 13) $n_{PAA}/n_{BSA} = \mathbf{1}$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.2270\text{g}/100\text{ml} = 2.27\text{g}/\text{ml} = 22.7\text{mg}/10\text{ ml}$
- 14) $n_{PAA}/n_{BSA} = \mathbf{1.33}$ olan 10ml PAA/BSA Kompleks Çözeltisi
 $c_{PAA} = 0.3030\text{g}/100\text{ml} = 3.03\text{mg}/\text{ml} = 30.3\text{mg}/10\text{ ml}$
- 15) $n_{BSA}/n_{PAA} = \mathbf{2}$ olan 10ml PAA-PAA Kompleks Çözeltisi
 $c_{BSA} = 0.455\text{g}/100\text{ml} = 4.55\text{mg}/\text{ml} = 45.5\text{mg}/10\text{ ml}$

3.5 UV-VIS Spektrofotometresi Ölçümleri

Kompleks çözeltileri hazırlandıktan sonra optik yoğunluklarına bakıldı. Bunun için santrifüj öncesi 500 nm deki absorbansları ölçüldü. Daha sonra bu çözeltiler santrifüj edilip çökelekleri ayrıldıktan sonra süpernatantların 280nm deki absorbanslarına bakıldı.

3.6 Moleküler Eleme Kromatografisi Ölçümleri

Kompleks çözeltileri santrifuj edildikten sonra 0.45 μm 'lik enjektör filtresiyle süzülerek bu cihaza verilmiştir. 25 °C'de, 1.0 ml/dk akış hızında, 20 μl enjeksiyon hacminde ve Shim-Pack Diol-300 kolonunda UV detektörüyle (280 nm'de) çalışılmıştır. Her pH değerindeki moleküler eleme kromatografisi ölçümleri için o pH'daki çözeltinin hazırlanmasında kullanılan tampon, mobil faz olarak kullanılmıştır. Bu sistemden komplekslerin karakteristiği hakkında bilgi elde edilmiştir.

3.7 Komplekslerin pH'a Bağlı Türbidimetrik Titrasyonu

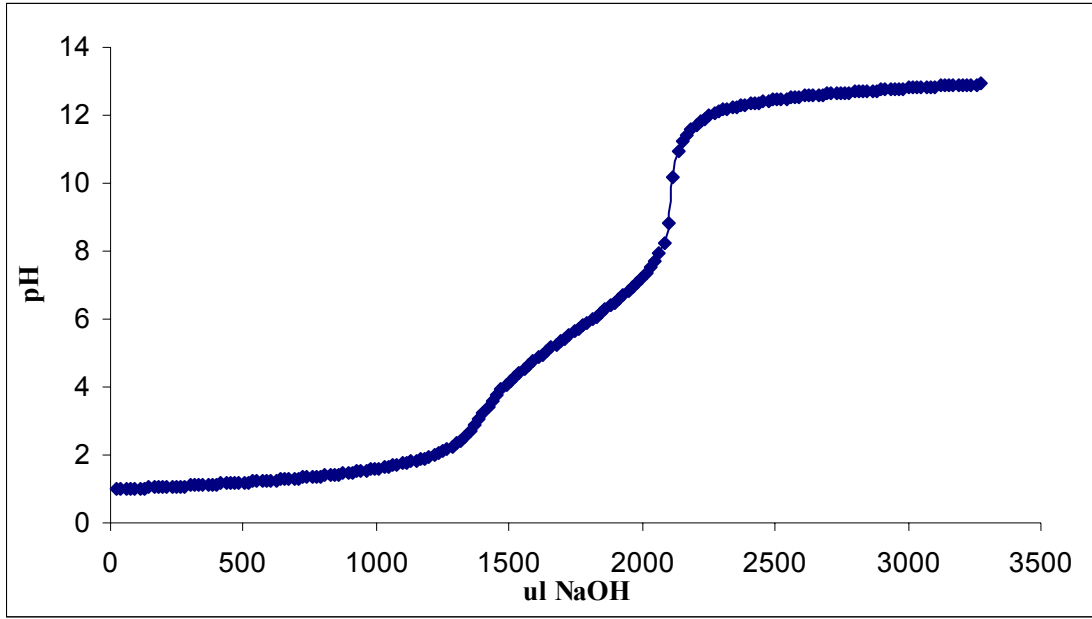
$n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}=1$ oranında pH 7'de kompleks hazırlandı. Hazırlanan çözelti 1 M HCl kullanılarak belli bir pH değerine düşürüldü, 30 dakika karıştırıldı ve 500 nm'de absorbens değeri ölçüldü. pH 4 oluncaya dek bu işlem tekrarlandı.

$n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}=15$ oranında pH 7'de kompleks hazırlandı. Hazırlanan çözelti 1 M HCl kullanılarak belli bir pH değerine düşürüldü, 30 dakika karıştırıldı ve 500 nm'de absorbens değeri ölçüldü. pH 4 oluncaya dek bu işlem tekrarlandı. pH 4 değerinden sonra 1 M NaOH kullanılarak pH belli bir değere yükseltildi, 30 dakika karıştırıldı ve 500 nm'de absorbens değeri ölçüldü. Bu işlem pH 7 oluncaya dek tekrarlandı.

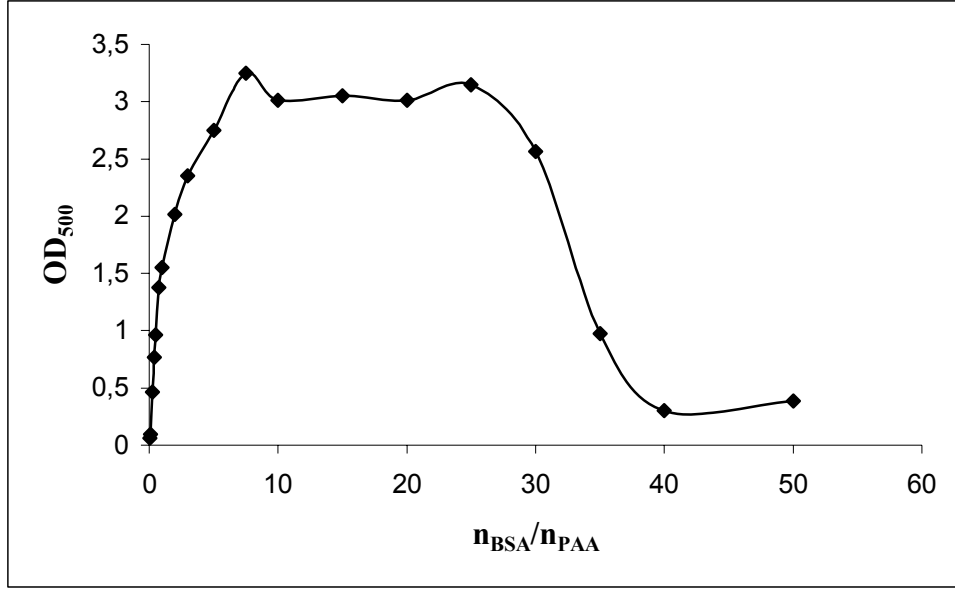
3.8 pH 4'te Oluşan Çökeltinin pH 7'de Çözülüp SEC'de İncelenmesi

pH 4'te hazırlanan $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}=10$ oranındaki kompleks çözeltisi santrifuj edilip çökeltisi ayrıldı. Çökelti vakumlu etüvde kurutuldu. Bu çökelek pH 7 tamponunda çözünene dek karıştırıldı. Çözelti 0.45 μm 'lik enjektör filtresiyle süzülerek SEC sistemine verildi. 25 °C'de, 1.0 ml/dak akış hızında, 20 μl enjeksiyon hacminde ve Shim-Pack Diol-300 kolonunda UV detektörüyle (280 nm'de) çalışıldı.

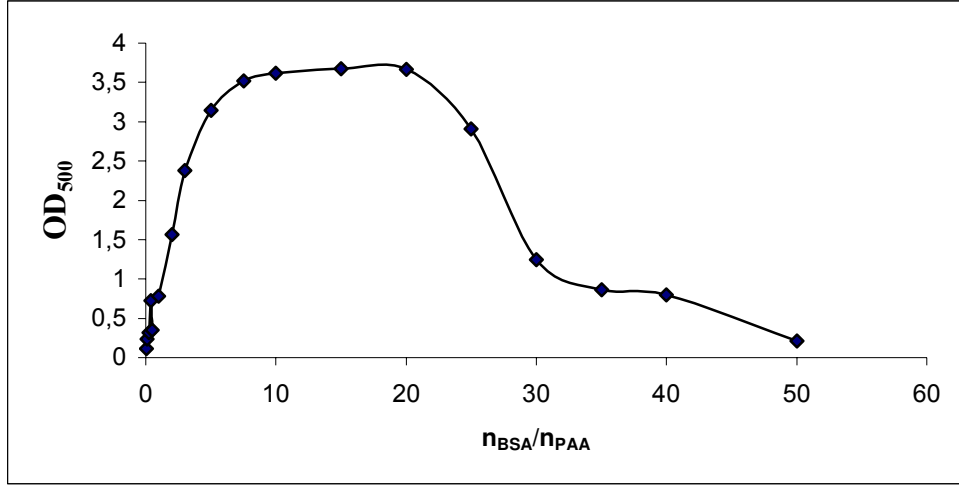
4. DENEY SONUÇLARI



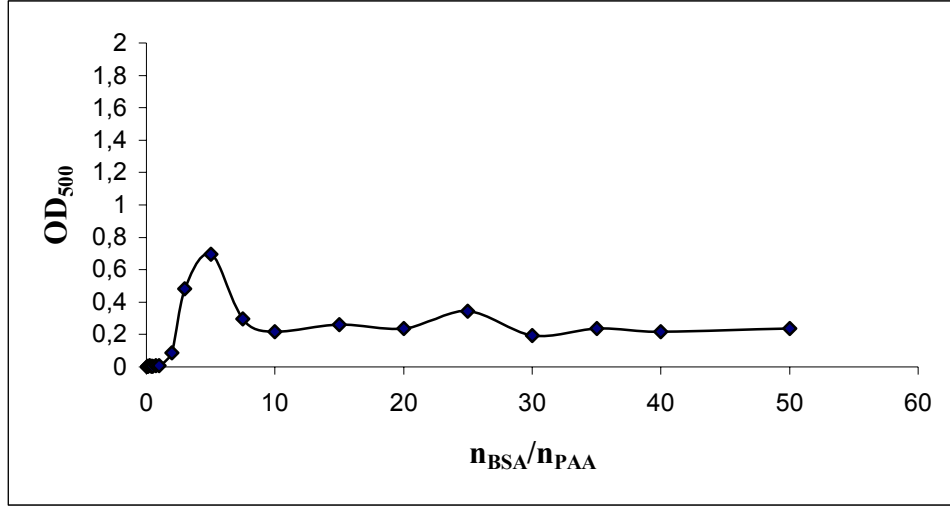
Şekil 4.1 PAA çözeltisinin NaOH ile titrasyon grafiği



