



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ANTİTÜMÖR ve ANTİOKSİDANT ÖZELLİKLİ TRIPEPTİD
YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

Yağmur KÖKCÜ

Fizik Anabilim Dalı

Atom ve Molekül Fiziği Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serda KECEL GÜNDÜZ**

**II. DANIŞMAN
Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ**

Ocak, 2019

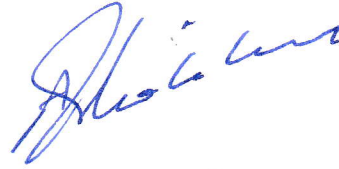
İSTANBUL

Bu çalışma, 25.01.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Fizik Anabilim Dalı, Atom ve Molekül Fiziğı Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Doç. Dr. Serda KECEL GÜNDÜZ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ayşen E. ÖZEL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Sevim AKYÜZ
Kültür Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2017-25634 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması süresi ve eğitimim boyunca ilgi ve teşvikleri ile beni hep destekleyen, motive eden danışmanlarım, İstanbul Üniversitesi, Fizik Bölümü hocalarından Doç. Dr. Serda KECEL GÜNDÜZ ve Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü hocalarından Araş. Gör. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ'a çok teşekkür etmek istiyorum. Ayrıca yüksek lisans hayatım boyunca bilgi ve tecrübeleri ile eğitimime ve öğretimime katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, Atom ve Molekül Fiziği Anabilim Dalı'nın değerli hocalarına da çok teşekkür ediyorum.

İyi, kötü her günümde beni hiç yalnız bırakmayan dostlarım, doktora öğrencileri Araş. Gör. Bilge BIÇAK, Uzman Deniz BOZOĞLU ve mesafelerin önemsiz olduğunu her seferinde hissettiren değerli dostum Merve DOĞAN'a, benim için yaptıkları ve bana kattıkları her şey için çok teşekkürler.

En önemlisi ise aileme; özellikle yüksek lisansa başlamam için beni ikna eden annem'e, bu süreçte desteğini benden esirgemediği, hep yanımda olduğu için minnetarım. Kızın olmaktan gurur duyuyorum anne.

Ocak 2019

Yağmur KÖKCÜ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	9
3.1. SPEKTROSKOPİ	9
3.1.1. Elektromanyetik Dalga	9
3.2. MOLEKÜLER SPEKTROSKOPİ.....	10
3.3. KIRMIZI-ALTI (IR) SPEKTROSKOPİSİ	11
3.3.1. Kırmızı-Altı Spektrum.....	11
3.3.2. Klasik Görüş Altında Kırmızı-Altı Spektrumu	13
3.3.3. Kuantum Mekaniksel Görüş Altında Kırmızı-Altı Spektrumu	14
3.4. RAMAN SPEKTROSKOPİSİ.....	16
3.4.1. Klasik Görüş Altında Raman Spektrumu	16
3.4.2. Kuantum Mekaniksel Görüş Altında Raman Spektrumu	19
3.5. UV-VIS SPEKTROSKOPİSİ	20
3.6. IR SPEKTROMETRELERİ	21
3.6.1. FT-IR (Fourier-Dönüşüm Infrared) Spektrometresi.....	24
3.6.1.1. ATR – FT-IR Tekniği	26
3.7. RAMAN SPEKTROMETRESİ.....	27
3.8. İKİ ATOMLU MOLEKÜLLERİN TİTREŞİM ENERJİ SEVİYELERİ.....	29
3.8.1. Harmonik Titreşici Yaklaşımı	30
3.8.2. Anharmonik Titreşici Yaklaşımı	33
3.9. BORN-OPPENHEIMER YAKLAŞIKLIĞI.....	35
3.10. MOLEKÜLER ENERJİNİN HESAPLANMASI.....	38

3.10.1. Moleküler Mekanik Yöntemler	38
3.10.2. Moleküler Dinamik Yöntemler	38
3.10.2.1. <i>Gromacs Programı</i>	44
3.10.3. Kuantum Mekaniksel Yöntemler.....	44
3.10.3.1. <i>Ab-Initio</i>	45
3.10.3.2. <i>DFT</i>	45
3.10.3.3. <i>Gaussian Programı</i>	47
3.10.4. Yarı Deneysel Yöntemler	47
3.11. AMİNO ASİTLER.....	48
3.11.1. Amino Asitler İle İlgili Genel Bilgiler	48
3.11.2. Amino Asitlerin Yapısı.....	48
3.11.3. Amino Asitlerin Adlandırılması	49
3.11.4. Amino Asitlerin Sınıflandırılması	49
3.11.5. Peptit Bağlarının Oluşumu	51
3.12. GLY-HİS-LYS TRİPEPTİDİ	53
3.12.1. GHK Tripeptidini Oluşturan Amino Asitler.....	53
3.12.2. GHK Tripeptidinin Özellikleri	53
3.13. MOLEKÜLER MEKANİK YÖNTEMLERLE PEPTİTLERİN İNCELENMESİ	55
3.13.1. Teorik Konformasyon Analizi.....	55
3.13.1.1. <i>Konformasyon Analizinde Kullanılan Notasyonlar</i>	55
3.13.2. Moleküllerin Toplam Enerjilerinin Hesaplanması	57
3.13.2.1. <i>Hidrojen Bağı Enerjisi</i>	58
3.13.2.2. <i>Torsiyon Enerjisi</i>	59
3.13.2.3. <i>Elektrostatik Etkileşme Enerjisi</i>	60
3.13.2.4. <i>Van der Waals Etkileşme Enerjisi</i>	60
3.14. MOLEKÜLER KENETLENME YÖNTEMİ (DOKİNG)	62
3.15. NANOTEKNOLOJİ VE NANOPARTİKÜLLER	64
3.15.1. Polimerik Nanopartiküllerin Sağladığı Avantajlar	65
3.15.2. Uygulama Alanları	66
3.15.3. Hazırlama Yöntemleri	66
3.15.3.1. <i>Emülsifikasyon/Çözücü Buharlaştırma Metodu</i>	67
3.15.3.2. <i>Emülsifikasyon/Çözücü Difüzyon Metodu</i>	67
3.15.3.3. <i>Tuzla Çöktürme/Emülsifikasyon Difüzyon Metodu</i>	68
3.15.3.4. <i>Nano-çöktürme (Çözücü Yer Değiştirme)</i>	68

3.15.4. Kullanılan Polimerler	68
3.16. PLGA KAPLI GHK NANOPARTİKÜLLERİNİN SENTEZİ	69
3.16.1. PLGA - poli(laktik-ko glikolik asit)	69
3.16.2. Nanopartikül Sentezlenmesi	70
3.16.2.1. Boş Nanopartikül Sentezi	70
3.16.2.2. Dolu Nanopartikül Sentezi	70
3.17. DENEYDE KULLANILAN MALZEMELER	71
3.17.1. Kullanılan Kimyasallar	71
3.17.2. Kullanılan Yardımcı Gereçler ve Cihazlar	71
3.18. DENEYDE KULLANILAN ANALİZ YÖNTEMLERİ	72
3.18.1. Zeta Potansiyeli ve Boyut Analizi	72
3.18.2. Transmilyon Elektron Mikroskopu (TEM)	74
3.19. L929 HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN YAPILMASI	75
3.19.1. GHK ve GHK Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin XTT Testi ile Hücre Canlılığına Etkisinin İncelenmesi	75
4. BULGULAR	76
4.1. GLY-HIS-LYS TRİPEPTİDİNİN MODELLENMESİ	76
4.1.1. GHK Tripeptidinin Teorik Konformasyon Analizi	76
4.1.2. Teorik Titreşim Dalgasayısı Hesabı Analizi	79
4.1.2.1. HOMO-LUMO Analizi	80
4.1.2.2. MEP Analizi	84
4.1.2.3. NBO Analizi	86
4.1.2.4. Hiperpolarizibilite Analizi	87
4.1.2.5. UV Analizi	89
4.1.3. Moleküler Dinamik Simülasyon Analizi	92
4.1.4. Moleküler Kenetlenme (Docking) Analizi	96
4.2. PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN KARAKTERİZASYONU	103
4.2.1. Boyut ve Potansiyel Analizi (Zeta Potansiyeli)	103
4.2.2. Yükleme Verimi ve Enkapsülasyon Sonuçları	104
4.2.3. In vitro Salım Testi Sonuçları	105
4.2.4. TEM Analizi	106
4.2.5. In vitro Hücre Kültürü Sonuçları	107
4.2.6. FT-IR ve RAMAN Analizi	108
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	120
KAYNAKLAR	134

EKLER	147
ÖZGEÇMİŞ	168



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1: Elektromanyetik Spektrum.	9
Şekil 3.2: Elektromanyetik spektrum ve kırmızı-altı bölgenin alt bölgeleri [19].	11
Şekil 3.3: Örnek üzerine gelen ışının, örnek tarafından soğurulması sonucu, şiddetinde meydana gelen azalma.....	12
Şekil 3.4: Farklı iki atoma sahip bir molekülün dipol momentinde meydana gelen değişim.	14
Şekil 3.5: Rayleigh, Stokes ve Anti-Stokes saçılması.	20
Şekil 3.6: UV-Vis Spektrometre.	21
Şekil 3.7: IR(Kırmızı-Altı) spektrometrenin blog diyagramı.	22
Şekil 3.8: FT-IR spektrometrelerinin blog diyagramı [16].	26
Şekil 3.9: ATR – FT-IR tekniği. Örnek ve örnek üzerine gelen ışının yönelimi.	27
Şekil 3.10: Dispersif Raman Spektrometresi blog diyagramı.	28
Şekil 3.11: NRS 3100 Dispersif Mikro Raman spektrometresi (solda) ve Jasco 6300 FT-IR Spektrometresi (sağda).	29
Şekil 3.12: Harmonik yaklaşım altında potansiyel enerji eğrisi.	32
Şekil 3.13: Harmonik olmayan yaklaşım altında potansiyel enerji eğrisi.	34
Şekil 3.14: MD yöntem ile hesaplama şeması.	39
Şekil 3.15: Bağ gerilmesi, açılı bükülmesi ve torsiyon (burulma).	42
Şekil 3.16: Bir amino asitin temel yapısı.	49
Şekil 3.17: Peptit bağı [67].	52
Şekil 3.18: Dihedral gösterimleri.	56
Şekil 3.19: Ramaşandran haritalarına göre ana zincir bölgeleri.	56
Şekil 3.20: Lennard-Jones potansiyel eğrisi.	61
Şekil 3.21: Ligand – Protein doking.	62

Şekil 3.22: Moleküler doking aşamaları [96].....	63
Şekil 3.23: Nanoküre ve nanokapsül gösterimi [109].....	65
Şekil 3.24: PLGA polimerinin yapısı.....	70
Şekil 3.25: Zeta Potansiyeli.	74
Şekil 4.1: GHK tripeptidi, yapısı, atom sayıları ve dihedraller.....	76
Şekil 4.2: (Solda) Nötral GHK tripeptidinin teorik konformasyon analizi yöntemi ile elde edilen en düşük enerjiye sahip (5.26 kcal/mol) konformasyonunun Gaussian09 programına tanıtılan geometrisi, (sağda) DFT-B3LYP/6-311++G(d,p) baz seti ile hesaplanması sonucu elde edilen geometrisi.....	79
Şekil 4.3: GHK tripeptidinin iç hidrojen bağları.....	80
Şekil 4.4: GHK tripeptidinin metanol, su ve gaz ortamındaki HOMO-LUMO bölgeleri.....	83
Şekil 4.5: GHK tripeptidinin gaz metanol ve su ortamında moleküler elektrostatik potansiyel haritası.....	85
Şekil 4.6: GHK tripeptidinin su ve metanolde UV-Vis spektrometresinde ölçülen deneysel absorbans değerleri.....	90
Şekil 4.7: GHK tripeptidinin gaz, su ve metanol ortamında hesaplanan teorik absorbans değerleri.....	91
Şekil 4.8: Su ile doldurulmuş kübik hücre içerisinde 3 Cl ⁻ ve 2 Na ⁺ iyonu ile birlikte GHK tripeptidi.....	93
Şekil 4.9: Metanol ile doldurulmuş kübik hücre içerisinde 3 Cl ⁻ ve 2 Na ⁺ iyonu ile birlikte GHK tripeptidi.	93
Şekil 4.10: Su dolu sistemin enerji minimizasyon grafiği (a), metanol dolu sistemin enerji minimizasyon grafiği (b).	94
Şekil 4.11: Su dolu sistemin sıcaklık denge grafiği (a), metanol dolu sistemin sıcaklık denge grafiği (b).	94
Şekil 4.12: Su dolu sistemin basınç denge grafiği (a), metanol dolu sistemin basınç denge grafiği (b).	95
Şekil 4.13: Su bulunan sistemin 10 ns boyunca değişimi gözlenen RMSD ve gyration grafikleri.	95
Şekil 4.14: Metanol bulunan sistemin 10 ns boyunca değişimi gözlenen RMSD ve gyration grafikleri.....	96
Şekil 4.15: GHK tripeptidi ve 5EG3 proteini.	98

Şekil 4.16: Ligand enerjisine karşılık gelen doking (kenetlenme) skor değerleri.....	98
Şekil 4.17: GHK tripeptidinin proteinin aktif bölgesine bağlanması sonucunda meydana gelen en kararlı bağlanma şeklinin etkileşimleri.....	100
Şekil 4.18: 5EG3 proteininin elektrostatik potansiyel haritası.	101
Şekil 4.19: GHK tripeptidinin ve 5EG3 proteinin elektrostatik potansiyel haritası.	101
Şekil 4.20: GHK tripeptidi ile ASP200, ASN187 ve LYS73 arasındaki hidrojen bağı gösterimi.	102
Şekil 4.21: GHK tripeptidi ile (solda) ALA123 ve (sağda) LEU43 arasındaki hidrojen bağı etkileşimleri.	102
Şekil 4.22: GHK tripeptidinin Nanodrop cihazında elde edilen karakteristik eğrisi.	104
Şekil 4.23: GHK tripeptidi yüklü PLGA nanopartiküllerinin salım grafiği.....	105
Şekil 4.24: Boş PLGA nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri.	106
Şekil 4.25: 5mg GHK yüklü PLGA nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri.	106
Şekil 4.26: GHK, PLGA nanopartikülleri ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının L929 hücre canlılığı üzerine etkisi.	107
Şekil 4.27: GHK tripeptidi, boş ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerine ait karşılaştırmalı FT-IR spektrumu.	110
Şekil 4.28: GHK tripeptidi, boş ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerine ait karşılaştırmalı ATR spektrumu.....	111
Şekil 4.29: ATR spektrumundan elde edilmiş, GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait 1423 cm^{-1} bandının altında gözlenen bantlar ve GHK'ya ait 1435 cm^{-1} bandı (1426 cm^{-1} 'de elde edilen pik, PLGA polimerine aittir.).	112
Şekil 4.30: ATR spektrumundan elde edilmiş, GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait 1270 cm^{-1} bandının altında gözlenen bantlar ve GHK'ya ait 1305 cm^{-1} ve 1268 cm^{-1} bandı (1276 cm^{-1} 'de elde edilen pik, PLGA polimerine aittir.).	112
Şekil 4.31: ATR spektrumundan elde edilmiş, GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait 956 cm^{-1} bandının altında gözlenen bantlar ve GHK'ya ait 947 cm^{-1} bandı (956 cm^{-1} 'de elde edilen pik, PLGA polimerine aittir.).	113
Şekil 4.32: ATR spektrumundan elde edilmiş, GHK'ya ait $1686\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$ bant aralığı altında kalan bantlar ve 1645 cm^{-1} de gözlenen amid I bandı (a), GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait $1670\text{-}1618\text{ cm}^{-1}$ bant aralığı altında kalan bantlar ve GHK'ya ait 1642 cm^{-1} bandı (b).....	114
Şekil 4.33: ATR spektrumundan elde edilmiş, GHK'ya ait $1611\text{-}1526\text{ cm}^{-1}$ bant aralığı altında kalan bantlar ve 1584 cm^{-1} de gözlenen amid II bandı (a), GHK yüklü	

PLGA nanopartikülüne ait 1593-1558 cm^{-1} bandının altında gözlenen bantlar ve GHK'ya ait 1585 cm^{-1} bandı (b).....	115
Şekil 4.34: ATR spektrumundan elde edilmiş, GHK'ya ait 1257-1209 cm^{-1} bant aralığı altında kalan bantlar ve 1241 cm^{-1} de gözlenen amid III bandı (a), GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait 1320-1145 cm^{-1} bant aralığı altında kalan bantlar ve GHK'ya ait 1231 cm^{-1} bandı (b).....	116
Şekil 4.35: GHK tripeptidine ait yeşil lazer ile çekilen Raman spektrumları.	117
Şekil 4.36: GHK tripeptidine ait kırmızı lazer ile çekilen Raman spektrumları.	118



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Moleküler Dinamik (MD) simülasyonda kullanılan topluluklardan birkaçı.....	40
Tablo 3.2: DFT’de kullanılan yöntemlerden birkaçı.	47
Tablo 3.3: 20 temel amino asit isimleri, kısaltmaları ve tek harf sembolleri.	48
Tablo 3.4: Amino asitlerin beslenme özelliklerine ve yan zincir yapısına göre sınıflandırılması [64].	51
Tablo 3.5: Hidrojen bağı uzunluklarına göre bağ enerjileri.	59
Tablo 3.6: Nanopartikül sentezinde kullanılan sentetik ve doğal polimerler [129].	69
Tablo 4.1: Glisin amino asitinin konformasyon bölgeleri.	77
Tablo 4.2: Histidin amino asitinin konformasyon bölgeleri.	77
Tablo 4.3: Lizin amino asitinin konformasyon bölgeleri.	77
Tablo 4.4: Nötral GHK tripeptidinin konformasyon bölgelerine karşılık gelen konformasyon sayıları ve minimum enerjinin (global enerji) bulunduğu konformasyon bölgesi.	77
Tablo 4.5: Nötral GHK tripeptidinin 5.26 kcal/mol minimum enerjili konformasyonunun dönü açıları.	78
Tablo 4.6: Nötral GHK tripeptidinin 5.26 kcal/mol minimum enerjili konformasyonuna etki eden diğer etkileşimler.	79
Tablo 4.7: Nötral GHK tripeptidinin 5.26 kcal/mol minimum enerjili konformasyonundaki hidrojen bağları ve enerjileri.	79
Tablo 4.8: 6-311++G(d,p) baz setinde hesaplana GHK tripeptidinin a.u. ve kcal/mol cinsinden enerji değerleri.	79
Tablo 4.9: GHK tripeptidinin molekül içi hidrojen bağları ve uzunlukları.	80
Tablo 4.10: TD-DFT/6-311++G(d,p) baz seti kullanılarak GHK tripeptidinin gaz, su ve metanol ortamında hesaplanan HOMO-LUMO değerleri (eV cinsinden).	81
Tablo 4.11: GHK tripeptidinin TD-DFT/6-311++G(d,p) baz seti ile hesaplanmış HOMO-LUMO değerleri ve kimyasal özellikleri.	82

Tablo 4.12: GHK tripeptidinin hesaplanan dipol moment, polarizibilite ve hiperpolarizibilite değerleri.	89
Tablo 4.13: GHK tripeptidinin elde edilen deneysel maksimum absorbans değerleri.	90
Tablo 4.14: GHK tripeptidinin TD-DFT/6-311++G(d,p) baz seti ile elde edilen teorik absorbans değerleri.	91
Tablo 4.15: GHK tripeptidinin 24 farklı konformeri ve 5EG3 proteini ile yapılan doking (kenetlenme) hesaplamaları sonucunda elde edilen doking skor değerleri.	99
Tablo 4.16: GHK tripeptidinin 5EG3 proteini ile yapılan doking (kenetlenme) sonucunda elde edilen ADME özellikleri.	103
Tablo 4.17: Boş ve GHK tripeptidi yüklü nanopartiküllerin boyut, zeta ve PDI değerleri.	103
Tablo 4.18: GHK, PLGA nanopartikülleri ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının L929 hücre canlılığı üzerine etkisinin % canlılık olarak ifadesi.	108
Tablo 4.19: Saf GHK tripeptidinin Raman, FT-IR ve ATR, GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin FT-IR ve ATR spektrumunda gözlenen pikler (Altı çizili olarak işaretlenmiş pikler bant komponent analizi sonucunda elde edilen GHK'ya ait pikler, * ile işaretlenmiş pikler PLGA'ya ait piklerdir).	119

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

h	: Plank Sabiti
Å	: Angstrom
°C	: Santigrat derece
K	: Kelvin
mV	: miliVolt
ns	: nanosaniye
ps	: pikosaniye
sa.	: saat
W	: Watt
λ	: Dalgaboyu
v	: Frekans
Ψ	: Dalga Fonksiyonu
ω	: Açısal Frekans

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

2D	: 2 Boyutlu Gösterim
a.u.	: atomik birim
ADME	: Emilim, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım
ATR	: Zayıflatılmış Toplam Yansıtma
DCM	: Diklorometan
DFT	: Yoğunluk Fonksiyon Teorisi
FBS	: Fetal Bovin Serum
FGF-2	: Fibroblast Büyüme Faktörü-2
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spetrometre
GHK	: Glisin-Histidin-Lizin
GHK-Cu	: Glisin-Histidin-Lizin – Bakır kompleksi
HOMO	: En Yüksek Dolu Moleküler Orbital
IR	: Infrared
KBr	: Potasyum Bromür
LINCS	: LINear Kısıtlayıcı Çözücü Algoritması

LUMO	: En Düşük Boş Moleküler Orbital
MD	: Moleküler Dinamik
MEP	: Moleküler Elektrostatik Potansiyel
MM	: Moleküler Mekanik
NBO	: Natürel Bağ Orbital
NP	: Nanopartikül
NPT	: Parçacık Sayısı, Basınç, Sıcaklık
NVE	: Parçacık Sayısı, Hacim, Enerji
NVT	: Parçacık Sayısı, Hacim, Sıcaklık
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltilisi
PDB	: Protein Data Bank
PdI	: Polidispersity İndeks
PGA	: Poli Glikolik Asit
PLA	: Poli Laktik Asit
PLGA	: poly(laktik-co-glikolik) Asit
PMS	: Fenazin Metasülfat
PVA	: Poli(vinil)alkol
QM	: Kuantum Kimyasal Yöntem
Rg	: Dönme Yarıçapı
RMSD	: Ortalama karekök Sapma
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
UV-Vis	: Ultraviyole ve görünür ışık
XTT	: 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

ÖZET

ANTİTÜMÖR ve ANTİOKSİDANT ÖZELLİKLİ TRIPEPTİD YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yağmur KÖKCÜ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Fizik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Serda KECEL-GÜNDÜZ

II. Danışman : Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ

İlaç taşıyıcı sistemlerden biri olan nanopartiküller, kontrollü salıma imkân vermeleri ve farklı yöntemlerle hazırlanmaları gibi birçok etkin madde için dizayn edilebilmeleri açısından pek çok avantaja sahiptir. Bu tez çalışmasında; anti-oksüdant ve anti-tümör özelliklerinin yanı sıra yara iyileştirici, cilt koruyucu özelliklere sahip ve sinir sistemi üzerinde olumlu etkileri gözlenen Gly-His-Lys tripeptidinin modellenmesi ve nano-ilaç formülasyonunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, tripeptit yüklü polimerik nanopartiküller sentezlenmiştir. UV-Vis spektroskopisi, dinamik ışık saçılması spektroskopisi, FT-IR spektroskopisi gibi spektroskopik yöntemlerle ve transmisyon elektron mikroskopisi gibi görüntüleme yöntemiyle ayrıntılı karakterizasyonu yapılmıştır. *In vitro* salım profili çıkartılmıştır. Enkapsülasyon ve yükleme verimi hesaplanmıştır. *In vitro* hücre kültüründe sitotoksitesi değerlendirilmiştir ve *in vivo* olarak kullanıma uygun olan dozları belirlenmiştir. Ayrıca *in silico* yöntemler kullanılarak bilgisayar destekli ilaç tasarımı gerçekleştirilmiştir. Nano-ilaç formülasyonunda etkin madde olarak tercih edilen GHK tripeptidinin moleküler mekanik, moleküler dinamik ve kuantum mekaniksel modellemeleri yapılmış ve GHK tripeptidinin vücut içerisine girdikten sonra hedef protein ile etkileşimleri

moleküler doking (kenetlenme) yöntemi ile incelenerek günümüzde gelişen bilgisayar destekli akılcı ilaç tasarımına katkıda bulunulmuştur.

Ocak, 2019, 186 sayfa.

Anahtar kelimeler: GHK, Moleküler Dinamik, Moleküler Doking, PLGA Nanopartikülleri, Spektroskopi



SUMMARY

DEVELOPMENT OF POLYMERIC NANOPARTICLES LOADED ANTITUMOR AND ANTIOXIDANT TRIPEPTIDE

M.Sc. THESIS

Yağmur KÖKCÜ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Physics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Serda KECEL-GÜNDÜZ

Co-Supervisor : Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ

Nanoparticles, one of the drug delivery systems, have many advantages in terms of being able to be designed for many active substances such as allowing controlled release and preparation by different methods. In this thesis, it is aimed to model Gly-His-Lys tripeptide, which has wound healing, skin protective properties and positive effects on the nervous system as well as anti-oxidant and anti-tumor properties and to develop nano-drug formulation. In this respect, tripeptide loaded polymeric nanoparticles were synthesized. Detailed characterizations have been carried out by spectroscopic methods such as UV-Vis spectroscopy, dynamic light scattering spectroscopy, FT-IR spectroscopy and transmission electron microscopy. The *in vitro* release profile was determined. Encapsulation and loading efficiency were calculated. Cytotoxicity in *in vitro* cell culture was assessed and the suitable doses for *in vivo* use were determined. In addition, computer-aided drug design was performed using *in silico* methods. Molecular mechanics, molecular dynamics and quantum mechanical modeling of the GHK tripeptide, which is preferred as an active ingredient in the nano-drug formulation, was performed and the interactions of the GHK tripeptide with the

target protein after entering the body were examined by molecular docking method and contributed to the developing computer-assisted rational drug design.

January, 2019, 186 pages.

Keywords: GHK, Molecular Dynamics, Molecular Docking, PLGA Nanoparticles, Spectroscopy



1. GİRİŞ

Doğadaki sistemlerin en kararlı hali en düşük enerjiye karşılık gelmektedir. Bu en düşük enerjiye sahip konformasyonlar, biyolojik aktif moleküllerin fonksiyonlarını yerine getirebildikleri geometrilere sahiptir.

Moleküllerin sahip oldukları konformasyonlar ortam koşullarına göre değişiklik göstermektedir. Bir enzim-substrat ilişkisinde, aralarındaki reaksiyonun gerçekleşebilmesi için enzim ve substratın sahip olduğu moleküler konformasyonların birbirlerini tamamlayabilmesi gerekmektedir. Ortam sıcaklığı, ortam pH'ı ve yoğunluğu enzimlerin moleküler yapısını etkileyeceğinden, tepkime hızlarında da değişime neden olacaktır.

İnsan plazmasında ve tükürükte bulunan Glisin-Histidin-Lizin (GHK) 1973 yılında Pickart tarafından izole edilmiş üç amino asitlik tripeptit dizisidir [1]. Yapılan literatür çalışmasında, GHK tripeptidinin anti-tümör ve anti-oksüdant özelliklerinin yanı sıra, anti-inflamatuvar özellik gösterdiği, nöron sayısını arttırdığı ve anksiyete tedavisinde de etkileri olduğu görülmüştür. Bu tez çalışmasında, literatürde birçok kullanım alanına sahip olan GHK tripeptidi ve GHK yüklü PLGA nanopartikülleri incelenmiştir.

Bu tez çalışması, iki aşamalı gerçekleştirilmiştir. Öncelikle teorik hesaplama yöntemleri kullanılmıştır daha sonrasında ise GHK yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiş, *in vitro* salım profili çıkartılmış, ayrıntılı karakterizasyonu yapılmış ve *in vitro* hücre kültüründe sitotoksitesitesi incelenmiştir.

Teorik hesaplamalar ile anti-tümör ve anti-oksüdant özelliklere sahip Glisin-Histidin-Lizin (GHK) tripeptidinin moleküler mekanik, moleküler dinamik ve kuantum kimyasal hesaplamaları ayrı ayrı uygulanarak en düşük enerjili kararlı konformerlerinin bulunması sağlanmış ve bu konformerler içerisinde en kararlı haldeki geometrisi belirlenmiştir. Saf GHK tripeptidinin titreşim dalgasayıları hesaplanmış ve potansiyel enerji dağılımı (PED) analizi kullanılarak bu dalgasayılarının atamaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca GHK tripeptidinin hücre içerisinde etkileştiği protein ile kenetlenme profili de moleküler kenetlenme (docking) hesaplamaları ile ortaya çıkarılmıştır.

Yapılan deneysel çalışmalar ile GHK yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiş, sentez sonuçları (nanopartikül boyutu, partikül dağılımı, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli) Zeta Sizer cihazı yardımıyla belirlenmiş, saf GHK tripeptidi ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin KBr-FT-IR, ATR-FT-IR ve Raman spektrumları kayıt edilmiş ve karşılaştırmalı olarak tablo ve şekillerde verilmiştir. Aynı zamanda, GHK yüklü PLGA nanopartikülleri için UV-Vis spektrometre ve Nanodrop cihazları kullanılarak, enkapsülasyon ve yükleme verimleri hesaplanmış, *in vitro* salım profili çıkartılmıştır. Bunun yanı sıra, TEM analizi sonuçları yardımıyla, GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin küresel morfolojiye sahip olduğu görüntülenmiştir. Ayrıca, saf GHK, GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin *in vitro* hücre kültüründe L929 hücreleri üzerindeki toksik etkisine de bakılmıştır.

Tez çalışmasının ilk aşamasında; GHK tripeptidinin serbest halde tüm konformerleri ve en kararlı konformer Teorik Konformasyon Analiz metodu kullanılarak elde edilmiştir. Moleküler mekanik yöntemeye dayalı olan teorik konformasyon analizi metodu, Prof.Dr. Niftali Godjayeve tarafından yazılan FORTRAN programı sayesinde uygulanmıştır [2]. En düşük enerjili konformer daha sonra Gaussian 09 [3] paket programına tanıtılmış, DFT (Density Functional Theory) metodu, 6-311++G(d,p) baz seti kullanılarak geometri optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, GHK tripeptidinin titreşim dalgasayıları yine bu paket program kullanılarak hesaplanmıştır. İkili ölçeklendirme [4] kullanılarak, teorik hesaplanan dalgasayıları deneysel değerlere yaklaştırılmıştır. PED analizi ile hesaplanan dalgasayılarının atamaları Gar2ped programı [5] sonuçlarının verilerine dayanarak belirlenmiştir. Ek olarak Saf GHK tripeptidinin, HOMO-LUMO, NBO, Hiperpolarizibilite hesaplamaları da Gaussian 09 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yetişkin bir insan vücudunun yaklaşık % 70'i sudan oluşmaktadır. Su vücutta, doku, kan ve kemiklerde bulunur ve insan vücudunun önemli bir kısmını oluşturur. Proteinler ve enzimler çoğu tepkimelerini su ortamında gerçekleştirmektedir. Sudan oluşan ve pH'ı insan vücuduna yakın bir pH'a sahip olan ortamlar için moleküllerin konformasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında ortam koşullarının konformasyon üzerine olan etkisini inceleyebilmek için, farklı ortamlarda (su ve metanol) optimize olmuş saf GHK molekülünün, moleküler dinamik hesaplamaları GROMACS paket program kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında ilk defa etkin madde GHK tripeptidi (ligand) ile etkileşeceği Fibroblast Büyüme Faktörü proteini (PDB Kodu: 5EG3) (Reseptör) arasındaki etkileşim moleküler

docking (moleküler kenetlenme) hesaplamaları yardımıyla gerçekleştirilmiş, etkileşimi sağlayan hidrojen bağları Schrödinger Maestro paket programı kullanılarak belirlenmiştir (Schrödinger Release 2017-4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017). Schrödinger Maestro paket programı içerisindeki Qik-Prop uygulaması kullanılarak, (Schrödinger Release 2017-4: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) ilaç tasarımında kullanılacak olan ligandın ADME (absorption, distribution, metabolism ve excretion) profili belirlenmiştir. Bu özelliklere göre ADME profili, ilacın (ligand) vücut içerisinde nasıl, nerede ve ne kadarlık kısmının absorbe edileceği, kan beyin bariyerindeki geçirgenliği, ilacın farmakolojik fiziksel özellikleri, ilacın oral absorpsiyonu gibi, bir molekülün (ligand) ilaç olarak kullanılıp kullanılamayacağını belirleyen çok önemli farmakolojik özelliklerin sonuçlarını vermektedir.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında ise; deneysel çalışmalar yapılmıştır ilk önce nano ilaç geliştirilmesi hedeflenmiştir. Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcısı olarak geliştirilmesi, tasarlanması ve sentezlenmesi son yıllarda artış göstermektedir. Özellikle kanser tanısı ve tedavisinde kullanılan nanopartiküller, kontrollü ve sürdürülebilir salım karakterlerinin yanı sıra etkin maddenin hedef hücre ile etkileşimini yüksek oranlarda sağlayabilmektedirler. Kolay sterilizasyon ve fizyolojik ortamda parçalanmaları sonucu ortaya çıkan ürünlerin toksik etkisinin olmaması, polimerik nanopartiküllerin avantajlarından biridir. Bu kapsamda, enkapsülasyon için PLGA sentetik polimeri, etkin madde olarak ise anti-oksidant ve anti-tümör etkili GHK tripeptidi kullanılarak nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. GHK tripeptidinin metabolizma içerisinde daha stabil yapıda, daha fazla biyoyararlanıma sahip olması ve kolay bozunumunu önlemek amacıyla, enkapsüle edilmesi sağlanmıştır. Vücut içerisine girdikten sonra parçalanan nanopartikül, GHK etkin maddesini salacak, salınan GHK organizmadaki etki edeceği protein ile etkileşerek tedavi sürecini başlatacaktır.

Bu tez kapsamında, literatürde ilk kez, anti-tümör ve anti-oksidant özelliğe sahip GHK tripeptidinin moleküler modellemesi ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezi ve karakterizasyonu yapılmıştır.

Bu tez çalışmasının deneysel aşamasında, sentezlenen nanopartiküllerin (boş ve GHK yüklü) boyutları ve zeta potansiyel karakterizasyonları, Zeta sizer cihazı, enkapsülasyon ve yükleme verimleri Nanodrop cihazı ve UV-Vis spektrometre kullanılarak elde edilmiştir. Aynı zamanda saf GHK ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin spektroskopik çalışmaları da

anabilim dalımızdaki Moleküler Spektroskopi Laboratuvarında bulunan Jasco 6300 FT-IR spektrometre kullanılarak $4000 - 400\text{cm}^{-1}$ dalgasayısı bölgesinde, katı formda KBr-FT-IR ve ATR-FT-IR spektrumları kayıt edilerek, belirlenmiştir. Yine moleküler spektroskopi laboratuvarında bulunan Jasco NRS 3100 Dispersif Micro Raman Spektrometresi kullanılarak saf GHK ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin, Raman spektrumları farklı lazer kaynakları kullanılarak elde edilmiştir. Saf GHK ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin dalgasayıları arasındaki farklar, kayıt edilen ve çizdirilen spektrumlar ve spektrumlar sonucunda oluşturulan tablolardaki dalgasayısı değerleri göz önünde bulundurularak belirlenmiştir.

Yapılan ayrıntılı literatür taramasında GHK tripeptidinin moleküler dinamik ve kuantum mekaniksel hesaplamaları ile birlikte moleküler doking (kenetlenme) hesaplamalarının yer aldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca kullanılan polimer ve enkapsüle edilen etkin madde açısından GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezi ilk kez bu tez çalışması çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Hem teorik hem de deneysel yöntemlerin kullanıldığı bu tez çalışması özgün bir bilimsel çalışma olma niteliği taşımaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

Latince “nanus”dan gelen “nano” öneki, eski Yunancada “cüce” anlamına gelmektedir. Uluslararası Birim Sistemi (SI) sözleşmesine göre 10^9 kez azaltmaya karşılık gelmektedir. Nanoboyutlar, nanometre (10^{-9} m = 1nm) cinsinden ölçülür ve boyutu moleküler boyutların üstünde ve makroskopik olanların (genellikle >1 nm ve <100 nm) altında olan sistemleri kapsar.

Son yıllarda farklı her alanda “Nano” öneki getirilerek farklı uygulama alanları geliştirilmiştir. Nanobilim, nanoteknoloji, nanotıp veya nanomateryaller, nano içerikli terimlerden sadece birkaçıdır.

Yapılan istatistiklere göre 2015 ve 2016 yıllarında nanoteknoloji alanında en fazla yayına Çin ve ABD, patent başvurularına ise yine ABD ve Almanya sahiptir. Bu sıralamalarda ise Türkiye yayın sayısında 20., patent sayısında ise 22. sırada yer almaktadır [6].

Nanoteknolojinin en umut vadeden alanları özellikle tıp ve farmasötik bilim alanlarıdır. Nanotıbbın potansiyel uygulama alanları, ilaç taşıma sistemlerini, medikal görüntülemeleri, hastalıkların teşhisi ve tedavisini kapsamaktadır. Özellikle eczacılık alanında potansiyel bir geleceğe sahip olan nanoparçacık sistemleri, nano boyutta, biyolojik olarak parçalanabilen ilaç taşıyıcı sistemler olarak tanımlanırlar [7]. Nanoteknolojik ilaçlar, hedefe dayalı tedavi olanakları sağlayarak, özellikle kanser tedavisinde ilaçların kanser hücrelerindeki hücre içi konsantrasyonları arttırılabilir, böylelikle sağlıklı hücrelere olan toksik etkileri en aza indirilebilir, sonuçta verimsiz tedavi ile sonuçlanan yüksek hasta maliyetleri en aza indirgenmiş olur.

Ayrıca nanoteknolojik yöntemlerle organizmadaki küçük bölgelere ilaçları ulaştırabilmek için yeni sistemler yaratılabilir [8].

Bu nanoyapılara, nanopartiküller, nanokapsüller, nanosüngerler, katı lipit nanopartiküller, nanoemülsiyonlar, nanosüspansiyonlar, lipozomlar, karbon nanotüpler, nanojeller, polimerik miseller örnek verilebilir.

Nano-ilac taşıyıcı sistemlerin tasarımı, hedeflendiği dokuda etkinliklerini gösterebilmek adına büyük önem taşımaktadır. Polimerik nanopartiküller bu anlamda lipozomlara ve diğer nano ilaç taşıyıcı sistemlere (nanokapsül, misel, katı lipid nanopartikül, vb.) karşı daha üstün özelliklere sahiptirler. Etkin maddenin hedef bölgedeki salım profilinin uygunluğu nano-ilac taşıyıcı sistemler için önemli bir özellik olup, bu özelliği en iyi gösterebilenler; nanopartiküllerdir. Nanopartiküller bünyelerinde barındırdıkları ilacın stabilitesini de arttırmaktadırlar [9].

Polimerler, daha basit kimyasallar olan monomer yapıdaki bileşiklerin katlarından oluşan, makromoleküllerdir. Doğal ve sentetik olarak iki sınıfa ayrılıp, canlı organizmada bulunan protein, selüloz ve nükleik asitlerle birlikte pek çok yapının oluşumuna katkı sağlarlar. Deniz kabuklularında bulunan kitin, kitinden elde edilen kitosan, selüloz, kolajen, pamuk, DNA ve protein, doğal polimerlere örnektir. Sentetik polimerler ise endüstride sentezlenen polimerlerdir. Polipropilen, polikaprolaton (PCL), poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA) bunlara örnektir.

Bununla birlikte, çoğu doğal ve sentetik polimer, iki veya daha fazla farklı tipte monomerden oluşur; bu gibi polimerler “kopolimer” olarak adlandırılır [10]. Bir nanopartikülün yapısı; etkin maddenin yani ilacın veya peptidin bulunduğu iç kısım ve bu ilacı koruyan polimerler ile kaplı zardan oluşmaktadır. Hem lipid, protein veya karbonhidrat gibi doğal polimerler ile hem de sentetik polimerler ile nanopartikül sentezi gerçekleştirilebilir.

Kitinden üretilen kitosan gibi doğal polimerlerin sentez için seçilmesinin nedenleri; biyoparçalanabilir özellikte olmaları, parçalandıklarında toksik bileşen açığa çıkarmamaları, stabil olmaları, boyut dağılımlarının kontrolünün sağlanabilmesi ve suda çözünebilir ilaçlar için yükleme hacimlerinin fazla olmasıdır. Poli(laktik-ko-glikolik)asit kısaca (PLGA) gibi sentetik polimerler ise hem hazırlık hem de saklama süreçlerine dayanıklı, istenilen şartlara uygun olarak sentezlenebilir oldukları için tercih edilirler [9]. Doğal polimerler gibi hücre içinde parçalanma esnasında ortama toksik madde yaymaması nedeni ile sentetik polimerler içerisinde en çok tercih edilen polimer PLGA’dır. Poli (laktik-ko-glikolik asit) yani PLGA, Amerika Birleşik Devletleri FDA ve Avrupa Tıp Ajansı (EMA) tarafından ilaç taşıma sistemlerinde kullanılması için onaylanmış bir polimerdir [11]. PLGA, monomer laktik ve glikolik asitlerinden meydana gelmiş bir kopolimerdir. PLGA, bozunuma uğradığında kendisini oluşturan laktik asit ve glikolik asit meydana gelmektedir. Laktik asit, metabolize

edilerek karbondioksit ve su yolu ile yok edilir. Glikolik asit ise aynı şekilde metabolize edilerek böbrek yoluyla vücuttan atılır [12]. Vücutta kolayca metabolize olabilmesi nedeni ile mikro ve nanopartikül, implant ve ilaç taşıma sistemlerinin tasarımı için kullanılan öncelikli polimerler arasında yer almaktadır.

İlacın, insan yaşamı ve sağlığı üzerindeki etkisi nedeni ile sektörün küreselleşen ve değişen dünyada önemi büyüktür. Bu nedenle yapılan Ar-Ge yatırımları söz konusu olduğunda üretim hacmi ve ticari kapasitesindeki artış ile ilaç sektörü başta gelmektedir. Satış hacmi 2017 yılı verilerine göre 24,5 milyar TL'yi aşan Türkiye, ilaç pazarı alanında 2017 yılında 17. sırada yer almakta olup, bu sektörde büyüme eğilimi göstermektedir [13]. Yerli ilaç üretimi desteklenerek bu alandaki başarı ve kalkınma Türkiye'nin bu pazardaki yerini sağlamlaştıracaktır.

İlaç sektörü için Ar-Ge faaliyetleri, yeni bir ilaç molekülünün keşfedilmesi ya da var olan ilaç moleküllerinin geliştirilmesi ile başlamaktadır. Sonrasında ise belirlenen bu moleküllerin güvenli ve etkili bir ilaca dönüşebilmesi adına bir kaç fazdan oluşan laboratuvar ortamında gerçekleştirilen deneyler ve klinik çalışmalar ile devam etmektedir. İlaç araştırma, tasarım ve geliştirme, yüksek maliyete sahip, üretme, geliştirme ve test etme aşamaları uzun olan bir süreçtir. Sorunun çözümü kısa süreli ve düşük maliyetli en etkin ilacı tasarlamak ve geliştirmektir. Bilgisayar ortamında yapılan hesaplamalar yani *In silico* metotlar etkin ilaç tasarlama aşamalarında süreyi ve maliyeti en aza indirdiğinden ötürü ilaç tasarımını bir adım öteye taşımaktadır. Captopril, Dorzolamide, Saquinavir, Zanamivir, Oseltamivir, Aliskiren, Boceprevir, Nilotrexed, Rupintrivir ve NVP-AUY922 gibi birçok ilacın keşfi ve geliştirilmesi, modern bilgisayar destekli ilaç tasarım yöntemleri sayesinde gerçekleşmiştir.

Bilgisayar destekli yapılan hesaplamalar ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda uygun ilaç yapıları, yüksek bütçeli gerçekleşen organik sentez süreçlerini azaltarak, daha akılcı ilaç tasarımlarına olanak sağlamaktadır.

Atomik düzeyde tanımlamalar yapılarak modellenen moleküler sistemler ile atom ve moleküllerin oluşturdıkları etkileşimler, üç boyutlu olarak görüntülenebilir ve simüle edilebilir. Böylece etkileşim mekanizmaları gözlenebilir. Kimyasal yapı ve fonksiyon ilişkileri, küçük sistemlerden büyük biyolojik moleküller ve materyal gruplarına kadar moleküler modelleme yöntemleriyle incelenebilmektedir. İlaç tasarım ve geliştirme

aşamalarını kolaylaştıran moleküler modelleme yöntemleri (kuantum mekaniksel hesaplamalar, moleküler dinamik simülasyon vs.) ilaç adayı yapılarının modellenmesi, yapısı bilinen ilaçların etkinliklerinin artırılması, yapısı bilinmeyen yeni ilaç molekülü tasarlanması için değerli ve gerekli bir araç haline gelmiştir. Bu nedenle, özellikle ilaç tasarımı, moleküler biyoloji, protein bilimi, polimer bilimi ile birlikte elektronik ve fotonik materyaller gibi endüstriyel alanlarda da kullanılan çok önemli bir uygulamadır.

In silico metotlar, incelenen sistemin mikroskobik detaylarından makroskobik özelliklerine kadar birçok bilgiyi verebilir. Bilgisayar simülasyon metotları, özellikle yüksek basınç ve sıcaklık gibi deney yapmanın da zor olduğu ortam koşullarında kusursuz bir şekilde hesaplama yapabilmektedir. Gaussian, Gromacs, Schrödinger Maestro paket programları bu tez çalışmasında *in silico* metotlar çerçevesinde kullanılan programlardır.

Gaussian programı moleküller modelleme için kuantum mekaniksel hesaplama yöntemleri kullanarak molekülün optimize olmuş geometrisi, teorik titreşim dalgasayıları gibi özelliklerin elde edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca tüm elektronik etkileşmelerin incelenmesi, bölgesel yük yoğunluklarının ve elektrostatik potansiyel yüzeylerinin belirlenmesini de mümkün kılmaktadır.

GROMACS programı ise moleküler dinamik hesaplamaya dayalı olan bir programdır. Ortam (su, metanol, vs...), hacim, sıcaklık ve basınç gibi koşulların değiştirilerek, peptitlerin, lipidlerin, moleküllerin ve makromoleküllerin farklı ortam koşulları altındaki davranışlarının ve konformasyonlarının ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır.

Schrödinger Maestro paket programı yardımıyla, bir molekülün (ligand) vücut içerisinde etki edeceği (reseptör) protein, enzim ve DNA vb. ile nasıl ve nereden etkileşeceğini, etkileşim enerjisini ve profilini, etkileşimi sağlayan bağların uzunluk ve çeşidini belirlemek mümkündür. Ayrıca bu program sayesinde, molekülün (ligandın) vücudun hangi bölgelerinde emilim ve dağılım göstereceği ve ilaç adayı olabilmesi için gereken tüm farmakolojik özellikleri belirlenebilmektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

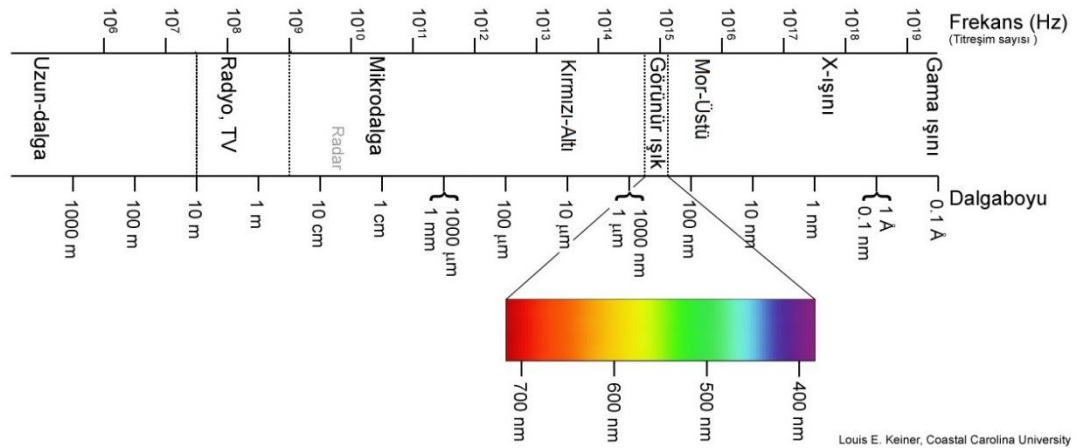
3.1.SPEKTROSKOPİ

Spektroskopi, maddelerin özelliklerini, madde üzerine gönderilen elektromanyetik dalganın etkileşimi ile inceleyen bilim dalıdır. Bu yöntem, gönderilen ışının dalgaboyu ile ilişkilidir. Spektroskopik ölçümler sonucunda elde edilen verilerin incelenmesi, yatay eksen dalgasayısı veya frekans, dikey eksen ise şiddet bilgileri ile çizdirilen “spektrum”lar ile gerçekleştirilmektedir.

3.1.1. Elektromanyetik Dalga

Dalgaboyu (λ) ve frekans (ν)’a sahip elektromanyetik dalgalar, boşlukta c ışık hızı ile yayılmaktadırlar ve bu dalgaların enerjileri $h\nu$ ile verilmektedir.

Elektromanyetik dalga spektrumunu tanımlayan bölgeler aynı zamanda dalga tiplerine verilen isimlerdir. Bu bölgeler Şekil 3.1’de de görüldüğü üzere, en yüksek enerjiye sahip olandan en düşük enerjiye doğru: Gama Işınları bölgesi, X-Işınları bölgesi, Mor-Üstü Bölge, Kırmızı-Altı Bölge, Mikrodalga Bölgesi ve Radyo Dalgaları Bölgesi olarak sıralanmaktadır.



Şekil 3.1: Elektromanyetik Spektrum.

Gama Işınları Bölgesi: Yüksek enerjiye sahip elektromanyetik dalgalar ve dalga boyları 10^{-10} ile 10^{-14} m (10^{18} - 10^{25} Hz) aralığındadır. Çok yüksek enerjiye sahip olmaları nedeni ile canlı organizma tarafından soğurulması ciddi zararlara neden olmaktadır.

X-Işınları Bölgesi: Dalgaboyu aralığı 10^{-8} ve 10^{-12} m (10^{16} - 10^{18} Hz frekans) olan bölgedir. Tıpta tanı koymak, kanserin belli türlerinin tedavisi ve röntgen çekiminde X-ışınları kullanılır. Aynı zamanda kristal yapı incelemelerinde de kullanılmaktadır.

Mor-Üstü (Ultraviyole) ve Görünür Bölge: Bu bölgeler, atomların dış yörüngedeki elektronların uyarılarak, elektronik enerji düzeyleri arasındaki geçişlerin gerçekleştiği bölgelerdir.

Kırmızı-Altı (IR) Bölge: Mikrodalga bölgesinin hemen üzerinden başlayıp, görünür bölgeye kadar uzanan değişken bir aralığa (10^{12} - 10^{15} Hz frekans) sahiptir. Kırmızı-altı bölge, moleküler titreşim ve dönü enerji düzeyleri arasındaki geçişlerin incelendiği bir bölgedir. Dolayısıyla bu bölgede, moleküler rotasyon ve titreşim önemli rol oynamaktadır.

Mikrodalga Bölgesi: 10^{-1} - 10^{-4} m dalgaboyu (300 GHz frekans) aralığında olup kısa dalgaboyuna sahiptirler. Moleküler rotasyon (dönü) etkileşimleri bu bölgede incelenir. “Elektron Spin Rezonans (ESR)” olayları mikrodalga bölgede gerçekleşir.

Radyo Dalgaları Bölgesi: İsminden de anlaşılacağı gibi radyo ve televizyon iletişim sistemlerinde kullanılıp $10^4 - 0.1$ m dalgaboyu (10^3 - 10^{10} Hz frekans) bölgesindedirler. bu bölgede “Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)” gözlenir. Radyo dalgaları bölgesi görüntüleme radarları, altimetreler ve sirenler gibi aktif radyo sensörleri tarafından kullanılır [14-16].

3.2. MOLEKÜLER SPEKTROSKOPİ

Bir molekül, negatif yüklü elektron bulutu ile çevrili, pozitif yüklü atomik çekirdeklerin birleşimidir. Kararlılığı, çekirdekler ve elektronlar arasındaki çekici ve itici kuvvetler arasındaki dengeden kaynaklanmaktadır.

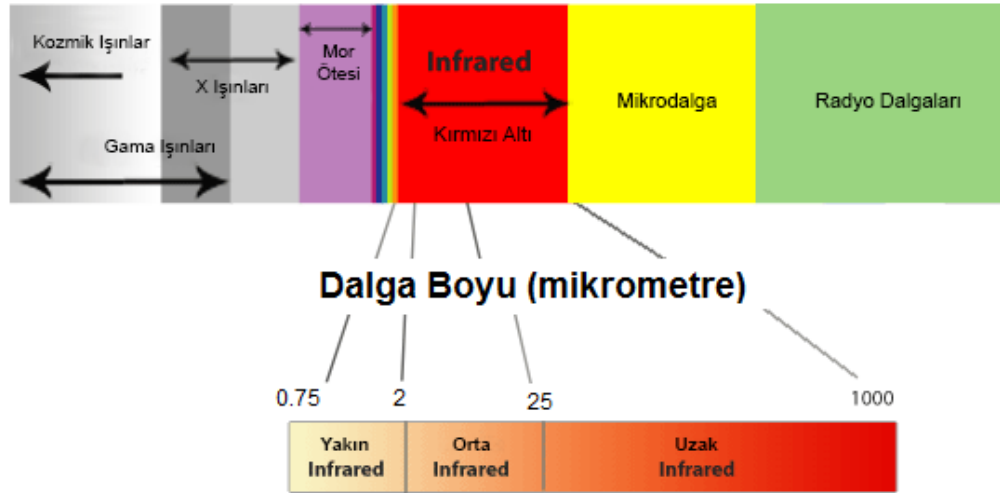
Spektroskopi tanımı göz önünde bulundurulduğunda, moleküler spektroskopi; moleküllerin gönderilen elektromanyetik dalga ile etkileşiminin incelendiği olay, olarak tanımlanabilir. Deneysel spektroskopik veriler, çeşitli moleküler özellikleri belirlemek için kullanılabilir [17]. Molekül tarafından yayılan veya soğurulan ışının miktarı ve değişen bant şiddetleri ile moleküllerin simetrisi, bağ uzunlukları, bağ kuvvetleri, kararlılıkları gibi temel özellikleri belirlenmektedir.

Atomik spektrumların aksine moleküler spektrumlar çizgi spektrumu olarak değil, bant spektrumu şeklinde gözlenir. Molekül ile elektromanyetik dalganın etkileşmesi sonucunda elde edilen spektrumlardaki bu bant şiddetleri incelendiğinde molekülün simetrisi, bağ uzunluğu, bağ kuvveti ve kararlılığı gibi bilgiler elde edilebilir [17,18].

3.3.KIRMIZI-ALTI (IR) SPEKTROSKOPİSİ

3.3.1. Kırmızı-Altı Spektrum

Kırmızı-altı bölge $0.75\mu\text{m} - 1\text{mm}$ aralığında dalgaboyuna, $10^{12}-10^{15}$ Hz frekansa sahip spektral bölgedir. Kırmızı-altı ışınlar insan gözü tarafından görülemez ve $0.75\mu\text{m}$ alt limite sahip kırmızı-altı bölge, görünür bölge ile birlikte insan görüşünün sona erdiği noktadır.



Şekil 3.2: Elektromanyetik spektrum ve kırmızı-altı bölgenin alt bölgeleeri [19].

Kırmızı-altı bölge; yakın, orta ve uzak kırmızı-altı olmak üzere kendi içinde üç bölüme ayrılmaktadır.

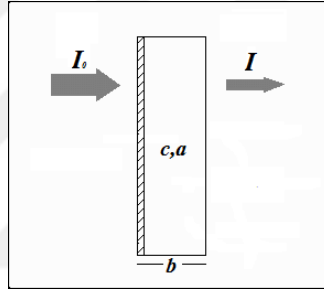
Yakın kırmızı-altı bölge: $0.75\mu\text{m} - 3\mu\text{m}$ dalgaboyu $10^{14} - 4 \times 10^{14}$ Hz frekans aralığında uzanmaktadır. Molekül titreşimlerine ait üstton geçişler yakın kırmızı-altı bölgede gözlenmektedir.

Orta (Temel) kırmızı-altı bölge: Bu bölge $2\mu\text{m}$ ila $25\mu\text{m}$ dalgaboyu ile $10^{13} - 10^{14}$ Hz frekans aralığını kapsar. Molekülerin temel titreşimler bu bölgedeki ışımlar ile uyarılmaktadır. Bu nedenle kırmızı-altı bölge elektromanyetik spektrumun en yaygın olarak kullanılmasına neden olan en yararlı bölgesidir.

Uzak kırmızı-altı bölge: $25\mu\text{m} - 1000\mu\text{m}$ dalga boyu ($6 \times 10^{11} - 10^{13}$ Hz frekans) aralığındadır. Kristal örgü titreşimleri ve dönü geçişleri bu bölgede meydana gelir [20].

Beer-Lambert Yasası

Kırmızı-altı spektrum, madde ile kırmızı-altı ışının etkileşmesi ve bu ışının molekül tarafından soğurulması (absorblanması) sonucunda elde edilir. Molekül ile etkileşimden önceki ve sonraki kırmızı-altı ışının şiddetleri karşılaştırılarak, molekülün kırmızı-altı ışını absorblama oranı belirlenir. Bu nedenle molekül ile kırmızı-altı dalganın etkileşmesinden elde edilecek olan spektrum, o moleküle özgü olacaktır [20]. Beer-Lambert yasası, madde ile etkileşen ışının soğurulma oranını verir. Bir madde tarafından iletilen ışık miktarını, örneğin kalınlığına bağlamak için kullanılır [21].



Şekil 3.3: Örnek üzerine gelen ışının, örnek tarafından soğurulması sonucu, şiddetinde meydana gelen azalma.

I_0 , örnek üzerine gelen radyasyon şiddeti olarak temsil edilirse; I , örnekten geçen radyasyon enerjisinden kalandır.

Beer-Lambert yasası;

$$I = I_0 e^{-abc} \quad (3.1)$$

Bu denklemde; a , doğal absorpsiyon, soğurma gücünü; b , örneğin uzunluğunu; c , örneğin konsantrasyonunu yani yoğunluğunu belirtmektedir.

İşlemlere devam edersek,

$$\frac{I}{I_0} = e^{-abc} \quad (3.2)$$

Burada $\frac{I}{I_0}$, örnek tarafından iletilen ışınım şiddetinin örneğe gelen ışınım şiddetine oranı yani, T, geçiş oranıdır. Yüzde olarak ise %T şeklinde ifade edilir.

$$T = e^{-abc} \quad (3.3)$$

$$\log T = \log e^{-abc} = -abc \quad (3.4)$$

$$\log_{10} \frac{1}{T} = abc \quad (3.5)$$

$\log_{10} \frac{1}{T}$ ya da $-\log T$ absorbans, soğurma oranı, A olarak tanımlanırsa,

$$A = \log_{10} \frac{1}{T} = abc \quad (3.6)$$

elde edilir.

Kırmızı-altı spektrumda, x ekseninde dalgasayısı (cm^{-1}) yer alırken, buna karşılık olarak y ekseninde yüzde geçirgenlik veya soğurma şiddeti yer alır.

3.3.2. Klasik Görüş Altında Kırmızı-Altı Spektrumu

İki atomlu bir molekülün titreşim modunu klasik görüş altında incelemek istersek, Hook ile Newton'un ikinci yasası altında Harmonik titreşici modelini göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Newton'un 2. Yasası, m kütle, a ivme olmak üzere;

$$\mathbf{F} = m\mathbf{a} \quad (3.7)$$

olarak ifade edilir.

Moleküler titreşimleri tanımlayan en basit model, molekülü oluşturan atomlar arasında yayların olduğu varsayılan harmonik titreşici modelidir. Hook yasasında, geri çağırıcı kuvvet yer değişimi, x ile orantılıdır:

$$\text{Geri çağırıcı kuvvet} = -kx \quad (3.8)$$

Bir orantı sabiti olan, k, kuvvet sabitidir [22].

İki atomlu bir molekül için ϑ titreşim kuantum sayısı, ν titreşim frekansı olmak üzere; harmonik titreşici modeline göre enerji ifadesi aşağıdaki ifade ile verilmektedir.

$$E_{\vartheta} = \left(\vartheta + \frac{1}{2} \right) h\nu \quad (3.9)$$

Burada ν titreşim frekansını açarsak;

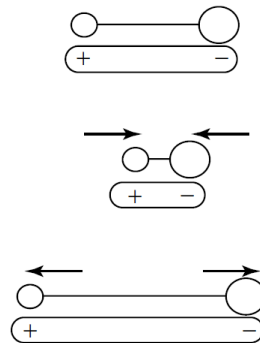
$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.10)$$

$$\mu = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \quad (3.11)$$

olacaktır. Burada μ iki atomun indirgenmiş kütesidir [16].

3.3.3. Kuantum Mekaniksel Görüş Altında Kırmızı-Altı Spektrumu

Bir molekülün titreşim geçişlerinin frekansının kırmızı-altı spektrumunda gözlenebilmesi için, molekülün elektrik dipol momentinin, titreşim sırasında değişmesi gerekmektedir. Bu Kırmızı-altı spektroskopisi için seçim kuralıdır. Şekil 3.4, bir heteronükleer yani farklı atomlara sahip atomlardan oluşan moleküler yapılar için elektriksel dipol moment değişimini göstermektedir. Bir molekül, titreşim esnasında değişen bir dipol momente sahipse, bu durum “infrared-aktif” olarak tanımlanır. Buna karşı olarak aynı atomlara sahip bir “infrared-inaktif” molekülün titreşim esnasında dipol momentini değişmez ve dipol moment değişimi sıfır kalır [21].



Şekil 3.4: Farklı iki atoma sahip bir molekülün dipol momentinde meydana gelen değişim.

Molekülün titreşim anında, elektromanyetik dalganın elektrik alanı ile molekülün değişen elektriksel dipol momentleri arasında bir etkileşme meydana gelmektedir. Kuantum mekaniksel

görüş, elektriksel dipol integralinin sıfırdan farklı olması durumunda geçişlerin izinli olabileceğini söyler.

$$|\mu_{nm}| = \int \Psi_n^* \mu \Psi_m d\tau \neq 0 \quad (3.12)$$

n üst seviye, m alt seviye olmak üzere; Ψ_n üst, Ψ_m alt titreşim enerjilerini tanımlayan dalga fonksiyonlarıdır. μ elektriksel dipol moment vektörünü ve μ_{nm} m seviyesinden n seviyesine geçiş durumunda dipol momentin büyüklüğünü (beklenen değerini) temsil etmektedir. $|\mu_{nm}|^2$ ifadesi geçiş olasılığı ile orantılıdır.

Titreşmekte olan iki atomlu bir molekül için dipol momentini denge noktasında seriye açalım;

$$\mu(r) = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dr}\right) q + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2\mu}{dr^2}\right) q^2 + \dots \quad (3.13)$$

μ_0 : Molekülün sahip olduğu başlangıç dipol momentini

q: denge noktasından ayrılma miktarı ($r-r_d$)

Harmonik titreştirici modeli göz önünde bulundurularak denklemdeki ilk iki terim μ_{nm} 'de yerine koyulur:

$$|\mu_{nm}| = \int \Psi_n^* \left(\mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dr}\right) q \right) \Psi_m d\tau \quad (3.14)$$

Dipol momentin denge noktasında $\mu_0 = 0$ olduğu kabul edilirse,

$$|\mu_{nm}| = \mu_0 \int \Psi_n^* \Psi_m d\tau + \int \Psi_n^* \left(\frac{d\mu}{dr}\right) q \Psi_m d\tau \quad (3.15)$$

Diklik şartı nedeni ile birinci integral sıfır olup $\left(\frac{d\mu}{dr}\right)_0$ sabittir.

Sonuç olarak;

$$|\mu_{nm}| = \left(\frac{d\mu}{dr}\right) \int \Psi_n^* q \Psi_m d\tau \neq 0 \quad (3.16)$$

elde edilir.

Buradan da anlaşılabildiği üzere kırmızı-altı bölgede bant gözlenebilmesi molekülün titreşimi boyunca değişen bir dipol momente sahip olması ile gerçekleşir. Gönderilen elektromanyetik

dalganın sahip olduğu frekans, n ve m seviyeleri arasındaki farka eşit ve geçiş integrali sıfırdan farklı ise bu seviyeler arasında geçiş gerçekleşir [20, 23].

Denklemin sonucunun sıfırdan farklı olabilmesi için, $\Psi_n^* q \Psi_m$ ifadesi çift fonksiyon olmalıdır. q tek bir fonksiyondur. Bu durumda Ψ_n^* tek fonksiyonken, Ψ_m çift; Ψ_n^* çift fonksiyonken Ψ_m tek olursa $\Psi_n^* q \Psi_m$ çarpımı çift fonksiyon olacaktır. Yani seviyeler arasındaki geçişler, 1.seviyeden 2. seviyeye, 2.seviyeden 3.seviyeye, ... şeklinde olmalıdır. Bu bize $\Delta v = \pm 1$ izinli geçiş şartını vermektedir.

3.4. RAMAN SPEKTROSKOPİSİ

Moleküllerin titreşim ve dönü geçişleri aynı zamanda Raman spektroskopisi tekniği ile de gözlemlenebilmektedir. Bununla birlikte, titreşim geçişlerini gözlemlemenin yöntemi kırmızı-altı spektroskopisi tekniğinden farklıdır. Kırmızı-altı spektroskopisi, gönderilen elektromanyetik dalganın molekül tarafından soğurulması olayına dayalı iken, Raman spektroskopisi tekniği, gönderilen elektromanyetik dalganın molekül tarafında saçılması olayına dayanır.

Raman olayı, 1928 yılında Hintli fizikçi Sir Chandrasekhara Venkata Raman ve Kariamanikkam Srinivasa Krishnan tarafından keşfedilmiştir [24-26]. 1940 ve 1950 yıllarında cıva lambası ile birlikte dalgaboyu aralığı dar olan filtreler kullanılmaktaydı. Bu, zayıf bir Raman sinyali elde edilmesine neden oluyordu. 1960'lı yıllarda lazerin icadı ile spektroskopide ışık kaynağı olarak lazerler kullanılmaya başlandı ve böylece zayıf Raman saçılmaları da gözlenerek yüksek çözünürlüğe sahip sinyaller elde edildi [27-28].

3.4.1. Klasik Görüş Altında Raman Spektrumu

Saçılma, gönderilen bir elektromanyetik dalganın bir engelle veya homojen olmayan bir ortamla karşılaştığında (bu durumda saçılma malzemesi, sıvı, katı veya gaz) elektromanyetik dalganın yeniden yönlendirilmesi olarak tanımlanır. Elektromanyetik dalga madde ile etkileşime girdiğinde, maddeyi oluşturan moleküllerin elektronik özellikleri ile gelen dalganın elektrik alanı etkileşir. Bu etkileşim molekül içindeki yük dağılımının değişmesi ile indüklenmiş bir dipol moment oluşmasına ve molekülde bir *kutuplanmaya* neden olacaktır [29].

Elektrik alan μ indüklenmiş dipol momentin oluşmasına neden olur ve

$$\mu = \alpha E \quad (3.17)$$

denklemleri ile verilir. α moleküle ait karakteristik bir değer olup, *kutuplanma tensörü* olarak tanımlanır.

$$\alpha = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \quad (3.18)$$

Tüm α_{ij} terimleri α kutuplanma tensörünün bileşenleridir [30].

Gelen elektromanyetik dalganın elektrik alan vektörü:

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.19)$$

ν_0 (Hz) gelen dalganın frekansı olmak üzere (3.19) şeklinde ifade edilir. Denklem dipol moment ifadesinde yerine koyulacak olursa:

$$\mu = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.20)$$

elde edilir.

Atomların belirli titreşim modlarına bağlı olarak denge konumu etrafındaki Q normal titreşim modu aşağıdaki gibidir:

$$Q = Q_0 \cos(2\pi\nu_{tit} t) \quad (3.21)$$

Burada ν_{tit} , molekülün sahip olduğu titreşim frekanslarından biridir. Q_0 , denge konumu etrafındaki maksimum yer değiştirmedir [29].

Çok küçük yer değiştirmeler için kutuplanma tensörü Taylor serisine açılırsa:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right)_0 Q + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \alpha}{\partial Q^2}\right)_0 Q^2 + \dots \quad (3.22)$$

Denge konumu kutuplanma yatkınlığı α_0 'dır.

Taylor serisine açılan kutuplanma yatkinliğının ilk iki teriminden sonraki terimlerin katkısı çok azdır. Dolayısı ile yalnızca ilk iki terim göz önüne alınır.

Bu denklemde, Q yerine yazılırsa;

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right)_0 Q_0 \cos(2\pi \nu_{tit} t) \quad (3.23)$$

elde edilir.

Elde edilen bu denklemler ile elektrik alan etkisindeki molekülün sahip olduğu indüklenmiş dipol moment ifadesi açık olarak aşağıdaki şekilde ifade edilir [29,30].

$$\mu = [\alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right)_0 Q_0 \cos(2\pi \nu_{tit} t)] E \quad (3.24)$$

$$\mu = [\alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right)_0 Q_0 \cos(2\pi \nu_{tit} t)] E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) \quad (3.25)$$

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right)_0 Q_0 \cos(2\pi \nu_{tit} t) E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) \quad (3.26)$$

trigonometri özdeşliğini kullanarak:

$$\mu = \underbrace{\alpha_0 E_0 \cos(2\pi \nu_0 t)}_{\text{Rayleigh Saçılması Terimi}} + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right)_0 Q_0 E_0 [\underbrace{\cos(2\pi(\nu_0 - \nu_{tit})t)}_{\text{Stokes Saçılması Terimi}} + \underbrace{\cos(2\pi(\nu_0 + \nu_{tit})t)}_{\text{Anti-Stokes Saçılması Terimi}}] \quad (3.27)$$

elde edilir.

Örnek üzerine; ν_0 frekansında bir monokromatik ışınım gönderildiğinde, örnekten $(\nu_0 - \nu_{tit})$ frekanslarında ve $(\nu_0 + \nu_{tit})$ frekanslarında, gelen ışınımın frekansından farklı frekanslarda saçılmalar gözlenebilir. $(\nu_0 - \nu_{tit})$ frekanslı saçılan ışınım spektrumda Stokes bantlarını verirken, $(\nu_0 + \nu_{tit})$ frekanslı saçılan ışınım Antistokes bantlarını verebilmektedir. Spektrumda gözlenen ν_0 frekanslı bant ise gelen ışınımın frekansına eşit frekansta olup Rayleigh bandı olarak isimlendirilmektedir. Stokes ve Anti-Stokes tipi geçişler ışınım ile madde arasındaki elastik olmayan etkileşimlere işaret ederken, Rayleigh geçişi elastik türden etkileşimlere işaret etmektedir.

Raman saçılmasının gerçekleşmesi için gereken şartlardan biri $\frac{\partial \alpha}{\partial Q}$ 'nin sıfırdan farklı olmasıdır. Bu koşul, molekülün sahip olduğu titreşim modlarından birine (Q) bağlı olarak, molekülün sahip olduğu kutuplanabilirlik tensöründe (α) değişim olup olmadığını tanımlamaktadır [29]. Eğer değişim var ise ($\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \neq 0$) “Raman Aktivlik”, değişim yok ise ($\frac{\partial \alpha}{\partial Q} = 0$) “Raman inaktivlik” durumunu tanımlamaktadır. Bu koşul ile birlikte titreşimsel geçişlerin gerçekleşeceği düzeylere ilişkin olarak da parite koşulunun sağlanması gerekmektedir.

3.4.2. Kuantum Mekaniksel Görüş Altında Raman Spektrumu

Molekül üzerine fotonlar gönderildiğinde, fotonlar ile moleküller elastik ya da elastik olmayan etkileşimler yaparlar. Elastik etkileşimde, gelen fotonların frekansları ile saçılan fotonların frekansları değişmeyecek ve enerjileri de eşit olacaktır. Elastik olmayan etkileşimlerde, $h\nu_0$ enerjisine sahip gelen bir foton molekül ile etkileşerek, iki titreşim düzeyi arasındaki enerji farkı kadar, etkileştiği molekülden enerji alır veya aktarır [31].

$$h\nu_0 + E_m = h\nu_s + E_n \quad (3.28)$$

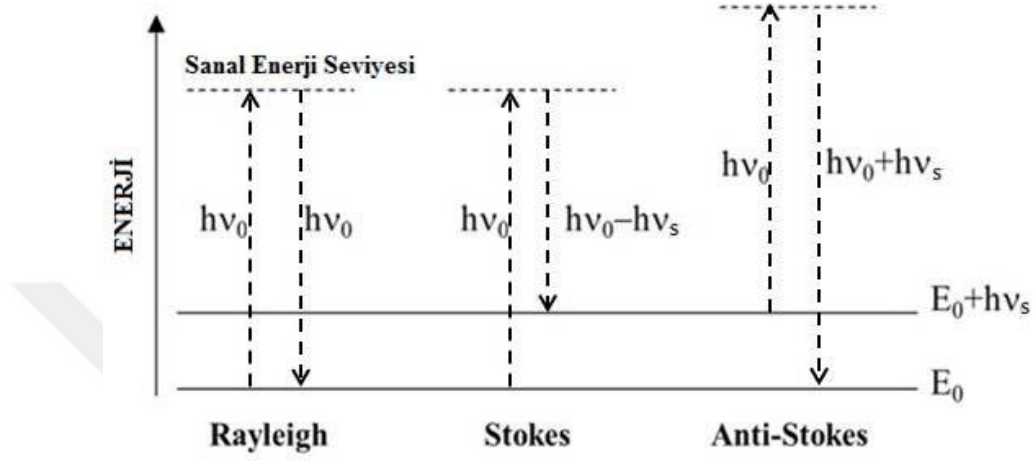
ν_0 , gelen fotonun frekansı; E_m , molekülün enerjisi; ν_s , saçılan fotonun frekansı; E_n , molekülün enerjisi olarak ifade edilmektedir.

Molekül ile foton etkileştiğinde elastik saçılma gerçekleşiyorsa, yani gelen foton molekülü bulunduğu titreşim enerji düzeyinden bir üst seviyeye uyardıktan sonra molekül tekrar ilk seviyesine geri dönüyorsa *Rayleigh Saçılması* gerçekleşir.

Eğer bu etkileşme nedeni ile taban titreşim düzeyinde bulunan molekül, bir üst düzeye geçip taban düzeyinden yüksek başka bir seviyeye geri dönerse bu *Stokes Saçılması* olarak adlandırılır. Saçılan fotonun frekansı gelen fotonun frekansından küçük olacaktır.

Uyarılmış titreşim düzeyinde bulunan bir molekül gelen foton ile etkileşerek daha yüksek kararsız bir düzeye uyarılarak, kısa bir süre sonra taban titreşim düzeyine dönerse *Anti-Stokes Saçılması* olarak adlandırılmaktadır. Bu saçılmada saçılan fotonun frekansı gelen fotonun frekansından büyük olacaktır [16].

Bu üç saçılma olayı da farklı olasılıklarla gerçekleşmektedir. Moleküller doğaları gereği en düşük titreşim enerji düzeyinde bulunmaktadırlar. Bu nedenle, Stokes saçılma olayı sonucunda elde edilen titreşim bandının gözlenebilme olasılığı, Anti-Stokes saçılma olayı sonucunda elde edilen titreşim bantlarının gözlenebilme olasılığından daha fazladır [32].



Şekil 3.5: Rayleigh, Stokes ve Anti-Stokes saçılması.

3.5. UV-VIS SPEKTROSKOPİSİ

Elektromanyetik spektrumda X-ışını ile görünür bölge arasında yer alan Ultraviyole (mor-üstü) bölge, 10-400 nm dalgaboyu aralığına sahiptir. Kendi içinde de iki kısma ayrılan bu bölge, 10-200 nm dalgaboyuna sahip bölge “uzak mor-üstü” olarak adlandırılırken, 200-400 nm bölgesi ise “yakın mor-üstü ya da mor-üstü” olarak adlandırılır. Mor-üstü bölgeden sonra görünür bölge yer almaktadır ve 400-700 nm dalgaboyu aralığına sahiptir [33].

Ultraviyole (UV, Mor-üstü) görünür bölge (Visible) enerjisinde bir ışınının madde ile etkileşmesi ile moleküllerde elektronik geçişler gözlemlenir. Gönderilen elektromanyetik ışınla, atomların dış yörüngelerindeki elektronların uyarılarak, temel halde bulunan titreşim ve dönme enerji seviyelerinden uyarılmış haldeki titreşim ve dönme enerji seviyelerine geçişler gerçekleşmektedir [34].

UV –Vis bölge enerjisine sahip ışınlar, molekül tarafından soğurulur ve elektronlar uyarılır. UV-Vis cihaz bu uyarılmayı bir spektruma dönüştürür. Elde edilen spektrumlar dalgaboyuna karşı soğurma şiddeti olarak çizdirilir [35].

Spektrometrelerde, sürekli radyasyon sağlayan bir ışık kaynağı bulunmalıdır. UV-Vis bölgede bu kaynaklar; döteryum (D_2), hidrojen (H_2), tungsten (W), ksenon (Xe), cıva buhar lambalarıdır.

En çok kullanılan lambalardan biri olan Hidrojen ve Döteryum lambaları, 180-380 nm dalgaboyu aralığında ışık yayar. Döteryum lambası daha dayanıklı olması, daha şiddetli ışın yayabilmesi nedeni ile hidrojen lambasına göre daha elverişlidir.

Tungsten flaman lambası, 320-3000 nm dalgaboyu aralığında, görünür bölge ve yakın IR bölgede, ışın yayar.

150-700 nm aralığında, UV-Vis bölgenin tamamında Xe ark lambası kullanılabilir.

Cıva buhar lambası da her iki bölgede ışın yapabilen bir ışık kaynağıdır.

UV-Vis spektrometrelerde cam veya kuartz örneğin hücresi kullanılır. Cam prizma görünür bölge için uygun bir örnek hücresidir. Düşük UV bölgeden gelen ışınları iyi geçiremez. Kuartz örnek hücresi, UV ışınlarını, görünür bölge ışınlarını iyi geçirebildiğinden, kullanımı cam örnek hücrelerine göre daha uygundur [36].

Bu tez çalışmasında Gly-His-Lys tripeptidi yüklü PLGA nanopartiküllerinin salım grafiği oluşturulurken Shimadzu UV-1280 UV-Vis Spektrofotometre kullanılmıştır.



Şekil 3.6: UV-Vis Spektrometre.

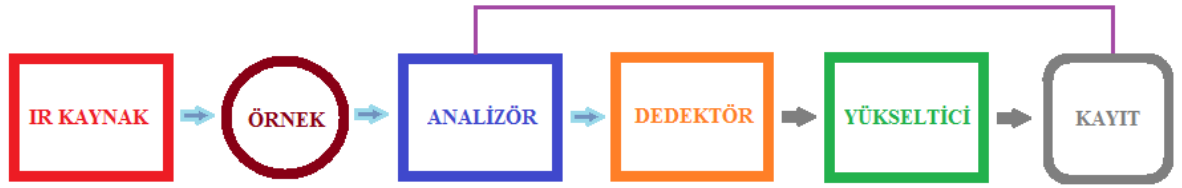
3.6. IR SPEKTROMETRELERİ

1940'lardan beri mevcut olan dispersif (kırınım ağı, prizma) aletler, kırmızı-altı spektrumları elde etmek için kullanılmıştır. Son yıllarda ise bir kırmızı-altı spektrum elde etmek için ağırlıklı olarak dispersif spektrometrelerin aksine Fourier-Transform (FT) Kırmızı-Altı (IR)

spektrometreler kullanılmaktadır ve Kırmızı-altı (infrared) spektrumlarının önemli ölçüde iyileşmesini sağlamıştır.

Kırmızı-altı spektroskopisi (IR Spektroskopisi) çok yönlü bir deneysel teknik olup bu teknik ile sıvı, katı veya gaz halindeki örneklerden ve çözeltilerden spektrum elde etmek nispeten daha kolaydır [21].

IR Spektroskopisi; kaynak, dispersif elemanlar, optikler, dedektör gibi birtakım bireysel bileşenlerin bir araya gelmesi ile oluşmuştur [16, 20].



Şekil 3.7: IR(Kırmızı-Altı) spektrometrenin blok diyagramı.

En genel olarak IR spektrometreleri aşağıdaki bölümlerden oluşmuştur.

Işık Kaynağı

Radyasyon kaynağı olarak 1500-1800 K sıcaklığına kadar ısıtılmış $4000-400\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki kırmızı-altı bölgede spektrum verebilen katı çubuklar (filamentler) kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Globalar Çubuğu: Eskiden yaygın olarak kullanılan bir radyasyon kaynağıdır. Boyu 50 mm, çapı 5 mm olup silisyum karbürden yapılır.

Nernst Çubuğu: Zirkonyum, itriyum ve erbiyum oksitlerinin bir karışımı olan Nernst çubuğu 20 mm uzunluğunda, 2 mm çapındadır. Bir Nernst çubuğu sadece yüksek sıcaklıklarda elektrik iletir.

Tungsten-Flaman Lambası: Yakın IR bölge olan $0,78\mu\text{m}-2,5\mu\text{m}$ dalgaboyu aralığında ışıma yapan bir kaynaktır.

Civa-ark Lambası: Uzak IR bölgede ($50\mu\text{m}$ dalgaboyu) ışıma yapan kaynaktır.

Nikrom tel: Uzun ömre sahip, akkor halde ısıtılabilen, %80 Nikel ve %20 Kromdan oluşan bir kaynaktır.

Örnek Hazırlama

IR spektroskopide katı örnekleri incelemek için kullanılan yöntemlerden en sık kullanılanı; alkali halojenür disklerdir. Yöntemin seçimi, incelenecek olan örneğin niteliğine bağlıdır. Alkali halojenür disklerin kullanılması, katı bir örneğin bir kuru alkali halid tozu ile karıştırılarak (1mg örnek – 100 mg alkali toz) 10 tonluk basınç altında bir disk haline getirilmesini içerir. Sıvı bir örnek ile çalışılıyorsa, oluşturulacak olan iki disk arasına bir damla damlatılarak incelenmesi sağlanabilir.

Alkali halid diskler için kullanılabilecek tuzlara örnek olarak; KBr, NaCl, CaF₂, CsI verilebilir. KBr tuzu 4000-400 cm⁻¹ dalgasayısına sahip IR bölgede soğurma yapmamaktadır.

Analizör (Monokromatör)

Monokromatörler yani dispersif elemanlar kaynaktan örnek üzerine gelen radyasyonu dalgaboylarına ayırmak için kullanılır. Prizma ve kırınım ağırları dispersif elemanlara örnek olarak verilebilir. Giriş yarığına düşen radyasyon dispersiyon elemanına aktarıldığında dağılım meydana gelir ve dağınık radyasyon daha sonra detektörde bulunan çıkış deliğine (slit) geri yansır.

Dedektör

Frekanslarına ayrılmış olan ışınım, dedektörler sayesinde elektrik sinyallerine dönüştürülür. Doğru dedektör tercihi çalışılacak dalgaboyu aralığı göz önünde bulundurularak yapılır. IR spektrometrelerinde kullanılan dedektörelere bazıları aşağıda verilmiştir.

Piroelektrik Dedektörler: Genellikle kullanılan bir dedektör türüdür. Sıcaklığa dayanıklı alkali halid bir pencerede döteryum triglisin sülfat (DTGS) içeren bir piroelektrik cihazdır. Piroelektrik malzemeler yalıtkan malzemelerdir.

Fotoiletken Dedektörler: Doped germanyum kullanan bu dedektörler, foton enerjisinin yaklaşık olarak 0.01 eV olduğu 77 cm⁻¹ dalgaboyları için kullanılabilir. Sıvı helyum sıcaklığında çalıştırılmalıdır.

Termal Dedektörler: Gelen ışıma enerjisini absorbe edip ısıya dönüştürerek bu ısının ölçülmesine dayalı bir çalışma prensibi vardır.

Yükseltici

Dedektör tarafından elektrik sinyallerine dönüştürülen ışının şiddetini artırır.

Kayıt

Son olarak şiddeti artan ışının frekansı çizdirilir, spektrum elde edilir.

Dispersif spektrometrelerin temel problemi, monokromatörüyle ilgilidir. Bu, giriş ve çıkışta bulunan dar yarıklar nedeni ile dedektöre ulaşan radyasyonun dalgaboyu aralığı bir çözünürlük genişliğine sınırlanır. Çok hızlı bir ölçümün gerekli olduğu örneklerde yetersiz kalırlar. Fourier Transform Infrared Spektrometrelerinde analizör olarak Michelson İnterferometresi kullanılmakta olup dispersif spektrometrelerin bu eksikliğini kapatmaktadır [16,20,21].

3.6.1. FT-IR (Fourier-Dönüşüm Infrared) Spektrometresi

Michelson interferometresi, FT-IR spektrometrelerinde yaygın olarak kullanılan bir optik tasarımıdır. Michelson interferometresi, bir sabit ve bir hareketli ayna ve ışın bölücünden oluşan optik bir sistemdir. Bir kırmızı-altı kaynaktan gelen ışın paralelleştirilir ve ışın bölücüye doğru yönlendirilir.

İdeal bir ışın bölücünün sahip olması gereken özellik, gelen ışığın %50'sini yansıtıp kalan %50'yi iletmek olmalıdır. Böylece optik bir yol yaratılır.

Bir optik yolda, ışın bölücünden %50'si yansıyan ışın sabit ayna tarafından tekrar yansıtılır, ışın bölücüye geri gönderilerek toplanır ve dedektörün okuması sağlanır. Aynı anda interferometrenin diğer yolunda diğer %50'si ışın bölücünden geçen ışın da ileri geri hareketli bir ayna tarafından yansıtılır, fakat bu, her zaman kendisine paralel olarak korunur. Hareketli aynanın ışını, aynı zamanda kısmen kaynağa geri iletilir ve ışın bölücüde toplanarak kısmen dedektöre yansır. Dedektöre ulaşan enerji, bu iki ışının toplamıdır. Işın ayırıcısının ortasından sabit aynaya olan mesafe ile ışın ayırıcısından hareketli aynaya olan mesafe aynı ise, bu durumda iki ışın eşit mesafelerde yol almış olacaktır. Fakat ikinci ayna hareket ettirildiği

takdirde, optik yol uzunlukları eşit olmayacaktır. Bu da iki ışın arasında bir gecikmeye ya da diğer adı ile bir optik yol farkı (δ) oluşmasına neden olacaktır. İki ışın arasındaki gecikme arttıkça dedektöre genel sinyal bir dizi maksimum ve minimumlar (yapıcı ve yıkıcı girişimler) oluşturacaktır.

Hareketli ayna d kadar hareket ettirildiği takdirde, hareketli aynaya giden ışın, yarı geçirgen ışın bölücüye kadar olan mesafeyi iki defa geçeceğinden, iki ışın arasındaki optik yol farkı $2d$ olacaktır. Yol farkının olmadığı durumda ise iki ışın aynı fazda üst üste binerek birbirlerini şiddetlendirecekler, yapıcı girişim meydana getirecekler ve dedektörde okunan şiddet $I(\delta)$ maksimum olacaktır.

Yapıcı girişim;

$$\delta = m\lambda, m=0,\pm1,\pm2,\pm3, \dots \quad (3.29)$$

gönderilen ışının dalgaboyunun tam katlarında meydana gelmektedir.

Hareketli ayna, $\lambda/4$ kadar hareket ettirilirse, optik yol farkındaki değişimi $\lambda/2$ olacaktır ve zıt fazlarda gelen dalgalar birbirlerini yok ederek yıkıcı girişim meydana getirecektir.

$$\delta = (m + 1/2) \lambda, m=0,\pm1,\pm2,\pm3, \dots \quad (3.30)$$

Hareketli ayna, bulunduğu bu konum üzerine bir $\lambda/4$ kadar daha hareket ettirilirse bu sefer aynı fazda gelen dalgalar birbirlerini güçlendirerek yapıcı girişim meydana getirecektir.

Michelson interferometresinden dedektöre gelen bu sinyaller *interferogram* olarak adlandırılır. Elde edilen interferogramda ışığın şiddeti (I) optik yol farkı (δ) ile ilişkilidir. İnterferogram için

$$I(\delta) = B(\nu) \cos\left(2\pi \frac{\delta}{\lambda}\right) \quad (3.31)$$

denklemini yazılabilir. Bu denklem, tek renkli (monokromatik) bir kaynak kullanıldığı durumlarda geçerlidir. Burada B , frekansın (ν) bir fonksiyonu olarak ifade edilen kaynak şiddetidir.

Dalgasayısı cinsinden ise;

$$I(\delta) = B(\bar{\nu}) \cos(2\pi\delta\bar{\nu}) \quad (3.32)$$

şeklinde ifade edilir.

Birden fazla frekans yayınlayan polikromatik bir kaynak için ise bu denklem, kaynağın kosinüs dalgalarının toplamı olarak;

$$I(\delta) = \int_0^\infty B(\bar{\nu}) \cos(2\pi\delta\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (3.33)$$

şeklindedir. Infrared kaynaklar sürekli ışın yayınlayabilen kaynaklar oldukları için, denklemde toplam sembolü yerine integral kullanılmalıdır. Optik yol farkına bağlı interferograma ait denklemin spektruma dönüştürülmesi “Fourier Dönüşümü” ile gerçekleştirilmektedir.

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^\infty I(\delta) \cos(2\pi\delta\bar{\nu}) d\delta \quad (3.34)$$

Bu ifadede, gelen ışınının her bir bileşeninin şiddeti yer almaktadır.



Şekil 3.8: FT-IR spektrometrelerinin blok diyagramı [16].

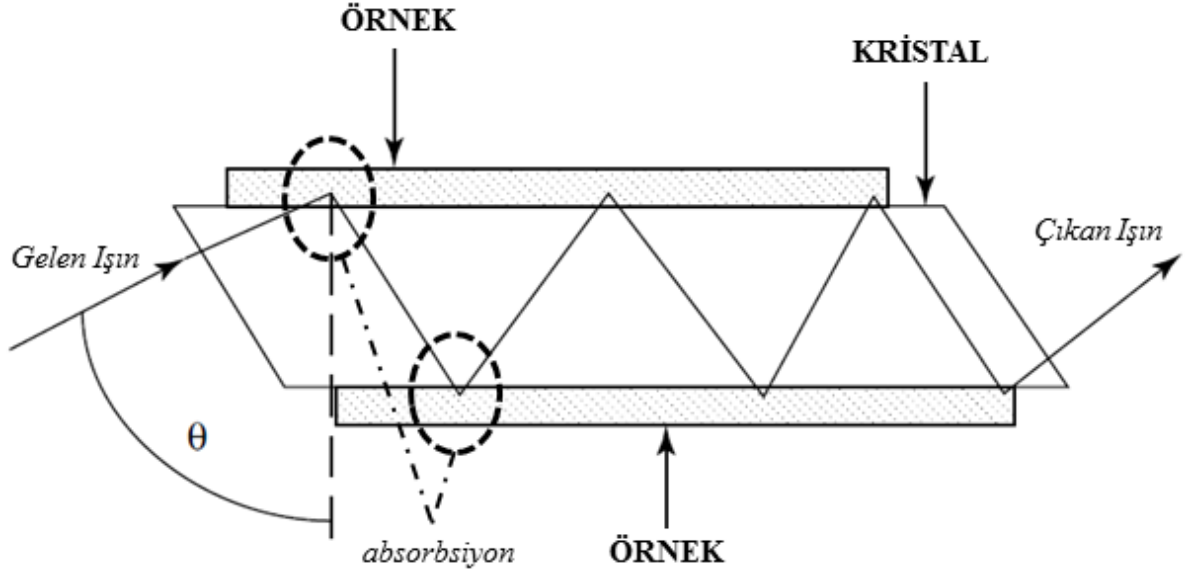
İnterferogram, matematiksel bir fonksiyondur. Bu hali ile yorumlamak mümkün değildir. Bir spektrumun elde edilebilmesi için, Fourier dönüşümü olarak bilinen bir dizi matematik tekniği uygulanarak, şiddete karşı dalgasayısı olarak ifade edilen *spektrumlara* dönüştürülür.

İnterferogram, tüm frekansların aynı anda ölçülebilmesinin bir sonucudur. Bu yüzden Fourier Transform infrared spektrometreler hızlı ölçüm alabilmektedir [16,18,37]. Bu tez çalışmasında Jasco 6300 FT-IR ve elmas kristale sahip ATR – FT-IR spektrometresi kullanılmıştır.

3.6.1.1. ATR – FT-IR Tekniği

Attenuated Total Reflectance (ATR) yani Zayıflatılmış Toplam Yansıtma Spektroskopisi tekniği, toplam iç yansıma temeline dayanmaktadır.

Gelen ışının bir kısmı, yansıtma yüzeyinin üzerinde bulunan ve yansıtma yüzeyi ile yakın temas halindeki örneğe nüfuz eder. Işınım örnek tarafından seçici olarak absorblanır. Çıkan zayıflamış ışın ölçülür ve spektrometre tarafından dalgaboyunun bir fonksiyonu olarak çizilerek örneğin absorbands spektrumu elde edilir.



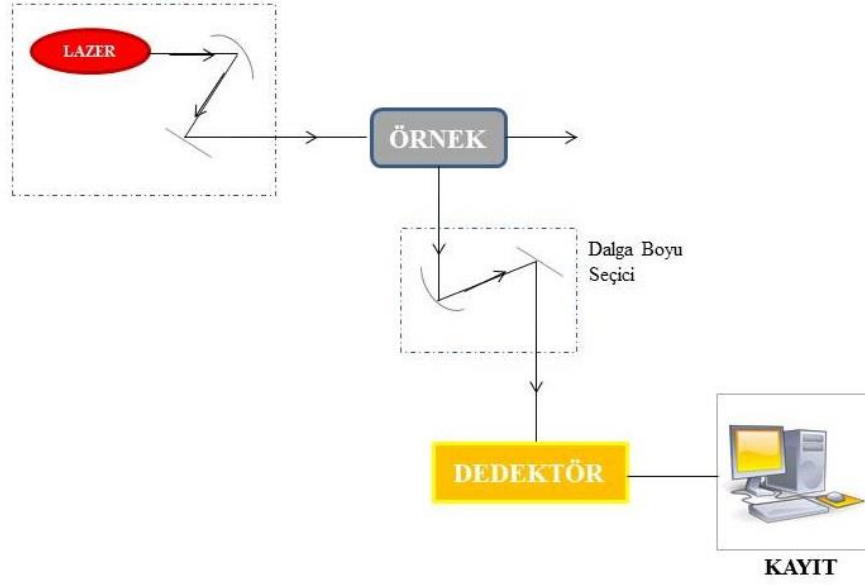
Şekil 3.9: ATR – FT-IR tekniği. Örnek ve örnek üzerine gelen ışının yönelimi.

ATR – FT-IR tekniğinde nüfuz etme derinliği gelen ışının dalgaboyunun, kristalin kırılma indisinin ve gelen ışının geliş açısının bir fonksiyonudur. ATR hücrelerinde kullanılan kristallerin çözünürlüğü suda düşük olup, çok yüksek bir kırılma indisine sahip olan çinko selenit (ZnSe), germanyum (Ge) ve talyum iyodür gibi malzemelerden yapılır [21].

3.7. RAMAN SPEKTROMETRESİ

Raman spektroskopisi; ultraviyole, görünür veya yakın Kırmızı-altı aralığında, molekülün soğurma bantlarına denk gelmeyen monokromatik (tek dalgaboylu) ışın ile bir örneğin ışınlanmasıyla ve örnekten saçılan ışının incelenmesine dayanan bir olaydır [30].

Bu tez çalışmasında Anabilim dalımızda bulunan NRS 3100 Dispersif Mikro Raman spektrometresi kullanılmaktadır. Bu spektrometrenin blog diagramı Şekil 3.10'da verilmektedir.



Şekil 3.10: Dispersif Raman Spektrometresi blok diyagramı.

Işık Kaynağı

Modern spektrometrelerde ışık kaynağı olarak lazer kullanılır çünkü şiddeti yüksektir ve ışık örnekteki küçük bir noktaya kolayca odaklanabilir. Raman spektrometrelerinde gaz lazerleri, özellikle 514 nm ve 488 nm'de iki emisyon dalgaboyuna sahip olan argon lazeri ile birlikte FT-Raman spektrometresinde 1064 nm'lik bir dalgaboyuna sahip Nd:YAG lazerleri kullanılmaktadır. Yakın zamanda diyot lazerler de popülerlik kazanmış olup, özellikle 976, 830 ve 785 nm dalgaboyuna sahip olanlar popülerdir [38]. NRS 3100 Dispersif Mikro Raman spektrometresinde iki lazer kaynağı bulunmaktadır. Bunlar, 532 nm dalgaboyuna sahip ND:YAG lazeri ve 785 nm dalgaboyuna sahip olan kırmızı diot lazerdir.

Örnek Hazırlama

Raman spektroskopisi tekniğinde, Kırmızı-Altı spektroskopisi tekniğine nazaran örnek hazırlanması daha kolaydır. Katı örnekler, ezilip toz haline getirilerek ve lam veya lamel üzerine yerleştirilir ve lazer ışın demetleri üzerlerine düşürülür. Raman spektroskopisi tekniğinde sıvı örneklerle çalışmak güvenlidir. Bunun nedeni lazerin çok zayıf bir saçılma vermesidir.

Dalgaboyu Seçici

Dalgaboyu ayırıcıları (dalgaboyu seçicileri) olarak grating yani kırınım ağları kullanılır. Bu sistemlerin ayırma gücü (rezolüsyon) yaklaşık olarak $2\text{-}4\text{ cm}^{-1}$ dir.

NRS 3100 Dispersif Mikro Raman spektrometresinde yapısında 1800 çizgi/mm, 1200 çizgi/mm ve 600 çizgi/mm olmak üzere 3 farklı kırınım ağı (grating) kullanılabilmektedir.

Dedektör

Raman spektrometrelerinde, fotoçoğaltıcı tüpler ya da CCD dedektörler kullanılmaktadır. NRS 3100 Dispersif Mikro Raman spektrometresi CCD dedektör kullanır.

Raman spektroskopisinde elde edilen spektrumlar ile Kırmızı-altı spektroskopisinde elde edilen spektrumlar karşılaştırıldığında birbirlerinin tamamlayıcısı olduğu görülebilmektedir. Kırmızı-altı spektrumda gözlenemeyen zayıf titreşimsel geçişlerin karşılık geldiği bantlar Raman spektrumlarında gözlenebilmektedir. IR'ye göre Raman spektroskopisinin de avantajları vardır. Kullanılan malzemede bir sınırlama yoktur, ışık kaynağı olarak UV, Görünür ve yakın IR bölgedeki ışın kaynaklarının kullanılabilir olması, sulu ortamda rahatlıkla çalışılabilmesi gibi... [16].



Şekil 3.11: NRS 3100 Dispersif Mikro Raman spektrometresi (solda) ve Jasco 6300 FT-IR Spektrometresi (sağda).

3.8. İKİ ATOMLU MOLEKÜLLERİN TİTREŞİM ENERJİ SEVİYELERİ

Bir araya getirilen iki atomda, pozitif yüke sahip çekirdekler arasında bir itme ve negatif yüke sahip elektronlar arasında da bir itme kuvveti meydana gelecektir. Aynı zamanda bir atomun

elektronları ve diğer atomun çekirdeği arasında da bir çekim kuvveti meydana gelecektir. Bu itme ve çekme kuvvetlerinin dengelendiği çekirdekler arası mesafede, minimum enerjiye sahip bir molekül oluşacaktır. Bu mesafe “denge uzaklığı ya da bağ uzunluğu” olarak adlandırılır. Molekül her zaman titreşim halindedir. Bir moleküldeki atomlar, denge noktası etrafında titreşirler ve bu titreşim durdurulamaz.

Moleküllerin titreşimlerinin enerjilerini iki farklı yaklaşım ile incelemek mümkündür. Bunlar harmonik titreşici yaklaşımı ve anharmonik titreşici yaklaşımdır [22].

3.8.1. Harmonik Titreşici Yaklaşımı

Harmonik titreşici yaklaşımına göre; iki atomlu bir molekülün çekirdekleri arasında yayların var olduğu varsayılır. Bu varsayılan yayların kuvvet sabitleri k , indirgenmiş kütleleri μ olarak verilmektedir. Bu modele göre titreşim frekansı,

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.35)$$

$$\omega = 2\pi\nu = \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.36)$$

şeklinde verilir.

Denge konumundan ayrılıp tekrar geri dönen sistem için geri çağırıcı kuvvet (Hook yasası);

$$\text{Geri çağırıcı kuvvet} = -kx \quad (3.37)$$

x yer değişim miktarı, R_d mesafesinden R mesafesine kadar olan yer değişim farkına denk gelmektedir.

$$x = R - R_d \quad (3.38)$$

Bu sistemin potansiyel enerjisi ise;

$$V = - \int F dx = k \int x dx = \frac{1}{2} kx^2 \quad (3.39)$$

olarak elde edilir.

Denge noktası etrafındaki x küçük yer değişimleri için potansiyel enerji ifadesi Taylor serisine açılırsa;

$$V(x) = V(0) + \left(\frac{dV}{dx}\right)_0 x + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)_0 x^2 + \frac{1}{3!} \left(\frac{d^3V}{dx^3}\right)_0 x^3 + \dots \quad (3.40)$$

elde edilir.

$x=0$ denge noktasındaki türev denklemde 0 alt indisi olarak gösterilmiştir. Bu denklemde birinci türev yani $\left(\frac{dV}{dx}\right)_0$ ifadesi potansiyel enerji eğrisinin (Şekil 3.12) minimuma gittiği yer olduğu için sıfır olup bununla birlikte $V(0) = 0$ alınabilir. $x=0$ civarında meydana gelen küçük yer değiştirmeler için de üçüncü türev ihmal edilmektedir [16].

Denklemin son hali,

$$V(x) = \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)_0 x^2 \quad (3.41)$$

olacaktır.

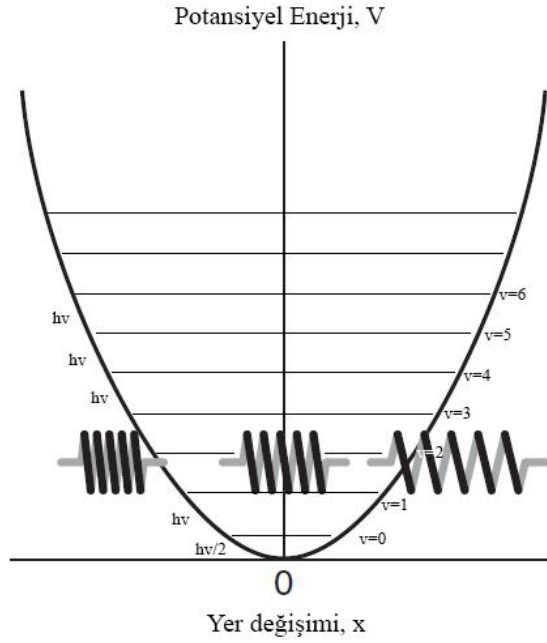
Denklem (3.39) ile (3.41) karşılaştırıldığında $k = \left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)_0$ olduğu görülmektedir.

Böylece tek boyutlu sistemdeki parçacığın potansiyel enerjisi, [22,31];

$$V(x) = \frac{1}{2} kx^2 \quad (3.42)$$

olacaktır.

Bu $V(x)$ potansiyel enerji ifadesi, ikinci dereceden bir parabol eğrisine ($y = ax^2$) karşılık gelmektedir ve harmonik hareket için “parabolik potansiyel enerji” olarak tanımlanmaktadır [22].



Şekil 3.12: Harmonik yaklaşım altında potansiyel enerji eğrisi.

m_a ve m_b kütlelerine sahip iki atomlu bir molekül için Hamiltonyeni yazalım.

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(x) \quad (3.43)$$

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m_a} \frac{d^2}{dx_a^2} - \frac{\hbar^2}{2m_b} \frac{d^2}{dx_b^2} + \frac{1}{2} kx^2 \quad (3.44)$$

m_a ve m_b kütlelerini indirgenmiş kütle olarak yazarsak, Hamiltonyeni toplam şeklinde ifade edebiliriz.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_a} + \frac{1}{m_b} \quad (3.45)$$

$$H = -\frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{d^2}{dx^2} + \frac{1}{2} kx^2 \quad (3.46)$$

Bu Hamiltonyen çözülerek, harmonik titreşici yaklaşımına göre enerji düzeyleri elde edilir ve denklem (3.47) ve (3.48)'deki gibi verilir.

$$E_{tit} = \hbar\omega \left(\vartheta + \frac{1}{2} \right) \quad \vartheta = 0, 1, 2, \dots \quad (3.47)$$

$$E_{tit} = h\nu \left(\vartheta + \frac{1}{2} \right) \quad \vartheta = 0, 1, 2, \dots \quad (3.48)$$

Burada $\vartheta = 0, 1, 2, \dots$ titreşimsel kuantum sayılarıdır. $\vartheta = 0$ değerinde bile bir E_{tit} ifadesi sıfırdan farklı değer almaktadır. Bu titreşim hareketinin hiçbir zaman durmadığı anlamına gelmektedir.

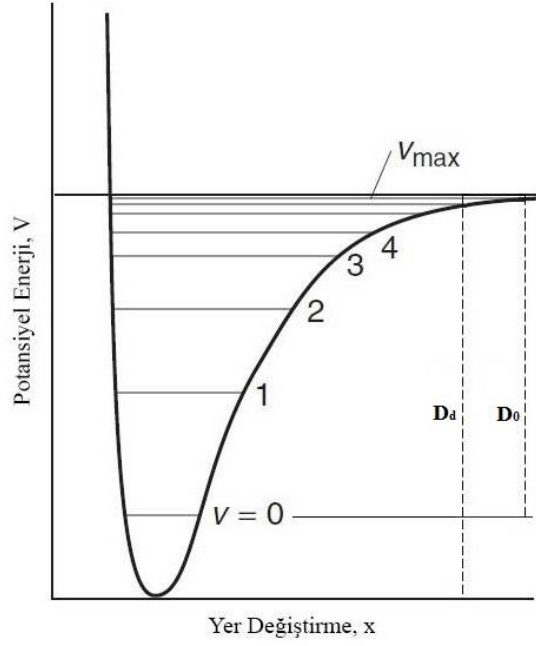
3.8.2. Anharmonik Titreşici Yaklaşımı

Harmonik titreşici yaklaşımda molekülün peş peşe gelen her iki enerji seviyesi arasındaki fark $h\nu$ kadardır, yani enerji seviyeleri arasındaki farklar eşittir. Bu yaklaşımda molekülün sonsuz bir potansiyel kuyusu içerisinde olduğu düşünülür ve molekülün hiçbir zaman atomlarına ayrılamayacağı, bu kuyudan çıkamayacağı söylenir. Bu nedenle harmonik yaklaşım ile molekülün sahip olduğu gerçek titreşim geçişlerinin frekansları elde edilemez [16,39].

Harmonik titreşici yaklaşımı, molekülün atomlarına ayrışmasına izin vermez. Fakat gerçekte molekül atomlarına ayrışabilmektedir.

Anharmonik titreşici yaklaşımı, moleküle dışarıdan belli bir enerji verildiği durumda molekülü oluşturan atomlar arasındaki kimyasal bağın kırılarak, molekülün ayrışacağını söylemektedir. Aynı zamanda anharmonik titreşici yaklaşımında, çekirdekler arasındaki mesafenin artması ile bu çekirdekler arasındaki kimyasal bağın giderek zayıflayacağı ve bu bağın kırılacağı ifade edilmektedir. Harmonik titreşici yaklaşımı ve anharmonik titreşici yaklaşımı karşılaştırıldığında, anharmonik titreşici yaklaşımının, moleküllerin esas doğası ile daha uyumlu olduğu açıkça görülmektedir [31].

Bu gerçeklikler altında iki atomlu bir moleküle ait gerçek potansiyel enerji eğrisi, Şekil 3.12’de çizilen potansiyel enerji eğrisi gibi parabolik olmayacaktır.



Şekil 3.13: Harmonik olmayan yaklaşım altında potansiyel enerji eğrisi.

Anharmonik titreşici yaklaşımını açıklamak için potansiyel enerjinin tanımında, deneylerle oldukça iyi uyuşan Morse potansiyeli yaklaşımı kullanılır:

$$V = D_d \left[1 - e^{-a(R-R_d)} \right]^2 \quad (3.49)$$

Denklemden D_d , ayrışma enerjisini tanımlarken, a , incelenen moleküle ait bir niceliktir.

Mors potansiyeli ve dalgasayısı cinsinden anharmonik titreşici modeli için enerji ifadesi yazılırsa;

$$E_{tit} = \left(\vartheta + \frac{1}{2} \right) h\nu - \left(\vartheta + \frac{1}{2} \right)^2 h\nu X_d \quad (3.50)$$

elde edilir. Burada X_d bir anharmoniklik sabitidir.

X_d her zaman pozitif olan bir sabit olduğu bilindiğine göre, anharmonik titreşici yaklaşımında, ϑ titreşim kuantum sayısı ile titreşim frekansında bir azalmaya götürecektir. Harmonik titreşici yaklaşımda olduğu gibi titreşim enerji seviyeleri arasındaki mesafe eşit olmayıp seviyeler arttıkça, seviyeler arasındaki mesafeler azalacaktır.

Sıfır noktası enerjisi $\vartheta = 0$ için;

$$E_0 = \frac{1}{2}h\nu - \frac{1}{4}h\nu X_d \quad (3.51)$$

elde edilecektir.

Harmonik titreşicinin sıfır nokta enerjisi anharmonik titreşiciden biraz daha fazladır. Anharmonik titreşici yaklaşımı altında potansiyel enerji eğrisi simetrik değildir. ϑ titreşim kuantum sayısı ile enerji seviyelerinin gerçek değerine daha yakın değerler elde edilecektir. Bu da deneysel sonuçlarla uyumlu olmasını sağlamaktadır.

Potansiyel enerji eğrisinde gösterilen D_d enerjisi, bağ seviyesi olup bu nokta molekülün spektroskopik ayrışma enerjisini ifade eder ve “*ayrışma sınır süreklilik bölgesi*” şeklinde adlandırılır.

D_0 , deneysel olarak ölçülmüş kimyasal ayrışma enerjisidir. Molekülün ayrışma sınırı ile potansiyel enerji eğrisinin sıfır noktası ile arasındaki farka eşittir.

3.9. BORN-OPPENHEIMER YAKLAŞIKLIĞI

Bir moleküler sistem için, dalga fonksiyonu Ψ sırasıyla $\mathbf{r}$ ve $\mathbf{R}$ olarak atanan, molekül içindeki elektronların ve çekirdeklerin konumlarının bir fonksiyonudur. Bu sistemin Hamiltonyeni kinetik ve potansiyel enerji terimlerinden meydana gelir.

$$\mathbf{H} = \mathbf{T} + \mathbf{V} \quad (3.52)$$

Kinetik enerji terimini açılırsa, molekül içindeki tüm parçacıkların ∇^2 toplamı olduğu görülür:

$$\mathbf{T} = -\frac{h^2}{8\pi^2} \sum_k \frac{1}{m_k} \left(\frac{\partial^2}{\partial x_k^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_k^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_k^2} \right) \quad (3.53)$$

Potansiyel enerji terimi ise, tüm yüklü parçacıklar arasındaki Coulomb itmesini ifade eder:

$$\mathbf{V} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_j \sum_{i < j} \frac{e_j e_i}{\Delta r_{ji}} \quad (3.54)$$

Bu denklemde Δr_{ji} iki parçacık arasındaki uzaklık olup, j ve i parçacıklarının sahip olduğu yükler e_j ve e_i olarak tanımlanır. Elektronlar için yük $-e$ ile ifade edilirken, çekirdekler için ise Z_e ’dir (Z: atom numarası). Böylece,

$$V = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left(-\sum_i^{elek.} \sum_I^{çek.} \left(\frac{Z_I e^2}{\Delta r_{iI}} \right) + \sum_i^{elek.} \sum_{j<i}^{elek.} \left(\frac{e^2}{\Delta r_{ij}} \right) + \sum_I^{çek.} \sum_{J<I}^{çek.} \left(\frac{Z_I Z_J e^2}{\Delta R_{IJ}} \right) \right) \quad (3.55)$$

İlk terim elektron-çekirdek çekim, ikinci terim elektron-elektron itme ve üçüncü terim ise çekirdek-çekirdek itme potansiyel enerji terimlerini göstermektedir [40].

Born-Oppenheimer yaklaşımı, Schrödinger denkleminin çözümünü basitleştirmek için kullanılan birkaç yaklaşımdan ilkidir. Çekirdek ve elektronik hareketleri birbirinden ayırarak genel moleküler problemi basitleştirir. Bütün moleküler yapı hesaplamalarında, Born-Oppenheimer yaklaşımını benimsemektedir.

Çekirdekler elektronlara göre çok yavaş hareket eder ve çekirdeğin kütlesi bir elektronunkinden binlerce kat daha fazladır. Böylelikle bu yaklaşımda, bir elektrondan çok daha ağır olan çekirdeklerin nispeten yavaş hareket ettiği ve elektronlar etrafta hareket ederken, çekirdeklerin ise sabit olarak kabul edilebileceği varsayılmaktadır.

Böylece, bir moleküler sistem içindeki elektronların dağılımı, çekirdeklerin pozisyonlarına bağlı olup hızlarına bağlı değildir. Bir başka deyişle, çekirdekler elektronlara göre sabitlenmiş ve elektronik hareketler sabit çekirdeğin bir alanında meydana geldiği şeklinde tanımlanabilir [22,40].

Tüm Hamiltonyen;

$$H = T_{elek.}(\mathbf{r}) + T_{çek.}(\mathbf{R}) + V_{çek.-elek.}(\mathbf{R}, \mathbf{r}) + V_{elek.}(\mathbf{r}) + V_{çek.}(\mathbf{R}) \quad (3.56)$$

BO yaklaşımı ile iki parçalı bu problem birbirlerinden bağımsız olarak çözülebilir, böylece çekirdeklerin sahip olduğu kinetik enerji terimini ihmal ederek bir elektronik Hamiltonyen yazabiliriz:

$$H_{elek.} = -\frac{1}{2} \sum_i^{elek.} \left(\frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2} \right) - \sum_i^{elek.} \sum_I^{çek.} \left(\frac{Z_I}{|\mathbf{R}_I - \mathbf{r}_i|} \right) + \sum_i^{elek.} \sum_{j<i}^{elek.} \left(\frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} \right) + \sum_I^{çek.} \sum_{J<I}^{çek.} \left(\frac{Z_I Z_J}{|\mathbf{R}_I - \mathbf{R}_J|} \right) \quad (3.57)$$

Yazılan bu Hamiltonyen, sabit çekirdek alanında elektronların hareketini açıklar.

$$H_{elek} \psi_{elek}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = E_{eff}(\mathbf{R}) \psi_{elek}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \quad (3.58)$$

Elektronik dalga fonksiyonu için (ψ_{elek}) bu denklemin çözümü bize çekirdek koordinatlarına bağlı E_{eff} 'i yani efektif çekirdek potansiyel fonksiyonunu verir ve sabit kabul edilen $V_{\text{çek}}$ (çekirdek çekirdek itme potansiyel enerjisi) bu sistemin potansiyel enerji yüzeyini tanımlar.

Çekirdek için E_{eff} üzerinden Hamiltonyeni yazmak istersek:

$$H_{\text{çek}} = T_{\text{çek}}(R) + E_{eff}(R) + V_{\text{çek}} \quad (3.59)$$

elde ederiz [41].

Bir moleküler sistemin Hamiltonyen terimi elektronik ve çekirdek enerji terimlerinin toplamı şeklinde yazılabilmektedir. Bununla birlikte bir molekülün dalga fonksiyonu ise tüm elektron ve çekirdekler için verilen dalga fonksiyonlarının çarpımları şeklinde olmalıdır.

Molekülün çekirdek hareketi, dönü, titreşim ve öteleme hareketlerini barındırır ve bu üç enerji terimi için dalga fonksiyonu yazılabilmektedir. Bu terimler içinde öteleme hareketi sürekli enerji değerleri alırken, titreşim ve dönü hareketleri süreksiz (kuantize) enerji değerleri alırlar ve kuantizedirler. Çekirdeğin öteleme enerjisi, molekülün herhangi bir hıza sahip olabileceği anlamına gelmektedir. Bu nedenle kuvantize değildir ve ihmal edilebilir.

Molekülün sahip olduğu toplam enerji, Born-Oppenheimer Yaklaşımı altında elektron ve çekirdeğin toplamı şeklinde yazılabilmektedir.

$$E_{\text{molekül}} = E_e + E_{\text{çek}} \quad (3.60)$$

Çekirdeğin titreşim ve dönü enerjileri etkileşim içerisindedir. Fakat bu enerjiler arasındaki fark çok büyük olduğundan birbirleri ile olan etkileşimler ihmal edilebilir ve ayrı enerji terimleri olarak yazılabilmektedir [16, 18].

$$E_{\text{molekül}} = E_{\text{elek.}} + E_{\text{tit.}} + E_{\text{dönü}} \quad (3.61)$$

3.10.MOLEKÜLER ENERJİNİN HESAPLANMASI

Küçük moleküllerden büyük moleküllere, sistemin enerjisini hesaplamak için birkaç yöntem bulunmaktadır. Bunlar Moleküler Mekanik, Moleküler Dinamik yöntemler ile birlikte, elektron etkileşimlerini de hesaba katan Kuantum Mekaniksel yöntemlerdir.

3.10.1. Moleküler Mekanik Yöntemler

Moleküler Mekanik (MM) yöntemler, molekül sistemlerini modellemek için klasik mekanik yasalarını kullanmaktadır. Born-Oppenheimer yaklaşıklığı altında tüm sistemlerin potansiyel enerjisi, çekirdek koordinatlarının bir fonksiyonu olarak hesaplanır, elektronlar dikkate alınmamaktadır.

Moleküler mekanik hesaplamalar, küçük moleküllerin yanı sıra özellikle çok büyük biyolojik sistemleri incelemek için de kullanılmaktadır.

Bu hesaplama yöntemi yalnızca çekirdekleri hesaba kattığı için, oldukça hızlı bir şekilde temel halde bulunan sistemin enerjisini hesaplayabilmektedir. Fakat elektron etkileşimleri hesaplamada yer almadığı için, elektronik etkileşimlerin önem kazandığı kimyasal problemlere çözüm getirememektedir.

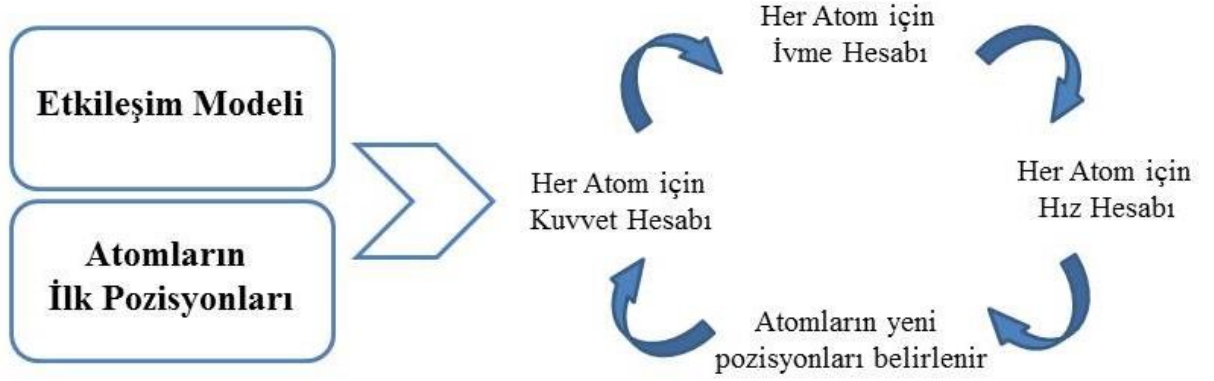
MM için kullanılan birkaç program şunlardır: AMBER, CHARMM, HyperChem, LAMMPS... [16].

3.10.2. Moleküler Dinamik Yöntemler

Moleküler Dinamik (MD) yöntem, Newton'un fiziğine göre atomların ve moleküllerin etkileşimini ve hareketini incelemek için kullanılan fiziksel bir yöntemdir. Bunun için molekül içi ve moleküller arası etkileşimleri de hesaba katmaktadır. MD yöntem, başlangıç durumu bilinen sistemin, bir süre sonraki yeni durumunun fiziksel ve matematiksel denklemler ile belirlenerek, moleküler yapı-fonksiyon-hareket ilişkisi ile sistemin zamana göre gösterdiği davranışlarının incelenmesini mümkün kılmaktadır [42].

MD yöntemin temel prensibinde, N parçacığa sahip bir sistem için Newton'un hareket denklemi ($F=ma$) çok küçük zaman aralıkları için çözülmektedir. Sistemdeki herhangi bir parçacığa (*i*. parçacık olsun) etki eden kuvvet, sistemdeki diğer parçacıkların o parçacığa

uyguladığı kuvvetler toplamı olarak hesaplanmaktadır. Bu kuvvet ifadesinden, ivme ve hız ifadesine geçilerek parçacığın ivmesi ve hızı, elde edilen ivme ve hız ifadesinden de parçacığının yeni konumu hesaplanır ve yeni konumdaki parçacık için kuvvet ve enerji hesabı yapılmaktadır. Bu hesaplamalar sürekli tekrarlanarak, çok parçacıklı sistemin zaman içerisinde değişen davranışları belirlenmektedir [43].



Şekil 3.14: MD yöntem ile hesaplama şeması.

$$\mathbf{F}_i = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} \quad (i=1, 2, 3, \dots, N) \quad (3.62)$$

i . atomun konumu ve kütlesi sırası ile $\mathbf{r}_i$ ve m_i ile ifade edilmektedir.

Kuvvet ifadesi, aynı zamanda potansiyel enerjinin negatif gradyantına eşittir:

$$\mathbf{F}_i = -\vec{\nabla}_i V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) \quad (3.63)$$

(3.62) ve (3.63) denklemleri karşılaştırıldığında;

$$-\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i} = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2}$$

denklemini elde edilir. Hareket denkleminin çözümünden aşağıdaki denklemlere ulaşılır.

$$\mathbf{a} = \frac{\mathbf{F}}{m} \quad (3.64)$$

$$\mathbf{v} = \mathbf{v}_0 + \mathbf{a}t \quad (3.65)$$

$$\mathbf{x} = \mathbf{x}_0 + \mathbf{v}_0 t + \frac{1}{2} \mathbf{a}t^2 \quad (3.66)$$

(3.64), (3.65) ve (3.66) eşitlikleri, yörünge hesaplamalarının yapılabilmesi için atomların başlangıç konumlarının, başlangıç hız dağılımlarının ve potansiyel enerjinin gradyanı ile elde edilebilen ivmelerinin bilgisine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

MD yöntem, bir sistemin gözlenmesi zor ya da imkânsız deneysel davranışlarını incelemeye olanak sağlamaktadır. Sistemin sahip olduğu parçacık sayısı (N), sıcaklık (T), basınç (P) gibi parametreler, o sistemin termodinamik durumunu vermektedir. MD simülasyon yönteminde kullanılan topluluklardan birkaçı Tablo 3.1’de verilmektedir [44];

Tablo 3.1: Moleküler Dinamik (MD) simülasyonda kullanılan topluluklardan birkaçı.

Topluluk		
Mikrokanonik Topluluk <i>NVE</i>	- Sabit Parçacık Sayısı (N) - Sabit Hacim (V) - Sabit Enerji (E)	İzole edilmiş sistemlere karşılık gelmektedir.
Kanonik Topluluk <i>NVT</i>	- Sabit Parçacık Sayısı (N) - Sabit Hacim (V) - Sabit Sıcaklık (T)	Bütün sistemler için kullanılabilir.
İzobarik-İzotermal Topluluk <i>NPT</i>	- Sabit Parçacık Sayısı (N) - Sabit Basınç (P) - Sabit Sıcaklık (T)	Bütün sistemler için kullanılabilir.

Bu tez çalışmasında GHK tripeptidinin su ve metanol ortamında moleküler dinamik simülasyonu, NVT ve NPT toplulukları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

MD yöntemde, bağ uzunluklarının, açı bükülmelerinin ve bağ burulmalarının zamana göre değişimi ile birlikte Van der Waals ve atomlar arasındaki elektrostatik etkileşimler göz önünde bulundurulmalıdır. Bu enerjileri tanımlamak için bir “kuvvet alanı” kullanılmaktadır. Kuvvet alanı, etkileşen atomlar arasındaki kuvvetleri tahmin etmek ve sistemin toplam enerjisini hesaplamak için kullanılan bir potansiyel enerji fonksiyonudur [45]. Böylece kullanılan bu kuvvet alanları ile birlikte, atomlar arasında meydana gelen etkileşimler gerçeğe uygun olarak modellenir ve deneysel veriler ile uyumlu sonuçlar elde edilir.

Kuvvet alanı potansiyel enerji fonksiyonu, molekül içi ve moleküller arası etkileşme potansiyellerini içermektedir. Molekül içi terimler; bağ gerilme, açı bükülme ve torsiyon

potansiyeli terimlerini içermektedir. Moleküller arası terimler ise elektrostatik etkileşimler ve Van der Waals etkileşimlerinden gelmektedir [46,47].

$$U_{\text{molekül içi}} = U_{\text{bağ}} + U_{\text{açı}} + U_{\text{torsiyon}} \quad (3.67)$$

$$U_{\text{moleküller arası}} = U_{\text{elek.}} + U_{\text{vdW}} \quad (3.68)$$

Bağ Gerilme Potansiyel Enerjisi;

Kimyasal bağ ile bağlanan iki atom arasındaki etkileşim “bağ gerilme potansiyeli” ile belirlenir. Enerji fonksiyonu, bağ türü ve bağı yapan atomlara bağlı bir fonksiyondur. İki atom arasında bir yay varmış gibi düşünüldüğü takdirde, enerji ifadesinde görülen katsayı ($k_{i,j}^b$), yay sabitine denk gelmektedir.

$$U_{\text{bağ}} = \sum_{i,j} k_{i,j}^b (r_{i,j} - r_{i,j}^0)^2 \quad (3.69)$$

$r_{i,j}^0$; denge anında i. ve j. atomlar arasındaki mesafe

$r_{i,j}$; anlık yer değişiminde i. ve j. atomlar arasındaki mesafe

Açı Bükülme Potansiyel Enerjisi;

Kimyasal bağlar ile bağlanan atomların iki bağ ve en az 3 atom arasındaki etkileşim “açı bükülme potansiyeli” ile verilir. Bağ gerilme potansiyel enerjisinde olduğu gibi, iki bağ arasında bir yay varmış gibi düşünülür ve bu yayın sabiti de “potansiyel fonksiyon katsayısı, ($k_{i,j,k}^a$)” olarak ifade edilir.

$$U_{\text{açı}} = \sum_{i,j,k} k_{i,j,k}^a (\theta_{i,j,k} - \theta_{i,j,k}^0)^2 \quad (3.70)$$

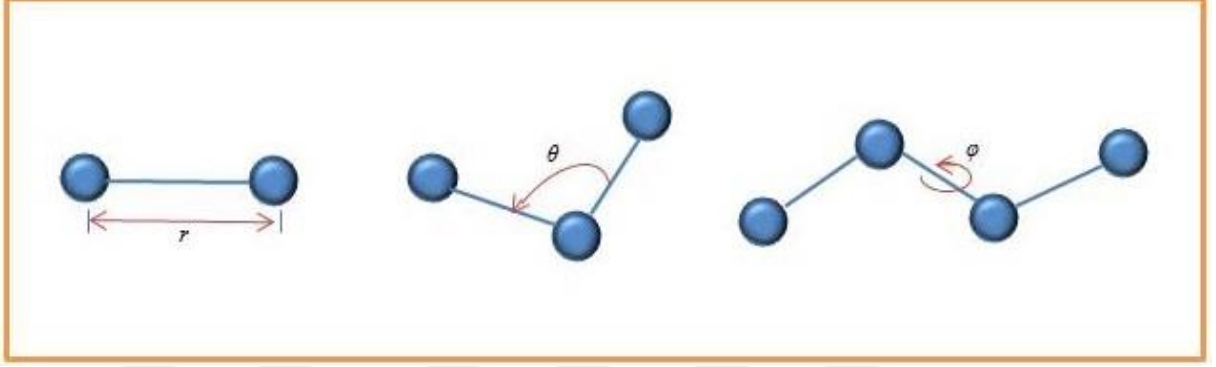
Burada $\theta_{i,j,k}$ anlık açı değeri, $\theta_{i,j,k}^0$ denge anındaki açı değeridir.

Torsiyon Potansiyel Enerjisi;

Molekül içindeki tekli kimyasal bağlar üzerinde burulmalar (torsiyon) meydana gelebilmektedir ve bu burulmaların molekülün toplam enerjisine katkısı vardır. (Torsiyon potansiyel enerjisi Bölüm 3.12.2.2’de ayrıntılı olarak verilmektedir).

$$U_{torsiyon} = \sum_{i,j,k,l} k_{i,j,k,l}^t [1 + \cos(n\varphi_{i,j,k,l} - \varphi_{i,j,k,l}^0)] \quad (3.71)$$

$k_{i,j,k,l}^t$, kuvvet sabiti; $\varphi_{i,j,k,l}^0$ ve $\varphi_{i,j,k,l}$ dört atom arasındaki denge anındaki ve anlık bağ burulmalarıdır.



Şekil 3.15: Bağ gerilmesi, açı bükülmesi ve torsiyon (burulma).

Elektrostatik ve Van der Waals etkileşim potansiyelleri moleküller arası potansiyel enerjiye katkı sağlamaktadır. Elektrostatik potansiyel enerji ve Van der Waals potansiyel enerjisi 3.12.2.3 ve 3.12.2.4 bölümlerinde ayrıntılı olarak anlatılmaktadır.

Elektrostatik Etkileşim Potansiyeli;

Yüklü iki atom arasındaki potansiyel enerji, elektrostatik potansiyel ile verilmektedir. Bu potansiyel, atomların yükleri ile doğru orantıda iken, atomlar arasındaki mesafe ile ters orantılıdır. Coulomb potansiyeli ile verilen elektrostatik etkileşimler uzun menzilli etkileşimlerdir.

$$U_{elek.} = K \sum_{i,j=1}^N \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (3.72)$$

Bu denklemde; ϵ ; elektriksel bir sabittir. q_i ve q_j , i . ve j . atomlara ait yükler ve r_{ij} atomlar arasındaki mesafedir. K ise kcal/mol cinsinden enerjiyi ifade etmek için kullanılan bir sabittir.

Van der Waals Etkileşim Potansiyeli;

Aralarında bağ olmayan atomlar arasında da bir etkileşim mevcuttur ve bu etkileşim bir atom etrafındaki elektron bulutunun dağılımında meydana gelen dalgalanmalar nedeni ile simetrik durumundan asimetrik duruma geçerek, anlık bir dipol oluşturarak çevre atomları da

etkilemesinden kaynaklanmaktadır. Lennard- Jones Potansiyeli ile verilen Van der Waals etkileşim potansiyeli kısa menzilli bir etkileşimdir.

$$U_{vdW} = \sum_{i,j=1} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (3.73)$$

Bu denklemde; σ_{ij} , parçacıklar arasındaki potansiyelin sıfır olduğu mesafe, ϵ_{ij} potansiyel kuyusunun derinliğidir. r_{ij} , atomlar arasındaki mesafeyi temsil etmektedir.

Tüm bu etkileşim potansiyelleri ile birlikte, sistemin toplam potansiyel enerji denklemi elde edilir [48].

$$U_{Top.} = U_{bağ} + U_{açıl} + U_{torsiyon} + U_{elek.} + U_{vdW} \quad (3.74)$$

MD yönteminde sıkça kullanılan ve en çok bilinen kuvvet alanlarından bazıları; AMBER, CHARMM, GROMOS ve OPLS kuvvet alanlarıdır.

Günümüzde yenilikçi donanım ve yazılım kodlarının ortaya çıkması ile MD simülasyonlarını nanosaniye, mikrosaniye zaman çerçevesinden birkaç milisaniyeye kadar çalıştırmak mümkündür. Bu, büyük biyomoleküller dâhil konformasyonel alanın ayrıntılı incelenmesini sağlamaktadır. Örneğin hedef bir proteine bağlanan ligandın izleyeceği yolun tam tarifini içerebilir. Daha sonra bu uzun MD yörüngeleri, ilaç keşfi için kritik olan termodinamik ve kinetik verilerle protein-ligand bağlanmasının serbest enerji profilini sağlamak için serbest enerji yöntemleri ile ilişkilendirilebilmektedir [45].

MD simülasyonunu gerçekleştirebilmek için kullanılan programlardan bazıları aşağıda verilmiştir.

AMBER: Amber yazılım paketi AMBER kuvvet alanını kullanarak, biyomolekül simülasyonları gerçekleştirir. Bu program, Fortran 90 ve C programlama dillerinde yazılmıştır [49].

CHARMM: Moleküler dinamikler için yaygın olarak kullanılan kuvvet alanlarının bir adı ve bunlarla ilişkili moleküler dinamik simülasyon ve analiz bilgisayar yazılım paketinin adıdır. CHARMM programı, çok çeşitli moleküler simülasyonların üretilmesini ve analiz edilmesini sağlamaktadır [50].

GROMACS: Proteinlerin, lipitlerin ve nükleik asitlerin simülasyonları için tasarlanmış moleküler dinamik program paketidir. GROMACS, birçok simülasyon programından 3-10 kat daha hızlı çalışmaktadır. GROMACS, komut satırı arabirimi aracılığıyla çalıştırılır ve dosyaları girdi ve çıktı olarak kullanılmaktadır. Hesaplama, ilerleme ve tahmini bitiş zamanı (ETA) geribildirim, yörünge (trajectory) görüntüleyici ve yörünge analizi için kapsamlı bir görüş sağlamaktadır. Buna ek olarak, farklı kuvvet alanlarının kullanılabilir olması, GROMACS'ı esnek bir program haline getirmektedir [51].

Bu programlara ek olarak; NAMD, LAMMPS ve GROMOS programları da verilebilir.

Bu tez çalışmasında MD simülasyonlar GROMACS paket programı yardımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.10.2.1. Gromacs Programı

Açılımı “GRONingen MACHine for Chemical Simulation” olan GROMACS programı ilk olarak 1990’lı yılların başında Hollanda’nın Groningen Üniversitesinde, kaynak kod sistemi (SCCS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir [52].

GROMACS, moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirirken, yüzlerce parçacık içeren sistemler için Newton denklemlerini belirli yaklaşımlar ile çözen çok yönlü bir paket programdır.

Öncelikle, karmaşık bağlanmış etkileşimler içeren proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi biyokimyasal moleküller için tasarlanmış GROMACS, bağlanmamış etkileşimleri hesaplamada son derece hızlıdır. Bunların yanı sıra GROMACS, polimerler gibi biyolojik olmayan sistemler için de kullanılmaktadır [53].

GROMACS programı, GROMOS, OPLS, AMBER ve ENCAD kuvvet alanlarıyla uyumludur [54]. Görsel bir ara yüz kullanmayan GROMACS, birçok alt programlardan meydana gelmektedir.

3.10.3. Kuantum Mekaniksel Yöntemler

Kuantum Mekaniği (QM), elektronların davranışlarının doğru matematiksel işlemlerle tanımlanmasıdır. Teorik olarak QM, bir tek atomun veya molekülün tüm özelliklerini tam

olarak tahmin edebilirken pratikte, QM denklemleri sadece bir elektron sistemi için tam olarak çözülmüştür. Çoklu elektron sistemleri için çözüm yaklaşımı için sayısız yöntemden oluşan bir yöntem geliştirilmiştir. Çözüm için kullanılan bu yaklaşımlar, varyasyon ve pertürbasyon yöntemleridir.

Kuantum mekaniksel yöntemlerin hesaplama süresi moleküler mekanik yöntemlere göre daha uzun sürmektedir [16, 55].

3.10.3.1.Ab-Initio

Doğrudan deneysel veriler dâhil edilmeyerek teorik prensiplerin kullanıldığı, *Ab-initio* yöntemi yaklaşık bir kuantum mekaniksel hesaplama. Bu yaklaşımlar hesaplama içerisinde kullanılan bir fonksiyonun daha basit formun kullanılması ile birlikte farklı bir denklemin çözümünün yaklaşık olarak verilmesi gibi matematiksel yaklaşımlar olabilir.

Yaygın olarak kullanılan bir *ab initio* hesaplaması, Hartree - Fock hesabı (HF) olarak bilinen temel yaklaşım, merkezi alan yaklaşımı olarak bilinmektedir. Hesaplanan yaklaşık enerjilerin hepsinin tam enerjiye eşit veya daha büyük olduğu anlamına gelen bir varyasyonel hesaplama. Enerji birimi Hartree ($1 \text{ Hartree} = 1 \text{ a.u.} = 27.2116 \text{ eV} = 627.509 \text{ kcal/mol}$, $1a_0 = 0.529 \text{ Å} = 1 \text{ Bohr}$) dir. HF hesaplamalarından elde edilen enerjiler, merkezi alan yaklaşımı nedeniyle, daima doğru enerjiden daha büyüktür.

Genel olarak, *ab-initio* hesaplamaları çok iyi sonuçlar verir. Özellikle moleküller küçüldükçe gittikçe daha hassas sonuçlar verebilir. Bu *ab-initio* yöntemlerin avantajıdır. Fakat bu yöntemler genellikle çok miktarda bilgisayar CPU zamanı, bellek ve disk alanı almaktadır [55].

HF yaklaşımı ile birlikte yaygın olarak kullanılan bir diğer *ab-initio* yaklaşımı DFT (Density Functional Theory) yani “Yoğunluk Fonksiyon Teorisi”dir. Bu teori elektron yoğunluğunun hesaplanması üzerine kuruludur.

3.10.3.2.DFT

Yoğunluk fonksiyon teorisi, 1920'lerden, özellikle Thomas-Fermi-Dirac modelinden ve 1950'lerde Slater'in kuantum kimyası alanındaki temel çalışmalarından elde edilen kuantum

mekaniği araştırmalarından kaynaklanmaktadır. DFT yaklaşımı, elektron yoğunluğunun genel işlevleriyle elektron korelasyonunu modelleme prensibine dayanmaktadır [56].

Yoğunluk fonksiyon teorisi, HF'nin eksikliğini ve çok sayıdaki elektronik dalga fonksiyonunu, temel yoğunluk olarak, elektronik yoğunluk ile değiştirerek ele almaya çalışır [57,58].

DFT, enerjiyi elektron yoğunluğu $\rho(\mathbf{r})$ cinsinden ifade eder. N elektronlu bir sistem için bu $\mathbf{r}$ noktasında elektronun bulunma olasılığı anlamındadır ve dolu orbitaller üzerinden elektron yoğunluğu aşağıdaki formül ile verilir:

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{\alpha=1}^N |\Psi^{\alpha}(\mathbf{r})|^2 \quad (3.75)$$

HF sistemi tanımlamak için dalga fonksiyonunu kullanırken, yoğunluk fonksiyon teorisi, $E[\rho]$ elektron yoğunluğu fonksiyonellerini kullanmaktadır. Hohenberg ve Kohn (HK), kuantum mekaniksel bir sistemin enerjisinin yalnızca temel hal yoğunluğunun bir fonksiyoneli ile tam olarak hesaplanabileceğini söylemektedir.

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC} \quad (3.76)$$

Yoğunluk fonksiyon teorisi molekülün enerjisini yukarıdaki gibi yazmayı mümkün kılmaktadır. Burada E^T , eletronların kinetik enerjisini, E^V , çekirdek- çekirdek itmesi ve çekirdek-elektron çekmesini ifade eden potansiyel enerjiyi, E^J , elektron çiftleri arasındaki itmeyi ve E^{XC} eletron çiftleri arasındaki itme haricindeki tüm etkileşimleri içeren exchange correlation (korelasyon değişimi) terimini ifade etmektedir. E^{XC} hem değişim hem de korelasyon olarak ikiye ayrılır [56].

Hesaplamalarına elektron korelasyonunu dâhil eden DFT, *ab-initio* yöntemler içinde en avantajlı olanıdır. Yoğunluk fonksiyon teorisinde kullanılan bazı yöntemler aşağıdaki tabloda verilmiştir [55].

Tablo 3.2: DFT’de kullanılan yöntemlerden birkaçı.

BLYP	Becke, Lee, Yang ve Parr. Beche değişim fonksiyonu ve Lee, Yang, Parr korelasyon fonksiyonları
B3LYP/Beche3LYP	BLYP’ye 3 parametre hibrit fonksiyonunun gelmesi ile elde edilen yöntem
B3P86	Becke’nin önerdiği değişim fonksiyonları ile birlikte Perdew’in korelasyon fonksiyonları
B3PW91	Becke’nin önerdiği 3 parametre hibrit fonksiyonları ile birlikte Perdew ve Wang’ın korelasyon fonksiyonları

3.10.3.3. Gaussian Programı

Gaussian, 1970 yılında John Pople [59] ve Carnegie Mellon Üniversitesi'ndeki araştırma grubu Gaussian 70 olarak yayınlanmış genel amaçlı bir hesaplamalı kimya yazılım paketidir [60] Gaussian programından elde edilen sonuçlar Gauss View programı aracılığı ile görüntülenebilir.

Gaussian Paket programında yapılan hesaplamalar ile aşağıdaki özelliklerin belirlenmesini sağlamaktadır.

- Optimize moleküler yapılar.
- Moleküler orbitaller.
- Elektrostatik potansiyel yüzeyler (yüzeyler ayrıca kontür haritası olarak da görülebilir).
- İç Atomik yükler ve dipol momentleri.
- Titreşim frekanslarına karşılık gelen normal modların animasyonu.
- IR, Raman diğer spektrumlar [3, 61, 62].

3.10.4. Yarı DeneySEL Yöntemler

Elektron-elektron etkileşmelerinden gelen iki elektron integralleri yarı ampirik yöntemlerce hesaplanmaz. Bunun için incelenecek olan molekülün elektronik yapısına benzer moleküllerin deneysel verilerinden elde edilen parametreler kullanılır. Büyük yapıdaki moleküllerin (biyolojik makro moleküller) *ab-initio* yöntemler ile hesaplanması mümkün değildir. Deneysel verilerle olan uyumu ve hızlı hesaplama yapabilmesi nedeni ile yarı deneysel yöntemler biyolojik sistemler için avantajlıdır.

AM1, PM3, PM6 HÜCKEL, MNDO, MNDO/3, ZDO, INDO vb... en çok kullanılan yarı deneysel yöntemlerdir [16, 55].

3.11. AMİNO ASİTLER

3.11.1. Amino Asitler İle İlgili Genel Bilgiler

Amino asitler hem amin (NH_2) hem de asit (COOH) gruplarını içeren organik madde olarak tanımlanır ve proteinler, enzimler ve hormonlar gibi büyük biyolojik makromoleküllerin yapısında bulunurlar. Doğada bulunan 300'den fazla amino asitten yalnızca 20 tanesi temel amino asit olarak adlandırılır ve proteinlerin yapısına katılır [63].

Amino asitlerin bir araya gelmesi ile oluşturdukları kısa polimer yapılara “peptit” adı verilmektedir. Eğer iki amino asit yan yana gelmişse “dipeptit”, üç amino asit yan yana gelmişse “tripeptit” olarak adlandırılmaktadır. Çok fazla amino asitin bir araya gelerek oluşturdukları uzun polimer yapılara ise “polipeptit” ya da en bilindik adı ile “protein” denmektedir [62].

Tablo 3.3: 20 temel amino asit isimleri, kısaltmaları ve tek harf sembolleri.

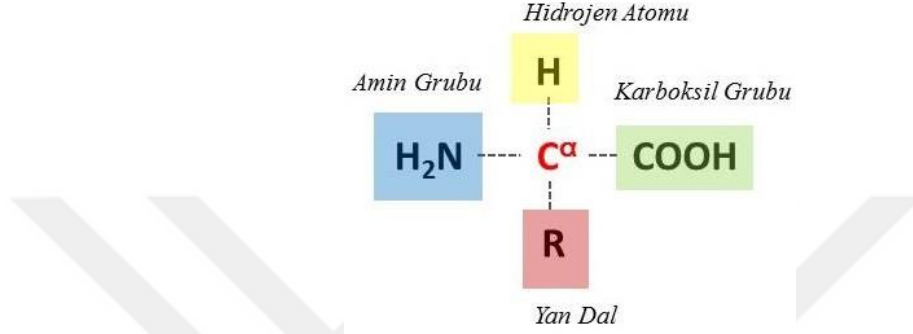
Amino Asit	3 harfli kısaltma	Tek harfli kısaltma	Amino Asit	3 harfli kısaltma	Tek harfli kısaltma
Glisin	Gly	G	Treonin	Thr	T
Alanin	Ala	A	Sistein	Cys	C
Valin	Val	V	Metiyonin	Met	M
Lösin	Leu	L	Asparajin	Asn	N
İzolösin	Ile	I	Glutamin	Gln	Q
Prolin	Pro	P	Glutamik Asit	Glu	E
Fenilalanin	Phe	F	Aspartik Asit	Asp	D
Tirozin	Tyr	Y	Lizin	Lys	K
Triptofan	Trp	W	Arjinin	Arg	R
Serin	Ser	S	Histidin	His	H

3.11.2. Amino Asitlerin Yapısı

Amino asitler temel olarak üç kısımdan oluşurlar. Merkezde bulunan karbon atomuna (C^α) bağlı amin, NH_2 grubu ve karboksil grubu COOH ile birlikte amino asitlerin birbirinden farklı

kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olmasını sağlayan değişken grup (R-yan dal ya da yan zincir).

R grubunda yalnızca bir H barındırmasından dolayı Glisin C^α atomuna göre simetrikken, Glisin hariç diğer tüm amino asitler asimetriktir. Bu temel amino asitler içerisinde Prolin ise siklik bir yapıya sahiptir ve yapısında C^α 'yı bulundurmaz [64].



Şekil 3.16: Bir amino asitin temel yapısı.

3.11.3. Amino Asitlerin Adlandırılması

Yapısında birden fazla karbon ve hidrojen atomu barındırdığından, aynı tip atomları birbirinden ayırmak için IUPAC-IUB komisyonu tarafından belirlenen işaretlendirmeler kullanılır. Amino grubuna bağlı C atomu C^α olarak gösterilir ve yan zincire doğru sırası ile C atomları β , γ , δ , ϵ , ζ , η şeklinde işaretlenir. Bununla birlikte her bir C atomuna bağlı olan diğer atomlar da aynı işaretle gösterilir. Karboksil grubundaki C atomu ise C' olarak işaretlenir [16].

3.11.4. Amino Asitlerin Sınıflandırılması

Amino asitlerin sahip olduğu R grubu, her bir amino asitin kimyasal ve fiziksel özelliklerinde farklılaşmaya neden olmaktadır. Bu da bir araya gelen amino asitlerin oluşturduğu proteinlerin kendine özgü yapısı ve aktivitesi olmasında etkilidir [65].

Amino asitler; asidik, bazik veya nötr özellikleri ile birlikte, polar ya da apolar olmalarına göre, suya karşı gösterdikleri tepki göz önüne alındığında ise hidrofilik veya hidrofobik olarak, organizmada sentezlenme durumu göz önüne alındığında ise esansiyel ve nonesansiyel olarak sınıflandırılırlar. Yan zincirlerin yapısı alifatik ya da aromatik olup olmadığını

belirlerken, yapı içerisinde bulunan hidroksil grubu ve tiyol veya tiyoser gruplarına göre de hidroksi-amino asitler ve kükürt içeren amino asitler olarak sınıflandırılır [16].

Amino asitlerin en yararlı sınıflandırılması yan zincirlerin (R-grupları) çözünürlük (yani iyonlaşma ve polarite) özelliklerine dayanır. R grupları dört sınıfa ayrılır [64];

- Apolar (hidrofobik)
- Polar negatif yüklü (asidik)
- Polar pozitif yüklü (bazik)
- Polar yüksüz (nötr)

Polarlığına göre amino asitler

Yan zincirlerin polarlık derecesi amino asitleri polar ve apolar olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır.

Apolar Amino asitler (Hidrofobik)

Bir amino asitin polarlığı dipol momentine bakılarak belirlenir. Molekül üzerindeki pozitif ve negatif yük dağılımlarının simetrik olması halinde, iki yükün üst üste çekim merkezleri, dipol momentin sıfır olmasına neden olur. Bu özelliği gösteren amino asitler apolar amino asitler olarak sınıflandırılır. 20 temel amino asit içerisinde apolarlık gösteren amino asitler; en basit yapıdaki Glisin ile birlikte Alanin, Valin, Lösin, İzölösin, Prolin, Metiyonin, Triptofan ve Fenilalanin'dir [66]. Bu amino asitler aynı zamanda hidrofobik özellik göstermektedirler.

Polar amino asitler suya eğilimlidirler yani hidrofilik özelliktedirler [64].

Polar Amino Asitler

Molekül üzerindeki yük dağılımının asimetrik olması halinde, yüklerin çekim merkezleri üst üste gelmez ve molekülün içyapısından kaynaklı bir dipol moment oluşmasına neden olur. Bir iç dipol momente sahip bu amino asitler polar amino asitler olarak sınıflandırılır [64,66].

Polar Asidik: Proton verici bir yan zincire sahip olan amino asitler Nötral pH (7.0)'da iyonize olarak negatif yüklü olan COO^- karboksil grubunu taşırlar. Dolayısı ile fizyolojik pH (7.35-

7.45)'da negatif yüklü olarak bulunurlar. Polar asidik amino asitler Aspartik Asit ve Glutamik Asittir [64,65].

Polar Bazik: Nötral pH'da pozitif yüklüdürler ve yan zincirleri proton alıcıdır. Lizin, Arjinin ve Histidin amino asitleri bu sınıfa girerler.

Polar Yüksüz (Nötr): Nötral pH'da yüksüz olup fizyolojik pH'da kısmi + ve – yük içerebildiklerinden tamamen yüksüz değildirler. Serin, Treonin, Asparajin, Sistein, Glutamin ve Tirozin bu sınıflandırma dâhilindedir [62,64].

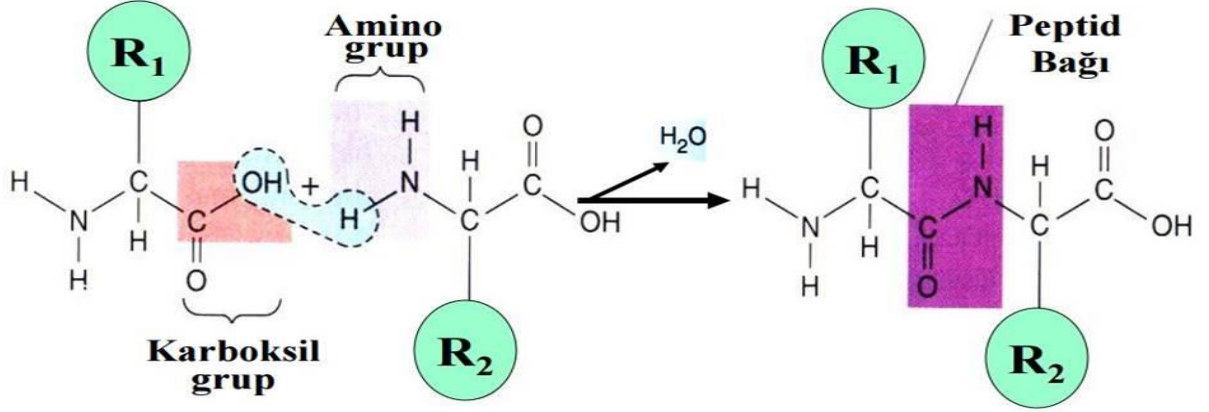
Tablo 3.4: Amino asitlerin beslenme özelliklerine ve yan zincir yapısına göre sınıflandırılması [64].

Amino Asit	Yan zincirinin yapısına göre	Beslenme özelliklerine göre
Glisin	Alifatik zincir	Non esansiyel
Alanin	Alifatik	Non esansiyel
Valin	Alifatik	Esansiyel
Lösin	Alifatik	Esansiyel
İzolösin	Alifatik	Esansiyel
Prolin	İminoasit	Non esansiyel
Fenilalanin	Aromatik halka	Esansiyel
Tirozin	Aromatik halka	Non esansiyel
Triptofan	Aromatik halka	Esansiyel
Serin	Alifatik	Non esansiyel
Treonin	Alifatik	Esansiyel
Sistein	Alifatik	Non esansiyel
Metiyonin	Alifatik	Esansiyel
Asparajin	Alifatik	Non esansiyel
Glutamin	Alifatik	Non esansiyel
Aspartik Asit	Alifatik	Non esansiyel
Glutamik Asit	Alifatik	Non esansiyel
Lizin	Alifatik	Esansiyel
Arjinin	Alifatik	Yarı esansiyel
Histidin	İmidazol halka	Yarı esansiyel

3.11.5. Peptit Bağlarının Oluşumu

Proteinler ve peptitler amino asitlerin birleşmesi ile meydana gelmektedir. Bu birleşme esnasında arada meydana gelen kimyasal bağa peptit bağı denilmektedir. Bir amino asitin

amin grubuna bağlı olan hidrojen ile diğer amino asitin karboksil (COOH) grubunda bulunan hidroksil grubu birleşerek 1 mol su molekülü açığa çıkarır. Geriye kalan amin grubundaki N ile karboksil grubundaki C atomu arasında peptit bağı oluşur.



Şekil 3.17: Peptit bağı [67].

Bu oluşan zincir yapının NH_2 ucu N-terminal COOH ucu ise C-terminal olarak adlandırılır. Bağlanan amino asit sayısı polipeptit zincirinin adını belirlemektedir ve adlandırma –di, -tri, -tetra, vs. peptit olarak devam etmektedir.

Peptit bağının uzunluğu, bir buçuk bağ kabul edilmektedir. Bunun nedeni $\text{C}'\text{-N}$ bağı arasındaki beklenen uzunluktan daha küçük olup, $\text{C}'=\text{O}$ bağı arasında beklenen uzunluktan ise daha uzun olmasıdır. Bir $\text{C}'\text{-N}$ bağının uzunluğu $1.49 \text{ \AA}$ ve bir $\text{C}'=\text{N}$ çift bağının uzunluğu $1.27 \text{ \AA}$ iken peptit bağının uzunluğu $1.32 \text{ \AA}$ olarak belirlenmiştir [68,69].

Peptit bağı ile bağlanıldığı sırada, her bir bağlanma ile bir amino asitin amin grubu $-\text{H}$ ve diğer amino asitin karboksil grubu $-\text{OH}$ kaybederek ve ana zincir üzerinde sırası ile dizilirler ve bu sırada 1 mol su açığa çıkar. Bu zincirdeki $-\text{H}$ ve $-\text{OH}$ kaybetmiş her bir amino asit amino asit artığı olarak adlandırılır [70].

3.12. GLY-HİS-LYS TRİPEPTİDİ

3.12.1. GHK Tripeptidini Oluşturan Amino Asitler

GHK yapısında 3 temel aminoasit bulunan protein bazlı aktif bir moleküldür.

Glisin: Kas dokusunun oluşturulması ve glukozun enerjiye dönüştürülmesinde rol almasının yanı sıra, anti-oksidantlarla birlikte çalışarak belirli kanser hücrelerine karşı koruma sağlayan, organizma tarafından sentezlenebilen bir amino asittir [71].

Histidin: Yarı esansiyel özellik gösteren, yalnızca belli hastalıklarda ve bebeklerde dışarıdan alınması gereken bir aminoasit olup vücudu toksinlerden ve ağır metallerden temizler [72].

Lizin: Organizma tarafından dışarıdan alınması gerekmeyen, en uzun alifatik zincire sahip bir aminoasittir. Anti-oksidant özellik göstermesinin yanı sıra antijen üretimini arttırarak bağışıklık sisteminin sağlıklı ve güçlü olmasını sağlar [73].

3.12.2. GHK Tripeptidinin Özellikleri

Glisil-l-histidil-l-lisin amino asit dizisi, insan plazmasında ve tükürükte mevcut olup, 1973 yılında Pickart tarafından izole edilmiştir [1]. GHK tripeptidi bakır (II) için yüksek afiniteye sahip bir tripeptittir. Yaşlı insan karaciğer dokusunun genç karaciğer dokusu gibi proteinleri sentezlemesine olanak sağlayan tripeptitin bakır kompleksi; ilk olarak insan plazma albümininde keşfedilmiştir [1,74]. Literatürde en çok GHK tripeptidinin bakır kompleksi ile ilgili yapılan çalışmalara rastlanmakla birlikte, saf GHK tripeptidi ile ilgili de birkaç çalışma bulunmaktadır. Saf GHK tripeptidinin, anti-tümör, anti-oksidant, anti-imflamatuvar ve sinir sistemi üzerindeki etkileri aşağıdaki çalışmalarla gösterilmiştir.

- GHK tripeptidinin agresif metastatik kolon kanseri hastalarında RNA üretimini bastırarak, iyileşmeye yönelik etkileri arttırdığı görülmüştür [75].
- Anti-oksidant ve anti-inflamatuvar etkileri nedeni ile cilt koruma ve yaraları iyileştirici etkisi olduğu da Sensenbrenner tarafından gözlenmiştir [76]. Nöral ve glial hücreler kullanılarak yapılan çalışmada, GHK'nın sinir büyümesini arttırdığı bulunmuştur.
- Bir kollajen tüpüne yerleştirilen sinir saplarına GHK tripeptidi emdirilerek, Schwann hücrelerinin (sinir hücrelerinin) akson sayısının arttığı görülmüştür [77].

- 2014 yılında Bobyntsev ve ekibi [78] tarafından yapılan bir çalışmada ise GHK ve GHK'nın analoglarının anksiyetik etkisine bakılmıştır. Erkek farelerin denek olarak kullanıldığı bu çalışmada en çok etkinin GHK peptidinin en düşük dozda (0.5 µg/kg) enjekte edilmesi ile olduğu görülmüştür.
- GHK ve bir toksik olan Akrolein (ACR) birlikte incelenerek; GHK'nın ACR'yi söndürme kabiliyeti ölçülmeye çalışılmıştır. Reaksiyonu karakterize edebilmek için elektron kütle spektroskopisi yöntemi kullanılmıştır. Sonuç olarak, GHK'nın yüksek oranda sitotoksik aldehit ACR'yi söndürdüğü gözlenmiştir [79].
- Başka bir çalışmada ise GHK'nın deride bulunan kök hücre yenilenmesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada normal insan hücresi keratinosit (derinin en üst tabakasını oluşturan hücreler [80]) ve deriye eş değer model (skin equivalent-SE) kullanılmıştır. GHK, keratinosit'de çoğalmaya neden olmuştur. SE modelinde, Epidermal basal hücrelerde köklenme ve çoğalma potansiyelini arttırmıştır [81].
- Sinir ve kan damarı büyümesi, cilt iyileşmesinde ve rejenerasyonunda önemli bir faktördür. Sage ve ekibi [82] SPARC proteininin bir hasarı sonrasında GHK ve türevlerinin peptitlerin protein yıkımı sırasında üretildiğini gözlemlemiştir.
- Zhou ve ekibi [83] GHK'nın Bleomisin (BLM)-kaynaklı fibrozis ve inflamasyondan akciğerleri koruduğunu bulmuştur. GHK ile yapılan tedavi ile BLM ile indüklenen kronik akciğer inflamasyonunu ve fibrozisini açıkça inhibe ettiğini ve BLM'nin neden olduğu kilo kaybını ve akciğer yaş/kuru ağırlık oranındaki artışları tersine çevirdiğini gözlemlemişlerdir. Böylelikle, GHK'nın fibrotik hastalıklar üzerindeki potansiyel terapötik etkileri hakkında yeni kanıtlar sağlamıştır.
- GHK'nın nöronlar üzerindeki rolü Zhang ve ekibi [84] tarafından da araştırılmıştır. Yapılan çalışmada GHK'nın ICH (intracerebral hemoraji-herhangi bir travma etkisi olmaksızın beyinde oluşan kanamalar) sıçan modelinde nörolojik zayıflığı hafiflettiğini ve nöronal apoptozisi azalttığını göstermiştir.

3.13.MOLEKÜLER MEKANİK YÖNTEMLERLE PEPTİTLERİN İNCELENMESİ

3.13.1. Teorik Konformasyon Analizi

Bir biyolojik molekülün fonksiyonlarını gerektiği gibi yerine getirebilmesi, minimum enerjiye sahip konformasyonda bulunması ile mümkündür. Konformasyon analizi olarak adlandırılan bu hesaplama ile molekülün en düşük enerjiye sahip yapısı belirlenmektedir. Teorik konformasyon analizi, molekülün sahip olduğu atomlar arasındaki karşılıklı etkileşmeler dâhilinde molekülün mümkün yapılarını ve bununla birlikte bu yapılara karşılık gelen enerjileri bulmak için kullanılan metoda denir.

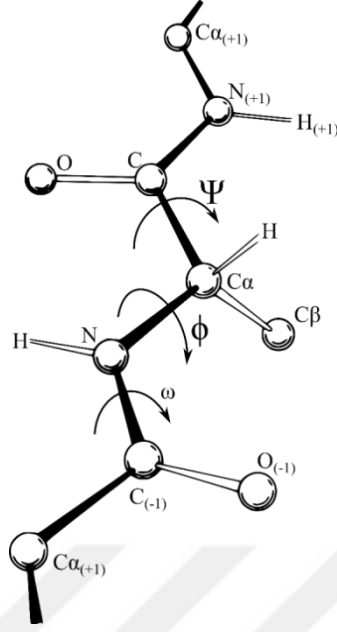
Teorik konformasyon analizinde molekül için Born-Oppenheimer yaklaşıklığı esas alınmaktadır. Buna göre molekül içerisindeki her bir atom noktasal kütleler olarak düşünülür, yani esas olan elektron – çekirdek yapıları dikkate alınmaz. Belirlenen bu yeni model, mekanik model olarak adlandırılır ve yarı-ampirik bir modeldir [85,86].

3.13.1.1.Konformasyon Analizinde Kullanılan Notasyonlar

Amino asitlerden oluşmuş bir biyolojik molekülde, örneğin bir peptit dizisinde, ana zincir ve yan dalları üzerinde bulunan iki yüzlü dihedral açılar, konformasyon belirlemede önemli rol oynamaktadır [70,87].

Molekül içi ikili ($=$) ve üçlü ($\equiv$) bağlar etrafında dönme gerçekleşmezken tekli bağlar serbest bir şekilde dönebilmektedir. Bir molekülde, tekli bağın dönmesinden kaynaklı farklılık gösteren herhangi bir iki atom düzeni, farklı konformasyonlar olarak ifade edilebilir ve konformasyonel izomerler veya konformerler olarak adlandırılır [88,89]. Atomların oluşturduğu dihedralleri tanımlamak için, bağlar belirli simgelerle tanımlamakta olup, bu simgeler IUPAC-IUB komisyonu tarafından belirlenmiştir [70,87].

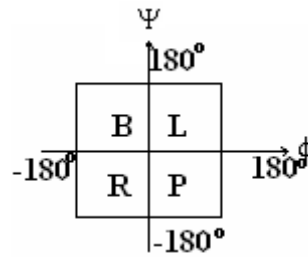
İlk kez Ramaşandran tarafından 1963 yılında amino asitler için en düşük enerjiye sahip oldukları geometrilerinin verildiği konformasyon haritaları belirlenmiştir ve ψ , ϕ , χ iki yüzlü dihedral açıları bu değerleri verir [90]. Teorik Konformasyon analizi yönteminde bu konformasyon haritaları esas alınır [70].



Şekil 3.18: Dihedral gösterimleri.

$C^\alpha - C$ bağı ψ , $C^\alpha - N$ bağı ϕ , $C^\alpha - C^\beta$ bağı χ , N- C bağı (peptit bağı) ω sembolü ile gösterilmektedir.

ψ - ϕ değerleri göz önünde bulundurularak ana zincir için Şekil 3.19'daki enerji bölgeleri belirlenmiştir. Bu açı değerine göre haritada yer aldığı enerji bölgesi ana zincirin formu, yani shape (şekil) belirlemesi yapılmaktadır. Her bir amino asit artığının sırası ile bulunduğu enerji bölgesi ile ifade edilerek, konformasyonu yazılır.



Şekil 3.19: Ramaşandran haritalarına göre ana zincir bölgeleri.

Ana zincir B,R,L,P bölge isimleri ile belirtilir. Yan zincir üzerindeki açılar ise sıra ile hangi açı bölgesine denk düşüyorlarsa 1,2,3 rakamları ile o amino asitin bulunduğu bölgeyi belirten harfin altına sırası ile indis olarak yazılır.

Örneğin bir dipeptit için konformasyon yazımı $R_{121}L_{23}$ şeklinde ise, bu birinci amino asitin R, ikinci amino asitin L enerji bölgesinde olduğunu göstermektedir. R bölgesinde bulunan birinci amino asitin üç yan zincir açısı, L bölgesinde bulunan ikinci amino asiti ise iki yan zincir açısına sahiptir [16].

Şekil 3.19 aynı zamanda bize molekülün formunu verir. Ana zincir gerilmiş (extended) bir formda bulunmakla birlikte katlanmış (folded) bir formda da bulunabilir. Sembolik olarak e gerilmiş, f ise katlanmış durumu ifade eder. Bir dipeptit için, form;

$$\theta = \psi_i + \phi_{i+1} \quad (3.77)$$

formülü ile belirlenir.

ψ ve ϕ bulundukları enerji bölgelerinin sınırlarının tam orta değeri olarak $+90^\circ$ veya -90° alınmaktadır. Burada “i” kaçınıcı amino asit olduğunu belirtir, yani $i=1$ ise $i+1=2$ olacaktır. ψ birinci amino asit için belirlenen açı değeri, ϕ ise ikinci amino asitin açı değeri olacaktır. Sınırlara göre belirlenen açı değerleri toplamı $\theta = 0^\circ$ olursa, e ; $\theta = \pm 180^\circ$ ise f şeklinde olduğunu verir. Bu sonuç göz önünde bulundurulduğunda bir dipeptit için e formu BB, BR, LR, RP, RL, LB, PL ve PP konformasyon gösteriminde; f formu ise RR, RB, BL, BP, LL, LP, PR ve PB konformasyon gösterimlerine sahip dipeptitler için söylenebilir.

Aynı şekilde bir tripeptit için ee , ef , ff , fe şekilleri mümkün olabilmektedir.

3.13.2. Moleküllerin Toplam Enerjilerinin Hesaplanması

Biyolojik moleküller (proteinler, peptitler, ...) organizma içerisinde moleküller ile etkileşim halindedirler. Bu nedenle moleküler mekanik yöntemde molekül enerjisi hesaplanırken bu etkileşimlerden kaynaklanan parametreler dikkate alınmalıdır.

Yaklaşık %80 sudan oluşan insan vücudunda bulunan söz konusu protein ve peptit molekülleri yapılarında fazla oranda hidrojen ve oksijen atomu bulundurmaktadır. Dolayısı ile su molekülleri ile aralarında hidrojen bağlar kurulacaktır. Meydana gelen bu molekül içi ve dışı *hidrojen bağları* molekülün toplam enerji hesabında yer almalıdır.

Molekül içindeki tekli kimyasal bağlar üzerinde gerçekleşen burulma hareketi, yapı içerisinde yer alan atom gruplarının uzaysal konumlarında değişim meydana getirecektir. Meydana

gelen bu değişim ile birlikte, molekülün enerjisinde de bir değişim gözlenmektedir. İkili ve üçlü bağlar üzerinde burulma hareketinin gerçekleşmemesi nedeni ile bu hareket genellikle “*tekli kimyasal bağ etrafında frenlenmiş iç dönme*” ya da diğer bir adı ile *torsiyon hareketi* olarak adlandırılır.

Molekülü içerisindeki bir diğer etkileşme elektronların neden olduğu etkileşmeler ile gerçekleşir. *Elektrostatik etkileşme* enerjisi; atomların, bağ oluşumu ile sahip olduğu etkin yükler ile molekülde bulunan yüklü iyon grupları arasında meydana gelmektedir.

Kimyasal bağ oluşturmada dolaylı yoldan etkileşim içerisinde olan atomlar arasında itme ve çekme hareketleri bulunmaktadır. *Van der Waals etkileşmesi* olarak adlandırılan bu etkileşme, Lennard-Jones Potansiyeli ile ifade edilmektedir.

Bu dört etkileşim göz önüne alındığında; U_{hb} hidrojen bağ enerjisi, U_{tor} torsiyon enerjisi, U_{vdW} Van der Waals enerjisini, U_{elk} elektrostatik etkileşim enerjisini temsil etmek üzere;

$$U = U_{hb} + U_{tor} + U_{elk} + U_{vdW} \quad (3.78)$$

olarak molekülün toplam enerji elde edilir.

Bu enerjiler atomlar arası uzaklığa bağlı olarak değişmektedir. Her bir enerjiyi ayrıntılı bir şekilde inceleyelim [16,85,91].

3.13.2.1.Hidrojen Bağı Enerjisi

Elektronegatif özellikteki atom ile kimyasal bağ kurmuş bir hidrojen atomu ile elektronegatifliği yüksek oksijen, azot gibi başka bir atom arasında meydana gelen etkileşim *Hidrojen bağı* olarak adlandırılır. Sahip olduğu tek elektron ile elektronegatif atomla kimyasal bağ yapan Hidrojen atomunun elektron ve çekirdek yönelimleri zıt yönlerde doğru olur. Böylelikle elektron, bağlı olduğu elektronegatif atom tarafından çekilirken, pozitif yük olarak algılanan çekirdek ile başka bir elektronegatif atom arasında etkileşme olacaktır. Daha açık olarak; biyolojik moleküllerde bulunan O, F, Cl, N, vb. elektronegativiteleri yüksek atomlar, kimyasal bağ ile bağlı oldukları diğer atomun elektron bulutunu kendilerine doğru çekerek, kısmi negatif yükleneceklerdir. Bu atomlar, O, F, C gibi başka bir elektronegatif atomla kimyasal bağ yapması nedeni ile kısmi pozitif yüklenen H atomuna yaklaşması durumunda,

kısmi negatif ve kısmi pozitif yükler arasında elektrostatik çekim etkisinden meydana gelen bir bağlanma oluşur.

Yapılarında birçok hidrojen atomu bulunması nedeni ile organik moleküller, çok fazla Hidrojen bağı yaparlar. Hidrojen bağının enerjisi kimyasal bağ enerjisinden 10 kat daha zayıftır. Fakat büyük moleküller bolca Hidrojen atomu içerdiklerinden meydana gelecek olan hidrojen bağı sayısı da çok fazla olup bu bağları kırmak için gereken enerjide çok büyük olacaktır. Bu nedenle düşük enerjiye sahip olsalar bile molekülün kararlılığının sağlanmasında katkıları büyük olacaktır.

Tablo 3.5: Hidrojen bağı uzunluklarına göre bağ enerjileri.

	Hidrojen Bağ Uzunluğu (Å)	Hidrojen Bağ Enerjisi (kcal/mol)
Çok güçlü	1.2 – 1.5	15 – 40
Güçlü	1.5 – 2.2	4 – 15
Zayıf	2.2 – 3.2	1 – 4

Genetik şifrelerimizi taşıyan DNA zinciri, molekülleri arasındaki H bağları nedeni ile ikili sarmal halinde bulunur. Ağaçların dik durabilmeleri, yapısında bulunan selüloz molekülleri arasında bulunan Hidrojen bağları sayesinde. Aynı zamanda yapıştırıcıların çoğu, yapıştırma özelliğini, yüzeyle madde arasında, hidrojen bağı oluşturarak gösterirler [92].

Hidrojen bağı enerjisi Mors Potansiyeli ile ilişkilidir.

$$U_{hb} = D[1 - e^{-\alpha\Delta r}]^2 \quad (3.79)$$

D: Disiasasyon yani hidrojen bağının ayrışma enerjisi. Bu enerji ortamın polarlık derecesi ile ilişkilidir.

α : ampirik bir sabit. Molekülün kutuplanma yatkınlığına bağlıdır.

Δr : hidrojen bağının denge konumundan sapma, yer değiştirme miktarıdır.

3.13.2.2. Torsiyon Enerjisi

Moleküldeki tekli kimyasal bağlar üzerinde meydana gelen burulmalar molekülün enerjisine katkı sağlar. Bağların burulması için gerekli olan bu enerji, U_{tor} olarak gösterilir ve torsiyon

enerjisi olarak tanımlanır. Torsiyon enerjisi (burulma, dönme etkileşim enerjisi) Lennard-Jones potansiyeli ile ilişkilidir.

$$U_{tor} = \frac{U_0}{2} [1 - \cos n\varphi] \quad (3.80)$$

3.12.1.1 bölümünde bir peptit için atomlar arasındaki bağ tipleri anlatılmıştı (ψ , ϕ , χ , ω). Her bir bağ döndürmek için gerekli olan torsiyon enerjisi farklıdır. Örneğin, C^α ile C atomları arasındaki ψ bağının burulması için gerekli olan enerji $U_\psi = 0.2$ kcal/mol'dür. Diğer bağlar için ise; $U_\phi = 0.6$ kcal/mol, $U_\omega = 20$ kcal/mol'dür. Peptit bağ bir buçuk bağ uzunluğunda kabul edildiği için, bu bağın burulması için gereken enerji diğerlerinden daha büyüktür [93].

3.13.2.3. Elektrostatik Etkileşme Enerjisi

Moleküllerin kararlılığını etkileyen bir diğer katkı ise elektrostatik etkileşmelerden meydana gelmektedir. 20 temel amino asit içerisinde yan dalları yüklü olan 4 amino asit bulunmaktadır. Bunlar; Arjinin, Lizin (pozitif yüklü), Aspartik asit, Glutamik asit (negatif yüklü)'tir. Peptit zincirinde yer alan bu yüklü amino asitlerin yan zincirleri etkileşerek, elektrostatik etkileşim enerjisini açığa çıkararak molekülün toplam enerjisine katkı sağlamaktadırlar.

$$U_e = K \sum_{i,j=1}^N \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (3.81)$$

İfade içerisinde yer alan terimler;

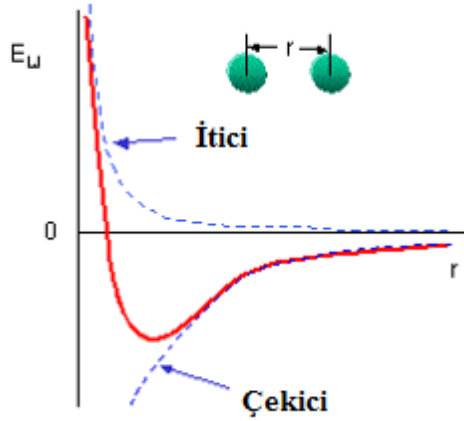
N, molekülde bulunan atom sayısını; K, enerjiyi kcal/mol cinsinden ifade etmeye yarayan dönüşüm katsayısını; ϵ : ortamın dielektrik katsayısını; r_{ij} : atomlar arası uzaklığı ve q_i , q_j , i. ve j. etkileşen atomların etkin yüklerini ifade etmektedir.

Dielektrik katsayısının değeri yapılan çalışmalar ile nötr ortamlar için $\epsilon = 4$, iyonik ortamlar için $\epsilon = 10$ ve su ortamı için $\epsilon = 81$ olarak kabul edilmiştir [94].

3.13.2.4. Van der Waals Etkileşme Enerjisi

Bir atom etrafındaki negatif yüklü elektron bulutları zaman içinde hızla dalgalandıklarından, yakından yaklaşan atomlar veya moleküller arasındaki indüklenen elektriksel etkileşimlerin bir sonucu olarak Van der Waals etkileşmeleri açığa çıkmaktadır. Bu dalgalanmalar, pozitif yüklü çekirdekler ve yakındaki atomların elektronları arasında meydana gelmesine izin verir.

Meydana gelen anlık dipol, atomların birbirlerini çekmesine neden olacaktır. İki atom birbirine çok yaklaştıklarında, elektron bulutları birbirine geçer, aralarında itici Van der Waals kuvvetleri meydana gelir. İtici ve çekici alanlar arasında potansiyel eğrinin düşük bir noktası vardır. Bu düşük nokta, Van der Waals bağ mesafesi olarak bilinen mesafeyi tanımlamakta olup yalnızca Van der Waals kuvvetlerinin iki atomu bir arada tutmasıyla sonuçlanmaktadır. İki atomun yaklaşma sınırı, Van der Waals yarıçaplarının toplamı ile bölüm 3.10.2’de verilen denklem (3.73) ile belirlenir (Lennard-Jones Potansiyeli) [16, 95].



Şekil 3.20: Lennard-Jones potansiyel eğrisi.

$$U_{vdW} = -\frac{A}{r^6} + \frac{B}{r^{12}} \quad (3.82)$$

Basit olarak ifade edilen (3.82) denkleminde, negatif terim çekmeyi ifade ederken pozitif terim itmeyi temsil etmektedir. A ve B atomların polaritelerine ait sabitlerdir, r ise etkileşen atomlar arasındaki mesafeyi ifade etmektedir. Burada, itme enerjisinin atomlar arasındaki mesafenin 12. mertebeden kuvveti ile ifade edilmiştir. Anlaşılabileceği üzere, atomların birbirlerine çok yaklaşması durumunda büyük bir itme gerçekleşecektir [48].

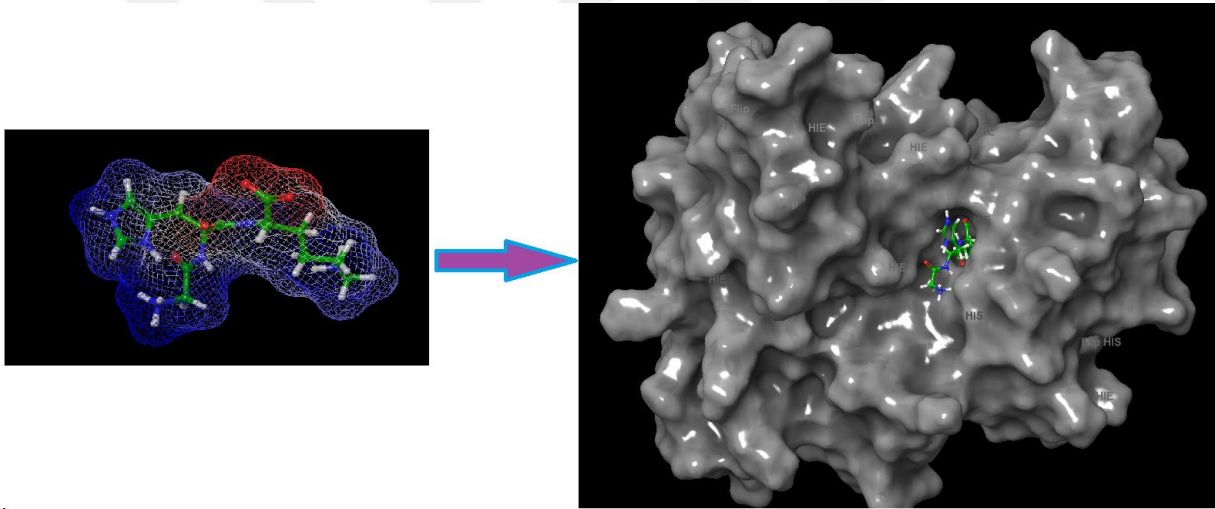
Bu soygazlar dâhil olmak üzere bütün atomlar için geçerlidir. Van der Waals etkileşmesi, proteinlerin oluşturduğu üç boyutlu yapının devamlılığının sağlanmasında önemli bir rol almaktadır. Atomlar arası mesafenin 2.5-2.7 Å olduğu mesafe ideal bir Van der Waals etkileşmesinin gerçekleşmesi için yeterli olup 0.4 ila 4.0 kJ/mol (0.0955 ila 0.955 kcal/mol) enerji ile molekülün toplam enerjisine katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte, bir makromolekül içinde veya makromoleküller arasında birçok etkileşim gerçekleşeceğinden bu enerji değeri, önemli bir katkı sağlayabilmektedir [16, 95].

3.14.MOLEKÜLER KENETLENME YÖNTEMİ (DOKİNG)

Son birkaç on yılda, ilaç tasarımı birçok deneysel ve yüksek verimli simülasyon yöntemleri geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bunlardan önce kullanılan geleneksel yaklaşımlar ile yeni terapötik ilaçları keşfetmek maliyetli olmakla birlikte, daha fazla zaman almaktadır.

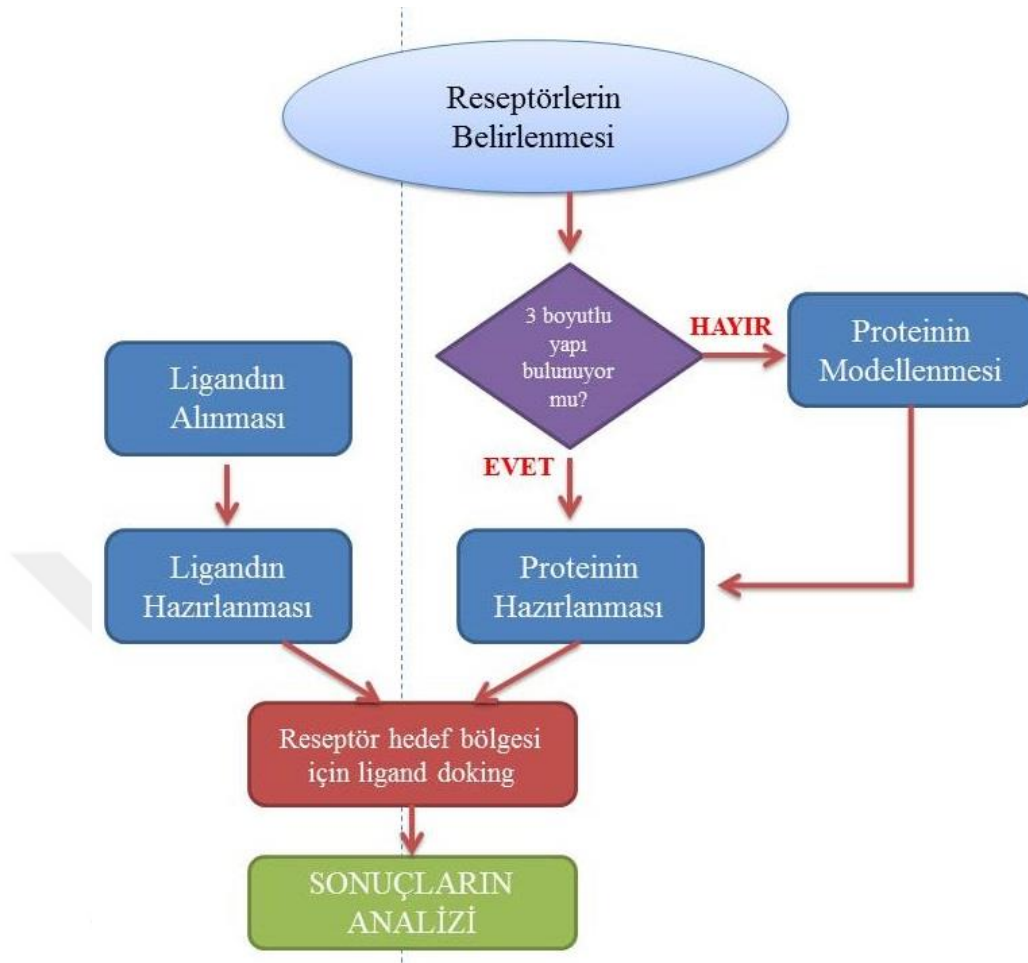
Geleneksel yöntemlerin bu dezavantajlarının üstesinden gelmek için, simülasyon yöntemleri kullanan daha etkin ve rasyonel teknikler ortaya konmuştur [96].

Bu geliştirilen yöntemlerden biri olan “Moleküler Kenetlenme (doking) Yöntemi”, iki molekülün birbirlerine kararlı konformasyonlarla bağlanmasını belirleyen bir metottur. Bu bağlanma sırasında protein ve ligand arasında meydana gelen etkileşimleri inceler [97].



Şekil 3.21: Ligand – Protein doking.

Birkaç türde moleküler doking (kenetlenme) uygulaması bulunmaktadır. Protein-protein, protein-ligand ve protein-nükleotid arasında moleküler doking çalışmaları mümkün olabilmektedir [98]. Moleküler doking ya da yerleştirme yönteminin aşamaları, Şekil 3.22’de gösterilen proteinlerin 3-D yapısının hazırlanması, ligandların hazırlanması, ligand-protein kompleksinin bağlanma enerjisinin tahmini gibi aşamalardan oluşmaktadır [99].



Şekil 3.22: Moleküler doking aşamaları [96].

Doking uygulamaları, Ligand ve/veya reseptör yerleştirme algoritmalarının esnekliğini düşündüğümüzde, iki büyük grupta sınıflandırılabilir: ilki rijit yani sabit/rijit cisim (rigid-body) ve ikincisi esnek yerleştirme. Rijit cisim yerleştirme yöntemi, iki molekül arasındaki geometrik tamamlayıcılıkları dikkate alarak hem ligandın hem de reseptörün esnekliğini hesaba katmamaktadır. Böylece sonuçların özgüllüğü ve doğruluğu sınırlanır. Esnekliği dikkate almayan rijit cisim doking simülasyonu, birkaç farklı protein için ligand bağlama bölgelerini belirleyebilir [100,101].

Esnek yerleştirme yöntemleri ise, her iki molekülün yanı sıra, aynı zamanda, daha yüksek bir hesaplama süresi maliyetindedir ve ligand veya reseptörün çeşitli olası uyumlarını dikkate alabilmektir [101].

Moleküler doking üç temel metodolojiyi barındırır:

İndüklenmiş yerleştirme: Ligand, protein ile aralarındaki bağlanmayı sağlayan kuvvetleri en üst düzeye çıkarabilmek için reseptör bölgesine esnek olarak bağlanır. Reseptör ise sabittir. Birbirlerini tamamlayıcıdır.

Kilit ve anahtar yerleştirme: Bu teorinin temeli hem ligandı hem de reseptörün sabit durarak sıkı bağlanma göstermeleridir [102]. Üç boyutlu tamamlayıcılığı temsil eder.

Topluluk yerleştirme: Bu yaklaşımda ise proteinlerin konformasyonel durumlarının esnekliği ile birlikte karmaşıklığı da açıklanır. Ligand ile dokinge toplu olarak çoklu protein yapıları kullanılır [103,104].

Moleküler kenetlenme çalışması, bilgisayar destekli ilaç tasarımında çok çeşitli uygulamalarda son derece önemlidir. Bu hesaplamalar için kullanılan programlara örnek olarak; AutoDock, GOLD, FlexX, GlamDock, Glide, Schrödinger Maestro, vb. verilebilir.

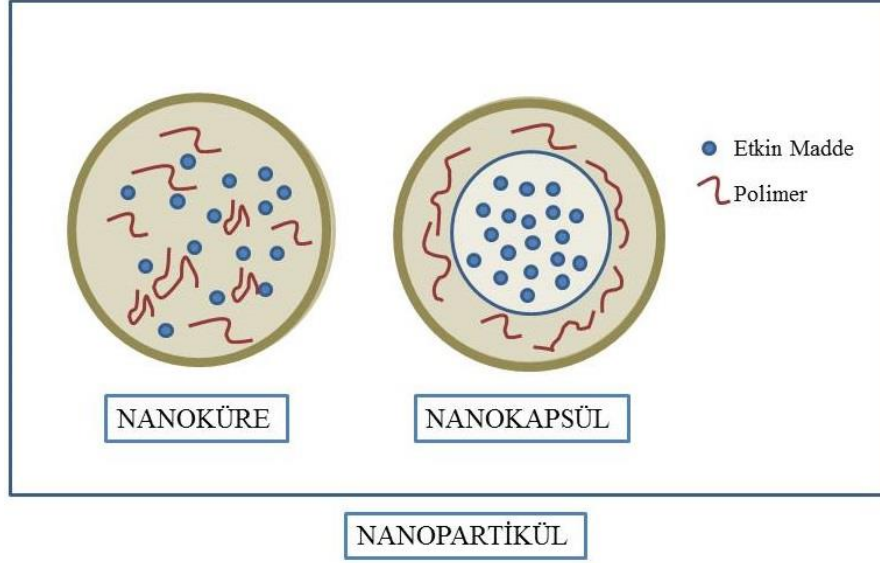
Moleküler doking hesaplamaları ile yeni terapötik ilaçların sentezi, tasarımı ve gelişimi sağlanırken, çeşitli enzimatik reaksiyonların moleküler etkileşimlerinin anlaşılması da mümkün kılınmaktadır. Bu yaklaşım, yeni ilaçların tasarlanması ve keşfedilmesi amacıyla, çeşitli kronik hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır [90].

3.15. NANOTEKNOLOJİ VE NANOPARTİKÜLLER

Nanoteknoloji 1.0 nm ve 100.0 nm nano boyut aralığındaki nesnelerin oluşturulması işlemi için yaygın olarak kullanılan bir terimdir [105]. Başka bir şekilde tanımlamak gerekirse maddenin yapı taşı olan atom ve moleküller üzerinde tek tek işlem yaparak, yapıyı tekrar düzenleme ile daha kullanışlı bir sistem oluşturma bilimidir [106].

Nanoteknolojinin farmokoloji alanında kullanılması ve bu yöntemler ile ilaç geliştirilmesi gelecek vadede bir uygulamadır [107].

Etkin madde yani ilacın, doğal veya sentetik polimerle kaplanarak, yaklaşık 10-1000 nm boyutunda sentezlenen matriks sistemler “Nanopartikül” olarak tanımlanır. Nanopartiküller hazırlanırken; ilaç polimer bir membran ile kaplanırsa “Nanokapsül”, polimer içinde çözünmesi sağlanarak ya da partikül yüzeyinde absorbe edilerek oluşturulmuş bir matriks sistem ise “Nanoküre” olarak adlandırılır [108].



Şekil 3.23: Nanoküre ve nanokapsül gösterimi [109].

Nano boyutlara sahip olmaları nedeni ile hücre içine, mikropartiküllere kıyasla, daha fazla alınırlar. Kan-beyin bariyeri, santral sinir sistemi hastalıklarının tedavisi için önemli bir problem oluşturmaktadır. Aktif maddeler bu bariyeri geçemedikleri için, tedavi zorlaşmaktadır. Bu nedenle, aktif madde taşıyan sistemler, sentezlenerek geliştirilen nanopartiküller sistemlerle hazırlanan nano ilaçlar, bu zorlukların giderilmesinde çok önemli rol oynamaktadır [110,111].

3.15.1. Polimerik Nanopartiküllerin Sağladığı Avantajlar

Polimer ile kaplı nano ilaçların yanı sıra, protein ve terapötik peptitlerin kullanılması ile elde edilen nano ilaç taşıyıcılarının en temel avantajı, boyutlarıdır. Nano boyutta olmaları hücrelerden kolaylıkla geçmelerini sağlayarak, aktif maddenin hedef bölgede etkili olmasını sağlar [110]. Fizyolojik ortamda parçalandıklarında ortaya çıkan ürünler toksik olmamakla birlikte, sterilize edilebilmeleri de kolaydır. Polimer yüzeyine hedef bölgeyi tanıyan ligandlar bağlanabilir ya da manyetik özellikteki hedefleyiciler kullanılarak etkin maddenin belli bir bölgeye yönlendirilmesi sağlanabilir [112]. Yükleme kapasitelerinin oldukça yüksek olması, hücre içinde etkin madde dağılımını artırır.

Bu yapılarda, etkin madde polimerik bir yapı içerisinde hapsedilerek parçalanması engellenir. Böylelikle hedef bölgeye yoğun konsantrasyonda farmasötik ajanın etki etmesi sağlanır.

Etkin maddenin salım ve sürdürülebilmesinin kontrol edilebilir olması büyük avantaj sağlamaktadır. Hedeflenen bölgede günler ya da haftalar süren bir salımı mümkün kılar.

Sentezleme metotlarına göre kolay ve ucuz olarak sentez üretim miktarı arttırılabilir [109].

3.15.2. Uygulama Alanları

Sahip oldukları avantajlar nedeni ile nanopartiküller birçok alanda tercih edilir olmuşlar ve nanoteknolojik araştırmalar ile birlikte tıp, biyoteknoloji gibi alanlarda öncelikli araştırma konusu haline gelmiştir.

Nanoteknolojinin hastalıkların tespiti, teşhisi ve tedavisinde kullanımı tıp alanındaki en büyük yeniliklerden biridir. Nanoteknolojik yöntemler ile mutasyonun erken evrelerinde kanser hücreleri tespit edilebilir ve kanser gelişimi durdurulabilir [113].

Nano yapılarla, ilgili görüntüleme teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte klasik yöntemlere kıyasla tümörler daha erken aşamalarda teşhis edilebilmekte ve nano-ilaçlar seçici tümör hücresine nüfuz edebilmektedir [114]. Örneğin demir oksit nanopartiküller, kanser hücrelerinin manyetik rezonans görüntülemesinde kontrast ajanlar olarak kullanılmaktadır. Demir oksit nanopartiküller, düşük toksisiteye sahip olup, uzun süre kana yapışabilir ve biyolojik olarak parçalanabilmektedirler [115,116].

Nano taşıyıcılar kardiyoloji alanında da tercih edilir, çünkü küçük boyutları nedeni ile kan damarları içinde dolaşmaları mümkündür. Karbonhidratla veya bir demir oksit çekirdeği içeren polimerlerle kaplı süper paramanyetik özelliklere sahip manyetik nanopartiküller ise, kardiyovasküler hastalıkların görüntülemesi için çok önemlidir [117].

Aynı zamanda anti-enflamatuvar [118], anti-parazit ilaçlar, aşı ve tanı maddesi [119] olarak kullanımının yanı sıra immünoloji için antijen özellik gösteren moleküller yüklü nanopartiküller için de literatürde birçok çalışma yapılmıştır [120].

3.15.3. Hazırlama Yöntemleri

Nanopartikül hazırlanması için uygun yöntem seçilirken, polimerin ve yüklenecek olan ilacın fiziko-kimyasal özellikleri dikkate alınır. Önceden oluşturulmuş polimerden nanopartiküllerin birincil üretim yöntemleri [8]:

3.15.3.1.Emülsifikasyon/Çözücü Buharlaştırma Metodu

İki aşamadan oluşan bu yöntemde öncelikle polimer diklorometan (DCM) ya da etil asetat gibi organik bir çözücünde çözülür. Organik faz, etkin maddenin yer aldığı sulu faz içinde mekanik karıştırma yöntemi ile (sonikasyon, yüksek basınçlı homojenizasyon vb.) emülsiyeye edilmektedir. Sonraki aşamada, organik çözücü (DCM, etil asetat, vb.) ortamdan uzaklaştırılır. Bunun için oda sıcaklığında sürekli karıştırma veya düşük basınç altında buharlaştırma yöntemi kullanılmaktadır. Üretim esnasında yüksek enerji gerektirmesi, endüstriyel olarak üretim zorluğuna neden olmaktadır [121]. Bu yöntem “Tekli Çözücü Buharlaştırma Metodu” olarak adlandırılır.

Çoklu çözücü emülsiyon yöntemi ise suda çözünen maddeler için uygun bir yöntemdir. İlk olarak su fazında çözülen etkin madde, DCM veya klorofom kullanılarak çözülmüş polimerin bulunduğu organik faza ilave edilmektedir. Elde edilen bu su içinde yağ tipi emülsiyon, seçilen uygun bir sulu çözeltide sürfaktan eklenerek emülsifiye edilmektedir. Tekli çözücü buharlaştırma metodunun ikinci aşamasında olduğu gibi mekanik yöntemlerle ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Enkapsülasyon etkinliğini, nanopartikül boyutunu, seçilen çözücü ile birlikte karıştırma hızı gibi parametreler de etkilemektedir [122].

3.15.3.2.Emülsifikasyon/Çözücü Difüzyon Metodu

Çözücü difüzyon yönteminde kullanılacak olan polimer su ile az da olsa çözünen organik çözücülerde (etil asetat, benzil alkol, izopropil asetas vs) çözünmektedir. Bu organik faza sürfaktan bulunan su fazı eklendiğinde yağ içinde su tipine benzeyen bir emülsiyon elde edilmektedir. Kısmen su ile karışabilen organik çözücü, ortama bir miktar daha su ilave edilmesi ile elde edilen organik çözücü tamamen su fazına difüze edilir. Böylelikle nanopartiküller çökertilir. Dışarıdan enerji gereksinimi olmadan nanopartikül üretimi gerçekleştirilebildiğinden, endüstriyel olarak nanopartikül üretimine uygun bir yöntem olması ile bir avantaj olup, üretim aşamasında kullanılan su miktarının fazla olması nedeni ile ise suda çözünen maddeler için uygun değildir. Nanopartikül sentezi sırasında enkapsülasyon verimi, etkin maddenin (ilaç, vb.) su fazına ne kadar geçtiği ile ilişkili olarak tanımlanabilir. Sentez sırasında ne kadar çok madde su fazına sızarsa enkapsülasyon verimi o kadar azalmaktadır [121,123,124].

3.15.3.3. Tuzla Çöktürme/Emülsifikasyon Difüzyon Metodu

Bu yöntem, adından da anlaşılabilir gibi, partiküllerin çöktürülmesi esasına dayanmaktadır. Etkin madde ile birlikte polimer su ile karışabilen organik çözücülerde (aseton vb.) çözülmemektedir. Elde edilen çözelti $MgCl_2$ (magnezyum klorür), $CaCl_2$ (kalsiyum klorür) gibi elektrolitler ve bir sürfaktanın (örneğin PVA) bulunduğu sulu çözelti içerisinde emülsifiye edilir. İyonların etkisi ile su fazından ayrılan organik çözücü nedeni ile nanopartiküller çöktürülmektedir.

Elde edilen yağ/su (oil/water) emülsiyonuna belirli oranda su eklenmesi ile organik çözücünün su fazına difüzyonu artırılarak nanoküreler oluşturulmaktadır. Sıcaklığın bir parametre olmaması nedeni ile ısıya duyarlı olan maddeler için avantajlı bir yöntem olup enkapsülasyon etkinliği için elektrolit tipi ve konsantrasyonu önemli parametrelerdir [121,125].

3.15.3.4. Nano-çöktürme (Çözücü Yer Değiştirme)

Fessi ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemin asıl prensibi, suyla karışabilen, lipofilik çözeltideki, yarıpolar bir çözücünün yer değişimi sonucu polimerin ara yüzeyde çökmesidir. Bu yöntemde, öncelikle polimer ve daha sonrasında etkin madde eklenerek aseton içerisinde çözündürülmektedir. Manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılan ve içeriğinde stabilizatör (sürfaktan) bulunan distile su içerisine, elde edilen bu organik çözelti eklenmektedir. Süspansiyonun son hacmi, ortamdan aseton ve belirli miktarda su uzaklaştırılması ile ayarlanmaktadır [126,127].

3.15.4. Kullanılan Polimerler

Nanopartikül sentezlenmesinde, protein ve polisakkarit gibi doğal ve sentetik polimerler kullanılırlar. Doğal bir protein olan Albümin ile birlikte poli(akrilamid) ve poli(metil metakrilat) gibi sentetik olan polimerler ilk üretilen nanopartiküllerde kullanılmıştır. Protein kullanılarak sentezlenen nanopartikülleri, antijenik reaksiyonların meydana gelmesine neden olurken, biyobozunur özelliği olmayan sentetik polimerler ise toksisite riskinin oluşmasına neden olduğu için çok fazla tercih edilmemektedir [128]. Bunların yerine biyobozunur özellikte olan ve toksik etkisi olmayan polimerler tercih edilmektedir.

Tablo 3.6: Nanopartikül sentezinde kullanılan sentetik ve doğal polimerler [129].

Sentetik Polimerler	Doğal Polimerler
Poli(laktid)	Kitosan
Poli(laktid-ko-glikolid)	Aljinat
Poli(ϵ -kaprolakton)	Jelatin
Poli(n-bütilsiyanoakrilat)	Albümin
Poli(akrilat)	
Poli(metakrila)	

Tablo 3.6’da nanopartikül hazırlanması aşamasında kullanılan polimerlerden bazıları verilmektedir.

3.16.PLGA KAPLI GHK NANOPARTİKÜLLERİNİN SENTEZİ

3.16.1. PLGA - poli(laktik-ko glikolik asit)

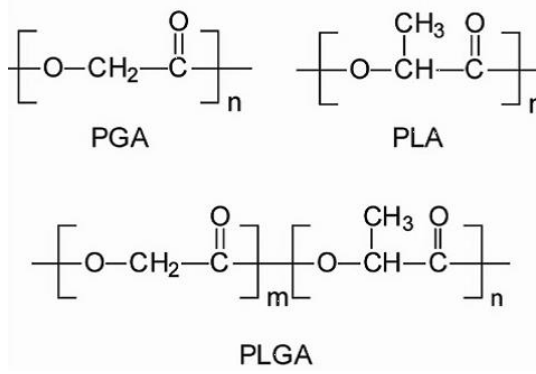
Poli(laktik-koglikolik asit) (PLGA), kristal özelliği ile laktid:glikolid oranına bağlı olarak düşük molekül ağırlığına sahip olan (bu çalışmada kullanılan 50:50 oranındaki PLGA için 38.000-54.000), biyolojik olarak uyumlu olup parçalanabilir özellikteki sentetik bir polimerdir. PLGA biyolojik olarak parçalandığı takdirde laktik ve glikolik asit açığa çıkmaktadır [130,131].

poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA) nanopartikül üretiminde en fazla kullanılan polimerlerdir. Aynı zamanda bunların kopolimerleri olan poli (laktik-ko glikolik asit) (PLGA)’da, PLA ve PGA ‘ya benzer olarak, sahip olduğu biyoyumlu polimer olma özelliği sayesinde nanopartikül üretiminde tercih edilen bir polimerdir. PLGA içerisindeki PLA ve PGA oranlarında değişiklik yapılarak, polimerin parçalanma oranlarına bağlı olarak içerisinde barındırdığı ilacı salım hızı değiştirilebilir. PLA oranı polimerin hidrofobik özelliğini artırırken, PGA oranı hidrofilik özelliğinin artması üzerinde etkindir [132].

İlaç taşımada PLGA polimeri tercih edilmesinin en önemli avantajı, kolaylıkla biyolojik moleküllere bozunması ve normal metabolik yollar ile vücuttan atılabilmesidir.

Biyoparçalanabilirlik, biyoyumluluk ve düşük toksisite PLGA’nın en önemli özelliklerindendir. Aynı zamanda bu polimer, yara örtüsünde, diş onarımlarında, sinir

tamirinde ve ilaç taşımada hem medikal hem de farmasötik olarak kullanıma uygundur [133]. Şekil 3.24’de PLGA’nın yapısı görölmektedir.



Şekil 3.24: PLGA polimerinin yapısı.

3.16.2. Nanopartikül Sentezlenmesi

3.16.2.1.Boş Nanopartikül Sentezi

2 ml DCM (diklorometan) içinde manyetik karıştırıcıda 150 mg PLGA çözölerek organik faz, 40 ml distile suda 1 gr polivinil alkol (PVA) ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 80 derece 400 devirde çözölerek, %2.5 konsantrasyonda sulu faz hazırlanmıştır. Organik faz üzerine 2ml distile su eklenmiş ve sonikatörde 85 W güç ile 4 dk boyunca soğuk su banyosu ile sonike edilmiştir. Üzerine %2.5 konsantrasyonda 2ml PVA eklenmiş ve 85 W güçte 4 dakika boyunca sonike edilmiştir.

Bir gece boyunca DCM’in uçması için beklemiştir. Bir gece bekleyen karışım oluşan ve askıda kalan nanopartiküllerin çökmesi için 8000 rpm’de 24 derecede 30 dakika santrifüj edilmiştir. Çöken partiküllerin üzerinde oluşan süpernatant ayrılmış ve partiküller distile su ile yıkanmıştır. Üzeri 10 ml distile suya tamamlanmıştır. Oluşturulan çözelti ~45 mikrometrelik filtreden geçirilerek eş boyutlu partiküller toplanmıştır.

3.16.2.2.Dolu Nanopartikül Sentezi

Optimize edilen boş PLGA nanopartikül formülasyonu üzerinden farklı konsantrasyonlarda GHK yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiştir. 2 ml DCM’de çözölmüş PLGA çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti üzerine; 0.25 mg, 0.5 mg, 1 mg, 1.5 mg, 2.0 mg, 2.5 mg, 3 mg, 5 mg, 10 mg ve 20 mg’lık GHK sulu çözeltisi ayrı ayrı eklenmiştir. Bu çözelti

sonikatörde %85 güçte 4 dk boyunca sonike edilmiş ve ardından üstüne 4 ml %2,5 'luk PVA çözeltisi ayrı ayrı eklenmiş, %85 güçte 4 dk boyunca sonike edilmiştir. Bu işlem sonrasında manyetik karıştırıcıda bir gece boyunca DCM'in uzaklaştırılması için karışım bekletilmiştir.

Elde edilen çözelti, 15 ml'lik falkonlara yerleştirilmiş ve 8000 rpm'de 30 dk boyunca santrifüjlenerek pelet ve süpernatant kısımları ayrıştırılmıştır. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak, pelet üzeri 10 ml distile su ile tamamlanarak pelet çözölmüştür.

3.17.DENEYDE KULLANILAN MALZEMELER

3.17.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasalların, katalog numaraları ve alındıkları firma bilgileri aşağıda verilmiştir.

- PLGA (poly(laktik-koglikolik asit))– Sigma Aldrich – 719900-5G (lactid:glicolid , 50:50)
- GHK (Gly-His-Lys.HCl) – Active Peptide – AP103008
- PVA (poli(vinil alkol)) – Sigma Aldrich – 363073-500G
- DCM (Diklorometan)- Merck

Nanopartikül karakterizasyonu sırasında kullanılan kimyasal;

- KBr tuzu

3.17.2. Kullanılan Yardımcı Gereçler ve Cihazlar

Nanopartikül üretim aşamasında kullanılan ekipmanlar;

- Eppendorf Research Mikropipet (1000-5000 µl)
- Heidolph MR 3000 Manyetik Karıştırıcı
- Isıticılı manyetik karıştırıcı
- HETTICH Zentrifugen – UNIVERSAL 320 R Santrifüj Cihazı
- Sartorius CP 225D Hassas Terazî
- Millipore Direct – Q & Direct –Q UV Ultrapure Su Cihazı
- LEEC Precision 50 Culture Safe CO2 Etüv

- BioSpec-nano, Nanodrop cihazı
- Shimadzu UV-1280 UV-Vis Spektrofotometre
- Sonikatör
- Şırınga
- 45µ Filtre

Nanopartikül karakterizasyonu belirlenmesinde kullanılan cihazlar;

- Jasco 6300 FT-IR ve ATR-FT-IR Spektrometresi
- NRS 3100 Dispersif Mikro Raman spektrometresi
- Malvern Zetasizer Nano ZS
- Transmisyon Elektron Mikroskobu

3.18.DENEYDE KULLANILAN ANALİZ YÖNTEMLERİ

Bu tez çalışmasında, saf GHK tripeptidi ve etkin madde olarak kullanıldığı nano-ilaç formülasyonunun karakterizasyonu FT-IR, ATR ve Raman spektroskopi çalışmaları ile GHK tripeptidi yüklü PLGA nanopartiküllerinin salım grafiği UV-Vis spektroskopisi ile oluşturulmuştur. Bu yöntemler ile birlikte, Dinamik Işık Saçılması tekniği ile Zeta potansiyeli ve boyut analizi gerçekleştirilmiş olup, TEM görüntüleme yöntemi ile sentezlenen nanopartiküllerin ayrıntılı karakterizasyonu yapılmıştır.

3.18.1. Zeta Potansiyeli ve Boyut Analizi

Zeta potansiyeli, nanopartiküllerin yüzeyindeki yükleri karakterize etmek için kullanılır. Bu bize partiküller arasındaki itme ve çekmenin ölçüsünü verir [134,135]. Zeta-sizer cihazı potansiyel ölçümünün yanı sıra partikül boyutu verilerini de elde etmemizi sağlar.

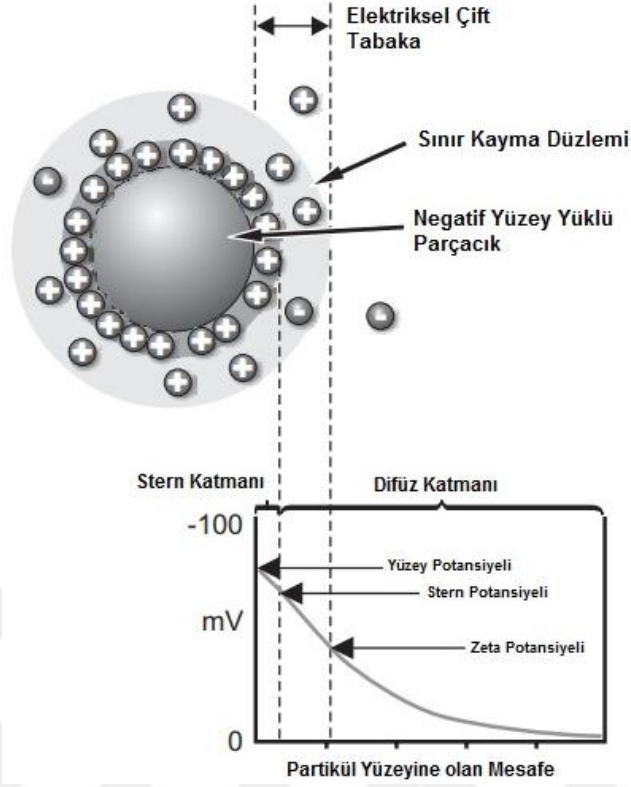
Partikül boyutunun belirlenmesi partiküllerin hızları ile ilişkilidir. Örnek üzerine lazer ışığı gönderilerek partiküller üzerinden saçılan ışık, dedektör üzerine düşürülür. Dedektör üzerinde, çeşitli yönlerden saçılarak gelen ışık dalgaları üst üste binerek bir girişim deseni oluştururlar. Sürekli hareket eden parçacıklar, saçılan ışığın da sürekli değişmesine ve böylece detektöre gelen ışık şiddetinde de sürekli değişmelere neden olmaktadır.

Boyutu diğer partiküllere kıyasla daha küçük olanlar, daha hızlı hareket ederler. Bu da küçük boyutlu partiküllerin yer değiştirmesinin daha çok olması demektir. Hızlı yer değiştirmeye sahip partiküller, dedektör üzerine düşen ışık şiddeti dağılımının da hızlı bir şekilde değişmesine neden olurlar. Işık şiddeti dağılımı, küçük zaman aralıkları için kaydedilir ve bu değerler birbirleri ile kıyaslanır. Bu değişim partiküllerin boyutunu belirler. Değişim ne kadar hızlı gerçekleşirse, partikül boyutu o kadar küçük demektir [136,137].

Partikül boyutu ile birlikte yüzey potansiyelleri bu sistemlerin en önemli özelliklerindendir. Zeta potansiyeli değeri, bir kolloidin kararlılığı ile ilişkilidir. Kararlılık ise, çözünmüş partiküllerin çözücü ortamında bir araya gelerek toplanmaması ya da çökmemesi olarak tanımlanır. Zeta potansiyeli bir yüzey özelliğidir [137].

Çoğu sıvı iyon içerir; bunlar sırasıyla katyonlar ve anyonlar olarak adlandırılan negatif ve pozitif yüklü atomlar olabilir. Yüklü bir partikül bir iyon sıvısı içerisinde askıya alındığında, karşı yükün iyonları asılı parçacık yüzeyine çekilecektir. Negatif yüklü bir örnek, bulunduğu sıvı içerisinde pozitif yükleri, pozitif yüklü bir örnek ise negatif yükleri kendisine çekecektir. Parçacık yüzeyine yakın olan iyonlar, yüzeye sıkıca bağlanırken; daha uzakta, dağınık yer alan iyonlar “difüz katmanı” olarak adlandırılan bir katman oluşturacak şekilde daha gevşek bağlanacaklardır. Dağınık tabaka içinde, bir sınır vardır ve bu sınırdaki herhangi bir iyon, sıvı içinde hareket ettiği zaman tanecikle birlikte hareket eder; ancak sınırın dışındaki herhangi bir iyon bu yerde kalır, bu “sınır kayma düzlemi” olarak adlandırılır. Parçacık yüzeyi ve dağılma sıvısı arasında, parçacık yüzeyinden mesafeye göre değişen bir potansiyel mevcuttur - kayma düzlemindeki bu potansiyele “Zeta potansiyeli” denir [138].

Yüzey yükü partiküllerin topaklanmasını engellediği için, zeta potansiyelleri ± 30 mV üzerindeki nanopartiküllerin, süspansiyon içinde stabil oldukları yani kararlı olduğu gösterilmiştir [139].



Şekil 3.25: Zeta Potansiyeli.

3.18.2. Transmiyon Elektron Mikroskobu (TEM)

“Transmisyon Elektron Mikroskobu”nda ışık kaynağı “elektronlar” dır. İncelencek örnekler elektron geçirgenliğine uygun olacak incelik ve çapta diskler şeklinde hazırlanmalıdır. Aksi halde uygun görüntü kontrastları elde edilememektedir.

TEM’in çalışma prensibi esas olarak, örnek üzerine paralel elektron demetleri gönderilerek, bu gönderilen demet içerisinde kırınım uğramadan örnek üzerinden doğrudan geçen ışın demeti ile örneğin yüzeyinde kırınım uğrayan ışınları örnek altında toplamaktır. Bu yöntem ile görüntü 600.000 kat büyütülebilir [140,141].

Bu tez çalışmasında nanopartikül karakterizasyon aşamalarından biri olan TEM (Transmisyon Elektron Mikroskobu) görüntüleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde çekilmiştir. Çekimler için JEOL TEM-1400-EDX modeli cihaz kullanılmıştır.

3.19.L929 HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN YAPILMASI

L929 (fare fibroblast) hücreleri DMEM-F12 besiyeri (%10 FBS, 5 µg/ml penisilin-streptomisin) içerisinde kültüre alınmıştır. Hücreler 37°C 'de % 5 lik karbondioksitli etüvde inkübe edilmiştir. Kültürde yeterli miktarda çoğalan hücreler, tripsinize edilerek flask yüzeyinden ayrılmış ve 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, dipte kalan hücre pelletinden tripan mavisini ile sayım yapılmış ve aşağıdaki formül uygulanarak ml'deki hücre sayısı hesaplanmıştır. Hücreler daha sonra toksisite deneylerinde kullanılmıştır.

Hücre Sayısı (ml'deki) =

Sulandırma Katsayısı × Thoma Lamı Sabiti (10000) ×

Sayılan Örnek Ortalaması

(3.83)

3.19.1. GHK ve GHK Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin XTT Testi ile Hücre Canlılığına Etkisinin İncelenmesi

96 kuyucuklu mikrolakalara, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-F12) hücre kültür besiyerinde hazırlanan hücreler, 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde eklenmiş ve 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde hücrelerin büyümesi ve yüzeyi kaplaması için 24 saat inkübe edilmiştir.

GHK, PLGA nanopartikülleri ve GHK yüklü PLGA nanopartikülleri, 2, 8, 14, 20, 30, 40, 60 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda hücrelere eklenmiş ve 24 saat inkübe edildikten sonra XTT testi uygulanmıştır (n=5). Kısaca; XTT sodyum tuzu 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) çözeltisinin hazırlanması için 4 mg tetrazolyum tuzu, 10 µl PMS stoğu, 10 mL hücre kültür medyumunda çözündürülüp, 0.45 µm'lik filtre ile steril edilmiştir. Kuyucukların hücre kültürü medyumları aspire edildikten sonra her bir kuyucuğa hazırlanan XTT solüsyonundan 100'er µl eklenmiştir.

Elde edilen absorbans değerlerine aşağıdaki formül uygulanarak % canlılık değeri elde edilmiştir.

$$\%Canlılık = \frac{\text{örneğin absorbans değeri}}{\text{kontrolün absorbans değeri}} \times 100$$

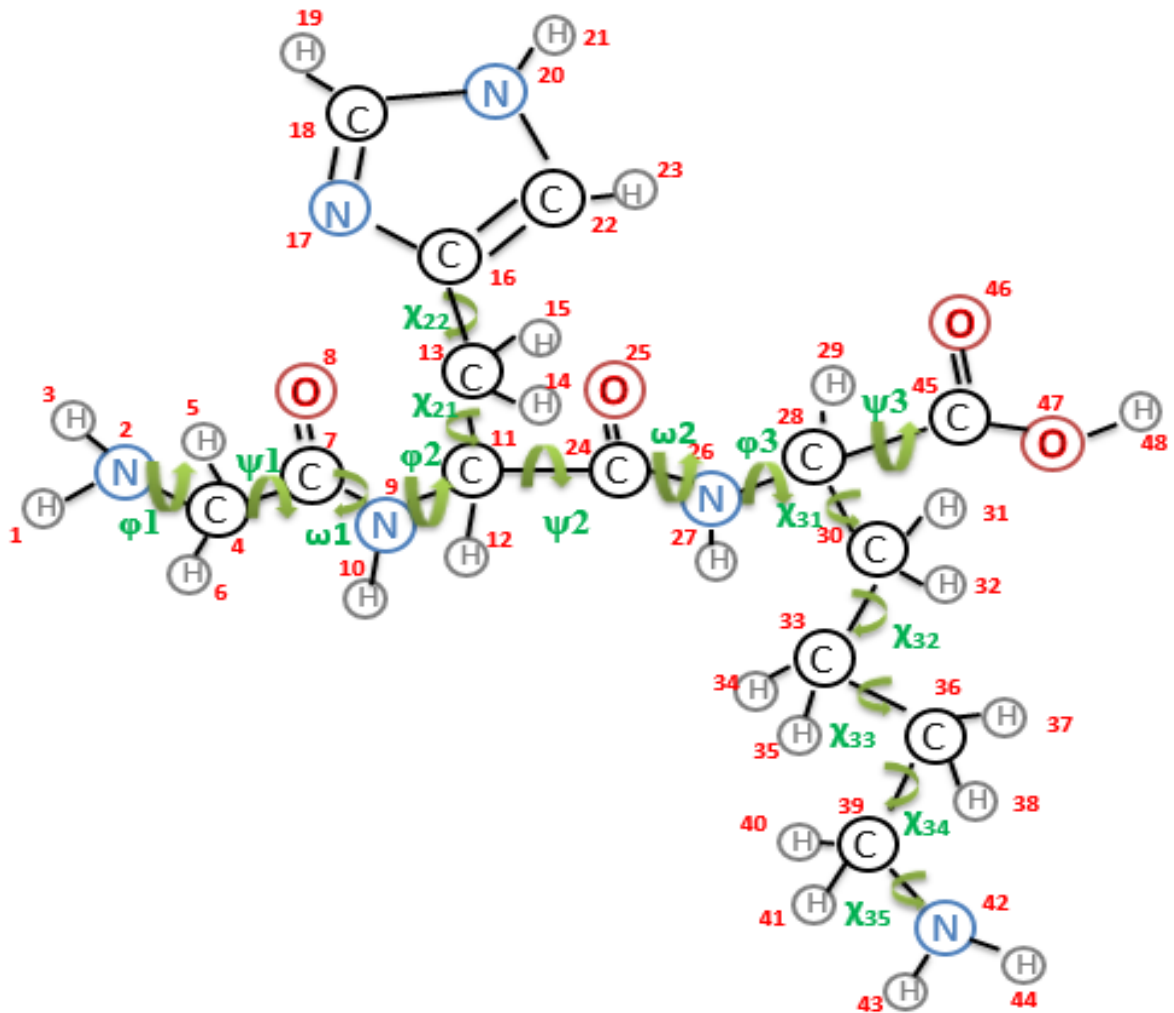
(3.84)

4. BULGULAR

4.1. GLY-HIS-LYS TRIPEPTİDİNİN MODELLENMESİ

4.1.1. GHK Tripeptidinin Teorik Konformasyon Analizi

GHK tripeptidinin iki boyutlu yapısı çizilerek, Teorik Konformasyon Analiz yöntemine dayanan Fortran programına tanıtılacak olan molekülün, atom sayıları ve dihedral dönü sayı ve çeşitleri belirlenmiştir.



Şekil 4.1: GHK tripeptidi, yapısı, atom sayıları ve dihedraller.

GHK tripeptidi 48 atoma ve 15 dihedral dönüye sahip bir moleküldür.

Glisin, Histidin ve Lizin aminoasitlerinin konformasyon bölgeleri;

Tablo 4.1: Glisin amino asitinin konformasyon bölgeleri.

Glisin	R	B	L	P
ϕ	-90	-90	90	90
ψ	-90	100	90	-90

Tablo 4.2: Histidin amino asitinin konformasyon bölgeleri.

Histidin	R			B			L		
ϕ	-100	-120	-120	-120	-120	-140	60	60	60
ψ	-40	-60	-60	160	140	140	80	100	60
χ_1	60,180,-60			60,180,-60			60,180,-60		
χ_2	90,-90			90,-90			90,-90		

Tablo 4.3: Lizin amino asitinin konformasyon bölgeleri.

Lizin	R			B			L		
ϕ	-110	-110	-115	-120	-120	-120	40	60	60
ψ	-50	-60	-60	150	115	100	60	70	70
χ_1, χ_2	60, 180, -60			60, 180, -60			60, 180, -60		
χ_3, χ_4, χ_5	180			180			180		

Ramaşandran tarafından her bir amino asit için en düşük enerjiye sahip geometrinin verildiği konformasyon bölgeleri kullanılarak, atomlar arasındaki tekli bağlar üzerindeki ψ , ϕ , χ iki yüzölçü dihedral açılar belli değer aralıklarında döndürülür [90]. Böylece her bir bölge için konformasyon sayısı, her bir bölge için minimum enerji değeri (kcal/mol) elde edilmiş olup Tablo 4.4'te bu değerler verilmiştir. Ayrıca, giriş-çıkış açıları, konformasyona etki eden enerji değerleri de Tablo 4.5, Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.4: Nötral GHK tripeptidinin konformasyon bölgelerine karşılık gelen konformasyon sayıları ve minimum enerjinin (global enerji) bulunduğu konformasyon bölgesi.

Konformasyon Bölgeleri	Konformasyon Sayısı	Minimum Enerji (kcal/mol)	Konformasyon Bölgeleri	Konformasyon Sayısı	Minimum Enerji (kcal/mol)
RRR	216	7.09	LBB	486	5.54
RBR	486	5.26 kcal/mol	LBR	486	5.63
RLR	486	8.08	LBL	216	7.62
RRB	216	7.02	LRB	216	7.16

Tablo 4.4 (devam): Nötral GHK tripeptidinin konformasyon bölgelerine karşılık gelen konformasyon sayıları ve minimum enerjinin (global enerji) bulunduğu konformasyon bölgesi.

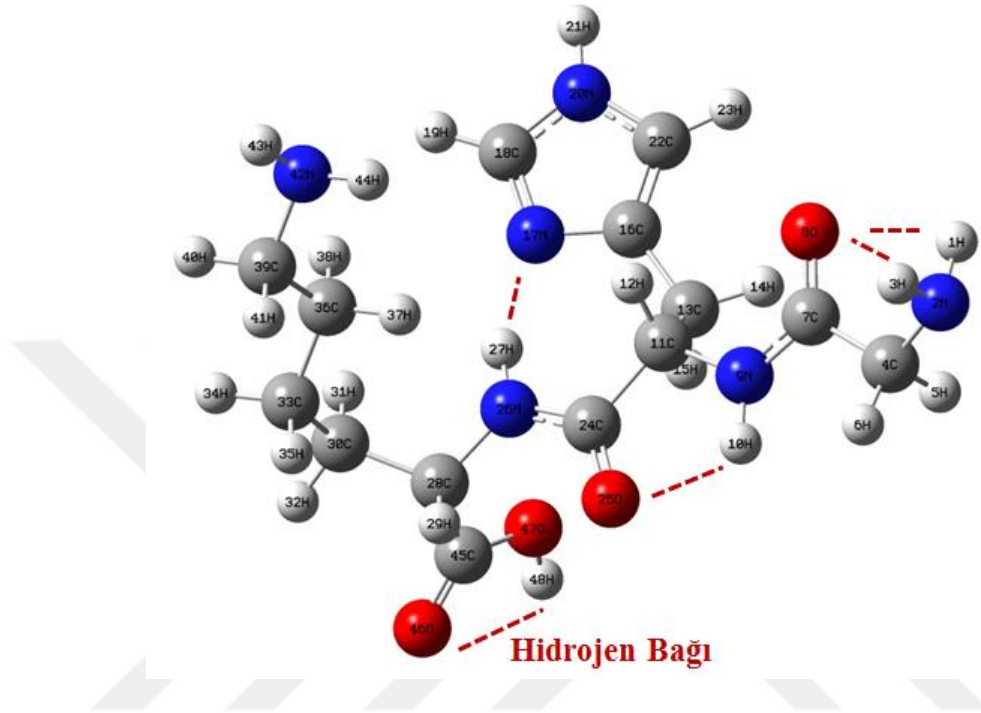
Konformasyon Bölgeleri	Konformasyon Sayısı	Minimum Enerji (kcal/mol)	Konformasyon Bölgeleri	Konformasyon Sayısı	Minimum Enerji (kcal/mol)
RRL	216	8.90	LRR	216	7.12
RBB	486	6.16	LRL	144	8.68
RBL	216	7.52	LLB	486	7.65
RLB	486	8.60	LLR	486	8.81
RLL	216	10.53	LLL	216	10.57
BBB	486	5.99	PBB	486	5.39
BBR	486	5.80	PBR	486	5.48
BBL	216	7.96	PBL	216	7.59
BRB	216	7.75	PRB	216	7.15
BRR	216	7.54	PRR	216	7.06
BRL	144	8.74	PRL	144	8.18
BLB	486	8.05	PLB	486	7.98
BLR	486	8.60	PLR	486	8.24
BLL	216	10.72	PLL	216	10.68

Nötral GHK tripeptidinin farklı 11,880 (toplam 17,496) konformasyon bölgesi içerisinde en düşük enerji RBR bölgesinde 5.26 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Global (en düşük enerjili) konformasyon RB_3R_3 ve fe formunda bulunmaktadır.

Tablo 4.5: Nötral GHK tripeptidinin 5.26 kcal/mol minimum enerjili konformasyonunun dönü açıları.

CH21							
Açılar	PH1 (ϕ_1)	PS1 (ψ_1)	W1 (ω_1)	PH2 (ϕ_2)	(χ_{21})	CH22 (χ_{22})	PS2 (ψ_2)
Giriş	-90.000	-90.000	180.000	-140.000	180.000	90.000	140.000
Çıkış	-106.649	-76.963	183.431	-100.894	177.788	89.500	148.045
CH31 CH32 CH33 CH34							
Açılar	W2 (ω_2)	PH3 (ϕ_3)	(χ_{31})	(χ_{32})	(χ_{33})	(χ_{34})	CH35 (χ_{35}) PS3 (ψ_3)
Giriş	180.000	-115.000	-60.000	60.000	180.000	180.000	180.000 -60.000
Çıkış	184.892	-104.604	-67.581	75.309	165.876	178.627	181.701 -61.742

GHK tripeptidinin DFT teori düzeyinde ve B3LYP/ 6-311++G(d,p) baz seti kullanılarak hesaplanmış optimize bağ uzunlukları, açı değerleri ve dihedral açı değerleri EK.4, EK.5 ve EK.6’da verilmiştir.



Şekil 4.3: GHK tripeptidinin iç hidrojen bağları.

Tablo 4.9: GHK tripeptidinin molekül içi hidrojen bağları ve uzunlukları.

Atomlar	Bağlar (Å)
1H --- 8O	2.5337
3H --- 8O	3.0467
10H --- 25O	2.0649
27H --- 17N	1.9265
48H --- 46O	2.2834

4.1.2.1.HOMO-LUMO Analizi

Moleküllere ait orbitaller, gerekli bağ mesafesinde atomik orbitallerin birbirine yaklaşım örtüşmesi ile meydana gelmektedir. Böylelikle moleküller oluşmaktadır. Orbital kavramı matematiksel bir fonksiyon olup, moleküldeki elektronların bulunma olasılığının en yüksek olduğu bölgeler olarak tanımlanır [142].

Bu orbitallerin enerjileri, en yüksek doluluğa sahip olanları HOMO (High occupied molecule orbitals) orbital enerjisi E_{HOMO} olarak, en düşük doluluğa sahip orbitaller ise LUMO (Low occupied molecule orbitals), orbital enerjisi de E_{LUMO} olarak tanımlanmaktadır. Elektron verme eğilimi HOMO enerjisine sahip orbital tarafından gerçekleştirilirken, LUMO enerjisi elektron alma eğilimini gösterir [143].

TD-DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) baz seti kullanılarak GHK tripeptidinin gaz, su ve metanol ortamında Şekil 4.4’de gösterilen HOMO-LUMO hesapları yapılmıştır. Gaz ortamında HOMO’nun glisin bölgesinde yoğunlaştığı görülmüş olup enerjisi -6.5925 eV’dur. LUMO ise histidin halkasında yoğunlaşmıştır ve -0.67185 eV’luk bir enerjiye sahiptir. Su ve methanolde benzer şekilde HOMO histidin bölgesinde bulunurken sırası ile -6.59985 eV ve -6.59876 eV enerjiye sahiptirler. LUMO ise lizin bölgesinde yoğunlaşmıştır. LUMO enerjisinin, su için -0.56763 eV ve metanol için -0.560001 eV olduğu bulunmuştur.

HOMO ve LUMO arasındaki fark “molekülün sahip olduğu kimyasal kararlılık” olarak tanımlanmaktadır. ΔE değerinin küçük olması orbital etkileşimlerinin kolay olduğunu göstermektedir. Tablo. 4.10, GHK tripeptidi için ΔE enerji farkını göstermektedir.

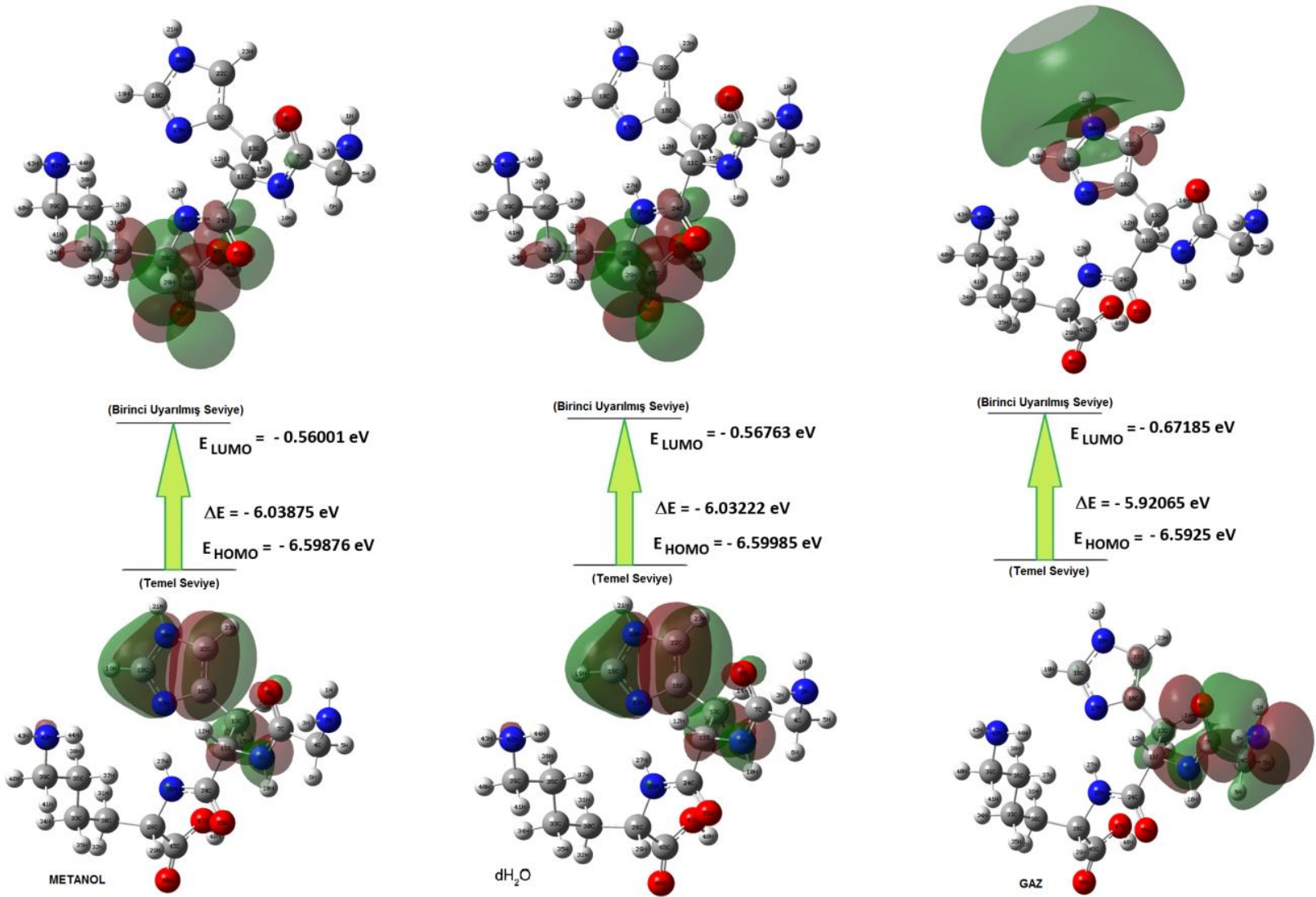
Tablo 4.10: TD-DFT/6-311++G(d,p) baz seti kullanılarak GHK tripeptidinin gaz, su ve metanol ortamında hesaplanan HOMO-LUMO değerleri (eV cinsinden).

	$E_{\text{LUMO}+2}$	$E_{\text{LUMO}+1}$	E_{LUMO}	E_{HOMO}	$\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$	$\Delta E_{(\text{HOMO-LUMO}+1)}$	$\Delta E_{(\text{HOMO-LUMO}+2)}$
Gaz	-0.3015	-0.4052	-0.6718	-6.5925	-5.9206	-6.1873	-6.2910
Metanol	-0.1964	-0.3956	-0.5600	-6.5987	-6.0387	-6.2031	-6.4023
Su	-0.1975	-0.3994	-0.5676	-6.5998	-6.0322	-6.2004	-6.40232

HOMO – LUMO analizleri ile birlikte GHK tripeptidinin elektronik özellikleri de hesaplanmıştır. Bir molekülün sertliği ve yumuşaklığı, kimyasal kararlılığı ve reaktiviteyi göstermek için de yararlı olabilmektedir. Tablo 4.11’de gösterildiği üzere, molekül için HOMO – LUMO enerjileri, enerji farkı, iyonlaşma potansiyeli, elektron eğilimi, kimyasal potansiyel ve sertlik değerleri de hesaplanmıştır.

Tablo 4.11: GHK tripeptidinin TD-DFT/6-311++G(d,p) baz seti ile hesaplanmış HOMO-LUMO değerleri ve kimyasal özellikleri.

Metanol	TD-DFT/6-311++G(d,p)	Enerji (a.u.)	Enerji (eV)
Homo Enerjisi	E_{HOMO}	-0.24250	-6.5987
Lumo Enerjisi	E_{LUMO}	-0.02058	-0.5600
İyonizasyon Potansiyeli	$I = -E_{\text{HOMO}}$	0.24250	6.5987
Elektron Eğilimi	$A = -E_{\text{LUMO}}$	0.02058	0.5600
Elektronegativite	$\chi = (I+A)/2$	0.13154	3.5793
Kimyasal Potansiyel	$\mu = -(I+A)/2$	-0.13154	-3.5793
Kimyasal Sertlik	$\eta = (I-A)/2$	0.11096	3.0193
ΔE (gap)	$E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$	0.22192	6.0387
Su	TD-DFT/6-311++G(d,p)		
Homo Enerjisi	E_{HOMO}	-0.24254	-6.5998
Lumo Enerjisi	E_{LUMO}	-0.02086	-0.5676
İyonizasyon Potansiyeli	$I = -E_{\text{HOMO}}$	0.24254	6.5998
Elektron Eğilimi	$A = -E_{\text{LUMO}}$	0.02086	0.5676
Elektronegativite	$\chi = (I+A)/2$	0.1317	3.5837
Kimyasal Potansiyel	$\mu = -(I+A)/2$	-0.1317	-3.5837
Kimyasal Sertlik	$\eta = (I-A)/2$	0.11084	3.0161
ΔE (gap)	$E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$	0.22168	6.0322
Gaz	TD-DFT/6-311++G(d,p)		
Homo Enerjisi	E_{HOMO}	-0.24227	-6.5925
Lumo Enerjisi	E_{LUMO}	-0.02469	-0.6718
İyonizasyon Potansiyeli	$I = -E_{\text{HOMO}}$	0.24227	6.5925
Elektron Eğilimi	$A = -E_{\text{LUMO}}$	0.02469	0.6718
Elektronegativite	$\chi = (I+A)/2$	0.13348	3.6321
Kimyasal Potansiyel	$\mu = -(I+A)/2$	-0.13348	-3.6321
Kimyasal Sertlik	$\eta = (I-A)/2$	0.10879	2.9603
ΔE (gap)	$E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$	0.21758	5.9206



Şekil 4.4: GHK tripeptidinin metanol, su ve gaz ortamındaki HOMO-LUMO bölgeleri.

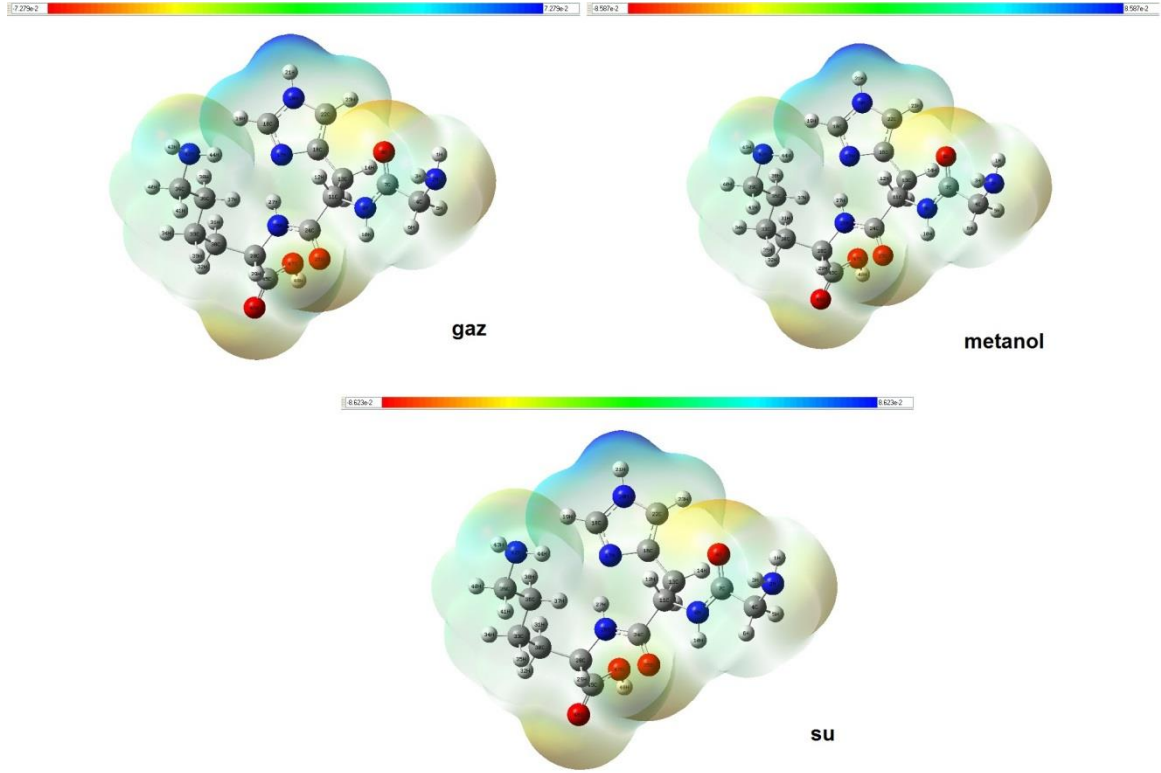
4.1.2.2.MEP Analizi

Moleküllerin ve molekül içerisindeki atomların birbirleri ile etkileşimleri, molekül içerisindeki elektron yoğunluğu dağılımının (yani çok yoğun ve az yoğun bölgelerin) belirlenmesi ile mümkün olmaktadır. MEP, yani “*Moleküler Elektrostatik Potansiyel*” haritaları, molekül yüzeyinin üç boyutlu elektrostatik potansiyel şeklini verir. Elektrostatik potansiyel haritaları, değişen yük dağılımları görselleştirmek için çok yararlıdır.

Moleküler elektrostatik potansiyel (MEP) yani $V(r)$, birim pozitif yük ile sistemin moleküler yük dağılımı arasındaki etkileşim enerjisini tanımlar. $V(r)$ 'in negatif bölgeleri, elektrofilik reaktivite (elektronların nispeten bolluğu), pozitif olanları nükleofilik reaktivite (elektronların nispeten yokluğu) ile ilişkilidir [144].

MEP haritasında görülen yüzey, elektrostatik potansiyelin yanı sıra moleküler büyüklük ve şekil değerlerini de vermektedir. Nötral bir molekülde elektronlarca yoğun bölge kırmızı renkle ifade edilirken elektronların az yoğun olduğu bölge ise mavi renk ile ifade edilmektedir. Renk gösterge çizelgesi maviden kırmızıya doğru geçiş göstermekte ve haritada bu renk geçişi ile elektron yoğunluğu ile ilişki kurulabilmektedir [143].

Yoğun elektrona sahip bölge düşük potansiyele sahipken, düşük elektron yoğunluğu olan bölgeler yüksek potansiyele sahiptir.



Şekil 4.5: GHK tripeptidinin gaz metanol ve su ortamında moleküler elektrostatik potansiyel haritası.

Gaz, metanol ve su ortamında yapılan hesaplama ile Şekil 4.5’de elektronca zengin bölgelerin lizinin karboksil ucundaki ve peptit bağlarındaki oksijenler üzerinde olduğu görülmektedir. GHK tripeptidi üzerinde elektronca en fakir bölge histidin halkası üzerindedir.

Gaz ortamındaki GHK tripeptidi için en yoğun kırmızı renge sahip olan bölge -0.07279 a.u. enerjiye sahip iken, en yoğun mavi renge sahip olan bölge +0.07279 a.u. enerji değerine sahiptir. Elektronca en zengin bölgeler içinde (kırmızı bölgeler) glisin ile histidin arasında meydana gelen peptit bağı üzerindeki oksijenin (8O) sahip olduğu enerji -0.0509855 a.u.’dur. Bu bölge en yoğun kırmızıya sahiptir. Bir diğer peptit bağı olan histidin ile lizin arasındaki bağ üzerinde bulunan 25O, -0.0504291 a.u. enerji değerine sahiptir. 46O yani lizine bağlı karboksil ucundaki oksijen ve glisin amino asitinin sahip olduğu 2N atomu, negatif yük yoğunluğunun olduğu diğer bölgeler olup, enerji değerleri sırası ile -0.0488796 a.u. ve -0.0502025 a.u. dir.

Mavi renk ile temsil edilen pozitif potansiyele sahip bölgelerin, histidin halkası üzerindeki hidrojen atomu (21H) ile lizin amino asitinin karboksil ucundaki hidrojen (48H) atomu

olduğu görülmektedir. Sahip oldukları enerji değerleri sırası ile 0.0725282 a.u ve 0.054461 a.u. dir. 21H en yoğun mavi bölgeye sahip olup elektronca en fakir bölgedir.

Su ortamında yapılan analiz sonucunda elektronca en yoğun ve en az yoğun bölgelerin enerjileri ± 0.08623 a.u değerindedir. Histidin-Lizin peptit bağına bağlı oksijen (25O) elektronca en zengin bölgedir ve -0.057372 a.u. değerine sahiptir. Glisin-Histidin peptit bağı üzerindeki oksijen (8O) -0.0570572 a.u. enerji değerine sahip olup, elektron yoğunluğunun en fazla olduğu bölgelerdendir. Lizine bağlı karboksil ucundaki oksijen (46O)'nun enerji değeri -0.0558071 a.u olarak elde edilmiştir. Elektronca en yoğun olan son bölge -0.0536127 a.u. enerji değerine sahip olan Glisinin N-terminal (2N) ucudur.

Lizinin karboksil ucunda bulunan hidrojen atomu (48H) +0.0604164 a.u. enerji ile elektronca az yoğun bölgelerden biridir. En yoğun mavi renge sahip olan histidin halkasının sahip olduğu hidrojen (21H) ise +0.085839 a.u. en yüksek enerji değerine sahip olup, elektronca en fakir bölgedir.

Elektronca en zengin ve en fakir bölgeler su ve gaz ortamında olduğu gibi metanol ortamında da benzer bölgelerde elde edilmiştir. Yalnızca enerji değerleri farklılık göstermektedir. En yüksek elektron yoğunluğu -0.08587 a.u, en düşük elektron yoğunluğu +0.08587 a.u. olarak görülmüştür. En yoğun kırmızı renge sahip 25O -0.057338 a.u enerji değerindedir. Diğer negatif yoğunluğa sahip bölgeler sırası ile 8O, 46O ve 2N atomlarıdır, enerji değerleri de -0.0568727 a.u , -0.0556293 a.u , -0.0535199 a.u olarak elde edilmiştir.

En yüksek pozitif değere sahip olan 21H en yoğun mavi renk ile temsil edilmiştir. Enerji değeri +0.084866 a.u. dir. Bir diğer pozitif bölge ise 0.0601945 a.u enerji değerine sahip 48H'dır.

4.1.2.3.NBO Analizi

Doğal bağ orbitalleri (NBO-Natural Bond Orbitals) analizi ile molekül içi ve moleküller arası etkileşimi sağlayan atomlar ve bağlar arasında meydana gelen etkileşimler, moleküler sistemlerin sahip olduğu elektron yoğunluğu delokalizasyonu ile birlikte konjugatif etkileşimler, moleküller arası yük geçişi ve rehibridizasyonu hesaplanabilmektedir.

İkinci derece pertürbasyon teorisi, molekül içi ve moleküller arası etkileşmelerin kararlı enerjileri elde edilir.

$$E(2) = \Delta E_{IJ} = n_i \left[\frac{F(i,j)^2}{(\epsilon_j - \epsilon_i)} \right] \quad (4.1)$$

Her bir verici (i) ve alıcı (j) için, elektron delokalizasyonu, i,j ile ilişkili stabilizasyon enerjisi E(2) ile verilir. Burada n_i verici (donör) orbital doluluğu, ϵ_j , ϵ_i köşegen elemanlar ve F (i, j) de diyagonal olmayan, NBO Fock matris elemanıdır [145].

Monomer GHK tripeptidine ait NBO hesaplamaları, Gaussian09 paket programı ile DFT/B3LYP seviyesi 6-311++G(d,p) baz setinde yapılmıştır. NBO analizi bize, moleküller arası ve molekül içi etkileşimleri, elektron yoğunluklarının delokalize olduğu bölgeleri ve moleküler yük geçişini verir.

GHK tripeptidine ait NBO analizi sonucunda, sistemdeki en yoğun elektron geçişlerinin n1(N26) yalnız elektron çiftinden $\pi^*(C24-O25)$ antibağ orbitaline doğru olan etkileşmeler olduğu hesaplanmıştır (EK.1). Molekül içi hidrojen bağları oluşan sistemde, en yoğun etkileşmenin olduğu beş bölgeye ait $E^{(2)}$ ikinci derece pertürbasyon enerjileri dikkate alınmıştır. Histidin ve lizin arasındaki peptit bağında meydana gelen 66.43 kcal/mol enerjiye sahip $n1(N26) \rightarrow \pi^*(C24-O25)$, glisin histidin amino asitleri arasındaki peptit bağındaki atomlar üzerinde 59.83 kcal/mol enerji ile $n1(N9) \rightarrow \pi^*(C7-O8)$ etkileşim olan bölgelerdir. Bu bölgeleri histidin halkasında meydana gelen 50.67 kcal/mol enerji ile $n1(N20) \rightarrow \pi^*(N17-C18)$, enerjisi 44.31kcal/mol olan karboksil ucunda meydana gelen $n2(O47) \rightarrow \pi^*(C45-O46)$ ve yine halka içerisindeki 42.35 kcal/mol enerjiye sahip $\pi^*(N17-C18) \rightarrow \pi^*(C16-C22)$ elektron yoğunluğu geçişleri takip etmektedir. (EK.1). NBO'ların etkileşmelerinin doluluk miktarları ve onlara ait enerjileri EK.2'de verilmiştir.

4.1.2.4.Hiperpolarizibilite Analizi

Monomer GHK tripeptidi için Gaussian paket programında DFT-B3LYP/6311++G(d,p) baz setinde, birinci derece hiperpolarizibilite (β), dipol moment (μ) ile birlikte polarizibilite (α) değerleri hesaplanmıştır.

Birinci derece hiperpolarizibilite, üçüncü dereceden bir tensör olup, 3x3x3 bir matristir. x,y,z bileşenleri kullanılarak;

Toplam statik dipol momenti μ :

$$\mu = (\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2)^{1/2} \quad (4.2)$$

ortalama polarizasyon kabiliyeti α_0 :

$$\langle \alpha \rangle = \left(\frac{\alpha_{xx}}{3} + \frac{\alpha_{yy}}{3} + \frac{\alpha_{zz}}{3} \right) \quad (4.3)$$

Polarize edilebilirlik anizotropisi $\Delta\alpha$:

$$\Delta\alpha = 2^{-1/2} \left[(\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{zz} - \alpha_{xx})^2 + 6\alpha_{xx}^2 \right]^{1/2} \quad (4.4)$$

Toplam birinci hiperpolarizibilite β_0 :

$$\beta_0 = (\beta_x^2 + \beta_y^2 + \beta_z^2)^{1/2} \quad (4.5)$$

$$\beta_x = \beta_{xxx} + \beta_{xyy} + \beta_{xzz} \quad (4.6)$$

$$\beta_y = \beta_{yyy} + \beta_{xxy} + \beta_{yyz} \quad (4.7)$$

$$\beta_z = \beta_{zzz} + \beta_{xxz} + \beta_{yyz} \quad (4.8)$$

şeklinde belirlenir.

Hesaplanan bu değerleri, atomik birimden (a.u.) elektrostatik birimlere (esu) $\alpha = 1$ a.u. (a_0) = 0.1482×10^{-24} esu ; $\beta = 1$ a.u. (a_0) = 8.639×10^{-33} esu eşitlikleri kullanılarak dönüştürülmüştür. Polarizibiliteler, normalde cgs birim sistemi cinsinden cm^3 olarak ifade edilir. Temel seviye polarizasyon, $10^{-24} \text{ cm}^3 = \text{\AA}^3$ aralığında olup genellikle $\text{\AA}^3$ biriminde verilir. Teorisyenler atomik birim olarak a_0^3 'ü kullanmayı tercih etmektedir. Burada a_0 Bohr yarıçapını temsil etmektedir [146]. $\alpha (\text{cm}^3) = 0.148184 \times 10^{-24} \times \alpha (a_0^3)$ şeklinde dönüştürülür [147].

Tablo 4.12 de hesaplanan dipol moment, hiperpolarizibilite ve polarizibilite değerleri verilmiştir. GHK tripeptidinin monomeri için dipol moment değeri 2.4119 D, hiperpolarizibilite değeri 1.298×10^{-30} esu'dur. Tabloda üre [148] ve P-nitroaniline [149] değerleri ile karşılaştırma yapılmış olup, GHK molekülünün değerlerinin B3LYP/6-31G(d,p) baz seti ile hesaplanan üre değerlerine daha yakın olduğu görülmüştür.

Tablo 4.12: GHK tripeptidinin hesaplanan dipol moment, polarizibilite ve hiperpolarizibilite değerleri.

Parametre	Monomer	Üre (esu)[148]	P-nitroaniline (esu) [149]
μ_x	-0.7297973		
μ_y	1.9605555		
μ_z	-1.2004423		
μ	2.411937744	1.3732	7.84
α_{xx}	251.7454427		
α_{xy}	4.4882273		
α_{yy}	229.822144		
α_{xz}	2.997448		
α_{yz}	-11.3107565		
α_{zz}	194.6273692		
$\langle \alpha_0 \rangle$	225.398318633		
$\langle \alpha_{tot(esu)} \rangle (x10^{-24})$	33.40403082	38.312	
β_{xxx}	139.4594647		
β_{xxy}	54.6869683		
β_{xyy}	-32.9549989		
β_{yyy}	-60.8883157		
β_{xxz}	22.6004551		
β_{xyz}	12.6647805		
β_{yyz}	-55.0481009		
β_{xzz}	0.0910463		
β_{yzz}	-21.5966514		
β_{zzz}	-69.8660798		9.79
β_0	150.3443726		
$\beta_{0(esu)} (x10^{-33})$	1298.825035		
$\beta_{0(esu)} (x10^{-30})$	1.298825035	0.3728	7.71

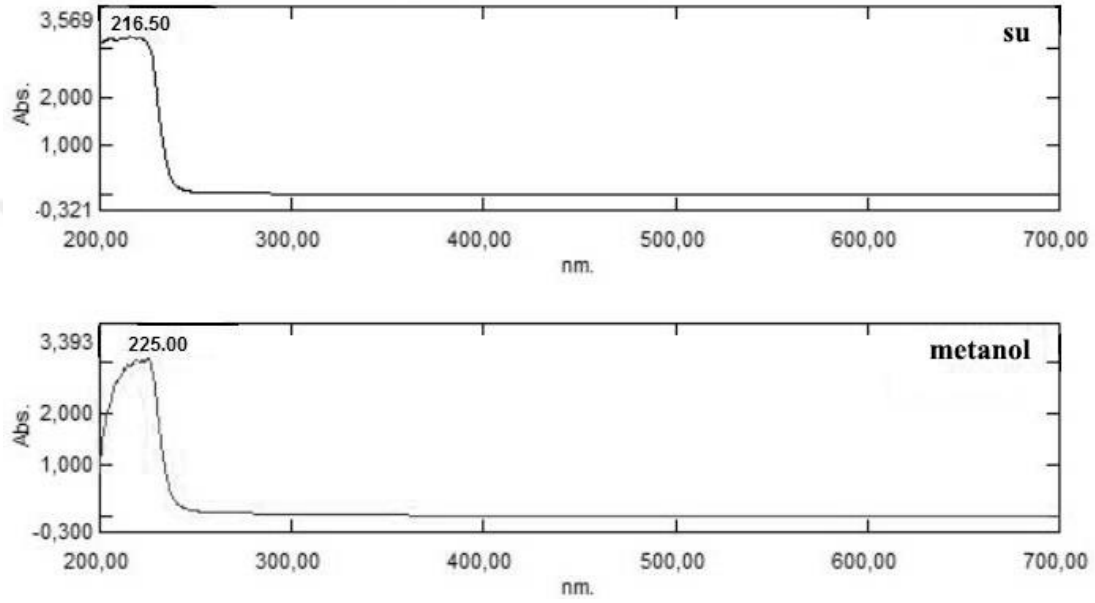
- Gaussian'dan çıkan polarizibilite (α) ve hiperpolarizibilite (β_0) değerleri atomik birimde (a.u.) verilmektedir. Hesaplanan değerler elektrostatik birime (esu) çevrilir.
- (α : 1 a.u. = 0.1482×10^{-24} esu; β : 1 a.u. = 8.639×10^{-33} esu)

4.1.2.5. UV Analizi

GHK tripeptide ait ultraviyole spektrumları teorik ve deneysel yöntemler kullanılarak ayrı ayrı hesaplanmış ve bu hesaplama sonuçları karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Hesaplamalar ve deneysel spektrum 200-700 nm aralığında kayıt edilmiştir. Elektronik soğurma (absorbsiyon) spektrumu, oda sıcaklığında metanol ve suda çözdürülerek ölçülmüştür. Teorik

olarak da, B3LYP/6-311++G(d,p) yöntemi ile TD-DFT hesaplamaları kullanılarak [150], taban durumundaki optimize geometriye ait molekülün uyarma enerjileri, absorbans değerleri elde edilmiştir.

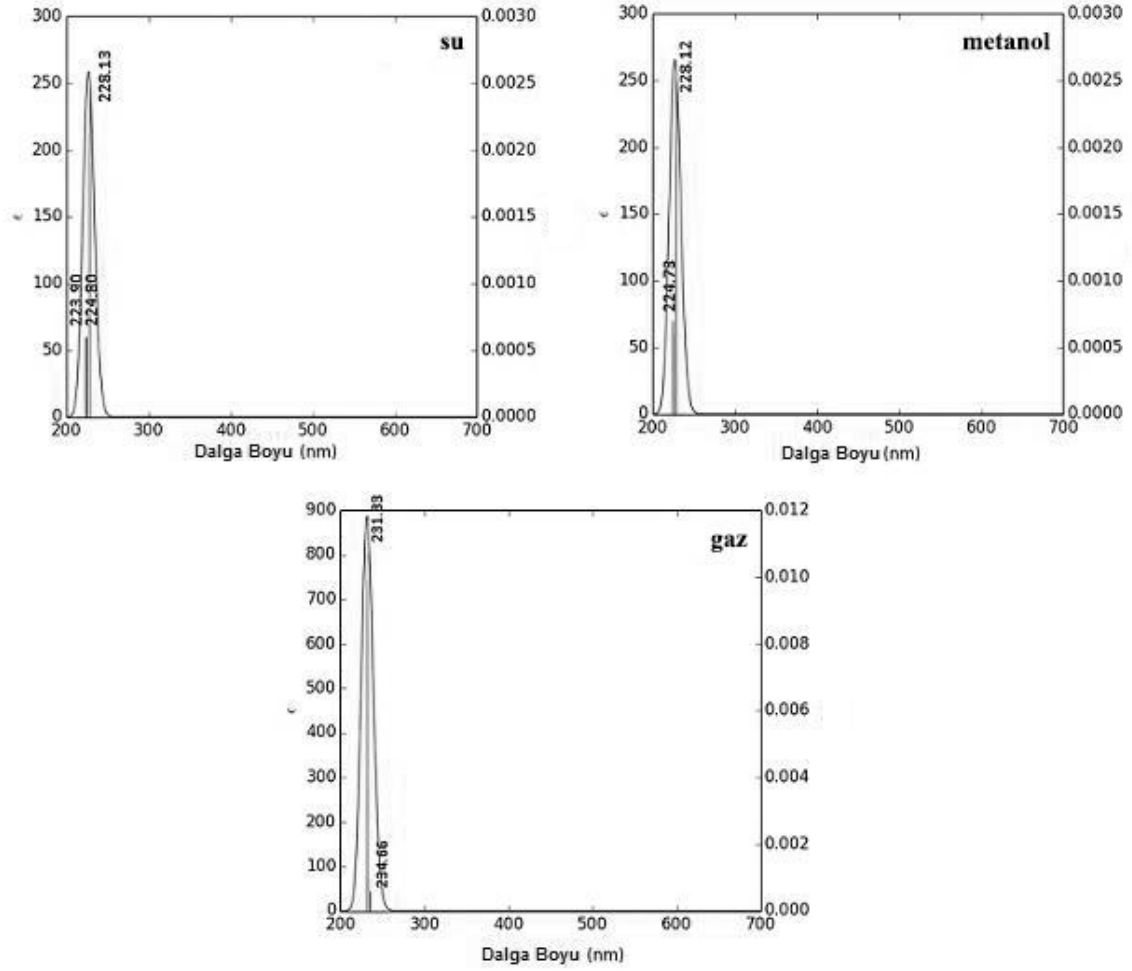
Deneysel ve teorik olarak elde edilen maksimum absorbans değerleri Şekil 4.6, Tablo 4.13 ve Şekil 4.7, Tablo 4.14’de paylaşılmıştır.



