

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MELATONİNİN
MODEL HÜCRE MEMBRANLARI İLE
ETKİLEŞMESİNİN BİYOFİZİKSEL
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

İpek ŞAHİN

Fizik Anabilim Dalı
Bilim Dalı Kodu: 404.01.00

Sunuş Tarihi: 18.08.2003

Tez Danışmanları: Prof. Dr. Nadide KAZANCI
Prof. Dr. Feride SEVERCAN

Bornova-İZMİR

Sayın İpek ŞAHİN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Melatoninin Model Hücre Membranları ile Etkileşmesinin Biyofiziksel Yöntemlerle İncelenmesi” adlı bu çalışma “Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği” nin 12 inci madde (c) ve (d) bentleri ve Enstitü yönergesinin ilgili hükümleri dikkate alınarak tarafımızdan değerlendirilmiş olup yapılan sözlü savunma sınavında aday oy ile başarılı bulunmuştur. Bu nedenle İpek ŞAHİN’ in sunduğu metnin yüksek lisans tezi olarak kabulüne oy ile karar verilmiştir.

14 Ağustos 2003

Jüri Başkanı; imza
Raportör ; imza
Üye ; imza

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun // gün ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Süleyman BORUZANLI
Enstitü Sekreteri

ÖZET**MELATONİNİN MODEL HÜCRE MEMBRANLARI İLE
ETKİLEŞMESİNİN BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

ŞAHİN, İpek

Yüksek Lisans Tezi, Fizik Bölümü

Tez Yöneticileri: Prof. Dr. Nadide KAZANCI**Prof. Dr. Feride SEVERCAN****Ağustos 2003, 69 sayfa**

Melatonin çok geniş kullanım alanına sahip bir ilaçtır. Bu bakımdan melatoninin etki mekanizmasının tayini için yapılan çalışmalar son derece büyük önem taşımaktadır. Melatonin için bir çok araştırma yapılmaktadır, fakat bu çalışmaların hepsi klinik değer taşımaktadır. Moleküler düzeyde ise şimdiye kadar herhangi bir araştırma yapılmamıştır.

Bu çalışmada amacımız melatoninin gerçek hücre membranıyla etkileşimini, model membran kullanarak anlamaya çalışmaktır. Gerçek membranlar çok komplike yapılar olduğundan moleküller arası etkileşimleri yorumlamak zordur. Bu nedenle yapı itibarıyla gerçek membranlarla hemen hemen aynı özelliklere sahip olan, bileşen sayısını ve konsantrasyonlarını değiştirebildiğimiz model membranlar ile çalışılmıştır. Moleküller arası etkileşimleri incelemek için çok katlı model membran yapılmıştır. Etkileşimler melatoninin lipid faz geçiş sıcaklığı, faz geçiş eğrisi, membran düzeni ve membran dinamiği üzerindeki etkileri kullanılarak bulunmaya çalışılmıştır. Çalışmalar sırasında spektroskopik ve kalorimetrik ölçümler yapılmıştır. Bu çalışmalar sayesinde melatoninin membrandaki etkileri moleküler düzeyde saptanarak, membrandaki konumunu tayin etmek mümkün olmuştur.

Anahtar Sözcükler: Melatonin, membran, liposom, FTIR spektroskopisi, DSC.

ABSTRACT**THE INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF MELATONIN
WITH MODEL MEMBRANE BY USING BIOPHYSICAL METHODS**

ŞAHİN, İpek

MSc in Physics

Supervisors: Prof. Dr. Nadide KAZANCI**Prof. Dr. Feride SEVERCAN****August 2003, 69 pages**

Melatonin is a drug which is widely used . Therefore, the studies for the understanding of the mechanism of action of melatonin are quite important. A lot of studies are performed wiht melatonin. But all of these are clinical, and there is not any research about the action mechanism of melatonin at molecular level.

Our aim in this study is to find interaction of melatonin with the real cell membrane by examining their interactions with model membrane. Since real membranes have very complicated structures, it is quite difficult to study the intermolecular interactions with them. Therefore, for the investigation, model membranes, which have similar properties with the real ones, were used. We can change the components and the concentration of the components in model membranes as well. Multilayer model membranes were used in order to find the intermolecular interactions. Interactions were determined by the effect of melatonin on the lipid phase transition temperature, phase transition slope, membrane order and membrane dynamics. During this studies spectroscopic and calorimetric measurements were performed. We obtained information about the membrane order and dynamics by the help of these studies. Moreover, the estimation of the position of melatonin on the membranes has been possible.

Keywords: Melatonin, membrane, liposom, FTIR spectroscopy, DSC.

TEŞEKKÜR

Kendisi ile karşılaştığım ilk günden beri bana her konuda yardım eden ve destek olan, böylesine zevk alarak çalıştığım tez konumu belirleyen ve tez çalışmalarımın her aşamasında ilgisini ve zamanını benden esirgemeyen, bilgi, deneyim ve görüşlerinden yararlanarak örnek aldığım, bundan dolayı kendimi çok şanslı gördüğüm saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nadide Kazancı'ya,

Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji bölümünde, tezimin deneysel çalışmaları için bana laboratuvarını açan, her türlü ihtiyacımda kolaylık sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden fazlası ile yararlandığım ikinci danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Feride Severcan'a, yine o laboratuvarında bana her konuda yardımcı olan Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma,

Aylar süren analizlerimi bilgisayarında gerçekleştirdiğim arkadaşım Araştırma Görevlisi Mehmet Okcan'a ve maddi manevi her türlü desteklerini benden esirgemeyen arkadaşım Araştırma Görevlisi Özgür Masalcı'ya ve aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|------------|
| ÖZET | V |
| ABSTRACT | VII |
| TEŞEKKÜR | IX |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | XV |
| TABLolar DİZİNİ | XIX |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1 ÇALIŞMANIN AMACI..... | 1 |
| 1.2 BİYoloJİK VE YAPAY MEMBRANLARLA İLGİLİ TEMEL BİLGİLER..... | 3 |
| 1.2.1. Membranların Fonksiyonları | 3 |
| 1.2.2. Membranların Yapısı..... | 5 |
| 1.2.3. Model Membran DPPC | 14 |
| 1.3. MELATONİNİN YAPI VE FONKSİYONU | 16 |
| 1.3.1. Melatonin Sentezi..... | 17 |
| 1.3.2. Melatoninin Fonksiyonları | 18 |
| 1.4. SPEKTROSKOPİNİN TEMELİ..... | 21 |
| 1.4.1. Elektromanyetik Spektrum | 23 |
| 1.4.2. İnfrared Spektrokopisi | 24 |
| 1.4.3. Titreşim Çeşitleri | 27 |
| 2. MATERYAL VE METOT | 29 |
| 2.1. Kimyasal Maddeler | 29 |
| 2.2. Membran Örneklerinin Hazırlanması..... | 29 |
| 2.2.1. FTIR Çalışmaları İçin Örnek Hazırlanması..... | 29 |
| 2.2.2. DSC Ölçümleri İçin Örnek Hazırlanması..... | 30 |

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

| | |
|---|-----------|
| 2.3. Fourier Dönüşüm Infrared (FTIR) | 30 |
| 2.3.1. FTIR Spektroskopisinin Diğer Biyofiziksel Tekniklere Göre Avantajları | 34 |
| 2.4. İncelenen İnfrared Spektral Bölgeleri | 35 |
| 2.5. FTIR Spektroskopik Membran Araştırmalarında Kullanılan Ampirik Kaideler | 37 |
| 2.5.1. CH ₂ Antisimetrik Gerilme Bandları | 37 |
| 2.5.2. CH ₂ Simetrik Gerilme Bandları | 38 |
| 2.5.3. CH ₃ Asimetrik Gerilme Bandları | 38 |
| 2.5.4. C=O Gerilme Bandları | 38 |
| 2.5.5. PO ₂ ⁻ Antisimetrik Gerilme Bandları..... | 39 |
| 2.5.6. Asil (Hidrokarbon) Zincirlerinin Spektral Karakteristiği..... | 39 |
| 2.6. Diferansiyel Tarama Kalorimetresi | 41 |
| 3. SONUÇLAR | 43 |
| 3.1. FTIR Çalışmaları | 43 |
| 3.1.1. C-H Gerilme Bölgesi | 43 |
| 3.1.1.1. CH ₂ Antisimetrik Gerilme | 43 |
| 3.1.1.2. CH ₂ Simetrik Gerilme | 48 |
| 3.1.1.3. CH ₃ Asimetrik Gerilme | 48 |
| 3.1.2. Baş Grup Gerilme Bölgesi | 50 |
| 3.1.2.1. C=O Gerilme | 50 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 3.1.2.2. PO_2^- Antisimetrik Gerilme..... | 52 |
| 3.2. DSC Çalışmaları | 54 |
| 4. TARTIŞMA | 56 |
| KAYNAKLAR..... | 60 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 69 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 1.1. Membranların Çeşitli Fonksiyonları | 5 |
| 1.2. Amfifilik Moleküllerin Oluşturdukları Değişik Yapılar | 8 |
| 1.3. Membran Akışkan Mozaik Modeli..... | 9 |
| 1.4. Lipid Moleküllerinin Hareketi | 10 |
| 1.5. Trans ve Gauche Yapıyı Açıklayan Bir Fosfolipid Molekülü..... | 11 |
| 1.6. Membran Fazlarının Şematik Gösterimi | 12 |
| 1.7. İki Lipid Karışımli Küresel Çift Katmanların Mümkün Yapılarının Şematik Gösterimi | 13 |
| 1.8. Yanlamasına Faz Ayrılmasının Şematik Açıklaması | 13 |
| 1.9. DPPC'nin Yapısal Formülü..... | 14 |
| 1.10. DPPC Hidrokarbon Zincirlerinin T_m 'de Yapısal Değişimi | 15 |
| 1.11. Melatoninin Yapısal Formülü..... | 16 |
| 1.12. Melatoninin Sentezi | 17 |
| 1.13. Potansiyel Enerji Diagramı..... | 26 |
| 1.14. (A) Lineer (B) Non-lineer Üç Atomlu Bir Molekülün Titreşim Tipleri..... | 28 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

| Şekil | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 2.1. Michelson İnterferometresi..... | 31 |
| 2.2. Havanın İnfrared Spektrumu | 32 |
| 2.3. Suyun İnfrared Spektrumu..... | 33 |
| 2.4. DPPC Çok Katmanlı Lipozomların C-H Gerilme Bölgesinin Farklı Sıcaklıklardaki FTIR Spektrumu | 40 |
| 2.5. A: Belirli Sıcaklıklardaki Endotermik Ön Geçiş ve Ana Geçişin DSC Ölçümleri | 42 |
| B: Jel ve Sıvı Kristal Fazda Fosfolipidin Diagramatik Gösterimi | 42 |
| 3.1. Saf ve farklı % mol Melatonin İçeren DPPC Lipozomunun CH ₂ Antisimetrik Gerilme Modu Frekansının Sıcaklığa bağlı Değişimi | 45 |
| 3.2. Saf ve farklı % mol Melatonin İçeren DPPC Lipozomunun CH ₂ Antisimetrik Gerilme Modu Bandgenişliğinin Sıcaklığa bağlı Değişimi..... | 47 |
| 3.3. Saf ve farklı % mol Melatonin İçeren DPPC Lipozomunun CH ₃ Asimetrik Gerilme Modu Frekansının Sıcaklığa bağlı Değişimi..... | 49 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

| Şekil | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 3.4. Saf ve farklı % mol Melatonin İçeren DPPC Lipozomunun C=O Gerilme Modu Frekansının Sıcaklığa bağlı Değişimi | 51 |
| 3.5. Saf ve farklı % mol Melatonin İçeren DPPC Lipozomunun PO_2^- Antisimetrik Gerilme Modu Frekansının Sıcaklığa bağlı Değişimi..... | 53 |
| 3.6. Saf ve farklı %mol Melatonin İçeren DPPC Lipozomunun DSC Kalorimetrik Eğrisi | 55 |

TABLolar DİZİNİ

| Tablo | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 1.1. Bazı Biyolojik Membranların % Lipid Bileşenleri..... | 7 |
| 1.2. Gözlenen Taneciklere Göre Spektroskopi Çeşitleri | 22 |
| 1.3. Elektromanyetik Spektrum Bölgeleri | 24 |
| 2.1. FTIR Spektrometre Bileşenleri..... | 31 |
| 2.2. Lipidlerin Karakteristik İnfrared Bandları..... | 36 |

1. GİRİŞ

Bu çalışmada, melatoninin, biyolojik membranlara en yakın model olan lipid membranlar (Dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC) üzerine etkisi, Fourier transform infrared (FTIR) ve diferansiyel tarama kalorimetre (DSC) teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Melatoninin membran yapı ve akışkanlığını, membran geçirgenliğini nasıl değiştirdiği, melatoninin çeşitli konsantrasyonları kullanılarak ve sıcaklığa bağlı olarak incelenmiştir.

Bu nedenle bu bölümde membran, melatonin ve teknikler hakkında teorik ve literatür bilgileri verilecektir.

1.1. ÇALIŞMANIN AMACI

Membranın fiziksel özellikleri membran fonksiyonlarını belirlediği için model ve biyolojik membranlarda ilaç-membran etkileşmelerinin incelenmesi aktif bir araştırma alanıdır. Biyolojik membranlar çok bileşen içerdiği için, bileşenler ve katkı maddeleri arasındaki etkileşmeleri anlamak zordur. Bu nedenle bileşenlerinin sayısını ve konsantrasyonlarını değiştirebildiğimiz model membranlarla çalışmak, biyolojik membranlardaki olayları açıklamada önem kazanır. Genellikle bu sistemler, doğal veya sentetik orijinli fosfolipidlerin birini ya da daha fazlasını içeren karışımlardan oluşan, lipidlerin çift katman teşkil ettiği küresel veziküllerdir. Bir lipid katmanı ile çevrili böyle veziküller **lipozom** olarak adlandırılırlar (Murray et al, 1990). İlaçların biyolojik etkisinde ilaç-membran etkileşmeleri yaşamsal önem taşır. Örneğin bir ilaç molekülünün sistemde reseptör kısmına ulaşması, ilaçların biyolojik membran boyunca transportu ile ilgilidir. Bazı ilaçlar membrana direkt olarak etki eder. Bu nedenle bir ilacın etki mekanizmasını iyice anlayabilmek için ilaç-membran etkileşmesini moleküler düzeyde anlamak gerekir. Bu çalışmada incelenen melatonin antioksidan olup pek çok hastalıkta tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Melatoninin

etki mekanizmalarının tayini için pek çok çalışma yapılmıştır. Fakat bu çalışmaların hepsi klinik seviyededir. Moleküler düzeydeki çalışmalar henüz çok kısıtlı sayıdadır (Bayari and Ise, 2003; Costa et al, 1997) dolayısı ile melatoninin membran içindeki konumu ve konformasyonu henüz belirsizdir. Bu tip çalışmalar melatoninin tedavideki kullanımı ile ilgili mekanizmaları anlamada yardımcı olacak değerli bilgiler verecektir.

Bu çalışmada ilaç olarak potansiyel vaad eden melatoninin yüksüz model membranlar üzerindeki fiziksel etkileri spektroskopik ve kalorimetrik olarak incelenmiştir. Melatoninin jel ve sıvı kristal fazda lipidin asil zinciri, karbonil grubu ve fosfat baş grubu ile nasıl etkileştiği, membran içindeki konumu ve dolayısı ile membran düzen ve dinamiğini nasıl değiştirdiği incelenmiştir.

Bu çalışmadaki esas amacımız henüz membranla etkileşmesi hemen hemen hiç bilinmeyen melatoninin membranla etkileşmesini sıcaklığa ve melatonin konsantrasyonuna bağlı olarak incelemektir. Ayrıca melatoninin nötür membranlarla etkileşmesini anlamak, incelenecek sistemin gerçek membranlara benzemesi nedeni ile hem gerçek sistemlerdeki etkileşmeleri anlamamız açısından değerli bilgiler verecektir hem de melatoninin etki mekanizmasını daha fazla anlamamıza yardımcı olacaktır. Melatonin-membran etkileşimini daha iyi anlamak için daha fazla teorik ve deneysel çalışma gereklidir Bu tip çalışmalar melatoninin moleküler düzeyde anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Bu çalışma, ayrıca ileride melatoninin hastalık tedavilerindeki rolünü anlamak için yapılacak çalışmalara kaynak olacaktır.

1.2. BİYOLOJİK VE YAPAY MEMBRANLARLA İLGİLİ TEMEL BİLGİLER

Membran hücrenin temel kısmı olup besin alımı, enerji çevirimi, bağışıklık tanırma veya organizmalarda biyosentez gibi pekçok hücre aktivitesi ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır.

Membranın yapı ve fonksiyonları birbiri ile yakından ilişkili olduğu için, membranların moleküler organizasyonu ile ilişkili fiziksel prensiplerin anlaşılması fizyolojik rollerini tanımlamak açısından gereklidir.

1.2.1. Membranların Fonksiyonları

Membranların fonksiyonları şu şekilde sıralanabilir:

- Membranlar hücre sınırlarını ve bölümlerini belirlerler ve geçirgenlik bariyeri görevi görürler. Hücre içi, istenilen maddeleri içeride tutar ve istenilmeyenleri de dışarıda bırakır.

- Membranların üzerinde ya da içerisinde çeşitli reaksiyonlarda rol alan bir çok enzimlerin bulunması, membranların spesifik fonksiyon bölgeleri olma görevini açıklamaktadır.

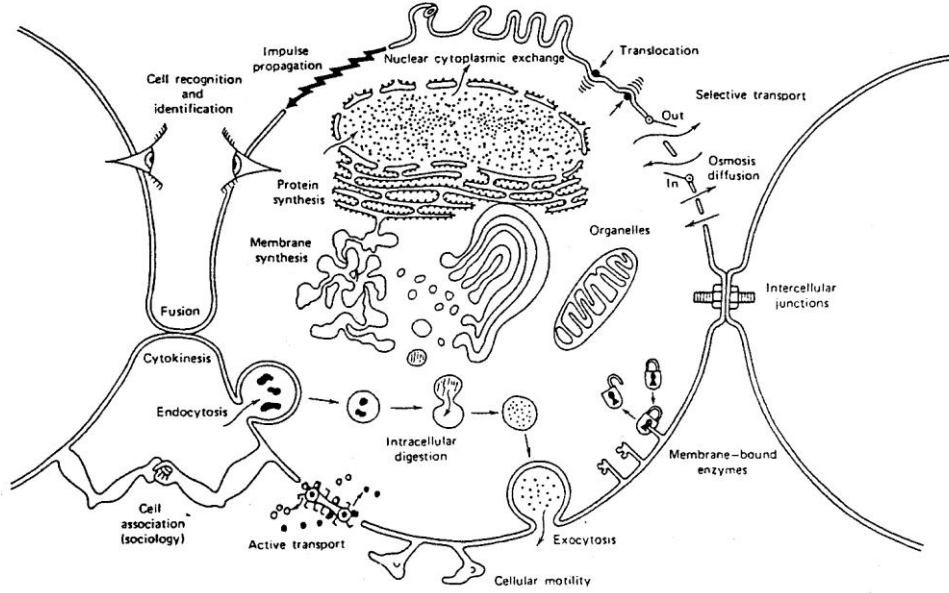
- Membranların diğeri bir fonksiyonu maddelerin hücre içine, hücre dışına ve hücre organellerine taşınmasını sağlamak ve düzenlemektir. Besinler, iyonlar, gazlar, su ve diğeri maddeler hücreler tarafından alınır ve diğeri atıklar uzaklaştırılır. Transport modları çeşitli maddeler için farklıdır. Bir çok madde konsantrasyon gradyentlerine uygun yönde hareket eder. Pasif transport denilen bu proses enerji gerektirmez. Pasif transport iki farklı şekilde olur; su, oksijen ve etanol gibi bazı moleküller ‘basit difüzyon’ ile membranları geçebilirler. Şeker ve amino asitler gibi daha büyük moleküller, spesifik transport proteinleri yardımıyla membranları geçerler, bu prosesde ‘yardımlı difüzyon’ olarak

adlandırılır. Alternatif olarak bazı durumlarda maddeler, konsantrasyon ve/veya yük gradyentlerinin tersi yönünde taşınabilirler. Aktif transport denilen bu proses enerji gerektirir ve enerji kaynağı olarak ATP kullanılır. Bu transport membrana bağlı enzim sistemleri tarafından gerçekleşir. Hücre dışında daha düşük konsantrasyonlarda bulunan şekerler ve amino asitler gibi besin molekülleri, ayrıca potasyum, kalsiyum, hidrojen gibi iyonlar (pozitif yüklü) bu yolla taşınır.

