

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİANYONLARIN HUMAN SERUM ALBUMIN İLE
ETKİLEŞİM MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Fizikçi Yunus SARIÇAY

FBE Biyomühendislik Bölümünde Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	iv
KISALTMA LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖNSÖZ	xii
ÖZET	xiii
1. GİRİŞ	1
2. PROTEİN-POLİELEKTROLİT KOMPLEKSLER	3
2.1 Zıt Yüklü Polielektrolitler ile Proteinlerin Kompleksleri	4
2.2 Protein-Polielektrolit kompleksleşmesini etkileyen faktörler:	9
2.3 Polikompleks İçinde Protein Yapısı.	16
2.4 Protein-Polielektrolit Komplekslerinin Yapıları.	21
2.4.1 Karakteristik bileşende(N_i) polikompleks parçacıklarının model yapısı:	27
2.4.2 Karakteristik bileşen oranlarının üzerinde polikompleks parçacıklarının yapı modeli($N > N_i$).	29
3. İNSAN SERUM ALBUMİNİN YAPISI	39
3.1 Giriş	39
3.2 Proteinin Yapısı	39
3.2.1 Alt Üniteler	41
3.2.2 Sistein İçindeki Serbest Sülfhidril Gruplar	42
3.2.3 İlaçlar ve Diğer Bileşenler İçin Bağlanma Bölgeleri	42
3.2.4 Sonuç	44
4. DENEYSEL KISIM	45
4.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	45
4.1.1 Kullanılan Cihazlar	45
4.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler	46
4.2 HSA/PAA Kompleksleri	47
4.2.1 Kullanılan Çözeltiler	47
4.2.2 Komplekslerin Hazırlanışı	47
4.2.3 Hesaplamalar	47
4.2.3.1 $C_{PAA}=1$ mg/mL için HSA-PAA Karışım Çözeltileri	47
4.2.3.2 $C_{PAA}=0,1$ mg/mL için HSA-PAA Karışım Çözeltileri	48
4.3 UV-VIS Spektrofotometresi Ölçümleri	49
4.4 Jel Filtrasyon Kromatografisi (HPLC) Ölçümleri	49
4.5 Dört Detektörlü Jel Filtrasyon Kromatografisi (Viscotek) Ölçümleri	50
4.6 Flüoresans Spektroskopisi	50
4.7 Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri	50
5. DENEY SONUÇLARI	52

6.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	87
6.1	Türbüdimetrik Titrasyon.....	87
6.2	$C_{PAA}=1,0$ mg/mL HSA-PAA Karışımları.....	88
6.2.1	pH7,0 ve pH6,0'da HSA-PAA Karışımlarının Analizi	88
6.2.1.1	HPLC ve Dört Detektörlü GPC Analizleri	88
6.2.1.2	Zetasizer Analizleri.....	89
6.2.1.3	Floresans Spektrofotometre Analizleri	89
6.2.2	pH5,0'de HSA-PAA Karışımlarının Analizi.....	89
6.2.2.1	HPLC	89
6.2.2.2	Dört Detektörlü GPC Analizi	90
6.2.2.3	Zetasizer Analizleri.....	91
6.2.2.4	Flüoresans Spektrofotometre Analizleri	92
6.2.3	pH7,0-pH6,0-pH5,0 Karşılaştırma	93
6.2.4	pH4,0'de HSA-PAA Karışımlarının Analizi.....	96
6.2.4.1	HPLC	96
6.2.4.2	Dört Detektörlü GPC Analizi	96
6.2.4.3	Zetasizer Analizleri.....	97
6.2.5	pH4,0 ve pH5,0 Karşılaştırma	97
6.3	$C_{PAA}= 0,1$ mg/mL için pH4,0 ve pH 4,5 Karşılaştırma	98
	KAYNAKLAR.....	100
	ÖZGEÇMİŞ.....	106

SİMGE LİSTESİ

Å	Angström
a	Mark-Houwink sabiti
A ₂	İkinci viral katsayı
C	Derişim
cm	Santimetre
Da	Dalton
dak	Dakika
g	Gram
k	Bağlanma sabiti
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
M _n	Sayıca-ortalama molekül ağırlığı
M _w	Ağırlıkça-ortalama molekül ağırlığı
M _w /M _n	Polidispersite
n	Mol
nm	Nanometre
R	Dönme yarıçapı
R _g	Hidrodinamik yarıçap
R _h	Hidrodinamik yarıçap
RT	Alıkonma zamanı
T	Mutlak sıcaklık
V	Hacim
δ _m [∞]	Doyma sabiti
η	Viskozite
μL	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
[η]	İndirgenmiş viskozite
μm	Mikrometre

KISALTMA LİSTESİ

A	Absorbans
BSA	Bovine serum albumin
CDS	Circular diclorism spectrpscopy
CH ₃ COOH	Asetik Asit
DNA	Deoksiribonükleotik asit
GPC	Jel geçirgenlik kromatografisi
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromotografisi
HSA	Human serum albumin
KPVS	Potasyum poli(vinil alkol) sülfat
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
NaN ₃	Sodyum azid
PAA	Poliakrilik asit
PDADMAC	Poli(diallildimetilamonyum klorür)
PDMDAAC	Poli(dimetildiallilamonyum klorür)
PE	Polielektrolit
PEC	Polielektrolit Kompleks
PEG	Poli(etilen glikol)
PMAPTAC	Poli(metakrilamidpropiltrimetilamonyum klorür)
PSS	Poli(sodyum stiren sülfonat)
PVEP	Kuarternize poli-4-vinilpiridin
PVP	Poli(-4-vinilpridin)
PVS	Poli(vinil sülfat))
RALS	Dik açılı ışık saçılması
RI	Kırılma İndisi
RNA	Ribonükleik asit
RT	Alıkonma zamanı
RV	Alıkonma hacmi

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	PEVP ve PECVP'nin kimyasal yapıları. 4
Şekil 2.2	(A) Farklı polimerleşme derecelerinde (P_w): $0,19 \cdot 10^3$ (1); $0,95 \cdot 10^3$ (2); $3,3 \cdot 10^3$ (3); $5,9 \cdot 10^3$ (4); ve $C_{PE}=0,15$ g/100ml durumunda BSA-PVEP karışım çözeltilerinin optik yoğunluğunun(OD) n_{BSA}/n_{PE} ile değişimi. (B) Çeşitli polimer/protein molar oranlarında türbidimetrik titrasyon eğrileri (a) PVEP-HSA (b) PECVP-HSA ; pH 7,0 ; $n_{HSA}=5,7$ μ M ve $R_i=n_{PE}/n_{BSA}$ 5
Şekil 2.3	Farklı n_{Q-PVP}/n_{BSA} oranlarında Q-PVP-BSA karışımının sedimentagramları. n_{BSA}/n_{Q-PVP} : 2-0,75; 3-1,25; 4-2; 5-3; santrifüj zamanı (t) 60dk.; 6-6; t=20 dk.; w=56000 rpm. 7
Şekil 2.4	Farklı DP'ye sahip Q-PVP için Q-PVP-BSA sisteminde serbest Q-PVP'nin sedimentasyon pik alanının (P_o) n_{BSA}/n_{Q-PVP} oranına göre değişimi. 1: $0,19 \times 10^3$, 2: $0,95 \times 10^3$; 3: $3,3 \times 10^3$; 4: $5,9 \times 10^3$; Q-PVP=0,15g/dl; 25 °C ; pH=7,0. 7
Şekil 2.5	Farklı DP'ye sahip Q-PVP için Q-PVP-BSA'nın sedimentasyon katsayılarının n_{BSA}/n_{Q-PVP} bağlı karakteri. 1: $0,19 \times 10^3$; 2: $0,95 \times 10^3$; 3: $3,3 \times 10^3$; 4: $5,9 \times 10^3$; [Q-PVP]=0,15 g/dl; 25 °C; pH=7,0. 8
Şekil 2.6	pH 7,0'da PVEP'nin artan miktarı ile değişen BSA'nın flüoresans spektrumu ($C_{BSA}=5,7$ μ M) $R_i=0,035$ (2), 0,07 (3), 0,14 (4), 0,21 (5), 0,35 (6), 0,7 (7); pH 7.0 20 °C. PEVP-BSA için (1a,1b) ve pH 7.0 (a) ve pH 4.3 (b)'de PEVP-BSA (2a, 2b) karışımları için R_i eğrilerinin 340 nm'de emisyon şiddetleri (I_{max}). 9
Şekil 2.7	(A) Farklı zamanlarda (t-saat) saf suya karşı yapılan diyalizden sonra BSA-PVEP karışım çözeltilisinin sedimentagramları. Diyalizden önce (1,1); 0,5 (1;2); 2 (1,3); 3 (2); 8 (3); 36 (4); pH 7,0 $n_{BSA}/n_{PE}=3$; 25 °C (B) Diyaliz sırasında (t_d) BSA-PVEP'nin indirgenmiş viskozitenin (η_{sp}/C) değişimi; pH 7,0; 25 °C. 11
Şekil 2.8	FDH-PVEP (1), BSA-PVEP (2), BGG-PVEP (3) için polikasyonların polimerizasyon derecesinin (P_0) Ni'ye göre değişimi. 12
Şekil 2.9	Farklı polimerleşme derecesine sahip PVEP ile farklı n_{BSA}/n_{PE} oranında BSA-PE karışım çözeltilisinin indirgenmiş viskozitenin değişimi: $0,19 \times 10^3$ (1); $0,95 \times 10^3$ (2); $3,3 \times 10^3$ (3); $5,6 \times 10^3$ (4); $C_{PE}=0,15$ g/100ml; pH 7,0; 25 °C. 13
Şekil 2.10	Farklı iyonik güçteki NaCl çözeltisindeki NaPSS-RNAz sisteminin türbidimetrik titrasyonu. 14
Şekil 2.11	Papain-KPVS komplekslerinin emisyon kayması üzerindeki pH etkileri(a: pH 2, pH 7, ve c: pH 10) (Kokufuta ve Takahashi, 1990). 15
Şekil 2.12	pH 7,0'da artan PVEP varlığı içinde 5,7 μ M HSA'nın flüoresans spektrumu. $R_i(n_{PVEP}/n_{HSA})=0,035$ (2); 0,14(3); 0,21(4); 0,35(5); 0,7(6); pH 7,0; 25 °C 15
Şekil 2.13	Papainin flüoresans emisyon spektrumu: KPVS komplekleri 280nm'de uyarılmıştır [a: papain; b: papain; KPVS=1,5:0,8] (Cha vd., 1992). 17
Şekil 2.14	Papainin emisyonuna KPVS'nin konsantrasyon etkisi: KPVS kompleksleşmesi [papain=a: 3×10^{-6} M, b: 1×10^{-6} M] (Cha vd., 1992). 17
Şekil 2.15	pH 7,4'de polielektrolitin çözelti içindeki varlığına göre BSA'nın flüoresans spektrumu. [BSA]= 4×10^{-2} (g/L). [polielektrolit]= 2×10^{-4} (mol/L). 18
Şekil 2.16	Su ortamında ve polielektrolit varlığında BSA'nın triptofanın λ_{em} 'nin pH ile olan değişimi. (A) polikasyon, (B) polianyon. (Δ) BSA, ($\blacktriangle$) BSA+ QPA1.Am, ($\blacktriangledown$) BSA + PQE, ($\circ$) BSA + PMA, ($\square$) BSA + PSS, (Δ) BSA + PNMA. [BSA] = 4×10^{-2} (g/L). [Polielektrolit] = 2×10^{-4} (mol/L). 18
Şekil 2.17	Su ortamında ve polielektrolit varlığında HSA'nın triptofanın λ_{em} 'nin pH ile olan değişimi. (Δ) HSA, ($\blacktriangle$) HSA + QPA1.Am, ($\circ$) HSA + PMA, ($\square$) BSA + PSS, [HSA] = 4×10^{-2} (g/L). [Polielektrolit] = 1×10^{-4} (mol/L). 19

Şekil 2.18	Antransen ile bağlanmış polielektrolit ve BSA'nın flüoresans spektrumu. [BSA] = 4×10^{-2} (g/L). [Polielektrolit] = 2×10^{-4} (mol/L) 20
Şekil 2.19	pH 7,4'de polielektrolit ile birlikte varfarin bağlanmış BSA'nın flüoresans spektrumu. [BSA] = 4×10^{-2} (g/L). [Varfarin] = 3×10^{-5} (mol/L). [Polielektrolit] = 1×10^{-4} (mol/L)..... 20
Şekil 2.20	pH 7,4'de polielektrolit ile birlikte densil-L-prolin (DNP) BSA'nın flüoresans spektrumu. [BSA] = 4×10^{-2} (g/L). [DNP] = 3×10^{-5} (mol/L). [Polielektrolit] = 1×10^{-4} (mol/L). 20
Şekil 2.21	Polielektrolit ile albüminin kompleksleşmesinin şematik gösterimi. 21
Şekil 2.22	PEC konsantrasyonuna karşı Q-PVP-BSA'nın indirgenmiş viskozitesinin değişimi. $\xi = 3.3 \times 10^2$ (1), $\xi = 2.5 \times 10^2$ (2), DPQ-PVP = 10^3 22
Şekil 2.23	Polikasyonun polimerleşme derecesinde $n_{BSA}/n_{Q-PVP} = N_i$ olduğunda Q-PVP-BSA polikompleksleri için sedimentasyon katsayısı ve indirgenmiş viskozitelerinin değişimi (η_{sp}/C)..... 23
Şekil 2.24	Konsantrasyona karşı Q-PVP-BSA kompleks çözeltisinin indirgenmiş viskozitesindeki değişim. İzotonik seyreltme. $\xi = 3.3 \times 10^2$ (1), DPQ-PVP= 10^3 (1); 2.3×10^3 (2); 2.6×10^3 (3). 23
Şekil 2.25	Farklı n_{BSA}/n_{PE} oranlarında BSA-PVEP karışımları için Zimm-diyagramları: 7(a); 11 (b); DP=2,5.10 ³ ; İ=0,01 mol/l; K ₁ (çözeltinin optik sabiti)=10 ² ; pH 7,0.24
Şekil 2.26	Q-PVP-BSA SPEC için logM _w - log[η] değişimi. $\xi = 3.3 \times 10^2$ 26
Şekil 2.27	Q-PVP-BSA kompleks parçacıkları için logM _w 'nin log<R ² > ^{1/2} bağımlılığı: $\xi = 3.3 \times 10^2$ (1); $\xi = 2.0 \times 10^2$ (2); $\xi = 1.8 \times 10^2$ (3). 27
Şekil 2.28	Karakteristik bileşende Q-PVP-BSA çözünür kompleksinin önerilen yapısı..... 27
Şekil 2.29	$n_{BSA}/n_{Q-PVP} = N_i$ DP=10 ³ koşulunda Q-PVP-BSA polikomplekslerinin mikroskop görüntüleri. a) substrat ve filtre kâğıdı ile çözeltiden katının uzaklaştırılmasıyla ızgara üzerindeki kompleks çözeltisinden (0,01 g/dl) bir damla koyulmasıyla hazırlanmış örnek. b) diyaliz çözeltisinden (0,01 g/dl) çözücünün buharlaştırılmasıyla hazırlanan örnek..... 28
Şekil 2.30	$n_{BGG}/n_{PE}=2$, DP=0,95.10 ³ koşulunda PVEP-BSA polikomplekslerinin elektron mikroskobu görüntüleri..... 28
Şekil 2.32	(A) BSA ve PVEP karışımının görelî optik yoğunluğunun A/A_{max} Q ile değişimi. [PEVP] = 1 g/l, DP=1,3.10 ³ . (B) n_{BSA}/n_{PE} oranlarında BSA-PVEP karışımlarının optik yoğunluğu (OD ₄₀₀ nm) değişimi. DP=10 ³ ; pH 7,0. 31
Şekil 2.33	PVEP'nin farklı polimerleşme derecesine bağlı olarak BSA-PVEP kompleksinin molekül kütleindeki (M_{sd}) değişim. 32
Şekil 2.34	PVEP'nin konsantrasyonu ile (C_{PE}) çözünmez komplekslerin miktarının (m) değişimi..... 34
Şekil 2.35	Serum-PE karışımına eklenen PVEP (C_{PE}) konsantrasyonunun çözünmeyen komplekslerin miktarlarıyla değişimleri. Başlangıç serumu 1:3 oranında seyreltilmiştir. pH 7,5. 34
Şekil 2.36	Farklı polielektrolit konsantrasyonunda ve PE yokluğunda (1) varlığında (2) BSA+BGG karışımlarının sedimentagramları (a) elektrogramları (b). C_{PE} : 0,025 (2); 0,05 (3); 0,075 (4); 0,1 (5); 0,3 g/dl (6); $C_{protein}=0,5$ g/dl BSA+0,5 g/dl BGG..... 34
Şekil 2.37	Farklı PE konsantrasyonlarında serum+PE'nin matris çözeltilerinin ve tüm serumun sedimentagramları (a) ve elektroforegramları (b). PE(g/dl): 0.1 (2); 0.3 (3); 1.0 (4); 1,5 (5); 2.5 (6); pH 7.5; A-albümin, G-globin, M-makro globin, serum 1:3 oranında 0,025 N NaCl çözeltisi ile seyreltili. 35
Şekil 2.38	Kompleks protein-PE'nin önerilen yapısı: (a) $n_{BGG}/n_{PE} \leq N_i^1$ koşulunda (BGG-PE) ,(b)< N_i ; durumunda (BSA-PE), (α -globulin-PE), (β -globulin-PE), (c) $n_{protein}/n_{PE} > N_i$ koşulunda çoklu bileşen karışımlarıyla oluşan farklı protein

	fraksiyonlarıyla polikompleks parçacıklarının yapısı.....	35
Şekil 2.39	Polikatyon zincirleri arasında farklı protein globüllerinin yapılanması.	36
Şekil 2.40	Çözünür BSA-PVEP komplekslerinin Zaitsev tarafından önerilen yapısı (Zaitsev vd., 1992).	37
Şekil 2.41	$\alpha_{\text{PMMA}} = 0.4$ olduğunda sulu çözeltiler içerisinde lizozom-PMMA polikompleks parçalarının düzenlenme karakteri (Anufrieva vd., 1987).	37
Şekil 2.42	Protein-polielektrolit komplekslerin intrapolimer ve interpolimer komplekslerinin yapısı.	38
Şekil 3.1	HSA molekülünün şematik gösterimi. Her alt bölge Ia sarı, yeşil Ib, kırmızı IIa, majenta IIb, mavi IIIa ve siyan IIIb olmak üzere farlı renklerle işaretlenmiştir. N ve C , N-C terminal uçları belirtmektedir. Arg117, Lys351, Lys475 uzun zincir yağ asidine bağlanmış ve beyaz ile gösterilmiştir.	40
Şekil 3.2	Alt bölgelerin C_{α} izlerinin şematik gösterimi (A, bölge I; B, bölge II; C, bölge III).	41
Şekil 3.3	HSA'nın disülfat köprülerinin ve ikincil yapı bileşenlerin şematik gösterimi.	41
Şekil 3.4	Ligand bağlanma bölgeleri I (A) ve II (B) için stereografik gösterim. Yüzeydeki yük dağılımları (+) yük için mavi ve (-) yük için kırmızı ile gösterilmiştir.	43
Şekil 5.1	(A) pH 4,0 (▼), pH 5,0 (■), pH 6,0 (●) ve pH 7,0 (▲)'de farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin 280nm'de optik yoğunlukları (OD_{280}) (B) pH 4,0 (▼), pH 5,0 (■), pH 6,0 (●) ve pH 7,0 (▲)'de farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin 500nm'de türbiditeleri (OD_{500}).	52
Şekil 5.2	$C_{\text{PAA}}=0,1\text{mg/mL}$ konsantrasyonunda $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=80$ için türbidimetrik titrasyon.	52
Şekil 5.3	$C_{\text{PAA}}=0,1\text{mg/mL}$ için (A) pH 4,0 (1), pH 4,5 (2)'de farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin 500 nm'de türbiditeleri (OD_{500}). (B) pH 4,0 (1), pH 4,5 (2)'de farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin santrifüj sonrası çökelek kütleleri.	53
Şekil 5.4	(A) $C_{\text{PAA}}=0,1\text{mg/mL}$ için pH 4,0 (1), pH 4,5 (2)'de farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin santrifüj sonrası 280 nm'de optik yoğunluğu (OD_{280}). (B) $C_{\text{PAA}}=1\text{mg/mL}$ pH 4,0 (3), pH 4,5 (4)'de farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin 280 nm'de optik yoğunluğu (OD_{280}).	53
Şekil 5.5	$C_{\text{PAA}}=1\text{ mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin 280 nm'de HPLC kromatogramları. PAA (1), HSA (2), $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 7,0 T=25 °C.	54
Şekil 5.6	$C_{\text{PAA}}=1\text{ mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin 280 nm'de HPLC kromatogramları. PAA (1), HSA (2), $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 6,0 T=25 °C.	54
Şekil 5.7	$C_{\text{PAA}}=1\text{ mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin 280 nm'de HPLC kromatogramları. PAA (1), HSA (2), $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 5,0 T=25 C.	55
Şekil 5.8	$C_{\text{PAA}}=1\text{ mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin üst fazlarının 280 nm'de HPLC kromatogramları. PAA (1), HSA (2), $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 4,0 T=25 °C.	55
Şekil 5.9	$C_{\text{PAA}}=0,1\text{ mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin santrifüj sonrası 280 nm'de HPLC kromatogramları. PAA (1), HSA (2), $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=10$ (3); 30 (4); 50 (5); 80 (6); 100 (7). pH 4,5 T=25 °C.	56
Şekil 5.10	$C_{\text{PAA}}=0,1\text{ mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin santrifüj sonrası 280 nm'de HPLC kromatogramları. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4); 10 (5). pH 4,5 T=25 °C.	56
Şekil 5.11	$C_{\text{PAA}}=0,1\text{ mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin santrifüj sonrası 280 nm'de HPLC kromatogramları. PAA (1), HSA (2),	

	$n_{HSA}/n_{PAA}=30$ (3); 50 (4); 80 (5); 100 (6). pH 4,0 T=25 °C.....	57
Şekil 5.12	$C_{PAA}=0,1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası 280 nm’de HPLC kromotogramları. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 4,0 T=25 °C.....	57
Şekil 5.13	$C_{PAA}=1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin GPC kromotogramları [Detektörler: RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 7,0; T=25 °C.58	
Şekil 5.14	$C_{PAA}=1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin GPC kromotogramları [Detektörler: RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 6,0; T=25 °C.59	
Şekil 5.15	$C_{PAA}=1$ mg/mL için n_{HSA}/n_{PAA} oranlarına karşılık gelen GPC kromotogramları. $C_{HSA} = 0,066$ mg/mL (1); 0,33 mg/mL (2); 0,66 mg/mL (3); 3,3 mg/mL (4); 6,6 mg/mL (5). pH 5,0 T=25 °C.	60
Şekil 5.16	$C_{PAA}=1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin GPC kromotogramları [Detektörler: RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 5,0; T=25 °C.61	
Şekil 5.17	$C_{PAA}=1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası dört detektörlü GPC kromotogramları [Detektörler: RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 4,0; T=25 °C.....	62
Şekil 5.18	$C_{PAA}=0,1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası dört detektörlü GPC kromotogramları [(RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=10$ (3); 30 (4); 50 (5); 80 (6); 100 (7). pH 4,5 T=25 °C.	63
Şekil 5.19	$C_{PAA}=0,1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası dört detektörlü GPC kromotogramları [(RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4). pH 4,5 T=25 °C.....	64
Şekil 5.20	$C_{PAA}=0,1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası dört detektörlü GPC kromotogramları [(RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=10$ (3); 30 (4); 50 (5); 80 (6); 100 (7). pH 4,0 T=25 °C.	65
Şekil 5.21	$C_{PAA}=0,1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası dört detektörlü GPC kromotogramları [(RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4); 10 (5). pH 4,0 T=25 °C.....	66
Şekil 5.22	$C_{PAA}=1$ mg/mL için GPC detektör alanlarının n_{HSA}/n_{PAA} oranına göre değişimi. (1) ile tanımlı PAA pikinin detektör alanları (■); (2) ile tanımlı HSA pikinin detektör alanları (●). pH 7,0 25 °C.	67
Şekil 5.23	$C_{PAA}=1$ mg/mL için GPC detektör alanlarının n_{HSA}/n_{PAA} oranına göre değişimi. (1) ile tanımlı PAA pikinin detektör alanları (■); (2) ile tanımlı HSA pikinin detektör alanları (●). pH 6,0 25 °C.	68
Şekil 5.24	$C_{PAA}=1$ mg/mL için GPC detektör alanlarının n_{HSA}/n_{PAA} oranına göre değişimi. (1) ile tanımlı PAA pikinin detektör alanları (■); (2) ile tanımlı HSA pikinin detektör alanları (●). pH 5,0 25 °C.	69
Şekil 5.25	$C_{PAA}=1$ mg/mL için n_{HSA}/n_{PAA} oranlarına karşılık gelen serbest HSA ve HSA-PAA karışımındaki serbest HSA konsantrasyonlarının GPC kromotogram alanlarının farklı detektörlerdeki grafikleri. $C_{HSA} = 0,066$ mg/mL (1); 0,33mg/mL (2); 0,66mg/mL (3); 1,98mg/mL (4); 1,32mg/mL (5). pH 5,0 T=25 °C.....	70
Şekil 5.26	$C_{PAA}=1$ mg/mL için n_{HSA}/n_{PAA} oranlarına karşılık gelen HSA-PAA	

	karışımındaki serbest HSA (1) ve serbest HSA (2) konsantrasyonlarının GPC kromatogram alanlarının farklı detektörlerdeki alanlarının karşılaştırılması. $C_{HSA} = 0,066\text{mg/mL}$ ($n_{HSA}/n_{PAA} = 0,1$); $0,33\text{mg/mL}$ ($n_{HSA}/n_{PAA} = 0,5$); $0,66\text{mg/mL}$ ($n_{HSA}/n_{PAA} = 1,0$); $1,98\text{mg/mL}$ ($n_{HSA}/n_{PAA} = 5,0$); $1,32\text{mg/mL}$ ($n_{HSA}/n_{PAA} = 10$). pH 5,0 T=25 °C.....	70
Şekil 5.27	$C_{PAA} = 1\text{mg/mL}$ için n_{HSA}/n_{PAA} oranlarına karşılık gelen HSA-PAA karışımındaki serbest HSA (●), serbest HSA (■) ve kompleks içerisindeki HSA (▲) konsantrasyonları. pH 5,0 T=25 °C.....	71
Şekil 5.28	$C_{PAA} = 1\text{mg/mL}$ için n_{HSA}/n_{PAA} oranlarına karşılık gelen bir PAA zincirine katılan HSA molekülü sayısı (N_i). pH 5,0, T=25 °C.	72
Şekil 5.29	γ_m^f / δ_m^f 'in γ_m^f göre değişimi. γ_m^f , HSA-PAA karışımı içerisinde serbest kalan HSA'nın PAA'ya mol kesri; δ_m^f , HSA-PAA karışımında polikompleks içine dahil olan HSA'nın PAA'ya mol kesri. pH 5,0 25 °C	72
Şekil 5.30	$C_{PAA} = 1\text{mg/mL}$ için n_{HSA}/n_{PAA} oranlarında etkileşen HSA-PAA komplekslerinin fiziko-kimyasal özelliklerinin grafik gösterimleri. $n_{HSA}/n_{PAA} = 0$ (PAA). pH 5,0 T=25 °C.....	73
Şekil 5.31	$C_{PAA} = 1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin boyut dağılımları. HSA (A), PAA (B), $n_{HSA}/n_{PAA} = 0,1$ (C); 0,5 (D); 1,0 (E); 5,0 (F); 10 (G). pH 7,0; T=25 °C.	74
Şekil 5.32	$C_{PAA} = 1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin (A) Boyut ortalamaları (B) Zeta potansiyelleri. HSA (●); PAA (●); $n_{HSA}/n_{PAA} = 0,1$; 0,5; 1,0; 5,0; 10. pH 7,0; T=25 °C.	74
Şekil 5.33	$C_{PAA} = 1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin (A) Boyut ortalamaları (B) Zeta potansiyelleri. HSA (●); PAA (●); $n_{HSA}/n_{PAA} = 0,1$ (C); 0,5 (D); 1,0 (E); 5,0 (F); 10 (G). pH 6,0; T=25 °C.	75
Şekil 5.34	$C_{PAA} = 1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin (A) Boyut ortalamaları (B) Zeta potansiyelleri. HSA (●); PAA (●); $n_{HSA}/n_{PAA} = 0,1$; 0,5; 1,0; 5,0; 10. pH 6,0; T=25 °C.	75
Şekil 5.35	$C_{PAA} = 1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin (A) Boyut ortalamaları (B) Zeta potansiyelleri. HSA (●); PAA (●); $n_{HSA}/n_{PAA} = 0,1$ (C); 0,5 (D); 1,0 (E); 5,0 (F); 10 (G). pH 5,0; T=25 °C.	76
Şekil 6.1	pH 7,0, 6,0 ve 5,0'da HSA-PAA karışım çözeltilerinin n_{HSA}/n_{PAA} oranına bağlı olarak 2. bölgedeki piklerin detektör alanlarının değişimi	93
Şekil 6.2	pH 7,0, 6,0 ve 5,0'da HSA-PAA karışım çözeltilerinin n_{HSA}/n_{PAA} oranına bağlı olarak 1. bölgedeki piklerin detektör alanlarının değişimi.	94
Şekil 6.3	pH 7,0, 6,0 ve 5,0'da HSA-PAA karışım çözeltilerinin n_{HSA}/n_{PAA} oranına bağlı olarak boyut ortalamaları değişimi.	94
Tablo 6-1	HSA ve PAA moleküllerinin pH değerlerine bağlı olarak boyut ve zeta potansiyel değerleri.....	95
Şekil 6.4	pH 7,0, 6,0 ve 5,0'da HSA-PAA karışım çözeltilerinin n_{HSA}/n_{PAA} ve $1/(n_{HSA}/n_{PAA})$ oranına bağlı olarak λ_{max} (nm) değişimi	96
Şekil 6.5	pH 7,0, 6,0 ve 5,0'da HSA-PAA karışım çözeltilerinin $1/(n_{HSA}/n_{PAA})$ oranına bağlı olarak λ_{max}/λ_0 ve n_{HSA}/n_{PAA} oranına bağlı olarak λ_{max} değişimi.....	98
Şekil 6.6	pH 4,0 (■) ve pH 4,5 (●) λ_{max}/λ_0 'ın $1/(n_{HSA}/n_{PAA})$ oranına göre değişim grafiği.99	99

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2-1 Farklı içeriklerle Q-PVP-BSA polikomplekslerinin diyalizindeki Br ⁻ konsantrasyonunun Ag analizinin sonuçları (Sigma, 2004)	10
Tablo 2-2 pH=7,0 ve 0,01N NaBr'de farklı yapıdaki çözünür Q-PVP-BSA kompleksler parçacıklarının moleküler karakteristikleri	25
Tablo 2-3 BSA-PEVP komplekslerinin moleküler karakterizyonu	33
Tablo 5-1 pH5,0'da serbest HSA, komplekse girmiş HSA ve HSA-PAA karışımında serbest kalan HSA'nın konsantrasyonları ve bu değerlerden bulunan N _i bir polimer zincirine bağlanan HSA sayısı.....	71
Tablo 6-1 HSA ve PAA moleküllerinin pH değerlerine bağlı olarak boyut ve zeta potansiyel değerleri.....	95
Tablo 6-2 HSA-PAA karışımlarının sulu çözeltilerinin n _{HSA} /n _{PAA} =0,5-1,0 oranlarının fiziko-kimyasal parametrelerinin PAA'ninkiler ile karşılaştırılması.....	97

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında bilgisi ve becerisi ile beni yönlendiren, eşsiz desteği ile her konuda yardımcı olan, değerli hocam ve danışmanım Biyomühendislik Bölümü Başkan Yardımcısı Yrd. Doç. Dr. Zeynep Akdeste'ye,

Engin bilgisi ve yapmış olduğu değerlendirmeleri ile çalışmamızın önünü açan, bilgi, beceri ve tecrübelerini aktararak tezimin hazırlanmasında değerli katkılarını esirgemeyen, Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Kurucu Bölümü Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Mustafa Akdeste'ye,

Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'nde başladığım yüksek lisans eğitimimde bana destek olan, beni yönlendiren ve Biyomühendislik Bölümü'ne geçmemde bana yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. Hikmet Yükselici'ye,

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarları'ndaki tez çalışmalarım sırasında işbirliği ve desteklerinden dolayı arkadaşlarım, Araş. Gör. Murat Topuzoğulları, Araş. Gör. Eray Dalgakıran, Araş. Gör. Namık Akkılıç, Araş. Gör. Yasemin Budama Battal, Araş. Gör. Zafer Özdemir, Araş. Gör. Özlem Öztolon ve Aslı Arslan'a,

Hayatımın her aşamasında yanımda olarak desteklerini benden esirgemeyen sevgili annem Mualla Sarıçay ve babam Erden Sarıçay'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Yağ asidi, amino asit, biliburin gibi metaboliklere ve Cu^{2+} - Zn^{2+} gibi metal içeren birçok etkin maddeye karşı yüksek ilgi gösteren HSA, araştırmacılar tarafından ilaç salınım sistemlerinde spesifik hedeflere taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada HSA'nın polianyonlar ile etkileşim mekanizması araştırılarak tıp, eczacılık ve temel bilim çalışmaları için mühendislik yaklaşımı geliştirilmiş ve etkileşimin fiziko-kimyasal yapısı HPLC, dört detektörlü GPC, dinamik ve elektroforetik ışık saçılması ve flüoresans yöntemleri kullanılarak açığa çıkarılmıştır. Protein-polianyon etkileşimlerinde baskın kuvvet elektrostatik etkileşim olup, hidrofobik etkilerin ve hidrojen bağlarının katkısının da olduğu düşünülmektedir. Sulu çözeltilerde polianyon ile protein arasındaki etkileşimler; pH, iyonik şiddet ve $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ miktarına bağlıdır. Kompleks oluşumunun ve sistemdeki faz geçişlerinin, çözeltilerin pH'ına ve bileşenlerin oranına bağlı olduğu, poliakrilik asit (PAA) ve human serum albumin (HSA), $C_{\text{PAA}}=1\text{mg/mL}$ için farklı pH değerlerine ($\text{pH}=4,0-7,0$) ve $n_{\text{protein}}/n_{\text{polimer}}$ oranlarına ($n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1-10$) bağlı olarak, suda çözünebilir ve çözünemeyen polimer-protein kompleksleri oluşturduğu gösterilmiştir. pH ($7,0-6,0$) $>$ pI_{HSA} ($4,9$) koşulunda, HSA-PAA komplekslerinin kararlılığı ihmal edilebilecek kadar zayıf olup, polielektrolit komplekslerinin oluşumu ve serbest bileşenlerin varlığı ilk kez pH $5,0$ değerinde gözlenmeye başlanmıştır. pH $5,0$ 'da polikompleks parçacıklarının sulu çözeltilerinin molekül ağırlığı (M_w , M_n), molekül ağırlığı dağılımı, Mark-Houwink (a), bağlanma (k) ve doyma (δ_m^∞) sabitleri gibi moleküler özelliklerinin ve yapısal değişikliklerin $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranına bağlılığı araştırılmıştır. pH $<$ pI durumunda kararlı polikompleks oluşumları artmış ve suda çözünemeyen HSA-PAA komplekslerinin varlığı pH $4,0$ değerinde gözlenmiştir. Ayrıca, $C_{\text{PAA}}=0,1\text{mg/mL}$ için pH $4,0$ ve pH $4,5$ 'de turbidimetrik titrasyon yöntemi kullanılarak, suda çözünmeyen interpolimer kompleksinin oluşumunun ve suda çözünür hale geçişin pH değişiminden etkilenme mekanizması aydınlatılmıştır.

Anahtar kelimeler: HPLC, dört detektörlü GPC, dinamik ışık saçılması, elektroforetik ışık saçılması, poliakrilik asit, human serum albumin, protein-polielektrolit kompleksi.

ABSTRACT

HSA that has a affinity to a very wide range materials, including metals such as Cu^{2+} and Zn^{2+} , fatty acid, amino acid, metabolites such as bilirubin is used for drug delivery systems as a carrier to specific targets by a lot of researcher. In this thesis, interaction mechanism between HSA and PAA which is a polyanion is investigated and approach in bioengineering is improved for medicine, pharmacy, fundamental science and physico-chemical character of interaction is researched by using HPLC, GPC with quadruple dedector systems, dynamic and electrophoretic light scattering and fluorescence techniques. Electrostatic interactions are the main forces in PPC formations; however, hydrophobic effects and hydrogen bondings are also possible. The interactions of polyelectrolytes (PE) with proteins in aqueous solutions is found to be pH, ionic strength and $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ ratio dependent. It was shown that the complex formation and the phase state of the systems depends on pH of the solution and ratio of components. For $C_{\text{PAA}}=1$ mg/mL, Polyacrylic acid (PAA) and human serum albumine (HSA) form polymer-protein complexes which are water soluble or insoluble depending on pH values (pH=4.0-7.0) and protein/polymer ratios ($n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0.1-10$). The stability of PAA-HSA complexes at pH > pI is negligible weak (pH 7.0 and pH6,0), at the same time decreasing of pH (pH < pI) results with increasing of the stability of polycomplex particles and $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ dependencies of physicochemical and conformational properties of of aqueous solutions of polycomplex particles at pH5,0 such as molecular properties and structural parameters (molecular weights (M_w , M_n), molecularweight distribution, radius of gyration (R_h), the Mark-Houwink equation constants (a), strenght of adsorption(k), saturated molar binding coefficient (δ_m^∞)) is investigated. In addition, for $C_{\text{PAA}}=0,1$ mg/mL pH effect to phase transition of policomplex particle at pH4,0 and pH4,5 is clarified using turbidimetric titration method.

Key words: HPLC, GPC with quadruple dedector system, dynamic light scattering, electrophoretic light scattering, poly(acrylic acid), human serum albumin, protein-polyelectrolyte complex

1. GİRİŞ

Sentetik polimerlerin, biyopolimer uygulamaları tıp, farmakoloji ve biyomühendislik alanlarında çalışılmıştır (Evdakov vd., 1976; Walter, 1977; Ottenbrite vd., 1978; Kataoka vd., 1980; Duncan ve Kopecek, 1984; Ikada vd., 1985; Ito vd., 1986; Albertsson, 1986; Osada, 1987; Bamford vd., 1989; Strege vd., 1990; Voycheck ve Tan 1992; Petrov vd., 1992; Mustafaev vd., 1992, 1996; Okano vd., 1994; Tsuruta, 1996; Ogata vd., 1996). Polimerik mikrokapsüller ve jeller; yapay kas, ilaç salınım sistemleri ve hücre kültür teknikleri gibi çeşitli fonksiyonel uygulamalara sahiptir. Proteinlerin ya da diğer biyomoleküllerin sentetik polimerlere bağlanma mekanizması ve modifikasyonu “*in vivo*” ve “*in vitro*” uygulamalarda birçok yarar sağlar. Proteinlerin makro moleküllere kovalent konjugasyonları, onların yüzeylerinde ve çözünürlük özelliklerinde değişiklik yaratır. Farklı moleküllerin polimerler ile modifikasyonu biyouyumluluğun ve “*in vivo*” koşullardaki kararlılığın artmasını sağlar. Enzimlerin polimerler ile modifikasyonu, onların çözelti içerisindeki aktivitelerini çarpıcı bir şekilde değiştirir. Proteinlere donmaya karşı koruma sağlar. Biyovalent polimerler biyolojik sistemde uzun yarılanma ömrüne sahip farmakolojik ajanlar olarak tasarlanan çeşitli moleküllerin bağlanmasında kullanılırlar. Yüzeydeki polimer modifikasyonları yüzeyin gerçek karakterini etkili bir şekilde maskeler. Böylece spesifik olmayan protein absorpsiyonu engellenir. Sonuçta, çok fonksiyonlu polimerler, polimer zincirine birden fazla proteinin kovalent bağlanmasını sağlar ve aktivitesi yükseltilmiş birçok kompleksin oluşmasını veya hedefleyici olarak davranmasını sağlar. Örneğin; polisakkarit, poli(L-lizin), polipeptid, poli(vinil alkoller), poli(vinil prolidon), poli(akrilik asit) türevleri, çeşitli poli(üretan) ve poli(fosfozen) gibi sentetik ve doğal polimerler çeşitli biyomaddeler ile bağlanmıştır.

İmmün cevabı ya da haptene karşı oluşan antikor cevabını yükseltmek için haptan-polimer konjugatları içeren (Evdakov vd., 1976; Petrov vd., 1992; Mustafaev, 1996) kuvvetli immünojenler yaratmak için benzer kompleksler oluşturulabilir (Abuchouwski vd., 1977). Biyobozunur poli(laktit-ko-glikolit)’in mikro kapsülleri ile immünizasyon için antijen salınım adaptasyonunda etkili bir güce sahip olan gebelik önleyici steroid salınımının güvenilir ve önceden programlanabilir hale getirilmesi için çalışılmıştır (Lee ve Sehon, 1977; Kohn vd., 1986; Braatz vd., 1993; Nathan vd., 1993). Ayrıca, antijenlerin polimerik kapsülizasyonu oral yolla alınan aşılarda geliştirilmesinde engel teşkil eden asetik ve enzimatik yıkımı engeller. Antijen salınımı ile güçlendirilmiş immünopotansiyalizasyonun olası mekanizması alüminyum tuzlarına karşı depolama görevi üstlenir. Mikro kapsül aşılarda gücüne rağmen, mikroküreler içerisindeki artık çözücüler ve monomerler, yavaş salınan antijenler ile ters

reaksiyonlar, alerjik reaksiyonların kontrolündeki zorluk ve mikrokürelerin boyutları çözümlenememiş sorunlardan bazılarıdır.

Lineer ve yüksüz sentetik polimerlere kovalent bağlanmış proteinlerin immün reaktiviteyi azalttığı bilinmektedir. Polietilen glikol (PEG) ile protein modifikasyonu, antijenik proteinlerin immünojenliğinin azaltılması ve daha uzun süre “*in vivo*” kararlılığını sağlanması için çalışılmaktadır.

Literatürde varolan bilgiler göstermektedir ki; suda çözünen yüklü polimerler (polielektrolitler-PE) çeşitli antijenler ile hayvanlara enjekte edildiğinde immün cevabı arttırarak adjuvant etkisine neden olmaktadır (Evdakov vd., 1976; Kabanov vd., 1978; Mustafaev vd., 1990; Petrov vd., 1992; Saraç vd., 1995). Mikrobiyal ve viral proteinlerin, polisakkarit antijenlerin immünojen olmayan sentetik PE kompleksleri/konjugatların hastalıklara karşı koruma sağlandığı gözlenmiştir. Bu durum klasik adjuvantlar olmadan da etkili immün korumanın sağlanabileceğini göstermiştir. Antijenlerin immünojenliklerinin modifikasyonuna getirilen bu tür yaklaşımlar, yeni aşılarda, tanı, teşhis, eczacılık ve biyoteknolojik hazırlıkların oluşturulması için yeni bir bakış açısı oluşturacaktır.

2. PROTEİN-POLİELEKTROLİT KOMPLEKSLER

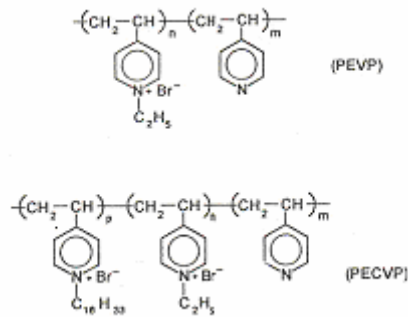
Protein polielektrolit komplekslerin ilk çalışmaları 1950 yılında Morawetz tarafından yapılmıştır (J. Phys. Chem., 1952; J. Phys. Chem., 1954; Arch. Biochem. Biophys., 1955). Morawetz katalazının çeşitli polielektrolitlerle oluşan kompleks çökeleklerini incelemiş ve değişik proteinlerin farklı sentetik polielektrolitlerle etkileşimlerini araştırmıştır.

Elektrostatik kuvvet ile kontrol edilen PE ile proteinlerin etkileşimi, çözünür kompleks (Berdick ve Morawetz, 1953; Mustafaev vd., 1975; Kabanov 1977, 1978, 1979, 1980), kompleks kuaservat (Samsonov vd., 1969; Lenk vd., 1987; Dubin vd., 1987; Sacco vd., 1988; Petrak, 1992) veya amorf (şekilsiz) çökelek oluşumu (Burgess vd., 1984; Veis vd., 1991) ile sonuçlanmaktadır. Bu polikompleksler yeni kuşak aşılar için immünolojik bileşiklerin tasarımında biyoteknoloji ve tıp alanında büyük öneme sahiptir (Petrov vd., 1992; Mustafaev, 1996). Proteinlerin sentetik polimerlerle kooperatif bağlanma mekanizmasıyla ilgili çalışmalar enzimlerin üç boyutlu yapısının immobilizasyonu, stabilizasyonu ve destabilizasyonu, yüzey üzerinde proteinlerin absorpsiyonu, polielektrolitlerin fizyolojik aktivitesinin ve protein-substrat ilgisinin değiştirilmesini sağlamaktadır. (Berdick ve Morawetz 1954; Sternberg vd., 1974; Burgess ve Jendrisak, 1975; Kokufuta vd., 1981, 1982; Shaner vd., 1983; Margolin vd., 1985; Nguyen., 1986; Clark ve Glatz 1987; Fisher ve Glatz, 1988; Bozzano vd., 1991; Shieh ve Glatz, 1991; Park vd., 1992). Fiziko-kimyasal mekanizmaların ve genel prensiplerin saptanması yapı ilişkisinin ortaya çıkarılması açısından önemlidir. Ayrıca, birçok reaksiyon, virüslerin, kromatinlerin, ribozom ipliklerinin ve gelişmiş biyolojik sistemlerdeki hücrelerin yapılanma sürecine benzemektedir. Bununla birlikte, protein-polimer etkileşimlerinin fiziko-kimyasal özelliklerinin araştırılması transkripsiyon işleminde nükleik asitler ve proteinler arasındaki etkileşimlerin iç yüzünü anlamayı sağlar (Shaner vd., 1983).

Protein içeren polikomplekslerin tüm durumları; makromolekül bileşenlerinin, iyonik güç ve pH'ın, polielektrolit ve protein konsantrasyonunun seçimi ile sağlanabilir. Bu tezin teorik kısmında, sentetik polielektrolitler ile serum proteinlerinin suda çözünür komplekslerinin fiziko-kimyasal ve yapısal özelliklerinin çözücü içerisindeki davranışlarına etkisi değinilecek ve güncel çalışmalar tartışacaktır.

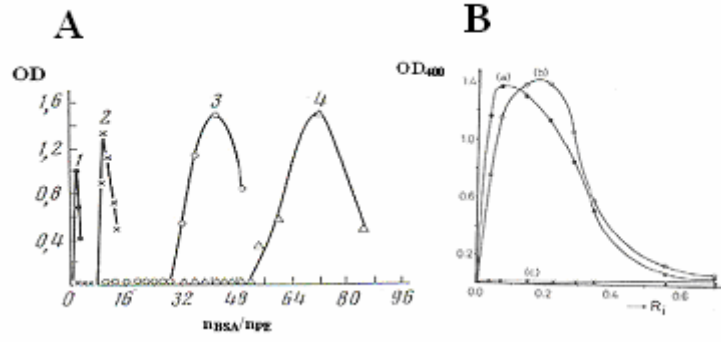
2.1 Zıt Yüklü Polielektrolitler ile Proteinlerin Kompleksleri

Proteinlerin suda çözünen ve çözünmeyen polielektrolit kompleksleri (PEC) birçok globüler protein ve zıt yüklü lineer PE ile elde edilir. Bu alandaki sistematik çalışmalar negatif yüklü proteinlerin polikatkonlarla kompleksleri: poli-4-vinilpridin (QPVP) (Mustafaev vd., 1975, 1980, 1981; Kabanov vd., 1977, 1978, 1979, 1980; Berezin, vd., 1980; Izumrudov vd., 1981; Dikov vd., 1984; Hiemenz, 1986; Anufrieva, 1987; Dubin ve Murell, 1988; Kokufuta ve Takahashi, 1990; Xia vd., 1993, 1994), poli(dimetildialüminyumklorit) (PDMDAAC) (Kabanov ve Mustafaev, 1981; Dubin vd., 1987; Strege vd., 1990), homopolimer (N,N,N, trimetilamino) etil klorit akrilat (CMA) ve pozitif yüklü proteinler ile polianyonlar: dekstran sülfat (Dubin vd., 1987), sodyum poli(steren sulfat)-NaPSS, poliakrilik asit-PAA polimetakrilik asit-PMAA, kopolimeri 2-(akrilamid)-2-metilpropansulfat ve akrilamid poli(A/CD) ile araştırmıştır. Fraksiyonlaştırılmamış polimerler kullanılarak yapılan ilk çalışmalardan; polimerlerin kompleks oluşturma aktivitesinin, polielektrolitlerin molekül kütle dağılımından (polidispersite) etkilendiği görülmüştür. Buradaki kritik nokta, bu çalışmaların başarılı sonuçları için molekül ağırlığı bilinen PE fraksiyonlarının kullanılmasıdır. Bu koşullar, proteinler ile suda çözünür kompleks oluşturma aktivitesini ve polikompleks çalışmalarında farklı fizikokimyasal metotların kullanımındaki farkları ortaya koyar. Suda çözünür protein-polimer komplekslerinin sistematik çalışmaları ilk olarak Kabanov ve Mustafaev tarafından açıklanmıştır (Kabanov vd., 1953, 1977, Mustafaev, 1975). Çözeltinin pH'ı proteinin izoelektrik noktasını (pI) geçtiğinde polikasyon zincirleri ile tuz bağları oluşturur ve küresel proteinlerin dış yüzeyinde bulunan karboksil gruplarının çözünmesiyle protein negatif yüklenir. Bu çalışmalarda, lineer yapılu kuaterner poli-4-vinilpridin ile globüler BSA molekülü kullanılmıştır.



Şekil 2.1 PEVP ve PECVP'nin kimyasal yapıları.

Polikompleksler zıt yüklü protein ve PE çözeltilerinin doğrudan karıştırılması ile elde edilir. BSA çözeltisine PE çözeltisinin eklenmesi ya da tam tersi olarak iki farklı karıştırma çeşitliliği olabilir. Bu izlek bir çözeltinin diğeri ile türbidimetrik titrasyonu ile sağlanır. İki farklı karıştırma çeşitliliğinde BSA ve PE karışımlarının davranışları Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 (A) Farklı polimerleşme derecelerinde (P_w): $0,19 \cdot 10^3$ (1); $0,95 \cdot 10^3$ (2); $3,3 \cdot 10^3$ (3); $5,9 \cdot 10^3$ (4); ve $C_{PE}=0,15$ g/100ml durumunda BSA-PVEP karışım çözeltilerinin optik yoğunluğunun(OD) n_{BSA}/n_{PE} ile değişimi. (B) Çeşitli polimer/protein molar oranlarında türbidimetrik titrasyon eğrileri (a) PVEP-HSA (b) PECVP-HSA ; pH 7,0 ; $n_{HSA}=5,7 \mu M$ ve $R_1=n_{PE}/n_{BSA}$.

pH 7,0’da BSA çözeltisi polikasyon çözeltisine eklendiğinde kompleks oluşumu gözlenmektedir. BSA/PE oranının geniş bir aralığında sistem homojen olarak suda çözünür halde kalır. Sistemdeki faz ayrımı PE’in polimerizasyon derecesine bağlı olarak sadece bazı kritik protein konsantrasyonlarında gözlenir. Karışımdaki protein bileşenindeki artış türbiditedeki azalmayı izleyen çözünür polielektrolit komplekslerin oluşmasına neden olur.

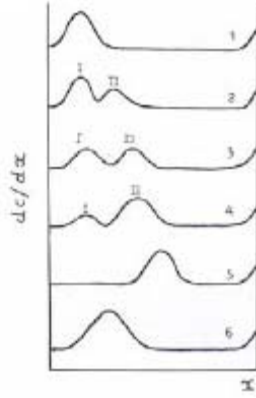
BSA çözeltisi PE çözeltisi ile titre edildiğinde farklı davranışlar gözlenebilir (Şekil 2.2 (b)). Karışımda artan polimer bileşeni, suda çözünmeyen polikomplekslerin oluşmasına neden olur. Polimer-protein karışımında, PE bileşenindeki artış türbiditedeki azalmanın işaret ettiği gibi suda çözünür komplekslerin oluşmasını sağlar. Çözeltideki bileşen oranları kritik değere ulaştığında sistem tekrar homojen olur ve PE bileşenindeki artış ile karışımdaki faz bölünmesi değişmeden kalır. Böylece protein ve PE karışımındaki farklı yollar karışımdaki birleşen oranına bağlı olarak karışımların temel durumundan farklı olur. Buna rağmen uygun oranların her ikisi de çözünür polielektrolit komplekslerin oluşumuna neden olur.

Proteinlerle polikasyonların homojen karışımları sedimentasyon (Kabanov vd., 1953, 1977, Mustafaev, 1975), viskozimetre (Kabanov vd., 1953, 1977), statik, kuasi-elastik ve elektroforatik ışık saçılması (Mustafaev ve Kabanov, 1980, 1981; Izumrudov vd., 1981;

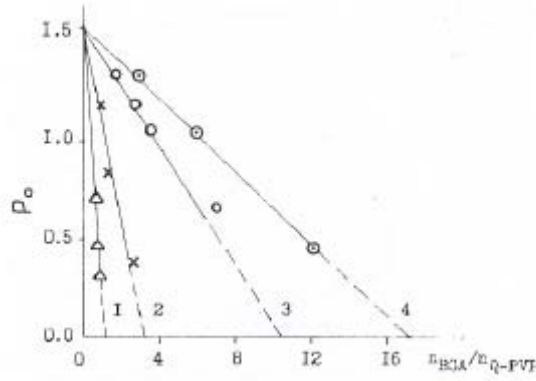
Kabanov vd., 198; Kokufuta vd., 1982; Shaner vd., 1983; Anufrieva vd., 1987; Dubin vd., 1988; Park vd., 1992; 1994; Güney vd., 1997), elektron mikroskobu (Kabanov vd., 1977) flüoresans ve CDS (Circular Dichroism Spectroscopy) (Izumrudov vd., 1981; Anufrieva vd., 1987; Dubin ve Murrell, 1988; Güney vd., 1997) spektroskopi gibi farklı metotlarla incelenmiştir.

Bileşenlerin farklı oranlarındaki homojen BSA-PVEP sisteminin sedimentasyonları Kabanov ve Mustafaev (1977) tarafından açıklanmıştır. Çözeltideki (n_{BSA}/n_{PE}) makromolekül konsantrasyonun farklı oranlarında PVEP ve BSA ile karışımının sedimentagramları Şekil 2.3’de verilmiştir. n_{BSA} ve n_{PE} sırasıyla, çözeltideki PVEP ve BSA fraksiyonlarının makromolekül sayıları, $n = C \times 10^{-2} N_A / M$ formülü ile hesaplanır. N_A Avagadro sayısı, M molekül kütlesi, C konsantrasyon g/dl’dir. Şekil 2.3’den görüldüğü üzere, sistem sedimentasyon bileşenlerinin çiftli dağılımı ile karakterize edilir. Karışımın ve başlı başına bileşenlerin (Benzer durumlar altında BSA ve PVEP’nin sedimentasyon katsayıları (S_c) 4.2 ve 1.9 svettir) pik I ve II ile ilişkili olan sedimentasyon katsayılarının (S_c) karşılaştırması göstermektedir ki; PVEP sedimentagramlarında serbest BSA’nın sedimentasyon piki görülmemektedir. Bir varsayım hızla çöken maddelerin (pik II) PVEP-BSA ($S_c = 3,6$ sved.) kompleks olduğudur. Daha yavaş çöken maddeler (Pik I) için S_c değeri 2.0’dır. Bu pik serbest PVEP ile ilişkilidir. Bileşenlerin farklı oranlarında homojen sistem araştırmaları PVEP-BSA kompleks oluşumunun karakterizasyonun birçok önemli özelliğini aydınlatır. Kompleks piki olarak farz edilen alanlar (pik II) artıyorken (eğri 2-4), karışımda protein moleküllerinin sayısındaki artış serbest PVEP makromoleküllerine bağlı (pik I) pik alanlarının artmasına neden olur.

Makromoleküllerin sayısının oranı 3:1 olduğunda, serbest PVEP piki ortadan kaybolur ve $S_c = 5,2$ sved ile karakterize edilen tek bir pik sedimentagramlarda kalır (Eğri 5). Açıklanan bu durum PVEP’nin çalışılmış tüm fraksiyonlarının BSA ile etkileşiminde tipiktir. Aynı zamanda, sabit molekül konsantrasyonundaki serbest PVEP piklerinin gözden kaybolduğu BSA/PVEP oranları, PVEP’nin polimerleşme derecesine ve PVEP makromoleküllerinin çevre uzunluğuna bağlıdır. Şekil 2.4’de farklı polimerleşme derecelerine sahip PVEP ve protein makromoleküllerinin sayı oranına karşı serbest PVEP piklerinin alanlarının bağımlılığı verilmiştir. Protein ile titre edildiği sürece çözeltideki serbest PVEP konsantrasyonundaki lineer azalma polimerin komplekse bağlandığını gösterir. Serbest PVEP’ye bağlı alanlardaki azalma çözünür polielektrolit kompleks parçacıklarını tanımlayan II. pikteki artışı izler.



Şekil 2.3 Farklı n_{Q-PVP}/n_{BSA} oranlarında Q-PVP-BSA karışımının sedimentagramları. n_{BSA}/n_{Q-PVP} : 2-0,75; 3-1,25; 4-2; 5-3; santrifüj zamanı (t) 60dk.; 6-6; t=20 dk.; w=56000 rpm..



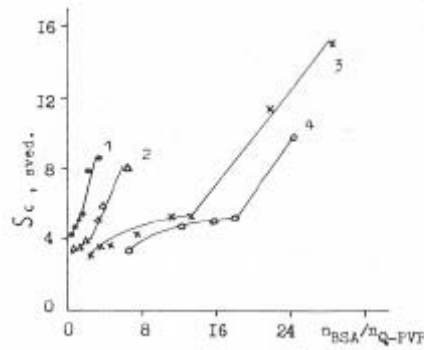
Şekil 2.4 Farklı DP'ye sahip Q-PVP için Q-PVP-BSA sisteminde serbest Q-PVP'nin sedimentasyon pik alanının (P_o) n_{BSA}/n_{Q-PVP} oranına göre değişimi. 1: $0,19 \times 10^3$, 2: $0,95 \times 10^3$; 3: $3,3 \times 10^3$; 4: $5,9 \times 10^3$; Q-PVP=0,15g/dl; $25^\circ C$; pH=7,0.

Üzerinde durulması gereken önemli nokta, $n_{BSA}/n_{PE} \leq 1$ olduğu zaman, serbest PVEP'nin BSA/PE'nin molar oranının geniş bir aralığında sistemde bulunuyor olmasıdır. Benzer sedimentasyon örnekleri Ovalbumin (Mustafaev vd., 1990), Gammaglobulin (Kabanov vd., 1980), Formiatdehidroginazın PEVP ile kompleksi ve Alkoldehidroginaz enzimlerinin (Mustafaev vd., 1980; Berezin vd., 1980; Dikov vd., 1984), mikrobakterlerin (B. tüberküloz antijenleri) yüzey protein fraksiyonlarının (Petrov vd., 1992), serum ve kan proteinlerinin karışımları (Kabanov vd., 1980) olarak verilebilir.

Bağlı deneyler göstermiştir ki; n_{BSA}/n_{PE} 'nin çalışılan tüm oranlarında sistemde serbest BSA'ya rastlanmamış ve eklenen tüm BSA güçlü bir şekilde polikatyon ile bağlanmıştır.

Aynı zamanda, sistemde bulunan serbest PE varlığı, protein molekülleri ile polikasyon arasında rastlantısal olmayan bir dağılımın olduğuna işaret eder. Bu durum bir zincir tarafından absorblanan globüllerin pozitif etkileşimleri nedeniyle rastlantısal dağılımın bozulmasıyla sonuçlanır. Başka bir deyişle, aynı polikasyon molekülleri üzerine yoğunlaşan BSA globülleri arasındaki bağlantı düzeni rastlantısal olmayan dağılımın neden olduğu serbest enerji artışındaki enerjinin azalmasıyla sonuçlanır. Kooperatif etkileşimin teorik açıklaması Papissov vd. tarafından (1974) verilmiştir. Rastlantısal olmayan dağılım proteinlerin polimer zincirine ya hiç eklenmemesi ya da verilen şartlar altında polikasyon zinciri tarafından maksimum değerde absorblanmasıyla bağlantılıdır. Dağılımın bu tipi sulu çözeltilerde poli(etilenglikol) oligamerleri ile polimetakrilad asit (Papissov vd., 1974), katyonik polipeptidler ve temel proteinlerin (histonlar ve lizozom) DNA komplekslerinde gözlenmiştir. Sulu ve tuzlu çözeltilerinde kompleks oluşum sürecinde negatif yüklü polimetakrilad asit ve pozitif yüklü proteinlerinin dinamik karakterlerindeki değişimler Anufrieva (1987) tarafından polarize lüminisans metot kullanılarak analiz edilmiştir. Polielektrolit zincirleri arasında protein moleküllerinin dağılımının düzensiz karakteri, polimetakrilik asidin birçok bölümünün sıkı bir şekilde proteinler tarafından doldurulurken diğer kısmının serbest olduğu gösterilmiştir.

PVEP komplekslerinin sedimentasyon katsayılarının n_{BSA}/n_{PE} oranına bağlı karakterini 4 farklı eğri ile Şekil 2.5'te verilmiştir.

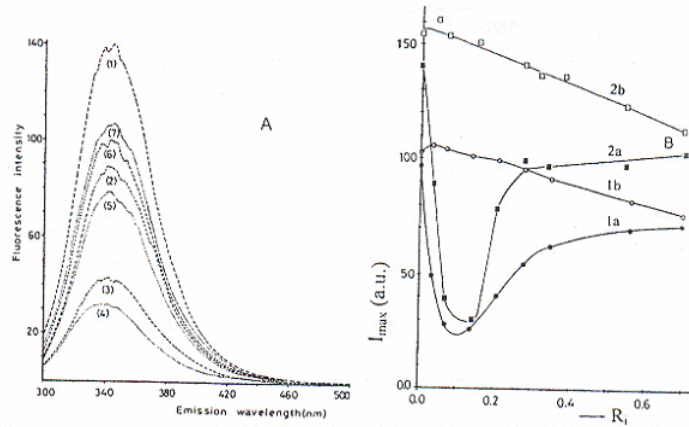


Şekil 2.5 Farklı DP'ye sahip Q-PVP için Q-PVP-BSA'nın sedimentasyon katsayılarının n_{BSA}/n_{Q-PVP} bağılı karakteri. 1: $0,19 \times 10^3$; 2: $0,95 \times 10^3$; 3: $3,3 \times 10^3$; 4: $5,9 \times 10^3$; $[Q-PVP]=0,15$ g/dl; $25^\circ C$; $pH=7,0$.

$n_{BSA}/n_{PE} > N_i$ değerini serbest polikasyonun sistemde bulunduğu ve S_c 'deki değişimin küçük olduğu görülmektedir. Yukarıda ifade edilen bilgilerden PVEP sabit tutularak protein miktarı artırıldığında, bu bölgede kompleksleşmenin oluşmaya başladığı görülmektedir. Verilen her PVEP için kompleks bileşenleri sabittir ve bu bileşen polikasyonun düzlemsel uzunluğu ile

hesaplanır. Güney ve çalışma arkadaşları (1997) bu oranda polikasyon ile kompleks oluşturan BSA globüllerinin içinde bulunan triptofanın flüoresans şiddetindeki değişimin göreceli olarak küçük olduğunu göstermiştir.

$n_{BSA}/n_{PE} > N_i$ 'nin üzerinde (Eğri 3 ve şekil 2.5) kompleksler için S_c 'deki bazı değişimler BSA'nın serbest PVEP tarafından sarılmasıyla (Kompleks parçacıklarının kütle artıştan bağımsız olarak) ortam viskozitesinde azalmaya sebep olur. $n_{BSA}/n_{PE}=N_i$ olduğunda “ya hep ya hiç” prensibi uyarınca, BSA-PE kompleksleri; globüllerin polikasyon zincirlerinde rastgele olmayan dağılımını veren N_i 'nin yüksek değerleri ile karakterize olan sistemle açıklanır.



Şekil 2.6 pH 7,0'da PVEP'nin artan miktarı ile değişen BSA'nın flüoresans spektrumu ($C_{BSA}=5,7 \mu M$) $R_i=0,035$ (2), 0,07 (3), 0,14 (4), 0,21 (5), 0,35 (6), 0,7 (7); pH 7.0 20 °C. PEVP-BSA için (1a,1b) ve pH 7.0 (a) ve pH 4.3 (b)'de PEVP-BSA (2a, 2b) karışımları için R_i eğrilerinin 340 nm'de emisyon şiddetleri (I_{max}).

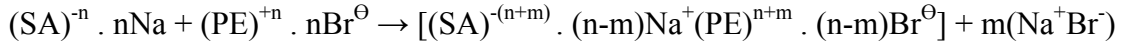
Bununla beraber, N_i 'ye (sedimentagramlarda gözükmeyen pik I) denk gelen n_{BSA}/n_{PE} değerinde, PVEP ile etkileşen BSA ürünlerinin sedimentasyon katsayılarında artış gözükmemektedir. Serbest BSA piki ise sedimentagramlarda gözükmemektedir (Şekil 2.6 eğri 6). Başka bir deyişle, BSA'nın miktarı arttığında, yukarıda ifade edilen kompleksler absorpsiyonları için ek kaynaklar ararlar. BSA ile PVEP arasındaki etkileşim proteinin ikincil yapısında bir değişim meydana getirmez.

2.2 Protein-Polielektrolit kompleksleşmesini etkileyen faktörler:

Polikasyon zinciri ile bağlanan protein yapısını açıklamak için polikompleksler denge diyaliz tekniği ile çalışılmıştır. (Mustafaeve ve Kabanov, 1981). Zıt yüklü polielektrolitler ile kooperatif etkileşim giren ve intermakromoleküler tuz bağlarının oluşumuna neden olan

çözelti içerisinde düşük moleküler elektrolitler giderilmelidir.

Protein-polielektrolit karışımında:



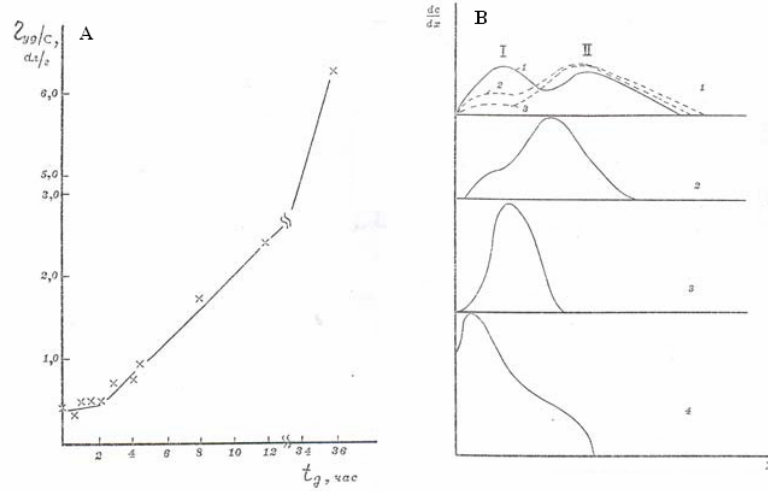
Bu yüzden, reaksiyon karışımının düşük tuz bileşeninin analizinin bir yöntemi polielektrolit makromolekülleri ile protein globülleri tarafından oluşturulan tuz bağlarının sayılarının tayin edilmesidir. BSA-PEVP karışımında düşük moleküler elektrolitlerin konsantrasyonun hesaplanması için polikompleks çözeltisinin denge diyalizi gerçekleştirilir. Diyaliz Ag titrasyonu ile halid bileşeninin hesaplanmasıyla analiz edilerek Tablo 2-1’de listelenmiştir.

Tablo 2-1 Farklı içeriklerle Q-PVP-BSA polikomplekslerinin diyalizindeki Br⁻ konsantrasyonun Ag analiz sonuçları (Sigma, 2004)

Polikompleks bileşeni	Q-PVP’nin her 1g’da Br ⁻ izolasyon miktarı 10 ³ mol	BSA’nın her 1 molekülündeki tuz bağı sayısı
7 : 1	0.974	60
9 : 1	1.154	50
11 : 1	1.374	60
13 : 1	1.634	50

Karışımındaki BSA bileşeninin artışı diyalizde Br⁻ konsantrasyonla orantılıdır. Şekil 2.7’de polikasyonlar ve BSA globülleri arasındaki tuz bağları sayısındaki artış gösterilmiştir. Eğer polikompleks bileşeni ve düşük moleküllü elektrolitlerin toplam miktarı intermakromoleküller reaksiyonun sonucu olarak uzaklaştırılırsa, polikompleks içerisindeki her protein globülüyle oluşan tuz bağı sayısı bulunabilir. Tablo 2-1’de bu değerlerin reaksiyon karışımın bileşenine bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç göstermektedir ki, PVEP ile BSA globüllerinin etkileşimi dengededir. Protein, karboksil gruplarının sadece yarısı ile etkileşime katılan protein bileşeninden (Tristam, 1956) hesaplanır.

BSA-PVEP komplekslerinin davranışları üzerinde çevrenin pH ve iyonik gücün etkisi Mustafaev (1981) tarafından çalışılmıştır. Polikasyon zincirlerine bağlı albümin molekülleri arasındaki dağılımın, çevrenin iyonik gücüne (Şekil 2.7 (A)) ve pH’sına (Şekil 2.7 (B)) keşfedilmiştir.

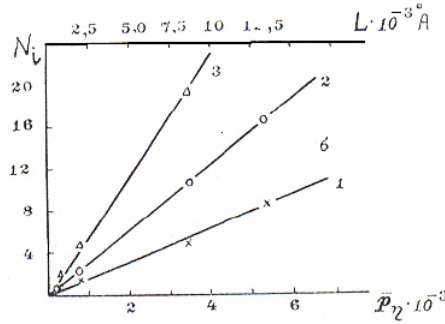


Şekil 2.7 (A) Farklı zamanlarda (t -saat) saf suya karşı yapılan diyalizden sonra BSA-PVEP karışım çözeltisinin sedimentagramları. Diyalizden önce (1,1); 0,5 (1;2); 2 (1,3); 3 (2); 8 (3); 36 (4); pH 7,0 $n_{BSA}/n_{PE} = 3$; 25 °C (B) Diyaliz sırasında (t_d) BSA-PVEP'nin indirgenmiş viskozitenin (η_{sp}/c) değişimi; pH 7,0; 25 °C.

Bu işleminin sonucu olarak; polikatyonlara daha fazla albümin eklenirken, diğerleri de serbest hale geçer. İyonik güç olarak ele alınan kompleks kararlılığının en düşük ve en yüksek tepe limitleri hesaplanır ($1.1 \times 10^{-8} \times 10$ mol/l) ve sistemin aşırı tuzdan uzaklaştırılması ($C:10$ mol/l) polielektrolit ile albüminin istatistiksel etkileşiminin ürünü olan oldukça iri ve düzensiz çökeleklerin oluşumu ile kooperatif polikompleks parçacıklarının elektrostatik dengesinin bozulmasıyla sonuçlanır. Bununla birlikte, BSA ve PVEP arasındaki kompleks oluşumu denge süreci olarak bilinir. Sedimentasyon metodu ile analiz edilen sistem göstermektedir ki; NaCl tuzunun eklenmesinden sonra polikompleks çözeltisinin tuzdan uzaklaştırılması doğal BSA-PVEP komplekslerinde olduğu gibi aynı dağılım sedimentagramlarıyla elde edilir.

Oluşan polikompleks bileşeni analizi üzerinde durduğumuzda serbest PVEP sedimentasyon pikleri ve sistem içerisinde PVEP zincirlerindeki protein moleküllerinin sayı oranı gösteren Şekil 2.7 (A)'ya geri dönmemiz gerekir. Kesişme noktaları, polikatyonların tamamı BSA ile kompleks oluşturduğunda, n_{BSA}/n_{PE} oranına uygun gelen serbest PVEP pikinin "0" olduğu analitik yaklaşımların ekstrapolasyonundan elde edilir. $P_0 = 0$ (Serbest PVEP sedimentasyon pik alanıdır) olduğunda, PVEP ile olarak bağlanan BSA sayısında, $\lim(n_{BSA}/n_{PE}) = N_i$ değeri göz önüne alınmalıdır. Bu limit verilen şartlar altında polimerizasyon derecesi bilinen polikasyon ile bağlanan protein moleküllerinin sayısına eşittir. Şekil 2.7'de yüksek polimerizasyon değerlerine sahip PVEP'de yüksek N_i değeri görülür. Farklı protein-polikasyon sistemlerinde PVEP için DP'nin N_i bağımlılığı Şekil 2.8'de verilmiştir. Deneysel

hatalar gözardı edildiğinde bu bağımlılık lineerdir. Bunun anlamı; sabit uzunluğa sahip (L) polikasyon zincirinin her bölgesi, globüllerin bağlanması için kullanılır.



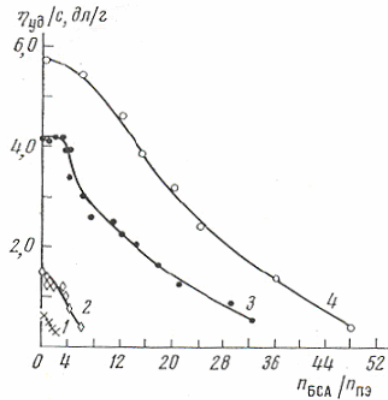
Şekil 2.8 FDH-PVEP (1), BSA-PVEP (2), BGG-PVEP (3) için polikasyonların polimerizasyon derecesinin (P_0) N_i 'ye göre değişimi.

Karışımın bileşenleri $N_i = n_{BSA}/n_{PE}$ (Karakteristik bileşenleri sedimentagramlarda serbest polikasyon fraksiyonlarının yok oluşuna karşılık gelir) olduğunda sadece karakteristik bileşenler ile polikompleks parçacıkları çözelti içerisinde bulunur. Parçacıkların yapısı polikasyon zinciri üzerinde globüllerin sarılmasıyla tuz bağları ile BSA globül bağlarının toplamını temsil eder. Polikompleksteki polikasyonun en fazla yüklenen grupları serbest olarak kalır. Bu gruplar karakteristik bileşenleri ile parçacıkların yüzeyindeki ilmiklere yerleşir ve onların suda çözünmesini sağlar. Yeni protein parçacıkları reaksiyon karışımına eklendiğinde ($n_{BSA}/n_{PE} = N_i$), çözünür kompleks içerisinde bulunan polikasyonların serbest bölgelerine BSA globüllerinin elektrostatik olarak bağlandığı gözlenir. Bu durum parçacıkların molekül kütlesinde ve sedimentasyon katsayısında artışa neden olur. Her etkileşimin sonucunda, polikompleks parçacıklarının toplam pozitif yüklerindeki azalma komplekslerin çözücüye olan ilgisinin azalmasına neden olur. Eğer Şekil 2.9'u incelersek, polikompleks içerisindeki protein bileşemindeki artış, yukarıdaki sonuçlar göz önüne alındığında, kompleks çözeltilerin indirgenmiş viskozitesindeki azalmayla sonuçlanır. Buna rağmen, polikompleks parçacıkları hala polielektrolit şişme yeteneğini korur. Reaksiyon karışımındaki protein bileşeni, polikompleks çökelti noktasına uyan değerlere yakın olduğunda, polikompleks çözeltisinin miktarları A_2 için en küçük değere sahiptir. (Kabanov vd., 1977, 1980).

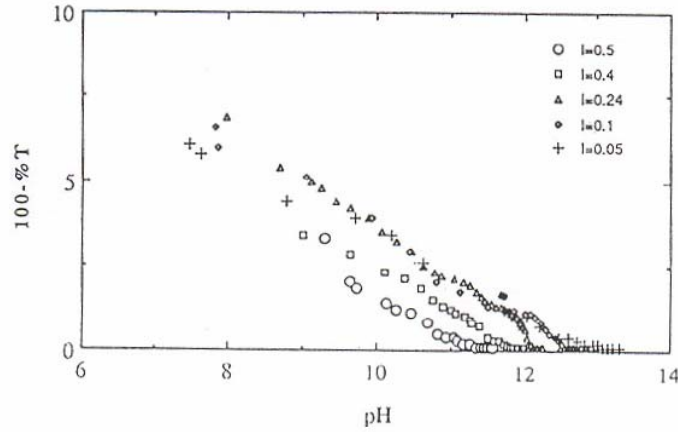
Hem anyonik hem de katyonik polielektrolitlerin proteinlerle kompleksleşmesi ile ilgili yapılan çalışmalar; protein-polielektrolit komplekslerin tuz bağları ile oluştuğunu ortaya koymuştur. İnorganik elektrolitlerin eklenmesi, genellikle yük koruyucu kılıf etkisi ile polianyonların elektrostatik etkileşimini azaltır. Protein ve polielektrolit arasındaki

kompleksleşmelerde tuz etkisi NAPSS-RNA (Hiemenz , 1986) ve BSA-PVEP sistemleri için Şekil 2.10'da gösterildiği gibi genellikle iç bağlanma derecesini azaltır. İyonik kuvvetin artmasıyla azalan protein bağlanmaları Anufrieva (1987) tarafından lizozim-PMAA sistemi için araştırılmıştır. Tuzun eklentisi protein-polielektrolit komplekslerin kararlılığını etkileyebilmektedir. Örneğin, Morawetz (1952) katalaz ve poliakrilik asidin artan $BaCl_2$ konsantrasyonunda daha kolay kompleks oluşturduğunu göstermiştir.

Bununla beraber, BSA-PDMDAAC'nin (Dubin vd., 1994) kompleksleşmesindeki ters etkinin yüksek iyonik güçte faz geçişinin pH'ı yükselttiği gösterilmiştir. Tuzun eklenmesi ile elektrostatik etkileşimin azalması kompleksi ya dengede tutar ya da kümeleşmesini sağlar. Protein-polielektrolit etkileşim mekanizmasının üzerindeki iyonik gücün etkisi BSA-PVEP ile Mustafaev (1981) ve BSA-PDMDAAC sistemi ile Dubin (1993) tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmalar göstermektedir ki; düşük iyonik güce sahip çözeltilerde polikompleksler stokiometrik olarak meydana gelirler. Yüksek iyonik güçte ise kompleksler farklı yapıların geniş dağılımı ile oluşurlar.



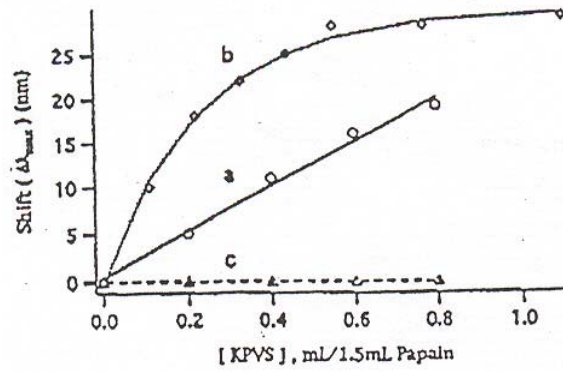
Şekil 2.9 Farklı polimerleşme derecesine sahip PVEP ile farklı n_{BSA}/n_{PE} oranında BSA-PE karışım çözeltisinin indirgenmiş viskozitenin değişimi: $0,19 \times 10^3$ (1); $0,95 \times 10^3$ (2); $3,3 \times 10^3$ (3); $5,6 \times 10^3$ (4); $C_{PE}=0,15$ g/100ml; pH 7,0; $25^\circ C$.



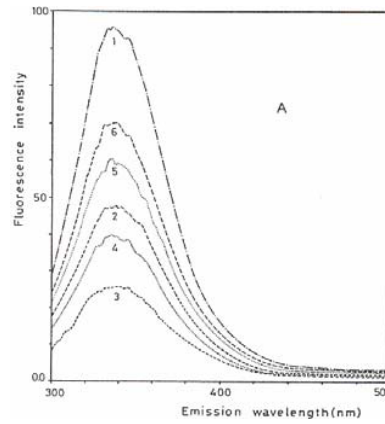
Şekil 2.10 Farklı iyonik güçteki NaCl çözeltisindeki NaPSS-RNAz sisteminin türbidimetrik titrasyonu.

Protein ve polielektrolitler arasındaki kompleksleşmeye Coulomb etkileşimi neden olmaktadır. Artan pH değerleri protein-polikasyon kompleksleşmenin derecesini arttırmasına rağmen azalan pH değerleri kompleksleşmeyi azaltmaktadır. Ohno ve çalışma arkadaşları (1981) human serum albumin (HSA) ile poli (N,N-dimetiltetrametilenamonyum Bromid)'in etkileşimini araştırarak polikasyon ve HSA'nın elektrostatik kuvvet aracılığı ile etkileştiğini ve bu etkileşimin eriminin pH'a duyarlı olduğu bulmuşlardır. Fraksiyonlaştırılmamış polikasyonların geniş molekül ağırlığı dağılımı göstermesiyle nedeniyle farklı polikompleks bileşimlerinin gerçekleşmesi bağlanmayı karmaşıktırır.

Cha (1992) tarafından çalışılmış Papain-PVS (poli(vinil alkol sülfat)) komplekslerinin ve Mustafaev (1969) tarafından çalışılmış serum proteinleri-kuaternize poli-4-vinilpridin komplekslerinin flüoresans çalışmalarından komplekslerin şiddet ve emisyon kaymalarının pH bağlı olduğu bulunmuş ve Şekil 2.11'de gösterilmiştir. Benzer sonuçlar sedimantasyon metoduyla da elde edilmiştir (Kabanov vd, 1977).



Şekil 2.11 Papain-KPVS komplekslerinin emisyon kayması üzerindeki pH etkileri(a: pH 2, pH 7, ve c: pH 10) (Kokufuta ve Takahashi, 1990).



Şekil 2.12 pH 7,0'da artan PVEP varlığı içinde 5,7 μ M HSA'nın flüoresans spektrumu.
 $R_i(n_{PVEP}/n_{HSA})=0,035(2); 0,14(3); 0,21(4); 0,35(5); 0,7(6);$ pH 7,0; 25 $^{\circ}$ C

Proteinler ve polielektrolitler arasındaki ilk kompleksleşme, proteinlerin polielektrolit ile aynı net yüke sahip olma durumu altında gözlenir. Dubin (1994), aynı yüklü sistemlerde BSA'nın katyonik ve anyonik PE'ler ile oluşturduğu kompleksleşmenin düzenli olamayan protein yük bölgelerinden kaynaklanabileceği sonucuna vardı. Samsonov (1969) moleküler eleme kromatografisi metodunu kullanarak RNaz ve sodyum vinil prolidonun kopolimeri arasındaki kompleksleşmenin gücünün kopolimer içerisinde sodyum vinil sülfat içeriğinin azaltılması ve çözelti içerisinde Na iyon bileşeninin arttırılması ile sağlanabileceğini göstermiştir. Bir kural dışı durum; BSA, RNaz veya lizozom ile PVS arasında güçlü etkileşimin gözlenmesidir. Bu durum polianyonun yüksek orandaki yük yoğunluğundan kaynaklanır (Kokufuta ve Takahashi, 1990). Bu çalışmada izoelektrik noktasında polimere bağlanacak olan proteinin kritik bağlanma pH'sının polianyonun negatif yük yoğunluğu ile arttığı bulunmuştur. Daha yoğun yüklü polianyon ve yerel pozitif yüklü protein bölgesi arasında artan elektrostatik çekim, toplam protein yükü ile polianyon arasındaki olası itmeyi

yener. BSA-PDMDAAC'nin kompleks çalışmalarında (Dubin vd., 1994), başlangıç kompleksleşme pH'sının BSA ve PDMDAAC'nin konsantrasyonuna duyarlı olmadığı bulunmuştur. Çeşitli protein-polielektrolit kompleksleri için, Kokufuta (1990, 1994) bir proteini çöktürmek için ihtiyacı olan polielektrolit miktarının çözeltideki protein miktarı ile doğru orantılı olduğunu bulmuştur. Protein-polielektrolit sisteminde faz değişiminin etkinliği için konsantrasyona olan bağımlılığı başka sistemler için Morawetz (1952) tarafından ifade edilmiştir.

2.3 Polikompleks İçinde Protein Yapısı.

Daha önceki bölümlerde ifade edildiği üzere, PE-protein karışımı içerisinde polikompleks oluşum mekanizması farklı fiziko-kimyasal metotlar ile çalışılmıştır (hidrodinamik, titrasyon, ışık saçılması, spektrofotometrik vs.).

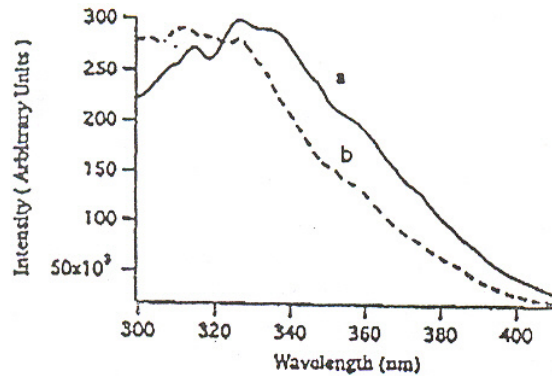
Bu metotlar kompleks içerisindeki proteinlerin yapısı hakkında herhangi bir bilgi vermezken, kompleksin yapısı ve bileşenlerin bağlanma mekanizması hakkında genel bilgileri sağlarlar.

Strelzowa ve Tolstogusow (1977), dekstran sülfat ile protein karışımında kemotripsinin 250-330 nm aralığında CD spektrum sonuçlarının değiştiğini buldular. Bununla beraber, kemotripsinin CD spektrumu protein çözeltisine dekstran sülfatın eklenmesinden etkilenmemektedir. Dubin (1994) papain, insülin ve hemoglobinin PDMDAAS ile kompleksleşmesini CD spektroskopisi ile inceledi. Papain ve insülinin CD spektroskopisinde kompleksleşmeyle α -heliks yapılarında değişiklik gözlenmiş ancak hemoglobin bu kompleksleşmeden etkilenmemiştir.

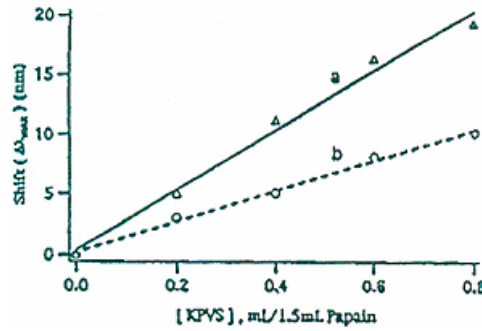
Kabanov (1977), ORT (Optical Rotary Dispersion) metodu ile BSA ile PVEP arasındaki etkileşimin proteinin ikincil yapısında herhangi bir değişime neden olmadığı gösterilmiştir.

Son zamanlarda protein-polielektrolit kompleksleşmelerinde flüoresans teknikler kullanılmaktadır (He ve Carter, 1993; Teramoto vd., 1994; Güney vd. 1997). Sentetik polimer sistemlerle yüklenmiş piren ve antrasende kullanılan flüoresans teknikler ile PEC oluşum mekanizması açıklanmıştır (He ve Carter, 1993). Başka bir deyişle, protein içinde yer alan triptofan (Trp) parçacıkların flüoresansı proteinin yapısal değişikliklerinde prob olarak kullanılmaktadır (Ohno vd., 1981; ; Kokufuta , 1990, 1994; Cha vd., 1992; Park vd., 1992; He ve Carter, 1993; Teramoto vd., 1994; Xia vd., 1995). Bu yüzden, flüoresansta spektral değişimler, özellikle emisyon tepe noktası (I_{max}) sentetik PE ile polielektrolitlerin komplekslerinin oluşumunun neden olduğu protein yapısal değişimleri için parametre olarak kullanılır. Proteindeki triptofan parçalarının flüoresans emisyonundaki kaymalardan,

belirlenmiş protein bölgelerinde PE ve protein arasındaki etkileşimlerin yerini belirlemek olasıdır. Frank ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada potasyum poli(vinil alkol sülfat) (KPVS) ile papainin kompleksleşmesinin flüoresans çalışmaları, KPVS varlığında papainin emisyon spektrumunun maviye kayması ile belirlenmiştir (Cha vd., 1992). Bu maviye kayma, triptofan parçalarının kompleks oluşturan KPVS zincirleri tarafından sulu çevreden korunduğu sonucu olarak açıklanmıştır. Papain konsantrasyonunun artmasıyla polimerin koruma etkisinde azalma görülmektedir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Papainin flüoresans emisyon spektrumu: KPVS komplekleri 280nm’de uyarılmıştır [a: papain; b: papain; KPVS=1,5:0,8] (Cha vd., 1992).

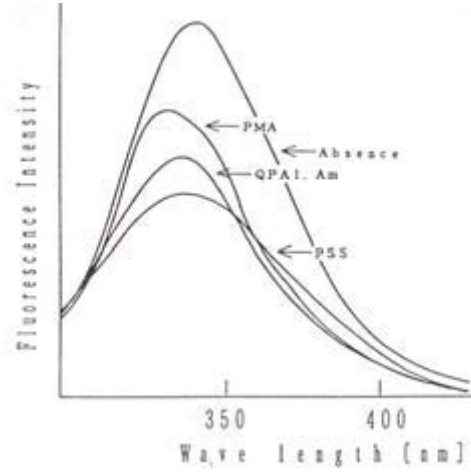


Şekil 2.14 Papainin emisyonuna KPVS’nin konsantrasyon etkisi: KPVS kompleksleşmesi [papain=a: 3×10^{-6} M, b: 1×10^{-6} M] (Cha vd., 1992).

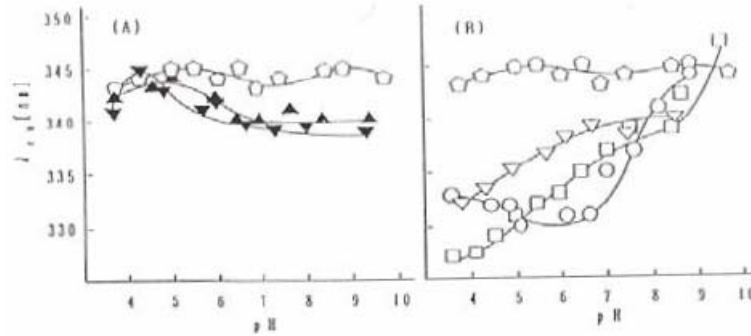
Bu yüzden, düşük papain içeriğinde kompleksleşmenin yüksek verimde gerçekleştiği önerilmektedir. Albüminin birincil yapısı ve yapısal değişimler özellikle sığır (BSA) ve insan (HSA) albüminleri için aydınlatılmaktadır. BSA molekülü iki triptofan parçası içerdiği bilinmektedir. Bunlardan biri bölge 1 ve 3 arasında hidrofobik yarığın üst kısmına yerleşmişken diğeri molekülün yüzeyindedir (Burstein vd., 1968, 1973; Peters, 1996). HSA

ise amorf ve geçirgen protein matrisinin tabakaları tarafından sarılmış tek Trp parçası taşır (Burstain, 1973).

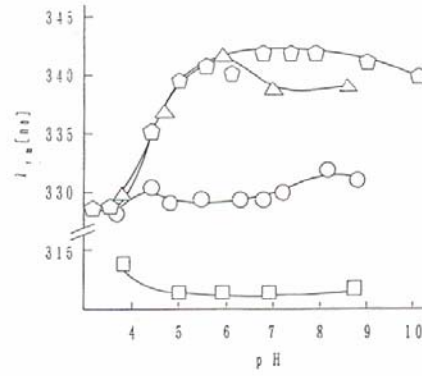
Teramoto (1994) polielektrolitler ile HSA ve BSA'nın etkileşimini flüoresans metodunu kullanarak incelemiştir. Şekil 2.16'da polikasyon (A) ve polianyon (B) varlığında BSA'nın Trp'nin emisyon spektrumunun pH'a olan bağıllığı gösterilmektedir.



Şekil 2.15 pH 7,4'de polielektrolitin çözelti içindeki varlığına göre BSA'nın flüoresans spektrumu. $[BSA]=4 \times 10^{-2}$ (g/L). $[polielektrolit]=2 \times 10^{-4}$ (mol/L).



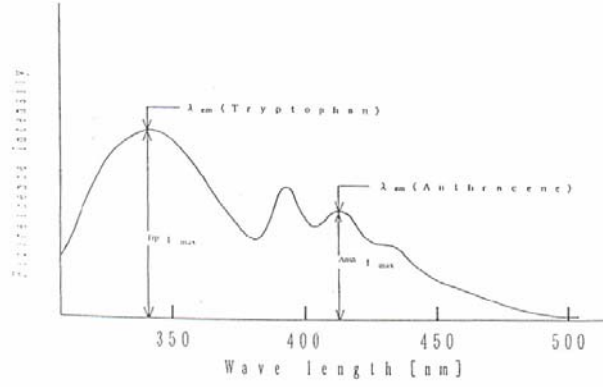
Şekil 2.16 Su ortamında ve polielektrolit varlığında BSA'nın triptofanın λ_{em} 'nin pH ile olan değişimi. (A) polikasyon, (B) polianyon. ($\triangle$) BSA, ($\blacktriangle$) BSA + QPA1. Am, ($\blacktriangledown$) BSA + PQE, ($\circ$) BSA + PMA, ($\square$) BSA + PSS, (Δ) BSA + PNMA. $[BSA] = 4 \times 10^{-2}$ (g/L). $[Polielektrolit] = 2 \times 10^{-4}$ (mol/L).



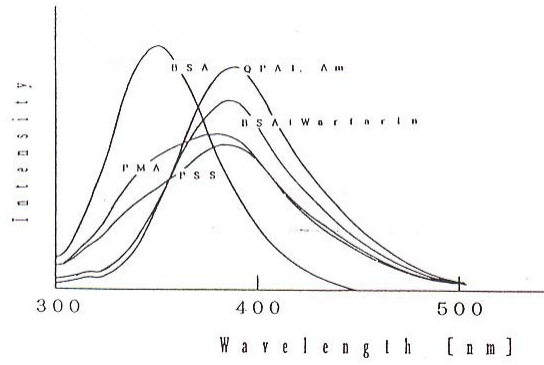
Şekil 2.17 Su ortamında ve polielektrolit varlığında HSA'nın triptofanın λ_{em} 'nin pH ile olan değişimi. (Δ) HSA, ($\blacktriangle$) HSA + QPA1.Am, ($\circ$) HSA + PMA, ($\square$) BSA + PSS, $[HSA] = 4 \times 10^{-2}$ (g/L). $[Polielektrolit] = 1 \times 10^{-4}$ (mol/L).

QPA1.Am-poli(aliltrimetilamonyumklorid), PQE-poli(2-akriloletiltrimetilamonyumklorid), PMA-poli(metakrilik asit), PNMA-poli(N-Metakrilat-d,l-alanin), PSS-poli(sodyumstirensülfat) gibi polikasyonlar eklendikten sonra BSA'nın izoelektrik noktasından ($pI=4,7$) daha büyük pH bölgelerinde λ_{em} 'da zayıf maviye kayma gözlenir. Polikasyonun yapısal formundaki farklılık λ_{em} üzerinde küçük bir etki ile gözlenir. Polikasyon elektrostatik kuvvet aracılığıyla BSA'nın anyonik bölgesiyle rasgele etkileşir ve BSA'nın Trp çevresinde küçük bir yapısal değişikliğe neden olur. Başka bir deyişle, polianyon BSA'nın net yükü negatif olduğu pH 9,0'dan daha küçük değerlerde λ_{em} 'da göze çaracak derecede maviye kaymaya neden olur.

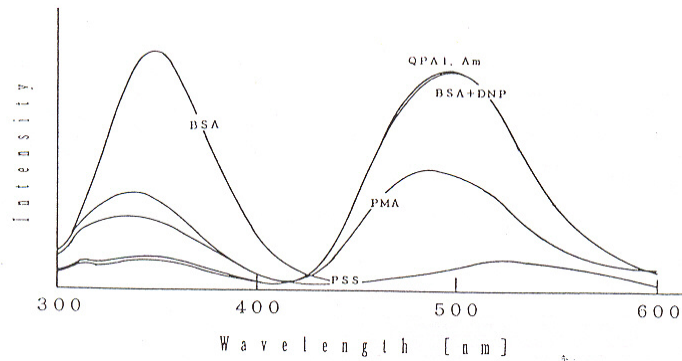
Albüminin ilaçlar için özel bağlanma bölgelerinin bulunduğu iyi bilinmektedir. Asidik bileşenler (anyonik yüzey aktif maddeler, yağ asitleri vs.) katyonik bileşenlerden daha kolay bir şekilde bu bölgelerine bağlanırlar (Teramoto ,1988). BSA'nın iki Trp'dan biri (Trp212) ilaç bağlanma bölgesi II' ye komşudur. Bu sonuçlar polianyonun Trp212'nin yönelimini değiştirerek bazik bölgede BSA'nın bölge II ile seçici olarak etkileştiğini desteklemektedir. Bununla beraber, λ_{em} pH'ın azalmasıyla daha kısa dalga boylarına doğru kaymaktadır. Bu durum, BSA'nın net yükü, polianyon ile PEC'nin oluşumunu kolaylaştırarak şekilde pozitif olduğunda diğer Trp(Trp134)'ün çevresinde meydana gelen yapısal değişimler nedeniyle gerçekleşir. BSA ile polielektrolit arasındaki etkileşim mekanizması Şekil 2.21'de bu durum sistematik olarak özetlenmiştir.



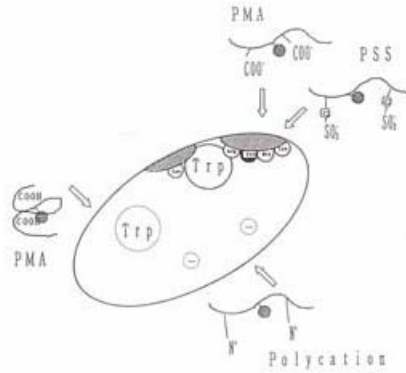
Şekil 2.18 Antransen ile bağlanmış polielektrolit ve BSA'nın flüoresans spektrumu. $[\text{BSA}] = 4 \times 10^{-2} \text{ (g/L)}$. $[\text{Polielektrolit}] = 2 \times 10^{-4} \text{ (mol/L)}$



Şekil 2.19 pH 7,4'de polielektrolit ile birlikte varfarin bağlanmış BSA'nın flüoresans spektrumu. $[\text{BSA}] = 4 \times 10^{-2} \text{ (g/L)}$. $[\text{Varfarin}] = 3 \times 10^{-5} \text{ (mol/L)}$. $[\text{Polielektrolit}] = 1 \times 10^{-4} \text{ (mol/L)}$.



Şekil 2.20 pH 7,4'de polielektrolit ile birlikte densil-L-prolin (DNP) BSA'nın flüoresans spektrumu. $[\text{BSA}] = 4 \times 10^{-2} \text{ (g/L)}$. $[\text{DNP}] = 3 \times 10^{-5} \text{ (mol/L)}$. $[\text{Polielektrolit}] = 1 \times 10^{-4} \text{ (mol/L)}$.



Şekil 2.21 Polielektrolit ile albüminin kompleksleşmesinin şematik gösterimi.

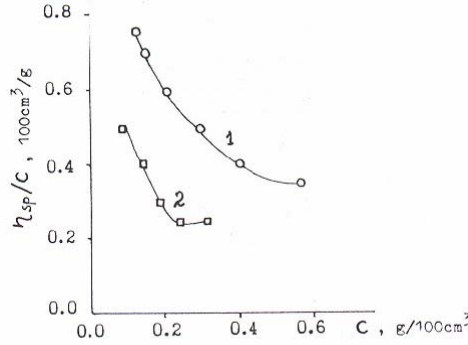
Farklı bileşen oranlarında homojen sistem içinde kuaternize olmuş poli-4-vinilpridin tuzlarıyla protein karışımının BSA ve HSA için triptofan flüoresans çalışmaları polikompleksin oluşumunun karakterizasyonun bazı önemli özelliklerinin aydınlatılmasına olanak sağlar (Güney vd., 1997). Şekil 2.22’de pH 7,0’da BSA çözeltisine PE çözeltisinin eklenmesi ile birlikte BSA’nın flüoresans şiddetinin ($I_{\max}$) sönümlendiği gösterilmektedir. Bileşen oranlarına bağımlı olarak sönümlenme bir oranda en düşük değerinden geçer ve sonra sabit değerlere yükselir.

Flüoresans şiddeti artan PE konsantrasyonuyla sönümlenmesine rağmen, sadece saf proteinler için emisyonun tepe noktasındaki dalga boylarında ($\lambda_{\max}$) değişme olmaz. Bu sonuçlar, emisyon şiddetindeki sönümlenmenin polikasyon zincirine bağlanan protein moleküllerinden kaynaklandığını göstermesine rağmen protein içeriğindeki Trp çevresinde yapısal değişiklikler olmadığına işaret eder. $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PE}} = 10$ koşulunda BSA ve HSA molekülleri polimere en yüksek sayıda bağlanır ve bu durum sedimentasyon analizi ile elde edilen sonuçlarla uyumluluk gösteren (Kabanov vd., 1977) flüoresans şiddetinde maksimum azalma ile açıklanır.

2.4 Protein-Polielektrolit Komplekslerinin Yapıları.

Kabanov (1977) tarafından yapılan hidrodinamik (viskozite ve sedimentasyon) ve ışık saçılması deneylerinde, pH 7,0’da kuaternize olmuş poli-4-vinilpridin (PVEP) çözeltisine BSA’nın eklenmesiyle birlikte çözeltinin indirgenmiş viskozitesinde (η_{sp}/C) önemli bir azalmanın olduğu belirtilmiştir. Viskozitedeki bu azalma polikasyon-BSA çözünür

komplekslerinin oluşumu ile açıklanabilir. $N = n_{BSA}/n_{PE}$ 'de (Karakteristik oran) PVEP-BSA polikompleksinin indirgenmiş viskozitesindeki değişim ve onların konsantrasyonlarındaki N Şekil 2.22'de verilmiştir. Çözelti konsantrasyonundaki azalma polielektrolit şişme yeteneği gösteren polikompleks parçacıklarının indirgenmiş viskozitesinin azalmasıyla izlenir.

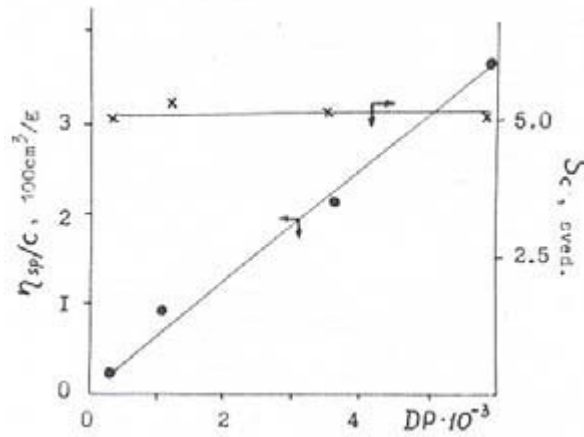


Şekil 2.22 PEC konsantrasyonuna karşı Q-PVP-BSA'nın indirgenmiş viskozitesinin değişimi. $\xi = 3.3 \times 10^2$ (1), $\xi = 2.5 \times 10^2$ (2), $DPQ-PVP = 10^3$

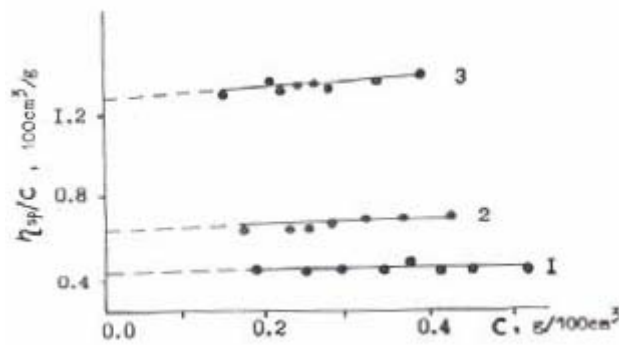
HSA-dekstran sülfat karışımları ile yapılan birçok çalışmada (Nguyen, 1986) η_{sp}/C 'in polimer konsantrasyonu ile azaldığı gösterilmiştir (Şekil 2.22). Saf suda polielektrolitlerin davranışlarının tersine özellikle yük nötralleşmesinin bir yansıması olarak görülen parçacıklar arasındaki iyonik etkileşim, kompleksleşme aracılığıyla azalmaktadır. Benzer davranış poli(akrilik asit) varlığında BSA için tarif edilmiştir. Farklı polimerizasyon derecelerine (DP) sahip PVEP için n_{BSA}/n_{PE} oranında PVEP-BSA komplekslerinin sedimentasyon katsayılarının değişimi Şekil 2.22'de verilmiştir.

$n_{BSA}/n_{PE} > N$ koşulunda sistem içerisinde serbest polikasyonlar gözlemlendiğinde sedimentasyon katsayısındaki değişim görece olarak küçük olur. Yukarıda ifade edilen bilgilerden, PVEP sabit tutularak eklenen protein miktarı arttığında, bu bölgede komplekslerin yapılandığı görülür. Verilen her PE için polikasyon, çevre uzunluğu ile hesaplanan bu komplekslerin bileşimi sabittir. Bu bölgedeki oranlarda flüoresans şiddeti (I_{max}) görece olarak küçüktür. Bununla beraber, $N=n_{BSA}/n_{PE}$ değerlerinde, polikasyon ile BSA etkileşim ürünlerinin sedimentasyon katsayılarında keskin artışlar gözlenmesine rağmen serbest BSA pikleri sedimentagramlarda gözlenmez (Şekil 2.3 eğri.6). Bu olay, serbest PVEP'nin tükenmesine rağmen proteinlerin bağlanmaya devam ettiğini gösterir. Başka bir deyişle, yukarıda tarif edilen kompleksler BSA eklendiğinde, absorpsiyonları için eklenecek başka kaynaklar bulunmaktadır. PVEP-BSA komplekslerinin yapılarının daha ileri tanımları $n_{BSA}/n_{PE} = N_i$ olduğunda farklı uzunluktaki polikasyonlar ile oluşan bu komplekslerin sedimentasyon

katsayıları ve indirgenmiş viskozitelerinin karşılaştırılmasından elde edilir (Şekil 2.23). Çözeltilerin viskozitesi polikasyonun polimerleşme derecesinin artmasıyla birlikte artmakta, sedimentasyon katsayısı ise değişmeden kalmaktadır. Bu iki fiziko-kimyasal parametre arasındaki bağlantı sert çubuk modeli ile açıklanır. Bunun gibi polikompleks parçacıkların şeklinin hesaplanması için N bileşimi ile belirtilen kompleks çözeltilerinin indirgenmiş viskozite araştırmaları tamamlanmıştır. Polielektrolitlerin şişme etkisini engellemek için viskozite ölçümleri izoiyonik seyreltme sisteminde gerçekleştirilmiştir. Çözelti konsantrasyonunda karakteristik bileşimle PVEP-BSA polikomplekslerinin çözeltisi için indirgenmiş viskozite değişimi Şekil 2.24’de gösterilmiştir.



Şekil 2.23 Polikasyonun polimerleşme derecesinde $n_{BSA}/n_{Q-PVP} = N_i$ olduğunda Q-PVP-BSA polikompleksleri için sedimentasyon katsayısı ve indirgenmiş viskozitelerinin değişimi (η_{sp}/C).



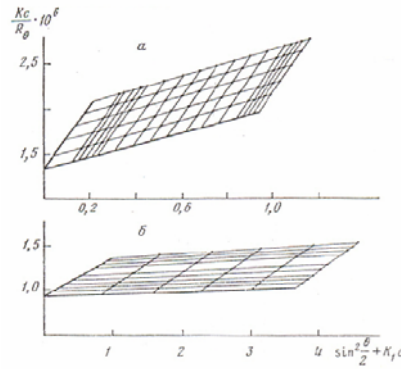
Şekil 2.24 Konsantrasyona karşı Q-PVP-BSA kompleks çözeltisinin indirgenmiş viskozitesindeki değişim. İzotonik seyreltme. $\xi = 3.3 \times 10^2$ (1), DPQ-PVP= 10^3 (1); 2.3×10^3 (2); 2.6×10^3 (3).

Bu değişimler polikompleks parçacıklarının polielektrolit şişmesinin bulunmadığına denk gelen çözelti konsantrasyonların tüm oranlarında doğru orantılıdır.

Yukarıda ifade edilenlere göre sadece çözünür kompleks parçaları, bir dereceye kadar karakteristik bileşen oranını aştığında veya protein bileşeni eşit olduğunda BSA-PVEP homojen karışımlarında bulunurlar. Bu ışık saçılması ile her çözeltinin çalışılmasına olanak sağlar. Makromoleküllerin moleküler parametreleri Zimm diyagramları kullanılarak statik ışık saçılmasından elde edilir.

$$\frac{K_c}{R_\theta} = \frac{K' \phi^2 c}{R_\theta} = \frac{1}{M} \left\{ 1 + \left(\frac{16\pi^2 n_0}{3\lambda_0^2} \right) R_g^2 \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \right\} + 2A_2 c \quad (2.1)$$

Denklemden c polimer kütle konsantrasyonu, K sistemin optik parametrelerini içeren sabit; M_w ve R_g ağırlık ortalamalı moleküler ağırlığı ve sırasıyla molekülün dönme küresel yarıçapı ve A_2 ikinci viral katsayısıdır. $n_{BSA}/n_{PE} = N_i$ olduğunda durumda çözünür PVEP-BSA kompleks parçacıklarının moleküler karakterleri çift dış değerbiçim metodu kullanılarak ışık saçılması metoduyla hesaplanmıştır (Kabanov vd., 1977, 1980; Izumrudov vd., 1981). Konsantrasyonların çalışılan tüm oranlarında araştırılan tüm polikasyonlar için Konsantrasyon üzerinde K_c/R_0 'a bağıllığı lineerdir ve seyreltmede polikomplekslerin çözülmesinin kaybolduğuna dikkat çekilir. Başka bir deyişle, çalışılmış çözünen PVEP-BSA polikompleksleri polikompleks bileşenlerinin ve çözelti konsantrasyonlarının geniş bir aralığının üzerinde kararlıdır.



Şekil 2.25 Farklı n_{BSA}/n_{PE} oranlarında BSA-PVEP karışımları için Zimm-diyagramları: 7(a); 11 (b); $DP=2,5 \cdot 10^3$; $I=0,01$ mol/l; K_1 (çözeltinin optik sabiti) $=10^2$; pH 7,0.

Farklı molekül kütlesine sahip polikasyonlarla oluşturulan farklı bileşenler PVEP-BSA kompleks çözeltilerinin sonuçları Tablo.2.2'de listelenmiştir.

Tablo 2-2 pH=7,0 ve 0,01N NaBr'de farklı yapıdaki çözünür Q-PVP-BSA kompleksler parçacıklarının moleküler karakteristikleri

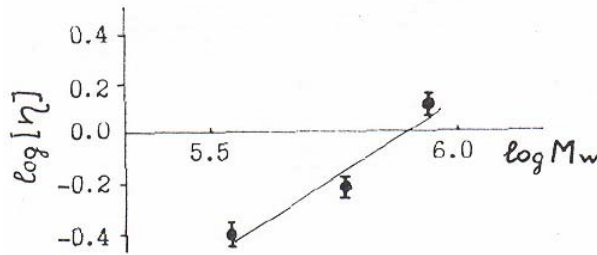
$M_{w(Q-PVP)}$	Karışım Kompozisyonu $\xi \cdot 10^{-2}$	n_{BSA}/n_{Q-PVP}	dn/dc (dl/g)	$M_w \cdot 10^{-5}$	$A_2 \cdot 10^{-4}$	Polikompleks Kompozisyonu n_{BSA}/n_{Q-PVP}
$1,2 \cdot 10^5$	3,3	3:1	0,188	3,6	3,25	3,4:1
	2,5	4:1	0,179	4,2	-	4,3:1
	2,0	5:1	0,181	5,1	3,33	5,5:1
	1,8	6:1	0,200	5,7	2,08	6,4:1
$2,5 \cdot 10^5$	3,3	7:1	0,188	7,6	2,16	7,3:1
	2,5	9:1	0,179	8,6	0,94	8,7:1
	2,0	11:1	0,181	10,5	0,72	10,3:1
	1,7	12:1	0,200	11,2	0,5	12,4:1
$3,2 \cdot 10^5$	3,3	8:1	0,188	8,9	0,82	8,1:1
	2,5	11:1	0,179	11,3	0,23	11,4:1
	2,0	14:1	0,181	13,2	0,17	14,3:1
	1,8	16:1	0,200	14,1	0,01	15,6:1

Reaksiyon karışımında protein miktarının artmasıyla birlikte kompleksin molekül ağırlığındaki artış, çalışılan tüm PVEP-BSA sistemlerinde gözükmemektedir. Kompleks parçacıklarının ve bileşenlerin molekül kütleleri biliniyorsa, kompleks bileşenlerinin kompozisyonu bulunabilir. Bu hesaplamalar, tablo 2-2'de gösterilmiştir. Karışım içerisinde karakteristik bileşen değerini aşan protein miktarında, çözünür polielektrolit kompleks bileşeni reaksiyon karışımındakine uymaktadır. Bu sonuç yüksek hızlı sedimentasyon bilgileri ile uyumludur ve bir PVEP makromolekülü, çalışılan konsantrasyon aralığının ve bileşen oranlarının üzerinde, polikompleks parçalarına dahil olur. Polikasyonun DP'sindeki artış polikompleksteki BSA globüllerinin sayısının artmasıyla sonuçlanır ve protein moleküllerinin sayısı polikasyon uzunluğu ile orantılı bir şekilde arttığından $\xi = DP/N_i$ (N_i bir PVEP zincir tarafından absorblanan BSA molekülü sayısı) oranı polikompleks bileşenini açıklamak için uygundur. Bu oran polikasyonun molekül kütlesine bağlı değildir. BSA ve farklı uzunluktaki polikasyon zinciriyle oluşturulan karakteristik kompozisyonunda, polikompleks bileşeni $\xi = 3,3 \times 10^2$ değerine denk gelmektedir. Polikompleks içerisindeki BSA bileşenindeki artış ξ değerlerindeki artışla sonuçlanır.

Tablo 2-2'de ifade edildiği üzere; karakteristik bileşende PVEP-BSA polikompleks parçacıkları minimum molekül kütlesine ve en yüksek çözücü ilgisine sahiptirler.

Karakteristik bileşeni geçen miktarlarda, reaksiyon karışımına eklenen protein, polikompleks parçalarının molekül kütlelerini arttırırken, çözeltilerin ikinci viral katsayı değerinde azalmaya neden olur. Sistemin bu davranışı, N_i 'den daha büyük miktarlarda, çözeltiye eklenen proteinlerin N_i değerindeki polikompleks parçacıkları ile reaksiyonuna neden olur ve serbest protein globülleri bileşenlerle etkileşir. pH=7,0'da BSA globülleri negatif yüklü olduğundan (pI=4,9), polikomplekste yeralan ve protein molekülleri ile tuz bağları oluşturmeyen polikatyondaki inorganik grupların, $\xi=3.3 \times 10^2$ değerinde polikomplekse bağlanan BSA'lardan sorumluluğu olduğunu önerilir. Çözünen polikomplekslerde yüklü polikasyon sıralarının varlığı viskozite bilgilerinden elde edilmektedir.

PVEP-BSA kompleks yapılarının ileri tanımları bu komplekslerin molekül ağırlıkları ve indirgenmiş viskozitelerinin karşılaştırılmalı bilgilerinden elde edilir. Şekil 2.26'da polikomplekslerin molekül ağırlıklarının logaritması ile indirgenmiş viskozitelerinin logaritmik bağımlılıkların grafikleri verilmiştir.

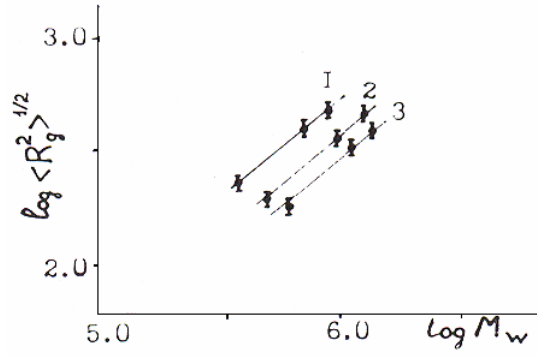


Şekil 2.26 Q-PVP-BSA SPEC için $\log M_w$ - $\log [\eta]$ değişimi. $\xi = 3.3 \times 10^2$.

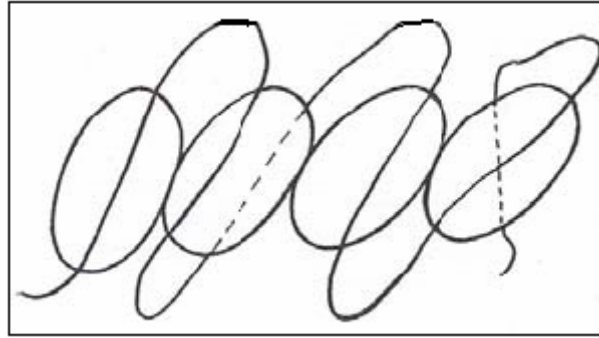
Bu değişim Mark-Kuhn-Houwink denklemine uymaktadır:

$$[\eta] = KM^a \text{ ve parametreleri } K=0,11.10^{-5} \text{ ve } a=1.4 \pm a^3 \quad (2.2)$$

Son değerler daha çok katı asimetrik çubuk şekline uyar ve çözünür polikompleks parçacıkları için katı çubuk modeli önerilir. İçeriği $\xi=3.3 \times 10^2$ değerinde polikompleks parçalarının şekli molekül kütlesi M_w 'ye bağlı olan dönme küresel yarıçapı ışık saçılmasıyla bulunur. Şekil 2.27'de çalışılan tüm bileşenlerde bu bağımlılığın lineer olduğu gözükmemektedir.



Şekil 2.27 Q-PVP-BSA kompleks parçacıkları için $\log M_w$ 'nin $\log \langle R_g^2 \rangle^{1/2}$ bağımlılığı: $\xi = 3.3 \times 10^2$ (1); $\xi = 2.0 \times 10^2$ (2); $\xi = 1.8 \times 10^2$ (3).



Şekil 2.28 Karakteristik bileşende Q-PVP-BSA çözünür kompleksinin önerilen yapısı.

Benzer bileşendeki polikompleksler bir polimer türdeşi serinin temsili olarak göz önüne alınır. Polikompleks parçacıklarının dönme küresel yarıçapının molekül kütlesine bağımlılığı $[\langle R_g^2 \rangle]^{1/2} = \text{sabit} \cdot M^\alpha$ denklemiyle tanımlanır ve $\alpha = 1 + 0.15$ asimetrik çubuğa denk gelir.

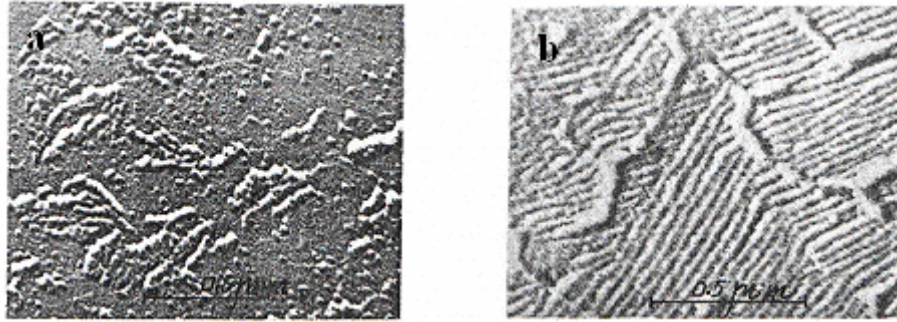
2.4.1 Karakteristik bileşende (N_i) polikompleks parçacıklarının model yapısı:

Yukarıda ifade edilen sonuçlardan karakteristik bileşende, çözünür polielektrolit kompleks parçacıkları için katı çubuk model önerilir. Bu model Şekil 2.28'de gösterilmiştir. Diğer oranlarda proteinlerin çeşitli yollarla asimetrik yığın oluşturduğu kabul edilir. Daha sonra ise yaklaşık olarak silindirik olabileceği düşünülür.

Polikatyon zinciri düz olarak eklenen protein globüllerini sarar ve uzun polimer zincirleri uzun silindirik şeklini oluşturur.

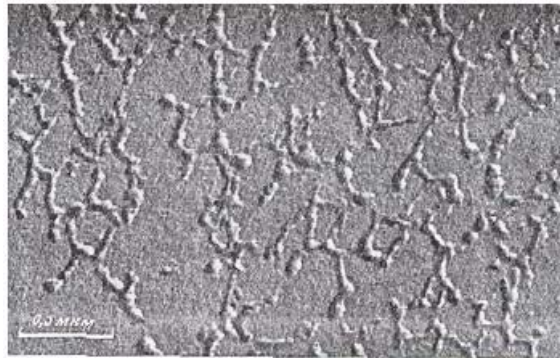
Kompleks yapısının yukarıda ifade edilen tanımlamasında elektron mikroskobu

görüntülerinin doğruladığı fiziko-kimyasal ölçüm bilgileriyle uyuşan analiz sonuçlarından elde edilmesi çarpıcıdır. Şekil 2.30'da $n_{BSA}/n_{PE} = N_i$ koşulunda BSA-PVEP ve BGG-PVEP kompleks sistemlerinden elde edilen mikroskop sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 2.29 $n_{BSA}/n_{Q-PVP} = N_i$ $DP=10^3$ koşulunda Q-PVP-BSA polikomplekslerinin mikroskop görüntüleri. a) substrat ve filtre kâğıdı ile çözeltiden katının uzaklaştırılmasıyla ızgara üzerindeki kompleks çözeltisinden (0,01 g/dl) bir damla koyulmasıyla hazırlanmış örnek. b) diyaliz çözeltisinden (0,01 g/dl) çözücünün buharlaştırılmasıyla hazırlanan örnek.

Globüler parçacıklarını içeren uzamış lineer oluşum açıkça mikroskop görüntülerinden izlenmektedir. Globül içeren her çubuğun kalınlığı yaklaşık 100 Å^0 civarındadır. Komplekslerin çözünürlüğünün, bağlanmış polimer zincirinin ilmiklerindeki hidrofobik katkıdan geldiği düşünülmektedir.



Şekil 2.30 $n_{BGG}/n_{PE}=2$, $DP=0,95 \cdot 10^3$ koşulunda PVEP-BSA polikomplekslerinin elektron mikroskobu görüntüleri.

2.4.2 Karakteristik bileşen oranlarının üzerinde polikompleks parçacıklarının yapı modeli($N > N_i$).

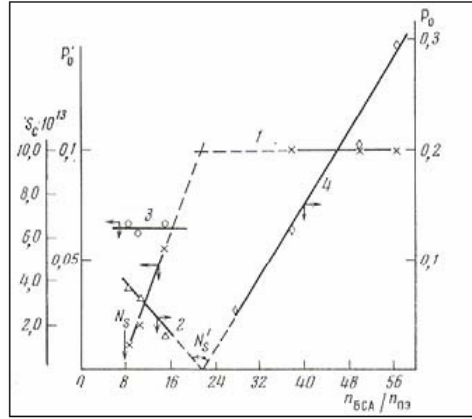
Şekil 2.31’de görüldüğü üzere, karışımdaki protein moleküllerinin sayısındaki artış (polikasyonun ağırlık konsantrasyonu sabit kalmaktadır), PVEP-BSA’nın indirgenmiş viskozite (η_{sp}/C) değerlerinde azalmaya öncülük eder. Bileşen oranı $N=N_i$ olduğunda, BSA’nın ardışık eklentileri indirgenmiş viskozitede değerlerinde azalmalarla sonuçlanır ve çok düşük değerlerler (0,03-0,05) ile karakterize edilir. Açıklanan durumlar BSA ile etkileşen PVEP’nin çalışılmış tüm fraksiyonları için tipiktir. $n_{BSA}/n_{PE}=N_s$ olduğu durumda farklı uzunluktaki polikasyonlar ile oluşturulan bu polikompleksler için sedimentasyon katsayısı ve indirgenmiş viskozitenin karşılaştırmasından, çözeltilerin viskozitesinde polikasyonların artan polimerizasyon derecelerine karşın değişmeden kaldığı buna karşı polikomplekslerin sedimentasyon katsayıları arttığı görülmektedir. Karakteristik bileşenden daha büyük değerlerde, karışımda protein içeren polikomplekslerin ışık saçılması bilgileri izlenerek ($N > N_i$) kompleksin molekül kütleindeki (M_w) artışın, çalışılan tüm PVEP-BSA sistemleri için karakteristik olduğu bulunmuştur (Tablo 2-2).

Komplekslerin molekül ağırlıkları ve bileşen oranlarından elde edilen bilgilerden yalnızca bir polikasyon zincirinin BSA-PVEP kompleks parçacıkları içinde yer aldığı söylenebilir. Bu durumda, çözünür polikompleks parçacıklarının sık bir yapı özelliği gösterdiği söylenebilir. $N > N_i$ koşulunda, PVEP’nin bir zincirinde ile toparlanan BSA’nın kümeleri ile oluşan suda çözünür PVEP-BSA komplekslerinin yapısını göz önüne almamızı sağlar.

PVEP-BSA sistemlerindeki faz geçişi polikasyonun polimerleşme derecesine bağlı olarak bazı kritik protein ($n_{BSA}/n_{PE} \geq N_s$) konsantrasyonlarında gözükür (Şekil 2.31). Protein (BSA, OA, BGG) çözeltileriyle PVEP çözeltisinin ve tersi olarak protein çözeltilerinin (BSA,HSA. BGG) polikasyon çözeltileri ile farklı protein karışımlarının (BSA+BGG, BSA+ β_1 -G; β_1 -G+BGG, BSA+ β_1 -G+BGG bütün serum ve kan proteinleri) türbidimetrik titrasyonlarından reaksiyon karışımlarının bileşimi üç bölgeye ayrılır (Şekil 2.30).

I. bölgede (polimer çözeltilerinin protein ile titre edildiği sistemler için) suda çözünür polielektrolit komplekslerin oluşumu nedeniyle çözeltiler homojen kalırlar. $n_{BSA}/n_{PE} > N$ oranında protein moleküllerinin eklenmesi, II. bölgede faz bölünmesine neden olur. Türbidimetrinin tepe değerleri, çalışılan polielektrolit-protein sistemlerinin çoğunda açıklandığı üzere, polikasyon ve proteinlerin zıt yüklü gruplarının denk oranlarında gözlenir. Yukarıdaki bu denk oranlarda protein eklentisi çözeltinin bulanıklığında azalmaya neden olur

ve bazı kritik oranlarda (III. Bölge) sistem tekrar homojen olur. PVEP-BSA karışımlarının üst fazlarının çözünür fraksiyonları çöküntüler uzaklaştırıldıktan sonra sedimentasyon analizi ile çalışılmıştır. Şekil 2.31’de çöküntünün miktarı (1), konsantrasyon (piklerin alanı) (2), çözünür komplekslerin sedimentasyon katsayıları (3) ve bileşen oranlarında üst fazlarının serbest protein molekülünün konsantrasyonu (4) ile gösterilmiştir.



Şekil 2.31 Çöküntünün miktarı (1), konsantrasyon (piklerin alanı) (2), çözünür komplekslerin sedimentasyon katsayıları (3) ve bileşen oranlarında üst fazlarının serbest protein molekülünün konsantrasyonu (4) .C_{PE}=0,15 g/dl; pH 7,0.

Bu değişimlerin lineeritesinden çözünür komplekslerin konsantrasyonu azalırken ve onların sedimentagram pikleri II.bölgede N_i değerinde gözükürken karışımdaki protein konsantrasyonun artması çöküntü miktarında artışına öncülük eder ve sonra limit değerlerine ulaşır. Buna karşın, piklerin sedimentasyon katsayıları ve çözünür komplekslerin bileşimleri hemen hemen değişmeden kalır.

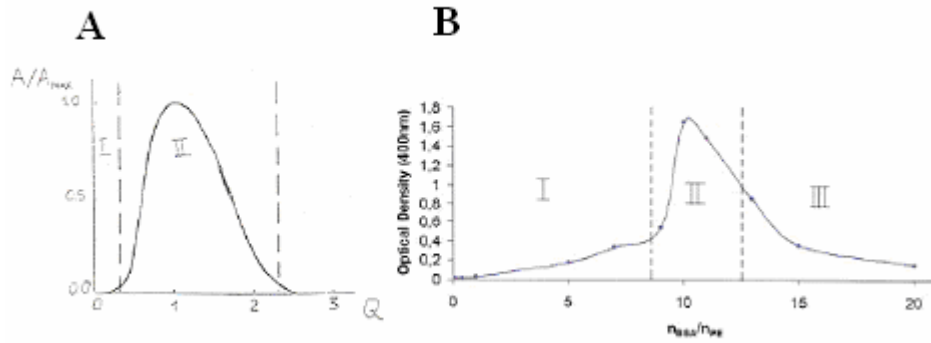
Çöküntünün tepe değerlerine denk gelen oranlarda, reaksiyon bileşenleri yoktur ve ürünler (Protein, polikasyon veya suda çözünür polikompleksler) çözelti içerisinde. Bu oranların yukarısında proteinin eklenmesi çözeltinin bulanıklığında azalmaya neden olur ve III. bölgede oranların bazı kritik değerlerinde sistem tekrar homojen olur.

BSA'nın karboksilik asit gruplarının toplam sayısı 125 olmasına rağmen (50 Asp+75 Glu), polikasyon ile tuz bağları oluşturabilen doğal BSA molekülünün 55 negatif yüklü karboksil grubu olduğu ifade edilmiştir (Neurath ve Bailey, 1953). BSA yüzeyine yerleşen karboksil grupların sadece bir bölümü reaksiyona girebilir. Polikompleksin bileşimi (Q) protein molekülleri üzerindeki negatif yüklerin toplam miktarının oranı olarak ifade edilir (Zaitsev vd., 1992). (a) polikasyon (b) karışım içerisindeki pozitif yüklerin toplam sayısı olmak üzere Q'nun değerleri:

$$Q = a^-/b^+ = 55 \times (C_{BSA}/M_{BSA}) \times (M_{PEVP}/C_{PEVP}) \quad (2.3)$$

olarak ifade edilir.

Şekil 2.32’de karışım bileşenlerinde Q, PVEP ve BSA’nın karışımlarının görelî optik yoğunluğunun A/A_{max} değişimi gösterilmektedir. $Q > 1$ değerinde üst faz çözeltilerinin sedimentagramlarında iki pik gözlenir. Hızla çöken parçacıklar yüksek sedimentasyon katsayısı 25S ile (“hızlı” pik) karakterize edilirken, yavaş çöken parçacıklar (“yavaş” pik) sedimentasyon katsayısı 4,3 S serbest BSA’nın biriyle kesişmektedir. Bunun anlamı, $2.5 > Q > 1$ bölgesinde serbest proteinler yeni oluşan suda çözünür PVEP-BSA kompleks parçacıkları ve çözünmeyen PVEP-BSA kompleks parçacıkları ile aynı ayna bulunurlar. $Q=2,5$ ’e kadar BSA’nın eklenmesi her iki pik alanında da koşut zamanlı artar ve hızlı pikin alanı yavaş pikin alanından daha büyük olur. Yavaş pikin alanının büyüme oranı artarken, çöküntünün tamamlanmış çözeltisinden ($Q > 2,5$) sonra BSA’nın ardışık eklentileri hızlı pikin alanında dikkate değer değişiklik yaratmaz. $Q > 1$ koşulunda her iki pikin sedimentasyon katsayıları (hem heterojen hem de homojen bölgeler için) aynı kalmaktadır (Sırasıyla 4,3S, 4,5S ve 25-26S). Türbidimetrik titrasyonun karakteri çalışılan bölgelerde $P_{PEVP} = 200-1500$ PVEP’nin çeşitli polimerleşme derecelerinde hemen hemen değişmez.



Şekil 2.32 (A) BSA ve PVEP karışımının görelî optik yoğunluğunun A/A_{max} Q ile değişimi. $[PEVP] = 1$ g/l, $DP=1,3 \cdot 10^3$. (B) n_{BSA}/n_{PEP} oranlarında BSA-PVEP karışımlarının optik yoğunluğu ($OD_{400\text{ nm}}$) değişimi. $DP=10^3$; pH 7,0.

BSA-PVEP çözünür komplekslerinin ve serbest BSA’nın sedimentasyon piklerinin alanlarından kompleks bileşenindeki BSA’nın (C_{BSA}) miktarı ve protein içerisindeki negatif yüklerin toplam miktarının oranı olarak ifade edilen komplekslerin bileşiminde ϕ (a) polikasyonlar üzerindeki (b) kompleksteki pozitif yüklerin toplam sayısı olmaz üzere:

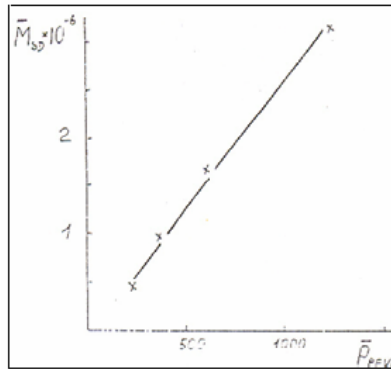
$$\phi = a^-/b^+ = 55 \times (C_{BSA}/M_{BSA}) \times (M_{PEVP}/C_{PEVP}) \text{’dir.} \quad (2.4)$$

Komplekslerin bileşimi $Q > 1$ durumunda, çalışılan tüm bölgelerde hem P_{PVEP} hem de karışım bileşenlerinden etkilenmez. Bu karakteristik bileşim değerleri $\phi_c 2,0 \pm 0,3$ eşittir.

Polikasyonun farklı polimerleşme dereceleri ile suda çözünür BSA-PVEP komplekslerinin ortalama moleküler kütlesi M_{sd} değişimi şekil 2.33’de verilmiştir. Komplekslerin ortalama molekül kütlesi (M_{sd}) değerleri, Svedberg formülü kullanılarak sedimentasyon ve QELS metodlarından elde edilen bilgilerden hesaplanır:

$$M_{sd} = \frac{RT}{(1 - \nu\rho)} x(S / D) \quad (2.5)$$

R evrensel gaz sabiti, T sıcaklık ($293 \text{ }^0\text{K}$), ρ çözücü yoğunluğu, S ve D sırasıyla kompleks parçacıklarının sedimentasyon ve difüzyon katsayılarıdır. BSA-PVEP ve BSA moleküllerinin spesifik kısmi hacimleri neredeyse birbirine eşittir, $\nu=0,75 \pm 0,03$. Kompleks bileşenleri (ϕ_{sd}) değişmeden kalıyorken, değişimin lineer yapısından zincir uzunluğundaki artışın kompleks içerisindeki protein sayısında artışa neden olduğu çıkarılır. Şekil 2.33’de grafik eğiminin tanjantından hesaplanan ϕ_{sd} ’nin ortalama değerleri $1,9 \pm 0,3$ ’dür ve bu değer sedimentasyon pik alanlarından hesaplanan ϕ değerlerle uyum içerisinde. M_{sd} ’nin bilinen değerlerinden hesaplanan kompleksteki polikasyon moleküllerinin (N_{PVEP}) ve BSA moleküllerinin (N_{BSA}) sayısı ve bileşenlerin molekül kütleleri Tablo2-3’de verilmiştir.



Şekil 2.33 PVEP’nin farklı polimerleşme derecesine bağlı olarak BSA-PVEP kompleksinin molekül kütleindeki (M_{sd}) değişim.

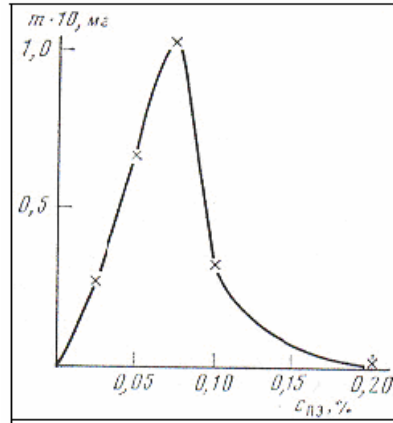
Tablo 2-3 BSA-PEVP komplekslerinin molekül karakterizasyonu.

P_{PEVP}	$M_{sd} \times 10^{-3}, Da$	N_{PEVP}	N_{BSA}
250	700	1	10
400	1100	1	15
650	1600	1	20
1300	3000	1	40

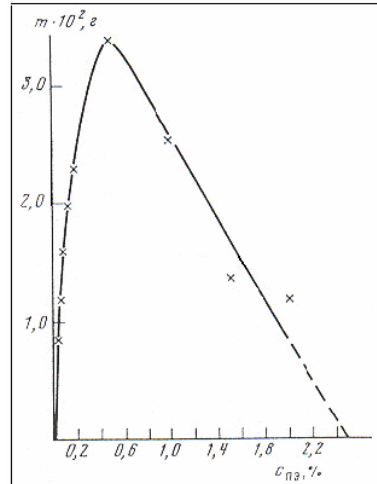
Bu bilgilerden çözünen BSA-PVEP kompleks parçacıkları içerisinde sadece bir polikasyon zinciri olduğu sonucu çıkarılır.

Komplekslerin reaksiyon karşımı bileşenleri, farklı protein içeren polikasyon çözeltileri içerisinde, üç bölgeye ayrılabilir. Şekil 2.34 PVEP çözeltileriyle BSA+BGG karışım çözeltilerinin türbidimetrik titrasyon eğrileri gösterilmiştir. Titrasyon eğrileri sabit konsantrasyonda BSA+BGG karışım çözeltisine eklenen PE konsantrasyonunun çöküntü miktarına (m) bağlı olduğunu gösterir. Bu bağımlılık protein karışımında ($C_{protein} = 0.5g/dl$ BSA+0.5g/dl BGG; $C_{PE} = 0.025 g/dl$ PVEP $C_{prot.}/C_{PE} = 40$) çok düşük polikasyon konsantrasyonu ile başladığında çözünmeyen üçlü polikompleks oluşumunu gösteren faz bölünmesini oluşturur.

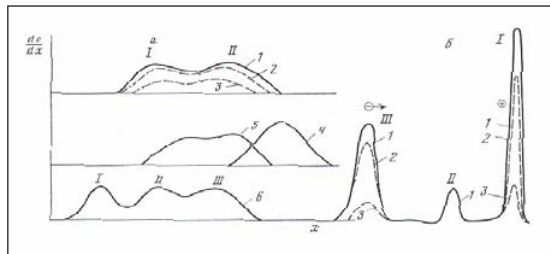
Polikasyon konsantrasyonundaki fazla artış ile birlikte çöküntü miktarı artar ve bir süre sonra limit değere ulaşır. Bu bölgede karışımların sedimentasyon ve elektroforatik bilgilerden gözlemlendiği üzere, çöküntünün uzaklaştırılmasından sonra, serbest protein fraksiyonları (BSA, sedimentasyon katsayısı 4,5S ve elektroforatik hareketlilik $u = 6,0 smv.sec$; BGG, 7,2 S ve $u = 1 smv.sec$) BSA ve BGG'nin her ikisini de içeren çözünür ve çözünmez polikompleksler ile aynı zamanda yer alır. Karışımındaki maksimum miktardaki çökme durumuna eşit bileşen oranlarında, tüm bileşenler çözünmez polikompleks parçacıkların bileşimini kapsar ve matris çözeltisinde polimerik bileşimler bulunmaz. $C_{protein}/C_{PE} = 13$ 'de üst faz çözeltisinin sedimentagramlarında çözünür polikompleks parçacıklarına denk gelen sadece bir pik (sedimentasyon katsayısı 8S) gözlenir (eğri-4). Bu pikin üçlü PVEP-BSA-BGG komplekslerine karşılık geldiği varsayılır. Bunun anlamı $C_{protein}/C_{PE} = 13$ 'de üçlü suda çözünür kompleksler çözünmeyen üçlü komplekslerle aynı zamanda yer alır. Sistemde polikasyon moleküllerinin azalması çeşitli kompozisyonların çözünür kompleks oluşumuyla sonuçlanır. BSA-PVEP ve BGG-PVEP polikompleksleri, serbest polikasyon molekülleriyle birlikte bulunurlar. Polikasyon zincirleri arasında protein moleküllerinin düzensiz dağılımı, bu oranlara denk olan her durumda gözlenmiştir (Kabanov vd., 1977).



Şekil 2.34 PVEP'nin konsantrasyonu ile (C_{PE}) çözünmez komplekslerin miktarının (m) değişimi

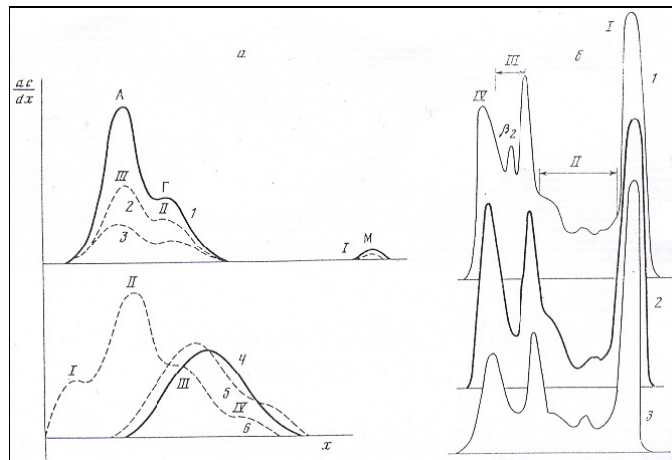


Şekil 2.35 Serum-PE karışımına eklenen PVEP (C_{PE}) konsantrasyonunun çözünmeyen komplekslerin miktarlarıyla değişimleri. Başlangıç serumu 1:3 oranında seyreltilmiştir. pH 7,5.

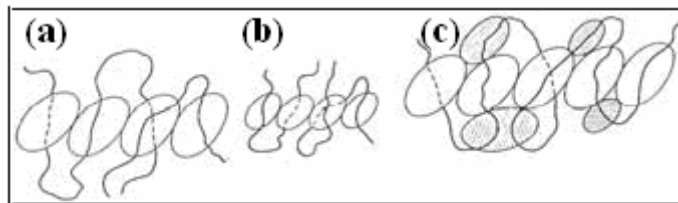


Şekil 2.36 Farklı polielektrolit konsantrasyonunda ve PE yokluğunda (1) varlığında (2) BSA+BGG karışımlarının sedimentagramları (a) elektrogramları (b). C_{PE} : 0,025 (2); 0,05 (3); 0,075 (4); 0,1 (5); 0,3 g/dl (6); $C_{protein}$ =0,5 g/dl BSA+0,5 g/dl BGG.