Şekil 4.6: GHK tripeptidinin su ve metanolde UV-Vis spektrometresinde ölçülen deneysel absorbans değerleri.

Tablo 4.13: GHK tripeptidinin elde edilen deneysel maksimum absorbans değerleri.

	E (eV)	λ (nm)	Abs.
Metanol	5.5104	225.00	3.085
Su	5.7267	216.50	3.245



Şekil 4.7: GHK tripeptidinin gaz, su ve metanol ortamında hesaplanan teorik absorbands değerleri.

Tablo 4.14: GHK tripeptidinin TD-DFT/6-311++G(d,p) baz seti ile elde edilen teorik absorbands değerleri.

TD-B3LYP/6-311++G(d,p)				
	E(eV)	λ (nm)	En Büyük Katkı	
Metanol	5.4351	228.12	H-3→L	(%56)
	5.5171	224.73	H→L+1, H→L	(%33)
	5.5337	224.05	H-2→L+1	(%36)
Su	5.4348	228.13	H-3→L	(%56)
	5.5152	224.80	H→L	(%38)
	5.5374	223.90	H-2→L+1	(%41)
Gaz	5.2836	234.66	H-2 → L	(%81)
	5.3596	231.33	H-1→ L+1	(%29)
	5.3612	231.26	H → L+5	(%28)

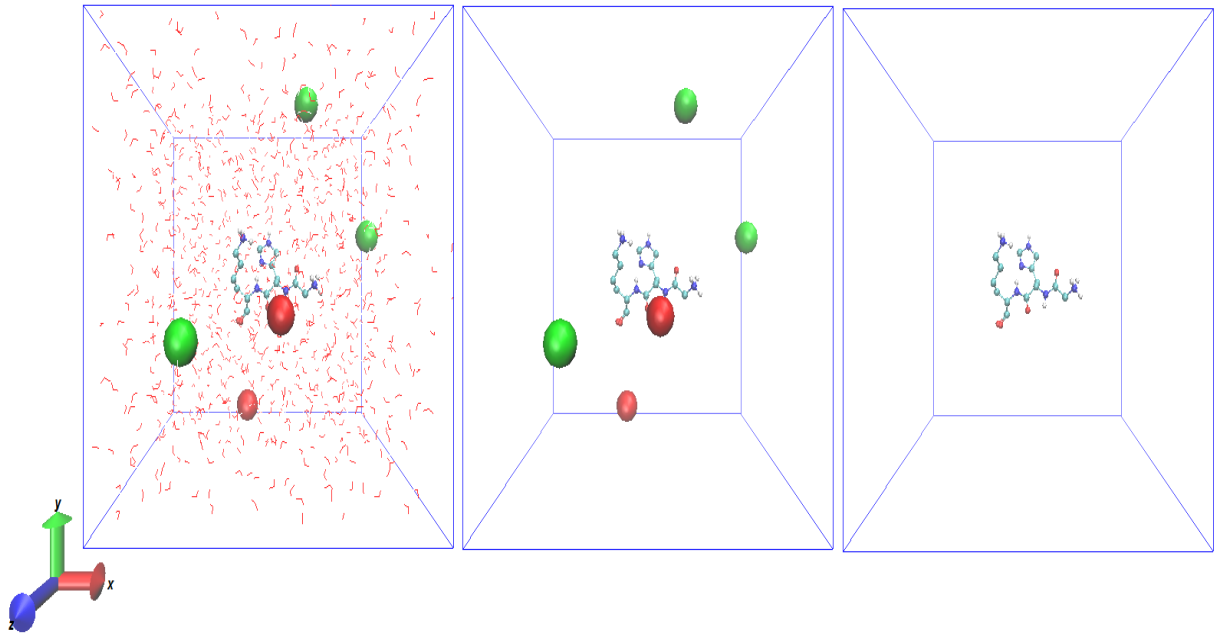
Şekil 4.7’de GaussSum programı kullanılarak elde edilen teorik absorbens değerleri görülmektedir.

Deneysel olarak hesaplanan absorbens değerleri Shimatsu UV-Vis Spektrometresi ile elde edilmiştir. 1 mg/ml derişime sahip distile suda, çözdürülmüş GHK ve metanolde çözdürülmüş GHK çözeltilerinin ayrı ayrı 200-700 nm aralığında absorbens değerleri ölçülmüştür.

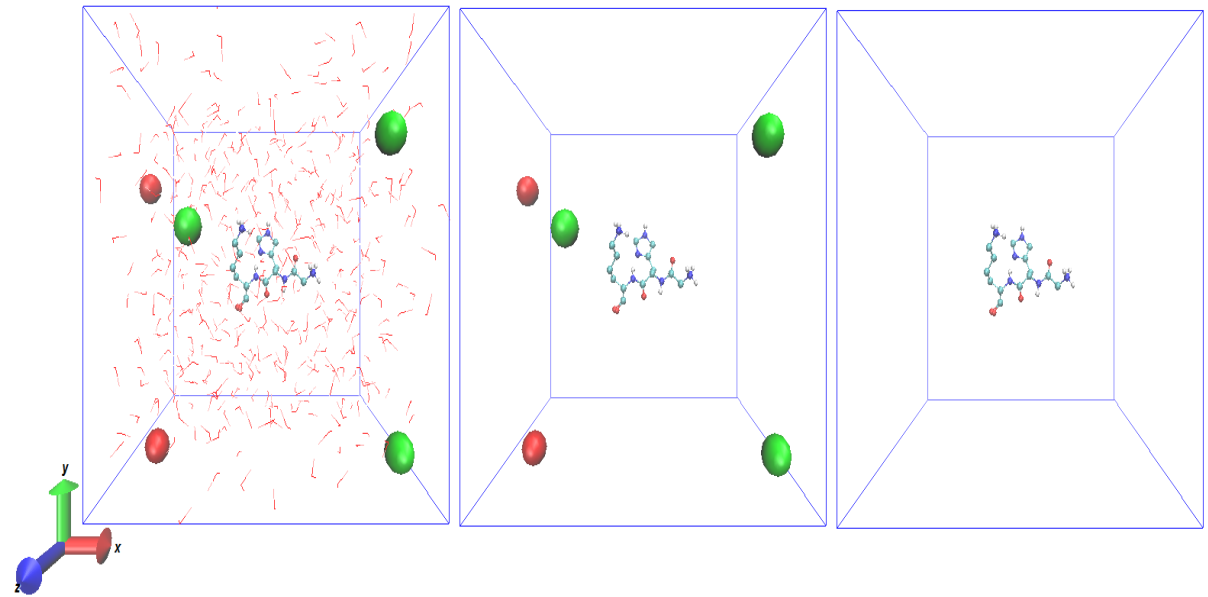
Teorik ve deneysel maksimum absorbsiyon dalgaboyları Tablo 4.13 ve 4.14’de verilmiştir. Deneysel olarak belirlenen maksimum absorbsiyon dalgaboyu değerleri, Şekil 4.6’da metanol içinde 225 nm ve su içinde 216.5 nm’dir. B3LYP / 6-311 ++ G (d, p) ile elde edilen λ (absorbsiyon dalgaboyu) değerleri, Şekil 4.6’da metanol içinde 228.12, 224.73, 224.05 nm, su içinde 228.13, 224.8, 223.9 nm’dir. GHK’nın hesaplanmış ve deneysel λ değerleri arasındaki farklar çok küçük değerlerdedir, bu farklar metanol ve su için sırası ile ~ 1 ve ~ 7 nm kadardır. Methanol ortamında GHK’nın teorik hesaplanan ve deneysel spektrum sonuçları karşılaştırıldığında λ dalgaboyu değerlerinin, sulu ortama göre daha uyumlu olduğu gözlenmiştir.

4.1.3. Moleküler Dinamik Simülasyon Analizi

GHK tripeptidinin moleküler dinamik hesaplamaları GROMACS v.5.1.2’de gerçekleştirilmiştir [54]. GHK tripeptidinin moleküler dinamik hesaplamaları için kullanılan başlangıç geometrisi, Gaussian paket programı yardımıyla DFT metodu B3LYP/6-311++G(d,p) baz seti ile optimize edilmiş olan geometrisidir ve bu geometri GROMACS programında GROMOS 43a1 kuvvet alanı kullanılarak topoloji dosyası oluşturulmuştur [151]. Başlangıçta, molekül merkezde olmak üzere kübik bir hücreye, molekül ve hücre arasında 1.0 nm mesafe ile yerleştirilmiş ve farklı ortamlar için (su ve metanol) programa tanıtılmıştır. Su ortamı için, hücre 944 mol SPC (Simple Point Charge) su modeli ile doldurulmuştur [152]. Sistemi nötralize etmek için Na^+ (2 adet) ve Cl^- (3 adet) iyonları eklenmiştir. Metanol ortamında gerçekleştirilecek olan simülasyon için hazırlanan sistem 444 mol metanol ile doldurulmuş ve sistemi nötralizasyonu sağlamak için Na^+ (2 adet) ve Cl^- (3 adet) iyonları eklenmiştir. Simülasyonlar, 2 fs’lik zaman aralıklarında, her üç yönde periyodik sınır koşulları uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

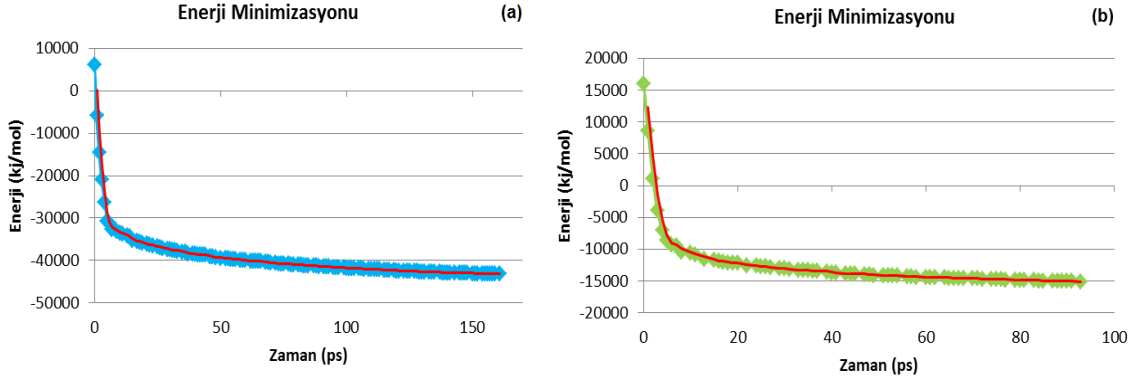


Şekil 4.8: Su ile doldurulmuş kübik hücre içerisinde 3 Cl⁻ ve 2 Na⁺ iyonu ile birlikte GHK tripeptidi.



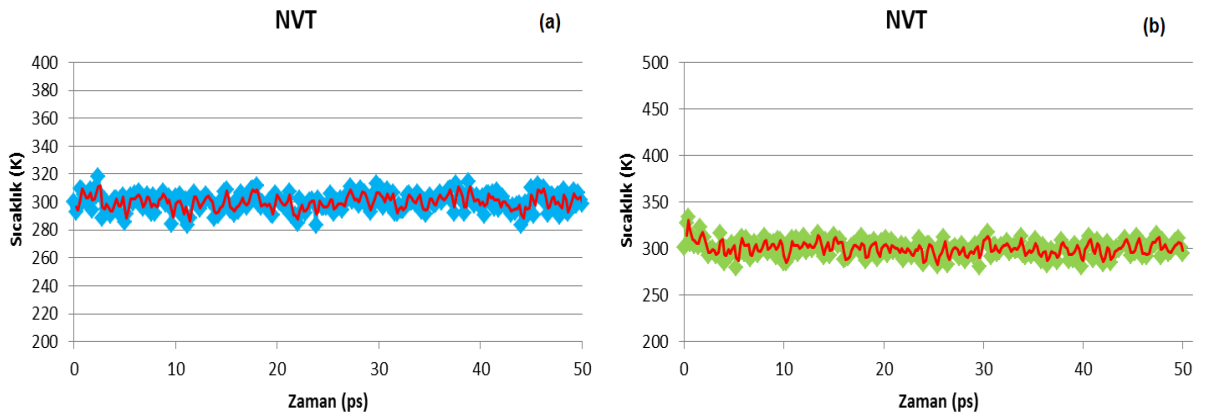
Şekil 4.9: Metanol ile doldurulmuş kübik hücre içerisinde 3 Cl⁻ ve 2 Na⁺ iyonu ile birlikte GHK tripeptidi.

Öncelikle, sistemler “*steepest descent*” metodu [153] seçilerek su dolu ortam için 200 ps, metanol dolu ortam için 100 ps boyunca enerji minimizasyonu yapılmıştır. Su ve metanol sistemlerinin başlangıç enerjileri sırasıyla 1.4517×10^3 kcal/mol ve 0.384×10^4 kcal/mol’ken minimize olmuş potansiyel enerjileri -1.0334×10^4 kcal/mol ve -0.36×10^4 kcal/mol olarak elde edilmiştir.

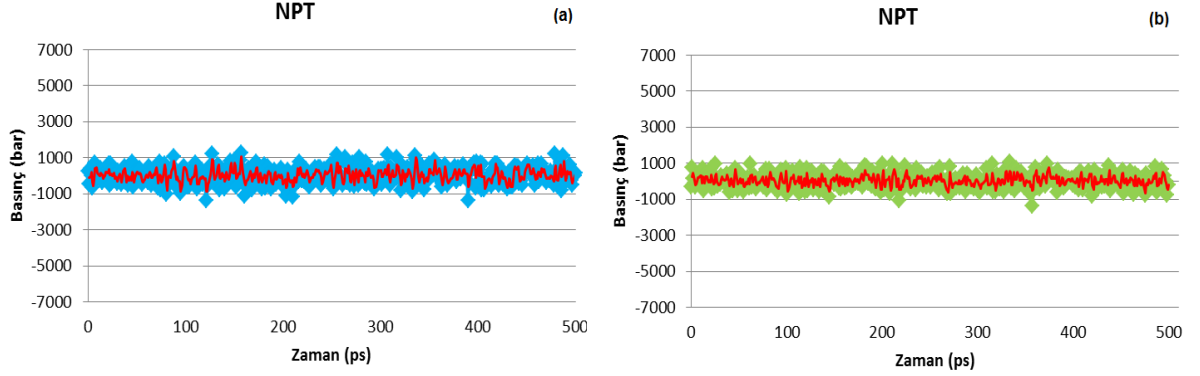


Şekil 4.10: Su dolu sistemin enerji minimizasyon grafiği (a), metanol dolu sistemin enerji minimizasyon grafiği (b).

Sistemlerin sıcaklık ve basınçlarını uygun koşullara getirmek için *NVT* (parçacık sayısı N , hacim V ve sıcaklık T) ve *NPT* (parçacık sayısı N , basınç P ve sıcaklık T) yaklaşımları sırasıyla kullanılarak sistemler dengeye getirilmiştir. İlk olarak, 50 ps boyunca *NVT* simülasyonu çalıştırılmış ve sistem istenilen sıcaklık olan 300 K’de *V-rescale* (Velocity rescaling thermostat) termostat kullanılarak dengeye getirilmiştir [154]. Sonrasında 500 ps boyunca *NPT* simülasyonu ile sistemin basıncı 1 bar’da sabitlenerek sistem için yoğunluk tespit edilmiştir. Sistemin basıncı izotropik Parrinello-Rahman barostatı ile dengeye getirilmiştir [155]. Zamana bağlı tüm yörüngeleri incelemek için, Newton’un 2. hareket denklemi 2 fs’lik zaman adımında Leap-frog algoritması ile integre edilmiştir.



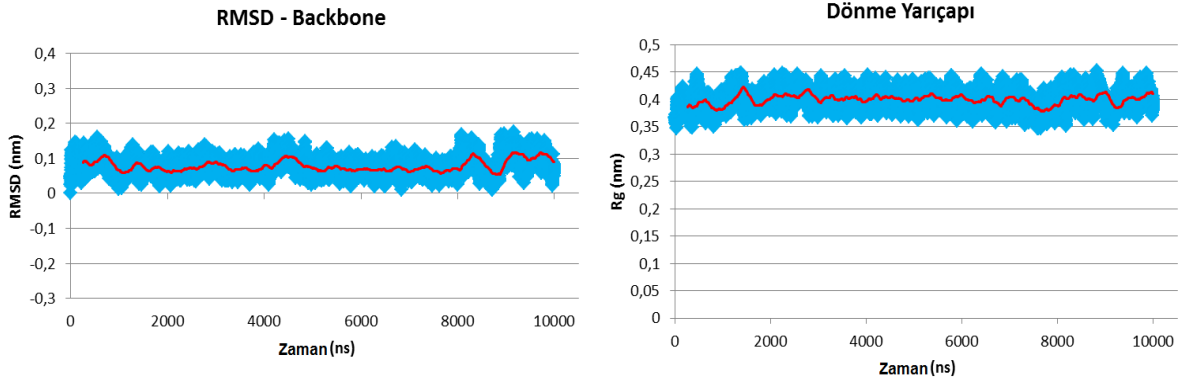
Şekil 4.11: Su dolu sistemin sıcaklık denge grafiği (a), metanol dolu sistemin sıcaklık denge grafiği (b).



Şekil 4.12: Su dolu sistemin basınç denge grafiği (a), metanol dolu sistemin basınç denge grafiği (b).

Dengeye getirilen sistemlerin, 10 ns boyunca LINCS algoritması kullanılarak Moleküler Dinamik simülasyon hesabı [156] gerçekleştirilmiştir. Moleküler yapıdaki değişimi belirlemek için, yönelim (trajectory) dosyaları kullanılmış ve “dönme yarıçapı (gyration)” ve “root mean square deviation (RMSD)” sonuçları yorumlanmıştır.

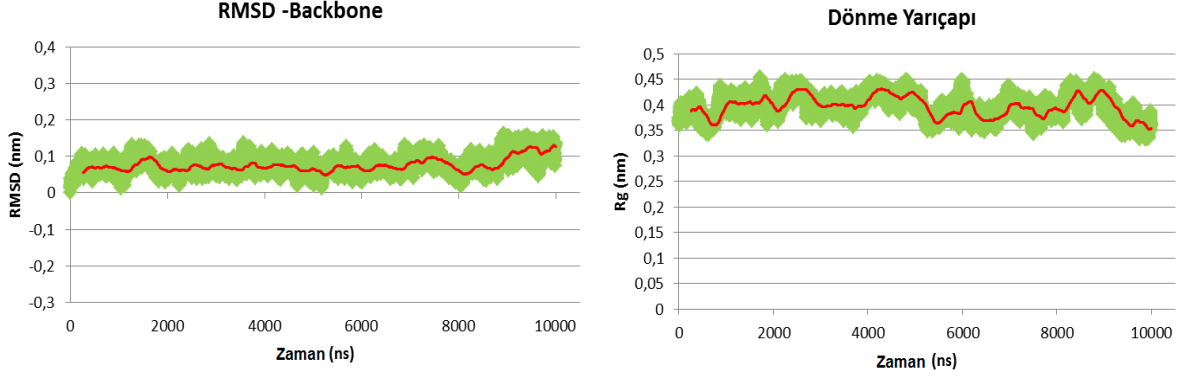
Gyration yani dönme yarıçapı sistem içerisindeki her bir atomun, kütle merkezine olan ağırlıklı skaler uzunluklarını ifade eder. Bununla birlikte RMSD, iki yapı için aynı tür atomlar arasında olan uzaklığın skaler ölçümüdür [48].



Şekil 4.13: Su bulunan sistemin 10 ns boyunca değişimi gözlenen RMSD ve gyration grafikleri.

RMSD değerinin $2 \text{ \AA}$ (0.2 nm)’ dan büyük değerlerde olması, peptidin parçalandığını, RMSD değerinin simülasyon boyunca $2 \text{ \AA}$ (0.2 nm) civarında veya altında olması ise peptidin yapısının bozulmadığını yani orijinal formunda kaldığını göstermektedir [157]. 10 ns’lik simülasyon boyunca GHK için RMSD değeri $0.17 - 0.01 \text{ nm}$ aralığında olduğu Şekil 4.13’de görülmektedir. Proteinin dönme yarıçapı (gyration), bir protein kararlı bir şekilde

katlandığında dengelidir ve nispeten sabit bir Rg değerindedir. Protein açıldığında ise Rg değeri zaman içinde değişecektir. Şekil 4.13’de görüldüğü üzere Rg değerinin nispeten sabit olduğu görülmektedir.



Şekil 4.14: Metanol bulunan sistemin 10 ns boyunca değişimi gözlenen RMSD ve gyration grafikleri.

10 ns’lik simülasyon boyunca metanol dolu sistemde GHK için RMSD değeri 0.16 - 0.011 nm aralığında olduğu Şekil 4.14’de görülmektedir. RMSD değerlerinin literatür ile uyum içinde olması GHK tripeptidinin su ve metanol ortamlarındaki kararlılığını bize vermektedir.

4.1.4. Moleküler Kenetlenme (Doking) Analizi

Moleküler doking (kenetlenme) hesabı Schrödinger Maestro programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Schrödinger Release 2017-4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017).

10 ns boyunca su ortamında moleküler dinamik simülasyonu gerçekleştirilen GHK tripeptidinin kararlı haldeki molekül yapısı GROMACS programından alınarak doking (kenetlenme) hesaplamasında ligand olarak kullanılmak üzere Schrödinger Maestro programına tanıtılmıştır.

Schrödinger Software (2017-4)’in Ligprep uygulaması yardımıyla (Schrödinger Release 2017-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) OPLS kuvvet alanı ile ligand, doking (kenetlenme) için hazırlanmıştır. Ligand için tüm hidrojenler hesaba katılarak, iyonizasyon seviyeleri $\text{pH } 7.0 \pm 2.0$ da 24 farklı konformer elde edilmiştir.

Tez çalışmasının deneysel kısımlarından biri olan toksisite testinde, sentezlenen nanopartiküllerin toksik etkisi fare fibroblast hücrelerindeki L929 hücre hattı üzerinde test

edilmiştir. Bu nedenle doking (kenetlenme) hesaplamasında fare fibroblast hücresinde bulunan bir protein olan Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor2 - PDB kodu: 5EG3) reseptör olarak seçilmiştir. Fibroblast büyüme faktörü, hücrede apoptosisi önlemektedir [158]. Protein data banktan elde edilen protein eksik rezidü bulundurduğu için, doking (kenetlenme) hesaplamalarında eksik rezidü bulunmayan SWISS-MODEL'den elde edilen kristal data kullanılmıştır [159]. Schrödinger paket programının Protein Preparation Wizard uygulaması ile moleküler doking (kenetlenme) için hedef olarak kullanılan reseptör, yapı içerisinde A zinciri haricindeki yapılar (sular vs.) silinerek ve polar hidrojenler ağır atomlara eklenerek doking (kenetlenme) hesabı için hazırlanmıştır.

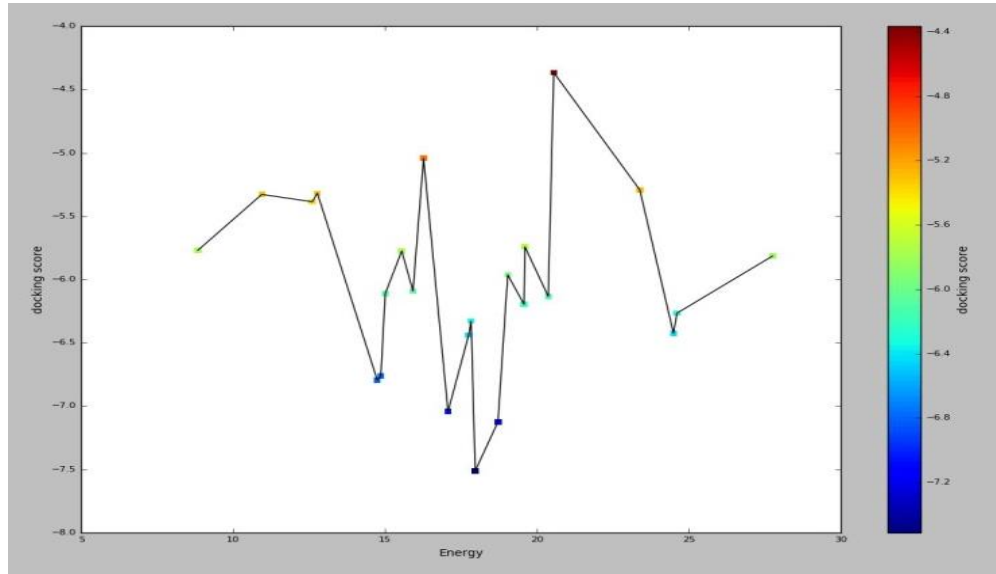
Ardından, hidrojen bağları nötr pH değerinde atanmış ve PROPKA uygulaması kullanılarak proteinin yapısında bulunan her bir amino asitin gerçek yükleri ve pH değerleri de ayarlanarak, yapı optimize edilmiştir. Daha sonrasında, protein için enerji minimizasyonu 0,3 Å RMSD ve OPLS3 kuvvet alanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Schrödinger programının Glide tool uygulaması (Schrödinger Release 2017-4: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) kullanılarak proteinin aktif bölgesinin tam olarak belirlenebilmesi için grid oluşturulmuştur. Proteinin aktif bölgesinde ligandın tüm konformerlerinin 24 farklı bağlanma pozisyonları için 24 farklı kenetlenme durumu elde edilmiştir.



Şekil 4.15: GHK tripeptidi ve 5EG3 proteini.

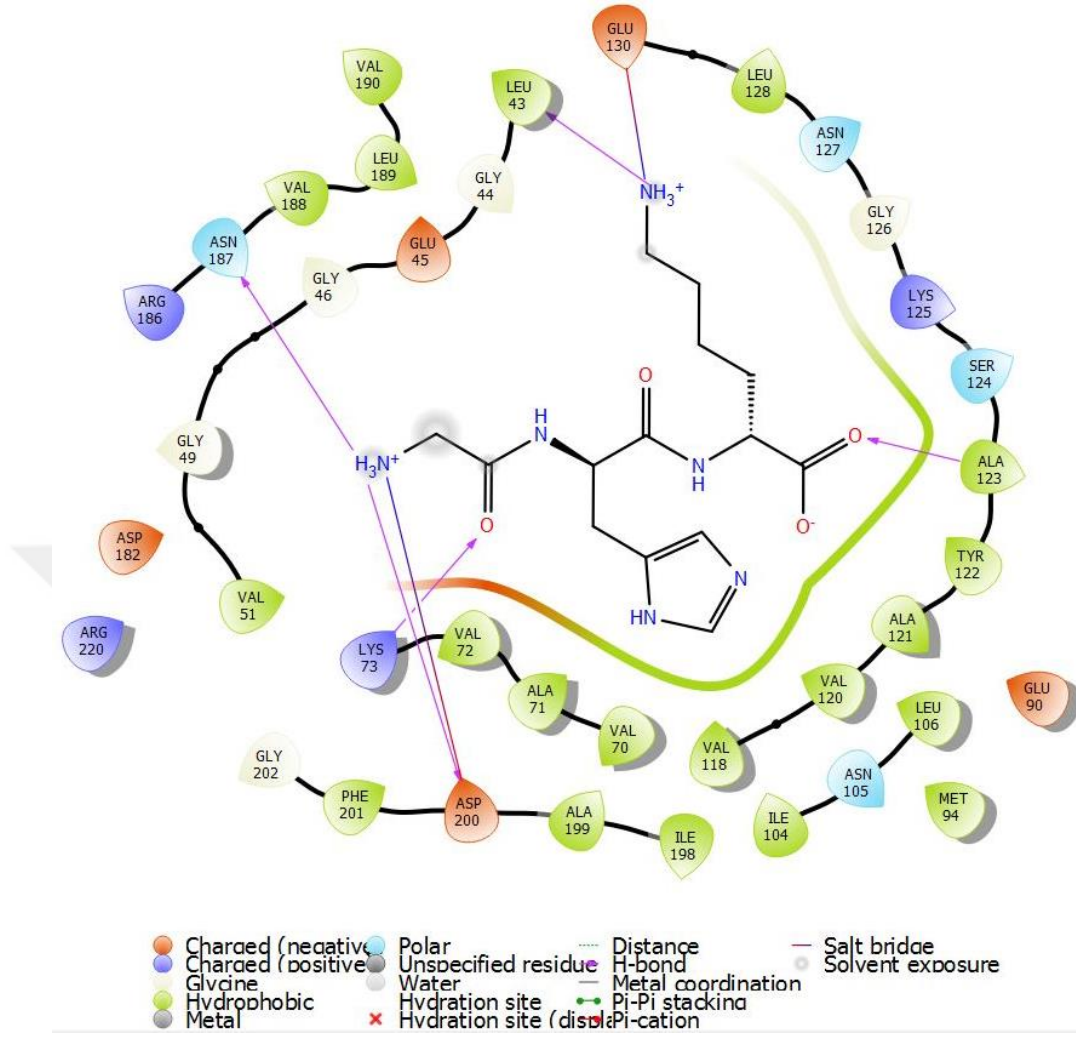
Bu konformerler arasında en iyi kenetlenme sonucunu -7.513 kcal/mol doking (kenetlenme) skoru ile 17.971 kcal/mol enerjiye sahip konformer vermiştir. Proteine kenetlenmiş olan tüm konformerlerin bağlanma enerjilerine göre dağılımı Şekil 4.16 ve Tablo 4.15’de verilmiştir. Tablo 4.15’deki sıralamalar doking (kenetlenme) skoruna göre yapılmıştır.



Şekil 4.16: Ligand enerjisine karşılık gelen doking (kenetlenme) skor değerleri.

Tablo 4.15: GHK tripeptidinin 24 farklı konformeri ve 5EG3 proteini ile yapılan doking (kenetlenme) hesaplamaları sonucunda elde edilen doking skor değerleri.

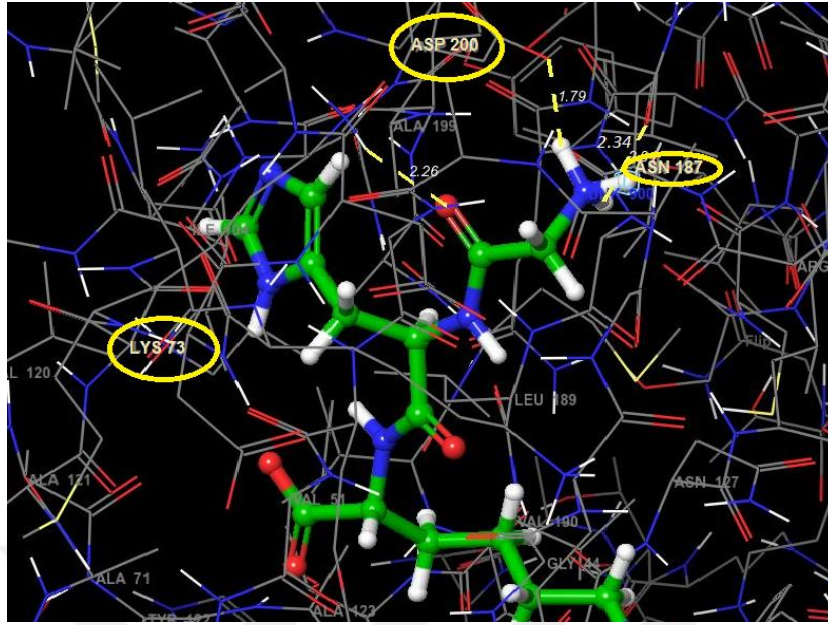
Ligand	Enerji (kcal/mol)	Doking (kenetlenme)	
		Skoru (kcal/mol)	Aradaki Fark
1	17.971	-7.513	-
2	18.719	-7.126	0.387
3	17.075	-7.043	0.47
4	14.745	-6.795	0.718
5	14.862	-6.762	0.751
6	17.754	-6.441	1.072
7	24.500	-6.425	1.088
8	17.835	-6.329	1.184
9	24.616	-6.267	1.246
10	19.576	-6.196	1.317
11	20.376	-6.135	1.378
12	15.008	-6.112	1.401
13	15.921	-6.091	1.422
14	19.042	-5.964	1.549
15	27.760	-5.816	1.697
16	15.552	-5.775	1.738
17	8.835	-5.771	1.742
18	19.608	-5.742	1.771
19	12.605	-5.387	2.126
20	10.944	-5.328	2.185
21	12.771	-5.318	2.195
22	23.391	-5.293	2.22
23	16.270	-5.043	2.47
24	20.556	-4.365	3.148



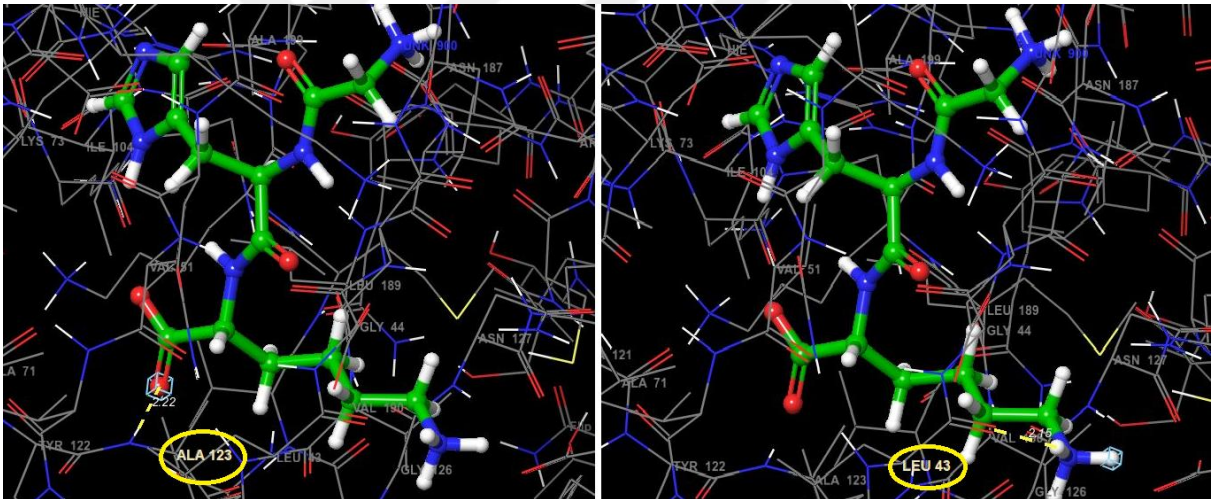
Şekil 4.17: GHK tripeptidinin proteinin aktif bölgesine bağlanması sonucunda meydana gelen en kararlı bağlanma şeklinin etkileşimleri.

Şekil 4.17’de iki boyutlu olarak gösterilen doking (kenetlenme) şemasında yeşil, kırmızı, açık ve koyu mavi bölgeler gösterilmektedir. Proteinin aktif bölgesinde yer alan açık yeşil ile resmedilmiş olan rezidüler, hidrofobik amino asitleri, kırmızı ile gösterilen bölgeler negatif yüklü, koyu mavi ile gösterilen bölgeler pozitif yüklü amino asitleri ve açık mavi bölgeler ise polar amino asitleri ifade etmektedir. Ayrıca iki boyutlu bağlanma pozisyonunda mor oklar yer almaktadır. Bu gösterimler ligand ve reseptör arasındaki olası hidrojen bağlarını bize vermektedir. Bunun yanında yine mor düz çizgi ile gösterilen tuz köprüleri de ligand ve reseptör arasındaki etkileşimi göstermektedir.

Ligand ve reseptör için ayrı ayrı elektrostatik potansiyel haritaları çizdirilmiştir. Bu haritalarda yer alan, kırmızı renkli bölgeler, en düşük potansiyeli yani elektronca en zengin



Şekil 4.20: GHK tripeptidi ile ASP200, ASN187 ve LYS73 arasındaki hidrojen bağı gösterimi.



Şekil 4.21: GHK tripeptidi ile (solda) ALA123 ve (sağda) LEU43 arasındaki hidrojen bağı etkileşimleri.

Emilim (Absorption), dağılım (Distribution), metabolizma (Metabolism) ve atılım (Excretion) – (ADME) analizinde yaygın olarak kullanılan bazı moleküler tanımlayıcıları hesaplamak için Schrödinger'in QikProp modülü (Schrödinger Release 2017-4: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) kullanılmıştır. QikProp modülü, molekül ağırlığı, insan oral emilim yüzdesi, polar yüzey alanı (PSA) ve oktanol-su bölme katsayısının logaritması (QPlog-Po/w) gibi moleküle ait bazı önemli farmokinetik özellikleri hesaplamak için kullanılmıştır.

Tablo 4.16: GHK tripeptidinin 5EG3 proteini ile yapılan doking (kenetlenme) sonucunda elde edilen ADME özellikleri.

Özellik	Değer	Önerilen Değerler
Doking (kenetlenme) skoru (kcal/mol)	-7.513	
Polar yüzey bölgesi, PSA (Å ²)	197.821	7.0 / 200.0
Moleküler Ağırlık, MW (g/mol)	340.381	130.0 / 725.0
Polarlanabilirlik (Angstroms ³)	30.663M	(13.0 / 70.0)
heksadekan/gaz için QP log P	12.735M	(4.0 / 18.0)
oktanol/gaz için QP log P	25.070M	(8.0 / 35.0)
su/gaz için QP log P	21.918M	(4.0 / 45.0)
oktanol/su için QP log P	-3.868	(-2.0 / 6.5)
sulu çözünürlük için QP log S	0.515	(-6.5 / 0.5)
QP log S - konformasyon bağımsızlığı	0.636	(-6.5 / 0.5)
QP log K h sa Serum Protein Bağlanma	-1.556	(-1.5 / 1.5)
beyin/kan için QP log BB	-2.441	(-3.0 / 1.2)
Primer Metabolitlerin Sayısı	8	(1.0 / 8.0)
Öngörülen CNS Etkinliği (-- to ++)	--	
HERG K ⁺ Kanal Blokağı: log IC ₅₀	-1.760	(-5 aşağısındaki değerler)
Caco-2 Geçirgenliği (nm/sec)	0	(<25 kötü. >500 iyi)
Görünen MDCK Geçirgenliği (nm/sec)	0	(<25 kötü. >500 iyi)
Cilt geçirgenliği için QP log Kp	-9.697	(Kp birimi cm/sa)
maksimum transdermal taşıma oranı	0	(mikrogram /cm ² -sa)
Lipinski Kuralı	1	(en fazla 4)
% İnsan Oral Emilimi (+-20%)	0	(<25% kötü)

4.2. PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN KARAKTERİZASYONU

4.2.1. Boyut ve Potansiyel Analizi (Zeta Potansiyeli)

Boş PLGA ve PLGA kaplı GHK yüklü nanopartiküllerin Zeta Potansiyel ve partikül boyutu ölçümleri için Malvern Zetasizer Nano ZS kullanılmıştır.

Tablo 4.17: Boş ve GHK tripeptidi yüklü nanopartiküllerin boyut, zeta ve Pdl değerleri.

PVA (%)	PLGA	Yüklenen GHK			
		miktarı	Boyut (nm)	Zeta (mV)	Pdl
% 2.5	150 mg	Boş PLGA	246.1±82.69	-13.2±5.44	0.084
		0.25 mg GHK	240.8± 60.54	-0.783±5.64	0.025
		0.5 mg GHK	222.1± 61.27	-1.61±7.59	0.060

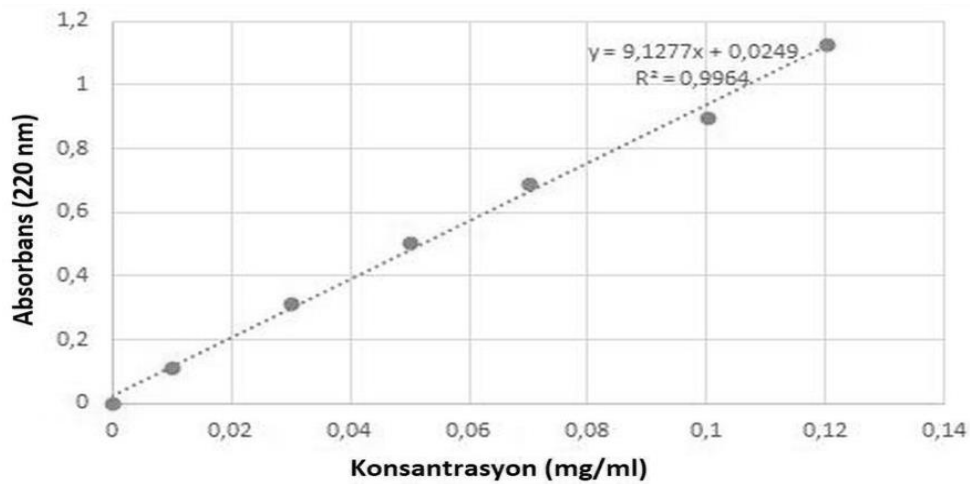
Tablo 4.17 (devam): Boş ve GHK tripeptidi yüklü nanopartiküllerin boyut, zeta ve Pdl değerleri.

PVA (%)	PLGA	Yüklenen GHK			
		miktarı	Boyut (nm)	Zeta (mV)	Pdl
% 2.5	150 mg	1.0 mg GHK	221.7± 53.50	-13.2±7.55	0.009
		1.5 mg GHK	223.6± 52.08	-1.65±6.33	0.010
		2.0 mg GHK	227.2± 93.58	-7.18±6.42	0.124
		2.5 mg GHK	238.3± 83.88	-3.39±4.32	0.108
		3.0 mg GHK	214.7± 69.14	-5.98±7.90	0.069
		5.0 mg GHK	223.0±75.10	-21.4±6.21	0.074
		10.0 mg GHK	231.3±78.03	-20.5±6.66	0.064
		20.0 mg GHK	245.8±72.32	-13.5±5.30	0.047

0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 5.0, 10.0 ve 20.0 mg GHK yüklü PLGA nanopartikülleri içerisinde Zeta Potansiyeli ve partikül boyutu göz önüne alındığında optimum partikül boyutu 223.0 ± 75.10 nm, zeta potansiyeli -21.4 ± 6.21 mV ile 5 mg GHK yüklü partikül olduğu görülmüştür.

4.2.2. Yükleme Verimi ve Enkapsülasyon Sonuçları

Öncelikle, Nanodrop ölçüm cihazı kullanılarak (220 nm) standart GHK eğrisi elde edilmiştir. Enkapsülasyon ve yükleme verimleri, nanopartiküllerin, sıvı nanopartikül süspansiyonundan santrifüj edilerek ayrılması sonucu ölçülmüştür [161].

**Şekil 4.22:** GHK tripeptidinin Nanodrop cihazında elde edilen karakteristik eğrisi.

Enkapsülasyon ve yükleme verimleri aşağıda sırası ile verilen denklemler ile hesaplanmıştır;

$$\text{Enkapsülasyon Verimi} = \frac{\text{Toplam GHK miktarı} - \text{Serbest GHK miktarı}}{\text{Toplam GHK miktarı}} \times 100 \quad (4.9)$$

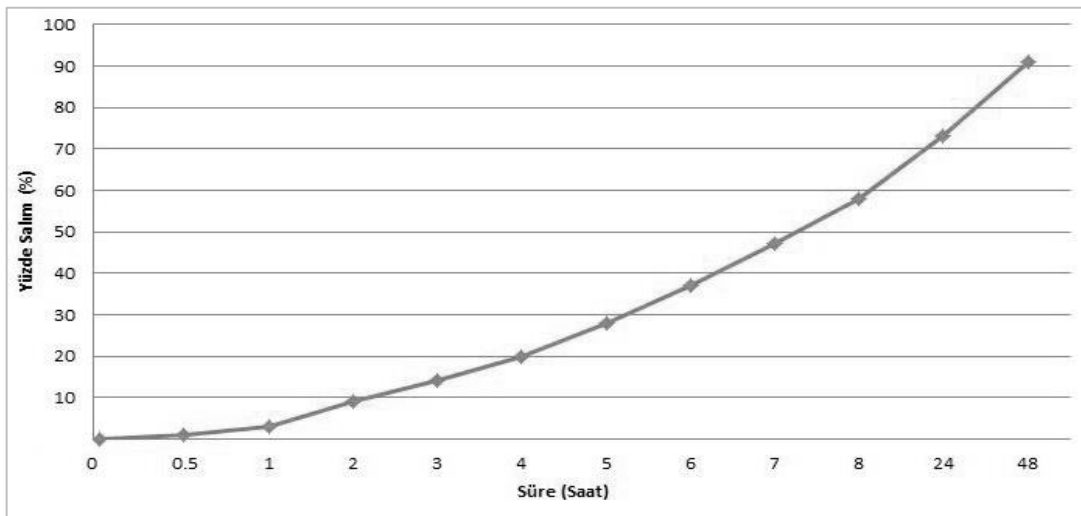
$$\text{Yükleme Verimi} = \frac{\text{Enkapsüle olan GHK miktarı}}{\text{Toplam nanopartikül ağırlığı}} \times 100 \quad (4.10)$$

GHK'nın enkapsülasyon verimliliği ilk denklem üzerinden hesaplanmış ve % 94 olduğu bulunmuştur. Bu sonuç GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin başarıyla elde edildiğini göstermektedir.

Toplam GHK yüklü PLGA nanopartikül kütleindeki GHK miktarı ikinci denklem üzerinden hesaplanmıştır. GHK yüklü PLGA nanopartiküllerin yükleme verimliliği % 4 olarak belirlenmiştir.

4.2.3. In vitro Salım Testi Sonuçları

GHK yüklü PLGA nanopartikül formülasyonu diyaliz membran içine alınarak 50 ml PBS tampon içeren kapaklı kaplarda (pH=7,4), 37 °C'de yatay çalkalayıcıda orta rpm'de çalkalanmaya bırakılmıştır. Belirli sürelerde (30.dk, 1.sa., 2.sa., 3.sa., 4.sa., 5.sa., 6.sa., 7.sa., 8.sa., 24.sa., 48.sa.) örnekler alınarak UV-Vis spektrofotometrede salınan GHK miktarı hesaplanmıştır. UV-Vis spektrofotometrede ölçüm saatlerinde elde edilen absorpsiyon sonuçları, GHK standart eğri denkleminde yerine koyularak, salınan GHK miktarı hesaplanmıştır.

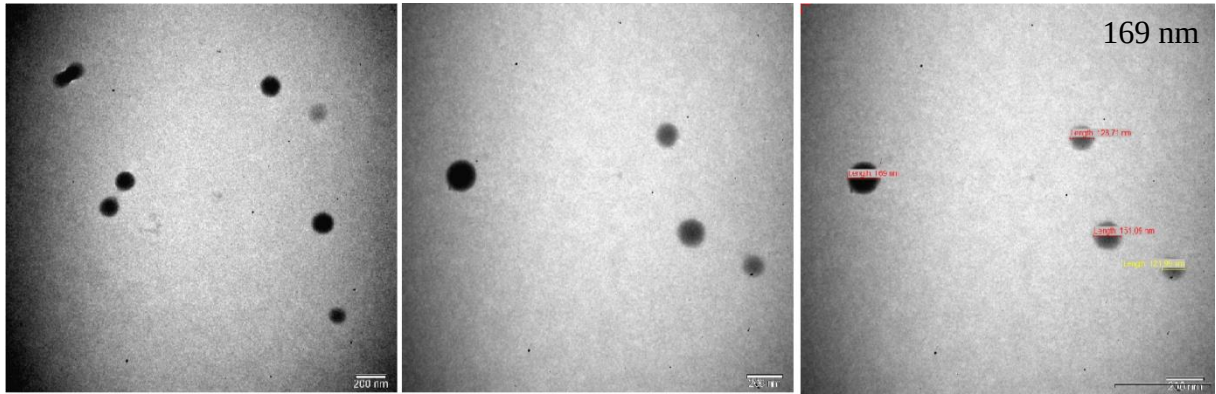


Şekil 4.23: GHK tripeptidi yüklü PLGA nanopartiküllerinin salım grafiği.

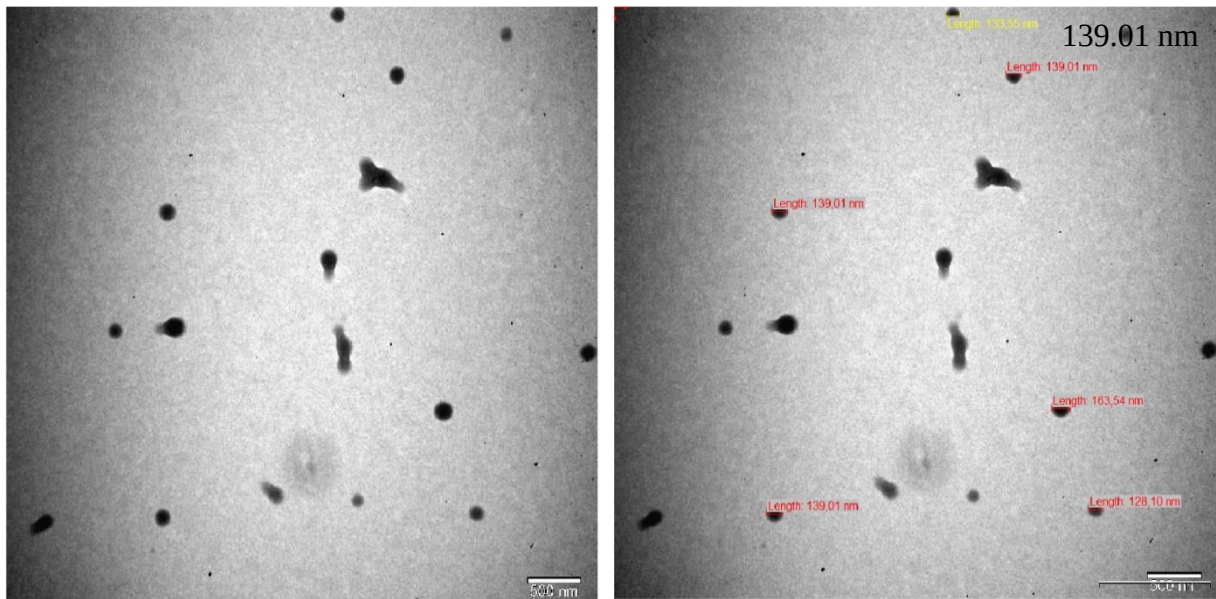
Şekil 4.23’de GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin, 48.saatin sonunda %90 GHK salındığı görülmüştür.

4.2.4. TEM Analizi

GHK yüklü PLGA nanopartiküllerin morfolojisi Transmisyon Elektron Mikroskobu ile belirlenmiştir. TEM görüntülerine göre, GHK yüklü PLGA nanopartikülleri katı yoğun yapıya sahip küresel parçacıklardır. Şekil 4.24 ve 4.25’da gösterildiği gibi, TEM görüntüleri, boş ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin, ortalama büyüklükte düzgün boyut dağılımı olduğunu göstermiştir.



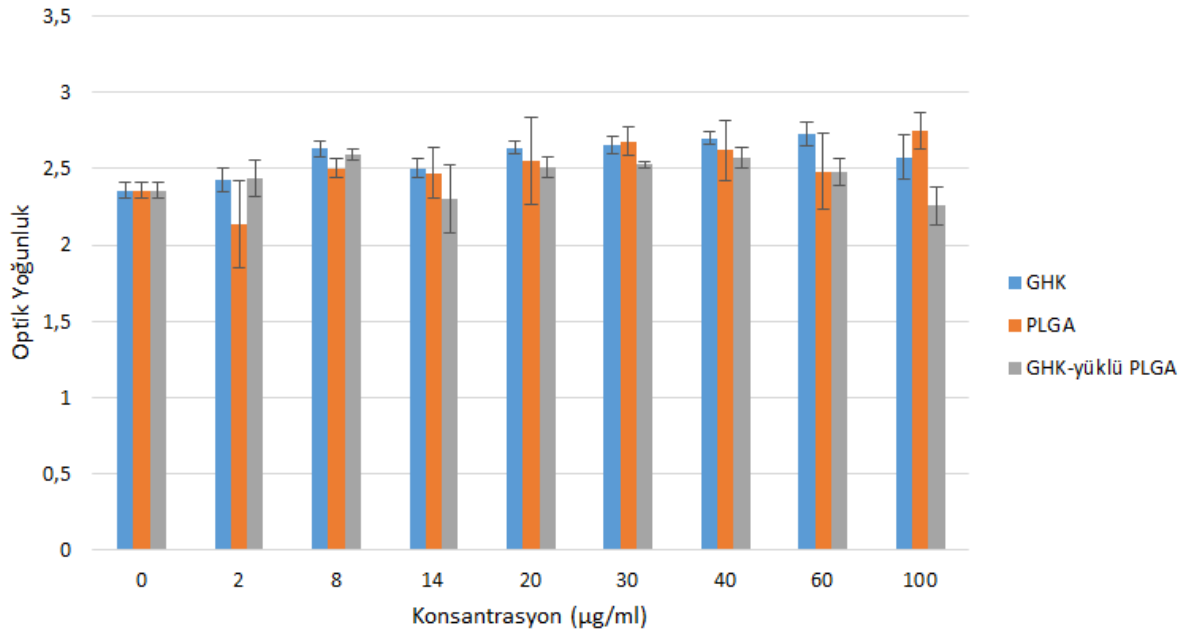
Şekil 4.24: Boş PLGA nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri.



Şekil 4.25: 5mg GHK yüklü PLGA nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri.

4.2.5. In vitro Hücre Kültürü Sonuçları

Şekil 4.26’da görüldüğü gibi incelenen konsantrasyonlarda GHK, PLGA nanopartikülleri veya GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin toksik etkisi yoktur. Hücre canlılığı ile orantılı olarak artan optik yoğunluk değeri deney gruplarında kontrole benzer değerlerdedir.



Şekil 4.26: GHK, PLGA nanopartikülleri ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının L929 hücre canlılığı üzerine etkisi.

Tablo 4.18’de ise yukarıdaki absorbans değerleri % canlılık olarak ifade edilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi hücre canlılıkları tüm gruplarda %90’ın üzerindedir. ISO 10993-5 standardına göre hücre canlılığı %80’in üzerindeki değerler non-toksik olarak ifade edilmektedir [162,163]. Buna göre incelediğimiz konsantrasyonlarda GHK, PLGA nanopartikülleri ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin toksik değildir.

Tablo 4.18: GHK, PLGA nanopartikülleri ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının L929 hücre canlılığı üzerine etkisinin % canlılık olarak ifadesi.

Konsantrasyon (µg/ml)	% Canlılık		
	GHK	PLGA	GHK yüklü PLGA
2	103,1	91,0	103,6
8	111,9	106,5	110,4
14	106,4	105,2	97,9
20	112,3	108,6	106,7
30	113,1	114,0	107,5
40	114,9	111,4	109,3
60	114,9	111,4	109,3
100	116,0	105,5	105,4

4.2.6. FT-IR ve RAMAN Analizi

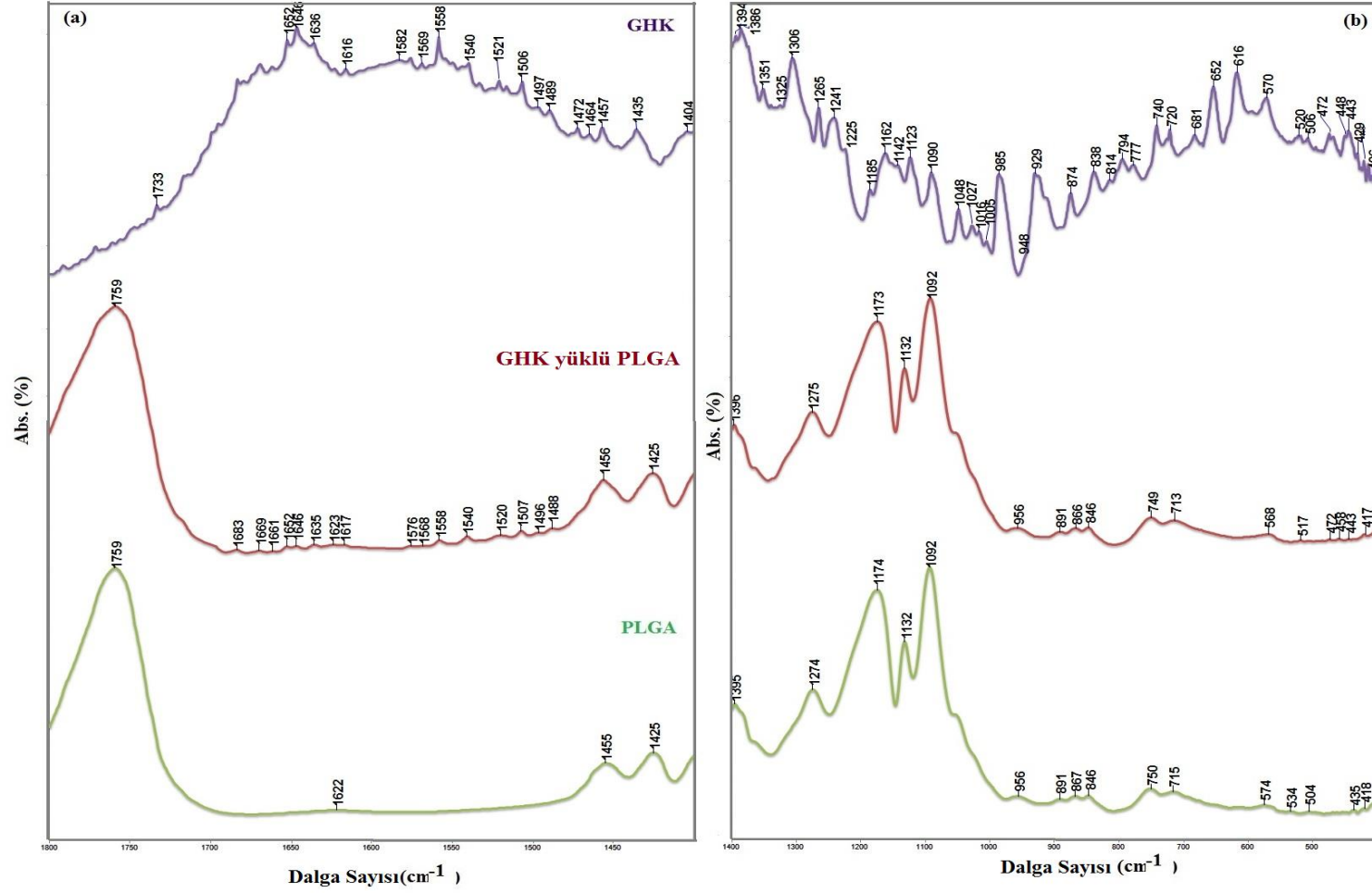
GHK ve PLGA sentetik polimeri arasındaki olası kimyasal etkileşimleri incelemek için FT-IR ve ATR analiz teknikleri kullanılmıştır. GHK peptidi, GHK yüklü PLGA nanopartikülleri ve PLGA nanopartikülleri için ATR ve FT-IR spektrumları, 2 cm^{-1} çözünürlükte $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ aralığında Jasco 6300 FT-IR spektrometresi kullanılarak elde edilmiştir. FT-IR spektrumları KBr pellet tekniği kullanılarak elde edilmiştir. ATR spektrumu için Jasco 6300 FT-IR spektrometresine takılan ATR ölçüm başlığı kullanılmıştır. Şekil 4.27’de verilen FT-IR ve Şekil 4.28’de verilen ATR spektrumlarına ait spektrumlar karşılaştırmalı olarak $1800\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ titreşim dalgasayısına göre çizdirilmiştir.

Raman spektrumları, NRS 3100 Dispersif Mikro Raman spektrometresi kullanılarak elde edilmiştir. GHK tripeptidi yeşil (532 nm, Şekil 4.35) ve kırmızı (785 nm, Şekil 4.36) lazerler kullanılarak ayrı ayrı uyarılmıştır.

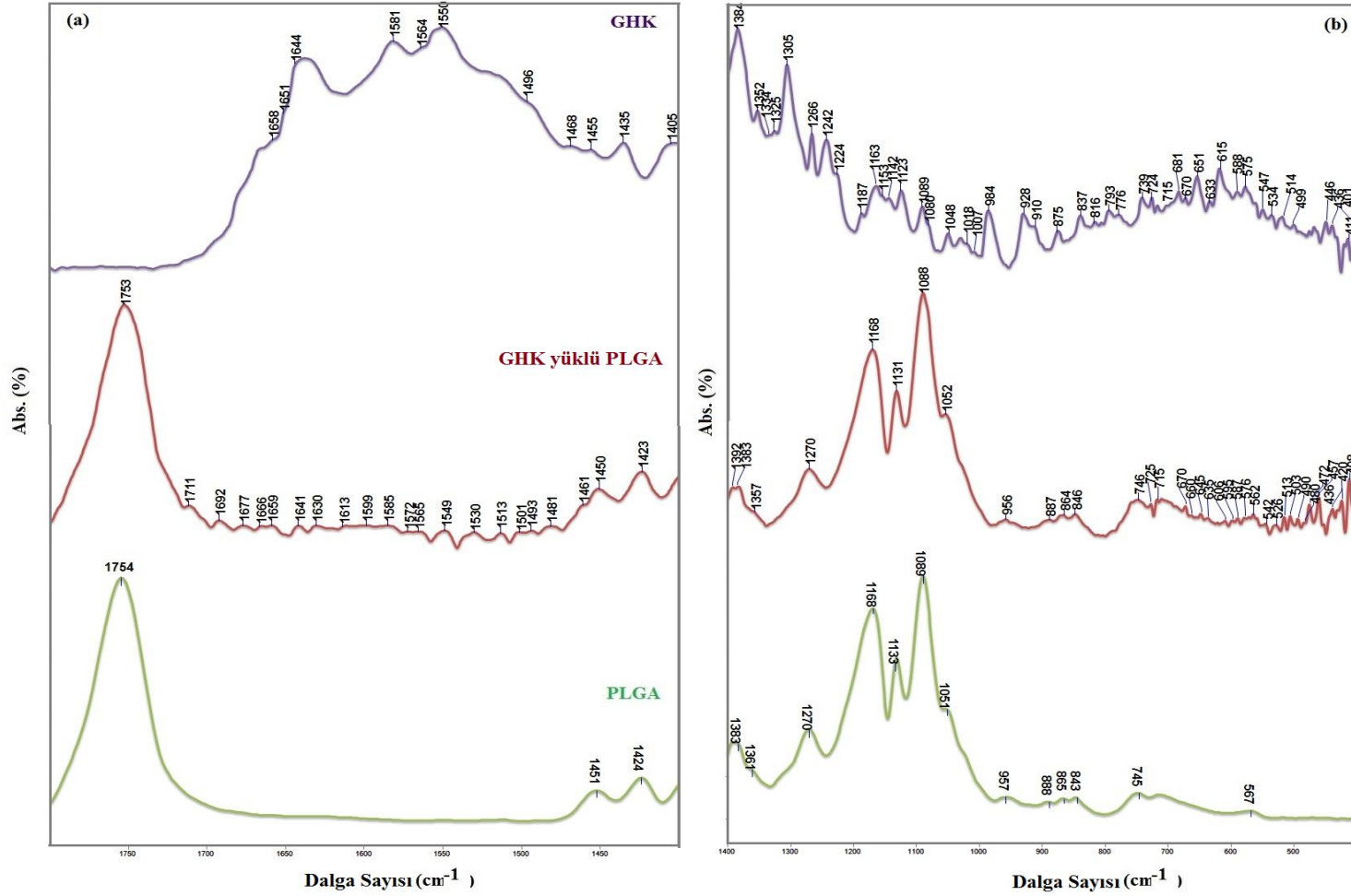
FT-IR ve ATR karşılaştırmalı spektrumları incelendiğinde, $1700 - 1455 \text{ cm}^{-1}$ bölge aralığı ve $750 - 400 \text{ cm}^{-1}$ bölge aralığında, saf GHK’ya ait olan karakteristik pikler (C=O ester, amid bantları, C=C (his), C=N (his), CH_2 , halka deformasyon ve karboksil grubu açılı bükülmesi) GHK yüklü PLGA polimerine ait spektrumlarda gözlemlenmiştir. Ancak, yüklenen GHK miktarının (5 mg) az olması nedeniyle; spektrumlarda, GHK’yı karakterize eden diğer pikler, polimer spektrumu altına gizlenmiştir. Bunun için “*Bant Komponent Analizi Yöntemi*” ile

(base line düzeltmesi ve smoothing işlemi; Savitzky Golay, 2.derece 9.polinom) GHK yüklü PLGA nanopartiküllerine ait spektrumlar açılarak sadece GHK'ya ait olan saf pikler görülebilmektedir. Bant komponent analizleri GRAMS/AI paket programı [164] kullanılarak ATR spektrumları için gösterilmiştir (Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32 Şekil 4.33, Şekil 4.34).

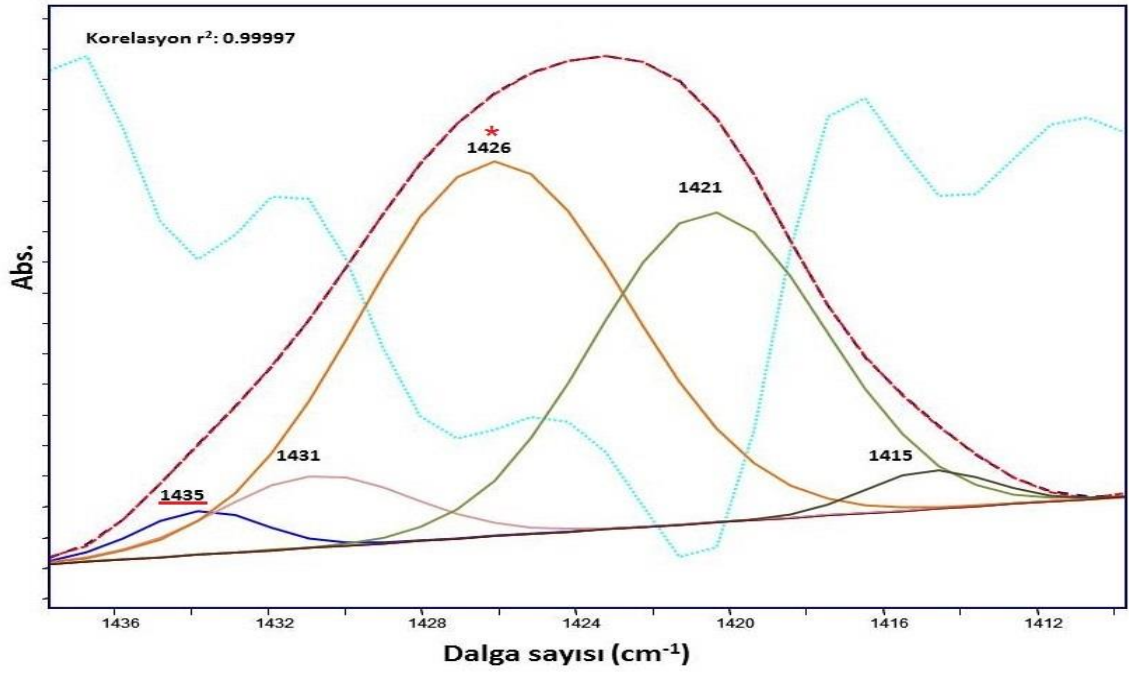




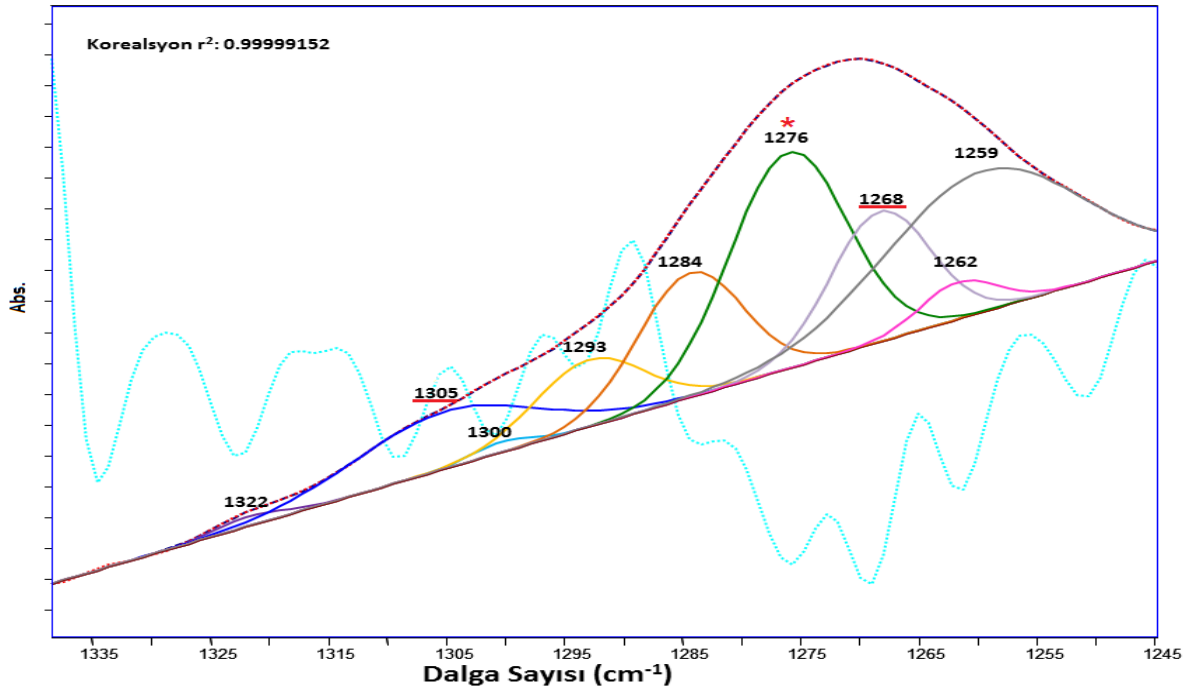
Şekil 4.27: GHK tripeptidi, boş ve GHK yüklü PLGA nanopatiküllerine ait karşılaştırmalı FT-IR spektrumu.



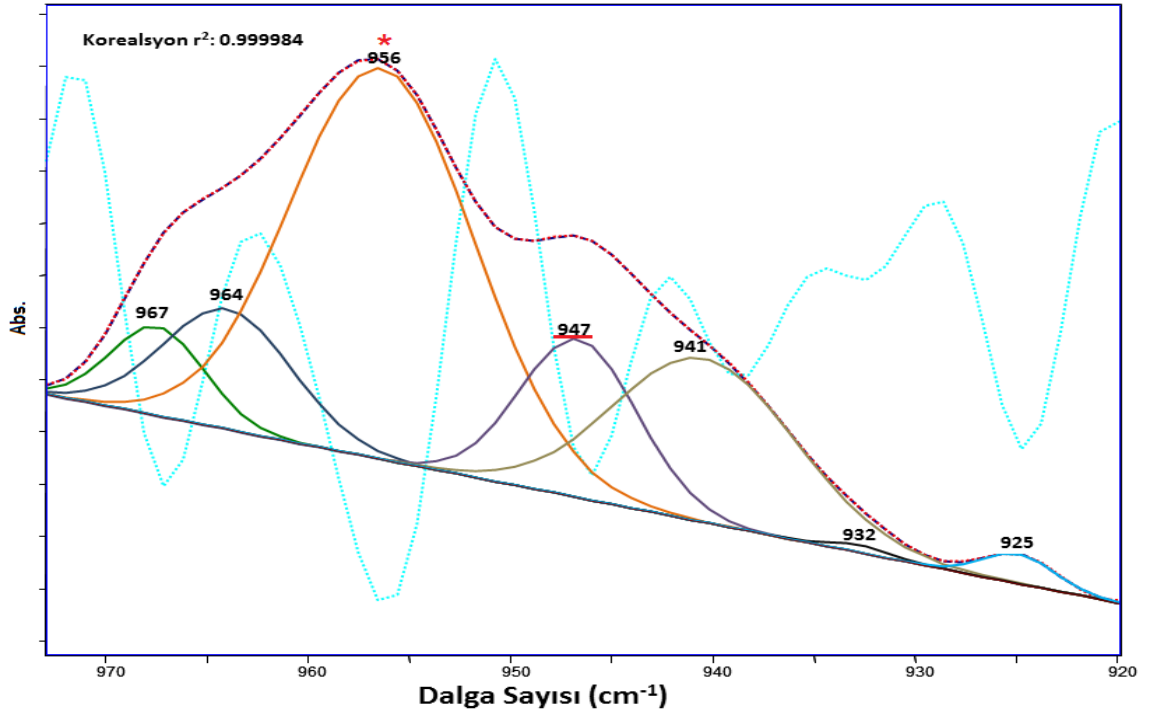
Şekil 4.28: GHK tripeptidi, boş ve GHK yüklü PLGA nanopatiküllerine ait karşılaştırmalı ATR spektrumu.



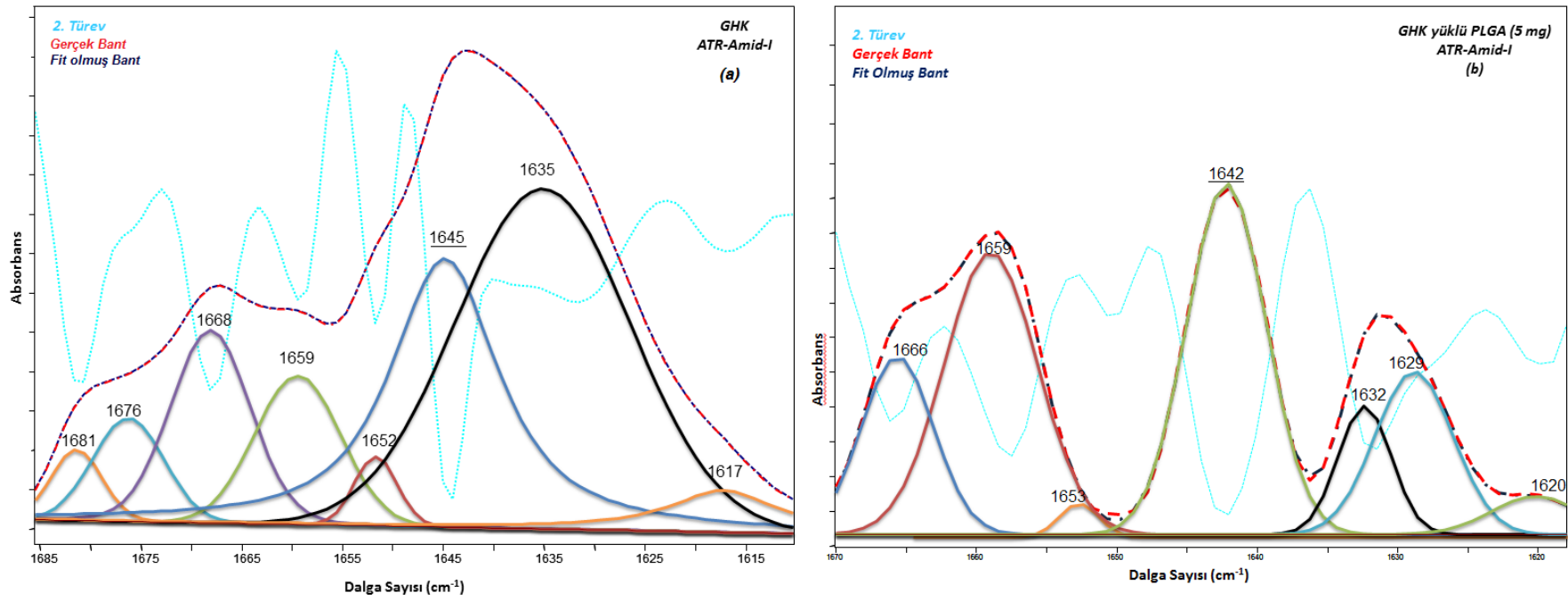
Şekil 4.29: ATR spektrumundan elde edilmiş, GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait 1423 cm^{-1} bandının altında gözlenen bantlar ve GHK'ya ait 1435 cm^{-1} bandı (1426 cm^{-1} 'de elde edilen pik, PLGA polimerine aittir.).



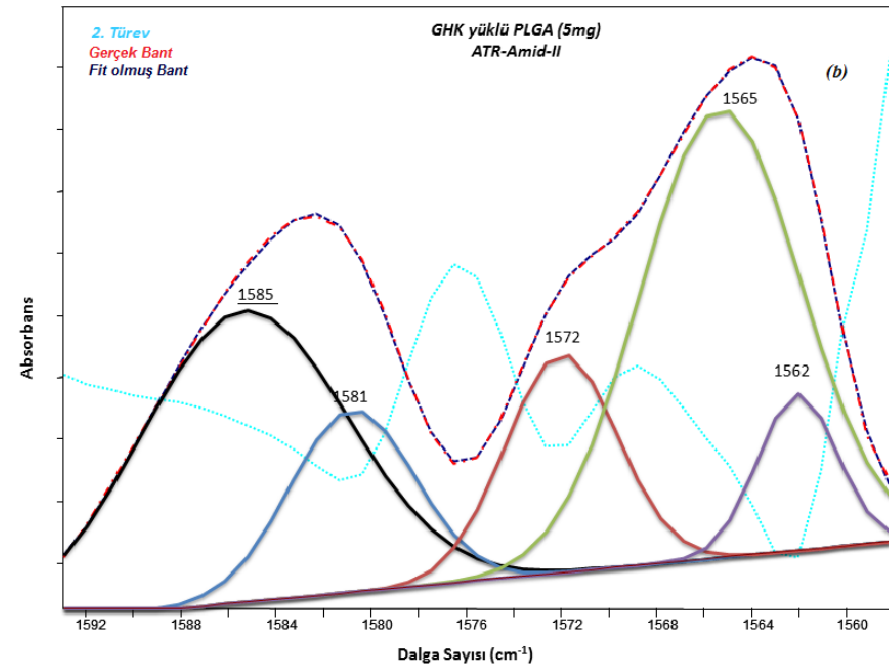
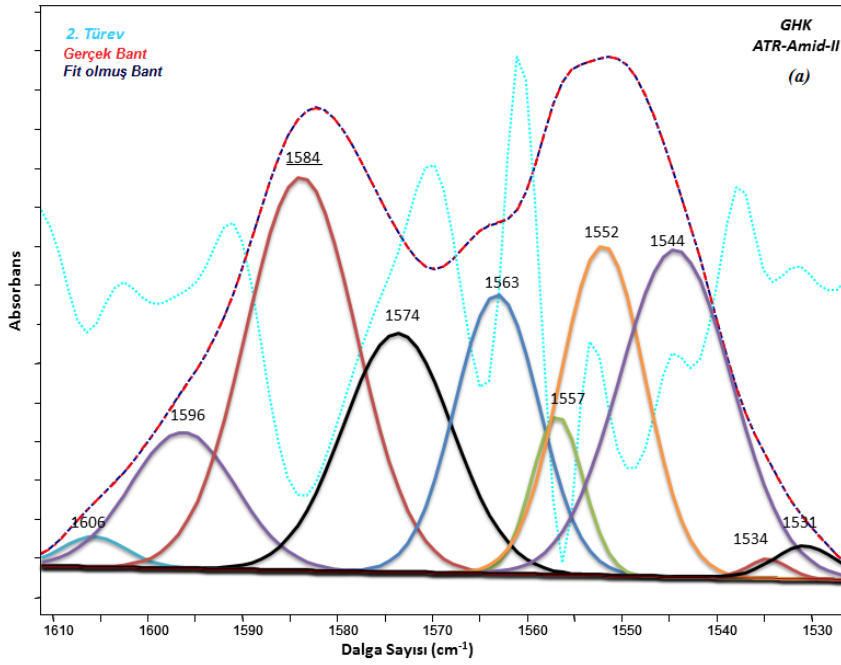
Şekil 4.30: ATR spektrumundan elde edilmiş, GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait 1270 cm^{-1} bandının altında gözlenen bantlar ve GHK'ya ait 1305 cm^{-1} ve 1268 cm^{-1} bandı (1276 cm^{-1} 'de elde edilen pik, PLGA polimerine aittir.).



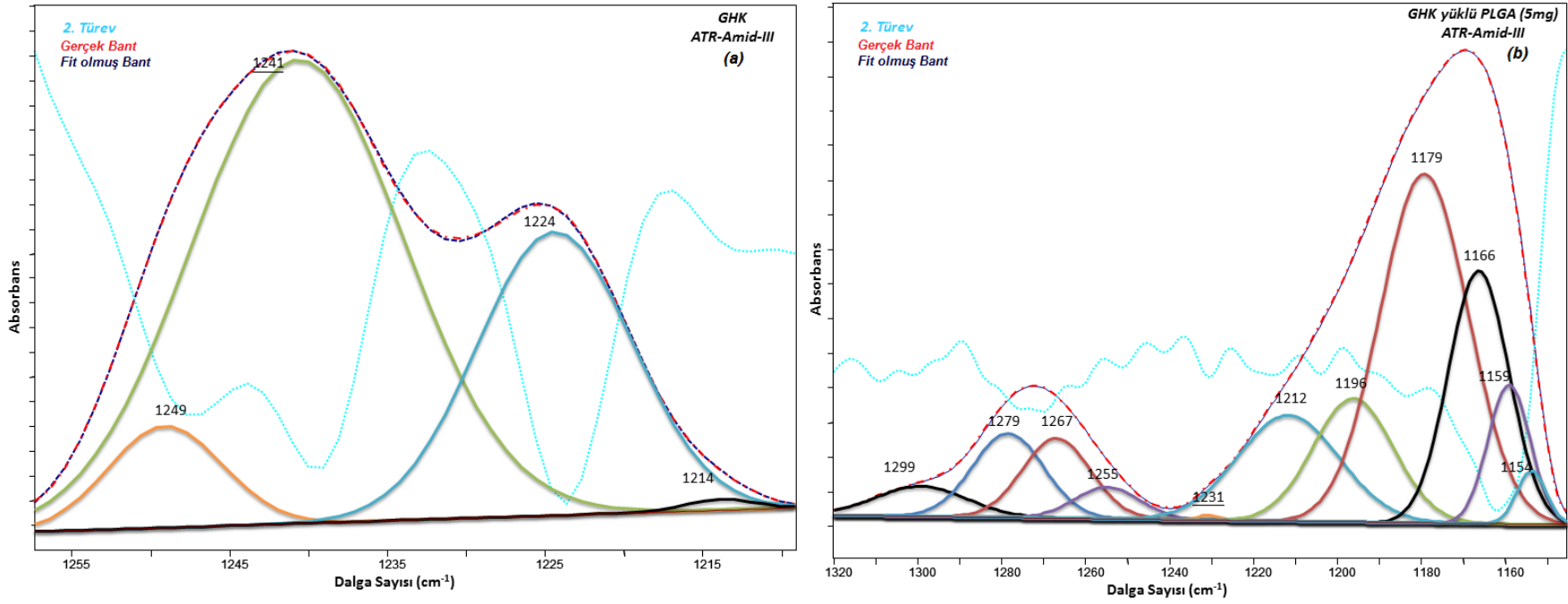
Şekil 4.31: ATR spektrumundan elde edilmiş, GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait 956 cm^{-1} bandının altında gözlenen bantlar ve GHK'ya ait 947 cm^{-1} bandı (956 cm^{-1} 'de elde edilen pik, PLGA polimerine aittir.).



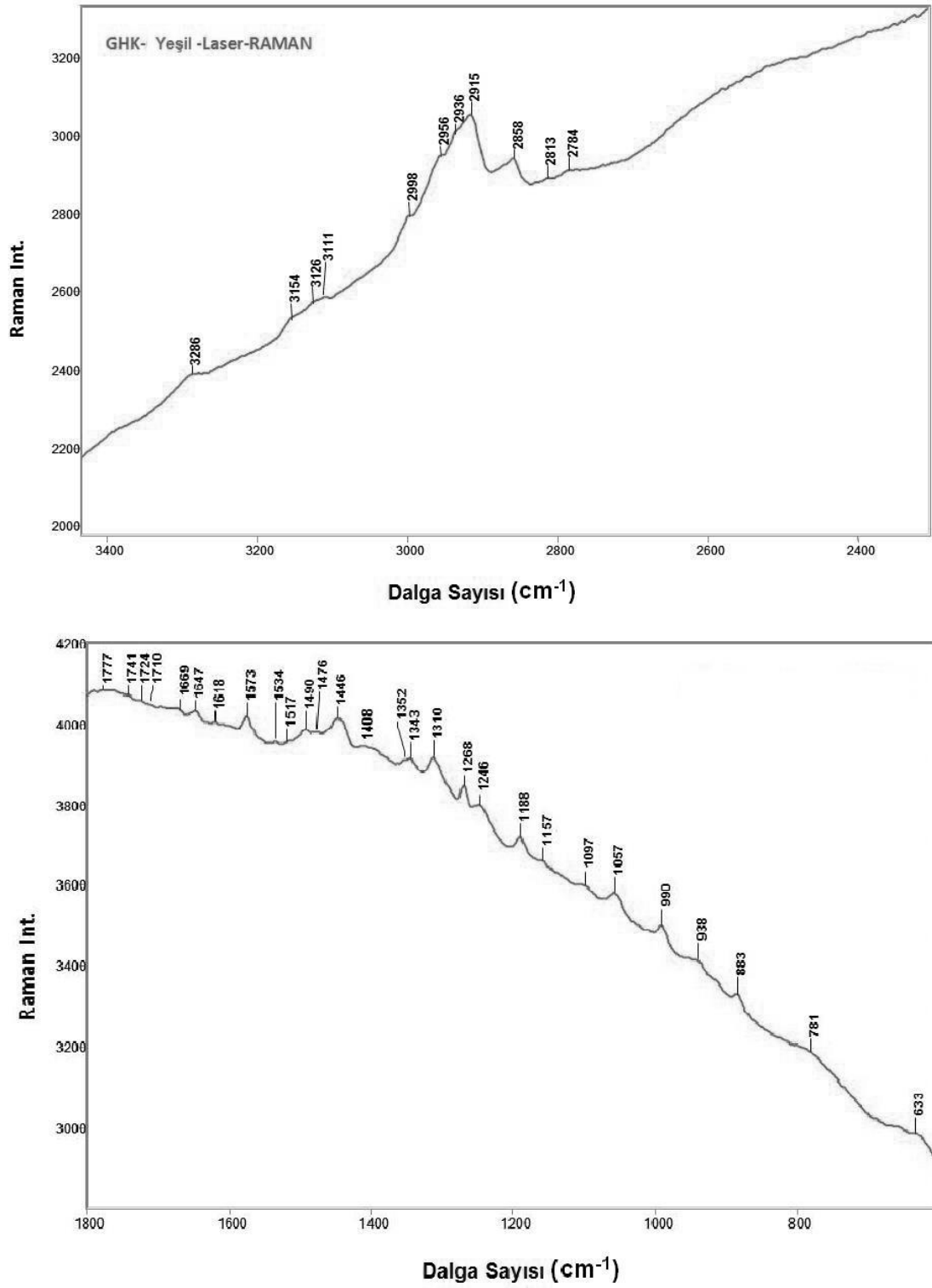
Şekil 4.32: ATR spektrumundan elde edilmiş, GHK'ya ait 1686-1610 cm^{-1} bant aralığı altında kalan bantlar ve 1645 cm^{-1} de gözlenen amid I bandı (a), GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait 1670-1618 cm^{-1} bant aralığı altında kalan bantlar ve GHK'ya ait 1642 cm^{-1} bandı (b).



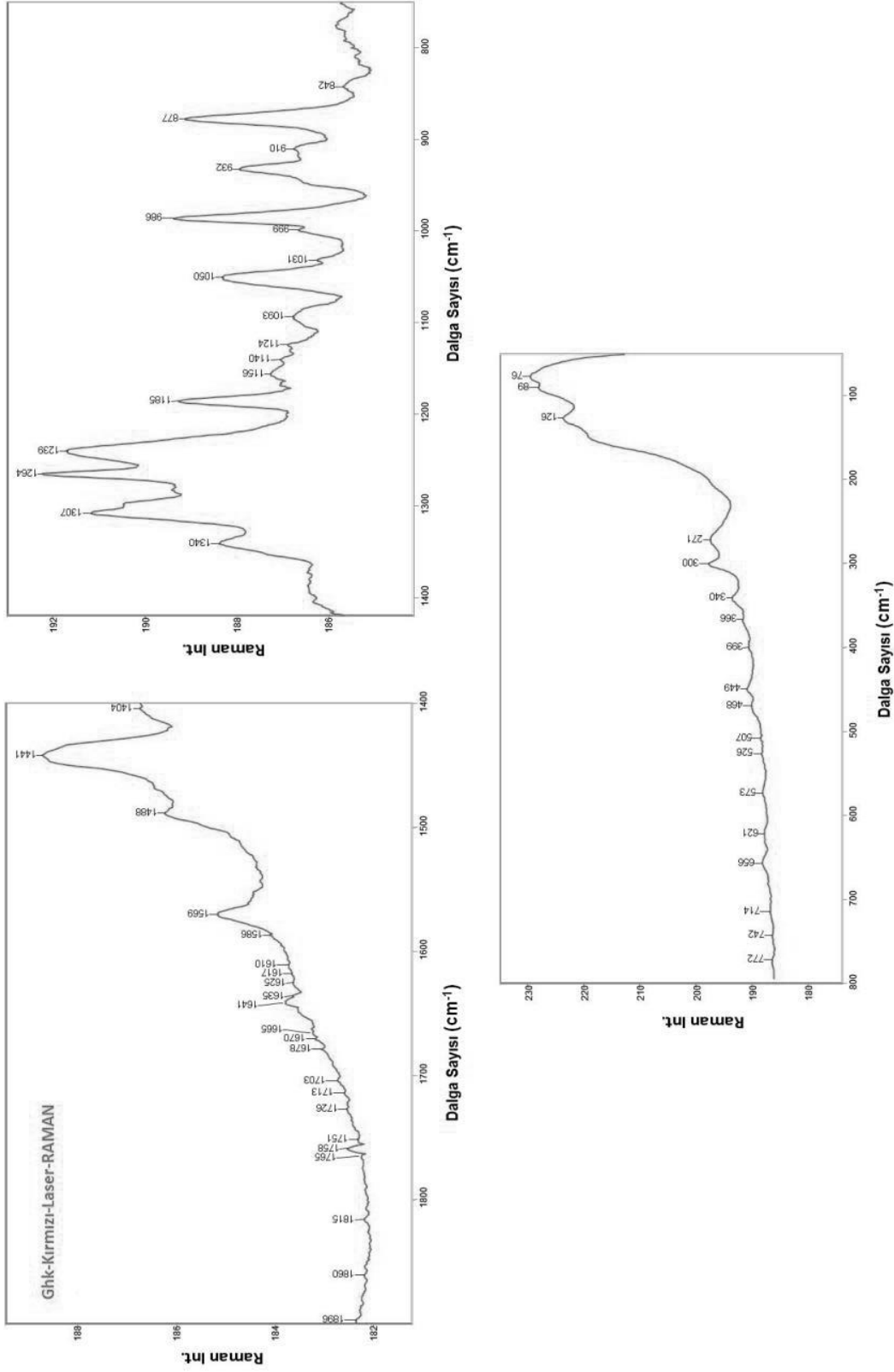
Şekil 4.33: ATR spektrumundan elde edilmiş, GHK'ya ait $1611\text{-}1526\text{ cm}^{-1}$ bant aralığı altında kalan bantlar ve 1584 cm^{-1} de gözlenen amid II bandı (a), GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait $1593\text{-}1558\text{ cm}^{-1}$ bandının altında gözlenen bantlar ve GHK'ya ait 1585 cm^{-1} bandı (b).



Şekil 4.34: ATR spektrumundan elde edilmiş, GHK'ya ait 1257-1209 cm^{-1} bant aralığı altında kalan bantlar ve 1241 cm^{-1} de gözlenen amid III bandı (a), GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait 1320-1145 cm^{-1} bant aralığı altında kalan bantlar ve GHK'ya ait 1231 cm^{-1} bandı (b).



Şekil 4.35: GHK tripeptidine ait yeşil lazer ile çekilen Raman spektrumları.



Şekil 4.36: GHK tripeptidine ait kırmızı lazer ile çekilen Raman spektrumları.

Tablo 4.19: Saf GHK tripeptidinin Raman, FT-IR ve ATR, GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin FT-IR ve ATR spektrumunda gözlenen pikler (Altı çizili olarak işaretlenmiş pikler bant komponent analizi sonucunda elde edilen GHK'ya ait pikler, * ile işaretlenmiş pikler PLGA'ya ait piklerdir).

	Referanslar											Bu Çalışma					
	pH 6.8 GHK [166]			pH 8.9 GHK [166]								GHK			GHK-PLGA NP		
	Boc- GHK [165]	GHK		GHK		Glisin [167]		Histidin [168]		Lizin		RAMAN		FTIR	ATR	FTIR	ATR
Assign.	FTIR	Raman	ATR	Raman	ATR	Raman	FTIR	Raman	FTIR	Raman [169]	FTIR [169,170]	Yeşil	Kırmızı				
NH	3373					-	3414			3312	3571; 3198	3286; 3154	-	3419; 3288	3363; 3281	3420 -	- -
CH						3050; 2930	3084; 2920	3130; 2987	3127; 2984	2975; 2936	2868; 2789 ^[169] , 2654 ^[169]	3111;2998; 2956;2936; 2915;2858; 2813	-	3074; 2953; 2927; 2857	3003; 2952; 2905; 2857	3000; 2953; 2853	2951; 2901; 2883
C=O(ester)	1740					1667	1703			1734	1734 ^[169] , 1634	1741	1758	1733	-	1759* 1718	1753* 1711
C=O(amid I)	1648	-	1657		1648							1647	1641	1652; 1636	1658; 1645	1652; 1635	1659; 1642
HNH açılı bükülmesi						-	1610			-	1619 ^[169] , 1554; 1525 ^[169]	-	1635	1646	1651	1646	-
CNH(amid II)	1551		1563		1586							- 1490	1586; 1488	1582; 1489	1584 ; -	1576; 1488	1585 ; 1481
C=C(His)		1568	-	1569				1573	1575			1573	1569	1569	1564	1568	1565
C=N(His)								1490	1490			-	-	1497	1496	1496	1493
HCH scis.						1410	1410	1451	1451		1475 ^[169] ; 1462 ^[169] , 1445 ^[169]	1476; 1446	1441	1464; 1457	1468; 1455	1472; 1456*	1461; 1450*
C-N(His)		-	1104; 1086	-	1105; 1084			1424; 1085	1423; 1087			1097	1093	1435; 1090	1435; 1089	1425*; 1092*	<u>1435</u> ; 1088*
NH ₂ (twist)+CH ₂ (twist)						1323	1334			1352	1355 ^[169]	1352	-	1351	1352	1362	1357
ν _{CN} (halka)+ δ _{NCH} (halka)		1267	-	1267	-			1301	1304			1268	1264	1265	1266	1275*	<u>1268</u>
CN(amid III)												1246	1239	1241	1241	-	1231
δ _{CNC} (halka)+ ν _{CN} (His)								975	975			990	986	985	984	-	-
δ _{NCN} (halka)+ δ _{CNC} (halka)								935	941			938		948	947	956*	<u>947</u>
Γ _{CNCH} (halka)									764			781	772	777	776	749*	746*
Γ _{NCCH} (halka)												-	-	681	681	-	-
δ _{CCO} (karboksil)												-	656; 507	652; 506	651; 499	-	660 503
Γ _{COOH} (karboksil)							584					-	573	570	575	568	576

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında anti-oksindant ve anti-tümör özelliğinin yanı sıra nöropatik faktör üretiminin artırılmasında da etkili olduğu gözlenen Gly-His-Lys tripeptidi yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiştir. Teorik hesaplamalar çerçevesinde, GHK tripeptidinin yapı fonksiyon ilişkisini belirleyebilmek için, en kararlı geometrik yapısı farklı teoriler (MM, MD, QM) ve farklı bilgisayar programları (Fortran, Gaussian, Gromacs) kullanılarak elde edilmiştir. Ayrıca biyolojik sistemlerdeki etkileşimini daha iyi analiz edebilmek için doking (kenetlenme) hesaplamaları da ilk defa bu tez çalışmamızda kullanılmıştır.

Öncelikle Godjayeve ve ekibi tarafından hazırlanan FORTRAN programı kullanılarak “Teorik Konformasyon Analizi” yöntemi ile tripeptidin kararlı yapıdaki tüm konformasyonları (17,496) elde edilmeye çalışılmıştır. Bunun için öncelikle GHK tripeptidi (atom sayısı ve tipleri, dihedral dönüler, vs.) ana ve yan zincir formlarını veren Ramaşandran haritaları kullanılarak programa tanıtılmıştır.

GHK, 48 atoma ve 15 dihedral dönüye sahip bir tripeptittir. Toplamda 17,496 konformasyon bölgesi vardır. Bu bölgelerden aynı dihedral açı değerlerine sahip bölgeler çıkarılarak incelenecek konformasyon sayısı 11,880 elde edilmiş olup, her bir bölge tek tek incelenerek en düşük enerjili bölge 5.26 kcal/mol enerjiye sahip RBR (RB₃R₃) bölgesi (Tablo 4.4) olarak tanımlanmıştır. En kararlı konformasyondaki dihedral dönüler incelendiğinde, ϕ_2 dihedral dönüşü, yaklaşık 40° dönerek (Histidin’in ana zincirinde giriş açısı -140°’ken çıkış açısı -100.894°) en kararlı konformasyon oluşumunu etkilemektedir. Katkı sağlayan diğer açılar ise ψ_1 (giriş açısı -90° iken çıkış açısı -76.963°), ϕ_3 (giriş açısı -115° iken, çıkış açısı -104.604°), χ_{32} (giriş açısı 60° iken, çıkış açısı 75.309°), χ_{33} (giriş açısı 180° iken, çıkış açısı 165.876°)’dür (Tablo 4.5).

Teorik konformasyon analizi yöntemi ile elde edilen minimum enerjiye sahip en kararlı konformasyon, optimizasyon ve titreşim dalgasayılarının hesaplanabilmesi için Gaussian09 paket programına tanıtılmış, DFT teori düzeyi, B3LYP metodu, 6-311++G(d,p) baz seti kullanılarak hesaplanmıştır. 48 atomlu serbest haldeki GHK tripeptidinin temel titreşim dalgasayısı $3N-6 = 138$ ’dir. Bu 138 titreşim dalgasayısı hesaplanmış ve titreşim kiplerinin

analizi “Potansiyel Enerji Dağılımı (%PED)” den faydalanılarak ve Gar2ped programı kullanılarak yapılmıştır [5].

DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) baz setinde optimize edilen tripeptidin yapısı, moleküler dinamik simülasyonunun yapılabilmesi için, GROMACS v5.1.2 programına GROMOS43a1 kuvvet alanı ile tanıtılmış su ve metanol dolu kübik hücre içerisinde *steepest descent* algoritması ile ayrı ayrı minimize edilmiştir. Sistemlerin başlangıç enerjileri sırası ile 1.4517×10^3 kcal/mol ve 0.384×10^4 kcal/mol’ken minimize olmuş potansiyel enerjileri -1.0334×10^4 kcal/mol ve -0.36×10^4 kcal/mol olarak elde edilmiştir. NVT ve NPT yaklaşımları sırası ile 50 ps ve 500 ps boyunca sistemlere uygulanmıştır. Sistemler, V-rescale termostat kullanılarak 300 K’e, Parrinello-Rahman barostat kullanılarak 1 bar’a sabitlenmiştir. Dengeye getirilen sistemler 10 ns boyunca moleküler dinamik hesaplama yöntemiyle simüle edilmiştir. 10 ns sonunda RMSD (Root Mean Square Deviation) ve Rg (Radius of Gyration) değerleri analiz edilmiştir. Simülasyon boyunca su ortamında bulunan GHK tripeptidinin RMSD değerinin 0.17 - 0.01 nm aralığında olduğu görülmüştür. 0.2 nm civarında veya altında olması beklenen bu değer peptidin orijinal formunda olduğunu göstermektedir (Şekil 4.13). Şekil 4.13’de aynı zamanda 10 ns boyunca Rg değişim grafiği de çizdirilmiştir. Bu grafiğe göre nispeten sabit bir ortalamaya sabit Rg değeri bize peptidin kararlı bir şekilde katlandığını ve dengede olduğunu söylemektedir. Metanol dolu sistem içerisinde ise GHK tripeptidinin RMSD değerinin simülasyon boyunca 0.011 nm ila 0.16 nm arasında olduğu görülmüştür Şekil 4.14.

10.ns sonunda potansiyel enerji değeri, -1.0133×10^4 kcal/mol, kinetik enerji değeri 1.711×10^3 kcal/mol ve toplam enerji değeri ise -0.8413×10^4 kcal/mol olarak elde edilmiştir. Bu enerji değerlerine sahip GHK tripeptidi doking (kenetlenme) hesaplamalarının ligandı olarak seçilmiştir. Moleküler doking (kenetlenme) hesaplamaları Schrödinger Maestro paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Ligprep tool yardımı ile doking (kenetlenme) işlemine hazırlanan ligandın 24 farklı enerjiye sahip konformerleri elde edilmiştir. Bu yapılar içerisinde elde edilen en düşük enerjili konformerin enerji değeri 8.835 kcal/mol’dür.

Nanopartikül sentezinin toksik etkisi L929 hücre hattı yani fare fibroblast hücresi üzerinde test edildiği için, doking (kenetlenme) çalışmasında fare fibroblast hücresinde bulunan bir protein olan Fibroblast Büyüme Faktörü (PDB kodu: 5EG3) seçilmiştir. Swiss-Model’den elde edilen 5EG3 proteini doking (kenetlenme) hesabı için hazırlanmıştır. Glide Tool yardımı

ile hazırlıkları tamamlanan ligand ve reseptör, doking (kenetlenme) hesaplamaları için kullanılmıştır. GHK tripeptidinin 24 konformasyonu içerisinde en düşük doking (kenetlenme) skoru veren konformasyon beklendiği gibi en düşük enerjili konformasyon olmayıp 17.971 kcal/mol enerjiye sahip konformer olmuştur. Elde edilen doking (kenetlenme) skoru ise - 7.513 kcal/mol'dür (Tablo 4.15). Reseptör içerisinde hidrofobik (yeşil renkli bölge) ve negatif yüklü (kırmızı renkli bölge) aktif bölgeye yerleşen GHK tripeptidi, reseptör ile hidrojen bağları yardımıyla bağlanarak en kararlı bağlanma skorunu oluşturmuştur. Glisin amino asitinin peptit bağındaki oksijen ile pozitif yüklü (koyu mavi renkte) LYS73 (2.26 Å) ile birlikte, NH_3^+ ucu ile polar (açık mavi renkte) ASN187 (2.34 Å) ve negatif yüklü (kırmızı renkte) ASP200 (1.79 Å) ile hidrojen bağları yaparak kararlı bir bağlanma pozisyonu oluşturmuştur (Şekil 4.20). Yapı içerisindeki Lizin amino asiti ise NH_3^+ ucundan LEU43 ile 2.15 Å'luk bir etkileşimde bulunmuştur. Ayrıca karboksil ucundaki oksijen ALA123 ile 2.22 Å'luk bir ikinci hidrojen bağını yapmıştır (Şekil 4.21).

Schrödinger paket programına ait Qik-Prop tool (Schrödinger Release 2017-4: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) kullanılarak, ilaç tasarımı için kullanılacak olan ligandın ADME (Emilim (Absorption), dağılım (Distribution), metabolizma (Metabolism) ve atılım (Excretion)) profili belirlenmiştir. Bu özelliklere göre ilacın vücut içerisinde nasıl ve ne kadar absorbe edileceği, kan beyin bariyerindeki geçirgenliği, benzer ilaçlar, ilacın farmakolojik fiziksel özellikleri, insanda ilacın oral absorpsiyonu gibi sonuçlar elde edilmektedir. Bu sonuçların Lipinski kurallarına [156,171] uyması beklenir. Güvenli ve etkili ilaç tasarımının gerçekleşmesinde, dokuların ilaca maruz kalması ile ilgili birçok farmakolojik özellik ADME hesaplamaları ile elde edilebilmektedir. ADME özellikleri Tablo 4.16'da verilmiştir.

Bir molekülün ilaç niteliği taşıyabilmesi için Moleküler Ağırlığının (MW) 130.0 – 725.0 g/mol aralığında olması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında etkin madde olarak kullanılan moleküler ağırlığı 340.381 g/mol olan GHK tripeptidi bir ilaç adayı olma özelliğindedir.

Partisyon katsayıları (oktanol/gaz, oktanol/su, ...) ilaçların vücut içerisinde dağılımlarını kontrol etmede yararlıdır. Bölme katsayısı (P), bir bileşiğin, dengede iki karışmaz fazın bir karışımındaki konsantrasyonlarının oranıdır. Dolayısıyla bu oran, bu iki fazdaki bileşiğin çözünürlüğündeki farkın bir ölçüsüdür [172]. Özellikle *oktanol/su* bölme katsayısı ilacın hidrofilik (suyu seven) veya hidrofobik (suyu sevmeyen) niteliği ile ilgili bilgi vermektedir.

Oktanöl/su katsayısı yüksek olan ilaçlar hücrelerin lipid katmanları gibi hidrofobik alanlara yayılabilmektedirler. Düşük oktanöl/su katsayısına sahip ilaçlar ise hidrofilik özellik gösterip, kan serumu gibi sulu bölgelerde bulunmaktadırlar [173]. Çözücülerden biri bir gaz ve diğeri bir sıvı ise, bir sıvı/gaz bölme katsayısı belirlenebilmektedir. Örneğin, genel bir anestezi kan/gaz bölme katsayısı, anestetik maddenin gazdan kana ne kadar kolay geçtiğini ölçmektedir [174]. Tablo 4.16'da GHK tripeptidi için oktanöl/gaz bölme katsayısı oranı 25.070 M olarak hesaplanmıştır. Bu değer 8.0 – 35 M aralığında olmalıdır.

Beyin/kan bariyeri katsayısı (QPlogBB) ilacın kan-beyin bariyerinden geçebilme yeteneği hakkında bilgi verir. Bu değer -3.0 ila 1.2 aralığında olması gereklidir. GHK tripeptidi için bu değer -2.441'dir. GHK tripeptidi için hesaplanan ADME özellikleri Tablo 4.16'da verilmektedir.

Bu tez çalışmasının deneysel kısımları içerisinde boş PLGA ve GHK yüklü nanopartikülleri sentezlenmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. PLGA nanopartikülleri boş ve farklı konsantrasyonlarda (0.25 mg, 0.5 mg, 1.0 mg, 1.5 mg, 2.0 mg, 2.5 mg, 3.0 mg, 5.0 mg, 10.0 mg ve 20.0 mg) GHK içerecek şekilde sentezlenmiştir (Tablo 4.17). Sentezlenen bu partiküller içerisinde Zeta-sizer boyut (223.0nm) ve potansiyel (-21.4mV) analizleri dikkate alınarak, optimum nanopartikül 5.0 mg GHK içeren nanopartikül olarak seçilmiştir. Boş nanopartikülün boyutu (246.1nm), farklı konsantrasyonlarda yükleme yapılan partiküllerin hepsinden daha büyük çıkmıştır. Partikül içerisine yüklenen etkin madde miktarı ile, partikül boyutunun küçüldüğü gözlenmektedir. Bunun nedeni, etkin madde ile polimer kapsül arasında meydana gelen elektrostatik etkileşimlerdir. 5.0 mg GHK içeren PLGA nanopartikül boyutu 223.0 nm olarak elde edilmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında nanopartiküllerin kararlı olabilmesi için zeta potansiyeli değerlerinin kitosan gibi pozitif yüklü örnekler için +30 mV'dan büyük veya PCL (polikaprolakton), PLGA gibi negatif yüklü örnekler için -30 mV'dan küçük çıkması gerekmektedir [139]. Yapılan tez çalışmasında elde edilen optimum nanopartikülün Zeta potansiyeli değerinin -21.4 mV olduğu ölçülmüştür. Yapılan FT-IR, ATR, TEM analizleri ve enkapsülasyon ve yükleme verimi hesaplamaları belirlenen optimum nanopartikül üzerinden yapılmıştır.

GHK tripeptidinin enkapsülasyon ve salım testleri için gerekli olan kalibrasyon eğrisi nanodrop cihazı (220nm) kullanılarak elde edilmiş ve eğri denklemi yardımı ile enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır. $y=9,1277x+0,0249$ kalibrasyon eğri denklemi (Şekil

4.22); GHK tripeptidi distile su yardımıyla seyreltilerek ve her seyreltilen miktar nanodrop cihazı ile ölçülerek elde edilmiştir.

Yapılan ölçümler sonucunda 5.0 mg GHK yükleme işleminde, peptidin %94'sının enkapsüle edildiği hesaplanmıştır. Toplam GHK yüklü PLGA nanopartikül kütleindeki GHK miktarı denklem (4.9) üzerinden hesaplanmıştır. GHK yüklü PLGA nanopartiküllerin yükleme verimliliği % 4 olarak denklem (4.10) yardımıyla bulunmuştur. Bu değer GHK yüklü PLGA partiküllerinin 1 mg'ında 0.04 mg GHK bulundurduğu anlamına gelmektedir.

Kontrollü ve sürdürülebilir salım, nanopartiküllerin en önemli özellikleridir. Bu nedenle GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin kontrollü salım süreci de gözlenmiştir. GHK'nın *in vitro* salım profilini belirlemek için, 5 mg GHK yüklü PLGA nanopartikülleri, diyaliz kapsüllerine yerleştirilmiştir. Diyaliz kapsülü 50 ml pH 7.4 PBS'ye konulmuş ve UV-Vis ölçümleri alınmıştır. Süreç başlangıç ve 48 saat arasında devam etmiştir. Enkapsüle edilmiş GHK tripeptidinin 48. saatte % 90'ının salındığı görülmüştür (Şekil 4.23).

Zeta sizer cihazı ile TEM cihazından elde edilen boyut sonuçları farklılık göstermektedir. Bunun nedeni, zeta sizer cihazının çözelti içerisine gönderdiği ışık şiddetinde dağılma olmasından dolayıdır. Bu nedenle çözeltinin yoğunluğu partikül boyutunu etkileyecektir. Boş PLGA nanopartiküllerinin ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin TEM sonuçlarından elde edilen boyutlar ise sırası ile 169 nm (Şekil 4.24) ve 139.01 nm (Şekil 4.25)'dir.

Sentetik bir polimer olan PLGA biyobozunur olması ile birlikte doğal polimerler gibi hücre içinde parçalanma esnasında ortama toksik madde yaymamaktadır. Şekil 4.26 ve Tablo 4.18'de de görüleceği gibi L929 fare fibroblast hücre hattında yapılan hücre kültürü sonuçlarında, hücre canlılığını olumsuz etkileyen bir değer elde edilmemiş olup, değerlerin %80 üzerinde çıkması ile canlılığı olumlu yönde etkilediği söylenebilmektedir. Sitotoksikite testi sonucunda elde edilen verilere göre GHK tripeptidi yüklü PLGA nanopartiküllerinin *in vivo* kullanımı için 8µg/ml dozu uygundur.

Saf GHK, GHK yüklü PLGA NP ve boş PLGA NP ait Titreşim Dalgasayısı Analizi

Saf GHK tripeptidi, boş ve 5 mg GHK yüklü PLGA nanopartiküllerine ait *FT-IR* ve *ATR* Spektrumları 1800-400 cm^{-1} bölgesinde karşılaştırmalı olarak Şekil 4.27 ve 4.28'de verilmiştir. Tablo 4.19'da GHK ve GHK yüklü nanopartiküllerin temel titreşim

dalgasayılarının atamaları, PED analizi (Gar2ped programı kullanılarak [5]) ve yapılan literatür çalışmaları yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.19’da verilen titreşim dalgasayılar atamaları EK.3’de verilen potansiyel enerji dağılımı (%PED) ile ve teorik dalgasayılarının ikili çarpanlarla çarpılarak [4] deneysel verilere yaklaştırılması ile elde edilmiştir.

Amid Bantları

Proteinler veya polipeptitler, peptit bağları ya da diğer adı ile amid bağları ile birbirlerine bağlanmış amino asit zincirine sahiptir [175]. Spektrumlarda gözlenen “Amid titreşimleri (bantları)”, proteinlerin karakteristik spektral özelliklerini ortaya çıkarmaktadır ve bir peptit bağı (amid bağı) C=O, C-N ve N-H gruplarını içermektedir [175-178]. Teorik ve deneysel çalışmalar amid titreşimlerini üç spektral bölgeye ayırmıştır. Bu bölgeler Amid I, Amid II ve Amid III bantları olarak tanımlanmıştır. Amid I, II ve III bantları, protein yapı fonksiyon analizi için en çok kullanılan IR spektral bölgeleridir [175].

Amid I

Peptid grubundaki C = O bağı (%70-80 katkı), CN bağı gerilme (%10-20 katkı) ve CCN deformasyon (%10 katkı) titreşimleri olarak tanımlanan Amid I bandı [179,180], 1700-1600 cm^{-1} titreşim bölgesi aralığında gözlenmektedir. Amid I, bu aralıkta güçlü sinyal vermesi nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadır [175].

FT-IR spektrumunda GHK tripeptidine ait 1652 cm^{-1} ve 1636 cm^{-1} de iki adet amid I bandı gözlenmiştir (Şekil 4.27, EK.3). Bu bantlar dolu nanopartikül spektrumunda yine 1652 cm^{-1} ve 1635 cm^{-1} gözlenmekte olup 1636 cm^{-1} ’den 1635 cm^{-1} ’e 1 cm^{-1} ’lik bir kayma gözlenmiştir (Tablo 4.19).

ATR spektrumunda Şekil 4.28 da gözlenen amid I bandını belirlemek için, seçilen amid I bölgesi band komponent analiz yöntemiyle incelenmiş, base line düzeltilmesi ve smoothing işlemi (Savitzky Golay, 2.derece, 9.polinom) uygulanmıştır. Bant komponent analizi yöntemi ile incelenen bantlar Şekil 4.32’de GHK ve GHK yüklü PLGA’ya ait bantlar karşılaştırmalı olarak verilmiştir. GHK tripeptidinin 1686 – 1610 cm^{-1} aralığında yapılan bant komponent analizi sonucunda bu bölgenin altında kalan 1645 cm^{-1} bandı C=O bağı gerilmesi titreşim hareketinden kaynaklanan amid I bandı (Şekil 4.32-a) olarak belirlenmiştir.

GHK yüklü PLGA spektrumunda (Şekil 4.32-b) $1670 - 1618 \text{ cm}^{-1}$ aralığında yapılan bant komponent analizi ile sonucunda, bu bölge altında kalan bantlar incelenerek, GHK'yüklü PLGA spektrumuna ait 1642 cm^{-1} bandı gözlenmiş ve amid I bandı olarak belirlenmiştir. İki spektrum karşılaştırıldığında Şekil 4.32-a'da gösterilen 1645 cm^{-1} bandının, enkapsülasyon sonucunda Şekil 4.32-b'de gösterilen 1642 cm^{-1} 'e 3 cm^{-1} 'lik bir kayma (azalma) gösterdiği görülmüştür. Bu kayma enkapsülasyon sonucunda C=O bağ gerilme titreşim dalgasayısındaki azalmadan kaynaklanmaktadır.

Raman spektrumunda boş ve peptit yüklü nanopartikülün uyarılması kırmızı ve yeşil lazerle gerçekleştirilemediği için bu tez çalışmasında yalnızca saf GHK tripeptidine ait Raman spekturumuna yer verilmiştir. Peptit bağındaki C=O bağ gerilmesi (amid I bandı) yeşil lazerde 1647 cm^{-1} (Şekil 4.35) ve kırmızı lazerde ise 1641 cm^{-1} 'de (Şekil 4.36) gözlenmiştir.

%PED analizi ile GHK tripeptidi için teorik olarak elde edilen titreşim dalgasayılarına göre amid I bantları 1653 cm^{-1} ve 1639 cm^{-1} 'de gözlenmiş olup deneysel FT-IR verileri ile uyumludur. 1653 cm^{-1} bandının şiddeti %72 katkı ile peptit grubundaki C=O bağ gerilmesinden, 1639 cm^{-1} bandı ise %73 C=O bağ gerilmesi, %6 CCN açı bükülmesi hareketlerinden kaynaklanmaktadır.

Amid II

$1600 - 1480 \text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenen Amid II bandı ile ilişkili absorbsiyon piklerinin oluşmasına, esas olarak peptid grubunda yer alan CNH atom grubunun açı bükülmesi (%40-60) ve ayrıca CN (%18-40) ve C^aC bağ gerilme (%10) titreşimleri yol açmaktadır [178,180].

Saf GHK *FT-IR* spektrumunda amid II bandı 1582 cm^{-1} ve 1489 cm^{-1} 'de işaretlenmiştir. Enkapsülasyon sonrasında, bu pikler 1576 cm^{-1} ve 1488 cm^{-1} 'e gözlenmiştir (Tablo 4.19).

Saf GHK *ATR* spektrumunda Şekil 4.28'da amid II titreşim bölgesine ait aralık, bant komponent analizi ile incelenmiş ve Şekil 4.33'de GHK ve GHK yüklü PLGA'ya ait olan bantlar karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Saf GHK tripeptidinin $1611 - 1526 \text{ cm}^{-1}$ aralığında yapılan bant komponent analizi sonucunda bu bant aralığı altında kalan 1584 cm^{-1} bandı CNH açı bükülme titreşim hareketinden kaynaklanan amid II bandı (Şekil 4.33-a) olarak belirlenmiştir. GHK yüklü PLGA spektrumunda (Şekil 4.33-b) $1593 - 1558 \text{ cm}^{-1}$ aralığı bant komponent analizi ile incelenerek, GHK yüklü PLGA nanopartikül spektrumu için bu band

1585 cm^{-1} de gözlenmiştir. İki spektrum karşılaştırıldığında Şekil 4.3-a'da gösterilen 1584 cm^{-1} bandının, enkapsülasyon sonucunda Şekil 4.33-b'de gösterilen 1585 cm^{-1} 'e 1 cm^{-1} 'lik bir kayma (artma) gösterdiği görülmüştür. Bu kayma enkapsülasyon sonucunda CNH açılı bükülme titreşim dalgasayısındaki artmadan kaynaklanmaktadır.

Saf GHK *Raman* spektrumunda GHK tripeptidine ait amid II bandı yeşil lazerde 1490 cm^{-1} 'de (Şekil 4.35) gözlenmiştir. Kırmızı lazer kullanılarak elde edilen spektrumda 1586 cm^{-1} ve 1488 cm^{-1} (Şekil 4.36) titreşim bölgelerinde iki adet amid II bandı kayıt edilmiştir.

Amid II bantları %PED ile teorik olarak ise 1597 cm^{-1} ve 1491 cm^{-1} 'de hesaplanmıştır (EK.3). 1597 cm^{-1} bandının şiddeti %61 katkı ile peptit grubundaki CNH açılı bükülmesinden ve %19 katkı ile CN bağ gerilmesinden, 1491 cm^{-1} bandı ise %44 CNH açılı bükülmesi, %29 CN bağ gerilmesi ve %8 Histidine ait CN bağ gerilmesi hareketlerinden kaynaklanmaktadır.

Amid III

1320-1220 cm^{-1} aralığı olarak tanımlanan amid III titreşim bölgesi, peptit bağı üzerindeki C-N bağ gerilmesi ile birleştirilmiş N-H düzlem içi bükülme (%10-40) ve ayrıca C-H ve N-H deformasyon titreşimleri içerir. Amid III bantlarının şiddeti, diğer amid bantlarına göre daha düşüktür [175,179].

FT-IR spektrumunda saf GHK tripeptidi için yalnızca 1241 cm^{-1} de gözlenmiştir. Enkapsülasyon sonrası ise bu band gözlenememiştir (Şekil 4.27).

Saf GHK tripeptidine ait Şekil 4.28'de verilen *ATR* spektrumunda amid III titreşim bölgesinin altında kalan bantlar, bant komponent analizi ile belirlenmiş ve Şekil 4.34'de GHK ve GHK yüklü PLGA'ya ait bantlar karşılaştırmalı olarak verilmiştir. GHK tripeptidinin 1257 – 1209 cm^{-1} aralığında yapılan bant komponent analizi sonucunda bu bölge altında kalan 1241 cm^{-1} bandı CN bağ gerilme titreşim hareketinden kaynaklanan amid III bandı (Şekil 4.34-a) olarak belirlenmiştir. GHK yüklü PLGA spektrumunda (Şekil 4.34-b) 1320 – 1145 cm^{-1} aralığında yapılan bant komponent analizi ile GHK yüklü PLGA nanopartikül spektrumunda düşük şiddetli 1231 cm^{-1} bandı gözlenmiş ve amid III olarak belirlenmiştir. İki spektrum karşılaştırıldığında Şekil 4.34-a'da gösterilen 1241 cm^{-1} bandının, enkapsülasyon sonucunda Şekil 4.34-b'de gösterilen 1231 cm^{-1} 'e 10 cm^{-1} 'lik bir kayma (azalma) gösterdiği görülmüştür.

Bu kayma enkapsülasyon sonucunda CN bağ gerilme titreşim dalgasayısındaki azalmadan kaynaklanmaktadır.

Raman spektrumlarında, yeşil lazer kullanılarak uyarılan GHK tripetidinde 1246 cm^{-1} (Şekil 4.35) ve kırmızı lazer ile uyarılma durumunda ise 1239 cm^{-1} 'de (Şekil 4.36) amid III bandı gözlenmiştir.

Teorik olarak %PED ile elde edilen amid III pikleri 1254 cm^{-1} ve 1216 cm^{-1} 'de elde edilmiştir (EK.3). 1254 cm^{-1} bandının şiddeti %16 katkı ile peptit grubundaki CN bağ gerilmesi, %11 katkı ile histidine ait CCH grubu açılı bükülmesi ve %8 katkı ile histidin halkasındaki CN bağ gerilmesi hareketinden kaynaklanmaktadır. İkinci amid III bandına ait 1216 cm^{-1} bandı ise %20 katkı ile CNH açılı bükülmesi, %12 katkı ile CN bağ gerilmesi ve %7 katkı ile Histidine ait CN bağ gerilmesi hareketlerinden kaynaklanmaktadır.

Boş PLGA Nanopartikülüne Ait Dalgasayıları

Tablo 4.19'da GHK tripeptidini oluşturan Glisin, Histidin, Lizin amino asitlerine ait FT-IR ve Raman, saf GHK tripeptidine ait deneysel FT-IR, ATR ve Raman spektrumlarında gözlenen dalgasayılarının literatür değerleri, saf GHK tripeptidine ait bu tez çalışması çerçevesinde elde edilen deneysel FT-IR, ATR ve Raman spektrumlarında gözlenen dalgasayıları ile birlikte GHK yüklü PLGA nanopartiküllerine ait FT-IR ve ATR spektrumlarında gözlenen dalgasayılarına yer verilmektedir. Tablo 4.19'da yer alan dalgasayılarındaki atamalar, literatür bilgisi ve EK.3'de verilen PED hesaplamaları doğrultusunda oluşturulmuştur.

Şekil 4.27 ve 4.28'de verilen *FT-IR* ve *ATR* spektrumlarında 1700 cm^{-1} 'li bölgede şiddetli bir pik gözlenmektedir. Bu pik boş ve GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait *FT-IR* spektrumunda 1759 cm^{-1} 'de, boş PLGA nanopartikülü için *ATR* spektrumunda 1754 cm^{-1} 'de ve GHK yüklü PLGA nanopartikülü için 1753 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Bu pikler C=O bağ gerilmesinden kaynaklanan PLGA polimerine ait karakteristik piklerdir [181-184].

Yapılan literatür çalışmasında $1500 - 1250\text{ cm}^{-1}$ aralığının PLGA'nın yapısında bulunan CH_3 ve CH_2 gruplarının asimetrik açısal deformasyon titreşim hareketine denk geldiği görülmüştür [183]. Aynı zamanda literatürde PLGA'nın yapısında bulunan glikolid için *FT-IR* spektrumunda CH_3 ve CH_2 gruplarına ait bu titreşim hareketlerinin 1540 cm^{-1} ve 1430 cm^{-1}

¹'de olduğu gözlenmiştir [184]. Boş nanopartikül *FT-IR* spektrumunda (Şekil 4.27) bu titreşim hareketi 1455, 1425 ve 1395 cm^{-1} 'de, *ATR* spektrumunda ise (Şekil 4.28) 1451, 1424 ve 1392 cm^{-1} de gözlenmektedir. Bu pikler PLGA'nın yapısında bulunan CH_3 ve CH_2 gruplarından kaynaklanmaktadır.

Laktik, glikolid monomerleri ve PLA homopolimerlerinin; C-O bağ gerilme titreşimleri literatürde sırası ile 1275;1100 cm^{-1} , 1265;1050 cm^{-1} and 1130;1090 cm^{-1} olarak elde edilmiştir [184]. PLGA polimerine ait karakteristik C-O bağ gerilme titreşimleri *FT-IR* spektrumunda 1274;1092 cm^{-1} ve *ATR* spektrumunda 1270;1089 cm^{-1} 'de elde edilmiştir. Literatürde C-H açılı bükülmesi hareketine ait absorpsiyon bantları 940 cm^{-1} ve 750 cm^{-1} [184] de gözlenmiştir. Tez çalışmasında bu bantlar *FT-IR* spektrumunda 956;750 cm^{-1} ve *ATR* spektrumunda 957;745; cm^{-1} 'de elde edilmiştir.

FT-IR ve *ATR* spektrumlarında; 1700-1455 cm^{-1} bölgesi aralığında boş ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerine ait spektrumlar karşılaştırıldığında GHK'ya ait olan C=O ester grubu, amid grupları, NH_2 amin grubu, histidine ait C = C ve C = N bağ gerilme titreşimleri ve CH_2 grup titreşimlerini karakterize eden dalgasayılarının varlığı, bu dalgasayılarındaki polimer ile etkileşiminden dolayı ortaya çıkan kayma miktarları, GHK'nın nanopartikül içine etkin bir şekilde yüklendiğini göstermektedir. Ayrıca, 750-400 cm^{-1} bölgesinde peptit yüklü nanopartiküller için *ATR* spektrumunda GHK'nın yapısında bulunan, halka(histidin) burulma ve karboksil grubu titreşimlerinin varlığı da GHK'nın etkin bir şekilde nanopartikül içerisine yüklendiğini kanıtlamaktadır.

Bunların dışında, peptidin nanopartikül içerisine yüklendiğinde, peptidin karakteristik bantlarında meydana gelen değişimler de, bu çalışmada ilk kez incelenip Tablo 4.19'da gösterilmiştir.

Tablo 4.19'da ayrıca saf GHK ve GHK yüklü PLGA nanopartiküllerinin deneysel *FT-IR*, *ATR* ve Raman spektrumlarında gözlenen belirgin pikleri ve atamaları yer almaktadır. Enkapsülasyon sonucunda dalgasayılarında gözlenen kaymalar Tablo 4.19'da karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

C=O ester: *FTIR* spektrumunda GHK yapısındaki C = O ester gruba ait bağ gerilmesi 1733 cm^{-1} 'de kaydedilmiştir. Dolu nanopartikül spektrumunda, bu titreşim hareketi *FT-IR* ve *ATR* spektrumunda sırasıyla 1718 cm^{-1} ve 1711 cm^{-1} 'de gözlenmiştir.

Amid I: ATR spektrumunda band komponent analizi sonucunda 1645 cm^{-1} 'de GHK tripeptidine ait amid I (C=O bağ gerilmesi) bandı olarak atanan ve gözlenen band, GHK yüklü PLGA nanopartikülünde 1642 cm^{-1} olarak gözlenmiştir. Enkapsülasyon sonucunda amid I (C=O bağ gerilmesi) bandında 3 cm^{-1} 'lik bir kayma elde edilmiştir.

HNH Açık Bükülmesi: ATR spektrumunda 1651 cm^{-1} de GHK tripeptidine ait HNH açık bükülmesinden kaynaklanan titreşim bandı gözlenmiştir. Bu bant enkapsülasyon sonrasında GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait spektrumda gözlenmemiştir.

Amid II (CNH bağının açık bükülme (%40-60) ve CN (%18-40) ve C^αC bağ gerilmesi (%10)) : FT-IR spektrumunda saf GHK tripeptidi için amid II bandı 1582 cm^{-1} ve 1489 cm^{-1} 'de kayıt edilmiştir. GHK yüklü nanopartikül için amid II bandı 1576 cm^{-1} ve 1488 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Enkapsülasyon dalga sayılarında sırasıyla 6 cm^{-1} 'lik ve 1 cm^{-1} 'lik bir kaymaya sebep olmaktadır.

ATR spektrumunda saf GHK tripeptidi için amid II bandı, bant komponent analizi ile 1584 cm^{-1} gözlenmiştir. Yüklü nanopartikülde bu bant, bant komponent analizi ile 1585 cm^{-1} de gözlenmiştir. Bununla birlikte yüklü nanopartikül spektrumunda 1481 cm^{-1} 'de de bir bant gözlenmiştir. Enkapsülasyon nedeni ile açık bükülme titreşim dalga sayısının değeri 1584 cm^{-1} 'den 1585 cm^{-1} 'e 1 cm^{-1} 'lik artma göstermektedir. (Şekil 4.28 ve Şekil 4.33).

C-N (histidin) Bağ Gerilmesi: FT-IR spektrumunda saf GHK tripeptidi için histidine ait CN bağ gerilme hareketi 1435 cm^{-1} 'de kayıt edilmiştir. Enkapsülasyon sonrasında yüklü nanopartikülde bu bant 1425 cm^{-1} bandı altında kaybolmuştur.

