

**FLORESİN İLE MEROSİYANİN 540 MOLEKÜL
ÇİFTİ ARASINDAKİ FLORESANS ENERJİ
TRANSFERİNİN MODEL MEBRANLARDA
İNCELENMESİ**

Mahmut TOPRAK

Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Doç. Dr. Mustafa ARIK
2011

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**FLORESİN İLE MEROSİYANİN 540 MOLEKÜL ÇİFTİ
ARASINDAKİ FLORESANS ENERJİ TRANSFERİNİN MODEL
MEBRANLARDA İNCELENMESİ**

Mahmut TOPRAK

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM
2011

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

Floresin ile Merosiyanin 540 Molekül Çifti Arasındaki Floresans Enerji Transferinin
Model Mebranlarda İncelenmesi

Doç Dr. Mustafa ARIK danışmanlığında, Mahmut TOPRAK tarafından hazırlanan bu çalışma 16/12/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak oybirliği/oy ~~çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Necati MENEK

İmza :

Üye : Prof. Dr. Yavuz ONGANER

İmza :

Üye : Prof. Dr. Neslihan EKİNCİ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mustafa ARIK

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat ALANYALIOĞLU

İmza :

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

FLORESİN İLE MEROSİYANİN 540 MOLEKÜL ÇİFTİ ARASINDAKİ FLORESANS ENERJİ TRANSFERİNİN MODEL MEBRANLARDA İNCELENMESİ

Mahmut TOPRAK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa ARIK

Bu tez çalışmasında floresin ile merosiyanin 540 molekülleri arasındaki etkileşimler, model membran sistemlerde spektroskopi teknikleriyle incelendi. Floresin molekülünün fotofiziksel özellikleri absorpsiyon, durağan hal floresans ve zamana bağlı floresans spektroskopi teknikleriyle belirlendi. Öncelikle fosfolipitlerden lipozomlar ve kesecikler oluşturuldu. Daha sonra ilgili bileşiklerin saf su, lipozom ve kesecik sistemlerindeki çözeltileri ayrı ayrı hazırlandı. Bu bileşiklerin kıyaslama amaçlı olarak saf su içerisindeki fotofiziksel davranışları (absorpsiyon spektrumları, floresans spektrumları, kuantum verimleri ve uyarılma ömürleri) belirlendikten sonra, uygun konsantrasyonlardaki bu iki bileşiğin karışımlarının lipozom ve kesecik içeren çözeltilerdeki absorpsiyon, durağan hal ve zamana bağlı floresans spektroskopi teknikleri ile gerekli ölçümler (floresans anisotropi, rotasyonel difüzyon ve buna bağlı olarak mikroviskozite hesaplamaları) yapıldı. Floresin konsantrasyonu sabit tutulup, merosiyanin 540'ın konsantrasyonu artırıldığında, floresin molekülünün floresans spektrum bandının şiddetinde bir azalma görüldü. Bu da floresin ve merosiyanin 540 bileşikleri arasında bir etkileşimin olduğunu gösterdi. Deneysel sonuçlar floresin ve merosiyanin 540 bileşikleri arasında statik bir kuençleşmenin meydana geldiğini, Van der Waals ve hidrojen bağlarının floresin-merosiyanin 540 etkileşiminde etkin rol oynadığını gösterdi. Stern-Volmer kuençleşme sabiti, bimoleküler kuençleşme sabiti, bağlanma sabiti ve bunlarla ilgili olan termodinamik parametreler hesaplandı. Kuençleşme özelliğinden faydalanarak merosiyanin 540 molekülünün lipozomlardaki ayrışma sabiti hesaplandı. Donör (floresin) ve akseptör (merosiyanin 540) arasındaki mesafe, radyasyonsuz Förster Enerji Transfer teorisine göre belirlendi.

2011, 102 sayfa

Anahtar Kelimeler: Floresin, merosiyanin 540, statik kuençleşme, Förster teorisi

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

AN INVESTIGATION OF FLUORESCENCE ENERGY TRANSFER BETWEEN FLUORESCEIN AND MEROCYANINE 540 IN THE MODEL MEMBRANE SYSTEMS

Mahmut TOPRAK

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Mustafa ARIK

In this study, the interaction between fluorescein and merocyanine 540 was investigated in the model membrane systems using spectroscopic techniques. The photophysical properties of fluorescein were analyzed by using absorption, steady-state fluorescence and time-resolved fluorescence spectroscopy techniques. Firstly, liposomes and vesicles were prepared from phospholipids. Then, the solution of fluorescein and merocyanine 540 were prepared in distilled water, liposomes and vesicles containing solution. After photophysical features (absorption spectra, fluorescence spectra, quantum yields and excited state lifetimes) of the compounds in distilled water were determined, absorption, steady state and time resolved emission studies of the compounds were carried out for the solutions which contain the mixture of fluorescein and merocyanine 540 in liposome and vesicle containing solutions (for the determination of fluorescence anisotropy, rotational diffusion and microviscosity). The fluorescence intensity of fluorescence decreased gradually with the increase in concentration of merocyanine 540, indicating that interaction merocyanine 540 and fluorescein occurred in the system. The experimental results demonstrate that the fluorescence quenching mechanism between fluorescein and merocyanine 540 is a static quenching, and van der Waals force and hydrogen bond are predominant forces in the merocyanine 540 interaction with fluorescein. The Stern-Volmer quenching constant, the bimolecular quenching constant and the binding constant and corresponding thermodynamic parameters were calculated. The quenching property was also used in determining quantitatively the partition coefficient of merocyanine 540 in liposome. The distance between the donor (fluorescein) and the acceptor (merocyanine 540) was calculated according to the Förster non-radiative energy transfer theory.

2011, 102 pages

Keywords: Fluorescein, merocyanine 540, static quenching, Förster theory

TEŞEKKÜR

Doktora Tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarımın her aşamasında desteğini esirgemeyen, bilgi ve birikimlerinden faydalandığım çok değerli tez hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa ARIK'a derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yavuz ONGANER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince ilgili yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Burcu Meryem AYDIN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Kadem MERAL'e, Sayın Uzman Murat ACAR'a ve Sayın Arş. Gör. Ebru BOZKURT'a, Sayın Arş. Gör. Tuğba BAYRAKTUTAN'a, Sayın Bahri GÜR'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında her türlü imkânı sağlayan Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na ve Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Nurullah SARAÇOĐLU'na teşekkür ederim.

Bu tez çalışmam süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli aileme ve eşime teşekkür ederim.

Mahmut TOPRAK

Aralık 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	32
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	45
3.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	45
3.2. Kullanılan alet ve cihazlar.....	45
3.3. Numunelerin hazırlanması.....	46
3.3.1. Stok çözeltilerinin hazırlanması.....	46
3.3.2. Lipozom ve kesecik hazırlama.....	46
3.3.2.a. Lipit hidratasyon metodu.....	46
3.3.2.b. Sonikasyon yöntemi.....	47
3.4. Spektroskopi teknikleri.....	48
3.4.1. UV-VIS Absorpsiyon spektroskopisi.....	48
3.4.2. Floresans spektroskopisi.....	50
3.4.3. Floresans ömürlerin (Lifetime) belirlenmesi.....	50
3.4.4. Geçişli elektron mikroskobu (TEM).....	52
3.5. Kuantum veriminin hesaplanması.....	54
3.6. Floresans anisotropi.....	55
3.10. Rotasyonel difüzyon ve mikrovizkozite.....	57
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	58
4.1. Lipozom ve kesecik çözeltileri karakterizasyonu.....	58
4.1.1. Kesecik çözeltisi karakterizasyonu.....	61
4.2. FL ve MC540 molekül çiftinin lipozom çözeltisindeki etkileşimi.....	67
4.3. FL ve MC540 molekül çiftinin lipozom+kolesterol karışımındaki etkileşimi.....	78

4.4. Enerji transfer parametreleri.....	88
4.5. FL ve MC540 molekül çiftinin kesecik çözeltisindeki etkileşimi.....	89
4.6. FL molekülünün lipozom çözeltisindeki bazı fotozikel özellikleri.....	91
5. SONUÇ	94
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	103

SİMGELER DİZİNİ

FL	Floresin
MC540	Merosiyanin 540
PC	L- α phosphatidylcholine
TEM	Geçişli Elektron Mikroskobu
D	Düzeltilmiş Floresans Spektrumu Altındaki Alan
G	Düzeltilme Faktörü
J	Donör-Akseptör Örtüşme Alanı İntegrali
K	Bağlanma Sabiti
OD	Optik Yoğunluk
k	Boltzmann Sabiti
n	Kırılma İndisi
r	Enerji Transfer Mesafesi
ε	Molar Absorpsiyon Katsayısı
η	Viskozite
τ	Floresans Ömrü
K_p	Ayrışma Oran Sabiti
K_{sv}	Stern-Volmer Hız Sabiti
R_0	Förster Mesafesi
V_{hyd}	Hidrodinamik Hacim
k_{nr}	Radyasyonsuz Geçiş Hız Sabiti
k_r	Radyasyonlu Geçiş Hız Sabit
r_0	Limit Anisotropi
α_m	Lipit Yoğunluğu
τ_{rot}	Rotasyonel Difüzyon Zaman
\emptyset	Kuantum Verimi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Elektromanyetik radyasyonun dalga hareketi.....	1
Şekil 1.2. Jablonski diyagramı.....	3
Şekil 1.3. Bimoleküler deaktivasyon prosesleri.....	7
Şekil 1.4. Dinamik kuençleşmenin temsili gösterimi.....	9
Şekil 1.5. Statik kuençleşmenin temsili gösterimi.....	11
Şekil 1.6. Statik ve dinamik kuençleşmenin sıcaklığa bağlılığı	14
Şekil 1.7. Artan kuençır konsantrasyonuna bağlı olarak floresans ömrü ile floresans şiddetini ilişkisi.....	15
Şekil 1.8. Floroforun aynı kuençır ile statik ve dinamik kuençleşmesi.....	16
Şekil 1.9. Amfifilik molekülün temsili gösterimi.....	21
Şekil 1.10. Fosfolipit tabakasının temsili gösterimi.....	22
Şekil 1.11. Lipozom veya kesecik yapısının genel gösterimi.....	23
Şekil 1.12. Yapılarına göre kesecik şekilleri.....	24
Şekil 1.13. L-egg lecithin phosphatidylcholine molekül yapısı.....	25
Şekil 1.14. Kolesterol molekülünün kimyasal yapısı.....	25
Şekil 1.15. Floresin molekülünün kimyasal yapısı.....	29
Şekil 1.16. Merosiyanin 540 molekülünün kimyasal yapısı.....	30
Şekil 3.1. Lipozom çözeltisi hazırlama yöntemleri.....	48
Şekil 3.2. Bir spektrofotometrenin şematik gösterimi.....	49
Şekil 3.3. Puls tekniğinin şematik gösterimi.....	51
Şekil 3.4. Detektörün veri kaydetmesinin şematik gösterimi.....	52
Şekil 3.5. Geçişli elektron mikroskobu kolonu çalışma prensibi.....	54
Şekil 4.1. MC 540 molekülünün artan lipozom konsantrasyonunda alınmış absorpsiyon (a) ve floresans spektrumları (b).....	59
Şekil 4.2. MC 540 molekülünün su, tampon çözelti (pH=7,4) ve artan kesecik konsantrasyonlarında alınmış absorpsiyon spektrumları.....	60
Şekil 4.3. Floresin molekülünün artan lipozom konsantrasyonlarında alınmış floresans spektrumları.....	61
Şekil 4.4. Kesecik çözeltisi için TEM görüntüleri.....	62

Şekil 4.5. MC 540 molekülünün su, tampon çözelti (pH=7,4) ve artan kesecik konsantrasyonlarında alınmış floresans spektrumları	63
Şekil 4.6. MC 540 molekülünün değişen kolesterol miktarındaki absorpsiyon spektrumu.....	64
Şekil 4.7. MC 540 molekülünün değişen kolesterol miktarında alınmış floresans spektrumları.....	65
Şekil 4.8. Floresin molekülünün değişen kolesterol miktarındaki absorpsiyon spektrumları.....	66
Şekil 4.9. Floresin molekülünün değişen kolesterol miktarında alınmış floresans spektrumları.....	66
Şekil 4.10. 150 µM'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında 1,0 µM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları.....	67
Şekil 4.11. 150 µM'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında 1,0 µM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarına karşı çizilmiş Stern- Volmer grafiği.....	68
Şekil 4.12. 150 µM'lık lipozom içeren sulu ortamda FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.....	69
Şekil 4.13. 150 µM'lık lipozom içeren sulu ortamda FL-MC 540 etkileşimi için bağlanma sabiti grafiği.....	70
Şekil 4.14. 65 µM'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında 1,0 µM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları.....	72
Şekil 4.15. 80 µM'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında 1,0 µM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları.....	72
Şekil 4.16. 105 µM'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında 1,0 µM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları.....	73
Şekil 4.17. 120 µM'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında 1,0 µM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları.....	73
Şekil 4.18. 65 µM'lık lipozom içeren sulu ortamda FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.....	74
Şekil 4.19. 80 µM'lık lipozom içeren sulu ortamda FL molekülünün Floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.....	75
Şekil 4.20. 105 µM'lık lipozom içeren sulu ortamda FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.....	75

Şekil 4.21. 120 μM 'lık lipozom içeren sulu ortamda FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.....	76
Şekil 4.22. MC540 molekülünün değişik lipozom konsantrasyonları için $1/k_{app}$ karşı α_m grafiği.....	77
Şekil 4.23. 105 μM lipozom + 10,5 μM kolesterol içeren sulu çözeltide 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları.....	79
Şekil 4.24. 105 μM lipozom + 21 μM kolesterol içeren sulu çözeltide 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları.....	79
Şekil 4.25. 105 μM lipozom + 31,5 μM kolesterol içeren sulu çözeltide 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları.....	80
Şekil 4.26. 105 μM lipozom + 10,5 μM kolesterol içeren sulu çözeltide FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.....	81
Şekil 4.27. 105 μM lipozom + 21 μM kolesterol içeren sulu çözeltide FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.....	81
Şekil 4.28. 105 μM lipozom + 31,5 μM kolesterol içeren sulu çözeltide FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.....	82
Şekil 4.29. (a) 105 μM lipozom + 10,5 μM kolesterol içeren sulu çözeltide ortamında 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarına karşı çizilmiş Stern-Volmer grafiği	83
Şekil 4.30. (a) 105 μM lipozom + 21 μM kolesterol içeren sulu çözeltide ortamında 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarına karşı çizilmiş Stern- Volmer grafiği.....	83
Şekil 4.31. 105 μM lipozom + 31,5 μM kolesterol içeren sulu çözelti ortamında 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarına karşı çizilmiş Stern-Volmer grafiği.....	84
Şekil 4.32. 105 μM lipozom + 10,5 μM kolesterol içeren sulu çözelti ortamında FL-MC 540 etkileşimi için bağlanma sabiti grafiği.....	85

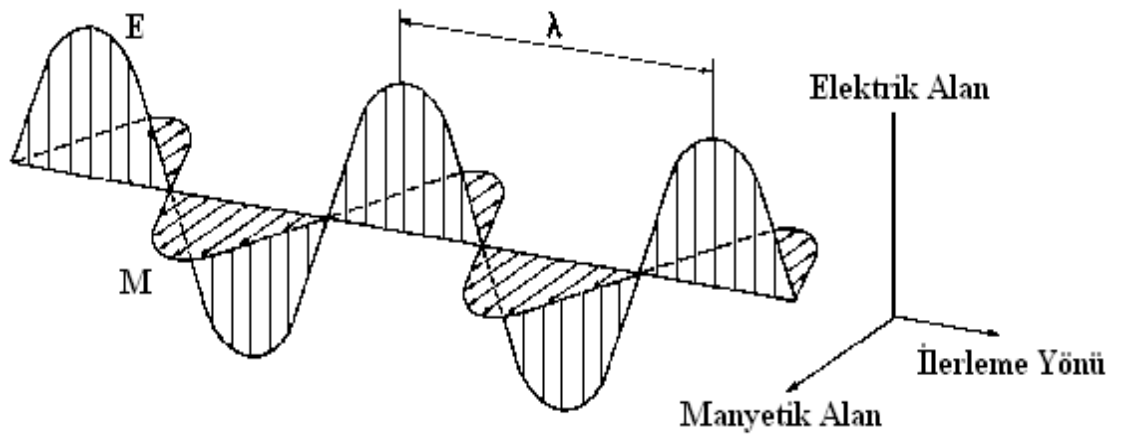
Şekil 4.33. 105 μ M lipozom + 21 μ M kolesterol içeren sulu çözelti ortamında FL-MC 540 etkileşimi için bağlanma sabiti grafiği.....	85
Şekil 4.34. 105 μ M lipozom + 31,5 μ M kolesterol içeren sulu çözelti ortamında FL-MC 540 etkileşimi için bağlanma sabiti grafiği.....	86
Şekil 4.35. 150 μ M lipozom içeren sulu ortamda Floresin ile MC540 molekül çiftlerinin spektral örtüşmesi.....	88
Şekil 4.36. 150 μ M'lık Kesecik içeren sulu çözelti ortamında 0,1 μ M FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları.	90
Şekil 4.37. FL molekülünün değişik lipozom konsantrasyonlarında alınmış floresans durulma spekturumları.....	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Denklemler, hız ifadeleri ve hız sabitleri.....	6
Çizelge 4.1. 150 μM 'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamda FL -MC 540 etkileşimi için değişik sıcaklıklardaki bağlanma ve termodinamik parametreleri ile Stern-Volmer sabitleri.....	71
Çizelge 4.2. Bimoleküler kuençleşme (k_q), mebrandaki bimoleküler kuençleşme (k_{qm}) ve ayrışma (K_p) sabitleri.....	78
Çizelge 4.3. FL -MC 540 etkileşimi için Stern-Volmer sabitleri ile bağlanma ve termodinamik parametreler.....	87
Çizelge 4.4. Floresin-MC540 molekül çifti için hesaplanan enerji transfer parametreleri.....	89
Çizelge 4.5. Değişik lipozom konsantrasyonu içeren sulu ortamda FL molekülünün bazı fotofiziksel özellikleri.....	92
Çizelge 4.6. FL molekülünün değişik lipozom konsantrasyonlarındaki rotasyonel difüzyon ve mikroviskozite değerleri.....	93

1.GİRİŞ

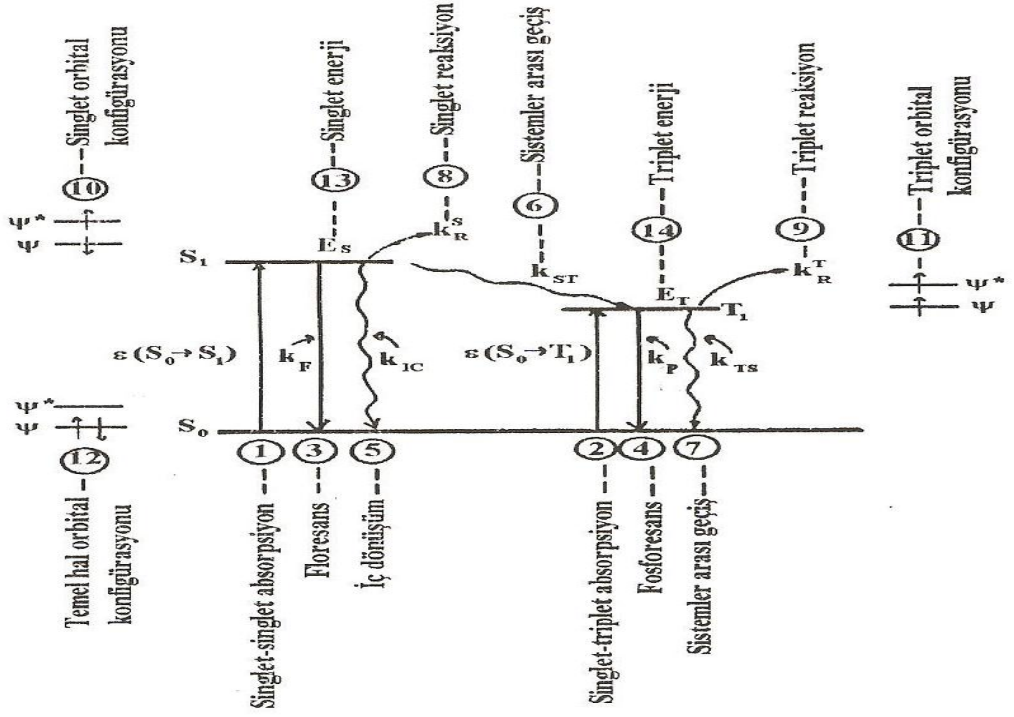
Moleküllerin birbirleriyle olan etkileşimlerini incelemek için elektromanyetik radyasyon kullanılabilir. Elektromanyetik radyasyonun bir molekül veya atom ile etkileşmesi, o molekülün veya atomun öteleme, dönme, titreşim ve elektronik uyarılmış hallerinin oluşmasına neden olur. Elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşmesini inceleyen bilim dalına spektroskopi denir. Spektroskopinin temelinde ışık ile madde etkileşimi olduğu için ışığın yapısının bilinmesi gerekir. Elektromanyetik radyasyon veya ışık, belli bir enerjiye sahip olup sinüzoidal dalgalar şeklinde hareket etmektedir(Skoog *et al.* 1992). Elektromanyetik radyasyonun sadece dalga özelliği olmayıp aynı zamanda tanecik özelliğine de sahip olduğu, ilk olarak Planck'ın siyah cisim ışıması daha sonra Einstein'ın fotoelektrik olayıyla da desteklenmiştir. Bu olaylarla ışığın, dalga ve tanecik özelliğine sahip olduğu kabul edilmiştir(McQuarrie and Donald 1983). Şekil 1.1'de gösterildiği gibi elektromanyetik radyasyon birbirlerine dik elektrik alan ve manyetik alan vektörlerinden oluşmaktadır. Elektromanyetik radyasyonun bileşenlerinden herhangi birinin iki tepe noktası arasındaki mesafeye dalga boyu, elektrik alan vektörlerinin en büyüğüne ise dalganın genliği denilmektedir(Skoog *et al.* 1992).



Şekil 1.1. Elektromanyetik radyasyonun dalga hareketi

Moleküllerin fotofiziksel ve fotokimyasal prosesleri, ışık ve maddenin etkileşmesi sonucunda gerçekleşir. Bu prosesler genellikle moleküllerin elektronik uyarılmış hallerinden meydana gelir. Işığın elektrik alan vektörü ile molekülün dipol momenti örtüşmesi sonucunda, o molekül uyarılmış hale geçer. Yani temel elektronik enerji seviyesinde bulunan valans elektronları molekülün temel haline göre daha fazla enerjiye sahip bir üst elektronik enerji seviyesine çıkar. Elektronik enerji seviyelerinin her biri titreşimsel enerji seviyelerine sahip olduğu için absorpsiyon spektrumlarının yapısı farklı titreşim enerji seviyelerine olan elektronik geçişlerin hepsini içermektedir.

Elektromanyetik radyasyonun absorpsiyonu sonucu uyarılmış halde bulunan molekülün kararlı hal olan temel hale geçmesi için mümkün olan iki tane fotofiziksel yol vardır. Birincisi, ışımsız bir geçiş olup sistem almış olduğu enerjiyi moleküller arası çarpışmalar sonucunda çevresine ısı olarak verebilir. Ancak bu ısı sistemin sıcaklığını arttıracak kadar olmayıp, sadece moleküllerin kinetik enerjilerini arttıracak kadardır. İkincisi floresans ve fosferasans olarak bilinen, uyarılma enerjisini dışarı ışımali bir şekilde salınımı olan luminesans olayıdır. Işımalı olayların türünü temel ve uyarılmış haldeki elektronik enerji geçişleri belirlemektedir. Floresans singlet uyarılmış halden singlet temel hale, fosferasans ise triplet uyarılmış halden singlet temel hale olan geçişlerdir. Moleküllerin elektromanyetik radyasyonu absorpsiyonu sonucunda meydana gelecek fotofiziksel prosesler A. Jablonski tarafından önerilen diyagram ile Şekil 1.2'de verilmiştir (Turro 1982).



Şekil 1.2. Jablonski diyagramı

Absorpsiyon, singlet temel halden (S_0) singlet uyarılmış hale (S_1) olan elektronik bir geçiştir (1). Bu olay yaklaşık 10^{-15} s gibi kısa bir zaman diliminde gerçekleşmektedir. Absorpsiyon,



Denklemlle ifade edilebilir. Burada S_0 singlet temel hali, S_1 birinci singlet uyarılmış hali ve $h\nu$ ise uyarılma enerjisini temsil etmektedir. Deneysel olarak $\epsilon_0(S_0 \rightarrow S_1)$ şeklinde ifade edilebilir. Burada ϵ , molar absorpsiyon katsayısı olup, elektronik geçişin şiddeti hakkında bilgi veren fotofiziksel bir parametredir. Bu olay elektronun spini bakımından müsaade edilen bir geçiştir. Singlet temel halden triplet uyarılmış hale olan elektronik geçiş ise fotofiziksel olarak yasaklı bir geçiştir ve ihtimali çok düşüktür (2). Sistem triplet uyarılmış hale ancak singlet uyarılmış halden geçiş yapabilir.

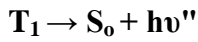
Franck-Condon prensibine göre absorpsiyon çok hızlı gerçekleştiği için bu süre içerisinde çekirdeğin yer değiştirmesi önemsenmeyecek kadar küçük olduğundan, molekülün temel halinin geometrik yapısı ile uyarılmış halin geometrik yapısı hemen hemen aynıdır (Atkins1998).

Floresans: Bu olay müsaade edilen bir elektronik geçiş basamağı olup, sistem singlet uyarılmış halden singlet temel hale geçmektedir (3). Bu olay ışımalı bir şekilde gerçekleşir ve aşağıdaki denklemle ifade edilebilir;



Floresans olayı 10^{-8} s veya 10^{-9} s gibi kısa bir sürede meydana gelmektedir. Burada $h\nu'$ uyarılmış halde bulunan sisteminsinglet temel hale dönerken dışarıya ışımaya olarak verdiği enerjidir. Bu enerjinin büyüklüğü aynı sistemi uyarmak için kullanılan uyarılma enerjisinden küçüktür. Ancak bu iki enerjinin birbirine eşit olduğu durumlarda söz konusudur. Böyle bir durumda sistem aldığı enerjiyi hiçbir kayıp olmaksızın geri ışımaya yaparak verir. Bu tür floresans ışımaya Rezonans Floresans denilmektedir.

Fosforesans: Sistem triplet uyarılmış halden singlet temel hale ışımalı bir şekilde geçiş yapmaktadır (4). Fosforesans olayında elektronun spin değişimi söz konusu olduğu için bu geçiş fotofiziksel olarak spin bakımından yasaklı bir geçiştir ve aşağıdaki denklemle ifade edilebilir.



Fosforesans 10^{-6} ile 1 saniyelik zaman aralığında meydana gelir. Burada $h\nu''$ uyarılmış halde bulunan sisteminsinglet temel hale dönerken dışarıya ışımaya olarak verdiği enerjidir. Bu enerji uyarılma ve floresans enerjilerinden küçüktür. Genel bir enerji sıralaması yapılırsa $h\nu'' < h\nu' < h\nu$ şeklinde olur. Uyarılmış triplet hali, genellikle uyarılmış singlet halinden meydana gelmektedir.

İç Dönüşüm: Sistem singlet uyarılmış halden singlet temel hale ışımasız bir şekilde geçiş yapar (5). Genelde aynı tür uyarılmış elektronik enerji seviyelerinin, titreşim enerji seviyeleri arasında meydana gelmektedir ($S_2 \rightarrow S_1$). Bu olay aşağıdaki denklemle ifade edilebilir.



Bu proseste sistem enerjisini moleküller arası çarpışmalarla çevresine ısı olarak yayar. Ancak bu ısı, sistemin sıcaklığını arttıracak kadar olmayıp moleküllerin kinetik enerjisini arttıracak kadardır. İç dönüşüm olayı yaklaşık 10^{-12} saniyelik bir zaman aralığında gerçekleşir. Uyarılmış elektronik enerji seviyelerinin titreşimsel enerji seviyeleri birbirleriyle çakışması durumunda iç dönüşüm olayı gerçekleşir.

Sistemler arası geçiş (6, 7): Bu proses singlet uyarılmış halden triplet uyarılmış hale olabileceği gibi triplet uyarılmış halden singlet temel hale de olabilir. Bu geçişler spin bakımından yasaklanmış geçişlerdir. Çünkü elektronun spini değişmektedir. Bu tür geçişin olabilmesi için, uyarılmış singlet halin titreşimsel enerji seviyelerinin uyarılmış triplet halin titreşimsel enerji seviyeleri ile çakışması gerekmektedir. Bu proses ışımasız olarak gerçekleşen elektronik geçiş türüdür. Molekülün yapısında bulunan paramanyetik türler ve ağır atomlar bu geçiş türünü desteklemektedir. Bu geçiş türleri aşağıdaki gibi ifade edilebilir.



Triplet uyarılmış halden singlet temel hale olan geçişlerde, sistem genellikle ışımalı elektronik geçiş olan fosforesans'ı tercih edecektir. Ayrıca sistem singlet veya triplet uyarılmış halde iken bir reaksiyona uğrayarak başka bir yapıda temel hale dönüşebilir. Bu olay fotokimyasal bir olaydır (8, 9). Zaman bakımından sistemler arası geçiş 10^{-10} - 10^{-8} saniye aralığında gerçekleşir (Lakowicz 1983).

Yukarıda özetlemeye çalıştığımız proseslerin, denklemleri, hız ifadeleri ve hız sabitleri aşağıdaki Çizelge1.1’de verilmiştir.

Çizelge1.1.Fotofiziksel denklemler, hız ifadeleri ve hız sabitleri.

Proses	Reaksiyon	Hız (r)	Hız Sabiti (k/s ⁻¹)
Uyarılma	$S_0 + h\nu \rightarrow S_1$ I_a	10^{15}	
Floresans	$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ $k_f[S_1]$	10^6-10^9	
İç Dönüşüm	$S_1 \rightarrow S_0 + ısı$ $k_{ic}[S_1]$	10^7-10^{12}	
Fosferasans	$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$	$k_p[T_1]$	$10^{-2}-10^3$
Sistemler arası geçiş	$S_1 \rightarrow T_1$	$k_{ST}[S_1]$	10^8-10^{11}
	$T_1 \rightarrow S_0 + ısı$	$k_{TS}[T_1]$	$10^{-2}-10^3$

Uyarılmış halde bulunan molekülün deaktivasyon prosesleri fotofiziksel veya fotokimyasal olarak gerçekleşebilir. Bu da molekül içi hareketler veya moleküller arası etkileşimlerin gerçekleşmesine sebep olabilir. Yukarıdaki çizelgede her bir proses bir hız sabitiyle karakterize edilmiştir. Deaktivasyon prosesinin ömrü bilinirse, ilgilenilen sisteme ait hız sabitleri hesaplanabilir (Arık 1999). Deaktivasyon prosesinin ömrü ile gerçekleşen proseslerin hız sabitleri arasında ters orantı vardır. Bu durum aşağıdaki gibi gösterilebilir.

$$\tau = \frac{1}{\sum_n k_n} \quad 1.1$$

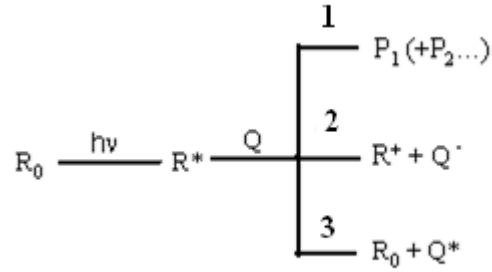
Burada k_n , n tane deaktivasyon proseslerinin hız sabitlerini göstermektedir. τ ise uyarılma ömrünü ifade etmektedir. Bu ifade aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$\tau_f = \frac{1}{k_{nr} + k_r} \quad 1.2$$

Burada sırasıyla k_{nr} ve k_r , radyasyonsuz ve radyasyonlu geçiş hız sabitleridir. Uyarılma ömrü ile kuantum verimi (ϕ_f) arasında da bir ilişki bulunmaktadır. Bu ilişki aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$\tau_f = \frac{\phi_f}{k_r} \quad 1.3$$

Yukarıda da söylediğimiz gibi uyarılmış haldeki sistemin deaktivasyonu, fotofiziksel proseslerin yanı sıra fotokimyasal proseslerde sebep olmaktadır. Buda molekül içi hareketler (monomoleküler) veya moleküller arası etkileşimlerin (bimoleküler) gerçekleşmesine bağlıdır. Bimoleküler etkileşmelerde temel halde bulunan R_0 molekülü $h\nu$ enerjisiyle uyarıldıktan sonra oluşan R^* 'in haricinde, onunla etkileşecek bir Q molekülünün olduğu kabul edilir. Bimoleküler olarak gerçekleşen prosesler temsili olarak Şekil 1.3'te verilmiştir (Kopecky 1992).



Şekil 1.3. Bimoleküler deaktivasyon prosesleri

Bimoleküler etkileşmelerde R^* molekülü herhangi bir Q molekülünün varlığında fotokimyasal reaksiyonla ürüne veya ürünlere dönüşebilir (1). Diğer bir deaktivasyon prosesinde ise uyarılmış haldeki R^* molekülü ortamda bulunan Q molekülüne elektron vererek R^+ ve Q^- hallerinin oluşmasına sebep olabilir (2).

Bimoleküler etkileşmelerde diğer bir deaktivasyon prosesinde, elektronik olarak uyarılmış halde bulunan R^* molekülü, uyarılma enerjisini temel halde bulunan Q

molekülüne vererek enerji yükünü azaltır ve kendi ışımsız olarak temel hale geçerken Q molekülünün uyarılmasına neden olacaktır(3).

Sonuç olarak transfer olan enerji ışımaya şeklinde olmayacaktır. Yukarıdaki proseste olduğu gibi uyarılma enerjisinin bir başka moleküle transfer edilmesiyle ilgili molekülün radyasyonsuz bir şekilde temel hale geçme olayını söndürme “kuençleşme” olayı veya sensitizasyon denilmektedir. Buna neden olan moleküle ise “söndürücü” (kuençır) veya sensitizer adı verilir. Kuençleşme olayında radyasyonsuz enerji transferi meydana gelmektedir.

Kuençleşme biyokimyasal problemlerde son yıllarda etkin bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Kuençleşme olayları, miktarı az olan, bozulmayan, katkılı veya katkısız floresans problemleri içeren numunelerde kolaylıkla gerçekleşebilir ve bu reaksiyonlardan son derece önemli bilgilerde elde edilebilir.

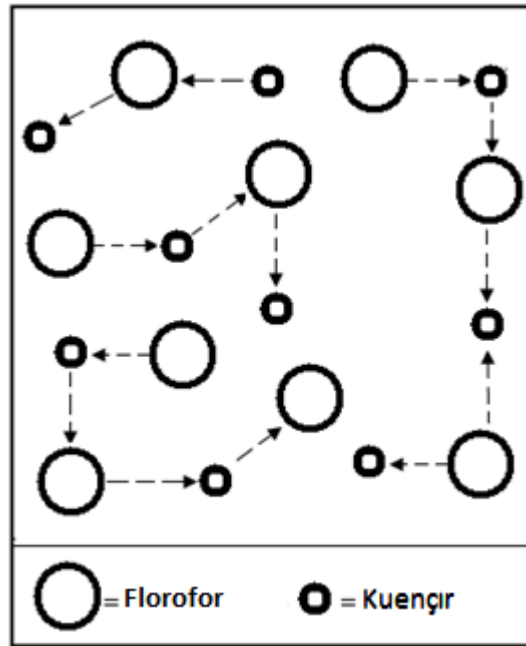
Örneğin floresans moleküllerinin kuençleşmesi, çözelti içindeki serbest moleküllerin yapısı üzerinde kullanışlı bilgiler vermektedir. Son zamanlarda bu teknik kullanılarak misel ve lipit sistemler üzerinde, moleküllerin bir araya gelip birleşmesi sonucunda, bu sistemlerin dinamik ve yapısal özellikleri hakkında bilgi elde edilmektedir. Floresans kuençleşme lipozom ve biyolojik membranların yüzeylerinde bulunan spesifik problemlerin yerlerini belirlemek için kullanılmaktadır. Ayrıca floresans kuençleşme tekniğiyle, membran üzerinde bulunan maddelerin bileşen oranlarının belirlenmesi mümkündür (Blatt *et al.* 1986; Valuer 2001; De Castro *et al.* 2002).

Bimoleküler kuençleşme olayında iki molekül arasındaki etkileşim temel esastır. Bu moleküller arasında difüzyon sonucu çarpışmalar ve bu çarpışmalar sonucunda moleküller arasında bir foton absorpsiyonu meydana gelebileceği gibi bu iki molekülün teması sonucunda karanlık bir kompleks de oluşabilir. Şayet moleküllerden biri uyarılmış hale geçerken, diğer molekül temel hale ışımsız bir şekilde dönerse bu olaya dinamik kuençleşme denilmektedir.

Dinamik kuenleşmede uyarılmış halin ömrü sırasında florofor kuençır'a difüzlenmektedir. Statik kuenleşmede ise florofor ile kuençır moleküllerinin temasıyla floresans özelliği taşımayan karanlık bir kompleks oluşur (Lakowicz 1983).

Her iki kuenleşme türünde de florofor ile kuençırın teması gerektiği için bu durum iki model ile açıklanabilmektedir. Birincisi statik kuenleşme için ileri sürülen Perrin modeli, diğeri ise dinamik kuenleşme için önerilen Stern-Volmer modelidir (Suppan 1994).

Dinamik kuenleşmede florofor ile kuençırın rastgele hareketleriesnasında bir birleriyle temas etmeleri gerekir. Şekil 1.4'te temsili olarak dinamik kuenleşmenin oluşum şekli gösterilmiştir. Florofor ile kuençırın çarpışmaları rastgele olmaktadır.



Şekil 1.4. Dinamik kuenleşmenin temsili gösterimi

Bu tür kuenleşme durumunda reaksiyon, türlerin çarpışma ihtimali ile orantılı olmalıdır. Dinamik ve statik kuenleşme için Stern-Volmer denklemi aşağıdaki gibidir.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad 1.4$$

Burada I_0 ve I sırasıyla, ortamda kuençir yokluğunda ve varlığındaki floroforun emisyon şiddeti; k_q bimoleküler kuençleşme hız sabiti; τ_0 kuençirin olmadığı andaki floroforun uyarılmış halde harcadığı ömür veya floresans ömrüdür. Q kuençir konsantrasyonu, K_{sv} ise Stern-Volmer sabitidir.

Stern-Volmer denklemi değişik yollarla türetilebilir. Floresans ölçümleri kuantum verimleri ile orantılı olduğundan

$$I \approx Q_f \quad 1.5$$

$$I_0 \approx Q_f^0 = \frac{k_0}{\sum k} \quad 1.6$$

Kuençir varlığında kuantum verimi

$$Q_f^q = \frac{k_0}{\sum k + k_q [Q]} \quad 1.7$$

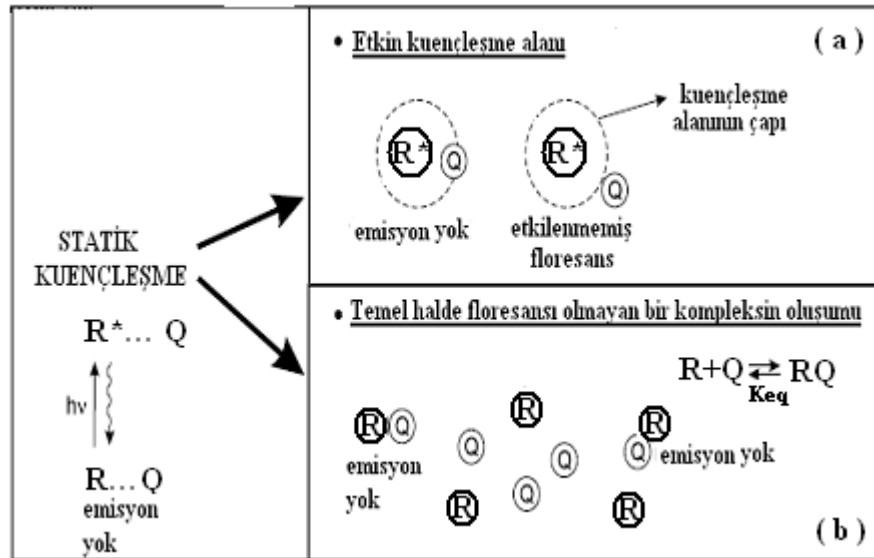
Kuençir olmadığı ve kuençirin olduğu durumların floresans şiddetlerini aşağıdaki gibi birbirine oranlarsak,

$$\frac{I_0}{I} = \frac{Q_f^0}{Q_f^q} = \frac{\sum k + k_q [Q]}{\sum k} = 1 + \frac{k_q [Q]}{\sum k} \quad 1.8$$

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad 1.9$$

olacak şekilde Stern-Volmer denklemi türetilbilir (Çelebi 1998).

Bir diğer kuençleşme türü olan statik kuençleşmede ise moleküllerin etkin bir hacim içerisinde oldukları düşünülmüş ve ilk olarak Perrin modeli ile açıklanmıştır. Bu modele göre bir polimer veya cam gibi rijit bir sistemde, uyarılmış molekül etkin kuençleşme alanına giren kuençir ile emisyonu olmayan bir kompleks oluşturmalıdır. Bu modelde uyarılmış halde R^* molekülü olmalı ve bu molekül merkez olacak şekilde, merkeze belli bir mesafe ile sınırlanan etkin hacim içerisinde Q molekülü varlığıyla ifade edilmiştir. Eğer bu etkin hacim içerisinde Q molekülü varsa R^* molekülü ile kuençleşir. Şayet bu etkin hacim içerisinde Q molekülü yoksa bir kuençleşme meydana gelmez ve R^* molekülü emisyon yaparak R molekülüne dönüşür. Bu model Şekil 1.5'in a kısmında gösterilmiştir (Valuer 2001).



Şekil 1.5. Statik kuençleşmenin temsili gösterimi

Statik kuençleşme için düşünülen diğer mekanizmada, florofor molekülü (R) ile kuençir (Q) molekülü arasında floresans özelliği olmayan, temel halde bir kompleks oluşur. Bu kompleks yapı, direkt olarak ışığı absorplar ve bir foton emisyonu yapmaksızın temel hale döner. Kompleks oluşturmayan diğer R

molekülleri, uyarıldıktan sonra radyasyonlu bir şekilde temel hale döner. Bu model Şekil 1.5'in b kısmında gösterilmiştir ve mekanizma aşağıdaki denklemlerle ifade edilebilir.

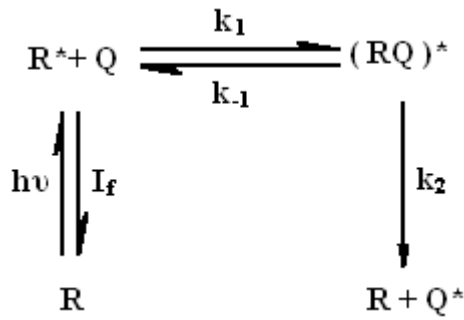
$$K_{eq} = \frac{[RQ]}{[R].[Q]} \quad 1.10$$

$$\frac{I_0}{I} = \frac{[RQ]+[R]}{[R]} = \frac{[RQ]}{[R]} + 1 \quad 1.11$$

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{eq}[Q] \quad 1.12$$

Statik ve dinamik kuençleşme, üç farklı yöntem ile birbirinden ayırt edilebilir. Bu yöntemler viskozite, sıcaklık ve özellikle yaşam ömrü ölçümleridir. Ayrıca absorpsiyon spektrumunda kuençleşmenin mekanizması ile ilgili bilgi verebilir.

Viskoziteye bağlı olarak kuençleşme mekanizmasının belirlenmesi aşağıdaki mekanizmaya göre tartışılabilir.



Uyarılmış halde bulunan R^* molekülü kuençir (Q) molekülü ile çarpışarak hız sabiti k_1 olan bir kompleks oluşturabilir. Bu oluşan kompleks, reaksiyonun ilerleme yönüne değil de tersine giderek k_{-1} hız sabitiyle reaktantlara dönüşebilir. Yada k_2 hız sabitiyle kuençleşmeye uğrayabilir. Bu durumda;

$$k_q = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1}} + k_2 \quad 1.13$$

olacaktır. Düşük viskoziteye sahip çözücülerde reaksiyon hız sabitleri arasındaki ilişki $k_{-1} \gg k_2$ olacağından, k_q yaklaşık olarak aşağıdaki gibi olur.

$$k_q = k_1 \left(\frac{k_2}{k_{-1}} \right) \quad 1.14$$

Sonuç olarak hız sabiti k_2/k_{-1} oranına bağlıdır. Ayrıca bu oran k_1 hız sabitinden küçük olduğunda reaksiyonun aktivasyon kontrollü olacağı görülmektedir. Çözücü değiştirilerek yada hidrostatik basınç artırılarak viskozite arttırıldığında reaksiyon hız sabitleri arasındaki ilişki $k_{-1} \ll k_2$ şeklinde olacaktır ve k_q aşağıdaki gibi olur.

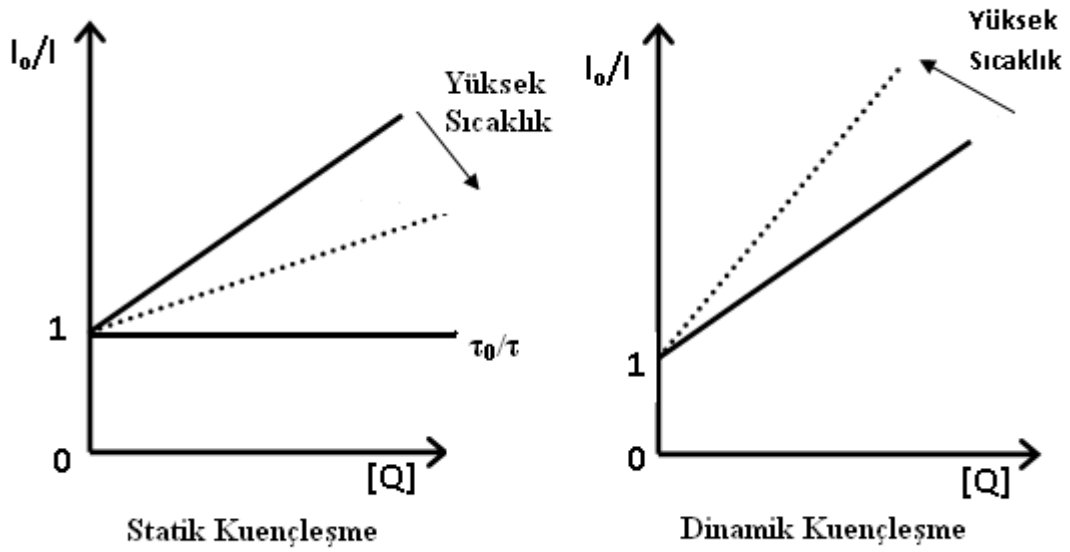
$$k_q = k_1 = k_{diff} \quad 1.15$$

Reaksiyon hız denklemleri göz önüne alındığında düşük viskozite ortamında, viskozite değerindeki az bir artışla, geri reaksiyon hız sabitinde önemli bir azalmaya sebep olur ve benzer şekilde viskozite değerinin azalmasıyla k_q azalacaktır.

Yüksek viskozite değerlerinde ise $k_{-1} \ll k_2$ olduğundan denklemde de görüldüğü gibi reaksiyon hız sabiti k_1 ' e eşit olacaktır. Sonuçta kuençleşme reaksiyonu difüzyon kontrollü (Dinamik kuençleşme) olacaktır.

Kuençleşme mekanizması sıcaklığa bağlı olarak da ayırt edilebilir. Difüzyona bağlı kuençleşmede (dinamik kuençleşme) sıcaklık arttıkça difüzyon katsayısının artmasından dolayı, bimoleküler kuençleşme sabitleri artarken diğer kuençleşme türü olan statik kuençleşmede, sıcaklık artışıyla kompleksin stabilitesi azalacağı için kuençleşme sabitinin değeri düşecektir (Lakowicz 1983; Toprak et al. 2011).

Farklı sıcaklıklarda yapılan floresans şiddeti ölçümleri Stern-Volmer eşitliğine göre grafik edilirse dinamik kuençleşmede sıcaklığın artmasıyla eğim artarken, statik kuençleşmede ise eğim azalacaktır. Şekil 1.6'da sıcaklığa bağlı olarak Stern-Volmer eğrisinde meydana gelen eğim değişimi temsili olarak gösterilmiştir (Suppan and Ghoneim 1998).



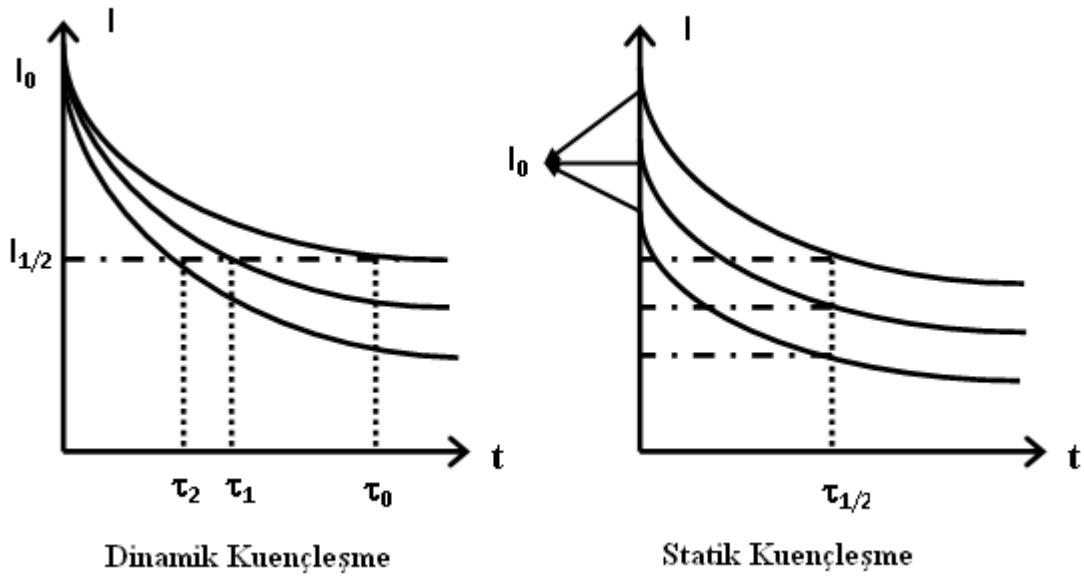
Şekil 1.6. Statik ve dinamik kuençleşmenin sıcaklığa bağlılığı

Statik ve dinamik kuençleşme mekanizmasını ayırt etmede floroforun absorpsiyon spektrumunda kullanılmaktadır. Bu yöntemde floroforun absorpsiyon spektrumunun değişimi esastır. Dinamik kuençleşme sadece floroforun uyarılmış halleri etkilendiği için floroforun absorpsiyon spektrumunda değişim beklenmez. Buna karşılık statik kuençleşmede temel halde bir kompleksleşme meydana gelmektedir. Bu yüzden floroforun absorpsiyon spektrumunda bir değişim gözlemlenecektir (Lakowicz 1983).

Kuençleşme mekanizmasını en etkin bir şekilde ayırt etme yöntemi, floresans ömür ölçümleridir. Kuençür konsantrasyonu ile floroforun floresans şiddetinin azalması

arasındaki ilişki, statik ve dinamik kuençleşme mekanizmalarını ayırt etmek için kullanılabilir. Statik kuençleşmede kuençirkonsantrasyonu artışıyla emisyon şiddeti azalır fakat uyarılmış hal ömrü değişmez. Bunun sebebi florofor ile kuençirin birleşmesi sonucu oluşan kompleksin floresans özelliği taşıması ve gözlenen floresansın sadece kompleks oluşturmamış floroforlardan kaynaklanmasıdır. Yani $\tau_0 / \tau = 1$ 'dir.

Dinamik kuençleşmede kuençir konsantrasyonu artışı ile başlangıç emisyon şiddeti sabit kalır. Ancak floroforun floresans ömrü azalır. Bu yüzden dinamik kuençleşmede $\tau_0 / \tau = I_0 / I$ olacaktır (Lakowicz 1983).

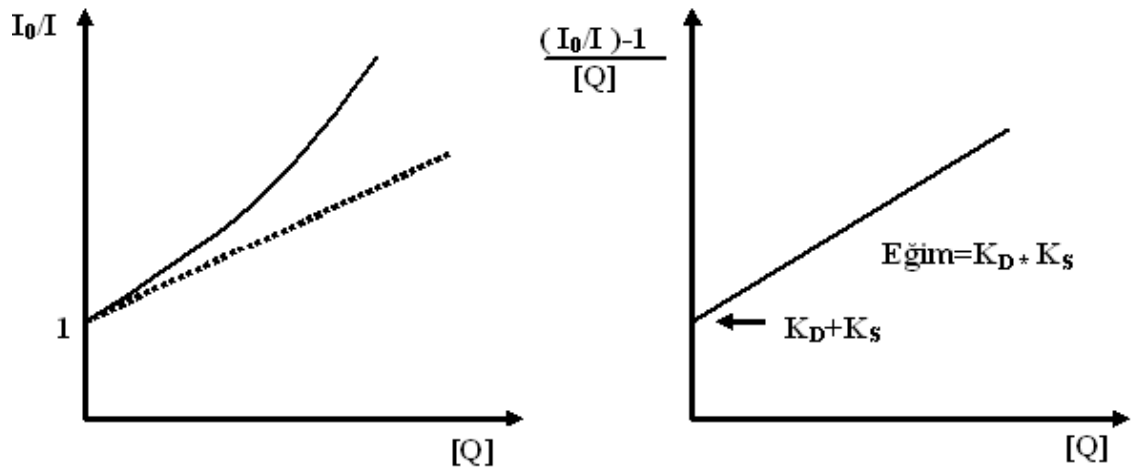


Şekil 1.7. Artan kuençir konsantrasyonuna bağlı olarak floresans ömrü ile floresans şiddetinin ilişkisi

Şekil 1.7 incelendiğinde, dinamik ve statik kuençleşmede emisyon şiddeti belli bir noktadan başlamış, dinamik kuençleşmede şiddet değişmezken, statik kuençleşmede emisyon şiddeti azalmıştır. Ancak bu azalma floroforun uyarılma ömrünü fazla etkilememiştir. Floroforun uyarılma ömrü spektrumun şiddetinden değil eğiminden hesaplanmaktadır (Lakowicz 1983).

Bazı durumlarda hem statik hem de dinamik kuençleşme aynı anda olabilir. Bu gibi durumlarda floroforlar, kuençır ile hem çarpışma hem de kompleks oluşturarak kuençleşme meydana getirmektedir. Sonuçta Stern-Volmer eğrisi yukarıya doğru içbükey bir eğri oluşturur (Şekil 1.8). Aynı anda oluşan dinamik ve statik kuençleşme için modifiye edilmiş Stern-Volmer denklemi denklem 1.16'da verilmiştir (Lakowicz 1983).

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_D[Q])(1 + K_S[Q]) \quad 1.16$$



Şekil 1.8. Floroforun aynı kuençırarla statik ve dinamik kuençleşmesi

Statik ve dinamik kuençleşme, moleküller arasındaki etkileşim sonucunda meydana gelmektedir. Kuençleşme bir tür enerji transferidir ve etkin bir enerji transferinin olabilmesi için bu moleküllerin belli bir mesafeye gelmeleri gerekmektedir. Bu yüzden donör ve akseptör arası mesafe oldukça önemlidir. Enerji transferinin olabilmesi için donör ile akseptör arasındaki mesafenin genel olarak 10 nm'den daha küçük olması gerekmektedir.

Enerji transfer oranı donör-akseptör arasındaki mesafeye bağlıdır. Bu mesafenin ölçülmesi enerji transfer prosesleri hakkında da bilgi verebilmektedir. Donör-akseptör çifti arasındaki uzaklık, donör-akseptör çiftinin difüzyon oranı veya en yakın uzaklığın tahmini için belirleyici olabilmektedir.

Kuenceleşme olaylarında gerçekleşen enerji aktarımının belirlenmesinde Förster eşitliğinden yararlanır. Enerji aktarımının olabilmesi için donör molekülünün emisyon spektrumu ile akseptör molekülünün absorpsiyon spektrumunun kısmi olarak çakışması gerekmektedir. Bu çakışma alanına overlap bölgesi denilmektedir (Lakowicz 2002). Aşağıdaki denklemle Förster mesafesi hesaplanabilir.

$$R_0^6 = 8,875 \times 10^{-25} \times k^2 \times n^{-4} \times Q_d \times J \quad 1.17$$

Bu denklemde; R_0 , Förster mesafesidir. Förster mesafesi, enerji transferinin %50'sinin meydana geldiği anda donör ve akseptör molekülleri arasındaki mesafe olarak tanımlanmaktadır (donör ve akseptör molekülleri arasındaki karakteristik uzaklık). k^2 , donör ve akseptör moleküllerinin geçiş dipollarının göreceli olarak yönelmesini ifade eden bir faktör olup genelde 2/3 olarak alınır; n , ortamın kırılma indisi; Q_d , ortamda akseptör molekülünün bulunmadığı anda donör molekülünün kuantum verimi; J , donör molekülünün emisyon spektrumu ile akseptör molekülünün absorpsiyon spektrumunun üst üste çakışma derecesini gösteren overlap (örtüşme alanı) integralidir. Dalga boyu teorisi üzerinden alternatif bir biçimde yazılabilir ve birimi $M^{-1} cm^3$ 'dür.

Kuenceleşme olayında önemli parametrelerden biri de enerji transfer verimliliğidir (E). Bu da akseptöre transfer olan fotonların, donör tarafından absorplanan fotonlara oranıdır (Lakowicz 1983). Enerji transfer verimliliği, enerji transfer hız sabitinin deaktivasyon proseslerinin hız sabitlerinin toplamının oranına eşittir (Lakowicz 2002).

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_f + k'} \quad 1.18$$

Bu denklemde; k_f , floresans durulma oranı; k' , ise diğer tüm deaktivasyon proseslerini temsil etmektedir. Enerji transfer verimliliği akseptörün olup olmadığına bakılmaksızın bağıl floresans şiddetinden veya göz önüne alınan bu proseslerin uyarılma ömür süresinden hesaplanabilir. Bu denklemler aşağıdaki gibidir.

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 1 - \frac{I_0}{I} \quad 1.19$$

Bu denklemlerde τ_D ve τ_{DA} ise sırasıyla ortamda akseptör olmadığı ve akseptör olduğu andaki floresans yaşam ömrüdür (Lakowicz 2002). Ayrıca enerji transfer verimliliği aşağıdaki denklemlerde hesaplanabilir.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad 1.20$$

Burada R_0^6 , Förster mesafesi; r , donör ve akseptör molekülleri arasında enerji transferinin olduğu mesafeyi göstermektedir (Lakowicz 2002).

Kuençleşme olayının meydana gelmesi için moleküllerin belli bir mesafeye gelmeleri veya birbirleriyle temas etmeleri gerekmektedir. Statik kuençleşmede, moleküllerin bir araya gelmesinde hidrojen bağları, van der Waals güçleri, elektrostatik veya hidrofobik etkileşimler etkilidir. Termodinamik parametreler, moleküllerin bir araya gelmesindeki etkileşim türünü belirlemede kullanılmaktadır (Ni *et al.* 2010; Guaet *al.* 2010; Yu *et al.* 2010).

Termodinamik parametrelerin ($\Delta G, \Delta H$ ve ΔS) işareti, bu etkileşimlerin meydana gelmesindeki yürütücü güç hakkında bilgi verebilmektedir. Entalpi değişimi (ΔH) sıfırdan küçük veya sıfıra denk olup, entropi değişimi de (ΔS) sıfırdan büyük ise iki

molekül elektrostatik etkileşimlerle bir araya gelirler. $\Delta S < 0$ ve $\Delta H < 0$ olduğu zaman iki molekülün bir araya gelmesi, van der Waals ya da hidrojen bağı etkileşimlerinin bir sonucudur. Diğer taraftan $\Delta S > 0$ ve $\Delta H > 0$ olduğu zaman bu moleküller arasındaki etkileşime hidrofobik güçler sebep olmaktadır (Qinet *al.* 2010; Pinto *et al.* 2010; Biet *al.* 2011).

Statik kuençleşmede moleküllerin etkin bir alan içerisinde kuençleştiği veya birbirleriyle etkileşerek kararlı bir kompleks oluşturduğundan daha önce bahsetmiştik. Bu moleküllerin kompleks oluşturabilmeleri için bağlanma sabiti, kuençleşme sabitinden faydalanılarak bulunabilir (Machicote *et al.* 2010). Bunun için denklem 1.21'de verilen modifiye Stern-Volmer denklemi kullanılmaktadır.

$$\log \left[\frac{I_0 - I}{I} \right] = \log K + n \log [Q] \quad 1.21$$

Denklemde; K , bağlanma sabiti; n , bağlanma yeri sayısıdır. Bağlanma sabiti farklı sıcaklıklarda hesaplanarak, van't Hoff denkleminde yerine koyularak, ΔH^0 ve ΔS^0 hesaplanabilir. van't Hoff denklemi aşağıdaki gibidir.

$$\ln K = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad 1.22$$

Denklemde; K , bağlanma sabiti; R , ideal gaz sabitidir. Serbest enerji değişimi ΔG aşağıdaki denklem ile hesaplanır.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad 1.23$$

1.1 Lipozom ve kesecik

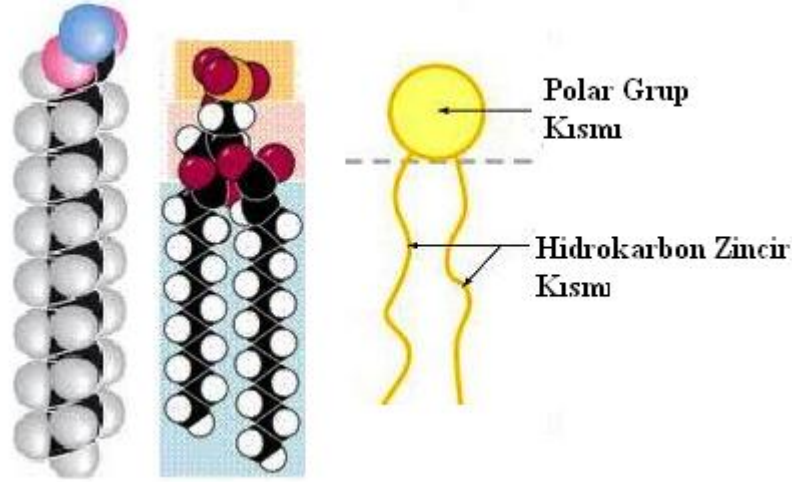
Lipozom yapıları, canlı hücreler kullanılarak elde edilen bilgiye göre daha kolay yorumlanabilen ve hızlı bir şekilde gerekli bilgileri elde edebileceğimiz basit model sistemlerdir. Yapay membranlar olan lipozomlar, yaklaşık 30 yıldan beri hücre zarı modeli olarak biyolojik çalışma alanlarında tercih edilmektedir. Gerçek hücre membranlarının yapısında bulunan lipitler, lipozom ve kesecik (vesicle) yapısı şekline getirilebilir.

Membranların yapısal yönü lipitlerin bileşimleriyle ele alınır. Organizasyonel yönü ise tabakanın derinliği ya da yüzeyden olan uzaklığı ve membran içindeki ve yanındaki fazları içermesiyle değerlendirilir. Membranların özellikleri, yüzeyin yükü ve dielektrik sabitiyle de ilişkilidir. Floresans teknikleri bu tür bilgileri elde etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin floroforun yaşam süresindeki zaman skalaları lipitlerin hareketleri; floresans enerji transferi, lipit tabakasındaki floroforların yüzey yoğunlukları, membranlardaki protein ya da protein segmentlerinin yönlenmeleri, floresans kuençleşme ise lipit yapıların geçirgenlikleri, floroforların tabakalardaki hareketleri ve konsantrasyonları gibi özellikler hakkında bilgi verebilmektedir (Lakowicz 1991).

Lipozom yapılarını oluşturan lipitlerin, yapısal özellikleri ve yüzey bileşimleri istenilen amaçlar için değiştirilmesi mümkündür. Ayrıca istenilen boyutlarda lipozomlar elde edilebilmektedir (de Leeuw *et al.* 2009).

Lipozomlar, lipit moleküllerinin kendiliğinden bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Moleküllerin kendiliğinden bir araya gelmelerinin sebebi, her bir lipit molekülünün yapısında iki veya daha fazla kimyasal ve fiziksel özellikleri farklı grupların varlığıdır. Bu tür moleküllere amfifilik moleküllerde denilmektedir. Bu moleküller kuyruk kısımları bir veya iki tane hidrokarbon zinciri, baş grupları ise anyonik, katyonik veya

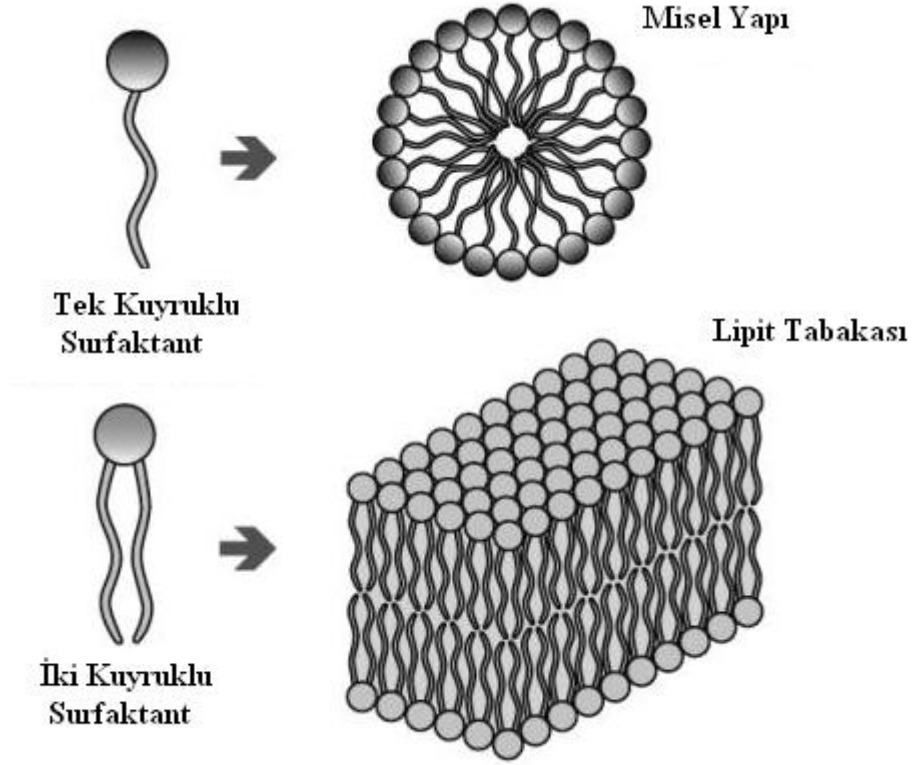
nötral olan polar gruplar içerir. Şekil 1,9'da amfifilik bir molekülün genel yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.9. Amfifilik molekülün temsili gösterimi

Amfifilik moleküllerin polar kısmı anyonik olursa ve özellikle de sülfonat grubu içerirse suya karşı kuvvetli bir ilgiye sahip olurlar. Bu tür surfaktant molekülleri genelde temizlik alanlarında kullanılmaktadır. Diğer taraftan polar baş kısımları katyonik olursa, antibakteriyel özellikler sergilemektedirler. Bu tür moleküler ise hafif antiseptik ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Amfifilik moleküller şayet iki hidrokarbon zincir ve fosfaditil kolin baş gruplarını içerirse bunlara fosfolipitler denilmekte olup biyolojik mebranların içinde bulunmaktadır.

Amfifilik bir molekül suyla temas ettiği zaman sistemde maksimum bir şekilde polar baş grupların hidratasyonu meydana gelirken, hidrofobik zincirler su ile kontak kurmaktan kaçınacaktır. Sonuç olarak yapısal bir organizasyon meydana gelir. Eğer kullanılan çözelti apolar seçilirse bu sefer moleküllerde tam tersi bir yapısal düzenlenme meydana gelecektir. Bir tane kuyruğu olan surfaktantlar misel, iki tane kuyruğu olan surfaktantlar ise lipozom sistemleri oluşturmaya eğilimlidirler. Bu düzenlenme şekli aşağıda Şekil 1.10'da gösterilmiştir.

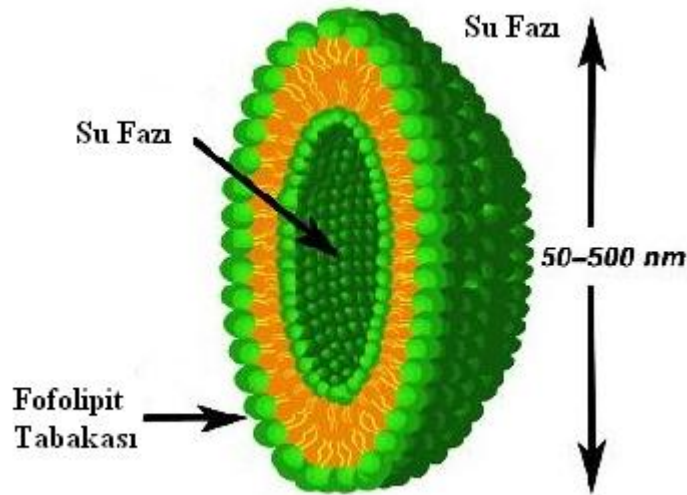


Şekil 1.10. Fosfolipit tabakasının temsili gösterimi

Genel olarak bu tür proseslere, Supramoleküler Self-Assembly denilmektedir. Terim olarak self assembly moleküllerin düzensiz diziliş hallerinden, düzenli bir diziliş yapısına kendiliğinden gelmeleri veya hareketleri anlamındadır. Supramoleküler yapıların oluşması iki fonksiyonlu olmalıdır. Bunlardan birincisi tek tip moleküllerin birleşmesi sonucu oluşacak, ikincisi ise bu oluşan supramoleküllerin özellikleri her bir bireysel bileşeninden farklı olacaktır. Örneğin ayrı ayrı olacak şekilde fosfaditilkolin iyonları ile alkil zincirlerinden bir çözelti oluşturmak istersek, sadece faz ayrımı (iki sıvı faz) meydana gelecektir. Ancak tek bir birimde birbirine bağlı olarak bulunan bu iki molekül, hücre duvarları gibi yaşamın merkezinde olan, aşırı derecede büyük karmaşık yapılar meydana getirecektir (Steinlin 2011).

Self-assembly olayında temel yürütücü güç, molekülün hidrofillik baş kısmına tutunmuş su molekülerini, molekülün kuyruk kısmında bulunan hidrofobik zincirle etkileşimini minimuma indirmek için, serbest gibbs enerjisini en aza indirmesi gerekecektir. Molekülün hidrofobik kuyruk kısmı, su moleküllerinin hidrojen bağı yapısını güçlü bir şekilde etkileyecek ve özellikle hidrofillik kısma 3-4 su molekülü bağlandığı düşünülürse hidrojen bağı mesafesini değiştirmeye çalışacaktır. Bu olay su moleküllerinin çözündüğü kısımda, hidrojen bağı etkisiyle tekrar düzenlenmeyi sağlayan güç olacaktır. Bu proses, su moleküllerinin hidrofobik moleküller etrafındaki konfigürasyonunu kısıtladığı için entropide bir azalmaya neden olacaktır.

Lipozomlara nanobiokolloitlerde denilmektedir. Genel olarak nanobiokolloitler, moleküllerden çok büyük fakat 1000 nm'den daha küçük yapıdadır. Örneğin su molekülünün çapı 0,1 nm iken, globular enziminin çapı 8 nm'dir. Lipozomlar, lipid moleküllerinin bir araya gelmesiyle tek tabakalı ya da birkaç tabakadan oluşan içi su dolu yapılar olarak tanımlanmaktadır. Yapının tamamen küresel olması durumunda ise kesecik olarak adlandırılır. Lipozom yapısı Şekil 1.11'da gösterilmiştir (Shah 2011).



Şekil 1.11. Lipozom veya kesecik yapısının genel gösterimi

Yapılarına göre kesecikler ikiye ayrılmaktadırlar. Birincisi birçok tabakanın iç içe girerek oluşturduğu çok tabakalı (multilamellar) yapılar, ikincisi ise tek bir tabakadan (unilamellar) oluşan yapılardır. Çaplarına göre kesecikler ise aşağıdaki şekilde ayrılmaktadır (Basu and Basu 2002; Gregoriadis 2007):

- a- Küçük tek tabakalı kesecik (Small unilamellar vesicle, SUV). Çapları genel olarak 30-100 nm arasındadır.
- b- Büyük tek tabakalı kesecik (Large unilamellar vesicle, LUV). Çapları yaklaşık olarak 100-5000 nm arasındadır.
- c- Çok büyük tek tabakalı kesecik (Giant unilamellar vesicle, GUV). Çapları 5-100 mikron arasındadır.
- d- Küçük çok tabakalı kesecik (Small multilamellar vesicle, SMV). Çapları genel olarak 30-100 nm arasındadır.
- e- Büyük çok tabakalı kesecik (Large multilamellar vesicle, LMV). Çapları yaklaşık olarak 100-5000 nm arasındadır.
- f- Çok büyük tabakalı kesecik (Giant multilamellar vesicle, GMV). Çapları 5-100 mikron arasındadır.

Tek ve çok tabakalı kesecik yapısı, Şekil 1.12’de verilmiştir.



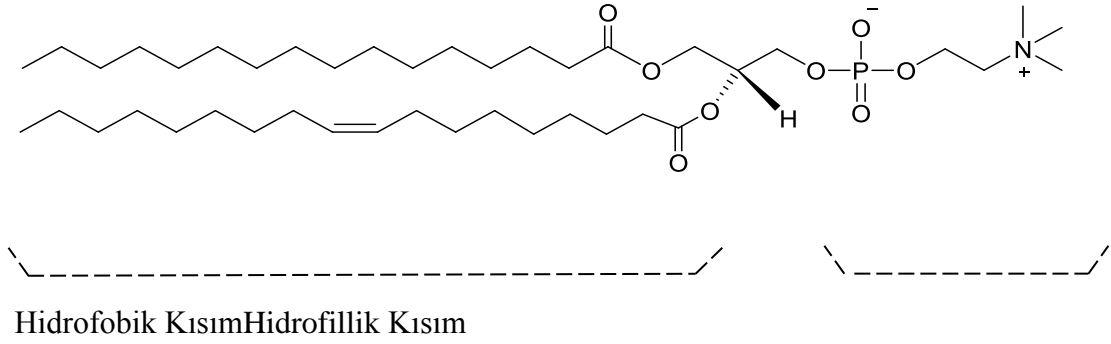
Çok Tabakalı Kesecik Yapısı

Tek Tabakalı Kesecik Yapısı

Şekil 1.12. Yapılarına göre kesecik şekilleri

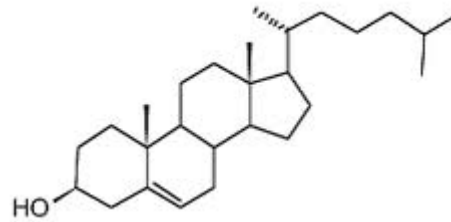
Lipozom, kesecik ve daha birçok yapının temelini oluşturan surfaktant molekülleri, uzun hidrokarbon zincirli bir kuyruk kısım (hidrofobik) ve polar bir baş kısımdan (hidrofilik) oluştuğunu daha önce bahsetmiştik. Surfaktant molekülü olarak doğal bir fosfolipit olan ve memeli hücrelerinin zarının dışında bulunan L-egg lecithin

phosphatidylcholine (PC) çalışmalarımızda kullanılacaktır. Genel formülü $C_{42}H_{82}NO_8P$ olup molekül ağırlığı 760.00 g/mol'dür. L-egg lecithin phosphatidylcholine'nin kimyasal yapısı Şekil 1.13'te verilmiştir.



Şekil 1.13. L-egg lecithin phosphatidylcholine molekülünün yapısı

Kolesterol ökaryotik hücrelerin membran yapılarında bulunan ana bir lipit bileşiğidir. Kolesterol membranların yapısında ve akışkanlığında önemli bir role sahiptir. Kolesterolün, tabaka yapılarındaki fosfolipitlerle olan reaksiyonları geniş bir şekilde çalışılmaktadır. Örneğin fosfolipitlerin tek tabakalı yapılarında bulunan kolesterol, yağ asit zincir segmentlerindeki sterik konfirmasyon sayılarını etkilediği belirlenmiştir (Huang *at al.* 1974). Kolesterolün yapısı Şekil 1.14'te verilmiştir.



Şekil 1.14. Kolesterol molekülünün kimyasal yapısı

1.2 Ayrışma oran sabiti

Lipozomların ikili faz sistemi içerdiğinden daha önce bahsetmiştik. Lipozom yapılarında kuençır molekülleri mebran (lipit) ve su fazında dağılık halde bulunmaktadır. Ancak floresans kuençleşmeye lipit faz üzerindeki kuençır sorumlu iken su fazındaki kuençırlar sorumlu olmayacak veya bunun tam tersi şeklinde olacaktır. Bu yaklaşımdan faydalanarak, ikili faz sistemlerinde kuençırın, su-mebran fazındaki ayrışma oranı belirlenebilir. İkili faz sistemlerinde moleküllerin fazlardaki ayrışma oranını belirlemede aşağıdaki denklem kullanılır (Geneveet al.1985).

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{\alpha_m}{k_{qm}} + 1/k_{qm}P \quad 1.24$$

Burada k_{app} deneysel olarak hesaplanan bimoleküler kuençleşme sabitidir ve verilen mebran konsantrasyonunda belirlenir. Bu sabit K_{sv}^{app} olarak ifade edilir. α_m ise fosfolipit konsantrasyonuyla orantılıdır ve g/ml 'lik lipit yoğunluğundan belirlenir. k_{qm} kuençırın mebrandaki bimoleküler kuençleşme sabitidir. P ise ayrışma oran sabitidir ve $\frac{[Q]_{membran}}{[Q]_{su}}$ olarak ifade edilir. İki fazpopülasyonu göz önüne alınarak bu denklemdeki sabitler hesaplanabilir. A florofor içeren sulu faz, B ise etiketlenen mebran fazındaki florofor olsun. Ayrışma sabiti $P_A = [Q]_A/W$ ve $P_B = [Q]_B/W$ olarak ifade edilir. Burada W , A ve B deki kuençır konsantrasyonunu belirtir. Bu iki denklem birbirine bölünürse $\frac{P_A}{P_B} = \frac{[Q]_A}{[Q]_B}$ ya da $[Q]_B = [Q]_A \left(\frac{P_B}{P_A}\right)$ ve $[Q]_W = [Q]_A/P_A$ olur. Maddenin korunumu yasaından;

$$[Q]_T V_T = [Q]_A [V]_A + [Q]_B [V]_B + [Q]_W [V]_W \quad 1.25$$

ifadesi yazılabilir. Burada V fazın hacmi V_T ise toplam hacimdir. $[Q]_T$ ise numunenin toplam hacmindeki kuençır konsantrasyonudur. Verilen V_T 'ye denklem bölünürse;

$$[Q]_T = [Q]_A[V]_A/V_T + [Q]_B[V]_B/V_T + [Q]_W[V]_W/V_T \quad 1.26$$

şeklinde olur. Eğer membran hacim kesrini $\alpha_A = V_A/V_T$ ve $\alpha_B = V_B/V_T$ olarak ifade edersek ve $1 = \frac{V_A}{V_T} + \frac{V_B}{V_T} + V_W/V_T$ olacaktır. Buradan da $\frac{V_W}{V_T} = 1 - \alpha_A - \alpha_B$ ifadesi yukarıdaki denklemde yazılır ve düzenlemeler yapılırsa;

$$[Q]_A = \frac{[Q]_T}{[\alpha_A + (P_B \alpha_B + 1 - \alpha_A - \alpha_B)/P_A]} \quad 1.27$$

şeklini alır. Daha öncede ifade ettiğimiz Stern-Volmer denklemi;

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_A \tau_0 [Q]_A \quad 1.28$$

Bu denklemde I_0 , ortamda kuençırın bulunmadığı andaki, I ortamda kuençırın bulunduğu andaki floresans şiddeti, $[Q]_A$ ise A fazındaki kuençır konsantrasyonudur. k_A A fazındaki bimoleküler kuençleşme sabitidir. Deneysel olarak $[Q]_A$ belirlenemeyeceğinden $[Q]_T$ dikkate alınmalıdır.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_A \tau_0 \frac{[Q]_T}{[\alpha_A + (P_B \alpha_B + 1 - \alpha_A - \alpha_B)/P_A]} \quad 1.29$$

olarak yazılırsa

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_{app} \tau_0 [Q]_T \quad 1.30$$

Buradaki k_{app} deneysel olarak belirlenen bimoleküler kuençleşme sabitidir.

$$k_{app} = \frac{k_A}{[\alpha_A + (P_B \alpha_B + 1 - \alpha_A - \alpha_B) / P_A]} \quad 1.31$$

Bileşiklerin membran yapılarının içindeki ayrışma sabitlerini belirlemek için Stern-Volmer denklemi genel olarak düşük membran konsantrasyonlarında uygulanır. Bundan dolayı $1 - \alpha_A - \alpha_B \cong 1$ şeklinde olur.

$$k_{app} = \frac{k_A}{[\alpha_A + (P_B \alpha_B + 1) / P_A]} \quad 1.32$$

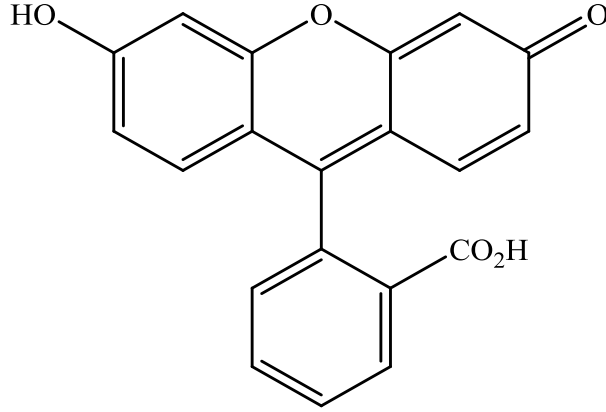
Eğer $\alpha_B = 0$ ya da $P_B = 0$ olduğu zaman $k_{app} = \frac{k_A}{[\alpha_A + 1 / P_A]}$ olur. A fazını belirlemek için bu denklem aşağıdaki şekildeki gibi kullanılır ve ayrışma sabiti genel olarak $P = K_p$ şeklinde ifade edilmektedir.

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{\alpha_m}{k_{qm}} + 1 / k_{qm} K_p \quad 1.33$$

Farklı lipit konsantrasyonlarında hesaplanan k_{app} değerleri, lipit yoğunluklarına göre grafik edilirse, kuençirın mebrandaki bimoleküler kuençleşme sabiti ve ayrışma oranı hesaplanabilir.

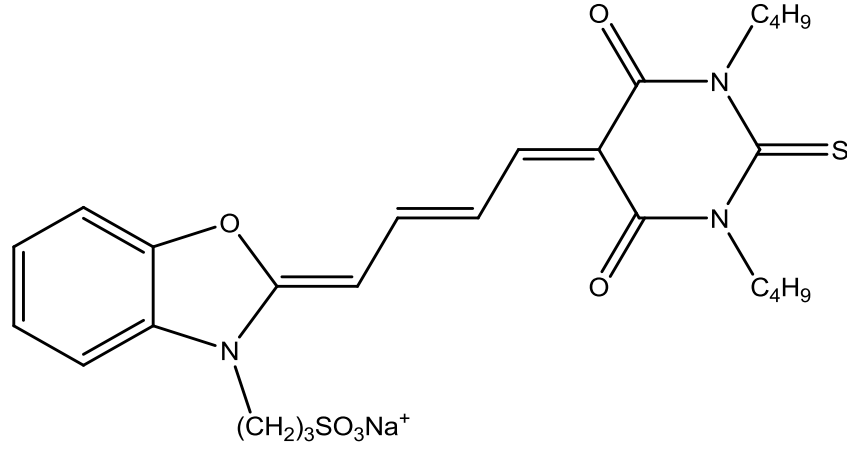
Bu tez çalışması kapsamında çalışılan moleküller Floresin ve Merosiyanin 540 boyar bileşikleridir. Donör olarak kullanılan Floresin molekülü ksentan türevi olup, 1871 yılında Von Bayer tarafından sentezlenmiştir. Sıvı ortamda kuantum verimi oldukça yüksek olmasından (0,92) dolayı lazer endüstrisinde fotosensitizer, lazer ışınlarının dalga boylarını ayarlama (450-600 nm) kullanılabilen boyar bileşimidir. Floresin, tıpta fotografik bir test olan hastanın göz sağlığı hakkında bilgi veren anjiyografi testinde kullanılmaktadır. Yüksek kuantum verimine sahip olması ve foton etkisinden oluşabilecek kayıplara karşı dirençli olması, bu molekülü özellikle protein işaretlemek için biyokimyada tercih edilmesindeki sebeptir. Ayrıca floresin son yıllarda enerji

transfer çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Aydın 2005). Floresin molekülünün kimyasal yapısı Şekil 1.15’te verilmiştir.



Şekil 1.15. Floresin molekülünün kimyasal yapısı

Akseptör molekülü olarak kullandığımız merosiyanin 540, sentetik ve biyolojik mebranlara bağlanan anyonik lipofillik bir boyar bileşiktir. Merosiyanin 540 polimetinboyar bileşiklerinden olup negatif yüklü heterosiklik bir yapıdadır. Merosiyanin 540 biyomedikal çalışmalarda, özelliklede biyolojik mebran sistemlerinde ve kanser hücrelerinin teşhisinde kullanılır. Ayrıca bu bileşik kan kanseri hücrelerinin parçalanmasında da kullanılmaktadır (Valinsky *et al.* 1978; Schlegel *et al.* 1980; Dougherty *et al.* 1998; Zareba *et al.* 2005). Merosiyanin 540’ın kimyasal yapısı Şekil 1.16’da gösterilmiştir.



Şekil 1.16.Merosiyanin 540 molekülünün kimyasal yapısı

Bu tez çalışmasında hücre zarı yapısına yakın olan lipozom ve kesecik (vesicle) sisteminde MC540-FL molekül çifti arasındaki floresans kuençleşme incelenecektir. Lipozom modelinin hücre yapısından farkı organel ve protein içermemesidir. Bu yapı kullanılarak FL ve MC540 molekülünün hücre ortamındaki etkileşimleri hakkında bilgi edinilecektir. Özellikler MC540 molekülü fotodinamik terapide kanser teşhisinde kullanılması, FL molekülün ise biyokimyada protein işaretlemeye kullanılması bu iki molekülün aynı hücre ortamında etkileşiminin önemini artırmaktadır. Bu nedenle gerçek hücre zarı yapısına en yakın yapılar olan lipozom sistemleri seçilerek, amaca uygun olarak kullanılacak moleküllerin davranışlarının belirlenmesi büyük bir önem arz etmektedir. Ayrıca dye bileşiklerin karışımlarının enerji transfer proseslerine dayalı spesifik bir dalga boyunda, daha verimli olarak dye laser endüstrisinde kullanıldıkları da bilinmektedir (De and Girigoswami 2004). Enerji transfer çalışmalarının birçoğu, biyolojik sistemlerde kullanılacak moleküllerin enerji transfer verimliliğinin, enerji transfer hız sabitinin ve Förster mesafenin belirlenmesini hedeflemektedir (GangoPadhyayet *al.* 1987;Hrbacet *al.* 2004; Wang *et al.* 2004). Bu tez çalışmanın amacı, fotofiziksel özellikleri incelenmiş olan FL ve MC540 bileşiklerinin lipozom ve kesecik ortamında floresans enerji transfer proseslerinin incelenmesidir (Aramendiaet *al.* 1990; Hoebeke *et al.* 1991;Onganer *et al.* 1993; Song *et al.* 2000; Acemioğlu *et al.*2001).

Bu amaçla öncelikle fosfolipitlerden, lipozomlar ve kesecikler hazırlanacaktır. Oluşturulan lipozomlar floresans spektrumuyla, kesecik yapısı ise geçişli elektron mikroskopuyla karakterize edilecektir. Daha sonra ilgili bileşiklerin saf su, lipozom ve kesecik sistemlerindeki çözeltileri ayrı ayrı hazırlanacaktır. Bu bileşiklerin kıyaslama amaçlı olarak saf su içerisindeki fotofiziksel davranışları (absorpsiyon spektrumları, floresans spektrumları, kuantum verimleri ve uyarılma ömürleri) belirlendikten sonra, bu iki bileşiğin uygun karışım konsantrasyonlarında lipozom ve kesecik içeren çözeltilerdeki absorpsiyon, durgun hal ve zamana bağlı floresans spektroskopisi teknikleri ile gerekli ölçümler yapılarak aralarındaki etkileşimler incelenecektir. MC 540 molekülünün lipozomlardaki ayrışma oran sabiti floresans kuençleşme yardımıyla hesaplanacaktır. Förster radyasyonsuz enerji transfer teorisine göre enerji transfer parametreleri hesaplanacak ve yorumlanacaktır. Gerçek hücre zarında bulunan kolesterol, oluşturulacak lipozom sistemine eklenerek FL ve MC540 molekülleri arasındaki etkileşimler incelenecektir. Gerçek hücre zarına yakın olması için kolesterol lipozom konsantrasyonlarının %10 olarak seçilecektir, ayrıca bu orana ek olarak %20 ve %30 konsantrasyon aralığında da çalışılacaktır.

Bu moleküllerin aralarında olan etkileşimleri, lipozom çözeltisi ve lipozom+kolesterol karışımı için bağlanma sabitleri, bağlanma yerleri ve termodinamik parametreleri hesaplanacaktır.

Ayrıca floresin molekülünün lipozom ve kesecik ortamındaki bazı fotodinamik özellikleri spektroskopisi teknikleriyle de incelenecektir. Bu amaçla bu bileşiğin floresans anizotropi, mikroviskozite ve rotasyonel difüzyon parametreleri durgun hal floresans spektroskopisi tekniği ile Debye-Stokes-Einstein ve Perrin denklemlerinden faydalanılarak belirlenecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bir fotosensitizer olan ve fotodinamik tedavilerde ilaç olarak kullanılan, klorin-p6 (Chlorin-p6) molekülünün, fosfaditil kolin (phosphatidly choline) oluşturulan lipozomlara bağlanmasını, pH değişimlerine bağlı olarak incelenmiştir. pH=5'te lipozom konsantrasyon artışıyla klorin-p6 molekülünün absorpsiyon ve emisyon spektrumlarında belirgin bir değişim gözlenmiştir. Ayrıca absorpsiyon spektrumlarında pH artışına bağlı olarak kırmızıya kayma meydana gelmiştir. Lipozom konsantrasyonu artışı emisyon spektrumu şiddetinde azalma ve kırmızıya kaymaya neden olmuştur. Klorin-p6 molekülünün, floresans uyarılma ömrü ve KI molekülüyle kuençleşmesi incelenmiş, bu ölçümlere bağlı olarak molekülün lipit tabakalarındaki yerleri hakkında bilgi sağlanmıştır. Lipozomlarda, pH değeri artarken floresans uyarılma ömründe ve floresans kuantum veriminde bir artış gözlemlenmiştir. Lipozom konsantrasyonu artışıyla da floresans kuantum verimi artmıştır. Sonuç olarak klorin-p6 molekülünün, pH=5'te lipit tabakalarının merkezinde olacağı fikri önerilmiştir. Çünkü yüksek hidrofobisitelerde lipit tabakasının polaritesinin minimum olduğu yer, lipit tabakasının merkezidir. pH=6'da ise anyonik bir molekül olan klorin-p6, yüklü lipit baş grupları ile elektrostatik etkileşimlerden dolayı, yüksek bir olasılıkla lipozomun yüzeyine yakın bir yere bağlanmış olabileceği belirtilmiştir (Das *et al.* 2005).

Biyolojik olarak aktif olan bir bileşiği karakterize etmek için en önemli anahtar parametrelerden biri, bu tür bileşiklerin biyolojik mebranlara sızma becerilerini belirlemektir. Bunun içinde, zamandan tasarruf sağlayacak, ekonomik ve basit olan metotlara her zaman ihtiyaç vardır. Bu çalışmada buna binaen moleküllerin biyolojik mebranlara sızma becerileri için yeni bir metot önerilmiştir. Molekülün konsantrasyonunu direkt olarak belirlemeye gidilmemiş, mebranın yüzeyini floresin molekülüyle etiketleme yaklaşımına gidilmiştir. Ancak mebran yüzeyini etiketlemek için kullanılan probaların ortamda bulunan yüklü bileşiklerin varlığına karşı hassas olmaları gerekmektedir. Bu yöntemde model bir lipit tabakasının her iki tarafına tutulan yüklü boyar bileşiğinin floresans şiddetindeki değişimler ölçülmüştür. Metotta numunenin varlığı, probun floresans şiddeti değişim zamanlarında bir düzensizliğe

neden olmuştur. Bu düzensizlik bileşiklerin mebrana sızabilirlikleri hakkında tahminlere izin vermektedir. Son olarak feniletin bileşiğinin, fosfaditil kolin ile oluşturulmuş tek tabakalı lipozom modeli de, bu molekülün geçiş transportu hakkında bilgi edinmek için kullanılmıştır. Yapılan çalışma molekülün pasif bir difüzyonla lipit tabakasına doğru gittiği ve elektrostatik yüzey potansiyelinden dolayı, probunun her iki membran yüzeyine adsorplandığını göstermiştir. Bu floresin-feniletin durumu anlamına gelmektedir. Bu sonucu ise iki olay desteklemektedir. Çünkü floresin hidrofilik bir moleküldür ve kovalent bir bağla membran yüzeyine yakın bir şekilde lipit moleküllerine tutunmuştur. İkincisi floresin molekülünün emisyon şiddeti, belirli bir yüzey yük miktarı değişiminden çok hassas bir şekilde etkilenmektedir (Przybylo *et al.* 2007).

Çevresel olarak öneme sahip moleküllerin, biyolojik membranlar ve bu membranların çevresi arasındaki ayrışma oranları hakkındaki bilgiler, hayati öneme sahiptir. Çünkü ayrışma oranları bu moleküllerin aktivitelerini ve toksikolojilerini açıklamakta kullanıldığı gibi metabolizmadaki adsorpsiyon ve dağılımları hakkında da bilgi sağlamaktadır. Bu çalışmada membranlarla üç farklı surfaktant bileşiğinin etkileşimi incelenmiştir. Kullanılan surfaktant maddeleri; t-oktifenoksiipolietoksiethanol (TritonX-100), heksatrimetilamonyum klorür (CTAC) ve sodyumdodesilbenzen sülfonat'tır (SDBS). Model membran sistemi olarak, tek tabakalı (LUVs) fosfaditil kolinle hazırlanmış lipozomlar kullanılmıştır. Ayrışma oran sabiti ksenobiotik bileşiklerin davranışlarını belirlemede temel bir parametredir. SDBS ve TritonX-100 bileşiklerini ayrışma sabitleri absorpsiyon türevi ve floresans kuençleşmeyle belirlenip kıyaslanmıştır. Sonuç olarak bu iki bileşiğin ayrışma sabitleri iki yöntemde de birbirine yakın çıkmıştır. Absorpsiyon spektrumlarının üçüncü türevi kullanılarak ayrışma sabiti hesaplanmıştır. Bu surfaktantların, lipozomlar üzerindeki fizikokimyasal karakteristik etkileri (akışkanlık, çap ve yüzey yükü) belirlenmiştir. Sonuç olarak üç surfaktant maddede yüksek konsantrasyonlarda lipozom membranlarının akışkanlığını azaltmıştır. Ancak düşük konsantrasyonlar membranın rijitliğini etkilememiştir, bunun sebebi olarak lipitin paketlenme yoğunluğunun etkilenmemesi olarak düşünülmüştür (Marcelino *et al.* 2007).

Rose Bengal son zamanlarda göz kuruluğu için oftalmolojide kullanılmaya başlayan, suda çözünebilen ksanten türevi bir boyar bileşimidir. Boyar bileşikleri fotodinamik tümör terapisi için potansiyel bir fotosensitizer olmalarına rağmen, Rose Bengal boyar bileşiminin yetersiz lifofilitesi ve tümör birikmelerinden dolayı fotodinamik terapilerde klinik kullanımı zordur. Lipozomal kapsüller bu dezavantajların üstesinden gelmek için uygun bir metot olarak düşünülmektedir. Bu çalışmada lipozom preparatında, Rose Bengal'in fotofiziksel özellikleri incelenmiştir. Lipozomal kapsüllerde Rose Bengal serbest formlarına kıyasla daha güçlü floresans özellik göstermiştir. Bu bileşikle yapılan deneylerden sonra varılan sonuçlar şu şekilde özetlenebilir. Büyük hacime sahip lipozomlar da Rose Bengal'in daha az agregasyonu belirlenmiştir. Rose Bengal bileşiminin sudaki floresans dalga boyu maksimumu etanol, lipit ya da lipozomal karışımlarda kırmızıya kaymıştır. Lipozom ya da lipozomal şartlarda Rose Bengal bileşiminin floresans ve absorpsiyon bandında kaymalar meydana gelmiştir. Ayrıca bu bileşimin agregasyon yapısı olduğu önerilmiştir (Cheng-Chang *et al.* 2008).

Küçük tek tabakalı 2 dimistrol-3-sn-fosfotidil kolin (DPPC) kesecikleri üzerine iki safra tuzunun etkisi, (sodyum deoksalat ve sodyum kolon'u (NaDC ve NaC)) difenilhekzatrinin probu ile durgun hal floresans anizotropisi kullanılarak (r_{ss}) incelenmiştir. Değişik r_{ss} değerleri, DPPC kesecikleriyle safra tuzlarının farklı durumlardaki reaksiyonlarını izlemek için yeterince hassas olduğunu göstermiştir. NaDC (6mM) kritik misel konsantrasyonunda, önemli spektral değişimlere neden olmuştur. Kritik misel konsantrasyonundan düşük olan 4mM da bile NaDC, fosfolipit misellerde tamamen çözünebilmiştir. DPPC keseciklerinin üzerinde, NaC'nin etkisinin çok daha az olduğu belirlenmiştir. Ancak özellikle kritik misel konsantrasyonlarının altındaki konsantrasyonlarda hidrofillik NaC, hassas bir şekilde mebranların yapısını etkileyebilmektedir. Tam olarak fosfolipitlerin çözünmesi, yaklaşık olarak NaC'nin, kritik misel konsantrasyonunun altında olduğu zamanda gerçekleşmiştir. Deneylerle, kesecik yapılarının değişimine neden olan safra tuzlarının konsantrasyonuna, güçlü bir şekilde bağlı olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca anizotropi değerinin, faz geçiş sıcaklığına bağlı olarak 42⁰C'de ani bir düşme gösterdiği belirlenmiştir (Subuddhi *et al.* 2007).

Sığır faktörü Va'nın fosfotidil kolin mebraniyla etkileşimi, dört farklı floresans tekniği kullanılarak incelenilmiştir. Bu teknikler 1-) 2 dimistrol-3-sn-fosfotidil kolin (DMPC) oluşturulan küçük tek tabakalı kesecik (SUV) ile Va faktörü etkileşimlerini göstermek için, floresans membran probu olan 1,6-difenil-1,3,5-hekzatrienin (DPH) floresans anizotropisinin değişmesi 2-) 1-polmitol-2-aleol-3-sn fosfotidil kolin (POPC) den hazırlanan SUV içine dâhil edilen N-(lizomin radomin B sulfonil) diozil fosfotil etil aminin (Ph-PE) floresans anizotropi değişimi, 3-) POPC oluşturulan SUV yapılarına eklenen (kalın zincirle etiketlenen) floresin ile etkilenen Va faktörünün floresans anizotropi değişimi, 4-) floresinle etkileşen Va faktöründen, radominle etiketlenen POPC den oluşturulan SUV'a yapılarına olan floresans enerji transferidir. Lipit kesecikleriyle etiketlenenler, etiketlenmeyen proteinlerle titre edilmiştir. Buna karşın son iki tip deneyde Va faktörüyle etiketlenen keseciklerle titre edilmiştir. Burada bağlanmanın zayıf olduğu gözlenmiştir. Lipit protein modeli hakkında bilgi edinmede gerekli olan üç parametre vardır. Bunlar ayrışma sabiti K_d , stokiyometrik bağlanma, her bir deneyde gözlemlenen, emdirme R_{max} değerleridir (K_d 3,0 mM da ve her bir bağlanan Va faktörü yaklaşık olarak 200 olduğu zaman stokiyometriktir). SUV yapılarının DMPC'e bağlanması yüksek anfinite de güzel bir şekilde olmuştur. Bu gözlemler toplam serbest bağlanma enerji bileşenlerini hesaplamada kullanılmış ve bu bağlanmanın asidik-lipit bağı ile olduğu ve buna ek olarak, asidik-lipit bağımsız reaksiyonlarının ortamda bulunan membran yapılarıyla yarışmalı olabileceği sonucuna varılmıştır (Koppaka *et al.* 1996).

Fare timusunun içine floresin molekülü koyularak, zamana ve uyarılma dalga boyuna bağlı, floresans anizotropi gibi değişik spektroskopik tekniklerle ayrıntılı bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Deneysel kısımda boyar molekülünün kullanılmasının sebebi, serbest ve bağlı molekülleri belirlemeye çalışmaktır. Bağlı moleküllerin iki farklı polarizasyon yönünde oldukları, zamana bağlı floresans spektrumundaki farklılıklar yorumlanarak elde edilmiştir. Ortamda bulunan serbest moleküllerin polarizasyon yönünü belirleyebilmek için, uyarılmadan sonra gecikme süresinin doğru bir şekilde

hesaplanması gerekmektedir. K r numuneler kullanılarak ölçülen floresans spektrumları ile numunenin olduğu şartlarda ölçülen floresans spektrumları birbirleriyle kıyaslanarak problemlerin durumları ile ilgili hesaplama yapılabilir. Elde edilen sonuçlardan hücre içinde boyar moleküllerinin varlığına ve yokluğuna bağlı olarak alınan absorpsiyon ve floresans spektrumları ile hesaplanan, floresans anizotropideğerlerinin yorumlanmasıyla sonuca gidilmiştir. Son olarak bu faktörlerin nasıl biyolojik nitelikleri ifade ettiği tartışılmıştır. Serbest moleküllerin stoplazmik matriste  z nmesiyle polarizasyonlarını kaybettiği anlaşılmıştır. Bağlı moleküllerde ise bu olay uzun sürmektedir. Yapılan deneylerde $r_b = 0,25-0,30$ bulunmuştur. Elde edilen r_b değeri floresinin albümin içine bağlanma değerinden k c kt r (Kinoshita *et al.* 1987).

Floresans özelliği olmayan glikol ayrışma ya da kimyasal dönüşüm olmaksızın eş zamanlı karışımlarda, floresans özelliği olan bir probla incelenmiştir. İki farklı analit  zeltisi hazırlanarak, birine floresin konulup diğer  zeltiye koymamak şartıyla, bu  zeltelerin floresans anizotropisi  l  lm ştir. İlk sistemde, saf sistemin ve karışımın anizotropi spektrumu, nicel olarak belirlemede kullanılmıştır (florofor konsantrasyonunun artışı floresans şiddetini değiştirmiştir). İkinci sistemde, Perrin denkleminde faydalanılarak konsantrasyona bağlı anizotropi grafiği çizilerek yapılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda, en iyi analitik performansı Perrin denkleminde başvurulduğunda elde edilmiştir. Bu teknik, glikol karışımlarını belirleyebilmede kesin ve kabul edilebilir doğrulukta, hızlı ve basit sonuçlar verebilmektedir. Sonuç olarak belirli limitlerde,  z c n n anizotropi ve floresans verimiyle sınırlı olduğu, kaydedilen değerlerde saf  z c n n anizotropi değerinden farklı olduğu bulunmuştur. Gliserin-etilen glikol (GL/EG), etilen glikol /1,2 propan diol (EG/1,2PPD), polietilen glikol 400/1,2 propan diol (PEG 400/ 1,2-PPD) karışımları %95-120 Perrin metoduyla analiz edilip kaydedilmiştir. Nispi standart sapma %1,3-2,9 oranında bulunmuş ve belirleme limiti % 8,9-3,9 aralığında olduğu g r lm ştir (Sanchez *et al.* 2007).

Bir başka çalışmada yapay membran olan lipozomlar kullanılarak, antioksidatın oksikom özelliği ve ilaçların membran ile reaksiyonları arasındaki ilişki incelenmiş ve bu

ilaçların antioksidan aktivitesine etkisi arasındaki ilişki kurulmuştur. Farklı deneylerle, 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihidroklorit (AAPH) 'den türetilen peroksiradikali'ye (ROO) neden olan lipid peroksidant'ın, koruyucu oksidantlarla üzerinin örtülmesi ve iki farklı lifofillik özelliğe sahip bir floresans prob kullanarak gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Hidrofillik bir prob olan floresin kullanılarak lipid peroksidant, su ve lipid ortamında incelenmiştir. Floresans probu difenilhekzatrien propionik asit (DPH-PA)'le etiketlenen lipid sistemi, floresans durulma ve durgun hal anizotropisi, değişen membran akışkanlığı, membran üzerindeki peroksidant ilaç etkisini eş zamanlı olarak değerlendirmek için kullanılmıştır. Sentetik membranlarda farklı prob ve lipozom kullanımı, membran lipoperoksidanlarında, ilaçların lipid tabakasıyla reaksiyon becerilerinin yanı sıra, antioksidanların çıkma (scavenging) karakteristiklerine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan deneylerde peroksidasyonda anizotropi değerinin arttığı görülmüştür (anizotropi değerinin artması akışkanlığın artmasından dolayıdır). Sistemde oksidasyon meydana geldiğinde Anizotropi maksimum değere ulaşmıştır (Marlene *et al.* 2007).

Lipid membran yapılarının biyofiziksel özelliklerini açıklamada, floresans hassasiyeti başarılı bir şekilde kullanılabilir. Bu hassasiyet lipozom tabakalarının üzerindeki, yayılmış veya emilmiş halde bulunan moleküllerin, dağılımını ve yerini belirlemede kullanılabilir. Bu çalışmada (1H-benzimidazol-2-yl)pridin (BBP) molekülünün lipozomal ortamdaki bazı fotofiziksel özelliklerine bakılmış ve bunlardan faydalanarak molekülün lipozom ortamındaki yeri ve dağılımı hakkında bilgi edinilmiştir. BBP molekülünün su ortamında hemen hemen hiç floresans özelliği olmadığı bilinmektedir. Bu molekül hidrofobik çevreye sahip ve lipid membran yapısının temel bileşeni olan fosfolipid tabakasında, suya göre güçlü bir floresans özelliği gösterdiği görülmüştür. Bu gözlemlenen ışık anahtar etkisi 'Light Switch Effect' durumuna, BBP floroforu ve su molekülleri arasında hidrojen bağı etkileşiminin kritik rol oynadığı fikri önerilmiştir. BBP molekülünün lipozom ortamındaki floresans şiddetindeki artış, lipid tabakasında, suyun olmadığı bölgelere yani lipid tabakanın iç kısmına doğru (lipid yapının hidrofobik kısmına) gittiği ve bu sayede floresans şiddetinin arttığı düşünülmüştür. Çünkü suyun varlığının bu molekülde, bir floresans kuençleşmeye sebep olabileceği önerilmiştir.

BBP molekülü geçiş metal iyonlarıyla güçlü bir kuençleşme meydana getirirken, lipozom içeren çözelti ortamında ise bir kuençleşme görülmemiştir. Buda lipozomların bir kalkan görevi yaptığı ve metal iyonlarını BBP molekülüne yaklaştırmadığını göstermektedir. Yine BBP molekülünü lipozomkonsantrasyonu artışıyla titre yaparak, bu molekülün lipozom ortamındaki ayrışma oran sabitini ve tampon çözeltisinden, lipit tabakalarına geçişi için Gibbs serbest enerjisi hesaplanmıştır. BBP molekülünün lipit yapılarından ayrışması ile Gibbs serbest enerjisi $-6,5$ 'ten $-7,0$ kcal/mol değişmiştir. Lipozom yapılarında, Gibbs serbest enerji değişiminin, tabakadaki lipit bileşimine bağımlılığı çok az olduğu bilinmektedir. Moleküler seviyede BBP molekülünün, lipozomlardaki dağılımını ve bağlanma yerini tahmin etmekte iki farklı yaklaşım kullanılarak, atomiktik moleküler dinamik (MD) simülasyon programı ile belirlenmiştir. Bu yaklaşımlar, molekülün bir lipit tabakasından serbest olarak difüzyonla hareket edip ayrılmasını diğerinde lipit takasına doğru boyar molekülünün sızması için şemsiye model profili gibi zorlanmasıdır. Her iki yaklaşımla BBP molekülünün lipit tabakasının yüzey bölgesinde olduğunu ve lipit tabakasının hidrokarbon kuyruğu ile lipit baş polar kısmının başlangıç yeri arasında olabileceği kabul edilmiştir. BBP molekülünün, suyun varlığında floresans şiddetinin güçlü bir şekilde düşmesinden (kuençleşmeden) dolayı ayrıca simülasyon, su moleküllerinin, POPC lipit tabakasının bu bölgesine sızamayacağını belirtmiştir (Kyrychenko *et al.* 2011)

Su + 2,6 Lulidin (LW) sıvı çifti karışımında çözünen floresin sodyum tuzunun, rotasyonel davranışları zamana bağlı ve durgun hal floresans spektroskopisi teknikleriyle incelenmiştir. Floresin molekülünün hareketlerinin, LW çözeltisinde yavaşladığı bulunmuştur. Floresin molekülünün iki farklı dönmesel modu görülmüştür. Işık saçılma şiddetinin kritik nokta için belli bir sıcaklık aralığında arttığı görülmüştür. Bu sıcaklık aralığı yaklaşık olarak 306-360 K olarak belirlenmiştir. Floresans anizotropi değerlerinin sıcaklıkla azaldığı belirlenmiştir. Buda çözeltinin akışkanlığının arttığını göstermiştir. Floresin molekülünün, çözücü moleküllerin hacmi arttıkça veya kritik konsantrasyondan sonra, rotasyonel düzensizliğinin arttığı görülmüştür ve ara dönmesel hareketlerde bulunmuştur. Bu sonuçlarla, kritik konsantrasyonda, geçici düzensizlikler

ve çözücü moleküllerinin farklı uzaysal dinamiğinden etkilendiği önerilmiştir (Morita *et al.* 2003).

Bu çalışmada yeni bir skuarliyum türevi SQ-1 molekül sentezlenmiş ve bu molekülün protein-lipit oluşumlarına etkisi test edilmiştir. Yapılan deneysel kısımda SQ-1 molekülü, zivitronik bir lipit olan fosfaditil kolin (PC) le oluşturulmuş mebrana bağlanmış ve bu oluşan sisteme, anyonik bir lipit olan kardilopinin (CL) farklı konsantrasyonları eklenmiştir. Böylece hidrofobik etkileşimler kontrol edilmiştir. Lizozim ve Ribonükleaz proteinlerinin, SQ-1 molekülüne etkisi, kesecik ortamında incelenilmiş ve bu proteinler ile SQ-1 molekülünün, muhtemelen birbirleriyle yarışmalı olarak lipozomlara bağlandıkları belirlenmiştir. Yapılan denemelerde, lizozimlerin mebranlara bağlanmaları diğerlerine göre daha fazla görülmüştür. Bu durumun bu molekülün gövdesinde bulunan ve mebranlara bağlanmada gerekli olan alifatik α -helixin proteinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Değişik mebran içeriklerinde SQ-1 molekülünün hem hidrofobik hem de elektrostatik protein lipit etkileşimlerine bu boyar bileşiğinin hassas olduğu kanıtlanmıştır. Floresans anizotropi çalışmalarında, lizozim ve ribonükleaz proteinlerinin varlığı, SQ-1 molekülünün, lipit çevredeki rotasyonel hareketlerini sınırladığı görülmüştür. Bu proteinler belirgin bir şekilde lipit yapıların iç kısımlarındadır. Floresans kuençleşme ve kinetik deneyleriyle bağlanma sonuçları hakkında bilgi edinilmiştir. Sonuç olarak lizozim proteinlerin negatif yüklü mebranlara, proteinlerin bağlanmasını azalttığı önerilmiştir. Bu mebran çalışmalarında CL konsantrasyonu karışımlarda maksimum %10 seçilmiştir (Loffe *et al.* 2007).

Bu çalışmada merosiyanin 540 (MC540) molekülünün, insan glioblastoma (U-87MG) hücre mebran plazması üzerindeki fotodinamik etkileri incelenmiştir. Çalışılan ortam olan plazma mebranları, spesifik lipit probu olan 1,(4-trimetilamonyum), 6-difenil-1, 3,5- heksitrien (TMA-DPH) ile etiketlenmiştir. TMA-DPH molekülünün, U-87MG hücresi içindeki durgun-hal (steady-state) anizotropi, durulma zamanı (decay-time) ve zamana bağlı (time-dependent) anizotropi ile floresans durulma zamanı ölçüm teknikleri kullanılarak yorumlanmıştır. Sonuçlarda, MC540 molekülünün olduğu ve ışın tedavisi

uygulanan hücrelerde, TMA-DPH molekülün durgun-hal ve durulma zamanında bir azalma gözlenmiştir. Zamana bağlı anizotropi ölçümlerinde, fotosensitizasyon hücreleri üzerinde probun, limit anizotropi değerinde bir azalma görülürken, rotasyonel relaksasyon zamanında ise bir artış gözlemlenmiştir. Mebrandaki probun rotasyonu için yarı-koni modeli kullanılmış ve veri analizleri sonucunda, koni açısında bir artış, S parametresinde ise bir azalma görülmüştür. Ayrıca spesifik protein probu olan N-(1-prin)-malamid molekülü, plazma mebran proteinleri üzerindeki fotosensitizasyonun etkilerini incelemek için kullanılmıştır. Bu molekülün, fotosensitizasyon olayı sırasında, rotasyonel relaksasyon zamanında bir artış görülürken, ekzimer monomer floresans şiddeti oranlarında bir azalma görülmüştür. Sonuç olarak, MC540 molekülünün fotodinamik etkilerinde, SH grup içeren proteinleri ve $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ plazma mebran aktivitelerini inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca sonuçlarda, MC540 molekülünün lipit tabakalarda düzensizliğe neden olduğu ve plazma mebranlarındaki proteinlerin hareketini de azalttığı bulunmuştur (Sharma *et.al.* 1997).

Lipofilik bir mebran probu olan BODIPY (4,4-difloro-4-bora-sa-4a-diaza-s-indasen) molekülünün lipozom yapılarındaki yeri, floresans kuençleşme yardımıyla belirlenmiştir. Bunun için, mebranın farklı derinliklerine yerleştirilmiş bir seri nitroksit grubundan faydalanılmıştır. Parallax analizi de denen bu yöntemde, lipit tabakasının farklı derinliklerine yerleştirilmiş floresans özelliğe sahip bir seri bileşik kullanılmaktadır. Probu lipit yapıdan içeri doğru gitmesi sonucunda floresans özelliği bulunan bu moleküllerle etkileşerek kuençleşmeye neden olmaktadır. Bu işlem titrasyon şeklinde yapılırsa faydalı bilgiler sağlamaktadır. Parallax analizleri sonucu, BODIPY molekülünün lipit tabakasındaki yerleri şu şekilde izah edilmiştir. BODIPY molekülü lipit yapının dip ve baş kısmında bulunan polar baş gruplarına ya da iki hidrokarbon zincirine tutulduğu zaman, iki prob popülasyonu görülür. Birinci durumda BODIPY molekülü yüzeyde toplanırken ikinci durumda lipit tabakasının ortasında yani iç kısımlarında toplanır. Yapılan analizler sonucunda bu molekülün lipit tabakasının içine gömülü olduğu ve yağ asidi zincirlerine bağlı olduğu düşünülmüştür (Kaiser and London 1998).

Bu çalışmada fosfolipit lipozomlarda model mebranlarla merosiyanin 540 (MC540) molekülünün etkileşimi üzerine, negatif yüklü lipitlerin etkisi incelenmiştir. Floresans boyar bileşiği olan MC540 molekülü lösemi hücreleri, lanfoit dokudan oluşan habis tümörlü hücreleri ve patolojik virüslerin etrafını çevirmede harika bir fotosensitizerdir. Çalışmada kullanılan lipozomlar, nötral dimistol lesitin (DMPC) ve negatif yüklü dimistol fosfodik asit (DMPA) karışımından elde edilmiştir. Yapılan çalışmada DMPA lipit miktarını arttırarak bir titrasyona tabi tutulmuş ve bu sistemlerin absorpsiyon spektrumları alınmıştır. Sonuçlarda, mebran ile boyar molekülü arasında yük varlığında güçlü bir bağlanmanın olduğu bulunmuştur. Lipozomlarda, boyar bileşiğinin anfinitesinin, sistemdeki DMPA miktarının artışıyla azaldığı görülmüştür. Alınan absorpsiyon spektrumunda, yüklü lipit miktarı artırıldığında 546 nm ve 595 nm’de iki tane izobestik noktanın meydana geldiği görülmüştür. MC540 molekülünün absorpsiyon spektrumunda meydana gelen değişikliklere, MC540 molekülünün yüklü mebranlardaki anfinitesinin azalmasının sebep olduğu ve anfinitedeki bu azalmaya da hipsokromik solvatakromik bir kayma ve mebranla birleşen MC540 molekülünün monomer/dimer dengesindeki değişimlerin neden olduğu belirlenmiştir. Yine bu çalışmadaki sonuçlar, negatif yükün varlığında, MC540 molekülü ile lipozomlar arasındaki elektrostatik itmeler meydana gelmekte ve bundan dolayı MC540 molekülünün, mebranın hidrofobik merkezine giremediği önerilmiştir. Ayrıca negatif yük varlığının, lipozoma bağlı MC540 molekülünün monomer formunu azalttığı önerilmiştir (Mateasik *et al.* 2002).

Biyolojik olarak önemli bazı inorganik tuzların, merosiyanin 540 (MC540) molekülünün elektronik absorpsiyon ve floresans spektrumuna etkisi 25°C’de su ortamında incelenmiştir. Çalışmada kullanılan inorganik tuzlar NaCl, NaI, NaBr, KCl, MgCl₂, MgSO₄ ve CaCl₂ dür. MC540 molekülü anyonik bir floresans boyar bileşiği olup değişik hücre mebranlarını işaretlemeye potansiyometrik biyolojik bir probgibi kullanılmaktadır. Ayrıca bu molekülün fototoksitesinden dolayı değişik kanser hücrelerinin fotodinamik tedavisinde kullanılmaktadır. Çalışmalarda, MC540 molekülünün ve doğal tuzların konsantrasyonlarına bağlı olarak 515 nm’de yeni bir absorpsiyon bandı görülmüştür. Bu bant yaklaşık olarak kritik tuz konsantrasyonunda

görülmüş ve tuz ile MC540 molekülleri arasında bir agregasyon oluşumu sonucundan meydana geldiği belirtilmiştir. Bu tuzların birkaçıyla MC540 molekülünün floresans kuençleşmeye maruz kaldığı görülmüştür. MC540 molekülü, bu tuzlardan katyonik yüklü olanları ile nötral iyonlar (monokovalent (K^+ , Na^+) iyonlar anlamında) lineer olmayan Stern-Volmer davranışları sergilemiştir. Değişik statik ve dinamik kuençleşme mekanizmalarının, bu lineer olmayan davranışa katkısı olduğu belirtilmiştir. Buna karşın iki değerlikli alkali toprak iyonlarında (Mg^{2+} , Ca^{2+}) ise lineer bir Stern-Volmer eğrisi elde edilmiştir. Bu sonuçlar kullanılarak, analitik kuençoflorometrik (quenchofluorometric) yaklaşımlar için, bu tuzlar arasında magnezyum iyonunun uygun olduğu önerilmiştir (Adenier and Aaron 2002).

Bir polien makrolit antibiyotik olan amfoterisinB (AmB) molekülü, mantar enfeksiyonlarının sistematik tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak bu molekülün toksin özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Bundan dolayı bir kapsül içine yerleştirilip istenilen bölgede tedavi oluşturması düşünülmüş ve böylece toksikoloji olarak diğer bölgeler korunmak istenmiştir. Bu çalışmada lipozomlar polietilen glikol (PEG) ile kaplanmış ve içine AmB molekülü konulmuş ve böylece korunaklı bir kapsül sistemi oluşturulmuştur. Daha sonra bu molekülün, lipozomlardaki yeri ve durumu incelenilmiştir. Çalışılan ortamdaki lipozomlar iki şekilde hazırlanmıştır. Birinci tür lipozomlar, dipalmitolfosfaditil kolin (DPPC) ile hazırlanmış ve PEG molekülleriyle sarılmıştır. İkincisi kolesterol (CH) ve bir başka lipit olan diesterol-N-(monometoksi-poli(etilen glikol) fosfatidil etanolaminle (DSPE-PEG şeklinde, ortalama PEG zincirinin molekül ağırlığı 2000'dir) lipozomlar, %9'luk sükröz çözeltisinde hidrasyon ve ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Lipozom içindeki AmB molekülünün miktarı, DSPE-PEG sisteminde artarken ortama kolesterol eklenmesiyle azalmıştır. AmB molekülünün lipozomlardaki yeri ve durumu, PEG/dekstran iki faz oranıyla (potasyum sızma ölçümlerinden), floresans kuençleşme özelliği ve sirkular dikrozim (CD) spektroskopisiyle incelenmiştir. Sonuçlarda AmB molekülünün PEG-lipozom sisteminde iki tip yeri olduğu görülmüştür. Onlardan birincisi mebran yüzeyinde DSPE-PEG ile AmB molekülünün kompleks halde bulunduğu, buna karşın diğer yerde lipozomal mebranın hidrofobik merkezinde olduğu bulunmuştur. PEG lipozomlarında

AmB molekülü hem agregat (kümelenme) hem de monomerik formda olduğu tespit edilmiştir (Moribe *et al.* 1999).

Floresin, proteinler gibi biyolojik sistemleri karakterize etmek için floresans etiketlemelerde en çok kullanılan moleküllerdendir. Ayrıca floresin molekülü floresans mikroskopisinde de kullanılmaktadır. Floresin molekülü bazı proteinlerin miktar tayin ölçümleri içinde kullanılabilir. Örneğin; floresinle etiketlenmiş proteinlerin floresans özelliği, triptofan gibi bir amino asitin varlığından etkilenebilmektedir. Ancak detaylı bir şekilde çok özel prosesleri açıklamada nicel bilgilerde eksiklik vardır. Bu eksiklik floresinle etiketlenmiş proteinin, fotofiziğini nicel bir şekilde tahmin etmekte zorluktur. Bu çalışmada, farklı asidik ve bazik şartlarda ve değişik triptofan türevi konsantrasyonlarının bulunduğu tampon çözeltilerde, floresin molekülünün floresans özellikleri çalışılmış ve floresans uyarılma ölçümleriyle birleştirilen, durgun hal absorpsiyon ve floresans spektroskopisi tekniklerinden faydalanılmıştır. Deney sonuçlarında, floresin ve triptofan türevleri arasında statik ve dinamik kuençleşme varlığı görülmüştür. Statik kuençleşmede oluşan karanlık kompleksin birleşme sabiti, çalışılan tüm pH' değerlerinde düşük bulunmuştur ($5,0-24,1 \text{ M}^{-1}$). Düşük pH larda statik kuençleşmeye, Perrin model (sphere-of-aciton (SOA)) mekanizmasının neden olduğu önerilmiştir. SOA statik kuençleşme mekanizmasında, proton transfer olasılığı olabileceği tartışılmıştır. Bunun sebebi olarak da floresin molekülünün farklı prototropik türlerde bulunması gösterilmiştir. Dinamik kuençleşme prosesleri için, bimoleküler oran sabiti, Debye-Smoluchowski difüzyon oran sabitine yakın bulunmuştur ($2,5-5,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Reaksiyon mekanizmalarının kontrolünü sağlamada, florofor ve kuençirimin yükünü ve potansiyelini azaltarak, foton azaltıcı (photoinduce) elektron transfer proseslerine başvurulmuştur. Kompleks tesadüf çarpışmalarıyla, triptofan türevleri ile floresin molekülü arasındaki floresans kuençleşmesi için elektron transfer oran sabiti ($2,3-6,7 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$) ve elektronik bağlanma değerleri ($5,7-25,1 \text{ cm}^{-1}$) hesaplanmıştır (Togashi *et al.* 2009).

Katyonik bir fenazonyum tuzu olan, fenosafraninle (PSF) anyonik lipozomal tabakalarıyla olan etkileşimleri, durgun-hal ve zamana bağlı floresans ve floresans anizotropi çalışmalarıyla incelenmiştir. Anyonik lipozom tabakaları, dimitirol-L- α -fosfatidilgliserin (DMPG) lipitleri ile yapılmıştır. Lipozom ortamında PSF molekülünün floresans spektrumlarında hipsokromik bir kayma ve floresan kuantum veriminde ise bir azalma meydana geldiği görülmüştür. Spektrumların maviye kayması, kesecik yapılarının iç kısmının su ortamıyla kıyaslandığı zaman daha düşük polariteye sahip olmasıyla açıklanmıştır. Floresans ve floresans kuençleşme çalışmalarına ek olarak ortamın mikro polaritesi belirlenerek katyonikflorofozun, anyonik DMPG mebranına bağlandığı kanıtlanmıştır. Katyonik florofoz ile anyonik mebran arasındaki elektrostatik etkileşmelerin arkasındaki tüm detaylar bu makalede tartışılmıştır. Bu sonuçlar floresans probu olarak kullanılan PSF yada benzeri moleküllerin doğal mebran ortamındaki yönelmeleri ve heteroloji hakkında mebran analizleri için faydalı bilgiler sağlamıştır (Bose *et al.* 2010).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda, Merck firmasından Floresin, Fluka firmasından Merosiyanin 540, Sigma firmasından fosfatidil kolin (L-egg lecithin phosphatidylcholine), kolesterol (Cholesterol) ve fosfat tamponu temin edilmiştir. Bu çalışmadaki kimyasallar saflaştırma yapılmaksızın kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Deneysel çalışmalar esnasında kullanılacak aletler aşağıda verilmiştir.

Spektroflorofotometre :

Durgun Hal	: Shimadzu RF-5301 PC Spectrofluorophotometer
Zamana Bağlı	: LaserStrobe Model TM-3 Lifetime Fluorometer (Photon Technology International (PTI))
Spektrofotometre	: Perkin Elmer Spektrofotometre (Lambda 35 model)
Geçişli Elektron	
Mikroskobu (TEM)	: JEOL JEM-1200 EX(80 KeV)
Sonikatör Cihazı	: Bandelin Sonopuls
Soğutucu Cihazı	: Julabo
Santrifuj Cihazı	: Biosan
Deiyonize Su Arıtma	
Cihazı	: Human Power Corporation
Saf Su Cihazı	: GFL 2002
Otomatik pipetler	: Socorex
Mikro Şırınga	: Hamilton Micro-syringe

3.3 Numunelerin Hazırlanması

3.3.1 Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılacak, floresin (FL) ve merosiyanin 540 (MC540) bileşiklerinin öncelikle stok çözeltileri hazırlandı. Bu amaçla FL ve MC540'ın 1,0 mM stok çözeltileri etanol/kloroform (V/V ve 3/1) karışımında oluşturuldu. Ayrıca kolesterol bileşiğinin 0,1 M'lık stok çözeltisi ve kuantum verimi hesaplamalarında referans olarak kullanmak için floresin molekülünün 0,1 N NaOH çözeltisinde hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltilerden seyreltme yöntemi kullanılarak gerekli konsantrasyon değerleri elde edildi.

3.3.2 Lipozom ve Kesecik Hazırlama

İstenilen özellikte lipozomların hazırlanabileceğini daha önce sayfa 20'de bahsetmiştik. Lipozomları boyut ve yapılarına göre çeşitli hazırlama yöntemleri vardır. Bu yöntemlerden bazıları şunlardır: Çok tabakalı lipozomları lipithidratasyon ve kürecik çözücü yöntemiyle, küçük tek tabakalı kesecikleri sonikasyon ve basınç hücre metoduyla, büyük tek tabakalı kesecikler ise çözücü enjeksiyon metoduyla hazırlanabilmektedir. Bu metotlar lipozom hazırlamak için en çok kullanılan yöntemlerdir. Aşağıdaki yöntemleri kullanarak lipozom ve kesecik sistemlerini hazırladık

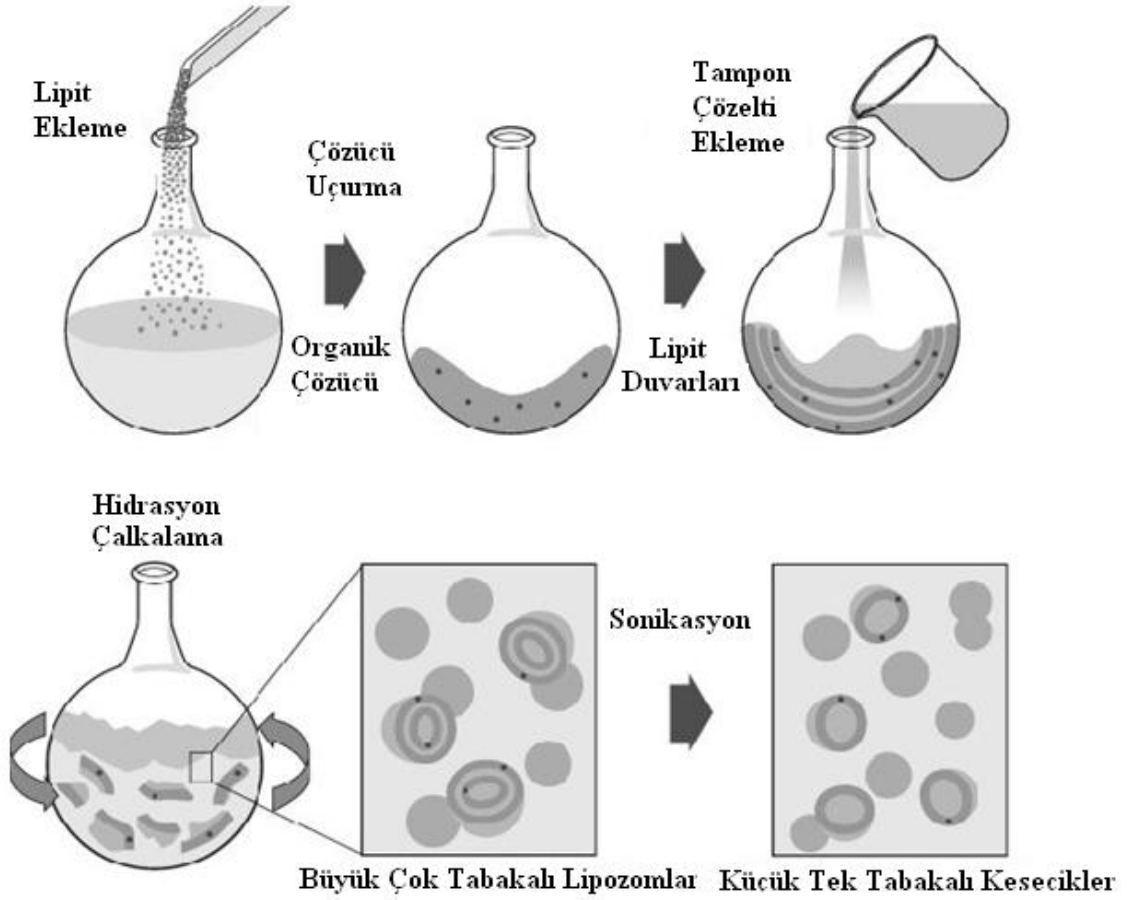
3.3.2.a Lipit Hidratasyon Metodu

Çok tabakalı lipozomları hazırlamada en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde istenilen konsantrasyondalipit mikro pipet yardımıyla şilifli erlene alınır ve üzerine organik çözücü (kloroform) veya çözücüler eklenerek lipit duvarlarının oluşması sağlanır. Lipit duvarları oluşuktan sonra sistemdeki organik çözücüler evaporatör

yardımıyla uzaklaştırılır. Burada dikkat edilmesi gereken husus ortamda apolar çözücünün kesinlikle bulunmamasıdır. Bunun için inert bir gazdan 3-5 dakika geçirilerek çözücünün tamamen uzaklaştırıldığına emin olunur. Sonuçta erlenin altında kuru ve ince bir lipit solüsyonu oluşur. Bu ince tabakanın hidratasyonu için ortama tampon çözelti eklenir ve bir süreliğine vortekslenir. Hidratasyon adımında ortamın sıcaklığı jel-kristal geçiş sıcaklığına yakın ya da üzerinde olmalıdır. Lipozomların içine yerleştirilecek bileşikler hem tampon hem de organik çözelti eklenirken koyulabilir.

3.3.2.b Sonikasyon Yöntemi

Bu yöntemde de küçük tek tabakalı kesecik sistemleri oluşturulmaktadır. Kesecik hazırlamada en önemli parametrelerden biri jel-kristal geçiş sıcaklığı değeridir. Bu kullanılan lipit türüne bağlı olarak değişir. Alınması gereken lipitmiktarı hesaplanarak şişesinden enjektör yardımıyla çekilir ve santrifüj tüpüne aktarılır. Tüpe alınan lipit organik bir çözücüde çözülür ve kesecik duvarlarının oluşması sağlanır. Daha sonra çözücü azot gazıyla uçurular, tampon çözelti eklenerek sonikatörde belli bir süre puls gönderilir bu esnada homojenliği sağlamak için çözeltilere inert bir gaz devamlı verilir. Bu şekilde lipit molekülleri bir araya gelerek küresel bir yapı olan kesecikleri oluştururlar. Daha sonra bu çözelti santrifüjlenerek sonikatörün mikro ucundan gelen metal parçacıkları ortamdaki uzaklaştırılır. Anlatılan lipozom hazırlama yöntemleri Şekil 3.1’de şematik olarak gösterilmiştir (Yalçın 2011).



Şekil 3.1 Lipozom çözeltisi hazırlama yöntemleri

3.4. Spektroskopi Teknikleri

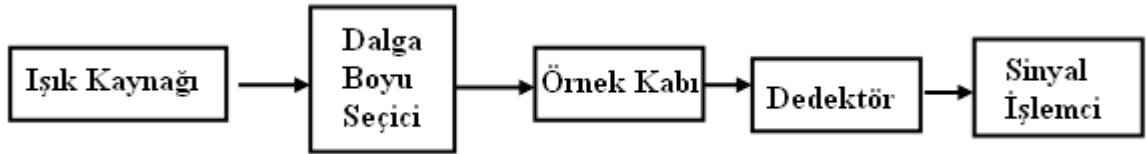
3.4.1. UV-Vis Absorpsiyon Spektroskopisi

Monokromatik ve I_0 şiddetindeki bir ışık demeti, kalınlığı b cm olan bir küvette bulunan çözeltideki herhangi bir molekül tarafından absorplandığı zaman şiddeti azalır ve küvette I şiddetinde terk eder. Işımanın şiddetindeki bu azalmanın nedeni, ışığın bir kısmı örnek kabının çeperlerinde ortaya çıkan yansımalar veya çözeltide bulunabilecek asılı taneciklerin yol açtığı saçılmalardır. Sadece moleküllerin o dalga boyundaki ışığı absorplaması sonucu ortaya çıkan azalma Beer-Lamberteşitliği ile aşağıda verilmiştir.

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc = A \quad 3.1$$

Bu denklemde, A ; absorbans, I_0 ; numune üzerine gelen ışığın şiddeti, I ; numuneyi terk eden ışığın şiddeti, ϵ ; molar absorptivite katsayısı (L/mol.cm), b ; numune kabının kalınlığı (cm), c ; ise konsantrasyon (mol/L)'dur. A ile c arasında bu basit doğrusal ilişkiden analitik uygulamalarda yararlanılmaktadır. Absorpsiyonun logaritmik tersine geçirgenlik (T) denilmektedir.

Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan cihaza absorpsiyon spektrometresi veya absorpsiyon spektrofotometresi denilmektedir. Bir spektrofotometre düzeneği Şekil 3.2'de görülmektedir ve genel olarak ışık kaynağı, dalga boyu seçici, detektörden oluşur(Skoog *et al.* 1992).



Şekil 3.2. Bir spektrofotometrenin şematik gösterimi

Detektörlerde optik sinyaller elektrik sinyaline çevrilip, bir kaydedici veya bir galvanometre ile ölçülmektedir. Işık kaynağı olarak UV ve görünür bölgede ışımaya yapan tungsten (320-3000 nm), hidrojen veya döteryum(180-380 nm) ve ksenon (150-700 nm) lambalar gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. Bu tez çalışmasında kullandığımız 200-1100 nm dalga boyu aralığına sahip Perkin-Elmer firmasına ait Lambda 35 model spektrofotometredir.

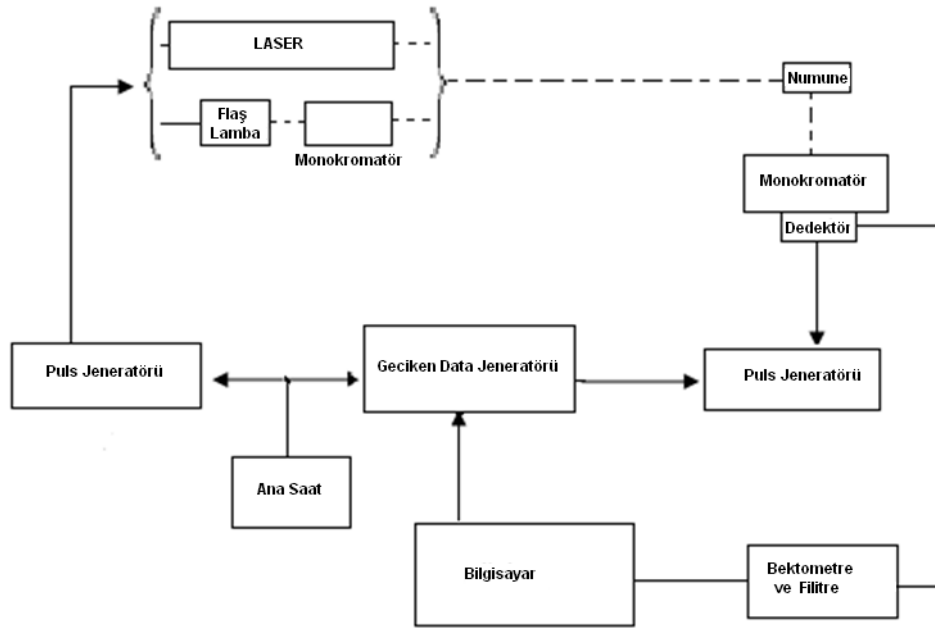
3.4.2. Floresans Spektroskopisi

Spektrofluorometri bir atom ya da moleküle ait elektronun yüksek (uyarılmış) enerji seviyesinden daha düşük bir enerji seviyesine geçerken, ısı oluşturmada gerçekleştiği ışımının (emisyona) değerlendirilmesine dayalı bir analitik ölçüm yöntemidir. Duyarlılık, seçicilik ve tek bir örnekteki birden fazla floresans yapan madde miktarının belirlenmesine olanak sağlaması açısından spektrofotometriden daha üstün bir analitik yöntemdir. Spektrofluorometri cihazlarında emisyon monokromatörü, ışık kaynağı ile dik açılı olmalıdır. Deneysel çalışmalarımızda Shimadzu firmasına ait (model RF-5301 PC Spectrofluorophotometer) durağan hal emisyon ve eksetasyon ölçümlerinin yapılabildiği spektrofluorofotometre kullanılmıştır. Cihazın ışık kaynağı ksenon lambadır. Bu tür lambalar 250 nm den daha büyük dalga boylarının hepsinde, yüksek şiddete sahip olmalarından dolayı kullanılmaktadır.

3.4.3. Floresans Ömürlerin Belirlenmesi

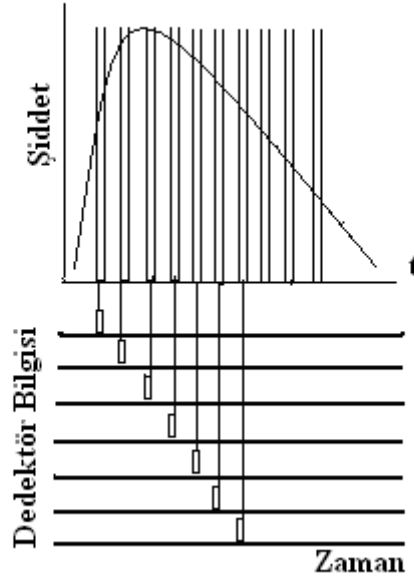
Bir floresans molekülünü, temel hale dönmeden önce uyarılmış enerji seviyesinde ortalama kalma süresine floresans yaşam ömrü denilmektedir. Bir molekülün floresans yaşam ömrü ortalama 0,2-50 ns aralığındadır. Floresans uyarılma ömrü molekülün bulunduğu çevreyle olan etkileşimleri hakkında önemli bilgiler vermektedir. Örneğin floroforun kuencırla çarpışma sıklığı, enerji transfer hızı ve uyarılmış hal reaksiyonlarının hızı hakkında bilgi edinilebilmektedir. Bu yüzden belirlenmesi gereken fotofiziksel bir parametredir. Ayrıca floresans anizotropi ölçümlerinden rotasyonel korelasyon zamanı hesaplanmak isteniyorsa, floresans ömrünün bilinmesi gerekmektedir. Floresans yaşam ömürlerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan iki metot vardır. Bunlar puls ve faz-modülasyon teknikleridir. Bu teknikler işleyiş bakımından bazı farklılıklara sahiptirler. Puls metodunda örnek, bir puls ile uyarılır ve floresans şiddetindeki durulma zamana bağlı ölçülür. Faz-modülasyon tekniğinde ise örnek sinusoidal olarak modüle edilmiş ışık ile uyarılır. Emisyon uyarıcı sinusoidal ışığa kıyasla faz kayması ve demodulasyonu dikkate alınarak ömür hesaplaması yapılır.

Bu tez çalışmasında floresans yaşam ömürleri puls azot lazer ihtiva eden ve stroboskopik detektör sistemiyle çalışan Time Master Laser sistemiyle ölçülmüştür. Bu sistemin puls genişliği yaklaşık 800 ps olup, puls oranı saniyede 20'ye kadardır. Bu sistemde uyarıcı ışık kaynağı olarak azot lazer'i kullanılmakta olup, boyar madde lazerlerle uyarıcı ışığın dalga boyu ayarlanabilmektedir. Time Master Laser sisteminin çalışma prensibi Şekil 3.3'deki gibi şematize edilebilir



Şekil 3.3. Puls tekniğinin şematik gösterimi

Stroboskopik detektörün kullanıldığı bu tekniğin çalışma prensibi; ilk olarak numune flaş lambası ya da (azot gazı kaynaklı) lazerden gelen puls ile uyarılır. Puls şeklindeki elektromanyetik radyasyon numuneye gönderilir. Gönderilen pulslar puls jeneratörü tarafından üretilir. Bu sistemde bilgisayar kontrollü detektörler, pulsun numune ile etkileşmesinden sonra geçen süreyi ölçer. Flaş veya lazerin eşzamanlılığı çok önemli olup bu işlem ana saat (master clock) veya zamanlayıcı tarafından kontrol edilir. Bu sistemde detektörlerin verileri kaydetmesi, hareketli bir pencere yardımıyla olup zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Şekil 3.4'de detektörlerin veri kaydetme işlemi temsili olarak gösterilmiştir.



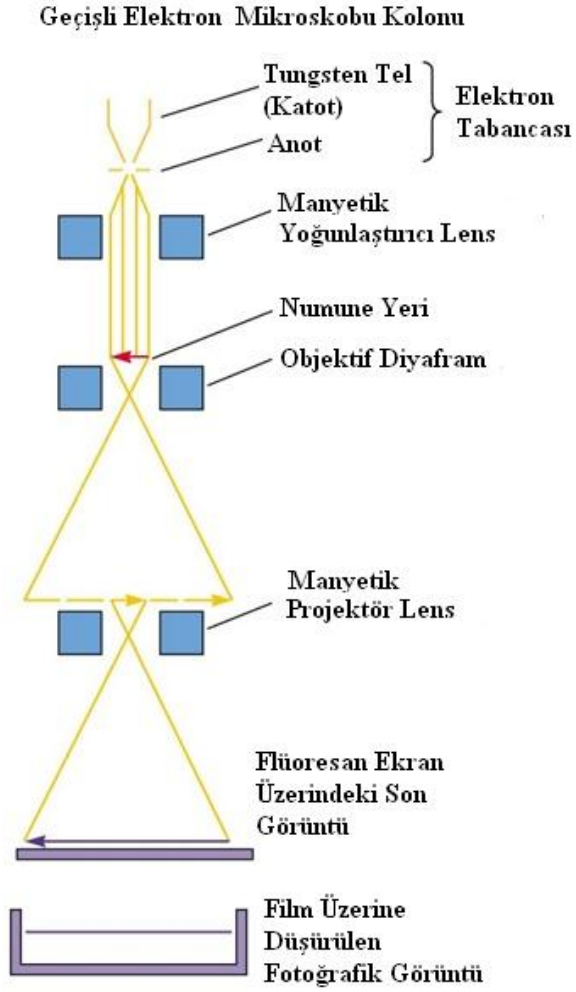
Şekil 3.4. Detektörün veri kaydetmesinin şematik gösterimi

3.4.4. Geçişli Elektron Mikroskobu (TEM)

Elektron mikroskopları, yüksek çözünürlük güçleriyle ışık mikroskoplarına oranla çok ince detaylara ulaşmayı sağlarlar. Başlıca kullanılan iki tane elektron mikroskobu vardır. Bunlar taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçişli elektron mikroskobudur (TEM). Bizim çalışmamızda kullandığımız TEM (80 KeV JEOL JEM-1200 EX elektron mikroskobu) cihazıdır. Ancak geçişli elektron mikroskobunda, elektron demeti görüntülenecek malzemenin içinden geçirildiğinden, incelenecek malzemeninde çok ince olması gerekir. Bu yüzden SEM daha avantajlıdır. Ayrıca SEM cihazı üç boyutlu görüntü verebilmektedir.

Elektron demetinin incelenen örneğin içinden geçerek görüntü oluşturduğu geçişli elektron mikroskoplarında başlıca üç ana bölümden oluşmaktadır. Bunlar; elektron demetini üreten ve örneğe odaklayan bölüm, görüntüyü oluşturan bölüm, görüntü izleme bölümüdür.

Elektron demetini oluşturan kısım elektron tabancası olarak adlandırılır. Elektronlar içinden akım geçirilen tungsten telden yani bir katottan salınır. Katota göre artı potansiyelde tutulan disk biçiminde bir elektron olan anoda doğru hızlandırılır. Elektronlar anottaki delikten bir demet biçiminde geçerler. Bu elektron demeti bir yada iki elektromagnetik lensten oluşan yoğunlaştırıcı tarafından örnek üzerine odaklanır. Elektronların enerjileri orta gerilim halinde 60-150 KeV aralığında, yüksek gerilim halinde ise 200 KeV-3MeV aralığındadır. Elektron demeti bir bakır ızgara üzerine yerleşmiş olan örnekten geçerek 1-5mm odak uzaklığına sahip objektif merceği aracılığıyla ilk etapta örneğin 20-200 kez büyütülmüş gerçek görüntüsünü oluşturur. Bu görüntü ikinci etapta projektör merceği denilen bir yada iki merceğ tarafından dahada büyütülür. Sonuç olarak 1000-50000 kez büyütülmüş bir elektron görüntüsü elde edilir. Bu görüntüyü insan gözünün algılayabileceği biçime dönüştürmek amacıyla floresan bir ekran üzerine yönlendirilir. Elektron görüntüsü direkt olarak film üzerinden geçirilerek görüntünün fotoğrafıda elde edilebilir. Bu sayede fotoğrafik bir büyüme yöntemi kullanılarak görüntünün dahada büyütülmesi sağlanabilir. Floresan ekranda oluşan görüntü de optik bir mikroskopla yaklaşık 10 kat büyütülerek izlenebilir. Mikroskopun elektron tabancasından ekran yada filme kadar tüm bölümlerinin elektronlarının serbestçe yol almalarını sağlamak üzere, vakumlu bir sistem içinde bulundurulması gerekir. Örnek kalınlığı, yoğunluğa, maddesel bileşime ve çözünürlüğe bağlı olarak 100 KeV enerjili elektronlar için 5 nm-0,5 µm arasındadır. TEM kolonunun genel çalışma sistemi Şekil 3.5'te gösterilmiştir (Novotny 2007).



Şekil 3.5. Geçişli elektron mikroskobu kolonu çalışma prensibi

3.5. Kuantum Veriminin Hesaplanması

Kuantum verimleri Parker-Rees metoduyla belirlenmiştir. Bu metodun en önemli özelliği bir standart bileşiğe ihtiyaç duyulmasıdır. Standart bileşik fotofiziksel özelliği iyi belirlenmiş floresans bileşiktir. Uygun referans veya standart bileşikler literatürde verilmiştir. Parker-Rees denklemi,

$$\Phi_S = \Phi_R \left(\frac{D_S}{D_R} \right) \left(\frac{n_S}{n_R} \right)^2 \left(\frac{1-10^{-OD_R}}{1-10^{-OD_S}} \right) \quad 3.2$$

şeklinde ifade edilir (Acemioğlu *et al* 2001, Arık *et al* 2005).

Burada Φ_S ve Φ_R sırasıyla, numune ve referansın kuantum verimi; D_S ve D_R , sırasıyla numune ve referansın düzeltilmiş floresans spektrumu altındaki alanları; n_S ve n_R , sırasıyla numune ve referansın çözücüsünün kırılma indisi; OD_S ve OD_R , sırasıyla numune ve referansın uyarılma dalga boyunda ölçülen optik yoğunluğudur.

3.6. Floresans Anizotropi

Floresans anizotropi kendi aralarında herhangi bir faz ilişkisi olmayan O_x , O_y ve O_z ile tanımlanan üç dik ekseninde polarize olmuş ışığın bir sonucudur. I_x , I_y ve I_z her bir eksenindeki floresans şiddet olmak üzere toplam şiddet $I = I_x + I_y + I_z$ şeklinde tanımlanır. Bir probun anizotropisi (r) polarize türün floresans şiddetinin toplam floresans şiddetine oranı şeklinde tanımlanır ve aşağıdaki denklemlerle ifade edilir.

$$r = \frac{(I_z - I_y)}{(I_x + I_y + I_z)} \quad 3.3$$

Gelen ışın düzleme dik polarize ise, dik eksen olan O_z , floresans şiddeti için simetri eksen olacaktır. Bu nedenle $I_x = I_y$ olacaktır. Dik eksen olan z' 'den gelen floresans şiddet I_z , uyarılma ışınıyla paralel olduğundan I_{\parallel} şeklinde gösterilebilir. Aynı yaklaşımla $I_x = I_y = I_{\perp}$ şeklinde yazılabilir. Buna göre anizotropi ifadesi aşağıdaki şekliyle gösterilebilir.

$$r = \frac{(I_{\parallel} - I_{\perp})}{(I_{\parallel} + 2I_{\perp})} \quad 3.4$$

Bu denklemde I_{\perp} ve I_{\parallel} , numune z ekseninde polarize ışık ile uyarılıyorsa, dik (\parallel) ve yatay (\perp) polarize olmuş floresans şiddetlerini temsil etmektedir. Anizotropi ölçümlerinde cihaz hassasiyeti yüksek olmalıdır. Uyarılma monokromatorü ışığı kısmi olarak polarize eder. Bunun sonucunda gelen ışık dik (V) ve yatay (H) olarak farklı şiddetlerde yönlendirilir. Emisyon monokromatörü de V ve H olarak polarize ışığı farklı şiddetlerde geçirecektir. Bu nedenle ölçülen şiddet I_{\parallel} , yerine I_{VV} ve I_{\perp} yerine de I_{VH} ifadelerinin kullanılması daha doğru olacaktır. Burada I_{VV} düzleme dik polarize uyarılma sonucu yine düzleme dik polarize emisyonun şiddetini temsil etmektedir. Aynı şekilde I_{VH} düzleme dik polarize uyarılma sonucu yatay polarize emisyonun şiddetini simgeler. Anizotropi veya polarizasyon çalışmalarında detektör sistemlerinin de farklı polarize emisyon şiddetlerine farklı cevap vermesinden dolayı bir düzeltme faktörü olan G 'nin dikkate alınması gerekir. Burada G ;

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad 3.5$$

şeklinde ifade edilir. Görüldüğü gibi bu faktör yatay polarize uyarılma ile kolaylıkla hesaplanabilir. I_{HV} yukarıda ifade edildiği gibi yatay polarize uyarılma sonucu dik polarize emisyonun şiddetini temsil etmektedir. Düzeltme faktörü de dikkate alınarak anizotropi ifadesi aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad 3.6$$

Bu denklemle polarizerler yardımıyla z eksenini polarize uyarılma sonucu elde edilecek yatay ve dik emisyonların şiddetleri G faktörü de dikkate alınarak ölçüldükten sonra anizotropi değeri elde edilir.

3.10. Rotasyonel Difüzyon ve Mikroviskozite

FL bileşiğinin çalışılacak sistemlerle nasıl etkileştiği ve serbestlik derecesinin ölçümüne dayanan rotasyonel durulma zamanı ve mikroviskozite, Perrin eşitliği esas alınarak belirlenebilir. Bu eşitlik;

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau_f}{\tau_{rot}} \quad 3.7$$

şeklinindedir. Denklemden r anizotropi, r_0 limit anizotropisi olup, difüzyon prosesinin olmadığı andaki anizotropi değerini temsil eder. τ_f floresans ömür, τ_{rot} ise rotasyonel difüzyon zamanını ifade etmektedir (Lakowich 2002).

Rotasyonel durulma zamanı yukarıdaki denklemden hesaplanabildiği gibi Debye-Stokes-Einstein (DSE) eşitliği olarak bilinen denklemlerle de hesaplanabilir (Lakowich 2002).

$$\tau_{rot} = \frac{\eta V_{hyd}}{kT} \quad 3.8$$

Denklemden η , çözeltinin viskozitesi; V_{hyd} hidrodinamik hacim; k ; Boltzmann sabiti ve T ise sıcaklığı ifade etmektedir. Bu denklem mikroviskozitenin hesaplanması için Perrin eşitliğinde yerine yazılırsa;

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{kT\tau_f}{\eta_{mik}V_{hyd}} \quad 3.9$$

şeklinde olacaktır. Mikroviskozite bir probun lokal çevresinin viskozitesinin ne olduğu hakkında fikir veren bir niceliktir. Bu yönüyle bulk viskozitesinden farklı anlam taşır. Çoğunlukla bir probun misel veya hücre zarı gibi sistemlerle etkileştiğinde, etkileşmenin gerçekleştiği kısmın viskozitesini tanımlar (Valuer 2001).

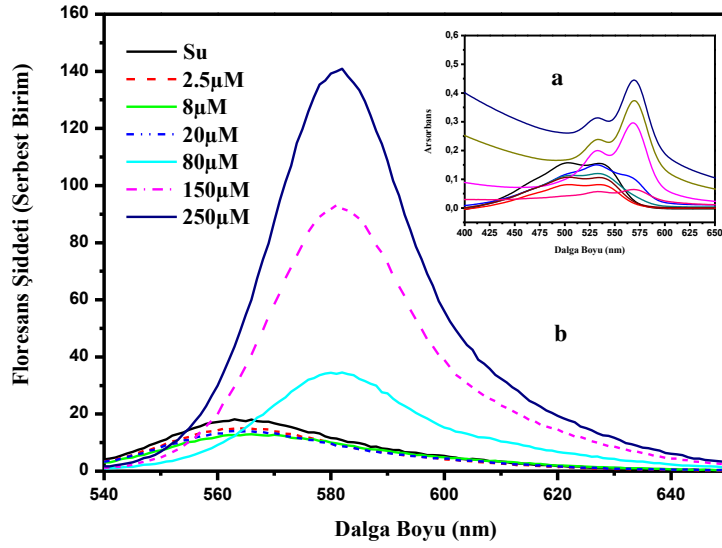
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

MC540 molekülünün optik özellikleri ortamın sıcaklık, polarite ve viskozite değişimlerinden etkilenmektedir. MC540'ın bilinen absorpsiyon ve floresans özelliklerinin yanı sıra, fosfolipidlerle etkileşim şekline göre absorpsiyon ve emisyon spektrumlarında da kaymalar gözlenmektedir. MC540 molekülünün bu özelliğinden faydalanarak lipozom sistemi oluşturulup oluşturulmadığı karakterize edilmiştir.

4.1. Lipozom ve Kesecik Çözeltileri Karakterizasyonu

İlk olarak kullanılacak floroforların 1,0 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra kullanılacak lipozom ortamı oluşturuldu. Bunun için lipit çözeltisinde belirli miktarda lipit(L- α phosphatidylcholine (PC)) alınarak hidratasyon yöntemine göre lipozom yapıları oluşturuldu. Tampon çözeltisiolarak fosfat tamponu(pH=7.4) kullanıldı. Mekanik çalkalama işlemi ultrasonik karıştırıcıda iki saat boyunca gerçekleştirildi. Oluşturulan lipozom yapısını karakterize etmek için floresans spektroskopisinden faydalanıldı.

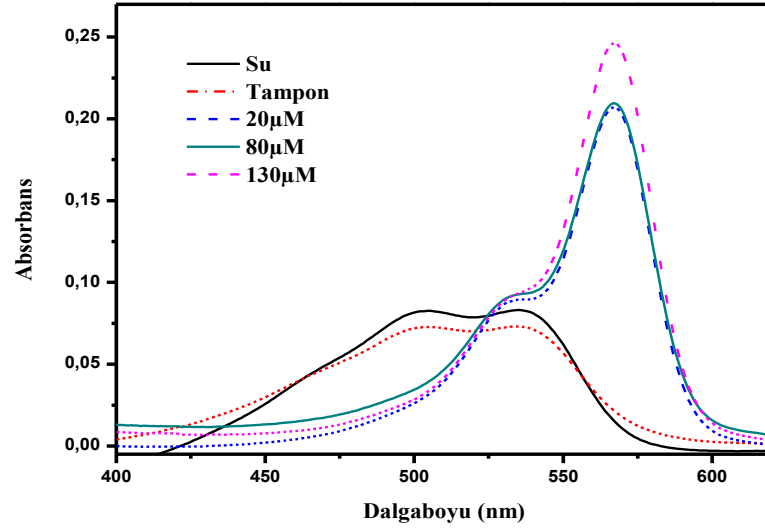
Lipozom çözeltisine akseptörmolekülü olan MC 540'ın konsantrasyonu 1,0 μ M olacak şekilde eklendi ve 10-15 dakika beklenerek tam olarak çözünmesi sağlandı. Ayrıca bu molekülün sudaki çözeltisi spektrumları kıyaslamak amacıyla hazırlandı. Daha sonra oluşturulan sistemin lipozom ortamı olup olmadığı spektroskopik olarak karakterize edilmeye çalışıldı. Bunun için literatürdeki MC 540 molekülüne ait PC lipozomlarında alınmış floresans spektrumu kullanıldı. Artan lipozom ortamında alınmış MC540 molekülünün absorbans ve floresans spektrumları Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. MC 540 molekülü için artan lipozom konsantrasyonunda alınmış absorpsiyon (a) ve floresans spektrumları (b)

*Uyarılma dalga boyu (λ_{ex}) 530 nm'dir

MC 540 molekülünün floresans ölçümünde uyarılma dalga boyu 530 nm olarak belirlenmiştir. Elde edilen spektrumun suya göre bir kıyaslaması yapıldığında, ilk olarak bu molekülün 565 nm'de emisyon piki verdiği, düşük lipozom konsantrasyonlarında dimerleşerek floresans şiddetinin azaldığı görülmüştür. Yüksek lipozom konsantrasyonlarına doğru gidildikçe dimer yapı formunun monomere döndüğü ve böylece emisyon şiddetinin arttığı görülmektedir. Monomer formunun ise 580 nm'de pik verdiği görülmektedir (Verkman 1987). Bu spektrumun literatürdeki verilerle uyduğu belirlenmiştir. MC 540 molekülünün çeşitli kesecik konsantrasyonlarında alınmış absorpsiyon spektrumu Şekil 4.2'de verilmiştir.

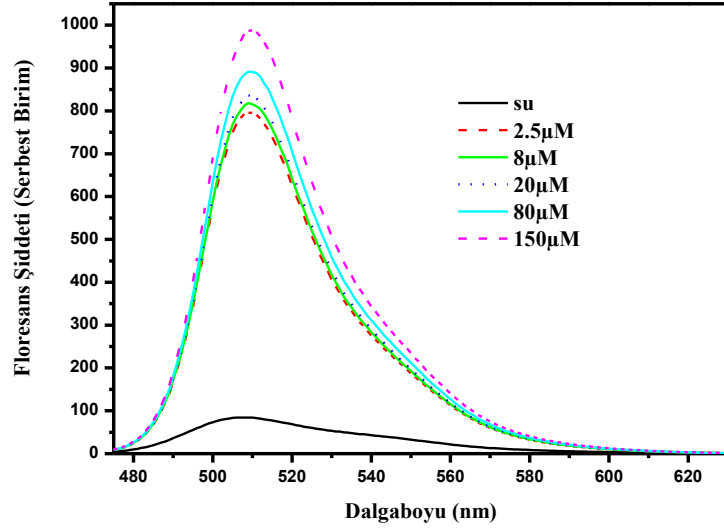


Şekil 4.2. MC 540 molekülünün su, tampon çözelti (pH=7,4) ve artan kesecik konsantrasyonlarında alınmış absorpsiyon spektrumları

MC 540 molekülünün su içerisinde 500 ve 534 nm'de iki absorpsiyon maksimumu gözlemlenmiştir. Tampon çözeltide (pH=7,4) spektrumunda fazla bir değişiklik olmamış hemen hemen aynı bölgelerde absorpsiyon maksimumları gözlemlenmiştir. Artan kesecik konsantrasyonu ile daha fazla MC 540 molekülü yüzeye tutulmasıyla absorpsiyon şiddeti artmıştır. Bu spektrumda MC 540'ın uzun dalga boylu bölgeye monomerin katkısı varken kısa dalga boylu bölgeye H-agregat tipi dimerin katkısının olduğu bilinmektedir (Sikirova and Cunderlikova 1996).

Floresin molekülünün lipozom sistemindeki floresans spektrumu alındı. Ortama eklenen lipozomların konsantrasyonu arttıkça Floresin molekülünün absorpsiyon şiddeti artmış ve 490 nm'de maksimum absorpsiyon gözlemlenmiştir. Ancak bu artışın konsantrasyonla doğru orantılı meydana gelmediği daha yüksek konsantrasyonlara çıkıldığında görülmüştür. Floresin molekülünün sudaki çözünürlüğünün oldukça az olduğu bilinmektedir. Budan dolayı floresin molekülünün sudaki emisyon şiddetinin oldukça düşüktür. Floresin molekülü bazik ortamlarda ise çözünürlüğü oldukça iyidir (Song et al. 2000). Floresin

molekülünün artan lipozom konsantrasyonunda alınmış floresans spektrumu Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Floresin molekülünün artan lipozom konsantrasyonlarında alınmış floresans spektrumları

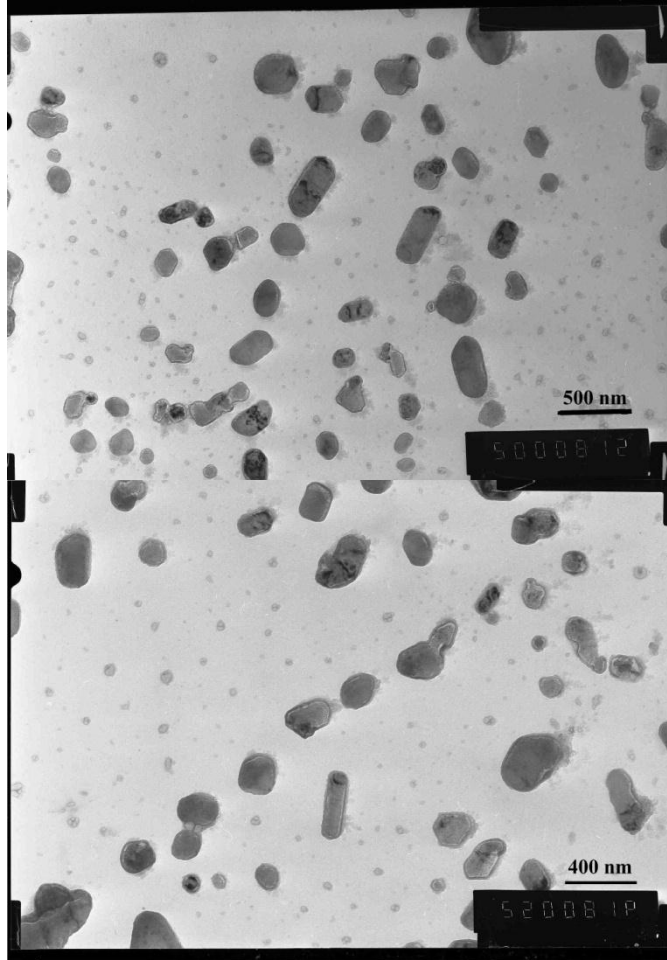
*Uyarılma dalga boyu (λ_{ex}) 475 nm’dir

Floresin molekülünün lipozom konsantrasyonu arttıkça emisyon şiddetinin arttığı ve 509 nm’de maksimum emisyon gösterdiği belirlenmiştir. Floresin molekülü için uyarılma dalga boyu 475 nm olarak belirlenmiştir. Lipozom konsantrasyonu arttıkça emisyon maksimumunun değişmediği gözlenmiştir.

4.1.1. Kesecik Çözeltisi Karakterizasyonu

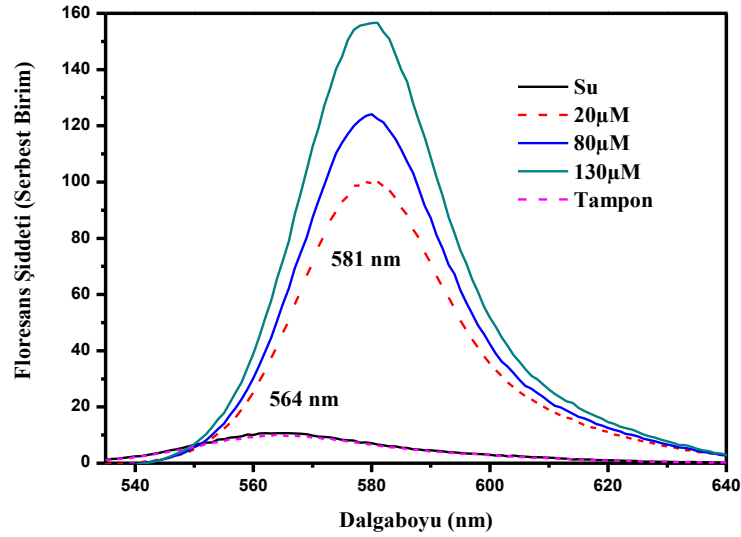
Lipozom formunun tam küre şekli olan kesecik sistemini oluşturmak için sonikasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu nedenle belirli miktarda lipit (L- α fosfatidylcholine (PC)) alınarak bir miktar kloroformda çözülmüş ve daha sonra kloroform evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Kloroformun tamamen uzaklaşması için azot gazından geçirilmiştir. Kloroform tamamen uzaklaştırıldıktan sonra tampon çözelti (5 mL fosfat tamponu, pH=7.4) eklenerek, sonikatöre konulmuştur. Homojenliğin sağlanması için azot gazı

verilerek iki saat süreyle bekletilmiştir. Elde edilen çözeltiyi karakterize etmek için alınan TEM görüntüsü Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4. Kesecik çözeltisi için TEM görüntüleri

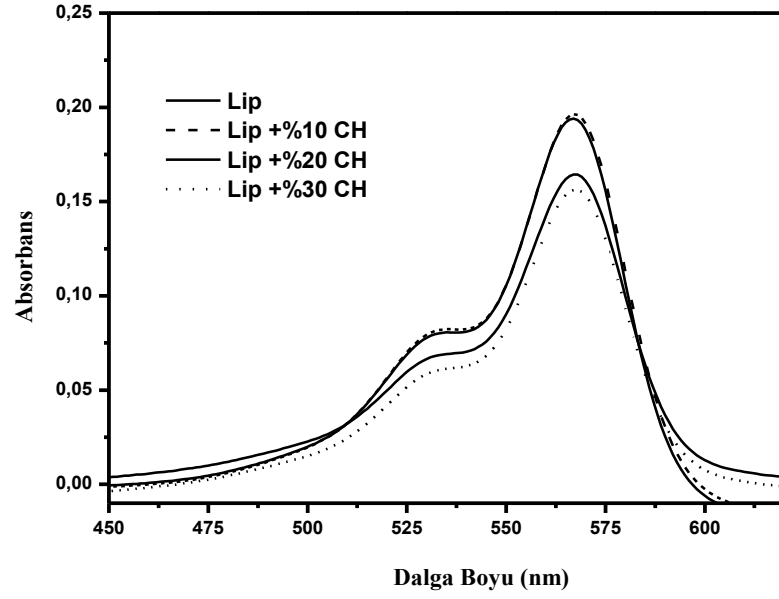
Elde edilen TEM görüntülerinden kesecik çaplarının yaklaşık 50-300 nm arasında değiştiği, bu değerlerin PC lipitleriyle hazırlanmış kesecik sistemlerinin boyutlarıyla uygunluk gösterdiği gözlenmiştir (Knolet *al.* 1998; Ruyschaert *al.* 2005). Bu çözeltilerden istenilen boyutlarda kesecik elde etmek için polikarbonat filtreler kullanılmaktadır (Zhao *et al.* 2005). Ancak çalışmamızda bu yöntem başvurulmamıştır. Çünkü kesecik boyutunun etkileri çalışmamız kapsamında yoktur. MC 540 molekülünün kesecik çözeltisindeki floresans spektrumu Şekil 4.5.’de verilmiştir.



Şekil 4.5. MC 540 molekülünün su, tampon çözelti (pH=7,4) ve artan kesecik konsantrasyonlarında alınmış floresans spektrumları
*Uyarılma dalga boyu (λ_{ex}) 530 nm'dir

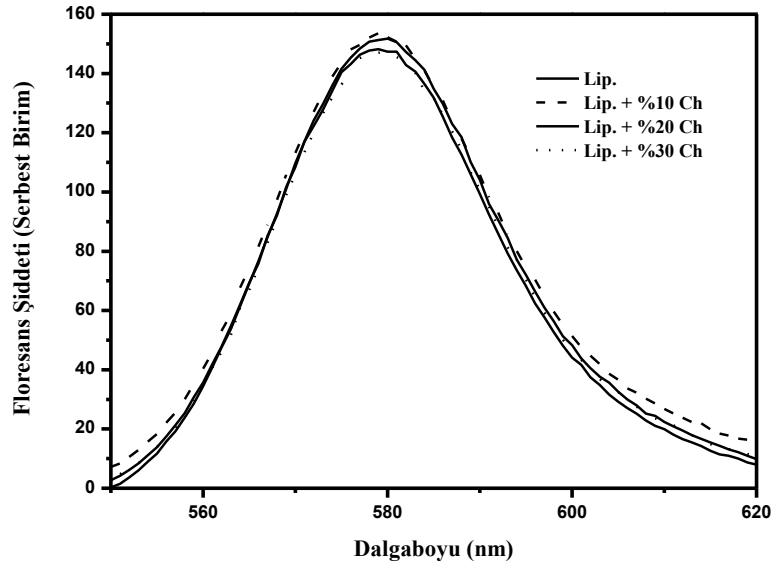
Su ve tampon çözelti içerisinde MC 540 molekülünün floresans maksimum değeri 564 nm iken kesecik ortamında 581 nm olup floresans maksimumunun düşük enerjili bölgeye kaydığı gözlenmiştir. Kesecik konsantrasyonunun artmasına rağmen emisyon maksimumunun değişmediği belirlenmiştir. 1,0 μM'lık konsantrasyona sahip floresin molekülü için kesecik ortamında spektrum alınamamıştır. FL molekülünün floresans spektrumu bu konsantrasyonda ve slit aralığında kesmiştir. Bu yüzden daha düşük konsantrasyon olan 0,1 μM seçilmiş ve alınan floresans spektrumunun dalga boyunda bir değişiklik gözlenmemiştir. Floresans maksimum değeri 509 nm olarak ölçülmüştür. Emisyon şiddetinin artması kesecik yapısının lipozom yapısına göre daha stabil bir yapı olduğunu göstermektedir.

Oluşturulan sisteme kolesterol eklendiği zaman meydana gelen değişimler incelenmiştir. Bunun için lipit konsantrasyonun belli oranlarda kolesterol eklenerek hidratasyon yöntemiyle lipozom+kolesterol karışımı oluşturulmuştur. 1,0 μM konsantrasyonda MC 540 molekülünün bu sistemde alınmış absorban spektrumu Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. MC 540 molekülünün değişen kolesterol miktarındaki absorpsiyon spektrumları

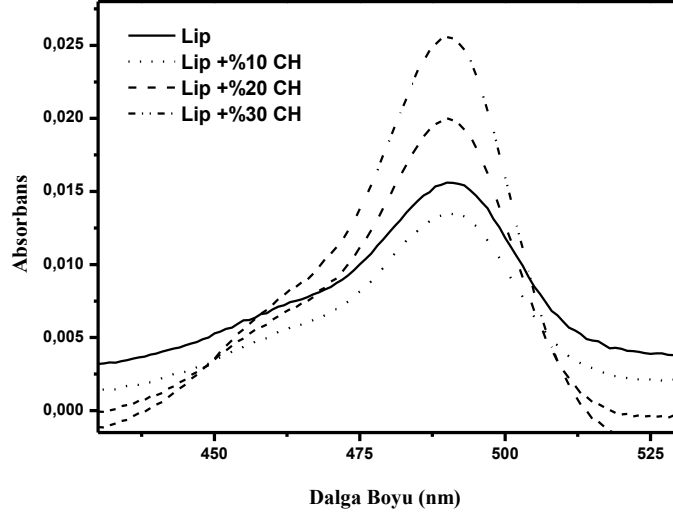
Lipozom ortamındaki MC 540 molekülü için absorbans maksimumu 567 nm iken, ortama kolesterol eklendiğinde absorbans maksimumu 1 nm kaymış ve 568 nm olmuştur. Bu kayma önemsizmeyecek kadar azdır. Bu molekül için alınan floresans spektrumu Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. MC 540 molekülünün değişen kolesterol miktarında alınmış floresans spektrumları

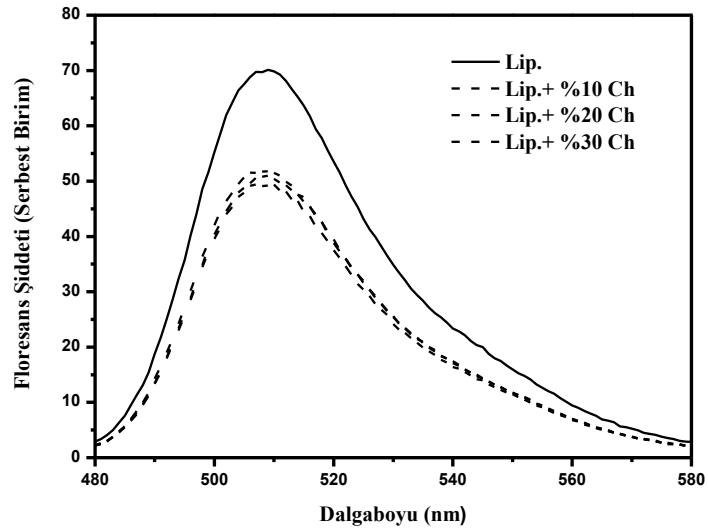
*Uyarılma dalga boyu (λ_{ex}) 530 nm'dir

30 μ M lipozom konsantrasyonunda alınan floresans spektrumunda, emisyon maksimum değeri 578 nm iken eklenen kolesterol miktarına bağlı olarak 1 nm kayarak 579 nm'de emisyon göstermiştir. Bu durum bileşimdeki değişikliğin probun bölge seçiciliğini etkilemediğini göstermektedir (Onganer 1993). Aynı şartlarda Floresin molekülü için alınan absorpsiyon spektrumu Şekil 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Floresin molekülünün değişen kolesterol miktarındaki absorpsiyon spektrumları

Floresin molekülü için alınan spektrumda absorbans maksimumu tüm ortamlar için 490 nm olarak tespit edilmiştir. Bu molekülün yapay mebranda alınmış floresans spektrumu Şekil 4.9.'da verilmiştir.



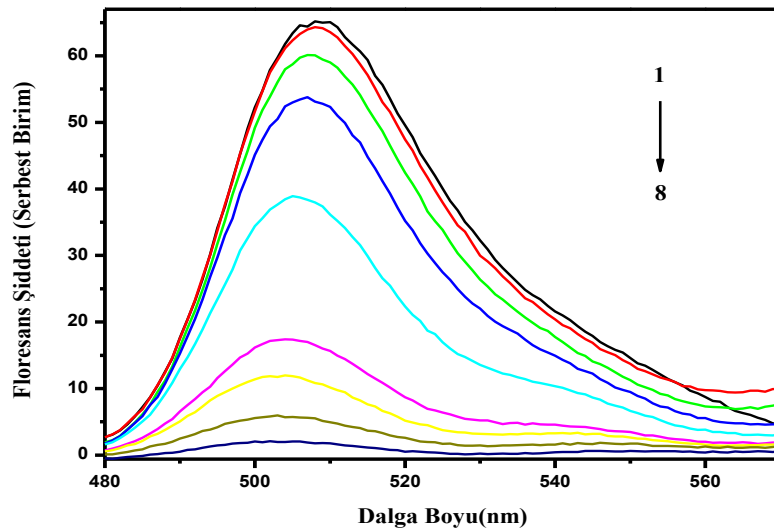
Şekil 4.9. Floresin molekülünün değişen kolesterol miktarında alınmış floresans spektrumları

*Uyarılma dalga boyu (λ_{ex}) 530 nm'dir

Absorpsiyonda olduğu gibi değişen kolesterol miktarına bağlı olarak floresin molekülünün floresans maksimumu değişmemiş ve 509 nm’de görülmüştür. Ancak floresans şiddetinde bir azalma meydana gelmiştir. Bunun sebebi olarak FL molekülünün ortamdaki farklı türlerden etkilenmesi olarak açıklanabilir. Lipozom ve kesecik sistemleri oluşturulup karakterize edildikten sonra bu moleküllerin aynı ortamda etkileşimleri hakkında bilgi edinmek için sabit bir lipozom konsantrasyonu (150 μ M) seçilmiştir.

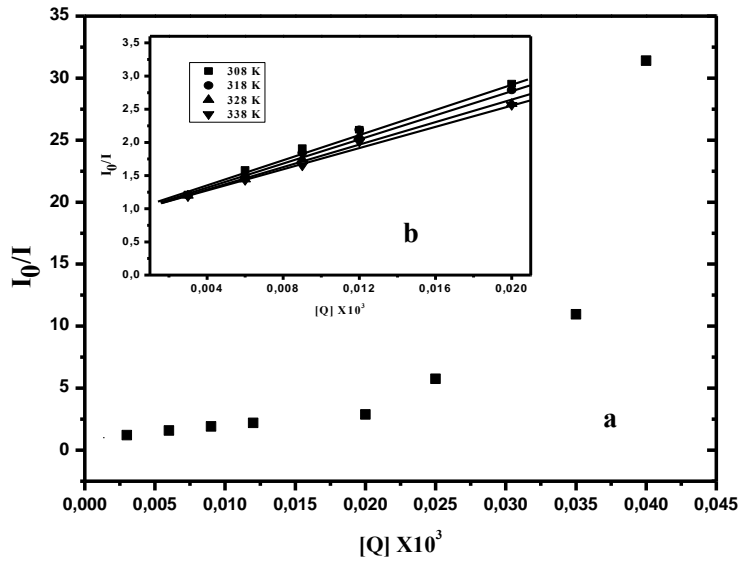
4.2.FLve MC540 Molekül Çiftinin Lipozom Çözeltisindeki Etkileşimi

150 μ M’lık lipozom ortamında FL molekülünün konsantrasyonu 1,0 μ M’da sabit tutulup, MC 540’in konsantrasyonu artırılarak numuneler oluşturuldu. Sonuçta elde edilen floresans spektrumlarında, FL molekülünün floresans şiddetinde bir azalma oluşu görülürken MC540 molekülünün emisyon bölgesinde herhangi bir kayda değer band görülmemiştir. Bu azalmanın gösterildiği floresans spektrumu Şekil 4.10’ da verilmiştir.



Şekil 4.10. 150 μ M’lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında 1,0 μ M FL’in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları
*MC 540 molekülünün konsantrasyonu:(1) 0 μ M; (2) 3 μ M; (3) 6 μ M; (4) 12 μ M (5) 20 μ M; (6) 25 μ M; (7) 35 μ M; (8) 40 μ M

Spektrumdan da görüldüğü gibi, floresin molekülünün floresans şiddeti MC 540'ın eklenmesiyle azalmış, yani MC 540'ın konsantrasyon artışıyla FL molekülünün floresans şiddetinin söndüğü görülmüştür. Sonuç olarak bu moleküllerin birbirleriyle etkileştikleri görülmektedir. MC540 bileşiğinin konsantrasyonunun artırılmasıyla, FL'in floresans şiddetinde gözlenen bu azalma, tipik bir kuençleşme prosesi olarak görülmektedir. Bu nedenle 150 μM 'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında FL için Denklem 1.4'te göre Stern-Volmer grafiği çizilip, grafikten Stern-Volmer hız sabiti (K_{sv}) belirlenebilir. 150 μM 'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında FL ve MC540 bileşiklerinin değişik konsantrasyonları için çizilen Stern-Volmer grafiği Şekil 4.11'de verilmiştir.

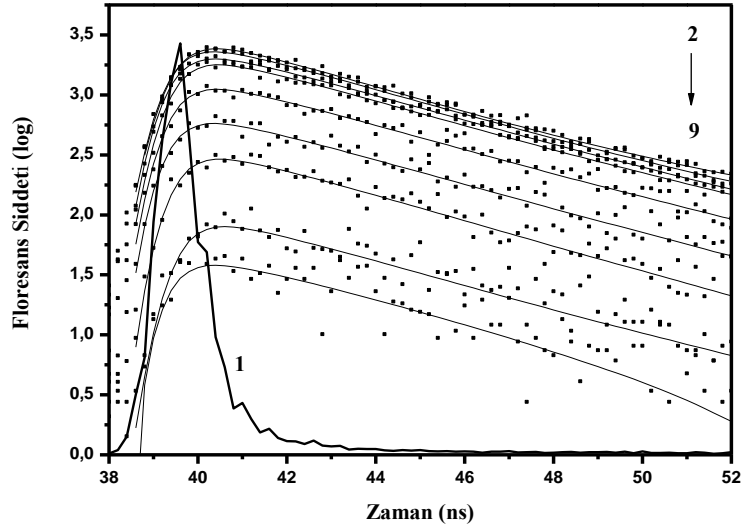


Şekil 4.11. 150 μM 'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarına karşı çizilmiş Stern- Volmer grafiği.

*(a)MC 540 molekülünün konsantrasyonu:3 μM ; 6 μM ; 12 μM ; 20 μM ; 25 μM ; 35 μM ; 40 μM . (b) FL-MC540 molekül çifti için lineer Stern-Volmer grafiği MC 540 molekülünün konsantrasyonu:3 μM ; 6 μM ; 12 μM ; 20 μM ; 25 μM

Şekilden de görüldüğü gibi düşük MC540 konsantrasyonlarında lineerlik varken konsantrasyon artışıyla lineerlikten pozitif bir sapma meydana gelmiş, kuençır konsantrasyonun artmasıyla bu sapma belirgin bir şekilde görülmüştür. Bu tür kuençleşme mekanizmaları statik kuençleşme olarak tanımlanmaktadır. Statik

kuençleşme olaylarında florofor (FL) ve kuençir (MC540) molekülü birleşerek karanlık bir kompleks oluştuğu bilinmektedir. Ancak kuençleşme mekanizmasının türünü tam olarak belirlemek için sıcaklık çalışması ve floresans durulma ölçümleri yapılmalıdır. Bunun için sıcaklık artışıyla elde edilen Stern-Volmer hız sabitleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Alınan floresans durulma spektrumu Şekil 4.12’de verilmiştir.

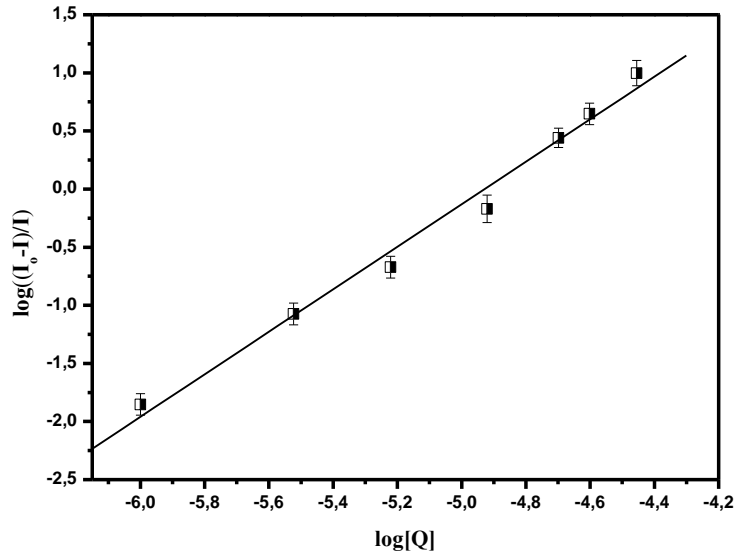


Şekil 4.12. 150 µM’lık lipozom içeren sulu ortamda FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.

* (1) IRF (cihazın tepki fonksiyonu), MC 540 konsantrasyonu: (2) 0 µM; (3) 3 µM; (4) 6 µM; (5) 12 µM (6) 20 µM; (7) 25 µM; (8) 35 µM; (9) 40 µM

Spektrumdan da görüldüğü gibi kuençir eklenmesiyle donörün floresans durulma şiddeti azalmıştır. Sıcaklık çalışmasıyla elde edilen Şekil 4.11(a)’da eğimden hesaplanan K_{SV} değerlerinin sıcaklık artışıyla azaldığı görülmektedir. Stern-Volmer grafiğinin eğimi azalmaktadır. Sonuç olarak floresans durulma ve sıcaklık çalışmasıyla FL ve MC540 molekülleri arasındaki kuençleşme mekanizmasının kesin olarak statik kuençleşme olduğu belirlenmiştir. Statik kuençleşme olaylarında florofor ile kuençir arasında bir etkileşim meydana geldiğinin ve bu etkileşim sonucu karanlık bir kompleks meydana geldiğini daha önce bahsetmiştik. Şayet bir kompleks oluşumu varsa bir bağlanma olayının da meydana gelmesi gerekmektedir. Bundan dolayı modifiye Stern-Volmer denklemi kullanılarak bu moleküller arasındaki bağlanma sabiti (K) ve bağlanma

anfinitesi hesaplanabilir. Bunun için FL-MC540 molekülleri arasındaki etkileşim için denklem 1.21 kullanılarak çizilen grafikten, etkileşim sabitleri hesaplanmıştır. 150 μM 'lık lipozom içeren sulu ortamda FL-MC540 moleküllerinin arasındaki etkileşimler için bağlanma sabiti grafiği Şekil 4.13'te verilmiştir. Bu grafikte FL molekülünün konsantrasyonu 1,0 μM 'dır.



Şekil 4.13. 150 μM 'lık lipozom içeren sulu ortamda FL-MC 540 etkileşimi için bağlanma sabiti grafiği
*($\chi^2=0.9932$)

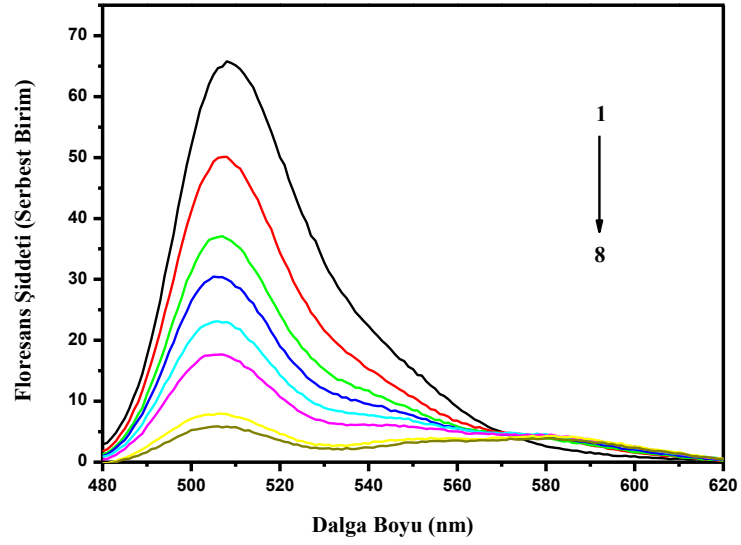
Grafiğin eğiminden bağlanma sabiti, kesim noktasından bağlanma anfinitesi hesaplanmıştır. Farklı sıcaklıklardaki bağlanma sabitleri kullanılarak Van't Hoff denkleminde 150 μM 'lık lipozom içeren sulu ortamda FL-MC540 molekülleri arasındaki etkileşimler için termodinamik parametreler hesaplanmıştır. Bunun için dört farklı sıcaklıktaki bağlanma sabitleri kullanılmıştır. Çizelge 4.1'de değişik sıcaklıklar için bağlanma ve anfinite sabitleri ile termodinamik parametreler yer almaktadır.

Çizelge 4.1. 150 μM 'lık lipozom içeren sulu ortamda FL -MC 540 etkileşimi için değişik sıcaklıklardaki bağlanma ve termodinamik parametreleri ile Stern-Volmer sabitleri

T (K)	$K_{sv}(\times 10^4)$ Lmol^{-1}	χ^2	$K(\times 10^{13})$ /mol)	n	ΔG^0 (kJ/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/molK)
308	9.6	0,9935	2864.0	3.41	-99.0	-190.98	-297.4
318	9.1	0,9874	559.7	3.26	-96.1		
328	8.2	0,9838	208,4	3.17	-93.1		
338	7.8	0,9901	3.4	2.80	-90.1		

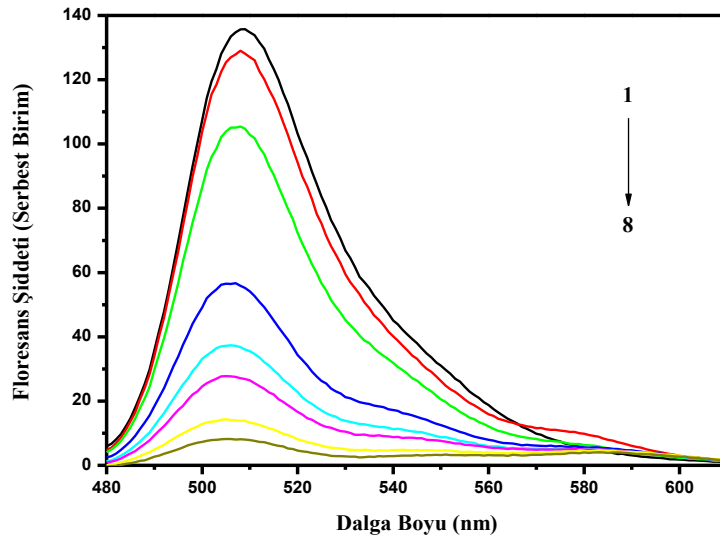
Gibbs serbest enerjisinin negatif çıkması FL ile MC 540'ın eşzamanlı olarak kuençleşme alanına girdiğini göstermektedir. ΔH^0 ve ΔS^0 negatif olarak çıkması ise MC 540 ile FL molekülleri arasında van der Waals ve hidrojen bağı etkileşimlerinin olduğunu göstermektedir. n değerinin 1'in üstünde çıkması kuençürün birden fazla yönde etkileşim şekli olduğunu, K değerinin sıcaklıkla azalması ise olayın ekzotermik olduğunu göstermektedir (Xi and Guo 2007; Roberta *et al.* 2010).

Lipozom konsantrasyonunun FL-MC540 etkileşimine etkisini belirlemek için değişik lipozom konsantrasyonlarında çalışıldı. Bunun için dört farklı lipozom konsantrasyonu (65 μM , 80 μM , 105 μM ve 120 μM) seçildi. Bu çözeltilerin her birine yine aynı şekilde FL bileşiğinin konsantrasyonu sabit tutularak MC540'ın artan konsantrasyonları eklenip floresans spektrumları alındı. 65 μM , 80 μM , 105 μM ve 120 μM lipozom konsantrasyonu içeren sulu ortamda alınmış floresans spektrumları sırasıyla Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



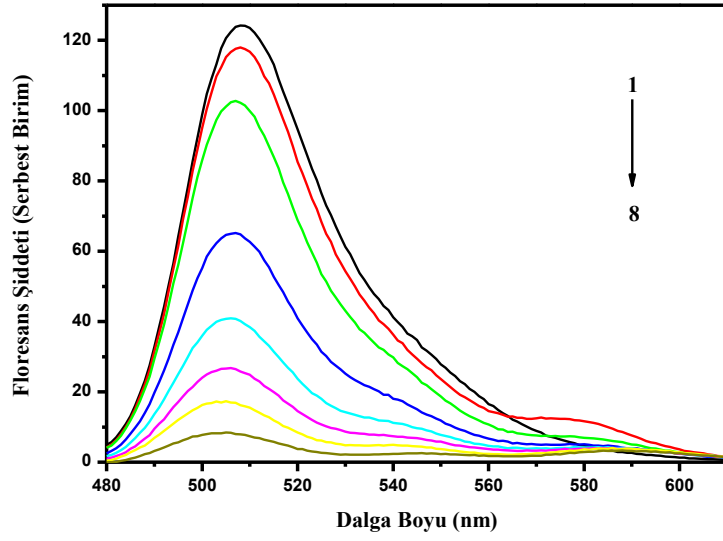
Şekil 4.14. 65 μ M'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında 1,0 μ M FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları

*MC 540 molekülünün konsantrasyonu:(1) 0 μ M; (2) 5 μ M; (3) 9 μ M; (4) 13 μ M (5) 16 μ M; (6) 20 μ M; (7) 30 μ M; (8) 40 μ M

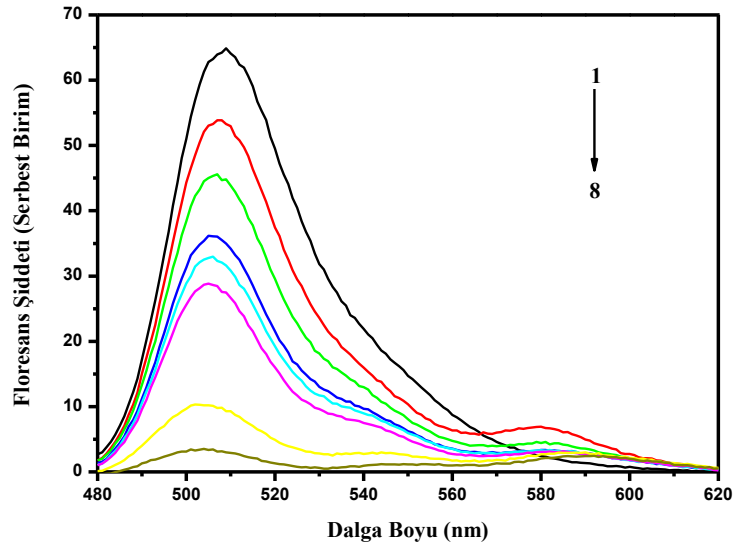


Şekil 4.15. 80 μ M'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında 1,0 μ M FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları

*MC 540 molekülünün konsantrasyonu:(1) 0 μ M; (2) 2 μ M; (3) 8 μ M; (4) 15 μ M (5) 20 μ M; (6) 25 μ M; (7) 33 μ M; (8) 40 μ M

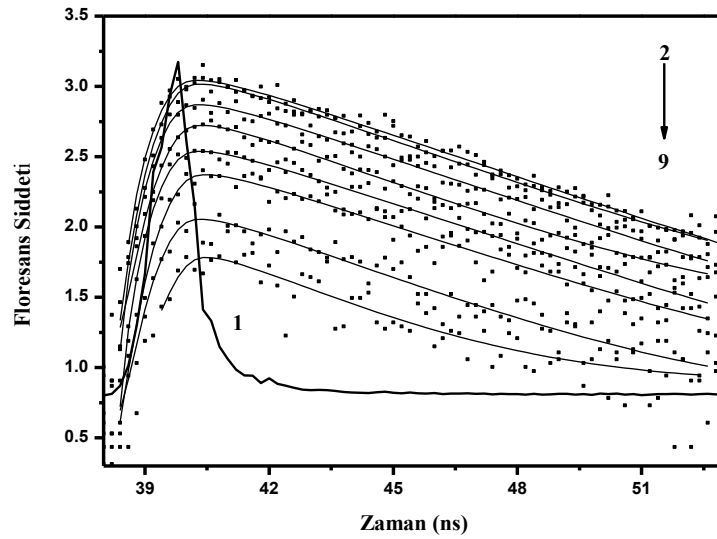


Şekil 4.16. 105 μ M'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında 1,0 μ M FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları
 *MC 540 molekülünün konsantrasyonu:(1) 0 μ M; (2) 2 μ M; (3) 8 μ M; (4) 15 μ M (5) 20 μ M; (6) 25 μ M; (7) 33 μ M; (8) 40 μ M



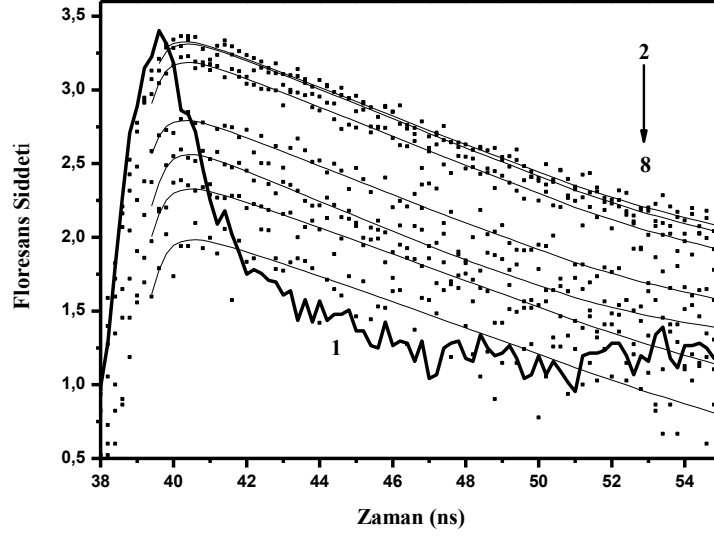
Şekil 4.17. 120 μ M'lık lipozom içeren sulu çözelti ortamında 1,0 μ M FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları
 *MC 540 molekülünün konsantrasyonu:(1) 0 μ M; (2) 5 μ M; (3) 9 μ M; (4) 13 μ M (5) 16 μ M; (6) 20 μ M; (7) 30 μ M; (8) 40 μ M

Grafiklerden de görüleceği gibi FL bileşiğinin floresans şiddeti, MC540'ın eklenmesiyle azalmaktadır. Düşük MC540 konsantrasyonlarında bu bileşiğin emisyon bandı kısmında bir bant (579 nm) meydana gelmekte fakat konsantrasyon artışıyla bu bandın kaybolduğu görülmektedir. Sonuçta bu çözeltilerde iki molekül arasında bir etkileşimin olduğu ve MC540 bileşiğinin konsantrasyonunun artırılmasıyla, FL'in floresans şiddetinde meydana gelen bu azalma, tipik bir kuençleşme prosesi olarak görülmektedir. Kuençleşme mekanizma türünü belirlemek için floresans durulma ölçümlerinden faydalanıldı. 65 μM , 80 μM , 105 μM ve 120 μM lipozom konsantrasyonu içeren sulu ortamda alınmış floresans spektrumları sırasıyla Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de gösterilmiştir.



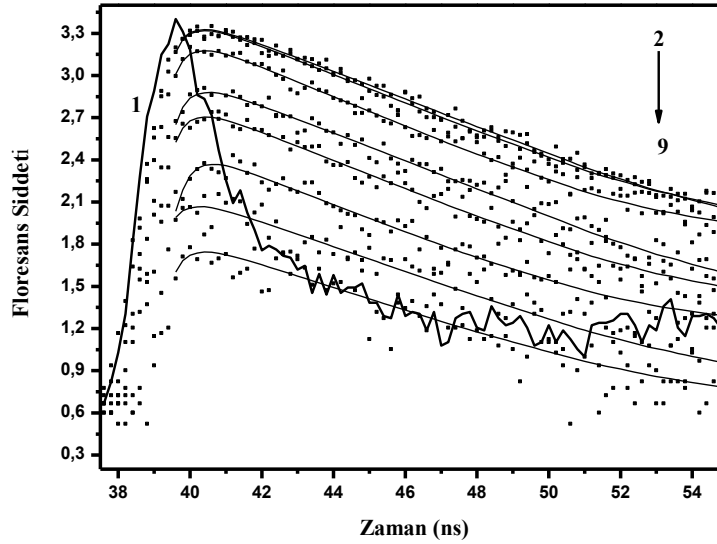
Şekil 4.18. 65 μM 'lık lipozom içeren sulu ortamda FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.

*(1) IRF(cihazın tepki fonksiyonu), MC 540 konsantrasyonu:(2) 0 μM ; (3) 5 μM ; (4) 9 μM ; (5) 13 μM (6) 16 μM ; (7) 20 μM ; (8) 30 μM ; (9) 40 μM



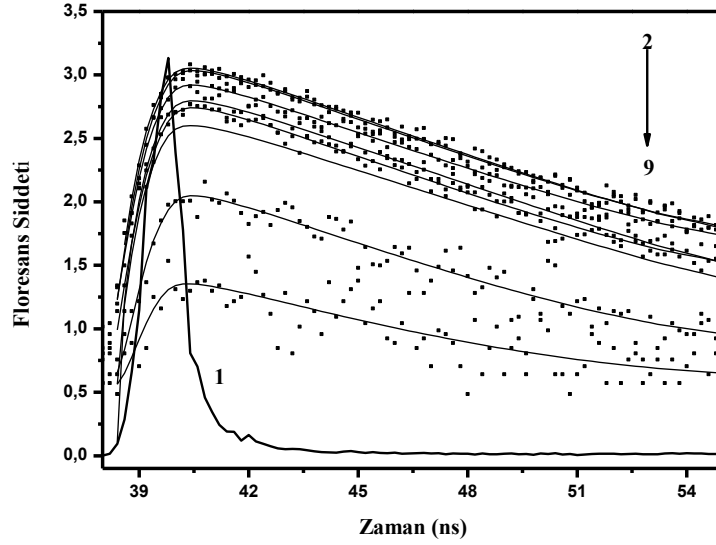
Şekil 4.19. 80 μ M'lık lipozom içeren sulu ortamda FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.

* (1) IRF (cihazın tepki fonksiyonu), MC 540 konsantrasyonu; (2) 0 μ M; (3) 2 μ M; (4) 8 μ M; (5) 15 μ M (6) 20 μ M; (7) 25 μ M; (8) 33 μ M



Şekil 4.20. 105 μ M'lık lipozom içeren sulu ortamda FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.

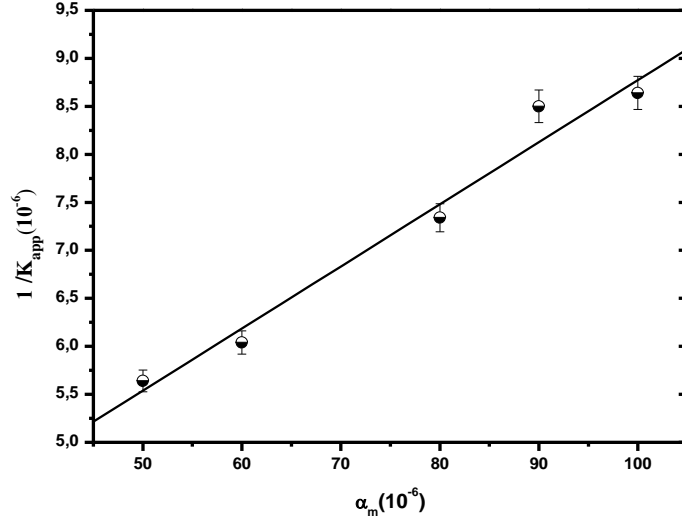
* (1) IRF (cihazın tepki fonksiyonu), MC 540 konsantrasyonu: (2) 0 μ M; (3) 5 μ M; (4) 9 μ M; (5) 13 μ M (6) 16 μ M; (7) 20 μ M; (8) 30 μ M; (9) 40 μ M



Şekil 4.21. 120 μ M'lık lipozom içeren sulu ortamda FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.

*(1) IRF(cihazın tepki fonksiyonu), MC 540 konsantrasyonu; (2) 0 μ M; (3) 2 μ M; (4) 8 μ M; (5) 15 μ M (6) 20 μ M; (7) 25 μ M; (8) 33 μ M; (9) 40 μ M

Floresans durulma spektrumlarından da görüldüğü gibi çalışılan tüm lipozom konsantrasyonlarda FL molekülünün floresans şiddeti MC540'ın konsantrasyon artışıyla azalmıştır. Sonuç olarak bu iki molekül arasında daha önce çalışılan konsantrasyonda olduğu gibi statik bir kuençleşme olduğu düşünülebilir. Bu sonuçlara göre lipozom konsantrasyonu değişse bile bu iki molekül arasındaki etkileşim türü genelde statik kuençleşme olabileceği söylenebilir. FL'in floresans şiddetinde gözlenen bu azalma, tipik bir kuençleşme prosesi olduğu için Stern-Volmer hız sabiti hesaplanabilir (Acar 2007; Bozkurt2007). Bu nedenle 65 μ M, 80 μ M, 105 μ M ve 120 μ M lipozom içeren sulu çözelti ortamında FL için denklem 1.4'te verilen Stern-Volmer denklemine göre çizilmiş ve grafikten Stern-Volmer hız sabiti (K_{sv}) hesaplanmıştır. Hesaplanan sabitler 65 μ M, 80 μ M, 105 μ M ve 120 μ M lipozom içeren sulu çözelti ortamı için sırasıyla 115220, 114889, 102548 ve 99567 L.mol⁻¹'dir. Bu sabitler kullanılarak MC540 molekülünün lipit fazdaki ayrışma oran sabiti hesaplanabilmektedir. Bunun için denklem 1.33 kullanılarak çizilen grafik Şekil 4.22' de verilmiştir.



Şekil 4.22. MC540 molekülü için değişik lipozom konsantrasyonları için $1/k_{app}$ karşı α_m grafiği

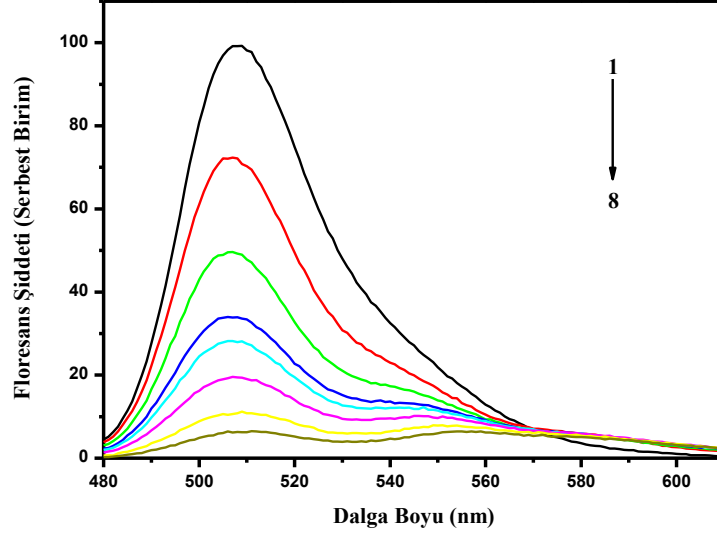
Bu grafikten elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2 de verilmiştir. Sonuç olarak lipozom konsantrasyonu artışıyla k_{app} değerleri azalmıştır. Bu azalmanın sebebi ortamda bulunan MC540 molekülünün lipozomlara bağlanması olarak açıklanmaktadır. Çünkü ortamda bulunan kuençirkonsantrasyonunun azalmasına sebep olmuştur. Ayrıca maksimum dinamik kuençleşme sabiti yaklaşık olarak $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ dir. ($k_{qm} = k_q \chi \tau_0$) olduğundan bulunan k_q değeri bu değerden büyüktür. Lipozom içeren sulu çözeltiler gibi heterojen ortamlarda karanlık bir kompleks oluşmasının baskın bir durum olduğunu, elde edilen k_q değeri de tekrar göstermektedir (Ge *et al.* 2010;Huanget *al.* 2010).

Çizelge 4.2. Bimoleküler kuençleşme (k_q), mebrandaki bimoleküler kuençleşme (k_{qm}) ve ayrışma (K_p) sabitleri

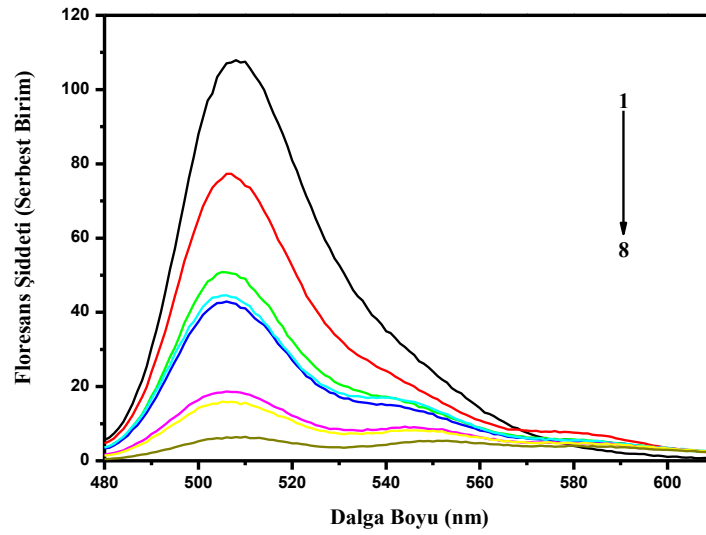
Bileşik	K_p	$k_{qm}(M^{-1})$	$k_q (x10^{14}L/mols)$
MC540	7936,5±620	9,3±1,2	3,11

4.3.FLve MC540 Molekül Çiftinin Lipozom+Kolesterol Karışımındaki Etkileşimi

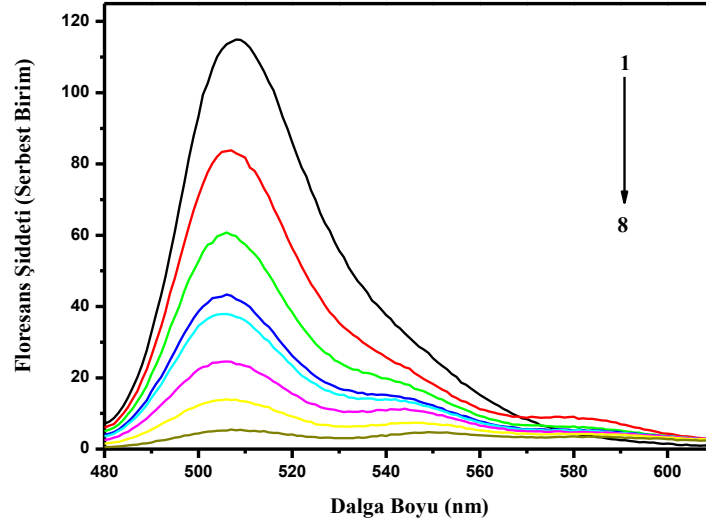
Kolesterol ökaryotik hücreli canlıların bir ana plazma mebran bileşimidir. Kolesterol mebranın akışkanlığı ve yapısı için ana maddelerinden biri olup, ayrıca lipitteki kolesterol oranı biyolojik fonksiyonları kontrol etmektedir. Hücre mebranında kolesterol bozuklukları birçok hastalığa da sebep vermektedir (Shaneet al. 2008). Çözelti ortamı olan lipozom yapısına çeşitli oranlarda kolesterol ekleyip model mebran sistemi oluşturulup, FL-MC540 etkileşimi incelendi. Seçilen lipozomkonsantrasyonu yaklaşık 105 μ M olup bu konsantrasyonun %10, %20 ve %30'u kadar kolesterol eklenmiştir. Seçilen lipozom konsantrasyonun florofor oranına yaklaşık 1:100 olması tercih edilmektedir. Şekil 4.23, Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'te 105 μ M'lık lipozomkonsantrasyonunun, sırasıyla %10, %20 ve % 30'u kadar eklenmiş kolesterollü lipozom içeren sulu çözelti ortamında, artan MC540 konsantrasyonuna karşı FL molekülünün alınmış emisyon spektrumları gösterilmiştir.



Şekil 4.23. 105 μM lipozom + 10,5 μM kolesterol içeren sulu çözeltide 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları
*MC 540 molekülünün konsantrasyonu:(1) 0 μM ; (2) 4 μM ; (3) 8 μM ; (4) 10 μM (5) 12 μM ; (6) 16 μM ; (7) 20 μM ; (8) 25 μM

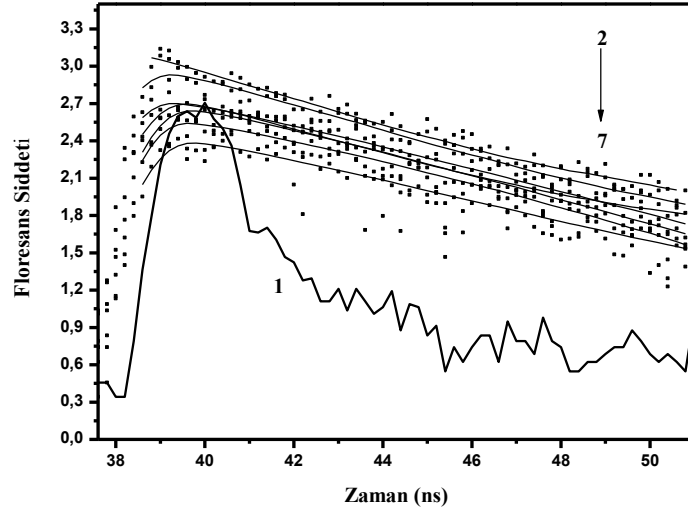


Şekil 4.24. 105 μM lipozom + 21 μM kolesterol içeren sulu çözeltide 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları
*MC 540 molekülünün konsantrasyonu:(1) 0 μM ; (2) 4 μM ; (3) 8 μM ; (4) 10 μM (5) 12 μM ; (6) 16 μM ; (7) 20 μM ; (8) 25 μM



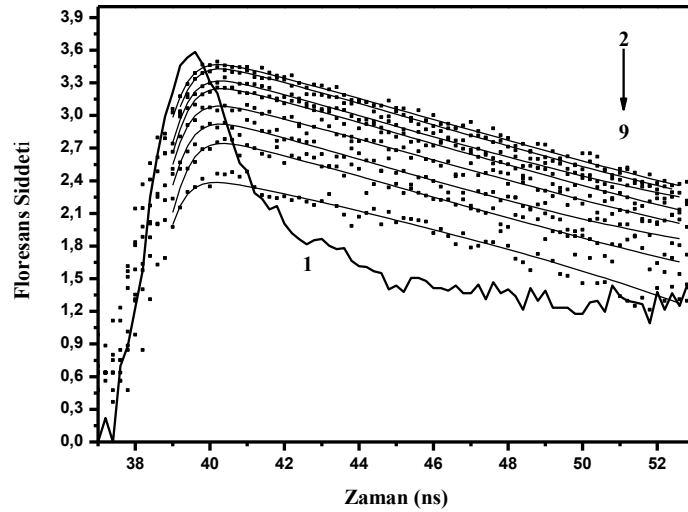
Şekil 4.25. 105 μM lipozom + 31,5 μM kolesterol içeren sulu çözeltide 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları
 *MC 540 molekülünün konsantrasyonu:(1) 0 μM ; (2) 4 μM ; (3) 8 μM ; (4) 10 μM (5) 12 μM ; (6) 16 μM ; (7) 20 μM ; (8) 25 μM

MC 540 molekülünün konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak alınan üç floresans spektrumunda da FL molekülünün floresans şiddeti azalmıştır. Bu azalma bu iki molekül arasında bir etkileşimin olduğunu göstermekte olup bu tür etkileşimler yukarıda da bahsettiğimiz gibi floresans kuençleşme olarak ifade edilmektedir. Yine aynı şekilde kuençleşme mekanizmasını belirlemek için floresans durulma ve sıcaklık çalışmasından faydalanılmıştır. Şekil 4.26, Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'te 105 μM 'lık lipozomkonsantrasyonuna, sırasıyla %10, %20 ve % 30'u kadar eklenmiş kolesterol içeren sulu çözelti ortamında alınmış floresans durulma spektrumları gösterilmiştir.



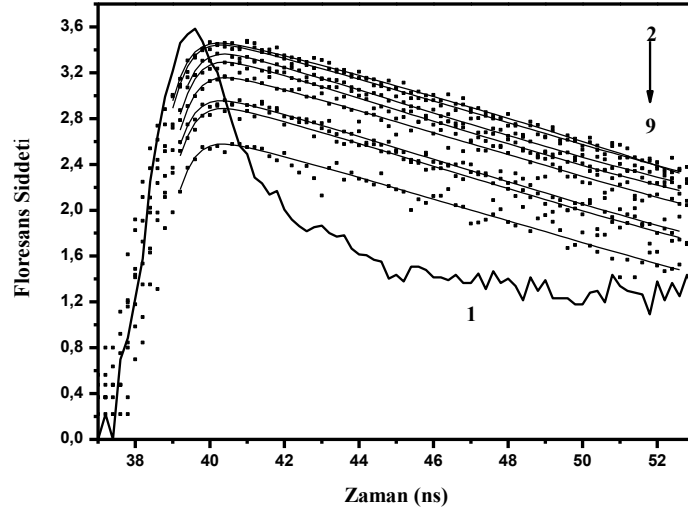
Şekil 4.26. 105 μM lipozom + 10,5 μM kolesterol içeren sulu çözeltide FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.

* (1) IRF (cihazın tepki fonksiyonu), MC 540 konsantrasyonu; (2) 0 μM ; (3) 4 μM ; (4) 8 μM ; (5) 10 μM (6) 22 μM ; (7) 16 μM ;



Şekil 4.27. 105 μM lipozom + 21 μM kolesterol içeren sulu çözeltide FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.

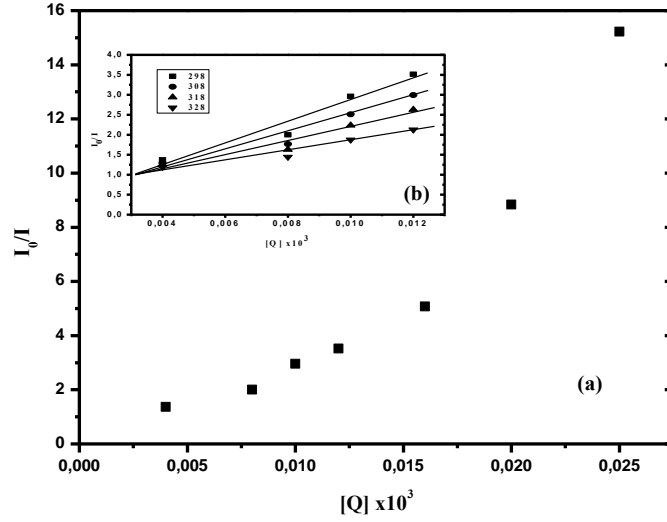
* (1) IRF (cihazın tepki fonksiyonu), MC 540 konsantrasyonu; (2) 0 μM ; (3) 2 μM ; (4) 8 μM ; (5) 10 μM (6) 12 μM ; (7) 16 μM ; (8) 20 μM ; (9) 25 μM



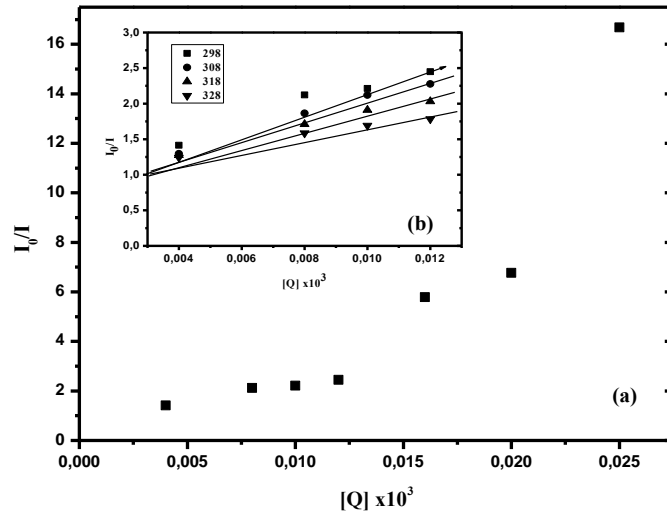
Şekil 4.28. 105 µM lipozom + 31,5 µM kolesterol içeren sulu çözeltide FL molekülünün floresans şiddetindeki azalmanın zamana bağlılığı.

*(1) IRF(cihazın tepki fonksiyonu), MC 540 konsantrasyonu; (2) 0µM; (3) 2 µM; (4) 8 µM; (5) 10 µM (6) 12 µM; (7) 16 µM; (8) 20 µM; (9) 25 µM

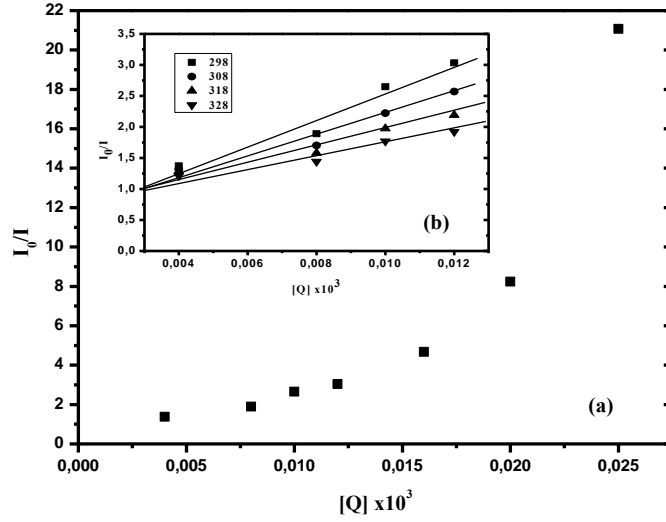
Floresans durulma spektrumlarından da görüldüğü gibi her üç kolesterol konsantrasyonundada MC540 molekülün konsantrasyonundaki artışla, floresans durulma şiddeti azalmaya başlamış ancak spektrumların eğimi fazla değişmemiştir. Bu daha önce bahsettiğimiz gibi kuençleşme mekanizmasının statik olduğunu göstermektedir. Denklem 1.4'e göre çizilen Stern-Volmer grafiklerinden hız sabileri (K_{sv}) hesaplanmıştır. 105 µM'lık lipozomkonsantrasyonunun, sırasıyla %10, %20 ve %30'u kadar eklenmiş kolesterol içeren sulu çözelti ortamında FL ve MC540 bileşiklerinin değişik konsantrasyonları için çizilen Stern-Volmer grafikleri sırasıyla Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de verilmiştir.



Şekil 4.29. (a)105 μM lipozom + 10,5 μM kolesterol içeren sulu çözelti ortamında 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarına karşı çizilmiş Stern- Volmer grafiği.
*MC 540 molekülünün konsantrasyonu:2 μM ; 8 μM ; 10 μM ; 12 μM ; 16 μM ; 20 μM ; 25 μM . (b) FL-MC540 molekül çifti için lineer Stern-Volmer grafiği MC 540 molekülünün konsantrasyonu:2 μM ; 4 μM ; 8 μM ; 10 μM ; 12 μM



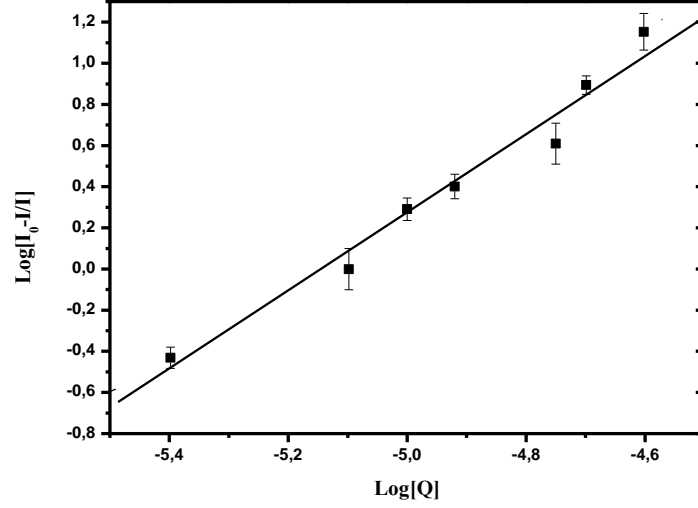
Şekil 4.30. (a)105 μM lipozom + 21 μM kolesterol içeren sulu çözelti ortamında 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarına karşı çizilmiş Stern- Volmer grafiği.
*MC 540 molekülünün konsantrasyonu:2 μM ; 8 μM ; 10 μM ; 12 μM ; 16 μM ; 20 μM ; 25 μM . (b) FL-MC540 molekül çifti için lineer Stern-Volmer grafiği MC 540 molekülünün konsantrasyonu:2 μM ; 4 μM ; 8 μM ; 10 μM ; 12 μM



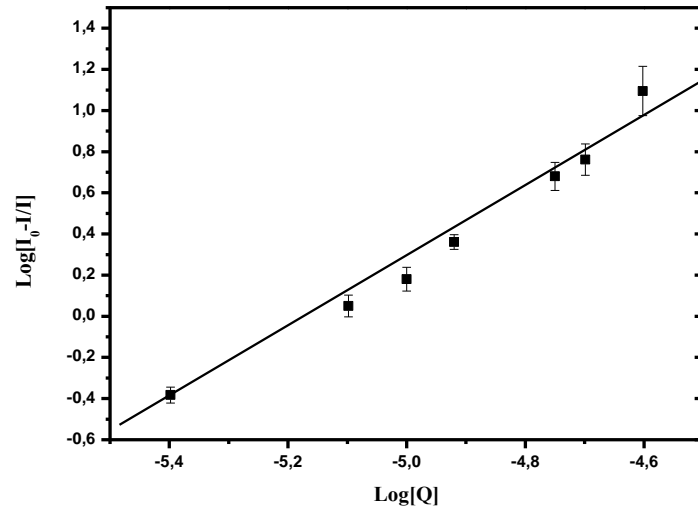
Şekil 4.31. (a)105 μM lipozom + 31,5 μM kolesterol içeren sulu çözelti ortamında 1,0 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarına karşı çizilmiş Stern- Volmer grafiği. *MC 540 molekülünün konsantrasyonu:2 μM ; 8 μM ; 10 μM ; 12 μM ; 16 μM ; 20 μM ; 25 μM . (b) FL-MC540 molekül çifti için lineer Stern-Volmer grafiği MC 540 molekülünün konsantrasyonu:2 μM ; 4 μM ; 8 μM ; 10 μM ; 12 μM

Grafiklerden de görüldüğü gibi MC540 molekülünün konsantrasyon artışıyla lineerlikten pozitif yönde bir sapma meydana gelmiştir. Ayrıca dört farklı sıcaklık çalışmasında, sıcaklık artışıyla Stern-Volmer eğrisinin eğiminin azaldığı görülmüştür. Eğim azalması ve Stern-Volmer eğrileri grafiklerin iç (b) kısmında verilmiştir. Bu üç çözelti için FL-MC540 molekülleri arasındaki etkileşimin statik kuençleşme olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu iki molekül arasında bir etkileşimin olduğu belirgindir. Çizelge 4.3'de Stern-Volmer hız sabitleri verilmiştir. Daha önce 105 μM lipozom ortamında bulunan K_{sv} hız sabitinin kolesterolü ortamdaki değerden daha küçük olduğu görülmektedir. K_{sv} hız sabitinin kolesterol eklenmesiyle artması kuençir molekülünün lipit faza daha az bağlandığını ve ortamda kuençir konsantrasyonunun arttığını göstermektedir. Yani bir başka ifade ile kuençir molekülünün lipit fazdaki yerini kolesterol molekülleri almıştır. Bu üç farklı ortam için FL-MC540 molekül etkileşimi için modifiye Stern-Volmer denklemi kullanılarak bu moleküller arasındaki bağlanma sabiti (K) ve bağlanma afinitesi hesaplandı. 105 μM 'lık lipozom konsantrasyonunun, sırasıyla %10, %20 ve % 30'u kadar eklenmiş kolesterol içeren sulu çözelti ortamında FL

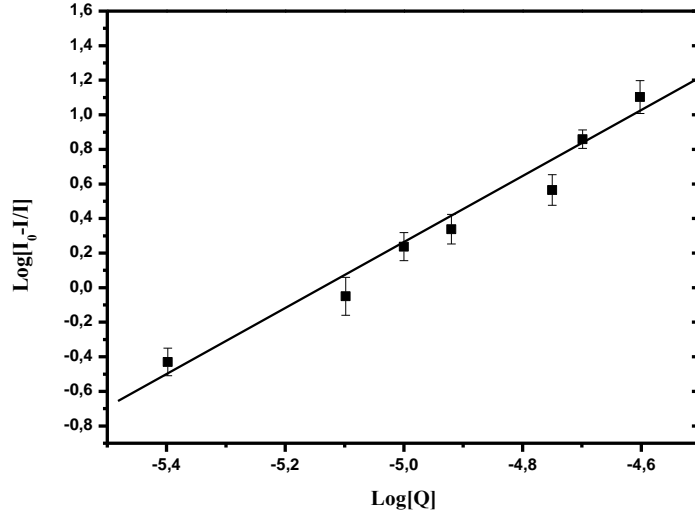
ve MC540 bileşiklerinin değişik konsantrasyonları için denklem 1.21 kullanılarak çizilen grafikler sırasıyla Şekil 4.32, Şekil 4.33 ve Şekil 4.34’de verilmiştir.



Şekil 4.32.105 μM lipozom + 10,5 μM kolesterol içeren sulu çözelti ortamında FL-MC 540 etkileşimi için bağlanma sabiti grafiği
*($\chi^2=0.9723$)



Şekil 4.33.105 μM lipozom + 21 μM kolesterol içeren sulu çözelti ortamında FL-MC 540 etkileşimi için bağlanma sabiti grafiği
*($\chi^2=0.9523$)



Şekil 4.34.105 μM lipozom + 31,5 μM kolesterol içeren sulu çözelti ortamında FL-MC 540 etkileşimi için bağlanma sabiti grafiği
 * $(\chi^2=0.9423)$

Yine aynı şekilde grafiklerin eğimlerinden bağlanma sabitleri, kesim noktalarından bağlanma anfiniteleri üç farklı çözelti için hesaplanmıştır. Farklı sıcaklıklardaki bağlanma sabitleri kullanılarak Van't Hoff denkleminde kolesterol içeren ortamlarda FL-MC540 molekülleri arasındaki etkileşimler için termodinamik parametreler hesaplanmıştır. Bunun için dört farklı sıcaklıktaki bağlanma sabitleri kullanmıştır. Çizelge 4.3'de değişik sıcaklıklar için bağlanma ve anfinite sabitleri ile termodinamik parametreler yer almaktadır.

Çizelge 4.3. FL -MC 540 etkileşimi için Stern-Volmer Sabitleri ile bağlanma ve termodinamik parametreler

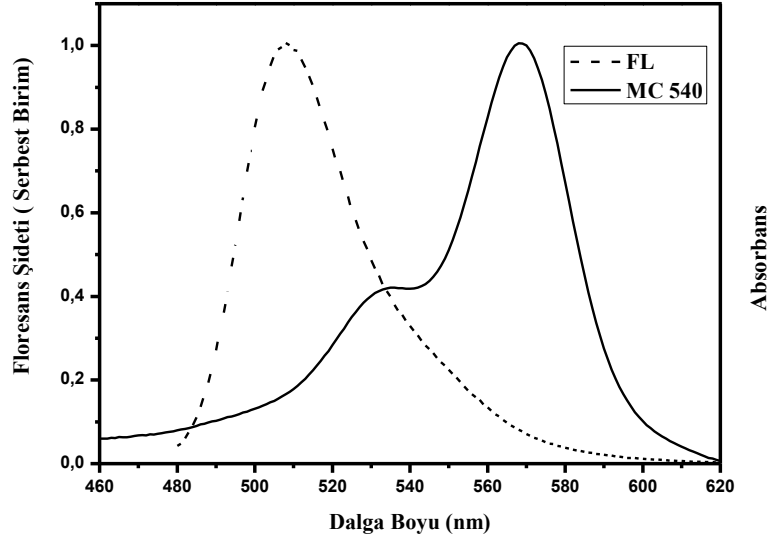
105 µM Lipit + 10,5 µM kolesterol						
<i>T</i>	<i>K_{sv}</i>	<i>K</i>	<i>n</i>	ΔG^0	ΔH^0	ΔS^0
(K)	(x10 ⁵ Lmol ⁻¹)	(x10 ⁹ /mol)		(kJ/mol)	(kJ/mol)	(J/molK)
298	1,84	8.88	1.94	-56,53	-57,5	-3.38
308	1,43	4.33	1.90	-56,49		
318	1,17	3.39	1.89	-56,46		
328	0,82	1.04	1.82	-56,43		
105 µM Lipit + 21 µM Kolesterol						
<i>T</i>	<i>K_{sv}</i>	<i>K</i>	<i>n</i>	ΔG^0	ΔH^0	ΔS^0
(K)	(x10 ⁵ Lmol ⁻¹)	(x10 ⁹ /mol)		(kJ/mol)	(kJ/mol)	(J/molK)
298	1,24	4.21	1.88	-55,26	-78,5	-78.72
308	1,07	3.64	1.87	-54,63		
318	0,87	1.47	1.83	-53,84		
328	0,68	0.24	1.69	-53,05		
105 µM Lipit + 31,5 µM Kolesterol						
<i>T</i>	<i>K_{sv}</i>	<i>K</i>	<i>n</i>	ΔG^0	ΔH^0	ΔS^0
(K)	(x10 ⁵ Lmol ⁻¹)	(x10 ⁹ /mol)		(kJ/mol)	(kJ/mol)	(J/molK)
298	1,53	2.70	2.04	-993,89	-1038,3	-150.4
308	1,17	1.85	2.03	-992,69		
318	0,92	0.17	1.84	-991,18		
328	0,71	0.09	1.81	-989,68		

Oluşturulan çözelti sistemlerinin termodinamik parametrelerini incelediğimiz zaman, Gibbs serbest enerjisinin tüm çözeltiler için negatif çıkması FL ile MC 540'ın eşzamanlı olarak birbirleriyle etkileştiklerini göstermektedir. ΔH^0 ve ΔS^0 negatif olması bu iki molekülün birbirleriyle etkileşiminde van der Waals ve hidrojen bağı etkileşimlerinin etkin rol oynadığını göstermektedir. Anfinite değerinin yaklaşık 2 çıkması kuencırın bir veya iki etkileşim şekli olduğunu, *K* değerinin sıcaklıkla azalması ise bu iki molekülün

etkileşiminin ekzotermik olduğunu göstermektedir (Ross and Subramanian 1981; Xi and Guo 2007; Roberta *et al.* 2010).

4.4. Enerji Transfer Parametreleri

Statik ve dinamik kuençleşme olaylarının bir enerji transferi olduğunu daha önce söylemiştik. Bu iki molekül arasında enerji transferinin gerçekleşebilmesi için bu moleküllerin belli bir mesafeye gelmeleri gerekmektedir. Bu mesafenin bilinmesi etkileşimler hakkında bilgi edinmemize katkı sağlamaktadır. İki molekül arasındaki mesafenin ölçülmesinde, bu moleküllerin örtüşme spektrumundan faydalanılmıştır. Floresin ile MC 540 molekül çifti için lipozom ortamındaki örtüşme (overlap) spektrumu Şekil 4.35’de verilmiştir.



Şekil 4.35. 150 µM lipozom içeren sulu ortamda Floresin ile MC540 molekül çiftlerinin spektral örtüşmesi

150 µM lipozom içeren sulu çözeltide, FL ve MC540'ın konsantrasyonu sabit tutulmuştur (1µM). Spektrumdaki emisyon ve absorpsiyon şiddetleri serbest birim olup gerçek değerlerin normalize edilmiş halidir. Çakışma sonrası belirlenen J (overlap), ve

sırasıyla Denklem 1.17, Denklem 1.19 ve Denklem 1.20'den hesaplanan Förster mesafesi, enerji transfer verimliliği ve enerji transfer mesafesi (r) Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Floresin-MC540 molekül çifti için hesaplanan enerji transfer parametreleri

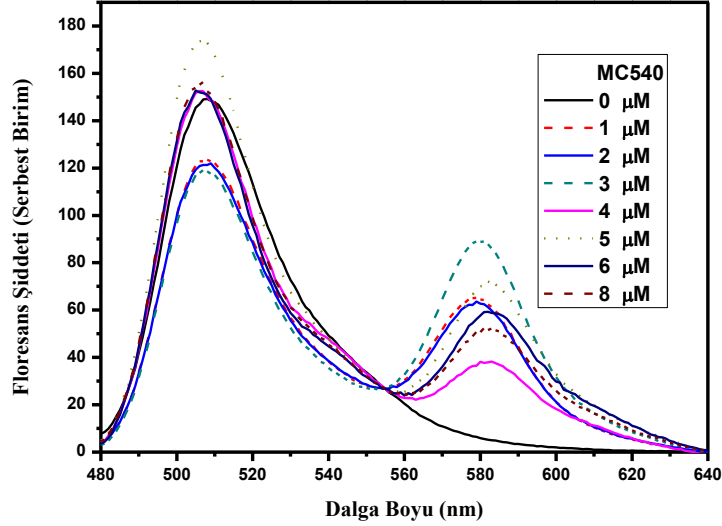
Molekül Çifti	J ($M^{-1} cm^3$)	R_0 (nm)	r (nm)	E
Floresin-MC540	$2,91775 \times 10^{-13}$	5.48	4,36	0,968

Çizelgeden de görüleceği gibi R_0 ve r değerleri 8 nm'den daha küçüktür. R_0 değeri 8 nm'den küçük çıkması floresans kuençleşmenin radyasyonsuz olduğunu göstermektedir. Bulunan R_0 ve r nin değerleri 8 nm'den daha küçük olup, buda enerji transferinin radyasyonsuz olduğunu göstermektedir (Valeur 2001; Biet *al.* 2011). Sonuçta tüm bu değerler FL-MC540 molekülleri arasındaki etkileşimde statik kuençleşmenin baskın olduğunu göstermektedir.

