

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
(DOKTORA TEZİ)

**MELATONİN'İN MODEL VE BİYOLOJİK MEMBRANLARLA  
ETKİLEŞMESİNİN FİZİKSEL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

İpek ŞAHİN

Fizik Anabilim Dalı  
Bilim Dalı Kodu: 404.01.01

Sunuş Tarihi:24.09.2009

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

Bornova-İZMİR



**İpek ŞAHİN** tarafından **DOKTORA** tezi olarak sunulan “**Melatonin’in Model ve Biyolojik Membranlarla Etkileşmesinin Fiziksel Yöntemlerle İncelenmesi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve ..... tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:****İmza**

**Jüri Başkanı** : ..... ..

**Raportör Üye** : ..... ..

**Üye** : ..... ..

**Üye** : ..... ..

**Üye** : ..... ..



**ÖZET****MELATONİN'İN MODEL VE BİYOLOJİK MEMBRANLARLA  
ETKİLEŞMESİNİN FİZİKSEL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

ŞAHİN, İpek

Doktora Tezi, Fizik Bölümü

**Tez Yöneticileri: Prof. Dr. Nadide KAZANCI**

**Prof. Dr. Feride SEVERCAN**

**Eylül 2009, 181 sayfa**

Membranın fiziksel özellikleri membran fonksiyonunu belirlediği için, model ve biyolojik membranlarda ilaç-membran etkileşmelerin incelenmesi, aktif bir çalışma alanıdır. İlaçların biyolojik etkisinde, ilaç-membran etkileşmeleri hayati önem taşır. Örneğin bir ilaç molekülünün sistemde reseptör kısmına ulaşması, ilaçların biyolojik membran boyunca transportu ile ilgilidir. Bazı ilaçlar membrana direkt olarak etki eder. Bu nedenle bir ilacın etki mekanizmasını iyice anlayabilmek için ilaç-membran etkileşmesini moleküler düzeyde anlamak gerekir.

Bu çalışmada kullandığımız melatonin çok geniş kullanım alanına sahip bir ilaçtır. Bu bakımdan melatoninin etki mekanizmasının tayini için yapılan çalışmalar son derece büyük önem taşımaktadır. Melatonin için birçok araştırma yapılmaktadır. Fakat bu çalışmaların çoğu klinik düzeydedir, moleküler düzeydeki araştırmalar sınırlıdır.

Bu çalışmada amacımız melatoninin gerçek hücre membranıyla etkileşimini, model membran kullanarak anlamaya çalışmaktır. Gerçek membranlar çok karmaşık yapılar olduğundan moleküller arası etkileşmeleri yorumlamak zordur. Bu nedenle yapı itibarıyla gerçek membranlarla hemen hemen aynı özelliklere sahip olan, bileşen sayısını ve konsantrasyonlarını

değiştiren bildiğimiz model membranlar ile çalışılmıştır. Moleküller arası etkileşmeleri incelemek için, melatoninin lipid faz geçiş sıcaklığı, faz geçiş eğrisi, membran düzeni ve membran dinamiği üzerindeki etkileri farklı melatonin konsantrasyonları için araştırılmıştır. alışmalar sırasında Fourier Transform Infrared (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) ve Floresans Spektroskopisi teknikleri kullanılarak spektroskopik ve kalorimetrik ölçümler yapılmıştır. Bu alışmalar sayesinde melatoninin membrandaki etkileri moleküler düzeyde saptanarak, membrandaki konumunu tayin etmek mümkün olacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Melatonin, membran, FTIR, DSC, Floresans spektroskopisi.

**ABSTRACT****THE INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF MELATONIN  
WITH MODEL AND BIOLOGICAL MEMBRANES USING PHYSICAL  
METHODS**

ŞAHİN, İpek

PhD in Physics

**Supervisors: Prof. Dr. Nadide KAZANCI****Prof. Dr. Feride SEVERCAN****September 2009, 181 pages**

Since the physical properties of membrane determine the membrane functions, the drug-membrane interactions in model and biological membranes are an active research area. In the biological effect of the drugs, drug-membrane interactions have a vital importance. For instance, reachment of a drug molecule to the receptor part of the system is associated with the transport of the drugs through the membrane. Some of drugs affect to the membrane directly. Thus in order to understand the mechanism of action of a drug effectively, it is necessary to understand the drug-membrane interactions in molecular level.

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

Our aim in this study is to find interaction of melatonin with the real cell membrane by examining their interactions with model membrane. Since real membranes have very complicated structures, it is quite difficult to study the intermolecular interactions with them. Therefore, for the investigation, model

membranes, which have similar properties with the real ones, were used. We can change the components and the concentration of the components in model membranes as well. Intermolecular interactions were determined by the effect of melatonin on the lipid phase transition temperature, phase transition slope, membrane order and membrane dynamics for different melatonin concentrations. During these studies spectroscopic and calorimetric measurements were performed by using Fourier Transform Infrared (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fluorescence Spectroscopy techniques. The effect of melatonin on membrane will be determined by the help of these studies in molecular level. Moreover, the estimation of the position of melatonin on the membranes will be possible.

**Keywords:** Melatonin, membrane, FTIR, DSC, Fluorescence spectroscopy.

**TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans ve doktora çalışmalarımı birlikte gerçekleştirdiğim, çalışmalarım boyunca her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen, bilgi, deneyim ve görüşlerinden her zaman yararlandığım, bilimsel hocam olmasının dışında kendisiyle karşılaşmayı büyük bir şans olarak gördüğüm saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nadide Kazancı'ya,

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

Maddi ve manevi her türlü desteklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Özgür Masalcı ve Araş. Gör. M. Duygu Bilge'ye ve aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>IX</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>XVII</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>XXII</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>XXIII</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 ÇALIŞMANIN AMACI .....	1
1.2 BİYOLOJİK HÜCRE MEMBRANLARI VE LİPİDLER .....	3
1.2.1. Hücre Membranlarının Fonksiyonları .....	3
1.2.2. Membranların Yapısı.....	4
1.2.3. Membranların Bileşenleri.....	4
1.2.3.1. Lipitler, Fosfolipidler .....	4
1.3. LİPİD YAPILARININ OLUŞUMU .....	8
1.3.1. Biyolojik Membran Modelleri.....	15
1.3.1.1. Lipozomlar ve Lipozom Çeşitleri.....	16
1.3.2. Moleküler Etkileşim Çeşitleri.....	18
1.3.2.1. Moleküler Etkileşme Enerjileri .....	18
1.3.2.1.1. Coulomb Etkileşimi.....	19
1.3.2.1.2. Van der Waals Etkileşimi.....	20
1.3.2.2. Makroskopik Etkileşme Enerjisi .....	21
1.3.2.3. Hidrojen Bağı, Hidrofobik ve Hidrofilik Etkileşmeler 22	
1.4. LİPİT ÇİFT TABAKA TERMODİNAMİĞİ.....	23
1.4.1. Lipid Fazları.....	23

1.4.2. Lipid Faz Diyagramı .....	26
1.4.3. Faz Geçişleri .....	27
1.5. MELATONİN YAPI VE FONKSİYONU .....	32
1.6. SPEKTROSKOPİ .....	34
1.6.1. Elektromanyetik Spektrum .....	35
1.6.2. Kızıl Ötesi “Infrared” Spektroskopisi .....	35
1.6.3. Titreşim Şekilleri.....	39
1.6.4. Fourier Transform Infrared (FTIR).....	41
1.6.5. FTIR Spektroskopisinin Diğer Biyofiziksel Tekniklere Göre Avantajları .....	43
1.6.6. İncelenen Kızıl ötesi Spektral Bölgeleri .....	45
1.6.7. FTIR Spektroskopik Membran Araştırmalarında Kullanılan Ampirik Kurallar.....	46
1.6.7.1. CH <sub>2</sub> Antisimetrik Gerilme Bandları.....	46
1.6.7.2. CH <sub>2</sub> Simetrik Gerilme Bandları .....	47
1.6.7.3. C=O Gerilme Bandları.....	47
1.6.7.4. PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> Antisimetrik Gerilme Bandları .....	47
1.6.7.5. Asil(Hidrokarbon) Zincirlerin Spektral Karakteristiği.....	48
1.7. DİFERANSİYEL TARAMA KALORİMETRESİ (DSC) .....	49
1.7.1. DSC’ nin Çalışma Prensibi .....	53
1.8. FLORESANS.....	55
1.8.1. Jablonski Diyagramı .....	56
1.8.2. Floresans Yaşam Süresi .....	58
1.8.3. Floresans Sönümlenme (Qenching) .....	59
1.8.4. Floresans Spektroskopisi.....	60
1.8.5. Zaman İlişkili Tek Foton Sayımı (TCSPC).....	61

<b>2. MATERYAL VE METOT</b> .....	64
2.1. Kimyasal Maddeler .....	64
2.2. Kullanılan Membran Çeşitleri .....	64
2.3. Membran Bileşenleri .....	65
2.4. Membran Örneklerin Hazırlanması .....	67
2.4.1. MLV Hazırlanması .....	67
2.4.2. LUV Hazırlanması .....	68
2.5. FTIR Ölçümleri İçin Örnek Hazırlanması .....	69
2.5.1. MLV Hazırlanması .....	69
2.5.2. LUV Hazırlanması .....	69
2.6. DSC Ölçümleri İçin Örnek Hazırlanması .....	70
2.6.1. MLV Hazırlanması .....	70
2.6.2. LUV Hazırlanması .....	70
2.7. TCSP Ölçümleri İçin Örnek Hazırlanması .....	70
2.8. Floresans Spektroskopisi Ölçümleri İçin Örnek Hazırlanması .....	70
2.9. TCSPC Çalışmaları İçin Kullanılan Kurulum .....	71
2.10. Floresans Spektroskopisi İçin Kullanılan Kurulum .....	71
<b>3. SONUÇLAR</b> .....	73
3.1. MELATONİN VE NEGATİF YÜKLÜ MODEL MEMBRAN (DPPG) ETKİLEŞİMİ .....	73
3.1.1. FTIR SONUÇLARI .....	74
3.1.1.1. C-H GERİLME BÖLGESİ .....	74
3.1.1.1.1. CH <sub>2</sub> Antisimetrik Gerilme .....	74
3.1.1.1.2. BAŞ GRUP GERİLEME BÖLGESİ .....	79
3.1.1.1.2.1. C=O Gerilme .....	79
3.1.1.1.2.2. PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> Antisimetrik Gerilme .....	81

3.1.2. DSC SONUÇLARI .....	83
3.2. MELATONİN DPPC VE DPPC/KOLESTEROL MODEL MEMBRANLARI ÜZERİNE ETKİSİ .....	85
3.2.1. FTIR SONUÇLARI .....	85
3.2.1.1. C-H GERİLME BÖLGESİ .....	86
3.2.1.1.1. CH <sub>2</sub> Antisimetrik Gerilme.....	86
3.2.1.2. BAŞ GRUP GERİLEME BÖLGESİ .....	95
3.2.1.2.1. C=O Gerilme .....	95
3.2.1.2.2. PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> Antisimetrik Gerilme .....	99
3.2.2. DSC SONUÇLARI .....	103
3.2.3. FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ SONUÇLARI .....	107
3.3. PROB-MEMBRAN ETKİLEŞİMLERİ.....	112
3.3.1. TCSPC SONUÇLARI.....	112
3.3.2. FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ SONUÇLARI .....	120
3.3.3. FTIR SONUÇLARI .....	125
3.3.3.1. C-H GERİLME BÖLGESİ .....	125
3.3.3.1.1. CH <sub>2</sub> Antisimetrik Gerilme(Jel Faz-25 °C ve Sıvı Kristal Faz-55 °C ).....	125
3.3.3.2. BAŞ GRUP GERİLME BÖLGESİ .....	128
3.3.3.2.1. C=O Gerilme (Jel Faz-25 °C ve Sıvı Kristal Faz- 55 °C).....	129
3.3.3.2.2. PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> Antisimetrik Gerilme (Jel Faz-25 °C ve Sıvı Kristal Faz-55 °C).....	131
3.3.4. DSC SONUÇLARI .....	133

<b>4. TARTIŞMA</b>	
4.1. MELATONİN VE NEGATİF YÜKLÜ MODEL MEMBRAN (DPPG) ETKİLEŞİMİ.....	136
4.2. MELATONİNİN DPPC VE DPPC/KOLESTEROL MODEL MEMBRANLARI (LUV) ÜZERİNE ETKİSİ .....	141
4.3. PROB–MEMBRAN ETKİLEŞİMLERİ.....	150
<b>5. DEĞERLENDİRME.....</b>	<b>155</b>
<b>6.GELECEKTEKİ PLANLAR.....</b>	<b>157</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>158</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1.1. Membran akışkan mozaik modeli .....	3
1.2. Lipid bileşenleri .....	5
1.3. Lipid türleri ve floresan analogları (e,f).....	6
1.4. Hidrofobik kuvvet prensibi .....	9
1.5. Misel oluşturan lipid molekülleri .....	11
1.6. Lipid Yapıları .....	12
1.7. Lipidlerin kendi şekil faktörlerine bağlı olarak farklı kümelenme yapılarını oluşturmaları .....	13
1.8. Boyutlarına göre vezikül çeşitleri .....	17
1.9. Lipozomun hücreye ilave edilmesi .....	18
1.10. Fosfolipid fazların şematik gösterimi.....	24
1.11. Esas faz geçişi yakınlarındaki değişim şeması.....	30
1.12. Melatoninin (N-Acetyl-5-methoxytryptamine, C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) Yapısı .....	32
1.13. Elektromanyetik Spektrum.....	35
1.14. Elektrik ve manyetik alan vektörleri düzlemsel gösterimi.....	36
1.15. Işık dalgası örneği. Ok ile gösterilen ardı ardına oluşan tepeler arasındaki mesafe dalga boyu olarak bilinir.....	37
1.16. Titreşim Şekilleri.....	40
1.17. Michelson interferometresi .....	42
1.18. DPPC çok katmanlı lipozomların C – H gerilme bölgesinin farklı sıcaklıklardaki FTIR spektrumu .....	49
1.19. Tipik bir DSC şeması .....	53
1.20. DSC aletinin içyapısı.....	54

1.21. Floresansın Fiziksel Prensibi .....	56
1.22. Jablonski Diyagramının bir formu .....	57
1.23. Çarpışmasal sönümlenme ve Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET)'ni içeren Jablonski Diyagramı .....	59
1.24. TCSPC Prensibi .....	62
2.1. Lipid Bileşenlerinin Moleküler Yapıları .....	66
2.2. SP-DiOC <sub>18</sub> (3) Moleküler Yapısı .....	67
2.3. Ekstrüzyon yönteminde kullanılan extruder parçaları .....	68
3.1. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPG lipozomunun CH <sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi .....	76
3.2. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPG lipozomunun CH <sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu band genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi .....	78
3.3. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPG lipozomunun C=O gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi. ....	80
3.4. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPG lipozomunun PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi. ....	82
3.5. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPG lipozomunun DSC kalorimetre eğrisi. ....	84
3.6. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC (LUV) lipozomunun CH <sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi. ....	87
3.7. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC (LUV) lipozomunun CH <sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu band genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi....	89
3.8. Saf, kolesterol ve kolesterolle birlikte farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun CH <sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi. ....	92

3.9. Saf, kolesterol ve kolesterol ile birlikte farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun $CH_2$ antisimetrik gerilme modu band genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi.....	94
3.10. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC (LUV) lipozomunun C=O gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.....	96
3.11. Saf, kolesterol ve kolesterol ile birlikte farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun C=O gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.....	98
3.12. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC (LUV) lipozomunun $PO_2^-$ antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.....	100
3.13. Saf, kolesterol ve kolesterol ile birlikte farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun $PO_2^-$ antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.....	102
3.14. Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC (LUV) lipozomunun DSC kalorimetrik eğrisi.....	104
3.15. Saf, kolesterol ve kolesterol ile birlikte farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun DSC kalorimetrik eğrisi.....	106
3.16. Saf ve farklı konsantrasyonlarda melatonin içeren DPPC LUV membranları için 25 ve 55 °C’de elde edilen emisyon spektrumları. (a) saf DPPC LUV membranı (b) % 3 mol melatonin içeren DPPC LUV membranı (c) % 15 mol melatonin içeren DPPC LUV membranı.....	108
3.17. Saf ve farklı konsantrasyonlarda melatonin içeren DPPC/Kolesterol LUV membranları için 25 ve 55 °C’de elde edilen emisyon spektrumları. (a) saf DPPC/Kolesterol LUV membranı (b) % 3 mol melatonin içeren DPPC/Kolesterol LUV membranı (c) % 15 mol melatonin içeren DPPC/Kolesterol LUV membranı.....	110

3.18. DOPC ve farklı boya konsantrasyonları için yaşam süresi bozunma eğrileri. ....	113
3.19. Farklı lipid sistemlerinin boya konsantrasyonuna bağlı yaşam süresi değerleri. ....	114
3.20. DPPC ve % 2 mol SP-DiOC <sub>18</sub> (3) boya karışımının sıcaklığa bağlı yaşam süresi değerleri. ....	117
3.21. DOPC ve % 2 mol SP-DiOC <sub>18</sub> (3) boya karışımının sıcaklığa bağlı yaşam süresi değerleri. ....	119
3.22. Farklı boya konsantrasyonları içeren DPPC/Kolesterol sisteminin eksitasyon ve emisyon spektrumları. ....	121
3.23. DOPC/Kolesterol ve DPPC sistemlerinde farklı boya konsantrasyonu içi gözlenen emisyon spektrumlarının maksimum dalgaboyu değerleri. ....	122
3.24. DOPC/Kolesterol (2:1) ve % 10 mol boya konsantrasyonu için elde edilen absorpsiyon spektrumu. ....	123
3.25. Farklı boya konsantrasyonları içeren DOPC/Kolesterol karışımının eksitasyon ve emisyon spektrumları. ....	124
3.26. Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun CH <sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu frekansının 25 °C'de boya konsantrasyonuna bağlı değişimi (*) P<0.05. ....	126
3.27. Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun CH <sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu frekansının 55 °C'de boya konsantrasyonuna bağlı değişimi (*) P<0.05. ....	126
3.28. Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun CH <sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu band genişliği değerlerinin 25 °C'de boya konsantrasyonuna bağlı değerleri (*) P<0.05. ....	128

3.29. Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun $CH_2$ antisimetrik gerilme modu band genişliği değerlerinin 55 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değerleri (*) $P<0.05$ . .....	128
3.30. Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun C=O gerilme modu frekansının 25 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değişimi (*) $P<0.05$ . .....	130
3.31. Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun C=O gerilme modu frekansının 55 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değişimi (*) $P<0.05$ . .....	130
3.32. Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun $PO_2^-$ antisimetrik gerilme modu frekansının 25 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değişimi (*) $P<0.05$ . .....	132
3.33. Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun $PO_2^-$ antisimetrik gerilme modu frekansının 55 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değişimi (*) $P<0.05$ . .....	132
3.34. Saf DPPC LUV örneğinin DSC kalorimetrik eğrisi. ....	133
3.35. Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC LUV örneklerin DSC kalorimetrik eğrisi.....	134

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1.1 Zincir ve baş grup isimleri .....	7
1.2 Lipit isimleri ve kısaltmaları .....	7
1.3. Doğal membranlarda % ağırlık oranında bulunan lipit bileşenleri .....	7
1. 4. Fosfokolin fazların karakteristikleri .....	26
1.5. Infrared ışınların dalga boyu, dalga sayısı ve frekans değerleri .....	36
1.6. FTIR spektrometre bileşenleri. ....	41
1.7. Lipidlerin karakteristik infrared bandları .....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
$L_{\beta'}$	Jel Faz
$P_{\beta'}$	Dalgalı Jel Faz
$L_{\alpha}$	Sıvı Kristal Faz
$L_d$	Sıvı-düzensiz Faz
$L_o$	Sıvı-düzenli Faz
$\Delta H$	Entalpi
$\Delta H_{cal}$	Kalorimetrik Entalpi
$\Delta V$	Hacim
$c_p$	Isı kapasitesi
$\kappa_T$	Hacim izotermal sıkıştırılabilirlik
$T_m$	Esas Faz Geçiş Sıcaklığı
$\tau$	Yaşam Süresi
$\Gamma$	Floroforun yayma hızı
$k_{nr}$	Uyarılmış durumdan temel duruma ışınımsal olmayan bozunmaların bütün formları

**Kısaltmalar**

**FTIR** Fourier Transform Infrared

**DSC** Diferensiyel Tarama Kalorimetresi

**TCSPC** Zaman İlişkili Tek Foton Sayımı

**MLV** Çok Katmanlı Vezikül

**LUV** Büyük Tek katmanlı Vezikül

**DOPC** 1,2-diöleoil-sn-glisero-3-fosfokolin

**DPPC** 1,2-dipalmitol-sn-glisero-3-fosfokolin

**DPPG** 1,2-dipalmitol-sn-glisero-3-fosfogliserol

**DMPC** 1,2-dimiristol-sn-glisero-3-fosfokolin

## 1. GİRİŞ

Bu çalışmada, melatoninin, biyolojik membranlara en yakın model olan lipid membranlar üzerine etkisi, Fourier Transform Infrared (FTIR), Diferansiyel Tarama Kalorimetre (DSC) ve Floresans Spektroskopi teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Melatoninin, membran yapı ve akışkanlığını, membran geçirgenliğini nasıl değiştirdiği, melatoninin çeşitli konsantrasyonları kullanılarak ve sıcaklığa bağlı olarak incelenmiştir.

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

### 1.1. ÇALIŞMANIN AMACI

İlaçların etkinliği, onların hücre membranlarıyla etkileşimine bağlıdır. Bu nedenle, ilaç-membran etkileşimlerinin anlaşılması onların farmakolojik performansını geliştirmek için gereklidir. Bu etkileşimler, ilaç araştırmalarında ve geliştirmede çok önemli bir faktördür. İlaç moleküllerinin membranlarla etkileşmesi, membranların akışkanlık ve faz geçiş sıcaklığı gibi özelliklerinin değişmesiyle gerçekleşir. Böyle etkileşimler yalnızca membranların fizikokimyasal özelliklerini değiştirmez, aynı zamanda membranın içindeki ilacın lokalizasyonunu, oryantasyonunu ve konformasyonunu etkiler ve belirler. İlaç membran etkileşimleri model yapay membranlar (çift tabakalar, lipozomlar) kullanılarak *in vitro* olarak çalışılabilir. Model membranlar biyolojik membranlar için bir model olarak kapsamlı araştırmaların konusu olmuştur (Kazancı and Severcan, 2007; Korkmaz and Severcan, 2005; Boyar and Severcan, 1997). Membranın fiziksel özellikleri membran fonksiyonlarını belirlediği için model ve biyolojik membranlarda ilaç-membran etkileşmelerinin incelenmesi aktif bir araştırma alanıdır. Doğal membranların karmaşık olmaları nedeniyle çalışmaların büyük çoğunluğunda membran modelleri olarak saf veya ikili

lipit karışımları kullanır (Dluhy et al.,1983). Model membran çalışmalarında spektroskopik metodlar, biyolojik membranların konformasyonel davranışını aydınlatmada oldukça büyük başarıya sahiptirler.

Bu çalışmadaki amacımız melatoninin negatif yüklü (DPPG) model membranlar, nötr (DPPC) ve kolesterol içeren DPPC model membranlar ile sıcaklığa ve melatonin konsantrasyonlarına bağlı olarak nasıl etkileştiğini FTIR, DSC ve Floresans Spektroskopisi teknikleri kullanarak incelemektir. Lipit membranlara kolesterol eklememizin amacı gerçek biyolojik membranlara daha yakın model sistemler elde etmektir.

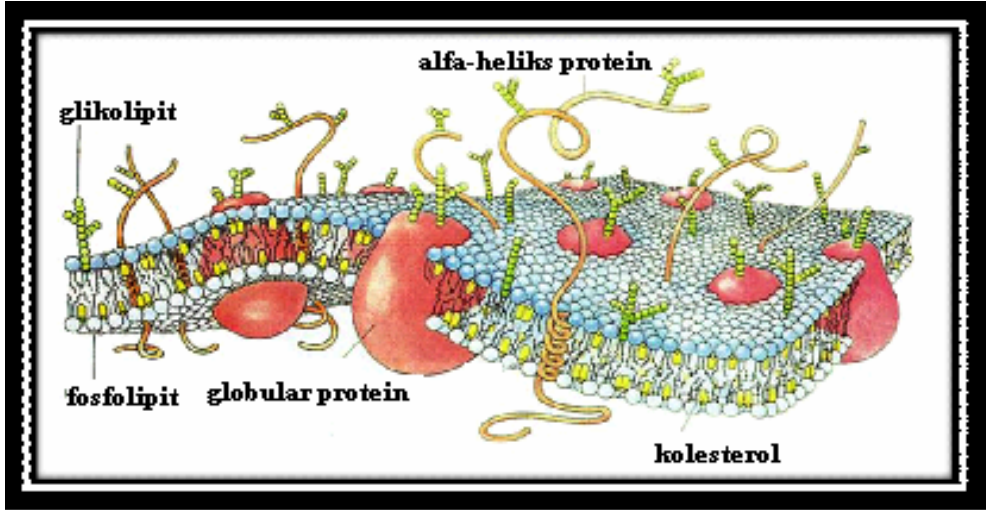
Daha önceki yüksek lisans çalışmalarımızda melatoninin nötr membranlar (DPPC) kullanarak hazırladığımız çok katmanlı veziküllerle (MLV) nasıl etkileştiğini sıcaklığa ve artan melatonin konsantrasyonlarına (%1, %3, %6, %9, %15, %24 ve %30 mol) bağlı olarak FTIR ve DSC teknikleri kullanarak incelemiştik. Çalışmamızın sonucunda melatoninin jel fazda membran düzenini arttırdığını, hem jel hem de sıvı kristal fazda membran akışkanlığını arttırdığını ve membranın karbonil ve fosfat grupları ile kuvvetli hidrojen bağı yaptığını bulmuştuk. Yüksek lisans çalışmalarımızın devamı olarak bu çalışmamızın bir kısmında yine aynı nötr membranları kullanarak ve bu sefer büyük tek katmanlı veziküller (LUV) hazırlayarak melatoninin membranlarla etkileşimini inceledik. Melatoninin çok katmanlı ve tek katmanlı lipozomlarla etkileşiminde farklı davranış sergileyip sergilemediğini gösterebilmek için deneylerimizi bir düşük (%3 mol) ve bir yüksek (%15 mol) konsantrasyonlar olmak üzere iki melatonin konsantrasyonu ile gerçekleştirdik.

Melatoninin membranlarla etkileşmesini anlamak, incelenecek sistemin gerçek membranlara benzemesi nedeni ile hem gerçek sistemlerdeki etkileşmeleri anlamamız açısından değerli bilgiler verecektir hem de melatoninin etki mekanizmasını daha fazla anlamamıza yardımcı olacaktır.

## 1.2. BİYOLOJİK HÜCRE MEMBRANLARI VE LİPİTLER

### 1.2.1. Hücre Membranlarının Fonksiyonları

Yaşayan bütün sistemler hücrelerden oluşmuştur. Hücrenin temel bileşenlerinden biri onu çevreleyen ve dış ortamdan ayrılmış bir iç ortam oluşmasına izin veren membrandır.



Şekil 1.1 Membran akışkan mozaik modeli (Yeagle, 2004)

Hücre membranı hücre içi ve dışı bölümler arasında bariyer görevi yapar. Ökaryotlar ek olarak çeşitli iç membranlar içerirler. Bu membranlar özel bileşenleri çevrelerler ve biyokimyasal reaksiyonların ayrı bir şekilde gerçekleşmesine izin verirler. Bu nedenle membranlar pek çok karmaşık fonksiyonları yerine getirirler. Membranlar aynı zamanda iyonlar ve büyük moleküllerin kontrollü geçişine izin veren bariyerler olarak da rol oynarlar. Membranları geçen iyon, pH ve elektrik yüklerinin gradyenti enerjiyi depolamada ve bir sinyale hızlı cevaplar verebilmek için kullanılır. Materyal transportu gerekmeksizin membranı geçen sinyal iletimi konformasyonel değişimlere uğrayan reseptör molekülleri ile yerine getirilir. Membranlar

ayrıca biyokimyasal reaksiyonları kolaylaştıran pek çok enzime ev sahipliği de yapar (Hoppe et al., 1982).

