

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FİZİKSEL VE KİMYASAL ÇAPRAZ BAĞLI DNA HİDROJELLERİNİN
SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hüsniye ÇAKMAK

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

OCAK 2013

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FİZİKSEL VE KİMYASAL ÇAPRAZ BAĞLI DNA HİDROJELLERİNİN
SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hüsniye ÇAKMAK
(509091072)**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oğuz OKAY

OCAK 2013

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 5091072 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Hüsniye ÇAKMAK**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**FİZİKSEL VE KİMYASAL ÇAPRAZ BAĞLI DNA HİDROJELLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Oğuz OKAY**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Bahire Filiz ŞENKAL**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Deniz Ceylan TUNCABOYLU.....
Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : **17 Aralık 2012**
Savunma Tarihi : **24 Ocak 2013**

Anneme ve Babama,

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince, bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren ve her türlü olanağı sunan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Oğuz OKAY'a gösterdiği her türlü destek, anlayış ve sabrından dolayı en içten dileklerle teşekkür ederim.

Polimerik jeller araştırma laboratuvarındaki çalışmalarım sırasında gerek deneysel çalışmalarda gerekse tezin yazım aşamasında fikirlerini, desteğini ve yardımını hiçbir zaman eksik etmeyen, tecrübelerinden faydalandığım Deniz CEYLAN TUNCABOYLU'na, Pınar KARACAN'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Bu süreç içerisinde manevi desteklerini, eşsiz dostluklarını ve olumlu enerjilerini hiçbir zaman eksik etmeyen Fatih AK, Selda ALVAN ve Semiha YAVUZ'a,

Anlayış, destek ve yardımlarıyla yanımda olan Timuçin BALKAN'a,

Bu çalışmanın bu hale gelmesini üstün sabır, anlayış ve maddi manevi desteklerine borçlu olduğum, yaşamım boyunca beni her konuda destekleyen, her zaman moral kaynağım olan annem Seher ÇAKMAK ve babam Zikri ÇAKMAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2012

Hüsniye ÇAKMAK
Kimyager

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK KISIM.....	5
2.1 Polimerik Jeller.....	5
2.1.1 Kimyasal çapraz bağlı hidrojeller.....	6
2.1.2 Fiziksel çapraz bağlı hidrojeller	7
2.1.3 Jellerin moleküler etkileşimleri	7
2.2 DNA Molekülünün Yapısı.....	10
2.3 DNA Hidrojelleri.....	12
2.4 Hidrojellerin Kullanım Alanları.....	14
2.5 İlaç Salımı	15
2.5.1 Kontrollü ilaç salım sistemleri	15
2.5.2 Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Doğal Polimerler	15
3. DENEYSEL KISIM	17
3.1 Malzemeler.....	17
3.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	18
3.3 DNA Hidrojellerinin Sentezi	20
3.3.1 Fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojellerinin sentezi	20
3.3.2 Kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojellerinin sentezi.....	21
3.4 Jellerin Karakterizasyonu.....	23
3.4.1 Şişme Ölçümleri.....	23
3.4.2 UV-Visible Spektrofotometre	23
3.4.3 Reolojik Ölçümler	23
3.4.4 Mekanik Ölçümler.....	24
3.4.5 ATR – FTIR Ölçümleri	24
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	25
4.1.1 Fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojelleri.....	25
4.2 Kimyasal Çapraz Bağlı DNA Hidrojelleri.....	33
5. SONUÇLAR.....	39
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ	45

KISALTMALAR

DNA	:Deoksiribonükleik asit
ds-DNA	:Çifte sarmal - DNA
ss-DNA	:Tekli sarmal - DNA
EGDE	:Etilenglikoldiglisidileter
TEMED	: <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamin

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Polimerik jel ağyapısının şematik gösterimi.	5
Şekil 2.2 : DNA çift sarmal yapısı	10
Şekil 2.3 : DNA çift sarmal yapısını oluşturan baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları.	11
Şekil 2.4 : DNA'nın soldan sağa doğru A,B ve Z yapısı.....	12
Şekil 3.1 : DNA hidrojel sentezinde kullanılan kimyasal maddeler	17
Şekil 3.2 : Elastik modül cihazının şematik görünümü.....	18
Şekil 3.3 : Reometre cihazı (solda), PC ekranı (ortada) ve kompresör (sağda).....	19
Şekil 3.4 : T80 UV-görünür spektrofotometre cihazı.....	19
Şekil 3.5 : Isıtma – soğutma çevrimi sonrası ds-DNA molekülünden hidrojen bağlarının yer değiştirmesiyle fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojel oluşum mekanizması.....	21
Şekil 3.6 : Nükleotitdeki amino grupları ile EGDE arasında çapraz bağlanma reaksiyonu.	22
Şekil 3.7 : Gravimetrik (solda) ve volumetrik (sağda) şişme ölçümleri.....	23
Şekil 4.1 : (a) %5 DNA çözeltisinin $\omega = 6,28$ rad/s'de yapılan ısıtma–soğutma çevrimi sırasında elastik modül G' (●), viskoz modül G'' (○) ve kayıp faktör $\tan\delta$ (çizgi)'nin sıcaklıkla değişimi. (b) Fiziksel jellerin ısıtma–soğutma çevrimi öncesi 25°C 'de (küreler) ve sonrası (üçgenler) $\Upsilon_{\circ} = 0,01'$ de frekans taraması sonucu G' (●), G'' (○)'nin değişimi. Kesikli yatay çizgi (a) $\tan \delta = 1'$ i temsil etmektedir.	27
Şekil 4.2 : DNA'nın jelleşme öncesi ve sonrası ATR-FTIR spektrumu.	28
Şekil 4.3 : 26 mg/L saf DNA çözeltisinin UV görünür bölge spektrumu.	29
Şekil 4.4 : Saf DNA'nın sulu çözeltilerinin jelleşme öncesi (A) ve sonrası(B) absorbans değerlerinin konsantrasyonla değişimi.	30
Şekil 4.5 : Farklı konsantrasyonlardaki NaBr çözeltileri içerisinde zamana bağlı olarak jellerin ağırlıkça relatif şişme oranları (a) ve salınan DNA miktarları (b)	31
Şekil 4.6 : %5'lik saf DNA hidrojjellerinin kuvvet altında deformasyon grafiği. Her eğri aynı örnek için farklı ölçümleri ifade etmektedir.	32
Şekil 4.7 : Farklı konsantrasyonlardaki NaBr çözeltileri içerisinde zamana bağlı olarak jellerin hacimce relatif şişme oranlarının değişimi.	33
Şekil 4.8 : Farklı konsantrasyonlardaki NaBr çözeltileri içerisinde zamana bağlı olarak jellerin salınan DNA miktarları. Sentez şartları: DNA = % 9,3. EGDE = % 9,6. TEMED = % 0,44.....	34
Şekil 4.9 : Farklı konsantrasyonlardaki NaBr çözeltileri içerisinde zamana bağlı olarak kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojjellerinin ağırlıkça relatif şişme oranlarının değişimi. Sentez şartları: DNA = % 9,3. EGDE = % 9,6. TEMED = % 0,44.....	35

- Şekil 4.10 :** Kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojellerinin kuvvet altında deformasyon grafiği. Sentez şartları: DNA = % 9,3. EGDE = %9,6. TEMED = %0,44..... 36
- Şekil 4.11 :** Farklı şişme oranlarındaki kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojellerinin elastik modül değerlerinin (G) değişimi. Sentez şartları: DNA = % 9,3. EGDE = %9,6. TEMED = %0,44. 37

FİZİKSEL VE KİMYASAL ÇAPRAZ BAĞLI DNA HİDROJELLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Tüm yaşayan hücreler bünyelerinde baz diziliminde genetik bilgiler içeren DNA moleküllerini bulundurlar. Polimerik jeller sentetik polimerlerden elde edilebileceği gibi DNA molekülü gibi doğal polimerlerden de elde edilebilir. DNA hidrojelleri, çapraz bağlı DNA ipliklerinden oluşan ve sulu çözeltilerde şişmiş bir ağyapı olarak tanımlanabilir. Yüklü, yarı-esnek zincirlerden oluşan DNA hidrojellerinin kontrollü ilaç salımı, doku mühendisliği ve biyomedikal kullanımları gibi DNA'nın karakteristik özelliklerinden yararlanılan geniş uygulama alanları vardır. Bu çalışmanın amacı, dışarıdan gelen uyarılara hızlı cevap verebilen ve ilaç salımında kullanılmak üzere vücutta herhangi bir toksik etki bırakmayacak fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojellerini sentezlemek ve karakterize etmektir.

DNA temel hal durumunda bazları iki sarmala bağlayan hidrojen bağları sayesinde kararlı bir yapıya sahiptir ve bu konformasyon çift sarmal konformasyon olarak bilinir. Bu yapıdaki DNA'nın sulu çözeltisi ısıtıldığı zaman, sarmalları bir arada tutan bu hidrojen bağları kırılır ve çift sarmal yapı rastgele konformasyona sahip tek sarmallar haline parçalanır. Çift sarmal yapıdan tek sarmal yapıya geçiş erime veya denatürasyon olarak bilinmekte olup, bu proses seyreltik DNA çözeltilerinin yavaşça soğutulması durumunda tersinir olabilir. Fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojelleri, NaBr çözeltisi içerisinde çözülen çifte sarmal yapıya sahip 2000 baz çifti içeren DNA'nın erime sıcaklığının (87,5°C) üzerine ısıtılması ve ardından 25°C'ye yavaş soğutulması sonucu elde edilmiştir. Fiziksel çapraz bağlı DNA jellerinin özelliklerini mukayese etmek amacıyla kimyasal çapraz bağlı DNA jelleri de bu tez kapsamında sentezlenmiştir. Kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojelleri NaBr çözeltisi içerisinde çözülen DNA'nın, N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) katalizörlüğünde ve etilenglikoldiglisidileter (EGDE) çapraz bağlayıcısı ile 50°C'de çapraz bağlanma reaksiyonları sonucu elde edilmiştir. Elde edilen fiziksel ve kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojellerinin farklı tuz konsantrasyonlarında şişme ve salım davranışları incelenmiş, mekanik ölçümleri yapılmıştır. Kimyasal çapraz bağlı jellerin DNA salımlarının çok az olduğu, fiziksel jellerin ise kolaylıkla kontrollü salım sistemlerinde kullanılabileceği görülmüştür. Diğer yandan reolojik ölçümler ile ısıtma-soğutma çevrimlerine tabi tutularak kPa boyutlarında elastik modüle sahip fiziksel DNA hidrojelleri elde edilmiştir. Sentezlenen fiziksel jeller UV ve ATR-FTIR ölçümleri ile karakterize edilerek çifte sarmal yapıda olduğu ortaya konmuştur.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL DNA HYDROGELS

SUMMARY

All living cells contain deoxyribonucleic acid (DNA) molecules carrying genetic information in their base sequences. DNA is a biopolymer composed of building blocks called nucleotides consisting of deoxyribose sugar, a phosphate group and four bases, adenine, thymine, guanine, and cytosine. DNA has a double-helical conformation in its native state which is stabilized by hydrogen bonds between the bases attached to the two strands. When a DNA solution is subjected to high temperatures, the hydrogen bonds holding the two strands together break and the double helix dissociates into two single strands having a random coil conformation. This transition from double-stranded (ds) to single-stranded (ss) DNA is known as denaturation or melting and can be reversed by slow cooling of dilute DNA solutions. DNA denaturation was extensively investigated in the past few decades as it gives useful information on DNA regarding its structure and stability. Typically, melting curves of DNA are obtained by monitoring the UV absorption at 260 nm. The disruption of base stacking decreases the electronic interaction between the bases so that it becomes easier for an electron to absorb a photon. Thus, denaturation leads to the hyperchromic effect, i.e., the increased absorption of light.

At concentrations below the critical overlap concentration, DNA form viscous structures in aqueous solutions, while at high concentrations, DNA molecules overlap and entangle to form a weak gel. Only a few reports exist in the literature on the viscoelastic properties of DNA solutions. The linear viscoelastic moduli of DNA solutions have been measured by Mason et al. in the concentration range 0.1-1.0% w/v. It was shown that the solutions in saline buffer behave as an entanglement network of semiflexible coils exhibiting an elastic modulus and a crossover frequency that vary with concentration according to known scaling laws. Sun et al. showed that heating of semidilute solutions of DNA (0.5% w/v) leads to a decrease of the elastic modulus, indicating that the rigid-rod-like DNA molecules lost their rigidity due to the dissociation of the two strands. Thus, the semiflexible ds-DNA consisting of fragments of about 150 base pairs behaving as rigid segments becomes flexible on heating so that the viscosity of the solution decreases. The breakup of the DNA base pairs begins at a temperature as low as 50 °C, which is well below the chain melting temperature (87 °C).

DNA hydrogel is a network of cross-linked DNA strands swollen in aqueous solutions. Such soft materials are a good candidate to make use of the characteristics of DNA such as coil-globule transition, biocompatibility, selective binding, and molecular recognition. DNA hydrogels were prepared starting from branched DNA molecules via ligase-mediated reactions. These hydrogels can also be prepared by cross-linking of DNA in aqueous solutions using diepoxides as chemical cross-linking agents. Epoxide groups can react with the amino groups on the nucleotide bases to form interstrand cross-links leading to the formation of a three dimensional

DNA network. Our research group has recently focused on developing responsive DNA hydrogels with a wide range of tunable properties such as the conformation of the network strands, viscoelasticity, nonlinear elasticity, and porosity. It was shown that DNA can also be physically cross-linked by subjecting DNA solutions to heating-cooling cycles. Heating of semidilute solutions of ds-DNA above its melting temperature results in the dissociation of the double helix into flexible single strand fragments. On cooling back to the room temperature at a slow rate, the dissociated strands cannot re-organize to form the initial double stranded conformation. Hence, the hydrogen bonds formed between strands belonging to different ds-DNA molecules act as physical junction zones leading to the formation of gels with a modulus of elasticity between 10^1 and 10^4 Pa. The effects such as the concentration of DNA solution, pH, the presence of a cross-linker, and the duration of the heating period on the viscoelastic properties of the physical gels were investigated before.

In the present study, the swelling behavior of both physically and chemically cross-linked DNA hydrogels was investigated in water and in aqueous salt solutions. The aim is to compare the swelling behavior of DNA hydrogels with that of synthetic polyelectrolyte hydrogels. DNA gels were made from deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testes. According to the manufacturer, the % G-C content of the DNA used is 41.2 %, and the melting temperature is reported to be 87.5°C in 0.15 M sodium chloride plus 0.015 M sodium citrate. Physical gels were prepared by subjecting aqueous solutions of 5 % DNA to heating-cooling cycles between below and above the melting temperature of DNA. Such physical gels were prepared before, on a small scale, between the parallel plates of rheometer, but their swelling behavior and stability in aqueous media have not been investigated. It was observed that, although the initial DNA solution flowed under gravity, the physical gels formed after the cycle preserved their shapes and they exhibited an elastic modulus of 2.1 kPa after a relaxation time of 3 sec. The conformation of DNA strands in the physical gels was investigated by ATR-FTIR measurements. It was found that the intensity of the characteristic ds-DNA peaks remain unchanged after gelation indicating that the DNA strands in the physical gels are in double stranded conformation. The conformation of DNA before and after heating-cooling cycle was also tested by determining the molar extinction coefficient of DNA, isolated from the gels, at 260 nm. Absorbance of DNA solutions at 260 nm is known to increase as the structure of DNA transforms from double to single strand; in case of complete denaturation, it increases 40 % due to the change of the molar absorption coefficient of the aromatic rings. The results show that the molar extinction coefficient of DNA is constant before and after gelation supporting that the physical gels consist of mainly ds-DNA strands.

Physical DNA gel samples were subjected to swelling tests in aqueous NaBr solutions of various concentrations (C_{salt}) between 0 and 10^{-1} M. In salt solutions below 10^{-2} M NaBr, the relative weight swelling ratio m_{rel} first increases with increasing swelling time, and after attaining a maximum value, it again decreases. By UV-vis measurements conducted on external salt solutions, it was found that the decrease in m_{rel} is related with the disintegration of DNA chains from the gel network. While about 80 % of ds-DNA in the physical gels released within one day in $0 - 10^{-4}$ M NaBr, a much slower release over a time scale of many days was achieved at higher salt concentrations.

Thus, the hydrogen bonds acting as physical cross-link zones between ds-DNA strands are destroyed during the expansion of the gels in dilute salt solutions.

However, at higher salt concentrations, the gels immersed in solutions remain stable over many days. For example, in 10^{-2} M NaBr, the gels dissolved after about 16 days while in 10^{-1} M NaBr they remained stable over the whole swelling time studied (42 days). The results thus show that both the release rate and the released amount of DNA could be adjusted by the salt concentration in the solution. This also suggests that the physical DNA gels prepared without a cross-linker can be used for the controlled release of ds-DNA in aqueous solutions.

Chemical DNA hydrogels were prepared by the solution cross-linking of DNA using ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE) cross-linker. The gel samples were subjected to swelling tests in aqueous NaBr solutions of various concentrations C_{salt} between 0 and 1 M. The gel samples swell to equilibrium state within 1 to 2 days while at longer times, the gel mass remains constant. This is in contrast to the physical gels, and indicates the stability of the chemically cross-linked DNA network structure. The results also show that, below 10^{-4} M NaBr, the equilibrium swelling ratio of gels remains almost unchanged while further increase in C_{salt} leads to a rapid deswelling. The decreased swelling ratio of DNA hydrogels with increasing salt concentration is due to decrease in the concentration difference of counterions inside and outside the gel. The fixed phosphate residues of DNA strands confined to the gel phase require equal number of counterions (Na^+) to stay within the gel to achieve electroneutrality.