- Hücreler, çevrelerinden genellikle hücrenin dış yüzeyini etkileyen elektriksel ya da kimyasal sinyal formunda bilgi alırlar. Kimyasal sinyal durumunda, bazı sinyal molekülleri hücreye girer ve hücre içinde görev görürler. Bir çok durumda sinyal molekülleri hücrenin içine girmek yerine plazma membranın dış yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanırlar. Bu reseptörler bir takım kimyasal sinyallerin farkedilmesini, iletilmesini ve bunlara cevap oluşturulmasını sağlar.

- Membranlar ayrıca komşu hücreler arasında iletişim sağlar. Hücrelerin birbiri ile bağlantısız olduğu zannedilmesine karşın, çok hücreli organizmalarda bir çok hücre, stoplazmik bağlantılar yoluyla diğer hücreler ile temas halindedir. Stoplazmik bağlantılar bazı hücresel komponentlerin değiş tokuşuna izin verir.

Şekil 1.1 Membranların fonksiyonlarını şematik olarak göstermektedir.



Şekil 1.1: Membranların çeşitli fonksiyonları

1.2.2. Membranların yapısı

Membranlar sıvı kristal yapı göstermektedirler. Bu nedenle öncelikle sıvı kristal kavramını açıklayalım. Sıvı kristaller katı kristallerle izotropik sıvı faz arasında yer alan ara bir fazdır. Sıvı kristalin doğasını anlamak için kristal yapısını tekrar hatırlamakta fayda vardır. Bir kristalde moleküllerin ağırlık merkezleri üç boyutlu olarak periyodik bir yapı boyunca yerleşmiştir ve uzun erimli düzen vardır. Bu düzen hem konumsal hem de yönelimsel olarak varlığını sürdürür. Diğer yandan izotropik sıvıların moleküllerinin ağırlık merkezlerinin uzun erimli olarak periyodik bir biçimde düzen gösterdiğinden bahsedilemez. Katı bir örnek sıvı hale dönüşürken genel olarak erimenin başlamasıyla birlikte konumsal ve yönelimsel düzen eş zamanlı olarak bozulur. Bazı maddelerde ise

erimeyle birlikte konumsal düzenin azalmasına veya tamamen ortadan kaybolmasına karşın yönelimsel düzenin hala varlığını sürdürdüğü gözlenir. Bu tür maddeler sıvı kristallerdir ve katı faz ile sıvı faz arasında yer almaktadırlar.

Bir sıvı kristal hem sıvıların hem de katıların özelliklerini aynı anda taşıyabilmektedir. Bu maddeler akışkanlık gibi sıvılara ait özellikler taşırken katılara ait olan çift kırıcılık özelliğini de gösterirler. Sıvı kristaller aynı zamanda optikçe anizotropurlar. Herhangi bir örneğin ışığı soğurması veya kırılma indisi gibi çeşitli optik özellikleri bütün yönlerde aynı özelliği gösteriyorsa bu maddeler optikçe izotropiktir. Optikçe anizotrop maddeler farklı yönlerde farklı optik özellikler gösterirler. Yani optik özellikleri yönelimle değişmektedir. Akışkanlık ve anizotrop özelliklere sahip oldukları için bu malzemeler aslında anizotrop sıvılardır.

Sıvı kristaller termotropik ve liyotropik sıvı kristal fazlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Termotropikler kendi aralarında nematikler, smektikler ve kolesterikler olmak üzere gruplandırılabilir. Nematiklerde moleküllerin ağırlık merkezlerinin dizilmesinde uzun erimli düzen yoktur. Uzun erimli düzen moleküllerin yönelimine (uzun eksenlerinin dizilmesine) göre vardır. Yapı tabakalı değildir ve moleküllerin ağırlık merkezlerinin dizilmesi rastgeledir. Smektiklerde ise moleküllerin ağırlık merkezleri bir tabaka boyunca yerleşir yani tabakalı yapı gösterir. Liyotropik sıvı kristaller ise amfifilik yapı gösteren organik maddeler tarafından meydana getirilir. Liyotropiklerde fazlar, amfifil konsantrasyonu ve sıcaklığa bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Liyotrop bir sıvı kristal olan membran lamellar yapı göstermektedir. Lamellar yapı tabakalı özellik gösterdiği için bu termotropiklerdeki smektik yapıya karşı gelmektedir (Per Shan, 1982; Vertogen and De Jeu, 1987; Nesrullazade vd., 2000).

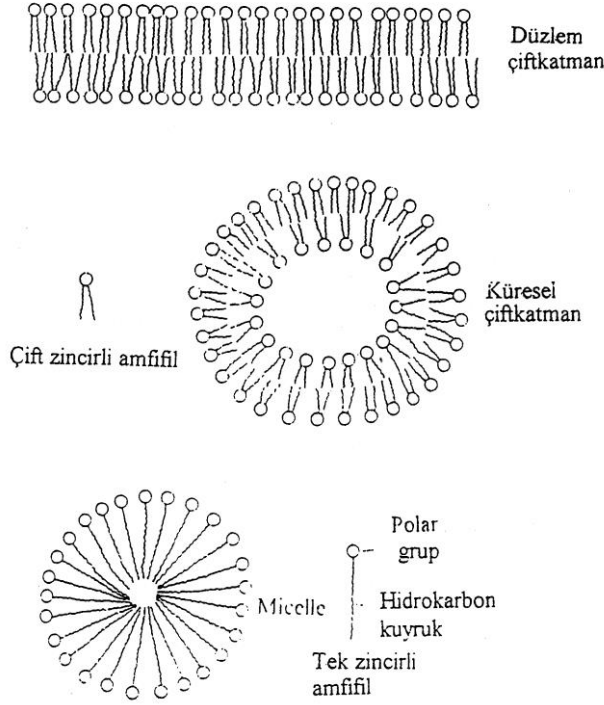
Membranlar esas olarak % 50 - % 60 arasında proteinlerden ve % 40 - % 50 arasında lipidlerden oluşur.

Lipid kısmı, kolesterol fosfolipidler ve sfingomyelinlerden oluşur. Tablo 1.1’de bazı biyolojik membranların lipid bileşenleri gösterilmiştir.

| Lipid | Human erythrocyte | Human myelin | Beef-heart mitochondria | E. coli |
|---------------------------|-------------------|--------------|-------------------------|---------|
| Phosphatidic acid | 1.5 | 0.5 | 0 | 0 |
| Phosphatidyl choline | 19 | 10 | 39 | 0 |
| Phosphatidyl ethanolamine | 18 | 20 | 27 | 65 |
| Phosphatidyl glycerol | 0 | 0 | 0 | 18 |
| Phosphatidyl inositol | 1 | 1 | 7 | 0 |
| Phosphatidyl serine | 8.5 | 8.5 | 0.5 | 0 |
| Cardiolipin | 0 | 0 | 22.5 | 12 |
| Sphingomyelin | 17.5 | 8.5 | 0 | 0 |
| Glycolipids | 10 | 26 | 0 | 0 |
| Cholesterol | 2.5 | 26 | 3 | 0 |

Tablo 1.1: Bazı biyolojik membranların % lipid bileşenleri

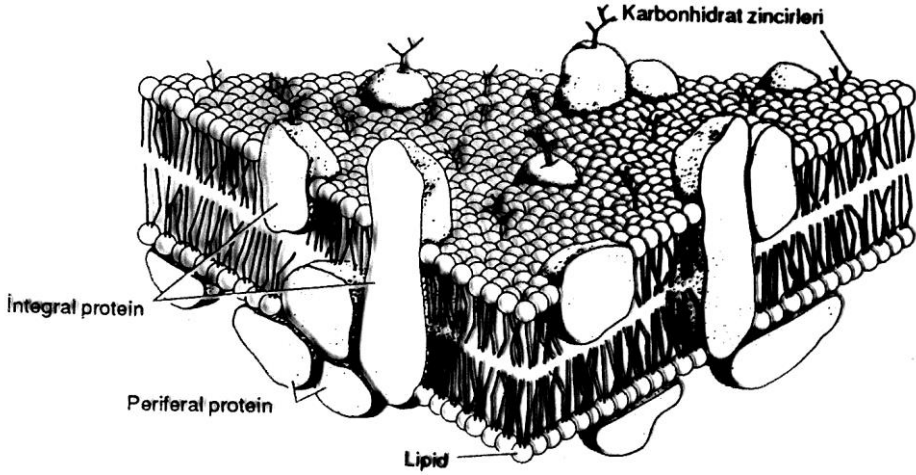
Lipid moleküllerinin çoğu polar baş ve polar olmayan hidrofobik kuyruk içeren amfifatik “amphiphatic” kısımlardan meydana gelir. Çift zincirli amfifiller sulu ortamda tek bir vezikül veya çok tabakalı küresel yapıda çift katmanlar oluştururlar. Polar baş kısmı sulu fazı, hidrokarbon zincir ise hidrofobik bölgeyi oluştururlar. Şekil 1.2 amfifillerin şematik yapısını göstermektedir (Cantor and Schimmel, 1980).



Şekil 1.2: Amfilik moleküllerin oluşturdukları değişik yapılar.

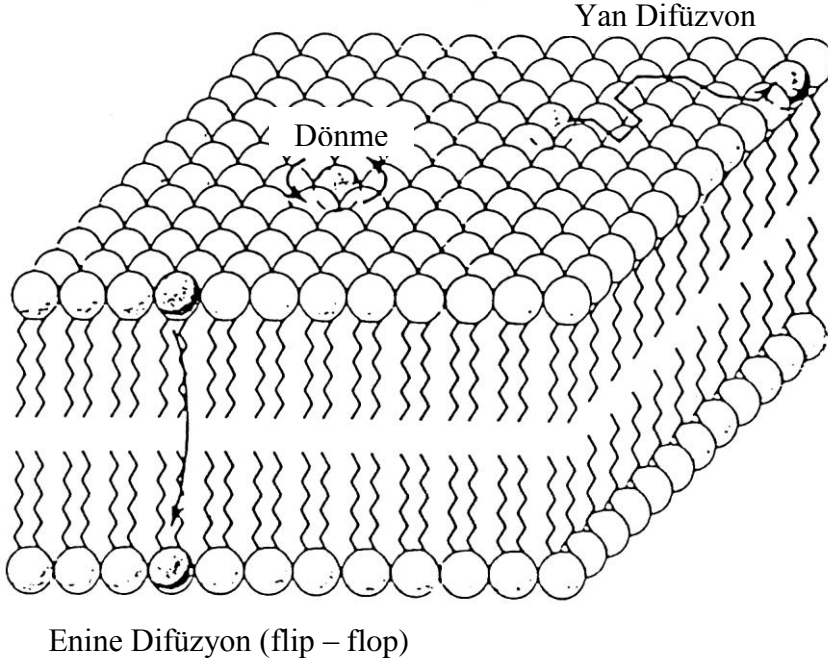
Biyolojik membranlar için en popüler model Singer ve Nicholson tarafından önerilen akışkan mozaik modeldir (Singer and Nicholson, 1972) (Şekil 1.3). Bu modele göre fosfolipid çift katmanlar 60 – 100 ⁰A kalınlığına sahip, proteinlerin üzerinde veya içine gömülü olduğu akışkan matris şeklindedir.

Membranın dinamik bir yapısı olduğu bilinmektedir. Lipid ve protein bileşenleri hareket halindedir. Moleküllerin membran düzlemine dik eksenler etrafındaki dönmesi, lipidler için 0,1-100 ns de, proteinler için 0,01-1 ms de olur ve bu son hareket membranın derinliklerine doğru düzensizlik arttıkça artar.



Şekil 1.3: Membran akışkan mozaik modeli

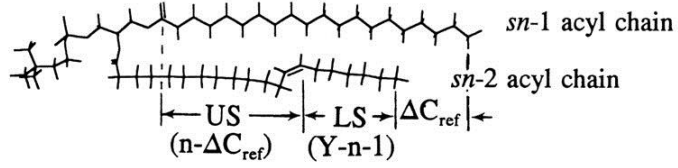
Molekülün bir kısmının diğer kısımlara göre hareketi (örneğin, tek bir bağ etrafındaki dönme ve torsiyonel hareket ve her bir hidrokarbon zincirinin hareketi) ve bütün molekülün hareketi olmak üzere lipid çift katmanlarında iki tür moleküler hareket vardır (Şekil 1.4). Molekülün bir bütün olarak hareketi, dönme ve öteleme olmak üzere ikiye ayrılır. Öteleme hareketi de yanlamasına öteleme ve membranın bir tabakasından diğerine göçü olmak üzere ikiye ayrılır (Andreoli et al, 1986). Bu son harekete “ **flip-flop** “ hareketi denir. Molekül içi hareket, grupların tek bağlar etrafındaki ve hidrokarbon zincirin segment veya daha uzun kısmı içeren salınım hareketi ve ayrıca polar baş kısımdaki konformasyonel değişimleri içerir.



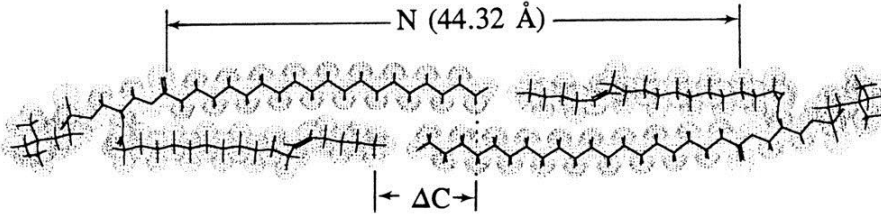
Şekil 1.4: Lipid moleküllerinin hareketi.

Hidrokarbon zincirdeki çok sayıdaki C-C bağlarının varlığı gauche-trans izomerizasyonu diye adlandırılan çeşitli konformasyonların oluşumunu gündeme getirir. En düşük enerji halinde, bütün karbon atomları aynı düzlemde yer alır, buna trans konformasyonu denir. C-C bağları esnektir dönebilir, bundan kaynaklanan termal enerji düzlemsel olmayan gauche konformasyonuna neden olur. Bunun sonucunda hidrokarbon zincirleri birbirine yakın konumda yerleşir ve böylece C-C tek bağları etrafında serbest dönme zorlaşır. Şekil 1.5 de bir fosfolipid molekülünün yapısı gösterilmiştir.

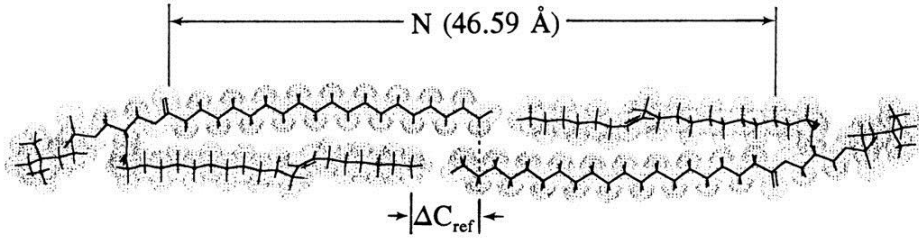
A The monomeric C(20):C(20:1 Δ^{13})PC:



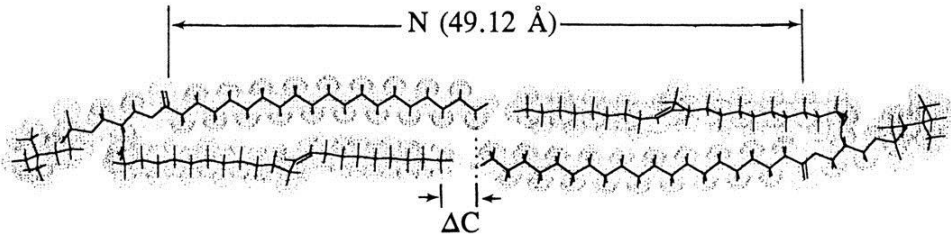
B The dimeric C(20):C(18:1 Δ^{13})PC:



C The dimeric C(20):C(20:1 Δ^{13})PC:



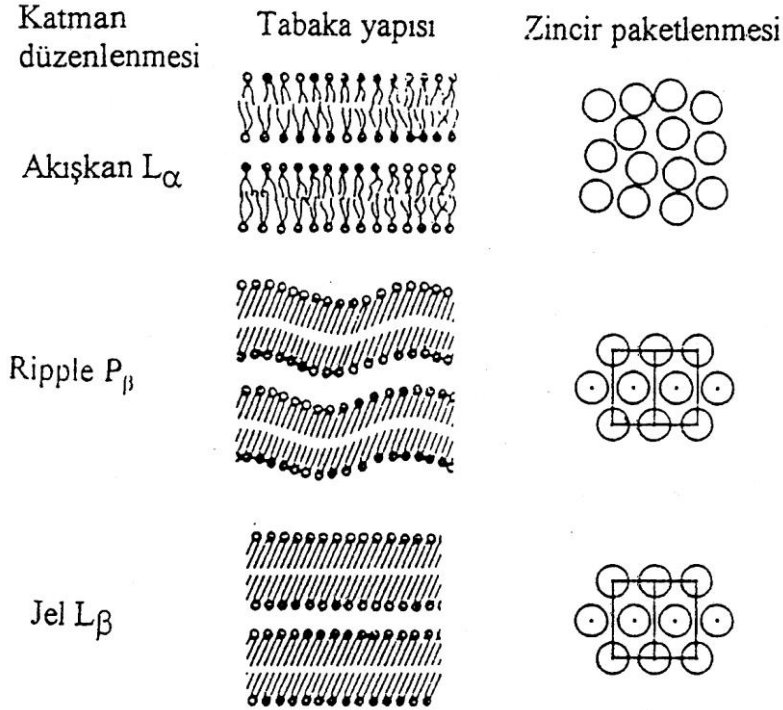
D The dimeric C(20):C(22:1 Δ^{13})PC:



Şekil 1.5: Trans ve gauche yapıyı açıklayan bir fosfolipid molekülü.

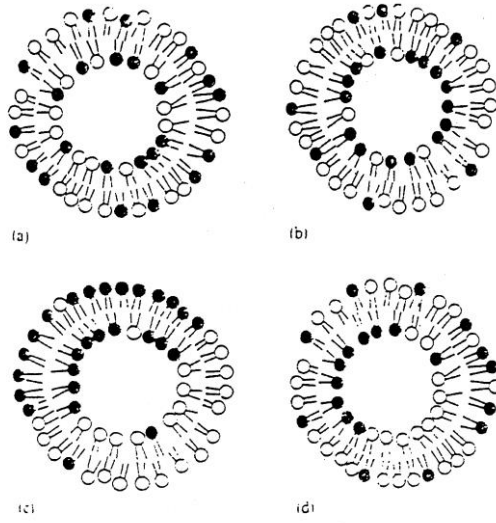
Çift katmanlarda lipid moleküllerinin davranışları sıcaklıkla çok ilişkilidir. Örneğin, bu çalışmada kullanılan DPPC lipozomlarında yaklaşık 35 °C de hidrokarbon zincirlerinin bükülmeye başladığı görülür. Bu sıcaklığa **ön geçiş**

sıcaklığı denir ve membran bu sıcaklıkta jel fazdan “ripple” (dalgalı) faza geçer. “Ripple” fazın özellikleri henüz tam olarak bilinmemektedir. 41 °C de membranın hidrokarbon zinciri tamamen erir ve sistem sıvı kristal faza geçer. Bu sıcaklığa **ana faz geçiş sıcaklığı** denir. Şekil 1.6 da, bahsedilen membran fazları şematik olarak gösterilmiştir (Jain, 1988).