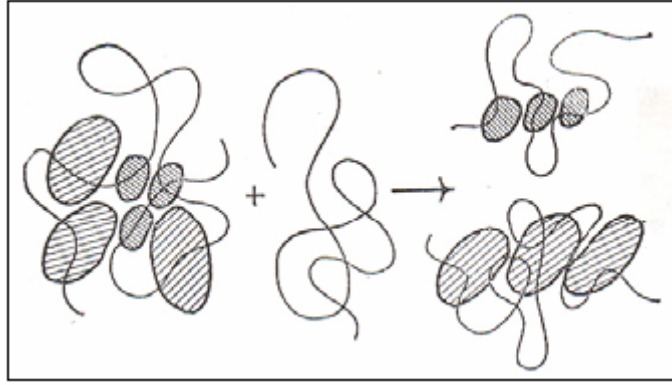
Yukarıda ifade edilen çözünmeyen polikomplekslerin çözünme karakteri ve bağlanan protein fraksiyonlarındaki seçicilik yapay olarak hazırlanan sistemlerde (BSA+BGG, β_1 -G + BGG, BSA + β_1 -G + BGG)(Şekil 2.36) serum ve kanda gözlenir (Kabanov vd., 1980). Şekil 2.37'den görüldüğü üzere çözünen polikasyon-proteinlerin kompleks sistemlerine benzer PVEP-kan ve PVEP-serum çözeltilerinin üst fazlarının sedimentagramlarında aynı pikler gözlenmektedir. Sistem içerisinde polikasyon konsantrasyonlarındaki azalma farklı bileşenlerde çözünür komplekslerin oluşmasıyla sonuçlanır. Çözünmeyen kompleks oluşumunda, β_1 -globin fraksiyonun serum-PVEP seçici absorpsiyonu gözlenir. Bu konular sistematik olarak Mustafaev (1975) ve Kabanov (1980) tarafından çalışılmıştır.



Şekil 2.37 Farklı PE konsantrasyonlarında serum+PE'nin matris çözeltilerinin ve tüm serumun sedimentagramları (a) ve elektroforegramları (b). PE(g/dl): 0.1 (2); 0.3 (3); 1.0 (4); 1,5 (5); 2.5 (6); pH 7.5; A-albümin, G-globin, M-makro globin, serum 1:3 oranında 0,025 N NaCl çözeltisi ile seyreltildi.



Şekil 2.38 Kompleks protein-PE'nin önerilen yapısı: (a) $n_{\text{BGG}}/n_{\text{PE}} \leq N_i^1$ koşulunda (BGG-PE), (b) $< N_i$ durumunda (BSA-PE), (α -globulin-PE), (β -globulin-PE), (c) $n_{\text{protein}}/n_{\text{PE}} > N_i$ koşulunda çoklu bileşen karışımlarıyla oluşan farklı protein fraksiyonlarıyla polikompleks parçacıklarının yapısı.



Şekil 2.39 Polikatyon zincirleri arasında farklı protein globüllerinin yapılanması.

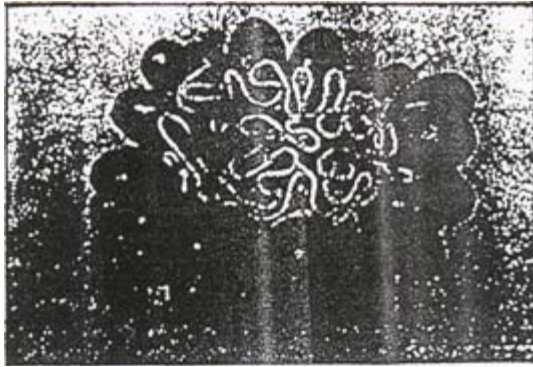
Negatif yüklü protein karboksil gruplarına göre pozitif yüklü PVEP yapıları üç kereden daha fazla katlandığında su içerisinde çözünürlük gözlenir (Kabanov vd., 1980). Aşırı yük taşıyan PVEP zincirlerinin parçaları kompleksin liyofilize olmuş parçaları olarak davranırlar.

Şekil 2.36'da I. bölgede pozitif yüklü suda çözünür protein-polielektrolit komplekslerin oluşumunu göstermektedir.

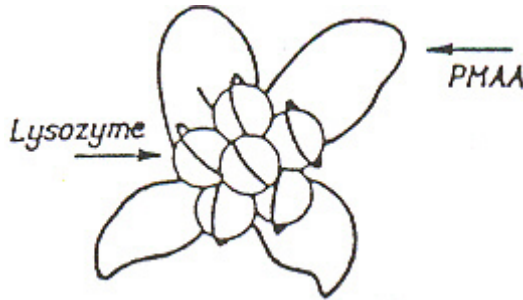
Çöküntünün maksimum miktarı, protein ve polikatyonun zıt yüklü gruplarının denk oranında gözlenir ($Q=1$, $n_{BSA}/n_{PE}=N$). N_s değerleri, polimerleşme dereceleri bilinen polikatyonlarla oluşan suda çözünmeyen ve çözünen polikomplekslerin bileşimine katılan protein globüllerinin maksimum sayısına denk gelmektedir. Tablo 2-3'den N_i 'de olduğu gibi N_s 'de de polikatyonun uzunluğu ve polimerleşme derecesi arttıkça lineer olarak arttığı görülmektedir. Bunun anlamı sabit uzunluktaki polikatyon zincirinin her globülün bağlanması için ve bağlanan protein moleküllerinin sayılarının bulunması için kullanıldığıdır. Karakteristik bileşendeki çözünen ve çözünmeyen polikompleks bileşimindeki her bir molekül sabittir ve $2((N_s-N_i)/N_i)=2$ ve 3'dür. Belli kritik n_{BSA}/n_{PE} oranlarında, pozitif yüklü çubuk benzeri polikompleks parçacıkları protein moleküllerinin eklenmesiyle bir araya toparlanırlar ve daha sıkı yapıda suda çözünen ve çözünmeyen parçacıklar oluştururlar (Şekil 2.39). Çözünürlüğün limit değerlerinde güçlü hidrofobik yapı, polikatyon zincirinde yüklenmiş çok sayıdaki grup protein globülleri ile iyonik bağ oluşumuna neden olur.

III. bölge negatif yüklü suda çözünür protein-polielektrolit komplekslerin oluşumunu gösterir. Kompleks oluşumuyla birlikte çöküntüler çözülür hale geçer. Çözünen komplekslerin karakteristik bileşeni $\phi=2$; parçacıkların hidrofobikliğini sağlamak için komplekse eklenen proteinlerin minimum miktarıyla hesaplanır. $Q > 1$ ($n_{BSA}/n_{PE} = N_i$) koşulunda Q 'deki artışla birlikte tuz bağlarının toplam sayısı, değişmeden kalan polikatyonlar ile hesaplanır. Bu durum,

sadece bir protein globülünü karşılayan tuz bağlarının azalması anlamına gelir. Bu yüzden, çözünür kompleksdeki globüllerinin ilave sayıları, azalan entropiye bağlı olarak parçacıkların toplam sayısında azalmaya neden olur ve sistemdeki entalpi düşüşü dengelenemez. Farklı sistemlerden elde edilen bilgiler, negatif yüklü suda çözünür protein-polielektrolit komplekslerinin yapısının, bir polikasyon zinciri tarafından bir araya toparlanan ve güçlendirilen BSA molekül kümeleri olarak düşünülmesini sağlar. Bu modelde, bağlanmış PVEP polikasyon zinciri, negatif protein yükleriyle nötrleşen pozitif polikasyon yüklerinin içindeki hidrofobik merkeze yerleşir ve hidrofobik merkez kompleks yüzeyinde bulunan net negatif yükler tarafından sağlanan proteinler ile sarılarak komplekse çözünürlük özelliği kazandırır (Şekil 2.40).



Şekil 2.40 Çözünür BSA-PVEP komplekslerinin Zaitsev tarafından önerilen yapısı (Zaitsev vd., 1992).



Şekil 2.41 $\alpha_{\text{PMAA}} = 0.4$ olduğunda sulu çözeltiler içerisinde lizozom-PMMA polikompleks parçalarının düzenlenme karakteri (Anufrieva vd., 1987).

Lizozom-PMAA kompleksleri için, Anufrieva (1987) bazı PMAA bölgelerinin aşırı protein varlığında doldurulmadan kaldığında diğer PMAA bölgelerinin proteinlerle dolduğunu söylemiştir (Şekil 2.41).

Çözünür protein-polielektrolit kompleksleri, pH'nın proteinin izoelektrik noktasına yakın olduğu bölgelerde oluşur ve çözünen kompleksler değişen pH değerleri ile faz bölünmesine

karşı kuaservat yapılar oluşturmak için bir araya toplanırlar. Bu durum aşırı protein miktarları için bir polimer zincirinin, birkaç protein molekülüne bağlandığı birinci intrapolimer komplekslerin varlığını destekler. Bu birincil kompleksler Şekil 2.42’de gösterildiği gibi birbirine bağlanan birkaç polimer zincirlerinden oluşan interpolimer kompleksler oluşturarak bir araya gelirler. Bu interpolimer kompleksler geniş ölçekli agregasyon noktasının üzerinde çözünür olabilir.

Kokufuta (1994) serbest tuz sisteminde stokiometrik çözünmez protein-polielektrolit komplekslerinin modelini aşağıda önermiştir.



Şekil 2.42 Protein-polielektrolit komplekslerin intrapolimer ve interpolimer komplekslerinin yapısı.

3. İNSAN SERUM ALBUMİNİN YAPISI

Human serum albuminin triklinik kristal formu plazmadan (pHSA) ya da *Pichia Pastoris*'ten (rHSA) elde edilmiştir. pHSA ve rHSA'nın 3-boyutlu yapısı, tetragonal kristal yapı olarak bilinen çoklu isomorfoz yer değiştirme ile elde edilen yeni triklinik kristal yapıdan $2.5 \text{ \AA}^0$ çözünürlükle elde edilmiştir. pHSA ve rHSA'nın yapısı birbirine benzemektedir. İki HSA molekülü sıkı yerel iki katlı simetri ile tanımlanan asimetriye sahiptir. Cys34 dışsal etkileşimlere disülfid bağlanmalara katılmayan sisteindir. Bölge II ve III'nin ikisi de hidrofobik ve pozitif yüklenmiş parçaları içeren kese yapısına sahiptir ve bileşenlerin oldukça geniş dizisi bu bölgelerin içine yerleşirler. Uzun zincir yağ asitleri için üç geçici bağlanma yerleri her bölgenin yüzeyine yerleşir.

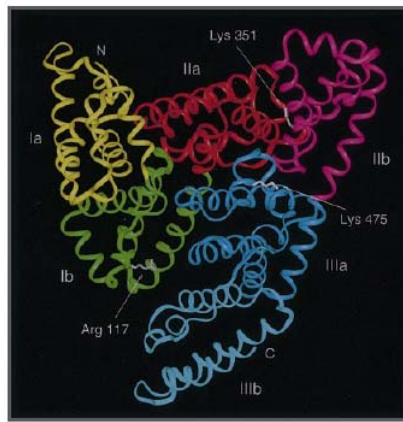
3.1 Giriş

Human serum albumin(HSA) plazmada en fazla bulunan protein olup 5g/100ml tipik kan konsantrasyonunda bulunur. Onun fizyolojik ve farmakolojik özellikleri son on yıldır geniş şekilde çalışılmıştır (Fekse vd., 1981; Kragh-Hansen,1981; Putnam, 1984; Peters,1985). Yapılan birçok araştırma HSA'nın Cu^{2+} ve Zn^{2+} gibi metaller içeren, yağ asidi, amino asit, bilirubin gibi metaboliklere ve birçok etkin maddeye karşı yüksek ilgi gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Proteinin en önemli fizyolojik özelliği, plazmanın osmotik basıncını ve pH'sını ayarlamının yanında kan dolaşımında çözünmüş maddelerin hedef organlarına ulaştırılmasında taşıyıcı olarak görev almasıdır. Ayrıca, hipovolemik şok davranışı HSA'nın sıradan klinik uygulamalarındandır. Birçok araştırmacı, HSA'yı spesifik hedeflere ilaç salınımında taşıyıcı olarak kullanmaya çalışmaktadır (Yapel, 1985; Filume vd., 1988). HSA'nın birincil sırası 17 çift disülfid köprü ve bir serbest sistein içeren 585 parçadan oluşan tek polipeptid zincirinden oluştuğu (Dugiaczyk vd.,1982) ve 3 homolog bölge içerdiği bulunmuştur (Brown, 1976).

3.2 Proteinin Yapısı

HSA, sarılmış ve uzanmış ilmikler ile heliks yapıda bir proteindir ve $80 \times 80 \times 30 \text{ \AA}^0$ boyutlarında kalp şekline benzemektedir (Şekil 3.1). Topolojik olarak benzerlik göstermeyen I (1-195 dizi), II (196-383) ve III (384-585) bölgelerinden oluşur. Buna rağmen, 3-boyutlu yapısı benzerdir (Şekil 3.2). C_α izleri bölge I ve II arasında bir benzerlik olduğunu desteklese de gerçekte II. ve III. bölgelerin şekilleri birbirine I ve II'den daha çok benzemektedir (Şekil 3.2). Her Bölge kendi arasında a ve b gibi alt bölgelere ayrılır. HSA'nın 3 bölgesi de benzer 3 boyutlu yapıya sahip olmasına rağmen, bir araya gelmiş yapısı oldukça asimetrik (Şekil

3.1). Bölge I ve II neredeyse birbirine dikey durumdadır. Hidrojen ve hidrofobik etkileşimler aracılığı ile Ia ve Ib alt üniteleri arasındaki ara yüzeye eklenmiş IIa alt ünitesinin uzantısı içerisinde T-Yapılı bir form oluşturur. Ters olarak bölge III, bölge II ve III için Y-yapısını oluşturmak için yaklaşık 45^0 açıyla IIb alt ünitesinden dışarı çıkmıştır. Bölge III sadece alt ünite IIb ile etkileşir. Bu özellikler HSA'yı kalp görünümünde yapar. Alt ünite Ib, IIIa ve IIIb aracılığıyla oluşmuş geniş kanallar nedeniyle bölge I ve III arasında birkaç temas alanı vardır. Bölge III'ün C-terminalindeki 2 heliks yapı, molekülün diğer kısımları ile etkileşmesinden dolayı oldukça yüksek sıcaklık faktörü gösterir.

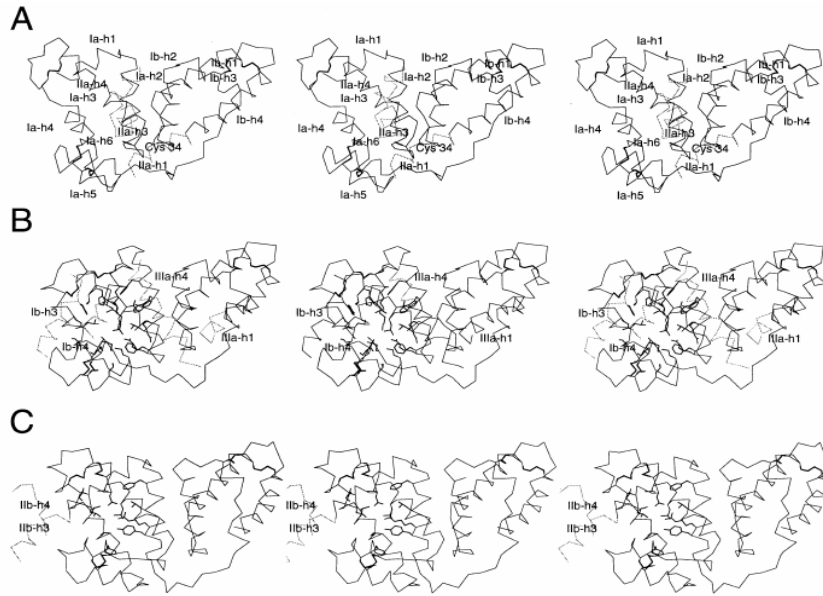


Şekil 3.1 HSA molekülünün şematik gösterimi. Her alt bölge Ia sarı, yeşil Ib, kırmızı IIa, majenta IIb, mavi IIIa ve siyan IIIb olmak üzere farklı renklerle işaretlenmiştir. N ve C , N-C terminal uçları belirtmektedir. Arg117, Lys351, Lys475 uzun zincir yağ asidine bağlanmış ve beyaz ile gösterilmiştir.

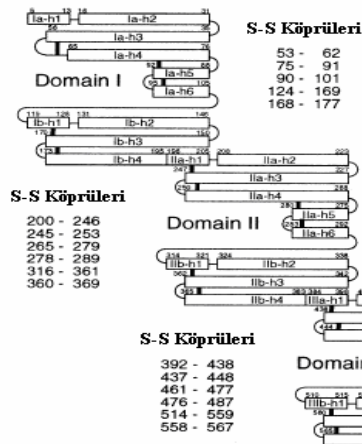
Yapılan çalışmalar, HSA'nın fizyokimyasal özelliklerinden anlaşıldığı üzere moleküler yapısını kolayca değiştirebilen esnek bir protein olduğu göstermiştir (Carter ve Ho, 1994). HSA'nın bir dizi ilginç özelliği mrstat ile yaptığı kompleksin karşılaştırılmasından açığa çıkarılmıştır (Curry vd., 1998). Öncelikle, bu üç bölgenin birbirine bağlı düzeni, yağ asidi proteine bağlandığında büyük ölçüde değişiklik gösterir. İkinci olarak her bölge kendi konformasyonunu kompleks oluşumu süresince korur. Ancak molekülün dış bölgesine doğru hareket eden bölge III'ün içindeki iki C-terminal heliks bu durumun dışında tutulur. Bu özellikler, bölge yapılarının bağımlı (görel) devinimleri nedeniyle HSA'nın farklı durumlar altında molekül esnekliğinin temelini oluşturur.

3.2.1 Alt Üniteler

Her Bölge a ve b alt birimlere ayrılır. Bu alt yapılar sırasıyla altı ve 4 α -heliks yapı oluştururlar (Şekil 3.2). Alt ünite “b” 4 α -heliks (b-h1 - b-h4) kümesine sahip iken alt ünite “a” iki kısa α -heliks (a-h5 ve a-h6) tarafından dört α -heliks (a-h1 - a-h4) yanal kümelerinin olması durumunda oluşturulur. Uzun yayılmış yanal ilmik hareketleri, iki alt üniteyi birbirine bağlar. Alt ünite a ve b içerisinde bulunan heliks kümelerinin 3-boyutlu yapısı benzerdir ve helikse benzer a-h2 ve b-h2 arasında pseudo-iki katlı eksen durumu olarak ifade edilir (Şekil 3.2) bölge I ve II’nin son helikseli (b-h4) diğer bölgenin birinci helikseli (a-h1) ile kaynaşmasına rağmen HSA molekülü içerisindeki helikslerin toplam sayısı 30 değil 28’dir (He ve Carter,1992).



Şekil 3.2 Alt bölgelerin C α izlerinin şematik gösterimi (A, bölge I; B, bölge II; C, bölge III).



Şekil 3.3 HSA'nın disülfat köprülerinin ve ikincil yapı bileşenlerin şematik gösterimi.

Göze çarpan genel yapısal özellikler alt üniteler arasında gözlenmiştir. Bu durum sadece polipeptid zincirinin katlanmasında değil onların özel disülfat bağlanma topolojisinde de bulunur. HSA molekülünün içerisinde, 17 disülfat köprüsü ile bağlanmış 35 sistein bulunur. Bunların onaltısı çift disülfat köprüsü olarak bilinen sekiz tanesinin oluşumuna katılır (Şekil 3.3). Heliksel a-h3 ve b-h3 üzerinde amino asit zinciri içerisinde bulunan bitişik iki sistein özel katlanmış topolojinin merkezinde yer alır. İlk köprü h3 ve h1 ile uzamsal olarak sıralanmış ve neredeyse birbirlerine dik olarak ilişki kurarken, ikinci köprü birbirine paralel olarak heliksel h3 ve h4'e bağlanır. Sonuç olarak, üç heliksel (h2, h3 ve h4) alt ünitelerin bir tarafında kavisli bir duvar oluşturmak için oluşur. Disülfat köprülerinin diğer serisi her a-h5 heliks üzerine iki ardışık sisteinin yerleştiği a-h4, a-h5 ve a-h6 heliks bulunur. Alifatik ve aromatik yan zincirlere sahip kısımlar, alt ünitelerin hidrofobik çekirdeklerini oluşturmak için heliks duvarlarının iç yüzeylerinde kümelenir ve heliks h1 ile kısmen de olsa kaplanır. Bu topolojik özellik Ia-h3'ün dışında her alt ünitenin içinde gözlenir. Çeşitli türdeki serum albüminlerin dizi karşılaştırmasında iki sistein parçası arasındaki eşzamanlı değişim protein içerisinde heliks Ia-h3'in sonunda gözlenebilir (Carter ve Ho, 1994)

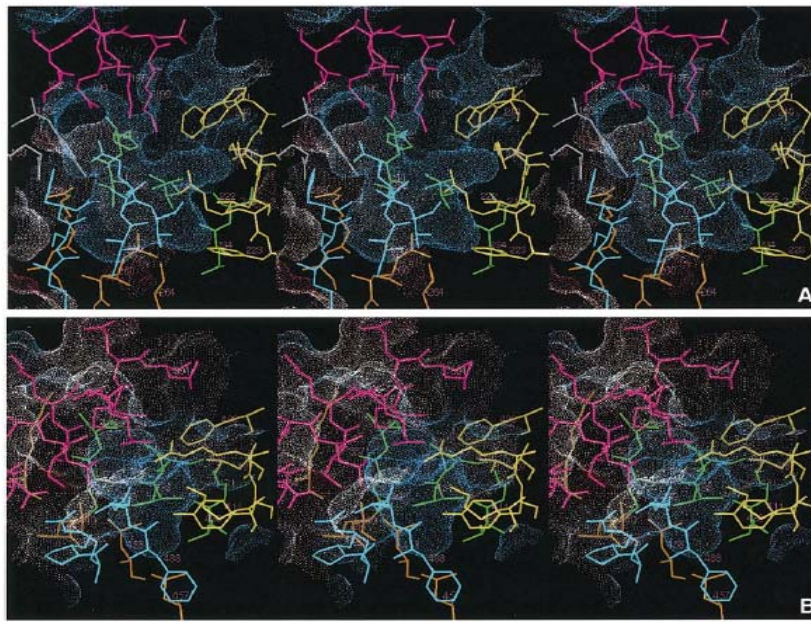
3.2.2 Sistein İçindeki Serbest Sülfhidril Gruplar

Heliksel Ia-h2 ve Ia-h3 arasında bir ilmi gibi yerleşen Cys34 disülfat köprülerine dahil olmayan sistein parçasıdır (Şekil 3.2 (A)). Onun sülfhidril grubu sistein ya da kan dolaşımı içerisindeki HSA molekülünün % 30–40 içerisindeki glutatin ile moleküller arası disülfat bağlantılar oluşturmak için okside olur (Peters, 1985). Bu genel yapıya rağmen, elektron yoğunluğu haritasındaki özelliklerden Cys34'ün sülfhidril yan zincirleri etrafında hiçbir şey gözlenmez. Cys34'ün proteinin yüzeyine yerleşmesine rağmen, onun S_γ atomları iç kısımlara doğrudur ve dış tamamlayıcılar ile birleşen sülfhidril gruplarını engelleyen Pro35, His39, Val77 ve Tyr84'in yan zincirleri ile sarılmıştır.

3.2.3 İlaçlar ve Diğer Bileşenler İçin Bağlanma Bölgeleri

Ila ve IIIa alt ünitelerinin her ikisi içerisinde de, hidrofobik çekirdeğin bir kısmı a-h5 ve a-h6 ile birlikte genişletilmiş ilmiğin ilk birkaç kısmı ile kese formunu oluşturmak için sıkıca sarılır (Şekil 3.2 B ve C). Ila alt ünitesinin kese formu saliklat, sülfonamid ve diğer ilaçların birçoğu ile bağlandığı düşünülen ve site I olarak adlandırılan kısım ile benzeşmektedir (Sudlow vd., 1975, 1976). Bilirubin bağlanma bölgesi bu yüzey ile üst üste gelir (Brown ve Shockley, 1982). Kesenin iç duvarları hidrofobik yan zincirler ile oluşturulmasına rağmen girişi pozitif yüklü Arg257, Arg222, Lys199, His242, Arg218 ve Lys195 gibi kısımlar ile

çevrenmiştir (Şekil 3.4 A). Triptofan, troksin, oktanat ve diğer ilaçlar için bağlanma bölgesi olarak kabul edilen (Sudlow vd., 1975) site II, site I ile aynı boyuta sahip alt ünite IIIa'nın keseciğine benzemektedir. Boğum hidrofobik yan zincirler ve heliks IIIa-h3'ün çift disülfid köprüleri ile doludur. Tyr411'in hidroksil ile boğumun içine doğru karşılaşırken, Arg 410'un yan zincirleri boğumun ağız kısmında yerleşir (Şekil 3.4 B). Alt ünite IIa ve IIIa'nın dışında alt ünite Ia onun hidrofobik çekirdeğin yakınında boğuma sahip değildir (Şekil 3.2 A). Heliks Ia-h4'ün denge durumuna geçiş nedeniyle, sonuncusu heliks Ia-h3'e daha uzun paralellikte değildir. Heliks Ia-h4 üzerindeki kısımların yan zincirleri varsayılan boğum içerisine saklanır ve alt ünite IIa onunla etkileşerek bu bölgeyi kapatır.



Şekil 3.4 Ligand bağlanma bölgeleri I (A) ve II (B) için stereografik gösterim. Yüzeydeki yük dağılımları (+) yük için mavi ve (-) yük için kırmızı ile gösterilmiştir.

Camerman vd. (1976) His3'ün imidazolda olduğu gibi ilk üç kısmın iskelet nitrojenleri Cu^{2+} iyonlarına bağlanma sitesi oluşturduğunu ileri sürmüştür. Ancak H-terminaldeki bozulmalardan dolayı metal bağlanmalarına karşı bir kanıt bulunamamıştır.

Oldukça iyi bilinen HSA'nın yağ asitlerine yer sağladığıdır. Reed (1986) palmitik asitin BSA'nın içerisindeki Lys473, Lys349 ve Lys116'a bağlandığını öne sürmüştür (Dengi olarak HSA' da sırasıyla Lys475, Lys351 ve Arg116). Lys475 ve Lys351 molekülün yüzeyinde (Şekil 3.1) ve Lys475 heliks IIIa-h5 üzerinde yer alır. İki fazla yarık heliks-h3 üzerindeki Lys351 yakınında görülür. Bir tanesi alt ünite IIa ve IIb arasındaki ara yüzeyde diğeri alt ünite IIb ve IIIa arasındadır. Arg 117 alt ünite Ib'nin heliks kümeleri ve alt ünite Ia ve Ib arasındaki genişlemiş ilmik ile çatlak formunda yer alır.

3.2.4 Sonuç

HSA sekiz çiftli disülfid köprüsü ile birbirine benzer üç heliksel bölgeyi içerir. Cys34, bir serbest sülfhidril grubuyla sistein, dış ligantlar ile disülfid bağlanmalara katılmaz. Pozitif yüklü girişleri ile derin hidrofobik boğumlar alt ünite IIa ve IIIa içerisinde benzer pozisyonlarda yer alırlar ve çeşitli bileşenler ile bağlanma yerleri olarak adlandırılan site I ve II' ye uygun gelirler.

4. DENEYSEL KISIM

4.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

4.1.1 Kullanılan Cihazlar

- WTW pH level 1 pH metre
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre
- Zetasizer Nano ZS
- Viscotek (Dört Detektörlü GPC)
- Precisa XB 220A Hassas Terazî
- Heidolph MR 3001 Isıtcılı Manyetik Karıştırıcı
- Binder Vakum Etüvü
- Finnpiette Micropipet (1-10 mL, 100-1000 µl, 5-50 µl)
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Shimadzu HPLC Sistemi
- PTI Flüoresans Spektroskopisi
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- Sartorius MiniSart RC Enjektör filtresi, 0,22 µm

4.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Aşağıda belirtilen bütün kimyasallar satın alındığı gibi kullanılmış olup herhangi bir ön işleme tabi tutulmamışlardır.

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Kodu
Poliakrilik asit, (PAA)	Aldrich	523925
Human serum albumin, (HSA)	Sigma	A9511
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka	06203
Asetik asit, (CH ₃ COOH)	Riedel-de Haën	27225
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën	04361
Sodyum hidrojen fosfat, (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	Fluka	71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel-de Haën	07102
Sodyum azid, (NaN ₃)	Applichem	A1430

4.2 HSA/PAA Kompleksleri

4.2.1 Kullanılan Çözeltiler

a) 0,01 mol/L'lik PBS Tamponu (pH=7,0 ve pH=6,0)

1,1998g NaH_2PO_4 ($M_w=119,98$ g/mol) tartılarak 500mL ultra saf suda çözülür. Aynı zamanda 2,6807g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($M_w=268,07$ 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 5,0 ve 4,0)

5,72mL asetik asit, ultra saf su ile 2L'ye tamamlanır. Bir süre manyetik karıştırıcıda karıştıktan sonra 17,53 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. 1M NaOH ile pH ayarlanır.

4.2.2 Komplekslerin Hazırlanışı

PAA stok çözeltisi 2mg/mL ve 0,2 mg/mL olacak şekilde ABS ve PBS tamponunda hazırlandı. Her bir çözeltideki PAA miktarı sabit olduğundan her bir çözelti için hazırlanan stoktan 5 mL çözelti çekilerek uygun tamponda iyice karışması sağlandı. Gerekli miktarda HSA tartılarak uygun tamponunda çözünmesi sağlanarak HSA stoğu hazırlandı. Daha sonra PAA çözeltilerinin pH'sı kontrol edilerek gerekli miktarlardaki HSA stoktan çekilerek karışmakta olan çözeltiye yavaş yavaş ilave edildi. Çözeltinin istenilen pH'da olup olmadığı kontrol edildi. Yaklaşık 30da. kadar karıştırıldı. Bütün karıştırma işlemleri manyetik karıştırıcıda ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Çalışılan her pH değeri için aynı aşamalar gerçekleştirildi.

4.2.3 Hesaplamalar

4.2.3.1 $C_{PAA}=1$ mg/mL için HSA-PAA Karışım Çözeltileri

PAA konsantrasyonu sabit tutularak, farklı HSA konsantrasyonlarına 5 farklı oranda kompleks çözeltisi hazırlanmıştır. Bu hesaplamalar şu şekildedir:

$$\frac{n_{HSA}}{n_{PAA}} = \frac{C_{HSA} \cdot M_{PAA}}{C_{PAA} \cdot M_{HSA}} = 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10$$

PAA'nın çözeltideki konsantrasyonu % 0,1'lidir.

$$M_{PAA}=100\text{kDa}$$

$$M_{BSA}=66\text{kDa}$$

1) $n_{HSA}/n_{PAA} = 0,1$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{HSA} = 0,0066\text{g}/100\text{mL} = 0,066\text{mg}/\text{mL} = 0,66\text{mg}/10 \text{ mL}$$

2) $n_{HSA}/n_{PAA} = 0,5$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{HSA} = 0,033\text{g}/100\text{mL} = 0,33\text{mg}/\text{mL} = 3,3\text{mg}/10 \text{ mL}$$

3) $n_{HSA}/n_{PAA} = 1$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{HSA} = 0,066\text{g}/100\text{mL} = 0,66\text{mg}/\text{mL} = 6,6\text{mg}/10 \text{ mL}$$

4) $n_{HSA}/n_{PAA} = 5$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{HSA} = 0,33\text{g}/100\text{mL} = 3,3\text{mg}/\text{mL} = 33\text{mg}/10 \text{ mL}$$

5) $n_{HSA}/n_{PAA} = 10$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{HSA} = 0,66\text{g}/100\text{mL} = 6,6\text{mg}/\text{mL} = 66\text{mg}/10 \text{ mL}$$

4.2.3.2 $C_{PAA}=0,1 \text{ mg/mL}$ için HSA-PAA Karışım Çözeltileri

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

$$\frac{n_{HSA}}{n_{PAA}} = \frac{C_{HSA} \cdot M_{PAA}}{C_{PAA} \cdot M_{HSA}} = 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10; 30; 50; 80; 100$$

PAA'nın çözeltideki konsantrasyonu % 0,01'lidir.

$$M_{PAA}=100\text{kDa}$$

$$M_{HSA}=66\text{kDa}$$

1. $n_{HSA}/n_{PAA} = 0,1$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{HSA} = 0,00066\text{g}/100\text{mL} = 0,0066\text{mg}/\text{mL} = 0,066\text{mg}/10 \text{ mL}$$

2. $n_{HSA}/n_{PAA} = 0,5$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{HSA} = 0,0033\text{g}/100\text{mL} = 0,033\text{mg}/\text{mL} = 0,33\text{mg}/10 \text{ mL}$$

3. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} = 1$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{\text{HSA}} = 0,0066\text{g}/100\text{mL} = 0,066\text{mg}/\text{mL} = 0,66\text{mg}/10 \text{ mL}$$

4. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} = 5$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{\text{HSA}} = 0,033\text{g}/100\text{mL} = 0,33\text{mg}/\text{mL} = 3,3\text{mg}/10 \text{ mL}$$

5. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} = 10$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{\text{HSA}} = 0,066\text{g}/100\text{mL} = 0,66\text{mg}/\text{mL} = 6,6\text{mg}/10 \text{ mL}$$

6. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} = 30$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{\text{HSA}} = 0,198\text{g}/100\text{mL} = 1,98\text{mg}/\text{mL} = 19,8\text{mg}/10 \text{ mL}$$

7. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} = 50$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{\text{HSA}} = 0,33\text{g}/100\text{mL} = 3,3\text{mg}/\text{mL} = 33\text{mg}/10 \text{ mL}$$

8. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} = 80$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{\text{HSA}} = 0,528\text{g}/100\text{mL} = 5,28\text{mg}/\text{mL} = 52,8\text{mg}/10 \text{ mL}$$

9. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} = 100$ olan 10mL HSA-PAA Kompleks Çözeltisi

$$c_{\text{HSA}} = 0,66\text{g}/100\text{mL} = 6,6\text{mg}/\text{mL} = 66\text{mg}/10 \text{ mL}$$

4.3 UV-VIS Spektrofotometresi Ölçümleri

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

4.4 Jel Filtrasyon Kromatografisi (HPLC) Ölçümleri

Proteinler, polielektrolitler ve suda çözünür polimer-protein kompleksleri, HPLC'de ayrılmıştır. Proteinlerin molekül kütleleri ve polimer-protein karışımlarının veya komplekslerini fraksiyon kompozisyonları jel filtrasyon kromatografisi ile Shim-Pack Diol-300 (7,9 mm ID x 50 cm) kolonu kullanılarak oda sıcaklığında belirlenmiştir. Shimadzu Model LC-6AD pompası, 1,0mL/dak. Akış hızıyla uygun tamponlar kullanılarak çalıştırılmıştır. Kompleks çözeltileri santrifüj edildikten sonra 0,22µm'lik enjektör filtresiyle süzülerek 20µl hacimlik örnek, analiz edilmek üzere cihaza verilmiş ve 280nm'de Shimadzu SPD-10AV VP Model UV-VIS Detektörü ile incelenmiştir. Kolonu kalibre etmek için

kullanılan standartlar şunlardır: thyroglobulin (670 kDa), immünoglobulin (155 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (44 kDa) ve myoglobin (16.9 kDa).

4.5 Dört Detektörlü Jel Filtrasyon Kromatografisi (Viscotek) Ölçümleri

Proteinler, polielektrolitler ve suda çözünür polimer-protein kompleksleri, HPLC’de ayrılmıştır. Proteinlerin molekül kütleleri ve polimer-protein karışımlarının veya komplekslerini fraksiyon kompozisyonları jel filtrasyon kromatografisi ile Shim-Pack Diol-300 (7,9 mm ID x 50 cm) kolonu kullanılarak oda sıcaklığında belirlenmiştir. Shimadzu Model LC-6AD pompası, 1,0mL/dak. Akış hızıyla uygun tamponlar kullanılarak çalıştırılmıştır. Kompleks çözeltileri santrifüj edildikten sonra 0,22µm’lik enjektör filtresiyle süzülerek 20µl hacimlik örnek, analiz edilmek üzere cihaza verilmiş ve 280nm’de Shimadzu SPD-10AV VP Model UV-VIS Detektörü ile incelenmiştir. Kolonu kalibre etmek için kullanılan standartlar şunlardır: thyroglobulin (670 kDa), immünoglobulin (155 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (44 kDa) ve myoglobin (16.9 kDa).

4.6 Flüoresans Spektroskopisi

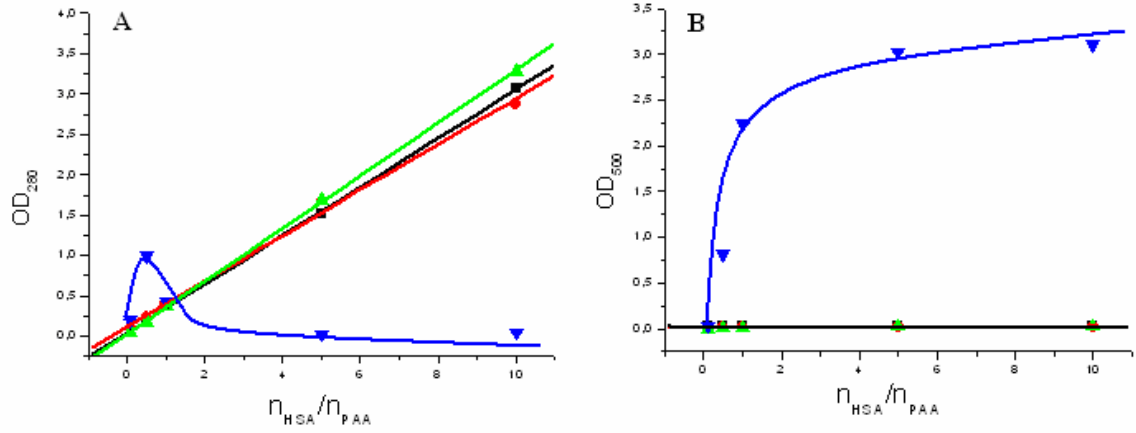
Flüoresans ölçümleri PTI marka spektrometre ile proteinler için 280 nm’de uyarma enerjisiyle yapılmıştır. Bütün örnekler kuars kuvvetlerde T=25 °C olacak şekilde ölçülmüştür.

4.7 Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Ölçümleri

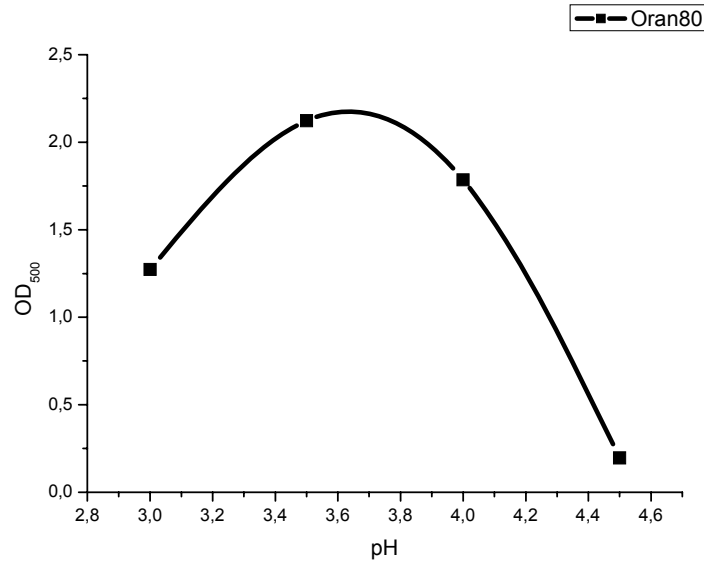
Dinamik ve elektroforetik ışık saçılması deneyleri, Malvern marka Zetasizer Nano ZS cihazında gerçekleştirilmiştir. Cihazda 633nm’lik 4,0mW’lık He-Ne lazeri bulunmaktadır. Dinamik ışık saçılması yöntemiyle, bir sıvıda çözünmüş parçacıkların boyutunu analiz eder. Ölçüm aralığı 0,6nm-6µm’dir. Elektroforetik ışık saçılması yöntemiyle de yine bir sıvıda çözünmüş parçacıkların zeta potansiyelini analiz eder. 5nm’den 10µm’ye kadar olan parçacıkların zeta potansiyellerini ölçebilmektedir. Tüm ölçümler $\pm 0,1$ °C hassaslığında 25 °C’de gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler, ölçümden hemen önce 0,22µm’lik enjektör filtresinden geçirilmiştir. Ölçümler, Malvern firmasından satın alınan kapiler kuvvetlerde gerçekleştirilmiştir. Boyut ölçümlerinde kullanılan parametreler şöyledir: viskozite: 0,8872 cP; kırılma indisi: 1,330. Adım (run) sayısı ve süreleri otomatik olarak seçilmiştir. Zeta potansiyel ölçümlerindeki parametreler de şöyledir: viskozite: 0,8872 c_{PE}; kırılma indisi:

1,330; dielektrik sabiti: 79; $f(\kappa)$, 1,50 (Smoluchowski). Ölçüm süreleri ve voltaj seçimi otomatiğe ayarlanmıştır.

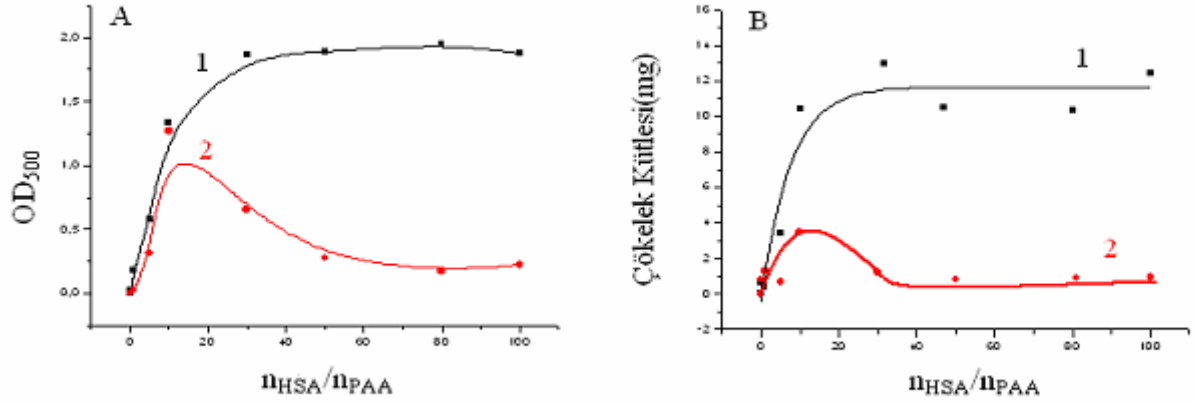
5. DENEY SONUÇLARI



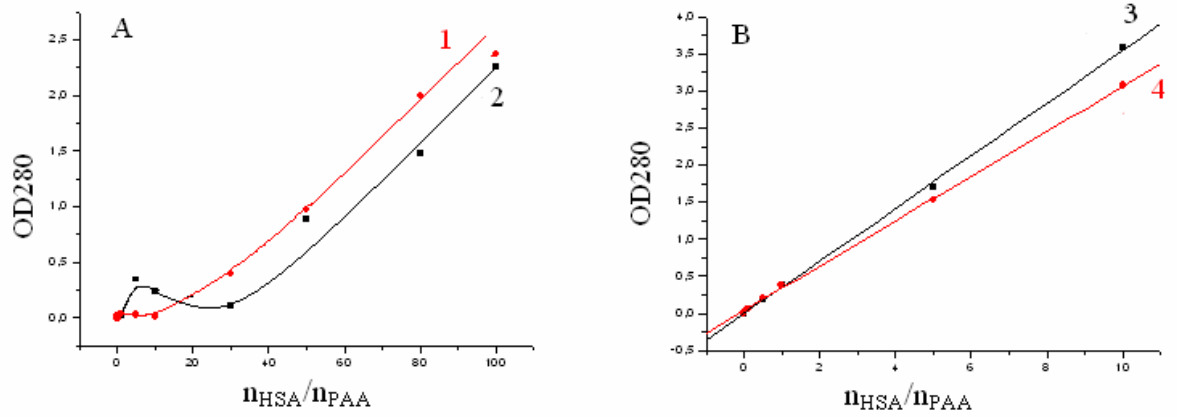
Şekil 5.1 (A) pH 4,0 (▼), pH 5,0 (■), pH 6,0 (●) ve pH 7,0 (▲)'de farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin 280nm'de optik yoğunlukları (OD₂₈₀) (B) pH 4,0 (▼), pH 5,0 (■), pH 6,0 (●) ve pH 7,0 (▲)'de farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin 500nm'de türbiditeleri (OD₅₀₀).



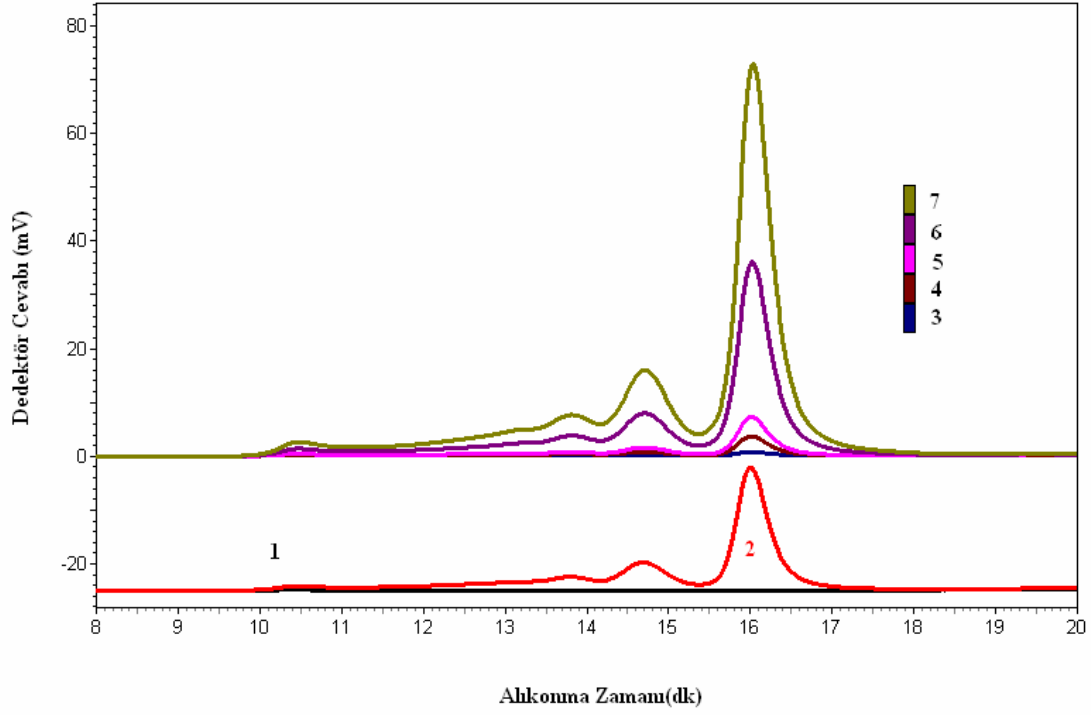
Şekil 5.2 $C_{PAA}=0,1\text{mg/mL}$ konsantrasyonunda $n_{HSA}/n_{PAA}=80$ için türbidimetrik titrasyon.



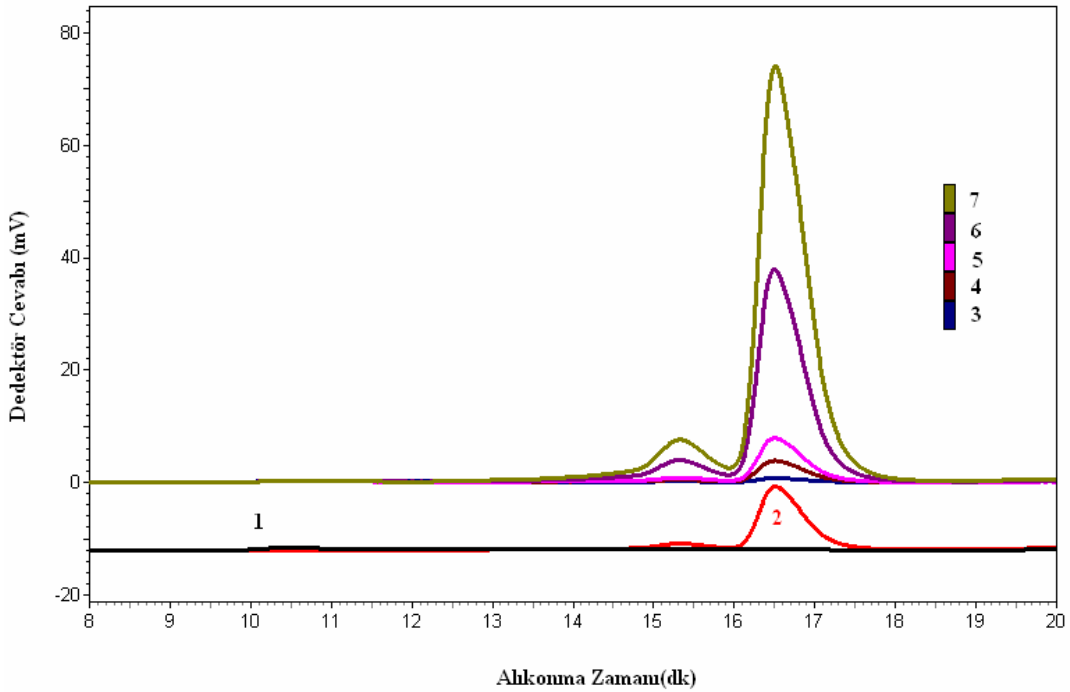
Şekil 5.3 $C_{PAA}=0,1\text{mg/mL}$ için (A) pH 4.0 (1), pH 4,5 (2)'de farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin 500 nm'de türbiditeleri (OD_{500}). (B) pH 4.0 (1), pH 4,5 (2)'de farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası çökelek kütleleri.



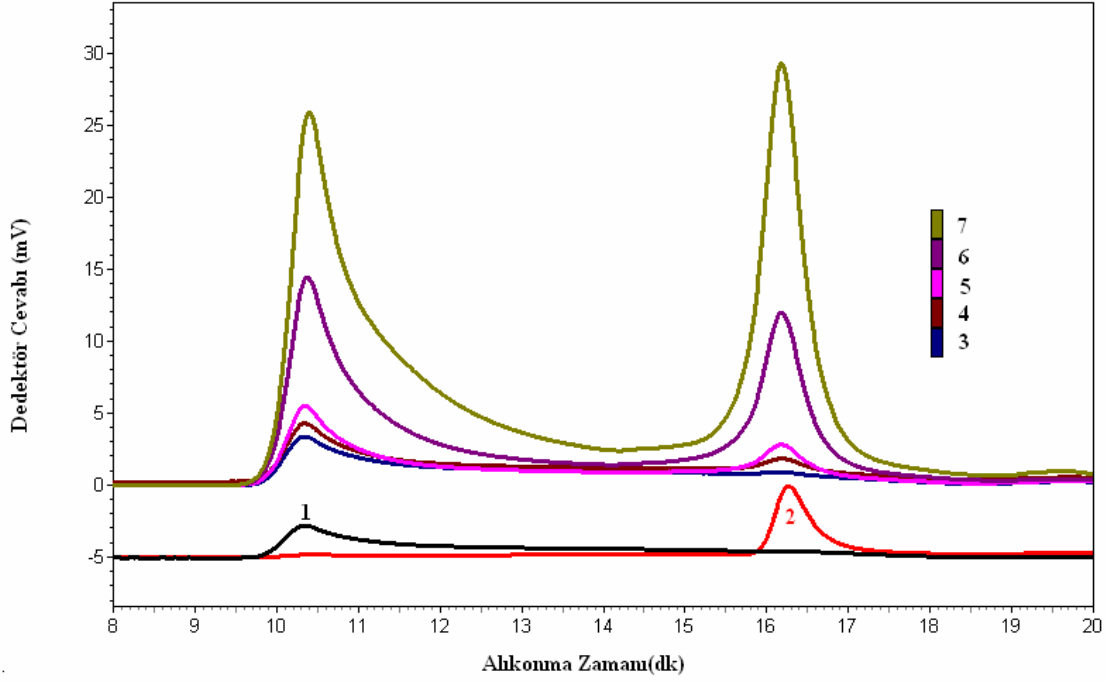
Şekil 5.4 (A) $C_{PAA}=0,1\text{mg/mL}$ için pH 4.0 (1), pH 4,5 (2)'de farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası 280 nm'de optik yoğunluğu (OD_{280}). (B) $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ pH 4.0 (3), pH 4,5 (4)'de farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin 280 nm'de optik yoğunluğu (OD_{280}).



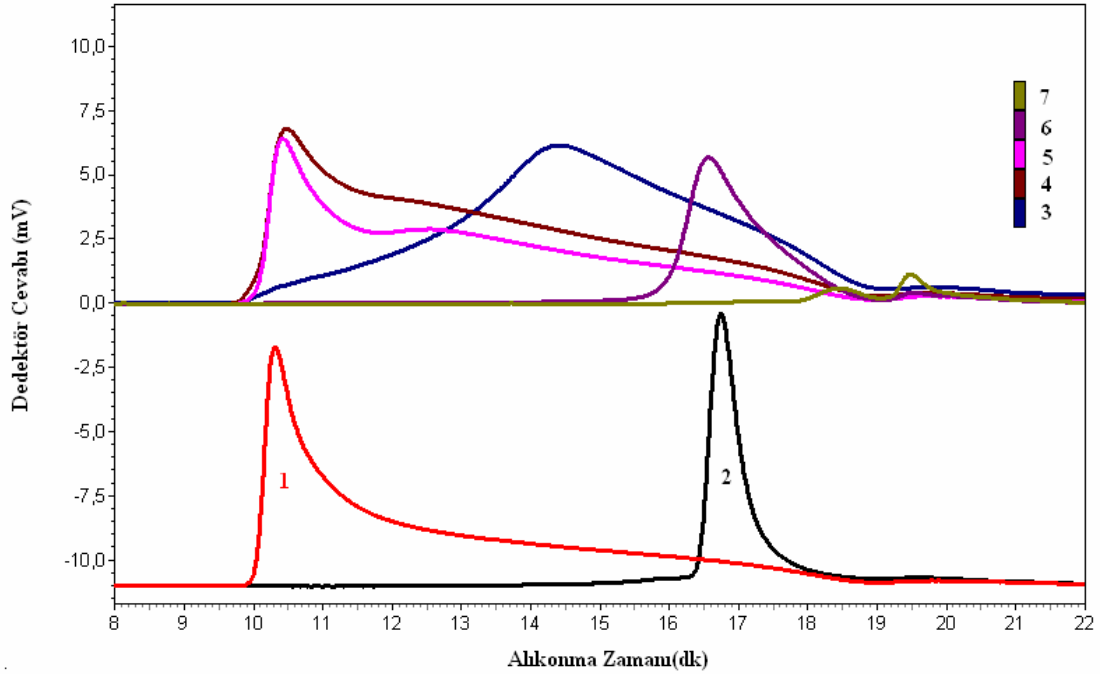
Şekil 5.5 $C_{PAA}=1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin 280 nm’de HPLC kromotogramları. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 7,0 T=25 °C.



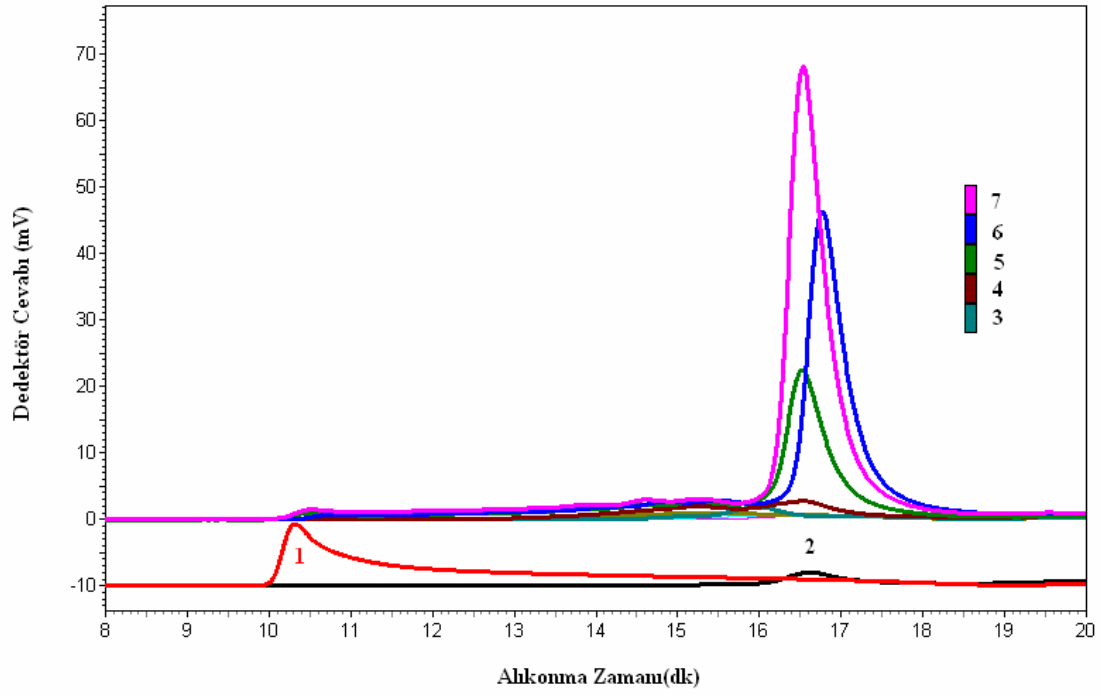
Şekil 5.6 $C_{PAA}=1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin 280 nm’de HPLC kromotogramları. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 6,0 T=25 °C.



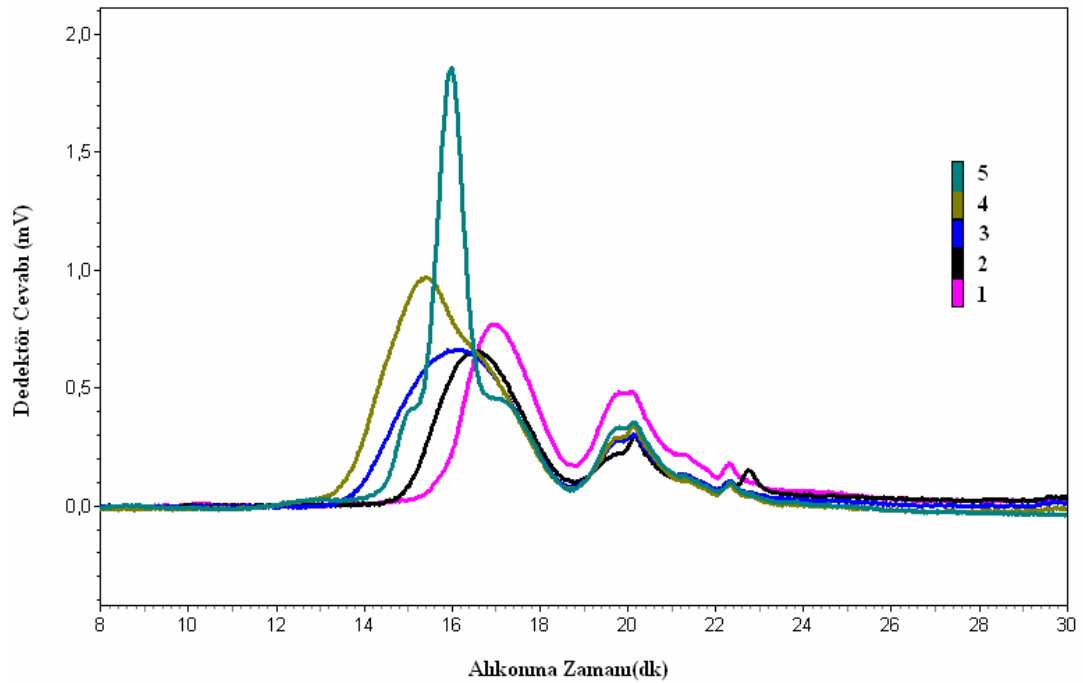
Şekil 5.7 $C_{PAA}=1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin 280 nm’de HPLC kromatogramları. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 5,0 T=25 C.



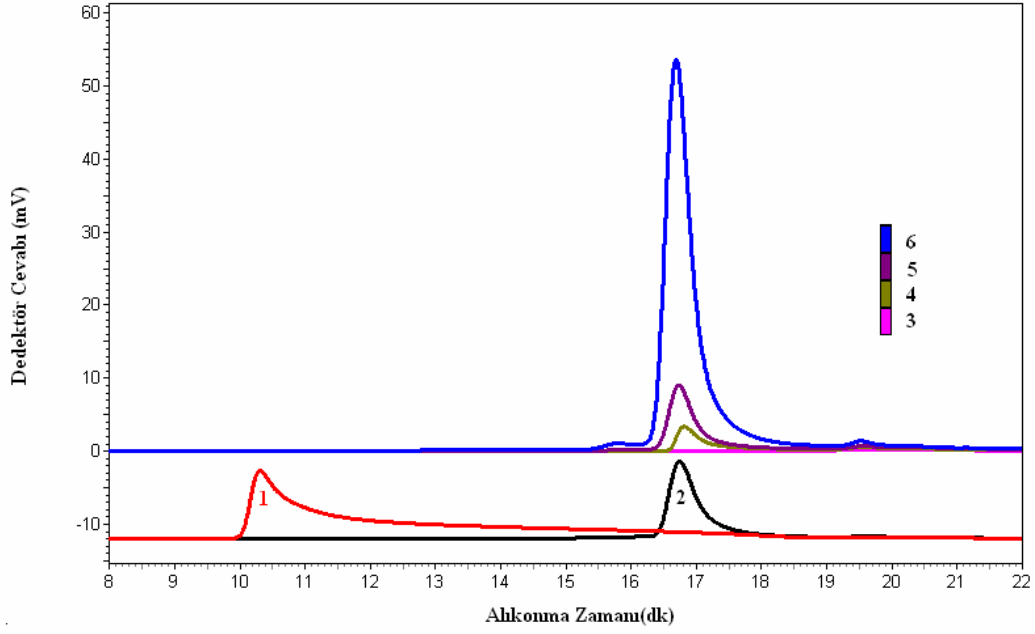
Şekil 5.8 $C_{PAA}=1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin üst fazlarının 280 nm’de HPLC kromatogramları. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 4,0 T=25 °C.



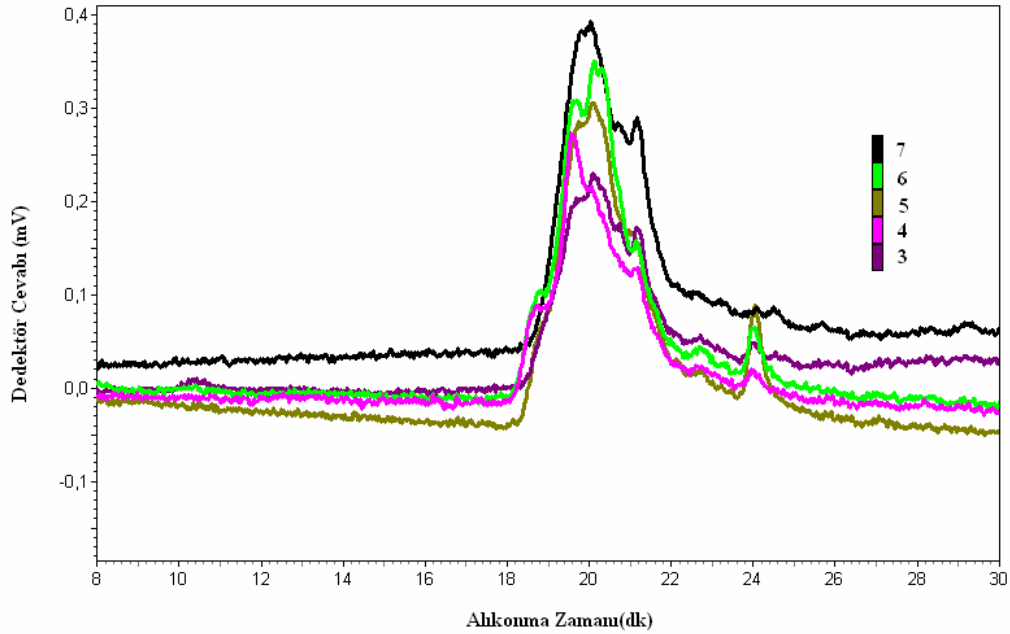
Şekil 5.9 $C_{PAA}=0,1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası 280 nm’de HPLC kromatogramları. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=10$ (3); 30 (4); 50 (5); 80 (6); 100 (7). pH 4,5 $T=25^{\circ}C$.



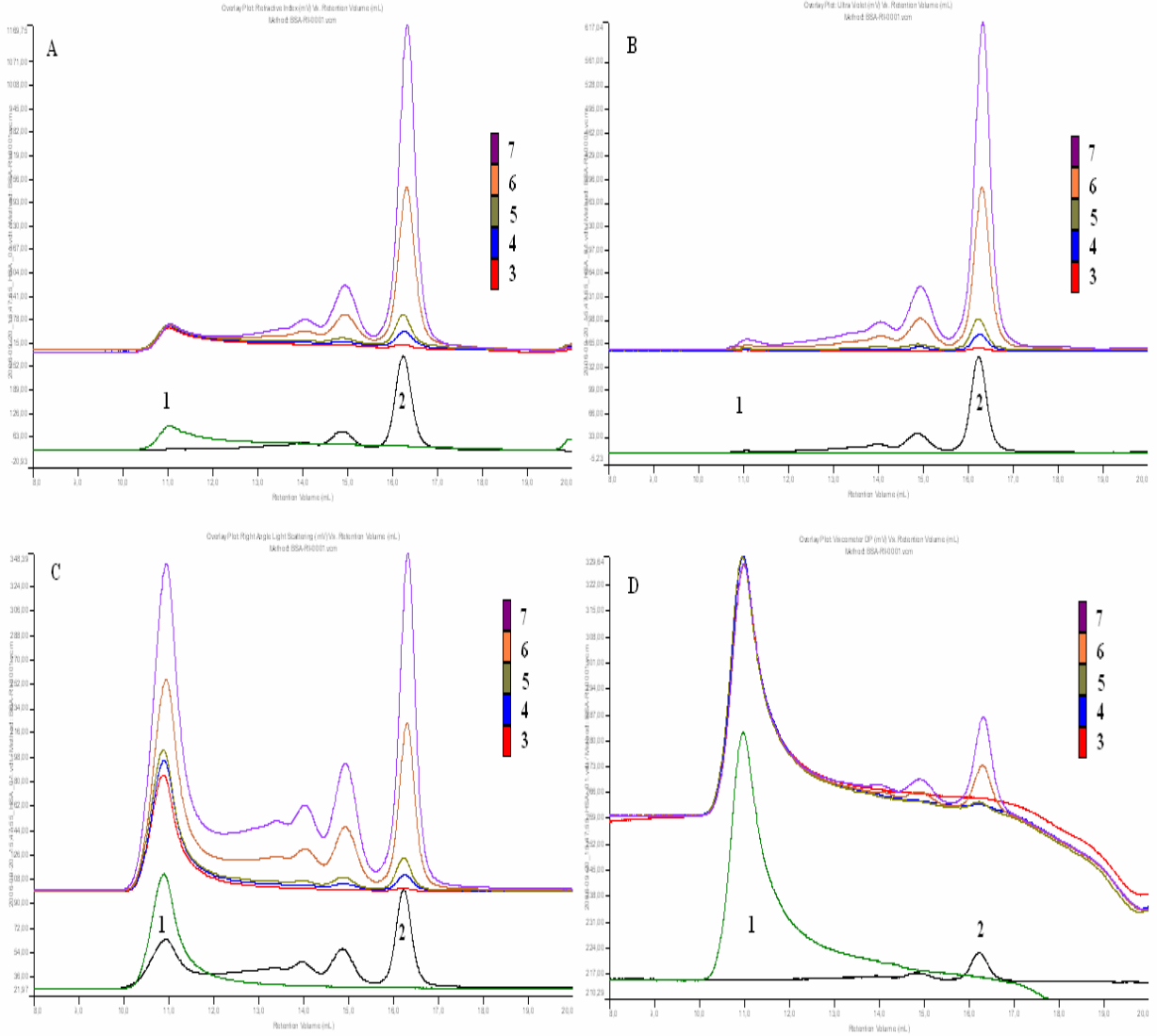
Şekil 5.10 $C_{PAA}=0,1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası 280 nm’de HPLC kromatogramları. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4); 10 (5). pH 4,5 $T=25^{\circ}C$.



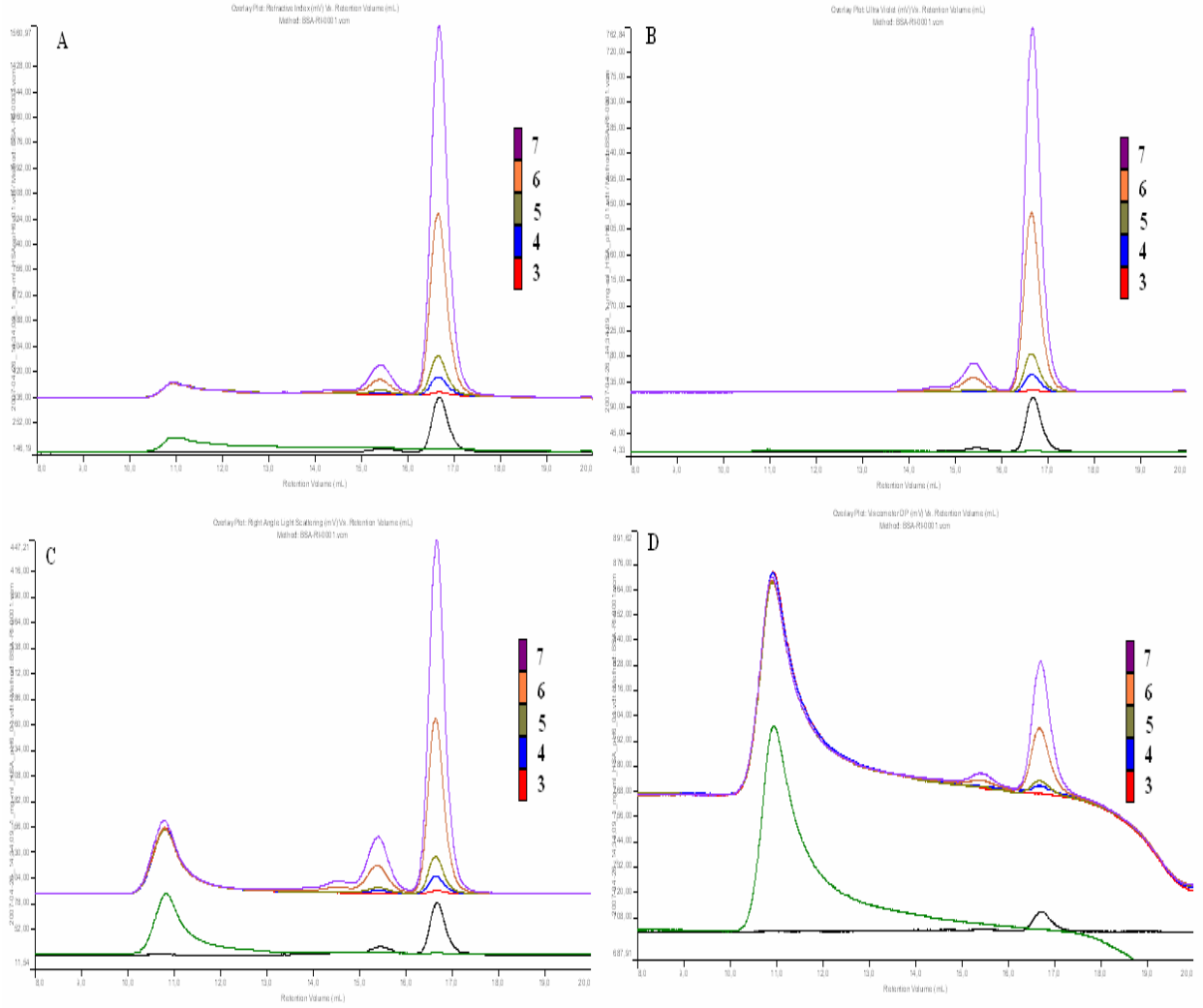
Şekil 5.11 $C_{PAA} = 0,1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası 280 nm’de HPLC kromatogramları. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=30$ (3); 50 (4); 80 (5); 100 (6). pH 4,0 $T=25$ °C.



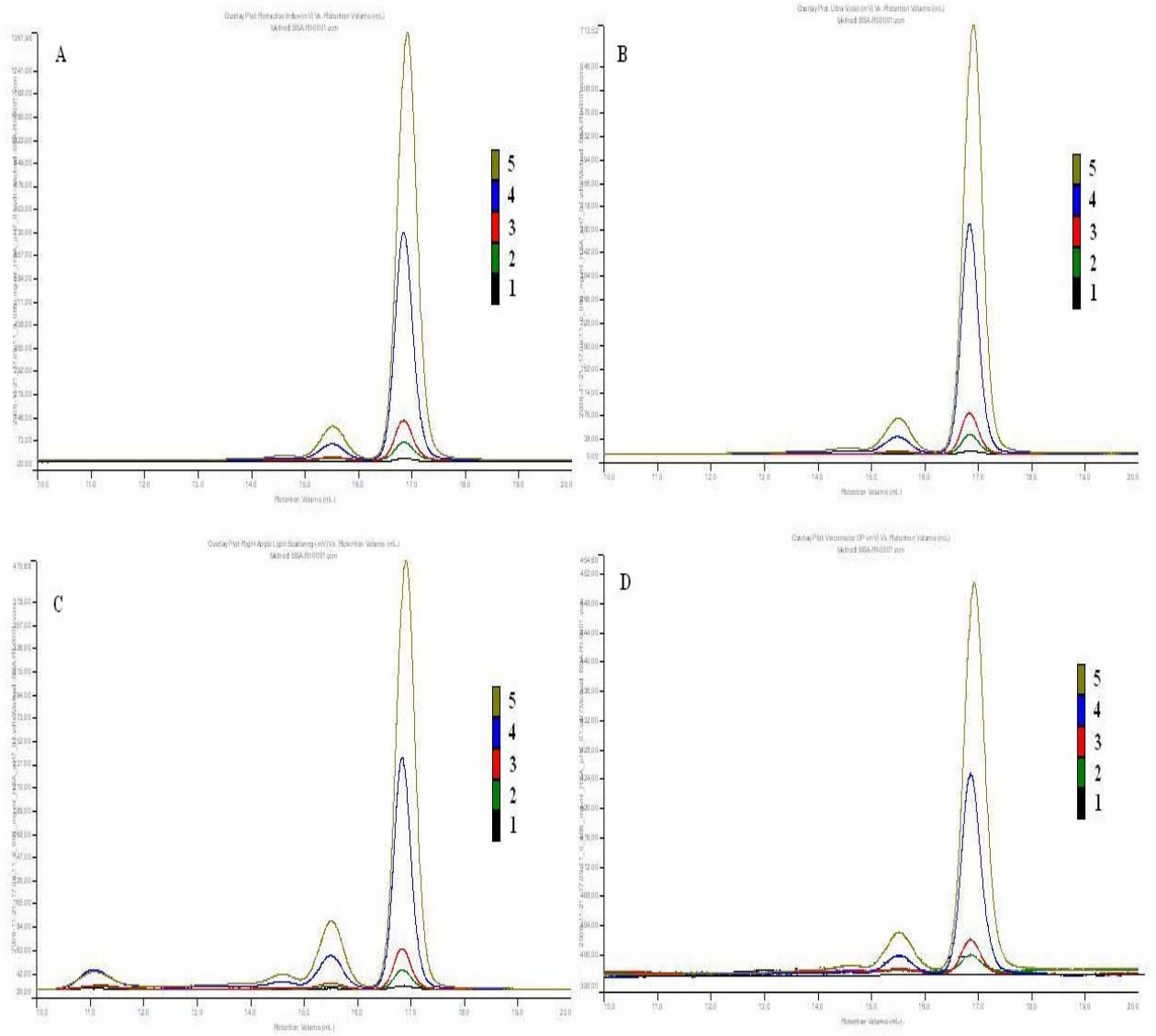
Şekil 5.12 $C_{PAA} = 0,1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası 280 nm’de HPLC kromatogramları. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 4,0 $T=25$ °C.



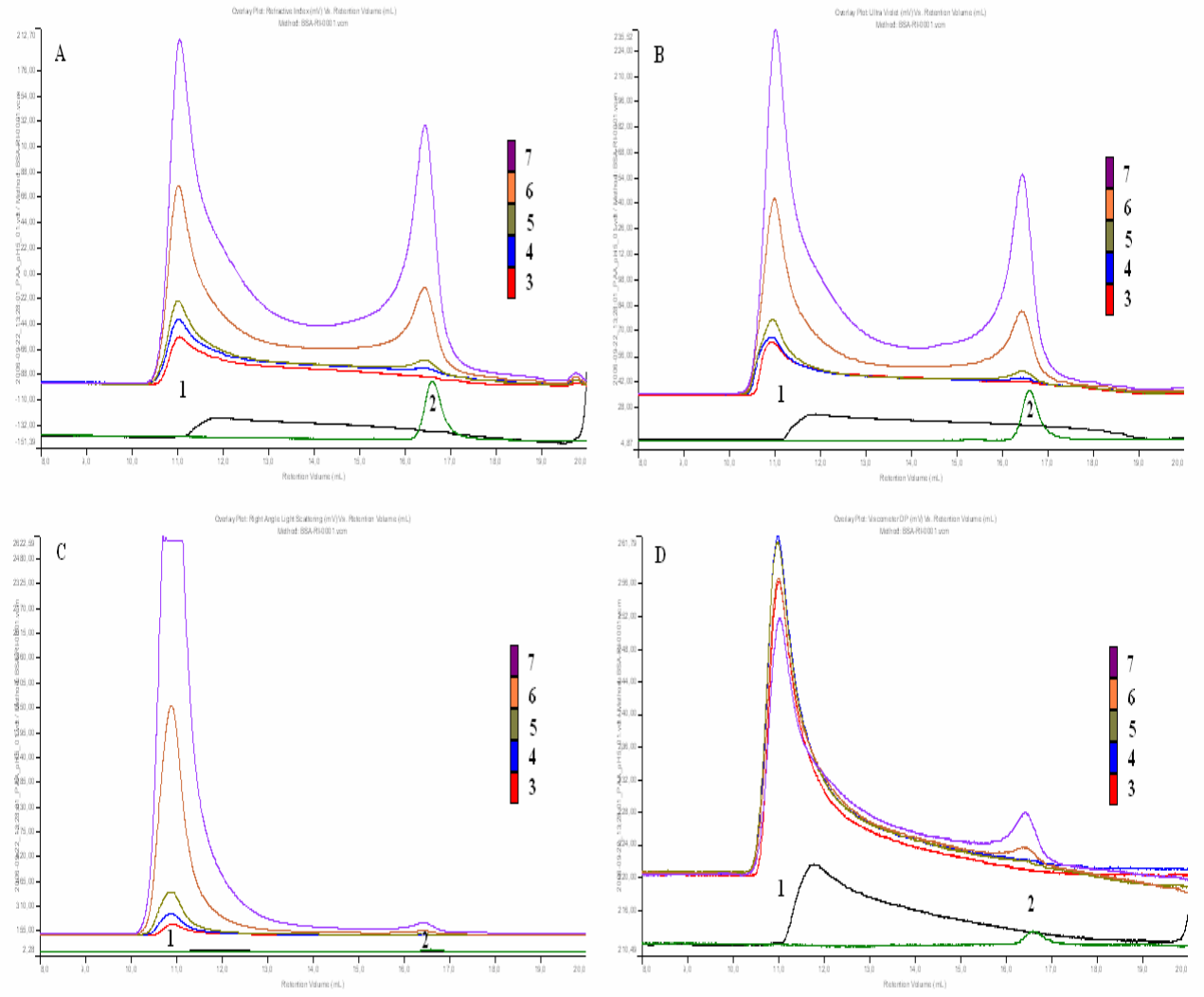
Şekil 5.13 $C_{\text{PAA}}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin GPC kromatogramları [Detektörler: RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. PAA (1), HSA (2), $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 7,0; $T=25^\circ\text{C}$.



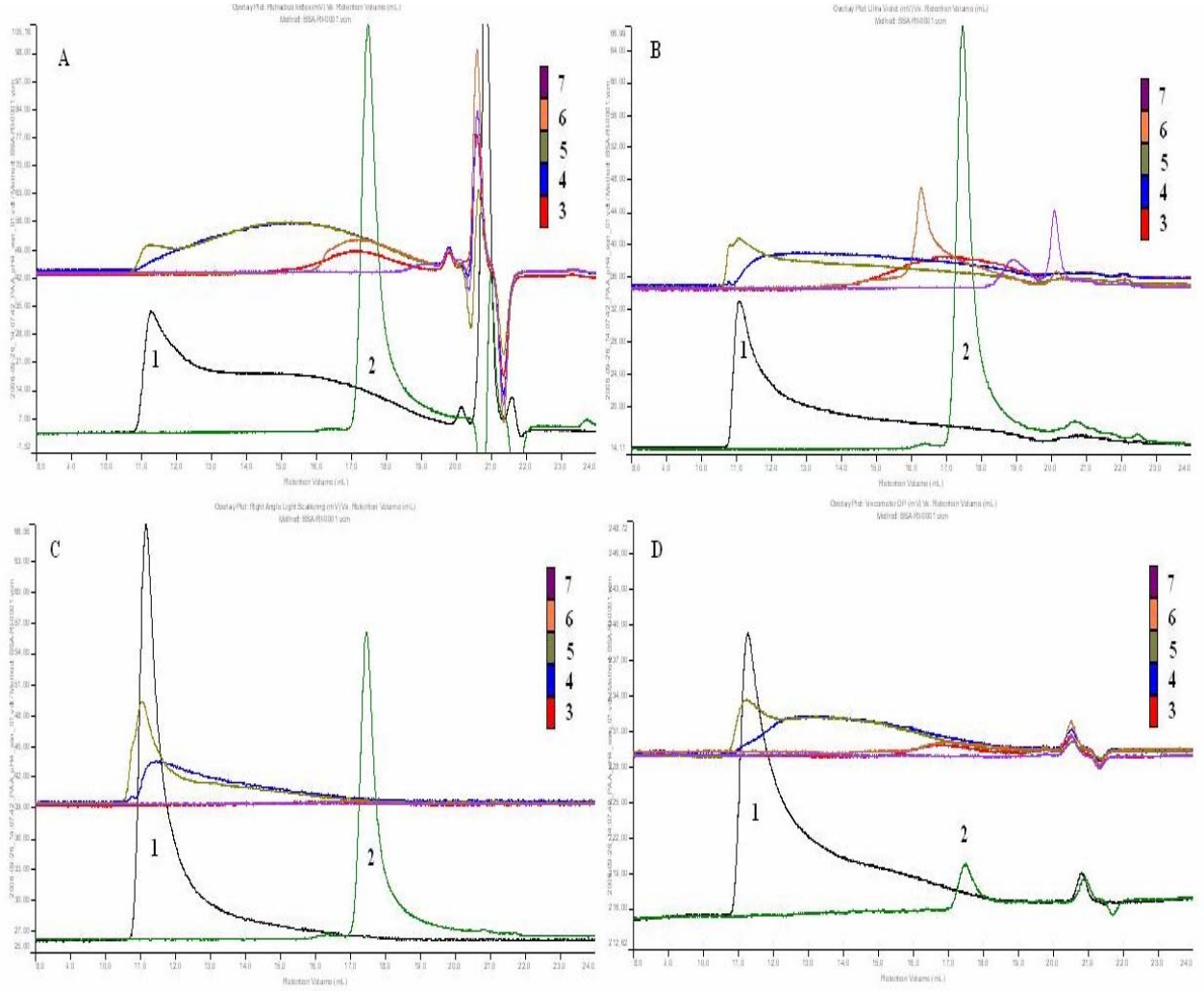
Şekil 5.14 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin GPC kromatogramları [Detektörler: RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 6,0; $T=25^{\circ}\text{C}$.



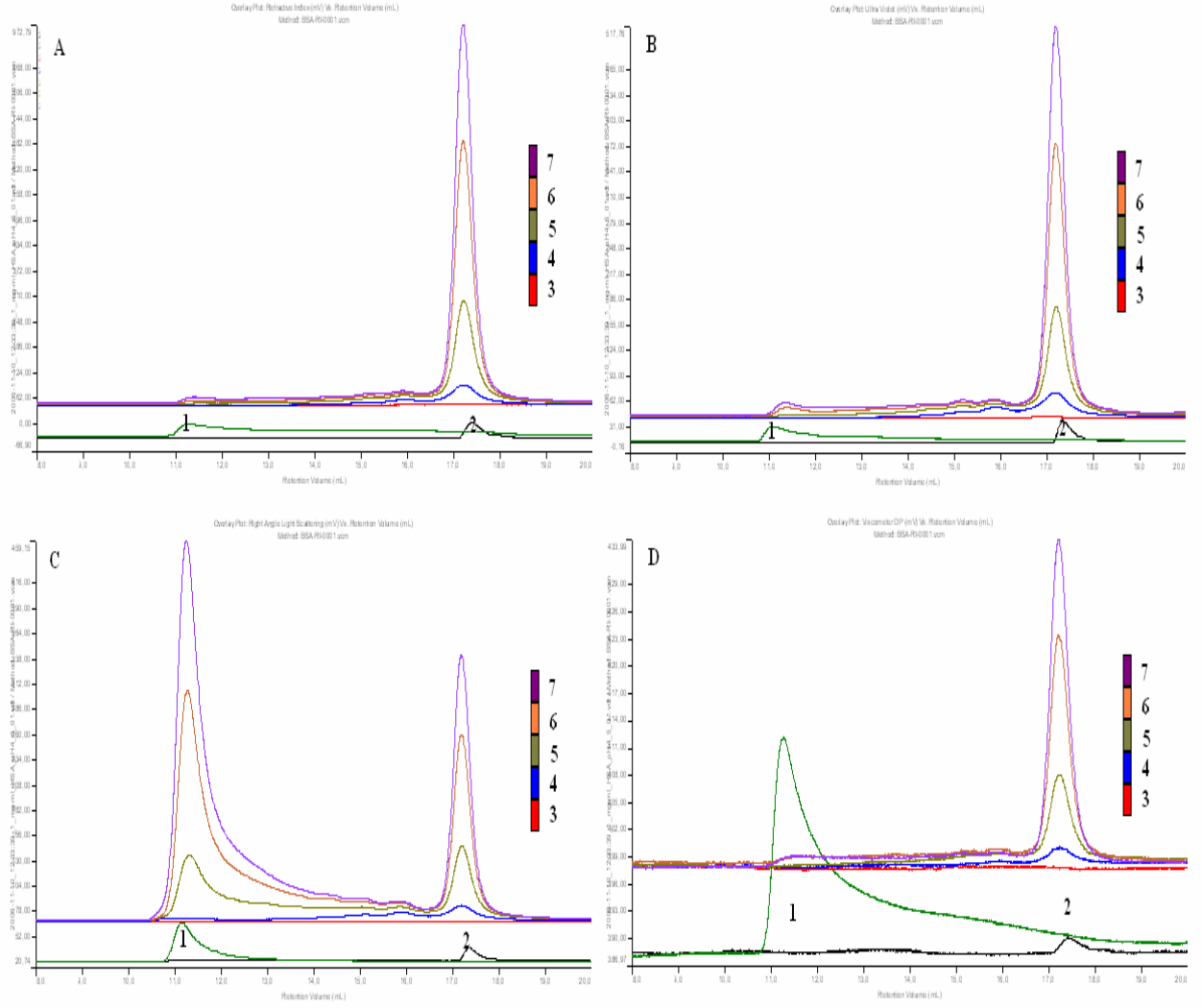
Şekil 5.15 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için n_{HSA}/n_{PAA} oranlarına karşılık gelen GPC kromotogramları.
 $C_{HSA} = 0,066\text{ mg/mL}$ (1); $0,33\text{ mg/mL}$ (2); $0,66\text{ mg/mL}$ (3); $3,3\text{ mg/mL}$ (4); $6,6\text{ mg/mL}$ (5).
 $\text{pH } 5,0$ $T=25^{\circ}\text{C}$.



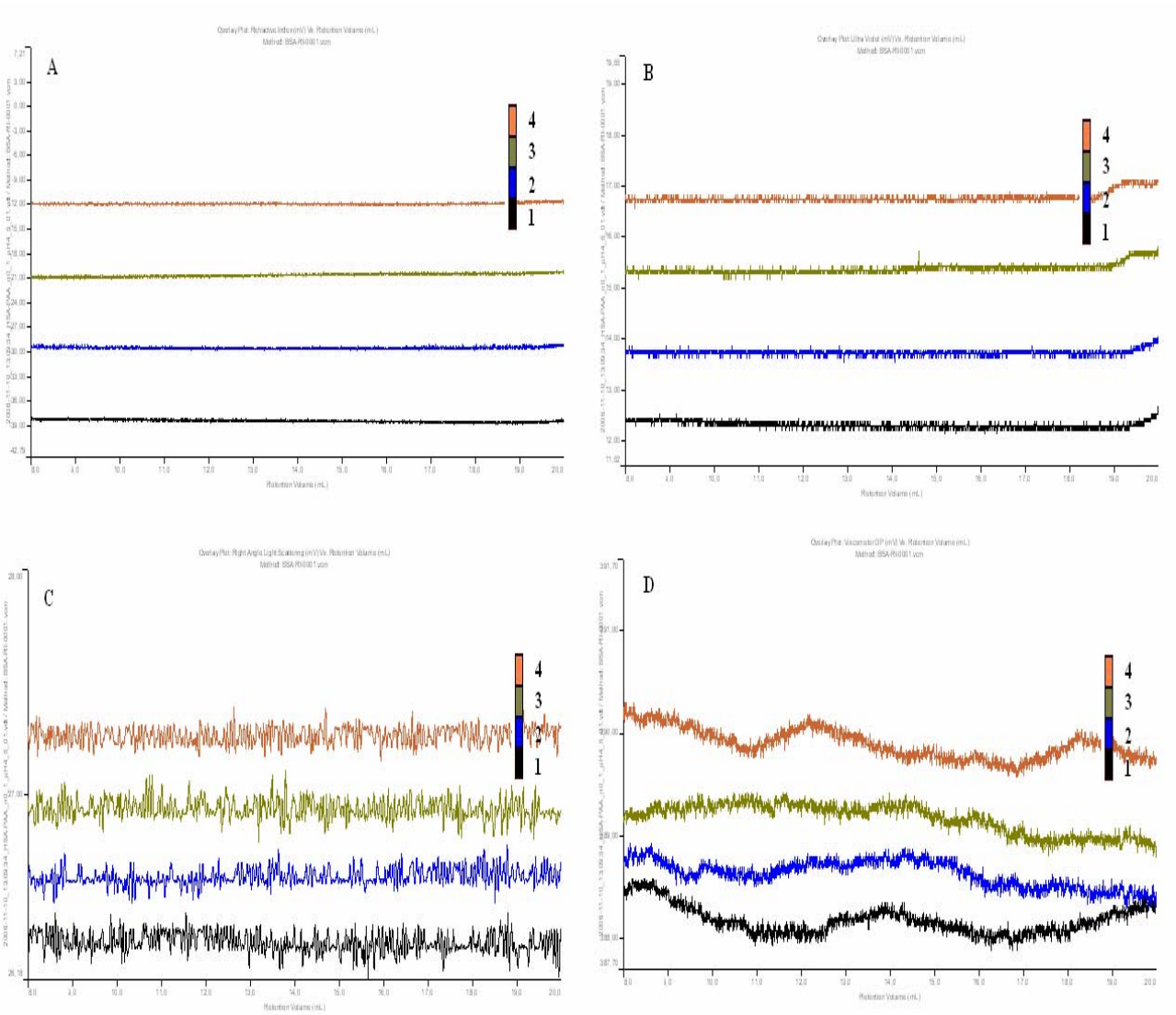
Şekil 5.16 $C_{\text{PAA}}=1\text{ mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin GPC kromatogramları [Detektörler: RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. PAA (1), HSA (2), $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 5,0; $T=25^\circ\text{C}$.



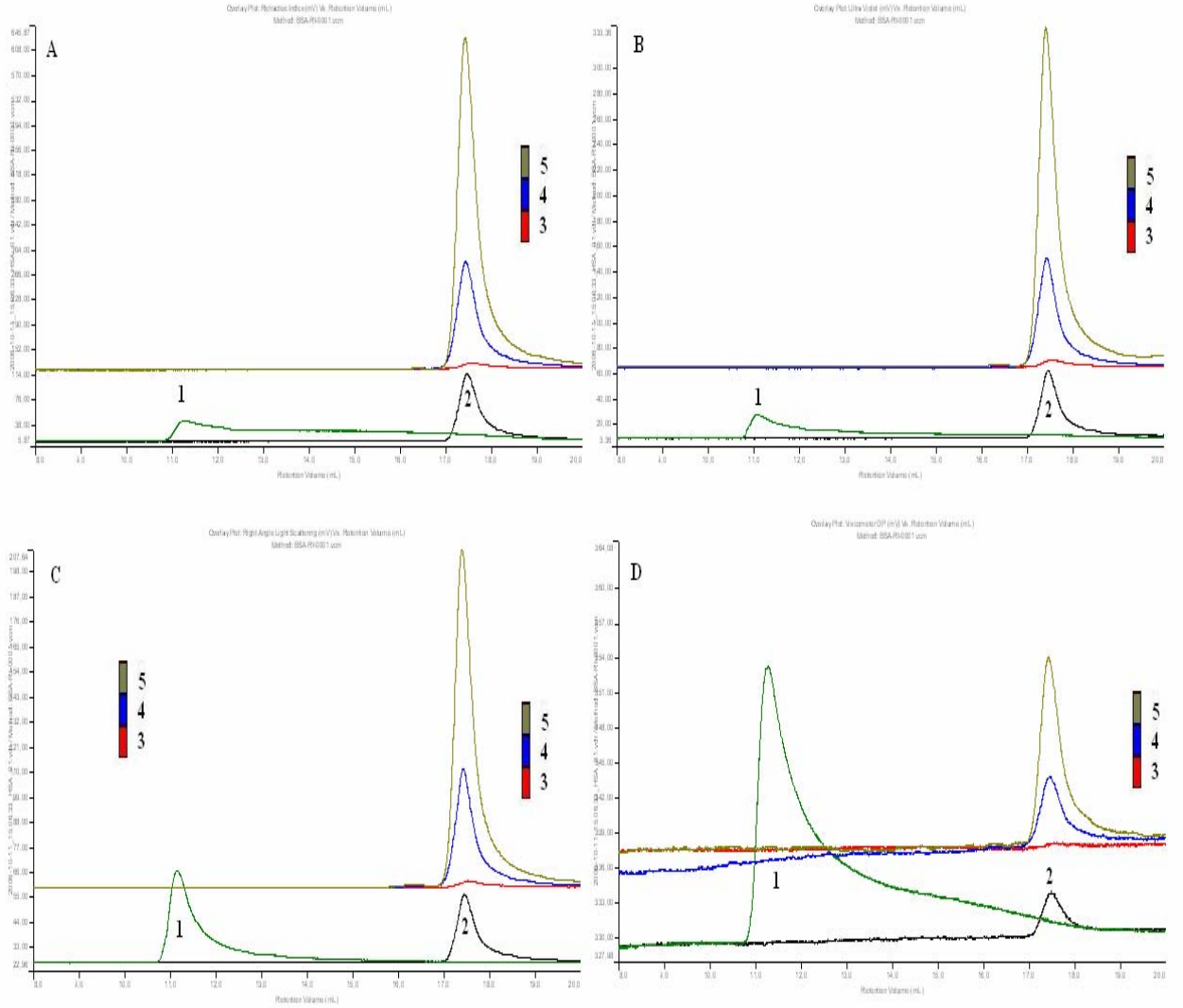
Şekil 5.17 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası dört detektörlü GPC kromatogramları [Detektörler: RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (3); 0,5 (4); 1,0 (5); 5,0 (6); 10 (7). pH 4,0; $T=25^{\circ}\text{C}$.



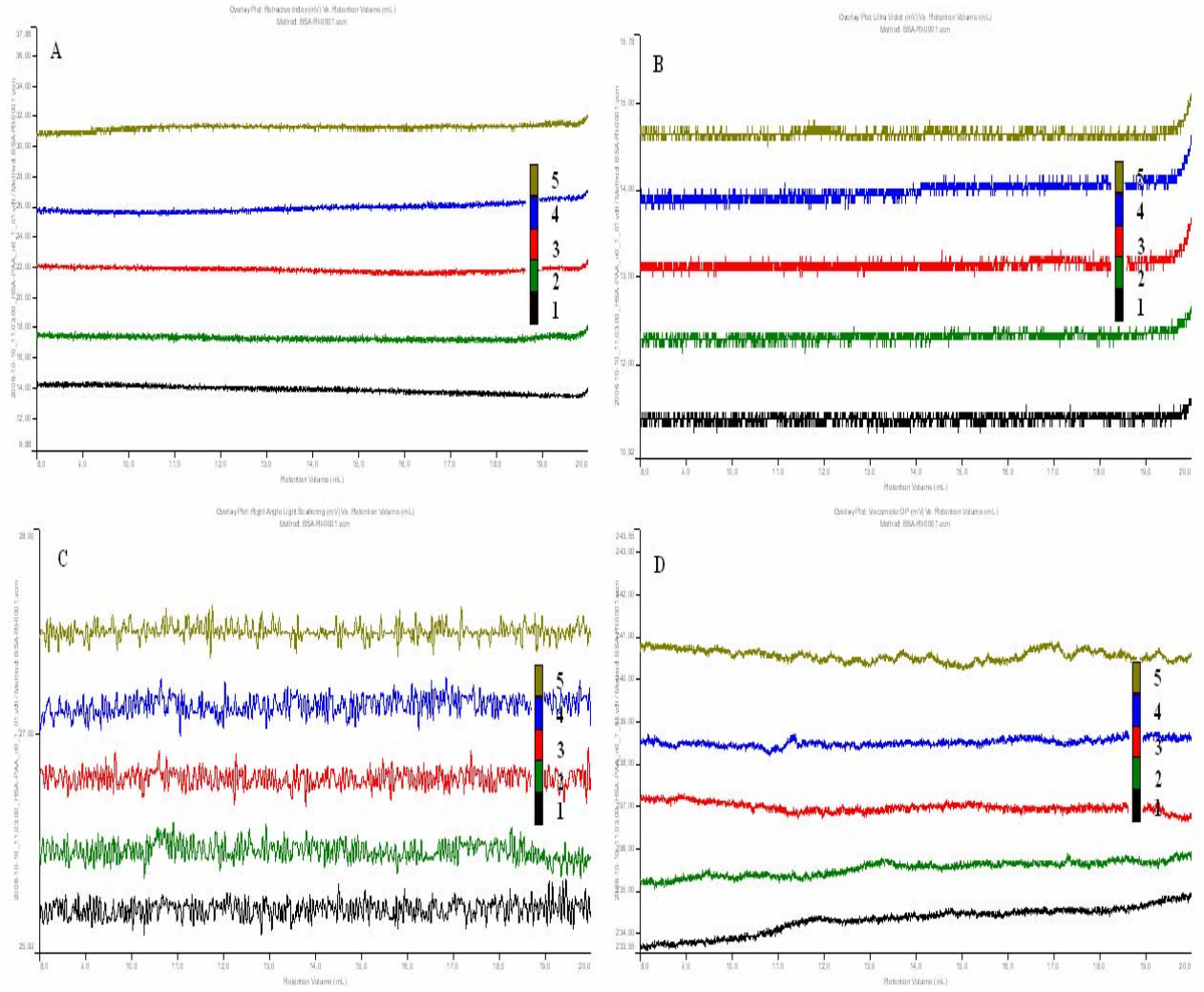
Şekil 5.18 $C_{\text{PAA}}=0,1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin santrifüj sonrası dört detektörlü GPC kromatogramları [(RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. PAA (1), HSA (2), $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=10$ (3); 30 (4); 50 (5); 80 (6); 100 (7). pH 4,5 $T=25^{\circ}\text{C}$.



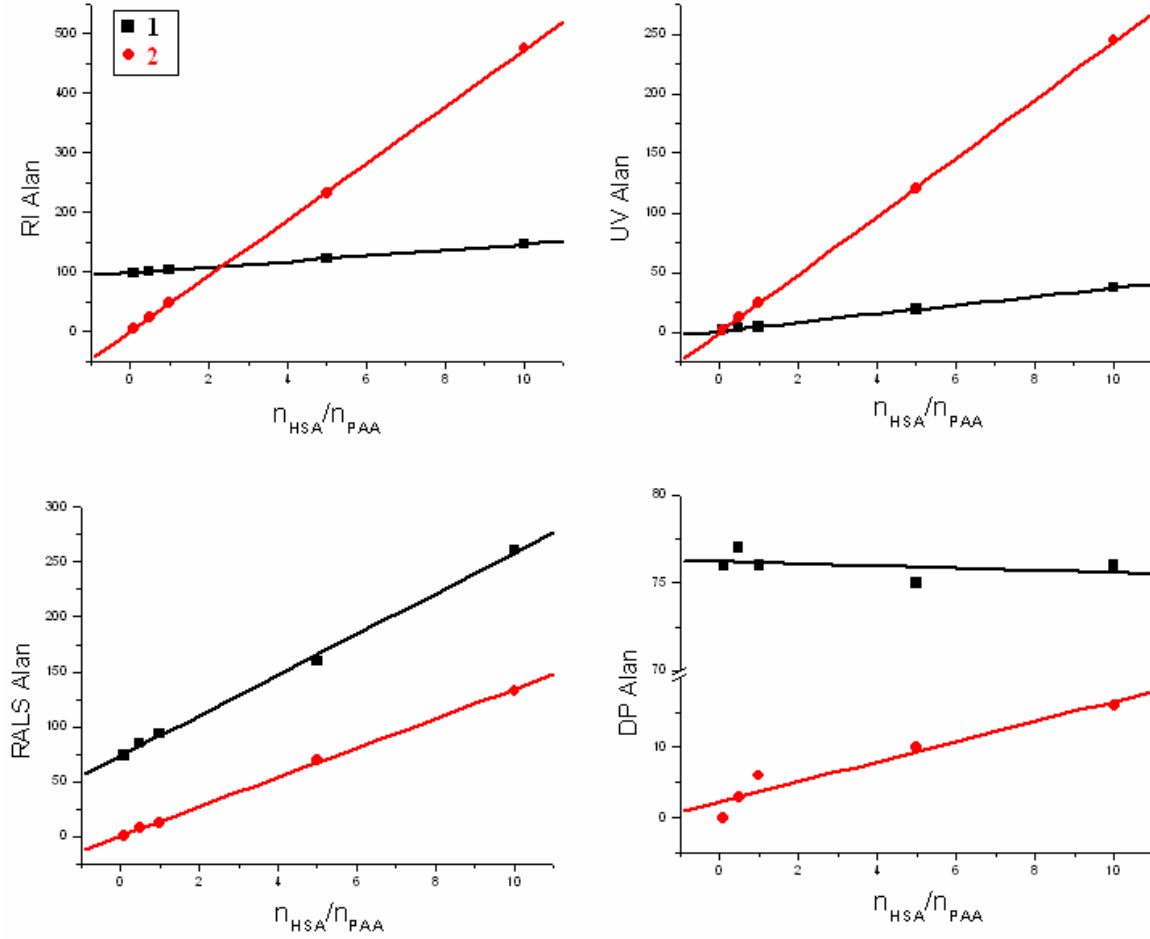
Şekil 5.19 $C_{\text{PAA}}=0,1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin santrifüj sonrası dört detektörlü GPC kromatogramları [(RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)].
 $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4). pH 4,5 T=25 °C.



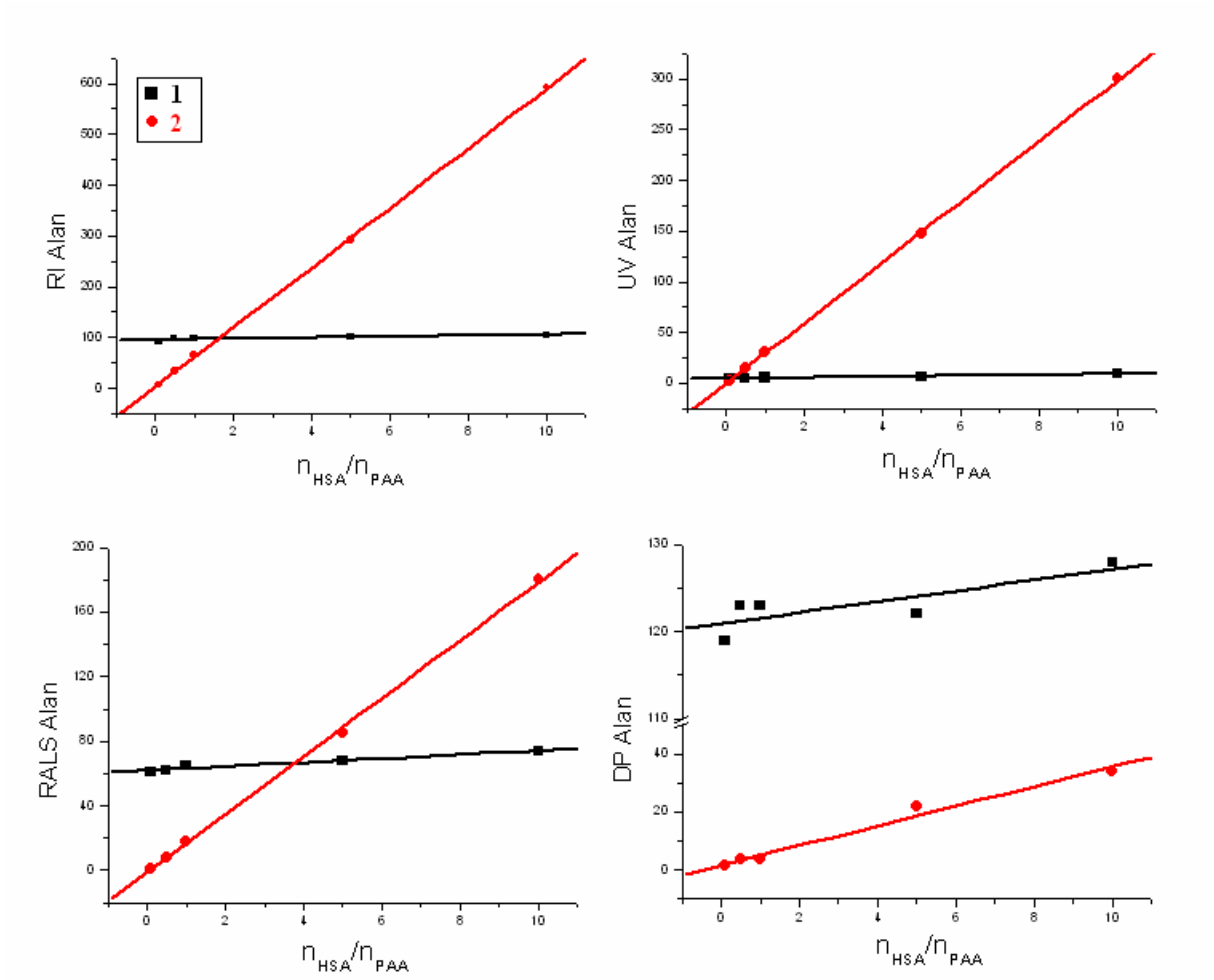
Şekil 5.20 $C_{PAA}=0,1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin santrifüj sonrası dört detektörlü GPC kromatogramları [(RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)]. PAA (1), HSA (2), $n_{HSA}/n_{PAA}=10$ (3); 30 (4); 50 (5); 80 (6); 100 (7). pH 4,0 $T=25^\circ\text{C}$.



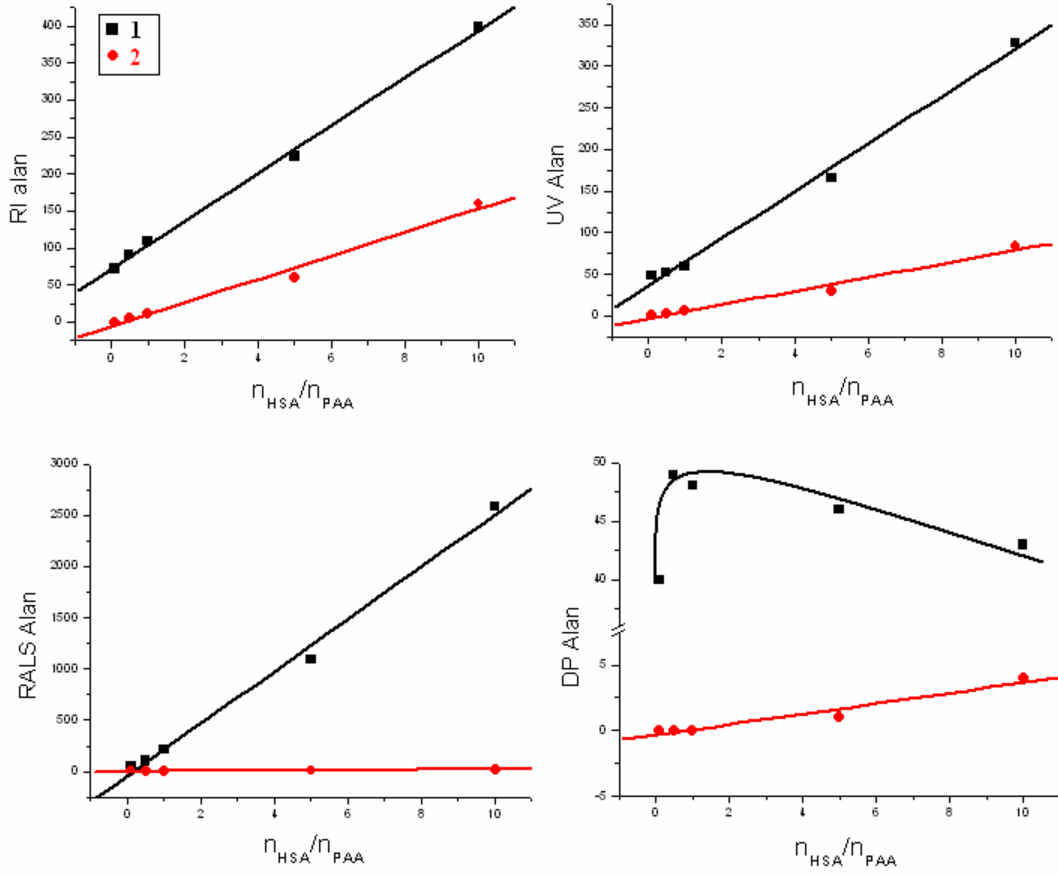
Şekil 5.21 $C_{\text{PAA}}=0,1$ mg/mL için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin santrifüj sonrası dört detektörlü GPC kromatogramları [RI (A); UV (B); RALS (C); DP (D)].
 $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4); 10 (5). pH 4,0 T=25 °C.



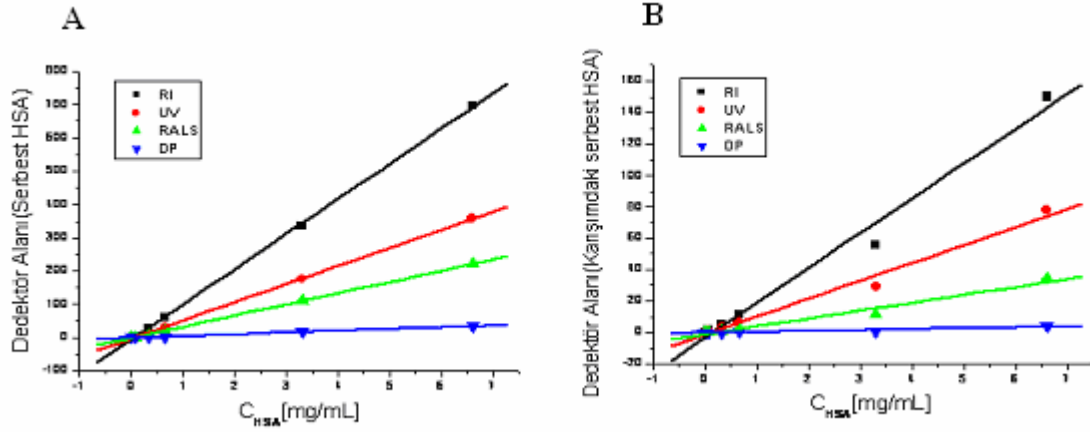
Şekil 5.22 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için GPC detektör alanlarının n_{HSA}/n_{PAA} oranına göre değişimi. (1) ile tanımlı PAA pikinin detektör alanları (■); (2) ile tanımlı HSA pikinin detektör alanları (●). pH 7,0 25 °C.



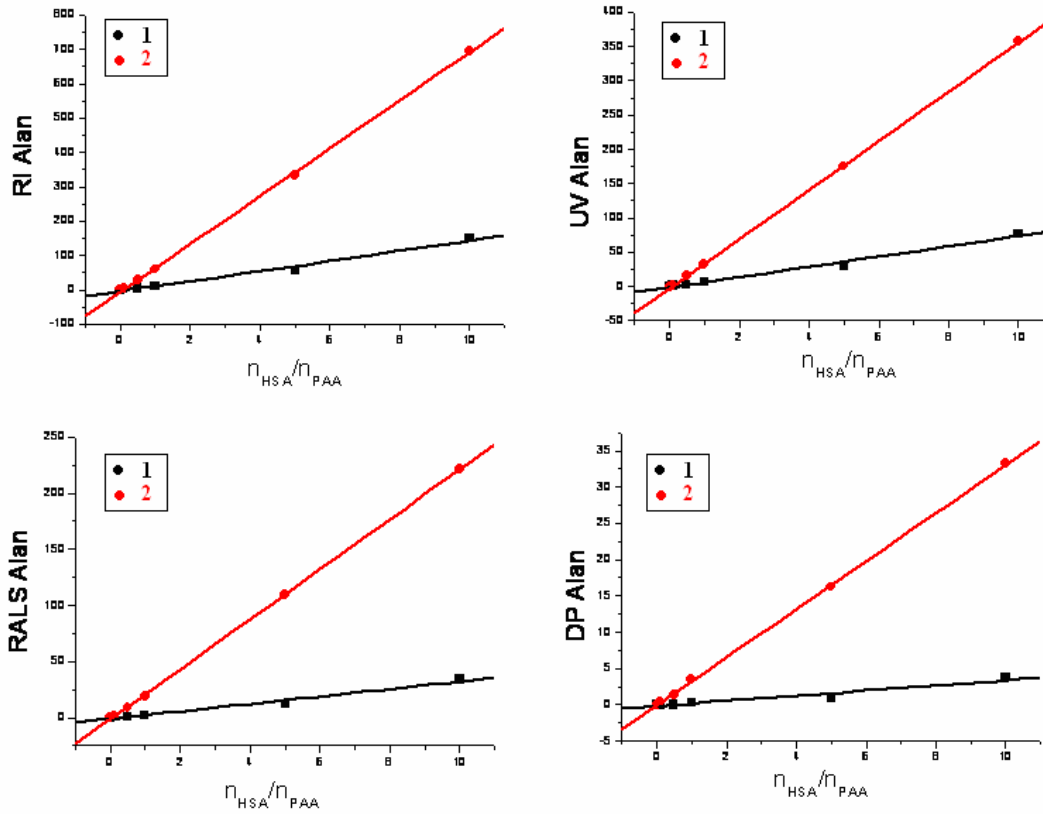
Şekil 5.23 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için GPC detektör alanlarının n_{HSA}/n_{PAA} oranına göre değişimi. (1) ile tanımlı PAA pikinin detektör alanları (■); (2) ile tanımlı HSA pikinin detektör alanları (●). pH 6,0 25 °C.



Şekil 5.24 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için GPC detektör alanlarının n_{HSA}/n_{PAA} oranına göre değişimi. (1) ile tanımlı PAA pikinin detektör alanları (■); (2) ile tanımlı HSA pikinin detektör alanları (●). pH 5,0 25 °C.



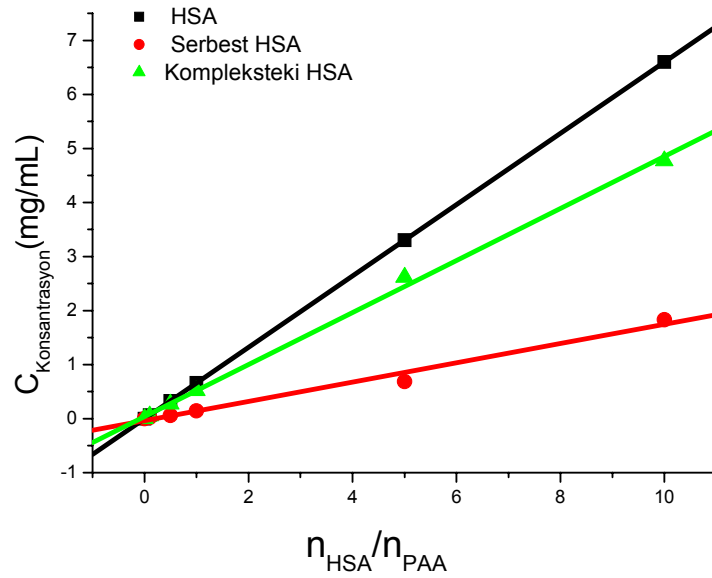
Şekil 5.25 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için n_{HSA}/n_{PAA} oranlarına karşılık gelen serbest HSA ve HSA-PAA karışımındaki serbest HSA konsantrasyonlarının GPC kromatogram alanlarının farklı detektörlerdeki grafikleri. $C_{HSA} = 0,066\text{mg/mL}$ (1); $0,33\text{mg/mL}$ (2); $0,66\text{mg/mL}$ (3); $1,98\text{mg/mL}$ (4); $1,32\text{mg/mL}$ (5). pH 5,0 $T=25^\circ\text{C}$.



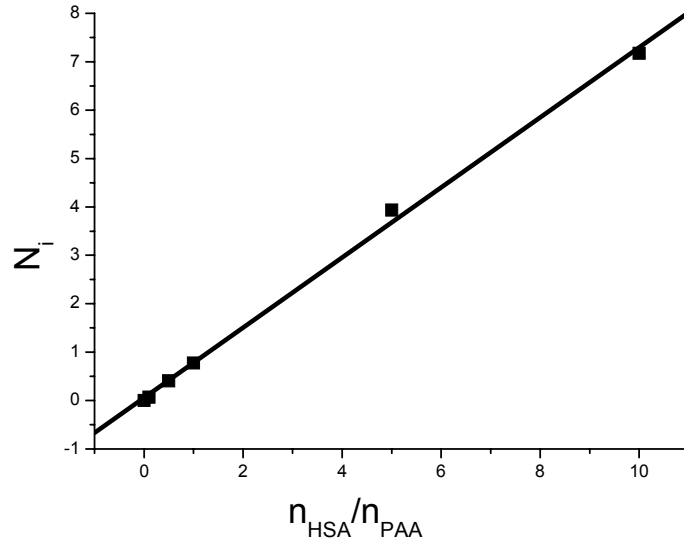
Şekil 5.26 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için n_{HSA}/n_{PAA} oranlarına karşılık gelen HSA-PAA karışımındaki serbest HSA (1) ve serbest HSA (2) konsantrasyonlarının GPC kromatogram alanlarının farklı detektörlerdeki alanlarının karşılaştırılması. $C_{HSA} = 0,066\text{mg/mL}$ ($n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$); $0,33\text{mg/mL}$ ($n_{HSA}/n_{PAA}=0,5$); $0,66\text{mg/mL}$ ($n_{HSA}/n_{PAA}=1,0$); $1,98\text{mg/mL}$ ($n_{HSA}/n_{PAA}=5,0$); $1,32\text{mg/mL}$ ($n_{HSA}/n_{PAA}=10$). pH 5,0 $T=25^\circ\text{C}$.

Tablo 5-1 pH5,0’da serbest HSA, komplekse girmiş HSA ve HSA-PAA karışımında serbest kalan HSA’nın konsantrasyonları ve bu değerlerden bulunan N_i (Bir polimer zincirine bağlanan HSA sayısı).

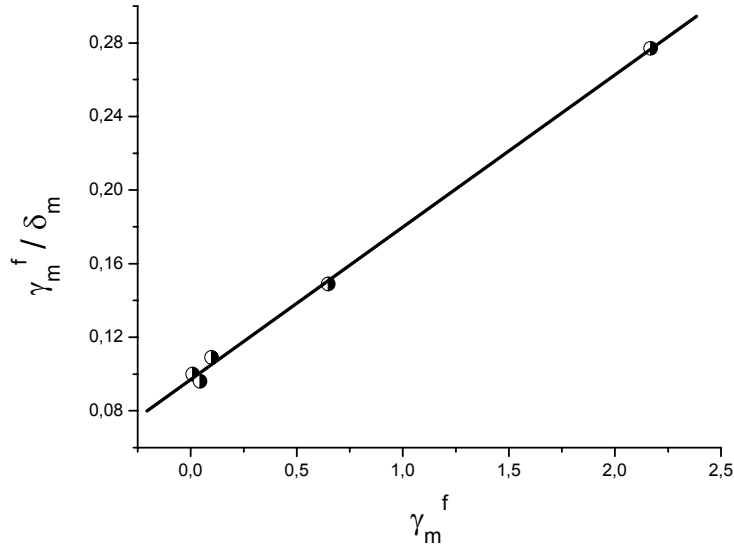
Oran	C_{HSA}	$C_{Serbest\ HSA}$	$C_{Bağlı\ HSA}$	N_i
0	0	0	0	0
0,1	0,066	0,019	0,047	0,0707
0,5	0,33	0,06	0,27	0,407
1	0,66	0,143	0,517	0,777
5	3,3	0,684	2,616	3,935
10	6,6	1,832	4,768	7,172



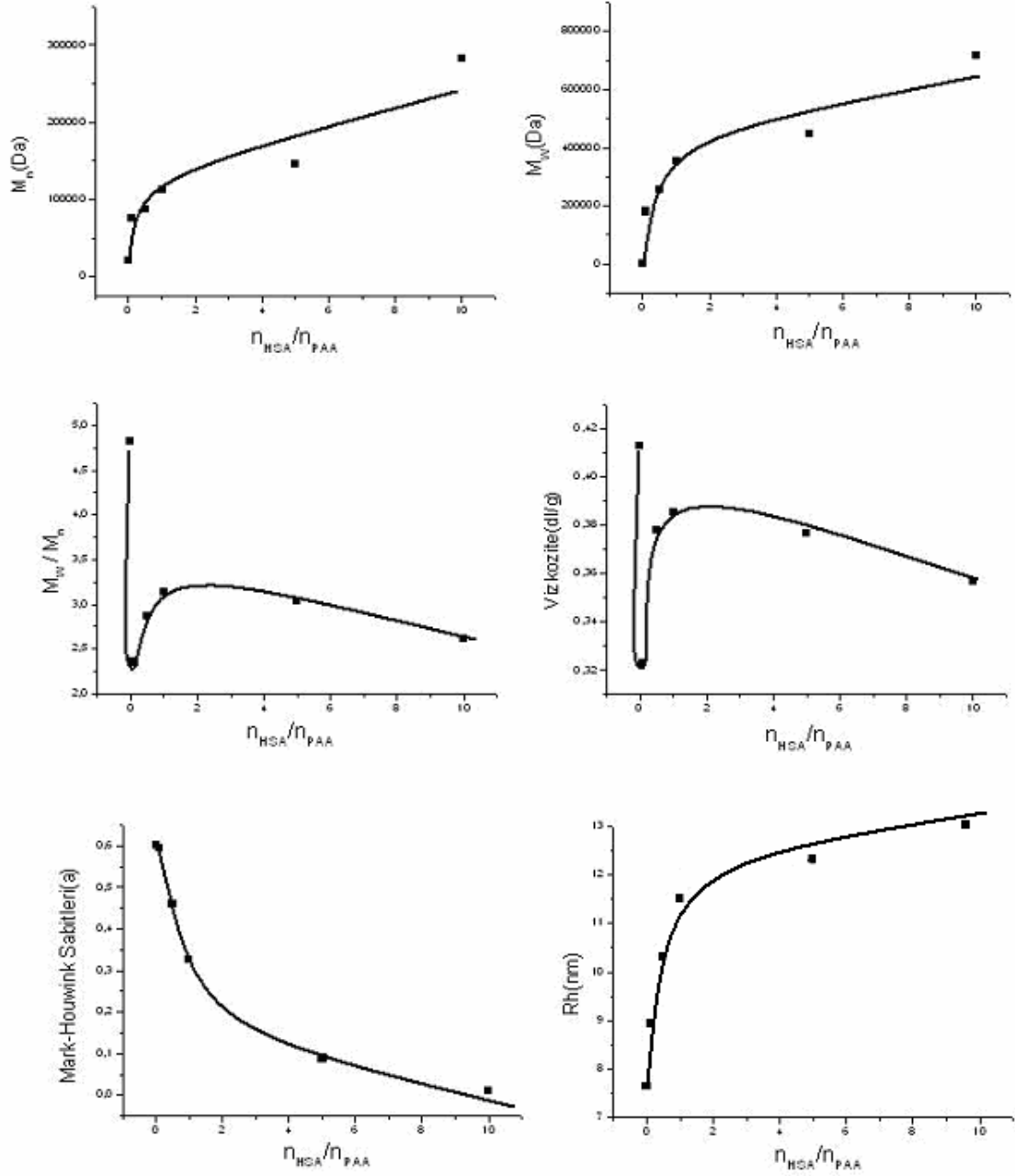
Şekil 5.27 $C_{PAA}=1\text{ mg/mL}$ için n_{HSA}/n_{PAA} oranlarına karşılık gelen HSA-PAA karışımındaki serbest HSA (●), serbest HSA (■) ve kompleks içerisindeki HSA (▲) konsantrasyonları. pH 5,0 $T=25^{\circ}\text{C}$.



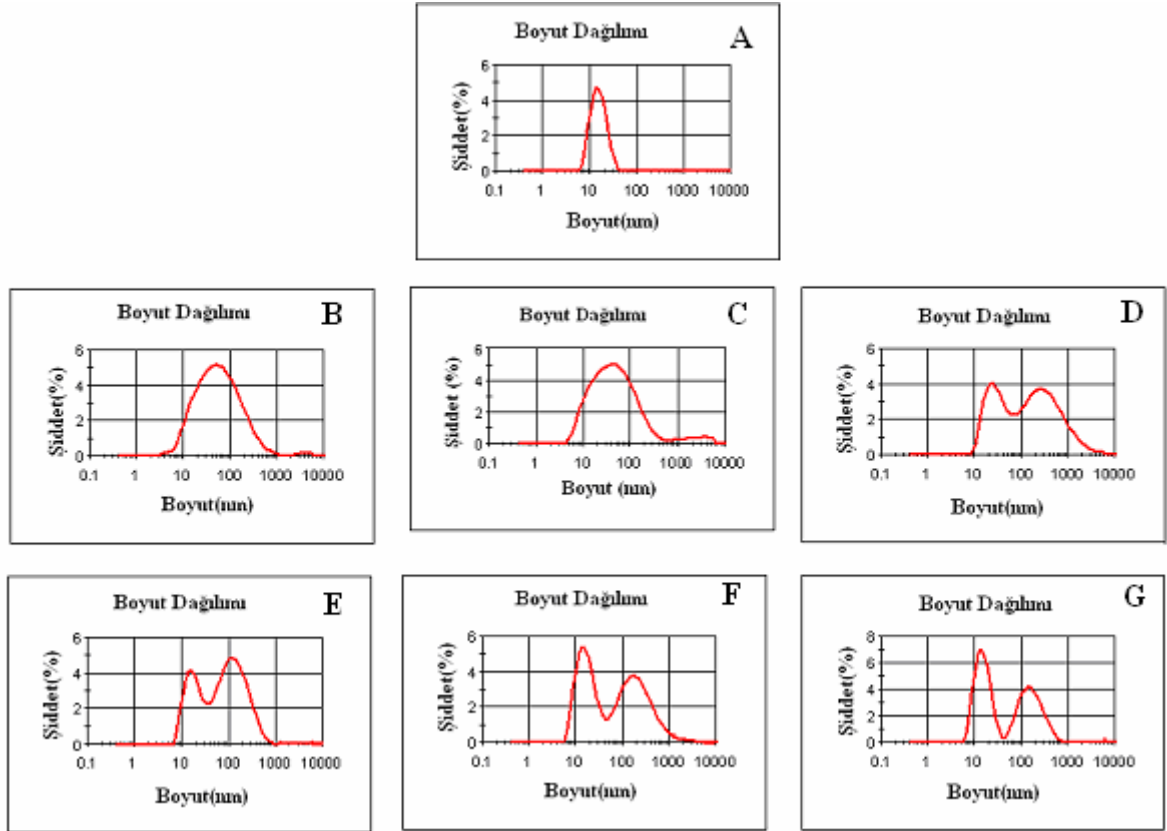
Şekil 5.28 $C_{\text{PAA}}=1\text{mg/mL}$ için $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarına karşılık gelen bir PAA zincirine katılan HSA molekülü sayısı (N_i). pH 5,0, $T=25^\circ\text{C}$.



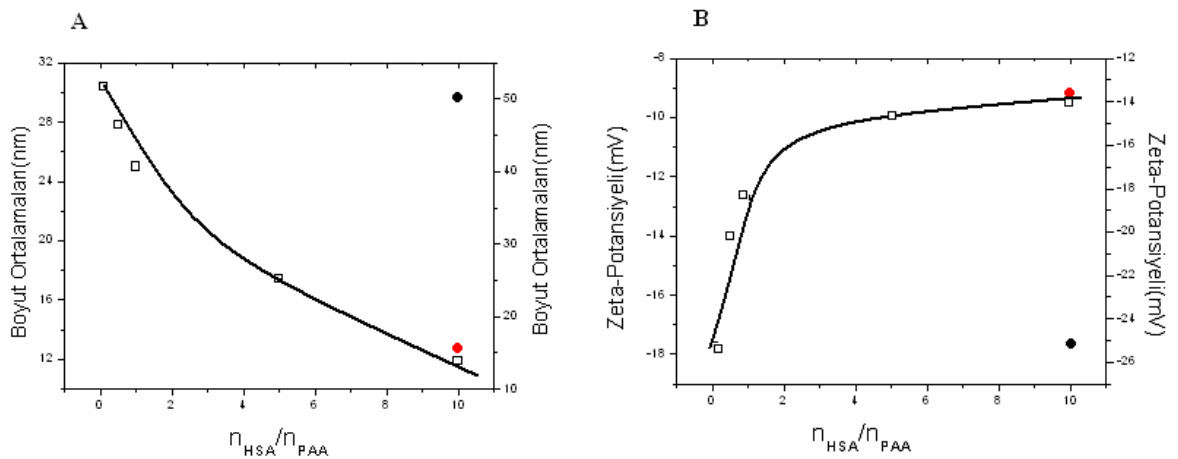
Şekil 5.29 γ_m^f / δ_m 'in γ_m^f göre değişimi. γ_m^f , HSA-PAA karışımı içerisinde serbest kalan HSA'nın PAA'ya mol kesri; δ_m , HSA-PAA karışımında polikompleks içine dahil olan HSA'nın PAA'ya mol kesri. pH 5,0 25°C



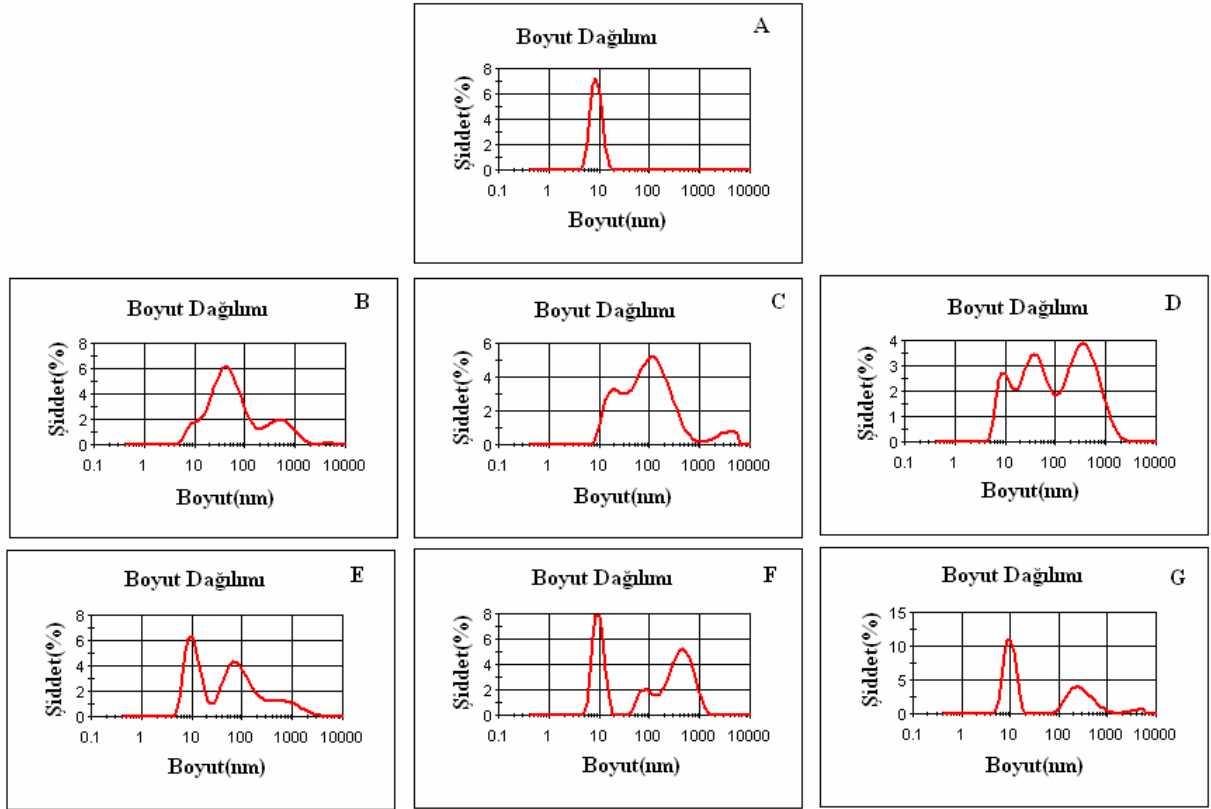
Şekil 5.30 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için n_{HSA}/n_{PAA} oranlarında etkileşen HSA-PAA komplekslerinin fiziko-kimyasal özelliklerinin grafik gösterimleri. $n_{HSA}/n_{PAA}=0$ (PAA). pH5,0 T=25 °C



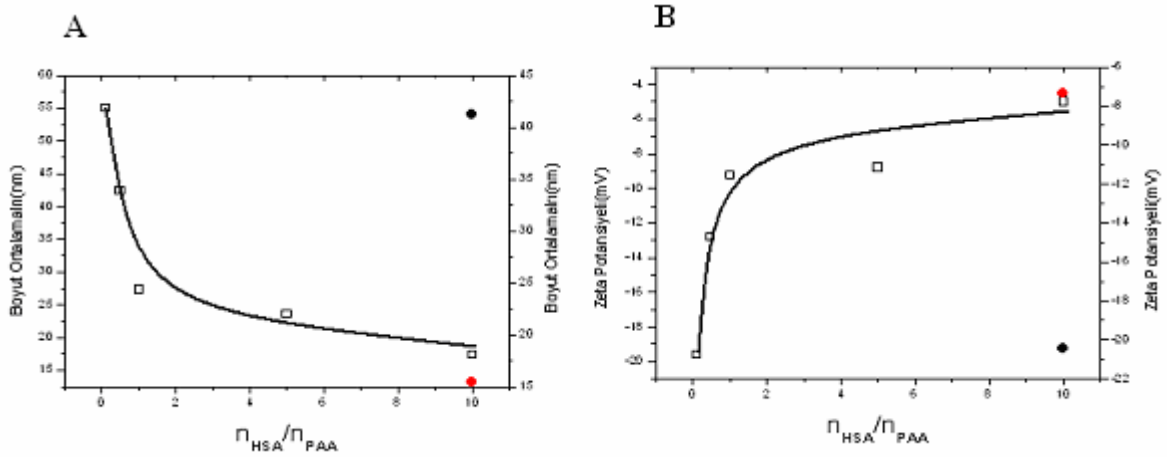
Şekil 5.31 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin boyut dağılımları. HSA (A), PAA (B), $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (C); 0,5 (D); 1,0 (E); 5,0 (F); 10 (G). pH 7,0; $T=25^\circ\text{C}$.



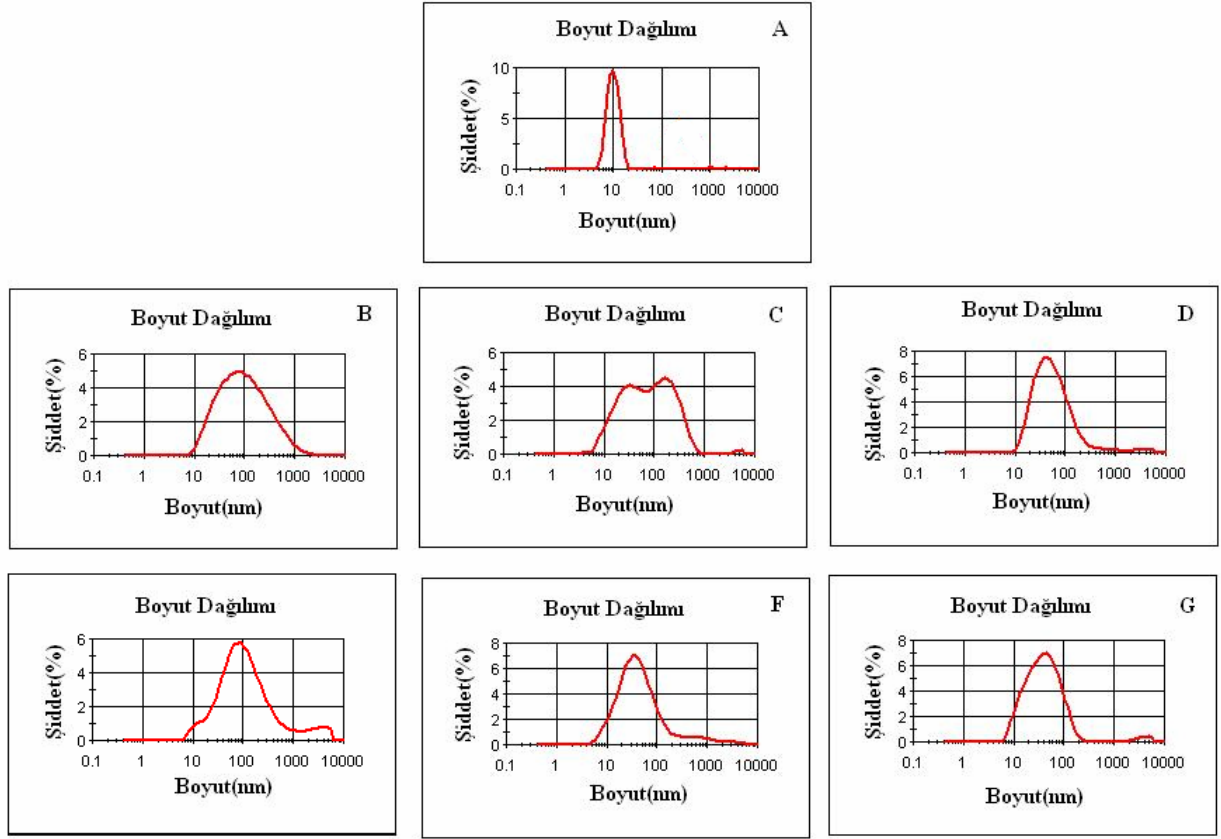
Şekil 5.32 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin (A) Boyut ortalamaları (B) Zeta potansiyelleri. HSA (●); PAA (●); $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$; 0,5; 1,0; 5,0; 10. pH 7,0; $T=25^\circ\text{C}$.



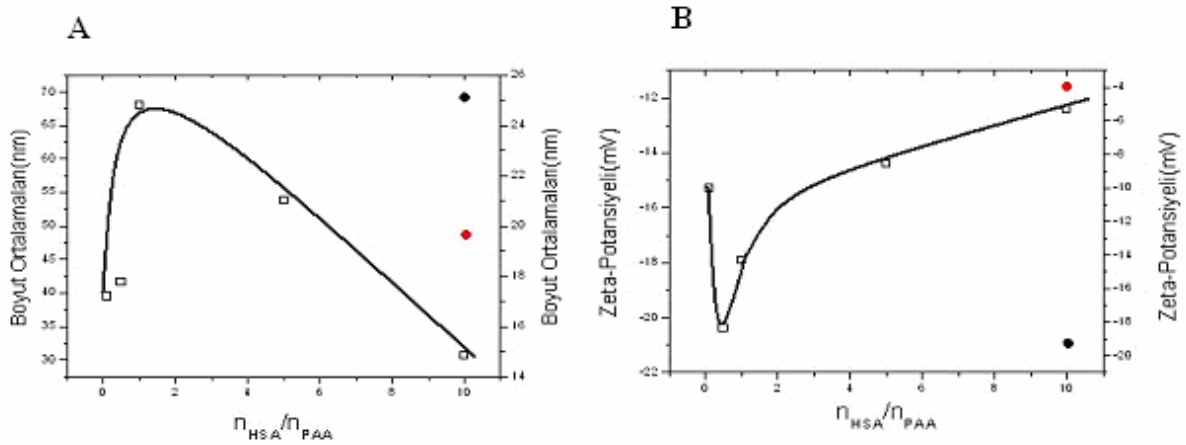
Şekil 5.33 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin (A) Boyut ortalamaları (B) Zeta potansiyelleri. HSA (●); PAA (●); $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (C); 0,5 (D); 1,0 (E); 5,0 (F); 10 (G). pH 6,0; $T=25^\circ\text{C}$.



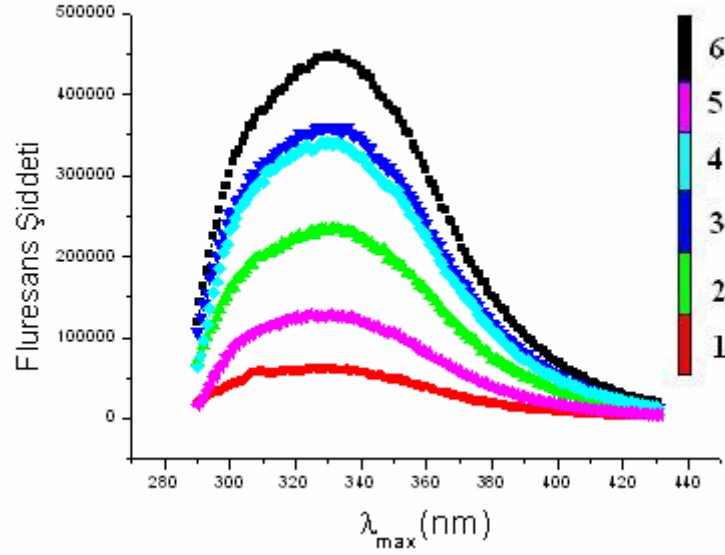
Şekil 5.34 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin (A) Boyut ortalamaları (B) Zeta potansiyelleri. HSA (●); PAA (●); $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$; 0,5; 1,0; 5,0; 10. pH 6,0; $T=25^\circ\text{C}$.



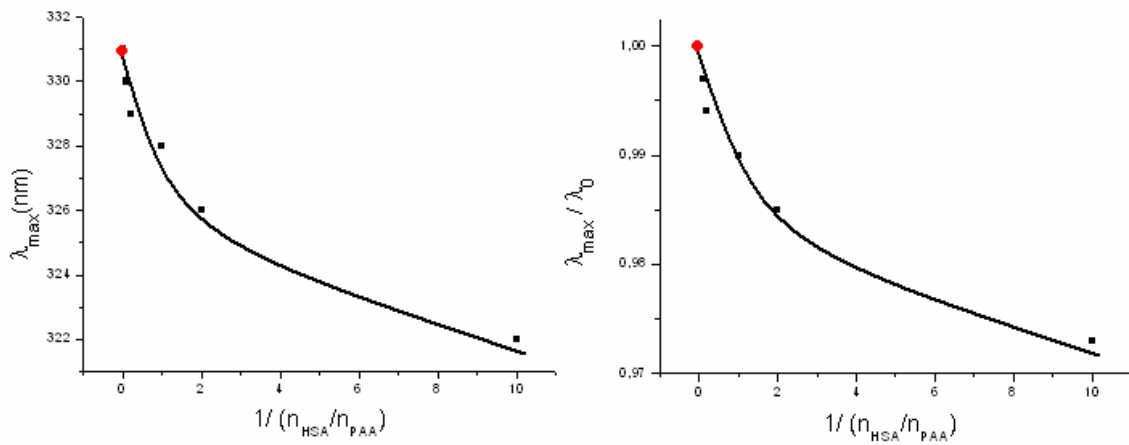
Şekil 5.35 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin (A) Boyut ortalamaları (B) Zeta potansiyelleri. HSA (●); PAA (●); $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (C); 0,5 (D); 1,0 (E); 5,0 (F); 10 (G). pH 5,0; $T=25^\circ\text{C}$.



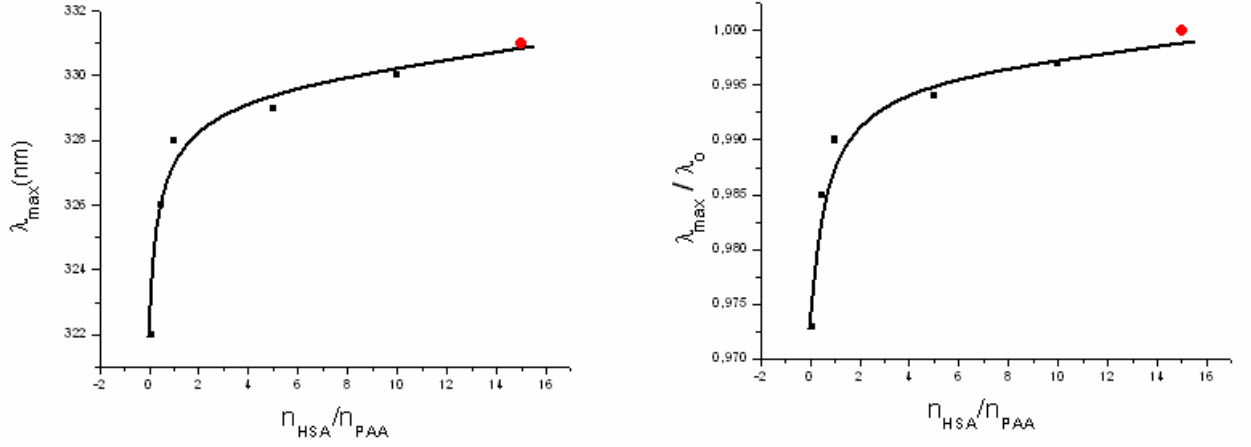
Şekil 5.36 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin (A) Boyut ortalamaları (B) Zeta potansiyelleri. HSA (●); PAA (●); $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$; 0,5; 1,0; 5,0; 10. pH 5,0; $T=25^\circ\text{C}$



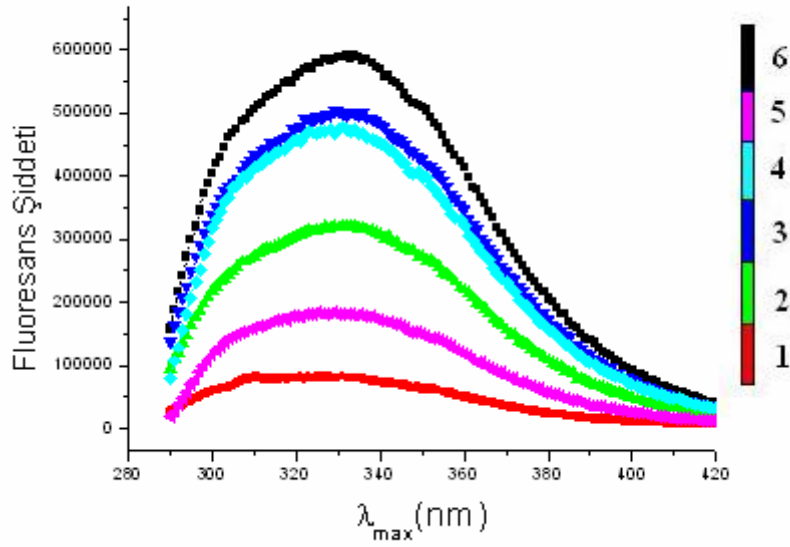
Şekil 5.37 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin flüoresans şiddetinin $\lambda_{\max}$ ile değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4); 10 (5); HSA (6). pH 7,0 $T=25^\circ\text{C}$.



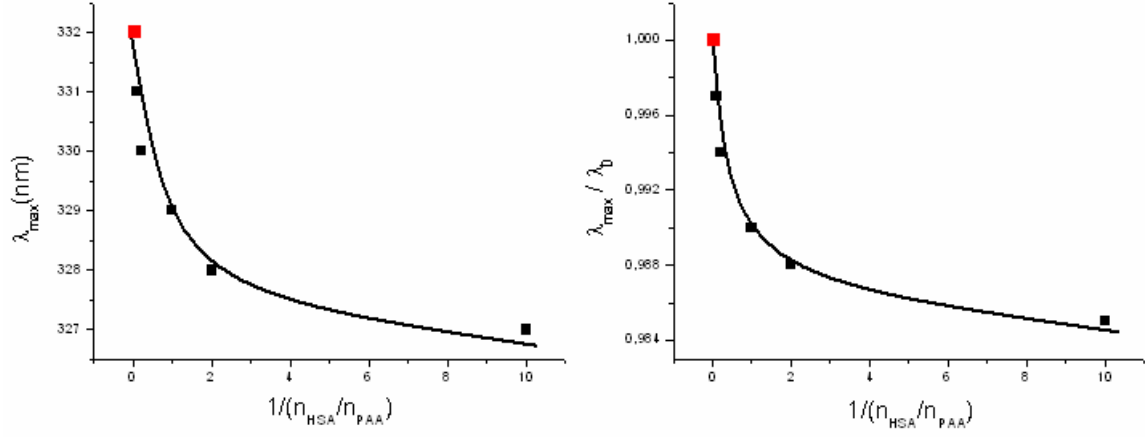
Şekil 5.38 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin $1/(n_{HSA}/n_{PAA})$ oranına karşı $\lambda_{\max}$ ve $\lambda_{\max}/\lambda_0$ değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$; 0,5; 1,0; 5,0; 10; (●)HSA. pH 7,0 $T=25^\circ\text{C}$



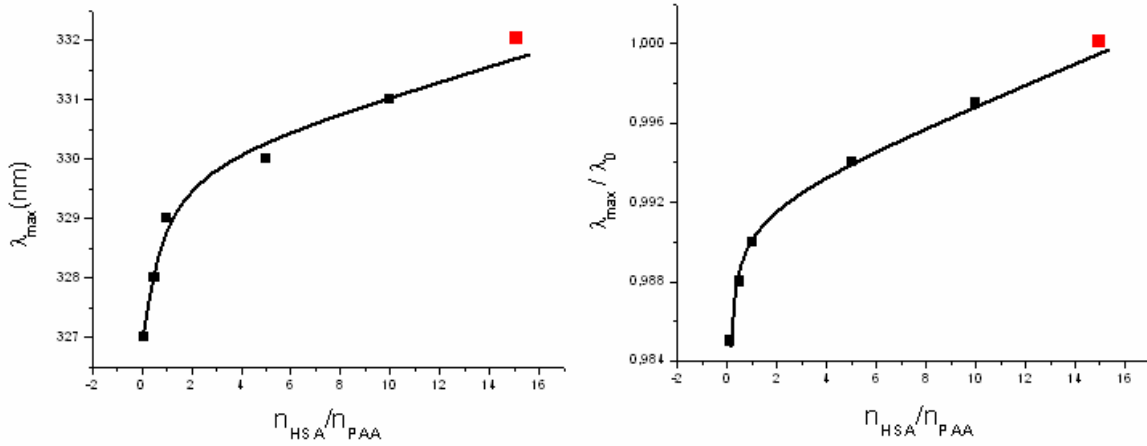
Şekil 5.39 $C_{\text{PAA}}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin $\lambda_{\max}$ ve $\lambda_{\max} / \lambda_0$ değişimi. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10;$ (●) HSA. pH 7,0 $T=25^\circ\text{C}$.



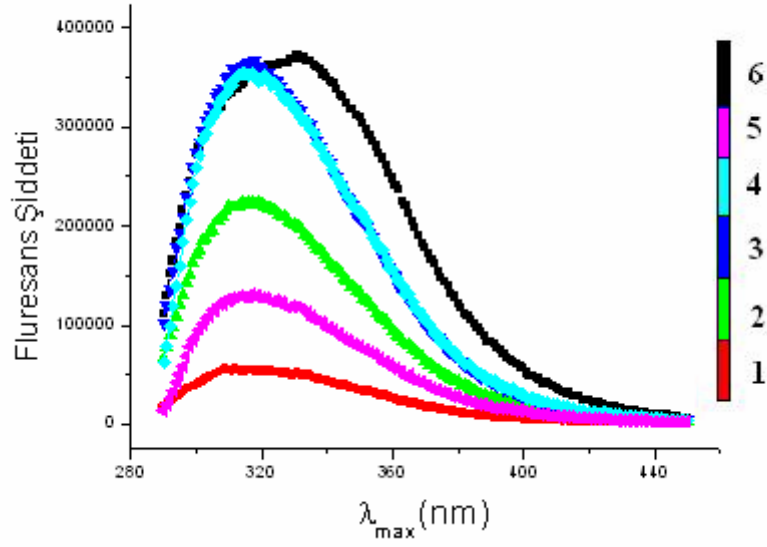
Şekil 5.40 $C_{\text{PAA}}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin flüoresans şiddetinin $\lambda_{\max}$ ile değişimi. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4); 10 (5); HSA(6). pH 6,0 $T=25^\circ\text{C}$.



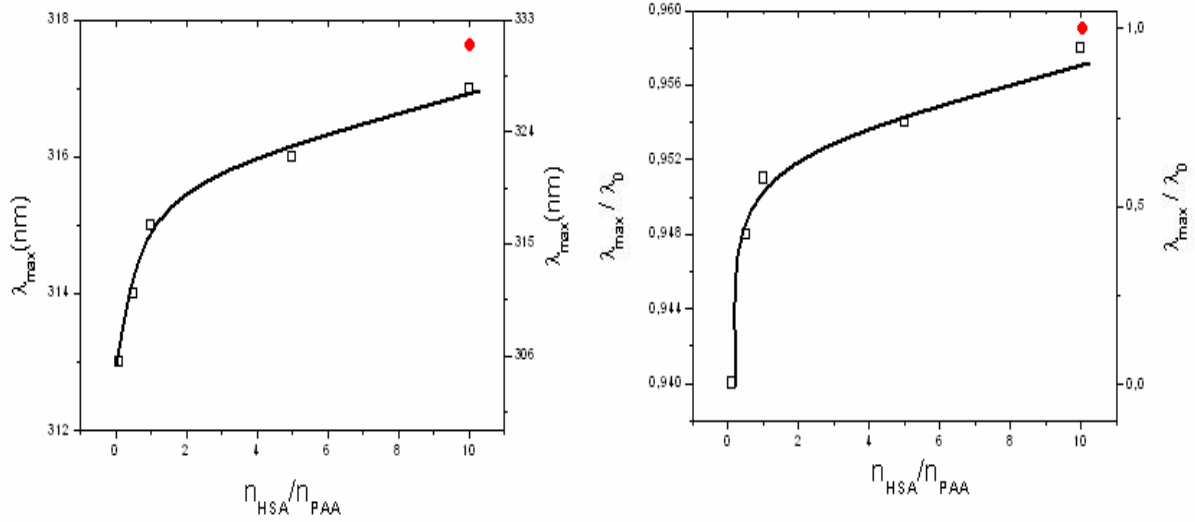
Şekil 5.41 $C_{\text{PAA}}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin $1/(n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}})$ oranına karşı $\lambda_{\max}$ ve $\lambda_{\max} / \lambda_0$ değişimi. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10;$ (■) HSA. pH 6,0 $T=25^\circ\text{C}$.



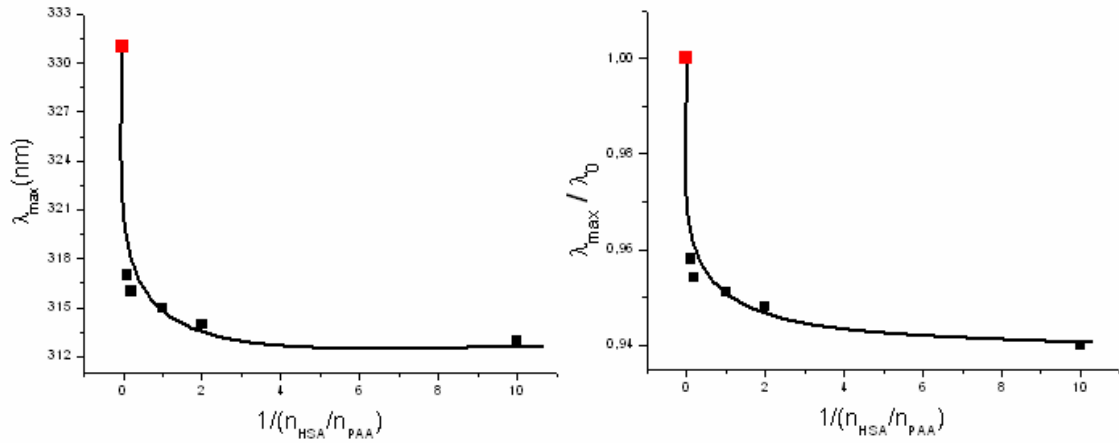
Şekil 5.42 $C_{\text{PAA}}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin $\lambda_{\max}$ ve $\lambda_{\max} / \lambda_0$ değişimi. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10;$ (■) HSA. pH 6,0 $T=25^\circ\text{C}$.



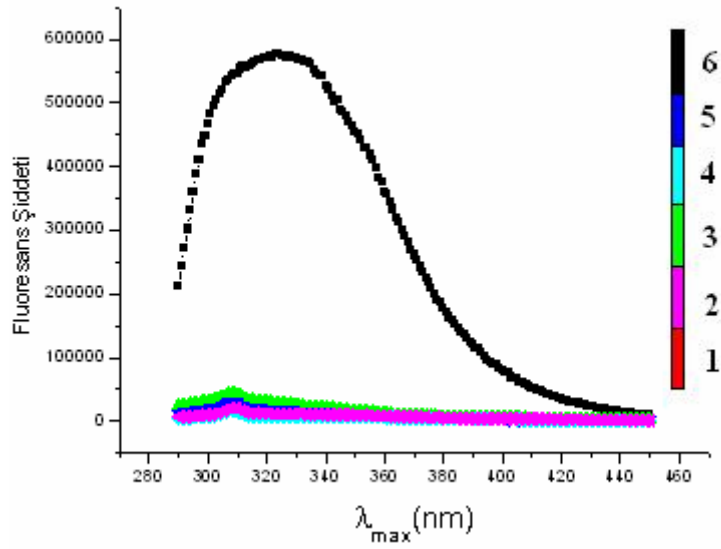
Şekil 5.43 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin flüoresans şiddetinin λ_{max} ile değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4); 10 (5); HSA (6). pH 5,0 $T=25^\circ\text{C}$



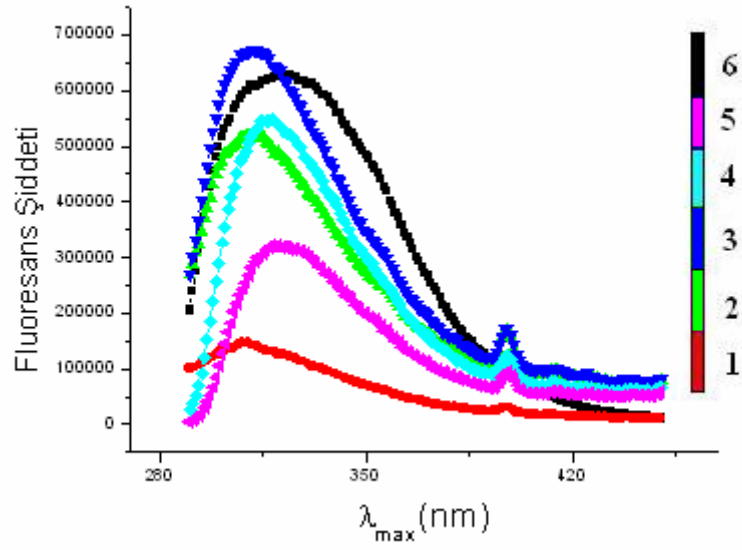
Şekil 5.44 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin λ_{max} ve λ_{max}/λ_0 değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$; 0,5; 1,0; 5,0; 10; (●) HSA. pH 5,0 $T=25^\circ\text{C}$.



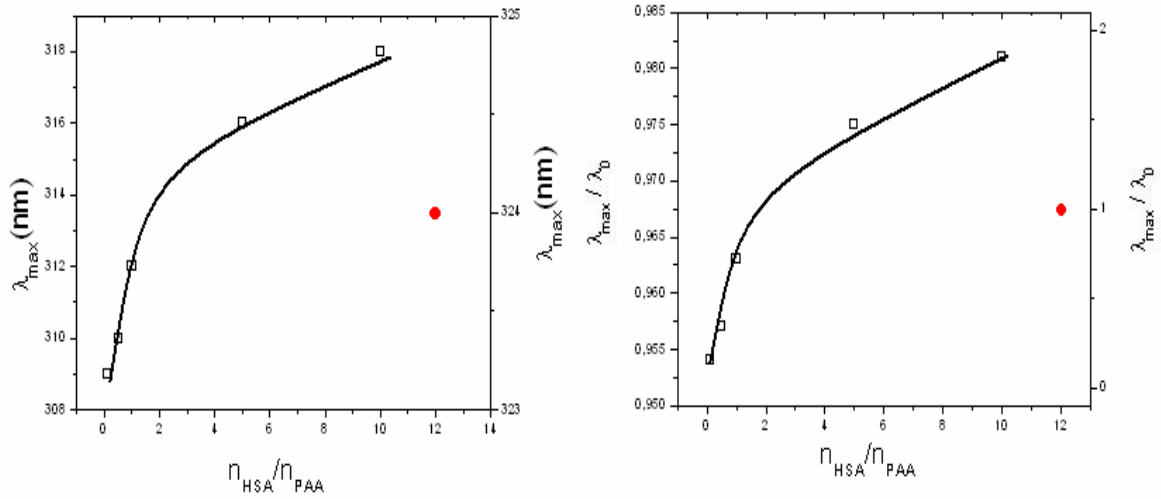
Şekil 5.45 $C_{\text{PAA}}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin $1/(n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}})$ oranına karşı $\lambda_{\max}$ ve $\lambda_{\max} / \lambda_0$ değişimi. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10;$ (■) HSA. pH 5,0 $T=25^\circ\text{C}$



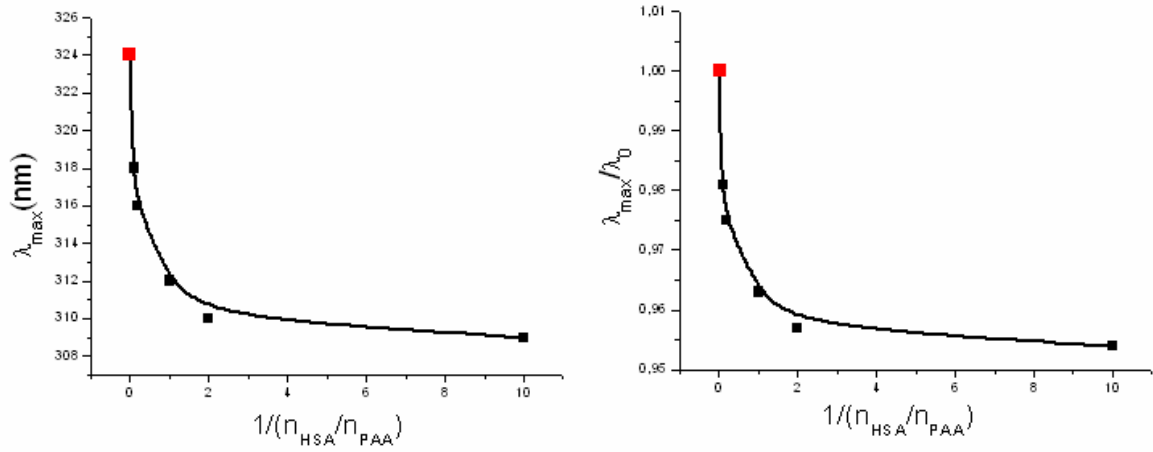
Şekil 5.46 $C_{\text{PAA}}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ çözeltilerinin üst fazlarının flüoresans şiddetinin $\lambda_{\max}$ ile değişimi. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4); 10 (5); HSA (6). pH 4,0 $T=25^\circ\text{C}$.



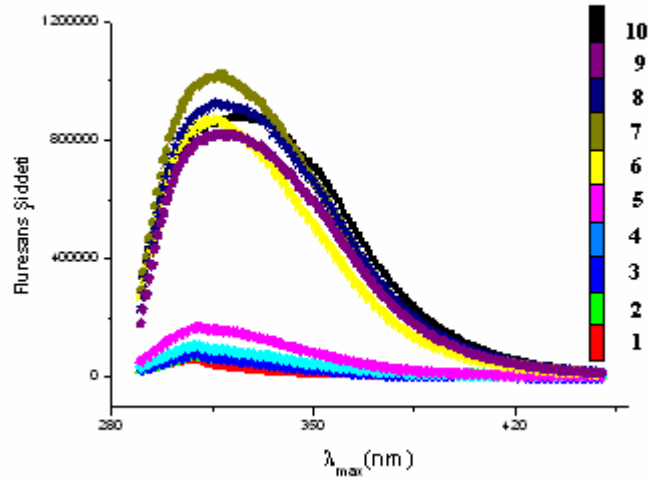
Şekil 5.47 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin flüoresans şiddetinin λ_{max} ile değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4); 10 (5); HSA (6). pH 4,0 $T=25^\circ\text{C}$.



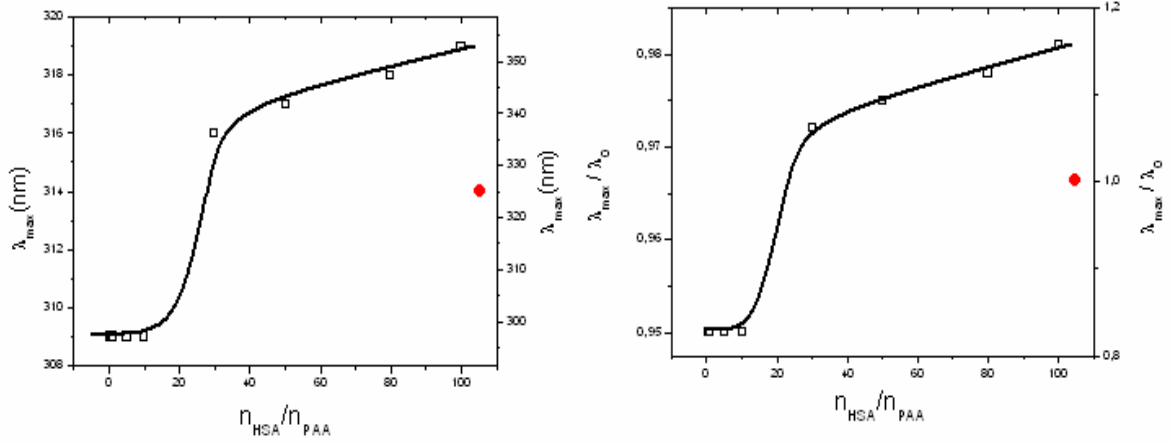
Şekil 5.48 $C_{PAA}=1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin λ_{max} ve $\lambda_{max} / \lambda_0$ değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10;$ (●) HSA. pH 4,0 $T=25^\circ\text{C}$.



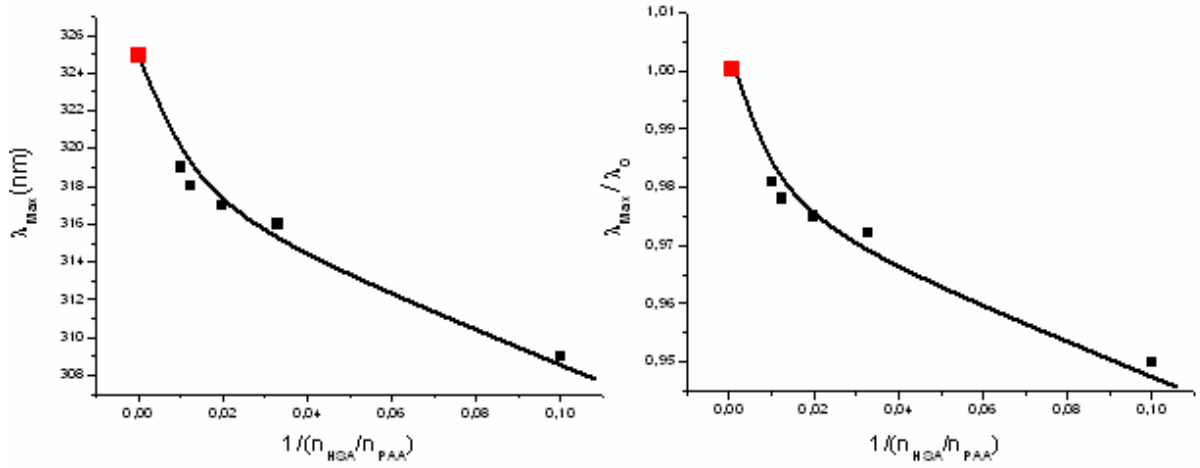
Şekil 5.49 $C_{PAA}=1\text{ mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin $1/(n_{HSA}/n_{PAA})$ oranına karşı $\lambda_{\max}$ ve $\lambda_{\max} / \lambda_0$ değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10;$ (■) HSA. pH 4,0 $T=25^\circ\text{C}$.



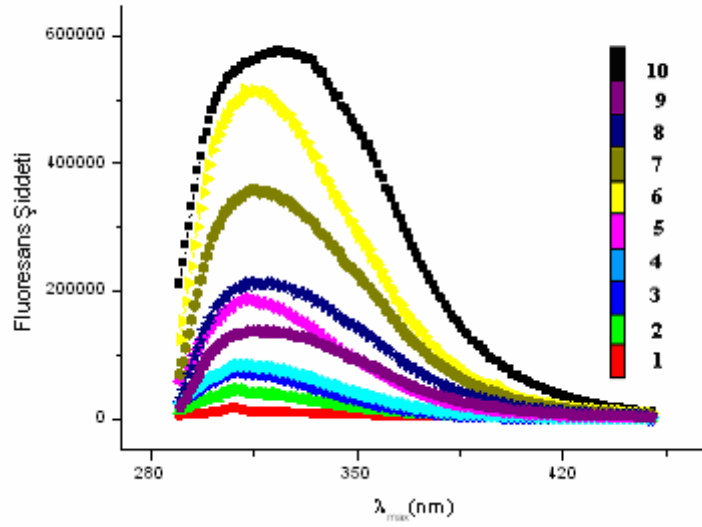
Şekil 5.50 $C_{PAA}=0,1\text{ mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin flüoresans şiddetinin $\lambda_{\max}$ ile değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4); 10 (5); HSA (6). pH 4,5 $T=25^\circ\text{C}$.



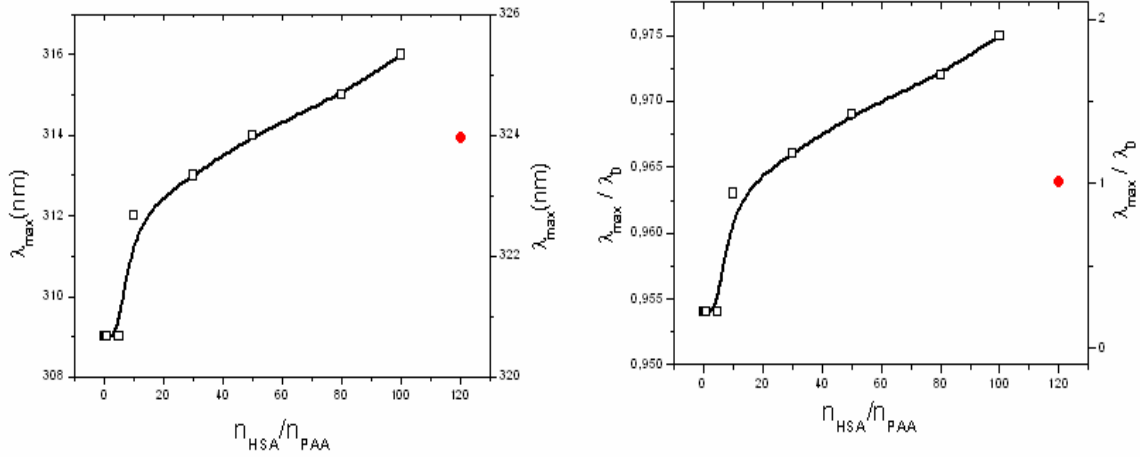
Şekil 5.51 $C_{PAA}=0,1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin $\lambda_{\max}$ ve $\lambda_{\max} / \lambda_0$ ile değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}= 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10;$ (●) HSA. pH 4,5 $T=25^\circ\text{C}$.



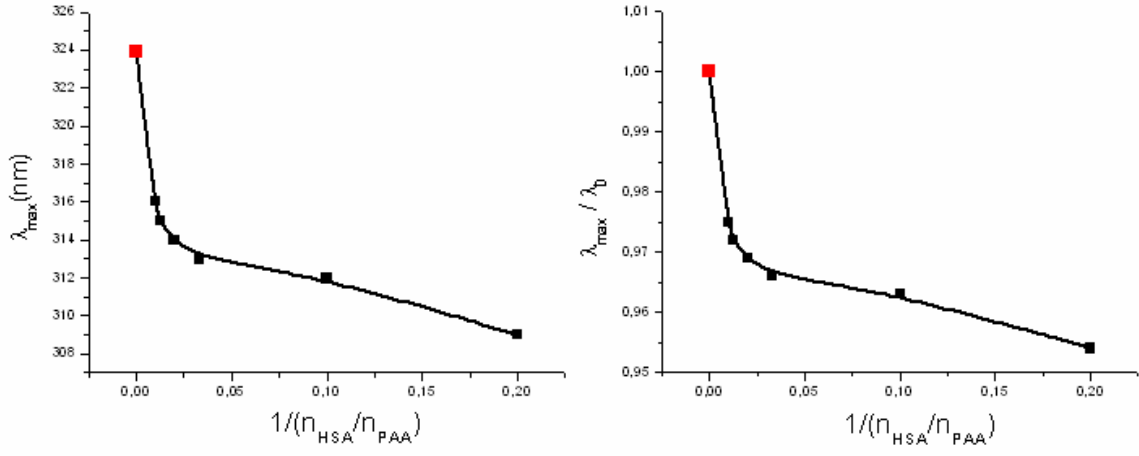
Şekil 5.52 $C_{PAA}=0,1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin $1/(n_{HSA}/n_{PAA})$ oranına karşı $\lambda_{\max}$ ve $\lambda_{\max} / \lambda_0$ ile değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}= 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10;$ (■) HSA. pH 4,5 $T=25^\circ\text{C}$.



Şekil 5.53 $C_{PAA}=0,1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin flüoresans şiddetinin λ_{max} ile değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$ (1); 0,5 (2); 1,0 (3); 5,0 (4); 10 (5); 30 (6); 50 (7); 80 (8); 100 (9); HSA (10). pH 4,0 $T=25^{\circ}\text{C}$.



Şekil 5.54 $C_{PAA}=0,1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin λ_{max} ve λ_{max}/λ_0 ile değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1$; 0,5; 1,0; 5,0; 10; 30; 50; 80; 100; (●) HSA. pH 4,5 $T=25^{\circ}\text{C}$.



Şekil 5.55 $C_{PAA}=0,1\text{mg/mL}$ için farklı oranlarda hazırlanmış n_{HSA}/n_{PAA} çözeltilerinin $1/(n_{HSA}/n_{PAA})$ oranına karşı λ_{max} ve $\lambda_{max} / \lambda_0$ değişimi. $n_{HSA}/n_{PAA}=0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10;$ (■)
HSA. pH 4,0 T=25 °C

6. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

6.1 Türbidimetrik Titrasyon

Türbidimetrik titrasyon yönteminin, suda çözünmeyen interpolimer komplekslerin oluşumu ve bu tür komplekslerin suda çözünür hale geçişini belirlemek için iyi yöntemlerden biri olduğu bilinmektedir. Burada, PAA ve HSA, pH değerlerine bağlı olarak farklı elektrik yükleri taşıdığından, etkileşim mekanizması pH'a ve bileşenlerinin oranına bağlı olarak incelenmiştir (Şekil 5.3 A). Nötral pH ortamlarında tümüyle suda çözünen polimer-protein karışımı, pH değerinin izoelektrik noktasına yakın değerlerinden başlayarak düşük değerlerinde suda çözünmeyen bir karışım haline dönüşmektedir. (Şekil 5.1 A ve B).

Türbidimetrik titrasyon eğrileri HPLC kromatogramları ile değerlendirildiğinde pH 7,0 ve 6,0 değerinde kompleks oluşumunun olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum her iki makromolekülün de bu pH değerlerinde (-) yük yoğunluğunun fazla olmasından kaynaklanmaktadır. HSA ve PAA'daki mevcut (-) yükler, bu iki polimer arasında bir itme kuvvetinin oluşmasına neden olmaktadır.

pH 5,0 değerinde türbidimetri sonuçlarına göre suda çözünür kompleks oluşumu gözükmemektedir. HPLC ve GPC çalışmaları, pH 5,0 değerinde suda çözünebilen komplekslerin oluştuğu fikrini doğrular. Bu pH'da proteinin yükü zayıf olarak (-) yüklüken PAA'nın yükü negatiftir. Buna göre kompleks oluşumu sürecinin proteinin yüzeyindeki pozitif yük bölgeleri üzerinden yürüdüğü söyleyebilir. Bu bölgelerdeki pozitif yüklerle polielektrolit üzerindeki negatif yükler arasındaki çekim kuvveti, makromoleküllerin negatif yükleri arasındaki itme kuvvetinden daha baskındır.

$C_{PAA}=0,1\text{mg/mL}$ için sistemdeki faz geçişinin, $n_{HSA}/n_{PAA}=80$ oranında pH 3,5 değerinde olduğu gösterilmiştir (Şekil 5.2). Bu bilgiler ışığında pH 4,0 ve pH4,5 değerinde hazırlanan HSA-PAA karışım çözeltilerinin, polimer konsantrasyonu sabit tutularak sistemin proteinle titrasyonunda, pH4,0'da $n_{HSA}/n_{PAA}=30$ oranına kadar sistemde suda çözünmeyen kompleks oluşumunun arttığı ancak $n_{HSA}/n_{PAA}>30$ oranlarında suda çözünmeyen komplekslerin oluşumunun sabit kaldığı buna karşın pH 4,5'de $n_{HSA}/n_{PAA}=10$ değerine kadar suda çözünmeyen polikompleksin artışına neden olduğu ve maksimum değere ulaşarak daha sonrasında sistemin yeniden çözünür hale geçtiği görülmüştür. (Şekil 5.3 A).

6.2 $C_{PAA}=1,0$ mg/mL HSA-PAA Karışımları

6.2.1 pH7,0 ve pH6,0'da HSA-PAA Karışımlarının Analizi

6.2.1.1 HPLC ve Dört Detektörlü GPC Analizleri

pH 7.0'de protein çözeltisinin eklenmesi belirli bir n_{HSA}/n_{PAA} değerleri içinde PAA'nın çözünürlüğünü etkilememiştir. Tipik olarak HSA'nın analizi ve farklı oranlardaki molekül konsantrasyonlarında PAA ile olan çözünür karışımları Sekil 5.1 A ve B'de verilmiştir. HPLC kromatogramları incelendiğinde "2" ile tanımlı HSA'nın monomer, dimer ve trimer ile belirginleşen 3 pikle ve PAA'nın "1" ile tanımlı UV_{280} değerinde düşük absorbands göstererek karakterize edildiği görülmektedir (Şekil 5.5).

Karışımın fraksiyon bileşenlerinin alıkonma zamanları artan n_{HSA}/n_{PAA} oranlarıyla ($RT_{PAA}=10$ dk ve $RT_{HSA}=16$ dk) değişmemiş ve serbest HSA ve PAA molekülleriyle aynı kalmıştır (Şekil 5.5).

Şekil 5.13'de sırasıyla RI, UV, RALS ve VIS detektörleri tarafından saptanmış olan bileşenlerin farklı oranlardaki HSA-PAA karışımlarının GPC kromatogramlarını göstermektedir. HPLC ile aynı ayırma koşullarını kullanan GPC'de de HSA-PAA çözeltisi iki ana pik (Bir PAA ve üç protein piki) ile karakterize edilmektedir. Karışımdaki protein miktarının artmasıyla HSA monomer pikinin alanı lineer olarak artarken PAA pikinin alanı görece sabit kalmaktadır (Şekil 5.22). Burada ilgi çekici olan 1.pikin RALS alanındaki artıştır. Bu artışa, HSA'nın safsızlıklarından ileri gelen agregatların neden olduğu düşünmek gerçekçidir.

pH 6,0'daki HSA-PAA karışımları, alıkonma zamanlarına göre, serbest polimer ve protein fraksiyon bileşenlerine ait HPLC ve GPC kromatogramlarıyla karakterize edilmiştir (Sekil 5.6 ve Şekil 5.14). GPC kromatogramlarının dört detektör sistemi için alan grafikleri incelendiğinde pH 7,0'da olduğu gibi pH 6,0'da da n_{HSA}/n_{PAA} 'nın artan oranlarında serbest HSA pikinin alanında artışın olduğu buna karşın PAA pikinin alanında bir artışın olmadığı açıktır (Şekil 5.23). pH 6,0'da zayıf etkileşim nedeniyle reaksiyon koşullarında serbest PAA, polimer-protein kompleksinden kromatografi yöntemiyle ayrılamamasından dolayı çözünebilir karışımda polimer sarmalları arasındaki protein moleküllerinin dağılımını analiz edilemez.

Sonuçta, pH=7,0 ve 6,0'da $pH > pI_{HSA}=4,9$ koşulu nedeniyle her ikisi de negatif yüklü olan polianyon ile protein molekülleri arasında zayıf etkileşimlerin görülmesine rağmen

elektrostatik itme kuvveti kararlı polikompleksin oluşumunu engellemekte ve PAA ile HSA molekülleri çözelti içinde serbest olarak bir arada bulunmaktadır. Sonuçlar sedimentasyon (Mustafaev, 1978), HPLC (Akkılıç, 2006) ve GPC analiz sonuçları (Topuzoğulları, 2007) ile örtüşmektedir.

6.2.1.2 Zetasizer Analizleri

Şekil 5.31 ve şekil 5.33’de, pH 7,0 ve pH 6,0’da örnek olarak seçilmiş n_{HSA}/n_{PAA} oranlarında, tek başına HSA, tek başına PAA ve HSA-PAA karışımlarının ışık saçılma şiddetine karşılık boyut dağılımlarını gösterilmektedir. Şekilden görüldüğü gibi, farklı oranlarda iki ayrı pik vardır. Pik I, pH 7,0 için yaklaşık 17,5 nm, pH6,0 için 15,4 nm civarında olup, ortamdaki serbest HSA’ya karşılık gelmektedir. pH 7,0’da 50,2 nm pH 6,0’da 41,3 nm civarındaki pik II ise, serbest polianiyona karşılık gelmektedir. Pik I’in alanı, $n_{HSA}/n_{PAA}=1$ değerinden sonra değişen oranlarda protein miktarının artmasıyla birlikte artış gösterir. Pik II’nin alanında ise bir değişiklik gözlenmez. Boyut dağılımından ve zeta potansiyel grafiğinden gözüken II. pikin, n_{HSA}/n_{PAA} oranındaki lineer artışla uyumluluk gösteren HSA ile tanımlı I. pike pH 7,0 için şekil 5.32’de, boyutu 15,7 nm ve zeta potansiyeli -14mV değerinde pH6,0 için şekil 5.34’da boyutu 15,4 nm ve zeta potansiyeli -7,5 mV değerine kaymasıyla HSA-PAA arasındaki etkileşiminin olmadığı HPLC ve GPC kromorogramları ile birlikte doğrulanır ve sonuçlar Dalgakıran (2006) ile uyum içerisindedir.

6.2.1.3 Floresans Spektrofotometre Analizleri

PAA’nın, pH 7,0 ve 6,0’da protein ile bazı etkileşimler gösterir. Gerçekte HSA’nın polimere maksimum oranı, HSA’nın flüoresansının maviye bölgeye kayması pH=7,0’de sırasıyla 331nm’den 323nm’ye; pH=6,0’da 332nm’den 327’ye ulaşır (Şekil 5.38, şekil 5.41). Bu da protein polimer etkileşimiyle ortaya çıkan su ortamındaki HSA’nın iç bölgesinde yer alan triptofanın gözlenmesine olanak sağlar. Sonuçta, n_{HSA}/n_{PAA} oranına bağlı olarak dalga boylarındaki küçük değişimler HSA ile PAA arasındaki etkileşimlerinin zayıf düzeyde olduğunu ve bu etkileşimlerin proteinin yapısında büyük değişimler yaratmadığını ispatlarken sonuçlar Battal (2006) ile uyuşmaktadır.

6.2.2 pH5.0’de HSA-PAA Karışımlarının Analizi

6.2.2.1 HPLC

HSA-PAA karışımının pH değerinin düşürülmesi ile birlikte kararlı kompleks oluşumu gözlenmeye başlar. pH 5,0 değerinde HSA globülleri zayıf olarak negatif yüklenmişlerdir.

Sonuç olarak protein moleküllerinin negatif yüklü polianyonlarla bağlanması elektrostatik itme kuvvetlerine karşı meydana gelir. HSA moleküllerinin farklı konsantrasyonlarıyla yapılan PAA çözeltilerinin titrasyonunun pH 5,0'daki HPLC sonuçları şekil 5.7'de gösterilmiştir. Reaksiyon karışım bileşenlerinin kromatogramları dikkatle incelendiğinde $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} > 0,1$ oranından sonra serbest HSA gözükemeye başlamıştır. Bu orandan sonra sistemi II bölge ile karakterize edebilir.

I. bölgede ($n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0.1$), HSA-PAA çözeltileri kromatogramlarda sadece 1 pik ile karakterize edilmiştir. Bu pikin alıkonma zamanı (RT) değişmez ve serbest PAA pikiyle aynı yerdedir. Üstelik HSA'nın varlığı karışımın optik yoğunluğunda (piklerin alanı) bir artışa neden olur. Bundan dolayı, şekil 5.7'de HPLC sonuçlarından da görüldüğü üzere HSA-PAA karışımlarında serbest HSA molekülleri yoktur.

II. bölgede, $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} \geq 0,1$ de elde edilen kromatogramlarda iki pik olduğu görülmüştür (Şekil 5.7). Alıkonma zamanı yaklaşık RT=16 dakika olan yavaş hareket eden parçacıklar (pik II), serbest HSA molekülüne ait olan RT ile aynıdır ve serbest PAA polimerine ait olan alıkonma zamanıyla karakterize edilen hızlı hareket eden parçacıkların alanı çözeltilerin titrasyonu ile birlikte $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=10$ oranına kadar artmıştır.

6.2.2.2 Dört Detektörlü GPC Analizi

Kompleks oluşum miktarı pH değerine bağlıdır ve pH 6,0'dan daha küçük değerlerde kantitatif olarak saptanabilmektedir. pH 5,0'da RI/UV/RALS/VIS detektörleri ile saptanmış farklı oranlardaki HSA-PAA karışımlarının GPC kromatogramları şekil 5.16'da gösterilmiştir. Bu şekillerden yola çıkarak $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ oranına kadar çözelti içindeki bileşenlerin bir pik ile karakterize edildiği görülmektedir. Saf HSA pikine karşılık gelen yeni pik bu orana ulaştıktan sonraki kromatogramlarda görülmekte ve çözeltideki protein miktarı ile orantılı olarak artmaktadır. Reaksiyon bileşenlerinin tek başlarına vermiş olduğu pikler göz önüne alındığında, PAA pikiyle aynı RV'de çıkan pikin çözünür polikomplekse, HSA monomeriyle aynı RV'de çıkan pikin ise komplekse girmeyen serbest HSA'ya ait olduğu söylenebilir.

Şekil 5.24'de değişen $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarında farklı detektörlerden elde edilen kromatogramlardaki karışımdaki serbest HSA'nın serbest HSA'nın pikinin alanındaki değişim, bileşenlerin oranlarına bağlı olarak polikomplekslerin yapısı, bileşimi ve bağlanma mekanizması hakkında bilgi vermektedir. pH5,0'da HSA-PAA etkileşiminin analitik yaklaşımları için $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarında kullanılan HSA konsantrasyonlarının GPC

kromatogramları Şekil 5.15’de gösterilmiştir. Serbest HSA’ların artan konsantrasyonlarının ve pH5,0 değerinde etkileşime girmeyen serbest HSA’ların detektörler alanları incelendiğinde lineer bir artışın olduğu gözlenmektedir (Şekil 5.24). Bu alanların artış değerleri karşılaştırıldığında etkileşime girmemiş HSA miktarının serbest HSA miktarına göre çok az olduğu (Şekil 5.26) buna karşın polianyon ile etkileşime giren HSA sayısının girmeyenlere göre daha fazla olduğu dikkat çekicidir. Bu grafiklerden yola çıkarak etkileşime giren HSA’nın konsantrasyon değerlerine ve bir polimer zincirine bağlanan HSA sayısına ulaşılmıştır (Şekil.5.27) (Topuzoğulları,2007). Bu sonuca göre $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ oran arttıkça polimer zincirine bağlanan HSA molekülleri sayısı artmaktadır (Şekil 5.28 ve tablo 5.1).

Şekil 5.29’dan $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranının artan değerlerinde belirmeye başlayan HSA’nın komplekse dahil olan HSA ile ilişkisi:

$$\delta_m = \delta_m^\infty \frac{k \cdot \gamma_m^f}{1 + k \cdot \gamma_m^f} \quad (6.1)$$

Denklem (6.1) uyarınca çizilen grafikten elde edilen doğru denkleminin $y = 0,0828x + 0,097$ elde edilmesiyle bağlanma sabitinin $k=0,86$ ve doyma sabitinin $\delta_m^\infty=12$ olduğu bulunmuştur. Topuzoğulları’nın (2007) açıkladığı üzere, BSA-PAA karışım çözeltilerinin pH 5,0’da k ve δ_m^∞ sabitleri sırasıyla 0,079 ve 30,5’dir. HSA-PAA karışımlarını ile BSA-PAA karışımları arasında $\Delta(k_{\text{HSA}}-k_{\text{BSA}})= +9,1\%$ gibi bir farkın olması HSA-PAA karışımlarında protein globüllerinin polimer zincirleri tarafından daha sıkı sarıldığı dolayısıyla HSA globüllerinin BSA globüllerine göre daha çabuk doyuma ulaştığı $\Delta(\delta_m^\infty(\text{HSA}) - \delta_m^\infty(\text{BSA})) = -39,3\%$ gibi bir farkın doğmasıyla doğrulanır. Kompleksleşmenin fiziko-kimyasal özellikleri incelendiğinde $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ artan oranlarında M_n ve M_w molekül ağırlıklarının artmaktadır. Buna karşın Mark-Houwink sabitlerinin azalarak $a=0,097$ değerine ulaştığı görülmektedir. Bu değer oluşan kompleksin, artan $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarıyla birlikte globülleştiği göstermektedir. Komplekslerin polidispersitesi, viskozitesi ve boyutu incelendiğinde $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=1,0$ değerinde maksimum vererek azaldığı ve bu değerlerin PAA’nın değerlerinden çok farklı olması suda çözünür kompleksleşmenin doğasının polielektrolit davranışından farklı olduğu göstermektedir (Şekil 5.30).

6.2.2.3 Zetasizer Analizleri

Şekil 5.35’de pH 5,0’da oluşan komplekslerin orana bağlı boyut dağılımını göstermektedir. Kompleks partiküllerin boyut dağılımları, protein miktarına bağlı olarak değişmektedir. Hiçbir oranda, serbest HSA’ ya karşılık gelen 10nm civarında bir pik görülmemektedir.

$n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1$ ile başlayan boyut değerleri, serbest PAA'ya göre farklılık göstermektedir. Buna göre diyebiliriz ki, oran arttıkça eklenen tüm HSA, poliyonlarla kompleks oluşturmaktadır.

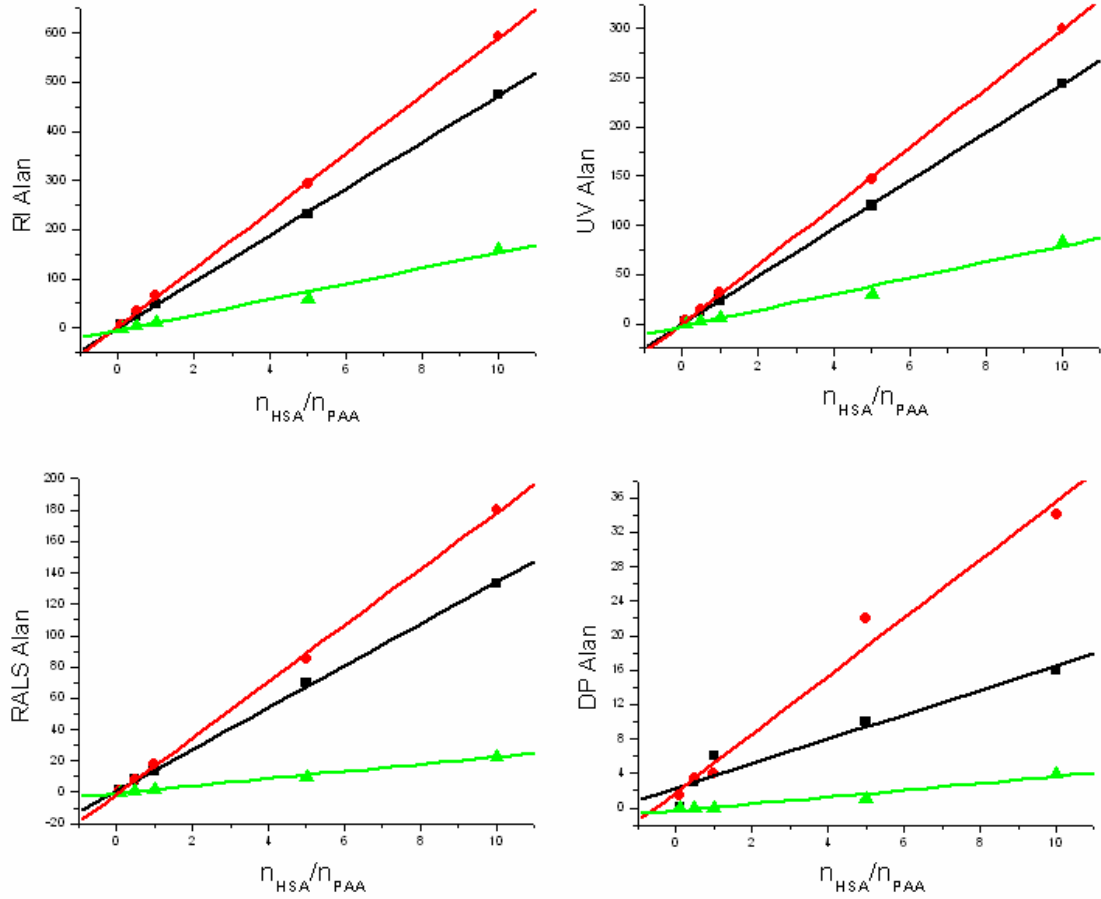
Şekil 5.36'dan, pH 5,0'da ilk orandan itibaren bir kompleks oluştuğu görülmektedir. Protein konsantrasyonunun artmasıyla kompleksin büyüklüğü artmakta, bir maksimumdan geçmekte ve $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} > 1,0$ değerinden sonra kompleks partiküllerin çapı yaklaşık 68nm'ye ulaşarak azalmaktadır. Boyut ortalamalarındaki bu azalma GPC'den elde edilen R_h değerleriyle karşılaştırıldığında oluşan farklılık sonuçları doğrular niteliktedir. Sonuçta GPC oluşan kompleksin boyut değerini vermektedir. Artan $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarıyla kompleksleşme artmakta dolayısıyla boyut değerleri de büyümektedir (Şekil 5.30). Buna karşın $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} \sim 1,0$ değerinde gözükmeye başlayan HSA molekülleri Zetasizer'ın boyut ortalamasını aşağıya çekmektedir. Boyut dağılımındaki bu karakteristiğe zeta-potansiyelleri de uyum göstermekte $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} = 0,5$ değerinde bir minimumdan geçerek HSA moleküllerinin eklenmesiyle kompleks parçacıklarının potansiyelleri HSA'nın değerine yaklaşmaktadır.

6.2.2.4 Flüoresans Spektrofotometre Analizleri

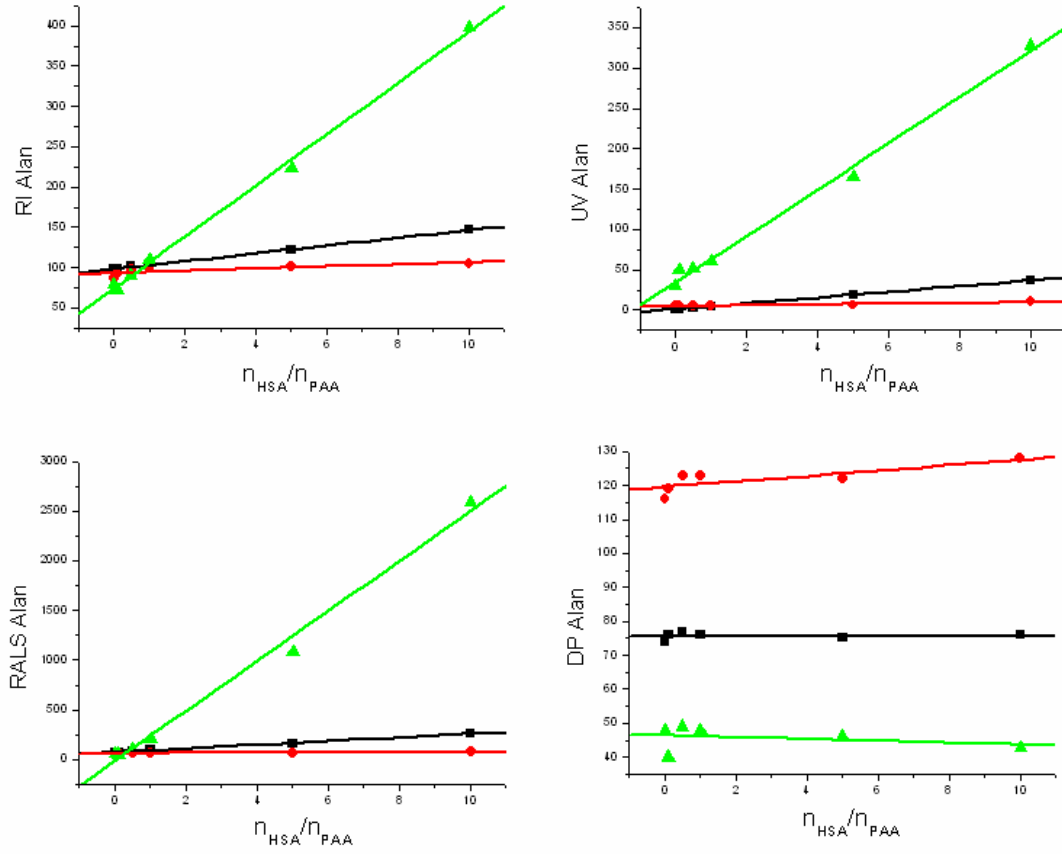
pH=5,0'te HPLC, GPC ve zeta sizer analizleri incelendiğinde HSA-PAA arasında ölçümlerde nicel olarak belirlenebilen kompleks oluşumu gözlenir. pH=5.0'de HSA moleküllerinin farklı konsantrasyonları ile PAA çözeltilerinin titrasyonunun HPLC sonuçlarını görülmektedir. Bu sonuçlarda karışım kompozisyonunda reaksiyonun iki bölgesi ayırt edilebilir (Şekil 5.7). Birinci bölgede HSA-PAA çözeltisi, kromatogramda suda çözünen $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ komplekslerine ait olan sadece tek pik ile karakterize edilir. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,5-10$ arasında elde edilen çözeltilerin kromatogramlarında iki pik elde edilir ve suda çözünen HSA-PAA kompleksleri serbest HSA molekülleri ile bir arada bulunur. Bu bölgede HSA-PAA karışımlarının λ_{max} 'larında 331nm'den 312nm'ye kadar yüksek bir düşüşün olduğu gözlenir (şekil 5.44). Bu durum artan $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranıyla birlikte HSA molekülleri, dış çevreye göre koruyucu bir kılıf görevini üstlenen PAA molekülleri tarafından kuvvetli bir şekilde sarılarak HSA'nın iç bölgesinde yerleşen triptofanın suyla olan etkileşimini diğer pH değerlerine göre çok azalttığı ve suda çözünür kararlı kompleksler oluştuğunu göstermiştir.

6.2.3 pH7,0-pH6,0-pH5,0 Karşılaştırma

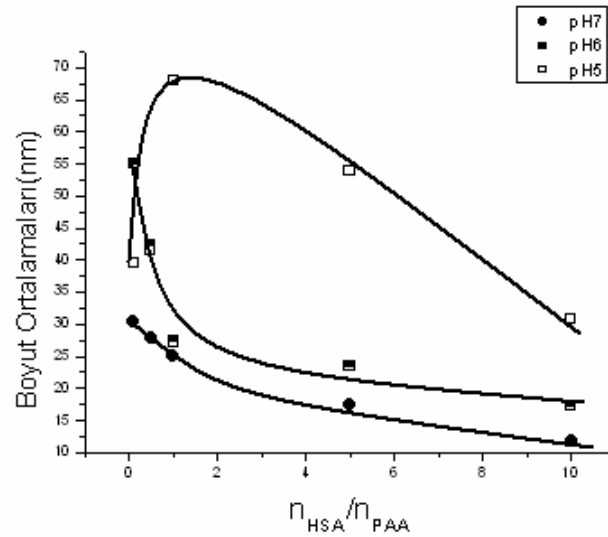
Üç pH değerinin kromatogramları incelendiğinde, serbest HSA pikinin GPC kromatogram alanlarının pH7,0 ve pH6,0'da birbirlerine yakın değerlerde ve pH5,0'a göre daha yüksek değerlerde olduğu gözlenmektedir (Şekil 6.1). Buna karşın PAA pikinin olduğu bölgede pH değerleriyle ters orantılı olarak artışların meydana geldiği açık bir şekilde gözlenmektedir (Şekil 6.2). Bu durum pH değerlerine bağlı olarak HSA moleküllerinin düşük pH değerlerinde polikomplekslere dahil olduğunu kanıtlar.



Şekil 6.1 pH7,0, 6,0 ve 5,0'da HSA-PAA karışım çözeltilerinin n_{HSA}/n_{PAA} oranına bağlı olarak 2. bölgedeki piklerin detektör alanlarının değişimi



Şekil 6.2 pH7,0, 6,0 ve 5,0'da HSA-PAA karışım çözeltilerinin n_{HSA}/n_{PAA} oranına bağlı olarak 1. bölgedeki piklerin detektör alanlarının değişimi.



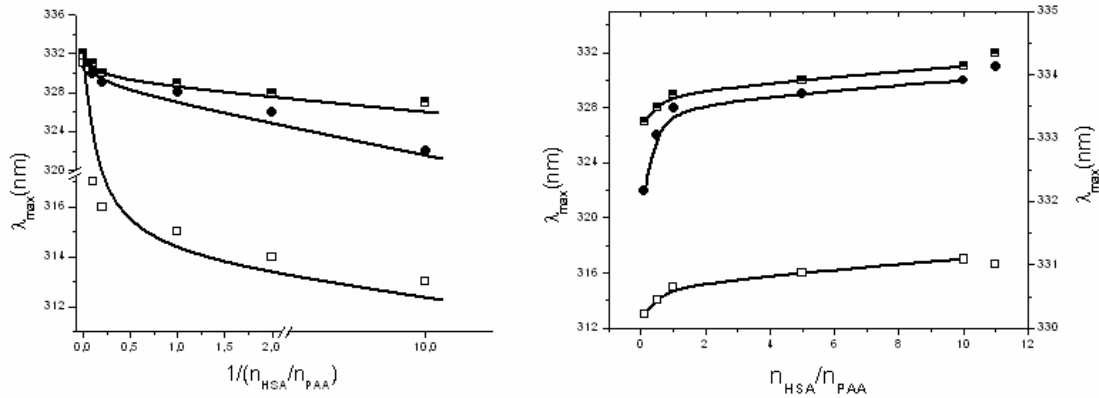
Şekil 6.3 pH7,0, 6,0 ve 5,0'da HSA-PAA karışım çözeltilerinin n_{HSA}/n_{PAA} oranına bağlı olarak boyut ortalamaları değişimi.

Kromatografi sonuçları pH değerine bağlı boyut sonuçlarıyla da uyumludur. Dikkat edilirse pH7,0 ve pH6,0'da n_{HSA}/n_{PAA} oranındaki artış HSA-PAA çözeltilerinin HSA moleküllerinin boyut değerlerine ulaşılırken (Tablo 6-1), pH5,0 değerinde pH7,0 ve pH6,0 boyut ortalamaları grafik karakteristiğinden farklı olarak $n_{HSA}/n_{PAA}=1,0$ oranında maksimum yapmakta ve azalmaktadır. Bu karakteristik $n_{HSA}/n_{PAA}=1,0$ değerine kadar HSA moleküllerinin suda çözünür polikompleks parçacıklarına dahil olduğunu ve bu orandan sonra açığa çıkan HSA moleküllerinin boyut ortalamasını düşürdüğü görülmektedir. Kromatografi sonuçları yardımıyla pH5,0 değerinde kompleksleşmenin açığa çıkarılması boyut ortalamaları grafiğinden anlaşılmaktadır(Şekil 6.3).

Tablo 6-1 HSA ve PAA moleküllerinin pH değerlerine bağlı olarak boyut ve zeta potansiyel değerleri

Molekül	Zeta Potansiyel(mV)		
	pH7	pH6	pH5
HSA	-13,6	-7,44	-3,96
PAA	-25,2	-20,4	-19,2
Molekül	Boyut Ortalamaları(nm)		
	pH7	pH6	pH5
HSA	15,2	15,4	19,6
PAA	50,2	41,3	25,1

Flüoresans sonuçları incelendiğinde ise pH5,0 değerinde λ_{max} 'da maviye kaymanın pH7,0 ve pH6,0'göre fazla olduğu görülmektedir. Bu durum protein moleküllerinin pH5,0 değerinde polianyon molekülleri ile sıkıca sarıldığı göstermekte ve böylece kompleksleşmenin olduğu diğer sonuçlar ile doğrulanmaktadır (Şekil6.4).



Şekil 6.4 pH7,0, 6,0 ve 5,0'da HSA-PAA karışım çözeltilerinin $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ ve $1/(n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}})$ oranına bağlı olarak $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ değişimi

6.2.4 pH4.0'de HSA-PAA Karışımlarının Analizi

6.2.4.1 HPLC

pH 4.0'de HSA çözeltisiyle titre edilen PAA çözeltisinin santrifüj sonrası OD_{280} ve turbidimetrik titrasyon eğrileri Şekil 5.1 B'de gösterilmiştir. Buna göre reaksiyon karışım bileşenlerinin $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarında santrifüj sonrası düşük değerlerde protein varlığı gözükmemektedir. $\text{pH}4,0 < \text{pI}$ olduğundan zıt yüklü olan HSA ve PAA birbiriyle güçlü etkileşime girip suda çözünmeyen kompleksler oluşturmuştur. Suda çözünmeyen kompleksler santrifüj metoduyla çöktürülerek karışımların üst fazları HPLC'de incelenmiştir. Şekil 5.8 incelendiğinde çok düşük konsantrasyonlarda da olsa karakteristiği PAA ve HSA'ya benzemeyen geniş polidispersiteye sahip komplekslerin olduğu gözükmemektedir. Kromotogramlar ışığında, bu komplekslerin geniş polidispersiteye sahip PAA'nın küçük molekül ağırlığına sahip molekülleri ile HSA etkileşimiyle oluştuğu düşünülebilir.

6.2.4.2 Dört Detektörlü GPC Analizi

GPC sahip olduğu dört detektörü ile HPLC'nin HSA-PAA etkileşimiyle ilgili verdiği bilgilerin ötesine geçer. GPC kromotogramları dikkatle incelendiğinde $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=10$ değerinde karışımın üst fazında hiçbir molekülün kalmadığı, bu oranda etkileşimin çok güçlü ilerleyerek suda çözünmeyen kompleksler oluşturduğu görülmektedir. $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} < 10$ oranlarında suda çözünen HSA-PAA kompleksleri gözükmemektedir. Komplekslerin alıkonma zamanları incelendiğinde $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,5-1,0$ oranlarındaki suda çözünür komplekslerinin $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,1-5,0$ oranlarındaki komplekslerden daha büyük olduğu görülmektedir (Şekil

5.17). GPC analiz yöntemini kullanılarak $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,5-1,0$ oranları yeterli saçılmayı sağladıklarından fiziko-kimyasal özellikleri aşağıdaki tablo6-2’de verilmiş, suda çözünür komplekslerin PAA’dan farklılıkları gösterilmiştir. Bu sonuçlar HPLC analizi ile önerdiğimiz etkileşim modelini destekler.

Tablo 6-2 HSA-PAA karışımlarının sulu çözeltilerinin $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=0,5-1,0$ oranlarının fiziko-kimyasal parametrelerinin PAA’ninkiler ile karşılaştırılması

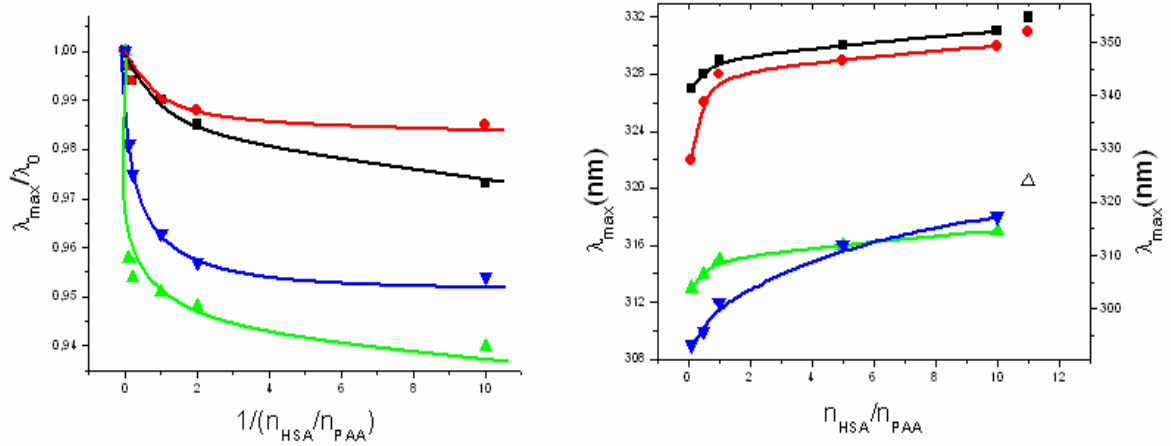
$n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$	$M_n(\text{Da})$	$M_w(\text{Da})$	M_w/M_n	IV(dl/g)	$R_h(\text{nm})$	a
PAA	29.518	100.638	3,409	0,6065	8,799	0,526
0,5	25.904	70.177	2,709	0,1076	4,437	0,446
1,0	20.984	71.289	3,397	0,1347	4,669	0,522

6.2.4.3 Zetasizer Analizleri

pH 4,0’da hazırlanan HSA-PAA çözeltisinde, bileşenler birbirleri ile güçlü bir elektrostatik etkileşmeye girerek çözünmeyen kompleksler oluşturmuşlardır. Sistemin üst fazlarının zetasizer analizleri, gerekli saçılma şiddetinin sağlanamamasından dolayı yapılamamıştır. Bu sonuç, sistemdeki tüm bileşenlerin büyük bir oranda çöküntüye gittiğini ispatlar.

6.2.5 pH4,0 ve pH5,0 Karşılaştırma

Yukarıda açıklanan bilgiler ışığında pH4,0 değerinde suda çözünür ve çözünmez komplekslerin bir arada olduğu söylemiştik. Santrifüj sonrası suda çözünmeyen komplekslerin HSA-PAA karışım çözeltisinden uzaklaştırılmasıyla gerekli konsantrasyona ulaşamadığımızdan kompleksleri flüoresansta analiz edilememiştir (Şekil 5.46). HSA-PAA karışımlarını santrifüj etmeden incelediğimizde, λ_{max} değerlerinin $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} < 5$ oranında diğer pH değerlerinde daha fazla maviye kaydığı görülmektedir (Şekil 5.48). Bu sonuç pH 4,0 değerinde üzerinde daha fazla (+) yük bulunduran HSA molekülleri ile polianyon arasında diğer pH değerine göre daha kuvvetli bir etkileşimin olduğunu açıklar.

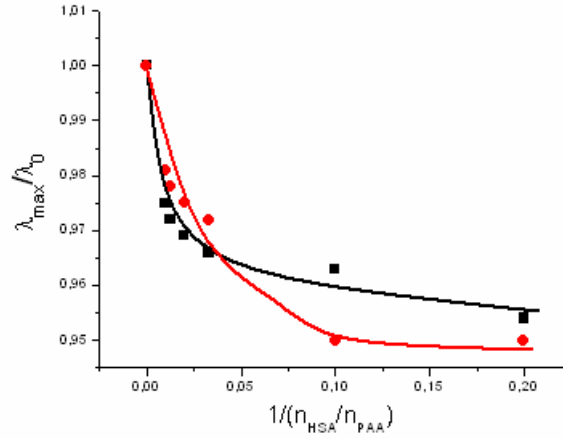


Şekil 6.5 pH7,0, 6,0 ve 5,0’da HSA-PAA karışım çözeltilerinin $1/(n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}})$ oranına bağlı olarak $\lambda_{\max}/\lambda_0$ ve $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranına bağlı olarak $\lambda_{\max}$ değişimi.

HSA-PAA karışımlarının boyut ortalamaları incelendiğinde pH 4,0 değerinde oluşan suda çözünür komplekslerin diğer pH değerine göre oldukça büyük değerlerde olmasıdır. Bu sonuçlar pH4,0 değerindeki etkileşim mekanizmasını pH5,0’dakinden farklı olduğunu göstermektedir.

6.3 $C_{\text{PAA}} = 0,1 \text{ mg/mL}$ için pH4,0 ve pH 4,5 Karşılaştırma

$n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=80$ oranı için türbidimetrik titrasyon eğrisinden sistemin pH 3,5 değerinde faz ayırmasına uğrayarak $\text{pH} > \text{pH}3,5$ noktasından sonra suda çözünür duruma geçtiği görülmektedir (Şekil 5.2). pH4,0 ve pH4,5’te hazırlanan HSA-PAA karışımlarının HSA ile titrasyonu pH4,0 değerinde $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=30$ noktasından sonra sistemin bulanıklığında bir değişim yaratmazken pH4,5’te sistemin $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=15$ değerine kadar türbidimetrisindeki artış olduğu ve $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}} > 15$ noktasında sonra azalarak çözünür duruma geçmektedir (Şekil 5.3 (A)). Şekil 5.3 (B)’de pH4,0 ve pH4,5 hazırlanan sistemlerin santrifüj sonrası elde edilen çökelek kütleleri iki sistemin faz ayırmasını doğrular niteliktedir. Aynı zamanda santrifüj öncesi OD_{280} değerleri birbirleriyle aynı karakteristik özelliğe sahipken santrifüj sonrası elde edilen OD_{280} değerleri arasındaki karakteristik fark pH4,5 için OD_{280} değerinin OD_{500} değerinin tersi olarak $n_{\text{HSA}}/n_{\text{PAA}}=15$ oranında minimum vermesiyle de ispatlanır (Şekil 5.4 (A)).



Şekil 6.6 pH4,0 (■) ve pH4,5 (●) λ_{max}/λ_0 'ın $1/(n_{HSA}/n_{PAA})$ oranına göre değişim grafiği.

pH4,0 ve pH4,5 değerlerinde hazırlanan HSA-PAA karışımlarını iki bölüme ayırmak mümkündür. HPLC ve GPC kromatogramları incelendiğinde I. bölgeyi $n_{HSA}/n_{PAA} > 10$ oranında sonra serbest HSA'ları gözükmeğe başladığı (Şekil 5.9, Şekil 5.11, Şekil 5.18 ve Şekil 5.20), II. bölgeyi ise $n_{HSA}/n_{PAA} < 10$ oranından önce serbest HSA'ların gözükmediği alanlar olarak tanımlayabiliriz (Şekil 5.10, Şekil 5.12, Şekil 5.19, Şekil 5.21). pH4,0'de I. bölgede türbidimetrisinin $n_{HSA}/n_{PAA} = 30$ değerinde sonra değişmeden kalması buna karşın OD_{280} değerinin artan n_{HSA}/n_{PAA} oranıyla artması HPLC ve GPC kromatogramlarında serbest HSA'ların görülmesiyle doğrulanmaktadır. Buna karşın pH4,5 için II. bölgede $n_{HSA}/n_{PAA} < 10$ koşulunda $RT = 16$ dk alıkonma zamanında karakteristiği HSA'ya benzemeyen küçük molekül ağırlıklı çözünür komplekslerin olduğu HPLC kromatogramların izlenir (Şekil 5.10). pH4,5'da I. bölgede $n_{HSA}/n_{PAA} = 10$ değerinden azalan türbidimetriye karşılık artan OD_{280} değerinin artan n_{HSA}/n_{PAA} oranıyla artması HPLC ve GPC kromatogramları ile doğrulanmış, pH4,0'daki etkileşimin pH4,5'e göre çok daha kuvvetli olduğu ve suda çözünmeyen komplekslerin oranının daha fazla olduğu ispatlanmıştır (Şekil 5.3(B)). Çözünür komplekslerin konsantrasyonları çok düşük olduğundan kromatografi sistemi ile analiz yapmamız zorlaşmıştır. Buna karşın pH4,0 ve pH4,5 değerlerinde HSA-PAA karışımlarının üst fazlarının flüoresans analizleri incelendiğinde λ_{max} maviye kayma oranının iki pH değerinde birbirlerine yakın olduğu ve düşük oranlarda sistemde HSA bulunmadığı bilgisine ulaşılır (Şekil 6.6). Diğer ilgi çekici nokta serbest HSA moleküllerinin pH4,5'ta pH4,0 değerine göre çözünür sistemde daha fazla buna karşın çökelek kütlesi içerisinde daha az olması iki pH arasındaki HSA moleküllerinin pH4,0'da daha fazla polikompleks içerisinde dahil olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abuchouwski, A., van Es., T., Pelczul, N.C. and Davis, F.F., J. Biol. Chem., 252, 3578-3581, 1977.
- Akkılıç, N., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M., “High Performance Liquid Chromatography Study of Water-Soluble Complexes and Covalent Conjugates of Polyacrylic Acid with Bovine Serum Albumin”, Journal of Applied Polymer Science, 2006 (Submitted).
- Albertsson, P.Å., “Partition of cell particles and macromolecules”, 3rd Ed. Wiley, New York, 1986.
- Anufrieva, Y.V., Pautov, V.D., Kuznetsova, N.P., Lushchik, V.B., Krakovyak, M.O., Polymer Science USSR, 29, 663, 1987.
- Bamford, C.H., Cooper, S.L., Tsuruta, T., J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 1, 1989.
- Battal, Y., “Anyonik Polielektrolitlerin Sığır Serum Albuminle Etkileşiminin Floresans Yöntemi İle İncelenmesi”, 2006 yüksek lisans tez çalışması.
- Berdick, M., Morawetz, H., J. Biol. Chem., 206, 959, 1954.
- Berdick, M., Morawetz, H., J. Phys. Chem., 57, 959, 1953.
- Berezin, I.V., Mustafaev, M.I., Dikov, M.M., Egorov, A.M., Pat. No: 2835139/28-04/150959, 25.10.1980.
- Bozzano, A.G., Andrea, G., Glatz, C.E., J. Membr. Sci., 55, 181, 1991.
- Braatz, J.A., Yasuda, Y., Olden, K., Yamada, K.M., and Heifetz, A.H., Bioconjugate Chem., 4, 262-267, 1993.
- Brown. J. R ve Shockley, P. (1982) in Jost, P and Griffit, O. H. (eds), Lipid-Protein Interactions, Vol. 1. Wilw, New York, pp 25-68
- Brown. J. R. (1976) Fed. Proc., 35, 2141-2144
- Brünger, A (1992a) Native, 355, 472-474
- Brünger, A (1992b) X-PLOR version 3.1: A System for X-ray Crystallography and NR. Yale University Pres, New Haven.
- Burgess, D.J., Carless, J.E., J. Colloid. Interface Sci., 98, 1, 1984.
- Burgess, R.R., Jendrisak, J.J., Biochemistry, 14, 4634, 1975.
- Burstein, E.A., Biophysica, 13, 433-442, 1968.
- Burstein, E.A., Vedenkina, N.S., Ivkova, M.N., Photochem. Photobiol., 18, 263-279, 1973.
- Camerman, N., Camerman, A. And Sarakar, B. (1976) Can. J. Chem., 4, 1309-1316 Carter, D. C. And He, X. M. 81990) Science, 249, 302-303
- Carter, D. C. And Ho, J. X. (1994) Adv. Protein Chem., 45, 153-203
- Carter, D. C., He, X. M., S. H., Twigg, P. D., Gernert, K. M., Brom, B. and Miller, T. Y. (1989) Science, 244, 1195-1198
- Carter, D. C., Z (1994) Eur. J. Biochem., 226, 1049-1052.
- Cha, H.J., Izumi, T., Kokufuta, E., Frank, C.W., Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem. Prepr., 33, 872, 1992.

- Cha, H.J., Izumi, T., Kokufuta, E., Frank, C.W., Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem. Prepr., 33, 872, 1992.
- Clark, K.M., Glatz, C.E., Biotechnol. Prog., 3, 241, 1987.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) Acta Crystallogr., D50, 760-776.
- Curry, S., mandelkow, H., Brick, P. and Franks, N. (1998) Nature Struct. Biol., 5, 827-835.
- Çimen, N., “Proteinlerin poliakrilik aist ile suda çözünmeyen kompleksleri”, 2006 yüksek lisans tez çalışması.
- Dalgakıran, E., “Poliakrilik Asidin Bovine Serum Albumın İle Etkileşiminin Dinamik Ve Elektroforetik Işık Saçılması Yöntemleri İle Araştırılması”, 2006 yüksek lisans tez çalışması.
- Dikov, M.M., Karulin, A.Y., Osipov, A.P., Egorov, A.M., Berezin, I.V., Mustafaev, M.I., Kabanov, V.A., Biochemistry (Moscow), 49, 9, 1219-1227, 1984.
- Dikov, M.M., Osipov, A.P., Egorov, A.M., Berezin, I.V., Mustafaev, M.I., Kabanov, V.A., Biochemistry (Moscow), 49, 8, 1113-1121, 1984.
- Dubin, P., Ahmed, L., Xia, J., J. Macromol. Sci., A31, 17, 1994.
- Dubin, P., Ross, T.O., Sharma, I., Yegerlehner, B., In: Hinze, W.L., Armstrong, D.W., (eds), “Ordered media in chemical separations”, American Chemical Society, Washington DC, chap. 8, 1987.
- Dubin, P.L., Murrell, J.L., Macromolecules, 21, 2291, 1988.
- Dugiaczyk, A., Law, S.W. and Dennison, O. E. (1982) Proc. Natl. Acad. Sst. USA, 79, 71-75.
- Duncan, R. and Kopecek, J. Adv. Polym. Sci., 57, 53-101, 1984.
- Evdakov, V.P., Kabanov, V.A., Kozhinova, E.V., Petrov, R.V., Savinova, I.V., Fedoseeva, N.A., Khaitov, R.M., Khaustova, L.I., Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 224, 464, 1976.
- Fehske, K. J., Muller, W. E. And Wollert, U. (1981) Biochem. Pharmacol., 30, 687-692.
- Fisher, R.R., Glatz, C.E., Biotechnol. Bioeng., 32, 777, 1988.
- Fiume, L., Busi, C., Mattioli, A and Spinosa, G. (1988) CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 4, 265-284.
- Furey, W. (1994) PHASES, Verona, PA, USA.
- Güney, O., Saraç, A. S., Mustafaev, M., J.Bioact. Compet. Polym., 12, 231, 1997.
- He, X. M. And Carter, D. C. (1992) Nature, 358, 209-215.
- He, X.M., Carter, D.C., Nature, 358, 209-315, 1993.
- Hiemenz, P.C., “Principles of colloid and surface chemistry”, Marcel Dekker, New York, 1986.
- Ho, J. X., Holowachuk, E. W., Norton, E. J., Twigg, P. D. And Carter D. C. (1993) Eur. J. Biochem., 215, 201-212.
- Ikada, Y., Suzuki, Y., Tamada, Y., In: Hoffman, A.S., Ratner, B.D., Horbett, T.A. (eds), “Polymer as biomaterials”, Plenum, New York, 135, 1985.
- Ito, H., Miyamoto, T., Inagani, H., Noshiki, Y., Iwata, H., and Matsuda, T., J. Appl. Polym. Sci., 32, 2, 3413-3418, 1986.

- Izumrudov, V.A., Kasaikin, V.A., Ermakova, L.N., Mustafaev, M.I., Zezin, A.B., Kabanov, V.A., *Visokomolek. Soed.*, 23A, 1365, 1981.
- Kabanov, V.A. and Mustafaev, M.I., *ibid*, 23A, 2255, 1981.
- Kabanov, V.A., Evdakov, V.P., Mustafaev, M.I., and Antipina, A.D., *Mol. Biol. (Moscow)*, 11, 582, 1977.
- Kabanov, V.A., Mustafaev, M.I., and Goncarov, V.V., *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 244, 1261, 1979.
- Kabanov, V.A., Mustafaev, M.I., and Goncarov, V.V., *ibid*, 23A, 2275, 1981.
- Kabanov, V.A., Mustafaev, M.I., Belova, V.V., and Evdakov, V.P., *Mol. Biol. (Moscow)*, 12, 1264, 1978.
- Kabanov, V.A., Mustafaev, M.I., Belova, V.V., and Evdakov, V.P., *Biophysics (Moscow)*, 23, 789, 1978.
- Kabanov, V.A., Mustafaev, M.I., Blokhina, V.D., and Agafeva, V.S., *Mol. Biol. (Moscow)*, 14, 64, 1980.
- Kabanov, V.A., Mustafaev, M.I., Norimov, A.Sh., Petrov, R.V., and Khaitov, R.M., *Dokl. Acad. Nauk SSSR*, 243, 1130, 1978.
- Kabanov, V.A., Mustafaev, M.I., *Vysokomol. Soed. (High Polym. Comp.)*, 23A, N2, 1128-1136, 1981
- Kabanov, V.A., Zezin, A.B., Mustafaev, M.I., and Kasaikin, V.A., "Polymeric Amines and Ammonium Salts", Goethals, E. J., Ed., Pergamon Press, Oxford, 1980, 173.
- Kataoka, K., Tsurata, T., Akaike, T., and Sakurai, Y., *Macromol. Chem.*, 181, 1363-1369, 1980.
- Kohn, J., Niemis, S.M., Albert, E.C., Murphy, J.C., Langer, R. and Fox, J.G., *J. Immünol. Methods*, 95, 31-38, 1986.
- Kokufuta, E., "Complexation of proteins with polyelectrolytes", in: "Macromolecular complexes in chemistry and Biology", Dubin, P.L., et. al. (eds.), Springer-Verlag, London, 994, 300.
- Kokufuta, E., Shimizu, H., Nakamura, I., *Macromolecules*, 14, 1178, 1981.
- Kokufuta, E., Shimizu, H., Nakamura, I., *Macromolecules*, 15, 1618, 1982.
- Kokufuta, E., Takahashi, K., *Polymer*, 31, 1177, 1990.
- Kokufuta, E., Takahashi, K., *Polymer*, 31, 1177, 1990.
- Kragh-Hansen, U. (1981) *Pharmacol. Rev.*, 33, 17-53.
- Lee, W.Y. and Sehon, H., *Natur.*, 267, 618-619, 1977.
- Lenk, T., Thies, C., In: Eisenberg, A., Bailey, F.E. (eds), "Coulombic Interactions in Macromolecular Systems", American Chemical Society, Washington, DC, chap 8, 1987.
- Margolin, A., Sheratyuk, S.F., Izumrudov, V.A., Zezin, A.B., Kabanov, V.A., *Eur. J. Biochem.*, 146, 625, 1985.
- McClure, R. J. And Craven, B. M. (1974) *J. Mol. Biol.*, 83, 551-555
- Minghetti, P. P., Ruffner, D. E., Kuang, W. J., Dennison, O. E., Hawkins, J. W., Beattie, W. G. And Dugaiczky, A. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 6747-6757.

- Morawetz, H. and Hughes, W.L., *J. Phys. Chem.*, 56, 64, 1952.
- Morawetz, H. and Zimmering, P.E., *J. Phys. Chem.*, 58, 753, 1954.
- Morawetz, H., Sage, H., *Arch. Biochem. Biophys.* 56, 103, 1955.
- Morris, W., Steinhoff, M.C., Russel, P.K., *Vaccine*, 12, 1, 5-11.
- Mustafaev, M. I. "Sigma", İstanbul, 2004.
- Mustafaev, M.I. and Norimov, A.Sh., *Biomed. Sci.*, 1, 274-278, 1990.
- Mustafaev, M.I., "Biopolymers (Biyopolimerler)", Gebze, Türkiye, 1996.
- Mustafaev, M.I., and Kabanov, V.A., *Pharmacol. Toxicol. (Moscow)*, 45, 395, 1980.
- Mustafaev, M.I., and Kabanov, V.A., *Vysocomol. Soedin Ser A*, 23A, 271, 1981.
- Mustafaev, M.I., Babakhin, A.A., Popov, A.N., Litvinov, I.S., Merkushev, A.V. and Gushin, I.S., *Molek. Biol. (Moscow)*, 24, 358, 1990.
- Mustafaev, M.I., Goncarov, V.V., Evdakov, V.P., and Kabanov, V.A., *Dokl. Acad. Nauk SSSR*, 225, 721, 1975.
- Mustafaev, M.I., Kabanov, V.A., Berezin, I.V., Dikov, M.M., *Solid Phase Chem.*, 1, 1980.
- Mustafaev, M.I., Manico, V.M., Sokolova, E.A. and Gadzhiev, R.I., *İmmünology (Moscow)*, 6, 48, 1990.
- Mustafaev, M.I., Norimov, A.S., Petrov, R.V., "Synthetic immünomodulators", eds., Petrov, R., Nauka, Moscow, 1992.
- Mustafaev, M.I., *Proceedings of the Second All-Union Symposium on Interpolymeric Complexes, USSR, Riga, 1969*, 326.
- Mustafaev, M.I., Saraç, S.A., "The polymeric material encyclopetide: Synthesis, properties and applications", Solomone, Ed., CRC press: Boca Rato, FL, 1996, 5771-5777.
- Nathan, A., Zalipsky, S., Ertel, S.I., Agathes, S.N., Yarmush, M.L, and Kohu, J., *Bioconjugate Chem.*, 4, 54-62, 1993.
- Neurath, H. and Bailey, K. (Eds.), "The proteins", Acad. Press Inc., New York, 1953, 630.
- Nguyen, T.Q., *Makromol. Chem.* 187, 2567, 1986.
- Ogata, N., Kim, S.W., Feijen, J., Okano, T. (Eds.), "Advanced Biomaterials in Biomedical Engineering and Drug Delivery Systems", Springer-Verlag, Tokyo, 381, 1996.
- Ohi, H., Miura, M., Hiramatsu, R and Ohmura, T. (1994) *Mol. Gen. Genet.*, 243, 489-499.
- Ohno, H., Abe, K. and Tsuchida, E., *Makromol. Chem.*, 182, 1253, 1981.
- Okano, T., Yui W., Yokoyama, M. and Yoshida, R., "Advances in polymeric systems for drug delivery", *Japanese Technology Reviews: Biotechnology*, Gordon and Breach, vol. 4., No 1, Yverdon, Switzerland, 1994.
- Olins, D.E., Olins, A.H. and van Hippel, P., *J. Mol. Biol.*, 24, 157, 1967.
- Osada, Y., *Advances in Polymer Science (S.Olive and G.Henrici, eds.)*, vol. 82, Springer, Berlin, 1987, 1-46.
- Ottenbrite, R.M., Regelson, W., Kaplan, A., Carchmen, R., Morahan, B., and Munson, A., Donaruma, L.G., Vogl, O. (Eds.), *Academic Press*, New York, 1978, 262-304.
- Papissov, I.M., Baranovski, V.Yu., Chernyak, V.Ya., Antipina, A.D. and Kabanov, V.A.,

Dokl. Akad. Nauk SSSR, 199, 1334-1337, 1974.

Papissov, I.M., Baranovski, V.Yu., Sergieva, E.I., Antipina, A.D. and Kabanov, V.A., Vysokomol. Soedin., SerA, 16, 1133, 1974.

Park, J.M., Muhoberac, B.B., Dubin, P., Xia, J., Macromolecules, 25, 290, 1992.

Park, J.M., Muhoberac, B.B., Dubin, P., Xia, J., Macromolecules, 25, 290, 1992.

Peters, T., "All about albumin: Biochemistry, genetics and medical applications", Academic press: San Diego, 1996.

Peters, T., Jr (1985) Adv. Protein Chem., 37, 161-245.

Petrak, K., "Polyelectrolyte complex" In: Polyelectrolytes: Science and Technology, Hara, M. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1992, 265-297.

Petrov, R.V., Mustafaev, M.I., and Norimov, A.Sh., Sov. Med. Rev. D. İmmünol., Harwood Academic Publishers GmbH, UK, 1992, 1-113.

Putnam, F. W. (1984) The Plasma Proteins, 2nd edn, Vol. 4. Academic Press, London.

Ramakrisman, C. and Ramachandran, G. N. (1965) Biophys. J., 5, 909-933.

Rao, S. N., Basu, S. P., Sanny, C. G., Manely, R. V. And Harts, J. A. (1976) J. Biol. Chem., 251, 3191-3193.

Reed, R. G. (1986) J. Biol. Chem., 261, 15619-15624.

Sacco, D., Bonneaux, F., Dellacherie, E., Int. J. Biol. Macromol., 10, 305, 1988.

Samsonov, G.V., Panamareva, R.B., Luchko, R.G., Biofizika, 14, 634, 1969.

Sarac, A.S., Özeroğlu, C., and Mustafaev, M.I., J. Bioact. Compet. Polym., 10, 121, 1995.

Sato, N., Yamamoto, M. Imada, K., Katsube, Y., Tanaka, N. And Higashi, T. (1992) J. Appl. Crystallogr., 25, 348-357.

Shaner, S.L., Melancan, P., Lee, K.S., Burgess, R.R., Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47, 463, 1983.

Shieh, J., Glatz, C.E., Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem. Prepr., 32, 1, 606, 1991.

Sternberg, M., Hershberger, C., Biochim. Biophys. Acta, 342, 195, 1974.

Strege, M.A., Dubin, P.L., West, J.S., Daniel Flinta, C.D., In: Ladisch, M., Willson, R.C., Painton, C.C., Builder, S.E. (eds), "Protein purification: from molecular mechanisms to large-scale processes", American Chemical Society, Washington, DC, chap. 5, 1990.

Strelzowa, S.A., Tolstogusow, W.B., Colloid & Polymer Sci., 255, 1054, 1977.

Sumi, A., Ohtani, W., Kobayashi, K., Ohmura, T., Yokoyama, K., Nishida, M. and Suyama, T. (1993) Biotechnol. Blood Proteins, 227, 293-298.

Sundow, G., Birkett, D. J and Wade, D. N. (1975) Mol. Pharmacol., 11, 824.

Sundow, G., Birkett, D. J and Wade, D. N. (1975) Mol. Pharmacol., 12, 1052-1061.

Teramoto, A., Watanabe, M., Izuka, E., Abe, K., J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem., A31, 1, 53-64, 1994.

Topuzoğulları, M., Çimen N., Mustafaeva Z., Mustafaev M, European Polymer Journal, 2007, In(Sunmitted).

- Tristram, G., "Proteins", ed. Neurath, G., Bailey, K.M., IL, Moscow, 1, 244, 1956.
- Tsuruta, T., Adv. Polym. Sci., 126, 1, 1996.
- Veis, A., Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem. Prepr., 32, 1, 596, 1991 and references therein.
- Voycheck, C.L., and Tan, J.S., "Ion containing polymers and their biological interactions" in: Polyelectrolytes", Science and Technology, Hara, M (Ed.), New York, 299-388, 1992.
- Walter, H., in: Catsimpoilas (ed) "Method of cell separation", Plenum, New York, vol. 1, 307, 1977.
- Wang, B. C. (1985) In Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (eds) Method in Enzymology, 115. academic Press, London, 90-112.
- Xia, J., Dubin, L.P., Morishita, Y., Sato, T., Muhaberac, B.B., Biopolymers, 35, 411-418, 1995.
- Xia, J., Dubin, P., Dauzenberg, H., Langmuir, 9, 2015, 1993.
- Xia, J., Dubin, P.L., "Protein-polyelectrolyte complexes", in: Macromolecular complexes in chemistry and biology, Dubin, P., Bock, J., Davis, R., Schulz, D.N., Thies, C., (Eds.), Springer-Verlag, London, 1994, 247-272.
- Yapel, A. F., Jr (1985)) In Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (eds) Method in Enzymology, 112. academic Press, London, 3-17.
- Yokoyama, K. And Ohmura, T. (1995) Jpn. J. Apheresis, 14, 19-20.
- Zaitsev, V.S., Izumrudov, V.A., Zezin, A.B., Kabanov, B.A., Dokl. Akad. Nauk. USSR, 332, 319, 1992.
- Zaitsev, V.S., Izumrudov, V.A., Zezin, A.B., Polymer Science USSR, 34, 54, 1992.
- Zhang, K. Y. J. And main, P. (190) Acta Crystallogr., A46, 337-381

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 15.06.1980

Doğum yeri Kocaeli

Lisans 1999-2004 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak.
Fizik Bölümü

Yüksek Lisans 2004-2007 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı