

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİÜRETAN YÜZEYLERE FİBRONEKTİN ADSORPSİYONUNUN
MOLEKÜLER SİMÜLASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Melisa PANOS**

Anabilim Dalı : Kimya Mühendisliği

Programı : Kimya Mühendisliği

HAZİRAN 2010

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİÜRETAN YÜZEYLERE FİBRONEKTİN ADSORPSİYONUNUN
MOLEKÜLER SİMÜLASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Melisa PANOS
506071019**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07 Mayıs 2010
Tezin Savunulduğu Tarih : 10 Haziran 2010**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Göktuğ AHUNBAY (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Seniha GÜNER (İTÜ)
Doç. Dr. Özlem KESKİN (KOÇ ÜNİ.)**

HAZİRAN 2010

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince her türlü desteğini esirgemedi bana yardımcı olan, daima sabır ve özveriyle beni yönlendiren, deneyimlerini paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Göktuğ AHUNBAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yorumlanmasında fikirleri ve önerileri ile bana yardımcı olan Dr. Taner Zafer ŞEN'e ve çalışmama katkılarından dolayı Prof. Dr. F. Seniha GÜNER'e çok teşekkür ederim.

Bana her zaman destek ve moral veren değerli arkadaşlarıma ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Melissa KARAGÖZLÜOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm hayatım boyunca hiçbir zaman desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen ve her an yanımda olan aileme ve Teni KARAMAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2010

Melisa Panos
Kimya Mühendisi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
SEMBOL LİSTESİ	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. POLİMERİK BİYOMALZEMELER VE PROTEİN İLİŞKİLERİ	3
2.1 Biyomalzemeler	3
2.2 Poliüretanlar	4
2.3 Proteinler	6
2.4 Protein-Yüzey İlişkileri ve Protein Adsorpsiyon	10
2.4.1 Protein ve biyomalzeme yüzey özelliklerinin önemi	10
2.4.2 Proteinlerin konformasyonunu etkileyen faktörler	12
2.4.3 Protein adsorpsiyonunun kinetiği.....	13
2.4.4 Çok bileşenli çözeltiler.....	13
3. MOLEKÜLER SİMÜLASYON YÖNTEMLERİ	17
3.1 Kuvvet Alanı	18
3.2 İstatistiksel Topluluklar.....	21
3.3 Moleküler Mekanik	23
3.4 Moleküler Dinamik	24
4. PROTEİN YÜZEY İLİŞKİLERİNİN MODELLENMESİ	29
4.1 Çözücünün Temsili	29
4.2 Yüzeyin Modellenmesi	31
4.3 Yüzey Adsorpsiyonu	32
5. SİMÜLASYON ÇALIŞMASI.....	39
5.1 Sistem.....	39
5.2 Polimer Matrislerinin Oluşturulması	41
5.3 Polimer Matrislerinin Dengelendirilmesi.....	43
5.4 Oluşturulan Polimer Matrislerinin Yapısal Özellikleri	43
5.5 Protein-Yüzey İlişkilerinin Belirlenmesi	45
5.6 Phi (Φ) ve Psi (ψ) Bağ Açılarındaki Değişimlerin Hesaplanması	48
6. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME	51
6.1 Polimerlerin Yapısal Özellikleri	51
6.2 Protein Adsorpsiyonu Simülasyonları	53
6.3 Phi (Φ) ve Psi (ψ) Bağ Açılarındaki Değişimlerin Hesaplanması	67
7. VARGILAR VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ.....	83

KISALTMALAR

AMBER	: Assisted Model Building with Energy Refinement
CED	: Kohesiv Enerji Yoğunluğu
CHARMM	: Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics
COMPASS	: Condensed-phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation Studies
CVFF	: Tutarlı Valans Kuvvet Alanı
ESFF	: Extensible Systematic Force Field
GB	: Genelleştirilmiş-Born
HSA	: Human Serum Albumin
HDI	: Hekzametilen Diizosiyanat
HY	: Hint Yağı
IgG	: Gamma-globülin
kDa	: kiloDalton
MM	: Moleküler Mekanik
MD	: Moleküler Dinamik
MC	: Monte Carlo
NPT	: İzotermal-izobarik topluluk
NVT	: Kanonik topluluk
PEG	: Polietilen Glikol
PCFF	: Polymer-Consistent Force Field
PB	: Poisson–Boltzmann
PDB	: Protein Veri Bankası
PU1	: Polietilen Glikol + Hekzametilen Diizosiyanat Kopolimeri
PU2	: Hint yağı + Hekzametilen Diizosiyanat Kopolimeri
PVA	: Polivinil alkol
RGD	: Proteinde Arginin-Glisin-Aspartik asit amino asitlerinden oluşan bölge
RIS	: Rotasyonel İzomerik Hal
UFF	: Universal Force Field

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Amino asitlerin yan zincirlerine göre sınıflandırılması.....	7
Çizelge 2.2 : İnsan kan serumunda bulunan temel proteinler ve fonksiyonları.....	15
Çizelge 5.1 : Literatürden alınan deneysel yoğunluklar	40
Çizelge 5.2 : Fibronektin tip I modülünün yapısında bulunan amino asitler ve sayıları	41
Çizelge 6.1 : PEG, PVA, PU1 ve PU2 polimerlerinin dönüş yarıçapı değerleri	52
Çizelge 6.2 : PEG, PVA, PU1 ve PU2 polimerlerinin kohesiv enerji yoğunluk ve çözünürlük parametresi değerleri.....	52
Çizelge 6.3 : PEG, PVA, PU1 ve PU2 polimerlerinin elastik sabitleri.	52
Çizelge 6.4 : Etkileşim enerjisinin amino asit ve atom sayısı ile ilişkisi grafiklerinin eğim değerleri	58
Çizelge 6.5 : Yüzeyler ile en fazla etkileşim enerjisi gösteren protein konumları ve bu konumlarda yüzeylere 7Å mesafede bulunan amino asitler ve sayıları.....	59
Çizelge 6.6 : Yüzeyler ile en fazla etkileşim enerjisi gösteren protein konumları ve bu konumlarda yüzeylere 7Å mesafede bulunan amino asitler	60
Çizelge 6.7 : Burulma enerjisinin amino asit ve atom sayısı ile ilişkisi grafiklerinin eğim değerleri	64
Çizelge 6.8 : β-Yapraklarındaki amino asitlerin adsorpsiyon öncesi ve sonrası değişimleri	65
Çizelge 6.9 : β-Yapraklarındaki amino asit sayısının değişimi	67

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: Poliüretanın genel yapısı ve üretan grubu.	4
Şekil 2.2	: Poliüretanın yumuşak ve sert bölümleri	5
Şekil 2.3	: Üretan yapısında bulunan hidrojen bağları.	5
Şekil 2.4	: Bir amino asit molekülü	6
Şekil 2.5	: İki amino asidin birleşmesi ile oluşan dipeptit yapısı	7
Şekil 2.6	: Proteinlerin dört farklı yapısal seviyesi.....	8
Şekil 2.7	: Polipeptit yapısında bulunan phi (Φ) ve psi (ψ) burkulma açıları	9
Şekil 2.8	: Ramachandran grafiği	9
Şekil 2.9	: Proteinlerin yüzey ilişkisinin zaman ile değişimi	13
Şekil 2.10	: Vroman etkisi	14
Şekil 2.11	: Hücre zarındaki reseptör intergin grupların hücre dışı matriste bulunan fibronektin proteininin RGD bölgesine bağlanması.....	16
Şekil 3.1	: Moleküller arası ve moleküller içi etkileşimler.....	19
Şekil 4.1	: Farklı saklı metotların serbest adsorpsiyon enerjisine etkileri.	31
Şekil 4.2	: Fibronektin proteininin grafit yüzeyi üzerinde altı farklı yönelmesi	34
Şekil 4.3	: MD sonucu proteinde konforasyon değişimleri.	35
Şekil 4.4	: Fibrinojen proteininin polimer yüzey üzerinde modellenmesi.....	37
Şekil 5.1	: Monomerlerin kimyasal yapıları: a) HY, b) PEG, c) HDI	39
Şekil 5.2	: PVA'nın kimyasal yapısı.....	40
Şekil 5.3	: Fibronektin tip I modülünün yapısı a) Moleküler b) Şematik.....	40
Şekil 5.4	: Fibronektin tip I modülünü oluşturan amino asitlerin dizilimi	41
Şekil 5.5	: Polimer matrisleri a) PU1, b) PU2, c) PVA	43
Şekil 5.6	: Protein molekülünün altı farklı konumda polimer yüzeyi üzerine yerleştirilmesi	47
Şekil 6.1	: PU2 poliüretanı için x-ışını saçılımı deseninin deneysel çalışma ile kıyaslanması	53
Şekil 6.2	: Fibronektinin polimer yüzeyine adsorpsiyonu öncesi (sağ) ve sonrası (sol) a) PVA, b) PEG, c) PU1, d) PU2.	54
Şekil 6.3	: Polimer yüzeyinden 3, 5 ve 7 Å mesafede bulunan amino asitlerin polimer yüzeyi ile teması sonucu ortaya çıkan etkileşim enerjileri	56
Şekil 6.4	: Polimer yüzeyinden 3, 5 ve 7 Å mesafede bulunan atomların polimer yüzeyi ile teması sonucu ortaya çıkan etkileşim enerjileri.....	57
Şekil 6.5	: Etkileşim enerjisinin amino asit ve atom sayısı ile ilişkisi grafiklerinin eğim değerlerinin kıyaslanması.....	58
Şekil 6.6	: Polimer yüzeyinden 3, 5 ve 7 Å mesafede bulunan amino asitlerin polimer yüzeyi ile teması sonucu proteinde görülen burulma enerjileri	62
Şekil 6.7	: Polimer yüzeyinden 3, 5 ve 7 Å mesafede bulunan atomların polimer yüzeyi ile teması sonucu proteinde görülen burulma enerjileri	63
Şekil 6.8	: Etkileşim enerjisinin amino asit ve atom sayısı ile ilişkisi grafiklerinin eğim değerlerinin kıyaslanması.....	64

Şekil 6.9 : Protein adsorpsiyonu sonrası amino asitlerin psi (ψ) bağ açıları değişimleri ve mutlak değişimleri	69
Şekil 6.10 : Protein adsorpsiyonu sonrası amino asitlerin phi (Φ) bağ açıları değişimleri ve mutlak değişimleri	70
Şekil 6.11 : Protein adsorpsiyonu sonrası amino asitlerin psi (ψ) bağ açılarının ortalama değişimleri ve mutlak değişimleri	71
Şekil 6.12 : Protein adsorpsiyonu sonrası amino asitlerin phi (Φ) bağ açılarının ortalama değişimleri ve mutlak değişimleri	72
Şekil 6.13 : Phi (Φ) ve psi (ψ) bağ açılarının Ramachandran grafikleri.....	73
Şekil 6.14 : Phi (Φ) ve psi (ψ) bağ açılarının glisinsiz Ramachandran grafikleri	74

SEMBOL LİSTESİ

ϵ	: Dielektrik sabiti
R	: İdeal gaz sabiti
δ	: Çözünürlük parametresi
T	: Sıcaklık
λ	: Dalga boyunu
ΔH_{buh}	: Buharlaşma ısısı
$E_{serbest}$	: Proteinin serbest enerjisi
$E_{polimer}$	: Polimerin enerjisi
E_{top}	: Sistemin toplam enerjisi
ν	: Poisson oranı
Φ	: Phi
Ψ	: Psi
R_g	: Dönüş yarıçapı

POLİÜRETAN YÜZEYLERE FİBRONEKTİN ADSORPSİYONUNUN MOLEKÜLER SİMÜLASYONU

ÖZET

Biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ve desteklemek amacıyla kullanılan doğal ve sentetik malzemelerdir. Biyouyumluluk, bir biyomalzemenin sahip olması gereken en önemli özelliktir. Yüksek biyouyumlulukları sayesinde poliüretanlar en çok ilgi çeken biyomalzemelerdendir. Poliüretanlar özellikle kardiyovasküler uygulamalarda, göğüs implantlarında ve yara örtüsü üretiminde kullanılmaktadırlar.

Biyomalzeme vücuda yerleştirildiğinde ilk olarak kan ile temasa geçer ve kanda bulunan proteinler bir süre sonra biyomalzeme yüzeyinde ince bir protein tabakası oluşturur. Böylece ev sahibi hücreler yüzeye adsorplanan bu protein tabakası ile karşılaşır. Bu nedenle, biyomalzeme üretilmeden önce protein adsorpsiyon mekanizması iyice anlaşılmalıdır.

Deneysel yöntemler ara yüzdeki dinamik süreçler ve konformasyon değişiklikleri gibi protein adsorpsiyon mekanizmasını atomistik düzeyde açıklamada yetersiz kalır. Öte yandan, moleküler simülasyon yöntemleri, deneysel verilerle birleştirildiğinde yeni biyouyumlu malzemelerin tasarımında kullanılabilecek değerli bilgileri atomistik düzeyde sağlayabilir.

Bu çalışmada, poliüretanların protein ile ilişkilerini incelemek için kristal polietilen glikol+hekzametilen diizosiyanat (PU1) ve amorf hint yağı+hekzametilen diizosiyanat (PU2) poliüretanları modellenmiş ve bu yüzeylerin x-ışını kırınimleri, dönüş yarıçapları, koheziv enerji yoğunlukları ve mekanik özellikleri hesaplanmıştır. Bu özelliklerin deneysel veriler ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Daha sonra Fibronectin tip I (1FBR) proteini polimerler üzerine altı farklı konumda yerleştirilmiştir. Simülasyonlar dielektrik ortamda ve polimer atomları hareketsiz tutularak gerçekleştirilmiştir. Her bir konum için enerji minimizasyonları yapılmıştır. Ardından polimer yüzeyinden 3, 5 ve 7 Å mesafede bulunan amino asitlerin yüzey ile teması sonucu ortaya çıkan etkileşim enerjileri incelenmiş ve 7 Å mesafede bulunan amino asitlerin yüzeye adsorplanmış kabul edilmesinin en doğru yaklaşım olduğu gözlenmiştir. Daha sonra, amino asit sayısına karşılık etkileşim enerjisi grafiklerinin eğimlerinden mutlak etkileşim enerjisi hesaplanmıştır. Eğim değeri fazla olan yüzey protein ile daha güçlü etkileşim göstermektedir. Böylece yüzeylerin biyouyumluluğu konusunda öngörü sağlanmaktadır.

Elde edilen sonuçlara göre daha fazla hidrofilik olan PU1 yüzeyi fibronectin ile daha güçlü etkileşim göstermektedir. Bu farklılık, kristal PU1'in düzgün bir yüzeye sahip olmasına ve böylece protein ile daha iyi ilişki kurabilmesine dayandırılabilir. Ayrıca adsorpsiyon çalışmalarında amino asitlerin yüzeye olan ilgilerini gözlemlemek için ψ ve Φ bağ açılarındaki değişim incelenmiştir. Amino asit gruplarının, yüzeyle etkileşimlerinin incelenmesi, yüzeylerin farklı proteinler için özel tasarlanarak, kontrollü protein adsorpsiyon yöntemlerinin geliştirmesinin sağlayacaktır.

MOLECULAR SIMULATION OF FIBRONECTIN ADSORPTION ON POLYURETHANE SURFACES

SUMMARY

Biomaterials are natural and synthetic materials used to mimics functions of living cells and to support the damaged organs. Biocompatibility is the most important property of a biomaterial. Because of their high biocompatibility, polyurethanes are among the most appealing class of biocompatible polymers. Polyurethanes especially used in cardiovascular field, breast implants and wound dressing production.

Biomaterials first interact with the blood proteins once inserted into the body, and the surface of the biomaterial is covered with a thin layer of protein. Host cells interact with the adsorbed proteins instead of the biomaterial surface. So, protein adsorption mechanism must be comprehended before producing biocompatible material.

Experimental methods are insufficient in the explanation of protein adsorption mechanism at the atomistic level, such as dynamic processes in the interface and the conformational rearrangements. However, molecular simulation methods can provide valuable insight at the atomistic level, when combined with the information gathered from the experimental studies, in order to design new biocompatible materials.

In this study, in order to understand polyurethane protein interactions, crystalline polyethylene glycol +hexamethylene diisocyanate (PU1) and amorphous castor oil + hexamethylene diisocyanate (PU2) copolymers were modeled and structural properties such as d-spacing, radius of gyration, cohesive energy density and mechanical properties were estimated. These properties were in good agreement with available experimental data. Next, Fibronectin type I (1FBR) module was placed near polymer surfaces in six different orientations. Simulations were carried out in an effective dielectric medium, and polymer surfaces were kept rigid. For each orientation, energy minimizations were carried out to analyze changes in the interaction energy between the surface and polymer due to adsorption, and the number of amino acids within a distance of 3, 5 and 7Å from the surface was determined. 7Å distance from the polymer surface accepted best predictors for protein adsorption. Next, a linear model was fitted to the interaction energy as a function of the number of amino acids. The slope in the model yielded the absolute interaction energies between the protein and the surface, was used as a basis for the comparison of the surface biocompatibility, larger slope values indicating larger interaction strength.

Simulation results showed that fibronectin was adsorbed more strongly on PU1 surface compared to PU2 surface, although the latter is less hydrophilic. This can be explained by the regular surface structure of crystalline PU1, allowing a better contact with the protein. Furthermore, the changes of ψ and Φ angles of the amino acids upon adsorption were also monitored in the simulations to determine the affinity of the amino acids to the surface. This information can be used to tailor polymer surfaces with functional groups to enhance protein adsorption.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Biyomalzemeler insan vücudundaki canlı dokuların işlevini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan malzemeler olup modern tıp uygulamalarında canlıların yaşamlarını sürdürmelerini sağlamak, yaşam koşullarını iyileştirmek ve tedavi sürelerini kısaltmak amacıyla kullanılmaktadırlar [1]. Son yıllarda, biyomalzeme bilimi büyük ilerleme kaydetmiştir, ancak biyolojik sistemlerle etkileştiğinde uyumluluğu yüksek olan yeni malzemelerin geliştirilmesi için çalışmalar sürmektedir. Biyouyumluluk, bir biyomalzemenin en önemli özelliğidir. Biyouyumlu malzeme vücutla uyumlu malzeme, yani kendisini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olmayan ve dokuda istenmeyen tepkiler (iltihaplanma, pıhtı oluşumu) meydana getirmeyen malzemelerdir. Biyouyumluluğu yüksek olan birçok organik ve inorganik malzeme biyomalzemelerin yapımında kullanılır [2]. Polimerler yüksek biyouyumlulukları ile biyomalzeme alanında yaygın olarak kullanılmaktadırlar [3]. Ancak halen mükemmel biyouyumluluğa sahip malzemenin sentezlenmesi gerçekleşmemiştir ve bu amaçla yapılan çalışmalar sürmektedir [2]. Poliüretanlar üstün fiziksel, mekanik özellikleri ve yüksek biyouyumlulukları sebebiyle biyomedikal uygulamalarda geniş kullanım alanına sahip olan polimerlerdir. Bir diol grubu ile bir diizosiyanat grubunun birleşmesinden oluşan yapılardır [3]. Poliüretanlar ilk olarak 1960 yılında biyomalzeme alanında kullanılmaya başlanmıştır. Yüksek dayanım özellikleri ile özellikle kardiyovasküler uygulamalarda en çok tercih edilen malzemelerdir. Kardiyovasküler uygulamaların yanı sıra poliüretanlar günümüzde yara örtüsü üretiminde de kullanılmaktadırlar [4]. Biyomalzemeler canlı vücuduna yerleştirildiklerinde biyolojik çevre ile ara yüzey oluştururlar. Vücuda yerleştirilen malzemenin yüzeyinde ilk olarak protein adsorpsiyonu meydana gelir ve ardından hücre ile birleşme başlar [5]. Bu nedenle proteinlerin polimer yüzeyler üzerine adsorpsiyonu biyomedikal uygulamalarda büyük öneme sahiptir. Son yıllarda bu konu üzerinde birçok deneysel çalışma yapılmıştır ancak protein yapıları büyük yapılar olduğundan ve sürekli hareket halinde olduklarından deneysel olarak protein-yüzey etkileşimlerini incelenmesi

oldukça karmaşıktır. Bu konuda birçok çalışma yapıldığı halde halen protein adsorpsiyonunun uygun şekilde kontrol edilebilmesi için ara yüzeyde gerçekleşen protein-yüzey etkileşimleri tam olarak açıklanamamıştır [6]. Deneysel metotlar ara yüzeyde gerçekleşen dinamik süreçleri ve konformasyon değişimlerini açıklamada yetersiz kalmaktadır bu nedenle bu konuda yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Son yıllarda biyomalzemelerin yüzey özellikleri ve yüzeylere protein adsorpsiyonu moleküler simülasyon yöntemleri ile araştırılmaktadır. Moleküler simülasyon yöntemlerinin protein-yüzey ilişkilerinde kullanılması diğer uygulamalara kıyasla daha yeni olup her geçen gün gelişme göstermektedir. Moleküler simülasyon yöntemleri protein adsorpsiyonuna atomik boyuttan bakabilmeyi sağlar. Böylelikle moleküler simülasyon yöntemleri kullanılarak önceden elde edilen deneysel verilerin atomik boyutta elde edilen veriler ile birleştirilerek proteinlerin yüzey üzerine adsorpsiyonu hakkında yeni bir bakış açısı kazanılması beklenmektedir. Moleküler simülasyon yöntemleri kullanılarak yapılan protein adsorpsiyonu çalışmaları genel olarak incelenirse; malzeme ve protein yapılarının modellenmesinin ardından;

- Protein-Yüzey (Ligant) etkileşimleri
- Proteinlerin farklı konumları
- Protein konformasyonlarında meydana gelen değişimleri incelenir [7].

Bu çalışmada farklı monomerlerden oluşan iki farklı poliüretan malzemelerin ara yüzey biyoyumlulukları Moleküler Mekanik (MM) ve Moleküler Dinamik (MD) yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmanın hedefi, literatürdeki deneysel verilerle simülasyon sonuçları arasında bir bağıntı kurarak, ileride yapılacak deneysel çalışmalarda deney sayısını azaltmak ve üretilecek malzemelerin özellikleri hakkında öngörüde bulunmaktır. Yapılan çalışmada biri kristal diğeri amorf olan iki farklı poliüretan yüzey kullanılmıştır. İki aşamada yürütülen simülasyon çalışmalarının ilk aşamasında poliüretan malzemelerin yapısal özellikleri hesaplanmış ve mevcut deneysel verilerle karşılaştırılmıştır. Simülasyon çalışmalarının ikinci aşamasında ise proteinlerin poliüretan yüzeylere adsorplanması moleküler mekanik (MM) yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu çerçevede proteinlerin farklı poliüretan yüzeylere adsorplanması karşılaştırılarak, bu yüzeylerin biyoyumlulukları değerlendirilmiştir. Böylece malzeme yüzeyi ile protein bağlanması arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve sentezlenmesi planlanan malzemelerin bir ön elemeden geçirilmesi amaçlanmıştır.

2. POLİMERİK BİYOMALZEMELER VE PROTEİN İLİŞKİLERİ

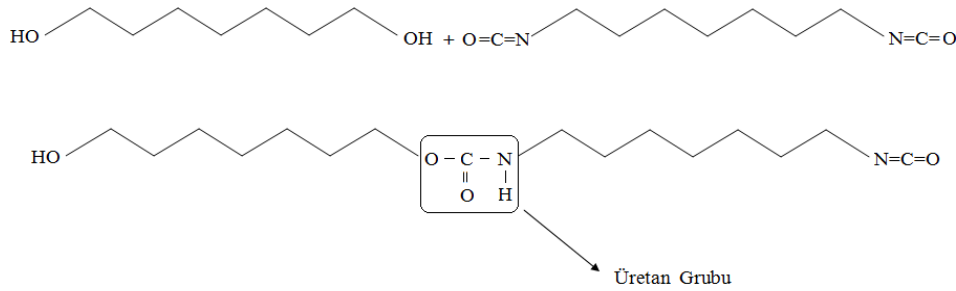
2.1 Biyomalzemeler

Biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek veya hasar görmüş organları tedavi etmek ve desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemelerdir. Bu amaca uygun olarak yeni malzemelerin geliştirilmesi için yoğun çaba harcamaktadır [2]. Bir malzemenin biyolojik ortamda kullanılabilmesi için üç temel özelliği dikkate alınır; mekanik dayanıklılık, fonksiyonel özellikler ve biyouyumluluk. Biyomalzemelerin mekanik dayanımlarının yüksek olması gerekir yani malzeme çabuk yıpranmamalı ve performansını uzun süre korumalıdır. Biyomalzemenin fonksiyonel özellikleri de kullanım yerine uygun olmalıdır. Bir biyomalzemenin en önemli özelliği ise biyouyumluluktur. Biyouyumluluk uygulama sırasında malzemenin vücut sistemine uygun cevap verebilme yeteneği olarak tanımlanır yani kendisini çevreleyen dokularda istenmeyen tepkiler (iltihaplanma, pıhtı oluşumu) meydana getirmeyen malzemelerdir. Biyouyumluluk kan uyumluluğu ve doku uyumluluğu adı altında sınıflandırılabilir. Kan uyumluluğu gösteren biyomalzemeler damarda veya kalpte kanın pıhtılaşmasına sebep olmayan malzemelerdir. Doku uyumluluğu gösteren biyomalzemeler ise zehirleyici etki göstermeyen ve implant etrafında yüksek miktarda doku gelişimi sağlayan malzemelerdir [3]. Biyouyumluluğu yüksek olan malzemeler biyomalzemelerin yapımında kullanırlar ancak halen mükemmel biyouyumluluğa sahip bir malzemenin sentezlenmesi gerçekleşmemiştir. Biyouyumluluğu yüksek olan malzemeler metaller, seramikler, polimerler ve kompozit malzemeler olarak sıralanmaktadırlar. Hangi malzemenin seçileceği malzemelerin biyouyumluluklarına ve uygulanacakları bölgeye uygunluklarına göre belirlenir. Metaller daha çok kalça, diz protezleri gibi sert bölgelerde tercih edilirler. En çok kullanılan metaller çelik, kobalt alaşımları, nikel titanyum alaşımlarıdır. Seramik malzemeler ise kalça, diş ve kalp implantlarında tercih edilirler. En çok kullanılan seramik malzemeler alüminyum oksit, zirkonyum dioksit, pirolitik karbon,

hidroksiapatit olarak sıralanabilir. Biyolojik malzemeler arasında polimer malzemelerin önemi büyüktür [1]. Polimerlerin mekanik özellikleri diğer metal seramik benzeri malzemeler ile kıyaslandığında dokulara çok daha fazla benzerlik göstermektedir [3]. Polimerler değişik şekil ve biçimlerde hazırlanabilmelerinden dolayı biyomalzeme olarak geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Polimer malzemelerin kullanıldığı bazı alanlar; yapay kalp, damar ve kalp kapakçıkları, göğüs implantları, kontakt lensler, ortopedik malzemeler, diyaliz üniteleri şeklinde özetlenebilir. Ancak yüksek avantajları yanı sıra polimerler yine de mükemmel biyouyumlu malzemeler değildir. Bazı uygulamalarda örneğin ortopedide mekanik dayanımlarının zayıf olması, sıvıları yapılarına alarak şişebilmeleri veya zehirli ürünler yayabilmeleri polimerlerin olumsuz özellikleri arasında yer almaktadır. Ayrıca bahsedilen tüm bu inorganik ve organik malzemelerin hibrit olarak kullanılması ile kontrol edilebilir hızlarda bozunabilen, kontrol edilebilir yüzey özelliklerine sahip kompozit malzemeler de hazırlanabilir. İnorganik ve organik maddelerin miktarı değiştirilerek malzeme özellikleri istenilen ölçüde kontrol edilebilir [1].

2.2 Poliüretanlar

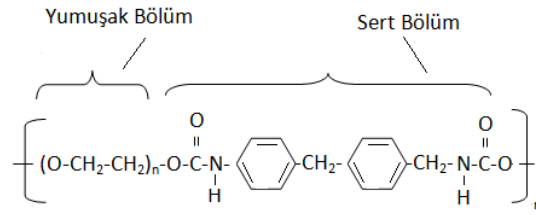
Poliüretanlar, bir diol grubu ile bir diizosiyanat grubunun birleşmesinden oluşan, yapılarında üretan grubu içeren heterojen kopolimerlerdir (Şekil 2.1) [3].



Şekil 2.1 : Poliüretanın genel yapısı ve üretan grubu [3]

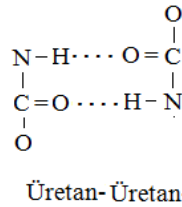
Yapıyı oluşturan polimer zincirlere kıyasla üretan bölümü yapının küçük bir kısmını oluşturur. Bu nedenle sentezlerinde kullanılan diizosiyanatların veya poliollerin yapılarına bağlı olarak ürünün özelliklerini değiştirebilir. Örneğin, kullanılan poliollerin zincir uzunluklarındaki değişime bağlı olarak poliüretanın özellikleri de değişir. Poliüretanların yapısının değişik metotlarla değiştirilebilmesi poliüretanların polimerler arasında daha avantajlı olmalarını sağlarlar [8]. Poliüretanlar katı sert

termoplastiklerden yumuşak elastomer yapılara kadar değişiklik özellikler gösterebilmektedirler. Poliollerden oluşan yumuşak kısımlar poliüretana elastomerik özellik kazandırırken diizosiyanatların oluşturduğu sert kısımlar ise sert termoplastiklerin oluşumunda etkilidir. Poliüretanın fiziksel ve mekanik özellikleri, yumuşak ve sert bölümlerin malzeme içindeki dağılımına bağlıdır. Yumuşak ve sert bölümler arasındaki faz dağılımı değiştirilerek malzemenin mekanik, fiziksel özellikleri ve biyouyumluluğu değiştirilebilir. Şekil 2.2’de poliüretanın yumuşak ve sert bölümleri şematik olarak gösterilmektedir [3].



Şekil 2.2 : Poliüretanın yumuşak ve sert bölümleri [3]

Üretan grupları birbirleri arasında veya değişik yapılarla çok güçlü hidrojen bağları kurarlar (Şekil 2.3). Üretan yapısında bulunan N-H ve C=O yapıları arasında güçlü hidrojen bağları oluşur. Moleküller arası kurulan bu kuvvetli bağlar özellikle kaplama ve tutkal yapımında avantajlar sağlar [8].



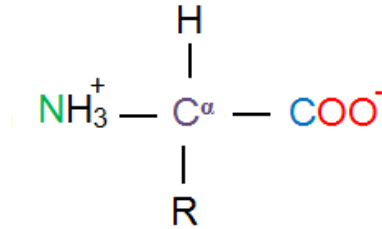
Şekil 2.3 : Üretan yapısında bulunan hidrojen bağları [3]

Poliüretanlar otomotiv sektöründen tıba kadar oldukça geniş kullanım alanına sahip yapılardır. Döşeme, tekstil, kâğıt, ambalajlama, arabaların gösterge panellerinde, ayakkabı tabanlarında, izolasyonda, halılarda, ilaç sektörü gibi birçok değişik alanda da poliüretanlar kullanılmaktadırlar. Üstün fiziksel özellikleri ve yüksek kan uyumluluğu sayesinde poliüretanlar biyomalzeme olarak da kullanılmaktadırlar ve en çok gelecek vadeden polimer biyomalzemeler olarak görülmektedirler. Daha önceden de bahsedildiği gibi bir malzemenin biyomalzeme olarak kullanılması için sadece fiziksel özelliklerinin yeterli olması yetmez. Birçok değişik faktörün bir arada tutulması ile uygun malzeme seçilir. Poliüretanların mükemmel fiziksel özelliklere sahip olmalarının yanı sıra kan uyumlulukları da oldukça yüksektir. Bu özellikler

poliüretanları biyomalzeme alanında kullanmak için çok uygun malzemeler kılmaktadır. Poliüretanlar ilk olarak 1960 yılında biyomalzeme alanında kullanılmaya başlamıştır. Poliüretanlar diğer elastomerlerle kıyaslandığında daha yüksek dayanıma sahip malzemeler olup özellikle kardiyovasküler uygulamalarda en önde gelen polimerlerdendir. Kalp her dakikada yaklaşık yetmiş iki vuruş yapmaktadır ki bu beş yılda iki yüz bin vuruş demektir. Bu nedenle kardiyovasküler uygulamalarda kullanılacak malzemeler yüksek dayanıma sahip olmalıdır aksi halde sonuç ölümle sonuçlanabilir [3]. Poliüretanlar yüksek dayanım özellikleri ile özellikle kardiyovasküler uygulamalarda; yapay kalp, damar ve kalp kapakçıkları üretiminde en çok tercih edilen malzemelerdir. Kardiyovasküler alanının yanı sıra poliüretanlar günümüzde göğüs implantlarında ve yara örtüsü üretiminde de kullanılmaktadırlar [4].

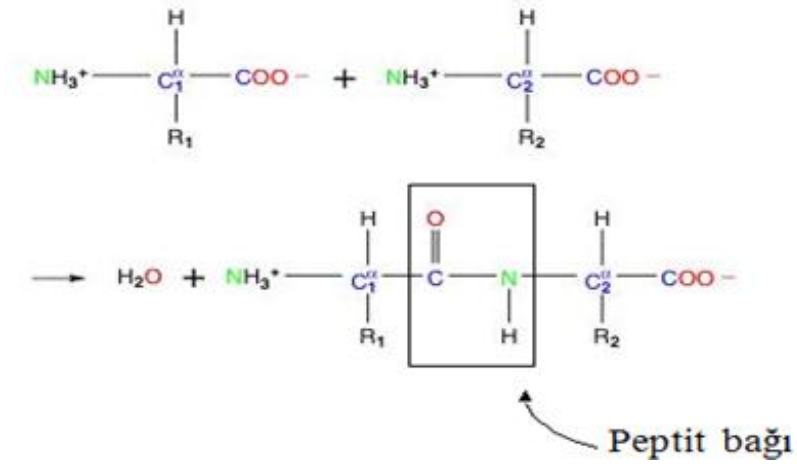
2.3 Proteinler

Proteinler amino asitlerin birleşmesi ile bir araya gelen organik bileşiklerdir. Şekil 2.4'de belirtildiği gibi amino asitler merkezde bir alfa karbon atomu ve etrafında bir karboksil grubu, bir amino grubu, bir hidrojen atomu ve bir de fonksiyonel R grubundan oluşan yapılardır.



Şekil 2.4 : Bir amino asit molekülü [9]

Proteinler amino asitlerin kondensasyon reaksiyonları sonucu oluşurlar. Bir amino asitte bulunan amino grubu ile diğer amino asitte bulunan karboksil grubu ile peptit bağı oluştururlar. İki amino asitin birleşmesi ile oluşan dipeptit yapısına amino asitlerin eklenmesi ile polipeptit yapısı oluşur. Polipeptitlerin birleşmesi ile de proteinin meydana gelir (Şekil 2.5) [9,10].



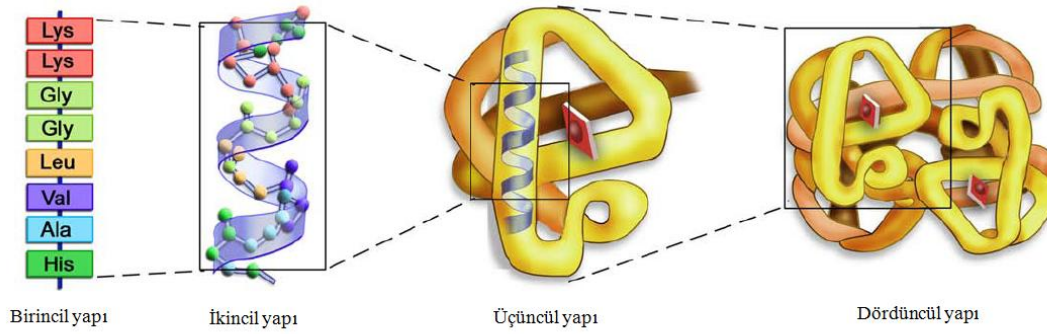
Şekil 2.5 : İki amino asidin birleşmesi ile oluşan dipeptit yapısı [9]

Proteinlerin yapısında 20 farklı amino asit bulunmaktadır. Amino asitler Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi yan zincirlerine göre polar olmayanlar (hidrofobik), polar olanlar, negatif yüklüler ve pozitif yüklüler olmak üzere 4 farklı grupta incelenebilirler [10].

Çizelge 2.1 : Amino asitlerin yan zincirlerine göre sınıflandırılması [10]

Polar Amino Asitler				Apolar Amino Asitler			
Amino Asit	Üç Harfli Sembol	Tek Harfli Sembol	Yan Zincir Yükü	Amino Asit	Üç Harfli Sembol	Tek Harfli Sembol	Yan Zincir Yükü
Aspartik asit	Asp	D	(-)	Alanin	Ala	A	Apolar
Glutamik asit	Glu	E	(-)	Glisin	Gly	G	Apolar
Arginin	Arg	R	(+)	Valin	Val	V	Apolar
Lizin	Lys	K	(+)	Lösin	Leu	L	Apolar
Histidin	His	H	(+)	İzolösin	İle	I	Apolar
Aspargin	Asn	N	Nötr	Prolin	Pro	P	Apolar
Glutamin	Gln	Q	Nötr	Fenilalanin	Phe	F	Apolar
Serin	Ser	S	Nötr	Metiyonin	Met	M	Apolar
Treonin	Thr	T	Nötr	Triptofan	Trp	W	Apolar
Tirozin	Tyr	Y	Nötr	Sistein	Cys	C	Apolar

Proteinler Şekil 2.6’da gösterildiği gibi dört farklı yapısal seviyede incelenebilirler.



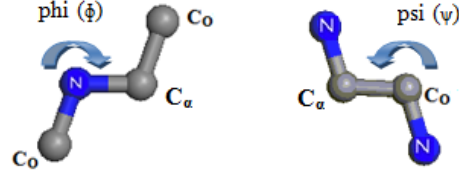
Şekil 2.6 : Proteinlerin dört farklı yapısal seviyesi [10]

- *Birincil Yapı*; Proteinlerin en basit ifade edilişleridir. Proteinin hangi amino asitlerden oluştuğunu ve bu amino asitlerin hangi sırayla birbirlerine bağlı olduklarını gösteren tek boyutlu bir dizgi şeklinde ifade edilişidir. Proteinler gerçekte birincil yapıda ifade edildiği gibi yan yana amino asitlerden oluşmuş uzun zincirler şeklinde yapılar değildirler.

- *İkincil Yapı*; Bu yapıda amino asitler arasındaki molekül içi ya da moleküller arası hidrojen bağlarının etkisi dikkate alınır. Hidrojen bağları zincirde katlanmalara bükülmelere sebep olur, bu da proteine üç boyutlu yapısını kazandırır. üç tür ikincil yapı vardır. *Alfa sarmalı (α heliks)*; Protein zinciri bir sarmal şeklinde ve birbirinin üstüne gelen amino asitlerin birbiriyle hidrojen bağı yapabileceği şekilde dizilmesinden oluşur. *Beta Yaprığı (β -sheet)*; ise protein zincirlerinin birbiri üzerine tabakalar halinde hidrojen bağı ile bağlanması sonucu oluşan yapıdır. Bu tabakalar birbirine paralel olarak durabildiği gibi paralel olmadan da durabilirler. *Burgu (Coil)*; Proteini oluşturan alfa sarmalları ve beta yaprakları dışında kalan değişik uzunluklardaki ve şekillerdeki bölgelerdir [11].

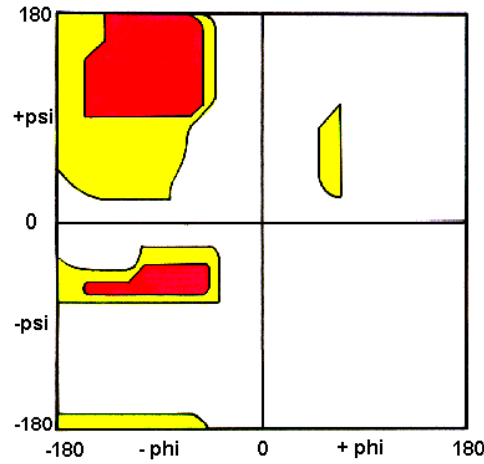
Hidrojen bağları sonucu oluşan katlanma ve bükülmeler sonucu ikincil yapıya sahip olan protein omurgasında temel olarak ϕ (Φ) ve ψ (Ψ) olmak üzere iki bağ açısı tanımlanır. Şekil 2.7’de görüldüğü gibi ϕ ; $C_o-N-C_\alpha-C_o$ bir alfa karbon ona bağlı olan bir karboksil grubu yine aynı alfa karbona bağlı olan amino grubu ve bu amino grubunun bağlandığı komşu amino asidin karboksil grubu arasındaki bağ açısıdır. ψ ; $N-C_\alpha-C_o-N$ ise bir alfa karbonu onun bağlı olduğu amino grubu yine aynı alfa karbonunun bağlı olduğu karboksil grubu ve bu karboksil grubunun bağlandığı komşu amino grubu arasındaki bağ açısıdır. Bir polipeptit yapısında sadece alfa

karbonuna bitişik bağların çevresinde rotasyon mümkündür. Bu nedenle protein adsorpsiyonu çalışmalarında tanımlanan Φ ve Ψ bağ açılarındaki değişimleri hesaplayarak protein omurgasında meydana gelen değişimler gözlenebilir [9].



Şekil 2.7 : Polipeptit yapısında bulunan phi (Φ) ve psi (Ψ) burkulma açıları

Proteinde amino asitlerin phi (Φ) ve psi (Ψ) bağ açılarının aldığı değerler Şekil 2.8’de gösterilen Ramachandran grafiğindeki gibi gösterilmektedir. Ramachandran grafiklerin proteinlerin ikincil yapısı hakkında bilgi veren grafiklerdir [12].



Şekil 2.8 : Ramachandran grafiği [12]

- *Üçüncül Yapı;* Proteinin genel olarak üç boyutlu yapısı olarak özetlenebilir. Bu yapıda örneğin iki sistemin amino asidi disülfid bağı kurabilir, pozitif ve negatif yüklü amino asitler etkileşebilir, polar amino asitler arasında hidrojen bağları oluşabilir ve hidrofobik etkileşimlerle polar yapılar yüzeyde bulabilirken polar olmayan yapılar iç kısımlara yönelebilir. Kısaca bu yapıda hidrojen bağlarının yanı sıra hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler ve Van der Waals kuvvetlerinin etkileri gibi her türlü etkileşim göz önündedir.

- *Dördüncül Yapı;* Birden fazla protein alt biriminden oluşan proteinlerin yapılarını ifade eder. Örneğin, hemoglobin dört protein molekülünden oluşur. Hemoglobinin dördüncül yapısı iste bu proteinlerin hepsinin bir arada bulunması ve geometrik bir şekil oluşturması sonucu oluşur. Üçüncül ve dördüncül yapı, proteinin işlevinin, içinde bulunduğu aktivitelerin ve diğer proteinlerle olan ilişkilerinin belirlenmesi

açısından önem taşımaktadır. Kısaca; protein dizilimi protein yapısını, protein yapısı da protein işlevini belirler [1,9,13].

2.4 Protein-Yüzey İlişkileri ve Protein Adsorpsiyonu

Biyomalzemeler vücuda yerleştirildiklerinde ilk olarak vücut sıvısı kan ile temasa geçerler. Kanda bulunan proteinler malzemenin yüzeyine doğru harekete geçer ve protein adsorpsiyonu başlar. Hücreler malzeme yüzeyine ulaştığında malzemelerin yüzeyi çoktan ince bir protein tabakası ile kaplanmış olur. Bu nedenle ev sahibi hücreler malzeme yerine yüzeye adsorplanan proteinlerle karşılaşır [13]. Ardından oluşan hücresel etkinlikler hücrelerin yapışması, trombosit kümelenmesi ve pıhtılaşma daha çok malzeme yüzeyinde oluşan bu protein tabakası ile ilişkilidir. Bu nedenle biyouyumlu malzeme üretilmeden önce yüzey ilişkileri ve protein adsorpsiyonu iyice anlaşılmalıdır [14].

2.4.1 Protein ve biyomalzeme yüzey özelliklerinin önemi

Vücuda yerleştirilen biyomalzemenin ve proteinin yüzey özellikleri ara yüzey etkileşimleri bakımından önemlidir. Proteinlerin ve biyomalzeme yüzeylerinin sahip olması gereken temel özellikler aşağıda sırasıyla belirtilmiştir [1].

Malzeme yüzeyine ulaşan proteinler yüzey ile moleküller arası bağlar kurarlar. Bu etkileşimler proteinlerin özelliklerinden oldukça fazla etkilenirler. Bu özellikler aşağıda kısaca özetlenmiştir. Proteinin büyüklüğü etkileşim için önemlidir. Büyük moleküller etkileşim için daha çok alana sahiptirler ve daha çok adsorplanırlar [13]. Örneğin silika yüzey kullanılarak yapılan bir çalışmada [1], moleküler büyüklüğü 67kDa olan albümin molekülünün silika yüzeyi ile yaklaşık 77 bağlantı noktası bulunmakta iken, 340kDa büyüklüğündeki fibrinojenin ise 703 bağlantı noktası bulunmaktadır. Ancak büyüklük her zaman temel belirleyici etmen değildir. 65kDa büyüklüğündeki hemoglobin kendisinden çok daha büyük olan fibrinojene göre daha fazla yüzey ilgisi göstermektedir [1]. Proteinlerin yükü de yüzey etkileşiminde önemlidir. Proteinin oluşturan amino asitler pH ve çevreye göre yüklenebilirler ve polarlaşabilirler. Polarlaşan bu yapılar hidrofilik olup ortamdaki su atomları tarafından yüzeye doğru çekilirler bu nedenle polarlaşan amino asitler dış yüzeye doğru yönelme eğilimindedirler ve bu amino asitler malzeme yüzeyi ile daha fazla temas halindedirler [13]. Kısaca protein yüzeyindeki yük ve bu yükün dağılımı protein adsorpsiyonunda

etkilidir ancak proteinlerin yükü de büyüklüğünde bahsedildiği gibi kesin belirleyici etmen değildir. Son olarak protein konformasyonu ve yapının kararlılığı da etkileşimde büyük öneme sahiptir. Kararlı olmayan protein yapıları kolaylıkla yayılma eğilimi gösterir böylece malzeme yüzeyi ile daha çok etkileşim alanına sahip olur [1]. Ayrıca bazı bağlanma noktaları sadece belli konformasyonlarda ortaya çıkmaktadır. Uygun konformasyonda yüzey ile daha fazla bağ kurulabilir [13].

Protein adsorpsiyonunda protein özelliklerinin yanı sıra biyomalzemenin yüzey özellikleri de adsorpsiyonu etkileyen en temel etkenlerdendir [1]. Proteinlerin büyük kısmı hidrofobik yüzeylere hidrofilik yüzeylere kıyasla daha fazla adsorplanırlar [6]. Hidrofobik bir yüzeyde etrafta bulunan su molekülleri yüzeyle değil birbirleri ile etkileşirler ve yüzeyin etrafında bulunurlar ve bu konumda entropi düşüktür. Protein adsorpsiyonunda yüzey etrafında bulunan bu su tabakası bir anda dağılır ve ani bir entropi yükselmesi oluşur ki bu durum hidrofobik yüzeylere gerçekleşen protein adsorpsiyonunun sürücü kuvvetidir. Kısaca hidrofobik yüzeylerde daha fazla protein adsorpsiyonu görülür. Hidrofilik yüzeylerde su molekülleri yüzeyle etkileşim halindedir ve protein ilave edildiğinde protein molekülü ile su moleküllerinin yüzeyle etkileşebilme yarışı protein adsorpsiyonunu azaltır [13]. Yapılan bir çalışmada 85:15 oranında N-isopropylacrylamide/N-tert-butylacrylamide kopolimeri daha fazla hidrofilik olan 50:50 kopolimeri ile kıyaslanmıştır. Daha fazla hidrofilik olan kopolimer neredeyse hiç protein adsorplanamıştır, yalnızca çok az miktarda insan serum albumini (Human Serum Albumin-HSA) adsorplanmıştır, diğer yandan daha hidrofobik olan kopolimer birçok HSA, fibrinojen ve daha birçok protein ile bağ kurmuştur [15,16]. Hidrofobik etkileşimler en kuvvetli etkileşimlerdenidir [17]. Elektrostatik çekme kuvvetleri yüklü yüzeyler için büyük öneme sahiptir [6]. Ters yükler adsorpsiyonu kuvvetlendirir ve iyonik kuvveti artırır. Örneğin kan serumunda bulunan proteinlerin büyük kısmı negatif yüklüdür ve yüzeyin negatif yüklü olması protein adsorpsiyonunu azaltacaktır [13]. Yüzey özellikleri de adsorpsiyonda etkilidir. Yüzey pürüzlülüğü artırılarak protein için daha fazla yüzey alanı sağlanır ki bu da adsorpsiyonu artırır [1,13].

Malzeme yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar da adsorpsiyon ile direkt olarak ilişkilidir. Bazı fonksiyonel grupların adsorpsiyona etkisi incelenmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu veriler genel değerlendirmelerdir, çok bileşenli malzeme yüzeylerinde veya canlı ortamlarda farklı birçok etkenin birleşimi ile farklı

sonuçlar gözlenebilir. Bazı fonksiyonel grupların adsorpsiyona etkisi aşağıda özetlenmiştir:

- *Metil (-CH₃)*: Apolar ve hidrofobiktir. Kan sıvısında nötr halde bulunur. Fibrinojen ve gamma-globülin (IgG)'in yapıya sıkıca tutunmasını sağlar.

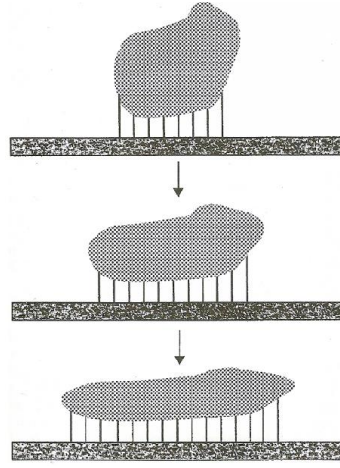
- *Hidroksil (-OH)*: Hidrofiliktir. Kan sıvısında nötr halde bulunur. Malzemenin hidrofilik özelliğini artırır ve plazma proteinlerinin ilgisini azaltır. Fibronektin proteininde konformasyon değişimine neden olur ki bu da fibronektinin hücrelere bağlanmasını sağlayan aktif bölgesinin ortaya çıkmasını sağlar yani hücrelerin fibronektine yapışmasını artırır.

- *Amin (-NH₂)*: Polardır ve hidrofiliktir. Kan serumunda ve su içeren çözeltilerde pozitif yüklenir. Fibronektine sıkıca bağlanmayı sağlar.

- *Karboksil (-COOH)*: Hidrofiliktir. Kan serumunda negatif yüklüdür. Fibronektin ve albuminle karşı ilgiyi artırır [13].

2.4.2 Proteinlerin konformasyonunu etkileyen faktörler

Birkaç proteinden oluşan bir çözelti yüzeye adsorplandığında proteinler yüzey ile değişik biçimlerde temas kurarlar. Yüzey kalabalıklaştıkça diğer proteinlerin etkileşmesi için daha az alan kalacaktır. Böylece protein yapıları değişik konformasyonlarda yüzey ile ilişki kuracaklardır. Bunun yanı sıra yüzey ve proteinin sahip olduğu yük, polarite, hidrofilik, hidrofobik gruplar gibi özelliklerden dolayı da proteinler yüzeye değişik konformasyonlarda bağlanabilirler. Proteinlerin değişik konformasyonlarda adsorplanması adsorplanma miktarını etkilediği gibi fonksiyonel anlamda da büyük öneme sahiptir. Yapışkan özelliğe sahip fibronektinin biyomalzeme üzerine adsorplanması incelenirse konformasyona göre hücre yapışmasında yardımcı olan aktif bölgeler uygun konumda değillerse hücre yapışması meydana gelmeyecektir. Proteinler yüzeye değişik konumlarda bağlanabilecekleri gibi ara yüzeydeki etkileşimler ile zamanla konformasyon değişikliği de gösterebilirler. Ara yüzeyde proteinlerin konformasyonlarının değişimleri için iki durum söz konusudur. Yüzeye ilk adsorplandığında düşük sayıda bağlanma bölgesi ile tutunan proteinler etkileşim süresi arttıkça yaygınlaşabilir ve yeni bağlanma bölgeleri ile daha fazla etkileşim kurulabilir. Böylece Şekil 2.9'da görüldüğü gibi zaman arttıkça baştakine göre daha fazla bölgede tutunma gerçekleşebilir [1].



Şekil 2.9 : Proteinlerin yüzey ilişkisinin zaman ile değişimi [1]

Diğer bir konformasyon değişme sebebi ise protein konsantrasyonudur. Düşük protein konsantrasyonlarında malzemenin yüzeyi her protein için daha müsaittir ancak yüksek konsantrasyonlarda proteinler için gerekli yüzey azalır böylelikle proteinler yayılmak için gerekli alanı bulamazlar böylece yüzeyde sayıca daha fazla ancak daha az bağlanma bölgesi ile yüzeye tutunan protein tabakası oluşur [1].

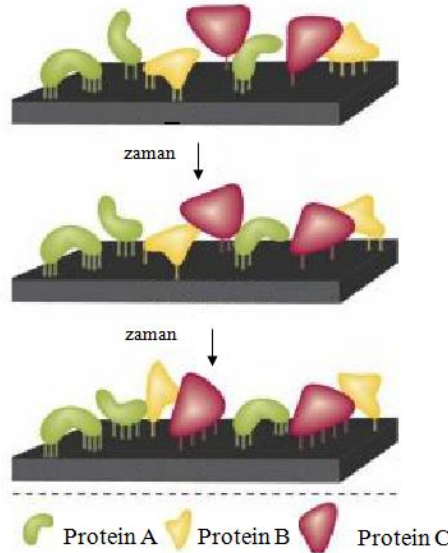
2.4.3 Protein adsorpsiyonunun kinetiği

Protein adsorpsiyon kinetiğini modellemek için taşınım mekanizması, sistemin geometrisi ve adsorpsiyon sürecini incelemek gerekir. Yüzeye ulaşan protein dört ayrı taşınım mekanizması ile taşınabilir: 1) Difüzyon 2) Termal konveksiyon 3) Akış 4) Birleşmiş transfer; bu difüzyon ve konveksiyonun birleşmesinden meydana gelir. Yüzeye ulaşan proteinin hızı, konsantrasyonu ve molekül büyüklüğü gibi parametreler taşınım mekanizması açısından büyük öneme sahiptir [1].

2.4.4 Çok bileşenli çözeltiler

Vücut sıvıları (kan, gözyaşı, tükürük) sayısız biyomolekül içermektedirler. Örneğin kan içerisinde yaklaşık 150 çeşit protein bulunmaktadır. Bu nedenle gerçek doku-malzeme ilişkilerinin anlaşılması için tek bir protein-yüzey etkileşimini incelemektense çok bileşenli protein çözeltilerinin yüzey ile ilişkilerini incelenmek daha doğru bir yaklaşımdır. Çok bileşenli sıvılarda proteinler yüzeye ulaşmak için konsantrasyonlarına, difüzyon miktarlarına ve afinitelerine göre yarış halindedirler. Difüzyon oranı proteinin büyüklüğü ve konsantrasyonu ile ilişkilidir. Konsantrasyonun etkisine bakıldığında bir malzemeyi çevreleyen sıvı içerisindeki bir tek çeşit protein varsa malzeme konsantrasyon

arttıkça daha çok proteine ihtiyaç duyar ancak protein çözeltisinde birden çok protein çeşidi varsa bu durum biraz daha karmaşık hal alır. Difüzyon etkisine bakılacak olursa küçük yapıda olan proteinler büyük proteinlere göre daha önce yüzeye ulaşır ve adsorplanırlar. Proteinin yüzeye olan afinitesi de protein yüzeye ne kadar güçlü ve kalıcı şekilde adsorplanacağını açıklar. Afinitiyi etkileyen büyüklük, yük, konformasyon değişimleri gibi etkenler yukarıda ayrıntılı biçimde açıklanmıştır. Yüksek afiniteye sahip olan proteinler düşük afiniteye sahip olanlara kıyasla daha çok adsorplanırlar ve yüzeyde daha kalıcıdır. Protein konsantrasyonu, difüzyon miktarı ve afinitesini içeren bu üç etken göz önüne alındığında çok bileşenli sıvılarda proteinler yüzeye ulaşmak için yarış halindedirler. Yüzeye ilk ulaşan protein orada sürekli kalacak anlamında değildir. Yüzeye adsorplanan proteinler değişkendirler. Vroman bu konuda araştırma yapan ilk bilim adamı olduğundan bu etkileşimler ‘Vroman Etkisi’ ismini almıştır. Proteinler adsorplandığı gibi tüm bağları kırılan bir protein aynı şekilde desorplanabilir. Yüzeye ilk ulaşan proteinler yüzeye çeşitli bağlanma bölgelerinden tutunurlar ancak daha sonra daha yüksek afiniteye sahip proteinler yüzeye ulaştığında yüzeye daha güçlü ve uygun bağlar kurarken önceden daha zayıf bağlar ile yüzeye tutunan proteinler ise yüzeyden ayrılmaya başlarlar (Şekil 2.10). Bu şekilde bağlar birçok kere kırılıp tekrar oluşurlar. Bu değişim tüm proteinler yüzey ile kuvvetli etkileşimler kurana ve kalıcı tabaka oluşana kadar sürer [1,13].



Şekil 2.10 : Vroman etkisi [13]

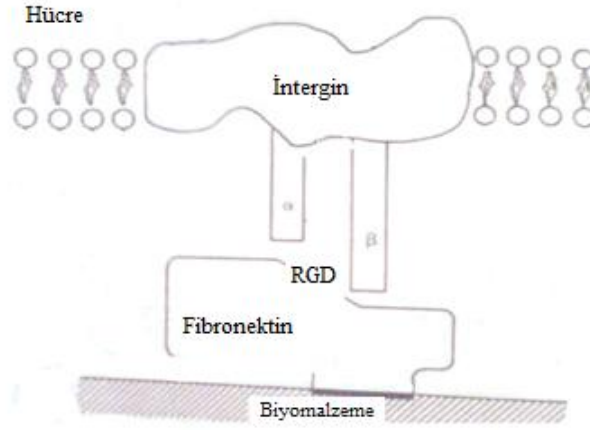
Çok bileşenli sıvılara en uygun örnek kandır. Kanda 150 çeşit protein bulunmaktadır. Kandaki proteinlerinin yüzey ile etkileşimleri önemlidir. Daha önce de bahsedildiği gibi malzeme vücuda yerleştirildiğinde ilk olarak kan ile temas eder ve kandaki serum proteinleri yüzeyde ince bir tabaka oluşturur. Ardından hücre yapışması veya pıhtılaşması gerçekleşir. Kan serum proteinlerinden birçoğu ile protein adsorpsiyonu çalışmaları yapılmıştır ancak en çok albümin, gamma-globülin (IgG) ve fibrinojen ile çalışılmıştır. Albümin kan ile doku arasındaki basıncın dengelenmesini sağlar, birçok ilaç ve hormon için taşıyıcı görev üstlenir [1]. Albümin küçük bir protein olup kanda çok yüksek konsantrasyona sahiptir bu nedenle de ilk olarak adsorplanma eğilimine sahiptir. Ancak albümin düşük afiniteye sahiptir ve zaman zarfında daha yüksek afiniteye sahip fibrinojen ile yer değiştirebilir [13]. Fibrinojen kanda yaklaşık %3 oranında yer alır ve kanın pıhtılaşmasında görev alır. İmmunoglobulin ise antikor olarak işlev görebilen bir proteindir. En çok çalışılan serum proteinleri ve görevleri Çizelge 2.2’de verilmiştir [1].

Çizelge 2.2 : İnsan kan serumunda bulunan temel proteinler ve fonksiyonları [13]

Kan Serum Proteinleri	İnsan Kanındaki Konsantrasyonu (mg/ml)	Temel Fonksiyonları
Albümin	40	Osmotik basıncı sağlar
Hemoglobin	0.01	Oksijen taşınımı sağlar
Gamma-globülin (IgG)	15	Bağışıklık sisteminde görev alır
Fibrinojen	3	Kanın pıhtılaşmasında görev alır
Fibronektin	0.3-0.4	Hücre yapışmasını sağlar
Faktör XII	0.03	Kanın pıhtılaşmasında görev alır
Vitronektin	0.3	Hücre yapışmasını sağlar

Çalışmada kullanılan fibronektin proteini serum proteinleri arasında önemli bir yer kaplamaktadır. Fibronektin, kollagen ve fibrinojen gibi yapışma proteinleri hücre dışı matriste bulunurlar ve doku yenilemesinde çok büyük önem taşırlar. Bu konuda en çok çalışılmış protein ise fibronektindir. Fibronektin, endotel, düz kas ve fibroblastlarca üretilen iki polipeptid zinciri içeren dimerik bir glikoproteindir ve her

bir zinciri yaklaşık 2500 amino asit içerir. Fibronektinler yapıştırıcı glikoproteinler olup üç homolog tekrar ünitesinden (tip I, II, III) oluşur [18]. Fibronektinin hücre bağlanmasında etkili olan çeşitli bölgeler içermektedir bunlardan en önemlisi tip III ünitesinde bulunan RGD olarak adlandırılan arg-gly-asp amino asitlerinden oluşan bölgedir. Hücre zarındaki reseptör intergin grupları Şekil 2.11’de görüldüğü gibi hücre dışı matriste bulunan fibronektin proteininin RGD bölgesine bağlanmayı sağlarlar [19].



Şekil 2.11 : Hücre zarındaki reseptör intergin grupların hücre dışı matriste bulunan fibronektin proteininin RGD bölgesine bağlanması [19]

Bu nedenle fibronektinin biyomalzeme yüzeyine adsorpsiyonu özellikle yara iyileşmesi doku yenilemesi için büyük öneme sahiptir. Ayrıca daha önce de bahsedildiği gibi proteinlerin konformasyonu da büyük öneme sahiptir. Biyomalzeme yüzeyine adsorplanan fibronektin molekülünün bağlanma bölgeleri hücre zarındaki intergin gruplar ile etkileşmeye müsait konumlanmazsa hücre yapışması gerçekleşemez [1].

3. MOLEKÜLER SİMÜLASYON YÖNTEMLERİ

Moleküler simülasyon yöntemleri deneysel çalışmaları desteklemek ya da deneysel çalışma yapmadan elde edilecek sonuçları önceden tahmin edebilmek amacıyla hesaplamalı yöntemleri kullanır. Moleküler simülasyon yöntemlerinin ilk basamağı moleküler modellemedir. Moleküler modellemede moleküllerin davranışlarının gerçek sistemlere benzer şekilde modellenmesi için teorik ve hesaplamalı kimyayı bir arada kullanır. Moleküler simülasyon ise oluşturulan bu moleküler modeller üzerine kurulmuş sayısal deneydir. Moleküler simülasyon yöntemleri küçük kimyasal sistemlerden geniş biyolojik moleküllere ve malzeme topluluklarına kadar değişen bir aralıkta kullanılmakta ve inorganik, biyolojik ve polimerik sistemlerin yapı, dinamik ve termodinamik özelliklerinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Basit hesaplamalar el ile yapılabilmektedir, fakat büyük ölçüdeki sistemlere moleküler simülasyon yöntemlerinin uygulanması bilgisayar kullanımını gerektirmektedir. Moleküler simülasyon yöntemleri temel olarak iki kategoriye ayrılabilirler. Bunlardan ilki kuantum mekaniği yöntemleri olup diğeri ise klasik mekanik yöntemlerdir. Kuantum mekaniği yöntemlerinde elektronlar temel alınır ve Schrödinger denklemleri kullanılarak moleküllerin özellikleri ve davranışları incelenir. Klasik mekanik yöntemlerde ise yalnız atomlar veya atom grupları temel alınır ve deneysel kuvvet alanları kullanılarak molekülün davranışları ve özellikleri incelenir. Kuantum mekaniği kullanan yöntemler daha kesin yöntemlerdir ve incelenen sistemle ilgili deneysel veri gerektirmezler ancak daha çok hesaplamaya dayanırlar ve küçük miktarda atom grupları için kullanılırlar. Protein-yüzey ilişkisi incelenen çalışmalarda çok fazla atomla çalışıldığından kuantum mekaniği kullanışlı değildir. Diğer tarafta klasik mekanik yöntemler kuantum yöntemlerine göre daha az hesaplama gerektirir ve binlerce atom içeren büyük sistemlerin bile simülasyonu yapılabilir. Bu nedenle protein-yüzey ilişkisi çalışmalarında daha çok klasik mekanik yöntemler tercih edilirler. Klasik mekanik yöntemler üç bölümde incelenebilirler : 1) Moleküler Mekanik (MM) 2) Moleküler Dinamik (MD) 3) Monte Carlo (MC). Bu üç yöntemden her biri kendine göre avantajlar ve kısıtlamalar içerirler [13]. Çalışmada

temel olarak kullanılan MM ve MD yöntemleri bu bölümde ayrıntılı olarak anlatılacaktır, ancak öncesinde moleküler simülasyon yöntemlerinde kullanılan kuvvet alanlarından ve istatistiksel topluluklardan bahsedilecektir.

3.1 Kuvvet Alanı

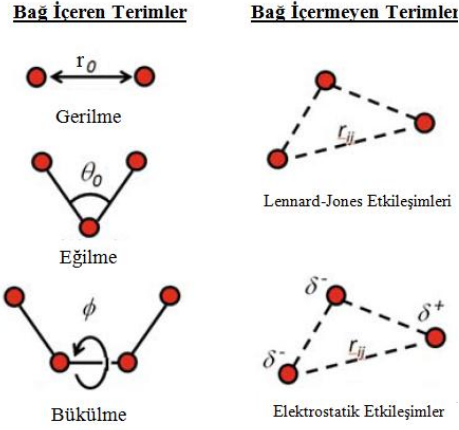
MM, MD ve MC yöntemlerinde deneye dayalı olarak hesaplanmış kuvvet alanı (forcefield) yardımıyla sistemin potansiyel enerjisi (E) hesaplanmaktadır. Moleküler simülasyon hesaplamalarının güvenilirliği kuvvet alanı ile ilişkilidir. Bu nedenle deneysel verilerin seçimi ve kuvvet alanı ile ilişkilendirilmesi moleküler simülasyonların en önemli basamağını oluşturur [20]. Toplam potansiyel enerji moleküller arası ve moleküller içi enerjinin toplamı olarak Eşitlik 3.1’de ifade edilmiştir. Eşitlik 3.2 ve 3.3 sırasıyla moleküller arası ve moleküller içi enerjinin bileşenlerini göstermektedir.

$$E_{top} = E_{iç} + E_{dış} \quad (3.1)$$

$$E_{iç} = E_{gerilme} + E_{eğilme} + E_{bükülme} \quad (3.2)$$

$$E_{dış} = E_{vdw} + E_{elektrostatik} \quad (3.3)$$

Molekül içi potansiyel enerji gerilme enerjisi, eğilme enerjisi ve bükülme enerjisinden oluşan enerjileri içerir. Moleküller arası potansiyel enerjiler ise elektrostatik enerji ve Lennard-Jones (LJ) enerjisi olarak da bilinen itme ve çekme enerjilerinden oluşmaktadır. Bu terimlerin ayrıntılı ifadesi Şekil 3.1’de özetlenmiştir [20,21].



Şekil 3.1 : Moleküller arası ve moleküller içi etkileşimler

Bağ içeren terimlerden $E_{gerilme}$; İki atom arasındaki bağda meydana gelen gerilme enerjisidir ve Eşitlik 3.4'teki gibi ifade edilir.

$$E_{gerilme} = \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 \quad (3.4)$$

Bu denklem bağların gerilme ve büzülmesinden kaynaklanan deformasyon enerjilerinin hesaplanmasında kullanılır. r mevcut bağ uzunluğunu, r_0 ideal bağ uzunluğu, k_b ise bağ gerilme kuvvet sabitini ifade eder. E_{egilme} ; Üç atom arasındaki açının değişmesiyle elde edilen eğilme enerjisidir ve Eşitlik 3.5'teki gibi ifade edilir.

$$E_{egilme} = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (3.5)$$

Bu denklem bağ arasındaki açıların değişiminden kaynaklanan deformasyon enerjilerinin hesaplanmasında kullanılır. θ bağlar arasındaki mevcut açıyı, θ_0 ideal açı değerini, k_θ eğilme açısı kuvvet sabitini ifade eder [10]. $E_{bükülme}$ dört atomun oluşturduğu iki düzlem arasındaki açının değişmesiyle meydana gelen bükülme enerjisidir. Bükülme enerjisi önceki iki durum gibi hesaplanamaz burada periyodik bir fonksiyon gerekmektedir ve Eşitlik 3.6'daki gibi ifade edilir.

$$E_{bükülme} = \frac{1}{2} k_\phi (1 + \cos(n\phi - \phi_0)) \quad (3.6)$$

Denklemde ϕ iki düzlemli arasındaki bükülme açısını ifade eder, n periyodik sayı, k_ϕ bükülme kuvvet sabiti, ϕ mevcut bükülme açısı, ϕ_0 ideal bükülme açısı değeridir

Bağ içermeyen terimlerden; E_{vdw} (Van der Waals etkileşimleri) Lennard-Jones enerjisi olarak da bilinen itme ve çekme enerjileri kullanılarak ifade edilirler.

Lennard-Jones enerjisinde, atomların birbirlerinden ayrı bulundukları mesafenin altıncı kuvvetiyle çekme enerjisi, on ikinci kuvvetiyle ise itme enerjisi belirlenmektedir. Bazı kuvvet alanlarında itme enerjisi on ikinci kuvvet yerine dokuzuncu kuvvet ile belirlenmektedirler. Farklı atom çiftlerinden oluşan bir sistemin Lennard-Jones enerjisi Eşitlik 3.7 ile gösterilmektedir.

$$E_{vnt} = E_{\text{çek.}} + E_{\text{it.}} = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (3.7)$$

Eşitlik 3.7’de r atomlar arasındaki mesafeyi, ε potansiyel kuyusunun derinliği, σ ise parçacıklar arası potansiyelin sıfır olduğu mesafeyi ifade eder. $E_{\text{elektrostatik}}$ (Elektrostatik enerji) Coulomb teorisine dayanır ve Eşitlik 3.8’deki gibi ifade edilir.

$$E_{\text{elektrostatik}} = \frac{q_i \cdot q_j}{4\pi\varepsilon r_{ij}} \quad (3.8)$$

□ dielektrik sabitini, q ve q_j etkileşen atomların yükleri, r_{ij} ise atomlar arası mesafeyi temsil eder [20,21].

Her bir kuvvet alanı farklı deneysel sistemi temsil etmek amacıyla deneye dayalı olarak türetildiğinden her bir kuvvet alanı farklı yapılardaki denklemler ile ifade edilmektedir. En çok kullanılmış olan kuvvet alanları sınıflandırılacak olursa; Klasik kuvvet alanları; Standart AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) [22], CVFF (Tutarlı Valans Kuvvet Alanı - CVFF) [23], CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) [22], Geniş kullanım alanı olan kuvvet alanları; ESFF (Extensible Systematic Forcefield), UFF (Universal Forcefield), VALBOND, Dreiding forcefield, İkinci jenerasyon kuvvet alanları; CFF91, PCFF (Polymer-Consistent Force Field) [24], CFF, COMPASS (Condensed-phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation Studies) [22], özel amaçlı kuvvet alanları; cam için tasarlanmış Glass forcefield, zeolit adsorpsiyonu için tasarlanan Zeolit forcefields şeklinde sınıflandırılabilir.

Bu çalışmada polimer yüzeylerin oluşturulması kısmında COMPASS kuvvet alanı kullanılmıştır, ardından protein adsorpsiyonu çalışmalarında ise proteinler için tasarlanmış olan CVFF kuvvet alanı kullanılmıştır. COMPASS kuvvet alanı karmaşık moleküllere ait olan molekül içi etkileşimler için tasarlanmış bir kuvvet alanıdır. COMPASS kuvvet alanında itme ve çekme enerjilerini tanımlayan Lennard-

Jones enerjisi 9-6'lı kuvvetler ile ifade edilmektedir. Bazı inorganik küçük yapılarda veya polimerlerde tercih edilir. COMPASS günümüzde katı hal özellikleri, birim hücre oluşturma, kafes (lattice) enerjisi, elastik özellikleri ve vibrasyonel (titreşim) etkileşimlerin belirlenmesinde tercih edilir. CVFF ise yıllardan beri çok kullanılan bir kuvvet alanıdır. CVFF kuvvet alanında Lennard-Jones enerjisi 12-6'lı kuvvetler ile ifade edilmektedir. Yapısal çalışmalarda, bağlanma enerjisinin hesaplanmasında konformasyon enerjilerinde öncelikle tercih edilir. Daha çok peptitler, proteinler ve çeşitli organik sistemler için uygundur. Bu özelliklerinden dolayı protein adsorpsiyon çalışmalarında CVFF tercih edilen kuvvet alanlarındadır [25].

3.2 İstatistiksel Topluluklar

Moleküler simülasyon yöntemlerinin deneysel bir sistemi doğru yansıtabilmesi için istatistiksel toplulukların belirlenmesi gerekir. İstatistiksel topluluklar bir sistemi oluşturan parçacıkların yerlerinin ve hızlarının farklı oluşundan elde edilen birçok durumunun toplanması ile oluşurlar. Sistem çeşidine ve topluluğun bulunduğu koşullara göre değişen farklı topluluklar mevcuttur. İstatistiksel topluluklar iki temel kategoride incelenebilirler. Mikrokanonik (NVE), kanonik (NVT), izotermal-izobarik(NPT) istatistiksel toplulukları molekül sayısı hiç değişmeyen kapalı sistemleri ifade ederken, büyük kanonik istatistiksel topluluğu (μ VT) ise molekül sayısı değişebilen açık sistemleri ifade eder. Ayrıca birden çok fazlı sistemlerde Gibbs istatistiksel toplulukları da mevcuttur [26,27]. İstatistiksel topluluklar gerçek sistemleri temsil etmelidir bu nedenle doğru istatistiksel topluluğun seçimi ortam şartlarına bağlıdır. Birçok fiziksel süreçte molekül sayısında değişim görülmez ve işlemler sabit sıcaklık veya basınçta gerçekleşebilir. Bunlara uygun olarak kanonik, izotermal-izobarik istatistiksel topluluklar tercih edilebilir.

Moleküler simülasyonda mikrokanonik topluluğun kullanımı fazla önemli değildir. Çünkü genellikle enerjiden çok sıcaklık ve basınç hakkında bilgiler mevcuttur. Bu yüzden simülasyonlarda kanonik ve izotermal-izobarik toplulukların kullanımı daha yararlıdır. Kanonik topluluk hacim ve sıcaklık sabit tutulurken, basınç ve toplam enerji değişkendir. İzotermal-izobarik toplulukta ise basınç ve sıcaklık sabit girdilerken, hacim ve toplam enerji değişken değerlerdir. İzotermal-izobarik toplulukta basınç sabit olduğu için hacim değişimi yani birim hücrenin kenar uzunluğunun (L) değişimi gözlenmektedir. Sabit sıcaklık elde etmek için değişik

yöntemler geliştirilmiştir. Kullanılan en temel yöntemler basit hız ölçeklendirme (simple velocity scaling), ısı banyosu ilişkilendirme (heat-bath coupling), Andersen, Nosé ve Hoover yöntemleridir. Sabit basınç elde etmek için de modifiye edilmiş Andersen, Hoover ve Constraint (Kısıt) metotları kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan Berendsen termostat ve barostat yöntemi ise hem sabit sıcaklık hem de basınç elde edilmesinde kullanılabilen bir yöntemdir [27].

Literatürde izotermal ve izobarik şartlarda yerine getirilen MD simülasyonlarla ilişkin çeşitli yöntemler yer almaktadır. Bu yöntemlerin çoğunda T ve P sabitlerinin kısıtlamaları dikkate alınarak Langrange hareket denklemlerinin yeniden formüle edilmesine çalışılmaktadır. Bu yöntemler arasından en çok kullanılanı da Nosé Hoover yöntemidir. Berensen izotermal ve izobarik MD simülasyonlarının yapılması için sistemi ısı ve basınç banyosu ile birleştirerek genişletilmiş Langrangian denklemlerine gerek kalmadan daha basit bir yöntem önermiştir. Sistemin sabit sıcaklık ve basınca ulaşabilmesi için Eşitlik 3.9 ve Eşitlik 3.10'un sağlanması gerekmektedir.

$$\frac{dT}{dt} = (T - T_{ist})/\tau_T \quad (3.9)$$

$$\frac{dP}{dt} = (P - P_{ist})/\tau_P \quad (3.10)$$

Bu eşitliklerde T_{ist} ve P_{ist} istenen sıcaklık ve basınç değerleridir. τ_T ve τ_P ise ısı ve basınç banyoları birleşimi sağlanan sistemin zaman sabitlerinin frekanslarını temsil etmektedir. T ve P momentumlar ve sistemin konfigürasyonundan hesaplanan anlık değerlerdir. Bu denklemlerin çözümü hızların ve konumların her bir zaman aralığında X_T ve X_P faktörleri ile yeniden ölçeklendirilmesini gerektirmektedir. Bu durum da Eşitlik 3.11 ve 3.12' de gösterdiği gibi sağlanmaktadır. Eşitlik 3.12'de β_T sistemin izotermal sıkıştırılabilirliğini göstermektedir.

$$x_T = \left(1 + \frac{dt}{\tau_T} \left(\frac{T}{T_{ist}} - 1 \right) \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.11)$$

$$x_P = 1 - \beta_T \frac{dt}{\tau_P} (P - P_{ist}) \quad (3.12)$$

Berensen tarafından önerilen yöntem Nosé ve Hoover tarafından önerilen yönteme göre daha basit ve kolay programlanabilen bir yöntemdir. Ancak, bu yöntemin tanımladığı olasılık yoğunluğunun belirli bir istatistiksel topluluğa (NVT, NPT gibi) karşılık gelmemesi nedeni ile sorun yaşanabilmektedir [28].

3.3 Moleküler Mekanik

MM yöntemleri daha çok moleküler yapının potansiyel enerjisini deneye dayalı bir kuvvet alanı kullanarak koordinatlara ve bağlarına göre ifade etmek için kullanılır [13,20]. Özellikle sıkışık sistemlerde gerilmiş, bükülmüş ya da kıvrılmış bağların gevşemesini sağlar ve atomların enerjik olarak uygun olmayan şekilde üst üste çakışmasını engeller. Bu hesaplama termal enerji etkilerini içermez. Meydana gelen geometriler 0 Kelvin'in altındaki koordinatları ifade eder. MM yöntemleri genellikle MC ve MD simülasyonlarının öncesinde ve sonrasında tercih edilen yöntemlerdir [13]. Moleküler mekaniğin temel amacı minimum potansiyel enerjiye sahip olan optimum geometriyi bulmaktır [20]. Simülasyon için tasarlanmış olan üç boyutlu modeller ilk hazırlandığında ideal geometriye sahip değildirler. Bu nedenle bu yapılar oluşturulduktan sonra ardından uygun geometri sağlanmalıdır. Bu mükemmelleştirme basamağı minimizasyon (geometri optimizasyonu) olarak bilinir. Minimizasyon basamağı ile molekül yapısı gevşetilecektir [21]. Minimizasyon döngülü bir yöntem olup birim hücre parametrelerini ve atom koordinatlarını toplam potansiyel enerji minimum olacak şekilde ayarlanmasını sağlar. Minimum enerjiye sahip olan yapı deneysel olarak gözlenen yapıya en çok benzeyen yapıdır [29]. MM yöntemlerde enerji minimizasyonunu sağlamak için çeşitli minimizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu enerji minimizasyon prosedürleri iki temel grupta incelenebilirler: ilk grupta enerji fonksiyonunun birinci türevini kullanan dik iniş (steepest descent) yöntemi ve eşlenik eğim (conjugate gradient) metodu ve ikinci grupta ise enerji fonksiyonunun ikinci türevini kullanan Newton-Raphson metodundan bahsedilebilir [10]. *Dik iniş* yöntemi en basit minimizasyon yöntemidir. Bu yöntem numerik hesaplanmış enerji fonksiyonunun birinci türevi kullanarak minimum enerjiye ulaşmayı hedefler. Öncelikle enerji başlangıç durumu için hesaplanır. Daha sonra yer değiştiren her bir atomun yeni koordinatına göre enerji tekrar hesaplanır. Bu hesaplama tüm atomlar yeni konumlarına geçene kadar tekrarlanır ve hesaplanan minimum enerji tekrar hesaplanana kadar sürdürülür.

Minimum noktaya yaklaşıldığında dik iniş yöntemi yavaşlar. Bu nedenle bu yöntem genellikle minimumdan çok uzak olan yapılarda tercih edilir. Genellikle bu metod ilk başta kabaca kullanılır ve daha sonra daha avantajlı diğerk yöntemler ile devam ettirilir. *Eşlenik eğim* metodu en çok kullanılan minimizasyon tekniğidir. Bu metotta bir döngüden bir sonraki döngüye bilgi biriktirmesi sağlanır. Her bir minimizasyon basamağında eğim hesaplanır ve bu eğim bir sonraki adımın hesaplanmasında kullanılır. Bu yöntem genellikle büyük sistemler için tercih edilir. Döngü süreleri dik iniş metodundan daha uzundur ancak daha etkili yakınsamaya sahiptir [21]. *Newton-Raphson* metodu fonksiyonun ikinci derece türevi hesaplanmasını ve depolanmasını gerektirir bu nedenle de pahalı bir yöntemdir. Newton-Raphson yöntemi maksimum 200 atomlu sistemler için tavsiye edilir [29]. Çok küçük yakınsama aralığına sahiptir ve enerji minimumuna yakın bölgelerde daha çok etkilidir. Bu nedenle genellikle önceden minimize edilmiş sistemlerde maksimum yakınsamayı elde etmek için son yöntem olarak kullanılır [21]. Bu çalışmada kullanılan minimizasyon akıllı minimizasyon olarak adlandırılır ve ilk olarak dik iniş yöntemi ile başlar daha sonra eşlenik eğim metodunu kullanır ve en son Newton-Raphson metodu ile son bulur [29].

3.4 Moleküler Dinamik

Moleküler Dinamik (MD) moleküler simülasyonda temel olarak kullanılan yöntemlerdendir. Moleküler dinamik çok parçacıklı sistemde sistemi oluşturan her bir parçacık için hareket denklemlerinin integrasyonuna dayanan simülasyon yöntemidir. Moleküler dinamik yöntemler daha çok zamana bağılı özelliklerin hesaplanmasında kullanılan yöntemlerdir. MD yöntemlerinde sıcaklık da sisteme ilave edilir ki bu da termodinamik özelliklerin hesaplanmasında büyük öneme sahiptir [13].

Hareket denklemini integre etmek için Newton hareket denklemi Eşitlik 3.13'teki gibi yazılır.

$$F_i = m_i \cdot a_i \quad (3.13)$$

Burada F parçacığae etki eden kuvveti, m ve a sırasıyla parçacığın kütesini ve ivmesini temsil eder. Hareketin zaman ile yer değıştirmesi incelendiğinden ivme yer

değiştirmenin zamana göre ikinci türevi olarak ifade edilmelidir ve hareket denklemi buna göre düzenlenmelidir (Eşitlik 3.14).

$$\frac{d^2 r_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} \quad (3.14)$$

Burada r parçacığın pozisyonunu ifade eder. Sistemin dinamik davranışını bu eşitliğin her bir molekül için çözülmesi ile elde edilir. Bu eşitliğin zamana göre integre edilmesi ile Eşitlik 3.15 elde edilir.

$$\frac{dr_i}{dt} = \left(\frac{F_i}{m_i} \right) t + c_1 \quad (3.15)$$

Başlangıç hız değeri (v_i) c_1 sabitine eşit olur (Eşitlik 3.16). Bu eşitlik zamana göre tekrar integre edilirse Eşitlik 3.17 elde edilir.

$$\frac{dr_i}{dt} = a_i t + v_i \quad (3.16)$$

$$r_i = a_i \frac{t^2}{2} + v_i t + c_2 \quad (3.17)$$

c_2 sabiti parçanın mevcut konumunu ifade eder. Eşitlik 3.17 parçacığın başlangıç hızından ve ivmesinden yola çıkarak parçacığın yer değıştirmesinin hesaplanmasını sağlar [27].

Moleküler simülasyonda kuvvet hesabı en çok zaman kaybettiren kısımdır. Bu yüzden bu kısmın hesaplanması önemlidir. Hareket denklemi standart sonlu fark algoritmaları kullanılarak çözülebilmektedir. Standart sonlu farklar algoritmaları predictor veya predictor-corrector metotlar olarak sınıflandırılabilirler. Predictor metotta moleküllerin koordinatları geçerli basamakta hesaplanabilir veya bir önceki basamaktan elde edilebilir. En çok kullanılan predictor metodu Verlet algoritmasıdır (1967). Predictor-corrector metotta ise moleküllerin koordinatları tahmin edilir daha sonra sonuçlara göre tahminlerin doğruluğu değerlendirilir. En çok kullanılan predictor-corrector metot Gear algoritmasıdır (1971).

Predictor metotlardan Verlet algoritması temelinde Taylor serisi açılımına dayanır (Eşitlik 3.18 ve 3.19).

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \frac{dr}{dt} \Delta t + \frac{1}{2!} \frac{d^2 r}{dt^2} \Delta t^2 + \dots \quad (3.18)$$

$$r(t - \Delta t) = r(t) - \frac{dr}{dt} \Delta t + \frac{1}{2!} \frac{d^2 r}{dt^2} \Delta t^2 + \dots \quad (3.19)$$

Bu iki eşitliğin kombinasyonu ile Eşitlik 3.20’de ifade edilen Verlet algoritması oluşur.

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + \frac{d^2 r}{dt^2} \Delta t^2 \quad (3.20)$$

Verlet algoritmasının avantajı moleküllerin pozisyonunun belirlenmesinde hız hesabı kullanmamasıdır. Ancak kinetik enerji hesaplamaları için hıza ihtiyaç duyulur. Hızın hesaplaması için Eşitlik 3.21 kullanılır.

$$v(t) = \frac{r(t + \Delta t) - r(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad (3.21)$$

Verlet algoritması kısa ve uygulaması kolay bir algoritmadır. Ancak, bu algoritmanın bazı dezavantajları da vardır. İlk dezavantajı $t=0$ da hesaplama yapılabilmesi için $t = -\Delta t$ tahmininin yapılması gerekmesidir. Yapılacak olan bu tahmin mantıklı olmalıdır ve algoritmanın doğruluğunu bozmamalıdır. Verlet algoritmasının en büyük dezavantajı ise hız değerlerinin doğru hesaplanamaması ve kesinliğinin tam olmamasıdır. Eşitlik 3.21’de hesaplanan hız değeri konum ile eş zamanlı değildir. Bu dezavantajların giderilmesi için Verlet algoritması üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. Leap-Frog algoritması Verlet algoritmasının modifikasyonu ile elde edilen algoritmalarındandır. Leap-Frog algoritması hesaplamalarda yarı zaman aralıkları kullanır ve hızı da hesaba katar.

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v(t + \Delta t / 2) \quad (3.22)$$

$$v(t + \Delta t / 2) = v(t - \Delta t / 2) + \Delta t a(t) \quad (3.23)$$

$$v(t) = \frac{v(t + \Delta t / 2) + v(t - \Delta t / 2)}{2} \quad (3.24)$$

Verlet algoritmasından farklı olarak bir sonraki konum şu andaki konum ve bir sonraki yarı zamandaki hıza bağlı olarak hesaplanır (Eşitlik 3.22). Bir sonraki yarı zamandaki hız ise şimdiki ivme ve bir önceki yarı zamanlı hıza bağlı olarak hesaplanır (Eşitlik 3.23). Şu andaki hız ise bir önceki ve bir sonraki yarı zamanlı hızın ortalaması alınarak hesaplanır (Eşitlik 3.24). Ancak bu yöntemde de hız ve konum eş zamanlı hesaplanamazlar ve yine Verlet algoritmasında olduğu

gibi $t = -\Delta t/2$ tahmin edilmelidir. Bu eksikliklerin giderilmesi için diğ er bir yol olan hız Verlet algoritması geliştirilmiştir. Hız Verlet algoritmasında önce yeni zamanlı konum (Eşitlik 3.25) ve yarı zamanlı hız hesaplanır (Eşitlik 3.26). Ardından yeni zamanlı hız hesaplanır (Eşitlik 3.27).

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v(t) + \frac{\Delta t^2 a(t)}{2} \quad (3.25)$$

$$v(t + \Delta t / 2) = v(t) + \frac{\Delta t a(t)}{2} \quad (3.26)$$

$$v(t + \Delta t) = v(t + \Delta t / 2) + \frac{\Delta t a(t + \Delta t)}{2} \quad (3.27)$$

Bu algoritmada ilk iki algoritmadan farklı olarak hız ve konum eş zamanlı olarak hesaplanabilir ve $t = -\Delta t$ tahmini gerektirmez [27].

4. PROTEİN YÜZEY İLİŞKİLERİNİN MODELLENMESİ

Bu bölümde günümüze kadar moleküler simülasyon yöntemleri ile yapılmış protein-yüzey ilişkileri ile ilgili çalışmalara kısaca değinilecek ve dikkat edilmesi gereken temel parametrelerden bahsedilecektir.

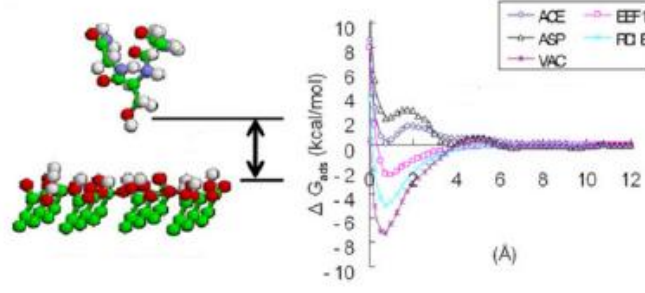
4.1 Çözücünün Temsili

Protein-yüzey ilişkilerinin moleküler simülasyon yöntemleri ile incelenmesinde yüzeyin bulunduğu ortamdaki çözücünün etkisinin incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Çözücü olarak genellikle suyun etkisi incelenir. Çözücü etkisinin incelenmesi için iki değişik yöntem kullanılmaktadır: Açık (explicit) çözücü yöntemde, su molekülleri simülasyona moleküller halinde ilave edilebilir ve bu durumda kuvvet alanına bağlı olarak su moleküllerinin ve iyonların davranımları incelenir. Alternatif bir yol olarak saklı (implicit) çözücü modeli de uygulanabilir. Bu metotta çeşitli yaklaşımlar ile su moleküllerinin temsil edilmesi sağlanır. Açık çözücü metodun faydası su moleküllerinin amino asitlerle veya malzeme yüzeyi ile etkileşimlerinin incelenebilmesidir. Amino asitler ve su molekülleri malzeme ile etkileşmek için yarış halindedirler ve bu etkileşimler direkt olarak gözlemlenebilir ancak diğer yandan çözücü olarak kullanılan suyu temsil etmek için çok fazla miktarda su molekülüne ihtiyaç vardır. Bu durumda simülasyonda kullanılan atomların yaklaşık %90'ı su atomlarından meydana gelmiş olur. Bu problemi ortadan kaldırmak için saklı çözücü modeli geliştirilmiştir. Böylelikle simülasyonda harcanan fazla zaman kısaltılmış olur. Saklı çözücü modeli su molekülünün iki önemli etkisini temsil etmelidir. 1) Su moleküllerinin oluşturduğu elektrostatik alan ve çözücüdeki iyonlar ki bunlar polar ve yüklü fonksiyonel gruplara karşı önemlidir. 2) Hidrofobik etkileşimler.

En basit saklı çözücü modeli kuvvet alanının temel terimlerinden olan Coulomb kanununu açıklayan terimin paydasına yer alan bağıl dielektrik sabiti teriminin değiştirilmesi ile elde edilir.

$$E_{elek} = \frac{q_i \cdot q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} \quad (4.1)$$

Eşitlik 4.1’de E_{elekt} i ve j atomları arasındaki potansiyel enerjiyi, q_i ve q_j bu atomların yüklerini ϵ ise bağıl dielektrik sabitini ifade eder. r_{ij} ise i ve j atomları arası mesafedir. Suyun bağıl dielektrik sabiti 298K dolaylarında 79, 300K’de 78’dir. Vakum (hava) bağıl dielektrik sabit değeri ise 1 dir. Coulomb ifadesinde suyu temsil etmek amacıyla ϵ değeri suyu temsil edecek şekilde uygun sıcaklığa göre 78 veya 79 alınırsa E_{elekt} değeri suyun bağıl dielektrik sabitine bölünmüş olur. Diğer yol ise ilkinden biraz daha karmaşıktır. Burada mesafeye göre değişen dielektrik terim kullanılır yani dielektrik sabiti (ϵ) yerine r_{ij} terimi kullanılır, böylece E_{elekt} r_{ij} ’nin karesi ile ters orantılı olur. Etkileşen atomlar birbirlerine çok yaklaştıklarında r^2 terimi küçük olacağından elektrostatik etkileşimler daha güçlü ancak atomlar birbirinde uzak olduğunda r^2 değeri büyüyeceğinden elektrostatik etkileşimler daha zayıf olacaktır ki bu durum suyun görevini temsil etmektedir. Bunlar dışında değişik saklı çözücü modelleri de bulunmaktadır. Poisson–Boltzmann (PB) eşitliğinin kullanıldığı saklı model ile elektrostatik etkileşimleri daha doğru hesaba katılabilmektedir ancak bu yöntemin dezavantajı MC ve MD hesaplamalarında çok yavaş olmasıdır; ancak MM hesaplamalarda tercih edilmektedir. PB yöntemine alternatif olarak Genelleştirilmiş-Born (GB) yöntemi de kullanılmaktadır. Bu yöntem de yine elektrostatik etkileşimler bakımından oldukça başarılıdır. Ancak saklı çözücü modeline dayalı yöntemlerin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu yöntemler amino asit ve su molekülleri arasında gerçekleşen rekabeti ve hidrofobik etkileşimleri tam olarak temsil edememektedir. Bu durum sonuçlarda bazı eksikliklere sebep olabilmektedir [7,30].



Şekil 4.1 : Farklı saklı çözücü modellerinin serbest adsorpsiyon enerjisine etkileri [30]

Şekil 4.1’de Glisin-serin-glisin polipeptidinin hidrofilik oligo (etilen oksit) yüzeyine belli bir mesafede serbest adsorpsiyon enerjisinin hesaplanmasında değişik saklı çözücü modelleri kullanılmıştır. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi değişik çözücü metotları sonuçlarda farklılıklara sebep olabilmektedir [30]. Raffaini ve Ganazzoli çalışmalarında çözücü etkisini araştırmışlardır. saklı çözücü modellerinden dielektrik sabiti yöntemi kullanılarak yapılan simülasyonlarda açık çözücü modeline göre fibronektin proteininde çok büyük bir konformasyon değişimi gözlemlenmemişlerdir. Sadece yapıda bazı tersinir değişimler gözlemlenmişlerdir. Diğer yanda su ile yapılan çalışmalar oldukça fazla zaman aldığından Raffaini ve Ganazzoli çalışmalarında saklı çözücü modelini tercih etmişlerdir [31].

4.2 Yüzeyin Modellenmesi

Protein-yüzey ilişkilerinin moleküler simülasyon ile incelenmesinde ilk basamak olan malzeme yüzeyinin modellenmesi büyük önem taşımaktadır. Daha önceden de bahsedildiği gibi kuvvet alanı sistemin potansiyel enerjisinin atomların pozisyonuna göre değişimini ifade eder atomların koordinatlarında meydana gelen tüm değişiklikler seçilen bu kuvvet alanına göre belirlenir. MM hesaplamalarda kuvvet alanı atomların minimum enerjiyi elde edecek şekilde yeniden düzenlenmesini sağlar. MD hesaplamalarda ise belirli bir simülasyon zamanı süresince atomların ne şekilde hareket edeceğini hesaplanır. Kısaca malzeme yüzeyinin modellenmesinde ve ardından gerçekleştirilen adsorpsiyon simülasyonunda kuvvet alanı seçimi temel faktördür. Simülasyonun doğruluğu kuvvet alanının atom etkileşimlerini ne kadar doğru temsil edebildiği ile ilişkilidir [30]. Polimer yüzeyler karmaşık yapılar olduklarından modellenmeleri inorganik yüzeylere göre daha karmaşıktır. Polimer yüzeyler modellenirken polimerlerin tekrar birimleri oluşturulur ve daha sonra

istenen zincir uzunluğunda yapılar hazırlanır. Ardından MD simülasyonları ile yapı dengelenir. Malzeme yüzeyleri moleküler simülasyon yöntemleri ile modellendikten sonra modelin doğruluğunu kontrol etmek için yapının fiziksel özelliklerinin deneysel veriler ile uyumluluğunun kontrol edilmesi gerekmektedir. Son olarak da yüzeyler adsorpsiyon çalışmalarında kullanılacak olan proteinin büyüklüğüne uygun şekilde genişletilmelidir [32]. Ayrıca protein yapısının da potansiyel enerjilerini koordinatın fonksiyonu olarak belirlemek oldukça zordur. Protein yapısının potansiyel enerjinin minimum olduğu bir sürü farklı konumu bulunmaktadır ki her bir durum enerjinin çok yüksek olduğu bariyerler ile ayrılmaktadırlar. Bu nedenle protein yapısının doğru modellenmesi büyük önem taşımaktadır [30]. Yüzey protein ilişkisinin incelendiği simülasyon çalışmalarında proteinlerin atomik koordinatları genellikle Protein Veri Bankasından (Protein Data Bank-PDB) elde edilmektedir [33].

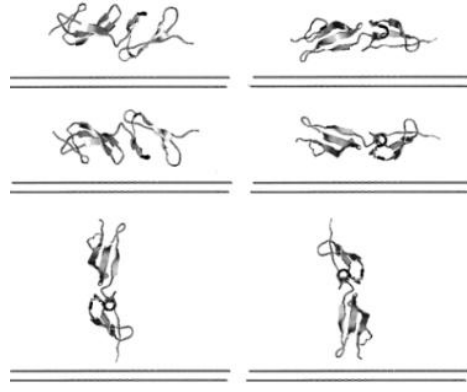
4.3 Yüzey Adsorpsiyonu

Yüzey ve proteinin modellenmesinin ardından proteinin yüzeye etkileşimleri incelenebilir. Küçük moleküllerin yüzeylere adsorpsiyonu simülasyon yöntemlerinde çok çalışılmış bir metottur ancak proteinler çok büyük, heterojen ve değişken yapılar olduklarından protein adsorpsiyonu çok daha karmaşık bir durumdur. Proteinler ile yüzey arasında meydana gelen etkileşimler protein adsorpsiyonunun sürücü kuvvetidir. Adsorpsiyon serbest enerjisinin belirlenmesi için birçok değişik MM, MD ve MC simülasyon çalışmaları yapılmıştır. Ancak protein-yüzey etkileşimlerinin moleküler simülasyon yöntemleri ile incelenmesinde genel bir uygulama yoktur. Yapılan simülasyon çalışmaları deneysel veriler ile nitel olarak tutarlılık göstermişlerdir ancak elde edilen sonuçlar nicel olarak birbirleri ile kıyaslanamazlar. Bu nedenle protein-yüzey ilişkilerinin modellenmesinde daha kesin yöntemlerin ve kuvvet alanlarının geliştirilmesi beklenmektedir [7].

Daha önceden de bahsedildiği gibi biyomalzemeler inorganik ve organik birçok malzemedan oluşabilirler. Bu nedenle protein-yüzey ilişkilerinin incelendiği simülasyon çalışmalarında inorganik ve organik birçok yüzey ile çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda birçok değişik parametre incelenmiştir. Çalışmalarda genel olarak incelenen parametreler; proteinin farklı konumları, yüzeyin boyutu, yüzeyin yükü, proteinin yüzey ile gösterdiği etkileşim enerjisi ve proteinde görülen

konformasyon değişimleri şeklinde özetlenebilir. Ayrıca proteinin yapısını oluşturan amino asitler de ayrı olarak incelenmiştir. Simölasyon öncesi ve sonrası amino asitlerin yüzeye olan mesafelerinin değişimi incelenmiş ve yüzeye en fazla ilgisi olan amino asidin türü belirlenmiştir. Böylece protein-yüzey ilişkilerinde amino asit bazında daha derin bilgiler elde edilmiştir.

Protein-yüzey ilişkilerinde proteinin konumunun rolü büyüktür. Protein yüzeyi heterojen yapıya sahiptir. Bu yüzeyde yüklü, hidrofilik, hidrofobik yapılar heterojen olarak yapıda dağılmışlardır. Örneğin; proteindeki hidrofobik bölge hidrofobik malzeme ile etkileştiğinde proteini çekecek aksi durumda ise itecektir. Moleküler simölasyon yöntemlerinde bu sebeple proteinler değişik konumlarda incelenmişlerdir [7]. Jia-Wei Shen ve arkadaşlarının [34] çalışmasında hidroksiapatit yüzeye fibronektin adsorpsiyonu üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada malzeme yüzeyi yüküdür bu nedenle elektrostatik etkileşimler büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle proteinin yapısında bulunan yüklü COO^- ve NH_3^+ gruplarının önemi büyüktür. Bu çalışmada proteinin konumu, altı değişik şekilde değiştirilerek her bir yüzeydeki amino asitlerin yüzeye etkileşen fonksiyonel grupları belirlemişlerdir. Her bir yönlenmede etkileşim enerji ve elektrostatik enerjileri hesaplamışlardır. Böylelikle fonksiyonel grupların etkileşim ve elektrostatik enerjilerine etkileri incelemişlerdir ve proteinle ilgili genel bir varğıya ulaşmışlardır. Çalışmada esas alınan Ganazolli ve arkadaşlarının çalışmalarında da benzer şekilde konformasyon etkisi incelenmiştir. Ganazolli ve arkadaşları öncelikle hidrofobik grafit yüzeyi ile ve iki değişik protein (albümin ve fibronektin) ile çalışmışlardır. Öncelikle grafit yüzeyi üzerine proteinleri altı değişik konumda yerleştirmişlerdir (şekil 4.2).

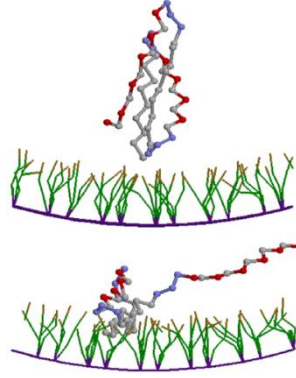


Şekil 4.2 : Fibronektin proteininin grafit yüzeyi üzerine altı farklı yönelmesi [35]

Ardından her bir yönelme için etkileşim enerjileri hesaplamışlardır ve adsorplanan amino asit sayısına göre adsorplanma kuvvetini belirlemişlerdir. Elde edilen veriler ile yönelmeden bağımsız proteinin yüzey ilişkisi için genel bir yargıya ulaşmışlardır. Aynı çalışmayı daha sonra hidrofilik bir yapı olan PVA için de tekrarlamışlar ve hidrofilik ve hidrofobik yüzeylerin protein ilişkileri deneysel veriler ile kıyaslamışlardır. Yapılmış deneysel çalışmalarla da tutarlı olarak hidrofobik yüzeylerde protein adsorpsiyonunun hidrofilik yüzeylere göre daha güçlü olduğunu tespit etmişlerdir [5,35].

Protein-yüzey ilişkileri ile ilgili çalışmalarda incelenen diğer bir parametre ise proteinin konformasyonundaki değişimdir. Protein-yüzey etkileşimlerinin malzeme yüzeyinde zamanla konformasyon değişimlerine sebep olmaktadır. Bu değişimler proteinin biyolojik aktivitesi ile direkt olarak ilişkili olup protein adsorpsiyonunun en önemli basamağını oluşturur. Konformasyon değişimlerinin deneysel yöntemlerle incelenmesi oldukça zordur bu nedenle konformasyon değişimlerinin incelenmesinde moleküler simülasyon yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Böylelikle protein yapısının belli bir zaman aralığında dinamik hareketleri gözlemlenebilmektedir. Bu konuda da birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan moleküler simülasyon çalışmalarında protein konformasyonlarında genellikle yayılma ve katlanma eğilimleri gözlemlenmektedir. Proteinlerin konformasyonlarının değişimleri ile protein-yüzey etkileşimlerinde de değişim gözlenir. İlk başta yüzey ile etkileşim göstermeyen atomlar konformasyonda meydana gelen değişimler ile etkileşmeye başlayabilirler. Yüzey üzerine yerleştirilen protein ilk başta moleküller arası etkileşimler sebebi ile yüzey üzerinde yayılma eğilimi gösterirler. Bu durum protein-yüzey etkileşimlerinin de maksimum düzeye gelmesine sebep olur. Ardından molekül içi etkileşimler ile

protein bir miktar toparlanır böylece adsorplanan atomlar yüzeyden tekrar uzaklaşabilirler [7]. Yan Sun ve arkadaşlarının çalışmasında protein konformasyon değişimleri Moleküler Dinamik (MD) metotlarla incelemişlerdir. Simülasyon sonuçlarından hidrofobik etkileşimler ve adsorpsiyon kinetiğini artırdığı ve bu durumun proteinde yayılmalara sebep olduğu görülmüştür (Şekil4.3) [7,36].



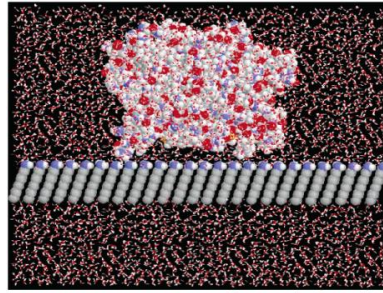
Şekil 4.3 : MD sonucu proteinde konforasyon değişimleri [7]

Proteinde konformasyon değişimleri genellikle üçüncül yapılarında gerçekleşir. ikincil yapıda değişim veya denatürasyon gözlemlenmemiştir. Konformasyon değişimlerinin MD ile incelenmesinde en büyük sorun MD çalışmalarının süresinin gerçek zamanla kıyaslandığında çok kısa olması ve deneysel verilerle birebir kıyaslanamamasıdır bu nedenle bu yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir [7].

Protein yapısının yanı sıra amino asitlerin de incelendiği çalışmalar mevcuttur. Hagiwara ve arkadaşları çalışmalarında 162 amino asitten oluşmuş küçük bir protein olan β -lactoglobulin yapısının yüzey ilişkilerini incelemişlerdir. Bu proteinin birçok değişik yüzey ile ilişkisi deneysel olarak incelenmiştir ancak adsorpsiyon mekanizması tam olarak belirlenememiştir. Gerçekleşen mekanizmanın daha iyi anlaşılması için moleküler simülasyon yöntemlerini kullanmışlardır. Çalışmalarında paslanmaz çeliği temsil eden bir model tasarlayamadıklarından temsili olarak altın (Au) yüzey kullanmışlardır. Çalışmalarında ilk olarak saklı su modeli kullanarak Monte Carlo (MC) simülasyonu β -laktoglobulin yapısının yüzeye karşı yönelmesini ve konumunu belirlemişlerdir. Bu konum belirlendikten sonra MD çalışmaları ile adsorpsiyon mekanizmasını incelemişlerdir. MC simülasyonu sonunda elde edilen proteinin yüzeye karşı konumu ve yönelmesi çalışmanın devamında kullanılacak olan pozisyon olarak kabul etmişlerdir. Ardından MD simülasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. İlk olarak sıcaklığı 10K'den 300K'e yükseltilmiş ardından

300K'de 5ns süre ile NVT simülasyonları gerçekleştirmişlerdir. Sıcaklığın ayarlanması için Nosé-Hoover termostat modelini kullanmışlardır. MD simülasyonlarında ise açık çözücü modeli kullanmışlardır. Çalışma sonunda yüzey ile en çok temas eden amino asidin Thr (Treonin) 125 olduğunu belirlemiş ve proteinin yüzey ile en çok ilişki kurduğu bölgeyi tespit etmişlerdir [37]. Diğer bir çalışmada Cormack ve arkadaşları MgO yüzey ile çalışılmışlardır. MgO yüzeyi Mg ve O atomları +2,-2 yüklenecek şekilde oluşturmuşlardır. Protein yapısını ise PDB'den elde etmişlerdir. Çalışmalarında açık çözücü modeli kullanmışlardır ve böylece su moleküllerinin de simülasyona etkisini incelemişlerdir. Çalışmada CVFF kuvvet alanı kullanmışlardır. Üç değişik protein yönelmesi hazırlamışlardır ve her bir yönelme için MD simülasyonları gerçekleştirmişlerdir. MD simülasyonları sonucunda her bir protein yönelmesi için etkileşim enerjilerini hesaplamışlardır. Simülasyonlar sonucunda yüzeyle etkileşen amino asitleri tespit etmişlerdir [38]. Kubiak ve Mulheran çalışmalarında lizozom proteini ve SiO₂ yüzeyi ile çalışmışlardır. Açık çözücü modeli kullanmışlardır. MD simülasyonlarını 20ns sürdürmüşlerdir. Çalışmada ortam yükünün etkisinin görülmesi için değişik ortam yüklerinde simülasyonlar yapmışlardır. Proteinin en çok adsorpsiyon gösteren amino asitlerin Lys1, Arg5, Arg14, ve Arg128 olduğunu tespit etmişlerdir. MD çalışmalarından önce ve sonra bu temel amino asitlerin uzaklıklarını incelemiş ve değişik yüklü ortamlarda yüke bağlı olarak amino asitlerin yüzeye ne kadar yakınlaştıkları veya uzaklaştıklarını tespit etmişlerdir. Amino asitlerin yük değişimine göre farklı davranımlar gösterdiği bu nedenle protein adsorpsiyonda yükün çok önemli bir etken olduğu görmüşlerdir. Ayrıca bu çalışmada düzlemsel ve düz olmayan yüzey ile çalışmışlardır ve düz yüzeyde proteinde konformasyon değişimi çok azken düz olmayan yüzeyde alfa heliks yapısında değişimler gözlemlemişlerdir [39]. Liang ve Wang çalışmalarında insülin proteini ile grafen yüzey arasındaki ilişkiyi moleküler dinamik simülasyonu ile incelemişlerdir. Bu çalışmada nötr karbon atomlarından oluşmuş kristal grafen yüzeyi değişik boyutlarda oluşturmuş ve grafen atomlarının konumları sabitlenerek ve serbest bırakılarak MD simülasyonları gerçekleştirmişlerdir. Proteinin değişik boyutlardaki yüzeylere adsorpsiyonu sonucunda etkileştiği amino asit sayısı ve etkileşim enerjilerini hesaplamışlardır böylelikle yüzey boyutu ve hareketliliği ile etkileşim enerjisi arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir [40]. Agashe ve arkadaşları çalışmalarında protein-yüzey ilişkilerinde yüzeyde bulunan fonksiyonel grupların etkisini incelemişlerdir.

Bu amaçla fibrinojen proteini ve CH_3 , OH , NH_2 , COOH ve $(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ (oligoetilen glikol) gibi değişik fonksiyonel gruplar içeren yüzeyler ile simülasyon çalışmaları yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada açık çözücü modeli kullanmışlardır. AMBER kuvvet alanını ile çalışmışlardır. Polimer yüzey olarak $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{R}$ yapısını oluşturmuşlardır ve R gruplarını değiştirilerek değişik fonksiyonel gruplar bağlamışlardır. MD simülasyonlarını 300K’de NVT kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Termostat olarak ise Berendsen termostatının tercih etmişlerdir. Şekil 4.4’de fibrinojen proteininin açık çözücü modeli ile polimer yüzey üzerinde modellenmesinin görünümü yer almaktadır.



Şekil 4.4 : Fibrinojen proteininin polimer yüzey üzerinde modellenmesi [41]

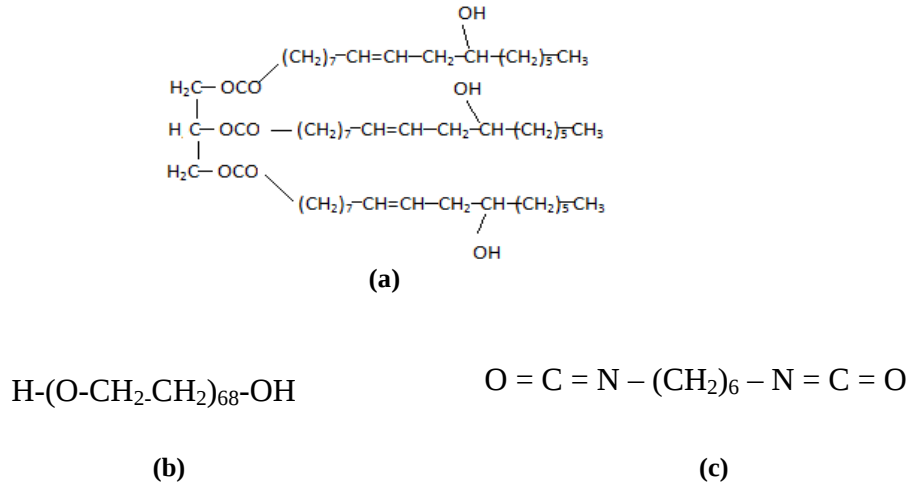
Çalışmada kullanılan değişik polimer yüzeylerden COO^- fonksiyonel grubunun bağlanarak oluşturdukları yüzeylere pozitif yüklü arginin ve lizinin ilgisinin fazla olduğu tersine NH_3^+ fonksiyonel grubunun bağlı olduğu yüzeylere negatif yüklü aspartik asit ve glutamik asidin ilgisinin fazla olduğunu görmüşlerdir.

Hidrofobik metil yüzeylerde hidrofilik etkileşimlerden dolayı hidrofobik amino asitler olan valin ve lizinin ilgisinin fazla olduğunu görmüşlerdir. OH^- içeren yüzeylerde ise yüzeyin su molekülleri ile kuvvetli hidrojen bağları oluşturduğu ve bu durumun protein adsorpsiyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Çalışma sonunda proteinlerin değişik yüzeylere karşı değişik adsorpsiyon davranımları gösterdiği ancak proteinde çok büyük konformasyon değişimleri olmadığını görmüşlerdir [41].

5. SİMÜLASYON ÇALIŞMASI

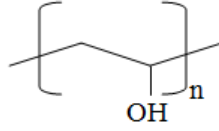
5.1 Sistem

Bu çalışmada sentetik malzemelerin biyolojik sistemdeki davranışlarının moleküler simülasyon yöntemler ile incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada poliüretan yüzeyleri olarak 3000g/mol molekül ağırlıklı polietilen glikol (PEG) ve 168g/mol molekül ağırlığına sahip hekzametilen diizosiyanat (HDI)'dan oluşan kristal kopolimer (PU1) ve 1000g/mol molekül ağırlığına sahip hint yağı (HY) ve hekzametilen diizosiyanat (HDI)'dan oluşan amorf kopolimer (PU2) kullanılmıştır. PEG, HY ve HDI'nın kimyasal yapıları Şekil 5.1'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1 : Monomerlerin kimyasal yapıları: a) HY, b) PEG, c) HDI

Bu çalışmada kullanılan yöntemi doğrulamak amacı ile PU1 ve PU2 poliüretan yapılarının yanı sıra sonuçların karşılaştırılması amacıyla Raffaini ve Ganazzoli'nin [42] çalışmalarında kullandığı polivinil alkol (PVA) polimeri de incelenmiştir. PVA'nın kimyasal yapısı Şekil 5.2'de gösterilmiştir. PVA, PU1 ve PU2 için literatürden alınan deneysel yoğunluklar Çizelge 5.1'de verilmiştir.

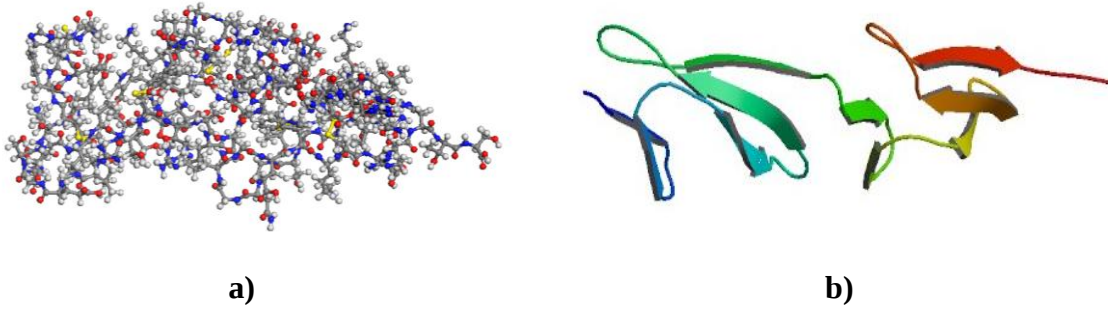


Şekil 5.2 : PVA'nın kimyasal yapısı [42]

Çizelge 5.1 : Literatürden alınan deneysel yoğunluklar

Polimer	Yoğunluk (g/cm ³)	Kaynak
PVA	1,26	[42]
PU1	1,2	[43]
PU2	1,01	[43]

Protein adsorpsiyonu çalışmalarında temsili biyolojik molekül olarak fibronectin tip I modülü kullanılmıştır. Fibronectin tip I (1FBR) modülünün atomik koordinatları Protein Veri Bankasından (Protein Data Bank-PDB) elde edilmiştir (Şekil5.3) [33].

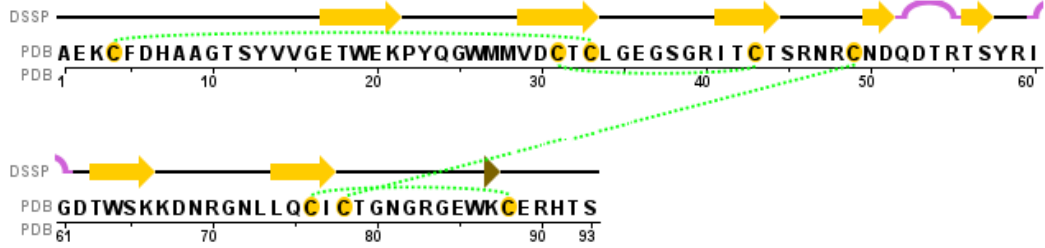


Şekil 5.3 : Fibronectin tip I modülünün yapısı a) Moleküler b) Şematik [33]

Fibronectin tip I modülü 93 amino asitten meydana gelmiştir. Protein yapısında bulunan amino asitler ve sayıları Çizelge 5.2'de, dizilimleri de Şekil 5.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 5.2 : Fibronektin tip I modülünün yapısında bulunan amino asitler ve sayıları

Polar Amino asitler	Sayıları	Apolar Amino asitler	Sayıları
Aspartik asit	6	Alanin	3
Glutamik asit	6	Glisin	11
Arginin	8	Valin	3
Lizin	5	Lösin	3
Histidin	2	İzolösin	3
Aspargin	5	Prolin	1
Glutamin	3	Fenilalanin	1
Serin	6	Metiyonin	2
Treonin	10	Triptofan	4
Tirozin	3	Sistein	8



Şekil 5.4 : Fibronektin tip I modülünü oluşturan amino asitlerin dizilimi [33]

Simülasyon çalışmaları *Accelrys Material Studio 4.1* yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Polimer matrislerini oluşturmada bu programa ait olan “Amorphous Cell” modülü gerçekleştirilen moleküler mekanik (MM) çalışmalarında ise “Discover” modülü kullanılmıştır.

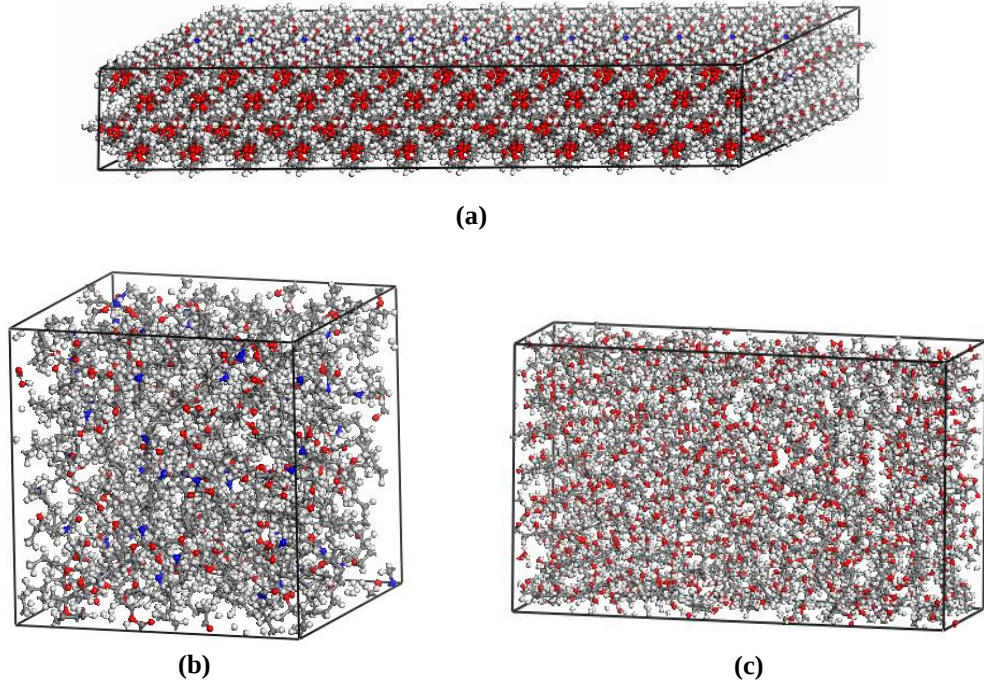
5.2 Polimer Matrislerinin Oluşturulması

Bu çalışmada kontrol amacı ile kullanılan PVA ve davranışları incelemek amacı ile seçilmiş olan PU1 ve PU2 polimerleri için birim hücreler oluşturulmuştur. Bu polimerlerden PU1 kristal, PU2 ve PVA ise amorf yapıdadırlar. Amorf PU2 poliüretan yapısı oluşturulurken yapıyı oluşturan hint yağı (HY) üç hidroksil grubu, diizosiyanat yapısı ise iki izosiyanat grubu içerdiğinden bu yapılar iki HY, üç HDI şekline bir araya getirilmiştir. Oluşturulan tekrar birimi (repeat unit) daha sonra minimize edilerek dengelenmiştir. Yapıyı oluşturan HY çok büyük ve karmaşık bir yapı olduğundan oluşturulan birim hücrede PU2 yapısından bir tek tekrar birimi

kullanılmıştır. Amorf PVA yapısı oluşturulurken de benzer şekilde PVA tekrar birimi hazırlanmış ve minimize edilmiştir. Oluşan tekrar biriminden yirmi tane ilave ederek polimer zinciri oluşturulmuştur. Polimer matrisleri literatürde mevcut olan yoğunluk değerlerine göre [42,43] hazırlanmıştır. Bazı elementlerin kendileriyle kovalent bağ oluşturarak halka yapabilmesini (Ring Catenation) ve hücreden fıskıran kısımlar bulunmasını (Spearing) engellemek için genellikle çok düşük başlangıç yoğunluğu ($0,1\text{g/cm}^3$) tercih edilir [44]. Elde edilen birim hücrelerden PVA birim hücresi 50 tane PVA zinciri, PU2 birim hücresi ise iki tane PU2 birimi içermektedir.

Amorf polimerik sistemlerin simülasyon hücresinin başlangıç konfigürasyonlarını oluştururken bazı özel önlemlere ihtiyaç vardır. Zincirlerin genel karakteristiklerini yansıtan konfigürasyonlardan başlanması amorf polimerler için önemlidir. İstiflenmiş zincirin konformasyonel istatistiği “Rotational Isomeric State” (RIS) teorisi ile uygun bir şekilde tanımlanmaktadır. Bükülme (torsion) hariç bütün serbestlik dereceleri ihmal edilerek, ilk adımda, rastgele bir oryantasyonla ilk bağ simülasyon hücresine yerleştirilir. Sonra ana zincire adım adım yeni bağlar eklenerek zincir oluşturulur. Fakat Florry tarafından oluşturulan bu RIS algoritması birbirinden birkaç bağ sonra bağlanmış atomların birbiri üzerine binmesine veya çakışmasına engel olmamaktadır. Theodorou ve Suter uzun aralıklı etkileşimleri hesaba katarak ve RIS algoritmasının avantajlarından yararlanarak amorf hücre oluşturmadaki kısıtlamaları yenmiştir [44].

Kristal PU1 poliüretan yapısının oluşturulmasında ise durum farklıdır. Kristal PU1 poliüretan yapısı oluşturulurken yapıyı oluşturan polietilen glikol (PEG) iki OH gurubu diizosiyanat yapısı da iki izosiyanat grubu içerdiğinden bu yapılar bir PEG ve bir HDI şekline bir araya getirilmiştir. Kristal yapının oluşturulması için öncelikle *Accelrys Material Studio* [29] programının kitaplığında hazır olarak bulunan kristal polietilen glikol (PEG) yapısı alınmıştır. Oluşacak olan poliüretan yapısının molekül ağırlığını elde etmek için bu hazır yapı birim hücrenin c eksenı yönünde 11 kat büyütölerek istenen molekül ağırlığı sağlanmıştır ve kristal yapıya uygun olacak şekilde diizosiyanat gruplarının polietilen glikol (PEG)’e bağlanması ile PU1 matrisi elde edilmiştir. Oluşturulan polimer matrisler Şekil 5.5’te gösterilmiştir. Ayrıca PU1 poliüretan yapısında üretan grubunun etkisini incelemek amacı ile polietilen glikol (PEG) yapısı da çalışmalarda kullanılmıştır.



Şekil 5.5 : Polimer matrisleri a) PU1, b) PU2, c) PVA

5.3 Polimer Matrislerinin Dengelendirilmesi

Amorf PVA ve PU2 polimer matrislerinin dengelenmesi için ilk önce polimer yapısını oluşturmada kullanılan COMPASS kuvvet alanını seçilmiştir. Daha sonra polimer matrisleri sırasıyla aşağıdaki adımlar uygulanarak dengelendirilmişlerdir.

- İlk olarak 5ps için yüksek basınçta (5000bar) NPT-MD topluluğu yardımıyla sıkıştırılmıştır.
- Daha sonra 20ps süreyle 600 ve 300K’de NVT-MD uygulanmıştır.
- Bu aşamanın sonunda 20ps süreyle 1 bar basınçta NPT uygulanarak yoğunluk değerleri kontrol edilmiştir [45].

PEG ve PU1 poliüretan yapıları ise kristal yapıda olduklarından hazırlandıkları şekilde 5000 adımlık kısa minimizasyonlar uygulanarak kullanılmışlardır.

5.4 Oluşturulan Polimer Matrislerinin Yapısal Özellikleri

Çalışmada ilk basamak olarak elde edilen tüm bu yapıların dönüş yarıçapları (radius of gyration, R_g), x-ışını kırınımı, kohesiv enerji yoğunlukları (cohesive energy density, CED), çözünürlük parametreleri ve elastik sabitleri belirlenmiştir.

Dönüş yarıçapı, polimer matrisinin sertliğinin tahmin edilmesinde kullanılan bir birimdir. Polimer matrisinin en sıkı paketlenildiği mesafeyi göstermektedir.

X-ışını kırınımı yardımıyla d-spacing değeri ya da ortalama zincir içi boşluk değeri bulunabilmektedir. Eşitlik 5.1'deki Bragg denkleminde d, d-spacing değerini, λ , dalga boyunu, 2θ ise saçılma açısını göstermektedir.

$$n\lambda = d\sin 2\theta \quad (5.1)$$

Genelde deneysel verilerden elde edilen grafiklerde şiddete ($\text{intensity}=I/I_0$) karşılık saçılma açısı (2θ) yer alırken simülasyon çalışmalarında elde edilen grafiklerde şiddete ($\text{intensity}=I/I_0$) karşılık saçılma vektörü (scattering vector ($1/\text{\AA}$)) bulunmaktadır. Saçılma vektörü Eşitlik 5.2'deki gibi tanımlanmaktadır.

$$\phi = \frac{4\pi\sin \theta}{\lambda} \quad (5.2)$$

Eşitlik 5.2'de de görüldüğü gibi saçılma vektörü kolaylıkla saçılma açısı cinsinden hesaplanmaktadır [44].

Koheziv enerji yoğunluğu, sıvı halde molekülleri bir arada tutan moleküller arası kuvvetlerin gücünün ölçüsüdür. Eşitlik 5.3'teki gibi ifade edilir. Burada ΔH_{buh} buharlaşma ısısı, R gaz sabiti, T sıcaklık, V ise molar hacim değeridir.

$$CED = \frac{\Delta H_{buh} - RT}{V} \quad (5.3)$$

Çözünürlük parametresi (δ), düzenli çözeltilerin oluşumu için çözeltinin birim hacminde meydana gelen iç enerji değişimidir ve Eşitlik 5.4'teki gibi tanımlanır. İki farklı bileşiğin çözünürlük parametresi değerleri birbirine yaklaştıkça çözünürlük artar [46,47].

$$\delta = (CED)^{\frac{1}{2}} \quad (5.4)$$

Mekanik özelliklerin belirlenmesi için yapıya ait elastik sabitlerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu sabitlerin hesaplanması kısaca incelenirse; σ stress (gerilme) ve ϵ strain (burulma) arasındaki ilişki Hooke kanunu ile (Eşitlik 5.5) ifade edilir.

$$\sigma = C\epsilon \quad (5.5)$$

Bu eşitlikte σ (stress) tensörünü, ϵ burulma (strain) tensörünü ifade eder ve C ise sertlik (stiffness) sabitini ifade eden bir tensördür ve bu tensör yardımı ile elastik

sabitler elde edilebilirler. Gerilme ve burulma tensörleri simetriktir bu nedenle bu ifadeleri Voigt işaretlemesi ile Eşitlik 5.6'daki gibi vektör şeklide gösterilebilirler.

$$\sigma_i = C_{ij} \varepsilon_j \quad (5.6)$$

σ_i ve ε_i gerilme ve burulma vektörlerinin altı elemanlı vektörleridir. 6x6 C_{ij} matrisi simetrik olup 21 sabit içermektedir (Eşitlik 5.7). Simetri şekline göre bağımsız değişken sayısı azaltılabilir. İzotropik bir malzeme için gerilme hareketleri lame sabiti adı verilen (μ ve λ) iki bağımsız değişken ile ifade edilir.

$$C = \begin{bmatrix} 2\mu + \lambda & \lambda & \lambda & 0 & 0 & 0 \\ \lambda & 2\mu + \lambda & \lambda & 0 & 0 & 0 \\ \lambda & \lambda & 2\mu + \lambda & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \mu & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \mu & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \mu \end{bmatrix} \quad (5.7)$$

Lame sabiti adı verilen μ ve λ verileri ile Young's modülü (E), Hacim modülü (Bulk modulus-B), Kayma gerilimi (shear modulus-G) ve Poisson oranı (ν) Eşitlik 5.8-11'de görüldüğü gibi türetilir [48].

$$E = \mu \frac{3\lambda + 2\mu}{\lambda + \mu} \quad (5.8)$$

$$\nu = \frac{\lambda}{2(\lambda + \mu)} \quad (5.9)$$

$$B = \lambda + \frac{2\mu}{3} \quad (5.10)$$

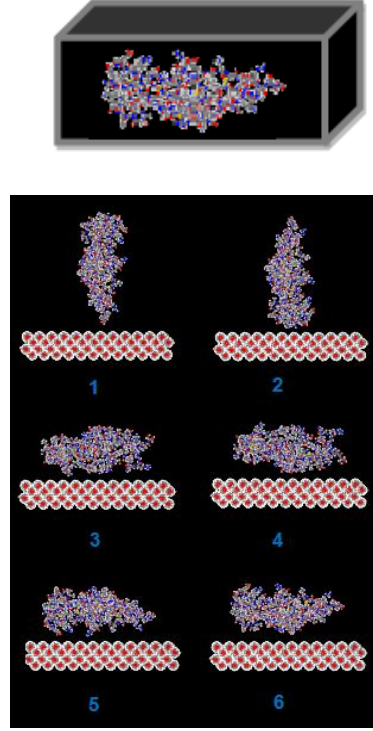
$$G = \mu \quad (5.11)$$

5.5 Protein-Yüzey İlişkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada sentetik malzemelerin biyolojik sistemdeki davranışlarını incelemesi amaçlanmıştır. Bu nedenle, fibronektin proteininin hazırlanan değişik polimer yüzeylere adsorpsiyonu incelenmiştir. Öncelikle Raffaini ve Ganazzoli'nin [42] çalışmalarında kullandıkları PVA polimeri ile çalışma tekrarlanmış kullanılan metodun doğruluğu saptandıktan sonra bu doğrultuda seçilen poliüretan malzemelerin davranışları incelenmiştir. Protein-yüzey etkileşimi çalışmalarında

proteinler için tasarlanmış olan Tutarlı Valans Kuvvet Alanı (Consistent Valence Force Field - CVFF) kullanılmıştır. Çalışmada Raffaini ve Ganazzoli'nin kullandığı metot esas alındığından kıyaslama yapabilmek ve simülasyonlarda zaman kaybı yaşamamak için bu çalışmada da saklı çözücü modeli kullanılmıştır. Saklı çözücü modellerinde gerçek su molekülleri ile çalışılmamaktadır. Suyun etkisini temsil eden çeşitli modeller kullanılmaktadır. Açık çözücü ile çalışıldığında hidrofilik yüzey su molekülleri ile kaplandığından protein yüzeye ulaştığında su molekülleri polimer yüzeyini kapladığından proteinin yüzeye etkileşimi düşük olmaktadır. Saklı çözücü yönteminde bu etkiler gözlenmemektedir. Çalışmada saklı çözücü modellerinden dielektrik metot kullanılmıştır ve 300K'de çalışıldığından dielektrik sabiti suyun bu sıcaklıktaki dielektrik sabiti olan $\epsilon = 78$ değeri alınmıştır. PDB'den elde edilen fibronektin molekülü moleküler mekanik (MM) yöntemler ile enerji minimizasyonu yapılarak dengelenmiştir.

Gerçek sistemlerde protein molekülleri polimer yüzeylere rastgele konumlarda adsorplanmaktadırlar. Bu etkiyi gözlemleyebilmek amacı ile protein molekülü Şekil 5.6'daki gibi bir dikdörtgen prizmanın içerisindeymiş gibi düşünülmüştür ve bu prizmanın her bir yüzeyinin polimer yüzeyler ile temas etmesi sağlanmıştır. Böylece altı farklı konum için protein adsorpsiyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler birleştirilerek konumdan bağımsız genel sonuçlara ulaşılmıştır.



Şekil 5.6 : Protein molekülünün altı farklı konumda polimer yüzeyi üzerine yerleştirilmesi

Her bir protein konumu için yüzeyler ile proteinler arasındaki etkileşim enerjileri, enerji minimizasyonları yapılarak hesaplanmıştır. Protein ve polimer yüzeyi arasındaki etkileşim enerjisi Eşitlik 5.12’deki gibi ifade edilmiştir.

$$E_{etki} = (E_{serbest} + E_{polimer}) - E_{top} \quad (5.12)$$

Eşitlik 5.12’de $E_{serbest}$ dengelenmiş fibronektin proteininin hesaplanan molekül içi enerjisidir. $E_{polimer}$ polimer yüzeyinin molekül içi enerjisidir. Çalışmada polimer atomları Raffaini ve Ganazzoli’nin çalışmalarında [42] olduğu gibi konumları sabitlenerek gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle $E_{polimer} = 0$ kabul edilmiştir. Altı farklı konumda yerleştirilen proteinlerin enerji minimizasyonları sonucunda elde edilen toplam molekül içi enerji değerleri ise E_{top} olarak ifade edilmiştir. Simülasyonlar sonucu polimer yüzeylerine altı farklı konumda adsorplanan proteinlerin oluşturduğu etkileşim enerjileri Eşitlik 5.12’ye göre hesaplanmıştır. Etkileşim enerjilerinin yanı sıra proteinin hidrojen bağlarının değişimlerini gözlemlemek amacı ile protein yapılarının burulma enerjileri de hesaplanmıştır. Burulma enerjileri Eşitlik 5.13’teki gibi hesaplanmıştır.

$$E_{burulma} = E_{donmuş} - E_{serbest} \quad (5.13)$$

Bu denklemde E_{serbest} değeri en başta dengelenmiş fibronektinin molekül içi enerjisidir. $E_{\text{donmuş}}$ ise altı farklı konumda gerçekleşen minimizasyon işlemleri sonrasında polimer yüzeylere adsorplanan protein yapılarının en son enerji değeridir. Böylelikle Eşitlik 5.13 kullanılarak protein yapısının minimizasyon öncesi ve sonrası enerji değişimleri hesaplanmıştır. Etkileşim ve burulma enerjilerinin hesaplanmasının ardından her bir protein konumu için gerçekleştirilen protein adsorpsiyonları sonrası polimer yüzeylerine sırası ile 3, 5 ve 7 Å mesafede bulunan atom ve amino asit sayıları hesaplanmıştır. Bu işlemlerin ardından bu üç mesafe için etkileşim ve burulma enerjilerine karşılık adsorplanan atom ve amino asit sayılarını gösteren grafikler hazırlanmıştır. Etkileşim enerjisine karşı adsorplanan atom ve amino asit sayısı grafiklerinde elde edilen eğim değerleri büyük önem taşımaktadır. Burada elde edilen eğim değeri protein yapısının polimer yüzeyine ne derece güçlü bağlandığı hakkında fikir vermektedir. Eğim değeri fazla olan polimer proteinle daha kuvvetli bağlanma göstermektedir.

5.6 Phi (Φ) ve Psi (ψ) Bağ Açılarındaki Değişimlerin Hesaplanması

Proteini oluşturan amino asitlerin phi (Φ) ve psi (ψ) bağ açıları proteinler yüzeylere adsorlandıktan sonra proteinlerin ikincil yapılarında meydana gelen değişimleri gözlemleyebilmek için önemlidirler. Bu amaçla fibronektin tip I modülünü oluşturan amino asitlerin Φ ve ψ bağ açılarındaki değişimler adsorpsiyon sonrası incelenmiştir.

Altı farklı konumda polimer yüzeylere adsorplanmış proteinlerin her bir konumu için protein zincirindeki 93 amino asidin Φ ve ψ bağ açısı değişimleri Eşitlik 5.14 ve Eşitlik 5.15'teki gibi hesaplanmıştır.

$$\Delta\Phi = \Phi_{\text{son}} - \Phi_{\text{ilk}} \quad (5.14)$$

$$\Delta\psi = \psi_{\text{son}} - \psi_{\text{ilk}} \quad (5.15)$$

Ardından Eşitlik 5.16 ve 5.17'deki gibi altı farklı konum için hesaplanan bağ açısı değişimlerinin ortalamaları alınmıştır ve böylece protein zincirindeki her bir amino asit için Φ ve ψ bağ açılarındaki değişimleri konumdan bağımsız olarak hesaplanmıştır.

$$\langle\Delta\Phi\rangle_{\text{konum}} = \sum_{i=1}^6 \Delta\Phi_i/6 \quad (5.16)$$

$$\langle\Delta\psi\rangle_{\text{konum}} = \sum_{i=1}^6 \Delta\psi_i/6 \quad (5.17)$$

Hesaplamalar Φ ve ψ bağ açılarındaki mutlak değişimleri hesaplamak için Eşitlik 5.18 ve 5.19'daki gibi tekrarlanmıştır.

$$|\Delta\Phi| = |\Phi_{\text{son}}| - |\Phi_{\text{ilk}}| \quad (5.18)$$

$$|\Delta\psi| = |\psi_{\text{son}}| - |\psi_{\text{ilk}}| \quad (5.19)$$

Ardından Eşitlik 5.20 ve 5.21'deki gibi altı farklı konum için hesaplanan mutlak bağ açısı değişimlerinin ortalamaları alınmıştır ve protein zincirindeki her bir amino asit için Φ ve ψ mutlak değişimleri yine konumdan bağımsız olarak hesaplanmıştır.

$$\langle |\Delta\Phi| \rangle_{\text{konum}} = \sum_{i=1}^6 |\Delta\Phi_i|/6 \quad (5.20)$$

$$\langle |\Delta\psi| \rangle_{\text{konum}} = \sum_{i=1}^6 |\Delta\psi_i|/6 \quad (5.21)$$

Elde edilen verilere göre farklı yüzeylere adsorplanmış protein moleküllerini oluşturan her bir amino asidin Φ ve ψ bağ açılarının değişimlerini ve mutlak değişimlerini gösteren grafikler hazırlanmıştır.

Protein zincirinde bulunan 93 amino asidin Φ ve ψ bağ açılarının değişimleri ve mutlak değişimleri hesaplamalarının ardından Eşitlik 5.22 ve 5.23'te kullanılarak proteinde bulunan aynı cins amino asitlerdeki değişimlerin ortalamaları alınmıştır. Böylece proteinde bulunan 20 çeşit amino asidin Φ ve ψ değişimleri ve mutlak değişimleri her bir amino asit cinsine (AA) göre hesaplanmıştır ve bu değişimleri gösteren grafikler hazırlanmıştır. (n: Her bir amino asidin proteindeki sayısı).

$$\langle \text{Amino asit AA } (\Delta\Phi) \rangle = \sum_{i=1}^6 \text{Amino asit AA } (\Delta\Phi)/n \quad (5.22)$$

$$\langle \text{Amino asit AA } (\Delta\psi) \rangle = \sum_{i=1}^6 \text{Amino asit AA } (\Delta\psi)/n \quad (5.23)$$

Hesaplanan tüm Φ ve ψ bağ açıları kullanılarak proteinin ikincil yapısındaki değişimleri daha iyi gözlemleyebilmek için her bir yüzeye adsorplanan amino asitlerin Ramachandran grafikleri hazırlanmıştır ve DSSP programı [49] kullanılarak protein yapısında bulunan β -yapraklarının adsorpsiyon öncesi ve sonrası değişimleri incelenmiştir.

6. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

Bu bölümde önce simülasyon çalışmasında elde edilen polimer matrislerinin yapısal özellikleri daha sonra da protein adsorpsiyonu çalışmalarının sonuçları verilecektir.

6.1 Polimerlerin Yapısal Özellikleri

Oluşturulan polimer matrislerinin karakterizasyonu için elde edilen dönüş yarıçapı (R_g), kohesiv enerji yoğunluğu (CED), çözünürlük parametresi, elastik sabitleri ve x-ışını kırınımı sonuçları sırasıyla verilmiştir.

Oluşturulan dört farklı polimer matrislerinden PEG ve PVA polimerleri için deneysel veriler mevcutken [50-55] çalışmamızda incelenen PU1 ve PU2 poliüretan yapıları için deneysel veriler mevcut değildir. Bu çalışmada bulunan değerler ileride yapılacak olan deneysel çalışmalara referans olabilecek değerlerdir.

Bu dört polimer yüzey için elde edilen dönüş yarıçapı değerleri (R_g) ve bu verilerin deneysel veriler ile karşılaştırılması Çizelge 6.1’de özetlenmiştir. Görüldüğü gibi amorf yapıdaki PVA için yakın sonuçlar elde edilirken kristal PEG yapısı için elde edilen değer deneysel verinin yaklaşık iki katı kadardır.

Çalışmada bu polimerler için elde edilen CED ve çözünürlük parametresi değerleri ve bu değerlerin deneysel veriler ile karşılaştırılması Çizelge 6.2’de özetlenmiştir. Çözünürlük parametresi değerleri PEG ve PVA polimerleri için oldukça tutarlı sonuçlar vermektedir. CED değerleri ise amorf PVA için oldukça tutarlıyken, PEG yapısı için ise deneysel verinin yaklaşık yarısı kadardır. Ancak genel olarak hesaplanan değerlerin deneysel verilerle mertebe ölçeğinde tutarlı olduğu görülmektedir. PU1 kristal matrisinin CED ve çözünürlük parametresi değerleri, yüzeyin oldukça büyük olması nedeniyle hesaplanamamıştır.

Çizelge 6.1 : PEG, PVA, PU1 ve PU2 polimerlerinin dönüş yarıçapı değerleri

	Yöntem	PEG	PVA	PU1	PU2
R_g(Å)	Deneysel	22,6 [50]	11,4 [51]	-	-
	Bu çalışma	43,95	8,17	68,11	16,61

Çizelge 6.2 : PEG, PVA, PU1 ve PU2 polimerlerinin kohesiv enerji yoğunluk ve çözünürlük parametresi değerleri

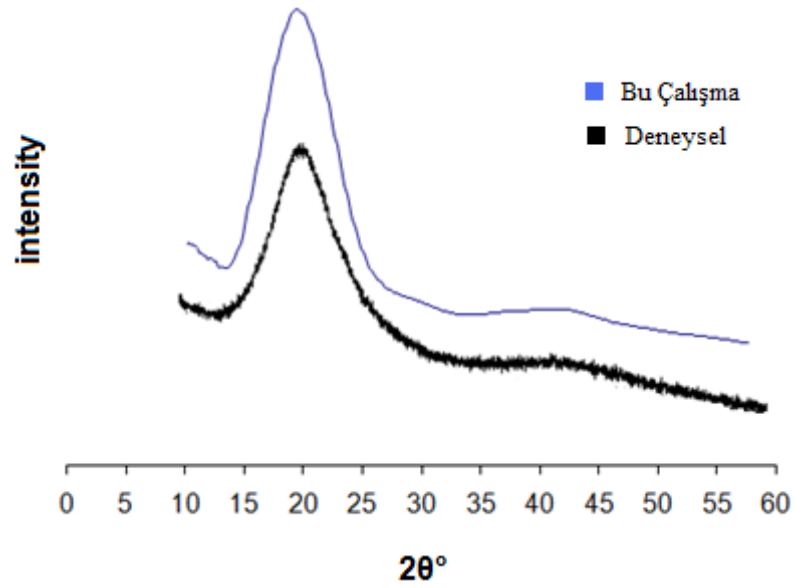
	Yöntem	PEG	PVA	PU1	PU2
Kohesiv Enerji Yoğunluğu (cal/cm³)	Deneysel	97 [52]	158-201 [53]	-	-
	Bu çalışma	55,07	138,87		43,01
Çözünürlük Parametresi (cal/cm³)^{1/2}	Deneysel	9,87 [52]	12,6-14,2 [53]	-	-
	Bu çalışma	7,42	11,78		6,56

Yine bu dört farklı polimer için bazı mekanik özellikler, simülasyon paketinde bulunan analiz araçları kullanılarak incelenmiştir. Elastik sabitlerden elde edilen Young modülü (E) ve Poisson oranı (ν) değerleri ve deneysel veriler ile karşılaştırılması Çizelge 6.3'te özetlenmiştir. Amorf PVA yapısı için elde edilen elastik sabitler deneysel veriler ile oldukça tutarlıdır. Kristal matrislerin elastik sabitleri, matrislerin geometrilerinin eşkenar prizma olmaları nedeniyle hesaplanamamıştır.

Çizelge 6.3 : PEG, PVA, PU1 ve PU2 polimerlerinin elastik sabitleri

	Yöntem	PVA	PU2
Young Modülü (GPa)	Deneysel	4,34+/-0,017 [54]	-
	Bu Çalışma	5,43	1,76
Poisson oranı	Deneysel	0,426-0,447 [55]	-
	Bu Çalışma	0,31	0,37

Çalışmada kullanılan PEG kristal yapıda olduğundan, *Accelrys Materials Studio*'nun kitaplığındaki verilerinden elde edilmişlerdir. Benzer şekilde PU1 yapısı da PEG kristali modifiye edilerek elde edilmiştir. PU2 poliüretan yapısı ise amorf bir yapı olduğundan yapının gerçekçiliğini kontrol etmek amacı ile literatürdeki deneysel çalışmadan [43] elde edilen x-ışını saçılımı deseni ile kıyaslama yapılmıştır. Simülasyonlar sonucu elde edilen x-ışını saçılımı deseni sonuçları saçılma vektörü cinsindendir ve Eşitlik 5.2 kullanılarak bu veri kolaylıkla saçılma açısı cinsinden hesaplanmıştır. Şekil 6.1'de simülasyon çalışmasında PU2 poliüretanı için elde edilmiş x-ışını saçılımı deseninin deneysel çalışma ile kıyaslaması gösterilmektedir.

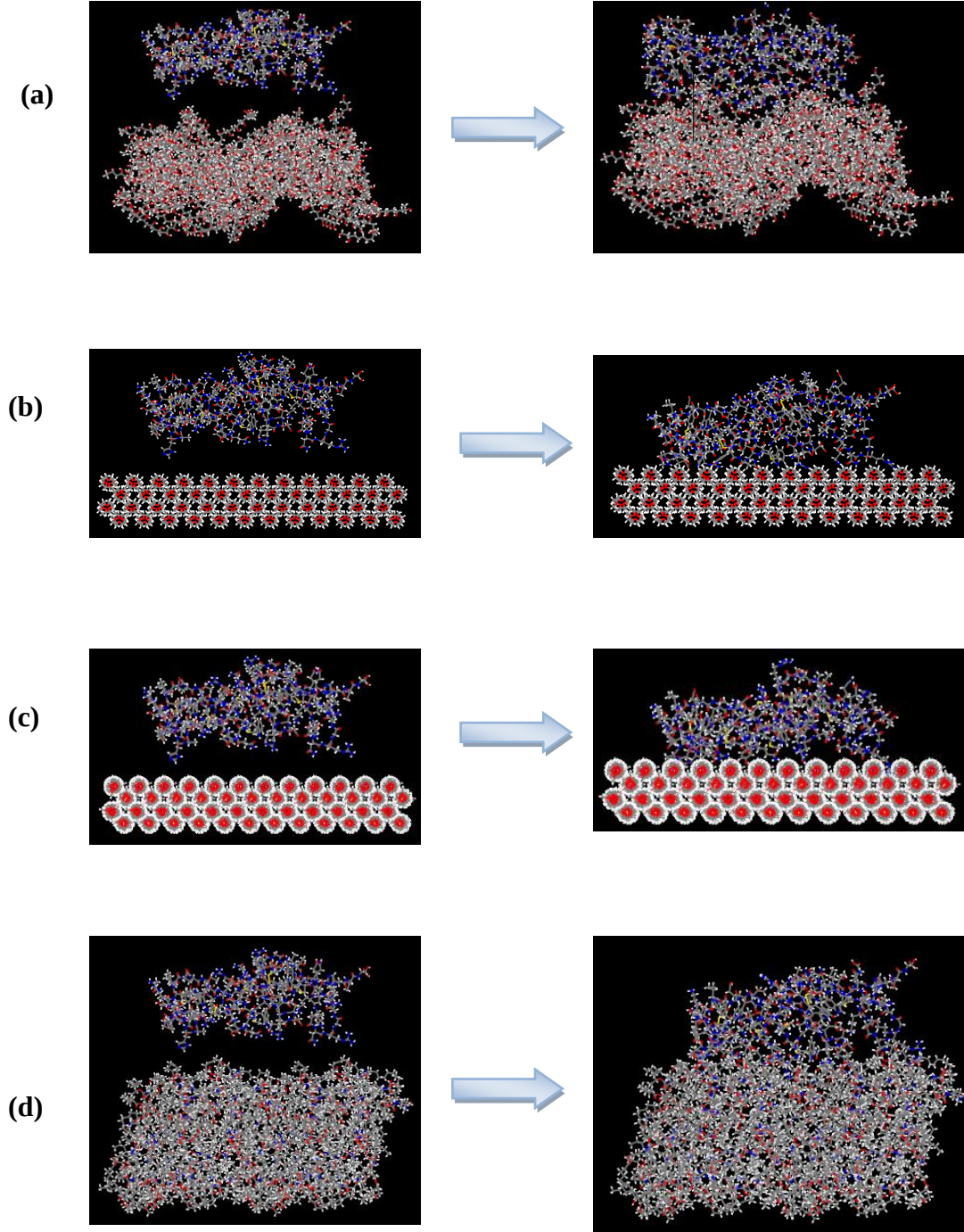


Şekil 6.1 : PU2 poliüretanı için x-ışını saçılımı deseninin deneysel çalışma ile kıyaslanması

Yapılan karşılaştırmada hesaplanan ve deneysel x-ışını saçılımı [43] desenlerinin çok iyi örtüştüğü görülmektedir.

6.2 Protein Adsorpsiyonu Simülasyonları

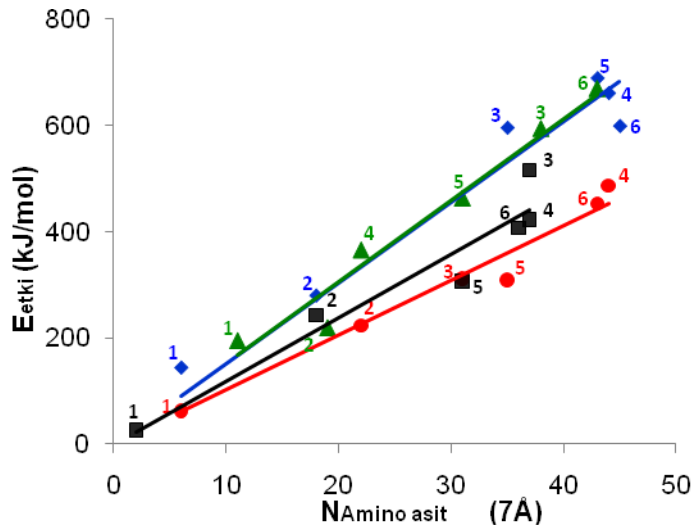
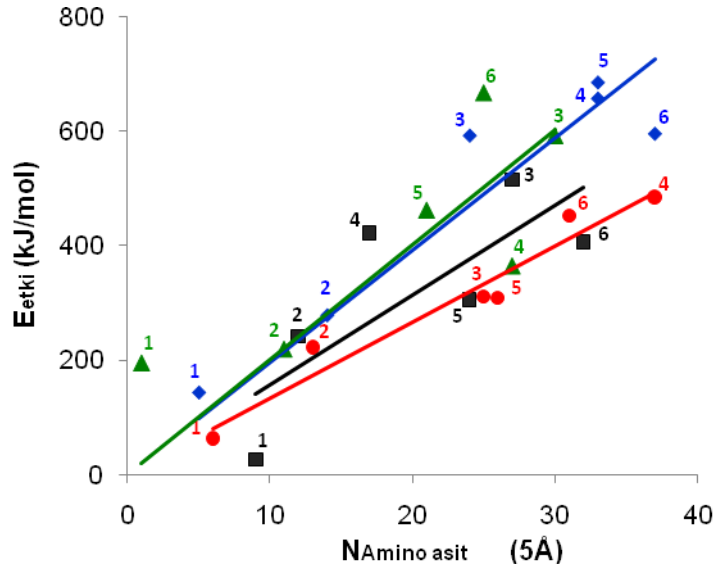
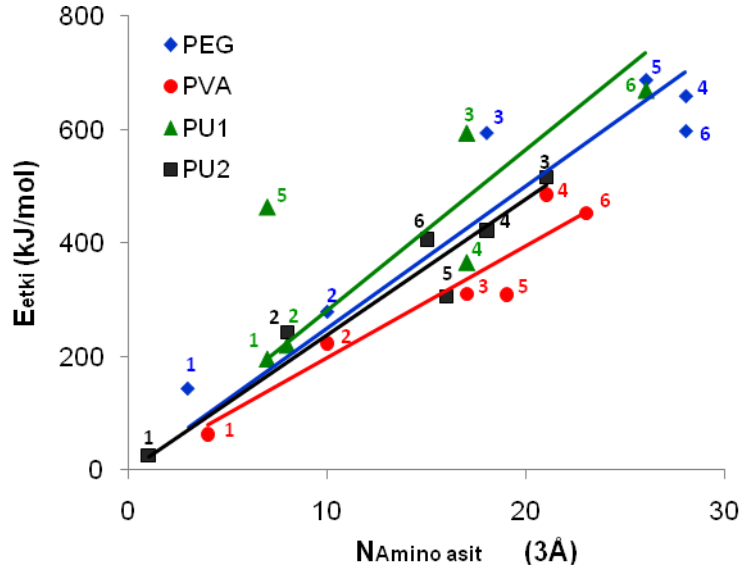
PEG, PVA, PU1 ve PU2 polimer yüzeylerinin altı farklı protein konumu için protein adsorpsiyon simülasyonu gerçekleştirilmiştir. Örnek olarak her bir polimerin Konum 3 için adsorpsiyon öncesi ve sonrası durumları Şekil 6.2'de gösterilmiştir.



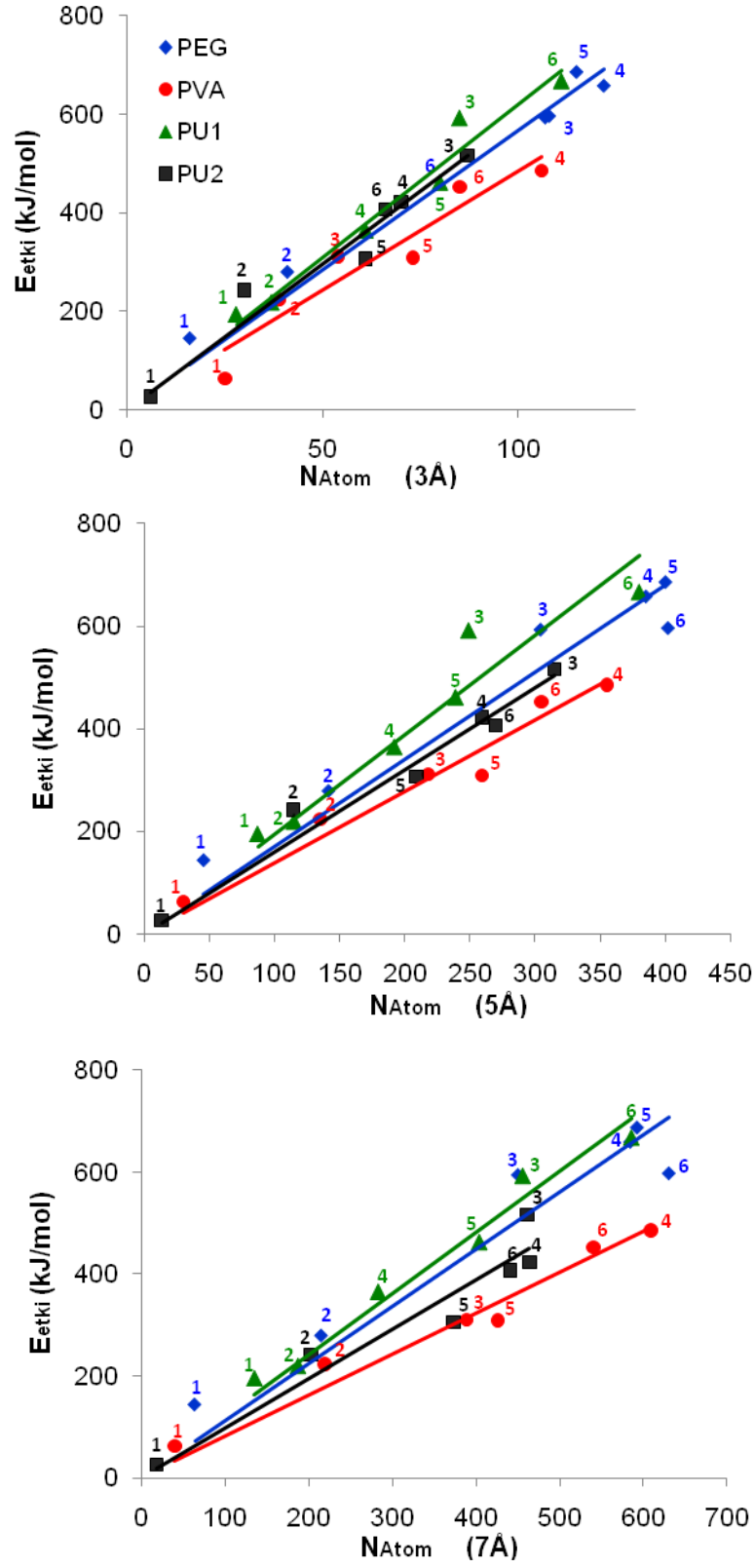
Şekil 6.2 : Fibronektinin polimer yüzeyine adsorpsiyon öncesi (sol) ve sonrası (sağ) a) PVA, b) PEG, c) PU1, d) PU2

Proteinin polimer yüzeyine adsorplandığı her bir konum için etkileşim enerjileri Eşitlik 5.12'ye göre hesaplanmıştır. Eşitlik 5.12'de bulunan E_{serbest} değeri serbest fibronektin proteini için yapılan minimizasyon işlemi sonrasında 3,19 MJ/mol olarak bulunmuştur. Raffaini ve Ganazzoli'nin çalışmasında [35] çalışmasında bu değer 3,13MJ/mol olarak elde edilmiştir. Elde edilen sonuç Raffaini ve Ganazzoli'nin çalışmasında elde edilen değer ile uyumludur. Buna göre adsorpsiyon işlemi sonrası bulunan her bir E_{top} değeri için E_{etki} değerleri hesaplanmıştır.

Bu işlemlerin ardından adsorpsiyon işlemi tamamlanmış olan polimer yüzeylere sırası ile 3, 5 ve 7Å mesafede bulunan amino asitlerin ve atomların sayıları hesaplanmıştır. Değişik polimer yüzeylere proteinlerin ilgisini görebilmek için E_{etki} değerine karşılık yüzeye adsorplanan atom ve amino asit sayıları arasındaki ilişki incelenmiştir. Tüm yüzeyler için elde edilen veriler sırası ile Şekil 6.3 ve 6.4'te sunulmuş ve grafiklerin eğim değerleri Çizelge 6.4'te kısaca özetlenmiştir. Yüzeyden 5Å mesafede bulunan amino asitler esas alınarak Şekil 6.3'te verilen PVA grafiğinin eğiminden elde edilen etkileşim enerjisi değerinin (13,3 kJ/mol), Raffaini ve Ganazzoli'nin çalışmalarında [42] elde edilen değer (14,5 kJ/mol) ile örtüşmesi, söz konusu çalışmada geliştirilen yöntemin başarıyla uygulandığını göstermektedir. Şekil 6.5'te ise dört polimer yüzeyi ile proteinlerin etkileşim enerjileri yüzeyden olan uzaklığa göre karşılaştırılmıştır.



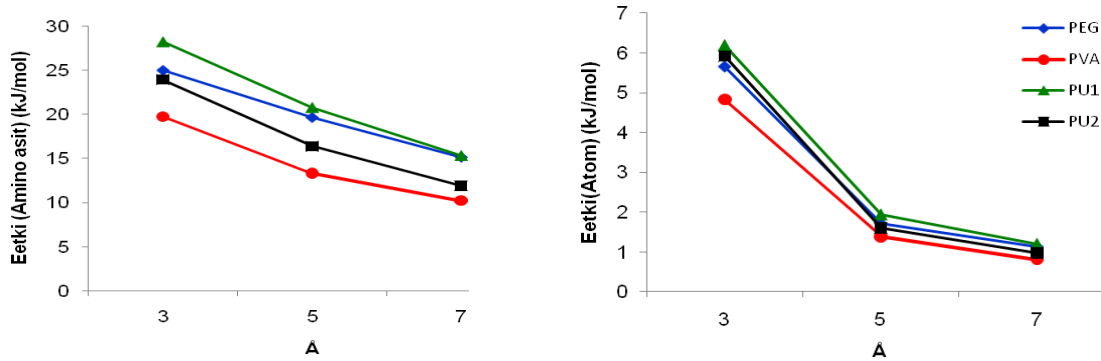
Şekil 6.3 : Polimer yüzeyinden 3, 5 ve 7 Å mesafede bulunan amino asitlerin polimer yüzeyi ile teması sonucu ortaya çıkan etkileşim enerjileri



Şekil 6.4 : Polimer yüzeyinden 3, 5 ve 7 Å mesafede bulunan atomların polimer yüzeyi ile teması sonucu ortaya çıkan etkileşim enerjileri

Çizelge 6.4 : Etkileşim enerjisinin amino asit ve atom sayısı ile ilişkisi grafiklerinin eğim değerleri

	$E_{\text{etki}} (N_{\text{Amino asit}}) [\text{kJ/mol}]$			$E_{\text{etki}} (N_{\text{Atom}}) [\text{kJ/mol}]$		
	3Å	5Å	7Å	3Å	5Å	7Å
PEG	25,006	19,656	15,155	5,665	1,703	1,121
PVA	19,725	13,315	10,254	4,837	1,390	0,808
PU1	28,231	20,097	15,300	6,198	1,942	1,202
PU2	23,933	15,681	11,876	5,926	1,599	0,967



Şekil 6.5 : Etkileşim enerjisinin amino asit ve atom sayısı ile ilişkisi grafiklerinin eğim değerlerinin kıyaslanması

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, polimer yüzeyinden 7Å mesafede bulunan amino asit ve atomların yüzeye adsorplanmış kabul edilmesinin en doğru yaklaşım olduğu gözlenmiştir. Etkileşim enerjilerine karşı amino asit veya atom sayısı grafikleri incelendiğinde eğim değerleri en yüksek olan polimer proteinle en güçlü etkileşim gösteren yüzeydir. Sonuçlar incelenecek olursa PU1 yüzeyi proteinle en kuvvetli etkileşimi göstermektedir. PEG ikinci, PU2 üçüncü sırayı almaktadır. PVA yüzeyi ise en düşük etkileşimi göstermektedir. Poliüretan yüzeylerden PU1, PU2 poliüretanından daha hidrofilik olduğundan protein ile PU2'den daha zayıf etkileşim göstermesi beklenmektedir. Çalışmada görülen bu farklılık, kristal PU1'in PU2'den daha düzgün bir yüzeye sahip olması ve çalışmaların açık çözücü sistemi ile yürütülmemesi gibi sebeplere dayandırılabilir. Ayrıca mesafeye bağlı olarak eğim değerlerinde görülen azalma ise polimer yüzeyinden uzakta bulunan atomların veya amino asitlerin yüzeye daha düşük etkileşim içinde olmalarına bağlanabilir.

Ayrıca polimer yüzeyler ile en fazla etkileşim gösteren amino asitlerin belirlenmesi için her bir polimer yüzey için protein ile en yüksek etkileşim enerjisi gösterdiği konumlar belirlenmiştir. Ardından bu konumlar için yüzeyden 7Å mesafede bulunan amino asitler belirlenmiştir. Çizelge 6.5’de yüzeyler ile en fazla etkileşim enerjisi gösteren protein konumları ve bu konumlarda yüzeylere 7Å mesafede bulunan amino asitler adsorplanma miktarına göre büyükten küçüğe sıralanmıştır. Çizelge 6.6’da ise bu amino asitler proteinde bulundukları konumlara göre sıralanmışlardır. Çizelge 6.6’da ürean gruplarının Glisin amino asidi ile daha fazla etkileşim gösterdiği görülmektedir.

Çizelge 6.5 : Yüzeyler ile en fazla etkileşim enerjisi gösteren protein konumları ve bu konumlarda yüzeylere 7Å mesafede bulunan amino asitler ve sayıları

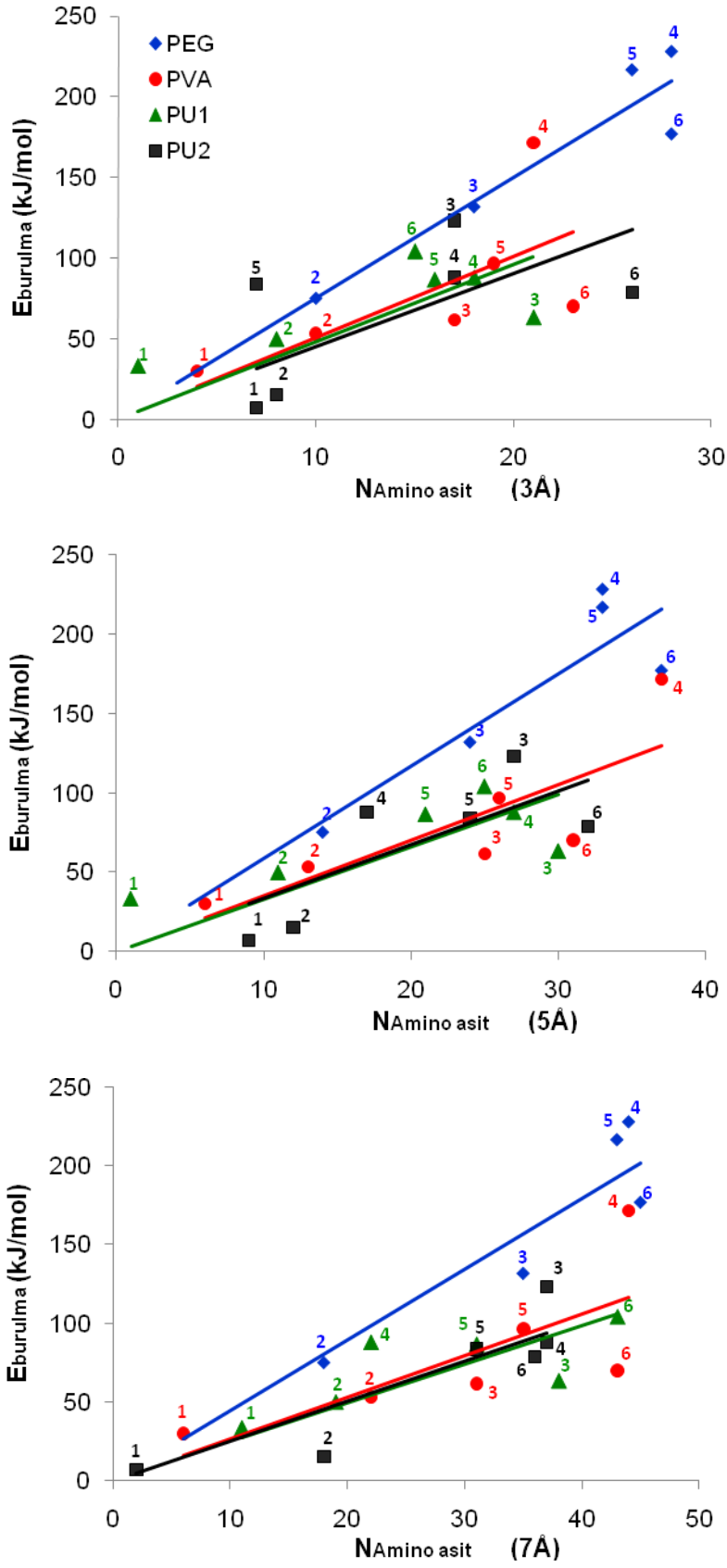
PU1		PU2		PEG		PVA	
Konum 6	N _{Amino asit}	Konum 3	N _{Amino asit}	Konum 5	N _{Amino asit}	Konum 4	N _{Amino asit}
GLY	4	GLY	4	ARG	5	THR	6
SER	4	CYS	3	ASN	4	GLY	4
ASP	3	ASP	3	THR	4	ARG	4
ARG	3	ARG	3	SER	3	SER	4
THR	3	ASN	3	GLU	3	GLU	4
TYR	3	THR	2	GLN	3	LYS	3
TRP	3	TRP	2	CYS	3	CYS	3
GLN	2	GLN	2	LYS	3	TRP	3
ALA	2	ALA	2	GLY	2	ASN	2
GLU	2	GLU	2	ASP	2	ASP	2
LYS	2	LYS	2	LEU	2	LEU	2
HIS	2	HIS	1	TRP	2	ILE	2
MET	2	MET	1	MET	2	GLN	1
CYS	2	TYR	1	ALA	1	ALA	1
ASN	2	SER	1	TYR	1	TYR	1
PHE	1	PHE	1	VAL	1	VAL	1
PRO	1	PRO	1	ILE	1	HIS	1
VAL	1	VAL	1	HIS	1		
LEU	1	LEU	1				
		ILE	1				

Çizelge 6.6 : Yüzeyler ile en fazla etkileşim enerjisi gösteren protein konumları ve bu konumlarda yüzeylere 7Å mesafede bulunan amino asitler

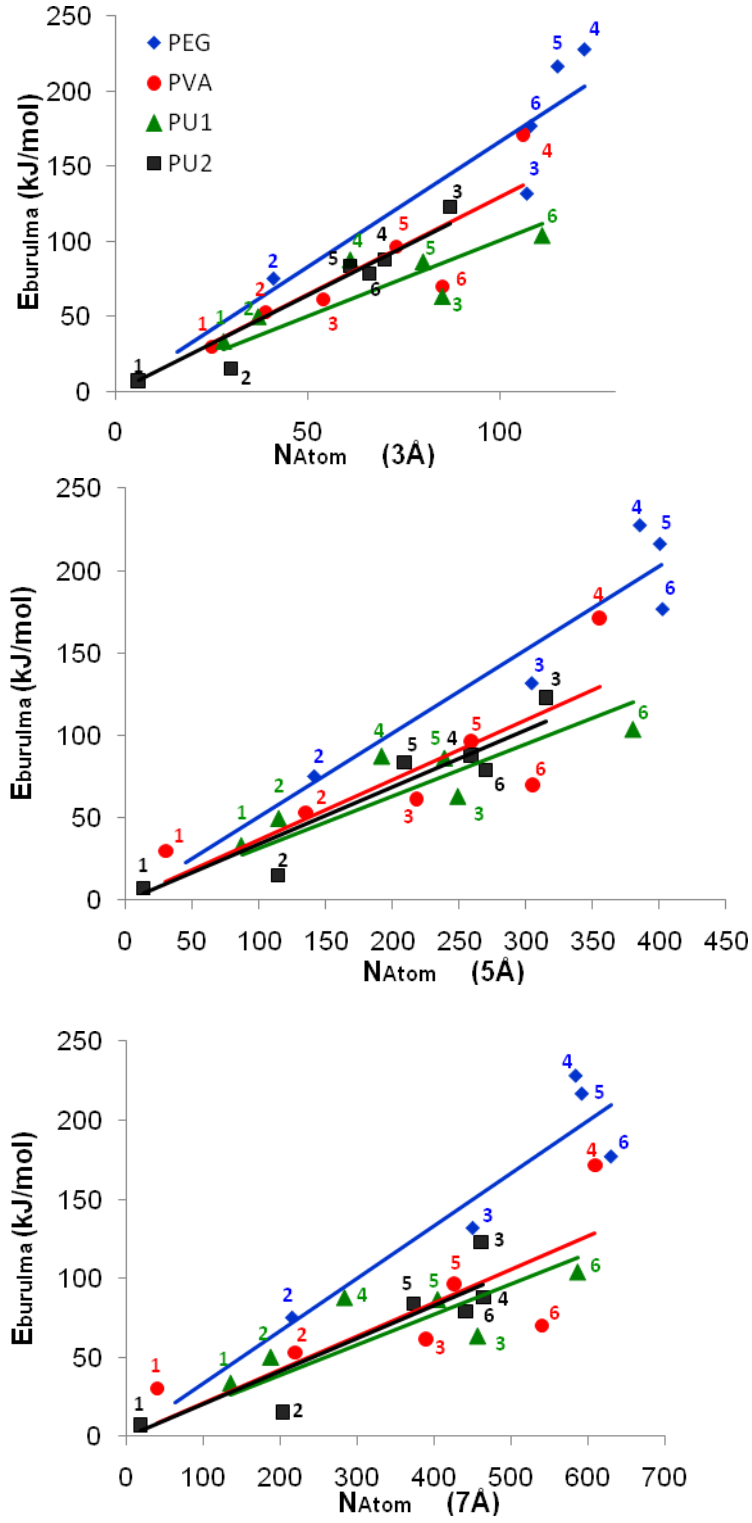
PU1	PU2	PEG	PVA
Konum 6	Konum 3	Konum 5	Konum 4
PHE5	GLU2	ALA1	ALA1
ASP6	CYS4	GLU2	GLU2
HIS7	PHE5	TYR23	LYS3
ALA8	ASP6	GLN24	THR11
ALA9	HIS7	TRP26	SER12
GLY10	ALA8	MET27	TYR13
THR11	ALA9	MET28	VAL15
SER12	GLY10	VAL29	GLY16
TYR13	TRP19	THR32	GLU17
GLU17	LYS21	LEU34	TRP19
TRP19	PRO22	GLY35	ASP30
GLU20	TYR23	GLU36	CYS31
LYS21	GLN24	SER38	THR32
PRO22	GLY25	ARG40	LEU34
TYR23	TRP26	THR44	GLU36
GLN24	MET27	SER45	GLY37
GLY25	VAL29	CYS49	THR42
TRP26	ASP30	ASN50	SER45
MET27	CYS33	ASP53	ARG46
MET28	THR32	GLN52	ASN47
VAL29	LEU34	ARG59	ARG59
CYS43	GLY35	LYS66	ILE60
ARG48	GLU36	LYS67	GLY61
ASP53	SER38	ASP68	THR63
THR54	ARG40	ASN69	TRP64
ARG55	ILE41	ARG70	SER65
SER57	CYS43	GLY71	LYS66
TYR58	ASN50	ASN72	ASP68
GLY61	GLN52	LEU73	LEU73
ASP62	ASP53	GLN75	GLN75
THR63	THR56	CYS76	CYS76
TRP64	ARG55	ILE77	ILE77
SER65	LYS66	THR79	THR79
LYS66	ASN69	ASN81	ASN81
ASN69	ARG70	ARG83	ARG83
ARG70	GLY71	GLU85	GLY84
GLY71	ASN72	TRP86	GLU85
ASN72		LYS87	TRP86
LEU74		CYS88	LYS87
GLN75		ARG90	CYS88
CYS76		HIS91	ARG90
HIS91		THR92	HIS91
SER93		SER93	THR92
			SER93

Etkileşim enerjisinin yanı sıra proteinde meydana gelen konfigürasyon değişikliğinin gözlemlemek amacı ile burulma enerjileri de hesaplanmıştır. E_{burulma} değeri hesapları için $E_{\text{serbest}} = 3,19 \text{ MJ/mol}$ değeri kullanılmıştır. Adsorpsiyon işlemi tamamlandıktan sonra adsorplanmış protein yapıları yüzeyden ayrılarak her bir protein için adsorpsiyon sonrası enerji değeri olan $E_{\text{donmuş}}$ değeri hesaplanmıştır ve E_{burulma} değerleri Eşitlik 5.13'teki gibi hesaplanmıştır.

Elde edilen tüm veriler sırası ile Şekil 6.6 ve 6.7'de sunulmuş ve grafiklerin eğim değerleri Çizelge 6.7'de kısaca özetlenmiştir. Şekil 6.6'da PVA için yüzeyden $5 \text{ \AA}$ mesafede bulunan amino asitler esas alınarak hesaplanan eğimden elde edilen burulma enerjisi değerinin ($3,5 \text{ kJ/mol}$), Raffaini ve Ganazzoli'nin çalışmasında [42] hesaplanan $3,5 \text{ kJ/mol}$ değeri ile birebir örtüştüğü görülmektedir. Şekil 6.8'de ise dört polimer yüzeyi için proteinin burulma enerjileri yüzeyden olan uzaklığa göre karşılaştırılmıştır.



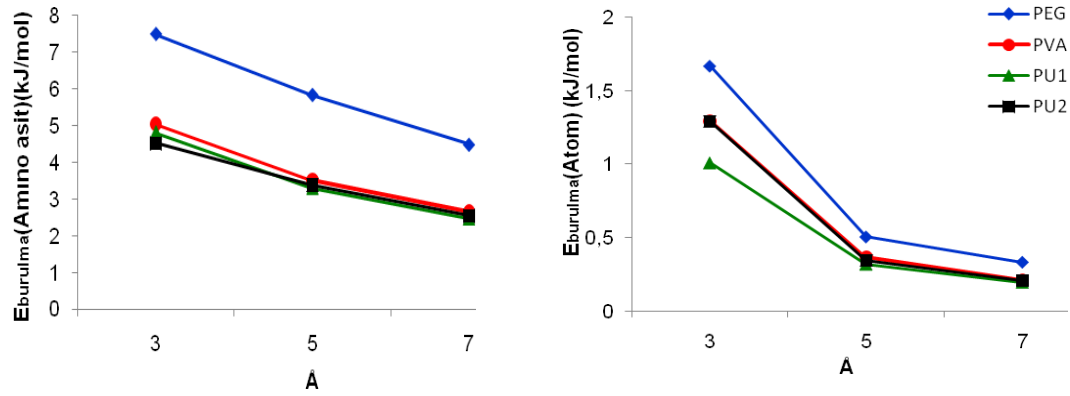
Şekil 6.6 : Polimer yüzeyinden 3, 5 ve 7 Å mesafede bulunan amino asitlerin polimer yüzeyi ile teması sonucu proteinde görülen burulma enerjileri



Şekil 6.7 : Polimer yüzeyinden 3, 5 ve 7Å mesafede bulunan atomların polimer yüzeyi ile teması sonucu proteinde görülen burulma enerjileri

Çizelge 6.7: Burulma enerjisinin amino asit ve atom sayısı ile ilişkisi grafiklerinin eğim değerleri

	$E_{\text{burulma}} (N_{\text{Amino asit}}) [\text{kJ/mol}]$			$E_{\text{burulma}} (N_{\text{Atom}}) [\text{kJ/mol}]$		
	3Å	5Å	7Å	3Å	5Å	7Å
PEG	7,486	5,835	4,485	1,669	0,506	0,333
PVA	5,039	3,504	2,649	1,294	0,365	0,211
PU1	4,799	3,293	2,456	1,006	0,316	0,193
PU2	4,515	3,375	2,541	1,288	0,345	0,208



Şekil 6.8 : Etkileşim enerjisinin amino asit ve atom sayısı ile ilişkisi grafiklerinin eğim değerlerinin kıyaslanması

Burulma enerjisi hidrojen bağlarının kırılması ile ortaya çıkan enerji değişimidir. Adsorplanan amino asit sayısı arttıkça daha fazla hidrojen bağı kırıldığından burulma enerjisi de artmaktadır. Burulma enerjisine karşılık amino asit veya atom sayısı grafikleri incelendiğinde eğim değeri en yüksek olan polimer PEG dir. PU2, PVA ve PU1 polimerlerinin eğim değerleri ise oldukça yakındır. Bu verilere göre PEG yüzeyine adsorplanan proteinde en fazla hidrojen bağı kırılması gerçekleşmiştir. PVA, PU2 ve PU1 yüzeyleri için eğim değerleri oldukça yakın olduğundan kırılan hidrojen bağı sayılarının da yakın olması beklenmektedir. Bu üç yüzeyden PU1 için hidrojen bağı kırılmasının bir miktar daha az olması beklenebilir. Hidrojen bağlarındaki değişimleri daha iyi gözlemleyebilmek için, protein yapısında bulunan β -yapraklarının adsorpsiyon öncesi ve sonrası değişimleri DSPP [49] programı ile incelenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 6.8’de belirtilmiştir. Çizelge 6.8’de B harfleri β -yapraklarını, C harfleri ise burgu yapısını temsil etmektedir.

Çizelge 6.8 : β -yapraklarındaki amino asitlerin adsorpsiyon öncesi ve sonrası değişimleri

	Fib	PU1	1	2	3	4	5	6	PU2	1	2	3	4	5	6	PEG	1	2	3	4	5	6	PVA	1	2	3	4	5	6
Glu2																													
Lys3																													
Cys4	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	
Phe5	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B		B	B	B		B	B	B		B	
Asp6																													
His7	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	
Ala8	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	
Ala9	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	
Gly10																													
Thr11								C														C			C			C	
Ser12	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B		B	B	B		B	B	B	B	B	
Tyr13	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	
Val14																													
Val15	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	
Gly16	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	
Glu17																													
Thr18	B		B	B	B	B	B	B		B	B		B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	
Trp19	B		B	B	B	B	B	B		B	B		B	B	B		B	B		B	B	B		B	B	B	B	B	
Glu20	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B		B	B	B		B	B	B	B	B	
Lys21	B		B		B	B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B		B				B	B	B	B		
Pro22	B		B		B		B			B	B	B	B		B		B	B		B				B	B	B	B		
Tyr23	C		C		C	C				C	C		C	C	C		C			C	C	C		C	C	C		C	
Gln24	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	
Gly25	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	
Trp26	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	
Met27								C																					
Met28	B		B		B		B			B	B	B	B		B		B	B		B				B	B	B	B	B	
Val29	B		B		B		B			B	B	B	B		B		B	B		B				B	B	B	B	B	
Asp30	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B		B	B	B		B	B	B	B	B	
Cys31	B		B	B	B	B	B	B		B	B		B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	
Thr32	B		B	B	B	B	B	B		B	B		B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	
Cys33			B	B		B		B		B			B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	
Leu34																													
Gly35	C										C											C							
Glu36	C		C		C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	
Gly37	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	
Ser38	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	
Gly39	C				C						C	C										C							
Arg40																													
Ile41			B	B		B		B		B			B	B	B		B	B	B	B	B		B		B	B	B	B	
Thr42	B		B	B		B		B		B	B		B	B	B		B	B	B	B	B	B		B	B	B	B	B	
Cys43	B		B	B		B		B		B	B		B	B	B		B		B	B	B	B		B	B	B	B	B	
Thr44				C	C			C	B					C				C				C						C	
Ser45																													
Arg 46	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	

Çizelge 6.8 : β -yapraklarındaki amino asitlerin adsorpsiyon öncesi ve sonrası değişimleri (Devam)

[illegible]

Çizelge 6.8’de fibronektin proteininin adsorpsiyon öncesi ve adsorpsiyon sonrası β -yapraklarında meydana gelen değişimleri görülmektedir. Bu verilerin daha net gözlenmesi için her bir yüzeyde kırılan ve oluşan β -yaprakları Çizelge 6.9’da özetlenmiştir.

Çizelge 6.9 : β -Yapraklarındaki amino asit sayısının değişimi

	PVA			PEG			PU1			PU2		
	Kırılan β -Yapraklar	Oluşan β -Yapraklar	Net Değişim	Kırılan β -Yapraklar	Oluşan β -Yapraklar	Net Değişim	Kırılan β -Yapraklar	Oluşan β -Yapraklar	Net Değişim	Kırılan β -Yapraklar	Oluşan β -Yapraklar	Net Değişim
Konum1	-2	2	0	-2	4	2	-2	2	0	-2	2	0
Konum2	0	2	2	-3	2	-1	0	0	0	-6	2	-4
Konum3	-8	3	-5	-15	3	-12	-15	0	-15	-6	1	-5
Konum4	-10	3	-7	-2	2	0	-2	2	0	-5	2	-3
Konum5	-2	3	1	-8	2	-6	-4	3	-1	-3	0	-3
Konum6	-7	3	-4	-7	3	-4	-2	2	0	-7	4	-3
Ortalama	-4,8	2,7	-2,1	-6,2	2,7	-3,5	-4,2	1,5	-2,7	4,8	1,8	-3

Çizelge 6.9 incelendiğinde β -yapraklarındaki değişimin en fazla PEG polimerinde olduğu görülmektedir. İkinci sırada PU2, üçüncü sırada PU1 polimeri bulunmaktadır. PVA polimeri ise son sırada yer almaktadır. Bu durum Şekil 6.8’de görülen hidrojen bağlarındaki değişim değerlerini desteklemektedir.

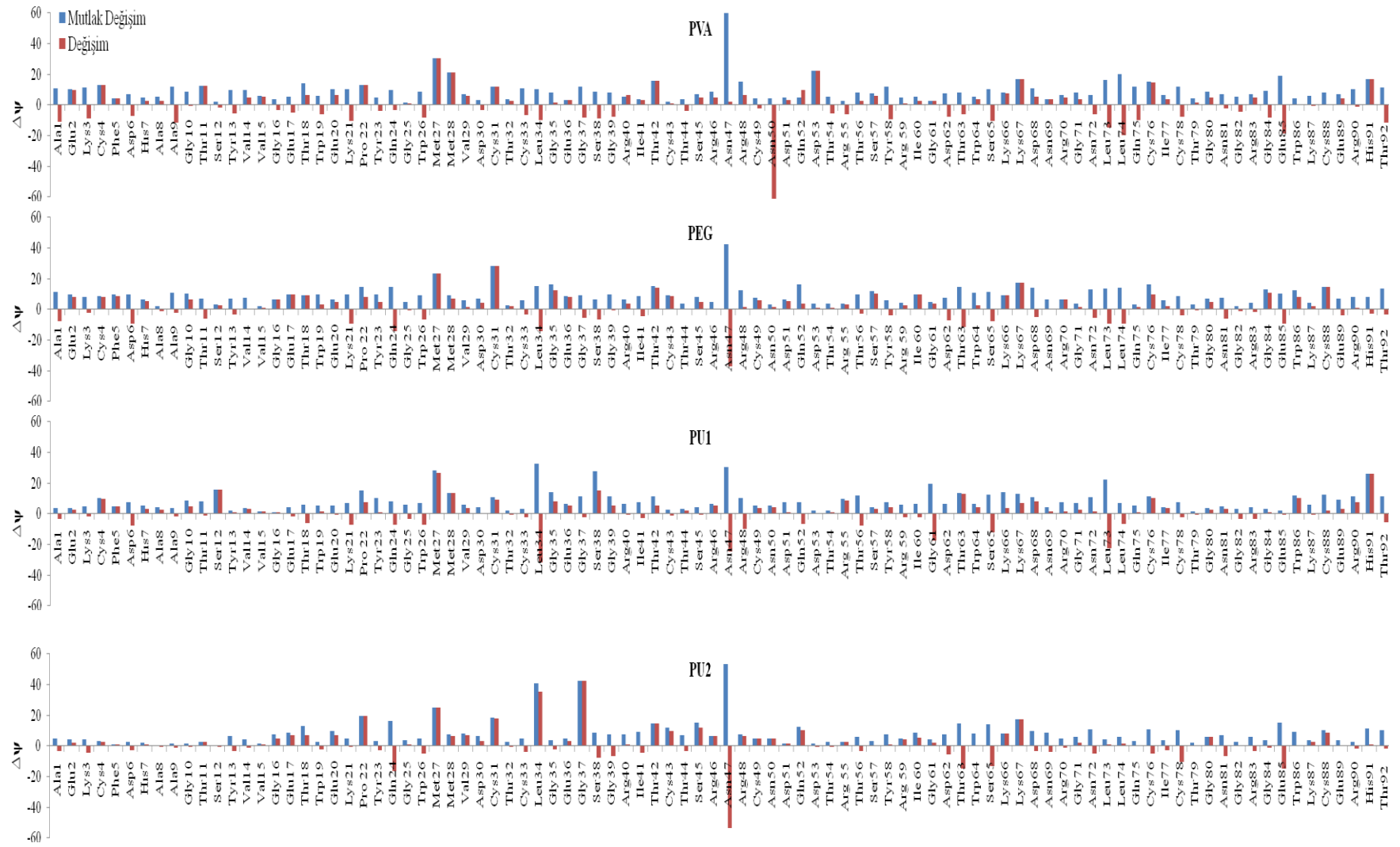
6.3 Phi (Φ) ve Psi (Ψ) Bağ Açılarındaki Değişimlerin Hesaplanması

Polimer yüzeylere adsoplanan proteinlerin her bir amino asidi için phi (Φ) ve psi (Ψ) bağ açıları hesaplanmıştır. Daha sonra Eşitlik 5.14 ve 5.18 kullanılarak her bir polimer yüzey için amino asitlerin Ψ bağ açıları değişimleri ve mutlak değişimleri sırası ile hesaplanmıştır elde edilen veriler Şekil 6.9’da özetlenmiştir. Ardından Eşitlik 5.15 ve 5.19 kullanılarak her bir polimer yüzey için amino asitlerin Φ bağ açıları değişimleri ve mutlak değişimleri hesaplanmıştır elde edilen veriler Şekil 6.10’da özetlenmiştir.

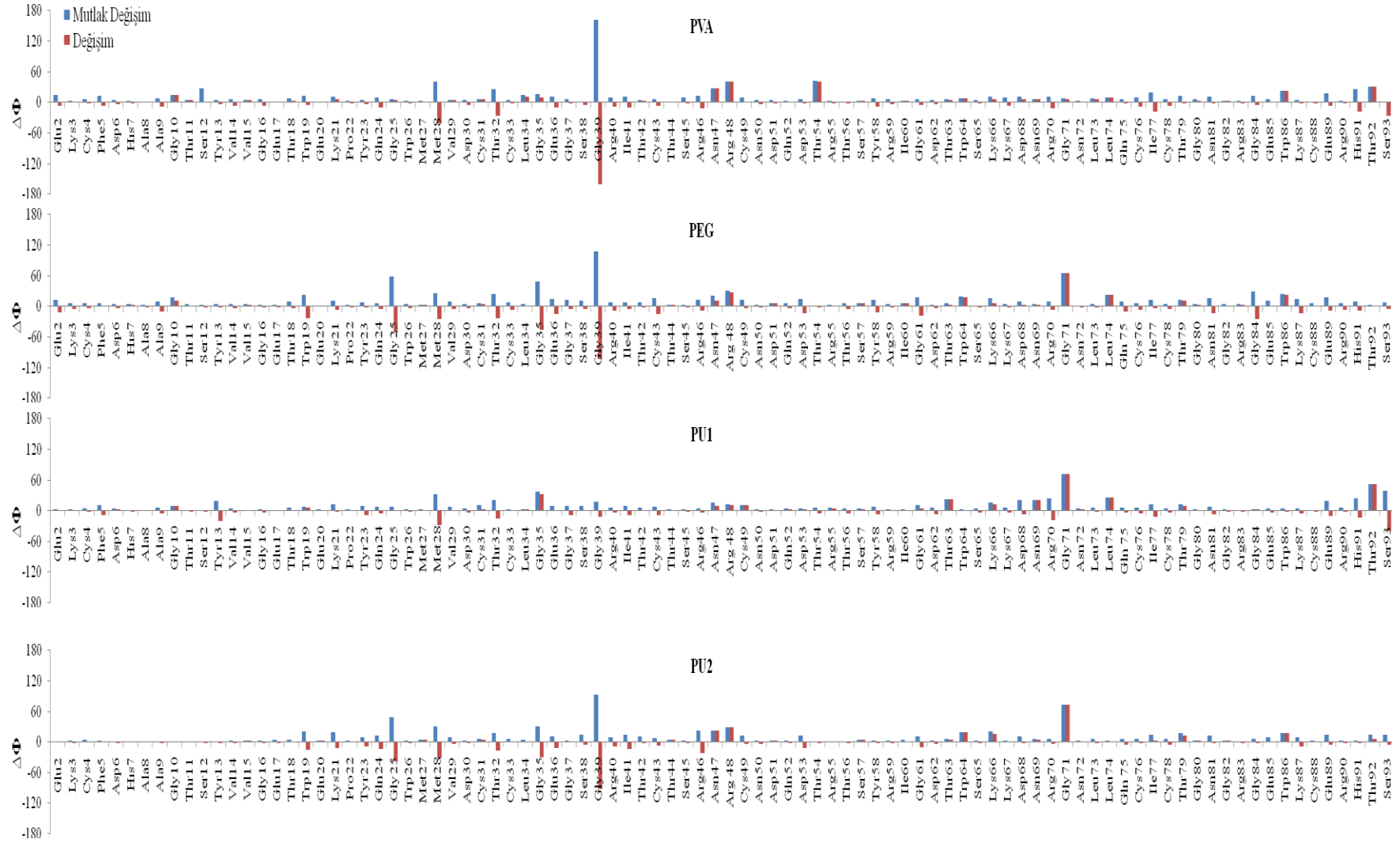
Şekil 6.9 ve 6.10’da protein zincirindeki her bir amino asit için phi (Φ) ve psi (ψ) bağ açıları değişimleri ve mutlak değişimleri sırası ile görülmektedir. Ardından Eşitlik 5.22 ve 2.23 kullanılarak proteinde bulunan 20 çeşit amino asidin Φ ve ψ bağ açılarının değişimleri ve mutlak değişimleri amino asit cinsine göre hesaplanmıştır. Şekil 6.11’de dört farklı yüzey için amino asitlerin ortalama ψ değişimleri, Şekil 6.12’de ise ortalama Φ değişimleri gösterilmektedir.

Şekil 6.9 ve 6.10 incelenirse yüzeylere adsorplanan proteinlerin amino asitlerinin ψ ve Φ değişimlerinin genel olarak protein zincirinin uç bölgelerinde daha az orta kısımlarda bir miktar daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ψ değişimleri incelendiğinde tüm yüzeylerde ortak olarak orta kısımda yer alan Pro22, Met 27, Leu 34 ve Asn 47; Φ değişimleri incelendiğinde ise Met 28, Gly 35 , Gly 39 ve Gly 71 amino asidindeki değişimlerin belirgin olduğu görülmüştür.

Birbirinden sadece üretan grubu ile ayrılan PEG ve PU1 yüzeyleri karşılaştırıldığında; PU1 yüzeyindeki ψ ve Φ değişimlerinin protein zincirinin sonuna yakın bölgede PEG yüzeyinden daha fazla olduğu görülmüştür Ayrıca Şekil 6.10’da PEG yüzeyi için Gly 39 da görülen belirgin değişimin PU1’de görülmediği gözlenmektedir. Bu iki yüzey arasında görülen bu farklılıklar PU1 yapısında bulunan üretan grupları ile meydana gelen etkileşimlere dayandırılabilir. PU1 ve PU2 poliüretan yüzeyleri karşılaştırıldığında ise ψ ve Φ değişimlerinde belirgin bir değişim görülmemiştir. PU1 kristal ve düzenli bir yüzeye sahip olduğundan üretan grupları ile etkileşimleri amorf PU2 yüzeyinden daha fazla gerçekleşmektedir. Bu nedenle üretan grubunun etkileri bu iki poliüretan yüzeyden PU1 yüzeyinde daha belirgin gözlenmektedir. PEG yüzeyi ile PU1 yüzeylerinde de görüldüğü gibi PU2 yüzeyinin de son uç bölgesinde belirgin bir değişim görülmemiştir. Bu durum PU2 yüzeyinde üretan grupları ile etkileşimin PU1’den az olmasına dayandırılabilir.

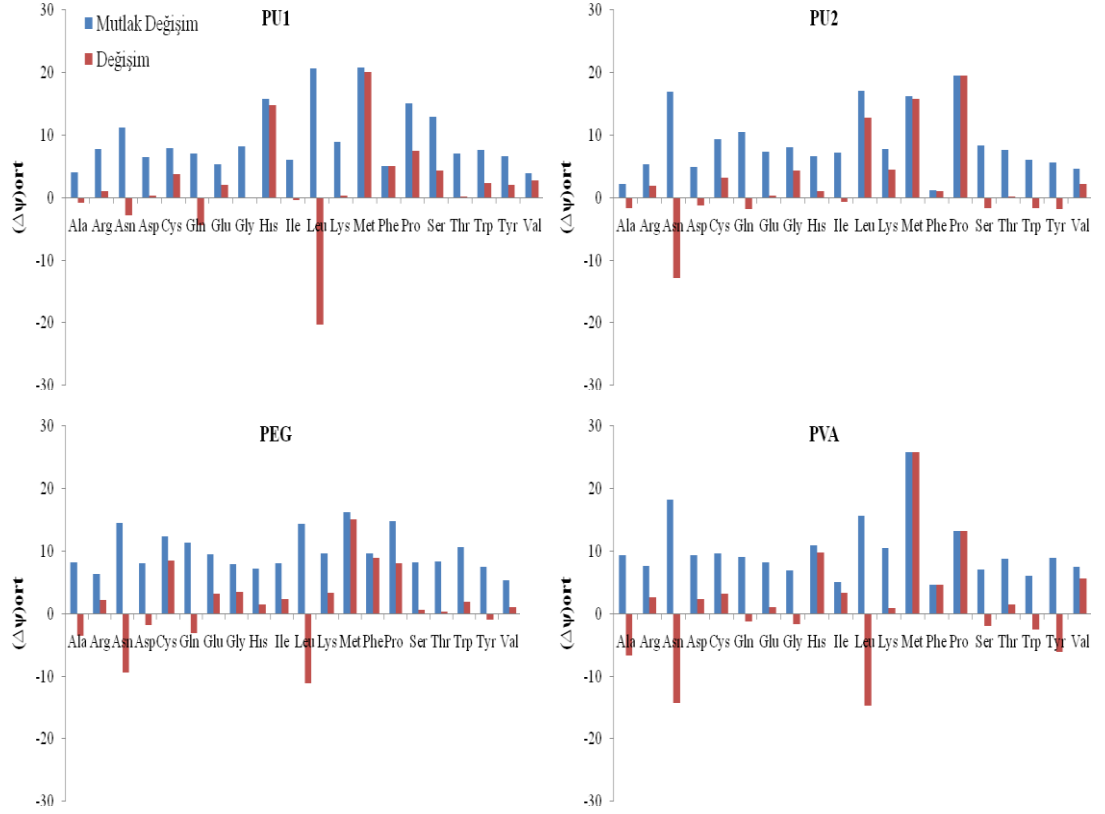


Şekil 6.9 : Protein adsorpsiyonu sonrası amino asitlerin psi (ψ) bağ açıları değişimleri ve mutlak değişimleri

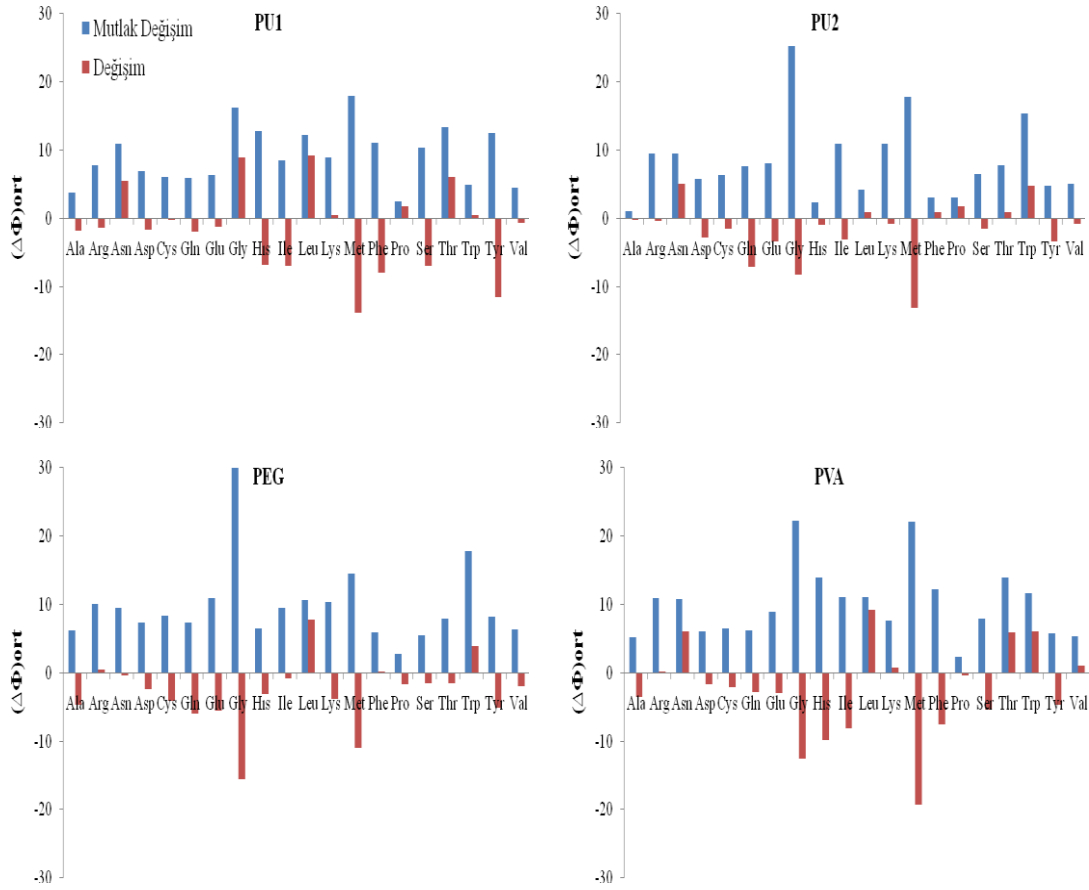


Şekil 6.10 : Protein adsorpsiyonu sonrası amino asitlerin phi (Φ) bağ açıları değişimleri ve mutlak değişim

Şekil 6.11 ve 6.12 incelendiğinde ise elde edilen verilerin önceki grafiklerle tutarlı olduğu görülmektedir. Her bir amino asit için ortalama ψ ve Φ değişim grafikleri incelendiğinde ortalama ψ değişimlerinin en belirgin değişimlerin olarak Asn, Leu, Met ve Pro; ortalama Φ değişimlerinin ise Met ve Gly amino asitlerinde gözlemlendiği görülmüştür.

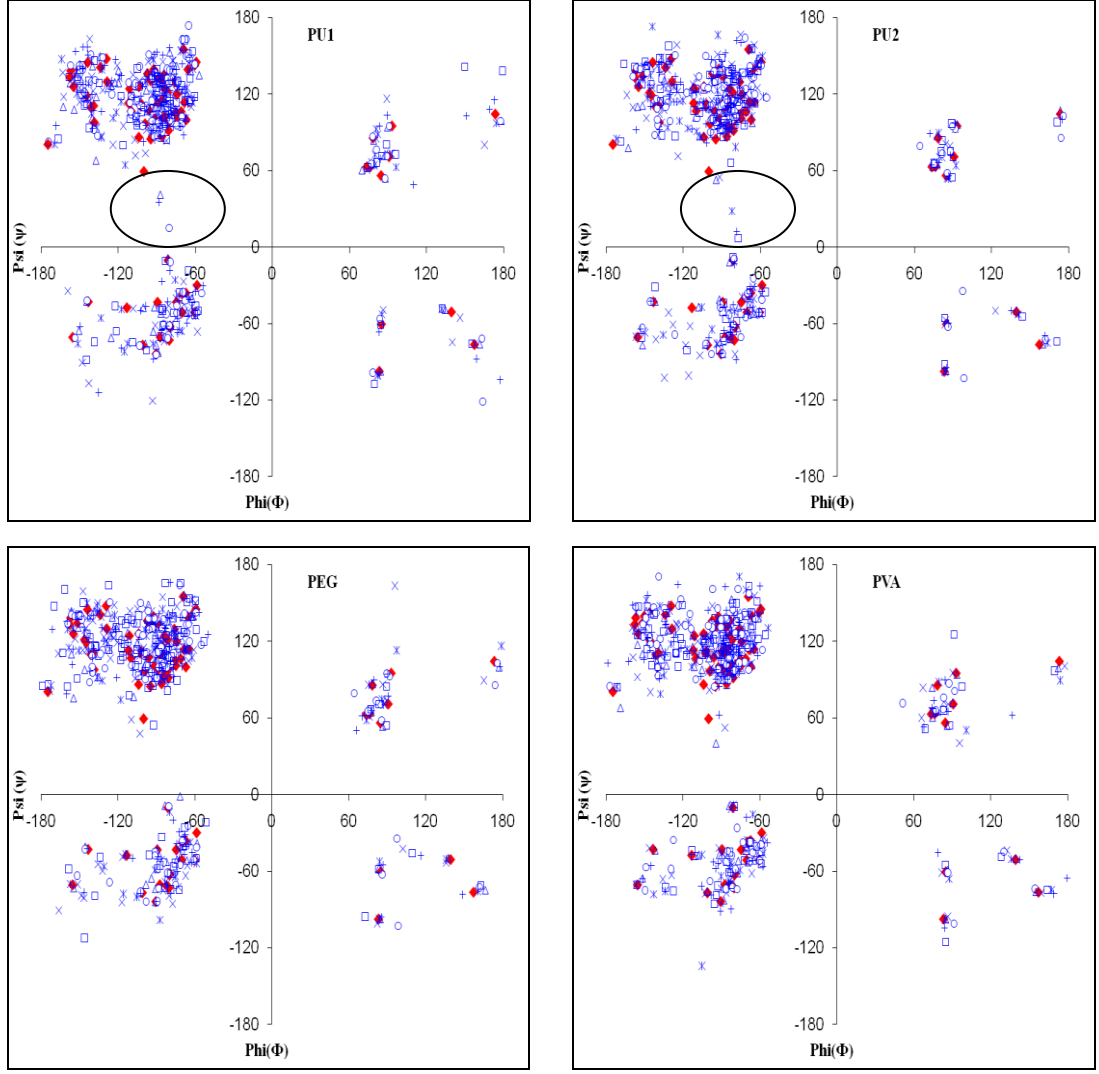


Şekil 6.11 : Protein adsorpsiyonu sonrası amino asitlerin psi (ψ) bağ açılarının ortalama değişimleri ve mutlak değişimleri



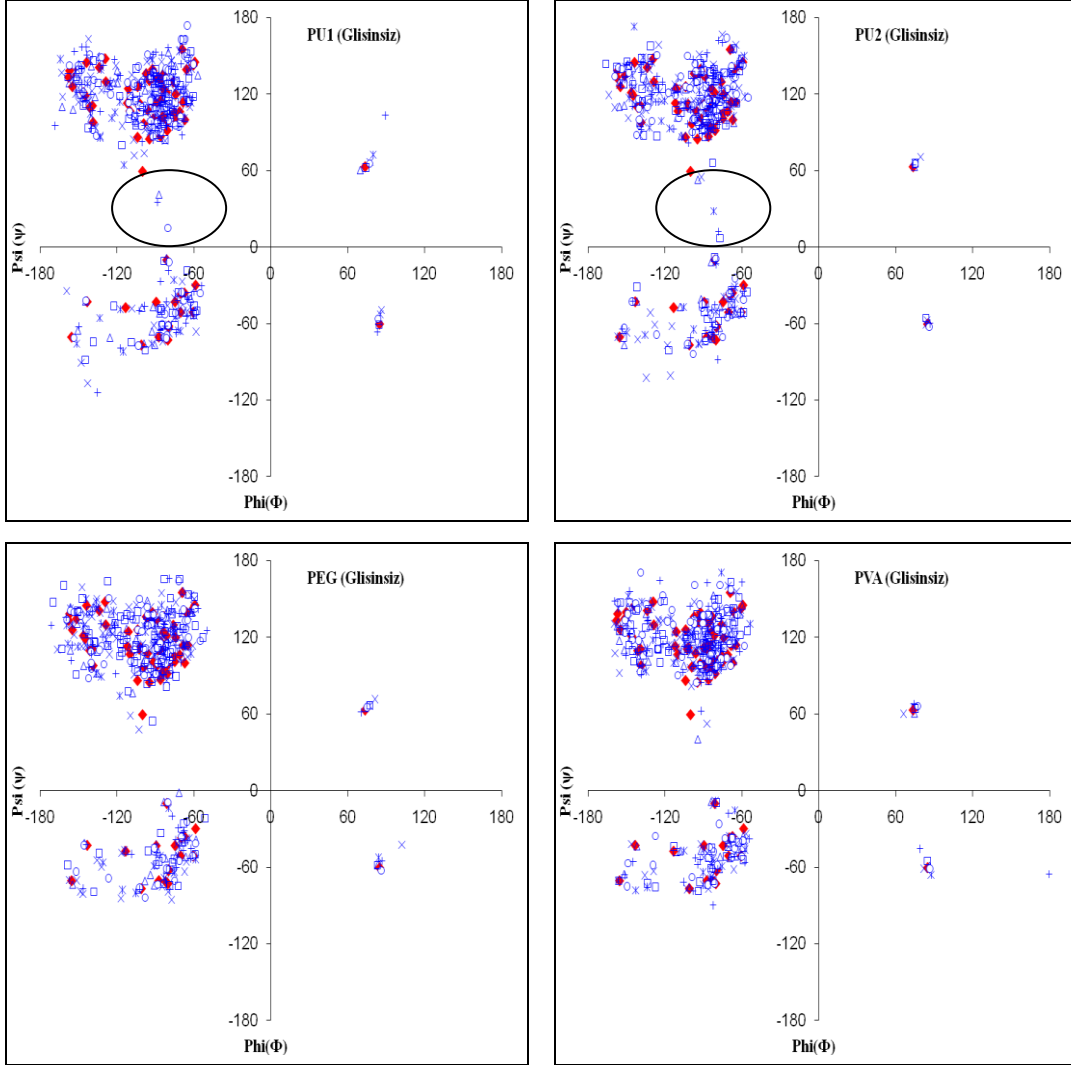
Şekil 6.12 : Protein adsorpsiyonu sonrası amino asitlerin phi (Φ) bağ açılarının ortalama değişimleri ve mutlak değişimleri

Proteinlerin ikincil yapılarındaki değişimlerin daha iyi gözlemlenmesi için tüm amino asitlerin Φ ve ψ bağ açıları kullanılarak hazırlanan proteinlerin Ramachandran grafikleri Şekil 6.13'te gösterilmiştir. Glisin çok esnek bir amino asit olduğundan ve protein yapısında çok fazla bulunduğundan glisin dışındaki amino asitlerin konformasyon değişimlerini gözlemleyebilmek amacı ile Ramachandran grafikleri ayrıca Şekile 6.14'teki gibi glisinsiz olarak da hazırlanmıştır.



◆ Fibronektin ▲ Konum 1 * Konum 2 × Konum 3 ○ Konum 4 □ Konum 5 + Konum 6

Şekil 6.13 : Phi (Φ) ve psi (ψ) bağ açılarının Ramachandran grafikleri



◆ Fibronektin △ Konum 1 * Konum 2 × Konum 3 ○ Konum 4 □ Konum 5 + Konum 6

Şekil 6.14 : Phi (Φ) ve psi (ψ) bağ açılarının glisinsiz Ramachandran grafikleri

Şekil 6.13 ve 6.14'teki Ramachandran grafikleri incelendiğinde; protein adsorpsiyonlarının proteinlerin ikincil yapılarında büyük değişimlere yol açmadığı görülmektedir. Ramachandran grafiklerinde görülen en belirgin değişimlerin PU1 ve PU2 yüzeyleri için işaretlenen bölgede olduğu görülmüştür. Bu bölgelerdeki değişimin Asn47 amino asidine ait olduğu belirlenmiştir. Bu durum Şekil 6.9'da görülen Asn47 amino asidindeki belirgin değişimi desteklemektedir.

7. VARGILAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, moleküler simülasyon yöntemleri ile biyomalzeme olarak kullanılan kristal polietilen glikol + hekzametilen diizosiyanat (PU1) ve amorf hint yağı + hekzametilen diizosiyanat (PU2) poliüretanlarının biyolojik ortamda bulunan proteinler ile olan ilişkileri incelenmiş ve biyouyumluluklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Kullanılan yöntemi test etmek amacı ile PVA, üretan grubunun poliüretandaki etkisini gözlemleyebilmek amacı ile de PU1 poliüretanının yanı sıra PEG yapısı ile simülasyonlar da gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde edilen vargılar kısaca özetlenmiştir.

Öncelikle modellenen polimerler matrislerinin dönüş yarıçapları (R_g), kohesiv enerji yoğunlukları (CED), çözünürlük parametreleri, x-ışını kırınimleri ve elastik sabitleri gibi bazı yapısal özellikleri incelenmiştir. Genel olarak hesaplanan değerlerin deneysel verilerle mertebe ölçeğinde tutarlı olduğu görülmüştür.

Gerçekleştirilen protein adsorpsiyonlarından polimer yüzeyinden 3, 5 ve 7 Å mesafede bulunan amino asitlerin ve atomların polimer yüzeyi ile teması sonucu ortaya çıkan etkileşim enerjileri grafikleri incelendiğinde en doğru karşılaştırmanın yüzeyden 7 Å mesafede bulunan amino asitler dikkate alınarak elde edildiği görülmüştür. Bu nedenle ileride yapılacak olan protein adsorpsiyonu çalışmalarında yüzeyden 7 Å mesafede bulunan amino asitlerin ve atomların yüzeye adsorplanmış kabul edilmesinin en doğru yaklaşım olduğu gözlenmiştir. Elde edilen etkileşim enerjisine karşılık amino asit ve atom sayısı grafiklerinin eğim değerleri adsorplanan proteinlerin yüzeye bağlanma gücü hakkında bilgi vermektedir. Eğim değeri fazla olan polimer protein ile daha güçlü etkileşim göstermektedir. Önceden bahsedilen hidrofobik etkileşimlerden dolayı hidrofobik yüzeylerin protein ile daha güçlü bağlanması beklenmektedir. Elde edilen sonuçlara göre daha fazla hidrofilik olan PU1 yüzeyi fibronektin ile daha güçlü etkileşim göstermektedir. Bu farklılık, kristal PU1'in düzgün bir yüzeye sahip olmasına ve böylece protein ile daha iyi ilişki kurabilmesi ve çalışmaların açık çözücü sistemi ile yürütülmemesi gibi gerekçelere dayandırılabilir. Ayrıca hidrofilik özellik gösteren fibronektin proteini daha fazla

hidrofilik olan PU1 polimeri ile daha güçlü etkileşimlere sebep olabilmektedir. PU1 ve PEG yüzeyleri ile protein arasındaki etkileşim enerjisi karşılaştırıldığında, ürean grubunun protein adsorpsiyonunun gücünü artırıcı yönde etki gösterdiği görülmektedir.

Burulma enerjisine karşılık amino asit veya atom sayısı grafikleri incelendiğinde eğim değeri en yüksek olan polimer PEG dir. PU2, PVA ve PU1 polimerlerinin eğim değerleri ise oldukça yakındır. Bu verilere göre PEG yüzeyine adsorplanan proteinde en fazla hidrojen bağı kırılması gerçekleşmiştir. PVA, PU2 ve PU1 yüzeyleri için ise kırılan hidrojen bağı sayılarının yakın olması beklenmektedir. Hidrojen bağlarındaki değişimleri daha iyi gözlemleyebilmek için, protein yapısında bulunan β -yapraklarının değişimi DSPP programı ile belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen verilere göre β -yapraklarındaki değişimin en fazla PEG polimerinde olduğu görülmektedir. İkinci sırada PU2, üçüncü sırada PU1 polimeri bulunmaktadır. PVA polimeri ise son sırada yer almaktadır. Bu durumun burkulma enerjisi grafiklerinden elde edilen değerler ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Polimer yüzeylere adsorplanan proteinlerin amino asitlerinin ψ ve Φ bağı açılarının değişiminde mutlak değişim değerlerinin incelenmesinin daha uygun bir yaklaşım olduğu görülmüştür. Mutlak değişim grafikleri incelendiğinde amino asitlerdeki ψ ve Φ değişimlerinin genel olarak protein zincirinin uç bölgelerinde daha az orta kısımlarda bir miktar daha fazla olduğu gözlenmiştir. Birbirinden sadece ürean grubu ile ayrılan PEG ve PU1 yüzeyleri karşılaştırıldığında; PU1 yüzeyindeki ψ ve Φ değişimlerinin protein zincirinin sonuna yakın bölgede PEG yüzeyinden daha fazla olduğu görülmüştür. Bu iki yüzey arasında görülen bu farklılıklar PU1 yapısında bulunan ürean grupları ile meydana gelen etkileşimlere dayandırılabilir. PU1 ve PU2 poliürean yüzeyleri karşılaştırıldığında ise ψ ve Φ değişimlerinde belirgin bir değişim görülmemiştir. Ramachandran grafikleri incelendiğinde; protein adsorpsiyonlarının proteinlerin ikincil yapılarında büyük değişimlere yol açmadığı görülmektedir. Ramachandran grafiklerinde görülen en belirgin değişimlerin Asn 47 amino asidinde görüldüğü belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Ramachandran grafikleri amino asitler için hesaplanan ψ ve Φ değişim grafikleri ile uyum içindedir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda adsorpsiyon çalışmalarının açık çözücü sistemi ile gerçekleştirilmesi önerilmektedir. Ayrıca hesaplamalar moleküler mekanik yöntemlerin yanı sıra moleküler dinamik yöntemler kullanılarak tekrarlanabilir.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda değişik hidrofobisiteye sahip polimerlerin yüzeylerinin farklı fonksiyonel gruplarla modifiye edilmesi ve bu yüzeylerde farklı proteinlerin adsorpsiyonunun incelenerek elde edilen verilerin kıyaslanması önerilmektedir. Ayrıca moleküler simülasyon çalışmalarının deneysel çalışmalarla paralel olarak gerçekleştirilmesi, protein adsorpsiyonuna yönelik yeni malzemelerin tasarlanmasında büyük katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] **Dee, K. C., Puleo, D. A. and Bizios, R.,** 2002: An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- [2] **Gümüşderelioğlu, M.,** 2002: Biyomalzemeler, *Bilim ve Teknik*, 1-23.
- [3] **Lambda, N. M. K., Woodhouse, K. A. and Cooper, S. L.,** 1998: Polyurethanes in Biomedical Applications, CRC Press, Florida.
- [4] **Corneillie, S., Lan, P. N., Schacht, E., Davies, M., Shard, A., Green, R., Denyer, S., Wassall, M., Whitfield, H. and Choong, S.,** 1997: Polyethylene glycol-containing polyurethanes for biomedical applications, *Polymer International*, **46**, 251-259.
- [5] **Raffaini, G. and Ganazzoli, F.,** 2007: Understanding the Performance of Biomaterials through Molecular Modeling: Crossing the Bridge between their Intrinsic Properties and the Surface Adsorption of Proteins, *Macromolecular Bioscience*, **7**, 552-566.
- [6] **Somasundaran, P., and Hubbard. A.T.,** 2006: Encyclopedia of Surface and Colloid Science Second Edition, Taylor & Francis, New York.
- [7] **Zhang, L. and Sun, Y.,** 2010: Molecular simulation of adsorption and its implications to protein chromatography: A review, *Biochemical Engineering Journal*, **48**, 408–415.
- [8] **Kricheldorf, H. R., Nuyken, O. and Swift, G.,** 2004: Handbook of Polymer Synthesis: Second Edition, Marcel Dekker, USA.
- [9] **Schlick, T.,** 2002: Molecular Modeling and Simulation. Springer, New York.
- [10] **Rappé, A. K. and Casewit, C. J.,** 1997: Molecular mechanics across chemistry. University Science Books, Sausalita, California.
- [11] **Singh, M.,** 2001: Predicting protein secondary and supersecondary structure, *Handbook of Computational Molecular Biology*, CRC Press, Princeton University, USA
- [12] <<http://swissmodel.expasy.org/course/text/chapter1.htm>>, alındığı tarih 04.05.2010
- [13] **Puleo, D. A. and Biziosi, R.,** 2009: Biological Interactions on Materials Surfaces: Understanding and Controlling Protein, Cell, and Tissue Responses. Springer, New York.
- [14] **Lima, M. V. S., Duek, E. A. R. and Santana, C. C.,** 2009: Adsorption of human immunoglobulin G to poly (β -hydroxybutyrate) (PHB), poly (L- lactic Acid) (PLLA) and PHB/PLLA blends, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. **26**, no.2, pp. 257-264.

- [15] **Cedervall, D., Lynch, I., Foy, M., Berggård, T., Donnelly, S. C., Cagney, G., Linse, S. and Dawson, K. A.,** 2007: Detailed Identification of Plasma Proteins Adsorbed on Copolymer Nanoparticles, Vol. **46**, pp 5754–5756.
- [16] **Aggarwal, P., Hall, J. B., Mcleland, C. B., Dobrovolskaia, M. A. and Mcneil, S. E.,** 2009: Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**, 428-437.
- [17] **Sigmund, W., El-Shall, H., Shah, D. O. and Moudgil, B. M.,** 2008: Particulate systems in nano and biotechnologies. CRC Press, USA.
- [18] **Seyfeli, S., Üstünel, İ., Değer, N., ve Demir, R.,** 2001: Ekstrasellüler Matriks ve Bazı Kardiovasküler Hastalıklarla İlişkisi, *T Klinik Kardioloji*, **14**, 359-369.
- [19] **Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen F. J. and Lemons, J. E.,** 1996: Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Academic Press, USA.
- [20] **Comba, P., Hambley, T. W. and Martin, B.,** 2009: Molecular Modeling of Inorganic Compounds. Wiley-Vch, Germany.
- [21] **Höltje, H.D., Sippl, W., Rognan, D. and Folkers, G.,** 2008: Molecular modeling: basic principles and applications, Wiley-Vch, Germany.
- [22] **Martin M. G.,** 2006. Comparison of the AMBER, CHARMM, COMPASS, GROMOS, OPLS, TraPPE ve UFF force fields for prediction of vapor–liquid coexistence curves ve liquid densities, *Fluid phase equilibria*, **248**, 50-55.
- [23] **Dauber-Osguthorpe, P., Roberts, V. A., Osguthorpe, D. J., Wolff, J., Genest, M., and Hagler, A. T.,** 1988: Structure and energetics of ligand binding to proteins: Escherichia coli dihydrofolate reductasetrimethoprim, a drug-receptor system, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* Vol. **4**, no. 1, pp. 31-47.
- [24] **Hill, J. R., and Sauer, J.,** 1994: Molecular Mechanics Potential for Silica and Zeolite Catalysts Based on ab Initio Calculations. 1. Dense and Microporous Silica. *J. Phys. Chem.* Vol. **98**, no. 4, pp. 1238-1244.
- [25] <http://www.chem.cmu.edu/courses/09560/docs/msi/ffbsim/FFSimuTOC.doc.html>, alındığı tarih 11.05.2010.
- [26] **Ungerer, P., Tavitian, B., and Boutin, A.,** 2005: Applications of Molecular Simulation in the Oil and Gas Industry - Monte Carlo Methods. Editions Technip, Paris.
- [27] **Sadus, R. J.,** 2002: Molecular Simulation of Fluids Theory, Algorithms and Object-Orientation. Elsevier, Amsterdam.
- [28] **Kotelyanskii, M. and Theodorou, N.,** 2004: Simulation methods for polymers. Marcel Dekker, USA.
- [29] www.accelrys.com, alındığı tarih 12.05.2010.

- [30] **Latour, R. A.**, 2008: Molecular simulation of protein-surface interactions: Benefits, problems, solutions, and future directions, Review. *Biointerphases*, **3**, FC2/11.
- [31] **Raffaini, G. and Ganazzoli, F.**, 2005: Computer simulation of polypeptide adsorption on model biomaterials, *Phys . Chem. Chem. Phys.*, **7**, 3651-3663.
- [32] **Raffaini, G. and Ganazzoli, F.**, 2005: Computer simulation of bulk mechanical properties and surface hydration of biomaterials, *Journal of Biomedical Materials Research*, **10**, 618-626.
- [33] <<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>>, alındığı tarih 04.05.2010.
- [34] **Shen, J. W., Wu, T., Wang, Q. and Pan, H. H.**, 2008: Molecular simulation of protein adsorption and desorption on hydroxyapatite surfaces, *Biomaterials*, **29**, 513–532.
- [35] **Raffaini, G. and Ganazzoli, F.**, 2004: Molecular Dynamics Simulation of the Adsorption of a Fibronectin Module on a Graphite Surface, *Langmuir*, **20**, 3371-3378.
- [36] **Zhang, L., Zhao, G. and Sun, Y.**, 2009: Molecular Insight into Protein Conformational Transition in Hydrophobic Charge Induction Chromatography: A Molecular Dynamics Simulation. *J. Phys. Chem.*, **113**, 6873–6880.
- [37] **Hagiwara, T., Sakiyama, T. and Watanabe, H.**, 2009: Molecular Simulation of Bovine β -Lactoglobulin Adsorbed onto a Positively Charged Solid Surface, *Langmuir*, **25**, 226-234.
- [38] **Cormack, A. N., Lewis, R. J. and Goldstein, A. H.**, 2004: Computer Simulation of Protein Adsorption to a Material Surface in Aqueous Solution: Biomaterials Modeling of a Ternary System. *J. Phys. Chem.*, **108**, 20408-20418.
- [39] **Kubiak, K. and Mulheran, P. A.**, 2009 :Molecular Dynamics Simulations of Hen Egg White Lysozyme Adsorption at a Charged Solid Surface, *J. Phys. Chem. ,* **113**, 12189–12200.
- [40] **Liang, L., Wang, Q., Wu, T., Shen, J. and Kang, Y.**, 2009: Molecular Dynamics Simulation on Stability of Insulin on Graphene, *J. Chem. Phys*, **22**, 627-634.
- [41] **Agashe, M., Raut, V., Stuart, S. J. and Latour, R. A.**, 2005: Molecular Simulation To Characterize the Adsorption Behavior of a Fibrinogen γ -Chain Fragment, *Langmuir* , **21**, 1103-1117.
- [42] **Raffaini, G. and Ganazzoli, F.**, 2006: Protein adsorption on the hydrophilic surface of a glassy polymer: a computer simulation study, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8**, 2765–2772.
- [43] **Mutlu B. H.**, 2008: Hint Yağı temelli poliüretan hidrojel sentezlenmesi ve karakterizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi* , İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul .

- [44] **Halitoğlu, S.**, 2008: Poliimid gaz ayırma membranlarının moleküler simülasyonu, *Yüksek Lisans Tezi* , İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- [45] **Heuchel M., Hofmann D. and Pullumbi P.**, 2004: Molecular modeling of small-molecule permeation in polyimides and its correlation to free-volume distributions, *Macromolecules*, **37**, 201-214.
- [46] **Solubility Parameters: Theory and Application**
<<http://cool.conservation-us.org/byauth/burke/solpar/solpar2.html>>
alındığı tarih 22.05.2010.
- [47] **Lee, S. H. and Lee, S. B.**, 2005: The Hildebrand solubility parameters, cohesive energy densities and internal energies of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based room temperature ionic liquids. *ChemComm*, 3469–3471.
- [48] **Galiatsatos, V.**, 2005: Molecular Simulation Methods For Predicting Polymer Properties. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- [49] **W. Kabsch and C. Sander.** 1983.:A dictionary of protein secondary structure. *Biopolymers*, **22** , 2577
- [50] **Bhat, R., and Timasheff, S. N.**, 1992: Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols, *The Protein Society*, **1** , 1133-1143.
- [51] **Damas, C., Leprince, T., Ngo, T. H. V. and Coudert, R.**, 2008: Behavior study of polyvinyl alcohol aqueous solution in presence of short chain micelle-forming polyols, *Colloid Polymer Science*, **286**, 999-1007.
- [52] **Mark, J. E.**, 2006: Polymer Data Handbook, Oxford University Press, USA.
- [53] **Ebewele, R. O.**, 2000: Polymer Science and Technology. CRC press, USA.
- [54] **Hou, Y., Tang, J., Zhang, H., Qian, C., Feng, Y., and Liu, J.**, 2009: Functionalized Few-Walled Carbon Nanotubes for Mechanical Reinforcement of Polymeric Composites, *National Institute for Materials Science*, **3**, 1057–1062.
- [55] **Ma, P. X. and Elisseeff, J.**, 2006: Scaffolding in tissue engineering. CRC press, USA.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Melisa Panos

Doğum Yeri ve Tarihi: Beşiktaş/İstanbul-07.11.1985

Adres: Türkbey Sok. Ferah Apt. No:113/3 Kurtuluş-İstanbul

Lise: Sakıp Sabancı Anadolu Lisesi (2000-2003)

Lisans: Kimya , Marmara Üniversitesi (2003-2007)