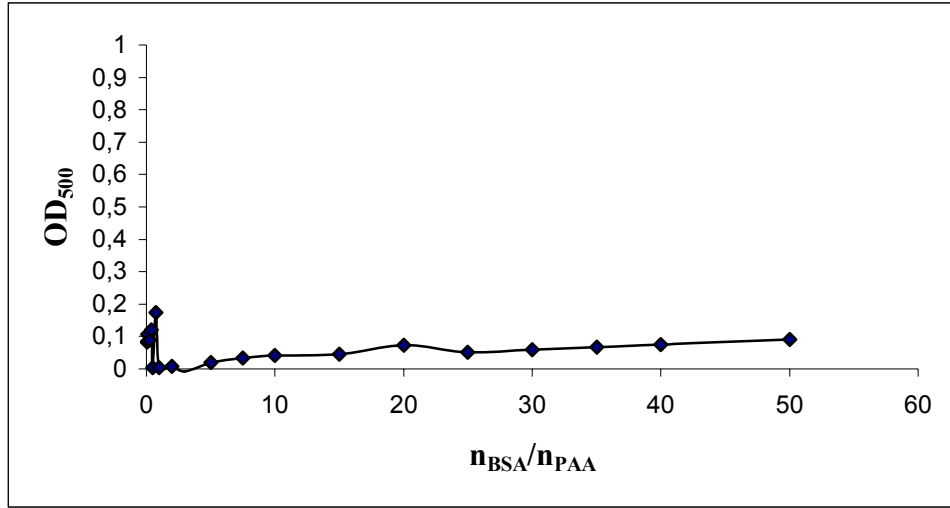
Şekil 4.2 pH 4’de hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu



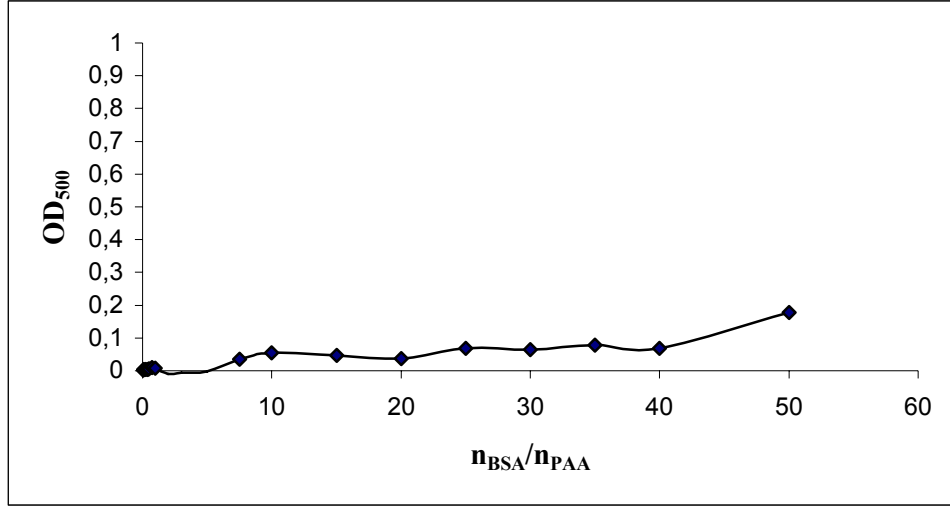
Şekil 4.3 pH 4.3’de hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu



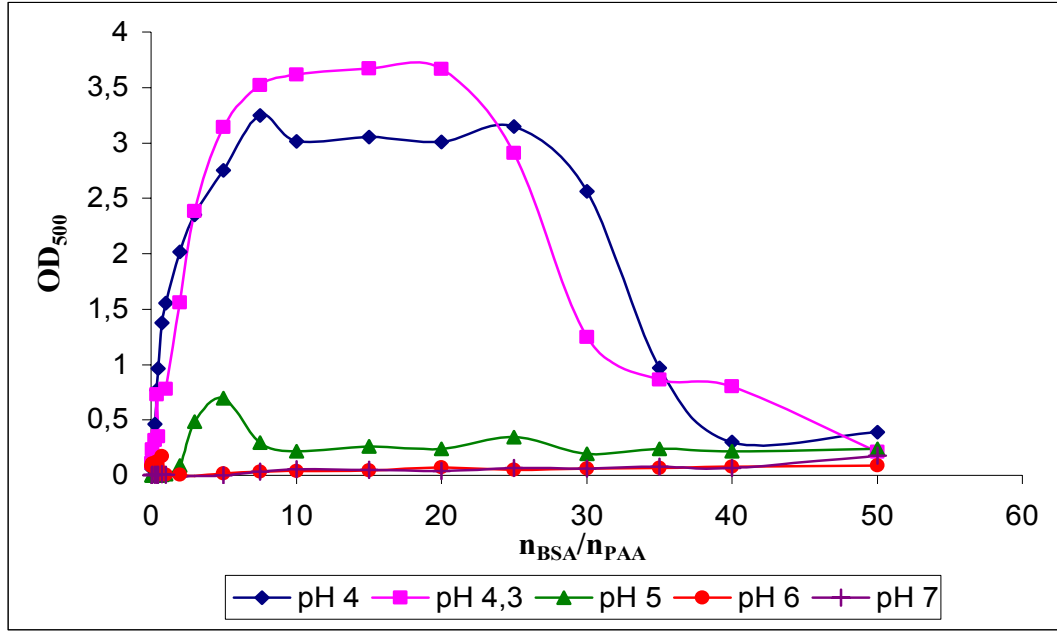
Şekil 4.4 pH 5’de hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu



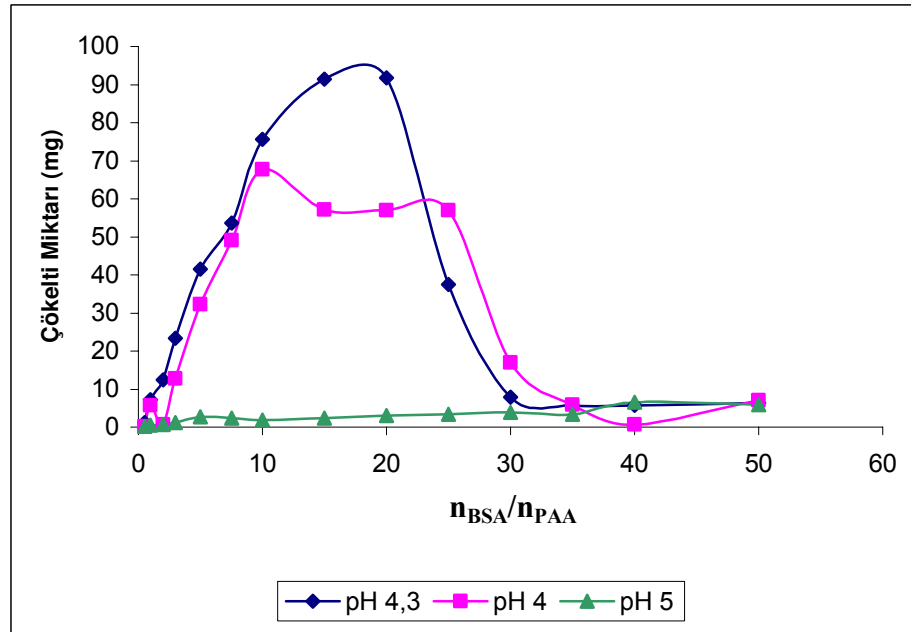
Şekil 4.5 pH 6'da hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu



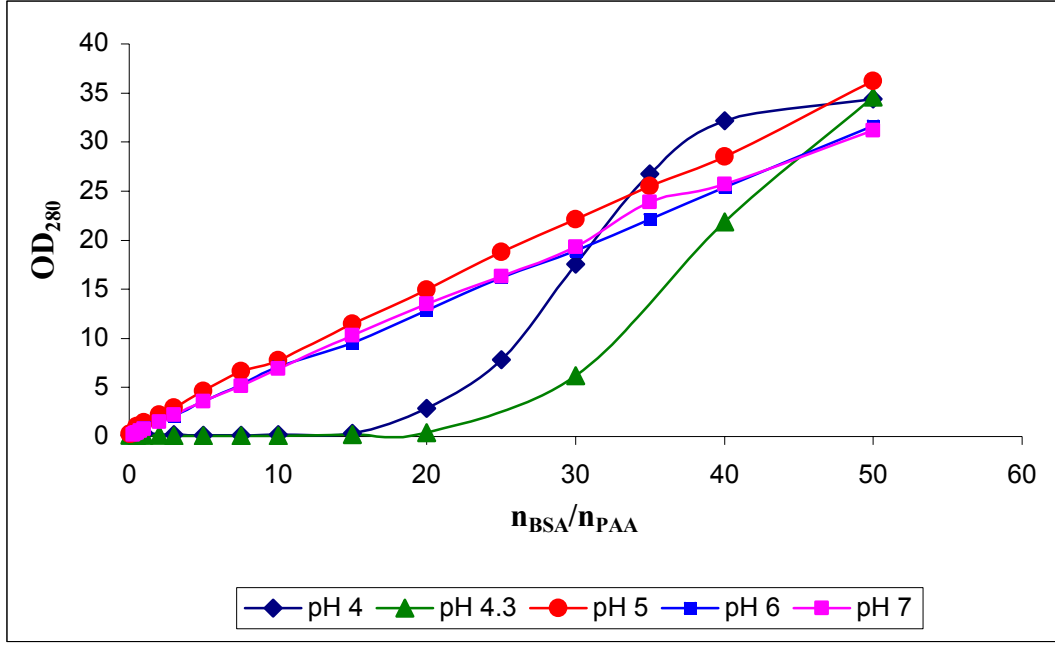
Şekil 4.6 pH 7’de hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonları



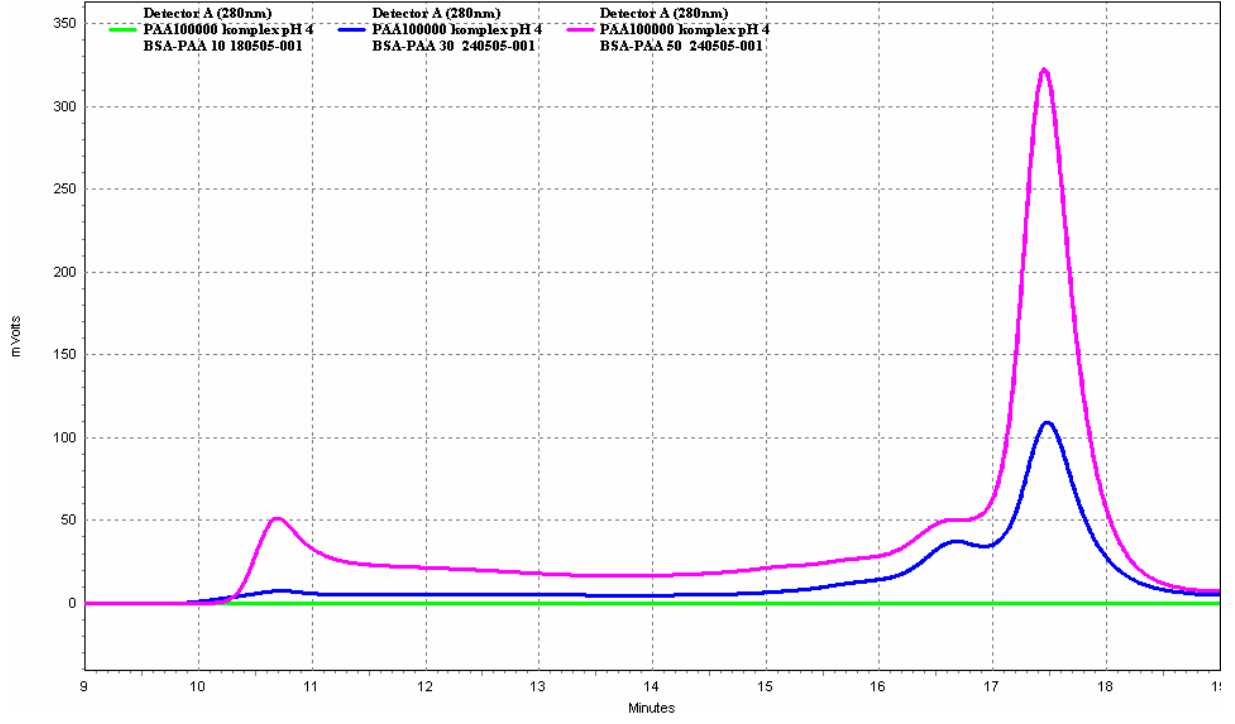
Şekil 4.7 pH 4, pH 4,3, pH 5, pH 6 ve pH 7'de hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonları



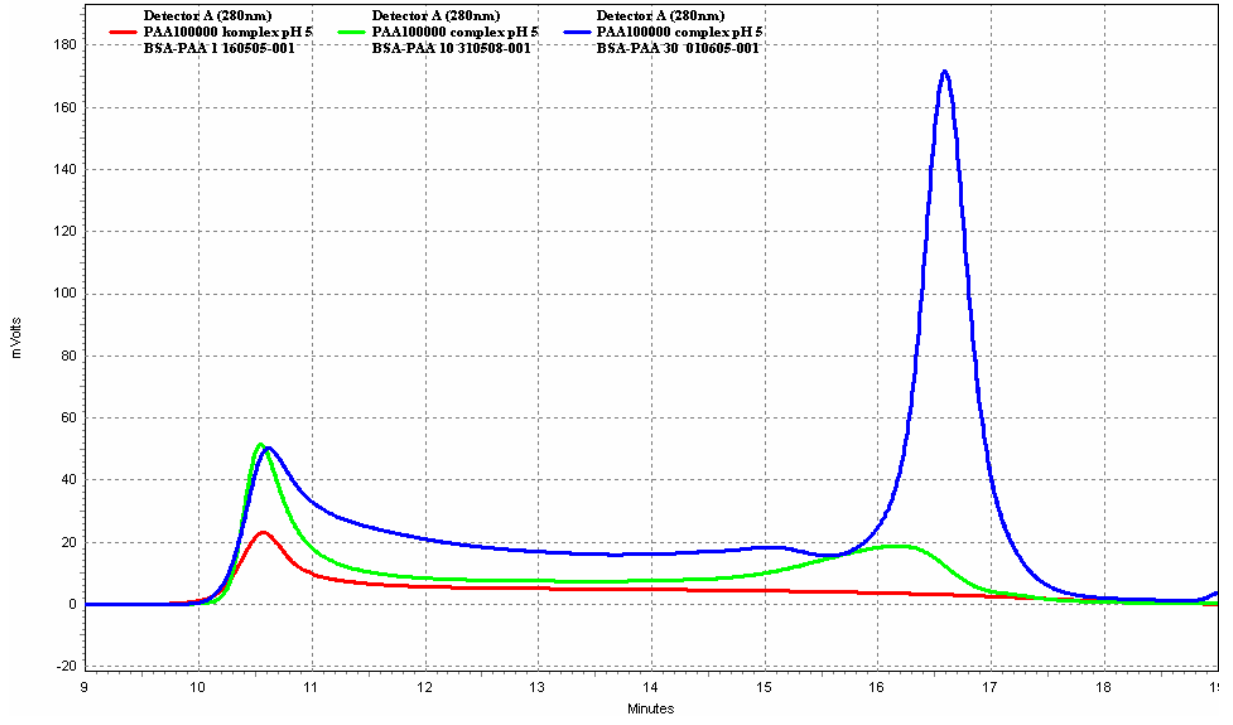
Şekil 4.8 pH 4, pH 4,3 ve pH 5'de hazırlanan BSA/PAA çözeltilerinden elde edilen çökeltilerin orana bağlı tartım grafiği



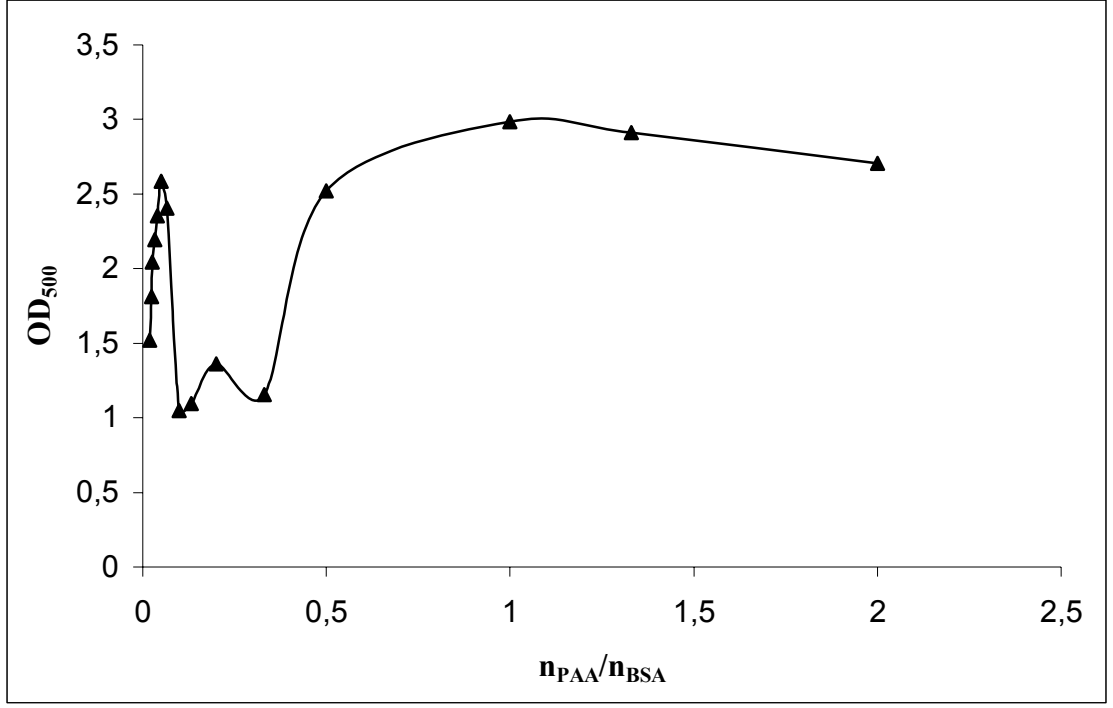
Şekil 4.9 BSA/PAA kompleks çözeltilerinin süpernatantlarının 280 nm'deki absorbanans değerlerinin orana bağlı grafiği



