

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

**BAZI PROTEİN VE ENZİM ÇÖZELTİLERİNDE NMR  
RÖLAKSASYON ZAMANLARINI MODÜLE EDEN İLĞİ  
ZAMANLARININ  $T_1/T_2$  ORANI KULLANIMI YOLUYLA  
BELİRLENMESİ**

**Bilgin ZENGİN**

**FİZİK ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**DİYARBAKIR**

**Eylül 2012**

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
DİYARBAKIR

Bilgin ZENGİN tarafından yapılan “Bazı Protein ve Enzim Çözeltilerinde NMR Rölaksasyon Zamanlarını Modüle Eden İlgili Zamanlarının  $T_1/T_2$  Oranı Kullanımı Yoluyla Belirlenmesi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından FİZİK Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali YILMAZ  
Üye : Prof. Dr. Belma TURAN  
Üye : Prof. Dr. Zülküf GÜLSÜN  
Üye : Prof. Dr. Kemal GÜVEN  
Üye : Yrd. Doç. Dr. Gülten KAVAK

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 28/09/2012

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

...../...../2012

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

## TEŐEKKÖR

Doktora öğrenimim süresince bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, her türlü yardım ve özveriyi gösteren danışman hocam Prof. Dr. Ali YILMAZ' a, MR ölçümlerinin alınmasında yardımlarından dolayı Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Meslek Yüksekokulu öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ayşegöl YURT' a, 400 MHz NMR ölçümleri için numunelerin hazırlanmasında ve tez ile ilgili yararlı kuramsal tartışmaları için değerli arkadaşım Arş. Gör. Sibel KORUNUR' a, yaşamımın ve öğrenim hayatımın tüm aşamalarında her türlü maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen çok değerli aileme ve Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümü' nün öğretim elemanlarına çok teşekkür ederim.

Bu tez Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından DÜBAP-07-02-01 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	I
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	II
<b>ÖZET</b> .....	IV
<b>ABSTRACT</b> .....	V
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	VI
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	VII
<b>KISALTMA ve SİMGELER</b> .....	X
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	3
2.1. Önceki Çalışmalar .....	3
2.2. NMR'ın Temel Teorisi .....	10
2.2.1. Çekirdeğin Manyetik özellikleri .....	10
2.2.2. Nükleer Manyetik Rezonansın Tanımı .....	12
2.2.3. Dış Manyetik Alanın Tek Spine Etkisi .....	13
2.2.4. Dış Manyetik Alanın Spin Topluluğuna Etkisi ve Boltzmann Dengesi .....	15
2.3. Rölaksasyona Yol Açan Etkileşme Türleri ve Bu Etkileşmeleri Modüle Eden Hareketler .....	17
2.3.1. Dipol-Dipol Etkileşimi .....	18
2.3.2. Paramanyetik İyon Yoluyla Rölaksasyon .....	22
2.4. NMR $T_1$ ve $T_2$ Rölaksasyon Zamanları .....	25
2.4.1. Spin-Örgü Rölaksasyon Zamanı ( $T_1$ ) .....	25
2.4.2. Spin-Spin Rölaksasyon Zamanı ( $T_2$ ) .....	27
2.4.3. NMR Rölaksasyon Zamanları Ölçümünde Kullanılan Pulsalar .....	29
2.4.3.1. Radyofrekans (RF) Pulsu .....	29
2.4.3.2. $90^\circ$ Pulsu .....	29
2.4.3.3. $180^\circ$ Pulsu .....	30
2.5. Protein Çözeltileri için Rölaksasyon Zamanları Kuramı .....	30
2.5.1. Düşük Frekans Deneyleri için Kuram .....	30
2.5.2. Yüksek Frekans Deneyleri için Kuram .....	35
<b>3. MATERYAL ve METOT</b> .....	39
3.1. NMR Örneklerinin Hazırlanması .....	39
3.1.1. H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O Çözücü Karışımının Hazırlanması .....	39
3.1.2. Hemoglobin İçeren Çözeltilerin Hazırlanması .....	39

3.2.	NMR Rölaksasyon Zamanlarının Ölçülmesi.....	39
3.2.1.	Spin-Örgü Rölaksasyon Zamanlarının ( $T_1$ ) Ölçülmesi.....	39
3.2.2.	Spin-Spin Rölaksasyon Zamanlarının ( $T_2$ ) Ölçülmesi.....	40
3.2.3.	$T_1$ ve $T_2$ Rölaksasyon Zamanlarının Sıcaklığa Bağlı Ölçülmesi.....	40
3.3.	MR Örneklerinin Hazırlanması.....	40
3.4.	MR Rölaksasyon Zamanlarının Ölçülmesi.....	41
3.4.1.	Spin-Örgü Rölaksasyon Zamanlarının ( $T_1$ ) Ölçülmesi.....	41
3.4.2.	Spin-Spin Rölaksasyon Zamanlarının ( $T_2$ ) Ölçülmesi.....	41
<b>4.</b>	<b>BULGULAR ve TARTIŞMA</b> .....	<b>43</b>
4.1.	NMR Bulguları.....	43
4.1.1.	Saf D <sub>2</sub> O Ortamında Konsantrasyon Artışına Ait Bulgular.....	44
4.1.2.	0.1ml H <sub>2</sub> O+0.9ml D <sub>2</sub> O Ortamında Konsantrasyon Artışına Ait Bulgular.....	46
4.1.3.	Saf D <sub>2</sub> O Ortamında Sıcaklık Artışına Ait Bulgular.....	48
4.1.4.	0.1ml H <sub>2</sub> O+0.9ml D <sub>2</sub> O Ortamında Sıcaklık Artışına Ait Bulgular.....	54
4.2.	MR Bulguları.....	60
<b>5.</b>	<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>75</b>

## ÖZET

### BAZI PROTEİN VE ENZİM ÇÖZELTİLERİNDE NMR RÖLAKSASYON ZAMANLARINI MODÜLE EDEN İLGİ ZAMANLARININ $T_1/T_2$ ORANI KULLANIMI YOLUYLA BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Bilgin ZENGİN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZİK ANABİLİM DALI

2012

Bu çalışmada, Hemoglobin ve üç enzim (Pepsin, Proteaz ve  $\alpha$ -chymotrypsin) çözeltisinin H<sub>2</sub>O' daki  $1/T_1$  (spin-örgü) ve  $1/T_2$  (spin-spin) rölaksasyon oranları 64 MHz (1.5 Tesla) MR spektrometresi kullanılarak oda sıcaklığında konsantrasyona karşı incelendi. Hemoglobinin D<sub>2</sub>O ve H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O) çözeltilerindeki rölaksasyon oranları ayrıca 400 MHz (9.4 Tesla) NMR spektrometresiyle konsantrasyona ve sıcaklığa karşı incelendi.

64 MHz' deki  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  rölaksasyon oranları, Hemoglobin ve enzim konsantrasyonu ile lineer olarak artmaktadır. 400 MHz' de belirlenen  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  de Hemoglobin konsantrasyonu ile lineer olarak artmaktadır. 400 MHz' de Hemoglobin çözeltisinin sıcaklık bağıllığı,  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  rölaksasyon oranlarının sıcaklık artışıyla lineer olarak arttığını gösterdi.

Rölaksasyon mekanizmasını modüle eden ilgi zamanı ( $\tau$ ) bu tezde türetilen teori kullanılarak, yüksek manyetik alan (9.4 Tesla) ve düşük manyetik alan (1.5 Tesla) için hesaplandı. 64 MHz' deki  $\tau$  değerleri; Hemoglobin için 2.0017ns, Pepsin için 5.3225ns, Proteaz için 2.2865ns ve  $\alpha$ -chymotrypsin için 3.8398ns olmaktadır. Buna ilaveten, Hemoglobinin D<sub>2</sub>O ve H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O çözeltileri için 400 MHz' deki  $\tau$  değerleri sırasıyla 1.22ns ve 1.27ns olmaktadır. Tezde elde edilen veriler; protein ve enzimler küresel simetrik kabul edildiği zaman,  $T_1/T_2$  rölaksasyon oranlarının  $\tau$  değerlerinin doğru hesabı için kullanılabileceğini gösterdi.

Protein ve enzimler için elde edilen sonuçlar; rölaksasyon oranlarına moleküler takla tarafından modüle edilen dipolar etkileşmenin neden olduğunu önermektedir. Serbest ve bağlı su arasındaki protonların hızlı kimyasal değiş tokuşu da sürece katılmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:**  $1/T_1$  spin-örgü rölaksasyon oranı,  $1/T_2$  spin-spin rölaksasyon oranı, 64 MHz MR, 400 MHz NMR,  $\tau$  ilgi zamanı, dipolar etkileşme, hemoglobin, pepsin, proteaz,  $\alpha$ -chymotrypsin

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF CORRELATION TIMES MODULATING NMR RELAXATION TIMES IN SOME PROTEIN AND ENZYME SOLUTIONS USING $T_1/T_2$ RATE

PhD THESIS

Bilgin ZENGİN

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

2012

In the present work, using 64 MHz (1.5 Tesla) MR spectrometer,  $1/T_1$  (Spin-Lattice) and  $1/T_2$  (Spin-Spin) Relaxation rates in H<sub>2</sub>O of solutions of Hemoglobin and three enzymes (Pepsin, Protease and  $\alpha$ -chymotrypsin) were investigated versus concentration at room temperature. The relaxation rates in the D<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O) solutions of Hemoglobin were also studied versus concentration and temperature at 400 MHz (9.4 Tesla) NMR spectrometer.

The  $1/T_1$  and  $1/T_2$  relaxation rates at 64 MHz increase linearly with concentrations of Hemoglobin and the enzymes. The  $1/T_1$  and  $1/T_2$  determined at 400 MHz also increase linearly with concentration of Hemoglobin. The temperature dependence of the Hemoglobin solution at 400 MHz showed that  $1/T_1$  and  $1/T_2$  relaxation rates increase linearly when the temperature increases.

The correlation time ( $\tau$ ) modulating relaxation mechanism was calculated for each of high magnetic field (9.4 Tesla) and low magnetic field (1.5 Tesla) by using theory derived in this thesis. The  $\tau$  values at 64 MHz were 2.0017ns for Hemoglobin, 5.3225ns for Pepsin, 2.2865ns for Protease and 3.8398ns for  $\alpha$ -chymotrypsin. In addition, the  $\tau$  values for D<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O solutions of Hemoglobin at 400 MHz were 1.22ns and 1.27ns, respectively. The data showed that  $T_1/T_2$  relaxation rates can be used for the accurate calculation of  $\tau$  values when proteins and enzymes were assumed to be spherically symmetrical.

The present results obtained for protein and enzymes suggest that the relaxation rates are caused by dipolar interaction modulated by molecular tumbling. The fast chemical exchange of protons between free and bound water is also involved in the process.

**Keywords:**  $1/T_1$  spin-lattice relaxation rate,  $1/T_2$  spin-spin relaxation rate, 64 MHz MR, 400 MHz NMR,  $\tau$  correlation time, dipolar interaction, hemoglobin, pepsin, protease,  $\alpha$ -chymotrypsin.

## ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 4.1.</b>	Saf D2O çözücüsü ortamında hemoglobin proteininin rölaksasyon zamanları oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi.....	44
<b>Çizelge 4.2.</b>	0.1ml H2O+0.9ml D2O çözücüsü ortamında hemoglobin proteininin rölaksasyon zamanları oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi.....	46
<b>Çizelge 4.3.</b>	Saf D2O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimi.....	48
<b>Çizelge 4.4.</b>	Saf D2O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimi.....	50
<b>Çizelge 4.5.</b>	Saf D2O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimi.....	52
<b>Çizelge 4.6.</b>	0.1ml H2O+0.9ml D2O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimi	54
<b>Çizelge 4.7.</b>	0.1ml H2O+0.9ml D2O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimi	56
<b>Çizelge 4.8.</b>	0.1ml H2O+0.9ml D2O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimi	58
<b>Çizelge 4.9.</b>	Saf H2O çözücüsü ortamında hemoglobin proteininin rölaksasyon zamanları oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi.....	61
<b>Çizelge 4.10.</b>	Saf H2O çözücüsü ortamında pepsin enziminin rölaksasyon zamanları oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi.....	62
<b>Çizelge 4.11.</b>	Saf H2O çözücüsü ortamında proteaz enziminin rölaksasyon zamanları oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi.....	64
<b>Çizelge 4.12.</b>	Saf H2O çözücüsü ortamında $\alpha$ -chymotrypsin enziminin rölaksasyon zamanları oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi....	65
<b>Çizelge 4.13.</b>	64 MHz MR spektrometresindeki ölçümlerden elde edilen rölaksivite değerleri ve bu değerlerden elde edilen $\tau$ ilgi zamanları..	67
<b>Çizelge 4.14.</b>	Hemoglobin için 400 MHz NMR spektrometresindeki ölçümlerden elde edilen rölaksivite değerleri ve bu değerlerden elde edilen $\tau$ ilgi zamanları .....	68



## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	(a) I spinin kurduğu yerel alan (b) Çubuk mıknatısın kurduğu yerel alan...	10
Şekil 2.2.	I=1/2 spinli bir çekirdeğin $H_0$ dış manyetik alan içerisindeki farklı iki yönelimi ve bu yönelimlere karşılık gelen enerji seviyeleri .....	14
Şekil 2.3.	Bir spinin enerji soğurma ve salma mekanizmaları.....	15
Şekil 2.4.	Dış manyetik alanın yokluğundaki spin topluluğunun manyetik momentlerinin yönelimi .....	15
Şekil 2.5.	Dış manyetik alan içerisinde bulunan spin topluluğu ve Boltzmann dengesi.....	16
Şekil 2.6.	Bir spinin bulunduğu yerde yerel alan kuran çevrelerin şeması.....	17
Şekil 2.7.	Dipolar etkileşmeyi anlatan şema.....	18
Şekil 2.8.	(a) Komşu I spinlerinin, gözlem altındaki spinlerin bulunduğu yerlerde kurdukları yerel alanların z bileşenlerinin yol açtığı enerji seviyesi genişlemeleri. (b) bu enerji seviyeleri genişlemelerin toplu gösterimi .....	19
Şekil 2.9.	Gözlem altındaki spinin, komşu spininin doğurduğu H yerel manyetik alanının $H_{xy}$ bileşenlerinden etkilenmesini gösteren şema .....	19
Şekil 2.10.	Sature edilmiş spin sistemi ve y-eksenine yatmış mıknatıslanmalar.....	22
Şekil 2.11.	Proton spininin komşusu olan elektron spini ve rölatif hareketi.....	23
Şekil 2.12.	Elektron spininin enerji seviyesindeki bağıl hareketi.....	24
Şekil 2.13.	90° Pulsu ve Saturasyon hali.....	26
Şekil 2.14.	Spin-örgü rölaksasyon zamanı ( $T_1$ ) şeması.....	26
Şekil 2.15.	Inversion Recovery Eğrisi.....	27
Şekil 2.16.	Spin sisteminin defaze olması ve $T_2$ rölaksasyon zamanı.....	28
Şekil 2.17.	Manyetizasyon bozunum eğrisi.....	28
Şekil 2.18.	Boltzmann Dengesindeki spin topluluğuna RF pulsu uygulanması.....	29
Şekil 2.19.	90° Pulsu ve $M_0$ mıknatıslanmasının y-eksenine yatması.....	30
Şekil 2.20.	180° Pulsu ve $M_0$ mıknatıslanmasının (-z) eksenine terslenmesi.....	30
Şekil 4.1.	Hemoglobin örneklerinden birinin Manyetizasyon Recovery Eğrisi.....	43
Şekil 4.2.	Hemoglobin örneklerinden birinin Manyetizasyon Decay Eğrisi.....	44
Şekil 4.3.	Saf D2O ortamında hemoglobin proteininin $1/T_1$ rölaksasyon zamanı	

	oranının konsantrasyona bağlı değişimi.....	45
<b>şekil 4.4.</b>	Saf D2O ortamında hemoglobın proteininin 1/T <sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi.....	46
<b>şekil 4.5.</b>	0.1ml H <sub>2</sub> O+0.9ml D2O ortamında hemoglobın proteininin 1/T <sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi.....	47
<b>şekil 4.6.</b>	0.1ml H <sub>2</sub> O+0.9ml D2O ortamında hemoglobın proteininin 1/T <sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi.....	48
<b>şekil 4.7.</b>	Saf D2O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobın çöztisinde 1/T <sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi.....	49
<b>şekil 4.8.</b>	Saf D2O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobın çöztisinde 1/T <sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi.....	50
<b>şekil 4.9.</b>	Saf D2O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobın çöztisinde 1/T <sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi.....	51
<b>şekil 4.10.</b>	Saf D2O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobın çöztisinde 1/T <sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi.....	52
<b>şekil 4.11.</b>	Saf D2O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobın çöztisinde 1/T <sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi.....	53
<b>şekil 4.12.</b>	Saf D2O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobın çöztisinde 1/T <sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi.....	54
<b>şekil 4.13.</b>	0.1ml H <sub>2</sub> O+0.9ml D2O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobın çöztisinin 1/T <sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi.....	55
<b>şekil 4.14.</b>	0.1ml H <sub>2</sub> O+ 0.9ml D2O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobın çöztisinin 1/T <sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi .....	56
<b>şekil 4.15.</b>	0.1ml H <sub>2</sub> O+0.9ml D2O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobın çöztisinin 1/T <sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi.....	57
<b>şekil 4.16.</b>	0.1ml H <sub>2</sub> O+0.9ml D2O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobın çöztisinin 1/T <sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi.....	58
<b>şekil 4.17.</b>	0.1ml H <sub>2</sub> O+0.9ml D2O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobın çöztisinin 1/T <sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi.....	59
<b>şekil 4.18.</b>	0.1ml H <sub>2</sub> O+0.9ml D2O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobın çöztisinin 1/T <sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi.....	60
<b>şekil 4.19.</b>	Saf H <sub>2</sub> O çözücüsü ortamında hemoglobın proteini çöztisinin 1/T <sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi.....	61
<b>şekil 4.20.</b>	Saf H <sub>2</sub> O çözücüsü ortamında hemoglobın proteini çöztisinin 1/T <sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi.....	62
<b>şekil 4.21.</b>	Saf H <sub>2</sub> O çözücüsü ortamında pepsin enzimi çöztisinin 1/T <sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi.....	63

<b>Şekil 4.22.</b>	Saf H <sub>2</sub> O çözücüsü ortamında pepsin enzimi çözeltisinin 1/T <sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi.....	63
<b>Şekil 4.23.</b>	Saf H <sub>2</sub> O çözücüsü ortamında proteaz enzimi çözeltisinin 1/T <sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi.....	64
<b>Şekil 4.24.</b>	Saf H <sub>2</sub> O çözücüsü ortamında proteaz enzimi çözeltisinin 1/T <sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi.....	65
<b>Şekil 4.25.</b>	Saf H <sub>2</sub> O çözücüsü ortamında α-chymotrypsin enzimi çözeltisinin 1/T <sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi...	66
<b>Şekil 4.26.</b>	Saf H <sub>2</sub> O çözücüsü ortamında α-chymotrypsin enzimi çözeltisinin 1/T <sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi.....	67
<b>Şekil 4.27.</b>	MR örneklerinin bulunduğu fantomun T <sub>1</sub> ağırlıklı film görüntüsü.....	68
<b>Şekil 4.28.</b>	MR örneklerinin bulunduğu fantomun T <sub>2</sub> ağırlıklı film görüntüsü.....	69

## KISALTMA ve SİMGELER

NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
RF	: Radyofrekans
IR	: Inversion Recovery
$T_1$	: Spin-Örgü rölaksasyon zamanı
$T_2$	: Spin-Spin rölaksasyon zamanı
$1/T_1$	: Spin-Örgü rölaksasyon oranı
$1/T_2$	: Spin-Spin rölaksasyon oranı
$\mu$	: Manyetik moment
$\gamma$	: Jiromanyetik oran
$H_0$ ve $B_0$	: Dış manyetik alan
$\tau$	: İlgı zamanı

## 1. GİRİŞ

Yirminci yüzyılın, spektroskopisi alanında yapılan en önemli buluşlardan biri olan manyetik rezonansın bilim ve teknolojiye olan katkısı sayılamayacak kadar çoktur. Manyetik rezonansın çalışma alanı 1946' da, Harvard' da Purcell, Pound, Torrey ve Stanford' dan Bloch, Hansen ve Packard' ın ilk başarılı deneylerinden sonra büyük bir hızla gelişti (Slichter 1963). Kuramsal ve teknik gelişimi hala devam etmekte olan bu tekniğin temel formülasyonu klasik çerçevede Abragam tarafından özetlendi (Abragam 1961). Başlangıçta fizikte kullanılan NMR daha sonra, kimyada, biyolojide, biyofizik, biyokimya, tıp ve eczacılık alanlarında da kullanılmaya başlanmıştır (Bahçeli 1996). Biyofizikte NMR spektroskopisinin birçok uygulaması vardır. Bir yapıdaki baz durumu ve hidrojen bağlarının durumu, proteinlerde geçici helis sarmalın gözlenmesi, proteinlerin ligandları ile etkileşmesi ve biyolojik zarlarının yapısının ve davranışlarının incelenmesinde NMR spektroskopisi geniş ölçüde kullanılmıştır (Yıldırım 1985).

Tıpta normal ve hasta kanlarının  $T_1$  rölaksasyon zamanlarının karşılaştırılması ile başlayan araştırmalar (Floyd ve ark. 1975, McLachlan 1980), kanserli ve normal dokuların rölaksasyon zamanlarının karşılaştırılması ile ileri boyutlara ulaşmış (Frey ve ark. 1972, Koutcher ve ark. 1978), ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yönteminin ortaya çıkmasına yol açmıştır (Koenig ve Brown 1985, Mansfield ve Maudsley 1977). Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yönteminin rutin olarak hastane hizmetlerinde kullanımı, daha önce NMR ile in vitro yapılan birçok çalışmanın in vivo olarak tekrarlanmasını sağlamıştır. Doku deneyleri bunun en tipik örneği olmaktadır (Frey ve ark. 1972, Koutcher ve ark. 1978). MRG, teşhis amaçları için yoğun olarak kullanılmaktadır. MRG, çeşitli düzlemlerde çekilebilen mükemmel görüntüler vermektedir. MRG' deki görüntü mükemmelliği aşağıdaki dört faktör tarafından oluşturulur: Hidrojen Yoğunluğu, Kimyasal Kayma,  $T_1$  ve  $T_2$  rölaksasyon zamanları. Rölaksasyon zamanlarının farklı dokuları birbirinden ayırt etmek için kullanıldığı bilinmektedir (Bottomley ve ark. 1987, Friedman ve ark. 1986).

Çözeltilerdeki moleküllere ilişkin dinamik mekanizmaların anlaşılması yolunda NMR rölaksasyon zamanlarının ( $T_1$  spin-örgü ve  $T_2$  spin-spin) kullanılması vazgeçilmez ve oldukça sıklıkla kullanılan bir yöntem olagelmıştır (Marshall ve ark. 1972, Hubbard 1963, Popov 1979).

Bu çalışmanın amacı; protein ve enzimlerin H<sub>2</sub>O ve D<sub>2</sub>O çözeltilerindeki rölaksasyon mekanizmalarını saptamaktır. Bu amaç için; hemoglobin proteini ile pepsin, proteaz ve  $\alpha$ -chymotrypsin enzimlerinin değişik konsantrasyonlarını içeren H<sub>2</sub>O' lu çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerin proton T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanları 1.5 Tesla (64 MHz) MR spektrometresiyle incelendi. Hemoglobin proteini ayrıca, 9.4 Tesla (400 MHz) NMR spektrometresiyle saf D<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında ve 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında konsantrasyon ve sıcaklık artışına bağlı olarak da incelendi. Buna paralel olarak, düşük alanda (1.5 Tesla) ve yüksek alanda (9.4 Tesla) proton T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanları için kuram geliştirildi. T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub> oranları kullanılarak  $\tau$  ilgi zamanlarını veren denklemler türetildi. Bu denklemlerden, T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanlarını modüle eden hareketler belirlendi.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

**1. O.K. Daszkiewicz** ve arkadaşları; 20 °C' de ve 3,2884 Gauss' luk manyetik alanda suda çözülen ovalbuminin, proton spin-örgü rölaksasyon zamanı  $T_1$  ve proton spin-spin rölaksasyon zamanı  $T_2$ ' yi azalttığını ve bu etkinin nedeninin bazı su moleküllerinin ilgi zamanlarının artışından kaynaklandığını bulmuşlardır. Elde edilen sonuçlar, rölaksasyon zamanlarının tersinin (2.1) ve (2.2) denklemlerinde olduğu gibi konsantrasyonla arttığını göstermişlerdir.

$$1/T_1 = 1/T_{1w} + k_1 C \quad (2.1)$$

$$1/T_2 = 1/T_{2w} + k_2 C \quad (2.2)$$

Burada C konsantrasyon,  $k_1$  ve  $k_2$  sabitler,  $T_{1w}$  ve  $T_{2w}$  de diyalizatın rölaksasyon zamanlarıdır. Çok yüksek frekansta ovalbumin çözeltisinin dielektrik sabitinden buldukları proteine dönmesiz bir biçimde bağlı olan su miktarının Buchanan ve arkadaşlarının daha önce buldukları sonuçlarla uyduğunu görmüşlerdir (Daszkiewicz ve ark. 1963).

**2. S.H. Koenig ve W.E. Schillinger;** protein çözeltilerindeki nükleer manyetik durulma dağılımı isimli çalışmalarında, apotransferrin çözeltilerindeki çözücü protonların  $1/T_1$ ' ini sıcaklık, konsantrasyon ve PH' ın bir fonksiyonu olarak incelediler. 1000 Oe' den daha düşük manyetik alan verileri için pulslu bir manyetik alan tekniği kullanarak ve 1k Oe ile 12k Oe arasındaki manyetik alan bölgesi için ise spin-echo yöntemini kullanmışlardır. Elde ettikleri datayı iki faz modeli ile karşılaştırıyorlar ve suyun proteine dönmesiz bağlı olması gerekmediğini, protein molekülüne göre sabit bir eksen etrafında dönmesinin yeterli olduğunu söylemişlerdir. Sabit bir  $r_{pp}$  mesafesinde etkileşen bir proton çiftinin durulma oranı

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

denklemini ile verilmektedir. Bu denklemin proteine dönmesiz bağlı olan su molekülleri için geçerli olduğunu varsayıp, ilgi zamanını  $2 \times 10^{-7}$ s olarak bulmuşlardır. Proteine dönmesiz bağlı olmayan fakat proteine göre sabit eksen etrafında serbest olarak dönecek şekilde bağlı olan bir proton çifti için durulma oranı

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

olarak önerilmiştir. Bütün bunlara ilaveten; proteinin yakınında yapışık bir su bölgesinin olduğunu ve hareketi bulk su ile karşılaştırıldıklarında daha yavaş, proteininkinden ise daha hızlı olduğunu ve bu moleküllerin  $\tau_c$  ilgi zamanlarının proteinin takla adımı süresinden hayli kısa olduğunu ileri sürmüşlerdir. Proteinin etkisinde bulunan çözücü protonların  $\tau_c$  ilgi zamanının  $3 \times 10^{-12}$ s' den  $3 \times 10^{-7}$  s' ye arttığını görmüşlerdir. Bunun yanında proteine bağlı küçük sayıdaki su moleküllerinin her durumda çözücü protonların  $1/T_1$ ' ini artırdığını da ifade etmişlerdir (Koenig ve Schillinger 1969).

**3. B. Blicharska** ve arkadaşları; sulu protein çözeltileri üzerine yaptıkları çalışmada, sulu protein çözeltilerindeki ilgi zamanlarının dağılımı ile ilgili olarak daha çok bilgi edinmeyi amaçlamışlardır. Rölaksasyona molekül içi dipolar etkileşmenin yol açması halinde rölaksasyon zamanları oranı

$$1/T_j = \beta/T_{jw} + \beta k_j C + q \quad j=1,2 \quad (2.5)$$

denklemini ile ve durulmaya moleküller arası etkileşmenin yol açması halinde ise

$$1/T_j = \beta/T_{jw} + k_j C + q \quad j=1,2 \quad (2.6)$$



denklemleri ile verilebileceğini ifade etmişlerdir. Verilerini bu bağıntılarla karşılaştırarak, hidrasyon tabakasındaki protonların durulmasına moleküller arası etkileşimin sonucunu çıkarmışlardır. Ayrıca proteine adsorbe olan su moleküllerinin protein molekülüne nispeten biraz daha serbest olduğunu, serbest su ile bağlı su arasında hızlı kimyasal değiş-tokuş olduğunu ve birden fazla ilgi zamanının var olduğunu varsamışlardır (Blicharska ve ark. 1970).

**4. J. Oakes;** yaptığı çalışmada doğal bovine serum albuminin (BSA) sulu çözeltisindeki protein ve su protonlarının NMR rölaksasyon zamanlarını, protein konsantrasyonunun ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçmüş ve protein hidrasyonu ile ilgili tahminlerini, dondurulmuş protein çözeltileri üzerindeki NMR incelemelerinden elde etmiştir.  $1/T_1$  ölçümlerini, BSA konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak 275 °K, 294 °K ve 318 °K’ de incelediğinde rölaksasyon zamanındaki artışın, %10 BSA konsantrasyonuna kadar lineer, daha yukarı konsantrasyonlarda ise lineerlikten saptığını ve sıcaklık arttıkça da  $1/T_1$ ’ in arttığını gözlemiştir. Doğal BSA’ nın varlığında suyun rölaksasyon oranlarındaki net artışın, uzun menzilli yüzey etkilerinden dolayı su moleküllerinin hareketindeki azalmadan ya da bulk su ile hızlı olarak değiş-tokuş yapan, küçük miktarda suyun proteine bağlanmasından ileri geldiğini öne sürmüştür. Burada BSA hidrasyonunun teorik olarak tahminlerini, 1 g BSA başına aminoasit kenar zincirleri üzerindeki kutup gruplarının sayısından ve kutup gruplarının suyu bağlama kapasitelerinden yapmıştır. Ölçümlerin çok tabakalı model ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışma; dondurulmuş doğal BSA’ lı çözeltilerden elde edilen hidrasyon sayılarının, çözeltideki hidrasyonu iyi tahmin ettiğini ve çözeltide tahmin edilen rölaksasyon zamanlarının dondurulmuş örneklerdeki ölçümlere benzediğini ortaya koymuştur (Oakes 1976).

