



T.C.

ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**POLİ (METİL VİNİL ETER-*ko*-MALEİK ANHİDRİT) -
BAKIR (II) - SIĞIR SERUM ALBUMİN
BİYOKOMPLEKSİNİN HAZIRLANMASI VE SULU
ÇÖZELTİLERİNDEKİ KARARLILIĞI ÜZERİNE
FARKLI pH VE TUZ KONSANTRASYONLARININ
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Rahime Bilge BÖRKLÜ

Doç. Dr. Mesut KARAHAN (Danışman)

Doç. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN (Eş Danışman)

İSTANBUL 2020

T.C.

ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**POLİ (METİL VİNİL ETER-*ko*-MALEİK ANHİDRİT) -
BAKIR (II) - SIĞIR SERUM ALBUMİN
BİYOKOMPLEKSİNİN HAZIRLANMASI VE SULU
ÇÖZELTİLERİNDEKİ KARARLILIĞI ÜZERİNE
FARKLI pH VE TUZ KONSANTRASYONLARININ
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Rahime Bilge BÖRKLÜ

Doç. Dr. Mesut KARAHAN (Danışman)

Doç. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN (Eş Danışman)

İSTANBUL 2020

ÖZET

Antikor oluşumunda sentetik peptidler yeterli moleküler büyüklükte olmadıkları ve istenen immünojenliği sağlayamadıkları için alternatif olabilecek lineer taşıyıcıları geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Fonksiyonel polimerlerle komplekslenen metal iyonlarının da biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynadığı görülmüştür. Bu bağlamda suda çözünür polielektrolitlerin ve polielektrolit-protein-metal komplekslerinin yüksek immünojenik aktivite göstererek immün yanıt geliştirmede başarılı olduğu çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ayrıca başta sentetik polimerik aşı sistemleri çalışmaları olmak üzere biyouyumluluğu yüksek biyokompleksler, farmakoloji, enzim immobilizasyonu, biyomedikal uygulamalar gibi farklı biyoteknolojik uygulamalarda da araştırılmaktadır.

Yapılan tez çalışmasında, suda çözünebilir sentetik bir polielektrolit olan poli (metil vinil eter ko-maleik anhidrit) (PMVEMA) ve sığır serum albumin (BSA) ile PMVEMA-BSA konjugatı ve bakır iyonları (Cu^{2+}) varlığında PMVEMA- Cu^{2+} -BSA biyokompleksi sentezlendi. Hazırlanan konjugat ve biyokomplekslerin sulu çözeltilerinin değişen pH ve tuz konsantrasyonlarında polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyeline ilişkin kararlılıkları Brookhaven 90 Zeta PALS Zetasizer cihazı ile ölçüldü. pH ve tuz konsantrasyonlarının ikili ve üçlü komplekslerin kararlılığını etkilediği gözlemlendi.

Biyokompleksin kararlılığı immünojenliği açısından önemlidir. Bu nedenle değişen pH ve tuz koşullarındaki yapısının ve kararlılığının ortaya konması, elde edilen verilerin sentetik polimerik aşı sistemleri başta olmak üzere biyokompleks ile ilgili yapılacak çalışmalara katkı sağlaması, daha etkin ve daha kararlı biyokomplekslerin geliştirilmesine yardımcı olması beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Sentetik Polielektrolit, Polielektrolit-Metal-Protein Kompleksleri, BSA (Sığır Serum Albumin), Zetasizer ölçümleri, Zeta Potansiyeli

ABSTRACT

PREPARATION OF POLY (METHYL VINYL ETHER-*co*-MALEIC ANHYDRIDE) - COPPER (II) - BOVINE SERUM ALBUMIN BIOCOMPLEX AND THE EFFECT OF DIFFERENT pH AND SALT CONCENTRATIONS ON THE STABILITY OF WATER SOLUTIONS

Studies are underway to develop linear carriers that may be alternatives as synthetic peptides are not of sufficient molecular size and cannot provide the desired immunogenicity in antibody formation. Metal ions complexed with functional polymers have also been shown to play an important role in biological processes. In this context, it has been proven by studies that water soluble polyelectrolytes and polyelectrolyte-protein-metal complexes are successful in developing immune responses by showing high immunogenic activity. It is also being investigated in different biotechnological applications such as biocompatible biocomplexes, pharmacology, enzyme immobilization, biomedical applications, especially synthetic polymeric vaccine systems studies.

In the thesis study, PMVEMA-BSA conjugate was created by a water-soluble synthetic polyelectrolyte poly (methyl vinyl ether co-maleic anhydride) (PMVEMA) and bovine serum albumin (BSA). On the other hand PMVEMA-Cu²⁺-BSA bio complex was synthesized in the presence copper ions (Cu²⁺). The stability of the aqueous solutions of the prepared conjugate and biocomplexes at varying pH and salt concentrations were measured with the Brookhaven 90 Zeta PALS Zetasizer device. It was observed that pH and salt concentrations affect the stability of binary and triple complexes.

Stability of the biocomplex is important for its immunogenicity. For this reason, it is expected to reveal the structure and stability of the changing pH and salt conditions, the data obtained will contribute to the studies on biocomplex, especially synthetic polymeric vaccine systems, and help to develop more effective and more stable biocomplexes.

Keywords: Synthetic Polyelectrolyte, Polyelectrolyte-Metal-Protein Complexes, BSA (Bovine Serum Albumin), Zetasizer Measurements, Zeta Potential

TEŞEKKÜR

Üsküdar Üniversitesi Moleküler Biyoloji bölümünde tamamlamış olduğum tez çalışmamda bilgi ve deneyimlerini aktaran, bana laboratuvar olanaklarını sunan, her türlü konuda yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Mesut KARAHAN ve eş danışman hocam Doç. Dr. Dolunay ŞAKAR DAŞDAN'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Muhsin KONUK ve Prof. Dr. Tunç ÇATAL'a

Yüksek lisans eğitimimde bana yoldaşlık eden, her türlü bilgi birikiminden yararlandığım sevgili Kübra ERGÜN ve Refika AYDOĞDU'ya

Bana her zorlandığım, çözmemin imkânsız olduğunu düşündüğüm anlarda bile en ön sırada destek sağlayan, avucumdaki çiçeği diriltmeye dair içimdeki umudu daima yeşerten aziz dostum Büşra Nur KILIÇ'a

Hayatım boyunca güzel varlıklarını hissettiren, maddi manevi destekleriyle her zaman yanımda olan değerli ailem anneme, babama, ablama ve biricik kardeşime

Üzerimde emeği olan, bana yardımlarını esirgemeyen ismini sayamadığım tüm değerli hocalarım ve arkadaşlarıma

Teşekkür ederim.

BEYAN FORMU

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, tarafımdan retilildiğini ve Üsküdar niversitesi güncel tez yazım kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

.08.2020

Rahime Bilge BÖRKLÜ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN FORMU	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Polimerler	3
2.2. Polielektrolitler	5
2.2.1. Homopolielektrolitler	6
2.2.2. Polielektrolitlerin Yapısal Davranışlarını Etkileyen Değişkenler	7
2.2.3. Polimerizasyon	10
2.2.4. Kopolimerizasyon	12
2.2.5. Polielektrolitlerin Uygulama Alanları	13
2.3. Poliamfolitler	13
2.4. Proteinler	15
2.4.1 Albuminler	17
2.5. Polielektrolit Kompleksler	19
2.5.1. Polielektrolit Komplekslerinin Oluşum Prensipleri	22

2.5.2. Polielektrolit ile Protein Komplekslerindeki Etkileşimler.....	26
2.5.3. Polielektrolit Protein Komplekslerde Fiziksel Haller.....	27
2.5.4. Polielektrolit Komplekslerin İmmünojenik Aktivitesi	29
2.6. Aşı Adjuvanları ve Etki Mekanizmaları	30
2.7. Nanopartiküllerin Sentetik Aşı Sistemlerinde Kullanılması.....	31
2.8. Polielektrolitlerin Sentetik Aşı Sistemlerinde Kullanılması.....	32
2.9. Sentetik Polimerler ve Konjugasyonu	34
2.10. Karbodiimidler.....	36
2.11. Zetasizer Ölçümleri.....	38
2.11.1 Polidispersite ve Partikül Boyutu	38
2.11.2 Mobilite ve Zeta Potansiyeli.....	39
3. GEREÇ ve YÖNTEM	44
3.1. Gereçler.....	44
3.1.1. Kullanılan Deney Ekipmanları (Marka/Model).....	44
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Üretici Firmaları	44
3.1.3. Kimyasal Maddeler.....	45
3.2 Kimyasalların Hazırlanması	46
3.2.1 BSA Çözeltilisinin Hazırlanması	46
3.2.2 PMVEMA-BSA Konjugatının Sentezlenmesi.....	46
3.2.3 PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA Kompleksinin Sentezlenmesi	48
4. BULGULAR.....	50
4.1. Çözeltilerin Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarında Elde Edilen Veriler	50
4.1.1. BSA Çözeltilisinin Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarında Elde Edilen Veriler.....	50
4.1.2. PMVEMA-BSA Konjugatının Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarında Elde Edilen Veriler	51

4.1.3. PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA Kompleksinin Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarında Elde Edilen Veriler	53
4.2. BSA, PMVEMA-BSA ve PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA Sulu Çözeltilerinin Polidispersite ve Partikül Boyutu üzerine farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisinin İncelenmesi 56	
4.2.1 BSA Çözeltilisinin Polidispersite ve Partikül Boyutu üzerine farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi.....	56
4.2.2 PMVEMA-BSA Çözeltilisinin Polidispersite ve Partikül Boyutuna Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi.....	59
4.2.3 PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA Çözeltilerinin Polidispersite ve Partikül Boyutu Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi	63
4.2 BSA, PMVEMA-BSA ve PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA Sulu Çözeltilerinin Mobilite ve Zeta Potansiyeli Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisinin İncelenmesi	67
4.2.1 BSA Çözeltilisinin Mobilite ve Zeta Potansiyeli üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi.....	67
4.2.2 PMVEMA-BSA Konjugatının Mobilite ve Zeta Potansiyeli üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi	71
4.2.3 PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA Çözeltilisinin Mobilite ve Zeta Potansiyeli üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi.....	75
5. TARTIŞMA.....	80
5.1. BSA Çözeltilisinin Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi	80
5.2. PMVEMA-BSA Konjugatının Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi.....	81
5.3. PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA Biyokompleksinin Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi.....	83
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	85
7. KAYNAKLAR	87
8. İNTERNET KAYNAKLARI.....	97
EKLER	98
Ek1. Özgeçmiş	98

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: BSA çözeltisinin farklı pH değerlerinde polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyeli sonuçları	50
Tablo 2: BSA çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyeli sonuçları.....	51
Tablo 3: PMVEMA-BSA konjugatının farklı pH değerlerinde polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyel sonuçları.....	52
Tablo 4: PMVEMA-BSA konjugatı çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyeli sonuçları.....	53
Tablo 5: PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA Kompleksi çözeltisinin farklı pH değerlerinde polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyel sonuçları.....	54
Tablo 6: PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyel sonuçları.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Polielektrolit ve yüksüz polimerlerde konsantrasyona bağlı viskozite değişim grafiği.....	9
Şekil 2: Polimerlerdeki farklı zincir yapılanmaları: a) doğrusal polimer b) dallanmış yapılı polimer c) çapraz bağlı polimerler.....	10
Şekil 3: Simpleks oluşum yolları.....	24
Şekil 4: Polimerin karboksil grubunun aktivasyonu ile polimer-peptid konjugatının eldesi	37
Şekil 5: Net enerji grafiği	40
Şekil 6: Negatif yüklü partikülün zeta potansiyeli (a) çift katman ve (b) çift katman potansiyel profili	42
Şekil 7: PMVEMA kopolimerinin yapısı.....	45
Şekil 8: PMVEMA-BSA biyokonjugatının konvansiyonel yöntem ile eldesi	47
Şekil 9: PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA biyokompleksinin şematik gösterimi.....	48
Şekil 10: BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde polidispersitesindeki değişim .	56
Şekil 11: BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde partikül boyutu değişimi	57
Şekil 12: BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında polidispersite değişimi	58
Şekil 13: BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında partikül boyutu değişimi.....	59
Şekil 14: PMVEMA-BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde polidispersitesindeki değişim.....	60
Şekil 15: PMVEMA-BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde partikül boyutu değişimi.....	61
Şekil 16: PMVEMA-BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında polidispersite değişimi	62
Şekil 17: PMVEMA-BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında partikül boyutu değişimi.....	63

Şekil 18: PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde polidispersitesindeki değişim.....	64
Şekil 19: PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde partikül boyutu değişimi.....	65
Şekil 20: PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarındaki polidispersite değişimi	66
Şekil 21: PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında partikül boyutu değişimi	67
Şekil 22: BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde mobilitesindeki değişim.....	68
Şekil 23: BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde zeta potansiyelindeki değişim. 69	
Şekil 24: BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında mobilite değişimi ..	70
Şekil 25: BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında zeta potansiyel değişimi.....	71
Şekil 26: PMVEMA-BSA konjugatının sulu çözeltisine ait farklı pH konsantrasyonlarında mobilite değişim grafiği.....	72
Şekil 27: PMVEMA-BSA biyokonjugatının farklı pH konsantrasyonlarındaki zeta potansiyeli değişim grafiği.....	73
Şekil 28: PMVEMA-BSA sulu çözeltisinin farklı tuz konsantrasyonları altındaki mobilite değişim grafiği	74
Şekil 29: PMVEMA-BSA biyokonjugatının farklı tuz konsantrasyonlarına ait zeta potansiyeli grafiği	75
Şekil 30: PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA kompleksinin farklı pH konsantrasyonlarında mobilite değişim grafiği	76
Şekil 31: Farklı pH koşullarında PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA biyokompleksinin sulu çözeltisinin zeta potansiyeli değerleri grafiği	77
Şekil 32: PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA kompleksinin farklı NaCl konsantrasyonları altındaki mobilite değişim grafiği.....	78
Şekil 33: PMVEMA-Cu ²⁺ -BSA biyokompleksinin farklı NaCl konsantrasyonlarına ait zeta potansiyeli değişim grafiği	79

SİMGE VE KISALTMALAR

BSA	Sığır Serum Albumin
Da	Dalton
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür
HSA	İnsan serum albumini
KLH	Keyhole Limpet Hemosiyanin
M	Molarite
ml	Mililitre
mV	Milivolt
n	Mol
NIPAA	Poli-N-isopropilakrilamit
NP	Nanopartikül
OVA	Ovalbumin
PAA	Poliakrilik asit
pI	İzoelektrik nokta
PI	Polidispersite indeksi
PMAA	Polimetilmetakrilik asit
PMVEMA	Poli (Metil Vinil Eter-ko-Maleik Anhidrit)
PVP	Poli-n-vinilprolidin
SA	Serum albumin
VP	Polivinilpirilidon

1. GİRİŞ

Polikompleksler tek başına bulunan polimer veya metale göre daha farklı fizikokimyasal özelliğe sahip olmaktadır. Ayrıca polikomplekslerle ilgili yapılan araştırmalar sonucu, genellikle konjugat ve ilaç yapımı üzerine odaklanılmıştır (Karahan ve ark., 2013). Polikomplekslerin moleküler ağırlığı düşük olan bileşiklere benzer şekilde, geçiş metal iyonlarının az yüklenmiş ya da yüksüz olan suda çözünebilir polimerlerini kendine bağlama özelliği vardır. Bu nedenle polimer bileşenleri, kompleks oluşturabilme özelliği kazanmış olur. Yapılan çalışmalar Cu, Zn, Fe gibi metal iyonlarının bu kapsamdaki rolünün büyük olduğunu göstermektedir.

Fizyolojik şartlar altında dayanıklı olan polikompleksler, yüksek immünojenik aktivite göstermektedir (Kabanov ve ark., 1978). Bu konuda yapılan araştırmalarda; immünojenik olarak zayıf olan antijenlerin farklı yapıdaki yapay polielektrolitlerle bağlanması sonucu, organizmada bağışıklığı artırıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Petrov ve ark., 1985). Aynı zamanda sentetik peptidler, antikor oluşumu için uygun bir büyüklükte değildirler. Antikor üretimine yönelik olarak, yeterli moleküler büyüklüğe ulaştırılması ve immün yanıtın oluşması için peptidlerin lineer taşıyıcılarla bağlanması gerekmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, polimer olarak çeşitli polielektrolitler tercih edilmiştir. Polielektrolitleri molekül boyutu, elektrik yükü veya konformasyon gibi özellikleri bakımından istenen şekilde sentezlemek mümkündür. Suda iyi çözünmeleri de çeşitli komplekslerin sentezlenebilmesi açısından avantaj sağlamaktadır.

Polielektrolitler, katyonik ve anyonik grupları kovalent bağlı bulunduran makromoleküller ile zıt yüklü iyonlardan oluşan polimer sistemlerdir. Kimya ve immünoloji alanının ortak çalışmalarında, sentetik elektrolitlerin kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir. Bu moleküllerin, sentezinin ve modifikasyonunun daha kolay olması ve ayrıca büyük moleküler yapıda elde etme ihtimalinin yüksekliği nedeniyle yapay polielektrolitlerin, kullanıma daha uygun olduğu varsayımını güçlendirmektedir. Aynı zamanda bu moleküller, suda iyi çözünürler ve bilinen yapılardaki çeşitli kompleksleri sentezlemek de mümkün hale gelir (Dautzenberg ve ark., 1994)

Sentetik polimerler ile biyomoleküllerin konjugatları, tıp, eczacılık, biyomühendislik gibi pek çok uygulama alanında kullanılmaktadır. Suda çözünür polielektrolitler ile proteinlerin veya peptid, enzim gibi moleküllerle oluşturduğu konjugatın fonksiyonu, mekanizması üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Konjugatların çeşitli alanlarda kullanımının mümkün olmasının yanı sıra immün yanıtın oluşturulmasında etkiyi arttırması, maliyetinin düşük ve elde edilmesinin kolay olması gibi nedenler de tercih edilmelerindeki en önemli sebeplerdir. Klasik adjuvanlar veya taşıyıcı proteinlere göre avantajlarının yüksek olması nedeniyle konjugatlar yeni tür aşı geliştirme sistemlerinde kullanılmaktadır. Polimerlerin kolay modifikasyonu, istenen amaca yönelik formda sentezlenebilmesi, immünojenik olmaması ve immün yanıtı desteklemesi, yeni tür aşılar için büyük olanaklar sağlamaktadır. Aynı zamanda oluşturulacak biyopolimer sistemlerin yapısında metal kullanımının, açığa çıkabilecek serbest bileşenleri engellediği ve immünojenik aktiviteyi arttırdığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Kissel ve ark., 1996).

Yapılacak olan tez çalışmasında; protein olarak BSA, kolay bulunabilirliği ve çözünürlüğünün iyi olması gibi avantajları nedeniyle tercih edilmiştir. Antikor oluşumunda BSA, yapısal olarak konjugasyon için önemli bir ilaç proteindir. Maleik anhidrit ve metil vinil eterin bir kopolimeri olan poli (metil vinil eter-ko-maleik anhidrit) (PMVEMA), ve BSA biyokonjugatı hazırlanacaktır. Polimer – protein karışımına, Cu^{2+} iyonu eklenerek bağlanması sağlanacak ve bir kompleks oluşturulacaktır. Hazırlanan PMVEMA- Cu^{2+} -BSA biyo polikompleksinin sulu çözeltisi üzerine, farklı konsantrasyonlarda pH ve tuzun etkisi incelenecektir. Ayrıca stok BSA çözeltisi ve Cu^{2+} iyonu barındırmayan PMVEMA-BSA konjugatı üzerine farklı konsantrasyonlarda pH ve tuzun etkisi araştırılacaktır. Çalışmanın biyopolimer-metal polikompleks ve konjugatları ile ilgili yapılan çalışmalara hem organizmadaki davranışların açıklanmasına hem de biyokonjugasyon alanındaki teknolojinin gelişmesine olanak sağlaması beklenmektedir. İmmünojenik polimer-peptid konjugatlar aşı alternatifi olacak niteliktedir. Ayrıca çeşitli teşhis ürünleri ile biyoteknolojik alandaki bazı ürünlerin üretimi ve geliştirilmesinde de önemli rol oynaması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polimerler

Monomerler, fonksiyonel olarak polimerizasyona uğrayabilen ve birbirine kovalent bağlarla bağlanarak büyük moleküller oluşturabilen, moleköl ağırlığı düşük kimyasal maddelerdir (Saçak, 2004). Polimerler ise sözlük anlamı olarak Yunancada “polys” ve “meros” ifadelerinin bir araya gelerek, benzer ya da farklı pek çok birimin kovalent bağlarla bağlanması sonucu oluşan yapıların adlandırılmasında kullanılmıştır. Polimerler; monomerlerin kimyasal bağlarla bağlandığı, yüksek moleköl ağırlığına sahip uzun zincirli bileşiklerdir (Pişkin, 1987).

Monomerler polimerize olma özelliğine sahiptir. Bu nedenle polimerler, polimerizasyon reaksiyonları adı verilen tepkimeler sonucu sentezlenebilirler. Kondenzasyon (adım) polimerizasyonu veya katılma (zincir) polimerizasyonu olarak adlandırılan farklı mekanizmalara sahip reaksiyonlar polimerizasyon tepkimelerine örnek olarak gösterilebilir (Baysal, 1981; Billmeyer, 1981).

Polimerler, ucuz ve hafif olmalarının yanı sıra yeterli düzeyde mekanik özelliğe sahip olmaları, şekillendirilmelerinin kolay olması, çeşitli amaçlara uygun olarak kullanılabilmeleri ve kimyasal açıdan korozyona uğramayan ve inert özelliğe sahip olan maddelerdir (Saçak, 2004). Aynı zamanda moleköl ağırlığının yüksek olması sayesinde vizkozite özelliği de fazladır (Tezcan ve ark., 2008).

Polimerler; oluşum şekilleri, kimyasal bileşimleri, yapıları, fiziksel durumları, fiziksel hal ve geçişleri, sentez yöntemleri gibi özelliklerine göre çeşitli şekilde sınıflandırılmaktadır. Kimyasal bileşimlerine göre organik veya inorganik polimerler; oluşumlarındaki zincirlerin yapılarına göre düz, dallanmış veya çapraz bağlı polimerler; yapılarına göre homopolimer veya kopolimerler olarak adlandırılırlar (Billmeyer, 1981). Ayrıca oluşum şekillerine göre doğal veya sentetik polimerler, sentezlenme yöntemlerine göre kondenzasyon polimer zinciri veya katılma polimerleri, fiziksel durumlarına göre amorf, kristalin veya yarı kristalin polimerler gibi polimer çeşitleri vardır (Pişkin, 1987).

Oluşumlarına göre doğal polimer olarak adlandırılan polimerler, doğadan hazır olarak elde edilen veya mikroorganizmalar tarafından üretilen polimerlerdir. Nişasta, kitin, selüloz gibi polisakkaritler ve kas lifleri, enzimler, ipek gibi proteinler ile deoksiribonükleik asit, ribonükleik asit gibi nükleik asitler doğal polimerlere örnek olarak verilebilir. Hidrolize uğrayabilecek bağ yapısına sahip olan doğal polimerler, genellikle mikroorganizmaların ürettiği hidrolitik enzimler tarafından parçalanabilir (Muller, 1996; Scott, 1999; Zhang ve ark., 2010)

Doğal polimerler, biyoyumluluk, biyobozunma ve etkinliğinin iyi olması gibi özellikleri nedeniyle nano partiküllerin oluşumu için öncelikli olarak tercih edilirler (Reis ve ark., 2006). Özellikle farmasötik nanopartiküller polimer bileşikleriyle üretilebilirler (Jia ve ark., 2011). Sentetik polimerler ise farklı kimyasal modifikasyonlarla elde edilen polimerlerdir. Doğal polimerlerin yapısı örnek alınarak ilk polimerler sentezlenmiştir (Fessenden ve ark., 2001). Sentetik polimerlerin en büyük avantajı; iyi şekilde yapılandırılabilirmeleri, istenen işlevsellik ve biyobozunurluğun elde etmek için uyarlanabilmeleridir. Ayrıca suda çözünebilir sentetik polimerlerin biyolojik sistemlerle çeşitli fonksiyonlar sergiledikleri bilinmektedir (Lin ve ark. 2006, Voycheck, 1992).

Sentetik polimerler, tekrarlanabilir küçük yapılardan oluşan zincirli moleküller olup monomerlerine göre farklı özellik gösterir. Sentetik polimerlerin monomerleri, genellikle hidrojen ve karbon atomlarından oluşur ve bir araya geldiklerinde uzun hidrokarbon zincirine sahip polimer yapısını oluştururlar. Örneğin en basit monomerlerden biri etilendir ve etilenin oluşturduğu polimer, polietilen olarak adlandırılır (Nair ve ark., 2007).

Biyometaryal ve doku mühendisliği, tıp, farmakoloji gibi çeşitli alanlarda sentetik polimerlerin yaygın kullanımına rastlanmaktadır. İlaç iletimi/salınımı, yüzey modifikasyonu, enzim immobilizasyonu, biyosensörler, biyoçipler, aşı geliştirme, hücre kapsülleme gibi uygulamalarda sentetik polimerlerden sıklıkla yararlanılmaktadır (Tüylek, 2017).

Özellikle de daha önce yapılan çalışmalarda sentetik polimerlerin; antijenlerle beraber organizmaya girerek bağışıklığı arttırdığı, kandaki dolaşımı etkileyen tortuları çözdüğü, farmakolojik salınım sistemlerinde ilacın organizma içinde yavaş salınımını

sağlayarak adjuvant ve antimikrobiyal etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle sentetik polimerlerin kullanılacağı alana uygun olarak seçilmeleri oldukça önemlidir.

2.2. Polielektrolitler

Bir terim olarak “Polielektrolit”, makroiyon yani kovalent bağlı katyonik veya anyonik grupları taşıyan makromoleküller ve elektronötralite sağlayan zıt yüklü iyonlardan oluşan polimer sistemleri ifade etmek için kullanılmaktadır.

Polielektrolitler, uzun bir moleküler zincir bulunduran, suda çözünebilme ve iyonize hale geçebilme özelliğine sahip, fonksiyonel gruplar barındıran organik bileşiklerdir. Ana zincirlerinde önemli düzeyde yük taşırlar. Bu yüklerin oluşturduğu yük yoğunluğu, polielektrolitleri suda çözünebilir hale getirerek sulu çözeltileri de reolojik ve yapıştırma-tutuculuk özelliklerini değiştirmek için kullanışlıdır (Dautzenberg ve ark., 1994).

Polielektrolit reolojisi ve karmaşık bileşenlerdeki yüklü taneciklerle olan etkileşimleri; molekül ağırlığı, moleküler yapı, çözücünün kalitesi gibi makromoleküler parametreler ve ayrıca tuz konsantrasyonu ile ilgili değişkenler ile istenildiği gibi ayarlanabilmektedir (Schaaf ve Schlenoff, 2015).

İyonik özellik taşımayan polimerlerden farklı olarak polielektrolitler, ana zincirde artı ve eksi yük taşıyan polimerlerdir. Tüm monomerleri aynı işarete sahip yük taşıyan polielektrolitler, homopolielektrolitler olarak adlandırılırlar. Hem katyonik hem de anyonik grupların birbirine kovalent olarak bağlandığı makromoleküller ise poliamfolitlerdir.

Polielektrolitler prensip olarak, bir kimyasal yapının polimer zincirine uygun sayıdaki iyonik grupların kovalent olarak bağlanarak, uygun bir pH’da suda çözünür hale getirilmesiyle elde edilebilir. Polielektrolitler genel olarak kondenzasyon veya katılma polimerleşme reaksiyonlarıyla elde edilebilir. Ayrıca doğadan elde edilebilen polielektrolit yapıdaki polisakkaritler ve bazı proteinler de vardır. Nişasta veya selüloz gibi

iyonik olmayan doğal polimerlerde kimyasal modifikasyonla polielektrolit hale dönüştürülebilir (Dautzenberg ve ark., 1994).

Polielektrolitler ayrılmış iyonik gruplar barındıran polimer türüdür. Aynı zamanda kapsamlı olarak incelenmesi gereken makromolekül sınıfıdır (Robertis ve ark., 2015). Çift zincir karakteristiği ve yüksek oranda yük içermeleri bakımından ilginç olgular içerirler. Polielektrolitler farklı şekilde sınıflandırılabilir. Polielektrolitlerin sınıflandırılmasında polielektrolitin; kökeni, yükü, yük yoğunluğu, zincirin konformasyonu, iyon bölgesinin konumu, kompozisyonu dikkate alınmaktadır.

Polielektrolitler tüm monomerlerinde aynı tür işaretli yüke sahip polielektrolitlere homopolielektrolit adı verilir. Hem katyonik hem de anyonik grupların kovalent olarak bağlı bulundukları makromoleküller ise poliamfolitler olarak adlandırılırlar. Yapısında çokça protein bulunduran doğal poliamfolitler bulunmakla beraber sentetik olarak elde edilebilen poliamfolitler de vardır. İzoelektrik noktalarında poliamfolitlerin molekülleri üzerindeki net yük toplamı sıfırdır. Homopolielektrolitler, katyonik ve anyonik polielektrolitler olarak iki alt grupta incelenirken poliamfolitlere nötral polielektrolitler de denir (Karahana ve ark., 2013).

2.2.1. Homopolielektrolitler

Homopolielektrolitler, tekrarlayan her monomer birimi yüklü bir elektrolit grup taşıyan polimerlerdir. Bu elektrolit gruplar sulu çözeltilerinde dissosiyasyona uğrayarak polimeri yüklü hale getirirler. Sulu çözeltileri, tuzlar gibi elektriği iletir ve polimerlerin koloidal çözeltileri gibi viskozdur. Proteinler, polipeptidler gibi pek çok biyolojik molekül polielektrolit formundadır.

Polimer kompozit malzemelerin yeni bir türü olarak polielektrolit kompleksler, elektrostatik etkiyle zıt yüklü polielektrolitlerden oluşur. Polielektrolit komplekslerin ve konjugatlarının sentezlenmesi, biyolojik açıdan etkilerinin anlaşılması ve immünolojik etkilerinin aydınlatılması için araştırmalar ile polimerik sentetik aşılarda geliştirilmesiyle ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Polielektrolitlerin ticari uygulamalarının çoğu su arıtımı, kireç çözme, reoloji modifikasyonu veya süper emici jeller üzerinedir (Schaaf ve Schlenoff, 2015). Keşfinden itibaren polielektrolit kompleksler üzerinde ise farklı alanlarda daha derin çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Tirrell, 2018). Polimer kompozit malzemelerin yeni bir türü olan polielektrolit kompleksler, elektrostatik etkiyle zıt yüklü polielektrolitlerden oluşur. Genellikle tıbbi implant materyalleri, ilaç dağıtımı, yapıştırıcılar, katalizör taşıyıcıları ve biyolojik pek çok alanda kullanılmaktadır (Schaaf ve Schlenoff, 2015; Tan ve ark., 2018; Tirrell, 2018; Volod'ko ve ark., 2018; Wasupalli ve Verma, 2018).

2.2.2. Polielektrolitlerin Yapısal Davranışlarını Etkileyen Değişkenler

Polielektrolitlerin yapısal davranışlarını etkileyen çeşitli etkenler bulunmaktadır. Bunlar genellikle dört farklı alanda incelenmektedir. Polimere bağlı bulunan yüklü gruplar anyonik ve katyonik olarak gruplandırılmaktadır. Bu gruplarda kendi içinde güçlü ve zayıf olan asit ve bazlar olarak iki grupta incelenebilir. Kuvvetli bir polielektrolit, çözeltide iyonlarına ayrışabilir. Ancak zayıf bir polielektrolit, iyonlarının tamamına ayrılmaz. Bu sebeple zayıf polielektrolitler, çözeltide tamamen yüklü olmazlar ve pH değişimiyle üzerlerindeki yük dağılımı da ayarlanabilir.

Polielektrolit davranışının tayininde bir diğer önemli parametre de iyonik grubun asit ve baz kuvvetlerinin yanında polimer zinciri boyunca bulunan bitişik anyonik ve katyonik yükler arasındaki uzaklıktır. Bu yük yoğunluğu, iyonik kısımları arasındaki uzaklığın ortalaması olarak da tanımlanabilir. Ayrıca polimer zinciri boyunca bulunan iyonik grupların dağılımı da çözünürlük gibi bazı polielektrolit özelliklerini önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Karahan ve ark., 2013).

Yüksüz polielektrolitleri normal makromoleküllere benzer şekilde davranırlar. Ancak iyonik gruplardaki küçük ayrışmanın varlığı, polielektrolitin özelliklerinde yoğun biçimde değişikliklere neden olabilir. İyonik grupların tamamen ya da kısmen ayrışması sonucu elektrostatik etkileşimleri ortaya çıkarır ve polimerin davranışında sapmaya neden olabilir. İyonik gücü, difüzyon katsayısı, çözünürlük, viskozitesi, pH derecesi,

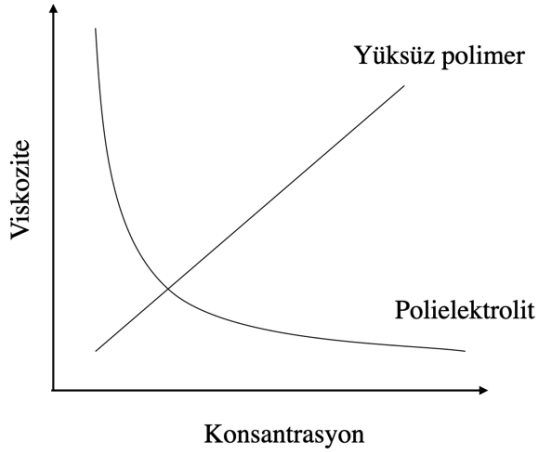
iyonlaşma sabiti gibi yeni bir iyonik grubun polielektrolite eklenmesi de polielektrolitin özelliklerini etkileyebilir (Dakhara ve Anajwala 2010).