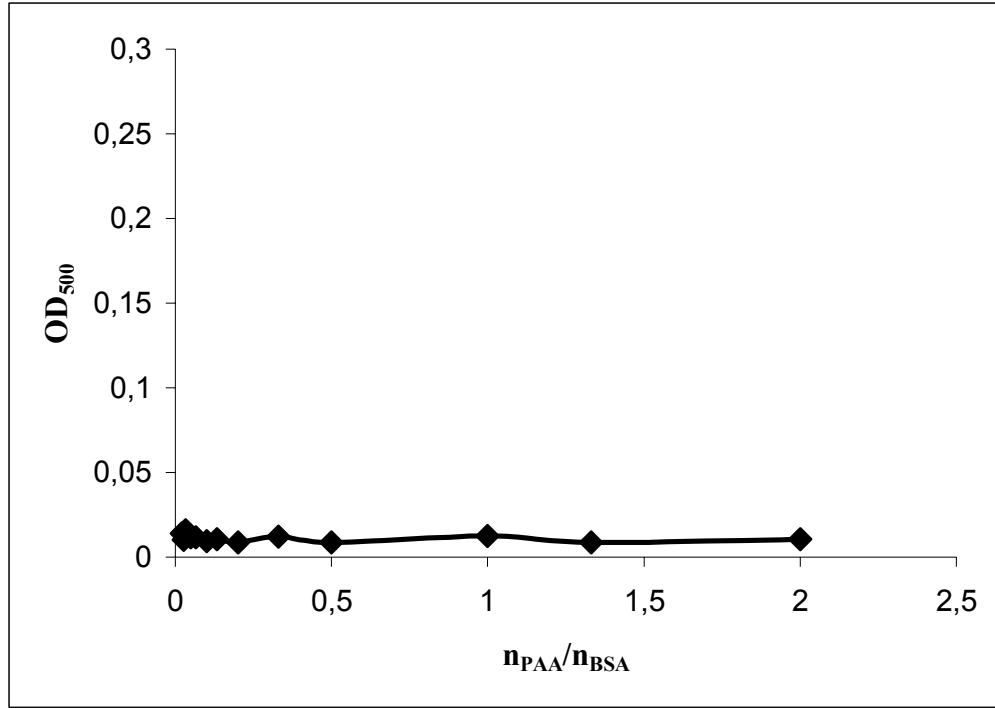
Şekil 4.10 pH 4'te hazırlanan $n_{BSA}/n_{PAA}=10$ (yeşil); 30 (mavi) ve 50 (pembe) oranlarındaki çözeltilerin HPLC kromatogramları



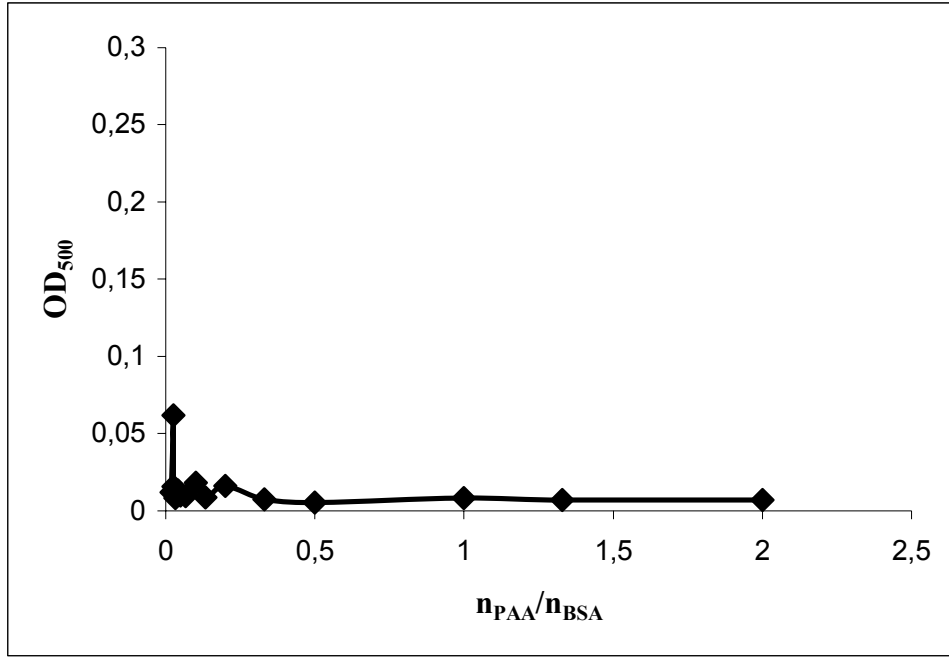
Şekil 4.11 pH 5'te hazırlanan $n_{BSA}/n_{PAA}=1$ (kırmızı); 10 (yeşil) ve 30 (mavi) oranlarındaki çözeltilerin HPLC kromatogramları



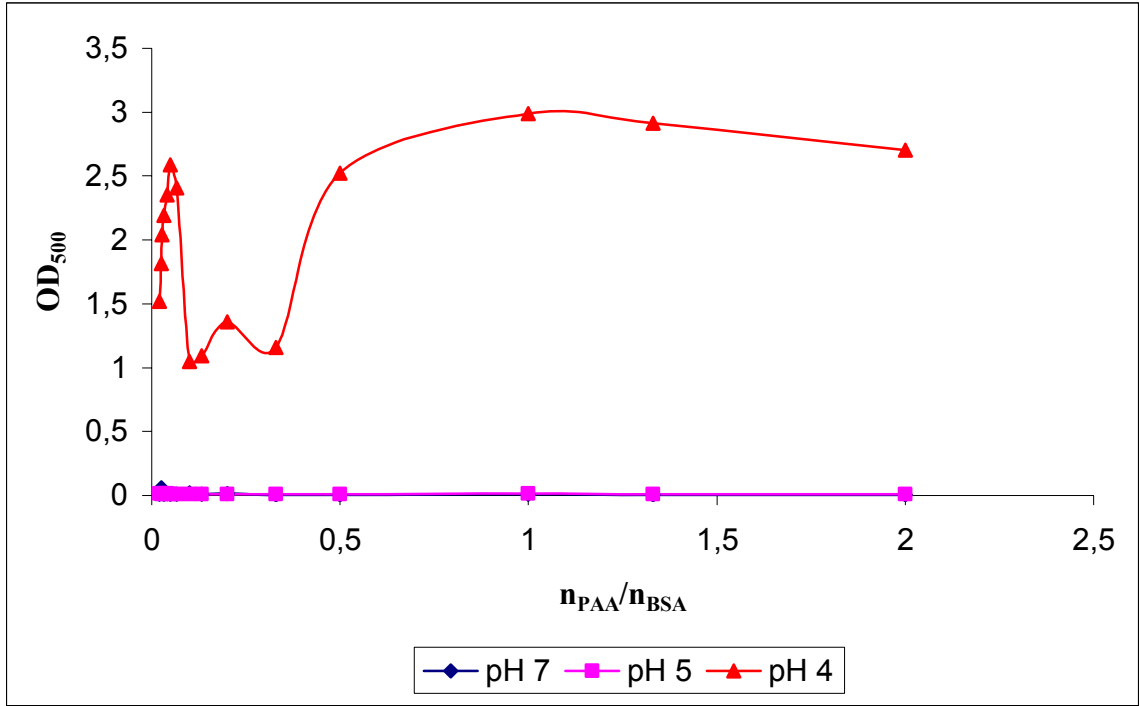
Şekil 4.12 pH 4’de hazırlanan PAA/BSA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu



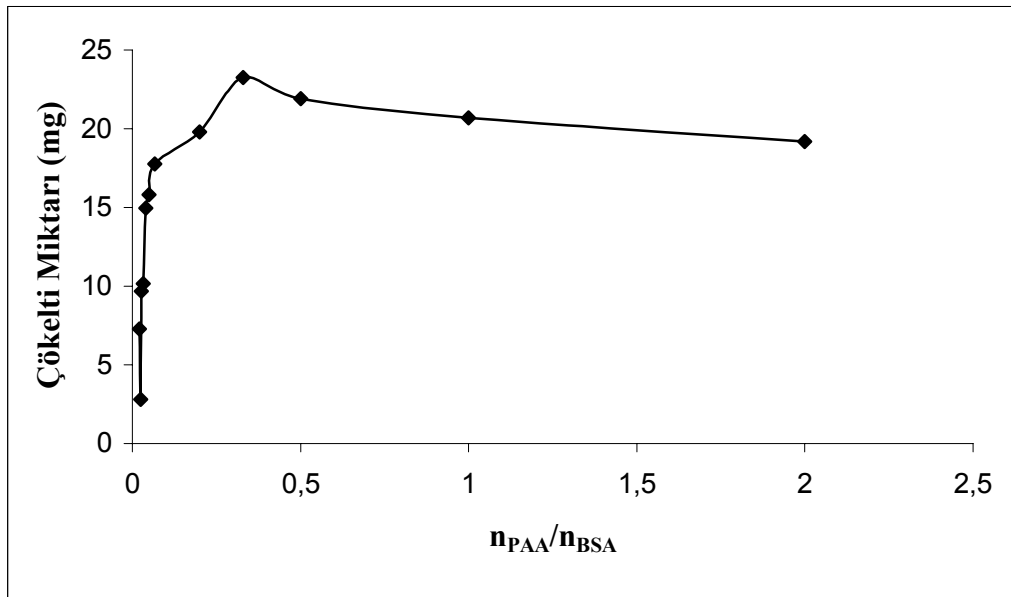
Şekil 4.13 pH 5’de hazırlanan PAA/BSA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu



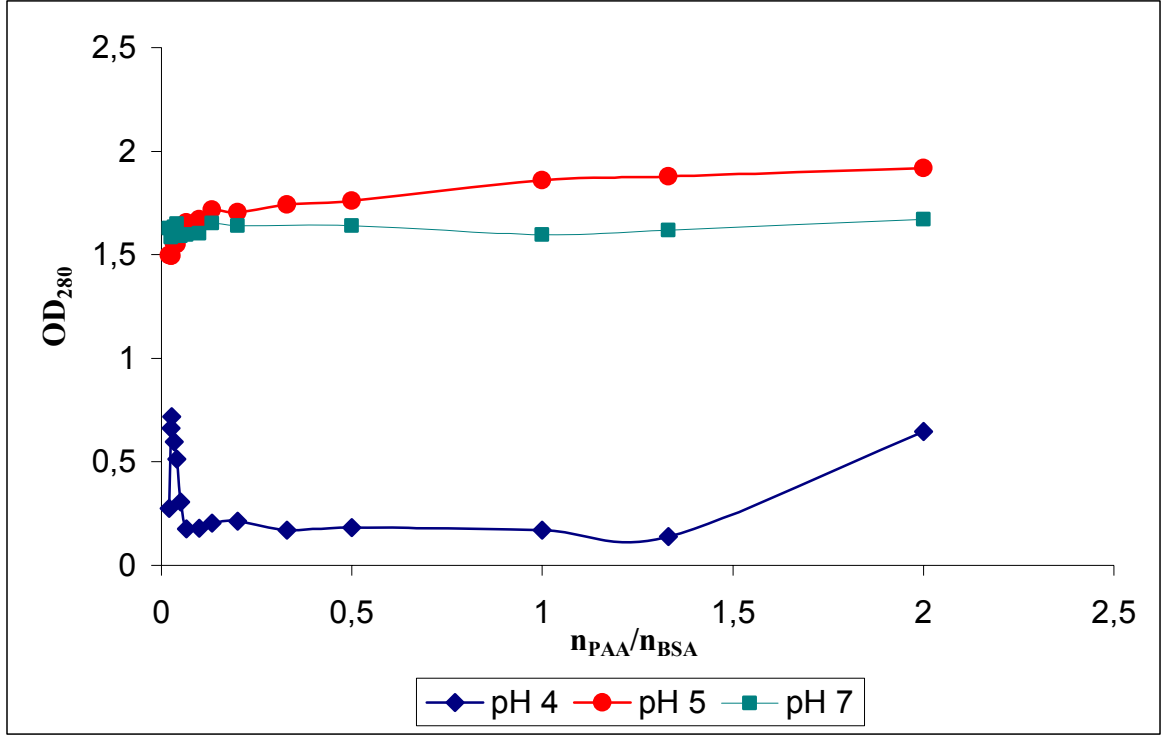
Şekil 4.14 pH 7’de hazırlanan PAA/BSA çözeltilerinin orana bağlı türbidimetrik titrasyonu



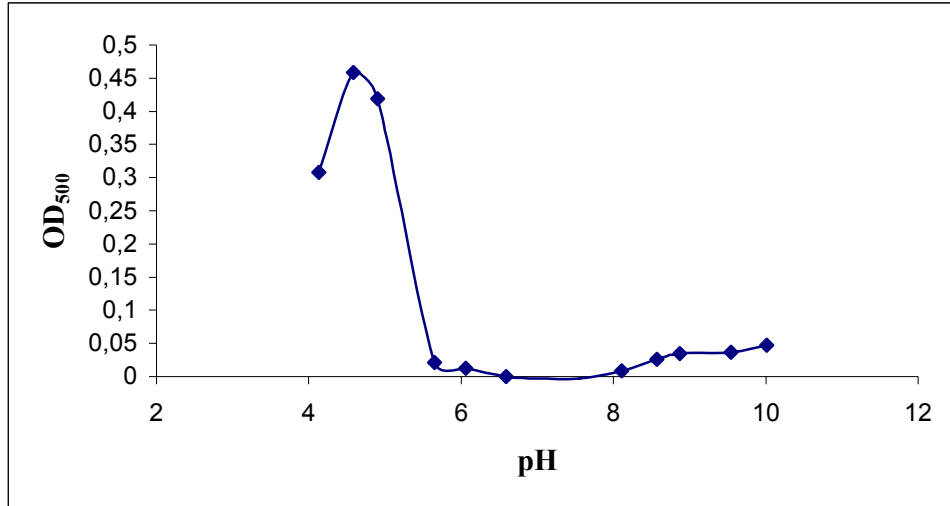
Şekil 4.15 PAA/BSA komplekslerinden tüm pH'larda elde edilen çözeltilerin orana bağlı turbidimetrik titrasyonları



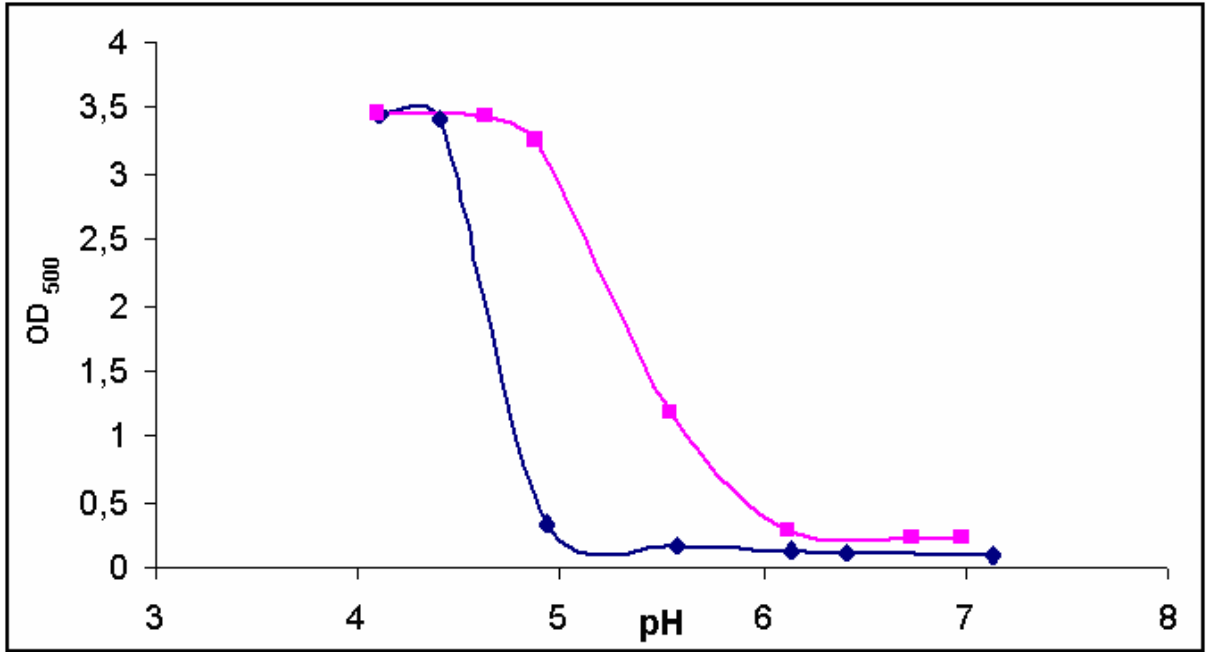
Şekil 4.16 pH 4'te hazırlanan PAA/BSA komplekslerinin çözeltilerinden elde edilen çökeltilerin orana bağlı tartım grafiği



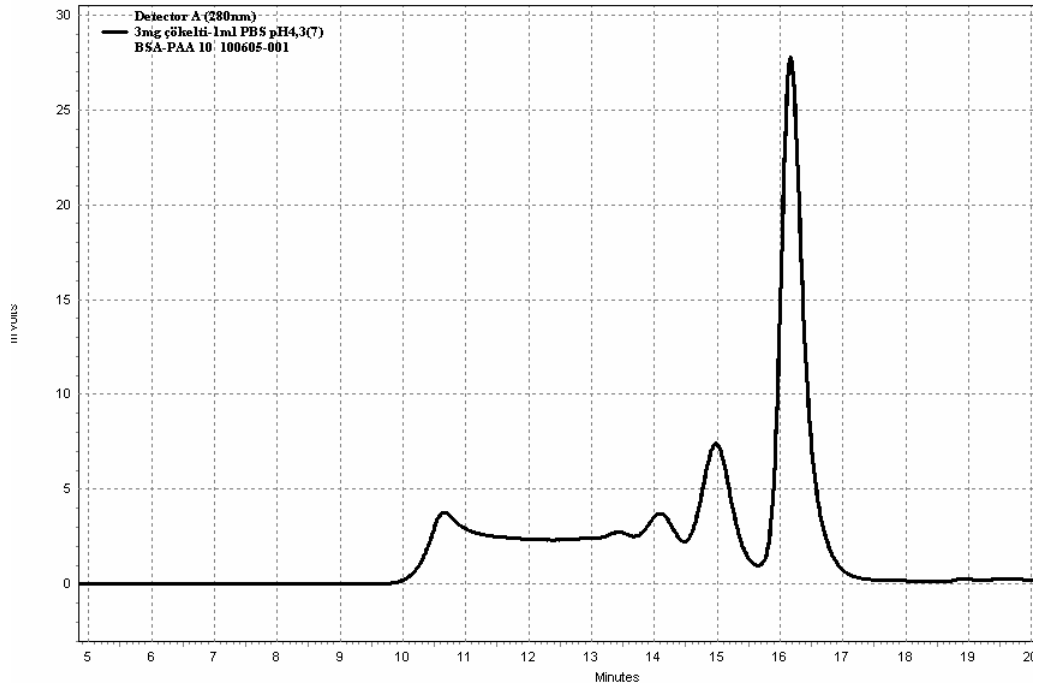
Şekil 4.17 PAA/BSA kompleks çözeltilerinin süpernatantlarının 280 nm'deki absorbanans değerlerinin orana bağlı grafiği



