

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**D₂O ORTAMINA EKLENEN PROTEİN VE ENZİMLERİN KİMYASAL
DEĞİŞ-TOKUŞ YÖNÜNDEN 400 MHz NMR İLE İNCELENMESİ**

Serpil BOZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZİK ANA BİLİM DALI

DİYARBAKIR

Haziran-2012

TEŞEKKÜR

Çalışma süresince, beni yönlendiren ve benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç.Dr. Fatma Őadan ULAK 'a teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezimin hazırlanmasında bana yardımcı olan Prof.Dr. Ali Yılmaz'a, Arő. Gör. Bilgin ZENGİN 'e ve değerli eőime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VII
ŞEKİL LİSTESİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Protein Çözeltilerinin NMR Spin-Örgü Durulma Zamanı (T_1) İle İlgili Önceki Çalışmalar.....	3
2.2. Manyetik Rezonansın Temel Teorisi.....	
2.2.1 Bir Dış H_0 Alanına Konulan Spin İçin Enerji.....	
2.2.2. Magnetik Alanda İzole Edilen Bir Çekirdeğin Hareketi ve Rezonans Olayının Oluşumu.....	12
2.2.3. Bir Spin Sisteminin Soğurduğu Enerji.....	14
2.2.4 Spin Örgü Durulma Mekanizması.....	17
2.3. Kimyasal Değiş-Tokuş	20
2.3.1. Çok Yavaş Değiş-Tokuş.....	22
2.3.2. Çok Hızlı Değiş-Tokuş.....	22
2.3.3. İki Faz Sistemleri İçin Durulma Zamanının Stokastik Teorisi.....	24
2.3.4. İki Faz Sistemlerinde Yavaş Ve Hızlı Değiş-Tokuş İçin Asimptotik İfadeler...	26
3. MATERYAL VE METOD.....	29
3.1. Sucrose İçeren Çözetilerin Hazırlanması.....	29

3.2.	Pepsin İçeren Çözeltilerin Hazırlanması.....	29
3.3.	Maltose İçeren Çözeltilerin Hazırlanması.....	29
3.4.	BSA İçeren Çözeltilerin Hazırlanması.....	29
3.5.	NMR Durulma Zamanlarının Ölçülmesi.....	29
3.5.1.	Spin-Örgü Durulma Zamanlarının (T_1) Ölçülmesi.....	29
3.5.2.	Spin-Spin Durulma Zamanlarının (T_2) Ölçülmesi.....	30
3.6.	T_1 Ve T_2 Zamanlarının Sıcaklığa Bağlı Ölçülmesi.....	30
3.7.	Çözeltilerden Elde Edilen Pikler.....	30
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	33
4.1.	Elde Edilen Piklerden Bazılarının Sunumu	33
4.2.	Piklerden Elde Edilen T_1 Ve T_2 Değerleri.....	38
4.3.	$1/T_1$ Ve $1/T_2$ 'lerden Elde Edilen Grafikler.....	43
4.4.	Lineer Piklerden Elde Edilen Pikler (Rölaksivite).....	47
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
6.	KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....		53

ÖZET

D₂O ORTAMINA EKLENEN PROTEİN VE ENZİMLERİN KİMYASAL DEĞİŞ-TOKUŞ YÖNÜNDEN 400 MHz NMR İLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Serpil BOZCAN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZİK ANABİLİM DALI

2012

Protein ve enzim çözeltilerinin NMR T_1 (spin-örgü) ve T_2 (spin-spin) durulma zamanları 1960'lı yıllardan beri incelenmektedir. Durulma mekanizmaları için birçok yaklaşım kullanılmıştır. Kullanılan yaklaşımlardan biri serbest su molekülleri ile bağlı su molekülleri arasındaki kimyasal değiş-tokuş olayı olmaktadır.

Bu çalışmada sucrose, maltose, pepsin, BSA eklenen D₂O çözeltilerinin $1/T_1$ ve $1/T_2$ oranları, eklenen madde konsantrasyonuna karşı incelendi. $1/T_1$ ve $1/T_2$, konsantrasyonla lineer değişmektedir. Bu nedenle, bağlı ve serbest su arasında hızlı kimyasal değiş-tokuş olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: NMR, T1, T2 durulmaları, kimyasal değiş-tokuş

ABSTRACT

STUDYING CHEMICAL EXCHANGE OF WATER IN PROTEIN AND ENZYME SOLUTIONS WITH D₂O BY 400 MHz NMR

MSc THESIS

SERPİL BOZCAN

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

2012

NMR T_1 (spin-lattice) and T_2 (spin-spin) relaxation times in protein and enzyme solutions have been studied since 1960's. Many approaches have been used for explaining the relaxation mechanisms. One of them is the chemical exchange of protons between free water and water bound to solids.

In this study, $1/T_1$ and $1/T_2$ ratios of the D₂O solutions, to which sucrose, maltose, pepsin and BSA were added, were studied versus concentration of added substances. It was found that $1/T_1$ and $1/T_2$ change linearly with concentration. Therefore, it was concluded that a fast chemical exchange occurs between bound and free water.

Keywords: NMR, T₁, T₂, relaxations, chemical exchange

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No	Sayfa
Çizelge 4.1.a. Sucrose çözeltisinin T_1 lerin konsantrasyona karşı değişim değerleri	39
Çizelge 4.1.b. Sucrose çözeltisinin T_2 lerin konsantrasyona karşı değişim değerleri	39
Çizelge 4.2.a. Pepsin çözeltisinin T_1 lerin konsantrasyona karşı değişim değerleri	40
Çizelge 4.2.b. Pepsin çözeltisinin T_2 lerin konsantrasyona karşı değişim değerleri	40
Çizelge 4.3.a. Maltose çözeltisinin T_2 lerin konsantrasyona karşı değişim değerleri	41
Çizelge 4.3.b. Maltose çözeltisinin T_2 lerin konsantrasyona karşı değişim değerleri	41
Çizelge 4.4.a. BSA çözeltisinin T_2 lerin konsantrasyona karşı değişim değerleri	42
Çizelge 4.4.b. BSA çözeltisinin T_2 lerin konsantrasyona karşı değişim değerleri	42
Çizelge 4.5.a. İncelenen maddelerin $1/T_1$ durulmalarının, madde konsantrasyonuna karşı elde edilen en küçük kareler fit doğrularının eğimleri	48
Çizelge 4.5.b. İncelenen maddelerin $1/T_2$ durulmalarının, madde konsantrasyonuna karşı elde edilen en küçük kareler fit doğrularının eğimleri	48

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Sayfa	
Şekil 2.1.	Spini 3/2 olan B çekirdeğinin bir dış alandaki zeeman yarılmaları	11
Şekil 2.2.	$\vec{\mu}$ Çekirdek magnetik momentinin H_0 alanı etrafındaki presesyon hareketi	12
Şekil 2.3.	Magnetik rezonansın oluşumu	14
Şekil 2.4.	Spin kuantum sayısı $\frac{1}{2}$ olan bir sistemin H_0 alanının uygulaması durumunda spinlerin yönelimi	15
Şekil 2.5.	Spin sistemi ile örgü arasındaki ısısal etkileşme	17
Şekil 2.6.	Spin-örgü etkileşmesi ile yeniden oluşan geçişler	18
Şekil 3.1.a.	Sucrose çözeltisinden elde edilen pikler	31
Şekil 3.1.b.	Pepsin çözeltisinden elde edilen pikler	31
Şekil 3.1.c.	Maltose çözeltisinden elde edilen pikler	32
Şekil 3.1.d.	BSA çözeltisinden elde edilen pikler	32
Şekil 4.1.a.	Sucrose çözeltisinin 5. pikine ait IR eğrisi (0,1 g/ml)	33
Şekil 4.1.b.	Sucrose çözeltisinin 5. pikine ait SE eğrisi (0,1 g/ml)	34
Şekil 4.2.a.	Pepsin çözeltisinin 1. pikine ait IR eğrisi (0,02 g/ml)	34
Şekil 4.2.b.	Pepsin çözeltisinin 1. pikine ait SE eğrisi (0,02 g/ml)	35
Şekil 4.3.a.	Maltose çözeltisinin 5. pikine ait IR eğrisi (0,1 g/ml)	35
Şekil 4.3.b.	Maltose çözeltisinin 5. pikine ait SE eğrisi (0,1 g/ml)	36
Şekil 4.4.a.	BSA çözeltisinin 1. pikine ait IR eğrisi (0,04 g/ml)	36
Şekil 4.4.b.	BSA çözeltisinin 1. pikine ait SE eğrisi (0,04 g/ml)	37
Şekil 4.5.a.	Sucrose 3. pikinin $1/T_1$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti	43

Şekil 4.5.b. Sucrose 5. pikinin $1/T_2$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti	44
Şekil 4.6.a. Pepsin 2. pikinin $1/T_1$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti	44
Şekil 4.6.b. Sucrose 1. pikinin $1/T_2$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti	45
Şekil 4.7.a. Maltose 4. pikinin $1/T_1$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti	45
Şekil 4.7.b. Maltose 7. pikinin $1/T_2$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti	46
Şekil 4.8.a. BSA 1. pikinin $1/T_1$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti	46

1.GİRİŞ

Nükleer Manyetik rezonans olayı 1946 yılında Zavoiski tarafından bulunmuştur. Bu olay başlangıçta su, alkol gibi saf maddelere uygulanmıştır. Daha sonraki zamanlarda saf maddelerin içine iyon katılarak incelemeler yapılmıştır (Bloembergen ve ark.1947, Gurowsky ve Mc Call 1953, Solomon ve Bloembergen 1956, Hackleman ve Hubbord 1963, Pendred ve ark.1966). 1950'li yılların sonuna doğru, ortama protein ve enzimler de eklenmiştir. Protein ve enzimler suda çözüldüğü için bu tip deneyler için su ortamı çözücü olarak kullanılmıştır (Gurowsky ve Sanka, Dissociation 1953, Nolle ve Morgan 1957, Pearson ve ark. 1960, Bernheim ve ark.1959, Danskiewich ve ark.1963). Pür çözeltilerdeki sinyaller, o zamanki spektrometrelerin ayırma gücüne bağlı olarak incelenmiştir. Bugün bu tip çözeltilerin sinyallerini daha iyi ayıran spektrometreler geliştirilmiştir. Ancak sulu protein ya da enzim çözeltilerinde, su iki fazda bulunmaktadır: suyun bir kısmı çözücü ortamda serbest fazdadır. Küçük bir kısmı ise proteine bağlıdır (Gurowsky ve Sanka, Dissociation 1953, Nolle ve Morgan 1957, Pearson ve ark. 1960, Bernheim ve ark.1959, Danskiewich ve ark.1963). Gerek o zamanın NMR spektrometreleri, gerekse günümüz NMR spektrometreleri bağlı ve serbest suyun sinyallerini birbirinden ayıramamaktadır.

Bağlı ve serbest suyun sinyalleri birbirinden ayrıştırılmadığı için; suyun bu iki çevre arasında gidiş gelişi için teoriler türetilmiştir. Bu teorilere göre su, örnekten tek sinyal alınması durumunda, bu iki çevre arasında hızlıca gidip gelmektedir. Bu nedenle her iki çevredeki suyun kimyasal kaymaları yerine ortalama bir kimyasal kayma geçmekte ve bu ortalama kaymadaki sinyal elde edilmektedir. Eğer su bu iki çevre arasında yavaş gidip gelseydi, iki ayrı sinyal elde edecektik ve bu durumda her bir fazın kimyasal kaymasını ve durulmasını ayrı ayrı bulabilecektik.

Protein yada enzim çözeltilerindeki suyun iki farklı çevre arasında hızlı değiş-tokuş yaptığına dair bir çok çalışma vardır (Koenig ve Schillinger 1969, Eley ve ark.1974, Oakes 1975, Grösch ve Noack, 1976, Hallenga ve Koenig, 1976). Bu olgunun teorisi de bir çok çalışma ile verilmiştir (Edzes ve Samulski, 1978, Fullerton ve ark.1986, Zimmerman ve Brittin 1957). Ancak bu tip çalışmalar 400 MHz NMR yapılmamıştır. Biz protein ve enzim çözeltilerindeki suyun hızlı değiş-tokuşunu 400 MHz NMR ile incelenmesini bu nedenle seçtik. Bu amaca ulaşmak için de sucrose, pepsin, maltose, BSA protein ve enzim çözeltilerindeki suyun T_1 ve T_2 durulma zamanlarının konsantrasyonlarına bağlı olarak incelemeye aldık.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Protein Çözeltilerinin NMR Spin-Örgü Durulma Zamanı (T_1) İle İlgili Önceki Çalışmalar

Daskiewicz ve ark. (1963) yaptıkları çalışmada, suda çözünen ovalbüminin T_1 durulma zamanını azalttığını bulmuşlar ve bunun bir kısım bağlı su moleküllerinin ilgi zamanının artışıyla kaynaklandığını ifade etmişler. Proton spin-örgü durulma zamanlarını (T_1), 20 °C de, 3,2881 Gauss 'luk magnetik alanda, Carr-Purcell ve Meiboom spin-eko tekniği ile ölçmüşlerdir. Ölçme sonucunda elde ettikleri sonuçların

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1w}} + KC \quad (2.1)$$

Denklemine uyduğunu göstermişlerdir (Yani, durulma zamanına karşı konsantrasyonun lineer olarak arttığını göstermişler).

Hazırlanan ovalbümin çözeltisinde üç tip proton vardır; 1- Serbest suyun protonları. 2- Proteine dönmesiz bağlı suyun protonları. 3- Protein protonları çok kısa sürede rölakse olduklarından gözlenemiyor ve ihmal ediliyor. Sadece serbest suyun protonları ve proteine dönmesiz bağlı su protonları kalır. Çözelti içerisinde yer alan serbest suyun protonları ve proteine dönmesiz bağlı su protonları arasında;

$$\frac{1}{T_1} = \frac{P_a}{T_{1a}} + \frac{P_b}{T_{1b}} \quad (2.2)$$

denklemine uyan hızlı kimyasal değiş-tokuş olduğunu göstermişlerdir. Burada P_a : serbest suyun olasılığı ve P_b ise proteine dönmesiz bağlı suyun olasılığıdır.

Ovalbümin ve yumurta akı için 1 gr başına düşen su miktarı ve τ ilgi zamanı değerlerini sırasıyla $w = 1,6.10^{-2}$, $\tau=1,03.10^{-8}$ sn ve $w = 1,97.10^{-2}$, $\tau=1,2.10^{-8}$ sn olarak bulmuşlardır. Elde ettikleri sonuçlar (proteine dönmesiz bağlı su miktarı için), Buchanan ve arkadaşları tarafından daha önce bulunan sonuçlarla uyumlu olduğunu görmüşlerdir.

Koenig ve Schilinger (1969) 'in yapmış oldukları bu çalışmada, pH, konsantrasyon ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak diamagnetik protein apotransferinin çözeltile ri içindeki çözücü protonların magnetik spin-örgü durulma oranı $1 / T_1$ 'in magnetik alana bağlılığının ölçümleri yapılmış ve incelenmiştir. Bu çalışmada, su moleküllerinin dönmesiz bağlı olması gerekmediğini, protein molekülüne göre sabit geometriye sahip bir eksen etrafında dönmelerinin sınırlanmasının kafi olduğunu belirtmişlerdir. Deney ölçümleri;1000 Oe

aşağıdaki magnetik alan verileri için, puls magnetik alan tekniği kullanılarak, 1 kOe ile 12 kOe arasındaki magnetik alan verileri içinde 90° - 180° spin- echo puls metodu ile elde etmişlerdir.

Magnetik alan artırılmasıyla birlikte $1 / T_1$ 'in monoton bir şekilde azaldığı görülmüş. Magnetik alan ile $1 / T_1$ 'in değişimi Nükleer magnetik rölaksasyon dağılımı olarak gösterilmiş. Sabit bir r_{pp} mesafesinde etkileşen bir proton çiftinin rölaksasyon oranı:

$$\frac{1}{T_{1pp}} = \frac{3h^2\gamma^4}{10r_{pp}^6} \left[\frac{\tau_c}{1+w^2\tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1+4w^2\tau_c} \right] \quad (2.3)$$

denklemleri ile verilir. Burada $w=2\pi\nu$, $\gamma = \omega / H$ dir. Bu denklem proteine dönmesiz bağlı su molekülleri için geçerli olduğu varsayılır. Bu durum için ilgi zamanı:

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta_0 a^3}{3kt} \cong 2 \cdot 10^{-7} \quad \text{sn olarak bulunmuştur.}$$

Burada a : protein molekülünün hidrodinamik yarıçapı , η_0 çözücünün viskozitesidir.

Proteine dönmesiz bağlı olmayan fakat proteine göre sabit bir eksen etrafında serbest olarak dönecek şekilde bağlı olan bir proton çifti için;

$$\frac{1}{T_{1pp}} = \left[\frac{3\cos^2\alpha - 1}{2} \right]^2 \left[\frac{1}{T_{1pp}} \right]_{irrot} \quad (2.4)$$

olarak önerilmiştir.

Teori; Daskiewicz ve arkadaşları, Coputa ve arkadaşlarının modelleri için küresel olmayan proteinlerin durumuna genelleştirildi. Bu nedenle bu teori onlarınkinden daha geçerli ve geniştir. Bu teori, kendi kendine protein ile değiş-tokuş yapan protonun durumuna ve dönmesiz bağlı su moleküllerinin durumuna uygulanabilir. Bütün bunlara ilaveten, proteinin yakınında yapışık bir su bölgesinin olduğunu ve hareketi bulk su ile karşılaştırıldığında daha yavaş, proteinlerinkinden ise daha hızlı olduğunu ve moleküllerin τ_c ilgi zamanlarının proteinin takla adımı süresinden hayli kısa olduğunu ileri sürmüşlerdir. Protein etkisinde bulunan çözücü protonların τ_c ilgi zamanının 3.10^{-12} sn' den 3.10^{-7} sn' ye arttığını görmüşler. Bunun yanında proteine bağlı küçük sayıdaki su moleküllerinin her durumda çözücü protonlarının $1/T_1'$ ini artırdığını da ifade etmişlerdir.

Eley ve ark. (1974) ,sulu bovine albümin çözeltilerinde NMR rölaksasyonu adlı çalışmalarında, su proton durulma zamanlarını, bovine plazma albüminin sulu çözeltilerinde ve çeşitli maddelerin (NaH_2PO_4 , NaC, LiBr ve LiCl)ilvesi ile kimyasal olarak değiştirilmiş bovine serum albüminin değişik formlarında ölçmüşler. Proteinlerin sulu çözeltilerindeki su proton magnetik durulma zamanlarının, temelde protein hidrasyonu ile ilgili bilgiyi sağlayabildiğini ifade etmişlerdir.

Blicharska ve arkadaşlarının “suyun durulmasına değiş-tokuş yapmayan protein protonları ile su protonlarının etkileşmesinin yol açtığı” ifadesi desteklenmiştir. Bu çalışmada denature tuzları içeren bovine plazma albüminli çözeltileri rölaksasyon oranlarını ölçtüktan sonra, onların spin difüzyon mekanizması ile uyumlu olup olmadığını tartışmışlardır.

Ölçülen proton durulma oranlarını proton konsantrasyonunun lineer bir fonksiyonu olarak değiştiğini bulmuşlar ve gözlenen durulma oranlarının da;

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_1^0} + R_i C \quad (2.5)$$

ifadesiyle verilebileceğini belirtmişlerdir.

Burada , $i=1,2$, T_1^0 ; saf suyun başlangıçtaki durulma zamanı, C; protein konsantrasyonu ve R_i ; protein konsantrasyon miktarı ile üretilen rölaksasyon oranı artması (tuzun ilavesiyle ve proteinin kimyasal değişmesiyle tesir edilebilir) dır.

Oakes (1975)'in yapmış olduğu protein hidrasyonu adlı çalışmada, NMR durulma zamanlarını, sıcaklık ve protein konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak, doğal bovine

serum albüminin sulu çözeltilerindeki su ve protein protonları için ölçmüştür. Protein hidrasyonu ile ilgili tahminlerini, dondurulmuş protein çözeltileri üzerindeki NMR incelemelerinden elde etmiştir. Doğal bovine serum albumin çözeltilerindeki suyun çoğunun, aynı sıcaklıktaki saf suyun akışkanlığına (mobilite) eşdeğer bir akışkanlığa sahip olduğunu gözlemlemiştir.

$1/T_1$ ölçümlerini, bovine serum albümin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak 275 K, 294 K ve 318 K'de incelendiğinde durulmadaki artışın, % 10 bovine serum albümin konsantrasyonuna kadar lineer, daha yukarı konsantrasyonlarda ise lineerlikten saptığını ve sıcaklık arttıkça da $1/T_1$ in arttığını gözlemlemiştir. Doğal bovine serum albüminin varlığında suyun durulma oranındaki net artışın, uzun menzilli yüzey etkilerinden dolayı su moleküllerinin akışkanlığındaki azalmadan ya da bulk su ile hızlı biçimde değiş-tokuş yapan, küçük miktardaki suyun proteine bağlanmasından ileri geldiğini ileri sürmüştür.

Bovine serum albümin hidrasyonunun teoriksel tahminleri; 1 gram bovine serum albümin başına amino asit kenar zincirleri üzerindeki kutup (polar) gruplarının sayısından ve kutup gruplarının suyu bağlama kapasitelerinden yapmıştır. Ayrıca bu çalışma; dondurulmuş bovine serum albüminli çözeltilerden elde edilen hidrasyon sayılarının, çözeltideki hidrasyonu iyi tahmin ettiğinin ve çözeltide tahmin edilen durulma zamanlarının dondurulmuş örneklerdeki ölçümlere benzediğini ortaya koymuştur.

Grösch ve Noack (1976) 'in sulu bovine serum albümin çözeltilerinde su akıcılığının NMR rölaksasyon incelenmesi adlı çalışmada biyolojik sistemlerdeki suyun durumunun; bulk (serbest) su, dönerek bağlı su, dönmeden bağlı su, düzenli ya da buz gibi olmak üzere ayrı fazlarda bulunabileceğine dair çok sayıda araştırmacının görüşü yer almıştır. Ölçümleri, albüminin hem doğal hem de denature durumu için farklı konsantrasyonlarda, farklı sıcaklıklarda ve pH değerlerinde frekansa bağlı olarak gerçekleştirmişlerdir. Doğal protein çözeltilerinin sıcaklığını 0 °C ile 30 °C arasında sınırlarken denature protein ise, örneği yaklaşık 80 °C de 5 dakika ısıtmak suretiyle elde etmişlerdir. Hesaplanan τ_i ve N_i (τ_i : i. Faz ile ilgili katsayıdır. N_i : birim hacimde bulunan i. Fazdaki protonların sayısı olmak üzere) değerlerinden, proteinin çevresinde tümü serbest, ötelemesi engellenmiş ve dönerek bağlı su olarak adlandırılan en az üç tip su tabakasının bulunabileceğini ifade etmişlerdir. Bu çevrelere ait τ ilgi zamanlarını da sırasıyla ; $\tau_s=10^{-10}$ sn , $\tau_{oe}= 10^{-9}$ ve $\tau_{db} = 10^{-8}$ sn olarak bulmuşlardır. Bu tabakalar arasında hızlı kimyasal değiş-tokuş olduğu varsayılarak durulma oranının (a:protein protonları, b:hidrasyonlu su protonları, c: serbest su

protonları olmak üzere)
$$\frac{1}{T_1} = \frac{P_a}{T_{1a}} + \frac{P_b}{T_{1b}} + \frac{P_c}{T_{1c}}$$

(2.6) şeklinde verilebileceğini ifade etmişlerdir. Dönerek bağlı durumdaki proton mesafesini 1,52 Å ve ötelemece engellenmiş durum için proton mesafesini 1,79 Å olarak almışlardır.

Hallenga ve Koenig (1976), yapmış oldukları çalışmada, diamagnetik prateinlerin çözeltileri içinde, çözücü protonların nükleer spin magnetik durulma oranının magnetik alana bağlı olduğunu ve bu bağlı olmanın çözünen proteinlerin dönel Brownian hareketiyle ilgili olduğunu göstermişlerdir. Çözücü proton spin-örgü durulma oranı $1/T_1$ 'in, magnetik alanın artırılmasıyla monoton biçimde azaldığını görmüşler. Ayrıca üç protein çözeltisi için (lisozyme, karbonmoksihemoglobin, helezon pomatia)döteron durulma oranını ölçmüşlerdir. Proton ve döteron rölaksasyon dağılımları arasında nicel bir ilişki tesbit etmişler. Magnetik rölaksasyon dağılımını Cole-Cole ifadesi;

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1w}} + D + \frac{A \left[1 + \left(\frac{\nu}{\nu_c} \right)^{\beta/2} \cos \left(\frac{\pi\beta}{4} \right) \right]}{1 + 2 \left(\frac{\nu}{\nu_c} \right)^{\beta/2} \cos \left(\frac{\pi\beta}{4} \right) + \left(\frac{\nu}{\nu_c} \right)^\beta} \quad (2.7)$$

İle açıklamışlardır. Burada T_{1w} ; serbest suyun rölaksasyon oranı ν ; H_0 alanında çekirdeğin Larmor presesyon frekansı, ν_c ; ilgi frekansı, D, A ve β ; belirlenen parametrelerdir. Cole-Cole ifadesinde $\beta=2$ yazarsak,

$$D + \frac{A}{1 + \left(\frac{\nu}{\nu_c} \right)^2} \quad (2.8) \quad \frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1w}} +$$

Lorentziyen ifadesini elde etmişlerdir.

Ayrıca, ilgi frekansı ν_c 'nin protein çözeltilerinde çözücü proton durulma oranlarının dağılımından çıkarıldığını doğrulamışlar ve basit biçimde protein moleküllerinin yönelme durulma zamanı ile ilgili olduğunu bulmuşlardır.

Edzes ve Samulski (1978), yapmış olduğu bu çalışmada, kross rölaksasyonun incelenmesi için genel bir yöntem sunmuşlardır. Heterojen biyolojik sistemlerde, su protonları ve makromoleküler protonları fazı olmak üzere iki faz bulunduğunu ve bu iki faz arasında

kross rölaksasyonun meydana geleceğini söylemişlerdir. Kross rölaksasyonuna su protonları ile makromoleküler protonları arasındaki Zeeman-enerji

değiş-tokuşunun tesir ettiğini söylerler. İ fazında redüklenen Z magnetizasyonu $m_i(t)$ 'yi

$$m_i(t) = - \frac{[M_i(t) - M_{i\infty}]}{2M_{i\infty}} \quad (2.9)$$

bağıntısı ile ifade etmişlerdir. Burada $M_i(t)$; t anında magnetizasyon ve $M_{i\infty}$ dengedeki magnetizasyondur. Ayrıca kross rölaksasyonunu,

$$\frac{dm_i}{dt} = - R_{ri} m_i(t) - k_i m_i(t) + k_i m_j(t) \quad (2.10)$$

Şeklinde Bloch denklemi içine alınabileceğini göstermişlerdir. Burada; R_{ri} kross rölaksasyonu yokluğunda i fazının spin- örgü oranı ve k_i ; kross rölaksasyon oranıdır.

Ölçülen kross-rölaksasyon oranını , makromoleküler protonlarının bulk'ı ve su protonlarının bulk'ı arasındaki Zeeman spin enerjisinin değiş-tokuşu ile ifade ederler ve sürecin gerektirdiği adımları şu şekilde sıralamışlardır. **1-** Bulk sudan yüzeydeki bağlı suya spin enerjisinin transferine, bağlı su ile bulk su arasındaki kimyasal değiş-tokuş yol açar. **2-** Bağlı su protonlarından makromolekülün çevresindeki protonlara spin enerjisinin transferi, makromolekül yüzeyindeki bir proton ile bağlı su protonu arasındaki karşılıklı spin yer değiştirmelerinden ileri gelir. **3-** Yüzey protonlarından bütün makromoleküler protonlara magnetizasyonun transferi, spin difüzyonu ve kross rölaksasyon yolu ile meydana gelir. Spin difüzyonu, kollojene geçici olarak bağlı olan su moleküllerinin üzerindeki protonlar ile kollojen protonları arasındaki hızlı değiş-tokuş vasıtasıyla meydana gelir.

Fullerton ve ark.(1986), bir NMR titrasyon metodu ile lizoziminin hidrasyonun değerlendirmesi , adlı çalışmalarında, proton NMR durulma ölçümlerini kullanarak , küresel proteinlerin etrafını saran su moleküllerinin hareketleri üzerinde bilgi edinmek için yeni bir titrasyon metodu önermişlerdir. Örnekler 0,5 gr'dan 5gr'a kadar değişen lizozime tozu üzerine 5 ml su ilave etmek suretiyle hazırlanmış, bu örnekler 21 gün boyunca oda sıcaklığında tüpün kapağı açık olacak biçimde buharlaşmaya tabi tutulmuş ve bu süre içerisinde örneklerin

periyodik olarak tartıları alınmış ve NMR ölçümleri yapılmıştır. En sonunda da örnekler, 90°C sıcaklığında bir fırın içinde tamamen dehidre etmişlerdir.

Her M_{madde} / M_{su} oranına karşılık ölçtükleri $\frac{1}{T_1}$ değerlerini grafik üzerinde değerlendirmişlerdir. $\frac{1}{T_1}$ 'in M_{madde} / M_{su} 'ya karşılık grafiğini çizdiklerinde iki belirgin yer ($M_{madde} / M_{su} = 0,723$ ve $M_{madde} / M_{su} = 4,49$)

İle iki lineer bölge ve bir sabit bölge elde etmişlerdir. Birinci lineer bölge:

($0 \leq M_{madde} / M_{su} < 0,723$) için

$$\frac{1}{T_1} = \left[7,25 \times \frac{M_{madde}}{M_{su}} \right] + 0,22 \quad (2.11)$$

Denklemleri ile ikinci lineer bölge ($0,723 < M_{madde} / M_{su} < 4,49$) için

$$\frac{1}{T_1} = \left[3,58 \times \frac{M_{madde}}{M_{su}} \right] + 3,02 \quad (2.12)$$

Denklemleri ile verileceğini ve sabit bölge ($M_{madde} / M_{su} > 4,49$) için

$$\frac{1}{T_1} = 19,1 \pm 3,91 \quad (2.13)$$

Denklemleri ile verileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmada dört su tabakası belirlenmiştir. Bunlar 1- bulk su 2- yapılanmış su 3- kutupsal bağlı su 4- süper bağlı su olarak adlandırmışlardır. Bu tabakalara ait τ ilgi zamanını da $\tau_c = 10^{-12} sn$ (bulk su), $\tau_c = 10^{-11} sn$ (yapılanmış su), $\tau_c = 10^{-9} sn$ (kutupsal bağlı su) ve $\tau_c > 10^{-6} sn$ (süper bağlı su) olarak hesaplanmıştır.

2.2. Manyetik Rezonansın Temel Teorisi

2.2.1. Bir Dış H_0 Alanına Konulan Spin İçin Enerji

Rezonans olayını açıklamak için basit bir kuantum mekaniksel sistem ele alalım. İzole edilmiş tek bir spinin (magnetik momenti $\vec{\mu}$) \vec{H} gibi statik bir magnetik alan ile karşılıklı etkileşmesini düşünelim \vec{H} magnetic alanın uygulamasıyla ortaya çıkan etkileşme enerjisi

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{H}$$

$$E = -\mu \cdot H_0 \cdot \cos\theta \quad (2.14)$$

ifadesi ile verilir. Bu etkileşmeyi gösteren basit kuantum mekaniksel hamiltonyen operatörü

$$\mathcal{H} = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} \quad (2.15)$$

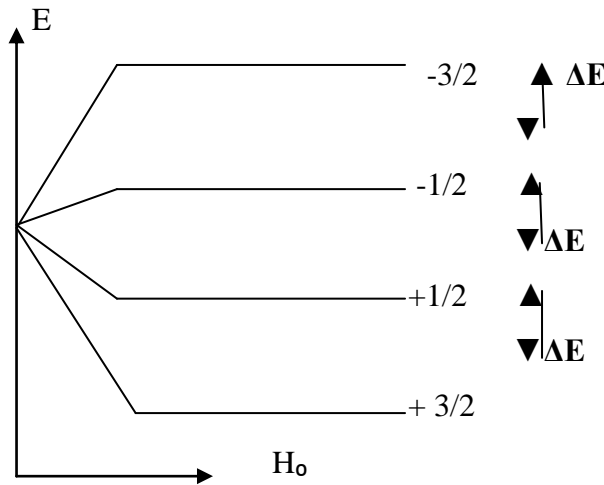
olur. Eğer H alanı z - ve denklem ($\mu = \gamma \hbar I$) denklemini (2.15) de yerine yazılırsa

$$\mathcal{H} = -\gamma \hbar I_z H_0 \quad (2.16)$$

bulunur. Bu hamiltonyen operatörünün öz değerleri, I_z 'nin öz değerlerinin ($\gamma \hbar H_0$) katlarıdır. Buradan, sistem için mümkün olan enerji değerleri

$$E = -\gamma \hbar H_0 m \quad (m = I, I-1, \dots, -1) \quad (2.17)$$

dir. Spini $I = 3/2$ olan ^{11}B çekirdeğinin bir dış magnetik alandaki enerji düzeyleri şekil 1.1'de görülmektedir. Burada m'nin alacağı değerler $2I+1$, yani dört tanedir. $m \rightarrow +3/2, +1/2, -1/2, -3/2$ bu enerji seviyeleri arasındaki uzaklık ($\gamma \hbar H_0$)'dır ve hepsi eş aralıktır.



Şekil 2.1. Spini 3/2 olan ^{11}B çekirdeğinin bir dış magnetik alandaki Zeeman yarılmaları

NMR'de uygun frekansta elektromagnetik enerji ile bu enerji düzeyleri arasındaki rezonans geçişleri oluşturulur. Sadece kesikli enerji düzeyleri mümkün olduğundan bu düzeyler arasındaki geçişler $h\nu_0$ veya bunun katları kadar kuantum enerjisinin soğurulması veya yayınlanmasına karşı gelir. Genellikle sadece ardı ardına enerji düzeyleri arasında geçişler olur. Ardı ardına geçişlerle ilgili geçiş kuralı $\Delta m = \pm 1$ 'dir. Rezonans düzeyleri arasındaki;

$$\Delta E = -\gamma \hbar H_0 \quad (2.18)$$

enerji farkına eşit ω_0 frekansında radyo frekans ışınlaması yapılarak elde edilir. Bu durumda;

$$\hbar \omega_0 = \Delta E = -\gamma \hbar H_0 \quad (2.19)$$

eşitliğinden rezonans şartı;

$$|\omega_0| = \gamma H_0 \quad (2.20)$$

elde edilir. Rezonans frekansı ile magnetik alan arasındaki bağıntıyı veren bu eşitlik NMR'ın temel eşitliğidir ve Larmor eşitliği olarak bilinir. Görüldüğü gibi rezonans şartı sadece ilgili çekirdeğe ve alanın büyüklüğüne bağlıdır. Rezonans şartında, h Planck sabiti yer almadığı için bu sonuç klasik bir rezonans olayı olarak düşünülebilir.