Polielektrolit özelliklerin saptanmasında makro iyonun üç boyutlu molekül yapısındaki yüklü kısımların yerleşimi de önemli bir rol oynamaktadır. İyonik gruplar polimerin ana zincirinin birimi olarak bulunabileceği gibi ana zincire asılı olarak yan zincirlerde de bulunabilir. Yüklü grupların üç boyutlu moleküler yapıda konumları polianyon ve polikasyon komplekslerin oluşumuyla ilişkilidir.

Düşük moleküler ağırlığa sahip counter iyonların türü, polielektrolitlerin çözünürlük ve yapı oluşumu gibi çözeltideki sistemin özellikleri üzerinde güçlü etkilere sahiptir (Dautzenberg ve ark., 1994).

Herhangi bir polimerin yapısı ve çözeltiyle olan ilişkisi, o polimerin konformasyonunu etkileyen özelliklerinden bazılarıdır. Çözeltideki yüksüz olan polimer zinciri rastgele yumak konformasyonu gösterir. Ancak lineer durumdaki polielektrolit üzerindeki yükler, Coulomb etkisi ile birbirini iter ve bu itmeyi azaltıcı uzamış halde bulunma eğilimine girerek en uygun konformasyona dönüşür. Bu konformasyonel dönüşüm, polielektrolit çözeltilerde viskozitenin yükselmesine sebep olur. Sulu ortamın iyonik şiddeti, polielektrolit çözeltilerinin özelliklerini etkiler. İyonik şiddetin artışıyla değişen viskozite, makroiyonların elektrik yükleri arası itme kuvvetini engeller. Bu nedenle iyonik şiddetteki artışın daha da fazla olması sonucu yüklü makromoleküller, yüksüz makromoleküllere benzer davranış göstermeye başlar [1].

Şekil 1: Polielektrolit ve yüksüz polimerlerde konsantrasyona bağlı viskozite değişim grafiği



Ortam pH'ı da iyonik şiddet gibi zayıf polielektrolitlerin özelliklerine etki eder. Polielektrolitlerdeki iyonik grupların disosiasyon dereceleri ve polielektrolitin yük yoğunluğu pH'tan etkilenmektedir. Aynı zamanda polimerlerde konsantrasyon arttıkça viskozitesi artar. Ancak polielektrolitlerde durum farklıdır. Çünkü polielektrolitteki pozitif ve negatif yüklerin konsantrasyonu azaldıkça birbirini iterek polielektrolitin şişmesine, dolayısıyla viskozitesinin artmasına yol açar (Şekil 1) (Mustafaev ve Saraç, 1996c).

Polielektrolit çözeltiler yüksek iyonik iletkenliğe sahiptir. Elektrik alanda küçük moleküler ağırlıklı iyonlardan daha yavaş da olsa makroiyonlar hareket ederler (Dautzenberg ve ark., 1994).

Polielektrolitlerin molekül ağırlığı polimerleşme dereceleri ile orantılıdır. Polimerleşme derecelerinin artışı istendiğinde kompleks oluşumuna katkı sağlar ve polimer bağlanma miktarı artar. Aynı zamanda polielektrolit çözeltilerdeki elektrokimyasal özellikler, poliyon zincir uzunluğuna bağlıdır. Yani polikompleksin çökmesi gibi durumlar, polimerdeki polimerleşme derecesinden etkilenmektedir (Mustafaev, 1996a).

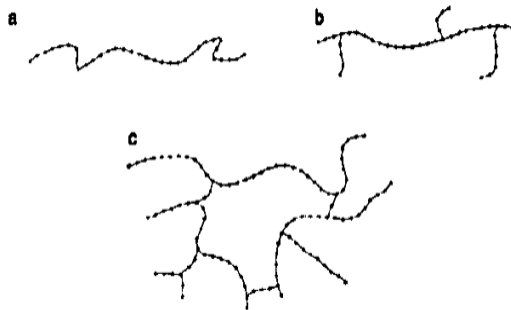
2.2.3. Polimerizasyon

Polimerizasyon yani polimerleşme, monomerlerin büyük yapılı polimer moleküllerini oluşturmak için bağlandığı süreçtir. Polimerleşme tepkimesi sonucunda homopolimer veya kopolimer yapılar meydana gelir.

Polimerler, moleküler boyutları çok küçük olan basit moleküllerin kovalent bağlarla bağlanması sonucu makromoleküller denilen daha büyük boyuta sahip moleküllerdir. Eğer polimer, tek tür monomerden sentezlenmişse homopolimer, kimyasal yapı olarak birbirinden farklı birimlerden oluşuyorsa kopolimer adı verilir.

Polimer zincirinde bulunan karbon atomları birbirlerine kovalent bağlarla bağlıdır. Bu kovalent bağlı olan zincir boyunca sp^3 hibritleşmesi nedeniyle düzgün dörtyüzlü geometri oluşturarak dizilirler. Polimerlerin diğer kimyasal maddelerden ayrılan en önemli özelliği, molekül boyutunun büyüklüğüdür. Bazı mekaniksel özellikler, belirli bir zincir uzunluğuna erişmiş büyük moleküllerde kazanılır. Bu nedenle makromoleküler yapının katkısı polimerler için oldukça fazladır. Aynı zamanda organik yapısı küçük moleküllerin oluşturduğu düşük mol kütlesine sahip katılar ile polimerlerin bulunduğu yüksek mol kütleli katılar vardır. Bunlar genellikle katı hal içerisinde incelenen büyük ve küçük mol kütleli katıları ifade eden gruplardır.

Şekil 2: Polimerlerdeki farklı zincir yapıları: a) doğrusal polimer b) dallanmış yapılı polimer c) çapraz bağlı polimerler



(Chawla ve ark., 2013)

Polimerler, zincirlerinin biçimlerine göre farklı özellikler gösterebilmektedirler. Bunlar, doğrusal, dallanmış olan ya da çapraz bağlı bulunan yapılar olabilir (Şekil 2).

Doğrusal polimerler: Yalnızca yan grupları bulunan uzun bir zincire sahip olan polimerlerdir. Doğrusal polimerlerin ana zincirleri başka bir zincire bağlı bulunmaz. Uygun olan çözücülerde çözünebilirler ve eritilerek şekillendirilmeleri yapılabilir.

Dallanmış polimerler: Polimerin ana zincirine, kendi kimyasal yapısına uygun olan dal görünümünde başka bir zincirin kovalent olarak bağlanması sonucu oluşan polimerlerdir.

Çapraz bağlı polimerler: farklı olan polimer zincirlerinin çeşitli uzunluktaki zincirler ile kovalent olarak bağlanmasıyla oluşan polimerlerdir. Çapraz bağları oranının yüksek olması, ağ yapılı polimer oluşumuna sebep olur. Çapraz bağlı polimerler çözünmez fakat bazı çözücülerde hacimleri artabilir. Çapraz bağ yoğunluğunun artışı ile bu polimerin hacminin artma oranı düşer.

Çeşitli uzunluktaki polimer zincirleri, farklı polimerleşme derecesi ve moleküler ağırlığı olan yapısal birimlere sahip makromoleküllerden oluşur. Bu nedenle polimer zincirleri için yalnızca bir molekül ağırlığından söz edilmez. Bunun yerine molekül ağırlığının ortalamasından bahsedilebilir. Polimerlerin moleküler ağırlığı oldukça önemlidir çünkü, bu durum farklı fiziksel özellikleri belirler. Ortalama molekül ağırlığı tanımlanırken kullanılan yöntemle göre değişkenlik gösterebilir.

Polimerler sentezlenirken polimerik malzemenin modifiyesinin yapılması, katı hal ve mikro yapısı, morfolojisi ve fiziksel-kimyasal özellikleri değiştirilebilir. Bu nedenle polimerler kendilerine özgü bir kimyasal yapıya sahip moleküllerdir.

Polimer zincirlerinin belli bir hareketliliği vardır ve kuvvetli bağların oluşumu söz konusu olursa, zincirler birbirinden bağımsız şekilde hareket edemezler. Zincirler arasındaki zayıf Van der Waals bağlarının oluşumu hariç, polar bir grubun varlığından dolayı daha kuvvetli olan bağların oluşumu bu hareket engeli sebep olabilir. Şayet zincirler çok uzun ve kıvrılmış halde ise zincirin birbirine dolanmasına yol açar ve bir yumak görüntüsü verebilir.

2.2.4. Kopolimerizasyon

Kopolimerler, kimyasal olarak yapısı birbirinden farklı olan monomerlerin bir araya gelerek oluşturduğu polimer zinciridir. Kopolimer zincirindeki monomer moleküllerinin diziliş biçimi, polimerizasyon mekanizması ya da sentezlenme yönteminden etkilenir. Birbirinden farklı iki monomer molekülünün, polimer zincirinde dönüşümlü olarak yer almasıyla ardışık kopolimer, zincirdeki sıralamaları arasında herhangi bir düzen yoksa rastgele kopolimer adı verilir. Aynı zamanda birbirinden farklı uzun monomer dizileri birbirini takip ediyorsa blok kopolimer oluşur. Kimyasal yapıları birbirinden farklı olan polimer zincirlerinin, zincir sonları haricindeki bir bölgeden birbirlerine bağlanmalarıyla oluşan polimere ise aş kopolimer oluşur.

Kopolimerlerin elde edilmesi için gerçekleşen reaksiyonlara kopolimerizasyon adı verilir. kopolimerizasyon reaksiyonu sonucu oluşan kopolimer moleküllerinde veya bir tek kopolimer molekülünün çeşitli kısımlarındaki monomer birimleri ve sayıları farklı olabilir. Bu nedenle kopolimerler iki farklı homopolimer karışımı değildir. Her kopolimer molekülü farklı monomerlerin kimyasal bağlarla bağlanmasıyla meydana gelmiştir.

Zincir polimerizasyonu, farklı monomerlerin kullanımıyla yapılırsa bu birimler, kopolimerize olurlar. Kopolimerizasyon reaksiyonları, zincir veya basamaklı polimerizasyon mekanizmasına göre gerçekleşir. Basamaklı şekilde ilerleyen polimerizasyon reaksiyonlarının çoğu, iki farklı monomer içermektedir.

Monomerlerin kopolimerizasyondaki davranışları, kimyasal yapıları ve reaktivlik özelliklerinin anlaşılabilmesi için kopolimerizasyon reaksiyonları önem arz etmektedir. Ayrıca kopolimerize olan monomerlerin çeşitleri veya miktarlarının değiştirilmesi sonucu sayısız özellikte ve miktarda polimer sentezlenebilir. Kopolimerizasyon reaksiyonunda, kopolimer zincirinin reaktivliği zincirin ucundaki monomer birimine bağlıdır. Burada monomer katılım ve dönüşüm oranı göz önünde bulundurularak kopolimerizasyon denklemi kullanılır ve böylece reaktivlik oranı bulunmuş olur.

2.2.5. Polielektrolitlerin Uygulama Alanları

Polielektrolitler tıp, biyotıp, ilaç endüstrisi, su plantasyonu, kozmetikte, kağıt ve gıda endüstrisi başta olmak üzere çok çeşitli alanda kullanılmaktadır. Özellikle ilaç sektöründe polielektrolitler diğer kullanıma amacının yanı sıra kontrollü polimerler, aktif yüzey cisimleri ve kaplama malzemesi olarak tercih edilmektedir (Dautzenberg ve ark., 1994). Polielektrolitler, farmasötik uygulamalarda ilaç formülasyonlarında uygulama ve çözünmeyi artırma veya bağlayıcı maddeler için kullanımı yaygındır. Biyoyapışkan özelliği nedeniyle polielektrolitler tıpta bölgeye özgü iletim amacıyla enjekte edilebilen kontrollü iletim sistemleri için polimer kompleksleri olarak da tanımlanmıştır. (Hamman, 2010; Veis, 1991)

2.3. Poliamfolitler

Polimerler içerdikleri iyon türüne göre polielektrolit ve poliamfolit olarak iki grupta incelenebilir. Bu gruplandırma için polimerde bulunan iyonik grup, polinükleotid, protein vb. makromoleküller önemlidir. Polielektrolitlerin anyonik veya katyonik grupları bulundururken poliamfolitler anyonik ve katyonik grupları beraber bulundurur.

İyonize olmayan suda düşük konsantrasyonlarında büyük bir hidrodinamik hacme ulaşması, polielektrolitlerin özgüsel bir özelliğidir. Bu durum polimer zincirindeki yüklü gruplar arasında oluşmuş olan Coulomb itme kuvvetinin etkisiyle zincirin konformasyonunun değişerek düz bir zincir görünümü almasına neden olur. pH değişimi veya elektrolit eklenmesi, Coulomb itme kuvvetinin engellenmesi sağlanır. Böylece hidrodinamik hacimde azalma meydana gelen zincir, düzensizlik bakımından daha uygun olan bir konformasyona geçer.

Poliamfolitler, yapısal özellikleri gereği, katyonik ve anyonik yapı birimleri (monomerleri) arası Coulomb kuvvetleriyle yönlendirilir. Yeterli seviyede bulunan ($>10-15$ mol %) bu yüklü grupların Coulomb etkisi oluşturması nedeniyle polielektrolitlerin özgün davranışlarına benzer şekilde zincir konformasyonunun gerilmesine sebep olur.

Katyonic ve anyonik grupların molar oranları birbirine yakın oldukça Coulomb etkileşimi, globular konformasyon oluşumuna sebep olur. Bu da polielektrolitin pek çok durumda deiyonize suda çözünmemesine yol açar. pH değişimi veya elektrolit eklenmesi, polielektrolit konformasyonunun düzensiz bir yumak hale gelmesine sebep olabilir ve suda çözünmesini hızlandırabilir. Bu durum genel olarak “antipolielektrolit etkisi” olarak tanımlanmakta ve elektrolit etkisiyle viskozitesinin artışına sebep olmaktadır. Davranışın nedenini açıklamak için farklı teoriler öne sürülmüştür (Higgs ve Joanny, 1991; Merle, 1987)

Poliamfolitlerdeki anyonik ve katyonik yüklerin dengesinin yanı sıra iyonik grupların monomer birimlerine eklenmesi, poliamfolitlerin davranışlarını etkilemektedir. Örneğin bu durum, pH'ın ayarlanması sonucu iyonik grupların nötralize edilmesiyle en iyi şekilde gözlemlenebilir. pH değişimine verilen cevaplara bağlı olarak poliamfolitler dört grupta incelenir.

Birinci yapısal grup poliamfolitler, karakteristik olarak anyonik olan karboksilat grubunu ve katyonik olan amin hidrohalojenürü içerir. İkinci yapısal grup, kuaterner alkil grupları gibi pH'a duyarlı olmayan katyonik grup içerirken anyonik olan grupları nötralize olabilir. Üçüncü yapısal grup, katyonik grubu nötralize olabılırken, sülfonat gruplarına benzer şekilde anyonik grubu pH'a duyarlı değildir. Dördüncü yapısal grup ise uygun pH değerinde, anyonik ve katyonik gruplarının her ikisi de yüklü halde kalabilir. pH etkisinin yanı sıra anyonik ve katyonik grupların hidrate olması ve zıt yüklü grupların arasındaki gerilme gibi diğer önemli durumlar da dikkate alınmalıdır.

Proteinler yapılarında asidik ve bazik olan aminoasitleri içerirler. Bu nedenle amfoterik özellik gösterirler. Proteinler proton alma-verme olayını gerçekleştirerek asidik bir ortamda daha fazla proton bulundurdıklarından net pozitif yüklü, bazik ortamda ise net negatif yüklü olacaktırlar. Aminoasitlerin izoelektrik noktası, net elektriksel yüklerinin sıfır olduğu pH derecesidir.

Poliamfolitlerin pH değişimine karşı oluşan yapılarının keşfi, diğer biyolojik moleküllerin sulu çözeltilerdeki davranışlarının anlaşılmasına da yardımcı olmuştur. Pek çok sentetik sistem, elektroforetik olarak devingenlik göstermeyen ve viskozitenin minimum olarak saptandığı pH değerinde izoelektrik noktaya sahiptir (Higgs ve Joanny, 1991). Bu izoelektrik noktanın pH değerinden daha yukarda ya da daha aşağıdaki pH

değerlerinde, sistemlerin viskozitesinin arttığı gözlenmiştir. İzoelektrik noktadaki yüklü grupların güçlü çekimi nedeniyle polimer, intramoleküler biçimde toplanmakta ve yoğun bir yapı oluşmaktadır. Ayrıca izoelektrik noktadayken çözücünün niteliği, elektrolit eklenmesiyle artmaktadır. Çözünürlük ve pH'a karşı oluşturulan yanıtlar mikroyapılara da bağlı olarak değişebilmektedir. Buna örnek olarak yakın komşu parçacıklarının asidik ve bazik gruplardaki kuvveti etkilemesi verilebilir.

İzoelektrik noktadaki bir protein, bu pH koşullarındayken çözünürlüğü en düşük ve çöktürülebilirliği en kolay olan özelliğe sahiptir. Proteinlerin izoelektrik noktaları da birbirine göre oldukça farklıdır. Ancak izoelektrik noktası nötr pH'a yakın olan proteinlerde genellikle bazik ve asidik aminoasit sayısı eşit olarak bulunur. Proteinler, içerdikleri yan grupları nedeniyle aminoasitler gibi titre edilebilirler. Oluşan titrasyon eğrisi ise kompleks bir yapıya sahiptir. Bu eğrileri, üç farklı pH bölgesine ayrılarak incelenebilirler (Gözükara, 1997).

2.4. Proteinler

Canlı hücreleri meydana getiren proteinlerin yapıtaşları aminoasit molekülleridir. Aminoasitler, amino grubu, karboksil grubu ve radikal grubun, bir karbon grubuna bağlanmasıyla meydana gelir. Bütün aminoasitlerdeki amino ve karboksil grupları aynıyken, bir aminoasidi diğer bir aminoasit molekülünden ayıran özellik bir uçtan moleküle bağlanan yan zincir yani radikal gruptur. Bu şekilde çok farklı özellikte aminoasitler oluşur (Damodaran, 2008).

Doğada 200'den fazla aminoasit çeşidi bulunmaktadır. Bunlardan yalnızca 20 çeşit aminoasit, canlılardaki proteinleri oluşturur. Aminoasitler proteinlere nazaran oldukça küçük moleküler yapıya sahip olmalarına rağmen oldukça kompleks bir yapıya sahiptirler. Aminoasitin yapısındaki atomları kovalent bağlar, aminoasit zincirini ise zayıf bağlar bir arada tutarlar. Amino asit zincirindeki zayıf bağlar, aminoasit zincirinin katlanmış üç boyutlu zincir yapısını özgün biçimde sabit tutar.

Proteinin oluşumu için gerekli olan aminoasit çeşidi, uygun sıralama ve sayıda olup üç boyutlu yapıda dizilmesi yeterli bir durum değildir. Aynı zamanda birden fazla

dallanma sayısına sahip aminoasit moleküllerinin yalnızca bazı dallanmaları arasında bağlanma meydana gelmelidir. Bu bağlanma peptit bağı ile sağlanır.

Proteinler yapılarında polar aminoasit bulundururken, aynı zamanda proteinin iç yapısında yerleşik formda apolar aminoasit içermektedir. Apolar forma sahip aminoasitler ile proteinler arasında hidrofobik etkileşim meydana geldiğinden bu durum, proteinlerin stabilitesi açısından önemlidir (Aryee ve ark., 2018).

Proteinler yapılarına göre gruplandırıldığında basit proteinler ve bileşik (konjuge) proteinler olarak ifade edilmektedir. Konjuge proteinler, protein ile protein olmayan bileşiklerle oluşturduğu lipoprotein, metalloprotein gibi komplekslerdir.

Proteinlerin üç boyutlu yapısı primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapı olarak dört farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Proteinlerde pimer yapı, aminoasitlerin peptit bağlarıyla kovalent olarak bağlanması sonucu oluşan düz zincir konformasyonuna sahip formdur. Sekonder yapı, polipeptit zincirlerinin hidrojen bağlarıyla oluşturduğu düzenli, α -heliks yapısı ya da β -tabaka gibi formlara dönüşmüş protein yapısıdır. Sekonder yapıdaki proteinler serbest enerjilerini minimal seviyede tutarlar. Proteinler kovalent ya da kovalent olmayan bağların etkisiyle katlanarak üç boyutlu bir forma ulaşmalarıyla tersiyer (üçüncül) yapıyı oluştururlar. Tersiyer yapıdaki bazı bölgelerde apolar özellikte kısımların bulunması, apolar özelliğe sahip bileşikler için alan oluşturmaktadır. Kuaterner (dördüncül) yapı, birden fazla proteinin bir araya gelmesi sonucu meydana gelen karmaşık bir protein dizisidir (Damodaran, 2008).

Denatürasyon, proteinlerin fiziksel ve kimyasal dış etkiler nedeniyle formlarının bozulmasıdır. Primer proteinler denatürasyon sırasında fazla değişmezken, sekonder ve tersiyer yapılarda ciddi bozulmalar meydana gelmektedir. Hidrofobik aminoasitlerin yapılarında, proteinler arası etkileşimlerin artmasıyla çökme eğilimi görülmektedir (Foegeding ve Davis, 2011).

Proteinler yapısal açıdan organizasyonlarına göre fibröz ve globüler proteinler olarak gruplandırılmaktadır. Fibröz proteinler, kıvrılmış haldeki proteinlerin düz zincirlerini bulunduran çubuk şekle sahip yapılardır. Proteinlerin katlanmasıyla oluşan küresel, eliptik ya da kompakt yapıda bulunan proteinler ise globüler proteinlerdir. Biyolojik fonksiyonları açısından ise proteinler, depo proteinleri, yapısal proteinler, taşıyıcı proteinler gibi gruplarda incelenmektedir. Taşıma görevi üstlenen miyoglobin

gibi proteinler ile kazein veya diğer süt proteinleri globüler proteinlere; kas kontraksiyonunda görevli protein olan aktin ve miyozin proteinleri ile kollajen gibi yapısal protein grupları ise fibröz proteinlere örnek olarak verilebilir.

2.4.1 Albuminler

Albuminler, Latince isminden türetilmiş ve suda çözünebilir olmasının yanı sıra sıcakta pıhtılaşan proteinler sınıfındadır. Kan serumunda bulunan en yaygın protein olduğu için serum albumini olarak da adlandırılmıştır. Yapılan araştırmalarla serum albuminin özellikleri ve çoklu rolleri anlaşılmaya başlanmıştır.

Moleküler yapısı büyük olan proteinler kılcallara geçiş yapamadığından kandaki madde dengesi albuminlerle sağlanır. Bu sebeple albuminler, kolloid osmotik basıncın veya diğer adıyla onkotik basıncın düzenlenmesindeki birincil kontrolör olan proteinler olarak kabul edilir (Roopenian ve ark., 2015). Kolloid osmotik basıncı düzenlenmesinin yanında daha düşük bir kapasitede, steroidler, yağ asitleri, tiroid hormonları, metabolitler, hem bileşikleri, ağır metaller ve çeşitli mineraller ile küçük moleküle sahip ilaç, metabolitler ve endojen bileşiklerin depo ve dolaşımına hizmet eder (Fanali ve ark., 2012; Peters, 1985; Peters ve Stewart, 2013).

Serum albumini, toplam serum proteinlerinin %50'sinden fazlasını oluşturur. Homeostazinin düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Albuminler de dahil olmak üzere hücre dışı proteinler, disülfid bağları ile stabilize edilir (Champe ve ark., 2005).

Serum albumini tıbbi açıdan yanıklar, şok tedavisi ve kan kaybını önleme gibi amaçlarla sınırlı olarak kullanılabilirken, farmakokinetiği ve bağlanma özelliklerinin bilinmesiyle beraber albuminin farklı alanlarda yararlanımını da sağlamıştır. Çalışmalarda özellikle de ilaçların kalıcılığını arttırmak amacıyla, immünojenik olmayan bir araç olarak kullanılması yönünde yoğunlaşmıştır. Serum albumin ile ilaç konjugatlarının, albumin füzyon proteinleri ve albumin nanoparçacıklarından oluşturulan konjuge edilmemiş olan formlarıyla klinik olarak kullanılmaya başlanmıştır (ando ve ark., 1980; Fanali ve ark., 2012; Minchiotti ve ark., 2013; Nagase ve ark., 1979; Dammacco ve ark., 1979). Özellikle de albumin proteinlerinden insan serum albumini (HSA) ile sığır

serum albumini (BSA), hedefe yönelik metal bazlı ilaç komplekslerinin hazırlanmasında yararlanılan konjugat proteinleridir (Yousuf ve ark., 2019).

Albuminlerin metal bağlayabilme kapasitelerine ilişkin yapılan çalışmalarda Cu (II) ve Zn (II) başta olmak üzere çeşitli esansiyel ve toksik olan metal iyonlarını bağladığı gösterilmiştir. Özellikle de çalışmalarda afinite, özgüllük ve stokiyometri üzerine yoğunlaşmıştır (Harford ve Sarkar, 1997; Lu ve ark., 2008; Masuoka ve ark., 1993; Giroux ve Schoun, 1981).

2.4.1.1. Sığır Serum Albumini

Sığır serum albumini (BSA), aspartik asit ve glutamik asit ile arjinin, histidin gibi aminoasitleri bulunduran, amfoter özellik gösteren globüler bir proteindir. Biyolojik reaksiyonlarda kararlı bir yapıya sahiptir ve biyokimyasal uygulamalarda kullanılır. Çünkü BSA, yapısal olarak insan serum albumini (HSA) ile çok benzerdir. Bu nedenle genellikle HSA yerine model bir protein olarak çalışmalarda tercih edilmektedir (Roufegarinejad ve ark., 2019).

BSA, kolaylıkla proton alabilen ya da proton verebilen bir özelliğe sahiptir. pH'ın yüksek olduğu ortamlarda BSA proton kaybederek negatif yüklenirken, pH'ın düşük olduğu ortamlarda pozitif yüklenir. Sığır serum albumini suda çözünür, biyolojik olarak uyumlu ve toksik olmayan bir protein yapısındadır (González ve Bolívar, 2014; Jun ve ark., 2011; Maghsoudi ve ark., 2008).

BSA, protein katlanması, toplanması ve biyoteknolojik uygulamalar açısından yaygın şekilde model olarak kullanılan bir proteindir. Çeşitli koşullar altında makromoleküler agregalarda, kendiliğinden toplanma eğilimine sahip olduğu bilinmektedir (Militello ve ark., 2004; Navarra ve ark., 2009). BSA, yapısal üç homolog I ve III domain içerir ve her bir domain, benzersiz bir bağlanma özelliğine sahip A ve B olarak iki alt domainden (subdomain) oluşur (Jahanban-Esfahlan ve ark., 2015). BSA'nın bu üç boyutlu yapısı, büyük ölçüde alt etki alanında her biri kendi içinde bir derece dayanıklılık sağlayan, fakat dış etkilere karşı biçim ve boyuttaki değişikliklere kontrollü şekilde izin veren, sistein (Cys) aminoasidi ile çapraz bağlı bulunan 17 tane

disülfid köprüsü tarafından stabilize edilir. Oda sıcaklığındaki yapısı genel itibarı ile α heliseldir (Dautzenberg ve ark., 1994). BSA, 583 tane amino asit kalıntısı içeren bir polipeptid zincir yapısındadır (Roufegarinejad ve ark., 2019). BSA'nın kalp şeklindeki yapısının molekül ağırlığı ise 66.8. kDa'dur. BSA, alt alanlarında sırasıyla IB ve IIA'da Triptofan aminoasit (Trp-134 ile Trp-212) tortusu içerir (Jahanban-Esfahlan ve Panahi-Azar, 2016).

BSA, metal çeşidine bağlı, farklı afinite değerleriyle karakterize edilen birden fazla metal bağlanma bölgeleri bulundurmaktadır. Bakır ve çinko iyonları karşılaştırıldığında BSA'nın birincil bölgede, çinko iyonlarına daha yüksek afinite gösterdiği görülmüştür. Cu (II) için spesifik sekonder bağlanma bölgesi, bakır, çinko, nikel ve kadmiyum için karşılaştırılabilir afiniteye sahip bu bölge çoklu metal bağlanma bölgesidir. Zn (II) ile ilgili olarak ise pH ve sıcaklık değişikliklerine duyarlı Zn-BSA ikili bağlanma bölgesinin varlığından söz edilebilir (andré ve Guillaume, 2004; Bal ve ark., 1998; Masuoka ve ark., 1993; Ohyoshi ve ark., 1999).

2.5. Polielektrolit Kompleksler

Polielektrolit kompleksler, kimyasal açıdan farklı ve karakterize edilebilir bileşikler grubudur. Belirli koşullar altında yüklü hale gelebilen ve nispeten fazla sayıda fonksiyonel grup içeren makromoleküllerden oluşurlar.

Polielektrolitler, yüksek veya düşük molekül ağırlıklı maddelerle reaksiyona girerek polielektrolit kompleksleri meydana getirirler ve bu kompleksler, polikompleks tuzu ya da jel olarak ayrılabilir veya çözelti içinde çözünür halde de bulunabilirler. Herhangi bir polielektrolit çözeltisi, pozitif yüke sahip bir elektrolit içeriyorsa negatif yüke sahip küçük iyonlar da bulundurabilir. Negatif yüke sahip elektrolitlere de pozitif yüke sahip iyonlar benzer şekilde eşlik edebilir (Liu ve ark., 1998).

Çözeltinin iyonik gücü polielektrolitlerin davranışı üzerinde büyük ölçüde etkilidir. Çözeltide düşük miktardaki iyonik dirençte polielektrolitler, molekül içindeki itme kuvvetlerinin etkisiyle geniş bir forma doğru eğilir. Çözeltinin iyonik gücü arttıkça polielektrolit kalın bir hale geçme eğilimi söz konusu olur. Bu özel yapıdan dolayı

polielektrolitler farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda yüksek bir öneme sahiptir. Çünkü polielektrolit kompleks dispersiyonları için birbirinden farklı stabilite, boyut, morfoloji ve viskozite dereceleri olabilir (Malviya, 2014).

Biyolojik makromoleküllerin tamamı, nükleik asitler, proteinler ve polisakkaritler birer polielektrolittir. Bu polielektrolitler, biyolojik fonksiyonları gerçekleştirirken hem birbirleriyle hem de küçük iyonlarla reaksiyon verirler. Biyolojik makromoleküllerin yapısal kararlılığı, polielektrolitlerin bu reaksiyonlar esnasında oluşan elektrostatik etkileşimlerinden etkilenir. Tüm bu prosesler ele alındığında, sentetik polielektrolitler kullanılarak oluşturulan polielektrolit kompleksler ile ilgili yapılan çalışmalarda, karmaşık yapıli biyopolimer reaksiyonlarını aydınlatacak basit modeller oluşturulabilir. Bu modeller ışığında düşük molekül ağırlıklı bileşikler ile sentetik polielektrolitler arasındaki polikompleks oluşumunun özelliklerinin incelenmesi, biyolojik membranlardaki protein ve lipidler arası etkileşimlerin ya da proteinlerin bozunma mekanizmalarının anlaşılması açısından yol gösterici olabilecektir.

Proteinler, doğal ve sentetik polimerler ile güçlü bir etkileşim kurarak polielektrolit kompleks meydana getirirler (Hubert ve ark., 1991; Sacco ve ark., 1988). Proteinlerin izoelektrik noktasının üstünde ve altında iken polikasyon ya da polianyonlara bağlandığında çözünebilir kompleks, amorf katı ya da koaservat oluşabileceği gözlenmiştir (Kokufuta ve ark., 1981; Lenk ve Thies, 1987; Veis, 1991, 86, 87). Faz değişimi; proteinleri ayırmada polielektrolit kullanma, polielektrolit komplekslerde enzim stabilizasyonu ya da immobilizasyonu, proteinlerin substrat affinitesi için modifikasyonunu içermektedir (Shieh ve Peppas, 1991).

Polielektrolit kompleksler ile ilgili art arda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar ışığında deniz suyunun arıtılarak içme suyu elde edilmesi, biyolojik sıvı ya da sulu çözeltilerin ultrafiltrasyonu gibi pek çok endüstriyel alanda yarı geçirgen membranların üretimi için de polielektrolit kompleksler ümit var etmektedir. Aynı zamanda polikomplekslerin bileşiminin anlaşılabilmesi için makromoleküler açıdan anlamak için yapılan çalışmalar yol gösterici olmuştur. Homojen çözelti oluşturan polimer- protein karışımları basit fizikokimyasal metodlar uygulanarak polikompleks yapış hakkında güvenilir sonuçlar vermiştir (Park ve ark., 1992).

Sentetik polielektrolit – protein kompleksleri ise ilk olarak Morawetz ve Hughes (1952) tarafından çalışılmış ve bu çalışmada farklı polimer/protein oranları, yine farklı pH ve iyonik şiddet değerlerinde türbidimetrik olarak sıgır serum albuminin polielektrolitler ile kompleks oluşumu incelenmiştir. Bu incelemede ağırlıklı olarak çökelek oluşumu üzerinde durulmuştur. Yapılan çalışmaya göre, çökelek miktarının maksimum miktarda olması için kritik bir oran bulunmaktadır. Bileşenlerin eklenmesiyle çökelek, çözünebilir kompleksler oluşturmaktadır. Bu durum antikor – antijen reaksiyonlarındaki duruma benzerlik göstermektedir. Ayrıca yapılan bir çalışmaya göre, polimerin molekül ağırlığının çökelek oluşumu dengesine etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (Morawetz ve Hughes; 1952). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ışığında, polimerin dar dağılımlı olması ve molekül ağırlığının kompleks oluşumunda etkili olduğu görülmüştür (Kabanov ve ark., 1978).

