

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

SARIMSAĞIN NÖTR MODEL MEMBRANLARLA
ETKİLEŞMESİNİN
BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLER İLE
İNCELENMESİ

ÜMİT ACAR
Fizik Anabilim Dalı
Bilim Dalı Kodu : 404.01.01
Sunuş Tarihi :22.10.2009

1.Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nadide Kazancı

2.Tez Danışmanı : Prof. Dr. Feride Severcan

Bornova – İZMİR

III

Ümit ACAR tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “**Sarımsağın nötr model membranlarla etkileşmesinin biyofiziksel yöntemler ile incelenmesi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 22.10.2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Nadide Kazancı

Raportör Üye: Yrd. Doç. Dr. Teoman Yıldız

Üye : Doç. Dr. Mehmet Dinçer Bilgin

ÖZET**Sarımsağın Nötr Model Membranlarla Etkileşmesinin Biyofiziksel Yöntemler ile İncelenmesi**

ACAR, Ümit

Yüksek Lisans Tezi, Fizik Bölümü

Tez Yöneticileri: Prof. Dr. Nadide Kazancı, Prof. Dr. Feride Severcan

2009, 73 sayfa

Bu tezde, sarımsağın etken maddesi alliin'in model membranlarla etkileşmesi biyofiziksel yöntemler kullanılarak incelenmiştir. FTIR (Fourier Transform Infrared) ve DSC (Diferansiyel Tarama Kalorimetresi) kullanılarak alliin'in farklı konsantrasyonlarının etkileri belirlenmiştir. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde sıcaklık, frekans, band genişliği ve ısı akışı gibi çeşitli parametreler göz önünde bulundurulmuş ve bu parametreler ile alliin konsantrasyonları arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda membran faz geçişi, membran düzeni ve dinamiğindeki değişimler araştırılmıştır. Elde edilen veri sonuçları, kullanılan yöntemler için ayrı ayrı incelenerek alliin'in model membranlarla etkileşmesi moleküler düzeyde araştırılarak; membran üzerindeki etkileri ve konumu hakkında bilgiler elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Alliin, lipozom, membran, FTIR, DSC

ABSTRACT

**THE INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF GARLIC,
WITH NEUTRAL MODEL MEMBRANE BY USING
BIOPHYSICAL METHODS**

ACAR, Ümit

MSc in Physics

Supervisor: Prof. Dr. Nadide Kazancı, Prof. Dr.Feride Severcan

2009, 73 pages

In this thesis, the interaction of alliin an active substance of garlic with model membrane was investigated by using biophysical methods. By using FTIR (Fourier Transform Infrared) and DSC (Differential Scanning Calorimetry), the effect of various concentrations of alliin were determined. Several parameters such as temperature, frequency, bandwidth and heat flow were considered to analyze the experimental data using these technique. The relations between these parameters and different concentrations of alliin were

VIII

investigated. Drug-induced variations among the membrane phase transition, membrane order and dynamics were studied. These DSC and FTIR results revealed information about alliin-membrane interactions and possible location of the drug in the membrane.

Keywords: Alliin, liposom, membrane, FTIR, DSC

TEŞEKKÜR

Tezimin her aŐamasında beni destekleyen, bilgi ve tecrübeleri ile bana ışık tutan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nadide Kazancı 'ya ve deneysel çalıŐmamda bana ODTÜ Biyoloji Bölümündeki laboratuvarını kullanma imkanı vererek önerileriyle beni yönlendiren ve destekleyen ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Feride Severcan'a ve hayatımın her aŐamasında beni koŐulsuz destekleyen aileme sonsuz teŐekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII-VIII
TEŞEKKÜR.....	X
İÇİNDEKİLER.....	XII-XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVI-XVII
TABLOLAR.....	XIX
KISALTMALAR.....	XXI
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Çalışmanın Amacı.....	2
1.2 Biyolojik ve Yapay Membranlarla İlgili Temel Bilgiler.....	4
1.2.1 Membranların Fonksiyonları.....	4
1.2.2 Membranların Yapısı.....	5
1.2.3 Model Membran DPPC.....	11
1.3 Alliin Nedir ?.....	12
1.4 Moleküler Spektroskopi.....	15
1.4.1 Moleküler Titreşim.....	22
1.4.2 İnfrared Spektroskopisi.....	26
1.4.3 Moleküler Titreşim Türleri.....	27
1.5 Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi.....	29
1.5.1 FTIR Spektrometresinin Diğer Tekniklere Göre Avantajları.....	32

XIII

1.5.2 FTIR Kullanarak Yapılan Membran Çalışmalarında Bilinen Bazı Ampirik Kurallar.....	33
1.6 Diferansiyel Tarama Kalorimetresi.....	35
2.MATERYAL VE METOD.....	38
2.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	38
2.2 Membran Örneklerinin Hazırlanması.....	38
2.2.1 FTIR Çalışmaları İçin Örnek Hazırlanması,Spektrum alınması ve Data analizi.....	39
2.2.2 DSC Örnekleri İçin Örnek Hazırlanması.....	44
3.SONUÇLAR.....	45
3.1 FTIR Çalışmaları.....	45
3.1.1 C-H Gerilme Bölgesi.....	45
3.1.1.1 CH ₂ Antisimetrik Gerilme.....	45
3.1.1.2 CH ₂ Simetrik Gerilme.....	50
3.1.1.3 CH ₃ Asimetrik Gerilme.....	50
3.1.2 Baş Grup Gerilme Bölgesi.....	53
3.1.2.1 C=O Gerilme.....	53
3.1.2.2 PO ₂ ⁻ Antisimetrik Gerilme.....	53
3.2 DSC Çalışmaları	56

4.TARTIŞMA.....	58
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Gliserol iskeleti üzerine kurulmuş bir fosfolipid	6
1.2 Fosfolipid molekülü ve fosfolipidlerin sulu ortamda kararlı durumları	7
1.3 Hücre zarı için akışkan – mozaik model	9
1.4 A:Jel faz B:Sıvı kristal faz	10
1.5 DPPC molekülü	11
1.6 Allin'in molekül yapısı	15
1.7 Alliinden allicin oluşumu	15
1.8 Elektromanyetik spektrum	17
1.9 Elektromanyetik ışığın bileşenleri	19
1.10 Titreşim türleri	29
1.11 Michelson interferometresinin bileşenleri	30
1.12 FTIR spektrometresi	31
1.13 Diferansiyel tarama kalorimetresi	36
1.14 Sistemin yarı kararlı denge durumundan kararlı denge durumuna geçişi	38

XVII

2.1	Havanın infrared spektrumu	40
2.2	a) Su içeren membran sinyali , b) Su katkısı	40
2.3	c)Su katkısı çıkarılmış membran sinyali	41
2.4	a)Alliin içermeyen su katkısı çıkarılmış spektrum ; b)Alliin içeren su katkısı çıkarılmış spektrum	42
2.5	C-H bölgesi (3000 – 2800 cm ⁻¹) için a) Alliin içermeyen normalize edilmiş spektrum; b)Alliin içeren normalize edilmiş spektrum	43
2.6	1800-1000 cm ⁻¹ bölgesi için a) Alliin içermeyen normalize edilmiş örnek; b) Alliin içeren normalize edilmiş örnek	44
3.1	DPPC liposomu içeren alliin'in farklı konsantrasyonları için CH ₂ antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi	48
3.2	DPPC liposomu içeren alliin'in CH ₂ antisimetrik gerilme modu band genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi	49
3.3	DPPC liposomu içeren alliin'in CH ₃ asimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi	52
3.4	DPPC liposomu içeren alliin'in C=O gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi	54
3.5	DPPC liposomu içeren aliin'in PO ₂ ⁻ gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi	56
3.6	DPPC katkılı alliin'in farklı konsantrasyonları için DSC kalorimetrik eğrisi	57
3.7	DSC için alliin'in farklı konsantrasyonlarının T _m sıcaklığına bağlı grafiği	58

TABLolar

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1 Spektroskopi çeşitleri	21
Tablo 2 3015 – 1000 cm ⁻¹ aralığında titreşim frekanslarından kaynaklanan başlıca fonksiyonel gruplar ve karşılık gelen dalga sayıları	43

KISALTMALAR

FTIR	Fourier Transform Infrared
DSC	Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
DPPC	Dipalmitoyl fosfotidilkolin

1. GİRİŞ

Bu çalışmada sarımsağın temel bileşenlerinden biri olan alliin'in, model membranlar (Dipalmitoyl fosfotidilkolin, DPPC) üzerine etkisi, Fourier transform infrared (FTIR) ve diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Alliin'in yapısal özellikleri hakkında bilgiler verilmiştir. Sarımsak (*allium sativum*); vücudumuzu kanser dahil bütün yabancı saldırılardan korumada görevlendirilmiş, bağışıklık sisteminin de güçlenmesine destek olan bileşiklerle donatılmıştır. Yapılan son çalışmalar sarımsak özünde bulunan allicin maddesinin de kanserin gelişmesinin baskılanmasında rol aldığını ortaya koymaktadır (Ezaj et al., 2003). Sarımsağın (*allium sativum*) anti kanser özelliği onun etki mekanizması incelenerek araştırılabilir. Sarımsağın anti kanser özelliği ilk defa Weisberger ve Pensky tarafından 1958 yılında ortaya çıkartılmıştır (Iciek et al., 2009). Ayrıca hücre zarı ya da plazma zarı hücrenin organellerini ve sıvı içeriğini saran ve hücreye yapısal bütünlük sağlayan çok önemli işlevleri yürüten seçici geçirgen bir yapı olan membranlar ve kullanılan teknikler hakkında teorik bilgiler verilerek her bir teknik ayrıntılı olarak incelenmiştir. Alliin'in çeşitli konsantrasyonlarının kullanılması ile membranın yapısı, geçirgenliği ve akışkanlığında meydana gelebilecek değişimler sıcaklığa bağlı olarak incelenmiştir. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak meydana gelen değişimler her bir teknik için ayrı ayrı yorumlanmıştır. Bu deneysel araştırmanın sonucunda, alliin'in hücrenin makro moleküllerinde meydana getirdiği değişimler hakkında bilgiler elde edilmiştir.

1.1 ÇALIŞMANIN AMACI

Biyolojik membranlar, temel yapı maddeleri lipid ve protein olan, moleküler yapıda, dinamik, organize sistemlerdir. Membran lipidlerinin temel bileşenlerinden biri fosfolipidlerdir. Fosfolipid molekülleri bir iskelet üzerine yerleşmiş polar ve hidrofilik bir baş ile polar olmayan hidrofobik iki karbon kuyruğundan oluşmaktadır. Biyolojik membranlar yağ, protein ve polisakkaritlerin farklı tiplerini içerdiği için biyolojik sistemlerde ilaç-lipid etkileşimlerinin mekanizmasını anlamak zordur. Membranın fiziksel özellikleri membran fonksiyonunu belirlediğinden, model ve biyolojik membranlar kullanarak ilaç-membran etkileşmelerini incelemek, günümüzde çok önem verilen bir çalışma alanıdır.

İlaçların biyolojik etkisinde, ilaç-membran etkileşmeleri hayati önem taşır. Örneğin bir ilaç molekülünün bulunduğu sistemde reseptör kısmına ulaşması, ilaçların biyolojik membran boyunca iletimi ile ilgilidir. Moleküler düzeydeki çalışmalar, biyolojik sistemlerin karmaşıklığı nedeni ile genelde bileşenlerin azaltılabildiği, konsantrasyonlarının değiştirilebildiği, model membranlar ile yapılmaktadır.

Moleküler düzeyde, biyolojik sistemlerde makromoleküllerin konsantrasyon, yapı ve fonksiyonlarını inceleme ile elde edilen moleküler seviyedeki bilgiler, hücre makro moleküllerinin etkileşimlerini, ayrıca ilaçların hücrenin bu makro moleküllerinde meydana getirdiği değişimleri anlamaya ve yorumlamaya yarayacaktır.

Bu tez çalışmasındaki amacımız, insan sağlığı için faydalı olduğu bilinen sarımsağın etki mekanizmasının, temel bileşenlerinden alliin'in gerçek sistemlere benzeyen DPPC çok katlı liposomlarla fiziksel etkileşmesini inceleyerek, açığa çıkarılmasına katkıda bulunmaktır. Bu etkileşmeler, FTIR spektroskopik ve DSC kalorimetrik teknikleri kullanılarak incelenecektir.

Liliaceae ailesinin bir üyesi olan sarımsak, çeşitli kanser türlerinin önlenmesinde ve tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Sarımsağın ana maddesi alliin olup, sarımsağın kesilmesi durumunda alliinaz enzimi yardımı ile (sarımsak enzimi) alliin'e dönüşür. Sarımsak bitkisi 6000 yıldan beri bilinen bir türdür. Sarımsak kalorisi yüksek bir besin maddesidir ve iyi bir kalsiyum, fosfor, selenyum, mangan, C vitamini kaynağı olarak kabul edilmektedir (Ezaj et al., 2003).

Alliin'in nötr bir fosfolipid olan DPPC ile fiziksel etkileşmeleri yani membran faz geçişi, membran düzeni ve membran dinamiği üzerindeki etkileri sıcaklığa ve konsantrasyona bağlı olarak incelenecektir. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlarla alliin'in kullanıldığı ilaçların hastalıkların tedavisinde göstereceği başarısı daha iyi anlaşılacaktır.

1.2 BİYOLOJİK VE YAPAY MEMBRANLARLA İLGİLİ TEMEL

BİLGİLER

Hücre membranı, hücrenin dış kısmında bulunan, molekülleri özelliklerine göre hücre içine alan veya dışarı bırakan katmandır (Dalton et al., 2006). Hücre canlılığının ve özgün hücre işlevlerinin sürekliliğini mümkün kılan çok önemli bazı fonksiyonlara sahip olan membranların fonksiyonlarının ve yapılarının anlaşılması, onların fizyolojik görevlerinin anlaşılması açısından önemlidir.

1.2.1 Membranların Fonksiyonları

Hücre membranı hücrenin çevresini sınırlayan bir örtüdür. Esnek, canlı, saydam, seçici-geçirgen protein yapılıdır. Ama görevi sadece hücreyi sarıp kuşatmak değildir. Bu membran, hem komşu hücrelerle iletişimi ve bağlantıyı sağlar, hem de en önemlisi, hücreye giriş çıkışı çok sıkı bir şekilde denetler.

Hücre membranı karmaşık bir yapıya sahiptir. Hücrenin dışındaki ortamda sayısız kimyasal madde vardır. Hücre içi ile hücre dışı ortamlar arasında seçici bir şekilde madde alışverişini sağlayarak hücrenin atıklarını hücre dışı ortama verir, hücre dışından hücreye gerekli maddeleri alır ve hücre içi ortamın özgün yapısını korumaya yardımcı olur (Guyton ve Hall, 2006).

Hücrenin yaşamını devam ettirmesi için zarlardan geçmesi gereken maddeler arasında elektron ve hatta fotonlar, protonlar, iyonlar, su gibi küçük moleküller, amino asit ve şeker gibi orta boy moleküller, proteinler ve nihayet DNA gibi makro moleküler yapılar bulunur. Bazen kapının kendisinden çok daha büyük bir molekül, yüksek enerjiler harcanarak, birçok enzimin yardımıyla son derece özenli bir şekilde hücrenin içine alınır (Guyton ve Hall, 2006).

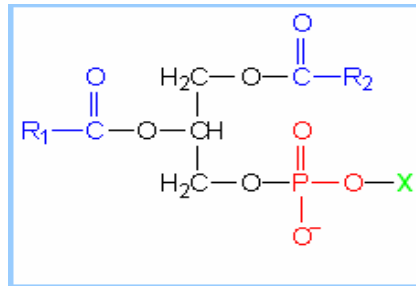
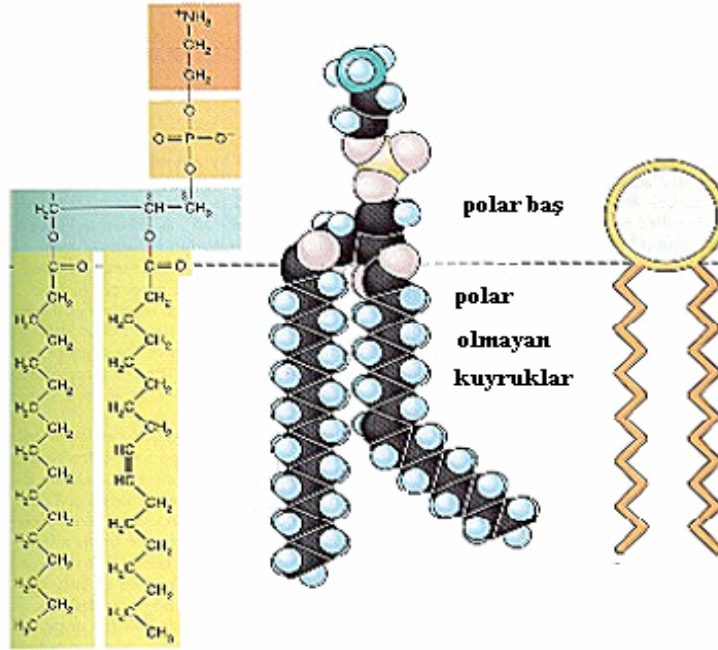
Hücre membranı, seçici geçirgen bir yapıya sahiptir. Molekülün büyüklüğüne, yağda veya suda çözünmesine, polaritesine, ortamdaki yoğunluğuna veya türüne göre madde taşınması sağlanır. Madde taşınması pasif taşıma ve aktif taşıma olmak üzere iki şekilde olmaktadır.