In conclusion, physical DNA gels generated via heating-cooling cycle of 5 % aqueous DNA solutions are not stable in water, indicating that the physical cross-links are destroyed during the swelling process. It was found that both the release rate and the released amount of DNA from the physical gels can be adjusted by changing the salt concentration in the external solutions. In this way, the release of ds-DNA molecules from the gels can be varied between a few hours and tens of days. This suggests that the physical gels can be used for the controlled release of DNA in aqueous media. In contrast, chemically cross-linked DNA gels formed using EGDE cross-linker are stable in water and thus, their swelling ratios could be adjusted by the amount of DNA at the gel preparations.

1. GİRİŞ

Üstün özellikleriyle ileri teknoloji malzemesi olarak yaşantımızda geniş bir yer tutan polimerik jeller, pek çok tanımının yanında kısaca birbirine çapraz bağlarla bağlanmış polimer zincirleri ve bu zincirler arasına girmiş çözücü moleküllerinden oluşan polimerik bir ağyapı olarak ifade edilebilir [5-7]. Polimerik jeller Flory'e göre yapısal özellikleri bakımından fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Hidrojen bağları, van der Waals gibi fiziksel etkileşimlerle oluşan jeller fiziksel jeller diye tanımlanırken birbirlerine kovalent bağlarla bağlı polimer zincirlerinin oluşturduğu çözünmez ağ yapılar ise kimyasal jeller olarak adlandırılır [4]. Bununla birlikte tek polimer zincirlerinin mikroskobik davranışları, jeller yardımıyla makroskobik ölçekte incelenebildiği bilinmektedir [5-7].

Polimerik jeller sentetik polimerlerden elde edilebileceği gibi DNA molekülü gibi doğal polimerlerden de elde edilebilir. Tüm yaşayan hücreler bünyelerinde baz diziliminde genetik bilgiler içeren DNA moleküllerini bulundururlar. DNA molekülü yapısında beş karbonlu bir şeker (deoksiriboz), fosfat grubu ve azotça zengin pürin (A:adenin, G:guanin) ve primidin (T:Timin, C:Sitozin) baz içeren nükleotid denilen bloklardan oluşan bir biyopolimerdir [8]. DNA temel hal durumunda bazları iki sarmala bağlayan hidrojen bağları sayesinde kararlı bir yapıya sahip olup, bu forma çift sarmal konformasyonu denilir. Bu yapıdaki DNA'nın sulu çözeltisi ısıtıldığı zaman, sarmalları bir arada tutan bu hidrojen bağları kırılır ve çift sarmal yapı rastgele konformasyona sahip tek sarmallar haline parçalanır [11]. Çift sarmal yapıdan tek sarmal yapıya geçiş erime veya denatürasyon olarak bilinmekte olup, bu proses seyreltik DNA çözeltilerinin yavaşça soğutulması durumunda tersinir olabilir. DNA denatürasyonu geçmiş yıllarda geniş bir biçimde araştırılmış olup, elde edilen veriler DNA'nın yapısı ve kararlılığı hakkında kullanışlı bilgiler verilmiştir. Özellikle DNA moleküllerinin erimesi sırasındaki davranışlarının UV görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak 260 nm'deki pikinin takip edilmesiyle elde edilen veriler DNA'nın yapısını aydınlatmada yararlı olmuştur [11-13]. Erime sırasında baz dizilimlerinin bozulması sonucunda bazlar arasındaki elektronik

etkileşimin azalmasından ötürü DNA molekülündeki bir elektronun bir fotonu absorblaması daha kolay hale gelir. Bu yüzden DNA moleküllerinin denatürasyonu sırasında absorblanan ışığın miktarı 1,4 kat artar [14].

Deoksiribonükleik asit (DNA) jelleri, çapraz bağlı DNA zincirlerinden oluşan suda şişmiş ağ yapılarıdır. İlk kez Amiya ve Tanaka [15] tarafından yayınlanan DNA hidrojelleri, çifte sarmal yapıdaki DNA' nın *N,N,N',N'* tetrametiletildiamin (TEMED) katalizörlüğünde etilenglikoldiglisidileter (EGDE) çapraz bağlayıcısı ile çapraz bağlanma reaksiyonlarına tabi tutularak elde edilmiştir [16-20]. Epoksi grupları nükleotidlerin baz gruplarındaki amino grupları ile reaksiyona girip çapraz bağlanmayı sağlar ve üç boyutlu bir DNA ağ yapısı oluşur. Yüklü, yarı-esnek zincirlerden oluşan DNA hidrojelleri suyu absorplarken ağ yapıdaki çapraz bağlar nedeniyle çözünmezler. DNA hidrojelleri, dıştan gelen uyarılara örneğin sulu çözeltideki aseton, inorganik tuz, poliamin, katyonik polimer, poli(etilen glikol), veya yüzey aktif madde miktarına bağlı olarak büyük hacim değişimleri gösterirler, yani uyarılara duyarlı hidrojel olarak gözönüne alınabilir [16]. Polimerik ağ yapısındaki iyonik grupların varlığından dolayı tipik polielektrolit jel davranışı göstermektedirler [16,21-24]. Bu hidrojellerin; kontrollü ilaç salımı, doku mühendisliği ve biyomedikal kullanımları gibi geniş potansiyel uygulama alanları vardır.

Bunun yanı sıra DNA çözeltilerinin çapraz bağlayıcı olmadan ısıtma soğutma çevrimlerine tabi tutulması ile fiziksel olarak çapraz bağlanabileceği de bilinmektedir [10,16]. Yarı seyreltik bir DNA çözeltisi erime noktasının üzerindeki bir sıcaklığa ısıtıldığı zaman çift sarmal yapısı bozulur ve esnek tek sarmallara ayrılır. Bu çözelti yavaş bir şekilde oda sıcaklığına tekrar soğutulduğunda esnek tek sarmallar başlangıçtaki çift sarmal yapıyı oluşturacak şekilde organize olamazlar ve rastgele bölgelerden hidrojen bağları vasıtasıyla birbirlerine bağlanırlar. Elde edilen bu jellerin reometrik ölçümler sonucu MPa boyutlarında elastik modüle sahip ve kuvvet altında sertleşme (strain hardening) özelliği olduğu gösterilmiştir [10,25]. Ancak tüm bu çalışmalarda fiziksel DNA jelleri reometre plakaları arasında ve mikroskopik boyutlarda hazırlanmış olup makroskopik boyutlarda özellikleri, şişme davranışları incelenmemiştir [10,16].

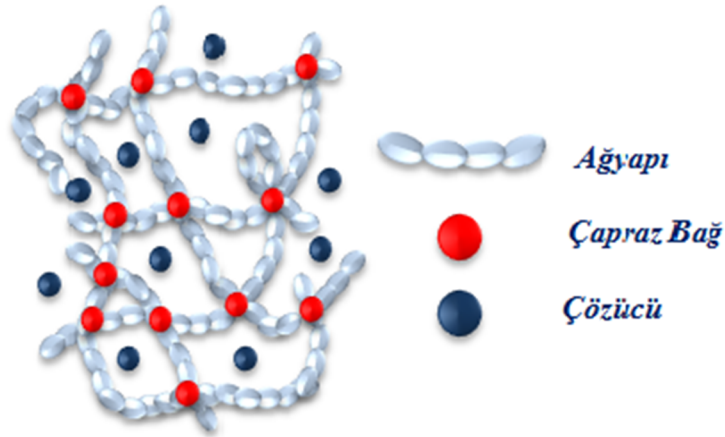
Bu çalışmanın amacı, vücutta herhangi bir toksik etki bırakmayacak ve kontrollü ilaç salımında kullanılabilecek fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojellerini literatürden farklı olarak silindirik bir şekilde sentezleyip, özelliklerini inceleyerek karakterize etmek

ve bulguları kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojellerinin özellikleri ile karılaştırmaktır. Yapılan bu çalışmada hem fiziksel hem de kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojellerinin salımı, şişme davranışları, mekanik dayanıklılığı gibi özellikleri incelenmiştir. Elde edilen kimyasal ve fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojelleri kıyaslamalı olarak karakterize edilmiştir. Fiziksel apraz bağlı jeller; 2000 baz çiftinden oluşan ifte sarmal yapıdaki DNA'nın sulu çözeltisi hazırlanarak DNA'nın erime noktasının üstündeki ve altındaki sıcaklıklar arasında ısıtma – soğutma çevrimine tabi tutulması sonucu ısıtılıp soğutulmasıyla elde edilmiştir. Kimyasal apraz bağlı DNA hidrojelleri ise DNA özeltisinin içerisine çapraz bağlayıcı olarak EGDE katılmasıyla sentezlenmiştir. Elde edilen bu iki tip jellerin su ve değişen konsantrasyonlardaki tuz çözeltisinde şişme ve elastik özellikleri karılaştırılmış polielektrolit davranış sergilediği gösterilmiştir. Her ne kadar fiziksel çapraz bağlı DNA ağyapısı su içerisinde genişleme sırasında dağılsa da bu jellerin sulu ortamda kontrollü DNA salımı için kullanılabilieceği öngörülmektedir.

2. TEORİK KISIM

2.1 Polimerik Jeller

Hidrojeller, hidrofilik polimer ağyapısı ile ağyapı içindeki çözücünden (su veya sulu çözelti) oluşan iki fazlı bir sistem olarak tanımlanabilir [7,9]. Polimer ağyapı, çözücünün jel dışına akmasını engellerken çözücü ağyapının çökmemesini sağlar. Polimerik hidrojeller konusunda günümüzde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bilim adamlarının hidrojel sistemlerine olan ilgisi bu sistemlerin yüksek su emme kapasiteleri, dıştan gelen uyarılara bağlı olarak ani hacim değiştirebilme yetenekleri, biyolojik sistemlere benzerlikleri, bunun sonucu olarak biyomoleküllerde molekül-içi etkileşmelere bağlı konformasyon değişimlerini izlemekte ve anlamakta model sistemler oluşturmaları, ve hidrojel halinde kimyasal reaksiyonlara girebilmeleri nedeniyledir.



Şekil 2.1 : Polimerik jel ağyapısının şematik gösterimi.

Hidrojellerin en önemli özellikleri çözücülerde şişmeleri ve elastisiteleridir. Hidrojelin iskeletini oluşturan polimer ağyapı, çapraz bağlar nedeniyle çözücü içerisinde çözünmez ama şişer. Bilindiği gibi lineer polimerlerin çözünürlük özellikleri o polimeri karakterize eden en önemli özelliklerden biridir. Benzer şekilde şişme de polimer ağyapının başka bir deyişle jelin karakteristik bir özelliğidir. Gerek şişme, gerekse elastisite özelliği, jellerin çapraz bağlı bir yapıda

olmalarından ileri gelmektedir. Jellerin şişmeleri, onların yapısına ve içinde bulunduğu ortama göre değişim gösterir. Bu durum endüstride yaygın olarak kullanılan jellerin kullanım alanını belirlemektedir. Jellerin mekanik özelliklerini de başlıca çapraz bağ yoğunlukları belirlemektedir. Jelin üzerine bir kuvvet etki ettiğinde jel deforme olur. Viskoelastik yapıda olan jellere elastik deformasyon uygulandığında elastik özelliklerinden dolayı kuvvet kaldırıldığında tekrar orijinal şekillerine geri dönerler.

Hidrojellerin bir alt kümesi olan DNA hidrojelleri ise tüm canlı hücrelerin, baz sıralarında genetik informasyonları taşıyan deoksiribonükleik asit (DNA) molekülleri kullanılarak elde edilirler. Bu hidrojeller, çapraz bağlı DNA ipliklerinden oluşan ve sulu çözeltilerde şişmiş bir ağyapı olarak tanımlanabilir [2]. Bu tip yumuşak malzemeler, yumak-kürecik geçişi, biyouyumluluk, seçici bağlama ve moleküler tanıma gibi DNA'nın karakteristik özelliklerinden yararlanmak için iyi bir adaydır. DNA hidrojelleri, dıştan gelen uyarılara örneğin sulu çözeltideki aseton, inorganik tuz, poliamin, katyonik polimer, poli(etilen glikol), veya yüzey aktif madde miktarına bağlı olarak büyük hacim değişimleri gösterirler, yani uyarılara duyarlı hidrojel olarak gözönüne alınabilir [16].

Polimerik jeller Flory'e göre yapısal özellikleri bakımından kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Birbirlerine kovalent bağlarla bağlı polimer zincirlerinin oluşturduğu çözünmez ağyapılar kimyasal jeller olarak tanımlanırken Hidrojen bağları, Van der Waals gibi fiziksel etkileşimlerle oluşan jeller fiziksel jeller diye adlandırılır [4].

2.1.1 Kimyasal çapraz bağlı hidrojeller

Keskin bir sol-jel geçişi gösteren ve kalıcı bir ağ yapısı bulunan kimyasal jeller "kuvvetli jeller" olarak da isimlendirilir ve yumuşak viskoelastik katılar gibi davranırlar. Kovalent çapraz bağlı jel yapıları tersinmez sistemlerdir[26]. Su-seven monomer ya da polimerlerden çeşitli yöntemlerle üretilirler. Bu amaçla uygulanan polimerizasyon yöntemlerinde sonsuz jel örgüsü, bir tanesi en azından üç fonksiyonelli olan iki ya da daha fazla monomer çeşidinin lineer olmayan kopolimerizasyonu ile meydana gelir. Kimyasal çapraz bağlı jel oluşturmak için iki yöntem kullanılır. İlk yöntemde monomerlerden çıkarak polimerizasyon ve çapraz bağlanma reaksiyonları ile yani monovinil monomer / divinil monomer çiftlerinin kopolimerizasyonu ile üç boyutlu kimyasal çapraz bağlı jel yapısı oluşurken diğer

yöntemde doğrusal polimer zincirlerinin çapraz bağlayıcılarla reaksiyonu sonucunda jeller elde edilir. Jel sentezlerinde kullanılan üç veya daha fazla fonksiyonlu monomere çapraz bağlayıcı denir ve polimerizasyon sırasındaki konsantrasyonu jellerin şişme ve elastik özelliklerini belirler. Kauçuk vulkanizasyonu, fibroin jeli eldesi ve bu çalışma kapsamında DNA jeli eldesi doğrusal polimerlerden çapraz bağlanma ile jel oluşuma örnektir.

2.1.2 Fiziksel çapraz bağlı hidrojeller

Fiziksel bağlı jeller hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri veya iyonik etkileşimler gibi zayıf kuvvetlerle çapraz bağlanır. Fiziksel bağlı jel ağları genel olarak tersinir sistemlerdir. Sıcaklık ve iyon katkısı gibi faktörler, sol ve jel fazları arasında tersinir bir dönüşüm meydana getirebilir. Bu jeller temel olarak bazı doğal organik moleküllerden (proteinler ve polisakkaridler) ve yarı-sentetik selüloz türevlerinden oluşur. Bazı sentetik su-seven polimerler de bu sınıfa dahil edilmektedir. Uygun değişikliklere uğrayarak jeli oluşturacak polimer zincirleri, sol durumunda iken büyük bir çoğunlukla “rastgele yumaklar” olarak nitelendirilen polimer zincirleri halindedir. Bu tür geçişler, bir veya daha fazla zincirin, tek, çift ya da üçlü sarmallar oluşturacak şekilde (DNA zinciri gibi) bükülerek sarmal yapıları ve bunların da bir araya gelerek kümeleri oluşturmalarıyla meydana gelir. Üç-boyutlu jel örgüsü ise bu küme grupları arasında meydana gelen ve eklem bölgeleri ya da çapraz bağlanma bölgeleri adı verilen ortaklaşa bağlanmaların sonucunda ortaya çıkar. Amorf yapıdaki ağ örgüsü boyunca yayılan bu eklem bölgeleri, jelle mekanik sertliğini verir. Fiziksel bağlı jellerin mikroyapıları, düzensiz kimyasal çapraz bağlı jellerinkinden çok daha fazla karmaşıktır. Fiziksel jellerin sertlik, erime sıcaklığı ve jel oluşma noktası gibi fiziksel özellikleri oluşan eklem bölgelerinin karakteristik yapısına bağlıdır [26].

2.1.3 Jellerin moleküler etkileşimleri

Jellerin şişme veya büzülme davranışı göstermesinin nedeni polimer moleküllerinin birbirleri ile veya çözücü molekülleri ile arasındaki etkileşimlerdir. Bu etkileşimler, kovalent olmayan veya sekonder bağlar olarak da bilinen van der Waals, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler ile hidrojen bağlarıdır [7, 27, 28].

Jellerin hacim faz geçişi, bu etkileşimlerden kaynaklanarak, polimer molekülleri arasındaki itme ve çekme kuvvetlerinin yarışının bir sonucu olarak gerçekleşir.

Polimer ağyapının genişlemesine neden olan itme kuvvetleri ile büzülmesine neden olan çekme kuvvetlerinden hangisi baskın ise jel o yönde hareket eder.

1) Van der Waals Etkileşimleri: Bilindiği gibi Van der Waals etkileşimi, herhangi bir anda bir atomun veya molekülün çevresinde bulunan elektronik yük dağılımındaki değişikliktir. Diğer bir ifade ile hareket halindeki elektronik yüklerin çok kısa sürelerle atomda veya molekülde pozitif ve negatif yük merkezleri oluşturmasıdır. Bu yük merkezleri komşu moleküllerde de zayıf bir polarizasyona neden olur ve bu polarizasyonla meydana gelen dipoller birbirlerini çekerler. Bu kuvvete “dispersiyon kuvveti” de denilir.