### **1.2.2. Membranların yapısı**

Membranların temel yapıtaşı fosfolipit çift tabakadır. Lipit çift tabakalarda kolesterol, proteinler ve integral membran proteinleri bir arada bulunurlar. Bazı lipit ve proteinler (glikolipitler, glikoproteinler) karbohidrat modifikasyonlar taşıyabilirler. Protein/lipit oranı membran tipine bağlı olarak değişir. Akışkan mozaik model, protein moleküllerinin fosfolipit matrixte rastgele dağıldığını varsayar (Singer and Nicolson, 1972). Bununla birlikte, lipit-lipit etkileşimlerinin temelinde membran içinde özel bölgelerin de oluşumu mümkündür. “Raft” hipotezine göre (Simons and Toomre, 2000) mikronaltı skalada, “sıvı-düzenli” faza benzer özellikler taşıyan bölgeler oluşur. Bu bölgeler sınıflandırma ve sinyalizasyon gibi hücrel işlemlerde fonksiyon sahibi olabilirler.

Lipit çift tabaka iki molekül kalınlığında lipitlerden oluşur ve yarı geçirgen bir membran olarak isimlendirilir. Bunun anlamı bazı moleküllerin yapıdan serbestçe geçmeye izinli olmaları demektir; yüklü iyonlar ve büyük moleküllere karşı geçirmezlik görevi yaparken, lipit de eriyebilen parçalar için geçirgendir. Lipit çift tabaka biyolojik membranların fonksiyonlarının anlaşılmasında önemli rol oynar.

### **1.2.3. Membran Bileşenleri**

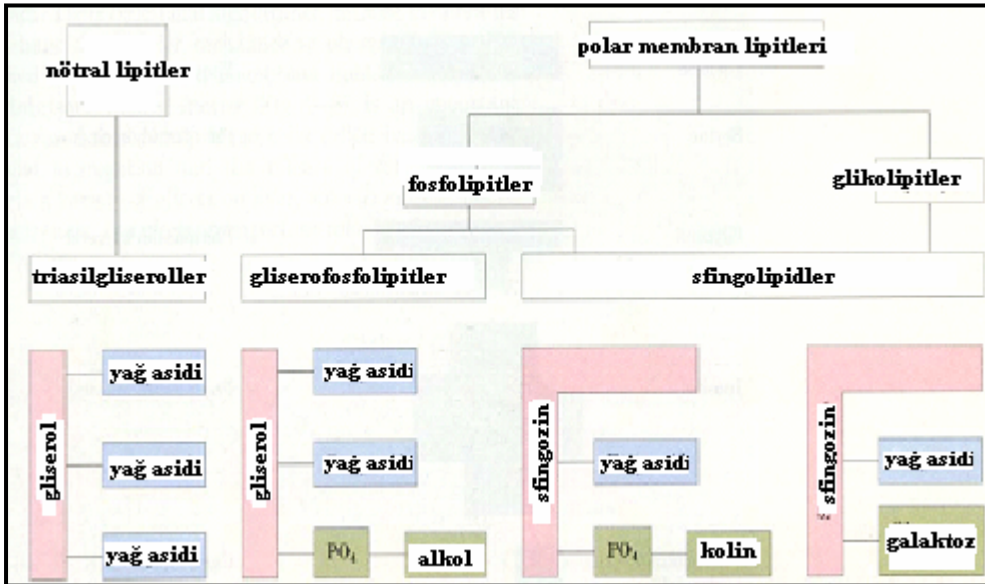
#### **1.2.3.1 Lipitler**

Biyomembranlarda üç ana tip lipit vardır: Fosfolipitler, steroller ve glikolipitler. En önemli ve en çok var olan lipit bileşeni ise fosfolipitlerdir.

Lipitlerin, insan organizmasında, depo ve yapısal fonksiyonu önemlidir. Trigliceridler, enerji yedeğini oluşturmak üzere depolanırlar ve depo lipitler olarak bilinirler. Membranların ve steroid hormonların, vitamin D gibi bazı

önemli maddelerin yapısını oluşturan fosfolipitler, glikolipitler ve kolesterol, yapısal lipitler olarak bilinirler.

En genel ve belirgin özellikleri sulu ortamlarda çözünmezlik olan lipitler kimyasal olarak farklı bileşiklerdir ve bu nedenle biyolojik fonksiyonları da çeşitlilik gösterir: 1) Nötral yağlar olarak bilinen trigliseridler, birçok organizmada enerji için başlıca yakıt deposudur. 2) Fosfolipitler ve steroller biyolojik membranların yapı taşlarıdır. 3) Nispeten küçük miktarlarda bulunan bazı lipitler, enzim kofaktörleri, elektron taşıyıcıları, ışık absorbe eden pigmentler, emülsifiye edici ajanlar, hormonlar ve intrasellüler haberciler olarak çok önemli fonksiyonlara sahiptirler.



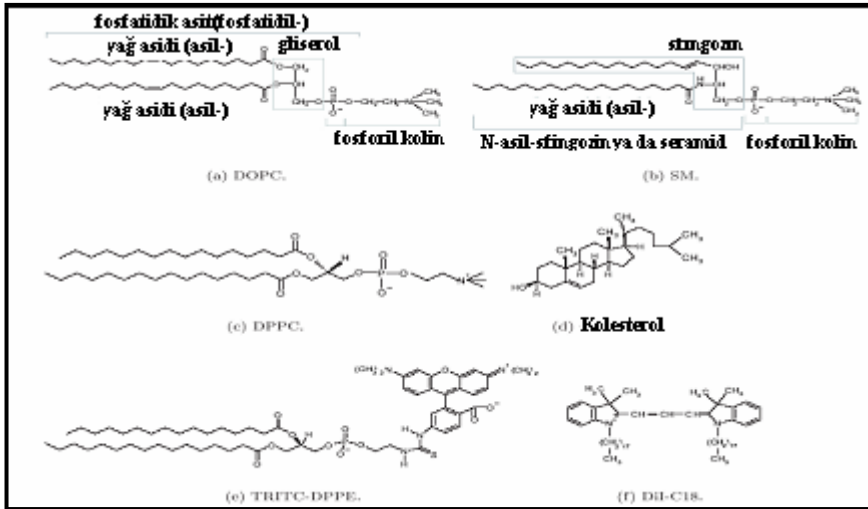
Şekil 1.2 Lipit Bileşenleri (Hoppe et al., 1982)

Lipitler, biyolojik kaynaklı organik bileşiklerdir. Lipitlerin yapılarında C, H, O bulunur; ayrıca N, P, S gibi elementler de bazı lipitlerin yapısına girerler; O miktarı, C ve H atomlarına oranla daha azdır. Lipitler, yağ asitlerinin esterleridirler ya da esterleşebilen bileşiklerdir; temel yapı taşları yağ asitleridir. Lipitler, suda çözünmeyen, apolar veya hidrofob bileşiklerdir.

Ancak yapılarında hidroksil ( $-\text{OH}$ ) ve karboksil ( $-\text{COOH}$ ) grupları gibi polaritesi fazla olan hidrofilik grupları fazla miktarda içeren lipitler suda kısmen çözünebilirler. Lipitler, kloroform, eter, benzen, sıcak alkol, aseton gibi organik çözücülerde çözünebilirler; buldukları bitkisel ya da hayvansal dokulardan bu çözücülerle ekstrakte edilebilirler. Lipitlerin enerji değerleri yüksektir; ancak yanma için karbonhidrat ve proteinlerden daha fazla oksijene gereksinim gösterirler.

### Fosfolipitler:

Fosfolipitler membranların temel yapı taşlarını oluştururlar. Gliserol ve üç yağ asidi zincirinden oluşan lipitlerden farklı olarak fosfolipitler sadece iki yağ asidi içerir. Gliserol ya da sfingozinden türemişlerdir.



Şekil 1.3 Lipit türleri (Hoppe et al., 1982)

<i>Karbon sayısı: çift band sayısı</i>	<i>Zincir ismi</i>	<i>Tam isim</i>	<i>Kısaltma</i>
12 : 0	<b>lorol</b>	<b>fosfatidilkolin</b>	PC
14 : 0	<b>miristol</b>	<b>fosfatidiletanolamin</b>	PE
16 : 0	<b>palmitol</b>	<b>fosfatidilserin</b>	PS
18 : 0	<b>sterol</b>	<b>fosfatidilinozitol</b>	PI
18 : 1	<b>oleol</b>		

Çizelge 1.1 Zincir ve baş grup isimleri

Fosfolipidler (gliserofosfolipitler) bir fosfat içerirler. Gliserolün iki karbonuyla esterleşmiş iki yağ asidine ve üçüncü karbonla esterleşmiş bir fosforik asit grubuna sahiptirler.

Biyomembranlardaki en yaygın fosfolipit tipi fosfatidilkolin (lesitin)dir. Hidrofilik baş olarak fosfata sahiptir.

<b>Lipid İsmi</b>	<b>Kısaltma</b>
1,2-dilorol-sn-glisero-3-fosfokolin	DLPC
1,2-dimiristerol-sn-glisero-3-fosfokolin	DMPC
1,2-dioleol-sn-glisero-3-fosfokolin	DPPC
1,2-dimiristerol-sn-glisero-3-fosfokolin	DOPC
1,2-dipalmitol-2-sn-glisero-3-fosfoetanolamin	DPPE
1-palmitol-2-oleol-sn-glisero-3-[fosfo-L-serin]	POPS
1,2-dipalmitol-sn-glisero-3-[fosfo-L-serin]	DPPS

Çizelge 1.2 Lipit isimleri ve kısaltmaları

<i>Membran Tipi</i>	PC	PE	PS	PI	SM	Glycol.	Chol.	Diğerleri
<i>(a) İnsan eritrosit plasma membranı</i>	20	18	7	3	18	3	20	11
<i>(b) Memeli akciğer plasma membranı</i>	18	12	7	3	12	8	19	21
<i>(c) Golgi membranı</i>	25	9	3	5	7	0	8	43

Çizelge 1.3 Doğal membranlarda % ağırlık oranında bulunan lipit bileşenleri

Fosfat grubu sırasıyla; etanolamin, kolin, serin ya da inositol gibi bir alkolle esterleşmiştir. Sfingomiyelin sfingozinden oluşur. Gliserolden farklı olarak uzun bir hidrokarbon zincir içerir. İkinci hidrokarbon zincir yine ester bağlı bir yağ asidi ile elde edilir. Baş grup için, sfingozin, bir koline ester bağlı olan bir fosforik asit ile esterlenmiştir.

Yağ asidi zincirleri genellikle 14 ile 24 arasında çift sayıda karbon atomu içerirler. En yaygın olanları 16 ve 18 dir. Normalde doymuş ve/veya cis konfigürasyonunda bir ya da daha fazla çift bağ içerirler. Asil zincirler ve baş grupları için bazı yaygın isimler Çizelge 1.1' de verilmiştir.

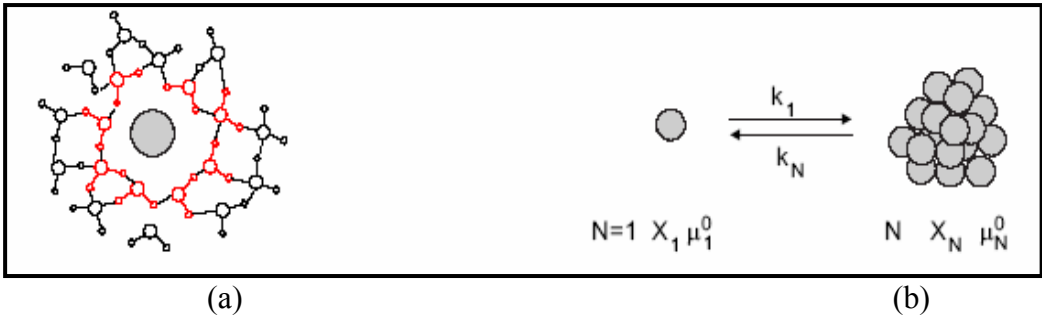
### **1.3. LİPİT YAPILARININ OLUŞUMU**

Membran lipitlerinin hepsi amfifilik (amfipatik) tir. Hidrofilik polar gruba ve hidrofobik hidrokarbon gruba sahiptirler. Tek bir lipit molekülündeki bu ikilem (Ying-Yang özelliği) sulu ortamda lipit çift tabaka oluşumunun ana faktörüdür. Her bir fosfolipit molekülünün hidrokarbon zincirlerinin biri komşu karbon atomları arasında bir ya da daha fazla çift bağ içerir. İçerdikleri çift bağ sayısı doymamışlığı gösterir. Hidrokarbon zincirlerin uzunluğu ve doymamışlığı çift tabaka içindeki paketlenmelerini oldukça etkiler. Kısa zincirler hidrokarbon kuyrukların birbirleriyle etkileşimini azaltır. Bu özellikler lipit çift tabakanın akışkanlığını artırır. Membranlar pek çok tip fosfolipit içerirler ve bu fosfolipitlerin bağlı oranları membranlar arasında farklıdır. Silindirik şekle sahip olmaları ve amfifatik doğaları sebebiyle bu moleküller solüsyonda kendiliğinden çift tabaka oluştururlar. Amfifatik fosfolipitler diğer amfifilik moleküller gibi iki zıt kuvvete bağlıdır: Hidrofilik baş grubu suyu severken hidrofobik hidrokarbon zincirler sudan kaçarlara ve diğer hidrofobik moleküllerle bir araya gelmek isterler. Bu çelişki sulu ortamda lipit çift tabaka oluşumu ile ortadan kalkar. Amfifatik molekülleri çift tabaka oluşturmak için bir araya

getiren bu kuvvetler aynı zamanda çift tabakanın kendinden yalıtılmış özelliğinin de sebebidir. Bu özellik önemlidir çünkü lipid çift tabakadaki herhangi bir yırtık su ile bir sınır oluşturacaktır, bu da istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle çift tabaka molekülleri bu sınırı yok etmek için kendiliklerinden toplanacaklardır. Yırtık eğer küçük ise çift tabaka kendi kendini yeniler. Yırtık büyük ise tabaka lipozomlar oluşacak şekilde veziküllere ayrılabilirler (Tien and Ottova-Leitmannova, 2000).

Lipitlerin kümelenmesi bir araya gelmesi kendiliğinden oluşan bir işlemdir. Bu işlem lipitlerin van Der WAALS, hidrofobik, elektrostatik etkileşimleri ve hidrojen bağlanma ile gerçekleşir.

Hidrofobik bir molekülün sulu bir ortamda bulunması entropik olarak oldukça istenmeyen bir durumdur. Su molekülleri hidrofobik molekül çevresinde hidrojen bağı oluşturmaya zorlanır, bu durumda da moleküsel sıkışma ile oluşan yapılar oluşur.



Şekil 1.4 Hidrofobik Kuvvet Prensibi (Israelachvili, 1991).

Şekil 1.4 (a)' da görüldüğü üzere bu yapılar H<sub>2</sub>O moleküllerinin yüksek düzenini dolayısı ile de düşük entropiyi gösterir. Hidrofobik moleküller bu sıkışık yapılarda kümelenme eğilimi gösterirler. Lipit kümelerinin kendiliğinden oluşma işlemi şu şekilde açıklanabilir: membran lipitleri polar hidrofilik bir baş gruba ve iki uzun hidrokarbon zincirlerine sahiptirler. Bu zincirler oldukça hidrofobiktirler. Bu zincirleri hidrofobik bir

ortamdan sulu bir ortama transfer etmek için büyük enerji gerekmektedir (Bray and Alberts, 1994).

$$\Delta G = \mu_{\text{sin gledişpersed}}^0 - \mu_{\text{misel}}^0 = -RT \ln (X_{CMC})$$

formülüne göre, kimyasal potansiyellerdeki bu büyük fark fosfolipitler için “kritik misel konsantrasyonu” nun oldukça küçük olmasına neden olur. Kritik misel konsantrasyonu serbestçe dağılmış lipit moleküllerinin % 50’sinin misellerle ilgili olduğu lipit konsantrasyonudur. İki zincirli 16 karbonlu bir fosfolipit için tipik değer  $\Delta G \approx 75 \text{ kJ/mol} \approx 30 \text{ RT}$  dir ve iki zincirli fosfolipitlerin kritik misel konsantrasyonu genellikle  $10^{-12} \text{ M}$  altındadır.

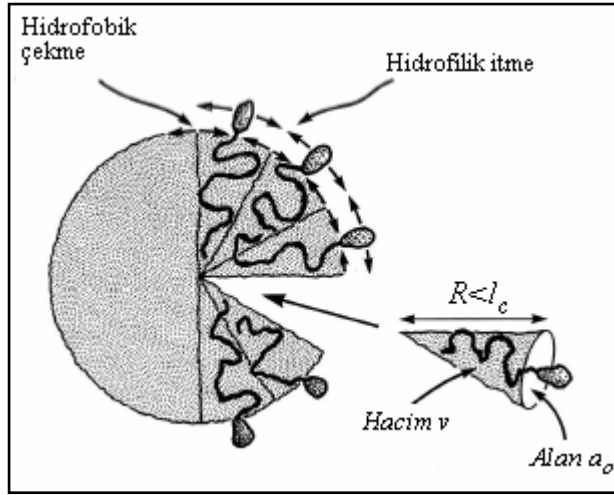
Amfililik moleküller bu nedenle oldukça yüksek bir kümelenme eğilimi gösterirler. Bununla birlikte misel ya da çift tabaka oluşumu lipit şekline ve paketlenmesine bağlıdır. Bir amfifil geometrisi üç parametreye bağlıdır:

- 1) Baş grup tarafından kaplanan en uygun yüzey alanı;  $a_0$ . Komşu moleküller arasındaki elektrostatik itme kuvvetleri yüzünden bu durum yüklü lipitler için kuvvetli bir şekilde pH ve solüsyon iyonik kuvvete bağlıdır.
- 2) Misel boyutunun en üst limitini belirleyen hidrokarbon zincir uzunluğu;  $l$ .
- 3) Hidrokarbon kuyruğun moleküler hacmi;  $v$ .

Özetle bir lipit kümesinin son şekli esas olarak lipit bileşenlerinin şekline bağlıdır  $\Rightarrow$

$$\frac{v}{a_0 l_c}$$

En basit lipit yapıları küresel yapılardır. Misel denilen bu yapılarda lipit zincirleri merkeze yönelmişken baş gruplar küre yüzeyini oluşturur. Şekil 1.5’ te lipit moleküllerinin paketlenme özelliklerinin etkisi görülmektedir.



Şekil 1.5 Misel oluşturan lipid molekülleri. *Intermolecular&Surface Forces* (Israelachvili, 1991).

Misel oluşturan lipidler büyük bir baş grup alanına ( $a_0$ ) ve kısa bir hidrokarbon zincir hacmine  $v$  sahip olmalıdır. Böyle lipidler koni şekline sahip lipidler olarak adlandırılır.

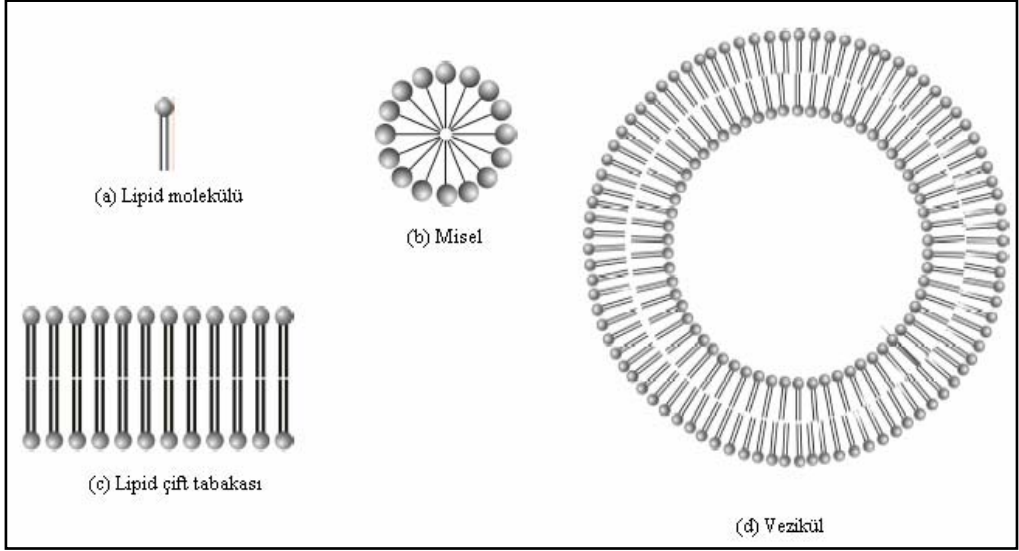
Çift tabakalı yapılar için, baş grup alanının küçük, hidrokarbon zinciri hacminin ise büyük olması gerekir. Bu yapıları silindir şeklindeki lipidler oluştururlar. Bu durumda şekil faktörü  $\Rightarrow$

$$\frac{1}{2} < \frac{v}{a_0 l_c} < 1$$

olmalıdır.

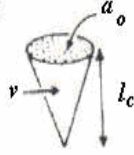


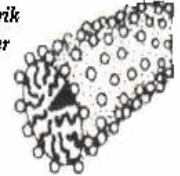

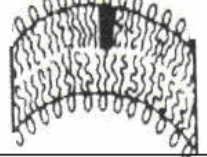

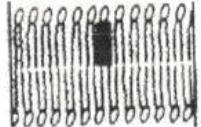

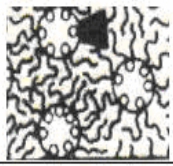
Çift tabakalar genellikle iki hidrokarbon zincirli lipidlerden oluşurlar (Şekil 1.6a). Düzlemsel bir çift tabakada, hidrofobik ortam yapının ortasında, hidrofilik başlar ise sulu ara yüzeyde bulunurlar. Fakat böyle bir düzlemsel çift tabakanın kenarında hidrokarbon zincirler suya maruz kalırlar (Şekil 1.6c). Bu nedenle yapı, bu kenarları, sulu ortamdan, açık kenarı bir diğeri ile birleştirerek korumaya eğilimli olacaktır. Bunun sonucunda da küresel vezikül yapıları oluşur (Şekil 1.6d). Güçlü iç yanal basınç gözenek

oluşumunu engeller. Lipit çift tabaka bu nedenle kovalent olmayan etkileşimlerle oldukça etkin bir şekilde bir arada tutulur.



Şekil 1.6 Lipit Yapıları (Israelachvili, 1991).

Bazı lipit kümelenme yapıları ve buna bağlı şekil faktörleri ve lipit gösterimleri Şekil 1.7’de verilmiştir (Israelachvili, 1991).

Lipid	Kritik Paketlenme Parametresi $v/a_0 l_c$	Kritik paketlenme Şekli	Yapısal Biçim
Büyük baş grup alanına sahip tek zincirli lipitler (surfaktantlar) : düşük tuzda SDS	$< 1/3$	Koni 	Küresel Miseller 
Küçük baş grup alanına sahip tek zincirli lipitler: yüksek tuzda SDS ve CTAB, iyonik olmayan lipitler	$1/3-1/2$	Deforme olmuş Koni 	Silindirik Miseller 
Akışkan zincirli, büyük baş grup alanına sahip çift zincirli lipitler: fosfatidil kolin (lesitin), fosfatidil serin, fosfatidil gliserol, fosfatidil inozitol, fosfatidil asit, sfingomiyelin, DGDG, dihegzadesil fosfat, dialkali dimetil amonyum tuzları	$1/2-1$	Deforme Olmuş Koni 	Esnek Çift tabakalı vesiküller 
Küçük baş grup alanına sahip çift zincirli lipitler, yüksek tuzda anyonik lipitler, doymuş stabil zincirler: fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin + $Ca^{2+}$	$\sim 1$	Silindir 	Düzlem Çift Tabakalar 
Küçük baş grup alanına sahip çift zincirli lipitler, iyonik olmayan lipitler, poli (cis) doymamış zincirler, yüksek T: doymamış fosfatidil etanolamin, kardiyopilin + $Ca^{2+}$ fosfatik asit + $Ca^{2+}$ , kolesterol, MGDG	$> 1$	Ters Deforme Olmuş Koni 	Ters Miseller 

Şekil 1.7 Lipitlerin kendi şekil faktörlerine bağlı olarak farklı kümelenme yapılarını oluşturmaları (Israelachvili, 1991).

Membran fonksiyonları için önemli olan lipit çift tabaka, diğer membran bileşenleri için iki boyutlu akışkandır. Hücre içi ve dışının sulu bir ortam olması membran lipitlerinin çift tabaka dışına çıkmalarını engeller. Akışkanlık bu moleküllerin hareket etmelerine, eksenleri etrafında dönmelerine ve termal hareketler ile çift tabaka düzleminde yer değiştirmelerine izin verir. Bu yer değiştirme membran düzleminde ani bir difüzyona neden olur.

Fosfolipit molekülleri çift tabakanın bir kısmından diğer kısmına oldukça nadir de olsa geçebilirler. Bununla birlikte belirli enzimler bu işlemi kolaylaştırır. “Flip-flop” adı verilen bu hareket çok yavaştır.

Bir hücre için membran akışkanlığı pek çok nedenden dolayı önemlidir. Akışkanlık membran proteinlerinin membran düzleminde yayılmasına izin verir ve proteinlerin sinyal iletimi gibi fonksiyonlar için gerekli olan birbirleriyle etkileşimlerine izin verir. Ayrıca hücre bölündüğünde membran bileşenlerinin hücreler arasında dengeli bir şekilde dağılmasını sağlar.

Lipit çift tabakaları faz geçişi adı verilen durum değişikliğine sahiptirler. Belirli sıcaklıklar altında ya da üzerinde donarlar ya da erirler. Düşük sıcaklıklarda lipitlerin hidrokarbon zincirleri sıkıca paketlenmiş durumdayken (jel faz) faz geçişi üzerinde lipit çift tabaka sıvı kristal ya da akışkan fazdadır. Faz geçişi membran lipitlerinin paketlenmesinde ve hareket yeteneğinde sıcaklığın neden olduğu değişimlerden ileri gelir. Lipit faz geçişinin meydana geldiği sıcaklık, lipitlerdeki yağ asitlerinin uzunluğu ve doymamışlık derecesi olmak üzere iki faktöre bağlıdır. Uzun zincirli lipitler yüksek sıcaklıklarda akışkan olurken, doymamış zincirler düşük sıcaklıklarda akışkan olurlar. Membran akışkanlığındaki artış, lipit moleküllerinin membran düzleminde lateral difüzyon yapabilmesi demektir. Lateral difüzyon oldukça hızlıdır ve lipitler saniyeler içinde hücrenin bir başından

diğerine difüz olabilirler. Bununla birlikte, “flip-flop” hareketi oldukça yavaş bir harekettir.

### **1.3.1 Biyolojik Membran Modelleri:**

Biyolojik membran modeli olarak iki tip deneysel çift tabaka lipit membran sistemi geliştirilmiştir. Birincisi; sulu solüsyon arasında var olan düzlemsel lipit çift tabaka membranı, ikincisi ise lipozom olarak bilinen lipit mikro vezikülleridir. İkinci sistemde küresel şekle sahip lipit çift tabaka sulu solüsyonu çevreler. Bu iki sistem birbirini tamamlayıcıdır ve biyomembranların özelliklerinin ve dinamik fonksiyonlarının anlaşılmasında katkıda bulunurlar.

Biyolojik membranların fiziksel ve fizikokimyasal olarak anlaşılması için moleküllerin ve moleküler kümelenmelerin, fonksiyonel özelliklere ve çeşitli konfigürasyon ayrıntılarına olan katkılarının değerlendirilmesi gerekmektedir. Biyolojik membranların karmaşıklığı nedeniyle bu tip ilişkileri anlamak oldukça zordur.

Model sistemler çalışılarak; lipitlerin, proteinlerin, karbohidratların yapısal ve fonksiyonel ilişkisi hakkında, sinyal iletimi, enerji transdüksiyonu ve transport gibi işlemlerin mekanizması hakkında daha ayrıntılı bilgi elde edilebilir.

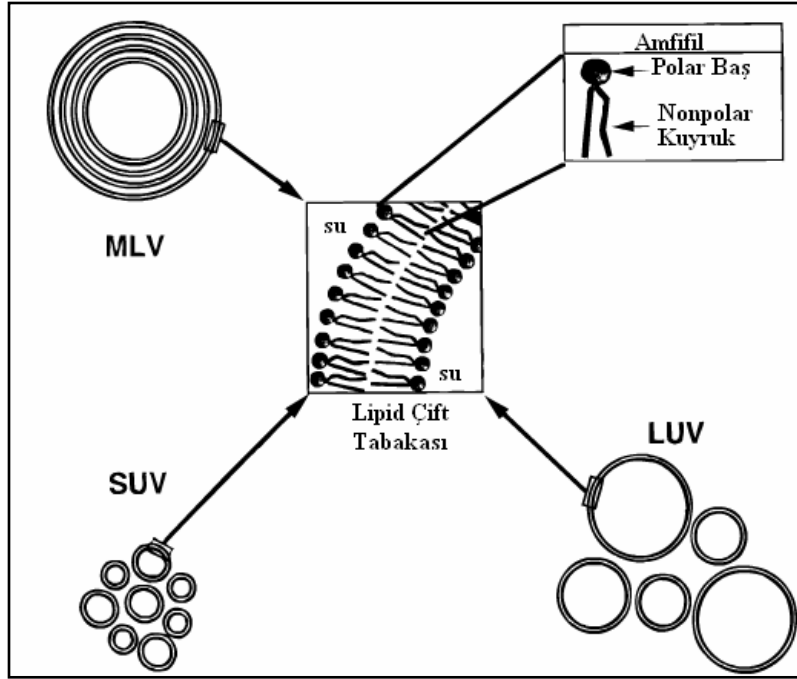
İyi bir deneysel biyomembran modeli için, kimyasal bileşim, membran kalınlığı, çevresel faktörler ve uygulama kolaylığı gibi bazı ölçütler gereklidir. Yapay model membranlar üzerinde yapılan çalışmalar biyolojik membranları anlamaya yönelik tamamlayıcı çalışmalardır.