1.2.2 Membranların Yapısı

Membranlar hücreyi koruyup dış etkenlerden izole eden ve hücreyi bir zar gibi saran yapılardır. Membranın yapısı temelde % 50–60 arasında protein moleküllerinden ve %40–50 arasında da lipidlerden oluşur. Membran lipidlerinin temel bileşenlerinden biri fosfolipidlerdir.

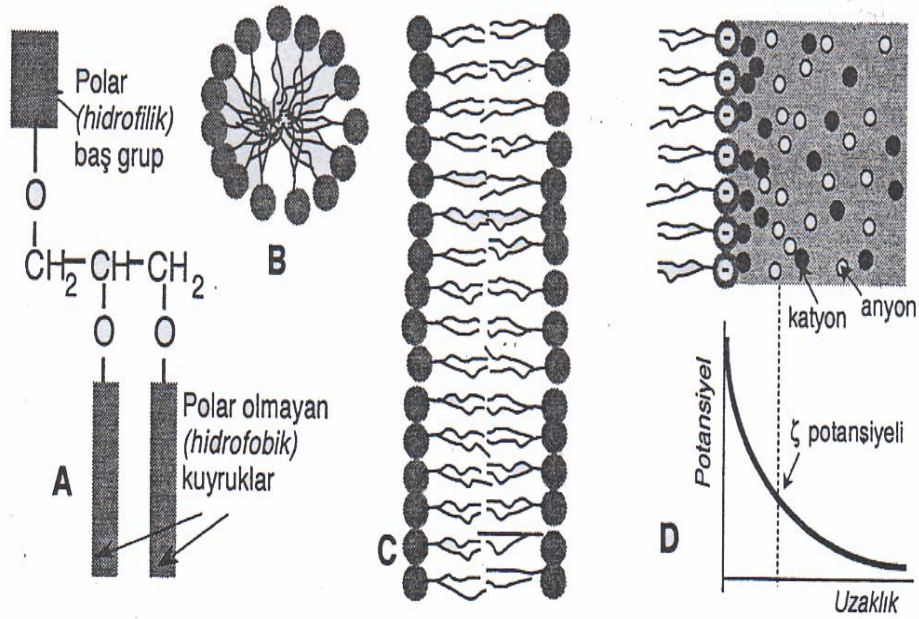
Lipid ve fosfolipidler, hücre membranlarının temel yapısını oluşturarak membranının önemli işlevlerinde rol alırlar. Membran lipidleri genellikle heterojen bir karışımdır. Bir fosfolipid molekülü polar (hidrofilik) bir baş kısmı ile polar olmayan (hidrofobik) kuyruk kısmından oluşur. İki kuyruklu lipidlere bu yüzden amfifatik denir (Guyton ve Hall, 2006).

Membranlarda en bol bulunanları gliserol iskeleti üzerine kurulmuş olan fosfolipidlerdir. Lipid baş grubunun dipolar veya yüklü yapıya sahip olması bu grubun su ile kolaylıkla etkileşmeye girebilmesini sağlar.



Şekil 1.1 Gliserol iskeleti üzerine kurulmuş bir fosfolipid [Alberts et al., 1994]

Şekil 1.1 de X ile gösterilen gruba dört alternatif söylenebilir. Bu alternatiflerden, ilk iki grubun bağlanmaları halinde baş grubu nötr, ancak polar (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin); diğer iki grubun bağlanmaları halinde ise baş grubu negatif yüklü (fosfatidilserin, fosfatidik asit) davranır.



Şekil 1.2 Fosfolipid molekülü ve fosfolipidlerin sulu ortamda kararlı durumları

[Pehlivan, 2004]

A: Gliserol iskeleti üzerine kurulmuş bir fosfolipid molekül,

B: Fosfolipidlerin su içinde misel biçiminde kararlı bir durumu,

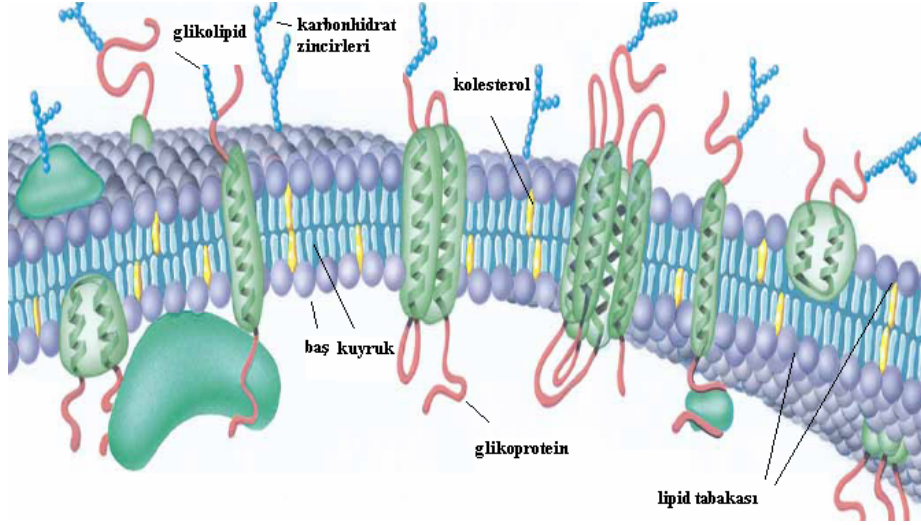
C: Fosfolipidlerin sulu ortamda çift tabaka (bilayer) şeklinde bir başka kararlı durumu,

D: Sulu ortamda negatif yüklü fosfolipid başlarının karşısında oluşan elektriksel çift tabakayı (double bilayer) göstermektedir.

Memelilerin plazma zarlarındaki fosfolipidler, kuyrukları çok miktarda doymamış çift bağ içerdiğinden, normal fizyolojik koşullarda ergimiş olarak bulunurlar ve zara akışkanlık özelliği verirler.

Lipid ve fosfolipidler sulu bir ortam içinde bulduklarında, hidrofobik kesimleri su molekülleri tarafından dışarlanır. Bu nedenle lipid molekülleri Şekil 1.2 B' deki gibi misel adı verilen küreler biçiminde, ya da Şekil 1.2 C'deki gibi çift tabaka (bilayer) biçiminde kümelenirler.

Hücre zarlarındaki lipidlerin düzenli, çift tabakalı bir yapı gösterdiği yüzyılımızın başlarından beri bilinmektedir. Proteinlerin membran modellerindeki konumları konusundaki görüşler ise çok büyük değişikliklere uğramıştır. Birçok deneysel bilgi birikimi sonucunda, Singer ve Nicholson 1972 de hücre membran zarı için **akışkan mozaik** model olarak adlandırılan bir model geliştirmişlerdir. Hücre zarlarının davranışları ile ilgili birçok olayı açıklayabilen bu modelde zarın akışkan bir özellik gösterdiği, proteinlerin bu yapı içinde mozaik gibi serpilmiş oldukları düşünülmektedir.



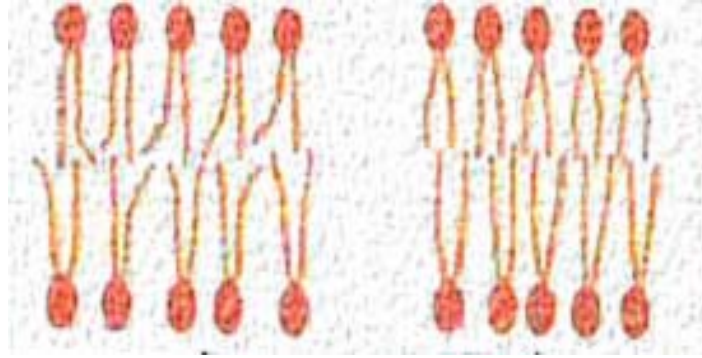
Şekil 1.3 Hücre zarı için akışkan - mozaik model [Garrett ve Grisham, 2006]

Hücre zarının lipid çift tabakası Şekil 1.3’de görüldüğü gibi, tam bir sıvı kristal özelliği göstermektedir. Lipid çift tabakası hareketlilik, akıcılık, kararsızlık gibi akışkanlara özgü özelliklerle birlikte, kristallere özgü yüksek düzeyde bir düzenlilik ve organizasyona da sahiptir.

Hidrokarbon zincirindeki bulunan C-C bağlarının varlığı gauche-trans diye adlandırılan çeşitli konformasyonların oluşumunu gündeme getirir. En düşük enerji durumunda; karbon atomlarının tamamı aynı düzlemde yer alırlar. Bu duruma trans konformasyonu denir.

C-C bağlarının esnekliği sebebiyle dönme gerçekleştiğinde, bundan kaynaklanan termal enerji düzlemsel olmayan gauche konformasyonunun oluşmasına neden olmaktadır.

Çift katmanlarda lipid moleküllerinin davranışları sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. Yapılan çalışmalarda DPPC lipozomlarında hidrokarbon zincirlerinin 35°C civarında bükülmeye başladığı görülmektedir. Bu sıcaklık **ön geçiş sıcaklığı** olarak ifade edilmektedir. Artan sıcaklığa bağlı olarak 41°C' de membranın hidrokarbon zinciri tamamen erimekte ve sistemin sıvı kristal faza geçtiği görülür. Bu sıcaklığa **ana faz geçiş sıcaklığı** denir (Jain 1988).



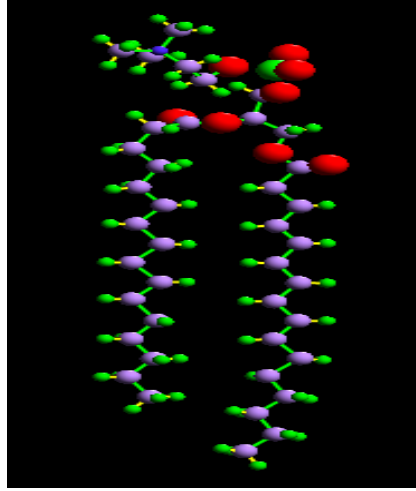
(A)

(B)

Şekil 1.4 A: Sıvı kristal faz , B:Jel faz [Wolfe, 1993]

1.2.3 Model Membran DPPC (Dipalmitoyl fosfotidilkolin)

Lipidlerin %90-95'ini fosfolipidler oluşturur. Bunun da en önemli bileşeni Dipalmitoyl fosfotidilkolindir (DPPC) (Yıldız, 2006). Ana fosfolipid bileşenleri fosfotidil kolin (PC) (%60–70), fosfotidil gliserol (PG) (% 5–10), fosfotidil etanolamin (PE) (% 5–10), fosfotidil inositol (PI) , fosfotidil serin (PS) dir. Fosfolipidler hidrofobik ve hidrofilik özellikleri nedeni ile yüzey kısımlarda lameller şeklinde tabakalar oluşturur. Dipalmitoyl fosfotidilkolin (DPPC) lipozom ve model biyolojik membran çalışmalarında kullanılmaktadır. DPPC nötr bir fosfolipiddir. Molekül formülü $C_{40}H_{80}NO_8P$ dır.



Şekil 1.5 DPPC molekülü [Garrett ve Grisham, 2006]

1.3 ALLİİN NEDİR?

Vatanının Orta ve Batı Asya stepleri olduğu söylenen sarımsak bitkisi 6000 yıldan beri bilinen bir türdür. Kalori değeri 140 olan sarımsağın 100 gramında 63.8 gr su, 28.2 gr karbonhidrat, 5.3 gr protein, 0.2 yağ, 1.1gr selüloz vardır (Ayaz ve Alpsoy, 2007). Liliaceae ailesinin bir üyesi olan sarımsak, çeşitli kanser türlerinin önlenmesinde ve tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan bilimsel araştırmalar sarımsağın birçok yararlı etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Ezaj et al., 2003).

Taze sarımsak su (%65), karbonhidrat, 33 sülfür bileşigi, 17 tane amino asit, germanyum, kalsiyum, potasyum, magnezyum, manganez, krom, baryum, sodyum, selenyum, demir, tiamin, riboflavin, nikotinik asit, vitamin C' den oluşmaktadır (Shukla ve Karla, 2007).

Sarımsağın bakterileri, mantarları, parazitleri öldürmek, doğal antibiyotik etkisi göstermek, kan basıncını, kan şekerini ve kolesterolü düşürmek, karaciğeri korumak, kanı sulandırmak ve tümör gelişimini önleyici maddeler ihtiva etmek gibi önemli özellikleri bulunmaktadır (Ayaz ve Alpsoy, 2007). Ayrıca immun sistemini güçlendirdiği, oksidatif stres ve kardiyovasküler hastalıklardan korunmaya yardımcı olduğu, hiperkolesterolemi tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Butt et al., 2009).

Sarımsaktaki aktif komponentler, organosülfür bileşikleri olan diallyl sulfid (DAS), diallyl disülfid (DADS), diallyl trisülfid (DATS) ve ajoendir. Bu bileşiklerin antikanserojen, antiproliferatif, antioksidan etkilerinin tedavi

edici gücü birbirinden farklıdır. Epidemiyolojik çalışmalar, sarımsak tüketiminin artması ile kanser olgularının azalması arasında yakın bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Atmaca, 2003).

Sarımsağı mucize yapan özellikler, bünyesinde bulunan kükürtlü bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Yapılan araştırmalar sarımsakta 75' in üzerinde kükürtlü bileşik bulunduğunu göstermektedir.

Sarımsaktaki kükürtlü bileşikleri yapısal yönden 4 grup altında toplayabiliriz.

1.CYSTEİNLER:

Bu bileşikler kokusuz, yapı olarak stabil, yani yapısını koruyabilen, amino asit yapısındadır ve kesilmemiş sarımsaklarda bulunur. Bunlara örnek olarak ALLİİN'i verebiliriz.

2.ARA BİLEŞİKLER:

Az miktarda bulunan ve sarımsağın kesilmesi ile aktif hale geçen bileşiklerdir. Bunlar sarımsağın kesilmesi durumunda sarımsak enzimi olan ALLİİNAZ'ı aktif hale geçirirler.

3.İZOLE EDİLEBİLİR KOKULU BİLEŞİKLER:

Bunlar kokulu stabil olmayan veya çok az stabil olan, sarımsak kesildiğinde ortaya çıkan, sarımsak koku ve tadına sahip, ara bileşiklerle birlikte hareket edebilen ve oda sıcaklığında birkaç saat kalabilen bileşiklerdir. Bunlara örnek olarak ALLİCİN verilebilir.

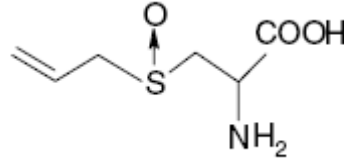
4.STABİL BİLEŞİKLER:

Oda sıcaklığında depolandığında daha stabil kalabilen, sarımsağın doğranması veya yağlar içinde tutulması durumunda ortaya çıkan bileşiklerdir. Bunlara örnek olarak da AJOEN, METİL AJOEN, DİTHİNLER verilebilir (Yanmaz, 2002).

Bu çalışmada allininin nötr bir fosfolipid olan DPPC ile fiziksel etkileşimleri yani membran faz geçişi, membran düzeni ve membran dinamiği üzerindeki etkileri sıcaklığa ve konsantrasyona bağlı olarak incelenecektir. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlarla allininin kullanıldığı ilaçların hastalıkların tedavisindeki başarısı daha iyi anlaşılacaktır. Yapılan çalışma ile insan sağlığına katkıda bulunulacağı için iş gücü kayıplarını azaltarak ülke ekonomisine katkı da sağlayacağı düşünülmektedir.

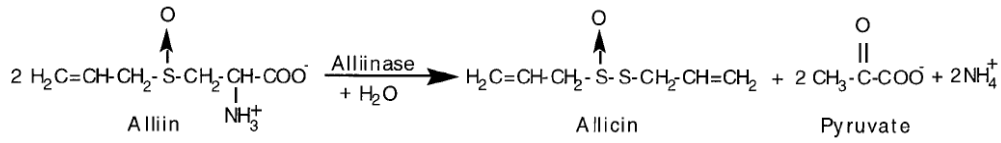
Sarımsakta esas etkili madde bir amino asit olan allindir (Şekil 1.6). Molekül formülü $C_6H_{11}NO_3S$ olup, molekül ağırlığı 177.22 g/mol dır.

Ethanol kloroform, benzen, aseton gibi çözücülerde çözünmeyip sadece suda çözünmektedir (O'Neill et al., 1996).