Düşük molekül ağırlığa sahip iyonların BSA'nın polivinilamin ile çökelek oluşturduğunu ve pH'ı değiştirdiği gösterilmiştir (Morawetz ve Hughes; 1952). Aynı zamanda polimetilmetakrilik asit (PMAA), serum albumin (SA) ile oksihemoglobin karışımının reaksiyonunu incelenmiştir. Söz konusu proteinlerin izoelektrik noktalarına uygun pH değerlerinde, oksihemoglobinin seçici olarak çöktüğünü gözlemlemişlerdir. Polimetakrilik asit, gamaglobülin ile SA ve insan albuminleri ile antikor ayırdığını göstermiştir.

Nanoteknolojinin biyomedikal alandaki çalışmalarının her geçen gün ilerlemesi sonucu, özellikle de ilaçların vektörlere yerleştirilerek hedef dokuya ulaştırılması için yeni fırsatlar doğurmuştur. Bu sayede ilaçların erken bozulmasının önüne geçilebilirken aynı zamanda biyoyararlanımının da artırılması sağlanabilir. Ayrıca vektörler ilaçların istenen anatomik bölgede kalma süresi uzatılabilir ve uygulama zaman aralıklarının arttırılmasında yararlı olabilir. Daha önce ilaç taşıma sistemlerinde kolloidal vektörler, taşıyıcı olarak denenmiştir (Wu ve ark., 2020).

2.5.1. Polielektrolit Komplekslerinin Oluşum Prensipleri

Polielektrolit komplekslerin oluşumu, zıt yüklü polielektrolitler arasındaki Coulombik etkileşimlerin etkisiyle gerçekleşir ve bu etki interpolimer iyonik yoğunlaşmaya sebep olur. Hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri, yük transferi, hidrofobik etkileşimler ve dipol kuvvetler ile diğer interpolimer etkileşimlerdir (De Robertis ve ark., 2015). Bu etkiler sayesinde agregat oluşumu gerçekleşmektedir ve sulu çözeltide interpolimer kompleksin kolloidal davranışını oluşturmaktadır.

İnterpolimer kompleksler ve oluşum süreçleri, makromoleküller arası etkileşimin araştırılması, makromoleküllerin kimyasının incelenmesine sebep olmuştur. Böylece bilimsel uygulamada büyük bir öneme sahiptir. Polimer zincirleri arası etkileşim sonucu kararlı yapı meydana gelir. Bu kararlı yapıya interpolimer kompleks adı verilirken bu yapı oluşumuna inter polimerleşme denir. Kompleks moleküller, içerdikleri bileşiklerine göre daha farklı özelliklere sahip olduğundan komplekslerin temel düzenleri, kimyasal ve yapısal karakterini belirleyen etkileşimleri gibi özelliklerinin araştırılması için çalışmalara devam edilmektedir.

Polielektrolit komplekslerdeki etkileşimlerin güçlü olmasının yanı sıra geri dönüşebilir olduğu düşünülmektedir (Ćirić ve ark., 2020). Birçok formülasyon parametresinin ve hazırlama koşulunun, iyonlaşma derecesini, yük yoğunluğunu ve yükün dağılımını, polimerdeki zincirin esnekliğini yani iyonik etkileşimleri güç ve derece bakımından etkilediği düşünülmektedir (Berger ve ark., 2004).

Polielektrolit komplekslerinin oluşum süreci, iyonizasyon ve dissosiasyon gibi yüklü olan gruplardaki etkileşimlere bağlıdır. Polielektrolitin yük yoğunluğu ise hem oluşum sürecinde hem de özellikleri üzerinde etkilidir (Koetz ve ark., 1986). Stabil kompleks oluşumu daha çok yük yoğunluğu fazla olan polielektrolitlerde gerçekleşirken daha kolay dissosiasyona uğrayabilen kompleksler ise yük yoğunluğu düşük polielektrolitler tarafından oluşmaktadır.

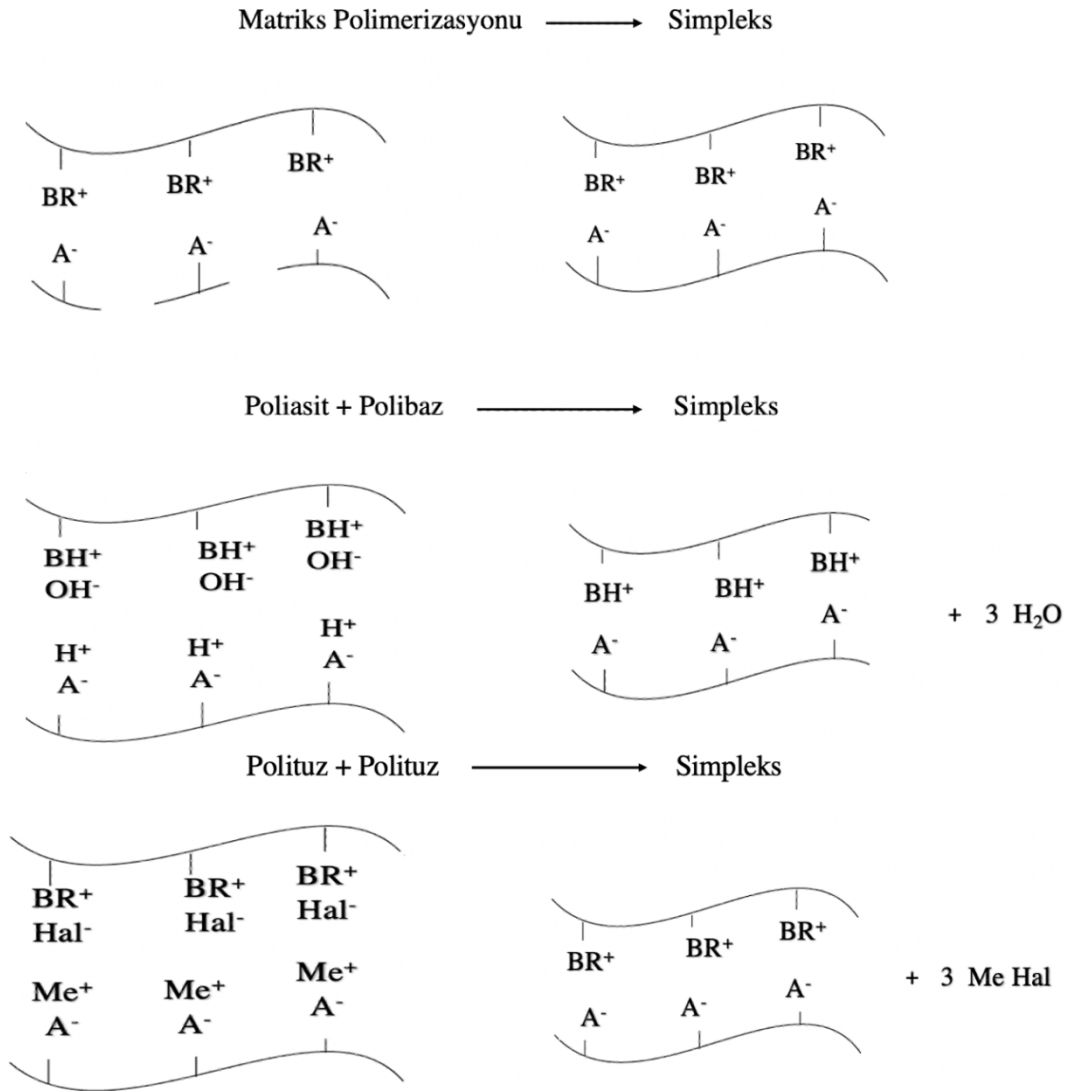
Polielektrolit komplekslerin yapılarının oluşumunda ilk etken zıt yüklü grupların arasındaki etkileşimlerdir. Ters yüklü elektrolitlerin iyonlaşma dereceleri, reaksiyon ortamının pH değeri, yük yoğunluğunun miktarı, polimerik zincirin yük dağılımı,

polielektrolitin karışım ve konsantrasyon oranı, karıştırılma miktarı, etkileşim süreci, iyonik grupların davranışı ve polimerik zincirdeki konumu, polielektrolitlerin her birinin molekül ağırlığı, zincirin sıcaklığı ve esnekliği ile iyonik açıdan gücü polielektrolit komplekslerin oluşumunu ve stabilitesini etkilemektedir (Bhattarai ve ark. 2010; Etrych ve ark., 2005; Il'ina ve Varlamov, 2005; Park ve ark., 2010).

Zıt yüklü polielektrolitlerin çözelti içindeki karışımı güçlü olmakla beraber geri dönüşümlü elektrostatik bağların nedeniyle polimerik zincirde olağan şekilde birleşme meydana gelir. Polimerik zincirdeki bu doğrudan meydana gelen etkileşimler, kovalent çapraz bağlayıcıları engellerken geçici bir yapıya sahip polielektrolit kompleks ağlarını oluşturur. Genellikle polimerik ağların biyoyumluluğu vardır ve çevre koşullarındaki değişimlere karşı duyarlılardır (Hamman, 2010). Reaksiyon şartlarına ve bileşenlerine bağlı olarak kompleks oluşum süreci, komplekslerin özelliğini etkilemektedir. Hacimce artış gösteren hidrojeller ile yoğun çökelek arasında bir kompleks yapısı görülmektedir.

Polielektrolit komplekslerin oluşumu genellikle iki ya da üç aşamalı olarak gerçekleşir (Şekil 3) (Meka ve ark., 2017).

Şekil 3: Simpleks oluşum yolları



(Philipp ve ark., 1989)

İlk aşama hızlıdır ve polimer zincirlerinin konfigürasyonlarında ciddi bozulmalara sahip olan bir primer kompleks oluşturur. Sonra kompleksler içindeki mevcut bağlantıların tekrar düzenlenmesiyle elektrostatik bağ, hidrojen bağları ya da hidrofobik etkileşimler gibi yeni bağların oluşumunu içeren ikincil kompleks oluşur. En son aşamada ise belirli koşullarda birincil ve ikincil oluşan kompleksler toplanarak, fibriller, dolaşmış agregatlar, sıralı ağlar gibi farklı kararlı yapıların oluşumuna sebep olabilir. Aynı zamanda kompleks oluşumu asit-bazlarla da gerçekleşmektedir. Bu durum genellikle üç farklı yolla incelenir. Matriks polimerizasyonu ile poliasit-polibaz, polituz-polituz etkileşimleridir (Şekil 3) (Philipp ve ark., 1989).

Poliasit-polibaz etkileşimi ekzotermik bir reaksiyondur ve oluşumda nötralizasyon etkilidir (Philipp ve ark., 1989). Kompleks oluşumunda farklı etkilerin varlığı söz konusu olduğundan iyonların ilk eşleşmesi sonrası daha fazla sayıda çapraz bağlanma gerçekleşir. Polimerin intramoleküler olarak etkileşime giren uzun bölgeleri arasında kooperatif etkileşimler bulunmaktadır. Bu durum, moleküler ağırlığı düşük bileşiklerin oluşturduğu kompleksler ile makro moleküllerin oluşturduğu kompleksler arası en büyük farktır.

Meydana gelen molekülün özellikleri ilk olarak yük-yük etkileşimine ait stokiyometrisine bağlıdır. Stokiyometrik polielektrolit kompleksler çökelti ve koaservat olarak da isimlendirilmektedir. Bu kompleksler meydana geldiği ortamda çözünebilir özellikte olmayabilir (Commandur ve ark., 1989). Yükleri nötralize olduğunda bile düşük konsantrasyon çözünebilir kompleks oluşması için yeterlidir. Ancak nonstokiyometrik kompleksler yüklerinden bazılarının iyonize olması sebebiyle çözünebilir parçacık içermektedir.

Faz ayrışması, bulanık simpleks yumağını ve dağılımını, yüksek polimer ve düşük koaservatlaşma içerir. Makroskobik homojen sistemlerle bulanık sistemleri birbirinden ayırmak fiziksel olarak mümkün değildir. Viskozimetrik ve elektroforetik ölçümler, simpleks parçacıklarının poliamfolitlere benzediğini ortaya koymuştur.

Faz ayrımının bulunduğu sistemler ile tek fazda ilerleyen homojen sistemler birbirinden farklıdır. Konsantrasyonu düşük olan polimerde küçük simpleks agregat oluşması, konsantrasyonu yüksek polimerde kompleksin disagregasyonu, bileşenlerinden birinin yoğun bulunması durumunda ardışık çözünebilir kompleksin oluşumu, homojen sistemlerin elde edilebildiği yollardandır.

Polielektrolitler, pozitif ya da negatif bir yükün fazla olduğu oranda karıştırılırsa genellikle çözünebilir bir stokiyometrik olmayan (nonstokiyometrik) bir kompleks oluşur. Stokiyometrik polielektrolit komplekslerinde net yük sıfırdır. Genellikle stokiyometrik bir polielektrolit kompleksi çözünür değildir, yapı üzerine çöeltiden çökme meydana gelir (Kramarenko ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalarda uzun polielektrolit ile kısa olan bir elektrolitin birleşmesi sonucu ardışık olarak nonstokiyometrik suda çözünebilir oluşumlar (simpleksler), çeşitli reaksiyon koşullarında incelenmiştir. Konakçı polielektrolit ile misafir polielektrolit

arasındaki nispeten zayıf bağlanma, bu sistemler için özgüsel olarak görünmektedir. Yeniden düzenlenmesi ile çözünürlük özelliğinde dönüşümler görülmüş, çözünebilirken çözünemez hale gelmiştir (Kabanov ve ark., 1980; Kabanov ve Zezin, 1984).

2.5.2. Polielektrolit ile Protein Komplekslerindeki Etkileşimler

Proteinler, suda çözünebilir ve suda çözünemez özelliğe sahip birçok önemli uygulamada kullanılan polielektrolit protein komplekslerini meydana getirirler (Akkılıç ve ark., 2007). Doğada esas olarak proteinler ile polielektrolitler arası etkileşim elektrostattır. Bu komplekslerin önemli ölçüde denge sistemlerini temsil etmesi sebebiyle çok sayıda deneysel teknikle araştırılmaya açıktır.

Polielektrolit protein kompleksleri, protein çözeltilerinin suda çözünebilir polielektrolitler ile karıştırılması sonucu elde edilir. Bu kompleksler, ilaç salınımı, biyo ayırıştırma, enzim ayırma gibi farklı kompleks çeşitleri oluşturmak için uygulamalarda kullanılabilir. Çeşitli konsantrasyonlarda iyon varlığındaki BSA ve BSA-polielektrolit komplekslerinin floresan davranışları daha önceki çalışmalarda incelenmiştir (Güney ve ark., 1997; Teramoto ve ark., 1994; Xia ve ark. 1995).

Polielektrolit protein kompleksleri farmakoloji, biyomühendislik, biyoteknolojideki uygulaması nedeniyle modern bilim ve endüstrideki çalışmalarda büyük önem kazanmıştır. Polielektrolitler, proteinlerin ayrılması veya saflaştırılması, protein iletimi gibi amaçlarla kullanılabilir (Sofronova ve ark. 2017). Ayrıca polielektrolit kullanımı protein birikimini önlemek amaçlı etkili ve ileri dönük olan bir yöntemdir. Elde edilen bazı sonuçlara göre, polikasyon ya da polianyon ilavesinde suda çözünür polielektrolit-protein komplekslerinin oluştuğu gözlenmiştir. Çünkü kompleksler arası elektrostattık itme, proteinlerin birikmesini önleyebilmektedir. Aynı zamanda polielektrolitler önceden oluşmuş olan agregayı da çözebilirler (Semenyuk ve ark., 2015; Shalova ve ark., 2007).

Protein-polielektrolit komplekslerdeki etkileşimler organizmalar için de önem taşıdığından çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Çünkü proteinler pek çok polimerle etkileşime girebilmektedir. Proteinlerden bazılarının modifiye edilmesi sonucu proteinin,

diğer proteinlerle etkileşiminin de değiştiği fark edilmiştir (Huttner, 1988; Niehrs ve ark., 1994; Stogov, 2010).

Çeşitli stokiyometri ve yapıya sahip polielektrolit-protein kompleksleri oluşturmak için protein ve polielektrolitler öncelikle elektrostatik kuvvetlerle etkileşime girer. pH, iyonik güç, protein yüzeyindeki yük dağılımı ve bu yüklü grubun karakteristiği, polimerizasyon derecesi, hidrofobik özelliği, polielektrolitin sertliği gibi durumlar elektrostatik etkileşimleri etkileyen özelliklerden bazılarıdır. Protein ve polielektrolit arası etkileşimlerin moleküler modellemesi için farklı simülasyon yöntemleri, kompleks oluşumunun itici kuvvetlerini, proteinlerin yüzey yük dağılımını ve çevresel koşulları araştırmak için kullanılmıştır (Carlsson ve ark., 2001).

Polimerizasyon derecesi, proteinin agregasyonunu baskılanmasını doğrudan etkileyen polielektrolitin ana özelliklerinden biridir. Polimerizasyon derecesi arttıkça polielektrolit, daha etkili bir biçimde protein birikimini önler. Aynı zamanda hidrofobik özelliği de yine polielektrolitin proteinle etkileşime girerek birikmesini önlemektedir (Sofronova ve ark., 2017).

2.5.3. Polielektrolit Protein Komplekslerde Fiziksel Haller

Doğal veya sentetik polielektrolitler ile protein moleküllerinin kuvvetli etkileşimi sonucu çeşitli kompleksler oluşur. Bu kompleksler; suda çözünebilir kompleksler, amorf çökeltiler (katı-sıvı faz ayrımı) veya kompleks koaservat oluşumu (sıvı-sıvı faz ayrımı) şeklinde meydana gelmektedir (Mansuroğlu ve ark., 2011). Protein-polielektrolit komplekslerinin fiziksel halleri çözünürlük dereceleriyle ilişkilidir. Çözünür kompleksler güçlü şekilde hidratlanmıştır ve genellikle proteinin izoelektrik noktasına yakın pH değerlerinde gerçekleşmektedir.

Polielektrolit-protein komplekslerinin bileşimi, özellikleri ve yapısı, protein ile polielektrolit zincirlerinin birbiriyle ya da çevreleriyle olan etkileşimleri sonucu belirlenir. Doğada elektrostatik olan bu etkileşimler, protein yüzeydeki iyonlaşabilen grupların ve polielektrolit zincirleri üstündeki yük yoğunluğu, dağılımı ve iyonlaşma derecesinden etkilenir.

Tuz iyonlarının varlığı, yüklü kısımların protein ve polielektrolit zincirleri üzerindeki iyonizasyona etki ederek elektrostatik etkileşimlerin etkisini değiştirir. Böylece polielektrolit protein komplekslerinin yapısı ve özellikleri değişmiş olur. Tuz bulunmayan sistemlerde ise protein molekülleri, zıt yüklü grupları arasında iyon çiftleri veya tuz bağlantılarının stokiometrik oluşumu yoluyla esnek polielektrolitler ile kompleks oluşturur (Braia ve ark., 2008).

Polielektrolit zincirlerinin yük yoğunluğu, tamamen iyonize zincirler ve deiyonize nötr zincirler arasında değişebilir ve bu durum çözeltinin pH değeri ile kontrol edilebilir. Polielektrolit zincirlerinin iyonlaşma derecesi, iyonlaşabilir grupların ayrışma sabiti pK_a kullanılarak ve Henderson-Hasselbalch denklemi ile ölçülebilir. Proteinler ise yüzeylerinde tipik olarak pozitif ve negatif yüklü iyonlaşabilen kısımlara sahiptirler. Sulu çözeltinin pH değeri, pozitif ve negatif yüklü her iki parçanın da iyonizasyon derecesini etkiler. Sonuç olarak proteinlerin net yükü kontrol edilmiş olur. Proteinlerin net yükünün sıfır olduğu pH değerine izoelektrik nokta (pI) adı verilir. Proteinler $pH < pI$ durumunda pozitif yüklü, $pH > pI$ durumunda ise negatif yüklüdür (Cousin ve ark., 2010; Cousin ve ark., 2011).

Aminoasit dizilimlerine bağlı olarak proteinler farklı izoelektrik noktaya sahiptir. pH değeri ile izoelektrik noktasının (pI) eşit olduğu durumda iyonlaşmış halde olmalarına rağmen dış çevreye karşı nötral yapıda bulunurlar. İzoelektrik noktasına göre daha düşük pH değerinde net pozitif yüklü olduklarında anyonik polielektrolitlerle etkileşirken, pH değeri izoelektrik noktasından daha yüksek olan bir ortamdayken net negatif yüke sahip olurlar ve katyonik polielektrolitlerle kuvvetli şekilde etkileşime girerler. Özellikle de düşük pH sistemlerinde protein üzerindeki pozitif yüklerin varlığı, anyonik polielektrolitlerle güçlü elektrostatik çekim meydana getirmektedir. Bu durumda kararlı polielektrolitler oluşmaktadır (Mansuroğlu ve ark., 2011).

Polielektrolit protein komplekslerinin yapısı, iyonizasyon dışında diğer özelliklerden de etkilenir. Polielektrolit zincirlerinin uzunluğu arttıkça protein globülleri arasında köprüler oluşturarak protein yüzeyinde adsorbsiyonu yükseltebilir ve sonuç olarak daha yoğun kompleks oluşturabilir (Cousin ve ark., 2010; Kayitmazer ve ark., 2007). Çözeltideki zincir ve globüllerin konsantrasyonu, komplekslerin bileşimini ve morfolojisini de belirler. Daha yüksek bileşimler büyük hacimli kompleks oluşumuna yol açabilir (Cousin ve ark., 2010). Aynı zamanda polielektrolit omurgası ile protein

yüzeyindeki hidrofobik etkileşimler bazı durumlarda kompleks yapıyı güçlendirebilir, bazı durumlarda ise yapının oluşumunu engelleyebilir (Cooper ve ark., 2005).

2.5.4. Polielektrolit Komplekslerin İmmünojenik Aktivitesi

Yüksüz veya sulu ortamda yüklenemeyen polimerler, adjuvant etkiye sahip olmadıklarından immün yanıtı pratik açıdan değiştiremezler. Bazı polimerlerin adjuvant özelliğinden yararlanılması ters bir etki gösterebilir. Homopolimerden farklı şekilde kopolimerlerden bazıları, immün yanıtı keskin olarak azaltabilir ve bağışıklığı yatıştırıcı etkiye sahip olabilir. Bu farklılık adjuvant özellikte kullanılan polimerlerin, kimyasal yapısının etki mekanizmalarına bağlı olmadığını göstermiştir.

Çalışmalar ışığında en fazla immün yanıt aktifliğinin kararlı komplekslerde veya konjugatlarda olduğu görülmüştür. Bu tür sistemler için antijen molekülü ile polielektrolitlerin kooperatif, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerle oluşturduğu konjugatlar veya kovalent bağlarla bağlı fonksiyonel grupların bileşenlerinden oluşan konjugatlar örnek olarak verilebilir. Ancak antijen molekülleriyle polielektrolitler, birbirine bağlanabilmek için uygun fonksiyonel grup hidrofobik radikaller içermiyorlarsa kimyasal modifikasyon sorunu ortaya çıkabilir. Bu da polimerin biyolojik açıdan etkisinde değişimlere yol açar.

Halihazırda kullanılan adjuvanlara alternatif olarak, antijenler için taşıyıcı özellikte pozitif ya da negatif yüklü polimerlerden immünojenik olmayan sentetik polielektrolitlerin kullanılmasıdır (Başalp ve ark., 2000; Dilgimen ve ark., 2001; Filenko ve ark., 2001; Mustafaev ve Sarac, 1996; Mustafaev ve ark., 1996a; Mustafaev ve ark., 1996b; Mustafaev ve ark., 1998; Petrov ve ark. 1992; Yücel ve ark., 2001). Zincir uzunluğu, elektrik yükü, konformasyon, hidrofobik özellik, polidispersite, supramoleküler yapının immünojenite üzerindeki baskılayıcı ya da uyarıcı olarak özellik kazanması üzerinde etkilidir (Mustafaev, 1996b). Mustafaev ve Mustafaeva (2002) yaptıkları çalışmada, daha önce zayıf yüklü olan viral ve mikrobiyal protein antijenlerinin farklı yüklü polimerlere bağlanması sonucu yalnızca immünojenik aktivite değil, aynı zamanda koruyucu aktivitesininin modülasyonuna izin verdiğini gözlemlemişlerdir.

Protein ve peptid antijenlerinin sentetik polielektrolitlerle bileşenlerinin kompleks oluşumu ya da kovalent bağlanmasıyla yüksek immünojenik etkiye sahip sentetik antijenler ortaya çıkartır (Kabanov ve ark., 1978; Petrov ve ark., 1983). Polimer polielektrolit kompleks oluşumu ile immünojenite arasında bir korelasyon bulunmuştur (Kabanov ve ark., 1980). Polimer zincirindeki serbest bölgelerin immünokompetan hücrelerin yüzeyinde kooperatif sorpsiyon kabiliyeti, fizikokimyasal olarak protein polielektrolit komplekslerinin immünojenik özelliklerinin açığa çıkmasının nedenlerinden biridir (Kabanov ve ark., 1982; Vinogradov ve ark., 1982). Aynı zamanda polielektrolitlerin polimerizasyon derecesi immün sistemi uyarıcı özelliklerinden biridir (Kabanov ve ark., 1984).

Proteinler ile polielektrolitler arası kompleks oluşumu, protein globülleri ile poliyonlar arasındaki homojen olmayan şekildeki dağılımıyla karakterize edilir (Kabanov ve ark., 1977; Kabanov ve ark., 1981). Polimer zinciri başına protein molekülü sayısı, polielektrolitin polimerizasyon derecesine bağlı olup zincir uzunluğunun doğrusal fonksiyonu olarak artar. Yapay antijenlerin immünojenliği proteinlere bağlı taşıyıcı polimerin uzunluğu ve serbest polielektrolitin immün sistemi uyarıcı aktivitesine olan bağlılığının karakteri ve mekanizmaları, polielektrolitlerin adjuvan etkisinin araştırılması açısından önem taşımaktadır.

2.6. Aşı Adjuvanları ve Etki Mekanizmaları

Adjuvan sözcüğü Latince “adjuvare” yani yardım etmek gibi bir anlama gelmekle beraber adjuvanlar, bir antijenin hücresel ve humoral bağışıklık yanıtının artırılmasını sağlayan yardımcı maddelerdir. Yapılan çalışmalarda, biyosentetik, rekombinant teknoloji ve modern teknolojiler saflaştırılan altbirimler ile sentetik aşılarda zayıf immünojenik aktivite göstermekte ve immün yanıtın uyarılması için iyi bir adjuvan gerekmektedir. Adjuvanlar, erken ve uzun dönemde immün yanıt oluşturmak için kullanılmaktadır. Önleyici bağışıklık sağlanması açısından adjuvan maddelerin aşılardaki işlevi oldukça önemlidir (Gupta ve ark., 1993).

İlk olarak 1916 yılında Le Moignac ve Pinay tarafından çalışılmış olan mineral yağ içinde *Salmonella typhimurium* süspansiyonu kullanılarak adjuvanların etkisi gösterilmiştir (Allison ve Byars, 1986). Bu tarihten itibaren adjuvan özellikteki maddelerle ilgili pek çok araştırma yapılmaya başlanmıştır. Yine adjuvan etkinin gözlemlendiği bir diğer çalışma da Gelnnny ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışma ışığında alüminyum preperatların iyi bir adjuvan etkiye sahip olduğu düşünülmüştür (Kissel ve Koneberg, 1996).

Adjuvan maddelerin etki mekanizmaları hücresel ve moleküler düzey olarak farklı mekanizmalara sahiptir. Antijenin yavaş salınımı, antijenin ifade edici hücreye yönlendirilmesi, hücrelerin uyarılması ve aktivasyonunun sağlanması, antijenlerin konformasyonel değişikliğe uğratılması şeklinde gerçekleşmektedir.

Antijenin adsorbsiyonu için spesifik bir bağlanma yüzeyinin olması adjuvanların biyolojik aktivitesi açısından önemli görülmektedir. Antijenin tanınması, antikor ile etkileşimi, bağlı proteinlerin immün yanıt oluşturmaları adjuvanların istenen biyolojik aktivitesini içermektedir. İmmün yanıtta önemli olan B ve T hücreleri vardır. Antijenler, bu hücreleri uyarak bağışıklığın korunmasını destekler.

2.7. Nanopartiküllerin Sentetik Aşı Sistemlerinde Kullanılması

Sentetik aşı sistemlerinde her geçen gün yan etkileri azaltılmış, immünojenik etkisi artırılmış yapılardan olan kontrollü salım araçları önerilmiştir. Nanopartiküller, bu amaçla öne çıkan sistemlerdendir. Bu yapılar yalnızca immün yanıt geliştirmekle kalmaz aynı zamanda yardımcı madde olarak adlandırılan immünoestimülatör maddelerle yüklü ilgili bağışıklık hücrelerine hedeflenebilir hatta immünojenik aktivitelerini indükleyebilirler (Smith ve ark., 2015).

Nanopartiküllerin (NP) sentetik aşı sistemlerinde immün yanıt geliştirmede fiziko-kimyasal özelliklerinin modüle edilebilmesi ve ayarlanabilmesi için yapılan araştırmalar ivme kazanmıştır. Boyut ve şekilleri, sentezi ve rasyonel tasarımı için oldukça önemlidir. Çünkü NP'lerin bu özellikleri antijen sunan hücrelerle olan etkileşimlerini belirler. Bu durum hedef bir hastalığa karşı immün yanıt geliştirmede önkoşuldur (Kim ve ark., 2017).

Nanopartiküllerin sentetik aşı sistemlerinde incelendiği üç ana kategori vurgulanmaktadır. Bunlar inorganik, polimerik ve biyomoleküler nanopartiküllerdir. Bunlar arasında tercih yapılırken bilinen adjuvanları birlikte uygularken veya kendileri adjuvan olarak etkinken ilişkili antijenlerin yönlendirilmiş ve kontrollü salınımını sağlaması önemlidir (Gregory ve ark., 2013; Smith ve ark., 2015).

2.8. Polielektrolitlerin Sentetik Aşı Sistemlerinde Kullanılması

Aminoasit zinciri kısa veya uzun olan sentetik peptidler, antikor oluşumu için yeterli büyüklüğe sahip değildir. Yeterli büyüklükte moleküler boyuta sahip olmadıklarından antikor üretiminde immünojenik aktivitenin artırılması için peptidlerin daha büyük molekül boyutuna ulaştırılması gerekmektedir. Bu da peptidlerin daha büyük moleküler boyuta sahip taşıyıcı polimerlere bağlanması ile sağlanabilir (Deen ve ark., 1990). Daha önce yapılan çalışmalarda poliakrilikasit (PAA), Polivinilpiridin ve Polisetilpiridin kopolimerleri, Poli-n-isopropilakrilamit (NIPAA), Poli-n-vinilprolidin (PVP), poliakrilikasit (PAA) ve polivinilpirilidon (VP) kopolimerleri çoğunlukla tercih edilen lineer taşıyıcılardır. Peptidler, bu gibi taşıyıcılara kovalent olarak bağlanırlar (Gürhan ve ark., 2002).

Sentetik peptidler, antikor oluşturma amaçlı yaygın şekilde tercih edilen moleküllerdir. Taşıyıcı moleküllere bağlanırken konjugasyon bölgesi, proteinlerdeki gibi peptid dizilimine bağlı olarak değişir. C ucu, N ucu ya da zincirdeki karboksil ucu (COOH), amino ucu (-NH₂) veya sülfidril (-SH) ucu, peptidin konjugasyon bölgesi olabilir. Ancak, çözünürlüğünün yetersizliği, kararsız yapısı, moleküler boyutunun düşük olması, toksisiteye neden olması, biyouyumluluğunun bulunmaması, özgüllüğünün yetersiz oluşu gibi nedenlerle etki yetenekleri oldukça sınırlıdır. Bu nedenle antijenlerin proteinler veya suda çözünebilir polimerlerle konjugatlarının oluşturulması, immünojenik aktivitesini ve terapötik etkisini önemli ölçüde değiştirmektedir.

Antijenik peptidlerin suda çözünür polimerlerle bağlanması ona pek çok özellik kazandırmaktadır. Peptidlerin modifikasyonunu sağlaması, bölgesel etki alanının artırılması, hidrofobik peptidlerin çözünürlüğünün artırılması, organizmadaki etkin

sürenin uzaması ve immünojenik aktivitenin istenen düzeye çıkartılması gibi özellikler bunlardan bazılarıdır.

Aynı zamanda polimer polielektrolit konjugatların adjuvan özellikleri de arttırılmaktadır. Bu sayede hali hazırda kullanımda olan adjuvant maddelere alternatif olarak, pozitif veya negatif yüklü olan, immünojen özelliği bulunmayan polielektrolitlerin kullanımıdır (Mustafaev, 1996a).

Polielektrolitlerin sentetik peptidlerle oluşturulacak konjugatlarının güçlü koruma özellikleri nedeniyle sentetik aşılardan bir bileşeni olarak düşünülmektedir (Mustafaev ve Mustafaeva, 2002). Polielektrolitler ile peptidlerin kovalent konjugasyonları için geleneksel yöntemler kullanılarak su içindeki makromoleküllerin aktivasyonu sağlanmış ve fonksiyonel grupları arasında gerçekleşen reaksiyonları sonucu peptid-lineer polielektrolit ve protein-lineer polielektrolit kovalent konjugatları sentezlenmiştir. İki basamaklı, karbodiimid aktivasyonu ile gerçekleşen kovalent konjugasyon reaksiyonu; polimere ait karboksil gruplarının karbodiimid ile aktive edilmesi ve karboksil gruplarıyla peptidin veya proteinin amino grupları arasında kondenzasyon reaksiyonunun olması sonucu gerçekleşir. Birinci basamak boyunca kararsız ara ürün olan O-açilisoüre oluşmaktadır. Kararsız bu ara ürüne, protein veya peptiddeki amino gruplarının gelmesiyle polimer ile protein veya peptid arasında çapraz bağlanması gerçekleşir.