Benzer şekilde polimer ağyapıdaki zincirler üzerinde bulunan asılı gruplar arasında da meydana gelebilen van der Waals kuvvetleri, polimer zincirleri arasında bir çekim kuvveti oluşturur. Böylece jel büzülme eğilimi göstermeye başlar. Örneğin, aseton-su karışımları içerisindeki kısmen hidrolize poliakrilamid jeli bu şekilde hacim faz geçişine uğrar [1]. Suyu, polar olmayan bir çözücü olan aseton eklendiğinde ağyapıdaki polimerler arasında çekim kuvvetleri meydana gelir. Bu çekim kuvveti de jelin faz geçişi göstermesine neden olur.

2) Hidrofobik Etkileşimler: Hidrofobik etkileşimler en basit şekilde, su ile etkileşime giremeyen hidrofobik grupların, su ile temas eden yüzeylerini azaltmak için sudan kaçarak birbirleriyle etkileşmeleri olarak tanımlanabilir.

Hidrofobik etkileşim, entalpi ve entropi kaynaklıdır ve bundan dolayı sıcaklıktan oldukça fazla etkilenir. Sıcaklık arttıkça hidrofobik grupların çevresindeki su molekülleri daha düzensiz yapıda olurlar ve hidrofobik gruplar birbirini daha çok çeker. Buna karşılık sıcaklık azaldıkça hidrofobik etkileşim de azalır.

Görüldüğü gibi, sıcaklığa bağlılığı açısından, hidrofobik etkileşim, van der Waals etkileşiminin tam tersidir. Buna en iyi örnek hidrofobik yan gruplar taşıyan poli(N-izopropil akrilamid) (PNIPA) jelleridir. Hirokawa PNIPA jelleri ile sıcaklığı arttırarak yaptığı çalışmada yaklaşık 33,2 °C’de hacim faz geçişinin olduğunu gözlemiştir [29]. Jel, polimer zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşimden dolayı düşük sıcaklıklarda şişmiş durumda olmasına rağmen, sıcaklık arttırıldığında büzülmektedir.

Ayrıca literatürde miseller kopolimerizasyon tekniği ile etrafı misellerle çevrili hidrofobik bloklar içeren hidrofilik polimer zincirleri sentezlenebilmektedir.

4) Hidrojen Bağları: Hidrojen bağı en az bir molekülünde hidrojen atomu içeren iki kuvvetli polar molekül arasında meydana gelir ve bu moleküllerden birinin kısmi negatif ucu ile diğer molekülün kısmi pozitif ucu birbirine bağlar. Buna en tipik örnek hidrojen bağları ile birbirine bağlanmış su molekülleridir. Bir başka örnek de protein molekülleri arasındaki hidrojen bağlarıdır. Benzer şekilde bazı polimer ağyapıları içerisinde, zincirdeki yan gruplar nedeniyle meydana gelen hidrojen bağları hacim faz geçişine neden olmaktadır.

Hidrofobik modifiye hidrojeller olarak adlandırılan bu polimerler, içerdikleri petkileşimler sayesinde kendini iyileştirme davranışı göstermektedir [30].

3) Elektrostatik Etkileşim: Yüklü atom veya atom grupları arasındaki etkileşim olup, iyonik bağ, tuz köprüsü veya iyon çifti olarak da adlandırılır. Elektrostatik etkileşimin meydana getirdiği elektrostatik kuvvet, Coloumb kanunu ile aşağıda görülen şekilde ifade edilir.

$$F = q_1 \cdot q_2 / r^2 \epsilon \quad (2.1)$$

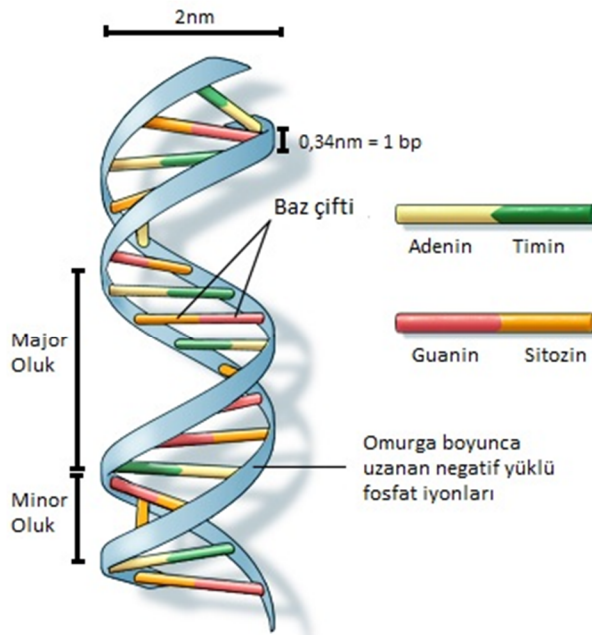
Burada q_1 ve q_2 atom veya atom gruplarının yükleri, r aralarındaki uzaklık, ϵ ise ortamın dielektrik sabitidir.

Elektrostatik kuvvet görüldüğü gibi ortamın dielektrik sabiti ile ters orantılıdır. Hidrofobik bir ortamda ortamın dielektrik sabitinin düşük olması nedeniyle etkileşim daha fazladır [31]. Bu etkileşim sonucunda aynı cins yüklü gruplar birbirlerini iterken, farklı cins gruplar birbirini çeker. Bu durum, yüklü gruplar içeren polimer zincirleri ve bu zincirlerden oluşmuş polielektrolit jeller için de geçerlidir. Jeli meydana getiren ağyapıdaki polimer zincirlerinin pozitif veya negatif yüklü grupları arasında itme kuvvetleri meydana gelir ve ağyapı genişleyerek jelin şişmesine neden olur.

4) Hidrojen Bağları: Hidrojen bağı en az bir molekülünde hidrojen atomu içeren iki kuvvetli polar molekül arasında meydana gelir ve bu moleküllerden birinin kısmi negatif ucu ile diğer molekülün kısmi pozitif ucu birbirine bağlar. Buna en tipik örnek hidrojen bağları ile birbirine bağlanmış su molekülleridir. Bir başka örnek de protein molekülleri arasındaki hidrojen bağlarıdır. Benzer şekilde bazı polimer ağyapıları içerisinde, zincirdeki yan gruplar nedeniyle meydana gelen hidrojen bağları hacim faz geçişine neden olmaktadır.

2.2 DNA Molekülünün Yapısı

DNA molekülünün yapısı, 1953 yılında James Watson ve Francis Crick tarafından açıklanmıştır. DNA molekülü, beş karbonlu bir şeker (deoksiriboz), fosfat grubu ve azotça zengin pürin (A: adenin, G:guanin) ve pirimidin (T: Timin, C:Sitozin) bazlarından oluşan polimerik bir nükleik asit makro molekülüdür.

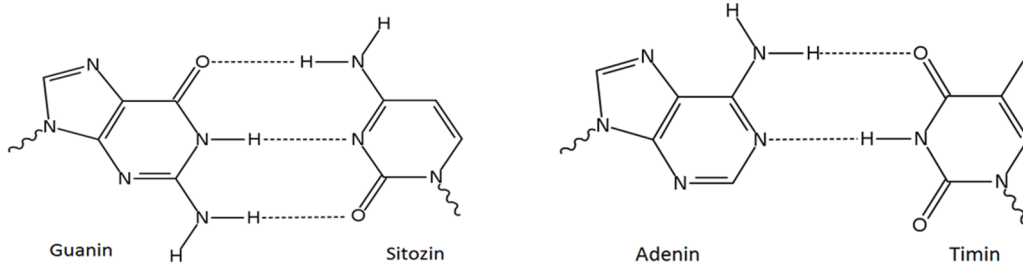


Şekil 2.2 : DNA çift sarmal yapısı [Url-1].

DNA molekülleri 5'ucundan 3' ucuna doğru şeker fosfat omurgasından oluşan iki zincirin birbiri eksenini etrafında birbirlerine anti paralel olarak sarılması ile meydana gelen çift sarmal yapıdadır. Bu yapıya “çifte sarmal (double heliks)” yapısı denir. Bir DNA zincirindeki adenin (A) nükleotidi (bazı) diğer zincirdeki timin (T) bazı ile guanin (G) bazı ise, diğer zincirdeki sitozin (C) bazı ile baz çifti oluşturur. Baz çiftleri hidrojen bağları ile bir arada tutulurlar.

DNA heliksinin en sık rastlanan şekli, klasik “B” şeklindedir [33, 34]. Burada zincirlerin hidrofilik deoksiriboz fosfat ana iskeleti molekülün dış kısmında bulunur. Hidrofobik bazlar ise içe doğru, heliks eksenine dik olarak yerleşmişlerdir. Heliksdeki bu yerleşim düzeni sarmallar arasında bir tane geniş (majör), bir tane de dar (minör) oluk ortaya çıkarır (Şekil 2. 2) [Url-1]. DNA molekülünün iki zinciri, pürin ve pirimidin bazları arasında yer alan hidrojen bağları tarafından bir arada tutulmaktadır. Çift zincirli helikste bazlar heliksin iç kısmında, fosfat ve şeker

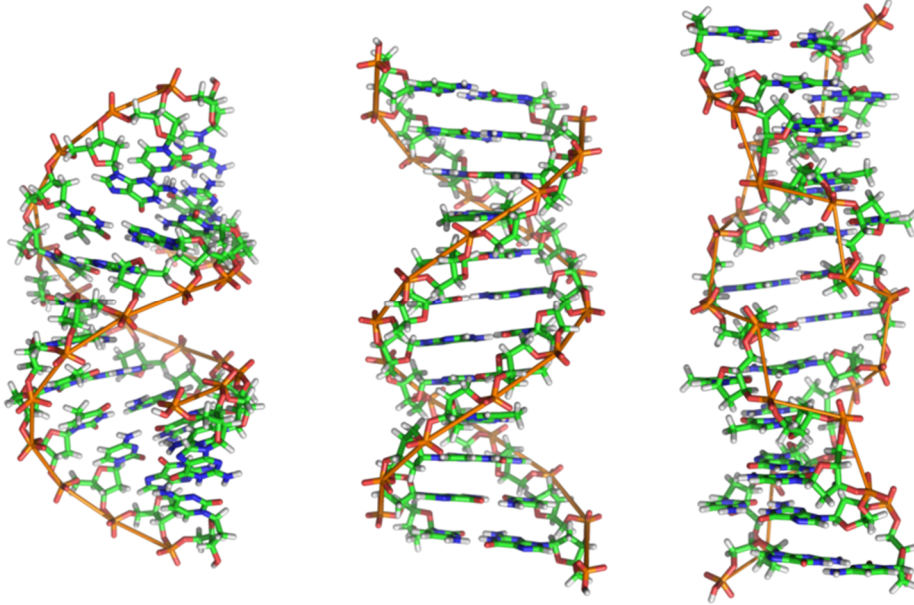
omurgası ise dış kısmında yer aldığı için heliksin iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliindedir. Pürin ve pirimidin nükleotitleri arasındaki eşleşmeler A karşısında T; G karşısında C bulunduğu için son derece spesifiktir. Bu nedenle çift heliks yapısında yer alan bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde; ikinci zincirdeki baz dizisi belirlenebilir [35]. DNA'nın içinde bulunduğu ortamın pH'sı değiştirilirse veya ortamın sıcaklığı artırılırsa bazlar arasındaki hidrojen bağları etkilenerek, çift sarmal yapı açılabilir. Şeker üniteleri arasındaki fosfodiester bağları ise hafif değişikliklerden etkilenmezler. Heliks yapısının yarısının açıldığı sıcaklığa, DNA'nın erime derecesi (melting temperature, T_m) denir. DNA zincirlerinin açılarak çift heliks yapısının tümüyle bozulmasına "denatürasyon" denir. Denatürasyon, DNA çözeltisinin 260 nm'de absorbansı ölçülerek izlenebilir. 260 nm dalga boyunda tek sarmal DNA (ss-DNA), çift sarmal DNA (ds-DNA)'ya göre 1,4 kat daha fazla absorbans verir [14]. G ve C arasında üç ($G \equiv C$); A ve T arasında iki ($A = T$) hidrojen bağı bulunduğundan (Şekil 2.3) yüksek konsantrasyonda G ve C taşıyan DNA, A ve T yönünden zengin DNA'ya göre daha yüksek sıcaklıkta denatüre olur. İlmli koşullarda birbirinden ayrılan DNA çift zinciri, koşullar düzeltilince tekrar eski haline dönüşebilir, bu işlem renatürasyon olarak isimlendirilir [33, 34, 36].



Şekil 2.3 : DNA çift sarmal yapısını oluşturan baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları.

DNA'nın başlıca üç değişik şekli vardır. A, B ve Z olarak adlandırılan DNA türlerinin çift sarmal yapılarında farklılıklar mevcuttur. Sağ el α heliks yapısına sahiptir. B şeklinin 360 derecelik her dönüşünde 10,4 baz çifti, heliks eksenine dik olarak sarmal yapısına katılır. Kromozomal DNA yapısının temel olarak B DNA yapısında olduğu düşünülmektedir. A şekli, B'nin ılımlı dehidratasyonu sonucu ortaya çıkar ve burada da heliks yapısı sağa doğru yönelmiştir. A şeklinin her bir dönüşünde 11 baz çifti yer alır. Ayrıca baz çiftlerinin düzlemleri heliks eksenine tam dik değildir. Sol el dönümlü heliks yapısında olan ve her dönüşünde 12 baz çifti

kapsayan Z DNA molekülü, DNA'nın özel bölgelerinde kendiliğinden ortaya çıkmakta ve gen ekspresyonunun kontrolünde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Doğal olarak normal DNA'nın bazı kısımlarında Z-DNA yapısı görülebilir. A-DNA, B-DNA molekülüne göre daha kısa ve kalın; Z-DNA ise B-DNA molekülüne göre daha ince ve uzundur (Şekil 2. 4) [34, 36-38].



Şekil 2.4 : DNA'nın soldan sağa doğru A,B ve Z yapısı [Url-2].

Genetik bilginin akışı DNA → RNA → Protein şeklinde gerçekleşir. Bu akış santral doğma olarak bilinir ve Retroviruslar hariç tüm canlılar için aynı mekanizma geçerlidir. Genetik bilgi DNA zinciri boyunca yer alan bazların diziliminde saklıdır. Buna genetik kod denir. DNA zincirinde ard arda gelen üç nükleotid bir kod oluşturur ve bu kod, proteindeki amino asit dizilerini belirler. DNA'nın yapısında dört nükleotidin yer alması ve bunlarda yan yana gelen üç tanesinin bir kod oluşturmasından dolayı, 4'un 3'ü kombinasyonuna göre 64 farklı kodon genetik kodu oluşturmaktadır.

2.3 DNA Hidrojelleri

DNA jelleri, çapraz bağlı DNA zincirlerinden oluşan suda şişmiş ağyapılardır. İlk kez Amiya ve Tanaka [15] tarafından yayınlanan DNA hidrojelleri, çifte sarmal yapıdaki DNA'nın TEMED katalizörlüğünde EGDE çapraz bağlayıcısı ile çapraz bağlanma reaksiyonlarına tabi tutularak elde edilmiştir [16-20]. Epoksi grupları nükleotidlerin baz gruplarındaki amino grupları ile reaksiyona girip çapraz

bağlanmayı sağlar ve üç boyutlu bir DNA ağı yapısı oluşur. Yüklü, yarı-esnek zincirlerden oluşan DNA hidrojenleri suyu absorplarken ağ yapısındaki çapraz bağlar nedeniyle çözünmezler. Amiya ve Tanaka tarafından yayınlanan DNA hidrojenlerinin jel sentezinin yanında aseton-su varlığında faz geçişleri ve şişme-büzülme davranışları incelenmiştir [15,27]. Daha sonra Costa tarafından DNA hidrojenlerinin şişme davranışları CsCl, NaCl, RbCl, LiCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, SrCl₂ gibi farklı ortamlarda incelenmeye devam edilmiştir [20,23-25,40]. DNA hidrojenleri, dıştan gelen uyarılara örneğin sulu çözeltideki aseton, inorganik tuz, poliamin, katyonik polimer, poli(etilen glikol), veya yüzey aktif madde miktarına bağlı olarak büyük hacim değişimleri gösterirler, yani uyarılara duyarlı hidrojel olarak göz önüne alınabilir [16]. Polimerik ağı yapısındaki iyonik grupların varlığından dolayı tipik polielektrolit jel davranışı göstermektedirler [16,21-24]. Bu hidrojenlerin; kontrollü ilaç salımı, doku mühendisliği ve biyomedikal kullanımları gibi geniş potansiyel uygulama alanları vardır.

Araştırma grubumuzda, DNA ağı yapısı zincirlerinin konformasyonu, hidrojenlerin viskoelastisite ve kuvvet altında sertleşme gibi çeşitli reolojik jel özellikleri sentez şartlarına bağlı olarak incelenmiştir [10,16,18].