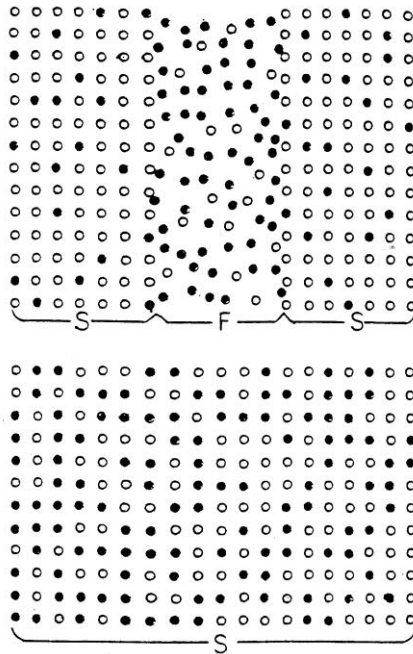
Şekil 1.6: Membran fazlarının şematik gösterimi.

Membran birden fazla lipid bileşeni içerdiği zaman Şekil 1.7 de görülen yanlamasına faz ayrılması meydana gelir. Hipotetik siyah ve beyaz lipidler için diğer gösterimi Şekil 1.8 de görülmektedir. Siyah lipidlerce zengin ve siyah lipidlerce fakir diye adlandırabileceğimiz birbiri ardına değişen iki bölge görülmektedir. Bölgelerden herbirinin özelliği farklı olup, difüzyon parametreleri ölçülebilir (McConnell et al, 1972; Cantor and Schimmel, 1980).



Şekil 1.7: İki lipid karışımı küresel çift katmanların mümkün yapılarının şematik gösterimi

a) Homojen çift katman, b) iki yüzeyde asimetrik dağılım, c) Her iki yüzeyde yanlamasına faz ayrılması, d) İç yüzeyde yanlamasına faz ayrılması.

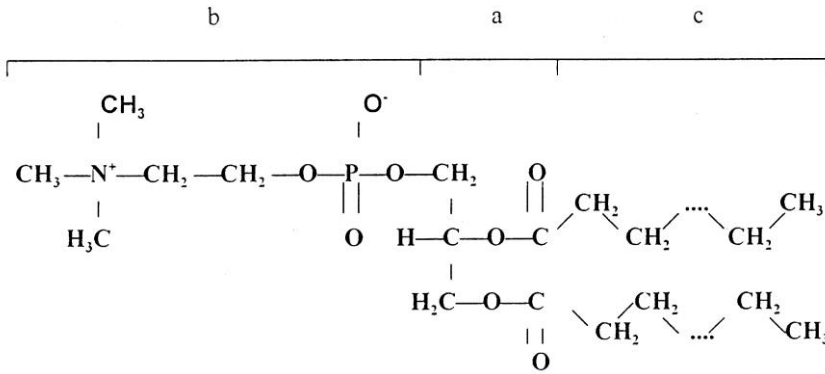


Şekil 1.8: Yanlamasına faz ayrılmasının şematik açıklaması.

1.2.3. Model Membran DPPC (Dipalmitoyl phosphatidylcholine)

Fosfolipidler lipidlerin temel yapı taşlarıdır. Fosfatidilkolin (PC), bir çeşit fosfolipiddir. Bunlar kolin içeren fosfogliserollerdir ve hücre membranında en çok bulunan fosfolipiddir, ayrıca vücudun kolin deposunun büyük kısmını temsil eder. Dipalmitol fosfatidilkolin “dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)”, çok etkili bir yüzey aktif maddedir, akciğerlerin iç yüzeylerinin, yüzey gerilimine bağlı olarak yapışmasını önler (Murray et al, 1990).

Şekil 1.9 da , (a) gliserin iskeletinden oluşan PC molekülünün yapısı, (b) kolin fosfat grubu, (c) gliserinin hidroksil grubu ile bağlantılı 16 karbon atomlu iki doymuş palmitik asit görülmektedir. Fosfatidil kolinin yapısına uygun olarak DPPC nötr bir fosfolipiddir. Kolin baş grubu (N^+) üzerindeki pozitif yük, fosfatın negatif yükünü (PO^-), nötr hidrofobik bir baş grubu oluşturmak için etkisizleştirir.

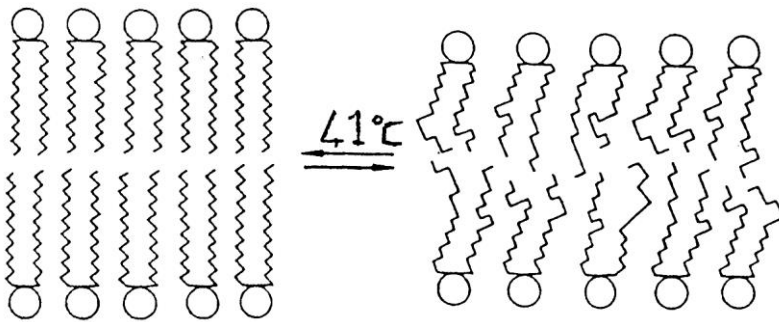


Şekil 1.9: DPPC'nin yapısal formülü

Membran fosfolipidlerinin ve genelde DPPC fosfolipidlerin en çok çalışılan özelliği termotropik mezomorfizm karakteridir. Makroskopik durumlardaki bu değişim sıcaklık kaynaklıdır ve lipid matrislerinin jelden sıvı kristal faza geçişlerine karşılık gelen düzen-düzensizlik faz geçişi ile sonuçlanır. DPPC fosfolipidin termotropik özellikleri çalışılırken, ana faz geçiş sıcaklığından

daha düşük sıcaklıklarda iki alt geçiş daha gözlenebilir. Bunlardan ilki; kristal jel fazdan, jel faza geçiş olan T_s (subtransition) dir. Bu geçiş, PC moleküllerinin $20\text{ }^\circ\text{C}$ civarında var olan rotasyonel hareketlerdeki artışa karşılık gelir. İkincisi, yaklaşık $37\text{ }^\circ\text{C}$ civarında oluşan jel fazdan, ripple jel faza geçiş olan T_p (pretransition) dir. Bu geçiş, gliserol iskeletinin konformasyonundaki değişime, asil zincirlerin eğilmesine ve terminal metil gruplarının yanındaki asil zincirlerin kendi içinde çoğalan bölümlerinin kaybına karşılık gelir. Diğer bir deyişle; bu geçiş zincirler arası etkileşimler ve tamamen genişletilmiş bütün trans asil zincirlerin paketlenmesi ile ilgilidir (Mantsch et al, 1980 ve Jain, 1988). Ek olarak, düşük sıcaklıklarda inkübe edildiğinde, DPPC model membranı, kalorimetrik olarak, $6,8\text{ }^\circ\text{C}$ de (Slaters et al, 1987) daha düşük sıcaklıklarda bile yeni bir faz gösterdiği gözlenmiştir (Wong et al, 1983).

DPPC fosfolipidi için, sub ve pre geçişlerin ortaya çıkması, $41\text{ }^\circ\text{C}$ civarında yer alan ana faz geçişin (T_m) ortaya çıkması kadar önemli değildir. DPPC nin farklı proteinler ya da iyonlarla etkileşmesindeki çoğu özellikler, özellikle ana faz geçişine ve onunla ilgili değişimlere karşılık gelir.



Şekil 1.10: DPPC hidrokarbon zincirlerinin T_m 'deki yapısal değişimi.

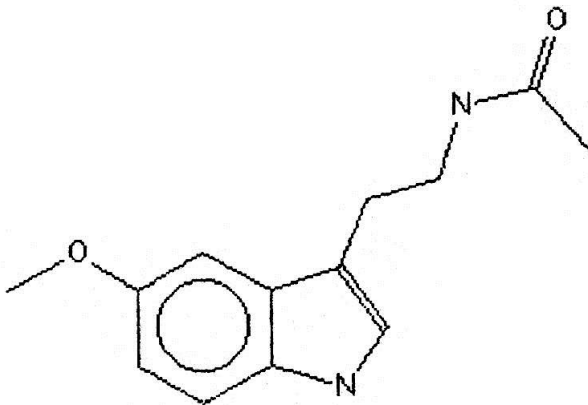
Ana faz sıcaklığından (T_m) daha düşük sıcaklıklar için, hidrokarbon zincirleri, hepsinin trans konfigürasyonunda (zig-zag konformasyonu) olduğu, sn

-1- yağlı asil zincirinin sn -2- zincirine paralel uzandığı sıralı bir konformasyondadır. T_m ve daha üstündeki sıcaklıklara ulaşıldığında, gauche konformasyonu olarak bilinen zincirlerde kırılma görülmeye başlar ve artan sıcaklıkla asil zincirlerin düzensiz konformasyonu ile sonuçlanır (Şekil 1.10).

Bu süreçte, zincir eksenine boyunca olan fosfolipid moleküllerinin rotasyonel geçişleri, çok hızlı gerçekleşir ve zincirler arasındaki bağlar daha da zayıflar. Bu, moleküler cross-sectional alandaki artışa uyum sağlamak için, efektif zincir uzunluğunda yaklaşık % 8 lik bir düşüşe öncülük eder. Bu durum, gauche konformerlerin (yapısal defekt) sayısındaki ve komşu molekülleri ayıran inter-mikroskopik mesafedeki artışla sonuçlanır, dolayısı ile bu sonuç, sıvı fazda, membran geçirgenliğinin fazla miktarda artışını açıklar.

1.3 MELATONİN YAPI VE FOKSİYONU

Melatonin pineal bezde sentezlenip salgılanan ve bir çok önemli fonksiyonu olan bir nörohormondur. Formülü $C_{13}H_{16}N_2O_2$ (N-Acetyl-5-methoxytryptamine) dir (Şekil 1.11).

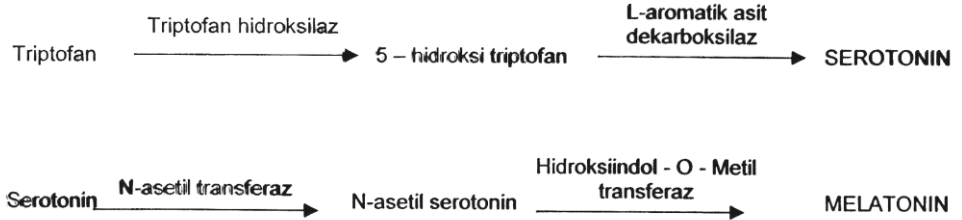


Şekil 1.11: Melatoninin yapısal formülü

1.3.1 Melatonin Sentezi

Melatoninin sentezi kandan beze perfüzyona uğramış triptofanın alımı ile başlar. Triptofan, triptofan hidroksilaz enzimiyle hidroksile edilir ve sonuçta 5-hidroksi triptofan meydana gelir. 5-hidroksi triptofan, L-aromatik asit dekarboksilaz enzimi ile dekarboksile olur ve Serotonin (5-hidroksitriptamin) oluşur. Serotoninden, çeşitli enzimler aracılığı ile çeşitli bileşikler sentezlenir. Serotoninin major metabolik son ürünü melatonindir. Serotoninin asetilasyonu, N-asetil transferaz enzimi ile gerçekleştirilir. Burada, asetil CoA, bir asetil donörü olarak rol oynar. Meydana gelen N-asetil serotonin, hidroksiindol-o-metiltransferaz enzimi ile metilasyona uğramak suretiyle melatonine dönüşür (Şekil 1.12).

MELATONİN (N-Acetyl-5-Methoxytryptamine) SENTEZİ



Şekil 1.12: Melatonin sentezi

İnsan ve farelerde, melatonin sentezi, gün ışığının bitiminden hemen sonra artmaya başlar, yavaş bir artış ile gece yarısında en yüksek seviyesine ulaşarak pik yapar. Gecenin ikinci yarısında düşmeye başlar ve güneşin doğmasından hemen önce gündüz seviyesine ulaşır ve gün boyunca bu düşük seviyesini, karanlık fotoperiyodun başlangıcına kadar sabit olarak muhafaza eder.

1.3.2 Melatoninin Fonksiyonları

Hücrelerde enerji üretimi ve normal metabolizmanın sürdürülebilmesi için zorunlu olan birçok reaksiyonda serbest radikaller ortaya çıkabilmektedir. Serbest radikaller hücrede lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşiklerde etkilidir. Membranı oluşturan fosfolipidler, glikolipidler, gliseritler gibi doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri serbest radikaller için oldukça çekici hedeflerdir (Cheeseman et al, 1993; Auroma, 1996). Biyomoleküllerin tümü serbest radikallerin etki alanında olsalar da lipidler bu riske en duyarlı yapılardır (Yu, 1994; Thomas, 1995). Hava kirliliği, kimyasallara maruz kalma, sigara dumanı ve iyonize edici radyasyon gibi çevresel kimyasal etkilerle karşı karşıya kalma sonucunda hücrelerde radikallerin çoğaldığı bilinmektedir (Thomas, 1995; Malgorzata et al, 2000). Pineal bez çeşitli canlılarda farklı fonksiyonlara sahip bir bez olup fotonöroendokrin altındadır. Bez özellikle karanlıkta sentezlenen melatonin adı verilen bir hormon üretir (Reiter, 1994; Goldstein et.al., 1993). Pineal melatonin güçlü bir serbest radikal toplayıcısıdır. Özellikle melatonin, organizmada yapılan son derece tahrip edici olduğu düşünülen hidroksil radikali (OH)'nin olumsuz etkisini engellemektedir (Reiter, 1994; Beyler et al, 1998). Pineal bezden melatonin üretimi insan ve hayvanlarda yaşlanmayla birlikte belirgin olarak azalmaktadır (Iquchi et al, 1982; Reiter, 1993). Yaşlanmayla ilgili kabul gören bir teoriye göre, yaşlanma esnasında organlarda oluşan anatomik ve fonksiyonel dejenerasyon, serbest radikallerin oluşturduğu hasara bağlanmaktadır (Waldhauser et al, 1984). Tüm organizmada, oksidant ve antioksidant yapılar arasında bir denge vardır. Hücrelerin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri, oksidant ve antioksidant moleküller arasındaki dengeye bağlıdır (Auroma, 1996). Oksidanların düzeyinde meydana gelen artışların veya antioksidanların yetersizliğinin, başta kalp hastalıkları ve kanserler olmak üzere, göz, kas ve

akciğer hastalıklarının oluşumunda, çok büyük bir role sahip oldukları anlaşılmıştır (Auroma, 1996). Antioksidantların çeşitli hastalıkların tedavisindeki rolünü anlayabilmek için, antioksidantların sağlıklı doku ve membrandaki etkisinin moleküler düzeyde iyice anlaşılması gerekmektedir. Biyolojik sistemlerin çok karmaşık olması nedeniyle araştırmalar genelde antioksidant-model membran etkileşmeleri olarak yapılmaktadır. Antioksidantların gerçek doku ve membranlarla etkileşmeleri ve bu etkileşmeleri doğuran faktörler ise henüz bilinmemektedir. Antioksidant özelliği olan tamoksifenin düşük ve yüksek dozda model membran akışkanlığında farklı etkiler yaptığı görülmüştür (Severcan et al, 2000). Hücresel elemanlara yakın olması ve hücresel elemanları koruyucu yönde hareket etmesi antioksidantların önemli bir özelliğidir. Bundan dolayı etkili bir serbest radikal toplayıcısı hücre içerisine girmeli ve etkili olabilecek konsantrasyonlarda hazır bulunmalıdır (Reiter, 1973). Organizmada yapılan çalışmalarda melatoninin antioksidan aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. (Reiter, 1994; Malgorzata et al, 2000; Chan et al, 1996). Melatoninin uzun zamandan beri lipofilik olduğu bilinmektedir. Bu nedenle melatonin hücre membranını kolayca geçebilmektedir (Reiter, 1993; Pierrefiche et al, 1993; Ceraulo et al, 1999). Melatoninin immün sistemin gücünü artırıcı ve kanser oluşumunu önleyici etkileri vardır. Melatonin insan ömrünü kısaltıcı etkiye sahip olan immün yetmezlik ve tümör gelişimini engellemekte ve dolayısıyla insan ömrü uzamaktadır (Maestroni, 1993; Sandyk, 1990). Melatoninin beyin elektriksel aktivitesini dengeleyici etkisi vardır. Melatonin verilmesi alfa beyin dalgalarının oluşumunu artırmış, uyku başlama sürecini kısaltmış, toplam uyku periyodu esnasında uykudan uyanış sayısını azaltmış ve uyku verimini arttırmıştır (Wright et al, 1986). Melatoninin kanser hacmini küçültücü yönde etkileri de mevcuttur. Melatoninin kanser hücresi üzerine direkt etkisi de olup, meme kanserlerinde östrojenin mitojenik aktivitesini baskılamakta,

antiöstrojen bir ajan olan tamoksifenin etkisini taklit etmekte ve doğal tamoksifen olarak önerilmektedir (Reiter, 1994; Tamarkin et al, 1982; Blask, 1984). Merkezi sinir sistemi içerisinde melatoninin esas hedef organı hipotalamustur. Melatonin verilmesi hipotalamusta çeşitli metabolik değişiklikler meydana getirir. Melatonin DNA tamiri, membranlar ve diğer hücre içi bileşenlerin bakımı için gerekli olan guanin nükleotidlerin oluşumuna da katkıda bulunur (Brezinski, 1997). Melatoninin overyal steroid sentezinin modülasyonunda direkt gerekliliğinin olduğu bilinmektedir. Ayrıca insan folliküler sıvısındaki yüksek melatonin seviyeleri ve overlerdeki melatonin bağlayan bölgelerin varlığı, melatoninin, overyal fonksiyonlar üzerine bir modülatör olarak rol oynadığı hipotezini ortaya attırmıştır. Melatonin, insan granülosa-luteal hücrelerindeki melatonin reseptörleri aracılığıyla bir steroid hormon olan progesteron üretimini, lüteinize edici hormon(LH) reseptörlerini ve gonadotropin salgılatıcı hormon(GnRH) reseptör gen ekspresyonunu düzenler (Woo et al, 2001). Melatoninin-membran etkileşimleri üzerine henüz yapılmış tek bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada melatoninin yüksüz model membranlar ile UV-radyasyonuna bağlı olarak etkileşmesi Diferansiyel tarama kalorimetresi ile incelenmiştir (Saija et.al.,2002). Melatonin-membran etkileşimini daha iyi anlamak için daha fazla teorik ve deneysel çalışma gereklidir Bu tip çalışmalar melatoninin moleküler düzeyde anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Biyoteknolojik uygulamalarda ve moleküler düzeydeki çalışmalarda kullanacağımız tekniklerden biri olan Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi sistemi bozmadan direkt olarak kullanılan eşsiz bir tekniktir (Parvez et al, 1998; Mantsch et al, 1996). Membranın FTIR bandlarının tanımı bilinmektedir. Bu bandların frekans değişimleri, band genişlikleri, sinyal şiddetleri ve bu parametrelerin sıcaklığa göre değişimleri, bize ilaçların membran faz geçişi, membran düzeni ve akışkanlığı üzerinde yaptığı etkileri ve ilaçların

membran içindeki konumunu verir (Casal et al, 1984; Severcan, 1997; Severcan et al, 1995; Lewis et al, 1990; Casal et al, 1989; Severcan et al, 2000; Lopez-Garcia et al, 1994). İlaçların membran fazlarında yaptığı etkiler direkt olarak diferansiyel tarama kalorimetresi ile saptanır (Jeffrey, 1988; Kodama et al, 1982).

1.4 SPEKTROSKOPİNİN TEMELİ

Spektroskopiye yüklü veya yüksüz bir temel taneciğin madde ile etkileşmesini ve bu etkileşme sonucundaki olayları inceleyen bilim dalı ya da radyasyonun madde tarafından absorpsiyonu veya yayılması üzerinde yapılan çalışmalar olarak tanımlayabiliriz.

