



Review Paper / Derleme Makalesi
POLYELECTROLYTES AND IST BIOLOGICAL PROPERTIES

Mesut KARAHAN^{*1}, Sevecen TUĞLU², Zeynep Mustafaeva AKDESTE²

¹Üsküdar Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Üsküdar-İSTANBUL

²Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Esenler-İSTANBUL

Received/Geliş: 03.02.2012 Revised/Düzeltilme: 04.04.2012 Accepted/Kabul: 23.04.2012

ABSTRACT

The interaction of polymers having the characteristics of synthetic or natural, biocompatible and biodegradable polyelectrolytes with biomolecules exhibits the presence of biologically important mechanisms and has a great importance for biomedical uses. Researches about artificial immunization systems are still continuing thanks to the adjuvant effect which stimulates the immunity and which is one of the most important features of polyelectrolytes. In addition, synthesis of polyelectrolytes' conjugate and complexes, lighting of their structures, examination of their biological effects are still being developed.

In this study, after giving general information about polyelectrolytes and their properties by presenting a general review of the preferred studies in artificial polymeric vaccine systems, it is intended to give information about their properties, importance and working principles in immunology.

Keywords: Polyelectrolyte, protein, bioconjugate, biomolecules, immunology.

POLİELEKTROLİTLER VE BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

ÖZET

Sentetik veya doğal, biyouyumlu ve biyobozunur polielektrolit özellikteki polimerlerin biyomoleküller ile etkileşimleri biyolojik açıdan önemli mekanizmaların varlığını ortaya koymakta ve biyomedikal uygulamalar için büyük önem taşımaktadır. Polielektrolitlerin konjugat ve komplekslerinin sentezi, yapılarının aydınlatılması, biyolojik etkilerinin incelenmesi çalışmaları, ayrıca en önemli özelliklerinden biri olan adjuvant etkisi (immüniteyi stimüle eden) sayesinde polimerik yapay aşı sistemleri ile ilgili araştırmalar devam etmektedir.

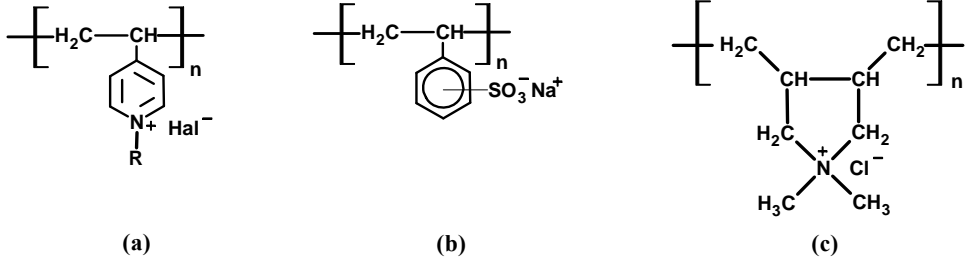
Bu çalışmada, polielektrolitler ve polielektrolitlerin özellikleri hakkında genel bilgi verildikten sonra, yapay polimerik aşı sistemlerinde tercih edilmesine dair yapılan çalışmaların genel bir derlemesi sunularak, immünolojide ki özellikleri, önemi ve çalışma modeli hakkında bilgi verilmesi amaçlanmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Polielektrolit, protein, biyokonjugat, biyomoleküller, immünoloji.

1. GİRİŞ

Polimer biliminin başlangıcından bu yana polielektrolitler pek çok geniş kapsamlı çalışmaya konu olmuştur. Polielektrolit terimi, anyonik veya katyonik gruplara sahip ve bu gruplara bağlı "counter" iyonları olan polimer sistemleri için kullanılmaktadır.

* Corresponding Author/Sorumlu Yazar: e-mail/e-ileti: mesut.karahan@gmail.com, tel: (216) 400 22 22

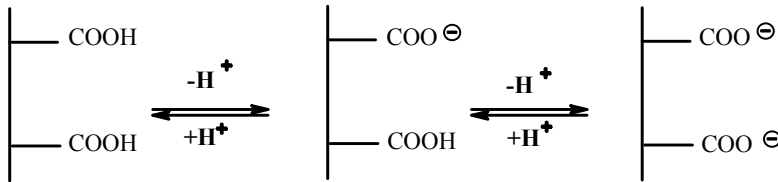


Şekil 1. (a) poli(vinilpiridinyum), (b) sodyum polistiren sülfonat, (c) poli(dialildimetilamonyum klorür) [3].

Prensipte, herhangi bir kimyasal yapının polimer zincirine uygun sayıda iyonik grup kovalent olarak bağlayıp yapıyı uygun bir pH'da suda çözünür hale getirilerek bir polielektrolit elde edilebilir. Polielektrolitler genelde katılma veya kondenzasyon polimerleşme reaksiyonlarıyla elde edilebilir. Ayrıca pektin gibi polielektrolit yapıdaki anyonik polisakaritler ve çok sayıda proteinler doğadan elde edilebilir. Nişasta ve selüloz gibi noniyonik doğal polimerler kimyasal modifikasyonla polielektrolite dönüştürülebilir [1].

Polielektrolitler farklı şekillerde sınıflandırılabilirler. Tüm monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip polielektrolitlere homopolielektrolit adı verilmektedir. Hem anyonik hem de katyonik grupların kovalent olarak bağlı bulunduğu makromoleküller ise poliamfolitler olarak isimlendirilmektedirler. Doğada bol miktarda protein yapılı poliamfolit olmakla birlikte sentetik yollarla da poliamfolitler elde edilebilir. Poliamfolitlerin izoelektrik noktalarında molekül üzerindeki net yük toplamı sıfıra eşittir. Homopolielektrolitler anyonik polielektrolitler ve katyonik polielektrolitler olmak üzere iki alt gruba ayrılarak sınıflandırılırken poliamfolitlere nötral polielektrolitler de denilmektedir.

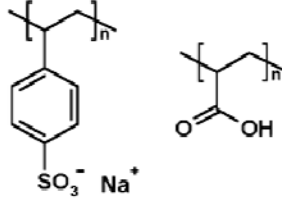
Homopolielektrolitler: herbir tekrarlayan birimi (monomeri) yüklü bir elektrolit grup taşıyan polimerlerdir. Bu elektrolit gruplar sulu çözeltilerde dissosiyasyon polimeri yüklü hale getirirler (Şekil 2). Çözeltileri, tuzlar gibi elektriği iletir ve polimerler gibi ise viskozdur. Polipeptidler, proteinler, DNA gibi çoğu biyolojik molekül polielektrolit formundadır.



Şekil 2. Poliakrilik asitin sulu çözeltideki dissosiyasyonu [3].

Polielektrolitlerin içindeki davranışlarını etkileyen başlıca dört faktörden söz edilebilir:

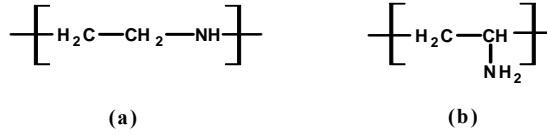
1. Polimere bağlı yüklü gruplar anyonik ve katyonik olarak sınıflandırılır. Bu gruplar da güçlü ve zayıf asitler ve bazlar olarak ikiye ayrılabilir. Kuvvetli bir polielektrolit çözeltide tüm iyonlarına ayrışabilir. Bunun aksine, zayıf bir polielektrolit tüm iyonlarına ayrışamaz. Bu sebeple, zayıf polielektrolitler çözelti içinde tamamen yüklü değildirler ve pH değiştirilerek üzerlerindeki yük dağılımı ayarlanabilir. PSS kuvvetli bir polielektrolitken PAA zayıf bir polielektrolittir [2].



Şekil 3. İki sentetik polielektrolitin kimyasal yapısı. Soldaki yapı poli(sodyum stiren sülfonat) (PSS) ve sağdaki ise poli(akrilik asit)tir (PAA). Her ikisi de negatif yüklü polielektrolitlerdir [13].

2. Bununla birlikte, iyonik grubun asit ve baz kuvvetlerinin yanında polimer zinciri boyunca uzanan bitişik anyonik ve kationik yükler arasındaki ortalama uzaklık polielektrolit davranışının tayininde önemli bir parametredir. Bu yük yoğunluğu, iyonik kısımlar arasındaki ortalama uzaklık olarak tanımlanabilir. Bu ortalama yük yoğunluğunun yanında zincir boyunca uzanan iyonik grupların dağılımı da polielektrolit özelliklerini önemli ölçüde etkileyebilmektedir, örneğin çözünürlük. Bir kural olarak, eğer bir kopolimerde her on monomerik birimin birden fazla iyonik kısmı varsa tipik polielektrolit davranışı beklenir.

3. Asit-baz kuvveti ve yük yoğunluğuna ek olarak, polielektrolit özelliklerinin saptanmasında, makro iyonun molekül geometrisinde yüklü kısımların yerleşimi üçüncü önemli noktadır. Şekil 4'e göre, iyonik gruplar ya polimerin ana zincirinin bir birimi olarak (integral tip) ya da bir spacer ile ana zincire asılı olarak (yan zincirlerde) bulunur. Yüklü grupların geometrik yeri özellikle polianyon-polikasyon kompleksi oluşumu ile ilgilidir.



Şekil 4. (a) İntegral tipe örnek olarak lineer poli(etilen imin) ve (b) asılı tipe örnek olarak poli(vinilamin) [13].

4. Düşük molekül ağırlıklı “counter” iyonların türünün çözeltideki tüm sistemin özellikleri üzerinde güçlü bir etkisi vardır, özellikle çözünürlük ve yapı oluşumunda. Bu iyonların önemini anlamak için şu örneği verebiliriz: poli(dialildimetilamoniyum) polikasyonunun klorürlü hali suda kolayca çözünürken, iyodürlü hali daha zor çözünür [1].

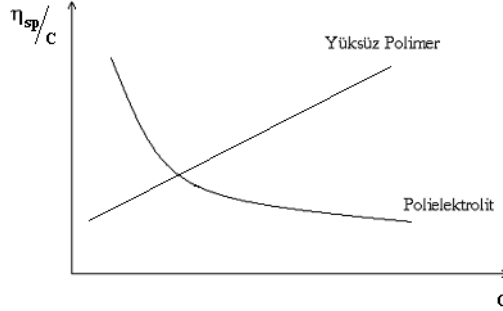
Herhangi bir polimerin konformasyonu özellikle polimerin yapısı ve çözelti ilişkisi gibi çeşitli etkenlere bağlıdır. Çözelti içindeki yüksüz bir lineer polimer zinciri rasgele yumak konformasyonu gösterirken, lineer polielektrolit üzerindeki yükler birbirini iter (Coulomb itmesi) ve eksi yüklerin birbirlerini itmesini azaltıcı en uygun konformasyon olan lineer halde bulunmaya eğilim gösterir (Şekil 5). Bu düzenleme, polielektrolit çözeltilerinin viskozitesinin yükselmesine yol açar. Polielektrolit çözeltilerinin özellikleri sulu ortamın iyonik şiddetine bağlıdır. İyonik şiddetin artmasıyla viskozitenin değişmesi makroiyoandaki elektrik yükleri arasındaki itme kuvvetinin engellenmesinden dolayı gerçekleşir ve iyonik şiddet daha fazla arttığında yüksüz makromoleküllere benzer davranış göstermeye başlar [3].



Şekil 5. Çözeltiye tuz ilavesi sonucu polielektrolit zincirinin yumak konformasyonunu alması [4].

İyonik şiddetin yanında, ortamın pH'ı da zayıf polielektrolitlerin özelliklerini etkiler. Çünkü iyonik grupların dissosiyasyon derecesi ve polielektrolitin yük yoğunluğu değişir. Polielektrolit çözeltilerinin diğer bir özelliği ise yüksek iyonik iletkenlikleridir. Elektrik alanı altında, küçük molekül ağırlıklı iyonlardan daha yavaş olmakla birlikte makroiyonlar göç etmektedirler [1].

Polimerlerde derişim arttıkça viskozite artarken, polielektrolitlerde derişim azalırken viskozite artar (Şekil 6). Bunun nedeni azalan derişimle artı ve eksi yüklerin birbirlerini itmeleri ve polielektrolitin şişmesidir.



Şekil 6. Yüksüz polimerlerde ve polielektrolitlerde viskozite-derişim ilişkisi [18].

Polielektrolitlerde molekül ağırlığı polimerleşme derecesi ile orantılıdır. Polimerleşme derecesinin artması istenilen kompleksin oluşumunu destekleyici yönde etki eder ve polimerin bağlanma miktarında artış gözlenir. Bunun yanı sıra polielektrolit çözeltilerinin elektrokimyasal özellikleri genellikle poliyonun zincir boyuna bağlıdır; yani polikompleksin çökmesi vb. özellikler polimerin polimerleşme derecesine bağlıdır [5].

Bunların yanı sıra polielektrolitler; sulu fazda çözünen polielektrolitler ve organik fazda çözünen polielektrolitler olarak da kategorize edilebildikleri gibi etki mekanizmalarına göre kendiliğinden fizyolojik aktivite gösteren ve göstermeyen polielektrolitler olarak da sınıflandırılır.

Kendiliğinden fizyolojik aktivite gösteren polielektrolitlerden bazılarının monomerleri fizyolojik aktivite gösterirler. Bazı monomerler ise bu aktiviteyi göstermezler ancak polimerleştiklerinde fizyolojik olarak aktiviteye sahip olurlar. Suda çözünebilir polimerlerdir, dolayısıyla fizikokimyasal özellikleri (iyonik yük, pH vb) incelenenilmektedir.

Fizyolojik aktifliğe sahip polielektrolitler de kendi içlerinde anyonik ve katyonik olarak iki alt birimde incelenenilmektedirler.

Fizyolojik aktif katyonik polielektrolitlerin fizyolojik aktiviteleri öncelikle yapılarında taşıdıkları (+) yüklerin yoğunluğuna daha sonra da monomerleri yapısına bağlıdır. Bu tip biyopolimerlere örnek olarak Polivinilamin yada PVP (Poli-4-vinilpiridin) verilebilir bunlardaki C-C bağı biyobozunur değildir. Bu tip polielektrolitler tıpta oldukça aktiftirler; Örneğin antiheparin olarak tıpta ve biyolojide kullanılırlar. En çok bilinen ve doğal polielektrolit olan

protamin sülfatlar küçük katyonik proteinlerdir ve heparinle kompleks oluşturarak heparinin antikoagülan özelliğini nötralize ederler. Heparin (-) yüklü olduğu için polikasyonların antiheparin etkisi gösterdiği bilinmektedir [5].

Ancak biyolojik sistemde kullanılacak polielektrolitler genel olarak toksik olmamalı, biyobozunur olmalı ve parçalanıp böbreklerden geçebilmelidir. Ayrıca polielektrolitleri oluşturan monomerlerin de toksik olmaması gerekmektedir. Fizyolojik aktif anyonik polielektrolitler ise (-) yüklü yan gruplara sahiptirler ve aktiviteleri bu yüklerin yoğunluğuna ve dağılımına daha sonra da monomerin yapısına bağlıdır. Canlı organizmaya verildiğinde hücre duvarı ile etkileşmezler. Anyonik polielektrolitler canlı organizmadaki bileşikler ile rekabete girerler ve yer değiştirme reaksiyonları gerçekleştirirler.

Fizyolojik aktif anyonik polielektrolitlerin kullanım alanları genel olarak şu şekilde sıralanabilir :

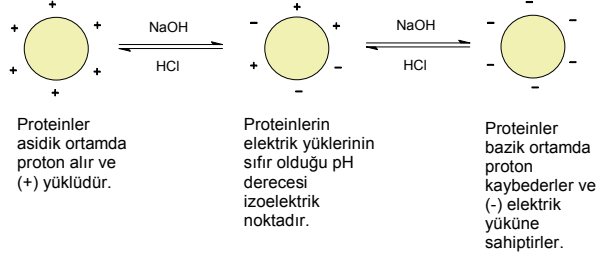
- Polianyonların biyolojik aktivitesi çok çeşitlidir ve glikoproteinler yada DNA'ya çok benzetilmektedir.
- Antikanserojen özelliklerden dolayı bu alanda kansere karşı kullanılmaları üzerine çalışılmaktadır.
- Heparin ve antikoagülan etkisi taşımaktadır.
- Proteinlerin izoelektrolit noktalarına etki ederler.
- Kanın viskozitesini değiştirirler
- Potasyumun hücre içi miktarını değiştirirler.

Diğer yandan kendiliğinden fizyolojik aktivite göstermeyen polielektrolitlerin ise polimerik yapılarının spesifik olarak aktiviteleri yoktur, kan serumu yerine kullanılan polimerlerdir. Antitoksik özelliklerinden dolayı toksik özelliğe karşı kullanılırlar. Kan kanserinde kullanılan polimerler ile sirküle olan (dolaşan) kan hacmi aynen sağlanmalı ve kanın ilk osmotik basıncı bu yapay kanda da sabit kalmalıdır. Yapay kan belirli bir süreden sonra vücuttan çıkarılmalıdır. Aksi halde böbreğe yapışmaları sözkonusudur ve bu durumda vücuttan atılamazlar [6-17].

Polimer iskeletindeki ya da asılı olarak bulunan iyonik gruplar, polinükleotidler ve proteinler gibi makromoleküllerin sınıflandırılmasında oldukça önem taşımaktadır. Polimerler iyon içeriğine göre homopolielektrolitler ve poliamfolitler olarak iki gruba ayrılabilirler. Homopolielektrolitler katyonik veya anyonik grupları içerirken, poliamfolitler katyonik ve anyonik grupların her ikisini bulundurur. Polielektrolitlerin karakteristik bir özelliği düşük konsantrasyonlarda deiyonize suda geniş bir hidrodinamik hacme ulaşabilmesidir. Bu etkiye polimer zinciri boyunca yer alan yüklü gruplar arasındaki coulombik itme kuvveti neden olur ve zincirin çubuğa benzer bir konformasyonda bulunmasını sağlar. Elektrolit eklenmesiyle ya da pH değişimiyle, coulombik itme kuvvetleri engellenir. Bunun sonucunda zincirin hidrodinamik hacmi azalır ve entropik olarak daha uygun konformasyona geçer. Polielektrolitlerin aksine, poliamfolitlerin yapı özellikleri anyonik ve katyonik monomer birimleri arasındaki coulombik çekme kuvvetleri tarafından yönlendirilmektedir. Anyonik veya katyonik gruplar yeteri kadar fazla olduğunda ($\geq 10-15$ mol%), yüklü grupların itme gücü, polielektrolitlerin tipik davranışlarında olduğu gibi zincir konformasyonunda gerilmelere neden olur. Anyonik ve katyonik grupların molar oranı birbirine yaklaşıncaya başladıkça coulombik etkileşimler globular konformasyona neden olurlar ve bir çok durumda deiyonize suda çözünmezler. Elektrolit eklenmesiyle ya da pH'ın değiştirilmesiyle düzensiz bir yumak konformasyonu gözlemlenebilir ve çözünmesi kolaylaştırılabilir. Bu davranış çoğunlukla "antipolielektrolit etkisi" olarak adlandırılmaktadır ve elektrolitlerin varlığında viskozitede bir artışa neden olmaktadır. Bu davranışı açıklamak üzere çeşitli teoriler ortaya atılmıştır [18-19].

Proteinler poliamfolit sınıfına girerler ve poliamit yapısındadırlar. Proteinlerin yapısında asidik ve bazik amino asitler vardır. Bundan dolayı da amfoterik özellik göstermektedirler. Bu proteinler proton verecekler veya proton alacaklardır. Asidik ortamlarda proteinler ekstra protona

sahip olduklarından net pozitif bir yüke, bazik ortam koşullarında ise net bir negatif yüke sahip olacaklardır. Amino asitlerin net elektrik yüklerinin sıfır olduğu pH derecesine ise izoelektrik nokta adı verilmektedir (Şekil 7) [3].

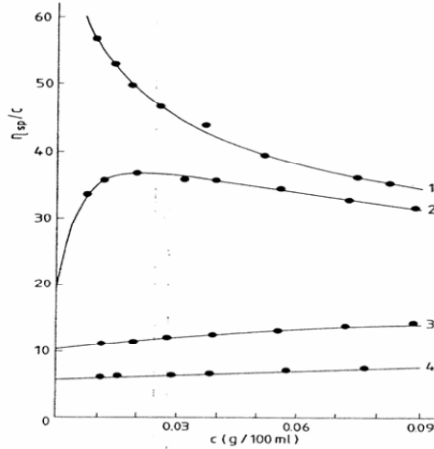


Şekil 7. Proteinlerin pH'a bağlı yük durumları [3].

2. POLİELEKTROLİTLERİN ÖZELLİKLERİ:

Polielektrolit çözeltilerinin özellikleri, viskozite gibi, sulu ortamın iyonik gücüne bağlıdır. İyonik gücün artışıyla birlikte viskozite yönünde oluşan değişikliğin nedeni temel olarak makroyondaki elektrik yüklerinin elektrostatik olarak korunmasıdır;

Şekil 8'de Na-karboksimetilselüloz' un polimer konsantrasyonunun η_{sp}/c 'ye bağımlılığında gösterildiği gibi iyonik güç daha çok "normal" yüksüz makromolekül davranışına yaklaşmaktadır.

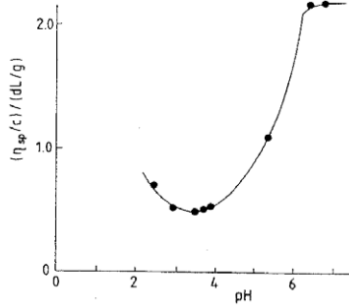


Şekil 8. Farklı iyonik şiddetlerdeki Na-karboksimetilselüloz' un sulu çözeltilerinde polimer konsantrasyonu c'nin η_{sp}/c bağımlılığı:

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

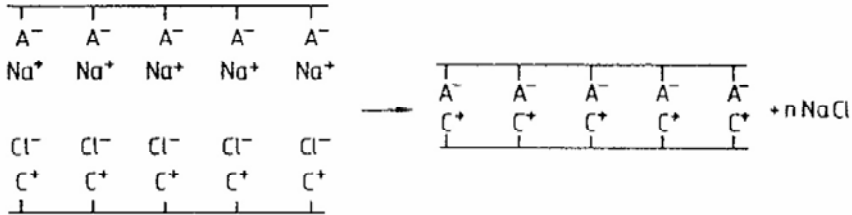
Verilen iyonik bir grubun ayrışma derecesini ve söz konusu polielektrolitin gerçek yük yoğunluğunu, pH belirlediği için iyonik gücün yanında, ortamın pH'ı da çözelti içindeki zayıf

polielektrolitin özelliklerini önemli ölçüde etkiler. Bu etki, zayıf asit ve zayıf baz grubu içeren poliampfolitin η_{sp}/c - pH grafiğiyle gösterilmektedir; izoelektrik noktanın pH değerinde, grafik minimum viskoziteye işaret etmektedir (Şekil 9).



Şekil 9. Maleik asit ve N-metildiallilamin' in değişken kopolimerlerinin sulu çözeltilerinin η_{sp}/c – pH grafiği [5].

Yüklü makromoleküller ve zıt yüklü makroiyonlar, yüzey aktif maddeler veya kolloid partiküller arasında oluşan polielektrolit komplekslerine, birçok polielektrolit uygulaması içinde bilimsel anlamda ilgi duyulmakta ve pratik anlamda önem verilmektedir. Şekil 10'da verilen şemaya uygun olarak stokiyometrik polituzların hazırlanması deneysel polielektrolit araştırmalarında bir kilometre taşı kabul edilebilir. Değişik anyonik yüklü kolloid türlerin çok büyük miktarının topraklanma ve çökme yeteneği bugünün atık su işleminde vazgeçilemezdir ve büyük miktarda suda çözünür katyonik polielektrolit üretimi teşvik edilmektedir. Ancak, makroiyonların zıt yüklü türlerle etkileşimleri, çoğunlukla elektrostatik etkileşimler ile olur.



Şekil 10. Polianyon-polikasyon polituzlarının şematik oluşumu [5].

Çözelti içindeki polielektrolitin özellikleriyle ilişkili olarak belirtilmesi gereken üçüncü nokta oldukça yüksek iyonik iletkenlikleridir; iyonik iletkenlik makroiyonların ve aynı zamanda yüklü polimer kolloidlerin elektrikli bir alanda düşük moleküler iyonik türlerin hızından tabii ki daha düşük bir hızda göçüyle sonuçlanır. İyonik iletkenlik aynı zamanda, sistemdeki su miktarına son derece bağlı olan, polielektrolit jellerinde ve su emmiş katı durumdaki polielektrolitte de görülür. polielektrolit -su sistemlerinin bu elektrokimyasal özellikleri kısaca yaygın polielektrolit karakterizasyon tekniklerinin yanında önemli uygulama alanlarının temelini de oluşturmaktadır [1].

3. POLİELEKTROLİTLERİN YAPAY POLİMERİK AŞI SİSTEMLERİNDE KULLANILMASI:

Hem kısa (10-12) hem de uzun aminoasit zincirlerine sahip sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, peptidlere karşı antikor üretiminde immünojenliği arttırmak için peptidlerin daha büyük molekül boyutuna sahip taşıyıcı proteinlere bağlanması gerekmektedir [21]. Poliakrilikasit (PAA), Poli-N-isopropilakrilamid (NIPAA), Poli-N-vinilprolidon (VP), Polivinilpiridin-Polisetilpiridin kopolimeri ve Polivinilpirilidon-Poliakrilikasit (VP-AA) kopolimerleri vb. genel olarak kullanılan lineer taşıyıcılardır ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar [22].

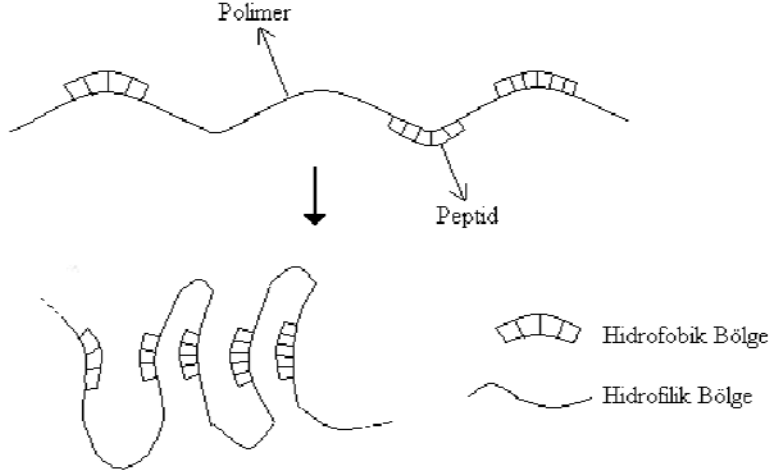
Konjugasyon bölgesi proteinlerde olduğu gibi peptid dizilimine bağlı olarak; dizinin N-ucu, C-ucu ya da içerisindeki bir nokta olabilir. Konjugasyon noktası karboksil (-COOH), amino (-NH₂) ya da sülfidril (-SH) uçları olabilir. Aşı olarak kullanıldığında önemli bir etki oluşturan sentetik peptidler, haptener vb. moleküller spesifik antikor oluşturmak için günümüzde oldukça yaygın kullanılmaktadırlar. Ancak tedavi edici ajanların ve sentetik peptidlerin ya da haptenerin; düşük çözünürlüğü, kararsızlığı, küçük molekül boyutlarından dolayı antijenik özelliklerinin düşük olması, biyouyumlu ve spesifik olmayışı ya da toksisitesi gibi istenmeyen özellikleri onların etki yeteneklerini oldukça azaltmıştır. Ancak proteinlerin, antijenlerin ya da ilaç etken maddelerinin suda çözünabilir polimerler ile konjugatlarının oluşturulması, tedavi edici ajanların özelliklerini ve immünojenliğini önemli ölçüde değiştirmektedir. Antijenik peptidlerin suda çözünabilir polimere bağlanması çok yönlü etkilere sahiptir. Bunlardan bazıları;

- Peptidlerin modifikasyonu sağlamak,
- Hidrofobik özellikte olanların suda çözünabilirliğini arttırmak,
- Bölgesel etkilerini yükseltmek,
- İmmünojenik etkilerini ve immünoreaktifliklerini arttırmak ve
- Canlı organizmada daha uzun süre etkili olmasını sağlamaktır

Polimerik konjugatların bu eşsiz özellikleri tedavi edici etkilerini de arttırmaktadır. Böylece klasik adjuvantlara en iyi alternatiflerden bir tanesi olarak da pozitif ya da negatif olarak yüklü, immünojenik olmayan sentetik polielektrolit kullanımıdır [5]. Polimerik taşıyıcı olarak kullanılan bazı polielektrolitlerin genel gösterimi aşağıda verilmiştir.

Polielektrolitler, sentetik peptidler ile konjugatlarının güçlü koruma özelliklerinden dolayı yapay aşı bileşenleri olarak düşünülmektedir [23].

Polielektrolit-peptid kovalent konjugasyonu açısından geleneksel metodlar kullanılarak, sudaki makromoleküllerin aktive edilmiş fonksiyonel grupları arasında gerçekleşen reaksiyonlar ile protein-lineer polielektrolit, peptid-lineer polielektrolit kovalent konjugatları sentezlenmiştir. Karbodiimid aktivasyonu ile gerçekleştirilen iki basamaklı kovalent konjugasyon reaksiyonu; polimerin karboksil gruplarının karbodiimid ile aktive edilmesi ve sonrasında karboksil grupları ile proteinin ya da peptidin amino grupları arasında kondenzasyon reaksiyonunun oluşumu ile gerçekleşir. Birinci basamak süresince karboksil grubunun karbodiimide saldırması ile O-açılısoüre ara ürünü oluşmaktadır. Daha sonrasında kararsız olan bu ara ürüne peptid ya da proteindeki amino gruplarının saldırmasıyla polimer ile peptid veya protein arasında çapraz bağlanma gerçekleşmektedir.

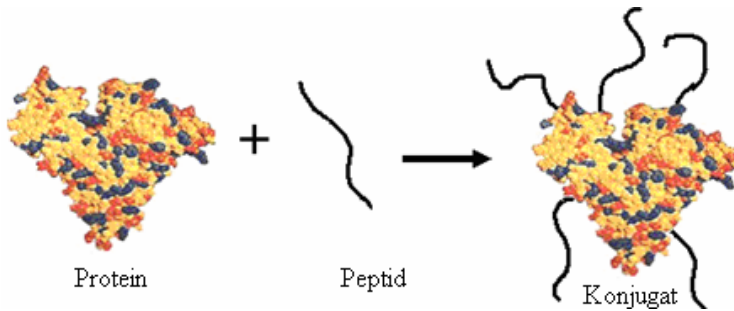


Şekil 11. Kısır zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerlerle oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi [13].

Yukarıda anlatıldığı gibi karbodiimid kullanılarak peptidlerin taşıyıcı polimerlerle kovalent konjugasyonu sonucu sentezlenen konjugatların yüksek immünolojik özelliğe sahip olduğu Yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ve konjugatın yüksek immünolojik özelliğinin polimerin adjuvant etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir [5, 20].

Sadece lineer yapıdaki polielektrolitler değil aynı zamanda yapay aşı sistemlerinde küçük molekülleri konjuge etmek için taşıyıcı moleküller olarak protein biyomolekülleri de kullanılabilir. Büyük moleküler boyutlardaki BSA, Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), Ovalbumin (OVA) gibi globular proteinler, peptidler için taşıyıcı olarak kullanılmakta ve küçük boyutlu peptidlerin in-vivo sistemde antikor oluşumu prosesinde tanınmasını sağlamaktadırlar.

Bovine Serum Albumin (BSA) antikor oluşumunda konjugasyon için genel olarak en yaygın kullanılan taşıyıcı proteindir. Yapısında taşıdığı çeşitli fonksiyonel gruplarından dolayı da konjugasyon reaksiyonlarında çeşitli moleküller, proteinler ya da haptener için taşıyıcı olarak tercih edilmektedir [24].

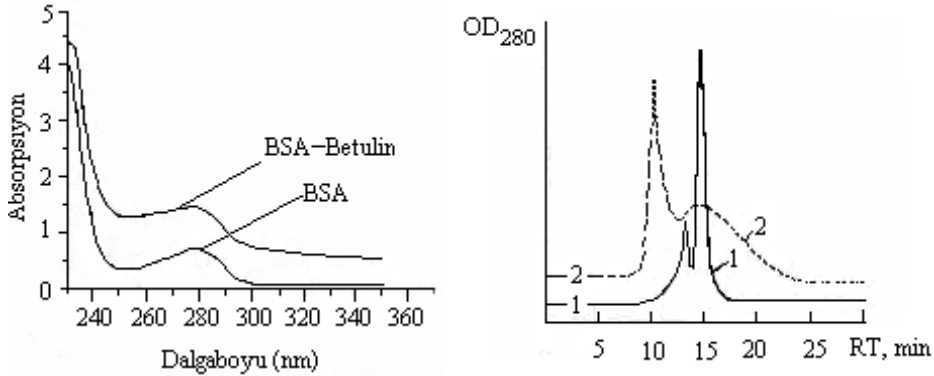


Şekil 12. Taşıyıcı protein olarak BSA'nın sentetik peptidlerle oluşturduğu konjugat [25].

BSA ve KLH genel olarak en sık kullanılan taşıyıcı proteinlerdir ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar. Bağlanma (konjugasyon) bölgesi, peptid

dizilimine bağlı olarak; dizinin N- ucu, C- ucu ya da içerisindeki herhangi bir nokta olabilir. Peptidler içerdikleri aminoasit kompozisyonuna göre N- ucundan, C- ucundan ya da dizinin içerisindeki herhangi bir fonksiyonel grubundan konjugasyona girebilirler. Konjugasyon noktası karboksil (-COOH), amino (-NH₂) ya da sülfidril (-SH) uçları olabilir. Antijenik peptid dizilimi taşıyıcı proteine (BSA, KLH, OVA vb.) bağlanacağı göz önünde bulundurularak sentezlenmelidir. Antikor oluşumunda iyi sonuçlar elde etmek için uygun antijenik peptid dizilimini seçmek ve buna bağlı olarak konjugasyonun dizaynını yapmak oldukça kritik noktalar. Peptidin taşıyıcı protein yüzeyinde konumlanması ve yerleşimi seçilen bağlanma yönteminden etkilenmektedir [21,25].

Örneğin, Mustafaev ve arkadaşları tarafından yapılan ve düşük immünolojik özellikteki Betulin (B) molekülünün taşıyıcı protein olan BSA'ya % 90 verimle kovalent olarak bağlandığı çalışmada BSA-B konjugatları 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür kullanılarak sentezlenmiştir. Suda çözünür özellikteki BSA-B konjugatlarının UV analizi sonucu agregat oluştuğu gözlemlenmiştir. HPLC analizinde elde edilen kromatogramda ise BSA'ya ait pik ve alıkonma zamanı 1 olarak gösterilirken 2 numaralı örnek BSA*B konjugatına aittir ve bu kromatogramda iki pik görülmüştür. Konjugatın alıkonma zamanının (RT)'da saf BSA'ya göre kaydığı gösterilmiştir. BSA*B konjugatına ait kromatogramdaki ilk pik konjugata ikinci pik ise ortamda bulunan ve reaksiyona girmemiş serbest BSA'ya ya da birkaç Betulin molekülüne bağlanmış BSA'ya aittir [26].



Şekil 13. Saf BSA ve BSA-B konjugatına ait (a) UV spektrumları (b) HPLC kromatogramları, (1=>BSA, 2 => BSA-B konjugatı) [5].

Polielektrolitler ile biyomoleküller arasında kovalent bağlanma kimyası dışında polielektrolitler ile kompleksleşmelerde farklı etkileşimler söz konusudur. Temel olarak kovalent olmayan etkileşimlerin bir çoğu polimer ve proteinler arasında kompleks oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Proteinler ve poli(vinilpirolidon) veya diğer hidrofilik noniyonik polimerler arasındaki etkileşim hidrojen bağı ile oluşur ve donör gibi görev yapan karboksilik asit gruplarının varlığını gerektirmektedir. Bütün çözünenler suya göre daha hidrofobiktir. Bu sebeple polikomplekslerdeki hidrofobik etkileşimlerin varlığı yok sayılamaz. Hidrofobik etkileşimler için en güçlü kanıt sistematik yapısal değişimlerle ortaya çıkar veya hidrofobik etkileşimlerin karakteristiği olan assosiyasyon entropisine ve entalpisine bağlı sıcaklık değişimi ile bulunabilir, ancak uygun bir ölçüm yöntemi bulunmamaktadır. Elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğu genel olarak kabul edilmiştir. Tuzsuz çözeltilerde ve kuvvetli polielektrolitlerle kompleks oluşumu sırasında stokiometrik çökeltme gözlenir. Çökelek oluşumu sabit protein/polielektrolit oranında pH'a bağlıdır. Bu davranış polielektrolit kolloid titrasyonuna benzemektedir [27]. Kabanov ve arkadaşları zıt yüklü polielektrolitler temelinde dayanan interpolielektrolit

kompleksleşme modeli üzerine çalışırken, protein ve polielektrolit arasında oluşan stokiyometrik tuz bağlarının, proteinin iyonik birimlerinden sadece birkaç fraksiyonunu gerektirdiğini bildirdiler. Bütün yüklü birimlerin ya serbest olduğu ya da tuz bağlarına tutunduğu tüm yüklü birimleri içeren iki türlü model bir denge durumunun olduğunu gösterir ve proteinin ya da polielektrolitin diğer bir makro iyonu yerine geçtiği yer değiştirme reaksiyonlarını kantitatif olarak açıklamakta kullanıldı [28].

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

Proteinlerle hidrofobik olarak etkileşecek polimerler spesifik olarak tasarlanabilir. Ancak önemli olan nokta, hidrofobik etkileşimlerin ciddi bir katkı yapmadığı hallerin bilinmesidir [29]. Bütün proteinlerin değişen miktarlarda hidrofobik bölgeleri bulunduğundan ve tüm vinil polimerlerin ana zinciri hidrofobik olduğundan bu tip etkileşimlerin incelenmesi önemlidir. Diğer taraftan bu kuvvetlerin uzun mesafeli doğasından dolayı kuvvetli elektrostatik kararlılığın olması için çözünme de dikkate alınmalıdır. Hidrofobik etkileşimler bazı karakteristik belirtilere sahiptir. Yüksek tuz konsantrasyonunda daha kuvvetli hale gelirler. Hidrofobik yan zincirler takılmış polielektrolitlerin proteinlerle kompleksleri çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bunlara göre metil ve etil yan zincirleri içeren polielektrolitlerin bağlanmasının yaklaşık aynı olduğu görülmüştür. Karbon sayısı 2-6 arasında olan yan zincirlere sahip polielektrolit protein komplekslerinde bağlanma karbon sayısı ile birlikte artmaktadır. Karbon sayısı 8-10 arasında olan yan zincirlere sahip polielektrolitlerde ise bağlanma azalmaktadır. Sonuç olarak C1 ve C2 yan zincirleri proteinin hidrofobik bölgelerine ulaşamamıştır ve C8-C10 yan zincirli polielektrolitlerde ise intrapolimer miselleşme polielektrolit-protein kompleksme reaksiyonu ile yarışmaktadır. Yapılan çalışmalar elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin birbirlerine katkıda bulduklarını göstermektedir.

4. POLİELEKTROLİT-PROTEİN KOMPLEKSLERİYLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

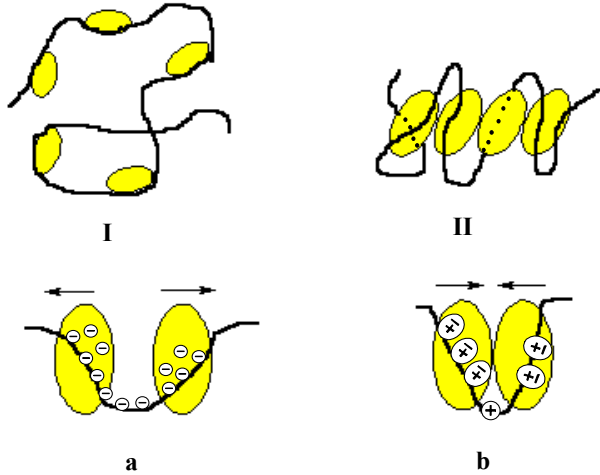
Sentetik polielektrolitlerin proteinlerle kompleksleri ilk olarak Morawetz tarafından çalışılmıştır. Bu çalışmasında farklı pH, iyonik şiddet, polimer/protein oranı değerlerinde BSA'nın polielektrolitlerle kompleks oluşumunu türbidimetrik olarak incelemiştir ve daha çok çökelek oluşumu üzerinde durmuştur. Maksimum çökelek oluşumu için kritik bir oran bulunduğunu göstermiştir. Bileşenlerden birisinin eklenmesiyle, antijen-antikor reaksiyonlarında olduğu gibi, çökelekler çözünür kompleksler oluşturmaktadır. Ayrıca bu çalışmada, çökelek oluşumu dengesinde polimerin molekül ağırlığının etkisinin olmadığı belirtilmiştir [30]. Ancak daha sonraki yıllarda Mustafaev ve arkadaşları polimerin molekül ağırlığının ve dar dağılımlı olmasının kompleks oluşumu üzerinde etkili olduğunu göstermiştir [32]. Morawetz küçük molekül ağırlıklı iyonların BSA'nın polivinilaminle çökelek oluşturduğu pH'ı değiştirdiğini de göstermiştir. Ayrıca polimetilmetakrilik asit (PMAA), SA ve oksihemoglobin karışımının reaksiyonunu da incelemiştir. Bahsedilen proteinlerin izoelektrik noktaları aralığına uygun olan pH değerinde oksihemoglobinin seçici olarak çöktüğü gözlenmiştir. Çalışmada polimetakrilik asit, gamaglobulin ile SA ve insan albumini ile bunun antikör karışımını ayırdığı gösterilmiştir.

Lineer polielektrolitlerin (poliasitlerin polianyonları, poliamfolitler, polikatyonlar ve onların türevleri) aynı yüklü (pozitif veya negatif) globular proteinlerle karşılıklı etkisini incelenmiş ve çok miktarda suda çözünebilir polimer-protein kompleksleri yapmışlardır. Yapmış

oldukları bazı çalışmalara göre; PAA-BSA çözeltilerinin pH:7’de alınmış sedimentogramları iki pik ile karakterize olmaktadır. Piklerden birinin sedimentasyon sabiti poliasit çözeltisinin sedimentasyon sabitine uygunken diğer pikin ise serbest proteine uygun olduğu bulunmuştur. Proteini ilave ettikçe protein pikinin alanı artarken, diğer pikin alanı ise sabit kalmaktadır. Bu sonuç pH:7’de PAA ile BSA’nın kompleks oluşturmadığını gösterir. pH:7’de protein ve poliasit negatif yüklenmişlerdir. Buna göre de aynı yüklenmiş partiküllerin birbirini elektrostatik itmesi kompleks oluşumunu engellemektedir.

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

Yapılan çalışmalar sonucunda proteinin kompleksleşmesi sırasında sarmallık seviyesinin değişmediğini göstermektedir. Bu sonuca göre proteinin polianyon üzerine adsorbsiyonu ile küresel yapısının fazla değişmediğini söylemek mümkündür. Polielektrolit makromoleküllerinin zincirinin uzunluğunun küresel proteinlerin çapından fazla olduğu dikkate alınarak her bir zincirin ardışık olarak birkaç protein molekülünü bağladığını söylemek mümkündür ve kompleksin yapısı şekildeki gibi gösterilebilir.



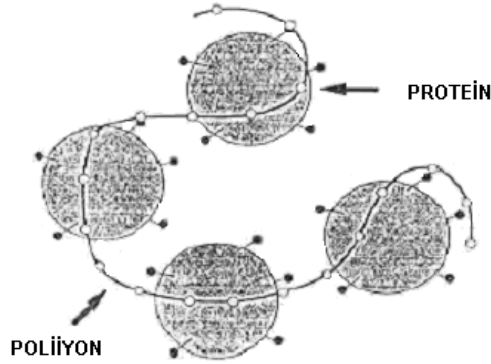
Şekil 14. Suda çözünen PE-protein komplekslerinin yapısı: I- Poliasitlerin polianyonlarının proteinlerle komponentler aynı (negatif) yüklendiğinde oluşan komplekslerinin yapısı, II- Lineer polielektrolitlerin zıt yüklenmiş proteinlerle $n_p/n_{PE} \leq N_i$ oranında oluşan komplekslerin yapısı "a" ve "b" - "a" (I) ve "b" (II) tipli yapıların oluşumunu şematik olarak göstermektedir [3].

Bu yapıda (I) protein molekülleri istatistik yumak konformasyonunda olan polielektrolit zinciri boyunca rastgele dağılmıştır. Sistemin kompleks oluşumunda spesifik viskozitesinin nispeten az değişimi bu yapıya uygundur. "I" yapısı, protein partiküllerinin polikatyonlarla nötral su ortamında oluşturdukları çözünen komplekslerinin yapısından prensip olarak farklıdır. Küresel proteinlerin polianyonlarla kompleks oluşumunun karşılaştırmalı analizi bu şekilde

açıklanabilmektedir. Her iki durumda küresel proteinler negatif yüklüdürler, yani elektrostatik faktör bunların temasta olmasını engellemektedir. Proteinlerin polikasyonlarla adsorpsiyonunda yukarıda söylenildiği gibi pozitif yüklü polikasyon monomerleri ile negatif yüklü protein grupları arasında elektrostatik bağların oluşması esastır. Buna göre proteinin negatif yükleri kapanmakta ve adsorpsiyon olmuş kürelerin temasta olmasına engel olmamaktadır. Yani polar olmayan karşılıklı bir etki gözlenmektedir. Aynı zamanda polikasyonun yükleri yeteri kadar kapanarak "II" yapısının yığılması yolu ile ayrı ayrı bölümlerinin yakınlaşmasına imkan vermektedir. Proteinlerin polianyonlarla adsorpsiyonunda durum tamamıyla başkadır. Negatif yüklü kürelerin polielektrolitlerle bağlanması elektrostatik itmenin tersi olarak oluşmaktadır. Her bir adsorbe olan proteinin efektif negatif yükü buna bağlı polianyon monomerinin miktarına göre artabilmektedir. Buna göre kompleks partiküllerinde küresel proteinlerin temasta olması menfaatli değil ve bunlar birbirlerine aralıklı olarak yerleşerek "II" tipli yapıyı oluşturmaktadırlar. Böylelikle küresel proteinler lineer polielektrolitlerle iki tip çözünen kompleks oluşturabilmektedir. Proteinlerin polikasyonlarla kompleksleri açık bir şekilde ifade olunan kooperatif karakterde ve kendisine bağlı yapı meyili olması ile karakterize olurlar. Proteinin az miktarında bunlar için küresel proteinlerin polielektrolit zincirleri arasında beraber olmayan dağılımı görülmektedir. Proteinle maksimum yüklenmiş polikasyonlar pratik olarak, yüklenmemiş polikasyonlarla aynı zamanda bulunmaktadırlar. Silindire benzer partiküllerin kendisine bağlı yığılması oluşur. Bu sistemlerin tam aksi olarak proteinlerle polianyonların çözünen kompleksleri bunlarda küresel proteinlerin beraber adsorpsiyonu yolu ile oluşmaktadır. Böylece sistemde istatistik yumak konformasyonunda olan çözünen kompleks partikülleri oluşmaktadır. Bütün bunlara bağlı olarak proteinlerin amfoter kopolimerlerle komplekslerinin incelenmesi çok önemlidir. Bu sistemlerde genellikle bir tip bağlanmadan başka tip bağlanmaya geçmek mümkündür [31, 32].

Elektrostatik itme faktörünün elimine edilmesi BSA proteinin sodyum poli(stirensülfonat) PSSNa ile etkileşiminde daha iyi görülmektedir. PSSNa sulu ortamlarda tüm olarak polianyona ve sodyum kationuna ayrılmış kuvvetli polielektrolittir. BSA-PSSNa sulu çözeltileri proteinin çeşitli konsantrasyonlarında sedimentogramlarla ancak şiddetli dar bir pikle karakterize edilmiştir. Bunun alanı ve sedimentasyon sabiti sistemde protein miktarı arttıkça çoğalır. Bu sonuçlar çok büyük ihtimalle pH:7.5'te proteinle polielektrolit arasında kararlı polikompleks oluşmasını göstermektedir. Aynı yüklü partiküllerin birleşmesinde, proteinin PSSNa poliiyonunun hidrokarbonları ile karşılıklı hidrofobik etkinin baskın olduğu gösterilmiştir [5].

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



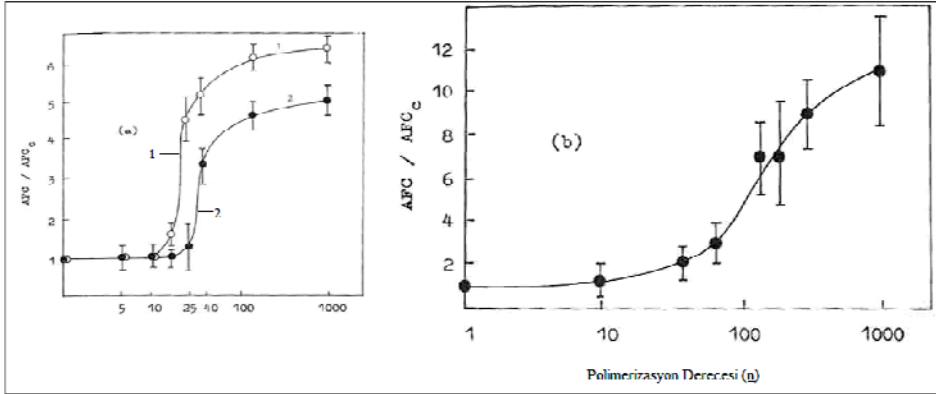
Şekil 15. Protein ve poliyon içeren stokiyoimetrik kompleksin şematik gösterimi [5].

Amorf çökelek oluşturacak şekilde kompleksin yapısını birarada tutan tuz bağları çok gevşektir, çünkü pH'nın değişimi veya poliyon ilavesi tuz bağlarının bir kısmını, özellikle proteinin imidazolil grubu ile polimerin sülfat grubu arasındakiini, kırar. Bağların gevşek olması protein ve poliyon moleküllerinin stokiyoimetrik olarak nötralleşmesini veya zıt yüklü grupların 1:1 oranında bağlanmasını mümkün kılabılır [27].

Andrianov ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise pH:7'de BSA-poli[di-(karboksilat-fenoksi) fosfozen] kompleksinin oluşumunu ve immünolojik etkilerini incelemişlerdir. Oluşan kompleksin molekül ağırlığının polimerin tek başına olduğu halden daha ağır olduğunu ama kompleksin boyutunun polimerden önemli derecede farklı olmadığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, mokromoleküler yapının daha kompakt bir hal aldığı ortaya konulmuştur [33].

4.1. İmmünolojide Polielektrolit Kompleksleri

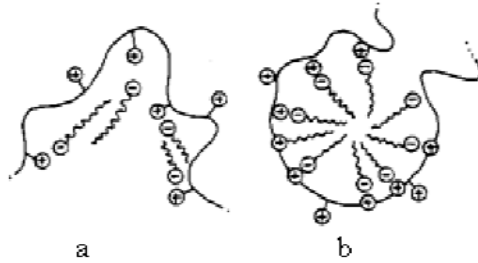
1970'li yılların başlarında immünolog ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı polielektrolitlerin immün sistem üzerine etkisi aydınlatılmış ve yapay polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu belirlenmiştir. PE'lerin bu özelliklerini aydınlatmak amacıyla yapay polielektrolitlerle koyun eritrositlerinin kompleksleri oluşturulmuş ve bu kompleksler hayvanlara immünize edilerek, immün cevabın yükselmesinde PE'lerin etkili oldukları gösterilmiştir. PE'lerin bakteri, virüs tabiatlı yapay antijenler için taşıyıcı olarak kullanılması sonucu immün cevabın artması ve devamlı bir immün koruyuculuk sağlaması sentetik aşı tasarlama fikrini ortaya çıkarmıştır [5]. Yüklü olmayan ve su ortamında yüklenmeyen polimerlerle (polivinil alkol, poli-N-vinil pirlidon, polietilen glikol) eritrositlerin kompleksleri yapılmış, fakat bu kompleksler immün cevapta artış sağlayamamışlardır yani bu tür yapılı polimerler adjuvant (yardımcı) özelliği taşımamaktadırlar. Bu bilgiler ışığında yüksek molekül ağırlıklı sentetik polielektrolitlerin (PE), (negatif ve pozitif yüklenmiş veya ortamın fizyolojik şartlarına göre yüklenbilen polimerler; polianyonlar, polikasyonlar ve bunların kopolimerleri) monomerlerinin kimyasal yapılarından bağımsız olarak adjuvant etkisi (immüniteyi stimüle eden) gösterdiği sonucu ortaya çıkmıştır [34-42]. Bunun nedeni şu şekilde açıklanmıştır: Bu polielektrolitlerin sentezi ve modifikasyonu daha kolaydır, istenen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek mümkündür. Suda iyi çözümler ve bilinen yapılarda çeşitli kompleksleri sentezlenebilmektedir. Polielektrolitlerde molekül ağırlığı polimerleşme derecesi ile orantılıdır. Polimerleşme derecesinin artması istenilen kompleksin oluşumunu destekleyici yönde etki eder ve polimerin bağlanma miktarında artış gözlenir. Bunun yanı sıra polielektrolit çözeltilerinin elektrokimyasal özellikleri genellikle poliyonun zincir boyuna bağlıdır; yani polikompleksin çökmesi vb. özellikler polimerin polimerleşme derecesine bağlıdır [5].



Şekil 16. Fare karaciğer hücrelerinde antikor oluşturan hücrelerin (AFC) miktarında artışın 4 değerli polikonidin (PC) tuzlarının (a) 1-PC-C₂H₅; 2-PC-C₂H₅-CH₂C₆H₅ ve (b) Poliakrilik asidin (PAA) polimerleşme derecesine olan bağlılığı. Polielektrolitin konsantrasyonu 50 mg/kg; 5×10^6 eritrosit hücre miktarı [5].

Bu konuda yapılan bu ve diğer fizikokimyasal ve immünolojik çalışmalar; immün sistemin uyarılmasında, PE'lerin immün hücrelerin yüzeyi ile etkileşimindeki kooperatif adsorbsiyonun önemli rolü olduğunu ve timusa bağlı olmayan polimer yapıları yapay immünojenlerin oluşum prensibini açıklamaya imkan vermektedir.

PE moleküllerinin sulu ortamlarda supramoleküler yapısının değişmesinin birinci yolu hidrofoblaşmasıdır. Bunun için poliyon zincirlerinin yüzey aktif maddelerle yüklenmesi gerekmektedir. PE'in yüzey aktif maddelere kovalent bağlanması veya yüzey aktif maddelerle PE'in arasında elektrostatik bağlarla kompleks oluşması ile PE'ler hidrofoblaştırılmaktadır. Polimer molekülü ile yüzey aktif maddeler (sodyum dodesil sulfat, sodyumdezoksi kelat, setil trimetil, amonyum bromür v.s.) arasında elektrostatik kompleks oluşumundan meydana gelen komplekslerin yapısı yüzey aktif madde/PE oranına bağlıdır [5, 20].



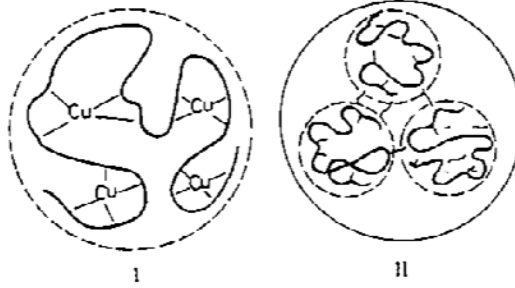
1. Tip Kompleks

2. Tip Kompleks

Şekil 17. a ve b Suda çözünen PE-Yüzey aktif madde kompleksleri [5].

Şekil 17 a'da yüzey aktif madde/PE oranının küçük olduğu değerlerde oluşan 1. Tip Kompleks, Şekil 17 b'de ise yüzey aktif maddenin konsantrasyonunun artması durumunda oluşan 2. Tip Kompleks görülmektedir. Yüzey aktif madde konsantrasyonunun artırılması ile birinci tip intramoleküler komplekste karşılıklı etkinin artması sonucu 2. Tip elektrostatik kompleks oluşur. 2. Tip kompleksin kompaktlığı 1. Tip komplekse göre daha fazladır.

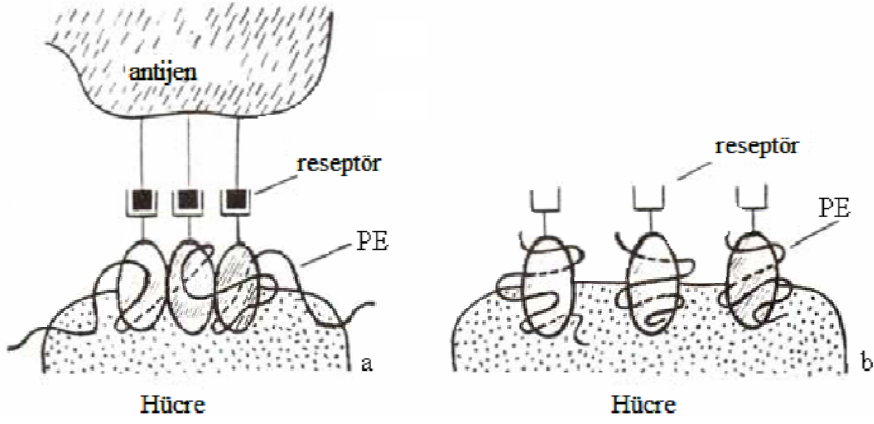
Supramoleküler yapının değişmesinin ikinci yolu, PE'lerin geçiş metal iyonları ile kompleks oluşturmasıdır. Bu metal iyonları az y¼kl¼ veya n¼tral polimer molek¼lleri ile birleşerek, bu polimerlerin hem komplementer y¼zeyle kompleks oluşturma etkisini, hem de polimer zincirlerinin ç¼zeltideki konformasyonunun d¼zenlenmesini sağlamaktadır. Örneğin Cu^{+2} iyonlarının y¼ksek konsantrasyonlarında intramolek¼ler agregasyon oluşturur ve partik¼ller asimetric yapıya yakın bir forma geçerler.



Şekil 18. Polimer-metal komplekslerinin $[Me]/[PE] \ll 1$ (I) ve $[Me]/[PE] \gg 1$ (II) oranlarında oluşan yapı [13].

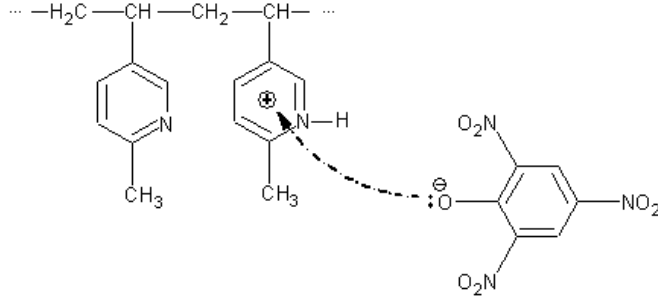
PE-Metal kompleks bileşenlerinin oranlarının sabit değerlerinde oluşan PE komplekslerinin yapısı ç¼zeltideki PE'in başlangıç konsantrasyonuna bağlıdır. Fazla seyreltilmiş ç¼zeltelerde PE-Metal kompleksleri kompakt yapıdadır. Polimerin başlangıç konsantrasyonu arttıka metal iyonları ile makromolek¼ller arasında çapraz bağlar oluşur ve sistemde assosiyeye olmuş asimetric partik¼ller meydana gelir.

PE-Metal ve PE-Y¼zey aktif madde komplekslerinin imm¼n sistem ¼zerine etki mekanizması genelde aynıdır ve PE kompleksinin kimyasal yapı çevrimlerine bağlıdır. Kimyasal olarak açık yapı ile karakterize edilen PE kompleksleri imm¼n sistemi g¼çl¼ uyaranlardandır. PE kompleksleri kompaktlaştığında ya imm¼n sistemi uyarmazlar ya da imm¼niteyi yatıştırıcı olarak çalışırlar. PE'lerin imm¼nolojik aktifliğinin oluşmasında protein fakt¼r¼ önemli bir rol oynamaktadır. Öyke ki; kana enjekte edilmiş PE makromolek¼lleri kanda plazma proteinleri ve ya h¼cre y¼zeyindeki proteinlerle karşılıklı etkileşimde bulunabilirler ve makrofajlar tarafından adsorbe edilebilirler. Ayrıca; PE kompleksinin imm¼n sistemi stimule etmesi; PE kompleks bileşiminin hem polimer zincir uzunluğuna, hem de kompleksin kompaktlığına bağlıdır. Stokiyometrik olmayan PE kompleksleri antijen resept¼rleri ile h¼cre resept¼rleri arasında birden fazla noktada etkişim imkanı sağlamaktadır (Şekil 19a). Stokiyometrik PE komplekslerinde ise antijen resept¼rleri ile h¼cre resept¼rleri arasında karşılıklı etkileşim ihtimali azalmakta ve birbirinden izole olmuş kompleksler oluşmaktadır (Şekil 19b) [5, 41].

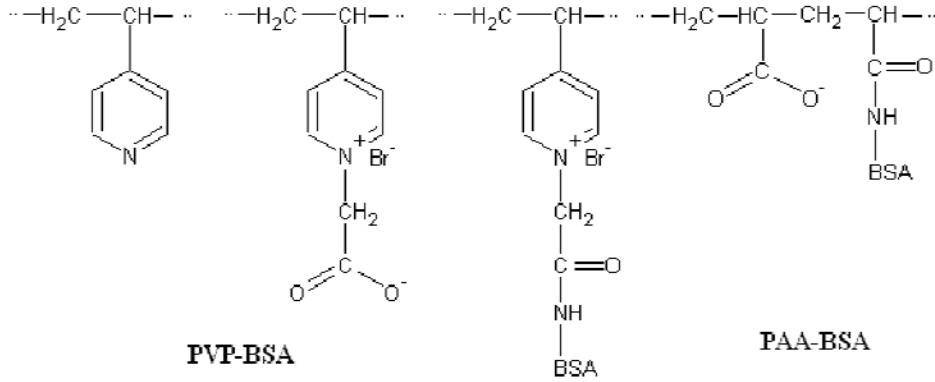


Şekil 19. Aynı polimerleşme derecesine ve aynı kimyasal yapıya sahip olan PE kompleksleri (a) Lineer yapıda PE kompleksi (b) Kompakt yapıda PE kompleksinin hücre yüzeyindeki antijenlerle karşılıklı etkileşiminin şematik gösterimi [5].

Doğal olmayan PE olarak sentezlenmiş ilk suni antijen poli-2-metil-5-vinil-piridinin trinitrofenol ile elektrostatik kompleksidir.



Bu suni antijen organizmaya immünize edildiğinde immün cevap oluşturması için bir adjuvanta (yardımcı) ihtiyaç göstermez ve timus organı olan veya olmayan hayvanlarda antikor oluşumunu artırır. Doğal olmayan ikinci tip antijen ise; kooperatif, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerle kararlı hale getirilen proteinlerin PE-Protein kompleksleridir. Bu kompleksler proteine spesifik antikorların sentezini uyarmışlar ve immün cevabın oluşmasının immün cevap genlerine ve timusa bağlı olmadığını göstermişlerdir. Aynı zamanda protein antijenlerinin PE'lerle olan kompleksleri efektif aşı özelliği göstermektedir. PE komplekslerinin yapısı ile (stabilitesinin, yükünün, konformasyonunun ve diğer fizikokimyasal özelliklerinin) immünojenik aktivite arasındaki bağlar analiz edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında polimer bileşimli immünojenlerin model yapısı ortaya konulmuştur.



Şekil 20. Poli-4-vinilpiridin (PVP)- BSA Kompleksi ve PAA-BSA kompleksinin yapısı [23].

Poli-4-vinilpiridin (PVP) ve PAA polimeri ile BSA'nın kompleksleri oluşturup bu PE-Protein komplekslerinin immünojenliği incelenmiştir. Tüm bu deneylerden elde edilen sonuçlar immünojenliğin PE'lerin kimyasına bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışmalar; PE-protein komplekslerinin organizma şartlarında kararlı olmasının, bu komplekslerin immün sistemi aktive etmesinin en önemli şartı olduğunu göstermiştir. Bu prosesin mekanizmasını anlamak için spesifik antikor oluşturan hücrelerin oluşum kinetiği incelenmiştir [5, 20].

4.2. İmmünojen Polielektrolit Kompleksinin Çalışma Modeli

Polielektrolit kompleksleri immünojenlik etki göstermesi için optimum şekilde yapılmalıdırlar. İmmünojenlik aktif (veya "pasif") polielektrolit kompleksleri için aşağıdaki model gösterilmiştir (Şekil 21). Gösterilen yüksek immünojen etkili polielektrolit kompleks modelinin ayrı ayrı çizgilerini ifade eden en önemli fizikokimyasal kriterleri şu şekilde yeniden açıklayabiliriz [5, 43, 44].



Şekil 21. Yüksek (I) ve düşük immünojen (II) etkili antijen-PE komplekslerinin modellerinin yapısı [5].

- 1) Antijen ve polimer molekülleri fizyolojik şartlarda parçalanmayan stabil bağlarla (çok noktali elektrostatik ve hidrofob karşılıklı etki, iyon koordinasyon ve kovalent bağlama) birleşmelidir.
- 2) Stokiyometrik yapılmayan PEK'leri antijenin birkaç epitopunu içermelidir.

3) Yapısında “ilmik” olan PEK’lerin (polimerin bükülebilen serbest bölümlerinin olması) hem protein yüzeyine yapışmış hem de serbest “ilmik”te bulunan ilave olarak iyonlanmış grupları, PEK yüzeyinde kompleks partiküllerinin çözeltide kalmasına yardım eden yayılmış hidrofil bölge yaratır.

4) Antijen moleküllerinden toplanmış ve polimer taşıyıcısı ile stabilleşmiş sert silindir (çubuk) tipli yapı; hem antijen determinantlarının uygun yerleşmesini hem de büyük yüzey oluşmasını sağlar.

5) PEK’in biyosistem komponentleri ile (proteinler, immün hücreler v.b.) çok noktali kooperatif karşılıklı etkileşimde olma kabiliyeti; yapısında olan “ilmik”lerdeki serbest polimer fonksiyonel gruplarına göre oluşur. Yüksek immünojen etkili PEK’ler biyosistem komponentleri ile yüksek kompleks oluşma kabiliyetine sahiptir.

6) Antijen determinantlarının uygun yerleşmesi ve antijen hücre reseptörleri ile çok noktali karşılıklı etkisi için daha önemli steril şartlara uygun olan yapıli kompleks. Bu nedenle polivalent aşilar yapmak için polielektrolit kompleksinin mekanik karışımı daha önemlidir.

Şekil 22 a’da scannig elektron mikroskobu ile sığır eritrositlerinin immünolojik etkiye sahip olan polimerlerle ve bunların protein kompleksleri ile karşılıklı etkisinden oluşan polimer-hücre komplekslerinin incelenmesinden alınan sonuçlar verilmiştir. Görüldüğü gibi hem polimerler hem de polimerlerin kompleksleri hücre ile interpolimer kompleks oluştururlar ve bunların agregasyonuna neden olurlar. Yukarıda açıkladığımız gibi hem saf polimer hem de polimer-protein kompleksleri T-hücrelerine bağıli olmadan immün cevap oluştururlar. Alınmış fizikokimyasal sonuçlar T-hücrelerine bağıli olmayan immün cevabın başlaması için antijen hücre kompleksinin hipotetik şemasını gösterme imkanı sağlamıştır (Şekil 22 b).



Şekil 22. İmmün cevap oluşturan antijen-hücre komplekslerinin hipotetik şeması. a- T-Bağımlı cevap. b- T-Bağımsız cevap [5].

T hücrelerine bağıli olmayan immün cevapta antijen B-lenfosit reseptörü ile yapı-spesifik kontakın oluşumuna katılır (birinci spesifik signal). İkinci signal B-lenfositin yüzeyinde absorpsiyon oluşmuş polimerden ileri gelir [5, 20].

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Klasik adjuvantların olumsuz etkilerinden dolayı alternatif olarak daha etkin immün ve koruma yanıtlarının alındığı polimerik adjuvantların kullanılması ve yapay polimerik aşı sistemlerindeki kullanımlarının geliştirilmesi amacıyla, yüksek immünojen etkili polielektrolit kompleksler, biyosistem komponentleri (proteinler, immün hücreler v.b.) ile yüksek kompleks oluşturma kabiliyetine sahip olduğu ve hem polielektrolitlerin hem de polielektrolit-protein komplekslerinin T-hücrelerine bağıli olmadan immün cevap oluşturduklarına dair bilgiler ortaya konularak konuya yeniden bir yaklaşım getirilmiştir. Yeni nesil aşı sistemlerinin geliştirilmesi başta olmak üzere

daha etkin, kararlı, hücre yönlendirmesi yapılabilen diagnostikler elde edilmesine, ayrıca teşhis kitlerinde ve tedavi yöntemlerinde kullanılmasına yönelik tasarlanacak kompleks ve konjugat sistemlerinin sentez ve kullanımına dair biyoyararlanımı daha yüksek biyoteknolojik yeni çalışmaların yapılması günümüzün araştırma konuları olarak incelenmesi devam etmektedir.

REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] Dautzenberg H., Jaeger W., Kötz J., *Polyelectrolytes: Formation, Characterization, and Application*, Hanser Publishers, Munich, 1994.
- [2] Polyelectrolyte description from Wikipedia, the free encyclopedia Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyelectrolyte> [last modified September 28, 2011]
- [3] Çimen N.S., “Proteinlerin Poliakrilik Asit ile Suda Çözünmeyen Kompleksleri”, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü, 2006.
- [4] Polymer Science Learning Center, Department of Polymer Science, The University of Southern Mississippi, conformation of tangled in a random coil and expanded polyelectrolytes available from : <http://www.pslc.ws/macrog/electro.htm> [accessed 2005]
- [5] Mustafaev M.I., “Biyopolimerler” (Biopolymers), TÜBİTAK, Gebze/Kocaeli, Türkiye, 1996.
- [6] Karahan M., Mustafaeva Z., Ozer H., “Polysaccharide-protein Covalent Conjugates and Ternary Metal Complexes”, *Asian J. Chem.*, 19, 1837-1845, 2007.
- [7] Kabanov V.A., “From synthetic polyelectrolytes to polymersubunit vaccines”, *Pure Appl Chem.*, 76(9), 1659–1677, 2004.
- [8] Sotiropoulou M., Bokias G., Staikos G., “Water-soluble complexes through coulombic interactions between bovine serum albumin and anionic polyelectrolytes grafted with hydrophilic nonionic side chains”, *Biomacromolecules*, 6(4), 1835-1838, 2005.
- [9] Akkiliç N., Mustafaeva Z., Mustafaev M., “High performance liquid chromatography study of water-soluble complexes and covalent conjugates of polyacrylic acid with bovine serum albumin”, *J. of Applied Polymer Science*, 105, 3108-3120, 2007.
- [10] Topuzogulları M., Cimen N.S., Mustafaeva Z., et.al., “Molecular-weight distribution and structural transformation in water-soluble complexes of poly(acrylic acid) and bovine serum albumin”, *European Polymer Journal*, 43, 2935–2946, 2007.
- [11] Shoukry M.M., Khairy E.M., El-Sherif A.A., “Ternary complexes involving copper(II) and amino acids, peptides and DNA constituents. The kinetics of hydrolysis of α -amino acid esters”, *Transition Metal Chemistry*, 27, 656-664, 2002.
- [12] Karahan M., Mustafaeva Z., Özeroğlu C., “Investigation of Ternary Complex Formations of Polyacrylic Acid with Bovine Serum Albumin in the Presence of Metal Ions by Fluorescence and Dynamic Light Scattering Measurements”, *The Protein Journal*, 29, 336-342, 2010.
- [13] Karahan M., “Development Of Functional Biopolymer Systems Containing Metal”, Ph.D. Thesis, Y.T.U., 2009.
- [14] Eroğlu B.I., Kilinc Y.B., Mustafaeva Z., “Bioconjugation of Hepatitis B antigenic peptide with polymeric carriers through various carbodiimide chemistry”, *Turkish Journal of Biochemistry*, 36, 222–229, 2011.
- [15] Mansuroğlu B., Kızılbey K., Derman S., et.al., “Investigation of protein-polyelectrolyte complex and conjugates by high performance liquid chromatography methods”, *Turkish Journal of Biochemistry*, 36, 21–28, 2011.
- [16] Zhao Z.X., Wang X.S., Qin X., et.al., “Enzyme microcapsules with substrate selective permeability constructed via layer-by-layer polyelectrolyte self-assembly”, *Materials Science & Engineering C- Materials for Biological Applications*, 32, 569-573, 2012.

- [17] Martinez, J.M.L., Chattah A.K., Sanchez R.M.T., et. al., "Synthesis and characterization of novel polyampholyte and polyelectrolyte polymers containing imidazole, triazole or pyrazole", *Polymer*, 53, 1288-1297, 2012.
- [18] Merle Y., "Synthetic Polyampholytes. 5. Influence of Nearest-Neighbor Interactions on Potentiometric Curves", *J. Phys. Chem.*, 91, 3092-3098, 1987.
- [19] Higgs P.G., Joanny J.F., "Theory of Polyampholyte Solutions", *J. Chem. Phys.*, 94 (2), 1543, 1991.
- [20] Mustafaev M., "Functionally Biopolymer Systems", *Sigma, Journal of Engineering and Natural Sciences* ISSN: 1304-7191, 4, 1-200, 2004.
- [21] Deen, C., Claasen, E., Gerritse, K., et.al., "A Novel Carbodiimide Coupling Method for Synthetic Peptides Enhanced Anti-peptide Antibody Responses", *J. Immunol. Methods.*, 129, 119-125, 1990.
- [22] Gürhan S.I., Akdeste, M.M., Akdeste, Z.M., et.al., "Preparation of Synthetic Peptide FMDV Vaccine with Newly Developed Antigen-Polymer Conjugates be Used as Immunogen and Vaccine in Veterinary Medicine", In:Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Appendix, 41, 349-357, 2002.
- [23] Mustafaev M., Mustafaeva Z., "Novel Polypeptide-Comprising Biopolymer Systems", *Technology and Health Care*, 10, 217-226, 2002.
- [24] Friedli G.L., "Interaction Of Deamidated Soluble Wheat Protein (SWP), With Other Food Proteins And Metals", A Thesis Presented For The Award of Doctor of Philosophy to The University Of Surrey, 1996.
- [25] Acar S., "Peptid-Protein Kovalent Konjugasyonu", Yüksek Lisans Tezi, Y.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü, 2006.
- [26] Mustafaev M., Mustafaeva Z., Ergen E., "Novel-Betulin-Containing Polyelectrolyte Conjugates", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 17, 251-269, 2002.
- [27] Thies, C., "Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology", Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1994.
- [28] Kabanov V.A., Skobeleva V.B., Rogacheva V.B., et.al., "Sorption of Proteins by Slightly Cross-Linked Polyelectrolyte Hydrogels: Kinetics and Mechanism", *J. Phys. Chem.*, 108, 1485-1490, 2004.
- [29] Radeva T., "Physical Chemistry of Polyelectrolytes", Marcel Dekker Inc., New York, 2001.
- [30] Morawetz H., Hughes W.L.J., "The Interaction of Proteins with Synthetic Polyelectrolytes. I. Complexing of Bovine Serum Albumin", *J. Phys. Chem.*, 56, 64-69, 1952.
- [31] Mustafaev M.I., Kabanov V.A., Belova V.V., et.al., *Biophys.*, 23: 789-795, 1978.
- [32] Kabanov V.A., Mustafaev M.I., Belova, V.V., et.al., *Mol. Biol.*, 12, 1264, 1978.
- [33] Andrianov A.K., Marin A., Roberts B.E., "Polyphosphazene Polyelectrolytes: A Link between the Formation of Noncovalent Complexes with Antigenic Proteins and Immunostimulating Activity", *Biomacromolecules*, 6, 1375-1379, 2005.
- [34] Mustafaev M., Çırakoglu B., Saraç S., et.al., "Soluble and Insoluble Ternary Complexes of Serum Proteins with Polyanions in the presence of Cu²⁺ in Water", *Journal of Applied Polymer Science*, 62 (1), 99-109, 1996.
- [35] Mustafaev M.I., Osada Y., Endo T., "Advanced Biopolymer Systems", First Japanese-Turkish Workshop Materials. TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi, 1-76, 1998.
- [36] Mustafaev M.I., Osada Y., Başalp A., et.al., "New Temperature-Responsive Immunogens by Poly(N-isopropyl-acryamide)-modified Bovine Serum Albumin", *Recent Advances in Peptide and Protein Delivery*, Editions de Sante, Paris, 1998, 145-162.
- [37] Mustafaev M.I., Saraç A.S., Erkol A.Y., et.al., "Effects of Cu²⁺ on Stability and Composition of Water Soluble Ternary Polyacrylic Acid-Cu²⁺-Protein Complexes Against

- Radiation Damage”, Polymer Bulletin, 36 (5), 623-627, 1996.
- [38] Mustafaev M.I., Yucel F., Ozturk S., et.al., “Cu²⁺-mediated Complex Formation Between Polyacrylic Acid (PAA) and Bovine Serum Albumin”, Journal of Immunological Methods, 197 (1-2), 31-37, 1996.
- [39] Mustafaev M., Yucel F., Çirakoglu B., et.al., “Immune Response to Progesterone Involved in Cu²⁺-mediated Polyanion-Protein Complex-Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma clones”, Immunology Letters, 52 (2-3), 63-68, 1996 .
- [40] Ozeroğlu C., Namazova N., Mustafaev M.I., et.al., “The Complex Formation Between Polyacrylamide Containing Glycine end Groups and Bovin Serum Albumin in the Presence of Copper (II) in Neutral Aqueous Media”, 274, 418-427, 1996.
- [41] Mansuroğlu B., “Biyohibrid Yapılı Polimer Peptid Konjugatlarının Geliştirilmesi”, Doktora Tezi, Y.T.Ü., FBE Biyokimya Anabilimdalı, 2007.
- [42] Güney O., Saraç S.A., Mustafaev M.I., “Fluorescence and Turbidimetry Study of Complexation of Human Serum Albumin with Polycations”, Journal of Bioact. And Compat. Polymers, 12, 231, 1997.
- [43] Petrov R.V., Mustafaev M.I., Norimov A.Sh., “Physico-Chemical Criteria for The Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on the Basis of Polyelectrolyte Complexes”, Harwood Acad. Pub., UK, 1992.
- [44] Mustafaev M.I., Romanova R.Y., Norimov A.Sh., et.al., “On the role of Chemical Nature of the Polymeric Carrier in the Immunogenic and Protective Activities of Polyelectrolyte Complexes of BGG Mycobacteria Cell Envelope Antigens in a Model of Tuberculosis Infection”. Immunologiya (Immunology), 6, 35-40, 1990.