

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALBUMİNİN D₂O ÇÖZELTİLERİNİN Mn (II) VARLIĞINDA ve
YOKLUĞUNDA 400 MHz NMR ile İNCELENMESİ

Canan AYTUĞ AVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
FİZİK ANABİLİM DALI

DIYARBAKIR

Eylül 2013

TEŞEKKÜR

Çalıőmam süresince beni yönlendiren, bilgilendiren, tezimin oluşmasında büyük katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. ALİ YILMAZ'a, danışman hocam Yrd. Doç. Dr. GÜLTEN KAVAK'a; ve deneylerimi yaparken benden emeklerini esirgemeyen Arş. Gör. BİLGİN ZENGİN 'e ve Arş. Gör. SİBEL ZEYDAN KORUNUR 'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VIII
KISALTMA VE SİMGELER.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Kuramsal Kısım.....	10
2.1.1. Temel NMR Kuramı	10
2.1.1.1. MR' a Uygun Bir Atomun Dış Manyetik Alan İçindeki Davranışı ve Enerji Durumları.....	10
2.1.1.2. Vücut Sıvılarındaki Çıplak Atomların Dış H_0 Manyetik Alandaki Davranışı.....	12
2.1.1.3. RF Pulsu (H_{RF}) ve Uygulanışı	14
2.1.1.4. 90^0 Pulsu.....	15
2.1.1.5. 180^0 Pulsu.....	16
2.1.1.6. Spin Sisteminin Çevresi.....	16
2.1.1.7. Bir Spin Çevreden Nasıl Enerji Alır ve Çevreye Nasıl Enerji Verir.....	17
2.1.1.8. Sıcak Spinlerin Çevreye Enerji Aktarması ve T_1 Süreci.....	18
2.1.1.9. Spinlerin Defaze Olması ve T_2 Süreci	19
2.2. Puls Türleri ve Puls Adımları	20
2.2.1. Inversion Recovery Puls Adımları.....	20
2.2.2. Spin Echo Puls Adımı.....	22
2.3. Rölaksasyona (Durulmaya) Yol Açan Bazı Önemli Etkileşme Türleri	24
2.3.1. Paramanyetik Rölaksasyon.....	24
2.3.2. Skaler Etkileşme.....	27

2.4.	Paramanyetik İyon İçeren Saf Çözeltilerde ve Protein Çözeltilerinde T_1 ve T_2 Rölaksasyon Zamanları.....	31
3.	MATERYAL METOT.....	39
3.1.	Örneğin Hazırlanması.....	39
3.1.1.	Konsantrasyon Deneyleri.....	39
3.1.2.	Sıcaklık Deneyleri.....	41
3.2.	NMR T_1 ve T_2 Ölçümleri.....	42
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	43
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
6.	KAYNAKLAR.....	59
	ÖZGEÇMİŞ.....	63

ÖZET

ALBÜMİNİN D₂O ÇÖZELTİLERİNİN Mn (II) VARLIĞINDA ve YOKLUĞUNDA 400 MHz NMR ile İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Canan AYTUĞ AVA

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZİK ANABİLİM DALI

2013

Mn (II) varlığında ve yokluğunda albüminin H₂O çözeltilerinin 1/T₁ ve 1/T₂ değerleri önceki çalışmalarda ayrıntılı incelenmiştir. D₂O çözeltileri de tamamlayıcı deneyler için kullanılmıştır. Ancak bu çalışmalar daha çok düşük frekanslarda gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle Mn (II) iyonu içeren albuminin D₂O çözeltilerinin 1/T₁ ve 1/T₂ değerlerini 400 MHz’de incelemek bir yenilik olacaktır.

Bu çalışmalarda D₂O ve 0.1 H₂O /0.9 D₂O çözeltilerinin 1/T₁ ve 1/T₂ oranları;

- Albümin ve iyon eklenmeksizin,
- Sabit albümin varlığında iyon konsantrasyonuna karşı,
- Sabit iyon konsantrasyonu için, protein konsantrasyonuna karşı incelenmiştir.

Deneyler Bruker Avance 400 MHz NMR kullanılarak yapılmıştır. T₁ için Inversion Recovery (180- τ -90) puls adımı ve T₂ için Carr-Purcell-Meiboom-Gill puls adımı kullanılmıştır. Bu deneyler 25 °C ‘de gerçekleştirilmiştir. Bazı örneklerin 1/T₁ ve 1/T₂ oranları sıcaklığa karşı da ölçülmüştür. Deneyler otomatik sıcaklık kontrol birimi kullanılarak 20°C-40°C aralığındaki sıcaklıklar için gerçekleştirilmiştir.

Tüm konsantrasyon deneylerinde 1/T₁ ve 1/T₂, konsantrasyonlarla lineer olarak artmaktadır. D₂O çözeltilerinin proton T₂ röleksivitesi, proton T₂ röleksivitesinden çarpıcı şekilde farklı olmaktadır. T₂ röleksivitesi H₂O eklenmesi durumunda hafifçe azalmaktadır. Su eklendiğinde T₁ mekanizması dipolar olmakla beraber; çok yüksek T₂ röleksiviteleri; T₂’nin spin rotasyon yada başka mekanizmalarla oluştuğunu öngörmektedir.

Anahtar Kelimeler: NMR, T₁, T₂, Röleksasyon, Albümin, Mangan(Mn)

ABSTRACT

STUDY OF D₂O SOLUTIONS OF ALBUMIN BY 400 MHz NMR IN THE PRESENCE OF AND ABSENCE OF Mn (II)

MSc. THESIS

Canan AYTUĞ AVA

DİCLE UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF PHYSICS

2013

$1/T_1$ and $1/T_2$ values of H₂O solutions of albumin were studied in the presence and absence of Mn(II) in the previous studies in detail. D₂O solutions were also used for supplementary experiments. However, these studies were carried out rather at low frequencies. Thus, studying of $1/T_1$ and $1/T_2$ values of D₂O solutions of albumin containing Mn(II) ions by 400 MHz will be a novelty.

In the present studies, $1/T_1$ and $1/T_2$ ratios of D₂O and 0.1 H₂O/0.9 D₂O solutions were investigated;

- a) Without addition of albumin and ion,
- b) With respect to ion concentration in the presence of constant albumin,
- c) With respect to protein concentration for constant ion concentration.

The experiments were carried out by using Bruker Avance 400 MHz NMR. Inversion Recovery (180- τ -90) pulse step were used for T_1 , whereas Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulse step were used for T_2 . These experiments were carried out at 25 °C. $1/T_1$ and $1/T_2$ ratios of some samples were also measured in terms of temperature. The experiments were performed for temperature range of 20°C-40°C by using automatic temperature control unit.

$1/T_1$ and $1/T_2$ values increase linearly with concentration increase in all concentration experiments. Proton T_2 relaxivity of D₂O solution is remarkable different from proton T_2 relaxivity, which decreases slightly by the addition of H₂O. Although T_1 mechanism becomes dipolar by the addition of water, very high T_2 relaxivity implies that T_2 occurs by spin rotation or by other mechanism.

Keywords: NMR, T_1 , T_2 , Relaxation, Albumin, Manganese(Mn)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Bir I spininin manyetik alan içindeki hareketleri	11
Şekil 2.2. H_0 alanı içine konulan bir I spininin enerji seviyeleri diyagramı	12
Şekil 2.3. H_0 alanı içindeki N_0 tane spin hareketinin temsili gösterimi	13
Şekil 2.4. H_0 alanı içindeki N_0 tane spinin hareketi ve enerji seviyeleri	13
Şekil 2.5. RF uygulanması sonucu bir spinin enerji soğurması ya da salması	14
Şekil 2.6. Bir spin sistemine 90° pulsunun uygulanışı	15
Şekil 2.7. Bir spin sistemine 180° pulsunun uygulanışı	16
Şekil 2.8. Spin sisteminin çevresi	17
Şekil 2.9. Çevrenin etkisi ile bir spinin enerji soğurması ya da salması	18
Şekil 2.10. T_1 spin-örgü rölaksasyon zamanının oluşum süreci	19
Şekil 2.11. T_2 spin-spin rölaksasyon zamanının oluşum süreci	20
Şekil 2.12. Tek bir Inversion Recovery (IR) puls adımı	21
Şekil 2.13. IR puls adımının peş peşe uygulanması	21
Şekil 2.14. Manyetizasyonun IR metodu ile geri kazanımını anlatan eğri	22
Şekil 2.15. Bir tek Spin-Echo (SE) puls adımı	23
Şekil 2.16. Peşpeşe uygulanan SE adımları sonucu sinyallerin gitgide küçülmesi	23
Şekil 2.17. Peşpeşe uygulanan echo adımları sonucu oluşan SE bozunum eğrisi	24
Şekil 2.18. Paramanyetik iyonlar yolu ile T_1 rölaksasyonunun (durulmasının) oluşumu	25
Şekil 2.19. Brown hareketleri sonucu oluşan H_{xy} alanları ve bu alanlar arasındaki ilginin süresi olan τ zamanı	27
Şekil 2.20. Hareketli i akım halkasının kurduğu H_{xy} alanı yolu ile gerçekleşen skaler etkileşme	28
Şekil 2.21. Hareketli S spinin yön değiştirmesi ile zamana bağlı kılınan H_{xy} 'nin gerçekleştirdiği skaler etkileşme	29
Şekil 2.22. Bir spin topluluğunda skaler etkileşmenin oluşum süreci	30
Şekil 2.23. Dipolar rölaksasyon mekanizması ve τ_r ilgi zamanı	32
Şekil 2.24. Komşu molekülün öteleme hareketi sonucu oluşan etkileşme ve τ_t zamanı	33

Şekil 2.25. Su ve protein çözeltileri	33
Şekil 2.26. Proteine dönmesiz bağlı suyun kurduğu Hxy alanı	34
Şekil 2.27. $J(\omega)$ 'nın ω 'ya göre değişimi yarı genişlik olan $1/\tau_c$ 'ye eşittir.	35
Şekil 2.28. Protein protonu ile su protonu arasındaki kimyasal değiş-tokuş	36
Şekil 2.29. Protein çözeltisi için önerilen su tabakaları	37
Şekil 2.30. Protein çözeltisinde 3 çevreli su modeli	37
Şekil 4.1. 0.02 g Albumin ve 0.017 mM Mn(II) içeren D ₂ O/H ₂ O karışımı (0.1 ml H ₂ O / 0.9 ml D ₂ O) için IR –T ₁ eğrisi	43
Şekil 4.2. Ölçülen $1/T_1$ değerlerinin iyon konsantrasyonuna karşı grafik- lendirilmesi ve en küçük kareler fitinden elde edilen bağıntılar	45
Şekil 4.3. 0.02 g Albumin ve 0.017 mM Mn(II) içeren D ₂ O/H ₂ O karışımı (0.1 ml H ₂ O /0.90 mlD ₂ O) için SE –T ₂ eğrisi	46
Şekil 4.4. $1/T_2'$ in iyon konsantrasyonuna karşı yapılan en küçük kare fitleri ve bu fitlerden elde edilen bağıntılar	47
Şekil 4.5. 0.02 g Albumin ve 0.036 mM Mn(II) içeren ve 298 K sıcaklıkta tutulan D ₂ O için IR –T ₁ eğrisi	48
Şekil 4.6. $1/T_1'$ in sıcaklığa karşı yapılan en küçük kare fitleri ve bu fitlerden elde edilen bağıntılar	49
Şekil 4.7. 0.02 g Albumin ve 0.036 mM Mn(II) içeren ve 298 K sıcaklıkta tutulan D ₂ O için SE –T ₂ eğrisi	50
Şekil 4.8. $1/T_1'$ in sıcaklığa karşı yapılan en küçük kare fitleri ve bu fitlerden elde edilen bağıntılar	51
Şekil 4.9. 0.02 g Albumin ve 0.036 mM Mn(II) içeren pure D ₂ O çözeltisi için IR –T ₁ eğrisi	52
Şekil 4.10. $1/T_1'$ in Albumin konsantrasyonuna karşı yapılan en küçük kare fitleri ve bu fitlerden elde edilen bağıntılar	53
Şekil 4.11. 0.02 g Albumin ve 0.036 mM Mn(II) içeren pure D ₂ O çözeltisi için SE –T ₂ eğrisi	54
Şekil 4.12. $1/T_2'$ nin Albumin konsantrasyonuna karşı yapılan en küçük kare fitleri ve bu fitlerden elde edilen bağıntılar	55

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No:	Sayfa No
Çizelge 4.1. 0.02 g albuminin varlığında ve yokluğunda saf D ₂ O ve 0.1 H ₂ O ml/0.9 D ₂ O ml karışımının 1/T ₁ oranının mangan konsantrasyonuna karşı değişimi	44
Çizelge 4.2. 0.02 g albuminin varlığında ve yokluğunda saf D ₂ O ve 0.1 H ₂ O ml/0.9 D ₂ O ml karışımının 1/T ₂ oranının mangan iyonu konsantrasyonuna karşı değişimi	46
Çizelge 4.3. D ₂ O'nun albumin varlığında ve yokluğunda 1/T ₁ rölaksasyon oran değerlerinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi.	48
Çizelge 4.4. D ₂ O'nun albumin varlığında ve yokluğunda 1/T ₂ rölaksasyon oran değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi.	50
Çizelge 4.5. Saf D ₂ O/iyon ve 0.1 H ₂ O ml/0.9 D ₂ O ml karışımlarının 1/T ₁ rölaksasyon oranının albumin konsantrasyonuna karşı değişimi	52
Çizelge 4.6. Saf D ₂ O/ iyon ve 0.1 H ₂ O/0.9 D ₂ O karışımının 1/T ₂ rölaksasyon oranının albumin konsantrasyonuna karşı değişimi	54
Çizelge 5.7. Albumin varlığında ve yokluğunda D ₂ O ile 0.1 H ₂ O/ 0.9 D ₂ O çözeltilerinin proton T ₁ ve T ₂ rölaksivitelemi	58
Çizelge 5.8. İyon varlığında ve yokluğunda D ₂ O ile 0.1 H ₂ O/ 0.9 D ₂ O çözeltilerinin albumin konsantrasyonu ile ilgili, proton T ₁ ve proton T ₂ rölaksivitelemi	58

KISALTMA VE SİMGELER

a	:Molekül yarıçapı
BSA	:Bovine Serum Albumin
D ₂ O	: Di döteryum oksit / ağır su
g	:Spektroskopik yarıma faktörü
H ₀	:Dış manyetik alan
H ₂ O	:Su molekülü
HSA	:Human Serum Albumin
IR	:Inversion Recovery
MRI	:Manyetik Rezonans Imaging
N _i	:Birim hacimde bulunan i. fazdaki protonların sayısı
NMRD	:Nükleer Manyetik Rezonans Dispersiyon
NMR	:Nükleer Manyetik Rezonans
PR	:Puls Repetition Time
RF	:Radyofrekans
S	:Spin açısal momentum
T	:Sıcaklık
T ₁	:Spin-örgü rölaksasyon zamanı
T ₂	:Spin-spin rölaksasyon zamanı
τ	:İlgi zamanı
τ_c	:Çözücü protonlarının ilgi zamanı
τ_i	:i. fazla ilgili korelasyon (ilgi) zamanı
τ_m	:Suyun protein üzerindeki ömrü
τ_r	:Rotasyonel korelasyon zamanı
μ	:Manyetik moment
μ_B	:Bohr Magnetonu
η	:Ortamın viskozluğu
τ_{eff}	:Sistemin tümünü temsil eden korelasyon zamanı

1. GİRİŞ

Human serum albumin (HSA) plazmada en çok bulunan serum proteini ve çok çeşitli bileşiklere bağlayabilen bir yüksek ligand bağlama kapasitesine sahiptir. HSA homeostasis, metabolizma, koruma ve keza endo-exogenous substratların geçiş ve bağlanması gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara katkıda bulunur (Cistola ve ark.1991, Fasano ve ark. 2005, Sulkowska ve ark. 2005).

Albumin çözeltilerinin Spin-Örgü (T_1) ve Spin-Spin (T_2) durulma zamanları, Nükleer Manyetik Rezonans Dispersiyon (NMRD) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) teknikleri ile ayrıntılı olarak incelenmiştir (Koenig ve Schillinger 1969, Grösch ve Noack 1976, Hallenga ve Koenig 1976, Oakes 1976, , Gallier ve ark. 1987, Koenig ve ark. 1993, Koenig ve Brown III 1993, Koenig 1995, Bryant 1996, Denisov ve ark. 1996, Bertini ve ark. 2000, Kiihne ve Bryant 2000, Denisov ve Halle 2002, Van-Quynh 2003, Halle 2004, Bertini ve ark. 2005, Yılmaz ve ark. 2008). Rölaksasyon mekanizmalarını açıklamak için birtakım yöntemlere başvurulmuştur. Bu yöntemlerden biri Albuminin rotasyonel korelasyon (ilgi) zamanının Stokes-Einstein bağıntısından türetilmesine dayanır (Oakes 1976, Bryant 1996, Kiihne ve Bryant 2000, Denisov ve Halle 2002). Bir diğeri ise, ilgi zamanının, T_1/T_2 oranlarından elde edilmesine dayanır (Yılmaz ve ark. 2008). İlk çalışmalarda mikrosaniye mertebelerinde çıkan ilgi zamanları, daha sonraki çalışmalarda nanosaniye mertebesinde türetilmiştir. Aradaki fark, ilk çalışmalarda kullanılan yüksek protein konsantrasyonu (%10 ya da %15 gibi) ile açıklanmıştır.

HSA'ya bir ligandın bağlanması kontrast maddelerin geliştirilmesi, damar yapılarının görüntülenmesi anormal damar geçirgenliğine sahip bölgelerin görüntülenmesi açısından da merkezi bir değere sahiptir (Kang ve ark. 1984, Elst ve ark 2001). Bu nedenle paramanyetik merkezler içeren albumin çözeltileri ile ilgili çalışmalar hala değerlidir. Mangan içeren albumin çözeltileri birçok kişi tarafından araştırılmıştır (Barnhart ve ark. 1986, Aime ve ark. 2002, Aime ve ark. 2002, Korb and Bryant 2002, , Kruk ve Kowalewski 2003, Bertini ve ark. 2005). Ancak Albuminin D_2O çözeltilerinde bulunan manganın T_1 ve T_2 durulması üzerine etkisi 400 MHz'de henüz incelenmemiştir. Bu nedenle bu konuyu tez konusu olarak seçtik. Bu çalışmada öncelikle çeşitli iyon konsantrasyonlarını içeren D_2O çözeltilerinin NMR'da T_1 ve

T₂'leri incelendi. Sonra aynı iyon konsantrasyonları 0.02 g albuminin varlığında da T₁ ve T₂'ye olan etkileri açısından incelendi. Ayrıca belli iyon konsantrasyonları için protein konsantrasyonları değiştirilerek ölçüm yapıldı.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Protein çözeltilerindeki nükleer manyetik durulma dağılımı isimli çalışmalarında, apotransferrin çözeltilerindeki çözücü protonların $1/T_1$ 'i sıcaklık, konsantrasyon ve PH' ın fonksiyonu olarak incelenmiştir. 1000 Oe' den daha düşük manyetik alan verileri için pulslu bir manyetik alan kullanarak ve 1k Oe ile 12k Oe arasındaki manyetik alan bölgesi için ise spin-echo yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen veriler iki faz modeli ile karşılaştırılıyor ve suyun proteine dönmesiz bağlı olması gerektiğini, protein molekülüne göre sabit bir eksen etrafında dönmesinin yeterli olduğu öne sürülmüştür. Sabit bir r_{pp} mesafesinde etkileşen bir proton çiftinin durulma oranı

$$\frac{1}{T_{1PP}} = \frac{3\hbar^2 \gamma^4}{10r_{pp}^6} \left[\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right] \quad (2.1.)$$

ile verilmektedir.

Bu denklemin proteine dönmesiz bağlı olan su molekülleri için geçerli olduğunu varsayıp, ilgi zamanı 2×10^{-7} s olarak bulunmuştur. Proteine dönmesiz bağlı olmayan fakat proteine göre sabit eksen etrafında serbest olarak dönecek şekilde bağlı olan bir proton çifti için durulma oranı

$$\frac{1}{T_{1PP}} = \left(\frac{3\cos^2 \alpha - 1}{2} \right) \left(\frac{1}{T_{1PP}} \right)_{dönmesiz} \quad (2.2.)$$

olarak önerilmiştir. Bütün bunlara ilaveten; proteinin yakınında yapışık bir su bölgesinin olduğunu ve hareketi bulk su ile karşılaştırıldıklarında daha yavaş, proteininkinden ise daha hızlı olduğunu ve bu moleküllerin τ_c ilgi zamanlarının proteinin takla adımı süresinden hayli kısa olduğu ileri sürülmüştür. Proteinin etkisinde bulunan çözücü protonların τ_c ilgi zamanının 3×10^{-12} s' den 3×10^{-7} s' ye arttığı görülmüştür. Bunun yanında proteine bağlı küçük saydaki su moleküllerinin her durumda çözücü protonların $1/T_1$ 'i artırdığı da ifade edilmiştir (Koenig ve Schillinger 1969).

Sulu bovine serum Albumin çözeltilerindeki su hareketliliğinin NMR rölaksasyonu ile incelenmesi adlı çalışmada; albumin üzerine olan ölçümleri hem doğal hem de denature durumu için farklı konsantrasyonlarda, farklı sıcaklıklarda ve farklı PH değerlerinde frekansa bağlı olarak incelenmiştir. Doğal protein sıcaklığını 0 °C ve 30 °C arasında sınırlarken denature proteini ise, örneği yaklaşık 80 °C' de 5 dakika ısıtarak elde edilmiştir. Hesaplanan τ_i ve N_i (τ_i : i. fazla ilgili korelasyon (ilgi) zamanı ve N_i birim hacimde bulunan i. fazdaki protonların sayısı olmak üzere) değerlerinden, proteinin çevresinde tümü serbest, ötelenmesi engellenmiş ve dönerek bağlı su olarak adlandırılan en az üç tip su tabakasının bulunabileceği ifade edilmiştir ve bu çevrelere ait τ ilgi zamanlarını da sırasıyla; $\tau_s = 10^{-11} s$, $\tau_{oe} = 10^{-9} s$ ve $\tau_{db} = 10^{-8} s$ olarak bulunmuştur. Bu tabakalar arasında hızlı kimyasal değiş-tokuş olduğu varsayılarak, durulma oranının (a: protein protonları, b: hidrasyonlu su protonları ve c: serbest su protonları olmak üzere)

$$\frac{1}{T_1} = \frac{P_a}{T_{1a}} + \frac{P_b}{T_{1b}} + \frac{P_c}{T_{1c}} \quad (2.3.)$$

şeklinde verilebileceğini ifade edilmiştir. Dönerek bağlı durumdaki proton mesafesini $1.52A^0$ ve ötelenmesi engellenmiş durum için proton mesafesini $1.79A^0$ olarak alınmıştır (Grösch ve Noack 1976).

Protein hidrasyonu. Doğal bovine serum albumin çözeltilerinin NMR rölaksasyon çalışmaları ile belirlenmesi adlı çalışmalarında; Doğal bovine serum albuminin (BSA) sulu çözeltilerindeki protein ve su protonlarının NMR durulma zamanlarını, protein konsantrasyonunun ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçülmüş ve protein hidrasyonu ile ilgili tahminleri, dondurulmuş protein çözeltileri üzerindeki NMR incelemelerinden elde edilmiştir. $1/T_1$ ölçümlerini, BSA konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak 275 °K, 294 °K ve 318 °K' de incelediğinde durulma zamanındaki artışın, %10 BSA konsantrasyonuna kadar lineer, daha yukarı konsantrasyonlarda ise lineerlikten saptığını ve sıcaklık arttıkça da $1/T_1$ ' in arttığı gözlemlenmiştir. Doğal BSA' nın varlığında suyun durulma oranlarındaki net artışın, uzun menzilli yüzey etkilerinden dolayı su

moleküllerinin hareketindeki azalmadan ya da bulk su ile hızlı olarak değiş-tokuş yapan, küçük miktarda suyun proteine bağlanmasından ileri geldiği öne sürülmüştür. Burada BSA hidrasyonunun teorik olarak tahminlerini, 1 g BSA başına aminoasit kenar zincirleri üzerindeki kutup guplarının sayısından ve kutup guplarının suyu bağlama kapasitelerinden yapılmıştır. Ölçümlerin çok tabakalı model ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışma; dondurulmuş doğal BSA'lı çözeltilerden elde edilen hidrasyon sayılarının, çözeltideki hidrasyonu iyi tahmin ettiğini ve çözeltide tahmin edilen durulma zamanlarının dondurulmuş örneklerdeki ölçümlere benzediğini ortaya koymuştur (J. Oakes 1976).

^1H and ^2H manyetik rölaksasyon çözücüleri tarafından çalışılan protein rotasyonel rölaksasyon adlı çalışmalarında; Bir çözeltiliye eklenen proteinin, çözeltilinin $1/T_1$ 'durulma oranını artırdığı (Koenig ve Schillger1969), bu artışın büyüklüğünün uygulanan dış alanın şiddetine bağlı olduğu ve düşük alanlarda etkinin daha büyük olduğu gözlemlenmiştir. Çözücü protonlar için $1/T_1$ ' in manyetik alan bağıllığı; PH ' ın, sıcaklığı ve konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak incelenmiştir. Ayrıca bir su molekülünün hızlı takla hareketi ile ilgili zamanını $\tau_R \approx 10^{-12} s$ ve onun komşuluğundaki herhangi bir protein molekülünün Brown hareketi ile ilgili ilgi zamanını da $\tau_R \approx 10^{-7} s$ olarak bulunmuştur (Hallenga ve Koenig 1976).

Bovine serum albumin çözeltilerinin ^1H ve ^2H NMR çalışması adlı makalesinde; Dondurulmuş, doğal ve denature bovine serum albumin çözeltilerini kullanarak spin-örgü durulma zamanlarını ölçmüşlerdir. $1/T_1$ spin-örgü durulma değerlerinin homojen sistemlerde daha güvenilir olduğu ve bu yüzden ölçümlerin homojen sistem olarak sulu bovine serum Albumin çözeltilerinde gerçekleştiği ifade edilmiştir. Bağlı su molekülünün öteleme hareketinin $1/T_{1su}$ ' ya katkıda bulunamayacak kadar yavaş olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca kros rölaksasyonun döteronlar ile protonlar arasında etkili olmadığını ve bu yüzden de protein protonlarının ^2H spin-örgü durulmasına katkıda bulunmadığı varsayılmıştır. Dondurulmuş çözeltiler için elde edilen sonuçlar: $1/T_{1su}$ süreci; bağlı su molekülünün hızlı izotropik dönme hareketi ile ilgilidir ve erime noktasına yakın sıcaklıklarda (T_c), τ_c ilgi zamanı yaklaşık olarak $10^{-9} s$ ' dir. Bunun yanında protein protonlarının ^1H spin-örgü durulma oranına önemli katkısı vardır.

Doğal çözeltiler için elde edilen sonuçlar: Su protonlarının spin-örgü durulma zamanı $1/T_{1su}$, protein proton durulma zamanlarının büyük değerlerinden dolayı, protein protonları ile kros rölaksasyonun etkili olduğu düşük frekanslardaki protonlardan başka, büyük ölçüde hem bulk hem de bağlı su moleküllerinin hareketleri ile durulur ve bağlı su moleküllerinin dağılımı daha yavaş iken (10^{-9} - 10^{-10} s), bu iki tip su molekülünün dönel ilgi zamanlarını aynı büyüklük mertebesinde (10^{-11} - 10^{-12} s). Denature çözeltiler için elde edilen sonuçlar: Bovine serum Albuminin izotropik dönmesi durur ve protein katı bir hal alır. Bu durum, bir katı gibi NMR sinyalinin görünmesine dayanır. Aynı zamanda, protein spin-örgü durulma oranına, takla hareketi ile ilgili katkının gözükmemesi ile teyit edilir. Bunun aksine su hareketi, T_c erime noktasının aşağısındaki ve yukarısındaki tüm sıcaklıklarda hemen hemen etkilenmez. Bununla beraber su NMR durulma zamanları, denaturasyonun yukarısındaki üst T_c de çok zor değişir. T_{1su} büyük ölçüde denaturasyona bağlıdır. Bu bağlılık, bağlı su ile protein protonları arasındaki kros rölaksasyon katkısını değiştirir. T_{1su} , denaturasyonla etkilenmez. Denature örnekte su proton spin-örgü durulma oranı $1/T_{1su}$, yun daha uzun olması oldukça sürpriz sonuç olarak değerlendirilmiştir (Gallier ve ark. 1987).

Bir doku modeli için 200 MHz de çapraz bağlı bovine serum albumin çözeltilerinde manyetizasyon transferi isimli çalışmalarında; Diyamanyetik çözücü protonların eklenmesi ile çözücü su çekirdeğinin manyetik spin-örgü durulma oranlarını artırdığının bilindiğini ve durulma oranlarındaki artışın, manyetik alanın bir fonksiyonu olduğu ve protein moleküllerinin yönelimsel durulma zamanının da alana bağlı durulma oranlarının incelemelerinden anlaşılabilirdiği ifade edilmiştir. Ayrıca çözücü ve çözünen protonlar arasındaki kros rölaksasyon sürecinden ortaya çıkan ek bir etkileşimin olduğu gösterilmiştir. Kros rölaksasyon katkısının manyetik alan bağıllığı (yaklaşık olarak döteron rölaksasyon oranına benzeyen) değişmeden olduğu gibi kalan çözücü proton durulmasına oldukça benzediği görülmüştür. Bu gözlem; diğer yazarlar tarafından kullanılmış olan, fakat manyetik alan şiddetinin geniş bir aralığı üzerindeki verilere uygulanmayan kross rölaksasyon için ifadelerin tahminleri ile uygun olmadığı belirtilmiştir. Hem protein protonları hem de çözücü protonların durulma davranışını ortaya çıkaran model, iki eksponansiyelin toplamı olduğu belirtilmiştir. Bu bulgu, dokular gibi kompleks sistemlerde yayınlanmış proton rölaksasyon oranlarının yorumu

için imalara sahip olduğunu ve bu verilerin, kross rölaksasyonu hesaba katarak yeniden incelenmesi gerektiğini ifade etmişlerdir (Koenig ve ark.1993).

Su protein etkileşimlerinin dinamikleri isimli çalışmada; Su ile protein arasındaki etkileşimler incelenmiş. Su proton nükleer spin-örgü durulma oranının, sıcaklık ve manyetik alan bağılılığı, protein ile etkileşen su molekülleri için geçen sürenin oda sıcaklığında saf suyunkine daha yakın olması gerektiği belirtilmiştir. Su-protein manyetik bağlanımı, dokular gibi heterojenik protein sistemlerinde su durulma oranlarının yorumunu etkilediğini ve suyun NMR üzerindeki etkileri vasıtasıyla hareketsiz bileşenler hakkında ekstra faydalı bilgi vermenin yollarını sağladığı söylenmiştir. Tartışmada, proteinin kristal yapılarında, iç yüzeydeki hızlı su molekül hareketleri ile ilgili sonuçları, proteinin kristal yapılarında çok sayıda su oksijen atomunun gözlenmesi ile uyumsuzluğun olmadığını gösterdiği gözlemlenmiştir (Bryant 1996).

NMR'ın kontrast madde tasarımını etkileyen faktörlerin çalışmaları adlı çalışmada; Manganes in Blood as a Model System adlı makalesinde, proton NMR imaging için kontrast maddeler olarak kullanılan paramanyetik iyon performansını etkileyen bazı faktörler çalışıldı. İyonun sulu çözeltisinin rölaksasyon oranı onun manyetik momenti tarafından güvenilir şekilde tahmin edilemediği gösterildi ama bu önemli rölaksasyon artışı iyon büyük molekül ile kompleksleştiğinde ortaya çıkabilir. Bu artış bağlama yarışı ve PH gibi faktörler tarafından değiştirilebilir. Zehiri azaltmak için yapılan şelatlaşma manganın T_1/T_2 oranı metal bağlanma derecesi hassas olan yararlı bir parametredir. Dokulardaki paramanyetik rölaksasyon artışının bu özellikleri; mangan ve kan bileşenlerinden oluşan bir seri deneylerin olduğu sistem üzerinde gösterildi. (Kang ve ark.1984)

Albumine bağlı MRI kontrast madde: Rotasyonel korelasyon zamanının ikilemi adlı makalesinde; HSA, MRI kontrastı olarak tasarlananlarda dahil çeşitli molekülleri bağlar. Böylece proteinin rotasyonel taklası bu maddelerin invivo rölaksitivelere etkileyen olası parametrelerden biridir. Literatür HSA'nın rotasyonel korelasyon zamanı değeri üzerindeki aykırılıkları açığa kavuşturmuştur. Bu çalışmada proteinin τ_r ' si, HSA' ya güçlü bağlandığı bilinen küçük moleküllerin döteryum rölaksasyon oranının incelenmesi suretiyle belirlendi. Yaklaşık 20-22ns' lik değerler %4 HSA

çözeltileri için 310 K 'de elde edildi ve bunlar teorik kestirimlerle uyumlu bulundu (Luce Vander Elst ve ark. 2001).

Biyolojik akışkanların proton nmr rölaksasyon üzerindeki paramanyetik iyonlar ve pH etkisi makalesinde; Paramanyetik metal iyonların (gadolinium(III), manganese(II), chromium(III), iron(III), nickel(II), copper(II) ve cobalt(II)) çeşitli konsantrasyonları damıtılmış suyun proton manyetik rölaksasyon zamanını etkiler. Bu paramanyetik iyonlar eklenmek suretiyle %4 HSA ve köpek plazması vitroda incelendi. Suyun ve HSA' nın pH'ı 4 ile 8 arasında değiştirildi. Nükleer manyetik rezonansın rölaksasyon parametreleri T_1 ve T_2 sırasıyla inversion recovery ve spin echo radyofrekans kullanılarak 10.7 MHz de ölçülmüştür. Fe(III), Ni(II), Cu(II), ve Co(II) sadece çok küçük bir etkiye sahip iken Mn(II), Gd (III) ve Cr(III) varlığındaki suyun T_1 'i önemli derecede azalır. % 4 HSA ve köpek plazma Mn(II) ve Cu(II) T_1 üzerinde çok büyük bir etkiye sahiptir. Mn(II) T_1 'i büyük ölçüde kısaltırken nötral pH 'ta Gd(III) ve Cr(III), T_1 üzerinde çok küçük bir etkiye sahiptir. Metal iyonlarının tümü T_2 'yi T_1 'den daha az değiştiriyorlar. Çalışılan üç çözümdeki çeşitli iyonların neden olduğu proton rölaksasyon artışıdaki farklılıklar etkili manyetik momentte ki çeşitlilik nedeni ile; iyonun proteine bağlanma derecesi ve PH' taki değişimle ilişkili iyonların kimyasal formu ile ilgili olduğu öne sürülmüştür. Bunun sonucu olarak invivo çeşitli biyolojik sıvıların karmaşıklığı nedeniyle sadece invitro deneyleri kullanılarak invivo proton rölaksasyonu üzerine metal iyonların son etkisini tahmin etmek imkansızdır (Barnhart ve ark. 1986).

Manyetik rezonans görüntüleme kontrast madde olarak yeni mangan (II) komplekslerinin rölaksometrik değerlendirmesi için uygulama makalesinde; Benzyloxymethyl fonksiyonlukları taşıyan üç yeni Mn(II) kompleksi incelenmiştir ve bunların suyun rölaksasyon zamanlarını arttırma yeteneği detaylı incelendi. Bunlardan ikisi bir kordine su molekülü içerir ve yine bunlardan ikisi kontrast maddelerin rölaksitivitelerinden hafifçe farklı bir rölaksitivite gösterir. Bunun yanısıra bu mangan şelatlarında kordine edilen suyun değiş tokuş oranı octadentate ligandlı Gd (III) kompleksleri için daha önceki yıllarda rapor edilmiş değiş tokuş oranlarına göre bir merteye daha büyüktür. Bu sonuçlar düşük etkili manyetik momente rağmen Mn(II)

kompleksinin MRI görüntülemesi için kontrast madde olarak Gd(III) kompleksi yerine kullanılması geçerli bir alternatif olarak düşünülebilir (Aime ve ark. 2002).

Proton spin-örgü rölaksasyon zamanlarının manyetik alan bağımlılığı makalesinde; Dokulardaki su protonunun spin-örgü rölaksasyon oranının $1/T_1$ manyetik alan bağımlılığı, dokunun dönme yönünde hareketsiz olan bileşenlerinin rotasyonelinin protonlarına manyetik eşleşmesinden kaynaklanmıştır. Bunun sonucu olarak su protonunun manyetik alan bağımlılığı, dokunun katı bileşenlerinin $1/T_1$ oranı, alan bağımlılığının bir ölçüsüdür. Proton spin-örgü rölaksasyon oranı genelde kuvvet kanunu gibi temsil edilebilmiştir: $1/T_1 = Ae^{-b}$ (0.5-0.8) aralığında bir değer olarak bulunmuştur. Yazarlar göstermiştir ki: kuvvet kanunu proton dipol dipol eşleşmesini modüle eden biopolimerdeki omurgalar boyunca varolan yerel yapısal dalgalanmalardan doğmuştur. Proteinlerdeki protonlar euclidean boyutundan daha küçük olan bir kesirsel boyut ile tasvir edilen bir spin iletişim ağı şekillendirmiştir. Önerilen bu model; farklı su miktarlarının varlığında hareketsiz protein sistemlerinde ölçülen proton spin-örgü rölaksasyon oranı niceliksel olarak hesaplanmış ve dokulardaki dinamiksel heterojen sistemlerdeki proton spin-örgü rölaksasyon oranının parametrik bağımlılığını anlamak için önemli bir temel sağlamıştır (Korb and Bryant 2002).

İnsan serum albuminine bağlanan Mn(II) iyonunun 1H and ^{17}O rölaksometrik araştırmaları adlı makalede; Mn(II) iyonu HSA'ya bir tane güçlü bağ ve birçok hafif bağ üzerinden bağlanmıştır. Kuvvetli bağlanma yerinin Cd(II) ve Zn(II) vasıtasıyla daha önceden belirlenmiş bölgede bulunduğu gösterilmiştir. Mn(II)'nin HSA'ya bağlanması pH'a bağlı metal iyonun kordinasyonunda histidine kalıntılarının içeriği ile tutarlı olunmuştur. Manyetik alan şiddetinin fonksiyonu olarak $^1H; T_1$ ' in analizi ve ^{17}O sıcaklığın bir fonksiyonu olarak T_2 'nin analizi; paramanyetik rölaksasyon sürecine giren Mn(II)-HSA kompleksinin çeşitli parametreleri bulunmuştur. HSA'ya bağlanan mangan iyonu üç veya dört kordine edilen su moleküllerine sahiptir ki bunların ömürleri 298 K'de 20ns olarak hesaplanmıştır. İlginç olarak NMRD profilinin iyi bir fiti, sadece kordine edilen su moleküllerinin protonları iki harekete sahip oldukları zaman elde edilmiştir: Kordinasyon küresindeki suların hızlı yerel harekete ve tüm proteinle meydana gelen total harekete maruz kaldıkları belirlenmiştir (Silvio Aime ve ark. 2002).

Bazı mangan (II) komplekslerinin sulu çözeltilerindeki bağımlı alan proton rölaksasyonu: a New Interpretation adlı makalenin: Mn(II) kompleksleri varlığında su protonları için paramanyetik rölaksasyon artışının alana bağlı ölçümleri teorik modeller kullanılarak yakın bir süreçte yeniden yorumlanmıştır. Bu teorik modeller $S > 1$ için elektron spin rölaksasyonunun multiexponential olduğu dikkate alınıyor ve yine bu modeller komplekste bulunan sıfır alan yarılması ve elektronik zeeman etkileşimi arasındaki rasgele ilişki için geçerli olduğu belirtiliyor (Danuta Kruk ve Jozef Kowalewski).

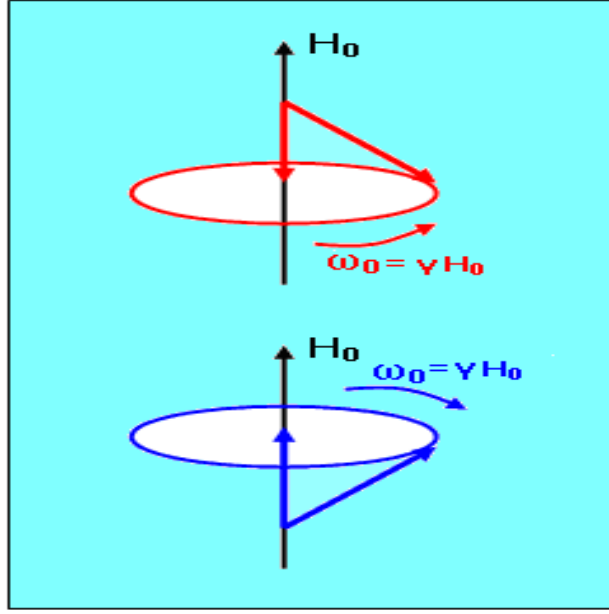
Paramanyetik Metaloproteinlerin NMR Spektroskopisi: Bu makale NMR spektroskopisi vasıtasıyla paramanyetik metalloproteinlerin çözelti içindeki yapısal tayini ile ilgilenmektedir. On yıl öncesine kadar bu proteinlerin NMR araştırmalarında ki yapı belirlenmesi için uygun olmadığına inanılmış ancak sonunda yeni deneyler ve software protokoller geliştirilmiş ve bunlar bu araştırmada kullanılmıştır. Bu makalede her bir metal iyonuna göre deneylerin optimizasyonu için ipucu verilmiştir. Netice olarak bu bölüm NMR spektroskopinin tüm alanlarında yeni bir bölüm meydana getiren ve paramanyetiklerin negatif etkisini azaltan ^{13}C direk dedeksiyonu üzerine yapılmış önemli bir ilerlemeye adanılmıştır (Bertini ve ark.2005).

2.1. Kuramsal Kısım

2.1.1. Temel NMR Kuramı

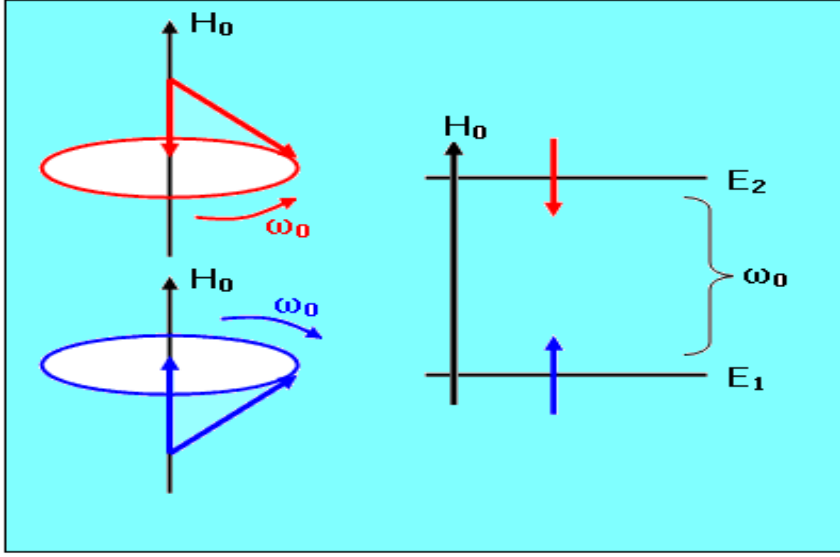
2.1.1.1. MR' a Uygun Bir Atomun Dış Manyetik Alan İçindeki Davranışı ve Enerji Durumları

Çekirdeğinde spin bulunan bir atom, bir dış H_0 manyetik alanına konulduğunda; Spin H_0 etrafında ya bir yönde (koni yüzeyinde) ya da diğer yönde (ters koni yüzeyinde) döner. Dönme hızı (ω_0), H_0 alan şiddeti ile orantılıdır ($\omega_0 = \gamma H_0$, γ : jromanyetik oran). Manyetik alana yerleştirilen insandaki ya da tüpteki tüm protonlar da, ya koni ya da ters koni yüzeyinde dönerler. Bunlardan sadece iki tanesini zihnimizde yan yana getirsek, Şekil 2. 1'deki hareket diyagramını elde ederiz.



Şekil 2.1. Bir I spinin manyetik alan içindeki hareketleri

Şekil 2.1.' de gösterilen spinler, tüp içinde ya da insan bedeninde çok farklı yerlerde yer alabilir. Örneğin biri gözün bulunduğu yerde dönerken, diğeri kulağın bulunduğu yerde dönebilir. Ya da biri tüpün üst kısmında dönerken, diğeri tüpün alt kısmında dönüşünü yapabilir. Bunlar, sadece hareket durumları dikkate alınarak, yan yana getirilince; meydana gelen resim bir hareket diyagramı olmaktadır. Kuantum mekaniksel hesaplardan anlaşıldığı üzere, koni yüzeyinde dönüş yapan (I_z bileşeni H_0 'a paralel) spinin enerjisi az; ters koni yüzeyinde dönüş yapan (I_z bileşeni H_0 'a zıt paralel) spinin enerjisi ise daha fazladır. İstatistik fiziğe göre, enerjisi az olan durum daha tercihlidir ve daha fazla sıklıkla meydana gelir. Şekil 2.1.'deki hareket diyagramını enerji seviyelerini de kapsayacak şekilde genişletebiliriz (Şekil 2.2.)



Şekil 2.2. Ho alanı içine konulan bir I spininin Enerji Seviyeleri Diyagramı

Bu diyagramdaki E_1 , enerjisi az olan spini yani koni yüzeyinde dönen spini göstermektedir. Diyagramdaki E_2 ise enerjisi fazla olan spini yani ters koni yüzeyinde dönen spini göstermektedir.

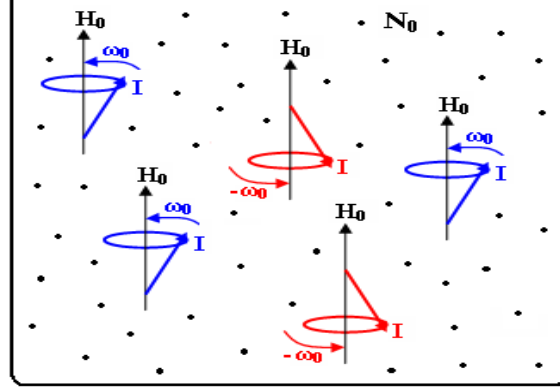
Şekil 2.1. ya da Şekil 2.2.'nin, tüp veya beden içindeki spinin gerçek konumları ile ilgili olmadığını önemle belirtelim. Bunları herhangi iki spinin Ho içindeki hareketini anlatıgını; hareketin enerji ile eş anlamlı olduğunu yani hareketten bir enerji meydana geldiğini de önemle belirtelim. Bu nedenle Şekil 2.2.'ye hareket-enerji diyagramı ya da sadece enerji seviyeleri diyagramı denilebilir.

H_0 var ise enerji seviyeleri de vardır H_0 yok olduğunda enerji seviyeleri de yoktur. Yani enerji seviyelerinin varlığı, H_0 alanının varlığının peşin kanıtıdır. Bu gerçekten hareketle, bazı karışık şekillerde enerji seviyelerinin yanına H_0 konulmamıştır.

2.1.1.2. Vücut Sıvılarındaki Çıplak Atomların Dış H_0 Manyetik Alandaki Davranışı

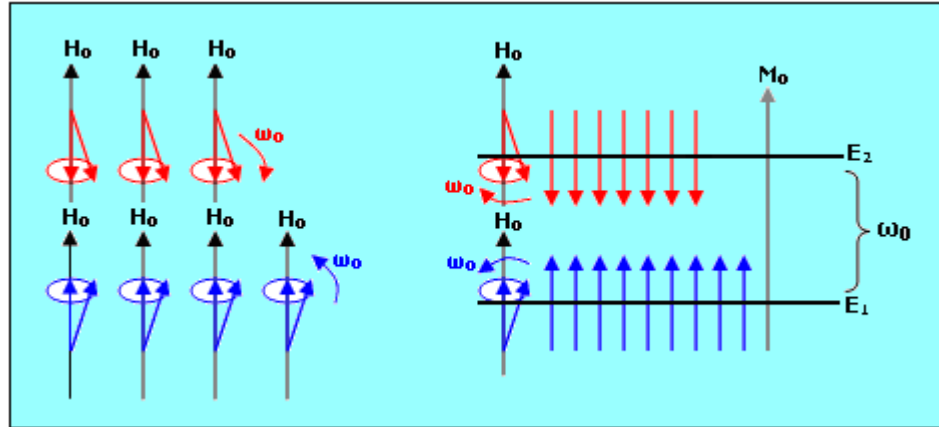
Bir dış H_0 alanı içine yerleştirilen spinler bu alan etrafında ya koni yüzeyinde ya da ters koni yüzeyinde dönerler. Bu hareketleri yapan spinlerin tümünü, gerçek yerlerinde resmetmek imkânsızdır. Ancak bu spinlerin bazılarının gerçek yerleri, tümünü temsilen, Şekil 2.3.'deki gibi resmedilebilir. Şekil 2.3.'ün içindeki ilave

noktalar, gerçek spin sayısının büyük bir N_0 (Avagadro sayısı) mertebesinde olduğunu anlatmaktadır.



Şekil 2.3. H_0 alanı içindeki N_0 tane spin hareketinin temsili gösterimi

Daha önce söylendiği gibi koni yüzeyinde dönen spinler az enerjili ve ters koni yüzeyinde dönen spinler ise daha fazla enerjili olmaktadır. Aynı hareket ya da aynı enerjiye sahip olan spinlerden bazıları yan yana dizdirilirse, Şekil 2.4.'deki gibi, temsili bir hareket-enerji diyagramı elde edilir.



Şekil 2.4. H_0 alanı içindeki N_0 tane spinin hareketi ve enerji seviyeleri

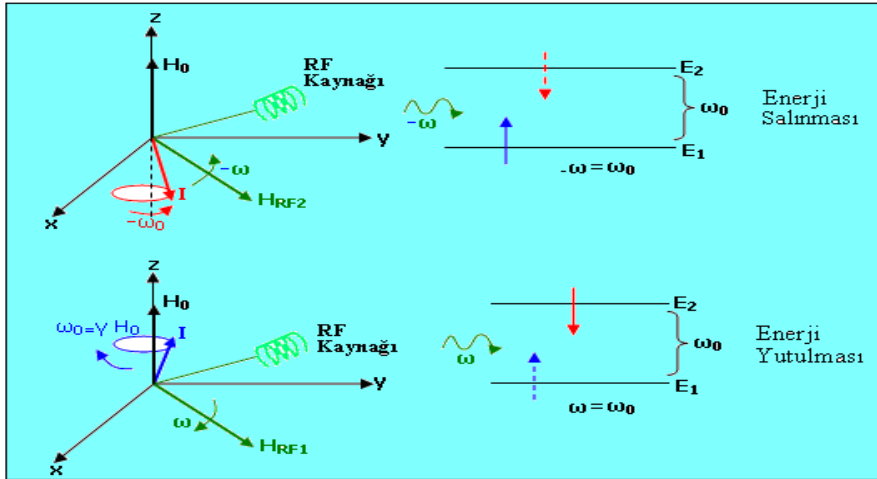
Şekil 2.4.'ün hareket diyagramının alt sırasında yer alan tüm düşük enerjili haller 4 tane spin çizimi ile; üst sırada yer alan tüm yüksek enerjili haller ise 3 tane spin çizimi ile temsil edilmiştir. Ancak bunun bir temsili gösterim olduğunu ve her bir enerji

seviyesinde avagadro sayısı ile mukayese edilebilir miktarda spin bulunduğunu hiçbir zaman unutmamalıyız.

Şekil 2.4.'deki alt çizgideki okların, düşük enerjili harekete sahip spinleri yan yana gösterdiğini; üst çizgideki okların ise yüksek enerjili hareketlere sahip spinleri yan yana gösterdiğini hatırlatmakta yarar vardır. Diğer bir söyleyişle, E_1 enerjili spinlerin sayısı N_1 ; E_2 enerjili spinlerin sayısı N_2 olmaktadır.

2.1.1.3. RF Pulsu (H_{RF}) ve Uygulanışı

RF pulsu enerji taşıyan bir dalgadır ve şu şekilde \square sembolize edilir. RF pulsunun bir tek salınımı, bir spin tarafından şöyle algılanır: Spini, laboratuvar (x,y,z) sisteminin başlangıç noktasına koyalım. Gözlem altındaki spin olarak da nitelendirilen bu spin, alanı etrafında $\omega_0 = \gamma H_0$ hızı ile döner. RF dalgası ise, RF kaynağı tarafından, x-y düzleminde ω hızı ile dönen bir alanı şeklinde üretilir. $\omega = \omega_0$ a eşit olunca spin, H_1 ' den enerjiyi alır. Alt enerji seviyesinden üst enerji seviyesine geçer. $\omega = -\omega_0$ a eşit olunca, üst seviyede olan bir spin alt seviyeye iner. Durum, Şekil 2.5.'deki gibi gösterilebilir.



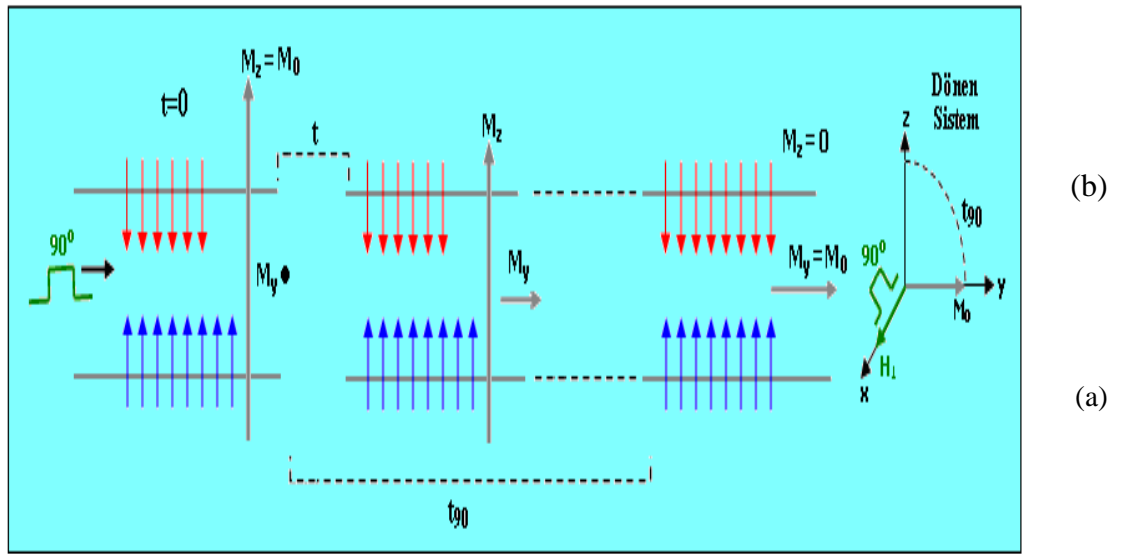
Şekil 2.5. RF uygulanması sonucu bir spinin enerji soğurması ya da salması

$\omega = \omega_0$ durumuna rezonans denir. Rezonans esnasında H_{RF} 'in enerjisi, iki seviye arasındaki enerji farkına eşittir ($\hbar\omega = E_2 - E_1$). Şekil 2.5.'de, RF alanını üreten kaynağın yeri temsilen verilmiştir. Esasında RF alanı, H_0 'ı üreten bobinin üzerine farklı şekilde sarılmış, diğer bir bobin tarafından üretilir. $H_{RF} \ll H_0$ ve H_{RF} , H_0 'a diktir.

2.1.1.4. 90° Pulsu

Spin gözlüğü ile bakıldığında 90° pulsu, alt ve üst seviyedeki spin sayısını eşitlemeye yarayan enerjidir. Bu enerjinin uygulanışının bir süresi vardır ki buna da 90° pulsu denir. Pulsun uygulanışı sürecinde, üst seviyedeki spin sayısı giderek artar ve en sonunda iki seviyenin nüfusu eşit hale gelir. (Şekil 2.6.)

Mıknatıslanmayı gören gözlükle bakıldığında ise, rezonans esnasında, z-yönündeki bileşke alan sıfır olur. Sadece H_1 kalır ve z- yönündeki mıknatıslanma M_0 , H_1 etrafında döner.

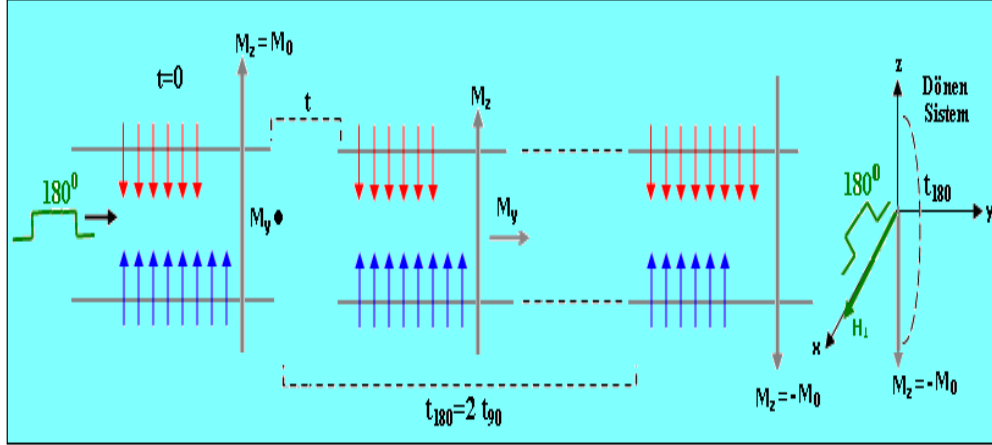


Şekil 2.6. Bir spin sistemine 90° pulsunun uygulanışı

Bu dönüş, M_z bileşenini giderek küçültür. Dönen mıknatıslanma y -ekseni yönüne yattığında $M_z = 0$ ve $M_y = M_0$ olur (Şekil 2.6.). Alt ve üst enerji seviyelerindeki spin sayılarının eşit olması haline saturasyon denir. Bu esnada $M_0 = 0$ olmuştur.

2.1.1.5. 180° Pulsu

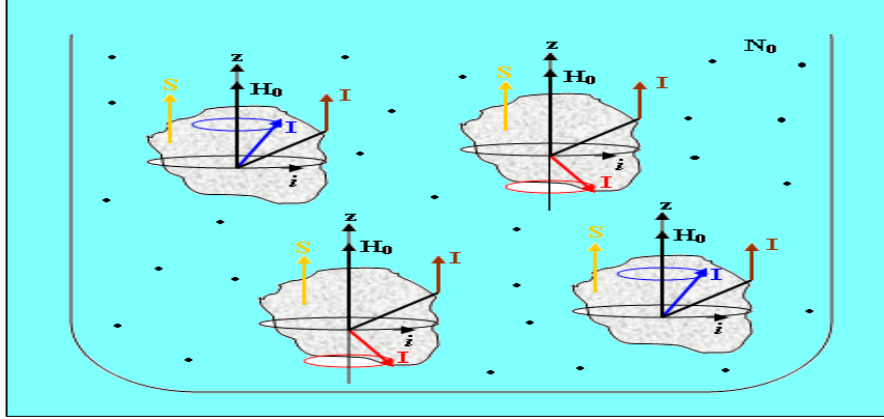
Alt seviyede fazla spinlerin tümünü üst seviyeye geçiren puls olmaktadır. Bu işlem sonunda M mıknatıslanması H_0 'a zıt paralel olur. Bu durum Şekil 2.7.'de görülüyor.



Şekil 2.7. Bir spin sistemine 180° pulsunun uygulanışı

2.1.1.6. Spin Sisteminin Çevresi

Bir örneğin içindeki spin topluluğu, şimdiye dek anlatıldandaki gibi, izole spinlerden ibaret değildir. Spinler daima bir molekülün içinde yer alırlar. Böyle bir spinin çevresi ise, gözlem altında olduğu düşünülen protona komşu I ya da komşu S (elektron spini) ve gözlem altındaki I' nın çevresindeki elektronik akımlar (i) olmaktadır. Spin topluluğu bu çevrenin içine gömülüdür. Bu durumun temsili resmi Şekil 2.8. 'deki gibi verilebilir. Avogadro sayısı kadar eşdeğer molekül içeren örnek, burada birkaç molekül ile anlatılmıştır. Her bir molekül, örnek içinde belli bir pozisyonadır. Molekül içinde yer alan spinler de, H_0 ile ve de komşuları olan (I,S,i) ile etkileşmektedir.



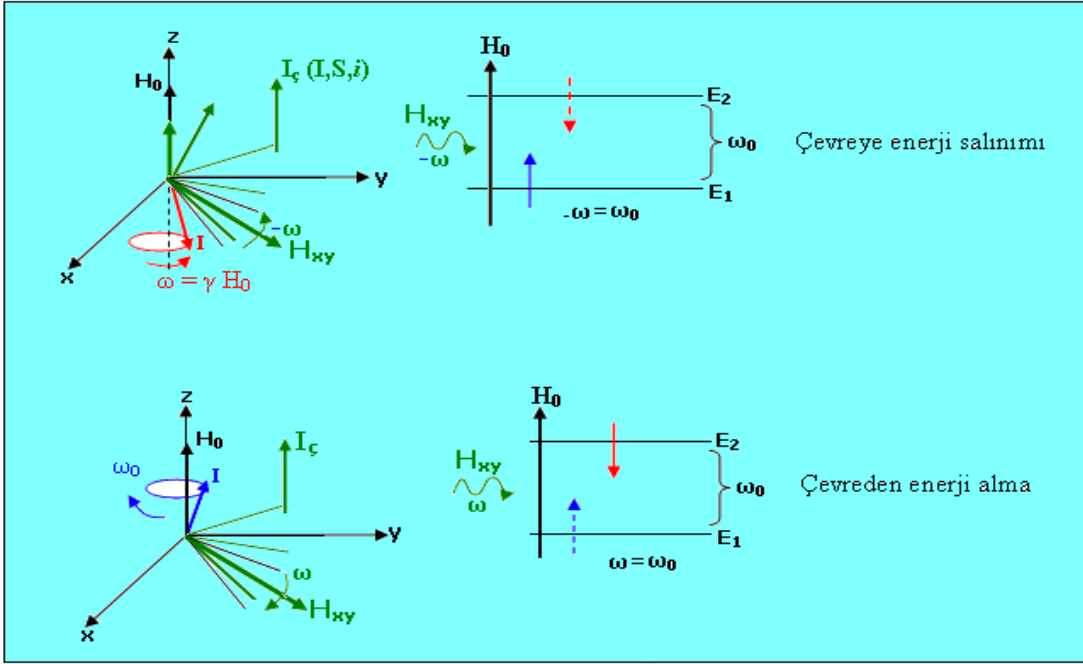
Şekil 2.8. Spin sisteminin çevresi

Görüldüğü üzere gözlem altındaki spinin komşuları, gözlem altındaki spininin bulunduğu yerde, bir yerel alan kurarlar. Söz konusu yerel alanın iki bileşeni vardır. Bir bileşen z-yönündedir. Diğeri ise x-y düzleminde yer alır. Gözlem altındaki spin, bu yerel alan bileşenleri ile etkileşir.

Şekil 2.8.'deki spin sistemi içinde yer alan her bir spin, sistemin çevresinde çizildiği gibi, bir molekülün içindedir. Bu sistemdeki her bir spin, yine çevrede çizildiği gibi, komşularının kurduğu yerel alan ile etkileşme halindedir.

2.1.1.7. Bir Spin Çevreden Nasıl Enerji Alır ve Çevreye Nasıl Enerji Verir?

Gözlem altında sayılan bir spinin çevresinin molekülde bulunan diğer bir I veya S ya da i akımı olabileceğini söyledik. Kolaylık olsun diye komşu çevreyi I_c ile niteleyelim. I_c gerektiğinde I, gerektiğinde S, gerektiğinde i ya da gerektiğinde bunların 2 veya 3 tanesi olabilmektedir. Daha önce söylendiği gibi çevre, gözlem altındaki spinin bulunduğu yerde bir Hyerel alanı kurar. Bu yerel alanın z-bileşeni H_0 alanına eklenir (veya çıkarılır) ve H_0 alanını değiştirir. Hyerel alanının xy-düzlemindeki bileşeni ise, I_c nin molekül üzerindeki bağlı hareketleri nedeniyle, değişik ω frekanslarında döner. H_{xy} ' nin $-\omega$ frekansı, ω_0 a eşit olunca, spin çevreye enerjiyi salar ve alt düzeye iner. H_{xy} ' nin ω frekansı, ω_0 a eşit olunca, spin çevreden enerji alır ve üst düzeye çıkar. Durum Şekil 2.9.'daki gibidir.

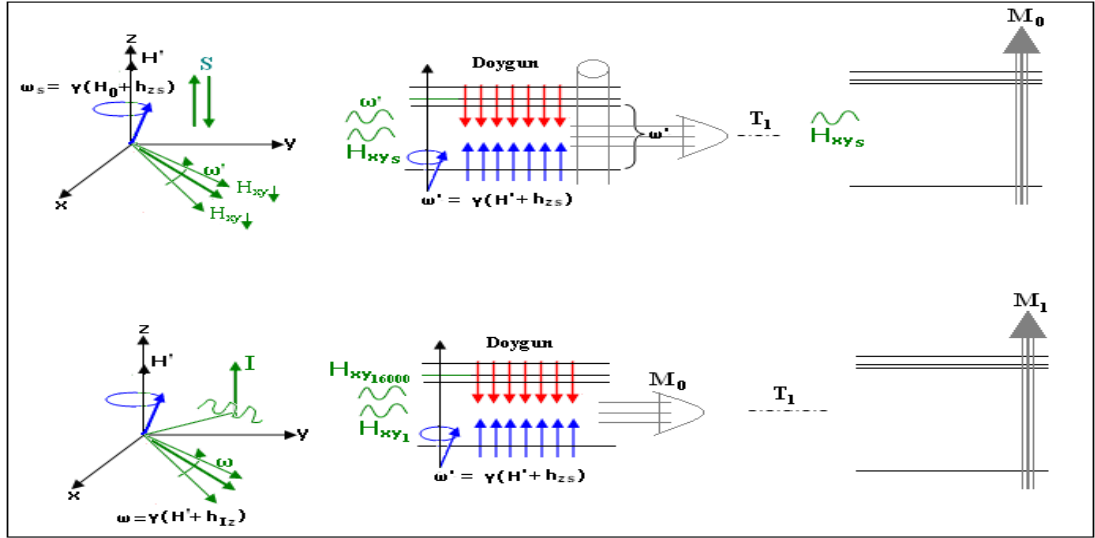


Şekil 2.9. Çevrenin etkisi ile bir spinin enerji soğurması ya da salması

Görüldüğü üzere Hrf, enerji alış-verişine nasıl yol açıyorsa; Hç de aynı mekanizme ile enerji alışverişine yol açar. Ancak bu kez, İstatistik fizikten yapılan hesaplamalara göre, bir spinin yukarıdan aşağıya inme olasılığı (w_0), aşağıdan yukarı çıkma olasılığı ise (w) olduğundan $w < w_0$ olmaktadır.

2.1.1.8. Sıcak Spinlerin Çevreye Enerji Aktarması ve T_1 Süreci

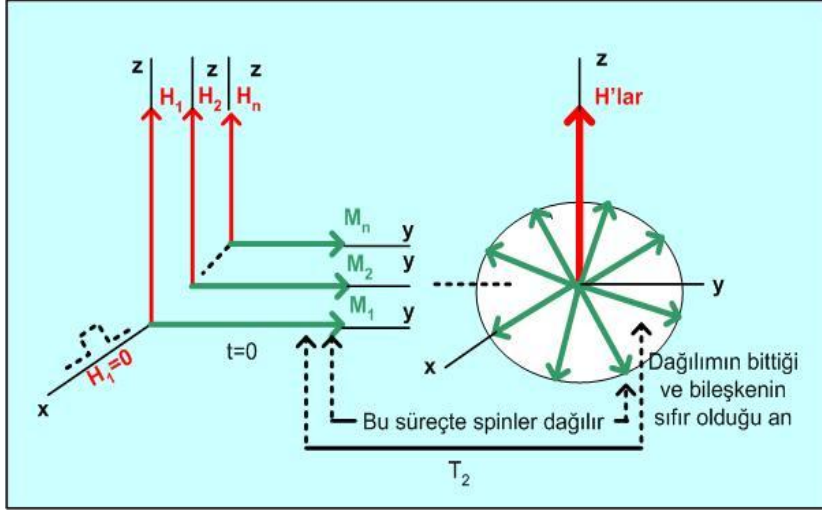
RF uygulaması sonunda sistem doyum (iki seviyenin nüfusu eşit) durumunda bulunur. Bu spinlerin çevrelerinde S varsa, S in kurduğu yerel alanın Hxy bileşeni; komşu I varsa, I in kurduğu yerel alanın Hxy bileşeni; i varsa, i in kurduğu yerel alanın Hxy bileşeni; spin sisteminin enerji seviyeleri arasında geçişlere yol açar. Saniye başına aşağı inen spin sayısı, yukarı çıkandan fazla olacağından; spin sistemi enerji kaybeder ve orijinal denge durumuna döner. Bu durum Şekil 2.10.'da görülüyor.



Şekil 2.10. T_1 spin örgü durulma zamanının oluşum süreci

2.1.1.9. Spinlerin Defaze Olması ve T_2 Süreci

T_1 süreci anlatılırken, sürece daha çok spin gözlüğünden bakıldı. T_2 sürecine ise makroskopik gözlükten bakmak daha öğreticidir. 90 derece puls kesildikten sonra, laboratuvar sistemine döndüğümüzü belirtmiştik. Laboratuvar sisteminde görebileceğimiz alanlar, z-boyunca yönelmiş, $H_1, H_2, \dots, H_{16000}$ alanları olmaktadır. Bunlarla birebir ilişkili $M_1, M_2, \dots, M_{16000}$ mıknatıslanmaları da artık y- yönüne yatmıştır. M_1, H_1 etrafında ω_1 ; M_2, H_2 etrafında ω_2 ; , M_{16000}, H_{16000} etrafında ω_{16000} hızı ile döner. Bu hızlar farklı olduklarından $M_1, M_2, \dots, M_{16000}$ zamanla defaze olur. Durum, Şekil 2.11.' de gösterilmiştir.



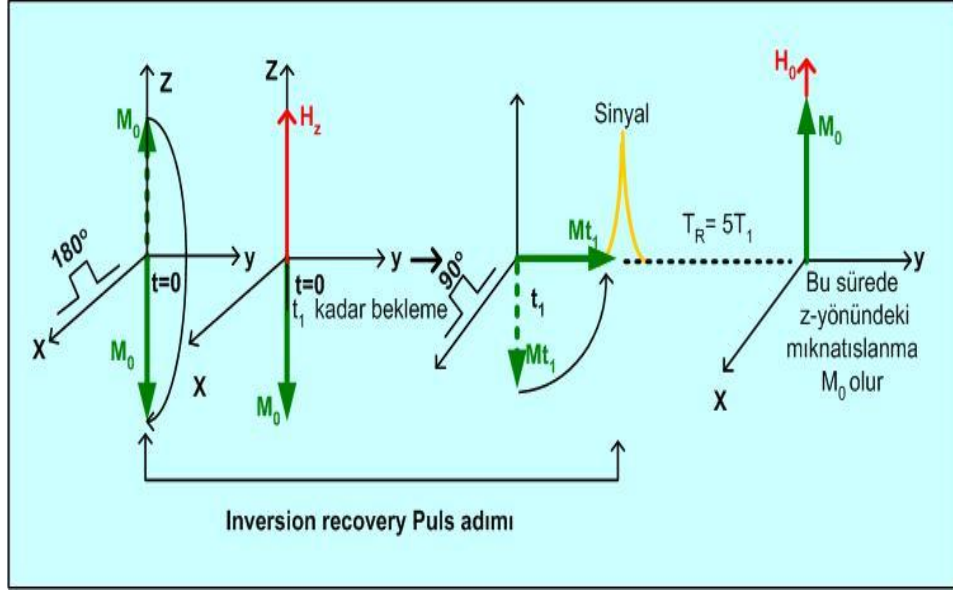
Şekil 2.11. T_2 spin-spin durulma zamanının oluşum süreci

Tüm spinlerin aynı yönde olduğu durumdan (ilk durum), spinlerin rastgele dağıldığı (son durum) kadar geçen süreye T_2 spin-spin durulma zamanı denir.

2.2. Puls Türleri ve Puls Adımları

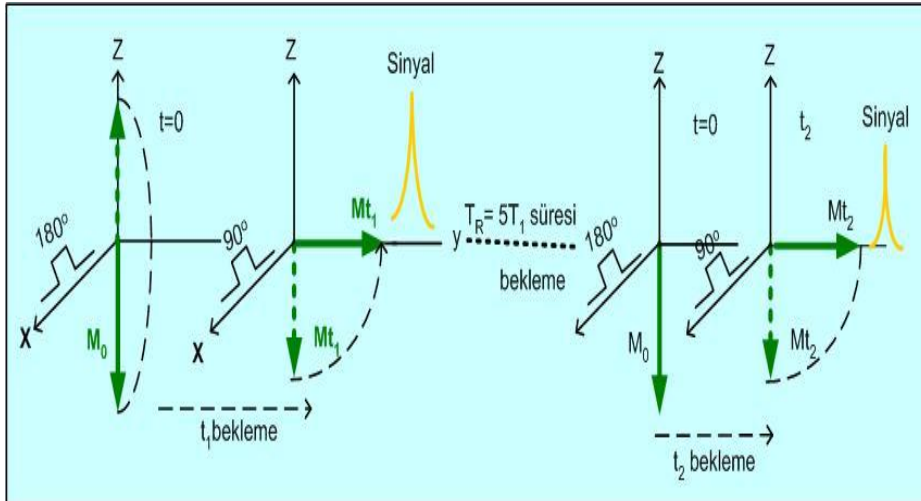
2.2.1. Inversion Recovery Puls Adımları

Inversion recovery puls adımı (180° puls uygulama- M nin kısılması için bekleme- 90° puls uygulama- sinyal ölçme ve z yönündeki M nin ilk M_0 değerine varması için bekleme) aşamalarını kapsar. Bu adım T_1 ölçümünde kullanılır. Bir tek adımın aşamaların açıklanması şöyledir: Örneğe önce 180 derece puls uygulananak mıknatıslanma terslenir ve 180 derece puls kesilir. Sonra bir t_1 süresi beklenerek z -yönündeki mıknatıslanmanın biraz kısılması sağlanır. Bu süreye inversion delay denir ve t_1 ile ya da τ ile gösterilir. Sonra örneğe 90 derece puls uygulananak, mıknatıslanma y -yönüne çevrilir ve M_{t_1} sinyali ölçülür. Ölçmeden sonra mıknatıslanmanın ilk M_0 değerine ulaşması için bir yeteri kadar uzun bir süre beklenir. Bu süreye de puls repetition time denir ve T_R ile gösterilir. Bu işlemler sonunda 1. adımın uygulanması bitmiştir. Bu adım Şekil 2.12.'deki gibi resmedilebilir:



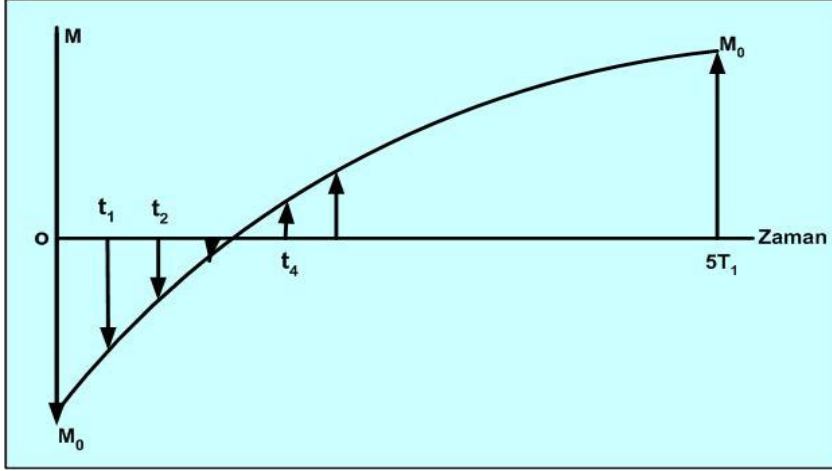
Şekil 2.12. Bir tek Inversion Recovery Puls adımı

Yukarıda anlatılan (180° puls uygulama $-M_z$ in değişmesi için bekleme- 90 derece puls uygulama-sinyal ölçme $-z$ -yönünde M_0 kurulması için T_R kadar bekleme) adımı, sadece bekleme süreleri artırılarak (t ya da t_1) peşpeşe uygulanır ve Mt_1, Mt_2, \dots, Mt_n sinyalleri de peşpeşe elde edilir. Peşpeşe adım uygulamaları Şekil 2.13.' deki gibi resmedilir:



Şekil 2.13. Inversion Recovery Puls adımının peş peşe uygulanması

Mt_1, Mt_2, \dots, Mt_n sinyallerinin zamana karşı grafiğe geçirilmesinden bir IR eğrisi (Şekil 2.14.); bu eğrinin temsil ettiği bağıntıdan da T_1 süresi elde edilir.



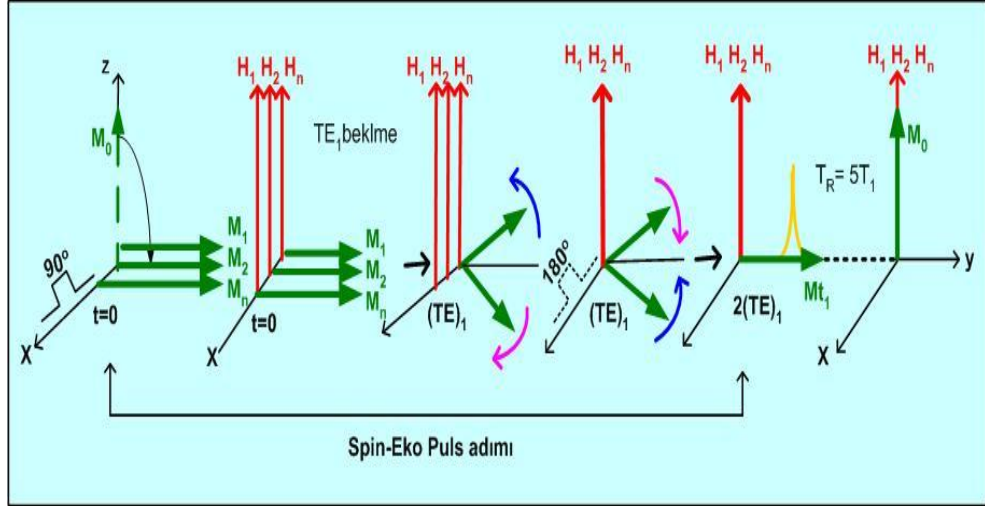
Şekil 2.14. Manyetizasyonun IR metodu ile geri kazanımını anlatan eğri

Bu eğri aşağıdaki formüllere uyar ve T_1 bu formülden elde edilir,

$$M_z = M_0(1 - 2e^{-t/T_1}) \quad (2.4.)$$

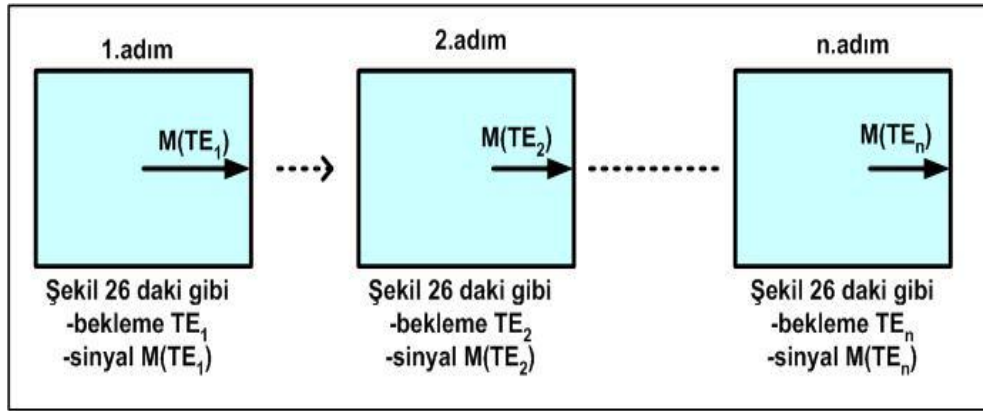
2.2.2. Spin-Echo Puls Adımı

Bu adım (90 derece pulsu uygulama – M_{xy} nin kısılması bir bekleme- 180 derece pulsu uygulama – aynı süre bekleme - sinyal ölçme - z -yönündeki M_z nin ilk M_0 değerine ulaşması için bekleme) aşamalarını kapsar. Bu aşamaların açıklanması şöyledir: Örneğe önce 90 derece pulsu uygulanarak manyetizasyon y -eksenine yatırılır. Sonra bir T_e süresi beklenerek y -yönündeki manyetizasyonun biraz kısılması sağlanır. Bu T_e bekleme süresine echo time denir. Sonra örneğe 180 derece pulsu uygulanarak defaz olan spinlerin yönleri terslenir ve daha sonra T_e kadar beklenerek spinlerin Y - yönünde toplanması sağlanır ve $M(T_{e1})$ sinyali ölçülür. Sonra da z -yönündeki manyetizasyonun ilk M_0 değerine ulaşması için T_R süresi kadar beklenir. Bu adımın aşamaları Şekil 2.15.'te verilmiştir.



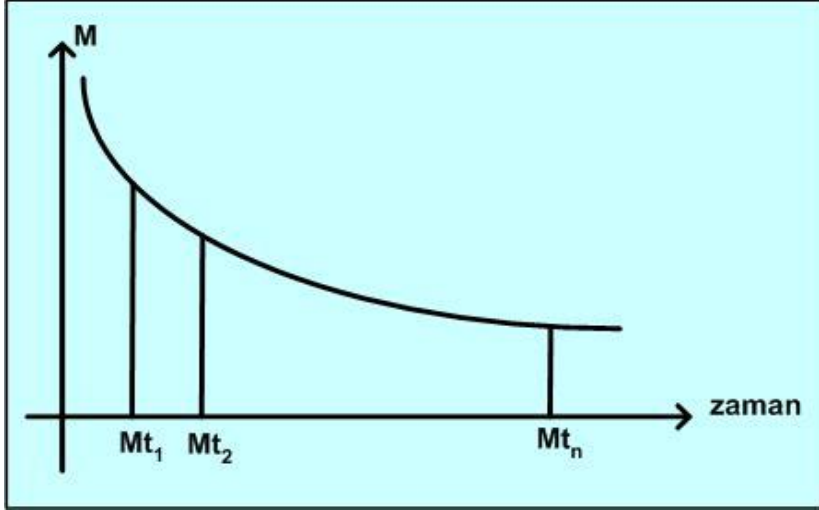
Şekil 2.15. Bir tek Spin-Echo puls adımı

Aynı adım, sadece T_e bekleme süreleri arttırılarak peşpeşe uygulanırsa; $M(T_{e1}) M(T_{e2}), M(T_{e3}), \dots M(T_{en})$ sinyalleri bulunur. Durum Şekil 2.16.'daki gibi olur.



Şekil 2.16. Peşpeşe uygulanan SE adımları sonucu sinyallerin gitgide küçülmesi

Bu sinyallerin T_e zamanlarına karşı grafiğe geçirilmesinde aşağıdaki Şekil 2.17. ile gösterilen spin-echo bozunum eğrisi elde edilir.



Şekil 2.17. Peşpeşe uygulanan eko adımları sonucu oluşan SE bozunum eğrisi

Bu eğri aşağıdaki formüllere uyar ve T_2 bu formülden elde edilir,

$$M_{xy} = A e^{-t/T_2} \quad (2.5.)$$

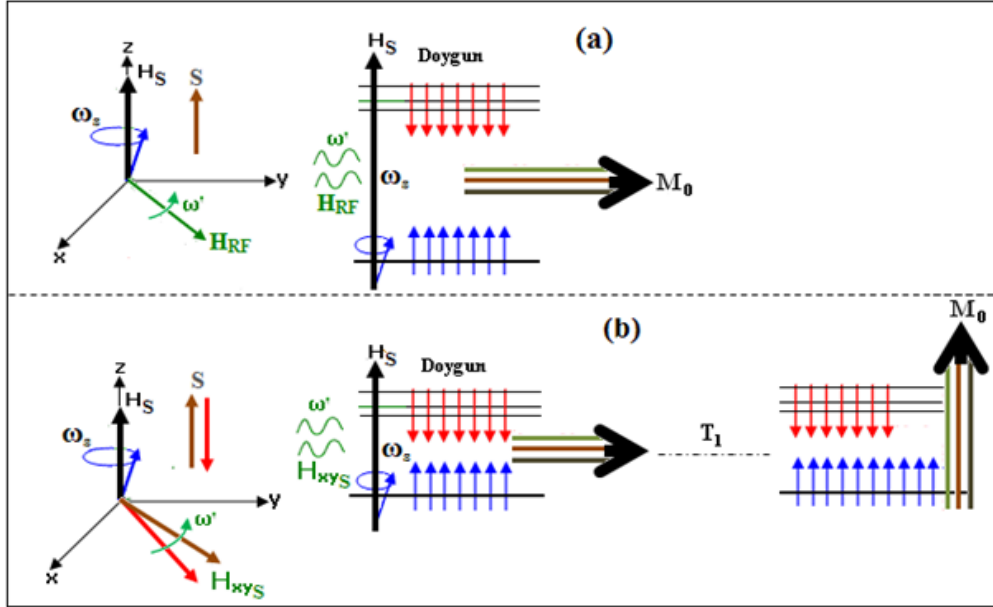
2.3. Rölaksasyona Yol Açan Bazı Önemli Etkileşme Türleri

Gözlem altındaki spine komşu $I\gamma$ 'nin (I ya da S ya da i akımı), gözlem altındaki spinin bulunduğu yerde kurduğu yerel alanın iki bileşeni vardır. Bu bileşenlerden biri z-yönündeki H_0 dış manyetik alanına ekleniyor ve H_0 'ı değişik büyüklüklerde farklılaştırır. Diğer bir söyeyişle, H_0 farklılaşmaları kimyasal kayma, spin spin yarılmaları, dipolar genişleme ve T_2 durulması olarak karşımıza çıkar. Yerel manyetik alanların diğer bileşeni ise, x-y düzleminde bulunan ve $H_{xy\gamma}$ ya da H_{xyk} olarak nitelediğimiz bileşendi. Buradaki k; çevrenin kısaltmasıdır. Komşu anlamına gelmektedir.

2.3.1. Paramanyetik Rölaksasyon

H_2O ya da tek başına CH_2 ya da tek başına CH_3 içeren gibi tek çevreli bir çözeltilimiz olsun. Bu çözelti $Mn(II)$, $Fe(III)$, $Cu(II)$ vesaire gibi iyonlarda içersin. Bu tek çevredeki spin sistemi RF yoluyla saturasyona getirilmiş olsun. Bu demektir ki söz konusu çevreye ait enerji seviyeleri doygun vaziyettedir ve bu seviyelere ait miktatıslar

da y yönüne yatmıştır. Spin sisteminde yer alan her bir spinin komşuluğundaki iyonların S spinleri, I'lerin bulunduğu yerde yerel alan kuruyorlardı. Bu yerel alanın z-bileşeni sinyal kaymasına yol açarken, x-y düzlemindeki bileşeni ise durulmaya yol açmaktadır. Bu durumu Şekil 2.18. üzerinde ayrıntılı anlatılmıştır:



Şekil 2.18. Paramanyetik iyonlar yolu ile T_1 durulmasının oluşumu

Şekil 2.18. Hrf'in uygulandığı an görülüyor ve tüpün içi S spininin seviyeleri arasındaki geçişlere göre, temsilen düzenlenmiştir. Şekil 2.18.'de görüldüğü gibi, gösterilmeyen komşunun kurduğu yerel alanlar, H_0 alanını 16000 kez farklılaştırdığı için, S spininin enerji seviyeleri de 16000 kez ayrılaşmıştır. Bu 16000 çizgiye aşağıdan yukarıya, 1. ayrık çizgi, 2. ayrık çizgi,...,16000. ayrık çizgi olarak isimlendirebiliriz. S spininin enerji seviyelerine ait en alt ayrık çizgi ile alt seviye arasındaki gidiş gelişi 1. hareket türünü oluşturur ve N1 spin bu tür geçişler yapar. S spininin 2. ayrık çizgisi ile alt seviye arasındaki gidiş gelişi 2. hareket türünü oluşturur ve N2 spin bu tür geçişler yapar. Böyle gidersek, S spininin en üst ayrık çizgisi ile alt seviye arasındaki gidiş gelişi n. hareket türünü oluşturur ve Nn spin bu tür geçişler yapar.

Şimdi dikkatimizi tüpün en üst kısmına temsilen yerleştirilen, 1. tür hareketler ve bunların etkilerine yoğunlaştıralım. S spininin 1. ayrık çizgiye yerleşmesi, I' nın bulunduğu yerde, H_{xy1} alanını kurar ve alt enerji seviyesine inmesi ise H_{xya} alanının

kurar. Bu alanlar, S nin aşağı inip –yukarı çıkmaları nedeniyle, zamana ve w' frekansına bağlı olur. $w'=w_1$ olunca, I spini bir seviyeden diğerine geçer. Şimdi bu geçiş sürecini, şeklin b kısmında görüldüğü üzere, N1 tane spin için açıklayalım. Seviyeler arasında birim zamanda geçiş olasılığı $H_{xy}(t).H_{xy}(t')$ ile orantılıdır. Aynı olay 2, 3.,..... n.ayrık çizgiler için de tekrarlanınca alanlar arasındaki ilişkiler için $Ha(t)H_P(t)_{1.bölge}$ $Ha(t)H_P(t)_{2.bölge},....., Ha(t)H_P(t)_{n.bölge}$, olarak verilir. Örneğin rölaksasyon zamanını bulmak için bunların ortalamasını almak gerekir. Yani sadelik için

$$1/T_1 \propto [\text{ortalama} (Ha(ta)Hp(tn))] \quad (2.6.)$$

gibi yazılabilir. Ortalama ($Ha(t)Hp(t)$) ifadesi, yine ta ve tn den bağımsızdır. Bu olgu da

$$\text{ortalama} (Ha(ta)Hp(tn)) =G(\tau) = \text{Ortalama} H(t)H(t+\tau)$$

şeklinde yazılmasına yol açar. $G(\tau)$ üzerinden işlemler yapılırsa $J(\omega)$ ' lar cinsinden rölaksasyon formülleri elde edilir. Burada; $J(\omega)$

$$J(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\tau) e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (2.7.)$$

şeklinde olup $G(\tau)$, nun Fourier dönüşümüdür. $1/T_1$ ' için en basit modeldeki tam formülü

$$1/T_1 = \int G(t) e^{-t/\tau} dt \quad (2.8.)$$

şeklinde verilebilir. Tam formülleri ise,

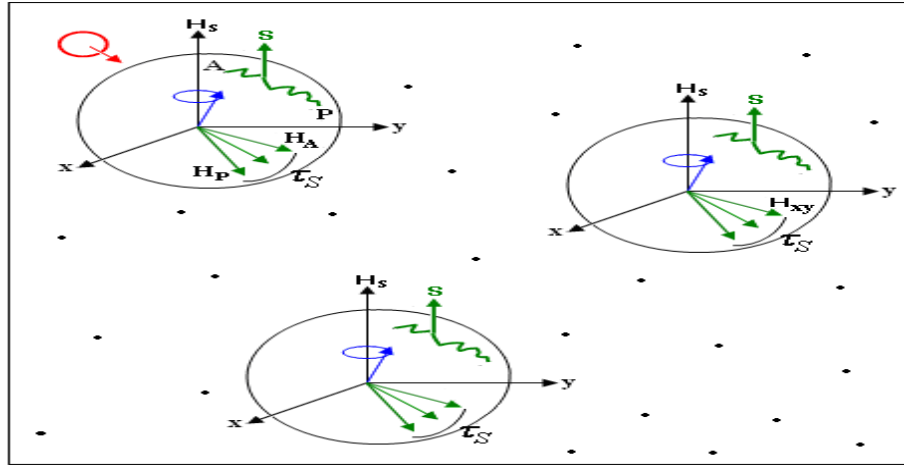
$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r^6} \left(\frac{\tau}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + \omega_I^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau^2} \right) \quad (2.9.)$$

$$\frac{1}{T_2} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{20r^6} \left(4\tau + \frac{\tau}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + \omega_I^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + \omega_S^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau^2} \right)$$

(2.10.)

bağıntılarıyla verilir.

Moleküller Brown hareketleri yaptıklarından, komşu molekülün gözlem altındaki moleküle çarpması yüzünden de, S spini I'ye göre bağıl hareket yapabilir. Söz konusu bağıl hareketler de, H_{xy} alanları kuruyordu. Bu durumu şekil 2.19.'da gösterelim.

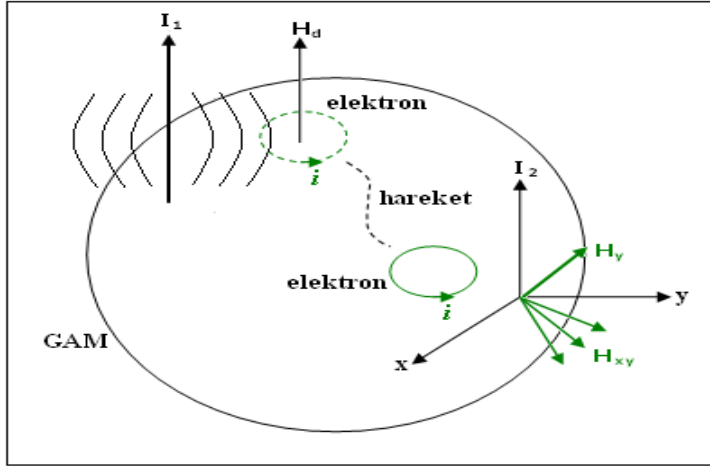


Şekil 2.19. Brown hareketleri sonucu oluşan H_{xy} alanları ve bunlar arasındaki ilişkinin süresi olan τ zamanı

Bu H_{xy} lerin ardışık değerleri arasında ilişkinin olduğu τ_s ilgi zamanı da vardır. Ancak bu H_{xy} ler, S spininin enerji seviyelerini değiştirmesi nedeniyle meydana gelen H_{xy} ler kadar etkin değildir.

2.3.2. Skaler Etkileşme

Saturasyon durumunda bulunan bir sistemi tekrar denge durumuna götüren bir etkileşme türü de, iki benzer I spin arasında, elektronlar aracılığıyla meydana gelen etkileşmedir. Şekil 2.20.'de görüldüğü üzere, bu tür etkileşmenin bir türünde, çevre olan I çekirdeği elektronu etkiler ve etkilenmiş elektron ise gözlem altındaki spinin bulunduğu yerde bir alan kurar.

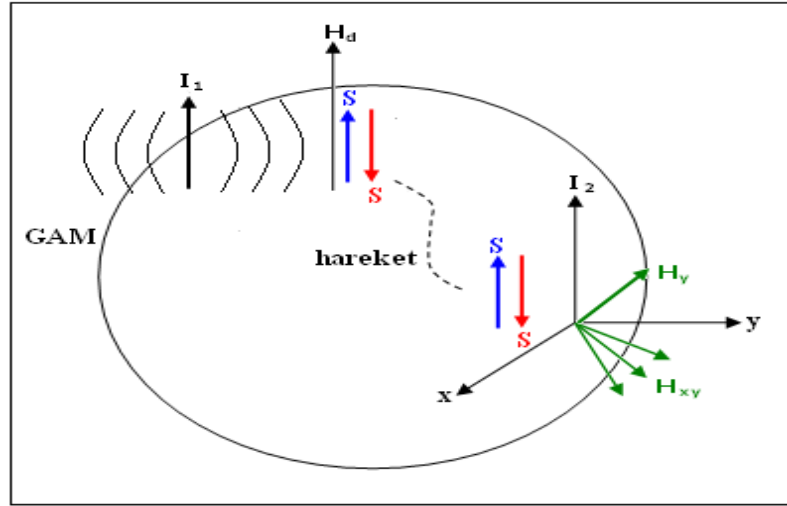


Şekil 2.20. Hareketli i akım halkasının kurduğu H_{xy} alanı

yolu ile gerçekleşen skaler etkileşme

Bu şeklin sol tarafında gözlem altındaki molekül üzerindeki I_1 çekirdeğinin kurduğu yerel manyetik alan (H_d) görülüyor. H_d , gözlem altındaki molekül üzerindeki elektronun yörüngesel hareketlerine bir düzen verir. Yani çeşitli yörüngelerde dolanan elektronu, sadece H_d manyetik alanı etrafında ve H_d 'ye dik bir yörüngede döner hale getirir. Bu durum Şekil 2.20.'nin orta kısmında gösterilmiştir. Şeklin sağ tarafında görüldüğü üzere, bu dairesel dönme ve dönmeye bağlı akım, elektronun hareketi aracılığıyla, Gözlem altındaki molekül (GAM) üzerindeki I_2 nin yakınına taşınır ve I_2 'nin bulunduğu yerde bir yerel alan kurulmasına yol açar.

Skaler etkileşme için diğer bir mekanizma Şekil 2.21.'de açıklanmıştır: Bu şeklin sol tarafında görüldüğü üzere; I_1 spini etrafında kurulan dipolar alan, manyetik alan olmadığında her yöne yönelen, elektron spinini (S) polarize eder. Yani S , H_d 'ye ya paralel ya da zıt paralel hale gelir. Şeklin orta kısmında görüldüğü gibi, spinin polarize hali, hareketle I_2 'nin yakınına taşınır ve I_2 'nin bulunduğu yerde bir yerel alan kurar. Bu durum Şekil 2.21.'in sağ tarafında gösterilmiştir.

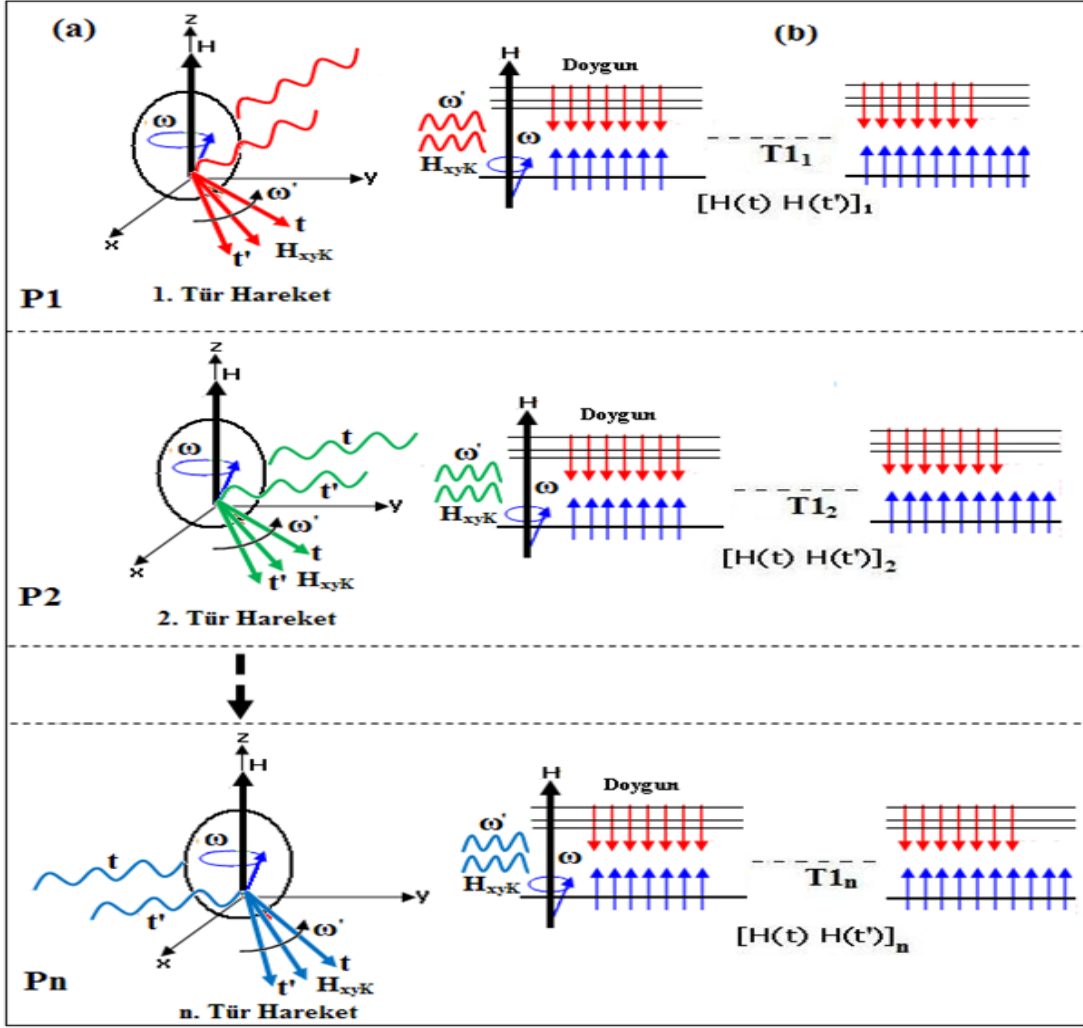


Şekil 2.21. Hareketli S spinin yön değiştirmesi ile zamana bağlı kılınan H_{xy} 'nin gerçekleştirdiği skaler etkileşme

S spini I_1 in yakınında iken yukarı yönelmişse; I_2 nin yakınına geçerken aşağı yönelebilir. I_2 nin yakınına taşınan S'in kurduğu H_{xy} 'ler durulmaya yol açar. Skaler etkileşmenin birinci türünde, i akım halkasının hareketli oluşu H_{xy} 'yi zamana bağlı kılar. 2. türünde ise S spinin yön değiştirmesi, H_{xy} 'yi zamana bağlı kılmaktadır.

Bu etkileşmenin hamiltonyeni $A I_1 \cdot I_2$ şeklindedir. Burada iki vektörün skaler çarpımı vardır ve I_1 ile I_2 nin etkileşimi, direkt değil, elektron aracılığı ile olmaktadır. Bu nedenle bu etkileşme skaler etkileşme adını alır.

Skaler etkileşmeye yol açan H_{xy} alanlarını, tek bir molekül üzerinden anlattık. NMR tüpü içinde bulunan tüm molekülleri dikkate alarak olayı anlatmamız, skaler durulma mekanizmasına açıklık getirecektir. Dikkatimizi 1. tür skaler etkileşmedeki bir moleküle yoğunlaştıralım ve I spin geçişlerini etkileyen farklı hareketleri bulalım. Bu hareketler, elektronun I_1 ile I_2 arasındaki yolculuğunda kullandığı farklı yollar olabilir. Elektron 1. yoldan, 2. yoldan, ..., n. yoldan I_2 'nin yakınına gidebilir. Benzer yollar ve bunlarla ilgili I_1 ve I_2 spinleri bir araya getirilirse, Şekil 2.22. elde edilir.



Şekil 2.22. Bir spin topluluğunda skaler etkileşmenin oluşum süreci

Elektronun yörüngesi A noktasında iken H_a , B noktasında iken H_b, \dots , P noktasında iken H_p alanı kurulur. Elektronun yörüngesinin yol hareketi H_{xy} alanlarını da zaman ve frekansa bağlı kılar $w' = w$ olunca, I spini bir seviyeden diğerine geçer.

Şimdi bu geçiş sürecini, şeklin b kısmında görüldüğü üzere, N_1 tane spin için açıklayalım. Seviyeler arasında birim zamanda geçiş olasılığı $H_{xy}(t).H_{xy}(t')$ ile orantılıdır. Aynı olay 2, 3, ..., n. hareket türleri için tekrarlanınca; alanlar arasındaki ilişkiler için $H_a(t)H_p(t)_{1.bölge}$, $H_a(t)H_p(t)_{2.bölge}, \dots, H_a(t)H_p(t)_{n.bölge}$, olarak verilir. Örneğin rölaksasyon zamanını bulmak için bunların ortalamasını almak gerekir. Yani sadelik için

$$1/T_1 \propto [\text{ortalama} (H_a(t)H_p(t))] \quad (2.11.)$$

gibi yazılabilir. Ortalama ($\langle H_a(t)H_p(t) \rangle$) ifadesi, yine t_a ve t_n den bağımsızdır. Bu olgu da

$$\text{ortalama } \langle H_a(t_a)H_p(t_n) \rangle = G(\tau) = \text{Ortalama } H(t)H(\tau+t) \quad (2.12.)$$

şeklinde yazılmasına yol açar. $G(\tau)$ üzerinden işlemler yapılırsa $J(\omega)$ 'lar cinsinden rölaksasyon formülleri elde edilir. Burada; $J(\omega)$

$$J(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\tau) e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (2.13.)$$

şeklinde olup $G(\tau)$ 'nın Fourier dönüşümüdür. $1/T_1$ ' için en basit modeldeki tam formülü

$$1/T_1 = \int G(t) e^{-t/\tau} dt \quad (2.14.)$$

şeklinde verilebilir.

Yapılan etkileşmeler sonucu skaler rölaksasyon;

$$\frac{1}{T_1} = \frac{8\pi J^2 I_2(I_2+1)}{3} \cdot \frac{\tau_{ex}}{1+(\omega_1-\omega_2)^2\tau_{ex}^2} \quad (2.15.)$$

şeklinde verilir. Benzer yaklaşım 2.tür skaler etkileşme için de kullanılabilir.

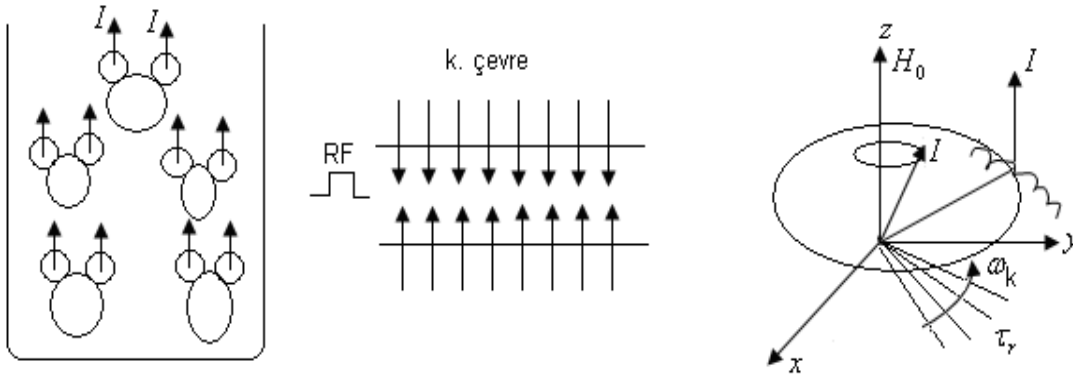
2.4. Paramanyetik İyon İçeren Saf Çözeltilerde ve Protein Çözeltilerinde

T_1 ve T_2 Durulma Zamanları

Protein Çözeltilerinin NMR ile İncelenmesi: Nükleer manyetik rezonansa rölaksasyon kuramını geliştiren bilim adamları başlangıçta en basit molekül olan su ile ilgilendiler. Deneysel olarak ölçülen su rölaksasyonu kuramsal olarak yeniden türetildi. Durulmanın bu türetimi eşleşmiş spinlerin etkileşimine dayanıyor ki biz de zaten hep çiftlenmiş spinleri örnek gösterdik. Yine de olayı bir kez daha hatırlayalım: Eğer su moleküllerini gören bir gözlüğümüz olsaydı Şekil 2.23.'de gösterilen su moleküllerinin rastgele kaynaşma hareketi yaptıklarını ve birbirlerine çarptıklarını görürdük. Yani bu

moleküller dış alandan etkilenmeyen rastgele bir hareket yapmaktadır. Ancak dış alandan etkilenen, molekülün içindeki spinlerdir.

Daha önce de belirtildiği gibi molekülün taklası sonucu aynı moleküldeki komşu spin rölatif bir hareket yapmakta ve bu rölatif hareket değişen manyetik alana sebep oluyordu. Değişen manyetik alan da eğer ω_k frekansını içeriyorsa rezonansa sebep oluyor ve spin tersleniyordu. Kurulan alanın ardışık değerleri arasında ilginin olduğu süreye ilgi zamanı deniliyordu. Bu ilgi zamanı molekülün taklasından ileri geldiği için rotasyonel korelasyon zamanı denir ve τ_r ile gösterilir.



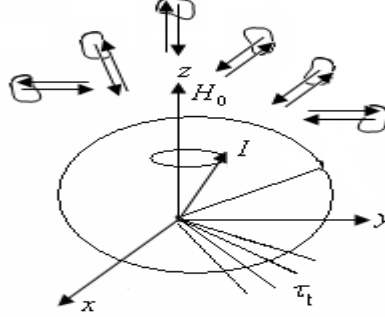
Şekil 2.23. Dipolar durulma mekanizması ve τ_r ilgi zamanı

Molekülün Brown hareketleri sonucunda attığı taklalardan ileri gelen, τ_r viskozluk katsayısını tayin etmekle aynı anlama sahiptir. Yani hiç NMR olmadan da bu τ_r hesaplanabilir. Çünkü su molekülleri küresel yapıda olup durmadan takla atmaktadır. Bu durumda τ_r Stokes-Einstein bağıntısıyla verilir. Bu bağıntı;

$$\tau_r = \frac{4}{3} \pi a^3 \frac{\eta}{kT} \quad (2.16.)$$

şeklinde. Bu bağıntıdaki η ortamın viskozluğu, T sıcaklık ve a molekül yarıçapıdır. Su molekülünün gözlem altındaki spini ile ilgili bir etkileşme daha vardır. Bu da komşu moleküldeki spinlerin, gözlem altındaki spin ile yaptığı etkileşmelerdir. Bu etkileşmelerden de H_{xy} alanı zamana bağlı olur ve alanın ardışık değerlerinin

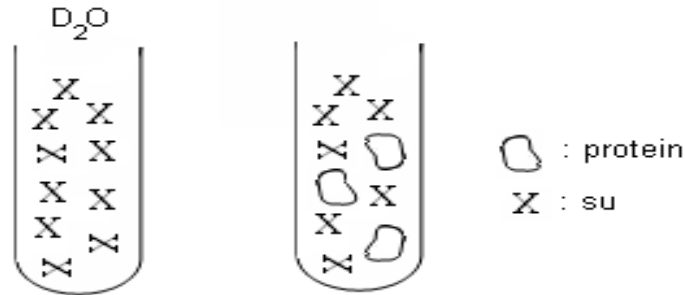
birbirlerine bağlandığı bir süre olur. Bu süreye translasyonel (öteleme) korelasyon zamanı denir. Çünkü bu etkileşimde komşu molekülün rölatif yaklaşıp uzaklaşması, alanı zamana bağlı kılmaktadır. Bu durum Şekil 2.24.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.24. Komşu moleküldeki öteleme hareketi sonucu oluşan etkileşim ve τ_t zamanı

Bu tip etkileşmeye giren komşu spinler bir tane olmayıp, olası spinlerin tümünün etkileşmeye girdiği varsayılır. Bu durum da durulmanın özel bir türetilimi vardır.