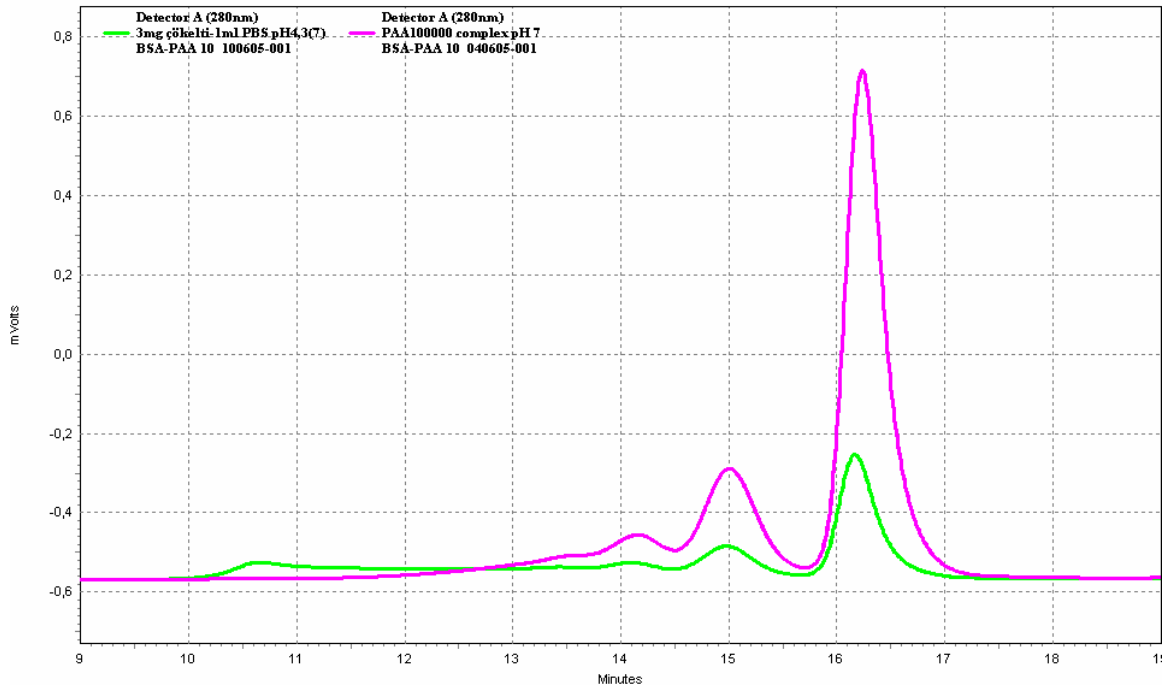
Şekil 4.18 $n_{BSA}/n_{PAA}=1$ oranında kompleksin pH'a bağlı türbidimetrik titrasyonu



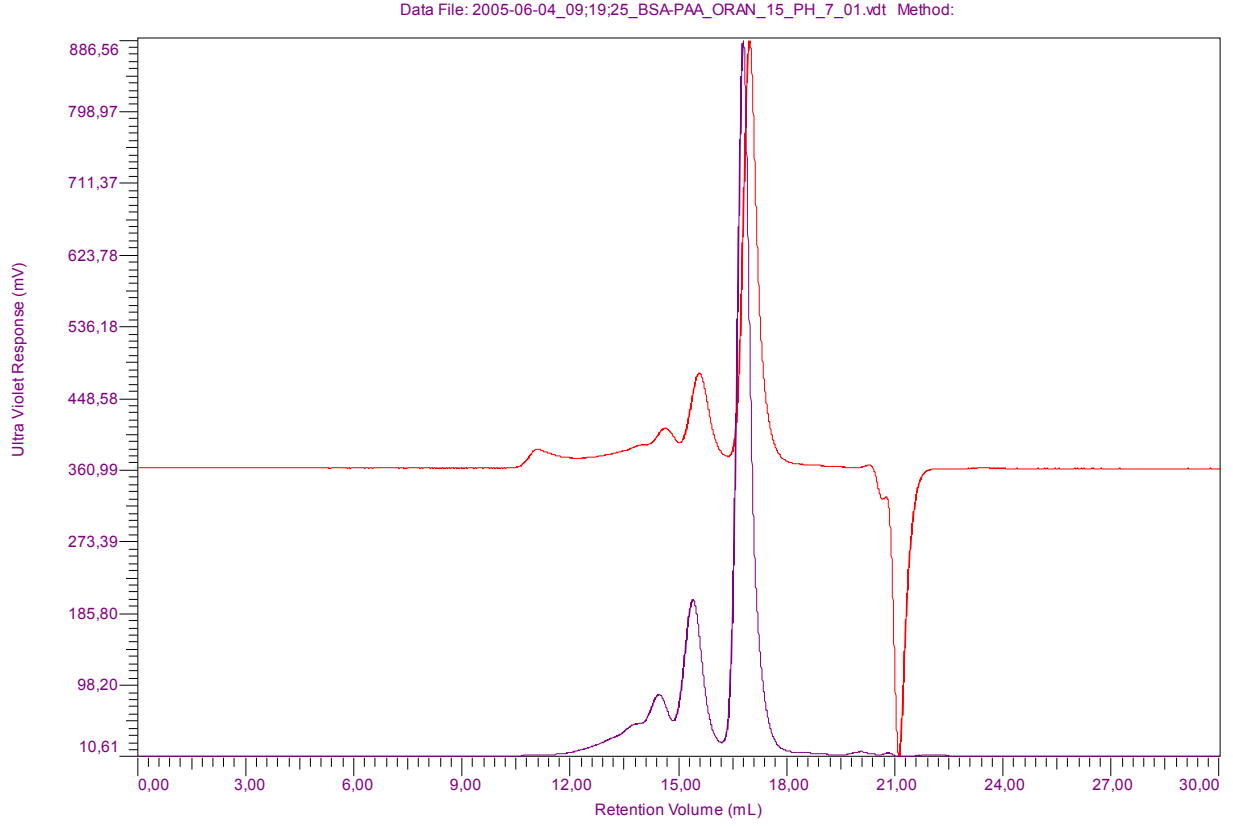
Şekil 4.19 $n_{BSA}/n_{PAA}=15$ oranında hazırlanan kompleks çözeltisinin ileri ve geri pH'a bağlı türbidimetrik titrasyon grafiği. ● pH 7'deki kompleksin 1 M HCl ile titre edildiği noktaları, ■ pH 4'teki kompleksin 1 M NaOH ile titre edildiği noktaları göstermektedir.



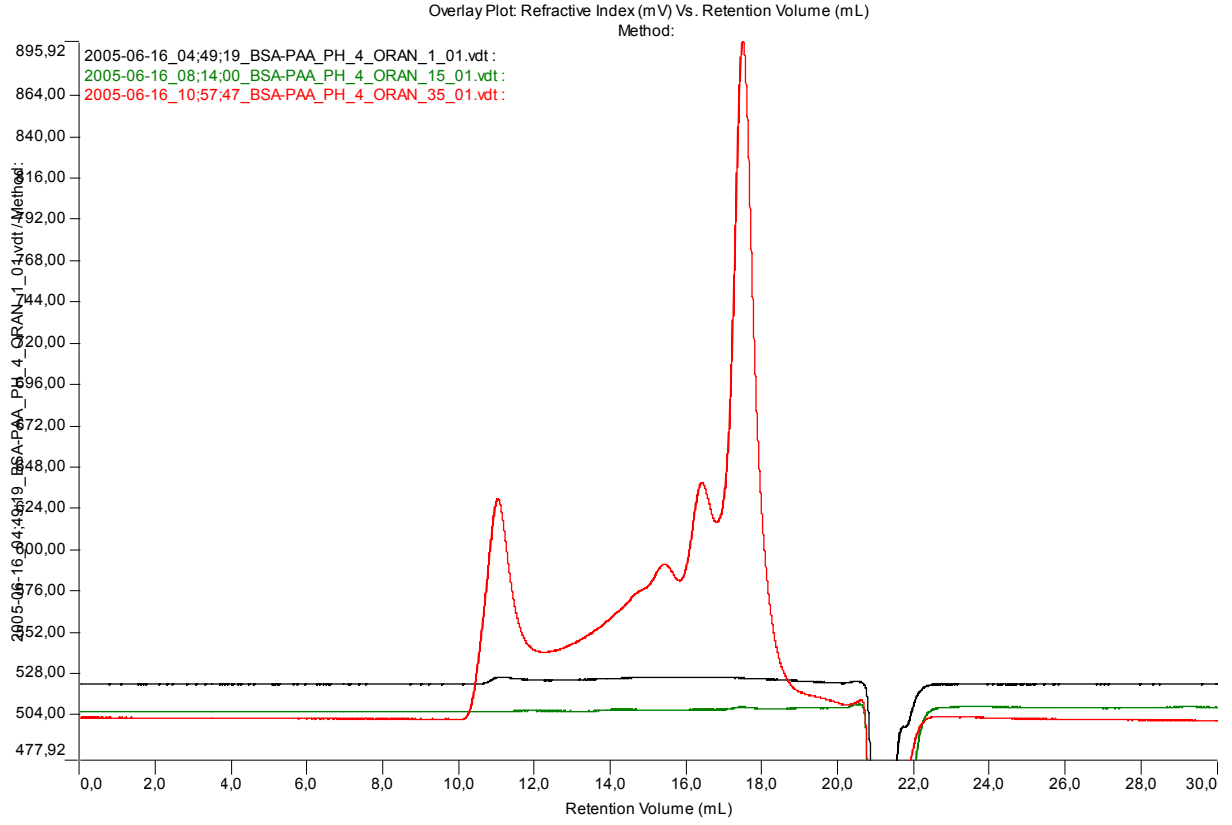
Şekil 4.20 pH 4.3'te hazırlanmış kompleksten ($n_{BSA}/n_{PAA}=10$) elde edilen çökeltinin pH 7'deki HPLC kromatogramı