**5. B. Blicharska;** yaptığı çalışmalarda, konsantrasyona bağlı olarak protein çözeltisinde oluşan yapısal değişmelerin, diğer metotlarla olduğu kadar NMR metodu ile de incelenebileceğini ortaya koymuştur (Blicharska ve Rydzy 1979, Blicharska 1986).

**6. L. Grösch ve F. Noack;** çalışmalarında albümin üzerine ölçümlerini hem doğal hem de denature durumu için farklı konsantrasyonlarda, farklı sıcaklıklarda ve PH değerlerinde frekansa bağlı olarak yapmışlardır. Doğal protein sıcaklığını  $0^{\circ}\text{C}$  ve  $30^{\circ}\text{C}$  arasında sınırlarken denature proteini ise, örneği yaklaşık  $80^{\circ}\text{C}$ ' de 5 dakika ısıtmak suretiyle elde etmişlerdir. Hesaplanan  $\tau_i$  ve  $N_i$  ( $\tau_i$ : i. fazla ilgili korelasyon (ilgi) zamanı ve  $N_i$ : birim hacimde bulunan i. fazdaki protonların sayısı olmak üzere) değerlerinden, proteinin çevresinde tümü serbest, ötelenmesi engellenmiş ve dönerek bağlı su olarak adlandırılan en az üç tip su tabakasının bulunabileceğini ifade etmişlerdir ve bu çevrelere ait  $\tau$  ilgi zamanlarını da sırasıyla;  $\tau_s = 10^{-11}\text{s}$ ,  $\tau_{oe} = 10^{-9}\text{s}$  ve  $\tau_{db} = 10^{-8}\text{s}$  olarak bulmuşlardır. Bu tabakalar arasında hızlı kimyasal değiş-tokuş olduğu varsayılarak, durulma oranının (a: protein protonları, b: hidrasyonlu su protonları ve c: serbest su protonları olmak üzere)

$$\frac{1}{T_1} = \frac{P_a}{T_{1a}} + \frac{P_b}{T_{1b}} + \frac{P_c}{T_{1c}} \quad (2.7)$$

şeklinde verilebileceğini ifade etmişlerdir. Dönerek bağlı durumdaki proton mesafesini  $1.52\text{Å}^0$  ve ötelenmesi engellenmiş durum için proton mesafesini  $1.79\text{Å}^0$  olarak almışlardır (Grösch ve Noack 1976) .

**7. K. Hallenga ve S.H. Koenig** yaptıkları çalışmada; bir çözeltiliye eklenen proteinin, çözeltinin  $1/T_1$  rölaksasyon oranını artırdığını (Koenig ve Schillinger 1969), bu artışın büyüklüğünün de uygulanan dış alanın şiddetine bağlı olduğunu ve düşük alanlarda da etkinin daha büyük olduğunu gözlemişlerdir. Çözücü protonlar için  $1/T_1$ ' in manyetik alan bağıllığını; PH' ın, sıcaklığın ve konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak incelemişlerdir. Ayrıca bir su molekülünün hızlı takla hareketi ile ilgili zamanını  $\tau_R \approx 10^{-12}\text{s}$  ve onun komşulundaki herhangi bir protein molekülünün Brown hareketi ile ilgili ilgi zamanını da  $\tau_R \approx 10^{-7}\text{s}$  olarak bulmuşlardır (Hallenga ve Koenig 1976).

**8. H.T. Edzes ve E.T. Samulski;** çalışmalarında çapraz (cross) rölaksasyon incelemesi için genel bir yöntem sunmuşlardır. Burada, çapraz rölaksasyonun gözlenen

su proton spin-örgü rölaksasyon oranını önemli ölçüde değiştirebileceğini görmüşlerdir. Ölçtükları çapraz rölaksasyon oranı, bütün su protonları ile makromoleküler protonlar arasında Zeeman spin enerjisinin değiş-tokuşunu ifade eder. Sürecin gerektirdiği adımları Őu Şekilde sıralamışlardır: a) Bulk sudan yüzeydeki bağlı suya spin enerjisinin transferine, bağlı su ile bulk su arasındaki kimyasal değiş-tokuş yol açar. b) Bağlı su protonlarından makromolekölün çevresindeki protonlara spin enerjisinin transferi, makromoleköl yüzeyindeki bir proton ile bir bağlı su protonu arasındaki karşılıklı spin yer değiştirmelerinden ileri gelir. c) Yüzey protonlarından bütün makromoleküler protonlara manyetizasyon transferi, spin difüzyonu ve çapraz rölaksasyon yolu ile meydana gelir (Edzes ve Samulski 1978). Spin difüzyonu, kolajene geçici olarak bağlı olan su moleküllerinin üzerindeki protonlar ile kolajen protonları arasındaki hızlı değiş-tokuş vasıtasıyla meydana gelir (Edzes ve Samulski 1977).

**9. J. Gallier** ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; dondurulmuş, doğal ve denature bovine serum albumin çözeltilerini kullanarak spin-örgü rölaksasyon zamanlarını ölçmüşlerdir.  $T_1$  spin-örgü rölaksasyon değerlerinin homojen sistemlerde daha güvenilir olduğunu ve bu yüzden ölçümlerini homojen sistem olarak sulu bovine serum albumin çözeltilerinde gerçekleştirdiklerini ifade etmişlerdir. Bağlı su moleküllerinin öteleme hareketinin  $1/T_{1su}$  'ya katkıda bulunamayacak kadar yavaş olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca çapraz rölaksasyonun döteronlar ile protonlar arasında etkili olmadığını ve bu yüzden de protein protonlarının  $^2\text{H}$  spin-örgü durulmasına katkıda bulunmadığını varsaymışlardır. Dondurulmuş çözeltiler için elde ettikleri sonuçlar:  $T_{1su}$  süreci; bağlı su moleküllerinin hızlı izotropik dönme hareketi ile ilgilidir ve erime noktasına yakın sıcaklıklarda ( $T_c$ ),  $\tau_c$  ilgi zamanı yaklaşık olarak  $10^{-9}$  s' dir. Bunun yanında protein protonlarının  $^1\text{H}$  spin-örgü durulma oranına önemli katkısı vardır. Doğal çözeltiler için elde ettikleri sonuçlar: Su protonlarının spin-örgü rölaksasyon zamanı  $T_{1su}$ , protein proton rölaksasyon zamanlarının büyük değerlerinden dolayı, protein protonları ile çapraz rölaksasyonun etkili olduğu düşük frekanslardaki protonlardan başka, büyük ölçüde hem bulk hem de bağlı su moleküllerinin hareketleri ile durulur ve bağlı su moleküllerinin dağılımı daha yavaş iken ( $10^{-9}$ - $10^{-10}$  s), bu iki tip su molekülünün dönel ilgi zamanlarını aynı büyüklük mertebesindedir( $10^{-11}$ - $10^{-12}$  s).

Denature çözeltiler için elde ettikleri sonuçlar: Bovine serum albuminin izotropik dönmesi durur ve protein katı bir hal alır. Bu durum, bir katı gibi NMR sinyalinin görünmesine dayanır. Aynı zamanda, protein spin-örgü rölaksasyon oranına, takla hareketi ile ilgili katkının gözükmemesi ile teyit edilir. Bunun aksine su hareketi,  $T_c$  erime noktasının aşağısındaki ve yukarısındaki tüm sıcaklıklarda hemen hemen etkilenmez. Bununla beraber su NMR rölaksasyon zamanları, denaturasyonun yukarısındaki üst  $T_c$  de çok zor değişir.  $T_{1su}$  büyük ölçüde denaturasyona bağlıdır. Bu bağıllık, bağlı su ile protein protonları arasındaki çapraz rölaksasyon katkısını değiştirir.  $T_{1su}$ , denaturasyonla etkilenmez. Denature örnekte su proton spin-örgü rölaksasyon oranı  $1/T_{1su}$  'yun daha uzun olması oldukça sürpriz sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bulk su ile bağlı suyun çok farklı davranış sergilediklerini ifade etmişlerdir (Gallier ve ark. 1987).

**10. S.H. Koenig** ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; diyamanyetik çözücü protonların eklenmesi ile çözücü su çekirdeğinin manyetik spin-örgü rölaksasyon oranlarını artırdığının bilindiğini ve rölaksasyon oranlarındaki artışın, manyetik alanın bir fonksiyonu olduğu ve protein moleküllerinin yönelimsel rölaksasyon zamanının da alana bağlı rölaksasyon oranlarının incelemelerinden anlaşılabilirdiği ifade edilmiştir. Ayrıca çözücü ve çözünen protonlar arasındaki çapraz rölaksasyon sürecinden ortaya çıkan ek bir etkileşimin olduğunu göstermişlerdir. Çapraz rölaksasyon katkısının manyetik alan bağıllığı (yaklaşık olarak döteron rölaksasyon oranına benzeyen) değişmeden olduğu gibi kalan çözücü proton rölaksasyonuna oldukça benzediğini görmüşlerdir. Bu gözlem; diğer yazarlar tarafından kullanılmış olan, fakat manyetik alan şiddetinin geniş bir aralığı üzerindeki verilere uygulanmayan çapraz rölaksasyon için ifadelerin tahminleri ile uygun olmadığını belirtmişlerdir. Hem protein protonları hem de çözücü protonların rölaksasyon davranışını ortaya çıkaran model, iki eksponansiyelin toplamı olduğunu söylemişlerdir. Bu bulgu, dokular gibi kompleks sistemlerde yayınlanmış proton rölaksasyon oranlarının yorumu için imalara sahip olduğunu ve bu verilerin, çapraz rölaksasyonu hesaba katarak yeniden incelenmesi gerektiğini ifade etmişlerdir (Koenig ve ark. 1978).

**11. R.G. Bryant** yaptığı çalışmada; su ile protein arasındaki etkileşimleri incelemiştir. Su proton nükleer spin-örgü rölaksasyon oranının, sıcaklık ve manyetik alan bağılılığı, protein ile etkileşen su molekülleri için geçen sürenin oda sıcaklığında saf suyunkine yakın olması gerektiğini belirtmişlerdir. Su-protein manyetik bağlanımı, dokular gibi heterojenik protein sistemlerinde su rölaksasyon oranlarının yorumunu etkilediğini ve suyun NMR üzerindeki etkileri vasıtasıyla hareketsiz bileşenler hakkında ekstra faydalı bilgi vermenin yollarını sağladığını söylemiştir. Tartışmada, proteinin kristal yapılarında, iç yüzeydeki hızlı su molekül hareketleri ile ilgili sonuçları, proteinin kristal yapılarında çok sayıda su oksijen atomunun gözlenmesi ile uyumsuzluğun olmadığını gösterdiğini gözlemlemiştir (Bryant 1996).

**12. D.D. Eley** ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; su proton rölaksasyon zamanlarını albuminin çeşitli formlarında ölmüşlerdir. Proteinlerin sulu çözeltilerindeki su proton rölaksasyon zamanlarının, temelde protein hidrasyonu ile ilgili bilgiyi sağlayabildiğini ifade etmişlerdir. Ölçtükları proton rölaksasyon oranlarının, konsantrasyonun lineer bir fonksiyonu olarak değiştirdiğini bulmuş ve gözledikleri rölaksasyon oranlarını da;

$$1/T_1 = 1/T_1^0 + R_1C \quad (2.8)$$

ifadesi ile verilebileceğini belirtmişlerdir (Eley ve ark. 1975).

**13. J. Zhong** ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; su protonlarının  $T_1$  rölaksasyon zamanlarını, 1.4 ve 480 kDa aralığında değişen proteinler ve döteryum miktarı değişen çözücülerle farklı statik manyetik alanlarda (0.47, 2 ve 7T) %5' lik protein çözeltilerinde ölçmüşlerdir. Döteryumlu örneklerin  $T_1$  rölaksasyon zamanı ölçümlerini 2 ile 7T için gerçekleştirmişlerdir. Döteryumlu örneklerin ölçümlerini, rotasyonel ilgi zamanlarını tahmin etmek için kullanmışlardır.  $T_1$  rölaksasyon zamanı ölçümlerinden, çözücü ve çözünen protonların arasındaki çapraz rölaksasyon oranı ve örneklerdeki paramanyetik safsızlıkların katkısını elde etmişlerdir. Protein çözeltileri üzerinde yapılan ölçümlerden elde edilen verileri incelemeleri sonucunda; protein protonları, bulk su protonları ve hidrasyonlu su protonları olmak üzere su protonlarının

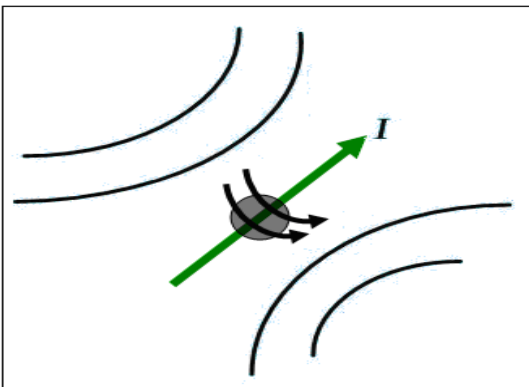
üç farklı fazının olduğunu kabul etmişlerdir. Hidrasyonlu su ve protein protonları arasındaki çapraz röleksasyon etkisinin önemli rol oynadığını fakat alan şiddetinin artışıyla öneminin azaldığını göstermişlerdir. Çapraz röleksasyon oranının, protein moleküler ağırlığı artışıyla arttığını belirtmişlerdir (Zhong ve ark. 1990).

## 2.2 NMR' IN TEMEL TEORİSİ

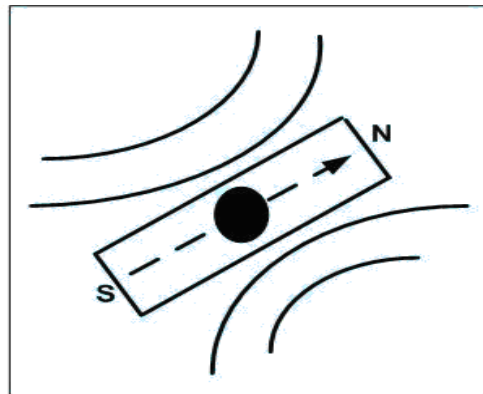
### 2.2.1. Çekirdeğin Manyetik Özellikleri

Bazı atom çekirdeklerinin yük ve kütlelerinin olmasının yanında birde spin yani, iç açısal momentumları vardır. Bu nedenle çekirdeği kendi eksenini etrafında dönen bir top gibi düşünebiliriz (Şekil 2.1 (a)). Çekirdeğin kendi eksenini etrafındaki bu dönme hareketi bir  $I$  kuantum sayısıyla belirlenir ve çekirdeğe  $I$  spinli çekirdek denir. Öte yandan çekirdek bir yüke sahip olduğundan, çekirdek yükü kendi eksenini etrafında dönme hareketi yapmaktadır. Klasik fizikte, dönen bir yük veya dairesel bir teldeki akım,  $\vec{\mu}$  vektörü ile gösterilen bir manyetik momentle tanımlanır.

Buna göre, çekirdeğin  $\vec{\mu}$  manyetik moment vektörü,  $\vec{I}$  spin açısal momentum vektörüne paralel olmaktadır. O halde  $I$  spinli atom çekirdeklerinin her biri, küçük bir mıknatıs çubuğu gibi düşünülebilir (Şekil 2.1 (b)).  $I$  spinli bir çekirdeğin uzayda kurduğu manyetik alan ile bir çubuk mıknatısın etrafında kurduğu manyetik alan birbirine benzemektedir (Şekil 2.1 (a) ve (b)).



(a)



(b)

Şekil 2.1. (a)  $I$  spinin kurduğu yerel alan (b) Çubuk mıknatısın kurduğu yerel alan

(Yılmaz ve Korunur, 2012)

Çekirdeğin  $\vec{\mu}$  manyetik momenti ile  $\vec{I}$  spin açısal momentumu arasında

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (2.9)$$

bağıntısı vardır. Burada  $\gamma$ ' ya çekirdeğin jromanyetik oranı denir ve

$$\gamma = \frac{g_N \mu_N}{\hbar} \quad (2.10)$$

olarak tanımlanır. Burada  $g_N$  sabitine, çekirdeğin g-çarpanı denir ve  $\mu_N$  ise çekirdek magnetonudur. Jromanyetik oran, bir çekirdek için ayırt edici (yani her çekirdek için farklı değerli) bir özelliktir. Çekirdek magnetonu

$$\mu_N = \frac{e\hbar}{2m_p} \quad (2.11)$$

şeklindedir. Burada  $m_p$  ve  $e$  sırasıyla protonun kütlesi ve yüküdür.

Çekirdeğin  $\vec{I}$  spin açısal momentum vektörü kuantumlu bir niceliktir. Bir vektörün kuantumlu olması demek, büyüklüğünün ve yöneliminin kuantumlu olması demektir.  $\vec{I}$  vektörünün büyüklüğünün kuantumluluğu,

$$|\vec{I}| = \sqrt{I(I+1)} \hbar \quad (2.12)$$

ve yöneliminin kuantumluluğu ise,

$$I_z = m_l \hbar \quad (2.13)$$

ile tanımlanır. Burada  $m_l$  magnetik spin kuantum sayısıdır ve  $m_l = \pm I, \pm I - 1, \pm I - 2, \dots$  gibi toplam  $2I+1$  değer alır (Şahin M. 2002).

### 2.2.2. Nükleer Manyetik Rezonansın Tanımı

Manyetik rezonans manyetik momenti ve açısal momentumu olan sistemlerde meydana gelen bir olaydır. Nükleer manyetik rezonansı, diğer çekirdeklerden yalıtılmış ve spini I olan tek bir çekirdeği göz önüne alınarak tanımlanabilir. Bu çekirdek +z-ekseni doğrultusunda bir  $\vec{B}_0$  dışa manyetik alanı içerisine konulduğunda klasik elektrodinamiğe göre çekirdeğin potansiyel enerjisi,

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 \quad (2.14)$$

ile ifade edilir. Kuantum mekaniğinin önermesine göre de, sistemin Hamiltonyeni

$$H = -\gamma B_0 I_z \quad (2.15)$$

olur. Denklem (2.15)'deki bu Hamiltonyene Zeeman Etkileşme Hamiltonyeni denir. Zeeman enerji özdeğerleri ise

$$E_m = -m_l \hbar \gamma B_0 \quad (2.16)$$

şeklinde ve Zeeman enerji düzeyleri olarak adlandırılır. Manyetik kuantum sayısı  $m_l$ ,  $2I + 1$  tane değer alır. Bu enerji düzeyleri, eşit aralıklarla dağılmıştır ve ardışık iki düzey arasındaki enerji farkı,

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 = \hbar \omega_0 \quad (2.17)$$

ile ifade edilir. Burada  $\omega_0 = \gamma B_0$ , Larmor presesyon frekansıdır. Çekirdek enerjisinin ölçümü, bu enerji özdeğerlerinden birini verir. Çekirdeğin belli bir t anındaki durumu  $\psi(\vec{r}, t)$  fonksiyonu ile tanımlanır ve

$$i\hbar \frac{\partial \psi(\vec{r}, t)}{\partial t} = H \psi(\vec{r}, t) \quad (2.18)$$

zamana bağlı Schrödinger denklemi ile tanımlanır. Ancak çekirdeğin enerji özdeğeri spin enerji düzeyi zamanla değişmez yani sabittir.



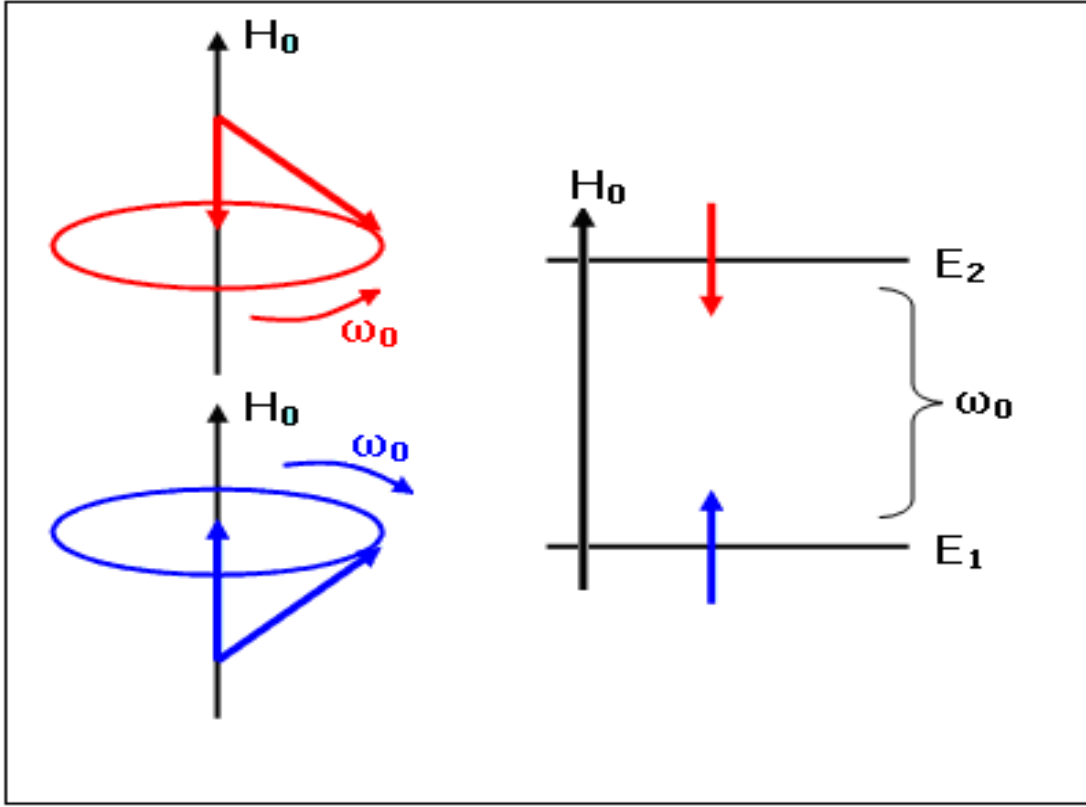
Çekirdeğin enerjisini değiştirebilmek için uygulanan dış manyetik alana dik doğrultuda ve zamana bağlı bir manyetik alan uygulanır. Bu manyetik alanın frekansı,  $\omega_0 = \gamma B_0$  Larmor presesyon frekansına eşit olursa çekirdeğin bir enerji düzeyinden diğerine geçişi mümkün olur. Bu geçiş, çekirdeğin  $\Delta E = \gamma \hbar B_0 = \hbar \omega_0$  enerjili bir fotonu soğurmasıyla veya yayımlamasıyla olabilir (Şahin 2002).

Buna göre, durgun dış manyetik alan içerisindeki bir çekirdek spin sisteminin doğal frekansı olan Larmor presesyon frekansına eşit frekanslı zaman bağlı bir manyetik alan uygulanmasıyla rezonans olayı oluşur ve çekirdek enerji düzeyleri arasında geçiş yapar. İşte bu olaya Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) olayı denir (Slonim ve Lyubimov, 1970).

### 2.2.3. Dış Manyetik Alanın Tek Spine Etkisi

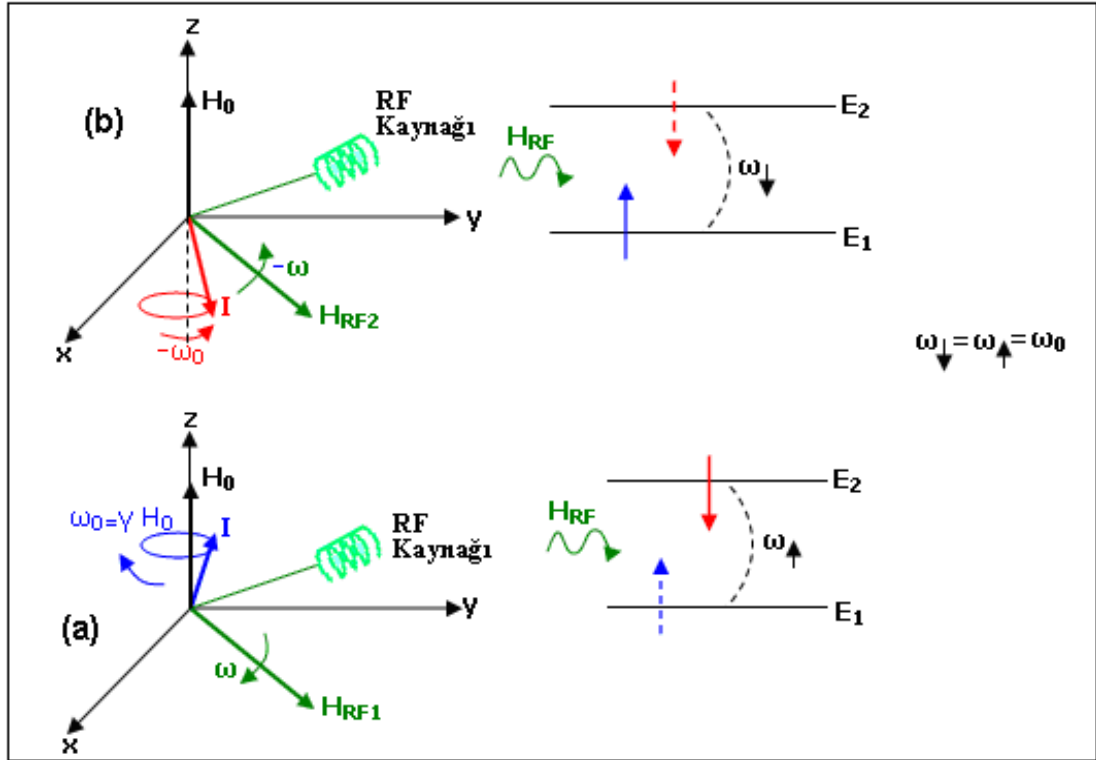
Her atom NMR'a uygun değildir. Nükleer Manyetik Rezonans olayı, çekirdeğinde çiftlenmemiş spini bulunan atomlarda gerçekleşen bir olaydır. Çekirdeğinde spin denilen mıknatıs bulunan atomlara örnek olarak  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{17}\text{O}$  ve  $^{31}\text{P}$  verilebilir. Bu tip çekirdeklerin NMR incelemeleri yapılabilir.

Çekirdeğinde spin bulunan bir atom,  $\vec{H} = H_0 \hat{k}$  bir dış manyetik alanına konulduğunda, spin alan etrafında iki farklı yönelimde döner. Dönme hızı z-yönündeki alan şiddeti ile orantılıdır. Burada  $\omega = \gamma H_0$  Larmor presesyon frekansıdır. Dış manyetik alan etrafındaki her dönme bir enerji seviyesine karşılık gelir. Dış alana paralel dönme  $E_1$  alt enerji seviyesine ve dış alana antiparalel dönme ise  $E_2$  üst enerji seviyesine karşılık gelir. Bu iki farklı yönelim ve bu yönelimlere karşılık gelen enerji seviyeleri Şekil 2.2' de gösterilmektedir (Yılmaz ve Korunur, 2012).



Şekil 2.2.  $I=1/2$  spinli bir çekirdeğin  $H_0$  dış manyetik alan içerisindeki farklı iki yönelimi ve bu yönelimlere karşılık gelen enerji seviyeleri (Yılmaz ve Korunur, 2012).

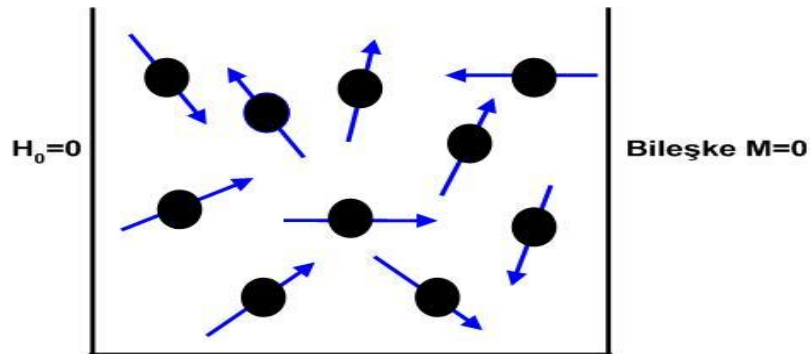
Radyo frekans (RF) alanı olarak isimlendirilen bir alanın dönme frekansı, spinin dönme frekansına eşit olunca spin enerji yutarak üst enerji seviyesine geçiş yapar ya da üst enerji seviyesindeki bir spin de enerji salarak alt enerji seviyeye geçiş yapar. Zamana bağlı pertürbasyon teorisine göre üst seviyeden bir spinin alt seviyeye geçiş olasılığı ile alt seviyeden üst seviyeye geçiş olasılıkları aynıdır. Bir spinin RF alanından enerji yutma ve salma mekanizmaları Şekil 2.3.' de gösterilmiştir (Yılmaz ve Korunur, 2012).