Spektroskopik bir olayda bir uyarıcı, incelenecek olan numune ve bir de çeşitli yollarla gözlenen tanecikler vardır. Şematik olarak bir spektroskopik olay;

Uyarıcı + Numune → Gözlenen tanecikler

şeklinde ifade edilebilir. Uyarıcı olarak belirli bir enerjiye sahip iyon, atom, molekül, elektron, nötron, proton, foton, fonon ve hatta ısı enerjisi kullanılabilir. Uyarıcı, madde ile etkileştiği zaman ya kendi enerjisi değişmekte ya da yine adı geçen taneciklerden biri yayılmaktadır.

Gelen ve yayılan taneciklerin cinsine göre spektroskopi çeşitli isimler alır. Bunlar Tablo 1.2'de gösterilmiştir.

| Gözlenen Tanecik | Spektroskopi |
|-------------------------|--|
| İyon, atom veya molekül | İyon, atom, molekül saçılma spektroskopisi, kütle spektroskopisi |
| Elektron | Elektron spektroskopisi, elektron mikroskopisi |
| Proton, nötron | Proton, nötron saçılma spektroskopisi |
| Fonon (ses) | Foto-akustik (opto-akustik) spektroskopisi |
| Foton | Optik spektroskopisi |

Tablo 1.2: Gözlenen Taneciklere Göre Spektroskopi Çeşitleri

Optik spektroskopisi; fotonların madde ile etkileşmesini inceleyen bir bilim dalıdır. Foton ‘elektromanyetik dalgaları oluşturan enerji paketleri veya tanecikleri’ şeklinde tanımlanabilir. O halde optik spektroskopisi elektromanyetik dalgaın elektrik alan bileşeni ile maddenin etkileşmesi ve bu etkileşmenin dalga boyu ile değişmesi veya bu olayı inceleyen bir bilim dalı şeklinde de tanımlanabilir.

Işınımınla madde etkileşmesi çeşitli şekillerde olabilmektedir. Bu etkileşmeleri belirleyen fiziksel özelliklerin ölçülmesi çeşitli şekillerde yapılmaktadır. Dolayısı ile ölçülen fiziksel özelliğe ve ölçme şekline göre de optik spektroskopisi değişik isimler almaktadır. Bunlar şu şekilde sıralanabilir;

- 1) Işınımın soğurulması; spektrofotometri: X-ışını spektroskopisi, UV, görünür, IR - Raman, atomik soğurma, NMR, ESR, CD ve ORD.
- 2) Işınımın yayılması; yayma veya salma spektroskopisi: atomik emisyon spektroskopisi, floresans, radyokimyasal yöntemler.
- 3) Işınımın saçılması; Türbidimetri, Raman spektroskopisi.
- 4) Işınımın kırılması; Refraktometri, İnterferometri, X-ışını kırınımı.

1.4.1 Elektromanyetik Spektrum

Elektromagnetik ışımlar 10^7 eV den 10^{-8} eV ye kadar geniş bir enerji aralığını kapsar. Gözle görülebildiği için görünür bölge olarak adlandırılan kısım elektromagnetik ışınının çok küçük bir bölgesidir. Enerjilerine göre büyükten küçüğe sıralandığı zaman elektromanyetik ışımlar X, UV (mor ötesi), görünür, IR (kızıl ötesi), mikrodalga ve radyo dalgaları kısmından oluşmaktadır.

Bir molekülün soğurma (absorpsiyon) bandlarının yeri, atomik ve elektronik yapısına bağlıdır. Bir molekülün enerjisi, yaklaşıklıkla, elektronik (E_e), titreşim (E_v) ve dönme (E_r) hareketlerine ait enerjilerin toplamı olarak yazılabilir ve bu enerjilerin hepsi kuantlaşmıştır.

$$E = E_e + E_v + E_r$$

Bir molekül ışık enerjisi absorpladığında;

$E = h\nu = hc/\lambda$ ya eşit olan bu enerji artışı elektronik, titreşim ve dönme uyarmaları yapar. İnfrared (kırmızı ötesi) ışınların enerjisi titreşim ve dönme uyarmaları seviyelerini uyarabilir, ultraviyole (mor ötesi) ışınların enerjisi ise elektronik ve dolayısı ile titreşim ve dönme uyarmalarına neden olur. Yalnız dönme seviyelerinde enerji artışı için çok düşük enerjili ışınlar, mikrodalgalar gerekir.

Radyasyon oluşumunu sağlayan fiziksel veya kimyasal olayların spektrum aralıklarını belirleyebileceği görüşü de mevcuttur. Bu açıdan bakınca γ -ışınları ve kozmik ışınların nükleer geçişlerden, X-ışınlarının iç \bar{e} geçişlerinden, UV ve visible (mor ötesi ve görünür) bölge ışınlarının valans \bar{e} geçişlerinden, IR (kırmızı ötesi) ışınların molekül titreşimi ve dönme titreşim seviyeleri arasındaki geçişlerden mikrodalgaların moleküler dönme ve çekirdek presesyon hareketlerinden oluştuğu söylenebilir.

| | | |
|-------------------------|-----------------------------|--|
| (Dalgaboyu) | Radyofrekans | (Nükleer magnetik rezonans ve elektron spin rezonans spektroskopisi) |
| (10m-1cm) | bölgesi | |
| (1cm-100 μ m) | Mikrodalga bölgesi | (Dönme spektroskopisi) |
| (100 μ m-1 μ m) | Infra-red bölgesi | (Titreşim ve dönme Spektroskopisi) |
| (1 μ m-10nm) | Görünür ve morötesi bölgesi | (Elektronik spektroskopi) |
| (10nm-100pm) | X-ışınları | (X-ışınları spektroskopisi) |
| (100pm-) | γ -ışınları | (Mössbaver spektroskopisi) |

Tablo 1.3: Elektromagnetik Spektrum Bölgeleri

1.4.2 Infrared Spektroskopisi

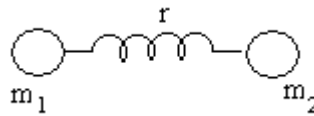
Infrared spektroskopisi, görünür bölge ile mikrodalga bölge arasında kalan enerjinin moleküller veya kimyasal gruplar tarafından absorplanmasının ölçümüne dayalı bir yöntemdir. Infrared spektroskopisinin organik kimya uygulamaları, hemen hemen tamamıyla $4000-650\text{ cm}^{-1}$ bölgesi yani ‘infrared bölgesi’ ile ilgilidir. 650 cm^{-1} den daha düşük frekanslar ‘uzak infrared’ ve 4000 cm^{-1} den daha yüksek frekanslar ise ‘yakın infrared’ olarak tanımlanır.

Homonükleer moleküller hariç bütün moleküller infrared ışınlarını absorplarlar ve moleküldeki bağların gerilmesine (bağ uzunluklarının değişmesine) yol açarlar. Organik bileşiklerde belirli bağ türleri bileşikten bileşiğe büyük farklılık göstermediği için bu yöntemin kullanılması ile

bilinmeyen bir bileşikteki bağ türleri dolayısı ile fonksiyonel gruplar kolayca bulunabilir.

IR spektrofotometreleri dalga boyuna veya dalga sayısına karşı absorpsiyonu ya da geçirgenliği kaydederler.

İnfrared ışık absorpsiyonu bir molekülün titreşim ve dönme hareketlerinde değişiklikler meydana getirir. Bu değişiklikler için enerji düşük olup, vibrasyonel (titreşim) değişiklikler ‘yakın infrared’ ve ‘infrared’ bölgede, rotasyonel (dönme) değişiklikler ise ‘uzak infrared’ ve ‘mikrodalga’ bölgelerinde meydana gelir. İnfrared radyasyonunu absorplayan bir molekülde titreşim enerji seviyelerinde bir geçiş olmaktadır. Bu geçiş, absorplama sebebiyle belirli bantlar halinde kendini göstermektedir. İnfrared radyasyonunun absorplanması sonucu oluşan titreşim hareketi basit iki atomlu bir bileşik üzerinde açıklanabilir. Kimyasal bağı basit olarak bir yayla tutturulmuş iki kütle olarak düşünebiliriz.



Yayla tutturulmuş iki kütleye dışardan bir kuvvet uygulayarak kütleleri denge konumundan uzaklaştırırsak aradaki uzaklık Δr kadar değişecektir. Hooke kanununa göre sistem bu değişikliğe ters yönde etkiyen bir f kuvvetiyle karşı koyacak ve salınıma geçecektir. f ‘in büyüklüğü Δr ile orantılıdır.

$$f = k \cdot \Delta r$$

Burada “ k ” ya ‘kuvvet sabiti’ adı verilir. Molekül sistemlerinde de bağ kuvvetinin bir göstergesidir. Harmonik salınım yapan yayla bağlanmış olan sistemdeki potansiyel enerji değişimleri uzaklığa bağlı olarak Şekil 1.13’de gösterilmiştir. Mekanik modellerde molekül arasındaki benzerlik tam değildir. Mekanik modelde enerji değişimi süreklilik gösterirken moleküler sistemlerde

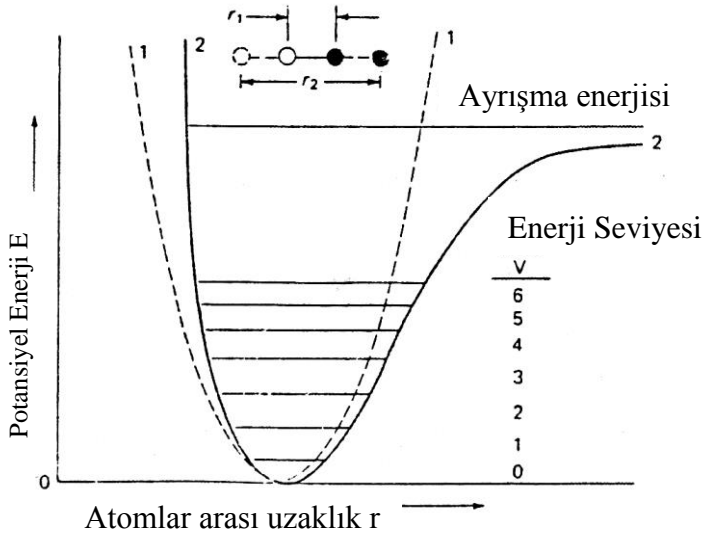
enerji seviyeleri belirli kuantumlara ayrılmıştır. Kuantum mekaniğinde de basit harmonik salınım yapan bir moleküldeki enerji seviyeleri ;

$$E_n = h\nu (n+1/2) \text{ bağıntısı ile verilmektedir.}$$

Bu bağıntıda n titreşim kuantum sayısını göstermekte ve $0,1,2,3,\dots$ gibi sayısal değerler alabilmektedir. h planck sabiti, ν temel titreşim frekansıdır. $n = 0$ olduğu zamanki titreşim enerjisine;

$$E_0 = 1/2 h\nu \text{ sıfır nokta enerjisi denir.}$$

Enerji seviyelerinin kuantalı olması durumu dışında gerçek moleküllerde potansiyel enerji tam parabolik olmayıp şekildeki gibidir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13: Potansiyel enerji diagramı (1) Harmonik osilatör (2) Anharmonic osilatör.

Yukarıda verilen enerji eşitliği gerçek sistemler için ancak yaklaşık olarak geçerlidir. Gerçek eğride kuantum sayısı arttıkça enerji seviyeleri arasındaki farkın azaldığı görülmektedir.

İki enerji seviyesi arasındaki fark, ΔE ;

$$\Delta E = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \text{ eşitliği ile verilebilir. Burada } k \text{ kuvvet sabitini, } \mu$$

indirgenmiş kütle göstermektedir.

İki atomlu bir molekül için;

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \text{ olarak verilebilir.}$$

Bu enerji farkına karşılık gelecek ışının dalga boyu (veya dalga sayısı);

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu} = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \text{ ve } \bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \text{ olacaktır.}$$

1.4.3. Titreşim Çeşitleri

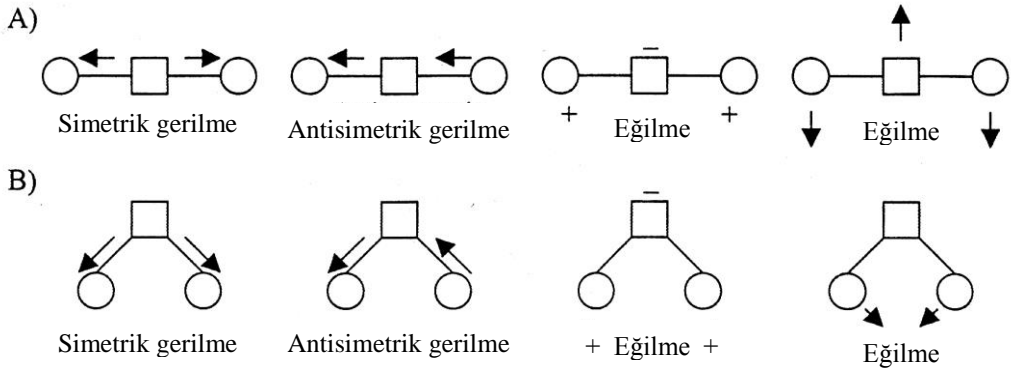
N sayıda atomdan oluşan bir moleküldeki toplam serbestlik derecesi $3N$ kadardır. Bunlardan 3'ü öteleme, 3'ü dönme (molekül doğrusalsa 2 si) serbestliğine karşı gelmekte dolayısı ile $3N-6$ (veya $3N-5$) kadarı da titreşim derecelerine karşılık gelmektedir. Titreşim hareketi iki tipte olabilir; gerilme ve eğilme (Şekil 1.14).

İlki atomlar arasındaki bağ boyunca meydana gelen periyodik gerilmelerdir, eğilme titreşimleriyle bağ ekseninde 90° lik yer değiştirmeler olur. Gerilme titreşimleri bükülme (eğilme) titreşimlerinden daha yüksek enerjilidir. Kendi içinde de asimetrik gerilme simetrik gerilmeden daha yüksek enerjilidir.

IR ışınının elektrik alan vektörünün molekülle etkileşebilmesi için temel titreşim sırasında molekülün dipol momentinde bir değişiklik olması, salınması gerekmektedir. Bu bir genel kuraldır. Bir molekülün IR aktif olabilmesi için dipol

momentinin titreşim sırasında değişmesi gerekmektedir. Buna seçimlilik kuralı denir.

İkinci bir seçimlilik kuralı da harmonik salınım yaklaşımından çıkarılabilir. Buna göre ışının absorplanması ancak enerji seviyeleri arasındaki fark $\Delta E = +1$ ise gerçekleşecektir.



Şekil 1.14: (A) Lineer (B) Non-lineer üç atomlu bir molekülün titreşim tipleri. Atomik yerdeğişirmeler, oklar ve + sayfa düzlemine, - sayfa dışına dik semboller ile gösterilmiştir (Arrondo et al, 1993).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Kimyasal Maddeler

Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamine) ve L- α -Phosphatidylcholine, dipalmitoyl (DPPC) Sigma (St. Louis, Mo) firmasından satın alınmıştır. Bütün kimyasal maddeler bu haliyle daha fazla saflaştırılmadan kullanılmışlardır.

2.2. Membran Örneklerinin Hazırlanması

Membran örnekleri Severcan et al (1995)'dan kaydedilen prosedüre göre hazırlandı. Değişik melatonin konsantrasyonları için gerekli olan melatonin miktarları hesaplandı. 5 mg. melatonin 1000 μ l etanolde çözünerek stok çözelti hazırlandı. Her bir konsantrasyon için ependorf kaplarına, hazırlanan stok çözeltiden gerekli melatonin miktarı konuldu ve herbir ependorftaki etanolün fazlası azot gazı geçirilerek uçuruldu. Saf DPPC (%0) için de dahil olmak üzere bütün ependorfların içine 5 mg. DPPC konuldu. Lipidi çözmek için 150 μ l kloroform konulup eritildikten sonra kloroformun fazlası azot gazı ile uçuruldu. Kalan tüm organik çözücülerden iyice arındırılması için örnek kapları vakum sistemine (Spin-Vac, HETO) bağlandı ve en az 2 saat vakum yapıldı. Bu işlem sonucunda kuru ince lipid tabakaları elde edildi. Lipid tabakası içeren kaplara 25 μ l tampon çözelti (fosfat buffer) konuldu. Karışım, lipid ana faz geçiş sıcaklığının 20 °C üzerinde ısıtılıp karıştırılarak yarım saat vortex karıştırıcıda çalkalandı ve böylece süt renginde çok katlı katmanlar elde edildi.

2.2.1. FTIR Çalışmaları İçin Örnek Hazırlanması

FTIR çalışmaları için Bomem 157 FT-IR spektrometresi kullanılmıştır. Hazırlanan membran örneklerinden 20 μ l alındı ve 12 μ m hücre kalınlıklı suda çözünmez CaF₂ quartz pencere arasına konuldu. Bu pencere sıcaklık kontrolüne uygun metal kaba konduktan sonra sıcaklık kontrol sistemine yerleştirildi.

Sıcaklık Unicam Specac sıcaklık kontrol birimi ile ayarlanıp, örneğe yakın yerleştirilen ısı çifti ile ölçüldü. Her örnek için 2 cm^{-1} çözme gücü ile 50 tarama yapıldı. Örnekler her sıcaklıkta 10 dakika inkübe edildi ve $2 \text{ }^\circ\text{C}$ aralıklar ile $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ile $70 \text{ }^\circ\text{C}$ arasında tarandı.

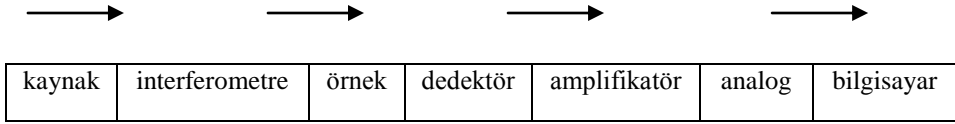
2.2.2. DSC Ölçümleri İçin Örnek Hazırlama

DSC ölçümleri için lipid karışımı infrared çalışmaları için kullanılan aynı yöntemle hazırlandı. Sadece 2 mg lipid ve $50 \mu\text{l}$ tampon çözelti (fosfat buffer) kullanıldı. Örnekler TA Q 100 DSC aletinde taranmıştır. Isıtma hızı dakikada $1 \text{ }^\circ\text{C}$ dir. Çalışılan sıcaklık bölgesi $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ile $65 \text{ }^\circ\text{C}$ arasındadır.

2.3. FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR)

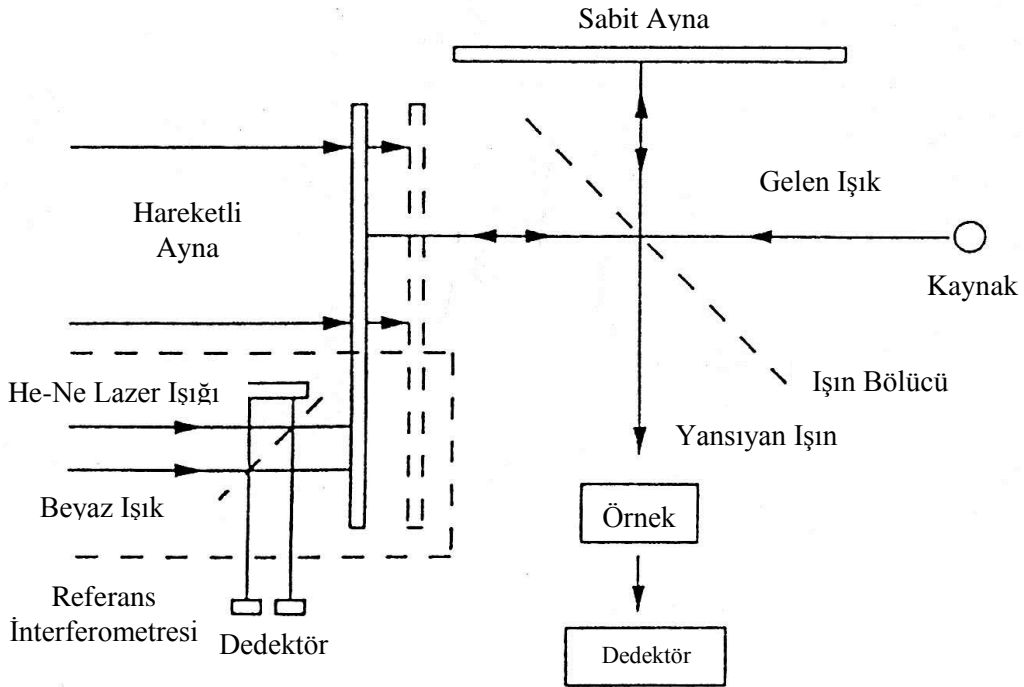
FTIR aletindeki ana fikir bir interferogram üretmektir. İnterferogram, iki ışın arasındaki radyasyonun girişiminden meydana gelen bir sinyaldir ve bu iki ışının arasındaki yol farkında meydana gelen değişimin bir fonksiyonu olarak tanımlanır.