4.5. FL ve MC540 Molekül Çiftinin Kesecik Çözeltisindeki Etkileşimi

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda çözücü ortam olarak lipitlerden oluşturulan lipozom şekli tercih edildi. Lipozomun küresel şekli olan kesecikle ölçüm alınmamıştır. Bu yüzden kesecik ortamında bu iki molekül arasında nasıl bir etkileşim meydana geldiğini belirlemek için çözücü sistem olarak kesecik formu seçilmiştir. Bunun için 150 μM kesecik ortamı sonikasyon yöntemiyle oluşturulup, FL molekülünün alınan floresans spektrumunda bir kesme olmaması için molekülün konsantrasyonu onda bir oranında azaltılarak 0,1 μM 'da sabit tutulmuştur. Çözelti üzerine değişen konsantrasyonlarda MC 540 molekülü eklenerek floresans spektrumu alındı. Ancak her bir konsantrasyondaki numune ayrı ayrı hazırlanması gerektiği için elde edilen 5 ml'lik numunelere farklı zamanlarda floresans spektrumu alınırken cihazdan gelecek olan etkileri yok etmek için oluşturulan numuneler dolapta $+4^{\circ}C$ 'de bekletildi ve numune serisi tamamlandıktan sonra aynı anda ölçüm alındı. $+4^{\circ}C$ 'de kesecik yapıları stabilitelelerini korumaktadır

(Bozkır and Koçyiğit 1995). Bu işlemler yaklaşık 48 saatte tamamlandı. Elde edilen floresans spektrumu Şekil 4.36’da verilmiştir.



Şekil 4.36.150 μM 'lık kesecik içeren sulu çözelti ortamında 0,1 μM FL'in artan MC 540 konsantrasyonlarında alınmış düzeltilmiş floresans spektrumları

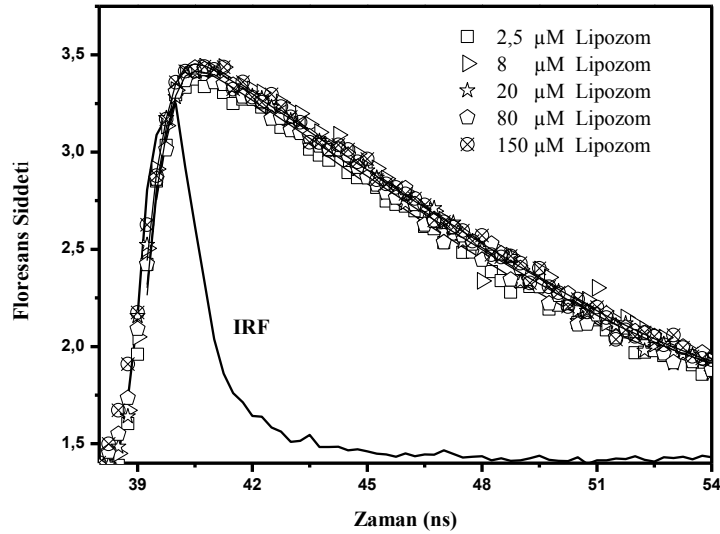
*MC 540 molekülünün konsantrasyonu: 0 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 3 μM ; 4 μM ; 5 μM ; 6 μM ; 8 μM

FL-MC540 molekül çifti için 150 μM kesecik ortamında FL molekülünün konsantrasyonu 0,1 μM 'da sabit tutulup, MC 540'ın konsantrasyonunun artırılmasıyla, FL molekülünün emisyon bandının şiddetinde bir azalma olurken, yaklaşık 580 nm'de MC540'ın floresans bölgesine karşılık gelen yeni bir bandın oluştuğu ve floresans şiddetinin, artan MC 540 konsantrasyonuyla arttığı gözlemlenmiştir. Ancak MC540 konsantrasyonunun belli bir artışından sonra, floresinin emisyon şiddetinin azalması yerine şiddetini arttığı, ayrıca 150 μM kesecik ortamında 580 nm'de floresans maksimumuna sahip MC 540 da emisyon maksimumunda kaymalar meydana geldiği görülmüştür. Sonuç olarak FL molekülünden MC540 molekülüne radyasyonlu bir geçişin olmadığı yani kesecik ortamında bir enerji transferi meydana gelmediğini anlaşılmıştır. Her iki bileşiğin emisyon maksimumlarının kaymasının sebebi ortama

eklenen MC540 molekülünün konsantrasyonunun artışıyla, ortamın polaritesinin değişmesiyle açıklanabilir (Toprak and Arık 2010).

4.6. FL Molekülünün Lipozom Çözeltilisindeki Bazı Fotoziksel Özellikleri

Çalışmanın diğer bir yönünde FL molekülünün lipozom içeren sulu çözeltililerdeki fotofiziksel özellikleri incelenmiştir. Bunun için değişik lipozom konsantrasyonlarında FL molekülünün floresans, absorpsiyon ve floresans durulma ölçümleri alınmıştır. Bu molekülün değişik lipozom içeren konsantrasyonlardaki floresans spektrumu daha önce Şekil 4.3'te verilmiştir. FL molekülün değişik lipozom konsantrasyonları içeren sulu çözeltilerinde alınmış floresansdurulma spektrumu Şekil 4.37'de verilmiştir.



Şekil 4.37. FL molekülünün değişik lipozom konsantrasyonlarında alınmış floresans durulma spektrumları

Floresans durulma spektrumlarına verilen fitlerle FL molekülünün uyarılma ömrü hesaplanmıştır. Kuantum verimi her bir lipozom çözeltisi için denklem 3.2 kullanılarak, radyasyonlu ve radyasyonsuz geçiş hız sabitleri sırasıyla denklem 1.3 ve 1.2'den hesaplanmış ve bu değerler Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Değişik lipozom konsantrasyonu içeren sulu ortamda FL molekülünün bazı fotofiziksel özellikleri

Çözelti	λ_{abs} (nm)	λ_{fl} (nm)	τ_f (ns)	χ^2	ϕ_f	k_r (s ⁻¹)	k_{nr}
Su	479	509	3.84	-	0,40	1,04X10 ⁸	1,564X10 ⁸
2,5μM	490	509	2.933	0,817	0.72 \pm 0.05	2.45 X10 ⁸	0.959X10 ⁸
Lipozom							
8 μM	490	509	3.057	0,971	0.759 \pm 0.06	2.48X10 ⁸	0.791 X10 ⁸
Lipozom							
20 μM	490	509	3.093	0,979	0.799 \pm 0.04	2.58 X10 ⁸	0.653 X10 ⁸
Lipozom							
80 μM	490	509	3.068	0,805	0.716 \pm 0.07	2.33 X10 ⁸	0.929 X10 ⁸
Lipozom							
150μM	490	509	3.082	1,007	0.798 \pm 0.01	2.58 X10 ⁸	0.664 X10 ⁸
Lipozom							

Çizelgeden de anlaşılabileceği gibi FL molekülünün lipozom konsantrasyonu değiştiği zaman kuantum veriminde fazla bir değişiklik olmadığı, uyarılma ömrü ise ortalama 3 ns civarında olduğu görülmektedir. Sulu ortamda FL molekülünün radyasyonsuz hız sabiti radyasyonlu hız sabitinden büyüktür. Bu durum Şekil 4.3'te görülen FL molekülünün sudaki emisyon şiddetinin düşük olmasını açıklamaktadır. FL molekülünün sudaki fotofiziksel özellikleri literatürden alınmıştır (Song *et al.* 2000). FL molekülünün değişik lipozom konsantrasyonlarında denklem 3.7 ve 3.8'den hesaplanmış rotasyonel difüzyon zamanı ve mikroviskozite değerleri Çizelge 4.6'd verilmiştir.

Çizelge 4.6. FL molekülünün değişik lipozom konsantrasyonlarındaki rotasyonel difüzyon ve mikroviskozite değerleri

Çözelti	r	τ_{rot} (ns)	η(cP)
2,5μM Lipozom	0.0177	0.135	5.74
8 μM Lipozom	0.0194	0.155	6.59
20 μM Lipozom	0.0241	0.202	8.58
80 μM Lipozom	0.0237	0.192	8.16
150μM Lipozom	0.0248	0.203	8.63

Çizelge incelendiğinde FL bileşiği için lipit konsantrasyonu artışıyla durgun hal anizotropi değerleri artmıştır. Bu da ortamın daha rijit bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Düşük lipit konsantrasyonlarında anizotropi değerinin küçük olması iki şekilde açıklanabilir. Birincisi lipozom formundan çok tabaka formunun oluşmuş olabileceği yani tam bir lipozom formu oluşmadığını ifade eder. İkincisi ise FL molekülünün oluşan lipit tabakalarının aralarına girmediğidir. Yine lipozom konsantrasyon artışıyla rotasyonel difüzyon süresi arttığı görülmektedir. Lipit konsantrasyonunu arttırdığımız zamanki durumu öğrenmek için, yüksek lipit konsantrasyonuyla yapılan diğer bir çalışmada, lipit konsantrasyonun artışıyla FL molekülünün durağan hal anizotropi değeri, 171 μ M, 210 μ M ve 250 μ M lipozom içeren sulu ortamlarda sırasıyla 0.364, 0.379 ve 0.347 gibi oldukça yüksek değerler bulunmuştur. Bu değerlerden 0,379 değeri FL molekülünün limit anizotropi değerine yakındır (0.402). Yüksek lipozom konsantrasyonları değerlerinde FL molekülü lipit yapılarının polar kısmına gömüldüğü bir başka ifadeyle bu molekülün kilitlendiği söylenebilir. Yani FL molekülünün yüzeyde bulunduğu söylenebilir. Lipozom konsantrasyonu artışıyla rotasyonel dönme zamanının da arttığı ve buna paralel olarak mikroviskozite değerlerinin arttığı görülmüştür.

5.SONUÇ

FL ve MC540 moleküllerinin arasındaki etkileşimler lipozom, kesecik ve yapay mebranlarda incelenmiştir. Hücre zarı yapısına yakın olan lipozom ve kesecik sistemleri sırasıyla hidrasyon ve sonikasyon yöntemleriyle oluşturulmuştur. Oluşturulan sistemin karakterizasyonu yapılmıştır. MC540 bileşiğinin lipozom ortamında meydana gelen spektrum değişiklikleri literatürle aynı bulunmuştur. MC540 bileşiğinin lipozom konsantrasyonu arttıkça monomer yapının dimer yapıya dönüştüğü ve floresans spektrumunun şiddetinin arttığı belirlenmiştir. Oluşturulan kesecik sistemi TEM spektroskopisiyle incelenmiş ve PC lipitleriyle oluşturulan kesecik yapılarıyla uyduğu bulunmuştur. Yaklaşık olarak kesecik yapısının çapının 50-300 nm arasında değiştiği görülmüştür (Ruysschaert *et al.* 2005).

Bu iki molekülün lipozom içeren sulu ortamda etkileşimi incelenmiştir. Kullanılan probun konsantrasyonunun lipozom konsantrasyonuna oranı yaklaşık olarak 1:100den fazla olması için, oluşturulan lipozom sisteminin konsantrasyonu 150 μ M olarak seçilmiştir. FL konsantrasyonu 1 μ M olarak seçilmiş ve sabit tutulmuştur. MC 540 molekülünün konsantrasyonu arttırıldığında bu iki molekülün birbirleriyle etkileşimleri floresans spektrumunda meydana gelen değişikliklerle tespit edilmiştir. Bu etkileşim türünün floresans kuençleşme olduğu, floresans spektrumunda meydana gelen şiddet azalmasıyla belirlenmiştir. Floresans kuençleşme mekanizmasını belirlemek için çizilen Stern-Volmer grafiğinden MC540 molekülünün konsantrasyon artışıyla eğimin lineerlikten pozitif yöne (yukarı doğru) saptığı belirlenmiştir. Sonuçta tipik bir statik kuençleşme mekanizması olduğu düşünülmüş ve emin olunmak için sıcaklık ve floresans durulma ölçümlerine başvurulmuştur. Sıcaklık çalışmasında Stern-Volmer eğrisi negatif bir sapma (aşağı doğru) yaparak eğrinin eğiminin azaldığı belirlenmiştir. Floresans durulma ölçümlerinde floresans şiddetinin azaldığı ve dikey eğrilerinin eğiminin fazla değişmediği belirlenmiştir. Bu iki yöntemle bu moleküller arasındaki etkileşimin statik kuençleşme olduğu belirlenmiştir.

Statik kuençleşmenin moleküller arasında bir karanlık kompleks oluşumuyla ve etkin bir hacim de meydana gelebileceği bilinmektedir. Bu moleküller arasındaki etkileşimler için termodinamik parametreler hesaplanmıştır. Hesaplanan bu parametreler yardımıyla iki molekülün bir araya gelmelerini sağlayan etkileşim türleri belirlenmiştir. Sonuçta iki molekülün bir ara gelmesinde van der Waals ve hidrojen bağı etkileşimlerinin neden olduğu görülmüştür. Bu etkileşimin eşzamanlı meydana geldiği ve etkileşim sabiti modifiye Stern-Volmer denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bağlanma sabitinin büyük çıkması iki molekül arasındaki etkileşimin güçlü olduğunu göstermektedir (Xi and Guo 2007;Robertaet al. 2010).

Ortama eklenen kolesterol bu moleküller arasındaki etkileşimi değiştirmemiş ve iki molekül arasındaki etkileşim türünün statik kuençleşme olduğu bulunmuştur. Stern-Volmer hız sabitinin kolesterol eklenmesiyle arttığı belirlenmiştir. Buda kuençir molekülünün lipit faza daha az bağlandığını ve ortamdaki kuençir konsantrasyonunun arttığını göstermektedir. Yani kuençir moleküllerinin lipit fazdaki yerlerini kolesterol molekülleri almıştır. Hesaplanan termodinamik parametrelerden yine aynı şekilde iki molekül arasındaki etkileşimin van der Waals ve hidrojen bağı etkileşimlerinden kaynaklandığı ayrıca iki molekül etkileşiminin eş zamanlı olduğu görülmüştür. Hesaplanan K değerlerinin sıcaklıkla azaldığı belirlenmiştir (Xi and Guo 2007;Robertaet al. 2010).

Kolesterol eklendiğinde kuençir moleküllerinin lipit fazdaki miktarını etkilemesi bu moleküllerin sadece lipozom fazında değil su fazında da olduğunu gösterir. MC540 molekülünün lipozom-su fazındaki ayrışma sabitini hesaplamak için, değişik lipozom konsantrasyonları içeren sulu çözeltilerde, her bir çözeltide FL molekülünün konsantrasyonu sabit tutulup MC540 molekülünün konsantrasyonu artırılmış ve kuençleşme sabitleri hesaplanmıştır. Bu sabitler kullanılarak MC540 molekülünün lipozom-su fazı ayrışma sabiti hesaplanmıştır. Hesaplanan değerlerden MC540 molekülünün iki fazda da bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca hesaplanan değerlerde lipozom konsantrasyonu artışıyla MC540 molekülünün su ortamındaki konsantrasyonunun azaldığı belirlenmiştir. Hesaplanan bimoleküler kuençleşme

sabitiylede kuençleşme mekanizmasının statik olduğu teyit edilmiştir (Ge *et al.* 2010;Huanget *al.* 2010).

İki molekül arasındaki etkileşim ve enerji transfer mesafesi radyasyonsuz Förster teorisi kullanılarak hesaplanmıştır. R_0 ve r değerlerisırasıyla 5,48 ve 4,36 olarak hesaplanmıştır. R_0 değerinin 8 nm'den küçük çıkması floresans kuençleşmenin radyasyonsuz olduğunu göstermektedir (Valeur 2001; Biet *al.* 2011). Enerji transfer verimi 0,968 olarak hesaplanmıştır. Bulunan bu değerler FL-MC540 molekülleri arasındaki etkileşimin statik bir kuençleşme olduğunu göstermektedir.

Bu iki molekülün kesecik içeren sulu çözeltideki etkileşimi incelenmiştir. Bunun için 0,1 μ M FL konsantrasyonu kesecik ortamında sabit tutulup MC540 molekülünün konsantrasyonu artırılmıştır ve sonuçta FL molekülünün emisyon bandının şiddetinde bir azalma olurken, MC540'ın floresansına karşılık gelen yeni bir bandın oluştuğu ve floresans şiddetinin, artan MC 540 konsantrasyonu ile arttığı belirlenmiştir. Ancak MC540 konsantrasyonunun belli bir artışından sonra, FL molekülünün emisyon spektrumunun şiddetinin azalması yerine şiddetin arttığı ve MC 540 da emisyon spektrumunun şiddetinin maksimum değerinde kaymalar meydana geldiği görülmüştür. Akseptör konsantrasyonunun artırılmasıyla donör molekülünün emisyon spektrumunun maviye kayması, konsantrasyon artışıyla polaritenin azalmasına bağlı olarak açıklanmıştır (Reichardt 1994). FL molekülünden MC540 molekülüne radyasyonlu bir geçişin olmadığı yani kesecik ortamında bir enerji transferi meydana gelmediği belirlenmiştir.

FL molekülünün lipozom içeren sulu ortamdaki fotofiziksel özellikleri incelenmiştir. Lipozom konsantrasyonu değiştirilip elde edilen sonuçlarda lipozom konsantrasyonu artışı kuantum veriminde fazla bir değişikliğe sebep olmamıştır. Uyarılma ömrü 150 μ M lipozom içeren sulu ortamda 3.082 ns olarak hesaplanmıştır. Buna bağlı olarak k_r ve k_{nr} değerleri sırasıyla 2.58×10^8 ve $0.664 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. FL molekülünün durgun hal anizotropi değerleri hesaplanmıştır. Yüksek lipozom

konsantrasyonlarında FL molekülü lipit yapılarının polar kısmına gömüldüğü, yani bu molekülün lipit yapılarla kilitlendiği belirlenmiştir. Bundan dolayı FL molekülünün lipozom yapılarının yüzeyinde bulunduğu söylenebilir. Lipozom konsantrasyonu artışıyla rotasyonel dönme zamanının da arttığı ve buna paralel olarak mikro viskozite değerinde arttığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Acar, M., 2007. Kolloidal ortamda kumarin-120'nin floresans enerji transferinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üni., Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Acemioğlu, B., Arık, M., Efeoğlu, H., Onganer, Y., 2001. Solvent effect on the ground and excited state dipole moments of fluorescein. *J. Mol. Struct.* 548,165- 171.
- Adenier, A., Aaron, J. J., 2002. A spectroscopic study of the fluorescence quenching interactions between biomedically important salts and the fluorescent probe merocyanine 540. *Spectrochim.Acta A*, 58, 543-551.
- Aramendia, P.F., Duchowicz, R., Scaffardi, L., Tocho, J.O., 1990. Photophysical characterization of a photochromic system the case of merocyanine 540. *J. Phys. Chem.*, 94, 1389.
- Arık, M.,1999. Floresinin floresans şideti üzerine moleküler oksijenin etkisi ve moleküler etkileşimler. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üni., Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Arık, M., Çelebi, N., Onganer, Y., 2005. Fluorescence quenching of fluorescein with molecular oxygen in solution. *Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 170,105-111.
- Aydın, B.M.,2005. Floresans enerji transferinin misel sistemlerde incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üni., Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Atkins, W., P., 1998. *Physical chemistry*. Oxford university press.h
- Basu, C., S., Basu, M., 2002. *Liposome and methods and protocols*. Humane press inc. Totowa, New jersey.
- Bi, S., Yan, L., Sun, Y., Zhang, H., 2011. Investigation of ketoprofen binding to human serum albumin by spectral methods *Spectrochim.Acta A*,78, 410-414
- Blatt, E., Chatelier, R. C. And Sawyer, W. H.,1986.Effects of quenchingmechanism and type of quencher association on stern-volmerplots in compartmentalized systems *Biophys. J.*, 50,356.
- Bose, D., Ghosh, D., Das, P., Girigoswami, A., Sarkar, D., Chattopadhyay, N., 2010. Binding of a cationic phenazinium dye in anionic liposomal membrane: a spectral Modification in the photophysics. *Chem. Phys. Lipids*, 163, 94-101.
- Bozkır, A., Koçyiğit, S.,1995. An investigation of physical and chemical stabilities on Liposome *J. Fac. Pharm. Ankara*, 24, 1
- Bozkurt, E., 2007. Kolloidal CdS'ün kumarin-151'in floresans şideti üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üni., Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Cheng-Chung, C., Yu-Tsai, Y., Jen-Chang, Y., Hong-Da, W., Tsai T., 2008. Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes. *Dyes Pigments*, 79, 170-175
- Çelebi, N., 1998. Pyronin türevlerinin sulu ortamda kimyasal sensör olabileme özelliklerinin floresans spektroskopi tekniğiyle belirlenmesi: Oksijen sensörü. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üni., Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Das, K., Jain, B., Dube, A., Gupta, P. K., 2005. pH dependent binding of chlorin-p6 with Phosphatidyl choline liposomes. *Chem. Phys. Lett.*,401 185-188
- De, S., Girigoswami, A., 2004. Fluorescence resonance energy transfer a spectroscopic probe for organized surfactant media. *J. Colloid Interface Sci.*, 271, 485.

- De Castro, B., Gameiro, P., Lima, L.F.C.J., Matos, C., Reis, S., 2002. Location and partition coefficient of anti-inflammatory drugs in EPC liposomes. A fluorescence quenching study using n-(9-anthroyloxy)-stearic probes. *Colloid Surface A*, 190-212
- De Leeuw, J., De Vijlder, H.C., Bjerring, P., Neumann, H.A.M., 2009. Liposomes in *Dermatology Today*, JEADV, 23, 505-506
- Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Peng Q. J., 1998. Photodynamic therapy. *Natl. Cancer Ins.*, 90, 899.
- Gangopadhyay, S., Pleil, M.W., Borst, W.L., 1987. Study of energy transfer in a solution of coumarin 460 and rhodamine 6G by time resolved laser induced fluorescence spectroscopy. *J. Lumin.*, 39, 105.
- Ge, F., Chen, C., Liu, D., Han, B., Xiong, X., Zhao, S., 2010. Study on the interaction between theasinesin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. *J. Lumin.*, 130, 168-173
- Geneve, M., Glaser, O., Glaser, M., 1985. Dynamic quenchers in fluorescently labeled membranes. *Biophys. J.*, 47, 627.
- Gregoriadis, G., 2007. Liposome preparation and related techniques volume I. Informa Healthcare USA, Inc., New York.
- Gua, Y., Yue, Q., Gao, B., 2010. Probing the molecular mechanism of C.I. Acid red 73 binding to human serum albumin. *Environ. Toxicol. Phar.*, 30, 45-51.
- Hrbac, J., Sichertova, D., Bancirova, M., Lasovsky, J., Papadopoulos, K., Nikokavouras, J., 2004. Sensitized chemiluminescence in micellar mixtures of phthalhydrazide and selected dyes. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 167, 169.
- Huang, C-H., Sipe, P. J., Chaw, S. T., Martin, B., 1974. Differential Interaction of Cholesterol With Phosphatidylcholine on The Inner and Outer Surfaces of Lipid bilayer vesicles. *Biochemistry*, 71, 359-362
- Huang, Y., Yan, J., Liu, B., Yu, Z., Gao, X., Tang, Y., Zi, Y., 2010. Investigation on interaction of prulifloxacin with pepsin: A spectroscopic analysis. *Spectrochim. Acta A*, 751024-1029
- Kaiser, D. R., London, E., 1998. Determination of depth of BODIPY probes in model Membranes by parallax analysis of fluorescence quenching. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1375, 13-22.
- Kinoshita, S., Fukami, T., Ido, Y., Kushida, T., 1987. Spectroscopic properties of fluorescein in living lymphocytes. *Cytometry*, 8, 35-41.
- Knol, J., Sjollem, K., Poolman, B., 1998. Detergent-Mediated Reconstitution of Membrane Proteins. *Biochemistry*, 37, 16410-16415
- Kopecky, J., 1992. *Organic photochemistry a visual approach*. VCH Publisher inc.
- Koppaka, V., Lentz, R. B., 1996. Binding of bovine factor Va to phosphatidylcholine Membranes. *Biophysical. J.*, 70, 2930-2937.
- Kyrychenko, A., Sevriukov, Y. I., Syzova A. Z., Ladokhin, S. A., Doroshenko, O. A., 2011. Partitioning of 2,6 bis(1H-Benzimidazol-2-yl) pyridine fluorophore into a phospholipid bilayer: Complementary use of fluorescence quenching studies and molecular dynamics simulations. *Biophys. Chem.*, 154, 8-17.
- Lakowicz, J. R., 1983. *Principle of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press, New York
- Lakowicz, J.R., 1991. *Topics in Fluorescence Spectroscopy Volume 1*. Plenum Press, New York

- Lakowicz, J.R., 2002. Volume 2 principles. Kluwer Academic publishers, New York
- Loffe, M. V., Gorbenko, P. G., Deligeorgiev, T., Gadjev, N., Vasilev, A., 2007. Fluorescence Study of protein-lipid complexes with a new symmetric squarylium probe. *Biophys. Chem.*, 128, 75-86.
- Machicato, G. R., Pacheco, E. M., Bruzzone, L., 2010. Binding of several benzodiazepines to bovine serum albumin: Fluorescence study. *Spectrochim. Acta A*, 77, 466-472.
- McQuarrie, A., Donald, A., 1983. *Quantum Chemistry*. Will Valley, California.
- Mateasik, A., Sikurova, L., Jr. Chorvat, D., 2002. Interaction of merocyanine 540 with charged membranes. *Bioelectrochemistry*, 55, 173-175.
- Marlene, L., Ferreira, H., Lima, Jos'e L.F.C., Reis, S., 2007. Use of liposomes to evaluate the role of membrane interactions on antioxidant activity. *Anal. Chim. Acta.*, 597, 163-170.
- Marcelino, J., Lima, J. L. F. C., Reis, S., Matos, C., 2007. Assessing the effects of surfactants on the physical properties of liposome membranes. *Chem. Phys. Lipids.*, 149, 94-103.
- Moribe, K., Maruyama, K., Iwatsuru, M., 1999. Molecular localization and state of amphotericin B in PEG liposome. *Int. J. Pharmaceut.*, 193, 97-106
- Morita, S., Ushiki H., 2003. Rotational behavior of fluorescent probe molecules near the critical point of phase separation. *Physica. B*, 327, 108-115.
- Ni, Y., Su, S., Kokot, S., 2010. Spectrometric studies on the interaction of fluoroquinolones and bovine serum albumin. *Spectrochim. Acta A*, 75, 547-542.
- Novotny, J. C., 2007. A study of InP nanowires: growth, material properties, and application in optoelectronic. University of California, San Diego. <http://escholarship.org/uc/item/91p662xd>. (15.11.2011)
- Onganer, Y., 1993. Photodynamics of merocyanine 540 in liquid and membrane systems. Doctor Thesis, Texas Tech University.
- Onganer, Y., Yin, M., Bessire, D.R., Quitevis, E.L., 1993. Dynamic solvation effects on the cis-trans isomerization reaction photoisomerization of merocyanine in polar solvents. *J. Phys. Chem.*, 97, 2344.
- Pinto, C. M., Duque, L. A., Macias, P., 2010. Fluorescence spectroscopic study on the interaction of resveratrol with lipoxygenase. *J. Mol. Struct.*, 980, 143-148.
- Przybilo, M., Olzynska, A., Han, S., Ozyhar, A., Langner, M., 2007. A fluorescence method for determining transport of charged compounds across lipid bilayer. *Biophysical. Chem.*, 129, 120-125
- Qin, Y., Zhang, Y., Yan, S., Ye, L., 2010. A comparison study on the interaction of hyperoside and bovine serum albumin with Tachiya model and Stern-Volmer equation. *Spectrochim. Acta A*, 75, 1506-1510.
- Reichardt, C., 1994. *Solvent and solvent effect in organic chemistry*. Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim (Federal Republic of Germany)
- Ross, P. D., Subramanian, S., 1981. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability, 20. 3096-3102.
- Roberta G.M., Maira E.P., Liliana B., 2010. Binding of several benzodiazepines to bovine serum albumin: Fluorescence study. *Spectrochim. Acta A*, 77, 466-472.
- Ruysschaert, T., Sonnen, F. P. A., Haefele, T., Meier, W., Winterhalter, M., Fournier D., 2005. Hybrid Nanocapsules: Interactions of ABA Block Copolymers with Liposomes *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (27), 6242-6247.

- Sanchez, G. F., Ruiz, C. C., 1996. Intracellular energy transfer in aqueous CTAB Solutions. *J. Lumin.*, 69, 179-186.
- Schlegel, B.M. Phelps, A. Waggoner, L. Terada and P. Williamson, 1980. Binding of merocyanine 540 to normal and leukemic erythroid cells. *Cell*, 20, 321
- Shah, M., 2011. An Overview On Brain Targeting Drug Delivery System
<http://www.pharmainfo.net/reviews/overview-brain-targeting-drug-delivery-system> (09.11.2011)
- Shane M., Michael G. E., Ruchi C., Arzu A., Rodney T., Sirinart A., 2008 Plasma membrane cholesterol content affects nitric oxide diffusion Dynamics and signal. *J. Biol Chem.*, 283, 27, 18513-18521.
- Sharma, M., Joshi, G. P., Joshi, B. N., 1997. Alterations in plasma membrane glioblastoma Cell by photodynamic action of merocyanine 540. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1323, 272-280.
- Sikurova, L., Cunderlikova, B., 1996. pH Dependence of Merocyanine 540 Absorption and Fluorescence Spectra. *Spectrochim. Acta A*, 53, 293-297.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 1992. Principles of Instrumental Analysis. Saunders College Publishing, Fort Worth.
- Steinlin, A., 2011. Determination of the critical micelle concentration of an amphiphile by conductivity measurements. http://dcb-server.unibe.ch/dcbneu/studies/pharmazie/PCI/CMCexp_07.pdf (10.10.2011)
- Song, A., Zhang, J., Zhang, M., Shen, T., Tang, J., 2000. Spectral Properties and Structure of Fluorescein and Its Alkyl Derivatives in Micelles. *Colloid Surface A*, 167, 253-262.
- Subuddhi, U., Mishra, K.A., 2007. Effect of sodium deoxycholate and sodium cholate On DPPC vesicle: A fluorescence anisotropy study with diphenylhexatriene. *J. Chem. Sci.*, 119, No. 2, 169-174.
- Suppan, P., 1994. Chemistry and light, Published by The royal society of chemistry., Cambridge, p 11, 70, 72
- Suppan, P., Ghoneim, N., 1998. Solvatochromism. University of Fribour. Switzerland, the royal society of chemistry.
- Togashi, M. D., Szczupak, B., Ryder, G. A., Calvet, A., O'Loughlin, M., 2009. Investigating Tryptophan quenching of fluorescein fluorescence under protolytic equilibrium. *J. Phys. Chem. A*. 113, 2757-2767.
- Toprak, M., Arik, M., 2010. An investigation of energy transfer between coumarin 35 and xanthene derivatives in liquid medium. *Turk. J. Chem.*, 34, 285- 293.
- Toprak, M., Aydın, M. B., Arik, M., Onganer, Y., 2011. Fluorescence quenching of fluorescein by Merocyanine 540 in liposomes. *J. Lumin.*, 131, 2286-2289.
- Turro, J., N., 1982. Modern molecular photochemistry. Columbia University
- Wang, L., Gaigalas, A. K., Blasic, J., Holden, M. 2004. Spectroscopic characterization of fluorescein and tetranethylrhodamine labeled oligonucleotides and their complexes with a DNA template. *J. Spectrochim. Acta Part A*: 60, 2741.
- Xi J., Guo R. 2007. Interactions between flavonoids and hemoglobin in lecithin liposomes. *Int. J. Biol. Macromol.*, 40 305-311.
- Yalçın, S., 2011. Antioksidan lipozomlar.
http://www.oksante.com.tr/antioksidan_lipozomlar.pdf (10.12.2011)

- Yu., X., Li, R., Ji, D., Xie, J., Yang, F., Li, X., Huang, H., Yi, P., 2010. Spectroscopic studies on the interactions between 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones and bovine serum albumin. *Spectrochim. Acta A*, 77, 213-218.
- Valeur, B., 2001. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Valinsky, J.E., Easton, T.G., Reich, E., 1978. Merocyanine 540 as a fluorescent probe Of mebranes: selective staining of leukemic and immture hemopoietic cells. *Cells*, 13, 487.
- Verkman, A. S., 1987. Mechanism and Kinetics of Merocyanine 540 Binding to Phospholipid Mebranes. *Biochemistry*, 26, 4050-4056.
- Zareba, M., Niziolek, M., Korytowski, W., Girotti, A.W., 2005. Merociyanine 540 sensitized photokilling of leukemia cells: Role of post-irradiation chain peroxidation of plasma mebrane lipids as revealed by nitric oxide proteciton. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772, 51
- Zhao, H., Jutila, A., Nurminen, T., Wickstrom, S. A., Keski-Oja, J., Kinnunen, P. K. J., 2005. Binding of Endostatin to Phosphatidylserine-Containing Mebranes and Formation of Amyloid-like Fibers. *Biochemistry*, 44, 2857-2863.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Erzurum'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 1999 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2003 yılında mezun oldu.

Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde 2005-2010 yılları arasında Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde 2006 yılında Fizikokimya bilim dalında yüksek lisansını tamamlayarak doktora programına başladı. 2010 yılından beri Bingöl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.