Şekil 2.3. Bir spinin enerji soğurma ve salma mekanizmaları (Yılmaz ve Korunur, 2012)

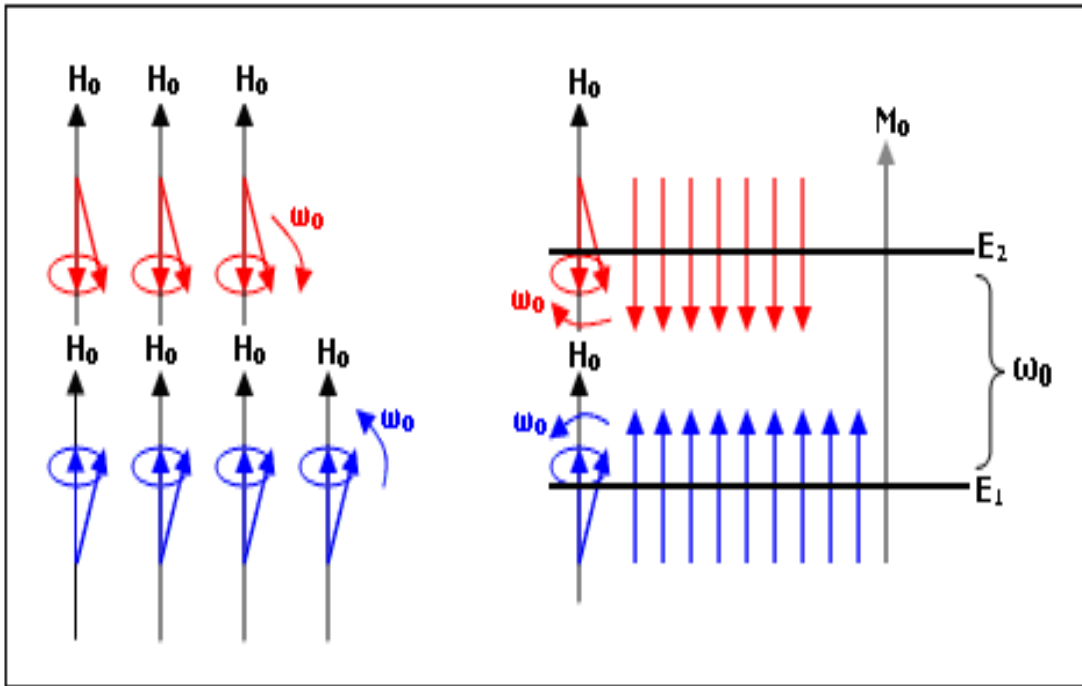
#### 2.2.4. Dış Manyetik Alanın Spin Topluluğuna Etkisi ve Boltzmann Dengesi

Bir dış manyetik alanın olmadığı ( $H_0=0$ ) durumdaki bir spin topluluğu, spinler için uzayda tercihli bir yön olmadığı için her yöne rastgele yönelirler. Bu rastgele yönelimler nedeniyle spin topluluğunun manyetik momentlerinin bileşkesi olan  $M$  mıknatıslanması sıfır olur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Dış manyetik alanın yokluğundaki spin topluluğunun manyetik momentlerinin yönelimi (Yılmaz ve Korunur, 2012)

$\vec{H} = H_0 \hat{k}$  dış manyetik alan içerisinde bulunan bir spin topluluğu, her bir spin bu dış alan etrafında iki tür yönelim göstereceğinden spinler enerji seviyelerine Boltzmann Dağılım Kuralına göre yerleşirler. Enerji seviyelerine spinlerin bu yerleşimi sonunda, enerji seviyelerindeki spin popülasyonu yönünden bir fark meydana gelmekte ve bu farkta sıfırdan farklı bir bileşke manyetik momente yani  $\vec{M} = M_0 \hat{k}$  mıknatıslanmasına neden olmaktadır (Şekil 2.5). NMR sinyali, enerji seviyelerindeki bu nüfus farkından ileri gelen mıknatıslanmadan üretilir.



Şekil 2.5. Dış manyetik alan içerisinde bulunan spin topluluğu ve Boltzmann dengesi (Yılmaz ve Korunur, 2012).

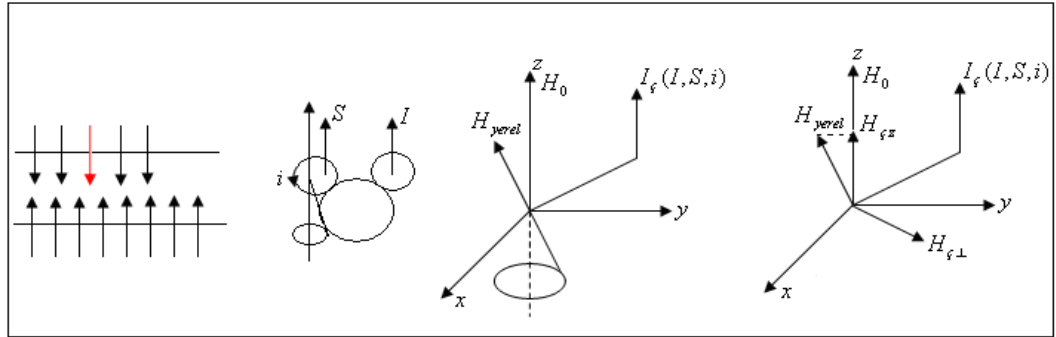
Bir dış manyetik alan içinde bulunan spin topluluğunun enerji seviyelerine yerleşimi Denklem (2.19) de verilen Boltzmann Dağılım Kuralına göre olur. Bu kural;

$$N_1 = C e^{-E_1/kT} \quad \text{ve} \quad N_2 = C e^{-E_2/kT} \quad (2.19)$$

şeklinde yazılır. Denklem alt enerji seviyesine daha fazla ve üst enerji seviyesine daha az spin yerleşeceğini ortaya koyar (Yılmaz ve Korunur, 2012).

### 2.3. RÖLAKSASYONA YOL AÇAN ETKİLEŞME TÜRLERİ ve BU ETKİLEŞMELERİ MODÜLE EDEN HAREKETLER

Boltzmann Dengesi durumunda göz önüne aldığımız bir spinin çevresini düşünelim. Bu spin aslında moleküler bir çevrenin etkisindedir ve bir alan etrafında dönmektedir. Spinin çevresinde bulunan komşu  $I$  spini, komşu  $S$  spini ve komşu  $i$  akımları, etkileşme türlerinin potansiyel kaynağıdır. Çevre kısaca  $I_{\phi}$  ile gösterilebilir. Durum Şekil 2.6' da görülmektedir.



Şekil 2.6. Bir spinin bulunduğu yerde yerel alan kuran çevrelerin şeması

Çevre, spinin bulunduğu yerde bir yerel manyetik alan kurar. Bu manyetik alanın iki bileşeni vardır. Bunlardan biri  $H_0$  dış manyetik alanına paraleldir ve  $H_0$  dış manyetik alanına eklenir. Diğeri ise  $H_0$  dış manyetik alanına diktir.  $H_{\phi}$  alanının  $H_0$  manyetik alanına paralel bileşeni  $H_0$  manyetik alanına eklenerek yeni bir  $H$  alanı meydana getirir. Bu yeni alandan etkilenen spinin dönme hızı da değişir. Yani;

Çevre yokken

$$H_0$$

$$\omega_0$$

i. çevrede

$$H_i = H_0 + H_{par.\phi.i}$$

$$\omega_i = \gamma(H_0 + H_{par.\phi.i})$$

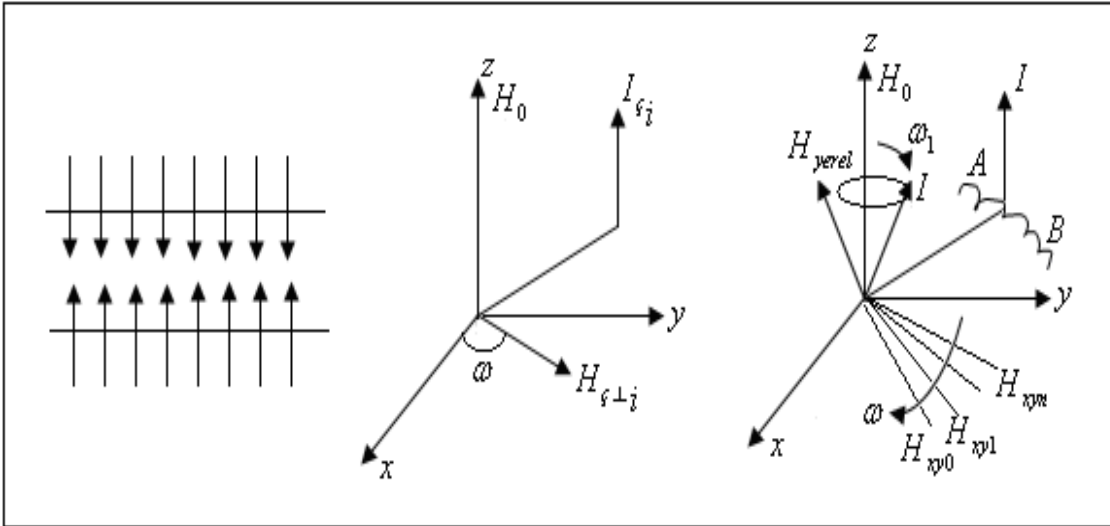
haline gelir. Bu demektir ki çeşitli çevrelerin etkisiyle  $H_0$  alanına eklenen yerel alanlar; spinlerin dönme enerjilerini değiştirmektedir. Yani üst enerji seviyesinin genişlemesine yol açmaktadır.

Diğer yandan  $H_0$  manyetik alanına dik olan yerel alan bileşeni ( $H_{\phi\perp}$ ) enerji seviyeleri arasında geçişlere yol açacaktır. Bu durumu, saturasyon durumundaki spin

üzerinden irdeleyelim: Bu spinin, çevrenin etkisiyle hissettiği  $H_{\zeta\perp}$  alanı zamana bağlıdır ve dolayısıyla frekansa da bağlıdır. Bunun nedeni, incelediğimiz spin ve çevresinin bir molekül içinde olması ve bu molekülün de Brownian hareketinden dolayı hareket halinde olmasıdır. Eğer biz gözlem altındaki spini sabit düşünersek, çevre faktörü ona göre hareketli olur. Bu hareket esnasında yerel alanın değeri devamlı değişir.

### 2.3.1. Dipol-Dipol Etkileşimi

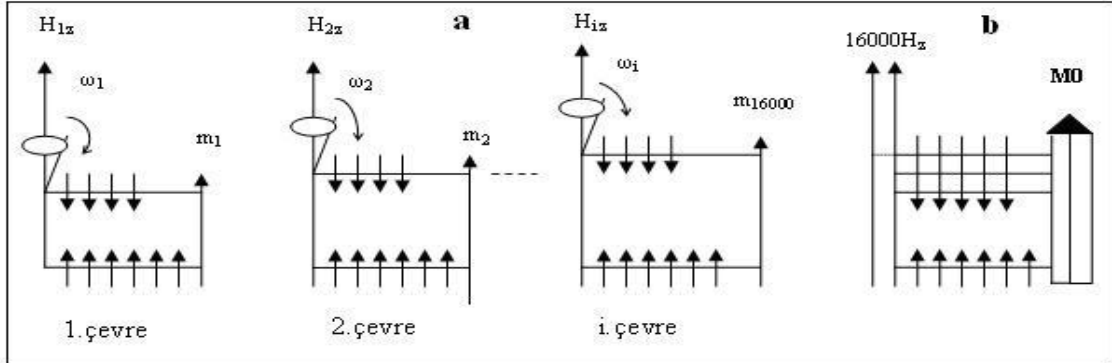
Spin sistemi içinden bir spin göz önüne alınsın. Bu spinin Iç çevresi olarak benzer bir I spinini seçelim. Çevre olan komşu I spini, gözlem altındaki spinin bulunduğu yerde  $H_{yerel}$  alanını kurar (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Dipolar etkileşmeyi anlatan şema (Yılmaz ve Korunur, 2012)

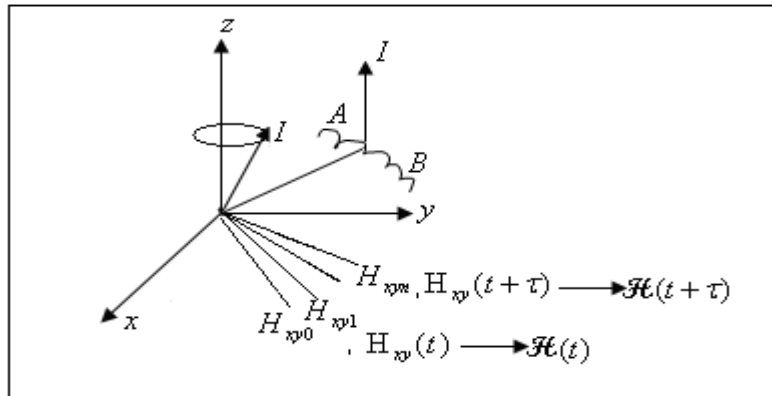
Bu yerel alanın hem z bileşeni hem de xy bileşeni zamanla değişir. Komşu I spininin farklı pozisyonları nedeniyle Hz alanının farklı değerleri olur. Bunlar  $H_{1z}$ ,  $H_{2z}$ , ..... $H_{16000z}$  olarak niteleyebiliriz. Bu değerler birbirinden çok az farklıdır. Bu alanların her biri, kendi etrafında dönen bir spin grubu meydana getirir. Yani  $M_0$  yerine  $M_{1z}$ ,  $M_{2z}$ , .....,  $M_{16000z}$  alanları meydana gelir.  $\omega_0$  yerine de;  $M_1$ , etrafında  $\omega_1$ ,  $M_2$  etrafında  $\omega_2$ , .....  $M_{16000}$  etrafında ise  $\omega_{16000}$  dönmeleri oluşur.  $H_z$  ya da  $\omega$  değerleri

birbirine çok yakın olduklarından, bu alan dağılımı, üst enerji seviyesinin genişlemesi tarzında gözükür (Şekil 2.8).



**Şekil 2.8.** (a) Komşu I spinlerinin, gözlem altındaki spinlerin bulunduğu yerlerde kurdukları yerel alanların z bileşenlerinin yol açtığı enerji seviyesi genişlemeleri. (b) Enerji seviyeleri genişlemelerinin toplu gösterimi (Yılmaz ve Korunur, 2012)

Burada sadece üst seviye genişlemektedir. 16.000 farklı şekilde genişleme (veya değişme) mümkün olduğu için spinler 16.000 gruba ayrılır. M<sub>0</sub> miknatıslanması da 16.000 alt miknatıslanmaya ayrılır. Şekil 2.9' deki resimde spini sabit tutulmuş gözlem altındaki bir moleküle komşu bir molekülün çarpması sonucu meydana gelen bağlı hareket gösterilmiştir. Bu hareket esnasında, gözlem altındaki molekül üzerindeki spinin bulunduğu yerde komşu spin tarafından bir yerel alan kurulur. Komşu spinin bu molekül yüzeyindeki hareketi rastgele bir harekettir. Bunun sonucu olarak, x-y düzleminde kurulan H<sub>xyç</sub> alanı da gelişigüzel değişir. Ancak komşu bir molekülün çarpması sonucu, gözlem altındaki molekül dönmelere maruz kaldığından; H<sub>xyç</sub> alanı da döner (Şekil 2.9). Bu alanın dönme frekansı, H<sub>z</sub> etrafında dönen spinin frekansına eşit olunca enerji yutulur ya da salınır ve böylece T<sub>1</sub> rölaksasyonu meydana gelir.



**Şekil 2.9.** Gözlem altındaki spinin, komşu spininin doğurduğu H yerel manyetik alanının  $H_{xy}$  bileşenlerinden etkilenmesini gösteren şema (Yılmaz ve Korunur, 2012)

Çevre spinin ( $I_c$ ) 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 2.8 üzerinde gösterilmiştir. Daha önce söylendiği gibi ardışık olarak değişen  $H_{xy}$  alanlarının rezonansa yol açmaları için  $\omega$  açılal 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* ( $\tau$ ) 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 rölaksasyona katkı olmaz.

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

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

$$G_{xy}^{-1, \text{ij}}(\tau) = \mathcal{H}_{xy}(\tau) \mathcal{H}_{xy}(t + \tau) \quad (2.20)$$

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

$$H = -\vec{\mu} \cdot \vec{H}_c \quad (2.21)$$

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

**b)** t, hareketin başlangıç anıdır.  $\tau$  ise  $H_{xy}$  alanları arasında ilginin koptuğu 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



$$G_{xy}^{1,ij}(t) = \overline{\mathcal{H}_{xy}(t) \mathcal{H}_{xy}(t+\tau)} \quad (2.22)$$

olacaktır. Bizim incelediğimiz sistemlerde  $G$  fonksiyonu zamandan bağımsızdır.

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

$$J(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\tau) e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (2.23)$$

Brownian hareketler için ;

$$G(\tau) = G_0 e^{-1/\tau} \quad (2.24)$$

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

$$J(\omega) = G_0^2 \frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (2.25)$$

elde edilir.

d) Diğer taraftan  $\frac{1}{T_1}$  rölaksasyon oranı  $J(\alpha\omega)$ ' ların ( $\alpha = 0,1,2,\dots,n$ ) karışık bir fonksiyonudur ve

$$\frac{1}{T_1} = f(J(\alpha\omega)) = f\{J(\omega) + J(2\omega)\} \quad (2.26)$$

$$\frac{1}{T_2} = f\{3J(0) + 5J(\omega) + 2J(2\omega)\} \quad (2.27)$$

şeklinde verilir. Böyle bir bağıllık, matematiksel analizden çıkarılmaktadır. Dipolar etkileşmelerin varlığında ( $I_{\text{ç}}=I$ ) ya da H<sub>2</sub>O çözeltilerinde  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  rölaksasyon oranları aşağıdaki formüllerle verilir (Bahçeli 1996):

$$\frac{1}{T_1} = \frac{6}{20} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left( \frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{4\tau}{1 + 4\omega^2 \tau^2} \right) \quad (2.28)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{6}{40} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left( 3\tau + \frac{5\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{2\tau}{1 + 4\omega^2 \tau^2} \right) \quad (2.29)$$

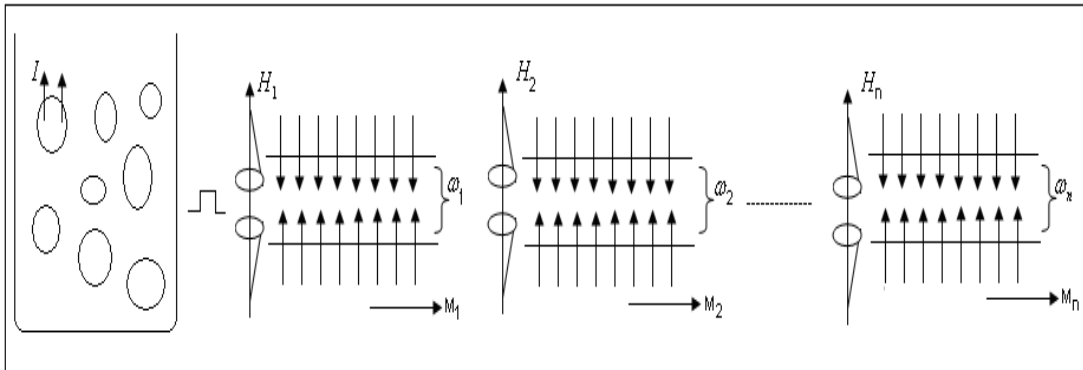
Gözlem altındaki I spinin çevresi D olduğunda durulma oranı

$$\frac{1}{T_1} = \left\{ (2/15)(\gamma_H^2 \gamma_D^2 \hbar^2 / r_{ID}^6) D(D+1) [J(\omega_I - \omega_D) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_D)] \right\} \quad (2.30)$$

şeklinde yazılır (Yılmaz ve Korunur, 2012).

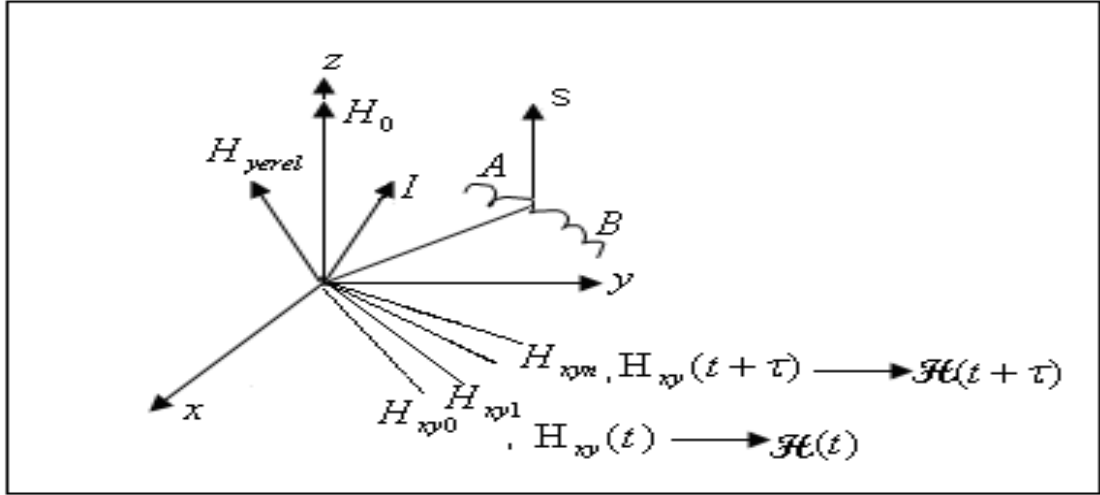
### 2.3.2. Paramanyetik İyonlar Yoluyla Rölaksasyon

Bir spin sistemi RF yoluyla saturasyona getirilmiş olsun. Bu demektir ki n farklı çevreye ait enerji seviyeleri doygun vaziyettedir ve bu seviyelere ait mıknatıslar da y-eksenine yatmıştır. Bu durum Şekil 2.10' da görülmektedir.



Şekil 2.10. Satüre edilmiş spin sistemi ve y-eksenine yatmış mıknatıslanmalar

Gözlem altındaki spinin (yerel alandan etkilenen spin) çevresi özdeş bir spin olmayabilir. Bu kez çevre, hemen yakınındaki bir elektron spinini olsun. Bu durum Şekil 2.11’ de görülmektedir.



Şekil 2.11. Proton spininin komşusu olan elektron spinini ve rölatif hareketi

Gözlem altındaki proton spinini ile komşu elektron spinini arasındaki etkileşme hamiltonyeni

$$\mathcal{H}(t) = -\vec{\mu}_I \cdot \vec{H}_{yerel} \quad (2.30a)$$

$$\mathcal{H}(t) = (\gamma_I \gamma_s) \hbar \left[ \frac{\vec{I} \cdot \vec{S}}{r^3} - 3 \frac{(\vec{I} \cdot \vec{r})(\vec{S} \cdot \vec{r})}{r^5} \right] \quad (2.30b)$$

Gerek I-I çiftinin etkileşmesinde gerekse I-S çiftinin etkileşmesinde yazılan hamiltonyeni, dipolar hamiltonyendir. İki spin arasında r mesafesi varken ki etkileşmeyi anlatmaktadır. Yani çevre olan spinin, gözlem altındaki spinin bulunduğu yerde kurduğu yerel alan ile spinin etkileşimini ( $-\vec{\mu}_I \cdot \vec{H}_{yerel}$ ) anlatmaktadır. Bu etkileşme türünde de S spinini I spinine göre rölatif hareket yapmakta, bu hareket xy dış alanlarını zamana bağlı kılmakta ve alanın bir  $t$  anındaki değeri ile  $t + \tau$  anındaki değeri arasında bir ilişki varsa, bu ilişki;

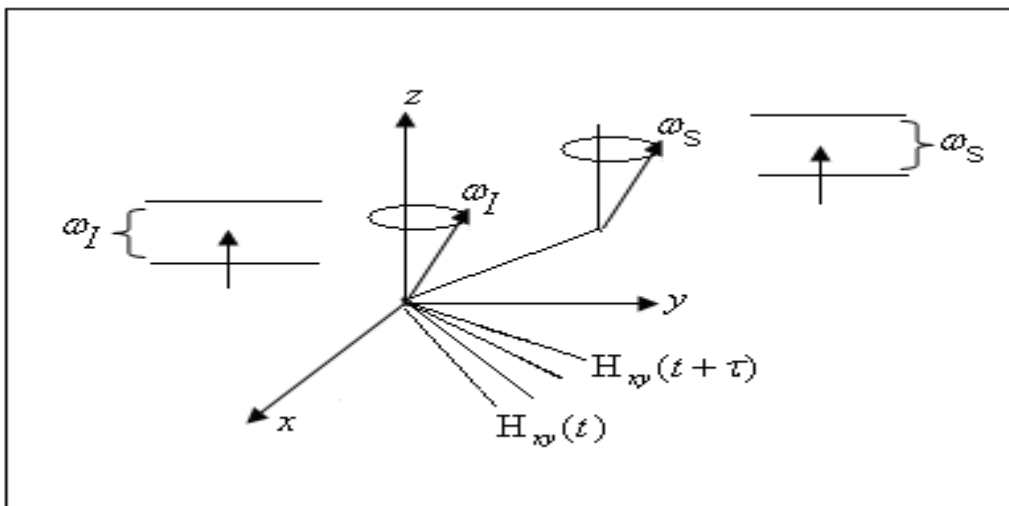
$$G(\tau) = \overline{\mathcal{H}_{xy}(\tau) \mathcal{H}_{xy}(t + \tau)} \quad (2.30c)$$

aracılığıyla anlatılmaktadır. Her ne kadar biz bir I-S çiftini kullanarak olayı anlattıksa da örneğin içerisinde Avogadro sayısı kadar çift vardır. Tüm çiftlerin etkisini dikkate aldığımızda ortalama almamız gerekmektedir. Bu ortalama üst çizgi şeklinde gösterilmiştir.  $G(\tau)$  üzerinden işlemler yapılırsa  $J(\omega)$  lar cinsinden röleksasyon formülleri elde edilir. Burada  $J(\omega)$ ;

$$J(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\tau) e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (2.30d)$$

şeklinde olup  $G(\tau)$  'nun Fourier dönüşümüdür.

S elektron spininin bağıl hareketlerinin ne olduğunu bir düşünelim. Bu hareket çarpışmalar yoluyla meydana gelen Brown hareketi olabilir ve Şekil 2.11' deki gibi gösterilebilir. S spininin varlığında bu hareketin çok etkili olmadığı deneylerden bilinmektedir. Gerek S spini ve gerekse I spini bir dış alan içerisinde. Bu spinler dış alan etrafında alanla aynı yönde dönme ve alana ters yönde dönme olmak üzere iki türlü dönme hareketi yapmaktadır. Bu nedenle her iki spin de 2 ayrı enerji seviyesinde bulunmaktadır. Bu durum Şekil 2.12' de gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Elektron spininin enerji seviyesindeki bağıl hareketi

Çevresiyle olan etkileşme yüzünden elektron spini, bir enerji seviyesinden diğerine geçiş yapabilir. Elektron spininin z bileşeninin yön değiştirmesi, I spininin bulunduğu yerde kurulan alanı zamana bağlı kılar. Bu durumda ilgi zamanı, elektronun rölaksasyon zamanına eşit olmaktadır. Yani proton spininin bulunduğu yerdeki manyetik alanı, spinin yön değiştirmesi zamana bağlı kılmakta ve rölaksasyona yol açmaktadır. I-S etkileşimi yoluyla meydana gelen proton rölaksasyonu,

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{10} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r^6} \left( \frac{\tau}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + \omega_I^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau^2} \right) \quad (2.30e)$$

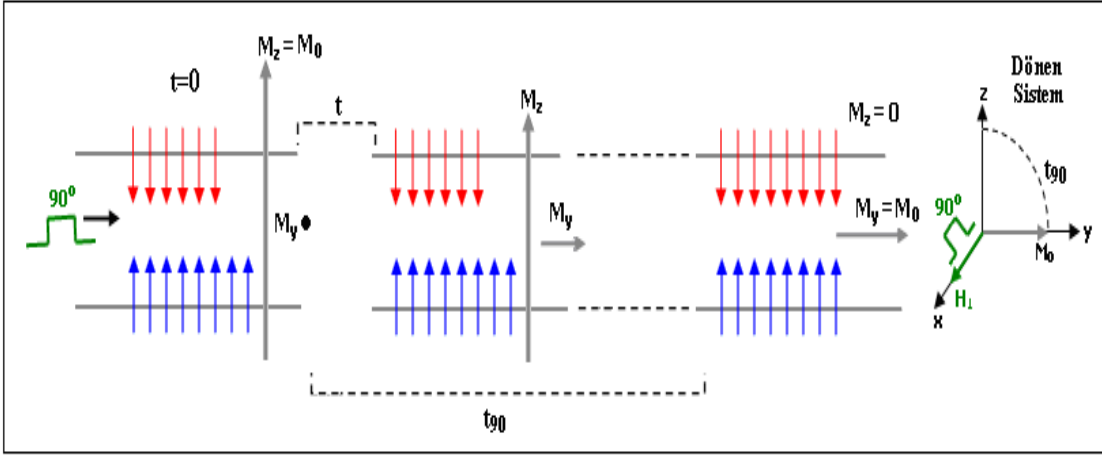
$$\frac{1}{T_2} = \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{20 r^6} \left( 4\tau + \frac{\tau}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + \omega_I^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + \omega_S^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau^2} \right) \quad (2.30f)$$

bağıntılarıyla verilir.