2.2.2. Magnetik Alanda İzole Edilen Bir Çekirdeğin Hareketi ve Rezonans Olayının Oluşumu

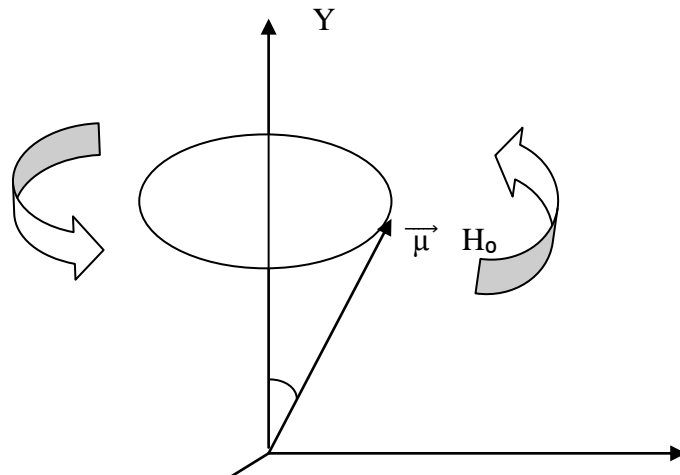
Rezonans olayının fiziksel özelliklerini anlamak için bir \vec{H} magnetik alanındaki $\vec{\mu}$ magnetik momentini düşünelim. Magnetik moment

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{H} \quad (2.21)$$

ile verilen bir torkun etkisinde kalacaktır. Bu tork, momenti alan doğrultusunda yöneltmeye çalışır. Çekirdeğin spin hareketi ve açısal momentum ile tork arasındaki

$$(d\vec{L}/dt) = \vec{\tau} \quad (2.22)$$

bağıntısından, sonuçtaki hareket basit bir yönelim değil, ama çekirdek dönme ekseninin uygulanan alan etrafında dönmesi şeklindedir. Şekil 2.2'de görülen bu harekete presesyon denir. (Tabak F. 1994)



θ

X

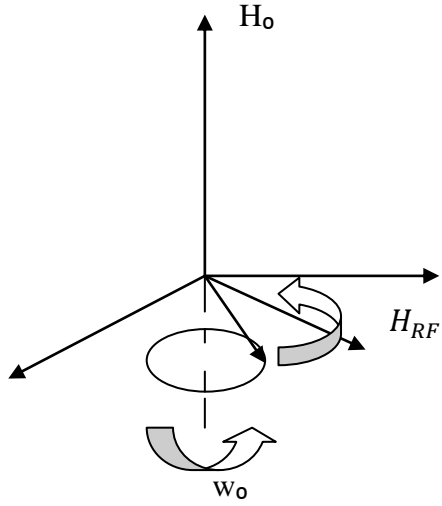
Z

Şekil 2.2. $\vec{\mu}$ Çekirdek magnetik momentinin H_0 alanı etrafındaki presesyon hareketi

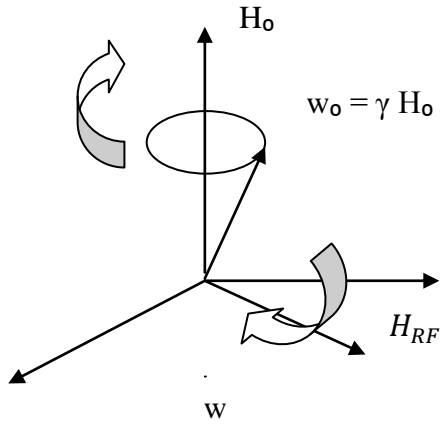
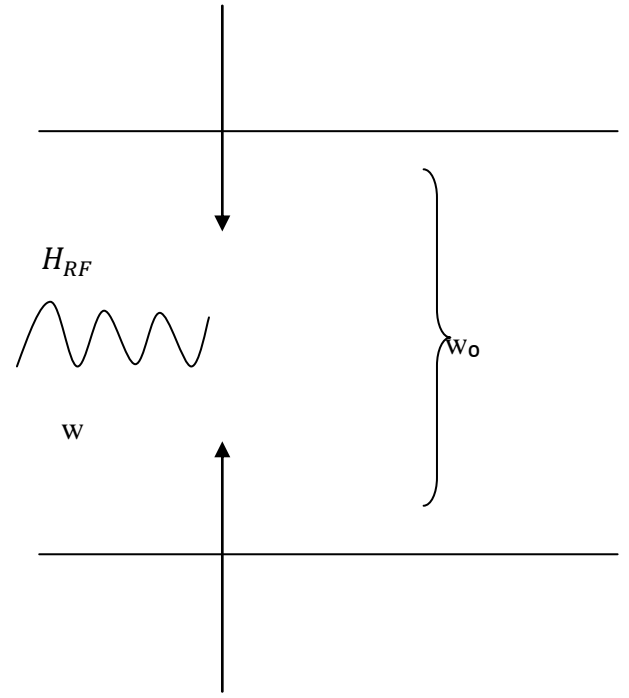
Şimdi bir çekirdek spinin H_0 'a göre yönelimini değiştirmek için magnetik alan vektörü \vec{H} 'ye dik olan bir düzlemde dairesel olarak polarize olmuş bir \vec{H}_1 radyo frekans alanı uygulanır (şekil 2.3.). Radyo frekans alanı da magnetik momente

$$\vec{\tau}_{(1)} = \vec{\mu} \times \vec{H}_1 \quad (2.23)$$

ile verilen bir tork uygulayacaktır. \vec{H}_1 alanı durgun ve şiddeti büyük ise bu alan \vec{H} 'e ekleneceğinden net etki yine bileşke alan etrafında presesyon olacaktır. Bununla birlikte eğer \vec{H}_1 'in büyüklüğü \vec{H} 'den çok daha küçük olacak şekilde seçilir ve \vec{H} etrafında döndürülecek olursa ortaya çıkan tork, \vec{H}_1 alanının spin ile aynı açısal hız ve yönde döndüğü durum hariç ihmal edilebilir olacaktır. Bu durumda, $\vec{\tau}_{(1)}$ sabit bir değere sahip olduğundan $\vec{\mu}$ dipolü $\omega_1 = \gamma H_1 \ll \omega_0$ frekansında \vec{H}_1 etrafında presesyon hareketi yapar. \vec{H}_1 'in sürekli olarak uygulanması ise \vec{H} ile belirlenen enerji düzeyleri arasında geçişlere neden olur.



$w = w_0$ olunca rezonans olur

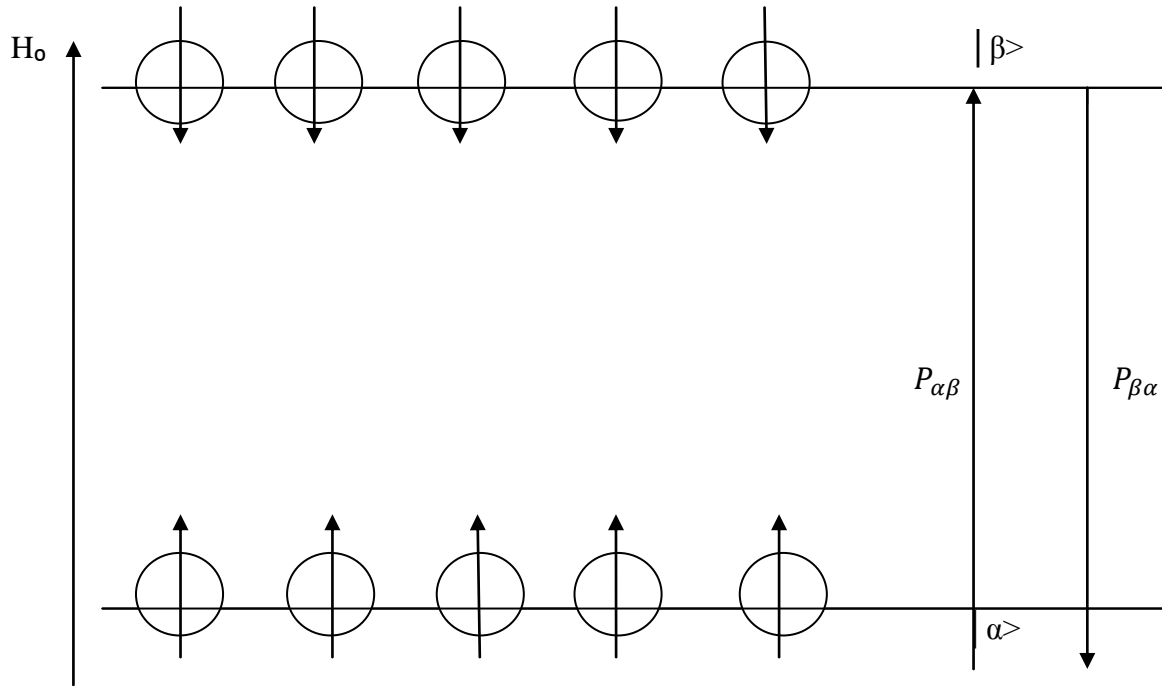


Şekil 2.3. Magnetik rezonansın oluşumu

2.2.3. Bir Spin Sisteminin Soğurduğu Enerji

Şimdi, rezonans olayının gözlemlendiği magnetik sistem ,spin kuantum sayısı $\frac{1}{2}$ olan yalıtılmış bir sistem olsun. Bir sistemde magnetik rezonansı oluşturan spinlerin dışındaki

yapıya örgü denir ve katı, sıvı ya da gaz olabilir. Böyle bir sistem üzerinde büyüklüğü H_0 olan bir magnetik alan uygulandığı zaman spin sistemi şekil 2.4. 'de görülen biçimde bir yönelme gösterir.



Şekil 2.4. Spin kuantum sayısı $1/2$ olan bir sistemin H_0 alanının uygulanması durumunda spinlerin yönelimi

Magnetik alanla aynı yöndeki yönelme $|\alpha\rangle$ düzeyi ve bu düzeydeki spin sayısı N_α magnetik alanla zıt yöndeki yönelme $|\beta\rangle$ düzeyi ve bu düzeydeki spin sayısı N_β olsun. N_α ve N_β arasındaki ilişki,

$$N_\alpha / N_\beta = e^{(E_\alpha - E_\beta) / kT} \quad (2.24)$$

Boltzmann-maxwell bağıntısı ile belirlenir. Burada E_α ve E_β sırasıyla $|\alpha\rangle$ ve $|\beta\rangle$ düzeylerine karşı gelen enerji değerleri, T mutlak sıcaklık ve k 'da Boltzmann sabitidir. Sistemde ısısal denge kurulduğunda $N_\alpha > N_\beta$ olduğu bir gerçektir. Bu durumdaki spin sistemine, frekansı sistemin doğal frekansı ile uyum içinde olabilecek bir dış etken

uygulansın. Bu dış etken $|\alpha\rangle$ ve $|\beta\rangle$ düzeyleri arasında, olasılıkları $P_{\alpha\beta}$ ve $P_{\beta\alpha}$ olan ,geçişleri oluşturacağı için düzeylerdeki spin topluluğunda bir değişme beklenir.

$$dN_{\alpha} / dt = N_{\beta} P_{\beta\alpha} - N_{\alpha} P_{\alpha\beta} \quad (2.25)$$

$$dN_{\beta}/dt = N_{\alpha} P_{\alpha\beta} - N_{\beta} P_{\beta\alpha} \quad (2.26)$$

Yani bir dt süresi içinde $|\alpha\rangle$ düzeyindeki spin topluluğunun değişimi, $|\alpha\rangle$ düzeyine gelen spin sayısı ile $|\alpha\rangle$ düzeyinden giden spin sayısının farkı kadardır. Magnetic rezonansta (2.12) ve (2.13) eşitlikleri spin değişim denklemleri olarak bilinir.

Spin sistemindeki toplam spin sayısı $N = N_{\alpha} + N_{\beta}$ herhangi bir anda düzeyler arasındaki spin farkı $n = N_{\alpha} - N_{\beta}$ ve $P_{\alpha\beta} = P_{\beta\alpha} = P$ ise, denk. (2.12) yada denk. (2.13) dan elde edilir ve bunun çözümü

$$dn / dt = -2Pn \quad (2.27)$$

$$n = n_0 e^{-2Pt} \quad (2.28)$$

olarak bulunur. Burada n_0 , $t=0$ anında iken düzeyler arasındaki spin farkıdır. Geçiş olasılığı P olan bir tek spinin dış etkenden bu geçiş sırasında soğuracağı enerji, düzeyler arasındaki enerji farkı $\Delta E = E_{\alpha} - E_{\beta}$ ya bağlı olarak $P\Delta E$ dir. $|\alpha\rangle$ düzeyinde N_{α} tane spin olduğuna göre bu düzeydeki spinler $P.\Delta E.N_{\alpha}$ kadar enerji soğurabileceklerdir. Dış etkenden soğrulan enerjinin değişim hızı:

$$dE / dt = \Delta E N_{\alpha} P_{\alpha\beta} - \Delta E N_{\beta} P_{\beta\alpha} \quad (2.29)$$

olacak (2.16) eşitliğini ,(2.15) eşitliğini kullanarak

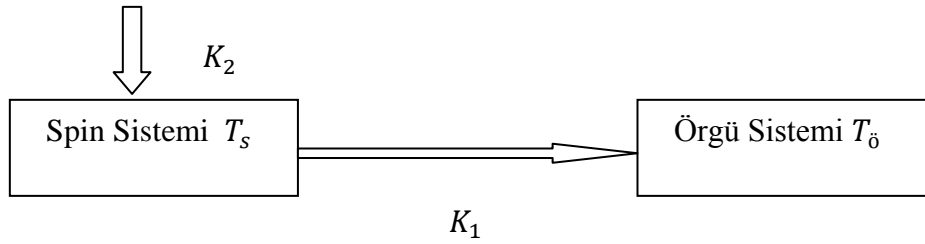
$$dE / dt = \Delta EP n_0 e^{-2Pt} \quad (2.30)$$

şeklinde yazılabilir. Bu eşitlik gösteriyor ki,dış etkende soğrulan enerjinin zamana göre değişimi ,düzeyler arasındaki spin sayısı farkına bağlıdır ve bu bağlılık üstel azalan bir fonksiyon şeklindedir. Yani başlangıçta düzeyler arasında n_0 spin farkı olan yalıtılmış bir spin sisteminde dış etken zamanla bu spin farkını sıfıra götürür. Buna bağlı olarak dış etkenden soğrulan enerji de sıfıra yaklaşır. Belli bir süre sonra spin sistemi dış etkenden enerji soğuramaz duruma gelir, magnetik rezonans durur. Fiziksel olarak örgüden yalıtılmış bir spin

sistemi olamayacağı için magnetic rezonansın durma olasılığı spin- örgü etkileşmesi denen başka bir mekanizma ile ortadan kalkar.

2.2.4. Spin-Örgü Durulma Mekanizması

Yalıtılmış spin sistemi dış etkenden enerji soğurduğu zaman spin sisteminin sıcaklığı başlangıçtaki sıcaklığına göre artar. Yani başlangıçta örgü ile ortak bir T_0 sıcaklığında olan spin sistemi dış etkenden enerji soğurarak yeni bir T_s sıcaklığına ulaşır. Belli bir süre sonra $T_s \gg T_0$ olacağı için düzeyler arasında spin topluluğu farkı sıfıra yaklaşır. Yani magnetic rezonans durur. Şimdi spin sistemi ile örgü arasında bir ısısal etkileşme olduğunu varsayalım bu durumda spin sisteminden örgü sistemine doğru bir ısı akışı doğar. (şekil 2.5.) ve spin sistemi enerji kaybeder. Spin sisteminin kaybettiği (örgü sistemine aktardığı)enerji dış etkenin uyguladığı enerji

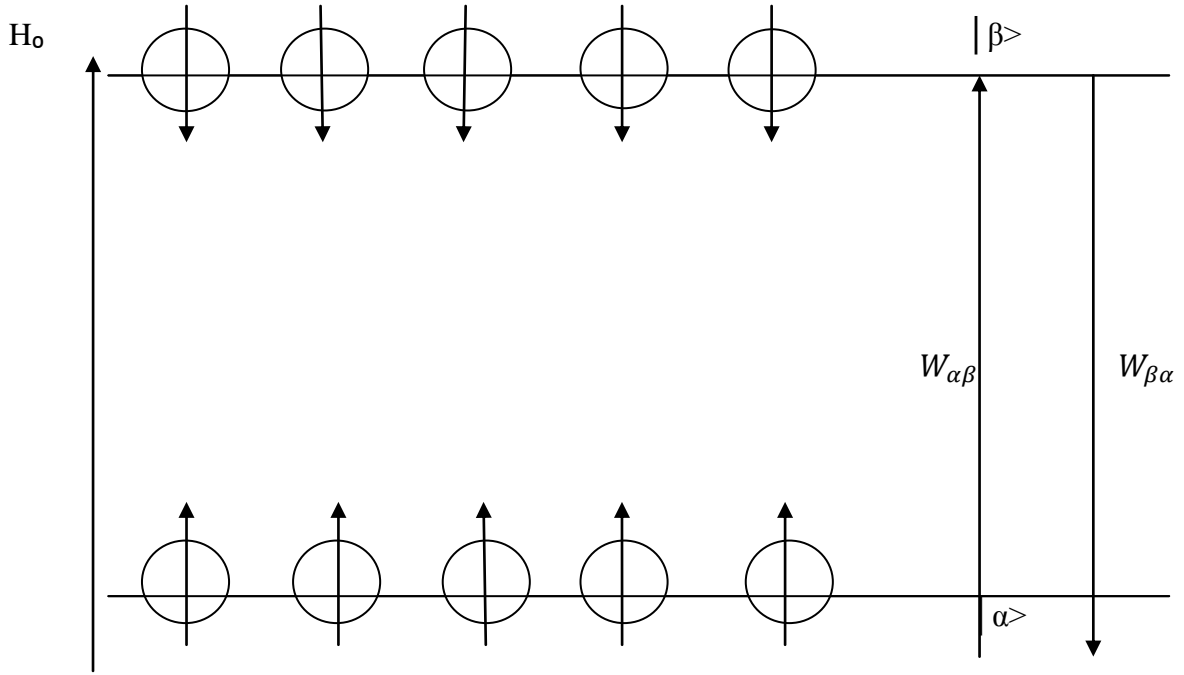


Şekil 2.5. Spin sistemi ile örgü arasındaki ısısal etkileşme

$$dE / dt = K_1 k (T_s - T_0) \quad (2.31)$$

ile belirlenir. Burada k Boltzmann sabit ve $1/sn$ biriminde olan K_1 de ısı akışı sabitidir. K_1 'in $1 / sn$ olması onun $1 / T_1$ şeklinde yazılabileceğini gösterir. Böylece elde edilen T_1 ,spin –örgü durulma zamanı olarak tanımlanır ve spin sistemiyle örgü sistemi arasındaki ısı iletişim olayının bir ölçüsüdür.(2.18) eşitliği uyarınca spin sisteminden örgü sistemine ısı akışı $T_s = T_0$ oluncaya değin sürer ve $T_s = T_0$ olunca toplam system ısısal denge durumuna ulaşır.