Yapılan araştırmalar sonucu, karbodiimid kullanılarak taşıyıcı polimerler ve peptidlerin kovalent konjugasyonu ile sentezlenen konjugatların immünojenik özelliklerinin yüksek olduğu görülmüştür. Konjugatların immünojenik özelliğinin yüksek olması ise polimerin adjuvant etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Mustafaev ve ark, 1996a; Mustafaev, 2004).

Lineer yapıdaki polielektrolitlerin yanı sıra küçük moleküllerin konjugasyonunu sağlamak için taşıyıcı proteinler de sentetik aşı sistemlerinde kullanılmaktadır. Bu taşıyıcı protein biyomoleküllerine sığır serum albumin (BSA), Keyhole Limpet Hemosiyanin (KLH), ovalbumin (OVA) gibi globüler proteinler de peptidler için taşıyıcı olarak kullanılmakta olup küçük moleküler boyuta sahip peptidlerin in-vivo sistmede antikor oluşturabilmesi prosesinde tanınmasını sağlamaktadır.

Genellikle sığır serum albumin (BSA) antikor oluşumunda konjugasyon için en yaygın kullanılan taşıyıcı proteinlerdendir. Konjugasyon reaksiyonlarındaki çeşitli

moleküller, hapteler veya proteinler için BSA, yapısında bulunan çeşitli fonksiyonel gruplarından dolayı tercih edilmektedir (Friedli, 1996).

Taşıyıcı proteinlerden BSA ve KLH kullanımı en yaygın proteinlerdir. Peptidler, bu proteinlere kovalent bağlarla kararlı olarak bağlanırlar. Bağlanma yani konjugasyon bölgesi, peptid dizilimine göre, peptidin içerdiği aminoasit kompozisyonu belirleyici rol oynamaktadır. Dizideki -N ucu veya -C ucu ya da içindeki herhangi bir fonksiyonel gruptan olabilir. Konjugasyon bölgesi olarak karboksil ucu (-COOH), amino ucu (-NH₂) ya da sülfidril (-SH) ucu olabilir. Antijenik peptid dizilimi, proteinin bağlanma özelliği dikkate alınarak sentezlenmelidir. Antikor oluşumu için peptid diziliminin antijenik özelliği ve konjugasyon dizaynının uygun olarak yapılması iyi sonuç alabilmek açısından önemlidir (Deen ve ark., 1990).

Antijenlerin tek başına immünojenik aktivitesinin düşük olması nedeniyle proteinler taşıyıcı peptidlere kovalent bağlarla bağlanır. Burada hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler sayesinde kompleks içeren sistemler elde edilmektedir. Aynı zamanda polielektrolitlerle antijen bağlanması sırasında açığa çıkabilecek serbest bileşenleri engellemek için metal varlığında bağlanması düşünülmüştür. Mustafaev ve Norimov (1990) tarafından yapılan çalışmaya göre, polielektrolitlerin protein antijenleri ile bağlanmasında Cu²⁺ metali kullanımının immünolojik etkiyi arttırdığı görülmüştür.

2.9. Sentetik Polimerler ve Konjugasyonu

Sentetik polimerlerin çeşitli biyomoleküllerle konjugasyonu, hem sentetik hem de doğal polimerlerin avantajlarını aynı anda sağlayan biyohibrid malzemelere erişim kolaylığı sağlar (Chen ve ark., 2020). Polimerler bir ya da birden fazla monomer ile sentezlenebilirler. Monomerlerden oluşan bu polimer zincirinde, tekrarlı birimlerin kimyasal bileşimleri aynı ise bu tür polimerlere homopolimer adı verilir. Ancak polimer zincirini oluşturan tekrarlı birimler iki farklı kimyasal bileşime sahipse bunlar kopolimer, üç farklı kimyasal bileşime sahip monomerden oluşan polimer zinciri ise termopolimer olarak adlandırılırlar.

İki farklı yapıda bulunan kimyasal bileşime sahip monomerlerden sentezlenmiş kopolimerler, diziliş şekline göre, rastgele, blok, ardışık ve aşırı kopolimerleri olarak dört grup olarak incelenir. Poli (metil vinil eter ko-maleik anhidrit), metil vinil eter ile maleik anhidritin sentetik yapılı bir kopolimeridir. Piyasadaki ismi ‘Gantrez’dir (Arbós ve ark., 2002). PMVEMA kopolimeri, protez yapıştırıcılarda, transdermal uygulamalarda, farmasötik amaçla veya biyouyumlu malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır (Sharma ve ark., 1999).

Biyolojik olarak parçalanabilir özellikteki bir polianhidrit olan PMVEMA, biyoadeziv ve mukoadesiv özelliklere sahip nanopartikül formlarının hazırlanabilmesi için de uygun bir kopolimer olabilmektedir (Arbós ve ark., 2002). Aslında poli anhidritler, hidrolitik açıdan bozunduğunda, parçalanmış her anhidrit bağının ürünü olarak iki karboksil grubu içerir. Adsorpsiyon prosesine göre, karboksil grupları, polimerlerin bazı bileşenlerle hidrojen bağları oluşturma kabiliyetini artırır. Aynı zamanda PMVEMA kopolimeri, içerdiği beş üyeli anhidrit halkasından ötürü sert bir yapıya sahiptir. Hidrolize uğrayarak şişer ve serbest asit formu olan poli (metil vinil eter ko-maleik) asite dönüşür (Singh ve ark., 2009a; Singh ve ark., 2009b).

Suda çözünebilir polielektrolitler ya da mikrobiyal antijen konjugatları, biyoteknolojik, farmasötik gibi alanlarda pek çok uygulama alanına sahip araştırmalarda incelenmiştir. Suda çözünür polielektrolitler, immünojenik özelliğe sahip değildirler ve taşıyıcı, adjuvan özellikte olmaları sebebiyle etkili immün yanıt ortaya çıkarırlar. Bu sayede suda çözünebilir polielektrolitlerin, mikrobiyal antijen taşıyıcıları olarak kullanılmasıyla yalnızca organizmadaki immün yanıtı arttırmak değil, aynı zamanda etkili bağışıklığın korunmasını da sağlamaktadır (Mansuroğlu ve ark., 2011).

Maleik anhidrit kopolimerleri, anhidrit halkasının hidrolizi nedeniyle sulu ortamda polielektrolit halini alır. Bu polielektrolitler, ilaç taşıma sistemleri, enzim immobilizasyonu gibi alanlarda, biyomedikal uygulamalarda etkili olduğu bilinmektedir (Ladavière ve ark., 1999). Ayrıca çeşitli karakteristik özellikleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca anhidrit kopolimerleri üzerinde yapılan pek çok çalışmada, model protein olarak kullanılan BSA gibi proteinler ile nükleik asit veya diğer farklı molekülleri bağlayabildiği kanıtlanmıştır (Ladavière ve ark., 1997; Wang ve ark., 2008).

Suda çözünür polielektrolitler ile mikrobiyal antijenlerin fiziksel karışımı ile elde edilen kompleksler, metal varlığında, çapraz bağlayıcılarla konjugat olarak sentezlendiği çalışmalarda geleneksel yöntemlerin zaman aldığı görülmüş, bu amaçla farklı destekli reaksiyonlar tercih edilmiştir.

2.10. Karbodiimidler

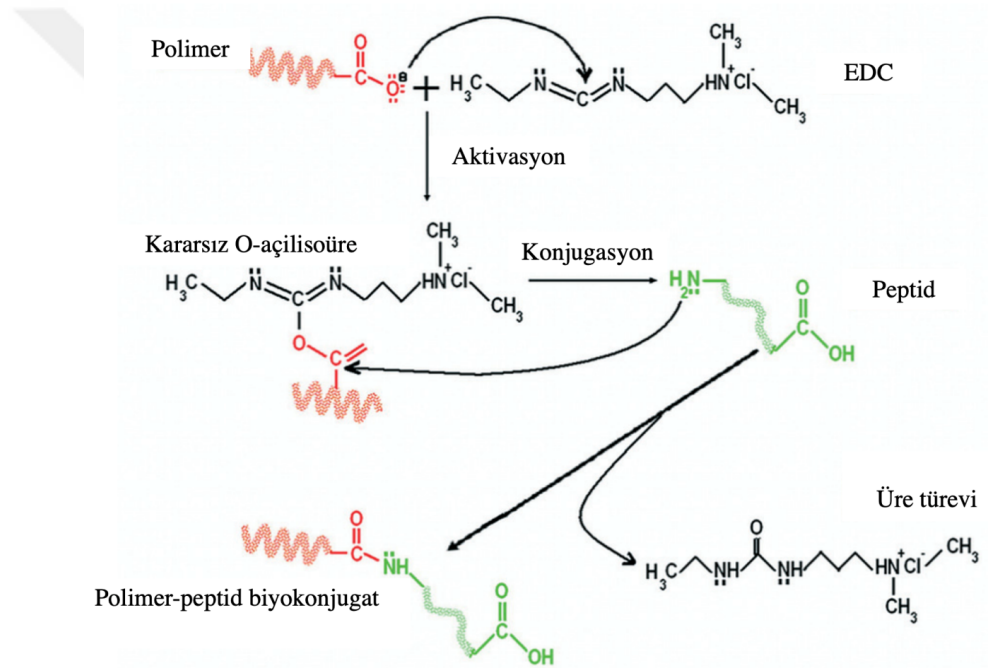
Amid bağı oluşumu, konjugasyon kimyası açısından özellikle protein yapısındaki birleştirilecek biyomoleküllere çeşitli bağlayıcılar veya araçlar eklemek amacıyla kullanılan reaksiyondur (Farkas ve Bystricky, 2010). Karbodiimidler, karboksil ve amin grupları arasındaki amid bağlarının oluşumunu sağlamak için kullanılan zero-length (direkt) çapraz bağlayıcı olarak sınıflandırılırlar. Bu tür bağlayıcı reaktifler, herhangi bir grup veya atom bulunmaksızın iki molekülün kovalent olarak bağlanmasını sağlar. Bu da zero-length bağlayıcı reaktiflerinin diğer çapraz bağlayıcılara göre en önemli avantajı olduğu söylenebilir (Everaerts ve ark., 2007; Hermanson, 2013; Staros ve ark., 1986). Çünkü direkt olmayan reaktif çapraz bağlayıcılar kullanıldığında konjugasyon reaksiyonu ile elde edilmiş konjugattaki moleküller birbirine bağlanırken yapısına yabancı maddeler de katılır. Bu şekilde elde edilen konjugatlarda immün yanıt geliştirilmesi istenirken bazen oluşan antikörlerin bir kısmı çapraz bağlayıcı reaktiflerine spesifik olmaktadır, bu da istenmeyen antikör oluşumlarına sebebiyet verir. Bunu engellemek için zero-length çapraz bağlayıcılar kullanmak önemlidir (Hermanson, 2013).

Biyolojik moleküllerin konjugasyonu için en çok kullanılan karbodiimid türevi olan 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür, EDC olarak adlandırılmaktadır. EDC, suda çözünebilmesi, ayrıca daha önce organik bir çözücüde çözmeksizin reaksiyon ortamına çapraz bağlayıcıyı ekleyebilme avantajını sağlar. Karbodiimidlerin suda çözünür bir türevidir ve peptidlerin, hapten-protein veya protein-protein konjugatlarının sentezinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2005). EDC varlığındaki karbodiimidin fazlası ve çapraz bağlama reaksiyonu yan ürünü olarak açığa çıkan üre türevleri suda çözünebilir özellikte olduğundan jel filtrasyonu vb. yöntemlerle ortamdan uzaklaştırılabilir. Böylece saflaştırılmış konjugatlar elde edilebilir (Sheehan ve ark., 1961; 1965).

EDC kullanımı sırasında dikkat edilmesi gereken birtakım hususlar vardır. Bunlar saklama koşulları ve hazırlanma aşamalarıdır. EDC su içerisinde kararlı olmadığı için -20oC’de saklanmalıdır. Kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirilerek açılmalıdır. Reaksiyon ortamına eklenebilmesi için suda stok çözeltisi hazırlanırken kimyasal aktivitesini bozmamak adına kısa sürede hızlı bir şekilde yapılması gerekmektedir.

EDC’nin polimer birleştirme reaktifi olarak kullanılması sırasında EDC, karboksil gruplarını aktive eder ve protein veya peptidlerin amin grupları ile amid bağı oluşturur (Şekil 4).

Şekil 4: Polimerin karboksil grubunun aktivasyonu ile polimer-peptid konjugatının eldesi



(Iscani, 2007)

Polimerlerin EDC varlığında çapraz bağlanması, O-açilisoure grubu ara ürününü vermek üzere polimer zincirlerinin karboksilik asit gruplarını aktivasyonunu içermektedir. Burada çapraz bağlar, peptid zincirindeki serbest amino gruplarıyla olan bir reaksiyondan sonra oluşur ve sırasıyla moleküller arasında çapraz bağla sonuçlanır. EDC varlığındaki peptid-protein konjugasyon esnasında moleküllerin kendi içinde polimerizasyonu da söz konusu olabilmektedir. Peptid molekülünde karboksil ve amino

grubu bulunduğundan karbodiimidçe aktive edilmiş karboksil grubunun oluşturduğu kararsız ara ürüne peptidin amino grupları giderek biyokonjugatın yanı sıra peptid oligomerlerinin oluşumuna da sebep olabilir. Ayrıca EDC bağlayıcısının kullanıldığı protein karboksil grubu aktivasyon reaksiyonları gerçekleşirken yan reaksiyon meydana gelebilir. Bunlar protein polimerizasyonu, EDC'nin ortamda bulunan sülfidril uçlarıyla ya da tirozin ucuyla reaksiyona girerek fenolat oluşturmaları reaksiyonlarıdır (Carraway ve Triplett, 1970; Carraway ve Koshland, 1968).

Karbodiimid türevleri kullanılırken pH aralığı oldukça önemlidir (Hermanson, 2013). EDC ile sağlanan konjugasyon reaksiyonlarında çözücü olarak su kullanılır ve pH değerinin sabit tutulabilmesi için de ortama HCl eklenmektedir. Karboksilat ve amino içeren tamponların kullanılması reaksiyon için uygun değildir. Bu nedenle pH nötr değerlerde tutularak yapılacak konjugasyon için 0.1 M fosfat tamponu kullanılmaktadır. Genellikle EDC varlığındaki konjugasyon prosesi şu şekilde işlemektedir; pH kontrollü, kullanılan tampon, reaksiyondaki peptid- protein bileşimi, EDC oranının ayarlamaları şeklindedir.

2.11. Zetasizer Ölçümleri

2.11.1 Polidispersite ve Partikül Boyutu

Biyolojik açıdan partiküllerin molekül boyutlarının etkisi oldukça farklıdır. Hücresel yapılar, biyomoleküller, polimerler nanoskala boyuta sahiptir. Doğal yapıların fonksiyonları boyutlarına göre değil, yapılarına göre değişkenlik gösterirken sentetik yapıların biyolojik yapılar ile etkileşimi sadece yapı değil boyut özelliğiyle de ilişkilidir. Farmasötik uygulamalarda, cilt ve kan damarları geçirgenliği, kandaki dolaşım süresi, hücre içi lokalizasyonu, organlardaki dağılım oranı gibi farmakolojik etkenliği üzerinde partikül boyutu oldukça önemlidir. Nanoskala, partiküllerin doku mühendisliği gibi diğer alanlarda da kullanımına ilişkin bilgiler sağlamaktadır. Ayrıca parçacıkların toksisitesi de yine partikül boyutuna göre belirlenebilir. Örneğin 1.4 nm boyutundaki altın nanopartiküller, DNA'daki ana boşluklara girerek hücre ölümüne sebep olduğu için diğer boyutlarına nazaran en yüksek toksisite oranına sahiptir (Beşergil, 2008).

Bir kolloidal sistemde partikül boyutu kadar partiküllerin moleküler ağırlık dağılımı da önemlidir. Bunun için bir polimerin moleküler ağırlık dağılımı ifade edilirken polidispersite indeksi (PI) kullanılır. Polidispersite indeksi bire eşit olan monodispers polimerler, sentetik olarak elde edilemezler. Sentetik polimerlerin PI değerleri yaklaşık olarak 1.5 ila 5 arasındadır. Polimerlerde polidispersite arttıkça moleküllerin ağırlık dağılımı da genişlemektedir. Stabil bir kolloidal sistem eldesinde, partikül dağılımını ifade eden pikin sivri olması yani dar aralıkta toplanması gerekmektedir. Aynı zamanda 0.7'den büyük PI değerleri için polidispers, 0.05'ten küçük PI değerlerinde ise çok dar monodispers dağılım elde edilir (Rogošić ve ark., 1996)

Zetasizer ölçümleri sıvı ortamlarda partikül veya moleküllerin değerli özelliklerinin elde edilmesini sağlar. Özellikle de biyomoleküler ve farmasötik uygulamalara ilişkin düşük konsantrasyon ve numune hacmi gereksinimine ilaveten kolloidal uygulamalar için yüksek konsantrasyon ihtiyacını da karşılamaktadır. Elde edilen veriler ise parçacıkların çözünme, biyoyararlanım veya immünotoksisite gibi özelliklerini doğrudan etkilemektedir (Mattison, K. W., & Kaszuba, M., 2004; Şakar Daşdan ve ark., 2019).

Zetasizer cihazı, partikül boyutunu Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS) yöntemiyle hesaplar. DLS yöntemi aynı zamanda karmaşık sıvıların davranışlarını incelemek için de kullanılmaktadır. Sabit ve tek dalga boyuna sahip olan ışın, çözeltiye gönderildiğinde moleküllerin boyut ve şekillerine göre saçılmaya uğrar. Bu saçılma yoğunluğu dedektör tarafından zamana göre kaydedilir. Doppler etkisi yani moleküllerin sürekli hareketlerinden dolayı Doppler genişlemesi olarak ifade edilen sonuçlar elde edilir. DLS, moleküllerin hareketleriyle de doğrudan ilişkili olduğundan ölçüm sonuçları moleküllerin şekli, çözücünün viskozitesi ve sıcaklığa bağlıdır (Harding ve Jumel, 1998).

2.11.2 Mobilite ve Zeta Potansiyeli

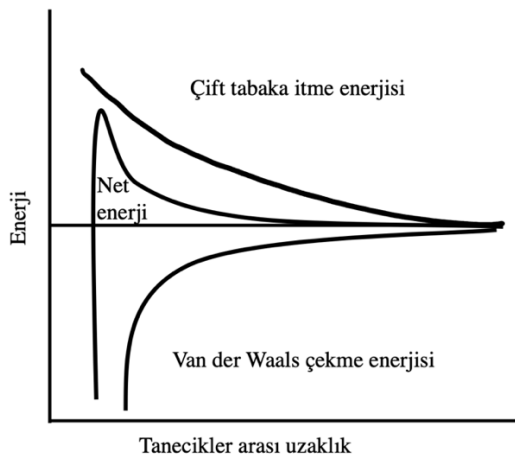
Partikül boyutu 1 nm ile 1 µm aralığında olan katı maddelerin (peptid, protein vb.) sıvı bir çözücü içinde çözünmesiyle oluşturulmuş sisteme kolloidal süspansiyon adı verilir. Kolloidal sistemlerin karakteristik özelliği partikül boyutları ve yüzey yükleridir.

Elektrostatik potansiyel, katı ve sıvı arayüzdeki iyonik etkileşimlerden oluşur ve bu da iki farklı faz arasında oluşan sınırlarda yük birikimine sebep olur (Kallay ve ark., 2010). Yüzey potansiyeli tanımlanırken kullanılan en yaygın parametre, kolloidal dispersiyonlardaki elektrokinetik potansiyeli karakterize eden zeta potansiyelidir (Clogston ve Patri, 2011). Zeta potansiyeli, partiküllerin yüzey yükleri tarafından oluşturulan potansiyelin dolaylı yoldan ölçümüdür. Partiküller arası itme ve çekme kuvvetlerinin değeriyle elde edilen ölçüm olduğu da ifade edilebilir.

Kolloidal sistemlerde kararlılığın sağlanması için tanecikler arası çekme kuvvetine karşın itme kuvvetinin büyük olması gerekir. Bu nedenle kararlılığı sağlamaya yönelik polimerik itme ve elektrostatik itme olarak iki temel mekanizma bulunmaktadır. Kolloidal dispersiyonlardaki kararlılık bozuldukça zeta potansiyeline etki eden durumlardan bahsedilebilir. Dispersiyonlardaki tanecikler birbirlerinin yüzeyine tutunarak topaklanmalar oluşturabilirler. Bu şekildeki tanecik boyutunun artışı sedimentasyona (çökelmeye) yol açar. İlk oluşan kümeye flok (tortu, topak), bu olaya ise flokülasyon (topaklanma) adı verilir. Şayet flokülasyon daha sıkı bir biçime geçerse koagülasyon (pıhtılaşma) ortaya çıkar.

Boris Derjaguin, Lev Landau, Evert Verwey ve Teo Overbeek koloidal sistemlerdeki kararlılık hakkında, kullanışlı bir teori olan DLVO teorisini geliştirmişlerdir. DLVO teorisi, tanım olarak sulu dispersiyonların kantitatif açıdan kümelenmesini ifade eder ve sıvı bir ortamdan etkileşen yüklü yüzeyler arası kuvvetleri açıklamaya yarar. Teoriye göre kolloidal bir sistemin kararlılığı, elektriksel çift tabaka itme kuvveti ve Van der Waals kuvvetlerinin toplamı belirlemektedir.

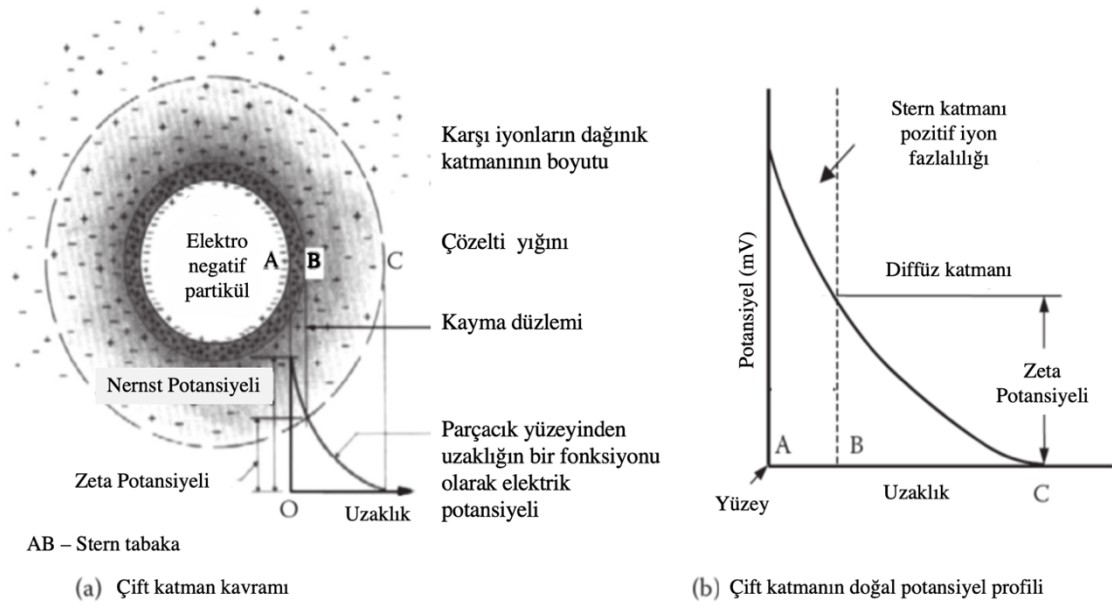
Şekil 5: Net enerji grafiği



DLVO teorisi, itme kuvvetlerinden kaynaklanan enerji bariyerinin, taneciklerin birbirlerine yaklaşımını ve toplanmasını engellediği yönünde bir görüş ileri sürmektedir. Ancak taneciklerin bu bariyeri yenecek ve yeterli enerjiyle çarpması durumunda çekme kuvvetleri tersinmez olarak Şekil 5'te gösterildiği gibi taneciklerin birbirine tutunmasına sebep olacaktır.

Katı bir madde sıvı çözeltiye daldırıldığında negatif ve pozitif iyonlar malzeme yüzeyinde toplanmaya başlar. Farklı enerji seviyesi taşıyan katı ve sıvı parçaların olması nedeniyle elektriksel bir çift katman oluşturur. Proton taşıyan ya da iyonize edilmiş olan maddenin fonksiyonel grupları, madde yüzeyindeki zıt iyonları kendine çeker ve ardından düzenli ve taşınmaz tabaka yüzey yükünü nötralize eder. Aynı zamanda iyonların su molekülleriyle çevrili olması nedeniyle anyonik kısımlar yüzey yükünü nötralize etmek için büyüktür. Diğer kalan anyonik kısımlar ise yüzeyden daha uzakta bulunan ve dıştan yayılan bir tabaka oluşturan karşıt iyonları çeker. kesme düzleminde zeta potansiyeli, iki tabaka arasında arayüzeyde ölçülür ve kolloidal sistemdeki elektriksel çift tabaka Helmholtz-Smoluchowski denklemi ile ölçülür. Ayrıca parçacıklar arasında itme kuvveti oluşturan bu elektrik çift tabakası elektrik yüklerinden oluşmaktadır.

Şekil 6: Negatif yüklü partikülün zeta potansiyeli (a) çift katman ve (b) çift katman potansiyel profili



(Albright, 2009: 1605)

Şekil 6’da gösterildiği gibi, negatif yüklü bir iyon için ortamdaki iyonlarla gireceği elektrostatik etkileşimler sonucu negatif iyonları iterek pozitif iyonları ise çekerek partikül yüzeyinin hemen dışındaki pozitif yüklerin yüzeye sıkıca bağlı bulunduğu ve Stern tabaka adı verilen bir katman oluşturmaktadır. Bu katmandan sonra iyonların hareket edebildiği bir difüz bölgesi bulunmaktadır. Difüz bölgesinde bir kayma düzlemi olduğu varsayılmaktadır. Buradaki düzlem içinde kalan pozitif iyonlar, partikülle birlikte harekete zorlanırken dışarda kalan pozitif iyonlar ise bağımsız hareket etmektedir. Moleküldeki Stern katmanında oluşan elektrik potansiyele Stern potansiyeli, kayma düzlemindeki potansiyele ise zeta potansiyeli denir. Zeta potansiyeli, direkt olarak numune yüzeyi üzerindeki ölçülen değeri değil, net yüzey yükünü ifade etmektedir. Ayrıca yüzeydeki fonksiyonel grupların varlığını gösterir (Spriano ve ark., 2017).

Zeta ölçümü, pH değerine, sıvı fazdaki iyonik güce, malzeme özelliğine, iletkenliğe, yüzey pürüzlülüğüne ve sıcaklık, nem gibi çevresel faktörlere karşı da duyarlıdır. Potansiyelin değeri kolloidal sistemdeki kararlılığın bir göstergesi olduğundan yaklaşık +30 mV’tan daha pozitif ve -30 mV’tan daha negatif ise sistemin kararlı olduğu

ifade edilir. +30 mV'tan daha pozitif değer alan potansiyel, parçacıkla arasındaki elektriksel itme kuvvetinin de baskın ve büyük olduğunu, Van der Waals ekme kuvvetlerinin yetersiz kalacağını ifade ederken şayet bundan daha düşük pozitif değerler alırsa parçacıklar elektriksel itmeyi yenerek bir araya toplanmaya başlar. Zeta potansiyelinin değeri yaklaşık +30 mV ile -30 mV aralığında ise sistem kararsızlığa, tanecikler agregasyon ve sedimentasyona yatkın olacaktır.

Elektroforetik mobilite ise yüklü parçacığın hareket edebilme kapasitesi veya iyonların çözeltideki hareketliliği şeklinde ifade edilebilir. Molekülün net yüküyle doğru orantılı, molekül boyutu ve elektroforez ortamının viskozitesiyle ters orantılı olarak değişmektedir. Aynı zamanda mobilite, ortamın iyonik gücüne de büyük ölçüde bağlıdır. mobilite değerindeki artış, kolloidal sistemler için stabilitenin arttığının bir göstergesi şeklinde yorumlanır (Varga ve ark., 2020).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada kullanılan cihazlar ve kimyasallar aşağıda yer almaktadır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Deney Ekipmanları (Marka/Model)

- Brookhaven 90 Zeta PALS Zetasizer
- Sartorius CP225D Hassas Terazî,
- Precisa XB 220A Hassas Terazî,
- Binder Vakum Etüvü,
- Finnpiette Micropipet (1-10 ml 100-1000 µl, 5-50 µl),
- IKAMAG çoklu karıştırıcı,
- Milipore-Q Gradient saf su cihazı

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Üretici Firmaları

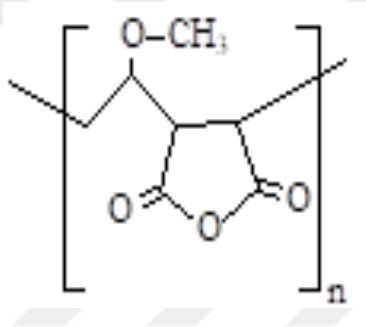
- Metil vinil eter-maleik anhidrit Kopolimeri (Gantrez AN-139)
- Bovin Serum Albumin (BSA), (Sigma A 7030)
- Bakır Sülfat (CuSO₄.5H₂O), (Merck 102788)
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (Sigma)

3.1.3. Kimyasal Maddeler

3.1.3.1 Poli (metil vinil eter ko-maleik anhidrit) Kopolimeri

Poli (metil vinil eter ko-maleik anhidrit) biyolojik olarak parçalanabilen bir polianhidrittir. Piyasada Gantrez ismiyle bilinmektedir. Maleik anhidritin sentetik yapılı kopolimeridir ve biyoteknolojik uygulamalarda çok çeşitli amaçlar için yararlanılmaktadır. Toksik olmadığı daha önceki çalışmalarda görülmüştür (Irache ve ark., 2005). Kimyasal yapısı Şekil 7'deki gibidir.

Şekil 7: PMVEMA kopolimerinin yapısı



(Salman ve Azcarate, 2016)

İmmünojenlik aktifliği zayıf olan sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli moleküler boyuta sahip olamadıklarından peptidlere karşı antikor üretimini arttırmak amacıyla peptidler lineer polimerlere bağlanabilir. Peptidler poli akrilik asit (PAA), Poli vinil piridin-poli setil piridin kopolimerleri gibi lineer taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar (Gürhan ve ark., 2002). Aynı zamanda maleik anhidrit kopolimerleri anhidrit halkalarının hidrolizi nedeniyle sulu ortamlarda polielektrolit halini alırlar.

Sulu çözeltilerinde polielektrolitlerin proteinlerle olan etkileşimleri daha önceki çalışmalarda araştırılmış ve bileşimlerine, iyonik şiddete, pH'ya bağlı olduğu görülmüştür. Yapılan tez çalışması kapsamında PMVEMA kopolimeri hazırlanan konjugat ve komplekslerin yapısında kullanılmıştır.

3.1.3.2 Sığır Serum Albumin (BSA)

Sığır serum albumin (BSA), çözünürlüğünün iyi olması ve kolay erişilebilirliği gibi nedenlerle deneysel araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir albumin proteindir. Özellikle yapısında bulundurduğu fonksiyonel gruplardan ötürü konjugasyon reaksiyonlarında tercih edilmektedir. Tez çalışması kapsamında BSA çözeltisi ile polielektrolit-protein ve polielektrolit-metal-protein komplekslerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Polikomplekslerin güçlü immün yanıt geliştirdiği ve immünolojik koruma sağladığı bilinmektedir.

3.2 Kimyasalların Hazırlanması

3.2.1 BSA Çözeltisinin Hazırlanması

BSA çözeltisi 60 mg /5 ml oranında olacak şekilde saf suda hazırlandı.