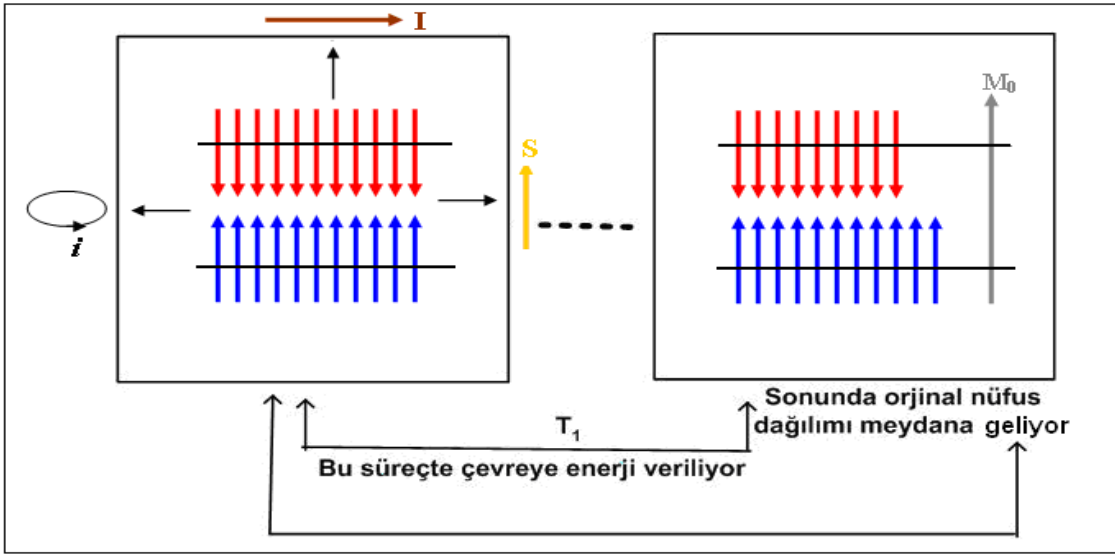
## 2.4. NMR $T_1$ ve $T_2$ RÖLAKSASYON ZAMANLARI

### 2.4.1. Spin-Örgü Rölaksasyon Zamanı ( $T_1$ )

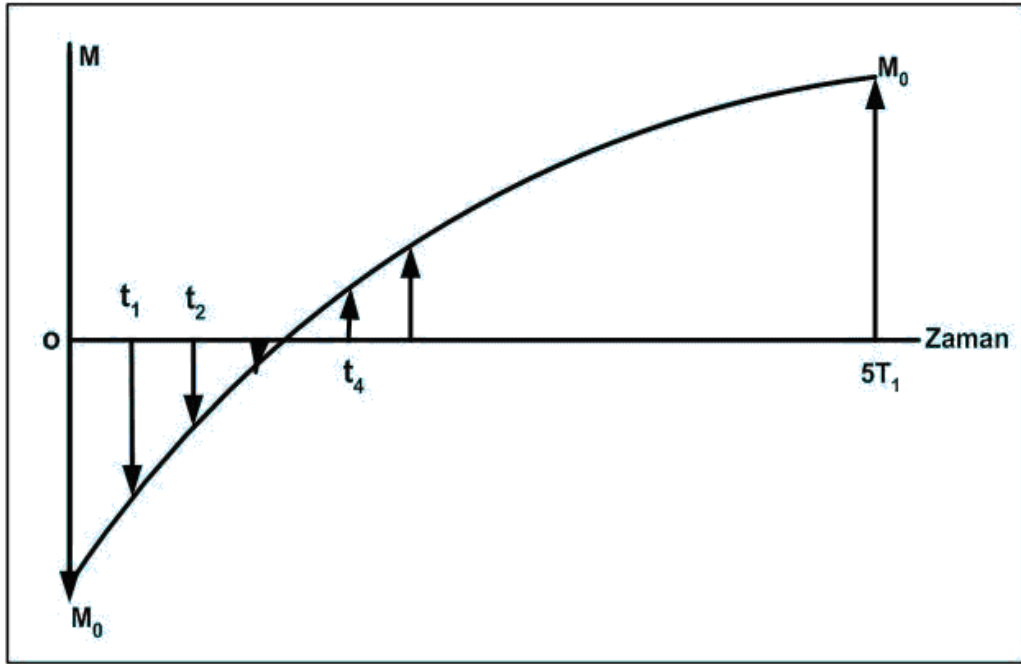
Boltzmann dengesi durumundaki bir spin sistemine radyofrekans (RF) alanı uygulandığında spin sistemi enerji seviyelerindeki spin popülasyonlarının eşit olduğu Saturasyon durumuna geçer. Bu durumda  $M_0$  mıknatıslanması y-eksenine yatar.  $M_0$  mıknatıslanması y-eksenindeyken RF alanı kesilirse buna  $90^\circ$  pulsu denir. Saturasyon durumunun ve  $90^\circ$  pulsunun temsili bir görüntüsü Şekil 2.13' de verilmiştir.

Şekil 2.13.  $90^\circ$  Pulsu ve Saturasyon halini

Puls kesildikten sonra spin sistemi RF' ten aldığı enerjiyi çevreye yani örgüye vererek yeniden Boltzmann dengesine geri döner. Spin sisteminin Saturasyon halinden tekrar Boltzmann dengesine geçmesi için geçen süreye spin-örgü rölaksasyon zamanı ( $T_1$ ) denir. Spin-örgü rölaksasyon zamanının temsili bir görüntüsü Şekil 2.14' de verilmiştir.

Şekil 2.14. Spin-örgü rölaksasyon zamanı ( $T_1$ ) şeması

Spin-örgü rölaksasyon zamanı ölçümünde, Inversion Recovery puls adımları tekniği kullanılır. Bu adımların sonunda elde edilen mıknatıslanma sinyallerinin zamana karşı grafiğe geçirilmesinden  $T_1$  rölaksasyon zamanı elde edilir. Bu durum Şekil 2.15' de gösterilmiştir.



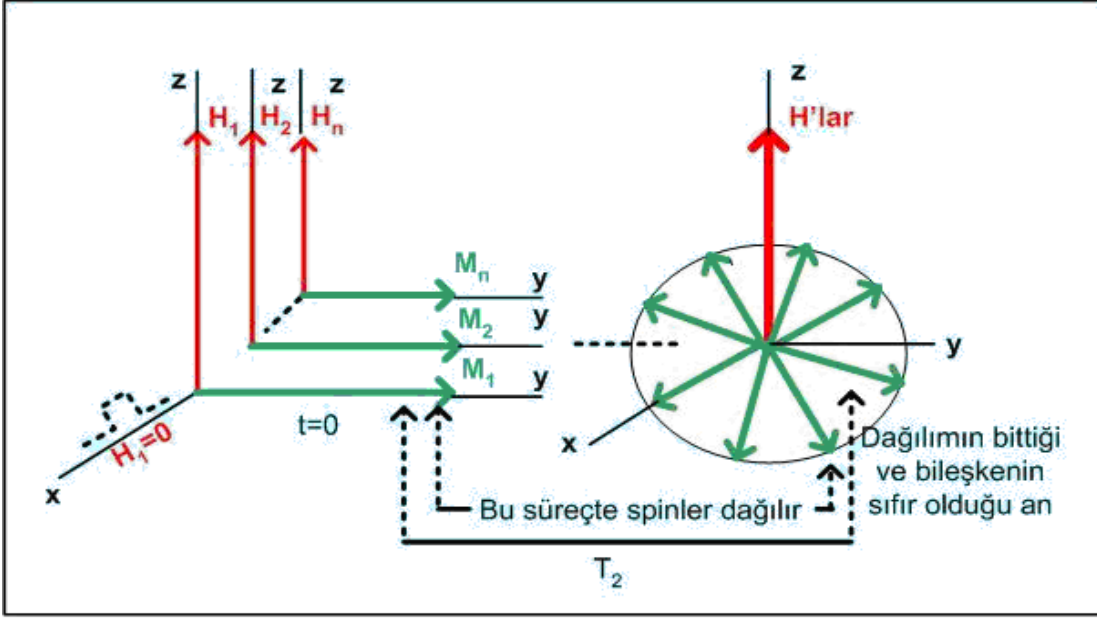
Şekil 2.15. Inversion Recovery Eğrisi

Spin-örgü rölaksasyon zamanı  $T_1$ , bu eğrinin denkleminde elde edilmektedir. Bu denklem Denklem (2.31)' deki gibidir.

$$M_z(t) = M_0 (1 - 2e^{-t/T_1}) \quad (2.31)$$

#### 2.4.2. Spin-Spin Rölaksasyon Zamanı ( $T_2$ )

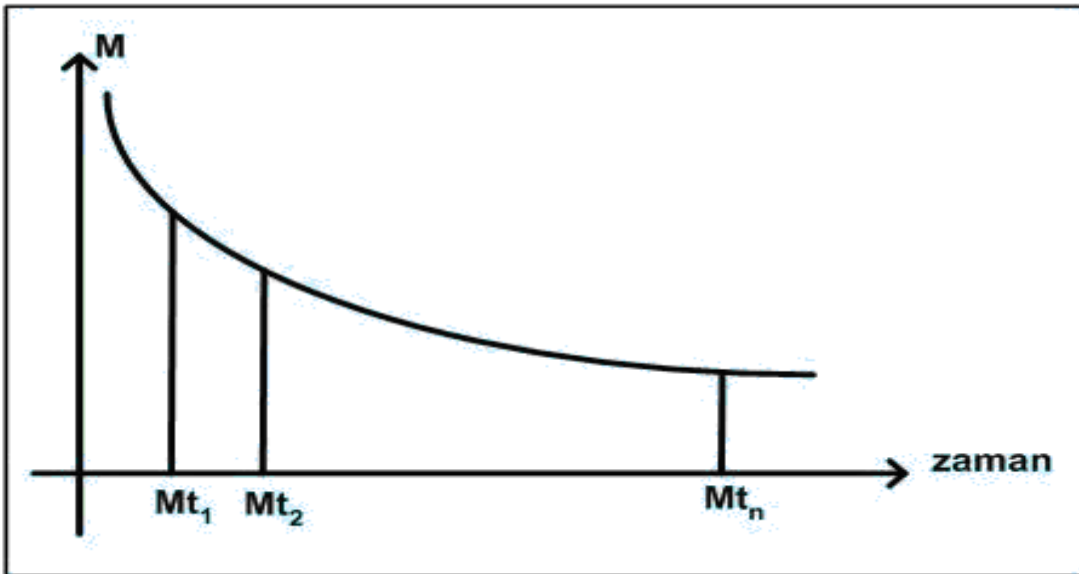
Spin sistemine  $90^\circ$  pulsu uygulanınca örnekteki  $M_1, M_2, \dots, M_n$  mıknatıslanmaları y-eksenine döner. Puls kesildikten sonra:  $M_1, H_1$ 'i;  $M_2, H_2$ 'yi ;...;  $M_n, H_n$ ' i hissederek x-y düzleminde döner. Böylece  $M_1$  in dönme hızı  $\omega_1$ ,  $M_2$  nin dönme hızı  $\omega_2$ , ...,  $M_n$  nin dönme hızı  $\omega_n$  olur. Dönme hızları farklı olduğundan en sonunda mıknatıslanmalar rastgele dağılır. Durum Şekil 2.16' deki gibi olur.



Şekil 2.16. Spin sisteminin defaze olması ve  $T_2$  rölaksasyon zamanı

Tüm spinlerin aynı yönde olduğu durumdan (ilk resim), spinlerin rastgele dağıldığı duruma (son resim) kadar geçen süreye  $T_2$  spin-spin rölaksasyon zamanı denir.

$T_2$  spin-spin rölaksasyon zamanı ölçümlerinde Spin-Echo Puls adımları tekniği kullanılır. Bu adımların peş peşe uygulanması sonunda elde edilen mıknatıslanma sinyallerinin zamana karşı grafiğe geçirilmesinden  $T_2$  rölaksasyon zamanı elde edilir. Bu durum Şekil 2.17' de gösterilmiştir.



Şekil 2.17. Manyetizasyon bozunum eğrisi



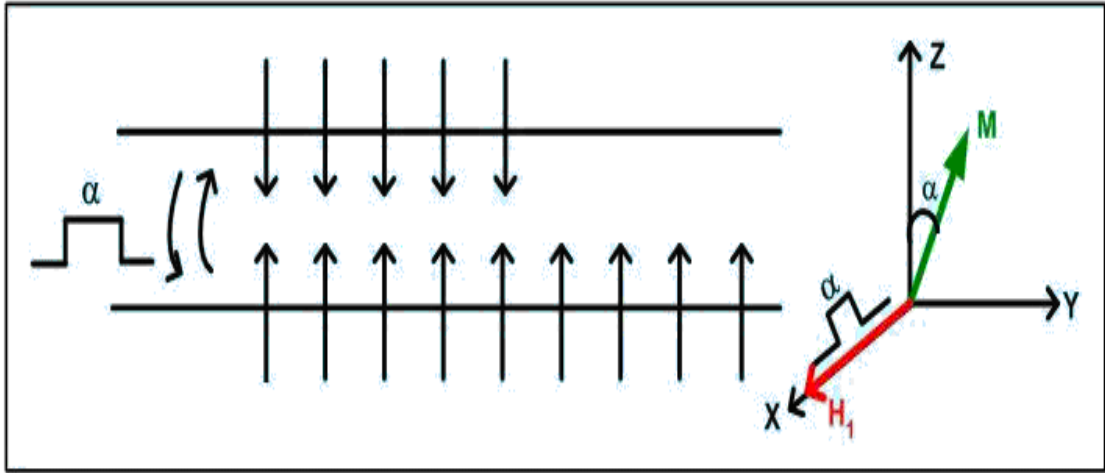
Spin-spin rölaksasyon zamanı  $T_2$ , bu eğrinin formülünden elde edilmektedir. Bu fonksiyon Denklem (2.32)' deki gibidir.

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{-t/T_2} \quad (2.32)$$

### 2.4.3. NMR Rölaksasyon Zamanları Ölçümünde Kullanılan Pulslar

#### 2.4.3.1 Radyofrekans (RF) Pulsu

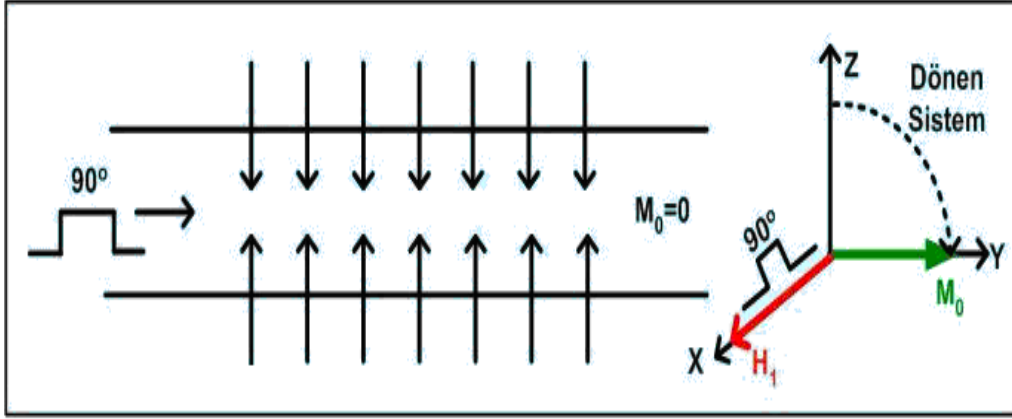
RF pulsu enerji taşıyan bir dalga olmaktadır. Numuneye x-ekseni yönünde uygulanır. Pulsun uygulandığı sürenin her adımında üst seviyedeki spin sayısı giderek artar (yani z-yönündeki mıknatıslanma giderek azalır) ve mıknatıslanma belli bir açı kadar döner. Puls kesildiğinde üst seviyenin popülasyonu artmış (yani z-yönündeki mıknatıslanma azalmış) ve  $M$  mıknatıslanmasının yönü de  $\alpha$  açısı kadar değişmiştir. Durum Şekil 2.18' deki gibi şematize edilebilir.



Şekil 2.18. Boltzmann Dengesindeki spin topluluğuna RF pulsu uygulanması

#### 2.4.3.2. 90° pulsu

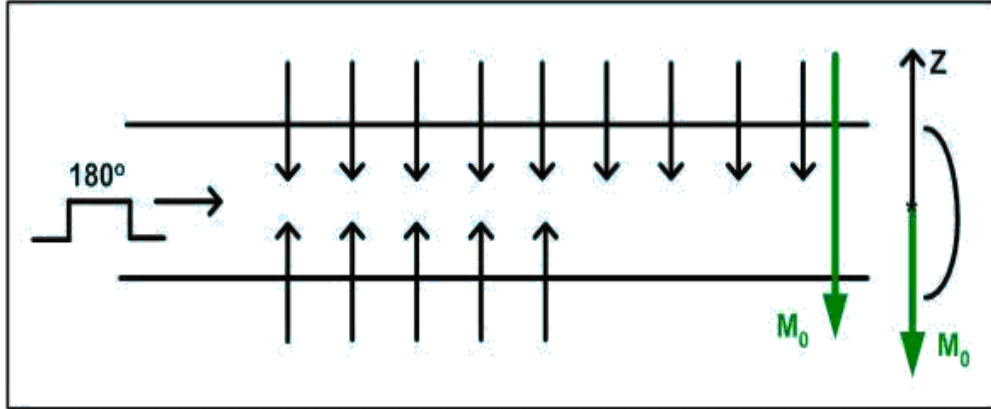
Alt ve üst seviyedeki spin sayısını eşitlemeye yarayan ve kısa bir süre uygulanan enerjidir. Bu süre sonunda  $M_0$  mıknatıslanması da y-yönüne döner. Yani pulsun uygulandığı süre  $M_0$  mıknatıslanmasını  $90^\circ$  çevirir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. 90° Pulsu ve  $M_0$  mıknatıslanmasının y-eksenine yatması

### 2.4.3.3. 180° pulsu

Alt seviyede fazla spinlerin tümünü üst seviyeye geçiren puls olmaktadır. Bu işlem sonunda  $M_0$  mıknatıslanması  $H_0$ 'a antiparalel olur (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. 180° Pulsu ve  $M_0$  mıknatıslanmasının (-z) eksenine terslenmesi

## 2.5. PROTEİN ÇÖZELTİLERİ İÇİN RÖLAKSASYON ZAMANLARI KURAMI

### 2.5.1. Düşük Frekans Deneyleri için Kuram

D2O çözeltilerindeki artık (residual) su protonları HDO formunda bulunur (Kühne ve Bryant 2000, Van-Quynh ve ark. 2003, Duplan ve ark. 2005). HDO'nun

proteinle etkileşimi H<sub>2</sub>O'nunkine benzer varsayılır (Kiihne ve Bryant 2000, Van-Quynh ve ark. 2003). Bunun için albuminin D<sub>2</sub>O çözeltilerinde HDO'nun temel olarak 3 durumu vardır: **(i)** serbest HDO; **(ii)** protein yüzeyine yakın HDO (kısa-ömürlü HDO molekülleri); **(iii)** proteine sıkı bağlı ya da proteine gömülü HDO molekülleri (uzun-ömürlü HDO molekülleri). Protein üzerinde bir paramanyetik merkez varlığında, bu merkezi de dikkate alarak ve de HDO'nun farklı yerleri arasında hızlı kimyasal değiş-tokuş varlığında; albumin çözeltilerindeki gözlenen  $1/T_1$  Denklem (2.33)' deki gibi yazılabilir (Kiihne ve Bryant 2000, Van-Quynh ve ark. 2003):

$$\frac{1}{T_{obs}} = \frac{P_f}{T_{1f}} + \frac{P_s}{T_{1s}} + \left( \frac{P_b}{T_{1b} + \tau_{res}} \right) + 1/T_{1PM} \quad (2.33)$$

burada birinci terim  $P_f$  olasılığıyla birlikte serbest çözücünün molekül içi H-D katkısını belirtiyor. İkinci terim; tek bir  $P_s$  olasılığıyla karakterize edilen protein yüzeyine yakın HDO moleküllerinin katkısını gösterir.  $1/T_{1b}$ ,  $P_b$  ve  $\tau_{res}$  sırasıyla rölaksasyon oranı, yer işgal olasılığı ve proteine bağlı HDO molekülleri için rotasyonel korelasyon zamanından daha uzun zamanlı ortalama residence(ikamet, oturma) zamanıdır (Halle 2004, Kiihne ve Bryant 2000, Van-Quynh ve ark. 2003).  $1/T_{1b}$ , bağlı HDO'nun molekül içi katkısını içeriyor. Ayrıca; bağlı bir HDO ile exchangeable (değiştirilebilen) protein protonları arasındaki ve bağlı bir HDO ile non-exchangeable (değiştirilemeyen) protein protonları arasındaki etkileşmelerin neden olduğu katkıları da içerir (Bryant 1996, Bertini ve ark. 2000, Gallier 1987, Kiihne ve Bryant 2000, Van-Quynh ve ark. 2003).  $1/T_{1PM}$ ; paramanyetik merkez ile (bu deneylerde  $Fe^{3+}$ ) çevresindeki protonların etkileşiminden ileri gelen katkıyı ifade etmektedir.

Serbest ve bağlı HDO'nun molekül içi katkıları; HDO molekülünün H ve D' si arasındaki etkileşmeden meydana gelmektedir. İlgili terimler Denklem (2.34)' deki gibi yazılabilir:

$$\frac{1}{T_{moleküllü}} = P_f B' (1/r_D^6) [J(\omega_I - \omega_D) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_D)] \\ + P_b AB' (1/r_D^6) [J(\omega_I - \omega_D) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_D)] \quad (2.34)$$

burada  $B' = (2/15)(\gamma_I^2 \gamma_D^2 \hbar^2) D(D+1)$ .  $\gamma_I$ ,  $\gamma_D$  ( $\gamma_I/6.5$ ),  $\omega_I$  ve  $\omega_D$  ( $\omega_I/6.5$ ) ise sırasıyla proton ve döteronun jromanyetik oranları ve rezonans frekanslarıdır.  $r_D$ , HDO' daki H ve D arasındaki mesafeyi belirtir. İkinci terimdeki A faktörü, HDO' nun iç hareketi için bir order parametredir. Birinci terim serbest HDO' nun katkısını ve ikinci terimde bağlı HDO' nun katkısını temsil ediyor. Denklem (2.34)' deki  $J(\omega_I - \omega_D)$ ,  $J(\omega_I + \omega_D)$  ve  $J(\omega_I)$  Denklem (2.35) gibi tanımlanır.

$$\begin{aligned} J(\omega_I - \omega_D) &= \left[ \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_D)^2 \tau_c^2} \right] \\ J(\omega_I + \omega_D) &= \left[ \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_D)^2 \tau_c^2} \right] \\ J(\omega_I) &= \left[ \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I)^2 \tau_c^2} \right] \end{aligned} \quad (2.35)$$

Burada  $\tau_c$  ilgi (korelasyon) zamanıdır. Serbest ve bağlı HDO için ilgi zamanı farklı değerlere sahiptir. İhmal edilebilir düzeyde olan serbest HDO katkısı, gözlenen rölaksasyondan çıkarıldığı için, bu katkıyı hesaba almaya gerek yoktur. Daha sonra gösterileceği üzere, bağlı suyun molekül içi katkısı da ihmal edilebilir mertebededir.

Diğer taraftan  $1/T_{1PM}$ , çevresindeki protein ve bağlı su protonları ile etkileşebilir. Ortalama bir uzaklık seçimi durumunda,  $1/T_{1PM}$  ve  $1/T_{2PM}$  aşağıdaki gibi yazılır;

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{10} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r^6} \left( \frac{\tau}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + \omega_I^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau^2} \right) \quad (2.36)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{20} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r^6} \left( 4\tau + \frac{\tau}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + \omega_I^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1 + \omega_S^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau^2} \right) \quad (2.37)$$

Yukarıdaki denklemler  $\omega_s \approx 658\omega_I$  olduğundan  $\omega_I \ll \omega_s$  varsayımı altında aşağıdaki hallere dönüşür.

$$\frac{1}{T_{1PM}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 \gamma_s^2 \hbar^2 S(S+1)}{r^6} \left( \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{7\tau_c}{1 + \omega_s^2 \tau_c^2} \right) \quad (2.38)$$

$$\frac{1}{T_{2PM}} = \frac{1}{15} \frac{\gamma_I^2 \gamma_s^2 \hbar^2 S(S+1)}{r^6} \left( 4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{13\tau_c}{1 + \omega_s^2 \tau_c^2} \right) \quad (2.39)$$

burada  $S$  elektron spin kuantum sayısıdır.  $r$  ise metal iyon ve protonlar arasındaki mesafedir.  $\omega_I$  ve  $\omega_s$  sırasıyla proton ve elektron Larmor frekanslarıdır.  $\gamma_I$  proton nükleer jromanyetik orandır. (2.38) denklemindeki dipolar etkileşmenin ilgi zamanı  $\tau_c$  aşağıdaki şekilde verilir;

$$\tau_c^{-1} = \tau_R^{-1} + \tau_M^{-1} + \tau_S^{-1} \quad (2.40)$$

burada  $\tau_R$  protein için rotasyonel ilgi zamanıdır.  $\tau_S$  elektron spin rölaksasyon zamanıdır.  $\tau_M$  ise exchangeable protonların ortalama ikamet(residence) zamanıdır. Bu katkının ihmal edilir mertebede olduğu gösterilecektir.

Yukarıdaki analizlere göre geriye sadece bağlı suyun moleküller arası katkısı kalmaktadır. Hızlı değiş-tokuş yapan su için  $\tau_{res} \ll 1/T_{1b}$  tutuluyor (Kiihne ve Bryant 2000, A. Van-Quynh ve ark. 2003). Tek bir ilgi zamanının seçilmesi durumunda bağlı HDO' nun moleküller arası katkıları Denklem (2.41)' deki gibi temsil edilebilir;

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} - P_f \frac{1}{T_{1f}} &= P_b AB \sum_k (1/r_k^6) \left[ \frac{\tau_k}{1 + \omega_I^2 \tau_k^2} + \frac{4\tau_k}{1 + 4\omega_I^2 \tau_k^2} \right] \\ &+ P_b AB \sum_n (1/r_n^6) \left[ \frac{\tau_n}{1 + \omega_I^2 \tau_n^2} + \frac{4\tau_n}{1 + 4\omega_I^2 \tau_n^2} \right] \end{aligned} \quad (2.41)$$

Burada k ve n sırasıyla exchangeable ve non-exchangeable protein protonlarını temsil ediyor. Toplamlar, protein protonlarının bütün konumları üzerinden alınıyor (Kiihne ve Bryant 2000, A. Van-Quynh ve ark. 2003).

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} - P_f \frac{1}{T_{1f}} = P_b B \sum_{k=1}^{\alpha} (1/r_k^6) \left[ \frac{\tau_r}{1 + \omega_l^2 \tau_r^2} + \frac{4\tau_r}{1 + 4\omega_l^2 \tau_r^2} \right] \\ + P_b B \sum_{n=1}^{\beta} (1/r_n^6) \left[ \frac{\tau_r}{1 + \omega_l^2 \tau_r^2} + \frac{4\tau_r}{1 + 4\omega_l^2 \tau_r^2} \right] \end{aligned} \quad (2.42)$$

burada  $\tau_r$ , albuminin rotasyonel ilgi zamanıdır. (2.42) denklemindeki toplamlar ortalama değerler yoluyla yeniden değerlendirilebilir. Bu durumda;

$$\sum_{k=1}^{\alpha} (1/r_k^6) = \alpha \left( \frac{1}{r_{ort}^6} \right)_k \quad \text{ve} \quad \sum_{n=1}^{\beta} (1/r_n^6) = \beta \left( \frac{1}{r_{ort}^6} \right)_n \quad (2.43)$$

olur. Burada k ve n alt indisleri sırasıyla exchangeable ve non-exchangeable protein protonlarının ortalamasını gösteriyor. Denklem (2.42) ve Denklem (2.43), Denklem (2.41)' e yerleştirilirse; protein protonlarının ortalama katkıları için Denklem (2.44) elde edilir.

$$\frac{1}{T_1} - P_f \frac{1}{T_{1f}} = P_b B \left[ \gamma \left( \frac{1}{r_{ort}^6} \right) \right] \left[ \frac{\tau_r}{1 + \omega_l^2 \tau_r^2} + \frac{4\tau_r}{1 + 4\omega_l^2 \tau_r^2} \right] \quad (2.44)$$

(r)' nin basit ortalaması, minimum mesafe ile maksimum mesafenin toplamının 2' ye bölümüdür. Minimum mesafe ya da bağlı bir HDO ve protein protonu arasındaki en yakın mesafe,  $2.2\text{\AA}^0$  luk van der Waals temas mesafesidir (Van-Quynh ve ark. 2003). Maksimum mesafe, her bir bireysel katkının ihmal edilebildiği en uzak mesafedir.

Benzer yollar izlenerek  $T_2$  rölaksasyonu için

$$\frac{1}{T_2} - P_f \frac{1}{T_{2f}} = \frac{P_b B}{2} \left[ \gamma \left( \frac{1}{r_{ort}^6} \right) \right] \left[ 3\tau_r + \frac{5\tau_r}{1 + \omega_l^2 \tau_r^2} + \frac{2\tau_r}{1 + 4\omega_l^2 \tau_r^2} \right] \quad (2.45)$$

bağıntısı elde edilir. Gözlenen  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  rölaksasyon zamanları oranı protein konsantrasyonuna bağlı olarak aşağıdaki şekilde yazılabilir;

$$\frac{1}{T_1} = P_f \frac{1}{T_{1f}} + P_b \frac{1}{T_{1b}} = P_f \frac{1}{T_{1f}} + m_1 C \quad (2.46)$$

$$\frac{1}{T_2} = P_f \frac{1}{T_{2f}} + P_b \frac{1}{T_{2b}} = P_f \frac{1}{T_{2f}} + m_2 C \quad (2.47)$$

burada C protein konsantrasyonunu,  $m_1$  ve  $m_2$  ise rölaksasyon oranları ve protein konsantrasyonu arasındaki bağıntıların eğimini veriyor. Denklem (2.44), (2.45), (2.46) ve (2.47) kullanılarak,  $m_1/2m_2=m$  tanımlaması yapılarak  $(1/T_1 - P_f 1/T_{1f})/2(1/T_2 - P_f 1/T_{2f})$  oranı için aşağıdaki ifade elde edilir:

$$12m(\omega_1 \tau_r)^4 + (37m - 8)(\omega_1 \tau_r)^2 + (10m - 5) = 0 \quad (2.48)$$

### 2.5.2. Yüksek Frekans Deneyleri için Kuram

NMR gözlemlerinin, bir an için kararsız dinamik ya da yapıların ortalanmış uzaysal ve ortalanmış zamansal nicelikleri verdiği biliniyor. Mevcut yaklaşım bu olguları hesaba alıyor, zaman ve mesafeyle ilgili ortalama niceliklere göre kestirimler yapıyor. Bu yüzden bu yaklaşım; çözeltildeki albumin molekülleri tarafından D2O ve HDO moleküllerinin ve ayrıca su bağlanma yerleri tarafından protein protonlarının eşit paylaşımına dayanır. Kullanılan D2O' da artık (residual) H2O' nun D2O'ya oranı %99.9 saflıklı çözücü için 1/1000' dir. Albuminin D2O çözeltilerinde artık su HDO formundadır ve proteinle HDO' daki H' in etkileşimi H2O' nun benzeri olarak varsayılır. Bir albumin molekülü 3600 non-exchangeable ve 1000 exchangeable protein protonlarına ve ayrıca 25 su bağlama yerine sahiptir (Gallier ve ark. 1987, Kiihne ve Bryant 2000). Bu nedenle, albuminin bir su bağlama yeri başına 40 mobil protein protonu vardır. Her bir albumin molekülü, HDO moleküllerinin küçük bir miktarını içeren D2O havuzuna batıyor. Protein yüzeyi birkaç HDO molekülü içeren temel olarak D2O molekülleri tarafından kuşatılır. Ayrıca protein yüzeyindeki su  $10^{-11}s'$  den  $10^{-10}s$  değerine kadar uzanan aralıkta ikamet(residence) zamanına sahiptir (Denisov ve Halle 1996, Moding ve ark. 2004, Hua ve ark. 2006, Pizzitutti ve ark. 2007). Protein yüzeyindeki HDO' nun ortalama ikamet zamanı, yaklaşık 0.5ms-5ms olan mobile

protein protonların ikamet zamanından çok daha küçüktür ve üstelik dakika mertebesinde olan mobile protonlar ve D2O arasındaki H/D değiş tokuşundan çok daha küçüktür. Bu yüzden, yüzey HDO ve mobile protein protonları arasındaki H-H etkileşimi, mobile protonlar protein üzerindeyken ve ayrıca yüzey HDO' nun çok sayıda öteleme hareketleri mobile protonların yaşam zamanı boyunca meydana gelebilir.