Şekil 1.6 Alliin'in molekül yapısı [Hughes et al., 2005]

Alliin sarımsağın kesilmesi durumunda alliinaz enzimi yardımı ile alliin'e dönüşür (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 Allinden alliin oluşumu [Miron et al., 1998]

1.4 MOLEKÜLER SPEKTROSKOPİ

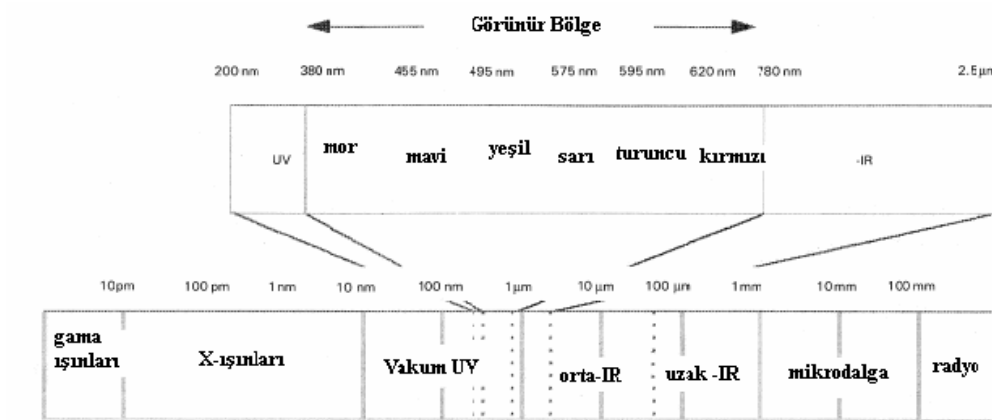
Spektroskopi, elektromanyetik dalganın madde ile etkileşmesi prensibine dayanır. Bir örnekteki moleküllerin bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının

ölçülmesi ve yorumlanması olarak da ifade edilmektedir. Atomların ve moleküllerin enerji seviyeleri arasındaki değişimin sonucu olarak, maddeden elektromanyetik ışınım yayılması ya da maddenin elektromanyetik ışınım soğurması, spektrumların oluşmasına yol açmaktadır.

Spektroskopi, analitik kimyada ve moleküler biyolojide maddelerin ışık aracılığı ile tanımlanmaları amacıyla kullanılmaktadır. Spektroskopik analiz yöntemlerinde örnek üzerine bir uyarıcı tanecik gönderilir ve örneğin bu uyarıcı taneciğe (elektron, nötron, proton, atom, molekül gibi) karşı davranışı ölçülür. Bunlar dışında, elektromanyetik olan ve olmayan ışınım da kullanılmaktadır (mikrodalgalar, radyo dalgaları, X ışınları, vs. gibi) (Tarjan ve Ronto, 1999).

Işınımın frekansı, bu süreçte yer alan enerji seviyelerine bağlıdır ve değişik frekans bölgelerinde değişik teknikler kullanılarak, son derece geniş bilgiler elde edilebilir. Elektromanyetik radyasyon başlıca yedi kategoride incelenir. Bunlar düşük frekanstan yüksek frekansa doğru radyo dalgaları, mikrodalga, kızılötesi, görünür ışık, morötesi, X-ışınları ve gama ışınlarıdır.

Burada belirtilen kategoriler arasında kesin sınır çizgileri yoktur ve bazı durumlarda aslında belirli bir kategoride yer alan bir ışınım, bir başka kategorinin dalgaboyu aralığında bulunabilir.



Şekil 1.8 Elektromanyetik spektrum bileşenleri [Lindon ve et al., 2000]

Elektromanyetik ışınım, hem dalga, hem tanecik özelliğine sahiptir. Girişim ve kırınım dalga özelliğiyle açıklanırken, bir metal yüzeyinden ışınım ile elektronların koparılması (fotoelektrik olay), ışınım enerjisinin bir madde tarafından absorpsiyonu (soğurulması) ve emisyonu (yayılması) olayları ışınımın tanecik özelliği (foton) ile açıklanır (Bernath, 1995).

Dalga boyu, frekans, hız ve genlik gibi parametreleri içeren sinüs dalga modeli ile elektromanyetik ışınım açıklanabilir. Bir dalganın ardışık iki tepe veya iki çukur noktası arasındaki mesafe bize dalgaboyunu verir. Birimi uzunluk birimidir (örneğin, cm). Dalgaların tepe noktalarının belli bir noktadan bir saniye içindeki geçme sayısıdır. "Denge noktası etrafındaki salınım" frekans denir.

$$f = \frac{1}{T} \quad (1.4.1)$$

şeklinde ifade edilir. Buradaki T periyottur. Frekans, dalga hızının dalga boyuna bölümüne eşit olup, birimi Hertz'dir.

Bir dalganın frekansı, dalgaboyu ile ilişkilidir. Dalganın dalgaboyuyla frekansının çarpımı, o dalganın hızını belirler. Dolayısıyla dalgaboyu bilinen bir dalganın frekansı bu ilişki kullanılarak belirlenebilir.

$$f = \frac{v}{\lambda} \quad (1.4.2)$$

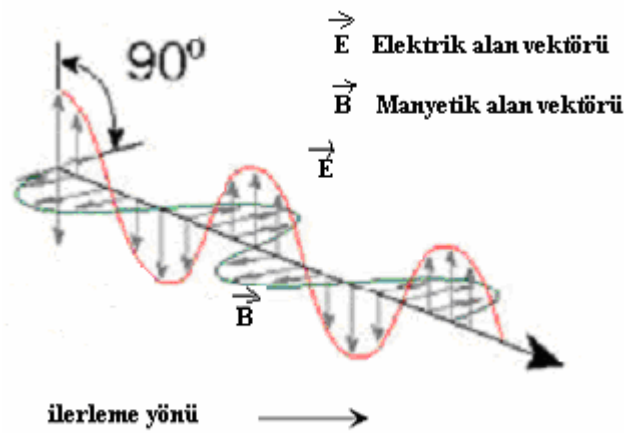
Bu ifadede v hızı, λ (lamda) ise dalgaboyunu temsil eder. Özel durumda değil her durumda elektromanyetik bir dalga olan ışık boşlukta ışık hızıyla hareket ettiği için bu denklem

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad (1.4.3)$$

ifadesine dönüşür. Dalgalar bir ortamdan başka fiziksel yoğunluğa sahip bir ortama geçtiklerinde frekansları değişmez ancak hızları ve dolayısıyla dalgaboyları değişir.

Elektromanyetik dalga, bir elektrik alanı ile bir manyetik alanı eşleştiği zaman oluşur. Elektromanyetik dalganın elektrik ve manyetik alanları birbirlerine ve dalganın hareket yönüne diktir (Sungur ve Gökgündüz,

2009). Aşağıdaki şekil, basit bir elektromanyetik dalganın anlık bir fotoğrafını temsil etmektedir. Bu örnek dalgada; elektrik ve manyetik alanlar düzlemde ilerleyen iki sinüs dalgası biçimindedir. Kırmızı çizgilerle gösterilen elektrik alan vektörü \vec{E} , yeşil çizgilerle gösterilen manyetik alan \vec{B} vektörüdür. Bu iki sinüs dalgası birbirine dik olup aralarında 90 derecelik bir faz farkı vardır. Dolayısıyla, herhangi bir noktada, eğer manyetik alan maksimum veya tersi olacaktır.



Şekil 1.9 Elektromanyetik ışığın bileşenleri [Sungur ve Gökğündüz , 2009]

Elektronik geçişler bir atom veya molekülde, elektronların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleriyle meydana gelir. Atomlar, iyonlar veya moleküller, ancak belli enerjiye sahip belli kesikli hallerde bulunurlar ve buldukları halin değişmesi durumunda iki enerji seviyesi arasındaki enerji farkına tam olarak eşit enerjiyi absorplar veya yayarlar.

$$\Delta E = h\nu \quad (1.4.4)$$

Elektromanyetik ışınmayı absorplayarak en düşük elektronik enerji düzeyinden (temel hal) uyarılmış elektronik düzeylere geçmiş olan moleküller, temel düzeye dönüş sırasında ultraviyole veya görünür bölge sınırları içinde ışınma enerjisi yayarlar (emisyon).

Absorpsiyon titreşim enerji seviyeleri arasında oluyorsa infrared, dönme enerji seviyeleri arasında oluyorsa mikrodalga bölgesinde elektromanyetik ışınması olur. Uyarılmış hallerdeki moleküller, kararsız buldukları durumdan fazla enerjilerini yayarak kurtulurlar (Şekil 2.3).

Tablo 1 de ölçülen fiziksel özelliğe ve ölçme şekline göre spektroskopi çeşitleri sınıflandırılarak gösterilmiştir (Campell, 1984).

İsim	Üretim durumu	Yayılma ortamı	Belirleme yöntemi	Parçacık özellikleri ve kullanımı
Elektronlar Nötronlar	Yüksek voltaj ile termal olarak hızlandırma	Elektrik ve manyetik alan	Floresans Fotoğraflama	Elektron mikroskobu
X-ray	Orbital elektronlarındaki içenerji değişimi		Fotoğraflama İonizasyon	Kristal yansıması Elektron saçılması
Ultraviyole	Atom ve moleküllerdeki elektronik geçişler	Quartz Florid	Fotoğraflama Floresans	UV spektrum
Görünür ışık	Atomve moleküllerdeki orbital elektronlarının düzensizliği	Cam	Fotoğraflama Fotosel	Kimyasal olaya neden olur,uv spektrum
İnfrared	Moleküler rotasyon ve titreşim enerji değişimi	Kaya tuzu	Özel ısıtma etkileri	
Mikrodalga	Klystron gibi özel elektronik aletler	Parafin	Nokta kontaklı diotlar	Esr ölçümü radar iletişimi
Radyo dalgaları	Manyetik alandaki nükleer spin düzensizliği		Radyo alıcıları	NMR ölçümleri

Tablo 1 Spektroskopi çeşitleri [Campell , 1984]

Özellikle yoğunlaşmış fazlardaki çok atomlu moleküllerin absorpsiyon spektrumları, atom spektrumlarına göre oldukça karmaşıktır; çünkü bu moleküllerdeki enerji düzeylerinin sayısı, sadece atomların enerji düzeyi sayılarına göre genellikle çok daha fazladır. Moleküllerin bandlarına ilişkin enerji (E), altı bileşenden oluşur (Campell, 1984).

$$E = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}} + E_{\text{öteleme}} + E_{\text{Nükleer spin yönelmesi}} + E_{\text{elektron spin yönelmesi}} \quad (1.4.5)$$

Moleküllerin elektromanyetik ışına ile etkileşimi sonucu yukarıda oluşan enerji seviyelerindeki değişiklikler moleküler spektroskopinin temelini oluşturmaktadır.

1.4.1 MOLEKÜLER TİTREŞİM

Bir moleküldeki atomların birbirine göre yerleşim durumları tam olarak sabit olmayıp, moleküldeki bağlar etrafında çok sayıda titreşim ve dönme hareketi meydana gelir.

İki atomlu bir molekülde gerilme titreşiminin mekanik modeli örnek alındığında atomik gerilme titreşiminin özellikleri, bir yayın iki ucuna bağlanmış iki kütlelen oluşan mekanik bir modelle ifade edilebilir. Yayın iki ucundaki kütlelerden birinin yayın eksenine yönünde çekilip bırakılması basit harmonik hareket denen olaya neden olur.

Dinamiğin birinci temel yasasından biliyoruz ki, kuvvet olmadığında cismin hızında bir değişim olmaz, yani ivme söz konusu değildir. O halde kuvvet olduğunda, bir ivme yani hız değişimi olmalıdır. Kuvvet ile ivme arasındaki bağlantıyı bulmak için, önce aynı cisme değişik şiddet ve doğrultuda kuvvet uygulayıp (F) ivme (a) ölçülürse, sonrada farklı cisimlerde aynı ölçümler yapılırsa şu sonuç elde edilir. Bütün durumlarda ivmenin doğrultusu kuvvet ile aynı doğrultudadır.

$$\vec{F} = m \cdot \vec{a} \quad (1.4.6)$$

eşitliğinde olduğu gibi kütle, uygulanan kuvvete karşı cismin kazanacağı ivmeye karşı koyan bir niceliktir.

Sabit bir yere bağlı bir yayın ucuna asılı tek bir kütle titreşimini göz önüne alalım. Yayın ucundaki kütle yayın eksenini yönünde çekilerek denge halinden x kadar uzaklaştırılırsa, yayı ilk haline getirmek için gerekli kuvvet \vec{F} , \vec{x} ile orantılı olur (Hooke yasası).

$$\vec{F} = -k\vec{x} \quad (1.4.7)$$

Burada k yay sabiti olup yayın gerilebilirliğine bağlıdır, x ise yerdeğiştirmedir. Negatif işaret, F' nin yayı ilk haline getiren kuvvet olduğunu ifade eder. Bu, kuvvetin yönünün çekilme yönünün tersi olması demektir. Bunun için, kuvvet kütleyle eski yerine getirmeye çalışır.

Newton'un 2.hareket yasanına göre;

$$\vec{F} = \mu \cdot \vec{a} = \mu \frac{d^2 \vec{x}}{dt^2} \quad (1.4.8)$$

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (1.4.9)$$

μ : indirgenmiş kütlelerdir.

İki atomun kütleleri sırasıyla m_1 ve m_2 dir. Buradaki eşitlikler karşılaştırıldığında aşağıdaki diferansiyel denklem elde edilir.

$$\mu \frac{d^2 \vec{x}}{dt^2} + k \vec{x} = 0 \quad (1.4.10)$$

Bu diferansiyel denklemin çözümü periyodik olmalıdır. İkinci dereceden türevi ise çözümün $-k/\mu$ ile çarpımına eşit olmalıdır. Bu koşullar altında çözüm, eşitlik (1.4.11) ile verilir.

$$x = A \cos(2\pi \nu t + b), \quad \nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1.4.11)$$

ile verilir. Burada ν titreşim frekansı ve b ise titreşimin fazıdır.

Eşitlik 1.4.6 dan da sistemin potansiyel enerjisini bulabiliriz:

$$\vec{F} = -\frac{d\vec{V}_v}{dx} \quad (1.4.12)$$

Eşitlik (1.4.12) nin çözümü de eşitlik (1.4.14) ile verilir.

$$\int d\vec{V}_v = -\int \vec{F}dx = k \int \vec{x}.dx \quad (1.4.13)$$

$$\vec{V}_v = \frac{1}{2}k\vec{x}^2 \quad (1.4.14)$$

Kuantum mekaniksel olarak basit harmonik hareketi incelendiği zaman hamiltonyenin, potansiyel enerji ve kinetik enerjinin toplamı olan bir enerji operatörü olduğu görülmektedir.

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V} = \frac{\hat{P}^2}{2m} + \frac{1}{2}k\hat{x}^2 \quad (1.4.15)$$

Schrödinger denklemi;

$$\begin{aligned} \hat{H}\psi &= E\psi \quad ; \\ -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\psi}{dx^2} + \hat{V}(x)\psi &= E\psi \end{aligned} \quad (1.4.16)$$

ile ifade edilir.

Bu eşitlik çözüldüğünde;

$$E_v = hv\left(v + \frac{1}{2}\right) \quad v=0,1,2 \text{ için ,} \quad (1.4.17)$$

elde edilir.

E_v ise titreşim enerji seviyesi (sistemin enerji öz değeri), v titreşim frekansı, v kuantum titreşim sayısıdır. $v=0$ durumundaki titreşim enerjisine sıfır noktası enerjisi denir. $E_v=0$ olması durumunda parçacık hem durgun hem de denge konumundadır.

1.4.2 İNFRARED SPEKTROSKOPİSİ

Atomlar arası titreşimin meydana gelmesi için molekülün infrared ışığı absorplaması gerekmektedir. İnfrared spektroskopisi infrared ışınımı ile molekül etkileşimlerini inceleyen bir yöntemdir. Belirli dalga boyu aralıklarında absorpsiyon yolu ile moleküllerin titreşim ve dönme enerji seviyelerine uyarılmalarının ölçümüne dayanır.

Genellikle 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} arasında kalan orta IR bölgesi kullanılır. Moleküler maddeler için infrared absorpsiyon emisyon ve yansıma spektrumları; spektrumların, moleküllerin bir titreşim veya dönme enerji seviyesinden ötekine geçişleriyle sağlanan enerjideki çeşitli değişmelerden

kaynaklandığı varsayımıyla açıklanabilir. İnfrared (kırmızı ötesi) ışınları, yüksek enerjili olmadığından elektronik geçişleri sağlayamazlar. Bunun yerine daha az enerji gerektiren titreşim geçişlerini sağlarlar.

Bir çözeltinin spektrumunu almak için en iyi yol onu uygun bir çözücüde çözelti haline getirmektir. Bunun için maddenin oldukça derişik bir çözeltisi yapılır (%0,1 ile 10). Çözeltileri koymak için kullanılan numune kaplarının ışın demetini geçiren pencereler sodyum klorür, lityum florür gibi suda çözünen maddelerden yapıldığından kullanılan çözücü numune kaplarını çözmemelidir. Bu yüzden infrared'de çözücü olarak su kullanılmaz ve spektrumu alınacak maddelerin de nem içermemesi gerekir.

Moleküllerin infrared ışınlarını absorplaması sonucu, moleküllerdeki bağ uzunluklarında bir değişim meydana gelebileceği söylenebilir. Bu değişim moleküllerdeki bağların gerilmesinden kaynaklanır. Bu yöntemin kullanılması ile bir bileşikte fonksiyonel gruplar kolayca bulunabilmektedir.

1.4.3 MOLEKÜLER TİTREŞİM TÜRLERİ

Kartezyen koordinatlarına bağlı olarak N atomdan oluşan bir molekülde $3N$ serbestlik derecesi vardır. Lineer moleküllerde 2 tane dönme ve 3 tane öteleme serbestlik derecesi; lineer olmayan moleküllerde ise 3 tane dönme ve 3 tane öteleme serbestlik derecesi olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda lineer moleküllerde $3N-5$ titreşim modu, lineer olmayan moleküllerde $3N-6$ titreşim modu olduğu söylenebilir.

İki veya üç atomlu bir molekül için titreşimlerin özelliğini ve bu titreşimler sırasında absorplanan enerji arasındaki ilişkiyi açıklamak kolay olacaktır. Büyük moleküllerde çok sayıda titreşim merkezi bulunmasının yanı sıra bazı titreşim merkezleri arasında etkileşimler de söz konusudur. Bu sebeple oluşan etkileşimlerin de göz önüne alınması gerekmektedir.

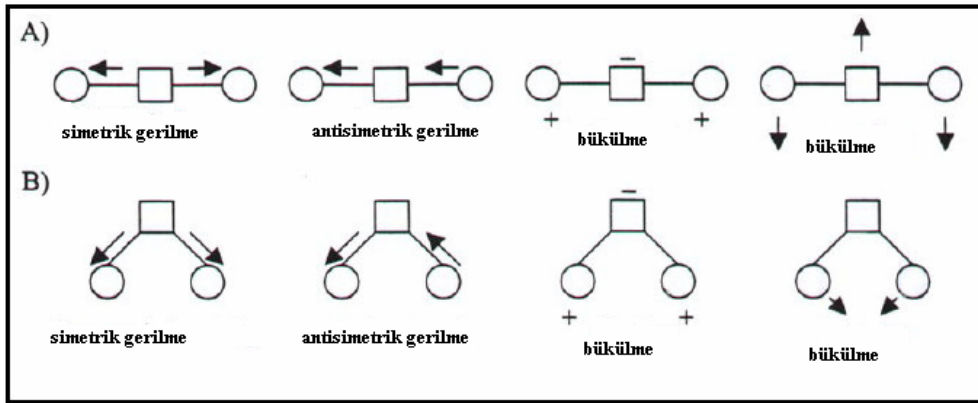
Titreşimler, gerilme ve bükülme olarak 2 grupta toplanabilir.

Gerilme titreşimi; iki atom arasındaki bağ eksenini boyunca atomlar arasındaki uzaklığın devamlı olarak değişmesi ile ifade edilir (simetrik, anti simetrik).

Bükülme titreşimi ise bağ arasındaki açının devamlı değişmesi ile karakterize edilmektedir ve dört tipten oluşmaktadır. Makaslama (Scissoring), sallanma (Rocking), salınma (Wagging) ve kıvrırma (Twisting).

Düzlem dışı açı bükülme (out of plane bending): Atomların hareketi ile bir düzlemin (genellikle bir simetri düzlemi) yok edilmesi hareketidir. Genelde kapalı bir halka oluşturan moleküllerde görülür.

Şekil 1.10 da titreşim türleri ve moleküllerin yapmış olduğu hareketler görülmektedir. A) Lineer olmayan 3 atomlu molekülleri, B) (+) ve (-) işareti düzlem dışı bükülmeyi temsil etmektedir.

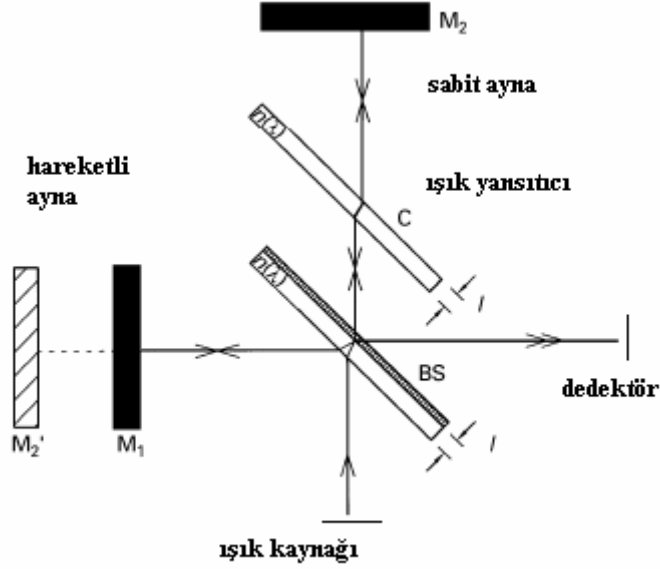


Şekil 1.10 Titreşim türleri [Arrondo ve diğerleri, 1993]

1.5 FOURIER TRANSFORM İNFRARED SPEKTROSKOPİSİ (FTIR)

FTIR aletinin temelini Michelson interferometresi oluşturmaktadır. Bir FTIR spektrometresinde yer alan temel bileşenler Şekil 1.11 de görülmektedir. Bu interferometre biri sabit diğeri hareketli olan birbirine dik iki ayna ve bu iki aynanın yüzeylerini ikiye bölen yarı yansıtıcı bir aynadan (ışın yansıtıcı) oluşur. Kaynaktan gelen ışık, ışık yansıtıcı aracılığı ile ikiye bölünür. Işık, biri sabit diğeri değişken uzunlukta iki ayrı optik yol üzerinden nakledilir. Hareketli ayna, bir analiz süresince ileri geri hareket ederek optik yoldaki değişkenliği sağlar. Eğer iki yol uzunluğu aynı ise, iki ışının yol farkı $n\lambda$ ya eşit ve aynı fazda olacaktır ve bütün frekanslar için yapıcı bir şekilde tekrar birleşeceklerdir. Fakat iki ışın arasında $(n+1/2)\lambda$ yol farkı olursa o zaman yıkıcı bir şekilde etkileşme meydana gelecektir. İki ışık yeniden birleşerek ve optik yol uzunluğunun farkı sebebi ile girişim oluşturacaklardır (Stuart, 1997). Bu ışığın yarısı örnek içinden geçerken, örnek tarafından absorplanmayan ışık detektöre ilerler. Detektörde iki ışının karışımından

kaynaklanan ve interferogram adı verilen girişimin oluşması, analizi yapılan örneklerle ilgili spektral bilgilerin oluşmasını sağlar.



Şekil 1.11 Michelson interferometresinin bileşenleri [Lindon et al., 2000]

FTIR spektrumu genellikle absorbansın, dalga sayısına (cm^{-1}) karşılık gelen grafiği ile gösterilir. Ölçümlerin çekimine başlanmadan önce ortamdaki CO_2 ve H_2O nun absorpsiyonu spektrumu gerçekleştirildi. Program tarafından elde edilen örnek spektrumundan otomatik olarak çıkarıldı. Örneğe ek olarak eklenen fosfat buffer etkisi de incelenen maddenin orijinal spektrumundan dijital data çıkarma yöntemi ile çıkarıldı.



Şekil 1.12 FTIR spektrometresi

FTIR kullanılarak hafızaya kaydedilen spektrumun daha sonra çağırılarak incelenmesi, spektrumun istenen dalga boyu aralığının büyütülerek incelenmesi, incelenecek örnek hakkında kesin analizler yapılmasını mümkün kılmaktadır. Yeni bir numuneye ait bir spektrumla daha önceden bilgisayar arşivinde kayıtlı spektrumun karşılaştırılması bilgisayar tarafından yapılmaktadır ve böylece numune hakkında analiz yapılması kolaylaşmış olur. Bu yöntemde pulslar halinde gönderilen ışınımın analizi bilgisayar tarafından her dalgaboyu için ayrı ayrı yapılarak, elde edilen absorplanmalar toplanmaktadır.

1.5.1 FTIR Spektrometresinin Diğer Tekniklere Göre Avantajları

Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopi tekniğinde, hücrenel bileşenlere zarar vermediği bilinen IR ışının soğurulması, moleküle özgü titreşime ve bunun sonucu olarak da belirli frekans değerlerinde karakteristik sinyallerin (bandların) oluşmasına neden olmaktadır. Bu sinyallerin şiddetinde, band genişliğinde ve frekans değerinde meydana gelen değişiklikler, incelenen sistem hakkında moleküler düzeyde önemli bilgiler vermektedir (Toyran, 2008).

Günümüzde membranlarla yapılan çalışmalarda farklı fiziksel, kimyasal ve spektroskopiksel teknikler kullanıldığı bilinmektedir. X-ışını kullanımı ile küçük miktarlarda su içeren kristallerden elde edilen sonuçların, su içeren gerçek sistemler hakkında kesin bilgi vermediği bilinmektedir ve düzensiz fazların detaylı çalışmaları için yeterli değildir. Bu dezavantaj spektroskopik tekniklerin gelişmesine olanak sağlamıştır.

FTIR spektrometresinin birçok avantajı vardır:

- FTIR aletinin çalışma prensibi zor değildir. Ve bu metod hızlı ve duyarlı bir tekniktir.
- FTIR spektroskopisi ile moleküler düzeyde, makromoleküllerin konsantrasyon, yapı ve fonksiyonları incelenerek, moleküler seviyede bilgiler elde edilmektedir.

- Sıvı, kuru çok değişik sistemlere uygulanmaktadır.
- Membranlar için baş-grup ve hidrokarbon zincir bölgeleri ortamı bozmadan görüntülenebilmektedir.
- FTIR, kullanılan madde ve lipidlerin etkileşimlerini, ayrıca maddenin hücrenin makro moleküllerinde meydana getireceği değişimleri anlamaya ve yorumlamaya yaramaktadır.
- En önemli avantajlarından biri ise sistemdeki protein, lipid gibi makro molekülleri aynı anda izleyebilme imkanını vermesidir.
- Veri elde etme, spektrometre dijital olduğu için oldukça kolaydır.

1.5.2 FTIR Kullanarak Yapılan Membran Çalışmalarında Bilinen Bazı Ampirik Kurallar

CH₂ (simetrik – antisimetrik), CH₃ antisimetrik, C=O, P=O gerilme modlarının frekanslarının ve band genişliklerinin sıcaklığa bağlı olarak incelenmesi ile sistemin düzeni ve dinamiği hakkında bilgiler elde edilmektedir. Frekanstaki değişimler sistemin düzeni ve hidrojen bağlanması tabiatı üzerine, band genişliğindeki değişimlerde sistemin dinamiği üzerine etki etmektedir.

Gerilme modlarını sırası ile inceleyecek olursak,

CH₂ (simetrik – antisimetrik) titreşim modunun frekansının ve band genişliğinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi: Artan sıcaklığa bağlı olarak frekans değerlerinin yüksek dalga sayısına kayması, gauche sayısındaki artışa (düzensizlik) karşılık gelir ve böylece lipid asil zincirin esnekliği artar (Flach et al., 1993; Severcan, 1997). Frekans değerlerindeki azalma sistemin düzeninin artmasına ve trans konformerlerinin artmasına yol açmaktadır. Band genişliği artıkça fosfolipid hidrokarbon zincirinin hareketliliği artar. Diğer bir deyişle band genişliğinin artması sistemin dinamiğinin artmasına yol açar.

CH₃ antisimetrik gerilme modunun frekansının sıcaklığa bağlı olarak değişimi: Frekanstaki değişimin incelenmesi membranın iç kısmının dinamiği hakkında bilgi edinilmesini mümkün kılar. Frekanstaki azalma membranın akışkanlığının azalmasına neden olur.

C=O, P=O gerilme modlarının frekanslarının sıcaklığa bağlı olarak değişimi: Molekülün bağlanması hakkında bilgi verir. C=O gerilme modunun frekansının azalması hidrojen bağlanmasının kuvvetli olduğunu göstermektedir. P=O gerilme bandında oluşan değişimler, C=O ile aynı özelliklere karşılık gelmektedir (Toyran ve Severcan, 2003).

1.6 DİFERANSİYEL TARAMA KALORİMETRESİ (DSC)

Sıcaklık veya zamana bağılı olarak malzemede oluşan enerji değişimini ölçen bu cihaz ile maddelerin ısıl özelliklerinin belirlenmesi, sayısal analiz, hammadde kalite kontrolleri, kinetik ve termodinamik çalışmalar yapılmaktadır (Reading et al., 1993).



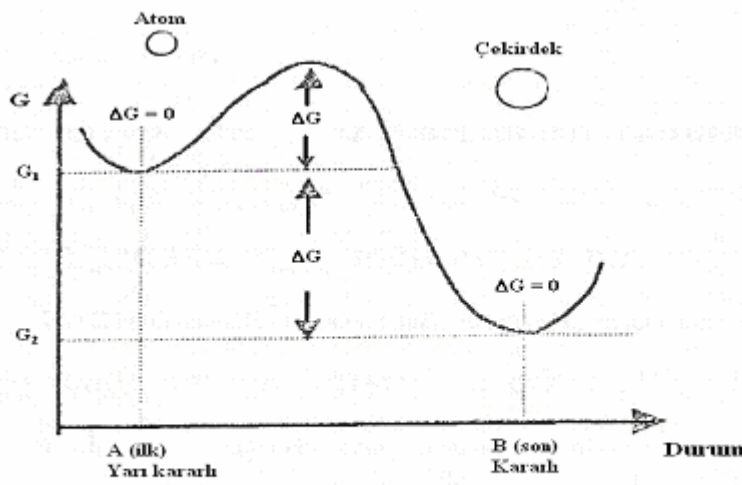
Şekil 1.13 Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC)

Bu cihaz, referans ile numuneden gelen (ya da uzaklaşan) ısı farkını zamana veya sıcaklığa bağılı olarak gösterir. Numunenin sıcaklığa göre verdiği tepkiler o numunenin yapısı, kalitesi, saflığı ve dayanıklılığı gibi birçok özellik hakkında bilgi verir.

DSC nin çalışma prensiplerinden bahsedecek olursak, sıcaklığın iletildiği yüzey üzerinde 2 tane pan bulunmaktadır. Bu panlardan bir tanesi

boş olup referans panı olarak bilinmektedir. Diğeri ise örneğin hazırlanıp konulduğu pandır. Daha sonra çeşitli zaman aralıkları ile sıcaklığın değiştirilmesi sonucunda endotermik ve egzotermik pikler meydana gelmektedir (Açıkgöz, 2004). Her bir pik bir faz dönüşümüne karşılık gelmektedir ve geçişlerin entalpisini ölçer ve geçiş entalpisi de asil zincirlerin erime enerjisini yansıtır.

Bir malzeme bağ kuvvetlerinin etkisinde denge halinde bulunan atomlar grubundan oluşur. Malzemeler üzerinde homojen sınırlarla ayrılmış ve özellikleri farklı olan bölgelere faz denir. Ancak şartlar değişirse denge bozulur ve atomlar başka bir denge konumuna geçerek dizilir ve sonuçta yeni bir faz oluşur. Malzemedeki basınç, bileşim ve sıcaklıktaki herhangi bir değişim faz dönüşümünün nedeni olabilmektedir (Abbaschian, 1992). Malzeme içindeki sıcaklık değişimleri, faz dönüşümünün en önemli nedenidir. Katı ve sıvı fazların dengede olduğu durumda, bu fazların Gibbs serbest enerjileri birbirine eşittir ($\Delta G = 0$). $\Delta G = 0$ olduğu durum, sistemin en düşük Gibbs serbest enerjisine sahip olma halini yani kararlı denge durumunu göstermektedir. $\Delta G \neq 0$ olduğu durumlara da kararsız durumlar denir (Okumuş, 2006).



Şekil 1.14 Sistemin yarı kararlı denge durumundan kararlı denge durumuna geçişi
[Okumuş, 2006]

Bu deneysel çalışmada Perkin Elmer markalı DSC aleti, deneylerin analizi sırasında da TA Universal Analysis programı kullanılmıştır. Analiz sırasında da ΔH_{vh} , ΔH_{cal} , C_p , T_m , T_d , C_u , M gibi aşağıda birbirleri ile ilişkisi görülen termodinamiksel parametreler incelenmiştir.

$$\Delta H_{vh} = (4R T_d^2 C_p M / \Delta H_{cal}) \quad (2.4.1)$$

R : 0,001987 kcal mol⁻¹ K⁻¹, T_d : Kelvin cinsinden T_m

T_m : Faz geçiş sıcaklığı, C_p : Pik yüksekliği, M : Molarite dir.

$$C_u = \Delta H_{vh} / \Delta H_{cal} \quad (2.4.2)$$

C_u : Kooperativiti ΔH_{cal} : Pikin altında kalan alandır.

2.MATERYAL VE METOD

2.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Alliin Fluka, Dipalmitoyl fosfotidilkolin (DPPC) ise Sigma (St.Louis,Mo) firmasından satın alınmıştır. Bütün kimyasal maddeler buldukları halden daha fazla saflaştırılmadan kullanılmışlardır.

2.2 Membran Örneklerinin Hazırlanması

Membran örneklerine katılacak % 1, %6, % 12, %18, %24 konsantrasyonları için gerekli olan alliin miktarları hesaplandı. 5 mg alliin 1000 µl fosfat tampon (pH=7.4) da çözünerek stok çözelti hazırlandı. Bu işlemin ardından her bir konsantrasyon için ependorf kaplarına, hazırlanan stok çözülden gerekli alliin miktarı konuldu.

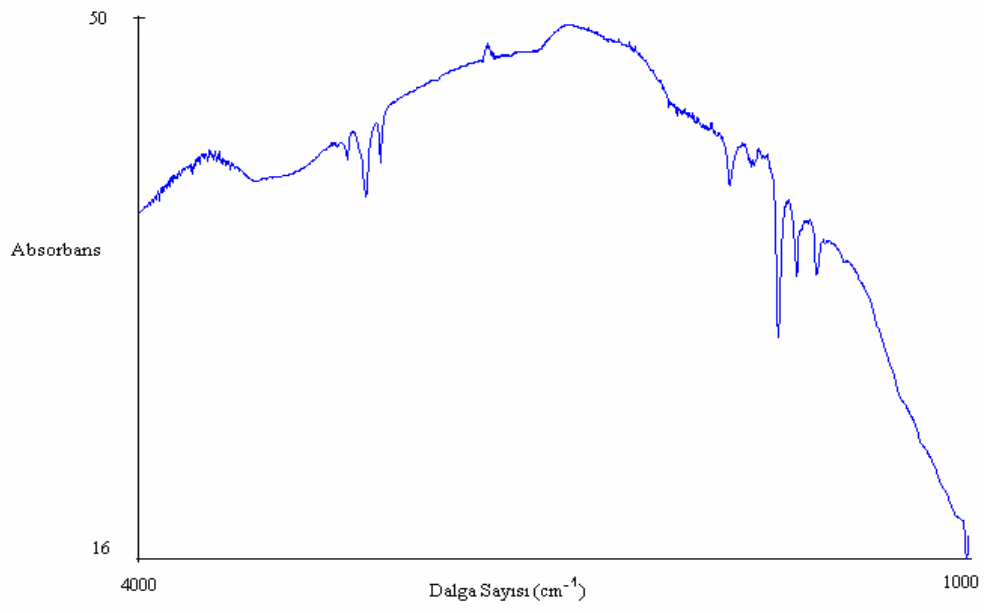
Daha sonra örnekler Freze Dry System'e konularak bir gece boyunca bekletildi. Saf DPPC (%0) dahil olmak üzere bütün ependorfların içine 5 mg DPPC konuldu. Lipidi çözmek için 150 µl kloroform konulup eritildikten sonra kloroformun fazlası azot gazı ile uçuruldu. Örneklerin tüm organik çözücülerden iyice arındırılması için tüm örnekler vakum sistemine (Spin – Vac) a yerleştirildi ve 2 saat süre ile vakum yapıldı. Bu işlemin yapılması sonucunda kuru ince lipid tabakaları elde edildi. Her bir konsantrasyona 25µl fosfat tamponu (pH= 7.4) konuldu.

Elde edilen karışım, 20 dakika süre ile 1 dakika lipid ana faz geçiş sıcaklığının 20 °C üzerinde, 1 dakika vortex karıştırıcıda çalkalanarak süt renginde çok katlı katmanlar elde edildi.

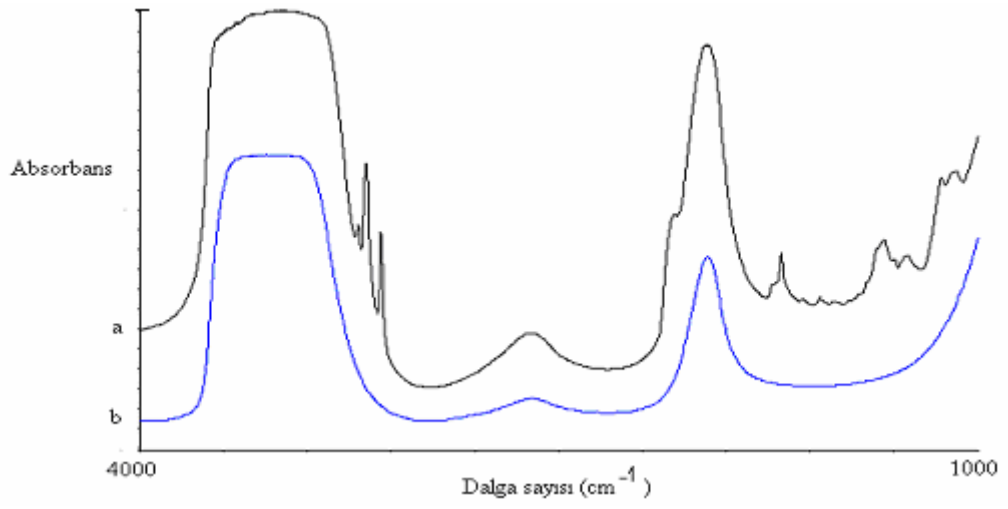
2.2.1 FTIR Çalışmaları İçin Örnek Hazırlanması, Spektrum alınması ve Data analizi

FTIR çalışmaları için (Perkin Elmer) FT-IR Spektrum spektrometresi kullanıldı. Hazırlanan membran örneklerinden 20 µl alındı ve 12 µm hücre kalınlıklı suda çözünmez CaF₂ quartz camlar arasına konuldu. Bu camlar sıcaklık kontrolüne uygun metal kap içerisine konulduktan sonra sıcaklık kontrol sistemine yerleştirildi. Sıcaklık, sıcaklık kontrol sistemi kullanılarak istenilen değerlere ayarlandı. Örnekler her sıcaklıkta 5 dakika inkübe edildi ve 2 °C aralıklar ile 25 °C ile 90 °C arasında tarandı. Her örnek için 2 cm⁻¹ çözme gücü ile 50 tarama yapıldı.

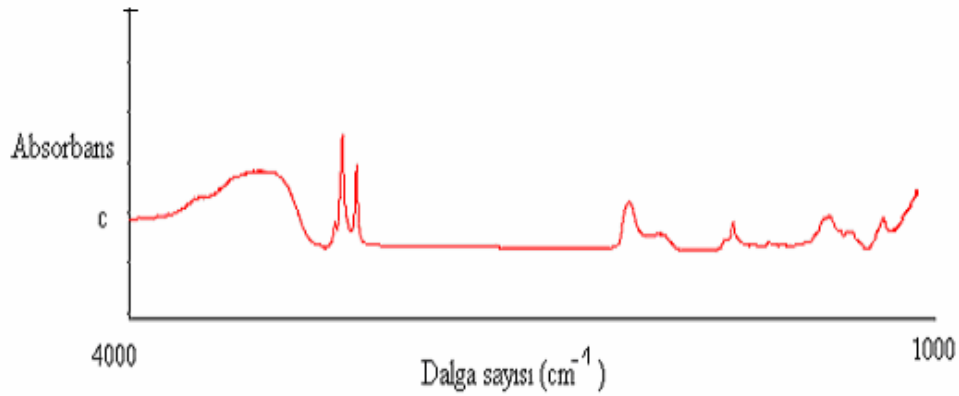
Havanın infrared spektrumu ölçümler gerçekleştirilmeden önce sağlandı ve örnek spektrumundan çıkartılma işlemi spektrum programı tarafından otomatik olarak yapıldı (Şekil 2.1). Ek olarak örneğe eklenen fosfat tamponu, allininin orijinal spektrumundan dijital data çıkarma metodu kullanılarak çıkarıldı (Şekil 2.2). Bu işlemler sonucunda saf lipid spektrumu elde edildi.



Şekil 2.1 Havanın infrared spektrumu



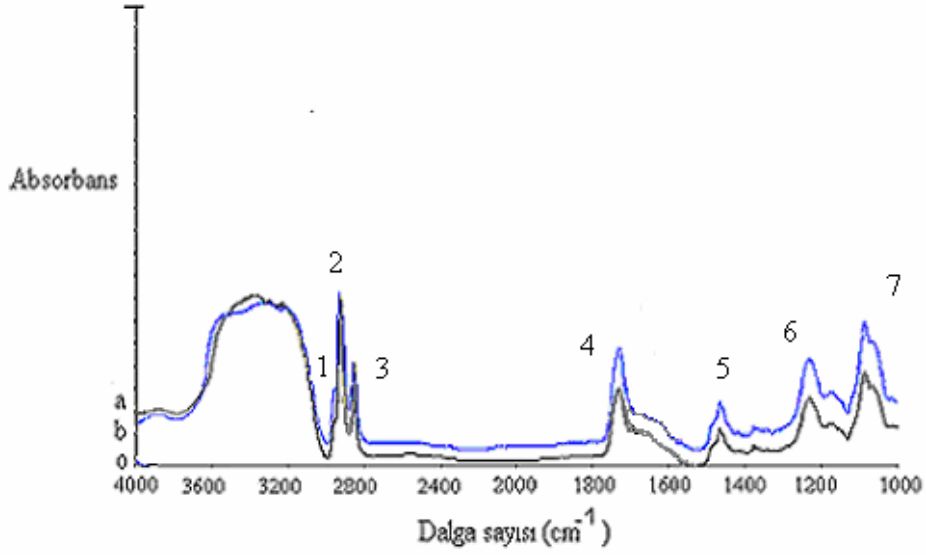
Şekil 2.2 a) Su içeren membran sinyali , b) Su katkısı



Şekil 2.3 c) Su katkısı çıkarılmış membran sinyali

Saf lipid spektrumu üzerinde istenen frekans aralıkları spektrum programına yazıldı ardından normalize etme işlemi gerçekleştirildi ve seçilen frekans aralıklarına karşılık gelen gerilme modları ayrıntılı bir biçimde incelendi. Deney 2 kez tekrarlandı. Band genişliklerinin okunması işleminde normalize edilmiş örnek üzerinde istenen frekans aralıkları seçilerek pik yükseklikleri okundu ve bu yüksekliğin %75 i hesaplandı. Elde edilen %75 lik değer pikin alt kısmından ölçülerek band genişliği çizildi. Yüksekliğe karşılık gelen pik genişliğinin yüzdesi hesaplanarak band genişliği elde edildi.

Alliin ile nötr model membranların etkileşimi incelenirken, Fourier Transform Infrared (FTIR) spektrometresi kullanılarak CH_2 gerilme modlarının frekansının ve band genişliğinin, CH_3 gerilme modunun frekansının, $\text{C}=\text{O}$ titreşim modu ve fosfat gerilme modunun frekansının sıcaklığa bağlı değişimi incelenmiştir.

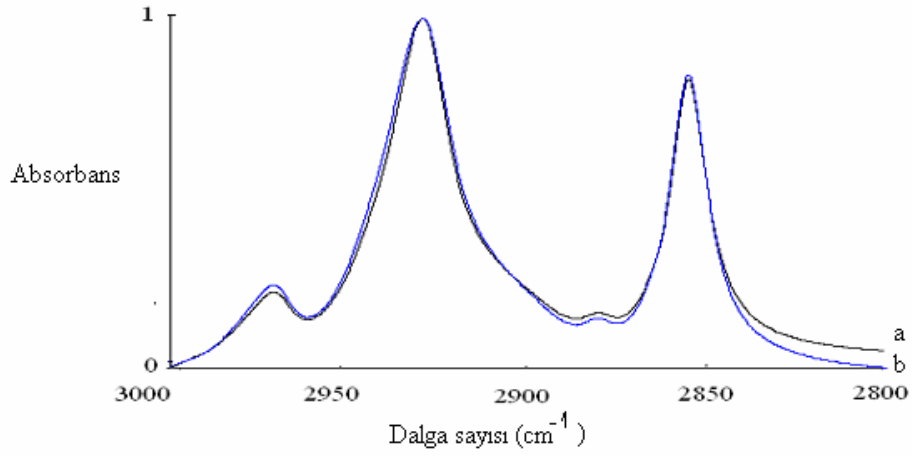


Şekil 2.4a) Alliin içermeyen su katkısı çıkarılmış spektrum ; b) Alliin içeren su katkısı çıkarılmış spektrum

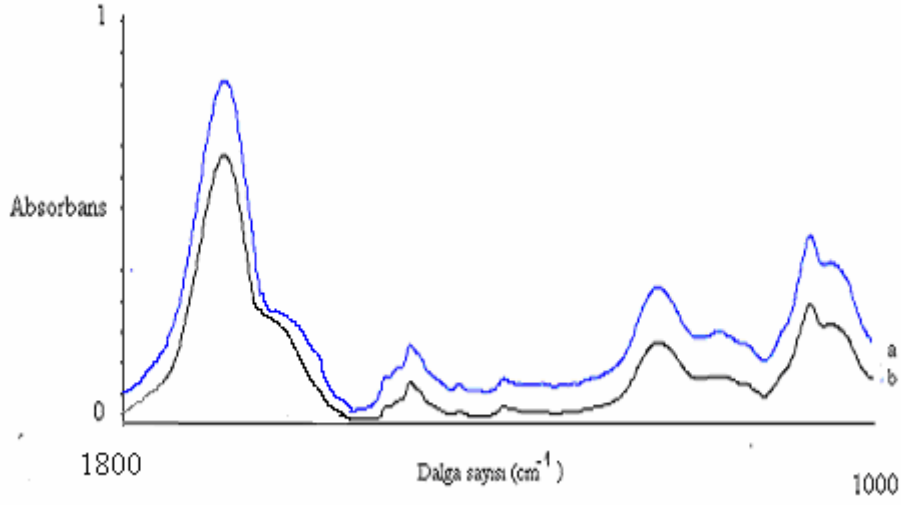
FTIR spektrometresi kullanarak yaptığımız bu deneysel çalışmadaki titreşimlerin tamamı frekans ve band genişliklerinin sıcaklığa bağlı değişimi göz önüne alınarak incelenmiştir. İncelediğimiz her bir titreşim spektral bölgede çeşitli frekans değerlerine karşılık gelmektedir. Yukarıda numaralandırılmış spektrum için tabloda literatürdeki bazı titreşim türleri ve buna karşılık gelen frekans değerleri gösterilmiştir (Toyran, 2008).

	Karşılığı	Frekans (cm ⁻¹)
1	CH ₃ asimetrik gerilme: Lipid	2956
2	CH ₂ antisimetrik gerilme: Lipid	2918
3	CH ₂ simetrik gerilme: Lipid	2850
4	C-O gerilme: Lipidlerdeki ester gruplar	1733-1739
5	CH ₂ makaslama: Lipid	1468
6	PO ₂ ⁻ asimetrik gerilme: Fosfolipidler, nükleik asitler	1228
7	PO ₂ ⁻ simetrik gerilme: Fosfolipidler, nükleik asitler	1000 -1085

Tablo 2 3015 – 1000 cm⁻¹ aralığında titreşim frekanslarından kaynaklanan başlıca fonksiyonel gruplar ve karşılık gelen dalga sayıları [Toyran , 2008]



Şekil 2.5 C-H bölgesi (3000 – 2800 cm⁻¹) için a) Alliin içermeyen normalize edilmiş spektrum; b)Alliin içeren normalize edilmiş spektrum



Şekil 2.6 1800-1000 cm^{-1} bölgesi için a) Alliin içermeyen normalize edilmiş örnek ;
b) Alliin içeren normalize edilmiş örnek

2.2.2 DSC Ölçümleri İçin Örnek Hazırlanması

DSC ölçümleri için lipid karışımı, infrared çalışmaları için kullanılan yöntemle hazırlandı. İnfrared çalışmalarından farklı olarak 2 mg DPPC ve lipidi çözmek için 100 μl kloroform kullanıldı. Lipozom hazırlamak için örneğe 50 μl fosfat tamponu eklendi. Örnekler TAQ100 DSC aletinde tarandı. Isıtma hızı dakikada 1 $^{\circ}\text{C}$ dir. Çalışılan sıcaklık 25 $^{\circ}\text{C}$ ve 75 $^{\circ}\text{C}$ arasındadır.

3.SONUÇLAR

Bu deneysel çalışmada, FTIR (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi) ve DSC (Diferansiyel Tarama Kalorimetresi), kullanılmıştır. Yapılan FTIR analizleri ile sistemin düzeni, dinamiği, faz geçişleri, ve molekülün membran içindeki konumu hakkında, DSC analizleri ile ise sistemin faz geçiş sıcaklıkları (ön geçiş – ana faz geçiş) hakkında bilgiler elde edilmiştir.

3.1 FTIR ÇALIŞMALARI

FTIR spektroskopisi kullanarak frekans ve band genişliklerindeki değişimler sıcaklığa bağlı olarak incelenebilmektedir. Değişik frekans aralıklarına karşılık gelen simetrik, antisimetrik, makaslama, burkulma bölgeleri hakkında bilgiler elde edilebilir.

3.1.1 C-H GERİLME BÖLGESİ

3.1.1.1 CH₂ Antisimetrik Gerilme

Titreşim frekansının sıcaklığa bağlı grafiği DPPC lipozomu için incelenmiştir. Şekil 3.1 de jel fazdan sıvı kristal faza 41 °C’de geçiş olduğu görülmektedir. Farklı konsantrasyonlardaki alliin’in saf DPPC lipozomlarına eklenmesi ile (%24 mol hariç) faz geçişinin altındaki sıcaklıklarda jel fazda, frekans değerlerinde kademeli olarak artış gözlemlenmiştir. % 24 mol alliin konsantrasyonu için ise frekans değerlerinde azalma gözlenmektedir. Faz geçiş sıcaklığının üstündeki değerlerde yani sıvı kristal fazda artan

konsantrasyonlara bağlı olarak frekans değerlerinde artış gözlemlenmiştir (%24 mol hariç).

Frekanstaki bu değişimler değerlendirildiğinde;

Jel fazda %1, 6, 12, 18 mol alliin'in DPPC lipozomlarına eklenmesi ile frekansın artması sistemdeki gauche konformerlerinin sayısının artmasına ve sistemin asıl zincir (hidrokarbon zincir) düzeninin azalmasına neden olmaktadır.

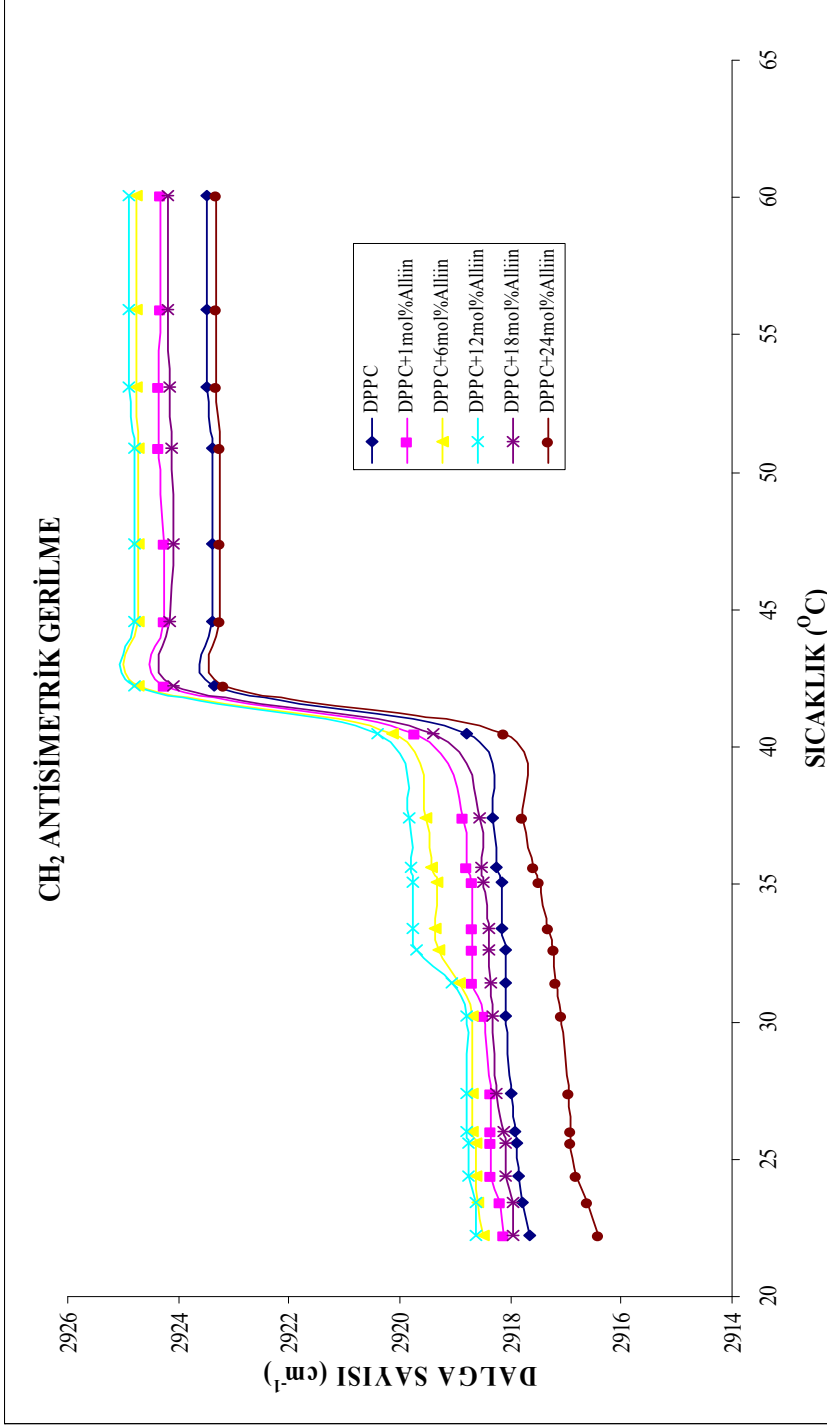
- Sıvı kristal fazda alliin'in artan konsantrasyonlarına bağlı olarak frekans değerlerindeki artış (%24 mol hariç) sistemdeki gauche konformelerinin sayısının artmasına ve sistemin asıl zincir (hidrokarbon zincir) düzeninin azalmasına neden olmaktadır.

CH₂ antisimetrik gerilme titreşiminin band genişliğinin sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde (Şekil 3.2); hem jel hem de sıvı kristal fazdaki değerler saf DPPC lipozomu değerlerine göre, alliin'in (%1, %6, %12, %18) mol konsantrasyonları eklenmesi ile artmış, %24 mol alliin konsantrasyonunun eklenmesi ile DPPC lipozom değerinin altında kalmıştır. Band genişliği değerlerindeki bu değişimler değerlendirildiğinde;

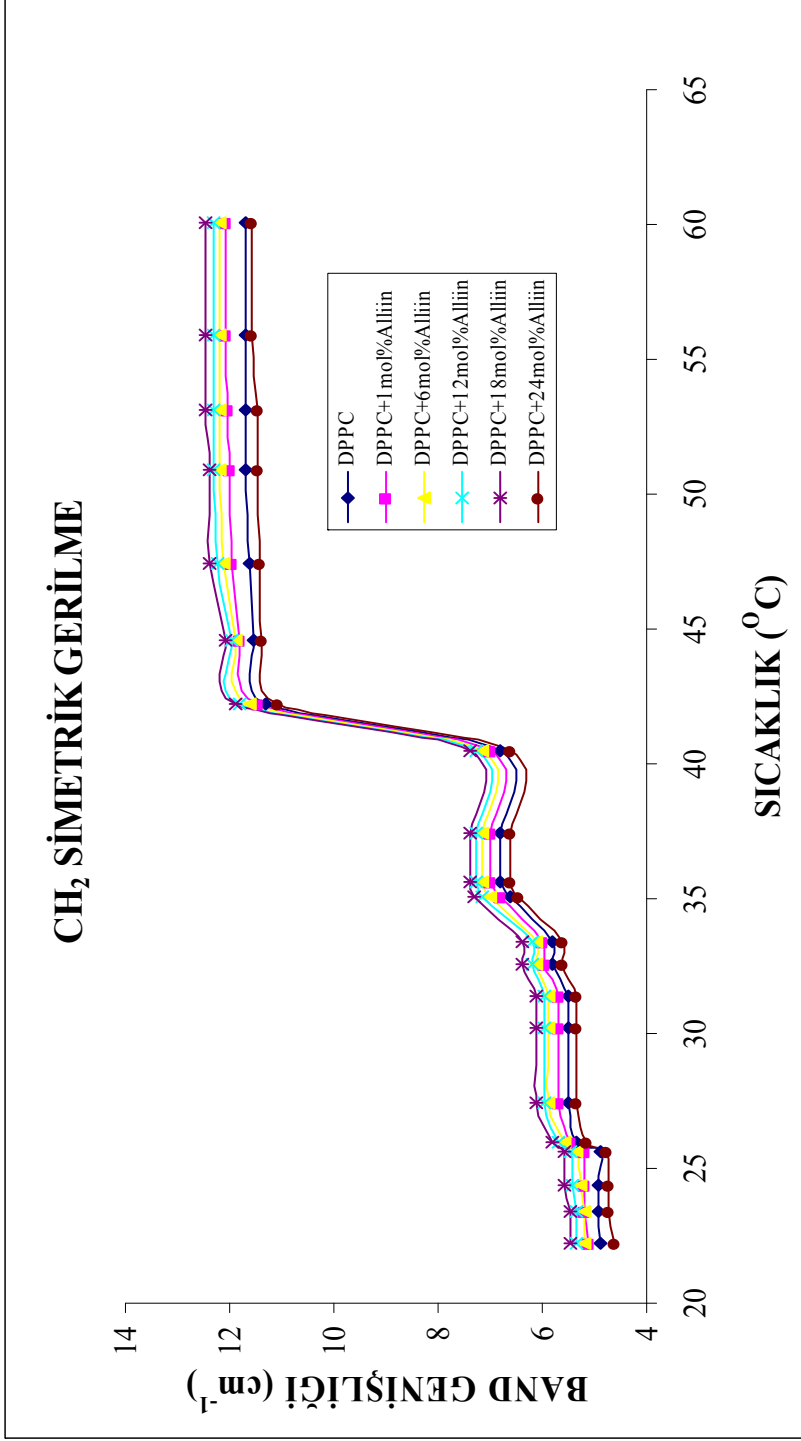
- Band genişliği değerlerinin %18 mol değerine kadar hem jel hem de sıvı kristal fazda saf DPPC değerlerine göre artması, lipid asil zincirlerinin hareket özgürlüğünün her iki fazda arttığını dolayısı ile alliin'in membranın akışkanlığını arttırdığını göstermektedir.

- %24 mol alliin için saf DPPC değerlerine göre band genişliğinin DPPC'nin altında kalması, yüksek konsantrasyonun, membran dinamiğini arttırıcı etkisinin daha az olduğunu gösterir.

Fakat şekilden açıkça görülmektedir ki; (%24 mol hariç) diğer konsantrasyonlarda DPPC'ye göre alliin membran dinamiğini arttırmaktadır.



Şekil 3.1 DPPC lipozomu içeren alliin'in farklı konsantrasyonları için CH₂ antisimetrik gerilme n odu frekansının sıcaklığa bağı değişimi



Şekil 3.2 DPPC lipozomu içeren alliin'in farklı konsantrasyonları için CH₂ antisimetrik gerilme modu band genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi

3.1.1.2 CH₂ Simetrik Gerilme

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

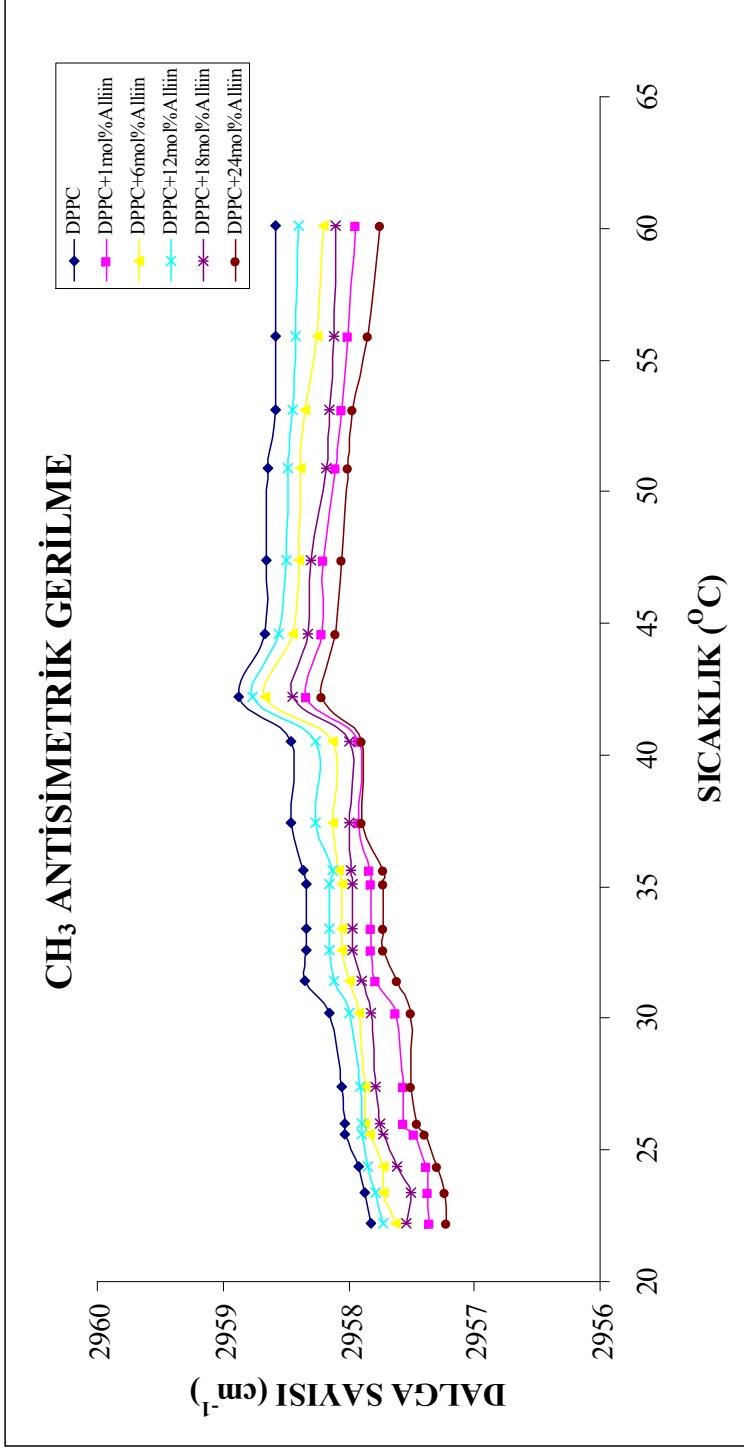
3.1.1.3 CH₃ Asimetrik Gerilme

CH₃ asimetrik gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerlerini incelediğimizde (Şekil 3.3) alliin'in artan konsantrasyonlarının faz geçiş sıcaklığını arttırdığı gözlemlenmiştir. Alliin'in saf DPPC lipozomlarına eklenmesi ile faz geçiş sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda (%1-%24) mol konsantrasyonlarının frekans değerlerini saf DPPC lipozomlarına göre azalttığı gözlemlenmiştir. Faz geçiş sıcaklığının üstündeki sıcaklıklarda ise alliin'in bütün konsantrasyonlarının frekans değerlerinin saf DPPC değerlerinin altında kaldığı gözlemlenmiştir. Frekans değerlerindeki bu değişimler değerlendirildiğinde;

- Jel fazda DPPC lipozomlarına eklenen (%1-%24) mol alliin konsantrasyonlarının frekans değerlerinin DPPC frekans değerlerinin altında kalması frekansın azalması, alliin'in bu konsantrasyonlarda membranın iç kısmının (asil zincir fleksibilitesi) düzenini arttırdığı ve dolayısı ile hareket serbestliğinin de azaldığı anlamına gelmektedir.

- Sıvı kristal fazda, alliin'in artan konsantrasyonları ile frekans değerlerinin saf DPPC lipozomunun frekans değerlerinin altında kalması, bu fazda alliin'in membranın iç kısmının düzenini arttırdığını göstermektedir.

CH₃ gerilme sonuçları CH₂ gerilme sonuçları ile kıyaslandığında, farklı olduğu görülmektedir. Bu da alliin'in lipozomlar üzerindeki etkisinin membranın farklı kısımları için ayrı özellikler taşıdığını göstermektedir.



Şekil 3.3 DPPC lipozomu içeren alliin'in farklı konsantrasyonları için CH₃ asim etrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi

3.1.2 BAŞ GRUP GERİLME BÖLGESİ

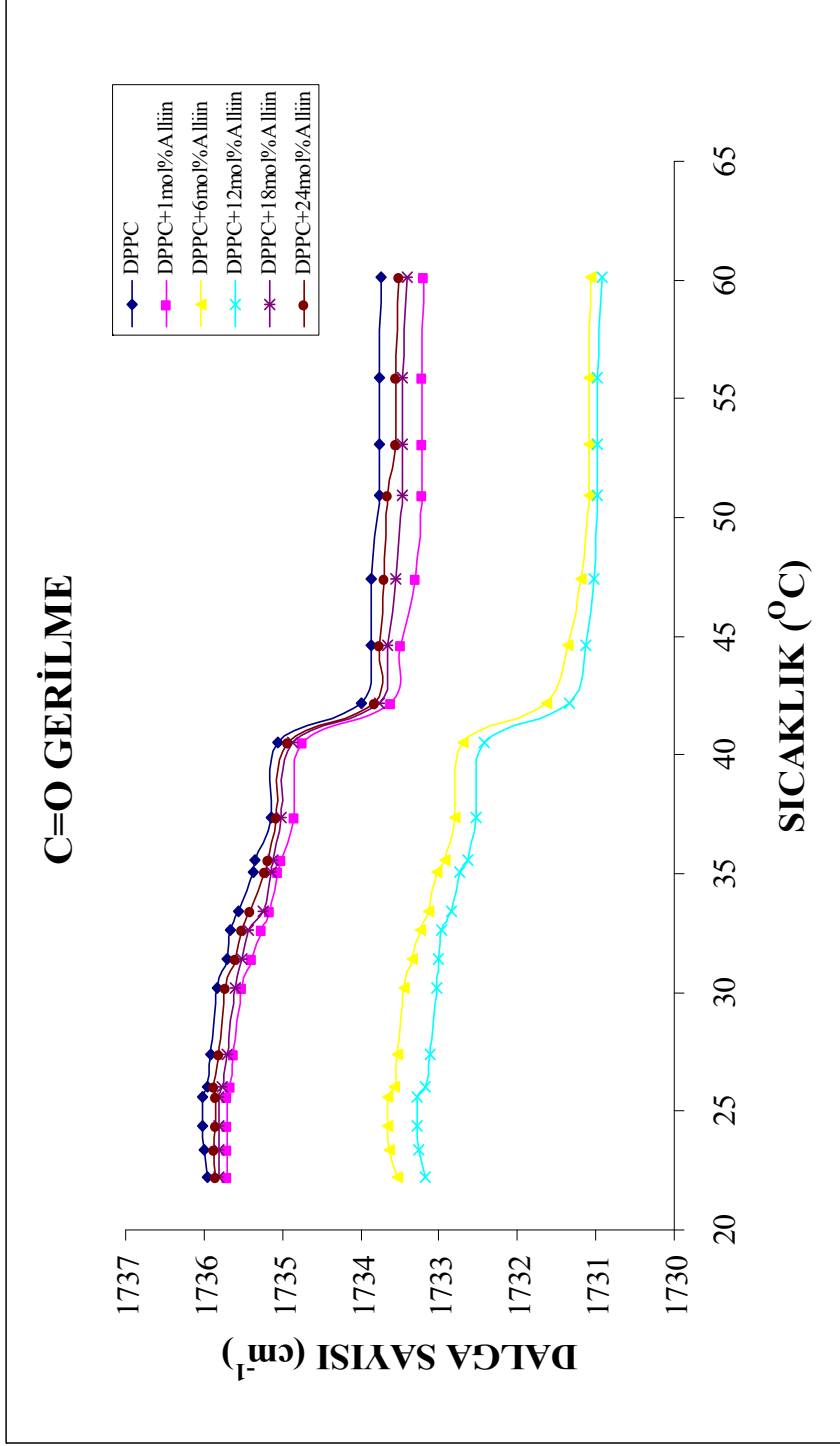
3.1.2.1 C=O Gerilme

C=O gerilme frekansının sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde (Şekil 3.4); saf DPPC eğrisinde 41°C civarında (ana faz geçiş sıcaklığı) ani bir azalma gözlenmiştir. Artan alliin konsantrasyonlarının hem jel hem de sıvı kristal fazda frekans değerlerinde azalma görülmektedir.

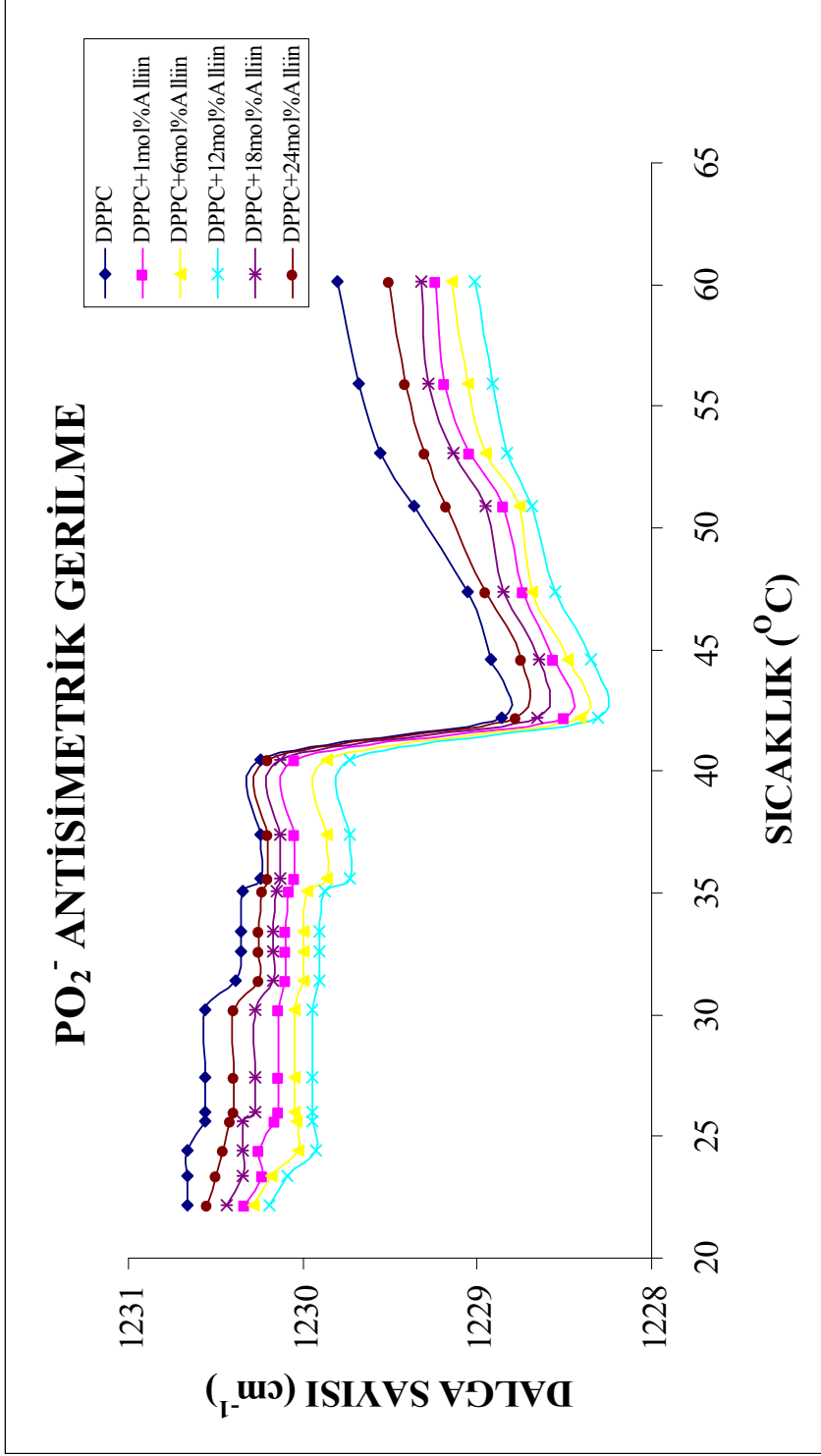
3.1.2.2 PO₂⁻ Antisimetrik gerilme

PO₂⁻ antisimetrik gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde (Şekil 3.5), C=O gerilme titreşim frekansına benzer şekilde hem jel hem de sıvı kristal fazda saf DPPC değerlerine göre artan alliin konsantrasyonuna bağlı olarak derece derece azalma gözlemlenmiştir.

Seçilen frekans aralıklarına karşılık gelen gerilme titreşim modları frekansının sıcaklığa bağlı değişimleri de her bölgeye göre farklılık göstermektedir. Böylece kullanılan maddenin sistem üzerine etkisi incelendiğinde bölgesel olarak farklılıklar görülmektedir.



Şekil 3.4 DPPC lipozomu içeren alliin'in farklı konsantrasyonları için C=O gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi

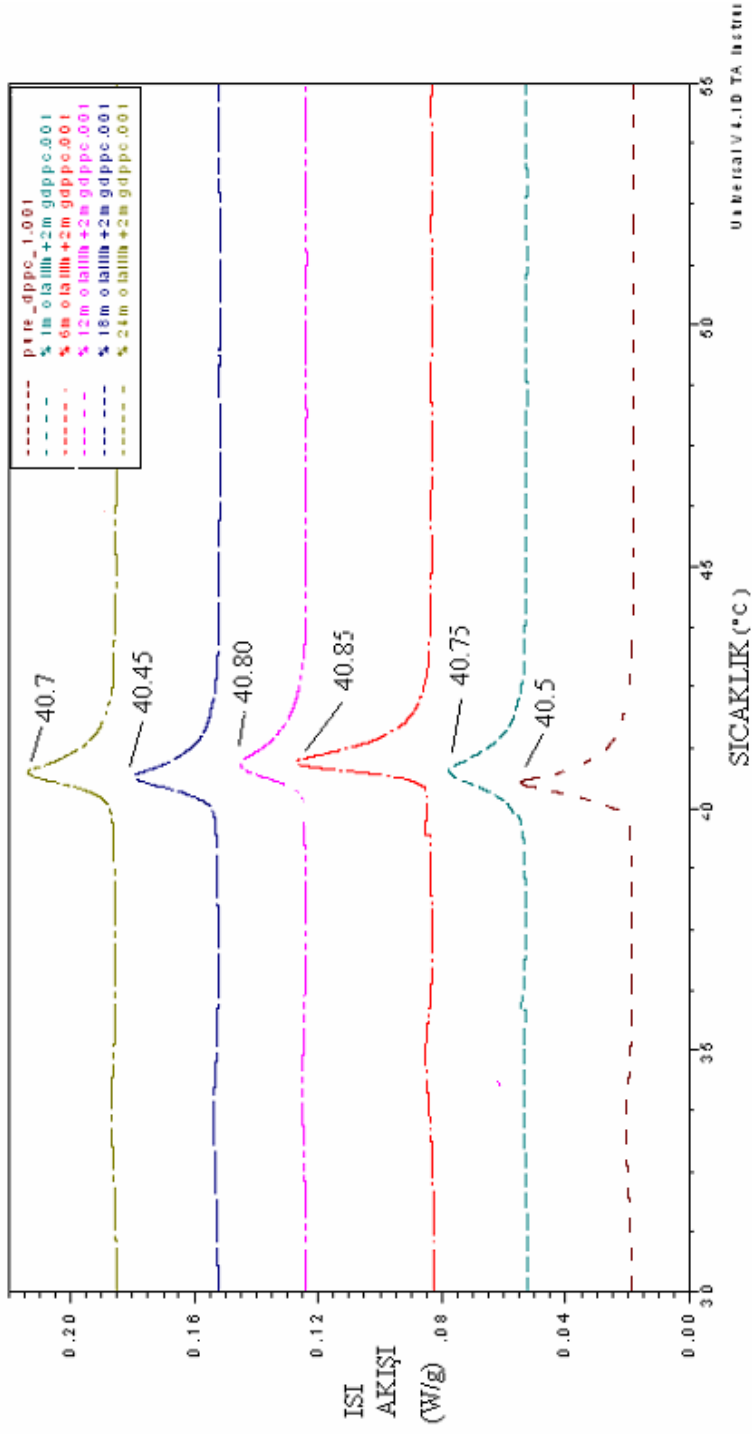


Şekil 3.5 DPPC lipozomu içeren alliin'in farklı konsantrasyonları için PO₂⁻ antisimetric gerilme modu frekansının sıcaklığa bağı değişimi

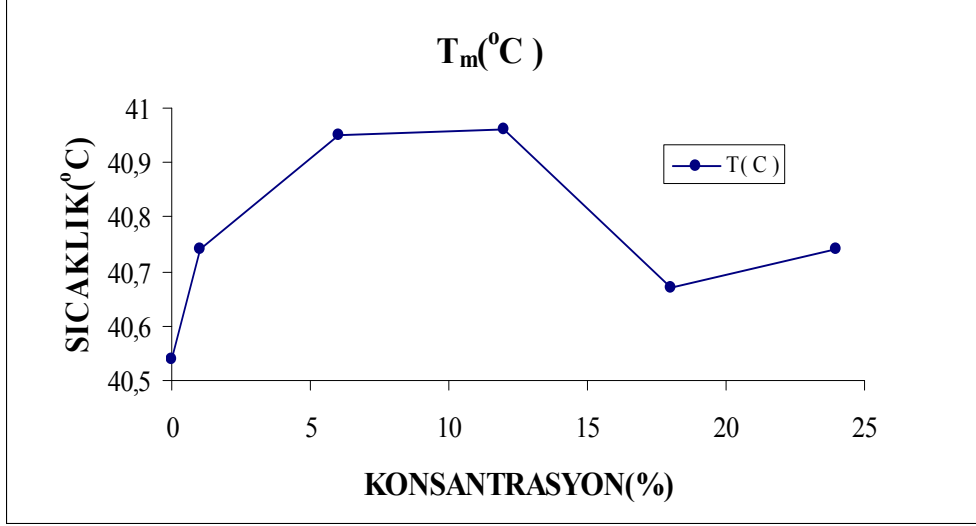
3.2 DSC Çalışmaları

Sıcaklığa bağlı olarak saf DPPC ve farklı alliin konsantrasyonları içeren DSC (440 nm) kalorimetrik eğrileri (Şekil 3.6) görülmektedir. Görüldüğü gibi alliin'in saf DPPC lipozomlarına eklenmesi ile %1, %6, %12 konsantrasyonlarında yüksek sıcaklıklara, %18, %24 konsantrasyonlarında da düşük sıcaklıklara kayma olduğu görülmektedir. Ayrıca bu eğri incelendiğinde ön geçiş eğrisinin kaybolduğu gözlemlenmiştir. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak DSC piklerinde herhangi bir genişleme olmadığından lipid zincirleri arasındaki işbirliğinde azalma veya artma olmadığı ayrıca lipidin membranlarda homojen olarak dağıldığı söylenebilir. Yüksek konsantrasyonlarda, düşük sıcaklıklara doğru kayma görülmesi sistem üzerinde düzensiz bir etki oluşturmaktadır. Bütün konsantrasyonlardaki geçişlerin DPPC lipozomunun faz geçiş sıcaklığı olan 41°C civarında olduğu görülmektedir.

DSC kalorimetrik eğrisinin incelenmesinin yanı sıra bazı termodinamiksel parametreler de incelenmiştir. T_m değerinin sıcaklığa bağlı konsantrasyon grafiği incelendiğinde %18 ve %24 konsantrasyonlarında sıcaklık değerlerinde düşüş gözlemlenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.6 DPPC lipozomu içeren alliin'in farklı konsantrasyonları için DSC kalonimetrik eğrisi



Şekil 3.7 DSC için alliin'in farklı konsantrasyonlarının T_m sıcaklığına bağlı grafiği

4.TARTIŞMA

Bu çalışmada, FTIR ve DSC teknikleri kullanılarak DPPC lipozomu katkı alliin'in saf ve farklı konsantrasyonları için deneysel çalışma yapılmıştır. Kullanılan her iki teknikle de faz geçişleri, sistemin düzeni ve dinamiği hakkında bilgiler elde edilmiştir. İncelenen madde olan alliin'in membranın hidrofobik ve hidrofilik kısım üzerindeki etkisi değişik gerilme bandları incelenerek araştırılmıştır. Hidrofobik kısım üzerindeki etkisi için C-

H gerilme bölgesi, hidrofilik kısım üzerindeki etkisi içinde C=O gerilme bandı ve PO_2^- antisimetrik gerilme bandı incelenmiştir.

Yapılan literatür araştırmasında allium içeren sebzelerin tüketimi ile prostat kanseri görülme oranı arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır. 450 kontrol grubundaki erkek ve 250 prostat kanseri hastası üzerinde yapılan çalışmada günlük 10 gr altında sarımsak tüketildiğinde belirgin bir şekilde prostat kanseri riskinin azaldığı görülmektedir (Hsing et al., 2002). Ayrıca sarımsağın yağları azaltıcı etkisi hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarla belirlenmiş ve yapılan klinik çalışmalarla da hiperkolesterolemi tedavisinde sarımsağın insanlar üzerindeki kolesterol düşürücü etkisi saptanmıştır. Elde edilen veriler sadece sarımsak kullanımının toplam serum kolesterol seviyesini düşürmek için tek başına yeterli olmadığını ortaya koymaktadır (Stevinson et al., 2000).

Sarımsağın yararlı etkileri içerdiği organosulfur bileşiklerinden kaynaklanmaktadır. Antitrombotik, antikanser ve bağışıklık sistemini kuvvetlendirici, oksidatif stres ve kardiyovasküler hastalıklardan korunmada olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (Butt et al., 2009).

Alliicin'in kolayca kan hücreleri içine difüz olabilmesi, yağ bilayerlarından ve membrandan kolayca geçmesine neden olacaktır. Bu etkiler biyolojik sistemlerde alliicin, hücrenin farklı bölümlerinin içerisine çok hızlı bir şekilde geçebilmesi ve biyolojik etkilerini ortaya çıkarabilme açısından büyük önem taşımaktadır. Düzenli sarımsak tüketimine bağlı olarak hücrelerin antioksidan aktivitelerinde artış olduğu görülmüştür (Banerjee et al., 2002). Sarımsağın içinde bulunan ally sülfür bileşikleri, insan

vücudundaki enzim aktivitesinin değişerek hücrelerin anormal şekilde çoğalması sonucu oluşan tümörlerin büyümesini önleyerek yavaşlatan bir etkiye sahiptir (Esaj et al., 2003).

Sarımsakta bulunan diğer etken madde olan alliiicin'in ESR, HPLC yöntemleri ile incelenmesi sonucunda alliiicin'in proteinlerin ve peptidlerin serbest SH grupları ile etkileşmekte olduklarını ortaya koymaktadır. Sarımsağın bu kuvvetli antioksidan, antimikrobiyal, antikanser ve antitrombotik etkileri SH gruplarının varlığından kaynaklanmaktadır (Miron et al., 2004)

FTIR spektrumunda pik yüksekliği ve band genişliğindeki değişimler ani bir artış ve ani bir azalış olarak karakterize edilebilirler ve bu değişim genellikle kullanılan lipozomların faz geçiş sıcaklıklarına karşılık gelmektedir. Böylece FTIR tekniği ile faz geçişleri monitör edilmektedir. Hidrokarbon zincirlerinin erimesi faz geçişi olarak ifade edilebilir. Bu durum da asil zincirlerde yapısal bir düzensizlik başlamasına neden olmaktadır ve band genişliğinde meydana gelen değişimler zincirlerin hareket hızlarındaki değişimlere bağlıdır (Asher ve Lewin, 1997; Casal, 1980).

DPPC lipozomu katkılı alliiin'in saf ve değişik konsantrasyonları için FTIR tekniğinin kullanılması sonucunda %24 mol konsantrasyonu hariç diğer tüm konsantrasyonların frekans değerlerinde artış gözlemlenmiştir. Grafikler incelendiğinde 41°C civarında ana faz geçiş sıcaklığı görülmektedir. Bu geçişin DPPC lipozomunun faz geçiş sıcaklığı ile uyumlu olduğu görülür.

CH₂ antisimetrik gerilme bandında görüldüğü gibi jel fazda alliin'in DPPC lipozomlarına eklenmesi ile frekans değerlerinde artış gözlemlenmiştir (%24 mol hariç). DPPC lipozomuna değişik konsantrasyonda eklenen 17/3-oestradiol (E2) maddesi ile yapılan FTIR sonuçları incelendiğinde frekans değerlerinde artış gözlemlenmiştir. Bu artış gauche konformelerinin sayısının artmasına dolayısı ile sistemin düzeninde azalmaya neden olmaktadır (Boyar ve Severcan, 1996). Bu bahsedilen çalışmadan faydalanarak sistemin düzensizliğinde artış meydana geldiği ve gauche konformerlerinin sayısının arttığı söylenebilir.

Ayrıca artan konsantrasyonlara bağlı olarak faz geçiş eğrisinde büyük bir oranda genişleme görülmemesi alliin'in membranın hidrofobik iç kısmına girmediği ve bu nedenle fosfolipid zincirler arasındaki Van der Waals etkileşmesini yok etmediğini göstermektedir. Bu durum etkisi ile de lipidlerin aynı sıcaklıkta eridiği ve faz geçişinin hep birlikte meydana gelerek işbirlikçi bir geçiş meydana getirdikleri söylenebilir. Grafikler incelendiğinde CH₂ antisimetrik gerilme bandlarında meydana gelen değişimler CH₂ simetrik gerilme bandında da görüldüğünden aynı yorumlar bu band için de geçerlidir. Yüksek konsantrasyon (%24 mol) için frekans değerlerindeki bu azalma konformasyonel düzeni yansıtmaktadır ve asil zincirlerdeki trans konformerlerinin artışı anlamına gelmektedir.

Alliin'in band genişliği değerleri incelendiğinde jel ve sıvı kristal fazda, %18 mol değerine kadar bir artış, %24 mol değerinde ise saf DPPC değerinin altında kalarak bir azalma gözlemlenmiştir. Band genişliğindeki bu artış lipid zincirlerinin hareket özgürlüklerinin artmasına karşılık gelmektedir.

Hareket özgürlüklerindeki bu artış da membranın akışkanlığının artmasına neden olmaktadır (Kazancı et al., 2001).

CH₃ asimetrik gerilme modları frekansının sıcaklığa bağlı değişiminin incelenmesi, asil zincirin fleksibilitesi dolayısı ile hareket serbestliğindeki değişimi ifade etmektedir. Şekil 3.3 incelendiğinde hem jel hem de sıvı kristal fazda bütün konsantrasyonların saf DPPC lipozomunun altında kaldığı görülmektedir. Literatürde D₂ ve Ca²⁺ un DPPC lipozomu ile yapılan FTIR çalışmasında, CH₃ asimetrik gerilme modları incelendiğinde frekans değerlerindeki azalmanın sistemin düzenindeki artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Toyran ve Severcan, 2003). Benzer şekilde CH₃ asimetrik gerilme bölgesinde aliin'in çift tabakanın iç bölgesindeki dinamiği azalttığını ve bu durumunda sistemin düzeninde artışa neden olduğu sonucuna varılabilir.

C=O gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi incelendiğinde bütün konsantrasyonların saf DPPC lipozomunun altında kaldığı görülmektedir. Böylece aliin'in frekans değerlerinde azalmaya neden olduğu söylenebilir.

PO₂⁻ gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi hidrasyon durumu hakkında bilgi vermektedir. DPPC katkılı aliin'in farklı konsantrasyonları jel ve sıvı fazda incelendiğinde frekans değerlerinde azalma görülmüştür. Literatürde DPPC lipozomuna değişik konsantrasyonlarda progesteron eklenmesi ile yapılan FTIR çalışmasında PO₂⁻ gerilme modu incelendiğinde DPPC lipozomunun altında kalan konsantrasyonlarda progesteronun hidrojen bağlanmasını arttırdığı gözlemlenmiştir (Korkmaz ve

Severcan, 2005). Buna benzer olarak alliin'in C=O ve PO₂⁻ gerilmeleri ile kuvvetli hidrojen bağlanması oluşturduğu söylenebilir. Fosfat grubunun hidrasyonundaki azalma frekans değerlerinde azalmaya neden olacaktır. Alliin'in polar ve polar kısma yakın bölgede konumlandığını, C₂-C₈ bölgesine girmediği söylenebilir.

Alliin'in yüksek konsantrasyonlarda düzen azaltıcı etkisi, DPPC asil zincirleri ve alliin arasındaki zayıf hidrofobik etkileşim ve alliin'in neden olduğu zayıf hidrojen bağlanması nedeni ile olabilir. Bu etki lipid çift tabakanın düzenindeki azalma ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca CH bölgesindeki bandlar incelendiğinde her bir konsantrasyon için bandlarda iyi bir ayrılma gözlemlendiğinden curve fit ile ayırmaya gerek duyulmamıştır.

DPPC katkılı alliin'in DSC kalorimetrik eğrisi incelendiğinde düşük konsantrasyonlarda (%1, %6, %12 mol) yüksek sıcaklıklara, yüksek konsantrasyonlarda da (%18, %24 mol) düşük sıcaklıklara kayma olduğu gözlemlenmiştir. Tüm konsantrasyonlar için geçişler DPPC lipozomunun faz geçiş sıcaklığı olan 41°C civarında gerçekleşmiştir. T_m değerinin sıcaklığa bağlı konsantrasyon grafiği incelendiğinde %18 ve %24 konsantrasyonlarında sıcaklık değerlerinde düşüş gözlemlenmiştir. Literatürde Vitamin D₂ ve Vitamin E ile yapılan DSC çalışmalarında, çeşitli konsantrasyonlardaki piklerde yarılmalar gözlemlenmiştir. Bu durum lipidin membranlarda homojen olarak dağılmamasından kaynaklanmaktadır. Faz geçiş sıcaklığındaki düşük değerlere kayma eğilimi sistemin düzensizliğine karşılık gelmektedir (Korkmaz ve Severcan, 2005). Bu DSC çalışmamızda piklerde genişleme veya yarılmalar gözlemlenmediğinden alliin'in lipid membranlarda homojen olarak dağıldığını, alliinince fakir ve zengin bölgelere ayrılma

gerçekleşmediği ve yüksek konsantrasyonların sistem üzerinde düzensiz etkisi olduğu söylenebilir.

FTIR sonuçlarının DSC sonuçları ile uyumlu olduğu açıkça görülmektedir. Bu çalışmalar sayesinde alliin'in membrandaki etkileri moleküler düzeyde saptanarak, membrandaki konumu tayin edilmiştir.

Alliin'in nötr membranlarla etkileşmesini araştırmakla, incelenen sistemin gerçek membranlara benzemesi nedeni ile hem gerçek sistemlerdeki etkileşmeleri anlamamız açısından değerli bilgiler elde edilmiştir hem de alliin'in etki mekanizması daha iyi anlaşılmıştır. Bu yapılan çalışmanın, alliin'in hastalıkların tedavisindeki rolünü anlamak için yapılacak olan diğer çalışmalara kaynak olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abbaschian, R., 1992, Physical Metallurgy Principles, PWS-Kent Publishing Comp., Boston, p.p 300-307

Açıkgöz, M., 2004, Temperature dependence of the spectroscopic and structural properties of TlGaS₂ and TlInS₂ crystals, p.p 28-32

Akinoglu, B., Gheith, M., Severcan, F., 2001, Thermodynamics study of gramicidin S and dipalmitoylphosphatidylcholine model membrane interactions based on the FTIR spectroscopy, Journal of Molecular Structure 565-566, p.p 281-285

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., 1994, Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, N.Y., Third Edition, Figure 10-7.

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

Agarwal, K.C., 1996, Therapeutic actions of garlic constituents, Med. Res. Rev. 16 ,p.p 111-124

Ankri, S., Miron, T., Rabinkov, A., Wilchek, M., Mirelman, D., 1997, Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 p.p 2286-2288.

Arrondo, J.L.R., Goni, F.M. and Macarulla, J.M., 1984, Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension a study of the phosphate group vibrations, *BBA*, 794, 165-168.

Atmaca, G., 2003, Sarımsağın ve tiol içeren bazı bileşiklerin antioksidatif etkileri, *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20(1-3) p.p 54-60

Banerjee, SK., Dinda, AK., Manchanda SC., Maulik, SA., 2002, Chronic garlic administration protects rat heart against oxidative stress induced by ischemic reperfusion injury, *BMC Pharmacol* 2, p.p 16-25

Boyar, H., Severcan, F., 1996, Oestrogen-phospholipid membrane interactions: an FTIR study, *Journal of Molecular Structure* 408/409, p.p 269-272

Butt, MS., Sultan, MT., Butt, MS., Iqbal, J., 2009, Garlic: Nature's protection against physiological threats, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49, p.p 538-551

Campbell, ID., Dwek RA., 1984, *Biological Spectroscopy (Biophysical Techniques Series)*, 1th edition

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

Çakmak, G., Togan I., Uguz C., Severcan F., 2003, *Applied spectroscopy*, 57 (7) ,p.p 835-841

Chu, T.C., Ogidigben, M., Han, J.C., Potter, D.C., 1993, Allicin-induced hypotension in rabbit eyes, *J. Ocul. Pharmacol.* 9, p.p 201-209

Erdal M.S., Dr. Ecz., *Deri ve Stratum corneum' un incelenmesinde kullanılan biyofiziksel yöntemler*, İ.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Esaj, S., Woong L.C., Esaj A., 2003, Extract of garlic (*allium sativum*) in cancer chemoprevention *Experimental Oncology* 25, pp 93-97

Flach , C.R., Branuer, J.W., Mendelson, R., 1993, Calciumion interactions with insoluble phospholipid monolayer films at theA/W interface:externalreflection-absorbtion infrared studies, *Biophys. J.*, 65(5), 1994-2001

Garrett, R., Grisham, C., 2006, *Biochemistry* 3th ed.

Guyton, A.C., Hall, E.J., 2006, *Textbook of medical physiology* 11th ed.

Hsing, A.W., Chokkalingam, A.P., Gao Y.T., Madigan, M.P., Deng, J., Gridley, G., Fraumeni, J.F., 2002, Allium vegetables and risk of prostate cancer, A population-based study. *J Natl Cancer Inst.* 94, p.p 1648-1651

Hughes, J., Tregova, A., Tomsett, A.B., Jones, M.G., Cosstick, R., Collin, H.A., 2005, Synthesis of the flavour precursor, alliin, in garlic tissue cultures *Phytochemistry* 66, p.p 187–194

Iciek, M., Kwiecien, I., Wlodek, L., 2009, Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50, p.p 247-265

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

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

Katanalp F., 2006, Antitiroid bir ilaç olan metimazol'ün farmasötik preparatlarda ve plazmada miktar analizi, p.p 13-14

Keusgen, M., Jünger, M., Krest, I., Schöning M.J., 2003, Biosensoric detection of the cysteine sulphoxide alliin *Sensors and Actuators B* 95, p.p 297–302

KAYNAKLAR (devam)

Key, TJA., Silcocks, PB., Davey, GK., Appleby, PN., Bishop DTA, 1997, Case-control study of diet and prostate cancer, *Br J Cancer* 76, p.p 678-687

Korkmaz, F., Severcan, F., 2005, Effect of progesterone on DPPC membrane: Evidence for lateral phase separation and inverse action in lipid Dynamics, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 440, p.p 141-147

Lawson, L.D., 1998, Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds, in: L.D. Lawson, R. Bauer (Eds.), *Phytomedicines of Europe: their Chemistry and Biological Activity*, American Chemical Society, Washington, DC, pp176–209

Lindon, J.C., Tranter, G.E., Holmes, J.E., 2000, *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*, p.p 400

Miron, T., Rabinkov, A., Mirelman, D., Weiner, L., Wilchek, M., 1998, A spectrophotometric assay for allicin and alliinase(alliin lyase) activity reaction of 2-nitro-5-thiobenzoate with thiosulfinates, *Anal. Biochem.* 265 , p.p 317-325

Miron, T., Shin, I., Feigenblat, G., Weiner, L., Mirelman, D ., Wilchek, M. and Rabinkov, A., 2002, A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase(alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates *Analytical Biochemistry* 307 p.p 76–83

KAYNAKLAR (devam)

Miron, T., Rabinkov, A., Mirelman, D., Wilchek, M., Weiner L.; 2000, The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity *Biochimica et Biophysica Acta* 1463 p.p 20-30

Okumuş, M.; 2006, Al-Ni-Si alaşımlarının hızlı katılaştırma ile üretilmesi ve özelliklerinin incelenmesi, p.p 25,26

O'Neill, M., Smith, A.S., Heckelman, P.H., Kinneary, J.K.; 1996, Merck Index, Twelfth Edition, p.p 49

Passwater A.R.; 2002 The chemistry of garlic health benefists.

Pehlivan F.; 2004 Biyofizik 2.Baskı, p.p 25,46

Phillips, CL., Parr, JM.; 1999, Signals, systems, and transforms of Discrete Time Signals. 2nded. New Jersey: Prendice Hall; p.p 524-600.

Rabinkov, A., Miron, T., Konstantinovski, L., Wilchek, M., Mirelman,D., Weiner, L.; 1998, The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins *Biochimica et Biophysica Acta* 1379, p.p 233–244

KAYNAKLAR (devam)

Reading, M., Elliott, D., Hill VH., 1993, A new approach to the calorimetric investigation of physical chemical transitions, Journal of thermal analysis vol. 40, p.p 949-955.

Shukla, Y., Karla, N., 2007, Cancercheoprevention with garlic and its constituents, Cancer Letters 247, p.p 167-181

Stevinson, C., Pittler, MH., Ernst, E., 2000, Garlic for treating hypercholesterolemia, Ann Intern Med.133, p.p 420-429

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

Sungur, C., Gökgündüz H., 2009, Definitonof a vehicle,tracking and positiondetermination by the use of rf signals

Tarjan, I., Ronto, G., 1999, An introduction to biophysics, 3th edition

Toyran N, Lasch P, Naumann D, Turan B, Severcan F., 2006, Early alterations in myocardiaand vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study. Biochem J; 397:427-36.

Toyran N., 2008, Turkiye Klinikleri J Med Sci;28:704-714

KAYNAKLAR (devam)

Toyran, N., Zorlu F., Dönmez G., Oge K., Severcan F, 2004, European Biophysics Journal with Biophysics Letters 33 (6), p.p 549-554

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

Weber, N.D., Andersen, D.O., North, J.A., Murray, B.D., Lawson, L.D., Hughes, B.G., 1992, In vitro virucidal effects of Allium sativum(garlic) extract and compounds, Planta Med. 58, p.p 417-423

Wolfe S.L.,1993, Molecular and Cellular Biology, Wadsworth Publishing Company, p.p 155

Yanmaz, R., 2002, The wonders of garlic. This miracle food protects you against heart disease, cancer and infections Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü-ANKARA

Yıldız, A.Ö., 2006, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, ANKARA, Tüberküloz ve Toraks Dergisi; 54: Ek 1: 3-14

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Tekirdağ'da doğdu. İlkokulu Tekirdağ Atatürk İlkokulunda, ortaokulu Tekirdağ Tuğlacılar Lisesinde okudu. 1996–2000 yılları arasında, yabancı dil ağırlıklı Tekirdağ Tuğlacılar Süper Lise'sinde ortaöğretimini tamamladıktan sonra, 2001 yılında Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik bölümünü kazandı. 2001–2002 eğitim-öğretim yılında İngilizce hazırlık eğitimi aldı. 2005–2006 eğitim-öğretim yılı bahar döneminde Fizik bölümünü bitirdi ve aynı yıl Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Fizik Bilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