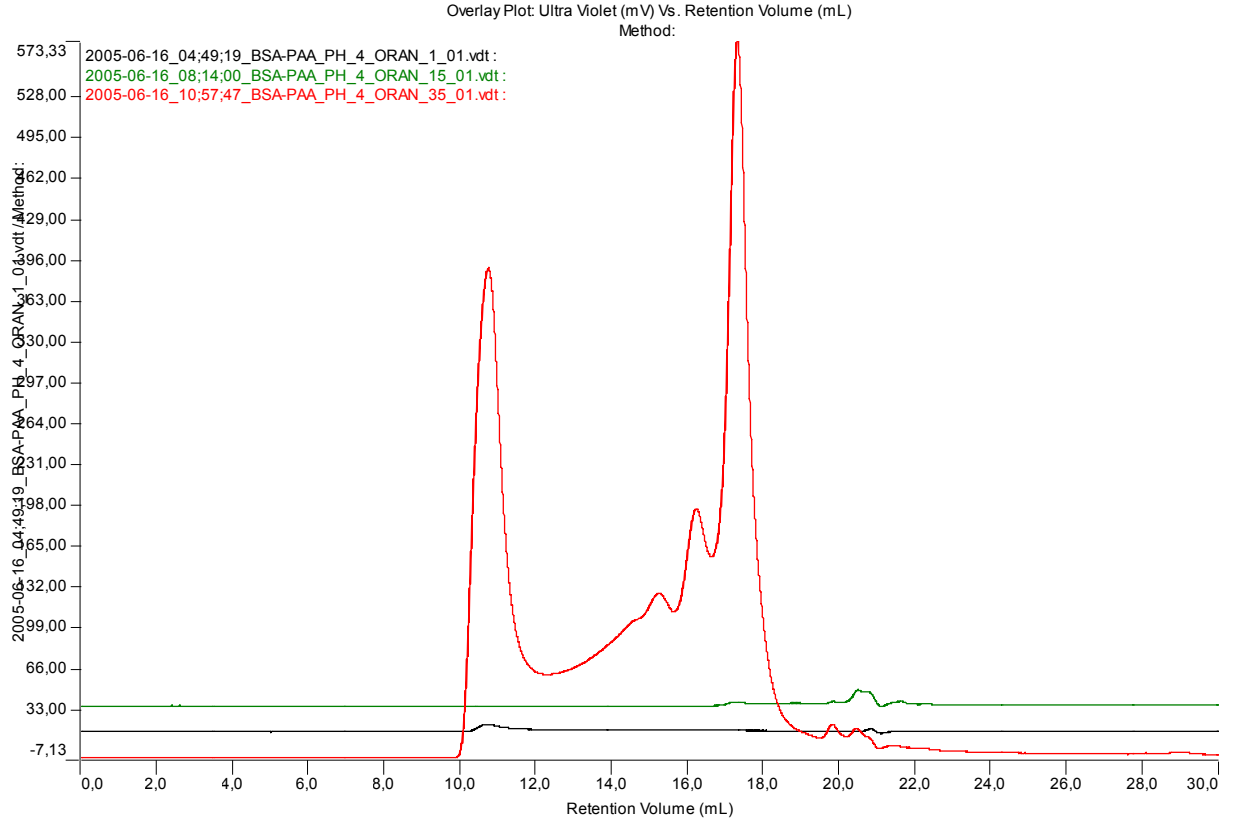
Şekil 4.21 pH 4.3'te hazırlanmış kompleksten ($n_{BSA}/n_{PAA}=10$) elde edilen çökeltinin pH 7'deki çözeltisinin (yeşil) ve aynı oranda pH 7'de hazırlanmış olan kompleksin (pembe) HPLC kromatogramları



Şekil 4.22 pH 7’de $n_{BSA}/n_{PAA}=15$ oranında hazırlanmış olan çözeltinin viscotek UV (mor) ve RI (kırmızı) kromatogramları



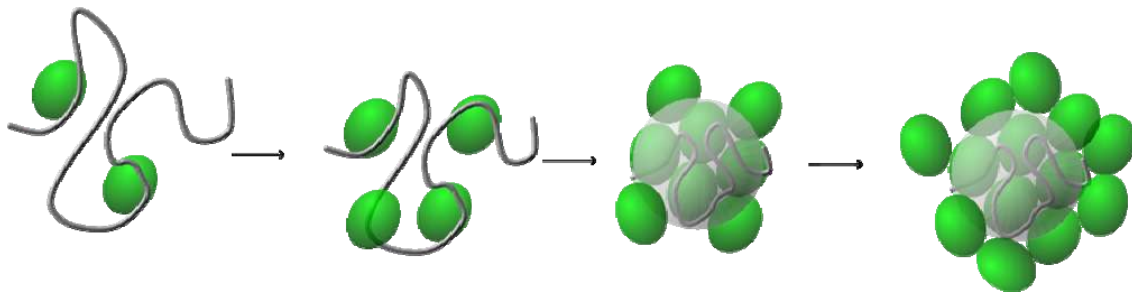
Şekil 4.23 pH 4'te hazırlanan $n_{BSA}/n_{PAA}=1$ (siyah); 15 (yeşil) ve 35 (kırmızı) oranlarındaki çözeltilerin viscotek RI kromatogramları



Şekil 4.24 pH 4'te hazırlanan $n_{BSA}/n_{PAA}=1$ (siyah); 15 (yeşil) ve 35 (kırmızı) oranlarındaki çözeltilerin viscotek UV kromatogramları

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Türbidimetrik titrasyon yönteminin, suda çözünmeyen interpolimer komplekslerin oluşumu ve bu tür komplekslerin suda çözünür hale geçişini belirlemek için en iyi yöntemlerden biri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle PAA'nın BSA ile etkileşimi türbidimetrik titrasyon yöntemi ile incelenmiştir. Bu tez çalışmasında gerek PAA gerekse de BSA pH değerlerine bağlı olarak farklı elektrik yükleri taşıdığından, sistem pH'a bağlı olarak; etkileşim mekanizmasının bileşenlerine de bağlı olduğu bilindiğinden dolayı orana bağlı etkileşimi incelenmiştir. Nötral pH ortamlarında tümüyle suda çözünen polimer-protein karışımı, pH değeri azaldıkça suda çözünmeyen hale geçmekte ve pH'ın değerinin izoelektrik noktasına yakın değerlerinden başlayarak düşük değerlerinde suda çözünmeyen bir karışım haline dönüşmekte olduğu belirlenmiştir. Biz bu oluşuma model olarak şekildeki gibi bir yaklaşımda bulunduk (Şekil 5.1).



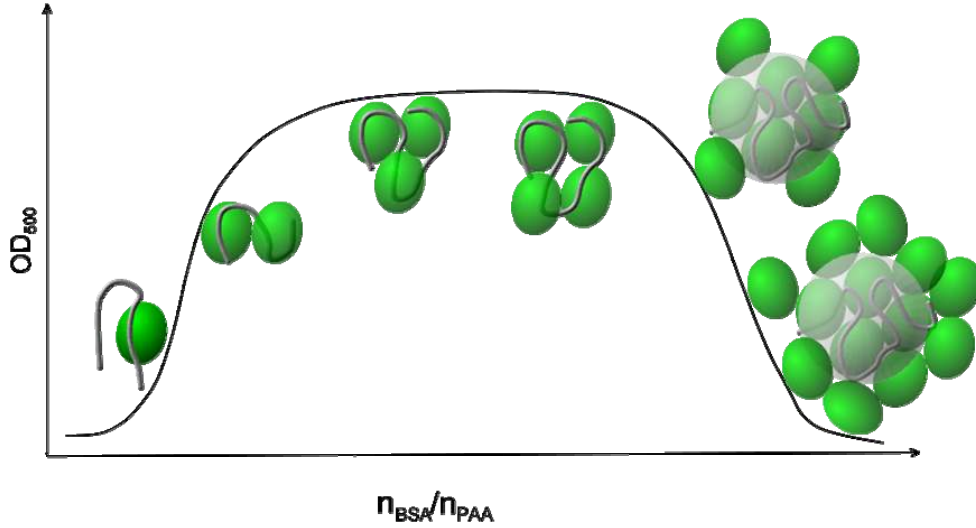
Şekil 5.1 pH 5'te oluşan polimer-protein kompleksi için düşünülen model

Daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi pH 6 ve 7 değerinde UV, Viscotek ve HPLC sonuçlarına dayanarak kompleks oluşumu olmadığını gözlemledik. Bu durum her iki makromolekülün de bu pH değerlerinde (-) yük yoğunluğunun fazla olmasından kaynaklanmaktadır. BSA ve PAA'teki mevcut (-) yükler, bu iki polimer arasında bir itme kuvvetinin oluşmasına neden olmaktadır.

pH'ın 5 değerinde türbidimetri sonuçlarına göre suda çözünmeyen kompleks oluşumu çok az gözükmemektedir. HPLC ve Viscotek çalışmalarında ise bu pH değerinde suda çözünebilen komplekslerin oluştuğu gösterilmiştir. Bu pH'ta proteinin yükü sıfıra yakinken PAA'nın yükü negatiftir. Buna göre kompleks oluşumu prosesinin proteinin yüzeyindeki pozitif yük öbekleri üzerinden yürüdüğünü söyleyebiliriz. Bu öbeklerdeki pozitif yüklerle polielektrolit üzerindeki negatif yükler arasındaki çekim kuvveti, proteinin negatif yükleriyle PAA'nın negatif yükleri

arasındaki itme kuvvetinden daha baskındır.