Ortama protein katıldığında durum değişir. Proteinin konsantrasyonuna bağlı olarak gözlenen $1/T_1$ oranı kısalır. Ortama protein katılma durumu Şekil 2.25.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.25. Su ve protein çözeltileri

Proteinin, rölaksasyon oranını niçin kısalttığını anlamak için teoriler geliştirilmiştir. Bu teorilerden birisi suyun iki fazda bulunduğu şeklindedir (L. Gösch, F.L. Noack 1976, J. Oakes 1976, K. Hallenga, S.H. Koenig 1976). Bu teoriye göre su moleküllerinin bir kısmı proteine bağlı olmakta, bir kısmı ise serbest durmaktadır. Bu teori doğrusa bizim iki sinyal gözlememiz gerekmektedir. Çünkü su çevresi farklı, protein çevresi daha farklıdır. Ancak böyle iki sinyal gözlenmiyor. Bu durum şöyle yorumlandı: Bağlı sular bağlı olarak durmuyor, serbest sular da serbest olarak

durmuyor. Bunlar arasında çok hızlı bir yer değiştirme vardır. Buna da kimyasal değiş-tokuş (chemical exchange) adı verilmişti. Bu görüş altında aşağıdaki teori türetildi. Bu teoriye göre;

$$\frac{1}{T_1} = \frac{\text{serbest su}}{\text{Toplam su}} \frac{1}{T_{1su}} + \frac{\text{bağlı su}}{\text{Toplam su}} \frac{1}{T_{1bagl}} \quad (2.17.)$$

$$\frac{1}{T_1} = P_f \frac{1}{T_{1su}} + P_b \frac{1}{T_{1bagl}} \quad (2.18.)$$

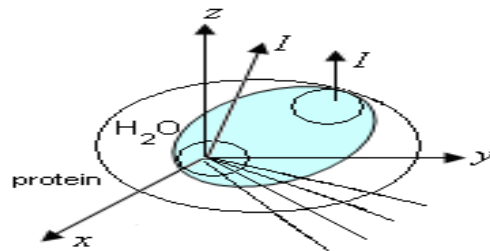
Serbest su toplam suya yakınsa yani bağlanan su azsa ($P_f = 1$ $P_b \ll P_f$)

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1su}} + P_b \frac{1}{T_{1bagl}} \quad (2.19.)$$

olarak yazılır. Daha sonra ise $P_b = \alpha C \Rightarrow \frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1su}} + mC$ haline gelir. Burada

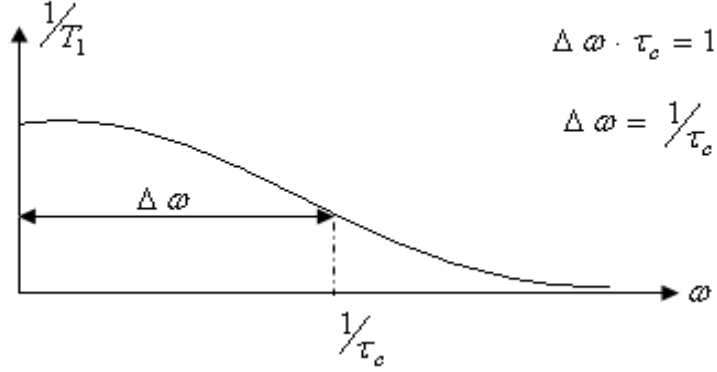
$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1su}} + P_b \frac{1}{T_{1bagl}}$ 'denklemindeki $1/T_1$, çözeltilinin rölaksasyonu olup

ölçülebilmektedir. O halde bizim $\frac{1}{T_{1bagl}}$ üzerine konuşmamız gerekmektedir. Bu rölaksasyon, proteine bağlı suyun rölaksasyonudur. Suyun protein üzerindeki ömrüne τ_m diyelim. τ_m yeteri kadar büyük olursa yani su, proteine dönmesiz bağlı ise ve de su hiç kıpırdamıyorsa dipol-dipol etkileşmesini, molekülün taklası yani molekülün τ_r si kumanda eder. Bunu şekil 2.26.'da görmekteyiz.



Şekil 2.26. Proteine dönmesiz bağlı suyun kurduğu Hxy alanı

Söz konusu τ_r 'nin hem NMR hem Stokes-Einstein bağıntısı hem de diğer tekniklerle elde edildiğini biliyoruz. τ_r ölçümleri daha çok NMRD denilen bir teknikle yapılıyordu. Bu teknikte Field-cycling denilen bir makine ile $1/T_1 \sim J(\omega)$ 'nın frekansa karşı grafiği çizilmiştir. Bu grafiğin yarı genişliğinden $1/\tau_r$ bulunuyordu. (Şekil.2.27.)



Şekil 2.27. $J(\omega)$ 'nın ω 'ya göre değişimi yarı genişlik $1/\tau_r$ 'ye eşittir.

Diğer yandan $1/T_1$, $J(\omega)$ 'ya

$$\frac{1}{T_1} = [J(\omega) + 4J(2\omega)] \quad (2.20.)$$

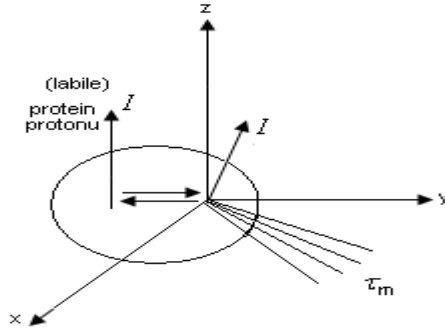
şeklinde bağlıdır. Bu τ_r , Stokes kanunu ve diğer metotlarla bulunan τ_r ile uyuşmuyor. Bu uyuşmamanın nedenleri şunlardır:

- 1) Ölçülen şeyin $1/T_1$ olması, işleme sokulan şeyin $J(\omega)$ olması ve bunun çok realistik olmaması yani $1/T_1$ ile $J(\omega)$ arasındaki uyumsuzluk.
- 2) Suyun öteleme hareketi dikkate alınmadığı için uyumsuzluk meydana gelir.
- 3) Su moleküle sınımsıkı bağlı olmayabilir. Suyun iç hareketi de vardır. Bu iç hareket dolayısıyla gözlem altındaki spinin bulunduğu yerde alan kurar. Bu alan da etkileşmeyi modüle edebilir.

İki hareketin olduğu durumda sistemi incelemek çok karışıktır. Çünkü sistemin tümünü temsil eden bir korelasyon zamanı tanımlamak gerekir ve buna uygun rölaksasyon formülleri türetmek gerekir. Bu çok zor bir iştir. O yıllarda bu tip çalışmalar yapılmış olmakla birlikte sistemin tümünü temsil eden τ_{eff} tanımlanmıştır.

Ya da daha sonraki zamanlarda iç hareketin etkisi rölaksasyon formüllerine bir A parametresi eklenerek sağlanmıştır.

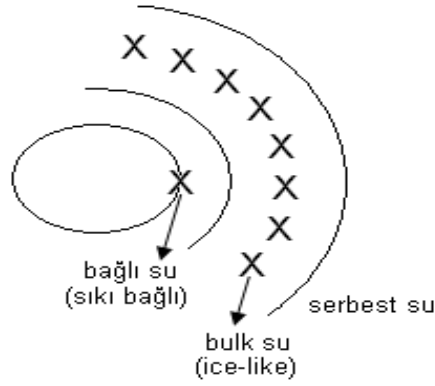
Stokes kanunundan bulunan τ_r ile NMR τ_r arasında büyük bir farklılık olduğunu söylemiş ve bu farklılıkların nedenlerini anlatmıştık. En önemli sebeplerinden birisi suyun iç hareketidir. İç hareket hesaba katılarak düzeltilen rölaksasyon formüllerinden elde edilen τ_r ile Stokes τ_r si arasında uyum meydana getirilmiştir. Protein çözeltilerindeki rölaksasyon teorisi ilerlerken farkına varılan bir olayda protein protonlarının rölaksasyona yaptığı katkıdır. Bilindiği üzere protein üzerinde çok çeşitli moleküler guplar vardır. Bu guplar sabit olmayıp hareketlidir. Bu atomlar bağlı olan su ile yer değiştirebilirler. Bu yer değiştirme iki su molekülünün yer değiştirmesi gibi rölaksasyona katkıda bulunur. Bu durum Şekil 2.28.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.28. Protein protonu ile su protonu arasındaki kimyasal değiş-tokuş

Protein protonlarının sabit olması durumunda da dipol-dipol etkileşmesi olur. Ancak bu defa aynı dış alan içerisinde bulunan protein protonunun, örneğin alt seviyeden üst seviyeye çıkması durumunda su protonu üst seviyeden alt seviyeye iner (enerji korunumu bunu gerektirir). Bu ise su mıknatıslanmasının artması ve azalması demektir. Buna manyetizasyon transferi denir. Bu yolla meydana gelen rölaksasyona çapraz rölaksasyon denilir. Protein çözeltilerinin teorisinin ilerleme aşamasında farkına varılan olaylardan biri de hareketli ve sabit protein protonlarının su rölaksasyonuna yaptığı katkıdır. Bu durum Şekil 2.29.'da gösterilmiştir. 45 senelik protein NMR incelemeleri sırasında, başlangıçta protein etrafındaki suyun serbest su, proteinden etkilenmiş su, çok sıkı bağlarla bağlı su, gevşek bağlarla bağlı su gibi gupları önerilmişti. Stokes τ_r si ile deneysel τ_r arasındaki farklılığı gidermek için de protein

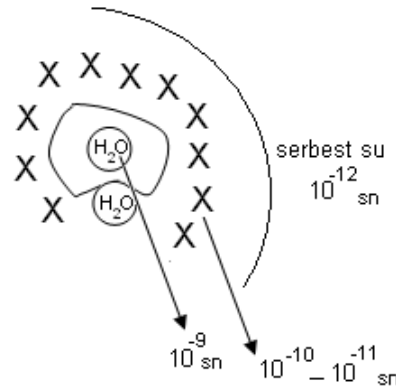
etrafında monomerik su tabakaları eklenmiştir. Bu tabakalarla τ_r 'yi büyüterek deneysel τ_r ile uyum meydana geliyordu. Zaten proteinden etkilenmiş su için çok çeşitli modeller önerilmişti.(buz vari örgütlenme, iplik vari örgütlenme,...) Bu durum Şekil 2.29.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.29. Protein çözeltisi için önerilen su tabakaları

Ancak gerek X-Ray ve gerekse çok boyutlu NMR metotlarıyla yapılan incelemeler, tabaka modelinin pek geçerli olmadığını göstermiştir. Şu andaki görüşe göre;

- 1) Serbest su
- 2) Protein yüzeyindeki girinti çıkıntılarında etkilenen su
- 3) Proteinin derinliklerinde ve ceplerinde bulunan ve hareketi yavaşlamış su olmak üzere üç çevreli su vardır. Bu durum Şekil 2.30.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.30. Protein çözeltisinde 3 çevreli su modeli

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Örneğin Hazırlanması

3.1.1. Konsantrasyon Deneyleri

Stok çözeltinin hazırlanışı:

20 ml D₂O içerisine 0.003 g MnCl₂ katılarak stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözelti iyice çalkalandı ve hava almaması için ağız kısmı parafilm ile tamamen kapatıldı. Bu çözeltinin 20 µl'si 1 µg Mn(II) ihtiva etmektedir.

D₂O Çözeltileri Kullanılarak İyon Konsantrasyon Setlerinin Hazırlanışı

A- Saf D₂O İçin İyon Konsantrasyon Setlerinin Hazırlanışı

Beş tane temiz tüp kullanılarak aşağıdaki konsantrasyonlar hazırlandı.

1. Konsantrasyon: Stok çözeltiden 20 µl, D₂O'dan ise 980 µl alınıp 1. tüpün içerisinde karıştırıldı. Stoktan alınan çözelti (20µl) tüpe bırakılırken, sıvının içerisinde hava kalmamasına itina gösterildi. Böylece 1 cc'lik çözelti elde edildi. Bu çözeltideki mangan oranı ise 1 µg Mn(II) /ml yani 1 mililitre başına 1 mikrogam Mn(II) ölçülmüş oldu.
2. Konsantrasyon: Stok çözeltiden 40 µl, D₂O'dan ise 960 µl alınıp 2. tüpün içerisinde karıştırıldı. 1 cc'lik çözelti elde edildi. Bu çözeltideki mangan oranı ise 2 µg Mn(II) /ml yani 1 mililitre başına 2 mikrogam Mn(II) ölçülmüş oldu.
3. Konsantrasyon: Stok çözeltiden 60 µl, D₂O'dan ise 940 µl alınıp 3. tüpün içerisinde karıştırıldı. Elde edilen 1 cc'lik çözeltideki mangan oranı ise 3 µg Mn(II) /ml yani 1 mililitre başına 3 mikrogam Mn(II) ölçülmüş oldu.
4. Konsantrasyon: Stok çözeltiden 80 µl, D₂O'dan ise 920 µl alınıp 4. tüpün içerisinde karıştırıldı. Elde edilen 1 cc'lik çözeltideki mangan oranı ise 4 µg Mn(II) /ml yani 1 mililitre başına 4 mikrogam Mn(II) ölçülmüş oldu.

5. Konsantrasyon: Stok çözeltiden 100 µl, D₂O'dan ise 900 µl alınıp 5. tüpün içerisinde karıştırıldı. Elde edilen 1 cc'lik çözeltideki mangan oranı ise 5 µg Mn(II) /ml yani 1 mililitre başına 5 mikrogam Mn(II) ölçülmüş oldu.

Hazırlanan tüm çözeltiler 5 mm çaplı NMR tüplerine aktarıldı. Bu örnekler kullanılarak D₂O' nun mangan konsantrasyonuna karşı T₁ ve T₂ değerleri ölçüldü.

B- Albumin İçeren İyon Konsantrasyon Setlerinin Hazırlanışı

Beş temiz tüpün her birine 0.02 g albumin konuldu. Albumin içeren çözeltilerin konsantrasyonu aşağıdaki gibi hazırlandı.

1. Konsantrasyon: İçerisinde 0.02 g albumin olan birinci tüpe 980µl D₂O ve 20 µl stok çözelti ilave edildi. (1 µg Mn(II) / 1 ml D₂O)

2. Konsantrasyon: İçerisinde 0.02 g albumin olan ikinci tüpe 960 µl D₂O ve 40 µl stok çözelti ilave edildi. (2 µg Mn(II) / 1 ml D₂O)

3. Konsantrasyon: İçerisinde 0.02 g albumin olan üçüncü tüpe 940 µl D₂O ve 60 µl stok çözelti ilave edildi. (3 µg Mn(II) / 1 ml D₂O)

4. Konsantrasyon: İçerisinde 0.02 g albumin olan dördüncü tüpe 920 µl D₂O ve 80 µl stok çözelti ilave edildi. (4 µg Mn(II) / 1 ml D₂O)

5. Konsantrasyon: İçerisinde 0.02 g albumin olan beşinci tüpe 900 µl D₂O ve 100 µl stok çözelti ilave edildi. (5 µg Mn(II) / 1 ml D₂O)

Bu ilavelerden sonra tüpün ağız kısmı parafilm ile kapatılıp iyice çalkalanır ve homojen bir

dağılım elde edilir. Çözeltilerdeki iyon konsantrasyonları 1 ile 5 µg/cc arasında

değişmektedir.

C- İyon İçeren Albumin Konsantrasyon Setlerinin Hazırlanışı

Bu setin hazırlanışında, iyon konsantrasyonları sabit tutulup protein konsantrasyonları

değiştirildi. Konsantrasyonların hazırlanışı ise aşağıdaki gibidir.

1. Konsantrasyon: 0.005g Albumin tüpün içerisine bırakıldı, üzerine 40µl stok çözültiden, 960 µl'de D₂O 'dan alınıp ilave edildi. Böylece karışım hazırlanmış oldu. (2 µg Mn(II) / 1 ml D₂O)
2. Konsantrasyon: 0.01 g albumin tüpün içerisine bırakıldı, üzerine 40 µl stok çözültiden,960 µl'de D₂O'dan alınıp ilave edildi. Böylece karışım hazırlanmış oldu. (2 µg Mn(II) / 1ml D₂O)
3. Konsantrasyon: 0.015 g albumin tüpün içerisine bırakıldı, üzerine 40 µl stok çözültiden,960 µl'de D₂O'dan alınıp ilave edildi. Böylece karışım hazırlanmış oldu. (2 µg Mn(II) / 1 ml D₂O)
4. Konsantrasyon: 0.02 g albumin tüpün içerisine bırakıldı, üzerine 40 µl stok çözültiden,960 µl'de D₂O'dan alınıp ilave edildi. Böylece karışım hazırlanmış oldu. (2 µg Mn(II) / 1 ml D₂O)
5. Konsantrasyon: 0.025 g albumin tüpün içerisine bırakıldı, üzerine 40 µl stok çözültiden, 960 µl'de D₂O'dan alınıp ilave edildi. Böylece karışım hazırlanmış oldu. (2 µg Mn(II) / 1 ml D₂O)

Şimdi hazırlanmış olduğumuz bu tüpleri NMR tüplerine aktarıp T₁ ve T₂ ölçümlerini yapabiliriz.

3.1.2. Sıcaklık Deneyleri

D- İyon İçeren D₂O Çözültülerinin Sıcaklık Değişimi

Örnek, 40 µl stok çözültiden ve 960 µl ise D₂O'dan alınıp bir tüp içerisinde karıştırılarak hazırlandı. (2 µg Mn(II) / 1 ml D₂O)

Hazırlanmış olan bu karışım NMR tüplerine aktarıldı. Sıcaklık ölçümleri 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C derecelerinde yapıldı. Sıcaklıklar otomatik sıcaklık kontrol sistemi yardımı ile değiştirildi.

E- Albumin ve İyon İçeren D₂O Çözültülerinin Sıcaklık Değişimi

Örnek 0.02 g albumine, 960 µl D₂O ve 40 µl stok çözelti eklenerek hazırlandı. Bu karışımın T₁ ve T₂ ölçümleri 20°C, 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C derecelerinde gerçekleştirildi.

F- H₂O / D₂O Karışımlarındaki Konsantrasyonların Hazırlanışı

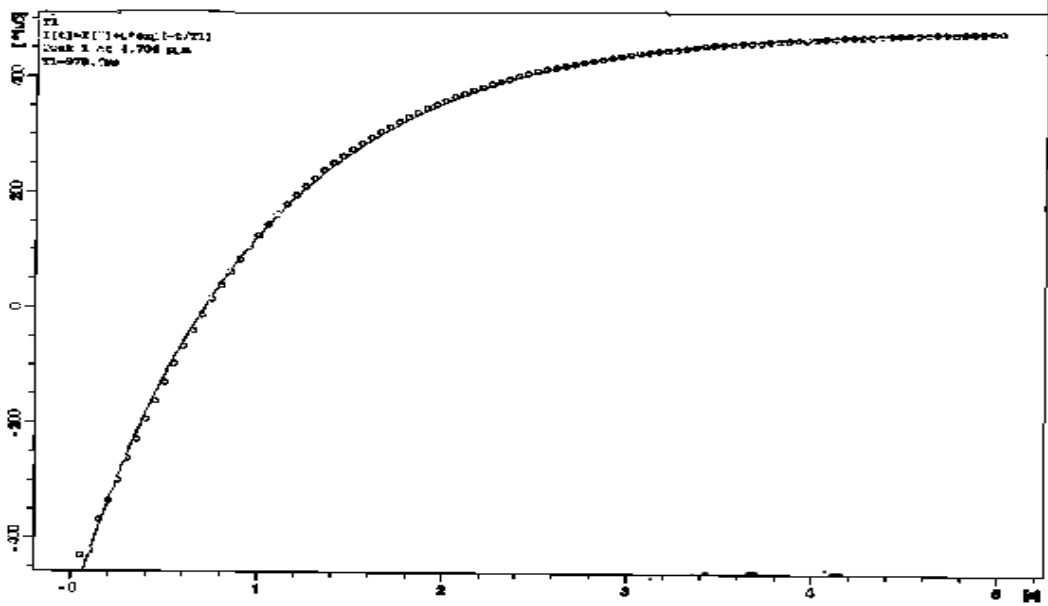
Bu deneyler için önce 1cc bidistile su, 9cc D₂O'ya eklenerek yeni bir karışım hazırlandı. 0.1 ml H₂O/ 0.9 ml D₂O karışımlarındaki iyon ve albumin konsantrasyonları ise A-B-C-D-E maddelerinde belirtilen tarzda hazırlandı. Ancak bu kez stok iyon çözeltisi, D₂O'ya değil, hazırlanan H₂O/D₂O karışımından alınan miktarlara eklendi.

3.2. NMR T₁ ve T₂ Ölçümleri

Yukarıda açıklandığı şekilde, hazırlanan örneklerin her biri 5 mm çaplı NMR tüplerine aktarıldı ve T₁ ile T₂ ölçümlerinde kullanıldı. Rölaksasyon zaman ölçümleri Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi'nde bulunan BRUKER-Avance 400 MHz NMR spektrometresiyle gerçekleştirildi. T₁ zamanları Inversion Recovery puls adımları, T₂ zamanları ise Carr-Purcell-Meiboom-Gill puls adımları ile gerçekleştirildi. Her örneğin T₁ ise önce öncül deneyler ile kestirildi. Sonra ölçümler yapılırken puls repetition time 5T₁ olarak alındı. Inversion Recovery ve Spin Eco'daki bekleme zamanları; rölaksasyonun geri kazanımı ve bozunumu süreçlerine uyarlı olarak değiştirildi. Bunu sağlamak için, gerektiğinde ölçümler tekrarlandı. Bekleme zamanları bulgular kısmındaki IR-T₁ ve SE-T₂ eğrileri üzerinde görülmektedir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

0.02 g Albumin ve 0.017mM (1 μ g/1ml) Mn(II) içeren H₂O/D₂O karışımından elde edilen IR -T₁ eğrisi diğer iyon konsantrasyon deneylerini temsilen Şekil 4.1.'de görülmektedir.



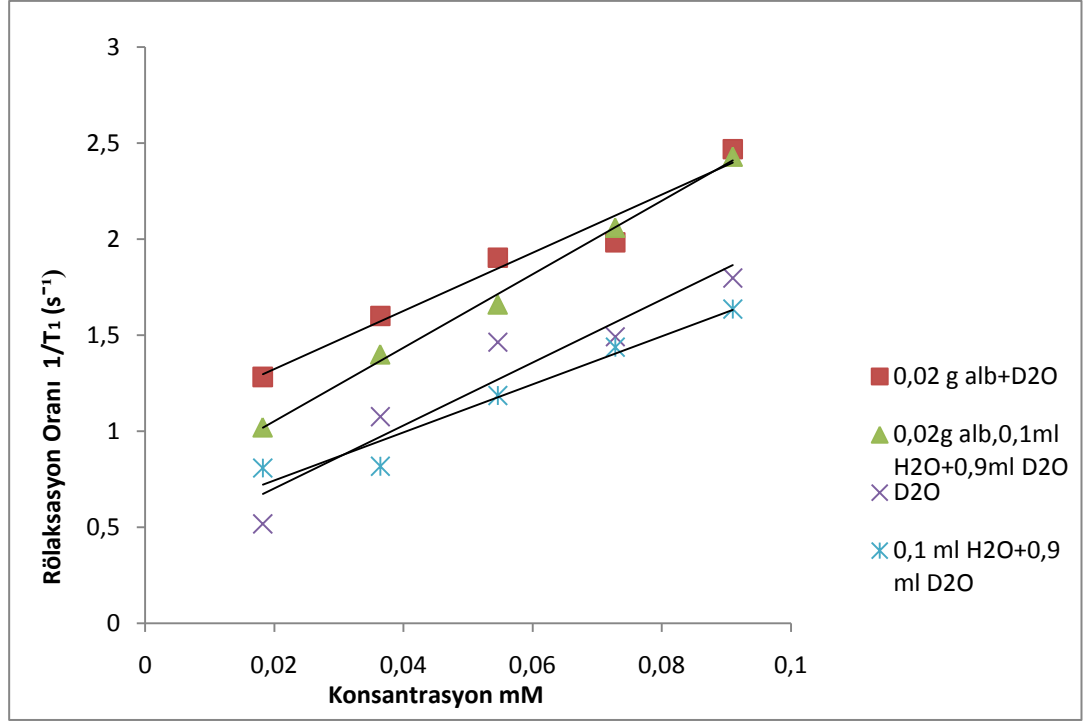
Şekil 4.1. 0.02 g Albumin ve 0.017 mM Mn(II) içeren D₂O/H₂O karışımı (0.1 ml H₂O /0.90 ml D₂O) için IR- T₁ eğrisi

Albumin varlığında ve yokluğunda saf D₂O ve 0.1 ml H₂O/0.9 ml D₂O karışımına ait, 1/T₁ oranının mangan konsantrasyonuna karşı değişimini gösteren veriler Çizelge 4.1. ve bu verilerden elde edilen grafik Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Çizelge 4.1. 0.02 g Albuminin varlığında ve yokluğunda saf D₂O ve 0.1 ml H₂O/0.9 ml D₂O karışımının 1/T₁ oranının mangan konsantrasyonuna karşı değişimi.

Mn(II) KONSANTRASYON (mM)	0.02g alb içeren D ₂ O 1/T ₁ (s ⁻¹)	0.02g alb içeren 0.1H ₂ O/0.9D ₂ O 1/T ₁ (s ⁻¹)	D ₂ O 1/T ₁ (s ⁻¹)	0.1 H ₂ O/0.9 D ₂ O 1/T ₁ (s ⁻¹)
0.0182	1.283	1.02	0.518	0.809
0.0364	1.6	1.4	1.076	0.818
0.0546	1.904	1.66	1.464	1.186
0.0728	1.984	2.06	1.492	1.438
0.091	2.469	2.43	1.798	1.636



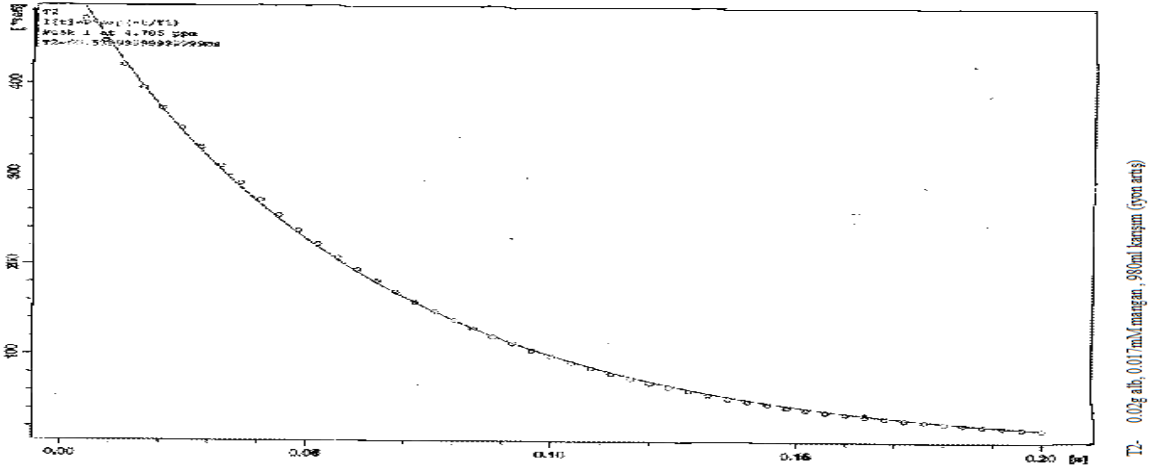
Şekil 4.2. Ölçülen $1/T_1$ değerlerinin Mn(II) konsantrasyonuna karşı grafiklendirilmesi.

Şekil 4.2.'deki verilerin en küçük kareler fitinden elde edilen bağıntılar aşağıdaki gibidir:

$1/T_1 = 15.143c + 1.0212$	$R^2 = 0.9639$	0.02 g alb/ D ₂ O
$1/T_1 = 19.121c + 0.67$	$R^2 = 0.9963$	0.02 g alb+0.1H ₂ O/0.9D ₂ O
$1/T_1 = 16.352c + 0.3768$	$R^2 = 0.9141$	0.1H ₂ O/0.9D ₂ O
$1/T_1 = 12.495c + 0.4952$	$R^2 = 0.952$	saf D ₂ O

0.02 g Albumin ve 0.017mM (1µg/1ml) Mn(II) içeren D₂O/H₂O karışımından elde edilen SE-T₂ eğrisi, diğer iyon konsantrasyon deneylerini temsilen, Şekil 4.3.'te gösterilmektedir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

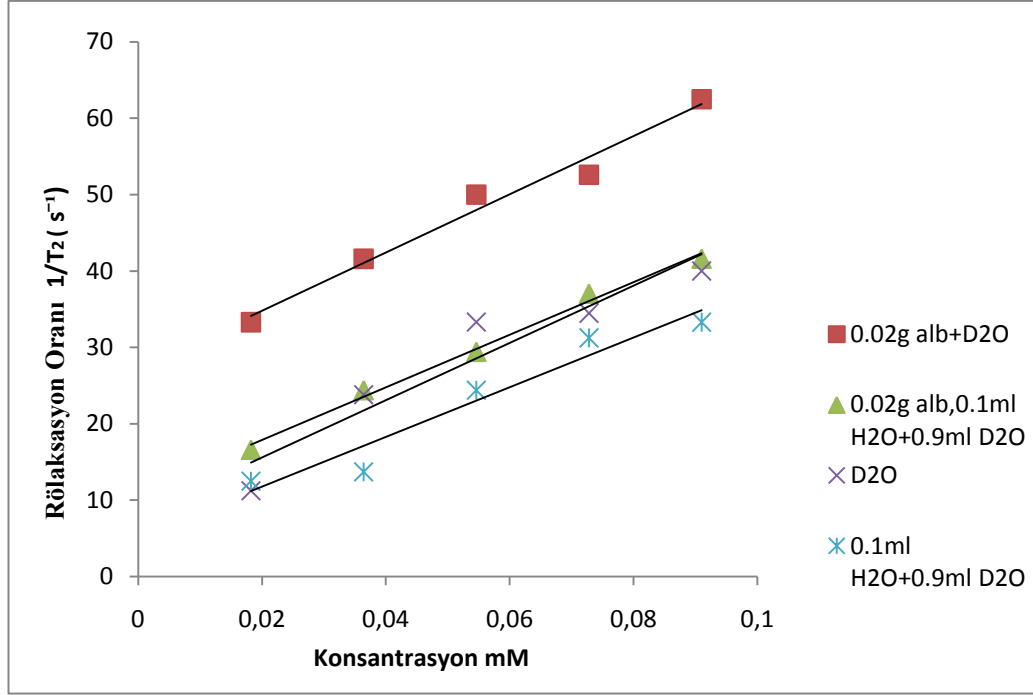


Şekil 4.3. 0.02 g Albumin ve 0.017mM Mn(II) içeren D₂O/H₂O karışımı (0.1 ml H₂O /0.90 ml D₂O) için SE-T₂ eğrisi

Albumin varlığında ve yokluğunda saf D₂O ve 0.1 ml H₂O/0.9ml D₂O karışımına ait 1/T₂ oranının, mangan konsantrasyonuna karşı değişimini gösteren veriler Çizelge 4.2.'de ve bu verilerden elde edilen grafik Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. 0.02 g Albuminin varlığında ve yokluğunda saf D₂O ve 0.1 ml H₂O/0.9 ml D₂O karışımının 1/T₂ oranının mangan konsantrasyonuna karşı değişimi

İYON KONSANTRASYONU (mM)	0.02g alb D ₂ O 1/T ₂ (s ⁻¹)	0.02g alb 0.1H ₂ O/0.9D ₂ O 1/T ₂ (s ⁻¹)	D ₂ O 1/T ₂ (s ⁻¹)	0.1H ₂ O/0.9 D ₂ O 1/T ₂ (s ⁻¹)
0.0182	33.3	16.6	11.235	12.5
0.0364	41.6	24.39	23.8	13.7
0.0546	50	29.41	33.33	24.4
0.0728	52.6	37.03	34.48	31.25
0.091	62.5	41.6	40	33.3



Şekil 4.4. 0.02 g Albumin varlığında ve yokluğunda 0.1ml H₂O/0.9ml D₂O çözeltisinin 1/T₂ 'sinin Mn(II) konsantrasyonuna karşı grafiği.

Şekil 4.4.'deki verilerin en küçük kareler fitlerinden elde edilen bağıntılar aşağıda formüllerle yazılmıştır

$$1/T_2 = 430.63c + 11.014$$

$$R^2 = 0.9467$$

0.02 g alb+D₂O

$$1/T_2 = 344.18c + 11.014$$

$$R^2 = 0.9929$$

0.02g alb+0.1 H₂O+0.9 D₂O

$$1/T_2 = 374.78c + 8.106$$

$$R^2 = 0.9096$$

saf D₂O

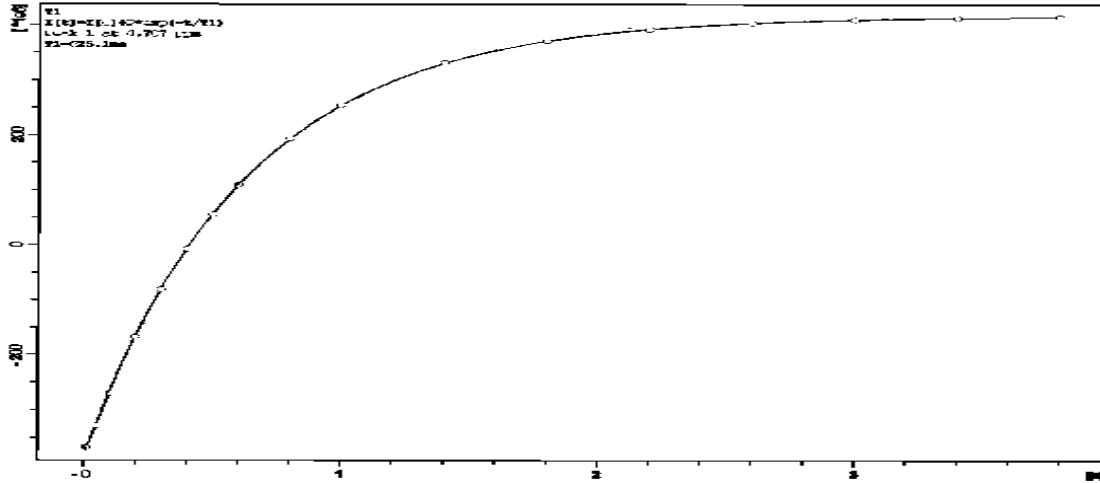
$$1/T_2 = 325c + 5.285$$

$$R^2 = 0.9384$$

0.1 H₂O+0.9 D₂O

0.02g Albumin ve 0.036 mM Mn(II) içeren D₂O çözeltisinin 298 K'de elde edilen IR-T₁ eğrisi, diğer sıcaklık ölçümlerini temsilen Şekil 4.5.'te görülmektedir

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

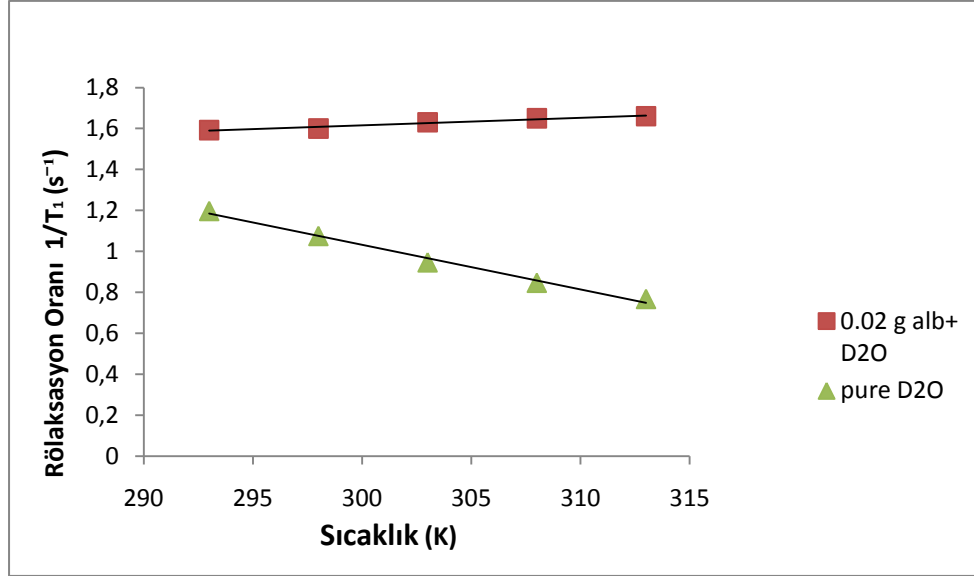


Şekil 4.5. 0.02g Albumin ve 0.036mM Mn(II) içeren D₂O çözeltisinin 298 K’de elde edilen IR-T₁ eğrisi

D₂O’ nun 1/T₁ değerlerinin albumin varlığında ve yokluğunda sıcaklığa bağlı olan değişiminden elde edilen veriler Çizelge 4.3.’te ve bu verilerden elde edilen grafik Şekil 4.6.’da verilmiştir.

Çizelge 4.3. D₂O’nun 1/T₁ değerlerinin albumin varlığında ve yokluğunda sıcaklığa bağlı olarak değişimi.

SICAKLIK (K)	0.02g alb+D ₂ O 1/T ₁ (s ⁻¹)	pure D ₂ O 1/T ₁ (s ⁻¹)
293	1.592	1.197
298	1.6	1.075
303	1.63	0.946
308	1.65	0.846
313	1.66	0.767



Şekil 4.6. 0.02 g Albumin varlığında ve yokluğunda pure D₂O'nun 1/T₁ değerlerinin sıcaklığa göre değişimi

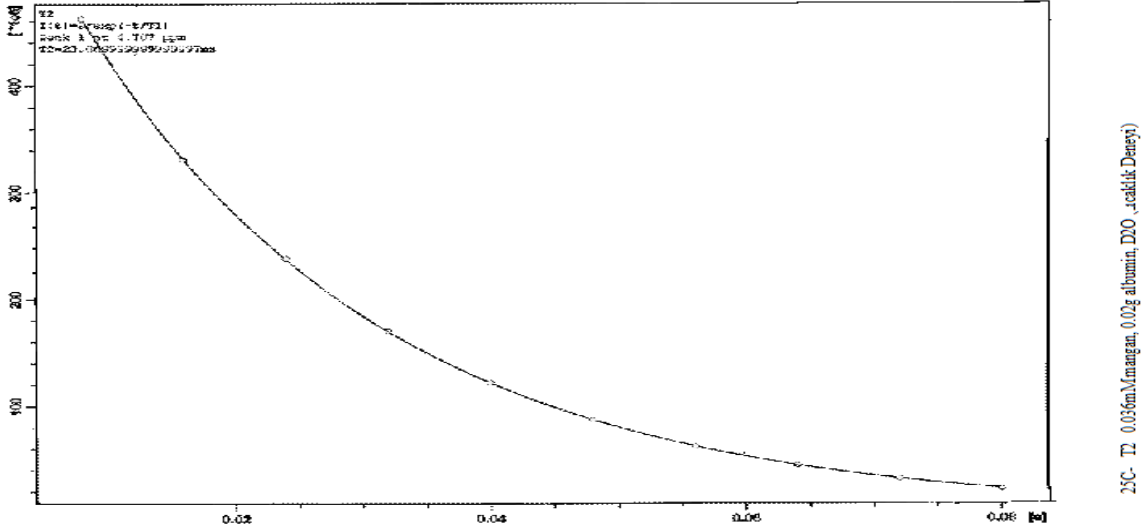
Şekil 4.6.'daki verilerin en küçük kareler fitlerinden elde edilen bağıntılar aşağıda verilmiştir.

$$1/T_1 = 0.0037c + 0.4992 \quad R^2=0.9666 \quad 0.02 \text{ g alb+ D}_2\text{O}$$

$$1/T_1 = -0.0218c + 7.5655 \quad R^2=0.9912 \quad \text{saf D}_2\text{O}$$

0.02g Albumin ve 0.036 mM Mn(II) içeren D₂O çözeltisinin 298 K'de elde edilen SE-T₂ eğrisi, diğer sıcaklık ölçümlerini temsilen Şekil 4.7.'de görülmektedir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

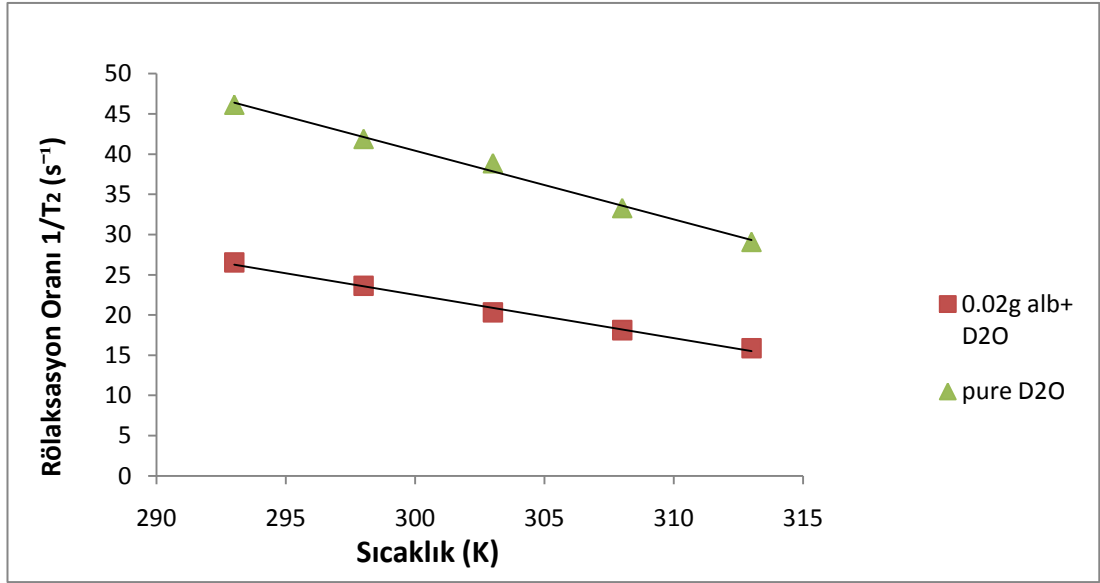


Şekil 4.7. 0.02 g Albumin ve 0.036mM Mn(II) içeren D₂O çözeltisinin 298 K’de elde edilen SE-T₂ eğrisi

Albuminin varlığında ve yokluğunda D₂O’ nun 1/T₂’sinin sıcaklığa bağlı değişiminden elde edilen veriler Çizelge 4.4.’te ve bu verilerden elde edilen grafik Şekil 4.8.’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. D₂O’nun 1/T₂ değerlerinin albumin varlığında ve yokluğunda sıcaklığa bağlı değişimi.

SICAKLIK (K)	0.02 g alb+ D ₂ O 1/T ₂ (s ⁻¹)	pure D ₂ O 1/T ₂ (s ⁻¹)
293	26.52	46.14
298	23.64	41.89
303	20.32	38.87
308	18.11	33.3
313	15.87	29.1



Şekil 4.8. 0.02 g Albumin varlığında ve yokluğunda pure D₂O 'nun 1/T₂ değerlerinin sıcaklığa göre değişimi

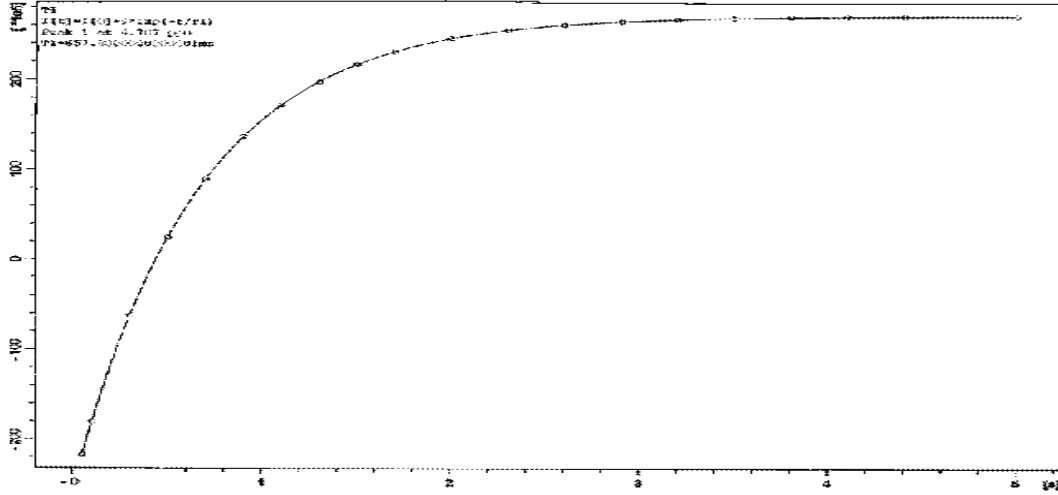
Şekil 4.8.'de gösterilen verilerin en küçük kareler fitlerinden elde edilen bağıntılar aşağıda formüllerle açıklanmıştır.

$$1/T_2 = -0.5366c + 183.48 \quad R^2=0.9927 \quad 0.02g \text{ alb}+ D_2O$$

$$1/T_2 = -0.8534c + 296.44 \quad R^2=0.993 \quad \text{saf } D_2O$$

0.02 g Albumin ve 0.036 mM Mn(II) içeren D₂O karışımında elde edilen IR -T₁ eğrisi, diğer albumin konsantrasyonlarını temsilen Şekil 4.9.'da görülmektedir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

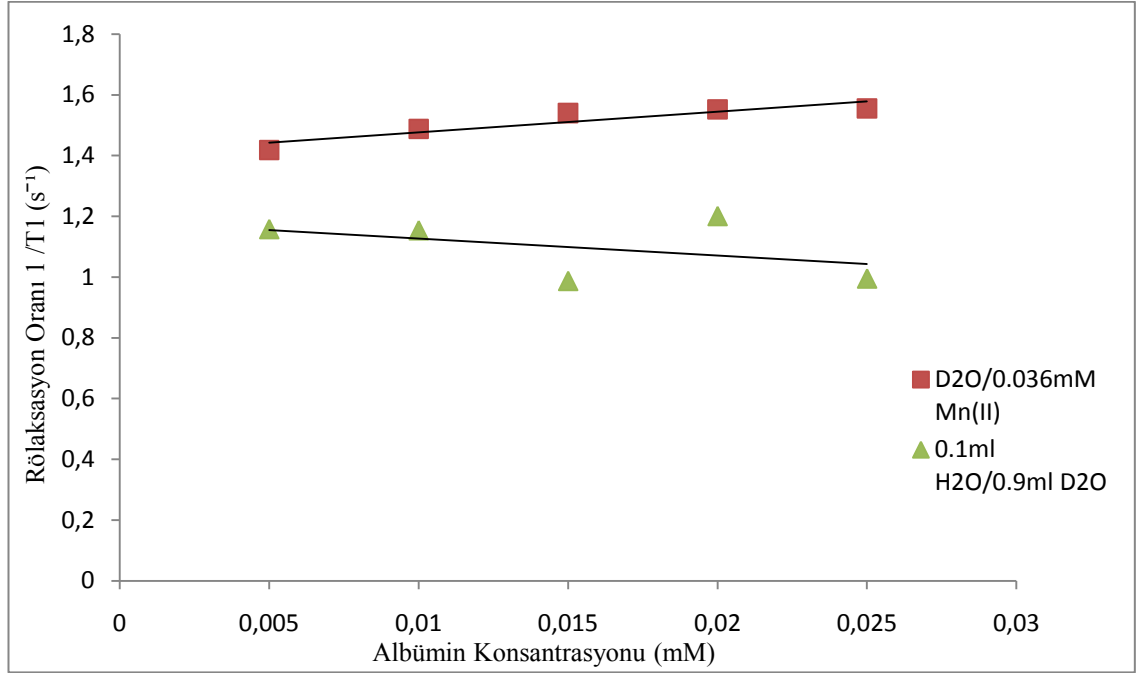


Şekil 4.9. 0.02g Albumin ve 0.036mM Mn(II) içeren pure D₂O çözeltisi için IR-T₁ eğrisi

Pure D₂O/ 0.036 mM Mn(II) ve 0.1 H₂O/ 0.9 D₂O karışımlarının, 1/T₁ değerlerinin albumin konsantrasyonuna karşı değişimi gösteren veriler Çizelge 4.5.'te ve bu verilerden elde edilen grafik Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. D₂O/ 0.036 mM Mn(II) ve 0.1 H₂O/0.9 D₂O karışımlarının 1/T₁ değerlerinin albumin konsantrasyonuna karşı değişimi

Albumin Konsantrasyonu (mM)	D ₂ O/0.036 mM Mn(II) 1/T ₁ (s ⁻¹)	0.1H ₂ O/0.9D ₂ O 1/T ₁ (s ⁻¹)
0.005	1.418	1.158
0.01	1.488	1.154
0.015	1.54	0.987
0.02	1.552	1.201
0.025	1.555	0.995



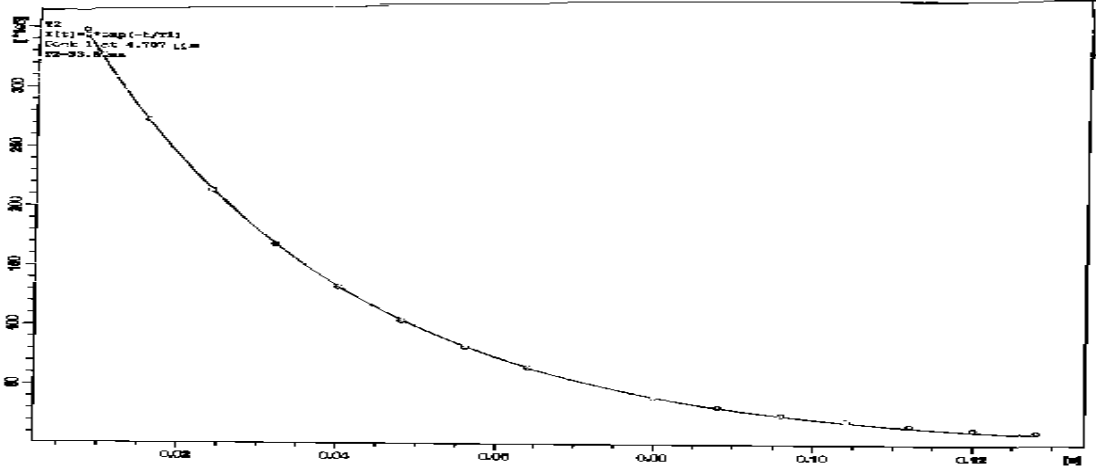
Şekil 4.10. D₂O/ 0.036 mM Mn(II) ve H₂O/D₂O karışımlarının 1/T₁ oranlarının albumin konsantrasyonuna karşı değişimini gösteren grafik

Şekil 4.10.'da görülen eğrilerden elde edilen bağıntılar aşağıda verilmiştir.

$$1/T_1 = 6.76c + 1.4092 \quad R^2 = 0.8379 \quad \text{D}_2\text{O}/ \text{Mn(II)} + \text{art alb}$$

$$1/T_1 = -5.58c + 1.1827 \quad R^2 = 0.1933 \quad \text{0.1 H}_2\text{O}/\text{0.9 D}_2\text{O} + \text{art alb}$$

0.02 g Albumin ve 0.036 mM Mn(II) içeren D₂O karışımından elde edilen SE -T₂ eğrisi, diğer Albumin konsantrasyonlarını temsilen Şekil 4.11.'de görülmektedir.

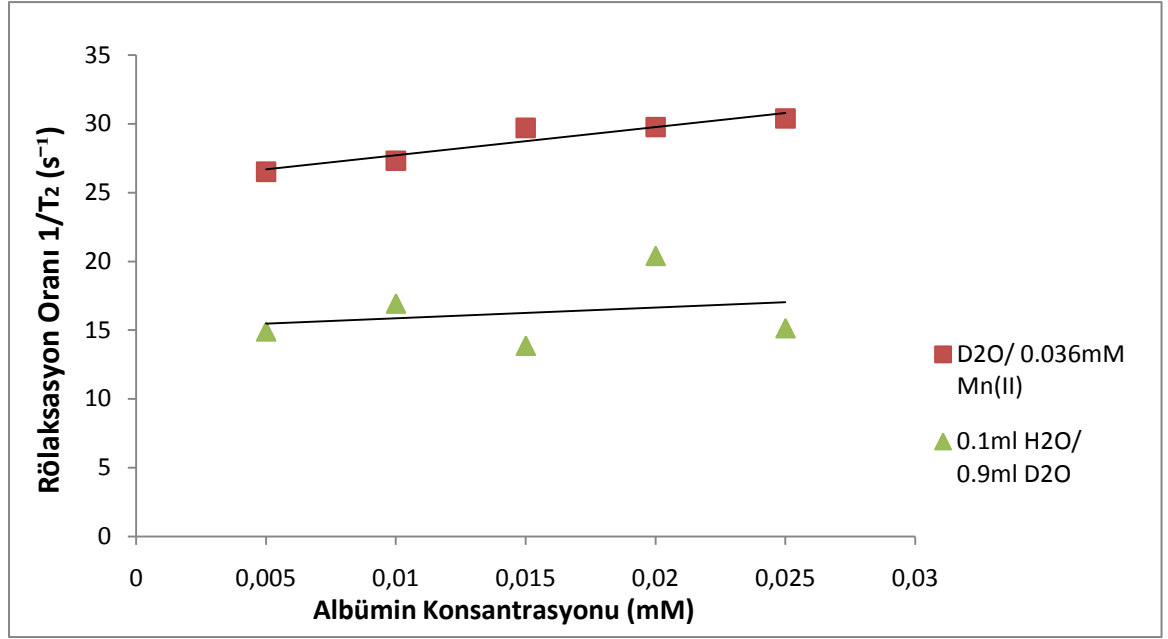


Şekil 4.11. 0.02g Albumin ve 0.036mM Mn(II) içeren pure D₂O çözeltisi için SE-T₂ eğrisi

D₂O/0.036 mM Mn(II) ve 0.1 H₂O /0.9 D₂O karışımlarının, 1/T₂ değerlerinin albumin konsantrasyonuna karşı değişimi gösteren veriler Çizelge 4.6.'da ve bu verilerden elde edilen grafik Şekil 4.12.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. D₂O/0.036 mM Mn(II) ve 0.1 H₂O/0.9 D₂O karışımlarının 1/T₂ değerlerinin albumin konsantrasyonuna karşı değişimi

Albumin Konsantrasyonu (mM)	D ₂ O / 0.036mM Mn(II) 1/T ₁ (s ⁻¹)	0.1H ₂ O/0.9D ₂ O 1/T ₁ (s ⁻¹)
0.005	26.52	14.92
0.01	27.32	16.94
0.015	29.71	13.88
0.02	29.77	20.4
0.025	30.4	15.15



Şekil 4.12. D₂O/0.036 mM Mn(II) ve H₂O/D₂O karışımlarının 1/T₂ oranlarının albumin konsantrasyonuna karşı değişimini gösteren grafik

Şekil 4.12.'de görülen eğrilerden elde edilen bağıntılar aşağıda verilmiştir

$$1/T_2 = 204.2c + 25.681 \quad R^2=0.8908 \quad \text{D}_2\text{O}/ \text{Mn(II)} + \text{art alb}$$

$$1/T_2 = 78.4c + 15.082 \quad R^2=0.0584 \quad \text{0.1 H}_2\text{O}/ \text{0.9 D}_2\text{O} + \text{art alb}$$

TARTIŞMA

0.02 g Albumin varlığında ve yokluğunda saf D₂O ve 0.1 H₂O+0.9 D₂O karışımının 1/T₁ ve 1/ T₂ oranının mangan konsantrasyonuna karşı değişiminin lineer olarak arttığı Şekil 4.2. ve Şekil 4.4.' te görülmektedir. Bu sonuçlar önceki çalışmalarla uyumludur. (Barnhart ve Berk 1986, Denisov ve Halle 2002)

D₂O + iyon karışımının albumin konsantrasyonuna karşı 1/T₁ ve 1/T₂ rölaksasyon oran değeri ile D₂O + iyon ile 0.1 H₂O+0.9 D₂O karışımlarının albumin konsantrasyonuna karşı, 1/T₂ rölaksasyon oran değerlerinin lineer bir şekilde arttığı Şekil 4.10. ve Şekil 4.12.'de; iyon + 0.1 H₂O+0.9 D₂O karışımının albumin konsantrasyonuna karşı 1/T₁ rölaksasyon oran değerinin ise lineer olarak azaldığı Şekil

4.10.'da açıkça görülmektedir. Bu ilişki daha önceki deneylerde bulunanlarla uyumlu olmaktadır. Bu sonuçlar da önceki literatürle uyumludur. (Bertini ve ark. 2005, Barnhart ve Berk 1986, Aime ve ark. 2002)

D₂O'nun 0.02g albumin varlığındaki 1/T₁ rölaksasyon oran değerinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi lineer olarak artarken; albumin yokluğundaki değerinin lineer olarak azaldığı Şekil 4.6.'da; 0.02 g albumin varlığında ve yokluğunda D₂O'nun 1/T₂ rölaksasyon oran değerinin sıcaklığa bağlı olarak değişiminin ise lineer olarak azaldığı Şekil 4.8.'de görülmektedir.

D₂O çözeltisinin hem 1/T₁ hem de 1/T₂ değerlerinin sıcaklıkla azalması, durulmaların spin rölaksasyon etkileşmesinden ileri geldiğini göstermektedir.

Albumin varlığında 1/T₁'in sıcaklıkla artışı dipolar mekanizmanın geçerliliğini kanıtlamaktadır. (Van- Quynh ve ark. 2003, Yılmaz ve ark. 2008, Halle 2004). 1/T₁ ve 1/T₂ oranlarının iyon ya da protein konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesinden elde edilen fitlerin eğimi rölaksivite olarak isimlendirilir.(Bertini ve ark. 2000, Bertini ve ark. 2005, Barnhart ve Berk 1986)

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Albumin içeren yada içermeyen D₂O ve 0.1 H₂O/ 0.9 D₂O çözeltilerinin proton T₁ ve T₂ rölaksiviteyi Çizelge 7. ve Çizelge 8.'de verilmiştir. Sonuçlar şöylece özetlenebilir:

- a) D₂O çözeltisinin iyon artışı ile ilgili proton T₂ rölaksivitesi, proton T₁ rölaksivitesinden 29 kez büyüktür.
- b) Albumin varlığı hem T₁ ve hem de T₂ rölaksivitesini hafifçe arttırmaktadır.
- c) 0.1 H₂O/ 0.9 D₂O 'da proton T₁ rölaksivitesi değişmezken, T₂ rölaksivitesi azalmaktadır.
- d) 0.1 H₂O/ 0.9 D₂O çözeltisine albumin eklenmesi her iki rölaksiviteyi arttırmaktadır.

İyon içeren ya da içermeyen D₂O ve 0.1 H₂O/ 0.9 D₂O çözeltilerinin albumin konsantrasyonu ile ilgili, proton T₁ ve proton T₂ rölaksiviteyi Çizelge 8. 'de verilmiştir.

- a) D₂O çözeltisindeki albuminle ilgili R₂ rölaksiviteyi R₁ rölaksivitesinden büyüktür.
- b) 0.1 H₂O/ 0.9 D₂O karışımında R₂ rölaksivitesi artmaktadır. R₁ ise negatiftir. Bu da T₁ mekanizmasının T₂ den farklılığı ile ilgilidir.

Gelecek için düşüncelerimiz ise D₂O ortamında çok yüksek proton T₂ rölaksivitesi kontrast amaçlı çalışmalarda kullanılması için planlanabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çizelge 7. Albumin varlığında ve yokluğunda D₂O ile 0.1 H₂O/ 0.9 D₂O çözeltilerinin proton T₁ ve T₂ röleksiviteri

İyon Konsantrasyonu (mM)	D ₂ O (s ⁻¹)	0.02 g alb+D ₂ O (s ⁻¹)	0.1H ₂ O/0.9D ₂ O (s ⁻¹)	0.02g alb+0.1H ₂ O/0.9D ₂ O (s ⁻¹)
R ₁	12.495	15.143	16.352	19.121
R ₂	374.78	381.32	325	344.18

Çizelge 8. İyon varlığında ve yokluğunda D₂O ile 0.1 H₂O/ 0.9 D₂O çözeltilerinin albumin konsantrasyonu ile ilgili, proton T₁ ve proton T₂ röleksiviteri

Albumin Konsantrasyonu (mM)	D ₂ O (s ⁻¹)	0.1 H ₂ O/0.9 D ₂ O (s ⁻¹)
R ₁	6.76	-5.58
R ₂	204.2	78.4

6. KAYNAKLAR

A. Sulkowska, B. Bojko, J. Rownicka, P. Rezner, W.W. Sulkowski, The competition of drugs to serum Albumin in combination chemotherapy: NMR study J. Mol. Struct. 744 (2005) 781-787.

A. Van-Quynh, S. Willson, R.G. Bryant, Protein reorientation and bound water molecules measured by ^1H magnetic spin-lattice relaxation, Biophys. J. 84 (2003) 558-563.

A. Yilmaz, H. Budak, F.S. Ulak, Determination of the effective correlation time modulating ^1H NMR relaxation processes of bound water in protein solutions, Magn. Reson. Imaging. 26 (2008) 254-260.

B. Halle, Protein hydration dynamics in solution: a critical survey, Philos. T. Roy. Soc. Lond. B. 359 (2004) 1207-1224.

Cistola, D.P., Small, D.M.: J. Clin. Invest. 87, 1431-1441 (1991)

Danuta Kruk, Jozef Kowalewski, Field dependent proton relaxation in aqueous solutions of some manganese (II) complexes: a new interpretation, J Biol Inorg Chem (2003) 8:512-518

Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S., Aseenzi, P.: IUBMB Life 12, 787-796 (2005)

I. Bertini, M. Fragai, C. Luchinat, G. Parigi, ^1H NMRD profiles of diamagnetic proteins: a model-free analysis, Magn. Reson. Chem. 38 (2000) 543-550.

I. Bertini, Y.K. Gupta, C. Luchinat, G. Parigi, C. Schlörb, H. Schwalbe, NMR Spectroscopic detection of protein protons and longitudinal relaxation rates between 0.01 and 50 MHz, Angew. Chem. 117 (2005) 2263-2265.

Ivano Bertini, Claudio Luchinat, Giacomo Parigi, and Roberta Pierattelli, NMR Spectroscopy of Paramagnetic Metalloproteins, Chem bio chem 2005,6,1536-1549

J. Gallier, P. Rivet, J. de Certaines, ^1H - and ^2H -NMR study of bovine serum Albumin solutions, *Biochim. Biophys. Acta.* 915 (1987) 1-18.

J. Oakes, Protein hydration. Nuclear magnetic resonance relaxation studies of the state of water in native bovine serum Albumin solutions, *J. Chem. Soc. Farad. Trans.* 72 (1976) 216-227.

James I. Barnhart, Phd, and Robert N. Berk, Md, Influence of Paramagnetic Ions and pH on Proton NMR Relaxation of Biologic Fluids, *invest radiol* 1986; 21:132-13

Jean Pierre Korb and Robert G. Bryant, Magnetic Field Dependence of Proton Spin-Lattice Relaxation Times , *Magnetic Resonance in Medicine* 48:21-26 (2002)

K. Hallenga, S.H. Koenig, Protein rotational relaxation as studied by solvent ^1H and ^2H magnetic relaxation, *Biochemistry* 15 (1976) 4255-4264.

Koenig SH, Schillinger WE. Nuclear magnetic relaxation dispersion in protein solutions. I. Apotransferrin. *J Biol Chem* 1969; 244:3283-89.

L. Gösch, F.L. Noack, NMR relaxation investigation of water mobility in aqueous bovine serum Albumin solutions, *Biochim. Biophys. Acta.* 453 (1976) 218-232.

Luce Vander Elst, Sophie Laurent, Helene Masaka Bintoma and Robert N. Muller, Albumin-bound MRI contrast agent: the dilemma of the rotational correlation time, R.G. Bryant, The dynamics of water protein interactions, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25 (1996) 29-53.

S. Kiihne, R.G. Bryant, Protein-Bound Water Molecule Counting by Resolution of ^1H Spin-Lattice Relaxation Mechanisms, *Biophys. J.* 78 (2000) 2163-2169.

S.H. Koenig, Classes of hydration sites at protein-water interfaces: The source of contrast in magnetic resonance imaging, *Biophys. J.* 69 (1995) 593-603.

S.H. Koenig, R.D. Brown III, A molecular theory of relaxation and magnetization transfer: Application to cross-linked BSA, a model for tissue, *Magn. Reson. Med.* 30 (1993) 685-695.

S.H. Koenig, R.D. Brown III, R. Ugolini, Magnetization transfer in cross-linked bovine serum Albumin solutions at 200 MHz: A model for tissue, [Magn. Reson. Med.](#) 29(3) (1993) 311-316.

Silvio Aime , Simonetta Canton, Simonetta Geninatti Crich, and Enzo Terreno, ^1H and ^{17}O relaxometric investigations of the binding of Mn(II) ion to human serum Albumin, *Magnetic Resonance in chemistry* 2002; 40:41-48

Silvio Aime, Pier Lucio Anelli, Mauro Botta, Marino Brocchetta, Simonetta Canton, Franco Fedeli, Eliana Gianolio, Enzo Terreno, Relaxometric evaluation of novel manganese(II) complexes for application as contrast agent in magnetic resonance imaging, *J Biol Inorg Chem* (2002) 7:58-67

V.P. Denisov, B. Halle, Hydrogen Exchange Rates in Proteins from Water ^1H Transverse Magnetic Relaxation, *J Am Chem Soc.* 124(35) (2002) 10264-10265.

V.P. Denisov, J. Peters, H.D. Hörlein, B. Halle, Using buried water molecules to explore the energy landscape of proteins, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 505–509.

Young S.Kang, John C. Gore, and Ian M. Armitage, Studies of Factors Affecting the Design of NMR Contrast Agent: Manganese in Blood as a Model System , *Magnetic Resonance in Medicine* 1,396-409 (1984)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Canan AYTUĞ AVA

Doğum Yeri : Diyarbakır/ Dicle

Doğum Tarihi :06.02.1985

Medeni Hali :Evli

Yabancı Dil :İngilizce

Eğitim Durumu (kurum ve yıl)

İlkokul : Mehmetçik İlköğretim Okulu (1992-1997)

Orta okul : Nevzat Ayaz Anadolu Lisesi (1997-2001)

Lise : Nevzat Ayaz Anadolu Lisesi (2001-2004)

Lisans :Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü (2005-2009)

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Öğretmenliği

Tezsiz Yüksek lisans(2009-2010)

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim dalı

yüksek lisans (2010-2013)