Bu koşullar altında, albuminin D2O çözeltilerinde HDO' nun yerleri, (i) serbest HDO; (ii) yaklaşık  $10^{-11}$ s ikamet zamanlı yüzey HDO molekülleri ( kısa-yaşamlı su molekülleri olarak isimlendirilirler; (iii) görel olarak uzun ikamet zamanlı yüzey HDO protonları. Suyun bu sınıfı için ortalama ikamet zamanı yaklaşık  $10^{-10}$ s. Onlar görel olarak uzun-yaşamlı HDO molekülleri olarak isimlendirilebilir. (iv) uzun-yaşamlı HDO molekülleri olarak isimlendirilen derince gömülü su molekülleri. Gömülü suyun yüksek katkısı 400MHz' de dağılmalıdır. Daha sonra gösterileceği üzere, yüzey HDO moleküllerinin katkısı tüm yüzey HDO' lar kısa-yaşamlı moleküllere olarak düşünüldüğünde ihmal edilir. Bu gösteriyor ki yüzey HDO molekülleri görel olarak uzun-yaşamlı düşünülmelidir. Bu nedenle D2O' daki albumin için yüzey HDO moleküllerinin durulması bu tür yüzey HDO ve 40 mobil protein protonları arasındaki H-H etkileşimlerine göre analiz edilebilir. Basitlik için, uzun-yaşamlı su moleküllerinin çevresi eşdeğer olarak düşünülür. Albuminin D2O çözeltilerindeki gözlenen  $1/T_1$  aşağıdaki gibi temsil edilebilir;

$$1/T_1 = P_f(1/T_{1f}) + P_s(1/T_{1s}) \quad (2.49)$$

$$\frac{1}{T_1} = \frac{P_f}{T_{1f}} + P_s B \sum_{k=1}^{40} (1/r_k^6) \left[ \frac{\tau}{1 + \omega_I^2 \tau^2} + \frac{4\tau}{1 + 4\omega_I^2 \tau^2} \right] \quad (2.50)$$

burada  $1/T_{1f}$  ve  $1/T_{1s}$  sırasıyla serbest HDO ve görel olarak uzun yaşamlı HDO için durulma oranlarıdır.  $P_f$  ve  $P_s$  serbest yerin ve ara yüzeyin HDO molekülleri tarafından işgal olasılıklarıdır.  $\tau$  yüzey HDO ve mobil protein protonları arasındaki tüm olası H-H etkileşimleri için bir ortalama korelasyon zamanıdır. Tek yüksek-alan dispersiyonu, tek bir korelasyon zamanı kullanmak için bize izin veriyor. Toplam, exchangeable protein protonlarının tüm pozisyonları üzerinden alınıyor ve bu toplam aşağıdaki bağıntıda verilen bir ortalama mesafe tarafından yenilenebilir:



$$\sum_{k=1}^{40} (1/r_k^6) = 40 \left( \frac{1}{r_{av}^6} \right) \quad (2.51)$$

Öyleyse yüzey suyunun katkısı  $P_s(1/T_{1s})$ , aşağıdaki gibi düzenlenebilir:

$$P_s(1/T_{1s}) = \frac{1}{T_1} - \frac{P_f}{T_{1f}} = 40P_s B(1/r_{av}^6) \left[ \frac{\tau}{1 + \omega_I^2 \tau^2} + \frac{4\tau}{1 + 4\omega_I^2 \tau^2} \right] \quad (2.52)$$

burada  $B$ ,  $(2/5) (\gamma_I^4 \hbar^2) I(I+1)$  olmakta ve CGS birimlerinde değeri  $17.0863 \cdot 10^{-38}$  olmaktadır.  $1/T_{1s}$  yüzey suyunun katkısını gösteriyor. HDO ve bir mobile protein protonları arasındaki en yakın mesafe  $2.2A^0$  luk Van der Waals mesafesi mertebesinde dir. En uzak mesafe mobil protonların toplam katkısını deneysel belirsizlik gibi (yaklaşık  $0.03s^{-1}$ ) yapan bir mesafe olmalı. Buna göre, mobile protein protonları ve yüzey HDO arasındaki ortalama mesafe yaklaşık  $2.48 A^0$  dur. 400MHz frekansında  $\omega^2 \tau^2 \gg 1$  olmaktadır. Sonraki alt bölümde gösterildiği gibi  $P_f$  ve  $P_s$ , albuminin 0.08g ve 0.02g için sırasıyla 55/82 ve 2/82, ve 303/330 ve 2/330.

Böylece Denklem (2.52) Denklem (2.53) haline geliyor.

$$P_s(1/T_{1s}) = 1/T_1 - P_f(1/T_{1f}) = 40BP_s(1/r_{av}^6) \left[ \frac{2}{\omega_I^2 \tau} \right] \quad (2.53)$$

$1/T_1$  ve  $1/T_{1f}$  NMR tarafından ölçülür. Bu nedenle, (2.53) denklemiyle verilen  $P_s(1/T_{1s})$  ölçülebilirdir (Yılmaz ve ark. 2012). Benzer olarak  $P_s(1/T_{2s})$ ;

$$P_s(1/T_{2s}) = \frac{1}{T_2} - \frac{P_f}{T_{2f}} = (1/2)40P_s B(1/r_{av}^6) \left[ 3\tau + \frac{5\tau}{1 + \omega_I^2 \tau^2} + \frac{2\tau}{1 + 4\omega_I^2 \tau^2} \right] \quad (2.54)$$

şeklinde olmaktadır. 400 MHz frekansında  $\omega^2 \tau^2 \gg 1$  olduğundan (2.54) denklemi (2.55) halini alır;

$$P_s(1/T_{2s}) = \frac{1}{T_2} - \frac{P_f}{T_{2f}} = (1/2)40P_s B(1/r_{av}^6)[3\tau] \quad (2.55)$$

(2.54) ve (2.55) denklemleri ile  $m_1/2m_2=m$  eğimlerinin oranı kullanılırsa yüksek frekans durumunda  $(1/T_1 - P_f1/T_{1f})/2(1/T_2 - P_f1/T_{2f})$  için aşağıdaki sonuç elde edilir;

$$3m(\omega_1\tau)^2 - 2 = 0 \quad (2.56)$$

### 3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada kullanılan proteinler, enzimler ve deuterium oxide (D<sub>2</sub>O) çözücüsü Sigma' dan satın alındı. Bozulmayı önlemek için, bu materyaller ölçme anları dışında buzdolabında tutuldu.

#### 3.1 NMR ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

##### 3.1.1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O Çözücü Karışımının Hazırlanması

0.1ml H<sub>2</sub>O ile 0.9ml D<sub>2</sub>O çözücüleri toplamı 1ml olacak şekilde uygun bir beherde karıştırılarak farklı konsantrasyonlardaki hemoglobin çözeltilerinde kullanılmak üzere hazırlandı. Bu çözücü karışımları hemoglobin çözeltilerinin T<sub>1</sub> (spin-örgü) ve T<sub>2</sub> (spin-spin) rölaksasyon zamanlarının ölçümünde kullanıldı.

##### 3.1.2 Hemoglobin İçeren Çözeltilerin Hazırlanması

1ml pure D<sub>2</sub>O çözücüsüne, 0.02g, 0.04g, 0.06g, 0.08g, 0.1g, 0.15g, 0.2g, 0.25g ve 0.3g miktarlarında tartılan hemoglobin proteini eklenerek değişik konsantrasyonlarda protein çözeltisi hazırlandı. 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O çözücüsüne ise, 0.05g, 0.1g, 0.15g, 0.2g, 0.25g ve 0.3g miktarlarında tartılan hemoglobin proteini eklenerek farklı konsantrasyonlarda protein çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler, T<sub>1</sub> (spin-örgü) ve T<sub>2</sub> (spin-spin) rölaksasyon zamanlarının ölçümünde kullanıldı.

#### 3.2 NMR RÖLAKSASYON ZAMANLARININ ÖLÇÜLMESİ

##### 3.2.1 Spin-Örgü Rölaksasyon Zamanlarının (T<sub>1</sub>) Ölçülmesi

1ml saf D<sub>2</sub>O çözücüsü ortamı ve 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O çözücüleri ortamında, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hemoglobin çözeltileri 5mm çaplı NMR tüplerine konulmuştur. Hemoglobin çözeltilerinin T<sub>1</sub> rölaksasyon zamanları 400 MHz AVANCE BRUKER NMR spektrometresiyle yapılmıştır. FID (Free Induction Decay) setleri ve T<sub>1</sub>

rölaksasyon zamanları IR (Inversion Recovery) tekniği kullanılarak (180-Vd-90-5T<sub>1</sub>) puls adımlarıyla gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerdeki gecikme zamanları (delay times:Vd), FID (Free Induction Decay) setleri için 1s-50s, 2ms-200ms, 10ms-500ms ve 20ms-2000ms aralığında değiştirildi. T<sub>1</sub> ölçümleri içinde uygun gecikme zamanları (Vd) seçildi.

#### 3.2.2 Spin-Spin Rölaksasyon Zamanlarının (T<sub>2</sub>) Ölçülmesi

1ml saf D<sub>2</sub>O çözücüsü ortamı ve 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hemoglobin çözeltileri 5mm çaplı NMR tüplerine konulmuştur. Hemoglobin çözeltilerinin T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanları 400 MHz AVANCE BRUKER NMR spektrometresiyle yapılmıştır. SE (Spin-Echo) setleri ve T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanları CPMG ( Carr-Purcell-Meiboom-Gill) puls tekniği ile elde edilmiştir. SE (Spin-Echo) setleri için gecikme zamanları (Vd) 3000ms-6000ms arasında 40ms' lik adımlarla değiştirildi. T<sub>2</sub> ölçümleri içinde uygun gecikme zamanları (Vd) seçildi.

#### 3.2.3 T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> Rölaksasyon Zamanlarının Sıcaklığa Bağlı Ölçülmesi

Hemoglobin çözeltileri için sıcaklık çalışmaları, Bruker 400MHz NMR spektrometresinin otomatik sıcaklık kontrol sistemi yoluyla yapıldı. Saf D<sub>2</sub>O ortamında 0.1g/ml, 0.2g/ml ve 0.3g/ml konsantrasyonlarda hazırlanan hemoglobin çözeltilerinin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanları, 5 °C artan sıcaklık adımlarıyla (20-40) °C aralığında ölçüldü. 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.1g/ml, 0.2g/ml ve 0.3g/ml konsantrasyonlarda hazırlanan hemoglobin çözeltilerinin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanları ise, 5 °C' lik artan sıcaklık adımlarıyla, (20-45) °C aralığında ölçüldü.

### 3.3 MR ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

Hemoglobin proteini ile  $\alpha$ -Chymotrypsin, Pepsin ve Proteaz enzimleri %0, %2, %4, %6, %8 ve %10 luk konsantrasyonlar oluşturacak şekilde, deiyonize suya eklenmiştir. Her bir maddenin çözeltileri, sıralı halde bulunan fantom tüplerine

aktarılmıştır. Tüplerdeki çözelti hacmi 3 ml' dir. Tüplerin iç yarıçapı 1.2 cm idi. Bu çözeltiler  $T_1$  (spin-örgü) ve  $T_2$  (spin-spin) rölaksasyon zamanlarının ölçümünde kullanıldı.

### **3.4 MR RÖLAKSASYON ZAMANLARININ ÖLÇÜLMESİ**

#### **3.4.1 Spin-Örgü Rölaksasyon Zamanlarının ( $T_1$ ) Ölçülmesi**

Fantom içerisindeki protein ve enzim çözeltilerin  $T_1$  (spin-örgü) rölaksasyon zamanları 1.5 Tesla (64 MHz) Philips İntera MR spektrometresiyle oda sıcaklığında (yaklaşık 20-22 °C) yapılmıştır. 256x256'lık bir matris, 10mm' lik dilim kalınlığı ve 200x200 mm' lik FOV alanı seçilmiştir.  $T_1$  ölçümlerinde IR (Inversion Recovery) setleri kullanıldı.  $T_1$  rölaksasyon zamanı ölçümünde tekrarlama zamanı TR 7000ms alındı. Gecikme zamanı TI 800/1000ms seçildi.

#### **3.4.2 Spin-Spin Rölaksasyon Zamanlarının ( $T_2$ ) Ölçülmesi**

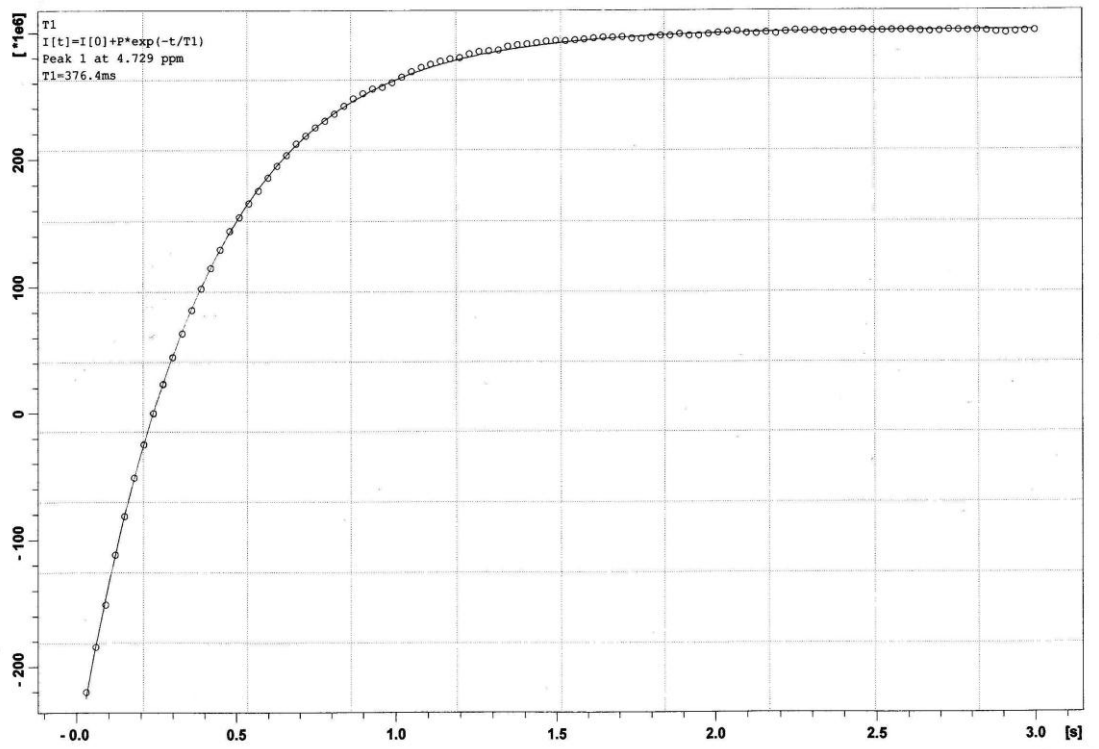
Fantom içerisindeki protein ve enzim çözeltilerin  $T_2$  (spin-spin) rölaksasyon zamanları 1.5 Tesla (64 MHz) Philips İntera MR spektrometresiyle oda sıcaklığında (yaklaşık 20-22 °C) yapılmıştır. 256x256'lık bir matris, 10mm' lik dilim kalınlığı ve 200x200 mm' lik FOV alanı seçilmiştir.  $T_2$  rölaksasyon zamanları 8 ekolu CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) puls tekniği ile elde edilmiştir. Tekrarlama zamanı TR 6000ms ayarlanmıştır ve eko gecikmeleri 30ms artışlarla 30 dan 240ms' ye değerine kadar adım adım artırılmıştır.



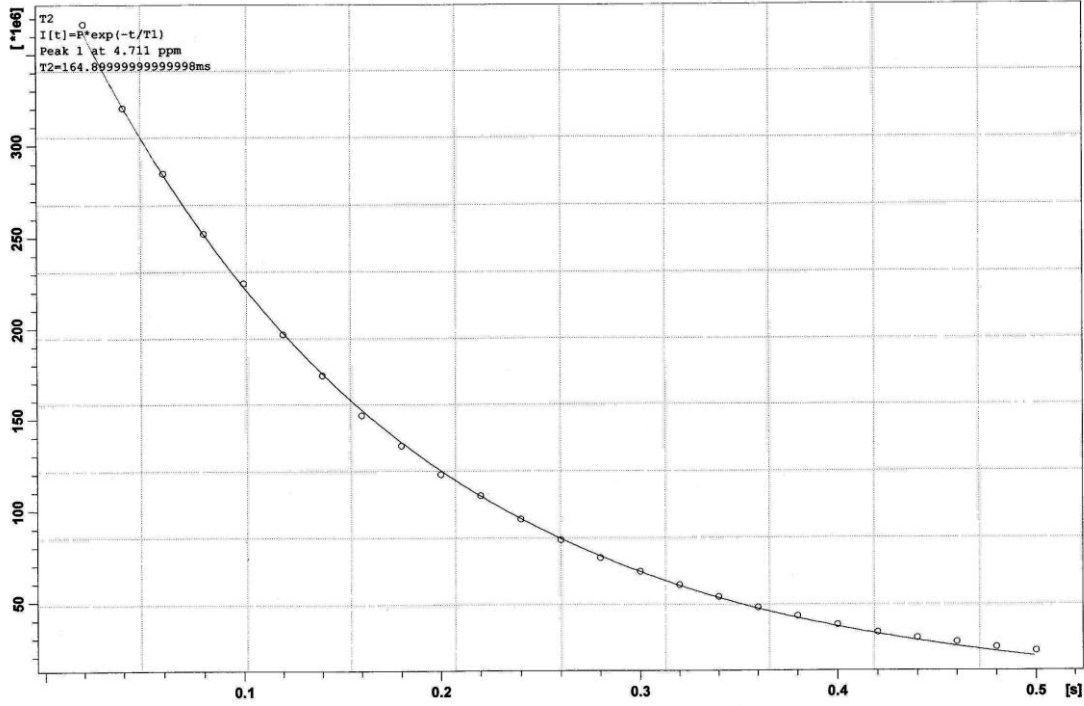
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 NMR BULGULARI

400 MHz NMR spektrometresiyle yapılan  $T_1$  rölaksasyon zamanı ölçümüyle ilgili Manyetizasyon Recovery ve  $T_2$  rölaksasyon zamanı ölçümüyle ilgili Manyetizasyon Decay eğrilerine ait birer örnek Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’ de verilmiştir.



Şekil 4.1. Hemoglobin örneklerinden birinin Manyetizasyon Recovery Eğrisi



Şekil 4.2. Hemoglobin örneklerinden birinin Manyetizasyon Decay Eğrisi

#### 4.1.1 Saf D2O Ortamında Konsantrasyon Artışına Ait Bulgular

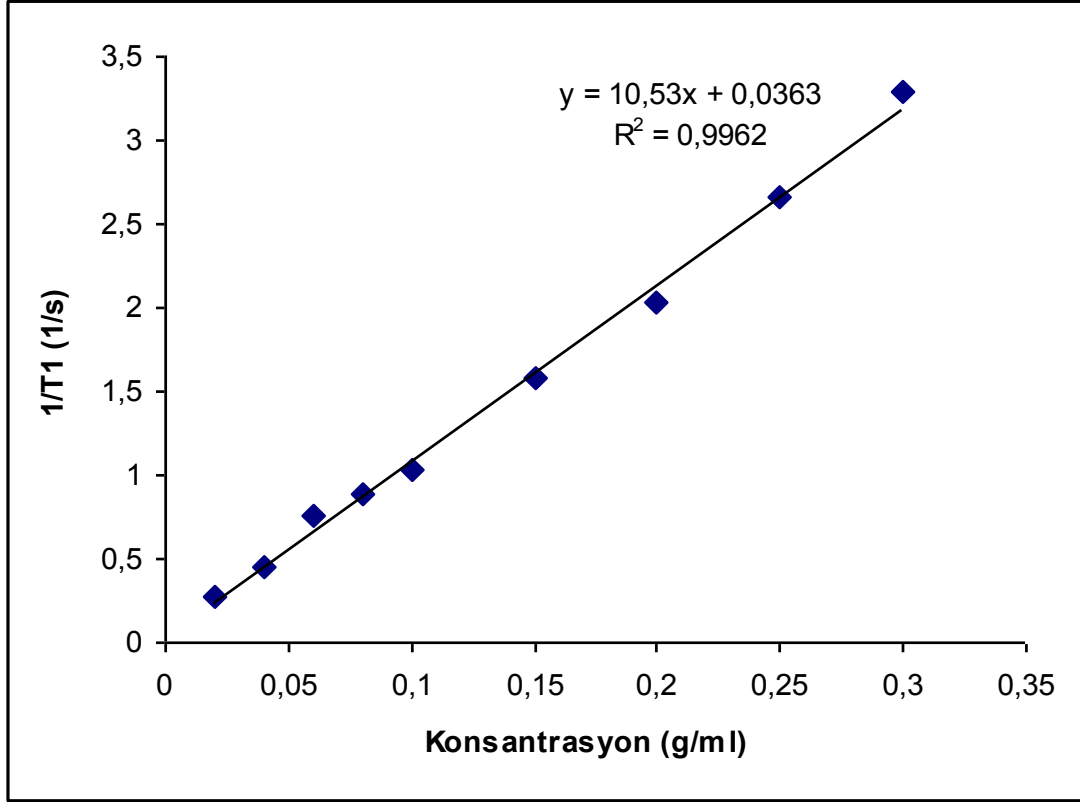
Saf D2O çözücüsü ortamında hemoglobin proteininin konsantrasyonuna bağlı olarak bulunan röleksasyon zamanı oranlarının ( $1/T_1$  ve  $1/T_2$ ) değerleri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Saf D2O çözücüsü ortamında hemoglobin proteininin röleksasyon zamanları oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi

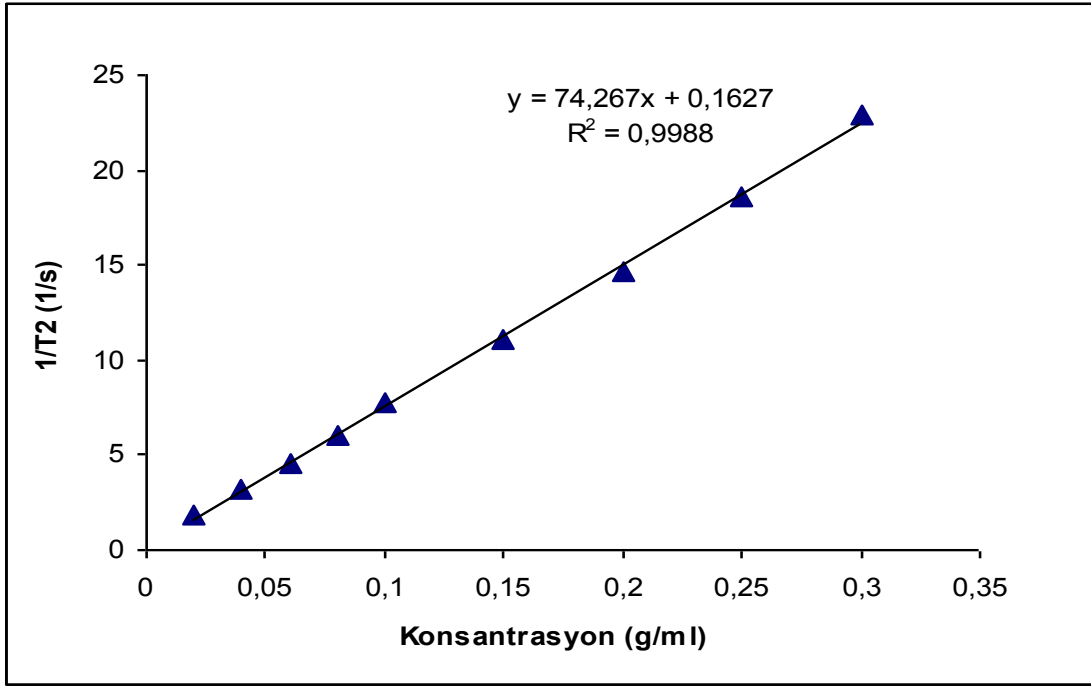
Konsantrasyon (g/ml)	$1/T_1$ ( $s^{-1}$ )	$1/T_2$ ( $s^{-1}$ )
0.02	0.271	1.851
0.04	0.451	3.204
0.06	0.752	4.497
0.08	0.890	6.065
0.10	1.038	7.776
0.15	1.574	11.104
0.20	2.037	14.658
0.25	2.657	18.546
0.30	3.293	22.883



Saf D2O çözücüsü ortamında hemoglobin proteininin  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  rölaksasyon zamanı oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4' de verilmiştir.



Şekil 4.3. Saf D2O ortamında hemoglobin proteininin  $1/T_1$  rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi



Şekil 4.4. Saf D<sub>2</sub>O ortamında hemoglobin proteininin 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi

#### 4.1.2 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O Ortamında Konsantrasyon Artışına Ait

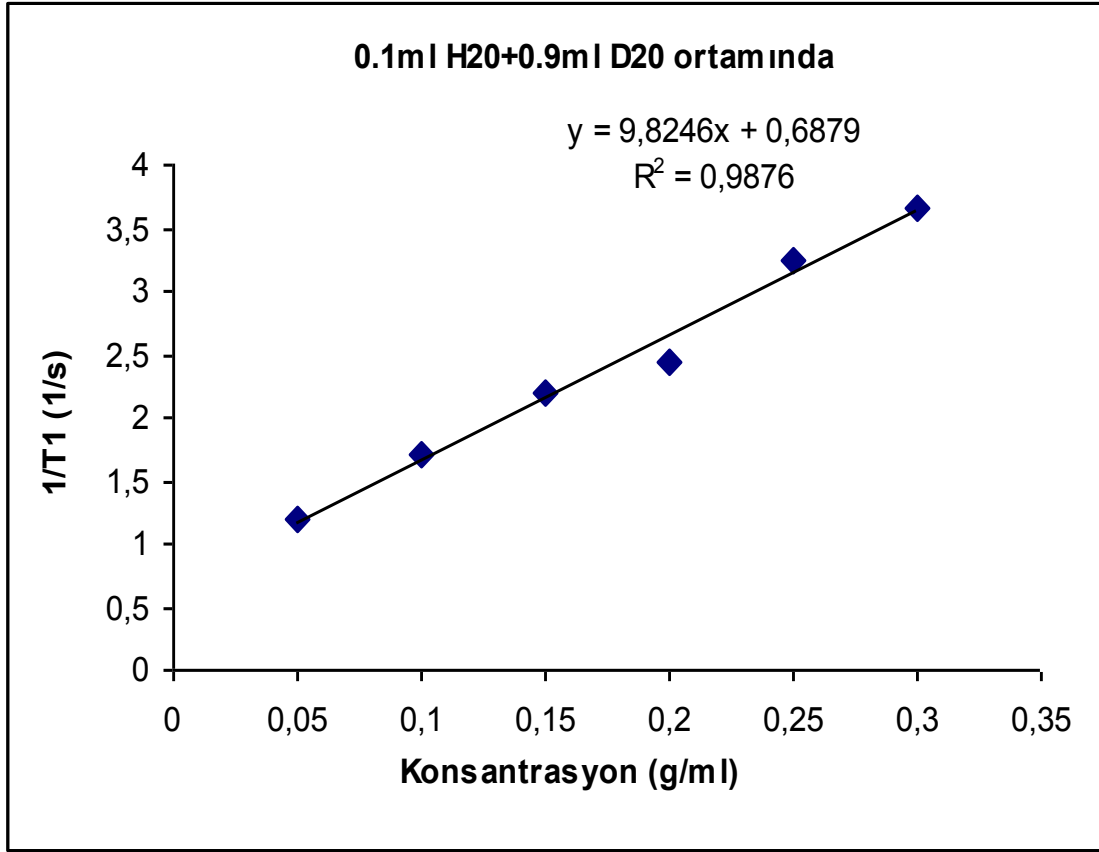
##### Bulgular

0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O karışımında çözdürülen hemoglobin proteininin konsantrasyonuna bağlı olarak rölaksasyon zamanı oranları 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub>' nin değerleri Çizelge 4.2' de verilmiştir.

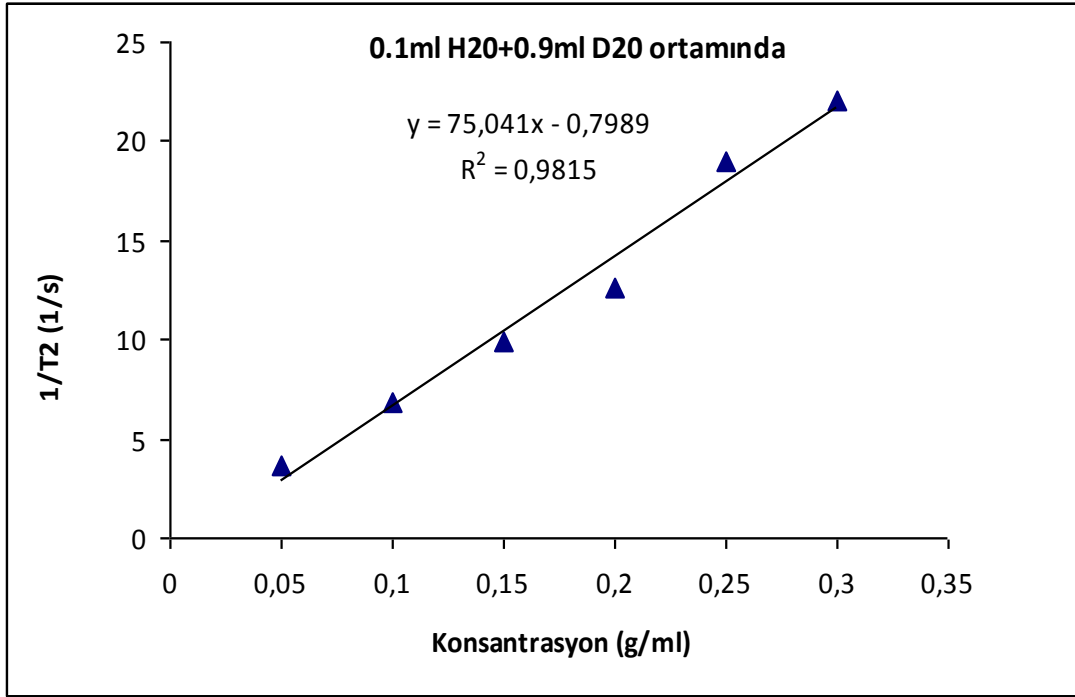
Çizelge 4.2. 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında hemoglobin proteininin rölaksasyon zamanları oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi

Konsantrasyon (g/ml)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )	1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )
0.05	1.190	3.610
0.10	1.716	6.873
0.15	2.186	9.852
0.20	2.451	12.605
0.25	3.237	19.029
0.30	3.663	22.030

0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O karışımında çözdürülen hemoglobin proteininin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranlarının konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' da gösterilmiştir.



Şekil 4.5. 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında hemoglobin proteininin 1/T<sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi



Şekil 4.6. 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında hemoglobün proteininin 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağılı değişimi

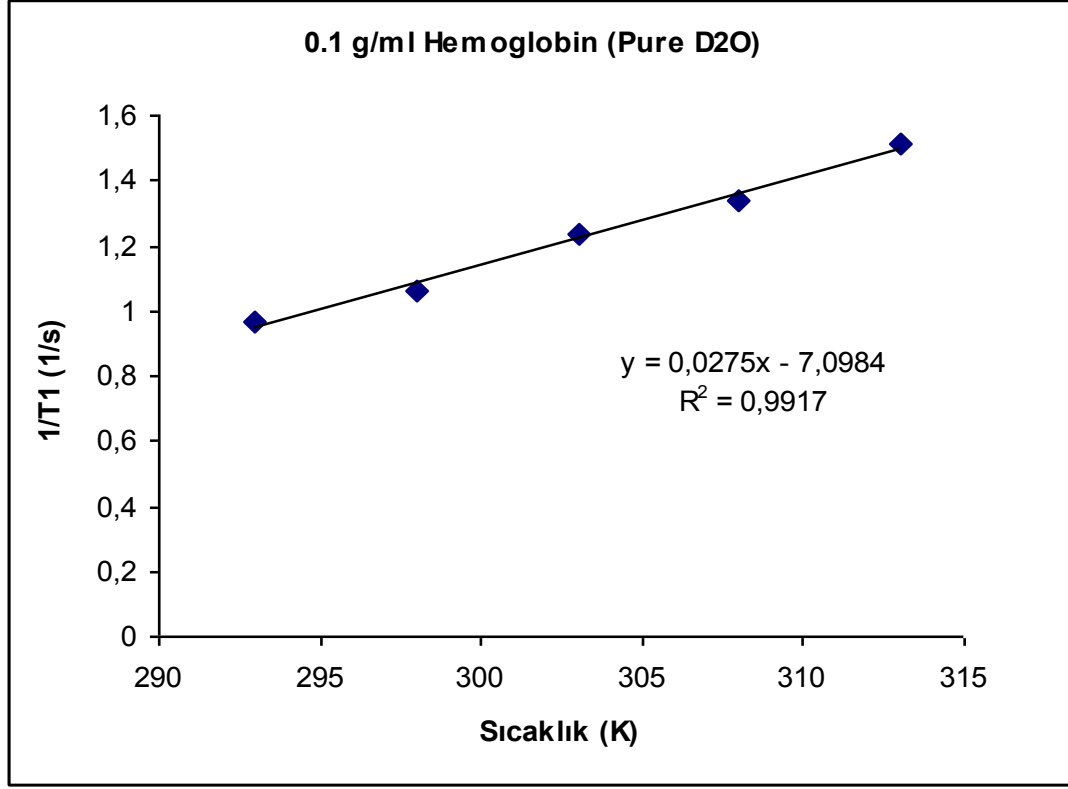
#### 4.1.3. Saf D<sub>2</sub>O Ortamında Sıcaklık Artışına Ait Bulgular

0.1 g/ml konsantrasyondaki hemoglobün proteininin rölaksasyon zamanları oranları saf D<sub>2</sub>O ortamında 5 °C' lik artan sıcaklık adımlarıyla, (20-40) °C aralığında sıcaklığa bağılı olarak incelenmiş ve Çizelge 4.3' de verilmiştir.

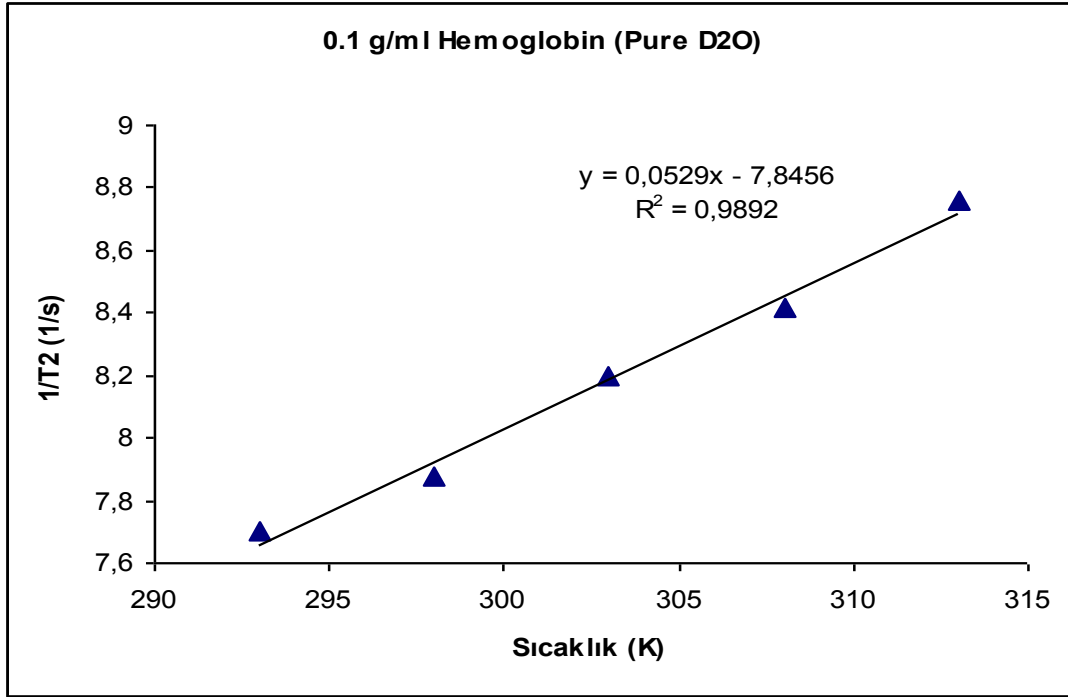
Çizelge 4.3. Saf D<sub>2</sub>O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobün çözeltisinde rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağılı değişimi

Sıcaklık (K)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )	1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )
293	0.964	7.704
298	1.059	7.874
303	1.236	8.197
308	1.342	8.414
313	1.509	8.757

Saf D2O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimleri sırasıyla Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Saf D2O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde  $1/T_1$  rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi



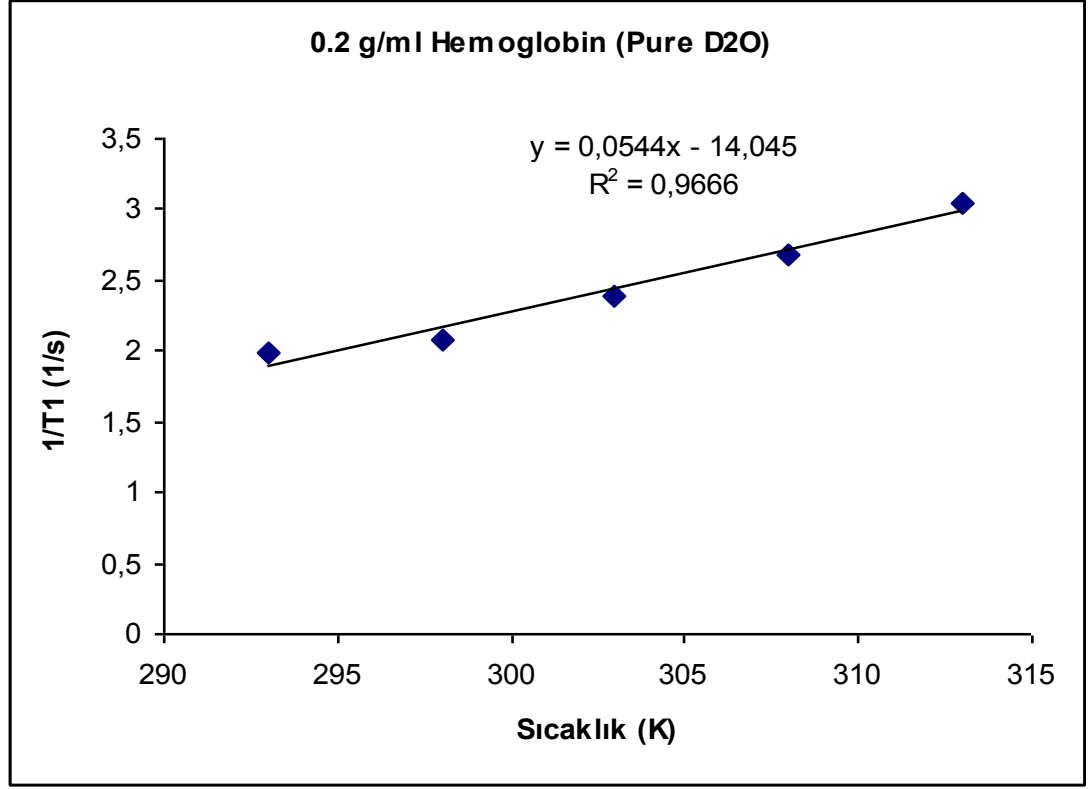
Şekil 4.8. Saf D<sub>2</sub>O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi

0.2 g/ml konsantrasyondaki hemoglobin proteininin rölaksasyon zamanları oranları saf D<sub>2</sub>O ortamında 5 °C' lik artan sıcaklık adımlarıyla, (20-40) °C aralığında sıcaklığa bağlı olarak incelenmiş ve Çizelge 4.4' de verilmiştir.

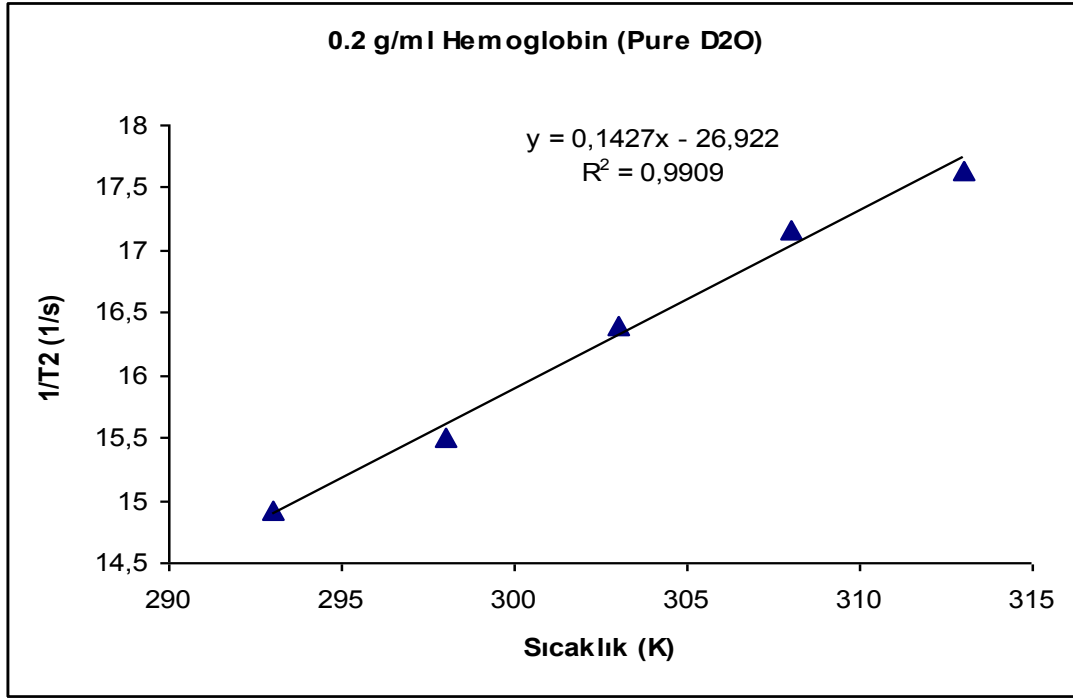
Çizelge 4.4. Saf D<sub>2</sub>O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimi

Sıcaklık (K)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )	1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )
293	1.992	14.912
298	2.082	15.495
303	2.381	16.393
308	2.682	17.167
313	3.052	17.644

Saf D2O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimleri sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10' da verilmiştir.



Şekil 4.9. Saf D2O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde  $1/T_1$  rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi



**Şekil 4.10.** Saf D2O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde  $1/T_2$  rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi

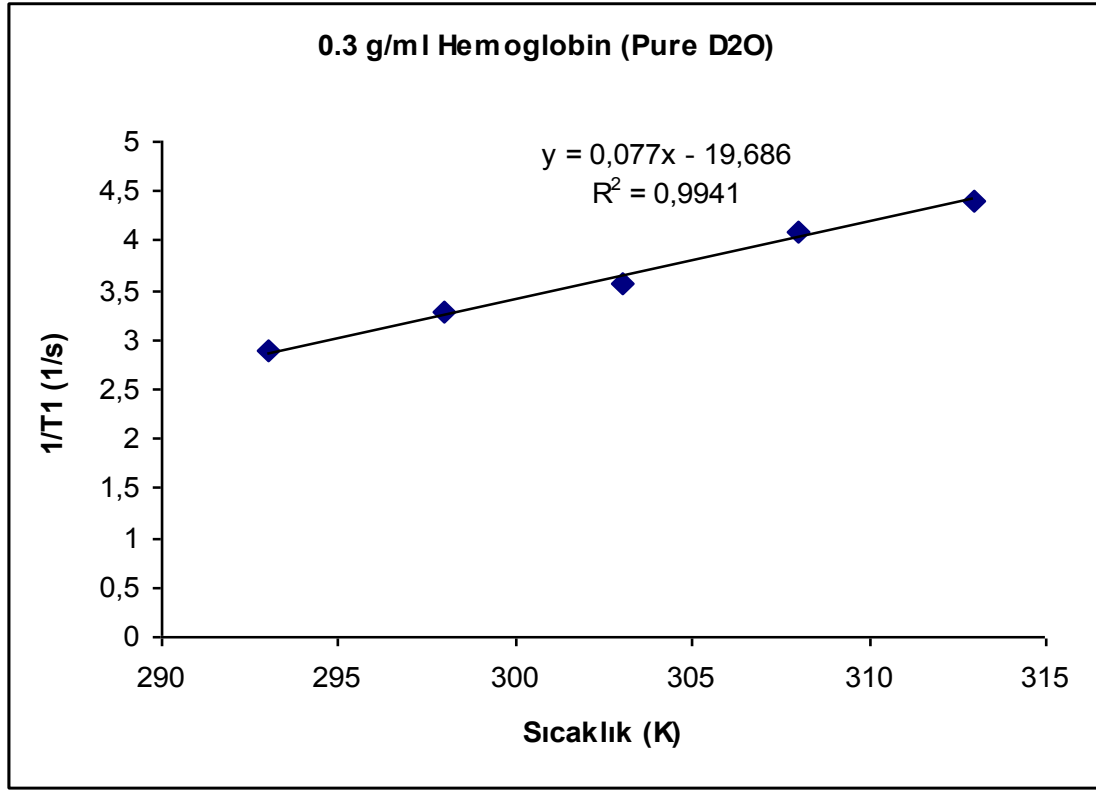
0.3 g/ml konsantrasyondaki hemoglobin proteininin rölaksasyon zamanları oranları saf D2O ortamında 5 °C' lik artan sıcaklık adımlarıyla, (20-40) °C aralığında sıcaklığa bağlı olarak incelenmiş ve Çizelge 4.5' de verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Saf D2O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimi

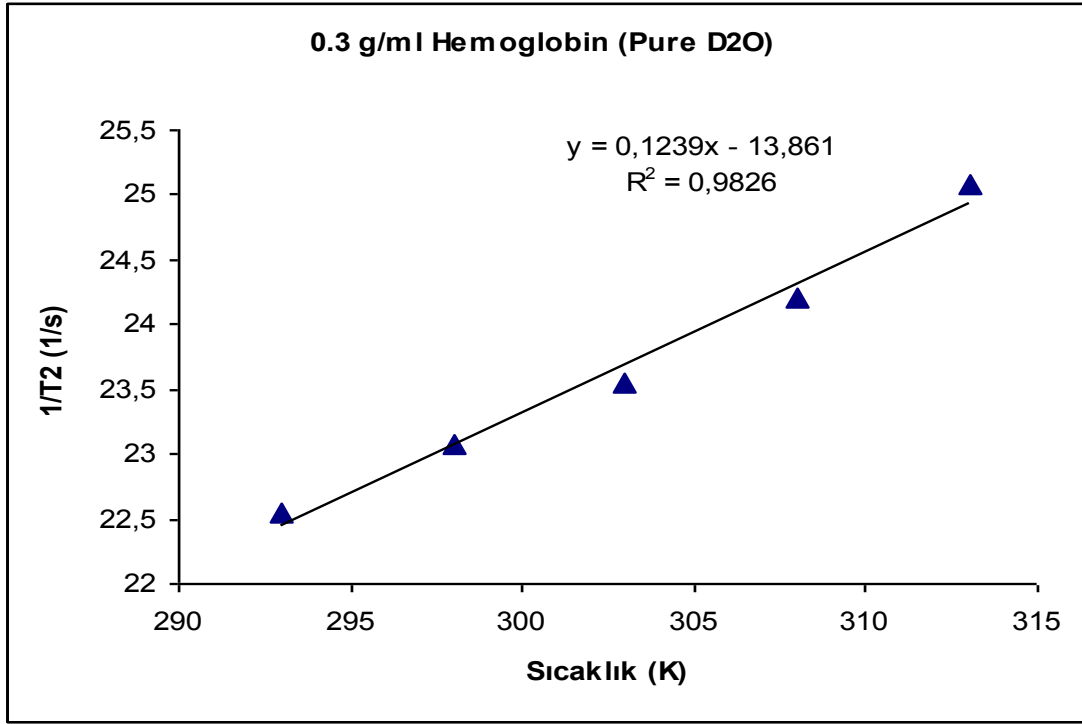
Sıcaklık (K)	$1/T_1$ (s <sup>-1</sup> )	$1/T_2$ (s <sup>-1</sup> )
293	2.879	22.553
298	3.286	23.074
303	3.571	23.546
308	4.080	24.201
313	4.407	25.088



Saf D2O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimleri sırasıyla Şekil 4.11 ve Şekil 4.12' de verilmiştir.



Şekil 4.11. Saf D2O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde  $1/T_1$  rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi



Şekil 4.12. Saf D2O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde  $1/T_2$  rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi

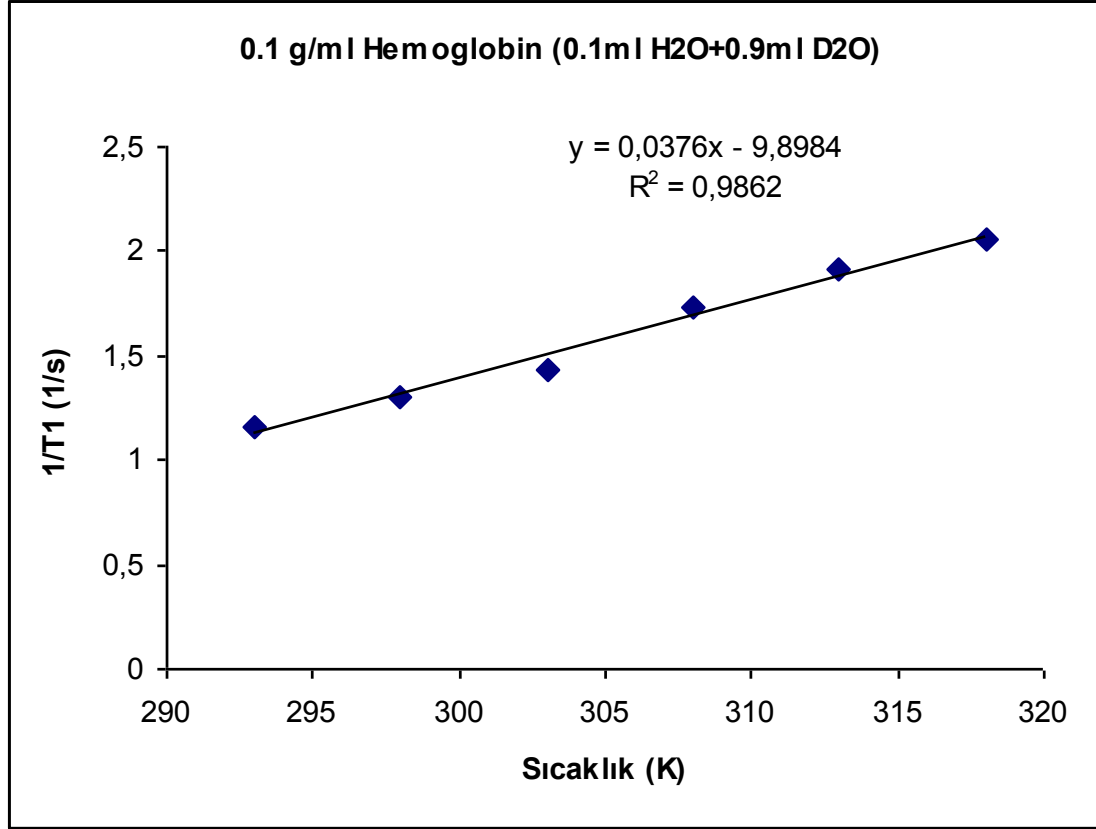
#### 4.1.4. 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O Ortamında Sıcaklık Artışına Ait Bulgular

0.1 g/ml konsantrasyonlu hemoglobin proteininin rölaksasyon zamanları oranları 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 5 °C' lik artan sıcaklık adımlarıyla, (20-45) °C aralığında sıcaklığa bağlı olarak incelenmiş ve Çizelge 4.6' da verilmiştir.

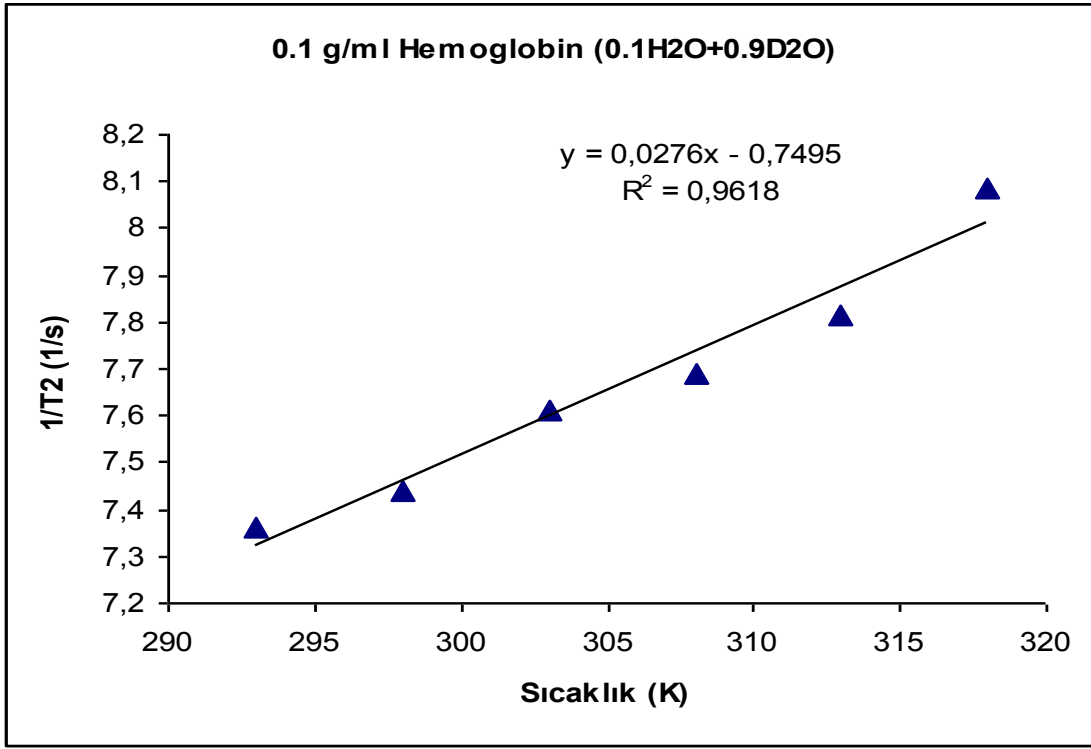
Çizelge 4.6. 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimi

Sıcaklık (K)	$1/T_1$ (s <sup>-1</sup> )	$1/T_2$ (s <sup>-1</sup> )
293	1.164	7.364
298	1.307	7.441
303	1.437	7.610
308	1.735	7.692
313	1.912	7.816
318	2.059	8.087

0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimleri sırasıyla Şekil 4.13 ve Şekil 4.14' de verilmiştir.



Şekil 4.13. 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinin 1/T<sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi



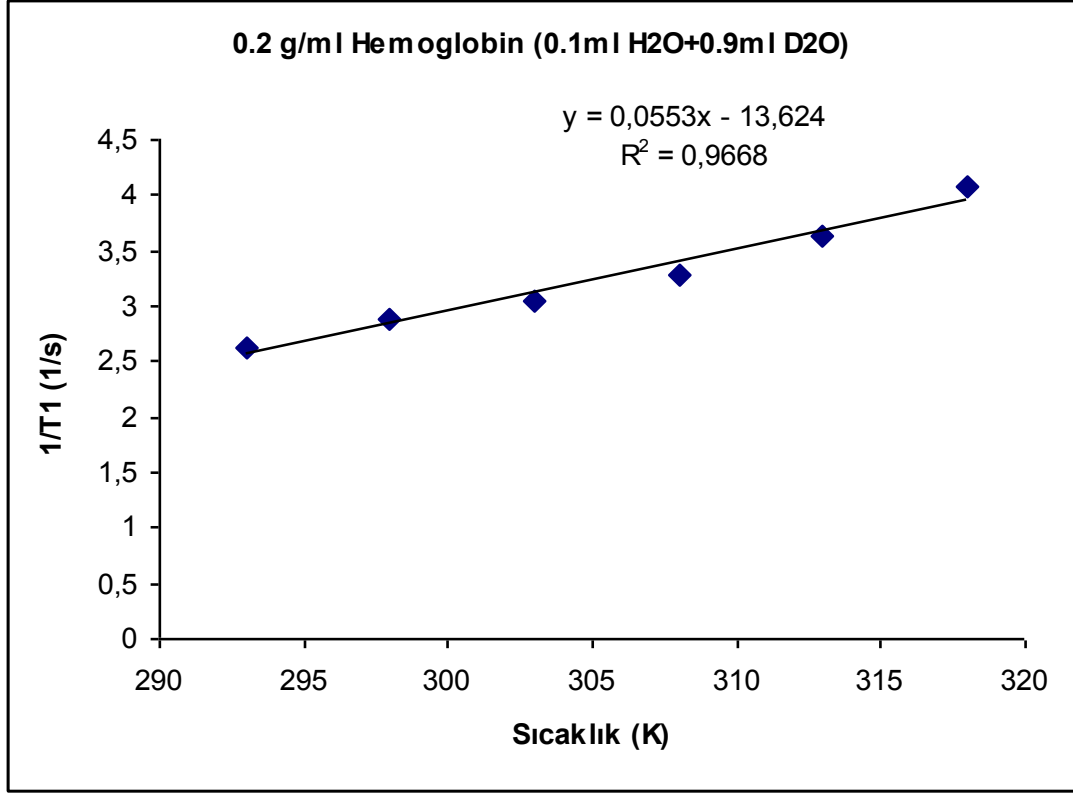
**Şekil 4.14.** 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.1 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinin 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi

0.2 g/ml konsantrasyonlu hemoglobin proteininin rölaksasyon zamanları oranları 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 5 °C' lik artan sıcaklık adımlarıyla, (20-45) °C aralığında sıcaklığa bağlı olarak incelenmiş ve Çizelge 4.7' de verilmiştir.

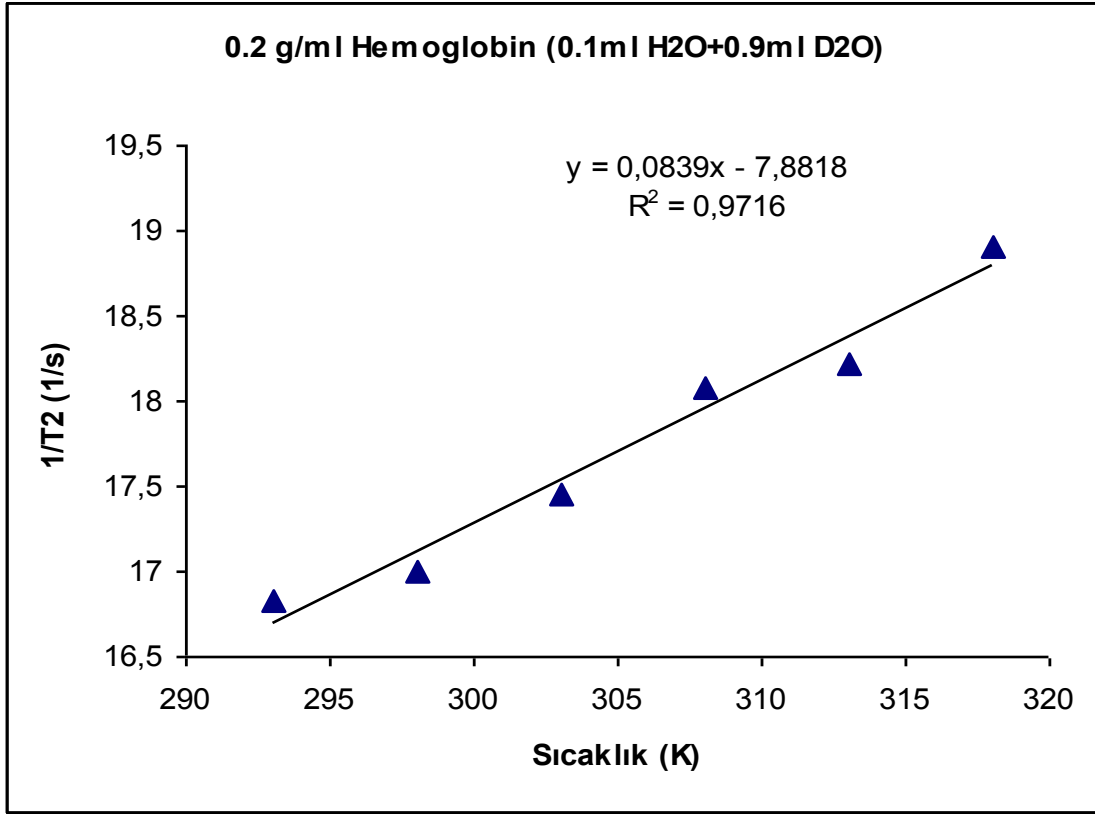
**Çizelge 4.7.** 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimi

Sıcaklık (K)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )	1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )
293	2.636	16.824
298	2.884	16.995
303	3.055	17.452
308	3.274	18.083
313	3.623	18.218
318	4.083	18.900

0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimleri sırasıyla Şekil 4.15 ve 4.16' da verilmiştir.



Şekil 4.15. 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinin 1/T<sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi



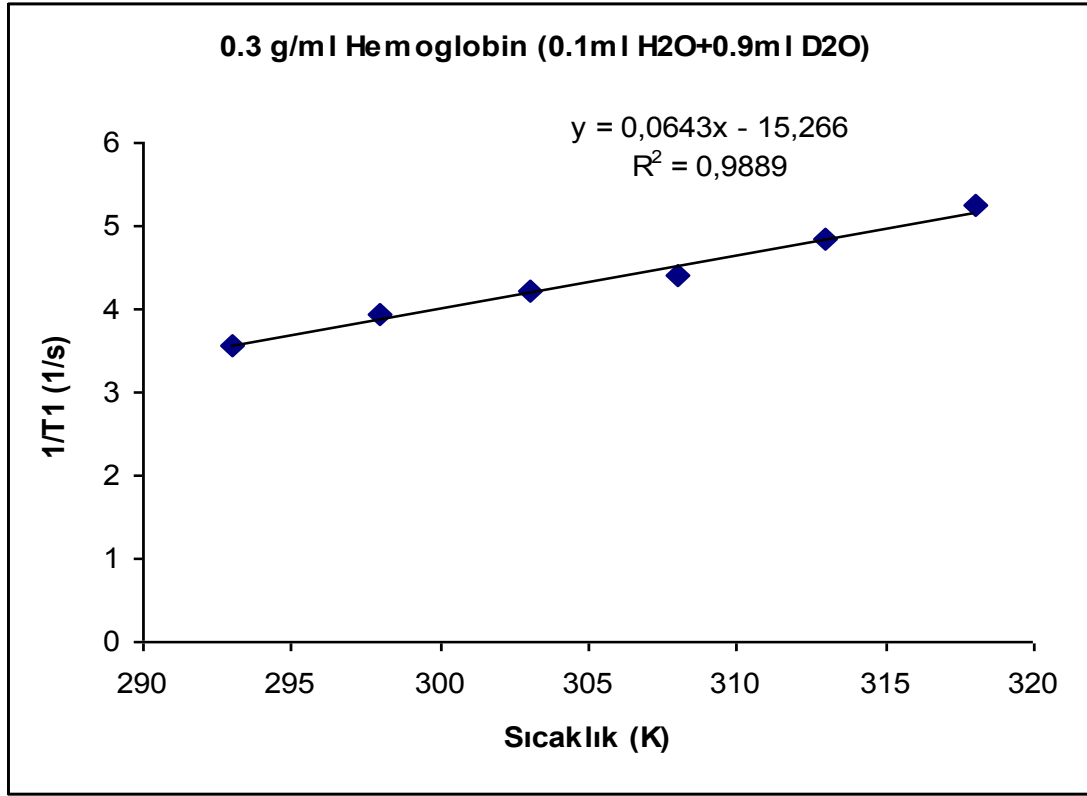
**Şekil 4.16.** 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.2 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinin 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi

0.3 g/ml konsantrasyonlu hemoglobin proteininin rölaksasyon zamanları oranları 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 5 °C' lik artan sıcaklık adımlarıyla, (20-45) °C aralığında sıcaklığa bağlı olarak incelenmiş ve Çizelge 4.8' de verilmiştir.

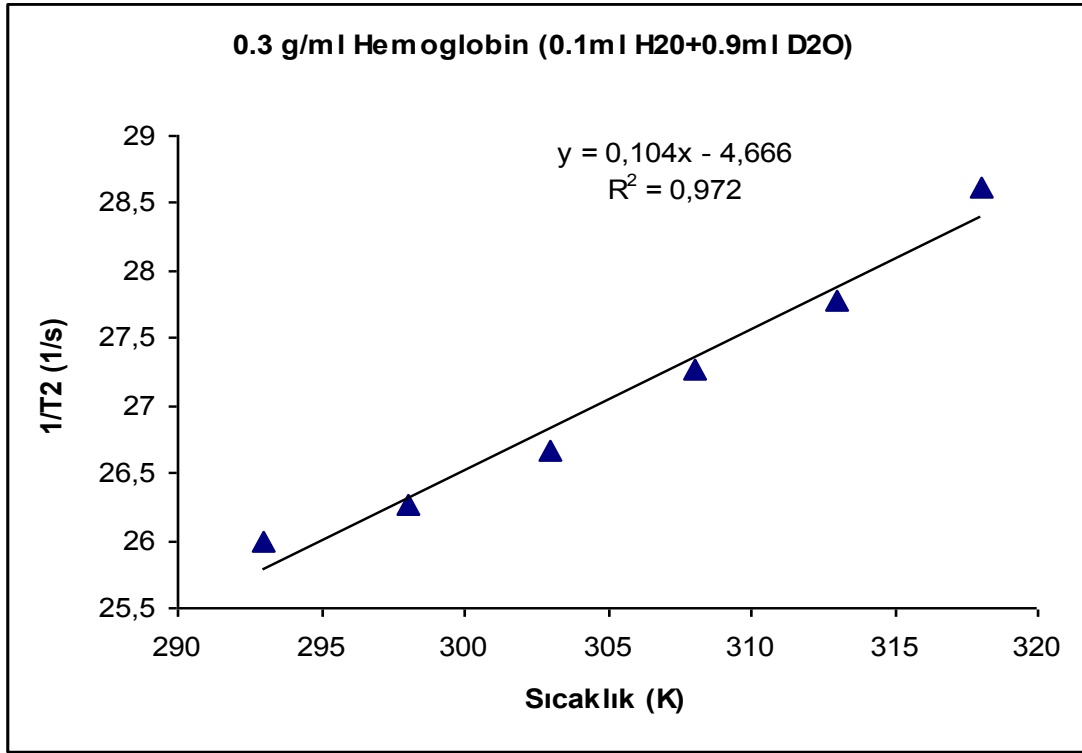
**Çizelge 4.8.** 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinde rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimi

Sıcaklık (K)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )	1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )
293	3.570	26.000
298	3.940	26.267
303	4.208	26.667
308	4.418	27.270
313	4.834	27.778
318	5.241	28.612

0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranlarının sıcaklığa bağlı değişimleri sırasıyla Şekil 4.17 ve Şekil 4.18' de verilmiştir.



Şekil 4.17. 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinin 1/T<sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi



**Şekil 4.18.** 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O ortamında 0.3 g/ml' lik hemoglobin çözeltisinin 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının sıcaklığa bağlı değişimi

#### 4.2. MR Bulguları

Tez çalışmasında kullandığımız hemoglobin proteini, pepsin, proteaz ve  $\alpha$ -chymotrypsin enzim çözeltilerinde T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanlarının konsantrasyona bağlılığı, 64 MHz Philips İntera MR spektrometresiyle oda sıcaklığında (yaklaşık 20-22 °C) yapılmıştır. Bu çözeltiler için elde edilmiş 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanları oranları konsantrasyona bağlı olarak aşağıdaki çizelge ve şekillerde sırasıyla verilmiştir.

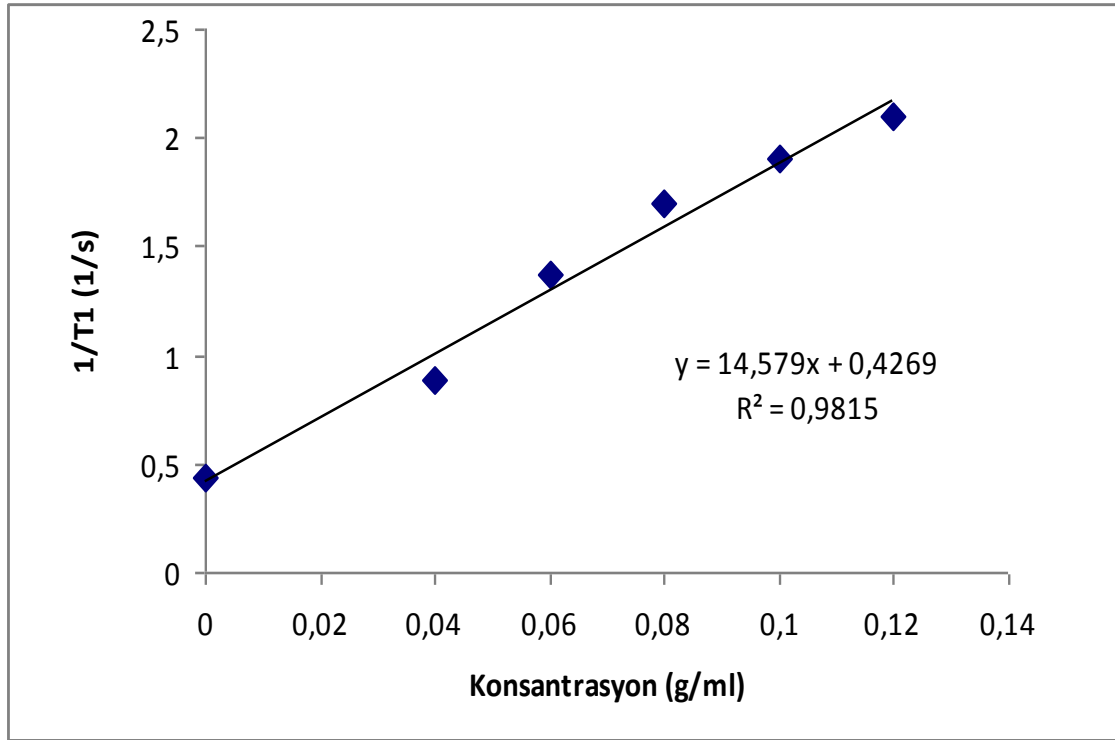
Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında hemoglobin proteininin konsantrasyonuna bağlı olarak rölaksasyon zamanı oranları 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub>' nin değerleri Çizelge 4.9' da verilmiştir.



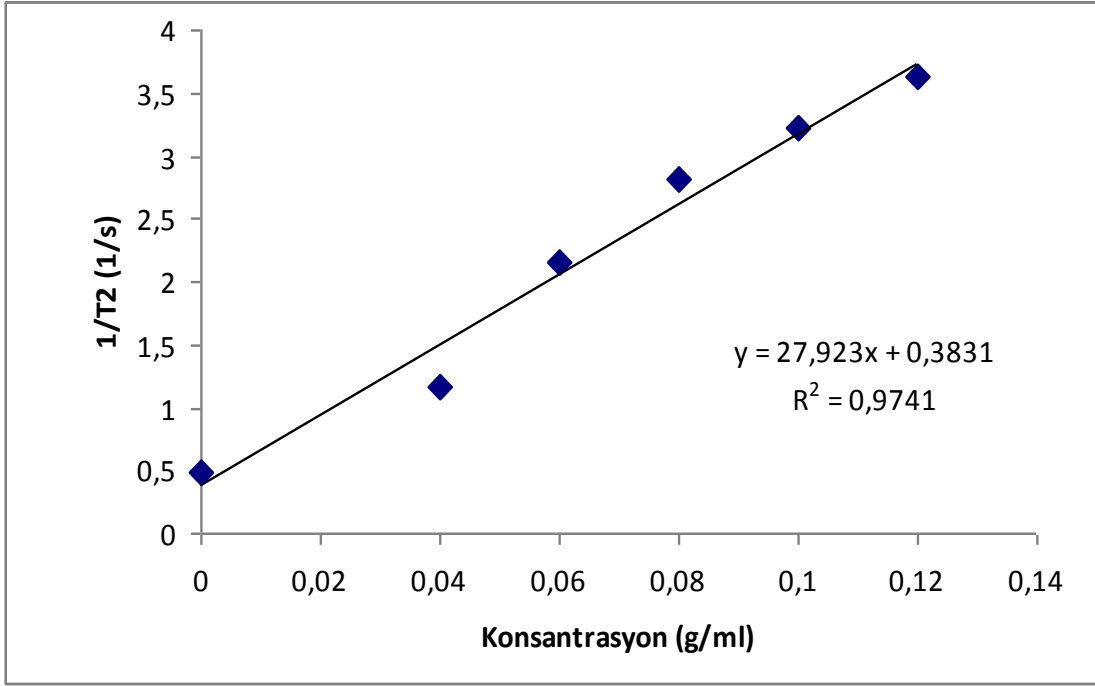
**Çizelge 4.9.** Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında hemoglobin proteininin rölaksasyon zamanları oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi

Konsantrasyon (g/ml)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )	1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )
0.00	0.438	0.489
0.04	0.887	1.159
0.06	1.366	2.146
0.08	1.698	2.825
0.10	1.908	3.226
0.12	2.096	3.623

Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında hemoglobin proteininin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi sırasıyla Şekil 4.19 ve Şekil 4.20' de verilmiştir.



**Şekil 4.19.** Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında hemoglobin proteinini çözeltisinin 1/T<sub>1</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi



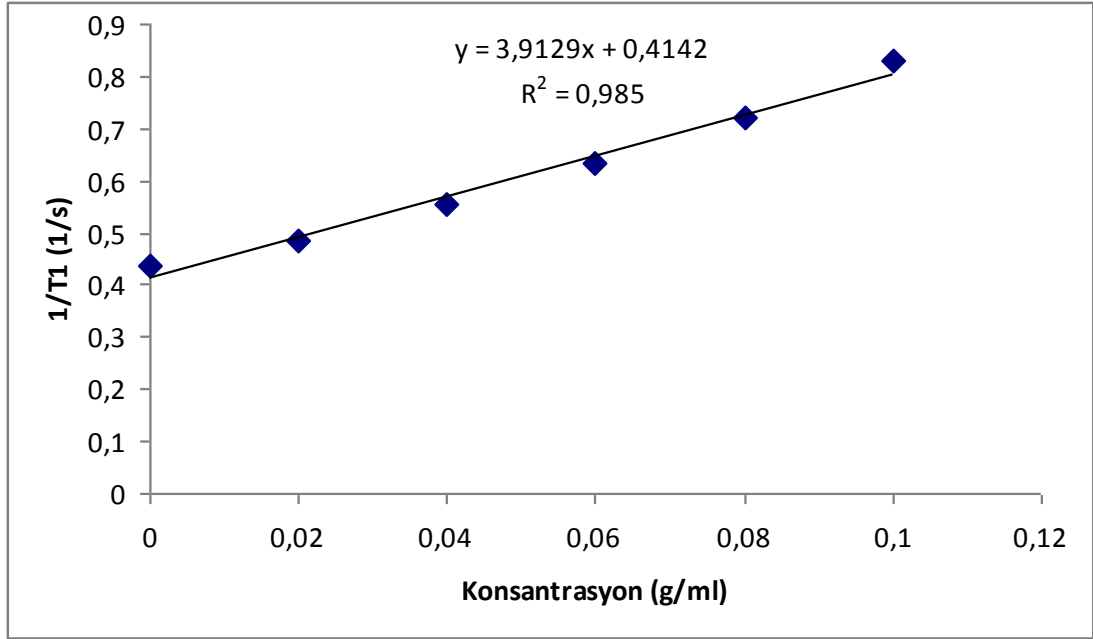
Şekil 4.20. Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında hemoglobin proteini çözeltisinin 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi

Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında pepsin enziminin konsantrasyona bağlı olarak rölaksasyon zamanı oranları 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub>' nin değerleri Çizelge 4.10' da verilmiştir.

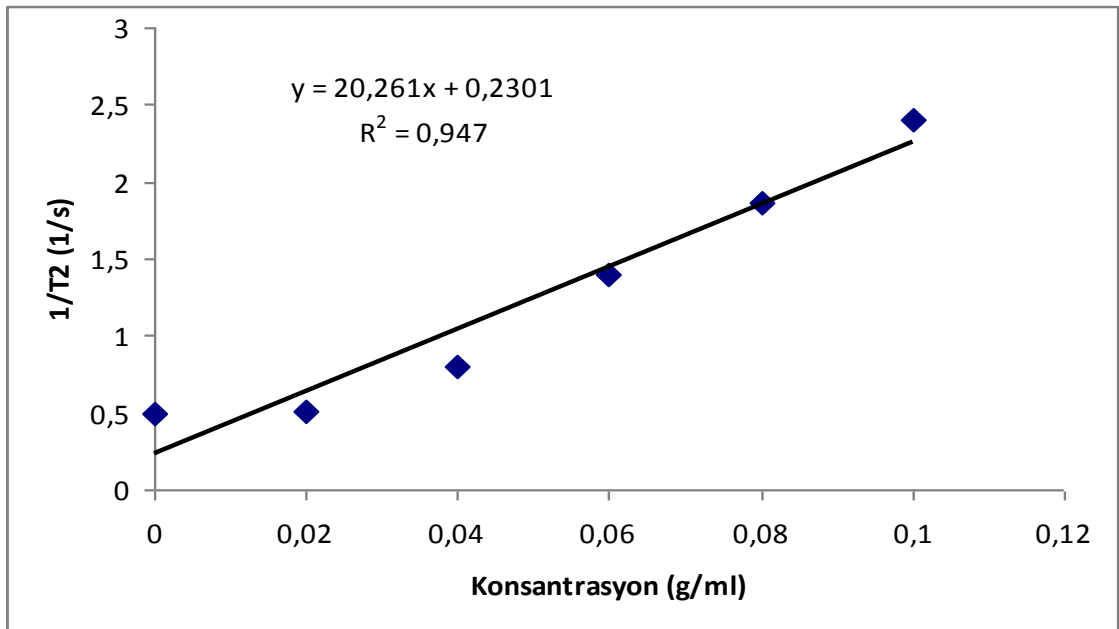
Çizelge 4.10. Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında pepsin enziminin rölaksasyon zamanları oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi

Konsantrasyon (g/ml)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )	1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )
0.00	0.436	0.489
0.02	0.487	0.512
0.04	0.555	0.805
0.06	0.633	1.393
0.08	0.719	1.862
0.10	0.829	2.398

Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında pepsin enziminin  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  rölaksasyon zamanı oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi sırasıyla Şekil 4.21 ve 4.22' de verilmiştir.



Şekil 4.21. Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında pepsin enzimi çözeltisinin  $1/T_1$  rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi



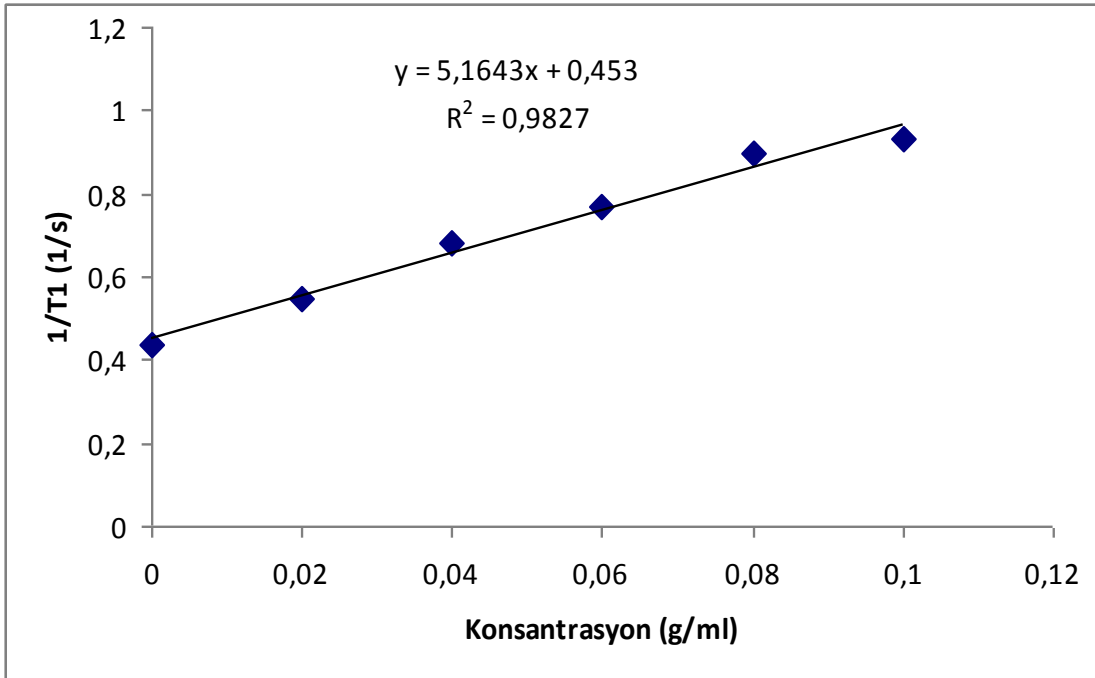
Şekil 22: Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında pepsin enzimi çözeltisinin  $1/T_2$  rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi

Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında proteaz enziminin konsantrasyona bağlı olarak rölaksasyon zamanı oranları  $1/T_1$  ve  $1/T_2$ ' nin değerleri Çizelge 4.11' de verilmiştir.

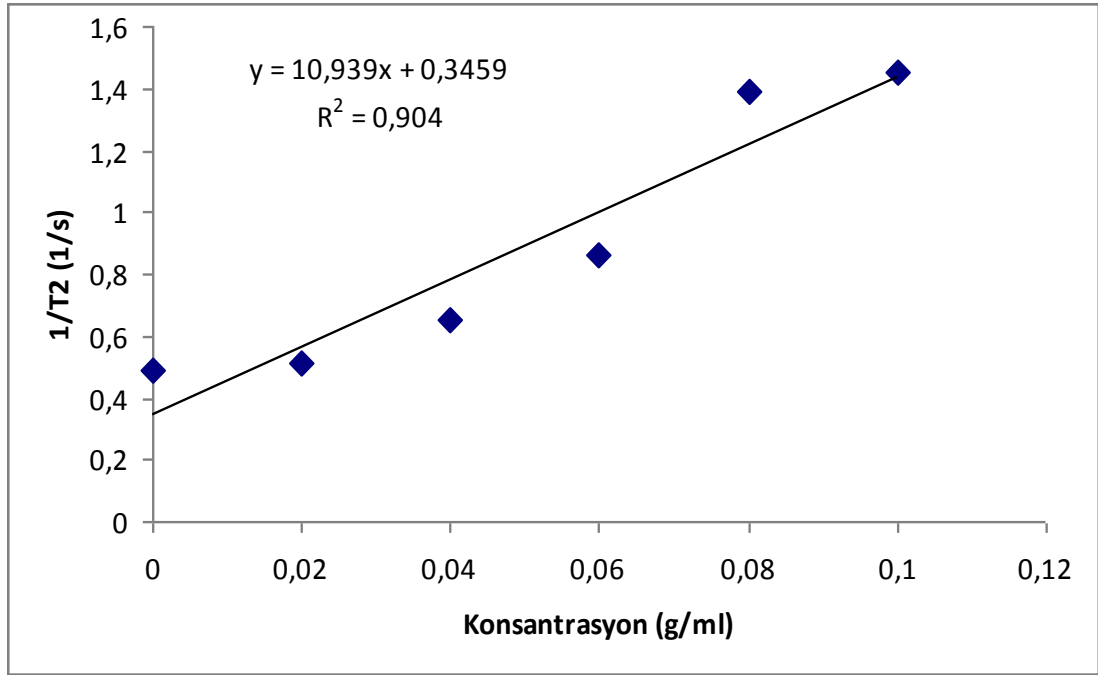
**Çizelge 4.11.** Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında proteaz enziminin rölaksasyon zamanları oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi

Konsantrasyon (g/ml)	$1/T_1$ (s <sup>-1</sup> )	$1/T_2$ (s <sup>-1</sup> )
0.00	0.435	0.489
0.02	0.550	0.510
0.04	0.682	0.656
0.06	0.771	0.860
0.08	0.897	1.391
0.10	0.932	1.451

Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında proteaz enziminin  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  rölaksasyon zamanı oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi sırasıyla Şekil 4.23 ve 4.24' de verilmiştir.



**Şekil 4.23.** Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında proteaz enzimi çözeltisinin  $1/T_1$  rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi



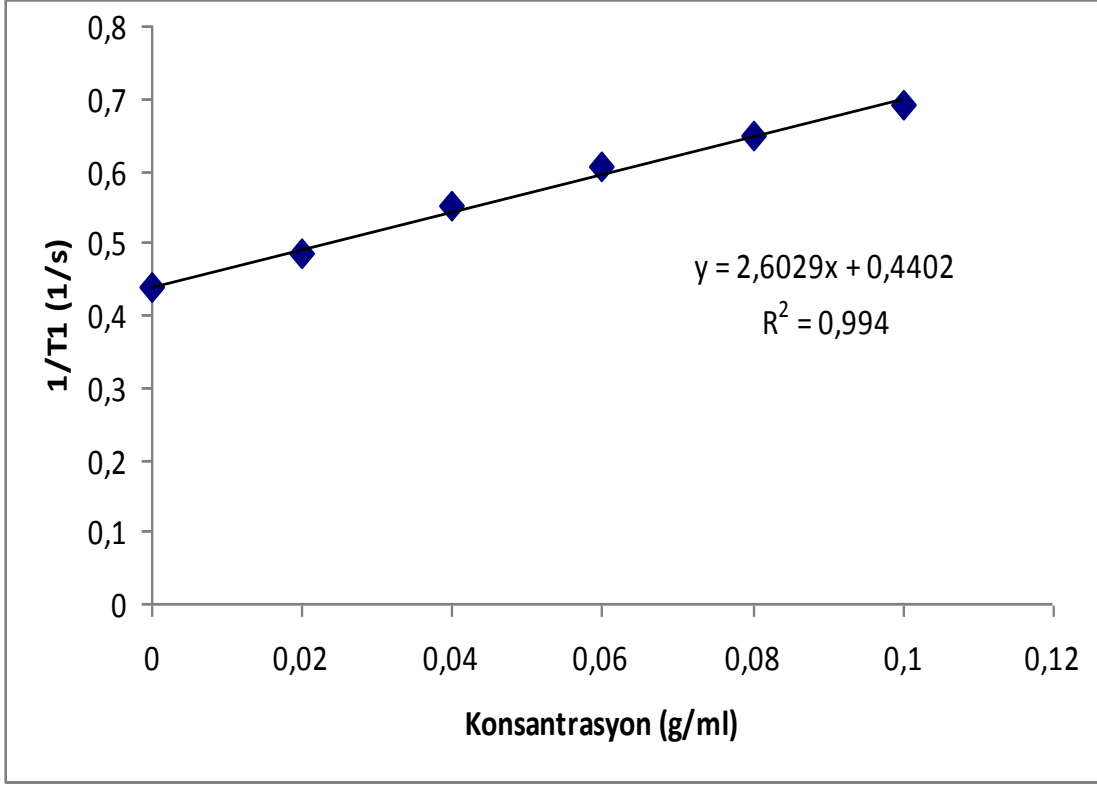
**Şekil 4.24.** Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında proteaz enzimi çözeltisinin 1/T<sub>2</sub> rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi

Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında  $\alpha$ -chymotrypsin enziminin konsantrasyona bağlı olarak rölaksasyon zamanı oranları 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub>' nin değerleri Çizelge 4.12' de verilmiştir.

