

**PYRONİN Y BİLEŞİĞİNİN BSA VE HSA İLE ETKİLEŞİMİNİN
SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Abdullah SALCI

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mahmut TOPRAK

Ocak 2015

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PYRONİN Y BİLEŞİĞİNİN BSA VE HSA İLE
ETKİLEŞİMİNİN SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Abdullah SALCI

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Mahmut TOPRAK

OCAK 2015

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PYRONİN Y BİLEŞİĞİNİN BSA VE HSA İLE ETKİLEŞİMİNİN
SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Abdullah SALCI

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez 21.01.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Doç. Dr.
Ramazan SOLMAZ
Jüri Başkanı**

**Yrd. Doç. Dr.
Kadir EJDERHA
Üye**

**Yrd. Doç. Dr.
Mahmut TOPRAK
Üye**

Yukarıdaki sonucu onaylarım

**Doç. Dr. İbrahim Yasin ERDOĞAN
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bilgi ve birikiminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, Yrd. Doç. Dr Mahmut TOPRAK'a derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Deneysel çalışmaların yapılması ve yorumlanması sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren kimya bölümünün değerleri Öğretim elemanları ve laboratuvar ekipmanların kullanılmasında bana yardımcı olan Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvar personeline desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Tez çalışmama desteklerinden dolayı Bingöl Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (Proje No: BAP-199-158-2013) teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim esnasında maddi ve manevi her türlü desteği benden esirgemeyen değerli aile fertlerime ve bugünlere gelmeme yardımcı olan annem Halime SALCI'ya en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Abdullah SALCI

Bingöl 2015

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Işık ve Madde Etkileşimi.....	2
1.1.1. Deaktivasyon Prosesleri.....	5
1.2. Floresans Kuençleşme.....	6
1.2.1.(a) Statik Kuençleşme Mekanizması.....	6
1.2.1.(b) Dinamik Kuençleşme Mekanizması.....	7
1.2.1.(c) Yarışmalı Mekanizma.....	8
1.2.2. Kuençleşme Mekanizmaların Ayırt Etme Yöntemleri.....	9
1.2.2.(a). Sıcaklık.....	9
1.2.2.(b). Floresans Ömür Ölçümleri.....	10
1.2.2.(c). Absorpsiyon Spektrumu Alınması.....	11
1.2.2.(d). Viskozite.....	11
1.2.3. Bağlanma Sabitleri ve Termodinamik Parametreler.....	11
1.3. Floresans Enerji Transferi.....	13
1.3.1. Enerji Transferi Gerçekleşme Koşulları.....	14
1.3.1.(a). Donor ve Akseptör Arasındaki Mesafe.....	14
1.3.1.(b). Spektral Örtüşme.....	15
1.3.2. Floresans Enerji Transferi Denklemleri.....	16

1.4. Floresans Kuençleşme ve Floresans Enerji Transferi Uygulama Alanları.....	18
1.5. Çalışmanın Amacı.....	18
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	21
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	29
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	29
3.3. Numunelerin Hazırlanması.....	29
3.4. Yöntemler.....	30
3.4.1. Floresans ve Senkronize Floresans Spektrumların alınması.....	30
3.4.2. Absorpsiyon spektrumların alınması.....	31
3.4.3. IR Spektrumların alınması.....	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
SONUÇLAR.....	53
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

k_q	: Biomoleküler dinamik kuençleşme sabiti
τ	: Kuençırın ortamda olmadığı andaki floresans ömrü
K_{sv}	: Dinamik Stern-Volmer hız sabiti
Φ_f	: Floresans kuantum verimi
OD	: Optik yoğunluk
n	: Kırılma indisi
K_a	: Bire bir kompleks oluşturma sabiti
J	: Donor-akseptör örtüşme alanı integrali
Φ_D	: Ortamda akseptörün bulunmadığı andaki donurun kuantum verimi
r	: Donor ile akseptör arasındaki uzaklık
τ_D	: Ortamda akseptör bulunmadığı andaki floresans ömrü
N	: Avogadro sayısı
R_0	: Förster mesafesi
k_f	: Floresans durulma oranı
ϵ_{ad}	: Akseptör ve donör içeren numunede akseptörün absorpsiyonu
τ_{DA}	: Ortamda akseptör bulunduğu andaki floresans ömrü
ϵ_{da}	: Donör ve akseptör içeren numunedeki donoron absorpsiyonu
I_{ad}	: Donör ve akseptör içeren numunedeki akseptörün floresans şiddeti
I_a	: Akseptörün donorsuz ortamdaki floresans şiddeti
λ	: Dalga boyu

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Işığın bileşenlerinin gösterimi.....	2
Şekil 1.2.	Jablonski Diyagramı.....	3
Şekil 1.3.	Deaktivasyon prosesleri.....	5
Şekil 1.4.	Statik kuençleşme gösterimi.....	7
Şekil 1.5.	Aynı kuençlerle floroforun dinamik ve statik kuençleşmesi.....	9
Şekil 1.6.	Statik ve dinamik kuençleşmenin sıcaklığa bağımlılığı.....	10
Şekil 1.7.	Sırasıyla dinamik ve statik kuençleşme kinetikleri.....	11
Şekil 1.8.	Floresans enerji transfer prosesi.....	13
Şekil 1.9.	Donor ve akseptör arasındaki mesafe gösterimi.....	14
Şekil 1.10.	Donor ve Akseptörün spektral örtüşmesi.....	15
Şekil 1.11.	Förster mesafesine bağlı olarak enerji transfer verimliliği gösterimi.....	17
Şekil 1.12.	Pyronin Y bileşiğinin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 1.13.	Sığır serum albüminin temsili şekli.....	19
Şekil 1.14.	İnsan serum albüminin temsili şekli.....	20
Şekil 3.1.	Bir spektroflorometrenin bileşenleri.....	30
Şekil 3.2.	Perkin elmer LS55 floresans spektroflorometre.....	31
Şekil 3.3.	Çift ışık yollu spektrometre.....	31
Şekil 3.4.	Shimadzu UV-3600 UV-VIS-NIR Spektrofotometre.....	32
Şekil 3.5.	Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spektrometre.....	33
Şekil 4.1.	Oda sıcaklığında farklı konsantrasyonlarda Pyronin Y içeren BSA çözeltilisine ait floresans spektrumları.....	34
Şekil 4.2.	Oda sıcaklığında farklı konsantrasyonlarda Pyronin Y içeren HSA çözeltilisine ait floresans spektrumları.....	35
Şekil 4.3.	BSA-PyY sistemine ait Stern-Volmr grafiği.....	36

Şekil 4.4.	HSA-PyY sistemine ait Stern-Volmer grafiği.....	37
Şekil 4.5.	Saf PyY ve PyY-HSA sistemine ait absorpsiyon spektrumları.....	39
Şekil 4.6.	Saf PyY ve PyY-BSA sistemine ait absorpsiyon spektrumları.....	40
Şekil 4.7.	BSA-PyY sistemi için modifiye Stern-Volmer denklemi	41
Şekil 4.8.	HSA-PyY sistemi için modifiye Stern-Volmer denklemi.....	41
Şekil 4.9.	HSA-PyY sistemi için Von't Hoff denklemi grafiği.....	43
Şekil 4.10.	BSA-PyY sistemi için Von't Hoff denklemi grafiği.....	43
Şekil 4.11.	BSA-PyY sistemine ait spektral örtüşme grafiği.....	45
Şekil 4.12.	HSA-PyY sistemine ait spektral örtüşme grafiği.....	46
Şekil 4.13.	Oda sıcaklığında PyY'nin farklı konsantrasyonlarında BSA molekülü için alınmış senkronize floresans spektumları ($\Delta\lambda=60$ nm).....	48
Şekil 4.14.	Oda sıcaklığında PyY'nin farklı konsantrasyonlarında HSA molekülü için alınmış senkronize floresans spektumları ($\Delta\lambda=60$ nm).....	48
Şekil 4.15.	Oda sıcaklığında PyY'nin farklı konsantrasyonlarında BSA molekülü için alınmış senkronize floresans spektumları ($\Delta\lambda=15$ nm).....	49
Şekil 4.16.	Oda sıcaklığında PyY'nin farklı konsantrasyonlarında HSA molekülü için alınmış senkronize floresans spektumları ($\Delta\lambda=15$ nm).....	49
Şekil 4.17.	Sadece BSA ile BSA-PyY'nin olduğu sisteme ait FT-IR spektrumu.....	51
Şekil 4.18.	Sadece HSA ile HSA-PyY'nin olduğu sisteme ait FT-IR spektrumu.....	52

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4.1.	BSA-PyY sistemine ait ve farklı sıcaklıklarda elde edilmiş kuenleşme sabitler.....	38
Tablo 4.2.	HSA-PyY sistemine ait ve farklı sıcaklıklarda elde edilmiş kuenleşme sabitleri.....	38
Tablo 4.3.	Farklı sıcaklıklar kullanılarak elde edilen BSA-PyY etkileşimine ait bağlanma sabitleri.....	42
Tablo 4.4.	Farklı sıcaklıklar kullanılarak elde edilen HSA-PyY etkileşimine ait bağlanma sabitleri.....	42
Tablo 4.5.	BSA-PyY sistemine ait termodinamik parametreler.....	44
Tablo 4.6.	HSA-PyY sistemine ait termodinamik parametreler.....	44
Tablo 4.7.	BSA-PyY sistemine ait enerji transfer parametreleri.....	46
Tablo 4.8.	HSA-PyY sistemine ait enerji transfer parametreleri.....	46

PYRONİN Y BİLEŞİĞİNİN BSA VE HSA İLE ETKİLEŞİMİNİN SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

ÖZET

Bu çalışmada; bir ksentan türevi olan Pyronin Y (PyY) bileşiminin bovine serum albümin (BSA) ve human serum albümin (HSA) arasındaki etkileşimi, floresans, absorpsiyon ve FT-IR spektroskopisi ile incelenmiştir.

HSA ve BSA floresans şiddetleri, PyY'nin artan konsantrasyonu ile azaldığı tespit edilmiştir. Stern-Volmer eşitliği kullanılarak BSA-PyY ile HSA-PyY arasındaki etkileşimin türü belirlenmiştir. BSA-PyY ile HSA-PyY arasında karanlık bir kompleks oluşumu belirlenmiştir. Bağlanma sabitleri ve termodinamik parametreler farklı sıcaklıklarda hesaplanmıştır. BSA-PyY arasında hidrofobik etkileşimler ve van der-Waals etkileşiminin etkin olduğu; HSA-PyY arasında ise güçlü hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerin etkin olduğu belirlenmiştir. HSA-PyY ve BSA-PyY arasındaki etkileşim mesafeleri Förster enerji transfer teorisine göre incelenmiştir. Her iki sistemde moleküller arasındaki mesafenin 8 nm'den küçük olduğu belirlenmiştir. PyY bileşiminin HSA ve BSA proteinlerinin konformasyonuna üzerine etkisi senkronize floresans, absorpsiyon, FT-IR spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: BSA, HSA, pyronin Y, hidrofobik, senkronize.

THE INVESTIGATION ON INTERACTION OF PYRONIN Y WITH BSA AND HSA BY SPECTROSCOPIC METHODS

ABSTRACT

In this study, the interactions of Pyronin Y (PyY), a kind of xanthine derivative, with bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA) have been investigated by various spectroscopic techniques.

It was found that, the fluorescence intensity of HSA and BSA decreased gradually with the increasing of PyY concentration. The spectroscopic data was analyzed using Stern–Volmer equation. Fluorescence tests showed that PyY could bind to BSA/HSA to form complexes. The binding constants and the thermodynamic parameters were calculated at different temperatures. It was revealed that the binding of PyY-BSA depended on hydrophobic interaction and van der Waal's interaction, and the binding of PyY-HSA might involve strong hydrophobic and electrostatic interactions. The binding distance between PyY and BSA/HSA was evaluated according to Förster non-radioactive energy transfer theory. The binding distance was found to be smaller than 8 nm in both systems. The effect of PyY on the conformation of BSA/HSA was also investigated using the synchronous fluorescence, absorbance and FT-IR spectroscopy.

Keywords: BSA, HSA, pyronin Y, hydrophobic, synchronous.

1. GİRİŞ

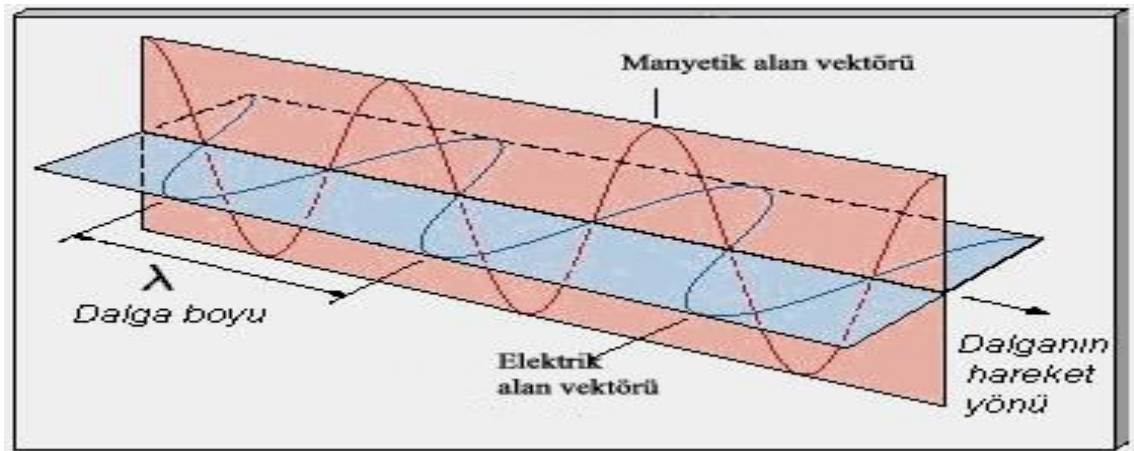
İlk olarak 1960'lı yılların sonunda floresans kuençleşme tekniği biyokimyasal problemler için kullanılmaya başlanmıştır. Floresans kuençleşme reaksiyonları proteinler, membranlar ve diğer makro molekül sistemleri hakkında bilgi verirler. Örneğin bu teknikte oksijen, akriylamid, iyodat iyonu gibi moleküller kullanılarak makromolekül guruplarındaki floresan gurupların yeri hakkında bilgi sağlanmaktadır (Lakowicz 2002). Bu yaklaşım optik olarak duyarlı biyosensörler, hedef bir protein veya peptidi tanınması ve bağlanması için de tasarlanabilir (Lakowicz 2002). Ayrıca floresans kuençleşme, proteinler ve biyolojik olarak öneme sahip moleküller arasındaki etkileşimi moleküler seviyede incelenmek içinde kullanılmaktadır. Floresans kuençleşme, bimoleküler deaktivasyon proseslerinde uyarılmış halde bulunan molekülden temel halde bulunan söndürücü (kuençir) molekülüne elektronik uyarılma enerjisini ışımasız bir şekilde transfer etmesine denir. Bu olaydan sonra uyarılmış halde bulunan molekül ışımasız bir şekilde temel hale dönerken kuençir molekülü uyarılmış hale geçer. Bu gerçekleşen enerji transferi olayına sensitizasyon da denilmektedir. Kuençleşme olayı, birincil veya ikincil bir molekül kullanılarak herhangi bir sisteme uygulanabilir. Ayrıca floresan kuençleşme reaksiyonları küçük miktardaki numunelere de kolaylıkla uygulanabilir. En karakteristik ve en önemli bilgiler floresans kuençleşme tekniği ile sağlanabilir (Lakowicz 2002).

Genel olarak floresans kençleşme tekniği ile yapılan analizler 10^{-7} ve 10^{-9} M derişime kadar duyarlıdır. Miktarı çok az ve belli yapıda maddelerin floresans özeliği göstermesi bir yandan floresans kuençleşme tekniğine üstünlük sağlarken diğer taraftan çalışma alanının kısıtlı olmasından dolayı dezavantaj oluşturmaktadır. Bundan dolayı ikincil bir molekül kullanılarak da uygulama yapılabilir. Uyarılmış halde bulunan bir molekülün floresansın sönmelenmesini etkileyen pek çok faktörün bulunmasından dolayı bu yöntem çok hassas çalışmayı gerektirmektedir (Lakowicz 2002; Valuer 2012).

İki molekül arasındaki etkileşimin esas alındığı kuençleşme reaksiyonları genellikle dinamik ve statik olmak üzere iki mekanizma üzerinde yürür (Arık vd 2005). Dinamik kuençleşme florofor ve kuençır arasındaki difüzyon sonucu çarpışmalar ve bu çarpışmalardan dolayı florofor uyarılma ömrü boyunca sönümlenir diğer molekül ise ışık absorpsiyonu sonucu uyarılmış duruma geçer. Statik kuençleşme olayında ise florofor ile kuençır arasında floresans özelliği olmayan kararlı bir karanlık kompleks oluşumu meydana gelir (Lakowicz 1983; Valuer 2012). Bu tekniğin temelini, ışığın madde ile etkileşimine dayandığından ışığın yapısı hakkında çok iyi bilgi sahibi olmak gerekir.

1.1. Işık ve Madde Etkileşimi

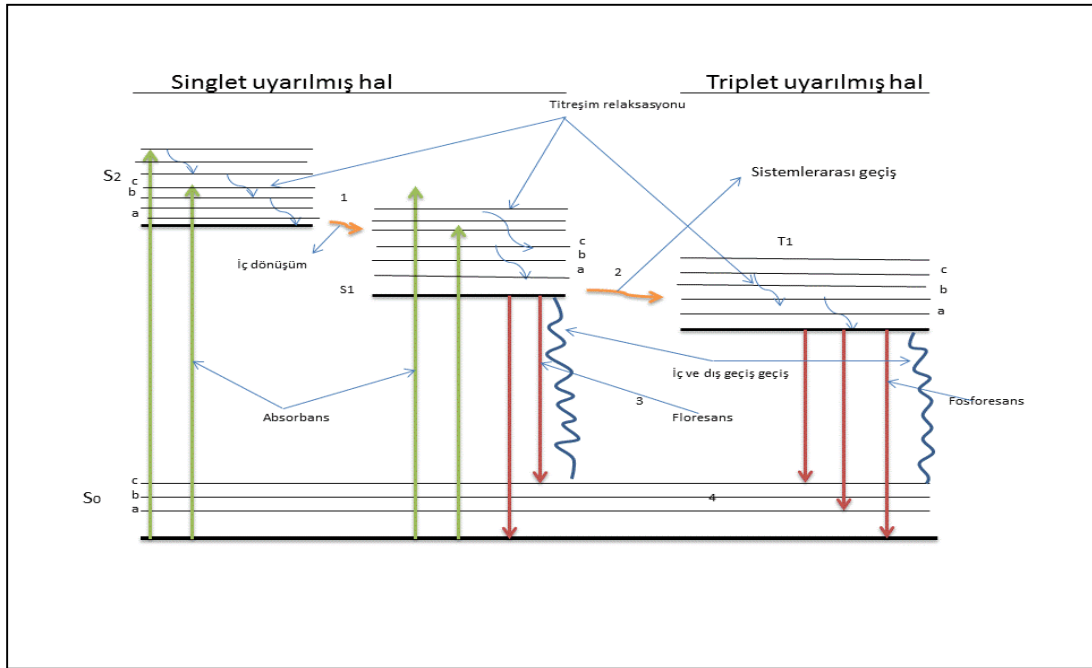
Işık birbirine dik elektrik ve manyetik alan vektörlerinden oluşur. Sinüsoidal harekete sahip olan ışık, dalga özelliği yanında tanecik özeliğine de sahiptir. Bu özellik Einstein'in fotoelektrik olayı ile ispatlanmıştır. Işığın bileşenleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 1.1. Işığın bileşenlerinin gösterimi (URL-1 2014)

Işığın madde ile etkileşimini inceleyen bilim dalına spektroskopi denir. Spektroskopi, bir bileşimdeki atom, molekül ve iyonların bir ışımayı soğurması veya yayması sırasında atom, molekül ve iyonların bir enerji düzeyinden diğer bir enerji düzeyine geçişleri sırasında elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve değerlendirilmesidir. Elektromanyetik ışımayı absorplayan bir molekülün, öteleme, dönme, titreşim ve elektronik uyarılma hallerin meydana gelmesine sebep olur. Uyarılmış bir atom veya

molekül enerjisinin artmasından dolayı kararsızdır. Atom veya molekül temel hale dönerken enerjisinin tümünü ya da bir kısmını ışığa dönüştürerek çevreye salar. Elektromanyetik radyasyon ile uyarılma sonucunda molekülün enerjisini ortama ışık olarak vermesi durumuna fotoluminesans veya lüminesans adı verilir. Lüminesans floresans veya fosforesans şeklinde oluşabilir. Floresans, uyarılmış bir singlet halden temel haldeki singlet hal durumuna ışımali geçişi; fosforesans ise uyarılmış triplet halden sistemin temel haldeki singlet hale ışımali geçişini belirtmektedir (Lakowicz 1986; Sarıkaya 1998; Gündüz 2007; Valuer 2012). Şekil 1.2'deki Jablonski diyagramında molekülün elektromanyetik radyasyonu absorplaması sonucu oluşabilecek fotofiziksel prosesler gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Jablonski Diyagramı (Gündüz 2007)

Şekilde görüldüğü gibi S_0 ile gösterilen bir molekülün singlet temel hali, S_1 ve S_2 ile gösterilenler bu molekülün uyarılmış singlet halleridir. Diyagramdaki hallerin altında bulunan kalın çizgilere o halin elektronik seviyesini, üzerindeki a, b, c,.. ile gösterilen ince çizgiler o halin titreşim seviyesini göstermektedir. 1 ile gösterilen durum iç geçişi ve 2 ile gösteril durum ise sistemler arası geçişi belirtmektedir. Yukarıdaki diyagramda gösterilen olayları kısaca özetlenecek olursa:

Absorpsiyon; singlet temel halden, S_1 ve S_2 ile gösterilen singlet uyarılmış hale elektronik bir geçiştir. Bu olayın yaklaşık 10^{-15} saniyede gerçekleşmesi ve uyarılma sırasında Franck-Condon prensibine göre çekirdeğin yer değiştirmesi önemsenmeyecek kadar az olduğundan, molekülün her üç durumdaki geometrik yapısı birbiriyle aynıdır. Singlet halden singlet hale geçişler spektroskopik olarak izinli geçişlerdir. Singlet temel halden triplet uyarılmış hale geçiş ise fotofiziksel olarak müsaade edilmeyen geçiştir. Sistem triplet uyarılmış hale ancak uyarılmış singlet halin, bir triplet titreşim enerji seviyesiyle çakışması sonucu izin verir (Skoog vd 1998; Valuer 2012).

Floresans: Uyarılmış bir singlet halindeki molekülün temel haldeki singlet durumuna ışıklı geçişi gösterir. Bu olay yaklaşık 10^{-7} ve 10^{-8} saniye gibi kısa bir sürede gerçekleşen elektronik bir geçiş basamağıdır.

Fosforesans: Uyarılmış bir triplet halinden temel haldeki singlet hale sistemin ışıklı bir şekilde geçişini belirtmektedir. Bu olay sırasında elektron triplet uyarılmış halden singlet uyarılmış hale geçerken spin değiştireceğinden elektronun mültiplisitesi değişir bu nedenle fotofiziksel olarak spin bakımından müsaade edilmeyen bu durum yaklaşık olarak 10^{-5} veya 1 saniyeden daha fazla sürede meydana gelir.

İç geçiş: Genelde bu olay izomerleşme veya rezonans halleri bulunan moleküllerde görülür ve molekül hangi elektronik seviyeye uyarılsa uyarılsın en altta bulunan enerji halin elektronik enerji seviyesinden floresans ışını yayarak temel hale geçişi ifade eden durumdur.

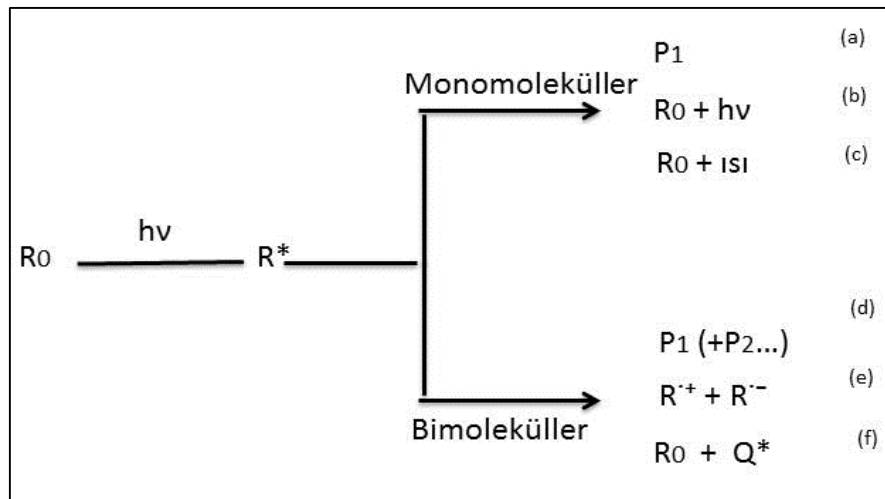
Dış geçiş: molekül üzerinde taşıdığı uyarılma enerjisini ortamda bulunan safsızlık molekülleriyle çarpışması suretiyle temele hale dönmesine dış geçiş denir.

Titreşim relaksasyonu: Molekül uyarıldığı ışının şiddetine bağlı olarak uyarılmış enerji seviyesinde herhangi bir titreşim enerji seviyesine yükselir. Ancak uyarılmış molekül titreşim enerjisini molekülün içinde bulunduğu çözücü ortamıyla çarpışması sonucu 10^{-14} gibi kısa bir saniyede dışarı salar. Bu geçişler ışısız olup floresans olayıyla rekabet eden ve onu bastırmaya çalışan bir durumdur. (Valuer and Santos 2012)

Sistemler arası geçiş: Elektromanyetik radyasyonla uyarılmış bir molekülün singlet halinin o molekülün triplet halindeki titreşim enerji seviyeleriyle çakışması durumunda uyarılmış molekülün elektronu, spin değiştirerek triplet halin enerji seviyesine geçer. Bu olay genel olarak spin/orbital etkileşimin çok fazla olduğu düşünülen ağır element içeren moleküllerde görülür (Gündüz 2007).

1.1.1. Deaktivasyon Prosesleri

Elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşimi sırasında uyarılmış halin deaktivasyonu fotofiziksel veya fotokimyasal olarak gerçekleşir. Monomoleküller ve bimoleküller ortamlar deaktivasyon proseslerinin farklı gerçekleşmesine sebep olur. Deaktivasyon prosesleri Şekil 1.3'te verilmiştir.



Şekil 1.3. Deaktivasyon prosesleri (Bozkurt 2007)

Şekilde temel halde bulunan R_0 molekülü elektromanyetik radyasyon ile uyarılmıştır. Uyarılma sonucu R^* molekülü oluşmakta ve eğer ortamda başka bir molekül yoksa bu molekül monomoleküler deaktivasyon proseslerine maruz kalacaktır. Şekilde a, b ve c ile gösterilen prosesler sırasıyla; fotokimyasal reaksiyon sonucu yeni ürün oluşabilir, molekül absorpladığı enerjini dışarıya floresans şeklinde verebilir ve R^* aldığı radyasyonu ışımasız olarak dışarıya ısı şeklinde verecektir. Fakat bu ısı ortamın sıcaklığını artırmayacak moleküllerin kinetik enerjisinde harcanacaktır.

Eğer ortamda Q gibi başka bir molekül bulunursa R* bimoleküler prosesler sonucu d, e ve f şeklinde gösterilen durumlar oluşabilir. Bu olaylar sırasıyla; R*, Q ile etkileşerek fotokimyasal bir reaksiyon sonucunda ürün veya ürünler oluşabilir. R* etkileştiği Q'ye elektron vererek R^{·+} şekline dönüşmesi ve Q ise aldığı bu elektron sayesinde Q^{·-} şekline dönüşmesini ifade eder. Elektron transferi olarak aktaracağımız bu işlem aşağıdaki mekanizmalar üzerinden yürür.



Deaktivasyon proseslerinde son olarak uyarılmış R* molekülü taşıdığı radyasyon enerjisini Q molekülüne vererek Q*'ın oluşmasına sebep olurken molekül R₀ haline ışımsız bir şekilde dönebilir. Bu olaya kuençleşme buna sebep olan moleküle ise kuençır denilir.

1.2. Floresans Kuençleşme

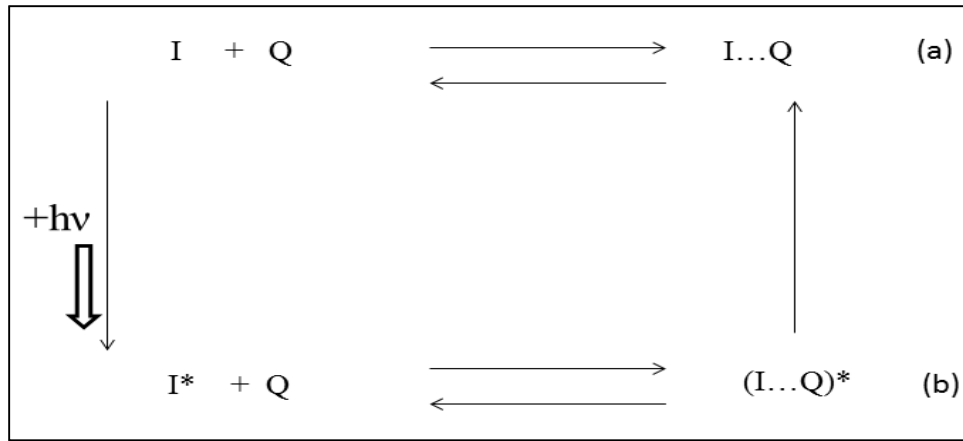
Uyarılmış molekül (floroför=R*) ile kuençırın (Q) Şekil 1.3.'te bimoleküler deaktivasyon prosesi safhasında gösterildiği gibi etkileşmesi sonucu floresans kuençleşme olayı meydana gelmektedir. Floresans kuençleşme genel olarak statik ve dinamik olmak üzere iki mekanizma üzerinde meydana gelmektedir. Bazı durumlarda sistemde hem dinamik hem de statik kuençleşme birlikte yürümektedir (Lakowicz 2002).

1.2.1.(a). Statik Kuençleşme Mekanizması

Çözelti ortamında floroför ile kuençırın etkileşmesi sırasında kuençırın florofora difüzyon sonucu ışımaya özeliği olmayan bir kompleks meydana geliyorsa bu olaya statik kuençleşme denir. İki molekül arasında gerçekleşen bu olay Stern-Volmer eşitliği ile ifade edilir (Lakowicz 1983).

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{sv}[Q])(1 + Ka[Q]) \quad (1.5)$$

Yukarıda verilen (1.5) denkleminde; I_0 ortamda kuençır olmadığı durumda floroforun floresans şiddetini, I ise ortamda kuençır ve florofor olduğu andığı floroforun floresans şiddetini, Q kuençır konsantrasyonu, K_{sv} Stern-Volmer kuençleşme sabitini, Ka ise kompleks oluşum sabitini ifade etmektedir (Lakowicz 1983).



Şekil 1.4. Statik kuençleşme gösterimi (Lakowicz 2002)

Şekil 1.4'te a ve b ile gösterilen durumlar statik kuençleşmenin iki durumda gerçekleştiğini gösterir. Burada a, statik kuençleşmede florofor ile kuençır arasında temel halde floresans özeliği olmayan bir kompleks oluşabileceğini gösterir. Şekilde b ile gösterilen diğer durumunda florofor uyarıldıktan sonra floresans özeliği olmayan bir komplekste oluşabilir (Bozkurt 2007).

1.2.1.(b). Dinamik Kuençleşme Mekanizması

Sistemde bulunan kuençır florofora difüzlenip floroforun floresans aktif bölgesine çarpıp ayrılırken kısa süreliğine sönüm olayı meydana getiriyorsa bu olaya dinamik kuençleşme denir. Bu floresans kuençleşme mekanizması Stern-Volmer eşitliği ile ifade edilmektedir.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = (1 + K_{sv}[Q]) \quad (1.6)$$

Yukarıda verilen (1.6) denkleminde; I_0 ortamda kuençır olmadığı durumda floroforun floresans şiddetini, I ise ortamda kuençır ve florofor olduğu durumda floresans şiddetini k_q biomoleküler kuençleşme sabitini, Q kuençır konsantrasyonu, τ_0 ise kuençırın olmadığı durumdaki floroforun floresans ömrünü belirtmektedir (Lakowicz 2002).

Yukarıdaki denklemde gösterilen k_q teorik olarak Smoluchowski eşitliği kullanılarak elde edilir. Denklem (1.6)'de Smoluchowski eşitliği verilmiştir.

$$k_{diff} = \frac{4\pi RND}{1000} \quad (1.7)$$

1.3 denkleminde belirtilen R florofor ile kuençır arasında çarpışmanın gerçekleştiği durumda florofor ile kuençırın çapların toplamını belirtmektedir. N , Avogadro sayısını ve D ise florofor ile kuençırın difüzyon katsayıların toplamını belirtmektedir. D değeri ise Stokes-Einstein eşitliğinden elde edilir. Stokes-Einstein eşitliği (1.8)'de verilmiştir.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (1.8)$$

Denklem (1.8)'de verilen k Boltzman sabitini, η ise çözücünün viskozitesini belirtmektedir.

Çözücü viskozitesine bağlı olan k_q değeri elde edilirken kullanılan A ve α ise çözücü viskozitesine bağlı olmayan sabitlerdir (Arik vd 2003).

$$k_q = A\eta^{-\alpha} \quad (1.9)$$

1.2.1.(c). Yarışmalı Mekanizma

Çeşitli durumlarda florofor aynı kuençır ile hem kompleks oluşturmakta hem de dinamik kuençleşme gösterebilmektedir. Bu durum, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak çizilen Stern-Volmer grafiğinde bimoleküler kuençleşme sabitlerinin elde edildiği

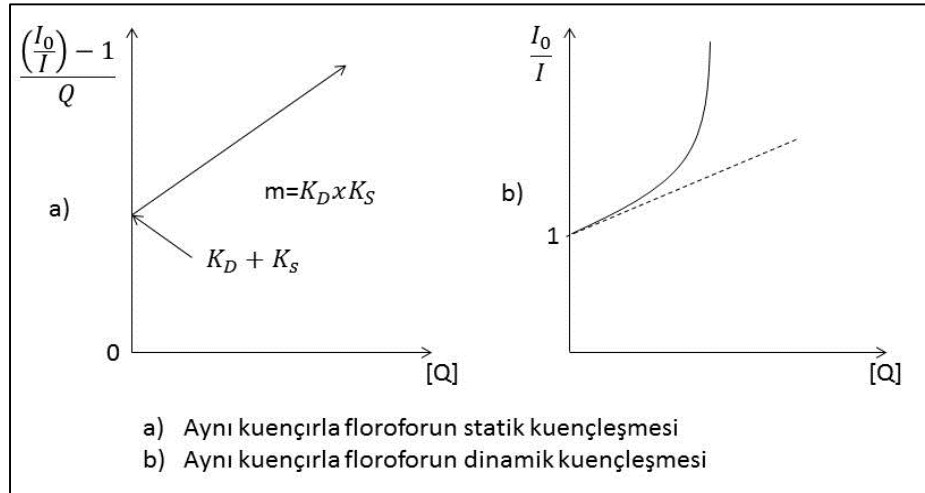
eğrinin y eksenine doğru iç bükey bir hal almasıyla anlaşılabilir. Bu durum modifiye edilmiş Stern-Volmer denklemiyle gösterilir (Denklem 1.10).

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_D[Q])(1 + K_S[Q]) \quad (1.10)$$

Bu denklem düzenlenirse aşağıdaki şekilde de ifade edilebilir (Lakowicz 1983).

$$\frac{I_0}{I} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S Q^2 \quad (1.11)$$

Yukarıda ifade edilen durumlar aşağıdaki şekilde kısaca özetlenebilir.



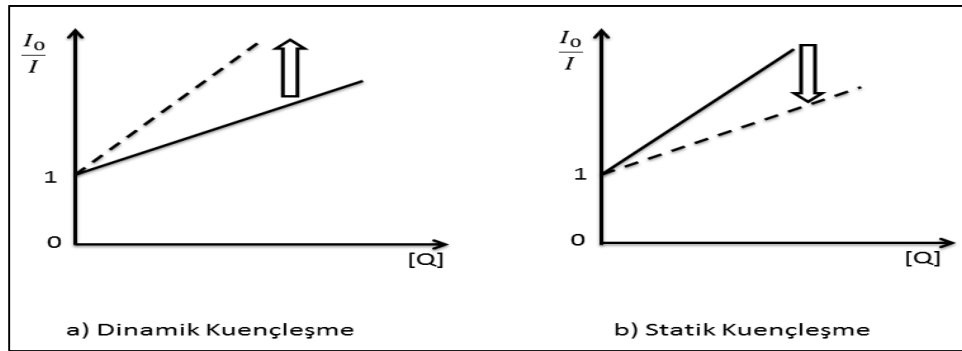
Şekil 1.5. Aynı kuençirle floroforun dinamik ve statik kuençleşmesi (Bozkurt 2007)

1.2.2. Kuençleşme Mekanizmalarını Ayırt Etme Yöntemleri

Kuençırım florofora difüzlemesiyle gerçekleşen statik ve dinamik kuençleşme reaksiyonlarını bir birlerinden ayırt etmek için sıcaklık, viskozite, floresans yaşam ömür ölçümleri ve absorpsiyon spektrumlarından faydalanılır.

1.2.2.(a). Sıcaklık

Dinamik kuençleşme reaksiyonunda artan sıcaklık ile birlikte bimoleküller kuençleşme sabitleri difüzyon kat sayısına bağlı olarak artarken; statik kuençleşmede sıcaklığın artmasıyla kompleksin stabilizesi azalacağı için bu değer azalır (Lakowicz 1983). Dinamik ve Statik kuençleşmenin sıcaklığa bağlı gösterimi Şekil 1.10'da sırasıyla gösterilmiştir.

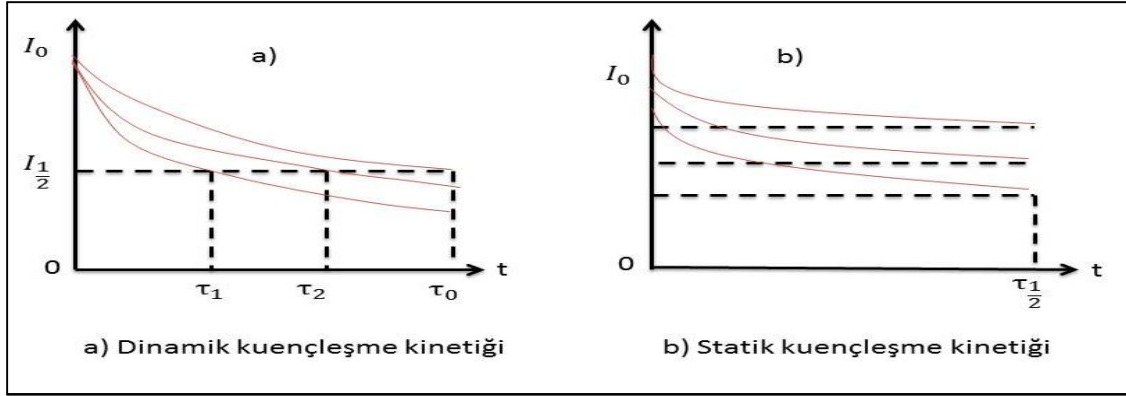


Şekil 1.6. Statik ve dinamik kuençleşmenin sıcaklığa bağımlılığı (Lakowicz 1983)

1.2.2.(b). Floresans Ömür Ölçümleri

Floresans ömür ölçümleri statik ve dinamik kuençleşmenin ayırt edilmesinde kullanılan en önemli yöntemdir. Statik kuençleşmede oluşan kompleks florofor özelliği göstermez, gözlemlenen floresans sadece çözelti içinde kompleksleşmemiş florofordan kaynaklanır. Kompleksleşmiş kısmın floresans özelliği olmadığından ilgisizdir. Bu yüzden statik kuençleşmede $\frac{\tau_0}{\tau} = 1$ olduğu durumda dinamik kuençleşmede $\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{I_0}{I}$ 'dir (Lakowicz 1983).

Başka bir ifadeyle; dinamik kuençleşmede ilk lüminesans şiddeti sabit kalırken artan kuençür konsantrasyonuna bağlı olarak floresans yaşam ömrü azalır. Bununla birlikte Statik Kuençleşme de artan kuençür konsantrasyonuna bağlı olarak floresans yaşam ömrü sabit kalır (Suppan *vd.* 1994). Bu durum Şekil 1.11'de sırasıyla gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Sırasıyla dinamik ve statik kuençleşme kinetikleri (Lakowicz 1983)

1.2.2.(c). Absorpsiyon Spektrumu Alınması

Statik ve dinamik kuençleşmenin ayırt etmenin bir diğer yoluda floroforun absorpsiyon spektrumunun incelenmesidir. Statik kuençleşmede floroforun absorpsiyon spektrumunda genellikle düzensizlik olurken; dinamik kuençleşme sadece floroforun uyarılmış hallerini etkileyeceğinden dolayı absorpsiyon spektrumunda pek değişme olmaması beklenir (Zaho vd 2010; Lakowicz 1983).

1.2.2.(d). Viskozite

Viskozitenin artmasıyla birlikte çözelti içinde bulunan kuençürün mobilitesi azalacağından dolayı dinamik kuençleşme oranı azalır. Statik kuençleşme olayında ise bunun tersi bir durum gerçekleşir (Arık vd 2004).

1.2.3. Bağlanma Sabitleri ve Termodinamik Parametreler

İki molekül arasındaki etkileşimin hangi şartlar altında gerçekleştiğini öğrenmek için etkileşimin gerçekleştiği sistemin termodinamik parametreleri yardım edebilir. Kuençleşme reaksiyonlarında küçük molekül makro molekülün aktif noktasına bağlandığı zaman bu iki molekül arasındaki etkileşim bir eşitlik ile gösterilir (Qin vd 2010). Makro molekül için bağlanma noktasının ve bağlanma sabitinin belirlendiği bu eşitlik sayesinde kuençleşme reaksiyonun termodinamik parametreleri hakkında bilgi edilebilir.

Bu eşitlik;

$$\log \frac{(I_0-I)}{I} = \log K_a + n \log [Q] \quad (1.12)$$

Yukarıda verilen denklem (1.12)'de; K_a makro molekül için bağlanma sabitini ve n ise makro molekül için bağlanma noktasını ifade etmektedir. Bu denklem modifiye Stern-Volmer denklemi olarak adlandırılır.

(1.12) denklemi kullanılarak $\log \frac{(I_0-I)}{I}$ 'in $\log [Q]$ 'ye karşı grafiği çizildiğinde K_a ve n parametrelerini elde edebiliriz (Qin vd 2010).

Yukarıdaki eşitlikte elde ettiğimiz K_a değerini Van't Hoff eşitliğinde (Denklem 1.13) kullanarak küçük molekül ile büyük molekül arasındaki etkileşimin termodinamik parametreleri elde edebilir. Bu tür etkileşimler genelde hidrofobik, van der Waals, hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimlerdir. Bu etkileşim türlerinin ne olduğunu aşağıdaki denklemler kullanılarak elde edilen termodinamik parametrelerden belirlenebilir (Qin vd 2010).

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (1.13)$$

Bu denklemde, R gaz sabitini ifade etmektedir.

ΔH ve ΔS ise $\ln K$ 'nın $\frac{1}{T}$ 'ye karşı grafiği çizildiğinde grafiğin eğiminden ve ekstrapolasyonundan sırasıyla elde edilebilir. Gibbs serbest enerjisi (ΔG) ise aşağıdaki eşitlik kullanılarak elde edilir.

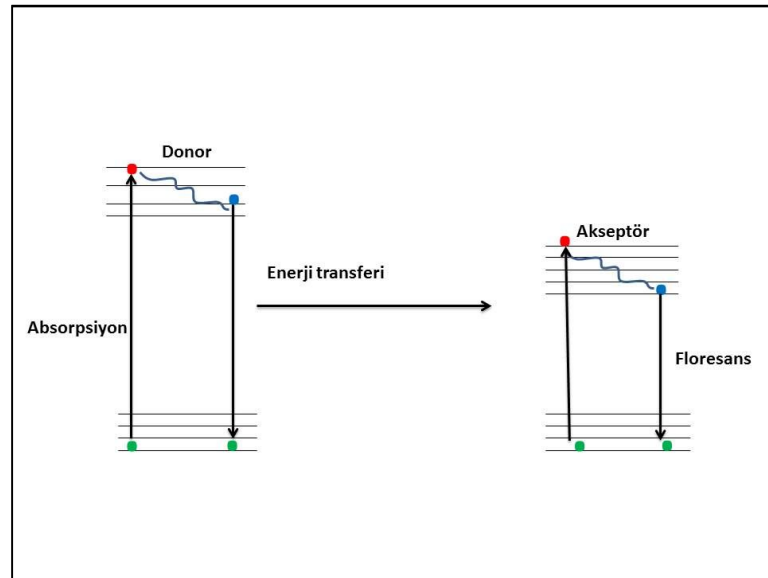
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.14)$$

Burada, ΔG gibbs serbest enerjisini; ΔH , entalpi değişimini ve ΔS ise entropi değişimini göstermektedir. Bu parametrelere bakarak makro molekül ile küçük molekül arasındaki etkileşim türünün ne olduğu tahmin edebilir.

Sistemin termodinamik parametrelerin büyüklüğü bize kuençleşme reaksiyonun hangi şartlar altında gerçekleştiğini ve bu reaksiyon gerçekleşirken moleküller arasındaki etkileşimlerin türü hakkında bilgi sağlar. Şayet, $\Delta H > 0$ ve $\Delta S > 0$ ise hidrofobik etkileşim; $\Delta H < 0$ ve $\Delta S < 0$ ise hidrojen bağları; $\Delta H < 0$ ve $\Delta S > 0$ ise elektrostatik etkileşim meydana geldiğini gösterir (Qin vd 2010).

1.3. Floresans Enerji Transferi

Förster kinetiği donör ile akseptör arasında gerçekleşen enerji transferi hakkında da bilgi sağlamaktadır. Fotofiziksel bir proses olan floresans enerji transferi donör (D) olarak adlandırılan floresant molekül ile akseptör (A) olarak adlandırılan ikinci molekül arasında gerçekleşir. Bu olayda donör absorbe ettiği elektromanyetik radyasyonu radyasyonsuz bir şekilde akseptör molekülüne transfer eder. Kendi temel hale ışınmaz geçerken akseptör molekülü uyarılmış hale gelir. Daha sonra bu molekül almış olduğu radyasyonu ışımalı bir şekilde dışarı salar (Chatterjee vd 2005). İki molekül arasında gerçekleşen bu durum Şekil 1.8’de gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Floresans enerji transfer prosesi (Toprak 2006)

Donör ve akseptör arasında ışınmaz bir şekilde gerçekleşen enerji transferi olayı bu iki molekül arasındaki dipol-dipol etkileşimlerden kaynaklanmaktadır (Tokmakof 2008).

Enerji transfer mekanizması aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir.

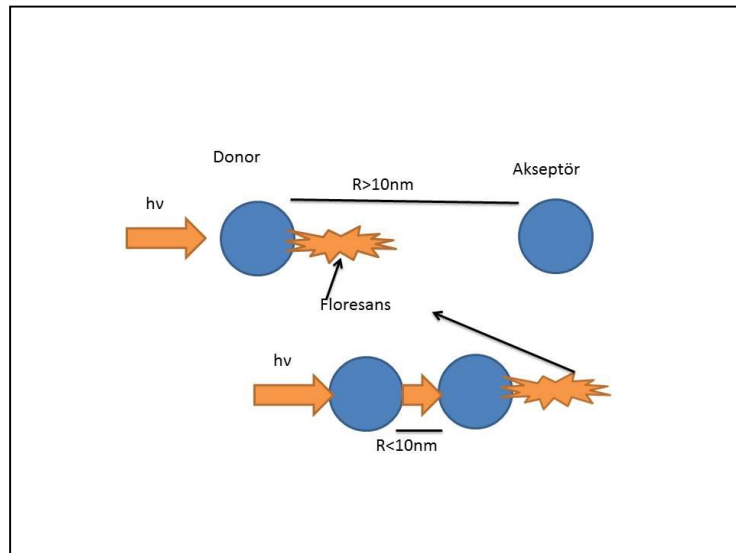


1.3.1. Enerji Transferi Gerçekleşme Koşulları

Donor ve akseptör arasında dipol-dipol etkileşimler sonucu meydana gelen floresans enerji transferi iki parametreye bağlı olarak gerçekleşir (Lakowicz 2002). Bunlar enerji transferinin gerçekleştiği anda donor ve akseptör arasındaki mesafeye bir diğeri de akseptörün absorpsiyon spektrumu ile donörün emisyon spektrumun çakışmasına bağlıdır.

1.3.1.(a). Donor ve Akseptör Arasındaki Mesafe

Donor ve akseptörün etkileşmesiyle meydana gelen enerji transferinin bu iki molekül arasındaki mesafeye bağlıdır. Enerji transfer olayının gerçekleşmesi için donor ile akseptör arasındaki mesafenin 10 nm'nin altında olması gerekmektedir. Bu olay Şekil 1.9'da temsili olarak gösterilmektedir (Lakowicz 2002).

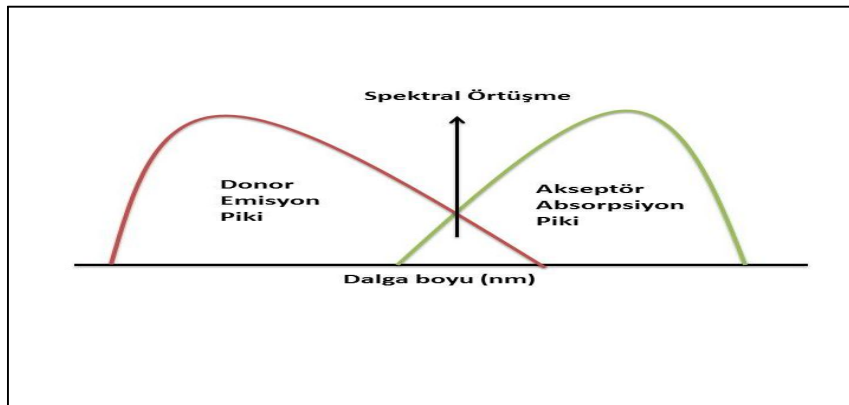


Şekil 1.9. Donor ve akseptör arasındaki mesafe gösterimi (Lakowicz 2002)

Şekil 1.9'da görüldüğü gibi donör ile akseptör arasındaki mesafa 10 nm'den küçük olduğu durumda donör molekülü absorpladığı elektromanyetik radyasyonu akseptöre aktararak molekülün emisyon yapmasına sebep olmaktadır. Bu durumda enerji transferi meydana gelir. Donör ile akseptör arasındaki mesafe 10 nm'den büyük olduğu durumda donörün absorpsiyonunun yanında emisyonu da görülmektedir. Bu olay esnasında enerji transferi gerçekleşmemektedir (Toprak 2006).

1.3.1.(b). Spektral Örtüşme

Floresans enerji transferinin gerçekleşmesi için gerekli olan bir diğer şart, akseptörün absorpsiyon spektrumu ile donörün emisyon spektrumunun kısmen olarak örtüşmesi gerekmektedir. Bu örtüşme alanına overlap denilmektedir. Overlap ne kadar genişse enerji transferi verimi o kadar büyük olacaktır (Valuer 2012). Şekil 1.10'da bu durum temsili olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.10. Donör ve Akseptörün spektral örtüşmesi (Lakowicz 1983)

Spektrumdaki örtüşen alanın büyüklüğü hesaplanarak enerji transfer verimi büyüklüğü hakkında bilgi edinilebilir (Lakowicz 1983).

1.3.2. Floresans Enerji Transfer Denklemleri

Spektral örtüşme ile donör ve akseptör arasındaki mesafeye bağlı olarak gerçekleşen enerji transferine ait parametreler aşağıdaki denklemler yardımıyla elde edilebilir. Förster kinetiğine göre enerji transfer hızı (k_T) aşağıda verilmektedir.

$$k_T = \frac{9000(\ln 10)K^2\phi_D}{128\pi^5 n^4 N r^6 \tau_D} \int_0^\infty \frac{F_D(\bar{\nu})\epsilon_A(\bar{\nu})}{\bar{\nu}^4} d\bar{\nu} \quad (1.16)$$

$$k_T = (r^{-6} J K^2 n^{-4} \lambda_D) \times 8,71 \times 10^{23} s^{-1} \quad (1.17)$$

Bu denklemde; J, akseptör ile donör arasında örtüşen kısmın alanını belirtmektedir. J değeri denklem 1.18 kullanılarak hesaplanır. ϕ_D ortamda akseptörün bulunmadığı durumda donörün kuantum verimini, r akseptör ile donör arasındaki mesafeyi, K^2 akseptör ve donöre ait geçiş dipollerini ifade eden faktörü, τ_D akseptörün ortamda bulunmadığı andaki floresans ömrünü, n ortamın kırılma indisini, N avogadro sayısını ifade etmektedir.

$$J = \frac{\sum(\lambda)\epsilon(\lambda)\lambda^4\Delta\lambda}{\sum F(\lambda)\Delta\lambda} \quad (1.18)$$

Yukarıdaki denklemde F(λ) donörün floresans yoğunluğunu, $\epsilon(\lambda)$ ise akseptörün molar absorpsiyon katsayısını belirtmektedir. Förster enerji transfer hızı aşağıdaki denklemde gösterildiği gibi ifade edilmektedir.

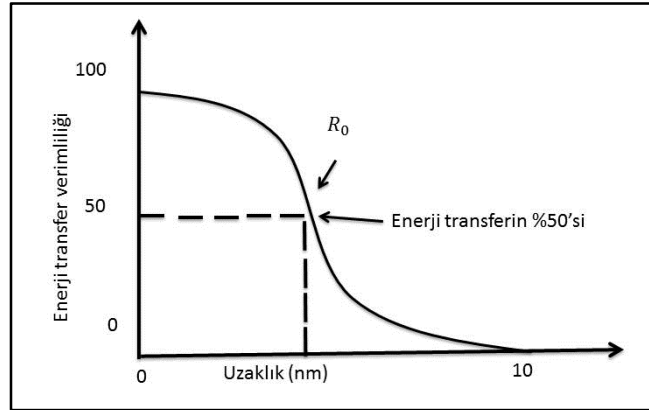
$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad (1.19)$$

Bu denklemde R_0 Förster mesafesi olarak adlandırılır. Akseptör ile donör arasındaki enerji transfer veriminin % 50'sinin gerçekleştiği mesafe olarak da tanımlanmaktadır. R_0 aşağıdaki denklemle hesaplanabilir.

$$R_0 = 9,79 \times 10^3 [K^2 n^{-4} \phi_D J]^{1/6} \quad (1.20)$$

Yukarıdaki denklem 1.12'de verdiğimiz parametreler ile bu denklemde verilen her bir parametre aynıdır.

Şekil 1.11 Förster mesafesi ile enerji transfer verimliliği arasındaki durumu göstermektedir.



Şekil 1.11. Förster mesafesine bağlı olarak enerji transfer verimliliğinin gösterimi (Lakowicz 2002)

Enerji transfer olayında en önemli parametrelerden birisi donör ile akseptör arasında gerçekleşen enerji transferin verimliliğidir. R_0 ve r ile I ve I_0 kullanarak enerji transfer verimliliği hesaplanabilir (Lakowicz 2002).

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{I_0}{I} \quad (1.21)$$

Bu Denklemde; R_0 enerji transfer verimliliğinin %50'sinin gerçekleştiği durumdaki Förster mesafesini, r enerji transferin gerçekleştiği mesafesini belirtmektedir (Lakowicz 2002). Enerji transfer verimliliğinin belirlenmesi için kullanılan bir diğer eşitlik enerji transfer hız oranının, tüm deaktivasyon proseslerin oranında elde edilir. Bu eşitlik;

$$E = \frac{k_t}{k_t + k_f + k'} \quad (1.22)$$

Bu eşitlikte; k_t floresans durulma oranını, k ise sistemdeki diğer tüm deaktivasyon proseslerini ifade etmektedir (Lakowicz 2002).

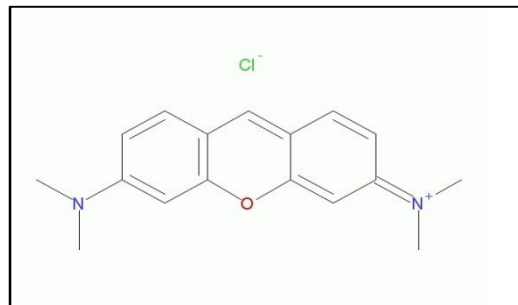
1.4. Floresans Kuençleşme ve Floresans Enerji Transferi Uygulama Alanları

Floresans kuençleşme ve Förster enerji transfer mekanizmaları genellikle enzim substrat arasındaki etkileşimin belirlenmesinde, makro moleküllerin topografikal yapıların araştırılmasında, moleküllerin konformasyonel değişimi hakkında bilgi edinmekte kullanılır (Lakowicz 2002). Proteinlerde bulunan kromoforik gurupların yerlerinin belirlenmesinde, biyolojik tabaka kalınlığının hesaplanmasında, proteinlerin yarı çaplarının tahmininde, dye lazerlerin enerji şiddetlerinin kontrol edilmesinde, molekül ve florofor arasındaki birleşme proseslerinde uygun biosensörlerin geliştirilmesine (Guy and Fabienne 1995; Hop vd 2000; Pampa dv 2003) yardımcı olmaktadır.

1.5. Çalışmanın Amacı

Çalışmamızda fotofiziksel özellikleri belirlenmiş olan Pyronin Y bileşiğinin fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış sığır serum albümini (BSA) ve insan serum albümini (HSA) arasında enerji transfer olayı için uygun molekül çiftleri oluşturup oluşturmayacakları, enerji transfer koşulları göz önüne alınarak incelenmesi hedeflenmiştir

Bu çalışmada akseptör molekülü olarak kullanılan Pyronin Y molekülün Şekli 1.12’de verilmiştir.

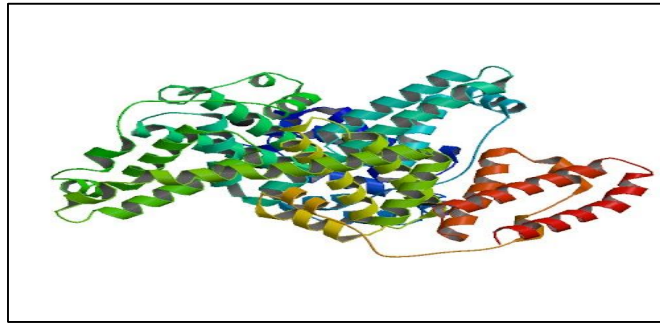


Şekil 1.12. Pyronin Y bileşiğinin kimyasal yapısı

Boyar maddeler anyonik, katyonik ve non-iyonik olarak üç guruba ayrılırlar. Pyronin Y, 540 nm görünür bölgede maksimum absorpsiyon pikini veren katyonik bir boyar

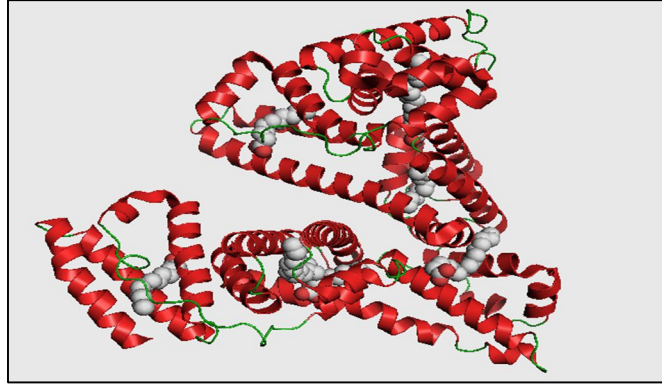
maddedir. As(III), Cr(VI) ve taninlerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Pyronin Y bir ksanten türevi bileşik olup heterosiklik yapıda, temel halde π orbitalleri içerir. Bu dye bileşik floresans özeliğine sahip olup kanda aksorbik asit, glukoz ve ürik asit tayininde kullanılmasının yanı sıra elektro optik manyetik ışımaya veren dye lazerlerin ışımaya dalga boyunun ayarlamasında kullanılmaktadır. Bu bileşik aynı zamanda tekstil, kağıt vb. alanlarda boyar madde olarak kullanılmaktadır (Rohatgi vd1966; Essawy vd 2013; Arik vd 2003).

Bu çalışmada triptofan ve trozin gibi floresans aktif bölgelerine sahip olan HSA ve BSA model proteinler olarak seçilmiştir. Sığır serum albümin doğal olarak küresel biçimde bulunan ve büyük molekül ağırlığına sahip bir proteindir. 586 aminoasit residüsü 17 disülfid bağlarıyla sağlamlaştırılmıştır. Uzun iyonize amino asit zinciri sayesinde su içerisinde çözünürlüğü çok yüksektir. Kan plazmasında bulunan sığır serum albümini proteinler ve metal iyonların taşınmasından sorumludur (He vd 1992; Wikipedia url-2; Kun vd. 2010). Sığır serum albümin temsili şekli aşağıda verilmiştir.



Şekil 1.13. Sığır serum albüminin temsili şekli(URL-2 2014)

İnsan serum albümin ve sığır serum albümin yapısı yapılan çalışmalar sonucu % 76 benzer özellik gösteren homolog proteinler olarak belirlenmiştir(Ye vd 2008). İnsan serum albümini globüler yapıda olup molekül ağırlığı yaklaşık olarak 67 kDa'dur. Amino asitlerin N-Terminal peptid bağlarıyla bağlanması sonucu oluşan insan serum albümini kanda hormon, ilaç, eser element vb. maddelerin taşınmasında ve depolanmasında sorumlu bir proteindir (Wikipedia url-2; Wang vd. 2010). İnsan serum albümin temsili Şekli 1.14'te verilmiştir.



Şekil 1.14. İnsan serum albüminin temsili şekli (URL-3 2014)

Pyronin Y bileşiğinin biyolojik kullanım alanlarının daha fazla araştırılması gerekmektedir. Bu çalışma Pyronin Y ile serum albüminler arasındaki etkileşimin moleküller seviyede incelenmesi kapsamaktadır. Bu çalışma Pyronin Y molekülün biyolojik kullanım alanını genişletecek ve değişik biyolojik alanlardaki çalışmalarına ışık tutacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tetramethylpyrazine'in (TMPZ) Sığır serum albümin (BSA) ve insan serum albümin (HSA) arasındaki etkileşim çeşitli spektroskopik teknikler kullanılarak incelenmiştir. Floresans sonuçlarına göre TMPZ'nin BSA ile HSA arasındaki etkileşimin kompleks formunda olduğu bulunmuştur. 278 K'de TMPZ-HSA ve TMPZ-BSA kompleksleri arasındaki bağlanma sabitleri sırasıyla $3,302 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $1,442 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Farklı sıcaklıklara dayanarak elde edilen termodinamik parametrelere (ΔH , ΔG ve ΔS) göre TMPZ-HSA bağlanmasının başlıca hidrofobik etkileşime dayandığı, fakat TMPZ-BSA bağlanmasının güçlü hidrofobik etkileşim ve elektrostatik etkileşimlere dayandığı ortaya çıkmıştır. Senkronize floresans, UV-vis absorpsiyon, FT-IR, 3D floresans ve CD spektra yöntemlerin sonucuna göre BSA ve HSA konformasyonların TMPZ eklenmesiyle değiştiği görülmüştür. TMPZ-HSA ve TMPZ-BSA komplekslerinin bağlanma mesafesi Förster enerji transferine göre 2,045 ve 2,033 nm olarak bulunmuştur. Ek olarak TMPZ ile BSA/HSA arasındaki bağlanma sabitleri Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , Cl^- , CH_3COO^- , CO_3^{-2} iyonların varlığında azaldığı tespit edilmiştir (Cheng 2012).

BSA ile Hiperosid arasındaki etkileşim floresans spektroskopisi kullanılarak incelenmiş ve Stern-Volmer ile Tachiya model kullanılarak bağlanma parametreleri elde edilmiştir. Tachiya modeline göre bağlanma noktası ve bağlanma sabitleri artan sıcaklığa bağlı olarak arttığı bulunmuştur, ancak Stern-Volmer eşitliğine göre bağlanma sabitlerinin artan sıcaklığa bağlı olarak azaldığı ve bağlanma noktasının sıcaklığa bağlı olmadığı ortaya çıkmıştır. Termodinamik parametrelere göre BSA ile Hiperosid arasındaki etkileşimin kendiliğinden meydana geldiği ve hidrofobik etkileşimin önemli bir rol aldığı bulunmuştur. Senkronize floresans ölçümlerine göre Hiperosid bileşiğinin BSA'nın triptofan bölgesine bağlandığı sonucuna varılmıştır (Qin vd 2010).

Fizyolojik koşullar altında Sığır serum albümini (BSA) ile adaravon (EDA) arasındaki etkileşim floresans ve ultraviole spektroskopileri kullanılarak incelenmiştir. BSA ile EDA arasındaki etkileşimin düşük EDA konsantrasyonlarında statik kuençleşme, yüksek EDA konsantrasyonlarında dinamik kuençleşme olduğu belirlenmiştir. Föster enerji transfer teorisine göre EDA ile BSA arasındaki bağlanma mesafesi 3,10 nm olarak bulunmuştur. Termodinamik parametrelere göre, iki farklı mekanizma üzerinde yürüyen bu kuençleşme olayında hidrofobik etkileşimin önemli bir rol aldığı ortaya çıkmıştır. EDA ile BSA etkileşimi bazı metal iyonların (Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , ve Ni^{+2}) BSA ile etkileşimiyle kıyaslanmış ve EDA/BSA etkileşimin bağlanma sabiti bu iyonların varlığında azaldığı tespit edilmiştir (Yi vd 2011).

Wang ve arkadaşları azelnidipine ve BSA arasındaki etkileşimi floresans spektroskopisi ve sirküler dikrozim (CD) tekniği ile incelemiştir. BSA ile azelnidipine arasındaki kuençleşmenin hem statik hem de dinamik kuençleşme üzerinde yürüdüğünü tespit etmişlerdir. Van't Hoff eşitliği kullanılarak hesaplanan termodinamik parametreler (ΔH^0 , ΔS^0) sırasıyla $-49,77 \text{ kJmol}^{-1}$ ve $-64,47 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ olarak bulunmuş ve bunun sonucunda azelnidipine-BSA kompleksinde hidrojen bağlarının büyük etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. $\Delta\lambda=15$ ve $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 'de alınan senkronize floresans spektroskopisine göre BSA'nın triptofan bölgesinde polaritenin arttığı görülmüştür. Buna bağlı olarak azelnidipine'in floroforun triptofan bölgesiyle daha çok kuençleştiği belirtilmiştir. Enerji transfer parametreleri olan $J= 5,33 \times 10^{-15} \text{ cm}^3\text{Lmol}^{-1}$, $R_0= 2,29 \text{ nm}$, $r=2,66 \text{ nm}$, $E=0,295$ olarak bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca insan vücudu için önemli rol alan Al^{+3} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , K^+ , Mg^{+2} , Zn^{+2} etkisi incelenmiş; sırasıyla Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Al^{+3} , K^+ , ve Ca^{+2} varlığında azelnidipine-BSA bağlanma sabitlerinin azaldığı görülmüştür. Hesaplanan termodinamik parametrelere göre bu sistemde hidrojen bağlarının önemli rol aldığı görülmüştür (Wang vd 2010).

5,6 benzo-4-azidomethyl coumarin (5BAMC) ile Analin'in arasındaki floresans kuençleşmesi benzen, dioksan, tetrahidrofuran, asetonitril ve dimetilformamit çözücülerini içerisindeki incelenmiştir. Stern-Volmer eşitliği kullanılarak hesaplanan k_q değerleri göz önüne alındığında asetonitril ve dimetilformamit çözücülerin kullanıldığı kuençleşme olayında diğer çözücülerle kıyasla kuençleşme veriminin çok yüksek olduğu bulunmuştur. Bulunan k_q değerleri çözücü viskozitesi ve çözücü polaritesi ile kıyaslanmıştır. Kıyaslanma sonucunda k_q değerinin çözeltili polaritesinden bağımsız ve çözeltili viskozitesine bağlı olduğu ortaya çıkmıştır (Melavanki vd 2009).

Apigenin (Ap) ile İnsan serum albümini arasındaki bağlanmanın statik kuençleşme mekanizması üzerinde yürüdüğü ve HSA'nın Apigenin ile kuençleşmesinin çok güçlü olduğu bulunmuştur. Farklı sıcaklıklar kullanılarak hesaplanan termodinamik parametrelere göre ($\Delta H = 17,49 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta S = 37,04 \text{ Jmol}^{-1}$) bu olayda hidrofobik ve elektrostatik etkileşimin etkin olduğu kabul edilmiştir. Apigenin, $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 'de alınan senkronize floresans spektrumları ve moleküler modelleme tekniğiyle HSA'nın I. bölgesine bağlandığı ortaya çıkmıştır. Hidrojen bağlarının bulunmadığı bu bölgede Förster enerji transferine göre bağlanma mesafesi 3,21 nm olarak bulunmuştur (Zoua vd 2007).

3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones bileşiğinin primidin halkasında farklı aril gurupları içeren formları ile Sığır serum albümin (BSA) arasındaki etkileşim incelenmiştir. Her bir formun BSA ile etkileşimi sonucunda bağlanma sabitleri bulunmuş ve birbirleriyle kıyaslanmıştır. Förster enerji transferi teorisine göre formların bağlanma mesafesi yaklaşık olarak 7 nm civarında olduğu tespit edilmiştir. Statik kuençleşme mekanizmasının etkin olduğu bulunmuştur. Senkronize floresans ölçümlerine göre BSA'nın konformasyonun değişmediği sonucuna varılmıştır (Yi vd 2010).

Spektroskopik ve moleküler docking yöntemi kullanılarak C.I Acid Red 73 bileşiğinin İnsan serum albümini (HSA) arasındaki etkileşim incelenmiştir. Moleküller docking yöntemine göre HSA'nın subdomain IB bölgesi C.I Acid Red 73 bileşiği için aktif bir bağlanma noktası olduğu bulunmuştur. 298 K'de bağlanma noktası sayısı (n) 1,73 olarak bulunmuştur. Ayrıca C.I Acid Red 73 bileşiği ile HSA etkileşiminin kompleks oluşum türünden olduğu spektroskopik yöntemlerle ortaya çıkarılmıştır.

Moleküller docking çalışması ve termodinamik verilere göre hidrofobik ve hidrojen bağları etkileşimi tespit edilmiştir. Förster enerji transferi teorisine göre boyar madde ile HSA'nın bağlanma mesafesi 3,28 nm olarak hesaplanmıştır (Gao vd 2010).

Pepsin (mide de bulunan bir enzim türü) ile prulifloxacin arasındaki etkileşim çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Pepsin ile prulifloxacin tarafında çok kuvvetli bir şekilde kuençleşmiştir. Statik kuençleşme mekanizmasının etkin olduğu bu etkileşimde floresans kuençleşme teknikleri kullanılarak farklı sıcaklıklarda elde edilen bağlanma parametreleri değerlendirilmiştir. 288 K'de $n=1,69$ ve $K_b=3,32 \times 10^8 \text{ Lmol}^{-1}$; 298 K'de $n=1,70$, $K_b=3,35 \text{ Lmol}^{-1}$; 308 K'de $n=1,72$ $K_b=3,96 \text{ Lmol}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bağlanma sabitleri ve bağlanma noktalarının değeri sıcaklıkla artığı görülmüştür. Üç farklı sıcaklıkta hesaplanan ΔG^0 'ın negatif değerde çıkması etkileşimin eş zamanlı olduğu tespit edilmiştir. ΔS 'in pozitif değerde bulunması pepsin-prulifloxacin sisteminde düzensizliğin artığının bir göstergesidir. Donör (pepsin) ve akseptörün (prulifloxacin) arasındaki mesafe Förster enerji transferi teorisine göre 0,95 nm olarak hesaplanmıştır (Zi vd 2009).

Rhodium complex $\text{RhCl}(\text{CO})(\text{TPPTS})^2$ ile katyonik, non-iyonik ve anyonik surfaktantlar arasındaki etkileşim spektroskopik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Rhodium complex $\text{RhCl}(\text{CO})(\text{TPPTS})^2$, katyonik surfaktant olan cetyltrimethylammonium (CTAB) ile etkileşimin çok hızlı olduğu görülmüştür. Non-iyonik surfactant Tween 20 ilavesiyle non-iyonik misel yüzeyinde zayıf Rhodium katalizlerinden dolayı hidroformülasyonun çok açık bir şekilde artırmadığı sonucuna varılmıştır. Rhodium complex $\text{RhCl}(\text{CO})(\text{TPPTS})^2$ ile anyonik surfaktant olan SDS etkileşiminin SDS üzerindeki negatif grupların etkisiyle gerçekleşmediği görülmüştür (Hua vd 2012).

Debabrata ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada Durağan-Hal floresans spektroskopisi kullanılarak 7-Aminino kumarin bileşikleri ile rhodomine 590 bileşiği arasında enerji transferleri susuz asetonitril ve metanol'de incelenmiştir. Bu çalışmada 7-amino kumarin bileşikleri donör olarak ve rhodomine 590 bileşiği ise akseptör olarak kullanılmıştır.

R_0 değerleri 100 \AA^0 dan yüksek çıkmış ve overlap bölgesi (J) de tüm donör ve akseptörler için yüksek bulunmuştur. J değerleri 10^{-11} ve $10^{-12} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-3}$ gibi yüksek bir değerde çıkmasına rağmen enerji transfer hız sabiti düşük çıkmıştır. Enerji transferlerindeki farklılık donrun yapısına bağlı olduğunu ortaya koymuştur (Debabrata vd 2004).

Essaway ve arkadaşı insan kanında glukoz tayini için pyronin Y ve glukoz etkileşimini floresans kuençleşme tekniğini kullanarak incelemişlerdir. Pyronin Y çözeltisine eklenen glukozun PyY'nin kuenleşmesini çok yüksek olduğu bulunmuştur. PyY pozitif yük noktası ile yük transfer uyarılma durumu sonucunda radyasyonsuz etkileşim artmış buna bağlı olarak PyY ile glukoz arasındaki kuençleşme durumu spesifik bir hal almıştır. Bu çalışmada, uygun çözücü, uygun pH ve eklenen florofor ile maksimum floresans yoğunluğu icelenmiştir. 10 hasta ve 10 sağlıklı insandan alınan kan örneklerinden floresans kuençleşme tekniğiyle glukoz tayini, standart glukoz tayini ile karşılaştırılmış ve her test üç kere tekrarlanmıştır bunun sonucunda % 100'e yakın sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, kanda girişime sebep olabilecek Na^+ , K^+ , Mg^+ , Ca^+ Cl^- , I^- , Zn^+ , SO_4^{2-} , fruktoz, laktoz, galaktoz, maltoz, aksorbik asit ile PyY etkileşimi incelenmiş ve glukozu göre kuenleşmelerinin çok düşük olduğu grlmştir (Essaway ve Attia 2012).

Toprak ve arkadaşı Orientin ile BSA arasındaki etkileşimi floresans ve absorbans spektroskopisini kullanarak incelemişler. Kuençleşme mekanizması Stern-Volmer eşitliğine göre orientin ve BSA arasındaki etkileşimin statik kuençleşme üzerinde yürüdüğü belirlenmiştir. Senkronize floresans yönetimi kullanılarak BSA'nın konformasyonun değiştiği grlmştir. $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 'de alınmış senkronize floresans spektrumları ile $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 'de alınmış senkronize floresans spektrumları karşılaştırılmış triptofan bölgesinde polaritenin tirozin bölgesine göre daha çok artığı belirlenmiş ve bunun sonucunda orientinin BSA'nın triptofan bölgesiyle daha çok kuençleştiği bildirilmiştir. Förster enerji transfer denklemi kullanılarak enerji transfer parametreleri olan R_0 , r , E(enerji transfer hızı) ve J(overlap) değerleri sırasıyla $5,09 \text{ nm}$, $4,48 \text{ nm}$, $0,684$ ve $6,8 \times 10^{-13} \text{ cm}^3/\text{Lmol}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca termodinamik parametreler (ΔH , ΔG ve ΔS) hesaplanmış bunun sonucunda orientin-BSA sisteminde başlıca elektrostatik ve hidrofobik etkileşimin rol aldığı belirlenmiştir (Toprak ve Arik 2013).

Theasinesin ile BSA arasındaki etkileşimin floresans kuençleşmesi incelenmiş elde edilen veriler Stern-Volmer eşitliği kullanılarak değerlendirilmiş ve bunun sonucunda theasinesin ile BSA arasındaki mekanizmanın statik kuençleşme üzerinde yürüdüğü belirtilmiştir. Senkronize floresans spektroskopisinde uyarılma ve emisyon dalga boyları arasındaki fark 15 ve 60 nm olacak şekilde ayarlanmış ve BSA'nın triptofan bölgesinde polaritenin değiştiği sonucuna varılmış buna bağlı olarak theasinesin molekülün triptofan bölgesiyle daha çok kuençleştiği sonucuna varılmıştır. Bu sistemde ayrıca Förster enerji transfer denklemi yardımıyla R_0 , r , E , J , değerleri sırasıyla 3,06 nm, 4,64 nm, 7,57, $8,68 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Sistemin termodinamik parametreleri ($\Delta H^0 < 0$, $\Delta G^0 < 0$ ve $\Delta S^0 > 0$) theasinesin-BSA etkileşiminde elektrostatik ve hidrofobik etkileşim ön planda olduğu söylenmiştir (Zhao vd 2010).

Dibozal ve BSA sistemi floresans UV-vis, RLS ve Fourier transform infrared (FT-IR) spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada dibozal'ın BSA ile kuençleşmesi statik kuençleşme mekanizmasına dayandığı belirtilmiştir. Dibozal-BSA sisteminin bağlanma sabitleri 295, 302 ve 309 K'de sırasıyla 0,83, 1,23, $1,62 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ olarak bulunmuştur. Termodinamik parametreler olan ΔH^0 , ΔS^0 'in pozitif değerlerde çıkması sistemin etkileşiminde hidrofobik gücün etkin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca standart gibbs enerjisinin negatif çıkması dibozal-BSA etkileşimin kendiliğinde olduğu bulunmuştur. Förster enerji transfer teorisine göre sistemin bağlanma mesafesi 4,28 nm olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada dibozal-BSA sistemine ibuprofen ve fenilbutazon eklenerek bu moleküllerin BSA'ya bağlanması karşılaştırılmış ve sonuçta fenilbutazon'un dibazol ile yarışmalı olarak BSA ile kuençleştiği ortaya çıkmıştır. Sistemde Dibazolun yokluğunda Alınan FT-IR ölçümlerinde amid I pikleri $1653,3 \text{ cm}^{-1}$ şiddetinde görülmüştür. Ortama dibazol konulduğunda amid I pikleri $1653,2$ 'ye kaymıştır. Bunun sonucunda BSA konformasyonu dibazol eklenmesiyle değiştiği belirtilmiştir (Wang vd 2010)

Bovine serum albümin (BSA) ve Rhodamine (RH) arasındaki etkileşimin mekanizması floresans spektroskopisi kullanılarak araştırılmıştır. Sistemde RB konsantrasyonu artırıldığında BSA ile kuençleştiği görülmüştür. Benzer şekilde BSA konsantrasyonları artırıldığında RB'nin kuençleştiği görülmüştür. Bu sistemde gerçekleşen çift kuençleşme RB-BSA arasındaki enerji transferine bağlanmıştır. Bu olayın floresans

kuençleşmesi Stern-Volmer eşitliğine göre hem statik hem de dinamik olduğu belirtilmiştir. RB'nin floresans uyarılma spektrumu 580 nm'ye ayarlanıp 250 nm'den 700 nm'ye kadar taranmıştır. Elde edilen sonuçlar 580 nm'de alınan emisyon 280 nm uyarılma için uygun olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden BSA-RB kompleksi 280 nm'de uyarılmıştır (Zhu *vd* 2009).

Li ve arkadaşları rutin ile BSA arasındaki etkileşimi floresans ve absorbans spektroskopisini kullanarak incelemiştir. Kuençleşme mekanizması Stern-Volmer eşitliğine göre, rutin ve BSA arasındaki etkileşimin statik kuençleşme üzerinde yürüdüğü belirlenmiştir. Bu çalışma da rutin ile BSA arasında oluşan kompleksin Cu^{+2} , Fe^{+3} eklenmesiyle ortaya çıkan sonuçlar tartışılmıştır. UV-vis'den alınan veriler Cu^{+2} , Fe^{+3} olduğu ortamda 210 nm'de güçlü absorbans pikleri elde edilmiştir; bu iki metal iyonun olmadığı durumda 279 nm'de zayıf pikler elde edilmiştir. Rutin molekülünün BSA'nın hangi bölgesiyle etkileştiğini belirlemek için phenylbutazone (PB) ve flufenamic (FA) ile yarışmalı reaksiyona sokulmuştur. Daha önce yapılan deneylerde PB'nin BSA'nın Subdomain IIA bölgesine ve FA'nın ise Subdomain IA bölgesine bağlandığı tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak bu çalışmada PB'nin Rutin'in bağlandığı bölge olan Subdomain IIA bölgesine bağlandığı belirlenmiştir (Li *vd* 2011).

Floresin (FI) molekülü ile katyonik boyar madde olan Safranin T (ST) ve setil trimetil anyonyum bromid'in (CTAB) misel çözeltisi arasında dipol-dipol etkileşim sayesinde gerçekleşen enerji transfer olayı incelenmiştir. CTAB ile floresin arasındaki kritik enerji transfer mesafesi (R_0) 8,52 nm olarak bulunmuştur. CTAB'nin misel yarı çap uzunluğu 4,57 nm olarak hesaplanmıştır. FI konsantrasyonu $3,3 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} ve ST konsantrasyonu $3,2 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} olarak sabit tutulmuş ve CTAB'nin enerji transfer verimliliği gözlemlenmiştir. CTAB'nin konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonun olduğu noktaya kadar artırılmış ve bunun sonucunda enerji transfer verimliliğinin doğrusal bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. FI, $3,3 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} olduğu durumda ST konsantrasyonu artırılarak FI çözeltisine eklenmiş FI'nın elektronik absorpsiyon spektrumu ST'nin varlığından etkilenmemiştir. Diğer bir taraftan kademeli olarak çözeltiliye eklenen ST, FI molekülünün floresans şiddetini ve kuantum verimini azaltmıştır. Bu yüzden ST molekülü kuençir olarak önemli bir rol oynamıştır. FI molekülünün floresans yarı ömrü su içerisinde 3,76 ns CTAB içerisinde 4,40 ns olarak bulunmuştur.

Bu durum FI'nın misel içerisinde hareketinin kısıtlı olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. FI'nın misel ve CTAB sisteminde bağlanma sabitleri K ve n sırasıyla $n=1,27$, $K=6,76 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ve $n=1,29$, $K= 5,29 \times 10^5$ olarak bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca alkol çözeltilerin viskozitesinin enerji transferi üzerine etkisi incelenmiştir. Bağlanma sabiti değerleri, Bütanol>Propanol>Etanol>Metanol şeklinde bulunmuştur. Bu durumda artan viskoziteye bağlı olarak enerji transfer verimliliği ve bağlanma sabitleri artışı şeklinde izah edilmiştir (Chatterjee vd 2005).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.

Çalışmalarda kullanılan pyronin Y (PyY), İnsan serum albümin (HSA), sığır serum albümin (BSA), H₂SO₄, H₃PO₄, ve Etanol SİGMA-ALDRİCH firmasından temin edilmiştir. NaOH, CARLO ERBA firmasından temin edilmiştir.

3.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Spektrofotometre	: Shimadzu UV-3600 UV-VIS-NIR Spektrofotometre
Spektrofluorometre	: Perkin Elmer LS55 Floresence Spektrofluorometre
Ultrasonik Banyo	: Wisd
IR Spektrometre	: Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spektrometre
Otomatik Pipetler	: Scorex
Diyonize Su Cihazı	: GFL 2008
pH Metre	: Orian 3 Star
Ultrasonik Karıştırıcı	: Elma S 60 H
Hassas Terazî	: Denver Instrument SI-234

3.3. Numunelerin Hazırlanması

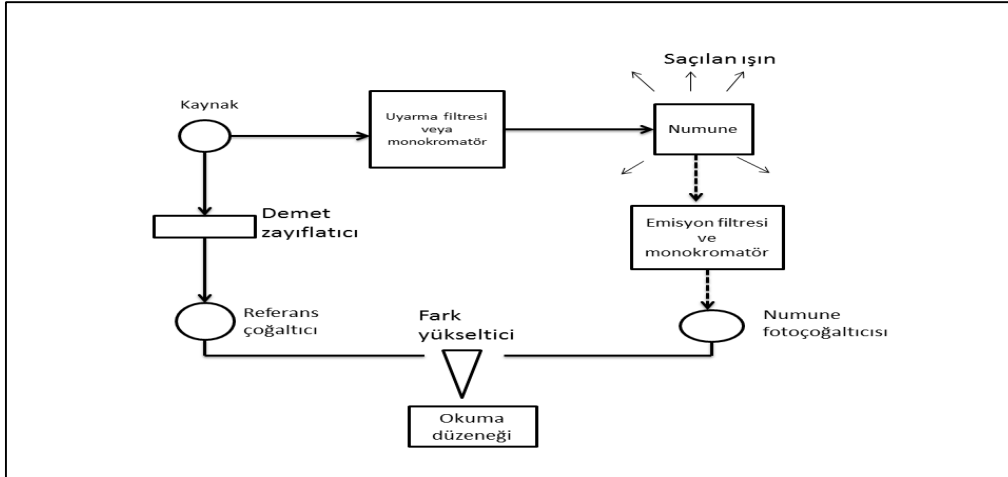
Pyronin Y'nin etanol içerisinde $1,0 \times 10^{-3}$ M'lık stok çözeltisi hazırlanmıştır. Donör olarak kullanılan HSA ve BSA'nın pH \approx 7,2 fosfat tamponu içerisinde $5,0 \times 10^{-6}$ M'lık sabit çözeltileri hazırlanmıştır. Fosfat tamponun hazırlanması için uygun miktarda alınmış H₃PO₄ çözeltisi üzerine NaOH eklenerek oluşan fosfat tamponun pH'sı 7,2 olarak ayarlanmıştır

3.4. Yöntemler

3.4.1. Floresans ve Senkronize Floresans Spektrumların alınması

Fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış HSA ve BSA çözeltilerine farklı miktarlarda PyY eklenerek elde edilen çözeltilerin floresans spektrumları oda sıcaklığında dahil dört farklı sıcaklıkta alınmıştır. Aynı yöntemle hazırlanmış HSA-PyY ve BSA-PyY çözeltilerin senkronize floresansı sadece oda sıcaklığında alınmıştır. Floresans spektrumların şekli, sadece floresans şiddetine bağlı olmadığı gibi cihazda bulunan lambanın, monokromatörün ve transduserin özelliklerine bağlı olduğu için düzenlenmiştir.

Şekil 3.1’de şekli gösterilen bütün florometreler de güç kaynağındaki dalgalanmaların etkisini gidermek için çift ışınli optik sistem kullanılır. Güç kaynağından çıkan ışın numuneye gelmeden önce floresans uyuracak ışınları geçiren ve emisyonu sebep olacak ışınları dışarıda tutan birincil optik filtreler olarak adlandırılan uyarılma filtresi veya bir monokromatörden geçer. Numuneye ulaşan ışın numunenin floresans uyarılmasına sebep olur ancak floresans için uygun ışın dik açıdan gözlenen ışındır. Örnekten yayılan ışın sistemde bulunan ikincil optik filtrelerle seçildikten sonra numune çoğaltıcısına gönderilir. Öte taraftan referans ışın demeti ise ışının gücünü floresans ışınına azaltan bir demet zayıflatıcıdan geçtikten sonra referans çoğaltıcıya ulaşır. Referans ve numune çoğaltıcıdan gelen sinyaller fark yükselticiden okuma düzeneğine gönderilir (Gündüz 2007). Şekil 3.2’de kullanılan spektroflore metre cihazı gösterilmiştir.



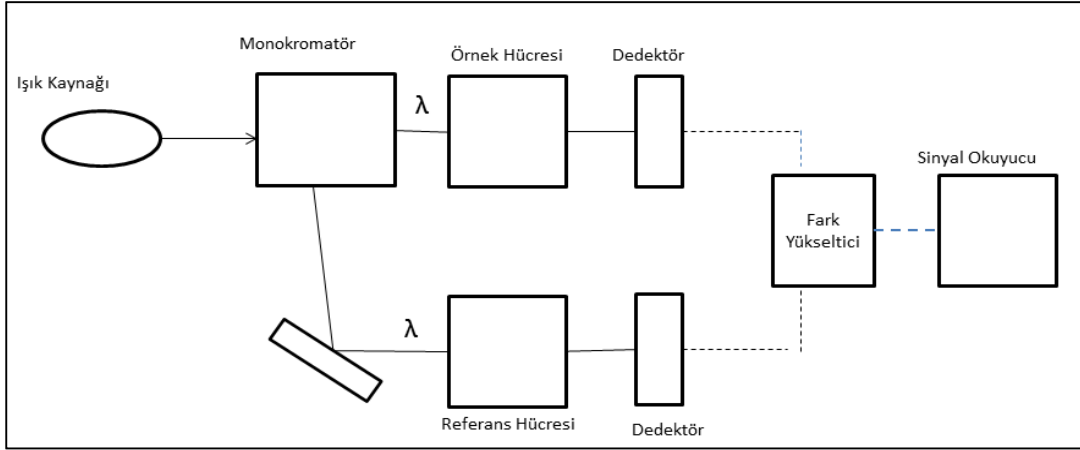
Şekil 3.1. Bir spektrofloreometrenin bileşenleri (Skoog vd 1998)



Şekil 3.2. Perkin Elmer LS55 Floresence Spektrofloreometre

3.4.2 Absorpsiyon spektrumlarının alınması

Şekil 3.3'te çift ışık yollu spektrometrenin bileşenleri gösterilmiştir. Bu sistemde ışık kaynağından çıkan ışın önce monokromatöre gelir. Monokromatörden çıkan ışık iki eşit dalga boyuna ayrılarak örnek hücreesine ve referans hücreesine gönderilir. Bu iki ışık demeti iki farklı dedektörle algılanır. Detektörlerde örnekteki geçirgenlik değeri ile referans hücreye konulan çözücünün geçirgenlik değeri sürekli karşılaştırılmış olur ve burada oluşan sinyallerin oranı sinyal okuyucuda okunur. Kullanılan spektrometre Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Çift ışık yollu spektrometre (Skoog vd 1998)



Şekil 3.4. Shimadzu UV-3600 UV-VIS-NIR Spektrofotometre

3.4.3 IR Spektrumların alınması

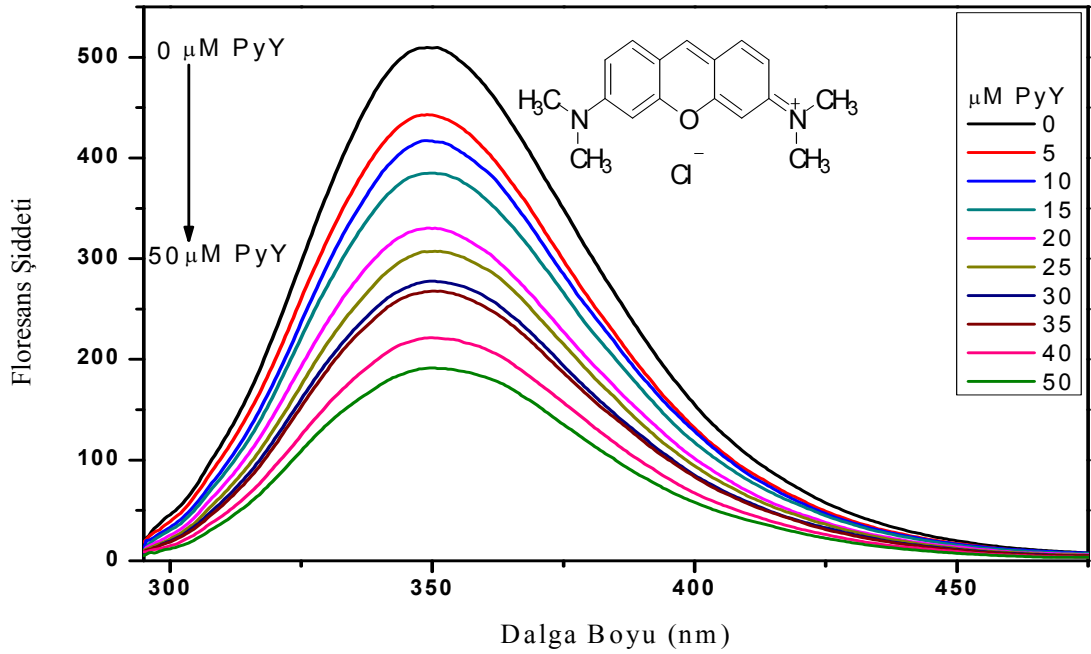
Ölçümlerde kullanılan FT-IR cihazının fotoğrafı Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Fosfat tamponu çözeltisinde hazırlanmış 5 μ M BSA ve HSA çözeltileri ATR aparatının üzerine damlatıldıktan sonra spektrumlar alınmıştır. Sonra aynı yöntemle 5 μ M BSA-PyY ve HSA-PyY çözeltilerin IR spektrumları alınmıştır.



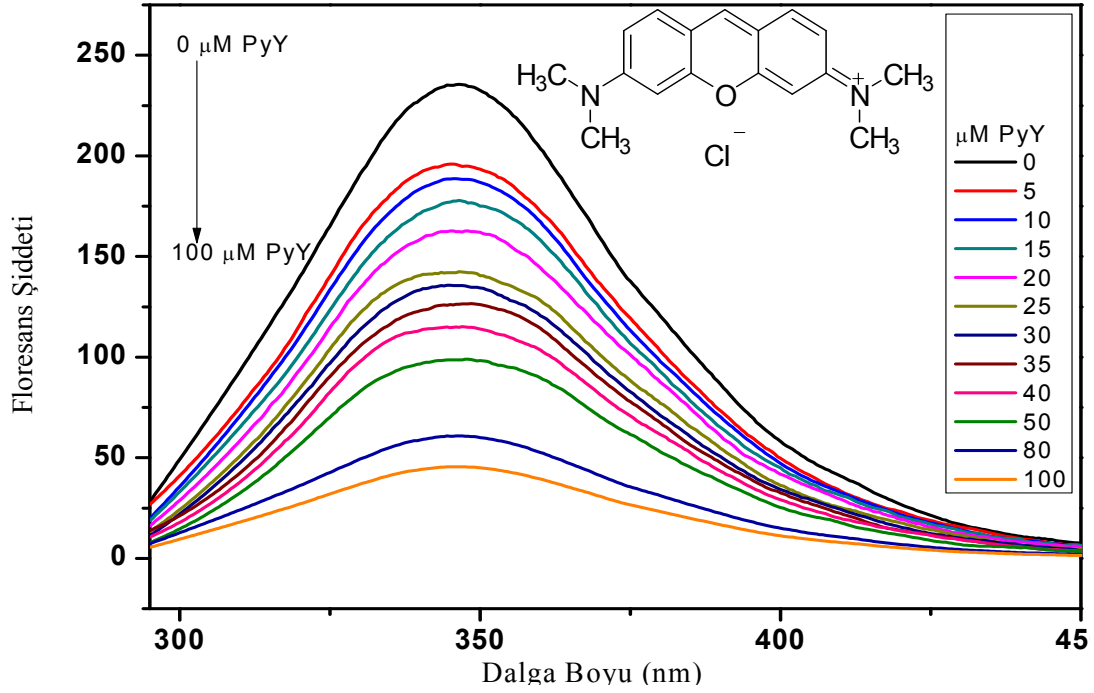
Şekil 3.5. Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spektrometre

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Floresans kuençleşme reaksiyonlarında, floroforun floresans şiddeti kuençir molekülleri ile etkileşime girmesiyle azalma göstermektedir (Evale vd 2009 and Guo vd 2009). HSA ve BSA moleküllerinin PyY'nin artan konsantrasyonlarında alınmış floresans spektrumları sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Spektrumlardan anlaşılacağı gibi PyY eklenmesiyle HSA ve BSA'nın floresans şiddetlerinde azalma meydana gelmiştir. Sonuç olarak bu iki molekülle PyY arasında bir etkileşimin olduğu gözükmemektedir.

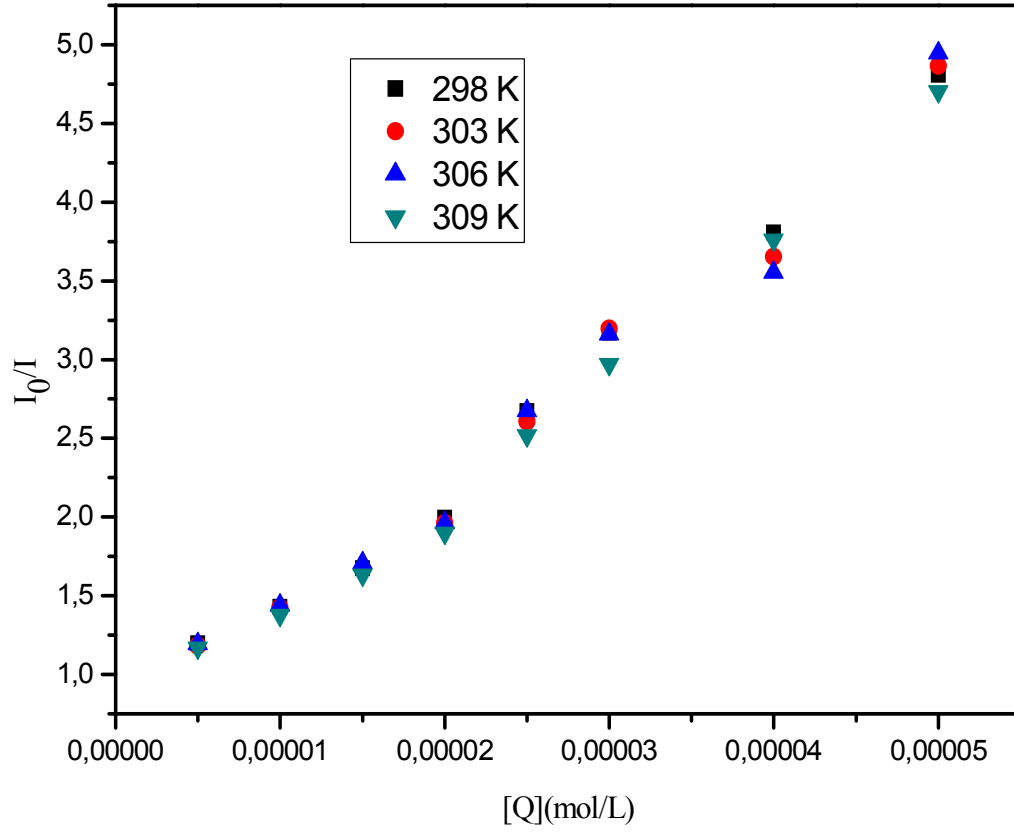


Şekil 4.1. Oda sıcaklığında farklı konsantrasyonlarda Pyronin Y içeren BSA çözeltisine ait floresans spektrumları

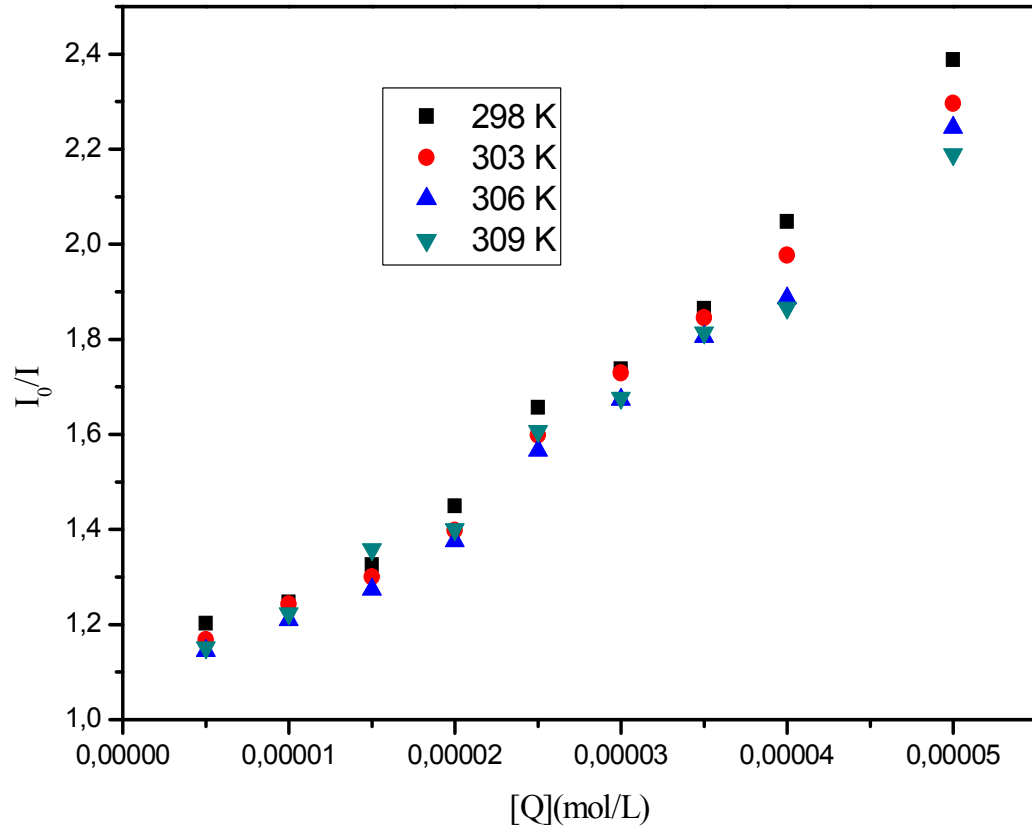


Şekil 4.2. Oda sıcaklığında farklı konsantrasyonlarda Pyronin Y içeren HSA çözeltisine ait floresans spektrumları

Etkileşimin türünü belirlemek için Stern-Volmer denkleminden yararlanılmıştır. Florofor ile kuençir arasında meydana gelen etkileşim iki mekanizma üzerinde yürümektedir. Biri karanlık kompleks oluşumuyla sonuçlanan statik kuençleşme diğeri ise çarpışma sonucu oluşan dinamik kuençleşmedir. BSA-PyY ile HSA-PyY molekülleri arasındaki kuençleşme mekanizmasını belirlemek için farklı sıcaklıklarda ölçümler alınmış ve Stern-Volmer denklemi denklem 1.6 kullanılarak sistemlere ait kuençleşme sabitleri sıcaklığın bir fonksiyonu olarak elde edilmiştir. Şekil 4.3 ve 4.4'te verilen grafiklerin eğiminden elde edilen Kuençleşme sabitleri Tablo 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. BSA-PyY sistemine ait Stern-Volmer grafiği



Şekil 4.4. HSA-PyY sistemine ait Stern-Volmer grafiği,

Tablo 4.1. BSA-PyY sistemine ait ve farklı sıcaklıklarda elde edilmiş kuençleşme sabitler

T(K)	K_{SV} ($\times 10^4$ L. mol ⁻¹)	K_q ($\times 10^{12}$ L. mol ⁻¹ . s ⁻¹)	R^2
298	8,26	8,26	0,9868
303	8,24	8,24	0,9779
306	8,21	8,21	0,9734
309	8,10	8,10	0,9862

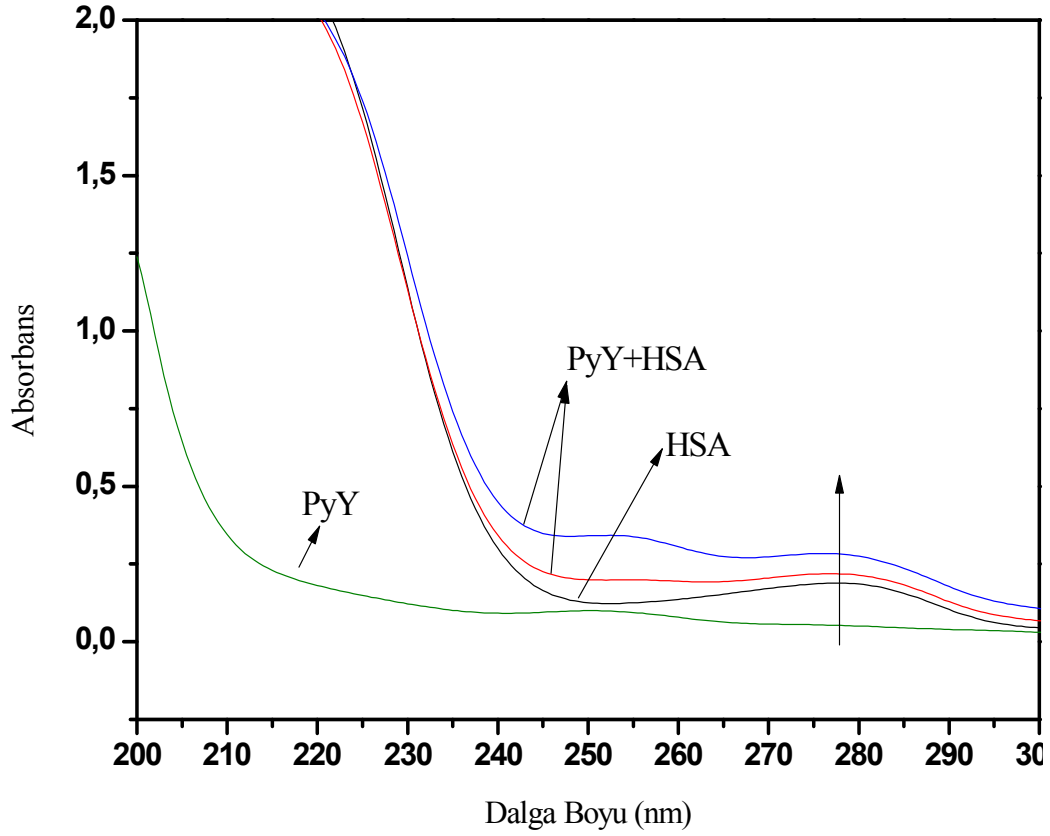
Tablo 4.2. HSA-PyY sistemine ait ve farklı sıcaklıklarda elde edilmiş kuençleşme sabitleri

T(K)	K_{SV} ($\times 10^4$ L. mol ⁻¹)	K_q ($\times 10^{12}$ L. mol ⁻¹ . s ⁻¹)	R^2
298	8,70	8,70	0,9820
303	8,58	8,58	0,9775
306	8,32	8,32	0,9844
309	8,26	8,26	0,9799

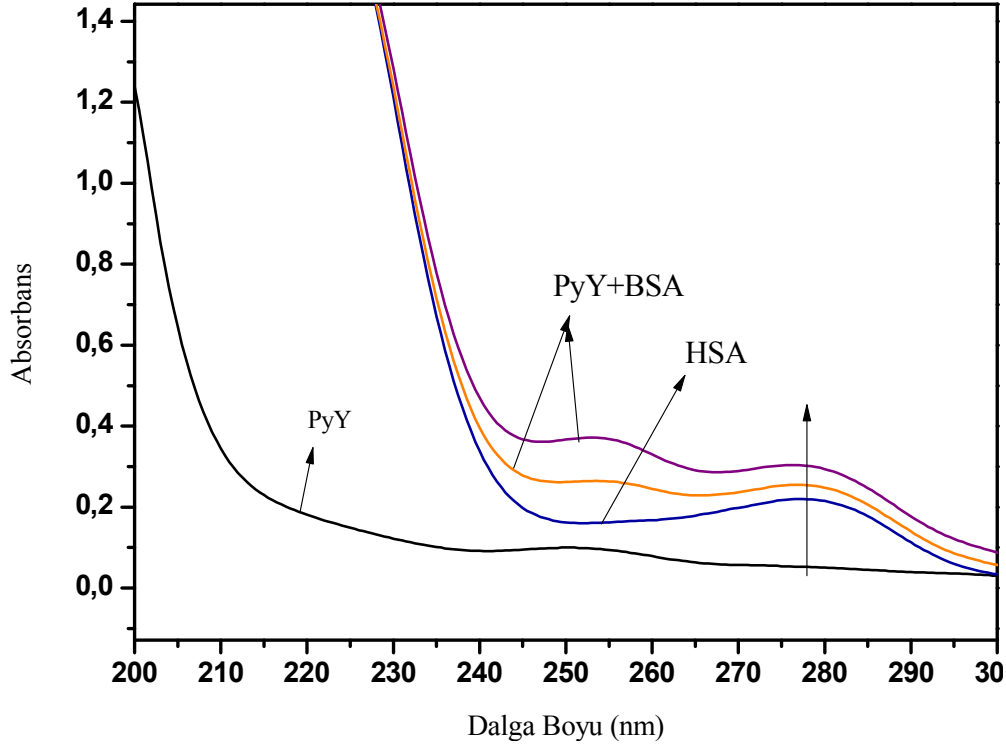
Statik kuençleşme olayında kuençır floroforun aktif bölgesiyle bir kompleks oluşturduğu için kuençleşme sabiti (K_{SV}) sıcaklık artışıyla azalmaktadır. Dinamik kuençleşme de ise, sıcaklığın artmasıyla birlikte kuençırın difüzyonu arttığı için kuençleşme sabiti artmaktadır (Bozkurt vd 2013). Tablo 4.1 ve 4.2’de verilen kuençleşme sabitlerinin sıcaklığa bağlı olarak azaldığı görülmüştür. Bu duruma bağlı olarak her iki sistemin etkileşim mekanizmasının statik kuençleşme üzerinde yürüdüğünü söyleyebiliriz. Ayrıca bimoleküller kuençleşme sabitlerinin her iki sistem için dinamik kuençleşme sabitinden ($2,0 \times 10^{10}$ L.mol⁻¹s⁻¹) büyük olması statik kuençleşmeyi desteklemektedir (Huang vd 2010).

Statik kuençleşme olayında florofor ile kuençır arasında kompleks oluştuğu için sistemin absorpsiyon spektrumunda düzensizlik olurken; dinamik kuençleşme olayında ise sistemin absorpsiyon spektrumunda herhangi bir değişim olmamaktadır (Ge vd 2010

and Li vd 2011). HSA-PyY ile BSA-PyY sistemlerine ait absorpsiyon spektrumları Şekil 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir.



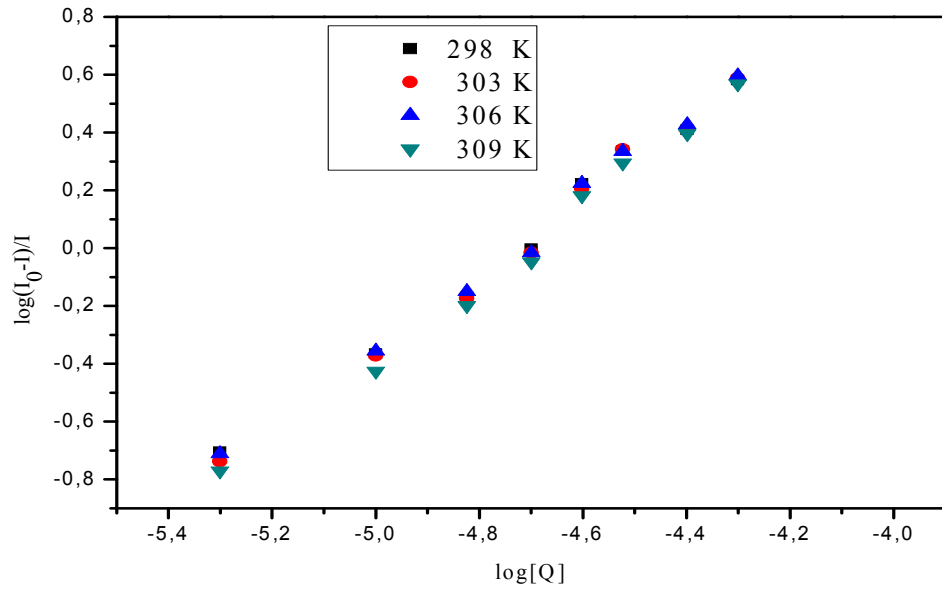
Şekil 4.5. Saf PyY ile PyY-HSA sistemlerine absorpsiyon spektrumları



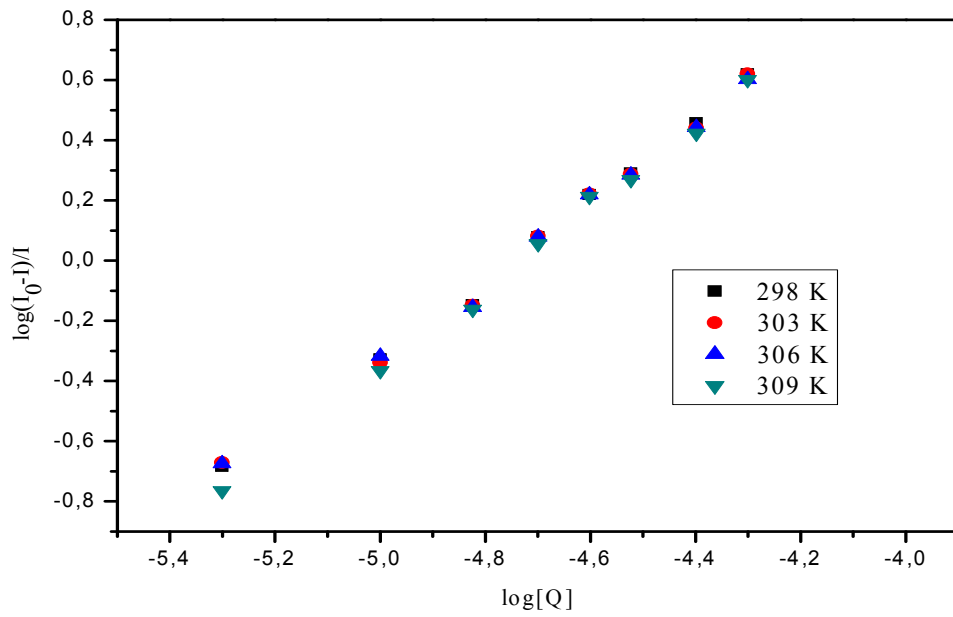
Şekil 4.6. Saf PyY ile PyY-BSA sistemine ait absorpsiyon spektrumları

Şekil 4.5. PyY ile PyY-HSA, Şekil 4.6. ise PyY ile PyY-BSA sistemlerinin absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Her iki durumda PyY'nin varlığında HSA ve BSA'nın absorpsiyon spektrumlarında düzensizlik görülmüştür. Bu durum artan kuençır konsantrasyonunda da görülmektedir. Floroforun absorpsiyon piklerindeki düzensizlik kuençleşme mekanizmasının statik kuençleşme üzerinde yürüdüğünü desteklemektedir. Maksimum absorpsiyon dalga boylarının maviye doğru kayması sistemde hidrofobik etkileşimin artığını göstermektedir (Toprak vd 2014).

BSA-PyY ile HSA-PyY sistemlerinde florofor ile kuençır arasındaki kuençleşme mekanizmasının statik kuençleşme olduğu belirlenmiştir. Bağlanma parametreleri hakkında daha fazla bilgi edinmek için denklem 1.12 kullanılarak BSA-PyY ile HSA-PyY sistemleri ait modifiye Stern-Volmer grafikleri çizilmiş ve sırasıyla Şekil 4.7 ile 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. BSA-PyY sistemi için modifiye Stern-Volmer denklemi



Şeki 4.8. HSA-PyY sistemi için modifiye Stern-Volmer denklemi

Bu grafikler ve denklem 1.12 kullanılarak her iki sistem için elde edilen bağlanma sabitleri Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'da gösterilmiştir

Tablo.4.3. Farklı sıcaklıklar kullanılarak elde edilen BSA-PyY etkileşimine ait bağlanma sabitleri

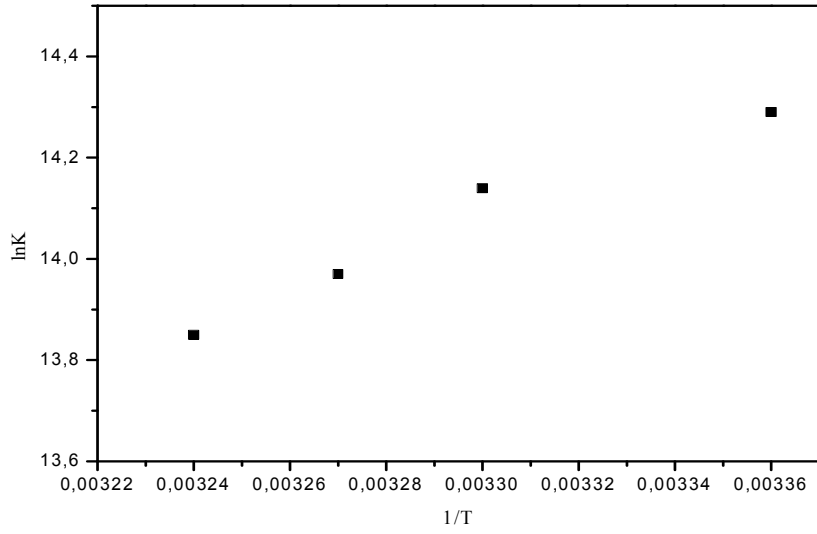
T(K)	$K_A(x10^7 Lmol^{-1})$	n	R^2
298	1,7	1,3114	0,9894
303	2,2	1,3432	0,9905
306	2,3	1,3536	0,9908
309	2,5	1,3616	0,9920

Tablo.4.4. Farklı sıcaklıklar kullanılarak elde edilen HSA-PyY etkileşimine ait bağlanma sabitleri

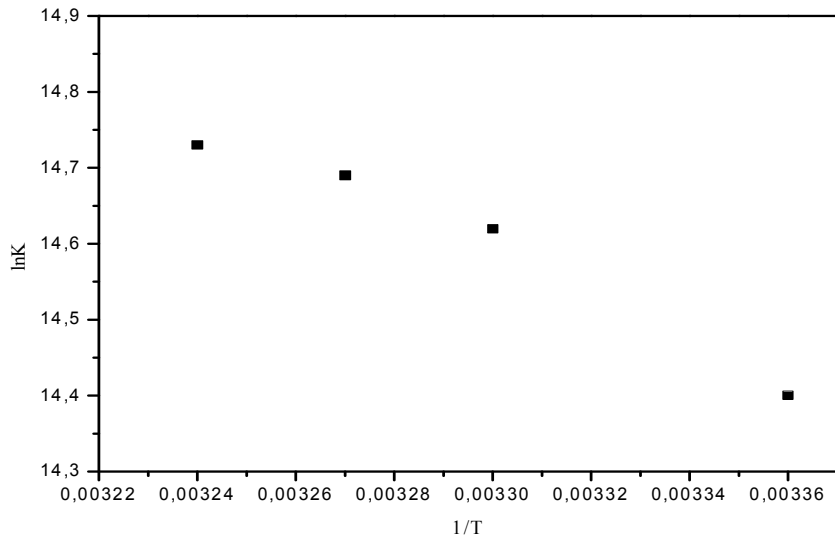
T(K)	$K_A(x10^7 Lmol^{-1})$	n	R^2
298	1,6	1,3072	0,99958
303	1,3	1,2925	0,9940
306	1,1	1,2784	0,9949
309	0,9	1,2549	0,9969

K_A ve n değerleri makro molekül gurupları için sırasıyla bağlanma sabitleri ve bağlanma noktasını ifade etmektedir. Tablo 4.3'te gösterilen BSA-PyY sistemine ait bağlanma sabitleri ve bağlanma noktası değerleri sıcaklığın artmasıyla birlikte arttığı görülmüştür. Buna bağlı olarak BSA'nın aktif yapısına bağlanan molekül sayısının ve bağlanma noktasının sıcaklıkla arttığı belirlenmiştir.

Tablo 4.4'te gösterilen ve HSA-PyY sistemine ait farklı sıcaklıklarda elde edilmiş bağlanma sabitleri ve bağlanma noktası değerleri azaldığı görülmüştür. BSA-PyY sistemin tersine, HSA-PyY sisteminde sıcaklığın artmasıyla HSA'nın aktif yapısına bağlanan molekül sayısı ve HSA üzerindeki bağlanma noktalarının azaldığı söyleyebiliriz. Bu molekül çiftlerinin bağlanma olayının doğasını daha iyi bir şekilde belirleye bilmek için termodinamik parametrelere başvuruldu bunun için K_A 'nın farklı sıcaklıklardaki değerleri denklem 1.13 ve 1.14 kullanılarak çizilmiş grafikleri Şekil 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.9. HSA-PyY sistemi için Von't Hoff denklemi grafiği



Şekil 4.10. BSA-PyY sistemi için Von't Hoff denklemi grafiği

Grafiklerden ve denklem 1.13 ve 1.14 'den elde edilen sabitler BSA-PyY ve HSA-PyY sistemleri için sırasıyla Tablo 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.5. BSA-PyY sistemine ait termodinamik parametreler

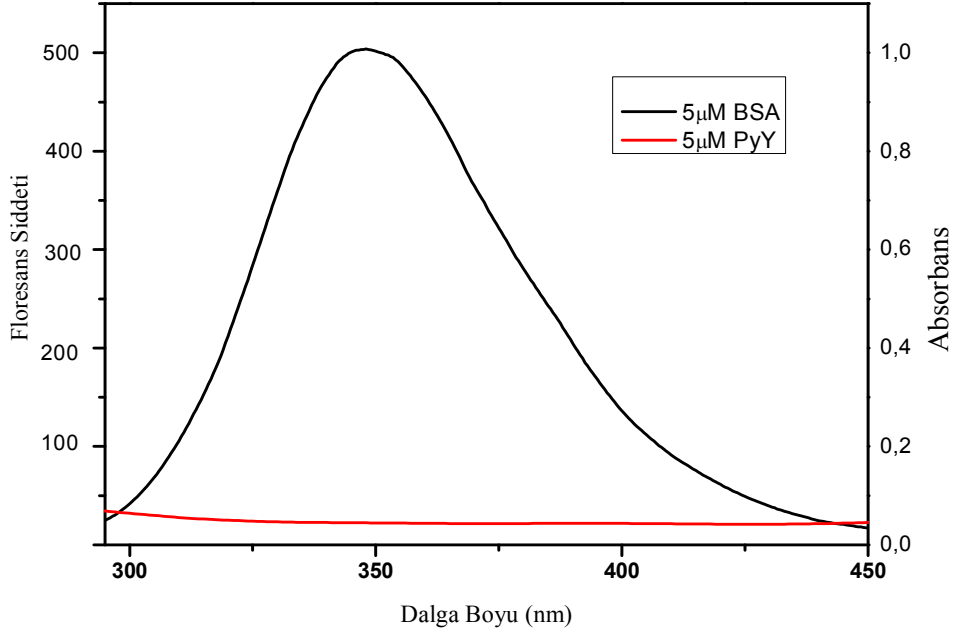
T(K)	ΔG (kJ.mol⁻¹)	ΔH (kJ.mol⁻¹)	ΔS (J. mol⁻¹K⁻¹)
298	-35,757	23,43	198,63
303	-36,747		
306	-37,344		
309	-37,940		

Tablo 4.6. HSA-PyY sistemine ait termodinamik parametreler

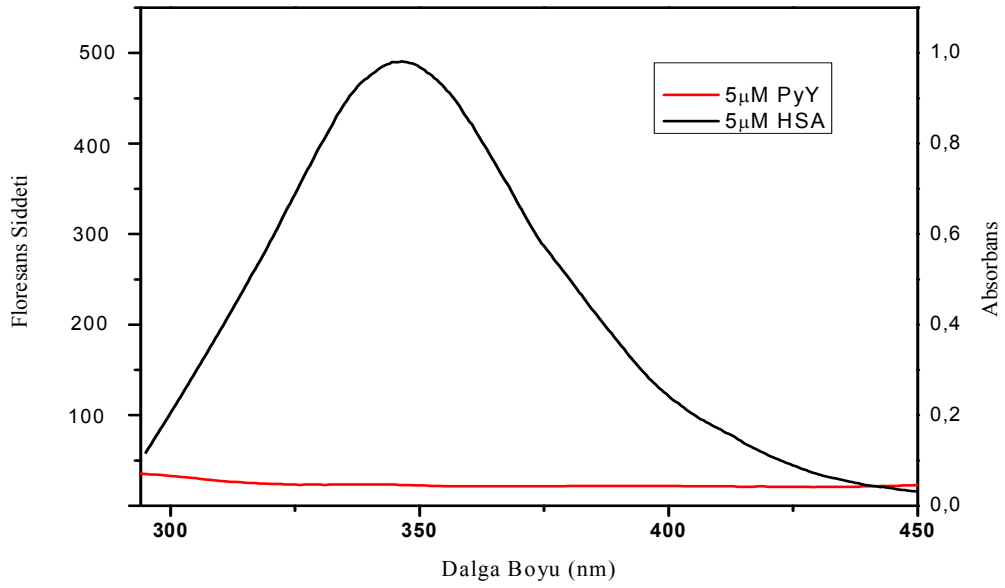
T(K)	ΔG (kJ.mol⁻¹)	ΔH (kJ.mol⁻¹)	ΔS (J.mol⁻¹K⁻¹)
298	-35,41	-30,79	15,50
303	-35,49		
306	-35,53		
309	-35,58		

Her iki tabloda Gibbs serbest (ΔG) enerjilerinin negatif çıkması HSA-PyY ve BSA-PyY sistemleri arasındaki etkileşimin kendiliğinden gerçekleştiğini göstermektedir. Tablo 4.6'da HSA-PyY için entalpi değişimi (ΔH) negatif ve entropi değişiminin (ΔS) pozitif olması iki molekül arasındaki etkileşimlerde güçlü hidrofobik etkileşimin yanı sıra elektrostatik etkileşimin de etkin olduğu görülmektedir. BSA-PyY sisteminde entalpi (ΔH) ve entropi değişiminin (ΔS) pozitif olması bu iki molekül arasında hidrofobik etkileşimler ve van der Waals bağlarının etkili olduğunu göstermektedir.

İki molekül arasındaki etkileşim mesafelerini ve enerji transfer verimini hesaplamak için Förster teorisinden faydalanılmaktadır. BSA-PyY ile HSA-PyY sistemleri için aynı şartlar altında alınmış donörün absorbanans spektrumu ile akseptörün floresans emisyon spektrumları arasındaki overlaplar sırasıyla Şekil 4.11 ile Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. BSA-PyY sistemine ait spektral örtüşme grafiği



Şekil 4.12. HSA-PyY sistemine ait spektral örtüşme grafiği

Şekil 4.11’de BSA-PyY, Şekil 4.12’de HSA-PyY molekül çiftlerinin spektral örtüşmelerini gösteren spektrumların altında kalan alan (J) enerji transfer hız sabitinin ve Förster mesafesinin (R_0) belirlenmesinde kullanılmıştır. Spektral örtüşme alanı (J) denklem 1.18 kullanılarak belirlenmiştir. Förster mesafesi (R_0) denklem 1.20 kullanılarak elde edilmiştir. Bu denklemde kuantum verimi (ϕ_D) BSA için 0,14; $k^2= 2/3$ fosfat tamponun kırılma indisi n ise 1,336 olarak alınmıştır (Li vd). HSA için kuantum verimi (ϕ_D) 0,118 olarak alınmıştır (Lakowicz 1973). E değeri ise denklem 1.21 kullanılarak elde edilmiştir. Bu denklemler kullanılarak BSA-PyY ile HSA-PyY molekül çiftlerine ait enerji transfer parametreleri aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 4.7. BSA-PyY sistemine ait enerji transfer parametreleri

E	J (cm³ L⁻¹mol⁻¹)	R₀ (nm)	r (nm)
0.565	1.199x10⁻¹²	3.65	3,00

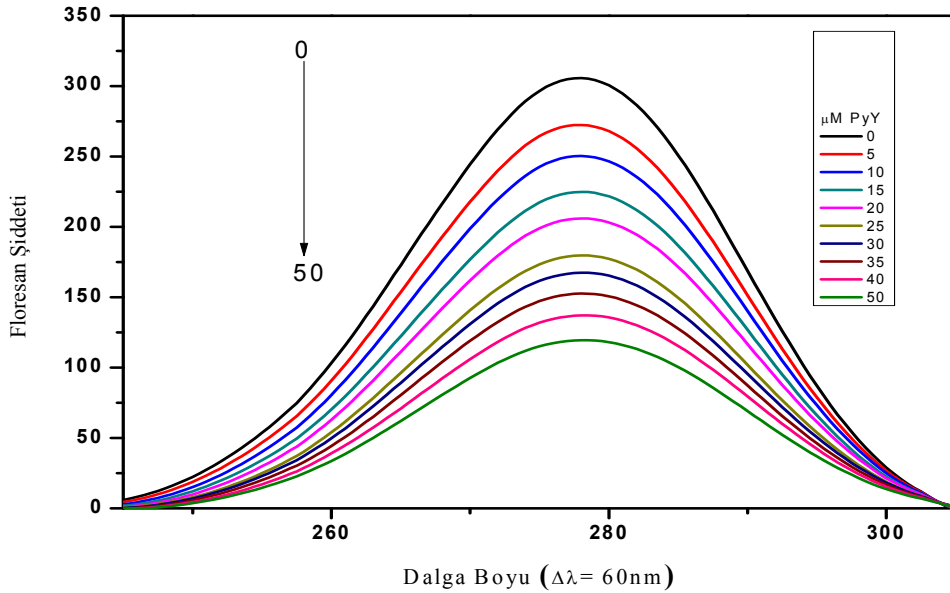
Tablo 4.8. HSA-PyY sistemine ait enerji transfer parametreleri

E	J (cm³ L⁻¹mol⁻¹)	R₀ (nm)	r (nm)
0.741	2.24x10⁻¹²	5.64	1.96

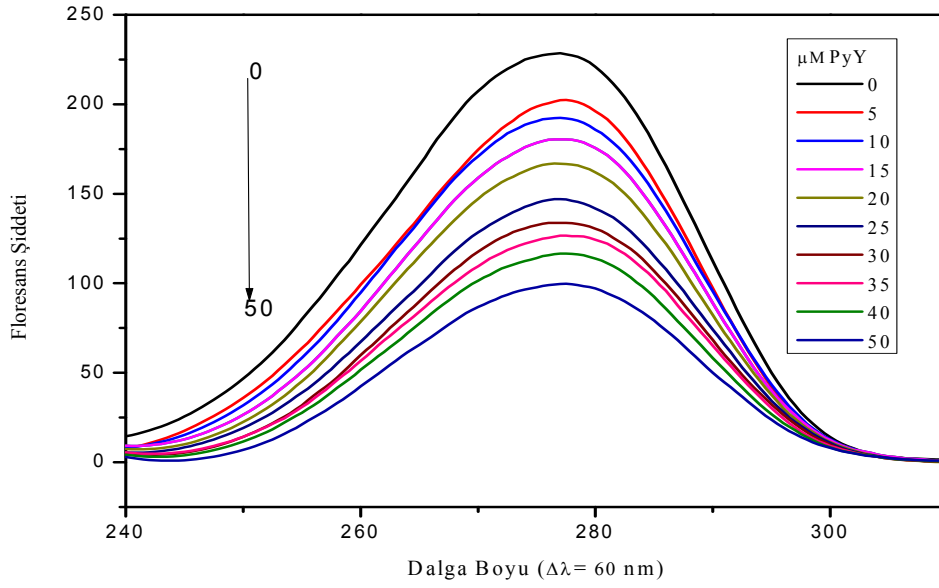
Literatürde moleküller arasındaki enerji transferinin gerçekleşmesi için r değerinin 8 nm’den küçük olması ön görülmüştür. BSA-PyY ile HSA-PyY sistemlerinde r değerleri sırasıyla 3,00 ile 1,96 nm olarak bulunmuştur. r değerlerin 8 nm’den küçük olması enerji transfer olasılığını arttırmakta ve değerlerin oldukça küçük bulunması her iki sistemde genel olarak statik kuençleşmenin etkin olduğunu göstermektedir (Wang vd 2011).

Ortama eklenen kuençir proteinin konformasyonunu değiştirebilir. Bu durum senkronize floresans spektrumları alınarak tespit edilmiştir. Senkronize floresans

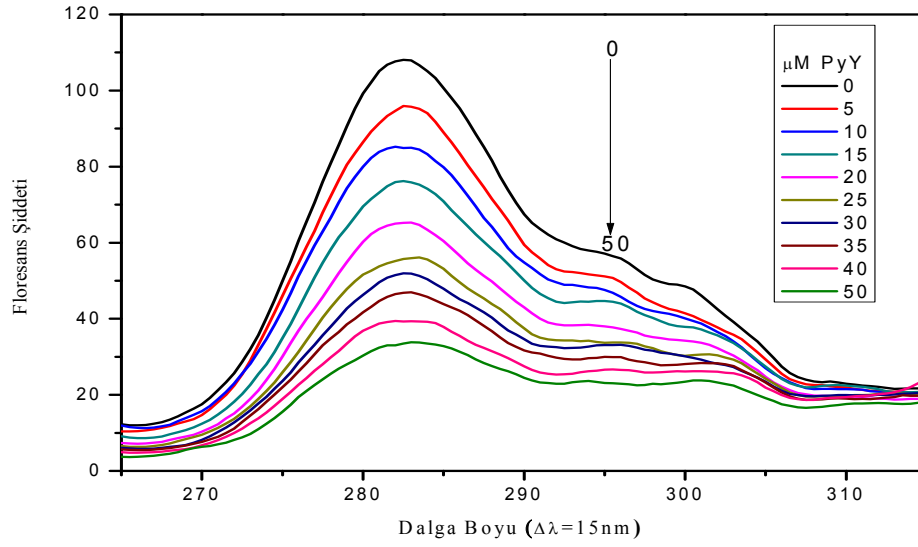
spektrumları BSA ve HSA proteinlerinin konformasyonlarını etkileyip etkilemediği hakkında bize bilgi verir. Çünkü, albüminlerin floresans aktif bölgeleri olan triptofan ve tirozin residülerinin floresans emisyon şiddetlerindeki değişimin oranı bize kuençırın hangi bölgeyle daha fazla etkileşim içinde olduğunu göstermektedir. $\Delta\lambda=15$ nm’de alınmış senkronize floresans spektrumların şiddetindeki değişim sadece tirozin residüsünün karakteri hakkında bilgi verir. $\Delta\lambda=60$ nm’de alınmış senkronize floresans spektrumları şiddetindeki değişim sadece triptofan residüsünün karakteri hakkında bize bilgi verir (Ye and Xu 2007). BSA-PyY ile HSA-PyY sistemlerine ait senkronize floresans spektrumları aşağıda gösterilmiştir.



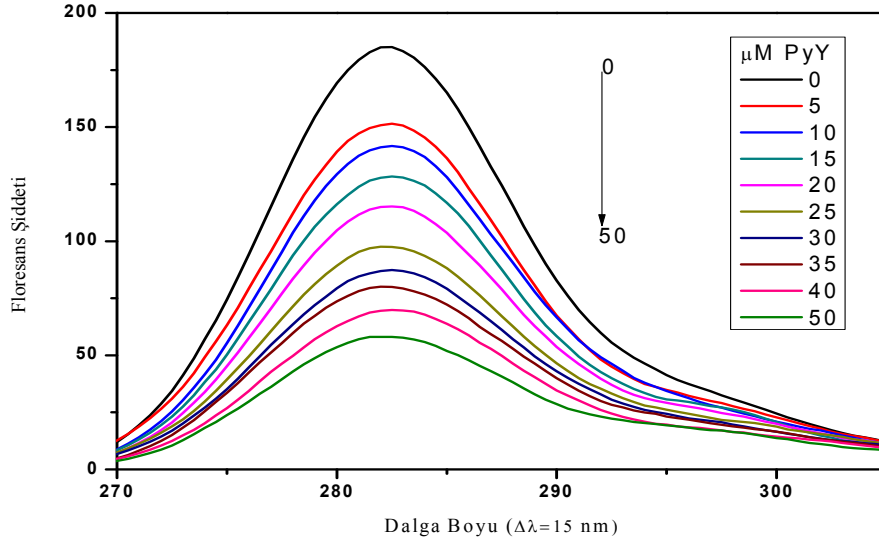
Şekil 4.13. Oda sıcaklığında PyY'nin farklı konsantrasyonlarında BSA molekülü için alınmış senkronize floresans spektumları ($\Delta\lambda=60$ nm)



Şekil 4.14. Oda sıcaklığında PyY'nin farklı konsantrasyonlarında HSA molekülü için alınmış senkronize floresans spektumları ($\Delta\lambda=60$ nm)



Şekil 4.15. Oda sıcaklığında PyY'nin farklı konsantrasyonlarında BSA molekülü için alınmış senkronize floresans spektumları ($\Delta\lambda=15$ nm)

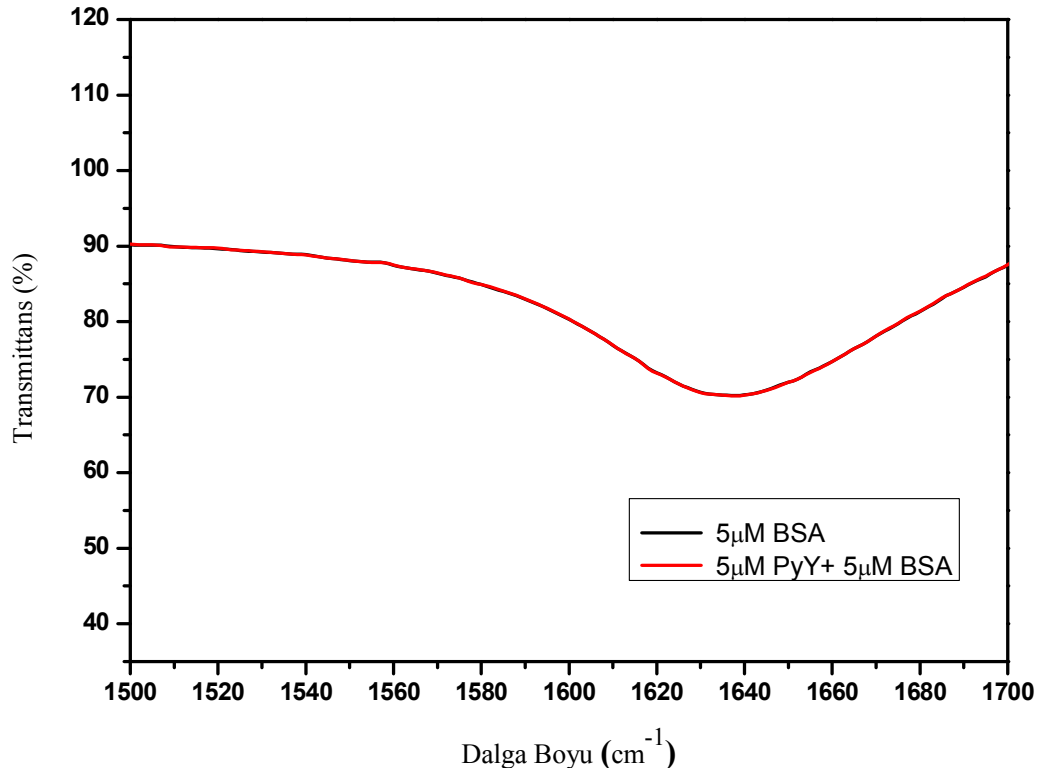


Şekil 4.16. Oda sıcaklığında PyY'nin farklı konsantrasyonlarında HSA molekülü için alınmış senkronize floresans spektrumları ($\Delta\lambda=15$ nm)

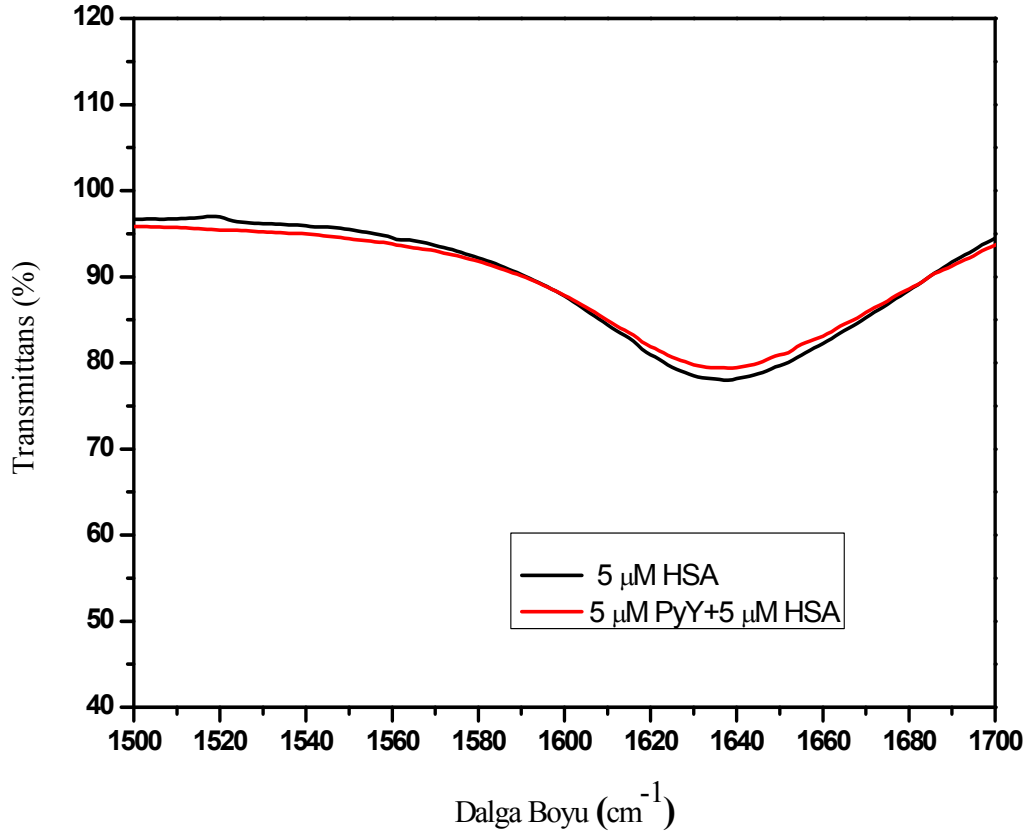
BSA-PyY sistemi için senkronize floresans spektrumları incelendiğinde Şekil 4.15'teki grafikte floresans şiddetinin Şekil 4.13'e göre oranla daha fazla değiştiği görülmüştür. Bu durumda PyY moleküllerin BSA'nın tirozin bölgesiyle daha fazla etkileştiğini göstermektedir. HSA-PyY sistemi için senkronize floresans spektrumları incelendiğinde Şekil 4.16'da floresans şiddetinin Şekil 4.14'e göre daha fazla değiştiği belirlenmiştir. Bu durum, PyY moleküllerin HSA'nın da tirozin bölgesiyle daha fazla etkileştiğini göstermektedir.

Ortamda PyY bulunmadığı sırada BSA'nın maksimum emisyon dalga boyu 278 nm'de görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda PyY eklendiğinde Şekil 4.13 ve 4.15'te BSA'nın maksimum emisyon pikinde dikkate değer bir kayma gözlemlenmemiştir. Şekli 4.14'de ve 4.16'da çözelti ortamında PyY bulunmadığı sırada HSA'nın maksimum emisyon pikinin 282 nm olduğu görülmüş ve ortama farklı konsantrasyonlarda PyY eklendiğinde HSA'nın maksimum emisyon pikinde herhangi bir değişim tespit edilmemiştir. Sonuç olarak her iki sistemde hem tirozin hem de triptofan bölgelerin polaritesinin değişmediği buna bağla olarak BSA ve HSA proteinlerinin konformasyonu değişmemiştir.

BSA-PyY ve HSA-PyY sistemi hakkında daha fazla bilgi edinmek için FT-IR spektroskopisi kullanılmıştır. FT-IR spektroskopisi ile proteinlerin peptit bağlarında bulunan amid bandlarının titreşimi hakkında bilgi edinilir. Proteinlerdeki amid bağları arasında amid I pikleri 1600-1700 nm bölgesinde, amid II pikleri 1548 nm bölgesinde görülür. Ancak amid I bandları amid II bandlarına göre daha hasastır (Wang vd 2010). FT-IR spektroskopisi kullanılarak elde edilen spektrumlar aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.17. Sadece BSA ile BSA-PyY'nin olduğu sisteme ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.18. Sadece HSA ile HSA-PyY'nin olduğu sisteme ait FT-IR spektrumu

Şekil 4.17'de ve Şekil 4.18'de verilen ve sistemlere ait FT-IR spektrumlarında proteinlere ait amid I ve amid II piklerin görüldüğü bölgelerde piklerde dikkate değer bir değişim görülmemiştir. Bunun sonucunda hem BSA hem de HSA proteinlerinin konformasyonunda herhangi bir değişim meydana gelmediğini söylebiliriz. Bu durum senkronize floresans spektrumlarında elde edilen sonuç ile benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇLAR

Serum albüminler, kanda bolca bulunun ve dolaşım sistemini meydana getiren önemli proteinlerdir. Bu proteinler, kana karışan ilaçların, eser elementlerin, boyar maddelerin, vb. maddelerin depolanmasını ve taşımını sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda PyY molekülün metabolizmada moleküller arasındaki etkileşim tespit edilmesine rağmen bu boyar maddenin metabolizmadaki moleküllerle etkileşim türü üzerine çalışılmamıştır. Bu çalışmada PyY molekülün BSA ve HSA molekülleri arasındaki etkileşim türü belirlenmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Fosfat tamponu içerisinde $pH \approx 7.20$ 'de HSA ve BSA konsantrasyonu sabit tutularak PyY konsantrasyonu değiştirilerek floresans, absorpsiyon ve senkronize floresans, FT-IR spektrumları alınmıştır. Floresans spektroskopisi ile elde edilen verilerde artan PyY konsantrasyonlarına bağlı olarak BSA ile HSA'nın floresans şiddetinin azaldığı görülmüştür. Buna bağlı olarak BSA-PyY ile HSA-PyY molekülleri arasında etkileşimin meydana geldiği, bu etkileşimin farklı sıcaklıklarda Stern-Volmer modeline göre incelenmiş ve karanlık bir kompleks oluşum olarak bilinen statik kuençleşme olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bimoleküller kuençleşme sabitlerinin her iki sistem için bipolimer kuençleşme sabitinden büyük olması statik kuençleşmeyi desteklemiştir.

Farklı sıcaklıklar kullanılarak elde edilen termodinamik parametreler (ΔG , ΔH , ΔS), BSA-PyY arasında hidrofobik etkileşim ve van der-Walls etkileşimin etkin olduğu; HSA-PyY arasındaki etkileşimde güçlü hidrofobik ve elektrostatik etkileşimin etkin olduğu görülmüştür. Her iki sistem için Gibbs serbest enerji değişiminin negatif olması moleküller arasındaki etkileşimin kendiliğinden gerçekleştiğini göstermiştir.

BSA-PyY çifti ile HSA-PyY çifti arasındaki etkileşim Förster enerji transfer teorisine göre incelenmiştir. Buna göre enerji transferin gerçekleştiği durumda BSA ile PyY arasındaki mesafe 3,00 nm; HSA ile PyY arasındaki mesafe 1,96 nm olarak

belirlenmiştir. Bu durum HSA-PyY ile BSA-PyY sistemlerinde statik kuençleşmenin olduğunu desteklemiştir.

Alınan Senkronize floresans spektrumları ile protein moleküllerin konformasyonlarının PyY varlığında değişip değişmedi hakkında bilgi edinmiştir. Buna bağlı olarak her iki protein molekülün polaritesinin değişmemesi konformasyonel yapının değişmediğini göstermiştir. BSA-PyY ile HSA-PyY'nin absorpsiyon spektrumlarında düzensizlik olması Stern-Volmer eşitliği kullanılarak belirlenen statik kuençleşme mekanizmasını desteklemiştir. FT-IR spektroskopisi ile proteinlerin peptit bağlarında bulunan amid bandaların titreşimi hakkında bilgi edinilmiş buna göre hem HSA-PyY sisteminde hem de BSA-PyY sisteminde amid bandaların yer değiştirmedeği tespit edilmiştir. Bunun sonucunda her iki sistemde konformasyonel yapıların değişmediği doğrulanmıştır.

KAYNAKLAR

Arik, M., Çelebi, N., Onganer, Y., “Fluorescence quenching of fluorescein with molecular oxygen in solution”, *J Photochem Photobiol A-Chem*, 170:105-111, 2005

Arik, M., Onganer, Y., “Molecular excitons of Pyronin B and Pyronin Y in colloidal silica suspension”, *Chem. Phys. Lett.*,375:126-133, 2003.

Bozkurt, E., Bayraktutan, T., Acar, M., Toprak, M., “Spectroscopic studies on the interaction of fluorescein and safranin T in pc liposomes”, *Spectrochim Acta A*, 101:31-5, 2013.

Bozkurt, E., “Coloidal CdS’ün kumarin-151’,n floresans şiddeti üzerine etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2007.

Chatterjee, S., Susantamanay, N., “Flourescence resonance energy transfer from fluorescein to safranin T in solutions and in micellar medium”, *Photochem. Photobiol. A:Chem.*,173:221-227, 2005.

Cheng, Z., “Interaction of tetramethylpyrazine with two serum albumins by a hybrid spectroscopic method”, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. and Biomol. Spect.*, 93:321–330, 2012.

Debabrata, S., Debdeep, C., “Study of energy transfer from 7-amino coumarin donors to rhodamine 6G acceptor in non-aqueous reverse micelles”. *Chem. Phys. Lett.*,401:546-552, 2004.

EL-Daly S.A., “Photophysical properties: Laser activity of and energy transfer from 1,4-bis[-(2-benzothiazoly)vinyl]benzene(BVB)”, *Photochem. Photobiol. A: Chem.* 124:127-133, 1999.

EL-Daly S.A., “Spectral, life-time, flourescence quenching , energy transfer and Photodecomposition of N,N’-bis(,6-dimethyl phenyl)-3,4:9,10 perylentetracarboxylic dimide(DXP)” *Spectrochim. Acta Part A*,55:143, 1999.

Essaway, A.A., Attia, M.S., “Novel application of pyronin Y fluorophore as high sensitive optical sensor of glucose in human serum” , *Talanta*, 107:18-24, 2013.

Evale, BG., Hanagodimath, SM., “Fluorescence quenching of newly synthesized biologically active coumarin derivative by aniline in binary solvent mixtures”, *J Lumin.* 129:1174–80, 2009.

Ge, F., Chen, C., Liu, D., Han, B., Xiong, X., Zhao, S., "Study on the interaction between theasinesin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy", *J lumin.*, 130:168-173, 2010.

Gua, Y., Yue, Q., Gao, B., "Probing the molecular mechanism of C.I. Acid red 73 binding to human serum albumin", *Envir. Toxic. and Pharm.*, 30: 45–51, 2010.

Guy, D., Fabbienne, M., "Flourescence energy transfer in lipid vesicles. A Timeresolved analysis using stretched exponentials", *Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 89:135-140, 1995.

Gündüz, T., *İnstrümental analiz. Gazi Kitabevi, Ankara, 2007.*

He, X.M., Carter, D.C., *Atomic structure and chemistry of human serum albumin, Nature*, 358:209-215, 1992.

Huang, Y., Yang, J., Liu, B., Yu, Z., Gao, X., Tang, Y., Zi, Y., "Investigation on interaction of prulifloxacin with pepsin: A spectroscopic analysis", *Spectrochim. Acta Part A* 75:1024–1029, 2010.

Kun, R., Kis., B., Dekany, I., "Hydrophobization of bovine serum albumin with cationic surfactants with different hydrophobic chain length. *Coll. and surf. B: Biointer.*", 79:61-68, 2010.

Lakowicz, J. R., "Principle of flourescence spectroscopy", Plenium Pres, New York, 1983.

Lakowicz, J.R., *Volume 2 principles. Kluwer Academic publishers, New York, 2002.*

Li-Mei, Z., Cai-Hong, G., Hai-Yan, F., Hui, J., Hua, C., Rui-Xiang, H., Xian-Jun, L., "Interaction between water-soluble rhodium complex $\text{RhCl}(\text{CO})(\text{TPPTS})_2$ and surfactants probed by spectroscopic methods", *Spectrochim., Acta Part A* 93:198– 202, 2012.

Li, J., Wang, Z., Wang, J., Gao, J., Zou, M., Li, Y., Wang, B., Xia, L., "Spectroscopic investigation on the sonodynamic activity of safranin T to bovine serum albumin damage, *J Lumin.*, 132:282-288, 2012.

Melavanki, R.M., Kasunar, R.A., Kadavaramath, J.S., Kulakarni, M.V., "Quenching mechanisms of 5BAMC by aniline in different solvents using Stern-Volmer plots, *J Lumin.*, 129:1298–1303, 2009.

Förster, T., Sinanoğlu, O., "Modern quantum chemistry", Vol. III. New York Acedemic Press, 93, 1966.

Pamppa, P., Chiuri, R., Pellegrino, T., "Fluorescence resonance energy transfer induced by conjugation of metalloproteins to nanoparticles", *Chem. Phys.Lett.*, 417:351-357, 2005.

Qin, Y., Zhang, Y., Yan, S., Ye, L., “A comparison study on the interaction of hyperoside and bovine serum albumin with Tachiya model and Stern–Volmer equation”, *Spectrochim. Acta Part A* 75:1506–1510, 2010.

Rohatgi, K.K., Singhal, G.S., “Nature of bonding in dye Aggregates”, *Phys. Chem.*, 70:1965-1701, 1966.

Skoog, D., Holler, F., Nieman, T., “Principles of Instrumental Analysis”, fifty edition, Harcourt Brace and Company, 1998

Suppan, P., “Chemistry and Light, Published by the Royal Society of Chemistry”, Cambridge, 1994.

Tokmakoff, A., “Förster rezonance energy transfer”, MIT Department of Chemistry, 2008.

Toprak, M., “Metanol ortamında kumarin 35 ile pyronin bileşikleri arasındaki floresans enerji transferinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2006.

Valuer, B., Sanstos, MNB., “Moleculer flouresence”, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany, 2012

Wang, N., Ye, L., Yan, F., Xu, R., “spectroscopic studies on the intraction of azelnidipine with bovine serum albumin”, *Int. J Pharm.* 351:55-60, 2008.

Wang, T., Zhao, Z., Wei, B., Zhang, L., Ji, L., “Spekroskopik investigation on the binding of dibazol to bovine serum albümin”, *J Mol. Structure*, 970:128-133, 2010.

Wang W., Min, W., Chen, J., Wu, X., Hu, Z.,” Binding study of diprophylline with lysozyme by spectroscopic methods”, *J Lumin.*, 131:820–4, 2011.

Url 1,

<http://www.zamandayolculuk.com/cetinbal/3saydev.htm> (Son erişim tarihi: 27.07.2014)

Url 2,

http://en.wikipedia.org/wiki/Human_serum_albumin#mediaviewer/File:ALB_structure.png (Son erişim tarihi: 27.07.2014)

Url 3,

http://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_serum_albumin#mediaviewer/File:Bovine_serum_albumin_3v03_crystal_structure.jpg (, Son erişim tarihi 27.07.2014)

Yua, X., Liu, R., Ji, D., Xieb, J., Yanga, F., Li, X., Huanga, H., Yi, P., “Spectroscopic studies on the interactions between 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones and bovine serum albümin”, *Spectrochim. Acta Part A* 77: 213–218, 2010.

Yuan, J.L., Iv, Z., Liu, Z.G., Hu, Z., Zou, G.L., “Study on interaction between apigenin and human serum albumin by spectroscopy and molecular modeling”, *J., Photochem., and Photobio., A: Chem.*, 191: 104–113, 2007.

Zhu, J., Li, J.J., Zhao, J.W., “Spectral characters of Rhodamine B as a multi-information fluorescence probe for bovine serum albumins”, *Sens. and Act. B: Chem.*, 138:9-13, 2009.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Bingöl'de doğdu. İlk ve ortaokulu Bingöl'de, liseyi Nusaybin lisesi'nde tamamladı. 2004 yılında Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2010 yılında Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2010 yılından itibaren özel sektörde çalışmaktadır. 2012 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programına yerleşti.