Sonuç olarak dış etken uygulanmadığı zaman spin- örgü etkileşmesi ile enerji kaybına uğrayan spin sisteminde yeniden geçişler oluşur (şekil 2.5.)



Şekil 2.6. Spin-örgü etkileşmesi ile yeniden oluşan geçişler.

$|\alpha\rangle$ düzeyinde $|\beta\rangle$ düzeyine geçiş olasılığı $W_{\alpha\beta}$ ve ters yöndeki de $W_{\beta\alpha}$ ise düzeyler arasındaki spin değişim denklemleri,

$$dN_{\alpha} / dt = N_{\beta} W_{\beta\alpha} - N_{\alpha} W_{\alpha\beta} \quad (2.32)$$

$$dN_{\beta} / dt = N_{\alpha} W_{\alpha\beta} - N_{\beta} W_{\beta\alpha} \quad (2.33)$$

Yazılabilir ve $N = N_{\alpha} + N_{\beta}$, $n = N_{\alpha} - N_{\beta}$ alınarak yeniden yazılır. Burada

$$dn / dt = (W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha}) [N(W_{\beta\alpha} - W_{\alpha\beta}) / (W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha}) - n]$$

$$W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha} = 1/T_1$$

$$n_0 = N (W_{\beta\alpha} - W_{\alpha\beta}) / (W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha})$$

tanımları yapılırsa:

$$dn / dt = (n_0 - n) / T_1 \quad (2.34)$$

ve buradan da

$$n = n_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad (2.35)$$

bulunur. Burada n_0 , ısısal denge durumunda düzeyler arasındaki spin farkıdır. T_1 zaman birimindedir ve toplam sistemin denge durumuna yaklaşması için geçen süredir. O halde magnetik rezonansın gerçekleşmesinde önemli rol oynayan düzeyler arasındaki spin topluluğu farkı (2.14) ve (2.21) eşitliklerinin toplamları şeklinde olmalıdır:

$$dn / dt = - 2pn + (n_0 - n) / T_1 \quad (2.36)$$

Kararlı duruma ulaşıldığında $dn / dt = 0$ olacağından düzeyler arasındaki spin farkı:

$$n = n_0 / (1 + 2PT_1) \quad (2.37)$$

ve soğurulan enerji değişimi de

$$dE / dt = \Delta E n_0 P / (1 + 2P T_1) \quad (2.38)$$

olacaktır. Bu son bağıntı $2PT_1$ 'in alacağı değere göre farklı sonuçlar doğurur.

1. $2PT_1 \ll 1$ olsun. Bu durumda denklem (2.37) dan $n \cong n_0$ ve denklem (2.38) den; $dE / dt \cong \Delta E n_0 P$ olur.
2. $2PT_1 \gg 1$ olsun. Bu durumda da $n \cong n_0 / 2PT_1$ ve $dE / dt \cong \Delta E n_0 / 2T_1$ olur. Dış etkenden uygulanan enerji ne denli artarsa artsın spin sisteminin soğurduğu enerji artmaz, sabit kalır. Bu duruma magnetik rezonansa doyma durumu denir.

Doyma durumu başka bir şekilde de incelenebilir. Şekil 1.5'de görüldüğü gibi dış etkenden spin sistemine uygulanan enerji hızı K_2 olsun. K_1 ' i de spin sisteminden örgü sistemine aktarılan enerji hızı olarak tanımlanmıştı. $K_2 \ll K_1 = 1 / T_1$ olduğu sürece spin sistemi enerji fazlalığını kolay bir şekilde örgüye aktarabilir. Bunun sonucu olarak $T_s \cong T_\delta$ için düzeyler arasında $n \neq 0$ olacak biçimde bir spin topluluğu farkı oluşur. Öte yandan $K_2 = K_1 = 1 / T_1$ ise spin sistemi enerji fazlalığını örgüye etkin bir şekilde aktaramaz. Bunun sonucu olarak spin sisteminin sıcaklığı başlangıçtaki sıcaklığına göre artar. ($T_s > T_\delta$) ve düzeyler arasındaki spin topluluğu doyma durumuna gelir. Çok kısa T_1 spin-örgü durulma zamanına sahip olan sistemlerde doyma durumu çabucak gerçekleşir.

T_1 spin-örgü durulma zamanı başka bir yaklaşımla da tanımlanabilir. Magnetik rezonansa spin sistemi aynı anda hem dıştan uygulanan kuvvetli bir H_0 magnetik alanı ve

hem de dış etken olarak tanımladığımız H_0 'a dik düzlem de sistemin doğal frekansına eşit bir frekansta titreşim hareketi yapan \vec{H}_1 alanı etkisinde kalır. Spin sistemi belirli bir süre sonra H_0 etrafında bir presesyon hareketi yapar. Eğer H_1 alanı magnetik sistem üzerinden kaldırılırsa magnetik momentler H_0 doğrultusuna yaklaşarak presesyon hareketini sürdürürler ve belirli süre sonra tamamen H_0 doğrultusunu alırlar. İşte bu süreye spin-örgü durulma ya da boyuna durulma adı verilir.

2.3. Kimyasal Değiş - Tokuş

Bir spin i 'nci fazda ise durulma süreciyle ilintisi Q miktarları

$$dQ/dt = -Q/T_1 \quad (2.39)$$

hızında bozunur. $t = 0$ ' da, $Q = Q_0$ ' dır. O zaman problem

$$Q(t) = Q_0 e^{-\int_0^t dt/T(t)} \quad (2.40)$$

'nin ortalama değeri olan $\bar{Q}(t)$ ' yi bulmaktır. Burada $T(t)$; sistem fazdan faza atlarken T_i değerlerini alan gelişigüzel bir değişkendir. Durulma süreci,

$$I(t) = e^{-\int_0^t dt/T(t)} \quad (2.41)$$

İntegralinin ortalama değeriyle tamamıyla tanımlanır. Kubonun yöntemi, $I(t)$ ' nin $I(t)$ ortalama değerini bulmak için çok uygundur. $I_{ij}(t)$, başlangıçta i ' nci fazda ve t zamanında olan j ' nci fazda bulunması için koşula bağlı olarak $I(t)$ ' nin ortalama değeri olsun. P_i , sistemin i ' nci fazda bulunması için olasılık olduğundan ve tüm final fazlar mümkün olduğundan

$$\bar{I}(t) = \sum_{i,j} I_{i,j}(t) \cdot P_i \quad (2.42)$$

bulunur. $I_{ij}(t)$ ' ler Chapman-Kolmogoroff denklemlerine benzer denklemleri, yani

$$dI_{ij}(t)/dt = \sum_{i,j} I_{i,j}(t) \cdot F_{ij} \quad (2.43)$$

' yi sağlar. Burada;

$$F_{\ell j} = \delta_{\ell j} (C_\ell + 1/T_\ell) - C_\ell P_{\ell j} \quad (2.44)$$

$$= D_{\ell j} + \delta_{\ell j} / T_{\ell} = D_{\ell j} + E_{\ell j}$$

'dir. Matris notasyonunda $D = [D_{ij}]$, $E = [E_{ij}]$, $F = [F_{ij}]$ olmak üzere

$$F = D + E \text{ dir. } I = [I_{ij}(t)] \text{ yazılırsa Denk. (2.42)}$$

$$dI / dt = - IF \quad (2.45)$$

şeklinde yazılabilir.

$$\phi_0 = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ \vdots \\ 1 \end{bmatrix} \text{ ve } \phi_0 = [P_1, P_2, \dots, P_n] \quad (2.46)$$

yazılırsa, $\overline{I(t)}$ ortalama değeri basit olarak:

$$\overline{I(t)} = \tilde{\phi}_0 I_{\phi_0} = \tilde{\phi}_0 e - (D + E) t_{\phi_0} \quad (2.47)$$

şeklinde ifade edilir. Dolayısıyla;

$$\overline{Q(t)} = Q_0 \overline{I(t)} \quad (2.48)$$

'dir. $(\phi_0, \tilde{\phi}_0)$ notasyonu, $(\phi_0, \tilde{\phi}_0)$ ' nin, D ' nin eşlenik öz vektörlerinin bir çiftini oluşturduğunu belirtmek için kullanılır. Gerçekte:

$$D_{\phi_0} = 0 \text{ ve } \tilde{\phi}_0 D = 0 \quad (2.49)$$

olduğu gösterilebilir.

Çok hızlı ve çok yavaş Değiş-Tokuş için asimptotik ifadeler:

2.3.1.Çok Yavaş Değiş-Tokuş

Bu durum için durulma görelisi olarak hızlıdır. ℓ ' nci faz için ömrün tersi olan C_{ℓ} ' nin $1/T_{\ell}$ ' ya göre çok büyük olduğu kabul edilir. $C_{\ell} \ll 1/T_{\ell}$ için

$$F_{k\ell} \approx E_{k\ell} = \delta_{k\ell} / T_{\ell} \quad (2.50)$$

'dir. Ve:

$$\bar{I}(t) \approx \tilde{\phi} \begin{bmatrix} e^{-t/T_1} & & & \\ & e^{-t/T_2} & & \\ & & \ddots & \\ & & & e^{-t/T_n} \end{bmatrix} \phi_0 \quad (2.51)$$

'dir. Dolayısıyla:

$$\bar{I}(t) = \sum_{i=1}^n P_i e^{-t/T_i} \quad (2.52)$$

'dir. Denklem (2.38) çok yavaş değiş-tokuş için durulmanın her bir fazda ayrı ayrı yer alan etkilerin ağırlıklı ortalaması olduğunu gösterir.

2.3.2. Çok Hızlı Değiş-Tokuş

Bu durum için ℓ ' nci fazın ömrünün tersi olan C_ℓ ve T_ℓ ' e göre çok büyüktür. Yani, $C_\ell \gg T_\ell$ 'dir. İlk olarak bu değiş-tokuş hız limiti için $D \gg E$ olduğunu, dolayısıyla:

$$\bar{I}(t) \approx \tilde{\phi}_0 e^{-Dt \phi_0} = 1 \quad (2.53)$$

İhmal edilir. Bu istenilen sonuç değildir. Doğru bir limitleme sonucu elde etmek amacıyla e^{-Pt} için bir yaklaşıklık hesaplamada, birinci basamaktan tedirginme teorisi kullanılır. Kullanılan tedirginme teorisi atomik fizikte kullanılan bir genellemedir.

$(\phi_k, \tilde{\phi}_k)$, D' nin normalize edilmiş öz vektörleri:

$$D_{\phi_k} = \lambda_k \phi_k, \quad \tilde{\phi}_k D = \lambda_k \tilde{\phi}_k \quad k = 0, 1, 2, 3, \dots, n-1 \quad (2.54)$$

'dir. Ve $\tilde{\phi}_k \phi_\ell = \delta_{k\ell}$ 'dir. Ayrıca $(\psi_k, \tilde{\psi}_k)$, $F = D + E$ ' nin yaklaşık öz vektörleri ve μ_k , F' nin yaklaşık özdeğerleri olsunlar. O zaman ,

$$F \psi_k = \mu_k \psi_k, \quad k = 0, 1, 2, \dots, n-1 \quad (2.55)$$

Olur. Birinci basamaktan tedirginme işlemi:

$$\psi_k = \phi_k + \sum_{\ell \neq k} \phi_\ell \tilde{\phi}_\ell E_{\phi_k} / (\lambda_k - \lambda_\ell) \quad (2.56)$$

ve

$$\mu_k = \lambda_k + \tilde{\phi} E_\phi$$

'yı verir. F' yi köşegenleştiren S matrisi:

$$S = [\psi_0, \psi_1, \dots, \psi_{n-1}] \quad (2.57)$$

İle verilir. Çok hızlı değiş-tokuş için birinci yaklaşıktta $(\lambda_k, \lambda_\ell)$ ' ya olan tüm düzeltmeler $\lambda_0 = 0$ olan için hariç olmak üzere ihmal edilebilir. Böylece

$$\psi_k \approx \phi_k, \quad k = 0, 1, 2, \dots, n-1$$

$$\mu_0 = \tilde{\phi}_k E \phi_0 = \sum_{i=1}^n P_i / T_i \quad (2.58)$$

Ve

$$\mu_k = \lambda_k \text{ dir. (2.45) denklemleri}$$

$$\bar{I}(t) = \tilde{\phi}_0 S \begin{bmatrix} e^{-\mu_0 t} & & & & \\ & e^{-\mu_1 t} & & & \\ & & \cdot & & \\ & & & \cdot & \\ & & & & \cdot \\ & & & & & e^{-\mu_{n-1} t} \end{bmatrix} s - 1_{\phi_0}$$

ifadesinde yerine yazılırsa, sonuç:

$$I(t) = \tilde{\phi}_0 [\phi_0, \phi_1, \dots, \phi_{n-1}] \begin{bmatrix} e^{-\mu_0 t} & & & & \\ & e^{-\lambda_1 t} & & & \\ & & \cdot & & \\ & & & \cdot & \\ & & & & \cdot \\ & & & & & e^{-\lambda_{n-1} t} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \phi_0 \\ \phi_1 \\ \vdots \\ \vdots \\ \vdots \\ \phi_n \end{bmatrix} \phi_0$$

$$= [1,0,0, \dots, \dots, 0] \begin{bmatrix} e^{-\mu_0 t} & & & & & & \\ & e^{-\lambda_1 t} & & & & & \\ & & \ddots & & & & \\ & & & \ddots & & & \\ & & & & \ddots & & \\ & & & & & \ddots & \\ & & & & & & e^{-\lambda_{n-1} t} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ \vdots \\ \vdots \\ \vdots \\ 0 \end{bmatrix}$$

$$\bar{I}(t) = e^{-\mu_0 t} = e - (\sum_{i=1}^n P_i / T_i) t \quad (2.59)$$

olur. Denklem (2.46) çok hızlı değiş-tokuş için durulmanın tersi, çeşitli durulma zamanlarının terslerinin ağırlıklı ortalaması olan tek bir durulma zamanı ile tanımlanabilir. Yani,

$$(1 / T)_{Q\phi} = \sum_{i=1}^n P_i / T_i \quad (2.60)$$

dir.

2.3.3. İki Faz Sistemleri İçin Durulma Zamanının Stokastik Teorisi:

Chapman-Kolmogoroff denklemi olan $dP / dt = -PD$, iki fazlı bir için

özellikle basittir. $P_{12} = 1$ olduğundan

$$D = \begin{bmatrix} C_1 & -C_1 \\ -C_2 & C_2 \end{bmatrix} \quad (2.61)$$

$D^2 = (C_1 + C_2) D$ dir. Dolayısıyla

$$P(t) = e^{-Dt} = 1 - e^{-(\lambda t + 1)D} / \lambda \quad (2.62)$$

'dir. Burada $\lambda = C_1 - C_2$ ' dir. Denklem (2.49)'ün açık sonucu:

$$P_{11}(t) = P_1 + P_2 e^{-\lambda t}$$

$$P_{12}(t) = P_2 + P_2 e^{-\lambda t} \quad (2.63)$$

$$P_{21}(t) = P_1 + P_1 e^{-\lambda t}$$

$$P_{22}(t) = P_2 + P_1 e^{-\lambda t}$$

ile ifade edilir. ($\lambda = C_1 + C_2$). F matrisi,

$$F = \begin{bmatrix} C_1 + 1/T_1 & -C_1 \\ -C_2 & C_2 + 1/T_2 \end{bmatrix} \quad (2.64)$$

ile verilir. F'nin (μ_1, μ_2) özdeğerleri, $\det |F - \mu I| = 0$ 'ın çözümleridir.

Bu çözümler:

$$2\mu_1 = (C_1 + C_2 + 1/T_1 + 1/T_2) - \{(C_2 - C_1 - 1/T_2 - 1/T_1)^2 + 4C_1C_2\}^{1/2}$$

ve (2.65)

$$2\mu_2 = (C_1 + C_2 + 1/T_1 + 1/T_2) + \{(C_2 - C_1 - 1/T_2 - 1/T_1)^2 + 4C_1C_2\}^{1/2}$$

ile verilir.

$$e^{-Ft} = g_0(t)I + g_1(t)F \quad (2.66)$$

olduğu gösterilebilir. Burada;

$$g_0(t) = \frac{\mu_2 e^{-\mu_1 t} - \mu_1 e^{-\mu_2 t}}{\mu_2 - \mu_1} \quad (2.67)$$

$$g_1(t) = \frac{e^{-\mu_2 t} - e^{-\mu_1 t}}{\mu_2 - \mu_1}$$

dir. Böylece;

$$\bar{I}(t) = \tilde{\phi}_0 e^{-Ft \phi_0}$$

veya (2.68)

$$\bar{I}(t) = a_1 e^{-\mu_1 t} - a_2 e^{-\mu_2 t}$$

dir. Burada;

$$a_1 = \frac{1}{\mu_2 - \mu_1} (\mu_2 - 1 / T_{\phi_0})$$

$$a_2 = \frac{1}{\mu_2 - \mu_1} (\mu_1 - 1 / T_{\phi_0}) \quad (2.69)$$

ve

$$(1 / T_{\phi_0}) = P_1 / T_1 + P_2 / T_2 \quad (2.70)$$

dir.

2.3.4. İki-Faz Sistemlerinde Yavaş ve Hızlı Değiş-Tokuş İçin Asimptotik İfadeler:

İki-faz sistemleri için denklem (2.55) ile tanımlanan sonuçların, çok yavaş ve çok hızlı değiş-tokuş için önceden bulunan çok fazlı durumlara nasıl indirgendüğünü açık olarak gözlemek ilginçtir.

Çok yavaş değiş-tokuş için $C_k \ll 1 / T_k$ dir. Dolayısıyla

$$\mu_1 \approx 1 / T_1$$

$$\mu_2 \approx 1 / T_2$$

$$a_1 \approx 1 / \mu_2 - \mu_1 (\mu_2 - \mu_1 P_1 - \mu_2 P_2) = P_1$$

ve

$$a_2 = -P_2$$

'dir. Fakat

$$\bar{I}(t) = P_1 e^{-t/T_1} + P_2 e^{-t/T_2} \quad (2.71)$$

'dir. Çok hızlı değiş-tokuş için $C_k \gg 1 / T_k$ 'dir ve

$$2\mu \approx (C_1 + C_2 + 1 / T_1 + 1 / T_2) \pm$$

$$\{(C_1 + C_2)^2 - 2(C_2 - C_1)(1/T_2 - 1/T_1)\}^{1/2} \quad (2.72)$$

'dir. Son ifade binom teoremine göre açılırsa

$$\mu_2 \approx \lambda = C_1 + C_2$$

ve (2.73)

$$\mu_1 \approx (1/T)\phi_0$$

bulunur. Denklem (2.69)' dan

$$a_1 \approx \frac{1}{\mu_2 - \mu_1} (\mu_2 - \mu_1) = 1$$

$$a_2 \approx \frac{1}{\mu_2 - \mu_1} (\mu_2 - \mu_1) = 0 \quad (2.74)$$

bulunur. Böylece

$$1/T\phi_0 = P_1/T_1 + P_2/T_2 \quad (2.75)$$

olmak üzere

$$\bar{I}(t) = e^{-t/T\phi_0} \quad (2.76)$$

bulunur. Denklem (2.71) ve denklem (2.76) ile ifade edilen özel iki faz sonuçları denklem (2.51) ve denklem (2.60)' un genel sonuçlarıyla tamamen uyuşur .

3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada kullanılan proteinler, enzimler ve deuterium oxide (D₂O) çözücüsü Sigma' dan satın alındı. Bozulmayı önlemek için, bu materyaller ölçme anları dışında buzdolabında tutuldu.

3.1.Sucrose İçeren Çözeltilerin Hazırlanması

1ml pure D₂O çözücüsüne, 0.1g, 0.2g, 0.3g, 0.4g, 0.5g miktarlarında tartılan sucrose enzimi eklenerek değişik konsantrasyonlarda enzim çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler, T₁ (spin-örgü) ve T₂ (spin-spin) durulma zamanlarının ölçümünde kullanıldı.

3.2.Pepsin İçeren Çözeltilerin Hazırlanması

1ml pure D₂O çözücüsüne, 0.02g, 0.04g, 0.06g, 0.08g, 0.10g miktarlarında tartılan pepsin enzimi eklenerek değişik konsantrasyonlarda enzim çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler, T₁ (spin-örgü) ve T₂ (spin-spin) durulma zamanlarının ölçümünde kullanıldı.

3.3.Maltose İçeren Çözeltilerin Hazırlanması

1ml pure D₂O çözücüsüne, 0.1g, 0.2g, 0.3g, 0.4g, 0.5g miktarlarında tartılan maltose enzimi eklenerek değişik konsantrasyonlarda enzim çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler, T₁ (spin-örgü) ve T₂ (spin-spin) durulma zamanlarının ölçümünde kullanıldı.

3.4. BSA İçeren Çözeltilerin Hazırlanması

1ml pure D₂O çözücüsüne, 0.1g, 0.2g, 0.3g, 0.4g, 0.5g miktarlarında tartılan BSA proteini eklenerek değişik konsantrasyonlarda protein çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler, T₁ (spin-örgü) ve T₂ (spin-spin) durulma zamanlarının ölçümünde kullanıldı.

3.5. NMR Durulma Zamanlarının Ölçülmesi

3.5.1. Spin-Örgü Durulma Zamanlarının (T₁) Ölçülmesi

1ml saf D₂O çözücüsü ortamında, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler 5mm çaplı NMR tüplerine konulmuştur. Çözeltilerin T₁ durulma zamanları 400 MHz AVANCE BRUKER NMR spektrometresiyle yapılmıştır. FID (Free Induction Decay) setleri ve T₁ durulma zamanları, IR (Inversion Recovery) tekniği kullanılarak ve (180-Vd-90-5T₁) puls adımlarıyla elde edilmiştir.

3.5.2. Spin-Spin Durulma Zamanlarının (T_2) Ölçülmesi

1ml saf D₂O çözücüsü ortamında, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler 5mm çaplı NMR tüplerine konulmuştur. Çözeltilerin T₂ durulma zamanları 400 MHz AVANCE BRUKER NMR spektrometresiyle yapılmıştır. SE (Spin-Echo) setleri ve T₂ durulma zamanları CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) puls tekniği ile elde edilmiştir.

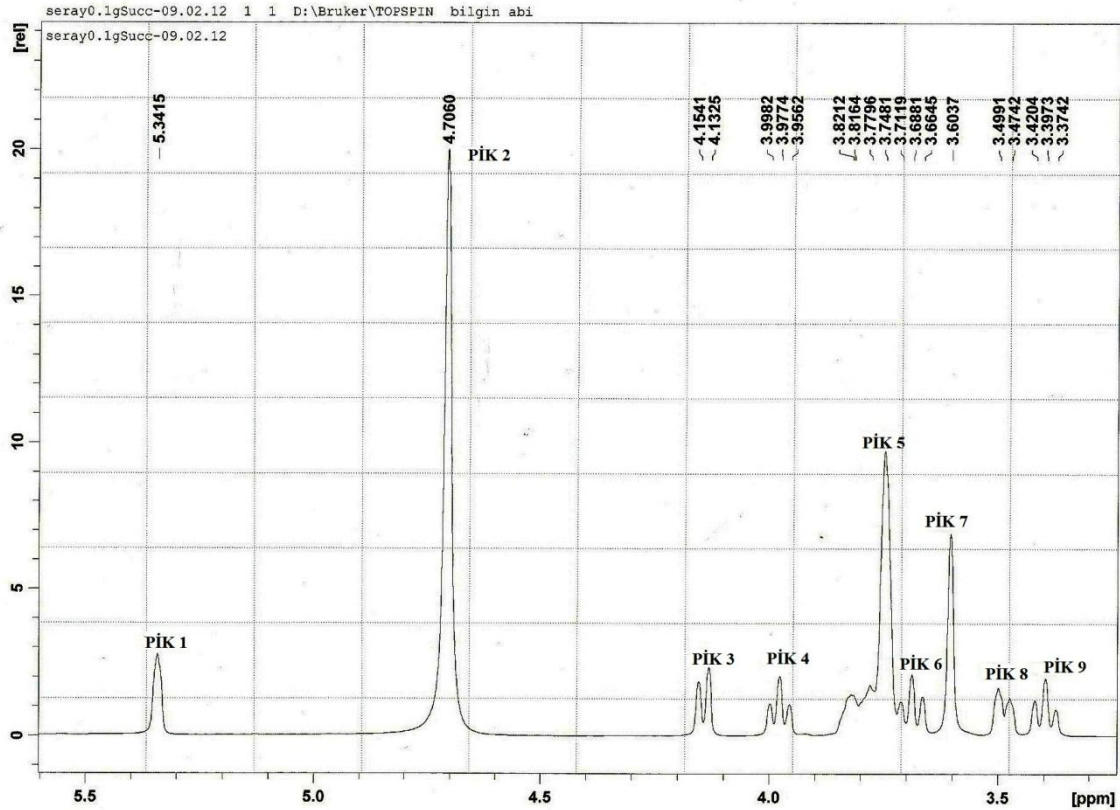
3.6. T₁ Ve T₂ Durulma Zamanlarının Sıcaklığa Bağlı Ölçülmesi

Bütün çözeltilerin rölaksasyon zamanları 298 K için ölçüldü. Bu sıcaklık değeri Bruker 400MHz NMR spektrometresinin otomatik sıcaklık kontrol sistemi ile sağlandı..

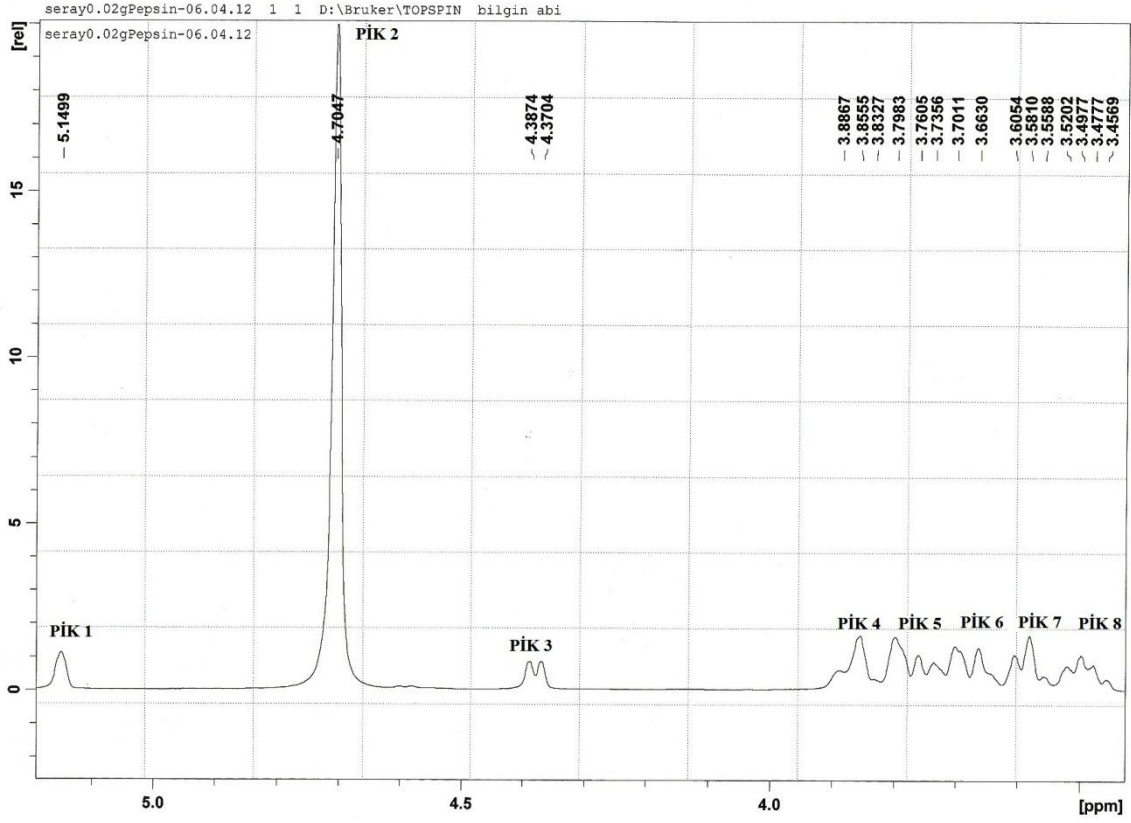
3.7.Çözeltilerden Elde Edilen Pikler

Sucrose , pepsin, maltose, BSA çözeltilerinden elde edilen pikler sırası ile şekil 3.1.a.- 3.1.d.'de verilmiştir.

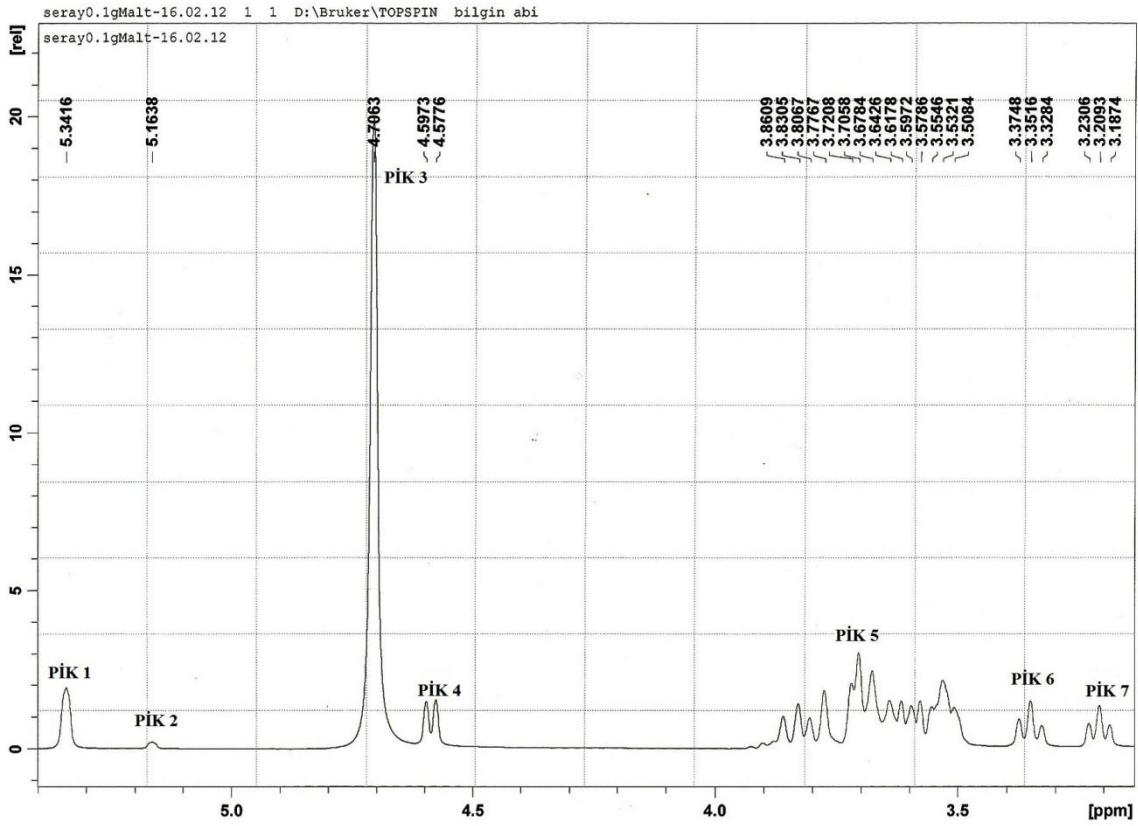
Bu maddelerin piklerini kimliklendirmek olanaklı olmadı. Kimliklendirmeyi daha sonraki çalışmalara bırakarak; her bir maddenin piklerini, azalan kimyasal kayma değerlerine göre numaraladık.



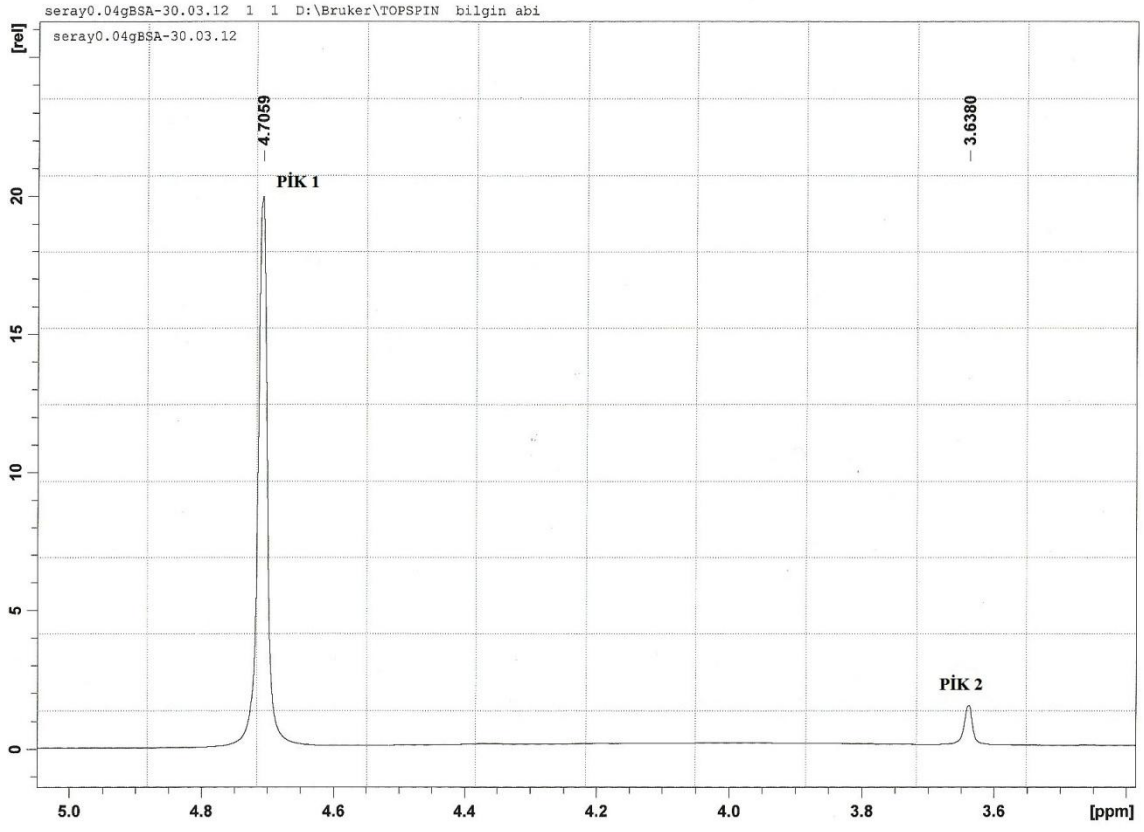
Şekil 3.1.a. Sucrose çözeltilisinden elde edilen pikler.



Şekil 3.1.b. Pepsin çözeltisinden elde edilen pikler.



Şekil 3.1.c. Maltose çözeltisinden elde edilen pikler.



Şekil 3.1.d. BSA çözeltisinden elde edilen pikler.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

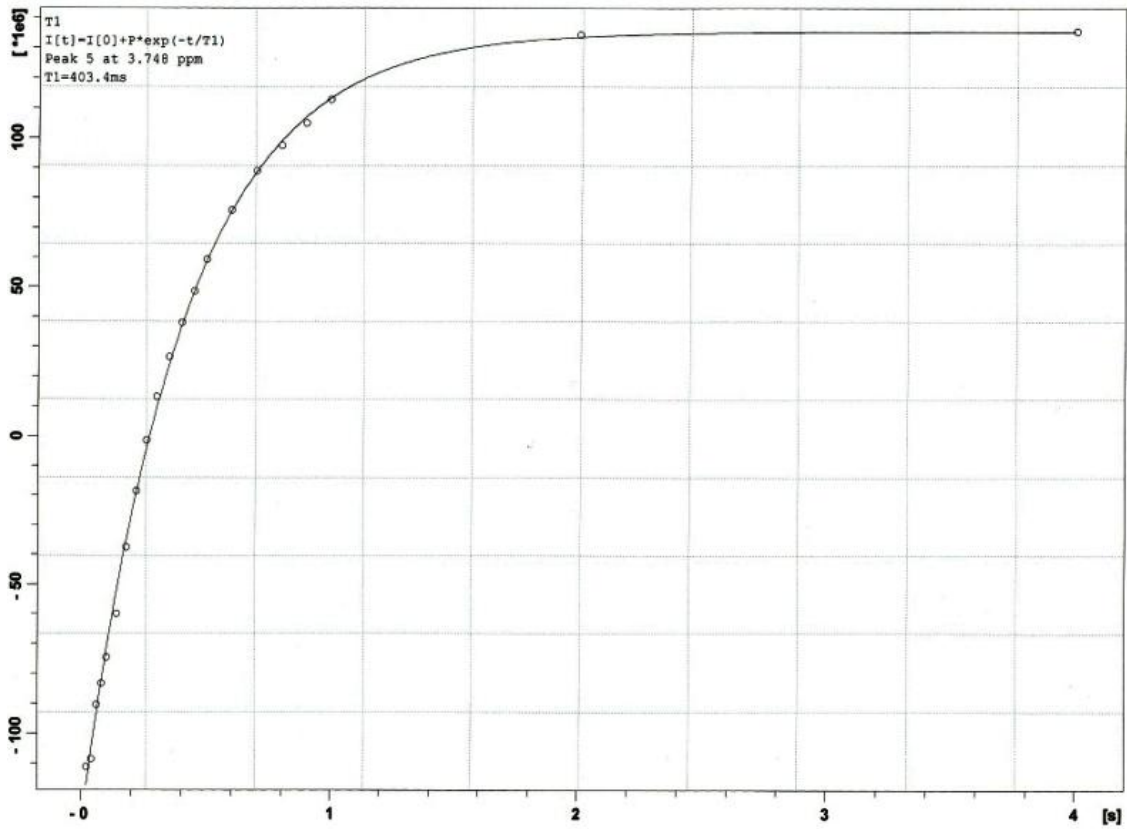
4.1. Elde Edilen Piklerden Bazılarının Sunumu

Sucrose çözeltisinin 5. pikine ait IR ve SE eğrileri temsilen şekil 4.1.a. ve şekil 4.1.b. de verilmiştir.

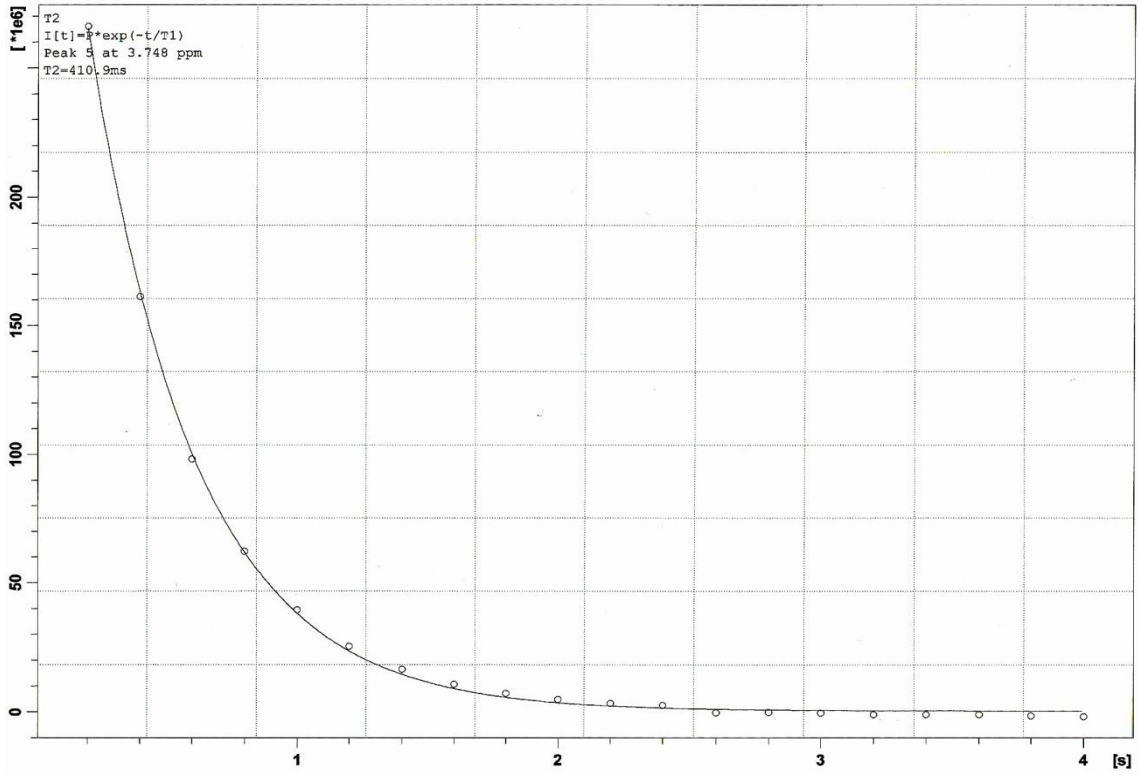
Pepsin çözeltisinin 1. pikine ait IR ve SE eğrileri temsilen şekil 4.2.a ve şekil 4.2.b. de verilmiştir.

Maltose çözeltisinin 5. pikine ait IR ve SE eğrileri temsilen şekil 4.3.a ve şekil 4.3.b. de verilmiştir.

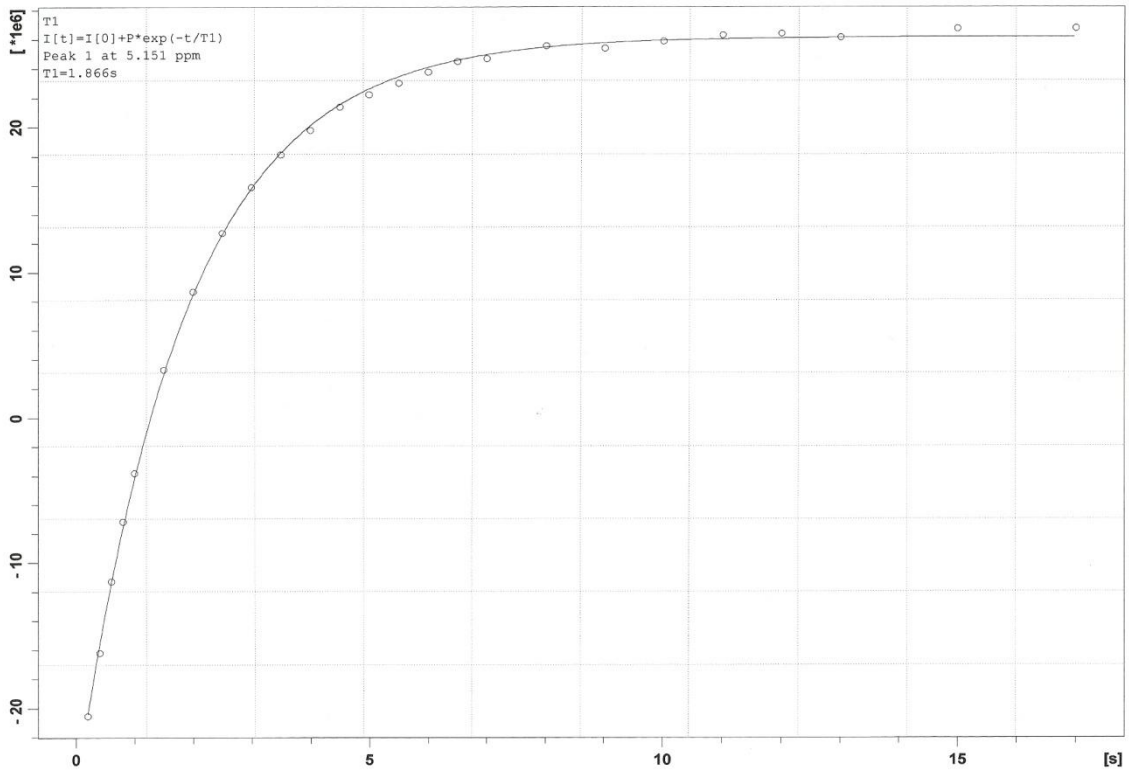
BSA çözeltisinin 1. pikine ait IR ve SE eğrileri temsilen şekil 4.4.a ve şekil 4.4.b. de verilmiştir.



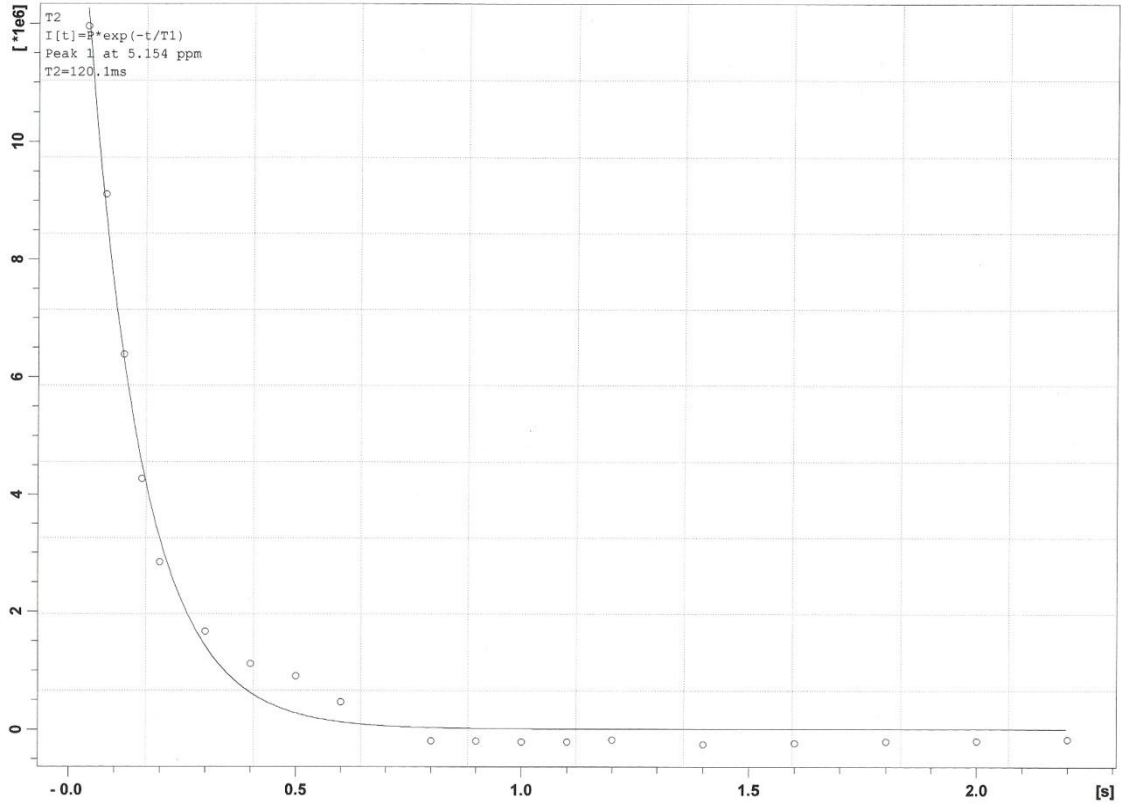
Şekil 4.1.a. Sucrose çözeltisinin 5. pikine ait IR eğrisi (0,1 g/ml)



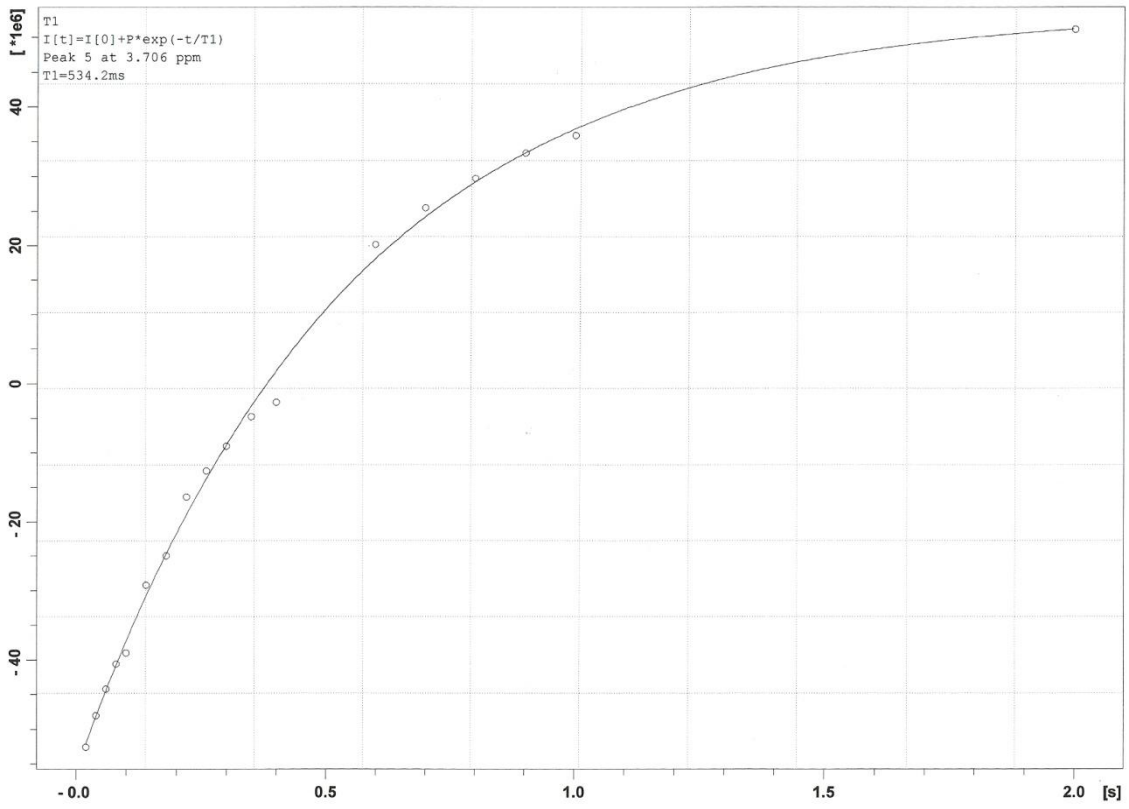
Şekil 4.1.b. Sucrose çözeltisinin 5. pikine ait SE eğrisi (0,1 g/ml)



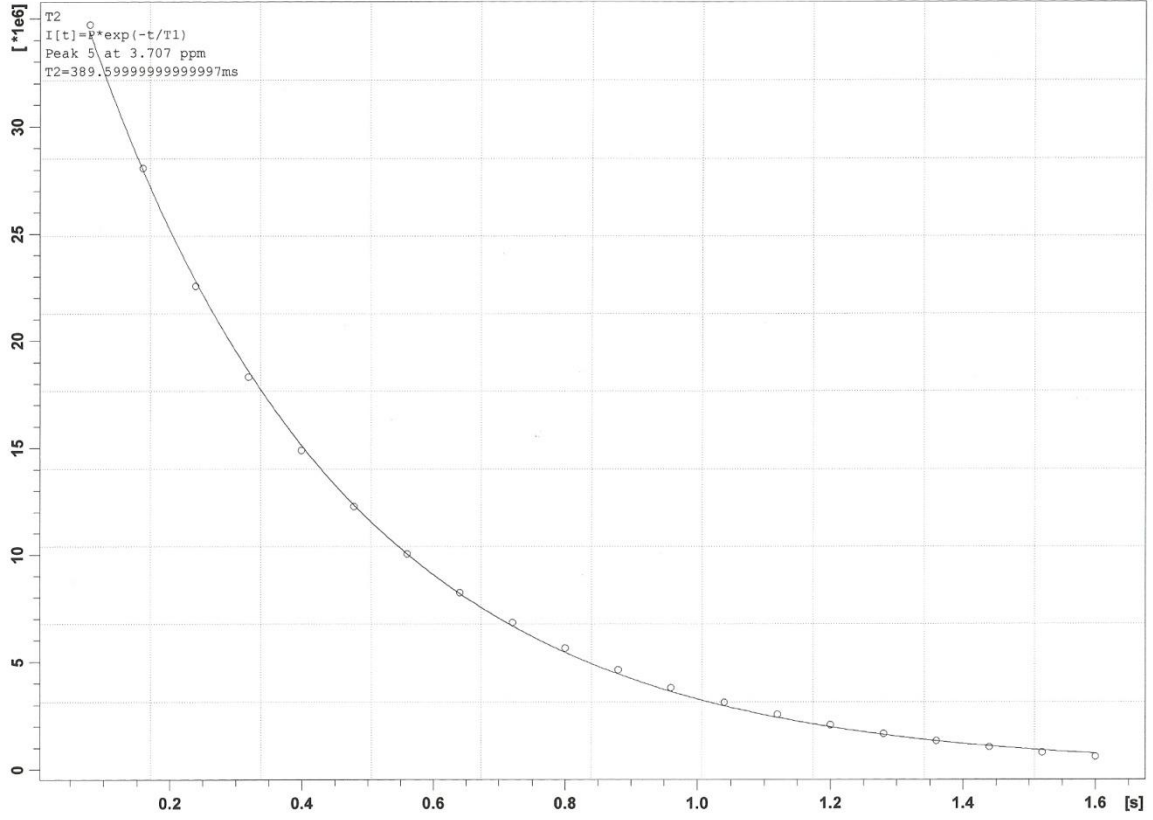
Şekil 4.2.a. Pepsin çözeltisinin 1. pikine ait IR eğrisi (0,02 g/ml)