ATR spektrumunda saf GHK tripeptidi için histidine ait CN bağ gerilmesi hareketi 1435 cm^{-1} 'de kayıt edilmiştir. Enkapsülasyon sonrasında yüklü nanopartikülde bu bant 1423 cm^{-1} bandı altında kaybolmuştur. Band komponent analizi yardımıyla 1423 cm^{-1} 'deki pik açılarak içerisindeki pikler belirlenmiştir ve GHK tripeptidi için histidine ait CN bağ gerilmesi titreşim hareketi 1435 cm^{-1} 'de düşük şiddette gözlenmiştir (Şekil 4.29).

C-N (halka) Bağ Gerilmesi ve NCH (halka) Açık Bükülmesi: FT-IR spektrumunda 1265 cm^{-1} de GHK tripeptidinin yapısında bulunan histidin halkasına ait titreşim bandı gözlenmiştir. GHK yüklü PLGA nanopartikülünde bu bant 1275 cm^{-1} bandı altında kaybolmuştur.

ATR spektrumunda 1266 cm^{-1} 'de GHK tripeptidinin yapısında bulunan histidin halkasına ait titreşim bandı gözlenmiştir. GHK yüklü PLGA nanopartikülünde gözlenen 1270 cm^{-1} bandı, bant komponent analizi yardımıyla açılmış ve 1268 cm^{-1} 'de histidin halkasına ait titreşim bandı belirlenmiştir (Şekil 4.30). Enkapsülasyon sonucunda açılı bükülme (N-C-H) titreşim dalgasayısı 2 cm^{-1} 'lik bir kayma (artma) göstermiştir.

NCN (halka) ve CNC(halka) Açılı Bükülmesi: FT-IR spektrumunda 948 cm^{-1} 'de GHK tripeptidinin yapısında bulunan histidin halkasına ait titreşim bandı gözlenmiştir. GHK yüklü PLGA nanopartikülünde bu bant 956 cm^{-1} bandı altında kaybolmuştur.

ATR spektrumunda 947 cm^{-1} 'de GHK tripeptidinin yapısında bulunan histidin halkasına ait titreşim bandı gözlenmiştir. GHK yüklü PLGA nanopartikülünde bu bant 956 cm^{-1} bandı altında kaybolmuştur. GHK yüklü PLGA nanopartikülünde gözlenen 956 cm^{-1} bandı, bant komponent analizi yardımıyla açılmış ve 947 cm^{-1} 'de histidin halkasına ait titreşim bandı belirlenmiştir (Şekil 4.31).

CCO (karboksil) grubu Açılı Bükülmesi: ATR spektrumunda 499 cm^{-1} 'de GHK tripeptidinin yapısında bulunan karboksil grubuna ait titreşim bandı gözlenmiştir. GHK yüklü PLGA nanopartikülünde bu bant 503 cm^{-1} olarak gözlenmiştir. Enkapsülasyon sonucunda açılı bükülme (C-C-O) titreşim dalgasayısı 4 cm^{-1} 'lik bir artma göstermiştir.

ATR spektrumunda 651 cm^{-1} 'de GHK tripeptidinin yapısında bulunan karboksil grubuna ait titreşim hareketini karakterize eden band gözlenmiştir. GHK yüklü PLGA nanopartikülünde bu bant 660 cm^{-1} olarak gözlenmiştir. Enkapsülasyon sonucunda 9 cm^{-1} 'lik bir kayma gözlenmiştir.

COOH Torsiyon: FT-IR spektrumunda 570 cm^{-1} 'de GHK tripeptidinin yapısında bulunan karboksil grubuna ait torsiyon hareketini karakterize eden band gözlenmiştir. GHK yüklü PLGA nanopartikülünde bu bant 568 cm^{-1} olarak gözlenmiştir. Enkapsülasyon sonucunda 2 cm^{-1} 'lik bir kayma gözlenmiştir.

ATR spektrumunda 575 cm^{-1} de GHK tripeptidinin yapısında bulunan karboksil grubuna ait torsiyon hareketini karakterize eden band gözlenmiştir. GHK yüklü PLGA nanopartikülünde bu bant 576 cm^{-1} olarak gözlenmiştir. Enkapsülasyon sonucunda 1 cm^{-1} 'lik bir kayma gözlenmiştir.

Enkapsülasyon için seçilen optimum GHK miktarı 5mg'dır. Az miktarlarda yükleme yapıldığı için GHK tripeptidine ait pikler PLGA polimerine ait spektrumun altında kalmış ve çok fazla gözlenememiştir. 5 mg GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait spektrumlarda, GHK'ya ait karakteristik pikler "Bant Komponent Analizi" yöntemi ile incelenebilmiştir.

Bant Komponent Analizi

GHK yüklü PLGA nanopartikülüne ait spektrumlar analiz edildiğinde, sadece GHK'ya ait olan ve PLGA polimeri altında kalan bantlar "Bant Komponent Analiz" yöntemi yardımı ile açığa çıkarılmıştır. Bu analiz yöntemi GRAMS/AI Suit Spektrum programı kullanılarak uygulanmıştır [164]. Bant Komponent Analizi ATR spektrumları için gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de FT-IR ve ATR spektrumlarında 1435 cm^{-1} 'de gözlenen ve EK.3'de ve Tablo 4.19'da verilen histidine ait C-N bağ gerilmesi olarak atanan band, GHK yüklü PLGA nanopartikül spektrumlarında, enkapsülasyon sebebiyle Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'da verilen FT-IR ve ATR spektrumlarında gözlenememektedir. Bunun için bant komponent analizi yöntemiyle, enkapsüle olmuş nanopartüküle ait olan 1423 cm^{-1} 'deki band $1436 - 1412\text{ cm}^{-1}$ aralığında ATR spektrumunda açılarak, sadece GHK tripeptidine ait olan 1435 cm^{-1} 'deki CN titreşim bandı tespit edilmiştir (Şekil 4.29).

Bu tez çalışmasında Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'da FT-IR spektrumunda 1306 cm^{-1} ve ATR spektrumunda 1305 cm^{-1} 'de gözlenen ve EK.3'de verilen lizine ait CCH açılı bükülmesi olarak atanan band, GHK yüklü PLGA nanopartikül spektrumlarında, enkapsülasyon sebebiyle Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de verilen FT-IR ve ATR spektrumlarında gözlenememektedir. Bunun için bant komponent analizi yöntemiyle, enkapsüle olmuş nanopartüküle ait olan 1270 cm^{-1} 'deki band $1322 - 1259\text{ cm}^{-1}$ aralığında ATR spektrumunda açılarak, sadece GHK tripeptidine ait olan 1305 cm^{-1} 'deki CCH titreşim bandı tespit edilmiştir (Şekil 4.30).

Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'da saf GHK için elde edilen FT-IR ve ATR spektrumunda 1266 cm^{-1} 'de bir pik gözlenmiştir. EK.3'de verilen histidin halkasına ait CN bağ gerilmesi olarak atanan bu band, GHK yüklü PLGA nanopartikül spektrumlarında, enkapsülasyon sebebiyle Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'da verilen FT-IR ve ATR spektrumlarında gözlenememektedir. Bunun için bant komponent analizi yöntemiyle, enkapsüle olmuş nanopartüküle ait olan 1270 cm^{-1} 'deki band $1322 - 1259\text{ cm}^{-1}$ aralığında ATR spektrumunda açılarak, bu band 1268 cm^{-1}

¹'de ve enkapsülasyon sebebiyle 2 cm⁻¹'lik bir kayma ile CN titreşim bandı tespit edilmiştir (Şekil 4.30).

Bu tez çalışmasında Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'da FT-IR spektrumunda 948 cm⁻¹ ve ATR spektrumunda 947 cm⁻¹'de gözlenen ve EK.3'de verilen histidin halkasına ait NCN açılı bükülmesi olarak atanan band, GHK yüklü PLGA nanopartikül spektrumlarında, enkapsülasyon sebebiyle Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'da verilen FT-IR ve ATR spektrumlarında gözlenememektedir. Bunun için bant komponent analizi yöntemiyle, enkapsüle olmuş nanopartiküle ait olan 956 cm⁻¹'deki band 967 – 925 cm⁻¹ aralığında ATR spektrumunda açılarak, sadece GHK tripeptidine ait olan 947 cm⁻¹'deki NCN açılı bükülmesi bandı tespit edilmiştir (Şekil 4.31).

Bant Komponent Analizi kullanılarak, amid I, amid II ve amid III bantları, saf GHK ve GHK yüklü PLGA nanopartikülleri için ayrı ayrı incelenerek, karşılaştırmalı olarak Şekil 4.32, Şekil 4.33 ve Şekil 4.34 ile verilmiştir.

Karşılaştırmalı olarak yapılan spektrum çalışmalarında, enkapsülasyon sonucunda belli bölgelerde kaymalar gözlenmiştir. Yüklü nanopartikül spektrumunda gözlenemeyip, etkin maddeye ait spesifik pikler ise bant komponent analizi ile belirlenmiştir. Böylelikle, etkin madde yükleme başarısı; zeta potansiyel ölçümü ve enkapsülasyon hesaplamalarının yanı sıra, titreşim analizleri ile de ispatlanmıştır.

Sonuç olarak, anti-oksidant, anti-tümör, yara iyileştirici ve cilt koruyucu özelliklere sahip, sinir sistemi üzerinde olumlu etkileri gözlenen Gly-His-Lys tripeptidinin modellenerek, nano-ilaç formülasyonunun geliştirilmesi amaçlanan bu tez çalışmasında, sentezlenen GHK tripeptidi yüklü polimerik nanopartiküllerinin ayrıntılı karakterizasyonu spektroskopik ve çeşitli görüntüleme yöntemleriyle yapılmış, *in vitro* hücre kültüründe sitotoksitesi değerlendirilmiş ve *in vivo* olarak kullanıma uygun olan dozları belirlenmiştir. Sentez, karakterizasyon, *in vitro* ve *in silico* çalışmaların bir arada bulunduğu bu tez çalışması ile GHK tripeptidinin vücut içerisine girdikten sonra hedef protein ile etkileşimleri de ilk defa moleküler doking (kenetlenme) yöntemi ile incelenerek ortaya çıkartılmış ve günümüzde gelişen bilgisayar destekli akılcı ilaç tasarımının bir örneği olarak literatüre katkı sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1]. Pickart, L., and Thaler, M. M., 1973, Tripeptide in human serum which prolongs survival of normal liver cells and stimulates growth in neoplastic liver. *Nature: New biology*, 243(124), 85-87.
- [2]. Godjaev N.M., Maksumov I.S., Ismailoval.I., 1983, *J.Chem.Struc.* (Russian), 24,147–152.
- [3]. Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, et al., 2016, Gaussian, Inc., Wallingford CT,.
- [4]. Andersson, M. P., and Uvdal, P., 2005, New scale factors for harmonic vibrational frequencies using the B3LYP density functional method with the triple- ζ basis set 6-311+ G (d, p). *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(12), 2937-2941.
- [5]. Martin J.M.L. and Van Alsenoy C., 1995, GAR2PED, *A Program to Obtain a Potential Energy Distribution from a Gaussian Archive Record*, University of Antwerp, Belgium.
- [6]. Sağlam, N., ve Emül, E., 2016, Bilimlerin buluşma noktası: Nanoteknolojiye kısa bir bakış, *Yeni Türkiye Dergisi*, 88.
- [7]. Couvreur, P., Dubernet, C., Puisieux, F., 1995, Controlled drug delivery with nanoparticles: Current possibilities and future trends, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41(1):2-13.
- [8]. Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P., and Manavalan, R., 2011, Nanoparticle: An overview of preparation and characterization, 2000-2010.
- [9]. Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski A.E., 2001, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70, 1-20.
- [10]. McNaught, A. D.; Wilkinson, A., 1996, Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations, *Pure and Applied Chemistry*, 68: 2287–2311.
- [11]. Astete, C. E. and Sabliov, C. M., 2006, Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles, *Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition*, 17 (3): 247–289.
- [12]. Crotts, G, 1998, Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: Release kinetics and stability issues, *Journal of Microencapsulation*, 15: 699–713.
- [13]. <http://www.ieis.org.tr/ieis/tr/> [Ziyaret tarihi: 19.09.2018]
- [14]. Raymond A. Serway, Robert J. Beichner, katkıda bulunan yazar John W. Jevett, Jr., 2007, *Elektromagnetik Dalgaların Spektrumu*, Fen ve Mühendislik için Fizik 2, Elektrik

ve Manyetizma – Işık ve Optik, In: Çolakoğlu, K, Bölüm 34, Palme Yayıncılık, Ankara, 1093-1095.

- [15]. Elachi, C., and Van Zyl, J. J., 2006, *Introduction to the physics and techniques of remote sensing*, Vol. 28, John Wiley & Sons., New Jersey.
- [16]. Kecel S., 2009, *Pro-Tyr, Glu-Asn ve Ala-Gln dipeptidlerinin konformasyon analizi ve ab-initio DFT yöntemleri ile titreşim frekans ve kiplerinin incelenmesi*, Doktora, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [17]. Barrow, G. M., 1962, *Introduction to molecular spectroscopy*, New York: McGraw-Hill.
- [18]. Balcı, K., 2003, *Pirimidin ve aminopirimidin moleküllerinin serbest halde ve kompleks yapıdaki titreşim frekanslarının hesaplanması*, Doktora, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [19]. <http://www.utan.ca/> [Ziyaret Tarihi: 19.05.2018]
- [20]. Kendal D.N., 1966, *Applied Infrared Spectroscopy*, Reinhold Publishing Co., New York.
- [21]. Stuart, B., 2005, *Infrared spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc.
- [22]. Atkins, P., and De Paula, J., 2011, *Physical chemistry for the life sciences*, Oxford University Press, USA.
- [23]. George W.O, McIntyre P.S., 1990, *Infrared spectroscopy*, John Willey and Sons, London-England, ISBN: 0471913820.
- [24]. Raman, C. V. and Krishnan, K. S., 1928, A new type of secondary radiation, *Nature*, 121(3048), 501.
- [25]. Krishnan, K., 1928, A new class of spectra due to secondary radiation Part I, *Indian J. Phys*, 2, 399-419.
- [26]. Smekal, A., 1923, The quantum, theory of dispersion, *Naturwissenschaften*, 11, 873–878.
- [27]. Kogelnik, H. and Porto, S. P. S., 1963, Continuous helium–neon red laser as a Raman source, *JOSA*, 53(12), 1446-1447.
- [28]. Hollas, J. M., 2004, *Modern spectroscopy*. John Wiley & Sons.
- [29]. Hahn D., 2007, *Raman Scattering Theory*, University of Florida, Department of Mechanical and Aerospace Engineering.
- [30]. Schrader, B. (Ed.), 2008, *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*, John Wiley & Sons.
- [31]. Haken, H., and Wolf, H. C., 2004, Çev. İbrahim okur, *Molekül fiziği ve kuantum kimyası*, Değişim Yayınları, İstanbul.

- [32]. Gökçe, H., 2013, *Antioksidanların ve çeşitli bileşiklerin kuramsal ve deneysel kırmızıaltı ve mikroraman spektroskopik ve kuantum kimyasal incelemeleri*, Doktora, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [33]. Erdik, E., 1993, *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*, 4. Baskı, Gazi Büro Kitabevi, 531 s, Ankara.
- [34]. Özdemir Tarı, G., 2013, *Schiff bazı içeren bazı organik moleküllerin deneysel ve teorik olarak incelenmesi*, Doktora, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [35]. Gündüz, T., 2004, *İnstrümental Analiz*. 7. Baskı, Gazi Kitabevi, 1357 s, Ankara.
- [36]. <http://biyokure.org/uv-gorunur-bolge-spektroskopisi/5276/> [Ziyaret Tarihi: 23.09.2018]
- [37]. Perkins, W. D., 1986, Fourier transform-infrared spectroscopy: Part 1. Instrumentation, *Journal of Chemical Education*, 63(1), A5.
- [38]. <http://users.abo.fi/mhotokka/mhotokka/lecturenotes/ms04.d/ms04-raman-eng.pdf> [Ziyaret Tarihi: 27.09.2017]
- [39]. Gören, Y., 2009, *Fenazopridin molekülünün konformasyon analizi ve ab-initio DFT yöntemleri ile titreşim frekans ve kiplerinin incelenmesi*, Doktora, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [40]. Foresman, J. B., and Frisch, A., 1996, *Exploring chemistry with electronic structure methods: a guide to using Gaussian*.
- [41]. Yakubovich, A. V., 2011. *Theory of phase transitions in polypeptides and proteins*. Springer Science & Business Media.
- [42]. Ferenkel, D. and Smith B., 2001, *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications*, Academic Press, 71p. USA.
- [43]. Gunsteren, W. F. and Berendsen, H. J. C., 1990, *Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications and perspectives in chemistry*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 29, 992- 1023pp.
- [44]. Menteş, M., 2009, *Metal gümüş nanoparçacıklarının boyuta bağlı ergimesinin moleküler dinamik simülasyon metodu ile incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü.
- [45]. De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., and Cavalli, A., 2016, Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery, *Journal of medicinal chemistry*, 59(9), 4035-4061.
- [46]. Field, M. J., 2007, *A Practical Introduction to the Simulation of Molecular Systems*, Cambridge University Press, New York, 339p.
- [47]. Hedman, F., 2006, *Algorithms for Molecular Dynamics Simulations*, Doktora, Stockholm University, 73p.

- [48]. Kockaya, E. A., Simsek, Y., 2010-2012, *Zp3 Protein Yapısının Cesitli cozelti Ortamlarında Farklı Parametrelerle Molekuler Dinamik Simulasyon Calismasi*, <http://w3.gazi.edu.tr/~yusufsimsek/projects/zp3.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 22.10.2017].
- [49]. D.A. Case, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, et al., *AMBER 2017*, University of California, San Francisco.
- [50]. Brooks B.R., Bruccoleri R.E, Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M.,1983, "CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations". *J Comp Chem.* 4 (2): 187–217.
- [51]. http://www.gromacs.org/About_Gromacs, [Ziyaret Tarihi: 13.07.2018]
- [52]. http://www.gromacs.org/Developer_Zone/History_of_development, [Ziyaret Tarihi: 23.10.2017].
- [53]. http://www.gromacs.org/About_Gromacs-23.10.2017, [Ziyaret Tarihi: 23.10.2017]
- [54]. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., and Berendsen, H. J., 2005, GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1701-1718.
- [55]. Young, D., 2004, *Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems*. John Wiley & Sons.
- [56]. Foresman, J., and Frish, E., 1996, *Exploring chemistry*, Gaussian Inc., Pittsburg, USA.
- [57]. Koch W., Holthausen M.C., 2000, *A chemist's guide to density functional theory*, Wiley-VCH, Weinheim.
- [58]. Lee C., Yang W., Parr R.G., 1988, Development of the Colle–Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys Rev B*, 37, 785–789.
- [59]. Sir John A. Pople, 1925-2004, *Journal of Computational Chemistry*. 25 (9): fmv–vii. 2004.
- [60]. W. J. Hehre, W. A. Lathan, R. Ditchfield, M. D. Newton, and J. A. Pople, 1970, *Gaussian 70 (Quantum Chemistry Program Exchange, Program No. 237)*.
- [61]. Aileen Frisch Hrant P. Hratchian ,Roy D. Dennington II Todd A. Keith John Millam with Alice B. Nielsen Andrew J. Holder Joanne Hiscoks, *GaussView 5 Reference*, Gaussian, Inc., USA.
- [62]. Bicak, B., 2014, *Met-ser dipeptidinin titreşim frekans ve kiplerinin konformasyon analizi ve ab-initio dft yöntemleri ile incelenmesi*, Yüksek lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [63]. Wu, G., 2009, Amino acids: metabolism, functions, and nutrition, *Amino acids*, 37(1), 1-17.

- [64]. Bhagavan, N.V., Chung, E. H., 2011, *Amino Acids*, Essentials of Medical Biochemistry; With Clinical Cases, Chapter 3, Pages 19–27.
- [65]. Kılınç Budama, Y., 2013, *Influenza A virüsüne ait sentetik peptidlerin polielektrolitlerle konjugasyon reaksiyonunun floresans rezonans enerji transferi ve diğer yöntemlerle incelenmesi*, Doktora, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [66]. Cengiz S., Cengiz M., 1994, *Proteinlerin yapısı*, Enzim bilgisi 2, Bilim ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, İstanbul.
- [67]. http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Proteinler.html [Ziyaret Tarihi: 04.02.2018]
- [68]. Pauling L., Corey Rb., 1951, *Configuration of Polypeptide Chains with Favored Orientations Around Single Bonds*, Two New Pleated Sheets Proc. Nat Acad. Sci.,USA
- [69]. Pauling, L., Corey, R. B., and Branson, H. R. (1951). The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 37(4), 205-211.
- [70]. Gökkaya, D., 1997, *Kiyotrofin dipeptidinin ve bunun (D-Arg)² analogunun teorik konformasyon analizi ile incelenmesi*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [71]. Amelio, I., Cutruzzolá, F., Antonov, A., Agostini, M., and Melino, G., 2014, Serine and glycine metabolism in cancer, *Trends in biochemical sciences*, 39(4), 191-198.
- [72]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-histidine#section=Top> [Ziyaret Tarihi: 09.07.2018]
- [73]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-lysine#section=Top> [Ziyaret Tarihi: 09.07.2018]
- [74]. Pickart, L., 2008, The human tri-peptide GHK and tissue remodeling. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 19(8), 969-988.
- [75]. Hong, Y., Downey, T., Eu, K. W., Koh, P. K., and Cheah, P. Y., 2010, A ‘metastasis-prone’ signature for early-stage mismatch-repair proficient sporadic colorectal cancer patients and its implications for possible therapeutics, *Clinical & experimental metastasis*, 27(2), 83-90.
- [76]. Sensenbrenner, M., Jaros, G. G., Moonen, G., and Meyer, B. J., 1980, Effect of conditioned media on nerve cell differentiation, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 36(6), 660-662.
- [77]. Ahmed, M. R., Basha, S. H., Gopinath, D., Muthusamy, R., and Jayakumar, R., 2005, Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes, *Journal of the Peripheral Nervous System*, 10(1), 17-30.

- [78]. Bobyntsev, I. I., Chernysheva, O. I., Dolgintsev, M. E., Smakhtin, M. Y., and Belykh, A. E., 2015, Anxiolytic Effects of Gly-His-Lys Peptide and Its Analogs, *Bulletin of experimental biology and medicine*, 158(6), 726.
- [79]. Beretta, G., Arlandini, E., Artali, R., Anton, J. M. G., and Facino, R. M. (2008). Acrolein sequestering ability of the endogenous tripeptide glycyl-histidyl-lysine (GHK): Characterization of conjugation products by ESI-MS n and theoretical calculations, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 47(3), 596-602.
- [80]. <http://www.iudermatoloji.com/tag/keratinosit/> [Ziyaret Tarihi: 12.09.2018]
- [81]. Pešáková, V., Novotná, J., and Milan, A., 1995, Effect of the tripeptide glycyl-L-histidyl-L-lysine on the proliferation and synthetic activity of chick embryo chondrocytes. *Biomaterials*, 16(12), 911-915.
- [82]. Lane, T.F., Iruela-Arispe, M.L., Johnson, R.S., Sage, E.H., 1994, SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis, *J. Cell Biol.*, 125, 929–943.
- [83]. Zhou, X. M., Wang, G. L., Wang, X. B., Liu, L., Zhang, Q., Yin, Y., et al., 2017, GHK Peptide Inhibits Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice by Suppressing TGF β 1/Smad-Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition, *Frontiers in pharmacology*, 8, 904.
- [84]. Zhang, H., Wang, Y., He, Z., 2018, Glycine-Histidine-Lysine (GHK) Alleviates Neuronal Apoptosis Due to Intracerebral Hemorrhage via the miR-339-5p/VEGFA Pathway, *Frontiers in neuroscience*, 12.
- [85]. Godjayevev N., Şahin Y., 1993, *Molekülün Yapısı II.Cilt*, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü, Erzurum.
- [86]. Toprak, L. G., 1996, *Biyolojik aktif moleüllerin konformasyon analizi yöntemi ile yapılarının incelenmesi*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [87]. IUPAC-IUB, 1971, Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochem J.*, 121, 577.
- [88]. IUPAC GOLD BOOK 1 - IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"), 1997, Online corrected version: (2006–) "conformer". - <http://goldbook.iupac.org/html/C/C01262.html> [Ziyaret Tarihi: 18.06.2018].
- [89]. IUPAC GOLD BOOK 2 - IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"), 1997, Online corrected version: (2006–) "Conformation" - <http://goldbook.iupac.org/html/C/C01258.html> [Ziyaret Tarihi: 18.06.2018].
- [90]. Cantor, C.R. , Schimmel, P.R., 1980, *The conformation of biological macromolecules biophysical chemistry*, W.H. Freeman and Company, San Fransisco.
- [91]. Godjayevev N., Şahin Y., 1993, *Molekülün Yapısı I.Cilt*, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü, Erzurum.
- [92]. Alpaydın, S., Şimşek, A., 2014, *Genel kimya*, Eğitim Kitabevi, Ankara.

- [93]. Momany F.A., Guire R.F., Burgess A.W., And Sheraga H.A., 1975, Energy Parameters in Polypeptides, Geometric Parameters, Partial Atomic Charge, Nonbonded Interactions, Hyrogen Bond Interactions and Intrinsic Torsional Potentials for the Naturally Occurring Amino Acids. *The Journal of Physical Chem*, 79(22) 2361-2379.
- [94]. Gocayev N., Akyuz S., Akverdiyeva G.A, 1997, A Molecular Mechanics Conformational Study of Peptid T, *J.Mol.Struc*, 403, 95-110.
- [95]. Garrett R. H., Grisham C. M., *Biochemistry*, Fifth Edition, 2013, Kanada.
- [96]. Tripathi A., Misra K., 2017, Molecular Doking: A Structure-Based Drug Designing Approach, *JSM Chem*, 5(2): 1042.
- [97]. Lengauer, T., and Rarey, M., 1996, Computational methods for biomolecular doking, *Current opinion in structural biology*, 6(3), 402-406.
- [98]. Rangaraju A., Rao A.V., 2013, A review on molecular doking- Novel tool in drug design and analysis, *J Hormo. Res Pharm*, 2: 215-221.
- [99]. Mukesh B., Rakesh K., 2011, Molecular doking: A review. *IJRAP*, 2: 1746-1751.
- [100]. Perozzo, R., Kuo, M., Sidhu, A.B.S., Valiyaveetil, J.T., Bittman, R., Jacobs, W.R., Fidock, D.A. and Sacchettini, J.C., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277(15), 13106-13114.
- [101]. Dias, R., de Azevedo, J., and Walter, F., 2008, Molecular doking algorithms, *Current Drug Targets*, 9(12), 1040-1047.
- [102]. Agarwal S., Mehrotra R., 2016, An overview of Molecular Doking. *JSM Chem*, 4: 1024.
- [103]. Lorber D.M., Shoichet B.K., 1998, Flexible ligand doking using conformational ensembles. *Protein Sci.*, 7: 938-950.
- [104]. Huang SY, Zou X., 2007, Ensemble doking of multiple protein structures: considering protein structural variations in molecular doking, *Proteins*. 66: 399-421.
- [105]. Ratner, M., Ratner, D., 2003, *Size matters*, In: Ratner, M., Ratner, D. eds. Nanotechnology. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 11–18.
- [106]. Ochekepe, N., Olorunfemi, P., Ngwuluka N., 2009, Nanotechnology and Drug Delivery Part 1 : Background and Applications, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (3), 265-274.
- [107]. Özer, Y., 2008, *Nanobilim ve Nanoteknoloji: Ülke Güvenliği/Etkinliği Açısından Doğru Modelin Belirlenmesi*, Yüksek lisans, Kara Harp Okulu Savunma Bilimleri Enstitüsü.
- [108]. Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. and Rudzinski, W.E., 2001, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *J Control Release*, 70:1-20.

- [109]. Nagavarma, B.V.N. Hermant, K.S.Y., Ayaz, A. , Vasudha, L.S., ve Shivakumar, H.G. , 2012, Different Techniques for preparation of polymeric nanoparticles – A Review, *Asian Journal of pharmaceutical and Clinical Research*, 5 (3).
- [110]. Desai, M.P., Labhasetwar, V., et al., 1997, The mechanism of uptake of biodegradable microparticles is Caco-2 cells is size dependent, *Pharmaceutical Research*, 14, 1568-1573.
- [111]. Şengel-Türk, C.T., Haşcelik, C., and Gönül, N., 2007, Nanoparticulate Drug Delivery Systems For Targeting The Drugs To The Brain, *Journal of Neurological Sciences*, 24, 254-263.
- [112]. Schlossauer B.A.S., H., 2002, Comparative anatomy, physiology and in vitro models of the blood-brain and blood-retina barrier. *Curr Med Chem*, 2, 175-186.
- [113]. Auyang, Y.S., 2006, *Cancer causes and cancer research on many levels of complexity*, <http://www.creatingtechnology.org/biomed/cancer.pdf> [Ziyaret Tarihi: 18.06.2018]
- [114]. Singh, K.K., 2005, Nanotechnology in cancer detection and treatment, *Technol Cancer Res Treat*, 4:583–4.
- [115]. Tan, Y.F., Chandrasekharan, P., Maity, D., Yong, C.X., Chuang, K.H., Zhao, Y., et al., 2011, Multimodal tumor imaging by iron oxides and quantum dots formulated in poly (lactic acid)-d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate nanoparticles, *Biomaterials*, 32:2969–78.
- [116]. Fan, C., Gao, W., Chen, Z., Fan, H., Li, M., Deng, F., et al., 2011, Tumor selectivity of stealth multifunctionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Int J Pharm*, 404:180–90.
- [117]. Gupta, A.K., Gupta, M., 2005, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, 26(18):3995–4021.
- [118]. Roco, M.C., 2003, Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine, *Curr Opin Biotech*, 14, 337-346.
- [119]. Panyam, J., and Labhasetwar, V., 2003, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Adv Drug Deliv Rev*, 55,3,329-347.
- [120]. Alonso, M.J., 1996, Nanoparticulate drug carrier technology, *Drugs and the pharmaceutical sciences*, 77, 203-242.
- [121]. Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro A.J., Veiga, F., 2006, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2: 8-21.
- [122]. Makadia, H. K., Siegel, S. J., 2011, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3: 1377-1397.

- [123]. Kawashima, Y., Iwamoto, T., Niwa, T., Takechi, H., Hino, T., 1993, Size Control of Ibuprofen Microspheres with an Acrylic Polymer by Changing the pH in an Aqueous Dispersion Medium and Its Mechanism. *Chem. Pharm. Bull.*, 41(1): 191-195.
- [124]. Pozo-Rodriguez A., Delgado D., Gascon A. R., Solinis M. A., 2013, Lipid Nanoparticles as Drug/Gene Delivery Systems to the Retina. *Journal of Ocular Pharmacology And Therapeutics*, 29(2): 173-187.
- [125]. Wischke, C., Schwendeman, S. P., 2008, Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 364: 298-327.
- [126]. Muthu, M., 2009, Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview, *Asian Journal of Pharmaceutics*, 3, 266-273.
- [127]. Fessi, C., Devissaguet, J.P., Puisieux, F., and Thies, C., 1992, Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles (Google Patents).
- [128]. Çırpanlı, Y., 2009, *Kamptotesin İçeren Polimerik Ve Oligosakkarit Bazlı Nanopartiküler Formülasyonların Geliştirilmesi Ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi*, Doktora, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [129]. Mohanraj, V. and Chen, Y., 2007, Nanoparticles-a review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1): 561-573.
- [130]. Kumar, M.N., Kumar, N., 2001, Polymeric controlled drug-delivery systems: perspective issues and opportunities, *Drug Dev Ind Pharm*, 27 (1), 1-30.
- [131]. Lucke, A., Tessmar, J., Schnell, E., Schmeer, G., Gopferich, A., 2000, Biodegradable poly(D,L-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their use as biomaterials, *Biomaterials*, 21 (23), 2361-2370.
- [132]. Hans, M. L., and Lowman, A. M., 2002, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4), 319-327.
- [133]. Kumari, A., Yadav, S. K., Yadav, S. C., 2010, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75 (1), 1-18.
- [134]. Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P., Vauthier, C., 2002, Nanocapsule technology: a review, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19 (2), 99-134.
- [135]. Dizer, K.Ö., 2010, *Kraft Kağıt Üretiminde Zeta Potansiyelin Kağıt Kalitesine Etkisi*, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [136]. Gittings, M. R., and Saville, D. A., 1998, The determination of hydrodynamic size and zeta potential from electrophoretic mobility and light scattering measurements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 141(1), 111-117.

- [137]. Dalgakıran, E., 2006, *Poliakrilik asidin bovine serum albumin ile etkileşiminin dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemleri ile araştırılması*, Yüksek Lisans, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [138]. Zetasizer Nano Series User Manual, MAN0317 Issue 1, 2004, Malvern Instruments Ltd. 2003, 2004, United Kingdom.
- [139]. Singh, R., and Lillard Jr, J. W., 2009, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 215-223.
- [140]. <http://merlab.metu.edu.tr/yuksek-cozunurluklu-transmisyon-elektron-mikroskobu-rtem>, [Ziyaret Tarihi : 12.07.2018]
- [141]. Kapakin, K. A. T., 2007, Transmission Elektron Mikroskobu, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(1), 105-110.
- [142]. Avcı, D., 2009, *Heteroatom İçeren Bazı Aromatik Moleküllerin Lineer Olmayan Optik ve Spektroskopik Özelliklerinin Teorik Olarak İncelenmesi*, Doktora, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [143]. Günay, N., Pir, H., and Atalay, Y., 2011, L-Asparaginyum pikrat molekülünün spektroskopik özelliklerinin teorik olarak incelenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü*.
- [144]. Kecel-Gunduz, S., Bicak, B., Celik, S., Akyuz, S., and Ozel, A. E., 2017, Structural and spectroscopic investigation on antioxidant dipeptide, l-Methionyl-l-Serine: A combined experimental and DFT study. *Journal of Molecular Structure*, 1137, 756-770.
- [145]. Karabacak, M., Sinha, L., Prasad, O., Asiri, A.M., Cinar, M., 2013, An experimental and theoretical investigation of Acenaphthene-5-boronic acid: conformational study, NBO and NLO analysis, molecular structure and FT-IR, FT-Raman, NMR and UV spectra, *Spectrochimica Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 115, 753-766.
- [146]. Kecel-Gunduz, S., Celik, S., Ozel, A.E., Akyuz, S., 2015, Structural and vibrational spectroscopic elucidation of sulphuric acid in solid state, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33, 322 - 343.
- [147]. Miller, T. M., 1990, *Atomic and molecular polarizabilities*. In R. Lide David (Ed.), Handbook of chemistry and physics (71st ed., pp. 10–193, 10–202). Boca Raton, FL: CRC Press.
- [148]. Y.X. Sun, Q.L. Hao, W.X. Wei, Z.X. Yu, L.D. Lu, X. Wang, Y.S. Wang, 2009, Experimental and density functional studies on 4-(3, 4-dihydroxybenzylideneamino) antipyrine, and 4-(2, 3, 4-trihydroxybenzylideneamino) antipyrine, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 904 (1), 74-82.
- [149]. Moliner, V., Escribano, P., Peris, E., 1998, Intermolecular hydrogen bonding in NLO. Theoretical analysis of the nitroaniline and HF cases, *New J. Chem.* 22 (4), 387 - 392.

- [150]. G. Zhang, C.B. Musgrave, Comparison of DFT methods for molecular orbital eigenvalue calculations, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 1554-1561.
- [151]. Van Gunsteren, W. F., Billeter, S. R., Eising, A. A., Hünenberger, P. H., Krüger, P. K. H. C., et al., 1996, *Biomolecular simulation: the {GROMOS96} manual and user guide*.
- [152]. Smith, P.E., and van Gunsteren, W.F., 1993, The viscosity of SPC and SPC/E water at 277 and 300 K, *Chemical physics letters*, 215:315-318.
- [153] Fletcher, R., 2000, *Practical Methods of Optimization*, 2nd edn. Wiley, Chichester, Numerical Algorithms, 26.2:198.
- [154]. Bussi, G., Donadio, D., and Parrinello, M., 2007, Canonical sampling through velocity rescaling, *The Journal of chemical physics*, 126(1), 014101.
- [155]. Parrinello, M., and Rahman, A., 1981, Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method, *Journal of Applied physics*, 52:7182-7190.
- [156]. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J., and Fraaije, J.G., 1997, LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations, *Journal of computational chemistry*, 18:1463-1472.
- [157]. van der Spoel, D., 1996, Structure and dynamics of peptides: theoretical aspects of protein folding.
- [158]. Gardner, A. M., and Johnson, G. L., 1996, Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor α -mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase, *Journal of Biological Chemistry*, 271(24), 14560-14566.
- [159]. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. 2018, SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46(W1), W296-W303.
- [160]. Tahtaci, H., Karacık, H., Ece, A., Er, M., and Şeker, M. G., 2018, Design, Synthesis, SAR and Molecular Modeling Studies of Novel Imidazo [2, 1-b][1, 3, 4] Thiadiazole Derivatives as Highly Potent Antimicrobial Agents, *Molecular informatics*, 37(3), 1700083.
- [161]. Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L., and Davis, S. S., 1999, PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, 57(2), 171-185.
- [162]. López-García, J., Lehocý, M., Humpolíček, P., Sáha, P., 2014, HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation, *Journal of functional biomaterials*, 5(2):43-57.
- [163]. ISO. 10993-5:2009 *Biological Evaluation of Medical Devices*. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 2009.

- [164]. Specifications Sheet: GRAMS Suite – A Solution for Visualizing, Processing, and Managing Spectroscopy Data.
- [165]. Arul, V., Gopinath, D., Gomathi, K., and Jayakumar, R., 2005, Biotinylated GHK peptide incorporated collagenous matrix: A novel biomaterial for dermal wound healing in rats, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 73(2), 383-391.
- [166]. Schirer, A., El Khoury, Y., Faller, P. and Hellwig, P., 2017, Similarities and differences of copper and zinc cations binding to biologically relevant peptides studied by vibrational spectroscopies. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22(4), 581-589.
- [167]. Kumar, S., Rai, A. K., Singh, V. B., and Rai, S. B., 2005, Vibrational spectrum of glycine molecule, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(11), 2741-2746.
- [168]. Hasegawa, K., Ono, T. A. and Noguchi, T., 2000, Vibrational spectra and ab initio DFT calculations of 4-methylimidazole and its different protonation forms: infrared and Raman markers of the protonation state of a histidine side chain, *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(17), 4253-4265.
- [169]. Herrklotz, J., 2012, *Analysis of the vibrational spectra of L-lysine and L-arginine* (Doctoral dissertation, University of Vienna).
- [170]. Amiri, A., Zardini, H. Z., Shanbedi, M., Maghrebi, M., Baniadam, M., and Tolueinia, B., 2012, Efficient method for functionalization of carbon nanotubes by lysine and improved antimicrobial activity and water-dispersion, *Materials Letters*, 72, 153-156.
- [171]. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. and Feeney, P. J., 1997, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3), 3-25.
- [172]. Kwon Y, 2001, *Partition and Distribution Coefficients*, Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists. (secondary), New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 44. ISBN 978-1-4757-8693-4.
- [173] Shargel, L., Susanna, W., Yu, A.B., 2012, Chapter 10: Physiological Drug Distribution and Protein Binding, *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. (secondary) (6th ed.). New York: McGraw-Hill Medical. p. 211. ISBN 978-0-07-160393-5.
- [174]. Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW, 2008, *Chapter 15: General Anesthetic Pharmacology*, Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy. (secondary) (2nd ed.). Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins. p. 243. ISBN 978-0-7817-8355-2.
- [175]. Singh, B. R., 2000, Basic aspects of the technique and applications of infrared spectroscopy of peptides and proteins. In *ACS symposium series* (Vol. 750, pp. 2-37). Washington, DC; American Chemical Society; 1999.

- [176]. Hopkins, J., Brenner, L., and Tumosa, C. S., 1991, Variation of the amide I and amide II peak absorbance ratio in human hair as measured by Fourier transform infrared spectroscopy. *Forensic science international*, 50(1), 61-65.
- [177]. Krimm, S. and Bandekar, J., 1986, Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. In C.B. Anfinsen, J. T. Edsall and F.M. Richards (eds.), *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 38, Academic Press Inc., Orlando, pp. 330-346.
- [178]. Gallagher, W., 2009, FTIR analysis of protein structure. *Course manual Chem*, 455.
- [179]. Hilderson, H. J., and Ralston, G. B. (Eds.), 2013, *Physicochemical methods in the study of biomembranes* (Vol. 23). Springer Science & Business Media.
- [180]. Xie, M. X., Liu, Y., 2003, Studies on amide III infrared bands for the secondary structure determination of proteins. *Chemical Journal Of Chinese Universities-Chinese*, 24(2), 226-231.
- [181]. Yang, J., Lee, C. H., Park, J., Seo, S., Lim, E. K., Song, Y. J., et al, 2007, Antibody conjugated magnetic PLGA nanoparticles for diagnosis and treatment of breast cancer, *Journal of Materials Chemistry*, 17(26), 2695-2699.
- [182]. Gupta, H., Aqil, M., Khar, R. K., Ali, A., Bhatnagar, A., and Mittal, G., 2010, Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 6(2), 324-333.
- [183]. Erbetta, C. D. A. C., Alves, R. J., Resende, J. M., de Souza Freitas, R. F., and de Sousa, R. G., 2012, Synthesis and characterization of poly (D, L-lactide-co-glycolide) copolymer, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 3(02), 208.
- [184]. Gümüşderelioğlu, M., and Deniz, G., 1999, Synthesis, characterization and in vitro degradation of poly (dl-lactide)/poly (dl-lactide-co-glycolide) films. *Turkish Journal of Chemistry*, 23(2), 153-162.
- [185]. Simon, S., Gil, A., Sodupe, M., and Bertrán, J., 2005, Structure and fragmentation of glycine, alanine, serine and cysteine radical cations. A theoretical study. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 727(1-3), 191-197.
- [186]. Kumar, S., Rai, A. K., Rai, S. B., and Rai, D. K., 2010, Infrared and Raman spectra of Histidine: an ab initio DFT calculations of Histidine molecule and its different protonated forms, *Indian Journal of Physics*, 84(5), 563-573.
- [187]. Saada, I., and Pearson, J. K., 2011, A theoretical study of the structure and electron density of the peptide bond, *Computational and Theoretical Chemistry*, 969(1-3), 76-82.

EKLER

EK 1: NBO hesabı, fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

Verici (i)	Alıcı (j)	$E(2)^a$ (kcal/mol)	$E(j) - E(i)^b$ (a.u.)	$F(i, j)^c$ (a.u.)
$\sigma(H_1 - N_2)$	$\sigma^*(C_4 - H_6)$	2.48	0.99	0.044
$\sigma(N_2 - H_3)$	$\sigma^*(C_4 - H_5)$	2.35	0.99	0.043
$\sigma(N_2 - H_3)$	$\sigma^*(C_4 - H_6)$	0.59	1	0.022
$\sigma(N_2 - C_4)$	$\sigma^*(C_7 - N_9)$	1.77	1.22	0.042
$\sigma(C_4 - H_5)$	$\sigma^*(N_2 - H_3)$	3	0.94	0.048
$\sigma(C_4 - H_5)$	$\sigma^*(C_7 - O_8)$	1.28	1.09	0.033
$\sigma(C_4 - H_5)$	$\pi^*(C_7 - O_8)$	5.07	0.54	0.05
$\sigma(C_4 - H_6)$	$\sigma^*(H_1 - N_2)$	2.84	0.96	0.047
$\sigma(C_4 - H_6)$	$\sigma^*(C_7 - O_8)$	3.12	1.1	0.052
$\sigma(C_4 - H_6)$	$\pi^*(C_7 - O_8)$	2.81	0.54	0.038
$\sigma(C_4 - C_7)$	$\sigma^*(C_7 - O_8)$	0.7	1.21	0.026
$\sigma(C_4 - C_7)$	$\sigma^*(N_9 - C_{11})$	4.3	0.98	0.058
$\sigma(C_7 - O_8)$	$\sigma^*(C_4 - C_7)$	0.91	1.4	0.033
$\sigma(C_7 - O_8)$	$\sigma^*(C_7 - N_9)$	1.1	1.52	0.037
$\sigma(C_7 - O_8)$	$\sigma^*(N_9 - H_{10})$	1.42	1.44	0.041
$\pi(C_7 - O_8)$	$\sigma^*(C_4 - H_5)$	1.2	0.77	0.027
$\pi(C_7 - O_8)$	$\sigma^*(C_4 - H_6)$	0.76	0.77	0.022
$\pi(C_7 - O_8)$	$\pi^*(C_7 - O_8)$	1.09	0.41	0.02
$\sigma(C_7 - N_9)$	$\sigma^*(N_2 - C_4)$	0.78	1.2	0.027
$\sigma(C_7 - N_9)$	$\sigma^*(C_7 - O_8)$	0.93	1.42	0.033
$\sigma(C_7 - N_9)$	$\sigma^*(N_9 - H_{10})$	0.65	1.25	0.026
$\sigma(C_7 - N_9)$	$\sigma^*(N_9 - C_{11})$	1.33	1.19	0.036
$\sigma(C_7 - N_9)$	$\sigma^*(C_{11} - C_{24})$	0.52	1.19	0.022
$\sigma(N_9 - H_{10})$	$\sigma^*(C_7 - O_8)$	4.26	1.24	0.065
$\sigma(N_9 - H_{10})$	$\pi^*(C_7 - O_8)$	0.74	0.68	0.022
$\sigma(N_9 - H_{10})$	$\sigma^*(C_{11} - C_{13})$	0.81	1	0.025
$\sigma(N_9 - H_{10})$	$\sigma^*(C_{11} - C_{24})$	0.73	1	0.024
$\sigma(N_9 - C_{11})$	$\sigma^*(C_4 - C_7)$	2.16	1.12	0.045
$\sigma(N_9 - C_{11})$	$\sigma^*(C_7 - N_9)$	1.24	1.24	0.035
$\sigma(N_9 - C_{11})$	$\sigma^*(C_{13} - C_{16})$	0.89	1.18	0.029
$\sigma(N_9 - C_{11})$	$\sigma^*(C_{24} - N_{26})$	2.1	1.24	0.046

EK 1 (devam): NBO hesabı, fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

$\sigma(C_{11} - H_{12})$	$\sigma^*(N_9 - H_{10})$	1.43	0.92	0.032
$\sigma(C_{11} - H_{12})$	$\sigma^*(C_{13} - H_{15})$	1.76	0.91	0.036
$\sigma(C_{11} - H_{12})$	$\sigma^*(C_{24} - O_{25})$	2.18	1.08	0.043
$\sigma(C_{11} - H_{12})$	$\pi^*(C_{24} - O_{25})$	3.36	0.53	0.04
$\sigma(C_{11} - C_{13})$	$\sigma^*(N_9 - H_{10})$	1.14	1.01	0.03
$\sigma(C_{11} - C_{13})$	$\sigma^*(C_{13} - C_{16})$	0.92	1.03	0.028
$\sigma(C_{11} - C_{13})$	$\sigma^*(C_{16} - C_{22})$	1.64	1.19	0.04
$\sigma(C_{11} - C_{13})$	$\pi^*(C_{16} - C_{22})$	1.94	0.62	0.033
$\sigma(C_{11} - C_{13})$	$\sigma^*(C_{24} - O_{25})$	1.22	1.17	0.034
$\sigma(C_{11} - C_{13})$	$\pi^*(C_{24} - O_{25})$	2.68	0.62	0.039
$\sigma(C_{11} - C_{24})$	$\sigma^*(C_7 - N_9)$	2.88	1.12	0.051
$\sigma(C_{11} - C_{24})$	$\sigma^*(C_{11} - C_{13})$	0.52	0.97	0.02
$\sigma(C_{11} - C_{24})$	$\sigma^*(C_{13} - H_{14})$	0.83	1.04	0.026
$\sigma(C_{11} - C_{24})$	$\sigma^*(C_{24} - O_{25})$	0.81	1.2	0.028
$\sigma(C_{11} - C_{24})$	$\sigma^*(N_{26} - C_{28})$	4.21	0.98	0.057
$\sigma(C_{13} - H_{14})$	$\sigma^*(N_9 - C_{11})$	1.33	0.85	0.03
$\sigma(C_{13} - H_{14})$	$\sigma^*(C_{11} - C_{24})$	2.01	0.85	0.037
$\sigma(C_{13} - H_{14})$	$\sigma^*(C_{16} - N_{17})$	6.59	0.97	0.071
$\sigma(C_{13} - H_{15})$	$\sigma^*(C_{11} - H_{12})$	1.9	0.89	0.037
$\sigma(C_{13} - H_{15})$	$\sigma^*(C_{11} - C_{24})$	0.52	0.85	0.019
$\sigma(C_{13} - H_{15})$	$\sigma^*(C_{16} - C_{22})$	1.86	1.09	0.04
$\sigma(C_{13} - H_{15})$	$\pi^*(C_{16} - C_{22})$	3.89	0.52	0.043
$\sigma(C_{13} - C_{16})$	$\sigma^*(N_9 - C_{11})$	1.38	1	0.033
$\sigma(C_{13} - C_{16})$	$\sigma^*(C_{11} - C_{13})$	0.65	0.99	0.023
$\sigma(C_{13} - C_{16})$	$\sigma^*(C_{13} - H_{14})$	0.54	1.06	0.021
$\sigma(C_{13} - C_{16})$	$\sigma^*(C_{13} - H_{15})$	0.59	1.05	0.022
$\sigma(C_{13} - C_{16})$	$\sigma^*(C_{16} - N_{17})$	1.28	1.12	0.034
$\sigma(C_{13} - C_{16})$	$\sigma^*(C_{16} - C_{22})$	2.61	1.24	0.051
$\sigma(C_{13} - C_{16})$	$\sigma^*(N_{17} - C_{18})$	2.08	1.2	0.045
$\sigma(C_{13} - C_{16})$	$\sigma^*(N_{20} - C_{22})$	0.9	1.07	0.028
$\sigma(C_{16} - N_{17})$	$\sigma^*(C_{13} - H_{14})$	0.58	1.19	0.024
$\sigma(C_{16} - N_{17})$	$\sigma^*(C_{13} - C_{16})$	1.05	1.21	0.032
$\sigma(C_{16} - N_{17})$	$\sigma^*(C_{16} - C_{22})$	1.34	1.37	0.038
$\sigma(C_{16} - N_{17})$	$\sigma^*(N_{17} - C_{18})$	0.91	1.33	0.031
$\sigma(C_{16} - N_{17})$	$\sigma^*(C_{18} - H_{19})$	4.67	1.17	0.066
$\sigma(C_{16} - N_{17})$	$\sigma^*(C_{18} - N_{20})$	1.21	1.22	0.034

EK 1 (devam): NBO hesabı, fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

$\sigma(\text{C16} - \text{N17})$	$\sigma^*(\text{N20} - \text{C22})$	0.96	1.2	0.03
$\sigma(\text{C16} - \text{N17})$	$\sigma^*(\text{C22} - \text{H23})$	2.96	1.19	0.053
$\sigma(\text{C16} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{C13} - \text{C16})$	2.81	1.16	0.051
$\sigma(\text{C16} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{C16} - \text{N17})$	0.85	1.19	0.028
$\sigma(\text{C16} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{N20} - \text{H21})$	4	1.11	0.059
$\sigma(\text{C16} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{N20} - \text{C22})$	0.73	1.15	0.026
$\sigma(\text{C16} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{C22} - \text{H23})$	2.08	1.14	0.044
$\pi(\text{C16} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{C11} - \text{C13})$	2.95	0.62	0.04
$\pi(\text{C16} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{C13} - \text{H15})$	2.78	0.68	0.04
$\pi(\text{C16} - \text{C22})$	$\pi^*(\text{N17} - \text{C18})$	15.34	0.26	0.06
$\sigma(\text{N17} - \text{C18})$	$\sigma^*(\text{C13} - \text{C16})$	4.4	1.28	0.067
$\sigma(\text{N17} - \text{C18})$	$\sigma^*(\text{C16} - \text{N17})$	0.92	1.32	0.031
$\sigma(\text{N17} - \text{C18})$	$\sigma^*(\text{C18} - \text{H19})$	0.92	1.24	0.03
$\sigma(\text{N17} - \text{C18})$	$\sigma^*(\text{C18} - \text{N20})$	0.57	1.29	0.024
$\sigma(\text{N17} - \text{C18})$	$\sigma^*(\text{N20} - \text{H21})$	2.38	1.23	0.048
$\pi(\text{N17} - \text{C18})$	$\pi^*(\text{C16} - \text{C22})$	21.13	0.35	0.08
$\sigma(\text{C18} - \text{H19})$	$\sigma^*(\text{C16} - \text{N17})$	2.93	1.05	0.05
$\sigma(\text{C18} - \text{H19})$	$\sigma^*(\text{N17} - \text{C18})$	0.8	1.13	0.027
$\sigma(\text{C18} - \text{H19})$	$\sigma^*(\text{N20} - \text{C22})$	2.67	1	0.046
$\sigma(\text{C18} - \text{N20})$	$\sigma^*(\text{C13} - \text{C16})$	0.74	1.28	0.027
$\sigma(\text{C18} - \text{N20})$	$\sigma^*(\text{N17} - \text{C18})$	0.56	1.4	0.025
$\sigma(\text{C18} - \text{N20})$	$\sigma^*(\text{N20} - \text{H21})$	0.69	1.23	0.026
$\sigma(\text{C18} - \text{N20})$	$\sigma^*(\text{N20} - \text{C22})$	1.32	1.27	0.037
$\sigma(\text{C18} - \text{N20})$	$\sigma^*(\text{C22} - \text{H23})$	2.44	1.26	0.049
$\sigma(\text{N20} - \text{H21})$	$\sigma^*(\text{C16} - \text{C22})$	0.96	1.31	0.032
$\sigma(\text{N20} - \text{H21})$	$\sigma^*(\text{N17} - \text{C18})$	1.47	1.27	0.039
$\sigma(\text{N20} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{C13} - \text{C16})$	4.59	1.25	0.068
$\sigma(\text{N20} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{C16} - \text{N17})$	0.6	1.29	0.025
$\sigma(\text{N20} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{C16} - \text{C22})$	1.12	1.41	0.035
$\sigma(\text{N20} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{N17} - \text{C18})$	0.64	1.37	0.026
$\sigma(\text{N20} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{C18} - \text{H19})$	2.65	1.21	0.05
$\sigma(\text{N20} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{C18} - \text{N20})$	1.44	1.26	0.038
$\sigma(\text{N20} - \text{C22})$	$\sigma^*(\text{N20} - \text{H21})$	0.6	1.2	0.024
$\sigma(\text{C22} - \text{H23})$	$\sigma^*(\text{C16} - \text{N17})$	2.52	1.03	0.046
$\sigma(\text{C22} - \text{H23})$	$\sigma^*(\text{C16} - \text{C22})$	2.27	1.15	0.046
$\sigma(\text{C22} - \text{H23})$	$\sigma^*(\text{C18} - \text{N20})$	2.44	1.01	0.044

EK 1 (devam): NBO hesabı, fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

$\sigma(\text{C24} - \text{O25})$	$\sigma^*(\text{C11} - \text{C24})$	0.92	1.4	0.033
$\sigma(\text{C24} - \text{O25})$	$\sigma^*(\text{C24} - \text{N26})$	1.15	1.54	0.038
$\sigma(\text{C24} - \text{O25})$	$\sigma^*(\text{N26} - \text{H27})$	1.68	1.47	0.045
$\pi(\text{C24} - \text{O25})$	$\sigma^*(\text{C11} - \text{H12})$	1.15	0.78	0.027
$\pi(\text{C24} - \text{O25})$	$\sigma^*(\text{C11} - \text{C13})$	1.24	0.73	0.027
$\pi(\text{C24} - \text{O25})$	$\pi^*(\text{C24} - \text{O25})$	1.08	0.4	0.02
$\sigma(\text{C24} - \text{N26})$	$\sigma^*(\text{N9} - \text{C11})$	0.62	1.19	0.024
$\sigma(\text{C24} - \text{N26})$	$\sigma^*(\text{C24} - \text{O25})$	1.17	1.41	0.036
$\sigma(\text{C24} - \text{N26})$	$\sigma^*(\text{N26} - \text{H27})$	0.98	1.26	0.032
$\sigma(\text{C24} - \text{N26})$	$\sigma^*(\text{N26} - \text{C28})$	1.28	1.19	0.035
$\sigma(\text{C24} - \text{N26})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{C30})$	0.97	1.2	0.03
$\sigma(\text{N26} - \text{H27})$	$\sigma^*(\text{C24} - \text{O25})$	5.02	1.22	0.07
$\sigma(\text{N26} - \text{H27})$	$\pi^*(\text{C24} - \text{O25})$	0.61	0.67	0.02
$\sigma(\text{N26} - \text{H27})$	$\sigma^*(\text{C24} - \text{N26})$	0.78	1.14	0.027
$\sigma(\text{N26} - \text{H27})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{H29})$	1.21	1.05	0.032
$\sigma(\text{N26} - \text{C28})$	$\sigma^*(\text{C11} - \text{C24})$	2.53	1.11	0.048
$\sigma(\text{N26} - \text{C28})$	$\sigma^*(\text{C24} - \text{N26})$	1.42	1.25	0.038
$\sigma(\text{N26} - \text{C28})$	$\sigma^*(\text{N26} - \text{H27})$	0.54	1.18	0.023
$\sigma(\text{N26} - \text{C28})$	$\sigma^*(\text{C30} - \text{H32})$	0.68	1.17	0.025
$\sigma(\text{N26} - \text{C28})$	$\sigma^*(\text{C45} - \text{O46})$	1.65	1.36	0.042
$\sigma(\text{C28} - \text{H29})$	$\sigma^*(\text{N26} - \text{H27})$	3.76	0.93	0.053
$\sigma(\text{C28} - \text{H29})$	$\sigma^*(\text{C30} - \text{H31})$	2.46	0.9	0.042
$\sigma(\text{C28} - \text{H29})$	$\pi^*(\text{C45} - \text{O46})$	3.56	0.52	0.04
$\sigma(\text{C28} - \text{H29})$	$\sigma^*(\text{C45} - \text{O47})$	2.32	0.85	0.04
$\sigma(\text{C28} - \text{C30})$	$\sigma^*(\text{C24} - \text{N26})$	2.55	1.11	0.048
$\sigma(\text{C28} - \text{C30})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{H29})$	0.7	1.01	0.024
$\sigma(\text{C28} - \text{C30})$	$\sigma^*(\text{C30} - \text{C33})$	0.56	1	0.021
$\sigma(\text{C28} - \text{C30})$	$\sigma^*(\text{C33} - \text{H34})$	1.03	1.02	0.029
$\sigma(\text{C28} - \text{C30})$	$\pi^*(\text{C45} - \text{O46})$	2.93	0.62	0.04
$\sigma(\text{C28} - \text{C30})$	$\sigma^*(\text{C45} - \text{O47})$	0.94	0.95	0.027
$\sigma(\text{C28} - \text{C45})$	$\sigma^*(\text{N26} - \text{H27})$	0.6	1.07	0.023
$\sigma(\text{C28} - \text{C45})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{C30})$	0.57	1	0.021
$\sigma(\text{C28} - \text{C45})$	$\sigma^*(\text{C30} - \text{C33})$	2.09	1.03	0.042
$\sigma(\text{C28} - \text{C45})$	$\sigma^*(\text{C45} - \text{O46})$	0.97	1.26	0.031
$\sigma(\text{C28} - \text{C45})$	$\sigma^*(\text{O47} - \text{H48})$	2.2	1.02	0.043
$\sigma(\text{C30} - \text{H31})$	$\sigma^*(\text{N26} - \text{C28})$	0.71	0.85	0.022

EK 1 (devam): NBO hesabı, fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

$\sigma(\text{C30} - \text{H31})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{H29})$	2.46	0.9	0.042
$\sigma(\text{C30} - \text{H31})$	$\sigma^*(\text{C33} - \text{H35})$	2.59	0.9	0.043
$\sigma(\text{C30} - \text{H32})$	$\sigma^*(\text{N26} - \text{C28})$	3.77	0.85	0.051
$\sigma(\text{C30} - \text{H32})$	$\sigma^*(\text{C33} - \text{H34})$	0.52	0.9	0.019
$\sigma(\text{C30} - \text{H32})$	$\sigma^*(\text{C33} - \text{C36})$	3.24	0.89	0.048
$\sigma(\text{C30} - \text{C33})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{C30})$	0.76	0.96	0.024
$\sigma(\text{C30} - \text{C33})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{C45})$	1.32	0.95	0.032
$\sigma(\text{C30} - \text{C33})$	$\sigma^*(\text{C33} - \text{C36})$	0.79	1	0.025
$\sigma(\text{C30} - \text{C33})$	$\sigma^*(\text{C36} - \text{C39})$	1.56	1	0.035
$\sigma(\text{C33} - \text{H34})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{C30})$	3.62	0.84	0.049
$\sigma(\text{C33} - \text{H34})$	$\sigma^*(\text{C30} - \text{H32})$	0.54	0.9	0.02
$\sigma(\text{C33} - \text{H34})$	$\sigma^*(\text{C36} - \text{H37})$	3	0.89	0.046
$\sigma(\text{C33} - \text{H35})$	$\sigma^*(\text{C30} - \text{H31})$	2.99	0.88	0.046
$\sigma(\text{C33} - \text{H35})$	$\sigma^*(\text{C36} - \text{H38})$	2.78	0.9	0.045
$\sigma(\text{C33} - \text{C36})$	$\sigma^*(\text{C30} - \text{H32})$	1.04	1.01	0.029
$\sigma(\text{C33} - \text{C36})$	$\sigma^*(\text{C30} - \text{C33})$	0.62	0.99	0.022
$\sigma(\text{C33} - \text{C36})$	$\sigma^*(\text{C36} - \text{C39})$	0.59	1	0.022
$\sigma(\text{C33} - \text{C36})$	$\sigma^*(\text{C39} - \text{N42})$	2.03	0.95	0.039
$\sigma(\text{C36} - \text{H37})$	$\sigma^*(\text{C33} - \text{H34})$	2.66	0.89	0.043
$\sigma(\text{C36} - \text{H37})$	$\sigma^*(\text{C39} - \text{H40})$	2.67	0.88	0.043
$\sigma(\text{C36} - \text{H38})$	$\sigma^*(\text{C33} - \text{H35})$	2.98	0.88	0.046
$\sigma(\text{C36} - \text{H38})$	$\sigma^*(\text{C39} - \text{H41})$	2.68	0.87	0.043
$\sigma(\text{C36} - \text{C39})$	$\sigma^*(\text{C30} - \text{C33})$	2.15	0.99	0.041
$\sigma(\text{C36} - \text{C39})$	$\sigma^*(\text{C33} - \text{C36})$	0.73	1	0.024
$\sigma(\text{C36} - \text{C39})$	$\sigma^*(\text{N42} - \text{H43})$	1.75	1.04	0.038
$\sigma(\text{C39} - \text{H40})$	$\sigma^*(\text{C36} - \text{H37})$	2.8	0.9	0.045
$\sigma(\text{C39} - \text{H40})$	$\sigma^*(\text{N42} - \text{H44})$	3.2	0.93	0.049
$\sigma(\text{C39} - \text{H41})$	$\sigma^*(\text{C36} - \text{H38})$	2.75	0.9	0.045
$\sigma(\text{C39} - \text{N42})$	$\sigma^*(\text{C33} - \text{C36})$	1.68	1.11	0.039
$\sigma(\text{N42} - \text{H43})$	$\sigma^*(\text{C36} - \text{C39})$	2.28	1.01	0.043
$\sigma(\text{N42} - \text{H44})$	$\sigma^*(\text{C39} - \text{H40})$	2.12	1.01	0.041
$\sigma(\text{C45} - \text{O46})$	$\sigma^*(\text{N26} - \text{C28})$	0.6	1.45	0.026
$\sigma(\text{C45} - \text{O46})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{C45})$	1.33	1.45	0.04
$\pi(\text{C45} - \text{O46})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{H29})$	0.53	0.8	0.018
$\pi(\text{C45} - \text{O46})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{C30})$	0.85	0.76	0.023
$\pi(\text{C45} - \text{O46})$	$\pi^*(\text{C45} - \text{O46})$	0.86	0.41	0.018

EK 1 (devam): NBO hesabı, fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

$\sigma(\text{O47} - \text{H48})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{C45})$	3.91	1.11	0.06
$\sigma(\text{O47} - \text{H48})$	$\sigma^*(\text{C45} - \text{O46})$	0.95	1.37	0.032
$n1(\text{N2})$	$\sigma^*(\text{C4} - \text{H5})$	2.26	0.7	0.036
$n1(\text{N2})$	$\sigma^*(\text{C4} - \text{H6})$	0.68	0.7	0.02
$n1(\text{N2})$	$\sigma^*(\text{C4} - \text{C7})$	7.95	0.68	0.066
$n1(\text{O8})$	$\sigma^*(\text{C4} - \text{C7})$	1.69	1.05	0.038
$n1(\text{O8})$	$\sigma^*(\text{C7} - \text{N9})$	1.52	1.17	0.038
$n2(\text{O8})$	$\sigma^*(\text{C4} - \text{C7})$	19.71	0.62	0.1
$n2(\text{O8})$	$\sigma^*(\text{C7} - \text{N9})$	23.07	0.74	0.118
$n1(\text{N9})$	$\sigma^*(\text{C7} - \text{O8})$	1.06	0.84	0.029
$n1(\text{N9})$	$\pi^*(\text{C7} - \text{O8})$	59.83	0.29	0.118
$n1(\text{N9})$	$\sigma^*(\text{C11} - \text{H12})$	5.43	0.65	0.057
$n1(\text{N9})$	$\sigma^*(\text{C11} - \text{C13})$	5.76	0.6	0.057
$n1(\text{N17})$	$\sigma^*(\text{C13} - \text{C16})$	0.99	0.82	0.026
$n1(\text{N17})$	$\sigma^*(\text{C16} - \text{C22})$	5.2	0.97	0.065
$n1(\text{N17})$	$\sigma^*(\text{C18} - \text{H19})$	2.1	0.77	0.037
$n1(\text{N17})$	$\sigma^*(\text{C18} - \text{N20})$	6.86	0.83	0.069
$n1(\text{N17})$	$\sigma^*(\text{N26} - \text{H27})$	16.09	0.81	0.103
$n1(\text{N20})$	$\pi^*(\text{C16} - \text{C22})$	28.55	0.31	0.087
$n1(\text{N20})$	$\pi^*(\text{N17} - \text{C18})$	50.67	0.27	0.106
$n1(\text{O25})$	$\sigma^*(\text{N9} - \text{H10})$	0.73	1.11	0.025
$n1(\text{O25})$	$\sigma^*(\text{C11} - \text{C24})$	1.94	1.05	0.041
$n1(\text{O25})$	$\sigma^*(\text{C24} - \text{N26})$	1.08	1.19	0.032
$n2(\text{O25})$	$\sigma^*(\text{N9} - \text{H10})$	2.41	0.68	0.037
$n2(\text{O25})$	$\sigma^*(\text{C11} - \text{C24})$	19.41	0.62	0.099
$n2(\text{O25})$	$\sigma^*(\text{C24} - \text{N26})$	22.06	0.76	0.117
$n1(\text{N26})$	$\sigma^*(\text{C24} - \text{O25})$	0.69	0.83	0.023
$n1(\text{N26})$	$\pi^*(\text{C24} - \text{O25})$	66.43	0.28	0.121
$n1(\text{N26})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{H29})$	2.17	0.66	0.037
$n1(\text{N26})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{C30})$	1.13	0.61	0.025
$n1(\text{N26})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{C45})$	9.81	0.6	0.073
$n1(\text{N42})$	$\sigma^*(\text{C36} - \text{C39})$	1	0.71	0.024
$n1(\text{N42})$	$\sigma^*(\text{C39} - \text{H40})$	1.35	0.71	0.028
$n1(\text{N42})$	$\sigma^*(\text{C39} - \text{H41})$	7.31	0.7	0.064
$n1(\text{O46})$	$\sigma^*(\text{C28} - \text{C45})$	2.2	1.06	0.044
$n1(\text{O46})$	$\sigma^*(\text{C45} - \text{O47})$	1.41	1.05	0.035

EK 1 (devam): NBO hesabı, fock matrisinin ikinci derece pertürbasyon teorisi analizi.

n2(O46)	$\sigma^*(N26 - C28)$	0.64	0.63	0.019
n2(O46)	$\sigma^*(C28 - C45)$	18.14	0.62	0.097
n2(O46)	$\sigma^*(C45 - O47)$	33.25	0.61	0.129
n1(O47)	$\sigma^*(C45 - O46)$	6.8	1.25	0.082
n2(O47)	$\pi^*(C45 - O46)$	44.31	0.35	0.112
$\pi^*(C7 - O8)$	$\sigma^*(C4 - H5)$	1.51	0.35	0.053
$\pi^*(C7 - O8)$	$\sigma^*(C4 - H6)$	0.81	0.36	0.039
$\pi^*(C7 - O8)$	$\sigma^*(C7 - O8)$	2.92	0.55	0.091
$\pi^*(C16 - C22)$	$\sigma^*(C11 - C13)$	1.24	0.32	0.044
$\pi^*(C16 - C22)$	$\sigma^*(C13 - H15)$	1.11	0.38	0.046
$\pi^*(N17 - C18)$	$\pi^*(C16 - C22)$	42.35	0.04	0.06
$\pi^*(C24 - O25)$	$\sigma^*(C11 - H12)$	1.21	0.37	0.047
$\pi^*(C24 - O25)$	$\sigma^*(C11 - C13)$	1.53	0.33	0.049
$\pi^*(C24 - O25)$	$\sigma^*(C24 - O25)$	1.98	0.55	0.073
$\pi^*(C45 - O46)$	$\sigma^*(C28 - H29)$	0.78	0.39	0.046
$\pi^*(C45 - O46)$	$\sigma^*(C28 - C30)$	0.93	0.35	0.048
$\sigma^*(C45 - O47)$	$\sigma^*(N26 - C28)$	13.88	0.02	0.051
$\sigma^*(C45 - O47)$	$\sigma^*(C28 - H29)$	0.61	0.06	0.022
$\sigma^*(C45 - O47)$	$\sigma^*(C28 - C30)$	1.35	0.02	0.019
$\sigma^*(C45 - O47)$	$\sigma^*(O47 - H48)$	1.09	0.04	0.025

^aE(2) hiper konjugatif etkileşme enerjisi (stabilizasyon enerjisi).^bVerici (i) ve alıcı (j) NBO orbitalleri arasındaki enerji farkı.^cF(i, j) : i ve j NBO orbitalleri arasındaki fock matris elemanı. σ : sigma bağ orbitalleri π : pi bağ orbitali

n : bağ yapmamış elektronlar (core orbital)

* : antibağ orbitali

EK 2: NBO'ların etkileşmelerinin doluluk miktarı ile onlara ait enerjileri.

<i>Parametreler</i>	<i>Doluluk (e)</i>	<i>Enerji (a.u.)</i>
$\sigma(H_1 - N_2)$	1.98877	-0.60318
$\sigma(N_2 - H_3)$	1.9891	-0.60595
$\sigma(N_2 - C_4)$	1.99275	-0.72889
$\sigma(C_4 - H_5)$	1.96578	-0.50242
$\sigma(C_4 - H_6)$	1.9762	-0.51109
$\sigma(C_4 - C_7)$	1.98074	-0.6245
$\sigma(C_7 - O_8)$	1.99327	-1.0304
$\pi(C_7 - O_8)$	1.98907	-0.38078
$\sigma(C_7 - N_9)$	1.98998	-0.83655
$\sigma(N_9 - H_{10})$	1.98144	-0.6513
$\sigma(N_9 - C_{11})$	1.98441	-0.74948
$\sigma(C_{11} - H_{12})$	1.96526	-0.51135
$\sigma(C_{11} - C_{13})$	1.96384	-0.60326
$\sigma(C_{11} - C_{24})$	1.97184	-0.62935
$\sigma(C_{13} - H_{14})$	1.97292	-0.49933
$\sigma(C_{13} - H_{15})$	1.97182	-0.50127
$\sigma(C_{13} - C_{16})$	1.97902	-0.64989
$\sigma(C_{16} - N_{17})$	1.97677	-0.78287
$\sigma(C_{16} - C_{22})$	1.97969	-0.72798
$\pi(C_{16} - C_{22})$	1.83459	-0.27933
$\sigma(N_{17} - C_{18})$	1.98507	-0.85196
$\pi(N_{17} - C_{18})$	1.87811	-0.32763
$\sigma(C_{18} - H_{19})$	1.98554	-0.57923
$\sigma(C_{18} - N_{20})$	1.99058	-0.84737
$\sigma(N_{20} - H_{21})$	1.9906	-0.72285
$\sigma(N_{20} - C_{22})$	1.98539	-0.81996
$\sigma(C_{22} - H_{23})$	1.98368	-0.56779
$\sigma(C_{24} - O_{25})$	1.99223	-1.04429
$\pi(C_{24} - O_{25})$	1.98878	-0.38453
$\sigma(C_{24} - N_{26})$	1.98789	-0.83847
$\sigma(N_{26} - H_{27})$	1.98011	-0.65346
$\sigma(N_{26} - C_{28})$	1.98529	-0.75448
$\sigma(C_{28} - H_{29})$	1.95961	-0.51091
$\sigma(C_{28} - C_{30})$	1.96656	-0.61582
$\sigma(C_{28} - C_{45})$	1.97091	-0.64749

EK 2 (devam): NBO'ların etkileşmelerinin doluluk miktarı ile onlara ait enerjileri.

$\sigma(C_{30} - H_{31})$	1.97802	-0.50109
$\sigma(C_{30} - H_{32})$	1.97535	-0.49558
$\sigma(C_{30} - C_{33})$	1.98152	-0.60684
$\sigma(C_{33} - H_{34})$	1.97676	-0.48761
$\sigma(C_{33} - H_{35})$	1.9788	-0.49044
$\sigma(C_{33} - C_{36})$	1.98312	-0.60131
$\sigma(C_{36} - H_{37})$	1.97759	-0.48694
$\sigma(C_{36} - H_{38})$	1.97824	-0.48296
$\sigma(C_{36} - C_{39})$	1.98332	-0.60156
$\sigma(C_{39} - H_{40})$	1.97972	-0.49367
$\sigma(C_{39} - H_{41})$	1.98728	-0.495
$\sigma(C_{39} - N_{42})$	1.99337	-0.71551
$\sigma(N_{42} - H_{43})$	1.9901	-0.61311
$\sigma(N_{42} - H_{44})$	1.99041	-0.61269
$\sigma(C_{45} - O_{46})$	1.99601	-1.10115
$\pi(C_{45} - O_{46})$	1.99476	-0.40028
$\sigma(C_{45} - O_{47})$	1.99524	-0.95018
$\sigma(O_{47} - H_{48})$	1.98601	-0.76235
$n_1(N_2)$	1.95092	-0.3085
$n_1(O_8)$	1.97918	-0.68405
$n_2(O_8)$	1.87327	-0.25092
$n_1(N_9)$	1.69789	-0.25852
$n_1(N_{17})$	1.8959	-0.38777
$n_1(N_{20})$	1.57783	-0.29171
$n_1(O_{25})$	1.97742	-0.69564
$n_2(O_{25})$	1.8677	-0.26427
$n_1(N_{26})$	1.67946	-0.2573
$n_1(N_{42})$	1.96035	-0.31195
$n_1(O_{46})$	1.97861	-0.7096
$n_2(O_{46})$	1.84465	-0.27761
$n_1(O_{47})$	1.97693	-0.64035
$n_2(O_{47})$	1.8187	-0.34895
$\sigma^*(H_1 - N_2)$	0.0092	0.44416
$\sigma^*(N_2 - H_3)$	0.00769	0.43547
$\sigma^*(N_2 - C_4)$	0.00455	0.36707
$\sigma^*(C_4 - H_5)$	0.01977	0.38796

EK 2 (devam): NBO'ların etkileşmelerinin doluluk miktarı ile onlara ait enerjileri.

$\sigma^*(C_4 - H_6)$	0.015	0.38905
$\sigma^*(C_4 - C_7)$	0.08286	0.367
$\sigma^*(C_7 - O_8)$	0.0231	0.58513
$\pi^*(C_7 - O_8)$	0.28956	0.03324
$\sigma^*(C_7 - N_9)$	0.06824	0.48699
$\sigma^*(N_9 - H_{10})$	0.02845	0.41099
$\sigma^*(N_9 - C_{11})$	0.02413	0.35482
$\sigma^*(C_{11} - H_{12})$	0.02618	0.39184
$\sigma^*(C_{11} - C_{13})$	0.03111	0.34378
$\sigma^*(C_{11} - C_{24})$	0.07034	0.35136
$\sigma^*(C_{13} - H_{14})$	0.00804	0.41057
$\sigma^*(C_{13} - H_{15})$	0.01663	0.3993
$\sigma^*(C_{13} - C_{16})$	0.02129	0.43139
$\sigma^*(C_{16} - N_{17})$	0.02506	0.46671
$\sigma^*(C_{16} - C_{22})$	0.02466	0.58518
$\pi^*(C_{16} - C_{22})$	0.29563	0.0188
$\sigma^*(N_{17} - C_{18})$	0.00987	0.54913
$\pi^*(N_{17} - C_{18})$	0.39862	-0.01819
$\sigma^*(C_{18} - H_{19})$	0.01964	0.38565
$\sigma^*(C_{18} - N_{20})$	0.02914	0.44164
$\sigma^*(N_{20} - H_{21})$	0.01576	0.37932
$\sigma^*(N_{20} - C_{22})$	0.01294	0.42198
$\sigma^*(C_{22} - H_{23})$	0.012	0.41134
$\sigma^*(C_{24} - O_{25})$	0.01987	0.57095
$\pi^*(C_{24} - O_{25})$	0.30347	0.01837
$\sigma^*(C_{24} - N_{26})$	0.06167	0.49092
$\sigma^*(N_{26} - H_{27})$	0.05633	0.42335
$\sigma^*(N_{26} - C_{28})$	0.031	0.35248
$\sigma^*(C_{28} - H_{29})$	0.02227	0.39804
$\sigma^*(C_{28} - C_{30})$	0.01943	0.35732
$\sigma^*(C_{28} - C_{45})$	0.08054	0.34665
$\sigma^*(C_{30} - H_{31})$	0.01656	0.39155
$\sigma^*(C_{30} - H_{32})$	0.01001	0.41154
$\sigma^*(C_{30} - C_{33})$	0.01237	0.38676
$\sigma^*(C_{33} - H_{34})$	0.01374	0.40019
$\sigma^*(C_{33} - H_{35})$	0.01654	0.39948

EK 2 (devam): NBO'ların etkileşmelerinin doluluk miktarı ile onlara ait enerjileri.

$\sigma^*(C_{33} - C_{36})$	0.01323	0.39631
$\sigma^*(C_{36} - H_{37})$	0.01741	0.40736
$\sigma^*(C_{36} - H_{38})$	0.01718	0.4078
$\sigma^*(C_{36} - C_{39})$	0.01566	0.39628
$\sigma^*(C_{39} - H_{40})$	0.01919	0.39504
$\sigma^*(C_{39} - H_{41})$	0.03267	0.38604
$\sigma^*(C_{39} - N_{42})$	0.00788	0.35234
$\sigma^*(N_{42} - H_{43})$	0.00538	0.43728
$\sigma^*(N_{42} - H_{44})$	0.0087	0.4325
$\sigma^*(C_{45} - O_{46})$	0.02015	0.60956
$\pi^*(C_{45} - O_{46})$	0.20378	0.00531
$\sigma^*(C_{45} - O_{47})$	0.10016	0.33724
$\sigma^*(O_{47} - H_{48})$	0.0109	0.37685

EK 3: GHK tripeptidinin deneysel IR, Raman, ATR, 6-311++G(d,p) baz setinde hesaplanan dalgasayıları ve titreşim modlarının potansiyel enerji dağılımları.

	Bu Çalışma				Referanslar									Bu Çalışma			
	GHK				Boc-GHK [165]	GHK [166]		Gly [167]		His [168]		Lys		6-311++G(d,p)			GAR2PED
	Assign.	IR	Raman	ATR	IR	R	ATR	IR	R	IR	R	IR [169,170]	R [169]	Frek	IR	Raman	PED%
		Y	K		Y												
		ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	$\nu_{sca.}$	I_{int}	$R_{act.}$	
1	VOH(karboksil)			3596								3486		3598	77	140	VOH(karboksil)(100)
2	VNH(halka)													3501	84	188	VNH(halka)(99)
3	VNH(lys)											3571		3423	1	88	VNH(lys)asy.(100)
4	VNH(gly)	3419						3414						3415	6	35	VNH(gly)asy.(100)
5	VNH(peptit)			3363	3373									3391	130	83	VNH(peptit)(99)
6	VNH(lys)				3321							3312		3348	1	143	VNH(lys)sym(99)
7	VNH(gly)	3288	3286	-	3281									3348	1	102	VNH(gly)sym(100)
8	VNH(lys)		3154	-								3198		3175	600	149	VNH(peptit)(99)
9	VCH(halka)	3230	3126	-						3165				3136	0	82	VCH(halka)(98)
10	VCH(halka)	3074	3111	-						3127	3130			3114	6	73	VCH(halka)(98)
11	VCH(his)		2998	-	3003					2984	2987			2984	5	51	VCH(his)asy(99)
										2956	2960						
12	VCH(lys)	2953	2956	-	2952							2975		2955	23	90	VCH(lys)asy(91)+VCH(lys)(8)
13	VCH(lys)													2942	28	13	VCH(lys)asym(90)
14	VCH(lys)											2936		2940	39	23	VCH(lys)asym(92)
15	VCH(gly)		2936	-				3084	3050					2938	16	51	VCH(gly)asym(99)
								2920	2930								
16	VCH(his)	2927	2915	-						2926	2930			2917	19	36	VCH(his)sym.(81)+VCH(his)(19)
17	VCH(lys)			2905								2871 ^[169]		2908	17	16	VCH(lys)asy(73)+VCH(lys)sym(22)
18	VCH(his)													2904	21	95	VCH(his)sym(61)+VCH(lys)asy(22)+VCH(lys)sym(5)
19	VCH(his)													2903	26	172	VCH(his)sym(82)+VCH(lys)asy(8)
20	VCH(lys)													2898	27	107	VCH(lys)sym(86)+VCH(lys)asy(8)
21	VCH(gly)													2893	23	128	VCH(gly)(99)
22	VCH(lys)													2891	4	82	VCH(lys)sym(75)+VCH(lys)asy(20)
23	VCH(lys)	2857	2858	-	2857							2868		2878	25	171	VCH(lys)sym(95)
24	VCH(lys)		2813	-								2789 ^[169]		2817	68	111	VCH(lys)(97)
25	VC=O	1733	1741	1758	1740			1703	1667			1734 ^[169]	1734	1729	357	10	VC=O(karboksil)(80)+δCCO(karboksil)(6)
26	VC=O(gly)amid-I	1652		1658			1657							1653	92	20	VC=O(peptit)amid-I(72)
27	δHNH(gly)scis	1646		1651				1610						1650	25	3	δHNH(gly)scis(94)
28	VC=O(his)amid-I	1636	1647	1641	1645	1648	1648							1639	397	2	VC=O(peptit)amid-I(73)+δCCN(peptit)(6)
29	δHNH(lys)scis	1616	1618	1617								1619 ^[169]		1631	34	3	δHNH(lys)scis(95)
												1554	1525 ^[169]				
30	δCNH(pep)amid-II	1582	-	1586	1584	1551		1563; 1586						1597	207	3	δCNH(peptit)amid-II(61)+VCN(peptit)(19)

EK 3 (devam): GHK tripeptidinin deneysel IR, Raman, ATR, 6-311++G(d,p) baz setinde hesaplanan dalgasayıları ve titreşim modlarının potansiyel enerji dağılımları.

	Bu Çalışma					Referanslar								Bu Çalışma				
	GHK					Boc-GHK [165]	GHK [166]		Gly [167]	His [168]		Lys		6-311++G(d,p)			GAR2PED	
	Assign.	IR	Raman	ATR		IR	R	ATR	IR	R	IR	R	IR [169,170]	R [169]	Frek	IR	Raman	PED%
		Y	K			Y												
		ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}		ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	$\nu_{sca.}$	I_{int}	$R_{act.}$	
31	$\nu_{C=C(halka)}$	1569	1573	1569	1564		1568; 1569				1575	1573			1570	18	16	$\nu_{C=C(halka)}(50)+\nu_{CC(his)}(13)+\delta_{CCH(halka)}(9)+\delta_{NCH(halka)}(5)$
32	$\nu_{C=N(halka)}$	1497			1496						1490	1490			1496	53	13	$\nu_{C=N(halka)}(39)+\delta_{NCH(halka)}(23)+\nu_{CN(halka)}(6)$
33	$\delta_{HCH(lys)scis}$														1494	8	6	$\delta_{HCH(lys)scis}(84)$
34	$\delta_{CNH(peptit)amid- II}$	1489	1490	1488	-										1491	460	6	$\delta_{CNH(peptit)amid-II}(44)+\nu_{CN(peptit)amidIII}(29)+\nu_{CN(his)}(8)$
35	$\delta_{HCH(lys)scis}$	1472	1476	-									1475 ^[169]		1475	7	4	$\delta_{HCH(lys)scis}(96)$
36	$\delta_{HCH(lys)scis}$	1464			1468								1462 ^[169]		1465	19	6	$\delta_{HCH(lys)scis}(94)$
37	$\delta_{HCH(lys)scis}$												1445 ^[169]		1461	4	15	$\delta_{HCH(lys)scis}(95)$
38	$\delta_{HCH(his)scis}$	1457			1455						1451	1451			1450	9	7	$\delta_{HCH(his)scis}(90)$
39	$\delta_{HCH(gly)scis}$	1447	1446	1441					1410	1410					1444	11	8	$\delta_{HCH(gly)scis}(93)$
40	$\nu_{CN(halka)}$	1435			1435						1423	1424			1436	30	17	$\nu_{CN(halka)}(40)+\delta_{CNH(halka)}(33)+\delta_{CNC(halka)}(10)$
41	$\delta_{CCH(lys)wagg}$	1404	1408	1404	1405										1403	13	1	$\delta_{CCH(lys)wagg}(72)+\nu_{CC(lys)}(11)+\delta_{CNH(lys)twist}(8)$
42	$\delta_{CCH(lys)wagg}$	1394													1382	5	1	$\delta_{CCH(lys)wagg}(74)+\nu_{CC(lys)}(7)$
43	$\delta_{NCH(gly)}$	1386			1384										1380	8	3	$\delta_{NCH(gly)twist}(44)+\delta_{NCH(his)rock}(13)+\delta_{CCH(his)wagg}(7)+\nu_{CC(gly)}(5)$
44	$\delta_{NCH(gly)}$														1369	11	6	$\delta_{NCH(gly)twist}(25)+\delta_{CCH(his)wagg}(16)+\delta_{NCH(his)rock}(14)$
45	$\delta_{CCH(lys)}$												1355 ^[169]	1352	1364	4	1	$\delta_{CCH(lys)wagg}(54)+\nu_{CC(lys)}(8)$
46	$\delta_{NCH(lys)}$	1351	1352	-	1352										1356	7	3	$\delta_{NCH(lys)}(40)+\delta_{CCH(lys)twist}(27)$
47	$\delta_{NCH(gly)}$								1334	1323					1342	9	12	$\delta_{NCH(gly)wagg}(41)+\delta_{CCH(his)wagg}(9)+\delta_{CCH(his)}(8)+\delta_{CNH(gly)twist}(6)$
48	$\delta_{COH(karboksil)}$	1340	1343	1340									1331		1335	41	7	$\delta_{COH(karboksil)}(18)+\nu_{CO(lys)}(13)+\delta_{CCO(karboksil)rock}(10)+\delta_{NCH(lys)}(9)+\delta_{NCH(gly)wagg}(8)+\nu_{CC(lys)}(7)$
49	$\nu_{CN(halka)}^+$ $\delta_{CCH(his)}$				1334										1335	19	17	$\nu_{CN(halka)}(16)+\nu_{C=N(halka)}(14)+\delta_{CCH(his)twist}(14)+\delta_{NCH(his)}(13)+\delta_{CCH(his)twist}(8)+\delta_{NCH(halka)}(5)$
50	$\delta_{CCH(lys)twist}$	1325			1325								1327 ^[169]	1326	1322	31	4	$\delta_{CCH(lys)wagg}(15)+\delta_{CCH(lys)twist}(18)+\delta_{COH(karb.)}(7)+\delta_{NCH(gly)wagg}(6)+\delta_{CNH(lys)twist}(6)$
51	$\delta_{NCH(gly)wagg}$														1318	74	13	$\delta_{NCH(gly)wagg}(11)+\delta_{CCH(lys)wagg}(8)+\delta_{CCH(lys)twist}(6)+\delta_{CCH(his)rock}(6)+\delta_{NCH(lys)rock}(6)+\nu_{CC(his)}(6)+\nu_{CN(peptit)}(5)$
52	$\delta_{CCH(lys)}$	1306	1310	1307	1305									1309	1310	6	15	$\delta_{CCH(lys)twist}(90)$
53	$\delta_{CCH(his)}$														1296	1	8	$\delta_{CCH(his)wagg}(14)+\delta_{NCH(his)}(14)+\delta_{CCH(lys)}(11)+\delta_{CCH(lys)twist}(17)+\delta_{CCH(lys)wagg}(8)$
54	$\delta_{CCH(his)}$														1295	4	7	$\delta_{CCH(his)wagg}(20)+\delta_{NCH(his)}(16)+\delta_{CCH(lys)rock}(10)+\delta_{CCH(lys)twist}(13)$
55	$\delta_{CCH(lys)}$	1280											1299 ^[169]		1278	7	6	$\delta_{CCH(lys)twist}(22)+\delta_{CCH(lys)wagg}(11)+\delta_{CNH(lys)wagg}(7)+\delta_{CCH(lys)}(5)$

EK 3 (devam): GHK tripeptidinin deneysel IR, Raman, ATR, 6-311++G(d,p) baz setinde hesaplanan dalgasayıları ve titreşim modlarının potansiyel enerji dağılımları.

	Bu Çalışma					Referanslar								Bu Çalışma					
	GHK					Boc-GHK [165]	GHK [166]		Gly [167]		His [168]		Lys [169,170]		6-311++G(d,p)			GAR2PED	
	Assign.	IR	Raman	ATR		IR	R	ATR	IR	R	IR	R	IR	R	Frek	IR	Raman	PED%	
			Y	K			Y												
		v_{exp}	v_{exp}	v_{exp}		v_{exp}	v_{exp}	v_{exp}	v_{exp}	v_{exp}	v_{exp}	v_{exp}	v_{exp}	v_{exp}	$v_{sca.}$	I_{int}	$R_{act.}$		
56	$V_{CN}(halka)$	1265	1268	1264	1268		1267				1304	1301			1275	22	11	$V_{CN}(halka)(18)+\delta_{NCH}(halka)(11)+V_{CC}(his)(9)+V_{CN}(peptit)(7)+\delta_{CCH}(his)twist(6)+V_{CN}(his)(5)$	
57	$\delta_{CCH}(lys)$														1258	3	1	$\delta_{CCH}(lys)(26)+\delta_{CCH}(lys)wagg(23)$	
58	$V_{CN}(pep.)amid III$	1241	1246	1239	1241										1254	34	2	$V_{CN}(peptit)amidIII(16)+\delta_{CCH}(his)rock(11)+V_{CN}(halka)(8)$	
59	$\delta_{CCH}(halka)$	1225			1224						1265	1262			1224	21	9	$\delta_{CCH}(halka)(26)+\delta_{NCH}(halka)(17)+V_{CN}(halka)(17)+\delta_{CCH}(his)(12)$	
60	$\delta_{CNH}+V_{CN}(pep)amid III$														1216	48	5	$\delta_{CNH}(peptit)(20)+V_{CN}(peptit)(12)+V_{CN}(his)(7)+\delta_{NCH}(halka)(7)+\delta_{CCH}(halka)(6)+\delta_{CCH}(his)wagg(6)+\delta_{NHC}(his)wagg(5)$	
61	$\delta_{CCH}(lys)$												1186 ^[169]		1207	0	2	$\delta_{CCH}(lys)wagg(45)+\delta_{CCH}(lys)twist(14)+\delta_{NCH}(lys)(7)+\delta_{CNH}(lys)twist(6)$	
62	$\delta_{CCH}(his)$	1185	1188	1185	1187										1176	10	6	$\delta_{CCH}(his)twist(25)+\delta_{CCH}(his)rock(20)+V_{CN}(his)(8)+\delta_{NCH}(gly)twist(6)$	
63	$\delta_{NCH}(gly)$	1162	1157	1156	1163										1157	67	6	$\delta_{NCH}(gly)twist(35)+V_{CO}(lys)(8)+\delta_{COH}(karboksil)(7)+\delta_{CCH}(his)twist(7)+V_{CN}(his)(6)+\delta_{CCH}(his)rock(5)$	
64	$V_{CO}(lys)$	1150			1153										1156	107	2	$V_{CO}(lys)(20)+\delta_{COH}(karboksil)(7)+V_{CC}(lys)(7)$	
65	$\delta_{CCH}(lys)$	1142	-	1140	1142								1146 ^[169]		1145	45	1	$\delta_{CCH}(lys)twist(22)+V_{CO}(lys)(12)+\delta_{CNH}(lys)twist(9)+\delta_{COH}(karboksil)(8)+V_{CC}(lys)(7)$	
66	$V_{CN}(lys)$														1132	12	5	$V_{CN}(lys)(15)+\delta_{CCH}(lys)rock(9)+\delta_{NCH}(gly)twist(6)$	
67	$V_{CN}(his)$	1123	-	1124	1123										1123	5	6	$V_{CN}(his)(30)+\delta_{CNH}(halka)(14)+V_{CN}(gly)(10)$	
68	$V_{CN}(his)$						1104								1118	10	5	$V_{CN}(his)(22)+\delta_{CNH}(halka)(16)+V_{CN}(gly)(16)$	
69	$V_{CN}(gly)$								1034	1033					1106	5	5	$V_{CN}(gly)(20)+V_{CN}(lys)(16)+V_{CC}(lys)(17)+\delta_{CNH}(lys)twist(5)$	
70	$V_{CN}(his)$	1090	1097	1093	1089		1086				1087	1085			1081	6	3	$V_{CN}(his)(22)+V_{CN}(gly)(14)+V_{CN}(lys)(7)+V_{CC}(his)(6)$	
71	$V_{CC}(lys)$				1080										1072	9	17	$V_{CC}(lys)(73)$	
72	$V_{CN}(his)$														1070	31	2	$V_{CN}(his)(50)+\delta_{CCH}(halka)(26)$	
73	$V_{CN}(lys)$	1048	1057	1050	1048										1060	8	5	$V_{CN}(lys)(60)+V_{CC}(lys)(19)$	
74	$V_{CC}(his)$	1016			1018										1012	11	3	$V_{CC}(his)(38)+\delta_{CCN}(his)(8)$	
75	$V_{CC}(his)$	1005			1007						995	993			1000	0	13	$V_{CC}(his)(22)+\delta_{CCH}(his)rock(16)+\delta_{CCC}(his)(21)+\Gamma_{NCCN}(his)(6)$	
76	$V_{CC}(lys)$														987	4	3	$V_{CC}(lys)(23)+\delta_{CCH}(his)rock(6)+\delta_{CCH}(lys)twist(6)+\delta_{CCH}(lys)rock(5)$	
77	$V_{CC}(lys)$														981	5	6	$V_{CC}(lys)(24)+\delta_{CNH}(lys)twist(12)+\delta_{CCC}(lys)(15)+V_{CN}(lys)(8)+\delta_{CNC}(halka)(6)$	
78	$\delta_{CNC}(halka)$	985	990	986	984						975	975			973	11	4	$\delta_{CNC}(halka)(32)+V_{CN}(his)(18)+V_{CC}(his)(13)$	
79	$V_{CC}(lys)$														962	7	1	$V_{CC}(lys)(45)+V_{CN}(lys)(20)$	
80	$\delta_{NCN}(halka)$	948	938		947						941	935			940	4	2	$\delta_{NCN}(halka)(54)+\delta_{CNC}(halka)(20)+\delta_{CCH}(halka)(8)$	

EK 3 (devam): GHK tripeptidinin deneysel IR, Raman, ATR, 6-311++G(d,p) baz setinde hesaplanan dalgasayıları ve titreşim modlarının potansiyel enerji dağılımları.

	Bu Çalışma				Referanslar								Bu Çalışma				
	GHK				Boc-GHK [165]	GHK [166]	Gly [167]	His [168]	Lys [169,170]	6-311++G(d,p)			GAR2PED				
	Assign.	IR	Raman	ATR	IR	R	ATR	IR	R	IR	R	IR	R	Frek	IR	Raman	PED%
		Y	K			Y											
		V _{exp}	V _{exp}	V _{exp}	V _{exp}	V _{exp}	V _{exp}	V _{exp}	V _{exp}	V _{exp}	V _{exp}	V _{exp}	V _{exp}	V _{sca.}	I _{int}	R _{act.}	
81	V _{CC(gly)}	929	932	928										936	32	7	v _{CC(gly)} (17)+Γ _{HNCH(gly)} (16)+δ _{CCH(his)rock} (13)
82	δ _{NCH(gly)}	-	910	910										900	11	1	δ _{NCH(gly)rock} (71)+Γ _{CNCO(pepit)} (17)+Γ _{HNCH(gly)} (5)
83	Γ _{HNCH(gly)}													888	207	2	Γ _{HNCH(gly)} (48)+v _{CN(gly)} (20)
84	V _{CC(lys)}	883	-											882	10	3	v _{CC(lys)} (15)+v _{CO(lys)} (12)+δ _{CCH(lys)twist} (14)+δ _{CCH(his)rock} (6)+δ _{CCH(lys)rock} (6)
85	δ _{CCH(his)}	874	-	877	875									877	36	7	δ _{CCH(his)rock} (23)+δ _{CCO(his)} (11)+v _{CC(lys)} (6)+v _{CC(his)} (6)+δ _{CNC(pepit)} (5)
86	Γ _{CNHH(lys)}	838	-	842	837									848	12	1	Γ _{CCNH(lys)} (22)+δ _{CCH(lys)rock} (10)+v _{CC(lys)} (7)+δ _{CCH(his)rock} (6)
87	δ _{CCH(lys)}													823	41	1	δ _{CCH(lys)rock} (28)+Γ _{CCNH(lys)} (14)+v _{CC(lys)} (12)
88	Γ _{CNCH(halka)}	814		816				827						808	12	1	Γ _{CNCH(halka)} (67)+Γ _{CCNC(halka)} (13)
89	Γ _{CNHH(lys)}			804										805	81	1	Γ _{CCNH(lys)} (38)+δ _{CCH(lys)rock} (27)+Γ _{CNCH(halka)} (7)
90	Γ _{CCNH}	794		793										794	61	1	Γ _{CCNH(pepit)} (31)+Γ _{CNCO(pepit)} (29)+Γ _{CNCH(lys)} (6)+Γ _{CNCH(halka)} (5)
91	Γ _{CNCH(halka)}	777	781	772	776			764						779	10	1	Γ _{CNCH(halka)} (18)+Γ _{CNCN(halka)} (16)+δ _{CCC(his)} (10)+v _{CC(his)} (7)+δ _{CNC(halka)} (7)+Γ _{CCNC(halka)} (6)+δ _{NCN(halka)} (5)
92	Γ _{NCCH(halka)}													757	20	1	Γ _{NCCH(halka)} (32)+Γ _{NCCN(his)} (15)+Γ _{NCCN(halka)} (13)+Γ _{CCNC(halka)} (7)
93	δ _{CCH(lys)}	740	-	742	739									740	2	0	δ _{CCH(lys)rock} (71)
94	Γ _{NCCH(halka)}			724										726	8	3	Γ _{NCCH(halka)} (33)+v _{CC(gly)} (8)+δ _{CCH(his)rock} (6)+δ _{NCC(gly)} (5)
95	Γ _{CCOH(karboksil)}	720	-	714	715									715	36	5	Γ _{CCOH(karboksil)} (46)+v _{CC(lys)} (16)+δ _{CCO(karboksil)} (5)
96	Γ _{NCCH(halka)}	681		681										708	5	1	Γ _{NCCH(halka)} (14)+Γ _{NCCN(halka)} (11)+Γ _{NCCN(his)} (11)+δ _{CCO(gly)rock} (9)+δ _{NCC(gly)} (8)+Γ _{CCNC(halka)} (6)+Γ _{NCCN(gly)} (6)+v _{CC(gly)} (5)
97	Γ _{NCCN(halka)}			670				664	660					666	12	1	Γ _{NCCN(halka)} (38)+v _{CC(his)} (8)+Γ _{CCNC(halka)} (6)
98	δ _{CCO(karboksil)}	652	-	656	651									649	55	1	δ _{CCO(karboksil)} (21)+Γ _{CCOH(karboksil)} (14)+δ _{NCC(lys)} (7)+δ _{CCC(lys)} (14)+v _{CC(his)} (5)
99	Γ _{CNCC(halka)}													643	5	1	Γ _{CCNC(halka)} (51)+Γ _{NCCN(halka)} (5)
100	Γ _{CONH(pepit)}	633	-	633										632	39	1	Γ _{CONH(pepit)} (29)+Γ _{CNCC(18)} +Γ _{CNCH(his)} (13)+Γ _{NCCN(gly)} (5)+δ _{NCH(gly)rock} (5)
101	Γ _{CNCC(halka)}	616		621	615			619						624	11	2	Γ _{CCNC(halka)} (28)+Γ _{NCCN(his)} (13)+v _{CC(his)} (7)+Γ _{CCOH(karboksil)} (7)+δ _{CCO(his)} (5)
102	δ _{CCN}			588										586	11	1	δ _{CCN(20)} +δ _{CCO(karboksil)} (12)+δ _{CCC(his)} (7)+Γ _{CCOH(karboksil)} (7)+δ _{CCC(lys)} (6)+δ _{CCN(6)}
103	Γ _{COOH(karboksil)}	570	-	573	575			584						567	62	1	Γ _{COOH(karboksil)} (53)+δ _{CCO(karboksil)} (12)+δ _{CCC(lys)} (5)
104	Γ _{NCCN(gly)}			547										540	46	1	Γ _{NCCN(gly)} (30)+Γ _{CNCC(his)} (23)+δ _{NCH(gly)rock} (11)+δ _{CCO(his)rock} (7)+Γ _{CONH(pepit)} (7)
105	Γ _{NCNH(halka)}	520	-	526	534									526	92	1	Γ _{NCNH(halka)} (66)+Γ _{CCNC(halka)} (28)

EK 3(devam): GHK tripeptidinin deneysel IR, Raman, ATR, 6-311++G(d,p) baz setinde hesaplanan dalgasayıları ve titreşim modlarının potansiyel enerji dağılımları.

Bu Çalışma					Referanslar										Bu Çalışma				
GHK					Boc-GHK [165]	GHK [166]	Gly [167]	His [168]	Lys [169,170]	6-311++G(d,p)					GAR2PED				
Assign.	IR	Raman	ATR		IR	R	ATR	IR	R	IR	R	IR	R		Frek	IR	Raman	PED%	
	Y	K			Y														
	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}		ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}	ν_{exp}		ν_{sca}	I_{int}	R_{act}		
106	$\delta_{CCO}(karbok.)$	506	-	507	499										496	15	2	$\delta_{CCO}(karboksil)(16)+\delta_{CCN}(10)+\delta_{CCC}(his)(8)$	
107	$\delta_{CCC}(lys)$	448	-	449	446										454	4	1	$\delta_{CCC}(lys)(48)+\delta_{CCH}(lys)rock(8)+\nu_{CC}(lys)(6)$	
108	$\delta_{CCN}(lys)$	429	-		436										428	12	1	$\delta_{CCN}(lys)(49)+\delta_{CCC}(lys)(18)+\nu_{CC}(lys)(6)$	
109	$\delta_{CCC}(his)$	406			411										408	14	1	$\delta_{CCC}(his)(30)+\delta_{CCN}(halka)(15)+\delta_{NCC}(his)(7)$	
110	$\delta_{CCO}(his)$	399		399	401										378	10	1	$\delta_{CCO}(his)rock(18)+\delta_{NCC}(lys)(16)+\delta_{CNC}(13)+\delta_{CCC}(lys)(11)+\Gamma_{COH}(karboksil)(7)+\delta_{NCC}(his)(6)+\delta_{CCH}(lys)(5)$	
111	δ_{CCN}	-		340											346	2	1	$\delta_{CCN}(21)+\delta_{CCO}(karboksil)(8)+\delta_{CCC}(his)(7)+\delta_{NCC}(lys)(6)$	
112	$\Gamma_{NCCH}(his)$														321	29	2	$\Gamma_{NCCH}(his)(33)+\delta_{CCN}(halka)(12)+\delta_{CCC}(his)(8)$	
113	$\delta_{CCN}(halka)$														318	3	3	$\delta_{CCN}(halka)(18)+\delta_{CCO}(karboksil)(12)+\Gamma_{NCCC}(his)(12)+\delta_{NCC}(his)(6)+\nu_{CC}(his)(6)$	
114	$\delta_{CCN}(halka)$	-		300											303	15	1	$\delta_{CCN}(halka)(13)+\Gamma_{NCCC}(his)(12)+\delta_{NCC}(lys)(7)+\delta_{CCO}(karboksil)(6)$	
115	$\delta_{NCC}(gly)$														283	12	1	$\delta_{NCC}(gly)(16)+\delta_{CCN}(11)+\Gamma_{HNCH}(gly)(9)+\Gamma_{CCNC}(halka)(7)+\delta_{NCC}(lys)(5)$	
116	$\delta_{CCC}(lys)$	-		271											279	3	1	$\delta_{CCC}(lys)(18)+\delta_{CCC}(his)(8)+\delta_{CCN}(halka)(6)+\delta_{CCO}(carboxyl)(6)+\Gamma_{NCCC}(his)(6)$	
117	$\Gamma_{CCNH}(lys)$														254	56	0	$\Gamma_{CCNH}(lys)(80)$	
118	$\Gamma_{HNCH}(gly)$														241	8	4	$\Gamma_{HNCH}(gly)(13)+\delta_{CCC}(lys)(8)+\Gamma_{CCCH}(lys)(7)+\delta_{CCC}(his)(7)+\delta_{CCN}(5)$	
119	$\Gamma_{HNCH}(gly)$														225	34	1	$\Gamma_{HNCH}(gly)(33)+\delta_{CCC}(lys)(22)$	
120	$\Gamma_{HNCH}(gly)$														214	24	0	$\Gamma_{HNCH}(gly)(27)+\delta_{CCC}(lys)(11)+\delta_{CCN}(7)+\delta_{NCC}(gly)(6)+\delta_{CCC}(his)(6)$	
121	$\delta_{CCC}(his)$														198	3	0	$\delta_{CCC}(his)(34)+\delta_{CCC}(lys)(14)+\delta_{CCN}(halka)(6)$	
122	$\Gamma_{NCCH}(his)$														152	1	1	$\Gamma_{NCCH}(his)(25)+\delta_{CNC}(13)+\delta_{CCC}(his)(11)$	
123	$\delta_{CCC}(lys)$														140	2	1	$\delta_{CCC}(lys)(40)+\Gamma_{NCCH}(his)(7)+\delta_{CCN}(lys)(6)$	
124	$\delta_{CCC}(his)$														135	1	1	$\delta_{CCC}(his)(18)+\Gamma_{CCNC}(halka)(15)+\Gamma_{NCCO}(his)(15)+\delta_{CNC}(9)+\Gamma_{CNCC}(5)$	
125	$\Gamma_{CCCH}(lys)$	-		126											124	2	0	$\Gamma_{CCCH}(lys)(68)+\delta_{CCC}(lys)(8)$	
126	$\Gamma_{CNCO}(his)$	-		89											92	5	1	$\Gamma_{CNCO}(his)(43)+\Gamma_{CNCC}(15)+\Gamma_{CONH}(peptit)(15)+\Gamma_{CNCH}(his)(6)$	
127	Γ_{CNCC}														81	1	1	$\Gamma_{CNCO}(peptit)(14)+\Gamma_{CNCC}(24)+\delta_{CNC}(9)+\Gamma_{NCCO}(gly)(7)$	
128	$\Gamma_{CCCH}(lys)$														77	3	0	$\Gamma_{CCCH}(lys)(61)+\Gamma_{CNCO}(peptit)(7)$	
129	$\Gamma_{CONH}(peptit)$	-		76											74	5	0	$\Gamma_{CONH}(peptit)(38)+\Gamma_{NCCO}(gly)(9)+\delta_{NCC}(his)(8)+\Gamma_{CCCH}(lys)(7)+\Gamma_{CNCC}(5)$	
130	$\Gamma_{NCCO}(his)$														64	1	1	$\Gamma_{NCCO}(his)(19)+\Gamma_{CNCO}(peptit)(15)+\delta_{CCN}(7)+\Gamma_{CCCN}(his)(14)+\delta_{CNC}(7)$	
131	$\Gamma_{NCCO}(gly)$														57	2	0	$\Gamma_{NCCO}(gly)(32)+\Gamma_{CONH}(peptit)(12)+\Gamma_{CNCC}(his)(7)$	
132	$\Gamma_{CCCN}(his)$														50	3	1	$\Gamma_{CCCN}(his)(45)+\Gamma_{CCCH}(lys)(6)+\Gamma_{NCCO}(lys)(6)+\Gamma_{CONH}(peptit)(6)+\Gamma_{CNCH}(5)$	
133	$\Gamma_{NCCC}(his)$														46	3	1	$\Gamma_{NCCC}(his)(31)+\Gamma_{NCCO}(lys)(23)+\Gamma_{NCCO}(gly)(10)+\Gamma_{CONH}(peptit)(6)+\delta_{CCC}(his)(5)$	
134	$\Gamma_{NCCC}(his)$														42	1	1	$\Gamma_{NCCC}(his)(50)+\Gamma_{NCCO}(his)(8)+\Gamma_{NCCO}(gly)(8)+\delta_{CCC}(his)(13)$	
135	$\Gamma_{CNCH}(lys)$														31	1	0	$\Gamma_{NCCH}(lys)(44)+\Gamma_{NCCO}(lys)(16)+\Gamma_{CCCH}(lys)(15)$	
136	$\Gamma_{NCCO}(his)$														27	1	2	$\Gamma_{NCCO}(his)(39)+\Gamma_{CCCN}(his)(25)+\Gamma_{CNCC}(his)(8)+\Gamma_{NCCO}(lys)(8)$	
137	$\Gamma_{CNCO}(peptit)$														22	0	1	$\Gamma_{CNCO}(peptit)(28)+\Gamma_{NCCO}(his)(18)+\Gamma_{CCCN}(his)(10)+\Gamma_{CNCC}(8)$	
138	$\Gamma_{CNCH}(lys)$														8	1	2	$\Gamma_{CNCH}(lys)(41)+\Gamma_{NCCO}(lys)(29)+\Gamma_{NCCO}(his)(7)$	

DFT/6-311++ G(d,p) baz seti ile elde edilen teorik titreşim dalgasayıları deneysel değerlere yaklaşılmak için, 1800 cm^{-1} üzerindeki titreşim dalgasayıları 0.96, 1800 cm^{-1} altındaki titreşim dalgasayıları 0.98 ikili ölçeklendirme katsayıları ile çarpılmıştır [4].

EK 4: Gly-His-Lys tripeptidinin optimize olmuş bağ uzunlukları.

Bağ	Monomer	Ref		Bağ	Monomer	Ref	
Parametre	6311++G(d,p)	[185]	[186]	Parametre	6311++G(d,p)	[185]	[186]
H1-N2	1.0163			C24-N26	1.3501		
N2-H3	1.0154			N26-H27	1.0255		
N2-C4	1.4543	1.449		N26-C28	1.4511		
C4-H5	1.0967			C28-H29	1.0931		
C4-H6	1.0941			C28-C30	1.5444		
C4-C7	1.538	1.525		C28-C45	1.5351		
C7-O8	1.2266	1.212		C30-H31	1.0967		
C7-N9	1.3564			C30-H32	1.0924		
N9-H10	1.0145			C30-C33	1.5377		
N9-C11	1.4522			C33-H34	1.097		
C11-H12	1.0954			C33-H35	1.0971		
C11-C13	1.5608			C33-C36	1.5338		
C11-C24	1.5463			C36-H37	1.0949		
C13-H14	1.0896			C36-H38	1.0956		
C13-H15	1.0948			C36-C39	1.5287		
C13-C16	1.4986			C39-H40	1.0955		
C16-N17	1.3837		1.380	C39-H41	1.1024		
C16-C22	1.3709		1.370	C39-N42	1.4692		
N17-C18	1.315		1.311	N42-H43	1.0147		
C18-H19	1.0789			N42-H44	1.0157		
C18-N20	1.3597		1.360	C45-O46	1.2053		
N20-H21	1.0078			C45-O47	1.3512		
N20-C22	1.3806		1.380	O47-H48	0.9694		
C22-H23	1.0767						

EK 5: Gly-His-Lys tripeptidinin optimize olmuş açılış değerleri.

Açı	Monomer	Ref.	Açı	Monomer	Ref.
Parametre	6311++G(d,p)	[186]	Parametre	6311++G(d,p)	[186]
H1-N2-H3	105.8907		O25-C24-N26	123.2094	
H1-N2-C4	109.0692		C24-N26-H27	118.8974	
H3-N2-C4	110.1175		C24-N26-C28	120.8661	
N2-C4-H5	108.827		H27-N26-C28	118.9052	
N2-C4-H6	109.3999		N26-C28-H29	108.1674	
N2-C4-7	114.8715		N26-C28-C30	112.2264	
H5-C4-H6	106.2525		N26-C28-H45	113.6602	
H5-C4-C7	106.841		H29-C28-C30	109.0898	
H6-C4-C7	110.2622		H29-C28-H45	104.1535	
C4-C7-O8	121.5713		C30-C28-H45	109.1539	
C4-C7-N9	115.3651		C28-C30-H31	109.0502	
O8-C7-N9	123.0119		C28-C30-H32	106.6473	
C7-N9-H10	121.338		C28-C30-C33	115.6507	
C7-N9-C11	122.812		H31-C30-H32	106.7045	
H10-N9-C11	114.407		H31-C30-C33	110.2349	
N9-C11-H12	108.7928		H32-C30-C33	108.1272	
N9-C11-C13	111.7934		C30-C33-H34	107.0784	
N9-C11-C24	106.1346		C30-C33-H35	108.7685	
H12-C11-C13	107.9037		C30-C33-C36	116.4574	
H12-C11-C24	108.6213		H34-C33-H35	105.8262	
C13-C11-C24	113.481		H34-C33-C36	108.3177	
C11-C13-H14	107.0253		H35-C33-C36	109.8449	
C11-C13-H15	109.4006		C33-C36-H37	110.1546	
C11-C13-C16	114.2466		C33-C36-H38	110.0781	
H14-C13-H15	107.5433		C33-C36-C39	112.5195	
H14-C13-C16	107.9427		H37-C36-H38	106.3693	
H15-C13-C16	110.4098		H37-C36-C39	109.0586	
C13-C16-N17	122.537		H38-C36-C39	108.4565	
C13-C16-C22	128.1192		C36-C39-H40	109.3337	
N17-C16-C22	109.3334	110.0	C36-C39-H41	109.116	
C16-N17-C18	106.4558		C36-C39-N42	110.7198	
N17-C18-H19	126.1579		H40-C39-H41	106.6642	
N17-C18-N20	110.9428	111.0	H40-C39-N42	107.5414	
H19-C18-N20	122.8989		H41-C39-N42	113.3184	

EK 5 (devam): Gly-His-Lys tripeptidinin optimize olmuş aç ı değ erleri.

Açı	Monomer	Ref.	Açı	Monomer	Ref.
Parametre	6311++G(d,p)	[186]	Parametre	6311++G(d,p)	[186]
C18-N20-H21	126.2201		C39-N42-H43	111.0122	
C18-N20-C22	107.5285	107.0	C39-N42-H44	110.6789	
H21-N20-C22	126.2384		H43-N42-H44	106.9536	
C16-C22-N20	105.7372	105.0	C28-C45-O46	123.2335	
C16-C22-H23	131.7895		C28-C45-O47	113.9818	
N20-C22-H23	122.4627		O46-C45-O47	122.7732	
C11-C24-O25	120.6354	124.0	C45-O47-H48	106.6681	
C11-C24-N26	116.152				

EK 6: Gly-His-Lys tripeptidinin optimize olmuş dihedral açı değerleri

Dihedral	Monomer		Dihedral	Monomer	
Parametre	6311++G(d,p)	[186, 187]	Parametre	6311++G(d,p)	[186, 187]
H1-N2-C4-H5	72.7737		C11-C24-N26-C28	175.7583	-3.38 ^[187]
H1-N2-C4-H6	-171.5327		O25-C24-N26-H27	-171.5667	
H1-N2-C4-C7	-46.9254		O25-C24-N26-C28	-4.8841	
H3-N2-C4-H5	-171.4318		C24-N26-C28-H29	38.3982	
H3-N2-C4-H6	-55.7382		C24-N26-C28-C30	158.7913	
H3-N2-C4-C7	68.8691		C24-N26-C28-C45	-76.7363	
N2-C4-C7-O8	23.497		H27-N26-C28-H29	-154.9202	
N2-C4-C7-N9	-159.0446		H27-N26-C28-C30	-34.5271	
H5-C4-C7-O8	-97.2979		H27-N26-C28-C45	89.9453	
H5-C4-C7-N9	80.1604		N26-C28-C30-H31	48.8384	
H6-C4-C7-O8	147.6498		N26-C28-C30-H32	163.7137	
H6-C4-C7-N9	-34.8919		N26-C28-C30-C33	-76.0326	
C4-C7-N9-H10	12.5975		H29-C28-C30-H31	168.6957	
C4-C7-N9-C11	178.1181	-2.76 ^[187]	H29-C28-C30-H32	-76.4291	
O8-C7-N9-H10	-169.9848		H29-C28-C30-C33	43.8246	
O8-C7-N9-C11	-4.4643		C45-C28-C30-H31	-78.0932	
C7-N9-C11-H12	-45.5232		C45-C28-C30-H32	36.782	
C7-N9-C11-C13	73.5407		C45-C28-C30-C33	157.0357	
C7-N9-C11-C24	-162.239		N26-C28-C45-O46	168.3193	
H10-N9-C11-H12	120.9138		N26-C28-C45-O47	-12.8855	
H10-N9-C11-C13	-120.0223		H29-C28-C45-O46	50.832	
H10-N9-C11-C24	4.1981		H29-C28-C45-O47	-130.3729	
N9-C11-C13-H14	-26.9636		C30-C28-C45-O46	-65.5686	
N9-C11-C13-H15	89.2717		C30-C28-C45-O47	113.2265	
N9-C11-C13-C16	-146.3878	-172.0 ^[186]	C28-C30-C33-H34	-166.2685	
H12-C11-C13-H14	92.6252		C28-C30-C33-H35	-52.3321	
H12-C11-C13-H15	-151.1395		C28-C30-C33-C36	72.3899	
H12-C11-C13-C16	-26.799	65.0 ^[186]	H31-C30-C33-H34	69.4742	
C24-C11-C13-H14	-146.9637		H31-C30-C33-H35	-176.5893	
C24-C11-C13-H15	-30.7285		H31-C30-C33-C36	-51.8674	
C24-C11-C13-C16	93.6121	68.0 ^[186]	H32-C30-C33-H34	-46.8224	
N9-C11-C24-O25	-0.1128		H32-C30-C33-H35	67.114	
N9-C11-C24-N26	179.2625		H32-C30-C33-C36	-168.164	
H12-C11-C24-O25	-116.9437		C30-C33-C36-H37	-64.1195	

EK 6 (devam): Gly-His-Lys tripeptidinin optimize olmuş dihedral açı değerleri

Dihedral	Monomer	Dihedral	Monomer
Parametre	6311++G(d,p) [186, 187]	Parametre	6311++G(d,p) [186, 187]
H12-C11-C24-N26	62.4316	C30-C33-C36-H38	52.8676
C13-C11-C24-O25	123.052	C30-C33-C36-C39	173.9614
C13-C11-C24-N26	-57.5727	H34-C33-C36-H37	175.1967
C11-C13-C16-N17	-59.9315	H34-C33-C36-H38	-67.8162
C11-C13-C16-C22	118.7695	H34-C33-C36-C39	53.2776
H14-C13-C16-N17	-178.8379	H35-C33-C36-H37	60.0526
H14-C13-C16-C22	-0.1369	H35-C33-C36-H38	177.0397
H15-C13-C16-N17	63.8687	H35-C33-C36-C39	-61.8665
H15-C13-C16-C22	-117.4303	C33-C36-C39-H40	-59.1968
C13-C16-N17-C18	179.0397	C33-C36-C39-H41	57.1139
C22-C16-N17-C18	0.1227	C33-C36-C39-N42	-177.5048
C13-C16-C22-N20	-179.2144	H37-C36-C39-H40	178.2648
C13-C16-C22-H23	-0.4113	H37-C36-C39-H41	-65.4245
N17-C16-C22-N20	-0.3749	H37-C36-C39-N42	59.9568
N17-C16-C22-H23	178.4281	H38-C36-C39-H40	62.82
C16-N17-C18-H19	-179.5719	H38-C36-C39-H41	179.1308
C16-N17-C18-N20	0.1906	H38-C36-C39-N42	-55.4879
N17-C18-N20-H21	-179.1818	C36-C39-N42-H43	177.0883
N17-C18-N20-C22	-0.4289	C36-C39-N42-H44	-64.3008
H19-C18-N20-H21	0.5899	H40-C39-N42-H43	57.6956
H19-C18-N20-C22	179.3428	H40-C39-N42-H44	176.3066
C18-N20-C22-C16	0.4806	H41-C39-N42-H43	-59.9336
C18-N20-C22-H23	-178.4617	H41-C39-N42-H44	58.6774
H21-N20-C22-C16	179.2332	C28-C45-O47-H48	179.5863
H21-N20-C22-H23	0.2909	O46-C45-O47-H48	-1.6123
C11-C24-N26-H27	9.0757		

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı Yağmur Kökcü
 Doğum Yeri Bakırköy
 Doğum Tarihi 12.04.1990
 Uyruğu ☒ T.C. ☐ Diğer:
 Telefon 0537-5829378
 E-Posta Adresi kokcuyagmur@gmail.com
 Web Adresi



Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Fakülte Fen Fakültesi
 Bölümü Fizik
 Mezuniyet Yılı 16.01.2013

Yüksek Lisans

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Enstitü Adı Fen Bilimleri Enstitüsü
 Anabilim Dalı Fizik Anabilim Dalı
 Programı Atom ve Molekül Fiziği Programı

Makale ve Bildiriler

Makaleler

- Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Kecel-Gunduz, S., Zorlu, T., Kokcu, Y., Bicak, B., Karavelioglu, Z. and Ozel, A.E., 2018, Papain Loaded Poly (ε-Caprolactone) Nanoparticles: In-silico and In-Vitro Studies. *Journal of fluorescence*, 28(5), 1127-1142.
- Cakir-Koc, R., Budama-Kilinc, Y., Kokcu, Y. and Kecel-Gunduz, S., 2018. Molecular docking of immunogenic peptide of *Toxoplasma gondii* and encapsulation with polymer as vaccine candidate. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 1-11.
- Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Kecel-Gunduz, S., Kokcu, Y., Bicak, B., Mutlu, H., Ozel, A. E., 2018, Novel NAC-loaded poly (lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for cataract treatment: preparation, characterization, evaluation of structure, cytotoxicity, and molecular docking studies. *PeerJ*, 6, e4270.
- Kecel-Gündüz, S., Budama-Kilinc, Y., Cakir Koc, R., Kökcü, Y., Bicak, B., Aslan, B., and Özel, A. E., 2018, Computational design of Phe-Tyr dipeptide and

preparation, characterization, cytotoxicity studies of Phe-Tyr dipeptide loaded PLGA nanoparticles for the treatment of hypertension. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(11), 2893-2907.

Bildiriler

Biçak, B., Kokcu, Y., Kecel Gündüz, S., Özel, A., Akyüz, S., Molecular Docking And Molecular Dynamics Studies of L-Glycyl-L-Glutamic Acid Dipeptide, *ICINSE 2018*, Kiev, 7-10 Eylül 2018, 3-3.

Kecel Gündüz S., Biçak B., Kokcu Y., Özel A., Molecular Docking And Molecular Dynamics Studies Of N-Terminal Fragment Of The Major Vasopressin Metabolite, *34.Uluslararası Fizik Kongresi Bildiri Kitabı*, 5-9 Eylül 2018, Muğla, 28, İstanbul, Anka Matbaa, 243.

Biçak B., Kecel Gündüz S., Kokcu Y., Özel A., Molecular Docking And Molecular Dynamics Studies of L-Isoleucyl-L-phenylalanine Dipeptide, *34.Uluslararası Fizik Kongresi Bildiri Kitabı*, 5-9 Eylül 2018, Muğla, İstanbul, Anka Matbaa, 243.

Kecel Gündüz, S., Biçak, B., Kokcu, Y., Budama Kilinc, Y., Çakır Koç, R. , Zorlu, T. , et al., Molecular Dynamic, Molecular Docking, Characterization And In-Vitro Studies of Sulpiride Loaded Chitosan Nanoparticles, *ICINSE 2018*, Kiev, 7-10 Eylül 2018, 1-1.

Kökcü, Y. , Biçak, B., Kecel Gündüz, S., Özel, A., The Theoretical Conformational Analysis And Quantum Chemical Calculations Of Antioxidant Tripeptide, *1st International Symposium on Graduate Research in Science*, İstanbul, 4-6 Ekim 2018, 9-9.

Budama-Kilinc, Y., Çakır Koç R. , Kecel Gündüz, S., Zorlu, T. , Kokcu, Y., Biçak, B., et al., Papain Loaded Polycaprolacton Nanoparticles: In-Silico And In-Vitro Studies, *2nd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB)*, Podgoric, 25-30 Haziran 2018, 1-1.

Kecel Gündüz, S., Budama-Kilinc, Y., Çakır Koç, R. , Aslan, B., Kokcu, Y., Biçak, B., et al., Molecular Docking, Molecular Dynamics, Optimization And Characterization Of Ghk-Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanoparticles As Potential Anti-Cancerogenic Effect On Glioblastoma Cancer Cells, *2nd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB)*, Podgorica, 25-30 Haziran 2018, 1-1.

Kecel Gündüz, S., Özel, A., Biçak, B., Kokcu, Y., Budama Kilinc, Y., Çakır Koç, R. , et al., Neuroprotective dipeptide AVP(4-5)-NH₂ loaded Chitosan Nanoparticle; In-silico and In-vitro Studies, *ICINSE 2018*, Kiev, 7-10 Eylül 2018, 5-5.

Kecel Gündüz, S., Kökcü, Y. , Biçak, B., Budama Kilinç, Y. , Çakır Koç, R., Özel, A., Antioxidant peptide Loaded poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles: Molecular Design, Characterization and Molecular Docking Study, *International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018)*, Ankara, 26-27 Nisan 2018, 1280-1281.

Kecel-Gündüz, S., Kökcü, Y., Biçak, B., Özel, A. E., Computational Design of Immunogenic Peptide, *33.Uluslararası Fizik Kongresi Bildiri Kitabı*, Muğla, 6-

- 10 Eylül 2017, İstanbul, Anka Matbaa, 226.
- B. Bıçak, Y.Kökcü, S.Kecel-Gündüz, A. E. Özel, Molecular Dynamic and Docking Studies of RGD Peptide, *33.Uluslararası Fizik Kongresi Bildiri Kitabı*, Muğla, 6-10 Eylül 2017, İstanbul, Anka Matbaa, 250.
- Kökcü, Y., Bıçak, B., Kecal-Gündüz, S., Özel, A.E., Molecular Dynamic Simulation of NAC Molecule, *33.Uluslararası Fizik Kongresi Bildiri Kitabı*, Muğla, 6-10 Eylül 2017, İstanbul, Anka Matbaa, 251.
- Kecal-Gündüz, S., Kökcü, Y., Bıçak, B., Özel, A. E., Molecular Dynamic, Molecular Docking, HOMO-LUMO, MEP and UV-Vis Analysis of Phe-Tyr Dipeptide for the Treatment of Hypertension, *33.Uluslararası Fizik Kongresi Bildiri Kitabı*, Muğla, 6-10 Eylül 2017, İstanbul, Anka Matbaa, 251.
- Kökcü, Y., Bıçak, B., Kecal-Gündüz, S., Özel, A.E., Molecular Modeling of – FAGAAGSAKSAAGTASHVSI- Peptide, *33.Uluslararası Fizik Kongresi Bildiri Kitabı*, Muğla, 6-10 Eylül 2017, İstanbul, Anka Matbaa, 252.
- Bıçak B., Kökcü, Y., Kecal-Gündüz, S., Özel, A. E., Structural Analysis of – SDKGATLTIKKEAFPAESKS- Peptide, *33.Uluslararası Fizik Kongresi Bildiri Kitabı*, Muğla, 6-10 Eylül 2017, İstanbul, Anka Matbaa, 263.
- Çakir Koç, R., Budama-Kılıç, Y., Kecal-Gündüz, S., Kökcü, Y., Computational Design, Preparation and Characterization of Immunological Peptide of Toxoplasma Gondii Major Surface Protein, *Innovation in Medicine Summit-3 Abstract Book*, 11-13 Mayıs 2017, Gaziantep, 128.
- Kökcü, Y., Kecal-Gündüz, S., Özel, A.E., Conformational Stability of NAC Molecule, *32.Uluslararası Fizik Kongresi Bildiri Kitabı*, Muğla, 6-9 Eylül 2017, İstanbul, Anka Matbaa, 61.