

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**D₂O ÇÖZELTİLERİNDEKİ ALBÜMİN TOPAKLAŞMASININ
(AGGREGATION) NMR
DURULMA ZAMANLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Şilan BATURAY

**DOKTORA TEZİ
FİZİK ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR
ARALIK-2012**

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Şilan BATURAY tarafından yapılan “D₂O Çözeltilerindeki Albümin Topaklaşmasının (Aggregation) NMR Durulma Zamanları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Fizik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Ali YILMAZ

Üye : Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN

Üye : Doç. Dr. Mehmet Zafer KÖYLÜ (Danışman)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Gülten KAVAK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Dilan ALP

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 27/12/2012

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20...

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Çalıőmam boyunca beni yönlendiren Danıőmanım Doç. Dr. Mehmet Zafer KÖYLÜ'ye, tezimin her aőamasında benden yardımlarını esirgemeyen Hocam Prof. Dr. Ali YILMAZ'a, her türlü destek ve yardımlarından dolayı Arő. Gör. Bilgin ZENGİN'e ve eőim Recep BATURAY'a çok teşekkür ederim.

Bu tez Dicle Üniversitesi araştırma fonu **DÜBAP-09-FF-11** nolu projeden desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VII
TABLO LİSTESİ.....	X
KISALTMA VE SİMGELER.....	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Bireysel Spinlerin Bir Manyetik Alandaki Davranışları, Boltzman Dengesi ve Makroskobik Miknatislanma.....	3
1.1.1. Radyo Frekans (RF) pulsu	5
1.1.2. Dönen Sistem.....	6
1.1.3. 90° pulsu.....	7
1.1.4. 180° pulsu.....	8
1.1.5. Spin Sisteminin Çevresi.....	8
1.1.6. Spin Çevreden Nasıl Enerji Alır ve Çevreye Nasıl Enerji Verir?.....	10
1.1.7. Sıcak Spinlerin Çevreye Enerji Aktarması ve T ₁ Süreci.....	11
1.1.8. Spinlerin Defaze Olması ve T ₂ Süreci.....	12
1.1.9. Inversion Recovery Puls Adımları.....	13
1.1.10. Spin- Echo Puls Adımı.....	15
1.2. Durulmaya Yol Açan Etkileşme Türleri Ve Bu Etkileşmeleri Modüle Eden Hareketler.....	18
1.2.1. Dipolar Rölaksasyon.....	18
1.2.2. Protein Topaklanması ve Rölaksasyon-Konsantrasyon İlişkisi.....	23
2. KAYNAK ÖZETLERİ	27
3. MATERYAL VE METOT	37

3.1.	Örneklerin Hazırlanması	37
3.2.	Rölaksasyon Ölçümleri.....	38
3.3.	Albümin (HSA).....	38
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1.	Bulgular.....	41
4.2.	Tartışma.....	81
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	83
5.1.	Sonuç	83
5.2.	Öneriler.....	83
6.	KAYNAKLAR.....	85
	ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

D₂O ÇÖZELTİLERİNDEKİ ALBÜMİN TOPAKLAŞMASININ (AGGREGATION)

NMR

DURULMA ZAMANLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Şilan BATURAY

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZİK ANABİLİM DALI

2012

Bu çalışma, albümin topaklanmasının, T_1 ve T_2 durulma zamanlarına olan etkilerini açığa kavuşturmak ve durulmaya yol açan mekanizmaları netleştirmek için yapıldı. Albümin topaklanmasının varlığı Inversion Recovery (IR)- T_1 FID sinyalleri, Spin Echo (SE)- T_2 sinyal ve bozunum eğrileri cinsinden incelendi.

Deneyde, insan serum albümini ve % 0,1 artık su içeren Döterium Oksit (D_2O) çözücüsü kullanıldı. Konsantrasyon incelemeleri için kullanılan albümin çözeltileri 1 ml D_2O 'ya değişik miktarlarda albümin eklenerek iki grupta hazırlandı. Birinci grupta albümin miktarları 0.02'lik eklemelerle 0.10 g'a kadar; ikinci grupta ise 0,1'lik eklemelerle 0.5 g'a kadar değiştirildi. Ölçümler Bruker Avance 400 MHz NMR spektrometresi kullanılarak gerçekleştirildi. T_1 ölçümleri Inversion Recovery, T_2 ölçümleri ise Carr-Purcell- Meibon-Gill metodu ile yapıldı.

Elde edilen FID ve Eko setleri ile IR- T_1 ve SE- T_2 eğrilerinden, D_2O 'nun FID ve SE katarlarının tek exponansiyel bir biçimde değiştiği görüldü. Ancak albümin katıldıkça, FID ve SE katarlarının exponansiyel görünümü değişti. Buda albümin topaklanmasının, ileri konsantrasyonlarda artmaya başladığını göstermektedir. % 10 konsantrasyona kadar olan örneklerin IR-FID ve SE- T_1 katarları ile IR- T_1 ve SE- T_2 eğrileri ilgili formülleri mükemmel bir şekilde fit etmektedir. Bu durum, % 10 konsantrasyona kadar albümin kullanılarak NMR T_1, T_2 ölçümleri yapılabileceğini göstermektedir. Sinyal bozunumları % 20 konsantrasyondan sonra

$1/T_1$ ve $1/T_2$ eğrileri üzerinde barizleşiyor. Bu da % 20 ve daha sonraki konsantrasyonlarda albümin topaklanmasının çok etkiliğini gösteriyor.

Anahtar kelimeler: T_1 , T_2 , NMR, albümin topaklanması, Inversion Recovery.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECT OF ALBUMIN AGGREGATION ON NMR RELAXATION IN D₂O SOLUTIONS

PhD THESIS

Şilan BATURAY

DEPARTMENT OF PHYSICS
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2012

This study was carried out to explain the effect of albumin aggregation to T₁ and T₂ relaxation times and mechanisms leading to relaxation. Existence of albumin aggregation was investigated in terms of Inversion Recovery (IR)-T₁ FID signals, Spin Echo (SE)-T₂ signals and decay curves.

In the experiment, Human serum albumin and Deuterium Oxide (D₂O) solvent, which includes 0,1 % residual water, were used. Albumin solutions for concentration studies were prepared in two groups by adding different amount of albumin to 1 ml D₂O. In the first group, albumin was added as 0.02 g up to 0.1 g, while in the second group, it was added as 0.1 g up to 0.5 g. Measurements were performed by using a Bruker Avance 400 MHz NMR spectrometer. T₁ measurements were conducted by Inversion Recovery method, whereas T₂ measurements were carried out by Carr-Purcell-Meibon-Gill Method.

FID and SE qatars of D₂O exhibit a single exponential change, which has seen from FID, Echo sets and IR-T₁, SE-T₂ curves. On the other hand, when albumin was added, exponential appearance of FID and SE qatars changed, which shows that protein aggregation increases at high concentrations. Concentrations of up to 10 % of the samples of IR-FID, SE-T₁ qatars and IR-T₁, SE-T₂ curves fit perfectly with related formulas, which shows that T₁, T₂ experiments can be performed by using albumin up to % 10 concentrations. Signal decays after 20 % concentration on the 1/T₁ ve 1/T₂ curves become apparent, which shows that protein aggregation is very effective at 20 % and higher concentrations.

Keywords: T₁, T₂, NMR, Albumin aggregation, Inversion Recovery

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	Bir I spininin H_0 manyetik alanı içerisindeki hareketleri.....	3
Şekil 1.2.	I spininin H_0 manyetik alanı içerisindeki hareketlerine karşılık gelen enerji seviyeleri.....	4
Şekil 1.3.	Bir spin topluluğunun H_0 manyetik alanı içerisindeki hareketleri ve bu hareketlere karşılık gelen enerji seviyeleri, alt enerji seviyesinde daha fazla nüfus bulunması, alt ve üst enerji seviyeleri arasındaki nüfus farkı bir M_0 manyetizasyonunu vermektedir.....	4
Şekil 1.4.	Bir H_0 alanı içerisine yerleştirilmiş spin topluluğuna H_{RF} alanı uygulandıktan sonra ortaya çıkan hareketler.....	6
Şekil 1.5.	Dönen sistemde yani H_1 'in (H_{RF} 'in) sabit kaldığı sistemde gözükten manyetik alanlar.....	6
Şekil 1.6.	Bir spin topluluğuna 90° pulsunun uygulanması süresinde gelişen olayların dönen sistemde görünüşü.....	8
Şekil 1.7.	Bir spin topluluğuna 180° pulsunun uygulanması süresinde gelişen olayların dönen sistemde görünüşü.....	8
Şekil 1.8.	Moleküllerin içerisinde bulunan spinlerin çevreleri ile beraber görüntülenmesi.....	9
Şekil 1.9.	Çevresi ile beraber ele alınan spin topluluğuna ait çevre türlerinin enerji seviyeleri ile beraber şematize edilmesi.....	10
Şekil 1.10.	Bir spin sisteminin çevrenin kurduğu yerel alan etkisi ile enerji alması ve salması.....	11
Şekil 1.11.	Doyum durumunda bulunan bir spin sisteminin çevreye enerji vererek orijinal durumuna dönmesi, dönüş süresi T_1 ile karakterize edilir.....	12
Şekil 1.12.	Spin sistemin defaze olması ve T_2 durulma zamanı.....	13
Şekil 1.13.	Bir tek Inversion Recovery Puls adımını anlatan şema.....	14
Şekil 1.14.	İki tane IR puls adımını anlatan şema.....	14
Şekil 1.15	$(180^\circ-\tau-90^\circ-TR)$ puls adımlarının ard arda uygulanmasından sonra ölçülen miktatıslanmaların bekleme zamanlarına göre grafiğe geçirilmesinden elde edilen Inversion Recovery Puls eğrisi.....	15
Şekil 1.16.	Spin-Echo Puls adımı.....	16
Şekil 1.17.	T_e bekleme süreleri arttırılarak peş peşe uygulanmasıyla oluşan $M(T_{e1})$, $M(T_{e2})$, $M(T_{e3})$,, $M(T_{en})$ sinyalleri.....	16

Şekil 1.18.	Spin-echo bozunum eğrisi.....	17
Şekil 1.19.	Gözlem altındaki spinimizle komşu spinler arasındaki ilişki dipolar etkileşmeyi anlatan şema.....	18
Şekil 1.20.	(a) Komşu I spinlerinin, gözlem altındaki spinlerin bulunduğu yerlerde kurdukları yerel alanların z bileşenlerinin yol açtığı enerji genişlemeleri. Burada sadece üst seviyeye genişlemektedir.16.000 farklı şekilde genişleme(veya değişme) mümkün olduğu için spinler 16.000 gruba ayrılır. M_0 mıknatıslanması da 16.000 alt mıknatıslanmaya ayrılır. (b) bu genişlemelerin toplu gösterimi: Üst enerji seviyesi genişler ve $m_1, m_2, \dots, m_{16000}$ 'nın toplamından M_0 oluşur.....	19
Şekil 1.21.	Gözlem altındaki spinimizin komşu H spininin doğurduğu H_{xy} bileşenlerinden etkilenmesini gösteren şema.....	19
Şekil 3.1.	Pure D_2O için tek puls spektrumu.....	37
Şekil 3.2.	İnsan serum albüminin şematik gösterimi, 6 palmitik asit molekülüne bağlanmış haliyle.....	38
Şekil 4.1.	0.00 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi	41
Şekil 4.2.	0.02 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi.....	42
Şekil 4.3.	0.04 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi.....	43
Şekil 4.4.	0.06 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi.....	44
Şekil 4.5.	0.08 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi.....	45
Şekil 4.6.	0.10 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi.....	46
Şekil 4.7.	0.00 g albümin için Inversion Recovery serisi.....	47
Şekil 4.8.	0.02 g albümin için Inversion Recovery serisi.....	48
Şekil 4.9.	0.04 g albümin için Inversion Recovery serisi.....	49
Şekil 4.10.	0.06 g albümin için Inversion Recovery serisi.....	50
Şekil 4.11.	0.08 g albümin için Inversion Recovery serisi.....	51
Şekil 4.12.	0.10 g albümin için Inversion Recovery serisi.....	52
Şekil 4.13.	0.00 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi.....	53
Şekil 4.14.	0.02 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi.....	54
Şekil 4.15.	0.04 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi.....	55
Şekil 4.16.	0.06 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi.....	56
Şekil 4.17.	0.08 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi.....	57
Şekil 4.18.	0.10 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi.....	58
Şekil 4.19.	0 00 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi.....	59
Şekil 4.20.	0.02 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi.....	60
Şekil 4.21.	0.04 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi.....	61

Şekil 4.22.	0.06 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi.....	62
Şekil 4.23.	0.08 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi.....	63
Şekil 4.24.	0.10 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi.....	64
Şekil 4.25.	0.2 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi.....	65
Şekil 4.26.	0.3 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi.....	66
Şekil 4.27.	0.4 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi.....	67
Şekil 4.28.	0.5 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi.....	68
Şekil 4.29.	0.2 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi.....	69
Şekil4.30.	0.3 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi.....	70
Şekil 4.31.	0.4 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi.....	71
Şekil 4.32.	0.5 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi.....	72
Şekil 4.33.	0.2 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi.....	73
Şekil 4.34.	0.2 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi.....	74
Şekil 4.35.	0.3 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi.....	75
Şekil 4.36.	0.4 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi.....	76
Şekil 4.37.	0.5 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi.....	77
Şekil 4.38.	Düşük Konsantrasyonlarda $1/T_1$ değerinin konsantrasyona karşı grafiği (g/ml)	79
Şekil 4.39.	Düşük Konsantrasyonlarda $1/T_2$ değerinin konsantrasyona karşı grafiği (g/ml)	79
Şekil 4.40.	Yüksek Konsantrasyonlarda $1/T_1$ değerinin konsantrasyona karşı grafiği (g/ml)	80
Şekil 4.41.	Yüksek Konsantrasyonlarda $1/T_2$ değerinin konsantrasyona karşı grafiği (g/ml)	80

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>		<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1.	Düşük konsantrasyonlar için Ölçülen IR ve SE eğrilerinden elde edilen T_1 ve T_2 zamanları ve de $1/T_1$ ve $1/T_2$ oranları.....	78
Tablo 4.2.	Yüksek konsantrasyonlar için Ölçülen IR ve SE eğrilerinden elde edilen T_1 ve T_2 zamanları ve de $1/T_1$ ve $1/T_2$ oranları.....	78

KISALTMA VE SİMGELER

T_1	: Spin-Örgü durulma zamanları
T_2	: Spin-Spin durulma zamanları
NMRD	: Nükleer Manyetik Rezonans Dispersiyon
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
IR	: Inversion Recovery
SE	: Spin Echo
ml	: Mililitre
g	: Gram
FID	: Free İnduction Decay
T_{1f} (serbest)	: Serbest suyun öz rölaksasyonu
T_{1b} (bağlı)	: Bağlı suyun öz rölaksasyonunu
MHz	: Mega Hertz
BSA	: Bovine Serum Albüminin
KHz	: Kilo Hertz
s	: Saniye
ϵ/T	: viskozite/sıcaklık
BPTI	: bovine pancreatic tripcine- inhibitör
ns	: Nano saniye
H_o	: Dış manyetik alan
γ	: Jiromanyetik oran
RF	: Radio Frekans pulsu
H_{rf}	: Radio Frekans alanı
I	: Proton Spini
S	: Elektron Spini
i	: Akım
M	: Miknatıslanma
TR	: Puls adımı tekrarlama zamanı
D ₂ O	: Döterium Oksit
n	: Bir tek moleküle bağlanan su sayısı

1. GİRİŞ

Albümin 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 (Grösch ve Noack 1976, Hallenga ve Koenig 1976, Oakes 1976, Gallier 1987, Koenig ve Brown 1993, Koenig 1995, Bryant 1996, Bertini ve ark. 2000, Kiihne ve Bryant 2000, Van-Quynh 2003, Halle 2004, Bertini 2005). Durulma mekanizmalarını açıklamak için birtakım yöntemlere başvurulmuştur (Grösch ve Noack. 1976, Hallenga ve Koenig 1976, Oakes 1976, Gallier 1987, Koenig ve Brown 1993, Koenig 1995, Bryant 1996, Bertini ve ark. 2000, Kiihne ve Bryant 2000, Bertini 2005, Yılmaz ve ark. 2008). Bu yöntemlerden birincisi, albüminin rotasyonel korelasyon (ilgi) zamanının Stokes-Einstein bağıntısından türetilmesine dayanır (Oakes 1976, Koenig 1995). İkincisi, ilgi zamanlarının, deneysel veri ile teorinin, fit yolu ile türetilmesine dayanır (Grösch ve Noack 1976, Gallier 1987). Üçüncüsü, H_2O ve D_2O durulma oranlarının karşılaştırmasına dayanır (Kiihne ve Bryant 2000, Van-Quynh 2003). Dördüncüsü ise, rotasyonel ilgi zamanının, T_1/T_2 oranlarından elde edilmesine dayanır (Yılmaz ve ark. 2008). Başlangıçtaki NMR çalışmalarında mikro saniye mertebelerinde çıkan ilgi zamanları, daha sonraki çalışmalarda nano saniye mertebesinde türetilmiştir (Hallenga ve Koenig 1976, Koenig ve Brown 1993, Bertini ve ark. 2000, Kiihne ve Bryant 2000, Van-Quynh 2003, Yılmaz ve ark. 2008). Aradaki fark, eski çalışmalarda kullanılan yüksek protein konsantrasyonu (%10 ya da %15 gibi) ile açıklanmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda albümin topaklaşmasının bu molekülün hareketini yavaşlattığı; mikro saniye mertebesinde ölçülen uzun ilgi zamanının, bu topaklaşma ile ilgili olduğu öne sürülmüştür (Hills ve ark. 1989, William ve ark. 1997, Kiihne ve Bryant 2000, Van-Quynh 2003, Yian-Biao ve ark. 2004, Wei, W. 2005, Aimee ve ark.2009, Viktor ve ark. 2012). Albümin topaklanmasının, T_1 ve T_2 durulma zamanları üzerine olan etkilerinin açığa kavuşturulması, durulmaya yol açan mekanizmaları netleştirmek açısından son derece önemlidir. Bu nedenle bu konu tez çalışması olarak seçilmiştir.

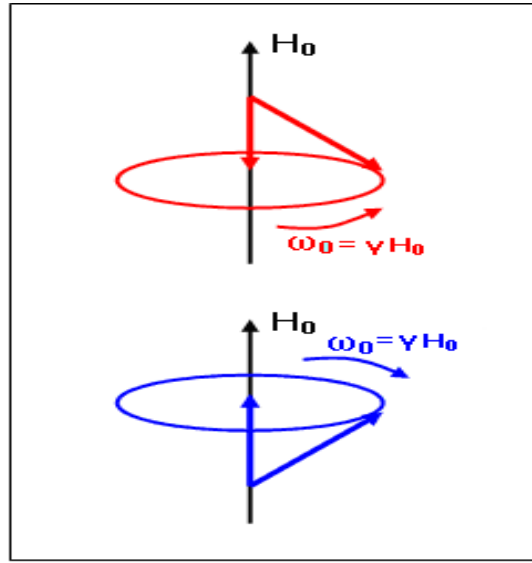
Protein topaklanmasının belirtileri olarak Inversion Recovery (IR) ve Spin Echo (SE) sinyallerindeki bozulmalar gösterilmiştir (Hills ve ark. 1989). Durulma

zamanları ile protein konsantrasyonu arasında var olan lineer ilişkinin de, protein topaklaşmanın ortaya çıkması ile bozulduğu gözlemlenmiştir (Hills ve ark. 1989, William ve ark. 1997, Kiihne ve Bryant 2000, Van-Quynh 2003, Yian-Biao ve ark. 2004, Wei, W. 2005, Aimee ve ark.2009, Viktor ve ark. 2012.). Ancak protein topaklaşmasının görünmeye başladığı konsantrasyon üzerinde görüş birliği bulunmamaktadır (Olechnowicz ve ark. 1999). Bazı kaynaklara göre böyle bir topaklaşma 20 g/dl (20%) ve hatta 30 g/dl (30%) protein varlığında meydana gelmektedir (Olechnowicz ve ark. 1999). Bu durumda, topaklaşmanın olduğu konsantrasyonu netleştirmek, durulma mekanizmalarını açıklamak için gereklidir. Albümin topaklaşmasının ortaya çıktığı konsantrasyonu netleştirmek için, D₂O çözeltilerinin ¹H, IR, FID (Free Induction Decay) ve SE katarları ve de bu katarlardan elde edilen IR-T₁ ve SE-T₂ eğrileri artan albümin konsantrasyonuna göre incelendi.

1.1. Bireysel Spinlerin Bir Manyetik Alandaki Davranışları, Boltzman Dengesi ve Makroskopik Mıknatıslanma

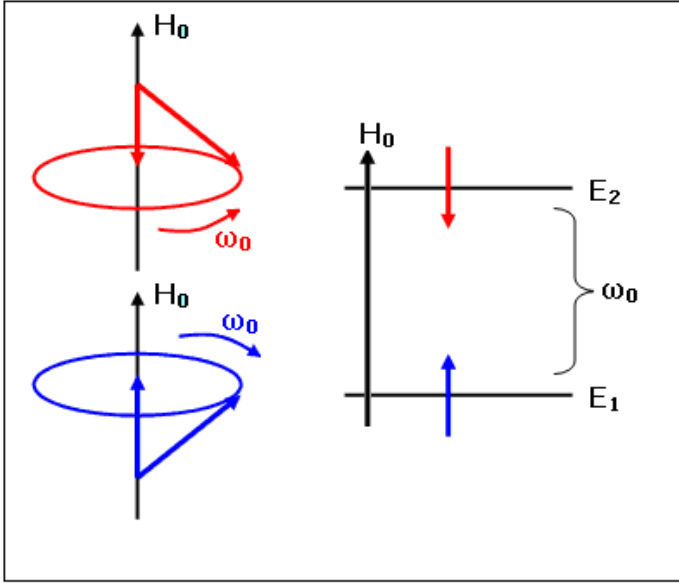
Her atom NMR'a uygun değildir. Çekirdeğinde spin (ya da manyetik moment) denilen içsel açısal momentum olan atomlar NMR'a uygundur. Spin, çekirdekteki protonun kendi eksenini etrafında dönmesi sonucu oluşur. Çekirdeğinde spin denilen mıknatıs bulunan atomlara örnek olarak ^1H , D , ^{19}F , ^{13}C ve ^{31}P verilebilir.

Spin içeren bir atom, bir dış H_0 manyetik alanına konulduğunda; Spin H_0 etrafında ya bir yönde ya da diğer yönde döner. Dönme hızı ω_0 , H_0 alan şiddeti ile orantılıdır ($\omega = \gamma H$, γ jiromanyetik oran). Manyetik alana yerleştirilen tüpteki tüm protonlar da, ya bir yön ya da ters yönde dönerler. Bunlardan sadece 2 tanesinin yan yana getirilmesiyle, Şekil 1.1 deki hareket diyagramı elde edilir.



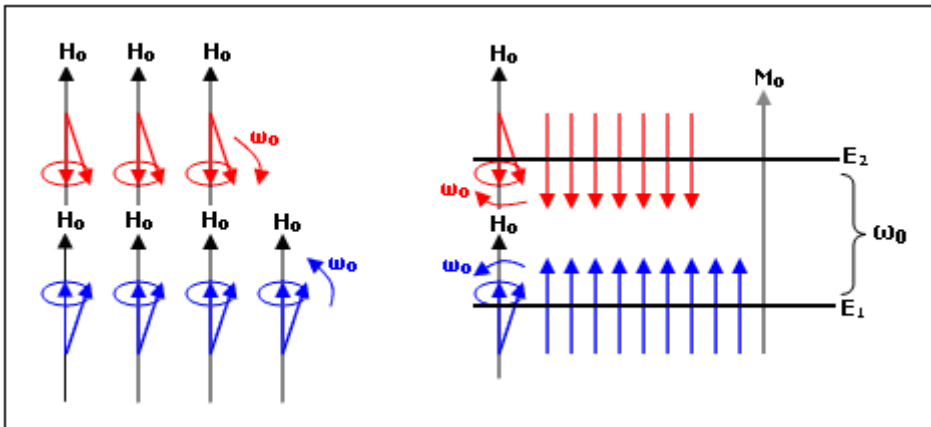
Şekil 1.1. Bir I spininin H_0 manyetik alanı içerisindeki hareketleri

I_z bileşeni H_0 'a paralel olan spinin enerjisi az; I_z bileşeni H_0 'a zıt paralel olan spinin enerjisi ise daha fazladır. Şekil 1'deki hareket diyagramı enerji seviyelerini de kapsayacak şekilde genişletilebilir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. I spininin H_0 manyetik alanı içerisindeki hareketlerine karşılık gelen enerji seviyeleri

Bir dış H_0 alanı içine yerleştirilen örnek tütünün içinde 2 tane değil, avogadro sayısı kadar spin vardır. Bu spinlerin her biri H_0 etrafında ya bir yönde ya da ters yönde dönerler. Daha önce söylendiği gibi saat yönünde dönen(huni yüzeyinde) spinler az enerjili ve ters yönde (ters huni yüzeyinde) dönen spinler ise daha fazla enerjili olmaktadır. Aynı hareket ya da aynı enerjiye sahip olan spinlerden bazıları yan yana dizdirilirse, Şekil 1.3'deki gibi, temsili bir hareket-enerji diagramı elde edilir.



Şekil 1.3. Bir spin topluluğunun H_0 manyetik alanı içerisindeki hareketleri ve bu hareketlere karşılık gelen enerji seviyeleri, alt enerji seviyesinde daha fazla nüfus bulunması, alt ve üst enerji seviyeleri arasındaki nüfus farkı bir M_0 manyetizasyonunu vermektedir

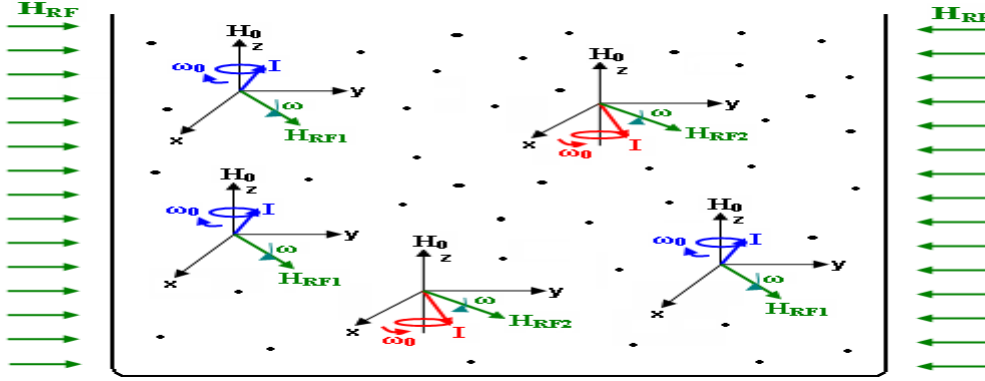
Şekil 1.3'ün E_1 seviyesinde yukarıya olarak gösterilen oklar, spinlerin H_0 alanına paralel bileşenini; E_2 seviyesinde aşağı yönlü olarak gösterilen oklar ise spinlerin H_0 alanına zıt-paralel olan bileşenini göstermektedir. İstatistik Fizik'e göre: huni dönüşü spinlerin sayısı, ters huni dönüşü yapan spinlerin sayısından daha fazladır. Bu nedenle alt enerji seviyesine fazla spin dizdirilir. Diğer bir söyleyişle alt enerji seviyesinde daha fazla ve üst enerji seviyesinde daha az spin vardır. Bu nüfuslar Boltzman denklemleri cinsinden

$$N_1 = Ce^{-E_1/KT} \quad \text{Ve} \quad N_2 = Ce^{-E_2/KT} \quad (1.1)$$

ile verilir. Denklem alt enerji seviyesine daha fazla ve üst enerji seviyesine daha az spin yerleşeceğini ortaya koyar. $M_0 =$ sabit. (N_1-N_2) olarak yazılabilir. Bu nüfus farkının bileşkesi bir M_0 mıknatıslanmasına yol açar. Sinyal bu mıknatıslanmadan üretilir. Sinyali veren mıknatıslanma da şekil 1.3'de verilmiştir H_0 alanına paralel M_0 mıknatıslanmasını veren bu duruma, Boltzman Dengesi de denir.

1. 1. 1. Radyo Frekans (RF) pulsu

RF pulsu örneğe net bir enerji veren puls olmaktadır. X-Y düzleminde dönen iki bileşeni olan bu alan, aslında tüm örneğe uygulanır. Bu nedenle de örnek içindeki tüm spinler, bu alanı hisseder. Durum temsilen, şekil 1.4'deki gibi çizilebilir.

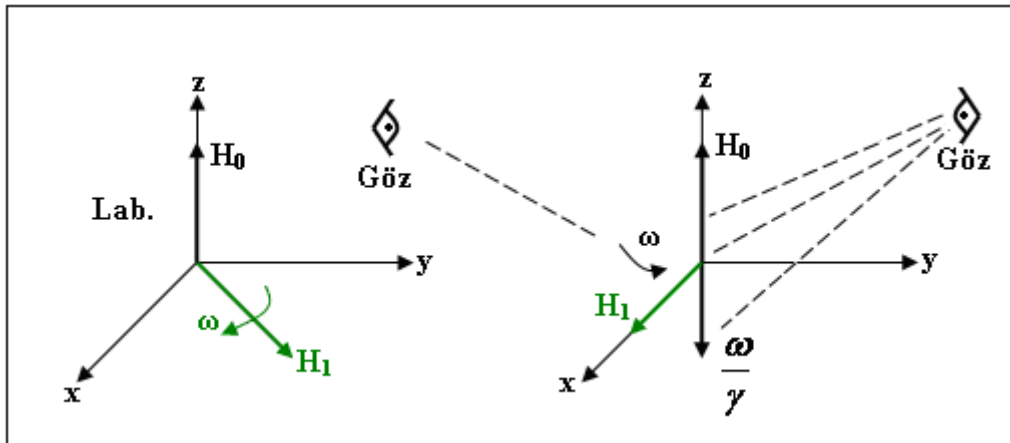


Şekil 1.4. Bir H_0 alanı içerisinde yerleştirilmiş spin topluluğuna H_{RF} alanı uygulandıktan sonra ortaya çıkan hareketler

H_{rf} alanı kısaca H_1 olarak da gösterilebilir. $H_1 \ll H_0$ olmaktadır.

1. 1. 2. Dönen Sistem

Dönen sistem (x,y,z) , Laboratuar sistemine göre ω hızıyla dönen bir sistemdir. Bu sistemde H_1 alanı x -eksenine göre hareket etmez ve x eksenine çakışık kalır. Laboratuardan bakan bir göz, dönen sistemi Şekil 1.5 deki gibi görür.



Şekil 1.5. Dönen sistemde yani H_1 'in (H_{RF} 'in) sabit kaldığı sistemde gözükten manyetik alanlar

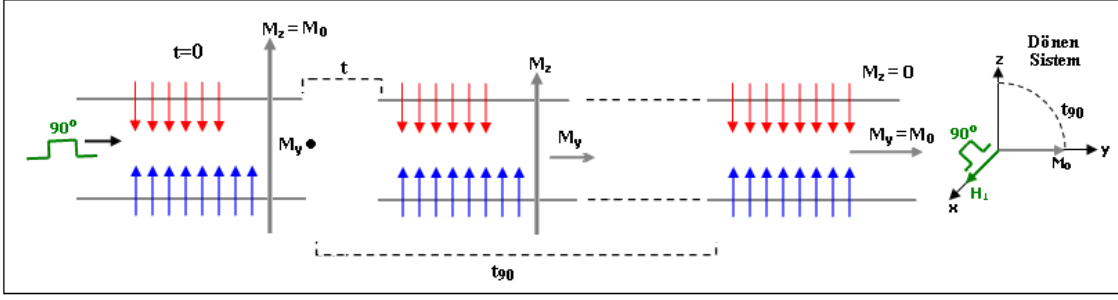
H_1 (yani H_{RF})'i x-ksenine göre sabit tutmanın bedeli olarak; dönen sistemde, H_0 ' a zıt olan bir $\frac{\omega}{\gamma}$ manyetik alanı ortaya çıkar. Laboratuarda oturan bir kimse, sadece H_0 ve H_1 alanlarını görürken, Dönen sistemde oturan bir kimse H_0 , H_1 ve $\frac{\omega}{\gamma}$ alanlarını görür.

RF pulsu yok iken H_1 olmaz. Bu nedenle H_1 ile x-kseninin çakışık kalması söz konusu olmaz. Bu ise laboratuvar sistemine dönüş anlamına gelir. Dönen sistem (yani H_1 ile x-kseninin çakışık kalması), sadece RF pulsu varken anlamlıdır. RF pulsu yok iken ve olaylara spini gören hayali gözlük ile bakarken, Laboratuvar sistemini kullanmak zorundayız. RF pulsu varken ve olayları mıknatıslanmayı gören hayali gözlük ile incelerken ise, dönen sistemi kullanmak daha yararlıdır.

1. 1. 3. 90° pulsu

Spin gözlü ile bakıldığında 90° pulsu, alt ve üst seviyedeki spin sayısını eşitlemeye yarayan enerjidir. Bu pulsun 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.

Mıknatıslanmayı gören gözlükle bakıldığında ise, rezonans esnasında, z-yönündeki bileşke alan sıfır olur. Sadece H_1 kalır ve z- yönündeki mıknatıslanma H_1 etrafında döner. Bu dönüş, M_z bileşenini giderek küçültür. Dönen mıknatıslanma y-ekseni yönüne yattığında $M_z=0$ ve $M_y= M_0$ olur (Şekil 1.6).

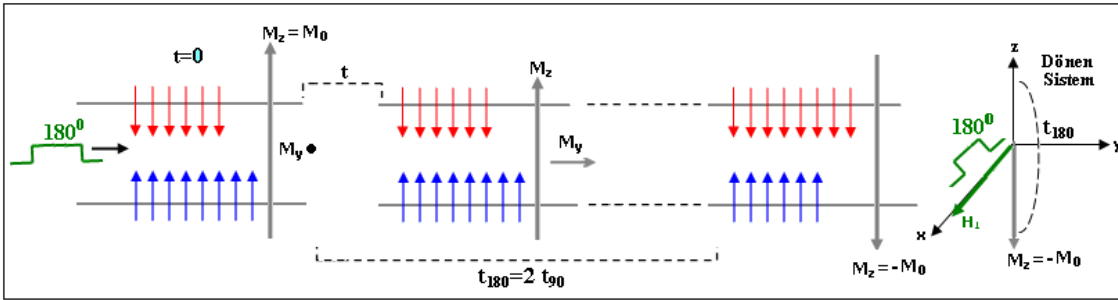


Şekil 1.6. Bir spin topluluğuna 90° pulsunun uygulanması süresinde gelişen olayların dönen sistemde görünüşü

Alt ve üst enerji seviyelerindeki spin sayılarının eşit olması haline saturasyon (doyum) denir. Bu esnada $M_0 = 0$ olmuştur.

1. 1. 4. 180° pulsu

Alt seviyede ki fazla spinlerin tümünü üst seviyeye geçiren puls olmaktadır. Bu işlem sonunda M mıknatıslanması H_0 'a zıt paralel olur. Bu durum Şekil 1.7'de görülüyor.

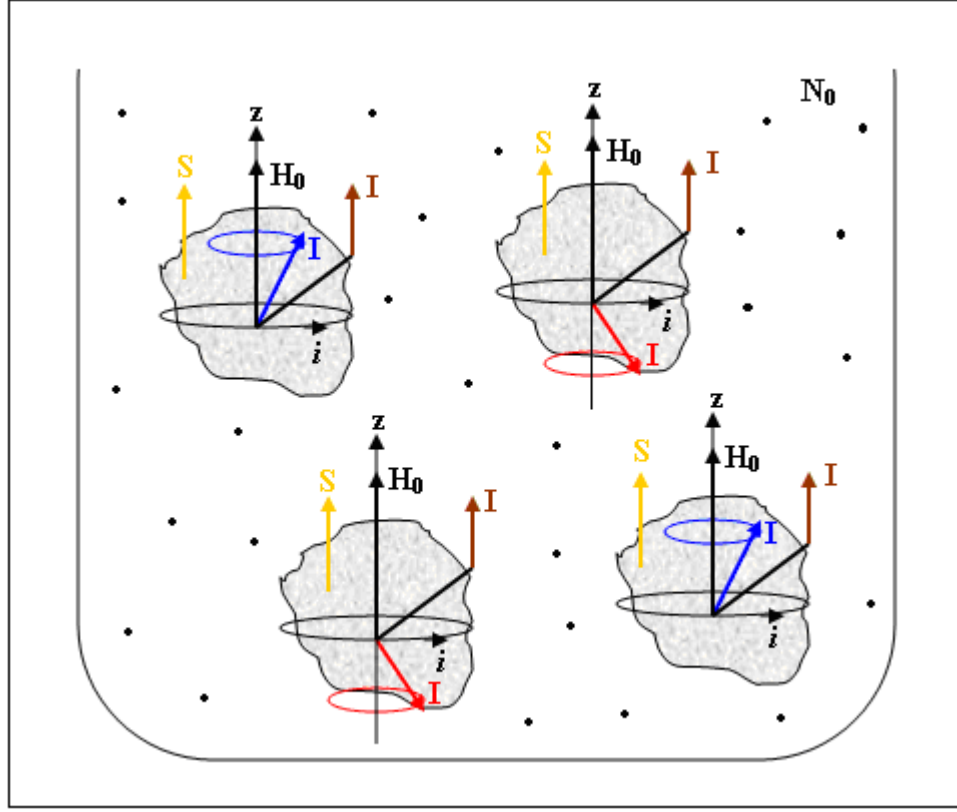


Şekil 1.7. Bir spin topluluğuna 180° pulsunun uygulanması süresinde gelişen olayların dönen sistemde görünüşü

1. 1. 5. Spin Sisteminin Çevresi

Bir örneğin spin topluluğu, şimdiye dek anlatıldandaki gibi, çıplak spinlerden ibaret değildir. Spinler daima bir molekülün içinde yer alırlar. Böyle bir spinin çevresi ise, gözlem altındaki protona komşu I ya da S (elektron spini) ve gözlem altındaki I'nın çevresindeki elektronik akımlar (i) olmaktadır. Spin topluluğu bu çevrenin içine gömülüdür. Bu durumun temsili resmi şekil 1.8 deki gibi verilebilir. Avogadro sayısı kadar olan molekül içeren örnek, burada birkaç molekül ile temsil edilmiştir. Her bir

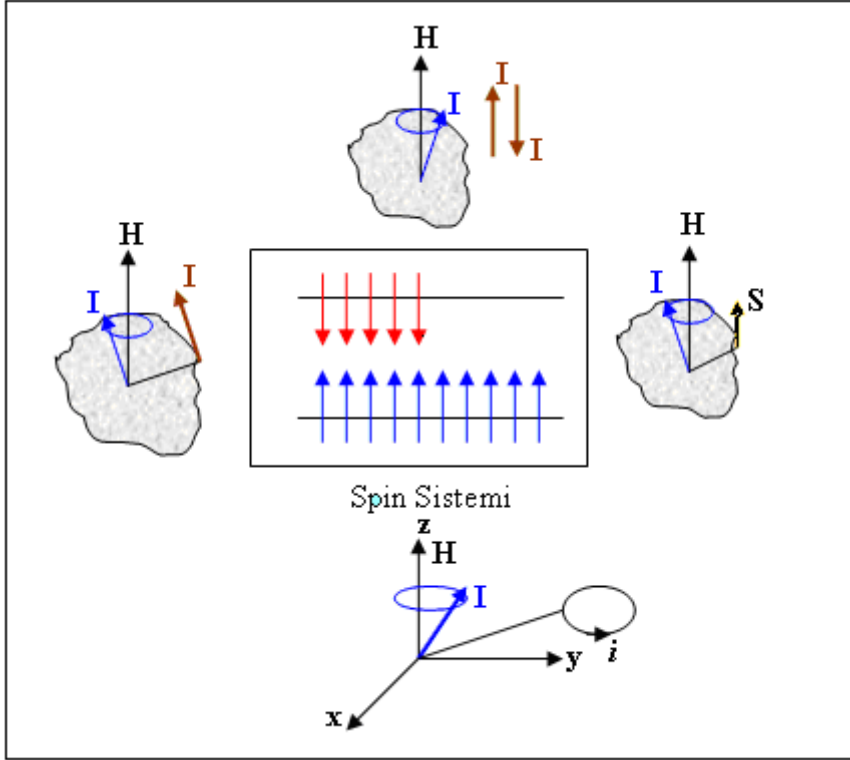
molekül, örnek içinde belli bir konumdadır. Moleküllerin içerisinde bulunan spinler de hem H_0 alanı hem de komşuları olan I , s ya da i akımı ile etkileşmektedir.



Şekil 1.8. Moleküllerin içerisinde bulunan spinlerin çevreleri ile beraber görüntülenmesi

Spin topluluğunun çevresi ile etkileşmesini, daha sade bir resim üzerinden anlatmak için; örnek tüpünün değişik yerlerinde bulunan spinleri, hareket tiplerine ya da enerjilerine göre yan yana dizelim. İki enerji seviyesine dağılan bu spin topluluğuna, spin sistemi de denir (şekil 1.9).

Spin sistemini, çizeceğimiz temsili resmin merkezine yerleştirelim. Spin sisteminde yer alan spinlerden birkaç tanesini, sistemin çevresine yerleştirelim. Bunların komşuları ile nasıl etkileştiklerinin görüntülenmesi aşağıdaki gibi olur.



Şekil 1.9. Çevresi ile beraber ele alınan spin topluluğuna ait çevre türlerinin enerji seviyeleri ile beraber şematize edilmesi

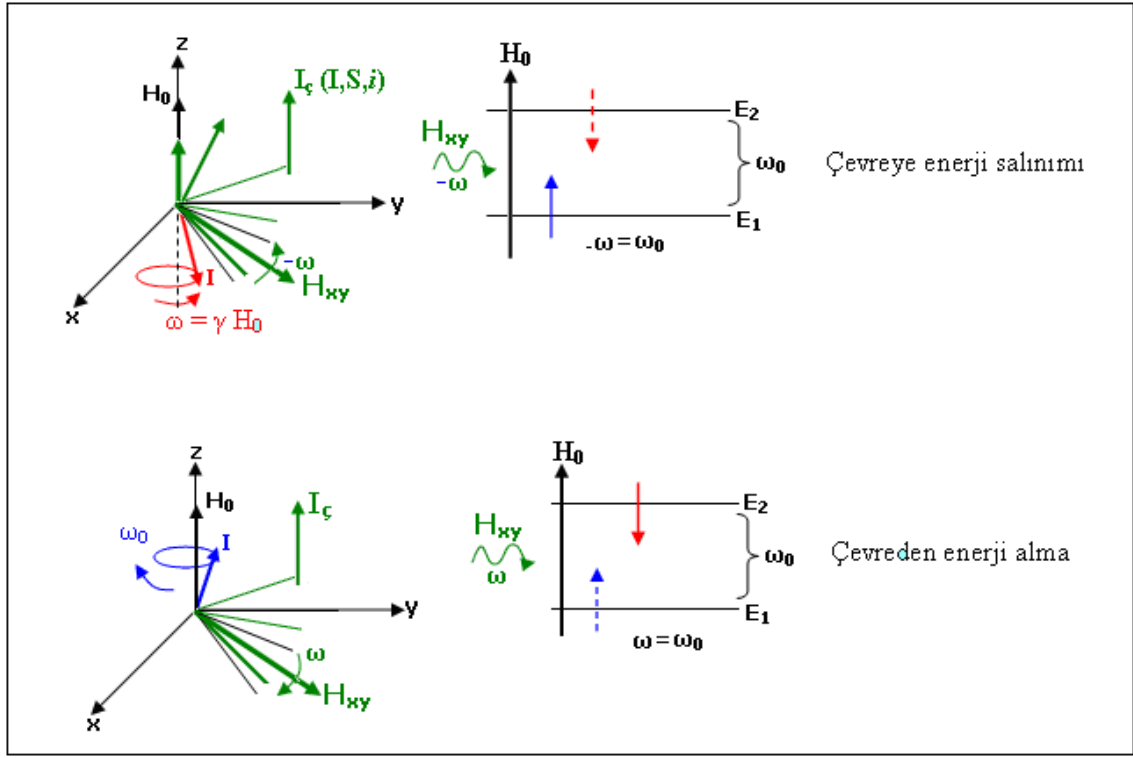
Gözlem altındaki spinin komşuları, gözlem altındaki spininin bulunduğu yerde ya H_1 ya H_S ya da H_i alanlarını kurarlar. Söz konusu yerel alanların iki bileşeni vardır. Bir bileşen z-yönündedir. Diğeri ise x-y düzleminde yer alır. Gözlem altındaki spin, bu yerel alan bileşenleri ile etkileşir.

Şekil 1.9'daki 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.

1. 1. 6. Spin Çevreden Nasıl Enerji Alır ve Çevreye Nasıl Enerji Verir?

Kolaylık olsun diye 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 H_{yerel} alanı kurar. Bu alanın z-bileşeni H_0 alanına eklenir (veya çıkarılır) ve H_0 alanını değiştirir. H_{yerel} alanının xy-düzlemindeki bileşeni ise, I_c nin molekül üzerindeki bağlı hareketleri nedeniyle, değişik frekanslarda döner. H_{xy}' nin $-\omega$ frekansı ω_0' a eşit olunca, spin

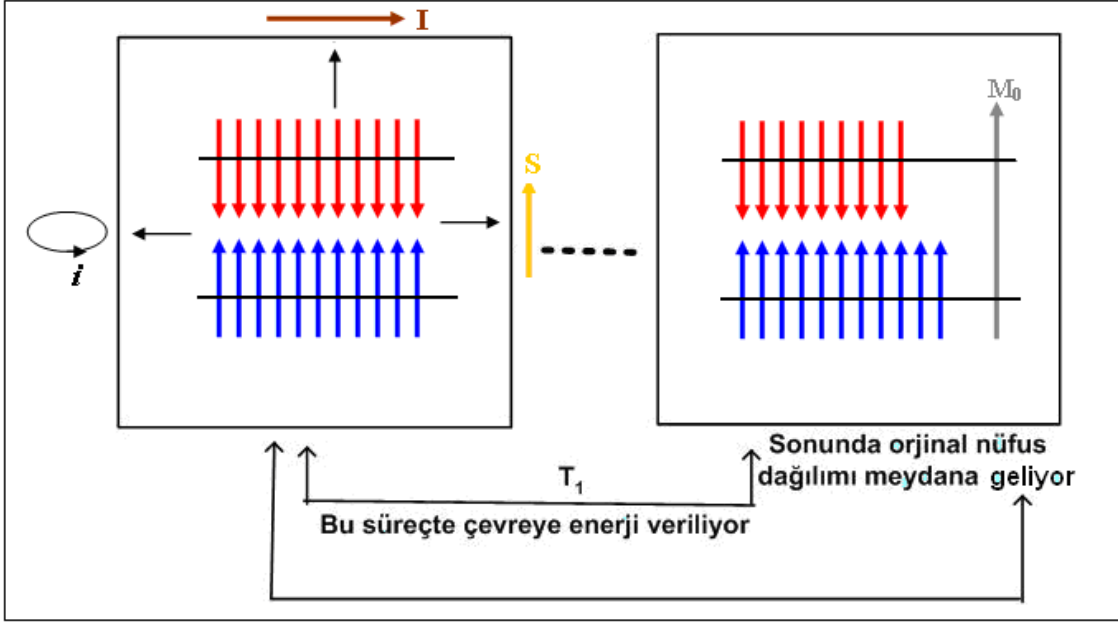
çevreye enerjiyi salar ve alt düzeye iner. H_{xy} 'nin ω frekansı ω_0 'a eşit olunca, spin çevreden enerji alır ve üst düzeye çıkar. Durum, şekil 1.10'daki gibidir.



Şekil 1.10. Bir spin sisteminin çevrenin kurduğu yerel alan etkisi ile enerji alması ve salması

1. 1. 7. Sıcak Spinlerin Çevreye Enerji Aktarması ve T_1 Süreci

RF uygulaması sonunda, şekil 1.8'de görüldüğü gibi her bir spin, RF alanını hisseder. Bazı spinler üst seviyeye bazıları da alt seviyeye iner. Bir spin için, RF etkisiyle yukarı çıkış ve aşağı iniş aynı olasılıkla meydana gelir. Ancak alt seviyede fazla spin bulunduğundan, daha çok spin yukarı çıkar. Sonunda alt ve üst seviyelerin nüfusları eşitlenir. Eşitlenme anından itibaren puls kesilirse, çevre devreye girer. Çevrenin kurduğu yerel alanın, x-y düzleminde dönen H_{xy} bileşeni (Şekil 1.10), spin sistemden hem enerji alır ve hem de ona enerji verir. H_{xy} etkisiyle bir spinin enerji verme olasılığı (aşağı seviyeye inme), enerji alma olasılığından (yukarı seviyeye çıkma) daha fazladır. Bu nedenle fazla enerji kazanan sıcak spinler enerjilerini çevrelerine aktararak ilk seviyelerine döner. Bu durum Şekil 1.11'deki gibi gösterilebilir.



Şekil 1.11. Doyum durumunda bulunan bir spin sisteminin çevreye enerji vererek orijinal durumuna dönmesi, dönüş süresi T_1 ile karakterize edilir

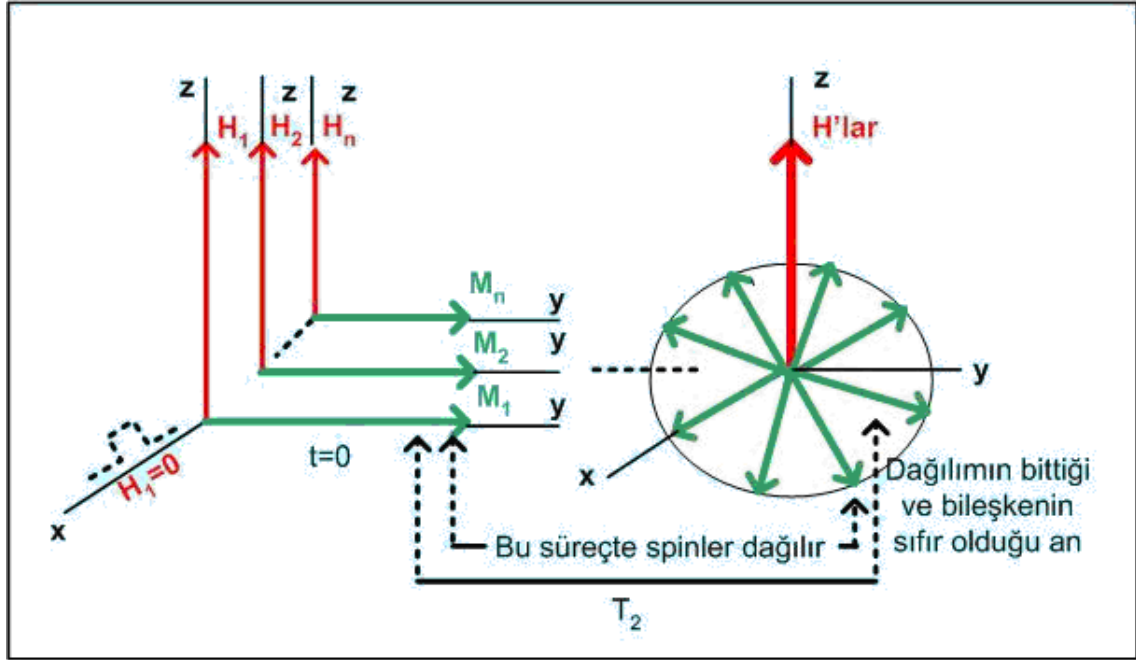
RF alanı tarafından iki seviye nüfusunun eşitlendiği andan, iki seviye nüfusunun çevre tarafından tekrar ilk durumuna (Boltzman dağılımına) dönüştürüldüğü ana kadar geçen süre Spin-örgü durulma zamanı (T_1) zamanı olmaktadır. T_1 , mıknatıslanmanın z-ekseni boyunca artarak denge değerine ulaşma sürecini karakterize eder. Bu durulma zamanının uyduğu formüller şöyle yazılır.

$$M_z = M_0(1 - 2e^{-t/T_1}) \quad (1.2)$$

1. 1. 8. Spinlerin Defaze Olması ve T_2 Süreci

T_1 süreci anlatılırken, daha çok spin gözlüğünden bakıldı. T_2 sürecine ise makroskopik gözlükten bakmak daha öğreticidir. Puls kesildikten sonra, Laboratuar sisteminde olduğumuzu belirtmiştik. Bu durumda görebileceğimiz alanlar, z-boyunca

yönelmiş, $H_1, H_2, \dots, H_{16000}$ alanları olmaktadır. Bunlarla ilişkili $M_1, M_2, \dots, M_{16000}$ alanları da artık y - yönüne yatmıştır. M_1, H_1 etrafında ω_1 ; M_2, H_2 etrafında ω_2 ; \dots ; M_{16000}, H_{16000} etrafında ω_{16000} hızı ile döner. Bu hızlar farklı olduklarından $M_1, M_2, \dots, M_{16000}$ zamanla dağılır. Durum, Şekil 1.12’de gösterilmiştir.



Şekil 1.12. Spin sistemin defaze olması ve T_2 durulma zamanı

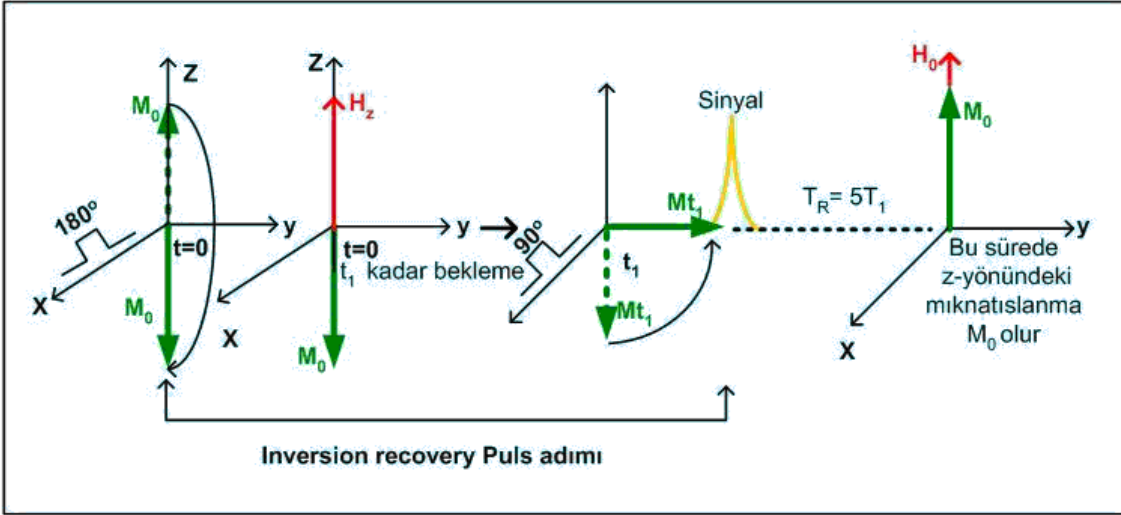
Tüm spinlerin aynı yönde olduğu durumdan, spinlerin rastgele dağıldığı duruma kadar geçen süreye T_2 denir.

1. 1. 9. 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 tekrar ilk M_0 değerine varması için bekleme) aşamalarını kapsar ve kısaca ($180^\circ-t-90^\circ-TR$) olarak gösterilir. 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 beklerek z -yönündeki mıknatıslanmanın biraz kısılması sağlanır. Bu süreye Inversion Delay (bekleme) denir ve t ile gösterilir. Sonra örneğe 90 derece puls uygulananak, mıknatıslanma y -yönüne çevrilir ve M_{tl} sinyali

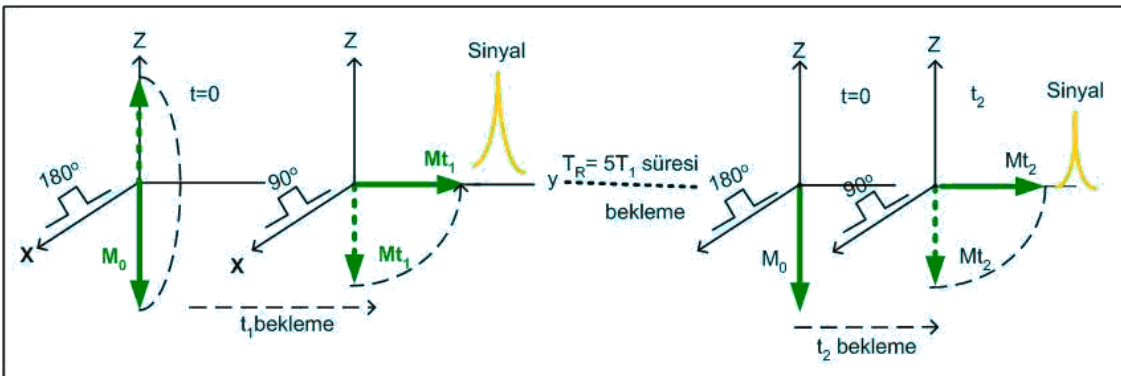
1. GİRİŞ

ölçülür. Ölçmeden sonra mıknatıslanmanın ilk M_0 değerine ulaşması için bir yeteri kadar uzun bir süre beklenir. Bu süreye de puls adımı tekrarlama zamanı denir ve TR ile gösterilir. İki Inversion Recovery Puls adımı arasındaki bekleme süresi olan TR en az $5T_1$ olarak seçilir. Zira x-y düzlemine yatırılmış mıknatıslanma $5T_1$ süresi sonunda ilk M_0 değerine döner. Bu işlemler sonunda 1. adımın uygulanması bitmiştir. Bu adım Şekil 1.13 deki gibi resmedilebilir:



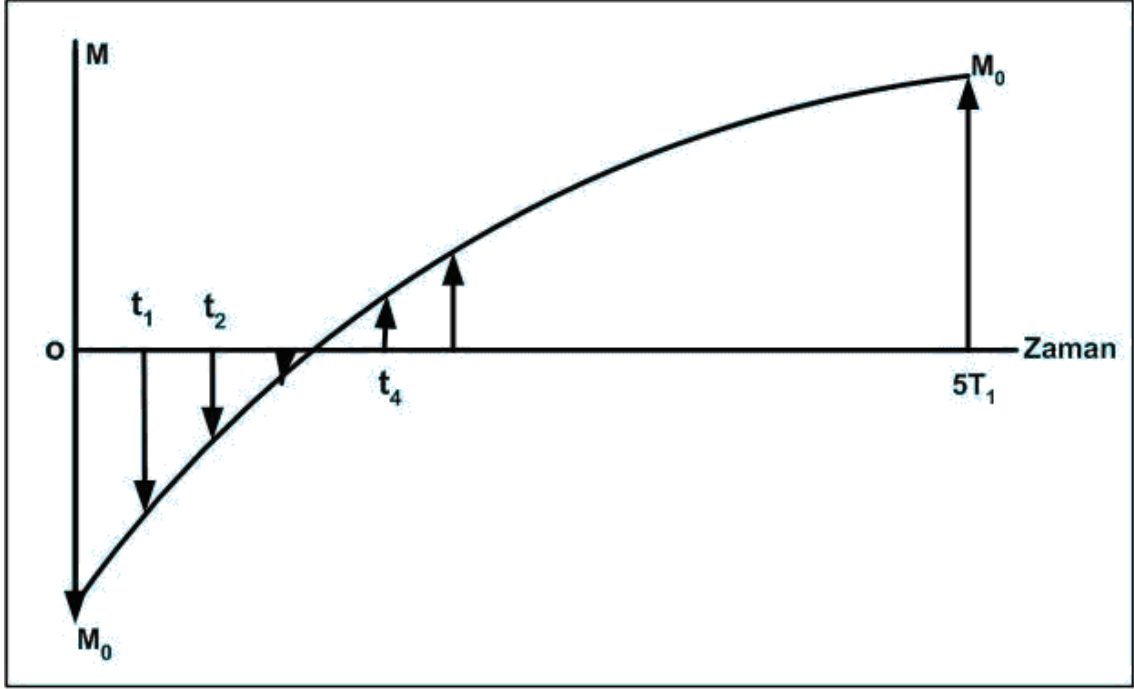
Şekil 1.13. Bir tek Inversion Recovery Puls adımını anlatan şema

Yukarıda anlatılan (180° puls uygulama - M_z in değişmesi için bekleme- 90° derece puls uygulama-sinyal ölçme- z-yönünde M_0 kurulması için TR kadar bekleme) adımı; sadece bekleme süreleri olan t'ler artırılarak peş peşe uygulanır ve M_{t1} , M_{t2} ,....., M_{tn} sinyalleri de peş peşe elde edilir. Peş peşe adım uygulamaları şekil 1.14 deki gibi resmedilir:



Şekil 1.14. İki tane IR puls adımını anlatan şema

$M_{11}, M_{12}, \dots, M_{1n}$ sinyallerinin zamana karşı grafiğe geçirilmesinden de IR eğrisi elde edilir. Bu durum şekil 1.14’de verilmiştir.



Şekil 1.15. (180° - τ - 90° -TR) puls adımlarının ard arda uygulanmasından sonra ölçülen mıknatıslanmaların bekleme zamanlarına göre grafiğe geçirilmesinden elde edilen Inversion Recovery eğrisi

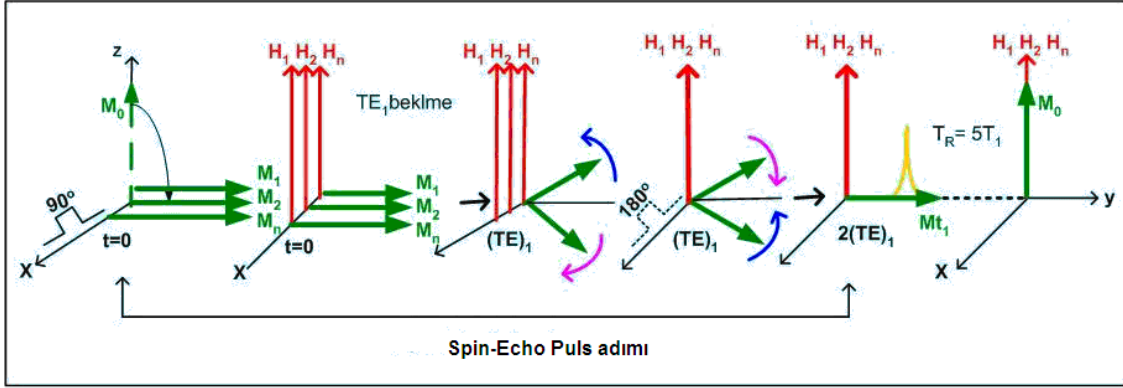
t_2 ile t_1 , t_3 ile t_2 , t_4 ile t_3, \dots, t_n ile t_{n-1} arasındaki fark ise; ardışık iki bekleme zamanı oluşturmak için kullanılan adım denilir. Bu adım eşit ya da değişken olarak seçilebilir.

1. 1. 10. 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 Mıknatıslanma y -eksenine yatırılır. Sonra bir T_e süresi beklenecek y -yönündeki mıknatıslanmanın biraz kısılması sağlanır. Bu bekleme süresine Echo time denir. Sonra örneğe 180 derece pulsu uygulanarak

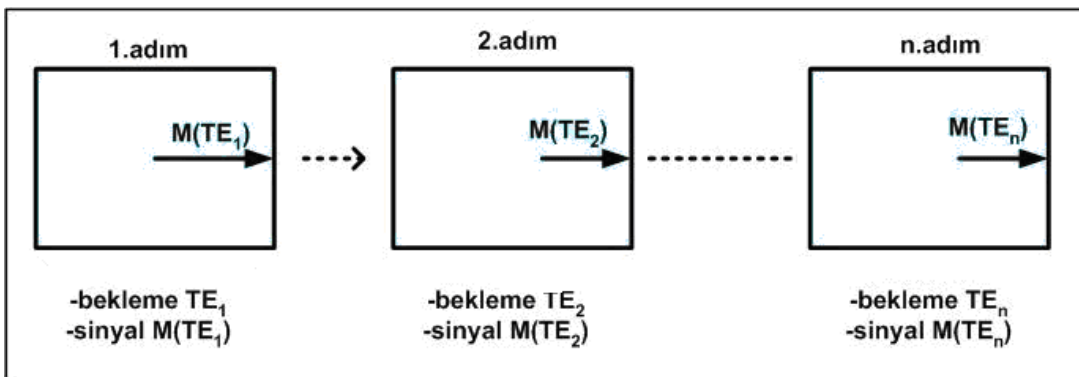
1. GİRİŞ

dağılan spinlerin yönleri terslenir ve daha sonra T_e kadar beklenerek spinlerin yönünde toplanması sağlanır ve $M(T_{e1})$ sinyali ölçülür. Sonra da z-yönündeki mıknatıslanmanın ilk M_0 değerine ulaşması için T_R süresi kadar beklenir. Bu adımın aşamaları Şekil 1.16'da verilmiştir.



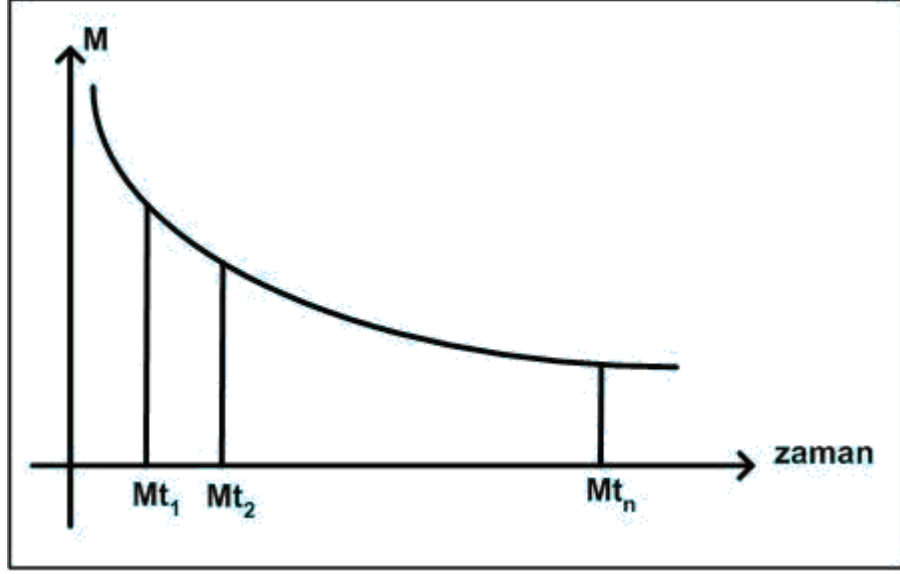
Şekil 1.16. Spin-Echo puls adımı

Aynı adım, sadece T_e bekleme süreleri artırılarak peş peşe uygulanırsa; $M(T_{e1})$, $M(T_{e2})$, $M(T_{e3})$, ..., $M(T_{en})$ sinyalleri bulunur. Durum, şekil 1.17 deki gibi olur.



Şekil 1.17. T_e bekleme süreleri artırılarak peş peşe uygulanmasıyla oluşan $M(T_{e1})$, $M(T_{e2})$, $M(T_{e3})$, ..., $M(T_{en})$ sinyalleri

Bu sinyallerin T_e zamanlarına karşı grafiğe geçirilmesinde aşağıdaki şekil 1.18'deki Spin-Echo bozunum eğrisi elde edilir.



Şekil 1. 18. Spin-Echo bozunum eğrisi

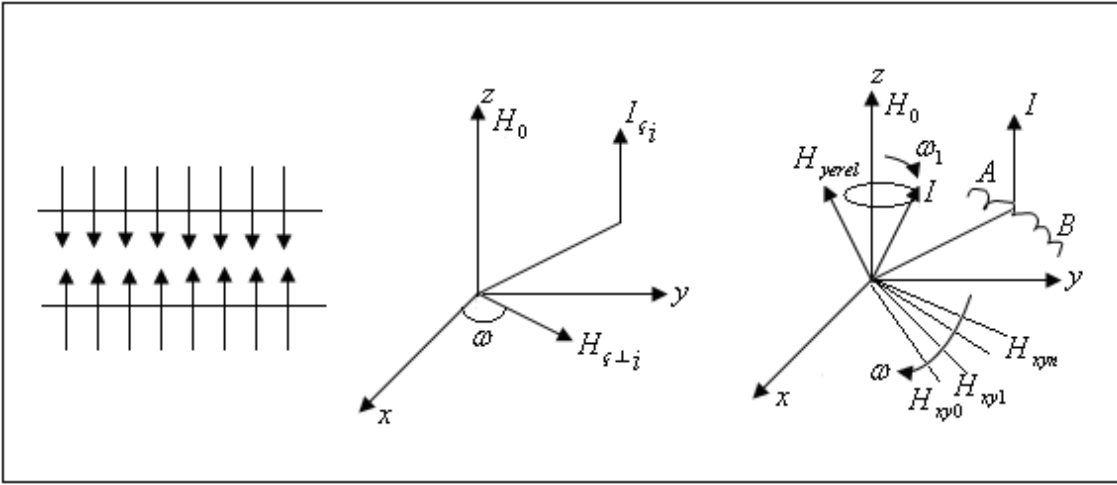
Bu eğri aşağıdaki formüle uyar ve T_2 bu formülden elde edilir,

$$M_{xy} = A e^{-t/T_2} \quad (1.3)$$

1.2. DURULMAYA YOL AÇAN ETKİLEŞME TÜRLERİ VE BU ETKİLEŞMELERİ MODÜLE EDEN HAREKETLER

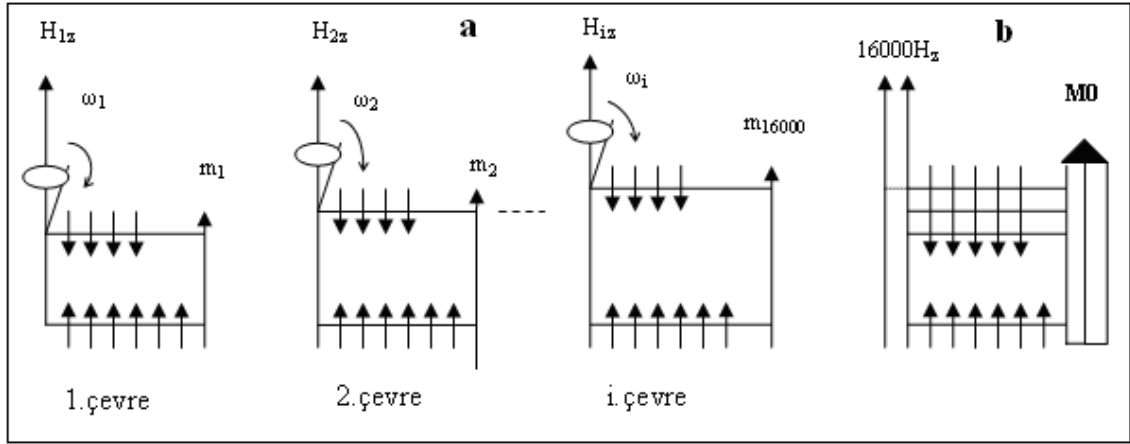
1.2.1. Dipolar Rölaksasyon

Tez konusu ile sıkı ilgisi nedeniyle dipolar durulmayı incelemekte yarar vardır. Spin sistemi içinden bir spin alalım. Bu spinin I_C çevresi olarak benzer bir I spinini seçelim. Çevre olan komşu I spinini, gözlem altındaki spinin bulunduğu yerde H_{yerel} alanını kurar (Şekil 1.19).



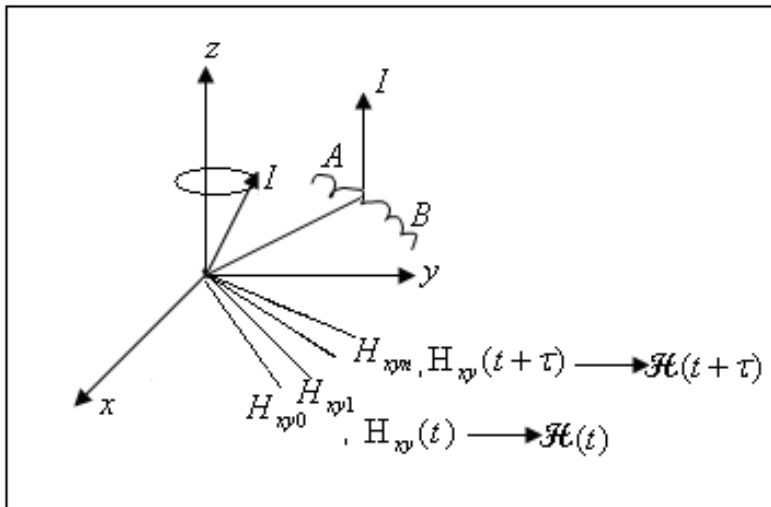
Şekil 1.19. Gözlem altındaki spinimizle komşu spinler arasındaki ilişki dipolar etkileşmeyi anlatan şema

Bu alanın hem z bileşeni hem de xy bileşeni değişir. Komşu I spininin farklı pozisyonları nedeniyle H_z alanının farklı değerleri olur. Bunlar $H_{1z}, H_{2z}, \dots, H_{16000z}$ olarak niteleyebiliriz. Bu değerler birbirinden çok az farklıdır. Bu alanların her biri, kendi etrafında dönen bir spin grubu meydana getirilir. Yani M_0 yerine $M_{1z}, M_{2z}, \dots, M_{16000z}$ alanları meydana gelir. H_0 yerine de; M_1 , etrafında ω_1 , M_2 etrafında $\omega_2, \dots, M_{16000}$ etrafında ise ω_{16000} dönmeleri oluşur. H_z ya da ω_z değerleri birbirine çok yakın olduklarından, bu alan dağılımı, üst enerji seviyesinin genişlemesi tarzında gözükür (şekil 1.20).



Şekil 1.20. (a) Komşu I spinlerinin, gözlem altındaki spinlerin bulunduğu yerlerde kurdukları yerel alanların z bileşenlerinin yol açtığı enerji genişlemeleri. Burada sadece üst seviyeye genişlemektedir. 16.000 farklı şekilde genişleme(veya değişme) mümkün olduğu için spinler 16.000 gruba ayrılır. M_0 mıknatıslanması da 16.000 alt mıknatıslanmaya ayrılır. (b) bu genişlemelerin toplu gösterimi: Üst enerji seviyesi genişler ve $m_1, m_2, \dots, m_{16000}$ ·nın toplamından M_0 oluşur

Şekil 1.19'daki resimde spin sabit tutulmuş gözlem altındaki bir moleküle ve komşu bir molekülün çarpması sonucu meydana gelen bağıl hareket yansıtılmıştır. Bu hareket esnasında, gözlem altındaki molekül üzerindeki komşu spin tarafından spinin bulunduğu yerde bir yerel alan kurulur. Komşu spinin bu molekül yüzeyindeki hareketi rastgele bir harekettir. Bunun sonucu olarak, x-y düzleminde kurulan $H_{xy\phi}$ alanı da gelişigüzel değişir. Ancak komşu bir molekülün çarpması sonucu, gözlem altındaki molekül dönmelere maruz kaldığından; $H_{xy\phi}$ alanı da döner (şekil 1.21). Bu alanın frekansı, H_z etrafında dönen spinin frekansına eşit olunca enerji yutulur ya da salınır ve bu süreç sonunda T_1 meydana gelir.



Şekil 1.21. Gözlem altındaki spinimizin komşu H spininin doğurduğu H_{xy} bileşenlerinden etkilenmesini gösteren şema

Çevre spininin (I_c) rastgele hareketi sonucunda, gözlem altındaki spininin bulunduğu yerde kurulan alanların x-y düzlemindeki bileşenleri; $H_{xy0}, H_{xy1}, \dots, H_{xyn}$ olarak değişir. Bu durum şekil 2.17 üzerinde gösterilmiştir. Daha önce söylendiği gibi ardışık olarak değişen H_{xy} alanlarının rezonansa yol açmaları için ω açısal frekanslarının olması gerekir. Ayrıca $H_{xy0}, H_{xy1}, \dots, H_{xyn}$ alanlarının arasında belli bir ilgi olması gerekir. $H_{xy0}, H_{xy1}, \dots, H_{xyn}$ alanlarının şiddet ve frekans yönünden işe yaradıkları süreye ilgi zamanı (τ) denir. Bu süre içerisinde H_{xy} alanları arasında belli bir ilgi vardır. Yani bu sürede bir sonraki H_{xy} alanı, bir önceki H_{xy} alanına bağlanabilir. Bu süreden sonra ise bu ilgi kopar. Yani alanlar birbirleriyle bağlanamazlar. Bu esnada da durulmaya katkı olmaz.

Anlattığımız olay bir tek spin ve bir tek çevre arasındaki etkileşim için resmedilmiştir. Oysaki avogadro sayısı kadar spin ve yine o kadar çevre vardır. Bütün spinlerin ve çevrelerin dikkate alınması gerekmektedir. Dikkate alındığında durulma sürecine giren adımlar şöyle özetlenebilir;

a) Bir spin ve bir çevre arasındaki etkileşmeden doğan ve rastgele değişen alan için bir oto korolasyon fonksiyonu $G(\tau)$ tanımlanır.

$$G_{xy}^{1, \text{ot}}(\tau) = \mathcal{H}_{xy}(\tau) \mathcal{H}_{xy}(t + \tau) \quad (1.4)$$

Bu denklemde $\mathcal{H}_{xy}(\tau)$ sistemin hamiltonyenini anlatır. Bu hamiltonyen,

$$H = -\vec{\mu} \cdot \vec{H}_c \quad (1.5)$$

Şeklinde tanımlanır. Burada H_c , çevre etkisiyle (I_c) kurulan yerel alan olmaktadır.

b) t, hareketin başlangıç anıdır. τ ise H_{xy} alanları arasında ilginin koştığı andır. Yukarıda da söylendiği gibi bu olay iki spin arasında meydana gelmektedir. Ancak

bizim örneğimizde avogadro sayısı kadar spin bulunmaktadır. Dolayısıyla bu işlemin ortalamasını almamız gerekir. Ortalama alındıktan sonra

$$G_{xy}^{1-i\omega t}(\tau) = \overline{\mathcal{H}_{xy}(\tau)\mathcal{H}_{xy}(t+\tau)} \quad (1.6)$$

olacaktır. Bizim incelediğimiz sistemlerde G fonksiyonu zamandan bağımsızdır.

- a) Söz konusu olan $G(\tau)$ fonksiyonunun Fourier dönüşümü, frekans spektrumu olan $J(\omega)$ ifadesini verir.

$$J(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\tau) e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (1.7)$$

Brownian hareketler için;

$$G(\tau) = G_0 e^{-\tau/T_1} \quad (1.8)$$

formundadır. Bu ifadeyi $J(\omega)$ bağıntısında yerine yazarsak;

$$J(\omega) = G_0^2 \frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (1.9)$$

elde edilir.

- d)Diğer taraftan $\frac{1}{T_1}$ durulma oranların karışık bir fonksiyonudur.

($\alpha = 0,1,2,\dots,n$)

$$\frac{1}{T_1} = f(J(\alpha\omega)) = f\{J(\omega) + J(2\omega)\} \quad (1.10)$$

$$\frac{1}{T_2} = f\{3J(0) + 5J(\omega) + 2J(2\omega)\} \quad (1.11)$$

İle verilir. Böyle bir bağılık, matematiksel analizden çıkarılmaktadır. Dipolar etkileşmelerin varlığında ($I_\zeta=I$) ya da H₂O çözeltilerinde durulma oranları olan $1/T_1$ ve $1/T_2$ aşağıdaki formüllerle verilir:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{6}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left(\frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{4\tau}{1 + 4\omega^2 \tau^2} \right) \quad (1.12)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{6}{40} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left(3\tau + \frac{5\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{2\tau}{1 + 4\omega^2 \tau^2} \right) \quad (1.13)$$

Gözlem altındaki I spinin çevresi D olduğunda durulma oranı

$$\frac{1}{T1} = \{ (2/15) (\gamma_H^2 \gamma_D^2 \hbar^2 / r_D^6) D(D+1) [J(\omega_I - \omega_D) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_D)] \} \quad (1.14)$$

şeklinde yazılır (Yılmaz ve Korunur 2011).

1.2.2. Protein Topaklanması ve Rölaksasyon-Konsantrasyon İlişkisi

1980'li yılların sonlarına doğru, bir çözeltiye eklenen proteinin belli bir konsantrasyondan sonra bireysel moleküllerine tamamen ayıramayabileceği ortaya konmuştur (Powles ve Smith 1964, Hauer ve ark. 1981, Gallier ve ark. 1987, Yılmaz ve ark. 1997, William ve ark. 1997, Yian-Biao ve ark. 2004, Wei 2005, Yılmaz ve ark. 2008, Aimee ve ark. 2009, Viktor ve ark. 2012). Böyle bir durumda birçok protein molekülü birbirine yapışık durumda kalmaktadır. Buna protein aggregation ya da protein topaklanması denilmektedir. Böyle bir durumda topak molekülün durulma ilgi zamanı artmakta bu ise ilgili $1/T_1$ zamanını aniden artırmaktadır (Bertini ve ark. 2000). Bu olgu $1/T_1$ ile konsantrasyon arasındaki lineer ilişkiyi aniden değiştirmektedir. Bazı çalışmalarda bu etkinin %20 albümin varlığında ortaya çıktığı ileri sürülmüşse de, bazı çalışmalarda lineer ilişkinin %20'lik albümin varlığından sonra bozulduğu not edilmiştir. Bu nedenle bu olgunun hangi konsantrasyonda meydana geldiğinin ortaya konması çok önemlidir.

Protein topaklanmasının meydana geldiği durumda IR ve SE eğrileri, $1/T_1$ ve $1/T_2$ verileri ile uygun bir fit yapmamakta ve ayrıca bu eğriler üzerinde bozulmalar meydana gelmektedir (Hills ve ark. 1989). Bu durumda T_1 ve T_2 değerleri yanlış çıkmaktadır. Bunun sonucu olarak $1/T_1$ erken doyuma ulaşır ve $1/T_2$ 'nin konsantrasyon ilişkisi lineer olmaktan çıkmaktadır.

Durulma zamanı oranı olan $1/T_1$ 'in konsantrasyonla lineer değiştiği olgusu 1960'lı yıllarda bulunmuş, daha sonra birçok çalışmada doğrulanmıştır (William ve ark. 1997, Yian-Biao ve ark. 2004, Wei 2005, Yılmaz ve ark. 2008, Aimee ve ark. 2009, Viktor ve ark. 2012). Bu ilişkiyi burada yeniden türetmede yarar vardır.

Protein çözeltilerindeki su ya serbest fazda bulunur ya da proteine bağlı durumdadır. Ancak bu iki farklı çevreye ait NMR sinyali elde edilmediğinden, suyun bu iki çevre arasında hızlı kimyasal değiş tokuş yaptığı varsayılmıştır. Bu hızlı gidiş gelişin $1/T_1$ ve $1/T_2$ oranlarını ortaladığı sonucuna varılmıştır. Suyun serbest su ile bağlı su arasında hızlı değiş tokuş yaptığı görüşüne göre, ölçülen $1/T_1$ ve $1/T_2$ oranları aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$1/T_1 = P_f 1/T_{1f} + P_b 1/T_{1b} \quad (1.15)$$

$$1/T_2 = P_f 1/T_{1f} + P_b 1/T_{1b} \quad (1.16)$$

olarak yazılır. Burada P_f ve P_b sırasıyla suyun serbest ve bağlı fazlarda bulunma olasılığını göstermektedir. T_{1b} ile T_{1f} ise sırasıyla suyun serbest ve bağlı fazlardaki durulma zamanları olmaktadır.

Serbest su moleküllerinin bağlı su moleküllerinden çok fazla olduğu durumlarda $P_f \cong 1$ alınabilir. Diğer yandan $P_f + P_b = 1$ ya da $P_f = 1 - P_b$ yazılabildiğinden,

$$1/T_1 = (1 - P_b)1/T_{1f} + P_b 1/T_{1b} \quad (1.17)$$

yazılır. Biraz düzenleme ile

$$1/T_1 = 1/T_{1f} + P_b (1/T_{1b} - 1/T_{1f}) \quad (1.18)$$

yazılabilir. $P_b = \frac{N_b}{N}$ olmaktadır. N_b : bağlı su molekül sayısını ve N toplam su molekül sayısını göstermektedir. N_b , protein konsantrasyonu ile ilgilidir. Yani çözeltideki protein molekül sayısı arttıkça N_b artmaktadır. Bu nedenle bu nedenle $N_b = nC$ yazılır. n bir tek moleküle bağlanan su sayısını göstermektedir. Tüm bunlar dikkate alınınca (1.18) bağıntısı

$$1/T_1 = 1/T_{1f} + \frac{nC}{N} (1/T_{1b} - 1/T_{1f}) \quad (1.19)$$

ya da

$$1/T_1 = 1/T_f + K_1 C \quad (1.20)$$

Olarak yazılır. Burada $K_1 = \frac{n}{N} (1/T_{1b} - 1/T_{1f})$ olmaktadır. Aynı yol izlenerek ölçülen $1/T_2$ içinde

$$1/T_2 = 1/T_{2f} + K_2 C \quad (1.21)$$

Bağıntısı türetilir. 1.20 ve 1.21 bağıntılarına göre hızlı kimyasal değiş tokuş durumunda $1/T_1$ -C ve $1/T_2$ -C ilişkisi lineer olmaktadır.

Diğer yandan $1/T_1$ ve $1/T_2$ ilgi zamanına bağlayan bağıntılar 1.6'dan 1.13'e giden denklemler aracılığı ile türetilmiştir. 1.13 denkleminde görüldüğü üzere $1/T_1$, τ ilgi zamanına bağlıdır. $1/T_2$ de yine

τ 'ya bağlı bulunmaktadır. O halde τ 'daki değişmeler $1/T_1$ -C ve $1/T_2$ -C ilişkisini etkileyecek ve lineerliği bozacaktır. Zira lineer ilişkinin sürdüğü konsantrasyonlar için τ sabit kalır (Hallenga ve Koenig 1976, Koenig ve Brown 1993, Koenig 1995, Bryant 1996, Bertini ve ark. 2000).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Proton Magnetic Relaxation and Protein Hydration

Bu çalışmada, Protein manyetik durulma ve protein hidrasyonu üzerine yapılan ön çalışmaların ilkinde iki sınıf suyun varlığı ilk olarak ortaya atılmıştır. Bu sınıf sulardan biri serbest su, diğeri ise proteine bağlı su olarak adlandırılmıştır. Her iki su grubu arasında hızlı bir değiş tokuş hareketinin var olduğu öne sürülmüştür. Bu durumda serbest suyun kendi öz durulmasının bulunduğu ve bağlı suyun da öz durulmasının var olduğunu söylenmiştir. Bunlara sırasıyla T_{1f} (serbest) ve T_{1b} (bağlı) denilmiştir. Hızlı değiş tokuş durumunda çözeltinin durulması yani gözlenen durulma oranı ($1/T_1$)'nın; $1/T_{1f}$ ile $1/T_{1b}$ 'nin ağırlıklı ortalamasına karşılık geldiğini türetmiştir. Bu alandaki ilk çalışmalardan biri olup, bugüne kadar referans edilebilir nitelikte olan bir temel çalışmadır (Rätz ve Thilö 1951).

Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion in Protein Solutions

Bu çalışmada, apotransferin denilen proteinin çözeltilerinde ki $1/T_1$ oranı frekansa bağlı olarak Nükleer Magnetic Rezonans Dispersiyon (NMRD) tekniği ile incelenmiştir. Burada kullanılan cihaz NMR olmayıp, Field cycling spektrometresi olmaktadır. Bu cihaz o yıllarda 60 MHz'ye kadar olan frekanslardaki $1/T_1$ 'i belirlemekteydi. Söz konusu çalışmada apotransferin $1/T_1$ 'i çeşitli sıcaklıklarda incelenmiştir. Ayrıca viskozite/sıcaklık oranına göre de T_1 belirlenmiştir. Bu çalışmalar ait veriler, COOL-COOL ifadesi denilen bir formülle FID edilmiştir. Bu çözeltideki durulma yine hızlı kimyasal değiş tokuşa göre analiz edilmiştir. Bağlı su ile protein protonları üzerindeki etkileşmeler de dikkate alınmıştır. Albüminin durulma ilgi zamanı (τ_r) H-H dipol-dipol etkileşmelerini modüle ettiğini ortaya koymuştur (Koeninig ve ark. 1969).

Protein-Water Interaction Studied by Solvent ^1H , ^2H , and ^{17}O Magnetic Relaxation

Bu çalışmada, protein-su etkileşmesi proton ^1H , ^2H ve ^{17}O durulması ile incelenmiştir. Yine NMRD görüntüleri elde edilmiştir. Yani; $1/T_1$ frekansa göre türetilmiştir. Yine kimyasal değiş tokuş modeli kullanılmış ve su protonlarının ömürlerinin rolü de tartışılmıştır. Bu tip çalışmada, suyun hidrodinamik etkisi de

tartışmanın içine konulmuştur. Bu çalışmada protonlardan ziyade su moleküllerinin bir bütün halinde etkileşmeye katıldığı öne sürülmüştür (Koeninig ve ark. 1975).

Protein Hydration

Bu çalışmada, Bovine Serum Albüminin (BSA) protein hidrasyonu incelenmiştir. Burada $1/T_1$ ve $1/T_2$ 'ler konsantrasyona ve sıcaklığa bağlı olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada, durulma zamanı hem protein kısmı için hem de su kısmı için belirlenmiştir. Durulama zamanları hızlı kimyasal değiş-tokuşa göre yorumlanmıştır. Bu yüksek kimyasal değiş-tokuşun serbest su ile protein aminoasit zincirlerinin polar grupları arasında meydana geldikleri analiz edilmiştir. Durulma oranlarındaki artmanın protein moleküllerinin tersinir katlanmazlığı ile ilişkili olduğu ve bitişik protein molekülleri arasındaki su köprülenmesi ile de ilgili olduğu öne sürülmüştür (John Qakes 1975).

NMR Relaxation Investigation of Water Mobility in Aqueous Bovine Serum Albumin solutions

Bu çalışmada, BSA sulu çözeltilerindeki T_1 ve T_2 durulma zamanları frekansın, protein konsantrasyonunun ve sıcaklığının bir fonksiyonu olarak incelenmiştir. Rezonans frekansı 3 KHz'den 75 MHz'ye kadar değiştirilmiştir. 3 faz kimyasal değiş-tokuş durulma modeli kullanılmıştır ve veriler bu modele göre yorumlanmıştır. Bunun sonucunda, 3 türlü su saptanmıştır. Bunlardan biri serbest su, ikincisi öteleme hareketi engellenmiş bağlı su ve üçüncüsü ise dönme hareketi engellenmiş bağlı sudur. Albümin molekülünün yavaş rotasyonel yönelmelere bağlı kaldığını ve bunun rotasyonel ilgi zamanının 10^{-6} s'den 10^{-7} s aralığına kadar değiştiği bulunmuştur (Grosch ve Noack. 1976).

Protein Rotational Relaxation as Studied by Solvent ^1H and ^2H Magnetic Relaxation

Bu çalışmada farklı molekül ağırlıklı proteinlerin $1/T_1$ durulma zamanı NMRD dispersiyon tekniği ile bulunmuştur. Kullanılan proteinlerin molekül ağırlıkları 12000 Da'dan 160000 Da'ya kadar değişmekte ve frekans ise 0.1 MHz'den 50 MHz'ye kadar değişmektedir. Aynı zamanda bir tane örneğin NMRD dispersiyonu sıcaklığa karşı ölçülmüştür. Ayrıca durulma zamanı viskozite/sıcaklık (ϵ/T) oranına karşı da

belirlenmiştir. Benzer çalışmalarda D₂O solüsyonunda yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda dispersiyonun eğilme noktasından her bir molekülün rotasyonel ilgi zamanı bulunmuştur. Durulma mekanizmasının hidrodinamik etkilerle modüle edildiği tezi bu çalışmada ileri sürülmüştür (Hallenga ve Koeninig 1976).

¹H- and ²H- NMR Study of Bovine Serum Albumin solutions

Bu çalışmada ise, BSA ¹H ve ²H NMR incelenmesi

- a) Donmuş örnekler için,
- b) Donmamış örnekler için yapılmıştır.

Bu çalışma, ayrıca BSA çözeltileri ve denature edilmiş BSA çözeltileri için de yapılmıştır. FID sinyalinin kısa ve uzun iki bileşeninin var olduğu ortaya konulmuştur. Kısa sürede sönen bileşeninin protein protonuna, uzun sürede sönen bileşeninin ise çözücü protonuna ait olduğu belirlenmiştir. Sinyal şiddetleri kullanılarak bir albümin molekülü üzerindeki hareketli ve sabit protonların sayıları belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, örneklerin T₁ ve T₂ oranları sıcaklığa ve ε/T'ye bağlı olarak da incelenmiştir. Kullanılan frekans aralığı 60 MHz'den 90 MHz'ye kadar değişmektedir. Durulma mekanizması hızlı kimyasal değiş-tokuş sürecine göre yorumlanmıştır (Gallier ve ark. 1987).

Proton NMR Studies of Bovine Serum Albumin

Bu çalışmada BSA'daki spinlerin kimliklendirilmesi yapılmıştır. Bunun için hem 500 MHz NMR spektrometresi kullanılmış hem de 400 MHz DQF COEZY proton NMR spektrometresi alınmıştır. Böylece protein üzerindeki çeşitli grupların kimyasal kaymaları ortaya konulmuştur. Bu kimyasal kaymalar üzerinden moleküler gruplar da kimliklendirilmiştir (Sadler ve Tucker 1992).

Magnetization Transfer in Cross-Linked Bovine Serum Albumin solutions at 200 MHz: A Model for Tissue

Bu çalışmada, Cross-linked BSA çözeltilerindeki manyetizasyon transfer süreci 200 MHz NMR spektrometresinde incelenmiştir. Bunun için önce bir teori gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sonradan çeşitli derecelerde Cross-linked edilmiş %10'luk BSA'nın 1/T₁ rölaksasyon oranı ve 1/T₂ durulma oranı frekansa bağlı incelenmiştir. Bu

çalışmada manyetizasyon transfer oranı BSA konsantrasyonuna göre incelenmiştir. Cross-linked çözeltilerinde çok güçlü manyetizasyon transfer olayının meydana geldiği, ancak doğal BSA'larda manyetizasyon transferin önemsiz olduğu ortaya konmuştur (Koeninig ve ark. 1993).

Dynamics of The Internal and External Hydration of globular Proteins

Bu çalışmada Globular proteinlerin iç ve dış hidrasyonunun dinamiği NMRD dispersiyon tekniği ile ölçülmüştür. Proton olarak 58 rezidue bovine pancreatic tripcine-inhibitör (BPTI) ve 76 rezidue ibuquinin materyal olarak kullanılmıştır. Her iki materyalin yüzey özellikleri birbirine tamamen benzerdir ancak ibuquininde iç su yoktur. Bu çalışmada BPTI'nın kristal formu 4 tane su göstermiştir ve çalışma, ^{17}O ile yapılmıştır. ^{17}O 'nin NMRD dispersiyonu da saptanmıştır. Bu dispersiyonun düşük alana ait kısmının gömülü sulardan ileri geldiği ortaya konmuş olup, yüksek alan bölgesinin ise yüzey suyundan ileri geldiğine atfedilmiştir (Denisov ve Halle 1994).

Hidrojen Exchange and Protein Hydration: The Deuteron Spin Relaxation Dispersions of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor and Ubiquitin

Bu çalışmada, ^2H spin durulma zamanı hidrojen değiş-tokuş hidrasyonu ve BPTI ile ubiquitin'in sulu çözeltilerindeki hidrojen değiş-tokuşunu, hidrasyon ve protein dinamiğini incelemek için kullanılmıştır. ^2H durulmasının NMRD dispersiyonu 27°C ve PH 2'den 11'e kadar değiştirilerek bulunmuştur. PH dispersiyonu PD üzerine çok kuvvetli olarak bağlıdır. Bu PD bağıllığı asidik yan zincirlerdeki ve yüzey peptid gruplarındaki labile protein döteronlarından ileri geliyor. Söz konusu labil protein döteronları, su döteronları ile hızlı değiş-tokuş yapıyorlar. BPTI çözeltilerinde ^2H durulmasının PD bağıllığı, hidrojen değiş-tokuş oranları ile bilinen PD değerlerine göre analiz edilmiştir. Ibuquinin için labil protein döteronları nötral PD'de bile dispersiyona katkıda bulunuyorlar. ^2H durulma verileri yan zincirlerde ve yüzey peptitlerindeki ND ve OD'nin iç hareketi ve yönelim düzeni üzerine bilgi sağlanmıştır. ^{17}O ve ^2H dispersiyonlarının su katkılarının mukayesesi ortaya koyuyor ki; BPTI'nın 4 su molekülünün bir tanesi derine gömülüdür. Bu molekül çok yavaş değiş-tokuş yapıyor (10^{-4}s 'den 10^{-6}s 'ye kadar değişen zamanlarla). Diğer üçü ise daha hızlı değiş-tokuş yapıyorlar (10^{-6}s 'den 10^{-8}s 'ye kadar değişen zamanlarla) (Denisov ve Halle1995).

Classes of Hydration Sites at Protein-Water Interfaces: The Source of Contrast in Magnetic Resonance Imaging

Bu çalışmada, cross-linked BSA ve doğal BSA çözeltilerinin NMRD dispersiyonu 60 MHz'ye kadar incelenmiştir. Proteini yüzeyinde bulunan su için sınıflandırmalar yapılmıştır. 23 ns'lik sudan bahsedildiği gibi suyun yüzeyle yaptığı hidrojen bağlarına göre de sınıflandırmalar yapılmıştır. Yüzeyle bir bağ yapan suyun ömrü 8×10^{-12} s, Yüzeyle iki bağ yapan suyun ömrü 4×10^{-10} s, yüzeyle üç bağ yapan suyun ömrü 3×10^{-8} s ve yüzeyle dört bağ yapan suyun ömrü 1×10^{-6} s bulunmuştur. Bu incelemelerden doku için de sonuçlar çıkarılmıştır. Bu incelemelerde cross-linked BSA doku için model olarak seçilmiştir ve gerek cross-linked BSA gerekse dokuda manyetizasyon transfer mekanizmasının önemli olduğu ortaya çıkarılmıştır (Koenig 1995).

Using Buried Water Molecules to Explore The Energy Landscape of Proteins

Bu çalışmada, ^{17}O ve ^2H NMRD dispersiyonu yolu ile ve BPTI'nın kristal yapısının incelenmesi yoluyla 4 tane su molekülünün enerji haritası ortaya çıkarılmıştır. Bu enerji haritasını ortaya çıkarabilmek için sıcaklığa bağlı çalışmalar da yapılmıştır ve elde edilen dispersiyon verilerinden protein içinde gömülü su moleküllerinin exchange oranlarının belirlenmesi ilk kez yapılmıştır. Durulma oranlarının sıcaklığa bağlılığı ise 10 KJmol^{-1} mertebesindeki enerji profilinde meydana gelen büyük ölçekli konformasyonel dalgalanmalara atfedilmiştir (Denisov ve ark. 1996).

The Dynamics of Water-Protein Interactions

Bu çalışmada, su ile protein etkileşimlerinin dinamiği gözden geçirilmiştir. Spektroskopi ile durulma arasındaki ilişki analiz edilmiş ve pür çözeltide T_1 için gerekli formüller verilmiştir. Sonrasında protein çözeltilerinin durulma oranları; serbest su, yüzey suyu ve mobil protein protonları ile mobil olmayan protein protonlarından gelebilecek katkılara göre analiz edilmiştir. Bu çalışmadaki analizde, yüzey suyunun translasyonel hareketlerinin durulmaya yol açtığı ileri sürülmüştür (Bryant 1996).

Water ¹H Magnetic Relaxation Dispersion in Protein Solutions. A Quantitative Assesment of Internal Hydration, proton Exchange, and Cross-Relaxation

Bu çalışmada, BPTI ve bir protein mutan tının (G36S) sulu çözeltilerindeki ¹H NMRD dispersiyonu 2-100 MHz frekans aralığı için ölçülmüştür. Mutandın BPTI'dan tek farkı dört tane iç sudan birinin eksik olmasıdır. Yani; BPTI'da 4 su varken mutant da 3 su vardır. Bu çalışmanın nitel analizi protein çözeltilerinden elde edilen ¹H durulmasının yorumundaki ana çelişkileri çözüyor. Bu çalışmadan 3 temel sonuç elde edilmiştir.

1.) BPTI-G36S fark ¹H dispersiyonu sadece ve sadece bir tek iç su molekülü ile ilgilidir. Bu su molekülünün ismine W122 denilmiştir ve bu molekül BPTI üzerindedir. Bu su molekülü tam düzenlidir yani çevresine sıkıca bağlıdır. 4 tane su protonunun iç durulma oranı %70 molekül içi olup, %30'u da moleküller arasındadır. Molekül içi katkı suyun proton-proton etkileşimlerinden ileri gelmektedir. Moleküler arası katkı ise suyun protonları ile protein protonları arasındaki etkilerden ileri gelmektedir.

2.) proteindeki yer değiştiren protonlar ölçülen su durulmasına önemli ölçüde bir katkı yapıyor. Bu katkı nötral PH'de baskın olmalıdır.

3.) protein protonları ile su protonları arasındaki moleküler arası etkileşimlerin etkisi ek bir etkidir ve cross durulma ihmal edilebilir boyuttadır. Bu çalışmadan çıkan anlam, proteinlerden gelen esas katkının mobil protonların su ile hızlı yer değiştirmesi sonucunda oluştuğudur. Burada anlatılan sonuçlarda aşırı daralma rejimi içinde geçerli olduğu da not edilmiştir (Venu ve ark. 1996).

¹H NMR Relaxation Measurements in Highly Concentrated Water Protein Solutions

Bu çalışmada, sulu protein çözeltilerindeki $1/T_1$ ve $1/T_2$ zamanları protein konsantrasyonuna göre ölçülmüştür. $1/T_1$ oranı %15 protein konsantrasyonuna kadar tam olarak lineer gitmektedir. Hatta bu lineerlik %30'a kadar da uzatılabilir. %30'dan sonra $1/T_1$ lineerlikten tamamen sapmakta ve hızlı bir artış göstermektedir. Benzer bir durum da $1/T_2$ için de söz konusudur. $1/T_2$ %35'den sonra hızlı bir şekilde yüksek bir artış göstermektedir. T_2 zamanının aşağı konsantrasyonları için su ile yüzey suyu

arasındaki hızlı değiş-tokuştan ileri geldiği, yüksek konsantrasyonlarda ise ikinci bir kimyasal değiş-tokuştan ileri geldiği gözlenmiştir (Olechnowicz ve ark. 1999).

Thermal Denaturation of Ribonuclease A Characterized by Water ¹⁷O and ²H Magnetic Relaxation Dispersion

Bu çalışmada, BSA'nın sulu çözeltilerindeki T₁ zamanı manyetik alan şiddetinin oksijen konsantrasyonunun ve çözücünün döteryumlanmasının fonksiyonu olarak ölçülmüştür. Yüksek protein konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiş önceki çalışmaların aksine, gözlenen NMRD dispersiyonu tamamen Lorentzien olmaktadır ve bu eğriden elde edilen etkin ilgi zamanı 41 ns olmaktadır. Oksijenin ortadan kaldırılması durulma dispersiyon görüntüsünün başlangıç kısmını (bükülme frekansının öncesini) düz yapıyor. Daha önceki çalışmalarda gözlenen yüksek alan kuyruğunu ise yaklaşık olarak düz ediyor. Geride kalan küçük alan dispersiyonu ise, 1 ns'lik zaman gösterge çizelgesini esas alan iç protein hareketlerine ya da protein üzerindeki bağlı suyun hareketine atfedilmiştir. Bu çalışmada, moleküler içi ve moleküler arası katkıları çözücünün döteryumlaştırılması yardımıyla birbirinden ayırt edilmiştir. Moleküler içi protein durulma oranı büyüklüğü 25 bağlı su molekülünün varlığına göre yorumlanmıştır (Denisov ve Halle 1998).

¹H NMRD profiles of Diamagnetic Proteins: A Model – Free Analysis

Bu çalışmada, çeşitli protein çözeltilerinin NMRD dispersiyonu frekansa karşı ölçülmüştür. Ayrıca bu dispersiyon belli proteinler için konsantrasyona da karşı ölçülmüştür. Elde edilen veriler “Model-Free Analysis” yöntemine göre yorumlanmıştır. Bu yöntem NMRD görüntüleri için ortalama bir J(ω) ve ortalama bir ilgi zamanı tanımını esas almaktadır. Söz konusu model esas alınarak incelenen proteinlerin ilgi zamanları Stokes yasasından elde edilen ilgi zamanları ile mukayese edilmiştir ve “Model-Free Analysis” den elde edilen ilgi zamanı ile Stokes'den elde edilen ilgi zamanı arasında iyi bir ilişki bulunmuştur (Bertini ve ark. 2000).

Protein – bound water Molecule Counting by Resolution of 1H spin- Lattice Relaxation Mechanisms

Bu çalışmada, birçok enzim ve proteinin MRD dispersiyonu yüksek frekanslara kadar ölçülmüştür. Ölçümler H₂O ve D₂O ortamlarında gerçekleştirilmiştir. 2 farklı çözücü kullanmak suretiyle, suyun 1/T₁'e olan moleküler arası katkılarından Moleküler içi katkılar ayırt edilmiştir. Proteine bağlı uzun ömürlü suyun (ömrü τ_r mertebesinde) molekül sayısı belirlenmiştir. Ayrıca bu proteinlerin rotasyonel ilgi zamanı da bulunmuştur. Bunun ötesinde protein ara yüzeyindeki su proteinlerinin ömrü çok kısa bulunmuştur. Proteinin yüzey kabalığının (girinti-çıkıntı) yüzey suyunun rotasyonel mobilitesinin yavaşlamasından sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Veriler çözücüdeki suyun serbest su, bağlı su ve yüzey suyu olmasına göre sınıflarına bölünüşüne göre analiz edilmiştir. Etkileşimlerin su protonları ile protein protonları arasında meydana geldiği varsayılmıştır. Doğal olarak su protonları ile su protonları arasındaki etkileşimlerde dikkate alınmıştır (Kiihne ve Bryant. 2000).

Proton T₁ and T₂ Relaxivities of Serum Proteins

Bu çalışmada, çeşitli proteinlerin çeşitli konsantrasyonları ile bir set halinde MR fantomlarına yerleştirilmiştir. Elde edilen T₁ ve T₂'ler protein konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilerek; her bir proteinin rölaksivitesi (birim konsantrasyon başına durulma oran artışı) bulunmuştur. T₂ rölaksivitesinin T₁ rölaksivitesinden çok yüksek olduğu ortaya konmuştur. Rölaksivite değerlerine bağlı olarak hastalıklı ve sağlıklı serumların durulma oranları analiz edilmiştir. Her bir çözelti için ortalama bir rölaksivite tanımlanmıştır. Bu ortalama rölaksivite serum içindeki bireysel proteinlerin rölaksivitesinin ağırlıklı ortalaması olmaktadır. Yani ortalama rölaksivite total proteinlerin rölaksivitesini temsil etmektedir. Bu yolla normal ve hasta serumların total proteinlerinin MR ile tayin olunabileceği ortaya konulmuştur (Yılmaz ve ark. 2004).

Protein Hydration Dynamics in Solution: a Critical Survey

Bu çalışmada, protein hidrasyonu ile ilgili daha önceki çalışmaların bir gözden geçirilmesi yapılmıştır. Bu çalışmada protein dinamiği ile ilgili kavramlar üzerine bilgi verilmiştir. Su- protein dinamiği su-protein yapısına göre incelenmiştir. Su hidrasyonunun yapısı ile ilgili çok boyutlu NMR ve kristallografik yapı analiz

edilmiştir. Protein hidrasyon dinamiğinin manyetik durulmaya göre analizi yapılmıştır. NMRD'den elde edilen sonuçlar analiz edilmiştir. Ayrıca sonuçlar "Nuclear Overhauser Effect" olayından da yorumlanmıştır. Bunun yanı sıra dielektrik durulma spektroskopisi ve floresans spektroskopisi gibi diğer tekniklerin protein hidrasyonuna katkıları da analiz edilmiştir (Halle 2004).

Slow Internal Protein Dynamics from Water ¹H Magnetic Relaxation Dispersion

Bu çalışmada, su-proton NMRD görünümü H-mUb ve D-mUb için elde edilmiştir. Elde edilen verilerden ya da su-proton durulma dispersiyonundan yavaş iç protein dinamiği üzerine bilgi edinilmiştir (Sunde ve Halle. 2009).

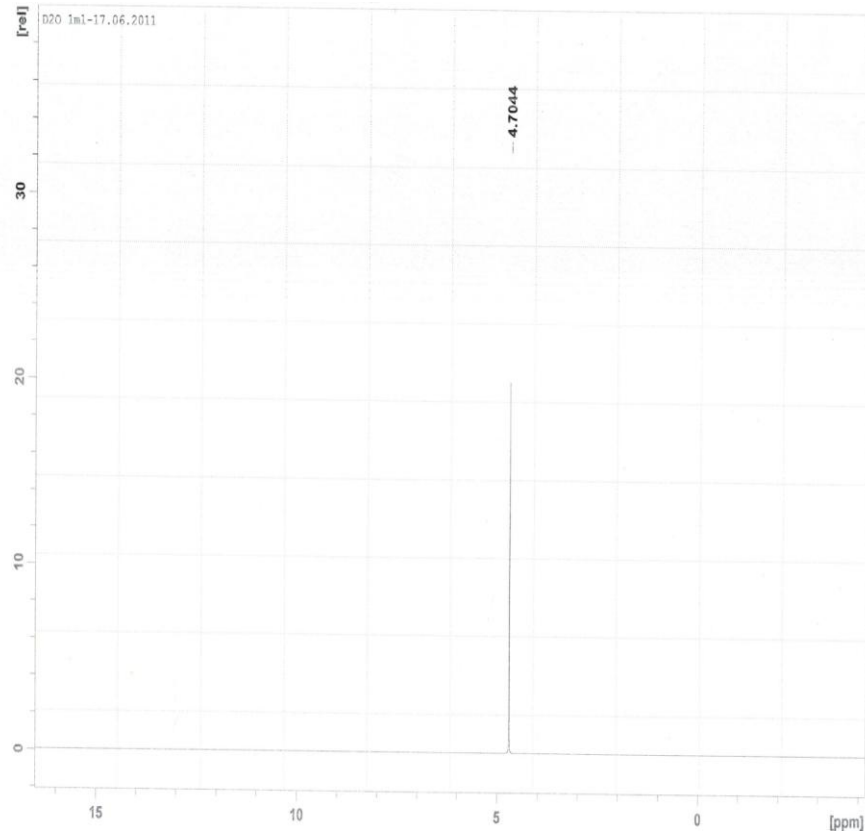
Dynamics of Water in and Around Proteins Characterized by ¹H-spin-Lattice Relaxometry

NMRD tekniği kullanılmak suretiyle protein çevresindeki suyun dinamiği incelenmiştir. Bu yapılırken önce, düşük frekanstaki dispersiyon üzerine bilgi verilmiştir. Bu dispersiyonun bağlı sudan ileri geldiği açıklanmıştır. Benzer bir dispersiyonun da protein içeren çözeltinin sadece çözelti kısmından elde edilebileceği ortaya konmuştur. Yani dispersiyon hem proteinli çözeltiyi hem de proteinin uzağındaki serbest çözücünün benzer bir dispersiyon verdiği tez ortaya konmuştur. Diğer taraftan yüksek frekans dispersiyonu ise su-protein ara yüzeyindeki yüzey suyuna atfedilmiştir. Bu amaçla $1/T_1$ 'in 300 MHz'ye kadar olan frekansa bağlılığı ortaya konmuş ve yüzey suyunun 30 ps civarında bir ömre sahip olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca bu kişiler, immobilized (hareketsiz hale getirilmiş) protein çözeltilerindeki durulma mekanizmalarını da incelemişler (Bryant 2010).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Örneklerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan İnsan serum albümini, Sigma firmasından satın alındı (Sigma-AldrichCo, St Louis, USA). Çözücü olarak kullanılan ve %0,1 artık su içeren D₂O (Döterium Oksit) çözeltisi ise MERCK firmasından satın alındı (Merck KGaA, Germany). Konsantrasyon incelemeleri için kullanılan albümin çözeltileri 1 ml D₂O'ya değişik miktarlarda albümin eklenerek iki grupta hazırlandı. Bu tip deneylerin bir grubunda albümin miktarları 0.02'lik eklemelerle 0.10 g'a kadar; diğerinde ise 0,1'lik eklemelerle 0.5 g'a kadar değiştirildi.



Şekil 3.1. Pure D₂O için tek puls spektrumu

İncelenen örnekte D₂O içinde % 0.1ml'lik su bulunmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada ölçülen su piki olmaktadır. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi, pik 4.7044 ppm'de çıkmaktadır. Bu D₂O içindeki suyun sinyalinin konumudur.

3.2. RÖLAKSASYON ÖLÇÜMLERİ

Ölçümler 400 MHz'de çalışan BRUKER, AVANCE- NMR spektrometresi kullanılarak gerçekleştirildi. T₁ durulmaları Inversion Recovery(IR) Puls adımı (180 bekleme zamanı -90 bekleme zamanı) kullanılarak gerçekleştirildi. Albümin solüsyonların puls tekrarlama zamanı (TT) 5T₁'den daha yüksek bir değer alındı ve her örneğin T₁'i önce öncül deneylerle saptandı. D₂O'nun puls tekrarlama zamanı 150s olarak seçildi. T₂ ölçümü CARR- PURCELL- MEİBON-GİLL(CPMG) metodu ile gerçekleştirildi.

Hazırlanan örneklerin IR-FID ve SE sinyal katarları alındı. IR-FID ve SE-T₂ ölçümlerinde bekleme zamanı örnekteki konsantrasyona göre değiştirildi. Bu τ bekleme zamanları bulgular kısmında, ilgili şekiller üzerinde gösterildi.

3.3. ALBÜMİN (HSA)



Şekil 3.2. İnsan serum albüminin şematik gösterimi, 6 palmitik asit molekülüne bağlanmış haliyle

Albümin, Latince albus (beyaz) sözcüğünden gelen, gene Latince, albumen (yumurta beyazı) sözcüğünden türemiştir. Proteinlerin ilk tanımlandığı dönemlerde, suda çözünür ve sıcakta pıhtılaşan proteinler sınıfına bu ad verilmiştir. Serumda bulunan en yaygın protein de bu özellikleri taşıdığından ona "serum albümini" adı verilmiştir.

Human Serum Albümin (HSA) insan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasında oldukça fazla olduğundan, HSA sık sık çalışma konusu olarak seçilir. HSA 585 amino asitten oluşan bir proteindir ve PH 7.4 iken 84 tane pozitif olarak yüklü gruba sahiptir. Kanda bulunan proteinlerin % 60'ını oluşturur. Ayrıca, doku sıvılarında, özellikle kas ve deride, az miktarda gözyaşı, ter, mide suları ve safrada da bulunur. Vücuttaki toplam albüminin % 30-40'ı kadardır. Yağ asitleri ve çeşitli maddeleri kanda taşımalarının yanı sıra en önemli işlevi, kan ile doku sıvıları arasında suyun dengelenmesini sağlamaktır. Sonuç olarak albümin insan kanında ilaç taşımada ve depolamada oldukça önemli rol oynar.

İşlevi

Büyük proteinler kılcal damarlardan geçemedikleri için kandaki sıvıların sızma eğilimini dengelerler. Bu yüzden albümin, kılcal damarlardan dokulara su ve suda çözünür maddelerin geçmesine neden olan kolloid osmotik basınç veya onkotik basıncı düzenleyen başlıca proteindir. Onkotik basıncın %70'i albümin tarafından karşılanır, bu yüzden albümin damarların içiyle dışındaki dokular arasındaki sıvının dengelenmesinde gereklidir. Kan protein seviyelerinin düşmesi halinde, örneğin idrara protein geçme (proteinüri) veya kötü beslenmeden dolayı, dokularda su birikmesi, yani ödem oluşur.

Albüminin en ilginç özelliği taşıyabildiği maddelerin çeşitliliğidir. Albümin, suda çözünürlükleri düşük olan yağ asitlerinin kandaki başlıca taşıyıcısıdır. Bunun yanı sıra, oksijen serbest radikallerine bağlanarak bunları kontrol altına alır, ayrıca bilirubin (hem molekülünün yıkımı sırasında ortaya çıkar) gibi suda çözünmeyen bazı toksit metabolizma ürünlerine bağlanarak onları zararsız kılar. Albümin, bir kısmı yüksek konsantrasyonda zehirli olabilecek olan çeşitli metal iyonlarına da bağlanabilir. Pek çok fizyolojik süreçte yer alan nitrik oksit (NO) kandaki başlıca taşıyıcısı da gene albümindir. Bu maddelere bağlanması sayesinde albümin hem bu maddelerin kandaki

konsantrasyonlarını düşük ve zararsız düzeylerde tutar, hem de onların ihtiyaç duydukları yerlere ulaşmalarını sağlar.

Albümünde uzun yağ asidi moleküllerinin (oleik, linoleik, linolenik, arasidonik, palmitik ve miristik asit gibi) bağlanabildiği, ikisi sıkı, dördü gevşek olmak üzere altı bağlanma yeri vardır (yukarıdaki şekle bakınız). Bu yağ asitleri albümin tarafından hücrelere taşınıp oralarda kullanılırlar.

Yağ asitlerinin bağlandıkları yerlerden farklı olarak ayrıca küçük organik iyonların bağlanabildiği de iki yer vardır. Bunlardan biri küçük aromatik karboksilik asitleri tercih eder, öbürü negatif yük içeren çok halkalı bileşikleri tercih eder. Bu yerlerde tiroit hormonu ve diğer steroid hormonlar ve bilirubin taşınabilir. Tedavi amaçla vücuda alınan çoğu ilaç da bir ölçüde buralarda albümine bağlanırlar. Piridoksal (vitamin B6) da albümin tarafından taşınır.

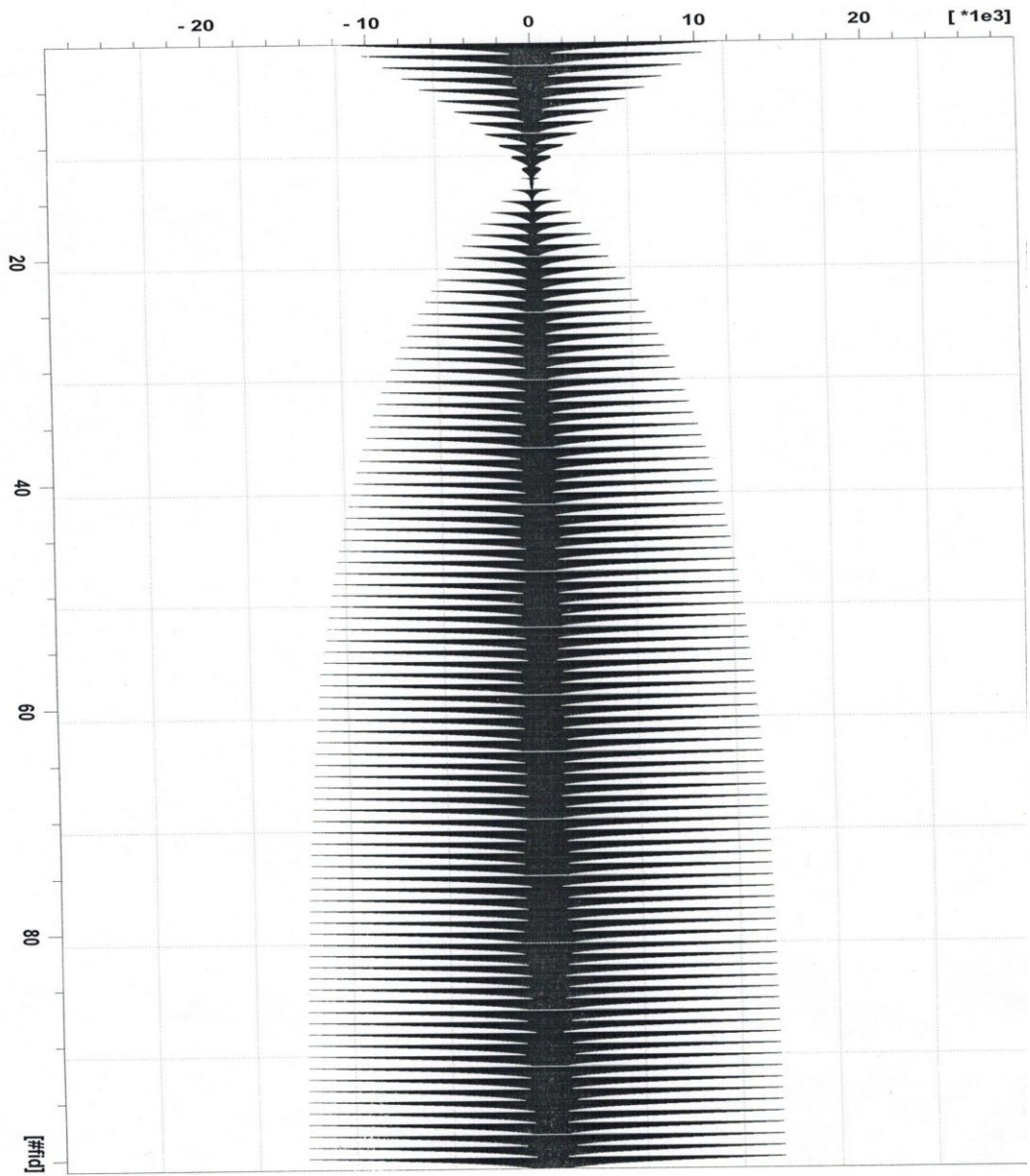
Albümin, yukarıda belirtilen bileşikler dışında çeşitli ağır metal iyonlarına da bağlanarak onların kandaki konsantrasyonunu kontrol eder. Albümin proteininde iki metal iyonu bağlanma yeri vardır ve bunlara çinko, bakır, kadmiyum, cıva, altın, gümüş ve nikel dahil olmak üzere çeşitli iyonlar bağlanabilir. Kalsiyum ve magnezyum da albümine bağlandığından albümin bu iki iyonun kandaki konsantrasyonlarına etki edebilir. Albüminin bir diğer özelliği de kan pH'sini kısmen tamponlayabilmesidir (<http://www.vikipedi.com>).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

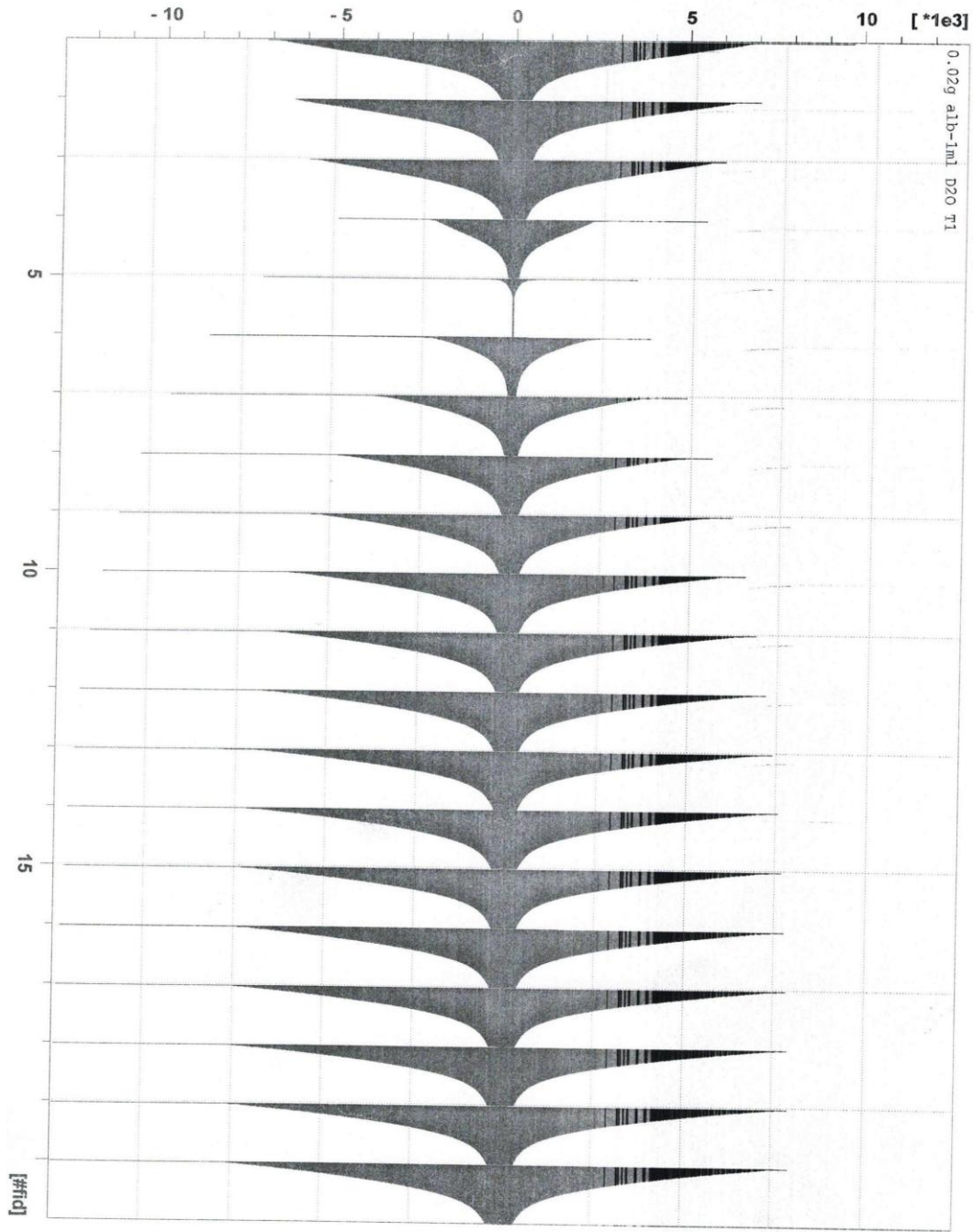
4.1. Bulgular

Elde edilen FID ve Eko setleri ve IR-T₁ ve SE-T₂ eğrilerinin tümü burada verilmemiştir. Hepsini temsilen; (pure D₂O) 0g, 0.02g, 0.04g, 0.06g, 0.08g, 0.10g, 0.20g, 0.30g, 0.40g ve 0.50g albümin varlığında elde edilenler sunulmuştur.

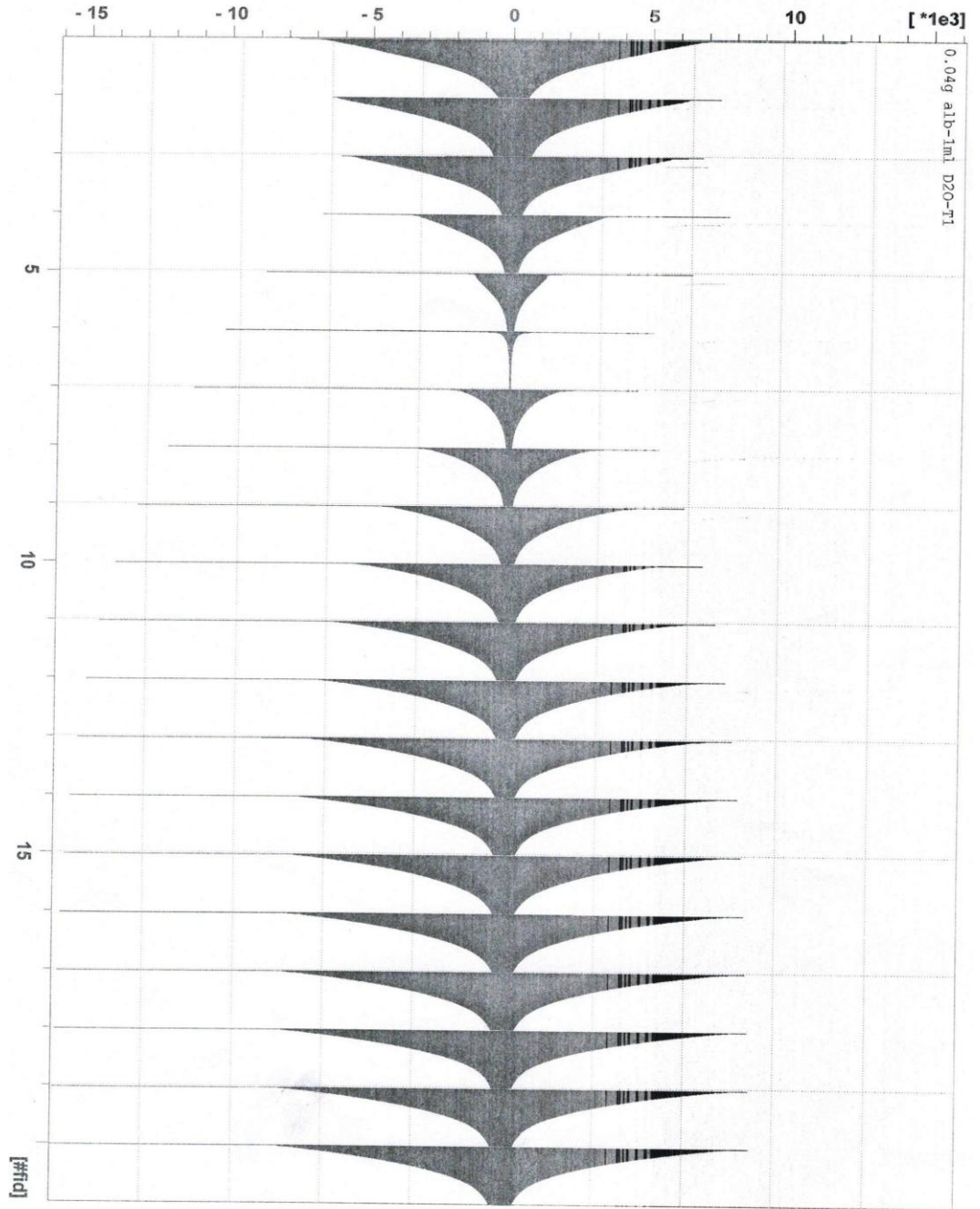
0g, 0.02g, 0.04g, 0.06g, 0.08g ve 0.10g albümin varlığında elde edilen Free Induction Decay sinyal serisi Şekil 4.1 – şekil 4.6 de gösterildi.



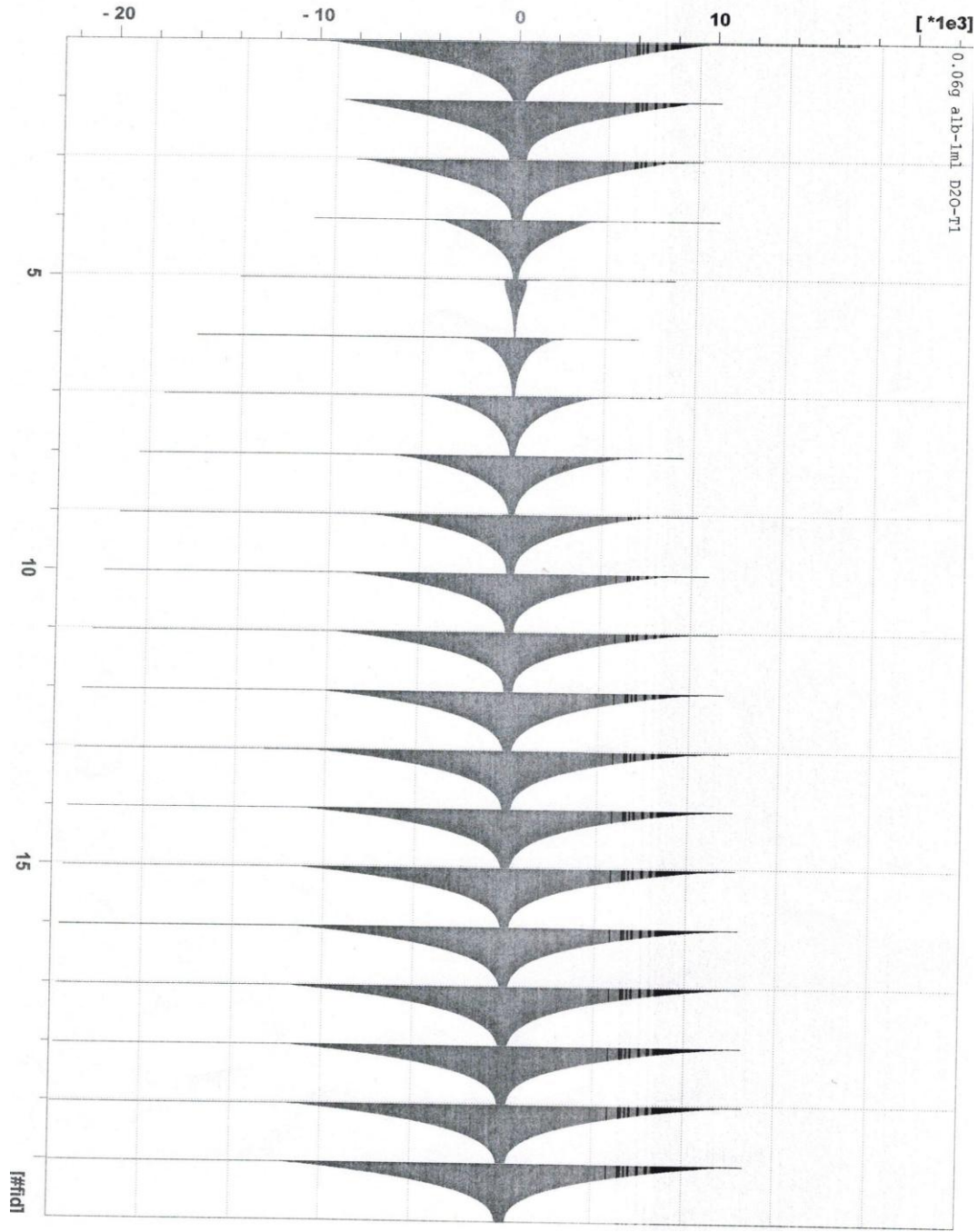
Şekil 4.1. 0.00 g albümin için T₁'in Free Induction Decay sinyal serisi



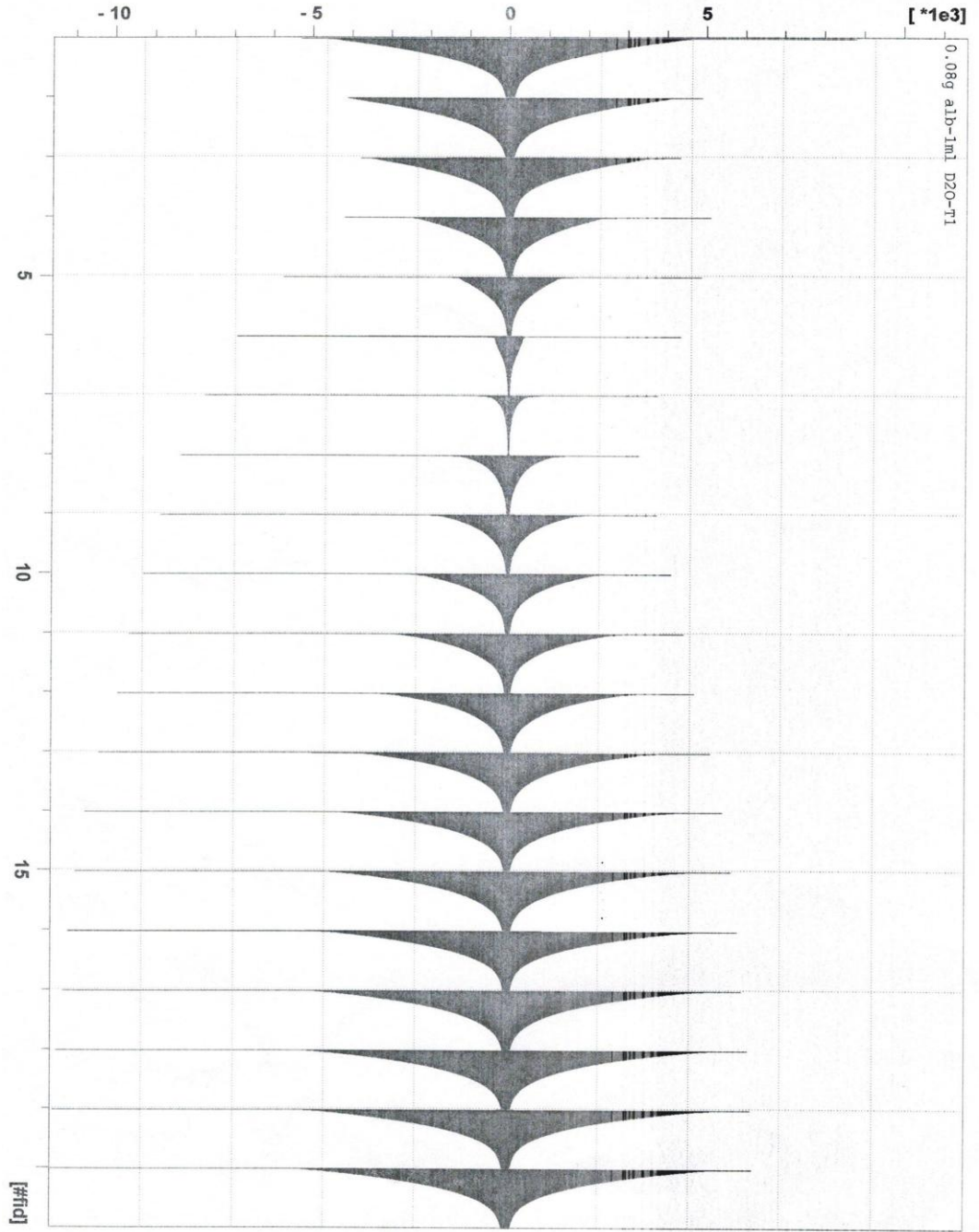
Şekil 4.2. 0.02 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi



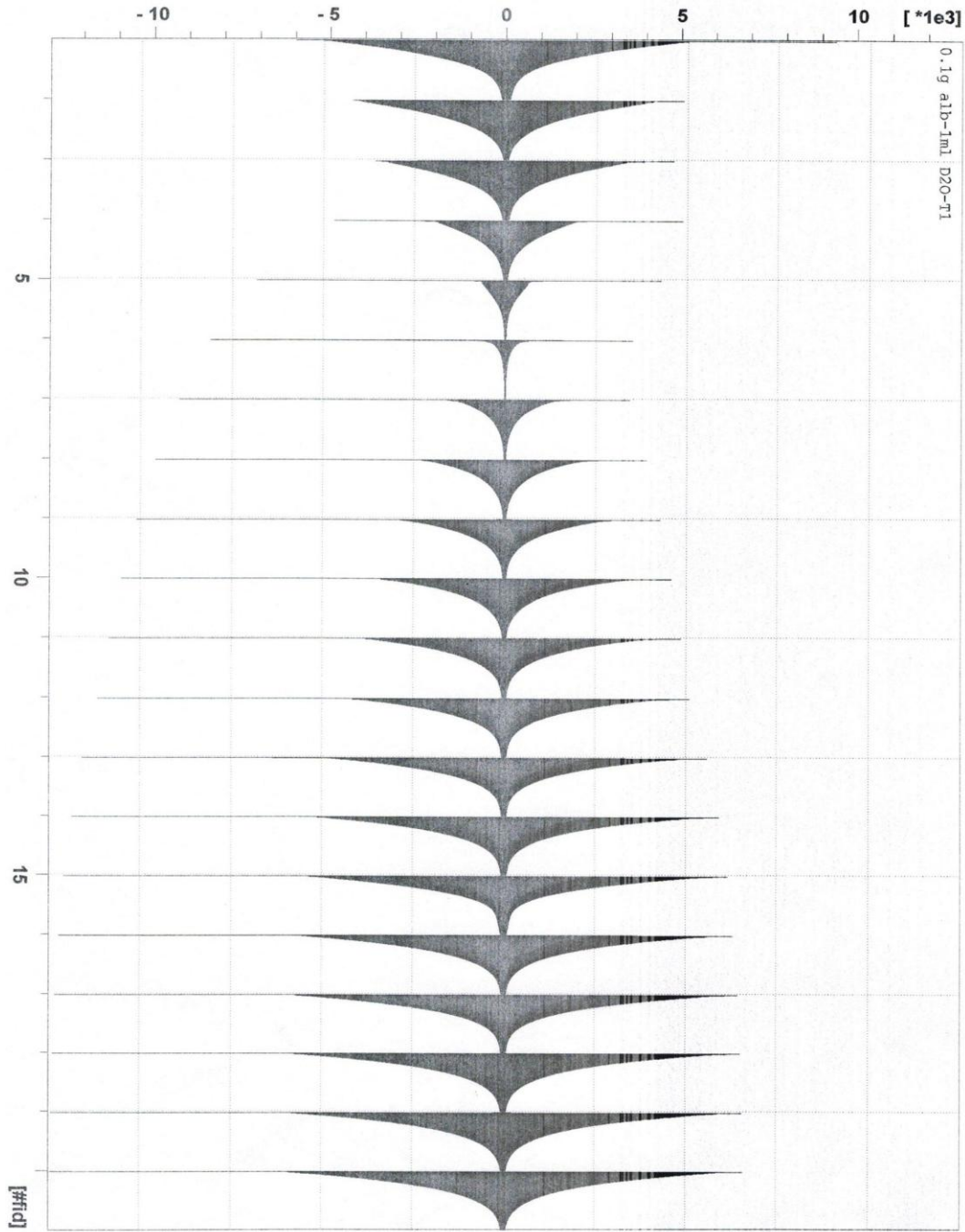
Şekil 4.3. 0.04 g albümin için T₁'in Free Induction Decay sinyal serisi



Şekil 4.4. 0.06 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi

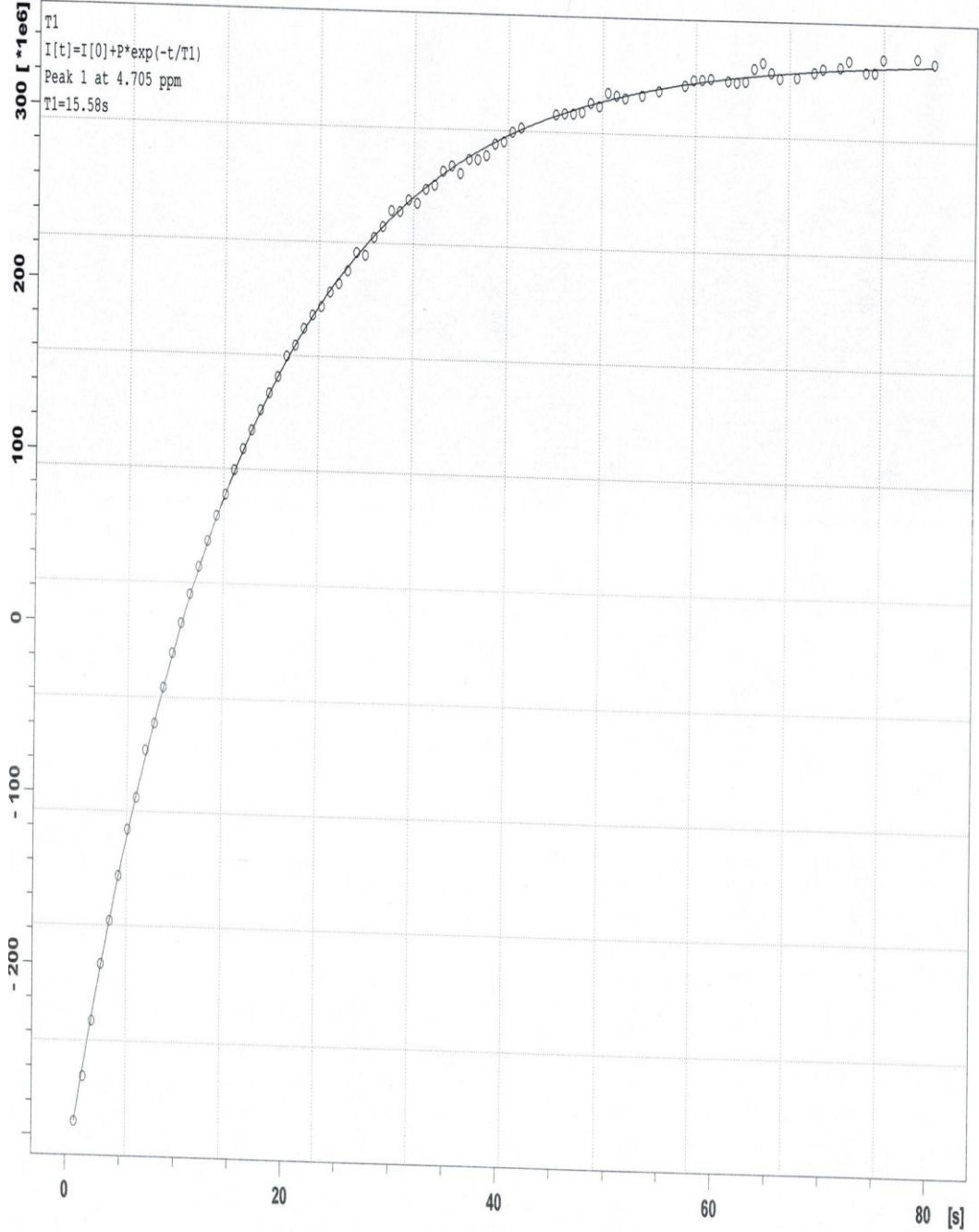


Şekil 4.5. 0.08 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi

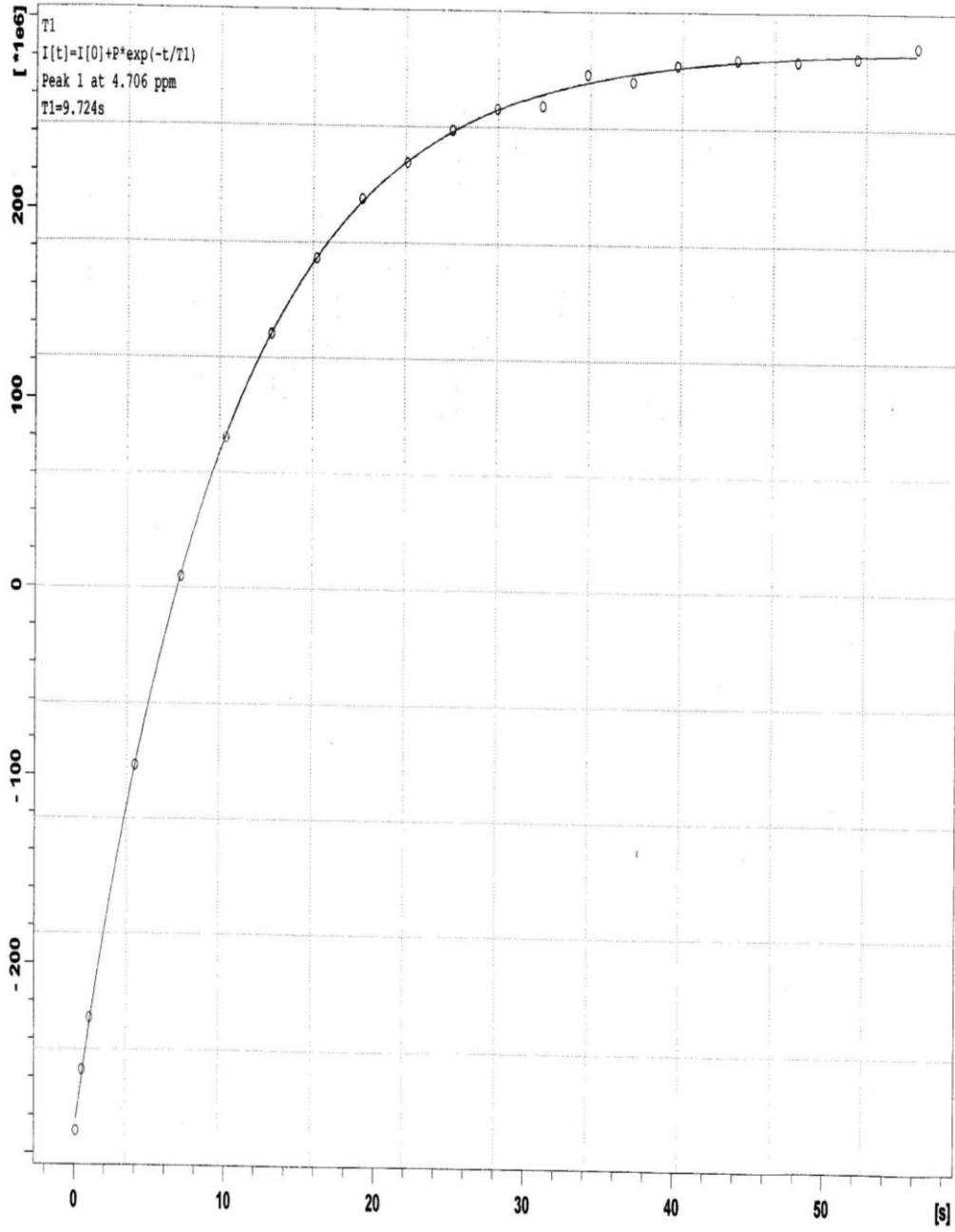


Şekil 4.6. 0.10 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi

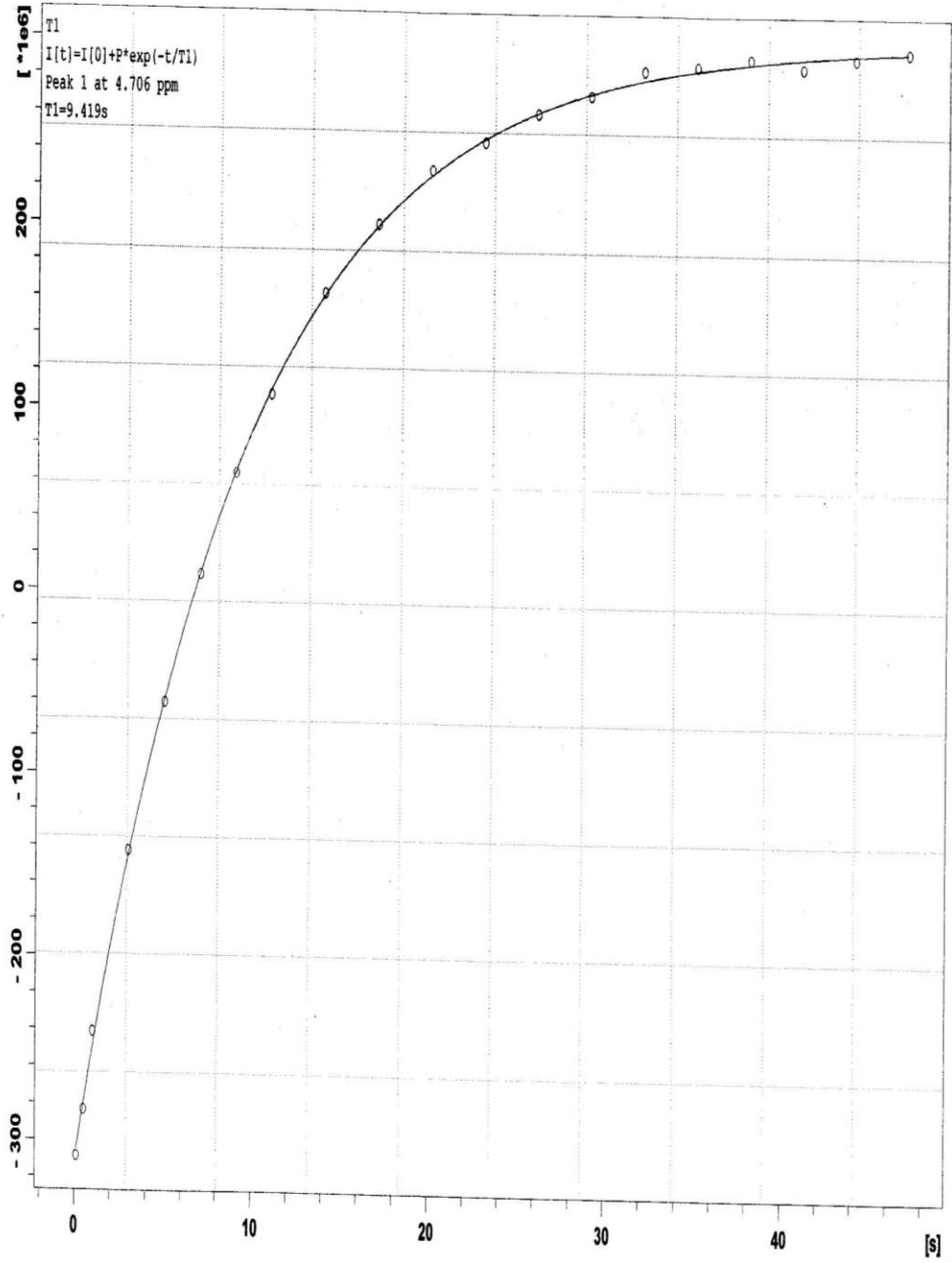
0g, 0.02g, 0.04g, 0.06g, 0.08g ve 0.10g albümin varlığında elde edilen Inversion Recovery serisi Şekil 4.7 - şekil 4.12 de gösterildi.



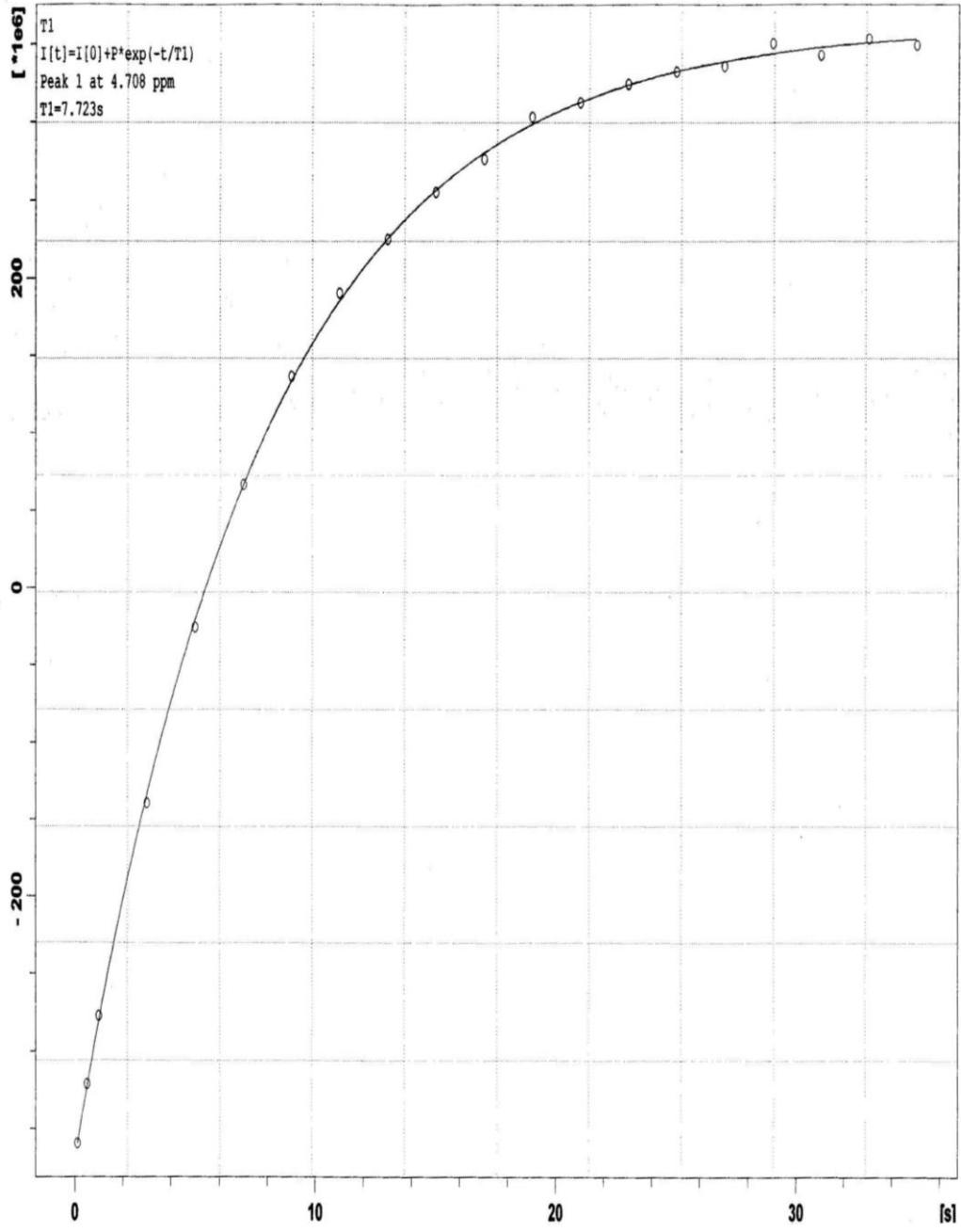
Şekil 4.7. 0.00 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi



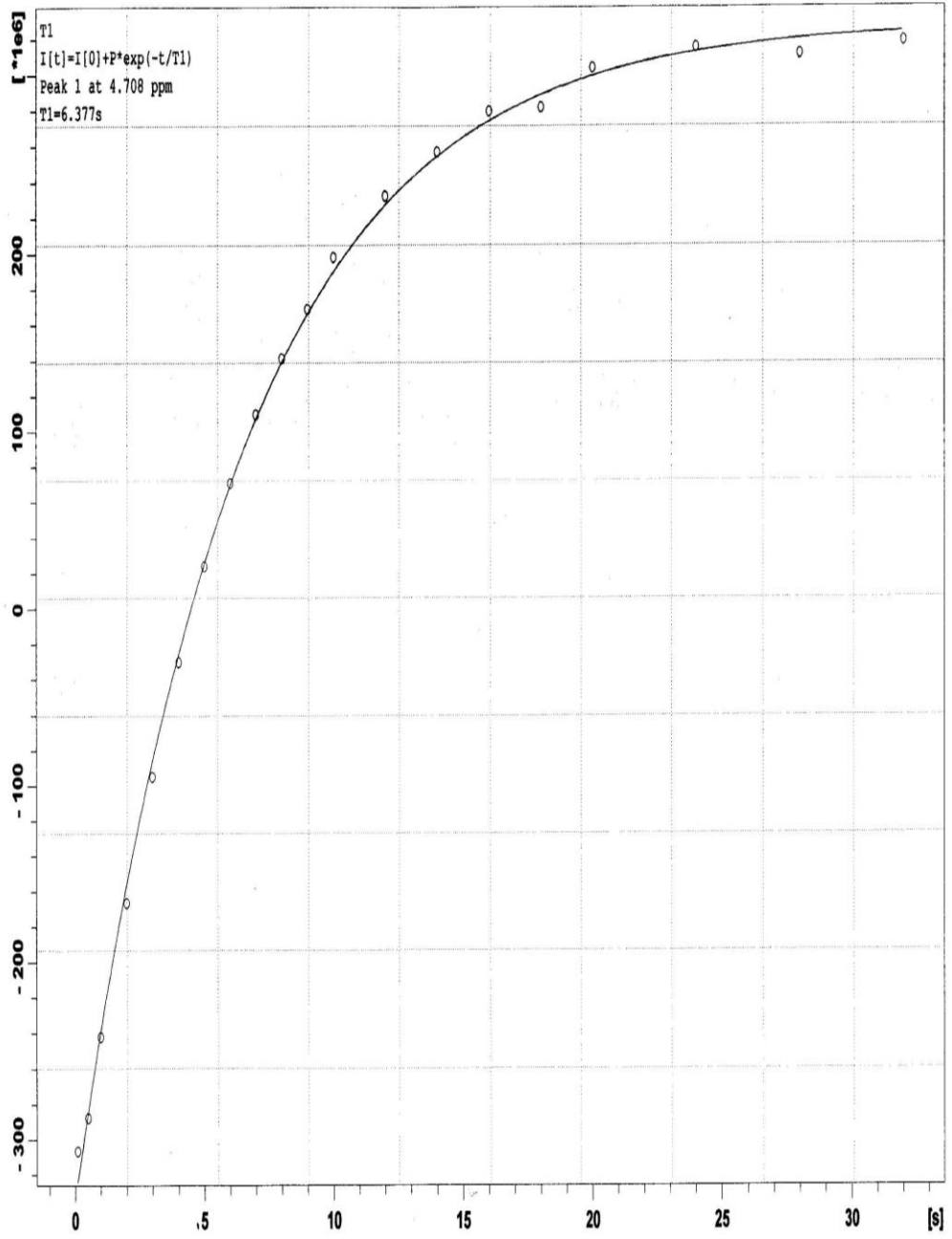
Şekil 4.8. 0.02 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi



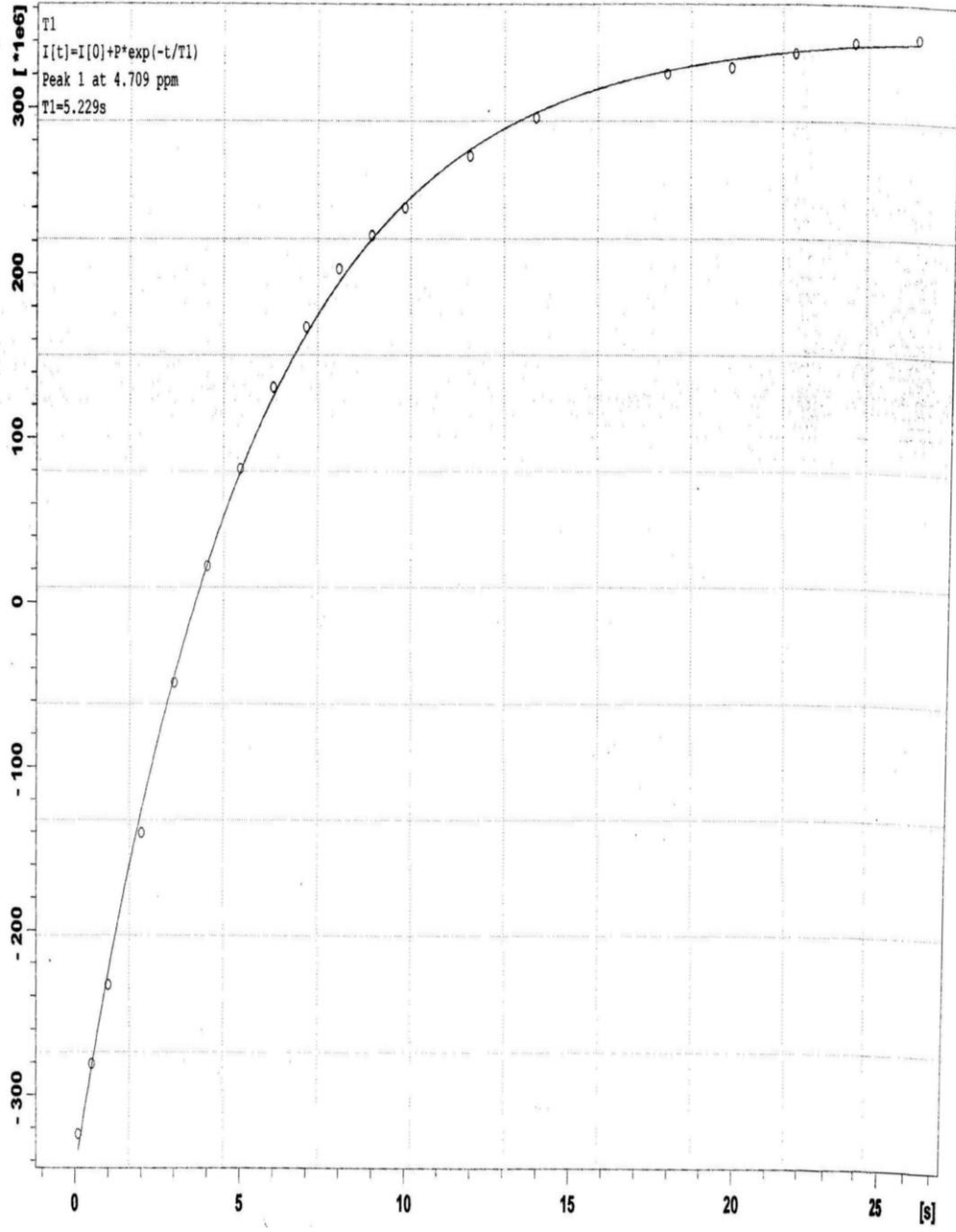
Şekil 4.9. 0.04 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi



Şekil 4.10. 0.06 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi

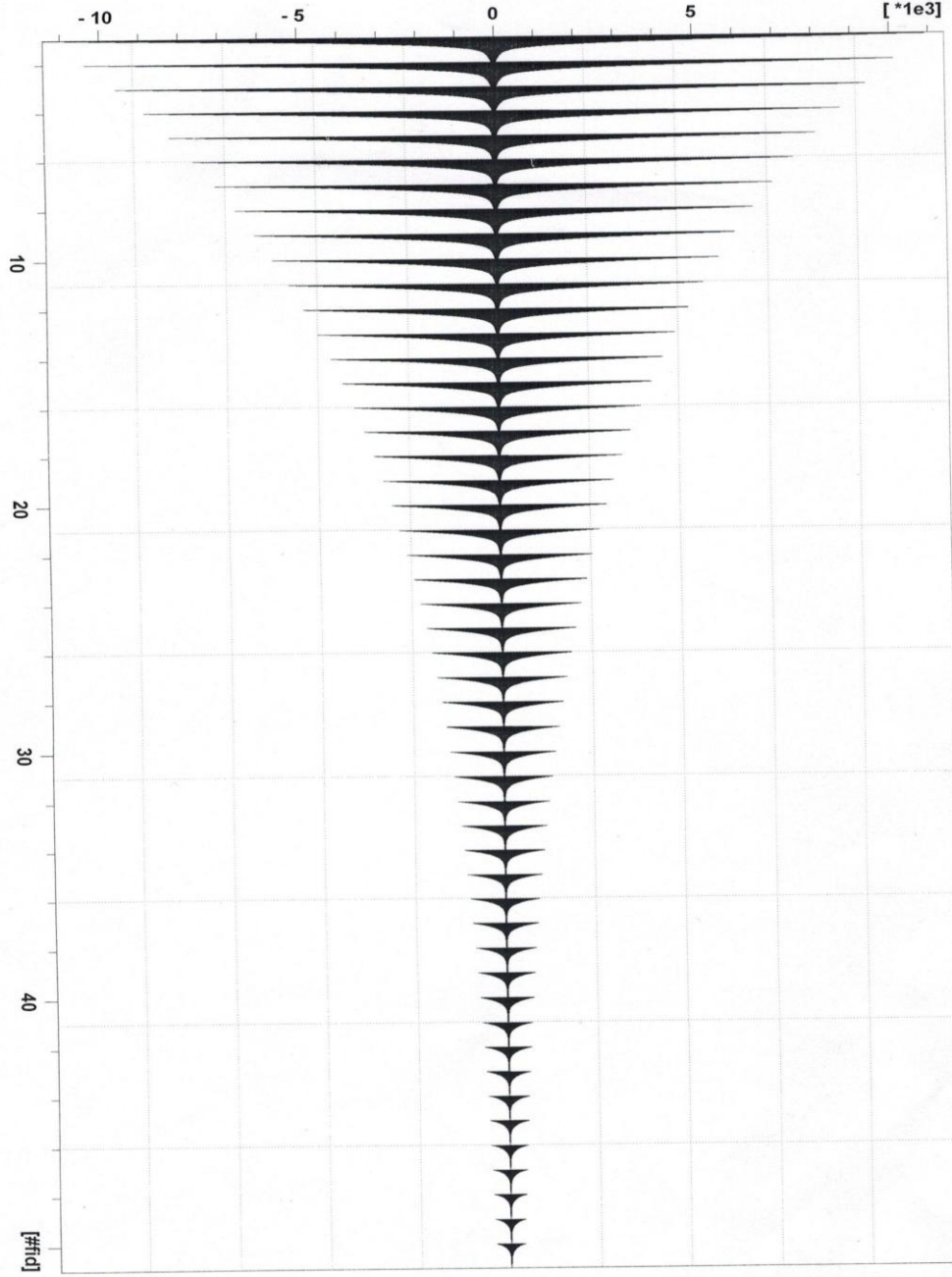


Şekil 4.11. 0.08 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi

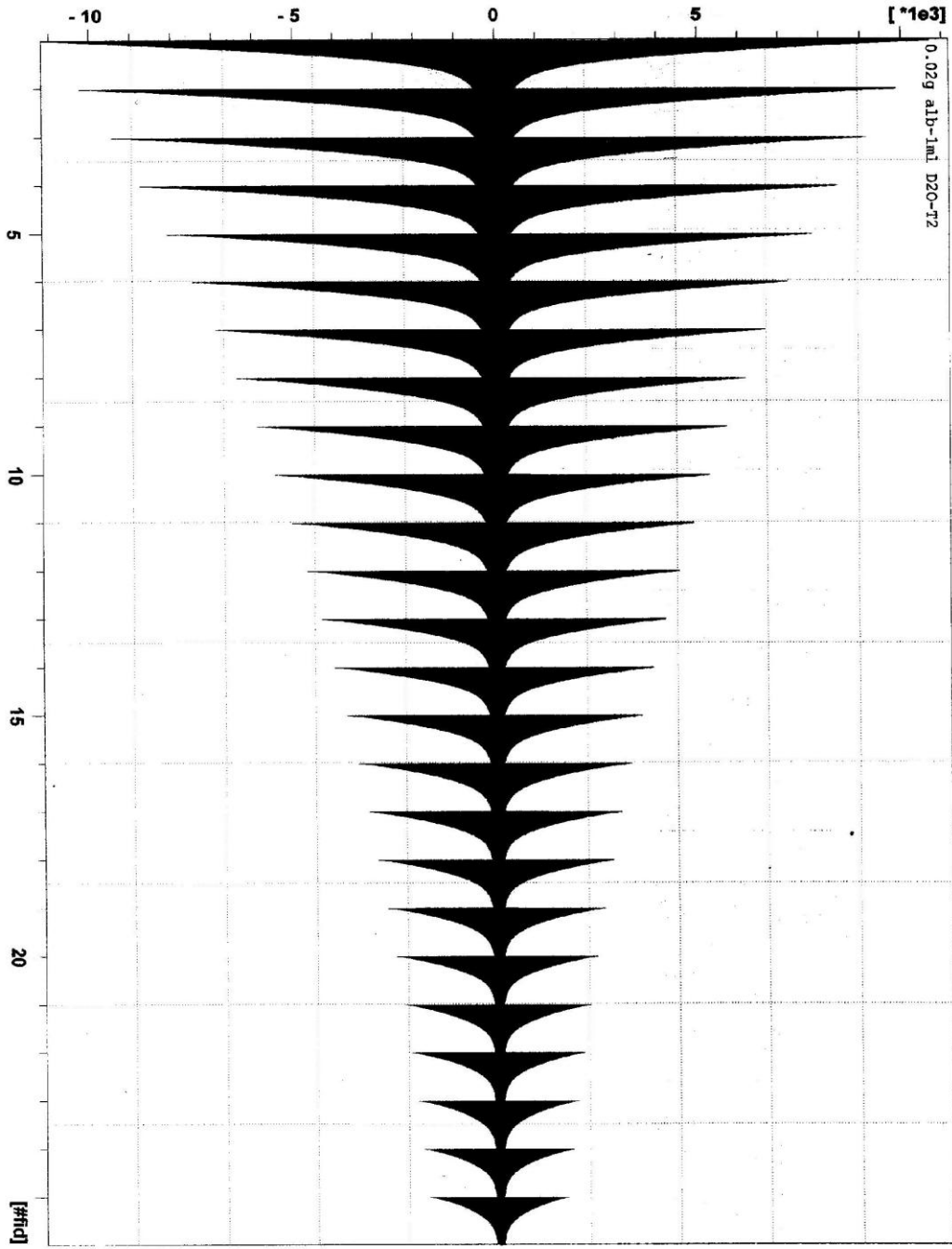


Şekil 4.12. 0.10 g albümin için T₁'in Inversion Recovery serisi

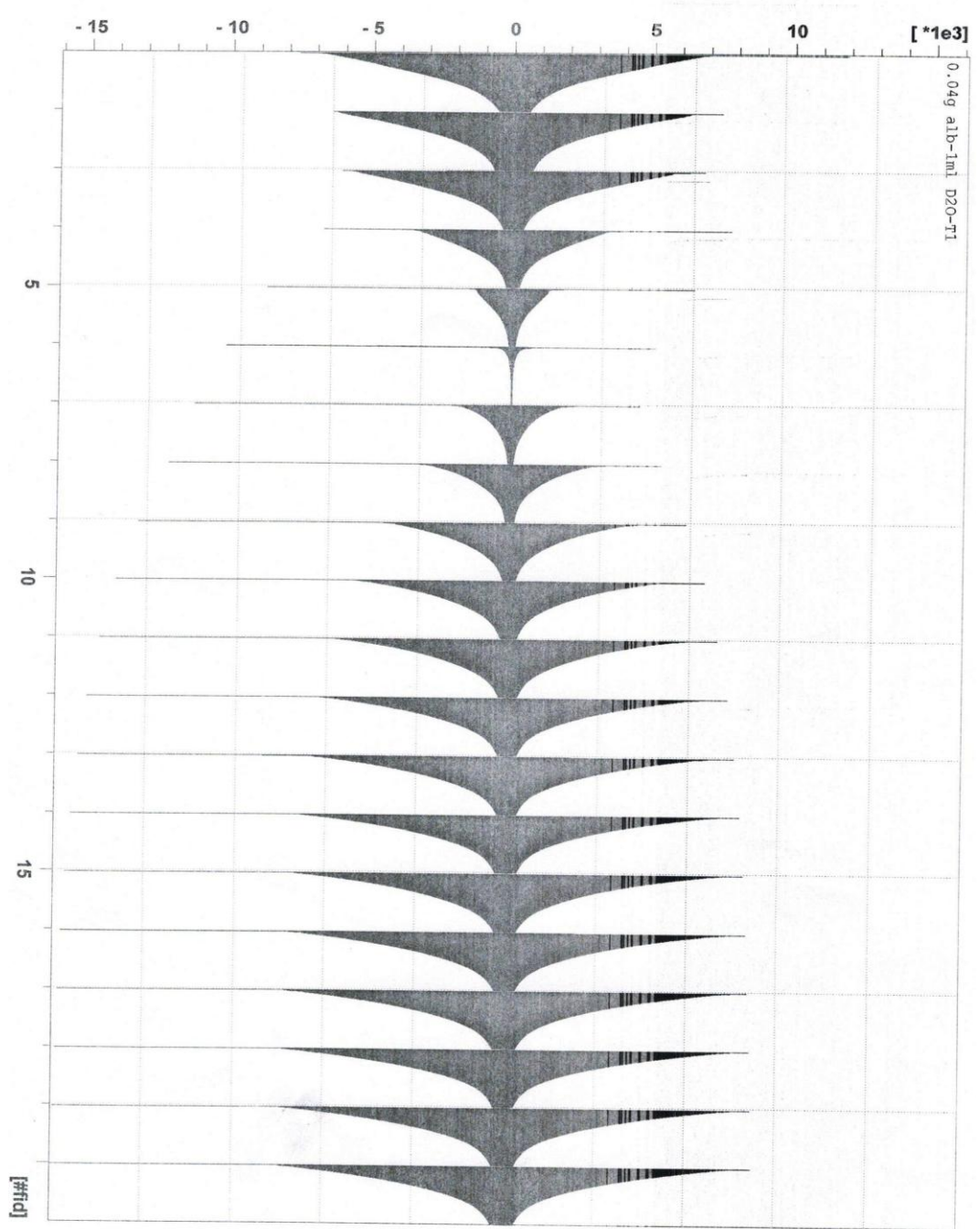
0g, 0.02g, 0.04g, 0.06g, 0.08g ve 0.10g albümin varlığında elde edilen EKO sinyal serisi şekil 4.13 - şekil 4.18'de gösterildi.



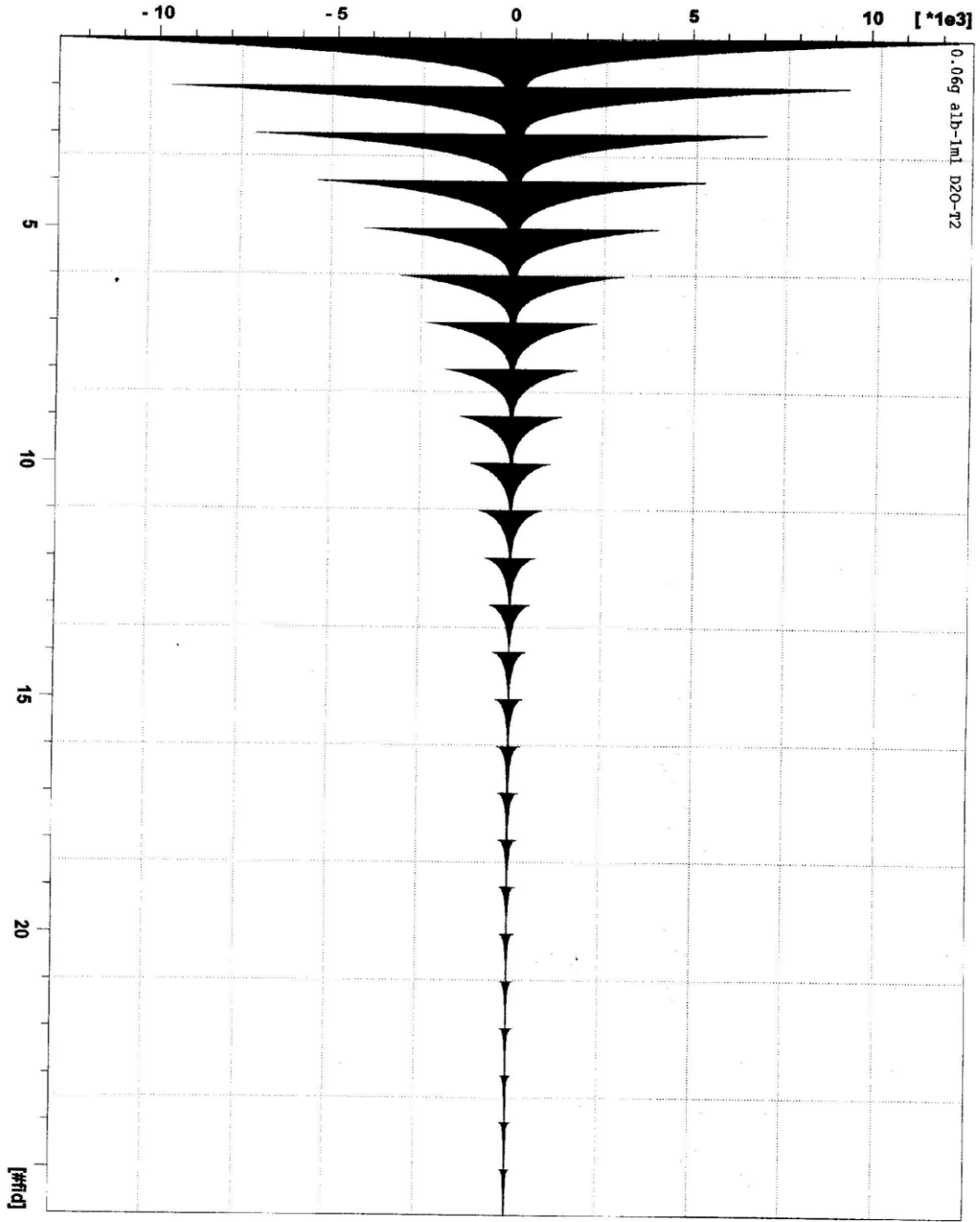
Şekil 4.13. 0.00 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi



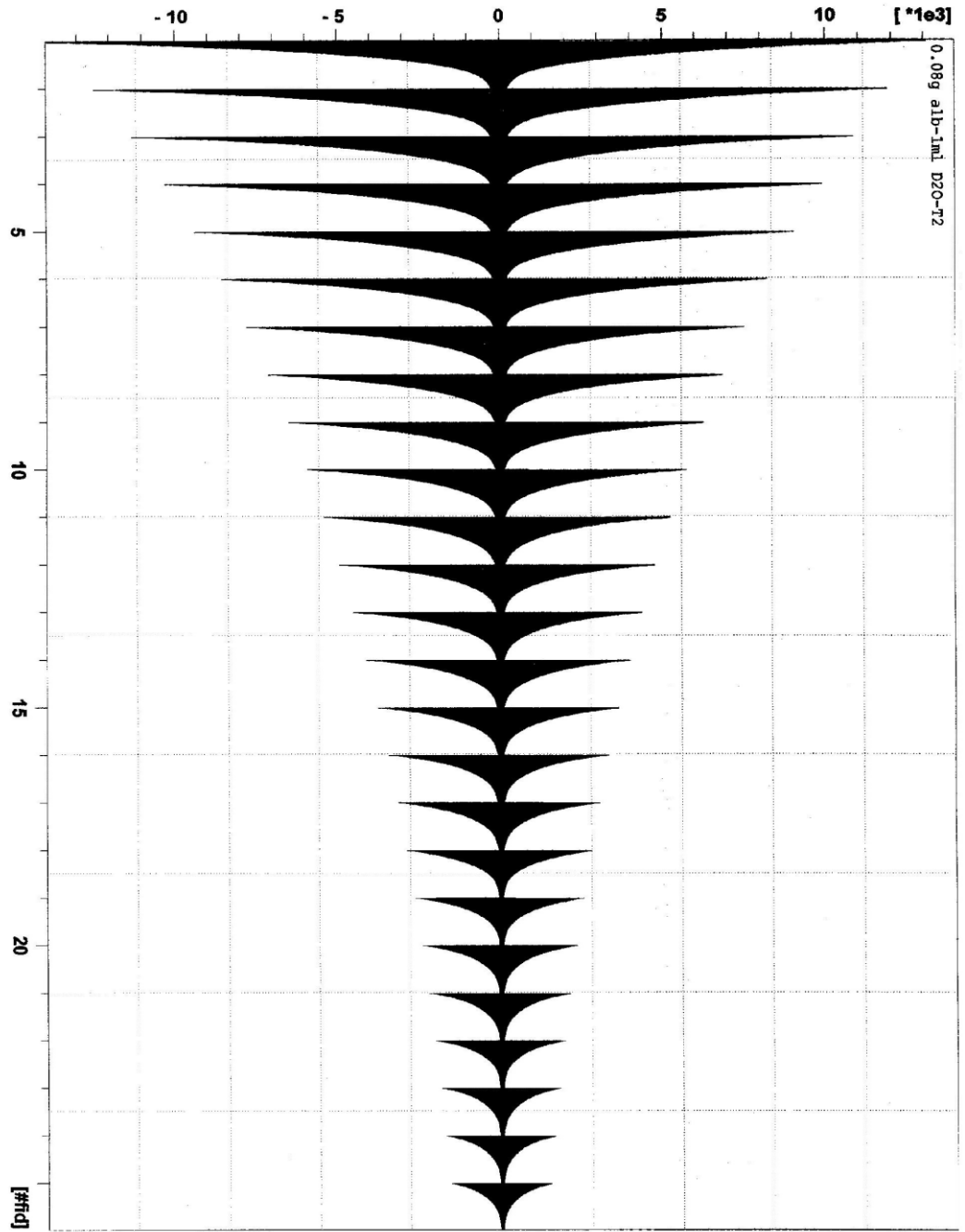
Şekil 4.14. 0.02 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi



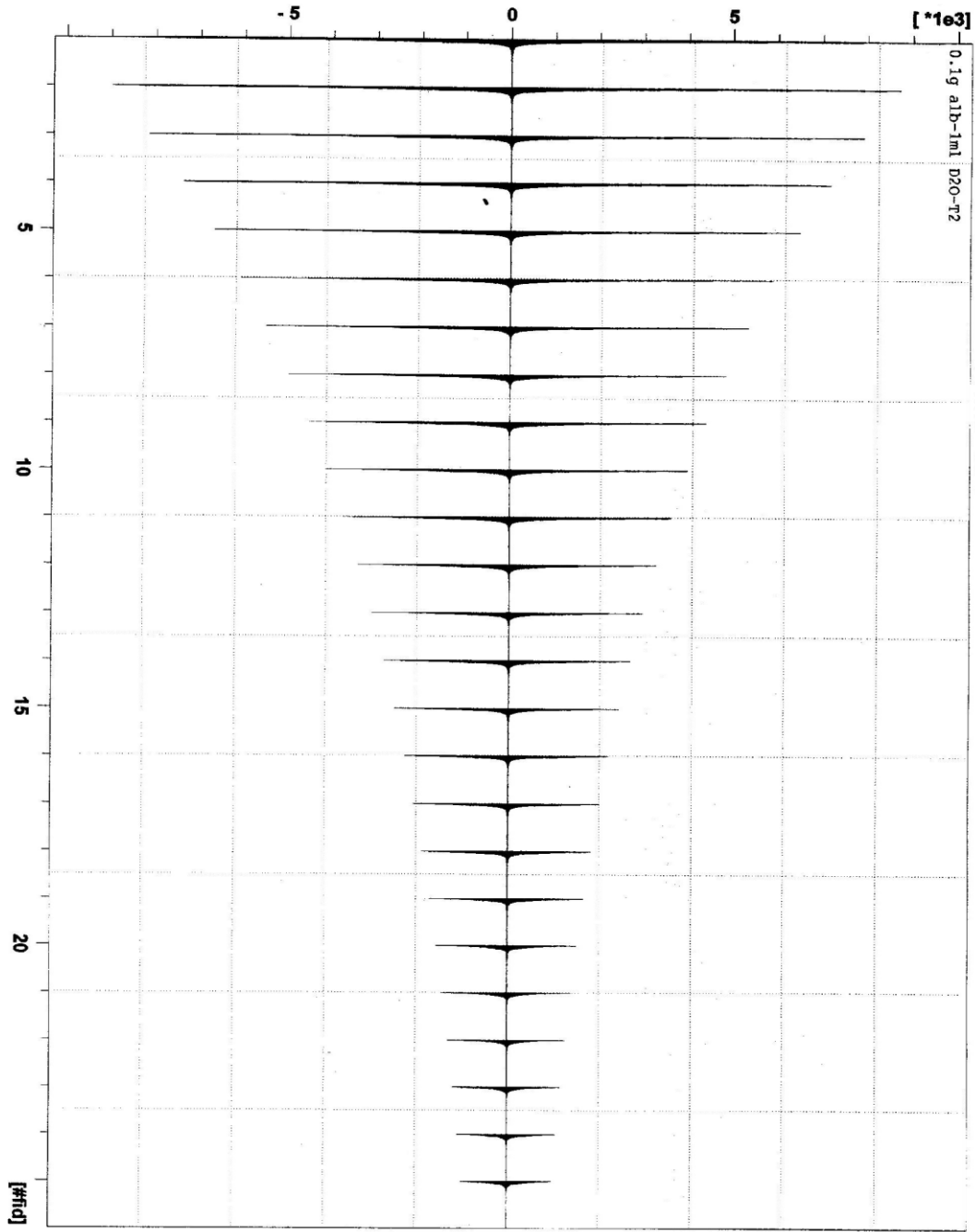
Şekil 4.15. 0.04 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi



Şekil 4.16. 0.06 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi

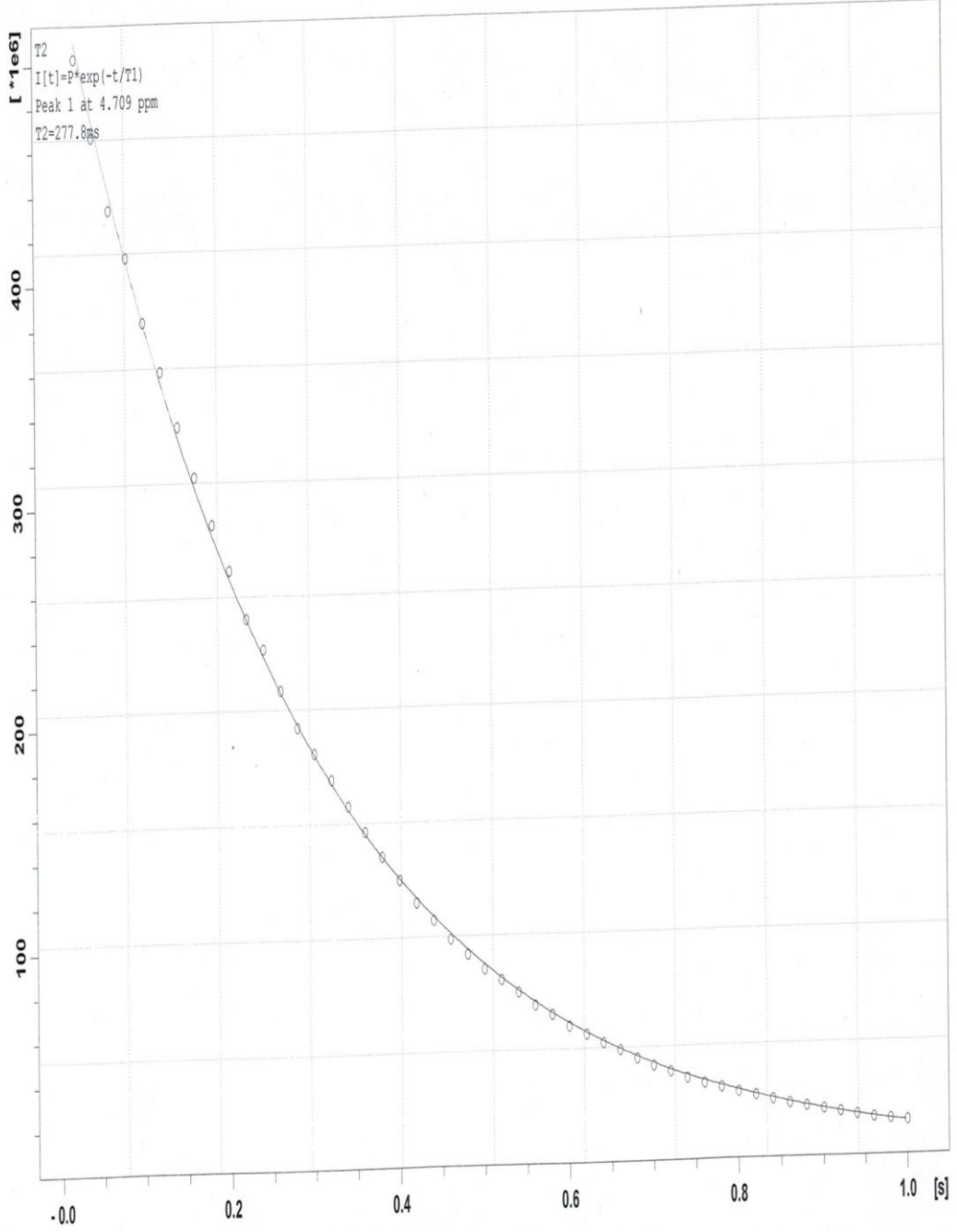


Şekil 4.17. 0.08 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi

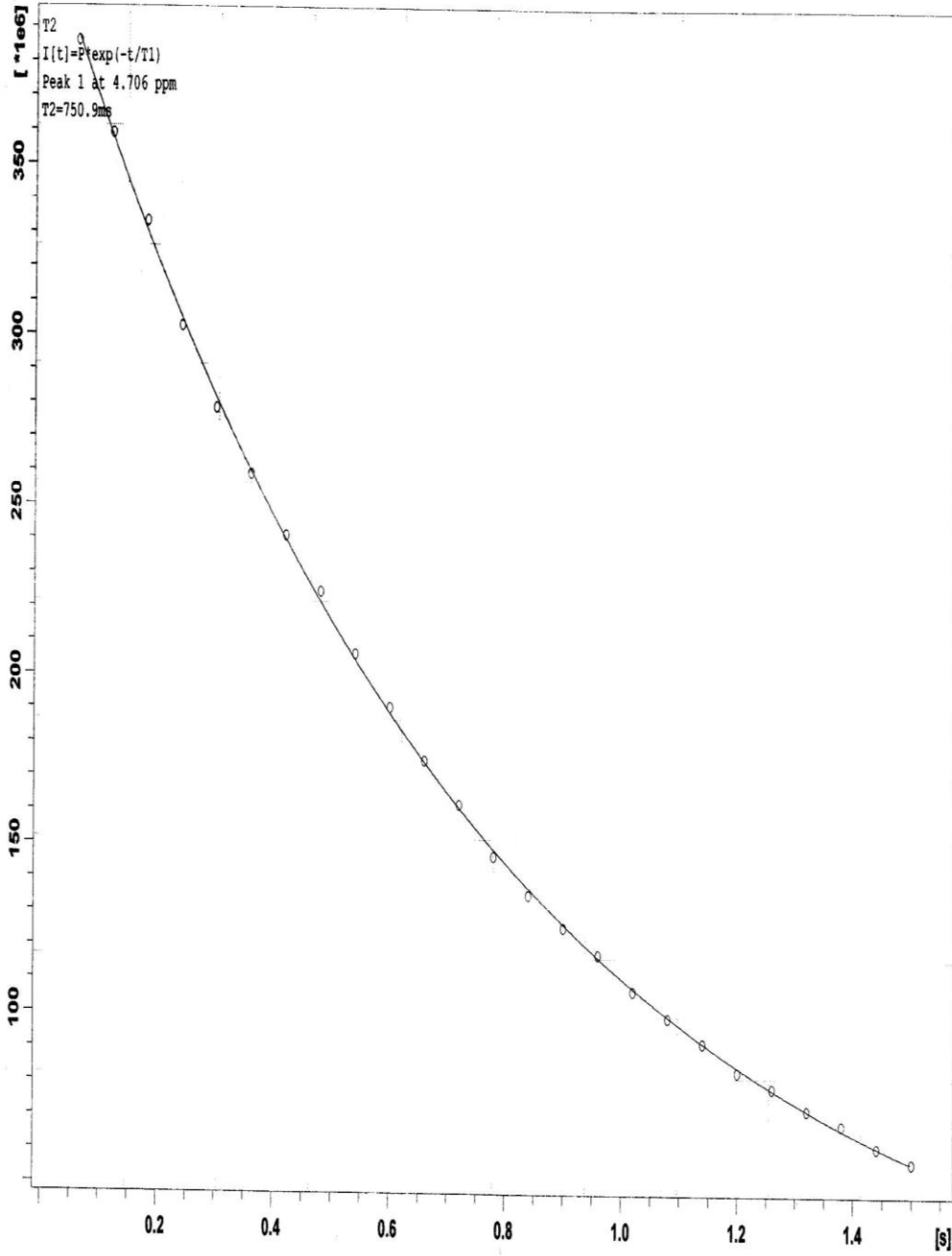


Şekil 4.18. 0.10 g albümin için T₂'nin Eko sinyal serisi

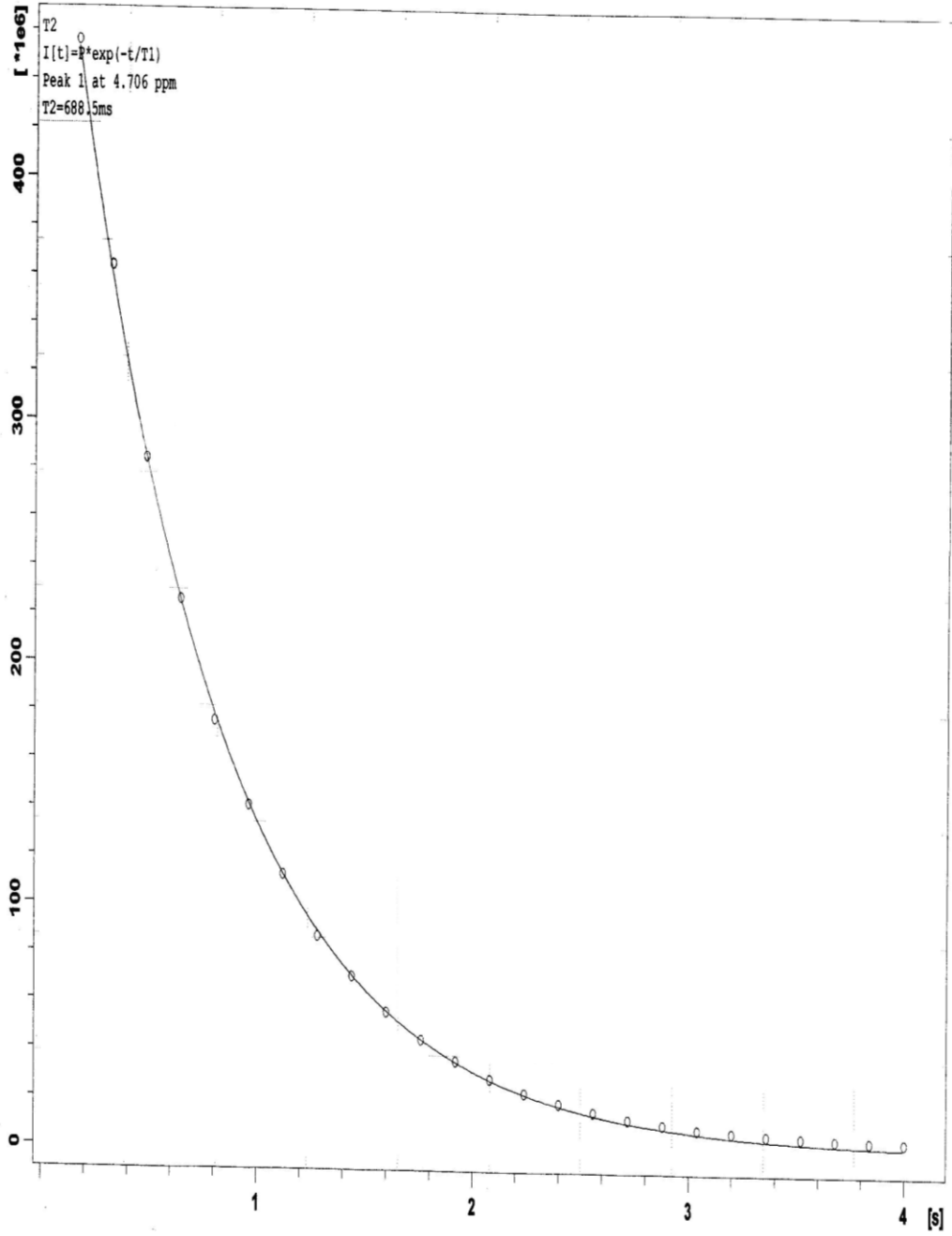
0g, 0.02g, 0.04g, 0.06g, 0.08g ve 0.10g albümin varlığında elde edilen Eko bozunum (T_2) eğrileri serisi şekil 4.19 - şekil 4.24 de gösterildi.



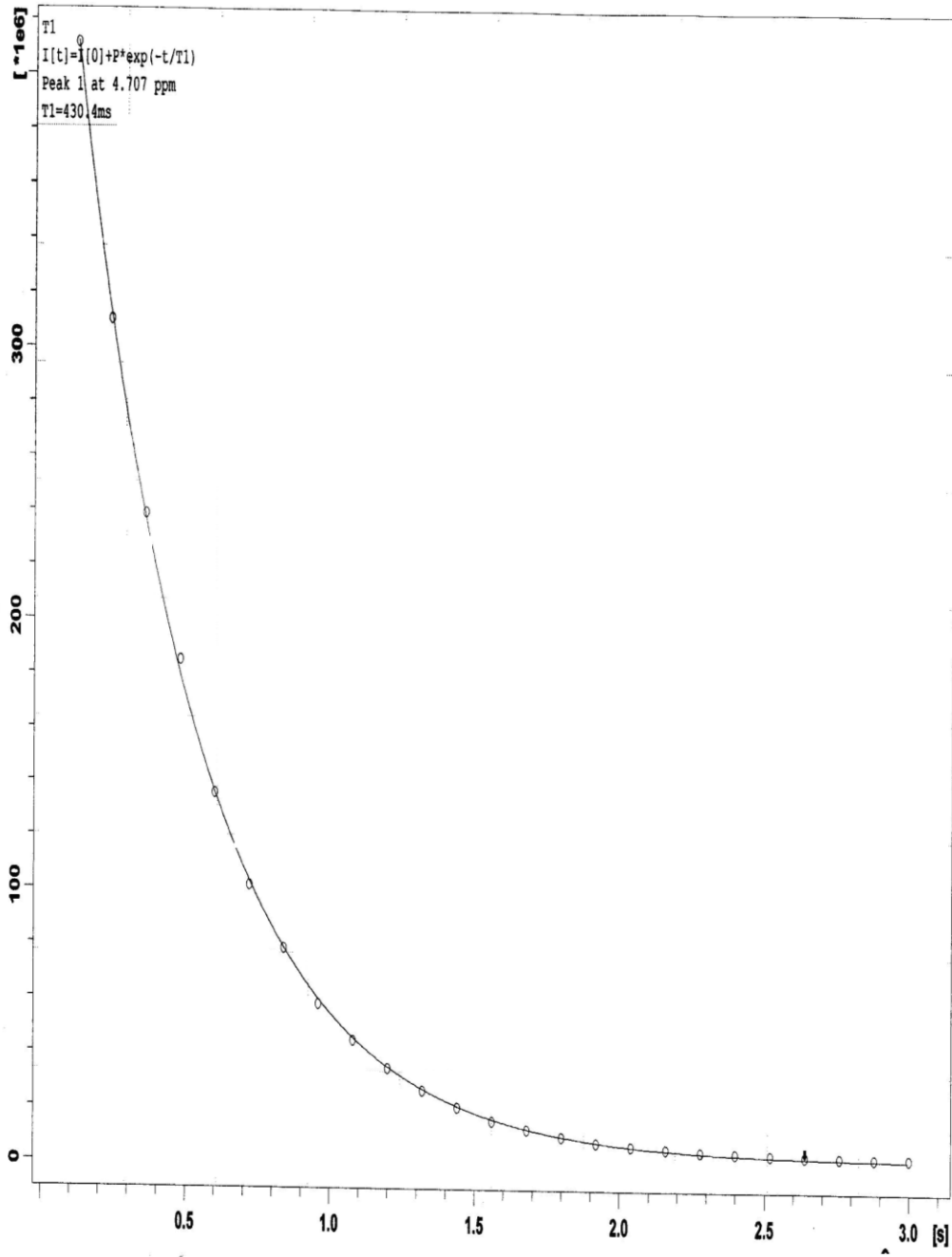
Şekil 4.19. 0.00 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi



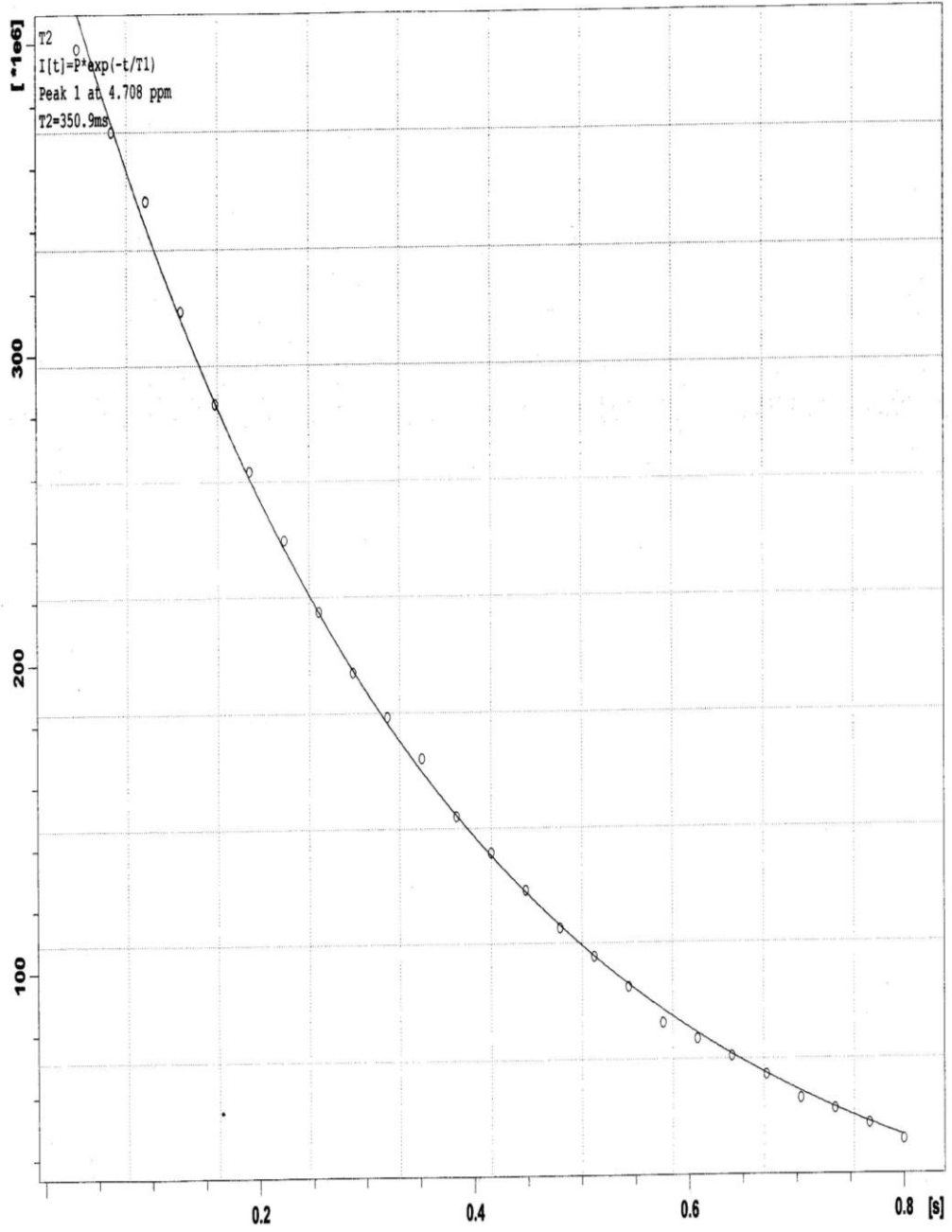
Şekil 4.20. 0.02 g albümin için T₂'nin Eko bozunum eğrileri serisi



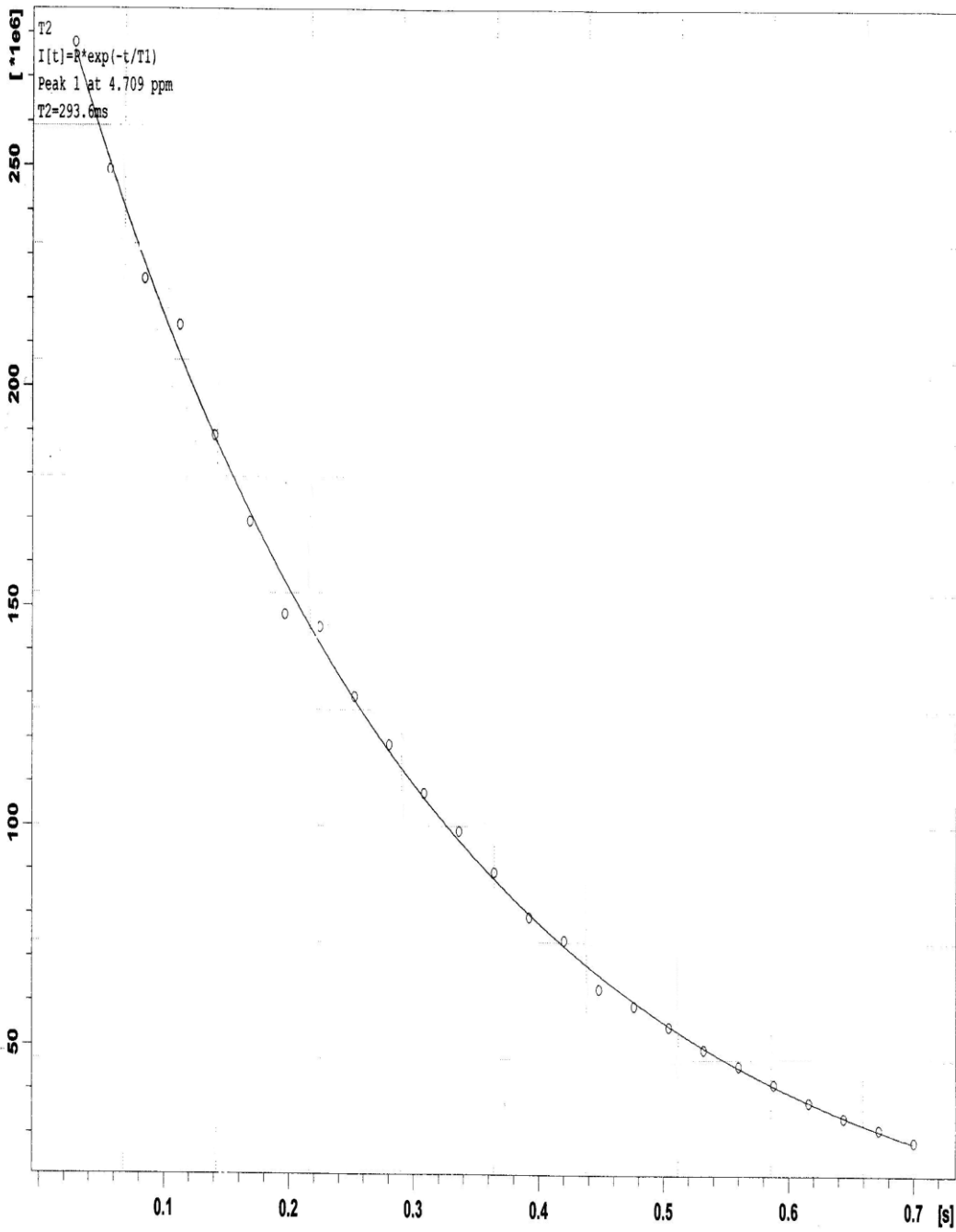
Şekil 4.21. 0.04g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi



Şekil 4.22. 0.06 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi



Şekil 4.23. 0.08 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi

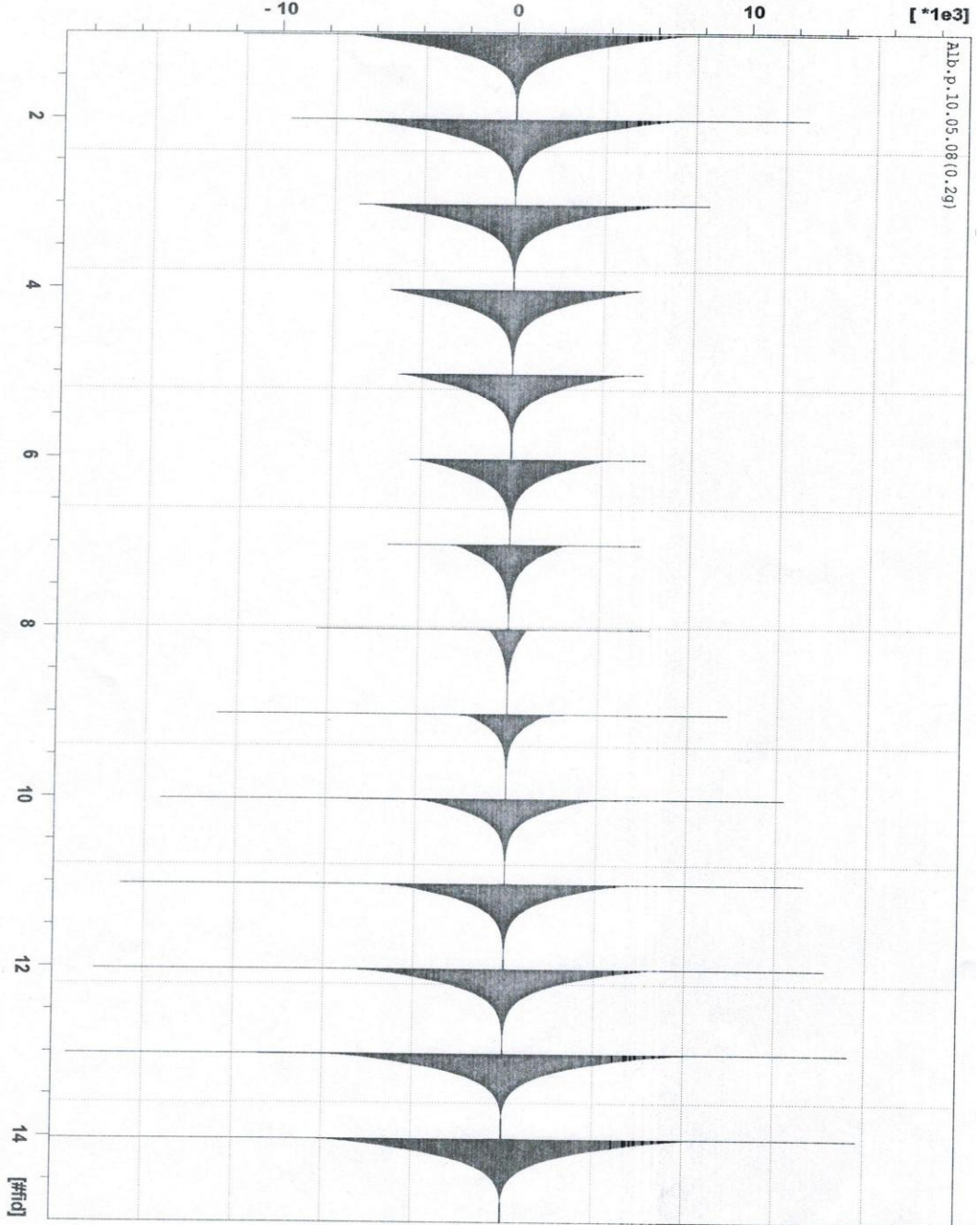


Şekil 4.24. 0.10 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi

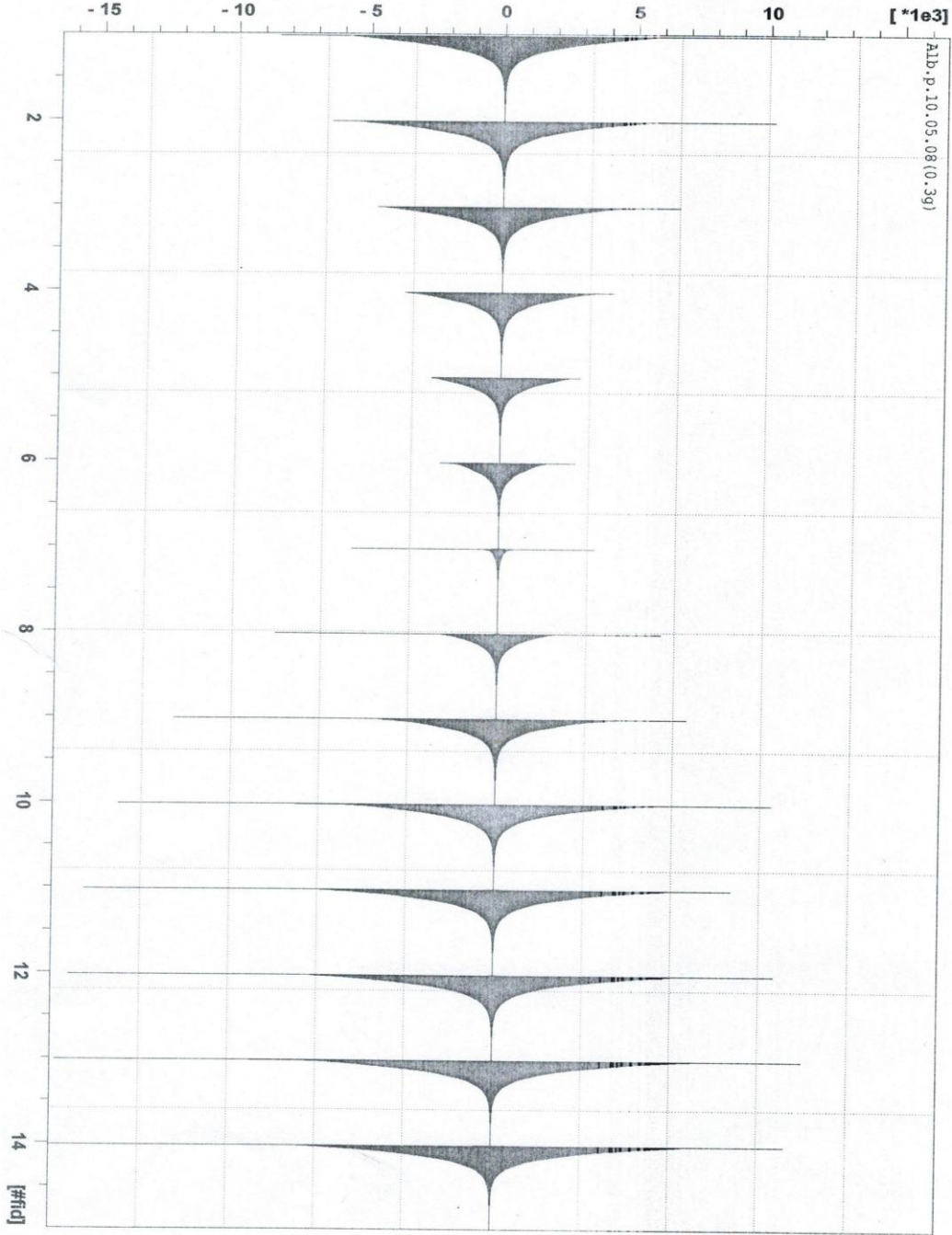
Şekil 4.1 ile şekil 4.24 aralığında görüldüğü üzere D_2O 'nun FID ve SE katarları tek exponansiyel bir biçimde değişmektedir. Ancak albümin katıldıkça, FID ve SE katarlarının exponansiyel görünümü değişmektedir. Bu albümin topaklanmasının, ileri konsantrasyonlarda artmaya başladığının kanıtıdır ve literatürle uyumludur (Hills ve

ark. 1989, William ve ark. 1997, Kiihne ve Bryant 2000, Van-Quynh 2003, Yian-Biao ve ark. 2004, Wei, W. 2005, Aimee ve ark.2009, Viktor ve ark. 2012).

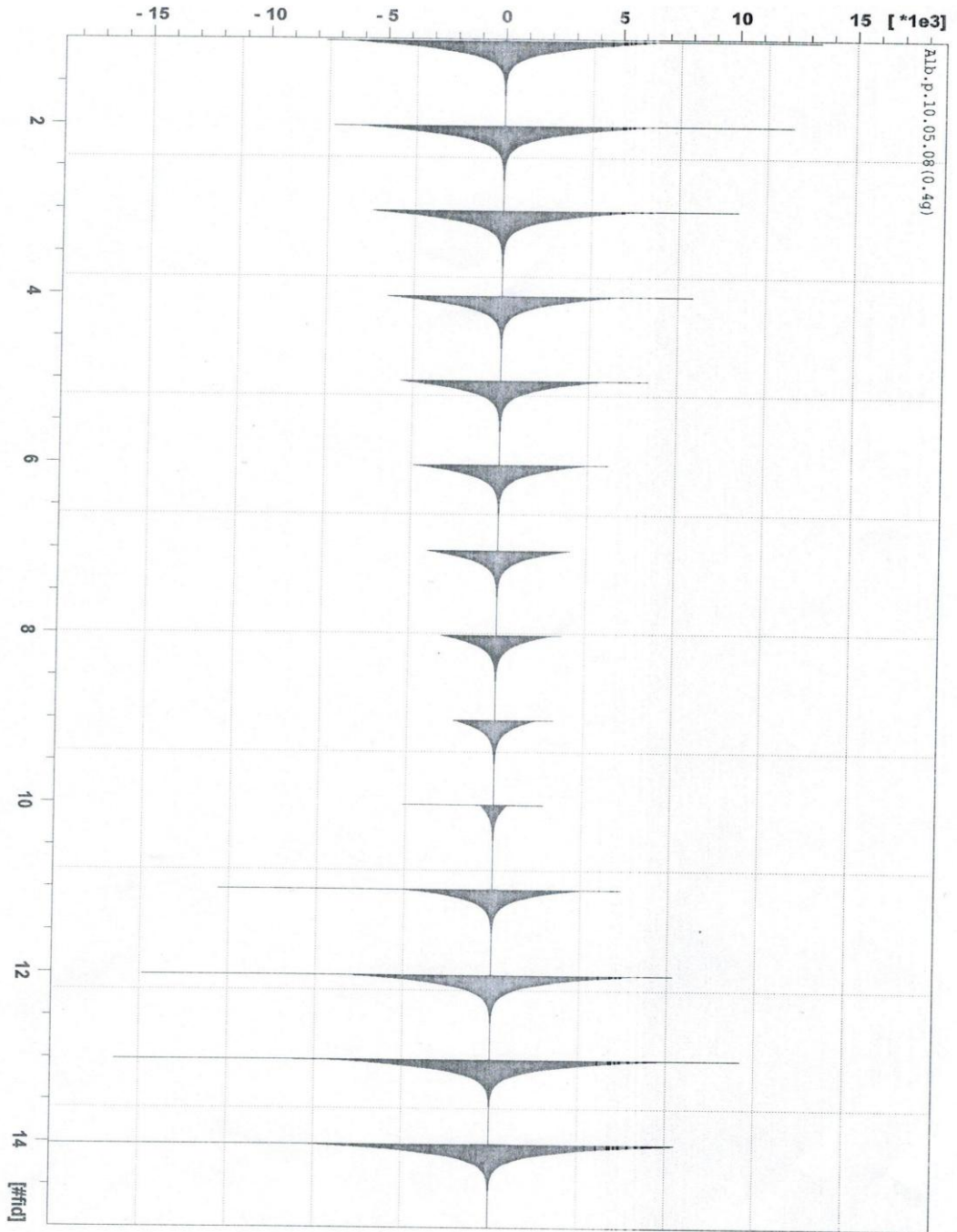
0,1 g/ml'lik adımlarla, D₂O'ya albümin eklenmesiyle elde edilen örneklerin IR-T₁ ve SE-T₂ eğrileri şekil 4.25 - şekil 4.37 de gösterildi.



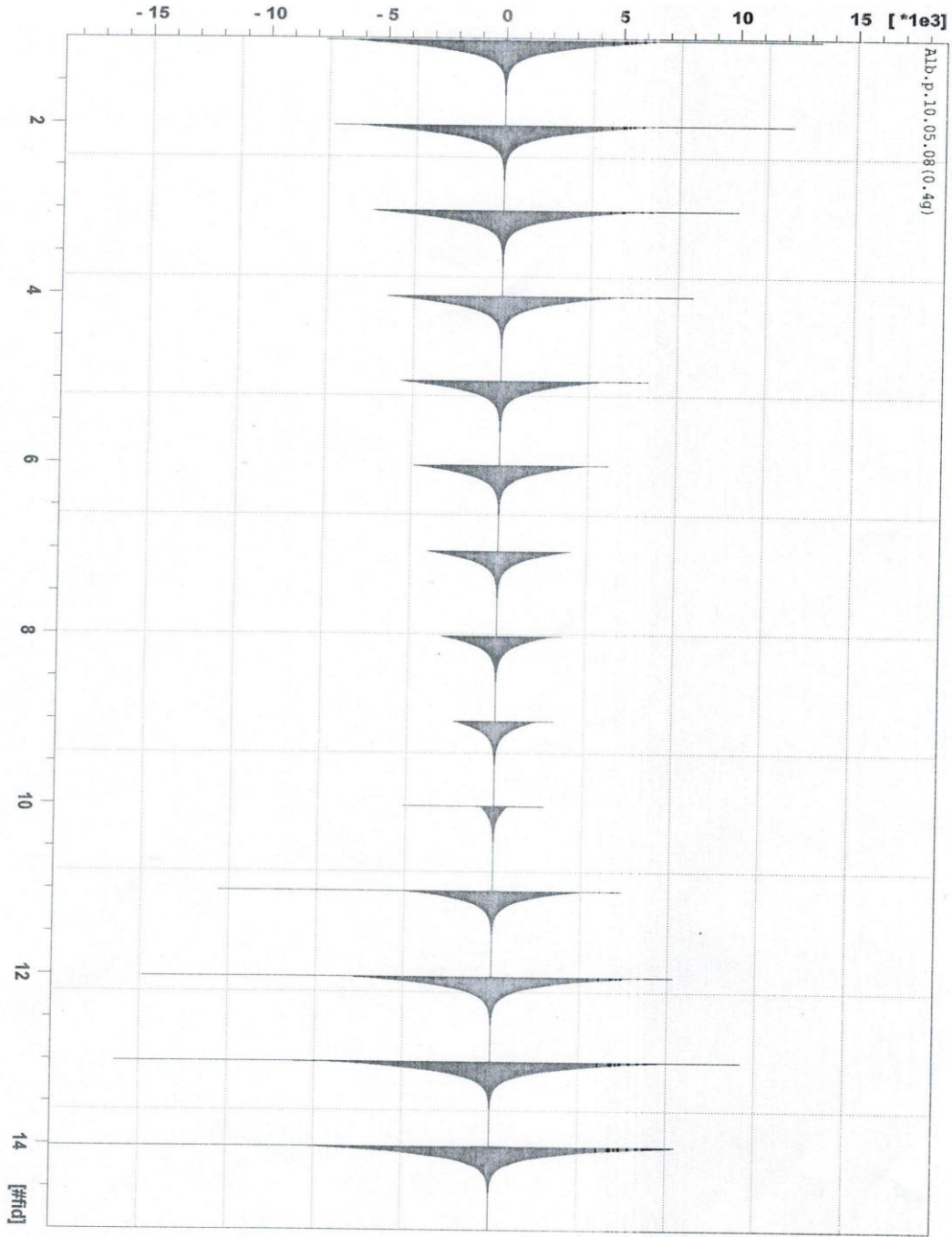
Şekil 4.25. 0.2 g albümin için T₁'in Free Induction Decay sinyal serisi



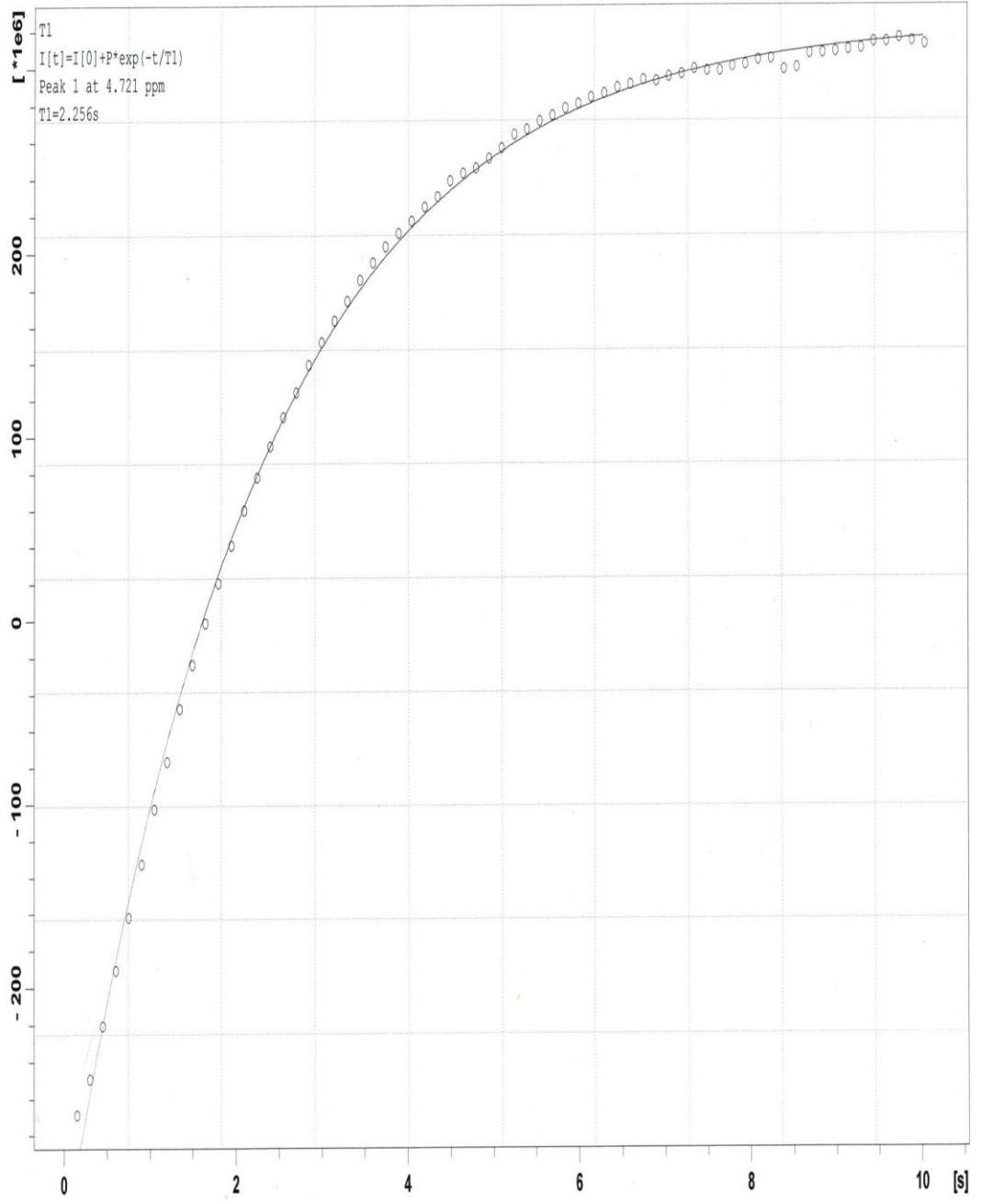
Şekil 4.26. 0.3 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi



Şekil 4.27. 0.4 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi

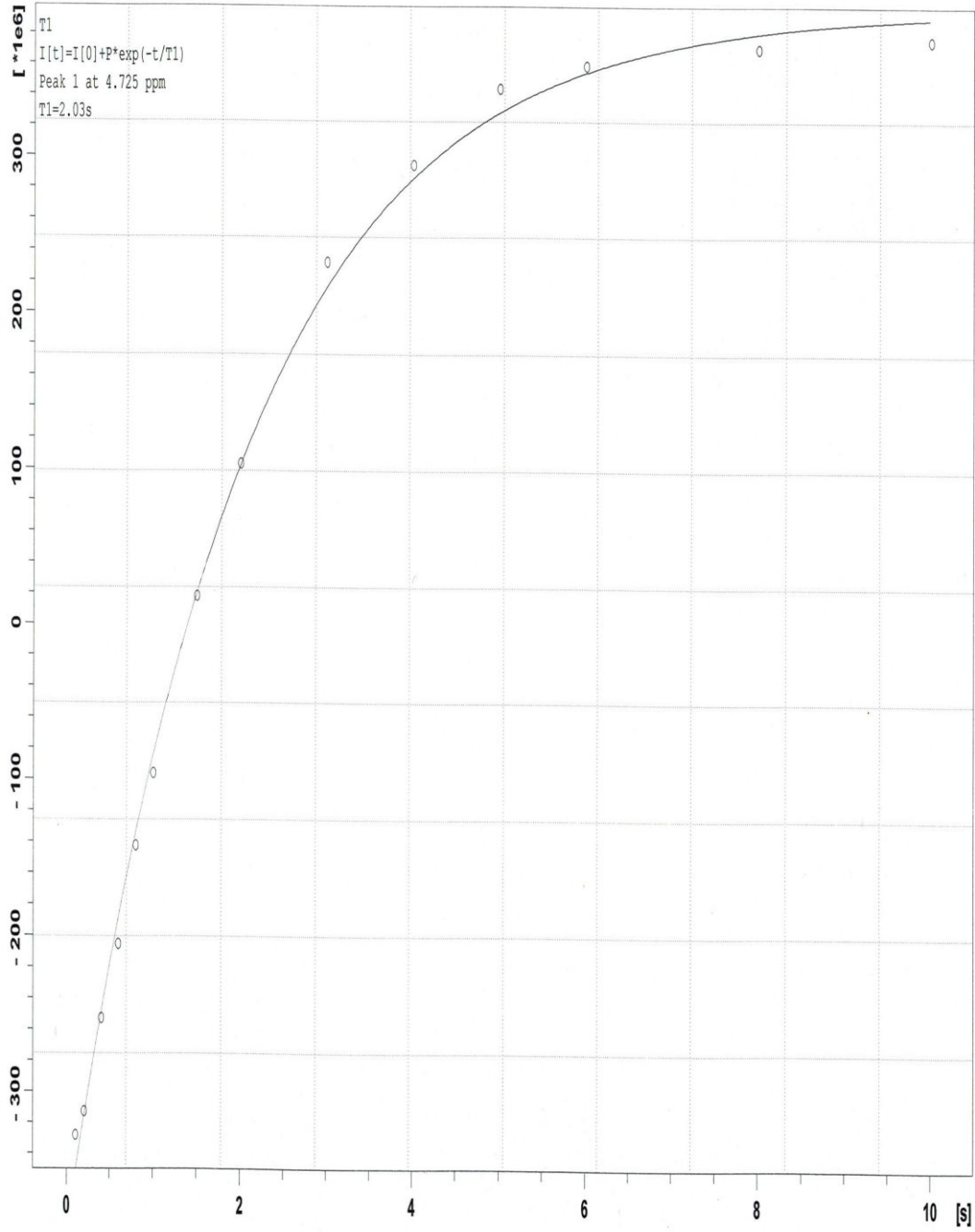


Şekil 4.28. 0.5 g albümin için T_1 'in Free Induction Decay sinyal serisi

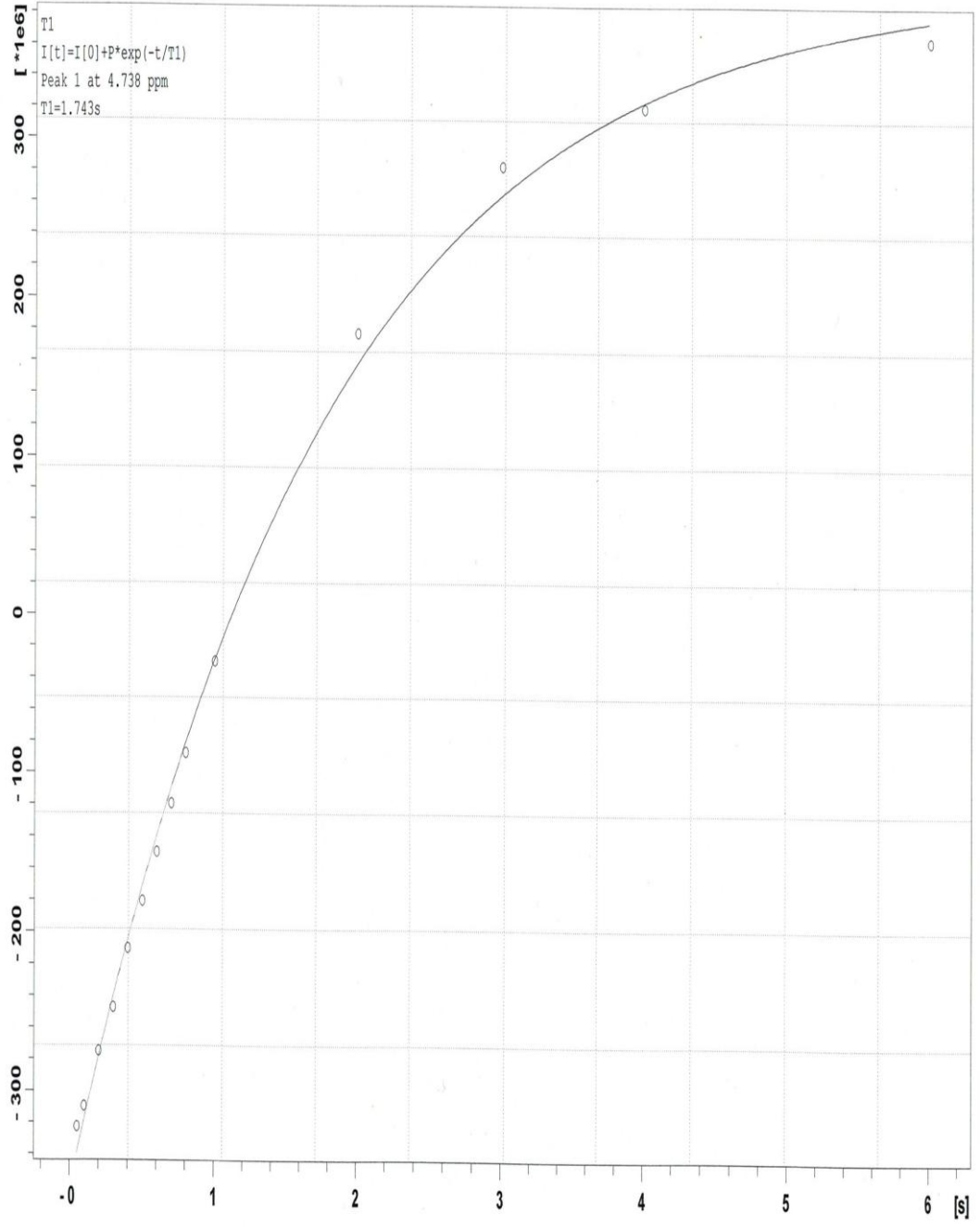


Şekil 4.29. 0.2 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

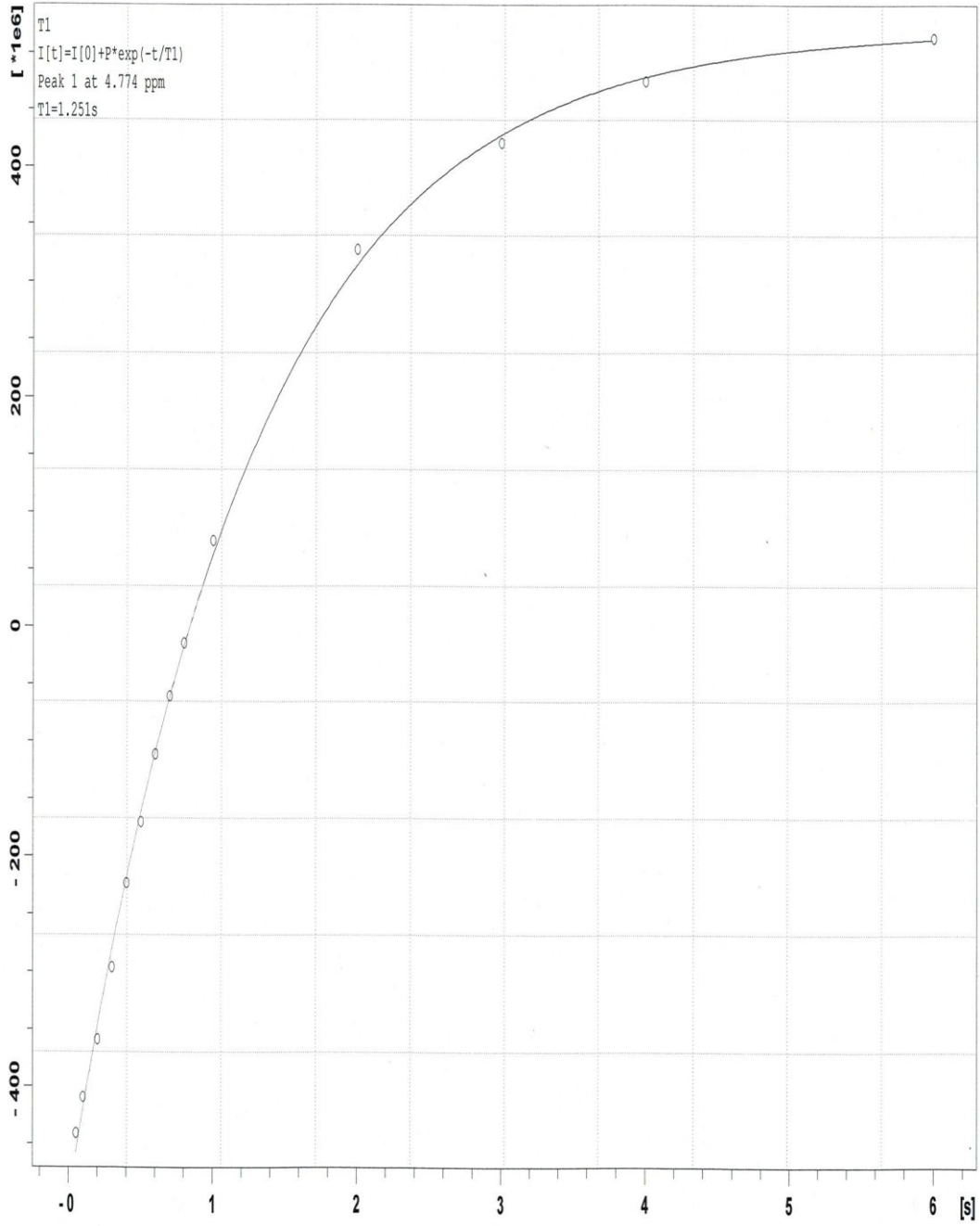


Şekil 4.30. 0.3 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi

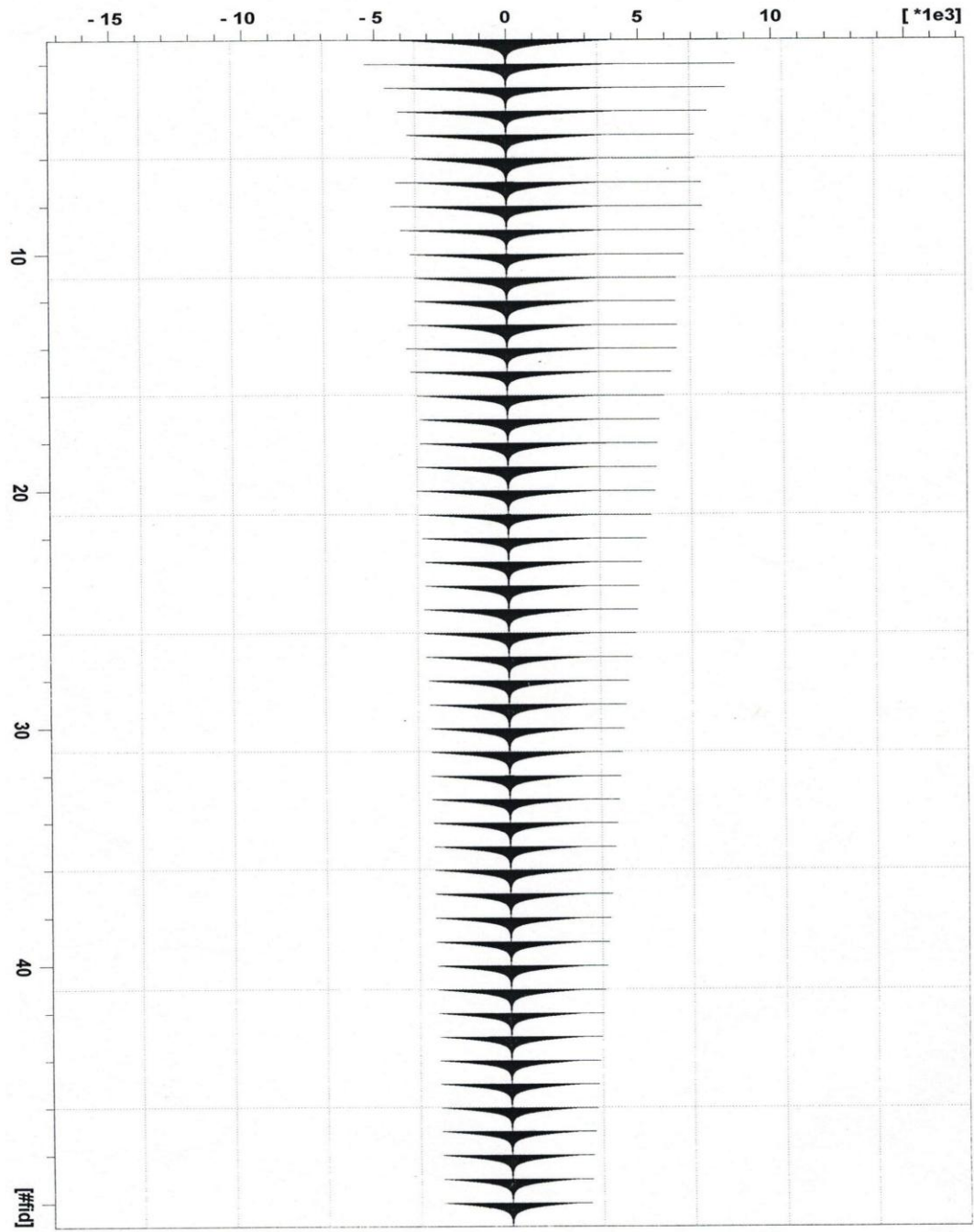


Şekil 4.31. 0.4 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi

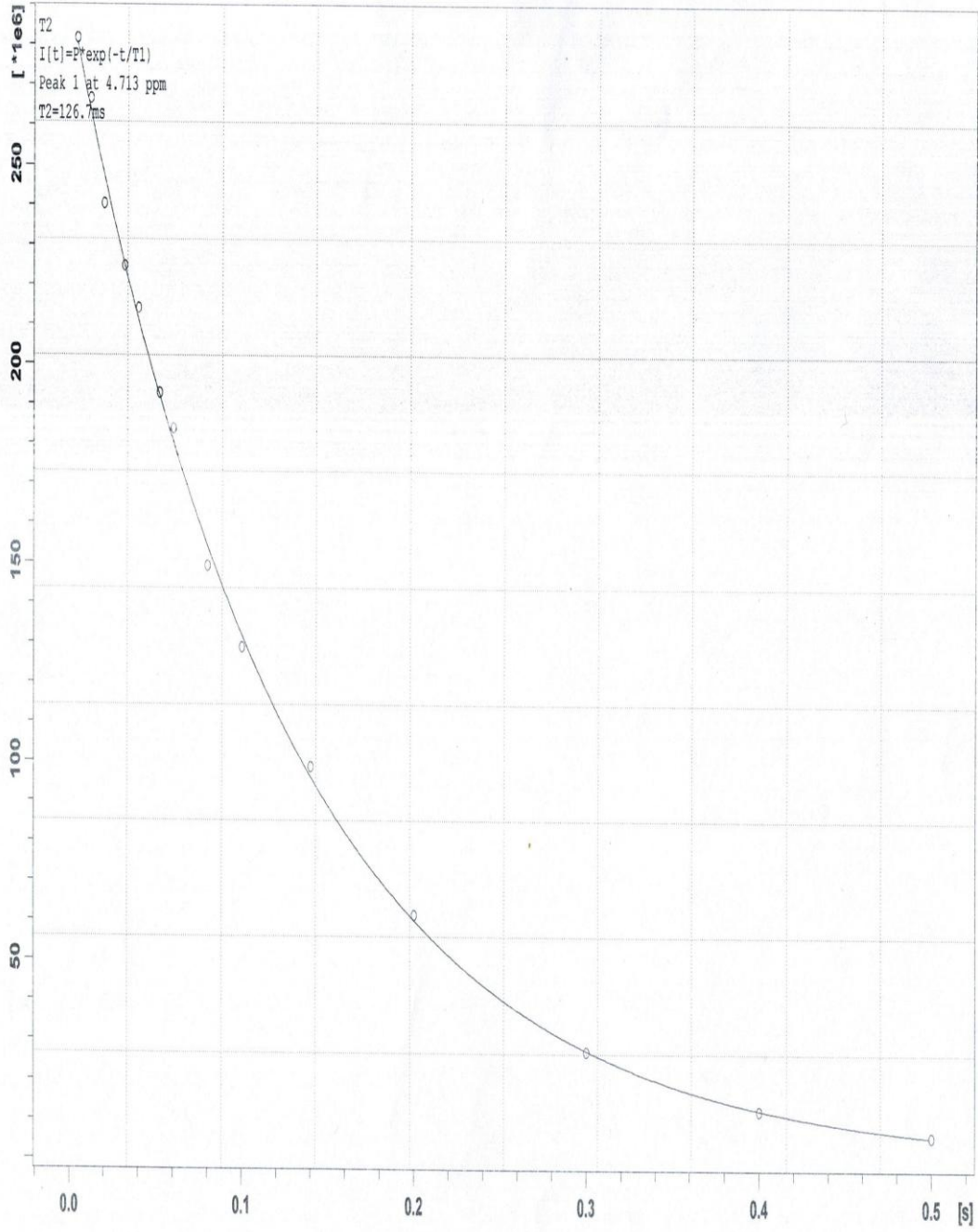
4. BULGULAR VE TARTIŞMA



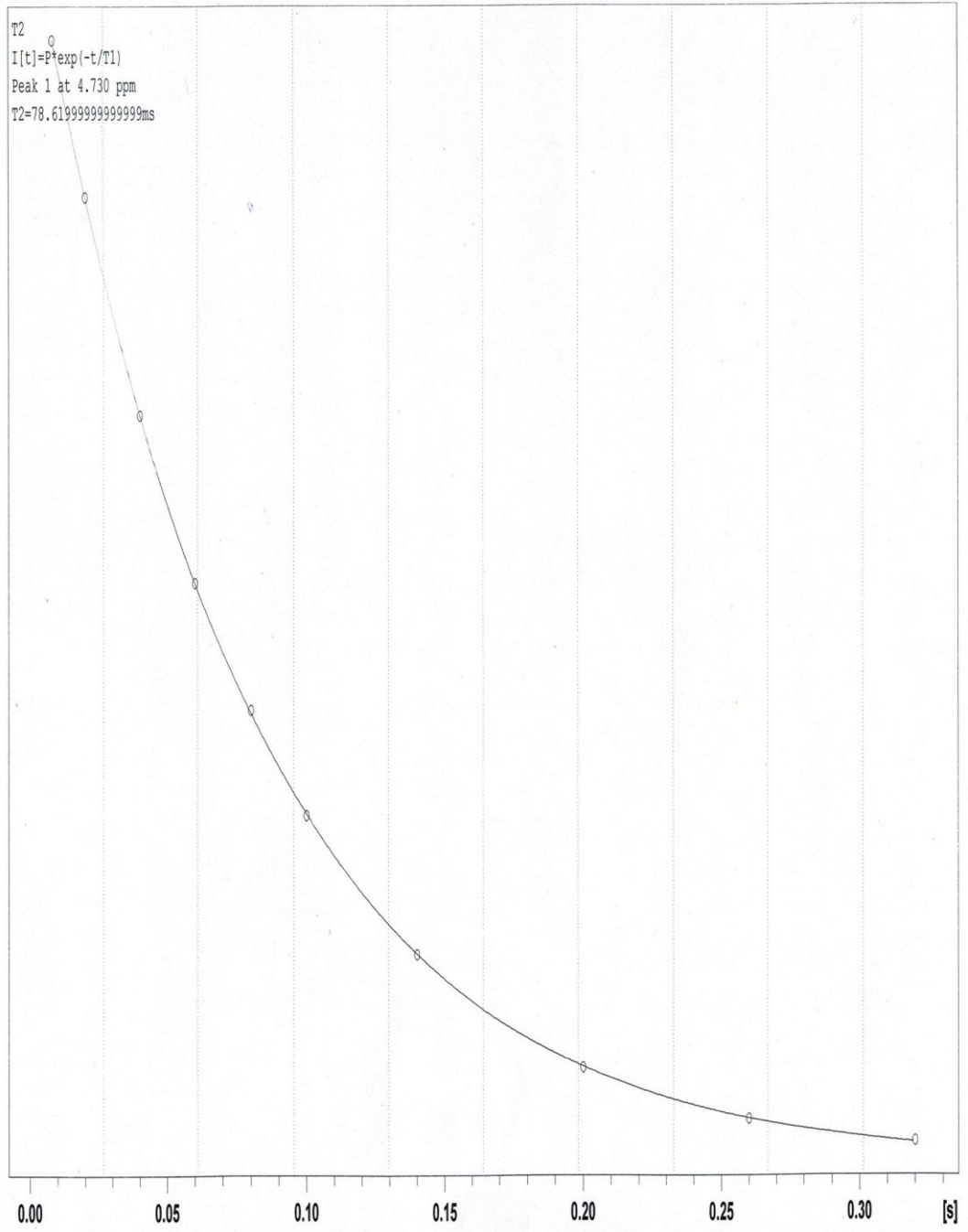
Şekil 4.32. 0.5 g albümin için T_1 'in Inversion Recovery serisi