### 1.3.1.1 Lipozomlar ve Lipozom Çeşitleri:

Biyolojik membran çalışmalarında en çok kullanılan ikinci tip model sistem, kapalı küresel lipit çift tabaka membranları ya da amfifatik lipitlerin sulu ortamda çalkalanmasıyla oluşan lipit mikro veziküllerdir.

Fosfolipit molekülleri lipozom adı verilen ve misellerden daha büyük olan küresel lipit çift tabakalar oluştururlar (Şekil 1.6d). Su içinde karıştırıldıklarında fosfolipitler kendilerini, benzer yerleşimde yan yana dizilerek ve hidrokarbon zincirlerin kuyrukları yukarıya gelecek, polar baş gruplar ise aşağıya gelecek şekilde ayarlarlar. Lipozomlar bir ya da birden fazla lipit çift tabaka içerebilirler. Bu veziküller dıştan içe doğru boyutları azalarak, eş merkezli fosfolipit çoklu tabakalı yapılar oluştururlar. Çift tabaka lipit membranlara benzer olarak lipozomlar, çoğunlukla fosfolipitlerin kullanıldığı doğal ve yapay lipitlerden hazırlanırlar. Bu fosfolipitler nötr ya da yüklü olabilirler. Lipozom hazırlarken, içerik sızıntısını engelleyerek stabiliteyi arttırmak için kolesterol de kullanılır. Lipozomlar 20 nm'den 100 µm' ye değişen çaplarda hazırlanabilirler.

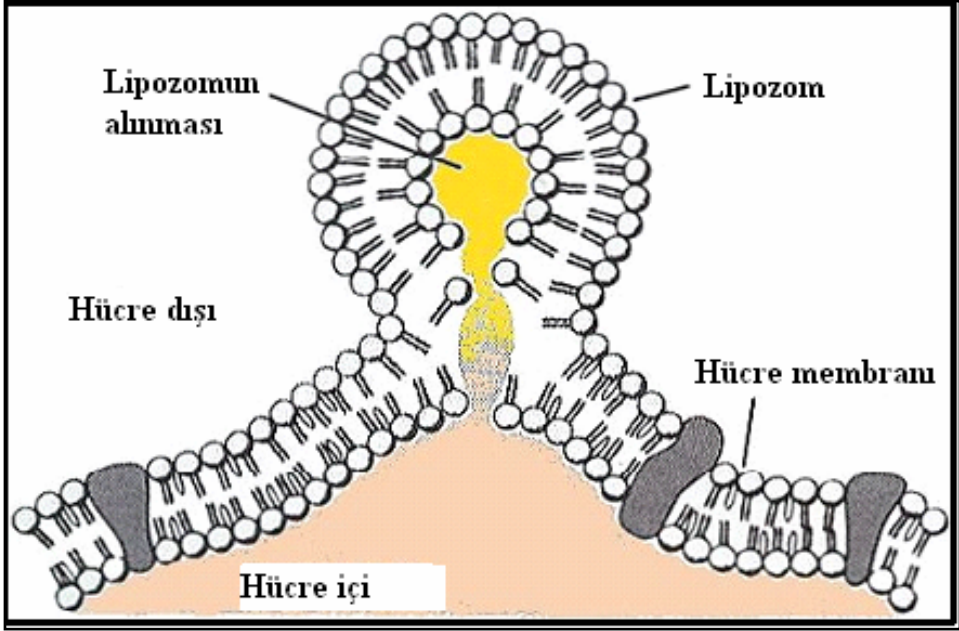
Tek katmanlı (unilamellar) veziküller boyutlarına göre iki sınıfa ayrılırlar; 1000 Å altındaki veziküller küçük tek katmanlı (Small Unilamellar Vesicles-SUV) veziküller olarak kabul edilir, bundan daha büyük çaplı veziküller ise büyük tek katmanlı (Large Unilamellar Vesicles-LUV) veziküller olarak adlandırılır. Tek katmanlı veziküller çok katmanlı (Multilamellar Vesicles-MLV) veziküllerden hazırlanır (Szoka and Papahadjopoulos, 1980). LUV'ler daha dayanıklı olup uzun süre saklanabilirler. SUV'ler ise vezikülü oluşturan lipitin faz geçiş sıcaklığının altında kolayca eriyip birbirleriyle kaynaşabildikleri için dayanıklı değildir (Şekil 1.8).



Şekil 1.8 Boyutlarına göre vezikül çeşitleri (Szoka and Papahadjopoulos, 1980).

Lipozom bileşenleri seçilirken fosfolipitlerin karakteristik jel-sıvı kristal faz geçişine uğradığı smektik mezofazlar oluşturduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu geçiş sıcaklığının altında, fosfolipitlerden oluşan veziküller katı yapıda, geçiş sıcaklığının üstünde ise veziküller akışkan yapıdadır (Chapman, 1975; Lee, 1975; Melchoir and Steim, 1976; Phillips, 1972). Geçiş sıcaklığı asil zincir uzunluğunun bir fonksiyonudur. Doymamış asil zincirlerin varlığı geçiş sıcaklığının düşmesine neden olur. Fosfatidilserin, fosfatidilgliserol gibi fosfolipitlerin baş grupları da bu geçiş sıcaklığı üzerinde etkiye sahiptir.

Lipozomlar oluşturulurken, lipitlerin, geçiş sıcaklıklarının üzerinde bir sıcaklıkta sulandırılması gereklidir. Lipozomlar farklı fosfolipit karışımlarından hazırlanabilirler.



Şekil 1.9 Lipozomun hücreye ilave edilmesi.

Lipozomlar ilaç taşıyıcıları olarak kullanılırlar. Bir lipozom sulu solüsyon üzerindeki bir bölgeyi sarıp kuşatabilir. Yapıları gereği hem hidrofilik hem de hidrofobik molekülleri taşıyabilirler. Moleküllerin gereken yere taşınması için lipozomlar hücre membranı ile kaynaşabilirler. Lipozomlar hücre membranının dış yüzeyine ulaştıklarında, membranın bir parçası olarak kabul edilirler (Şekil 1.9).

## 1.3.2 Moleküler Etkileşim Çeşitleri

### 1.3.2.1 Moleküler Etkileşme Enerjileri

Atom ve moleküllerin sıvı ve katı içinde nasıl organize olduğunu anlamamız açısından moleküller arası etkileşimler önemlidir. Maddeler; atomlar, iyonlar ve moleküller arasındaki etkileşmelere bağlı olarak bir araya gelip düzenlenmektedirler. Bu etkileşimler yüklerin türlerine bağlı olarak üç kategoride sınıflandırılabilirler. Coulomb etkileşimi, daimi yüklerin

elektrostatik etkisinden; van der Waals etkileşimi, komşu moleküllerin (atomların veya iyonların) indüklemesiyle ortaya çıkan ani polarizasyon etkisinden kaynaklanır. Üçüncü etkileşim türü de kuantum mekaniksel olarak ortaya çıkan kısa erimli güçlü bir itme etkisidir (Zhang et al., 2002; Kocevar, 2001; Mortimer, 1993).

### 1.3.2.1.1 Coulomb Etkileşimi

Coulomb etkileşimi yüklü parçacıklardan kaynaklanır ve yüklerin işaretine bağlı olarak pozitif veya negatif olabilir.

#### (i) İyon-iyon etkileşimi

$$E=(Z_1e)(Z_2e)/4\pi\epsilon_0x \quad (1.1)$$

Burada E etkileşme enerjisi,  $Z_1$  ve  $Z_2$  iyonların valans değeri (veya yüklerin sayısı),  $e$  elektronik yük,  $\epsilon_0$  boşluğun dielektrik sabiti ve  $x$  iki iyon arasındaki uzaklıktır (Zhang et al., 2002; Kocevar, 2001; Mortimer, 1993).

#### (ii) İyon-dipol etkileşimi

$$E=(Ze)\mu\cos\theta/4\pi\epsilon_0x^2 \quad (1.2)$$

Burada  $\mu$  dipol moment ve  $\theta$  merkez çizgisiyle dipol eksenini arasında kalan açıdır.

#### (iii) Dipol-dipol etkileşimi

$$E=(sabit)\mu_1\mu_2/4\pi\epsilon_0x^3 \quad (1.3)$$

Denklemdaki sabit değer dipoller arasındaki bağıl yönetime göre değişmektedir. Paralel dipoller için sabit 2 iken dipoller birbirine antiparalel olduğunda sabit -2 değerini alır. Dipollerin birbirlerine göre diğer yönelimleri için sabit  $\sqrt{2}$  olarak alınabilir (Zhang et al., 2002; Kocevar, 2001; Mortimer, 1993).

### 1.3.2.1.2 Van der Waals Etkileşimi

Komşu moleküller, atomlar veya iyonların etkisiyle ortaya çıkan ani polarizasyon van der Waals etkileşimin kaynağını oluşturmaktadır ve her zaman negatif yani çekici bir etkiye sahiptir.

(i) Kalıcı dipol-indüklenmiş dipol etkileşimi (Debye etkileşmesi)

$$E = (\alpha_1 \mu_2^2 + \alpha_2 \mu_1^2) / (4\pi\epsilon_0)^2 x^6 \quad (1.4)$$

Burada  $\alpha_1$  ve  $\alpha_2$  iki dipolün kutuplanabilirliğidir.

(ii) Kalıcı dipol-kalıcı dipol etkileşmesi (Keesom etkileşmesi)  
kutuplanabilirliğin dönme etkisinin ortalama katkısını içerir.

$$E = -(2/3) \mu_1^2 \mu_2^2 / (4\pi\epsilon_0)^2 kTx^6 \quad (1.5)$$

Burada k Boltzman sabiti ve T mutlak sıcaklıktır.

(iii) İndüklenmiş dipol-indüklenmiş dipol (London Etkileşmesi)

$$E = -(3h/3)[v_1 v_2 / (v_1 + v_2)] \alpha_1 \alpha_2 / (4\pi\epsilon_0)^2 x^6 \quad (1.6)$$

Burada  $h$  Planck sabiti ve  $\nu$  elektronun karakteristik titreşim frekansdır (Zhang et al., 2002; Kocevar, 2001; Mortimer, 1993).

### **1.3.2.2 Makroskobik Etkileşme Enerjileri**

Yukarıda atomların birbirleriyle etkileşmeleri durumunda ortaya çıkan kuvvetlerden bahsedilmektedir. Eğer birçok atomdan oluşan makroskopik yapılar varsa, bu durumda van der Waals çekim enerjisi her bir atomdan gelen katkıların toplamı olarak düşünülebilir.

Makroskopik cisimler arasındaki elektrostatik etkileşmeyi nicel olarak analiz etmek van der Waals etkileşimini analiz etmekten daha zordur. Genellikle yüklü yüzeyin iki bölgeden oluştuğu düşünülür ve bu çift tabaka yapısı olarak da adlandırılır (Zhang et al., 2002; Kocevar, 2001; Mortimer, 1993).

Toplam etkileşme enerjisi, elektrostatik itme ve van der Waals çekiminin toplamıdır. Yüksek yüzey potansiyeli için itme büyüktür ve toplam etkileşme pozitifdir. Birbirine yaklaşan parçacıkların enerjisi meydana gelen enerji engelini aşmaya yetemeyeceğinden parçacıklar birbirlerinden ayrı kalacaklardır. Düşük yüzey potansiyeli için itme güçlü değildir ve toplam etkileşme enerjisi çekicidir. Bu şartlar altında parçacıklar birleşik salkımlar meydana getirecek şekilde bir araya gelirler (Zhang et al., 2002; Kocevar, 2001; Mortimer, 1993).

### 1.3.2.3 Hidrojen Bağı, Hidrofobik ve Hidrofilik Etkileşmeler

*Hidrojen Bağı:* Su molekülü polar bir moleküldür ve tetrahedral bir yapıya sahiptir. Pozitif yüklü iki hidrojen atomu bir tarafa yönelirken, iki değerlikli oksijen atomu diğer tarafa (zıt yönde) yönelir. Pozitif polarize olan hidrojen atomu komşu elektronegatif atomlarla güçlü bir şekilde etkileşebilir ve elektrostatik bir bağ oluşur (hidrojen bağı). Genellikle karşılaşılan hidrojen bağı, su ile O, N, F ve Cl gibi elektronegatif atomlar içeren moleküller arasındadır (Mortimer,1993; Jönsson et al., 1999).

*Hidrofobik Etkileşme:* Su molekülü alkan, hidrokarbon ve florakarbon gibi rijit bir yüzeye yaklaştığında molekül yeniden düzenlenme gereği hisseder. Tetrahedral su molekülü üzerindeki dört yük yüzeyden dışarı doğru yönelirken molekül yeniden düzenlenir. Böylece su molekülü üzerindeki yükler rijit yüzeye etkileşimlerini minimize etmiş olurlar. Rijit yüzeye yakın su moleküllerinin yeniden bu şekilde düzenlenmesi su ile etkileşmeyi sevmeyen-sudan korkan (hidrofobik) bir tabaka oluşmasını sağlar. Hidrofobik hidrasyon sonucunda, polar olmayan moleküller ile yüzey arasında oluşan etkileşim hidrofobik çekim olarak adlandırılır. Enerjiyi minimize etmek için rijit yüzeye etkileşime giren su molekülleri serbest su molekülleriyle karşılaştırıldığında daha düzenli yapıda olacaklardır. Hidrofobik çekim kuvvetlidir ve uzun erimli olup daha önce bahsedilen van der Waals etkileşimi olarak göz önüne alınamaz (Mortimer,1993; Jönsson et al., 1999).

*Hidrofilik Etkileşme:* Belirli hidrofilik (suyu seven) moleküller ve gruplar (yükü iyonlar, moleküller, polar molekül ve gruplar, hidrojen bağ kapasiteli molekül ve gruplar) suda çözünürler ve su dışındaki molekülleri iterler. Sudan korkan moleküllerin tersine suyu seven (hidrofilik) molekül ve gruplar su ile etkileşim içinde olmayı tercih ederler. Bazen su molekülleri bu hidrofilik moleküllerle birleşebilir. Su içinde dağıldıklarında hidrofilik moleküller su ağıının düzenini artırmaktan çok azaltma eğilimindedirler (Mortimer,1993; Jönsson et al., 1999).

## 1.4 LİPİT ÇİFT TABAKA TERMODİNAMIĞI

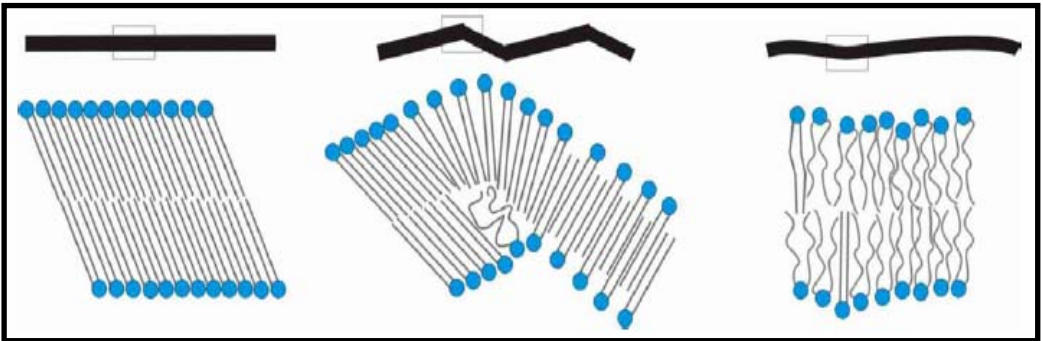
### 1.4.1 Lipit Fazları:

Fosfolipit fazları oldukça çeşitlidir. Saf maddelerin erimeleri gibi birinci dereceden faz geçişleri küçük bir sıcaklık aralığının üzerinde enerji emilimi sonucu meydana gelir. Termal enerjinin absorplanması bütün atomların titreşim enerjilerinin büyüklüklerindeki artış ile sonuçlanır. Başlıca sonuçlarından biri hidrokarbon zincirlerin all-trans konformasyonunun, baş grupların iyonik ağıını bozmak için gereken sıcaklığın altında bir sıcaklıkta rotasyonel izomerizasyon tarafından bozulmasıdır. Bu nedenle erime işlemi enerji gereksinimlerinden bağımsız olmak ya da geçiş sıcaklığı olmak üzere iki aşama gerektirir.

All-trans durumdan kısa yaşam süresine sahip diğer zincir konformasyonlarına geçiş, düzenden düzensizliğe, katıdan sıvıya, all-trans durumdan rotasyonel düzensizliğe ve jelden sıvı kristale gibi pek çok isim alır. Jel fazdan sıvı kristal faza geçiş, eriyen hidrokarbon zincirlerin sıvı kristal doğasında olması demektir. Burada moleküller sıvı fazın hareketsel özgürlük derecesine sahiptir bu da örneğin yığın özelliklerinde anizotropiye yol açar.

Fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin ve sfingomiyelinin erime noktaları diğer lipitlere göre hidrokarbon zincir uzunluğundan bağımsızdır. Diğer yandan baş grupları ile güçlü bir şekilde etkileşmeyen fosfatidik asitlerde erime işlemi tamamıyla hidrokarbon zincirler arasındaki kontak dağılımından oluşur ve zincirler arasındaki kuvvetler uzunluk ile arttığı için erime noktası da artar. Yüksek erime noktasına sahip amfifillerde bu değer önemli derecede hidrokarbon zincir uzunluğuna bağlıdır. Zincirlerin erimesi fosfatidik asidin erimesine benzerdir. Bu da zincirler arasındaki van der Waals kuvvetleri üzerinde termal enerjinin ne kadar önemli olduğunu gösterir (Silver, 1985).

Fosfakolinler gibi çift tabakalı yapılar oluşturan fosfolipitler için fazlar artan sıcaklıkla  $L_c/L_c'$ ,  $L_\beta/L_\beta'$ ,  $P_\beta'$  ve  $L_\alpha$  şeklinde değişir. Faz sembollerindeki (') işaret fazlardaki eğilmiş alkil zincirlerini ifade eder. En düşük sıcaklıklarda başka alt fazlar da vardır. Düşük sıcaklık  $L_c$  fazı, alkil zincirlerinin hepsinin trans konfigürasyonunda olduğu ve baş grupların da oldukça düzenli olduğu kristal benzeri bir fazdır (Raghunathan and Katsaras, 1995).



Şekil 1.10 Fosfolipit fazların şematik gösterimi (Fazların soldan sağa doğru sırası  $L_\beta$ ,  $P_\beta'$  ve  $L_\alpha$  şeklindedir. Yukarıdaki siyah barlar membranın enine kesitini göstermektedir) (Alakoskela, 2005).

Jel faz olarak adlandırılan  $L_{\beta'}$  fazı alkil zincirlerinin hepsinin *trans* konfigürasyonunda bulunduğu baş grup dipol örgüsünün ise düzensiz olduğu bir fazdır (Şekil 1.10).  $L_c$  ve  $L_{\beta'}$  fazlarındaki lateral difüzyon aşırı derecede yavaş olduğunda (Raghunathan and Katsaras, 1995), tekrar düzenlenme fazlar arasındaki geçişlerle ilgilidir. Sıcaklık arttığında fosfakolinler ve diğer fosfolipitlerde dalgalı jel benzeri bir faz olan  $P_{\beta'}$  fazına bir geçiş olur. Bu geçiş “ön geçiş” olarak adlandırılır ve bu geçişten hemen sonra sıvı kristal  $L_{\alpha}$  fazına geçiş olur.  $L_{\alpha}$  fazı karbon zincirlerindeki düşük konformasyonel düzen (daha düşük iç düzen) ve düşük öteleme düzeni (daha düşük paketlenme düzeni ve daha yüksek öteleme difüzyonu) ile karakterize edilir. Bu nedenle son zamanlarda sıvı-düzensiz faz ( $L_d$ ) tanımlanmıştır.

Sterolün en yaygın tipi olan kolesterolün eklenmesi, jel fazdan sıvı kristal faza geçişin hep birlikte olmasına engel olur. NMR çalışmaları bunun nedeninin başka bir denge fazı olan sıvı-düzenli ( $L_o$ ) fazına geçişin var olduğunu göstermiştir. Bu fazda hala jel fazdaki gibi yüksek konformasyonel düzen vardır fakat öteleme düzeni  $L_{\alpha}$  fazında olduğu gibi hala azdır (Meyer et al., 1997; Vist and Davis, 1990; Ipsen et al., 1987). Teorik çalışmalar (Nielsen et al., 1999), karbon zincirlerinin düzen-düzensizlik geçişleri ile paketlenmenin düzen-düzensizlik geçişlerinin birlikte olmasının gerekmediğini gösterir ki bu da  $L_o$  fazının oluşumunu destekler. Bununla birlikte, deneysel çalışmalar  $L_o$  fazının tek lipitten oluşan yapılarda bulunmadığını sadece sterol içeren ikili lipit sistemlerinde bulunduğunu göstermiştir.

$P_{\beta'}$  fazında, alkil zincirlerinin *trans*  $\rightarrow$  *gauche* izomerizasyonu,  $L_{\beta'}$  ve  $L_{\alpha}$  fazları arasında bir durumdadır.  $L_{\alpha}$  fazı *trans*  $\rightarrow$  *gauche* izomerizasyonun önemli derecede olduğu buna bağlı olarak da hızlı lateral difüzyonun olduğu akışkan bir fazdır. *Trans*  $\rightarrow$  *gauche* izomerizasyonun jel ve akışkan faz arasında ortada olduğu bilinirken, dalgalanmalardaki bu zincir

düzensizliğinin tam dağılımı belirsizdir (Nagle and Tristram-Nagle, 2000).  $P_{\beta}$  fazından ya da direkt olarak  $L_{\beta}$  fazından  $L_{\alpha}$  fazına geçiş esas faz geçişi olarak tanımlanır. Fazların bazı özellikleri Şekil 1.10'da gösterilmiş ve Çizelge 1.4'de listelenmiştir.

Lipid ve Özellikler	$L_{\beta}$ Fazında	$P_{\beta}$ Fazında	$L_{\alpha}$ Fazında
<b>DPPC'deki CF geçirgenliği için oran sabiti, <math>10^{-4}/s</math></b>	$\approx 0.1-0.2$	$\approx 2$	$\approx 3-4$
<b>alan/lipid <math>\text{\AA}^2</math></b>	(20°C) 47.9	(37°C) -	(50°C) 64
<b>DPPC</b>			
<b>hidrofobik kalınlık, <math>\text{\AA}</math></b>			
DPPC	34.4	-	28.5
<b>hacim/lipid <math>\text{\AA}^3</math></b>	(20°C)		(50°C)
DPPC	1142-1145	-	1228-1232
<b>termal alan genişliyebilirliği, <math>K^{-1}</math></b>			
DMPC	3	5800	6800
<b>elastik alan genişliyebilirlik genliği, <math>mN/m</math></b>			
DMPC	860	62	145 (at $T^*$ )
DMPC	526	500	476 ( $T-T_m=11^\circ C$ )
<b>1991 deki verilere göre gauge bağlarının kesri</b>	0-0.1	-	0.3
<b>IR spektradan elde edilen düzeltmeli MD</b>	-	-	0.28
<b>düzeltilmesiz MD</b>	-	-	0.22
<b>düzeltilmesiz MD</b>	-	-	0.14±0.04

Çizelge 1.4 Fosfokolin fazların karakteristikleri (Alakoskela, 2005).

Çizelge 1.4'de görüldüğü üzere farklı fazlarda sadece özellikler farklı olmayıp aynı zamanda bir fazdan diğer faza geçişlerdeki değişimler de keskindir.

#### 1.4.2 Lipit Faz Diyagramları:

Lipit faz diyagramları, sıcaklık, basınç ve bileşenler gibi termodinamik parametrelerin kombinasyonunda hangi lipit fazların oluşacağını gösterir. İkili lipit sistemleri oldukça karmaşık faz diyagramlarına sahiptirler, üçlü sistemler ise bunlardan daha fazlasına sahiptir. Gibbs Faz kuralı, P farklı

fazları sergileyen C bileşenli bir sistem için serbestlik derecesi sayısını ( $F^{\#}$ ) belirlemek için uygulanır:

$$P + F^{\#} = C + 2$$

Sadece suda oluşan lipit fazları göz önünde bulundurulduğunda su ihmal edilebilir bir bileşen olduğu için su konsantrasyonu için serbestlik derecesi yoktur. Ayrıca tek tabakalı sistemler dışında basınç genellikle göz önünde bulundurulur, böylelikle kalan serbestlik derecesi sayısı:

$$F = C - P + 1$$

Doğal membranlarda bulunan karmaşık bir lipit karışımının faz diyagramını oluşturabilmek mümkün değildir. Gibbs Faz kuralına göre, çok sayıda faz izinli olabilir. Belirlenebilir fazlara sahip basit sistemlerle çalışmak gerçek membranlarla ilgili bilgi edinebilmek için gereklidir. Bütün membranı kapsayan gerçek bir faz geçişi olmasa bile “lipit faz bölgeleri” (raft) nin oluşumu ya da membran proteinleri yakındaki “lipit erime” gibi lokal geçişler olabilir.

### 1.4.3 Faz Geçişleri:

Geçen yüzyılda büyük çaba sarf edilmesine karşın faz geçişleri fizik için hala temel bir problemdir. Uzun bir süre maddenin katı, sıvı ve gaz olmak üzere üç faza sahip olduğuna ve sadece bir erime geçişinin var olduğuna inanılmıştır. Sıvı kristal madde olan fosfolipitler çeşitli faz geçişleri sergilerler. Bunlardan bir kaçısı jel ve sıvı ve benzeri lamellar fazlardır. Fosfolipit esas faz geçişinde itici kuvvet asil zincirlerin konfigürasyonel entropisidir (trans  $\rightarrow$  gauche izomerizasyon).  $L_{\beta'}$  fazı için gauche bağlarının kesri sifıra yakındır,  $L_{\alpha}$  fazı için ise değerler 0.14 ve 0.3 arasında değişir (Çizelge 1.4) (Marsh 1991; Snyder et al., 2002). Bir gauche bağının bulunma olasılığı çift tabaka merkezine doğru artar. Bu artış gliserol iskeletine yakın olan ilk iki bağda yaklaşık olarak 0,1'den metilen sonlarında yaklaşık olarak

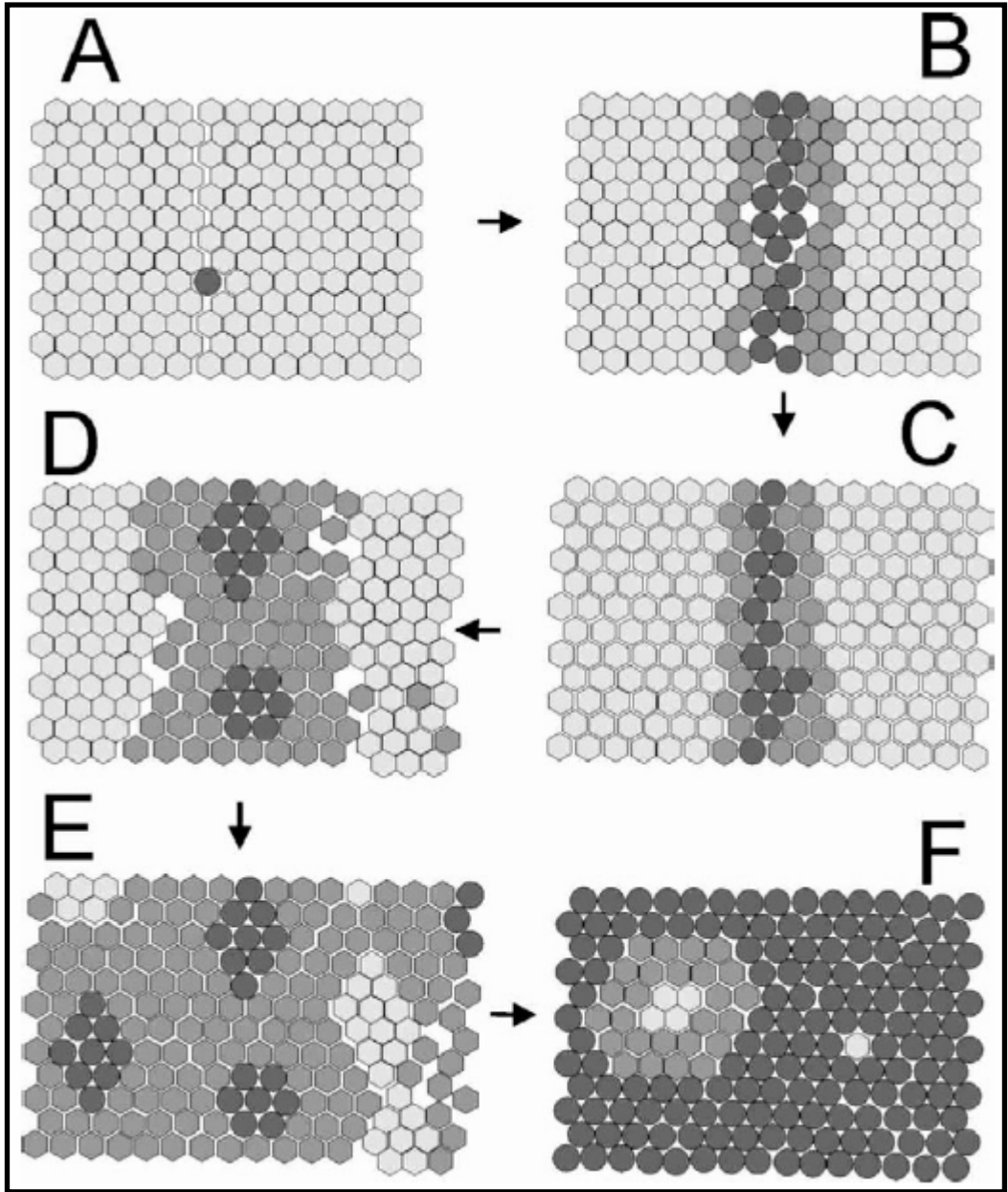
0.3' e kadar olur. Gauche bağlarının kesrindeki bu artış ve azalışlar sırasıyla zincir düzeninde azalış ve artışa denk gelir.

Gauche bağlarının faz geçişi süresince aniden artması durumunda alkil zincirleri kıvrılır. Bununla birlikte zincirlerdeki bükülme boşluk miktarını ve dolayısı ile de çift tabakaya su girişini arttırır. Bu nedenle çift tabaka hacmi yaklaşık % 4 artar (Heimburg, 1998). Buna göre çift tabakanın hem alanı hem de hacmi alkil zincirlerin düzeniyle, geçiş entalpisi de benzer olarak zincir düzeni ile ilişkilidir. Farklı fosfolipitler için bile genel sabit entalpi ( $\Delta H$ ) ve hacim ( $\Delta V$ ) değişimleri söz konusudur ve  $\Delta H$  eğrisi şekil olarak  $\Delta V$  eğrisine benzerdir, ısı kapasitesi ( $c_p$ ) eğrisi ise hacim izotermal sıkıştırılabilirlik ( $\kappa_T$ ) eğrisine benzerdir (Heimburg, 1998; Ebel et al., 2001; Halstenberg et al., 1998; Schrader et al., 2002).

Şekil 1.10' da gösterildiği gibi  $L_{\beta}$ ,  $P_{\beta}$  ve  $L_{\alpha}$  fazları ön ve esas faz geçişleri ile bağlantılıdır. Heimburg ön geçiş ve bununla ilgili değişen yapının erimiş asil zincirlere sahip fosfolipitler tarafından oluşan “çizgi defektleri” den kaynaklandığını vurgulamıştır. Buna göre erimiş ve erimemiş lipitler yüzeyi farklılaştırır (Heimburg, 2000). Model, MD simülasyonuna uymayan özellikler taşımaya karşın (Vries et al., 2005) Heimburg modeli, ön ve esas geçişler arasındaki bağlantıyı gösteren hem tek tabakalı hem de çok tabakalı veziküllerin geçişi için deneysel entalpi değişimlerini tekrar üretir. Ön geçiş çoklu tabakalı veziküllerde (MLVs) daha belirgin olmasına rağmen, tek tabakalı veziküllerde de gözlenir. Tek tabakalı veziküllerin ön geçişi ile ilgili entalpi, MLVs için olandan çok daha küçüktür ve dalgalı (ripple) yapının belirlenmesi kolay değildir (Heimburg, 1998; Lichtenberg et al., 1984; Mason et al., 1999 ). İri veziküllerden elde edilen tek tabakalı veziküller MLVs'den daha küçüktür ayrıca hacimsel olarak karşılaştırıldığında aşırı yüzey alanına sahiplerse şekil olarak çok daha kolay bozulabilirler.

Büyük tek tabakalı veziküllerdeki “çizgi defektleri” göz önünde bulundurulduğunda esas faz geçişinin üzerinde tek tabakalı fosfolipit veziküller neredeyse pürüzsüz küreler halindeyken, esas faz geçiş sıcaklığı  $T_m$  altındaki veziküller sadece kabataslak bir şekilde küreseldirler. Tek tabakalı veziküllerde bu defekt çizgileri başlangıç erimesinin yeri olabilir.

Fosfolipit çift tabakaların özellikleri esas geçişte süreksizlik gösterir (Çizelge 1.4). Fazlar arasındaki ayrılıklara ek olarak membran geçirgenliği, ısı kapasitesi ve lateral kompresibilite gibi bazı özellikler (Langner and Hui, 1993)  $T_m$ ' de maksimum olur. Bütün bunlar, jel ve akışkan lipit bölgelerinin oluşumuna öncülük eden kritik yoğunluk dalgalanmaları ile açıklanmaktadır. Bununla birlikte bütün bu açıklamalar floresans spektroskopisi sonuçları ile çelişir. Bu çalışmalar bu modelin yeterli olmadığını ve ayrıca faz sınırındaki lipit kesrinin yüksek olduğunu gösterir (Jutila and Kinnunen, 1997; Metso et al., 2003).



Şekil 1.11 Esas faz geçişi yakınlarındaki değişim şeması (Alakoskela and Kinnunen, 2004).

Bu görüşler Şekil 1.11’de gösterilmiştir. Esas faz geçişinin teorik modellerinde asil zincirlerin serbestlik derecesinin sabit olduğu varsayılmıştır. Bu durum fosfolipit baş gruplarının hareket yeteneğini ihmal eder. Fosfolipitlerin esas faz geçişleri birinci derece geçişlerdir (Mouritsen, 1991). Fosfolipit membranlar ayrıca esas geçiş dışında oldukça geniş dalgalanmalar gösterirler (Kharakoz and Shlyapnikova, 2000). Bu dalgalanmalara ikinci derece geçişler denir.

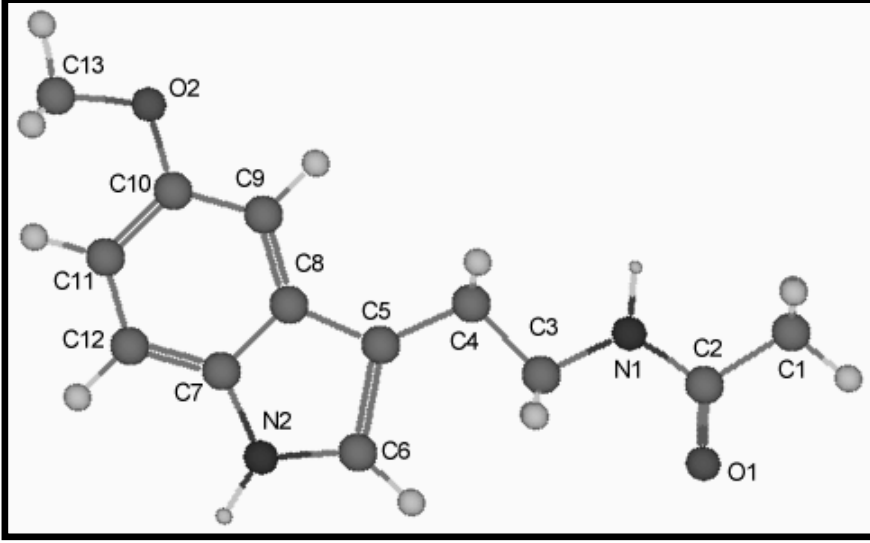
Lipitlerin faz davranışı, lipit-su ara yüzeyindeki değişimlerden ve lipit-su ara yüzeyi ile ilişkili moleküller ya da diğer parçacıklardan oldukça etkilenir (Boggs, 1987; Cevc, 1988; Söderlund et al., 1999). Faz geçişi asil zincir düzenindeki değişim ile ilgili olduğundan bu etkiler geçişin doğasını etkilemez. Geçişin nasıl ilerlediğine ilişkin molekül seviyesindeki ayrıntılar incelendiğinde lipit-su ara yüzey bölgesindeki değişimleri de dikkate almak önemlidir.

DMPC ve DPPC lipozomları üzerinde yapılan floresans (Jutila and Kinnunen, 1997; Söderlund et al., 1999), IR (Mellier and Diaf, 1988; Mellier et al., 1993) ve dielektrik spektroskopi (Enders and Nimtz, 1984) çalışmaları polar baş grup ve ara yüzey ile ilgili su organizasyonunun  $T_m$  altındaki sıcaklıklarda farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Aynı şekilde  $T_m$  üzerinde, kritik tek tabaka  $T^*$  sıcaklığı adında yeni tür bir kritik davranış gözlenmiştir. Bu sıcaklıkta kalan jel benzeri yapılar da ısınma etkisiyle kaybolur (Gershfeld, 1989a; Gershfeld, 1989b).

Membran özelliklerindeki pek çok farklılıklar bu sıcaklıkta meydana gelir ve bu değişimlerin ayrıca membran hidrasyonu ile de bağlantılı olduğu görülmektedir (Gershfeld and Ginsberg, 1997; Gershfeld et al., 1993; Jin et al., 1999; Koshinuma et al., 1999; Lehtonen and Kinnunen, 1994).

## 1.5 MELATONİN YAPI VE FOKSİYONU

Melatonin (N-Asetil-5 metoksitriptamin), pineal bezde üretilen ve pineal bezden salgılanan küçük bir lipofilik indoleamindir. Melatonin salgılanma periyodu karanlığın devam süresi ile orantılıdır.



Şekil 1.12 Melatoninin (N-Asetil-5 metoksitriptamin,  $C_{13}H_{16}N_2O_2$ ) Yapısı

Melatonin pek çok önemli fizyolojik fonksiyonda rol oynar. Pineal melatonin güçlü bir serbest radikal toplayıcısıdır. Organizmada yapılan son derece tahrip edici olduğu düşünülen hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ )'nin olumsuz etkisini engellemektedir (Petrosillo at al., 2009; Mahieu et al., 2009; Reiter, 1994; Beyer et al, 1998).

Antioksidantların çeşitli hastalıkların tedavisindeki rolünü anlayabilmek için, antioksidantların sağlıklı doku ve membrandaki etkisinin moleküler düzeyde iyice anlaşılması gerekmektedir. Biyolojik sistemlerin çok karmaşık olması nedeniyle araştırmalar genelde antioksidant-model membran etkileşimleri olarak yapılmaktadır. Antioksidantların gerçek doku ve

membranlarla etkileşmeleri ve bu etkileşmeleri doğuran faktörler ise henüz tam olarak bilinmemektedir.

Pineal bezden melatonin üretimi insan ve hayvanlarda yaşlanmayla birlikte belirgin olarak azalmaktadır (Iquchi et al, 1982; Reiter, 1993).

Melatoninin beyin elektriksel aktivitesini dengeleyici etkisi vardır. Melatonin verilmesi alfa beyin dalgalarının oluşumunu artırmış, uyku başlama sürecini kısaltmış, toplam uyku periyodu esnasında uykudan uyanış sayısını azaltmış ve uyku verimini arttırmıştır (Blask, 2009 ; Wright et al, 1986).

Melatoninin immün sistemin gücünü artırıcı ve kanser oluşumunu önleyici etkileri vardır. Melatonin insan ömrünü kısaltıcı etkiye sahip olan immün yetmezlik ve tümör gelişimini engellemekte ve dolayısıyla insan ömrü uzamaktadır (Alpert et al., 2009 ; Makay and Ünsal, 2009 ; Maestroni, 1993; Sandyk, 1990).

Melatonin DNA tamiri, membranlar ve diğer hücre içi bileşenlerin bakımı için gerekli olan guanin nükleotidlerin oluşumuna da katkıda bulunur (Brezinski, 1997). Melatoninin overyal steroid sentezinin modülasyonunda direkt gerekliliğinin olduğu bilinmektedir. Ayrıca insan folliküler sıvısındaki yüksek melatonin seviyeleri ve overlerdeki melatonin bağlayan bölgelerin varlığı, melatoninin, overyal fonksiyonlar üzerine bir modülatör olarak rol oynadığı hipotezini ortaya attırmıştır (Viswanathan and Schernhammer, 2009; Tamura et al., 2009).

Melatoninin kanser hacmini küçültücü yönde etkileri de mevcuttur. Kanser hücresi üzerine direkt etkisi de olup, meme kanserlerinde östrojenin mitojenik aktivitesini baskılamakta, antiostrojen bir ajan olan tamoksifenin etkisini taklit etmekte ve doğal tamoxifen olarak önerilmektedir (Blask, 2009 ; Reiter, 1994; Tamarkin et al, 1982; Blask, 1984). Merkezi sinir sistemi içerisinde melatoninin esas hedefi hipotalamustur. Melatonin verilmesi

hipotalamusta çeşitli metabolik değişiklikler meydana getirir. Melatonin DNA tamiri, membranlar ve diğer hücre içi bileşenlerin bakımı için gerekli olan guanin nükleotidlerin oluşumuna da katkıda bulunur (Brezinski, 1997). Melatonin amfifilik ve lipofilik bir moleküldür ve bütün morfofizyolojik bariyerlerden geçme yeteneğine sahiptir (Reither, 1993 ; Ceraulo et al, 1999). Membran akışkanlığı ile membran fonksiyonları arasında yakın bir ilişki vardır. Membran akışkanlığındaki çok küçük değişimler bile farklı fonksiyonlara ve patolojik proseslere neden olmaktadır. Bu nedenle antioksidan moleküllerin membran akışkanlığını dengeleyici etkisi membranların serbest radikal zararlarından ve membran fonksiyonlarının korunması açısından önemlidir (Dobretsov et al, 1977 ; Garcia et al, 1998).

Melatonin-membran etkileşimini daha iyi anlamak için daha fazla teorik ve deneysel çalışma gereklidir Bu tip çalışmalar melatoninin moleküler düzeyde anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

## **1.6 SPEKTROSKOPİ**

17. yüzyılda, ışığın prizmadan geçirilerek, renk tayfının elde edilmesiyle 'spektrum' kelimesi bilim dilinde kullanılmaya başlanmıştır. Buna bağlı olarak spektroskopi, bir kaynaktan salınan elektromanyetik ışınımın, farklı dalgaboyu bileşenlerine ayrılması yoluyla elde edilen tayfin incelenmesi ve çözümlenmesidir.

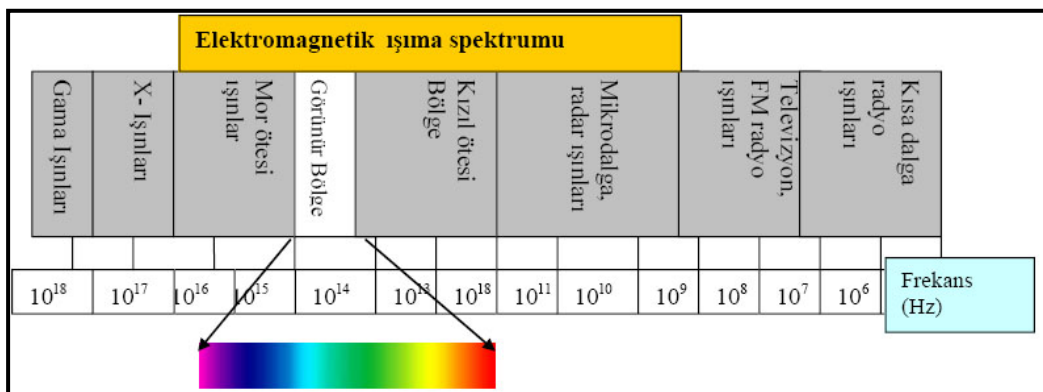
Spektroskopiye, yüklü veya yüksüz bir temel taneciğin madde ile etkileşmesini ve bu etkileşme sonucundaki olayları inceleyen bilim dalı olarak tanımlayabiliriz.

Spektroskopinin diğer bir tanımı ise, “bir numuneyle enerjinin etkileşmesini kullanan teknik” şeklindedir.

Bir organik maddenin yapısının aydınlatılmasında, bir kaç spektroskopik yöntemle elde edilen bilgiler kullanılabilir. Kullanım açısından en yaygın yöntemler şunlardır: Kızılötesi Spektroskopisi, Ultraviyole-Görünür ve Dairesel Dikroizm Spektroskopileri, Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi, Kütle Spektrometresi (KS) (Freifelder, 1982).

### 1.6.1 Elektromanyetik Spektrum

NMR, Vibrasyonel ve Elektronik Spektroskopiler, elektromanyetik spektrumun belirli bir bölgesini kullanırlar. Dolayısı ile buldukları bölgeye göre isimlendirilirler.



Şekil 1.13 Elektromanyetik Spektrum (Freifelder, 1982)

Kütle spektroskopisi, soğurma değil de, kütle sayısını ölçtüğü için elektromanyetik spektrumda gözükmez.

### 1.6.2 Kızıl Ötesi “Infrared” Spektroskopisi

Infrared spektroskopisi, görünür bölge ile mikrodalga bölge arasında kalan enerjinin moleküller veya kimyasal gruplar tarafından absorplanmasının ölçümüne dayalı bir yöntemdir.

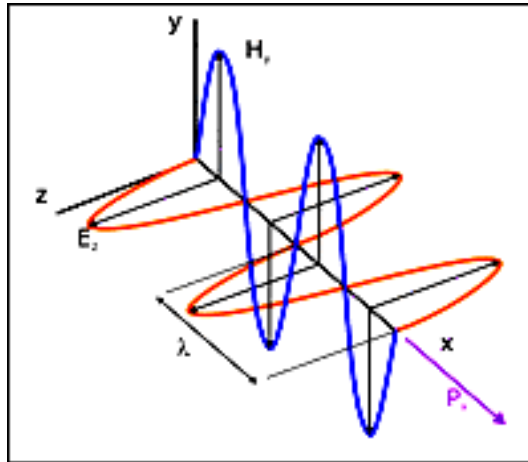
Dalga boyları, dalga sayısı ve frekanslarına göre kızılötesi ışınlar şu şekilde gruplandırılmaktadır;

<i>Bölge</i>	<i>Dalga boyu (<math>\lambda</math>)</i>	<i>Dalga sayısı (<math>\nu</math>)</i>	<i>Frekans</i>
<i>Yakın kızılötesi</i>	0,75-2,5 $\mu\text{m}$	12800 - 4000 $\text{cm}^{-1}$	$3,8 \times 10^{14}$ - $1,2 \times 10^{14}$ Hz
<i>Orta kızılötesi</i>	2,5-50 $\mu\text{m}$	4000 - 200 $\text{cm}^{-1}$	$1,2 \times 10^{14}$ - $6 \times 10^{12}$ Hz
<i>Uzak kızılötesi</i>	50-1000 $\mu\text{m}$	200 - 10 $\text{cm}^{-1}$	$6 \times 10^{12}$ - $3 \times 10^{11}$ Hz

Çizelge 1.5 Infrared ışınların dalga boyu, dalga sayısı ve frekans değerleri (Freifelder, 1982).

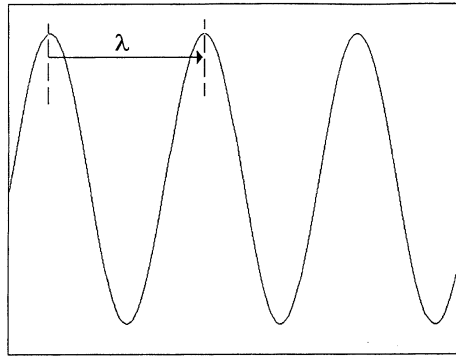
Organik bileşiklerde belirli bağ türleri bileşikten bileşiğe büyük farklılık göstermediği için bu yöntemin kullanılması ile bilinmeyen bir bileşikteki bağ türleri dolayısı ile fonksiyonel gruplar kolayca bulunabilir.

Infrared spektroskopisi, kızılötesi ışığın maddeyle etkileşimiyle ilgilidir. Işık, elektrik ve manyetik dalgalardan meydana gelir (Şekil 1.14). Bu iki dalga birbirlerine dik düzlemlerdedirler ve ışık dalgası uzayda elektrik ve manyetik dalgaları içeren düzlemlere dik düzlem boyunca hareket eder (Freifelder, 1982).



Şekil 1.14 Elektrik ve manyetik alan vektörleri düzlemsel gösterimi (Freifelder, 1982).

Elektrik vektörünün genliği zamanla değişir ve sinüzoidal iki dalga arasındaki tepe veya çukur aralığı olarak ifade edilir (Şekil 1.15). Işık dalgasının dalga boyu, ard arda oluşmuş iki dalga tepesi (veya çukuru) arasındaki mesafedir. Dalga boyu  $\lambda$  (lamda) ile gösterilir. Işığın dalga sayısı, dalga boyunun tersidir ve  $\nu=1/\lambda$  ile ifade edilir.  $\lambda$  cm cinsinden ölçülürse,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  ile ifade edilir.  $\nu$ , bir santimetre içerisindeki dalga sayılarını yani dalganın tepe veya çukurlarının sayısını verir. Dalga sayıları tipik olarak kızılötesi spektroskopide kullanılırlar (Freifelder, 1982) .



Şekil 1.15 Işık dalgası örneği. Ok ile gösterilen ard arda oluşan tepeler arasındaki mesafe dalga boyu olarak bilinir.

Işık dalgasının dalga sayısı, enerjisi ile doğru orantılıdır;

$$E = h c \nu$$

Burada:  $E =$  Işığın enerjisi  
 $c =$  Işığın hızı ( $3 \times 10^8$  metre/saniye)  
 $h =$  Planck sabiti ( $6.63 \times 10^{-34}$  Joule.saniye)  
 $\nu =$  dalga sayısı

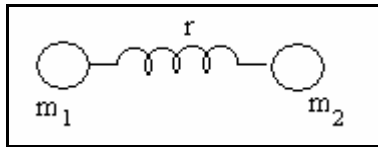
Formülden de anlaşılacağı gibi yüksek dalga sayısına sahip ışık, düşük dalga sayılı ışığa göre daha çok enerjiye sahiptir.  $4000$  ve  $400 \text{ cm}^{-1}$  aralığındaki ışık, orta büyüklükte kızılötesi ışın olarak tanımlanmaktadır.

Evrendeki tüm nesnelere mutlak sıfır sıcaklığında kızılötesi radyasyon

verirler. Kızılötesi ışın madde ile etkileştiğinde, madde tarafından emilerek kimyasal bağların titreşimine sebep olur. Kızılötesi soğurumun gerçekleşmesi için gerekli şart materyaldeki kimyasal bağların varlığıdır. Fonksiyonel grup olarak adlandırılan moleküllerin kimyasal yapısındaki bozunum, kızılötesi ışın soğurumu ile ilgilidir. Örneğin, ketonlar, aldehitler ve karboksilik asitlerde  $1700 \text{ cm}^{-1}$  'de C=O karbon grubu yayılımı oluşur. Buradan, kızılötesi ışın emilimi yapan molekülün dalga sayısı ile yapısı arasında bir korelasyon olduğu anlaşılır. Bu korelasyon, molekülün kızılötesi spektrumundan, yapısı bilinmeyen moleküller hakkında bilgi sahibi olma olanağı sağlar. Bu aynı zamanda kızılötesi spektroskopisinin kullanılma amacının açıklamasıdır.

Dalga sayısına karşılık ölçülen kızılötesi ışının şiddetinin oluşturduğu grafiğe kızılötesi spektrum adı verilir. IR spektrofotometreleri dalga boyuna veya dalga sayısına karşı absorpsiyonu ya da geçirgenliği kaydederler.

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



Yayla tutturulmuş iki kütleye dışarıdan bir kuvvet uygulayarak kütleleri denge konumundan uzaklaştırırsak aradaki uzaklık  $\Delta r$  kadar değişecektir. Hooke kanununa göre sistem bu değişikliğe ters yönde etkiyen bir  $f$  kuvvetiyle karşı koyacak ve salınımına geçecektir.  $f$  'in büyüklüğü  $\Delta r$  ile orantılıdır.

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

Burada “ $k$ ” ya ‘kuvvet sabiti’ adı verilir. Molekül sistemlerinde de bağ kuvvetinin bir göstergesidir. Mekanik modelde molekül arasındaki benzerlik tam değildir. Mekanik modelde enerji değişimi süreklilik gösterirken moleküler sistemlerde enerji seviyeleri belirli kuantumlara ayrılmıştır. Kuantum mekaniğinde de basit harmonik salınım yapan bir moleküldeki enerji seviyeleri;  $E_n = h\nu (n+1/2)$  bağıntısı ile verilmektedir.

Bu bağıntıda  $n$  titreşim kuantum sayısını göstermekte ve  $0,1,2,3,\dots$  gibi sayısal değerler alabilmektedir.  $h$  planck sabiti,  $\nu$  temel titreşim frekansıdır.

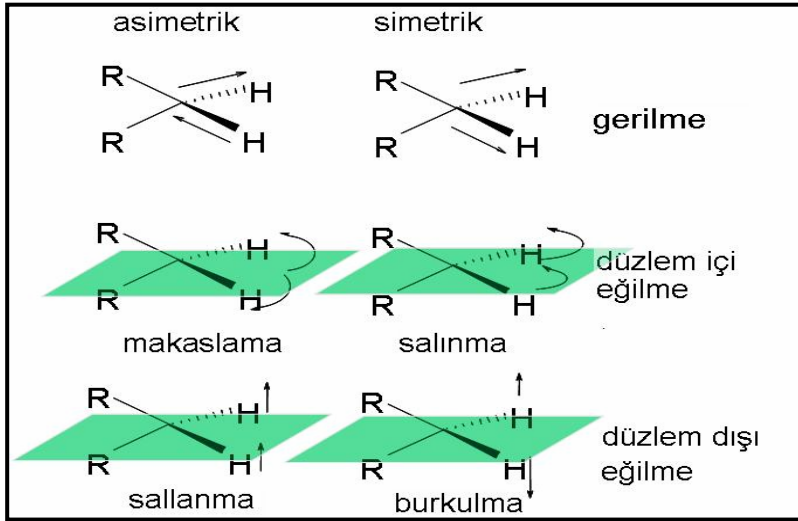
$n = 0$  olduğu zamanki titreşim enerjisine;  $E_0 = 1/2 h\nu$  sıfır nokta enerjisi denir (Stuart, 2004).

### 1.6.3 Titreşim Şekilleri

Bir moleküldeki atomların birbirine göre yerleşim durumları tam olarak sabit olmayıp, moleküldeki bağlar etrafında çok sayıda titreşim ve dönme sonucu devamlı değişir. Basit iki veya üç atomlu bir molekül için, böyle titreşimlerin sayısını, özelliğini ve bu titreşimlerle absorplanan enerji arasındaki ilişkiyi açıklamak kolaydır. Böyle bir analiz, çok sayıda atomdan meydana gelen moleküller için imkânsız değilse bile zor olur. Büyük

moleküllerde sadece çok sayıda titreşim merkezi bulunmaz, ayrıca bazı titreşim merkezleri arasında etkileşim de söz konusudur ve bu etkileşimlerin de göz önüne alınması gerekir.

Titreşimler *gerilme* ve *eğilme* denilen iki grupta toplanabilir. Gerilme titreşiminde iki atom arasındaki bağ eksenini boyunca atomlar arasındaki uzaklığın devamlı değişmesi söz konusudur. Asimetrik ve simetrik olmak üzere iki şekilde meydana gelir. Eğilme titreşimleri ise iki bağ arasındaki açının değişmesi ile karakterize edilir ve dört tiptir: *Makaslama*, *sallanma*, *salınma* ve *burkulma*. Titreşim tipleri Şekil 1.16'da şematik olarak görülmektedir.



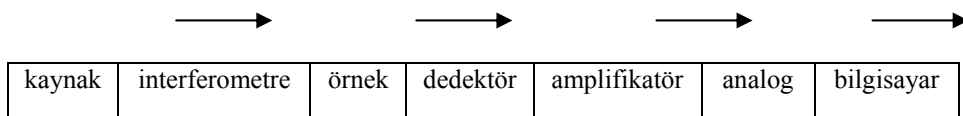
Şekil 1.16 Titreşim Şekilleri (Stuart, 2004).