Bunun yanı sıra grubumuz tarafından yapılan araştırmalar sonucu DNA çözeltilerinin çapraz bağlayıcı olmadan reometre plakaları arasında ısıtma soğutma çevrimlerine tabi tutulması ile fiziksel olarak çapraz bağlanabileceği de bilinmektedir [10,16]. Yarı seyreltik bir DNA çözeltisi erime noktasının üzerindeki bir sıcaklığa ısıtıldığı zaman çift sarmal yapısı bozulur ve esnek tek sarmallara ayrılır. Bu çözelti yavaş bir ve ardından oda sıcaklığına tekrar soğutulduğunda esnek tek sarmallar başlangıçtaki çift sarmal yapıyı oluşturacak şekilde organize olamazlar ve rastgele bölgelerden hidrojen bağları vasıtasıyla birbirlerine bağlanırlar. Elde edilen bu jellerin reometrik ölçümler sonucu MPa boyutlarında elastik modüle sahip ve kuvvet altında sertleşme (strain hardening) özelliği olduğu gösterilmiştir [10,16,25]. Ancak tüm bu çalışmalarda fiziksel DNA jelleri reometre plakaları arasında ve mikroskopik boyutlarda hazırlanmış olup makroskopik boyutlarda özellikleri, şişme davranışları incelenmemiştir [10]. Çalışmalara ek olarak laboratuvarımızda makrogözenekli DNA kriyojenleri de sentezlenmiş ve toksik maddelerin sulardan uzaklaştırılmasında sorbent olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [41].

2.4 Hidrojellerin Kullanım Alanları

Polimerik hidrojellerinin üstün özellikleri sonucu ileri teknoloji malzemesi olarak insan yaşamında geniş bir yer tutmakta olup uygulama alanları giderek genişlemektedir [42]. Günümüzde hidrojeller en çok süper absorban polimer (SAP) olarak çocuk bezi ve hijyenik ped yapımında kullanılmaktadır. Diğer yandan ziraatta toprakta su tutucu malzeme olarak, oral ve transdermal kontrollü salım sistemlerinde, kontakt lenslerde, yara örtülerinde, harekete geçiricilerde (actuator), biyosensörlerde, yapay organların yapımında da uygulama alanı giderek genişlemektedir [43,44]. Ayrıca hidrojeller biyolojik algılamalarda, ilaç salımında ve doku dejenerasyonunda kullanılmaktadır. Çünkü:

- Hidrojeller moleküler düzeyde biyolojik etkileşimler için uygun yarı ıslak 3-D ortamı sağlamaktadırlar.
- Bir çok hidrojel proteinlerin spesifik olmayan adsorbsiyonlarını önleyen (anti fouling özelliği) inert yüzey oluşturmaktadır.
- Biyolojik moleküller hidrojellerin yapısına kovalent olarak dahil olabilmektedirler.
- Hidrojellerin mekanik özellikleri ayarlanabilir.
- Hidrojeller, hedefe yapılan harici uygulamalar ile (sıcaklık, elektrik/manyetik alan, ışık ya da küçük (biyo)moleküller gibi) cevap özelliklerini (şişme/büzülme ya da çözelti-jel dönüşümü) değiştirecek tasarımların uygulanmasına olanak sağlamaktadır [45,46].

Hidrojeller temel yapılarını korurken büyük miktarlardaki su ya da biyolojik sıvıyı içerilerine çekebilme özelliğine sahiptirler ve çevredeki uyarana bağlı olarak jel yapısını değiştirmesi ile ilaç salımını kontrol edebilmektedir. Isıya duyarlı hidrojeller çevreleyen sıvının sıcaklığının değişimine göre şişme ya da büzülme özelliğinden dolayı farmasötik alanda önemli bir düzeyde dikkat çekmektedir.

Mükemmel doku uyumu, kullanım kolaylığı ve çözünen geçirgenliği özellikleri ile ilaç salımı sistemlerinin geliştirilmesine büyük katkı sağlamaktadır.

2.5 İlaç Salımı

İlaç salım sistemleri kimyasal bir uyarıya cevap olarak ilacın serbest bırakıldığı sistemlerdir. Hidrojellerin pH, sıcaklık gibi değişimlerle şişip büzülmesinden ilaç salımında çok yararlanır. Örnek olarak artan glikoz konsantrasyonuna bağlı olarak insülin salımı verilebilir. Yapılan bir çalışmada pH'a duyarlı polimer, poli(N,N-dimetilamino) etilmetakrilat-ko-etilakrilamid, glikoz oksidaz, bovin serum albümin ve insülin ile mekanik olarak karıştırılarak insülin dolu bir matris elde edilmiştir. Ortama glikoz verildiğinde glikoz oksidaz aktivitesi ile glukonik asit oluşması pH'ı düşürmüştür, protonasyon polimerin şişmesini ve insülinin ortama yayılmasını sağlamıştır. Ortamdaki glikoz bittiğinde, insülin salımı da 10 dakikada durmuş, tekrar glikoz eklendiğinde yeniden uyarılma sağlanmıştır [46,47].

İlaç salımında polimerlerin kullanılmasıyla kontrollü ilaç salım sistemleri sağlanmıştır.

2.5.1 Kontrollü ilaç salım sistemleri

Çeşitli ilaçların polimerik taşıyıcılar ile birlikte kullanılması denemelerine 1950'lerde tarım ilaçları ile başlanmıştır. 1960'ların ortalarında bu denemeler tıp alanına da girmiştir. İlk çalışmalarda etken madde diyaliz tüpü [46,48] veya silikon kauçuk tüp [46,49] içine konmuş veya bir polietilen matris içinde homojen olarak dağıtılmıştır [46,50]. 1970'lerde çalışmalar büyük moleküllü ($m_A > 600$) ilaçların katı polimerlerden sürekli ve kontrollü bir şekilde salımını sağlayacak şekilde gelişmiştir. Bu yaklaşımlardan, özellikle etilen-vinil asetat kopolimerleri ve değişik hidrojellerin kullanıldığı sistemler çok başarılı olmuştur [46,51]. Son yıllarda polimer-ilaç sistemlerinin çeşitli uygulamaları tasarlanmıştır. İlaçlar, polimerlerin taşıyıcı olarak kullanıldığı sistemlerle çok uzun süreler boyunca (bazı durumlarda bir yıldan fazla) sürekli ve kontrollü olarak salınabilmektedir.

2.5.2 Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılan Doğal Polimerler

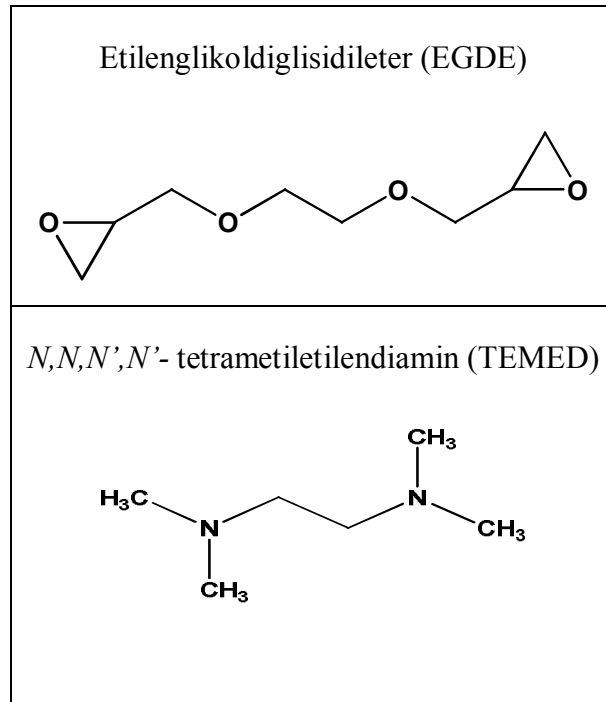
Kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanılan en yaygın materyaller, doğal ve sentetik polimerlerdir. Doğal polimerlerin sentetik polimerlere göre doğal ürün olmaları, hazır bulunmaları, pahalı olmamaları gibi avantajları vardır. Doğal polimerlerin ilaç

salım sistemlerinde matris olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar, proteinler (kollojen, jelâtin ve albümin), polisakkaritler (nişasta, dekstran, inulin, selüloz, aljinik asit) üzerine yoğunlaşmıştır [46,52].

3. DENEYSEL KISIM

3.1 Malzemeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan deoksiribonükleik asit (DNA, Sigma) somon balığından izole edilmiş olup G-C içeriği % 41,2, erime sıcaklığı 87,5°C, ve molekül ağırlığı $1,3 \times 10^6$ g/mol yani yaklaşık 2000 baz çiftidir. Çapraz bağlayıcı olarak etilenglikoldiglisidileter (EGDE, mol kütlesi 174,2 g/mol, Polysciences), hızlandırıcı olarak *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin (TEMED, Merck, mol ağırlığı 116,21g/mol), şişme ve elastisite testleri için saf su ve sodyum bromür (NaBr, Merck) kullanılmıştır. Kullanılan kimyasal malzemelerin kimyasal formülleri Şekil 3.1 de verilmiştir.



Şekil 3.1 : DNA hidrojel sentezinde kullanılan kimyasal maddeler

3.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Hassas Terazi: 205 g ağırlık kapasitesine sahip 0,0001 grama duyarlı Sartorius model elektronik terazi kullanılmıştır.

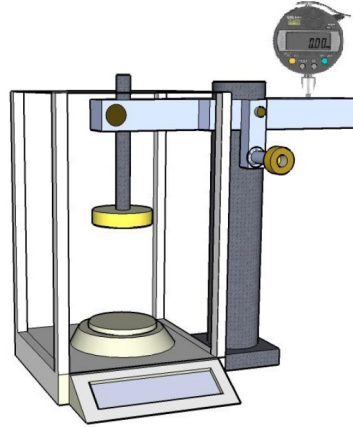
Hassas Sıcaklık Ayarlı Etüv: 1°C'ye duyarlı 0-250 °C arasında çalışan Nüve EV 018 marka etüv kullanılmıştır.

Plastik Şırınga: Jelleşme reaksiyonları için iç çapı 4,5-5 mm olan plastik şırıngalar kullanılmıştır.

Dijital Kumpas: Silindirik jel örneklerinin çaplarını ölçmede 0,02 mm'ye duyarlı 0-150 mm ölçüm aralığına sahip Mitutoyo marka Absolute Digimatic 500 model dijital kumpas kullanılmıştır.

Dondurmalı Kurutucu (Freeze-Dryer): Elde edilen jellerin ATR-FTIR spektrumlarını alabilmek için Christ marka Alpha 2-4 LD Plus model kurutucu ile vakumda kurutulmuştur.

Elastik Modül Cihazı: Hidrojellerin sentez sonrası, şişmiş ve vakum altında kurutulmuş durumdaki modülleri Şekil 3.2'de şematik olarak gösterilen grubumuz tarafından geliştirilen elastik modül cihazı yardımı ile ölçülmüştür.



Şekil 3.2 : Elastik modül cihazının şematik görünümü.

Reometre Cihazı: Fiziksel çapraz bağlı hidrojellerin ısıtma soğutma çevrimiyle oluşumunu sağlamak ve oluşum esnasındaki modül değerlerini ölçmek amacıyla Şekil 3.3' de şematik olarak gösterilen Bohlin Gemini 150 reometre cihazı kullanılmıştır.



Şekil 3.3 : Reometre cihazı (solda), PC ekranı (ortada) ve kompresör (sağda).

UV-Visible Spektrofotometre: DNA jelinin karakterizasyonunu yapmak ve salımını izleyebilmek için Şekil 3.4' de gösterilen T80 UV-visible spektrofotometresi kullanılmıştır



Şekil 3.4 : T80 UV-görünür spektrofotometre cihazı.

ATR-FTIR Spektrofotometre Cihazı: DNA hidrojjellerinin kuru ve sentez sonrası durumlarının kimyasal yapılarının tayini için Nicolet Nexus 6700 ATR-FTIR spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Desikatör: Jellerden çözücünün uzaklaştırılması için kullanılmıştır.

3.3 DNA Hidrojellerinin Sentezi

Denemelerde kullanılmak üzere fiziksel ve kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojelleri aşağıda anlatıldığı üzere iki tip olarak sentezlenmiştir.

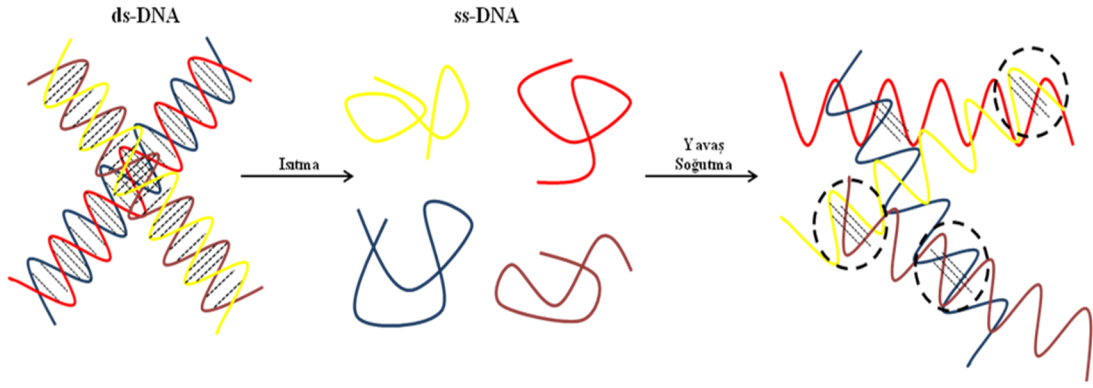
3.3.1 Fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojellerinin sentezi

Fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojelleri saf DNA'nın ısıtma soğutma prosesine tabi tutularak sentezlenmiştir. Çözücü olarak 4 mM NaBr kullanılmıştır. Denemelerdeki hidrojeller 2000 baz çiftinden oluşan % 5' lik DNA çözeltilerinden başlanarak hazırlanmıştır. 2000 baz çiftinden oluşan bir DNA için kritik örtüşme konsantrasyonu $c^* = \% 0,04'$ tür [10].

Tipik bir fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojel sentez yöntemi aşağıda verilmiştir:

Fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojel eldesi için yapılan bütün denemelerde DNA konsantrasyonu % 5 olarak sabit tutulmuştur. DNA ilk olarak 35 °C de 4,0 mM NaBr içerisinde 500 rpm de 1 gece karıştırılarak çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 4-5 mm çapındaki plastik şırıngalara çekilmiştir. Alüminyum folyo kaplanan şırıngalar sıcaklık kontrollü bir etüve yerleştirilmiş ve 25 °C' den 90 °C' ye dakikada 5 °C arttırılarak ısıtılmıştır, 90 °C de 30 dakika tutulmuştur ve ardından kapalı etüv içerisinde bir gece 25 °C ye kadar yavaş soğutmaya bırakılmıştır. Isıtma soğutma çevrimi ile bu şekilde elde edilen jellere aynı proses tekrar uygulandığında jellerin mekanik özelliklerinin değişmediği gözlemlenmiş ve bu nedenle deneylere tek çevrimli ısıtma soğutma işlemiyle devam edilmiştir. Çevrim sonrası şırıngalar kesilerek jel dışarıya alınmış, su ve/veya farklı konsantrasyonlardaki NaBr çözeltileri içerisinde bekletilmiştir.

Şekil 3.5' de ısıtma – soğutma çevrimi sonrası ds-DNA molekülünden hidrojen bağlarının yer değiştirmesiyle fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojel oluşum mekanizması görülmektedir. Yarı seyreltik bir DNA çözeltisi erime noktasının üzerindeki bir sıcaklığa ısıtıldığı zaman şekildeki gibi DNA'nın çift sarmal yapısı bozulur ve esnek tek sarmallara ayrılır. Bu çözelti yavaş bir şekilde oda sıcaklığına tekrar soğutulduğunda esnek tek sarmallar başlangıçtaki çift sarmal yapıyı oluşturacak şekilde organize olamazlar ve rastgele bölgelerden hidrojen bağları vasıtasıyla birbirlerine bağlanırlar. Böylelikle zayıf bağlı üç boyutlu DNA ağyapısı oluşur. Ancak kritik örtüşme konsantrasyonunun altındaki konsantrasyonlarda yavaş soğutmaya jel yapısını oluşturamaz başlangıç formuna geri döner.