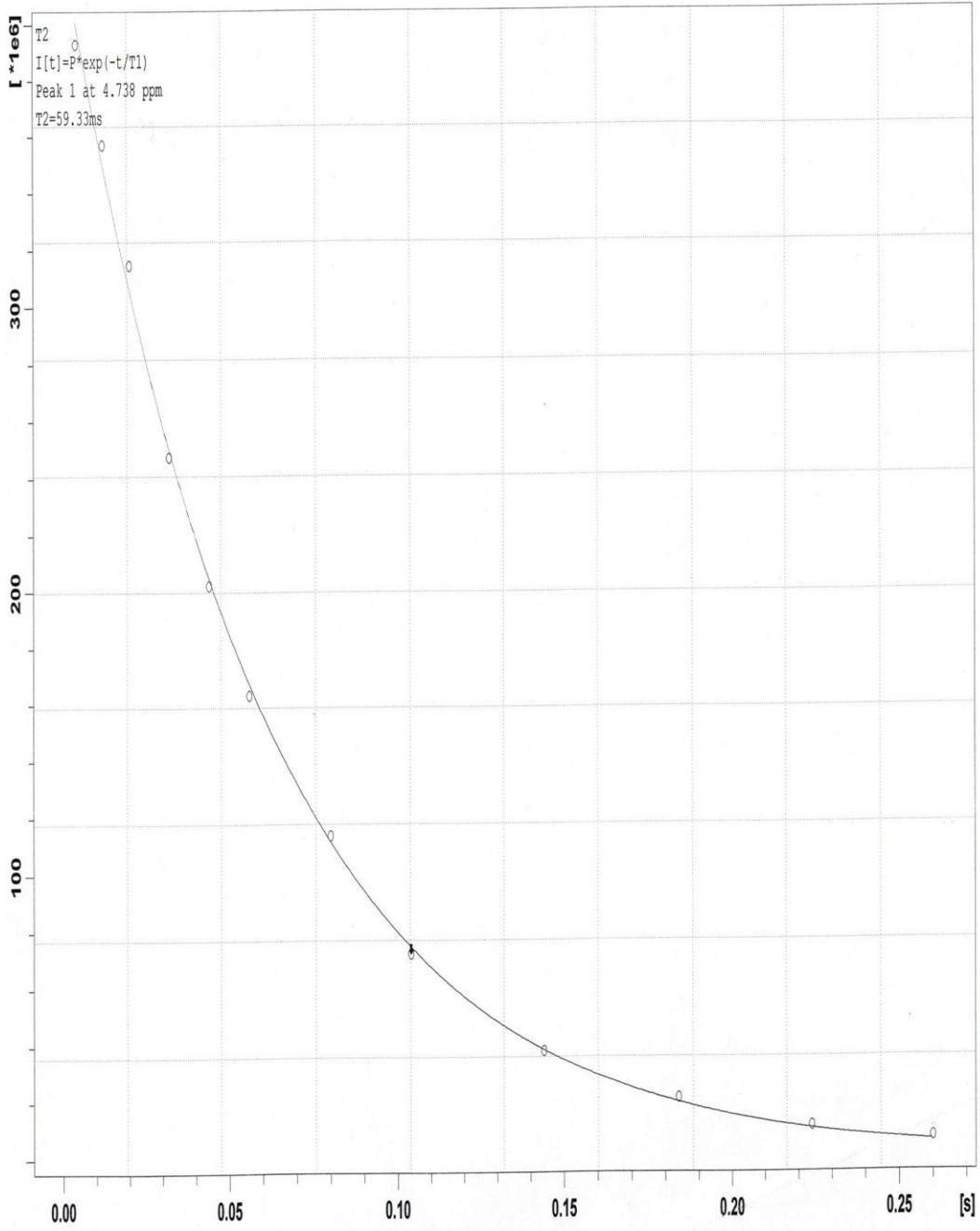
Şekil 4.33. 0.2 g albümin için T_2 'nin Eko sinyal serisi



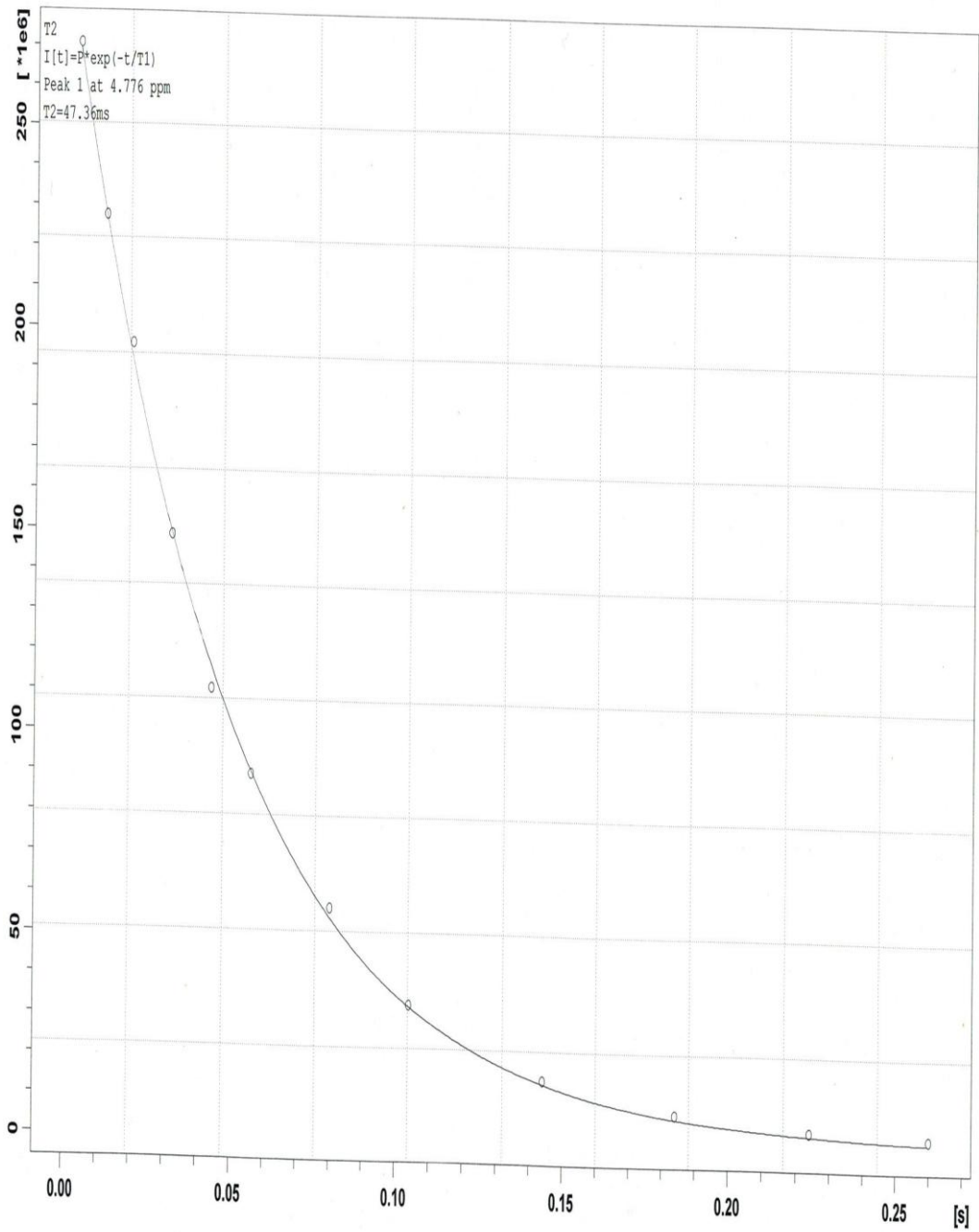
Şekil 4.34. 0.2 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi



Şekil 4.35. 0.3 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi



Şekil 4.36. 0.4 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi



Şekil 4.37. 0.5 g albümin için T_2 'nin Eko bozunum eğrileri serisi

Protein 0,1g/ml'den fazla olunca, albümin yığılması daha belirginleşir. IR- T_1 ve SE- T_2 katarları, tek exponansiyeli iyi fit etmez. Şekil 4.25 ile şekil 4.37 aralığında olan fitler de, eğri dışına çıkan pek çok nokta silinmiştir. Yani, T_1 ve T_2 'ler yaklaşık değerlerdir. Bu durum, albümin yığılmasının yüksek konsantrasyonlarda arttığını göstermektedir (Hills ve ark. 1989, William ve ark. 1997, Olechnowicz ve ark. 1999,

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Kiihne ve Bryant 2000, Van-Quynh 2003, Yian-Biao ve ark. 2004, Wei, W. 2005, Aimee ve ark.2009, Viktor ve ark. 2012).

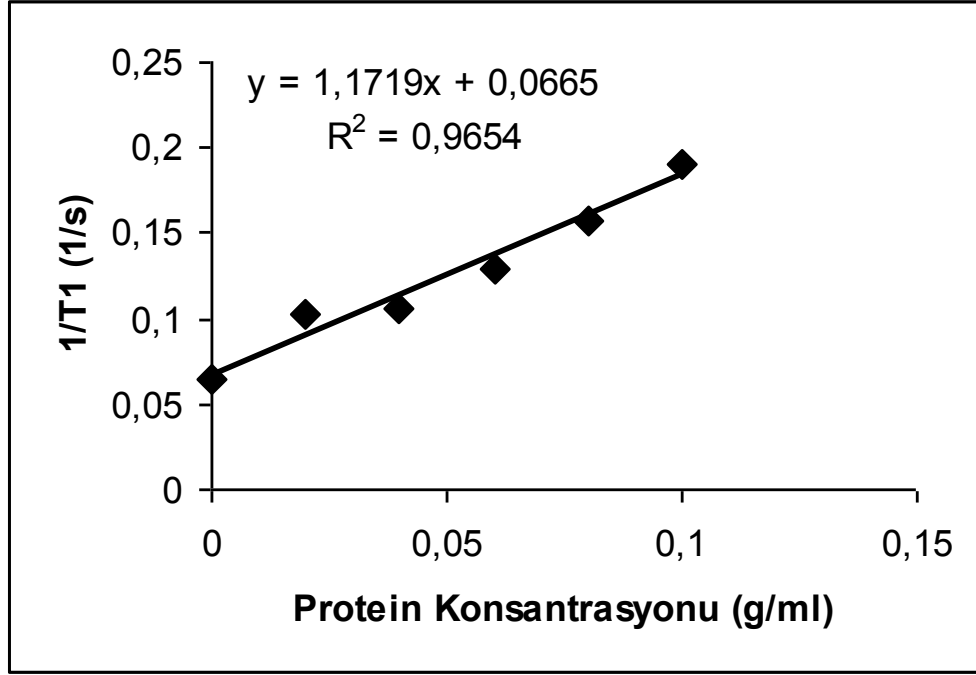
Ölçülen IR ve SE eğrilerinden elde edilen T_1 ve T_2 zamanları ve de $1/T_1$ ve $1/T_2$ oranları düşük konsantrasyonlar için, Tablo 4.1’de yüksek konsantrasyonlar için, Tablo 4.2’de gösterildi.

Tablo 4.1. Düşük konsantrasyonlar için Ölçülen IR ve SE eğrilerinden elde edilen T_1 , T_2 zamanları ve $1/T_1$ ve $1/T_2$ oranları				
Konsantrasyon (g/ml)	T_1 (s)	$1/T_1$ (s ⁻¹)	T_2 (ms)	$1/T_2$ (ms ⁻¹)
0 g/ml	15.58	0.0642	277.8	0.00036
0.02g/ml	9.724	0.1028	750.9	0.00133
0.04g/ml	9.419	0.1062	688.5	0.00145
0.06g/ml	7.723	0.1295	430.4	0.00232
0.08g/ml	6.377	0.1568	350.9	0.00285
0.10g/ml	5.229	0.1912	293.6	0.00341

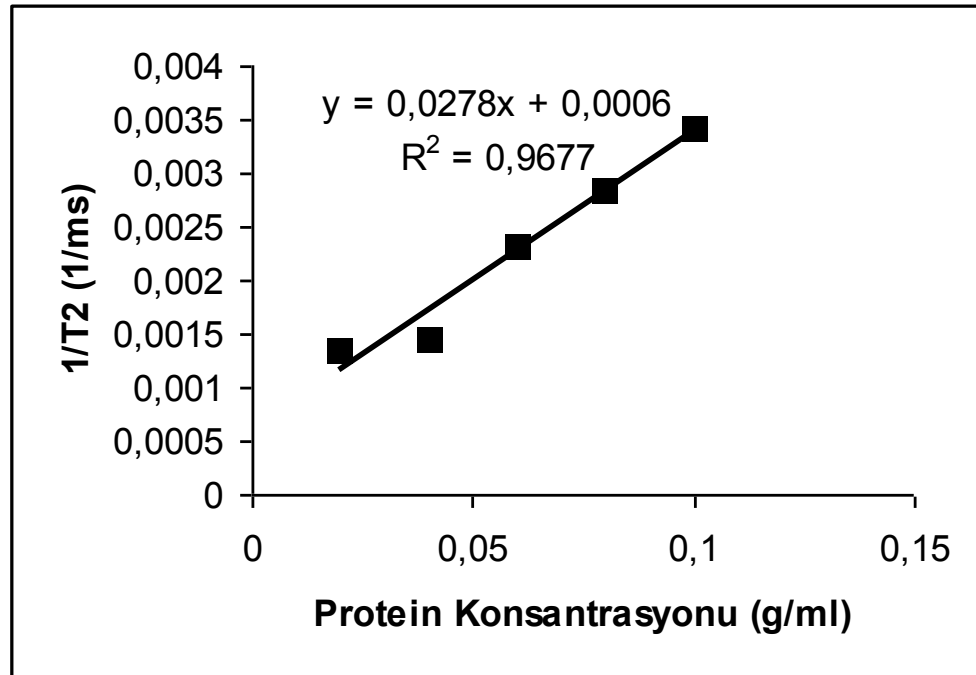
Şekil 4. 29 - 4. 32 ve şekil 4. 34- şekil 4. 37 aralığında elde edilen $1/T_1$ ve $1/T_2$ değerleri Tablo 2’de görülmektedir.

Tablo 4.2. Yüksek konsantrasyonlar için Ölçülen IR ve SE eğrilerinden elde edilen T_1 , T_2 zamanları ve $1/T_1$ ve $1/T_2$ oranları				
Konsantrasyon (g/ml)	T_1 (s)	$1/T_1$ (s ⁻¹)	T_2 (ms)	$1/T_2$ (ms ⁻¹)
0.10g/ml	5.229	0.1912	293.6	0.00341
0.20	2.256	0.4433	126.7	0.0079
0.30	2.03	0.4926	78.62	0.0127
0.40	1.743	0.5737	59.33	0.0169
0.50	1.251	0.7994	47.36	0.0211

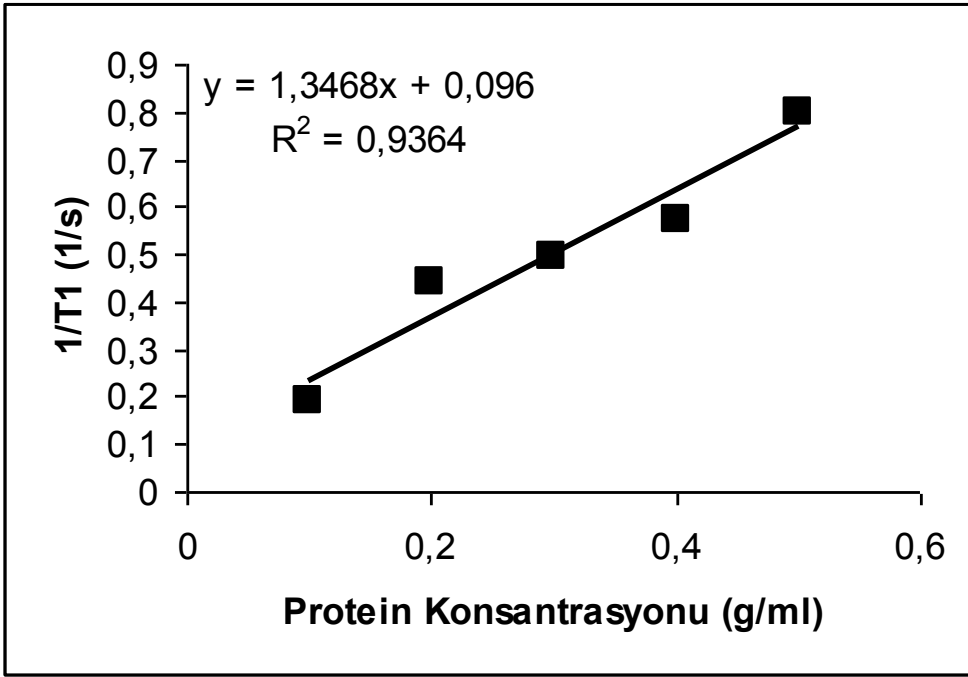
Düşük konsantrasyonlu (0g/ml-0.1g/ml) çözeltilerden elde edilen $1/T_1$ ve $1/T_2$ değerlerinin, konsantrasyona karşı grafiğe geçilmesi şekil 4.38 ve şekil 4.39'da görülmektedir. Tablo 4.2'deki verilerin albümin konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesinden elde edilen eğriler şekil 4.40 ve şekil 4.41 de görülmektedir.



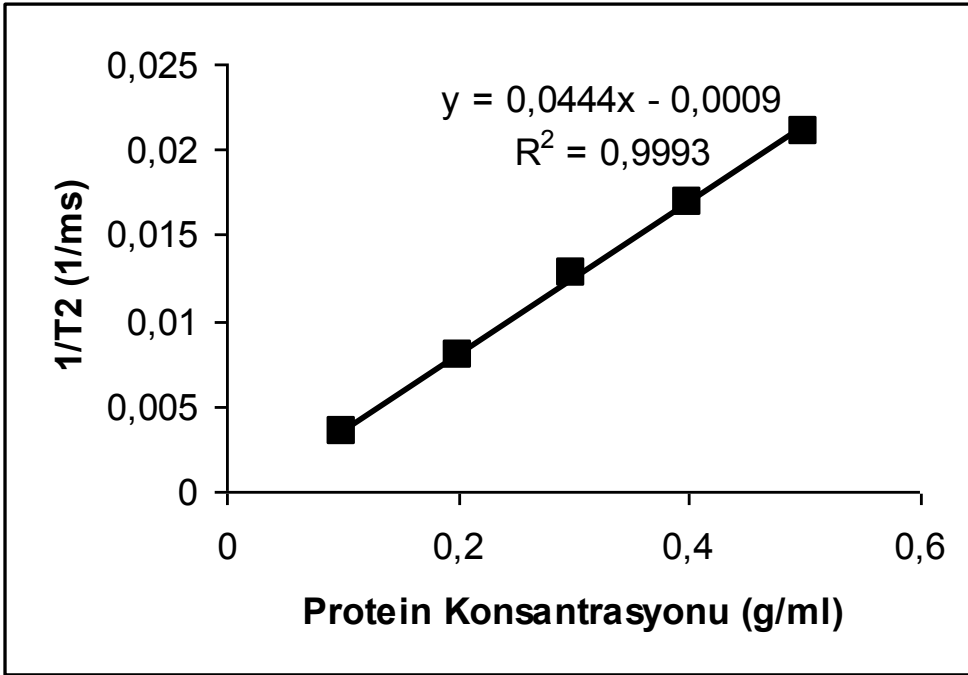
Şekil 4.38. Düşük Konsantrasyonlarda $1/T_1$ değerinin konsantrasyona karşı grafiği (g/ml)



Şekil 4.39. Düşük Konsantrasyonlarda $1/T_2$ değerinin konsantrasyona karşı grafiği (g/ml)



Şekil 4.40. Yüksek Konsantrasyonlarda $1/T_1$ değerinin konsantrasyona karşı grafiği (g/ml)



Şekil 4.41. Yüksek Konsantrasyonlarda $1/T_2$ değerinin konsantrasyona karşı grafiği (g/ml)

4.2. Tartışma

Protein çözeltilerinde iki tip proton havuzu mevcuttur: 1 Protein protonlarından ileri gelen havuz 2 su protonlarından ileri gelen proton havuzu. Bu nedenle de, protein çözeltileri çoklu NMR pikleri verir. Ancak protein protonları çok kısa sürede durulmaya uğrar ve geride su protonlarının NMR sinyali kalır (Gallier ve ark. 1987). Bu sinyal de artan bekleme zamanlarına karşılık, 1.2 ve 1.3 bağıntılarında ifade edilen tarzda değişime uğrar. Bu değişim, şekil 1.15 ve şekil 1.18'de gösterilmiştir. Burada sinyal tek exponansiyel bozunum göstermektedir. Sinyalin tek exponansiyel bozunum gösterdiği durumda IR-T₁ eğrisi

$$M_z = M_0(1 - 2e^{-t/T_1}) \quad (1.2)$$

Bağıntısına göre, artan t ile artarken; SE-1/T₂ eğrisi

$$M_{xy} = A e^{-t/T_2} \quad (1.3)$$

Bağıntısına göre, artan t ile azalır. Burada t, materyal ve metot da bahsi edilen bekleme zamanı olmaktadır. Her bir bekleme zamanına karşılık bir IR-FID ile IR-M_z sinyali ve de SE sinyali ile M_{xy} manyetizasyonu mevcuttur. Tek exponansiyel değişimde, FID ve SE katarlarının değişimi exponansiyeldir. IR-T₁ ve SE-T₂ eğrileri 1.2 ve 1.3 denklemlerini iyi fit eder. Düşük protein konsantrasyonları için elde edilen ve şekil 4.1 ile şekil 4.12'de gösterilen IR-FID katarları tek exponansiyel davranış sergilemektedir. Yine protein konsantrasyonları için elde edilen ve de şekil 4.13 ile şekil 4.24 arasında gösterilen SE katarları da tek exponansiyel davranış sergilemektedir. Gözlenen bu davranış 0.1 g/ml'e kadar olan konsantrasyonlarda protein topaklamasının etkili olmadığını göstermektedir. Bu olgu şekil 4.25 ile şekil 4.32 aralığında verilen IR-T₁ ve şekil 4.33 ile şekil 4.37 aralığında verilen SE-T₂ eğri fitleri ile de doğrulanıyor.

Bu şekillerde IR-T₁, 1.2 denklemini; SE-T₂ ise, 1.3 denklemini mükemmel fit ediyor. Bu ise, bu konsantrasyonlarda, albümin topaklamasının olmadığını kanıtlıyor. Diğer yandan 1/ T₁-C ve 1/ T₂-C ilişkisi, 1.20 ve 1.21 denklemleri ile verilmişti. Bu denklemler, ilgi zamanını da içerecek şekilde belli koşullar altında

$$\frac{1}{T_1} = \frac{6}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left(\frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{4\tau}{1 + 4\omega^2 \tau^2} \right) \quad (1.12)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{6}{40} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left(3\tau + \frac{5\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{2\tau}{1 + 4\omega^2 \tau^2} \right) \quad (1.13)$$

şekline getirilebilir. Daha önce sergilendiği üzere lineer ilişkinin sürdüğü koşullarda τ sabittir. Protein çözeltilerinde τ 'nın molekülün taklasından ileri geldiği kanıtlanmıştır (Gallier ve ark. 1987, Hills ve ark. 1989, Kiihne ve Bryant 2000, Van-Quynh ve ark. 2003, Yılmaz ve ark. 2008). Diğer yandan, topaklanmanın varlığında, moleküller birbirine yapışarak daha iri moleküllerin oluşmasına yol açar. İri moleküller daha yavaş hareket edeceklerinden τ ilgi zamanı uzar. Bunun sonucu olarak 1/ T₁ ve 1/T₂ aniden büyür. Yüksek protein konsantrasyonu varlığında, şekil 4.25 ile şekil 4.28 için gösterilen FID katarlarının ve şekil 4.33'de verilen SE katarlarının exponansiyel davranışındaki bozulma, albümin topaklanması varlığına kanıttır. Şekil 4.29 ile şekil 4.32 aralığında verilen IR-T₁ ve şekil 4.34 ile şekil 4.37 aralığında verilen SE-T₂ eğrilerinin 1. 2 ve 1.3 denklemlerini fit edememesi de bu olguyu doğruluyor.

Bunlardan ayrı olarak, düşük konsantrasyonlarda, şekil 4.1 ile şekil 4.24'de verilen 1/T₁-C ve 1/ T₂-C ilişkisinin lineer olması, τ 'nın sabit kaldığını ve topaklanmanın bulunmadığını göstermektedir. Yüksek konsantrasyon varlığında, 0.1 g/ml'den itibaren görünen artış ise, τ 'nın uzadığını ve topaklaşmanın oluştuğunu belirtmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuç

% 10 konsantrasyona kadar olan örneklerin IR-FID ve SE-T₁ katarları ile IR-T₁ ve SE-T₂ eğrileri uygun görülmektedir. Data ile ilgili formülleri mükemmel bir şekilde fit etmektedir. Bu demektir ki % 10 konsantrasyona kadar albümin kullanılarak NMR T₁, T₂ ölçümleri yapılabilir.

% 10'dan sonraki konsantrasyonlar da exponansiyel görünüm, hem sinyal katarlarının da hem de IR-T₁, IR-T₂ eğrilerinde giderek yok olmaktadır. Ancak % 50 konsantrasyonlarda bazı verileri atmak suretiyle ortalama IR-T₁ ve SE-T₁ eğrileri elde ediliyor.

Sinyal bozunumları % 20 konsantrasyondan sonra 1/T₁ ve 1/T₂ konsantrasyon eğrileri üzerinde barizleşiyor. Buda % 10 ile % 20 konsantrasyonları arasında ilişkinin çok zayıf ve daha sonra bu ilişkinin çok etkiliği olduğunu gösteriyor. Veriler düşük konsantrasyonlarda lineer ilişki sergilerken % 20 ve daha sonraki konsantrasyonlarda lineer ilişki bozuluyor. Bu da albümin topaklanmasının çok etkiliği olduğunu gösteriyor.

5.2. Öneriler

Sıcaklığın albümin topaklamasına olan etkisi ayrıntılı olarak incelenebilir. Albümin eğer varsa suyun dışındaki farklı çözücülerde çözülerek incelenebilir. Topaklamaya uğramış ve uğramamış moleküllerin τ zamanları hesaplanarak, topaklama ile ilgili τ zamanları arasındaki ilişki üzerinden topaklama tanımlanabilir. Vizkozite ile albümin topaklaması arasındaki ilişki araştırılabilir. Albümin topaklaması ile moleküler crowding arasındaki ilişki araştırılabilir.

6. KAYNAKLAR

Aimee, M., Murielle, A., Watzky, Richard., G, Finke. 2009. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: A review of the literature, 1794 (3): 375–397.

Bertini, I., Fragai, M., Luchinat, C., Parigi, G. 2000. *Magn. Reson. Chem.* ^1H NMRD profiles of diamagnetic proteins: a model-free analysis, 38 (7): 543-550.

Bertini, I., Gupta, Y.K., Luchinat, C., Parigi, G., Schlörb, C., Schwalbe, 2005. *Angew. Chem. H. NMR Spectroscopic detection of protein protons and longitudinal relaxation rates between 0.01 and 50 MHz*, 44(15): 2223-5.

Bryant, R.G. 1996. *Biophys. Biomol. Struct.* The dynamics of water protein interactions, *Ann. Rev.* 25 (1996): 29-53.

Bryant, R.G. 2010. Dynamics of water in and around proteins characterized by ^1H -spin-lattice relaxometry, *Comptes Rendus Physique*, 11(2010): 128-135.

Denisov, V.P., Halle, B. J. 1994.. *Am. Chem.* Dynamics of The Internal and External Hydration of globular Proteins, 116(1994); 10324-10325.

Denisov, V.P., Halle, B. 1995. *J. Mol. Biol.* Hidrojen Exchange and Protein Hydration: The Deuteron Spin Relaxation Dispersions of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor and Ubiquitin, 245(1995); 698-709.

Denisov, V.P., Peters, J., Hörlein, H. D., Halle, B. 1996. *Nature Strucural Biology*. Using Buried Water Molecules to Explore The Energy Landscape of Proteins, 3(1996): 505-509.

Denisov, V.P., and Halle, B. 1998. *Biochemistry*. Thermal Denaturation of Ribonuclease A Characterized by Water ^{17}O and ^2H Magnetic Relaxation Dispersion 37(26): 9595-604.

Gallier, J., Rivet, P., de Certaines, J. 1987. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. ^1H - and ^2H -NMR study of bovine serum albumin solutions, 915 (1): 1–18.

Grosch, L., Noack, F. 1976. *Biochimica et Biophysica Acta*. NMR Relaxation Investigation of Water Mobility in Aqueous Bovine Serum Albumin solutions, 453(1): 218-32.

Halle, B. 2004. *Philos. T. Roy. Soc. Lond. B*. Protein hydration dynamics in solution: a critical survey, 359(1448): 1207-23.

Halle, B. 2004. *The Royal Society*. Protein Hydration Dynamics in Solution: a Critical Survey, 359(1448): 207-23.

Hallenga, K., Koenig, S.H. 1976. *Biochemistry*. Protein Rotational Relaxation as Studied by Solvent ^1H and ^2H Magnetic Relaxation, 15(19): 4255-4264.

Hauer, J., Lang, E.W., Lüdemann, H.-D. 1981. *Chemical Physics*. Pressure and temperature dependence of the proton and deuteron spin-lattice relaxation times in liquid H_2S and D_2S , (1-29): 1 195-205

Hills, B.P., Takacs, S.F., Belton, P.S. 1989. *Mol. Phys*. The effects of proteins on the proton NMR transverse relaxation time of water. II protein aggregation, 67 (4): 919-93.

<http://www.vikipedi.com>

Kiihne, S., Bryant, R.G. 2000. *Biophys. J*. Protein-Bound Water Molecule Counting by Resolution of ^1H Spin-Lattice Relaxation Mechanisms, 78(4): 2163–2169.

Koeninig, S.H., Schillinger, W.E. 1969. The Journal of Biological Chemistry. Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion in Protein Solution, 244(1969): 3283-1289.

Koeninig S.H., Hallenga, K., Shporer, M. 1975. Biophysics. Magn. Reson. Chem. ^1H NMR relaxation measurements in highly concentrated water protein solutions, (John Qakes., 1975. Protein hydration, Unilever Research Port Sunlight Laboratory).

Koenig, S.H., Brown III, R.D., Ugolini, R. 1993. Magn. Reson. Med. Magnetization transfer in cross-linked bovine serum albumin solutions at 200 MHz: A model for tissue, 29(3): 311-6.

Koenig, S.H., Brown, R.D. 1993. III, Magn. Reson. Med. A molecular theory of relaxation and magnetization transfer: Application to cross-linked BSA, a model for tissue, 30(6): 685-95.

Koeninig, S.H. 1995. Biophysical Society. Classes of Hydration Sites at Protein-Water Interfaces: The Source of Contrast in Magnetic Resonance Imaging, 69(2): 593–603.

Olechnowicz, R., Masierak, W., Bodurka, J., Gutsze, A. 1999. Magn. Reson. Chem. ^1H NMR relaxation measurements in highly concentrated water protein solutions, 37 (1999): 147-149.

Paul G, B., Lewis, S., Philip, F. 1986. Magnetic Resonance Imaging. The measurement of extracellular water volumes in tissues by Gadolinium modification of ^1H -NMR spin lattice (T1) relaxation, 4 (4): 85–291.

Powles, J.G., Smith, D.W.G. 1964. Physics Letters. Proton spin relaxation in water, 9(3): 239–241.

Oakes, J. 1975. J. Chem. Soc. Farad. Trans. Protein hydration. Nuclear magnetic resonance relaxation studies of the state of water in native bovine serum albumin solutions, 72 (1976): 216-227.

Olechnowicz, R., Masierak, W., Bodurka, J., and Gutsze, A. 1999. Magn.Reson. Chem. ^1H NMR relaxation measurements in highly concentrated water protein solutions, 37(1999); 147-149.

Rätz, R., and Thilö, E., Ann. Ber. Chem., 272,173 (1951).

Sadler, P.J., Tucker, A. 1992 Biochem. Proton NMR Studies of Bovine Serum Albumin, Eur. J, 205(2): 631-43.

Sunde, E.P., Halle, B. 2009. Slow Internal Protein Dynamics from Water ^1H Magnetic Relaxation Dispersion, Biophysical Chemistry, 131(51): 18214-18215.

Van-Quynh, A., Willson, S., Bryant, R.G. 2003. Biophys. J. Protein reorientation and bound water molecules measured by ^1H magnetic spin-lattice relaxation, 84(1): 558-63.

Venu, K., P.Denisov, V., and Halle, B. 1996. J. Am. Chem. Soc. Water ^1H Magnetic Relaxation Dispersion in Protein Solutions. A Quantitative Assesment of Internal Hydration, proton Exchange, and Cross-Relaxation, 119(13); 3122-3134

Viktor, B. A., Caroline, S., Kajsa, U., Niclas, S. 2012. Biochemical and Biophysical Research Communications. Preparation of amyloid-like fibrils containing magnetic iron oxide nanoparticles: Effect of protein aggregation on proton relaxivity, 419 (4): 682-686.

Wei, W. 2005. International Journal of Pharmaceutics. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics, 289 (1-2): 1-30

William S, P., Masayuki, N., Yoji, A. 1997. Biophysical Chemistry. A pulsed field gradient NMR study of the aggregation and hydration of parvalbumin, 65 (2-3): 179-187.

Yian-Biao, Z., Jason, H., Sean, M., Paul, L., Karen, S., Paul, F. 2004. Magnetic Resonance Imaging. Protein aggregation during overexpression limited by peptide extensions with large net negative charge, 22 (5): 683–688.

Yilmaz, A., Ulak, F.Ş., Batun, M.S. 1997. Biophysical Chemistry. Proton T_1 and T_2 relaxivities of serum proteins, 65 (2–3): 179–187.

Yilmaz, Ali., Budak, H., F. S, Ulak. 2008. Magnetic Resonance Imaging. Determination of the effective correlation time modulating ^1H NMR relaxation processes of bound water in protein solutions, 26 (2): 254–260.

Yilmaz, A., Ulak, F.Ş., Batun M.S. 2004. Proton T_1 and T_2 Relaxivities of Serum Proteins, Magnetic Resonance Imaging, 22(5): 683-8.

Yilmaz, A., Korunur, S. 2011. NMR Ders Notları, Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi Fizik Bölümü.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı : Şilan BATURAY

Doğum yeri : İSKENDERUN

Doğum tarihi : 19.02.1980

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise – Ziya Gökalp Lisesi

Lisans – Dicle Üniversitesi

Yüksek Lisans – Dicle Üniversitesi

Çalıştığı Kurum/Kurumlar Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü,
Araştırma Görevlisi, 2007-Devam Ediyor