Tipik bir FTIR spektrometresinde yer alan temel bileşenler Tablo 2.1'de gösterilmiştir. FTIR spektrometresinde kullanılan en önemli parametre çoğunlukla Michelson interferometresi olan interferometredir (Şekil 2.1). Bu interferometre, biri sabit diğeri ise hareketli olan birbirine dik iki ayna ve bu iki aynanın yüzeylerini ikiye bölen yarı yansıtıcı bir aynadan (ışın bölücü) oluşur. Işın bölücü, kaynaktan (orta-infrared bölgesi için çoğunlukla kullanılan Globar – silikon karbid – kaynağı) gelen ışını iki eşit parçaya böler. Bu iki parça daha sonra iki ayna yüzeyine gider, burada yansır ve tekrar birleşmek ve girişim oluşturmak için ışın bölücüye dönerler. Işın bölücüden çıkan toplam ışın örnek içinden geçer ve FTIR spektrometresinde toplanır.



Tablo 2.1: FTIR spektrometre bileşenleri.

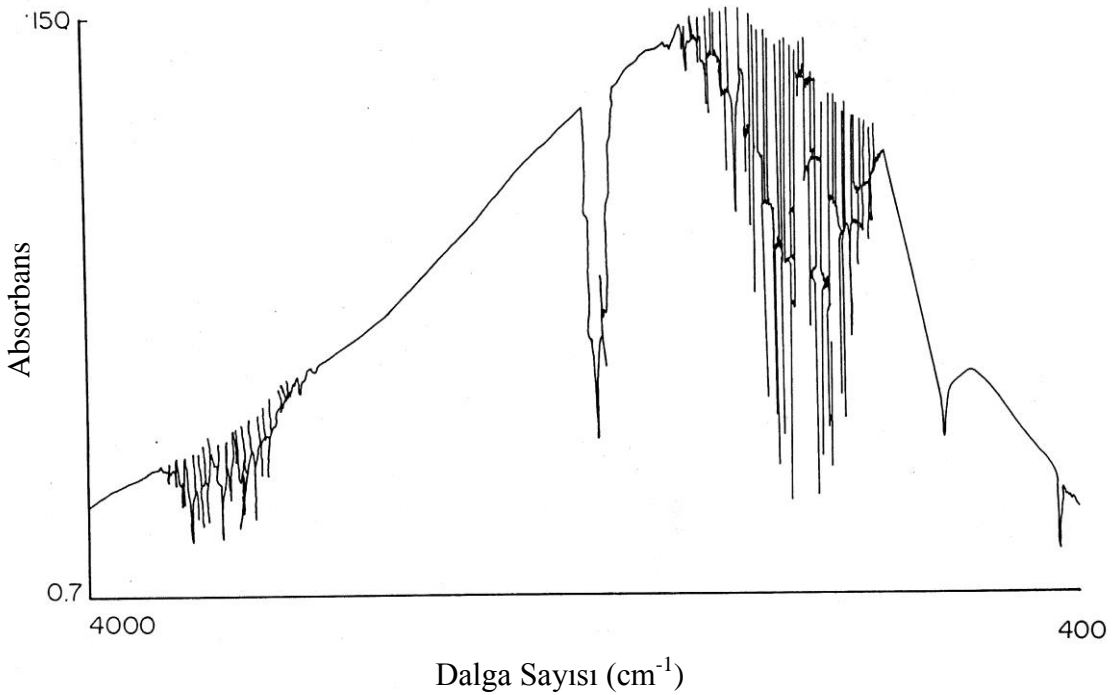
Hareketli aynanın oynadığı rol, iki ışın arasında optiksel bir yol farkı oluşturmaktır. Eğer iki yol uzunluğu aynı ise, iki ışın yol farkı $n\lambda$ ya eşit ve aynı fazda olacaktır ve bütün frekanslar için yapıcı bir şekilde tekrar birleşeceklerdir. Fakat iki ışın arasında $(n+1/2)\lambda$ yol farkı olursa o zaman yıkıcı bir şekilde etkileşecekler ve girişim frekansına ve aynanın hareket uzaklığına bağlı olacaktır. Sonuçta bir interferogram oluşur (Stuart, 1997).



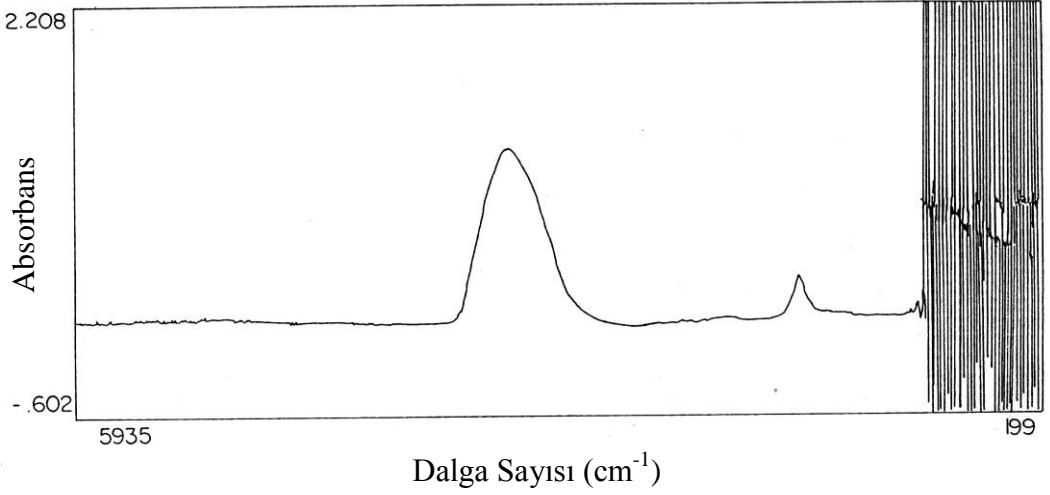
Şekil 2.1: Michelson interferometresi

FTIR spektrumu çoğunlukla absorbansın, titreşim frekansı ile orantılı olan dalga sayısına (cm^{-1}) karşı çizimi ile gösterilir.

Aletin içindeki atmosferin CO_2 ve H_2O nun absorpsiyonu spektrum elde ederken dikkate alınır. Atmosferik absorpsiyonun spektrumu ölçümler gerçekleştirilmeden önce sağlandı ve elde edilen örnek spektrasından otomatik olarak çıkarıldı (Şekil 2.2). Ek olarak örneğe eklenen aköz solüsyonun (fosfat buffer) absorpsiyon problemi dijital data çıkarma metodu ile çözüldü. Su spektrumu incelenen maddenin orjinal spektrasından çıkarıldı (Şekil 2.3).



Şekil 2.2: Havanın infrared spektrumu



Şekil 2.3: Suyun infrared spektrumu

Bilgisayarla donatılmış modellerinde fark spektrumların alınması, reflektans ölçümlerinin yapılabilmesi, hafızaya kaydedilen spektrumun daha sonra çağırılarak incelenebilmesi günümüz kullanıcılarına sağlanan kolaylıklardan birkaçıdır. Spektrumun istenen dalga boyu aralığının büyütülerek incelenmesi daha kesin analizlere imkan sağlamaktadır. Bir bilgisayar arşivindeki kayıtlı spektrumlarla yeni bir numuneye ait spektrumun karşılaştırılması bilgisayar tarafından yapılarak numunenin hangi madde olduğu kişinin spektrum yorum yapmadan analiz yapmasını sağlar olmuştur.

Monokromatör kullanılmayan FTIR da yayılan tüm dalga boylarındaki ışık bir bilgisayar tarafından analizlenmektedir. Pulslar halinde gönderilen ışın her dalga boyunda ayrı ayrı bilgisayarca analizlenerek absorplanmalar toplanmaktadır. Böylelikle zayıf absorpsiyon değerleri bile büyük hassasiyetle ölçülmektedir.

2.3.1. FTIR Spektroskopisinin Diğer Biyofiziksel Tekniklere Göre Avantajları

Membranların çeşitli karakteristiklerini araştırmak için farklı fiziksel, kimyasal ve spektroskopik teknikler kullanılmaktadır.

X-ışını düzensiz fazların detaylı çalışılması için yeterli değildir ve ayrıca çok küçük miktarlarda su içeren kristallerden elde edilen sonuçların, su içeren gerçek sistemler hakkında kesin bilgi vermesi pek olası gözükmemektedir. Ayrıca bu teknik ile incelemeler çok uzun zaman almaktadır. X-ışınlarının bu dezavantajı sistem hakkında süratle bilgi veren spektroskopik tekniklerin gelişmesine önayak olmuştur.

ESR ve Floresans spektroskopisinde kullanılan prob moleküllerin varlığı data analizi için birçok komplike faktörler üretir; birincisi yapıları ve polariteleri fosfolipidlerinkinden farklıdır. Bu nedenle çevreyi altüst edebilirler. İkincisi, prob molekülleri, inceleme altındaki membran bileşenleri hakkında direkt yapısal ya da dinamik bilgi çıkarmak için önemsiz olmayan spektral parametreler üretirler. İnfrared spektroskopi tekniği ortamı bazen hiçbir prob madde içermeden ortam hakkında süratle bilgi veren eşsiz bir tekniktir.

FTIR spektroskopisinin avantajları şu şekilde özetlenebilir:

- FTIR metodu hızlı ve duyarlı bir tekniktir. Aletin çalışma prensibi çok zor değildir.

- IR ışını örnek tarafından belirli bir enerji limitine ihtiyaç olmadan tamamen absorplanır.

- IR, moleküler titreşimler ve farklı moleküler parçacıklardan meydana gelen spektral bölgeler açısından avantaja sahiptir, mesela membranlar için baş-grup ve hidrokarbon zincir bölgeleri görüntülenebilir.

- Yapısal ve dinamik veriler spektroskopik problemlerin kullanımı gereksiz inceleme altındaki verilerden çıkar.

- Infrared spektroskopide, titreşimler, lipid molekülünün çeşitli bölgelerinden gözlenebildiği için bu verilerden yapısal bilgi toplanabilir.

- Lipidler jel ya da sıvı kristal fazlarda kolayca çalışılabilmektedir. Asil zincirlerin ve baş grupların titreşimsel spektrumu fiziksel durumun bir fonksiyonudur, iki form arasındaki konformasyonel geçişler, titreşimsel spektrumun sıcaklığa bağlılığı ölçülerek belirlenebilir.

- Data elde etme, modern spektrometre dijital olduğu için oldukça kolaylaşır. Frekans, band genişliği değerleri $\pm 0.05 \text{ cm}^{-1}$ hassasiyetle elde edilir.

- *In vivo* membran çalışmaları da mümkündür.

Yukarıda bahsedilen avantajlar FTIR'ı membran çalışmaları için uygun kılar. Biyolojik örneklerde her zaman varolan suyun, infrared spektrumunu önemli derecede absorblaması tekniğin en önemli dezavantajıdır. Bu nedenle suyun kuvvetli soğurma bandı biyolojik sistemler ile ilgili bazı bandların iyi ayrışmamasına neden olur. Bu durumdan doğan sorunların üstesinden gelmek için su bandının biyolojik örnek bandından çıkarılması gerekmektedir. Diğer bir metod da örnekleri D_2O çözücü içinde hazırlamaktır. Bu durumda D-H değişimi hesaba katılmalıdır.

2.4. İNCELENEN İNFRARED SPEKTRAL BÖLGELERİ

Bu çalışmada hidrokarbon kuyruğu temsil eden karbon- hidrojen (C-H) gerilme bandları ve baş grubu temsil eden karbonil titreşim bandları incelenmiştir. Karbon-hidrojen gerilme titreşimleri $2800-3100 \text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesindeki bantlara, karbonil gerilme titreşimleri de $1700-1750 \text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesindeki bantlara neden olur (Tablo 2.3).

İncelenen bütün titreşimler, sıcaklığa bağlı olarak frekans ve band genişliğinde değişim gösterir ve bu da moleküler düzeyde yapısal ve fonksiyonel değişimlere karşılık gelir (Stuart, 1997).

| Frekans (cm^{-1}) | Bandlar |
|------------------------------|--|
| 3010 | =C – H gerilme |
| 2956 | CH ₃ asimetric gerilme |
| 2920 | CH ₂ asimetric gerilme |
| 2870 | CH ₃ simetric gerilme |
| 2850 | CH ₂ simetric gerilme |
| 1730 | C=O gerilme |
| 1485 | (CH ₃) ₃ N ⁺ asimetric eğilme |
| 1473, 1472, 1468, 1463 | CH ₂ makaslama |
| 1460 | CH ₃ asimetric eğilme |
| 1405 | (CH ₃) ₃ N ⁺ asimetric eğilme |
| 1378 | CH ₃ simetric eğilme |
| 1400-1200 | CH ₂ sallanma band progresyonu |
| 1228 | PO ₂ ⁻ asimetric gerilme |
| 1170 | CO-O-C asimetric gerilme |
| 1085 | PO ₂ ⁻ simetric gerilme |
| 1070 | CO-O-C simetric gerilme |
| 1047 | C-O-P gerilme |
| 972 | (CH ₃) ₃ N ⁺ asimetric gerilme |
| 820 | P-O asimetric gerilme |
| 730, 720, 718 | CH ₂ sallanma |

Tablo 2.2: Lipidlerin karakteristik infrared bandları

2.5. FTIR SPEKTROSKOPİK MEMBRAN ARAŞTIRMALARINDA KULLANILAN AMPİRİK KURALLAR

2.5.1. CH₂ Antisimetrik Gerilme Bandları

Fosfolipidin asil zincirlerini yani hidrokarbon kuyruğu temsil eden karbon-hidrojen gerilme bantlarından en güçlü olanı 2920 cm⁻¹ spektral bölgesinde gözlenen CH₂ Antisimetrik gerilme bantlarıdır.

CH₂ Antisimetrik titreşim modunun frekansının sıcaklığa bağlı değişimleri;

- Fosfolipidin hidrokarbon zincirinin düzeni (trans veya gauche durumu) hakkında bilgi verir.

- Frekans değerlerinin yüksek dalga sayısına kayması gauche sayısındaki artıma yani lipid asil zincirinin esnekliğinin artmasına, diğer bir değişle sistemin düzensizliğinin artmasına karşılık gelir.

- Frekans değerlerinin düşmesi trans konformerlerinin artmasına, dolayısı ile sistemin düzeninin artmasına karşılık gelir (Umemura et al, 1980; Casal and Mantsch, 1984; Cameron and Charette, 1981; Flach et al, 1993).

CH₂ Antisimetrik titreşim modunun band genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimleri;

- Titreşim ve torsiyonel hareketlerdeki değişime karşılık gelir.

- Band genişliğinin artması lipid membran dinamiğinin (akışkanlığının, lipid mobilitesinin) arttığını gösterir.

- Band genişliği azaldıkça membran dinamiği (akışkanlığı, lipid mobilitesi) azalır (Toyran and Severcan, 2002; Lopez-Garcia et al, 1993).

2.5.2. CH₂ Simetrik Gerilme Bandları

Fosfolipidin asil zincirlerini temsil eden karbon-hidrojen gerilme bandlarından diğere bir güçlü olanı 2850 cm⁻¹ çevresinde gözlenen CH₂ simetrik gerilme modudur. Bu bandın frekansının ve band genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi CH₂ antisimetrik gerilme bandıyla aynı özellikleri taşır (Stuart, 1997).

2.5.3. CH₃ Asimetrik Gerilme Bandları

Fosfolipidin asil zincirlerinin, karbon-hidrojen bandlarından bir diğere 2956 cm⁻¹ bölgesinde ki CH₃ asimetrik gerilme bandıdır. Bu bant palmitol zincirlerinin terminal metil grubunun asimetrik titreşimlerinden oluşur.

CH₃ asimetrik gerilme modunun frekansının sıcaklığa değişimleri incelendiğinde;

- Frekans membranın iç kısmının dinamiği hakkında bilgi verir.
- Frekanstaki değişim membranın iç kısımlarının düzeni hakkında bilgi verir.
- Frekansın artması membranın iç kısımlarında asil zincirin hareket serbestliğinin artması dolayısı ile membranın düzensizliğinin artması anlamına gelir (Umemura et al, 1980; Kazancı et al, 2001).

2.5.4. C = O Gerilme Bandları

Fosfolipidin baş grubunu temsil eden karbonil titreşim bantı 1735 cm⁻¹ çevresinde gözlenen C = O gerilme modudur. C = O gerilme modunun frekansının ve band genişliğinin sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde;

- Frekansın düşük değerlere kayması hidrojen bağlanmasının kuvvetli olduğunu gösterir.

- Frekansın yüksek değerlere kayması karbonil grubun dehidrasyonunun arttığını yani serbest C=O gruplarının arttığını gösterir.

- Band genişliğindeki değişim C=O bölgesi civarında membran dinamiği hakkında bilgi verir (Lewis et al, 1990; Toyran and Severcan, 2003; Jackson and Mantsch, 1993).

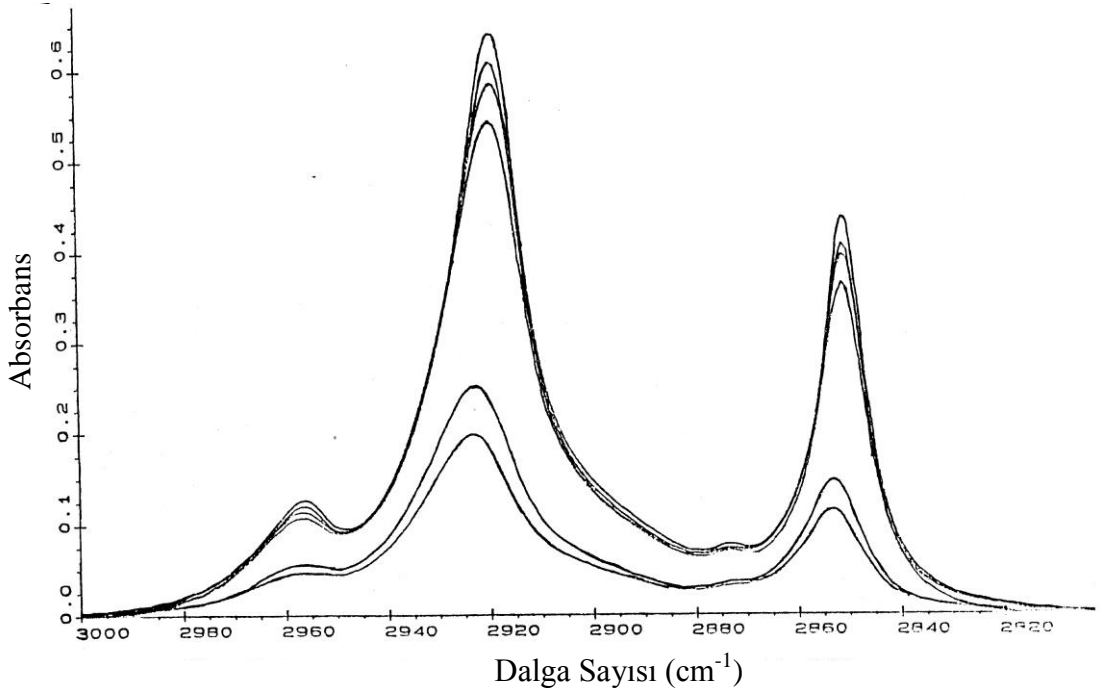
2.5.5. P = O Gerilme Bandları

Bu band da C = O gerilme bandı gibi fosfolipidin baş grubunu temsil eden, 1220-1260 cm^{-1} spektral bölgesinde gözlenen fosfat bandıdır. P=O gerilme bandının etkileri C = O gerilme bandı ile aynı özellik taşımaktadır (Lopez-Garica et al, 1993; Casal et al, 1989; Kan-Zhi et al, 1996).

2.5.6. Asil (Hidrokarbon) Zincirlerin Spektral Karakteristiği

Şekil 2.4, DPPC multilamellar çift tabakanın, farklı sıcaklıklarda, C – H gerilme bölgesindeki spektrumunu gösterir. Bu şekil, sıcaklıklardaki değişimlerin, pik pozisyonunda, pik yüksekliğinde ve C – H gerilme bandlarının band genişliğinde önemli değişiklikler ürettiğini gösterir. Genelde, pik yüksekliği artan sıcaklık ile azalır. CH_2 antisimetrik ve simetrik gerilme bantları, jel fazda nispeten bir dereceye kadar keskindir. Sıvı kristal faza dönüşümde, bu bantlar genişler ve absorpsiyonları daha yüksek dalga sayılarına kayar. Aköz lipid topluluklarının en yaygın yapısı, düzenli, rijid jel faz ve daha akışkan, düzensiz sıvı kristal faz gibi iki fiziksel durumda bulunabilen çok katlı yapıdır. Bu iki durum arasındaki sıcaklık kaynaklı geçiş, yani jelden sıvı kristal faza geçiş, infrared spektrumunda önemli değişimler üretir. Şekil 2.4’de de görüldüğü gibi; pik pozisyonunda ve band genişliğindeki ani artış ve pik yüksekliğindeki ani bir azalış yaklaşık 41 °C civarında gözlenir (Casal and Mantsch, 1984). Bu geçiş hidrokarbon zincirlerinin erimesine karşılık gelir ve bu nedenle de bazen zincir erime faz geçişi olarak da ifade edilir. Bu durum asil zincirlerde yapısal

düzensizliğin (gauche konformerleri) başlangıcına neden olur. Band genişliğindeki değişimler de asil zincirlerin hareket hızlarındaki değişimlere bağlıdır (Asher and Lewin, 1977 ve Casal, 1980).



Şekil 2.4: DPPC çok katmanlı lipozomların C – H gerilme bölgesinin farklı sıcaklıklardaki FTIR spektrumu.

2.6. DİFERANSİYEL TARAMA KALORİMETRESİ (DSC)

DSC, benzer ısı kapasiteli referans bir örnek ile karşılaştırılan lipid dispersiyonunun sıcaklığındaki sabit değişimi ölçen en yaygın metodlardan biridir.

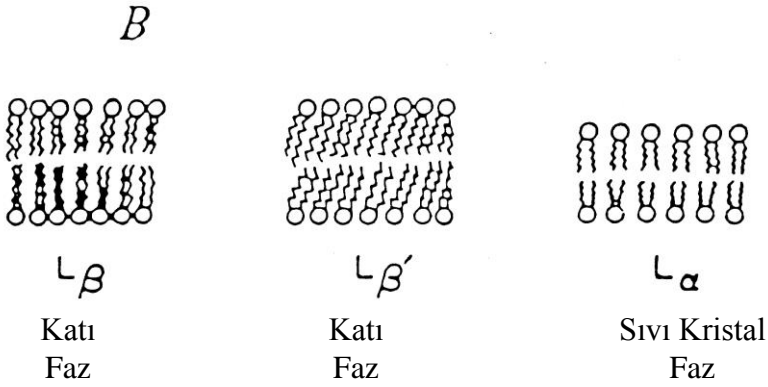
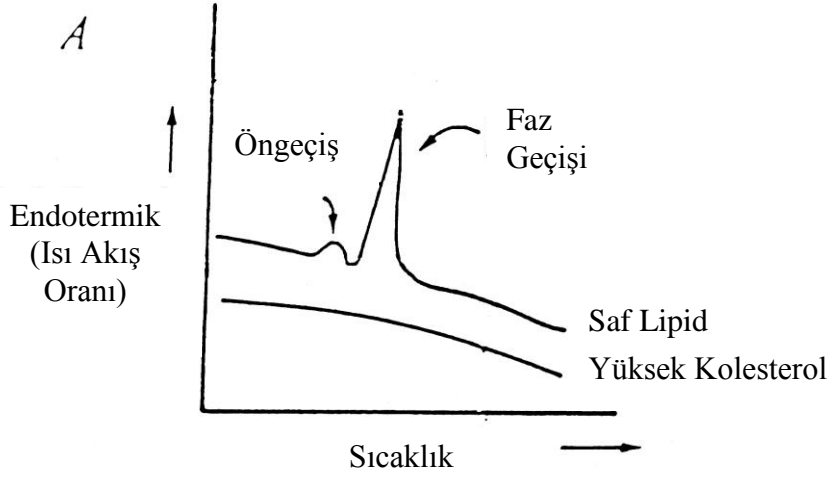
Yapı hakkında herhangi bir bilgi vermez fakat bir fazdan diğerine dönüşümün yer aldığı doğru sıcaklığı gösterir ve geçişlerin entalpisini ölçer. Endotermik geçişin spesifik sıcaklık absorpsiyon eğrisinin dikliği faz geçişlerinin işbirliği ile ilgilidir. Faz geçişinin üst ya da alt sıcaklığı arasındaki ısı absorpsiyon pikinin veya sıcaklık farkının yarı yüksekliğindeki sıcaklık genişliği bu bilgiye ulaşmamızı sağlar (Silvius, 1982; McElhaney, 1982; Small, 1985). Geçiş entalpsi asil zincirlerin erime enerjisini yansıtır.

Eğer sistemin sıcaklığı arttırılırsa, sistem daha yüksek enerji durumlarına kayar. Bu, lipidlerin jelden sıvı kristal faza termotropik geçişlerine neden olur (Şekil 2.5A ve 2.5B). Sıcaklık arttırıldığında, trans çift bağ ve cis çift bağ, serbest hacmi ve serbestliğin rotasyonel derecesini arttırır, bu durum azalan düzen ve artan entropi demektir.

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = - R T \ln K$$

ΔG sifira yakın olduğunda, sistemde iki durum sözkonusudur. Bu iki durum arasındaki Gibbs Enerji farkı sifir ise o zaman;

$$T_m = \Delta H / \Delta S \text{ olur.}$$



Şekil 2.5: A: Belirli sıcaklıklardaki, endotermik ön geçiş ve ana geçişin DSC ölçümleri

B: Jel ve sıvı kristal fazda, fosfolipidin diagramatik cross – sectional gösterimi.

3.SONUÇLAR

Bu çalışmada FTIR (Fourier Transform Infrared) ve DSC (Diferansiyel Tarama Kalorimetre) teknikleri kullanılmıştır. İlk olarak FTIR tekniğinden elde edilen sonuçlar incelenecektir. Elde edilen sonuçların analizi boyunca yapısal parametreler (düzen gibi) ve dinamik parametreler (band genişliği gibi) dikkate alınmıştır.

Çalışmada kullanılan diğer bir teknik olan DSC ile kalorimetrik olarak faz geçiş sıcaklıkları hakkında bilgi elde edilmiştir. Dikkate alınan parametreler ön geçiş sıcaklığı ve ana faz geçiş sıcaklığıdır.

3.1 FTIR ÇALIŞMALARI

FTIR tekniği kullanımı ile değişik frekans bölgelerindeki (antisimetrik, simetrik gerilme bölgeleri ile bükülme ve makaslama bölgeleri) değişmeler ve bu frekanstaki bant genişliklerinden fizikokimyasal bilgiler elde edilebilir.

Lipidlerin infrared spektrası, baş grup ve hidrokarbon zincir spektral karakteristikleri belirtilen farklı moleküler parçacıkların moleküler titreşimlerinden başlayan iki spektral bölgede çalışılmıştır.

3.1.1 C – H GERİLME BÖLGESİ

3.1.1.1 CH₂ Antisimetrik Gerilme

Şekil 3.1'deki CH₂ antisimetrik gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerleri saf DPPC lipozomu için incelendiğinde; jelden sıvı kristal faza geçişin yaklaşık 41°C de merkezlenen dar bir sıcaklık aralığında meydana geldiği gözlenmiştir.

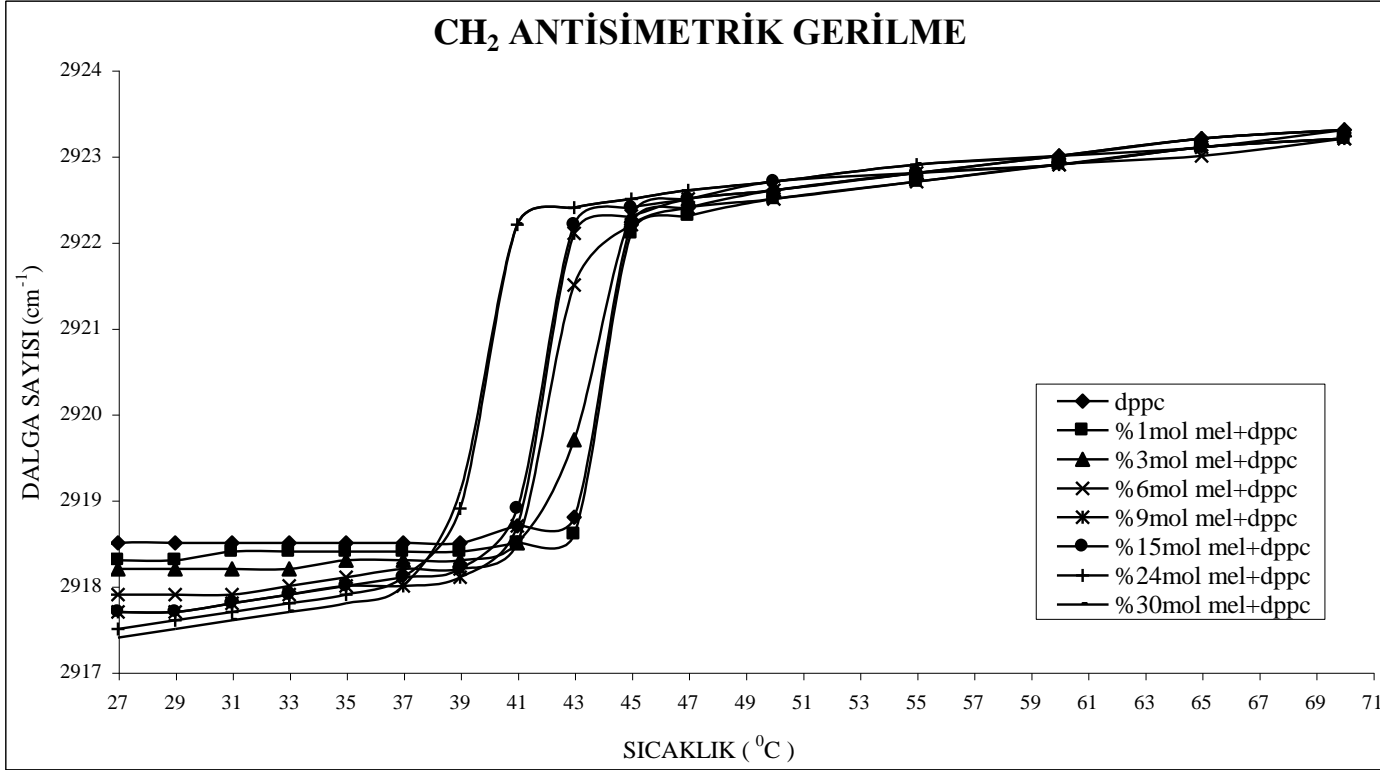
Saf DPPC lipozomlarına farklı % mol melatonin eklendiğinde faz geçişi değişmiştir. Melatoninin artan konsantrasyonları (%1 mol hariç) faz geçiş

eğrisinin, özellikle %24 ve %30 gibi yüksek konsantrasyonlarda, genişlemesine ve faz geçiş sıcaklığının düşmesine neden olmuştur.

Saf DPPC lipozomlarına farklı konsantrasyonlarda (%1, %3, %6, %9, %15, %24, %30 mol) melatonin eklenmesi ile, faz geçişinin altındaki sıcaklıklarda yani jel fazda frekansta derece derece azalma gözlenmiştir. Faz geçişinin üstündeki sıcaklıklarda yani sıvı kristal fazda ise frekans saf DPPC lipozomun frekansı ile aynı kaldığı için ihmal edilebilir etkiye sahiptir. Frekanstaki bu değişimler değerlendirildiğinde;

- Jel fazda, farklı % mol melatoninin DPPC lipozomlarına eklenmesi ile frekansın azalması, sistemde gauche konformerlerinin sayısının azalmasına ve bu da sistemin asil zincir (hidrokarbon zincir) düzeninin artmasına neden olmaktadır.

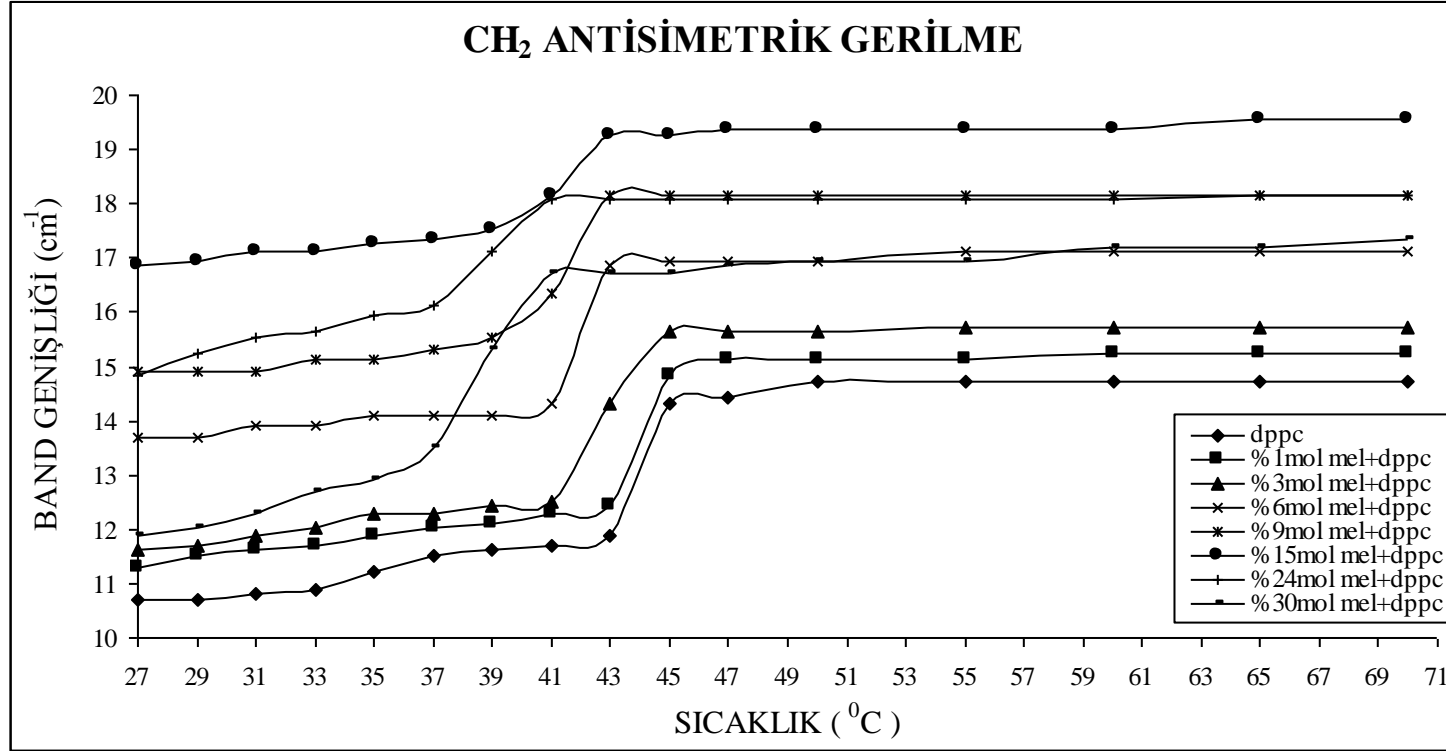
- Sıvı kristal fazda, melatoninin artan konsantrasyonları ile frekans değerlerinin saf DPPC frekans değerleri ile aynı kalması, eklenen melatoninin bu fazda frekans üzerinde ihmal edilebilir etkiye sahip olduğunu gösterir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun CH₂ antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.

Şekil 3.2'deki CH₂ antisimetrik gerilme titreşiminin band genişliğinin sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde; hem jel hem de sıvı kristal fazda değerler saf DPPC lipozomu değerlerine göre, melatoninin %1, %3, %6, %9 ve %15 mol konsantrasyonlarının eklenmesi ile artmış, %24 ve %30 gibi daha yüksek konsantrasyonların eklenmesi ile ise yine saf DPPC lipozom değerlerinin üstünde kalmak şartıyla azalmıştır. Band genişliği değerlerindeki bu değişimler değerlendirildiğinde;

- Band genişliği değerlerinin %15 mole kadar hem jel hem de sıvı kristal fazda saf DPPC değerlerine göre artması; lipid asil zincirlerinin hareket özgürlüğünün her iki fazda artması dolayısı ile melatoninin membranın akışkanlığını arttırdığı anlamına gelir. Yüksek konsantrasyon değerlerinin (%15 ve % 30) ise, saf DPPC değerlerinin üstünde olmasına rağmen, hem jel hem de sıvı kristal fazda, diğer konsantrasyon değerlerine göre azalmış olması, yüksek konsantrasyonların membran dinamiğini arttırıcı etkisinin daha az olduğunu gösterir. Fakat şekilden açıkça görülmektedir ki tüm konsantrasyonlar da DPPC'ye göre melatonin membran dinamiğini arttırmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun CH₂ antisimetrik gerilme modu bandgenişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi (Band genişliği 0,75 x pik yüksekliğinde ölçülmüştür).

3.1.1.2 CH₂ Simetrik Gerilme

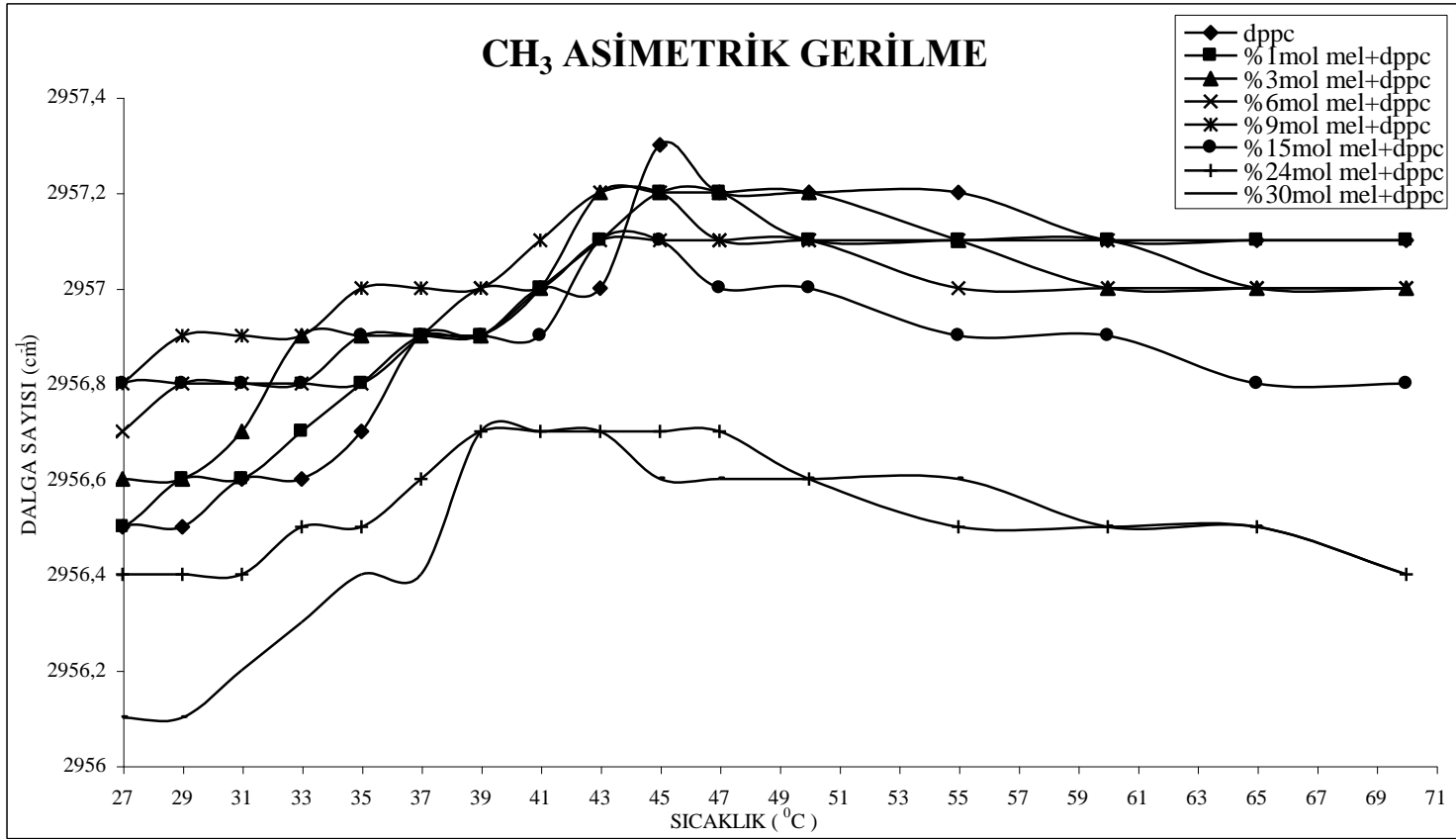
- CH₂ simetrik gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde de, antisimetrik değerleri ile aynı etkiyi gösterdiği görülmüştür.

3.1.1.3 CH₃ Asimetrik Gerilme

Şekil 3.3'deki CH₃ asimetrik gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde; melatoninin artan konsantrasyonlarının (%1 mol hariç) faz geçiş sıcaklığını düşürdüğü gözlenmiştir. Melatoninin saf DPPC lipozomlarına eklenmesi ile faz geçiş sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda, %1, %3, %6, %9 ve %15 mol konsantrasyonlarının frekans değerlerini saf DPPC lipozomlarına göre arttırdığı, %24 ve %30 gibi yüksek konsantrasyonların ise azalttığı gözlenmiştir. Faz geçiş sıcaklığının üstündeki sıcaklıklarda ise melatoninin bütün konsantrasyonlarının frekans değerlerinin saf DPPC değerlerinin altında kaldığı gözlenmiştir. Frekans değerlerindeki bu değişimler değerlendirildiğinde;

- Jel fazda, saf DPPC lipozomlarına eklenen %1, %3, %6, %9 ve %15 mol melatonin konsantrasyonlarının frekans değerlerinin DPPC frekans değerlerinin üstüne çıkması, yani frekansı arttırması, melatoninin bu konsantrasyonlarının membranın iç kısmının asil zincirin fleksibilitesini arttırdığı yani lipidin düzensizliğini arttırdığı anlamına gelmektedir. %24 ve %30 mol yüksek melatonin konsantrasyonlarının frekans değerlerinin bu fazda DPPC frekans değerlerinin altında olması, yani frekansı azaltması, ise bu konsantrasyonların diğer konsantrasyonlara göre membranın iç kısmının düzenini arttırdığı dolayısı ile hareket serbestliğinin de azaldığı anlamına gelir.

Sıvı kristal fazda, melatoninin artan konsantrasyonları ile frekans değerlerinin saf DPPC lipozomunun frekans değerlerinin altına düşmüş, azalmış olması, bu fazda melatoninin membranın iç kısmının düzenini arttırdığını gösterir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun CH₃ asimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.

CH₃ gerilme sonuçları CH₂ gerilme sonuçları ile farklıdır, bu da melatoninin lipozomlar üzerindeki etkisinin membranın farklı kısımları için ayrı özellikler taşıdığını gösterir.

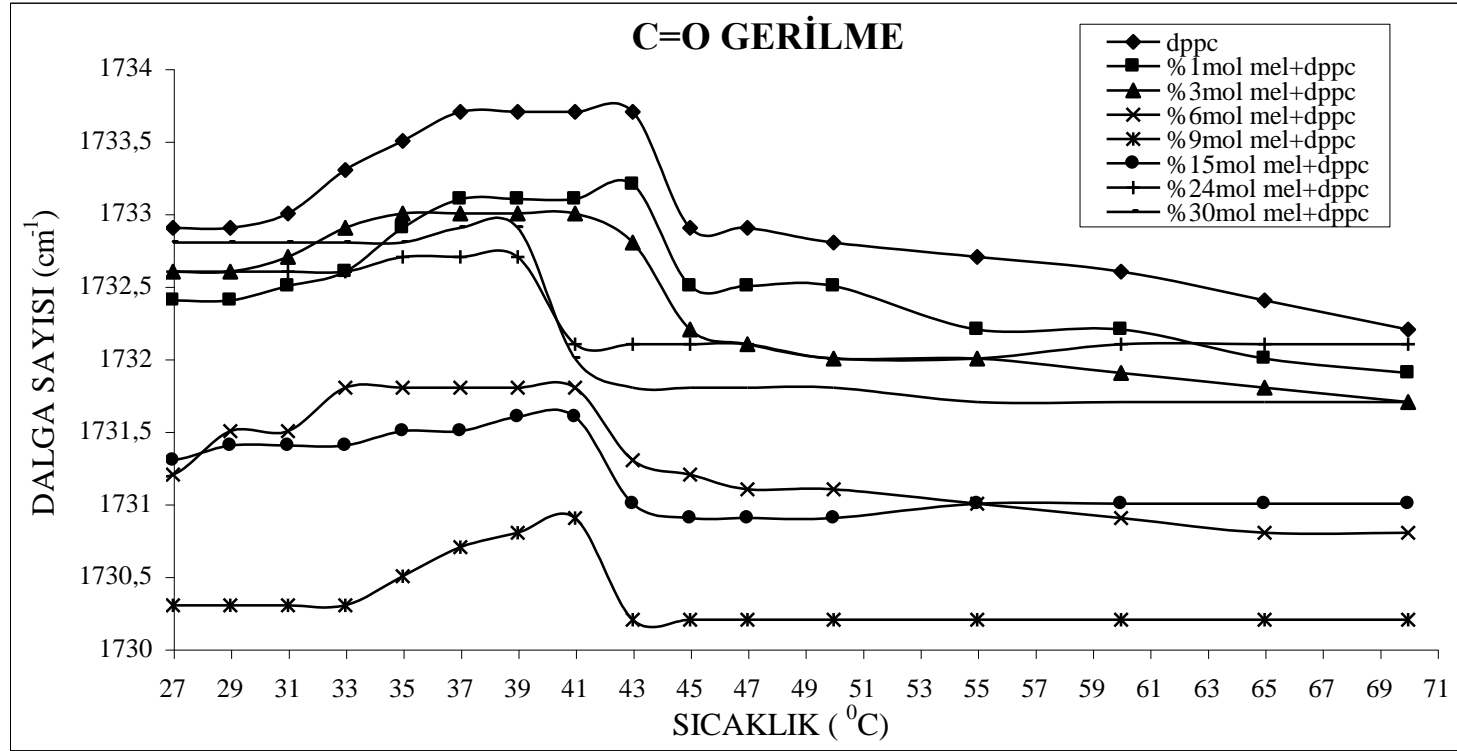
3.1.2 BAŞ GRUP GERİLME BÖLGESİ

3.1.2.1 C = O Gerilme

Şekil 3.4'deki C = O gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde; saf DPPC eğrisinde 41 °C civarında ana faz geçiş sıcaklığını görüntüleyen ani bir azalma gözlenmiştir. Melatoninin artan konsantrasyonlarının (%1 mol hariç) faz geçiş sıcaklığını düşürmesi söz konusudur. Saf DPPC lipozomuna melatoninin farklı konsantrasyonlarının eklenmesi sonucunda, hem jel hem de sıvı kristal fazda, frekans değerlerinde, genel olarak azalma görülmüştür. Bu azalma %1 molden başlayarak %9 mole kadar derece derece olurken, %15, %24 ve %30 mol melatonin konsantrasyonlarının ise yine saf DPPC frekans değerlerinin altında olmasına rağmen diğer konsantrasyonlara göre frekans değerlerinin arttığı gözlenmiştir.

C = O gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerlerindeki bu değişimler değerlendirildiğinde;

Hem jel hem de sıvı kristal fazda, DPPC lipozomlarına eklenen düşük konsantrasyonlarda ki (%1, %3, %6, %9) melatoninin frekans değerlerini düşürmesi, melatoninin hidroksil grubunun fosfolipidlerin karbonil grupları ile kuvvetli hidrojen bağı yaptığını gösterir. Yüksek konsantrasyonlarda ki (%15, %24, %30) melatoninin frekans değerlerinin saf DPPC değerlerinin altında olmasına rağmen düşük konsantrasyonlara göre artmış olması, bu konsantrasyonların, hidrojen bağı etkisini diğer konsantrasyonlara oranla biraz azalttığı anlamına gelir (Şekil 3.4).



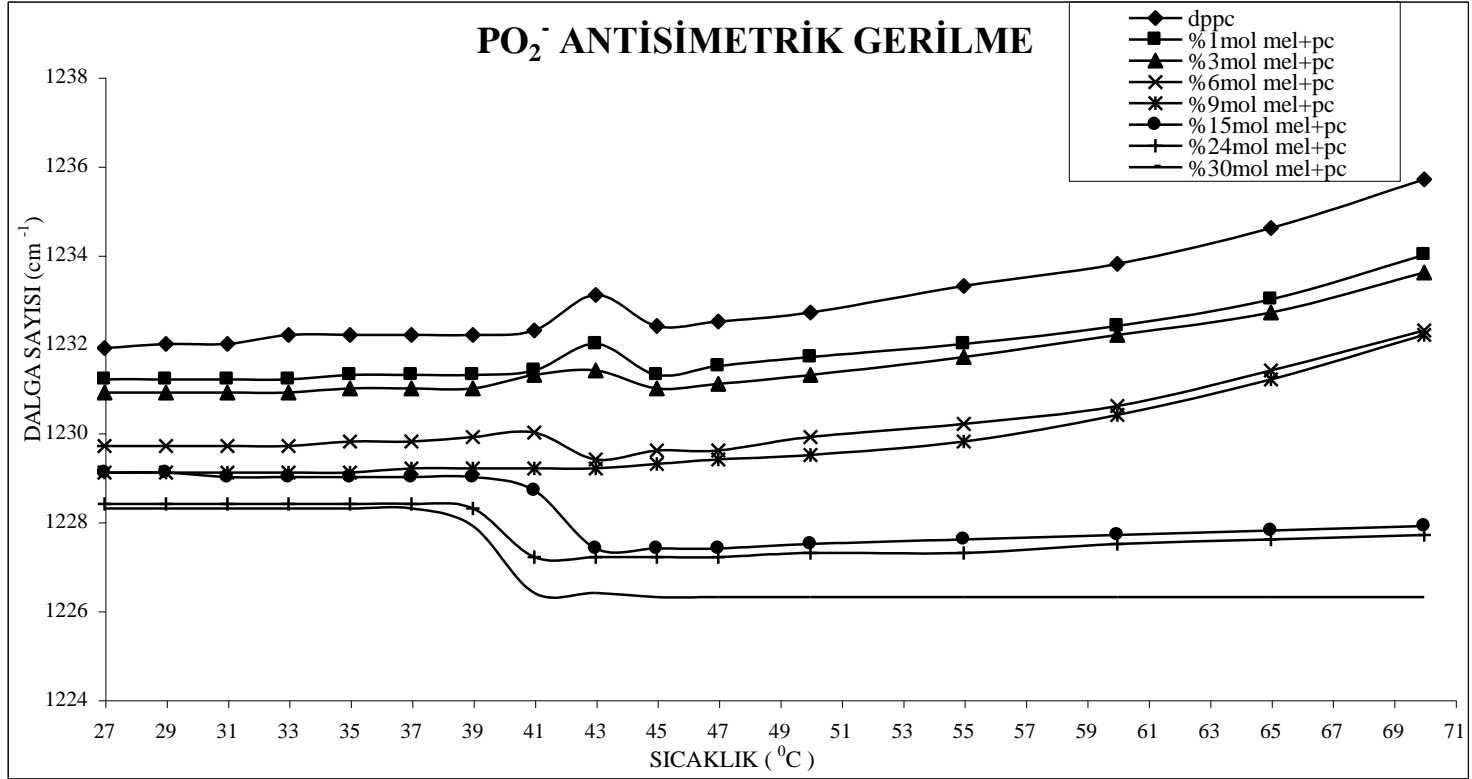
Şekil 3.4. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun C=O gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi

3.1.2.2 PO_2^- Antisimetrik Gerilme

Şekil 3.5'deki PO_2^- antisimetrik gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerlerinde de yine C = O gerilme titreşim frekansında olduğu gibi hem jel hem de sıvı kristal fazda saf DPPC frekans değerlerine göre artan melatonin konsantrasyonları ile derece derece azalma gözlenmiştir.

Frekanstaki bu değişim değerlendirildiğinde;

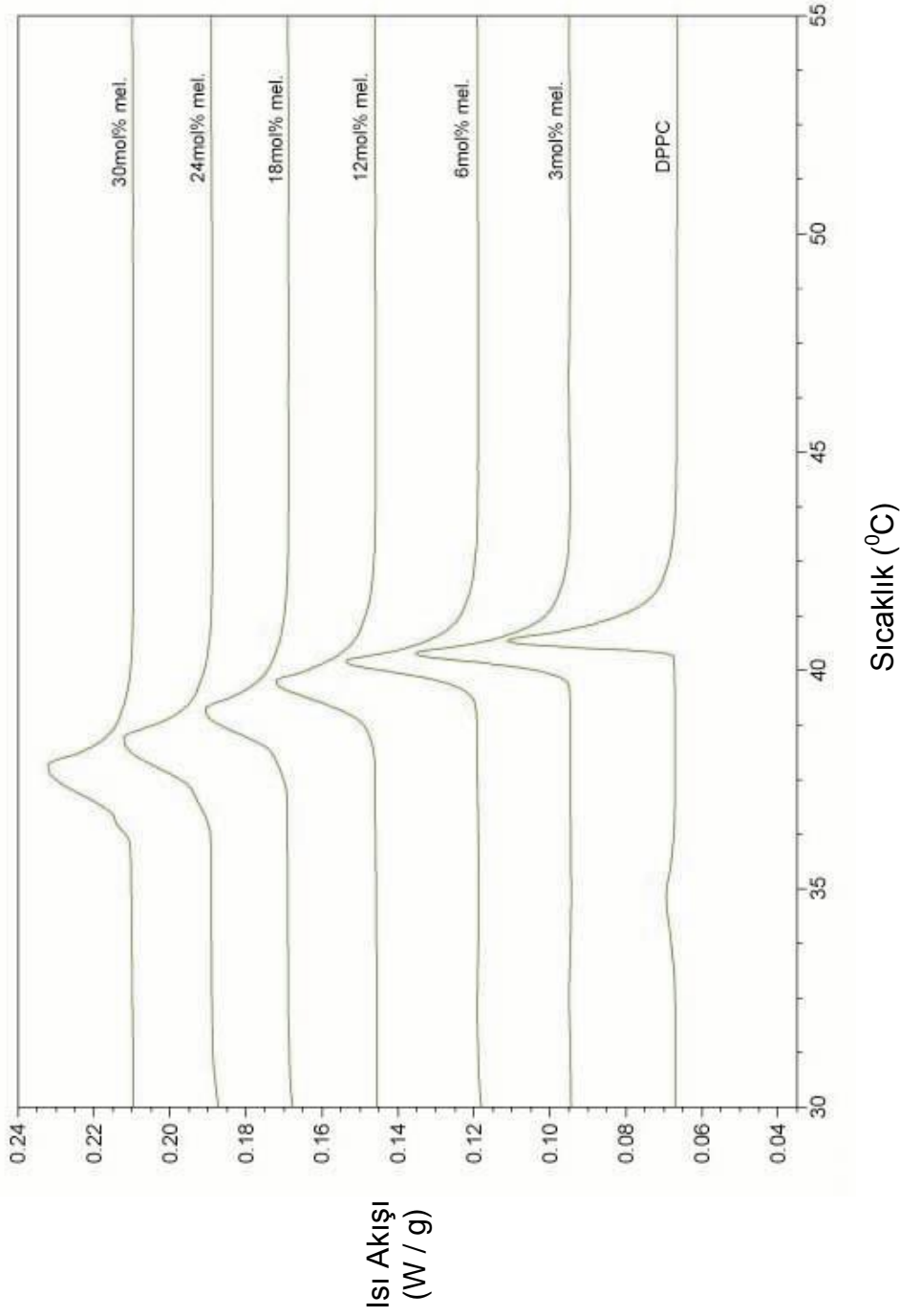
Hem jel hem de sıvı kristal fazda, artan melatonin konsantrasyonlarının frekanslarının azalması yine melatoninin hidroksil grubunun, fosfolipidlerin karbonil grupları ile kuvvetli hidrojen bağı yaptığını gösterir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun PO_2^- antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi

3.2 DSC ÇALIŞMALARI

Sıcaklığa bağılı olarak saf DPPG ve değişik melatonin konsantrasyonları içeren DSC kalorimetrik eğrileri Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Bu eğrilerden görüldüğü gibi, melatoninin saf DPPC lipozomlarına eklenmesi ile ön geçiş eğrisi kaybolur ve ana faz geçiş eğrisinin büyüklüğünde küçülme ve düşük sıcaklıklara kayma gözlenir. Bu DSC sonuçlarına göre, melatonin konsantrasyonu arttıkça DSC piklerinin genişlemiş olması lipid zincirler arasındaki işbirliğinin azaldığı anlamına gelir.



Şekil 3.6. Saf ve farklı %mol melatoninin içeren DPPC lipozomunun DSC kalorimetrik eğrisi.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, melatoninin DPPC membranlarının faz geçişleri, membran düzen ve dinamiği üzerindeki etkileri FTIR ve DSC teknikleri kullanılarak incelenmiştir. İnfrared spektroskopisi, bu geçişlerin görüntülenmesini fonksiyonel gruplar yolu ile ve termotropik davranışlarındaki farklılıkları gözleyerek sağlar. Buna göre, melatoninin membranın hidrofilik kısım üzerindeki etkisini C=O gerilme bandını ve PO_2^- antisimetrik gerilme bandını inceleyerek, hidrofobik kısım üzerindeki etkisini ise C-H gerilme bölgesini inceleyerek araştırdık.

Saf DPPC lipozomlarında, IR bandlarının jel fazdaki frekansı yüksek trans konformerli düzenli asil zincirlerin karakteristiğidir. DPPC'nin ana faz geçişi boyunca meydana gelen CH_2 gerilme modlarının maksimum frekansındaki ani yükseliş bütün transların gauche konformerlerine değişimi ile ilgilidir (Asher, 1977; Cameron et al, 1980)

Fosfolipidlerin faz geçişi, CH_2 gerilme frekansındaki değişimleri izlenerek incelenebilir (Sanchez-Migallon et al, 1996). FTIR çalışmalarımız sonucunda, %1 mol melatoninin saf DPPC lipozomlarına eklenmesinin faz geçiş sıcaklığını değiştirmedeği görülmüştür (Şekil 3.1) . Fakat %3 molen başlayarak daha yüksek konsantrasyonlardaki melatoninin saf DPPC lipozomlarına eklenmesi faz geçiş sıcaklığının daha düşük sıcaklıklara kaymasına neden olmuştur. Faz geçiş sıcaklığındaki bu düşüş, melatoninin membranı stabil kıldığını gösterir (Prenner et al, 1999; Kazancı et al, 2001). Faz geçiş sıcaklığının daha düşük sıcaklıklara kayması, bütün transların gauche konformerlerine değişiminin daha düşük sıcaklıklarda meydana gelmesi demektir. Fosfolipidlerdeki CH_2 gerilme frekansları lipid çift tabakadaki asil zincirlerin konformasyonel düzenini görüntülemektedir (Flach et al, 1993). FTIR sonuçları DSC sonuçları ile uyum içindedir.

Şekil 3.1. de görüleceği üzere, CH_2 antisimetrik gerilme bandları incelendiğinde, özellikle jel fazda, melatoninin saf DPPC lipozomlarına eklenmesi ile frekans değerlerinde bir azalma gözlenmiştir. CH_2 antisimetrik gerilme frekansındaki azalma konformasyonel düzeni yansıtır ve asil zincirlerdeki trans konformerlerinin artışı anlamındadır. Melatoninin düzen stabilize etkisi, DPPC asil zincirleri ve melatonin arasındaki kuvvetli hidrofobik etkileşim ve melatoninin neden olduğu kuvvetli hidrojen bağlanması nedeni ile olabilir. Bu lipid çift tabakanın düzenindeki artış ile sonuçlanır. Melatoninin membran faz geçişleri ve düzeni üzerine literatürde karşılaştırma yapabileceğimiz başka bir çalışma mevcut değildir.

Aynı zamanda yine Şekil 3.1.'den görüleceği üzere, melatoninin artan konsantrasyonlarının saf DPPC lipozomlarına eklenmesi ile faz geçiş eğrisinde önemli bir genişleme görülmemiştir. Bu durum, melatoninin, fosfolipid zincirler arasındaki Van der Waals etkileşimini yok etmediğini bu nedenle lipidlerin aynı sıcaklıkta eridiğini yani geçişin hep birlikte olduğunu göstermektedir. Buna işbirlikçi geçiş denir (Jain and Wu, 1977).

Melatoninin band genişliği değerleri incelendiğinde (Şekil 3.2.), hem jel hem de sıvı kristal fazda, frekans değerlerinde dikkate değer bir artış görülmüştür. Melatoninin %15 mol konsantrasyon değerine kadar bu artış devam etmiş, %24 ve %30 mol melatonin gibi yüksek konsantrasyonlarda ise diğer konsantrasyonlara göre azalma olmasına rağmen yine saf DPPC değerlerinin üstündedir. Bu durumda melatoninin band genişliği değerlerini arttırdığı açıktır. Band genişliği asil zincirlerin mobilitesi hakkında bilgi vermektedir (Lopez-Garcia et al, 1993; Toyran and Severcan, 2003; Kazancı et al, 2001).

Şekil 3.3. çift tabakanın iç derinliklerindeki zincirlerin serbestlik özgürlükleri hakkında bilgi veren CH_3 asimetrik gerilme modlarının frekans

değişimlerini sıcaklığın bir fonksiyonu olarak göstermektedir. Melatoninin saf DPPC lipozomlarına eklenmesi ile jel fazda %9 mole kadar frekans değerlerinde bir artış, sıvı kristal fazda ise azalma gözlenmiştir. %24 ve %30 gibi yüksek konsantrasyonlardaki melatoninin ise frekansı saf DPPC değerlerine göre önemli ölçüde düşürdüğü gözlenmiştir. Bu durumda sıvı kristal fazda ve yüksek melatonin konsantrasyonlarında hem jel hem de sıvı kristal fazda, CH₃ asimetrik gerilme modunun frekansındaki azalma, melatoninin çift tabakanın iç bölgesindeki dinamiği azalttığını göstermektedir.

Çalışmamızda, melatoninin DPPC membranının hidrofilik kısmına gliserol iskeleti üzerine etkisini C=O gerilme bandını analiz ederek inceledik (Şekil 3.4.). Melatonin bu bandın frekansının daha düşük frekans değerlerine kaymasına neden olmuştur. Bu değişim, karbonil gruplarının oldukça yüksek hidrasyonunu gösterebilir. Bunun sonucunda da hidrojen bağlı karbonillerin sayısında artış olur. Bu durum, karbonil grupları ve melatoninin hidroksil grupları veya etraftaki su molekülleri ile kuvvetli hidrojen bağlanması yaptığını gösterir.

Polar baş grup bölgesindeki değişimler PO_2^- antisimetrik çift bağ gerilme modları ile de incelenebilmektedir. PO_2^- grubunun fosfolipidlerin esas hidrasyon bölgesi olduğu bilinmektedir. Bu bandın frekansı hidrasyon durumu hakkında bilgi verir. Frekanstaki azalma fosfat grubunun hidrasyonu ile azalma ise dehidrasyonu ile ilgilidir (Dluhy et al, 1983). Şekil 3.5.'den de görüleceği üzere melatoninin artan konsantrasyonlarının saf DPPC lipozomlarına eklenmesi ile frekansta kademe kademe bir azalma görülmüştür. DMPC model membranı ile etkileşimleri UV spektroskopisi tekniği ile incelenen diğer bir çalışmada (Ceraulo et al, 1999) melatoninin polar baş grup bölgesiyle güçlü etkileştiği ve kuvvetli hidrojen bağlanması yaptığı, DMPC model membran kullanılarak, UV spektroskopi ve DSC tekniği ile incelenen çalışmada (Saija et al, 2002)

melatoninin güneş ışınlarından koruyucu aktivitesi, ve Fluorescence ve ESR teknikleri ile incelenen çalışmada (Costa et al,1997) yine DMPC model membran kullanılarak melatoninin lipid bilayerlarla nasıl etkileştiği görülmüştür.

Fonksiyonel grupların detaylıca incelenmesi sonucunda, melatoninin DPPC model membranı stabilize ettiği ve CH₂ antisimetrik gerilme modunda da görüleceği üzere, düzeni arttırıcı bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Şekil 3.6 daki DSC eğrilerinden açıkça görüleceği üzere, melatoninin eklenmesi ile ön geçişin (pretransition) yok olduğu, ana faz geçiş sıcaklığının melatonin konsantrasyonu arttıkça daha düşük sıcaklıklara kaydığı gözlenmiştir. DSC çalışmasından elde edilen diğer bir ilginç sonuç; yüksek melatonin konsantrasyonlarında (%18, %24, %30 mol), ana geçiş sinyalinin iki pike ayrılmasıdır. Piklerde elde edilen genişleme ve açıkça gözlenen iki pik melatoninin sistemde bir faz ayrılmasına neden olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde yanlamasına faz ayrılması, Vitamin E veya Vitamin D₂ içeren fosfolipid membranlarda da gözlenmiştir (Severcan and Cannistraro, 1988; Kazancı et al, 2001). Bu bahsedilen çalışmalardan faydalanarak, melatoninin, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, lipid membranlarda homojen olarak dağılmadığı ve melatonince fakir ve zengin bölgelere ayrıldığı önerilebilir.

Daha önce de bahsedildiği gibi, melatonin faz geçiş eğrisinde bir genişlemeye neden olmamakta fakat C=O ve PO₂⁻ gerilmeleri ile kuvvetli hidrojen bağlanması meydana getirmektedir. Bu sonuçlar bize melatoninin polar ve polar kısma yakın bölgesinde yerleştiğini, C₂-C₈ bölgesine girmediğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

Andreoli, J.E., Hoffman, J.F., Fanestil, D.D. and Schultz, S.C., (1986), Physiology of membrane disorders, Plenum Publishing Corporation.

Arrondo, J.L.R., Muga, A., Castresana, J., and Goni, F.M., (1993), Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy, Prog Biophys Mol Biol, 59, 23-56.

Asher, I.M and Lewin, I.W., (1977), Effects of temperature and molecular interactions on the vibrational infrared spectra of phospholipid vesicles, BBA. 468,63

Auroma, O.I., Characterization of drugs as antioxidant prophylactics, (1996), Free Radical Biology and Medicine, 20, 675-705.

Bayarı, S. and Ise, S., (2003), Fourier transform infrared spectra and molecular structure of 5-methoxytryptamine, N-acetyl-5-methoxytryptamine and N-phenylsulfonamide-5-methoxytryptamine, Spectrochimica Acta Part A- Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 59(6),1255-1263

Beyer, C. E., Steketee, J. D. and Saphier, D., (1998), Antioxidant properties of melatonin an emerging mystery, Biochemical Pharmacology., 56, 1265-1272.

Blask, D.E., (1984), The pineal gland: An oncostatic gland ? In the pineal gland (ed., R.J.Reiter, pp., 253-284, Raven Press, New York.

Brezinski, A., (1997), New Eng. J. Med, 336, 186-195.

KAYNAKLAR (Devami)

Cameron, D.G., Casal, H.L., and Mantsch, H.H., (1980), Characterization of the pretransition in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry*, 19,3665-75.

Cameron, D.G., Charette, G.M., (1981), Automotion of fourier transform infrared of temperature-induced phenomena, *Appl. Spectrosc.*, 35, 224.

Cantor, C.R. and Schimmel, P. R., (1980) *Biophysical Chemistry Part I: The conformation of biological macromolecules*, W. H. Freeman and Co. New York.

Casal, H. L., (1980), *Biochemistry*, 19, 444

Casal, H.L. and Mantsch, H.H., (1984), Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy, *BBA*, 779, 381

Casal, H.L., Mantsch, H.H. and Hauser, H., (1989), Infrared and ³¹P-NMR studies of the interaction of Mg²⁺ with phosphatidylserine: Effect of hydrocarbon chain unsaturation, *BBA*, 982(2), 228-236.

Ceraulo, L., Ferrugia, M., Tesoriere, L., Segreto, S., Livrea, M.A., Turco, Liveri, V., (1999), Interactions of melatonin with membrane models: Portioning of melatonin in AOT and lecithin reversed micelles, *J.Pineal Res.*, 26, 108-112

Chan, T-Y., and Tang, P-L., (1996), Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro, *J. Pineal Res.*, 20, 187-191

Cheeseman, K H, Slater T.F., (1993), An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49 (3), 481-493.

KAYNAKLAR (Devamı)

Costa, Ernane J. X., Shida, C.S., Biaggi, M.H., Ito, A.S., Lamy-Freund, M.T., (1997), How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies, FEBS letters, 416, 103-106.

Dluhy, R.A., Cameron, D.G., Mantsch, H.H. and Mendelshon, R., (1983), Fouriertransform infrared spectroscopic studies of the effect of calcium ions on phosphatidylserine, Biochemistry, 22, 6318-6325.

Flach, C.R., Branuer, J.W., Mendelson, R., (1993), Calcium ion interactions with insoluble phospholipid monolayer films at the A/W interface: external reflection-absorption infrared studies, Biophys. J., 65(5), 1994-2001

Goldstein, S., Meyerstein, D., Czapski, G., (1993), The fenton reagents, Free Radical Biology & Medicine, 15, 435-445

Iguchi, H., Kato, K. I., Ibayashi, H., (1982), Age dependent reduction in serum melatonin concentration in healthy human subjects, The journal of clinical endocrinology and metabolism, 54, 1025-1027

Jackson, M. and Mantsch, H.H., (1993), Biomembrane structure from FTIR spectroscopy, Spectrochim. Acta, 15,53-69.

Jain, M. K. and Wu, N.M., (1977), J. Membr. Biol., 34, 157-201.

Jain, M. K. (1988) Interactions to Biological Membranes, John Wiley and Sons Inc, New York.

Jeffrey, T. Mason, (1988), Mixing behavior of symmetric chain length and mixed chain length phosphatidylcholines in two-component multilamellar bilayers: evidence for gel and liquid-crystalline phase immiscibility, Biochemistry, 27, 4421-4429.

KAYNAKLAR (Devami)

Kan-Zhi, L., Jackson, M., Sowa, M.G., Haisong, J., Dixon, I.M.C., Mantsch, H.H, (1996), Modification of the extra cellular matrix following myocardial infarction monitored by FTIR spectroscopy, BBA, Mol. Basis Dis., 1315(2), 73-77.

Kazancı, N., Toyran, N., Haris, P.I., Severcan, F., (2001), Vitamin D2 at high and low concentrations exert opposing effects on molecular order and dynamics of dipalmitoyl phosphatidylcholine membranes, Spectroscopy, 15, 47-55.

Kodama, M., Kuwabara, M., Seki, S., (1982), Successive phase transition phenomena and phase diagram of the phosphatidylcholine-water system as revealed by differential scanning calorimetry, BBA, 689, 567-570.

Lewis, R.N., Mannok, D.A. and Mcelhaney, N., (1990), Physical properties of glycosyldiacylglycerols: an infrared spectroscopic study of the gel-phase polymorphisms of 1,2-di-O-acyl-3-O-(β -D-glucopyranosyl)-sn-glycerols, Biochemistry, 29, 8933-8943.

Lopez-Garcia, F., Villalain, J. and Gomez-Fernandez, J.C., (1993), Infrared spectroscopic studies of the interaction of diacylglycerols with phosphatidylserine in the presence of calcium, BBA, 1169, 264-272.

Lopez-Garcia, F., Villalain, J. and Gomez-Fernandez, J.C., (1994), Diacylglycerol, phosphatidylserine and Ca²⁺: a phase behavior study, BBA, 1190, 264-272.

Maestroni, G.J., (1993), Journal of Pineal Research, 14, 1-10.

KAYNAKLAR (Devamı)

Malgorzata, K. and Russel, J.R., (2000), Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation, P.Soc.Exp.Biol.Med., 9-21

Malgorzata, K., Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., (2000), Renal toxicity of the carcinogen δ -aminolevulinic acid: antioxidant effects of melatonin, Cancer Letters, 161(1), 1-7

Mantsch, H. H., Cameron, D.G., Casal, H.L. (1980) Characterisation of the pretransition in DPPC model membrane by FTIR spectroscopy. Biochemistry. 19, 3665-3672.

Mantsch, H.H. and Chapman, D., (1996), Infrared Spectroscopy of Biological Molecules, (Eds.) John Wiley and Sons,.

McConnel, H. M. , Devaux, D. and Scandella, C. (1972) Lateral Diffusion and Phase Separations in Biological Membranes, in Membrane Fusion (Fox, C. F. ed), Academic Press, New York.

Mc Elhaney, R. N. (1982) The use of Differential Scanning Calorimetry and Differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. Chem. Phys. Lipids 30:229-259.

Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W., (1990), Harper's Biochemistry, Appleton&Lange

Nesrullazade, A., Kazancı, N., Yurtseven, H., (2000), Sıvı kristaller: Yapıları, özellikleri, uygulamaları, E.Ü. Basımevi, Bornova, İzmir

KAYNAKLAR (Devami)

Parvez, I. Haris and Dennis Chapman, (1998), FTIR spectroscopy as a tool for characterization of Biomembrane structure in Biomembrane structures (eds. P.I.Harris and D. Chapman) IOS Press,.

Per Shan, P.S., (1982) Lyotropic Liquid Crystal, *Physics Today*, May, pp:34-39

Pierrefiche, G., Topall, G., Courboin, G., Henriet, I., Laborit, H., (1993), Antioxidant activity of melatonin in mice, *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 80, 211-223.

Prenner, E.J., Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R., (1999), The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes, *BBA*, 1462,201-221.

Prenner, E.J., Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R., Kondejewski, L.H., Hodges, R.S., (1999), Differential scanning calorimetric study of the effect of the antimicrobial peptide gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol lipid bilayer membranes, *BBA*, 1417, 211-223

Reiter, R.J., (1973), Comparative physiology: Pineal gland, *Annual Review Physiology*, 35, 305-328.

Reiter, R. J., (1993), Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals, a brief review, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26, 1141-1155.

Reiter, R.J., (1994), Pineal function during aging; attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences, *Acta Neurobiologiae Experimentalis.*, 54, 31-39

KAYNAKLAR (Devamı)

Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pellegrino, M.L., Tita, B., Caruso, S., Castelli, F., (2002), Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity, *Euro. J. Phar. Biophar.*, 53(2), 209-215.

Sanchez-Migallon, M.P., Aranda, J.F. and Gomez-Fernandez, J.C., (1996), The interaction of α -tocopherol with phosphatidylserine vesicles and calcium, *BBA*, 1281, 23-30.

Sandyk, R., (1990), Possible role of pineal melatonin in the mechanisms of aging, *The International Journal of Neuroscience.*, 52, 85-92

Severcan, F., Kazancı, N., Baykal, Ü. and Süzer, Ş. (1995) Infrared and Turbidity Studies of Vitamin E –Cholestrol-phospholipid Membrane Interactions. *Bioscience Report.* 15, 221-229.

Severcan, F., (1997), Vitamin E decreases the order of the phospholipid model membranes in the gel phase: An FTIR study, *Bioscience Reports*, 17, 231-235.

Severcan, F. and Cannistraro, S., (1988), Direct electron spin resonance evidence for alpha-tocopherol-induced phase separation in model membranes, *Chem. Phys. Lipids*, 47, 129-133.

Severcan, F., Kazancı, N., Zorlu, F., (2000), Tamoxifen increases membrane fluidity at high concentrations, *Bioscience Reports*, 20, 177-184.

Severcan, F., Toyran, N., Kaptan, N. and Turan, B., (2000), Fourier transform infrared study of the effect of diabetes on rat liver and heart tissues in the C-H region, *Talanta*, 53, 55-59

KAYNAKLAR (Devami)

Silvius, J.R. (1982), In: Lipid Protein Interactions Jost, P.C ve Griffith, O.H. , eds Vol 2, pp 239-281 Wiley and Sons Inc, New York.

Singer, S.J. and Nicholson, G.L. (1972), The fluid mosaic model of the structure of cell membrane, Science 175-726.

Slaters, J.L, Huang, C. (1987), Scanning Calorimetry Reveals a new Phase Transition in L- α -Dipalmitoyl phosphatidylcholine. Biophysical Journal. 52, 667-670.

Small, D.M. (1985), Physical Chemistry of Lipids: From Alkanes to phospholipids, Plenum Press, New York.

Stuart, B. (1997), Biological Applications of infrared spectroscopy, John Wiley & Sons.

Tamarkin, L., Danforth, D., Lihter, A., DeMoss, E., Cohen, M., Chabner, B., Lippman, M., (1982), Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer, Science, 216, 1003-1005.

Thomas, M J., (1995), The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working?, Critical reviews in food science and nutrition, 35, 21-39

Toyran, N. and Severcan, F., (2002), Infrared spectroscopic studies on the dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer interactions with calcium phosphate: effect of vitamin D₂, Spectroscopy, 16,399-408.

Toyran, N. and Severcan, F., (2003), Competitive effect of Vitamin D₂ and Ca²⁺ on phospholipid model membranes: a FTIR study, Chemistry and Physics of Lipids, 123, 165-176.

KAYNAKLAR (Devami)

Umemura, J., Cameron, D.G., Mantsch, H.H, (1980), A fourier transform infrared spectroscopic study of the molecular interaction of cholesterol with 1,2-dipalmitoyl-sn-glcero-3-phosphocholine, BBA, 602, 32-44.

Vertogen, G., De Jeu, W.H., (1987), Thermotropic Liquid Crystals Fundamentals, Springer-Verlag

Waldhauser F, Lynch H J, Wurtman R J., (1984), Melatonin in body fluids: Clinical significance, In the pineal gland, (ed., R.J.Reiter), pp.345-370, Rawen, New York

Wong, P.T. Mantsch, H.H, (1983) A low-temperature structure phase transition of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine bilayers in the gel phase. BBA: 732, 92-98.

Woo, M.M., Tai, C.J., Kang, S.K., Nathwani, P.S., Pang, S.F., Leung, P.C., (2001), Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells, J Clin EndocrinoMetab, Oct;86(10):4789-97

Wright, J., Aldhous, M., Franey, C., English, J., Arendt, J., (1986), The effects of exogenous melatonin on endocrine function in man, Clinical Endocrinology, 24, 375-382

Yu, B P., (1994), Physiological Reviews, 74,1,139-162

ÖZGEÇMİŞ

İpek Şahin 27.04.1975 İzmir doğumludur. İlk, orta ve lise tahsilini Isparta'da tamamladı. 1998 yılında İstanbul Üniversitesi Fizik Bölümü'nden mezun oldu. Halen Ege Üniversitesi Fizik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak öğrenimine devam etmektedir.