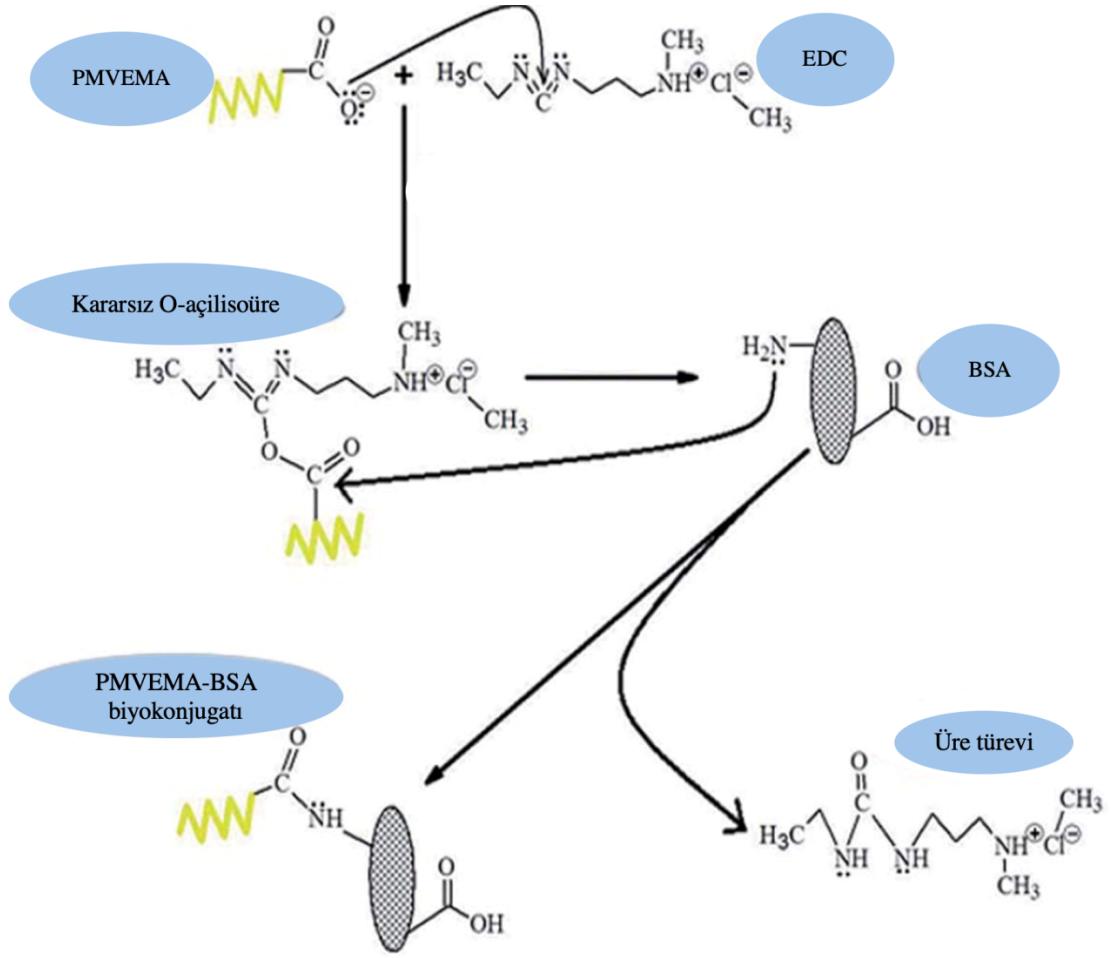
3.2.2 PMVEMA-BSA Konjugatının Sentezlenmesi

Moleküllerin kovalent bağlarla bir araya gelebilmesi için kullanılan çapraz bağlayıcı ajanlar bulunmaktadır. Genellikle 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) kullanılarak içeriğinde karboksil grupları ve primer amin bulunduran biyolojik moleküllerin konjugasyonu sağlanmaktadır.

Konjugatın oluşumu için öncelikle N-substitue karbodiimidler ve karboksilik asitlerle tepkimeye girerek reaktifliği yüksek olan O-açilisoüre ara ürününü meydana getirir. Oluşan aktif ara ürün primer amin gibi nükleofilik gruplarla reaksiyona girerek amid bağları oluşur.

PMVEMA-BSA biyokonjugatının oluşturulması için tercih edilen konvansiyonel yöntem prosedürü şekil 8’de şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 8: PMVEMA-BSA biyokonjugatının konvansiyonel yöntem ile eldesi



(Karahana ve ark., 2012)

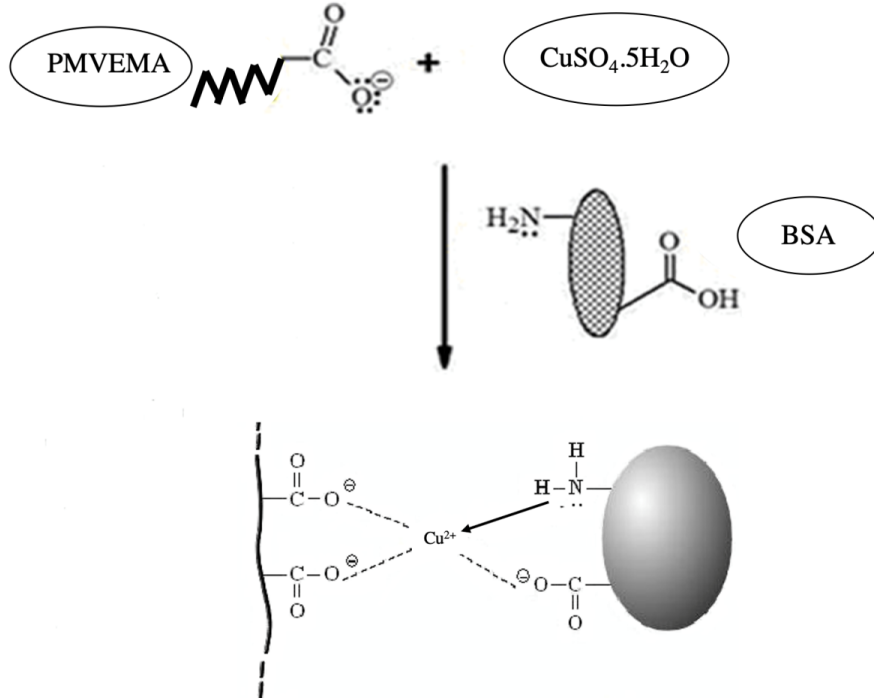
PMVEMA-BSA biyokonjugatının konvansiyonel olarak eldesi için, 1 mg poli (metil vinil eter-ko-maleik anhidrit) çözeltisi, 0.1 ml DMSO içerisinde çözdürüldü. organik fazın toplam çözelti içinde en fazla %5 olmasını sağlamak ve çeşitli formlardaki misellerin oluşmasını engellemek için oda sıcaklığında karıştırılarak 1.9 ml fosfat tuzu tamponu (PBS) çözeltiye ilave edildi. Çözeltinin pH değeri EDC'nin reaktifliğinin maksimum olduğu 4.7'ye ayarlandı ve ardından EDC kopolimerden dört kat fazla olacak şekilde 4 mg olarak çözeltiye eklendi. 3 saatlik karıştırma işlemi sonunda BSA ve PMVEMA mol oranı 2 olacak şekilde ($n_{BSA}/n_{PMVEMA} : 2.0$) reaksiyon ortamına eklenerek 12 saat boyunca karıştırıldı. Toplam çözelti hacmi 4 ml'ye tamamlanarak 2 saat daha karıştırıldı. Ayrıca ultra saf suyla hazırlanmış olan 1 M NaOH ile çözeltinin pH derecesi 7 olacak şekilde ayarlandı. Reaksiyonun toplam süresi 17 saat olarak kaydedildi.

3.2.3 PMVEMA-Cu²⁺-BSA Kompleksinin Sentezlenmesi

PMVEMA kopolimerinin stok çözeltisi 3 mg/ml olacak şekilde PBS tamponunda hazırlandı. CuSO₄.5H₂O çözeltisi ultra saf suda, BSA stok çözeltisi ise yine tamponda hazırlandı.

Hazırlanan PMVEMA kopolimerinin stok çözeltisinden 10 ml çözelti için 3333 µl (9.999 mg) PMVEMA alınarak CuSO₄.5H₂O eklendi ve oluşturulan ikili kompleksler 1 gece karıştırıldıktan sonra pH derecesi 7 olacak şekilde 1 N NaOH çözeltisiyle ayarlandı. BSA stok çözeltisi yavaş yavaş PMVEMA-Cu²⁺ ikili kompleksinin üzerine eklenerek karıştırıldı. pH derecesinin 7 olduğu kontrol edilerek üçlü PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksleri oluşturuldu. Oluşan kompleksin şematik gösterimi Şekil 9'daki gibidir. Mol oranları metal-polielektrolit için 0.5, protein-polielektrolit için 2.0 olarak alındı ($n_{Cu^{2+}} / n_{PMVEMA} = 0.5$, $n_{BSA} / n_{PMVEMA} = 2.0$).

Şekil 9: PMVEMA-Cu²⁺-BSA biyokompleksinin şematik gösterimi



(Karahane ve ark., 2012)

Hazırlanan BSA, PMVEMA-BSA biyokonjugatının ve PMVEMA-Cu²⁺-BSA biyokompleksinin sulu çözeltilerinin polidispersitesi, partikül boyutu, mobilitesi ve zeta potansiyeli üzerine farklı pH ve tuz konsantrasyonlarının etkisi incelendi ve sonuçlar yorumlandı.



4. BULGULAR

4.1. Çözeltilerin Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarında Elde Edilen Veriler

4.1.1. BSA Çözeltisinin Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarında Elde Edilen Veriler

Zeta potansiyel cihazında 660 nm de yapılan ölçümlerde stok BSA çözeltisine asidik ortamda (pH=6) sırasıyla 0.001 M, 0.01 M, 0.1 M, 0.25 M, 0.5 M NaOH ilave edilerek, artan pH'larda BSA çözeltisinin polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyelleri ölçüldü. Sonuçlar Tablo 1'de verildi.

Tablo 1: BSA çözeltisinin farklı pH değerlerinde polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyeli sonuçları

pH	Polidispersite	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
6	0.293	645	-0.37	-9.97
7	0.378	700	-0.38	-10.02
8	0.406	745	-0.39	-10.25
9	0.354	755	-0.42	-10.23
10	0.315	766	-0.43	-10.83
11	0.345	760	-0.41	-10.45
12	0.355	755	-0.44	-10.93

Zeta potansiyel cihazında yapılan ölçümlerde, stok BSA çözeltisine (pH=6) sırasıyla 0.2'şer ml 0.001 M, 0.002 M, 0.005 M, 0.008 M, 0.01 M, 0.02 M ve 0.05 M NaCl çözeltileri ilave edilerek BSA çözeltisinin partikül boyutu, mobiliteleri ve zeta potansiyelleri ölçüldü. Sonuçlar Tablo 2'de verildi.

Tablo 2: BSA çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyeli sonuçları

[NaCl] (M)	Polidispersite	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
0	0.296	360	-2.22	-24.93
0.001	0.295	365	-2.23	-25.93
0.002	0.294	369	-2.72	-29.28
0.005	0.291	370	-2.89	-29.77
0.008	0.285	380	-2.89	-29.19
0.01	0.279	385	-2.86	-28.95
0.02	0.272	390	-2.36	-26.55
0.05	0.281	425	-2.31	-24.89

4.1.2. PMVEMA-BSA Konjugatının Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarında Elde Edilen Veriler

Zeta potansiyel cihazında 660 nm de yapılan ölçümlerde, stok PMVEMA-BSA konjugatına, asidik ortamda (pH = 6) sırasıyla 0.001 M, 0.01 M, 0.1 M, 0.25 M, 0.5 M NaOH ilave edilerek, artan pH 'larda PMVEMA-BSA konjugatının partikül boyutları, mobiliteleri ve zeta potansiyelleri ölçüldü. Sonuçlar Tablo 3'te verildi.

Tablo 3: PMVEMA-BSA konjugatının farklı pH değerlerinde polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyel sonuçları

pH	Polidispersite	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
6	0.398	480	-1.65	-21.18
7	0.378	395	-1.69	-21.68
8	0.398	350	-1.46	-19.67
9	0.418	375	-2.15	-27.48
10	0.408	415	-2.06	-26.36
11	0.198	540	-0.65	-8.29
12	0.186	530	-0.52	-6.62

Zeta potansiyel cihazında yapılan ölçümlerde, stok PMVEMA-BSA konjugatına sırasıyla 0.2'şer ml 0.001 M, 0.002 M, 0.005 M, 0.008 M, 0.01 M, 0.02 M ve 0.05 M NaCl çözeltileri ilave edilerek, PMVEMA-BSA konjugatının partikül boyutları, mobiliteleri ve zeta potansiyelleri ölçüldü. Elde edilen veriler Tablo 4'te verildi.

Tablo 4: PMVEMA-BSA konjugatı çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyeli sonuçları

[NaCl] (M)	Polidispersite	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
0	0.429	415	-1.41	-18.01
0.001	0.425	425	-1.89	-24.25
0.002	0.426	428	-1.91	-24.96
0.005	0.415	435	-1.97	-25.22
0.008	0.409	370	-1.98	-25.45
0.01	0.469	365	-1.96	-25.09
0.02	0.505	370	-1.78	-22.76
0.05	0.410	450	-1.65	-21.17

4.1.3. PMVEMA-Cu²⁺-BSA Kompleksinin Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarında Elde Edilen Veriler

Zeta potansiyel cihazında 660 nm de yapılan ölçümlerde, stok PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksine, asidik ortamda (pH = 6) sırasıyla 0.001 M, 0.01 M, 0.1 M, 0.25 M, 0.5 M NaOH ilave edilerek, artan pH'larda PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksinin partikül büyüklükleri, mobiliteleri ve zeta potansiyelleri ölçüldü. Sonuçlar Tablo 5'te verildi.

Tablo 5: PMVEMA-Cu²⁺-BSA Kompleksi çözeltisinin farklı pH değerlerinde polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyel sonuçları

pH	Polidispersite	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
6	0.441	626	-0.520	-6.63
7	0.350	520	-0.360	-4.62
8	0.340	540	-0.350	-1.20
9	0.341	530	-1.010	-12.90
10	0.341	626	-0.710	-9.13
11	0.450	555	-0.409	-5.23
12	0.420	450	-0.138	-1.77

PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksine (pH=6), sırasıyla 0.2'şer ml 0.001 M, 0.002 M, 0.005 M, 0.008 M, 0.01 M, 0.02 M ve 0.05 M NaCl çözeltileri ilave edilerek, PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksinin partikül boyutları, mobiliteleri ve zeta potansiyelleri ölçüldü. Sonuçlar Tablo 6'da verildi.

Tablo 6: PMVEMA-Cu²⁺-BSA çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyel sonuçları

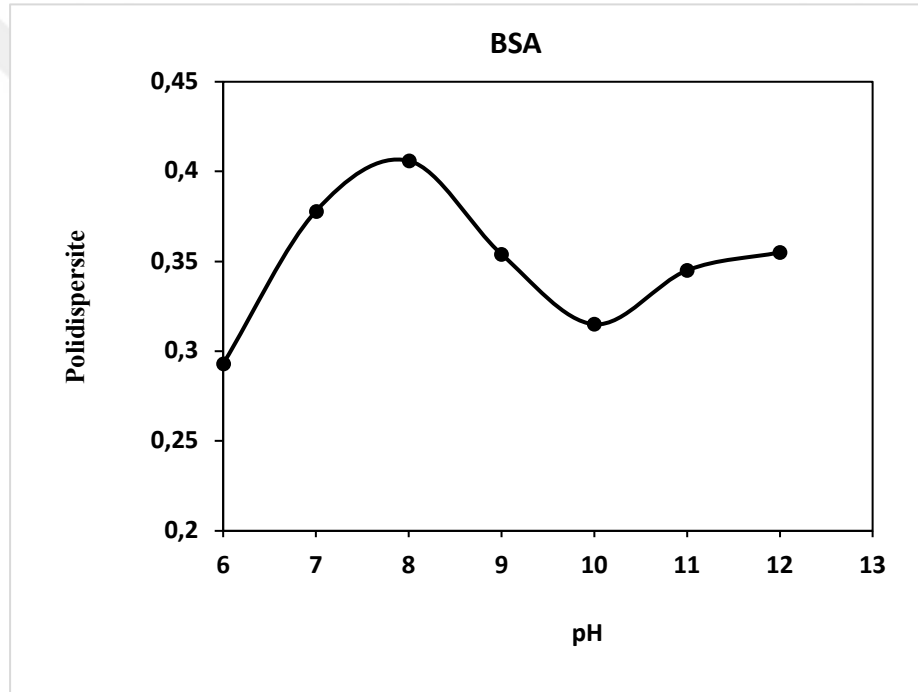
[NaCl] (M)	Polidispersite	Partikül Boyutu (nm)	Mobilite	Zeta Potansiyeli (mV)
0	0.540	425	-0.25	-3.15
0.001	0.490	415	-0.18	-2.35
0.002	0.500	405	-0.68	-8.74
0.005	0.430	355	-1.85	-23.68
0.008	0.420	320	-1.93	-22.62
0.01	0.480	310	-1.77	-22.67
0.02	0.400	370	-1.74	-22.24
0.05	0.450	335	-1.58	-20.25

4.2. BSA, PMVEMA-BSA ve PMVEMA-Cu²⁺-BSA Sulu Çözeltilerinin Polidispersite ve Partikül Boyutu üzerine farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisinin İncelenmesi

4.2.1 BSA Çözeltisinin Polidispersite ve Partikül Boyutu üzerine farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi

BSA sulu çözeltisine ait farklı pH'larda polidispersite değişimi Şekil 10'da verildi.

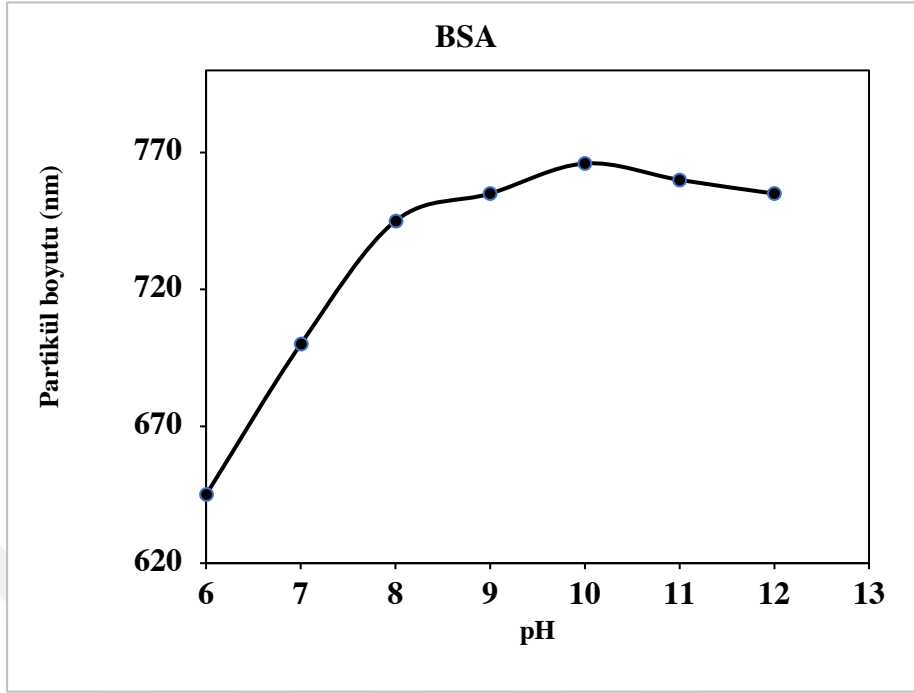
Şekil 10: BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde polidispersitesindeki değişim



Şekil 10'a göre, asidik ortamda (pH=6) polidispersite değeri yaklaşık olarak 0,3 civarındayken pH artışıyla beraber polidispersitenin de arttığı ancak pH=8 seviyesinden itibaren düşerek pH=10 da minimum değere ulaşmış ve artan pH ile çok az artış göstermiştir. Polidispersite değeri 0,2 ile 0,45 aralığında olup BSA çözeltisi farklı pH'larda monodispers dağılım göstermiş, sulu çözeltide homojen dağılmıştır.

BSA sulu çözeltisine ait farklı pH'larda partikül boyutu değişimi Şekil 11'de verildi.

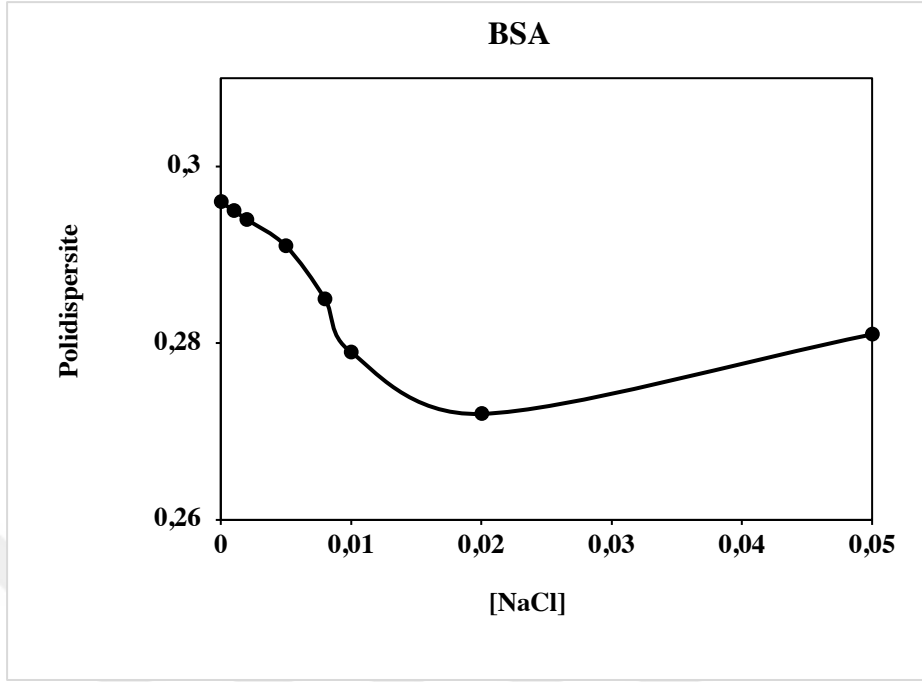
Şekil 11: BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde partikül boyutu değişimi



Şekil 11'e göre, artan pH değerleri ile BSA'nın partikül boyutu artmakta, pH=9'da maksimum değere ulaşmış olup artan pH ile partikül boyutu çok az düşmüştür.

BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında polidispersite değişimi Şekil 12'de verildi.

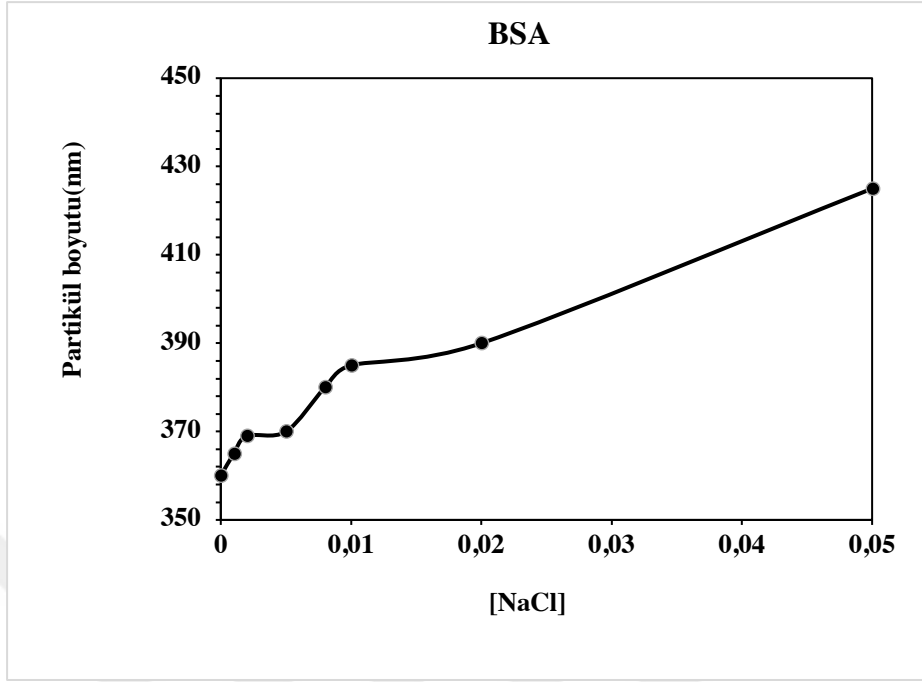
Şekil 12: BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında polidispersite değişimi



Şekil 12'ye göre BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında polidispersitesi 0.2-0.3 aralığında değişmekte olup BSA değişen tuz konsantrasyonlarında monodispers dağılım göstermiştir ve artan NaCl konsantrasyonu ile herhangi bir çökeltme gözlenmemiştir.

BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında partikül boyutu değişimi Şekil 13'te verildi.

Şekil 13: BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında partikül boyutu değişimi

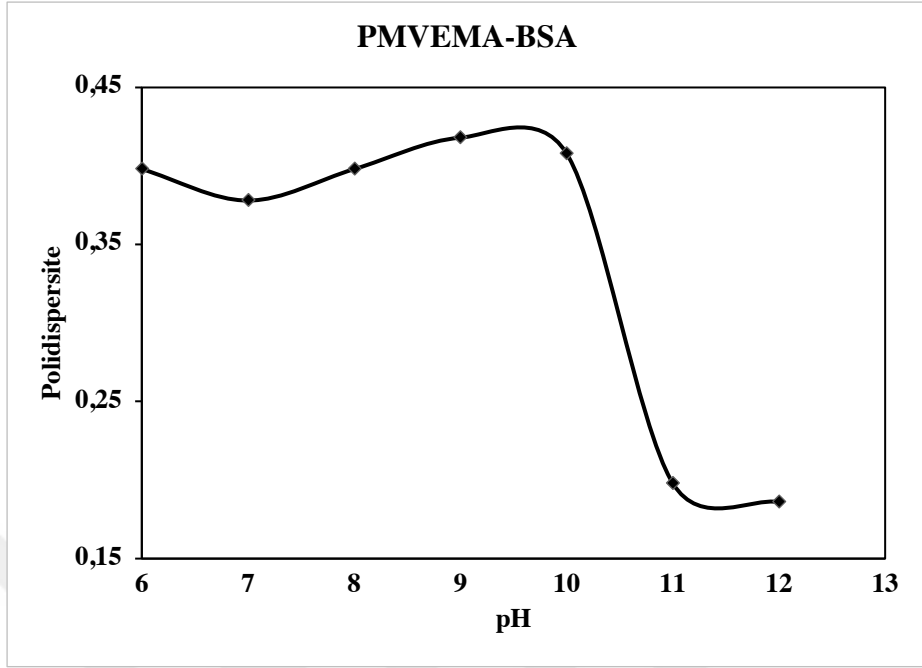


Şekil 13'e göre BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında partikül boyutu 360-430 nm aralığında değişmektedir. BSA değişen tuz konsantrasyonları ile partikül boyutunu korumakta olup herhangi bir çökelme gözlenmemiştir.

4.2.2 PMVEMA-BSA Çözeltisinin Polidispersite ve Partikül Boyutuna Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi

PMVEMA-BSA sulu çözeltisine ait farklı pH'lardaki polidispersite değişimi Şekil 14'te verildi.

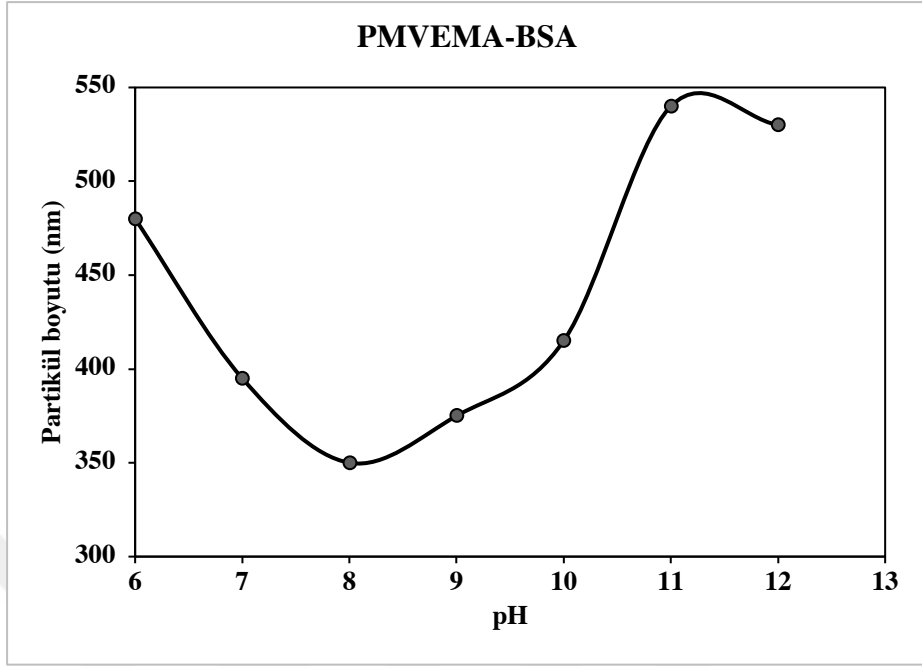
Şekil 14: PMVEMA-BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde polidispersitesindeki değişim



Grafiğe göre PMVEMA-BSA konjugatının artan pH'larda polidispersite değerleri 0.1 ila 0.4 aralığında değişmektedir. pH=10 seviyesinden sonra pH artışıyla polidispersitesi aniden düşmüştür. PMVEMA-BSA farklı pH'larda monodispers dağılım göstermiştir.

PMVEMA-BSA çözeltisinin partikül boyutu üzerine farklı pH değerlerinin etkisinin incelendiği grafik Şekil 15'teki gibidir.

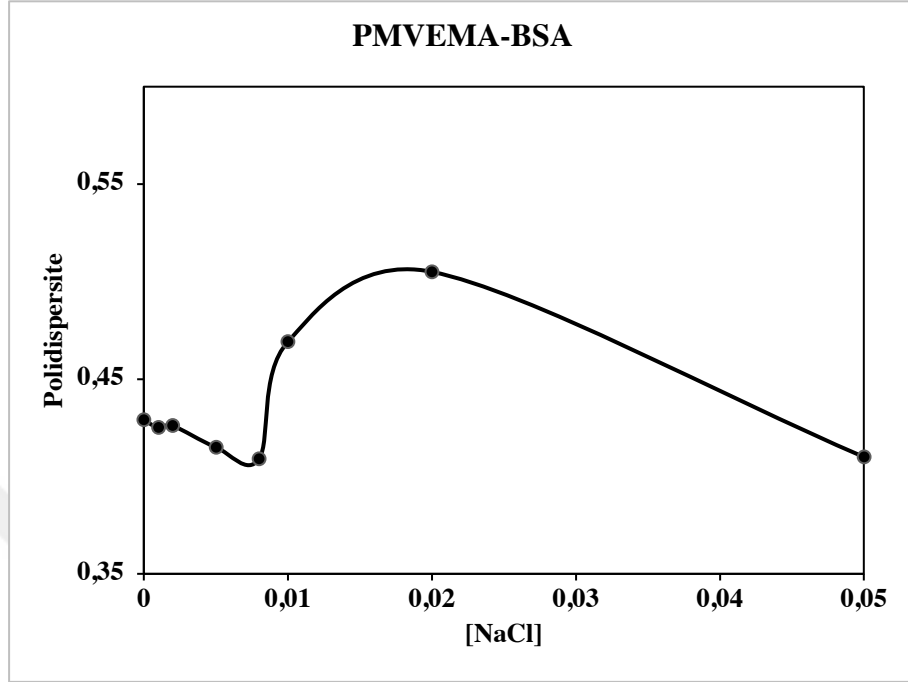
Şekil 15: PMVEMA-BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde partikül boyutu değişimi



PMVEMA-BSA'nın partikül boyutu artan pH değerlerinde 350 ile 540 nm arasında değişmektedir. pH=8 seviyesinde minimum değere inmiş pH=11 civarında ise maksimum değere ulaşmıştır. pH değişiminin partikül boyutunda önemli bir değişikliğe sebep olmadığı, çökelme yapmadığı görülmüştür.

PMVEMA-BSA sulu çözeltisinin farklı tuz konsantrasyonlarındaki polidispersite değişimine ait grafik Şekil 16'da verildi.

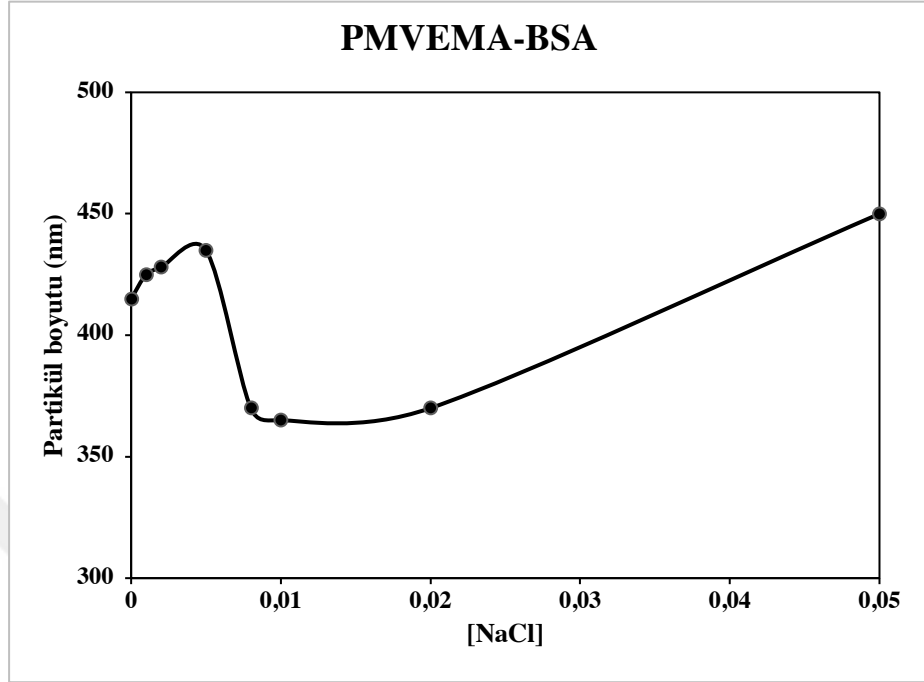
Şekil 16: PMVEMA-BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında polidispersite değişimi



Farklı tuz konsantrasyonlarında PMVEMA-BSA monodispers dağılım göstermiştir. Konjugatın polidispersitesi yaklaşık 0.4 ile 0.5 aralığında değişmektedir. Çözelti ortamındaki tuz konsantrasyonun 0.01 M olduğu durumda polidispersitesi en düşük seviyeye inmiş, konsantrasyon arttıkça maksimum seviyeye yükselmiştir.

PMVEMA-BSA'nın artan NaCl konsantrasyonlarındaki partikül değişimine ait grafik aşağıdaki gibidir (Şekil 17).

Şekil 17: PMVEMA-BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında partikül boyutu değişimi

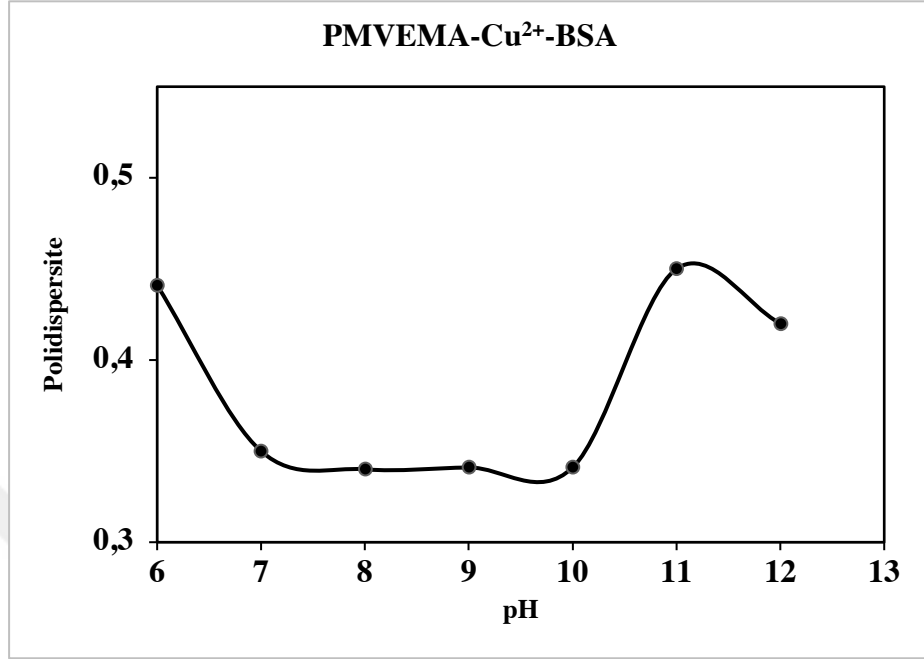


Artan tuz konsantrasyonlarında PMVEMA-BSA'nın partikül boyutunda önemli bir değişim gözlenmemiştir. Konjugatın, sulu çözeltide çökelme yapmayıp homojen dağıldığı görülmüştür.

4.2.3 PMVEMA-Cu²⁺-BSA Çözeltilerinin Polidispersite ve Partikül Boyutu Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi

PMVEMA-Cu²⁺-BSA sulu çözeltisine ait farklı pH'larda polidispersite değişimi Şekil 18'de verildi.

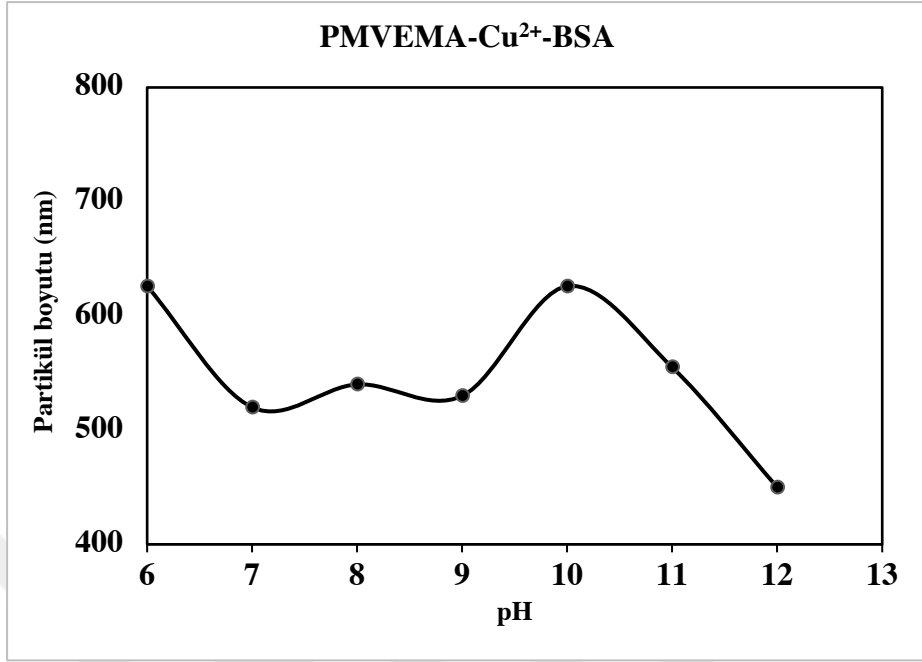
Şekil 18: PMVEMA-Cu²⁺-BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde polidispersitesindeki değişim



Üçlü kompleksin farklı pH ortamlarında polidispersitesi ortalama 0.4 civarındadır. Polidispersitesi başlangıçta pH artışıyla bir miktar düşmüş, pH=11 de maksimum seviyeye ulaşmış, ardından önemli bir değişim olmamıştır. Aynı zamanda pH değeri yaklaşık 10 iken komplekste ani renk değişimi meydana gelmiştir. PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksi farklı pH'larda çökelme yapmamış, çözelti ortamında monodispers dağılım göstermiştir.

PMVEMA-Cu²⁺-BSA'nın sulu çözeltisine ait farklı pH'larda partikül boyutu değişimi Şekil 19'daki gibidir.

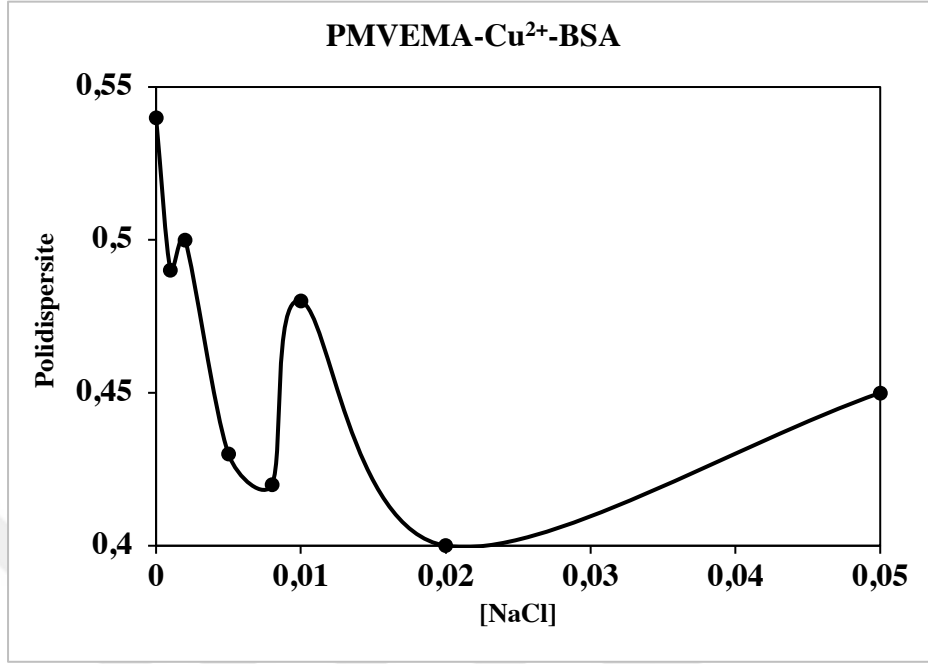
Şekil 19: PMVEMA-Cu²⁺-BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde partikül boyutu değişimi



Farklı pH ortamlarında PMVEMA-Cu²⁺-BSA partikül boyutu yaklaşık 450 ila 620 nm aralığında seyretmektedir. Ortamın pH değeri arttıkça partikül boyutunda önemli bir değişim olmamakla beraber pH=10 itibariyle bir miktar azalma eğilimine geçmiştir. Kompleksin herhangi bir çökelme yapmadığı görülmüştür.

PMVEMA-Cu²⁺-BSA sulu çözeltisinin değişen NaCl konsantrasyonlarında polidispersite değişimi Şekil 20'deki gibidir.

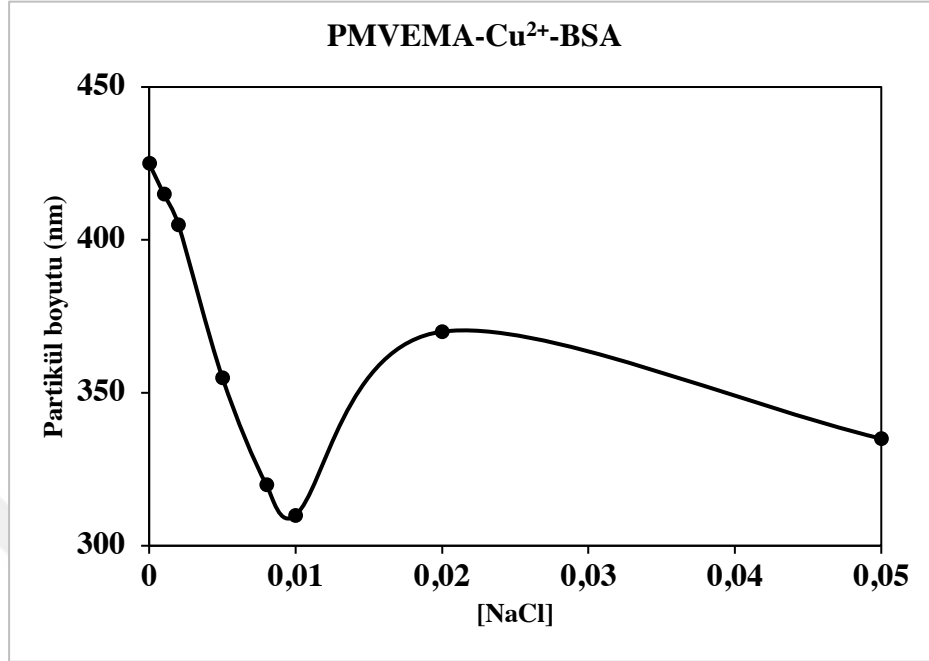
Şekil 20: PMVEMA-Cu²⁺-BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarındaki polidispersite değişimi



PMVEMA-Cu²⁺-BSA'nın ortamdaki tuz konsantrasyonunun artmasıyla beraber polidispersitesi genellikle azalma eğilimindedir. Ortamdaki konsantrasyon 0.02 M civarındayken en düşük polidispersiteye sahip olduğu kaydedilmiştir.

Artan tuz konsantrasyonlarında PMVEMA-Cu²⁺-BSA sulu çözeltisinin partikül boyutundaki değişim Şekil 21'deki gibidir.

Şekil 21: PMVEMA-Cu²⁺-BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında partikül boyutu değişimi



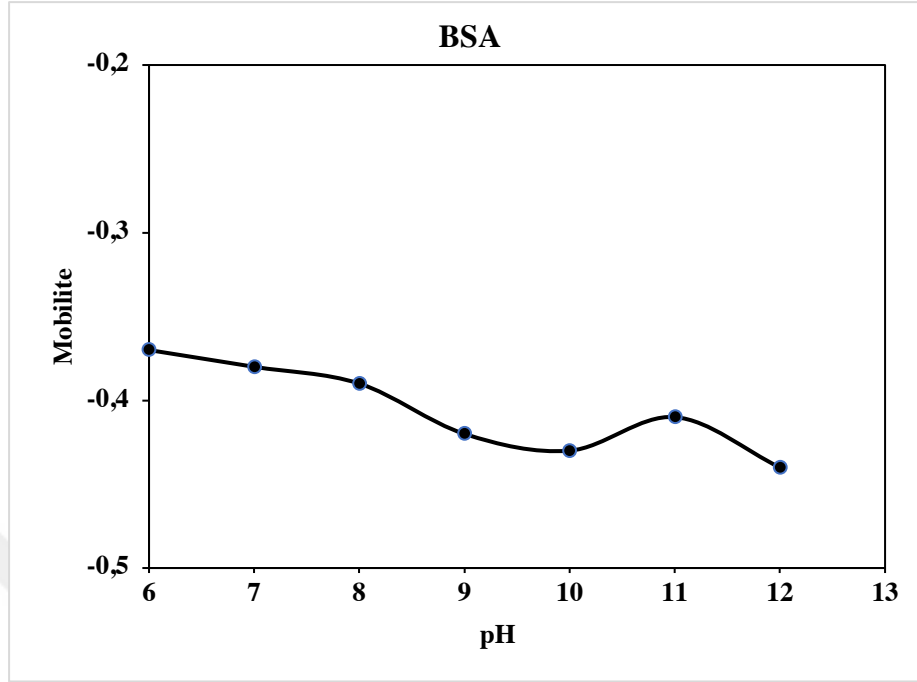
PMVEMA-Cu²⁺-BSA'nın artan tuz konsantrasyonunda partikül boyutunun 310 ila 425 nm aralığında değiştiği kaydedilmiştir. Ortamdaki yaklaşık 0.01 M tuz konsantrasyonunun etkisiyle kompleksin partikül boyutu minimum seviyeye inmiştir.

4.2 BSA, PMVEMA-BSA ve PMVEMA-Cu²⁺-BSA Sulu Çözeltilerinin Mobilite ve Zeta Potansiyeli Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisinin İncelenmesi

4.2.1 BSA Çözeltisinin Mobilite ve Zeta Potansiyeli üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi

BSA sulu çözeltisine ait farklı pH'larda mobilite değişimi Şekil 22'de verildi.

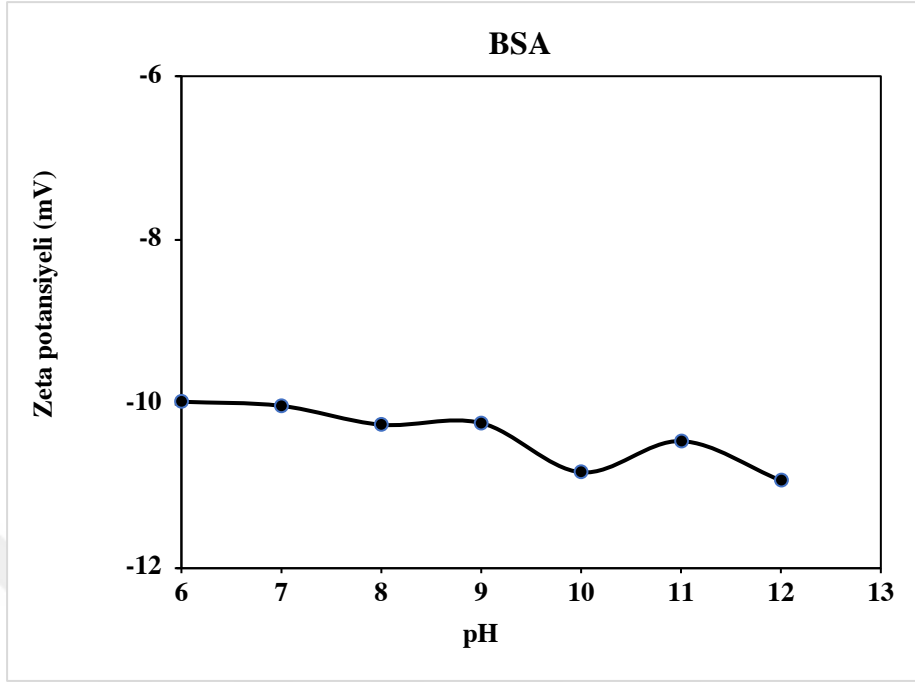
Şekil 22: BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde mobilitesindeki değişim



Şekil 22'ye göre, BSA çözeltisi izoelektrik noktasının ($\text{pH} = 4.9$) (Kim ve ark., 2005) üzerindeki farklı pH'larda mobilité değerleri -0.5 ile -0.3 civarında değişmekte olup çalışılan pH aralığında BSA negatif yüklenmiştir.

BSA sulu çözeltisine ait farklı pH'larda zeta potansiyel değişimi Şekil 23'te verildi.

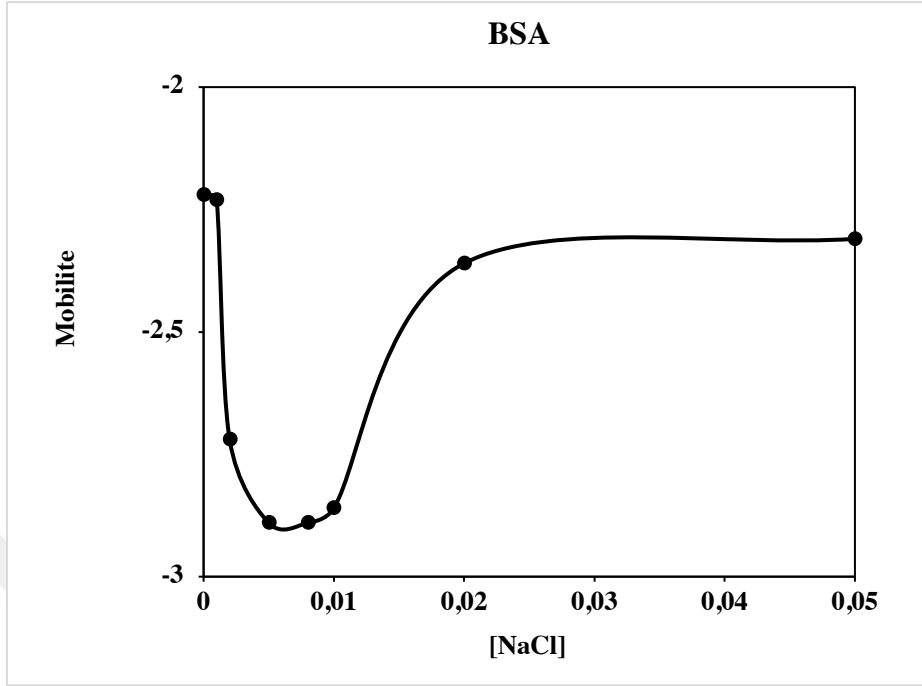
Şekil 23: BSA sulu çözeltisinin farklı pH değerlerinde zeta potansiyelindeki değişim



Şekil 23'e göre, BSA çözeltisi izoelektrik noktasının (pH= 4.9) (Kim ve ark., 2005) üzerindeki farklı pH'larda zeta potansiyeli değerleri negatiftir. çözeltide artan pH'larda herhangi bir toplanma veya çökme gözlemlenmemiş, BSA kararlılığını korumuştur.

BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında mobilite değişimi Şekil 24'te verildi.

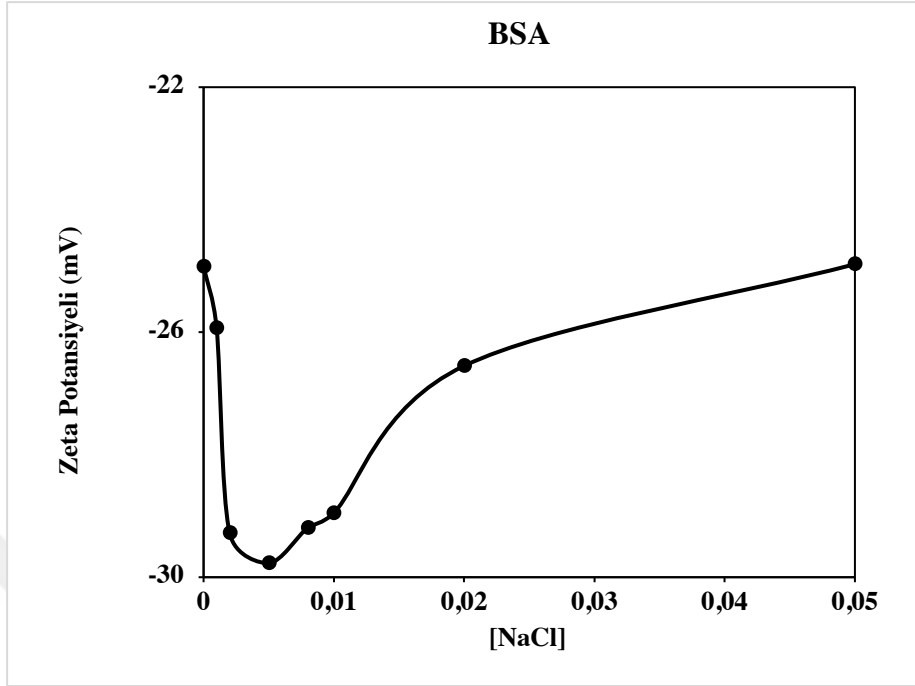
Şekil 24: BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında mobilité değışimi



Şekil 24'e göre BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında mobilitesi -2 ile -3 arasında değışmektedir. BSA çözeltisi, çalışılan farklı NaCl konsantrasyonlarında negatif yüklenmiştir.

BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında zeta potansiyel değışimi Şekil 25'te verildi.

Şekil 25: BSA sulu çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında zeta potansiyel değişimi

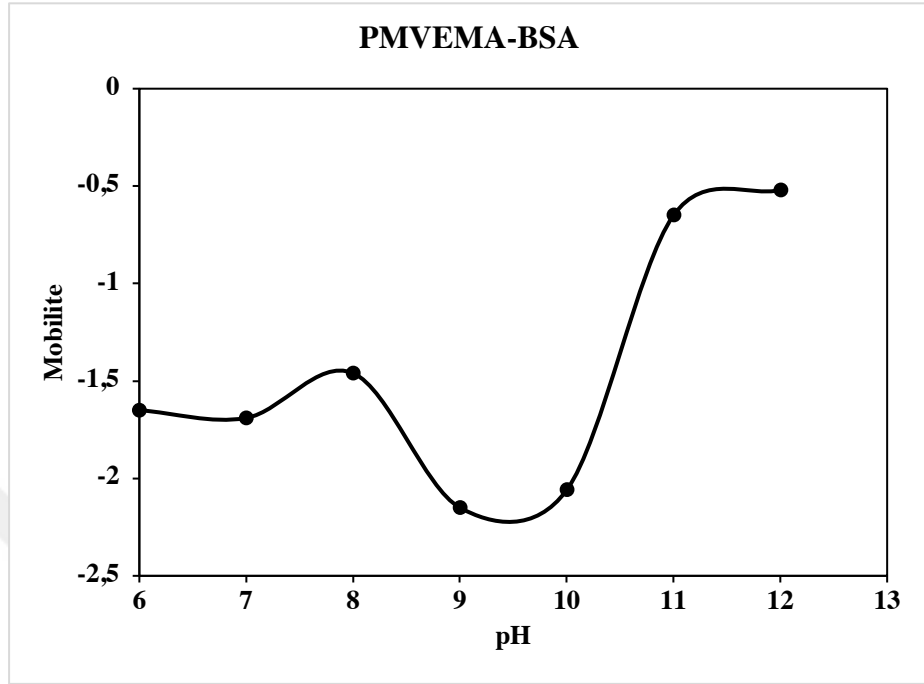


BSA çözeltisinin zeta potansiyel değerleri negatiftir. Herhangi bir çökeltme gözlenmeyen BSA, çalışılan NaCl konsantrasyonları ile kararlılığını korumuştur.

4.2.2 PMVEMA-BSA Konjugatının Mobilite ve Zeta Potansiyeli üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi

PMVEMA-BSA konjugatının artan pH'larda mobilite değerleri Şekil 26'daki gibidir.

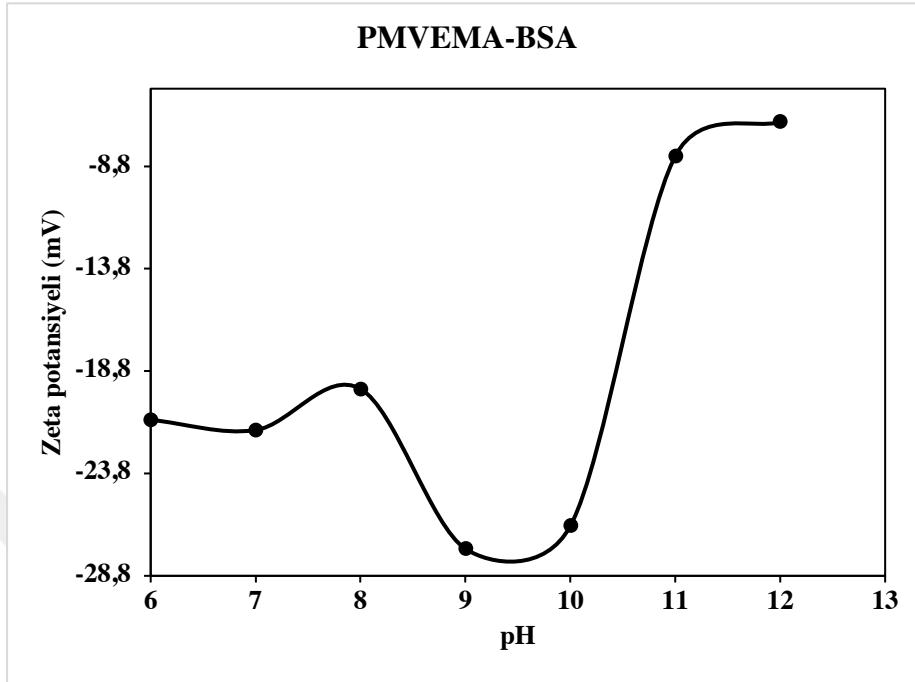
Şekil 26: PMVEMA-BSA konjugatının sulu çözeltisine ait farklı pH konsantrasyonlarında mobilite değişim grafiği



pH=6 olan stok konjugat çözeltisi -0.5 ila -2.5 aralığında mobilite değerlerine sahip olduğu kaydedilmiştir. Buna göre, konjugat artan pH değerlerinde negatif yükünü korumuştur.

PMVEMA-BSA biyokonjugatının değişen pH değerlerine karşılık zeta potansiyeli grafiği aşağıdaki gibidir (Şekil 27).

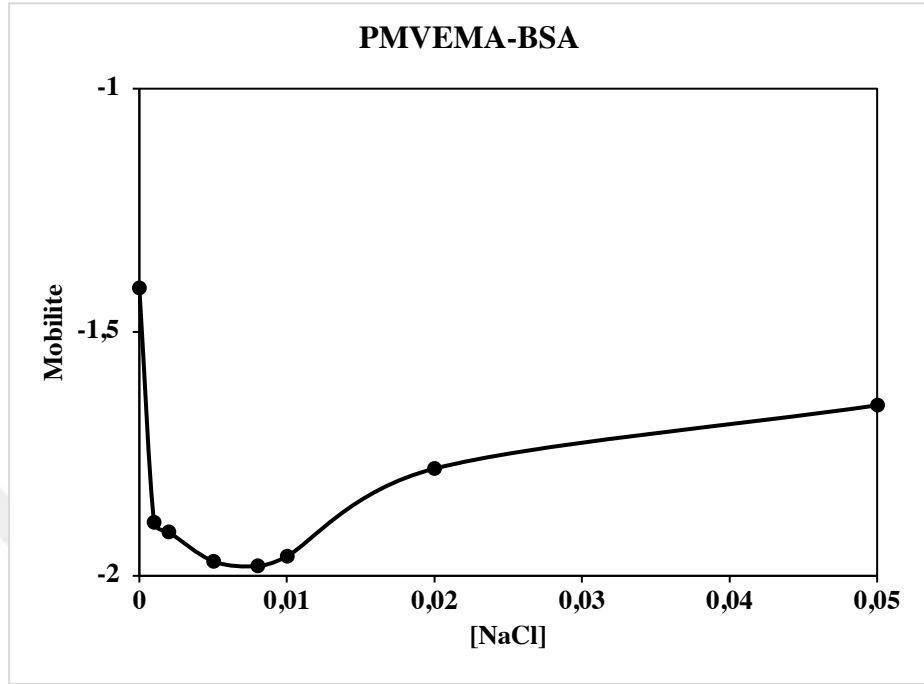
Şekil 27: PMVEMA-BSA biyokonjugatının farklı pH konsantrasyonlarındaki zeta potansiyeli değişim grafiği



Elde edilen verilere göre, biyokonjugatın zeta potansiyeli negatif değerlerdedir. Stok biyokonjugat sulu çözeltisinin (pH=6) yaklaşık -20 mV zeta değerine sahip olduğu, pH değerinin 6 ila 8 aralığında pek fazla değişmediği, pH=9 civarında ise kararlı yapıya yaklaşılarak -27 mV civarında zeta potansiyeli değerlerine ulaştığı, ardından pH artışı etkisiyle -6 mV seviyesine geldiği gözlemlendi.

Ortama eklenen 0.2'şer ml 0.001 M, 0.002 M, 0.005 M, 0.008 M, 0.01 M, 0.02 M ve 0.05 M NaCl çözeltilerinin etkisiyle PMVEMA-BSA konjugatının mobilite değerlerindeki değişime ait grafik aşağıda gösterilmiştir (Şekil 28).

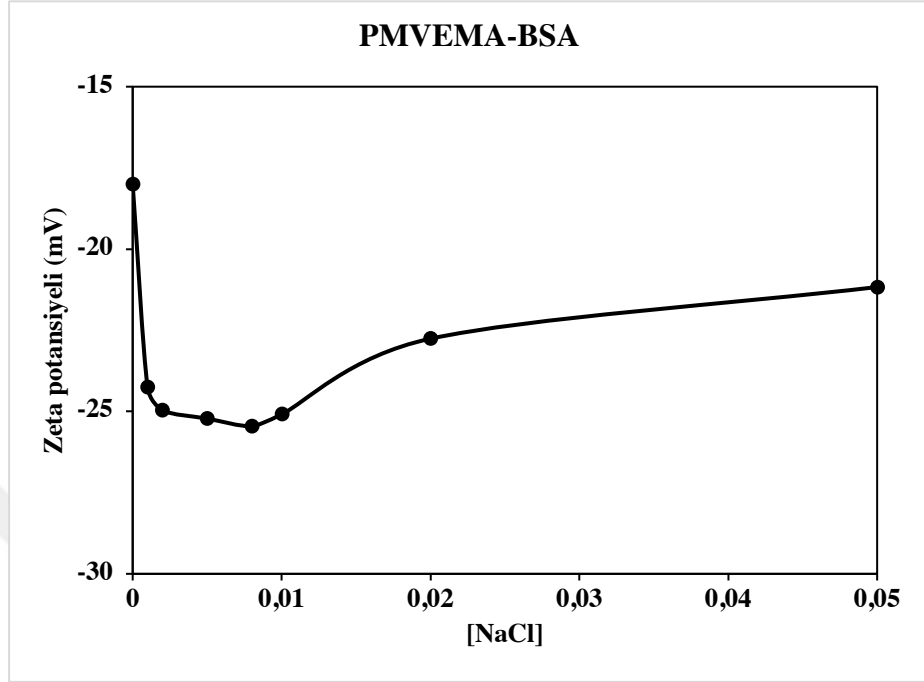
Şekil 28: PMVEMA-BSA sulu çözeltisinin farklı tuz konsantrasyonları altındaki mobilité değişim grafiğı



Grafiğı göre, negatif yüklü konjugatın farklı tuz konsantrasyonlarında da düşük negatif değérlerde olduğı görölmektedir. Ayrıca farklı tuz konsantrasyonlarında mobilitéde önemli bir değışim gözlenmemiştir.

PMVEMA-BSA biyokonjugatına artan oranlarda sırasıyla 0.2'şer ml 0.001 M, 0.002 M, 0.005 M, 0.008 M, 0.01 M, 0.02 M ve 0.05 M NaCl çözeltileri eklendi. Elde edilen zeta potansiyeli değışimi Şekil 29'daki gibidir.

Şekil 29: PMVEMA-BSA biyokonjugatının farklı tuz konsantrasyonlarına ait zeta potansiyeli grafiği

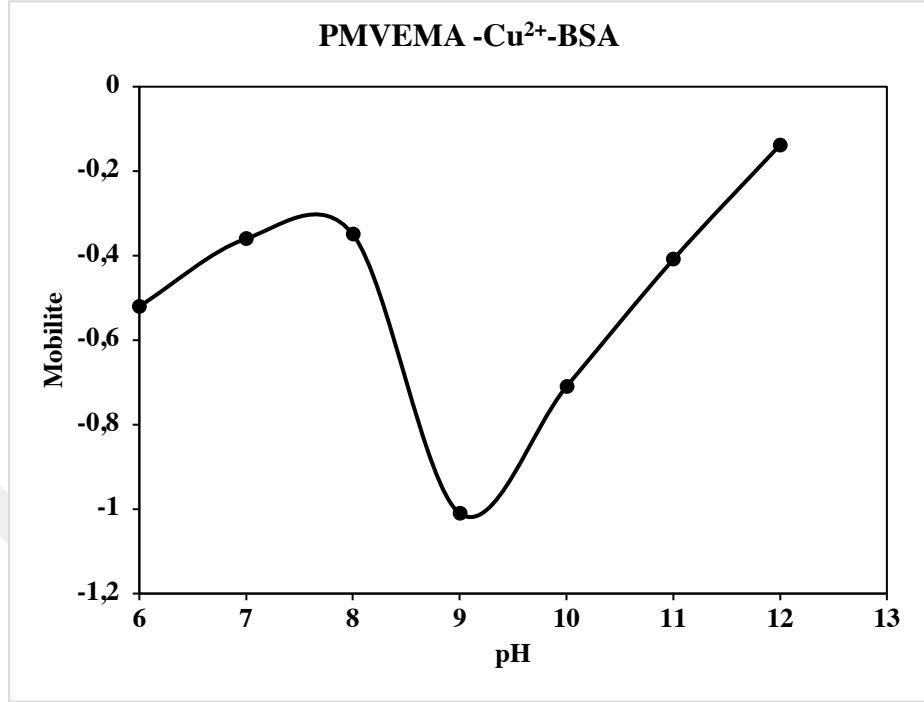


Grafiğe göre, biyokonjugatın zeta potansiyeli değeri -18 mV seviyesinden artan tuz konsantrasyonları etkisiyle daha kararlı olan -25 mV seviyelerine geldiği ve ortamdaki tuz konsantrasyonu arttıkça bu değer çok fazla değişmediği görülmüştür. Bu veriler, PMVEMA-BSA biyokonjugatının farklı tuz konsantrasyonlarında stabilitesini koruduğu ve kararlı yapıya yakın değerlerde zeta potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

4.2.3 PMVEMA-Cu²⁺-BSA Çözeltisinin Mobilite ve Zeta Potansiyeli üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi

PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksine ait değişen pH konsantrasyonlarında mobilite değerleriyle oluşturulan grafik Şekil 30'daki gibidir.

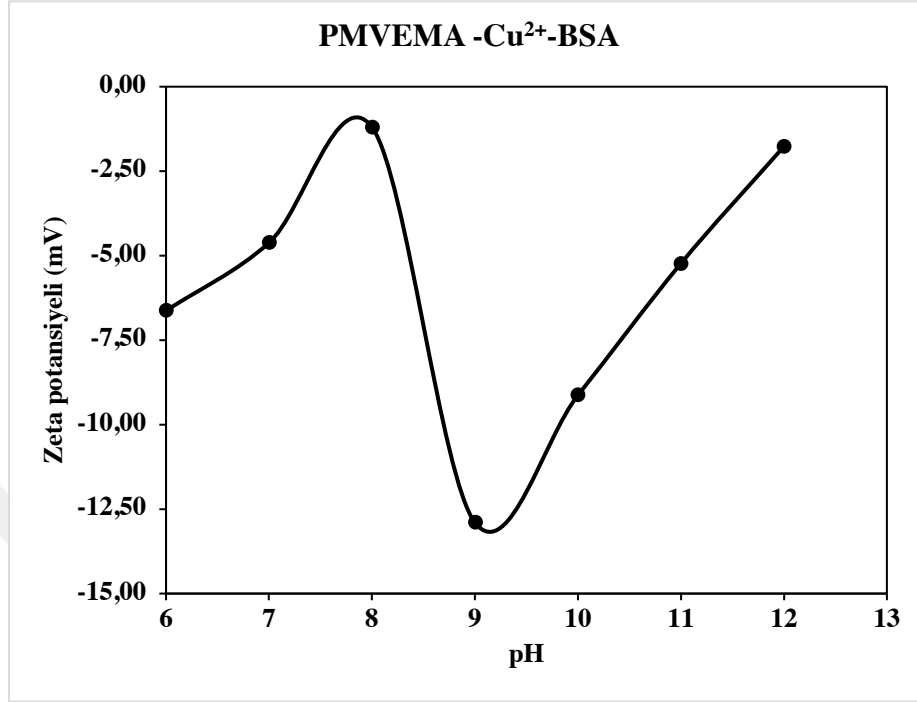
Şekil 30: PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksinin farklı pH konsantrasyonlarında mobilitte değişim grafiği



pH=6 olan stok çözeltinin artan pH'larda mobilitesi -1 ila -0.1 civarında değişmektedir. Üçlü kompleksin pH=9'da negatif maksimum değere ulaştığı çalışılan son pH değerinde ise minimum negatif değer aldığı görüldü.

Farklı pH konsantrasyonlarında, PMVEMA-Cu²⁺-BSA biyokompleksinin sulu çözeltisinin zeta potansiyel değerlerine ait grafik aşağıdaki gibidir (Şekil 31).

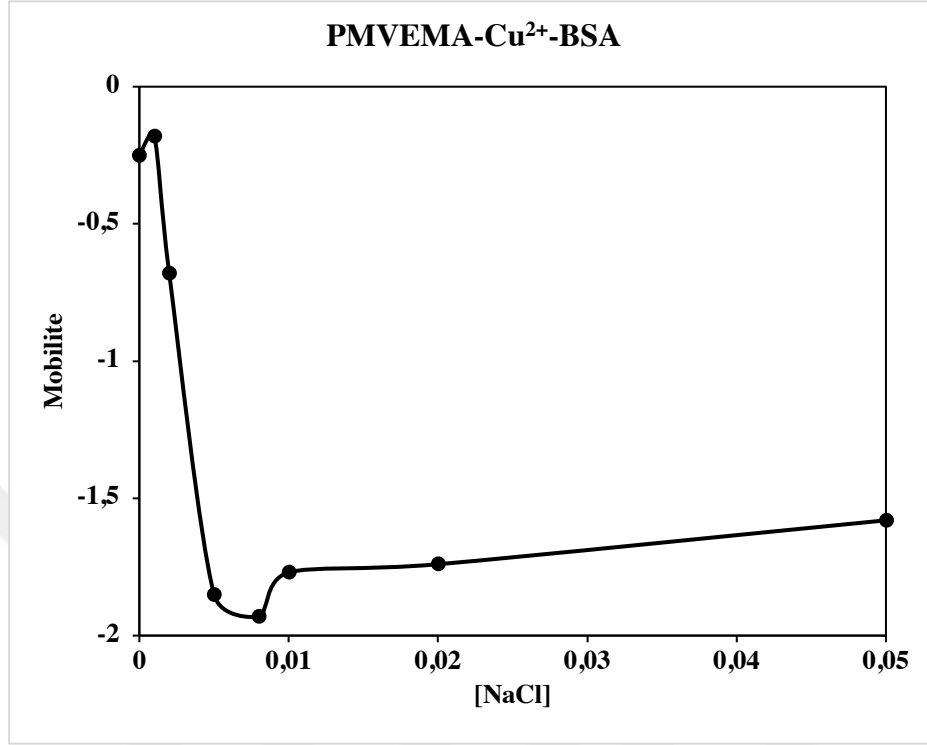
Şekil 31: Farklı pH koşullarında PMVEMA-Cu²⁺-BSA biyokompleksinin sulu çözeltisinin zeta potansiyeli değerleri grafiği



Grafiğe göre, biyokompleksin zeta potansiyeli değerleri -1 ila -13 mV aralığında değişmektedir. Yaklaşık olarak pH=9 iken biyokompleksin zeta potansiyeli maksimum negatif değere (-12.9 mV) ulaşmıştır. Elde edilen bu veriler, PMVEMA-Cu²⁺-BSA biyokompleksinin değişen pH koşulları altında düşük negatif zeta potansiyeline sahip olduğunu, sedimentasyon ve agradesyona yatkın olduğunu göstermektedir.

PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksinin artan tuz konsantrasyonlarındaki mobilité değerlerine ait çizilen grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 32).

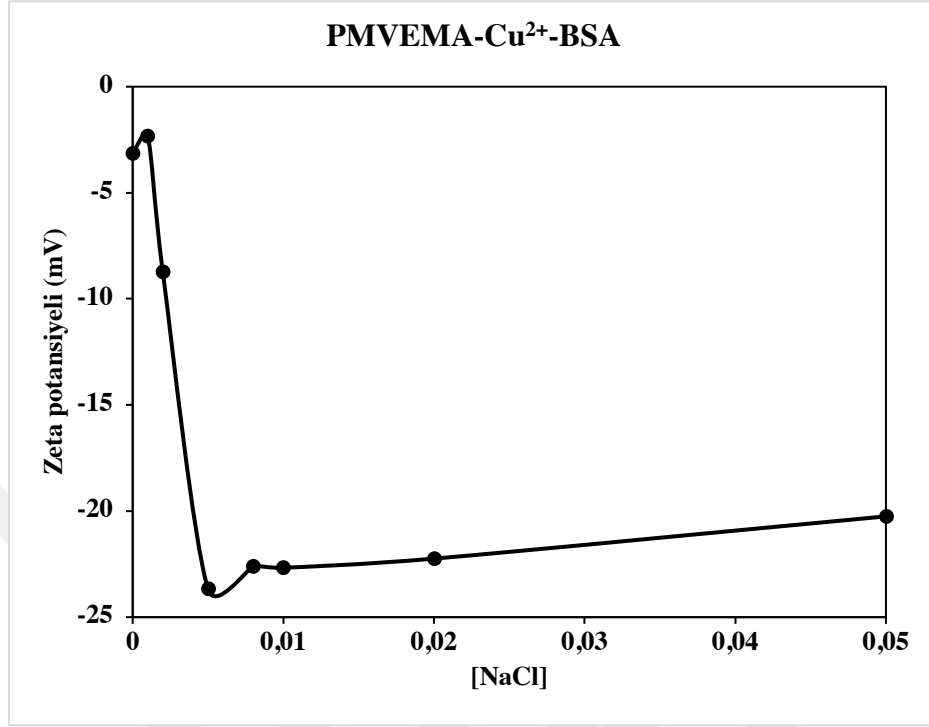
Şekil 32: PMVEMA-Cu²⁺-BSA kompleksinin farklı NaCl konsantrasyonları altındaki mobilitte değişim grafiği



Grafiğe göre, mobilitte değerlerinin artan tuz konsantrasyonuyla 0 ile -2 değerlerinde seyrettiği gözlemlendi. Özellikle de 0.01 M ve sonrasındaki konsantrasyon artışı mobilitte değişikliğe sebep olmamıştır.

Zeta potansiyel cihazında yapılan ölçümlerde PMVEMA-Cu²⁺-BSA biyokompleksine artan oranlarda eklenen tuz çözeltilerinin zeta potansiyeline etkisi Şekil 33'te gösterilmiştir.

Şekil 33: PMVEMA-Cu²⁺-BSA biyokompleksinin farklı NaCl konsantrasyonlarına ait zeta potansiyeli değişim grafiği



Biyokompleksin zeta değerleri -3 ile -24 mV aralığında değişmektedir. Asidik ortamda (pH=6) NaCl konsantrasyonunun artışıyla potansiyelde negatif yükselme meydana gelmiştir. Yaklaşık 0.005 M itibariyle artan NaCl konsantrasyonlarının etkisiyle zeta potansiyelinde önemli bir değişim olmadığı görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Tez çalışmamızda BSA, PMVEMA-BSA, PMVEMA-Cu²⁺-BSA sulu çözeltilerinin partikül boyutu, polidispersite, mobilite ve zeta potansiyeli üzerine farklı pH ve tuz konsantrasyonlarının etkisi incelenmiş, elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla irdelenmiştir.

5.1. BSA Çözeltisinin Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi

Değişen pH ve NaCl konsantrasyonları koşullarında BSA herhangi bir agregat oluşturmamış, elde edilen verilerimize göre polidispersitesini ifade eden pik dar aralık göstermiştir (Şekil 10 ve Şekil 12). Bu durum BSA sulu çözeltisinin çökelme yapmadığını, monodispers dağılım gösterdiğini ifade etmektedir.

BSA nanopartikülünün tek başına partikül boyutu daha önce bildirilen çalışmalara göre 120-550 nm ve 101-503 nm aralığında değişmektedir (Jun ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda ise BSA'nın sulu çözeltisi incelenmiş ve artan NaCl konsantrasyonlarının etkisine bakıldığında partikül boyutunun 360 ile 425 nm civarında değerler aldığı görülmüştür (Şekil 13). Ayrıca bildirilen bir çalışmada artan pH oranlarında BSA'nın partikül boyutunda azalma olmuş, buna BSA'nın iyonizasyonu ile ortaya çıkan partikül agregasyonuna karşı itme kuvvetini oluşturan anyonik yükün sebep olabileceği belirtilmiştir (Wang ve ark., 2008). Bizim verilerimizde çalışılan pH değerlerinde BSA'nın partikül boyutu 645-770 nm civarında olduğu kaydedilmiştir.

BSA çözeltisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında ve izoelektrik noktadan daha yüksek pH'larda (>pH=4.9) mobilitesinin negatif değerlerde olduğu bildirilmiştir (Galisteo-González ve Molina-Bolívar, 2014). Bizim mobilite sonuçlarımız da bu durumu desteklemektedir (Şekil 24).

Ortamdaki tuz ve pH konsantrasyonlarının değişimi zeta potansiyelini etkilemektedir. Özellikle de sulu çözelti ortamındaki H^+ ve OH^- iyonlarının varlığı nedeniyle pH, zeta potansiyelini etkileyen en önemli değişkendir (Bukackova ve ark., 2018). Çünkü H^+ iyonları asidik ortamda elektriksel çift katmana bağlanır ve zeta potansiyeli pozitif olurken bazik ortamda ise OH^- iyonları çift katmana bağlanır ve ortaya çıkan zeta potansiyeli negatif olur. İzoelektrik noktası $pH=4.9$ olarak bildirilen (Kim ve ark., 2005) BSA'nın tez çalışmamızda izoelektrik noktası üzerindeki değerlerde negatif zeta potansiyeli ölçüldü (Şekil 23). Bu durum literatürdeki verileri desteklemektedir (Bukackova ve ark., 2018; Jun ve ark., 2011; Salgin ve ark., 2012).

Farklı tuz konsantrasyonlarında BSA çözeltisi izoelektrik noktanın üzerindeki pH değerinde ($pH=6$) incelendiğinden zeta potansiyeli negatif değerler vermiştir (Şekil 25). Tuz konsantrasyonunun artışı BSA'nın kararlılığını arttırmış, zeta potansiyeli için ideal olarak belirtilen -30 mV seviyelerine yaklaşmıştır. BSA üzerine yapılmış olan çalışma sonuçları ile örtüşmektedir (Salgin ve ark., 2012; Şakar Daşdan ve ark., 2019).

5.2. PMVEMA-BSA Konjugatının Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi

PMVEMA polimeriyle ilgili olarak daha önce makrofajlarla etkileşimi, sitotoksitesi gibi özellikleri (Gamazo ve ark., 2015), PMVEMA-BSA ve PMVEMA-aglütinin şeklinde oluşturulan ligandların in-vitro aktivitesinin araştırılması (Arbós ve ark., 2002), polimer-BSA suda çözünür kovalent konjugatı ve toksisitesi (Dilgimen ve ark., 2001) gibi çalışmalar yapılmıştır. Iglesias ve ark. (2017) poli anhidrit nanopartiküllerinin biyolojik olarak parçalanabilir ve uyumlu olduğu, ilaç taşıma veya biyoadeziv sistemlerde kullanılabilirliği, yüzeyleri farklı ligandlarla modifiye edilerek fiziko-kimyasal özellikleri istenen ölçütte değiştirilebileceği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada poli anhidrit gurubunun en iyi örneği olarak da poli (metil vinil eter-ko-maleik anhidrit) bildirilmiştir. Ayrıca PMVEMA-BSA konjugatının mikrodalga destekli yöntemle eldesi hakkında çalışma yapılmıştır (Karahana ve ark., 2011).

Polielektrolitlerin proteinlerle oluşturacağı konjugatların istenen elektrik yükü, moleküler ağırlık ya da konformasyonda elde edilebilir olmaları nedeniyle immüniteyi stimüle edici özelliğe sahip olduğu çalışmalarla ortaya konulmuştur (Güney ve ark., 1997; Mansuroğlu ve ark., 2011; Mustafaev ve ark., 1996a; Mustafaev ve Saraç, 1996). Tez çalışmasında bu doğrultuda PMVEMA-BSA ikili konjugatı sentezlenerek Zetasizer ölçümleri yapılmış elde edilen veriler kaydedilmiştir.

PMVEMA-BSA artan NaCl ve pH konsantrasyonlarındaki polidispersite değişim grafiği Şekil 18 ve Şekil 20'deki gibidir. Konjugat artan pH değerlerinde çökelme yapmamış, monodispers dağılım göstermiştir.

Konjugatın partikül boyutlarına ait veriler Tablo 3 ve Tablo 4'teki gibidir. Farklı pH ve NaCl konsantrasyonlarında konjugatın boyutu yaklaşık 400-450 nm civarındadır. Bu durum konjugatın sulu çözeltide çözünürlüğünün iyi olmasıyla açıklanabilir. Çünkü maleik anhidrit kopolimerleri, reaktif anhidrit halkası içermeleri nedeniyle nanopartiküller için çözündürücü ajan özelliğine sahiptir (Karakuş, 2015).

Farklı pH ve NaCl konsantrasyon koşullarındaki konjugatın mobilitesine ait grafikler Şekil 26 ve Şekil 28'de verilmiştir. Buna göre konjugat, değişen ortamlarda negatif mobilitelere sahiptir.

Arbós ve ark. (2002) çalışmasına göre, PMVEMA-BSA'nın boyutu ve zeta potansiyeli Zetamaster analiz sistemi kullanılarak belirlenmiş ve potansiyeli yaklaşık -25 mV olarak bildirilmiştir. Elde ettiğimiz veriler (Tablo 3 ve Tablo 4) bu sonuçla örtüşmektedir. Çalışmamızdaki pH derecesinin daha fazla artışı zeta potansiyelinin ani düşüşüne sebep olmuştur (Şekil 27). Bu durumun BSA ile peptid moleküllerinin konjugasyonu neticesinde negatif yüklerin kaybolarak konjugatın net negatif yükünde azalmaya ve buna bağlı olarak da zeta potansiyeli değerlerinin sıfıra yaklaşmasına sebep olabilir. Artan tuz konsantrasyonlarında ise konjugatın kararlılığını koruduğu görülmüştür (Şekil 29).

5.3. PMVEMA-Cu²⁺-BSA Biyokompleksinin Kararlılığı Üzerine Farklı pH ve Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi

Sentetik aşı sistemlerinde adjuvan maddelerin kullanımı uzun dönemde immün yanıt geliştirme ve önleyici bağışıklık sağlanma açısından oldukça önemli bir işleve sahiptir. Ancak uygun immün yanıt oluşturmada yetersiz kalmaları ve biyoyumluluklarının düşük olması gibi dezavantajlarından ötürü klasik adjuvanlar yerine elektrostatik, hidrofobik etkileşimleri açısından kararlı yapıda hazırlanacak polielektrolit-metal-protein kompleksleri bu dezavantajları ortadan kaldırmaktadır (Karahan ve ark., 2013). Sentetik polimerler kolay sentezlenebilmeleri, ucuz olup istenen formda elde edilebilmeleri, biyoyumluluklarının olması gibi avantajları nedeniyle polimerik aşı sistemlerindeki çalışmalarda önemli bir yer teşkil etmektedir (Bose ve ark., 2019; Sahdev ve ark., 2014). Sentezlenen konjugat ve üçlü kompleksin kararlılıklarının ölçüldüğü tez çalışmasının polimerik aşı sistemlerinde yapılacak olan çalışmalara da yol göstereceği düşünülmektedir.

Çalışma kapsamında PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü biyokompleksi sentezlenmiştir. Literatür taramasında elde edilen verilere göre daha önce poli akrilik asit (PAA), poli-N-vinilprolidon (VP), poli vinilpirilidon-poli akrilikasit (VP-AA) kopolimeri, poli-N-isopropilakrilamit (NIPAA), pikolilamin ile poli vinilpiridin-poli setilpiridin kopolimerlerinin incelendiği çeşitli çalışmalar bildirilmiştir (Dinçer ve ark., 1997; Filenko ve ark., 2001; Gürhan ve ark., 2002; Karahan ve ark., 2010; Shoukry ve ark., 2002; Şakar Daşdan ve ark., 2019). Sentezlenen polimer-metal-protein üçlü komplekslerinden PMVEMA-Cu²⁺-BSA için toksisite ile ilgili çalışma yapılmış ve toksisitenin karışımlardaki bileşenlerin doğası ve oranına bağlı olduğu tespit edilmiştir (Karahan ve ark., 2014). Ancak PMVEMA- Cu²⁺-BSA biyokompleksinin detaylı zetasizer ölçümleri tez çalışması kapsamında yapılmış ve verilerin öncelikle sentetik aşı sistemleri ile ilgili yapılacak çalışmalara ve sonuçların geliştirilmesine yardımcı olması beklenmektedir.

Farklı pH ve tuz konsantrasyonlarında üçlü kompleksin polidispersite değerleri yaklaşık 0.3 ve 0.5 civarında olup monodispers dağılım aralığına sahiptir (Şekil 18 ve Şekil 20). Polikompleks, değişen pH ve tuz konsantrasyonlarında çökelme yapmamıştır. Partikül boyutu tuz etkisiyle daha küçük boyutta iken (Şekil 21) artan pH'larda ortalama partikül boyutu 550 nm civarındadır (Tablo 5). Kararlı olmayan komplekslerde parçacıklar agregat

oluşturmakta dolayısıyla parçacık boyutunda artış meydana gelmektedir. Çünkü çözeltilerdeki taneciklerin yük değerleri sıfıra yaklaştığında kompleksler arasındaki elektrostatik itme neredeyse kaybolarak çekici potansiyel gücün varlığıyla parçacık birikimine (agregat oluşumuna) sebep olur. Ancak elde edilen verilerde çalışılan pH ve NaCl konsantrasyonlarında partikül boyutunda artış gözlenmemiştir.

Polikompleksin farklı pH ve tuz konsantrasyonlarında negatif yüklendiği görüldü. Üçlü kompleks partikülünün çözelti ortamından iyon adsorbe etmesi ya da partikülün yüzey yükü ile çözeltideki çözünmüş iyon etkileşimi gibi sebeplerle negatif yüklendiği düşünülmektedir. Aynı zamanda antijenik nanopartiküllerin hücre alımı da büyük ölçüde biyolojik moleküllerin net yüküne bağlıdır. Nötr yüzeylere sahip olan partiküllerin daha uzun yarı ömrü olduğu yapılan çalışmalarda yer almaktadır (Gref ve ark., 1995). Bu nedenle içerisinde pozitif ve negatif yük bulunduran moleküller olan polimerler hem suda çözünmeleri hem de biyolojik moleküllerle olan etkileşimleri açısından araştırmalarda önemli bir yer teşkil etmektedir.

Hazırlanan üçlü polikompleksin ölçümlerine göre (Tablo 6), zeta değerlerinin negatif yüksek değerler alması pozitif yüzey yükünü daha verimli korumasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda ortamdaki NaCl konsantrasyonu arttıkça zeta değerlerinin de arttığı gözlenmiştir. Zeta potansiyelindeki artış, konjugatın hücre alımını tetikleyebilir ve bu durum sentetik peptid aşı tasarımları için umut vadeden bir strateji olabilir (Derman ve Akdeste, 2015). Zeta potansiyeli artan pH koşullarında ise -1 ila -13 mV değerlerinde olup ortamda herhangi bir çökme görülmemiştir. Fakat düşük zeta potansiyel değerleri nedeniyle polikompleks partikülündeki çekici kuvvetler baskın hale gelerek zamanla agregat oluşumuna sebep olabilir.

Pek çok biyopartikül, karmaşık immünojenik mekanizmaya sahiptir (Bose ve ark., 2019). Polikomplekslerin yapılarının aydınlatılabilmesi için detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda sentezlenen PMVEMA-BSA ikili konjugatı ve PMVEMA-Cu²⁺-BSA üçlü kompleksine ait Zetasizer ölçüm sonuçlarının buna katkı sağlaması beklenmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasında polielektrolitler ve özellikleri ile sentetik polimerik aşı sistemlerinde polielektrolitlerin kullanımının immün sistemdeki önemi ve çalışma yapıları hakkında genel bilgiler verilmiştir. Fonksiyonel biyopolimer sistemlerde alternatif olarak suda çözünebilir polielektrolitler ile oluşturulan konjugat ve üçlü biyokompleks sentezlenmiştir. Maleik anhidritin sentetik yapılı kopolimeri olan poli (metil vinil eter-ko-maleik anhidrit) (PMVEMA) ile sığır serum albumin (BSA) biyokonjugatı (PMVEMA-BSA), geçiş metali kullanılarak hazırlanan polielektrolit-metal-protein (PMVEMA-Cu⁺²-BSA) üçlü biyokompleksi ve stok BSA sulu çözeltilerinin değişen pH ve tuz konsantrasyonlarında kararlılıklarına ilişkin polidispersite, partikül boyutu, mobilite ve zeta potansiyeli değerleri Brookhaven 90 Zeta PALS Zetasizer cihazı ile ölçülmüş ve ilgili özelliklere dair grafikler eklenerek sonuçlar yorumlanmıştır.

Zetasizer ölçümleri, partiküllerin boyutu ve mobilite değerleri gibi sıvı ortamdaki moleküllerin veya partiküllerin özelliklerinin açıklanmasını sağlamaktadır. Moleküllere ait bu özellikler, moleküllerin biyoyararlanımını, iyonların kandaki pıhtılaşma üzerindeki etkisini, çözünmesini veya immünotoksitesini doğrudan etkilemektedir (Mattison, K. W., & Kaszuba, M., 2004). Bu amaçla, çalışmamızda stok BSA çözeltisi ile PMVEMA-BSA konjugatı ve PMVEMA-Cu⁺²-BSA biyokompleksinin farklı pH ve tuz konsantrasyonlarındaki etkileşimleri Zetasizer analiziyle araştırılmıştır. Zetasizer ölçümleri biyokompleksin kararlılığına ait bilgi vermekte ve immünojenliği açısından önemli bir gösterge olmaktadır. Değişen pH ve tuz koşullarındaki yapısının ve kararlılığının ortaya konması, elde edilen verilerin sentetik polimerik aşı sistemleri başta olmak üzere biyokompleks ile ilgili yapılacak çalışmalara katkı sağlaması, daha etkin ve daha kararlı biyokomplekslerin geliştirilmesine yardımcı olması beklenmektedir.

Polikomplekslerin organizma şartlarında kararlı olması, immün sistemdeki aktivitelerinin ortaya çıkması veya var olan özelliklerin aktifleştirilmesi açısından oldukça önemli bir şarttır. Son yıllarda gelişen polimerizasyon teknikleri, istenen durumda polimerlerin sentezlenebilmesine imkan sağlamaktadır. Kontrollü sentezlenebilen polimerler sayesinde polimerik aşı ya da polimer-ilâç vb. sistemlerde avantaj sağlamakta, en önemlisi

de klasik yöntemlerle sentezlenen polimerlerin toksisite gibi pek çok dezavantajını ortadan kaldırmaktadır.

Tez çalışması sonucunda farklı pH ve tuz konsantrasyonlarının sentezlenen konjugat ve biyokomplekslerin kararlılığını etkilediği gözlemlendi. Uygun ve kararlı yapı sergilediği ortaya konan sonuçlarımızın ışığında oluşturulacak olan konjugat ya da üçlü kompleksler halihazırda devam etmekte olan sentetik polimerik aşı sistemi çalışmalarına katkı sağlaması beklenmektedir. Aynı zamanda çalışma sonuçlarının enzim immobilizasyonu, ilaç taşıma sistemleri, biyomedikal uygulamalar, kanser tedavisi gibi diğer alanlarda yapılacak olan çalışmalara da yol gösterebileceği düşünülmektedir.



7. KAYNAKLAR

- Akkılıç, N., Mustafaeva, Z., & Mustafaev, M., (2007). High Performance Liquid Chromatography Study of Water-Soluble Complexes and Covalent Conjugates of Polyacrylic Acid With Bovine Serum Albumin. *Journal of Applied Polymer Science*, 105(5), 3108-3120.
- Albright, L. F., (2009). Albright's Chemical Engineering Handbook, *Crc Press*, P.1605.
- Allison, A. C., & Byars, N. E., (1986). An Adjuvant Formulation That Selectively Elicits The Formation of Antibodies of Protective İsoypes and of Cell-Mediated İmmunity. *Journal of İmmunological Methods*, 95 (2), 157-168.
- Alsehli, M., (2020). Polymeric Nanocarriers As Stimuli-Responsive Systems For Targeted Tumor (Cancer) Therapy: Recent Advances İn Drug Delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(3), 255-265.
- ando, S., Kon, K., Tanaka, Y., Nagase, S., & Nagai, Y., (1980). Characterization of Hyperlipidemia İn Nagase Analbuminemia Rat (Nar). *The Journal of Biochemistry*, 87 (6), 1859-1862.
- andré, C., & Guillaume, Y. C., (2004). Zinc–Human Serum Albumin Association: Testimony of Two Binding Sites. *Talanta*, 63 (2), 503-508.
- Arbós, P., Wirth, M., Arangoa, M. A., Gabor, F., & Irache, J. M., (2002). Gantrez® An As A New Polymer For The Preparation of Ligand–Nanoparticle Conjugates. *Journal of Controlled Release*, 83 (3), 321-330.
- Aryee, A. N. A., Agyei, D., & Udenigwe, C. C., (2018). Impact of Processing On The Chemistry and Functionality of Food Proteins. *Proteins İn Food Processing*, Woodhead Publishing, 27-45.
- Bal, W., Christodoulou, J., Sadler, P. J., & Tucker, A., (1998). Multi-Metal Binding Site of Serum Albumin. *Journal of İnorganic Biochemistry*, 70 (1), 33-39.
- Başalp, A., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M., & Bermek, E., (2000). Immune Response To 17 β -Estradiol İnvolved İn Polymer Gels: Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones. *Hybridoma*, 19(6), 495-499.
- Baysal, B., (1981). *Polimer Kimyası*. Çağlayan Basımevi, Ankara.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., & Gurny, R., (2004). Structure and İnteractions İn Chitosan Hydrogels Formed By Complexation Or Aggregation For Biomedical Applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 35-52.
- Beşergil, B. (2008). *Polimer Kimyası*. Gazi Kitabevi.
- Bhattarai, N., Gunn, J., & Zhang, M., (2010). Chitosan-Based Hydrogels For Controlled, Localized Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 83-99.
- Billmeyer, F. W., & Billmeyer, F. W., (1984). *Textbook of Polymer Science* (Vol. 19842, Pp. 361-484). New York: Wiley.
- Braia, M., Porfiri, M. C., Farruggia, B., Picó, G., & Romanini, D., (2008). Complex Formation Between Protein and Poly Vinyl Sulfonate As A Strategy of Proteins İsolation. *Journal of Chromatography B*, 873(2), 139-143.
- Bose, R. J., Kim, M., Chang, J. H., Paulmurugan, R., Moon, J. J., Koh, W. G., Lee, S. H. & Park, H., (2019). Biodegradable Polymers For Modern Vaccine Development. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 77, 12-24.
- Bukackova, M., Rusnok, P., & Marsalek, R. (2018). Mathematical Methods in the Calculation of the Zeta Potential of BSA. *Journal of Solution Chemistry*, 47(12), 1942-1952.

- Carlsson, F., Linse, P., & Malmsten, M., (2001). Monte Carlo Simulations of Polyelectrolyte-Protein Complexation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(38), 9040-9049.
- Carter, D. C., & Ho, J. X., (1994). Structure of Serum Albumin. In *Advances In Protein Chemistry* (Vol. 45, Pp. 153-203).
- Causin, V., (2015). *Polymers On The Crime Scene*. Springer, Cham., 105-166.
- Champe, P. C., Harvey, R. A., & Ferrier, D. R., (2005). *Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Chawla, A., Kaur, R., & Sharma, A. K., (2012). Ficus Carica Linn.: A Review On Its Pharmacognostic, Phytochemical and Pharmacological Aspects. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 1(4), 215-232.
- Chen, C., Ng, D. Y. W., & Weil, T., (2020). Polymer Bioconjugates: Modern Design Concepts Toward Precision Hybrid Materials. *Progress In Polymer Science*, 101241.
- Ćirić, A., Medarević, Đ., Čalić, B., Dobričić, V., Mitrić, M., & Djekić, L., (2020). Study of Chitosan/Xanthan Gum Polyelectrolyte Complexes Formation, Solid State and Influence On Ibuprofen Release Kinetics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 942-955.
- Clogston, J. D., & Patri, A. K., (2011). Characterization of Nanoparticles Intended For Drug Delivery. *Methods In Molecular Biology*. Springer Science Business Media, Llc., Vol. 697.
- Commandur, B., Arneodo, C., Benoit, J. P., & Thies, C., (1989). A Study of The Viscosity of Gelatin-Based Complex Coacervates. *Controlled Release of Bioactive Materials, Chicago, Abstract*, 132, 89.
- Cooper, C. L., Dubin, P. L., Kayitmazer, A. B., & Turksen, S., (2005). Polyelectrolyte-Protein Complexes. *Current Opinion In Colloid & Interface Science*, 10(1-2), 52-78.
- Cousin, F., Gummel, J., Clemens, D., Grillo, I., & Boué, F., (2010). Multiple Scale Reorganization of Electrostatic Complexes of Poly (Styrenesulfonate) and Lysozyme. *Langmuir*, 26 (10), 7078-7085.
- Cousin, F., Gummel, J., Combet, S., & Boué, F., (2011). The Model Lysozyme-Pssna System For Electrostatic Complexation: Similarities and Differences With Complex Coacervation. *Advances In Colloid and Interface Science*, 167(1-2), 71-84.
- Dakhara, S., & Anajwala, C., (2010). Polyelectrolyte Complex: A Pharmaceutical Review. *Systematic Reviews In Pharmacy*, 1 (2), 121.
- Dammacco, F., Miglietta, A., & Bonomo, L., (1979). Analbuminemia. *Ricerca In Clinica E In Laboratorio*, 9 (1), 5-12.
- Damodaran, S. (2008). Amino Acids, Peptides and Proteins. *Fennema's Food Chemistry*, 4, 425-439.
- Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötz, J., Philipp, B., Seidel, C., & Stscherbina, D., (1994). Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application. *Hanser Publishers*, Munich.
- De Robertis, S., Bonferoni, M. C., Elviri, L., Sandri, G., Caramella, C., & Bettini, R., (2015). Advances In Oral Controlled Drug Delivery: The Role of Drug-Polymer and Interpolymer Non-Covalent Interactions. *Expert Opinion On Drug Delivery*, 12 (3), 441-453.
- Deen, C., Claassen, E., Gerritse, K., Zegers, N. D., & Boersma, W. J., (1990). A Novel Carbodiimide Coupling Method For Synthetic Peptides: Enhanced Anti-Peptide Antibody Responses. *Journal of Immunological Methods*, 129(1), 119-125.
- Derman, S., & Akdeste, Z. M., (2015). Particle Size and Zeta Potential Investigation of Synthetic Peptide-Protein Conjugates/Sentetik Peptid-Protein Konjugatlarının Parçacık Boyutu Ve Zeta Potansiyel Analizi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 40(4), 282-289.