Şekil 3.5 : Isıtma – soğutma çevrimi sonrası ds-DNA molekülünden hidrojen bağlarının yer değiştirmesiyle fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojel oluşum mekanizması

3.3.2 Kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojellerinin sentezi

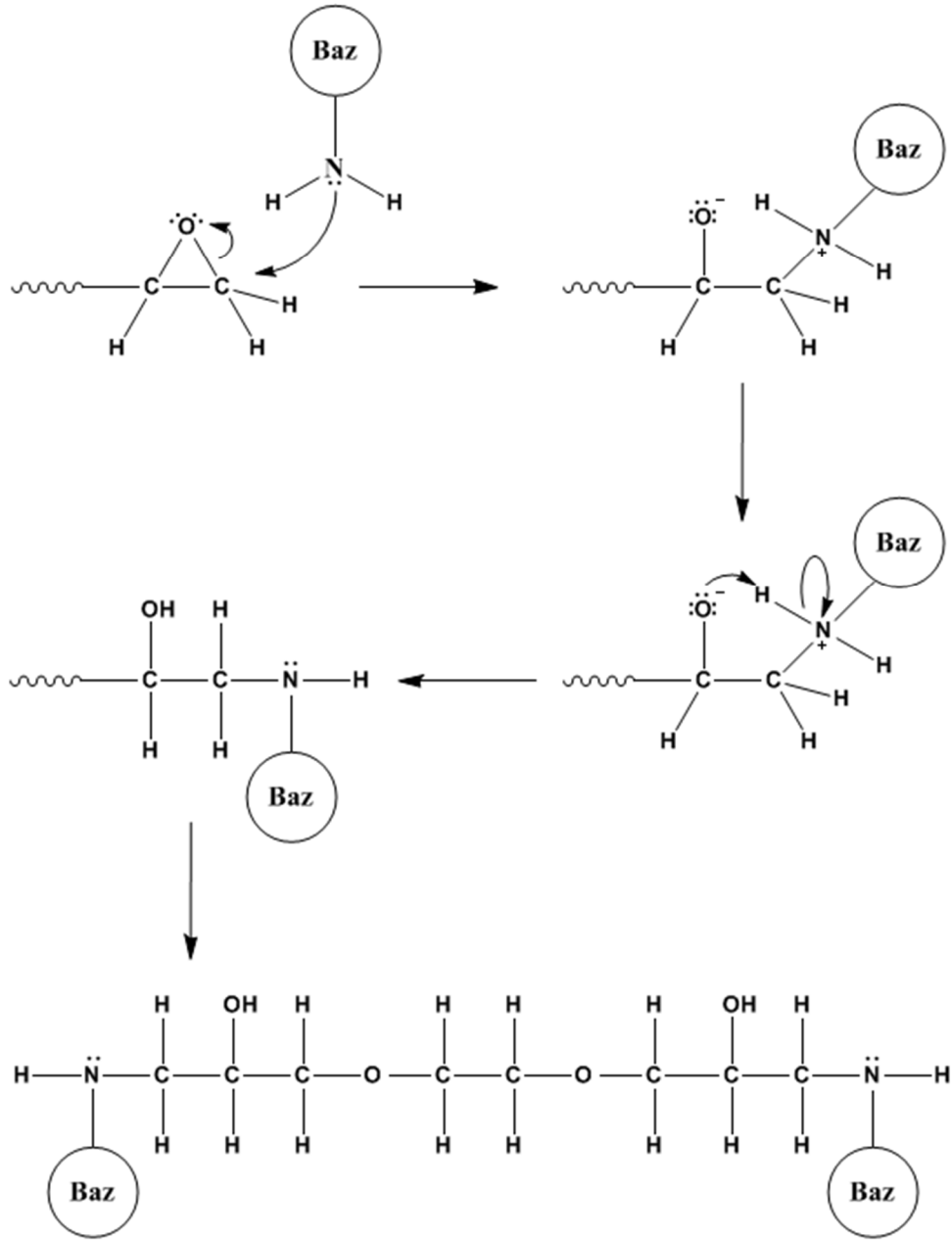
Denemelerde DNA'nın EGDE ile çapraz bağlanma reaksiyonları +50 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Çözücü olarak 4,0 mM NaBr kullanılmıştır. Hızlandırıcı olarak kullanılan TEMED miktarı tüm jel sentezlerinde hacimce % 0,44, DNA miktarı ağırlıkça % 9,3 iken, çapraz bağlayıcı oranı (saf çapraz bağlayıcı ağırlığı / DNA ağırlığı) % 9,6 olarak sabit tutulmuştur.

Çapraz bağlayıcı doğrudan kullanılırken, hızlandırıcı için ise stok çözeltiler hazırlanmıştır. 0,44 mL saf TEMED 20 mL 4,0 mM NaBr içinde çözülerek stok çözeltiler hazırlanmıştır. Tipik bir deneysel yöntem aşağıda verilmiştir:

DNA 4,0 mM NaBr çözeltisi içinde 1 gece 35 °C'de karıştırılarak çözülmüş ve ardından EGDE çapraz bağlayıcısı ilave edilerek 500 rpm de 1 saat daha karıştırılmıştır. Ardından TEMED ilave edilen çözelti 1-2 dakika karıştırılıp 4,5 mm çapındaki plastik şırıngalara çekilmiştir. Plastik şırıngalara aktarılan çözeltiler etüvde +50 °C'de 4 saat bekletilmiştir. Reaksiyon sonrası şırıngalar kesilerek jel dışarıya alınmış, su ve/veya farklı konsantrasyonlardaki NaBr çözeltileri içerisinde bekletilmiştir.

EGDE, DNA nükleotitindeki amino gruplarıyla reaksiyona girebilmektedir. Şekil 3.6'da nükleotitdeki amino grupları ile EGDE arasında çapraz bağlanma reaksiyonu görülmektedir. Epoksit molekülü gergin üç üyeli halkaya sahip olduğu için nükleofilik yer değiştirme tepkimelerinde çok etkindir. Epoksitlerin halka gerginliği nedeniyle halka açılmasına uğrarlar. Kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojel sentezi için denemelerde kullanılan EGDE'nin protein ve organik maddeleri çapraz bağladığı bilinmektedir [53]. DNA'nın nükleotitindeki guanin bazının amino

grubundaki azot, epoksiteki gergin karbona atak yaparak halka açılmasına sebep olur. S_N2 reaksiyonu ile yürüyen mekanizmada amino grupları nükleofil görevi görmektedir. Devam eden reaksiyon boyunca çapraz bağlanma reaksiyonları gerçekleşmektedir.



Şekil 3.6 : Nükleotitdeki amino grupları ile EGDE arasında çapraz bağlanma reaksiyonu.

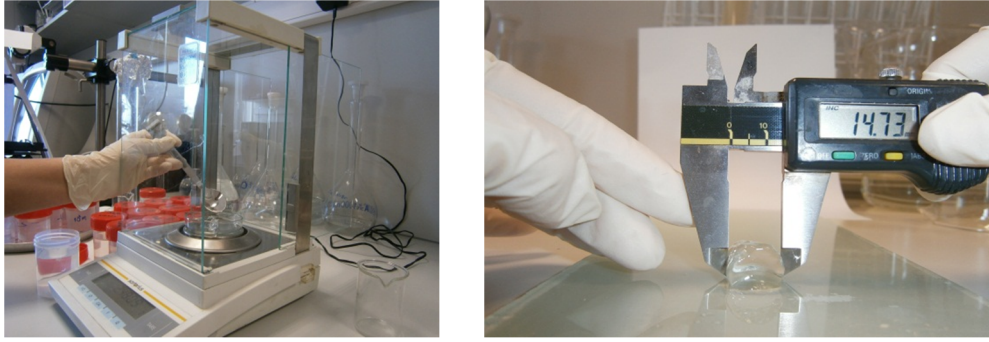
3.4 Jellerin Karakterizasyonu

3.4.1 Şişme Ölçümleri

Jellerin şişme ölçümleri hem volumetrik hem de gravimetrik olarak yapılmıştır. DNA jeller öncelikle yaklaşık olarak 5 mm uzunluğunda kesilmiştir. Her örnek 24 ± 1 °C’de NaBr çözeltisine veya suya atılmıştır. Volumetrik analiz için su veya sulu çözeltilerde yaklaşık 2 gün bekletilerek termodinamik şişme dengesine gelmiş olan jel örneklerinin çapları kumpas yardımıyla ölçülmüştür. Gravimetrik teknikte ise jel örnekleri terazi yardımıyla tartılmıştır. Şekil 3.7’de gravimetrik ve volumetrik şişme ölçümleri gösterilmektedir. Jellerin şişme dereceleri aşağıdaki şekillerde ifade edilmiştir:

Hacimce bağlı şişme oranı $V_{rel} = (\text{Şişmiş jel çapı} / \text{Sentez sonrası jel çapı})^3$

Ağırlıkça bağlı şişme oranı $m_{rel} = \text{Şişmiş jel ağırlığı} / \text{Sentez sonrası jel ağırlığı}$



Şekil 3.7 : Gravimetrik (solda) ve volumetrik (sağda) şişme ölçümleri.

3.4.2 UV-Visible Spektrofotometre

Şişme dengesine gelmiş DNA jellerinden salınan DNA miktarları UV ölçümleri yardımıyla hesaplanmıştır. Çözelti içerisindeki salınan DNA’nın konsantrasyonu T80 UV-visible spektrofotometre kullanılarak izlenmiştir. Hesaplamalar için 260 nm’de tanımladığımız molar sönüm katsayısı olarak $6900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ değeri kullanılmıştır.

3.4.3 Reolojik Ölçümler

Fiziksel DNA jelleri Bohlin Gemini 150 reometre cihazının paralel plakaları arasında hazırlanmıştır. Sistemin sıcaklığını kontrol etmek için Peltier sıcaklık ünitesi kullanılmıştır. Reaksiyonun başlangıcından önce cihazın üst plakası (çapı 40mm) alt plakaya olan uzaklığı 500 µm olarak ayarlanmıştır. Tüm reolojik ölçümler

sırasında buharlaşmayı minimize etmek için çözücü tuzağı kullanılmıştır. Buna ek olarak kapatılan plakanın dışı solventin uçmasını engellemek için düşük viskoziteye sahip silikon yağı ile kaplanmıştır. Salınım deformasyonunun lineer bölgede olmasını sağlamak için frekans $\omega = 6,28$ rad/s ve deformasyon genliği $Y_0 = 0,01$ olarak seçilmiştir. Isıtma-soğutma çevrimi daha önceki çalışmalarımızda tanımladığımız gibi 25 °C ile 90 °C arasında yapılmıştır [16]. Proses sırasında 25 °C’den 90 °C’ye ısıtmak için ısıtma hızı 3,25 °C/dak. seçilmiş, 90 °C’ye ulaşıldığında 10 dakika beklenilmiş daha sonra 1,08 °C/dak. soğutma hızıyla 25 °C’ye ulaşılmış ve son olarak 25 °C’de 40 dakika beklenilmiştir. Daha sonra, frekans tarama testleri $Y_0 = 0,01$ ’ de yapılmıştır.

3.4.4 Mekanik Ölçümler

Tüm ölçümler $24 \pm 0,5$ °C yapılmıştır. Yaklaşık 4-5 mm çapında ve 6 ± 1 mm uzunluğunda silindirik jel örneği dijital terazi üzerine konulmuş ve terazi sıfırlanmıştır (Şekil 3. 2). Ardından yüzeyi teflon kaplı bir piston yardımı ile jel üzerine bir kuvvet uygulanmıştır. Jel üzerine etki eden kuvvet teraziden okunan ağırlık (m) dan $F = m g$ denklemi yardımı ile hesaplanmıştır. ($g = 9,803$ m.s⁻²). Bu kuvvet sonucu olan jeldeki deformasyon Δl ($\Delta l = l_0 - l$, l_0 ve l sırası ile başlangıç ve deformasyon sonucu uzunluklarıdır) dijital komparatör yardımı ile ölçülmüştür. Kuvvet ve deformasyon 3 saniye gevşeme süresi sonunda kaydedilmiş ve ölçümler toplam deformasyon % 15-20 olana kadar sürdürülmüştür. Deformasyon oranı α (deforme uzunluk/ başlangıç uzunluk) $\alpha = 1 - \Delta l / l_0$ olarak hesaplanmıştır. Bu deformasyona karşılık gelen stress f ise $f = F / A$ denklemi ile hesaplanmıştır. ($A =$ jel örneğinin yüzey alanı $= \pi D_0^2$, $D_0 =$ jel örneğinin başlangıç yarıçapı). Stres (f) ile deformasyon oranı (λ) arasındaki

$$f = G(\lambda - \lambda^{-2}) \quad (3.1)$$

bağıntısından jellerin elastik modülü G hesaplanmıştır.

3.4.5 ATR – FTIR Ölçümleri

Fiziksel çapraz bağlı jelleri -86 °C’de 1 gün boyunca dondurma işlemine tabi tutulmuştur. Ardından -40 °C / 0,12 mbar da 1 gün, ek olarak -60 °C/0,01 mbar da bir gün tutularak malzemenin kurutulması sağlanmıştır. Kurutulmuş örneklerin spektrumları 500 - 4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ATR – FTIR (Nicolet Nexus 6700) kullanılarak alınmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Bu çalışmanın amacı, kolaylıkla DNA salımı yapabilen fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojellerini literatürden farklı olarak [10,16] makroskopik boyutlarda sentezlemek, özelliklerini inceleyerek bulguları kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojelleri ile karşılaştırmaktır. Fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojelleri; % 5 saf DNA çözeltilerinin ısıtma - soğutma çevrimlerine tabi tutulmasıyla elde edilmiş olup, aynı zamanda sonuçları karşılaştırmak amacıyla DNA'nın EGDE çapraz bağlayıcısı yardımıyla da kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojelleri elde edilmiştir. Sentezlenen jellerin su ve tuzlu çözeltilerde ağırlıkça ve hacimce şişme oranlarının yanısıra DNA salımı ve mekanik dayanıklılığı gibi özellikleri incelenmiştir.

Deneysel sonuçlar iki bölümde tartışılmıştır. Birinci bölümde ısıtma - soğutma çevrimi ile elde edilen fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojelleri karakterize edilirken çalışmanın ikinci bölümünde ise kimyasal çapraz bağlı DNA 50°C'de sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir.

4.1.1 Fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojelleri

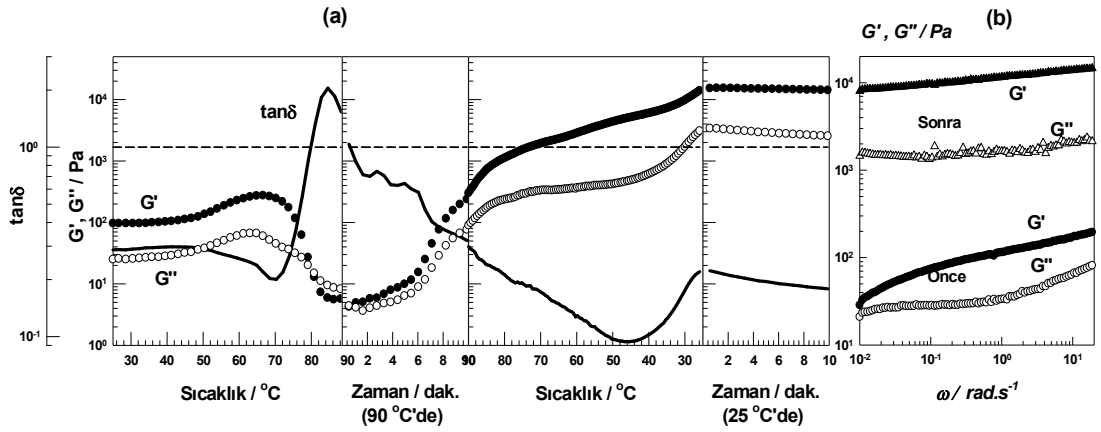
Fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojelleri hazırlarken herhangi bir çapraz bağlayıcı kullanılmamakta, sadece sulu DNA çözeltileri ısıtma - soğutma çevrimlerine tabi tutulmaktadır [10,16]. DNA'nın denatürasyon (erime) sıcaklığının üzerine, örneğin 90°C'ye ısıtılan çözeltideki çift sarmal DNA tek sarmal DNA ipliklerine ayrılırlar. Daha sonra çözeltinin çok yavaş olarak oda sıcaklığına soğutulması sırasında ise tek sarmallar birbirleri ile hidrojen bağları oluşturarak tekrar çift-sarmal bir konformasyona dönerler. Ancak bu işlem DNA'nın kritik örtüşme konsantrasyonu c^* 'in üzerinde yapıldığında (2000 baz çiftinden oluşan bir DNA için $c^* = \% 0,04$), hidrojen bağları farklı çift sarmallar arasında oluşarak çapraz bağ görevi görmekte ve bu şekilde hidrojeller elde edilmektedir. DNA'dan başka herhangi bir madde içermeyen bu tip hidrojeller, tüm DNA özelliklerini taşıması bakımından öne çıkmaktadır. Bu çalışmada elde edilen fiziksel jeller % 5'lik ds-DNA çözeltilerinden başlanarak 25 °C ve 90 °C arasında ısıtma – soğutma çevrimlerine tabi tutulup hazırlanmıştır. DNA çözeltilerinin ısıtma ve soğutma periyotları sırasındaki

viskoelastik davranışları reometre kullanılarak $\omega = 6,28$ rad/s frekansta ve $\gamma_0 = 0,01$ deformasyon genliğinde incelenmiştir.

Bir malzemenin enerjiyi elastik olarak saklayabilmesini temsil eden elastik modül (G') iken, malzemenin enerjiyi dağıtabilmesini viskoz modül (G'') temsil eder. Kayıp faktör ($\tan \delta$) bunların bir fonksiyonu olup viskoz modül / elastik modül (G'' / G') olarak tanımlanır. $\tan \delta$, elastik modülün viskoz modüle eşit olduğu noktada 1 değerini verip jelleşme noktasını ifade ederken 1' den büyük olduğu nokta da malzemenin viskoz davranışta olduğunu ve 1' den küçük olduğu noktada ise malzemenin elastik özelliğini gösterir. Şekil 4.1'de ısıtma ve soğutma çevrimleri sırasında çözeltiden ölçülen kayıp faktör $\tan \delta$, viskos modül G'' , elastik modül G' değerleri görülmektedir. Isıtma sırasında özellikle 70 °C'nin üzerine çıkıldığında çözeltinin dinamik modülünün hızlı bir şekilde düştüğü, buna karşılık kayıp faktörün $\tan \delta$ ' nin arttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç ds-DNA molekülü içerisindeki konformasyonel geçişlerin de ortaya çıktığına işaret eder. Ayrıca, 90 °C'den 25 °C'ye soğutma sırasında, dinamik modülün tekrar yükseldiği ve çok yüksek değerlere ulaştığı gözlemlenmiştir. Örneğin; G' ısıtma – soğutma çevriminden önceki değeri 0,1 kPa iken ısıtma – soğutma çevriminden sonra bu değer 15 kPa'a ulaşmıştır. Sonuçların tekrarlanabilir olduğu ayrı ayrı ölçümlerle desteklenmiştir.

Isıtma-soğutma periyotları sırasında DNA çözeltilerinin dinamik modülündeki büyük değişimler DNA moleküllerinin denatürasyonu ve ardından renatürasyonu ile ilgilidir. Bir DNA baz çiftinde iki sarmalı bir arada tutan hidrojen bağları ısıtma prosesinde kırılırlar ve buna bağlı olarak ds-DNA yapısı ss-DNA yapısına ayrışır. Şekil 4.1a'da görüldüğü üzere G' ve G'' değerlerinin 45 °C ve 70 °C aralığında hafifçe artmıştır. Bu artışın sebebi, yarı esnek ds-DNA molekülleri içerisinde ds-DNA'ya göre daha esnek ss-DNA'ların oluşması ve bunun sonucu yapıdaki bağlantı noktalarının artmasıdır. Ancak sıcaklık artışı devam ettirildiğinde DNA'nın yapısındaki denatürasyon hızlanır ve çifte sarmal yapı rastgele dolanmış iki ayrı sarmala ayrışır. Bu deneyde kullanılan 2000 baz çiftli ds-DNA'ya ait jirasyon yarıçapı su içerisinde 106 nm iken bu değer ss-DNA'da 20 nm dir [10]. Dolayısıyla, DNA molekülünün denatürasyonu sonucu $(106/20)^3 \approx 150$ kat molekül hacminde değişim (azalma) olmaktadır. Bu nedenle 80 °C'de jel-sol geçişlerine bağlı olarak her bir DNA molekülünün denatürasyondan sonra 150

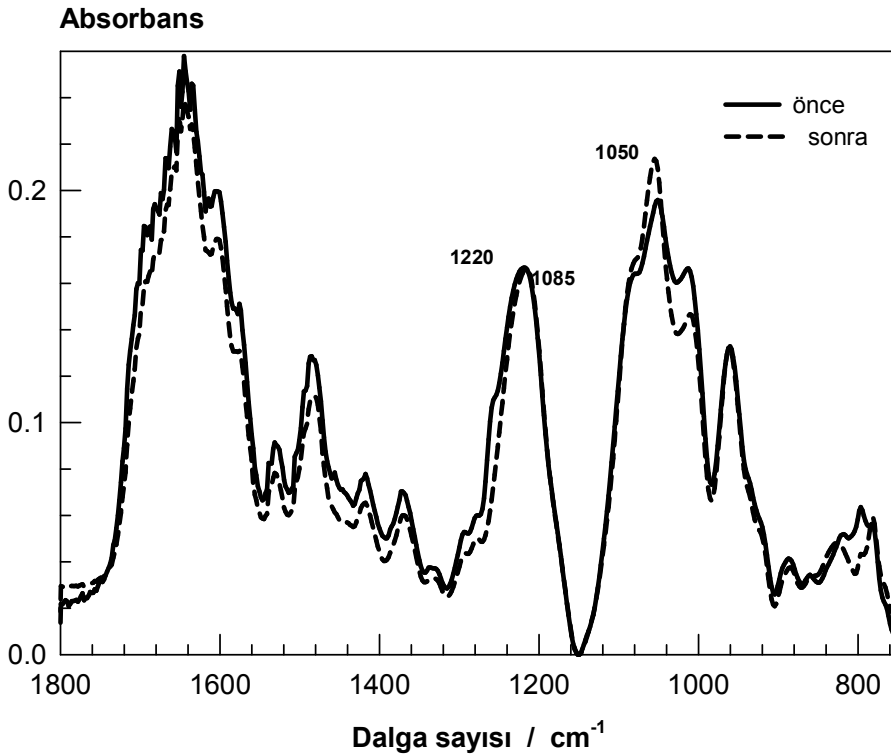
kat daha küçük hacim işgal edeceğinden $\tan \delta (G''/G')$ 'da artma gözlemlenmiştir. Bundan başka 25 °C'ye tekrar soğutma esnasında DNA'nın kritik örtüşme konsantrasyonun üstündeki renatürasyonuna bağlı olarak modüle artış gözlemlenmiştir. Farklı ds-DNA moleküllerine ait sarmallar arasında soğutma prosesi boyunca hidrojen bağları tekrar oluşmaktadır ve bu bağlar fiziksel çapraz bağlayıcı gibi davrandığı için elastik modül artmaktadır. Jelin son halinin çok yüksek elastik ve viskoz modüle sahip olması hareketli DNA kümelerinin varlığında zayıf bağlı üç boyutlu DNA yapısının oluşumunu ortaya koymaktadır. Şekil 4.1b 25 °C' de % 5' lik DNA çözeltisinin ısıtma-soğutma çevrimlerinden önceki ve sonraki mekanik spektralarını göstermektedir. Ölçümler sırasında deformasyon genliği $\gamma_0 = 0,01$ ve frekans aralığı $\omega = 0,063 - 130$ rad/s seçilmiştir. Başlangıç DNA çözeltisi frekansa bağlı olarak zayıf jel gibi davranmakta olup, düşük frekanslarda bu çözeltiye ait G' değerlerinin G'' değerlerine yaklaştığı grafik üzerinden takip edilebilmektedir. Isıtma-soğutma çevriminden sonra hem G' hem de G'' incelenen frekans aralığında frekanstan bağımsız olup, bu davranış düşük frekanslarda fiziksel DNA ağıyapılarındaki baskın viskoelastik relaksasyonlara ve DNA ağıyapısındaki relaksasyon zamanının uzun olduğuna işaret etmektedir. Bu tür reolojik davranışlar kuvvetli jellerin karakteristik özellikleriyle örtüşmektedir.



Şekil 4.1 : (a) %5 DNA çözeltisinin $\omega = 6,28$ rad/s'de yapılan ısıtma-soğutma çevrimi sırasında elastik modül G' (●), viskoz modül G'' (○) ve kayıp faktör $\tan\delta$ (çizgi)'nin sıcaklıkla değişimi. (b) Fiziksel jellerin ısıtma-soğutma çevrimi öncesi 25°C'de (küreler) ve sonrası (üçgenler) $\gamma_0 = 0,01$ 'de frekans taraması sonucu G' (●), G'' (○)'nin değişimi. Kesikli yatay çizgi (a) $\tan \delta= 1$ 'i temsil etmektedir.

Fiziksel jellerin içerdiği DNA sarmallarının konformasyonu ATR-FTIR ölçümleriyle incelenmiştir. DNA'nın ısıtma-soğutma çevriminden önceki ve sonraki ATR-FTIR spektrumları Şekil 4.2'de görülmektedir.

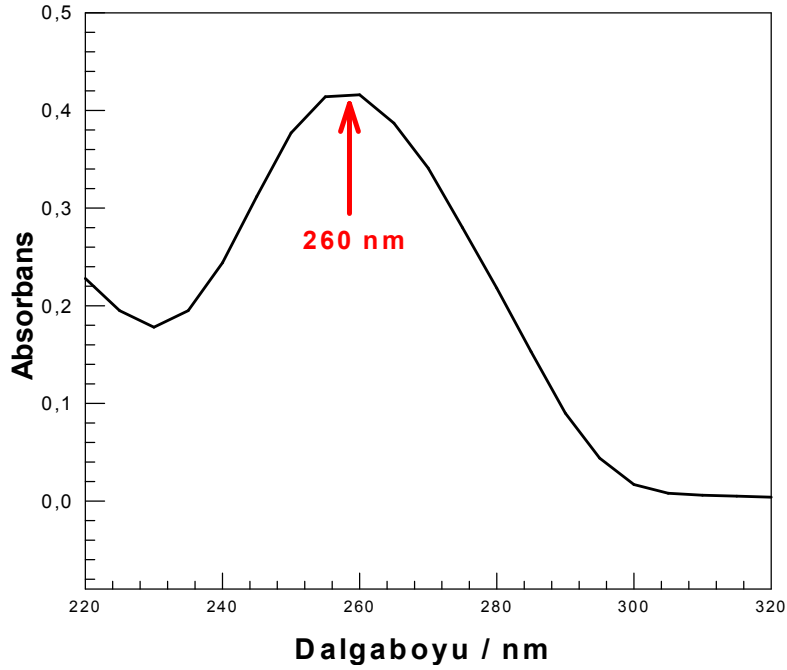
1220 cm^{-1} 'de gözükten pik DNA konformasyonun bilinen PO^{2-} ye ait antisimetrik gerilme titreşimi olup bu pik normalizasyon piki olarak kullanılmıştır. 1550-1750 cm^{-1} aralığındaki pikler baz çiftlerinin ve baz yığınlarının karakteristik pikleri olup jelleşme sonrasında herhangi bir değişikliğe uğramamıştır. Bu sebepten DNA konformasyonun ısıtma soğutma çevrimi sonunda eski halinde olduğu öngörülebilir. 1085 ve 1050 cm^{-1} 'deki pikler sırasıyla PO^{2-} 'nin simetrik gerilme titreşimi ve fosfodiesterin C-O uzama titreşimine ait olup DNA konformasyonunun karakteristik pikleridir. Literatürde rapor edildiği gibi bu piklerin intensitesi denatürasyon sırasında konformasyonel değişikliklere (DNA yapısının bozulmasına) bağlı olarak azalır. Piklerdeki intensitenin jelleşmeden sonra değişmeden kalması fiziksel jeldeki DNA sarmallarının ds-DNA konformasyonunda olduğunu desteklemektedir [54-56].



Şekil 4.2 : DNA'nın jelleşme öncesi ve sonrası ATR-FTIR spektrumu.

Şekil 4.3'de 26 mg/L konsantrasyonda bir saf DNA çözeltisinin UV-Visible spektrumu verilmiştir. Spektrumdan görüldüğü üzere ds-DNA'ya ait maksimum absorbans değeri 260 nm'de gözlemlenmiştir. Bu değer literatürdeki bilgilerle

uyumludur. DNA'nın yapısının aydınlatılması için yapılan çalışmalarda 260 nm'deki pik takip edilmiştir [11-13].



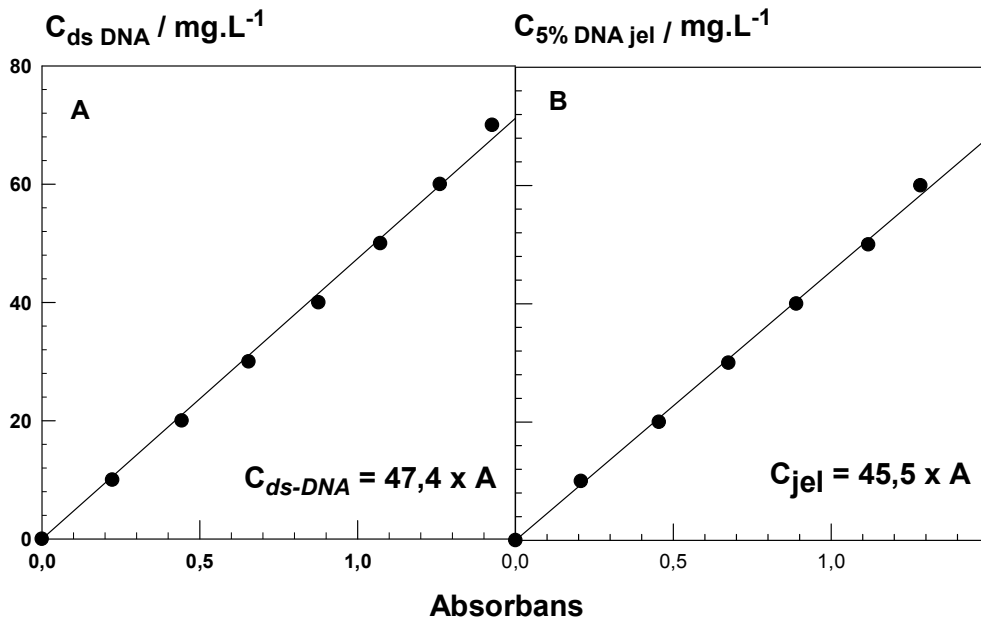
Şekil 4.3 : 26 mg/L saf DNA çözeltisinin UV görünür bölge spektrumu.

Isıtma soğutma çevriminden önceki ve sonraki DNA konformasyonunun değişip değişmediği DNA'nın 260 nm'deki molar sönüm katsayısı ϵ_{260} belirlenerek de test edilmiştir. 260 nm'deki molar sönüm katsayısının belirlenmesi için, saf DNA'nın ve fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojellerinin sulu çözeltileri farklı konsantrasyonlarda (10-65 mg DNA/L) hazırlanmış ve absorbans değerleri kaydedilmiştir. Daha sonra elde edilen verilerden konsantrasyon-absorbans grafiği çizilmiş ve eğimden molar sönüm katsayısı $M.L^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.4a'da başlangıç DNA çözeltilerine ait konsantrasyon-absorbans grafiği, şekil 4.4b'de ise jelleşmeden sonraki DNA hidrojelin sulu çözeltilerine ait konsantrasyon-absorbans grafiği görülmektedir. Her iki DNA çözeltisinden elde edilen sonuçlar Lambert – Beer yasası göz önünde bulundurularak

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (4.1)$$

(denklemden A, absorbans ϵ , molar sönüm katsayısı c, çözeltinin molar derişimi ve l, ışığın çözelti içinde kat ettiği yoldur.) incelendiğinde 260 nm de ki molar sönüm katsayısı (ϵ) jelleşmeden önce ve sonra sabit olup $6900 \pm 100 M^{-1}cm^{-1}$ olarak

bulunmuştur. Bu sonuçlar fiziksel jellerin esas olarak ds-DNA yapısında olduğuna işaret etmektedir. Literatüre göre DNA çözeltisinin 260 nm deki absorbansı DNA yapısının denatürasyonunun (ds-DNA'dan ss-DNA'ya dönüşümü) tamamlanması halinde aromatik halkaların molar sönüm katsayılarının değişimlerinden ötürü bu absorbans değerinin % 40 arttığı bilinmektedir [8]. Burdan yola çıkılarak ve şekil 4.4' teki doğruların eğimleri daha ayrıntılı olarak göz önünde bulundurularak yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojenlerin ds -DNA içeriği % 90 olarak bulunmuştur. Böylelikle bu jellerin ds-DNA yapısında olduğu

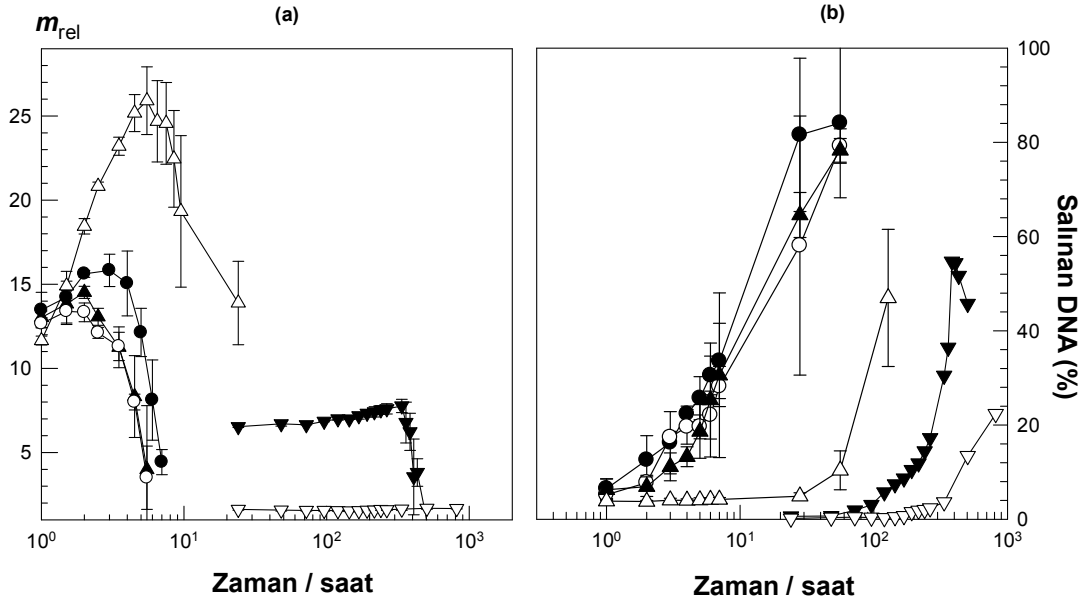


bir kez daha söylenebilir.

Şekil 4.4 : Saf DNA'nın sulu çözeltilerinin jelleşme öncesi (A) ve sonrası(B) absorbans değerlerinin konsantrasyonla değişimi.

Fiziksel jel örneklerinin şişme testleri 0 ve 10^{-1} M arasında 5 farklı konsantrasyonda hazırlanan NaBr çözeltilerinde yapılmıştır. Şekil 4.5a'da ağırlıkça şişme oranının m_{rel} zamana t karşı grafiği gözükmektedir. Kısa sürelerdeki m_{rel} değerlerindeki değişikliği daha anlamlı gösterebilmek için yarı logaritmik grafik tercih edilmiştir. 10^{-2} M NaBr konsantrasyonunun altındaki tuz çözeltilerinde m_{rel} ilk olarak artan şişme süresiyle birlikte artar ve sonra maksimum bir değere ulaşır ve tekrar düşer. UV-Vis ölçümlerine dayanarak m_{rel} de ki bu düşüşün sebebi jel bağlantı noktalarındaki DNA zincirlerinin ayrışması olarak bulunmuştur. Şekil 4.5b'de jel içerisindeki toplam DNA miktarının salımının NaBr çözeltileri içerisindeki şişme zamanına karşı grafiği çizilmiştir. Fiziksel jellerdeki çift sarmal DNA ların 0 – 10^{-4} M NaBr çözeltileri

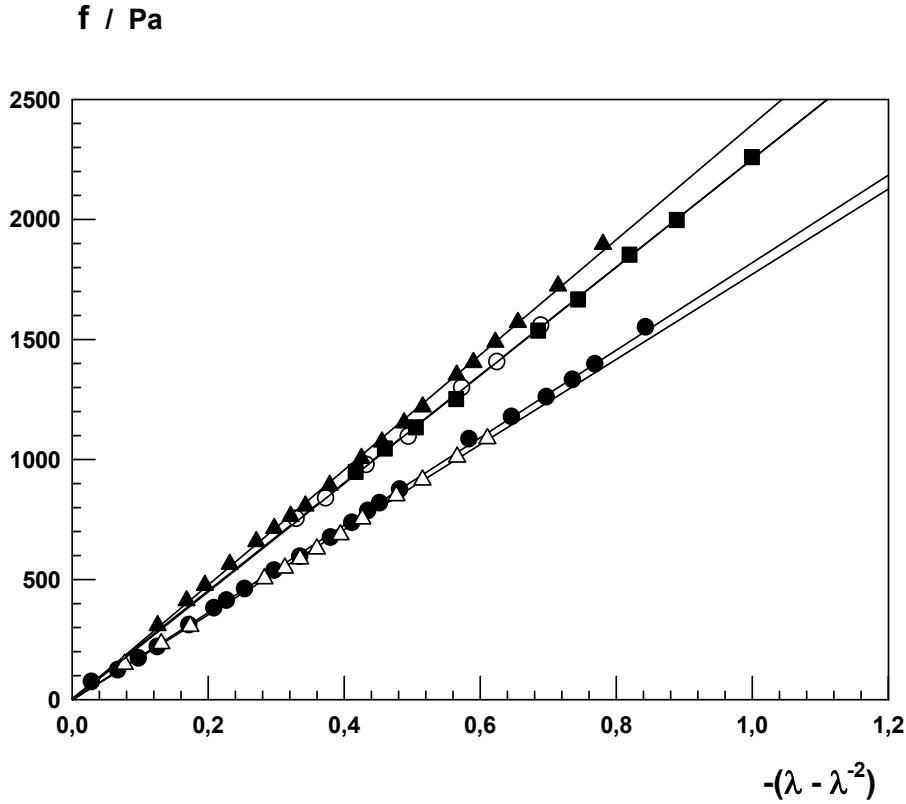
içerisinde bir günde % 80'inin salındığı gözlemlenirken daha yüksek tuz konsantrasyonlarında birkaç gün geçmesine rağmen daha az salının olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, seyreltik tuz çözeltilerinde jellerin şişmesi sırasında DNA sarmallarını bir arada tutan (fiziksel çapraz bağlı gibi davranan) hidrojen bağlarının zarar gördüğü anlamına gelmektedir. Bunun yanısıra, yüksek tuz konsantrasyonlarında çözeltilere daldırılan jellerin günler boyunca kararlı hallerini koruduğu görülmüştür. Örneğin; 10^{-2} M NaBr içerisindeki jel 16 gün kararlı iken 10^{-1} M NaBr içerisinde jel 42 gün kararlı halini korumuştur. Bu bağlamda sonuçlar salınan DNA miktarının ve salınma hızının çözeltilerin tuz konsantrasyonlarının değiştirilerek kontrol edilebileceğini göstermektedir. Ayrıca bu sonuçlar çapraz bağlayıcı kullanmadan hazırlanan fiziksel DNA jellerinin sıvı çözeltilerdeki DNA'nın kontrollü salımı için kullanılabilirliği öngörülmektedir.



Şekil 4.5 : Farklı konsantrasyonlardaki NaBr çözeltileri içerisinde zamana bağlı olarak jellerin ağırlıkça relatif şişme oranları (a) ve salınan DNA miktarları (b). C_{tuz} : 0 (●), 10^{-5} (○), 10^{-4} (▲), 10^{-3} (△), 10^{-2} (▼) ve 10^{-1} (▽).

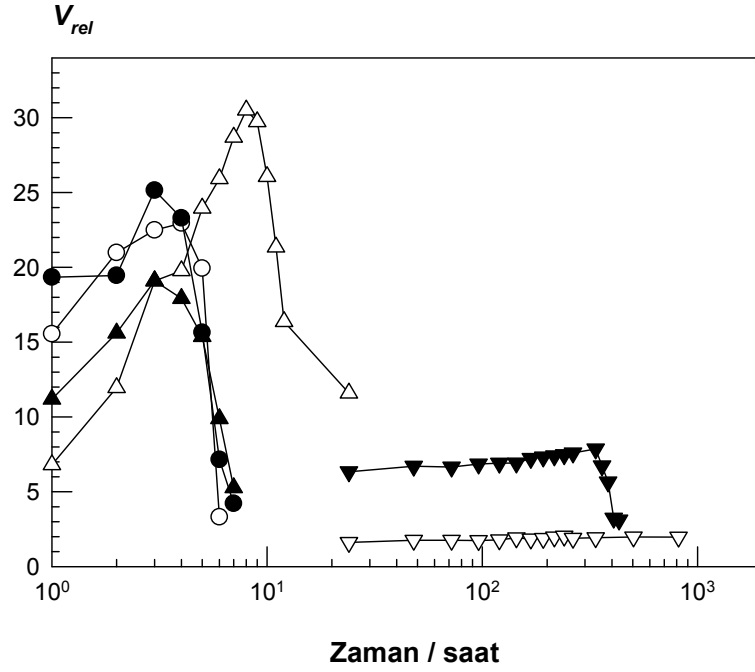
Fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojellerinin mekanik özellikleri tek-eksenli sıkıştırma testleri uygulanarak incelenmiştir. Jele etki eden kuvvete (f) bağlı olarak jeldeki deformasyon oranı takip edilmiştir [57]. Sıkıştırma testleri jel örneğinin yaklaşık % 20 deformasyonuna kadar devam ettirilmiştir. Şekil 4.6'da % 5 saf DNA kullanılarak elde edilmiş fiziksel DNA hidrojellerinin kuvvet – deformasyon grafikleri görülmektedir. Bu grafiğin eğiminden yararlanılarak fiziksel çapraz bağlı

DNA jeline ait sentez sonrası elastik modül değeri hesaplanmış ve $G_0 = 2098 \pm 281$ Pa olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6 : %5'lik saf DNA hidrojellerinin kuvvet altında deformasyon grafiği. Her eğri aynı örnek için farklı ölçümleri ifade etmektedir.

Fiziksel jel örneklerinin hacimce şişme testleri 0 ve 10^{-1} M NaBr arasında 5 farklı konsantrasyonda hazırlanan NaBr çözeltilerinde yapılmıştır. Şekil 4.7'de % 5 saf DNA hidrojelinin bağıl jel hacminin V_{rel} zamana t karşı grafiği görülmektedir. Yarı logaritmik grafik tercih edilmesinin sebebi V_{rel} değerlerindeki değişikliği daha anlamlı gösterebilmektir. 10^{-2} M NaBr konsantrasyonunun altındaki tuz çözeltilerinde V_{rel} ilk olarak artan şişme süresiyle birlikte artar ve sonra maksimum bir değere ulaşır ve tekrar düşer. Dolayısıyla jelin dayanım süresinin de azaldığı gözlemlenmiştir. V_{rel} 'de ki bu düşüşün sebebi jel bağlantı noktalarındaki DNA zincirlerinin ayrışmasıdır. Yüksek tuz konsantrasyonu içeren çözeltilerde ise dış ortamındaki yük yoğunluğunun (Na^+) giderek jelin ağ yapısındaki yük yoğunluğuna yaklaşması ters bir osmotik basınç etkisi yaratır. Bu “iyonik etki” ağ yapısı içerisindeki suyun jel dışına akmasına yani jelin büzülmesine neden olur denilebilir. Yani artan NaBr konsantrasyonu ile ağ yapısının korunduğunu ve dayanıklılığının daha uzun sürelerde olduğu söylenebilir.



Şekil 4.7 : Farklı konsantrasyonlardaki NaBr çözeltileri içerisinde zamana bağlı olarak jellerin hacimce relatif şişme oranlarının değişimi. C_{tuz} : 0 (●), 10⁻⁵ (○), 10⁻⁴ (▲), 10⁻³ (△), 10⁻² (▼) ve 10⁻¹ (▽).

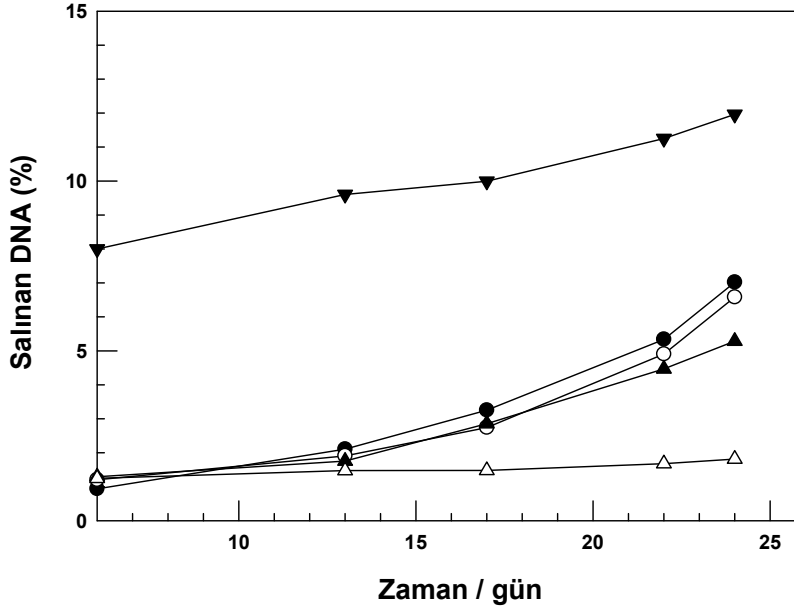
Sonuç olarak, % 5 DNA konsantrasyonlarında ısıtma - soğutma ile gerçekleştirilen fiziksel çapraz bağlanma reaksiyonları sonucunda DNA hidrojelleri sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Bu jellerin çok fazla şişebildiği ve zamana bağlı salımları gözlemlenmiştir. Uygun konsantrasyonlardaki tuz çözeltileri kullanılarak bu durumların kontrol edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Daha yüksek DNA konsantrasyonlarında, mekanik özellikleri daha iyi kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojelleri elde edilmiş ve takip eden bölümde bu konuda ulaşılan sonuçlar verilmiştir.

4.2 Kimyasal Çapraz Bağlı DNA Hidrojelleri

Yapılan deneysel çalışmalarda kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojelleri % 9,3 DNA ve % 9,6 çapraz bağlayıcı (EGDE) konsantrasyonlarında sentezlenmiştir. Jel sentezlerinde TEMED katalizörü kullanılmış (% 0,44) ve reaksiyon süresi 4 saat olarak sabit tutulmuştur. Belirtilen koşullarda hazırlanan jellerin elastik ve şişme özellikleri incelenmiş, DNA salımlarına bakılmıştır. Şekil 4.8'de farklı konsantrasyonlardaki NaBr çözeltileri içerisindeki DNA jellerinden salınan DNA miktarının zamana karşı grafiği çizilmiştir. NaBr konsantrasyonunun artması ile

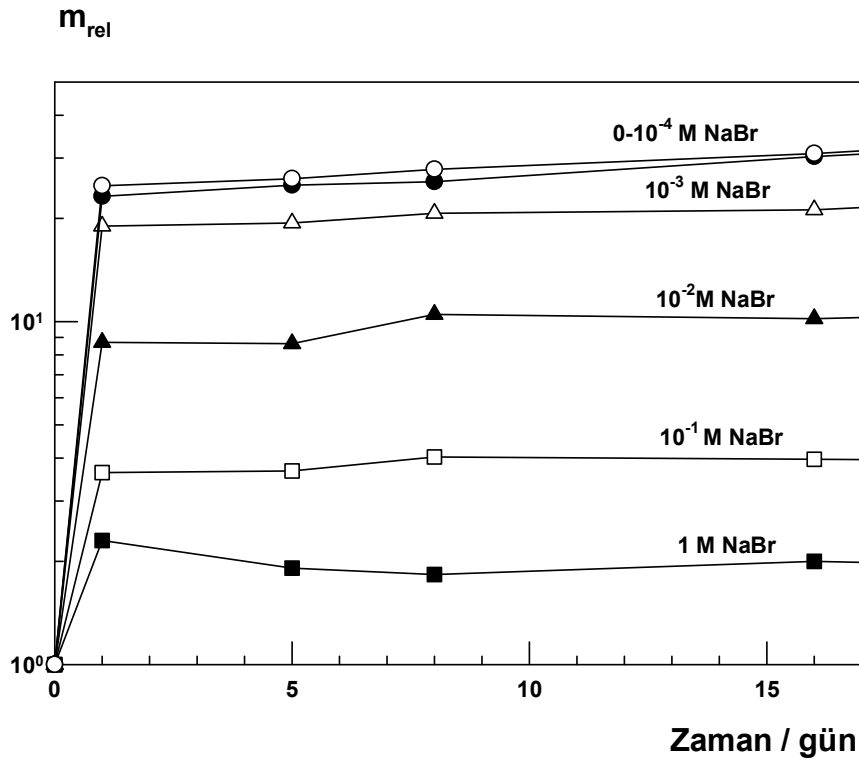
salınan miktarın azaldığı görülmüştür. Örneğin 10^{-5} M tuz konsantrasyonu içerisinde salınan miktar 24 günün sonunda % 6 iken bu değer 10^{-3} M'lık tuz çözeltisi için % 2 ve su için % 7 seviyesindedir. Aynı şartlarda 10^{-5} M tuz çözeltisi içerisindeki fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojelleri için salınan miktar, 2 günlük kısa bir süre içerisinde yaklaşık % 80 gibi yüksek bir değere ulaşmıştır (bkz Şekil 5b). Fiziksel çapraz bağlı DNA hidrojellerle kıyaslandığında, kimyasal bağlı hidrojellerin salımlarının uzun



Şekil 4.8 : Farklı konsantrasyonlardaki NaBr çözeltileri içerisinde zamana bağlı olarak jellerin salınan DNA miktarları. C_{tuz} : 0 (●), 10^{-5} (○), 10^{-4} (▲), 10^{-3} (△), 10^{-2} (▼). Sentez şartları: DNA = % 9,3. EGDE = % 9,6. TEMED = % 0,44.

Kimyasal çapraz bağlı jel örneklerinin zamana bağlı şişme testleri 0 ve 10^0 M arasında 6 farklı konsantrasyonda hazırlanan NaBr çözeltilerinde yapılmıştır. Şekil 4.9'da ağırlıkça şişme oranının m_{rel} zamana t karşı grafiği yani şişme kinetiği gözükmemektedir. Jeller NaBr konsantrasyonuna bağlı olmaksızın 2 günde dengeye ulaşmakta ve yaklaşık 20 gün çözünmeden kalabilmektedirler. Farklı NaBr konsantrasyonlarındaki şişme oranları irdelendiğinde birinci gün içerisinde bir artışın olduğu gözlemlenmiş ve daha sonra şişme oranlarının sabit kaldığı görülmüştür. Ayrıca tuz konsantrasyonu arttıkça jellerdeki şişme oranları da azalmıştır. Bu durumu bir büzülme kabul edersek ve bunun nedenini şişme davranışına bakarak açıklayacak olursak; DNA jellerinin su içerisindeki şişme davranışları incelendiğinde, jel ağyapısı üzerindeki yük yoğunluğunun dış çözeltideki (saf su) yük

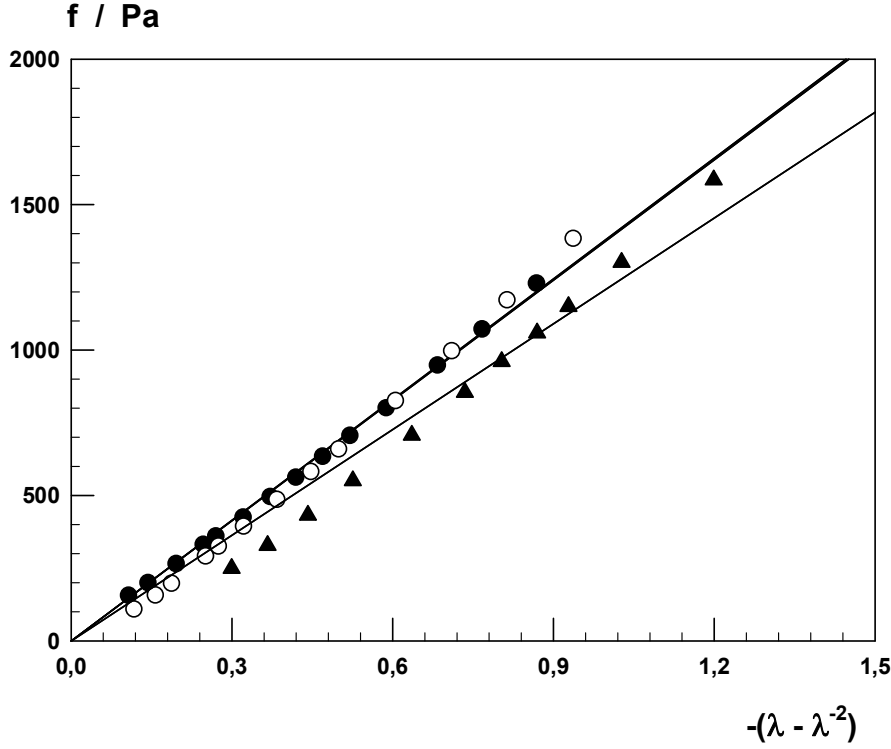
yoğunluğundan fazla olması nedeniyle ortamdaki su molekülleri osmotik basınç etkisiyle jele akar ve jel şişer. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan NaBr çözeltilerine daldırılan jellerde, dış ortamındaki yük yoğunluğunun (Na^+) giderek jelin ağı yapısındaki yük yoğunluğuna yaklaşması ters bir osmotik basınç etkisi yaratır ve bu durum ağı yapısı içerisindeki suyun jel dışına akmasına yani jelin büzülmesine yol açar diyebiliriz. Bu sonuç, DNA hidrojellerinin tipik bir iyonik hidrojel olduğunu ortaya koymaktadır. Kimyasal çapraz bağlı jelleri fiziksel çapraz bağlı jellerle kıyasladığımızda, kimyasal çapraz bağlı hidrojellerin düşük konsantrasyonlardaki tuz çözeltileri içerisinde dahi yapısını muhafaza ettiği ve kararlılığını sürdürdüğü görülmüştür. Bunun nedeni yapısında bulunan ve kovalent olan kimyasal çapraz bağlardır.