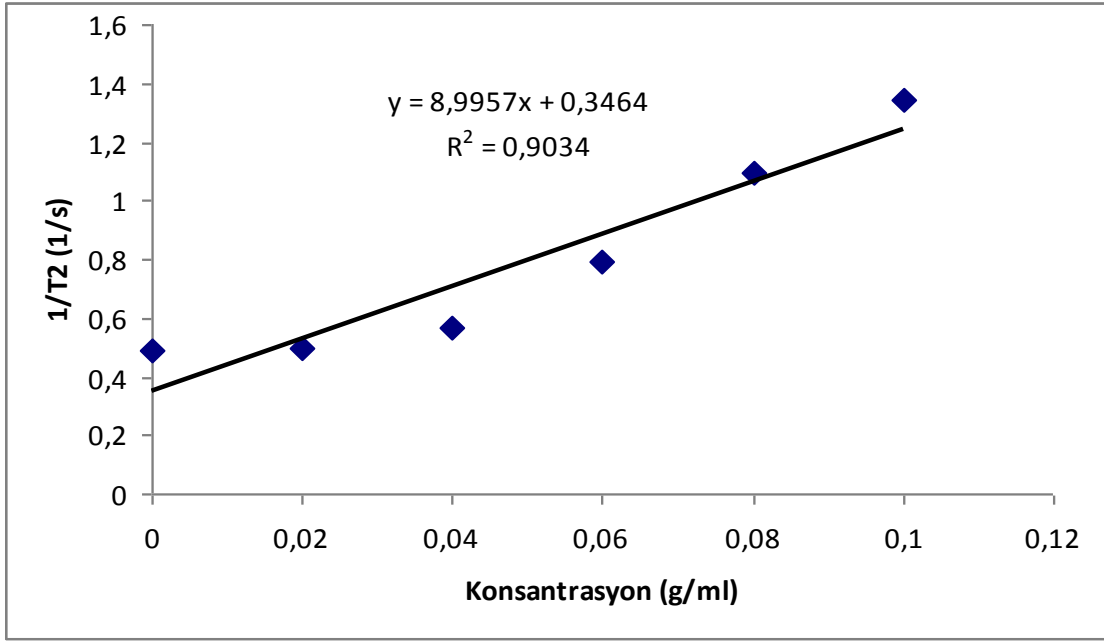
**Çizelge 4.12.** Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında  $\alpha$ -chymotrypsin enziminin rölaksasyon zamanları oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi

Konsantrasyon (g/ml)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )	1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )
0.00	0.437	0.489
0.02	0.485	0.494
0.04	0.553	0.564
0.06	0.605	0.791
0.08	0.650	1.099
0.10	0.692	1.340

Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında  $\alpha$ -chymotrypsin enziminin  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  rölaksasyon zamanı oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi sırasıyla Şekil 4.25 ve Şekil 4.26' da verilmiştir.

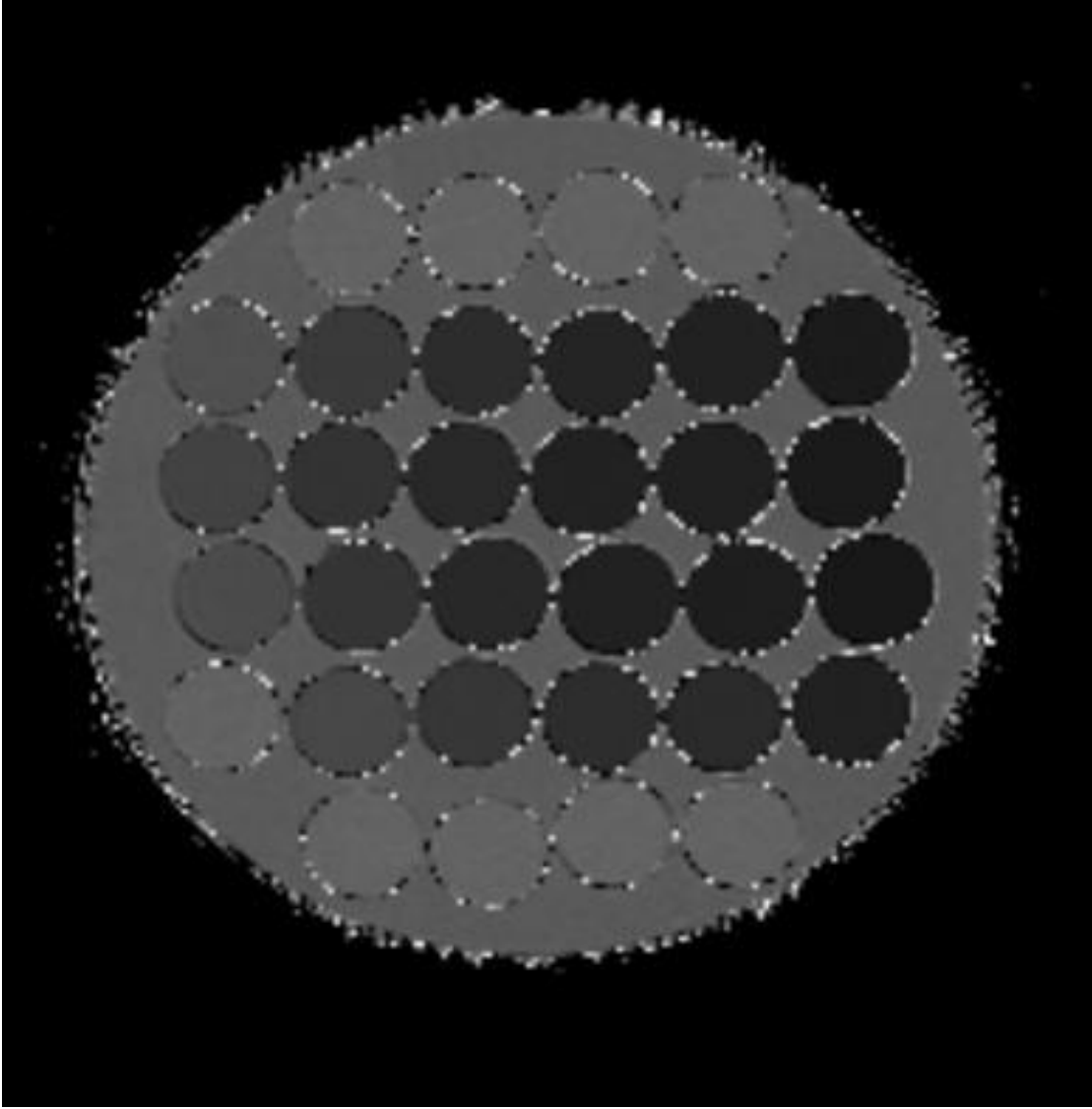


Şekil 4.25. Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında  $\alpha$ -chymotrypsin enzimi çözeltisinin  $1/T_1$  rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi



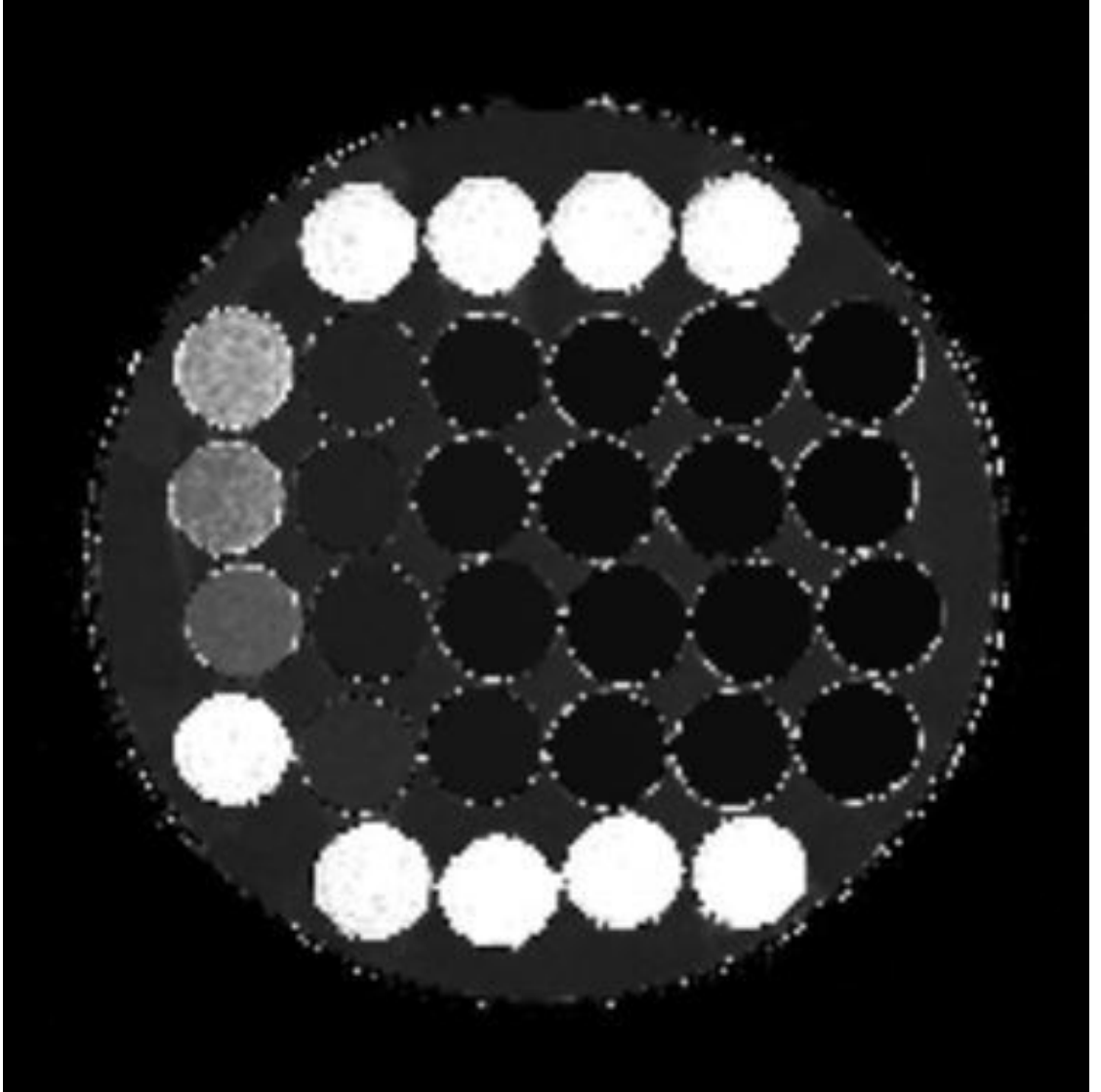
Şekil 4.26. Saf H<sub>2</sub>O çözücüsü ortamında  $\alpha$ -chymotrypsin enzimi çözeltisinin  $1/T_2$  rölaksasyon zamanı oranının konsantrasyona bağlı değişimi

Tez çalışmasında kullanılan MR örneklerinin bulunduğu fantomun 64 MHz MR spektrometresi ile alınan  $T_1$  ve  $T_2$  ağırlıklı film görüntüleri sırasıyla Şekil 4.27 ve Şekil 4.28’ de görülmektedir. Fantom görüntülerinde bulunan 6 satır aşağıdan yukarı sırasıyla şunları göstermektedir: Birinci satırdaki dört daire saf suyun görüntüsüdür. İkinci satırdaki altı daire Hemoglobin proteininin görüntüsüdür. Üçüncü satırdaki altı daire Pepsin enziminin görüntüsüdür. Dördüncü satırdaki altı daire Proteaz enziminin görüntüsüdür. Beşinci satırdaki altı daire  $\alpha$ -Chymotrypsin enziminin görüntüsüdür. Altıncı ve son satırdaki dört daire ise yine saf suyun görüntüsüdür. Görüntülerdeki soldan sağa renk koyulaşması, çözünen konsantrasyonunun artışı anlatmaktadır.



Şekil 4.27. MR örneklerinin bulunduğu fantomun  $T_1$  ağırlıklı film görüntüsü





Şekil 4.28. MR örneklerinin bulunduğu fantomun  $T_2$  ağırlıklı film görüntüsü

Hemoglobin, Pepsin, Proteaz ve  $\alpha$ -Chymotrypsin için 64 MHz MR spektrometresi yardımıyla konsantrasyona bağlı olarak ölçülen T1 ve T2 rölaksasyon zamanlarının grafiğe geçirilmesi sonucu elde edilen  $m_1$  ve  $m_2$  eğimlerinden elde edilen  $m = m_1 / 2m_2$  oranları ve  $\omega_0 = 2\pi f = 6.28 * 64 * 10^6 = 4.02 * 10^8 \text{ rad/s}$  değeri Denklem (2.48)' de yerine yazılmıştır ve  $\tau$  ilgi zamanları  $(1/T_1 - P_f 1/T_{1f}) / 2(1/T_2 - P_f 1/T_{2f})$  oranı yoluyla hemoglobin, pepsin, proteaz ve  $\alpha$ -chymotrypsin için Çizelge 4.13' de verilen değerler bulunmuştur.

**Çizelge 4.13.** 64 MHz MR spektrometresindeki ölçümlerden elde edilen rölaksivite değerleri ve bu değerlerden elde edilen  $\tau$  ilgi zamanları

Madde Adı	$m_1$	$m_2$	$m = m_1 / 2 m_2$	$\tau$ (ns)
Hemoglobin	14.579	27.923	0.2611	2.0017
Pepsin	3.9129	20.261	0.0966	5.3225
Proteaz	5.1643	10.939	0.2360	2.2865
$\alpha$ -Chymotrypsin	2.6029	8.9957	0.1447	3.8398

Hemoglobin proteinin 400 MHz NMR spektrometresi yardımıyla konsantrasyona bağlı olarak ölçülen T1 ve T2 rölaksasyon zamanlarının grafiğe geçirilmesi sonucu elde edilen  $m_1$  ve  $m_2$  eğimlerinden elde edilen  $m = m_1 / 2m_2$  oranları ve  $\omega_0 = 2\pi f = 6.28 * 400 * 10^6 = 25.12 * 10^8 \text{ rad/s}$  değeri Denklem (2.56)' da yerine yazılmıştır ve  $\tau$  ilgi zamanları  $(1/T_1 - P_f 1/T_{1f}) / 2(1/T_2 - P_f 1/T_{2f})$  oranı yoluyla hemoglobin için Çizelge 4.14' de verilen değerler bulunmuştur.

**Çizelge 4.14.** Hemoglobin için 400 MHz NMR spektrometresindeki ölçümlerden elde edilen rölaksivite değerleri ve bu değerlerden elde edilen  $\tau$  ilgi zamanları

Madde Adı	$m_1$	$m_2$	$m = m_1 / 2 m_2$	$\tau$ (ns)
Hemoglobin (saf D2O)	10.53	74.267	0.07089	1.22079
Hemoglobin (0.1ml H2O+0.9ml D2O)	9.8246	75.041	0.06546	1.27042

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Protein çözeltileri için röleksivite; birim protein konsantrasyonu başına röleksasyon oranındaki değişim oranı şeklinde tanımlanır ve

$$R = \frac{\Delta(1/T_i)}{C} \quad i:1,2 \quad (5.1)$$

formülü ile verilir (Kang, Y.S. ve ark. 1984).

Hemoglobin proteini 400 MHz NMR spektrometresinde saf D2O ortamı ve 0.1ml H2O+0.9ml D2O ortamında artan sıcaklık ve konsantrasyona bağlı olarak incelendi. Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2' den de görüldüğü gibi hem saf D2O ortamı hem de 0.1ml H2O+0.9ml D2O ortamında  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  röleksasyon oranlarının arttığı görüldü. Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' dan konsantrasyon artışına göre  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  röleksasyon oranlarının artışının lineer ilişkili olduğu görüldü. Hemoglobinin 3 farklı konsantrasyonu için (0.1 g/ml, 0.2 g/ml ve 0.3 g/ml) saf D2O ortamında 293-313K sıcaklık aralığında ve 0.1ml H2O+0.9ml D2O ortamında 293-318K aralığında sıcaklığa bağlı olarak 400 MHz NMR spektrometresinde incelendi. Saf D2O ortamında Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5' den ve 0.1ml H2O+0.9ml D2O ortamında ise Çizelge 4.6, Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8' den de görüldüğü gibi sıcaklık artışıyla  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  röleksasyon oranları artmaktadır. Saf D2O ortamındaki 3 farklı Hemoglobin çözeltisi için de incelen sıcaklık aralığında (293-313K) artan sıcaklığa bağlı olarak  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  röleksasyon oranlarının lineer olarak arttığı görüldü (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Yine 0.1ml H2O+0.9ml D2O ortamındaki 3 farklı Hemoglobin çözeltisi için de incelen sıcaklık aralığında (293-318K) artan sıcaklığa bağlı olarak  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  röleksasyon oranlarının lineer olarak arttığı görüldü (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18). Hemoglobin proteininin düşük alan (1.5 Tesla) incelemesi konsantrasyona bağlı olarak oda sıcaklığında (yaklaşık 20-22 °C) saf su ortamında 64 MHz MR spektrometresiyle incelendi. Çizelge 4.9' dan da görüldüğü gibi  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  röleksasyon oranlarının konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı görülmektedir. Bu artışın tıpkı 400 MHz yüksek alan ölçümlerinde olduğu gibi lineer ilişkili olduğu Şekil 4.19 ve Şekil 4.20' den görülmektedir. Pepsin, Proteaz ve  $\alpha$ -Chymotrypsin enzimleri de saf su ortamında, oda sıcaklığında 64 MHz MR spektrometresiyle incelendi. Çizelge 4.10, Çizelge 4.11 ve

Çizelge 4.12' den de görüldüğü gibi  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  rölaksasyon oranları konsantrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26' dan da görüldüğü gibi rölaksasyon oranlarındaki bu artış lineer olmaktadır. Bu lineer ilişkinin  $1/T_1$  rölaksasyon oranı için çok güçlü olduğu yüksek korelasyon değerlerinden (yaklaşık 1) anlaşılmaktadır.  $1/T_2$  rölaksasyon oranı için ise bu lineer ilişkinin  $1/T_1$ ' e göre hafifçe daha küçüldüğü, sırasıyla Pepsin için 0.947, Proteaz için 0.904 ve  $\alpha$ -Chymotrypsin için 0.903 korelasyon değerlerinden anlaşılmaktadır. Ancak bu küçülme; kullanılan enzimlerin rölaksasyon mekanizmasının dipolar mekanizma olduğu sonucunu değiştirecek bir küçülme değildir.

64 MHz MR spektrometresinden elde edilen Çizelge 4.13 göstermektedir ki;  $T_2$  rölaksivite  $T_1$ ' den daha büyüktür.  $T_1$  rölaksivitesi en büyük Hemoglobin proteini ve en küçük ise  $\alpha$ -Chymotrypsin enzimi olduğu görülmektedir.  $T_2$  rölaksivite için de en büyük ve en küçük değere sahip maddeler aynı olmaktadır. Ancak  $T_1$  rölaksivitesi Pepsinden büyük olan Proteaz enziminin  $T_2$  rölaksivitesinin Pepsinden daha küçük olduğu görülmektedir.

400 MHz NMR spektrometresinde 2 farklı çözücü ortamı (saf D<sub>2</sub>O ve 0.1ml H<sub>2</sub>O+0.9ml D<sub>2</sub>O) için incelenen Hemoglobin proteininin rölaksivite  $T_1$  ve  $T_2$  değerleri Çizelge 4.14' de görülmektedir. Çizelgeden de görüldüğü gibi her iki çözücü ortamı içinde  $T_1$  rölaksivitesi yaklaşık 10 iken  $T_2$  rölaksivitesi yaklaşık 75 olmaktadır. 64 MHz için hemoglobin proteininin  $T_1$  ve  $T_2$  rölaksivite değerleri arasındaki fark yaklaşık 2 kat iken, 400 MHz için bu fark 7.5 kat kadardır.

Çizelge 4.13' te görülen  $\tau$  ilgi zamanları (2.48) formülünden elde edilmiştir. Tablo 14' te görülen hemoglobinin  $\tau$  ilgi zamanları ise (2.56) denkleminde elde edilmiştir. Hemoglobin proteininin ilgi zamanı 64 MHz için 2ns ve 400 MHz için ise ortalama 1.25ns olduğu hesaplanmıştır. İlgi zamanının mertebesindeki bu uyuma ve değerlerinin birbirine yakın oluşu göstermektedir ki; rölaksasyon oranları yoluyla ilgi zamanlarının tespiti küresel simetrik protein ya da enzimler için yüksek doğrulukla belirleme yapmaya imkan vermektedir. Bu ilgi zamanlarının tespiti dipolar rölaksasyon mekanizması ve protonların hızlı kimyasal değişimi yoluyla açıklanabilir.

64 MHz MR ve 400 MHz NMR spektrometreleri kullanılarak, küresel simetrik protein ve enzim çözeltilerinde rölaksasyon zamanlarını modüle eden ilgi zamanlarının  $T_1/T_2$  oranı kullanılarak belirlenmesi, küresel olmayan moleküllere de uygulanabilir olup

olmadığına bakılabilir olması açısından önemli olmaktadır.  $T_1/T_2$  rölaksasyon oranı kullanılarak belirlenen ilgi zamanları üzerine paramanyetik iyonların etkisine, PH etkisine, protein aggregation (yığışım) etkilerine, denature edilmiş protein-enzim çözeltilerine ve dondurulmuş protein-enzim çözeltilerini incelemek bu çözeltilerin moleküler dinamiği daha iyi anlamak için önerilir. Protein ve enzim çözeltilerinin rölaksasyon zamanlarına frekans bağıllığını incelemek temel bilimler, tıp ve eczacılık alanında önemli katkılar sağlayacaktır. Bu çözeltilerle yapılacak paramanyetik iyon çalışmaları kontrast madde gelişimi ve manyetik rezonans görüntüleme için önemli katkılar sağlayacaktır.



## 6. KAYNAKLAR

- Abragam, A. 1961. The principles of nuclear magnetism. Oxford University Press Inc., 603, New York.
- Bahçeli, S., 1996. Çekirdek Magnetik Rezonansın Temelleri. Bizim Büro Basımevi, 421, Ankara.
- Bertini, I., Fragai, M., Luchinat, C., Parigi, G. 2000.  $^1\text{H}$  NMRD profiles of diamagnetic proteins: a model-free analysis. *Magn. Reson. Chem.* 38: 543-550.
- Blicharska, B. 1986. Some application of spin lattice relaxation time measurements to investigation of protein solutions. *Acta. Phys. Pol.* A70: 122-125.
- Blicharska, B., Florkowski, Z., Hennel, J.W., Held, G., Noack, F. 1970. Investigation of protein hydration by proton spin relaxation time measurements. *Biochim. Biophys. Acta.* 207(3): 381-389.
- Blicharska, B., Rydzy, M. 1979. Investigation of protein denaturation by nuclear magnetic relaxation method. *Acta. Phys. Pol.* A56: 439-443.
- Bottomley, P.A., Hardy, C.J., Ardersinger, R.E., Allen-Moore, G. 1987. A review of  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance relaxation in pathology: are T1 and T2 diagnostic? *Med. Phys.* 14(1): 1-37.
- Bryant, R.G. 1996. The dynamics of water-protein interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25: 29-53.
- Bryant, R.G. 1996. The dynamics of water-protein interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25: 29-53.
- Daszkiewicz, O.K., Hennel, J.W., Lubas, B., Szczepkowski, T.W. 1963. Proton Magnetic Relaxation and Protein Hydration. *Nature*, 200: 1006-1007.
- Denisov, V.P., Halle, B. 1996. Protein hydration dynamics in aqueous solution. *Faraday Discuss.* 103: 227-244.
- Duplan, J.C., Mahi, L., Brunet, J.L. 2005. NMR determination of the equilibrium constant for the liquid  $\text{H}_2\text{O}$ - $\text{D}_2\text{O}$  mixture. *Chem. Phys. Lett.* 413: 400-403.
- Edzes, H.T., Samulski, E.T. 1977. Cross relaxation and spin diffusion in the proton NMR of hydrated collagen. *Nature* 265: 521-523.

Edzes, H.T., Samulski, E.T. 1978. The measurement of cross-relaxation effects in the proton NMR spin-lattice relaxation of water in biological systems: Hydrated collagen and muscle. *J. Magn. Reson.* 31: 207-229.

Eley, D.D., Hey, M.J., Ward, A.J.I. 1975. Nuclear magnetic resonance relaxation in aqueous bovine albumin solutions. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* 71: 1106-1113.

Floyd, R.A., Yoshida, T., Leigh, J.S. Jr. 1975. Changes of tissue water proton relaxation rates during early phases of chemical carcinogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 56-58.

Frey, H.E., Knispel, R.R., Kruuv, J., Sharp, A.R., Thompson, R.T., . Pinar, M.M. 1972. Proton Spin-Lattice Relaxation Studies of Nonmalignant Tissues of Tumorous Mice. *J. Natl. Cancer. Inst.* 49(3): 903-906.

Friedman, A.C., Ramchandani, P., Black, M., Caroline D.F., Radecki P.D., Heeger, P. 1986. Magnetic resonance imaging diagnosis of Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology.* 91(5): 1289-1295.

Gallier, J., Rivet, P., de Certaines J. 1987. <sup>1</sup>H- and <sup>2</sup>H-NMR study of bovine serum albumin solutions. *Biochim. Biophys. Acta.* 915(1): 1-18.

Gallier, J., Rivet, P., de Certaines, J. 1987. <sup>1</sup>H- and <sup>2</sup>H-NMR study of bovine serum albumin solutions. *Biochim. Biophys. Acta.* 915: 1-18.

Grösch, L., Noack, F. 1976. NMR relaxation investigation of water mobility in aqueous bovine serum albumin solutions. *Biochim Biophys Acta.* 453(1): 218-232.

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

Hallenga, K., Koenig, S.H. 1976. Protein rotational relaxation as studied by solvent <sup>1</sup>H and <sup>2</sup>H magnetic relaxation. *Biochemistry* 15(19): 4255-4264.

Hua, L., Huang, X., Zhou, R., Berne, B.J. 2006. Dynamics of Water Confined in the Interdomain Region of a Multidomain Protein. *J. Phys. Chem. B* 110: 3704-3711.

Hubbard, P.S. 1963. Theory of Nuclear Magnetic Relaxation by Spin-Rotational Interactions in Liquids. *Phys. Rev.* 131: 1155-1165.

Kang, Y.S., Gore, J.C., Armitage, I.M. 1984. Studies of Factors Affecting the Design of NMR Contrast Agents: Manganese in Blood as a Model System, *Magn. Reson. Med.*, 1(3): 396-409.



Kiihne, S., Bryant, R.G. 2000. Protein-bound water molecule counting by resolution of <sup>1</sup>H spin-lattice relaxation mechanisms. *Biophys. J.* 78: 2163-2169.

Koenig, S.H., Brown, R.D. 3rd. 1985. The importance of the motion of water for magnetic resonance imaging. *Invest. Radiol.* 20(3): 297-305.

Koenig, S.H., Bryant, R.G., Hallenga, K., Jacob, G.S. 1978. Magnetic cross-relaxation among protons in protein solutions. *Biochemistry* 17(20): 4348-4358.

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

Koutcher, J.A., Goldsmith, M., Damadian, R. 1978. NMR in cancer. X. A malignancy index to discriminate normal and cancerous tissue. *Cancer.* 41(1): 174-182.

Mansfield, P., Maudsley, A.A. 1977. Medical imaging by NMR. *Br. J. Radiol.* 50(591): 188-194.

Marshall, A.G., Schmidt, P.G., Sykes B.D. 1972. Effect of internal rotation on nuclear magnetic relaxation times for macromolecules. *Biochemistry.* 11(21): 3875-3879.

McLachlan, L.A. 1980 Cancer-induced decreases in human plasma proton NMR relaxation rates. *Phys. Med. Biol.* 25(2): 309-315.

Modig, K., Liepinsh, E., Otting, G., Halle, B. 2004. Dynamics of protein and peptide hydration. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 102-114.

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

Pizzitutti, F., Marchi, M., Sterpone, F., Rossky, P.J. 2007. How protein surfaces induce anomalous dynamics of hydration water. *J. Phys. Chem. B* 111: 7584-7590.

Popov, A.I. 1979. Multinuclear NMR studies of alkali ions in nonaqueous solvents. *Pure Appl. Chem.*, , Vol. 51: 101-110.

Slichter, C.P. 1963. Principles of magnetic resonance. Harper & Row Publishers, 663, New York.

Slonim, I.Y., Lyubimov, A.N. 1970. The NMR of Polymers, Palanium Press, 146, New York.

Şahin, M. 2002. Bazi Pulslu Çmr Deneylelerinin Çeşitli Spin Sistemleri İçin Çarpım İşlemci Kuramı İle Analitik İncelenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta

Van-Quynh, A., Willson, S., Bryant, R.G. 2003. Protein Reorientation and Bound Water Molecules Measured by  $^1\text{H}$  Magnetic Spin-Lattice Relaxation. *Biophys. J.* 84: 558-563.

Yıldırım, H., 1985. Biyofizik. Anadolu Üniversitesi Basımevi, 352, Eskişehir.

Yılmaz, A., Korunur, S. 2012. Basılmamış Ders Notları, Diyarbakır.

Yılmaz, A., B. Zengin and F. S. Ulak, High-Field Proton Spin-lattice Relaxation Mechanism in  $\text{D}_2\text{O}$  Solutions of Albumin, yayınlanmamış makale 2012.

Zhong, J.H., Gore, J.C., Armitage, I.M. 1990. Quantitative studies of hydrodynamic effects and cross-relaxation in protein solutions and tissues with proton and deutron longitudinal relaxation times. *Magn. Reson. Med.* 13(2): 192-203.

## **ÖZGEÇMİŞ**

### **Kişisel Bilgiler**

**Adı Soyadı** : Bilgin Zengin

**Doğum Yeri** : Mut

**Doğum Tarihi**: 28.01.1979

**Yabancı Dili**: İngilizce

### **Eğitim Durumu:**

Lise : Salim Yılmaz Lisesi

Lisans : Mersin Üniversitesi

Yüksek Lisans : Mersin Üniversitesi

### **Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:**

Mersin Üniversitesi, Fizik Bölümü, Araştırma Görevliliği, 2002-2005

Dicle Üniversitesi, Fizik Bölümü, Araştırma Görevliliği, 2005 – Devam ediyor