- Dilgimen, A. S., Mustafaeva, Z., Demchenko, M., Kaneko, T., Osada, Y., & Mustafaev, M., (2001). Water-Soluble Covalent Conjugates of Bovine Serum Albumin With Anionic Poly (N-İsopropyl-Acrylamide) and Their İmmunogenicity. *Biomaterials*, 22(17), 2383-2392.
- Dinçer, B., Mustafaev, M. I., & Bayülken, S., (1997). High-Performance Liquid Chromatography Study of Water-Soluble Ternary Polyacrylamide-Metal-Protein Complexes. *Journal of Applied Polymer Science*, 65(1), 37-40.
- Easmon, J., (2002). Copper and İron Complexes With Antitumour Activity. *Expert Opinion On Therapeutic Patents*, 12(6), 789-818.
- Etrych, T., Leclercq, L., Boustta, M., & Vert, M., (2005). Polyelectrolyte Complex Formation and Stability When Mixing Polyanions and Polycations İn Salted Media: A Model Study Related To The Case of Body Fluids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(2-3), 281-288.
- Everaerts, F., Torrianni, M., Hendriks, M., & Feijen, J., (2007). Quantification of Carboxyl Groups İn Carbodiimide Cross-Linked Collagen Sponges. *Journal of Biomedical Materials Research*, 83(4), 1176-1183.
- Falb, R. D., Grode, G. A., Takahashi, M. T., & Leininger, R. I., (1968). Characteristics of Heparinized Surfaces. *Advances İn Chemistry* 87, American Chemical Society, Washington.
- Fanali, G., Di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., & Ascenzi, P., (2012). Human Serum Albumin: From Bench To Bedside. *Molecular Aspects of Medicine*, 33 (3), 209-290.
- Farkaš, P., & Bystrický, S., (2010). Chemical Conjugation of Biomacromolecules: A Mini-Review. *Chemical Papers*, 64(6), 683-695.
- Fessenden, R. J., Fessenden, J. S., and Logue, M. W., (Çev. Uyar T.), 2001. *Serbest Radikal Tepkimeleri: Organik Kimya*, Güneş Kitabevi, Ankara, 241–274.
- Filenko, A., Demchenko, M., Mustafaeva, Z., Osada, Y., & Mustafaev, M., (2001). Fluorescence Study of Cu²⁺-İnduced İnteraction Between Albumin and Anionic Polyelectrolytes. *Biomacromolecules*, 2(1), 270-277.
- Foegeding, E. A., & Davis, J. P., (2011). Food Protein Functionality: A Comprehensive Approach. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1853-1864.
- Friedli, G. L., (1996). Interaction of Deamidated Soluble Wheat Protein (Swp) With Other Food Proteins and Metals. *Doctoral Dissertation, University of Surrey*.
- Galisteo-González, F., & Molina-Bolivar, J. A., (2014). Systematic Study On The Preparation of Bsa Nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 286-292.
- Gamazo, C., Bussmann, H., Giemsa, S., Camacho, A. I., Unsihuay, D., Martín-Arbella, N., & Irache, J. M. (2015). Interactions of poly (anhydride) nanoparticles with macrophages in light of their vaccine adjuvant properties. *International journal of pharmaceutics*, 496(2), 922-930.
- Giroux, E., & Schoun, J., (1981). Copper and Zinc İon Binding By Bovine, Dog, and Rat Serum Albumins. *Journal of İnorganic Biochemistry*, 14 (4), 359-362.
- Gözükara, E. M., (1997). *Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul.
- Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Muller, R. H., Verbavatz, J. M., & Langer, R., (1995). The Controlled İntravenous Delivery of Drugs Using Peg-Coated Sterically Stabilized Nanospheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16(2-3), 215.
- Gregory, A. E., Williamson, D., & Titball, R. (2013). Vaccine delivery using nanoparticles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 13.
- Gupta, R. K., Relyveld, E. H., Lindblad, E. B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S., & Gupta, C. K., (1993). Adjuvants-A Balance Between Toxicity and Adjuvanticity. *Vaccine*, 11 (3), 293-306.

Güney, O., Saraq, A. S., & Mustafaev, M. I., (1997). Fluorescence and Turbidimetry Study of Complexation of Human Serum Albumin With Polycations. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 12(3), 231-244.

Gürhan Deliloğlu, S. I., Akdeste, M. M., Akdeste, Z. M., Aynagöz, G., Ünver, G., Ünal, N., & Çelik, N., (2002). Preparation of Synthetic Peptide Fmdv Vaccine With Newly Developed Antigenpolymere Conjugates Be Used As İmmunogen and Vaccine In Veterinary Medicine. *Report of The Session of The Research Group of The Standing Technical Committee of The European Commission For The Control of Foot-and-Mouth Disease, Appendix41*, 349-357.

Hamman, J. H., (2010). Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes As Potential Carrier Materials İn Drug Delivery Systems. *Marine Drugs*, 8(4), 1305-1322.

Harding, S. E., & Jumel, K., (1998). Light Scattering. *Current Protocols İn Protein Science*, 11(1), 7-8.

Harford, C., & Sarkar, B., (1997). Amino Terminal Cu (II)-and Ni (II)-Binding (Atcun) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties. *Accounts of Chemical Research*, 30 (3), 123-130.

Hermanson, G. T., (2013). Bioconjugate Techniques. *Academic Press*, California.

Higgs, P. G., & Joanny, J. F., (1991). Theory of Polyampholyte Solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 94(2), 1543-1554.

Honary, S., & Zahir, F., (2013). Effect of Zeta Potential On The Properties of Nano-Drug Delivery Systems-A Review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 265-273.

Hubert, P., Mathis, R., & Dellacherie, E., (1991). Polymer Ligands For Mild Hydrophobic Interaction Chromatography—Principles, Achievements and Future Trends. *Journal of Chromatography A*, 539(2), 297-306.

Huttner, W. B., (1988). Tyrosine Sulfation and The Secretory Pathway. *Annual Review of Physiology*, 50(1), 363-376.

Iglesias, T., Dusinska, M., El Yamani, N., Irache, J. M., Azqueta, A., & de Cerain, A. L., (2017). In vitro evaluation of the genotoxicity of poly (anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 523(1), 418-426.

Il'ina, A. V., & Varlamov, V. P., (2005). Chitosan-Based Polyelectrolyte Complexes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(1), 5-11.

Irache, J. M., Huici, M., Konecny, M., Espuelas, S., Campanero, M. A., & Arbos, P., (2005). Bioadhesive Properties of Gantrez Nanoparticles. *Molecules*, 10(1), 126-145.

Iscani B., (2007). *The Synthesis of The Region of 95-109 Sequence of Hepatitis B Surface Antigen Peptide and Development of The Water Soluble Bioconjugates With Polielectrolytes*. M.Sc Thesis.

Jahanban-Esfahlan, A., & Panahi-Azar, V., (2016). Interaction of Glutathione With Bovine Serum Albumin: Spectroscopy and Molecular Docking. *Food Chemistry*, 202, 426-431.

Jahanban-Esfahlan, A., Panahi-Azar, V., & Sajedi, S., (2015). Spectroscopic and Molecular Docking Studies On The İnteraction Between N-Acetyl Cysteine and Bovine Serum Albumin. *Biopolymers*, 103(11), 638-645.

Jia, Z., Lin, P., Xiang, Y., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., & Zhang, Q., (2011). A Novel Nanomatrix System Consisted of Colloidal Silica and Ph-Sensitive Polymethylacrylate İmproves The Oral Bioavailability of Fenofibrate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79 (1), 126-134.

- Jun, J. Y., Nguyen, H. H., Chun, H. S., Kang, B. C., & Ko, S., (2011). Preparation of Size-Controlled Bovine Serum Albumin (Bsa) Nanoparticles By A Modified Desolvation Method. *Food Chemistry*, 127 (4), 1892-1898.
- Kabanov, V. A., & Zezin, A. B., (1984). Soluble Interpolymeric Complexes As A New Class of Synthetic Polyelectrolytes. *Pure and Applied Chemistry*, 56(3), 343-354.
- Kabanov, V. A., Evdakov, V. P., Mustafaev, M. I., & Antipina, A. D., (1977). Cooperative Interaction of Serum Albumin With Quaternized Poly-4-Vinyl Pyridine and Structure of The Complexes. *Molekuliarnaia Biologiya*, 11(3), 582-597.
- Kabanov, V. A., Mustafaev, M. I., & Belova, V. V., (1978). Negative Charge of The Dextran Chain Appears Likely To Be Vp. *Mol. Biol*, 12, 1264.
- Kabanov, V. A., Mustafaev, M. I., Goncharov, V. V., Petrov, R. V., & Khaitov, R. M., (1980). Correlation of The Immunostimulating Properties In A Series of Polymer-Analogs of Poly-4-Vinylpyridine and The Immunogenicity of Their Bovine Serum Albumin Mixtures With Complex-Formation In These Mixtures. *Doklady Akademii Nauk Sssr*, 250(6), 1504.
- Kabanov, V. A., Mustafaev, M. I., Nekrasov, A. V., Norimov, A., & Petrov, R. V., (1984). Critical Nature of The Effect of The Degree of Polyelectrolyte Polymerization On Immunostimulating Properties. *Doklady Akademii Nauk Sssr*, 274(4), 998.
- Kabanov, V. A., Mustafaev, M. I., Norimov, A. S., Petrov, R. V., & Khaitov, R. M., (1978). Immunogenicity of The Complex of Bovine Serum-Albumin With Polycation Loaded With Hydrophobic Lateral Groups. *Doklady Akademii Nauk Sssr*, 243(5), 1330-1333.
- Kabanov, V., Zezin, A., Mustafaev, M., & Kasaikin, U., (1980). Polym. Amines Amm. Salts., *Pergamon Press Ltd.*, Oxford, England.
- Kabanov, V.A., Petrov, R.V. and Khaitov, R.M., (1982). A New Principle For Preparation of Artificial Immunogens. *V.Kh.O. (Russ.)*. 27 (4), 57-68.
- Kallay, N., Preočanin, T., Kovačević, D., Lutzenkirchen, J., & Chibowski, E., (2010). Electrostatic Potentials At Solid/Liquid Interfaces. *Croatica Chemica Acta*, 83(3), 357-370.
- Karahan, M., Tuğlu, S., & Mustafaeva, Z., (2012). Synthesis of Microwave-Assisted Poly (Methyl Vinyl Ether-Co-Maleic Anhydride)-Bovine Serum Albumin Bioconjugates. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40(6), 363-368.
- Karahan, M., Tuğlu, S., & Mustafaeva, Z., (2013). Polyelectrolytes and Ist Biological Properties. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31, 85-106.
- Kayitmazer, A. B., Strand, S. P., Tribet, C., Jaeger, W., & Dubin, P. L., (2007). Effect of Polyelectrolyte Structure On Protein– Polyelectrolyte Coacervates: Coacervates of Bovine Serum Albumin With Poly (Diallyldimethylammonium Chloride) Versus Chitosan. *Biomacromolecules*, 8(11), 3568-3577.
- Kim, S. Y., Noh, Y. W., Kang, T. H., Kim, J. E., Kim, S., Um, S. H., ... & Lim, Y. T. (2017). Synthetic vaccine nanoparticles target to lymph node triggering enhanced innate and adaptive antitumor immunity. *Biomaterials*, 130, 56-66.
- Kim, J. H., Taluja, A., Knutson, K., & Bae, Y. H., (2005). Stability of Bovine Serum Albumin Complexed With Peg-Poly (L-Histidine) Diblock Copolymer In Plga Microspheres. *Journal of Controlled Release*, 109(1-3), 86-100.
- Kissel, T., & Koneberg, R., (1996). Injectable Biodegradable Microspheres For Vaccine Delivery. *Drugs and The Pharmaceutical Sciences*, 77, 51-88.
- Koetz, J., Linow, K. J., Philipp, B., Hu, L. P., & Vogl, O., (1986). Effects of Charge Density and Structure of Side-Chain Branching On The Composition of Polyanion-Polycation Complexes. *Polymer*, 27(10), 1574-1580.

Kokufuta, E., Shimizu, H., & Nakamura, I., (1981). Salt Linkage Formation of Poly (Diallyldimethylammonium Chloride) With Acidic Groups In The Polyion Complex Between Human Carboxyhemoglobin and Potassium Poly (Vinyl Alcohol) Sulfate. *Macromolecules*, 14(5), 1178-1180.

Kramarenko, Ey; Khokhlov, Ar; Reineker, P., (2006). Stoichiometric Polyelectrolyte Complexes of Ionic Block Copolymers and Oppositely Charged Polyions. *J Chem Phys*, 125, 1–8.

Kumar, R., Shukla, A. K., Bagga, E., Kumari, S., Bajpai, R. P., & Bharadwaj, L. M., (2005). 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Interference With Lowry Method. *Analytical Biochemistry*, 336(1), 132-134.

Ladaviere, C., Delair, T., Domard, A., Pichot, C., & Mandrand, B., (1999). Covalent Immobilization of Biological Molecules To Maleic Anhydride and Methyl Vinyl Ether Copolymers-A Physico-Chemical Approach. *Journal of Applied Polymer Science*, 71(6), 927-936.

Ladavière, C., Veron, L., Delair, T., Domard, A., Pichot, C., & Mandrand, B., (1997). Reactive Polymers In Diagnostics: Syntheses and Characterizations of Nucleic Acid Probes and Maleic Anhydride-Co-Methyl Vinyl Ether Polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 65(12), 2567-2577.

Lenk, T. Ve Thies, C., (1987). In Coulombic Interactions In Macromolecular Systems, A. Eisenberg; F. E. Bailey, Eds.; American Chemical Society: Washington, Dc, Chapter 8.

Lin, C. C., & Metters, A. T., (2006). Hydrogels In Controlled Release Formulations: Network Design and Mathematical Modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 (12-13), 1379-1408.

Liu, H., Skibinska, L., Gapinski, J., Patkowski, A., Fischer, E. W., & Pecora, R., (1998). Effect of Electrostatic Interactions On The Structure and Dynamics of A Model Polyelectrolyte. I. Diffusion. *The Journal of Chemical Physics*, 109(17), 7556-7566.

Lu, J., Stewart, A. J., Sadler, P. J., Pinheiro, T. J., & Blindauer, C. A., (2008). Albumin As A Zinc Carrier: Properties of Its High-Affinity Zinc-Binding Site. *Biochemical Society Transactions*, 36 (6):1317–1321.

Maghsoudi, A., Shojaosadati, S. A., & Farahani, E. V. (2008). 5-Fluorouracil-Loaded Bsa Nanoparticles: Formulation Optimization and In Vitro Release Study. *Aaps Pharmscitech*, 9 (4), 1092-1096.

Malviya, R., (2014). Poly-Electrolyte Complex: A Novel System For Biomedical Applications and Recent Patents. *Recent Patents On Nanotechnology*, 8(2), 129-141.

Mansuroğlu, B., Kizilbey, K., Derman, S., & Mustafaeva, Z., (2011). Investigation of Protein-Polyelectrolyte Complex and Conjugates By High Performance Liquid Chromatography Methods. *Turkish Journal of Biochemistry*, 36(1).

Masuoka, J., Hegenauer, J., Van Dyke, B. R., & Saltman, P., (1993). Intrinsic Stoichiometric Equilibrium Constants For The Binding of Zinc (II) and Copper (II) To The High Affinity Site of Serum Albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (29), 21533-21537.

Mattison, K. W., & Kaszuba, M., (2004). Molecular Weight Measurements With The Zetasizer Nano System. *American Biotechnological Laboratory*, 23, 1-6.

Meka, V. S., Sing, M. K., Pichika, M. R., Nali, S. R., Kolapalli, V. R., & Kesharwani, P., (2017). A Comprehensive Review On Polyelectrolyte Complexes. *Drug Discovery Today*, 22 (11), 1697-1706.

Merle, Y., (1987). Synthetic Polyampholytes. 5. Influence of Nearest-Neighbor Interactions On Potentiometric Curves. *Journal of Physical Chemistry*, 91(11), 3092-3098.

Militello, V., Casarino, C., Emanuele, A., Giostra, A., Pullara, F., & Leone, M., (2004). Aggregation Kinetics of Bovine Serum Albumin Studied By Ftir Spectroscopy and Light Scattering. *Biophysical Chemistry*, 107 (2), 175-187.

Minchiotti, L., Galliano, M., Caridi, G., Kragh-Hansen, U., & Peters Jr, T., (2013). Congenital Analbuminaemia: Molecular Defects and Biochemical and Clinical Aspects. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba)-General Subjects*, 1830 (12), 5494-5502.

Morawetz, H., & Hughes Jr, W. L., (1952). The Interaction of Proteins With Synthetic Polyelectrolytes. I. Complexing of Bovine Serum Albumin. *The Journal of Physical Chemistry*, 56(1), 64-69.

Muller, R., (1996). Mechanistic Studies On The Biodegradation of Polyester. *Dechema Monogr*, 133, 211-213.

Mustafaev, M., (2004). Functionally Biopolymer Systems. *Sigma*, 4, 1-200.

Mustafaev, M. I., (1996a). *Biyopolimerler*. Tübitak Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği Ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü.

Mustafaev, M. I., (1996b). Polyelectrolytes In Immunology: Fundamentals and Perspectives. *Turkish Journal of Chemistry*, 20(2), 126-138.

Mustafaev, M. I., & Kabanov, V. A., (1981). A Water-Soluble Ternary Poly-4-Vinylpyridine–Bovine Serum Albumin–Cu²⁺ Complexes. *Vysokomol Soed (Moscow) A*, 23, 2271-2275.

Mustafaev, M. I., & Mustafaeva, Z., (2002). Novel Polypeptide-Comprising Biopolymer Systems. *Technology and Health Care*, 10(3-4), 217-226.

Mustafaev, M. I., & Norimov, A., (1990). Polymer-Metal Complexes of Protein Antigens New Highly Effective Immunogens. *Biomedical Science*, 1(3), 274-278.

Mustafaev, M. I., Osada, Y., Başalp, A., Mustafaeva, Z., Çirakoğlu, B., & Bermek, E., (1998). New Temperature-Responsive Immunogens By Poly (N-İsopropyl-Acryamide)-Modified Bovine Serum Albumin. *Recent Advances In Peptide and Protein Delivery, Editions De Sante, Paris*, 145-162.

Mustafaev, M., & Saraç, A., (1996c). Polyelectrolyte Complexes (In Immunology). The Polymeric Materials. Encyclopedia. Synthesis, Properties and Applications. Crc Press Inc., Pp. 5771–5777.

Mustafaev, M., Osada, Y., Matsukata, M., Başalp, A., Çirakoğlu, B., & Bermek, E., (1996a). New Amphiphilic Immunogens By Poly (N-İsopropylacrylamide)-Modified Bovine Serum Albumin. *Polymer Gels and Networks*, 4(4), 363-372.

Mustafaev, M., Yücel, F., Çirakoğlu, B., & Bermek, E., (1996b). Immune Response To Progesterone Involved In Cu²⁺ Mediated Polyanion-Protein Complex—Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones. *Immunology Letters*, 52(2-3), 63-68.

Nagase, S., Shimamune, K., & Shumiya, S., (1979). Albumin-Deficient Rat Mutant. *Science*, 205 (4406), 590-591.

Nair, L. S., & Laurencin, C. T., (2007). Biodegradable Polymers As Biomaterials. *Progress In Polymer Science*, 32 (8-9), 762-798.

Navarra, G., Giacomazza, D., Leone, M., Librizzi, F., Militello, V., & San Biagio, P. L., (2009). Thermal Aggregation and Ion-Induced Cold-Gelation of Bovine Serum Albumin. *European Biophysics Journal*, 38 (4), 437-446.

Niehrs, C., Beißwanger, R., & Huttner, W. B., (1994). Protein Tyrosine Sulfation, 1993-An Update. *Chemico-Biological Interactions*, 92(1-3), 257-271.

Ohyoshi, E., Hamada, Y., Nakata, K., & Kohata, S., (1999). The Interaction Between Human and Bovine Serum Albumin and Zinc Studied By A Competitive Spectrophotometry. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 75 (3), 213-218.

Özeroglu, C., Namazova, N., Mustafaev, M. I., & Saraç, A. S., (1996). The Complex Formation Between Polyacrylamide Containing Glycine End Groups and Bovine Serum Albumin In The Presence of Copper (II) In Neutral Aqueous Media. *Colloid and Polymer Science*, 274(5), 418-427.

- Park, J. H., Saravanakumar, G., Kim, K., & Kwon, I. C., (2010). Targeted Delivery of Low Molecular Drugs Using Chitosan and Its Derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 28-41.
- Park, J. M., Muhoberac, B. B., Dubin, P. L., & Xia, J., (1992). Effects of Protein Charge Heterogeneity In Protein-Polyelectrolyte Complexation. *Macromolecules*, 25(1), 290-295.
- Peters Jr, T., (1985). Serum Albumin. *Advances In Protein Chemistry*. Vol. 37, Pp. 161-245.
- Peters Jr, T., & Stewart, A. J., (2013). Albumin Research In The 21st Century. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1830 (12), 5351.
- Petrov, R. V., Khaitov, R. M., & Ataulakhanov, R. I., (1983). Immunogenetics and Synthetic Antigens. Moscow.
- Petrov, R.V., Mustafaev, M.I., Norimov, A., (1992). Physico-Chemical Criteria For The Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens On The Basis of
- Philipp, B., Dautzenberg, H., Linow, K. J., Kotz, J., & Dawydoff, W., (1989). Polyelectrolyte Complexes—Recent Developments and Open Problems. *Progress In Polymer Science*, 14(1), 91-172.
- Pişkin, E., (1987). Polimer Teknolojisi Giriş. *İnkılap Kitapevi*, Ankara.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F., (2006). Nanoencapsulation I. Methods For Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2 (1), 8-21.
- Rogošić, M., Mencer, H. J., & Gomzi, Z., (1996). Polydispersity index and molecular weight distributions of polymers. *European polymer journal*, 32(11), 1337-1344.
- Roopenian, D. C., Low, B. E., Christianson, G. J., Proetzel, G., Sproule, T. J., & Wiles, M. V., (2015). Albumin-Deficient Mouse Models For Studying Metabolism of Human Albumin and Pharmacokinetics of Albumin-Based Drugs. *Mabs*, Vol. 7, No. 2, Pp. 344-351.
- Roufegarinejad, L., Amarowicz, R., & Jahanban-Esfahlan, A., (2019). Characterizing The Interaction Between Pyrogallol and Human Serum Albumin By Spectroscopic and Molecular Docking Methods. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37 (11), 2766-2775.
- Sacco, D., Bonneaux, F., & Dellacherie, E., (1988). Interaction of Haemoglobin With Dextran Sulphates and The Oxygen-Binding Properties of The Covalent Conjugates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 10(5), 305-310.
- Saçak, M., (2004). Kimyasal Kinetik. *Gazi Kitabevi*, Ankara.
- Sahdev, P., Ochyl, L. J., & Moon, J. J., (2014). Biomaterials For Nanoparticle Vaccine Delivery Systems. *Pharmaceutical Research*, 31(10), 2563-2582.
- Salgin, S., Salgin, U., & Bahadir, S., (2012). Zeta potentials and isoelectric points of biomolecules: the effects of ion types and ionic strengths. *Int. J. Electrochem. Sci*, 7(12), 12404-12414.
- Salman, H. H., & Azcarate, I. G., (2016). Patent and Trademark office, Washington, Dc: U.S., No. 9,351,940.
- Schaaf, P., & Schlenoff, J. B., (2015). Saloplastics: Processing Compact Polyelectrolyte Complexes. *Advanced Materials*, 27 (15), 2420-2432.
- Scott, G., (1999). *Polymers and The Environment*. Royal Society of Chemistry.
- Semenyuk, P. I., Moiseeva, E. V., Stroylova, Y. Y., Lotti, M., Izumrudov, V. A., & Muronetz, V. I., (2015). Sulfated and Sulfonated Polymers Are Able To Solubilize Efficiently The Protein Aggregates of Different Nature. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 567, 22-29.

Shalova, I. N., Naletova, I. N., Saso, L., Muronetz, V. I., & Izumrudov, V. A., (2007). Interaction of Polyelectrolytes With Proteins, 3: Influence of Complexing Polycations On The Thermoaggregation of Oligomeric Enzymes. *Macromolecular Bioscience*, 7(7), 929-939.

Sharma, N. C., Galustians, H. J., Qaquish, J., Galustians, A., Rustogi, K. N., Petrone, M. E., ... & Proskin, H. M., (1999). The Clinical Effectiveness of A Dentifrice Containing Triclosan and A Copolymer For Controlling Breath Odor Measured Organoleptically Twelve Hours After Toothbrushing. *The Journal of Clinical Dentistry*, 10 (4), 131-134.

Shieh, L. Y., & Peppas, N. A., (1991). Solute and Penetrant Diffusion In Swellable Polymers. Xi. The Dynamic Swelling Behavior of Hydrophilic Copolymers Containing Multiethylene Glycol Dimethacrylates. *Journal of Applied Polymer Science*, 42(6), 1579-1587.

Shoukry, M. M., Khairy, E. M., & El-Sherif, A. A., (2002). Ternary Complexes Involving Copper (II) and Amino Acids, Peptides and DNA Constituents. The Kinetics of Hydrolysis of A-Amino Acid Esters. *Transition Metal Chemistry*, 27(6), 656-664.

Slngh, T. R. R., Mccarron, P. A., Woolfson, A. D., & Donnelly, R. F., (2009a). Physicochemical Characterization of Poly (Ethylene Glycol) Plasticized Poly (Methyl Vinyl Ether-Co-Maleic Acid) Films. *Journal of Applied Polymer Science*, 112 (5), 2792-2799.

Slngh, T. R. R., Mccarron, P. A., Woolfson, A. D., & Donnelly, R. F., (2009b). Investigation of Swelling and Network Parameters of Poly (Ethylene Glycol)-Crosslinked Poly (Methyl Vinyl Ether-Co-Maleic Acid) Hydrogels. *European Polymer Journal*, 45 (4), 1239-1249.

Smith, J. D., Morton, L. D., & Ulery, B. D. (2015). Nanoparticles as synthetic vaccines. *Current opinion in biotechnology*, 34, 217-224.

Sofronova, A. A., Evstafyeva, D. B., Izumrudov, V. A., Muronetz, V. I., & Semenyuk, P. I., (2017). Protein-Polyelectrolyte Complexes: Molecular Dynamics Simulations and Experimental Study. *Polymer*, 113, 39-45.

Spriano, S., Ferraris, S., Cazzola, M., & Peretti, V., (2017). Investigation of Surface Functionalization and Coatings For Biomedical Applications By Zeta Potential and Adsorption Measurements On Solid Surfaces. *Wit Transactions On Engineering Sciences*, 116, 379-390.

Staros, J. V., Wright, R. W., & Swingle, D. M., (1986). Enhancement By N-Hydroxysulfosuccinimide of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Coupling Reactions. *Analytical Biochemistry*, 156(1), 220-222.

Stogov, S. V., Izumrudov, V. A., & Muronetz, V. I., (2010). Structural Changes of A Protein Bound To A Polyelectrolyte Depend On The Hydrophobicity and Polymerization Degree of The Polyelectrolyte. *Biochemistry (Moscow)*, 75(4), 437-442.

Şakar Daşdan, D., Karahan, M., Noyan Tekeli, F., & Gölbaşı Şimşek, G., (2019). Modeling Particle Size of Polyacrylic Acid-Copper (II)-Bovine Serum Albumin Ternary Complex In Salt Solution. *Journal of The Indian Chemical Society*.

Tan, C., Celli, G. B., & Abbaspourrad, A., (2018). Copigment-Polyelectrolyte Complexes (Pecs) Composite Systems For Anthocyanin Stabilization. *Food Hydrocolloids*, 81, 371-379.

Teramoto, A., Watanabe, M., Iizuka, E., & Abe, K., (1994). Interaction of Polyelectrolytes With Albumin Using Fluorescence Measurement. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry*, 31(1), 53-64.

Tezcan, H., & Uzluğ, E., (2008). The Synthesis and Spectral Properties of 1, 3-Substituted Phenyl-5-Phenylformazans and Their Ni (II) Complexes. *Dyes and Pigments*, 76 (3), 733-740.

Tirrell M., (2018). Polyelectrolyte Complexes: Fluid Or Solid. *Acs Central Science*, 4 (5), 532-533.

Tsuchida, E., & Osada, Y., (1974). The Role of The Chain Length In The Stability of Polyion Complexes. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 175(2), 593-601.

Tsuchida, E., Osada, Y., & Sanada, K., (1972). Interaction of Poly (Styrene Sulfonate) With Polycations Carrying Charges In The Chain Backbone. *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry*, 10(11), 3397-3404.

Tunçay, M., & Çalış, S., (1999). Biyoparçalanabilir Sentetik Ve Doğal Polimerler. *Fabard J. Pharm. Sci*, 24, 109-123.

Tüylek, Z., (2017). Biomaterials and Use Their İn Health. *Bozok Tıp Dergisi*, 7 (4), 80-89.

Vandenberg, E. J., Diveley, W. R., Filar, L. J., Patel, S. R., & Barth, H. G., (1989). The Synthesis and Solution Properties of Some Rigid-Chain, Water-Soluble Polymers: Poly [N, N'-(Sulfo-Phenylene) Phthalamide] S and Poly [N, N'-(Sulfo-P-Phenylene) Pyromellitimide]. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 27 (11), 3745-3757.

Varga, I., Kardos, A., Borsos, A., & Gilányi, T., (2020). Effect of İnternal Charge Distribution On The Electrophoretic Mobility of Poly (N-İsopropylacrylamide) Based Core-Shell Microgel Particles. *Journal of Molecular Liquids*, 302, 111979.

Veis, A., (1991). Complex Coacervates İnvolving Protein Biopolymer Pairs. *Cell & Developmental Biology*, 32(1), 596-597.

Vinogradov, I. V., Kabanov, V. A., Mustafaev, M. I., Norimov, A., & Petrov, R. V., (1982). Protein Complexes With Nonnatural Polycations: Thymus-İndependent Antigens. *Doklady Akademii Nauk Sssr*, 263(1), 228.

Volod'ko, A. V., Davydova, V. N., Nedashkovskaya, O. I., Terentleva, N. A., Chusovltin, E. A., Galkin, N. G., & Yermak, I. M., (2018). Morphology, Electrokinetic Characteristics and The Effect On Biofilm Formation of Carrageenan: Chitosan Polyelectrolyte Complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 1118-1124.

Voycheck, C. L., & Tan, J. S., (1992). Ion-Containing Polymers and Their Biological İnteractions. *Polyelectrolytes Science and Technology*, Ny, 299-388.

Wang, N., Ye, L., Zhao, B. Q., & Yu, J. X., (2008). Spectroscopic Studies On The İnteraction of Efonidipine With Bovine Serum Albumin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(7), 589-595.

Wasupalli, G. K., & Verma, D., (2018). Molecular İnteractions İn Self-Assembled Nano-Structures of Chitosan-Sodium Alginate Based Polyelectrolyte Complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 10-17.

Wu, D., Zhu, L., Li, Y., Zhang, X., Xu, S., Yang, G., & Delair, T., (2020). Chitosan-Based Colloidal Polyelectrolyte Complexes For Drug Delivery: A Review. *Carbohydrate Polymers*, 116126.

Xia, J., Dubin, P. L., Morishima, Y., Sato, T., & Muhoberac, B. B., (1995). Quasielastic Light Scattering, Electrophoresis, and Fluorescence Studies of Lysozyme-Poly (2-Acrylamido-Methylpropylsulfate) Complexes. *Biopolymers: Original Research On Biomolecules*, 35(4), 411-418.

Yousuf, I., Bashir, M., Arjmand, F., & Tabassum, S., (2019). Multispectroscopic İnsight, Morphological Analysis and Molecular Docking Studies of Cu II-Based Chemotherapeutic Drug Entity With Human Serum Albumin (Hsa) and Bovine Serum Albumin (Bsa). *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37 (12), 3290-3304.

Yücel, F., Çırakoğlu, B., Mustafaeva, Z., & Mustafaev, M., (2001). Immune Response To Progesterone Immobilized On Cu²⁺-Induced Amphifilic Polyelectrolyte-Protein Complex: Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones. *Hybridoma*, 20(1), 11-15.

Zhang, X., Gozukara, Y., Sangwan, P., Gao, D., & Bateman, S., (2010). Biodegradation of Chemically Modified Wheat Gluten-Based Natural Polymer Materials. *Polymer Degradation and Stability*, 95 (12), 2309-2317.

8. İNTERNET KAYNAKLARI

[1] <https://www.pslc.ws/macrog/electro.htm> (10.04.20-13.40)



EKLER

Ek1. Özgeçmiş

Adı soyadı: Rahime Bilge BÖRKLÜ

e-posta: rahimebilge.borklu@st.uskudar.edu.tr

Eğitim Durumu

Lise: Özel Üsküdar Bağlarbaşı Lisesi / Sayısal

Lisans: Marmara Üniversitesi / Fen Bilimleri Öğretmenliği

Yüksek Lisans: Üsküdar Üniversitesi / Moleküler Biyoloji

İş Tecrübesi

2013-2014 : Kurum: Final Yayıncılık Tic. ve San. Ltd. Şti.

İş tanımı: Yazar - Editör

2015-Devam ediliyor : Kurum: MEB'e bağlı eğitim kurumu

İş tanımı: Fen Bilimleri Öğretmeni