Şekil 4.9 : Farklı konsantrasyonlardaki NaBr çözeltileri içerisinde zamana bağlı olarak kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojellerinin ağırlıkça relatif şişme oranlarının değişimi. Sentez şartları: DNA = % 9,3. EGDE = % 9,6. TEMED = % 0,44.

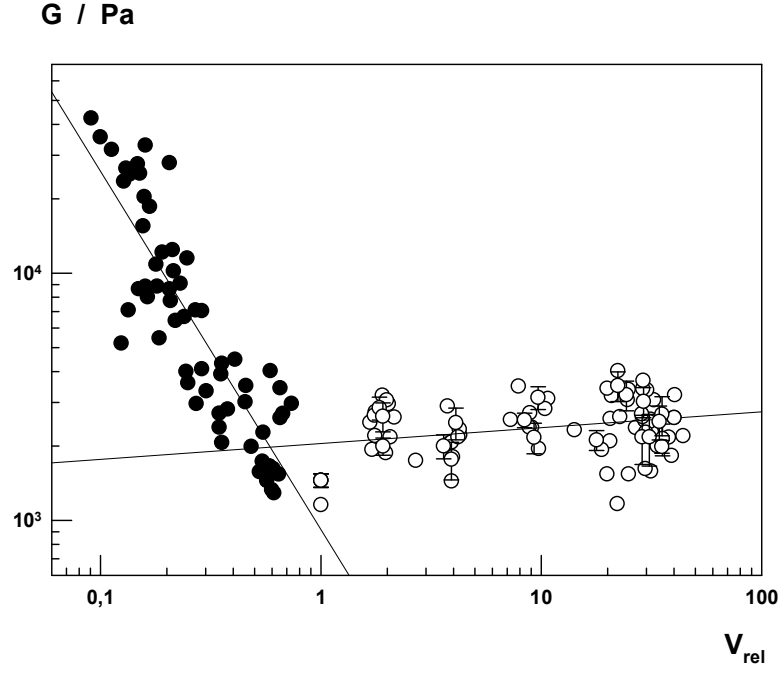
Kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojellerinin mekanik özellikleri tek-eksenli sıkıştırma test cihazı kullanılarak incelenmiştir. Jele etki eden kuvvete (f) bağlı olarak jeldeki deformasyon oranı takip edilmiştir [57] Sıkıştırma testleri jel örneğinin yaklaşık % 20 deformasyonuna kadar devam ettirilmiştir. Şekil 4.10'da % 9,3 DNA, % 9,6 EGDE ve % 0,44 TEMED kullanılarak 50°C'de elde edilmiş kimyasal çapraz bağlı

DNA hidrojjellerinin kuvvet - deformasyon grafikleri görülmektedir. Bu grafiğin eğiminden yararlanılarak kimyasal çapraz bağlı DNA jeline ait sentez sonrası elastik modül değeri hesaplanmış ve $G_0 = 1497 \pm 67$ Pa olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10 : Kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojjellerinin kuvvet altında deformasyon grafiği. Sentez şartları: DNA = % 9,3. EGDE = %9,6. TEMED = %0,44.

Farklı NaBr konsantrasyonları içerisinde farklı şişme oranlarına sahip jellerin elastik modülleri şekil 4.11’de gösterilmektedir. Grafikten de anlaşılacağı üzere şişme oranlarının artması durumunda yani V_{rel} (hacimce relatif şişme oranı) değerinin 1’den büyük olduğu durumlarda elastik modül değeri az da olsa artmakla beraber çok fazla değişime uğramamaktadır. Aksi durumda, yani sentezlenen jelin desikatör içerisinde 15 dakikalık vakum periyotları uygulandıktan sonra kapalı sistemde 1 saat bekletilmesi ve dengeye gelmesinin ardından jellerin çapları ölçülerek hesaplanan V_{rel} değerinin 1’den küçük olduğu bölgede ise, elastik modül değerlerinin diğer bölgeye nazaran daha büyük değişimlerle arttığı ve bu artışın vakum periyotları devam ettirildiğinde de aynı şekilde artarak devam ettiği söylenilebilir. Bunun sebebi jellerdeki suyun uzaklaştırılması sonucunda kuruyan malzemenin daha dayanıklı bir duruma gelmesidir.



Şekil 4.11 : Farklı şişme oranlarındaki kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojellerinin elastik modül değerlerinin (G) değişimi. Sentez şartları: DNA = % 9,3. EGDE = %9,6. TEMED = %0,44.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, ds-DNA çözeltilerinden yola çıkarak fiziksel ve kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojelleri makroskopik boyutlarda elde edilmiştir. Fiziksel çapraz bağlı DNA jelleri %5'lik DNA çözeltilerinin, DNA'nın erime noktasının üzerindeki sıcaklıklara ısıtılması ve daha sonra yavaş bir şekilde oda sıcaklığına soğutulması ile elde edilmiştir. Kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojelleri ise DNA'nın EGDE çapraz bağlayıcısı yardımıyla çapraz bağlanma reaksiyonları sonucu elde edilmiştir. Elde edilen fiziksel ve kimyasal çapraz bağlı DNA hidrojellerinin farklı tuz konsantrasyonlarında şişme ve salım davranışları incelenmiş, mekanik ölçümleri yapılmıştır. Bu jellerin elastik modül değerlerinin birbirine çok yakın ve 1,5-2 kPa civarında olduğu bulunmuştur. Kimyasal çapraz bağlı jellerin uzun süreler sonunda dahi salımlarının ancak % 0 - 20 oranında değiştiği, buna karşılık fiziksel çapraz bağlı jellerin su ve sulu çözeltilerin içerisinde şişmesi sırasında fiziksel çapraz bağların zarar görmesinden ötürü kararlı olmadığı, çok fazla şişebildiği ve kısa sürelerde % 80'lere varan DNA salımının gerçekleştiği görülmüştür. Yani çapraz bağlayıcı kullanılmadan elde edilen jellerin kimyasal çapraz bağlı jellerin aksine su ortamında dayanıksız olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak fiziksel jellerden salınan DNA miktarının ve salınma hızının NaBr konsantrasyonu değiştirilerek kontrol edilebileceği tespit edilmiştir. Bu yolla jelden salınan ds-DNA moleküllerinin miktarının saatler mertebesinden günler mertebesine arttırılabildiği gösterilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde, fiziksel çapraz bağlı jellerin sulu ortamda kontrollü DNA salımında kullanılabileceği ve kontrollü ilaç salım sistemlerine uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] **Tanaka, T.** (1981). Gels, *Sci. Am.*, **244**-110.
- [2] **Okay O.** (2011). *J. Polym. Sci. Part B. Polym. Phys.*, **49**, **551**.
- [3] **Um, S., H., Lee, J. B., Park, N., Kwon, S., Umbach, Y. C., Luo, D.** (2006). *Nature Materials*, **5**, 797-801.
- [4] **Flory, P. J.** (1974). *Discuss Faraday Soc.*, **56**, 7-8.
- [5] **Mark, H. F., Bikelas, N.,M.** (1967). *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, **45**, 78.
- [6] **Funke, W., Okay, M., Joos-Muller, B.** (1998). Microgels – Intramolecularly Crosslinked Macromolecules with a Globular Structure, *Adv. Polym. Sci.*, **136**, 139.
- [7] **Shibayama, M., Tanaka, T.** (1993). Volume Phase Transition and Phenomena of Polymer Gels *Adv. Polymer Sci.*, **109**, 1-62
- [8] **Xu, J., LaBean, T. H., Craig, S. L.** (2004). Supramolecular polymers; Ciferri, A., Ed., CRC Press.
- [9] **Amiya, T., Tanaka, T.** (1987). Coil-globula transition in polymers, *Macromolecules*, **20**, 1162-1164.
- [10] **Topuz, F., Okay, O.** (2008). Rheological Behavior of Responsive DNA Hydrogels, *Macromolecules*, **41**, 8847.
- [11] **Bloomfield, V. A., Crothers, D. M., Tinoco, I., Jr.** (2000). Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions, *University Science Books: Sausalito, CA*.
- [12] **Freifelder, D.; Davison, P. F.** (1963). *Biophys. J.*, **3**, 49.
- [13] **Ivanov, V., Zeng, Y., Zocchi, G.** (2004). *Phys. Rev.*, **E70**, 051907.
- [14] **Planken, K. L., Koenderink, G. H. R., Roozendaal, A. P., Philipse, J.** (2005). *Coll. Interface Sci.*, **291**, 120.
- [15] **Amiya, T., Tanaka, T.** (1987). Phase Transitions in Cross-Linked Gels of Natural Polymers, *Macromolecules*, **20**, 1162–1164.
- [16] **Topuz, F., Okay, O.** (2009). Formation of Hydrogels by Simultaneous Denaturation and Cross-Linking of DNA, *Biomacromolecules*, **10**, 2652–2661.
- [17] **Topuz, F., Okay, O.** (2008). Rheological Behavior of Responsive DNA Hydrogels, *Macromolecules* **41**, 8847.

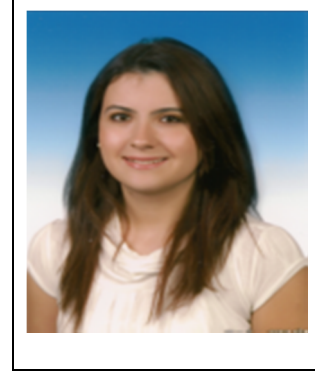
- [18] **Orakdogan, N., Erman, B., Okay, O.** (2010). Evidence of Strain Hardening in DNA Gels, *Macromolecules*, **43**, 1530–1538.
- [19] **Costa, D., Santos, S., Antunes, F. E., Miguel, M. G., Lindman, B.** (2006). Some novel aspects of DNA physical and chemical gels, *Arkivoc*, 161–172.
- [20] **Costa, D., Miguel, M. G., Lindman, B.** (2010). Swelling properties of cross-linked DNA gels, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **158**, 21–31.
- [21] **Bastide, J., Candau, S.J.** (1996). In:Physical Properties of Polymeric Gels, Ed:Cohen Addad, *J.P., Wiley*. New York.
- [22] **Horkay, F., Basser, P. J.** (2004). Osmotic Observations on Chemically Cross-Linked DNA Gels in Physiological Salt Solutions, *Biomacromolecules*, **5**, 232–237.
- [23] **Costa, D., Miguel, M. G., Lindman, B.** (2007). Effect of Additives on Swelling of Covalent DNA Gels, *J. Phys. Chem.* **111**, 8444–8452.
- [24] **Costa, D., Valente, A. J. M., Pais, A. C., Miguel, M. G., Lindman, B.** (2010). Cross-linked DNA gels: Disruption and release properties, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **354**, 28–33.
- [25] **Costa, D., Miguel, M. G., Lindman, B.** (2007). Responsive Polymer Gels: Double-Stranded versus Single-Stranded DNA, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 10886.
- [26] **Kavzak B.**, 2005 Trakya Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, *Carrageenan Jellerin UV-Görünür Bölge Spektrometreyle incelenmesi*.
- [27] **Tanaka, T., Fillmore, D.J.** (1979). Kinetics of Swelling of Gels, *J. Chem. Phys.*, **70**, 1214.
- [28] **Li, Y., Tanaka, T.** (1984). *J.Chem. Phys.*, **81**, 6379.
- [29] **Hirokawa, Y., Tanaka, T.** (1984). Volume phase-transition in a nonionic gel. *J.Chem. Phys.*, **81**, 6379.
- [30] **Bastide, J., Candau, S.J.** (1996). In:Physical Properties of Polymeric Gels, Ed:Cohen Addad, *J.P., Wiley*. New York.
- [31] **Yılmaz, Y.** (1999). Fluoresence Technique for Studying Polymeric Gels, Doktora tezi, İ.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- [32] **Flory, P. J.** (1974). *Discuss Faraday Soc.*, **56**, 7-8.
- [33] **Gözükara EM.** (2000). Biyokimya, Dördüncü Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi.
- [34] **Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM.** (2000). Principles of Biochemistry. 3rd ed., New York, Worth Publishers Inc.
- [35] **Ravanat JL, Guicherd P, Tuce Z, Cadet J.** (1999). Simultaneous determination of five oxidative DNA lesions in human urine *Chem Res Toxicol*, **12**, 802-8.
- [36] **Champe PC, Harvey RA.,** (1998). Biochemistry Lippincott's Illustrated Reviews. Philadelphia, J.B. Lippincott Company.

- [37] **Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW.** (2000). Harper's Biochemistry. 25th Ed. Stamford, Appleton & Lange.
- [38] **Mathews CK, van Holde KE.** (1996). Biochemistry. Redwood City, California, The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- [39] **Amiya, T., Tanaka, T.** (1987). *Macromolecules*, **20**, 1162–1164.
- [40] **Costa, D., Hansson, P., Schneider, S., Miguel, M. G., Lindman, B.,** 2006. *Biomacromolecules*, **7**, 1090.
- [41] **Orakdogan, N., Karacan, P., Okay, O.** (2011). *Reac. Funct. Polym.*, **71**, 782.
- [42] **Mattiason, B., Galaev, I.** (2008). Smart Polymers: Production, Study and Application in Biotechnology and Biomedicine, Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis.
- [43] **Kopecek, J., Yang, J.** (2007). *Polym. Int.*, **56**, 1078-1098.
- [44] **Calvert, P.** (2008). Hydrogels for Soft Machines *Adv. Mater.*, **20**, 1-14.
- [45] **Ulijn, R. V., Jayawarna, V., Thronton, P., Todd, S.J., Mart, R.J., Smith, A.M., Gough, J.E.** (2007). *Bioresponsive Hydrogels*, **10**, 40-48.
- [46] **Sozmen, N. N.** (2008). Biyomedikal Uygulamalarında Akıllı Polimer Kullanılması ve Karakterizasyon Yönteminin Kuartz Kristal Mikro Dengeleyici Sistemler İle Geliştirilmesi, Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [47] **Gupta, A. K., NG, K. W.** (2001). Compact Coarse Approach Mechanism for Scanning Tunneling Microscope, *Rev. of Scien. Inst.*, **72**, 3552-3555.
- [48] **Waitz, J. A., Olszewski, B. J., Thompson, P. E.** (1963). *Science*, **141**, 723.
- [49] **Folkman, J., Long, D. M.** (1964). *J. Surg. Res.*, **4**, 139.
- [50] **Desai, S. J., Simonelli, A. P., Higuich, W. I.** (1966). *J. Pharma Sci.*, **54**, 1469.
- [51] **Langer, R., Folkman, J.** (1976). *Nature*, **263**, 797.
- [52] **Bogdansky, S.** (1990). Natural polymers as drug delivery system, in Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems: M. Chasin and R. Langer, (eds.), *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, **45**, Marcel Dekker, New York.
- [53] **Lu, X., Xu, Y., Zheng, C., G. Zhang, Z. Su.** (2006). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**, 767.
- [54] **Lee, S. L., Debenedetti, P. G., Errington, J. R., Pethica, B. A., Moore, D. J. J.** (2004). *Phys. Chem. B.*, **108**, 3098.
- [55] **Matsuno, H., Nakahara, J. I., Tanaka, K.** (2011). *Biomacromolecules*, **12**, 173.
- [56] **Whelan, D. R., Bambery, K. R., Heraud, P., Tobin, M. J., Diem, M., McNaughton, D., Wood, B. R.** 2011. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5439.
- [57] **Sayı, C., Okay O.** (2001). *Polymer* **42**, 7639 - 7652.
- [58] **Tuncaboylu C.D., Sari M., Oppermann W., Okay O.** (2011) *Macromolecules* **44**, 4997-5005

Url-1 < <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/dna> >, alındığı tarih: 03.05.2011

Url-2 < http://en.wikipedia.org/wiki/File:A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png >, alındığı tarih: 03.05.2011.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Hüsniye ÇAKMAK

Doğum Yeri ve Tarihi: Bakırköy 1987

Adres: Eyüp / İSTANBUL

E-Posta: husniyecakmak@gmail.com

Lisans: Trakya Üniversitesi

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR

Karacan P., **Çakmak H.**, Okay O. “Swelling Behavior of Physical and Chemical DNA Hydrogels” *J. Appl. Polym. Sci.* 2012

TEZDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR

- **Çakmak H.**, Okay O. Fiziksel ve Kimyasal Çapraz Bağlı DNA Hidrojelleri (Poster Sunumu). *Uluslararası Katılımlı Ulusal Kongre - 26. Ulusal Kimya Kongresi*, 1-6 Ekim, 2012. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, Türkiye.
- **Çakmak H.**, Okay O. DNA Hydrogels by Heating – Cooling Process. (Poster Sunumu). *Uluslararası Kongre - Polymer for Advances Technologies*, 2-5 Ekim, 2011. Lodz, Polonya
- **Çakmak H.**, Okay O. DNA Gelation by Heating – Cooling Process (Poster Sunumu). *Uluslararası Çalıştay - Recent Advances in Synthetic and Biological Gels*, 21 Eylül, 2011. İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye