

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİDRAZİNLENMİŞ BAZI KALKON TÜREVLERİNİN İNSAN
SERUM ALBUMİN VE MODEL MEMBRAN SİSTEMLERDEKİ
FLORESANS KARAKTERİSTİĞİ

Berat YILDIRIM

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Meryem BEŞER

KİMYA
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2020
Her Hakkı Saklıdır.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“Hidrazinlenmiş bazı kalkon türevlerinin insan serum albumin ve model membran sistemlerdeki floresans karakteristiği” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımda intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim.

24/07/2020



Berat YILDIRIM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HİDRAZİNLENMİŞ BAZI KALKON TÜREVLERİNİN İNSAN SERUM ALBÜMİN VE MODEL MEMBRAN SİSTEMLERDEKİ FLORESANS KARAKTERİSTİĞİ

Berat YILDIRIM

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Meryem BEŞER

Bu tez çalışmasında hidrazinlenmiş kalkon türevi iki pirazolin izomer bileşiğinin (4,2/ 2,2) biyolojik sistemler için uygun floresans prob olma özelliği incelenmiştir. Bu amaçla 4,2 ve 2,2 izomerlerinin in-vitro model membran sistem olarak kabul edilen Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve model taşıyıcı protein olan insan serum albümin (HSA) ile etkileşimleri absorpsiyon ve floresans spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışma, bahsi geçen ortamlardaki floresans enerji transferi Förster teorisi ve Stern-Volmer eşitliği esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla SDS misel ortamında donör olarak 4,2 ve 2,2 pirazolin türevi moleküller kullanılırken akseptör molekül olarak Safranin T, Akridin O, Pyronin Y ve Floresin molekülleri tercih edilmiştir. HSA ortamında ise donör molekül HSA iken akseptör 4,2 ve 2,2 izomer bileşikleridir. Spektral örtüşme alanlarının uygun olduğu belirlenen donör-akseptör çiftleri için enerji transfer parametreleri ve Stern-Volmer parametreleri hesaplanmış, donör-akseptör çiftlerinin uyumu hesaplanan parametreler ile desteklenmiştir. SDS ve HSA sistemindeki enerji transferleri, Stern-Volmer ve termodinamik parametreler biyolojik sistemler için moleküllerin uyumunu ifade etmiştir. Ayrıca moleküllerin biyolojik sistem çalışmalarına uygunluğunun tespit edilmesi için sitotoksik olup olmadıkları in-vitro kanser hücre hattı çalışmaları ile araştırılmış ve her iki molekülün de toksik olmadığı tespit edilmiştir. Bu moleküllerin hücre görüntüleme tekniklerinde kullanım alanı olup olamayacağının belirlenmesi amacıyla in-vitro hücre uygulaması yapılarak konfokal mikroskop görüntüleri elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda da moleküllerin hücre sitoplazmasını boyadığı, dolayısıyla her iki molekülün de hücre görüntüleme proseslerinde 360 nm dalga boyunda hücre boyama amacıyla kullanılabilceği anlaşılmıştır.

2020, 87 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Floresans Enerji transferi, Floresans Spektroskopisi, İnsan Serum Albümin (HSA), Pirazolin, Sodyum Dodesil Sülfat (SDS).

ABSTRACT

Master Thesis

FLUORESCENCE CHARACTERISTIC OF HYDRASINATED SOME CHALCONE DERIVATIVES IN HUMAN SERUM ALBUMIN AND MODEL MEMBRANE SYSTEMS

Berat YILDIRIM

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Asts. Prof. Dr. Burcu Meryem BEŞER

In this thesis, two hydrazinated chalcone derivative pyrazoline isomer compounds (4,2 / 2,2) are investigated as suitable fluorescence probes for biological systems. For this purpose, interactions of 4,2 and 2,2 isomers with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), which is accepted as in-vitro model membrane system, and human serum albumin (HSA), which is the model carrier protein, were investigated using absorption and fluorescence spectroscopy technique. The study mainly includes the investigation of fluorescence energy transfer in the aforementioned environments according to Förster's theory and Stern-Volmer equation. For this purpose, while 4, 2 and 2, 2 pyrazoline derivative molecules are used as donors in SDS micelle medium, Safranin T, Akridin O, Pyronin Y, and Floresin molecules were preferred as acceptor molecules. In the HSA environment, while the donor molecule is HSA, acceptor 4, 2 and 2, 2 are isomer compounds. Energy transfer parameters and Stern-Volmer parameters were calculated for these donor-acceptor pairs, whose spectral overlap areas were suitable, and the compatibility of donor-acceptor pairs was supported by the calculated parameters. Energy transfers in the SDS and HSA system, Stern-Volmer, and thermodynamic parameters expressed the compatibility of molecules for biological systems. Also, to determine whether the molecules are suitable for biological system studies, whether they are cytotoxic was investigated by in-vitro cancer cell line studies and both molecules were found to be non-toxic. To understand whether these molecules can be used in cell imaging techniques, confocal microscope images were obtained by in-vitro cell application. As a result of this study, it was understood that the molecules stain the cell cytoplasm, so both molecules can be used for cell staining at 360 nm wavelength in cell imaging processes.

2020, 87 Pages

Keywords: Energy transfer, Fluorescence Spectroscopy, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Pyrazoline, Human Serum Albumin (HSA).

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde gerçekleşmiştir.

Çalışmalarım esnasında bana yön veren, tecrübelerini ve yardımlarını esirgemeyen, maddi ve manevi desteğini gördüğüm çok değerli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Burcu Meryem BEŞER' e teşekkür ederim.

Benim şu an ki durumuma gelmem için beni yetiştiren, bana büyük emekleri olan değerli Kimya Bölümü Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada kullanılan Pirazolin türevi moleküllerin sentezini yapan ve bize çalışma imkânı sağlayan KTÜ Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Ahmet YAŞAR'a teşekkür ederim.

Sitotoksisite çalışması ile toksik doz çalışmasını yapan EBYÜ Kimya Bölümü Doç. Dr. Ahmet ALTAY'a teşekkür ederim.

Çalışmakta olduğum ilaç şirketinde bana manevi destekte bulunan çok değerli çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm yaşamım ve eğitim hayatım boyunca bana büyük destekleri olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda ve tüm yaşamım boyunca benim her zaman en büyük destekçim olan çok değerli eşim Yasemin MERT YILDIRIM' a en kalbi duygularıyla teşekkür ederim.

Berat YILDIRIM

Temmuz, 2020

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM	22
3.1. Kullanılacak Kimyasal Maddeler	22
3.2. Kullanılacak Alet ve Cihazlar	22
3.3. Numunelerin Hazırlanması	22
3.4. UV-Vis. Absorbsiyon Spektroskopisi	26
3.5. Floresans Spektroskopisi	28
3.6. Kuantum Veriminin Hesaplanması	29
3.7. Floresans Yaşam Ömrünün (Lifetime) Belirlenmesi	30
3.8. Enerji Transferi, Kuençleşme ve Sıcaklık Parametrelerinin Belirlenmesi	31
3.9. Konfokal Mikroskop	34
3.10. Sitotoksisitenin Belirlenmesi	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1. SDS Ortamında Etken Maddelerinin (2,2 & 4,2) Boyar Maddeler (AcO, Fl, PyY, Sft) İle Etkileşimleri	38
4.2. İnsan Serum Albumini (HSA) İle Etken Maddelerinin (2,2 & 4,2) Etkileşimleri	62
4.3. Floresans Yaşam Ömürlerinin (Lifetime) Belirlenmesi	71
4.4. Sitotoksisite İncelemesi	75
4.5. Konfokal Mikroskop İncelemesi	78
5. SONUÇ	80
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Kalkonların genel yapısı	1
Şekil 1.2. 2-(5-(pyridin-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)phenol (2,2).....	2
Şekil 1.3. 4-(5-(pyridin-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)phenol (4,2).....	2
Şekil 1.4. Elektromanyetik Radyasyonun temsili gösterimi	3
Şekil 1.5. Jablonski diyagramı	4
Şekil 1.6. Monomoleküler ve bimoleküler deaktivasyon prosesleri.....	8
Şekil 1.7. Bir enerji transfer prosesinin temsili gösterimi	9
Şekil 1.8. Donör molekülünün emisyon spektrumu ile akseptör molekülünün absorpsiyon spektrumunun temsili spektral örtüşmesi	10
Şekil 1.9. Pyronin Y (PyY) molekülünün kimyasal yapısı	11
Şekil 1.10. Akridin Oranj (AcO) molekülünün kimyasal yapısı	11
Şekil 1.11. Safranin T (SfT) molekülünün kimyasal yapısı.....	12
Şekil 1.12. Floresin (Fl) molekülünün kimyasal yapısı	12
Şekil 1.13. Oluşabilecek misel şekilleri	14
Şekil 1.14. Sodyum Dodesil Sülfat surfaktantının (SDS) kimyasal yapısı.....	14
Şekil 1.15. İnsan Serum Albumininin (HSA) temsili yapısı.....	15
Şekil 3.1. Bir UV-Vıs Spektrometre şematik gösterimi	27
Şekil 3.2. PG firmasına ait (T80+ UV/VIS Spectrometer) UV/VIS Spektrofotometre cihazı.....	27
Şekil 3.3. Genel bir spektroflorofotometrenin şematik gösterimi.....	28
Şekil 3.4. Shimadzu firmasına ait (RF-5301 PC Spectrofluorophotometer) Floresans Spektroflorofotometre cihazı	29
Şekil 3.5. Konfokal Mikroskop cihazı	35
Şekil 3.6. XTT tetrazolyumun fenazin meto sülfat varlığında mitokondriyal dehidrogenaz ile XTT formaza indirgenme işlemi	36
Şekil 4.1. SfT, AcO, PyY, Fl boyar maddelerin absorpsiyon spektrumları ile 4,2 etken maddesinin floresans spektrumları arasındaki spektral örtüşme	38
Şekil 4.2. SfT, AcO, PyY, Fl boyar maddelerin absorpsiyon spektrumları ile 2,2 etken maddesinin floresans spektrumları arasındaki spektral örtüşme	39
Şekil 4.3. 4,2 ile SfT molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları.....	40

Şekil 4.4. 4,2 ile AcO molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları	41
Şekil 4.5. 4,2 ile Fl molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları	42
Şekil 4.6. 4,2 ile PyY molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları	43
Şekil 4.7. 2,2 ile SfT molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları.....	44
Şekil 4.8. 2,2 ile PyY molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları.....	45
Şekil 4.9. 2,2 ile Fl molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları	46
Şekil 4.10. 2,2 ile AcO molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları	47
Şekil 4.11. 2,2 etken maddesi ile AcO boyasının Stern-Volmer grafiği	51
Şekil 4.12. 2,2 etken maddesi ile Fl boyasının Stern-Volmer grafiği	51
Şekil 4.13. 2,2 etken maddesi ile PyY boyasının Stern-Volmer grafiği.....	52
Şekil 4.14. 2,2 etken maddesi ile SfT boyasının Stern-Volmer grafiği.....	52
Şekil 4.15. 4,2 etken maddesi ile AcO boyasının Stern-Volmer grafiği.....	53
Şekil 4.16. 4,2 etken maddesi ile Fl boyasının Stern-Volmer grafiği.....	53
Şekil 4.17. 4,2 etken maddesi ile PyY boyasının Stern-Volmer grafiği.....	54
Şekil 4.18. 4,2 etken maddesi ile SfT boyasının Stern-Volmer grafiği.....	54
Şekil 4.19. Farklı sıcaklıklarda 2,2 etken maddesinin AcO ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği	55
Şekil 4.20. Farklı sıcaklıklarda 2,2 etken maddesinin Fl ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği	56
Şekil 4.21. Farklı sıcaklıklarda 2,2 etken maddesinin PyY ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği	56
Şekil 4.22. Farklı sıcaklıklarda 2,2 etken maddesinin SfT ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği	57
Şekil 4.23. Farklı sıcaklıklarda 4,2 etken maddesinin AcO ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği	57
Şekil 4.24. Farklı sıcaklıklarda 4,2 etken maddesinin Fl ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği	58
Şekil 4.25. Farklı sıcaklıklarda 4,2 etken maddesinin PyY ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği	58
Şekil 4.26. Farklı sıcaklıklarda 4,2 etken maddesinin SfT ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği	59

Şekil 4.27. 4,2 ve 2,2 etken maddelerinin absorpsiyon spekturumları ile HSA'nın floresans spektrumları arasındaki spektral örtüşme	63
Şekil 4.28. HSA ile 4,2 etken maddesinin floresans spektrumları.....	64
Şekil 4.29. HSA ile 2,2 etken maddesinin floresans spektrumları.....	65
Şekil 4.30. HSA ile 2,2 etken maddesinin Stern-Volmer grafiği	68
Şekil 4.31. HSA ile 2,2 etken maddesinin Stern-Volmer grafiği	68
Şekil 4.32. Farklı sıcaklıklarda HSA'nın 2,2 etken maddesi ile kuenleşme etkilerinin çift log grafiği	69
Şekil 4.33. Farklı sıcaklıklarda HSA'nın 4,2 etken maddesi ile kuenleşme etkilerinin çift log grafiği	69
Şekil 4.34. 4,2 molekülünün SDS ortamında AcO, SfT, PyY ve Fl molekülleri ile etkileşimine ait floresans durulma spektrumları	72
Şekil 4.35. 2,2 molekülünün SDS ortamında AcO, SfT, PyY ve Fl molekülleri ile etkileşimine ait floresans durulma spektrumları	72
Şekil 4.36. 4,2 molekülünün HSA ile etkileşimine ait floresans durulma spektrumu	73
Şekil 4.37. 2,2 molekülünün HSA ile etkileşimine ait floresans durulma spektrumu	73
Şekil 4.38. 2,2 molekülünün HT-29 kolon kanser hücre hattı için sitotoksitite grafiği..	76
Şekil 4.39. 2,2 molekülünün MCF-7 meme kanser hücre hattı için sitotoksitite grafiği..	76
Şekil 4.40. 4,2 molekülünün HT-29 kolon kanser hücre hattı için sitotoksitite grafiği..	77
Şekil 4.41. 4,2 molekülünün MCF-7 meme kanser hücre hattı için sitotoksitite grafiği	77
Şekil 4.42. 2,2 Etken maddesi konfokal mikroskop görüntüleri.....	79
Şekil 4.43. 4,2 Etken maddesi konfokal mikroskop görüntüleri.....	79

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Çalışılacak konsantrasyonlar (SfT)	23
Tablo 3.2. Çalışılacak konsantrasyonlar (AcO)	23
Tablo 3.3. Çalışılacak konsantrasyonlar (Fl).....	24
Tablo 3.4. Çalışılacak konsantrasyonlar (PyY).....	24
Tablo 3.5. Çalışılacak konsantrasyonlar (2,2 / 4,2).....	25
Tablo 4.1. 4,2 etken maddesinin Fl, PyY, AcO ve SfT ile misel sistemde farklı konsantrasyonlarındaki floresans kuantum verimleri	48
Tablo 4.2. 2,2 etken maddesinin Fl, PyY, AcO ve SfT ile misel sistemde farklı konsantrasyonlarındaki floresans kuantum verimleri	49
Tablo 4.3. 4,2 ve 2,2 molekülleri için hesaplanan floresans enerji transferi parametreleri	50
Tablo 4.4. 4,2 için SDS ortamında farklı sıcaklıklarda hesaplanan değerler	60
Tablo 4.5. 2,2 için SDS ortamında farklı sıcaklıklarda hesaplanan değerler	60
Tablo 4.6. 2,2 ile boyar baddeler için hesaplanan termodinamik parametreler	61
Tablo 4.7. 4,2 ile boyar baddeler için hesaplanan termodinamik parametreler	62
Tablo 4.8. HSA'nın 4,2 molekülünün farklı konsantrasyonlardaki floresans kuantum verimleri	66
Tablo 4.9. HSA'nın 2,2 molekülünün farklı konsantrasyonlardaki floresans kuantum verimleri	66
Tablo 4.10. Hesaplanan floresans enerji transferi parametreleri (HSA)	67
Tablo 4.11. HSA ile 2,2 ve 4,2 etken maddeleri için farklı sıcaklıklarda hesaplanan değerler.....	70
Tablo 4.12. 2,2 ve 4,2 etken maddeleri için hesaplanan termodinamik parametreler....	71
Tablo 4.13. 4,2 ve 2,2 molekülünün farklı ortamlardaki floresans yaşam ömrü değerleri	74

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

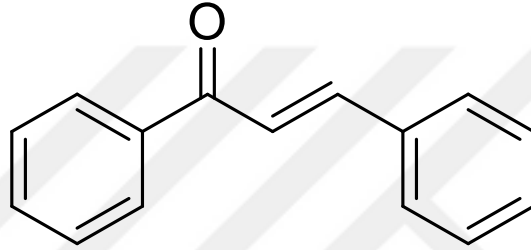
η	<i>Kırılma İndisi</i>
τ	<i>Floresans Ömür</i>
$\langle \tau \rangle$	<i>Floresans Ömür Ortalaması</i>
ϕ	<i>Floresans Kuantum Verimi</i>
A	<i>Absorbans</i>
B	<i>Floresans Ömür Değer Yüzdesi</i>
C	<i>Konsantrasyon</i>
D	<i>Düzeltilmiş Floresans Spektrumu Altında Kalan Alan</i>
E	<i>Enerji Transfer Verimliliği</i>
F, I	<i>Floresans Şiddeti</i>
J	<i>Donor-Akseptör Örtüşme Alan İntegrali</i>
κ	<i>Donor-Akseptör Geçiş Dipollerinin Göreceli Yönlendirme Faktörü</i>
K_{SV}	<i>Stern-Volmer Hız Sabiti</i>
k_T	<i>Enerji Transfer Hızı</i>
k_q	<i>Bimoleküler Kuençleşme Sabiti</i>
N	<i>Avagadro Sayısı</i>
OD	<i>Optik Yoğunluk</i>
r	<i>Donör-Akseptör Arasındaki Uzaklık</i>
R_0	<i>Förster Mesafesi</i>
χ^2	<i>Ölçüm Doğruluğu</i>
ν	<i>Frekans</i>

Kısaltmalar

<i>2,2</i>	<i>2-(5-(pyridin-2-yl)-4,5-dihidro-1H-pyrazol-3-yl) phenol</i>
<i>4,2</i>	<i>4-(5-(pyridin-2-yl)-4,5-dihidro-1H-pyrazol-3-yl) phenol</i>
<i>AcO</i>	<i>Akridin Oranj</i>
<i>AHDMAPPC</i>	<i>2-amino-6-hidroksi-4-(4-N, N-dimetilaminofenil)-pirimidin-5-karbonitril</i>
<i>AQ</i>	<i>Amodiakin</i>
<i>BSA</i>	<i>Siğır Serum Albumini</i>
<i>CMC</i>	<i>Kritik Misel Konsantrasyonu</i>
<i>DMB</i>	<i>2,5 dimetoksibenzaldehid</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimetil Sülfoksit</i>
<i>Fl</i>	<i>Floresin</i>
<i>FRET</i>	<i>Floresans Rezonans Enerji Transferi</i>
<i>HCPT</i>	<i>10-hidroksi kamptotesin</i>
<i>HSA</i>	<i>İnsan Serum Albumin</i>
<i>HT-29</i>	<i>Kolon Kanser Hücre Hattı</i>
<i>Lys</i>	<i>Lisin</i>
<i>MCF-7</i>	<i>Meme Kanser Hücre Hattı</i>
<i>MCR-ALS</i>	<i>Çok Değişkenli Eğri Çözünürlüğü-Alternatif En Küçük Kareler Analizi</i>
<i>PARAFAC</i>	<i>Paralel Faktör Analizi</i>
<i>PBS</i>	<i>Fosfat Tampon Çözeltilisi</i>
<i>PLS</i>	<i>Primer Lateral Skleroz</i>
<i>PMT</i>	<i>Foton Çoğaltıcı Tüp</i>
<i>PyY</i>	<i>Pyronin Y</i>
<i>PYZ</i>	<i>3-pirazolil-2-pirazolin</i>
<i>RhB</i>	<i>Rhodamin B</i>
<i>SDS</i>	<i>Sodyum Dodesil Sülfat</i>
<i>SfT</i>	<i>Safranin T</i>
<i>Trp</i>	<i>Triptofan</i>
<i>FFA</i>	<i>Fundus Floresin Anjiyografi</i>
<i>TX-100</i>	<i>Triton X-100</i>

1. GİRİŞ

Kalkonlar, flavonoid ailesine üye, α , β doymamış ketonlar olarak bilinirler ve kimyasal olarak üç karbonlu bir α , β doymamış karbonil yapıyla birbirine bağlanmış olan iki aromatik halkadan (1,3-diaril-2-propen-1-on iskeleti) meydana gelirler. Doğal ya da sentetik bileşikler olup geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptirler. Son zamanlarda kalkonların farmakolojik aktivitelerinden dolayı ciddi öneme sahip oldukları anlaşılmıştır (Asiri, vd. 2017). Dolayısıyla tıbbi ve farmakolojik uygulamalarda önemleri giderek artmaktadır (Ramkumar ve Kanan, 2015).



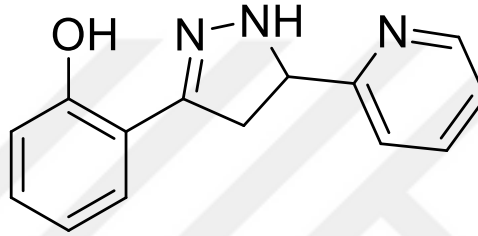
Şekil 1.1. Kalkonların genel yapısı

Kalkonlar yapılarında π bağıyla konjuge iki aromatik halka içerirler ve sahip olduğu bu uzun π bağı konjuge sisteminin varlığı onları kromoforlara çevirir. Bu özellikleri ile ilişkili olarak belli renklere sahip olurlar ve görünür bölge ışığını absorplayabilirler. Kalkonlar; pirimidin, pirazolinler, flavonlar, kinolinler gibi çoğu biyolojik aktif heterosiklik bileşiğin sentezi için de uygundur.

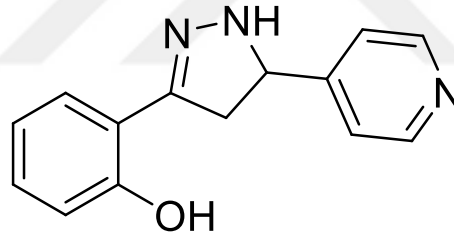
Azalkalkonlardan sentezlenen pirazolinler heterosiklik halkada iki azot atomu içeren, 300-400 nm aralığındaki ışığı absorplayabilen hem katı halde hem de çözeltide güçlü floresans özellik gösteren moleküllerdir. Parlak mavi renkleri ile bilinirler ve floresans prob olarak kullanılırlar (Geeta, vd. 2011). Yüksek floresans karakterlerinden dolayı da elektrolüminesans, elektro fotoğrafıma tekniklerinde kemosensör olarak kullanılırlar (Ramkumar ve Kanan, 2015). Birçok pirazolin bileşiği antimikrobiyal, antifungal, antidepresan, antikonvulsant, antibakteriyel, antihelminitik, antiülser, antiviral, antiprotozoal, antikanser olarak biyolojik aktiviteye sahiptir (Perdana, vd. 2015; Kahrman, vd. 2013). Ayrıca son yıllarda anestezi, analjezik, antiinflamatuar ve antidiyabetik farmasotik amaçlı sentezleri giderek artmaktadır (Sarkar ve Bhattacharya, 2012).

Pirazolin türevi bileşikler yüksek kuantum verimleri ve uzun floresans ömürleri ile önemli organik floresans molekülleridir. Literatür incelendiğinde pirazolin türevi bileşiklerin absorpsiyon ve floresans spektrumları alınarak farklı özelliklerinin belirlendiği görülmüştür. Moleküle bağlanan grupların değiştirilmesinin floresans özelliklerini nasıl etkilediği de yapılan çalışmaların konusu olmaktadır (Vikash, vd. 2017).

Bu çalışmada pirazolin türevi iki izomer molekül kullanılacaktır ve bu moleküller Şekil 1.2, Şekil 1.3' de verilmiştir.



Şekil 1.2. 2-(5-(pyridin-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl) phenol (2,2)

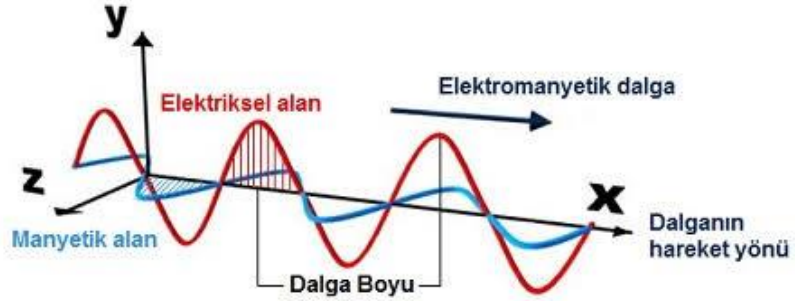


Şekil 1.3. 4-(5-(pyridin-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl) phenol (4,2)

Moleküler sistemlerin davranışlarını incelemek için günümüzde çoğunlukla spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır. Spektroskopi elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşimini fotokimyasal ve fiziksel prosesler ile inceleyen bilim dalıdır. Bir diğer spektroskopi tanımı ise örnekteki molekül, atom veya iyonların belli bir enerji seviyesinden diğer bir enerji seviyesine geçişleri esnasında meydana gelen absorplanma veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve değerlendirilmesine dayanan bilim dalı şeklindedir (Skoog, vd. 2017). Kısacası spektroskopi madde ile ışığın etkileşimidir.

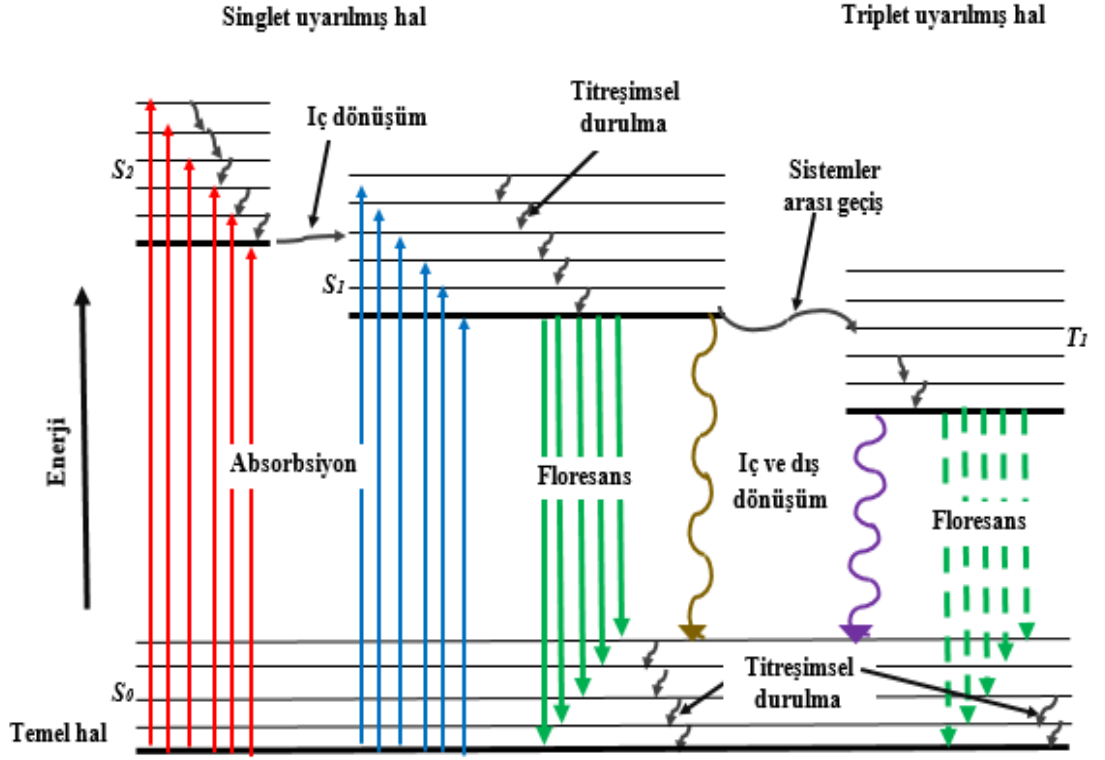
Elektromanyetik radyasyon yani ışık; foton adı verilen bir enerji paketi taşıyan, birbirleri ile aynı fazda birbirine dik, bir elektrik ve bir manyetik alandan oluşan sinüzoidal olarak

yayılan bir dalgadır. Şekil 1.4’ de elektromanyetik radyasyon temsili olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Elektromanyetik Radyasyonun temsili gösterimi

Bu çalışmada hidrazinlenmiş kalkon türevi bu iki izomer bileşiğin spektroskopik özellikleri absorpsiyon ve floresans spektroskopisi teknikleri kullanılarak incelenecektir. Absorpsiyon ve floresans spektroskopisinin temel prensibi Jablonski Diyagramına dayanmaktadır. Jablonski Diyagramı; elektromanyetik radyasyonun absorpsiyonu sonucu bir üst enerji seviyesine geçmiş olan molekülün, kararlı hali olan temel hale geçiş yapabilmesi için mümkün olan ihtimalleri ifade etmektedir. Jablonski Diyagramı Şekil 1.5’ de gösterilmiştir;



Şekil 1.5. Jablonski diyagramı

Jablonski Diyagramı $E = h\nu$ kadar enerji (foton) ile molekülün uyarılmasından sonra gerçekleşebilecek ihtimalleri gösterir ve bir foton absorpsiyonu ile başlar.

Absorpsiyon: Singlet temel halden singlet uyarılmış hale olan bir elektronik geçiş olarak adlandırılır. Bu geçiş spin bakımından müsaadeli bir geçiş olup hiçbir fotofiziksel ve fotokimyasal prensibin ihlal edilmesi söz konusu değildir. Bu basamak genel olarak;



denklemleriyle ifade edilebilir. Burada belirtilen S_0 singlet temel hali, S_1 birinci singlet uyarılmış hali ve $h\nu$ ise uyarma enerjisini temsil etmektedir. Deneysel olarak da $\epsilon_0 (S_0 \rightarrow S_1)$ şeklinde ifade edilebilir. Burada ifade edilen ϵ molar absorpsiyon katsayısı olup, elektronik geçişin şiddeti ile ilgili bilgi veren fotofiziksel bir parametredir. Singlet-singlet absorpsiyonu olan bu olay, oldukça hızlı gerçekleşen bir süreçtir ve yaklaşık 10^{-15} saniyede gerçekleştiği bilinmektedir.

Absorbsiyonun gerçekleşmesinin ardından temel hale geçiş için mümkün olan iki fotofiziksel durum vardır. Bunlardan bir tanesi ışımsız geçişlerdir. Sistem aldığı enerjiyi çevresine ısı enerjisi olarak verir. Bir diğeri de floresans ve fosforesans olarak adlandırılan ışımalı geçişlerdir. Floresans; singlet uyarılmış halden singlet temel hale olan elektronik geçişleri temsil ederken, fosforesans; triplet uyarılmış halden singlet temel hale olan elektronik geçişleri temsil etmektedir. Singlet ve triplet uyarılmış haller elektron spinini bakımından birbirinden farklıdır. Singlet uyarılmış halde bulunan elektronun spinini, singlet temel hale göre aynı yöndeysen, triplet uyarılmış haldeki elektronun spinini ise singlet temel haldeki ile ters yönlüdür.

Floresans: Singlet uyarılmış halde bulunan bir sistemin, enerjisini ışıma yaparak kaybetmesi sonucunda singlet temel hale geçmesi olayıdır. Floresans basamağı;



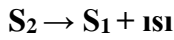
şeklindeki bir denklemle ifade edilebilir. Burada belirtilen $h\nu'$ sistem singlet temel hale dönerken dışarıya ışıma olarak verdiği enerjiyi ifade etmekte olup bu enerjinin büyüklüğü aynı sistemi uyararak için kullanılan uyarılma enerjisinden küçüktür. Bu durum $h\nu' < h\nu$ şeklinde ifade edilebilmektedir. Ancak bu iki enerjinin birbirine eşit olduğu durumlar söz konusu olabilmektedir. Böyle bir sistem için $h\nu' = h\nu$ olur ise sistem aldığı enerjiyi hiçbir kayıp olmaksızın geri ışıma yaparak verebilmektedir. Bu duruma da **Rezonans Floresans** adı verilir. Floresans olayı absorpsiyon olayına göre daha yavaş sürelerde gerçekleşmekte olup yaklaşık 10^{-10} - 10^{-7} saniyelik bir zaman aralığında sonuçlanır.

Fosforesans: Sistem triplet uyarılmış halden singlet temel hale olan ışımalı bir geçiş yapar. Bu geçiş esnasında elektronun spininde bir değişiklik olmaktadır. Bu olay fotofiziksel olarak yasaklı bir geçiştir. Triplet-singlet emisyon basamağı olarak da ifade edilebilen bu olay da;



şeklindeki denklemlerle gösterilir. Floresans enerji bakımından fosforesanstan daha büyük enerjili olduğundan $h\nu'' < h\nu' < h\nu$ şeklinde sıralanarak gösterilebilir. Uyarılmış triplet enerji seviyeleri genel olarak singlet uyarılmış haller üzerinden oluşmakta olduğundan zaman bakımından fosforesans, floresanstan daha uzun süreli gerçekleşir. Zaman olarak yaklaşık 10^{-6} -1 saniye aralığında gerçekleşir.

İç dönüşüm: Genellikle uyarılmış elektronik enerji seviyelerinin ($S_2 \rightarrow S_1$) titreşim enerji seviyeleri arasında gerçekleşen bir durum olup denklemlerle;



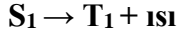
şeklinde gösterilir. Genelde bu olay aynı elektronik haller arasındaki ışımasız bir enerji kaybı olarak da tanımlanabilir. İç dönüşüm olayı; relaksasyon basamağı olarak da tanımlanabilir. Bu olay zaman bakımından 10^{-11} - 10^{-9} saniyelik bir zaman aralığında gerçekleşmektedir. Eğer elektronun transfer olacağı elektronik enerji seviyeleri birbirine yakın veya bu enerji seviyelerinin titreşim enerji seviyeleri çakışıyorsa iç dönüşüm olayı gerçekleşir. Bazı durumlarda ise sistem singlet uyarılmış halden (S_1) singlet temel hale (S_0) ışımasız geçebilmekte olup, elektronik haller arasındaki geçiş de iç dönüşüm olarak adlandırılabilir. Bu durumun denklemi ise,



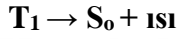
şeklinde ifade edilir. Sistem uyarılmış halden temel hale geçişi esnasında sahip olduğu enerjini moleküler çarpışmalarla ısı enerjisi olarak kaybeder. Bu şekilde gerçekleşen bir ısı transferi, sistemin sıcaklık artışına büyük oranda etki etmeyip sadece moleküllerin kinetik enerjilerinde bir artışa sebep olur.

Sistemler arası geçiş: Sistemler arası geçiş ışımasız olarak gerçekleşen ve normalde spin bakımından yasaklanmış bir geçiş türüdür. Bunun nedeni ise sistem singlet uyarılmış halden (S_1) triplet uyarılmış hale (T_1) geçiş yaparken elektronun spini değişmektedir. Moleküler yapı bu olayın gerçekleşmesi için büyük bir etkiye sahiptir. Moleküler yapıda bulunan ağır metaller triplet hale geçişi fazlasıyla kolaylaştırmaktadır. Özellikle

inorganik bileşikler genel olarak yapılarında ağır metalleri kompleks halinde bulundurduğundan triplet uyarılmış halin oluşmasına sebep olabilmektedir. Bu olayın denklemlerle gösterilişi ise;

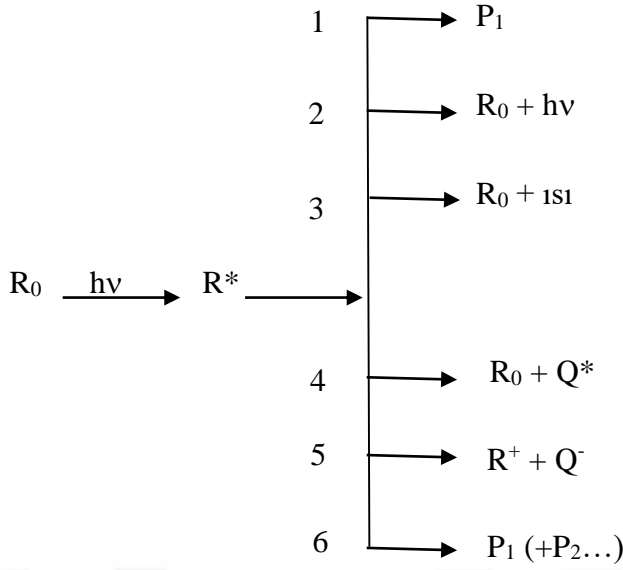


şeklindedir. Bir diğer sistemler arası geçiş olayı ise triplet uyarılmış halden (T_1) singlet temel hale (S_0) olan geçişlerdir. Bu prosesin denklemi de;



şeklinde ifade edilmektedir. Bu durumun gerçekleşme olasılığı diğer $S_1 \rightarrow T_1$ geçiş basamağına kıyasla çok daha düşüktür. Bundan dolayı ise sistem genellikle ışımalı elektronik geçiş olan fosforesansı tercih edebilmektedir. Zaman bakımından ise sistemler arası geçiş 10^{-10} - 10^{-8} saniye gibi bir aralıkta gerçekleşmektedir (Lakowicz, 1991).

Jablonski diyagramında elektromanyetik radyasyon etkisi sonucu oluşabilecek fotofiziksel deaktivasyon prosesleri üzerinde durulmuştur. Bu tür sistemlerde elektromanyetik radyasyon fotofiziksel proseslerin yanısıra fotokimyasal proseslere de sebep olmaktadır. Temel halde bulunan R_0 molekülü $h\nu$ enerjisiyle uyarıldığında uyarılmış R^* hali oluşmaktadır. Bu R^* molekülünün R_0 haline dönmesi için monomoleküler ve bimoleküler deaktivasyon prosesleri meydana gelebilir. Monomoleküler deaktivasyon ortamında tek tür molekül varken, bimoleküler deaktivasyon prosesinde ise ilgilenilen türün dışında farklı bir molekül de bulunmaktadır. Bu durum Şekil 1.6' da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Monomoleküler ve bimoleküler deaktivasyon prosesleri

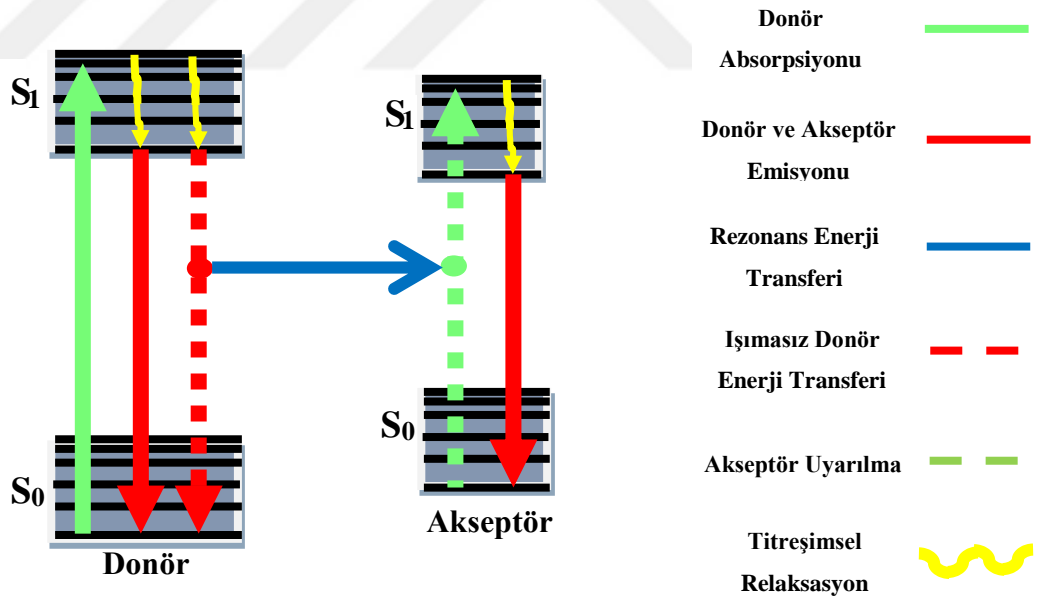
Bu deaktivasyon proseslerinden; 1, 2 ve 3 numara ile belirtilen prosesler monomoleküler olarak gerçekleşmektedir. (1) Uyarılmış halde bulunan (R^*) bir molekül doğrudan P_1 gibi bir ürüne dönüşebilir. (2) Daha önce de bahsetmiş olduğumuz, uyarılmış halde bulunan molekül ışımaya yaparak temel hale dönmesi gibi bir yol takip edebilir veya (3) sahip olduğu enerjisini ısı şeklinde dışarıya vererek radyasyonsuz bir geçişle temel hale dönebilir. Bu basamaklardan hangisinin daha etkili olduğunu anlamak için her bir basamağın hız sabitlerinin bilinmesi gerekir.

Bimoleküler etkileşmeler durumunda; (6) R^* halindeki molekül herhangi bir Q molekülünün varlığında fotokimyasal bir reaksiyonla ürüne veya ürünlere dönüşebilir. (5) nolu basamakta ise iki farklı tür arasında bir elektron transferi prosesiyle R^+ ve Q^- hallerini oluşturarak buradan bir ürüne ya da başlangıçtaki haline dönebilir.

Bimoleküler etkileşmeler durumunda diğer bir yol (4) nolu basamakta verilmiştir. Burada R^* molekülü, Q molekülü ile etkileştiğinde kendi uyarılma enerjisini Q 'ya transfer ederek Q^* oluşmasına sebep olurken, kendisi temel R_0 haline döner. Bu şekilde uyarılma enerjisinin bir başka moleküle transfer ederek ışımaz bir şekilde temel hale geçme olayına (R^* için) kuençleşme veya sensitizasyon denir. Bu Q^* 'ın oluşturulması olayına enerji transfer prosesi denilmektedir. Kuençleşme olayı bimoleküler bir proses olduğundan uyarılmış haldeki R^* molekülüyle Q molekülünün birbiriyle etkileşimi önemlidir. R^* molekülü ile Q molekülü arasında çarpışmalar olabileceği gibi bu iki

molekülün teması sonucu kompleks de oluşabilir. Kuençleşme işlemi çarpışma (dinamik) ve statik kuençleşme olarak iki ana sınıfa ayrılabilir. Dinamik kuençleşmede uyarılmış durumdaki bir florofor başka bir türle çarpıştığında yani enerji transferi, elektron transferi veya sistemler arası geçişe maruz kaldığında meydana gelir ve sonucunda florofor molekülü deaktive olmuş olur. Statik kuençleşme ise, temel haldeki florofor bir söndürücü ile geri dönüşümlü bir kompleks oluşturduğunda meydana gelir, bu nedenle işlem moleküler çarpışmaya dayanmaz ve floresans özelliği taşımayan bir kompleks oluşabilir (Lakowicz, 1991; Korkmaz, 2019).

Förster' e göre floresans enerji transferi, uyarılmış halde bulunan donör molekülden akseptör molekülüne uyarılma enerjisinin transferi şeklinde tanımlanır. Donör-akseptör moleküllerin geometrik ve spektroskopik özelliklerine dayanarak dipol-dipol etkileşiminin sonucunda floresans enerji transferinin gerçekleştiği ilk olarak Förster tarafından öne sürülmüştür (Förster, 1959). Förster'in belirttiği etkileşim Şekil 1.7' de temsili olarak gösterilmiştir.

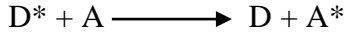


Şekil 1.7. Bir enerji transfer prosesinin temsili gösterimi

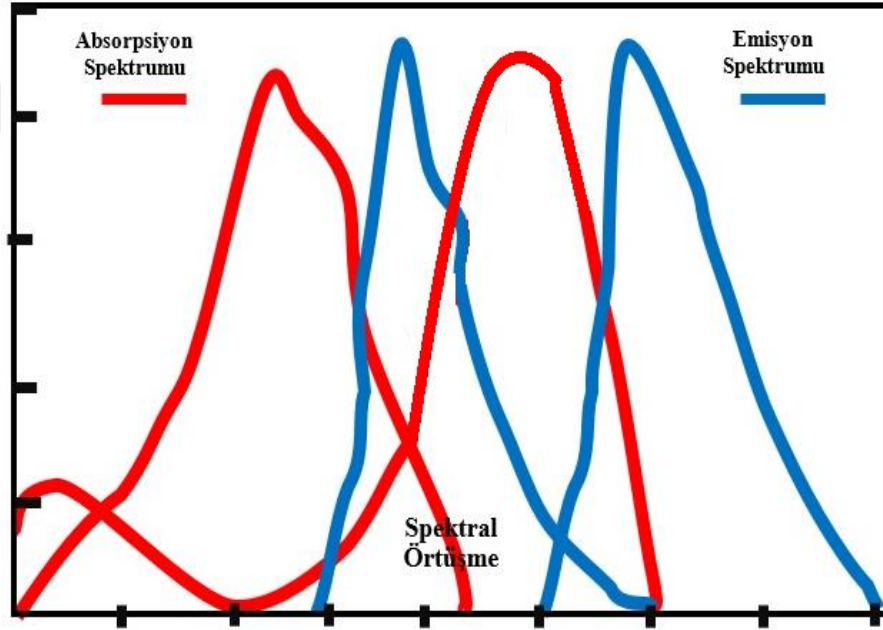
Şekil 1.7' de gösterildiği gibi, moleküler sistemlerde enerji transferi donör (D)-akseptör (A) molekülleri arasındaki dipol-dipol etkileşimi sonucunda meydana gelir. Bu etkileşimin ve dolayısıyla enerji transfer olayının gerçekleşebilmesi için donör-akseptör

arası mesafe oldukça önemlidir. Etkin bir enerji transferi için bu mesafenin 10 nm den daha küçük olması gerekmektedir. Özellikle biyolojik sistemlerde bu mesafe oldukça önemlidir çünkü protienlerin katlanmaları konformasyonlarının değişimleri, ayrıca ilaç bağlanma bölgeleri ile ilgili bilgi sağlar (Ariga, vd. 2017).

Elektromanyetik radyasyon absorpsiyonu sonucu uyarılmış donör molekülü (D^*) ve akseptör molekülü (A) arasında enerji transferi;



şeklinde gösterilen temsili bir mekanizma ile ifade edilebilir. Enerji transferinin olabilirliğine spektroskopik olarak Şekil 1.8’ de gösterildiği gibi, donörün emisyon spektrumu ile akseptör molekülünün absorpsiyon spektrumlarının kısmi örtüşmesine bakılarak karar verilebilir. Spektrumlardaki örtüşme ne kadar iyi ise enerji transferinin gerçekleşme olasılığı o kadar artmaktadır.



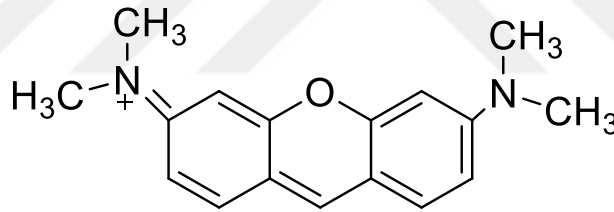
Şekil 1.8. Donör molekülünün emisyon spektrumu ile akseptör molekülünün absorpsiyon spektrumunun temsili spektral örtüşmesi

Son yıllarda artarak devam eden enerji transfer olaylarını inceleme çalışmaları farklı amaçlı enerji dönüştürme proseslerinde, dye laserlerde belli dalga boyunda en iyi cevabı verecek dye karışımların belirlenmesinde ve özellikle biyokimya alanında hız kazanmıştır

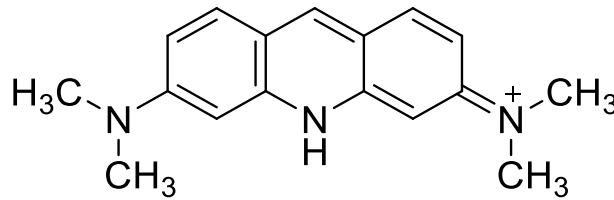
(Steinberg, vd. 1976). Biyokimyada enerji transferi; proteinlerin yarıçapları, biyolojik membran kalınlığı, proteinlerdeki kromoforik gruplar arasındaki mesafe, çözeltideki makro moleküllerin statik ve dinamik yapısal özelliklerinin belirlenmesi gibi farklı amaçlar için kullanılabilir (Kalyanasundaran, 1987; Sanchez ve Ruiz, 1996).

Pirazolin türevi moleküller farmasotik önemi olan floresan bileşikler olduklarından özellikle floresans rezonans enerji transfer (FRET) çalışmaları ile protein etkileşimleri incelenmektedir. Buradaki temel amaç farmasotik olarak yeni biyolojik uygulama alanlarını bulabilmektir. Pirazolin türevi bu biyoaktif floresan moleküller canlı sistemlerdeki fizyolojik aktivitelerin habercisi olarak görev alabilirler (Sarkar ve Bhattacharya, 2012).

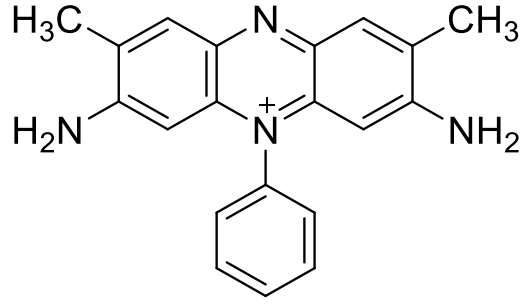
Bu çalışmada iki pirazolin izomer molekülünün [(2,2 ve (4,2)] farklı boyar maddeler ile arasındaki enerji transferi çalışılmıştır. Boyar madde olarak Pyronin Y (PyY), Akridin Oranj (AcO), Safranin T (SfT) ve Floresin (Fl) kullanılmıştır. Kullanılacak olan boyar maddelerin kimyasal yapıları aşağıda gösterilmiştir;



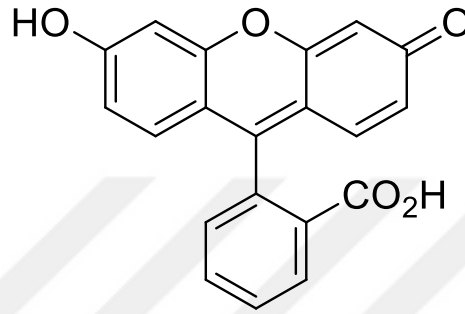
Şekil 1.9. Pyronin Y (PyY) molekülünün kimyasal yapısı



Şekil 1.10. Akridin Oranj (AcO) molekülünün kimyasal yapısı



Şekil 1.11. Safranin T (SfT) molekülünün kimyasal yapısı



Şekil 1.12. Floresin (Fl) molekülünün kimyasal yapısı

PyY, Fl, AcO ve SfT özellikle biyolojik sistemlerde sıklıkla kullanılan bileşiklerdir. Yüksek floresans etkinliğine sahip olan bu bileşikler ile biyolojik sistemlerin davranışlarının incelenmesi spektroskopik yöntemler kullanılarak takip edilebilmektedir. Örneğin; PyY dye lazer sistemlerinde ve uranyum zenginleştirme proseslerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Dare-Doyen, vd. 2003). Bunlara ek olarak AIDS, kanser, akıl hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde kullanılan askorbik asidin miktar tayini, yüksek hassasiyetle PyY varlığında spektroskopik olarak tayin edilebilmektedir (Feng, vd. 2005). SfT molekülü fotoredoks özelliğinden ötürü güneş enerjisi dönüşümünde ve fotopolimerizasyonda önemli iken, AcO canlı hücrelerde mitokondriyal prob olarak kullanılmaktadır (Ganguly, vd. 2010). Fl molekülü ise retina ve koroidin anatomisi, patolojisi ve patofizyolojisine katkıda bulunan, retina damarlarının kolay görüntülenmesini sağlayan, etkili bir tanı yöntemi olan Fundus Floresin Anjiyografi (FFA) yönteminin ana molekülüdür.

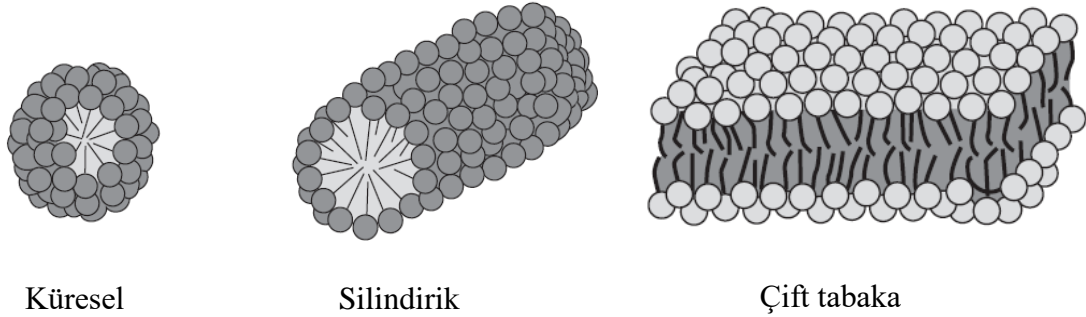
Kullanılacak olan bu boyar maddelerin fotofiziksel özellikleri bulunduğu ortamlara göre değişiklik gösterebilmektedir. Bu bileşiklerin misel ortamlar gibi çeşitli çözücü

ortamlarındaki moleküler davranışları spektroskopik teknikler kullanılarak incelenmektedir (Ganguly, 2010; Maiti, 2015; Mallick, 2004; Moumita, 2011).

Misel ortamlar, yüzey aktif maddeler olarak bilinen surfaktantların belirli bir konsantrasyonun üzerinde biraraya gelerek düzenli yapılar oluşturmasıyla meydana gelir. Surfaktantlar, gerilip uzanabilen, hidrofobik (polarize) ve hidrofilik (hem polar/iyonik hemde polarize) kısımlara sahiptirler. Hidrofobik olan kısım bir ya da daha fazla uzun, esnek, hidrokarbon veya florokarbon zincirlerinden oluşmaktadır. Hidrofilik kısım ise çok daha küçük polar veya iyonik baş gruplardan meydana gelmektedir. Surfaktantlar genel olarak baş grubun yüküne göre polar, kationik ya da anyonik ve zwitter iyonik (pozitif ve negatif yükü birlikte bulunduran) olarak belli gruplara ayrılırlar (Liveri, vd. 2006).

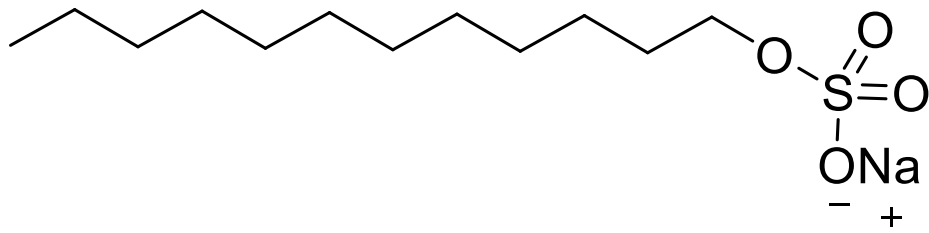
Çözelti ortamında belirli bir konsantrasyonun üzerinde surfaktantlar alışılmışın dışında bazı fiziksel özellikler gösterirler. Surfaktantların fiziksel özelliklerinde değişimlerin meydana geldiği konsantrasyona, “kritik misel konsantrasyonu” (CMC) denir. Surfaktantların fiziksel özelliklerindeki bu değişimin sebebi hidrofobik kısımların içe, hidrofilik kısımların sulu ortamla temasta olacak şekilde yönlenmesiyle, 10-100 adet surfaktant molekülünden oluşan “misel” olarak adlandırılan agregatların meydana gelmesidir (Aydın, 2009). Kritik misel konsantrasyonu entropi artışıyla ilgilidir (Liveri, 2006). Surfaktantlardan misellerin oluşturulabilmesi için minimum bir sıcaklığa ihtiyaç vardır. Kraff sıcaklığı olarak bilinen bu değer önemli olup, bir surfaktant sistemde misel oluşturulacaksa çözeltinin sıcaklığı bu değerden yüksek olmalıdır. Misel popülasyonu genellikle polidispers halde yani birbirinden farklı tanecik büyüklüğüne sahip yapıda olmakla birlikte, misellerin şekilleri de derişim ile değişebilmektedir (Şekil 1.13). Miseller genellikle küreseldir. Bunun yanı sıra elips, silindir veya çift tabaka (bilayer) şeklinde de olabilmektedir (Onganer, 1993). Kritik misel konsantrasyonun (CMC) üzerine çıkıldıkça misel yassılaşımaktadır. CMC’nun çok üzerine çıkıldığında miseller iki molekül kalınlığında olan lamelli miseller adıyla da bilinen uzamış paralel levhalar şeklindedirler. Sulu çözeltilerde moleküller tek tek hidrofilik kısım dışı, apolar ortamlarda ise iç kısma bakacak şekilde bu levhalara dik olarak yerleşmektedirler. Bu tür miseller biyolojik hücre zarı yapısına büyük benzerlik göstermektedir. Bu özelliklerinden

dolayı boyar madde ile etkileşime giren surfaktant sistemleri; biyolojik yapıları incelemek için kullanılan bir model oluştururlar (Atkins, 1998).



Şekil 1.13. Oluşabilecek misel şekilleri

Miseller model membran sistemler olarak bilinmektedir. Misel sistemlerdeki etkileşimler incelenerek biyolojik sistemlerde çeşitli protein veya membranların etiketlenmesi yani işaretlenmesini gerçekleştirebilecek sistemlerin belirlenmesi mümkündür. Bu nedenle membran yapısına uygun misel sistemler seçilerek moleküllerin misel ortamdaki fotofiziksel davranışlarının incelenmesi önem arz etmektedir. Bu çalışmada misel sistem olarak negatif yüke sahip olan Sodyum dodesil sülfat (SDS) surfaktantı seçilmiştir. SDS surfaktantının yapısı Şekil 1.14' de verilmiştir.



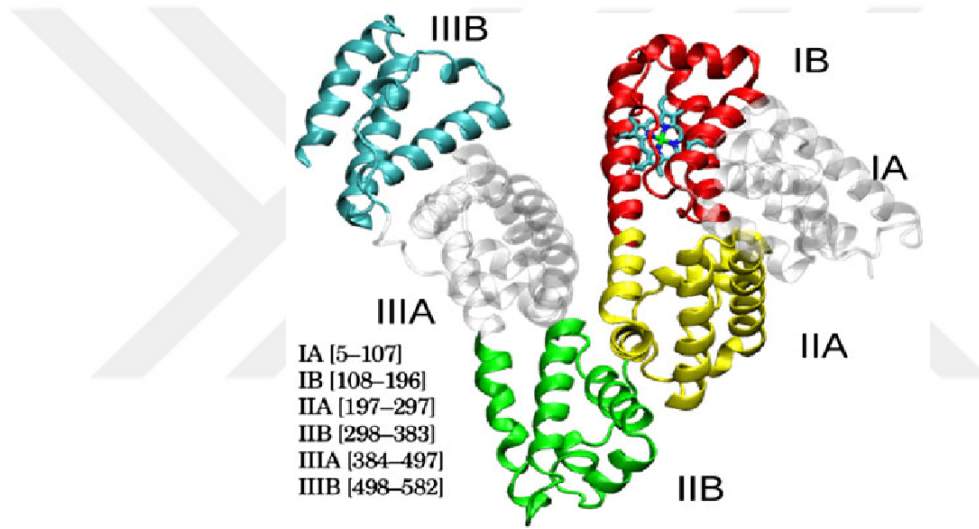
Şekil 1.14. Sodyum Dodesil Sülfat surfaktantının (SDS) kimyasal yapısı

Bu çalışmada pirazolin türevi olan 2,2 ve 4,2 izomerinin PyY, SfT, AcO ve Fl boyar bileşikleriyle aralarındaki enerji transferi, anyonik bir surfaktant olan, Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) misel ortamında UV-Görünür bölge absorpsiyon, durgun hal floresans spektroskopisi teknikleri kullanılarak aydınlatılacaktır. SDS surfaktantı için kritik misel

konsantrasyonunun (8,1 mM) üzerinde bir konsantrasyon olan 8,5 mM uygun konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

Çalışılacak bir diğer ortam ise albümin olarak da bilinen serum albüminidir. Albumin insan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasında en yaygın olarak bulunan proteindir. Kan içerisinde bulunan proteinlerin %60'ını oluşturmaktadır. Ayrıca doku sıvılarında, kas ve deride, az miktarda da gözyaşı, ter, mide suları ve safrada bulunmaktadır.

HSA' nın temsili yapısı Şekil 1.15' de gösterilmiştir;



Şekil 1.15. İnsan Serum Albumininin (HSA) temsili yapısı

HSA, α -sarmal alanda 585 amino asit dizisinden oluşan üç homologlu (I, II, III) küresel bir proteindir. HSA aminoasit dizisi altı alt alandan oluşur (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB) ve bu alt alanların dördü düzenlenmesiyle şekil alır. Heliks yapının amino ve karboksi bağlantı uçlarının birleşmesiyle elektron yoğunluğunda değişim meydana gelir. Molekülün amino ucundan karboksil terminaline kadar genişliği 82 Å'dur ve molekülün derinliği yaklaşık 30 Å'dur. Kuyruk (IIB, IIIA, IIIB) ve baş (IA, IB, IIA) kısımlar birbirine bağlanarak dördü düzenleme sağlanır. I, II ve III alanları, aminoasit dizisi içindeki dizilim ile tutarlı şekilde üst üste katlanabilir. HSA'nın genel konfigürasyonunda alt alanlar, genetik olarak bir kalp şekli alırlar. Ana ligand bağlama bölgeleri, ilaç bağlanmaları IIA alt alanları içinde tanımlanır. HSA'nın II-A alt alanında, zincir boyunca

214 konumunda sadece bir triptofan (Trp) bulunur. İlaç bağlanma bölgesi IIA'daki Trp'dir (Ariga, vd. 2017).

İnsan serum albümini (HSA), sağlıklı bir yetişkinde 35 ila 55 g/L arasında değişen ve tüm serum proteinlerinin yaklaşık üçte ikisini oluşturan kan plazmasındaki en bol proteindir. Dolaşım sisteminde HSA, taşımacılık dahil olmak üzere endojen ve ekzojen ligandların (serbest yağ asitleri, tiroksin, metabolitler, vb) taşınması, kolloid ozmotik basıncın düzenlenmesi, serbest radikal toplanması gibi önemli fonksiyonlar sunar. Bu nedenle, gerçek biyolojik örneklerde HSA çalışmaları klinik tanı ve koruyucu ilaç için büyük önem kazanmıştır (Zijie, vd. 2018).

Dolaşım sisteminde HSA bolluğu ve çok çeşitli moleküller ile sıra dışı alıcı yetenekleri, HSA'yı yeni terapötik ajanların geliştirilmesinde, ilaçların farmakokinetik davranışının ve farmakodinamik modülasyonların prognozunda önemli bir araç haline getirmektedir. Test edilecek bir ilacın HSA proteini ile etkileşimini incelemek bilgilendiricidir çünkü protein-ilaç bağlanması farmakoloji ve farmakodinamikte önemli bir rol oynar. HSA'nın ilaçla etkileşimi hakkında ki bilgi, ilacın emilimini ve dağılımını daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir (Zhang, vd. 2008). Bu amaç için özellikle floresans spektroskopi tekniği sadeliği, yüksek duyarlılığı ve gerçek zamanlı yanıt özellikleri sayesinde uygun ve kullanılabilir bir tekniktir. HSA ile ilaç etken madde özelliği gösterebilecek farklı moleküller arasındaki etkileşimlerin floresans spektroskopi tekniği ile incelendiği çalışmalar son yıllarda popülerdir (Zijie, vd. 2018).

Bu çalışmada pirazolin türevi 2,2 ve 4,2 moleküllerinin HSA ile etkileşimleri floresans spektroskopi tekniğinden faydalanılarak incelenmiştir. Çalışmada HSA ile floresan prob olarak kullanılan iki pirazolin molekülü (HSA + 4,2 ve HSA + 2,2) arasındaki enerji transfer prosesi incelenmiştir. Bununla ilişkili olarak floresans kuençleşmesi değerlendirilmiştir. Bu çalışma oda sıcaklığında ve 25°C (298 K), 35°C (308 K), 45°C (318 K)' de gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık çalışması yapılarak fizyolojik koşullarda (36,5°C) ve protein denaturasyonunun meydana geldiği 45°C' deki etkileşimlerinin anlaşılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu enerji transferi çalışmasında üç farklı floresan molekülün, 2,5 dimetoksibenzaldehid (DMB), floresin (Fl) ve rhodamin B' nin (RhB) farklı surfaktant sistemleri ile etkileşimi, durgun hal floresans spektroskopisi tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Floroforların misel sistem içindeki spektral özelliklerine misel yapının etkilerini anlamak için moleküllerin ikili olarak birlikte çözündürme çalışmaları yapılmış ve enerji transfer süreçleri açısından değerlendirilmiştir. DMB-Fl ve Fl-RhB arasında FRET çalışmaları yapılmış ve misel sistemlerinde kullanılabilecek iki yeni FRET çifti oluşturulmuştur. Surfaktantın doğasının her iki çiftin FRET verimi üzerinde önemli bir etkisi olduğu bulunmuştur. Burada, Fl vasıtasıyla DMB'den RhB'ye eşzamanlı olarak üç aşamalı FRET gerçekleşeceği, aksi takdirde DMB ve RhB arasında spektral örtüşme olmaması nedeniyle FRET'in meydana gelmeyeceği incelenen tüm misel sistemlerde belirlenmiştir. Elde edilen bu üç bileşenli FRET sisteminin biyolojik sistemlerde geniş uygulamalara sahip olabileceği sonucuna varılmıştır (Afzal, vd. 2018).

Model mutagen olan Hiperisin ile Akridin Orange arasındaki etkileşimlerin ışık absorpsiyonu ve floresans spektroskopisi ile analiz edilmesi ile ilgili bu çalışma, Hiperisin'in Akridin Orange ile etkileşime girme kabiliyetini incelemek için yapılmıştır. Hiperisin ve Akridin Orange'ın bu birlikteliği, sulu DMSO çözeltisinde absorpsiyon ve floresans spektroskopisi yöntemleriyle araştırılmıştır. Veriler, Hiperisin'in Akridin Orange ile kompleksler oluşturduğunu ve birleşme sabitlerinin yüksek olduğunu ve bu sabitin DMSO konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermektedir. Hiperisin ve Akridin Orange komplekslerinin absorpsiyon spektrumları da incelenmiştir. Düz aromatik bileşiklerle etkileşime girme kabiliyeti sayesinde, Hiperisin'in potansiyel olarak bir mutagen önleyici molekül olarak kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır (Pietrzak, vd. 2016).

Bir başka çalışma ise, Amodiakin ve insan serum albümini arasındaki etkileşimin floresans spektroskopisi ve moleküler modelleme ile incelenmesi üzerinedir. Amodiakin'in (AQ) insan serum albümini (HSA) ile etkileşiminin floresans spektroskopisi ile incelenmesine, entalpi ve entropi değişimlerine dayanarak, ana etkileşen kuvvetler olarak hidrojen bağı ve Van der Waals kuvvetleri önerilmiştir. Ayrıca,

enerji transferinin verimliliği ve HSA ile AQ arasındaki mesafe hesaplanmıştır. Son olarak, AQ' nun HSA' ya bağlanması moleküler bağlanma ve moleküler dinamik simülasyon yöntemleri ile modellenmiştir. Deneysel ve teorik sonuçlar arasında mükemmel bir uyum olduğu bulunmuştur (Samari, vd. 2012).

Floresans rezonans enerji transferi (FRET) ve floresans kuençleşme yöntemi ile ligand ve proteinler arasındaki afinitenin belirlenmesini amaçlayan bir çalışma yapılmıştır. Eskulin ve serum albüminleri arasındaki etkileşimin, FRET ile elde edilen bağlanma sabitlerinin belirlenmesinde etkili olduğunu göstermek amaçlanmıştır. Eskulin-BSA ve eskulin-HSA için çift logaritma eğrisi ile elde edilen bağlanma sabitleri (K_a), sırasıyla 1.02×10^7 ve 2.07×10^4 L/mol olarak belirlenmiştir. Senkronize floresans spektrumlarından elde edilen bu sonuçlar HSA' nın Tirozin ve Triptofan kısımlarının BSA' nın kilerden daha fazla etkilendiğini göstermiştir. Eskulinin BSA ve HSA varlığında $S_0 \rightarrow S_1$ geçişini (maks. 340 nm) gerçekleştirdiğini ve her ikisinin maksimumlarının benzer olduğunu göstermiştir. Santrifüjlemeden sonra, albüminlere bağlı eskulin konsantrasyonları, eskulinin floresansı aracılığıyla belirlenmiş ve bununla ilişkili olarak eskulinin HSA'ya BSA'dan daha çok bağlı olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, eskulin ve HSA' nın bağlanma ilişkisinin eskulin ve BSA' ninkinden daha yüksek olacağı sonucuna varılmıştır. Bu örnek, FRET' in varlığında, floresans kuençleşmeye dayanan ligandlar ve proteinler arasındaki bağlanma sabitlerinin saptanabileceğini göstermiştir (Xiao, vd. 2009).

Bir diğer çalışma da Sefamandolün sığır serum albümini ile etkileşim özelliklerinin spektroskopik olarak incelenmesini içermektedir. Sefamandolün sığır serum albümini (BSA) ile etkileşimi, fizyolojik koşullar altında UV-Vis spektroskopik yöntemle kombine edilerek floresans kuençleşmesi incelenmiştir. BSA-sefamandol sistemi için floresans kuençleşme hız sabitleri ve bağlanma sabitleri farklı sıcaklıklarda belirlenmiştir. BSA' nın sefamandol ile floresan kuençleşmesi, statik kuençleşme ve enerji transferinden kaynaklanmaktadır. Dairesel dikroizm spektrumları, senkronize floresans ve üç boyutlu floresans çalışmaları, sefamandolün varlığının bağlanma işlemi sırasında BSA konformasyonunu değiştirebileceğini göstermiştir (Wang, vd. 2015).

Biyolojik olarak aktif pirimidin türevinin sığır serum albümini ile bağlanma etkileşimi üzerine spektroskopik analizlerinin yapılması da bir diğer çalışmadır. Biyolojik olarak

aktif bir antibakteriyel reaktif olan 2-amino-6-hidroksi-4-(4-N, N-dimetilaminofenil)-pirimidin-5-karbonitril (AHDMA PPC) sentezlenmiştir. Farklı spektroskopik yöntemler kullanılarak, sığır serum albümini (BSA) ile bağlanma etkileşimi detaylı olarak araştırılmıştır. Yaygın gıda zehirleyici bakterileri olan *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*' a karşı bu molekül antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Deneysel sonuçlar, AHDMA PPC tarafından model taşıyıcı protein BSA' nın floresans kuençleşmesinin statik olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, reaksiyonun endotermik olarak kendiliğinden gerçekleşen bir süreç olduğunu ve hidrofobik etkileşimlerin ilaç ve BSA arasındaki bağlanmada önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Tüm bu sonuçlar AHDMA PPC' nin BSA' ya bağlanabileceğini ve vücutta etkin bir şekilde taşınabileceğini ve elimine edilebileceğini göstermiştir (Suryawanshi, vd. 2016).

Protein ile ilacın bağlanma modu üzerine yapılan çalışmada ise ilacın farmakokinetiğini, toksisitesini, proteinin yapı ve işlevinin ilişkisini anlamının önemli olduğu vurgulanmıştır. Çalışmada, üre ve metal iyonlarının, sefarantin Lisin (Lys) ile etkileşimi üzerindeki etkileri, floresansları ve üç boyutlu (3D) floresans spektrumları ölçülerek karakterize edilmiştir. Sefarantin proteine bağlanma kabiliyetinin daha zayıf olduğundan emin olunmuştur. Buna ek olarak, birçok metal iyonun sefarantin Lys ile bağlanma sabiti üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışma fizyolojik olarak proteinin ilaçlarla etkileşimleri hakkında önemli bilgiler sağlayabilir. Ayrıca, proteinin çevresinin yapısal özellikleri üzerindeki etkisi hakkında bilgiler sağlayarak fizyolojik aktivitesiyle ilişkili olarak yapı bazlı ilaç tasarımına da yardımcı olacaktır (Yang, vd. 2015).

Harmalol ve insan serum albümin (HSA) arasındaki etkileşim, floresans spektroskopisi ve moleküler modelleme yöntemleri ile incelenen bir çalışma olarak belirtilmiştir. HSA' nın floresansı, statik kuençleşme mekanizmasına uygun olarak Harmalol tarafından söndürülmüştür. Bağlayıcı parametreler, kuençleşme sabitleri ve konformasyon değişiklikleri floresans kuençleşme ile belirlenmiştir. Farklı sıcaklıklarda hesaplanan bağlanma sabitlerinden termodinamik parametreler belirlenmiştir. Bununla ilişkili olarak bağlanmada Van der Waals kuvvetinin ve hidrojen bağının etkili olduğu belirtilmiştir. Harmalol' un HSA' ya bağlanması moleküler bağlanma ve moleküler dinamik simülasyon yöntemleri ile modellenmiştir. Moleküler dinamik simülasyon, HSA' nın harmalol ile

bağlandığında önemli bir konformasyonel değişime sahip olmadığını ortaya koymuştur (Hemmateenejad, vd. 2012).

Misel ortamda boyar maddeler ile gerçekleştirilen bu enerji transferi çalışmasında sulu sodyum dodesil sülfat, setil trimetil amonyum bromür ve Triton X-100 misel çözeltileri ve ayrıca deiyonize su içinde Floresin'den Merosiyanin 540' a floresans rezonans enerji transferi, durgun hal ve zamana bağlı floresans spektroskopisi teknikleri kullanılarak oda sıcaklığında araştırılmıştır. Stern-Volmer ve Förster diyagramları kullanılarak elde edilen floresans rezonans enerji transfer hız sabitlerinin (k_T) iyi bir uyum içinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, deiyonize su, sodyum dodesil sülfat, TX-100 ve setil trimetil amonyum bromür misel çözeltisi için enerji transfer verimliliği değerleri 0.14, 0.38, 0.77 ve 0.85 olarak floresans rezonans enerji transferinin gerçekleştiği en yüksek akseptör konsantrasyonunda elde edilmiştir. Durgun hal absorpsiyon, durgun hal ve zamana bağlı floresans spektral çalışmalarından ve ayrıca zamana bağlı floresans ömür ölçümlerinden elde edilen veriler, Floresin'den merosiyanin 540' a floresans rezonans enerji transferinin en etkili şekilde sulu setil trimetil amonyum bromür misel çözeltilerinde meydana geldiğini göstermiştir (Aydın, vd. 2009).

Pirazolin türevi bir molekülün enerji transferi ile ilgili olan bu çalışmada 3-pirazolil-2-pirazolin (PYZ) farmasötik olarak önemli, yeni bir floresan probu sentezlenmiş ve serum albüminleri ile floresan rezonans enerji transferi (FRET) etkileşimi için akseptör molekül olarak seçilmiştir. PYZ' nin serum albüminleri (BSA ve HSA) ile etkileşiminin doğasını açıklamak için durgun hal ve zamana bağlı floresans spektroskopisi teknikleri kullanılmıştır. BSA' da etkili bir FRET emisyonu gözlenirken HSA' da ise zayıf FRET emisyon meydana geldiği belirlenmiştir. PYZ' nin proteinlerle FRET seçiciliği hakkında daha fazla bilgi edinmek için, mevcut diğer gruplar BSA ve HSA tarafından PYZ'ye uygulanan sterik kısıtlamalar hakkında bir fikir edinmek amacıyla L triptofandan (donör; triptofan) PYZ' ye (akseptör) FRET yapılmıştır. Çalışmalar, BSA' daki yüzeye bağlı Trp-134' ün PYZ ile verimli bir FRET emisyonuna izin verdiğini, HSA'da gömülü Trp-214' ün ise izin vermediğini ortaya koymuştur. PYZ ve serum albüminleri arasındaki FRET için olağandışı seçicilik, içinde daha büyük fenil parçalarının varlığından dolayı PYZ'nin karmaşık yapısı ile de ilişkilendirilmiştir. Proteinlerdeki triptofanın (Trp) uyarılmış

halinin fotofiziğinin karmaşık yapısı, PYZ' nin BSA ve HSA ile olan FRET seçiciliğine de açıklık getirmiştir (Sarkar ve Bhattacharya, 2012).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılacak Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılacak olan boyar maddeler Floresin (Fl), Pyronin Y (PyY), Akridin Oranj (AcO), Safranin T (SfT), surfaktant olarak kullanılacak olan Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), İnsan Serum Albumini (HSA) ve referans bileşik olan Kinin Sülfat Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.2. Kullanılacak Alet ve Cihazlar

Deneysel çalışmalar esnasında kullanılan aletler ve cihazlar aşağıda verilmiştir.

Spektroflorofotometre	: Shimadzu RF-5301 PC Spektroflorometre
Uv/Vis Spektrofotometre	: PG T80+ UV/Vis Spektrofotometre
Konfokal Mikroskop	: Zeiss Konfokal Mikroskop
Floresans Lifetime	: Horiba J. Yvon SPEX Fluorolog 3-2iHR
Saf su cihazı	: Human Zeener Power II
Otomatik pipetler	: LLG
Ultrasonik Banyo	: Bandelin Sonorex
Sıcaklık Kontrollü Manyetik Karıştırıcı	: LLG

3.3. Numunelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılacak olan boyar maddeler olan Floresin (Fl), Pyronin Y (PyY), Akridin Oranj (AcO), Safranin T (SfT)' nin 1×10^{-3} M stok çözeltileri 2:1 etanol:kloroform içerisinde numune hazırlamayı kolaylaştırmak amacıyla önceden hazırlanmıştır. Çalışma konsantrasyon aralığının belirlenmesi için ön konsantrasyon çalışması yapıldıktan sonra konsantrasyon aralığı belirlenmiştir. SDS' nin kritik misel konsantrasyonu 8,1 mM' dir. Çalışma konsantrasyonu 8,5 mM olarak belirlenmiştir. Pirazolin türevi izomerler 4,2 ve 2,2'nin de stok çözeltileri 2:1 etanol:kloroform içerisinde hazırlanmıştır. Her bir numune 1×10^{-4} M etken (2,2 veya 4,2) bileşiği içerecek şekilde pipetlenerek argon gazı ile kurutulmuş ve artan konsantrasyonlarda boya çözeltileri otomatik pipetler yardımıyla eklenmiştir. Sonrasında hazırlanan SDS çözeltisi

eklenerek toplam hacim 4 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışılan konsantrasyonlar farklı boyalara göre değişiklik göstermiş olup aşağıdaki tablolarda belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışılacak konsantrasyonlar (SfT)

	2,2 / 4,2 (M)	SfT (M)	SDS (mM)	Kısa Ad
1	1.10^{-4}	0	8,5	XBOS
2	1.10^{-4}	1.10^{-6}	8,5	X1
3	1.10^{-4}	2.10^{-6}	8,5	X2
4	1.10^{-4}	3.10^{-6}	8,5	X3
5	1.10^{-4}	4.10^{-6}	8,5	X4
6	1.10^{-4}	5.10^{-6}	8,5	X5
7	1.10^{-4}	6.10^{-6}	8,5	X6
8	1.10^{-4}	7.10^{-6}	8,5	X7
9	1.10^{-4}	8.10^{-6}	8,5	X8
10	1.10^{-4}	1.10^{-5}	8,5	X9

Tablo 3.2. Çalışılacak konsantrasyonlar (AcO)

	2,2 / 4,2 (M)	AcO (M)	SDS (mM)	Kısa Ad
1	1.10^{-4}	0	8,5	XBOS
2	1.10^{-4}	1.10^{-7}	8,5	X1
3	1.10^{-4}	3.10^{-7}	8,5	X2
4	1.10^{-4}	5.10^{-7}	8,5	X3
5	1.10^{-4}	7.10^{-7}	8,5	X4
6	1.10^{-4}	9.10^{-7}	8,5	X5
7	1.10^{-4}	$1,2.10^{-6}$	8,5	X6
8	1.10^{-4}	$1,5.10^{-6}$	8,5	X7
9	1.10^{-4}	2.10^{-6}	8,5	X8

Tablo 3.3. Çalışılacak konsantrasyonlar (Fl)

	2,2 / 4,2 (M)	Fl (M)	SDS (mM)	Kısa Ad
1	1.10^{-4}	0	8,5	XBOS
2	1.10^{-4}	5.10^{-7}	8,5	X1
3	1.10^{-4}	7.10^{-7}	8,5	X2
4	1.10^{-4}	1.10^{-6}	8,5	X3
3	1.10^{-4}	2.10^{-6}	8,5	X4
4	1.10^{-4}	3.10^{-6}	8,5	X5
5	1.10^{-4}	4.10^{-6}	8,5	X6
6	1.10^{-4}	5.10^{-6}	8,5	X7
7	1.10^{-4}	6.10^{-6}	8,5	X8

Tablo 3.4. Çalışılacak konsantrasyonlar (PyY)

	2,2 / 4,2 (M)	PyY (M)	SDS (mM)	Kısa Ad
1	1.10^{-4}	0	8,5	XBOS
2	1.10^{-4}	1.10^{-7}	8,5	X1
3	1.10^{-4}	2.10^{-7}	8,5	X2
4	1.10^{-4}	3.10^{-7}	8,5	X3
5	1.10^{-4}	4.10^{-7}	8,5	X4
6	1.10^{-4}	5.10^{-7}	8,5	X5
7	1.10^{-4}	6.10^{-7}	8,5	X6
8	1.10^{-4}	7.10^{-7}	8,5	X7
9	1.10^{-4}	8.10^{-7}	8,5	X8

HSA ile 2,2 ve 4,2 molekülleri arasındaki etkileşimlerin inceleneceği çalışmalarda 2,2 ve 4,2 molekülleri için konsantrasyonlar Tablo 3.5' de verilmiştir.

Tablo 3.5. Çalışılacak konsantrasyonlar (2,2 / 4,2)

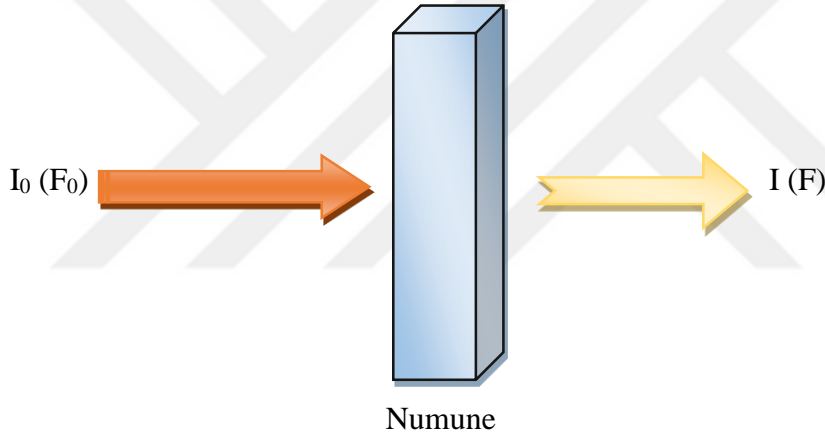
	HSA (M)	2,2 / 4,2 (M)	Kısa Ad
1	1.10^{-6}	0	XBOS
2	1.10^{-6}	$3,3.10^{-5}$	X1
3	1.10^{-6}	$6,7.10^{-5}$	X2
4	1.10^{-6}	$1,0.10^{-4}$	X3
5	1.10^{-6}	$1,3.10^{-4}$	X4
6	1.10^{-6}	$1,7.10^{-4}$	X5
7	1.10^{-6}	$2,0.10^{-4}$	X6
8	1.10^{-6}	$2,3.10^{-4}$	X7
9	1.10^{-6}	$2,7.10^{-4}$	X8

Hazırlanan numuneler her ölçüm öncesi ultrasonik banyoda boyar (SfT, AcO, PyY, Fl) ve etken (2,2, 4,2) maddelerin ortamda tamamen çözünmeleri amacıyla 15 dk bekletilmiştir. Daha sonrasında her bir numune için floresans ölçümleri alınmıştır. Alınan ölçüm verileri kaydedilmiştir. Bu çalışma sırasında her bir ölçüm en az üç kez tekrarlanmıştır. Oda koşullarında ve 25°C (298K), 35°C (308K), 45°C (318K) de ölçümler alınacağından sıcaklık kontrollü manyetik karıştırıcı kullanılarak sıcaklık değerleri sabit tutularak UV ve floresans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. SDS ortamında alınan ölçümler tamamlandıktan sonra bu çalışma saf su ortamında gerçekleşmiştir.

HSA; fosfat tamponunda (pH=7,4) hazırlanmıştır. Her çalışmada HSA taze olarak hazırlanmıştır. Bunun için deiyonize 200 mL suya 1 adet hazır fosfat tampon çözelti (PBS tablet) atılarak ultrasonik banyoda çözüldürülerek fosfat tamponu hazırlanmıştır. Ardından 1.10^{-6} M HSA hazırlamak için gerekli HSA tartılarak 100 mL tamponda çözülmüştür. Ardından HSA ortamında etken maddeler için absorpsiyon ve floresans ölçümleri alınmıştır. HSA içerisine etken maddeler titrasyon metoduyla artan miktarlarda eklenerek ölçümleri alınıp, verileri kaydedilmiştir. Yapılan bütün ölçümler en az üç kez tekrar edilmiş ve en iyi sonuçların ortalaması grafiğe dönüştürülüp gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Bu çalışma oda sıcaklığında ve 25°C (298 K), 35°C (308 K), 45°C (318 K) de gerçekleştirilmiştir.

3.4. UV-Vis. Absorpsiyon Spektroskopisi

Ultraviyole ve görünür bölgede meydana gelen absorpsiyon olayı, genel olarak bağ elektronlarından kaynaklanmaktadır. UV ve görünür bölgede spektrofotometrik ölçümler nicel analizlerde sıklıkla tercih edilen yöntemlerdendir. Maddenin ışığı absorplama seviyesini ölçümlemek ve bundan faydalanarak konsantrasyonu belirlemek için, absorpsiyon ile konsantrasyon arasındaki ilişki mutlaka bilinmelidir. İçerisinde çözelti halinde moleküllerin bulunduğu, kalınlığı b cm olan bir küvete monokromatik yani tek dalga boylu $I_0 (F_0)$ şiddetindeki bir ışık demeti gönderildiğinde çözeltilerdeki moleküller tarafından absorblandığında ışığın şiddetinde azalma meydana gelir ve küveti $I (F)$ şiddetinde terk etmiş olur. Bu durumda meydana gelen etkileşim Lambert-Beer eşitliği ile ifade edilir;



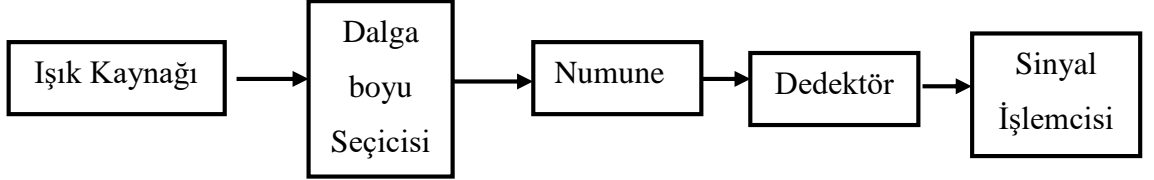
$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{F_0}{F} = \epsilon bc \quad (1)$$

olarak ifade edilir. Bu denklemde;

A ; absorbans, $I_0 (F_0)$; numune üzerine gelen ışığın şiddeti, $I (F)$; numuneyi terk eden ışığın şiddeti, ϵ ; molar absorptivite katsayısı ($L/mol.cm$), b ; numune kabının kalınlığı (cm), c ; konsantrasyon (mol/L) olarak ifade edilmektedir.

Maddelerin ışığı absorplama özelliğinin incelenmesi için spektrofotometreler kullanılır. Spektrofotometreler başlıca ışık kaynağı, monokromatör, numune kabı ve dedektörden oluşmaktadır. Bu tür cihazlarda, radyasyon kaynağı olarak UV ve görünür bölgede ışınma

yapan tungsten, hidrojen veya döteryum ve ksenon lambalar gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. Bu sistemlerde, UV ve görünür bölgede fotovoltik veya fotoiletken dedektörler, fototüpler ve foton çoğaltıcı tüpler dedektör olarak kullanılır. Spektrofotometrelerde bu ana bileşenlerden başka olarak ışığı toplayan, yansıtan, bölen mercekler, aynalar, ışık bölücüleri de mevcuttur. Genel bir spektrofotometrenin şematik gösterimi Şekil 3.1' de verilmiştir.



Şekil 3.1. Bir UV-Vis Spektrometre şematik gösterimi

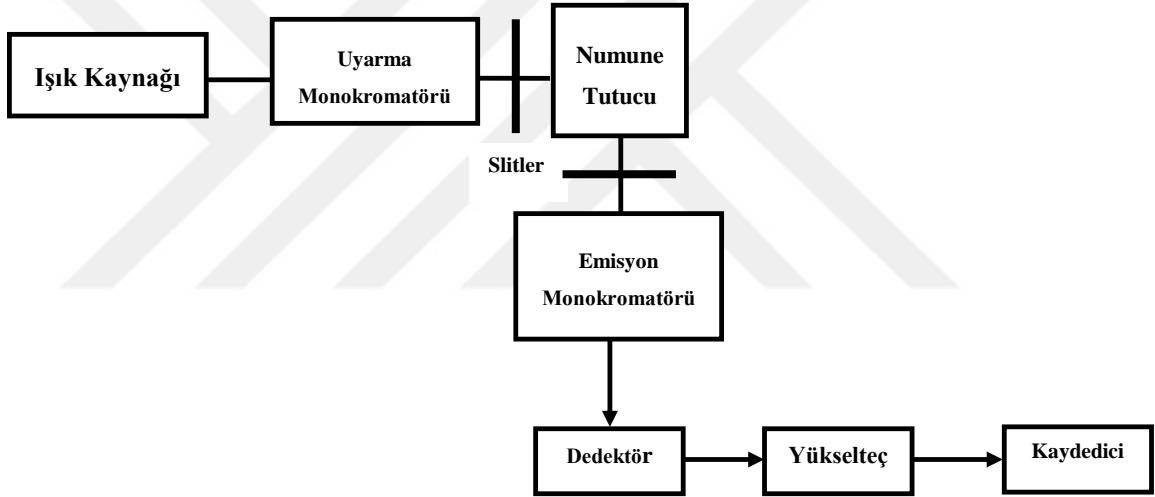
Bir molekülde belli bir dalgaboyu aralığındaki ışığın absorpsiyonundan sorumlu olan fonksiyonel gruplar olan kromofor grupların absorpsiyon bantları geniş oldukları için birbirleriyle örtüşürler. Bu sebeple UV-görünür bölge spektroskopisi ile nitel analizlerin yapılması çok uygun olmamaktadır. Diğer yandan bu yöntem nicel analiz için oldukça uygun ve kullanışlı olduğu için tercih edilmiştir. Çalışmalarımızda kullandığımız PG firmasına ait T80+ UV/VIS Spektrofotometre cihazının görseli Şekil 3.2'de verilmiştir;



Şekil 3.2. PG firmasına ait (T80+ UV/VIS Spectrometer) UV/VIS Spektrofotometre cihazı

3.5. Floresans Spektroskopisi

Floresans spektroskopisi teknikleriyle başarılı uygulamalar gerçekleştirebilmek cihazı iyi tanımakla mümkündür. Floresans spektroskopisi tekniği oldukça hassas bir tekniktir. Bir emisyon spektrumu, sabit bir uyarma dalga boyunda ölçülen emisyonun dalga boyuna göre dağılımından oluşmaktadır. Bu tür spektrumlar dalga boyuna göre verilebileceği gibi dalga sayısına göre de verilebilir. Genellikle dalga boyu nanometre (nm), dalga sayısı ise cm^{-1} olarak verilmektedir. Farklı cihazlarda kaydedilen emisyon spektrumları her bir cihazın dalga boyu hassasiyetine bağlı olduğundan farklılık gösterecektir. Şekil 3.3’de genel amaçlar için kullanılan bir spektrofotometrenin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 3.3. Genel bir spektrofotometrenin şematik gösterimi

Spektrofotometrelerde genellikle uyarma ışık kaynağı olarak ksenon (xenon) lamba kullanılmaktadır. Bu tür lambalar 250 nm’ den daha büyük dalga boylarının hepsinde yüksek şiddete sahip olmalarından dolayı kullanılmaktadır. Spektrofotometreler hem uyarma hem de emisyon monokromatörleriyle donatılmıştır. Bu her iki monokromatör de dalga boyunun otomatik taranmasına izin veren bir motor sistemine bağlı olarak işlem görür. Floresans şiddeti, PMT (foton çoğaltıcı tüp) ile belirlenir ve uygun elektronik devre elemanları ile uygun data formatına dönüştürülürler. Datalar genellikle grafik halinde (spektrum) alınarak dijital ortamda saklanabilmektedir. Bir spektrofotometrede bulunan parçaları kısaca özetlemek gerekirse; Shutter’lar yani kapayıcı, emisyon kanalını kapatmak için veya uyarma ışığını elimine etmek için

kullanılır. Beam splitter yani ışık ayırıcı; uyarıcı ışığın iki farklı yöne yönlendirilmesini sağlar. Beam splitter, içinden geçen ışığın yaklaşık %4'ü yansıtan temiz kuartz kısımlardan oluşmaktadır. Bu tür cihazlarda uyarma ve emisyon ışık yolu üzerine filtreler yerleştirilebilir. Bunlar emisyon kanalından gelen saçılan ışığın elimine edilmesi veya uyarma ışığındaki istenmeyen dalga boyundaki ışığı uzaklaştırmak için kullanılır. İdeal bir spektroflorofotometrede kaydedilen emisyon ve uyarma spektrumu her dalga boyu aralığı için göreceli foton şiddetini gösterir. Çalışmalarımızda kullanılan Shimadzu firmasına ait RF-5301 PC Spectrofluorophotometer durağan hal emisyon ve eksetasyon ölçümlerinin yapılabildiği spektroflorofotometrenin görseli Şekil 3.4'de verilmiştir;



Şekil 3.4. Shimadzu firmasına ait (RF-5301 PC Spectrofluorophotometer) Floresans Spektroflorofotometre cihazı

3.6. Kuantum Veriminin Hesaplanması

Floresans kuantum verimi; floresans özelliği olan herhangi bir bileşiğin, fotofiziksel özelliklerinin incelenmesi için dikkate alınan en önemli parametrelerden biridir. Genel olarak floresans kuantum verimi, moleküller tarafından salınan foton sayısının moleküller tarafından absorplanan foton sayısına oranı olarak tanımlanmaktadır. Floresans özelliği olan bir bileşiğin floresans kuantum verimi; kullanılan çözücüye, ortamın sıcaklığına, molekülün rijitliğine, moleküler yapıda bulunan ağır metallere, molekülün yapısındaki elektron çifti bulunduran atom veya atom gruplarına bağlı olarak değişiklik

göstermektedir. Reaksiyonun olmadığı saf sistemlerin floresans kuantum verimleri belirlenirken sıklıkla kullanılan metotlardan biri Parker-Rees metodudur (Valeur, 2001). Bu tez çalışmasında floresans kuantum verimleri (Φ_f) Parker-Rees metoduyla hesaplanacaktır. Bu metodun en önemli özelliği standart bir bileşiğe göre kuantum verimlerinin belirlenmesidir. Standart bileşikten kasıt, fotofiziksel özelliği iyi belirlenmiş bir floresans bileşik olmasıdır. Uygun referans veya standart bileşikler literatürde verilmiştir (Albert M. Brouwer, 2011). Parker-Rees denklemi,

$$\phi_s = \phi_r \left(\frac{D_s}{D_r} \right) \left(\frac{n_s}{n_r} \right)^2 \left(\frac{1 - 10^{-OD_r}}{1 - 10^{-OD_s}} \right) \quad (2)$$

şeklinde ifade edilir. Burada, ϕ_s ve ϕ_r sırasıyla, numune ve referansın floresans kuantum verimi, D_s ve D_r , sırasıyla numune ve referansın düzeltilmiş floresans spektrumu altındaki alanlar, n_s ve n_r sırasıyla numune ve referans çözücüsünün kırılma indisi, OD_s ve OD_r sırasıyla numune ve referansın uyarılma dalga boyunda ölçülen optik yoğunluğu temsil etmektedirler.

3.7. Floresans Yaşam Ömrünün (Lifetime) Belirlenmesi

Bir maddenin veya molekülün temel hale dönmeden önce uyarılmış enerji seviyesinde kalma süresine floresans yaşam ömür denilmektedir. Floresans ömrünün elektronik uyarılmadan sonra gerçekleşen radyasyonlu ve radyasyonsuz geçişlerin hız sabitlerinin toplamıyla ters orantılı olduğu bilinmektedir.

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (3)$$

Floresans yaşam ömrü bazı önemli bilgilere ulaşmamızda öncülük etmektedir. Floresans ömür; enerji transferinin hızı, kuencır ile çarpışma sıklığı ve uyarılmış hal reaksiyonlarının hızı gibi değerlerin belirlenmesi için önemli bir fotofiziksel parametredir. Ayrıca floresans durulma spektrumları floroforun çevresiyle olan

etkileşmeleri hakkında da bilgi verir. Floresans ömür ölçümü zor bir işlem olup çoğunlukla 10 nanosaniyelik bir zaman ortalama değeri olarak kabul edilebilmektedir.

Bu tez çalışmasında floresans yaşam ömürleri (τ_f), Horiba J. Yvon SPEX Fluorolog 3-2iHR marka cihaz ve TCSPC modülü ile tek foton sayımı tekniğine göre ölçüm alınmıştır. Uyarma dalga boyu 310 nm, emisyon dalga boyu aralığı ise 460-475 nm olarak belirlenmiştir. Alınan ölçümler sonunda ilgili cihazın yazılımı ile floresans ömür hesaplamaları yapılmıştır.

3.8. Enerji Transferi, Kuençleşme ve Sıcaklık Parametrelerinin Belirlenmesi

Enerji transferi, dinamik kuençleşme için geliştirilen ve enerji transfer etkinliği hakkında bilgi veren Stern-Volmer modeli ve Förster kinetiğine göre tartışılacaktır. Stern-Volmer modeli, R* ve Q moleküllerinin rastgele difüzyon hareketleri sırasında birbiri ile temasını esas almaktadır (Lakowicz, 1991). Bu tür kuençleşme durumunda reaksiyon çarpışma ihtimaliyle orantılıdır. Dinamik ve statik kuençleşme için Stern-Volmer eşitliği;

$$\frac{I_0}{I} = \frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (4)$$

$$k_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0} \quad (4.1)$$

şeklinde. Burada; F_0 (I_0) ve F (I) sırasıyla ortamda kuençırın bulunmadığı ve bulunduğu andaki floresans şiddetleri; k_q , bimoleküler kuençleşme sabiti; τ , kuençırın ortamda olmadığı andaki floroforun uyarılmış halde harcadığı zaman veya florofor'un floresans ömrü; $[Q]$, kuençır konsantrasyonu; $K_{SV} = k_q \cdot \tau$ olup Stern-Volmer sabitini temsil etmektedir. K_{SV} 'nin alacağı değeri enerji transferinin etkinliği hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir (Lakowicz, 1991).

Radyasyonlu enerji transfer olaylarının bir türü singlet-singlet enerji transferidir. Radyasyonlu enerji transferinde donör tarafından salınan enerjinin akseptör molekülü tarafından absorplanması mümkündür. Bu absorplanan enerji, akseptörün uyarılmasında temel teşkil eder. Bu şekildeki enerji transfer olaylarının ihtimaliyeti "spektral örtüşme

integrali'nin bir fonksiyonudur. Spektral örtüşme integralinden kasıt; donörün normalize emisyon spektrumu ile akseptörün normalize absorpsiyon spektrumunun örtüşme alanıdır. Bu alanın büyüklüğü ile orantılı olarak enerji transferi gerçekleşmektedir. Örtüşmenin büyüklüğü spektrumdaki örtüşen kısmın alanı hesaplanarak belirlenir (Lakowicz, 1991). Spektral örtüşme alanı;

$$J = \int f_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (5)$$

eşitliğiyle belirlenir.

Floresans enerji transfer parametreleri Förster tarafından önerilen eşitlik kullanılarak belirlenmektedir. Bu eşitlik;

$$k_T = \frac{9000(\ln 10) \kappa^2 \phi_D}{128 \pi^5 n^4 N r^6 \tau_D} \int_0^{\infty} \frac{F_D(\tilde{\nu}) \varepsilon_A(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu} \quad (6)$$

veya

$$k_T = (r^{-6} J \kappa^2 n^{-4} \lambda_D) \times 8,71 \cdot 10^{23} s^{-1} \quad (6.1)$$

şeklinde olabilir. Förster enerji transfer formülünde, integral ifadesi donör ile akseptör spektrumlarının örtüşen kısmının alanının sayısal değerini temsil etmektedir. Bu integral ifadesi formülün düzenlenmiş şeklinde J ile ifade edilmiştir. ϕ_D , ortamda akseptörün bulunmadığı durumdaki donörün kuantum verimini; n, ortamın kırılma indisini; N, Avagadro sayısını; r, donör-akseptör arasındaki uzaklığı; τ_D , ortamda akseptörün olmadığı durumda donörün floresans ömrünü temsil etmektedir. κ^2 , donör ve akseptörün geçiş dipollerinin göreceli yönelmesini ifade eden bir faktör olup genelde değeri 2/3 olarak alınır.

Enerji transferinde önemli parametrelerden biri olan enerji transfer hızı (k_T) ve enerji transfer verimliliği (E), Förster kinetiğine göre incelenmektedir. Enerji transfer hızı (k_T) örtüşmenin büyüklüğüne, donör ve akseptör geçiş dipol momentlerinin birbirilerine göre yönelmelerine, donörün kuantum verimine (ϕ_D), iki molekül arasındaki mesafeye (r) ve donörün floresans ömrüne (τ_D) bağlıdır.

Radyasyonlu enerji transferinde moleküller arası mesafenin rolü de önemlidir. Biyolojik sistemlerdeki enerji transfer prosesinde önemli bir parametre olan Förster mesafesi (R_0), enerji transferinin %50 gerçekleştiği anda donör-akseptör arası mesafe olarak tanımlanır. Bu R_0 mesafesi;

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} k^2 N^{-4} \phi J \quad (7)$$

eşitliğiyle belirlenir.

Bir diğer önemli parametre olan enerji transfer verimliliği ise enerji transferinin gerçekleşme yüzdesini temsil etmektedir. Enerji transfer verimliliği aşağıdaki eşitliklerle belirlenebilir.

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (8)$$

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (8.1)$$

Burada τ_D , akseptör molekülünün ortamda bulunmadığı şartlarda donörün floresans ömrünü, τ_{DA} ise akseptörün ortamda bulunduğu şartlardaki donörün floresans ömrünü ifade etmektedir. I_{DA} ve I_D , akseptörün ortamda bulunduğu ve bulunmadığı şartlardaki donörün floresans şiddetini ifade eder.

Bu etkileşimleri incelemek için bir diğer yöntem de Stern-Volmer eşitliğinin logaritmasının alınmasıyla elde edilen eşitliktir. Bu eşitlikten K; bağlanma sabiti ve n; bağlanma sayısı belirlenmiştir.

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K + n \log [Q] \quad (9)$$

Eşitliğe göre $\log(F_0 - F/F)$ 'ın $\log[Q]$ 'ya karşı çizilen grafiğinin eğiminden n ve kesim noktasından K belirlenmiştir.

Sıcaklık parametreleri ise iki molekül arasındaki etkileşimin kuvvetini yani van der Waals, hidrojen bağı ile elektrostatik ve hidrofobik özelliklerini açıklar. Bu çalışma için seçilen sıcaklıklar 25°C (298 K), 35°C (308 K) ve 45°C (318 K) olarak tercih edilmiştir. Bu sıcaklıklarda moleküler yapıların herhangi bir yapısal bozulmaya uğramayacağı ön

görülmüş olup herhangi bir bozunmaya da rastlanmamıştır. Entalpi değişimi (ΔH^0), entropi değişikliği (ΔS^0) ve Gibbs serbest enerjisindeki değişimi (ΔG^0) aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\log K = -\frac{\Delta H^0}{2.303RT} + \frac{\Delta S^0}{2.303R} \quad (10)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (10.1)$$

Burada $\log K$ ya karşı $1/T$ grafiği çizilerek eğimden ΔH^0 değeri, kesim noktasından ise ΔS^0 değeri hesaplanmıştır. Son eşitlikten faydalanarak da ΔG^0 değeri bulunmuştur. ($R=8,314 \text{ J.K}^{-1}\text{mol}^{-1}$)

3.9. Konfokal Mikroskop

Konfokal Mikroskop; yüksek hızda, az zarar ile yüksek çözünürlükte, parazitsiz parlak görüntüler alabilen bir mikroskop türüdür. 2 ve 3 boyutlu görüntü ve film oluşturabilir. Özellikle floresan işaretlemelerde yüksek ayırım gücü sayesinde oldukça net görüntüler elde edilebilmektedir. Konfokal mikroskop yoğun olarak biyolojik bilimlerde, özellikle canlı hücre araştırmalarında sunduğu yüksek çözünürlük ile öne çıkmaktadır. Floresan işaretlemeye sahip olmayan yüzeylerin ışık yansıtma özelliklerinden faydalanarak yüksek çözünürlüklü optik görüntülenmesi ve mikro yapıların incelenmesi de mümkündür. İlave olarak XYZ taraması yapılarak dokuların üç boyutlu incelenmesinde, canlı hücrelerde zamana bağlı değişim veya hücre içi aktivite (iyon geçişleri vb.) incelemelerinde, floresan proteinlerin uyarılma reaksiyonlarının incelenmesinde, soldurma (fotobleaching) deneylerinde, kolokalizasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Konfokal mikroskop Şekil 3.5' de verilmiştir;



Şekil 3.5. Konfokal Mikroskop cihazı

Bu çalışmada izomer moleküllerin canlı hücreleri boyama yeteneğinin tespiti için konfokal mikroskoptan faydalanılmıştır.

3.10. Sitotoksitenin Belirlenmesi

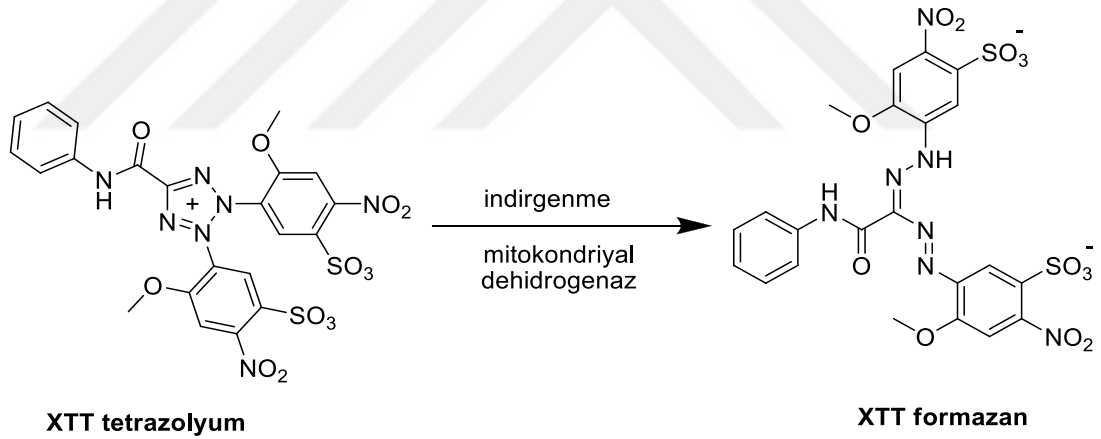
Sitotoksitenin genel olarak, canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranının belirlenmesi olarak ifade edilmektedir. Sitotoksitenin testleri ise toksik olabilecek kimyasal maddenin, uygun hücre kültüründe, hücre çoğalma oranı ve hücre üzerindeki toksik etkisi dikkate alınarak yapılan testlerdir. Bu testler, morfolojik olarak hücresel hasarın gözlemlenmesi, hücresel hasarın çeşitli ölçüm yöntemleri ile tespit edilebilmesi, hücresel büyümenin belirlenebilmesi ve de hücresel metabolizmadaki bir değişikliğin tespit edilmesi amacıyla yapılabilmektedir.

Laboratuvar ortamında hücrelerin kontrollü bir şekilde çoğaltılması işlemine hücre kültürü adı verilir. Bu şekilde hücrelerin daha hızlı büyüyüp çoğalması sağlanmış olur. Canlı ortamda (*in vivo*) gerçekleştirilemeyen deneyler, belirli bir hücre hattından çoğaltılan hücrelerde laboratuvar şartlarında (*in vitro*) gerçekleştirilebilmektedir. *In vitro* testlerde sitotoksitenin incelenen kimyasal madde artan derişimlerde hücrelere

uygulanmaktadır. Kullanılan bu kimyasal maddenin hücre morfolojisi ve hücrelerin yaşama oranları üzerine olan etkileri incelenmektedir.

Bu çalışmadaki etken maddelerin (2,2-4,2) in-vitro olarak sitotoksisite etkileri meme kanser (MCF-7) hücre hattında ve kolon kanser (HT-29) hücre hattında çoğaltılan hücreler üzerinde incelenmiştir. Hücre kültürlerinin inkübasyonu, 37°C'de %95 nem %5 CO₂ inkübatöründe gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları Class II Güvenlik Kabini'nde yapılmıştır.

Numunelerimizin hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktiveleri XTT metodu ile üretici firma tarafından belirtilen talimatlarına göre yapılmıştır (Hücre Proliferasyon XTT Kiti, BI). Bu belirlenen yöntemde metabolik olarak aktif olan hücrelerde mitokondriyal enzim aktivitesiyle suda çözünmeyen XTT tetrazolyum tuzu, suda çözünebilen turuncu renkli formazan bileşiğine indirgenerek işleme başlanmıştır. Elde edilen bu ürün ELISA okuyucuda kolaylıkla belirlenmiştir.



Şekil 3.6. XTT tetrazolyumun fenazin meto sülfat varlığında mitokondriyal dehidrogenaz ile XTT formazana indirgenme işlemi

Uygulama yapılacak olan hücrelerden 100'er µL (10.000 cell/mL) 96 kuyucuklu plakalara konulup 24 saat süreyle inkübasyon süreci için bekletildi. İnkübasyon süreci bittikten sonra kuyucuklardaki besi yeri ortamdan uzaklaştırılarak işlemlere devam edildi. Sıradaki adımda 50 µL PBS tamponuyla kuyucuklar yıkanarak bu tampon tekrar uzaklaştırıldı. Ardından hücrelerin üzerine 50'şer µL taze tam besi yeri eklendi. Üzerlerine 50'şer µL farklı konsantrasyonlarda (100-250 µM) örnekler eklendi. Kontrol

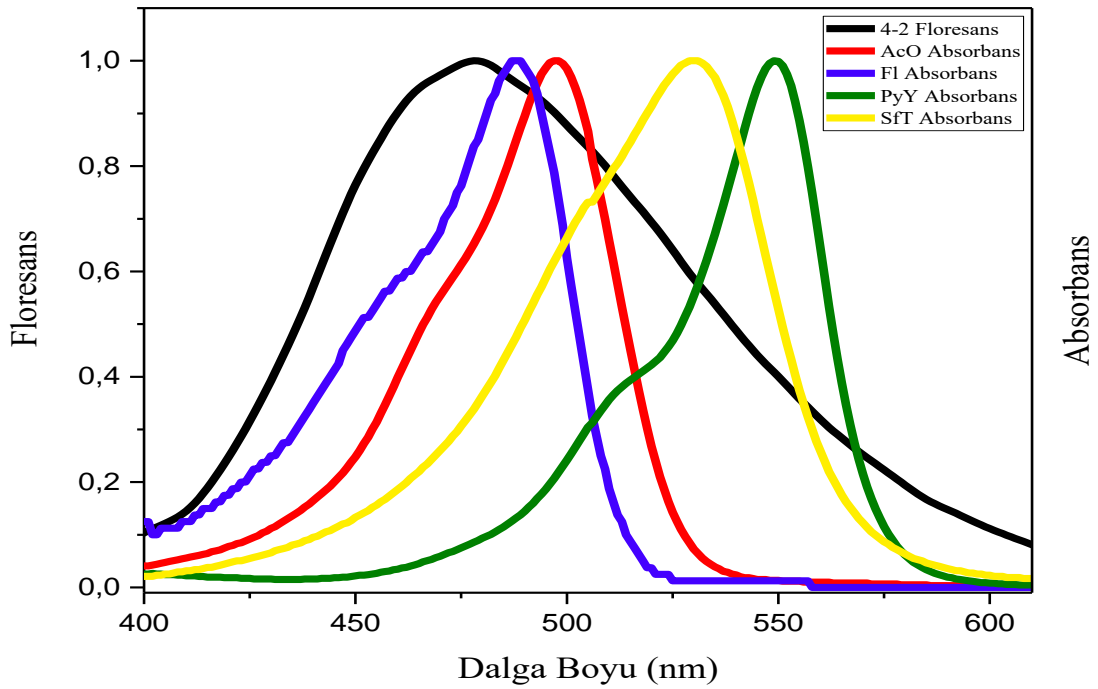
kuyucuklarına da 100 µL %0,2 DMSO içeren tam besi yeri ilave edildi. Bir sonraki adımda plakalar 24 saat inkübasyon sürecinde beklemeleri için tekrardan 37°C' de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatör içerisine konuldu. Bu süreçten sonra plakalara ELİSA okuyucuda kolorimetrik olarak okuma yapıldı.

Bu 96 kuyucuklu plakada A1/A12, A1/H1, H1/H12 ve A12/H12 kuyucukları boş bırakılmıştır. Aynı zamanda B2/B11 ve C2/C11 aralığındaki kuyucuklar hücresiz ve D2/D11, G2/G11 aralığındaki kuyucuklar da hücreli ortamlar olarak kullanılmıştır. Ayrıca B2/C2 kuyucuklarda kontrol hücreleri içermekte olup kuyucuklara 100 µL, %0,2'lik DMSO içeren besi yeri ilave edilmiştir. B3/B11 aralığındaki kuyucuklara ise 100 µL numunelerin farklı konsantrasyonları ilave edildi ve 24 saat inkübe edilmeye bırakılmıştır. Bu inkübasyon süreci tamamlanmasının ardından herbir kuyucuktaki besiyeri uzaklaştırıldı. Sonrasında 100 µL basal besiyeri ilave edilerek üzerlerine 50' şer µL XTT solüsyonu eklendi. Ortalama 5-6 saat inkübasyon için CO₂ inkübatörüne konuldu. Son olarak da plakalar mikroplate okuyucuda 490 nm kolorimetrik olarak absorbansları ölçülmüş olup kuyucuklardaki hücre canlılığı hesaplandı.

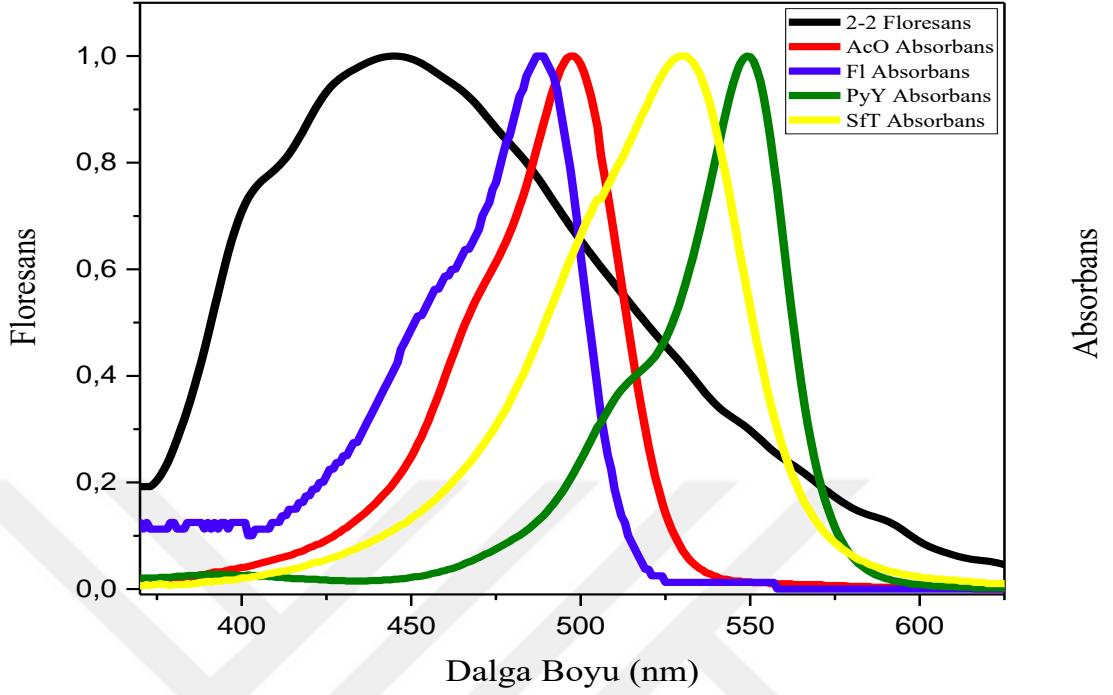
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. SDS Ortamında Etken Maddelerinin (2,2 & 4,2) Boyar Maddeler (AcO, Fl, PyY, SfT) İle Etkileşimleri

Çalışmamızın ilk aşamasında floresans enerji transferi, biyolojik membran modeli olarak kabul edilen misel sistemlerden biri olan SDS ortamında incelenmiştir. Floresans enerji transferinde donör (verici molekül) ve akseptör (alıcı molekül) olarak davranması beklenen iki molekül çifti arasında misel ortamında enerji transferinin gerçekleşmesi için temel şartlardan olan, donörün (4,2 / 2,2) floresans spektrumu ile akseptörün (SfT / AcO / PyY / Fl) absorpsiyon spektrumlarının örtüşmesi durumu incelenmiştir. Donör konsantrasyonu 1.10^{-4} M, akseptör konsantrasyonu 1.10^{-5} M sabit konsantrasyonda çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışma için SDS konsantrasyonu 8,5 mM'dır. Spektral örtüşmenin doğru şekilde gözlenebilmesi için spektrumlar normalize edilerek aynı grafik üzerinde gösterilmiştir. Belirtilen spektrumlar 4,2 ve 2,2 molekülleri için sırasıyla Şekil 4. 1 ve Şekil 4. 2'de verilmiştir.



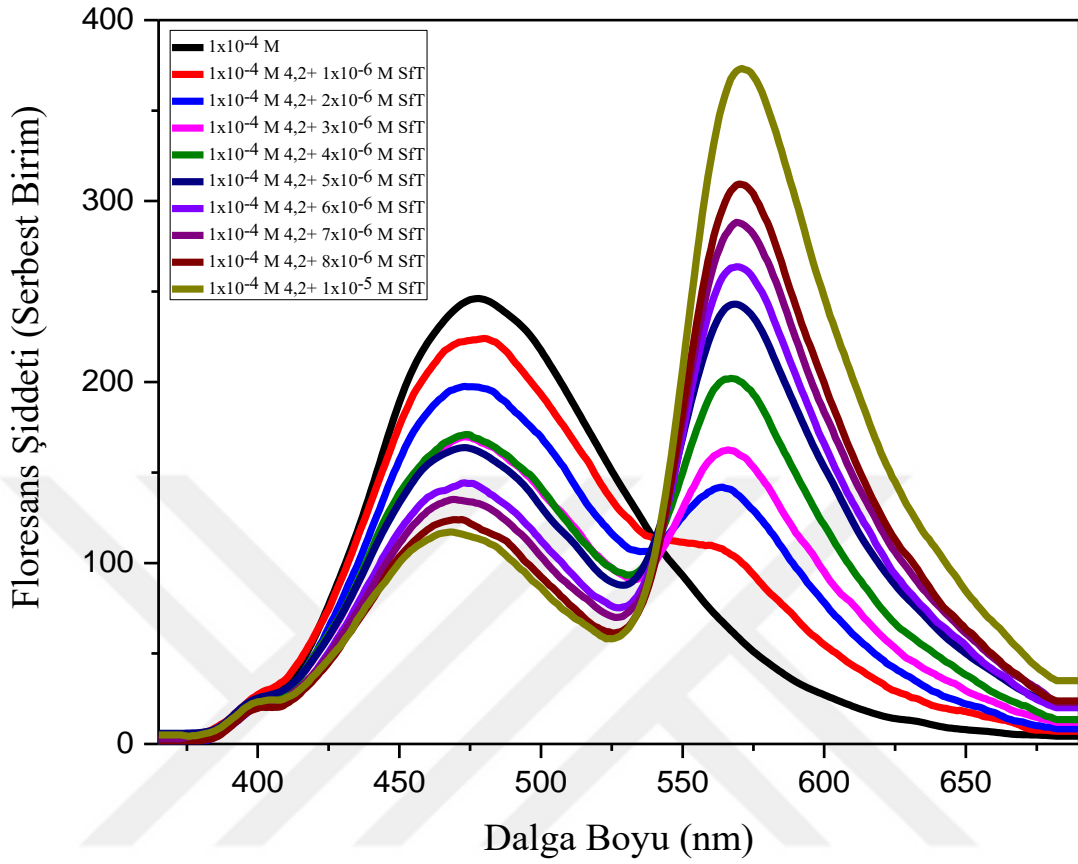
Şekil 4.1. SfT, AcO, PyY, Fl boyar maddelerinin absorpsiyon spektrumları ile 4,2 etken maddesinin floresans spektrumları arasındaki spektral örtüşme



Şekil 4.2. SfT, AcO, PyY, F1 boyar maddelerin absorpsiyon spektrumları ile 2,2 etken maddesinin floresans spektrumları arasındaki spektral örtüşme

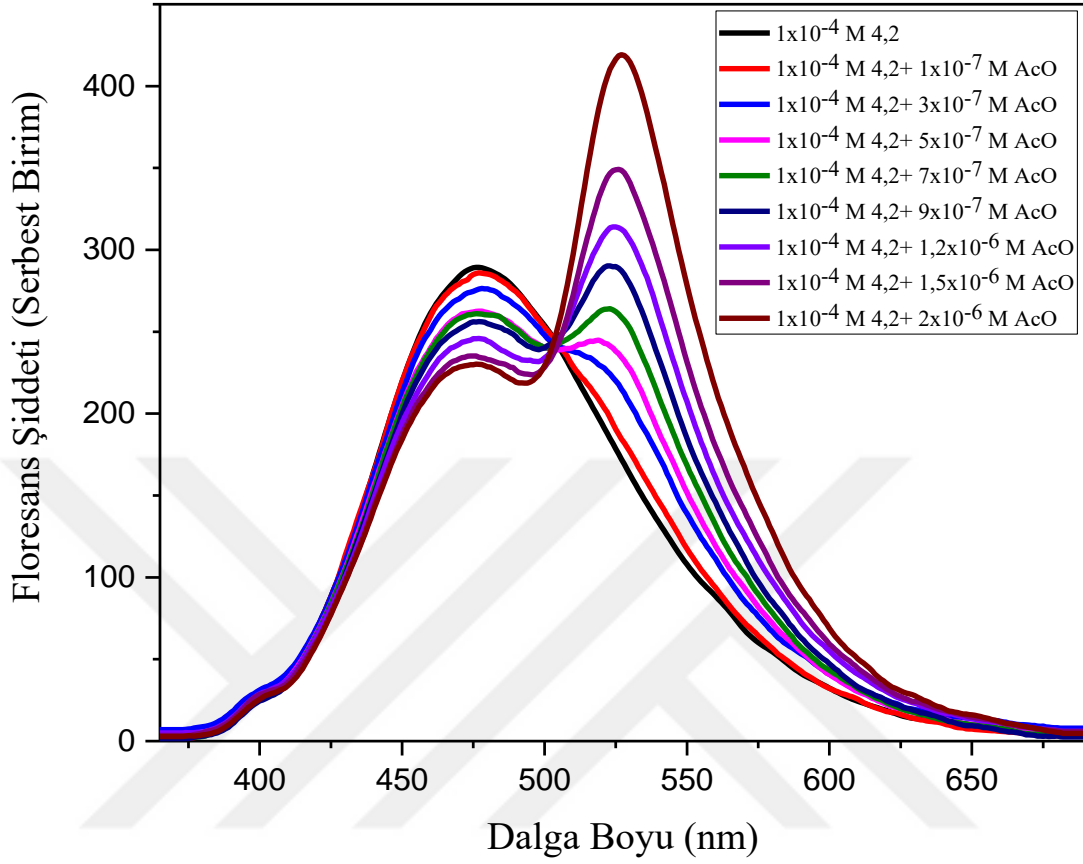
Şekil 4.1 ve 4.2’ de görüleceği üzere 4,2 ve 2,2 etken moleküllerinin floresans spektrumu ile AcO, PyY, F1 ve SfT boyar moleküllerinin absorpsiyon spektrumlarının spektral örtüşmesinden enerji transferi için ilgili molekül çiftlerinin uygun oldukları anlaşılmaktadır.

Donör olarak davranan etken moleküller (2,2 ve 4,2) 1.10^{-4} M konsantrasyonda sabit tutularak 8,5 mM SDS ortamına eklenmiştir. Akseptör molekülleri olan boya moleküllerinin (SfT, AcO, PyY ve F1) artan konsantrasyonları aynı ortama eklenerek floresans ölçümleri alınmıştır. SDS ortamı için alınan ölçümlerde uyarma dalga boyu 350nm, emisyon dalga boyu aralığı 365-690 nm olup slit 5-10 olarak çalışılmıştır. Spektrumlar sırasıyla 4,2 molekülü için Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6’ da 2,2 molekülü için de Şekil 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10’ da verilmiştir. Burada verilen emisyon spektrumları normalize edilmeden ham şekilde verilmiştir.



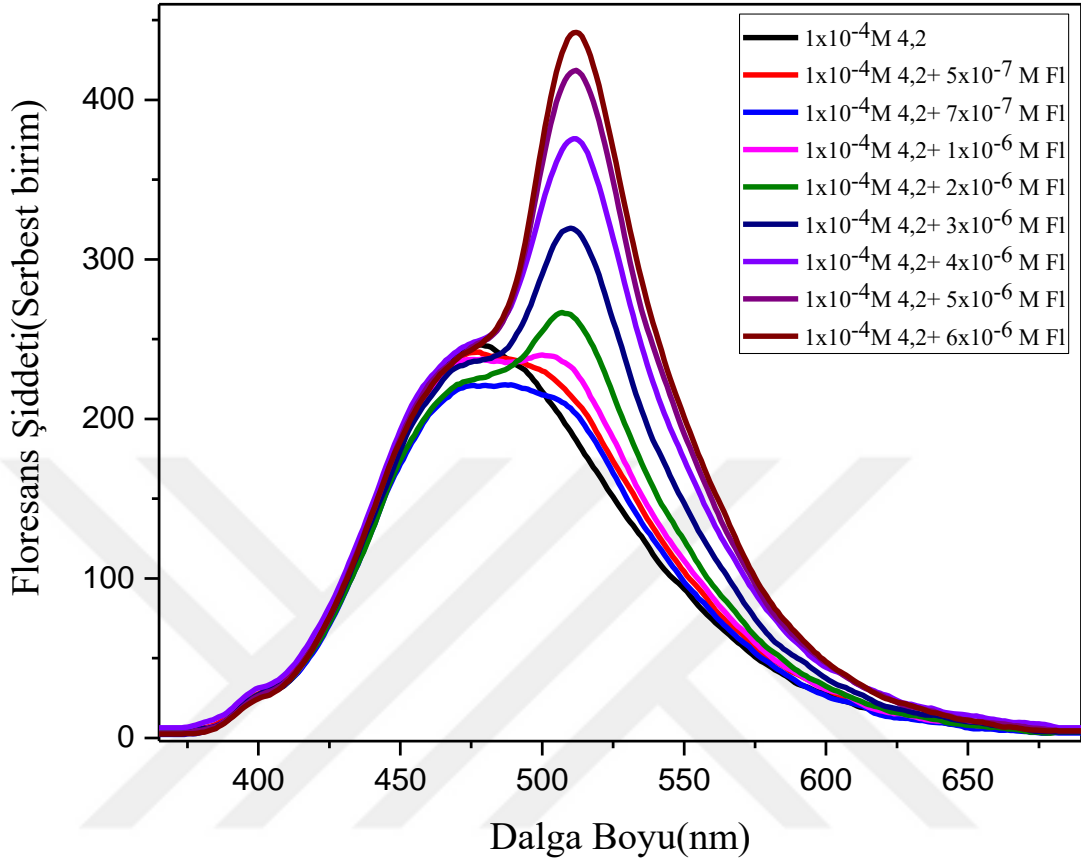
Şekil 4.3. 4,2 ile SFT molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları

Spektrum incelendiğinde SDS misel ortamında sabit konsantrasyondaki donör molekülünün (4,2) floresans şiddetinin, ortama eklenen SFT'nin konsantrasyonunun artışıyla azaldığı görülmektedir. Bu azalmaya karşılık 566-571 nm civarında pik maksimumuna sahip yeni bir bant oluştuğu ve donörün floresans şiddetindeki azalmaya karşılık bu bantın şiddetinin kademeli olarak arttığı gözlenmiştir. Yeni oluşan bu bant akseptör olan molekül SFT'ye aittir. Ayrıca 541 nm' de isobestik nokta gözlenmiştir. Bir çözeltinin konsantrasyonu değişse de ışık absorpsiyonunun değişmediği, sabit kaldığı dalga boyuna isobestik nokta adı verilir.



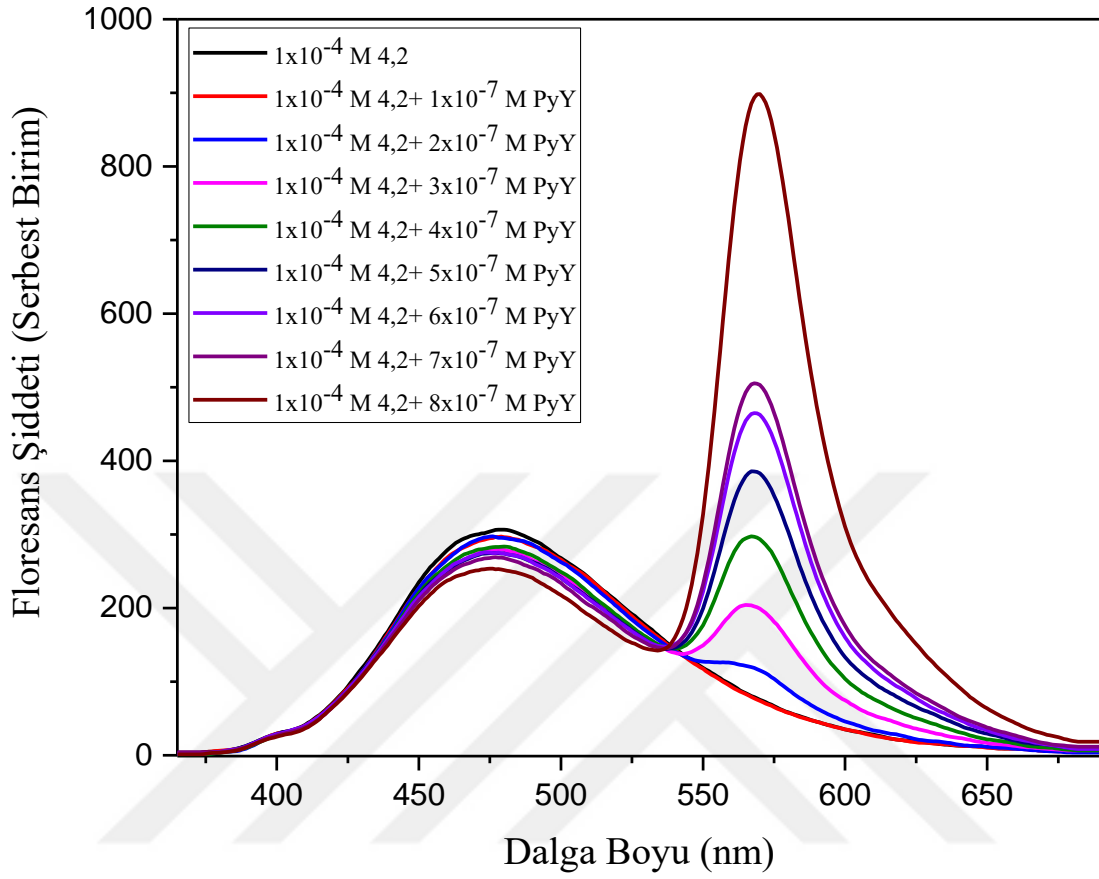
Şekil 4.4. 4,2 ile AcO molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları

4,2 ile AcO molekülü arasındaki spektrum dikkate alındığında 504 nm’de isobestik nokta olduğu, 520-525 nm civarında pik maksimumu olan ikinci bantın oluştuğu görülmüştür. Bu pik AcO molekülünün floresans pikidir.



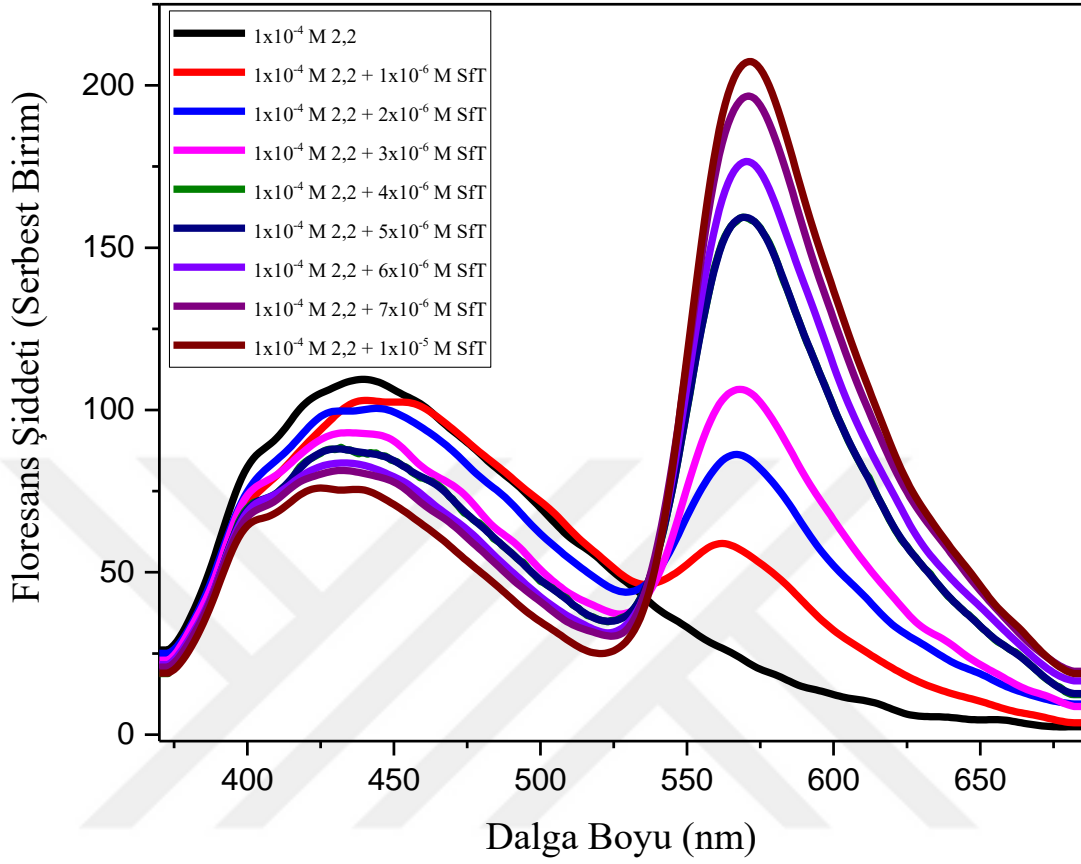
Şekil 4.5. 4,2 ile FI molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları

4,2 ile FI molekülü ikilisinin SDS ortamındaki floresans spektrumu incelendiğinde diğerlerindeki isobestik nokta gözlenememiştir. 4,2 molekülü ile FI arasındaki enerji transferini açık şekilde gösterecek düşük enerjili bölgede ortaya çıkan ikinci pik 504-512 nm civarında oluşmuştur.



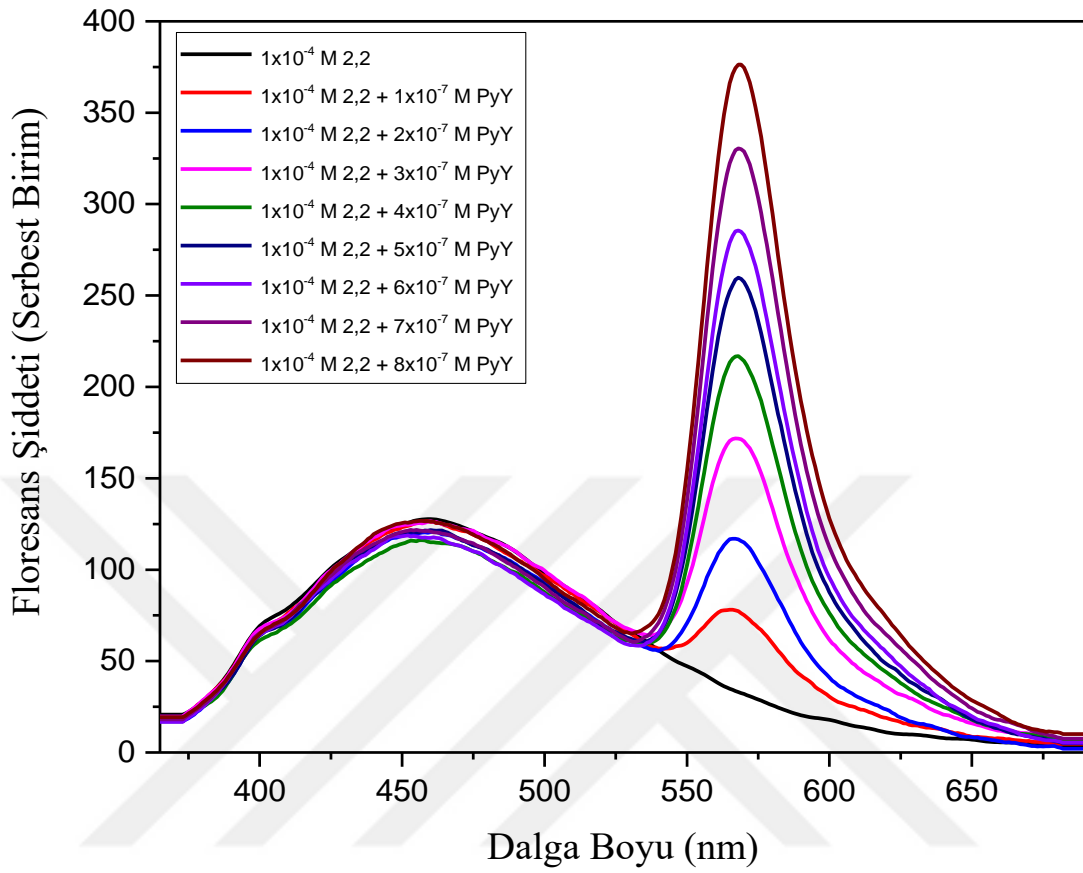
Şekil 4.6. 4,2 ile PyY molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları

Spektrum incelendiğinde sabit konsantrasyonda tutulan donörün (4,2) pik şiddetinde kayda değer azalma olmamasına rağmen akseptör molekülünün (PyY) oluşan piki oldukça şiddetlidir. Bu yeni pik 566-569 nm civarında oluşurken 538 nm’de isobestik nokta gözlenmiştir.



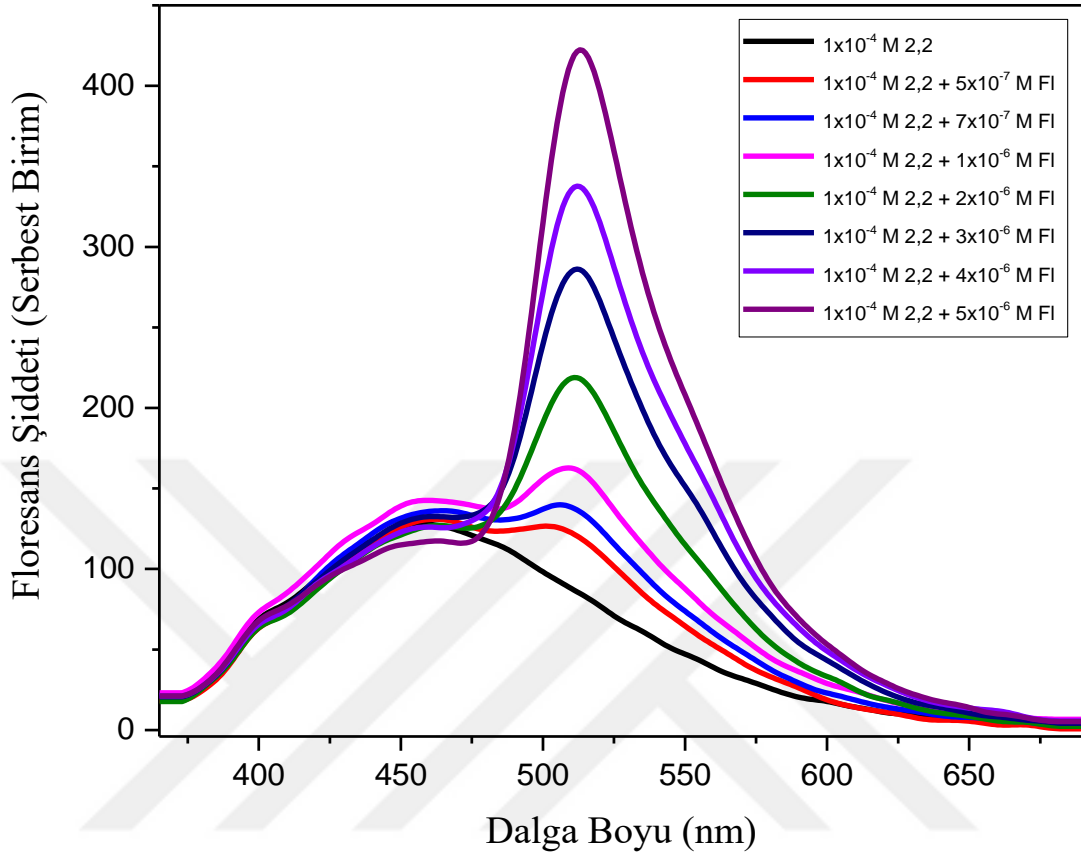
Şekil 4.7. 2,2 ile Sft molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları

2,2 ile Sft molekülü ikilisinin SDS ortamındaki floresans spektrumuna bakıldığında 536 nm’ de isobestik noktanın oluştuğu dikkat çekmektedir. Sft’ ye ait floresans spektrumunun 561-570 nm aralığında pik maksimumuna sahiptir.



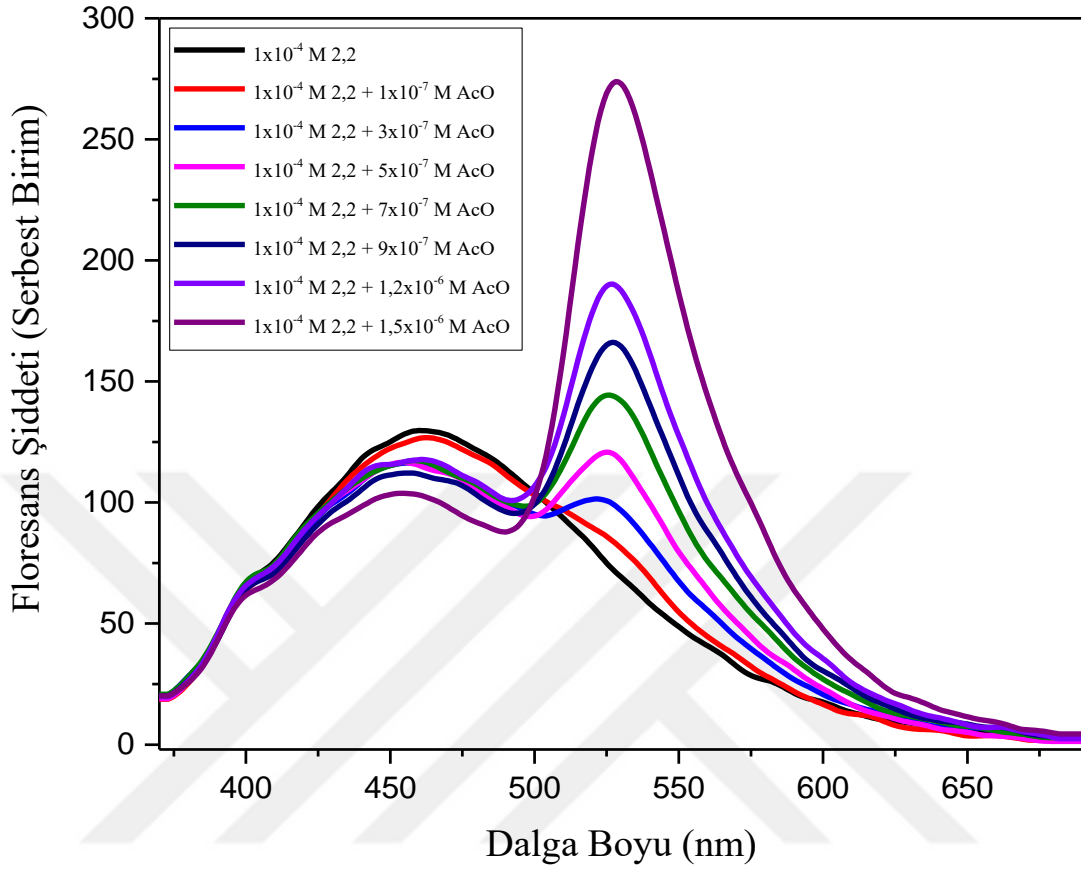
Şekil 4.8. 2,2 ile PyY molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları

Şekil 4.8 incelendiğinde Şekil 4.6 ile benzer bir durum olduğu görülmektedir. Donörün (2,2) pik şiddetinde kayda değer bir değişiklik gözlenmezken akseptör molekülün (PyY) pik şiddeti oldukça yüksektir. Bu pikin maksimumları 565-569 nm civarında gözlenmiştir. İsobestik nokta 534 nm'dedir.



Şekil 4.9. 2,2 ile FI molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları

Akseptör molekül olan FI 4,2 etkeni ile gösterdiği etkileşimine benzer etkileşimi 2,2 etkeni ile de göstermektedir. İsobestik nokta oluşmamıştır, akseptör piki ise 506-513 nm civarındadır.



Şekil 4.10. 2,2 ile AcO molekülü arasındaki floresans enerji transferi spektrumları

Spektral örtüşmenin çok iyi olduğu bu molekül ile de 2,2 etken maddesinin konsantrasyonu diğerlerinde olduğu gibi sabit tutulmuş olup akseptör molekülün (AcO) konsantrasyonunun artırılması ile donörün floresans bandında azalma gerçekleşirken akseptörün floresans bant şiddetinde bir artış söz konusudur. Bu sıralı dönüşüm etken maddenin enerjisini AcO'ya ışımali olarak aktardığının bir kanıtıdır. Bu molekül çifti için net isobestik nokta gözlenememiştir. AcO'ya ait 526 nm' de maksimuma sahip, pik şiddeti artan konsantrasyonla artan floresans piki görülmüştür.

Yapılan tüm ölçümler için tekrar denemeleri yapılarak birbirini destekleyen sonuçlar değerlendirilmiş olup uygun sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen floresans spektrumlarından gerekli hesaplamalar yapılarak tablo haline dönüştürülmüştür. İlk olarak kuantum verimleri hesaplanmıştır. Lüminesans yapan moleküllerin sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranı olarak ifade edilen kuantum veriminin, 1

değerine yakın olması beklenir. 0 değerine yaklaştıkça molekülün floresans karakterinin zayıf olduğu söylenebilir. Kuantum veriminin sıralı olarak azalması enerji transferinin bir göstergesidir.

4,2 molekülünün Fl, PyY, AcO ve SfT boyalarının misel sistemde farklı konsantrasyonlarındaki floresans kuantum verimleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 4.1. 4,2 etken maddesinin Fl, PyY, AcO ve SfT ile misel sistemde farklı konsantrasyonlardaki floresans kuantum verimleri

4,2							
[SfT] / M	ϕ_f	[AcO] / M	ϕ_f	[PyY] / M	ϕ_f	[Fl] / M	ϕ_f
0	0,254	0	0,254	0	0,254	0	0,254
1.0x10 ⁻⁶	0,220	1.0x10 ⁻⁷	0,250	1.0x10 ⁻⁷	0,244	5.0x10 ⁻⁷	0,218
2.0x10 ⁻⁶	0,190	3.0x10 ⁻⁷	0,231	2.0x10 ⁻⁷	0,207	7.0x10 ⁻⁷	0,196
3.0x10 ⁻⁶	0,154	5.0x10 ⁻⁷	0,227	3.0x10 ⁻⁷	0,203	1.0x10 ⁻⁶	0,189
4.0x10 ⁻⁶	0,146	7.0x10 ⁻⁷	0,223	4.0x10 ⁻⁷	0,198	2.0x10 ⁻⁶	0,145
5.0x10 ⁻⁶	0,142	9.0x10 ⁻⁷	0,215	5.0x10 ⁻⁷	0,193	3.0x10 ⁻⁶	0,138
6.0x10 ⁻⁶	0,125	1.2x10 ⁻⁶	0,199	6.0x10 ⁻⁷	0,187	4.0x10 ⁻⁶	0,123
7.0x10 ⁻⁶	0,115	1.5x10 ⁻⁶	0,184	7.0x10 ⁻⁷	0,187	5.0x10 ⁻⁶	0,109
8.0x10 ⁻⁶	0,106	2.0x10 ⁻⁶	0,176	8.0x10 ⁻⁷	0,173	6.0x10 ⁻⁶	0,094
1.0x10 ⁻⁵	0,099						

SDS ortamında boyar madde ilavesiyle 4,2 molekülünün kuantum verimlerinde düşüş olduğu görülmektedir. 4,2 molekülünün floresans kuantum verimlerindeki düşüş ortama eklenen kuçncır molekül (Fl, PyY, AcO ve SfT) ile kuçncleşmenin gerçekleştiğinin bir kanıtıdır. Eklenen kuçncırın konsantrasyonunun artışıyla 4,2'nin floresans karakteri zayıflamaktadır.

2,2 molekülünün SDS ortamına Fl, PyY, AcO ve SfT'nin farklı konsantrasyonlarının eklenmesiyle floresans kuantum verimleri hesaplanmış olup Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. 2,2 etken maddesinin Fl, PyY, AcO ve SfT ile misel sistemde farklı konsantrasyonlardaki floresans kuantum verimleri

2,2							
[SfT] / M	ϕ_f	[AcO] / M	ϕ_f	[PyY] / M	ϕ_f	[Fl] / M	ϕ_f
0	0,127	0	0,127	0	0,127	0	0,127
1.0x10 ⁻⁶	0,118	1.0x10 ⁻⁷	0,121	1.0x10 ⁻⁷	0,121	5.0x10 ⁻⁷	0,095
2.0x10 ⁻⁶	0,108	3.0x10 ⁻⁷	0,113	2.0x10 ⁻⁷	0,114	7.0x10 ⁻⁷	0,093
3.0x10 ⁻⁶	0,106	5.0x10 ⁻⁷	0,111	3.0x10 ⁻⁷	0,113	1.0x10 ⁻⁶	0,090
4.0x10 ⁻⁶	0,099	7.0x10 ⁻⁷	0,103	4.0x10 ⁻⁷	0,100	2.0x10 ⁻⁶	0,058
5.0x10 ⁻⁶	0,093	9.0x10 ⁻⁷	0,091	5.0x10 ⁻⁷	0,108	3.0x10 ⁻⁶	0,053
6.0x10 ⁻⁶	0,085	1.2x10 ⁻⁶	0,095	6.0x10 ⁻⁷	0,106	4.0x10 ⁻⁶	0,048
7.0x10 ⁻⁶	0,079	1.5x10 ⁻⁶	0,081	7.0x10 ⁻⁷	0,105	5.0x10 ⁻⁶	0,048
8.0x10 ⁻⁶	0,076			8.0x10 ⁻⁷	0,106		

SDS ortamında boyar madde ilavesiyle 2,2 molekülünün kuantum verimlerinde düşüş olduğu görülmektedir. Boyar madde konsantrasyonunun artışıyla ilişkili olarak kuantum verimlerinde azalma gerçekleşmiştir. Bu durum kuençleşmenin işaretidir.

Kuantum verimi hesaplamalarından sonra floresans enerji transferi parametrelerinin hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. Förster kinetiğine göre hesaplanan R_0 ve J değerleri Tablo 4.8’de verilmiştir. R_0 değeri moleküller arasındaki enerji transferinin %50 gerçekleştiği anki mesafeyi temsil etmektedir ve kritik enerji transfer mesafesi olarak bilinir. R_0 için ideal değer aralığı 10-100 Å olarak bildirilmiştir (Förster, 1959). J değeri ise spektral örtüşme alanını ifade etmektedir. Spektral örtüşme alanının büyüklüğü enerji transferinin gerçekleşme ihtimalini ifade eder.

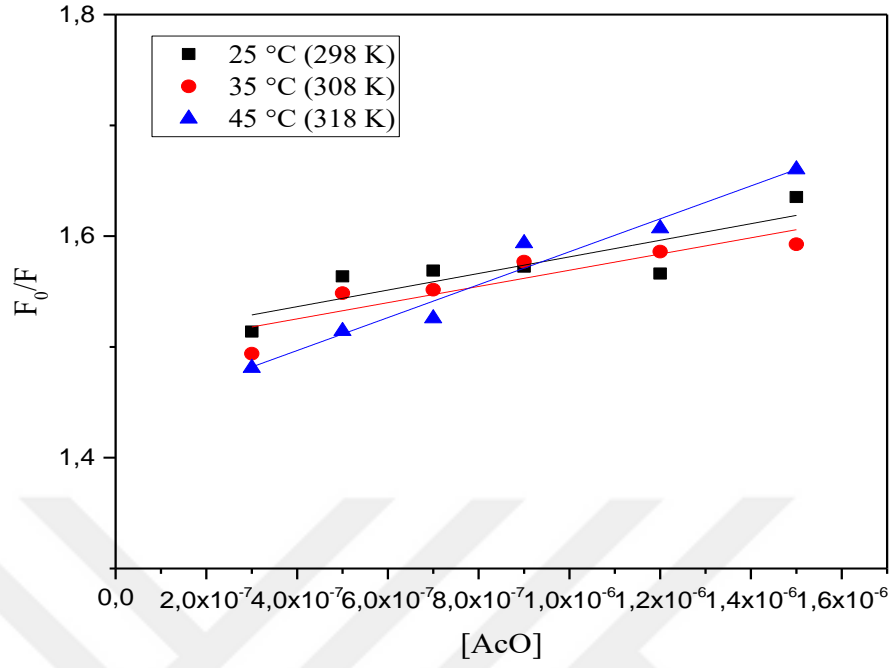
Tablo 4.3. 4,2 ve 2,2 molekülleri için hesaplanan floresans enerji transferi parametreleri

	J (M⁻¹cm⁻¹nm⁴)	R₀ (Å)
4,2 + AcO	2,12x10 ⁻¹⁵	49,98
4,2 + SfT	2,48x10 ⁻¹⁵	51,3
4,2 + PyY	1,48 x10 ⁻¹⁵	47,06
4,2 + Fl	2,08 x10 ⁻¹⁵	49,8
2,2 + AcO	1,43 x10 ⁻¹⁵	39,56
2,2 + SfT	1,57 x10 ⁻¹⁵	40,22
2,2 + PyY	9,03 x10 ⁻¹⁴	36,85
2,2 + Fl	1,54 x10 ⁻¹⁵	40,09

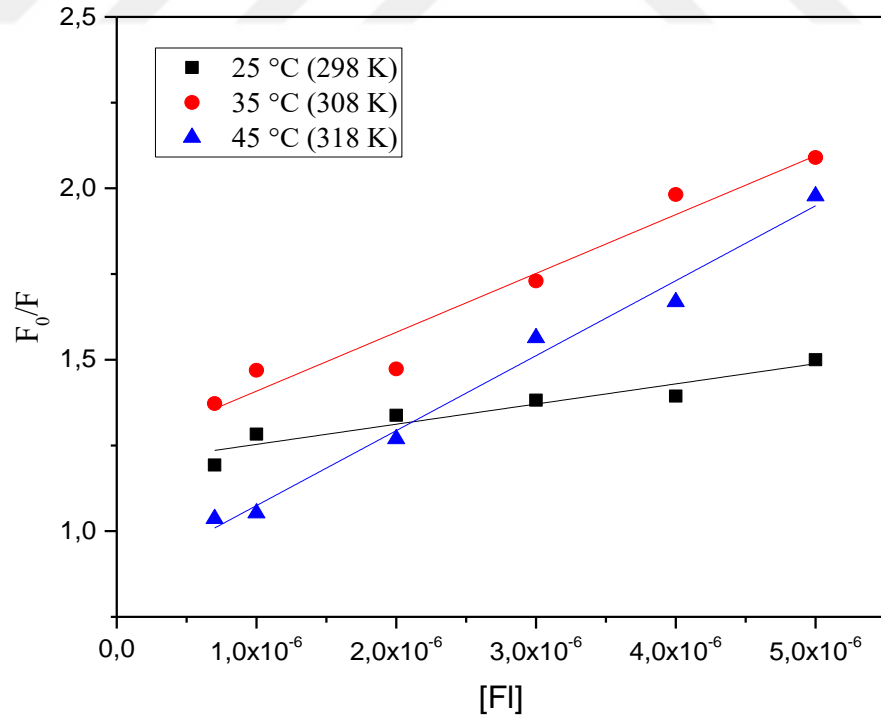
Donör-akseptör çiftleri arasında floresans enerji transferinin gerçekleştiği tablodaki R₀ değerlerine bakıldığında her bir çift için doğrulanmaktadır. Kritik enerji transfer mesafesi her bir donör-akseptör çifti için uygun aralıktadır. Ayrıca SDS misel ortamı molekülleri birbirine yaklaştırarak enerji transferinin gerçekleşmesine katkı sağlar.

Donör-akseptör çiftleri arasındaki etkileşimler 25°C, 35°C, 45°C sıcaklıklarda da gerçekleştirilmiştir. Buradaki temel amaç; canlı sistem vücut sıcaklığı olan 36,5°C yaklaşık sıcaklığını denemek ve proteinler gibi biyolojik sistemlerin yapılarının bozulduğu 45°C'deki etkileşimlerin değişimini belirlemektir.

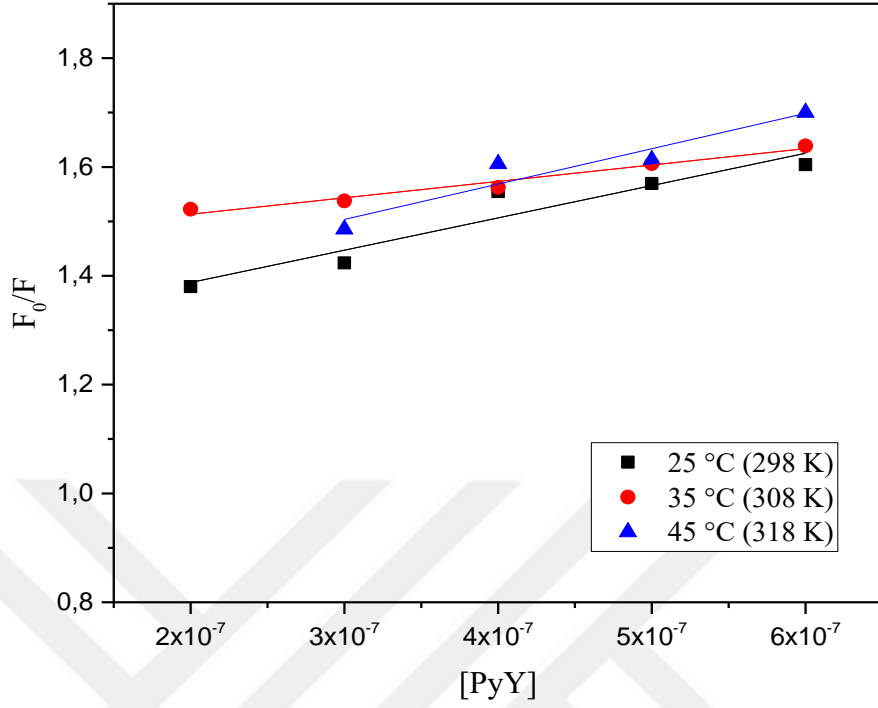
Tüm sıcaklıklarda K_{sv} değerlerini hesaplamak üzere Stern-Volmer grafikleri oluşturulmuştur. (4) nolu eşitlikte Stern-Volmer denklemi verilmiştir. Burada belirtilen K_{sv}; Stern-Volmer kuençleşme sabitini ifade etmektedir. Elde edilen grafiklerin eğiminden K_{sv} değeri elde edilir. Stern-Volmer grafikleri aşağıda gösterilmiştir.



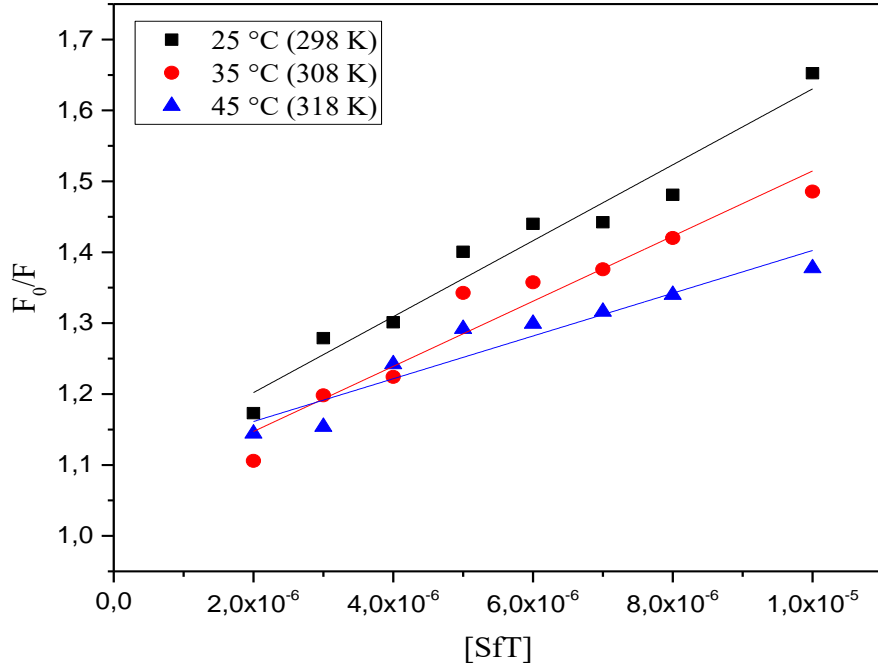
Şekil 4.11. 2,2 etken maddesi ile AcO boyasının Stern-Volmer grafiği



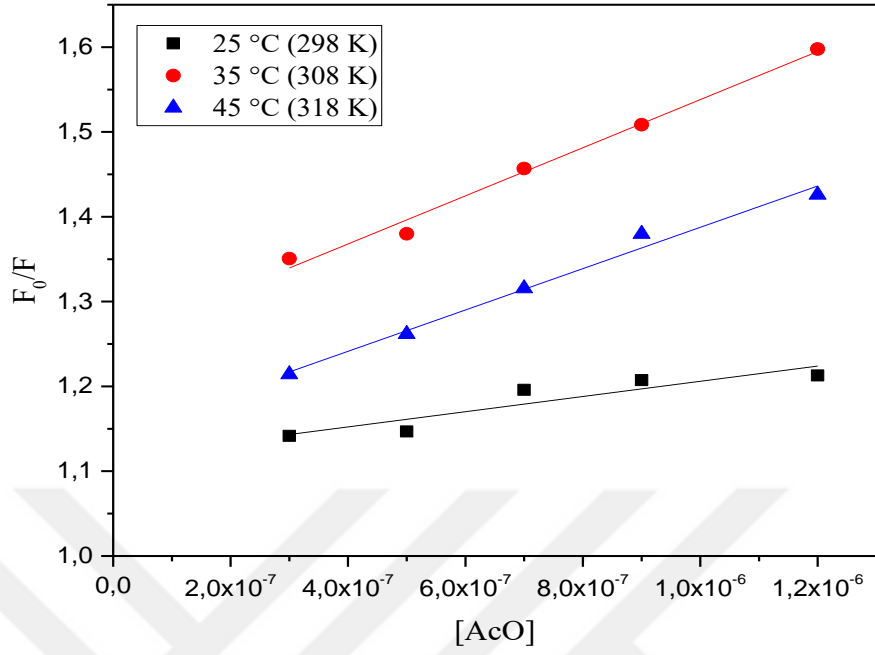
Şekil 4.12. 2,2 etken maddesi ile Fl boyasının Stern-Volmer grafiği



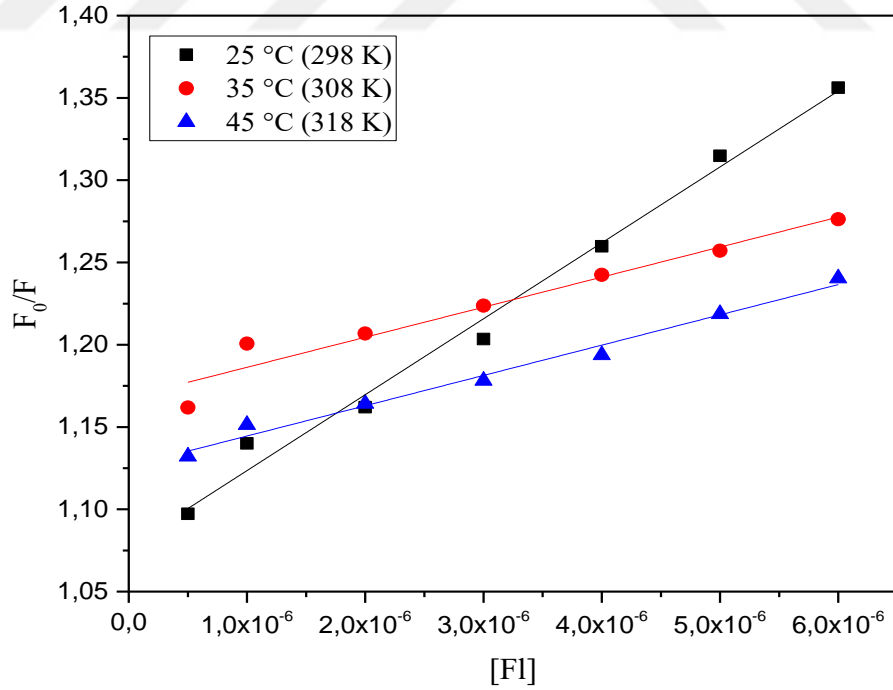
Şekil 4.13. 2,2 etken maddesi ile PyY boyasının Stern-Volmer grafiği



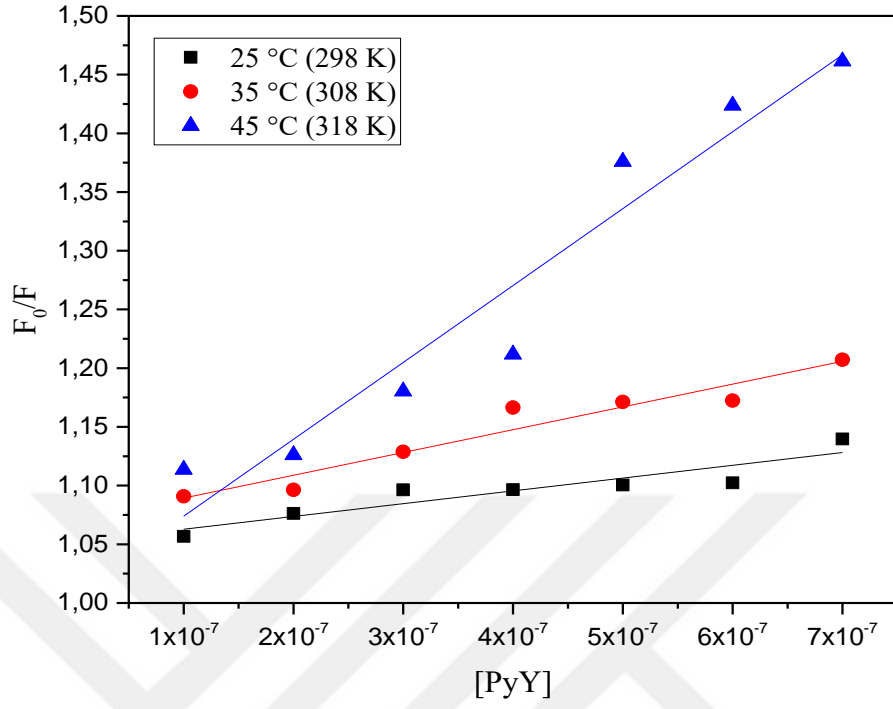
Şekil 4.14. 2,2 etken maddesi ile SfT boyasının Stern-Volmer grafiği



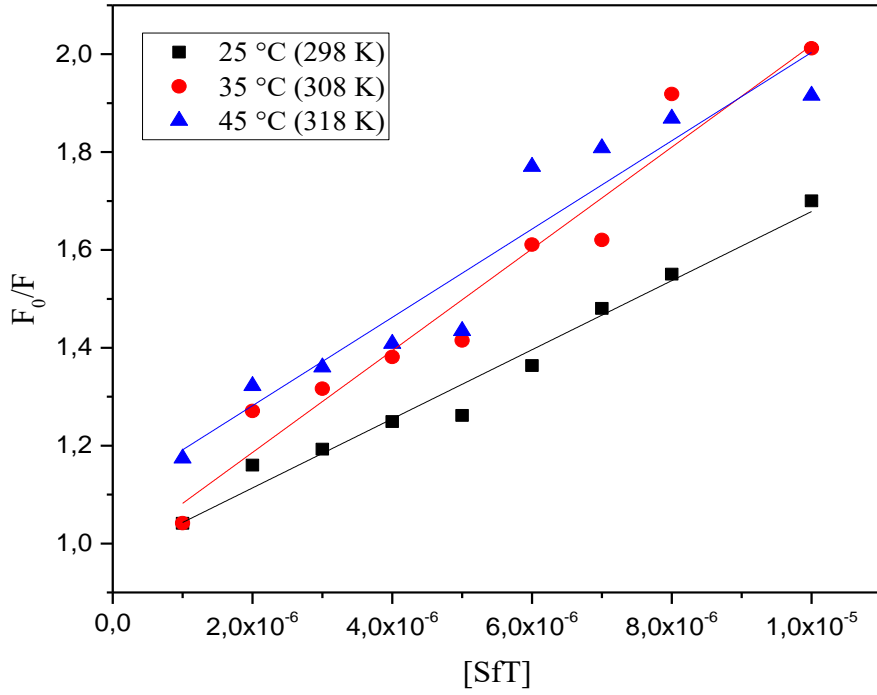
Şekil 4.15. 4,2 etken maddesi ile AcO boyasının Stern-Volmer grafiği



Şekil 4.16. 4,2 etken maddesi ile FI boyasının Stern-Volmer grafiği



Şekil 4.17. 4,2 etken maddesi ile PyY boyasının Stern-Volmer grafiği



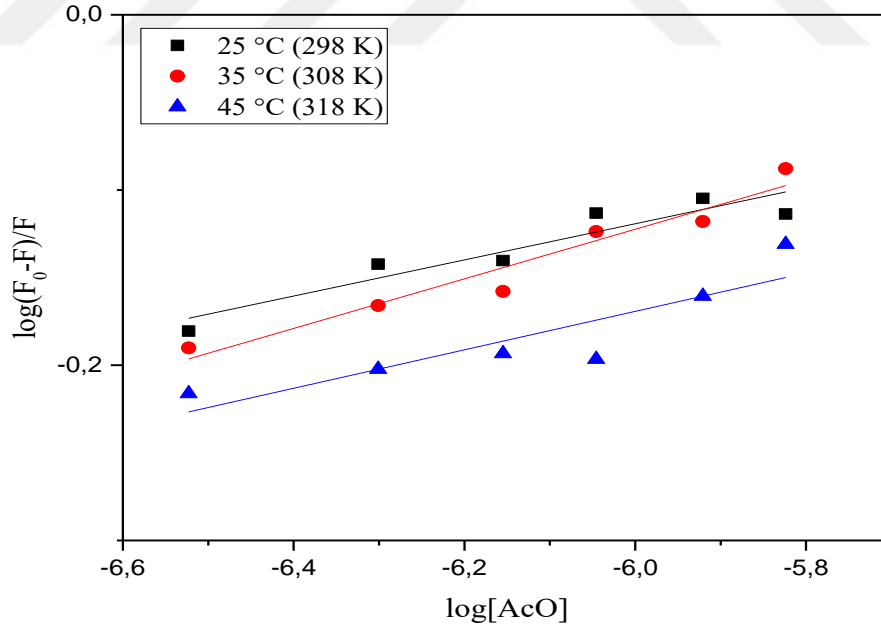
Şekil 4.18. 4,2 etken maddesi ile Sft boyasının Stern-Volmer grafiği

Stern-Volmer grafikleri incelendiğinde eğimin lineer olduğu ve artan sıcaklığa bağlı olarak genelde eğimin azaldığı görülmektedir. Bu durum kuençleşmenin dinamik olduğunu ifade etmektedir (Li, vd. 2013). Stern-Volmer grafiklerinin eğiminden faydalanılarak K_{sv} değerleri hesaplanmıştır. Tablo 4.4 ve Tablo 4.5’ de değerler belirtilmiştir.

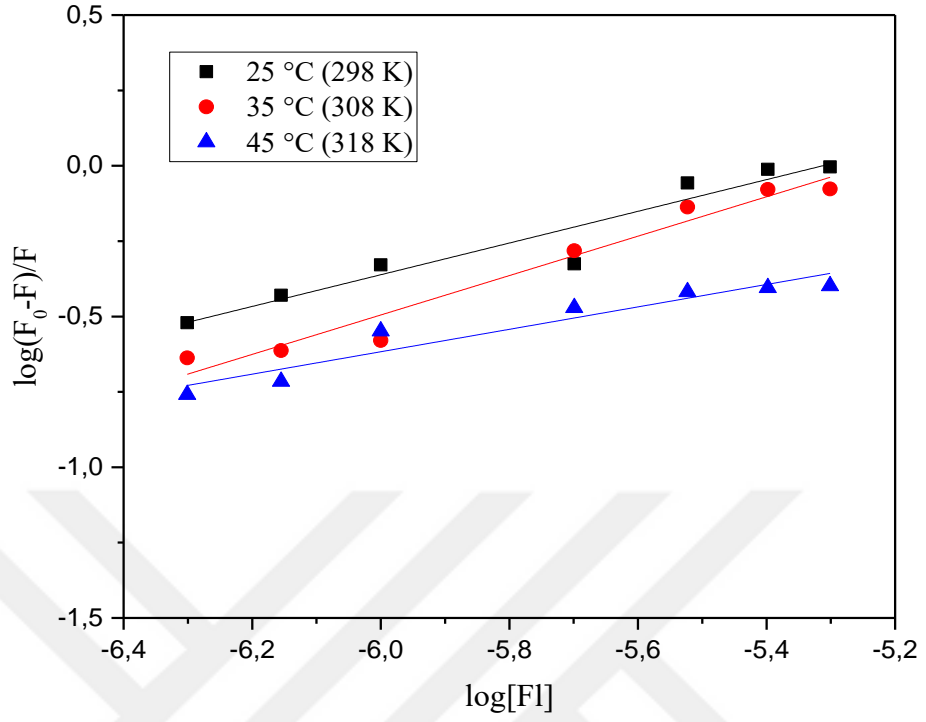
Stern-Volmer grafiklerinden kuençleşme türünün dinamik olabileceği düşünülmüştür. Bu bulgunun desteklenmesi gereklidir. Dinamik kuençleşme için; floresans kuençleşme şiddeti ile kuençür konsantrasyonu arasındaki ilişki çift logaritma ile açıklanabilir:

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_a + n \log [Q] \quad (11)$$

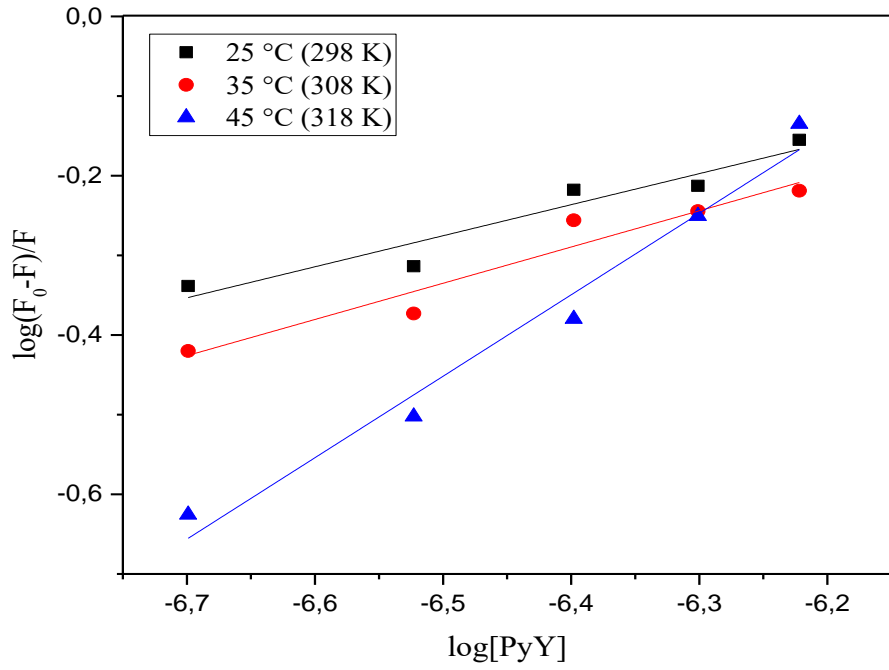
Burada K_a : bağlanma sabiti, n : bağlanma bölgesi sayısını ifade eder. $\log \frac{(F_0 - F)}{F}$ ’e karşı $\log [Q]$ grafikleri 2,2 etken maddesi için Şekil 4.19, 4.20, 4.21, 4.22’ de ve 4,2 etken maddesi için Şekil 4.23, 4.24, 4.25, 4.26’ da verilmiştir.



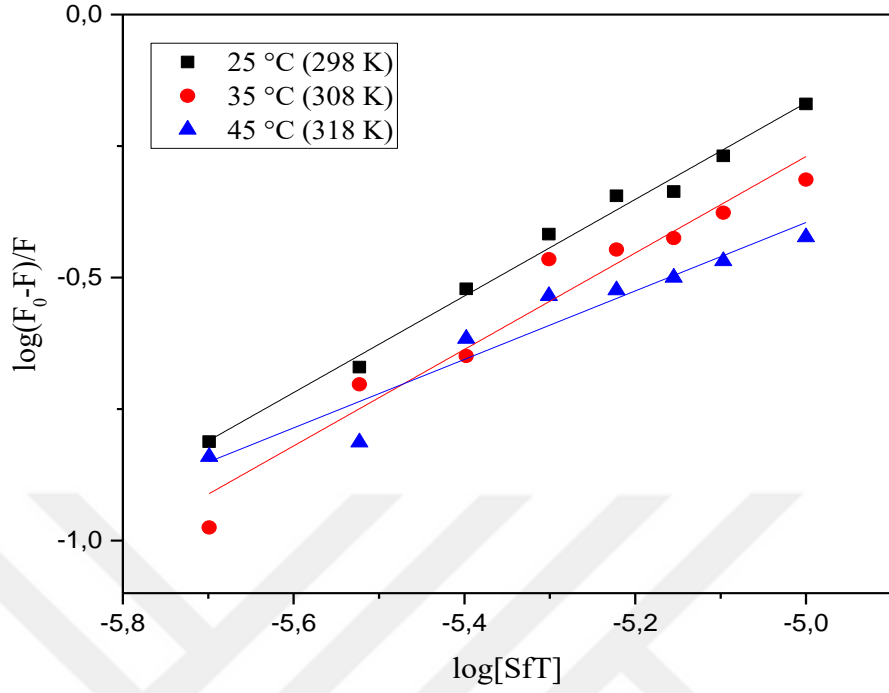
Şekil 4.19. Farklı sıcaklıklarda 2,2 etken maddesinin AcO ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği



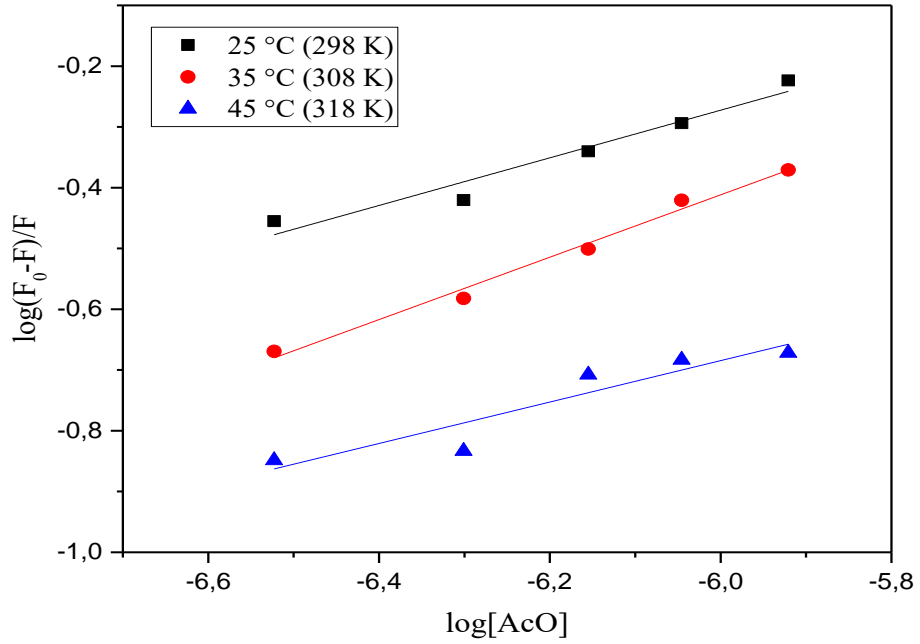
Şekil 4.20. Farklı sıcaklıklarda 2,2 etken maddesinin Fl ile kuenleşme etkilerinin çift log grafiği



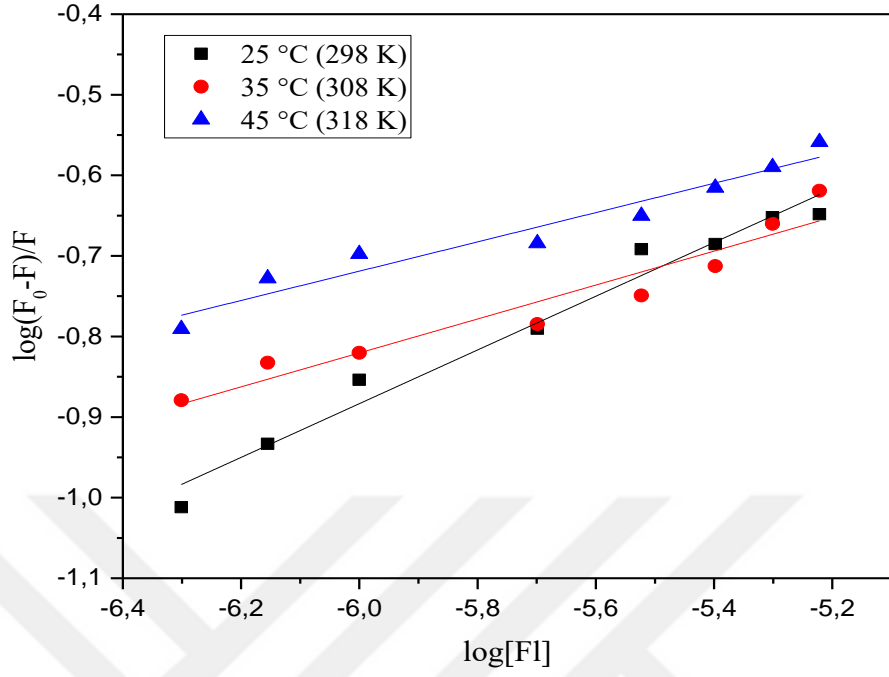
Şekil 4.21. Farklı sıcaklıklarda 2,2 etken maddesinin PyY ile kuenleşme etkilerinin çift log grafiği



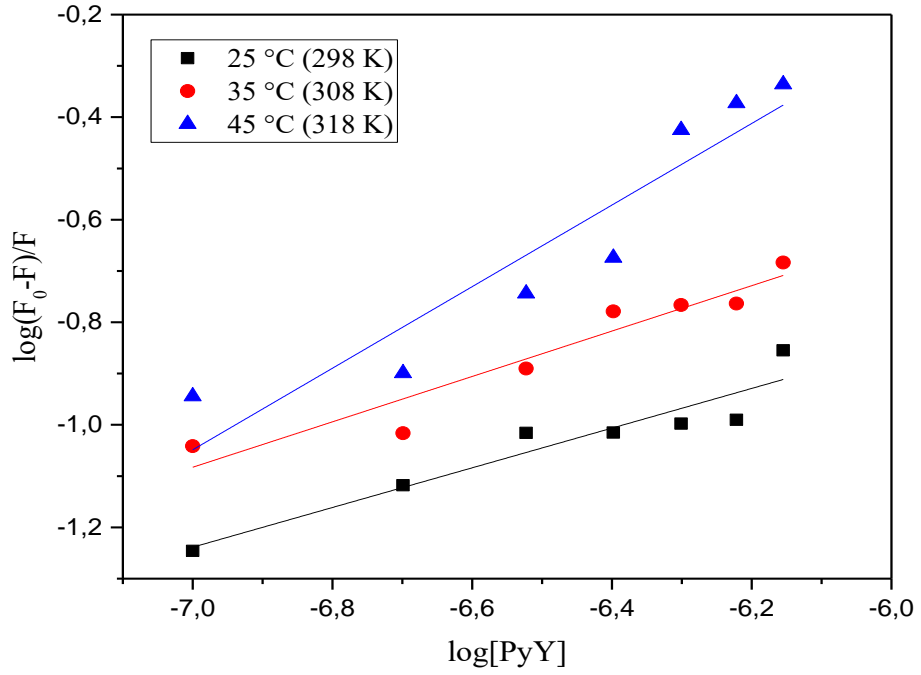
Şekil 4.22. Farklı sıcaklıklarda 2,2 etken maddesinin SfT ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği



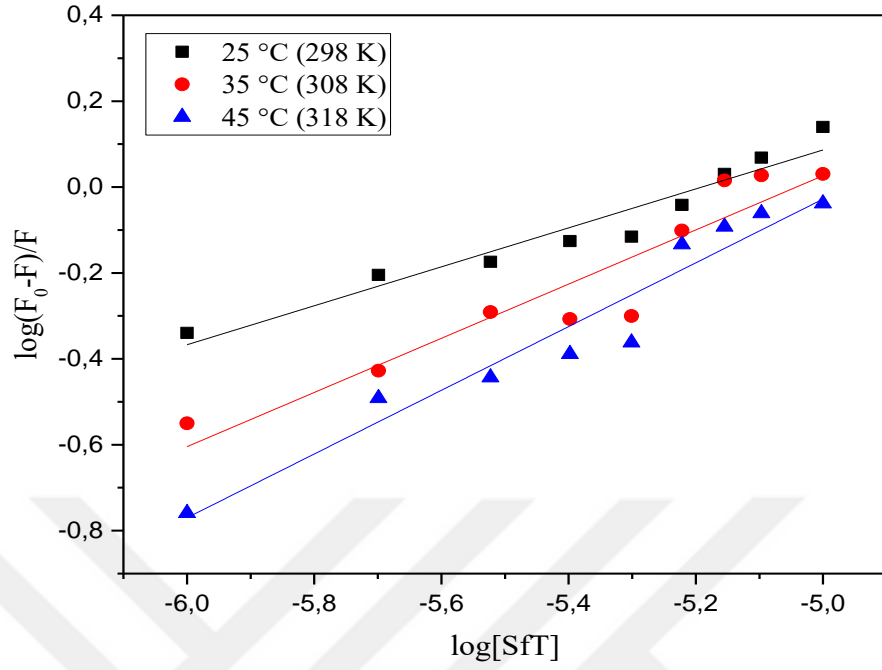
Şekil 4.23. Farklı sıcaklıklarda 4,2 etken maddesinin AcO ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği



Şekil 4.24. Farklı sıcaklıklarda 4,2 etken maddesinin Fl ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği



Şekil 4.25. Farklı sıcaklıklarda 4,2 etken maddesinin PyY ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği



Şekil 4.26. Farklı sıcaklıklarda 4,2 etken maddesinin SfT ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği

Grafiklerden elde edilen veriler hesaplanarak enerji transferi parametreleri ile birlikte Tablo 4.4 ve Tablo 4.5’ de verilmiştir. Burada ifade edilen enerji transferi parametreleri E: enerji transfer verimliliğini, r: donör-akseptör mesafesini, R²: korelasyon değerini ifade etmektedir. Değerler herbir sıcaklık için hesaplanmıştır.

Tablo 4.4. 4,2 için SDS ortamında farklı sıcaklıklarda hesaplanan değerler

Numune	Sıcaklık	$K_{sv}(M^{-1})$	$k_q(M^{-1}s^{-1})$	$K_a(M^{-1})$	E	r(Å)	n	R^2
4,2 + PyY	25°C	$1,09 \cdot 10^5$	$2,54 \cdot 10^4$	2,95.10	0,092	68,92	0,387	0,852
4,2 + PyY	35°C	$1,94 \cdot 10^5$	$4,51 \cdot 10^4$	$1,04 \cdot 10^2$	0,112	66,45	0,443	0,935
4,2 + PyY	45°C	$6,55 \cdot 10^5$	$1,52 \cdot 10^5$	$3,31 \cdot 10^4$	0,223	57,94	0,631	0,938
4,2 + AcO	25°C	$9,17 \cdot 10^4$	$2,22 \cdot 10^4$	$1,20 \cdot 10^2$	0,109	70,94	0,392	0,844
4,2 + AcO	35°C	$3,58 \cdot 10^5$	$8,66 \cdot 10^4$	$4,66 \cdot 10^2$	0,145	67,18	0,513	0,989
4,2 + AcO	45°C	$3,22 \cdot 10^5$	$7,79 \cdot 10^4$	2,29.10	0,155	66,31	0,341	0,986
4,2 + Fl	25°C	$4,73 \cdot 10^4$	$1,12 \cdot 10^4$	1,31.10	0,164	65,33	0,333	0,990
4,2 + Fl	35°C	$1,78 \cdot 10^4$	$4,21 \cdot 10^3$	2,77	0,179	64,19	0,211	0,949
4,2 + Fl	45°C	$1,79 \cdot 10^4$	$4,23 \cdot 10^3$	2,35	0,151	66,41	0,182	0,986
4,2 + SfT	25°C	$7,06 \cdot 10^4$	$1,46 \cdot 10^4$	$2,26 \cdot 10^2$	0,437	53,51	0,453	0,977
4,2 + SfT	35°C	$1,10 \cdot 10^5$	$2,27 \cdot 10^4$	$1,51 \cdot 10^3$	0,502	51,23	0,631	0,954
4,2 + SfT	45°C	$9,02 \cdot 10^4$	$1,86 \cdot 10^4$	$4,81 \cdot 10^3$	0,325	57,95	0,742	0,917

Tablo 4.5. 2,2 için SDS ortamında farklı sıcaklıklarda hesaplanan değerler

Numune	Sıcaklık	$K_{sv}(M^{-1})$	$k_q(M^{-1}s^{-1})$	$K_a(M^{-1})$	E	r(Å)	n	R^2
2,2 + PyY	25°C	$5,94 \cdot 10^5$	$1,61 \cdot 10^5$	$1,81 \cdot 10^2$	0,313	42,01	0,390	0,912
2,2 + PyY	35°C	$3,02 \cdot 10^5$	$8,19 \cdot 10^4$	$4,18 \cdot 10^2$	0,215	74,02	0,455	0,971
2,2 + PyY	45°C	$1,38 \cdot 10^6$	$3,74 \cdot 10^5$	$1,57 \cdot 10^6$	0,104	52,76	1,023	0,908
2,2 + AcO	25°C	$2,87 \cdot 10^5$	$7,40 \cdot 10^4$	3,16	0,330	44,52	0,103	0,746
2,2 + AcO	35°C	$8,38 \cdot 10^4$	$2,16 \cdot 10^4$	5,33	0,366	43,35	0,142	0,809
2,2 + AcO	45°C	$3,39 \cdot 10^5$	$8,74 \cdot 10^4$	3,08	0,332	44,45	0,110	0,964
2,2 + Fl	25°C	$4,90 \cdot 10^4$	$2,18 \cdot 10^4$	$6,22 \cdot 10^2$	0,203	50,35	0,526	0,910
2,2 + Fl	35°C	$2,01 \cdot 10^5$	$8,96 \cdot 10^4$	$2,67 \cdot 10^3$	0,297	46,28	0,654	0,956
2,2 + Fl	45°C	$2,13 \cdot 10^5$	$9,50 \cdot 10^4$	4,12.10	0,337	44,88	0,372	0,987
2,2 + SfT	25°C	$5,98 \cdot 10^4$	$1,55 \cdot 10^4$	$2,65 \cdot 10^4$	0,489	40,52	0,918	0,957
2,2 + SfT	35°C	$5,16 \cdot 10^4$	$1,33 \cdot 10^4$	$2,07 \cdot 10^4$	0,192	51,10	0,917	0,939
2,2 + SfT	45°C	$3,66 \cdot 10^4$	$9,47 \cdot 10^3$	$7,23 \cdot 10^2$	0,178	51,90	0,651	0,907

Tablo 4.4 ve 4.5’deki parametrelerden K_a değeri çift log grafiklerinden elde edilmiştir ve bu değerin büyüklüğü moleküller arasında etkileşimin güçlü olduğunu ifade eder. Burdaki n değeri bağlanma bölgesi sayısıdır ve 1 değeri civarında olması donör-akseptör çiftinin tek bölgeden etkileştiğini göstermektedir (Ghosh, vd. 2016; Xiao, vd. 2009). E değeri enerji transferi verimliliği olarak donör-akseptör çifti arasında enerji transferinin gerçekleşme oranını ifade etmektedir. 0-1 arasında değer alır ve 1’e yakın olması enerji transferinin gerçekleştiğini ifade eder. Burada belirtilen r değerinin 10 nm’nin altında olması ise moleküllerin enerji transferini gerçekleştirmek için yeterince yakın olduğunu göstermektedir. R^2 korelasyon değerinin yüksek olması doğruluğu işaret etmektedir. Sıcaklık artışıyla K_{SV} değerinin azalması da kuençleşme türünün dinamik olduğunu işaret eder (Ariga, vd. 2017). 4,2 – Fl çifti ve 2,2 – SFT ikilisinde bu durum gözlenmektedir.

Tablolarda verilen değerlere dayanarak enerji transfer verimliliğinin en yüksek olduğu etkileşim 25°C ’de 2,2 + SFT etkileşimidir. Donör-akseptör arasındaki mesafenin en yakın olduğu etkileşim ise 25°C ’de 2,2 + SFT olduğu anlaşılmaktadır.

Sıcaklık çalışmalarının tamamlanmasının ardından termodinamik parametreler hesaplanmıştır. Entalpi (ΔH^0), Entropi (ΔS^0) ve Gibbs enerjisi (ΔG^0) değerleri hesaplanmış ve 2,2 molekülü için Tablo 4.6’ da 4,2 molekülü için Tablo 4.7’ de verilmiştir.

Tablo 4.6. 2,2 ile boyar maddeler için hesaplanan termodinamik parametreler

	ΔH^0 (kJ mol ⁻¹)	ΔS^0 (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG^0 (kJ mol ⁻¹)
2,2 + AcO	-24,54	0,08	-47,50
2,2 + Fl	-166,84	0,58	-325,22
2,2 + PyY	-367,19	1,26	-711,11
2,2 + SFT	-128,15	0,46	-253,89

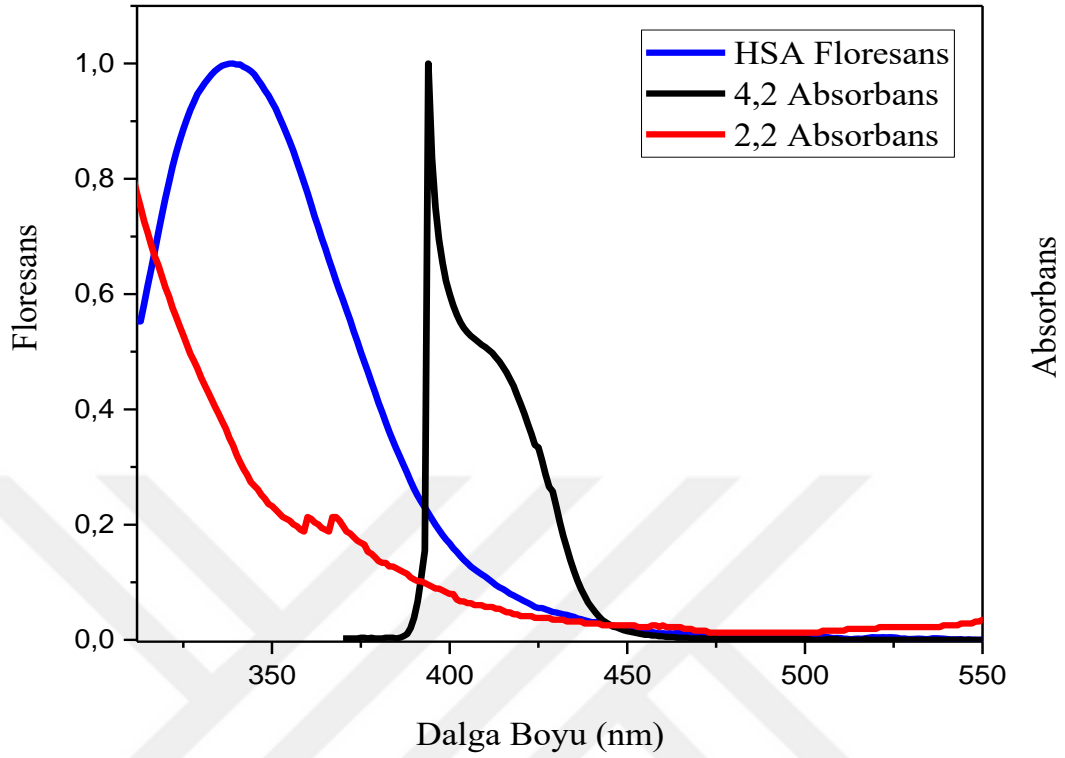
Tablo 4.7. 4,2 ile boyar maddeler için hesaplanan termodinamik parametreler

	ΔH^0 (kJ mol ⁻¹)	ΔS^0 (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG^0 (kJ mol ⁻¹)
4,2 + AcO	-164,44	0,56	-316,63
4,2 + Fl	-74,69	0,25	-143,29
4,2 + PyY	-119,24	0,41	-231,07
4,2 + SfT	-53,07	0,20	-106,92

Her iki tabloda da görüleceği üzere hem 4,2 hem de 2,2 molekülünün akseptör moleküllerle etkileşimlerine ait ΔG^0 değerleri negatif değer almıştır. ΔG^0 değerinin negatif olması bu etkileşimlerin kendiliğinden gerçekleştiğini ifade eder (Ariga, vd. 2017). Buna ek olarak tablo 4.12 ve 4.13’ den ΔH^0 değerlerinin negatif, ΔS^0 değerlerinin ise pozitif olduğu görülmektedir. ΔH^0 değerlerinin negatif ve ΔS^0 değerlerinin de pozitif değer alması donör-akseptör arasındaki etkileşimin esasen elektrostatik olduğunun işaretidir (Li, vd. 2013).

4.2. İnsan Serum Albumini (HSA) İle Etken Maddelerinin (2,2 & 4,2) Etkileşimleri

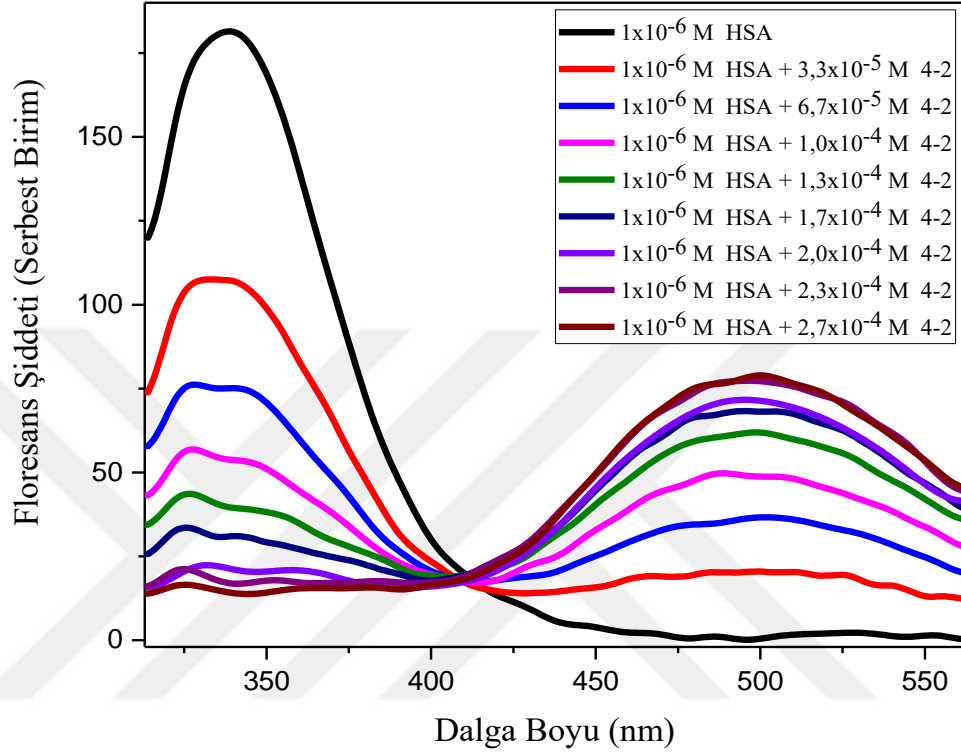
Çalışmanın ikinci aşaması olarak floresans enerji transferi insan serum albümini (HSA) ile 2,2 ve 4,2 molekülleri arasında incelenmiştir. Floresans enerji transferinde iki molekül çifti arasında enerji transferinin gerçekleşmesi için temel şartlardan olan, donörün (HSA) floresans spektrumu ile akseptörün (4,2 / 2,2) absorpsiyon spektrumlarının örtüşmesi durumu incelenmiş ve bu örtüşmenin her iki molekül için de iyi oranda gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu örtüşme, çalışmanın uygunluğu hakkında yol gösterici niteliktedir. Bu çalışmada donör (HSA) konsantrasyonu 1.10^{-6} M, akseptör (4,2, 2,2) konsantrasyonu 1.10^{-4} M olarak çalışılmıştır. Ayrıca etken moleküllerin (4,2 / 2,2) HSA ile arasında gerçekleşeceği öngörülen enerji transferinin bu moleküllerin proteinlerle bağlanmalarını ifade etmesi beklenmektedir. Örtüşmenin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla spektrumlar normalize edilerek aynı grafik üzerinde gösterilmiştir. Belirtilen spektrumlar Şekil 4.27’ de verilmiştir.



Şekil 4.27. 4,2 ve 2,2 etken maddelerinin absorpsiyon spektrumları ile HSA'nın floresans spektrumları arasındaki spektral örtüşme

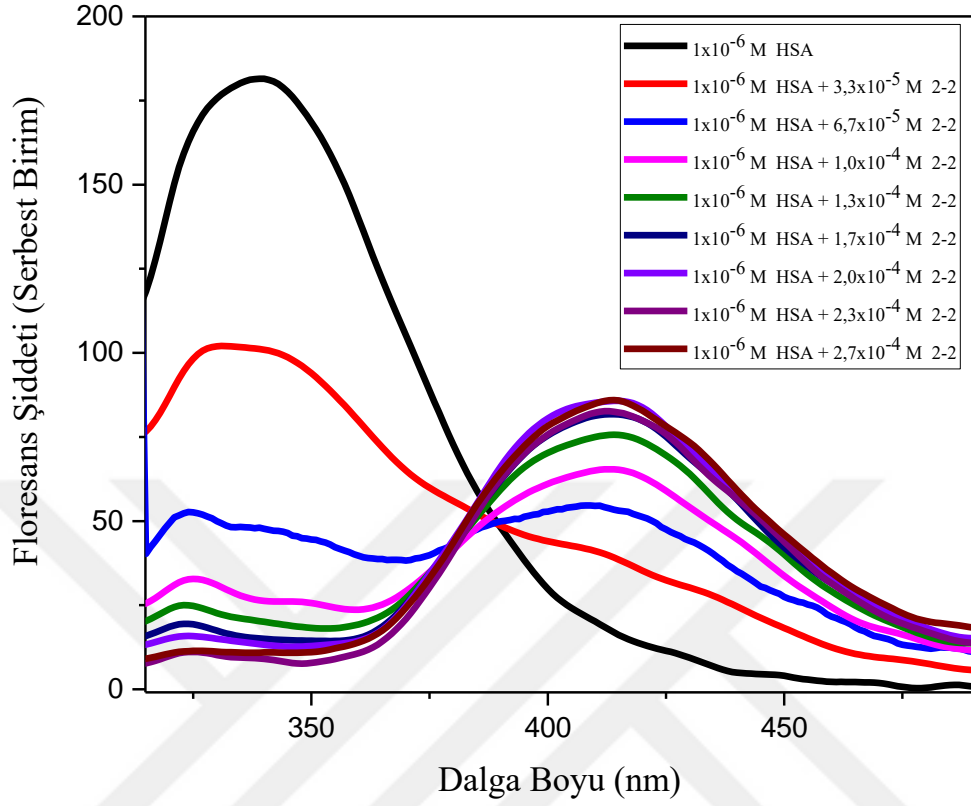
Floresans enerji transferi çalışması 2,2 ve 4,2 molekülleri ile HSA arasında denenmiştir. Bu çalışmada HSA donör, 2,2 ve 4,2 molekülleri akseptördür. HSA, PBS tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Çalışmada HSA konsantrasyonu 1.10^{-6} olarak sabit tutulup etken madde konsantrasyonu artırılarak 4 mL'lik numuneler hazırlanmıştır. Hazırlanan numunelerde tam çözünme sağlanmaya çalışılmıştır. Fakat tam çözünme meydana gelmediği için vortex yardımıyla çözünme sağlanmaya çalışılmıştır. Bu durumda da HSA yapısında bozulmalar meydana gelmiş olup ölçümler hata ile sonuçlanmıştır. Ardından $3,33.10^{-5}$ ile $2,33.10^{-4}$ aralığındaki etken madde konsantrasyonlarında titrasyon metodu kullanılarak işlem yapılmıştır. Bu metotta PBS tamponunda sabit konsantrasyonda hazırlanan HSA'ya 4,2 ve 2,2 etkenleri artan konsantrasyonlarda pipetlenerek ultrasonikasyonla dağılması sağlanıp ardından floresans spektrumları alınmıştır. HSA ortamı için alınan ölçümlerde uyarma dalga boyu 290 nm, emisyon aralığı 305-570 nm olup slit 5-10 olarak çalışılmıştır. Yapılan ölçümlerde ise HSA'nın floresans bandında azalmaya karşın artan akseptör konsantrasyonu ile akseptör floresans bandında artış

gözlenmiştir. HSA ile 4,2 ve HSA ile 2,2 molekülü arasındaki etkileşimi gösteren floresans spektrumları sırasıyla Şekil 4.28 ve Şekil 4.29’ da verilmiştir;



Şekil 4.28. HSA ile 4,2 etken maddesinin floresans spektrumları

HSA'nın donör, 4,2'nin ise akseptör olarak davranışı Şekil 4.28'de görülmektedir. Sabit HSA konsantrasyonuna karşı 4,2'nin artan konsantrasyonu ile HSA'nın floresans şiddeti sönümlenirken 495 nm'de pik maksimumuna sahip yeni bant 4,2'nin floresans pikidir. Bu yeni pikin şiddeti 4,2 molekülünün konsantrasyonunun artışıyla kademeli olarak artmaktadır. HSA ile 4,2 molekülü arasındaki enerji transferinin bir ifadesi olan bu spektrumda 411 nm'de isobestik nokta gözlenmiştir.



Şekil 4.29. HSA ile 2,2 etken maddesinin floresans spektrumları

HSA ile diğerk etken molekül 2,2 arasındaki floresans enerji transferini gösteren bu spektrumda 4,2 ile benzer davranış görülmektedir. Spektrum 382 nm’ de isobestik noktaya sahiptir. Akseptörün konsantrasyonundaki artış ile donör floresansı sönerken 413 nm’ de pik maksimumuna sahip akseptörün floresansı gözlenmiştir.

Şekil 4.28 ve Şekil 4.29’dan 4,2 ve 2,2 moleküllerinin bulunduğu HSA ortamının floresans kuantum verimleri hesaplanarak Tablo 4.8 ve Tablo 4.9’ da sırasıyla verilmiştir;

Tablo 4.8. HSA' nın 4,2 molekülünün farklı konsantrasyonlarındaki floresans kuantum verimleri

HSA	
[4,2] / M	ϕ_f
0	0,445
$3,33 \times 10^{-5}$	0,250
$6,67 \times 10^{-5}$	0,157
$1,00 \times 10^{-4}$	0,103
$1,33 \times 10^{-4}$	0,060
$1,67 \times 10^{-4}$	0,041
$2,00 \times 10^{-4}$	0,020
$2,33 \times 10^{-4}$	0,008
$2,67 \times 10^{-4}$	0,005

Tablo 4.9. HSA' nın 2,2 molekülünün farklı konsantrasyonlarındaki floresans kuantum verimleri

HSA	
[2,2] / M	ϕ_f
0	0,445
$3,33 \times 10^{-5}$	0,228
$6,67 \times 10^{-5}$	0,116
$1,00 \times 10^{-4}$	0,064
$1,33 \times 10^{-4}$	0,040
$1,67 \times 10^{-4}$	0,024
$2,00 \times 10^{-4}$	0,020
$2,33 \times 10^{-4}$	0,020
$2,67 \times 10^{-4}$	0,008

Tablodaki değerler incelediğinde HSA'nın kuantum veriminin yüksek olduğu ve artan konsantrasyonda etken madde ilavesiyle kuantum veriminde azalmalar meydana geldiği anlaşılmaktadır. Kuantum verimindeki azalmalar enerji transferinin ve dolayısıyla floresans kuenęleşmenin bir sonucudur.

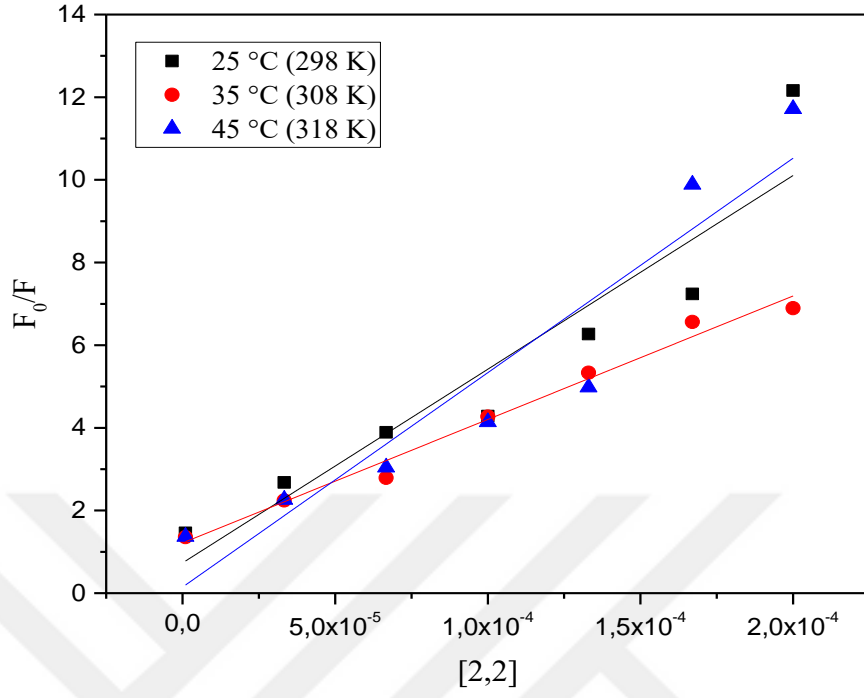
Kuantum verimleri hesaplamalarından sonra floresans enerji transferi parametreleri de hesaplanmıştır. Hesaplanan R_0 ve J değerleri Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10. Hesaplanan floresans enerji transferi parametreleri (HSA)

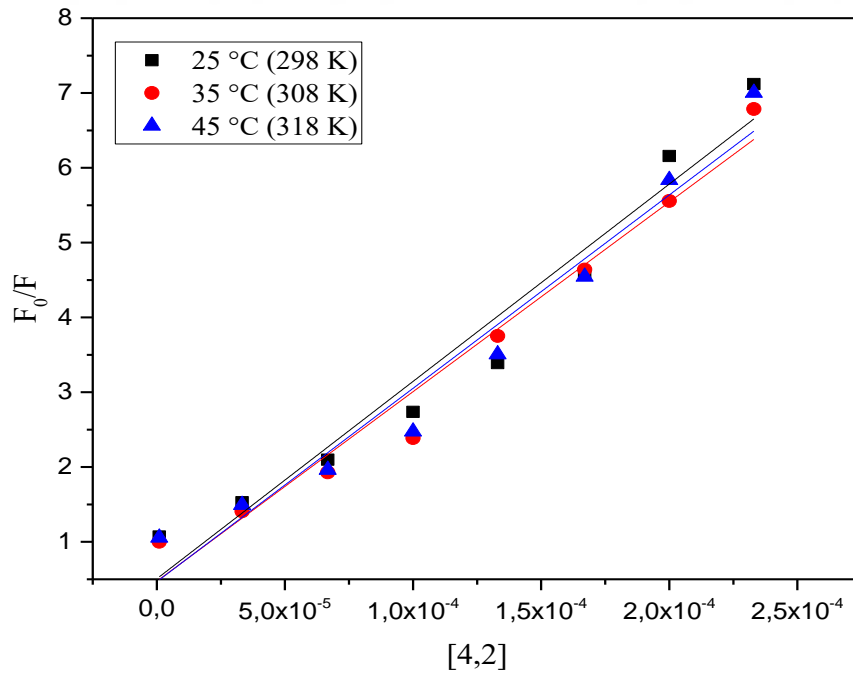
	J ($M^{-1}cm^{-1}nm^4$)	R_0 (Å)
HSA + 4,2	$6,22 \times 10^{-14}$	41,41
HSA + 2,2	$7,94 \times 10^{-13}$	29,38

R_0 değeri hem HSA – 4,2 etkileşiminin hem de HSA – 2,2 etkileşiminin geręekleşebilmesi için insan serum albümin (HSA) ve etken molekül (2,2 ve 4,2) arasındaki mesafenin uygun olduğunu ifade etmektedir.

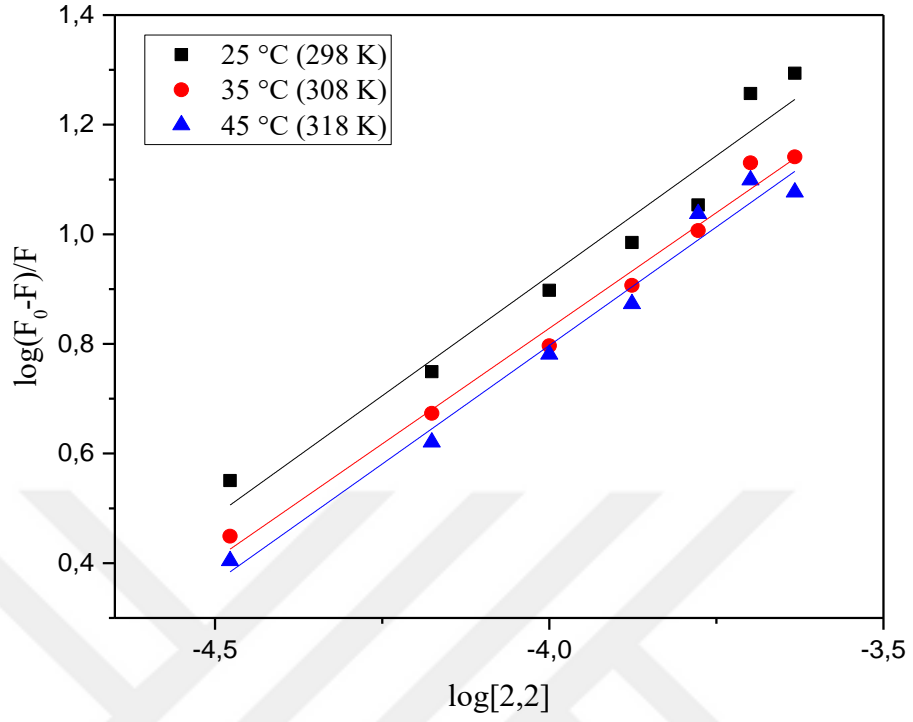
Bu alışma 25°C, 35°C, 45°C sıcaklıklarda tekrar edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm sıcaklıklarda K_{sv} ve k_q değerlerini hesaplamak üzere Stern-Volmer grafikleri oluşturulmuştur. Stern-Volmer grafikleri Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de verilmiştir. Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'de de sırasıyla 2,2 ve 4,2 molekülleriyle arasındaki floresans kuenęleşmesinde yol gösterici olan $\log \frac{(F_0-F)}{F}$, e karşı $\log[Q]$ grafikleri verilmiştir.



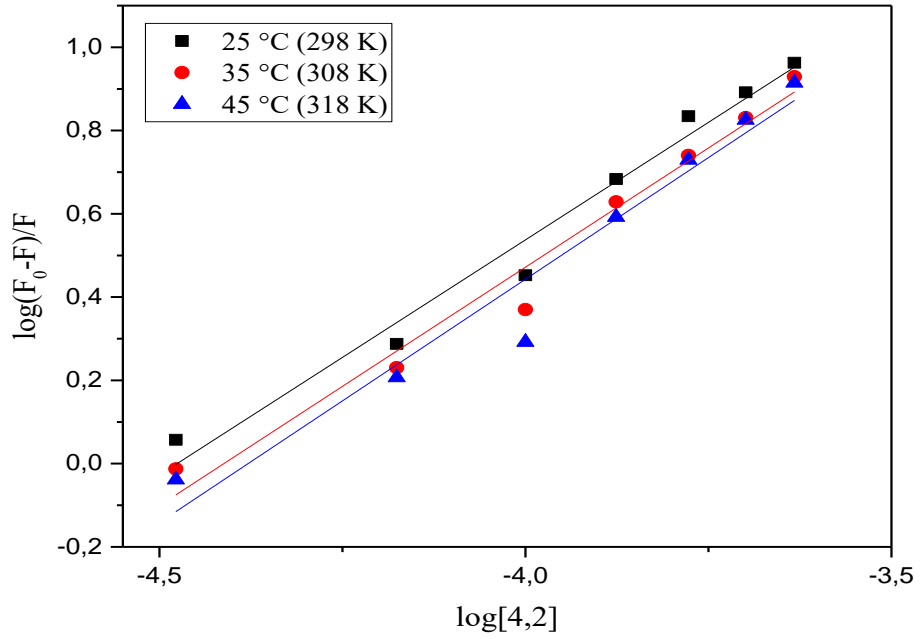
Şekil 4.30. HSA ile 2,2 etken maddelerinin Stern-Volmer grafiği



Şekil 4.31. HSA ile 4,2 etken maddelerinin Stern-Volmer grafiği



Şekil 4.32. Farklı sıcaklıklarda HSA'nın 2,2 etken maddesi ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği



Şekil 4.33. Farklı sıcaklıklarda HSA'nın 4,2 etken maddesi ile kuençleşme etkilerinin çift log grafiği

Grafiklerden elde edilen datalardan ilgili formüller yardımıyla Tablo 4.11'deki parametreler elde edilmiştir. Ayrıca Tablo 4.11'de enerji transferi parametreleri de verilmiştir.

Tablo 4.11. HSA ile 2,2 ve 4,2 etken maddeleri için farklı sıcaklıklarda hesaplanan değerler

Numuneler	Sıcaklık	$K_{sv}(M^{-1})$	$k_q(M^{-1}s^{-1})$	$K_a(M^{-1})$	E	$r(\text{Å})$	n	R^2
HSA + 4,2	25°C	$2,64.10^4$	$2,64.10^{12}$	$1,13.10^5$	0,710	35,67	1,129	0,960
HSA + 4,2	35°C	$2,53.10^4$	$2,53.10^{12}$	$1,13.10^5$	0,691	36,21	1,145	0,971
HSA + 4,2	45°C	$2,58.10^4$	$2,58.10^{12}$	$1,31.10^5$	0,701	35,93	1,169	0,961
HSA + 2,2	25°C	$4,69.10^4$	$4,69.10^{12}$	$2,68.10^4$	0,852	21,95	0,876	0,891
HSA + 2,2	35°C	$2,99.10^4$	$2,99.10^{12}$	$1,60.10^4$	0,823	22,74	0,844	0,985
HSA + 2,2	45°C	$5,19.10^4$	$5,19.10^{12}$	$1,80.10^4$	0,835	22,42	0,865	0,892

Burada HSA için hesaplanan kuenleşme sabiti oranları (k_q), HSA'nın floresans ömrü (τ_0) 10^{-8} s olarak alınmasıyla hesaplanmıştır (Ariga, vd. 2017; Li, vd. 2013). Biyomoleküller için τ_0 genel olarak 10^{-8} s alınmaktadır. Stern-Volmer hız sabitinin büyük değer alması enerji transferinin gerçekleşme oranının yüksek olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilir. r değeri donör-akseptör arası kritik mesafeyi ifade eder ve 8nm'nin altında olması enerji transferinin gerçekleştiğinin göstergesidir (Ariga, vd. 2017). n değeri bağlanma bölgesi sayısını ifade eder. Tablodaki n değerlerine bakılarak HSA ile etken molekülleri arasındaki bağlanmanın gerçekleştiği ve tek bölgeden olduğu söylenebilir.

Çalışılan maddelerin bağlanmasını sağlayan kuvvetler hidrofobik, elektrostatik, Van der Waals ve hidrojen bağı etkileşimleri dahil olmak üzere çeşitli zayıf kovalent olmayan etkileşimlerden oluşabilir. Moleküllerimizin kompleksleşmesiyle ilişkili zayıf etkileşimler hakkında daha fazla bilgi edinmek için termodinamik parametreleri belirlenmiştir. Hesaplanan ΔH^0 (entalpi değişimi), ΔS^0 (entropi değişimi) ve ΔG^0 (Gibbs serbest enerji değişimi) değerleri aşağıdaki Tablo 4.14' de verilmiştir.

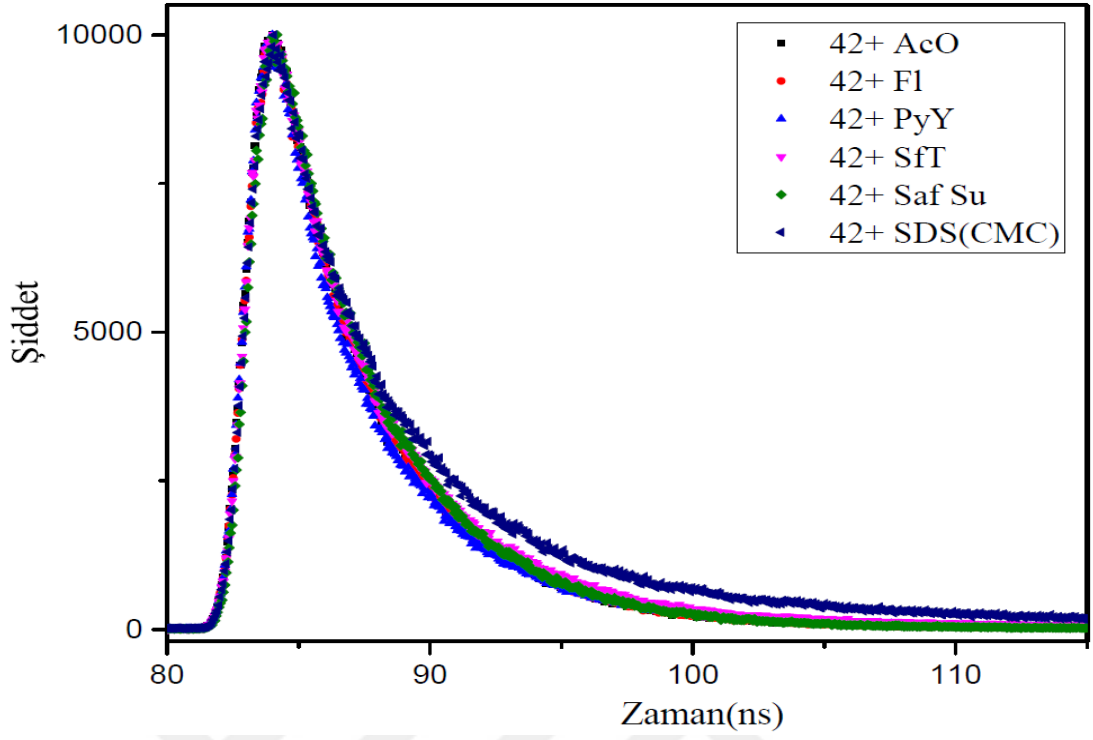
Tablo 4.12. 2,2 ve 4,2 etken maddesi için hesaplanan termodinamik parametreler

	ΔH^0 (kJ mol ⁻¹)	ΔS^0 (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG^0 (kJ mol ⁻¹)
HSA + 2,2	-12,02	0,06	-28,67
HSA + 4,2	-4,87	0,04	-15,09

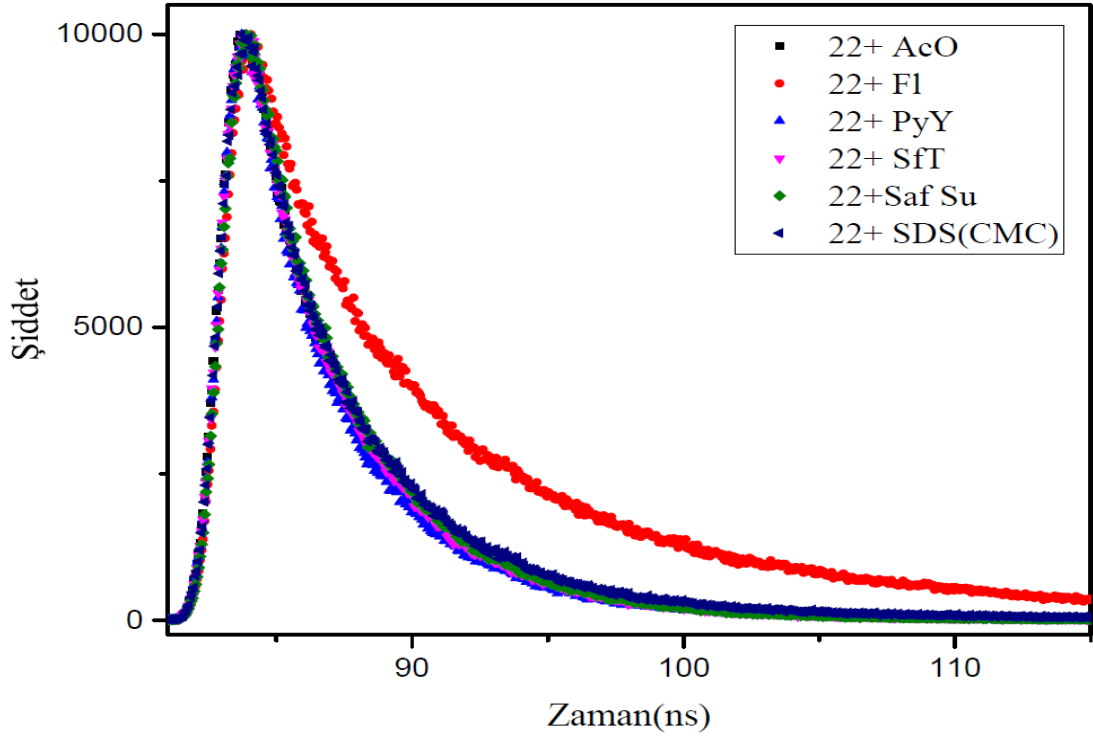
Tablodan anlaşılacağı üzere hem 4,2 hem de 2,2 molekülünün HSA ile etkileşimlerine ait ΔG^0 ve ΔH^0 değerleri negatif, ΔS^0 değerleri ise pozitif değer almıştır. ΔG^0 değerinin negatif olması bu etkileşimlerin kendiliğinden gerçekleştiğini ifade ederken (Ariga, vd. 2017) ΔH^0 değerlerinin negatif ve ΔS^0 değerlerinin de pozitif değer alması donör-akseptör arasındaki etkileşimin temelde elektrostatik olduğunu göstermektedir (Li, vd. 2013).

4.3. Floresans Yaşam Ömürlerinin (Lifetime) Belirlenmesi

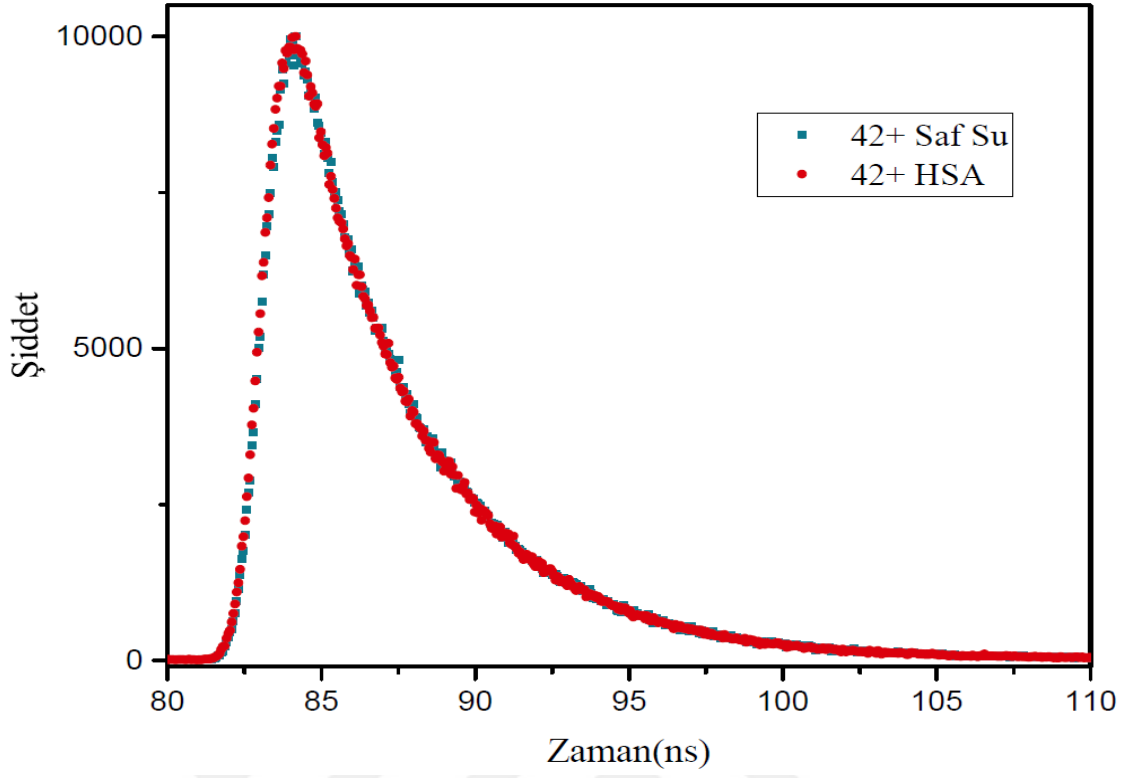
Çalışmanın bir sonraki aşaması, bu tez çalışmasının esasını teşkil eden iki pirazolin türevi molekülün floresans yaşam ömürlerinin belirlenmesidir. 2,2 ve 4,2 moleküllerinin saf suda, HSA'da ve SDS'de floresans durulmaları ölçülmüştür. 4,2 ve 2,2 molekülleri için hem SDS hem de HSA ortamında elde edilen floresans durulma spektrumları Şekil 4.36, 4.37, 4.38 ve 4.39' da verilmiştir.



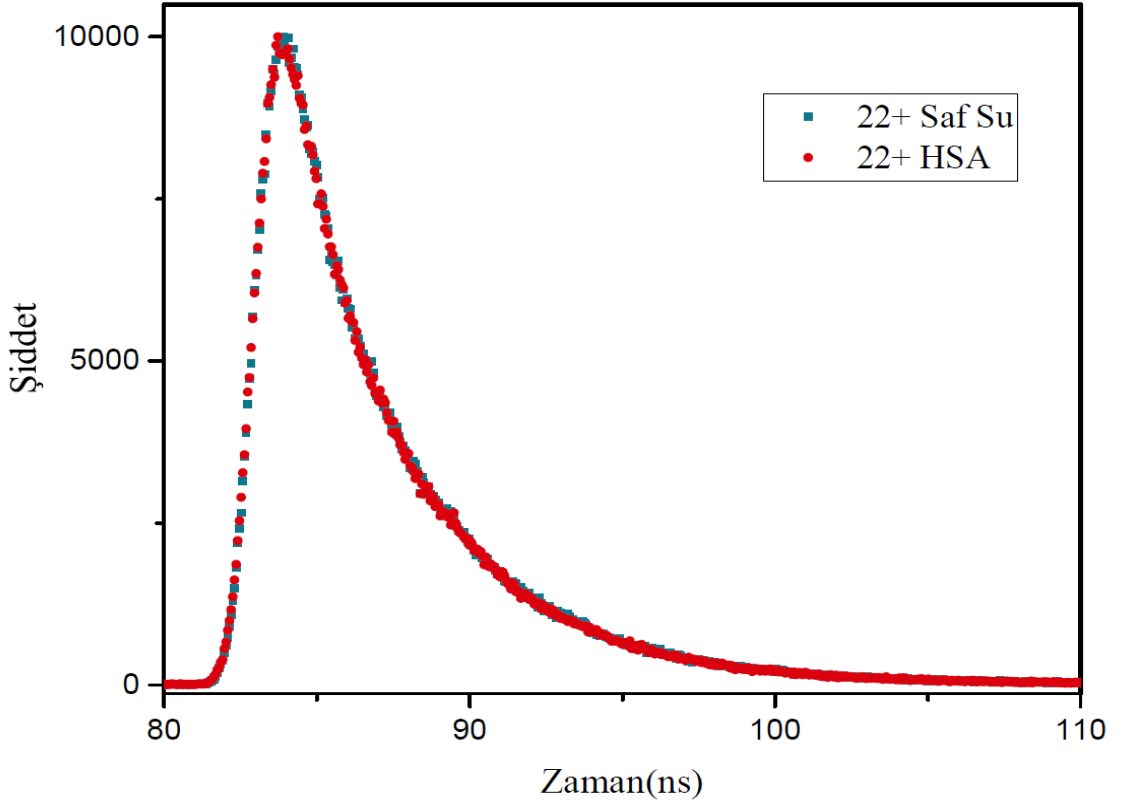
Şekil 4.34. 4,2 molekülünün SDS ortamında AcO, SfT, PyY ve Fl molekülleri ile etkileşimine ait floresans durulma spektrumları



Şekil 4.35. 2,2 molekülünün SDS ortamında AcO, SfT, PyY ve Fl molekülleri ile etkileşimine ait floresans durulma spektrumları



Şekil 4.36. 4,2 molekülünün HSA ile etkileşimine ait floresans durulma spektrumu



Şekil 4.37. 2,2 molekülünün HSA ile etkileşimine ait floresans durulma spektrum

Tek foton sayma tekniğine bağı olarak ölçüm yapan Horiba Jobin Yvon cihazı ile yapılan floresans ömür ölçümlerinden sonra cihazın yazılımı ile hesaplanan parametreler Tablo 4.13'de verilmiştir.

Tablo 4.13. 4,2 ve 2,2 molekülünün farklı ortamlardaki floresans yaşam ömrü değerleri

Numuneler	τ_1 (ns)	B_1 (%)	τ_2 (ns)	B_2 (%)	$\langle \tau \rangle$ (ns)	χ^2
2,2 + AcO	1,508	18,71	4,425	81,29	3,879	1,495
2,2 + Fl	3,931	36,81	1,261	63,19	2,243	1,583
2,2 + PyY	1,568	25,53	4,417	74,47	3,689	1,495
2,2 + SfT	1,606	20,34	4,455	79,66	3,866	1,440
2,2 + Saf Su	1,706	18,31	4,407	81,69	3,912	1,569
2,2 + SDS	3,184	71,42	8,017	28,58	4,608	1,844
4,2 + AcO	3,384	75,20	6,411	24,80	4,134	1,503
4,2 + Fl	3,700	90,20	9,084	9,80	4,227	1,428
4,2 + PyY	3,187	74,10	7,474	25,90	4,297	1,783
4,2 + SfT	3,650	81,17	9,974	18,83	4,840	1,639
4,2 + Saf Su	4,141	100,00	-	-	4,141	1,976
4,2 + SDS	3,817	66,23	1,428	33,77	3,010	1,423
2,2 + HSA	1,618	15,66	4,300	84,34	3,880	1,403
4,2 + HSA	3,446	64,27	5,341	35,73	4,123	1,511

Burada τ_1 ve τ_2 floresans ömür değerlerini, B_1 ve B_2 floresans ömür değerlerinin yüzdelerini, $\langle \tau \rangle$ ortalama floresans ömrü, χ^2 ölçümün doğruluğunu veren kare değerini ifade etmektedir. Floresans ömür değerleri floresans probun çevresiyle etkileşimleri hakkında bilgi verir. Her iki molekül içinde, saf su içerisindeki 4,2 molekülü hariç, çoklu floresans ömür değeri elde edilmiştir. Bunun anlamı; molekül ortamda iki farklı türde etkileşime sahiptir. Örneğin; 2,2 molekülü SDS ortamında τ_1 3,184 (%71) ve τ_2 8,017 (%29) değerlerini almış olması muhtemelen 2,2 moleküllerinin bir kısmının SDS'nin yüzeyinde elektrostatik olarak tutunduğunu (yüksek olasılıkla) ifade ederken bir kısım molekülün ise SDS'nin iç kısmına yerleştiğini (düşük olasılıkla) ifade edebilir.

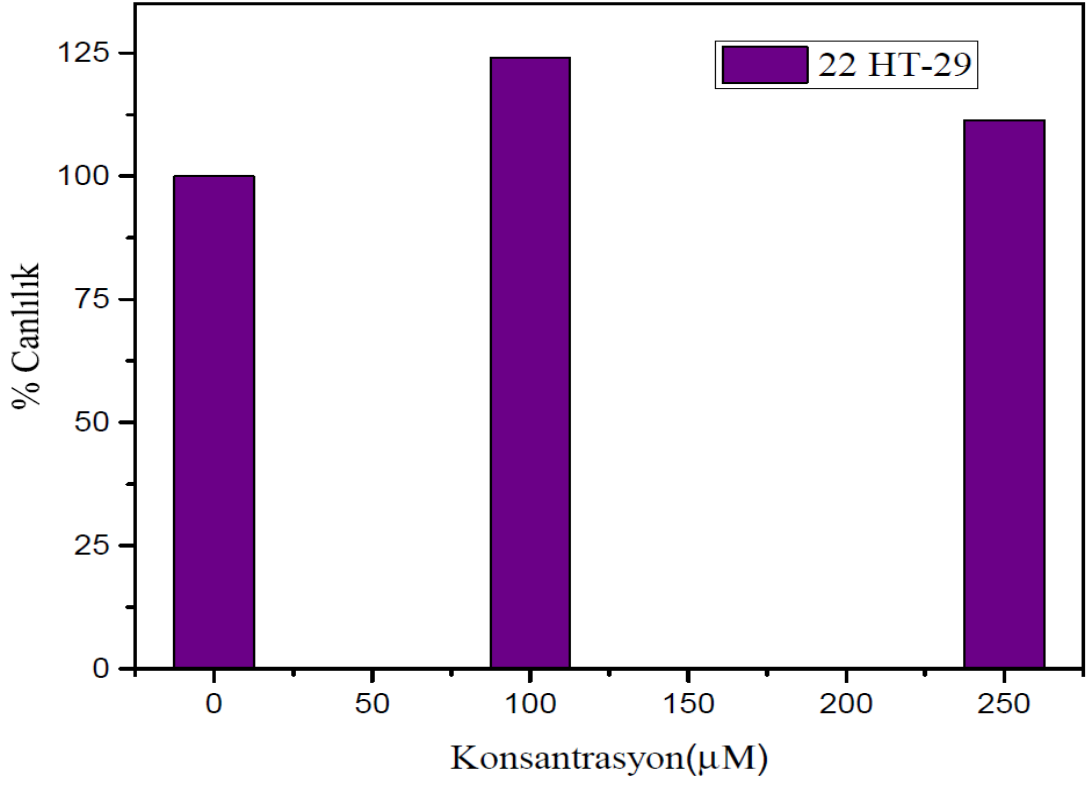
Diğer ihtimaller ise prob dimerleşmiş olabilir ya da prob su fazında serbest dolaşıyor olabilir (Aygün, 2017). Ortalama floresans ömür değerleri ($\langle \tau \rangle$) iki floresans ömür değerinin kendi yüzde değerleri ile çarpılarak ortalamalarının alınması yoluyla hesaplanmıştır. χ^2 değerinin 1 ile 2 arasında olması beklenir ve değer 1'e ne kadar yakınsa doğruluk o derece yüksektir.

Tez çalışmasının buraya kadar ki kısmında pirazolin türevi iki molekülün (4,2 ve 2,2) model membran ve model taşıma sistemindeki davranışları fotofiziksel açıdan incelenmiş ve moleküllerin hücre zarı ve protein bağlanmaları değerlendirilmiştir. Bu aşamadan sonra moleküllerin canlı sistemlerle olan etkileşimleri in vitro deneyler ile takip edilmiştir.

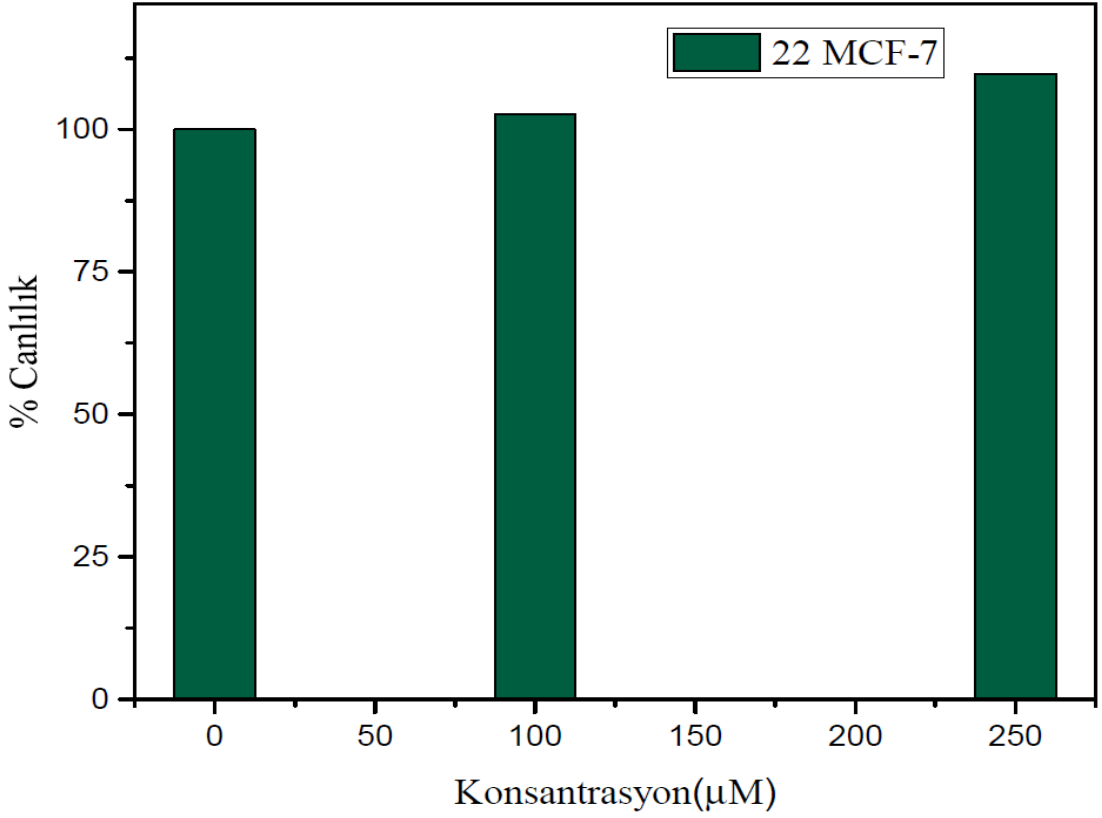
4.4. Sitotoksosite İncelemesi

Sitotoksosite incelemesi pirazolin türevi moleküllerin (4,2 / 2,2) canlı hücreler için toksik etki yapıp yapmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

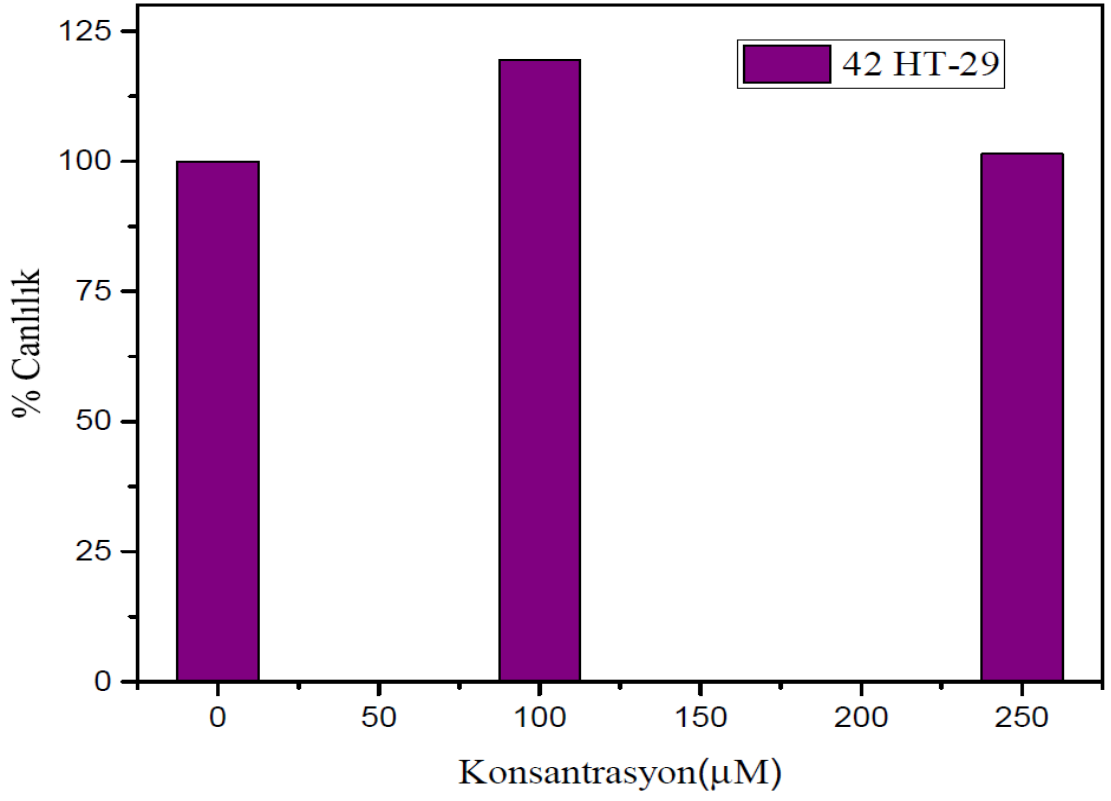
Bu çalışmada hem HT-29 kolon kanser hücre hattı hem de MCF-7 meme kanser hücre hattı ile çalışılmıştır. Numune konsantrasyonu olarak 100 μM ve 250 μM iki doz belirlenmiştir. Her iki doz da floresans çalışmalarında kullanılan en yüksek konsantrasyonlardır. Uygulama iki kanser hücre hattında 3'er tekrarla yapılmıştır. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak grafiğe dönüştürülmüştür. Çalışmada uyarma dalga boyu 490 nm' dir. Tüm maddeler hücrelere uygulandıktan 24 saat sonra okuma yapılmıştır.



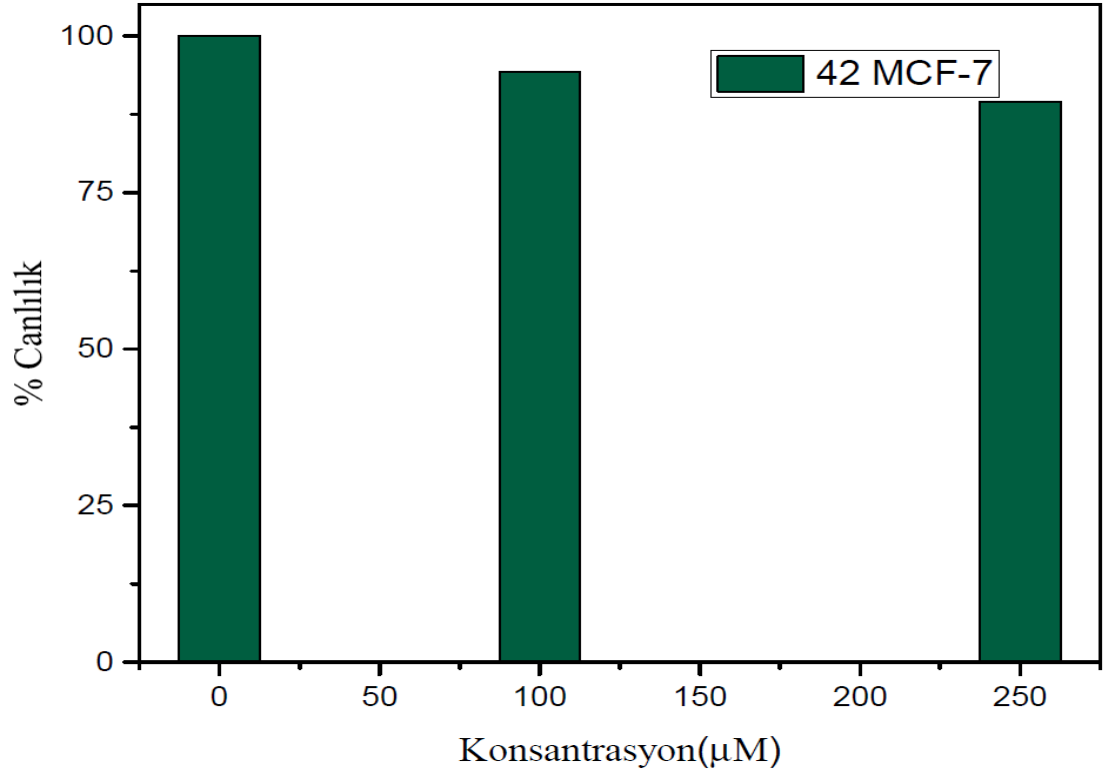
Şekil 4.38. 2,2 molekülünün HT-29 kolon kanser hücre hattı için sitotoksitite grafiği



Şekil 4.39. 2,2 molekülünün MCF-7 meme kanser hücre hattı için sitotoksitite grafiği



Şekil 4.40. 4,2 molekülünün HT-29 kolon kanser hücre hattı için sitotoksitite grafiği

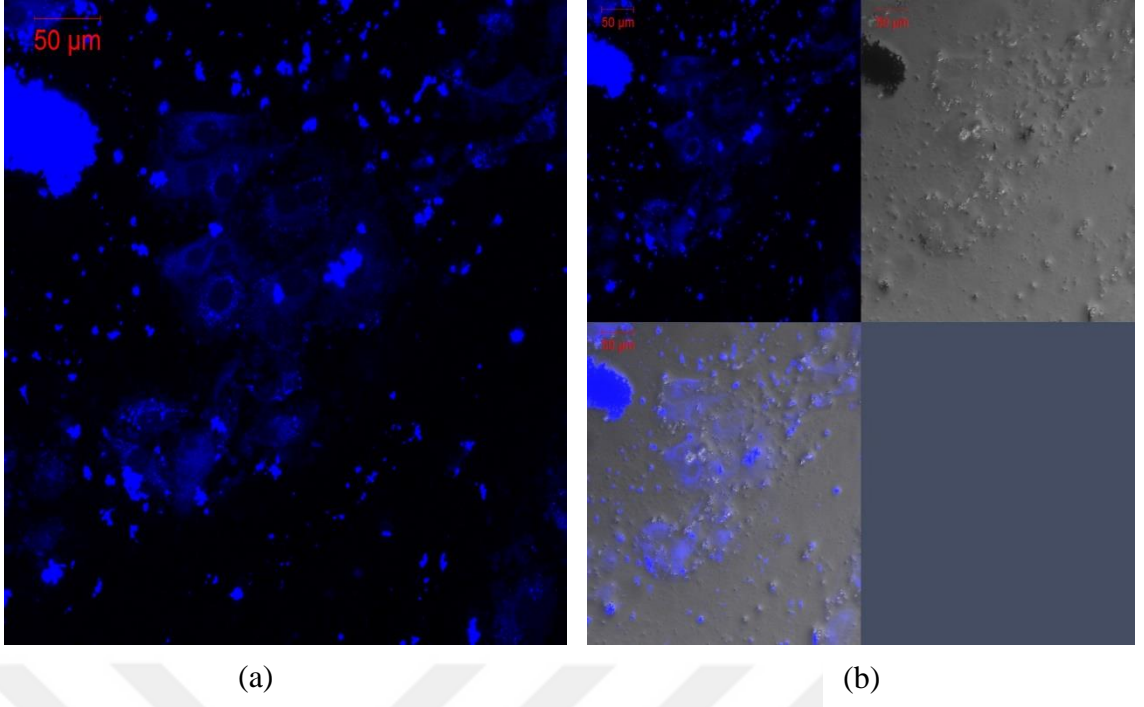


Şekil 4.41. 4,2 molekülünün MCF-7 meme kanser hücre hattı için sitotoksitite grafiği

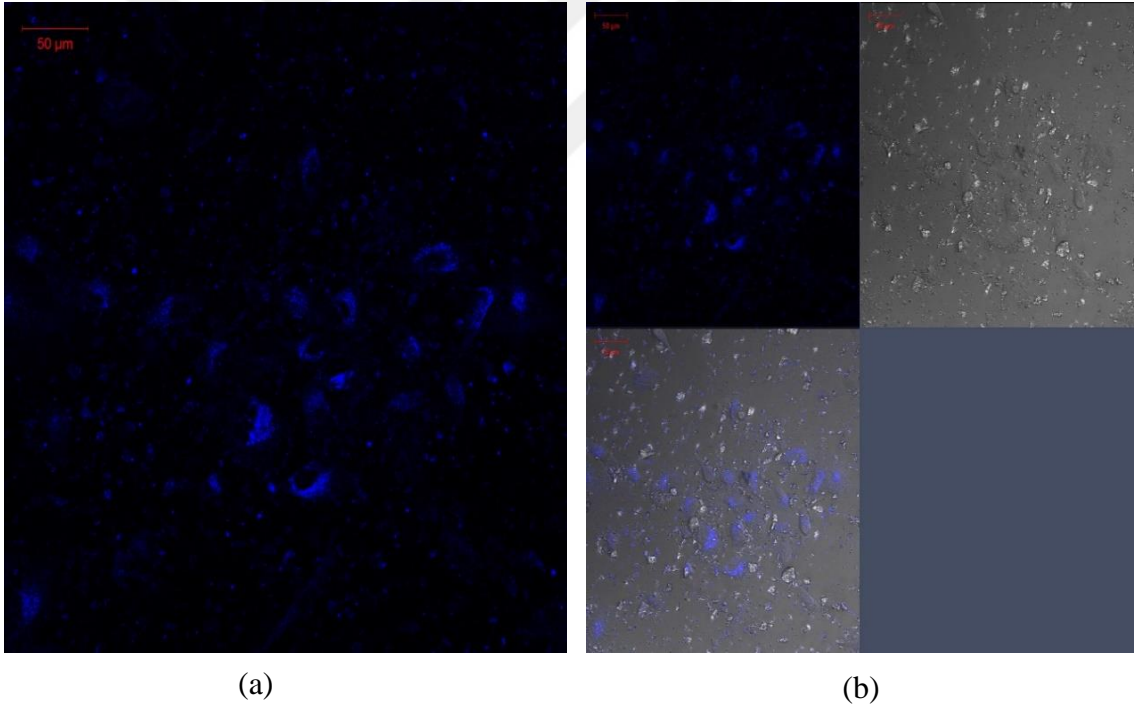
Yapılan sitotoksosite testlerinde uygulanan 100 ve 250 μM over dozdur. Elde edilen grafiklerden anlaşılacağı üzere 2,2 molekülünün her iki hücre hattında da ortamdaki hücrelere hiçbir ölümcül etkisi olmamıştır. 4,2 molekülünde ise 100 μM ' da meme kanser hücre hattında %6-7 civarında tolere edilebilir düzeyde hücre canlılığında azalma olmuştur. Kolon kanser hücre hattında ise her iki dozda da canlılıkta azalma gözlenmemiş aksine hücre sayısı artmıştır. 250 μM yüksek dozda meme kanser hattında %10-11 oranında hücre sayısında azalma meydana gelirken kolon kanser hücre hattında bu dozda hücre sayısında azalma yerine artış gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde her iki molekülün de canlı organizma için sitotoksik olmadığı sonucuna varılabilir. Buna bağlı olarak da hücre çalışmalarında 4,2 ve 2,2 moleküllerinin güvenli bir şekilde kullanılabilirliği ortaya konulmuştur.

4.5. Konfokal Mikroskop İncelemesi

İki kanser hücre hattında da toksik etki göstermeyen 4,2 ve 2,2 moleküllerinin floresans hücre görüntüleme mikroskobu olan konfokal mikroskopta uygulama amacıyla kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır. Konfokal mikroskop yardımıyla numuneleri bozmadan yüksek çözünürlükte üç boyutlu optik görüntüler elde edilmiştir. Her iki molekül için de uyarma dalga boyu 350 nm ve emisyon dalga boyu aralığı 365-650 nm' dir. Boyama işlemi meme kanser hücrelerinde (MCF-7) gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla önce meme kanser hücreleri lam üzerinde fikse edilmiş, ardından %1' lik DMSO' da çözülmüş 100 μM etken moleküller ile boyama işlemi yapılmıştır. Şekil 4.34 ve Şekil 4.35' de sırasıyla 2,2 ve 4,2 molekülleri için elde edilen görüntüler verilmiştir. Burada (a) ile verilen fotoğraflarda floresans görüntüsü, (b) ile verilen fotoğraflarda ise floresans görüntü ile aydınlık alan görüntüsünün birleştirilmiş halidir. Floresans görüntüsü moleküllerle hücrelerin boyanması sonucu belirli dalga boyunda ışıkla moleküllerin uyarılması sonucu moleküllerin floresans karakterinden faydalanılarak elde edilen görüntüdür. Molekül hücre içine girdiyse hücrenin hangi kısmında bulunduğu bu şekilde belirlenir. Bu sayede canlı hücre sayısı rahatlıkla sayılabilir. Aydınlık alan görüntüsünde ise sadece mevcut hücreler görünmektedir. Birleştirilmiş görüntü ise hücrelerin sadece sitoplazmalarının boyanmış olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.42. 2,2 Etken maddesi konfokal mikroskop görüntüleri



Şekil 4.43. 4,2 Etken maddesi konfokal mikroskop görüntüleri

Konfokal floresans görüntüleri incelendiğinde hem 4,2 hem de 2,2 etken molekülünün meme kanser hücrelerinin sitoplazmasını boyadığı görülmektedir. Bu işlem canlı hücrelerin tespitinde sayımı kolaylaştırmak için oldukça önemlidir. Elde edilen görüntüler sitotoksik olmayan bu iki molekülün de hücre boyama amacıyla kullanılabilceğini kanıtlamaktadır.

5. SONUÇ

Çalışma iki temel üzerine dizayn edilerek planlanmıştır. Birinci kısım model membran sistem olan bir miselle (SDS) gerçekleştirilmiş ve bir membran ile prob etkileşimleri model sistem üzerinden değerlendirilmiştir. Çalışmanın bu kısmında elde edilen bulgulardan pirazolin türevi her iki molekülün (4,2 / 2,2) de membran etkileşimlerinde enerji transfer çalışmalarından faydalanılabileceği anlaşılmıştır. Molekülün membran ile bağlanabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca floresans enerji transfer prosesinin dinamik kuençleşmeye dayandığı belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci kısmı protein-prob etkileşimine dayanmaktadır. Bu kısımda insan serumu proteini (HSA) ile pirazolin türevi moleküller arasındaki bağlanma dinamiklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için yine floresans enerji transferinden faydalanılmıştır. Elde edilen parametreler prob moleküllerinin her ikisinin de HSA'ya tek bir bölgeden, Trp-214 kısmından bağlandığı kanıtlamıştır. Termodinamik parametreler 4,2 ve 2,2'nin her iki ortamdaki etkileşimlerinin de elektrostatik olduğunu göstermiştir. Ayrıca pirazolin türevi olan 2,2 ve 4,2 moleküllerinin hücre boyama çalışmalarında kullanılabileceği belirlenmiştir. Sitotoksikite sonuçları değerlendirildiğinde her iki molekülün de canlı organizma için sitotoksik olmadığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak hücre çalışmalarında 4,2 ve 2,2 moleküllerinin güvenli bir şekilde kullanılabilir olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca yapılan in vitro çalışma ile konfokal floresans mikroskop görüntülerinde moleküllerin hücrelerin sitoplazmasını boyadığı belirlenmiştir. Sitotoksik olmayan ve hücrelerin sitoplazmasını boyayabilen bu iki molekül hücre çalışmalarında, özellikle hücre görüntüleme tekniklerinde 350-360 nm uyarma dalga boyunda floresan boya olarak kullanılabilir sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abboud R., Akil M., Charcosset C. and Gerges-Greige H., (2017).” Interaction of glucocorticoids and progesterone derivatives with human serum albumin”, *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, 271-278.
- Abdullah M. Asiri, Tariq R. Sobahi, Osman I. Osman, Salman and A. Khan, (2017). "Photophysical investigation of (D- π -A) DMHP dye: Dipole moments, photochemical quantum yield and fluorescence quantum yield, by solvatochromic shift methods and DFT studies" *Journal of Molecular Structure* 1128, 636-644
- Afzal S., Lone S. M., Bhat A. P. and Dar A. A., (2018). “Multi-step fluorescence resonance energy transfer between the fluorophores via cocolubilization in cationic, anionic and non-ionic micelles”, *Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry*, 365,220-231.
- Agrawal R., Thakur Y., Tripathi M., Siddiqi K. M., Khan H. R. and Pande R., (2019). “Elucidating the binding propensity of naphthyl hydroxamic acid to human serum albumin (HSA): Multi-spectroscopic and molecular modeling approach”, *Journal of Molecular Structure*, 1184, 1-11.
- Ariga G. G., Naik N. P., Chimatadar A. S. and Nandibewoor T. S., (2017). “Interactions between epinastine and human serum albumin: Investigation by fluorescence, UVEvis, FTeIR, CD, lifetime measurement and molecular docking”, *Journal of Molecular Structure*, 1137, 485-494.
- Atkins P. W., (1998). “Physical Chemistry”, Oxford University Press, Oxford Melbourne Tokyo.
- Aydın M. B., Acar M., Arik M. and Onganer Y., (2009). “The fluorescence resonance energy transfer between dye compounds in micellar media”, *Dyes and Pigments*, 81, 156-160.
- Aygün S., (2017). “Ksanten türevi bazı boyar maddelerin model Membran sistemler olan misel ortamlardaki Fotofiziksel özellikleri”, Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi, 61.
- Bayraktutan T. and Onganer Y., (2017). “Spectral-luminescent study of coumarin 35 as fluorescent “light-up” probe for BSA and DNA monitoring”, *Dyes and Pigments*, 142, 62-68.
- Brouwer M. A., (2011). “Standart for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report)”, *Pure and Applied Chemistry*, 83, 2213-2228.

- Bozkurt E., Bayraktutan T., Acar M. and Toprak M., (2013). "Spectroscopic studies on the interaction of fluorescein and safranin T in PC liposomes", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 101,31-35.
- Buddanavar T. A. and Nandibewoor T. S., (2017). "Multi-spectroscopic characterization of bovine serum albumin upon interaction with atomoxetine", *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7,148-155.
- Dare-Doyen, S., Doizi, D., Guilbaud, Ph., Djedaini-Pilard, F., Perly, B. and Millie, Ph. (2003). "Dimerization of Xanthene Dyes in Water: Experimental Studies and Molecular Dynamic Simulations", *The Journal of Physical Chemistry B*, 107: 13803-13812.
- Du J., Zhu T., Gu Q., Cao W., Fan J. and Peng X., (2018). "Fabrication of artificial fluorescent protein probe for HSA recognition and relay sensing Ag⁺ by functional microenvironment-sensitive fluorescent dye", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 263,661-667.
- Feng, S., Wang, J., Chen, X. and Fan, J. (2005) "Kinetic spectrofluorimetric determination of Trace ascorbic acid based on its inhibition on the oxidation of pyronine Y by nitrite", *Spectrochimica Acta Part A*, 61: 841-844.
- Förster Th., (1959). "Transfer mechanisms of electronic excitation", *Discussions of the Faraday Society*, 27:7–17.
- Ganguly, P. (2010). "Photophysics of some cationic dyes in aqueous micellar dispersions of surfactants and different solvents", *Journal of Molecular Liquids*, 151: 67-73.
- Geeta Joshi nee Pant Pramod Singh, B.S. Rawat, M.S.M. Rawat, G.C. Joshi., (2011). "Synthesis, characterization and fluorescence studies of 3,5-diaryl substituted 2-pyrazolines" *Spectrochimica Acta Part A* 78 1075–1079
- Ghosh K., Rathi S. and Arora D., (2016). "Fluorescence spectral studies on interaction of fluorescent probes with Bovine Serum Albumin (BSA)", *Journal of Luminescence*, 175, 135-140.
- Grinvald A., and Steinberg I.J., (1976). "The fluorescence decay of tryptophan residues in native and denatured proteins", *Biochimica et Biophysica Acta*, 663-78.
- Han J., Zou Y. H., Gao X. M. and Huang Z. C., (2016). "A graphitic carbon nitride based fluorescence resonance energy transfer detection of riboflavin", *Talanta*, 148, 279-284.

- Hemmateenejad B., Shamsipur M., Samari F., Khayamian T., Ebrahimi M. and Rezaei Z., (2012). "Combined fluorescence spectroscopy and molecular modeling studies on the interaction between harmalol and human serum albumin", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 67-68, 201-208.
- Hordge N. L., McDaniel L. K., Jones D. D., JR. And Fakayode O. S., (2016). "Simultaneous determination of estrogens (ethinylestradiol and norgestimate) concentrations in human and bovine serum albumin by use of fluorescence spectroscopy and multivariate regression analysis", *Talanta*, 152, 401-409.
- Kahriman N., Yaylı B., Aktaş A., İskefiyeli Z., Beriş Ş. F. And Yaylı N., (2013). "Synthesis, antibacterial and antioxidant activities of new 11-alkyl-4- (1-alkyl-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-2-yl) pyridinium bromides", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69, 348-355.
- Kalyanasundaran K. (1987) Photochemistry in Microheterogeneous Systems, *Academic Press*, New York, 2.
- Kara M., Paul S., Mallick A. and Majumdar T., (2018). "Shipment of a photodynamic therapy agent into model membrane and its controlled release: A photophysical approach", *Chemical Physics of Lipids*, 210,122-128.
- Korkmaz K., (2019). "Sulu Ortamda Grafen Oksit-Safranin T Kompozitlerinin Hazırlanması Ve Fotofiziksel Özelliklerinin İncelenmesi", Erzincan Binali YILDIRIM Üniversitesi, Erzincan.
- Lakowicz J.R. 1991, Topics in Fluorescence Spectroscopy Volume 1. Plenum Press, New York.
- Li J., Jiao Y. and Dong C., (2013). "Spectroscopic analysis and molecular modeling on the interaction of jatrorrhizine with human serum albumin (HSA)", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118,48-54.
- Liao C., Li F., Huang S., Zheng B., Du J., Xiao D., (2016). "A specific and biocompatible fluorescent sensor based on the hybrid of GFP chromophore and peptide for HSA detection", *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 489-495.
- Liveri V. T. (2006). "Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems", *Springer*, New York.
- Managa M., Achadu J. O., Nyoong T., (2018). "Photophysical studies of graphene quantum dots- Pyrene-derivatized porphyrins conjugates when encapsulated within Pluronic F127 micelles", *Dyes and Pigments*, 148, 405-416.

- Maiti, J., Yeasmin, S., Parui, P. P., Chakraborty, S., Biswa, S. and Das, R., (2015). “Photophysical study of a charge transfer oxazole dye in micelles: Role of surfactant headgroups”, *Journal of Luminescence*, 163: 21-27.
- Mallick, A., Haldar, B., Maiti, S. and Chattopadhyay, N. (2004). “Constrained photophysics of 3-acetyl-5-oxo-6,7-dihydro-12H indolo-[2,3-a] quinolizine in micellar environments: a spectrofluorometric study”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 278: 215-223.
- Moumita, C., Amiya, K. P. (2011). “Spectral behaviour of eosin Y in different solvents and aqueous surfactant media”, *Spectrochimica Acta Part A*, 81: 458– 465.
- Perdana F., Eryant. Y. and Zamri A., (2015). “Synthesis and Toxicity Assessments Some para-methoxy Chalcones Derivates”, *Procedia Chemistry*, 16, 129-133.
- Pietrzak M., Szabelski M., Kasperek A. and Wieczorek Z., (2017). “Interactions of hypericin with a model mutagen – Acridine orange analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy”, *Chemical Physics Letters*, 669, 85-91.
- Samari F., Shamsiper M., Hemmateenejed B., Khayamian T. and Gharaghani S., (2012). “Investigation of the interaction between amodiaquine and human serum albumin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 255-263.
- Sanchez F. G. and Ruiz C. C., (1996). “Intracellular energy transfer in aqueous CTAB solutions”, *Journal of Luminescence*, 69:179-86.
- Sarkar A. and Bhattacharya C. S., (2012). “Selective fluorescence resonance energy transfer from serum albumins to a bio-active 3-pyrazolyl-2-pyrazoline derivative: A spectroscopic analysis”, *Journal of Luminescence*, 132,2612-2618.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Crouch, S.R., 2017. *Principles of Instrumental Analysis*.
- Suryawanshi D. V., Walekar S. L., Gore H. A. and Anbhule V. P., (2016). “Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin”, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 56-63.
- Onganer Y. (1993). “Photodynamics of merocyanine 540 in liquid and membrane systems”, Doctor of Philosophy, Texas Tech University, Graduate Faculty, Texas.
- Wanga T., Xiang R.B., Li Y., Chen Y. C., Zhuo H. X., Wang M. Z., Dong Y., Wang Y. and Fang S. H., (2009). “Studies on the binding of a carditonic agent to human serum albumin by two-dimensional correlation fluorescence spectroscopy and molecular modeling”, *Journal of Molecular Structure*, 921, 188-198.

- Wang Q., Liu X., Su M., Shi Z. and Sun H., (2015). "Study on the interaction characteristics of cefamandole with bovine serum albumin by spectroscopic technique", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 321-326.
- Wang Y., Wang L., Zhu M., Xue J., Hua R. and Li X. Q., (2019). "Comparative studies on biophysical interactions between gambogic acid and serum albumin via multispectroscopic approaches and molecular docking", *Journal of Luminescence*, 205, 210-218.
- Wang Y., Liu J., Zhu M., Wang L., Zen X., Fan S., Wang Z., Li H., Na R., Zhao X. and Li X. Q., (2018). "Biophysical characterization of interactions between falcarinol-type polyacetylenes and human serum albumin via multispectroscopy and molecular docking techniques", *Journal of Luminescence*, 200, 111-119.
- Vikash K. Mishra, Mitali Mishra, Varsha Kashaw, Sushil K. Kashaw. "Synthesis of 1,3,5 trisubstituted pyrazolines as potential antimalarial and antimicrobial agents" *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25 (2017) 1949–1962 6.
- V. Ramkumar and P. Kannan., (2015). "Highly fluorescent semiconducting pyrazoline materials for optoelectronics" *Optical Materials*, 46 605–613
- Xiao J., Wei X., Wang Y. and Liu C., (2009). "Fluorescence resonance energy-transfer affects the determination of the affinity between ligand and proteins obtained by fluorescence quenching method", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74, 977-982.
- Yang Y., Li D. and Xu C., (2015). "Influences of urea, pH and metal ions on the interaction between cepharanthine and lysozyme by steady state fluorescence spectroscopy", *Journal of Molecular Structure*, 1084, 229-235.
- Yu X., Lu S., Yang Y., Li X. And Yi P., (2012). "Study on the interaction between NCP-(4-hydroxycoumarins) and bovine serum albumin by spectroscopic techniques", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 91, 113-117.
- Zaaba I. N., Foo L. K., Hashim U., Tan J. S., Liu W. W. and Voon H. C., (2017). "Synthesis of Graphene Qxide using Modified Hummers Method: Solvent Influence", *Propedia Engineering*, 184, 469-477.
- Zhang G., Que Q., Pan J. and Guo J., (2008). "Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy", *Journal of Molecular Structure*, 881, 132-138.

Zijie L, Bin L, Kangning Z, Yingying H, Chengjun P, Bingfeng W, Lei W., (2018). “An environment-sensitive fluorescent probe for quantification of human serum albumin: Design, sensing mechanism, and its application in clinical diagnosis of hypoalbuminemia”, *Dyes and Pigments*, 152 60–66



ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Kars ilinin Sarıkamış ilçesi Ali Sofu köyünde doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2009 yılında girdiği Erzincan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2013 yılında mezun oldu.

İstanbul ilinde 2014 yılından beri özel bir ilaç şirketinde Tedarik Zinciri Direktörlüğüne bağlı olarak Sorumlu Uzman pozisyonunda çalışmaktadır.