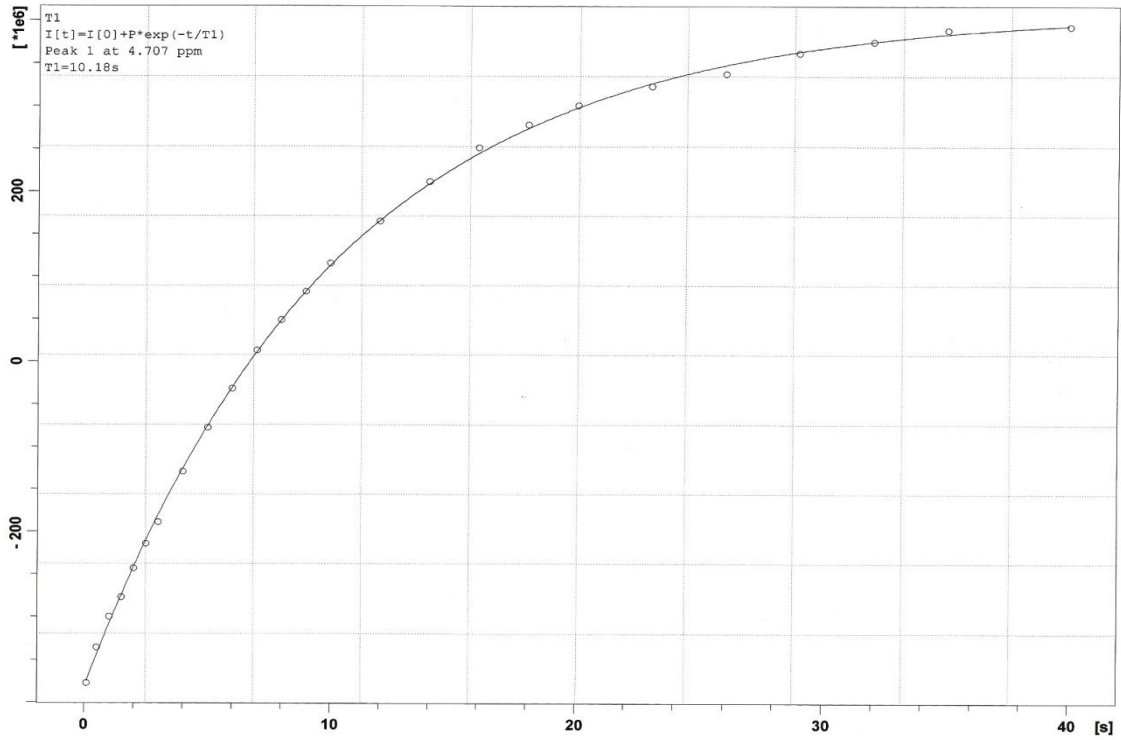
Şekil 4.2.b. Pepsin çözeltisinin 1. pikine ait SE eğrisi (0,02 g/ml)



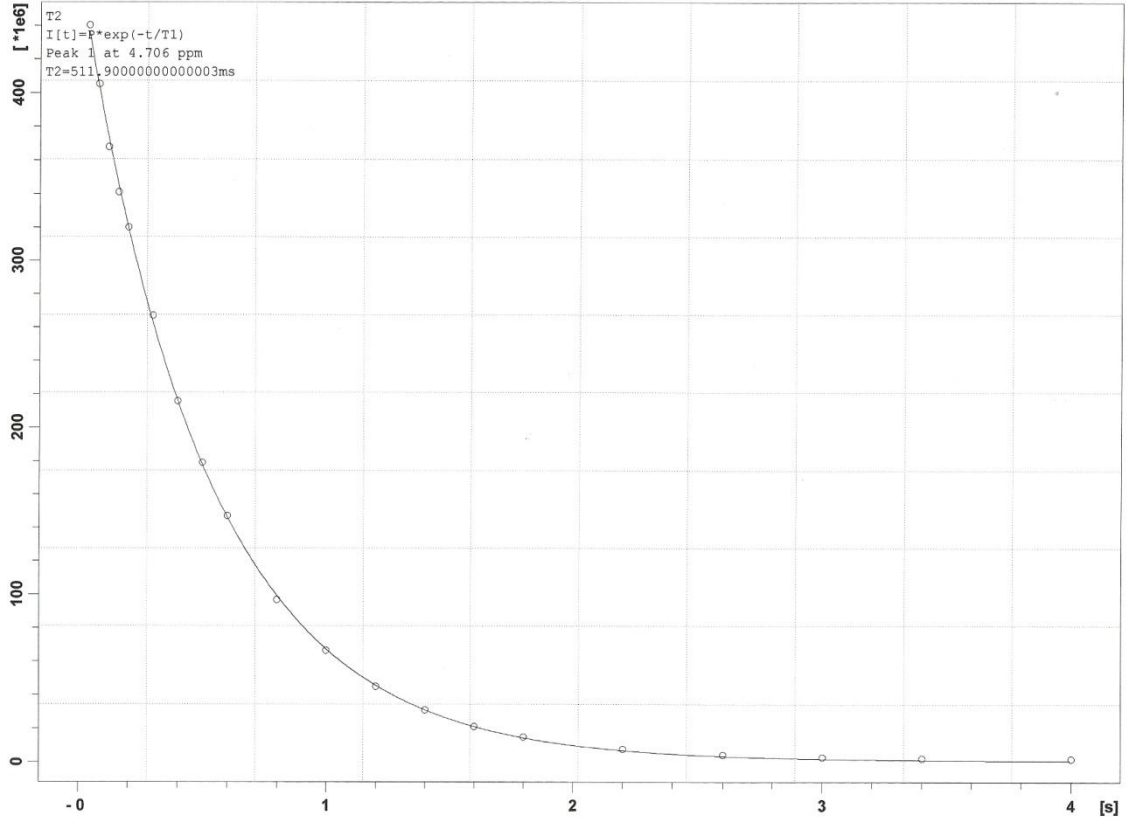
Şekil 4.3.a. Maltose çözeltisinin 5. pikine ait IR eğrisi (0,1 g/ml)



Şekil 4.3.b. Maltose çözeltisinin 5. pikine ait SE eğrisi (0.1 g/ml)



Şekil 4.4.a. BSA çözeltisinin 1. pikine ait IR eğrisi (0,04 g/ml)



Şekil 4.4.b. BSA çözeltisinin 1. pikine ait SE eğrisi (0,04 g/ml)

4.2. Piklerden Elde Edilen T_1 ve T_2 Değerleri

Sucrose özeltisinin T_1 ve T_2 lerin konsantrasyona karşı değişim değerleri izelge 4.1.a. ve 4.1.b. de görölüyor.

Pepsin özeltisinin T_1 ve T_2 lerin konsantrasyona karşı değişim değerleri izelge 4.2.a. ve 4.2.b. de görölüyor.

Maltose özeltisinin T_1 ve T_2 lerin konsantrasyona karşı değişim değerleri izelge 4.3.a. ve 4.3.b. de görölüyor.

BSA özeltisinin T_1 ve T_2 lerin konsantrasyona karşı değişim değerleri izelge 4.4.a. ve 4.4.b de görölüyor.

Çizelge 4.1.a. Sucrose için T1 değerleri (25 °C)

Konsantrasyon (g/ml)	Pik 1 (s)	Pik 2 (s)	Pik 3 (s)	Pik 4 (s)	Pik 5 (s)	Pik 6 (s)	Pik 7 (s)	Pik 8 (s)	Pik 9 (s)
0.1	0.841	8.580	1.410	1.036	0.403	1.678	0.340	1.065	1.261
0.2	0.753	4.856	1.146	0.872	0.361	1.411	0.297	0.944	1.087
0.3	0.757	4.334	1.243	0.950	0.372	1.438	0.319	0.938	1.154
0.4	0.715	2.850	1.060	0.812	0.360	1.593	0.299	0.852	1.181
0.5	0.718	2.312	1.087	0.818	0.383	1.364	0.331	0.896	1.113

Çizelge 4.1.b. Sucrose için T2 değerleri (25 °C)

Konsantrasyon (g/ml)	Pik 1 (s)	Pik 2 (s)	Pik 3 (s)	Pik 4 (s)	Pik 5 (s)	Pik 6 (s)	Pik 7 (s)	Pik 8 (s)	Pik 9 (s)
0.1	1.000s	0.170	1.089	0.941	0.411	0.479	1.000	0.393	0.356
0.2	0.112	0.078	0.758	0.682	0.337	0.428	0.160	0.384	0.331
0.3	0.102	0.043	0.730	0.635	0.298	0.394	0.140	0.346	0.305
0.4	0.218	0.058	0.990	0.656	0.270	0.099	0.099	0.328	0.279
0.5	0.187	0.049	0.843	0.565	0.228	0.079	0.079	0.279	0.233

Çizelge 4.2.a. Pepsin için T1 değerleri (25 °C)

Konsantrasyon (g/ml)	Pik 1 (s)	Pik 2 (s)	Pik 3 (s)	Pik 4 (s)	Pik 5 (s)	Pik 6 (s)	Pik 7 (s)	Pik 8 (s)
0.02	1.866	12.68	0.540	0.964	1.328	0.929	1.746	
0.04	1.886	12.11	0.034	0.510	0.845	0.374	0.924	1.959
0.06	1.804	10.64	0.496	0.804	0.370	0.912	0.002	
0.08	1.738	7.943	0.246	0.474	0.745	0.482	0.876	1.194
0.10	1.696	7.460	0.441	0.708	0.459	0.857	1.116	

Çizelge 4.2.b. Pepsin için T2 değerleri (25 °C)

Konsantrasyon (g/ml)	Pik 1 (s)	Pik 2 (s)	Pik 3 (s)	Pik 4 (s)	Pik 5 (s)	Pik 6 (s)	Pik 7 (s)	Pik 8 (s)
0.02	0.120	0.303	0.642	0.621	0.380	0.548	0.614	
0.04	0.063	0.169	0.941	0.987	0.695	0.383	0.595	0.706
0.06	0.065	0.134	0.919	0.665	0.368	0.570	0.659	
0.08	0.065	0.086	0.800	0.931	0.644	0.361	0.561	0.744
0.10	0.051	0.078	0.871	0.628	0.336	0.541	0.760	

Çizelge 4.3.a. Maltose için T1 değerleri (25 °C)

Konsantrasyon (g/ml)	Pik 1 (s)	Pik 2 (s)	Pik 3 (s)	Pik 4 (s)	Pik 5 (s)	Pik 6 (s)	Pik 7 (s)
0.1	0.804	2.397	10.640	0.952	0.534	1.280	1.956
0.2	0.754	1.667	7.614	0.861	0.460	1.139	1.743
0.3	0.728	1.726	5.918	0.816	0.494	1.062	1.547
0.4	0.700	1.520	4.448	0.797	0.488	1.028	1.440
0.5	0.708	1.281	3.542	0.674	0.470	0.903	1.323 s

Çizelge 4.3.b. Maltose için T2 değerleri (25 °C)

Konsantrasyon (g/ml)	Pik 1 (s)	Pik 2 (s)	Pik 3 (s)	Pik 4 (s)	Pik 5 (s)	Pik 6 (s)	Pik 7 (s)
0.1	0.158	1.000	0.236	0.753	0.390	0.463	0.517
0.2	0.121	1.000	0.106	0.725	0.330	0.379	0.429
0.3	0.106	0.056	0.079	0.627	0.284	0.326	0.370
0.4	0.164	1.000	0.068	0.674	0.276	0.306	0.384
0.5	0.152	1.000	0.042	0.583	0.241	0.278	0.352

Çizelge 4.4.a. BSA için T1 değerleri (25 °C)

Konsantrasyon (g/ml)	Pik 1 (s)	Pik 2 (s)
0.04	10.180	0.745
0.08	6.620	0.710
0.12	5.344	0.693
0.16	4.398	0.725
0.20	2.978	0.735

Çizelge 4.4.b. BSA için T2 değerleri (25 °C)

Konsantrasyon (g/ml)	Pik 1 (s)	Pik 2 (s)
0.04	0.512	0.524
0.08	0.494	0.250
0.12	0.191	0.485
0.16	0.136	0.489
0.20	0.465	0.101

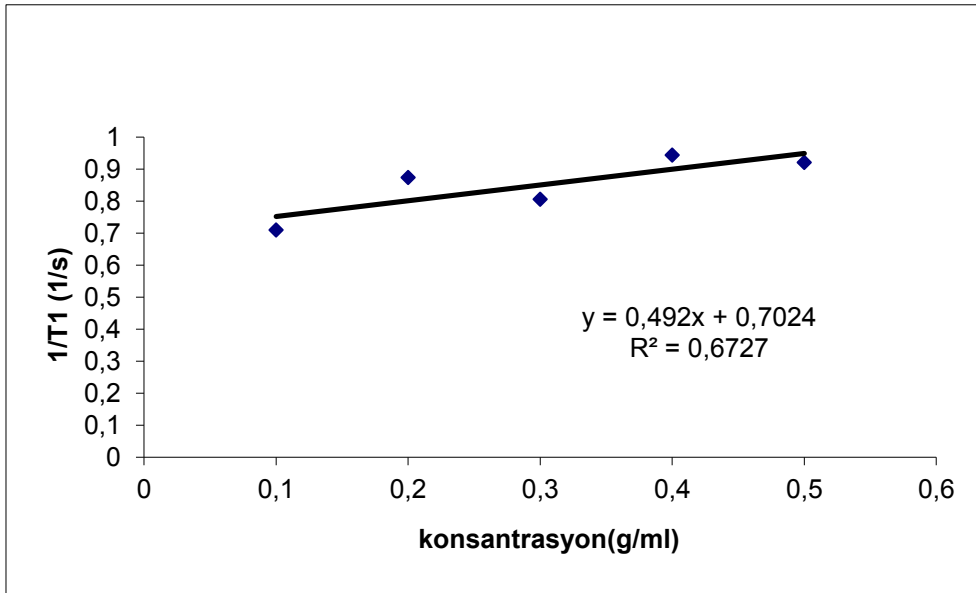
4.3. $1/T_1$ ve $1/T_2$ 'den Elde Edilen Grafikler

Sucrose pikinin $1/T_1$ ve $1/T_2$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti temsilen şekil 4.5.a. ve şekil 4.5.b. da grlyor.

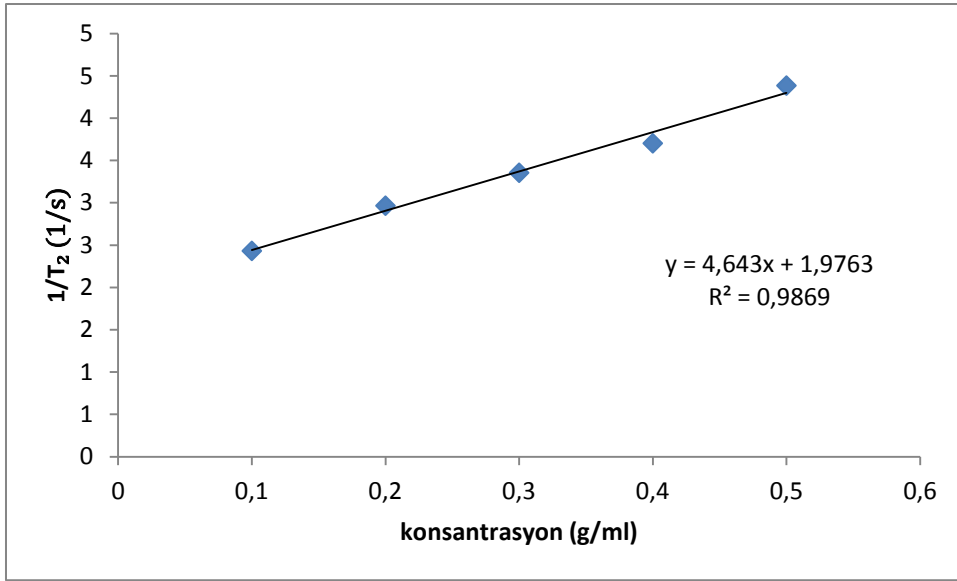
Pepsin pikinin $1/T_1$ ve $1/T_2$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti temsilen şekil 4.6.a. ve şekil 4.6.b. da grlyor.

Maltose pikinin $1/T_1$ ve $1/T_2$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti temsilen şekil 4.7.a. ve şekil 4.7.b. da grlyor.

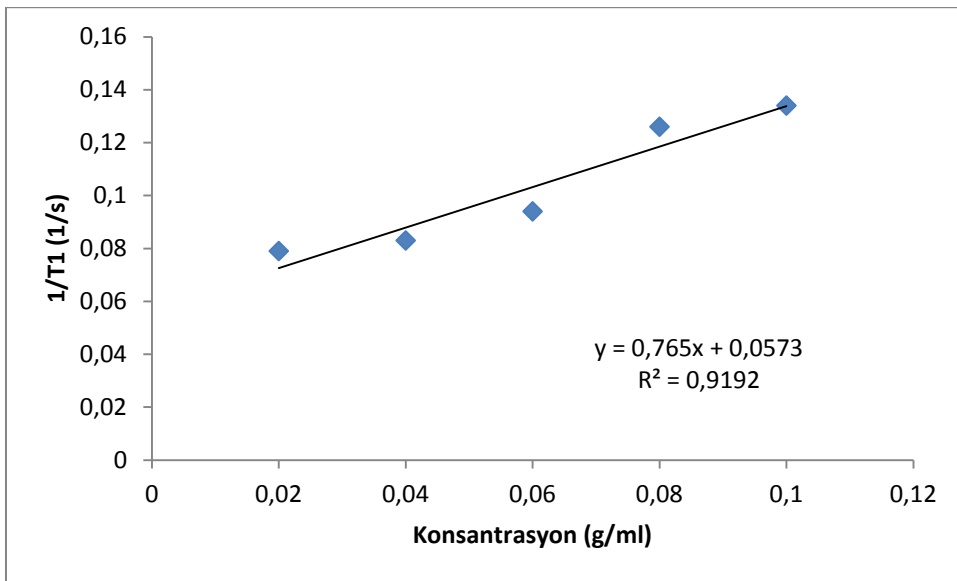
BSA pikinin $1/T_1$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti temsilen şekil 4.8.a da grlyor.



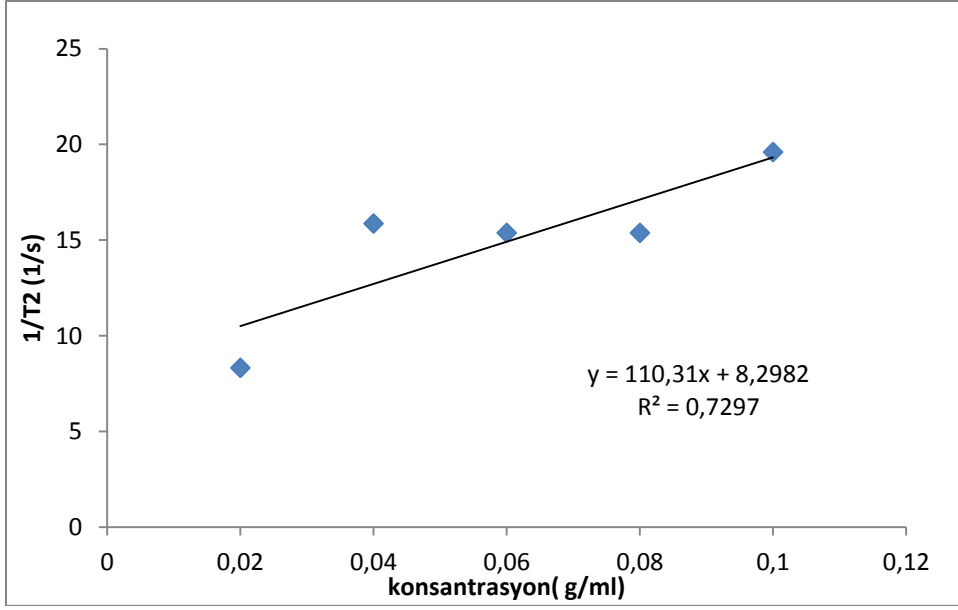
şekil 4.5.a. Sucrose 3. pikinin $1/T_1$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti



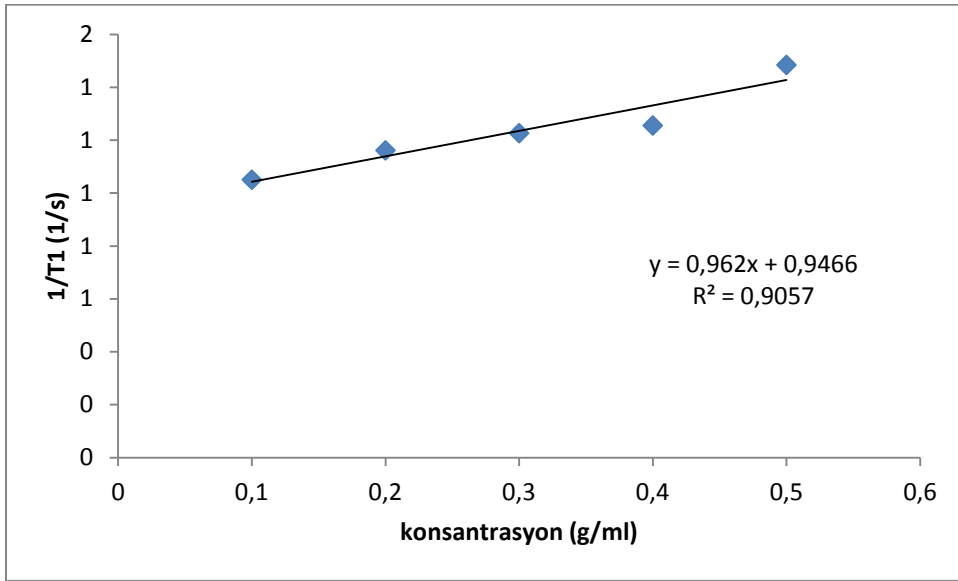
Şekil 4.5.b. Sucrose 5. pikinin $1/T_2$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti



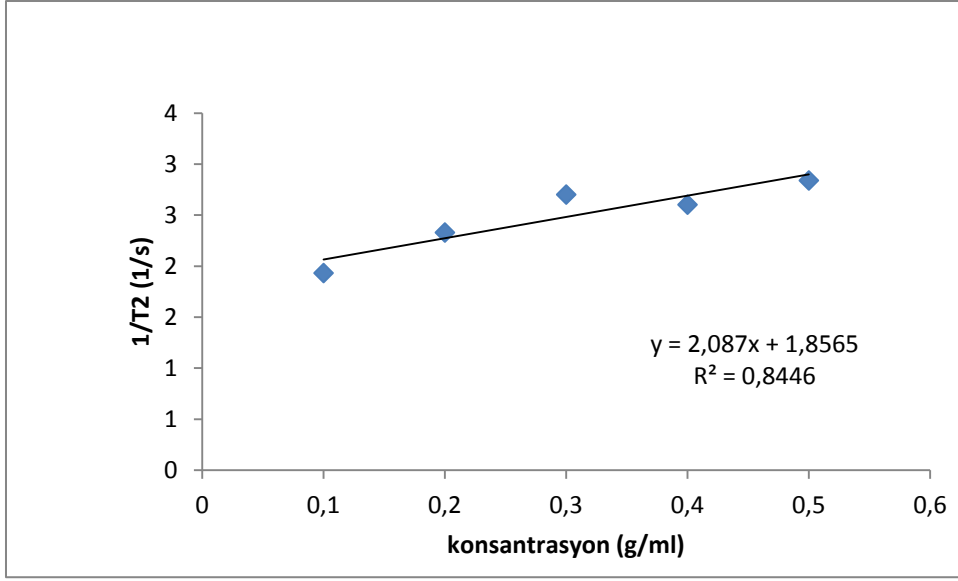
Şekil 4.6.a. Pepsin 2. pikinin $1/T_1$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti



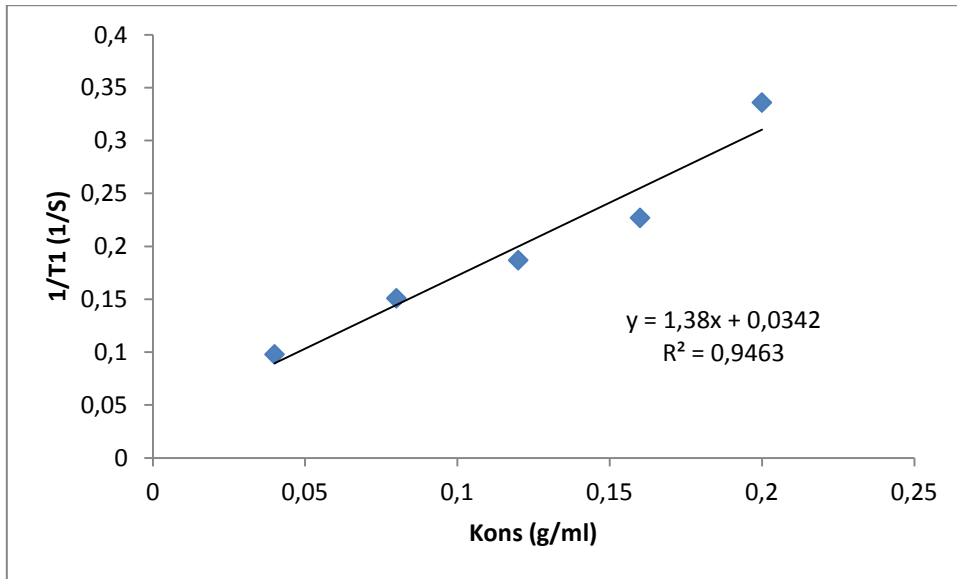
Şekil 4.6.b. Pepsin1. pikinin $1/T_2$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti



Şekil 4.7.a. Maltose 4. pikinin $1/T_1$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti



Şekil 4.7.b. Maltose 7. pikinin $1/T_2$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti



Şekil 4.8.a. BSA 1. pikinin $1/T_1$ değerlerinin konsantrasyona karşı elde edilen en küçük kareler fiti

4.4. Linear Piklerden Elde Edilen Eğimler (Rölaksivite)

İncelenen maddelerin $1/T_1$ ve $1/T_2$ durulmalarının, madde konsantrasyonuna karşı elde edilen en küçük kareler fit doğrularının eğimleri (Rölaksivite), T_1 için çizelge 4.5.a. ve T_2 'ler için çizelge 4.5.b.da görülmüyor.

Çizelge 4.5.a. İncelenen maddelerin $1/T_1$ durulmalarının madde konsantrasyonuna karşı elde edilen en küçük kareler fit doğrularının eğimleri

Madde	Pik 1 (ml/g.s)	Pik 2 (ml/g.s)	Pik 3 (ml/g.s)	Pik 4 (ml/g.s)	Pik 5 (ml/g.s)	Pik 6 (ml/g.s)	Pik 7 (ml/g.s)	Pik 8 (ml/g.s)	Pik 9 (ml/g.s)
Sucrose	0,478	0,777	0,492	0,598	0,266	0,193	0,137	0,468	0,137
Pepsin	0,765	0,765	-122,57	4,495	15,055	-2,085	3,53	8,25	
Maltose	0,441	0,786	0,47	0,962	0,385	0,747	0,306		
BSA	1,38	0,0225							

Çizelge 4.5.b. İncelenen maddelerin $1/T_2$ durulmalarının madde konsantrasyonuna karşı elde edilen en küçük kareler fit doğrularının eğimleri

Madde	Pik 1 (ml/g.s)	Pik 2 (ml/g.s)	Pik 3 (ml/g.s)	Pik 4 (ml/g.s)	Pik 5 (ml/g.s)	Pik 6 (ml/g.s)	Pik 7 (ml/g.s)	Pik 8 (ml/g.s)	Pik 9 (ml/g.s)
Sucrose	4,354	33,472	0,227	1,473	4,643	28,909	27,167	2,523	3,527
Pepsin	110,31	123,77	-3,165	0,125	4,01	1,045	-2,62	-1,8	
Maltose	-2,7763	0	44,418	0,879	3,763	3,502	2,087		
BSA	14,305	35,078							

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Şekil 4.5.a, 4.8.a ile verilen şekillerde görüldüğü üzere, $1/T_1$ ve $1/T_2$ 'nin her ikisi konsantrasyon ile lineer olarak artmaktadır. Temsili pikler için elde edilen bu lineerlik her bir maddenin her bir piki için elde edildi. Bu durum daha önce bulunan sonuçlarla uyumludur (Kang ve Ark. 1984, Gallier ve Ark. 1987, Yılmaz ve Ark. 2004, Barnhart ve Berk 1986).

Çizilen eğrilerin eğimlerinden elde edilen değerlere rölaksivite denir (Kang ve ark. 1984, Yılmaz ve ark. 2004, Barnhart ve Berk 1986, Koenig ve ark. 1985). Yani rölaksivite; birim konsantrasyon başına rölaksasyon zamanının artışı olmaktadır. Rölaksivite maddenin rölaksasyon zamanını değiştirme etkinliğini ifade eder. Bu durumda proton T_1 rölaksivitesi BSA için en yüksektir. Bunu pepsin izlemektedir. Pepsinin bazı pikleri çok yüksek rölaksivite göstermektedir. T_2 rölaksiviteleri T_1 rölaksivitelerinden daha yüksektir. T_2 durumunda da yine en yüksek rölaksiviteyi pepsin göstermektedir. BSA'nın pikleri de yüksektir.

T_1 rölaksivitelerini incelediğimizde sucrose'un 2. piki en yüksek rölaksiviteyi gösteriyor. Pepsin'in 5. piki en yüksek rölaksiviteyi gösteriyor. Maltose'nin 4. piki en yüksek rölaksiviteyi gösteriyor. Sucrose'nin 7. piki en düşük rölaksiviteyi gösteriyor. Pepsin'in 1.piki en düşük rölaksiviteyi gösteriyor. Maltose'nin 7. piki en düşük rölaksiviteyi gösteriyor.

T_2 rölaksivitelerini incelediğimizde sucrose'nin 2. piki en yüksek rölaksiviteyi gösteriyor. Pepsin'in 2. piki en yüksek rölaksiviteyi gösteriyor. Maltose'un 3. piki en yüksek rölaksiviteyi gösteriyor. Sucrose'nin 3. piki en düşük rölaksiviteyi gösteriyor. Pepsin'in 4. piki en düşük rölaksiviteyi gösteriyor. Maltose'un 4. piki en düşük rölaksiviteyi gösteriyor.

Sonuç olarak, $1/T_1$ ve $1/T_2$, konsantrasyonla lineer değişmektedir. Bu nedenle, bağlı ve serbest su arasında hızlı kimyasal değiş-tokuş olmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Apaydın, F. 1996. Manyetik Rezonans Temel İlkeler Deney Düzenekleri Ölçüm Yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 20, 72, 268-271.

Aydın, M. 2000. Protein Çözeltilerinin NMR T_1 'i için Önerilmiş T_1 Durulma Mekanizmalarının Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır

Barnhart, J.L. and Berk, R.N. 1986. Influence of Paramagnetic Ions and pH on proton NMR Relaxation of Biologic Fluids. Invest Radiol., 21:132-136.

Bernheim, R.A., Brown, T.H., Gurowsky, H.S. and Woessner, D.E. 1959. Temperature Dependence of Proton Relaxation Times in Aqueous Solutions of Paramagnetic Ions. The Journal of Chemical Physics, 30, 4.

Bloembergen, N., Purcell, E.M. and Pound, R.V. 1947. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. Nature, 160, 475.

Danskiewich, O.K., Hennel, J.W., Lubas, B. 1963. Proton magnetic relaxation and protein hydration, Nature, 200:1006, 1007.

Edzes, H.T. and Samulski, E.T. 1978. The Measurement of Cross Relaxation Effect in the Proton NMR Spin – Lattice Relaxation of Water in Biological Systems: Hydrated Collagen and Musele, J. Mag. Rezon., 31: 207 – 229.

Eley, D.D., Hey, M.J. and Ward, A.J.I., 1974. Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Aqueous Bovine Albumin Solutions. J. Chem. Soc. Faraday Transact. I, 5:1106-1113.

Fullerton, G.D., ORD, V.A., and Cameron, I.L., 1986. And Evaluation of the Hydration of Lysozyme by an NMR Titration Method. Biochimica et Biophysica Acta, 869: 230 – 246.

Gallier, J., Rivet, P. & Certanes, J.de. (1987). ^1H - and ^2H -NMR study of bovine serum albumin solutions. Biochimica et Biophysica Acta, 915:1-18.

Grösch, L. and Noack, F., 1976. NMR Relaxation Investigation of Mobility in Aqueous Bovine Serum Albumin solutions. Biochimica et Biophysica Acta, 1945: 218-232

Gurowsky, H.S. and Mc Call, D.W. 1953. Nuclear Magnetic Resonance Multiplets in Liquids. The Journal of Chemical Physics, 21, 2

Gurowsky, H.S. and Sanka, A. 1953. Dissociation, Chemical Exchange and Proton Magnetic Resonance in some Aqueous Electrolytes, The Journal of Chemical Physics, 21, 10

Hackleman, W.R. and Hubbard, P.S. 1963. Nuclear Magnetic Relaxation and diffusion in Diffusion SF. The Journal of Chemical Physics 39, 10

Hallenga, K. And Koenig, S. H. 1976. Protein Rotational Relaxation as Studied Solvent H^1 and H^2 Magnetic Relaxation, Biochemistry, 15 (19): 4255 – 4263.

Kang, Y.S., Gore J.C. and Armitage Ian M. 1984. Studies of Factors Affecting The Design of NMR Contrast Agents: Manganese in Blood as a Model System. Magnet Reson Med. 1:396-409.

Koenig, S.H. and Schillinger, W.E. 1969. Nuclear magnetic relaxation dispersion in protein solution. *J. Biol. Chem.*, 244 (12): 3283-3289.

Koenig, S.H., Baglin C.M., Brown III R.D. 1985. Magnetic Field dependence of solvent Proton Relaxation in Aqueous solutions of Fe^{3+} Complexes, *Magn Reson Medicine* 2:283-288.

Nolle, A.W. and Morgan, L.O. 1957. Frequency Dependence of Proton Spin Relaxation in Aqueous Solutions of Paramagnetic Ions. *The Journal of Chemical Physics*, 26, 3.

Oakes, J., 1975. Protein Hydration, *J. Chem. Soc. Faraday Transact. I*, 72:216-227.

Pearson, R.G., Palmer, J., Anderson, M.M. and Allred, A.L. 1960. Exchange Reactions in Complex Ions by NMR. *Zeitschrift für Electrochemie*, Bd 64, Nr 1

Pendred, T.L., Pritchard, A.M. and Richards, R.E. 1966. Spin-Lattice Relaxation Times of Protons in some organic compounds. *Inorg Phys. Theor.*, (A): 1009-1012.

Solomon, I. and Bloembergen, N. 1956. Nuclear Magnetic Interactions in the HF Molecule. *The Journal of Chemical Physics*, 25, 2.

Yilmaz, A., Ulak, F.Ş., Batun, M.S. 2004. Proton T_1 and T_2 Relaxivities of Serum Proteins. *Mag. Reson. Imaging*. 22:683-688.

Zimmerman, J.R. and Brittin, W.E. 1957. Nuclear Magnetic Resonance Studies in Multiple phase systems: Lifetime of a Water Molecule in an Adsorbing Phase on Silica Gel. (61): 1328-1331.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Balıkesir’de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Balıkesir’de tamamladım. 1996 yılında Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Fizik Eğitimi bölümünü kazandım ve 2000 yılında mezun oldum. 2009-2010 Eğitim-Öğretim yılında Dicle Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalında Yüksek lisans Eğitimine başladım. Halen Milli Eğitim Bakanlığı’nda sınıf öğretmeni olarak görev yapmaktayım.