Sistemdeki faz geçişlerinin komponentlerin oranına bağlı olarak ekstremal bir değer gösterdiği bulunmuştur. Şöyle ki; pH'ın sabit değerlerinde (pH 4 ve pH 4.3), polimerin konsantrasyonunun sabit tutulduğu sistemin proteinle titrasyonu, önce suda çözünmeyen polikompleksin artışına neden olmuş, maksimum değere ulaşmış ve daha sonrasında ise sistem yeniden çözünür hale geçmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 pH 4 ve 4.3'te hazırlanan komplekslerin orana bağlı oluşumunda düşünülen model

İlk kez tarafımızca oranın sabit değerinde pH değerinin artırılması ya da azaltılmasıyla elde edilen titrasyon eğrilerinin çakışmadığı görülmüş ve sistemde bu iki eğrinin histereziz gösterdiği belirlenmiştir.

Bu sistemlerin matriks çözeltileri bölümde farklı yöntemlerle incelenmiş ve yapılan ortak çalışmalara dayanarak bu sistemde PAA'nın BSA ile etkileşim mekanizması hakkında literatürde belli olmayan yeni bilgiler elde edilmiştir. Tezimde asıl amaç olan suda çözünmeyen polikomplekslerin oluşumu ve bunların suda çözünmeyen hale dönüşümü, tarafımca kullanılan türbidimetrik titrasyon yöntemine dayanarak elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Bromberg, L.E. (2001), "Interactions among proteins and hydrophobically modified polyelectrolytes", *J. Pharm. Pharmacol.*, 53, 541-547.
- Carter, D. C., Ho, J. X. (1994), "Structure of serum albumin", *Adv. Protein Chem.*, 45, 153-203.
- Commandur, B., Arneodo, C., Benoit, J. P., Thies, C. (1989), "A study of the viscosity of gelatin-based complex coacervates", *Controlled Release of Bioactive Materials*, Chicago, Abstract 132, 89.
- Cooper, C.L., Dubin, P.L., Kayitmazer, A.B., Turksen, S. (2005), "Polyelectrolyte-protein complexes", *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10, 52-78.
- Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötzt, J. (1994), *Polyelectrolytes: formation, characterization, and application*, Hanser Publishers, Munich.
- Dellacherie, E. (1991), *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)*, 32, 1, 602.
- Falb, R. D., Grode, G. A., Takahashi, M. vd. (1968), *Characteristics of Heparinized Surfaces*, *Advances in Chemistry* 87, American Chemical Society, Washington.
- Figge, J., Rossing, T. H., Fencel, V. (1991), "The role of serum-proteins in acid-Base Equilibria", *J. Lab. Clin. Med.* 117, 453-467.
- Gözükara, E. M. (1997), *Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul.
- Herrero-Vanrell, R., Rincon, A.C., Alonso, M., Reboto, V., Molina-Martinez, I.T., Rodriguez-Cabello, J.C. (2005), "Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release", *Journal of Controlled Release*, 102, 113– 122.
- Higgs, P.G., Joanny, J.F. (1991), "Theory of polyampholyte solutions", *J. Chem. Phys.*, 94, 2, 1543.
- Jiang, H.L., Zhu, K.J. (2001), "Polyanion/gelatin complexes as pH-sensitive gels for controlled protein", *J. Appl. Polym. Sci.*, 80, 1416-1425.
- Kabanov, V. A., Zezin, A. B. (1984), *Pure Appl. Chem.*, 56, 343.
- Kabanov, V.A., Skobeleva, V.B., Rogacheva, V.B., Zezin, A.B. (2004), "Sorption of proteins by slightly cross-linked polyelectrolyte hydrogels: Kinetics and mechanism", *J. Phys. Chem., B* 108, 1485-1490.
- Koetz, J., Linow, K. J., Burkart, P., Li Ping, H. (1986), "Effects of charge density and structure of side-chain branching on the composition of polyanion-polycation complexes", *Polymer*, 27, 10, 1574.
- Kokufuta, E., Shimizu, H., Nakamura, I. (1981), "Salt linkage formation of poly(diallyldimethylammonium chloride) with acidic groups in the polyion complex between human carboxyhemoglobin and potassium poly(vinyl alcohol) sulfate", *Macromolecules*, 14, 1178.
- Lenk, T., Thies, C. (1987), In *Coulombic Interactions In Macromolecular Systems*, Eisenberg, A., Bailey, F. E., Eds., American Chemical Society, Washington, DC, 1987, Böl. 8.
- Lough, W.J., Wainer, W. (1992), *High Performance Liquid Chromatography-Fundamental Principles and Practice*, Blackie Academic & Professional, New York.
- Matsudo, T., Ogawa, K., Kokufuta, E. (2003), "Complex formation of protein with different water-soluble synthetic polymers", *Biomacromolecules*, 4, 1794-1799.

- McCormick, C.L., Salazar, L.C. (1992), "Water soluble copolymers: 44. Ampholytic terpolymers of acrylamide with sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulphonate and 2-acrylamido-2-methylpropanetrimethyl-ammonium chloride", *Polymer*, 33, 4384.
- Merle, Y. (1987), "Synthetic polyampholytes. 5. Influence of nearest-neighbor interactions on potentiometric curves", *J. Phys. Chem.*, 91, 3092-3098.
- Morawetz, H., Hughes, W. L. J. (1952), "The interaction of proteins with synthetic polyelectrolytes. I. Complexing of bovine serum albumin", *J. Phys. Chem.*, 56, 64-69.
- Mustafaev, M. I. (1996), *Biyopolimerler*, TÜBİTAK-MAM, Gebze.
- Mustafaev, M.I. (2004), "Functionally Biopolymer Systems", *Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 4, 1.
- Mustafaev, M.I., Kabanov, V.A., Belova, V.V., Evdakov, V.P. (1978), *Biophys.*, 23, 789.
- Nguyen, T.Q. (1986), "Interactions of human hemoglobin with high-molecular-weight dextran sulfate and diethylaminoethyl dextran", *Makromol. Chem.*, 187, 11, 2567-2578.
- Osada, Y., Tsuchida, E., Sanada, K. (1972), "Interaction of poly(styrene sulfonate) with polycations carrying charges in the chain backbone", *J. Polym. Sci. A-1*, 10, 11, 3397-3404.
- Park, J. M., Muhoberac, B.B., Dubin, P.L., Xia, J. (1991), "Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation", *Macromolecules*, 25, 290-295.
- Peters, T., Jr. (1985), "Serum Albumin", *Adv. Protein Chem.*, 37, 161-245
- Philipp, B., Dautzenberg, H. (1985), *Wiss. Zeitschr. THLM*, 27, 3, 295.
- Radeva, T. (2001), *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Sacco, D., Bonneaux, F., Dellacherie, E. (1988), "Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and the oxygen-binding properties of the covalent conjugates", *Int. J. Biol. Macromol.*, 10, 305.
- Selzer, T., Albeck, S., Schreiber, G. (2000), "Rational design of faster associating and tighter binding protein complexes", *Nat. Struct. Biol.*, 7, 537-541.
- Shieh, J., Glatz, C.E. (1991), *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)*, 32, 1, 606.
- Thies, C. vd. (1994), *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Tsuboi, A., Izumi, T., Hirata, M., Xia, J.L., Dubin, P.L., Kokufuta, E. (1996), "Complexation of proteins with a strong polyanion in an aqueous salt-free system", *Langmuir*, 12, 6295-6303.
- Tsuchida, E., Osada, Y. (1974), "The role of the chain length in the stability of polyion complexes", *Makromol. Chem.*, 175, 2, 593-601.
- Veis, A. (1991), *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)*, 32, 1, 596.
- Virella, G. (2001), *Medical Immunology: Fifth Edition, Revised and Expanded*, Marcel Dekker Incorporated, New York, NY, USA.

İNTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyelectrolyte>
- [2] <http://www.pslc.ws/macrog/electro.htm>
- [3] <http://www.chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Dihedral.jpg>

- [4] <http://www.friedli.com/research/PhD/bsa>
- [5] <http://www.polymersnetbase.com/pme>
- [6] <http://en.wikipedia.org/wiki/Hysteresis>
- [7] <http://euclid.ucc.ie/hysteresis/node3.htm>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	17.09.1980	
Doğum yeri	Karabük	
Lise	1998-1994	Mustafa Yazıcı Yabancı Dil Ağırlıklı Lise
Lisans	1998-2003	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	2003-2004	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı
	2004-	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı