

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

**FLORETİN İLE HSA ARASINDAKİ ETKİLEŞİMİNİN
LİPOZOM SİSTEMLERİNDE SPEKTROSKOPİK
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

YÜKSEKLİSANS TEZİ

SEDA KARABULUT

KİMYA ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Mahmut TOPRAK**

BİNGÖL-2019

ÖNSÖZ

Tez çalışmaları süresince yardımlarını ve bilgi birikimini esirgemeyen, çalışmaların tamamlanabilmesi için gerekli desteği veren insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, Doç. Dr Mahmut TOPRAK'a derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Öncelikle Bingöl Üniversitesi Rektörlüğüne, Deneysel çalışmaların yapılması ve yorumlaması sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren kimya bölümünün değerli Öğretim elemanları ve laboratuvar ekipmanların kullanılmasında bana yardımcı olan Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvar personeline desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Tez yazım aşamasında tezinde yararlandığım Dr Abdullah SALCI'ya, Tez çalışmamda desteklerinden dolayı Bingöl Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (Proje no: BÜBAP PROJESİ (BAP-199- 286-2015)) teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her konuda olduğu gibi, tez çalışmamda da bitmeyen bir sabırla beni hep ileriye yönlendiren, maddi, manevi destekleri ve sonsuz hoşgörüleri ile hep yanımda olan çalışmalarım sırasında gücümü ondan aldığım (merhum) annem Fatma KARABULUT'a, babam Mustafa KARABULUT'a, her zaman varlığını yanımda hissettiğim Handan YÜKSEL'e ve tüm aileme içten teşekkür ederim.

Seda KARABULUT

Bingöl 2019

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. Floretin..... | 2 |
| 1.2. İnsan Serum Albümin | 3 |
| 1.3. Işık ve Fotofizik | 4 |
| 1.4.1. Floresans Kuençleşme Mekanizmasının Belirlenmesi | 8 |
| 1.4.2. Bağlanma Sabiti ve Bağlanma Yeri Sayısı | 9 |
| 1.4.3. Termodinamik Parametreler..... | 9 |
| 1.4.4. Ayrışma Sabitinin Belirlenmesi..... | 10 |
| | |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 13 |
| | |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 17 |
| 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler | 17 |
| 3.1.2 Deneyde Kullanılan Cihazlar | 17 |
| 3.2. Lipozom ve Numunelerin Hazırlanması..... | 18 |
| 3.3. Yöntemler | 18 |
| 3.3.1. Floresans ve Absorbsiyon Spektrumlarının Alınması | 18 |
| | |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... | 19 |

| | |
|-------------------------------|----|
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER | 34 |
| KAYNAKLAR..... | 36 |
| ÖZGEÇMİŞ | 39 |

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|--------------|--|
| K_b | : Bağlanma sabiti |
| K_{sv} | : Dinamik Stern-Volmer hız sabiti |
| n | : Bağlanma yeri sayısı |
| K_a | : Bire bir kompleks oluşturma sabiti |
| λ | : Dalga boyu |
| I_0 | : Ortamda kuençırım bulunmadığı andaki floresans şiddeti |
| I | : Ortamda kuençırım bulunduğu andaki floresans şiddeti |
| $[Q]$ | : Kuençır konsantrasyonu |
| k_q | : Bimoleküler kuençleşme sabiti |
| τ | : Kuençırım ortamda olmadığı andaki floresans ömrü |
| R | : İdeal gaz sabiti |
| ΔG^0 | : Serbest enerji değişimi |
| k_{app} | : Bimoleküler kuençleşme sabiti |
| k_{qm} | : Bimoleküler kuençleşme sabiti |
| P | : Ayrışma oran sabiti |
| K_D | : Dinamik kuençleşme sabiti |
| K_s | : Statik kuençleşme sabiti |
| K_p | : Dağılma sabiti |
| $[Q]_L$ | : Lipit fazındaki kuençır konsantrasyonu |
| $[Q]_{su}$ | : Su fazındaki kuençır konsantrasyonu |
| V_{top} | : Sistemin toplam hacmi |
| V_{su} | : Suyun toplam hacmi |
| α_L | : Lipit fazın hacminin |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | | |
|------------|---|----|
| Şekil 1.1. | Lipozomların yapısı ve oluşumu. | 1 |
| Şekil 1.2. | Çok tabakalı lipozom modeli | 2 |
| Şekil 1.3. | Floretinin molekülünün kimyasal yapısı..... | 3 |
| Şekil 1.4. | İnsan serum albumin temsili gösterimi..... | 4 |
| Şekil 1.5. | Jablonski Diyagramı..... | 5 |
| Şekil 1.6. | Statik kuençleşme gösterimi..... | 6 |
| Şekil 1.7. | Statik ve Dinamik kuenleşmenin birleşmesi..... | 7 |
| Şekil 1.8. | Sıcaklığa bağlı olarak Stern Volmer Eğrileri | 8 |
| Şekil 3.1. | L-egg lecithin phosphatidylcholine molekülünün yapısı..... | 18 |
| Şekil 4.1. | 260 µM'lık lipozom içeren fosfat tamponu çözeltisi ortamında 5,0µM HSA'nın artan Floretin miktarlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumu. Floretinin konsantrasyonu: (1) 0µM; (2) 2 µM; (3) 4 µM; (4) 6 µM (5) 8 µM; (6) 10µM; (7) 12 µM; (8) 16µM, (9) 20 µM..... | 19 |
| Şekil 4.2. | 220 µM'lık lipozom içeren fosfat tamponu çözeltisi ortamında 5,0µM HSA'nın artan Floretin miktarlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumu. Floretinin konsantrasyonu: (1) 0µM; (2) 2 µM; (3) 4 µM; (4) 6 µM (5) 8 µM; (6) 10µM; (7) 12 µM; (8) 16µM, (9) 20 µM..... | 20 |
| Şekil 4.3. | 242 µM'lık lipozom içeren fosfat tamponu çözeltisi ortamında 5,0µM HSA'nın artan Floretin miktarlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumu. Floretinin konsantrasyonu: (1) 0µM; (2) 2 µM; (3) 4 µM; (4) 6 µM (5) 8 µM; (6) 10µM; (7) 12 µM; (8) 16µM, (9) 20 µM..... | 21 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Şekil 4.4. | 282 μM 'lık lipozom içeren fosfat tamponu çözeltisi ortamında 5,0 μM HSA'nın artan Floretin miktarlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumu. Floretinin konsantrasyonu: (1) 0 μM ; (2) 2 μM ; (3) 4 μM ; (4) 6 μM (5) 8 μM ; (6) 10 μM ; (7) 12 μM ; (8) 16 μM , (9) 20 μM | 22 |
| Şekil 4.5. | (a) Farklı sıcaklıklarda 260 μM 'lık lipozom içeren fosfat tamponu çözeltisi ortamında HSA-Floretin sistemi için Stern-Volmer grafiği (b) HSA- Floretin sistemi için lineer Stern-Volmer grafiği; Floretin konsantrasyonu 2,4,6ve 8 μM 'dır..... | 23 |
| Şekil 4.6. | 260 μM lipozom çözeltisi içinde HSA'nın farklı konsantrasyonlarda Phloretin varlığındaki absorpsiyon spektrumları. Floretin konsantrasyonları: 2 μM , 4 μM , 6 μM ve 8 μM ; kesik çizgili kısım 260 μM lipozom çözeltisi içinde Floretinin adsorpsiyon spektrumu.. | 25 |
| Şekil 4.7. | Floretin-HSA sistemi için $[(F_0/F) - 1]/[Q]$ karşı $[Q]$ grafiği..... | 26 |
| Şekil 4.8. | 260 μM 'lık lipozom sisteminde HSA-Floretin etkileşimi için bağlanma sabiti grafiği..... | 27 |
| Şekil 4.9. | Floretin-HSA sistemine ait Van't Hoff denklemi grafiği..... | 28 |
| Şekil 4.10. | 260 μM 'lık lipozom konsantrasyonunun Floretin'in farklı konsantrasyonlarında HSA molekülü için alınmış senkronize floresans spektrumları ($\Delta\lambda=15$ nm)..... | 29 |
| Şekil 4.11. | 260 μM 'lık lipozom konsantrasyonunun Floretin'in farklı konsantrasyonlarında HSA molekülü için alınmış senkronize floresans spektrumları ($\Delta\lambda=60$ nm)..... | 30 |
| Şekil 4.12. | (a) Farklı lipozom konsantrasyonlarında HAS-Floretin sistemi için Stern-Volmer grafiği (b) 2 μM , 4 μM , 6 μM ve 8 μM Floretin miktarları için lineer Stern-Volmer grafiği..... | 31 |
| Şekil 4.13. | Floretin bileşiğinin PC lipozomlarındaki ayrışma sabiti grafiği..... | 32 |

TABLULAR LİSTESİ

| | | |
|------------|---|----|
| Tablo 4.1. | Farklı sıcaklıklarda 260 μM 'lık lipozom çözeltisi ortamında HSA-Floretin sistemi için Stern-Volmer kuençleşme ve bağlanma sabitleri.. | 24 |
| Tablo 4.2. | HSA- Floretin sistemi için termodinamik parametreler..... | 28 |
| Tablo 4.3. | Farklı lipozom konsantrasyonlarında HSA-Floretin sistemi için lineer Stern-Volmer sabitleri..... | 32 |

FLORETİN İLE HSA ARASINDAKİ ETKİLEŞİMİNİN LİPOZOM SİSTEMLERİNDE SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

ÖZET

İlaçların vücuttaki dağılımı, metabolizması ve etkinliği hücre zarlarından lipit tabakasına sızma yeteneğine bağlıdır. Bu tezde, Floretin ile İnsan Serum Albumin (HSA) arasındaki etkileşim L-egg lecithin phosphatidycholine (PC) lipozom sisteminde floresans ve absorbans spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Spektroskopik ve floresans kuenleşme deneyleri, Floretin moleküllerinin lipozomlara nüfuz ettiğini göstermiştir. Floresans kuenleşme kullanılarak Floretinin lipozomlardaki ayrışma sabiti belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda Floretin ile HSA arasında statik ve dinamik kuenleşme mekanizmalarının birleşmesiyle etkili bir sönüm meydana geldiği görülmüştür. PC lipozomlarında Floretin ile HSA arasındaki etkileşimde Gibbs serbest enerji, entalpi ve entropi değişim değerleri negatif çıkmıştır. Gibbs serbest enerjisinin negatif çıkması lipozom sisteminde HSA-Floretin arasındaki etkileşimin kendiliğinden gerçekleştiği, entalpi ve entropi değişiminin negatif olması iki molekül arasında hidrojen bağı ve güçlü van der Waals etkileşimlerin varlığını gösterir. Floretinin HSA'nın konfirmasyonu üzerine etkisi aynı deneysel şartlar altında sekronize floresans spektroskopisiyle incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda, Floretinin HSA'ya bağlanması HSA'nın konfirmasyonunda değişikliğe yol açtığı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Floretin, HSA ,lecithin, phosphatidycholine.

BIOPHYSICAL STUDY OF PHLORETIN WITH HUMAN SERUM ALBUMIN IN LIPOSOME USING SPECTROSCOPIC METHOD

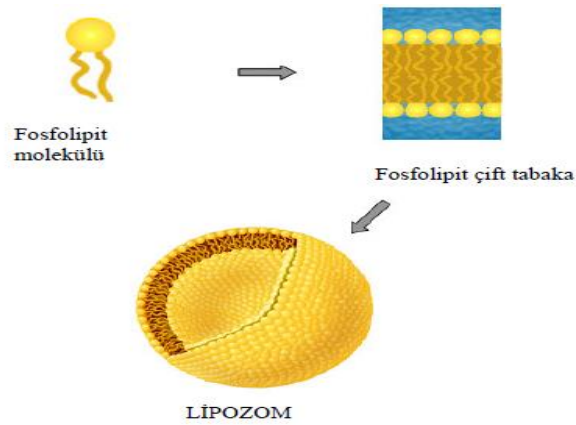
ABSTRACT

The ability of drugs to diffuse through the lipid bilayer of cell membranes is important for the distribution, metabolism, and efficacy of many drugs. In this thesis, the interaction between Phloretin and Human serum albumin (HSA) in L-egg lecithin phosphatidylcholine (PC) liposome was examined using fluorescence and absorbance spectroscopy. The spectroscopic and fluorescence quenching experiments show that Phloretin molecules penetrated into the liposomes. The partition coefficient of Phloretin in the PC liposomes was calculated by utilizing the fluorescence quenching. The results show that Phloretin effectively quenched the intrinsic fluorescence of HSA via a combination of static and dynamic quenching. The values of Gibbs free energy, the enthalpy and entropic change in the binding process of Phloretin with HSA in the PC liposomes were negative, suggesting that the binding process of Phloretin and HSA was spontaneous and hydrogen bonding and van der Waals force interactions played an important role in the interaction between Phloretin and HSA. According to synchronous fluorescence spectra, the binding of Phloretin to HSA leads to changes in the conformation of HSA.

Keywords: Phloretin, HSA, phosphatidylcholine, lecithin.

1. GİRİŞ

Lipozomlar yaklaşık 30 yıldır biyolojik çalışma alanlarında kullanılmaktadır. Lipozomlar doğal veya yapay lipidlerin kendiliğinden bir araya gelmesiyle oluşan içi su dolu yapılardır. Bu yapılar hücre zarına benzer olup keseciklerde denilmektedir. Lipozom yapıları oldukça basit olup canlı hücreler kullanılarak elde edilen biyolojik bilgileri daha kolay ve hızlı bir şekilde sağlamaktadır. Lipozom sitemleri su fazı ve lipid fazı olmak üzere iki bölümden oluşur. Lipid tabakaları sentetik veya doğal fosfolipitlerden meydana gelebilir. Lipozomlar tek tabakalı veya birkaç tabakadan da oluşabilir. Tek tabakadan oluşanların su fazı içteki bölümdür.

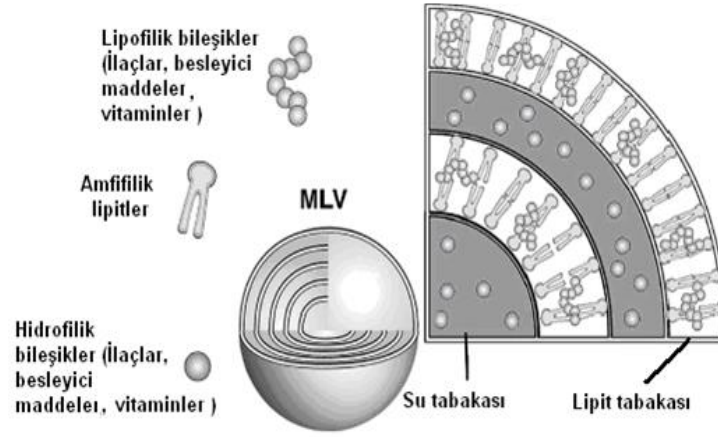


Şekil 1.1 Lipozomların yapısı ve oluşumu (URL-1)

Lipozomların temel yapıları hücre membran yapılarına benzer olduğundan in vitro araştırmalarında model membran olarak kullanılmaktadır. Günümüzde ise başta ilaç taşıyıcı partiküler sistem olmak üzere birçok bilim dalında farklı kullanım alanlarına sahiptir. (Gürsoy vd 1989; Taylan ve Özer 1991)

Lipozomlar içine hapsedilen ilacı taşıyabilecek üç bölgeye sahiptir. Fosfolipit tabaka (lipofilik etkin maddeler), sulu kısım (hidrofilik etkin maddeler) ve su-lipid ara yüzeyi (peptit ve küçük moleküller) ilaç moleküllerini hapsederek taşıyabilir. Lipozomların ilaç taşıma

yerleri Şekil 1.2’de gösterilmiştir. Lipozomların bu özellikleri sayesinde lipofilik ve hidrofilik etkin madde hatta orta derece lipofiliteye sahip etkin maddeleri bile taşıyabilmektedir.



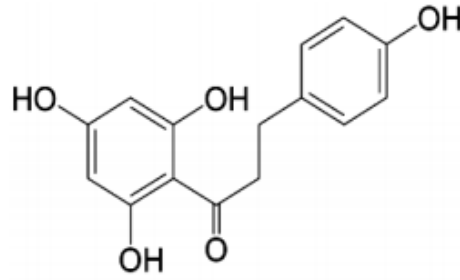
Şekil 1.2. Çok tabakalı lipozom modeli (Keller 2001)

Büyüklik, tabaka ve elde edilme yöntemlerine göre lipozomlar 4 farklı sınıfta incelenmektedir (Gürsoy 2002). Birçok lipit tabakasının bir araya gelmesiyle tabakaların arasına su fazının yerleşmesi sonucu oluşan yapılara çok tabakalı lipozomlar denir. Çapları 0,4-3,5 μm arasında değişir. Sulu fazı çevreleyen tek bir lipit tabakasından oluşan yapılara ise tek tabakalı lipozomlar denir. Çapları 0,2-1 μm arasında değişir. Çapları genel olarak 30-100 nm aralığına sahip küçük tek tabakalı lipozomlar genellikle ters faz tekniği ile hazırlanır. Bu lipozomlar sulu fazı çevreleyen tek bir lipit tabakasından oluşan yapılardır (Gürsoy 2002).

1.1. Floretin

Flavonoit ailesinin üyelerinden olan Floretin, kalkon türevi bir molekül olup elma, elma suyu ve elma şarabı gibi ürünlerde yüksek oranda bulunmaktadır. Elma kabuğunda glikozit formu olan floridzin formunda (floretin-2'-glukoz) 80-420 mg/kg ve elmanın etli bölgesinde ise 16-20 mg/kg miktarında bulunmaktadır (Escarpa ve Gonzalez 1988). Çeşitli elma türlerindeki miktarları ve metabolitlerin düzeyleri HPLC-MS ile belirlenmiştir (Justesen vd 1998). Bu molekülün antioksidan ve anti-inflamatuar aktivitelere sahip olduğu bilinir (Ang vd 2004). Antioksidan özelliğine sahip olmasından dolayı cilt bakım

ürünlerinde kullanılmaktadır. Apoptozu indükleyerek kansere karşı korucu görev görmektedir (Yang vd 2009). Floretinin östrojenik etkisi ve östrojen almaçlarına bağlanma afinitesi in vitro testlerle belirlenmiştir. Molekül ağırlığı 278,24 gr/mol olan Floretin molekülünün kimyasal yapısı Şekil 1.3’de verilmiştir.



Şekil 1.3. Floretinin molekülünün kimyasal yapısı (Özer 2012)

Tetrahidroksikalkon türevi olan Floretin (Lee vd 2002; Yang vd 2001) canlılar içindeki toksitesini ve ilaç dinamiği, moleküler seviyede anlaşılması ve açıklanması gerekmektedir.

1.3. İnsan Serum Albümin

Serum albümin kan plazmasında en çok bulunan proteindir. Dolaşım sisteminde çözülmüş halde bulunan bu protein kanın içindeki değişik iç ve dış kaynaklı bileşiklerin taşınmasından ve depolanmasından sorumludur. Serum albümin osmotik kan basıncında ve ilaç etkinliğinde önemli bir role sahiptir (Raja vd 2003; Hassan vd 2007). Bu yüzden, ilaçlar ile albüminler arasındaki etkileşimin moleküler seviyede açıklanması gerekmektedir. Serum albüminler amino asitlerin birbirlerine N-terminal peptit bağıyla bağlanması sonucu oluşur. İnsan serum albuminin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 67 kDa olup globüler yapıdadır. İnsan serum albumin bir protein olup hormon, ilaç, eser element gibi değişik maddelerin kanda taşınmasından sorumludur (Wang vd. 2010). İnsan serum albuminin temsili molekül yapısı şekil 1.4’te verilmiştir.



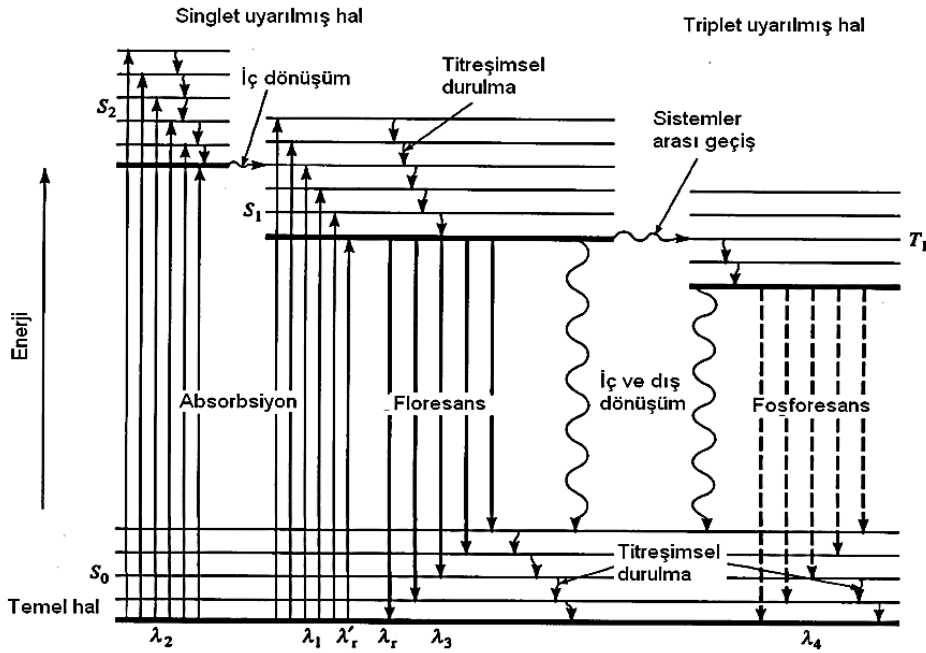
Şekil 1.4. İnsan serum albumin temsili gösterimi (URL-2 2014)

1.4. Işık ve Fotofizik

Sinüzoidal harekete sahip olan ışık, birbirine dik olan elektrik ve manyetik alan vektörlerinden meydana gelmektedir. Elektro manyetik radyasyon (EM) olarak ta adlandırılır. Planck'ın siyah cisim ışıması olayı ve Einstein'ın fotoelektrik olayı ile ışığın tanecik özelliği kanıtlanmıştır.

Spektroskopi, ışık ile madde arasındaki etkileşimi inceleyen bilim dalıdır. Molekülün elektromanyetik radyasyonu absorplamasıyla öteleme, dönme, titreşim ve elektronik uyarılma hallerinde bir değişim olmaktadır. Işık ile bir molekülün etkileşim gösterebilmesi için ışığın elektrik alan vektörü ile molekülün dipol momentinin çakışması gereklidir. Gözlemlenen bu çakışma sonucunda absorpsiyon meydana gelecektir.

Bir molekülün ışığı absorplaması sonucu oluşacak fotofiziksel deaktivasyon prosesleri Şekil 1.5'de Jablonski diyagramında verilmiştir.



Şekil 1.5. Jablonski Diyagramı

Jablonski diyagramını kısaca özetlenecek olursa; S₀ singlet temel hali, S₁ uyarılmış 1. singlet hali, S₂ uyarılmış 2. singlet hali, T₁ ise uyarılmış triplet hali göstermektedir. Singlet temel halden (S₀) singlet uyarılmış hale (S₁ ve S₂) elektronik geçişine absorpsiyon denir. Sistemin temel halden uyarılmış hale geçişi yaklaşık 10⁻¹⁵ saniyede gerçekleşmektedir. Tek moleküllü sistem için Jablonski diyagramını kısaca aşağıdaki gibi açıklanabilir.

İç dönüşüm, uyarılmış bir molekülün, titreşim enerji seviyelerinin çakışması sonucu uyarılmış halden diğer uyarılmış hale ışımsız (radyasyonsuz) geçişe denir. Radyasyonsuz geçişte sistem aldığı uyarılma enerjisini dışarıya ısı olarak verir.

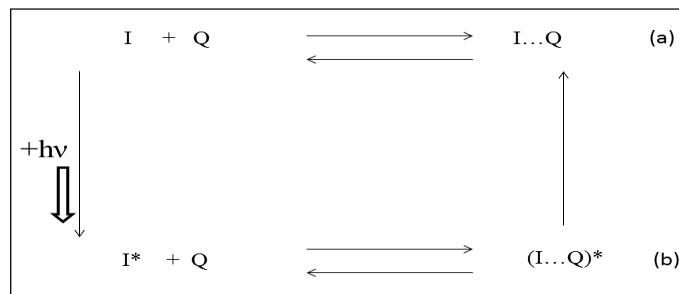
Dış dönüşüm, uyarılmış halde bulunan sistem çözücü veya diğer çözünen moleküller ile çarpışması sonucunda temel hale radyasyonsuz bir şekilde geçmesine denir.

Sistemler arası geçiş, triplet uyarılmış halden singlet uyarılmış hale veya singlet uyarılmış halden triplet uyarılmış hale geçiş olayına denir. Bu geçişlerin gerçekleşebilmesi için titreşim enerji seviyelerinin çakışması gerekmektedir. Ayrıca bu geçişler sırasında elektron spin değiştirmektedir. Bu geçişler sistemin fosforesans yapmasını artırırken floresans yapmasını azaltacaktır.

Floresans, molekülün uyarılmış singlet halden temel hale ışıklı geçişine denir. Bu ışıklı geçiş 10^{-7} ve 10^{-8} saniye gibi kısa bir sürede gerçekleşir. Fosforesans ise triplet uyarılmış halden singlet temel hale ışıklı geçişe denilmektedir.

Ortamda birden fazla molekül varsa uyarılmış haldeki molekül, temel halde bulunan moleküle (söndürücü veya kuençir) elektronik uyarılma enerjisini ışımsız bir şekilde transfer edebilir. Bu olaya Floresans kuençleşme denir. Uyarılmış halde bulunan molekül radyasyon enerjisini kuençire ışımsız olarak vererek temel hale dönerken kuençir molekülü uyarılmış hale geçer. Bu olaya enerji transferi denir. Floresans kuençleşme reaksiyonları küçük miktardaki numunelere uygulanabilir. Ayrıca ortamda ikincil bir molekül kullanılarak istenilen sistemlere uygulanabilir (Lakowicz 2002).

Kuençleşme etkileşimleri genelde dinamik ve statik mekanizmalar üzerinden yürür (Arık vd 2005). Dinamik kuençleşme mekanizmasında florofor ile kuençirin gelişi güzel hareketleri sırasında birbirleri ile temas etmeleri gerekir. Moleküllerden biri uyarılmış hale geçerken, diğer molekül temel hale ışımsız bir şekilde döner bu olaya dinamik kuençleşme denir. Statik kuençleşme mekanizmasında florofor ve kuençirbirleşerek floresans özelliğine sahip olmayan kararlı bir karanlık kompleks oluşur (Lakowicz 1983; Valuer 2012). İki molekül arasındaki bu olay, Stern-Volmer denklemi ile ifade edilir(Lakowich 1983). Statik kuençleşme Şekil 1.6'te gösterilmiştir.

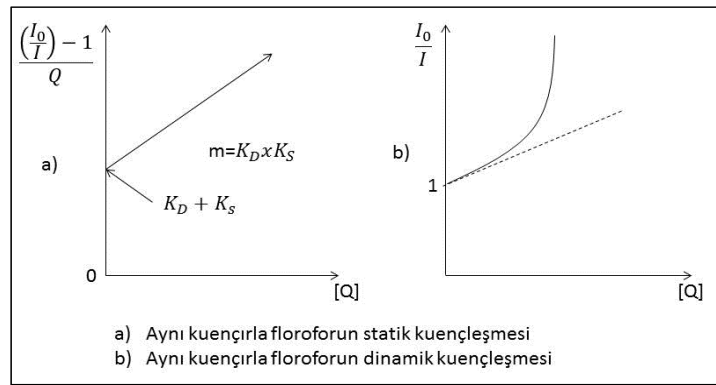


Şekil 1.6. Statik kuençleşme gösterimi (Lakowicz 2002)

Şekil 1.6'da Statik kuençleşmenin iki durumda gerçekleşmesi a ve b ile gösterilmiştir. (a)Temel halde florofor ile kuençir birleşerek emisyon özeliği olmayan kompleks

oluşabilir. (b) Florofor uyarıldıktan sonra emisyon özeliği olan bir kompleks oluşabileceğini gösterir (Bozkurt2007).

Bazı hallerde florofor ile kuençir hem dinamik olarak hem de kompleks oluşturarak etkileşebilir. Sistemde statik ve dinamik kuençleşmenin birlikte olması, Stern-Volmer eğrisine bakılarak anlaşılabilir. Sabit sıcaklıkta çizilen grafikte eğrinin y eksenine doğru iç bükey bir hal almaktadır. Statik ve dinamik kuençleşmenin aynı anda olduğu sistemler için çizilen Stern Volmer eğrileri Şekil 1.7’de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Statik ve Dinamik kuenleşmenin birleşmesi (Bozkurt2007)

Kuenleşme mekanizmasını belirlemek için Stern-Volmer denkleminde faydalanılır. Stern-Volmer denklemi Eşitlik 1.1’de verilmiştir.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q]_T \quad (1.1)$$

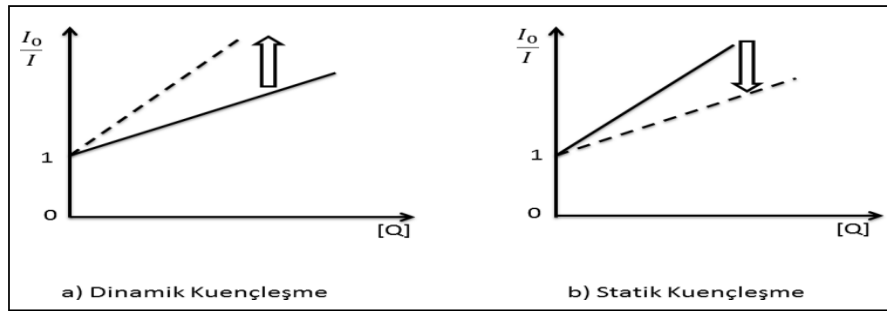
Bu denklemde, I_0 ortamda kuençirin bulunmadığı andaki, I ise ortamda kuençirin bulunduğu andaki floresans şiddeti ve $[Q]$ ise kuençir konsantrasyonudur. $K_{sv} = k_q\tau_0$ olup, dinamik Stern-Volmer hız sabitini temsil etmektedir. k_q bimoleküler kuenleşme sabiti, τ_0 ise kuençirin ortamda olmadığı andaki floresans ömrüdür. Statik ve dinamik kuenleşmenin aynı anda yürüdüğü sistemler için modifiye edilmiş Stern-Volmer denklemi kullanılır. Modifiye edilmiş Stern-Volmer denklemi Eşitlik 1.2’de verilmiştir.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + (K_D K_S)[Q]^2 \quad (1.2)$$

Burada, K_D ve K_S sırasıyla dinamik ve statik kuençleşme sabitlerini ifade etmektedir.

1.4.1. Floresans Kuençleşme Mekanizmasının Belirlenmesi

Kuençleşme mekanizmasının belirlemek için ortamın viskozitesi, sıcaklığı, floresans yaşam ömrü ve absorpsiyon spektrumlarından faydalanılır. Dinamik kuençleşmede ortamın sıcaklığı arttırılırsa Stern-Volmer sabitleri difüzyon kat sayısına bağlı olarak artış göstermektedir. Statik keunçleşmede sıcaklığın artması ile kompleksin stabilitesinin azalmasına neden olur. Bunu sonucu olarak Stern-Volmer sabitlerinde bir azalma meydana gelir (Lakowicz 1983). Sıcaklığa bağlı olarak Stern-Volmer eğrileri Şekil 1.8'de gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Sıcaklığa bağlı olarak Stern Volmer Eğrileri (Lakowicz 1983)

Dinamik kuençleşmede sistemin viskozitesinin arttırılması çözelti içindeki kuençirinin mobilitesini azaltacağından kuençleşme sabiti azalır. Statik kuençleşmede ise bunun tam tersi olarak viskozitenin artması ile statik kuençleşme artar (Arık vd 2004).

Statik ve dinamik kuençleşmenin ayırt etmede en etkili yöntem floresans ömür ölçümleridir. Dinamik kuençleşmede floresans şiddeti sabit kalırken artan kuancır konsantrasyonundan dolayı floresans yaşam ömrü azalır. Statik kuençleşmede ise floresans şiddeti sabit kalmaz. Kuençir konsantrasyonu arttıkça şiddet azalır floresans yaşam ömrü sabit kalmaktadır.

Statik ve dinamik kuençleşmeyi ayırt etmede floroforun ve kuençirin absorpsiyon spektrumlarındaki değişime bakılabilir. Statik kuençleşmede sabit florofor

konsantrasyonunda ortama kuençir eklendiği zaman karanlık bir kompleks oluşumundan dolayı absorpsiyon spektrumunda bir artış gözlemlenir. Dinamik kuençleşmede kuençirin florofora difüzyonu floroforun uyarılmış hallerini etkilememesinden dolayı absorpsiyon spektrumunda değişme gözlemlenmez (Lakowicz 1983).

1.4.2. Bağlanma Sabiti ve Bağlanma Yeri Sayısı

Statik kuençleşmede florofor ile kuençir arasında bir bağlanma meydana gelmektedir. Modifiye edilmiş Sten-Volmer denklemi kullanılarak iki molekülün bir birine bağlanması hakkında kantitatif değerler elde edilmektedir. Modifiye edilmiş Sten-Volmer denklemi Eşitlik 1.3'te verilmiştir.

$$\log \frac{I_0 - I}{I} = \log K_b + n \log [Q] \quad (1.3)$$

Bu denklemde K_b bağlanma sabiti, n ise bağlanma yeri sayısının göstermektedir. Statik kuençleşmede sıcaklığın artmasıyla kompleksin stabilitesi azaldığı için bağlanma sabitide azalmaktadır.

1.4.3. Termodinamik Parametreler

Küçük moleküller biyolojik makromoleküllere hidrojen bağları, van der Waals etkileşimi, elektrostatik etkileşim ve hidrofobik kuvvet içeren zayıf etkileşimler ile bağlanır. Moleküller arasındaki etkileşim kuvvetlerini belirlemek için termodinamik parametrelerden faydalanılır. Değişik sıcaklıklarda elde edilen bağlanma sabiti değerleri van't Hoff denkleminde kullanılarak termodinamik parametreler hesaplanabilir. van't Hoff denklemi Eşitlik 1.4'te verilmiştir.

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (1.4)$$

Bu denklemde K_b bağlanma sabiti, R ise ideal gaz sabitidir. Serbest enerji değişimi ΔG^0 Eşitlik 1.5 ile hesaplanmaktadır.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (1.5)$$

Küçük molekül-biyomolekül etkileşimi için, $\Delta H^0 < 0$, $\Delta S^0 < 0$ olursa van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağı oluşumu etkilidir; $\Delta H^0 > 0$, $\Delta S^0 > 0$ iki molekül arasında hidrofobik etkileşimler baskındır; $\Delta H^0 \approx 0$, $\Delta S^0 > 0$ olduğu zaman iki molekül arasında elektrostatik kuvvetin varlığını gösterir.

Floresans kuençleşme yöntemi, 10^{-7} ve 10^{-9} M aralığındaki konsantrasyonlara karşı duyarlı olması bu yöntemi diğerlerine karşı üstün kılmaktadır. Ancak belli yapıdaki maddelerin floresans özelliği göstermesi ve kısıtlı çalışma alanından dolayı da dezavantaj sağlamaktadır. Bu dezavantajı bertaraf etmek için ikincil bir molekül kullanılabilir. Yine uyarılmış halde bulunan bir molekülün floresans sönümlenmesini etkileyen pek çok faktör vardır. Floresans kuençleşme çalışmaları yapılırken oldukça dikkatli olunmalıdır (Lakowicz 2002; Valuer 2012). Floresans spektroskopisi ilk olarak 1960'lı yılların sonunda biyokimyasal olaylar için kullanılmaya başlamıştır. Akriylamid, oksijen ve iyodat iyonu gibi moleküller kullanılarak makromoleküllerde bulunan floresan grupların yeri hakkında bilgi edinilmiştir. Özellikle floresans kuençleşme yöntemi proteinler, membranlar ve diğer makro molekül sistemler hakkında bilgi vermektedir (Lakowicz 2002). Aynı zamanda biyolojik öneme sahip olan moleküller ile proteinler arasındaki etkileşimin moleküler seviyede incelenmesine de katkı sağlamaktadır.

1.5. Ayrışma Sabitinin Belirlenmesi

Floresans kuençleşme sulu ve lipit fazları arasındaki moleküler dağılımı belirlemek için uygun bir yöntemdir. Lipit tabakalarında bulunan florofor ile kuençir arasındaki etkileşim derecesi, kuençir molekülünün zardaki konsantrasyonuna, lipit tabakasına sızmasına ve lipit tabaksındaki hareketliliğine bağlıdır (Eyer vd 2014). Membran üzerindeki kuençir molekülleri, floroforun floresans şiddetinde bir azalmaya neden olur ve bu da membrandaki ortalama kuençir molekülünün sayısı hakkında bilgi verir. Moleküllerin lipit ve su fazları arasındaki oranlarına ayrışma (dağılım) katsayısı denir (Neunert vd 2015). Bu dağılım, bileşiklerin lipofilikliği, yükü, büyüklüğü ve hidrojen bağı özellikleri ile ilgili olup molekülün hücre zarına geçirgenlik derecesini etkilemektedir (Bozkurt vd 2013). Lipit tabakalarına sızma kinetiği, ilaç geliştirme ve toksikoloji alanında geniş ilgi görmektedir.

Bu sayısal oran ilaçların moleküler mekanizmasını, toksisitesini ve boyaların hücre zarı içindeki yerlerini anlamada önemli bir rol oynayacaktır (Takegami vd 2015). Su veya lipit fazdaki kuençir sayısı lipit ve sulu fazlar arasındaki dağılıma bağlıdır. Kuençir molekülleri lipit katmanına geçerse su fazındaki miktarı azalacaktır (Przybylo vd 2014). Bu azalma göz önüne alınırsa farklı lipit konsantrasyonları kullanılarak ayrışma sabiti hesaplanabilir. Kuençir, sulu ve lipit fazları arasında dağıldığında, ayrışma katsayısı denklemi ile tanımlanmaktadır (Toprak 2015). Kuençirin, sulu ve lipit fazları arasında dağılıma (ayrışma) oranı Eşitlik 1.6'da verilmiştir.

$$K_p = [Q]_L / [Q]_{su} \quad (1.6)$$

Burada $[Q]_L$ ve $[Q]_{su}$ sırasıyla lipit ve su fazındaki kuençir konsantrasyonudur. K_p ise dağılıma sabitidir. Numunedeki toplam kuençir konsantrasyonu ($[Q]_{top}$) Eşitlik 1.7'de verilmiştir.

$$[Q]_{top} V_{top} = [Q]_L V_L + [Q]_{su} V_{su} \quad (1.7)$$

Denklemden, V_{top} ve V_{su} sırasıyla sistemin ve suyun toplam hacmidir. V_L ise lipidin toplam hacmidir. Lipit fazının hacminin sistem hacmine oranı (α_L) Eşitlik 1.8'de verilmiştir.

$$\alpha_L = V_L / V_{top} \quad (1.8)$$

Denklemler 1.6, 1.7 ve 1.8 kullanılarak kuençirin lipit fazındaki miktarı Eşitlik 1.9'da verilmiştir.

$$[Q]_L = \frac{K_p [Q]_{top}}{K_p \alpha_L + (1 - \alpha_L)} \quad (1.9)$$

Uygun dönüşümler yapıldıktan sonra Stern-Volmer denklemi Eşitlik 1.10'daki gibi yazılabilir.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + \frac{\tau_0 k_m K_p [Q]_{top}}{K_p \alpha_L + (1 - \alpha_L)} = 1 + \tau_0 K_{app} [Q]_T \quad (1.10)$$

Bu denklemde K_{app} görünen kuençleşme sabiti, k_m ise membran fazındaki bimoleküler kuençleşme sabitidir. Bu denkelem Eşitlik 1.11 gibi modifiye edilebilir.

$$\frac{1}{K_{app}} = \alpha_L \left(\frac{1}{k_m} - \frac{1}{k_m K_p} \right) + \frac{1}{k_m K_p} \quad (1.11)$$

$1/K_{app}$ karşı α_L gragiği çizilerek ayrışma sabiti (K_p) ve k_m değerleri hesaplanabilir. Bu tez çalışmasında kullanılan L-egg lecithin phosphatidylcholine lipidinin moleküler ağırlığı ve lipit molar hacmi sırasıyla 700 gr/mol ve 0.688 L/mol'dir (Yang vd 2001).

Bu tez çalışmasında, birçok biyolojik fonksiyona sahip olan Floretin ile HSA arasındaki etkileşim lipozom ortamında moleküler seviyede incelenecektir. Bunun için absorpsiyon, floresans ve senkronize floresans spektroskopileri kullanılacaktır. Ayrıca etkileşim türünün mekanizması, bağlanma sabiti ve termodinamik parametreler belirlenecektir. Floretinin HSA'nın konfirmasyonu üzerine etkisi senkronize floresans ve absorpsiyon spektroskopisi kullanılarak belirlenecektir. Floresans kuençleşme yardımıyla Floretinin L-egg lecithin phosphatidylcholine ile oluşturulan lipozom sistemlerindeki ayrışma sabiti belirlenecektir. Elde edilen sonuçlar Floretinin ilaç bilimi ve klinik tıpta kullanılmasına katkı sağlayacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lipid oksidasyonu, lipitlerin ve lipit içeren materyallerin bozulmasına izin veren bir serbest radikal zincir prosesidir. Antioksidan eklemek oksidasyonu yavaşlatmak için en etkili yöntemlerden biridir. Antioksidan özelliğe sahip olmak, radikallerin yer aldığı reaksiyona katılmalarına bağlıdır. Bütil hidroksianisol (BHA) gibi sentetik antioksidanlar çok yaygın olarak kullanılmasına karşın son yıllarda doğal antioksidanlara ilgi artmıştır. Bu çalışmada linoleik asit içerisinde kinetik analizlerle, Buteinin antioksidan davranışları belirlenmiştir. Proses karanlıkta ve 40 °C de yüksek oksijen konsantrasyonunda yapılmıştır. Etkinlik ölçüsü olarak stabilizasyon faktörü, ölçümün dayanıklılığı olarak oksidasyon hız oranı belirlenmiştir. Bu iki parametrenin birleştirilerek antioksidant aktivitesi ve inhibitör tüketim ortalaması gibi farklı kinetik parametreler belirlenmiştir. Bunun için %0,02 bütillenmiş hidroksitoluenden (BHT) ve değişik oranlarda Butein kullanılmıştır. Sonuçta 40 °C' de ve karanlıkta linoleik asitli ortamda meydana gelen reaksiyon sürecinde peroksit birikimi kinetik eğrileri hesaplanmış ve kıyaslama yapılmıştır. %0,10 dan daha düşük konsantrasyonlarda Butein radikal zincir genişleme reaksiyonuna katılmamıştır (Raja vd 2003).

Epitemal mezankimal değişimleri (EMT) kanser yayılımında kritik rol oynadığına dair kanıtlarda artış vardır. Örneğin EMT değişimleri embriyogenezin önemli bir sebebi olarak kabul edilmiş ve ektoderm ile endoderm arasında gelişen orta tabaka hücrelerine (mezoderme) ve sinir ucuna katıldığı bulunmuştur. Polifenolik bir bileşik olan Buteinin kanserli hücreler üzerine anti-proliforesyon (çoğalmayı engelleyen) etki sergilediği bilinmektedir. Kanser metasdası, primer tümörlerden daha çok kanser hücrelerinin ölümünden sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada bu etkisinin yanı sıra başka etkilerine de bakılmıştır. Butein insan mesane kanser hücrelerinde ERK1/2 ve NF-κB sinyal yollarına doğru göç ve yayılma (invazyon) gösterebilir. Bu engelleyici etki EMT tersini oluşturmuştur. Bu olay kısaca açıklanacak olursa in vitroda EMT olayını tersine

çevirerek hücrenin yayılma becerisini engellediği görülmüştür. Buna göre mesane kanserinde Buteinin hücre yayılmasını engelleme bildiği gibi yeni bir fonksiyonu olduğu sonucuna varılmıştır (Stangl vd 2005).

Flavonoid ailesi içerisinde yer alan Floretin ve onun glikozit türevleri ağaç kabukları, yapraklar ve elma ağaçlarının meyvelerinde bol miktarda bulunmaktadır. Floretin molekülü glikoz taşıyıcıları düzenlemesi ve anti-oksidaz aktivitesi dahil bir çok biyolojik özelliklere sahiptir. Makroforajlar değişik inflamatuvar cevaplarda önemli rol oynarlar. Bunun için kullanılan Gram-pozitif bakterileri lipopolisakkaritleri (LPS) serbest bırakabilir, bu olay 11 makroforajlarla teşhis edilir. Bu çalışmada fare makroforajlarına Floretin ve Florezinin, anti-enflamatuvar etkisi çalışılmıştır. Bunun için RAW264.7 hücreleri değişik miktarlarda Floretin ve Florezine tabi tutulmuş ve hücre inflamatuvarı LPS ile ölçülmüştür. Sonuçta 10 µM Floretin önemli seviyede NO, PGE2, IL-6, TNF- α , iNOS and COX-2 miktarını inhibe etmiştir. İlginç olarak Floretin protein 95 in alt birimi NF- κ B çekirdek translokasyonunu bastırması buna karşın Florezin bastıramamıştır (Hassan vd 2007).

Bir flavonoid bileşik olan Hyprosid'in antiviral etkinlik, iltihap sökücü, antidepresan gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlar gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada Hyprosid ile sığır serum albümin (BSA) arasındaki etkileşim floresans spektroskopisiyle değişik sıcaklıklarda incelenmiştir. Bulunan spektroskopik datalar (Tachiya modeli ve Stern-Volmer denklemi) kullanılarak Hyprosid ve BSA arasındaki bağlanma sabiti ve bağlanma yeri sayısı belirlenmiştir. Ayrıca bu iki denklemin sonuçları kıyaslanılmış ve literatürdeki trans-resveratrol ile BSA molekülü etkileşimine benzer olduğu görülmüştür. Bulunan entalpi ve entropi değişimlerinden bağlanma etkileşimlerinde, hidrofobik güçlerin ana rol oynadığı belirlenmiştir. Senkronize floresans spektroskopisi kullanılarak BSA konfirmasyonu üzerine Hyprosid molekülünün etkisi incelenmiş ve hyprosid'in BSA'nın konfirmasyonunu değiştirdiği ve BSA'nın triptofan amino grup kısmına bağlandığı bulunmuştur. Cu²⁺, Ca²⁺ ve Zn²⁺ iyonlarının varlığı BSA ve hyprosid bağlanmasını güçlendirmiş buna karşın Mg²⁺ iyonu zayıflatmıştır (Qin vd 2010).

Rutin molekülü bir flavanol glukozittir. Yapısında flavanol kuersetin ile ramnoz ve glikozdan meydana gelen disakkarit moleküllerini bulundurur. Rutin, siyah çay ve elma

gibi çoğu bitkilerde bulunan ve genel olarak diyetlerde tüketilmektedir. Rutin molekülü geleneksel olarak birçok biyolojik ilaç uygulamalarında tedavi edici özelliğe sahiptir. Bu çalışmada Rutin ile hayvan serum albümin (BSA) arasındaki etkileşim floresans ve UV spektroskopisi ile incelenmiştir. Ayrıca ortamda bulunan metal iyonları ilaç-protein etkileşmelerini etkilediği için bazı metal iyonlarının (Cu^{2+} , Fe^{3+}) BSA ile Rutin arasındaki etkileşime etkisi incelenmiştir. Floresans titrasyonu sonucunda Rutinin BSA'nın floresans şiddetini statik kuenleşme ile azalttığı bulunmuştur. Bağlanma yeri, bağlanma sayısı ve BSA ile Rutin arasındaki bağlanma mesafesi Cu^{2+} ve Fe^{3+} metal iyonları ile bu iyonların olmadığı durumlar incelenmiştir. Sonuçta Cu^{2+} ve Fe^{3+} metal iyonların varlığı bağlanma sabitini $3,1 \times 10^{-4}$ 'ten sırasıyla $1,15 \times 10^{-5}$ ve $3,13 \times 10^{-5}$ azalttığı, donör ile akseptör arasındaki mesafeyi 4,56 nm'den sırasıyla 4,93 ve 5,18 nm'ye değiştirdiği belirlenmiştir. Bu değer azalması olayını metal iyonunun Rutin ile BSA molekülü arasına girmesi sonucunda olduğu belirtilmiştir. Rutinin BSA konfirmasyonu üzerine etkisi incelenmiş ve sonuç olarak Rutin molekülünün BSA molekülünün IIA (triptofan amino grup kısmı) kısmına bağlandığı bulunmuştur (Hilt vd 2003).

Apigenin (Ap) ve İnsan serum albumin (HSA) arasındaki etkileşim spektroskopik yöntemlerde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda HSA ile Apigenin arasında çok güçlü bir etkileşimin olduğu ve etkileşim mekanizmasının statik kuenleşme mekanizmasından yürüdüğü görülmüştür. Termodinamik parametreler farklı sıcaklıklar kullanılarak hesaplanmıştır. Entalpi ve entropi değişimleri sırasıyla $17,49 \text{ kJmol}^{-1}$ ve $37,04 \text{ Jmol}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. İki molekül arasında elektrostatik ve hidrofobik etkileşimin baskın olduğu tespit edilmiştir. Apigenin HSA konfirmasyonu üzerine etkisi senkronize floresans spektrumları ve moleküler modelleme kullanılarak incelenmiştir. Apigenin HSA'nın I. bölgesine bağlandığı tespit edilmiştir. Förster enerji transferine göre bu bölgede Hidrojen bağlarının bulunmadığı tespit edilmiş 3,21 nm de bağlanma mesafesi olarak bulunmuştur (Yuan vd 2007).

C.I Acid Red 73 bileşiği ile İnsan serum albümini (HSA) arasındaki etkileşim Spektroskopik ve Moleküler docking yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. C.I Acid Red 73 bileşiği HSA'nın subdomain IB bölgesine aktif olarak bağlanabileceği Moleküler docking yöntemine göre tespit edilmiştir. C.I Acid Red 73 bileşiği HSA'ya bağlanabileceği nokta sayısı noktası sayısı 1,73 olarak bulunmuştur. Spektroskopik yöntemlerle C.I Acid Red 73

bileşiği ile HSA etkileşim statik kuençleşme mekanizması üzerinden yürüdüğü tespit edilmiştir. Moleküller docking yöntemi ve termodinamik verilerden yola çıkarak iki molekül arasındaki hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler olduğu gözlemlenmiştir. göreC.I Acid Red 73'ün HSA'nın bağlanma mesafesi Förster enerji transferi teorisine göre 3,28 nm olarak bulunmuştur (Guo vd 2010).

Durađan-hal floresans spektroskopisini kullanan Debabrata ve arkadaşları 7-Aminino kumarin bileşikleri ile rhadomine 590 bileşiğini susuz asetonitril ve metanol'de iki bileşik arasındaki enerji transferlerini incelenmiştir. Deneyler esnasında donör ve akseptör olarak sırasıyla7-amino kumarin ve rhadomine 590 bileşiği kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda R_0 değeri 100 \AA^0 'dan yüksek çıkmıştır. Farklı çözeltilerde hesaplanan overlap bölgeleri (J) oldukça büyük olup susuz asetonitril ve metanol için sırasıyla 10^{-11} ve $10^{-12} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-3}$ olarak tespit edilmiştir. Overlapların yüksek çıkmasına karşın enerji transfer hız sabitler düşük elde edilmiştir. Bu nedenle enerji transferindeki farklılık donörün yapısına bağlı olduğu ispatlanmıştır (Debabrata vd 2004).

Nükleotid analogu olan çeşitli hastalıklar ile ilgili farmakolojik etkilere sahip 2'-deoksi-2'-fluoro-4'azidocytidine (FNC) molekülünün insan hemoglobini (HHb) arasındaki ilişki floresans kuençleşme tekniği, absorpsiyon spektroskopisi, floresans kuençleşme tekniği, senkronize floresans spektroskopisi teknikleriyle incelenmiştir. FNC molekülü ile HHb arasındaki etkileşimin statik kuençleşme gösterdiği gözlemlenmiştir. Termodinamik parametreler ve moleküler modelleme tekniğine göre moleküller arasında hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetlerinin olduğu gözlemlenmiştir (He vd 2014).

3.MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda kullanılan floretin (2,4,6-trihidroksi-3-(4-hidroksifenil)-propiofenon), İnsan serum albumin HSA (safılık%99), Etanol, H₂SO₄, NaOH ve L-egg lecithin phosphatidylcholine (safılık%99) SİGMA firmasından satın alındı. Kloroform Scharlau firmasından temin edildi.

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

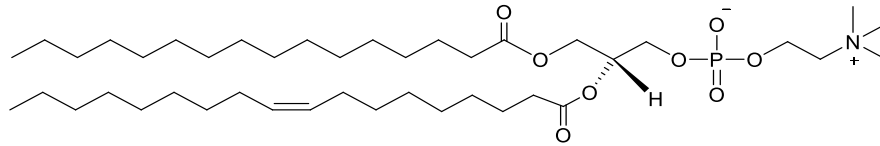
Spektrofotometre (Shimadzu UV-3600 UV-VIS-NIR) absorpsiyon ölçümleri için kullanıldı. Spektroflorofotometre (Perkin Elmer LS55 Floresence Spektroflorometre) floresans ve senkronize floresans ölçümleri için kullanıldı. Ultrasonik karıştırıcı (Elma S 60H) lipozom ve çözelti hazırlamak için kullanıldı. pH metre (Thermo Scientific Orion 3 marka pH metre,) çözeltilerinin pH'sını ayarlamak için kullanıldı.

3.2. Lipozom ve Numunelerin Hazırlanması

Lipozomlar çözeltileri, ince film hidrasyon metodu kullanılarak L-egg lecithin phosphatidylcholine'den (PC) hazırlanmıştır (Bozkurtvd. 2013). İstenilen konsantrasyonda PC fosfolipiti alınıp kloroformda çözünerek lipit duvarlarının oluşması sağlandı. Hafif bir azot gazı akımı ile kloroform şişelerden uzaklaştırıldı. Çözücünün tamamen uzaklaştırıldığından emin olmak için en az 1 saat vakum altında bekletildi. Daha sonra tampon çözelti (25 ml fosfat tampon, pH 7.4) eklenerek ultrasonik su banyosuna bırakıp iki saat boyunca beklendi. Böylece çok tabakalı fosfolipid lipozomları elde edildi. Dört farklı lipit konsantrasyonu (220 µM, 242 µM, 260 µM, ve 282 µM) hazırlandı. HSA'nın konsantrasyonu 5µM olacak şekilde elde edilen lipozom çözeltileri

ne eklendi. Floretinin 1.0 mM'lık etanol içerisinde stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiden uygun miktarda konsantrasyonu 5 μ M olacak şekilde elde edilen lipozom çözeltilerine eklendi.

Floretinin 1.0 mM'lık etanol içerisinde stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiden uygun miktarda Floretin deneylerde kullanılmak üzere 10 ml'lik şişelere Floretin deneylerde kullanılmak üzere 10 ml'lik şişelere konuldu. Şişelerden azot gazı geçirilerek ortamdaki etanol tamamen uzaklaştırıldı. Şişelerden azot gazı geçirilerek ortamdaki etanol tamamen uzaklaştırıldı. 5 μ M olacak şekilde elde edilen lipozom çözeltilerine eklendi. Floretinin 5 mL HSA-Lipozom çözeltisi eklendi. Elde edilen karışımlar uygulamadan önce 30 dakika boyunca dengelendi ve deneyler yapıldı. L-egg lecithin phosphatidylcholine molekülünün yapısı Şekil 3.1'de verilmiştir.



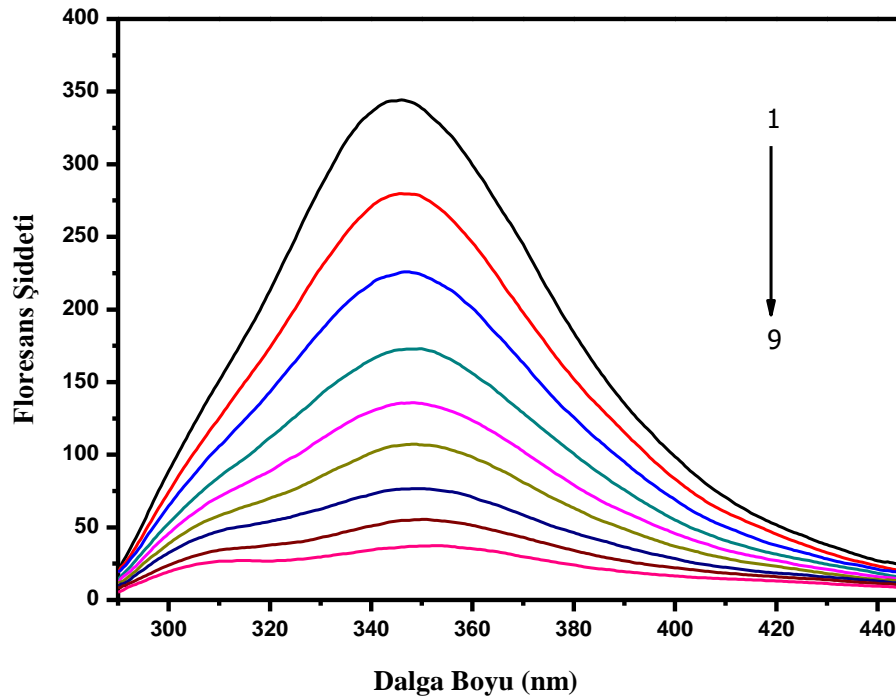
Şekil 3.1. L-egg lecithin phosphatidylcholine molekülünün yapısı

3.3.1. Floresans ve Absorpsiyon Spektrumlarının Alınması

Öncelikle Floretin ve HSA'nın oda sıcaklığında farklı lipozom çözeltisi konsantrasyonlarında absorpsiyon ve floresans spektrumları alınacaktır. Daha sonra termodinamik parametrelerin belirlenebilmesi için farklı sıcaklıklarda bu ölçümler tekrarlanacaktır. Floretin'in HSA molekülünün yapısal değişimine etkisini belirlemek için senkronize floresans (SF) spektrumları ve absorpsiyon spektrumlarından faydalanılacaktır. SF spektrumu kromofor etrafındaki moleküler çevre hakkında bilgi vermektedir. Bu metotta kromofor molekülünün çevresindeki polaritenin değişmesi sonucunda emisyon maksimumunda bir kayma oluşur. Bu kaymanın miktarına bağlı olarak moleküllerin serum albüminlerin hangi bölgesiyle etkileştiği bulunur. Örneğin SF spektrumu alınırken, uyarılma ve emisyon dalga boyu farkı 15 nm'ye ayarlandığı zaman ($\Delta\lambda = 15$) HSA molekülünün trozin amino grubunun zengin olduğu bölge, uyarılma ve emisyon dalga boyu farkı 60 nm'ye ayarlandığı zaman ($\Delta\lambda = 60$) HSA'nın tiptofon amino grubunun zengin olduğu bölge için karakteristik bilgi sağlamaktadır. Deneysel olarak bu dalgaboyu farklarında moleküller uyarılacak ve grafikler bu doğrultuda yorumlanacaktır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

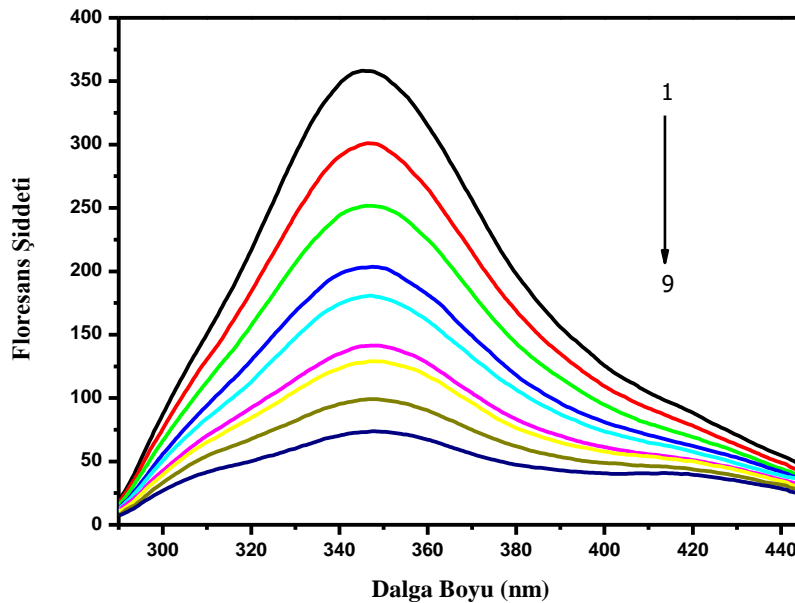
İlk olarak lipozom ortamında HSA ve Floretin arasında etkileşim olup olmadığına bakıldı. Bunun için lipozom konsantrasyonu sabit tutulup HSA-Floretin sistemi için floresans ölçümleri alındı. 260 μM 'lık lipozom ortamında HSA'nın 5,0 μM 'da konsantrasyonu sabit tutulup Floretinin artan konsantrasyonları için floresans spektrumları ölçülmüştür. Elde edilen floresans spektrumları Şekil 4.1'de verilmiştir.



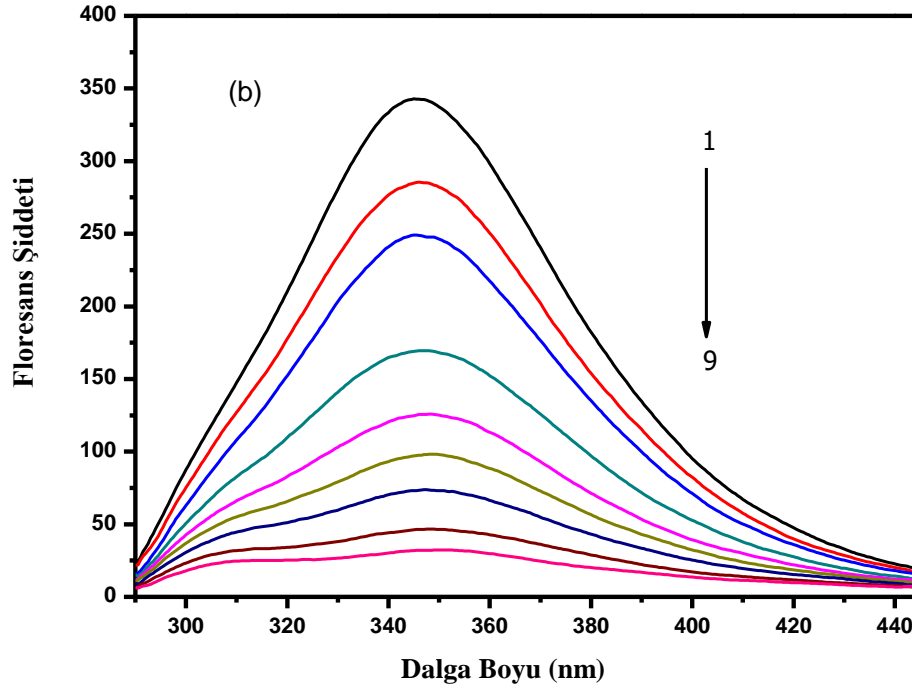
Şekil 4.1. 260 μM 'lık lipozom içeren fosfat tamponu çözeltisi ortamında 5,0 μM HSA'nın artan Floretin miktarlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumu. Floretinin konsantrasyonu:(1) 0 μM ; (2) 2 μM ; (3) 4 μM ; (4) 6 μM (5) 8 μM ; (6) 10 μM ; (7) 12 μM ; (8) 16 μM , (9) 20 μM

Şekil 4.1'de gösterildiği gibi bir dizi artan Floretin konsantrasyonu ile HSA'nın floresans şiddeti azalmıştır. HSA emisyon dalga boyunun maksimum değeri 345 nm olarak bulunmuştur. Ayrıca yeni bir floresans bandı gözlenmemiştir. HSA molekülünün fosfat

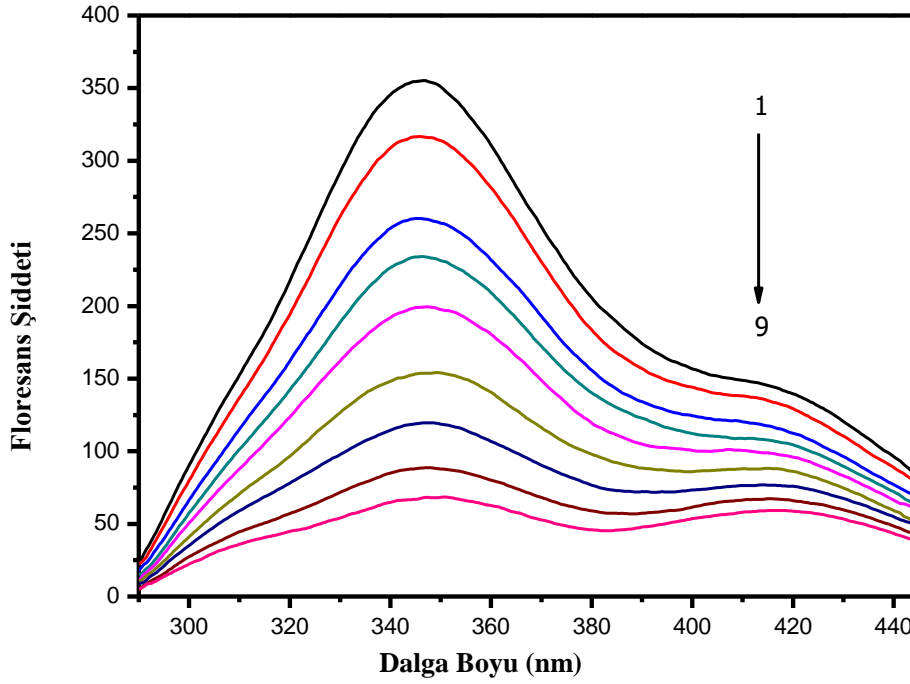
tamponu ortamında emisyon maksimumu 345 nm olması, HSA ile lipozomlar arasında bir etkileşim olmadığını göstermektedir. Çünkü ortamdaki sıcaklık, polarite ve viskozite değişimleri moleküllerin optik özelliklerini değiştirmektedir (Toprak 2011). HSA molekülünün floresans özelliği bünyesinde bulunan triptofan, tirozin ve fenilalanin kalıntılarından kaynaklanır. HSA'nın floresans şiddetine esas katkıyı bir florofor olarak değişimleri moleküllerin optik özelliklerini değiştirmektedir (Toprak 2011). HSA molekülünün floresans özelliği bünyesinde bulunan triptofan, tirozin ve fenilalanin kalıntılarından kaynaklanır. HSA'nın floresans şiddetine esas katkıyı bir florofor olarak işlev gören triptofan yapar. Bu nedenle, HSA'nın merkezinin dibine yakın bulunan triptofan kalıntısı, 345 nm'de emisyon vermektedir (Steblecka vd 2015). HSA'nın floresans şiddetindeki azalma Floretin ile etkileştiğini göstermektedir. Floresans şiddetindeki aşırı sönme Floretinin HSA'nın triptofan aminoasit gruplarına daha yakın olduğunu gösterebilir. Farklı lipozom konsantrasyonlarında iki molekül arasındaki etkileşim olup olmadığını bakıldı. Bunun için 220 μM , 242 μM ve 282 μM olmak üzere üç tane lipozom konsantrasyonunda floresans ölçümleri alındı. 220 μM , 242 μM ve 282 μM 'lık lipozom ortamında HSA'nın 5,0 μM 'da konsantrasyonu sabit tutulup floretinin artan konsantrasyonları için floresans spektrumları ölçülmüştür. Elde edilen floresans spektrumları 220 μM , 242 μM ve 282 μM 'lık lipozom ortamı için sırasıyla Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.2. 220 μM 'lık lipozom içeren fosfat tamponu çözeltisi ortamında 5,0 μM HSA'nın artan Floretin miktarlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumu. Floretinin konsantrasyonu:(1) 0 μM ; (2) 2 μM ; (3) 4 μM ; (4) 6 μM (5) 8 μM ; (6) 10 μM ; (7) 12 μM ; (8) 16 μM , (9) 20 μM



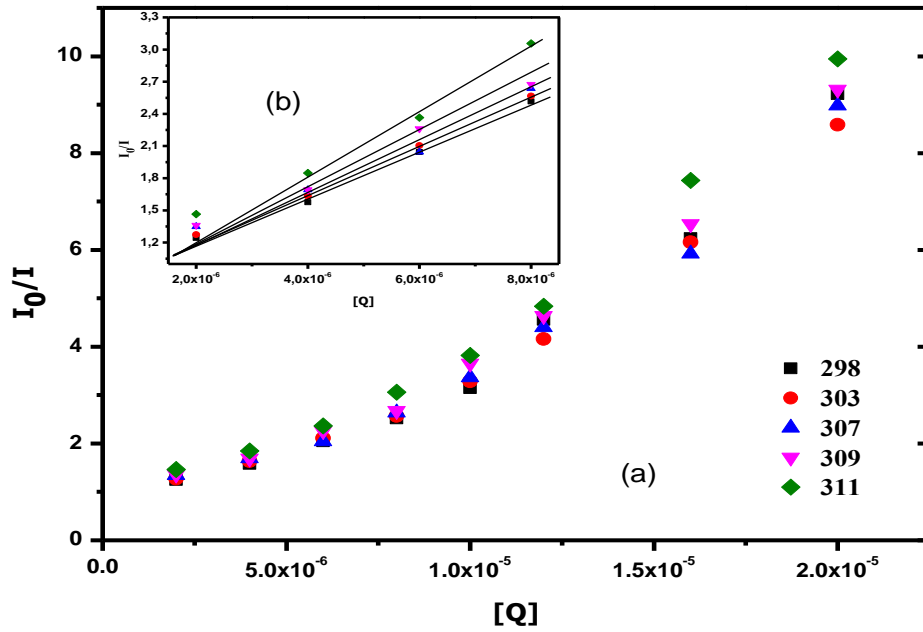
Şekil 4.3. 242 μM 'lık lipozom içeren fosfat tamponu çözeltisi ortamında 5,0 μM HSA'nın artan Floretin miktarlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumu. Floretinin konsantrasyonu:(1) 0 μM ; (2) 2 μM ; (3) 4 μM ; (4) 6 μM (5) 8 μM ; (6) 10 μM ; (7) 12 μM ; (8) 16 μM , (9) 20 μM



Şekil 4.4. 282 µM'lık lipozom içeren fosfat tamponu çözeltisi ortamında 5,0µM HSA'nın artan Floretin miktarlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumu. Floretinin konsantrasyonu:(1) 0µM; (2) 2 µM; (3) 4 µM; (4) 6 µM (5) 8 µM; (6) 10µM; (7) 12 µM; (8) 16µM, (9) 20 µM

Spektrumlardanda görüldüğü gibi tüm lipozom çözeltilerinde HSA molekülünün floresans şiddeti ortama eklenen artan Floretin konsantrasyonlarında düşmüştür. Floresans cihazının açılıp kapanması dikkate alınırsa farklı lipozom konsantrasyonlarında HSA'nın floresans şiddetinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Ancak, lipozom konsantrasyonu arttıkça HSA spektrumunda, (282 µM) yapısal değişiklik ve maksimum floresans şiddetinde 1 nm'lik bir kayma olduğu görülmektedir. Bu durum HSA molekülü ile lipitler arasında yüksek lipozom konsantrasyonlarına çıkıldıkça etkileşimin olduğunu göstermektedir (Sangrà vd 2017).Tüm lipozom konsantrasyonlarında HSA'nın floresans şiddeti, Floretin konsantrasyonundaki artışla yavaş yavaş azaldığı gözükmemektedir. Bu durum, tüm lipozom konsantrasyonlarında HSA ve Floretin arasındaki etkileşimin varlığını göstermektedir. Bu etkileşim, doğrudan Floresans kuençleşme nedeniyle olabilir. Floresans kuençleşme, bileşiklerin serum albümin ile etkileşimlerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılır ve bu teknik, bileşikler ve proteinler arasındaki bağlanma mekanizmalarını, bağlanma sabitlerini ve bağlanma modlarını ölçmek için kullanılır. 260 µM'lık sabit lipozom konsantrasyonunda Floretin ve HSA arasındaki etkileşimin mekanizmasını incelemek için floresans kuençleşme kullanılmıştır. Floresans kuençleşme dinamik, statik ve ikisinin

birleşmiş şekli gibi üç kategoride incelenebilir. 260 μM 'lık sabit lipozom konsantrasyonunda 5,0 μM 'lık HSA üzerine artan miktarlarda Floretin eklendi. Bu çözeltiler 298, 303, 307, 309 ve 311K sıcaklıklarda hazırlandı. Elde edilen çözeltilerin floresans spektrumları alındı. Spektrumlardan elde edilen veriler Denklem 1.1'e yerine koyularak Stern-Volmer grafiği çizildi. Bu grafikte Stern-Volmer hız sabiti (K_{sv}) belirlendi. 260 μM 'lık lipozom sisteminde Floretin bileşiğinin farklı konsantrasyonları ve sıcaklıklar için çizilen Stern-Volmer grafiği Şekil 4.5'te verilmiştir.



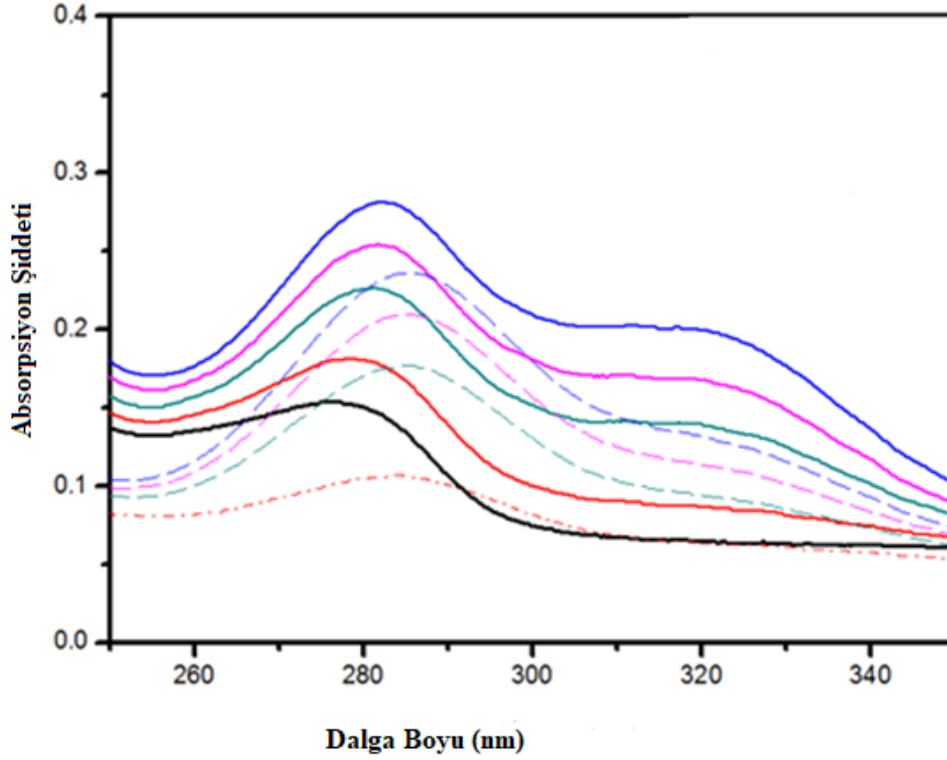
Şekil 4.5. (a) Farklı sıcaklıklarda 260 μM 'lık lipozom içeren fosfat tamponu çözeltisi ortamında HSA-Floretin sistemi için Stern-Volmer grafiği (b) HSA-Floretin sistemi için lineer Stern-Volmer grafiği; Floretin konsantrasyonu 2, 4, 6 ve 8 μM 'dır

Şekilde görüldüğü gibi düşük Floretin konsantrasyonunda lineerlik vardır. Ancak konsantrasyon artışıyla bu lineerlik kaybolmaktadır. Sıcaklık artışı I_0/I oranlarını arttırmıştır. 2, 4, 6 ve 8 μM 'lık Floretin konsantrasyonları için farklı sıcaklıklarda hesaplanan K_{sv} ve k_q değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Farklı sıcaklıklarda 260 μM 'lık lipozom çözeltisi ortamında HSA-Floretin sistemi için Stern-Volmer kuençleşme ve bağlanma sabitleri

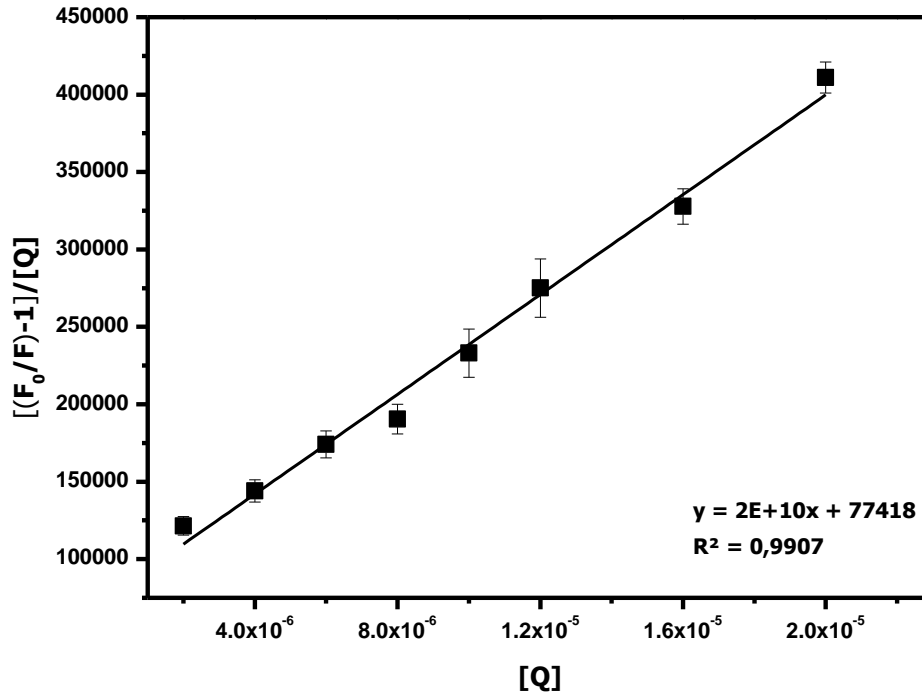
| <i>T</i> (K) | χ^2 | K_{sv} ($\times 10^4 \text{ L. mol}^{-1}$) | k_q ($\times 10^{12} \text{ L. mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) | χ^2 | K_b ($\times 10^7$) | <i>n</i> |
|-------------------------------|----------------------------|---|--|----------------------------|--|-----------------|
| 298 | 0,9597 | 17,5 | 17,5 | 0,9772 | 11,6 | 1,53 |
| 303 | 0,9702 | 18,4 | 18,4 | 0,9857 | 4,1 | 1,44 |
| 307 | 0,9688 | 19,2 | 19,3 | 0,9892 | 2,3 | 1,38 |
| 309 | 0,9797 | 20,3 | 20,3 | 0,9862 | 1,6 | 1,36 |
| 311 | 0,9974 | 24,1 | 24,1 | 0,9862 | 1,1 | 1,31 |

HSA gibi biopolimerlerin ortalama uyarılma ömrü 10^{-8} dir (Rhodes et al 2014). Tabloya bakıldığında sonuçlar, Stern-Volmer kuençleşme sabitinin değerlerinin artan sıcaklıkla arttığı görülmektedir. Bu durum, HSA-Floretin arasındaki etkileşimin muhtemel mekanizmasının dinamik kuençleşme olabileceğini göstermektedir. Ancak tüm sıcaklıklar için k_q değeri maksimum dinamik kuenleşme oran sabitinden oldukça büyüktür. Dinamik kuenleşme sabitleri en fazla $2.0 \times 10^{-10} \text{ L/mol.s}$ olarak verilmektedir (Liu et al., 2012). İki molekül arasındaki etkileşim mekanizmasını netleştirebilmek için absorpsiyon spektroskopisine başvuruldu. İlk olarak 260 μM 'lık lipozom ortamında HSA'nın 5,0 μM 'da konsantrasyonu sabit tutulup ortama 2 μM , 4 μM , 6 μM ve 8 μM floretin eklenerek absorpsiyon spektrumu alındı. Daha sonra 260 μM 'lık lipozom ortamında 2 μM , 4 μM , 6 μM ve 8 μM floretinin absorpsiyon spektrumları alındı. Elde edilen absorpsiyon spektrumları birleştirilerek Şekil 4.6'da verilmiştir.



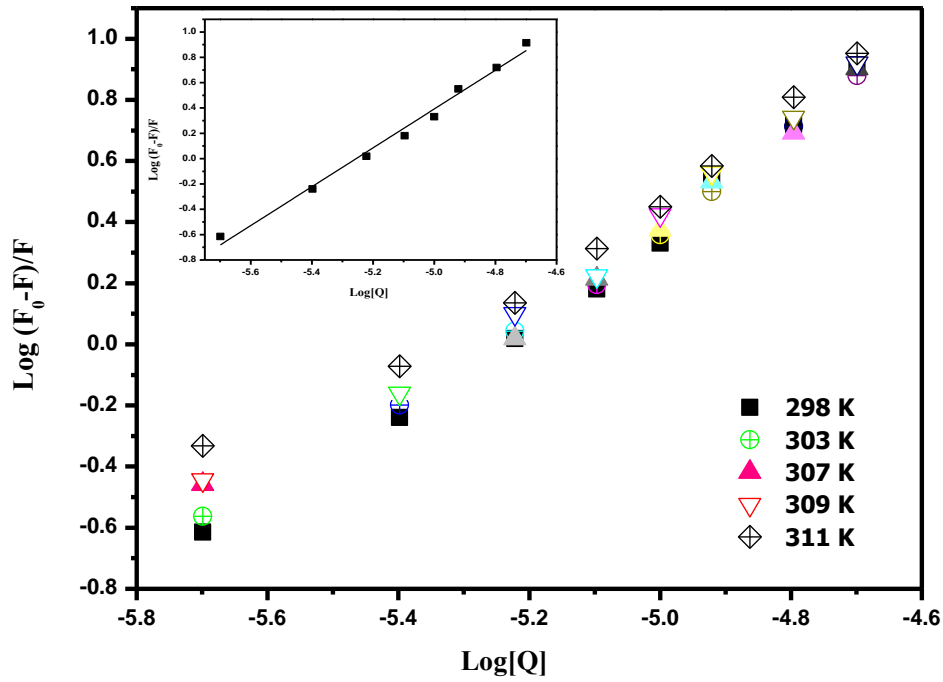
Şekil 4.6. 260 μM lipozom çözeltisi içinde HSA'nın farklı konsantrasyonlarda floretin varlığındaki absorpsiyon spektrumları. Floretin konsantrasyonları: 2 μM , 4 μM , 6 μM ve 8 μM ; kesik çizgili kısım 260 μM lipozom çözeltisi içinde Floretinin adsorpsiyon spektrumu.

Şekilden'de görüldüğü gibi HSA'nın 5,0 μM sabit konsantrasyonda olmasına karşın ortama Floretin eklenmesiyle absorpsiyon spektrumlarında artış meydana gelmiştir. HSA-Floretin sisteminin absorpsiyon spektrumları bu molekülerin tek başına alınmış spektrumlarından farklıdır. Bu da HSA ile ortama eklenen Floretin arasında bir kompleksin oluştuğunu gösterir. Bu durum HSA miktarı sabit iken absorpsiyon şiddetinin artmasını göstermektedir. Absorpsiyon spektrumları Floretin-HSA sisteminde statik kuenleşmenin varlığını da göstermektedir. Bu nedenle, 260 μM 'lık lipozom ortamında Floretin-HSA arasındaki etkileşim mekanizmasında statik ve dinamik kuenleşmenin aynı anda olduğu söylenebilir. Dinamik ve statik kuenleşmenin birleşmesiyle oluşan sistemlerde modifiye edilmiş Stern-Volmer denklemi kullanılır. Bu denklem ile çizilen grafiğin korelasyon değeri (x^2) ne kadar 1'e yakın olursa o kadar statik ve dinamik kuenleşme mekanizmasının aynı anda olduğunu gösterir. Kuenleşme mekanizmasını netleştirmek için, veriler Denlem 1.3'e göre analiz edildi. Elde edilen grafik Şekil 4.7'de verilmiştir.



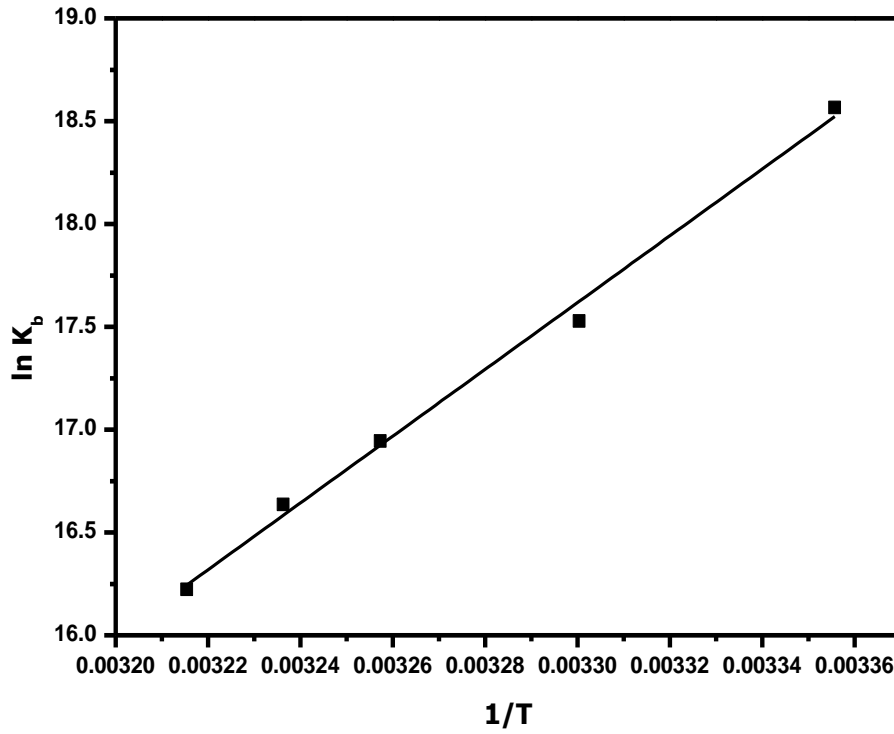
Şekil 4.7. Floretin-HSA sistemi için $[(F_0/F) - 1]/[Q]$ karşı $[Q]$ grafiği.

Grafikte görüldüğü gibi korelasyon değeri 0.9907 çıkmıştır. Tablo 4.1'e bakıldığında Stern-Volmer denkleminde elde edilmiş korelasyon değerinden büyüktür ve ayrıca 1'e oldukça yakındır. Tüm bu sonuçlar HSA ile Floretin arasında etkileşimin dinamik ve statik kuençleşme üzerinden yürüdüğünü göstermektedir. Biyomoleküller bağımsız bağlanma bölgelerine sahiptirler. İki molekül arasında bağlanma sabitlerinin bulmak için modifiye edilmiş Stern-Volmer denklemi kullanılır. Bunun için 298, 303, 307, 309 ve 311K sıcaklıkta 260 μM 'lık lipozom ortamında hazırlanmış HSA-Floretin çifti çözeltilerinden elde edilmiş floresans spektrumları kullanıldı. Veriler Denklem 1.2'de yerine koyularak modifiye edilmiş Stern-Volmer grafiği çizildi. Grafikten HSA-Floretin sistemi için bağlanma sabiti ve bağlanma sayısı (afinitesi) hesaplandı. 260 μM 'lık lipozom sisteminde Floretin bileşiğinin farklı konsantrasyonları ve sıcaklıklar için çizilen modifiye edilmiş Stern-Volmer grafiği Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. 260 μM 'lık lipozom sisteminde HSA-Floretin etkileşimi için bağlanma sabiti grafiği

5 farklı sıcaklık için bağlanma sayısı ve sabiti hesaplanmış, elde edilen veriler Tablo 4.1'de verilmiştir. Bağlanma sabitinin büyüklüğü Floretin ve HSA arasında güçlü bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Ancak sıcaklığın artmasıyla bağlanma sabitlerinin azaldığı görülmektedir. Bu durumda şu şekilde açıklanabilir. Floretin ve HSA arasındaki etkileşim mekanizmasına yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça dinamik kuenleşmenin katkısı artmaktadır. Düşük sıcaklıklarda ise etkileşim mekanizmasına statik kuenleşmenin katkısı daha fazladır. Buradan HSA'nin aktif bölgesine bağlanan molekül sayısı ve HSA üzerindeki bağlanma noktasının artan sıcaklıkla azaldığı ifade edilebilir. Moleküller arasındaki etkileşim kuvvetlerini belirlemek için termodinamik parametrelerden faydalanılır. Değişik sıcaklıklarda elde edilen bağlanma sabiti değerleri van't Hoff denklemi kullanılarak termodinamik parametreler hesaplanabilir. Denklem 1.4 kullanılarak grafik Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Floretin-HSA sistemine ait Van't Hoff denklemi grafiği

Grafikten elde edilen değerler Denklem 1.5 kullanılmıştır. 260 μM 'lık lipozom sisteminde Floretin-HSA arasındaki etkileşim için elde edilmiş termodinamik parametreler Tablo 4.2'de verilmiştir.

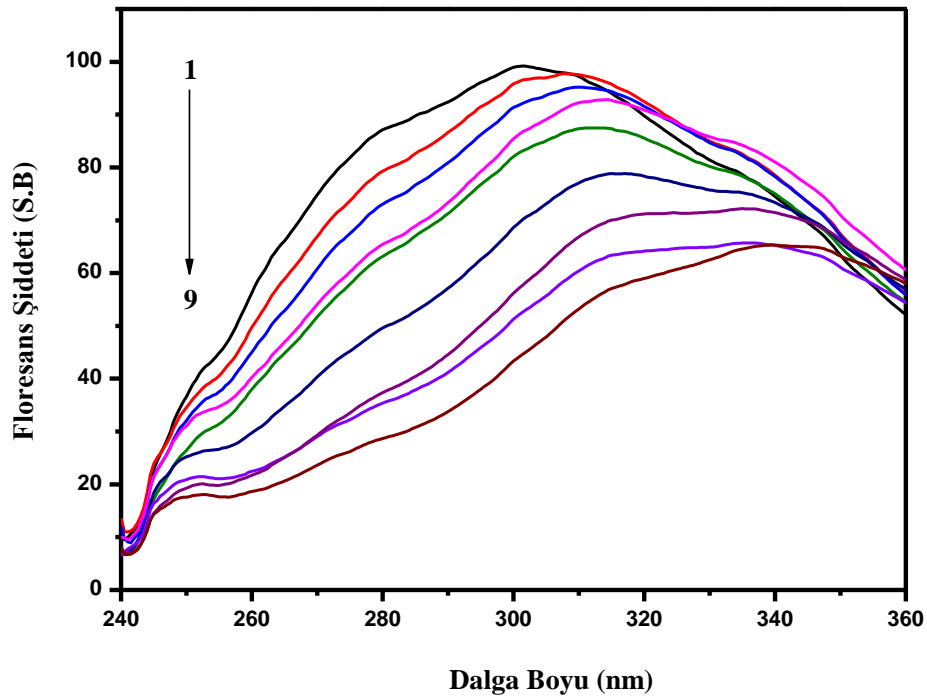
Tablo 4.2. HSA- Floretin sistemi için termodinamik parametreler

| T (K) | ΔG (kJ mol ⁻¹) | ΔH (kJ.mol ⁻¹) | ΔS (J. mol ⁻¹ K ⁻¹) |
|------------|------------------------------------|------------------------------------|--|
| 298 | -45,89 | -135,0 | -299,0 |
| 303 | -44,39 | | |
| 306 | -43,19 | | |
| 309 | -42,60 | | |
| 311 | -42,00 | | |

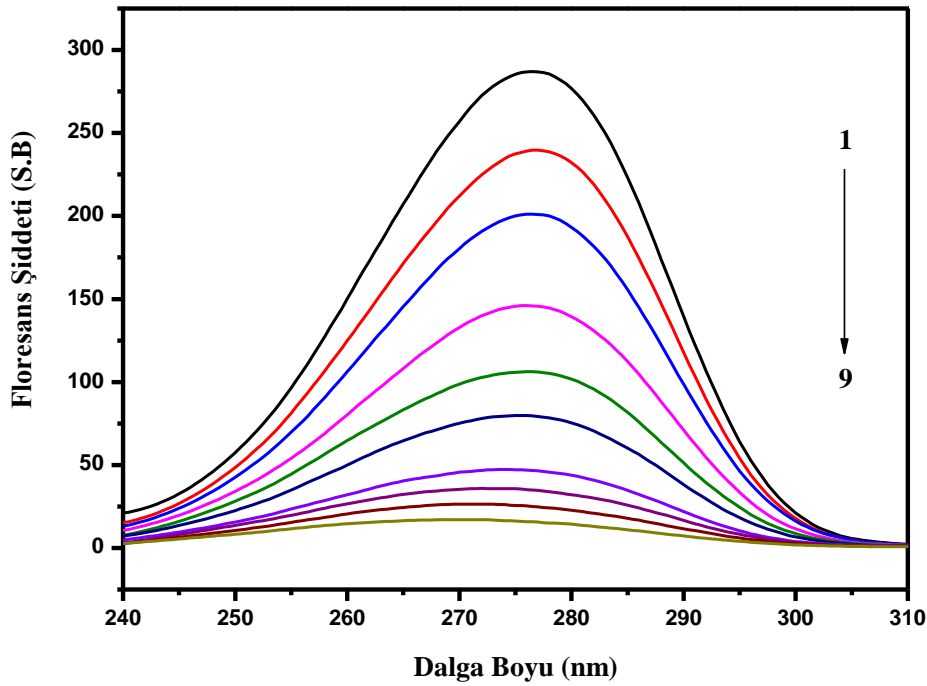
Tablo 4.2' ye bakıldığında Gibbs serbest enerjisi negatif çıkmıştır. Bu durum 260 μM 'lık lipozom sisteminde HSA-Floretin arasındaki etkileşimini kendiliğinden gerçekleştiğini belirtmektedir. Yine entalpi ve entropi değişiminin negatif değerde çıkması iki molekül arasında hidrojen bağı ve güçlü van der Waals etkileşimlerinin olduğu sonucunu göstermektedir. Ek olarak, entalpi değişiminin negatif olması, HSA-Floretin kompleks oluşumunun ekzotermik bir reaksiyon olduğunu gösterir. Gibbs serbest enerji değerlerinin

artan sıcaklıkla yükseldiği görülmektedir. Buda iki molekül arasındaki bağlanmanın sıcaklık artıkça azaldığı anlamında gelir. Düşük sıcaklıklarda iki molekülün bağlanması daha fazladır. Termodinamik sonuçlar HSA ve Floretin arasındaki etkileşimde, statik ve dinamik kuenleşmenin aynı anda olduğunu tekrar göstermektedir. Sistem yüksek sıcaklıklarda dinamik keunleşmeye kayarken düşük sıcaklıklarda statik kuenleşme mekanizmasına yönelmektedir. Bu da lipozom ortamında HSA ve Floretin arasındaki etkileşim yarışmalı olarak statik ve dinamik kuenleşme mekanizması üzerinden yürüdüğünü göstermektedir. Etkileşim mekanizması sıcaklıktan etkilenmektedir.

260 μM 'lık lipozom sisteminde HSA'nın konfirmasyonu ortama ilave edilen Floretin ile değişip değişmediğini belirlemek için senkronize floresans spektrumları alınmıştır. Floretin-HSA sisteminin senkronize floresans spektrumları Şekil 4.10 ve 4.11'de gösterilmiştir.



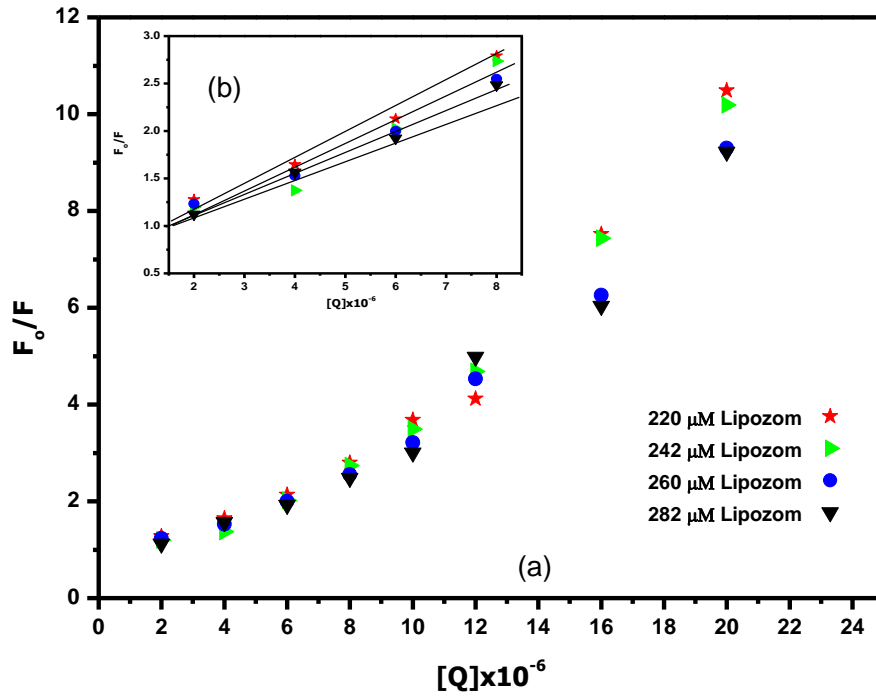
Şekil 4.10. 260 μM 'lık lipozom konsantrasyonun Floretin'in farklı konsantrasyonlarında HSA molekülü için alınmış senkronize floresans spektrumları ($\Delta\lambda=15$ nm)



Şekil 4.11. 260 μM 'lık lipozom konsantrasyonunun Floretin'in farklı konsantrasyonlarında HSA molekülü için alınmış senkronize floresans spektrumları ($\Delta\lambda=60$ nm)

Grafikler incelendiğinde Floretin-HSA etkileşiminin $\Delta\lambda=60$ nm için çizilen grafiğinin $\Delta\lambda=15$ nm'de çizilen grafiğe göre daha fazla değiştiği görülmektedir. Bu değişim Floretin molekülünün HSA'nın triptofan bölgesiyle daha fazla etkileşimde olduğu sonucunu vermektedir. Şekil 4.11'de ortama artan konsantrasyonlarda Floretin eklendiğinde HSA'nın maksimum emisyon dalga boyunda herhangi bir kayma gözlenmemiştir. Bu durum HSA-Floretin sistemi için HSA'nın triptofan bölgesindeki polaritenin değişmediğini ve aynı zamanda HSA'nın konfirmasyonunun değişmediğini göstermektedir. Bu sonucu floresans spektrumları da desteklemektedir. Diğer taraftan Şekil 4.10'da emisyon şiddetindeki azalmayla birlikte emisyon maksimumunda kırmızıya kayma meydana gelmiştir. Bu durum da HSA molekülünün bulunduğu ortamın artan Floretin konsantrasyonu ile polaritesinde bir değişimin olduğu görülmektedir. Bu değişime bağlı olarak kırmızıya kayma meydana gelmiştir. Floretin konsantrasyonu daha fazla artırıldığında azalmanın yerini düzensiz bir spektruma çevirmiştir. Bu durum Floretin molekülünün HSA'nın trozin bölgesini etkilediğini, fakat konsantrasyondaki belirli artıştan sonra polaritenin değişmediği ve dolayısıyla enerji transfer verimliliğinde bir azalmaya sebep olduğunu göstermektedir.

Floretin bileşiminin PC ile hazırlanmış değişik oranlarda lipozomlarda HSA ile etkileştiği ve bu etkileşimin tipik olarak kuençleşme olduğu gösterildi. Farklı lipozom konsantrasyonlarında elde edilen floresans spektrumları daha önce Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'te verilmişti. Bu floresans spektrumları kullanılarak Floretin bileşiminin PC lipozomlarına sızma miktarı belirlendi. 220 μM , 242 μM , 260 μM ve 282 μM lipozom çözeltileri için Stern-Volmer grafiği Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4 kullanılarak çizildi. Elde edilen Stern-Volmer grafiği Şekil 4.12'de verilmiştir.



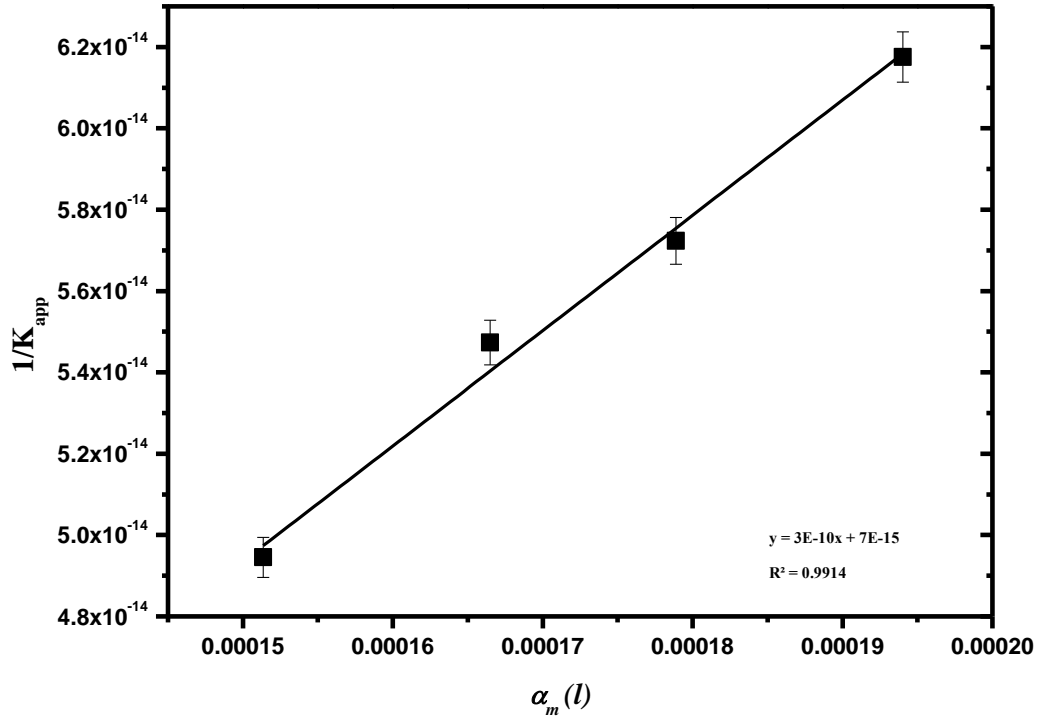
Şekil 4.12. (a) Farklı lipozom konsantrasyonlarında HSA-Floretin sistemi için Stern-Volmer grafiği (b) 2 μM , 4 μM , 6 μM ve 8 μM Floretin miktarları için lineer Stern-Volmer grafiği

Farklı lipozom konsantrasyonlarının için hesaplanan Stern-Volmer hız sabitleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Farklı lipozom konsantrasyonlarında HSA-Floretin sistemi için linear Stern-Volmer sabitleri.

| Çözeltiler | x^2 | K_{app} ($\times 10^4$ L. mol ⁻¹) | k_q ($\times 10^{12}$ L. mol ⁻¹ s ⁻¹) |
|---------------------|-------|--|---|
| 220 μ M Lipozom | 0,937 | 20,2 | 20,2 |
| 242 μ M Lipozom | 0,839 | 18,3 | 18,3 |
| 260 μ M Lipozom | 0,932 | 17,5 | 17,5 |
| 280 μ M Lipozom | 0,917 | 16,6 | 16,6 |

Görünen kuençleşme sabitleri kullanılarak Floretin molekülünün PC lipitleri ile oluşturulan lipozom fazındaki ayrışma oran sabiti hesaplandı. Bunun için Denklem 1.11 kullanılarak çizilen grafik Şekil 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.13. Floretin bileşiğinin PC lipozomlarındaki ayrışma sabiti grafiği

Tablo 4.13'e bakıldığında lipozom konsantrasyonu arttıkça görünen kuençleşme sabitleri azalmaya başlamıştır. Tüm lipozom çözeltileri için HSA miktarı ve ortama eklenen kuençir miktarı sabittir. Lipozom miktarının artmasıyla görünen kuençleşme sabitlerindeki düşüş, HSA konsantrasyonu sabit olduğundan ortamda bulunan kuençir miktarının azaldığını gösterir. Bu durum sistemde bulunan kuençir moleküllerinin lipozom fazına sızdığı ve sulu fazda azaldığı anlamına gelmektedir. Grafikten Floretinin PC lipozomlarındaki ayrışma

sabiti K_p ve membran fazındaki bimoleküler kuençleşme sabitli (k_m) sırasıyla 42900 ve 3.33×10^9 olacak şekilde hesaplanmıştır. Ayrışma sabiti oldukça büyük olması Floretinin PC lipozomlarına sızma oranının az olduğunu göstermektedir. Floretin molekülünün lipofilikliği (kimyasal bileşiğin yağlarda, yağlarda, lipidlerde ve heksan veya toluen gibi polar olmayan çözücülerde çözünme kabiliyeti) düşük ve hidrojen bağı yapma özelliği yüksektir. Bu bilgiler Floretin molekülüyle ilaç geliştirilmesine ışık tutacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında HSA ile Floretin arasındaki etkileşim, L-egg lecithin phosphatidylcholine'den (PC) hazırlanmış lipozom sistemlerinde absorpsiyon, floresans ve senkroniz floresans spektroskopileri kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca floresans kuenleşme kullanılarak Floretinin PC lipozomlarındaki dağılıma (ayrışma) sabiti belirlenmiştir. 220 μM , 242 μM , 260 μM ve 282 μM 'lık lipozom ortamında HSA'nın sabit miktarı üzerine artan miktarlarda Floretin eklenerek floresans spektrumları alınmıştır. Elde edilen tüm floresans spektrumlarında sabit miktarı üzerine artan miktarlarda Floretin eklendiğinde HSA'nın floresans spektrumlarında azalma görülmüştür. Bundan dolayı HSA ile Floretin arasında bir etkileşimin olduğu görülmüştür. HSA'nın floresans maksimum dalga boyu ilk üç lipozom sisteminde 345 nm, 282 μM 'lık lipozom sisteminde ise 346 nm olarak bulunmuştur. Ayrıca 282 μM 'lık lipozom sisteminde HSA'nın floresans spektrumunda yapısal değişiklikler görülmüştür. Bu durum HSA molekülü ile lipitler arasında etkileşimin olduğunu göstermektedir (Sangràvd 2017).

260 μM 'lık lipozom ortamında HSA-Floretin etkileşimin mekanizmasını belirlemek için floresans kuenleşmeden faydalanılmıştır. Farklı sıcaklıklarda elde edilen floresans spektrumları ile Stern-Volmer grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden Stern-Volmer hız sabiti (K_{sv}) belirlenmiştir. Sıcaklık arttıkça Stern-Volmer kuenleşme sabitinin değerlerinin arttığı görülmüştür. Ancak tüm sıcaklıklar için k_q değeri maksimum dinamik kuenleşme oran sabitinden oldukça büyük bulunmuştur. Yine HSA-Floretin sistemi için alınan absorpsiyon spektrumlarında HSA-Floretin sisteminin absorpsiyon spektrumları bu moleküllerin tek başına alınmış spektrumlarından farklı olduğu bulunmuştur. Bu bulgular göz önüne alındığında HSA ile Floretin arasındaki etkileşim mekanizmasının statik ve dinamik kuenleşmenin aynı anda olduğu önerilmiştir. Bu öneriyi desteklemek Önerilmiştir modifiye edilmiş Stern-Volmer denklemi kullanılmış ve çizilen grafikte korelasyon değeri (x^2) bire çok yakın olduğu görülmüştür. Sonuç olarak HSA ve Floretin

arasındaki

etkileşim mekanizmasına yüksek sıcaklıklarda dinamik kuençleşme, düşük sıcaklıklarda ise statik kuençleşmenin katkısının daha fazla olduğu önerildi.

HSA ve Floretin arasındaki etkileşim kuvvetlerini belirlemek için termodinamik parametreler belirlendi. Gibbs serbest enerjisi negatif çıkması lipozom sisteminde HSA-Floretin arasındaki etkileşimin kendiliğinden gerçekleştiğini göstermektedir. Entalpi ve entropi değişiminin negatif olması iki molekül arasında hidrojen bağı ve güçlü van der Waals etkileşimlerinin olduğunu gösterdi. Gibbs serbest enerji değerlerinin artan sıcaklıkla yükselmesi iki molekül arasındaki bağlanmanın sıcaklık artıkça azaldığını göstermektedir. Termodinamik sonuçlar HSA ve Floretin arasındaki etkileşiminin yüksek sıcaklıklarda dinamik kuenleşmeye kayarken düşük sıcaklıkla da statik kuenleşmeye kaydığını göstermektedir.

HSA'nın konfirmasyonuna ortama eklenen Floretinin etkisini belirlemek için senkronize floresans spektrumları alınmıştır. Elde edilen sonuçlarda Floretin molekülü HSA'nın trozin bölgesini etkilediği, fakat konsantrasyondaki belirli artıştan sonra polaritenin değişmediği ve dolayısıyla enerji transfer verimliliğinde bir azalma meydana geldiği şeklinde açıklanmıştır. HSA'nın triptofan bölgesindeki polaritenin değişmediği önerilmiştir. Floretin-HSA etkileşiminin $\Delta\lambda=60$ nm için çizilen grafiğinin $\Delta\lambda=15$ nm'de çizilen grafiğe göre daha fazla değişmesi Floretin molekülünün HSA'nın triptofan bölgesiyle daha fazla etkileşimde bulunduğunu göstermektedir.

Görünen kuençleşme sabitleri kullanılarak Floretin molekülünün lipozom fazındaki ayrışma oran sabiti hesaplandı. Lipozom miktarının artmasıyla görünen kuençleşme sabitlerinde düşme meydana gelmiştir. Sonuç olarak HSA konsantrasyonu sabit olduğundan su fazında bulunan kuençir miktarı azalmış yani kuençir molekülleri lipit faza sızmıştır. Floretinin PC lipozomlarındaki K_p ve k_m değerleri sırasıyla 42900 ve 3.33×10^9 olarak hesaplanmıştır. Ayrışma sabitinin büyük olması Floretin molekülünün su fazında daha fazla olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak Floretin molekülünün yağlarda, lipitler,

hekzan veya toluen gibi polar olmayan çözücülerde çözünme kabiliyeti düşük hidrojen bağı yapma özelliği yüksektir. Floretin bileşiğinin sudaki çözünürlüğünün yüksek olması bu molekülün vücuttan atılımını kolaylaştırmaktadır. Yani toksitesini düşürmektedir.

KAYNAKLAR

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

Bozkurt E (2007) Coloidal CdS'ün kumarin-151'n floresans şiddeti üzerine etkisi Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

Bozkurt E, Bayraktutan T, Acar M, 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. doi:10.1016/j.saa.2012.09.082

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

Escarpa A and González MC (1998) High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties, Journal of Chromatography 823: 331-337

Guo Y, Yue Q, Gao B (2010) Probing the molecular mechanism of C.I. Acid red 73 binding to human serum albumin Environ Toxicol. Phar 30: 45–51

Gürsoy A, Pişkin E, Dortunç B, Peppas NA (1989) Kontrollü ilaç Serbestleştirilen Sistemler İstanbul Tekno Grafik Ada Ofset 173

Gürsoy AZ (2002) Kontrollü Salım Sistemleri ed 1: 104

Hassan M, El Yazidi C, Landrier JF, Lairon D, Margotat A, Amiot MJ (2007) Phloretin enhances adipocyte differentiation and adiponectin expression in 3T3-L1 cells Biochem. Biophys Res Commun 361: 208–13

Hilt P, Schieber A, Yildirim C, Arnold G, Klaiber I, Conrad J, Beifuss U, Carle R (2003) Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy J. Agric. Food. Chem. 51: 2896–9

Justesen U, Knuthsen P and Leth T (1998) Quantitative analysis of flavonols flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid

chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography* 799: 101-110

Keller BC (2001) Liposomes in Nutrition Trends in Food Science and Technology 12: 25- 31

Lakowicz JR (1983) Principle of fluorescence spectroscopy Plenum Pres, New York

Lakowicz JR (2002) Volume 2 principles. Kluwer Academic publishers, New York

Lee JC, Lim KT, Jang YS (2002) Identification of Rhus verniciflua Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti-apoptotic properties. BBA-Gen. Subjects., 1570: 181–191

Özer S (2012) assessing phytoestrogenic potency of apigenin, phloretin and myricetin in vegetal food Yüksek lisans tezi. Biyoloji Anabilim dalı. Hacettepe üniversitesi 15

Przybylo M, Procek J, Hof M, Langner M (2014) The alteration of lipid bilayer dynamics by phloretin and 6-ketocholestanol, Chemistry and Physics of Lipids. doi:10.1016/j.chemphyslip.2013.11.005 178: 38–44

Qin Y, Zhang Y, Yan S, Ye L (2010) 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

Raja MM, Tyagi NK, Kinne RK (2003) Phlorizin recognition in a C-terminal fragment of SGLT1 studied by tryptophan scanning and affinity labeling, J. Biol. Chem. 278: 49154–63

Stangl V, Lorenz M, Ludwig A, Grimbo N, Guether C, Sanad W, Ziemer S, Martus P., Baumann G, Stangl K (2005) The flavonoid phloretin suppresses stimulated expression of endothelial adhesion molecules and reduces activation of human platelets J Nutr 135:172–8

Takegami S, Kitamura K, Ohsugi M, Ito A, Kitade T (2015) Partitioning of organophosphorus pesticides into phosphatidylcholine small unilamellar vesicles studied by second-derivative spectrophotometry, Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. doi:10.1016/j.saa.2015.02.061 145: 198–202

Toprak M (2016) Fluorescence study on the interaction of human serum albumin with Butein in liposomes, Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. doi:10.1016/j.saa.2015.10.023 154: 108–113

URL-2

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

Yang KC, Tsai CY, Wang YJ, Wei PL, Lee CH, Chen JH., Wu CH. and Ho YS (2009) Apple Polyphenol Phloretin Potentiates the Anticancer Actions of Paclitaxel Through Induction of Apoptosis in Human Hep G2 Cells, Molecular Carcinogenesis 48: 420–431

Yang EB, Guo YJ, Zhang K, Chen YZ, Mack P (2001) Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by chalcone derivatives, BBA-Proteins Proteom 1550:

144–152.

Wang T, Zhao Z, Wei B, Zhang L, Ji L(2010) Spektroskopik investigation on the binding of dibazol to bovine serum albumin, *J Mol. Structure* 970-133

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Elazığ'da doğdu. İlk ve ortaokulu Elazığ Şair Hayri ilk öğretim okulunda, liseyi Elazığ Balakgazi lisesi'nde tamamladı. 2009 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2013 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2014 yılından itibaren özel sektörde çalışmaktadır. 2015 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programına yerleşti.