Şekilde gösterilen titreşim tiplerinin hepsi ikiden fazla atom içeren bir molekülde mümkündür. Ayrıca, titreşimler tek bir merkez atomundaki bağlarla ilgili ise titreşimlerin etkileşimi veya örtüşmesi meydana gelebilir. Etkileşme sonucu mevcut titreşimlerin özelliklerinde bir değişme olur (Stuart, 2004).

### 1.6.4 Fourier transform infrared (FTIR)

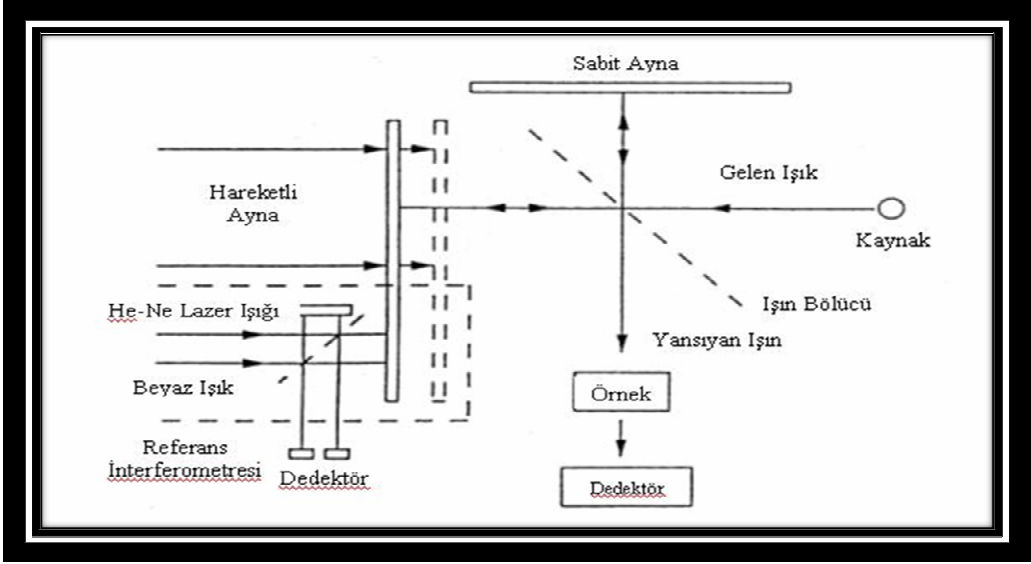
FTIR aletindeki ana fikir bir interferogram üretmektir. İnterferogram, iki ışın arasındaki radyasyonun girişiminden meydana gelen bir sinyaldir ve bu iki ışının arasındaki yol farkında meydana gelen değişimin bir fonksiyonu olarak tanımlanır.

Tipik bir FTIR spektrometresinde yer alan temel bileşenler Çizelge 1.6'da gösterilmiştir. FTIR spektrometresinde çoğunlukla Michelson interferometresi kullanılır (Şekil 1.17). Bu interferometre, biri sabit diğeri ise hareketli olan birbirine dik iki ayna ve bu iki aynanın yüzeylerini ikiye bölen yarı yansıtıcı bir aynadan (ışın bölücü) oluşur. Işın bölücü, kaynaktan (orta-infrared bölgesi için çoğunlukla kullanılan Globar – silikon karbid – kaynağı) gelen ışını iki eşit parçaya böler. Bu iki parça daha sonra iki ayna yüzeyine gider, burada yansır ve tekrar birleşmek ve girişim oluşturmak için ışın bölücüye dönerler. Işın bölücüdün çıkan toplam ışın örnek içinden geçer ve FTIR spektrometresinde toplanır.



Çizelge 1.6 FTIR spektrometre bileşenleri (Stuart, 2004).

Hareketli aynanın oynadığı rol, iki ışın arasında optiksel bir yol farkı oluşturmaktır. Eğer iki yol uzunluğu aynı ise, iki ışın yol farkı  $n\lambda$  ya eşit ve aynı fazda olacaktır ve bütün frekanslar için yapıcı bir şekilde tekrar birleşeceklerdir. Fakat iki ışın arasında  $(n+1/2)\lambda$  yol farkı olursa o zaman yıkıcı bir şekilde etkileşecekler ve girişim frekansa ve aynanın hareket uzaklığına bağlı olacaktır. Sonuçta bir interferogram oluşur (Stuart, 2004).



Şekil 1.17 Michelson interferometresi (Stuart, 2004).

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

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

Monokromatör kullanılmayan FTIR da yayılan tüm dalga boylarındaki ışık bir bilgisayar tarafından analizlenmektedir. Pulsar halinde gönderilen ışın her dalga boyunda ayrı ayrı bilgisayarca analizlenerek absorpsiyonlar toplanmaktadır. Böylelikle zayıf absorpsiyon değerleri bile büyük duyarlılıkla ölçülmektedir (Stuart, 2004).

### 1.6.5 FTIR Spektroskopisinin Diğer Biyofiziksel Tekniklere Göre Avantajları

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

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

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

FTIR spektroskopisinin avantajları şu şekilde özetlenebilir (Haris and Severcan, 1999):

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

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

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

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

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

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

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

- *In vivo* membran çalışmaları da mümkündür.

Yukarıda bahsedilen avantajlar FTIR'ı membran çalışmaları için uygun kılar (Severcan et al., 2005, Sahin et al., 2007, Korkmaz and Severcan, 2005, Kazanci and Sevecan, 2007). Biyolojik örneklerde her zaman varolan suyun, infrared spektrumunu önemli derecede absorblaması tekniğin en önemli dezavantajıdır. Bu nedenle suyun kuvvetli soğurma bandı biyolojik sistemler ile ilgili bazı bandların iyi ayrışmamasına neden olur. Bu durumdan doğan sorunların üstesinden gelmek için su bandının biyolojik örnek bandından çıkarılması gerekmektedir. Diğer bir metod da örnekleri D<sub>2</sub>O çözücü içinde hazırlamaktır. Bu durumda D-H değişimi hesaba katılmalıdır.

### 1.6.6 İncelenen Kızıl ötesi Spektral Bölgeleri

Bu çalışmada hidrokarbon kuyruğu temsil eden karbon- hidrojen (C-H) gerilme bandları ve baş grubu temsil eden karbonil titreşim bandları incelenmiştir.

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

Çizelge 1.7 Lipitlerin karakteristik infrared bandları (Stuart, 2004).

Karbon-hidrojen gerilme titreşimleri 2800-3100  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesindeki bantlara, karbonil gerilme titreşimleri de 1700-1750  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesindeki bantlara neden olur (Çizelge 1.7).

İncelenen bütün titreşimler, sıcaklığa bağlı olarak frekans ve band genişliğinde değişim gösterir ve bu da moleküler düzeyde yapısal ve fonksiyonel değişimlere karşılık gelir (Stuart, 2004).

## **1.6.7 FTIR Spektroskopik Membran Araştırmalarında Kullanılan Ampirik Kurallar**

### **1.6.7.1 $\text{CH}_2$ Antisimetrik Gerilme Bandları**

Fosfolipitin asil zincirlerini yani hidrokarbon kuyruğu temsil eden karbon-hidrojen gerilme bantlarından en güçlü olanı 2920  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesinde gözlenen  $\text{CH}_2$  Antisimetrik gerilme bantlarıdır.

$\text{CH}_2$  Antisimetrik titreşim modunun frekansının sıcaklığa bağlı değişimleri bir yapısal bilgi olan fosfolipitin hidrokarbon zincirinin düzeni (trans veya gauche durumu) hakkında bilgi verir. Frekans değerlerinin yüksek dalga sayısına kayması gauche sayısındaki artıma yani lipit asil zincirinin esnekliğinin artmasına, diğer bir değişle sistemin düzensizliğinin artmasına karşılık gelir. Frekans değerlerinin düşmesi trans konformerlerinin artmasına, dolayısı ile sistemin düzeninin artmasına karşılık gelir (Umemura et al, 1980; Casal and Mantsch, 1984; Cameron and Charette, 1981; Flach et al, 1993, Severcan, 1997).

$\text{CH}_2$  Antisimetrik titreşim modunun band genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimleri ise titreşim ve torsiyonel hareketlerdeki değişime karşılık gelir.

Band genişliğinin artması lipit membran dinamiğinin (akışkanlığının, lipit mobilitesinin) arttığını gösterir. Band genişliği azaldıkça membran

dinamiği (akışkanlığı, lipit mobilitesi) azalır (Toyran and Severcan, 2002, 2003; Lopez-Garcia et al, 1993, Severcan et al., 2005).

#### **1.6.7.2 CH<sub>2</sub> Simetrik Gerilme Bandları**

Fosfolipitin asil zincirlerini temsil eden karbon-hidrojen gerilme bandlarından diğer bir güçlü olanı 2850 cm<sup>-1</sup> çevresinde gözlenen CH<sub>2</sub> simetrik gerilme modudur. Bu bandın frekansının ve band genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme bandıyla aynı özellikleri taşır (Stuart, 1997).

#### **1.6.7.3 C = O Gerilme Bandları**

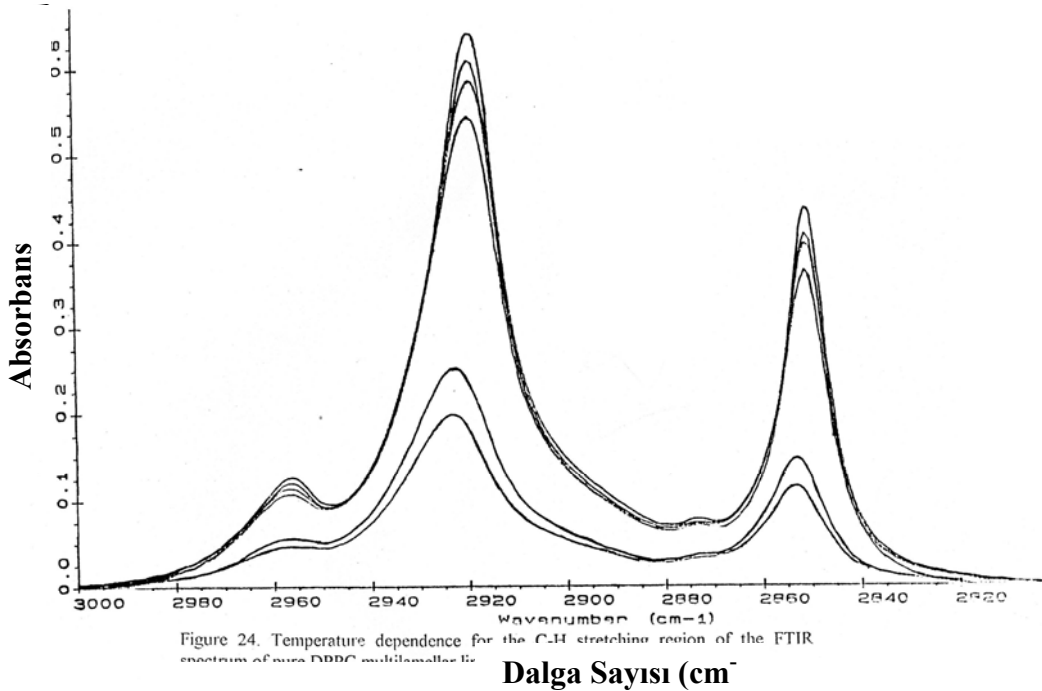
Fosfolipitin baş grubunu temsil eden karbonil titreşim bantı 1735 cm<sup>-1</sup> çevresinde gözlenen C = O gerilme modudur. C = O gerilme modunun frekansının ve band genişliğinin sıcaklığa bağlı değerleri hidrojen bağlanmasının tabiatı hakkında bilgi verir. Frekansın düşük değerlere kayması hidrojen bağlanmasının kuvvetli olduğunu gösterir. Frekansın yüksek değerlere kayması karbonil grubun dehidrasyonunun arttığını yani serbest C=O gruplarının arttığını gösterir. Band genişliğindeki değişim C=O bölgesi civarında membran dinamiği hakkında bilgi verir (Lewis et al, 1990; Toyran and Severcan, 2003; Jackson and Mantsch, 1993, Severcan et al., 2005).

#### **1.6.7.4 PO<sub>2</sub><sup>-</sup> Antisimetrik Gerilme Bandları**

Bu band da C = O gerilme bandı gibi fosfolipitin baş grubunu temsil eden, 1220-1260 cm<sup>-1</sup> spektral bölgesinde gözlenen fosfat bandıdır. P=O gerilme bandının etkileri C = O gerilme bandı ile aynı özellik taşımaktadır (Lopez-Garica et al, 1993; Casal et al, 1989; Kan-Zhi et al, 1996, Sahin et al, 2007, Korkmaz and Severcan, 2005).

### 1.6.7.5 Asil (Hidrokarbon) Zincirlerin Spektral Karakteristiği

Şekil 1.18 DPPC multilamellar çift tabakanın, farklı sıcaklıklarda, C – H gerilme bölgesindeki spektrumunu gösterir. Bu şekil, sıcaklıklardaki değişimlerin, pik pozisyonunda, pik yüksekliğinde ve C – H gerilme bandlarının band genişliğinde önemli değişiklikler ürettiğini gösterir. Genelde, pik yüksekliği artan sıcaklık ile azalır. CH<sub>2</sub> antisimetrik ve simetrik gerilme bantları, jel fazda nispeten bir dereceye kadar keskindir. Sıvı kristal faza dönüşümde, bu bantlar genişler ve absorpsiyonları daha yüksek dalga sayılarına kayar. Sulu lipit topluluklarının en yaygın yapısı, düzenli, rijid jel faz ve daha akışkan, düzensiz sıvı kristal faz gibi iki fiziksel durumda bulunabilen çok katlı yapıdır. Bu iki durum arasındaki sıcaklık kaynaklı geçiş, yani jelden sıvı kristal faza geçiş, infrared spektrumunda önemli değişimler üretir. Şekil 1.18'den de görüldüğü gibi; pik pozisyonunda ve band genişliğindeki ani artış ve pik yüksekliğindeki ani bir azalış yaklaşık 41 °C civarında gözlenir (Casal and Mantsch, 1984). Bu geçiş hidrokarbon zincirlerinin erimesine karşılık gelir ve bu nedenle de bazen zincir erime faz geçişi olarak da ifade edilir. Bu durum asil zincirlerde yapısal düzensizliğin (gauche konformerleri) başlangıcına neden olur. Band genişliğindeki değişimler de asil zincirlerin hareket hızlarındaki değişimlere bağlıdır (Asher and Lewin, 1977; Casal et al., 1980).



Şekil 1.18 DPPC çok katmanlı lipozomların C – H gerilme bölgesinin farklı sıcaklıklardaki FTIR spektrumu.

### 1.7 DİFERENSİYEL TARAMA KALORİMETRESİ (DSC)

Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC), biyolojik sistemleri de içeren, çeşitli materyallerin termal özelliklerini belirlemede kullanılan bir tekniktir. DSC'nin başlıca uygulamaları biyolojik membranların faz geçiş sıcaklıkları ve entalpileri üzerindeki kompozisyon, hidrasyon, pH ve çözücü etkilerini belirlemektir (Ceckler ve Cunningham 1997).

DSC, aynı sıcaklıkta tutulan bir örnek ve bir referans hücresine sahiptir. Örnek ve referans hücrelerinin sıcaklıkları, her iki hücre aynı sıcaklıkta kalacak şekilde kontrollü bir şekilde artırılır. Her iki hücreyi ısıtmak için uygulana güç işlem süresince görüntülenir. Örnek hücresinde faz geçişi olduğunda, iki hücreyi ısıtmak için ihtiyaç duyulan güçte bir fark oluşur. Her iki hücreyi aynı sıcaklıkta tutmak için gerekli güç ölçülür ve sıcaklığa

karşı ısı kapasitesi eğrisine dönüştürülür. Bu eğri, geçiş sıcaklığı  $T_m$ , geçiş entalpisi  $\Delta H$  gibi değerlerin belirlenmesi için analiz edilir (Ohline et al, 2001).

Jel fazdan sıvı kristal faza geçiş gibi birinci derecede faz geçişleri için, geçiş sıcaklığı  $T_m$  maksimum değerine ulaşır. Faz geçişi için kalorimetrik entalpi değeri ( $\Delta H_{cal}$ ) pik altındaki alanın integralinin alınması ile belirlenir.

$$\Delta H_{cal} = \int C_p dT$$

$C_p$  ısı kapasitesidir. Faz geçiş entalpisi ise

$$\Delta H = \Delta H_{cal} / T_m$$

ile belirlenir.  $\Delta H_{cal}$ ,  $\Delta H$  ve  $T_m$  değerlerinin kıyaslanması yapısal değişimlerin (zincir uzunluğu gibi) faz geçiş termodinamiği üzerindeki etkisini gösterir.

Diferansiyel Tarama Kalorimetresi ( DSC ) termoanalitik bir tekniktir. Bu teknikteki esas amaç, örnek ve referansın sıcaklığını arttırmak için gerekli ısı miktarını, sıcaklığın fonksiyonu olarak ölçmektir. Örnek ve referans, deney boyunca hemen hemen aynı sıcaklıkta kalır. Genel olarak, DSC analizi için geliştirilen sıcaklık programı, örnek kabının sıcaklığının, zaman fonksiyonu ve lineer olarak artacak şekilde tasarlanmıştır. Referans kabının iyi tanımlanmış bir ısı kapasitesi olması gerekir. Burada ısı kapasitesi, bir maddenin bir molünün ya da bir gramının sıcaklığını (faz da bir değişim olmaksızın)  $1^\circ\text{C}$  arttırmak için gerekli ısı miktarıdır. Bu tekniğin temel prensibi şudur: Örnek, faz geçişi gibi fiziksel bir transformasyona uğradığında, referans ile aynı sıcaklığa sahip olabilmesi için, örneğin içinden daha az ya da daha fazla ısı geçmesi gerekmektedir. Örneğin içinden geçecek ısının az ya da fazla olması, işlemin ekzotermik veya endotermik olmasına bağlıdır.

Ekzotermik bir reaksiyonda dışarıya ısı salınır. Kimyasal denklem olarak göstermek gerekirse;



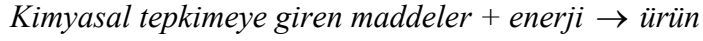
Ekzotermik bir reaksiyonda, bir bağı bozmak için absorbe edilen toplam enerji, bir bağı oluşturmak için salınan toplam enerjiden daha azdır. Diğer bir deyişle, reaksiyonun oluşması için gerekli enerji, toplam enerjiden daha azdır. Bunun sonucu olarak, ekstra enerji genellikle ısı formunda salınır. Bir kalorimetri kullanıldığında, kalorimetrisinin ısısında ki değişimin, sistemin ısısında ki değişimin tersine eşit olduğu görülür. Bu demektir ki, reaksiyonun yer aldığı ortam ısı elde ediyorsa, reaksiyon ekzotermiktir. Kimyasal bir sistemde, mutlak enerji miktarının ölçülmesi veya hesaplanması oldukça zordur. Bunun yerine kimyasal bir reaksiyonun entalpi değişimi  $\Delta H'$  ı ölçmek ya da hesaplamak daha kolaydır. Entalpi bir sistemin termodinamik fonksiyonudur, ölçülen ve hesaplanan  $\Delta H$  değerleri, bağ enerjisine şu şekilde bağlanır;

$$\Delta H = \text{bağ bozulması reaksiyonlarında kullanılan enerji} - \text{bağ yapılmasında salınan enerji}$$

Bu tanımlama ile entalpi değişimi değeri negatiftir ( $\Delta H < 0$ ). Entalpi değişiminin negatif olmasının nedeni, reaksiyondan salınan enerji değerinin, reaksiyon için kullanılan enerji değerinden daha büyük olmasıdır.

Endotermik bir reaksiyonda ise kimyasal tepkimeye katılan maddeler üründen daha az enerjiye sahiptir ve bu nedenle de genellikle ısı formunda olan bir enerji girdisine ihtiyaç vardır. Kimyasal bir işlemde, kimyasal tepkimeye katılan maddelerin bağlarının bozulması için bir enerji (aktivasyon enerjisi) girişine ihtiyaç duyulmasına karşın bağların oluşması için salınan enerji, ürünlerdeki bağların bozulması için gerekenden daha azdır. Bu nedenle, ürünlerdeki bağlanma elektronları, kimyasal tepkimeye giren maddelerden daha yüksek bir enerji seviyesindedir. Maddeleri çevreleyen materyallerin ısı enerjisi genellikle bağlarını bozan enerjidir, çünkü ısı

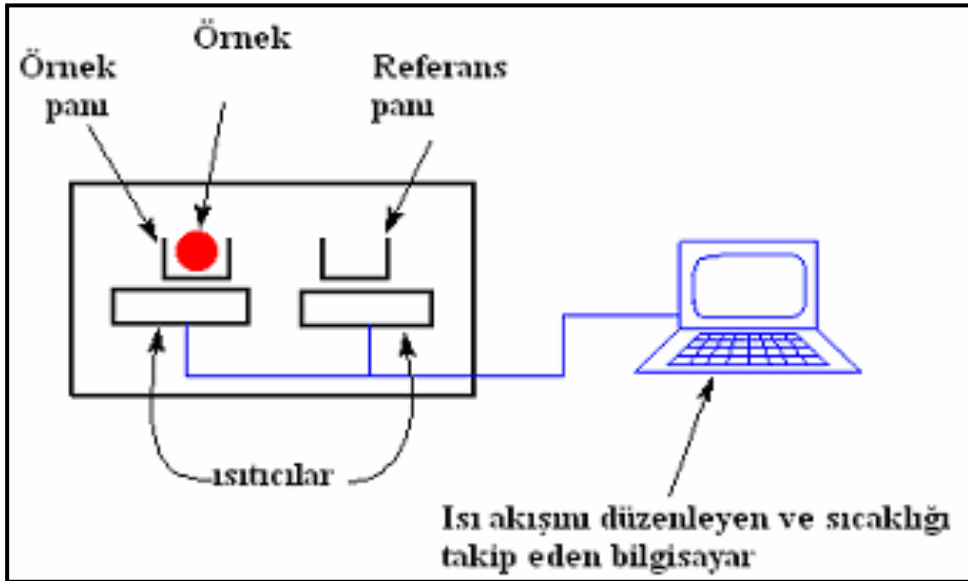
enerjisi, kimyasal tepkimeye giren maddeleri çevreleyenlerden transfer edilir ve bu maddeyi çevreleyenler soğurlar. Kimyasal denklem olarak gösterilirse;



Örneğin katı bir örnek sıvıya eridiğinde, bu örnek ile referansın sıcaklığını aynı anda tutabilmek için örneğin sıcaklığının artması gerekmektedir, bunun içinde örneğin içinden daha fazla ısı akması gerekmektedir. Örnek, katıdan sıvıya endotermik bir faz geçişine uğradığı için, ısı absorblanması gerekmektedir. Aynı şekilde, örnek kristalizasyon gibi ekzotermik bir faz geçişine uğrarsa, örneğin sıcaklığını arttırmak için daha az ısıya ihtiyaç vardır. Örnek ve referans arasındaki ısı akışındaki fark gözlenerek, bu tip geçişler boyunca absorbe edilen ya da salınan ısı miktarlarını DSC ile ölçmek mümkündür. DSC ayrıca, cam geçişleri gibi daha alt faz değişimlerini gözlemlemede de kullanılabilir. DSC, endüstriyel alanlarda da kalite kontrol cihazı olarak kullanılmaktadır, çünkü bu aletle polimer çalışmaları yapmak ve örnek saflığının değerlendirilmesi mümkündür.

### 1.7.1 DSC' nin Çalışma Prensibi

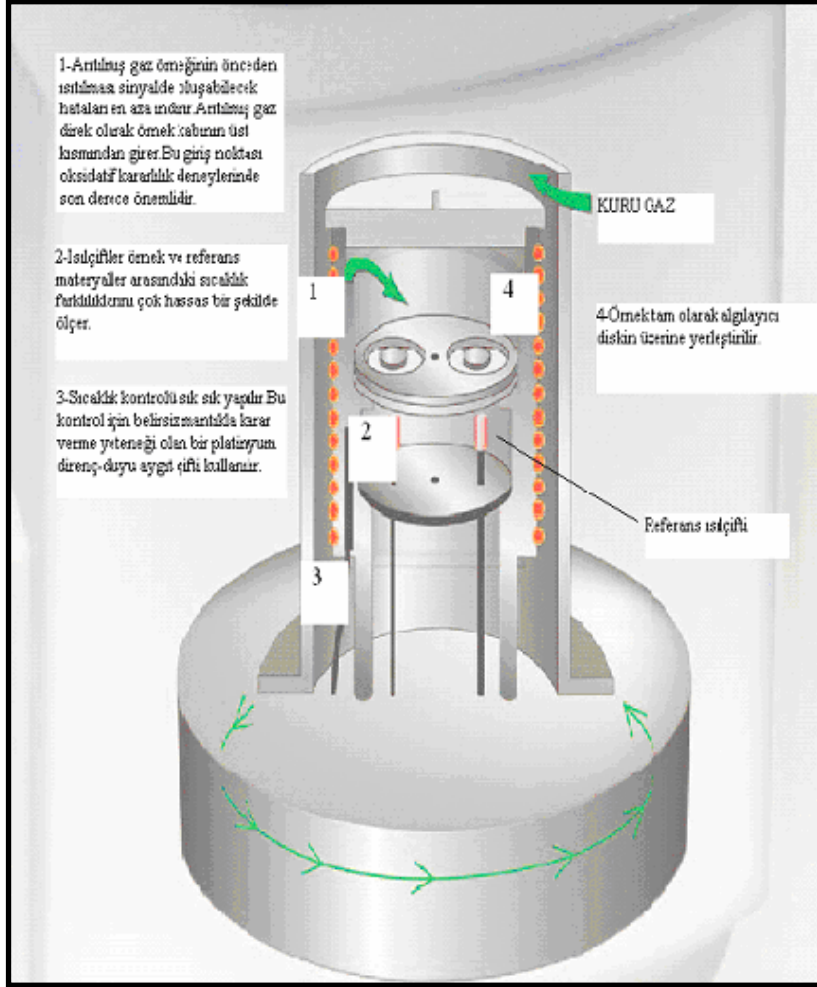
Tipik bir DSC, iki kapalı kaptan (pan) oluşur; biri örnek kabı, diğeri genellikle içi boş olan referans kabıdır. Bu kaplar genellikle alüminyumdan yapılmıştır, çünkü alüminyum, radyasyon kalkanı olarak rol oynar. Bu iki kap aynı şekilde ısıtılır ya da soğutulur ve bu iki kap arasındaki ısı akışı farkı görüntülenir. Bu olay, izotermal olarak sabit bir sıcaklıkta yapılabilir. Fakat çoğunlukla, sıcaklığın sabit bir oranda değişmesiyle yapılır.



Şekil 1.19 Tipik bir DSC şeması (Dean, 1995).

Determinasyon boyunca alet, örnek ve referans arasında ısı akışındaki farkları saptar. Bu bilgi, bir çıkış cihazına gönderilir, bu genellikle bir bilgisayardır. Bilgisayarda görünen, örnek ve referans arasındaki diferansiyel ısı akışının sıcaklığın bir fonksiyonu olarak çizimidir. Oluşan herhangi bir termodinamik, fiziksel ya da kimyasal bir süreç olmadığında, örnek ve referans arasındaki ısı akış farkı sıcaklıkla çok az bir şekilde değişir ve grafikte bu düz bir çizgi olarak görülür. Bununla birlikte, örnek içindeki ekzotermik ya da endotermik bir süreç, grafikte iki ısı akışındaki önemli bir sapma olarak kendini gösterir. Sonuç, DSC eğrisinde görülen bir piktir.

Genel olarak, diferansiyel ısı akışı, referans ısı akışından örnek ısı akışının çıkarılması ile hesaplanır. Bu bilgilere göre, ekzotermik bir işlem pozitif bir pik olarak, endotermik bir işlem ise negatif bir pik olarak gözlenir (Dean, 1995).



Şekil 1.20 DSC aletinin iç yapısı (Dean, 1995) .

Sıvı ya da kristal formda ki örnek, alüminyum bir kap içine yerleştirilir ve daha sonra bu kap DSC içindeki yerine yerleştirilir. Referans kabı boş alüminyum kabıdır ve bu da aletin referans hücreğine yerleştirilir. Örnek kapları oldukça yüksek termal iletkenliğe sahip olacak şekilde tasarlanmıştır.

Termal iletkenlik, bir materyalin ısıyı iletebilme yeteneğini gösteren bir özelliktir.

*Termal iletkenlik = ısı akış oranı × uzaklık / alan × sıcaklık farkı*

$$k = \frac{Q}{t} \times \frac{L}{A \times \Delta T}$$

Burada Q, L kalınlığı boyunca, A yüzey alanına normal doğrultuda t zamanında geçirilen ısı miktarıdır.

Örnek boyutları, 0,1 ile 100mg arasında değişir. Alet hücreleri, örnek ve referansı, dış termal pertürbasyonlardan korumak amacıyla hava geçirmezdir. Bu, ayrıca deneylerin farklı basınç ve atmosfer altında gerçekleştirilmesine izin verir.

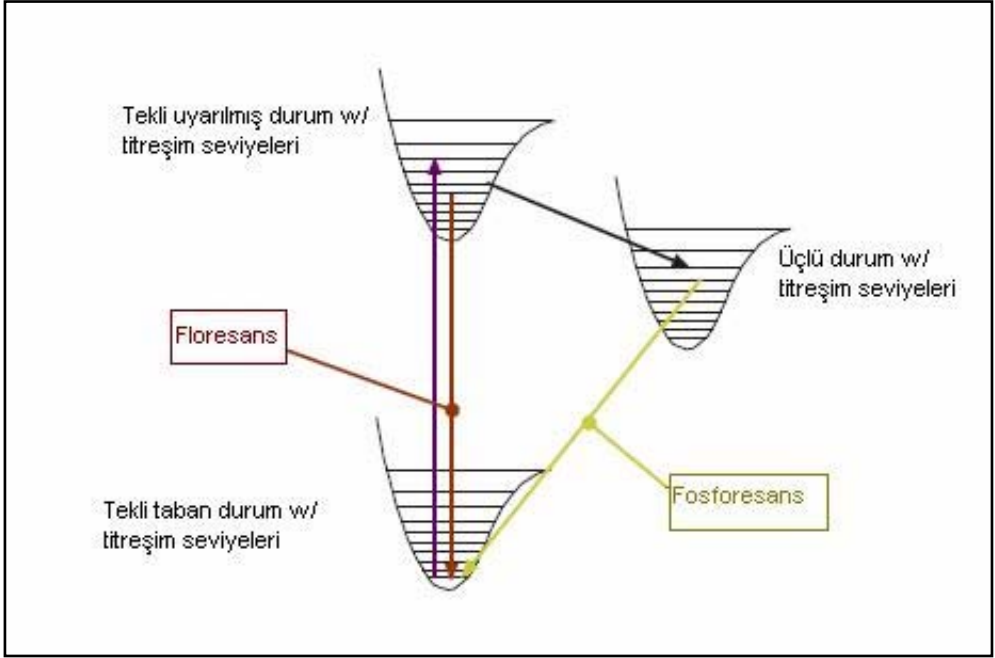
### **1.8 FLORESANS**

Lüminesans, herhangi bir maddeden ışığın yayılması temeline dayanır ve elektronik olarak uyarılmış durumlarda gerçekleşir. Lüminesans uyarılmış duruma bağlı olarak floresans ve fosforesans olmak üzere iki gruba ayrılır.

Uyarılmış tekli durumlarda, uyarılmış orbitaldeki elektron, temel durum orbitalindeki ikinci bir elektronla çiftleşir. Temel duruma dönme foton emisyonu ile gerçekleşir. Floresans emisyon hızı genellikle  $10^8 \text{ sn}^{-1}$  'dir. Tipik bir floresans yaşam süresi değeri 10 ns civarındadır. Bir floroforun yaşam süresi değeri ( $\tau$ ), eksitasyon ve temel duruma dönme arasındaki ortalama zamandır.

Fosforesans, ışığın üçlü uyarılmış durumundan emisyondur. Üçlü uyarılmış durumda, uyarılmış orbitaldeki elektron, temel durum elektronuyla aynı spin yönelimine sahiptir. Temel duruma geçişler yasaktır ve emisyon

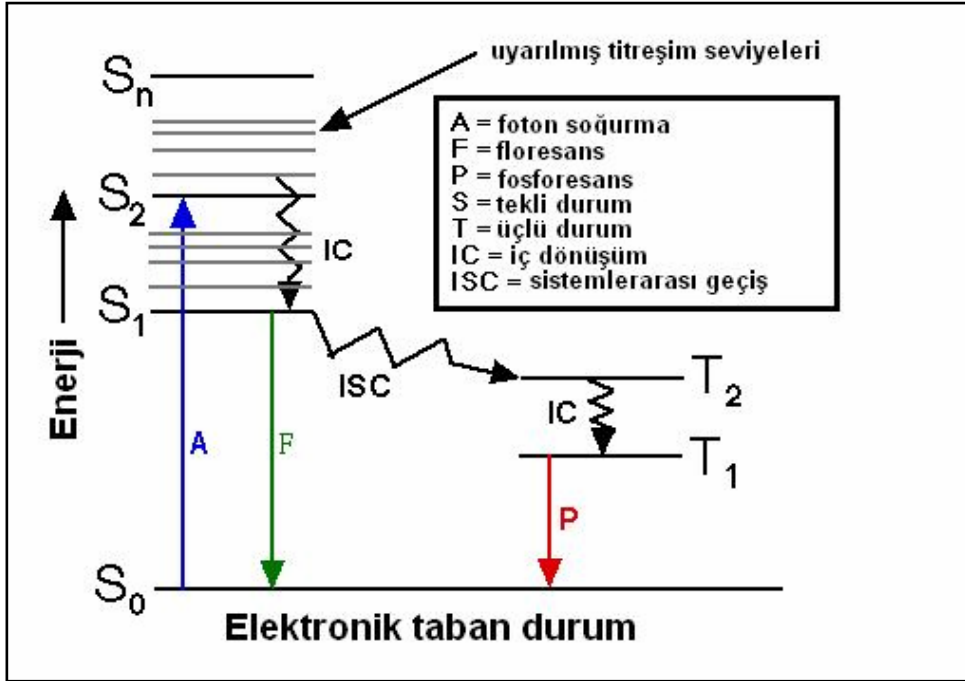
hızları yavaştır ( $10^3-10^0 \text{ s}^{-1}$ ), dolayısı ile fosforesans yaşam süresi değerleri milisaniye ile saniye mertebesindedir (Lakowicz, 2003).



Şekil 1.21 Floresansın Fiziksel Prensibi (Lakowicz, 2003).

### 1.8.1 Jablonski Diyagramı

Işığın absorpsiyonu ve emisyonu arasında meydana gelen prosesler çoğu zaman Jablonski diyagramı ile gösterilir. Jablonski diyagramları uyarılmış durumlarda meydana gelen çeşitli moleküler prosesleri göstermek için kullanılır. Tipik bir Jablonski diyagramı şekilde (Şekil 1.22) gösterilmiştir. Temel düzey, birinci ve ikinci elektronik düzeyler, sırasıyla  $S_0$ ,  $S_1$ , ve  $S_2$  ile gösterilir.



Şekil 1.22 Jablonski Diyagramının bir formu (Lakowicz, 2003).

Elektronik enerji seviyelerinin herbiri ise 0, 1, 2,..... ile gösterilir. Seviyeler arasındaki geçişler yatay çizgilerle gösterilmiştir. Geçişler yaklaşık  $10^{-15}$  s' de oluşur, bu süre çekirdeğin önemli yer değiştirmesi için oldukça kısa bir zamandır. Bu Franck Condon prensibidir. Bir florofor,  $S_1$  ya da  $S_2$  düzeylerinin titreşim enerji seviyelerine uyarılır. Yoğun fazda bulunan moleküller hızlı bir şekilde  $S_1$  daha düşük titreşim seviyelerine döner. Bu işlem iç çevrim olarak adlandırılır ve genellikle  $10^{-12}$  s ya da daha kısa sürede oluşur. Floresans yaşam süresi değerleri genellikle  $10^{-8}$  s olduğu için, iç çevrim genellikle emisyonun önce tamamlanır. Bu nedenle, floresans emisyon genellikle termal olarak dengelenmiş uyarılmış durumdan yani  $S_1$ ' in en düşük titreşim enerji seviyesinden kaynaklanır. Temel duruma dönüş, temel durumun daha yüksek bir titreşim enerji seviyesine olur. Emisyon, temel durumun daha yüksek bir titreşim enerji seviyesine olmasının ilginç bir sonucu, emisyon spektrumunun,  $S_0 \rightarrow S_1$  geçişinin absorpsiyon spektrumunun

bir ayna görüntüsü olmasıdır. Bu benzerliğin oluşma nedeni elektronik eksitasyonun nükleer geometriyi çok büyük ölçüde değiştirmesidir. Bu nedenle uyarılmış durumun vibrasyonel enerji seviyelerinin arası temel durumunki ile benzerdir. Sonuç olarak, absorpsiyon ve emisyon spektrumlarında görülen titreşim yapıları benzerdir.  $S_1$  durumundaki moleküller, ayrıca ilk üçlü durum  $T_1$ ' e bir spin çevrimine uğrayabilirler.  $T_1$  düzeyinden olan emisyon fosforesans olarak adlandırılır ve genellikle floresansa göre daha düşük dalgalılarına dolayısı ile daha düşük enerjiye değişir.  $S_1$  ' in  $T_1$  ' e dönüşümü sistemler arası geçiş olarak adlandırılır.  $T_1$  ' den tekli temel duruma geçiş yasaklıdır (Lakowicz, 2003).

### 1.8.2 Floresans Yaşam Süresi

Floresans yaşam süresi değeri, bir floroforun en önemli özelliklerinden biridir. Bu değer, floroforun çevresiyle etkileşmesi için kullanışlı zamanı ve dolayısıyla da emisyonu ile ilgili mevcut bilgiyi belirler. Bir floroforun yaşam süresi değeri ( $\tau$ ), uyarılması ile temel duruma dönmesi arasındaki ortalama zamandır. Floresans yaşam süresi değerleri genellikle 10 ns civarındadır. Florofor için yaşam süresi değeri,

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}$$

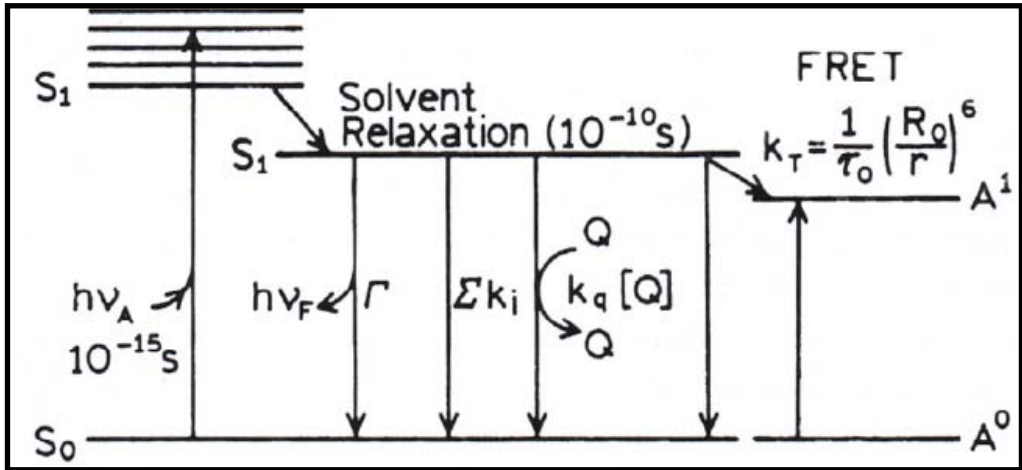
ile verilir.  $\Gamma$ , floroforun yayma hızı ( yayılan foton sayısı) ve  $k_{nr}$ , uyarılmış durumdan temel duruma ışınımsal olmayan bozunmaların bütün formlarıdır. Işınımsal olmayan bozunma, bir foton emisyonu içermeyen herhangi bir bozunmadır. Floresans emisyonu rastgele olan bir prosestir ve birkaç molekül fotonlarını tam olarak  $t=\tau$  zamanında ve %37' si de  $t>\tau$  anında yayarlar. Işınımsal olmayan proseslerin olmadığı durumlarda floroforun yaşam süresi değerine gerçek ya da doğal yaşam süresi değeri denir.

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma}$$

ile verilir. Temelde doğal yaşam süresi değeri  $\tau_n$ , floroforun emisyon spektrumundan, absorpsiyon spektrumundan ve sönümleme katsayısından hesaplanabilir (Lakowicz, 2003).

### 1.8.3 Floresans Sönümleme (Quenching)

Floresans şiddeti, çeşitli nedenlerden dolayı azalabilir. Şiddetteki bu azalmalara sönümleme (quenching) adı verilir. Sönümleme farklı mekanizmalarla meydana gelebilir. Çarpışmayla olan sönümleme (collisional quenching) uyarılmış durumdaki floroforun, solüsyondaki quencher adı verilen diğer moleküller ile etkileşerek etkisiz hale gelmesiyle oluşur.



Şekil 1.23 Çarpışmasal sönümleme ve Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET)'ni içeren Jablonski Diyagramı.  $\Sigma k_i$  terimi, temel düzeye olan, sönümleme ve FRET dışındaki ışımsal olmayan yolları göstermek için kullanılır (Lakowicz, 2003).

Çarpışmayla olan sönümleme, Şekil 1.23' deki değiştirilmiş Jablonski diyagramlarıyla gösterilmiştir. Florofor, quencher ile karşılaşma süresi boyunca temel duruma döner. Moleküller bu süreç boyunca kimyasal olarak

değişmezler. Çarpışmayla olan sönmülemde şiddetteki azalma Stern-Volmer denklemiyle açıklanır.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

Bu ifadede  $K$ , Stern-Volmer sönmüleme sabiti,  $k_q$  bimoleküler sönmüleme sabiti,  $\tau_0$  sönmülenme yaşam süresi değeri ve  $[Q]$  yakalayıcı (quencher) konsantrasyonunu gösterir. Stern-Volmer sönmüleme sabiti  $K$ , floroforun söndürücüye (quencher) karşı olan duyarlılığını ifade eder. Bir makromolekül ile örtülmüş bir florofor, genellikle suda eriyen söndürücülere ulaşamaz, böylece  $K$  değeri düşük olur. Daha büyük  $K$  değerleri, floroforun solüsyonda serbest olduğu ya da floroforun bir biyomolekülün yüzeyinde olduğu durumlarda elde edilir.

Çarpışma ile olan sönmülemeden başka, floresans sönmüleme diğer proseslerle de gerçekleşebilir (Lakowicz, 2003).

#### 1.8.4 Floresans Spektroskopisi

Floresans spektroskopisi bir örneğin floresansını analiz eden elektromanyetik spektroskopisi tipidir. Moleküllerdeki elektronların genellikle ultraviyole bir ışın kullanarak uyarılması ve daha düşük enerjili ışın yayılması temeli üzerine kuruludur.

Moleküller enerji seviyeleri adı verilen çeşitli durumlara sahiptirler. Floresans spektroskopisi elektronik ve vibrasyonel seviyeler de incelenir. Genel olarak örnekler temel elektronik seviye (düşük enerjili) ve daha yüksek enerjili uyarılmış elektronik seviyelerde bulunurlar. Floresans spektroskopisinde örnekler önce fotonun absorbe edilmesi ile temel elektronik düzeyden uyarılmış elektronik düzeydeki çeşitli vibrasyonel seviyelerin birine uyarılır. Diğer moleküller ile çarpışmalar molekülün uyarılmış elektronik düzeyin en düşük vibrasyonel seviyesine ulaşınca

kadar enerjisini kaybetmesine neden olur. Daha sonra molekül bir foton yayınlarak temel elektronik düzeyin çeşitli vibrasyonel seviyelerinden birine düşer. Moleküller temel düzeydeki vibrasyonel seviyelerin herhangi birine düşecekleri için yayınlanan fotonlar farklı enerjilere dolayısı ile de farklı frekanslara sahip olacaklardır. Bu nedenle floresans spektroskopisinde ışığın farklı frekansları analiz edilerek farklı vibrasyonel seviyelerin yapıları belirlenebilir.

Tipik bir floresans spektroskopi deneyinde eksitasyon ışını sabit bir dalga boyunda tutularak örnek tarafından yayılan floresans ışığın farklı frekansları ölçülür. Elde edilen spektruma emisyon spektrumu adı verilir. Eksitasyon spektrumu ise farklı dalga boylarında eksitasyon ışını kullanılarak emisyon spektrumlarının kaydedilmesi ile elde edilir (Lakowicz, 2003).

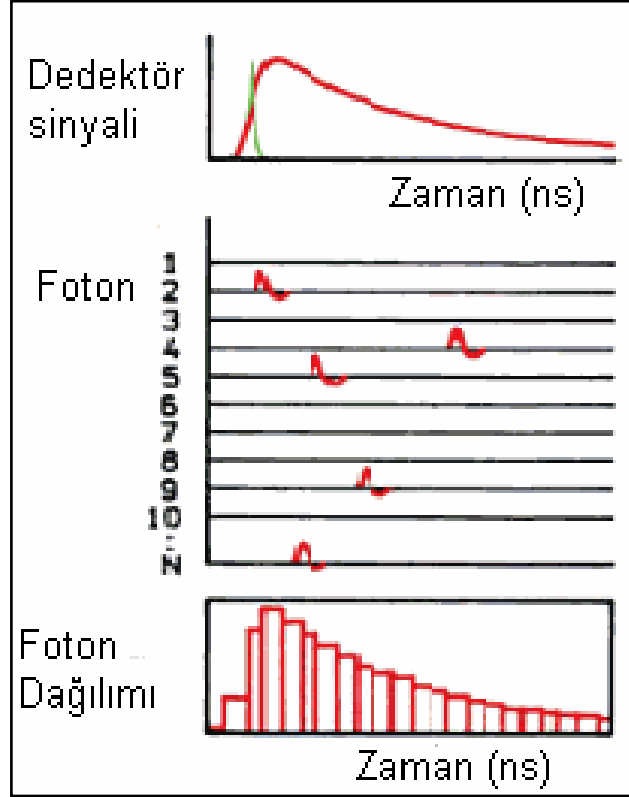
### 1.8.5 Zaman İlişkili Tek Foton Sayımı (TCSPC)

Time-resolved ölçümler, floresans spektroskopisinde, biyolojik makromoleküllerin çalışılmasında ve ayrıca hücre görüntülemeye yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ölçümlerin avantajları sayesinde görüntü kontrastının, örneğin her bir bölgedeki yaşam süresi değerlerine göre belirlendiği yaşam süresi görüntüleri elde etmek mümkündür.

Time-resolved floresans ölçümü için time-domain ve frequency-domain metodları olmak üzere iki metot kullanılmaktadır. Time-domain metodunda, örnek ışık pulsu ile uyarılır. Puls genişliği mümkün olduğu kadar kısa tutulur ve örneğin bozunma zamanından ( $\tau$ ) çok daha kısa olmalıdır. Eksitasyon pulsunu takiben zamana bağlı şiddet ölçülür. Bozunma zamanı  $\tau$ ,  $\log I(t)$ 'nin  $t$ 'ye karşı çizilen grafiğin eğiminden hesaplanır ya da şiddetin,  $t=0$ 'da  $1/e$  kadar azaldığı zamandan hesaplanır. Şiddet bozunmaları dikey z-ekseni ile  $54.7^\circ$  açı yapacak şekilde yerleştirilmiş bir polarizör yardımıyla ölçülür. Bu

durum şiddet bozunmaları üzerindeki rotasyonal difüzyon ve/veya anizotropi etkilerinden kaçınmak için kullanılır.

Günümüzde time-domain ölçümlerinin pek çoğu Time Correlated Single Photon Counting tekniği kullanılarak gerçekleştirilir.



Şekil 1.24 TCSPC Prensipli (Lakowicz, 2003).

TCSPC tekniğinde, örnek şeklin en üstünde dalga formunda gösterilen ışık pulsu ile uyarılır. Dalga formu, pek çok florofor uyarıldığında ve çok sayıda foton gözleendiğinde, gözlenir. TCSPC tekniğinde şartlar, lazer pulsu başına bir fotondan daha az algılanacak şekilde ayarlanır. Eksitasyon pulsu ile gözlenen foton arasındaki zaman ölçülür ve histogramda saklanır.

x -ekseni zaman farkını, y-ekseni ise bu zaman farkında algılanan foton sayısını gösterir. Eksitasyon pulsu başına 1 fotondan daha azı algılandığında,

histogram bozunmayı dalga formunda gösterir. Sayım hızı yüksek olursa, histogram daha kısa zamanlara meyilli olur. Bunun nedeni TCSPC' de sadece ilk fotonların gözlenmesidir. Günümüzde elektronik cihazlar, yaşam süresi değerleri nano saniye mertebesinde olduğundan çoklu fotonları ölçecek kadar hızlı değildir. Puls başına çoklu foton mikro saniye ya da daha uzun bozunma zamanları için ölçülebilir (Lakowicz, 2003).

## **2. MATERYAL VE METOT**

### **2.1. Kimyasal Maddeler**

Melatonin (N-Asetil-5-metoksitriptamin), L- $\alpha$ -Fosfatidilkolin gliserol (DPPG), L- $\alpha$ - Fosfatidilkolin dipalmitol (DPPC), L- $\alpha$ - Fosfatidilkolin dioleoil (DOPC) ve kolesterol Sigma (St. Louis, Mo) firmasından satın alınmıştır. Elde edilen membranları görüntülemek için kullanılan boya SP-DiOC<sub>18</sub>(3) Invitrogen firmasından satın alınmıştır. Bütün kimyasal maddeler bu haliyle daha fazla saflaştırılmadan kullanılmışlardır.

### **2.2. Kullanılan Membran Çeşitleri**

Bu çalışmada çok katlı membranlar (MLV) ve tek katlı membranlar (LUV) gibi farklı membran çeşitleri kullanılmıştır.

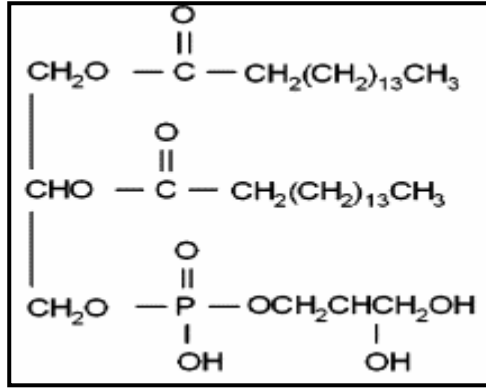
Çok katmanlı veziküller hazırlanması detaylı bir şekilde tanımlanabilen ilk lipozom çeşididir ve en geniş kullanıma sahiptir (Bangham et al., 1965). MLV hazırlanması oldukça basittir (Severcan et al., 2005). Organik çözücü içindeki lipitleri çözücünden ayırıp ince film tabakası haline getirebilmek için, azaltılmış basınç altında dönerek uygulanan uçurma işlemi gerekmektedir. İnce film tabakası haline getirilmesinin nedeni katmanın hidrasyonunun kolaylaşmasını sağlamaktır. Eğer farklı lipitlerden oluşan bir lipit karışımı ile MLV hazırlanmak isteniyorsa, bu lipitlerin ince film haline gelmeden önce uygun bir organik çözücü içinde karıştırılmaları gerekmektedir. İnce film haline getirildikten sonra tampon çözelti eklenir ve karışım belli bir süre boyunca çalkalanır. Lipozom hazırlanırken, lipozomu oluşturan lipitlerin faz geçiş sıcaklığına dikkat edilmelidir ve hazırlık aşamasında karışımın sıcaklığının lipit faz geçiş sıcaklığının üzerinde bir sıcaklıkta tutulması gerekmektedir. Hidrasyon süresi maksimum enkapsülasyon sağlamak açısından önemlidir.

MLV çeşitli moleküllerin kapsüllenmesinde oldukça uygundur ve çeşitli lipit bileşenlerinden yapılabilir. Diğer lipozom hazırlama yöntemleri ile karşılaştırıldığında hazırlanması en kolay lipozomlardır.

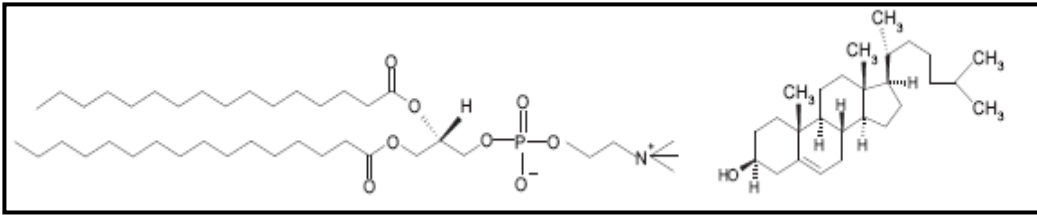
Büyük tek katmanlı veziküller (LUVs), 100nm mertebesindeki büyüklüklerde çaplara sahip olan lipozomlardır ve tek katmandan oluşurlar. Tek katmanlı veziküller için fosfolipit içeriği vezikülün çapının karesiyle orantılı olan yüzey alanı ile ilişkili iken tutulmuş hacim (entrapped volume) çapının kübüyle değişir. Ayrıca membranın sınırlı kalınlığı sebebiyle veziküller küçüldükçe, fosfolipitler daha fazla iç boşluğu kaplayacağından sulu hacimleri daha da azalır. Bu nedenden dolayı verilen bir lipit miktarı için, büyük lipozomlar küçük lipozomlara göre çok daha büyük sulu hacme sahiptirler. Büyük tek katmanlı veziküller (LUV) çeşitli yöntemler kullanılarak hazırlanabilirler. Bunlardan biri ve en çok kullanılanı ekstrüzyon yöntemidir.

### **2.3. Membran Bileşenleri**

Çok katlı ve tek katlı membran hazırlamak için doymuş bir lipit olan DPPG, DPPC ve kolesterol kullanılmıştır (Şekil 2.1). Melatonin membran etkileşimlerini Floresans Spektroskopisi tekniği ile incelemek için florofor bir boya olan SP-DiOC<sub>18</sub>(3) kullanılmıştır.



(a) DPPG

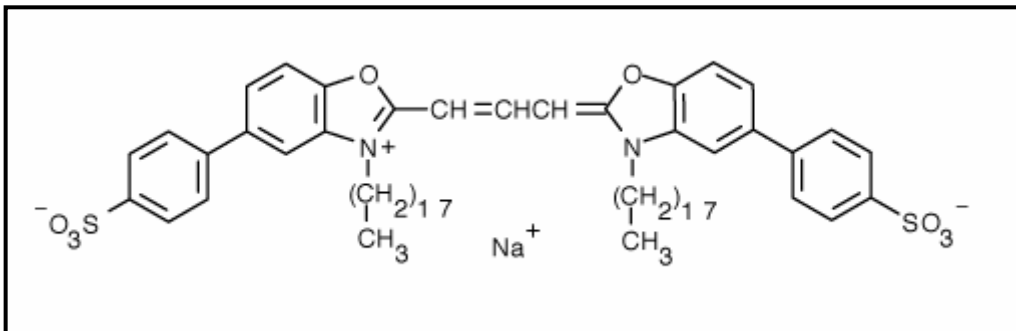


(b) DPPC

(c) Kolesterol

Şekil 2.1 Lipit Bileşenlerinin Moleküler Yapıları

Anyonik doymuş bir fosfolipit olan DPPG yaklaşık 40 °C faz geçiş sıcaklığına sahiptir. Doymuş bir fosfolipit olan DPPC 41 °C faz geçiş sıcaklığına sahip olduğu için oda sıcaklığında jel fazda olan ve hücre membranında en çok bulunan fosfolipittir, ayrıca vücudun kolin deposunun büyük kısmını temsil eder. DPPC çok etkili bir yüzey aktif maddedir, akciğerlerin iç yüzeylerinin yüzey gerilimine bağlı olarak yapışmasını önler.



Şekil 2.2 SP-DiOC<sub>18</sub>(3) Moleküler Yapısı

SP-DiOC<sub>18</sub>(3) karbosiyanin bir boyadır (Şekil 2.2). Karbosiyanin boyalar floresan boyalar arasında en yüksek soğurmaya sahiptir ve lipid membranlarda oldukça floresandır. Boyaların uzun lipofilik zincirlere sahip olması onları hücre membranlarının boyanmasında ideal yapar.

## 2.4. Membran Örneklerinin Hazırlanması

### 2.4.1 MLV Hazırlanması

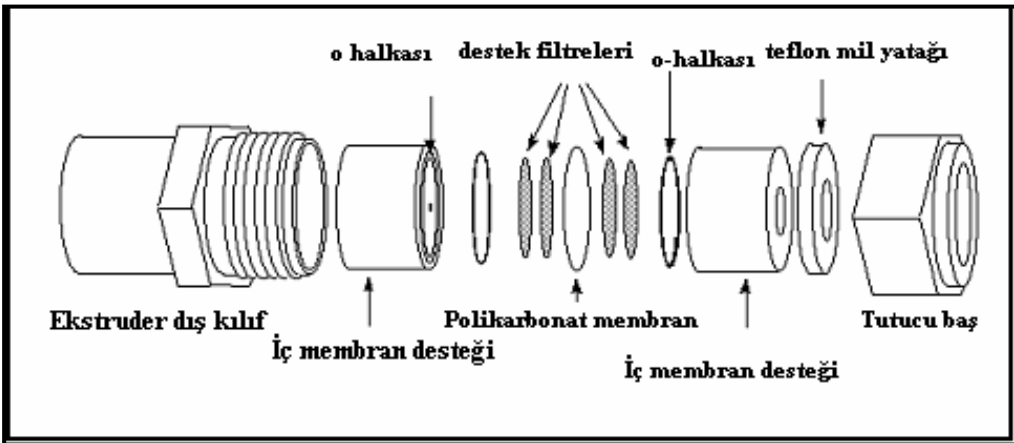
Çok katlı membran örnekleri Severcan et al. (2005)'dan kaydedilen prosedüre göre hazırlandı. Değişik melatonin konsantrasyonları için gerekli olan melatonin miktarları hesaplandı. 5 mg. melatonin 1000 µl etanolde çözünerek stok çözelti hazırlandı. Her bir konsantrasyon için ependorf kaplarına, hazırlanan stok çözeltiden gerekli melatonin miktarı konuldu ve herbir ependorftaki etanolün fazlası azot gazı geçirilerek uçuruldu. Saf lipid (%0) için de dahil olmak üzere bütün ependorfların içine 5 mg lipid miktarı konuldu. Lipiti çözmek için 150 µl kloroform konulup eritildikten sonra kloroformun fazlası azot gazı ile uçuruldu. Kalan tüm organik çözücülerden iyice arındırılması için örnek kapları vakum sistemine (Spin-Vac, HETO) bağlandı ve en az 2 saat vakum yapıldı. Bu işlem sonucunda kuru ince lipid tabakaları elde edildi. Lipit tabakası içeren kaplara 25 µl tampon çözelti (10 mM fosfat buffer, pH 7.4 ) konuldu. Karışım, lipid ana faz geçiş sıcaklığının

20 °C üzerinde ısıtılıp karıştırılarak yarım saat vortex karıştırıcıda çalkalandı ve böylece süt renginde çok katlı katmanlar elde edildi.

#### 2.4.2 LUV Hazırlanması

Bu tip yapay membranların hazırlanmasında da yine aynı lipid bileşenleri ve kolesterol kullanılmıştır. LUV'ler de çeşitli yöntemler kullanılarak hazırlanabilirler. Bunlardan biri ve en çok kullanılanı ekstrüzyon yöntemidir.

Lipit ekstrüzyon tekniğinde lipid süspansiyonu belirli bir gözenek boyutuna sahip polikarbonat filtreden geçirilir. 100 nm civarında gözenek boyutuna sahip filtreler kullanılarak yapılan ekstrüzyon sonucunda 120-140 nm çaplı büyük tek katmanlı veziküller elde edilmektedir. Vezikül boyutu ayrıca lipid bileşenlerine de bağlıdır. Ekstrüzyon yönteminde esas polikarbonat filtreye gelmeden önce, lipid solüsyonu daha geniş gözenek boyutuna sahip ön filtrelerden geçirilir. Bu ön filtreler, membranları kirlenme ve tortu oluşumu gibi olumsuz etkilerden korumaya yardımcı olur. Ayrıca işlem sonrası solüsyon boyut dağılımında homojenlik sağlamaktadırlar.



Şekil 2.3 Ekstrüzyon yönteminde kullanılan ekstruder parçaları.

Ekstrüzyon işlemi sırasında lipitin faz geçiş sıcaklığına dikkat edilmelidir ve işlem lipit faz geçiş sıcaklığının üzerinde bir sıcaklıkta gerçekleştirilmelidir. İşlem faz geçiş sıcaklığının altında gerçekleşirse membran rijid haldeyken gözeneklerden geçemeyeceği için başarısız olacaktır.

## **2.5 FTIR Ölçümleri İçin Örnek Hazırlanması**

### **2.5.1 MLV Hazırlama**

FTIR çalışmaları için Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR spektrometresi kullanılmıştır. Hazırlanan membran örneklerinden 20 µl alındı ve 12 µm hücre kalınlıklı suda çözünmez CaF<sub>2</sub> quartz pencere arasına konuldu. Bu pencere sıcaklık kontrolüne uygun metal kaba konduktan sonra sıcaklık kontrol sistemine yerleştirildi. Sıcaklık Unicam Specac sıcaklık kontrol birimi ile ayarlanıp, örneğe yakın yerleştirilen ısı çifti ile ölçüldü. Her örnek için 2 cm<sup>-1</sup> çözme gücü ile 50 tarama yapıldı. Örnekler her sıcaklıkta 10 dakika inkübe edildi ve 2 °C aralıklar ile 25 °C ile 70 °C arasında tarandı. Tüm çalışmamızda FTIR tekniği ile gerçekleştirdiğimiz sıcaklığa bağlı ölçümlerin hepsi üç kez tekrarlanmıştır.

### **2.5.2 LUV Hazırlama**

Melatonin, lipit ve lipit/kolesterol (10:1) karışımları için hazırlanan LUV örnekleri için öncelikle FTIR ölçümleri için hazırlanan örnek prosedürüne göre MLV hazırlandı. FTIR ölçümleri için hazırlanan MLV örnekleri için 25 µl tampon çözelti kullanılırken, LUV örnekleri hazırlanırken 1000 µl tampon çözelti kullanılarak MLV hazırlandı. Elde edilen MLV'lerden daha sonra ekstrüzyon yöntemi ile LUV elde edildi. Ekstrüzyon işlemi sonucunda elde edilen LUV'ler yaklaşık 3 saat Freze Dryer'da bekletilerek daha konsantre olması sağlandı. Sonrasında MLV örneklerinden FTIR verileri elde etmek için izlenen prosedür kullanıldı. Tüm çalışmamızda

FTIR tekniği ile gerçekleştirdiğimiz sıcaklığa bağlı ölçümlerin hepsi üç kez tekrarlanmıştır.

## **2.6 DSC lümleri İçin rnek Hazırlanması**

### **2.6.1 MLV Hazırlama**

DSC lümleri için lipit karışımı infrared çalışmaları için kullanılan aynı yöntemle hazırlandı. Sadece 2 mg lipit ve 50 µl tampon çözelti kullanıldı. Örnekler TA Q 100 DSC aletinde taranmıştır. Isıtma hızı dakikada 1 °C dir. Çalışılan sıcaklık bölgesi 25 °C ile 65 °C arasındadır.

### **2.6.2 LUV Hazırlama**

FTIR lümleri için elde edilen LUV örneklerinden 50 µl alınarak ölçümler gerçekleştirildi ve MLV rneklerinin DSC verileri elde edilmesinde kullanılan prosedür izlendi.

## **2.7 TCSPC lümleri İçin rnek Hazırlanması**

TCSPC lümleri için LUV rnekleri hazırlandı. Farklı lipitler ve kolesterol için ayrı ayrı 5 mg madde 1000 µl kloroformda çözölerek stok çözelti hazırlandı. 10 µl lipit ve değişik konsantrasyonlarda boya bu lipit miktarına uygun olarak hesaplanarak eklendi. Boya ve örnek karışımları 1000 µl tampon çözelti kullanılarak önce MLV haline getirildi daha sonra elde edilen MLV'lerden ekstrüzyon yöntemiyle LUV elde edildi. Boya konsantrasyonuna bağlı ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

## **2.8 Floresans Spektroskopisi lümleri İçin rnek Hazırlanması**

Artan boya konsantrasyonu ve hem bireysel lipitler hem de lipit/kolesterol karışımlarından oluşan örneklerin Floresans Spektroskopisi ölçümlerinde, örnek hazırlama prosedürü TCSPC tekniğinde kullanılan

prosedür ile aynıydı. Ölçümlerde 1000 µl örnek miktarı kullanıldı. Ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Melatonin, lipit ve lipit/kolesterol (10:1) karışımları için ise kullanılan örnek prosedürü FTIR ölçümleri için hazırlanan LUV örneklerinin prosedürü ile aynıydı. Bu ölçümlerde de 1000 µl örnek miktarı kullanıldı. Ölçümler oda sıcaklığı ve lipit sıvı kristal faz bölgesi sıcaklığı olmak üzere iki farklı sıcaklıkta (25-55 °C) gerçekleştirildi.

### **2.9 TCSPC Çalışmaları İçin Kullanılan Kurulum**

TCSPC çalışmaları Nikon inverted mikroskop kullanılarak gerçekleştirildi. SP-DiOC<sub>18</sub>(3) boyayı uyarmak için 470nm Becker&Hickle picosecond pulsed diod lazer kullanıldı. 50 MHz puls aralığı üretildi. Uyarma ışını, örneğe 40xNA 0.55 WD objektif lens kullanılarak odaklandı. Emisyon ışını 500nm band-pass filtre kullanılarak ayrıldı.

TCSPC ölçümleri için LUV örnekleri kullanıldı. SP-DiOC<sub>18</sub>(3) emisyonu  $\lambda=500\text{nm}$ 'de ölçüldü. Instrument Response Function (IRF) Rose Bengal saçılma dispersiyonundan elde edildi. TCSPC tekniği ile farklı lipit sistemleri için bozunma zaman grafikleri elde edildi.

### **2.10 Floresans Spektroskopi İçin Kullanılan Kurulum**

Boya ve çeşitli lipit membran karışımları için elde edilen ölçümlerde Perkin Elmer Luminesans Spektrometre LS 50B kullanıldı. Melatonin lipit ve lipit/kolesterol karışımları ile etkileşimini incelemeye ise Varian Cary Eclipse Floresans Spektrofotometresi kullanıldı. Boya ve çeşitli lipit membran karışımları için önce absorpsiyon spektrumları daha sonra eksitasyon ve emisyon spektrumları alındı. Melatonin, lipit ve lipit/kolesterol karışımları için ise emisyon spektrumları alındı. Emisyon spektrumu elde etmek için belirlenen aralıklar başlangıç değeri için 480nm bitiş değeri için 700 nm,

eksitasyon değeri ise 470 nm alındı. Eksitasyon spektrumu için belirlenen aralıklar başlangıç değeri için 370 nm, bitiş değeri için 530 nm, emisyon değeri ise 550 nm alındı.

### 3.SONUÇLAR

#### 3.1 MELATONİN VE NEGATİF YÜKLÜ MODEL MEMBRAN (DPPG) ETKİLEŞİMİ

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

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

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

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

### 3.1.1 FTIR SONUÇLARI

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

Lipitlerin infrared spektrası, baş grup ve hidrokarbon zincir spektral karakteristikleri belirtilen farklı moleküler parçacıkların moleküler titreşimlerinden başlayan iki spektral bölgede çalışılmıştır. Tüm çalışmamızda FTIR tekniği ile gerçekleştirdiğimiz sıcaklığa bağlı ölçümlerin hepsi üç kez tekrarlanmıştır.

#### 3.1.1.1 C – H GERİLME BÖLGESİ

##### 3.1.1.1.1 CH<sub>2</sub> Antisimetrik Gerilme

Şekil 3.1'deki CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerleri saf DPPG lipozomu için incelendiğinde; jelden sıvı kristal faza geçişin yaklaşık 40 °C'de merkezlenen dar bir sıcaklık aralığında meydana geldiği gözlenmiştir.

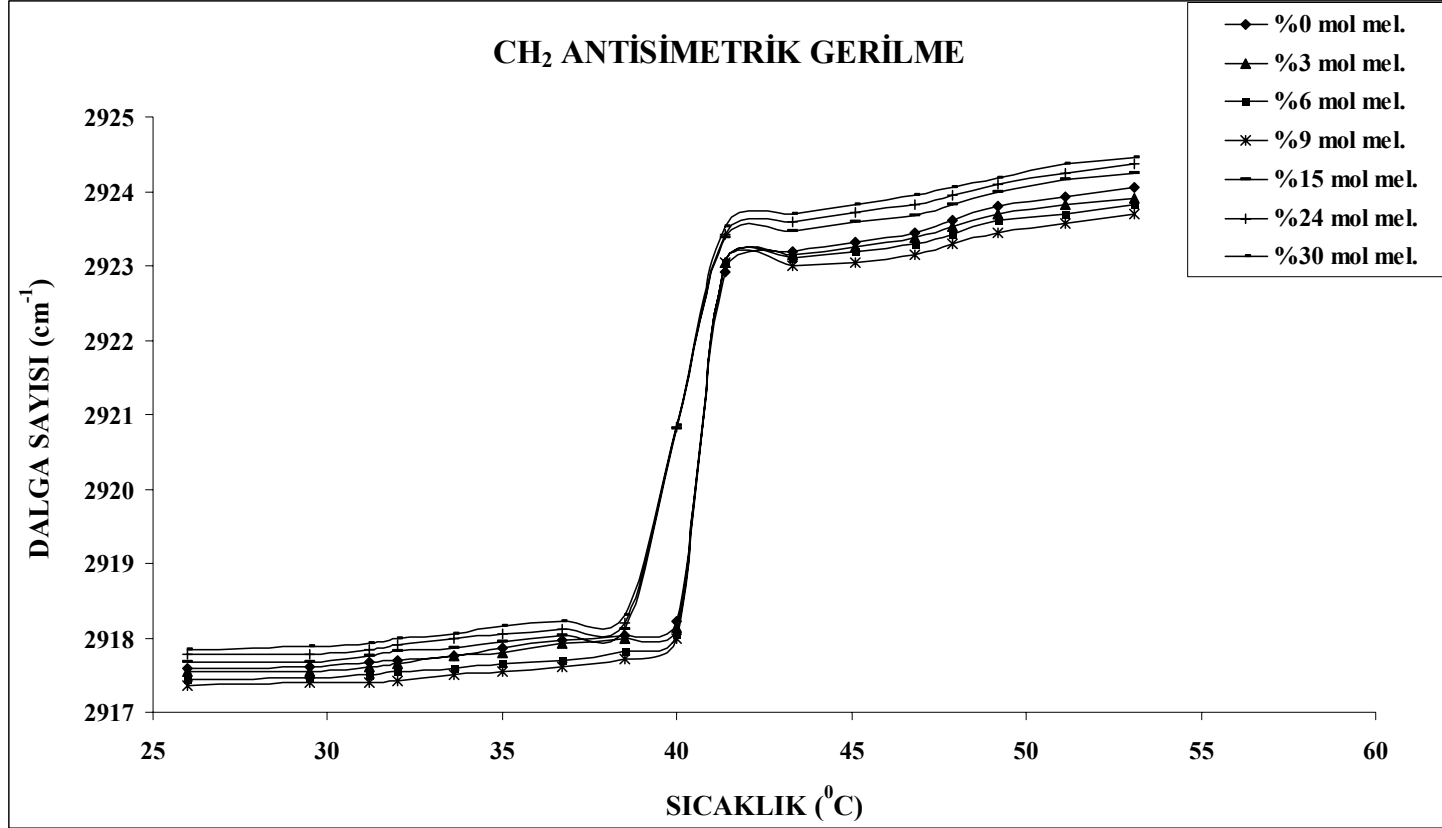
Saf DPPG lipozomlarına farklı % mol melatonin eklendiğinde faz geçişi değişmiştir. Melatoninin artan konsantrasyonları faz geçiş eğrisinin, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, genişlemesine ve faz geçiş sıcaklığının düşmesine neden olmuştur.

Saf DPPG lipozomlarına farklı konsantrasyonlarda (%3, %6, %9, %15, %24, %30 mol) melatonin eklenmesi ile faz geçişinin altındaki sıcaklıklarda yani jel fazda ve faz geçişinin üzerindeki sıcaklıklarda yani sıvı kristal fazda, frekansta konsantrasyona bağlı olarak farklı değişimler gözlenmiştir. Frekanstaki bu değişimler değerlendirildiğinde;

- Jel ve sıvı kristal fazda, %3, %6 ve %9 mol melatoninin DPPG lipozomlarına eklenmesi ile frekansın azalması, sistemde gauche

konformerlerinin sayısının azalmasına ve bu da sistemin asil zincir (hidrokarbon zincir) düzeninin artmasına neden olmaktadır.

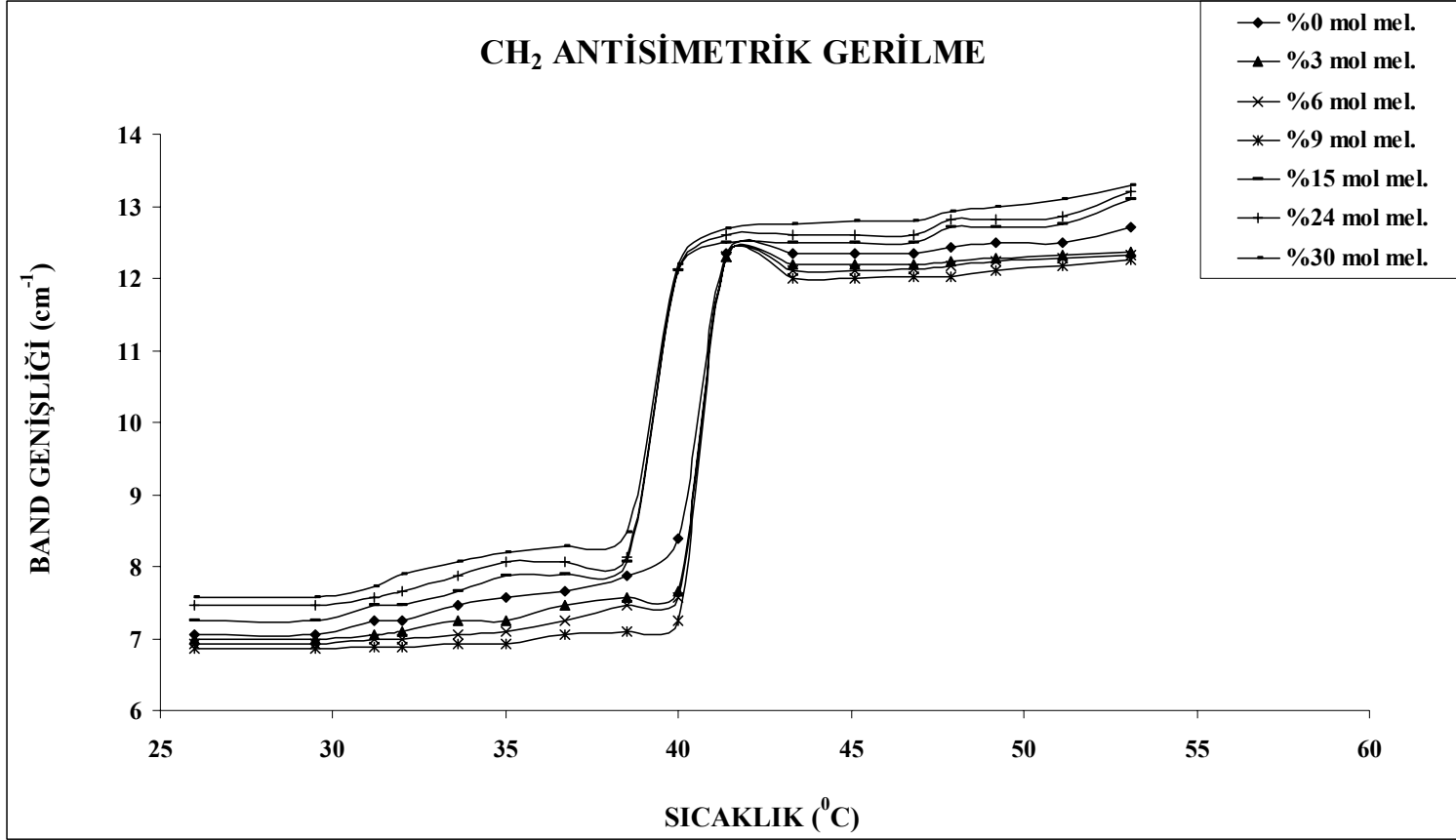
- Jel ve sıvı kristal fazda, melatoninin artan konsantrasyonları (% 15, 24, 30) ile frekans değerlerinin saf DPPG frekans değerlerinden yüksek olması, gauche konformerlerinin sayısının artması demektir (Şekil 3.1) .



Şekil 3.1 Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPG lipozomunun CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.

Şekil 3.2'deki CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme titreşiminin band genişliğinin sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde; melatoninin %3, %6 ve %9 mol konsantrasyonlarının eklenmesi hem jel hem de sıvı kristal fazda değerler saf DPPG lipozomu değerlerine göre azalmış, %15 %24 ve %30 mol gibi daha yüksek konsantrasyonların eklenmesi ile ise band genişliği değerleri artmıştır. Band genişliği değerlerindeki bu değişimler değerlendirildiğinde;

- Band genişliği değerlerinin %3, %6 ve %9 mole kadar hem jel hem de sıvı kristal fazda saf DPPG değerlerine göre azalması; lipit asil zincirlerinin hareket özgürlüğünün her iki fazda azalması anlamına gelir. Yüksek konsantrasyon değerlerinin (%15, %24 ve % 30) ise, hem jel hem de sıvı kristal fazda saf DPPG değerlerinin üstünde olması, diğer konsantrasyon değerlerine göre yüksek konsantrasyonların membran dinamiğini arttırıcı etkisinin olduğunu gösterir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPG lipozomunun CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu band genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi.

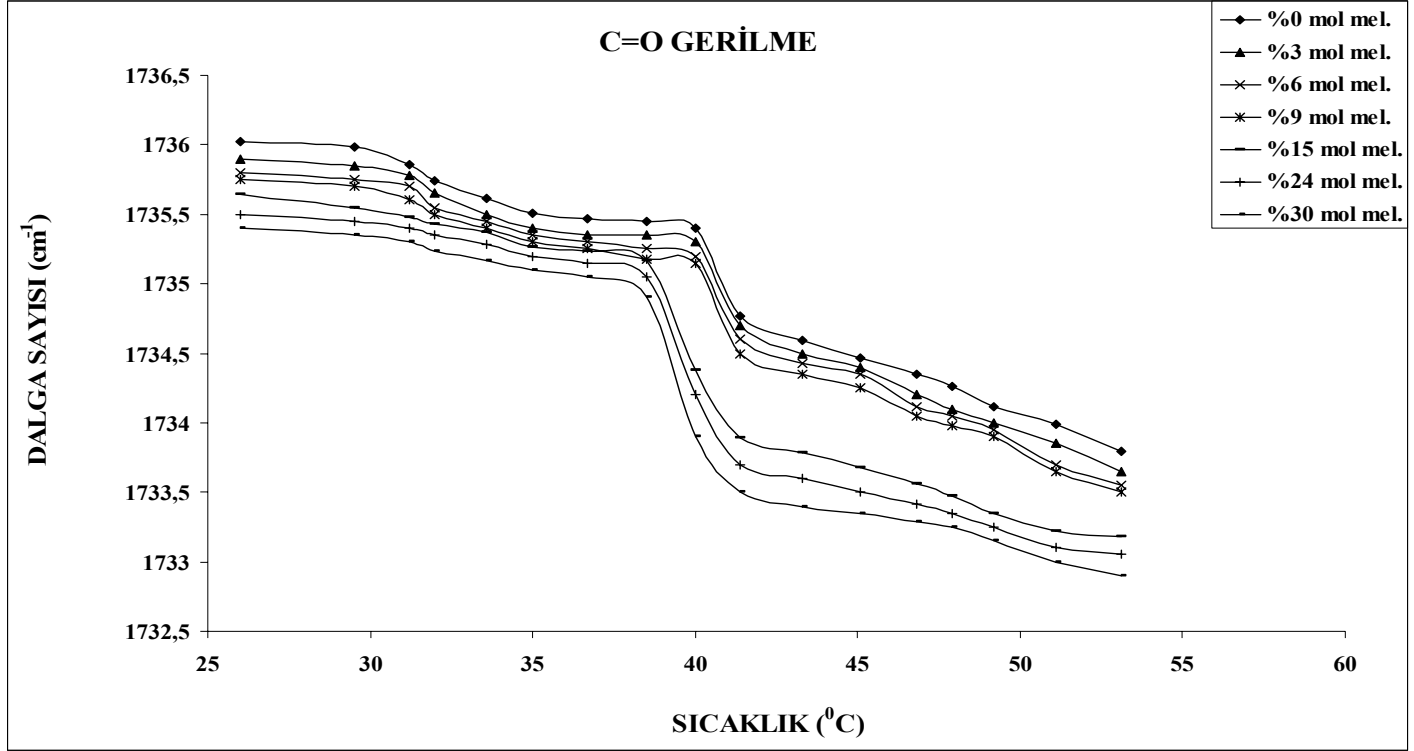
### 3.1.1.2 BAŞ GRUP GERİLME BÖLGESİ

#### 3.1.1.2.1 C = O Gerilme

Şekil 3.3'deki C = O gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde; saf DPPG eğrisinde 40 °C civarında ana faz geçiş sıcaklığını görüntüleyen ani bir azalma gözlenmiştir. Saf DPPG lipozomuna melatoninin farklı konsantrasyonlarının eklenmesi sonucunda, hem jel hem de sıvı kristal fazda, frekans değerlerinde, genel olarak azalma görülmüştür.

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

Hem jel hem de sıvı kristal fazda, DPPG lipozomlarına eklenen melatonin konsantrasyonlarının frekans değerlerini düşürmesi, melatoninin fosfolipitlerin karbonil grupları ile kuvvetli hidrojen bağı yaptığını gösterir (Şekil 3.3).



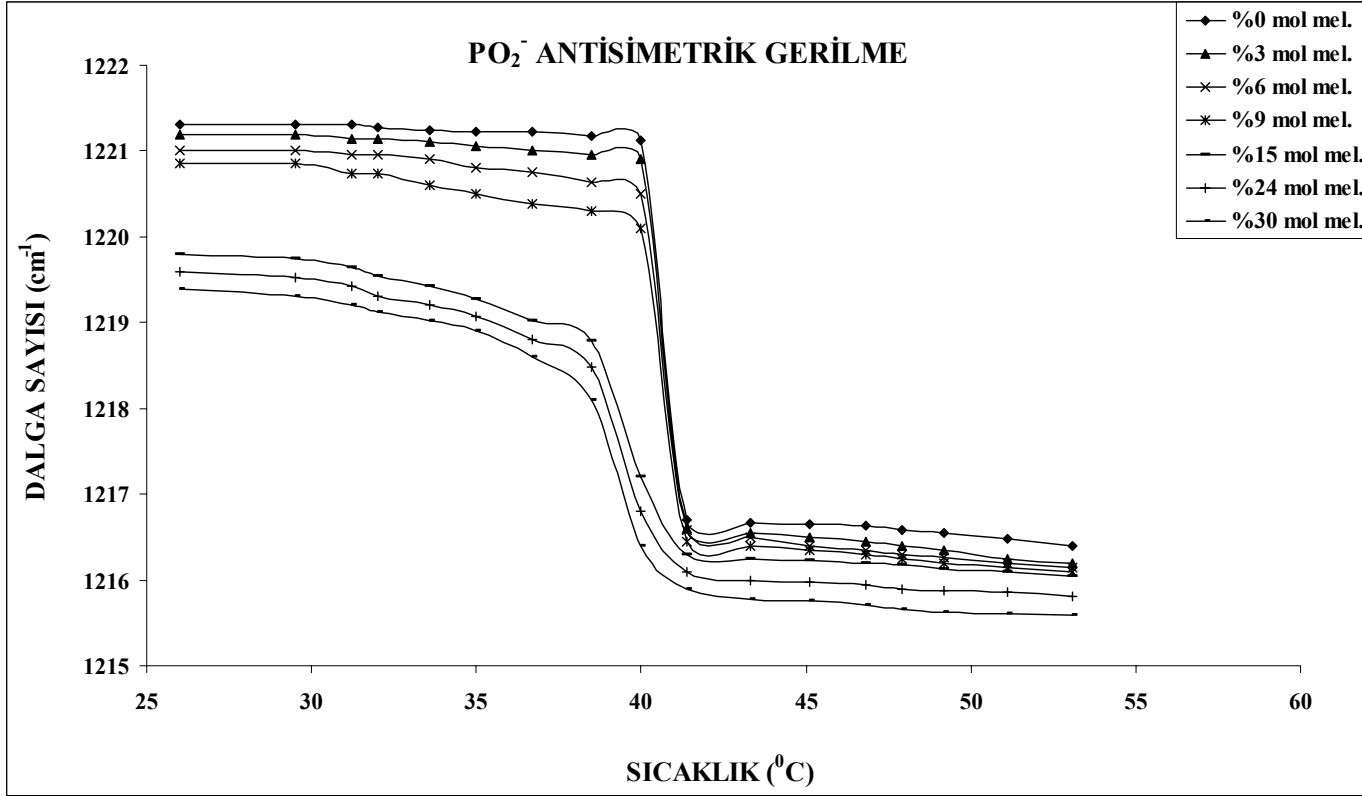
Şekil 3.3 Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPG lipozomunun C=O gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.

### 3.1.1.2.2 $PO_2^-$ Antisimetrik Gerilme

Şekil 3.4'deki  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerlerinde de yine C = O gerilme titreşim frekansında olduğu gibi hem jel hem de sıvı kristal fazda saf DPPG frekans değerlerine göre artan melatonin konsantrasyonları ile azalma gözlenmiştir.

Frekanstaki bu değişim değerlendirildiğinde;

Hem jel hem de sıvı kristal fazda, artan melatonin konsantrasyonlarının frekanslarının azalması yine melatoninin fosfolipitlerin baş grupları ile kuvvetli hidrojen bağı yaptığını gösterir (Şekil 3.4).

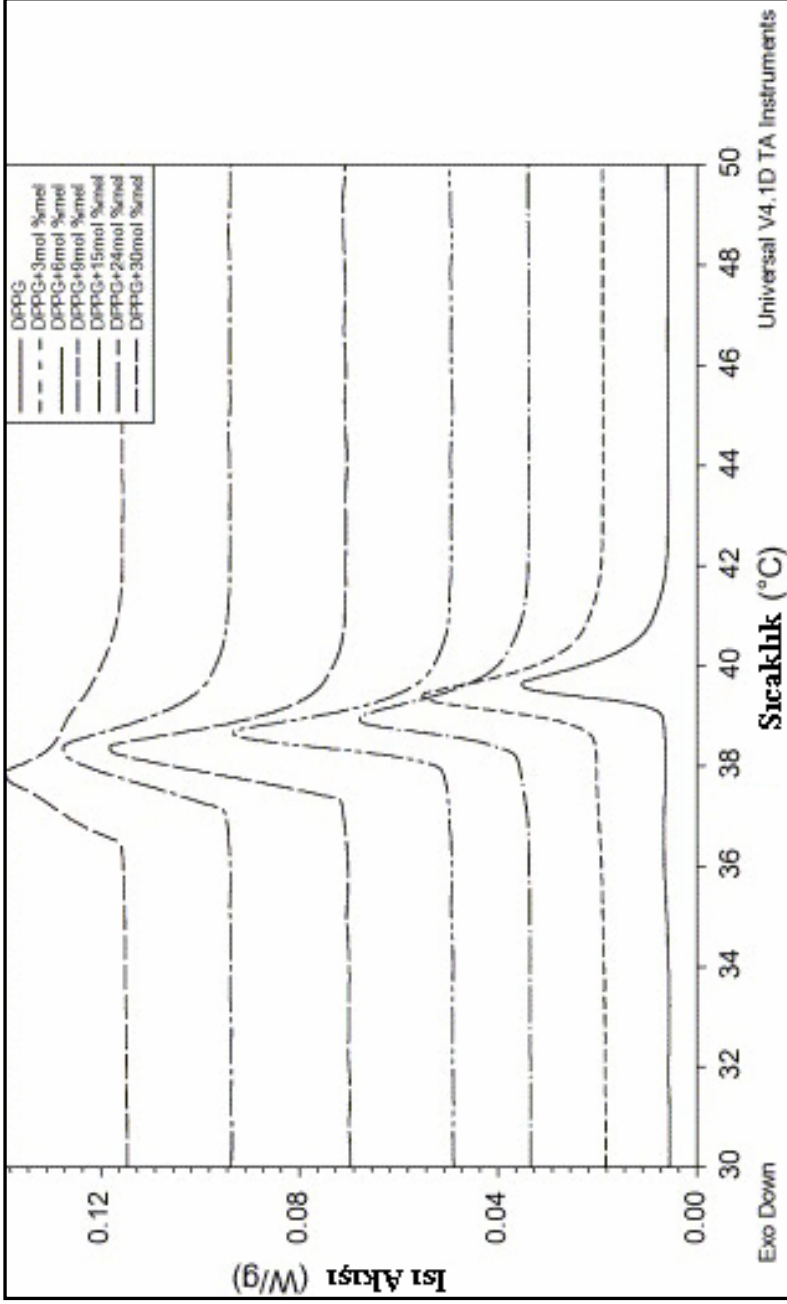


Şekil 3.4 Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPG lipozomunun  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.

### 3.1.2 DSC SONUÇLARI

Sıcaklığa bağı olarak saf DPPG ve değişik melatonin konsantrasyonları içeren DSC kalorimetrik eğrileri Şekil 3.5’de gösterilmiştir. Bu eğrilerden görüldüğü gibi, melatoninin saf DPPG lipozomlarına eklenmesi ile ön geçiş eğrisi kaybolur ve ana faz geçiş eğrisinin büyüklüğünde küçülme ve düşük sıcaklıklara kayma gözlenir.

Bu DSC sonuçlarına göre, melatonin konsantrasyonu arttıkça DSC piklerinin genişlemiş olması lipit zincirler arasındaki işbirliğinin azaldığı anlamına gelir.



Şekil 3.5 Saf ve farklı %mol melatonin içeren DPPG lipozomunun DSC kalorimetrik eğrisi.

### **3.2 MELATONİNİN DPPC VE DPPC/KOLESTEROL MODEL MEMBRANLARI (LUV) ÜZERİNE ETKİSİ**

Bu çalışmada, melatoninin, biyolojik membranlara en yakın model olan lipit membranlar; dipalmitol fosfatidilkolin (DPPC) ve DPPC/Kolesterol karışımı üzerine etkisi, Fourier transform infrared (FTIR) , diferansiyel tarama kalorimetre (DSC) ve Floresans Spektroskopisi teknikleri kullanılarak incelenmiştir.

Yüksek lisans çalışmalarımızda melatoninin nötr membranlar (DPPC) kullanarak hazırladığımız çok katmanlı veziküllerle (MLV) nasıl etkileştiğini sıcaklığa ve artan melatonin konsantrasyonlarına (%1, %3, %6, %9, %15, %24 ve %30 mol) bağlı olarak FTIR ve DSC teknikleri kullanarak incelemiştik. Bu çalışmamızda ise yine aynı nötr membranları kullanarak ve bu sefer büyük tek katmanlı veziküller (LUV) hazırlayarak melatoninin membranlarla etkileşimini inceledik. Melatoninin çok katmanlı ve tek katmanlı lipozomlarla etkileşiminde farklı davranış sergileyip sergilemediğini gösterebilmek için deneylerimizi bir düşük (%3 mol) ve bir yüksek (%15 mol) konsantrasyonlar olmak üzere iki melatonin konsantrasyonu ile gerçekleştirdik.

Melatoninin membran yapı ve akışkanlığını, membran geçirgenliğini nasıl değiştirdiği, melatoninin çeşitli konsantrasyonları kullanılarak ve sıcaklığa bağlı olarak incelenmiştir.

#### **3.2.1 FTIR SONUÇLARI**

Bu bölümde hem DPPC ve melatoninden oluşan model membranlar (LUV) için elde edilen hem de DPPC/Kolesterol ve melatoninden oluşan model membranlar (LUV) için elde edilen FTIR sonuçları incelenecektir.

FTIR tekniğinden elde edilen sonuçların analizinde düzen gibi yapısal parametreler ve dinamik parametreler dikkate alınmıştır. Tüm çalışmamızda

FTIR tekniği ile gerçekleştirdiğimiz sıcaklığa bağlı ölçümlerin hepsi üç kez tekrarlanmıştır.

### **3.2.1.1 C – H GERİLME BÖLGESİ**

#### **3.2.1.1.1 CH<sub>2</sub> Antisimetrik Gerilme**

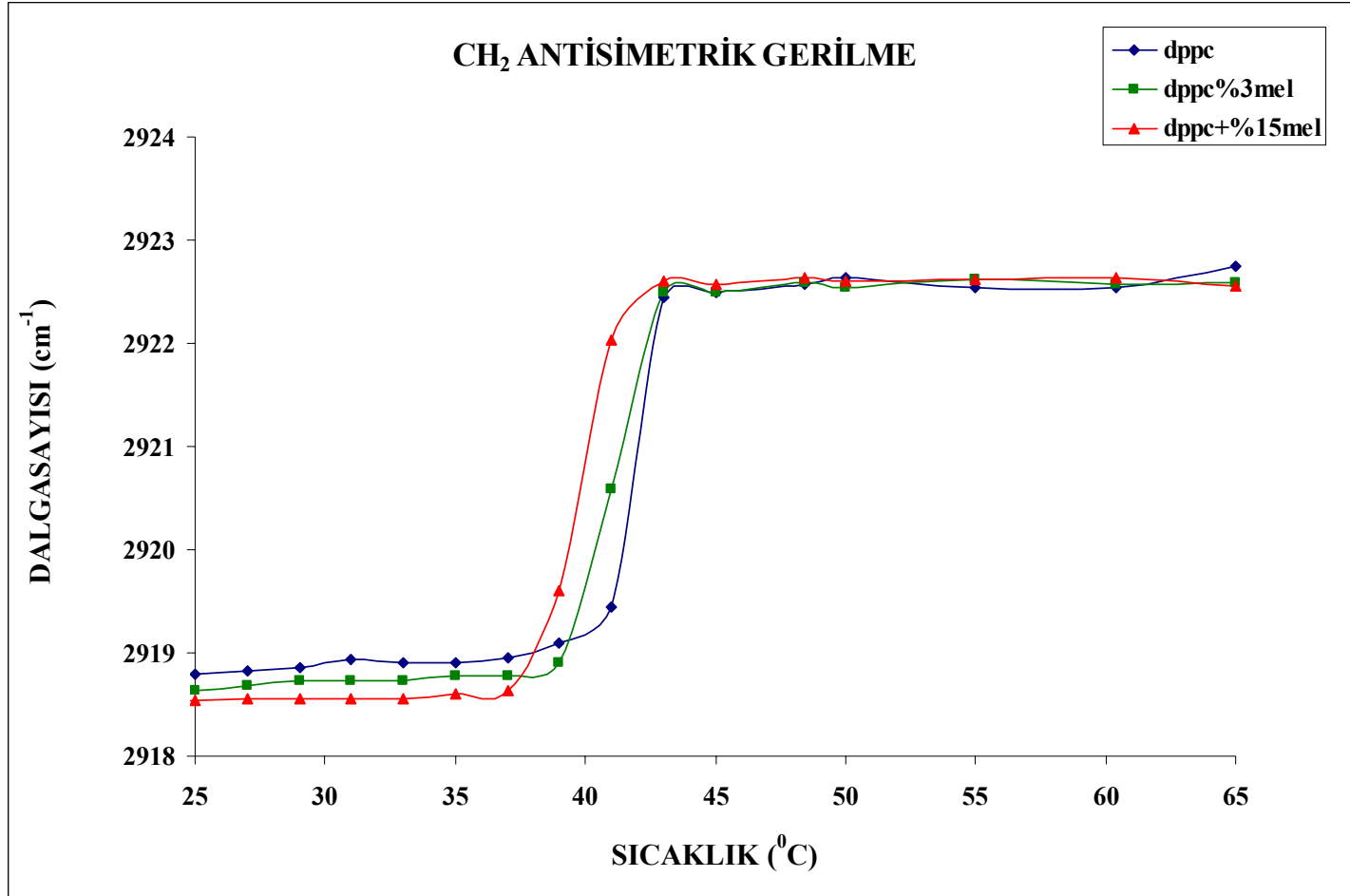
şekil 3.6'daki CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerleri saf DPPC (LUV) lipozomu için incelendiğinde; jelden sıvı kristal faza geçişin yaklaşık 41°C'de merkezlenen dar bir sıcaklık aralığında meydana geldiği gözlenmiştir.

Saf DPPC (LUV) lipozomlarına farklı % mol melatonin eklendiğinde faz geçişi değişmiştir. Melatoninin artan konsantrasyonları faz geçiş sıcaklığının düşmesine neden olmuştur.

Saf DPPC (LUV) lipozomlarına farklı konsantrasyonlarda (%3 ve %15 mol) melatonin eklenmesi ile faz geçişinin altındaki sıcaklıklarda yani jel fazda ve faz geçişinin üzerindeki sıcaklıklarda yani sıvı kristal fazda, frekansta konsantrasyona bağlı olarak farklı değişimler gözlenmiştir. Frekanstaki bu değişimler değerlendirildiğinde;

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

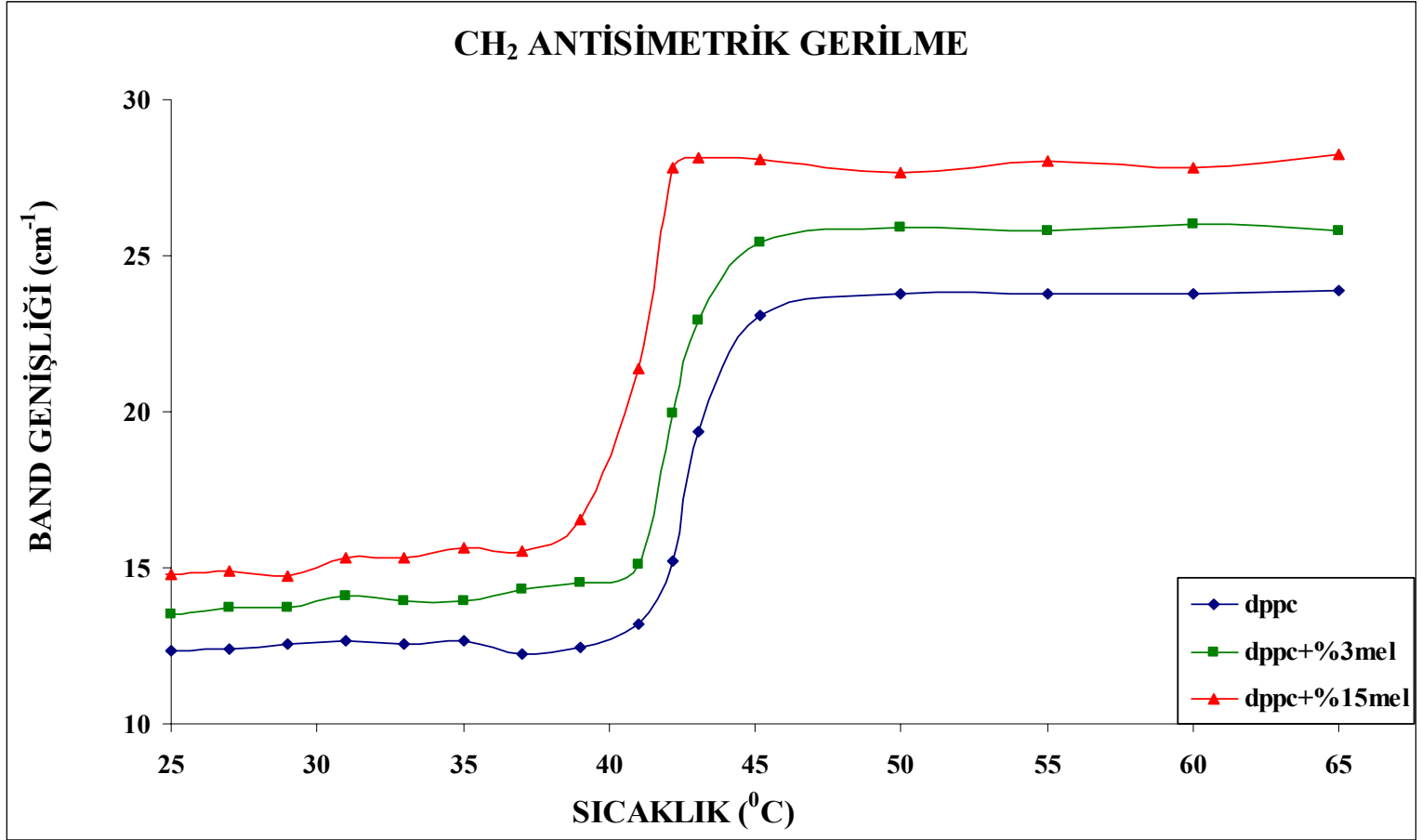
- Sıvı kristal fazda, melatoninin artan konsantrasyonları ile frekans değerlerinin saf DPPC (LUV) frekans değerleri ile hemen hemen aynı kalması, eklenen melatoninin bu fazda frekans üzerinde ihmal edilebilir etkiye sahip olduğunu gösterir (şekil 3.6).



Şekil 3.6 Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC (LUV) lipozomunun CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.

Şekil 3.7'deki CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme titreşiminin band genişliğinin sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde; hem jel hem de sıvı kristal fazda değerler saf DPPC (LUV) lipozomu değerlerine göre, melatoninin %3 ve %15 mol konsantrasyonlarının eklenmesi ile artmıştır. Band genişliği değerlerindeki bu değişimler değerlendirildiğinde;

- Band genişliği değerlerinin hem jel hem de sıvı kristal fazda saf DPPC (LUV) değerlerine göre artması; lipit asil zincirlerinin hareket özgürlüğünün her iki fazda artması dolayısı ile melatoninin membranın akışkanlığını arttırdığı anlamına gelir.



Şekil 3.7 Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC (LUV) lipozomunun CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu band genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi.

Buraya kadar melatonin ve DPPC LUV model membranlarının C-H gerilme bölgesi için elde edilen etkileşimi incelenmiştir. Şimdi ise saf DPPC membranlarına kolesterol ve melatonin eklenmesi ile elde edilen LUV model membranlarının C-H gerilme bölgesi için elde edilen etkileşim incelenecektir.

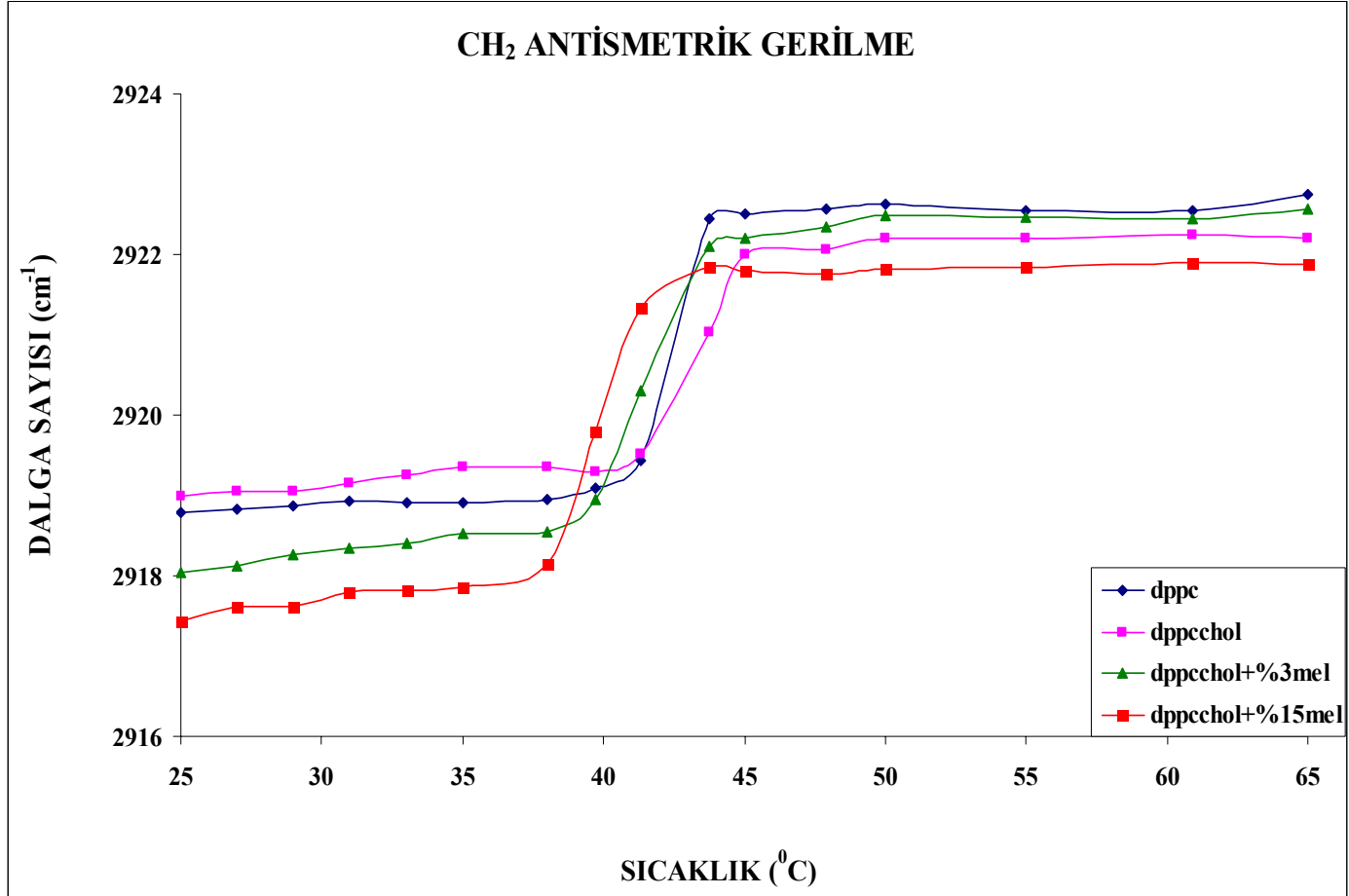
Şekil 3.8'deki sadece kolesterol ve farklı melatonin konsantrasyonları (%3 ve %15 mol) ile kolesterol eklenmesi ile elde edilen karışım için  $CH_2$  antisimetrik gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerleri saf DPPC (LUV) lipozomu için incelendiğinde; saf DPPC lipozomuna kolesterol eklenmesi ile jelden sıvı kristal faza geçişin yaklaşık yine  $41^\circ C$  de meydana geldiği gözlenmiştir.

Saf DPPC lipozomuna kolesterol ve farklı % mol melatonin eklendiğinde faz geçişi değişmiştir. Melatoninin faz geçiş sıcaklığının kolesterol varlığında da düşmesine neden olmuştur.

Saf DPPC lipozomuna sadece kolesterol ve kolesterol ile birlikte farklı konsantrasyonlarda (%3 ve %15 mol) melatonin eklenmesi durumunda jel fazda ve sıvı kristal fazda, frekansta konsantrasyona bağlı olarak farklı değişimler gözlenmiştir. Frekanstaki bu değişimler değerlendirildiğinde;

- Jel fazda, kolesterolün saf DPPC lipozomlarına eklenmesi ile frekans değerlerinde artma gözlenirken, kolesterol ve farklı % mol melatoninin DPPC lipozomlarına eklenmesi ile frekans değerlerinde azalma gözlenmiştir. Saf DPPC lipozomlarına sadece kolesterolün eklenmesi jel fazda gauche konformerlerinin sayısının artmasına neden olurken, kolesterol ve melatonin DPPC membranlarına eklenmesi sistemde gauche konformerlerinin sayısının azalmasına ve dolayısı ile de sistemin asil zincir (hidrokarbon zincir) düzeninin artmasına neden olmuştur.

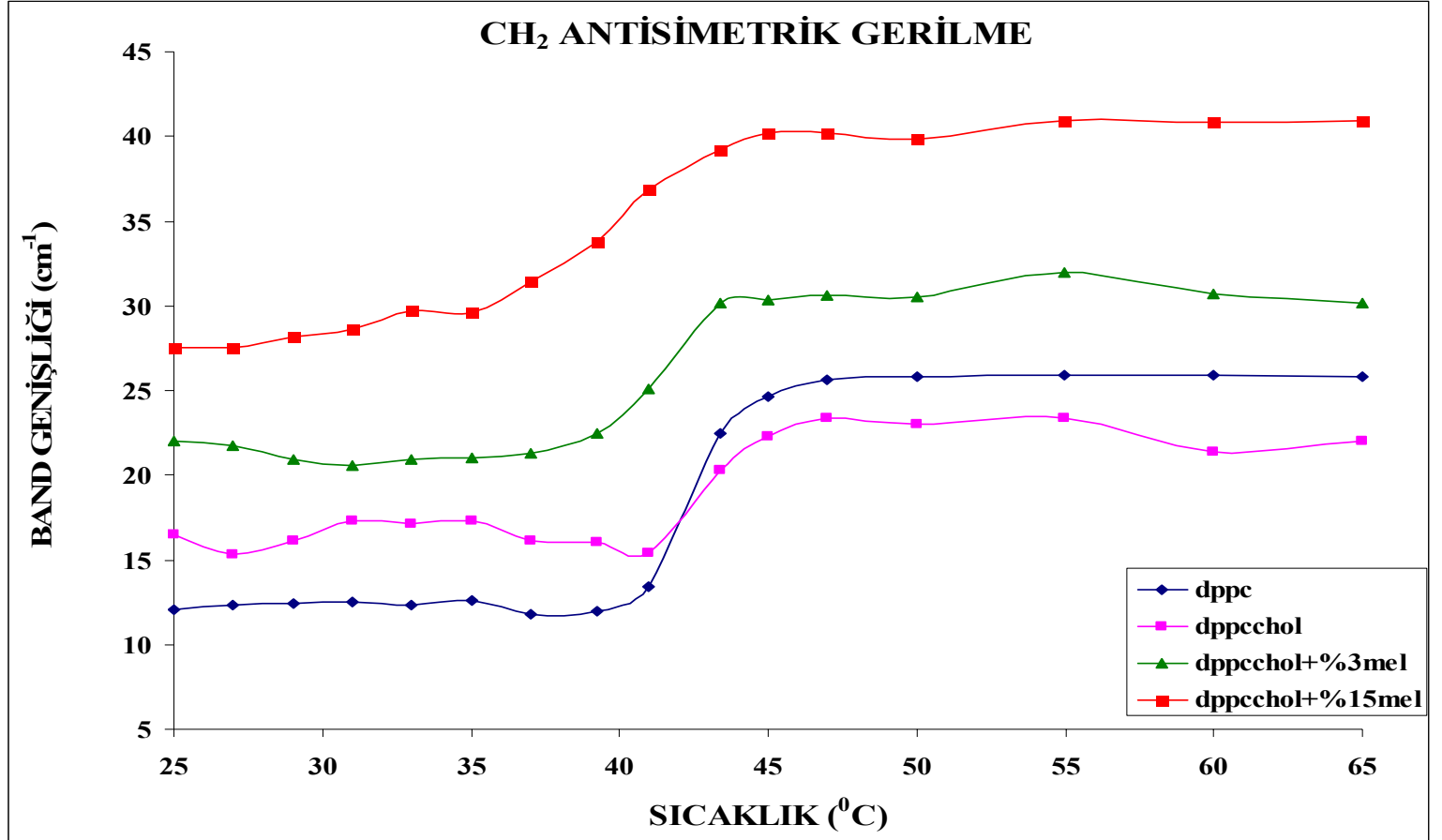
- Sıvı kristal fazda, kolesterol, saf DPPC membranlarının frekans değerlerini azaltmıştır. Melatonin ve kolesterolün sistemde bir arada bulunmasıyla da frekans değerleri saf DPPC membranlarının frekans değerlerine göre azalmıştır. Sadece kolesterol ve kolesterol ve melatonin karışımından oluşan DPPC membranlarının frekans değerlerinin saf DPPC frekans değerlerinden düşük olması ise, kolesterol ve melatoninin, sistemin asil zincir düzenini sıvı kristal fazda arttırdığı anlamına gelmektedir. (şekil 3.8)



Şekil 3.8 Saf, kolesterol ve kolesterolle birlikte farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.

Şekil 3.9'daki CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme titreşiminin band genişliğinin sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde; kolesterolün saf DPPC membranlarına eklenmesi ile jel fazda band genişliği değerleri artarken sıvı kristal fazda bu değerler azalmıştır. Sistemde hem kolesterol hem de melatoninin bulunması durumunda ise band genişliği değerleri hem jel hem de sıvı kristal fazda artmıştır. Band genişliği değerlerindeki bu değişimler değerlendirildiğinde;

- Band genişliği değerlerinin sadece kolesterol varlığında jel fazda artması; kolesterolün saf DPPC lipozomlarının asil zincir hareket özgürlüğünü arttırdığı anlamına gelirken, sıvı kristal fazda bu değerlerin saf DPPC lipozomlarına göre azalması ise kolesterolün bu fazda lipit asil zincirlerinin hareket özgürlüğünü azalttığı anlamına gelir. Sistemde hem kolesterol hem de melatoninin bir arada bulunduğu durumda band genişliği değerlerinin hem jel hem de sıvı kristal fazda saf DPPC lipozomu değerlerine göre artması; lipit asil zincirlerinin hareket özgürlüğünün her iki fazda artması dolayısı ile melatoninin, membran akışkanlığını her iki fazda da arttırdığı anlamına gelir.



Şekil 3.9 Saf, kolesterol ve kolesterol ile birlikte farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu band genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi.

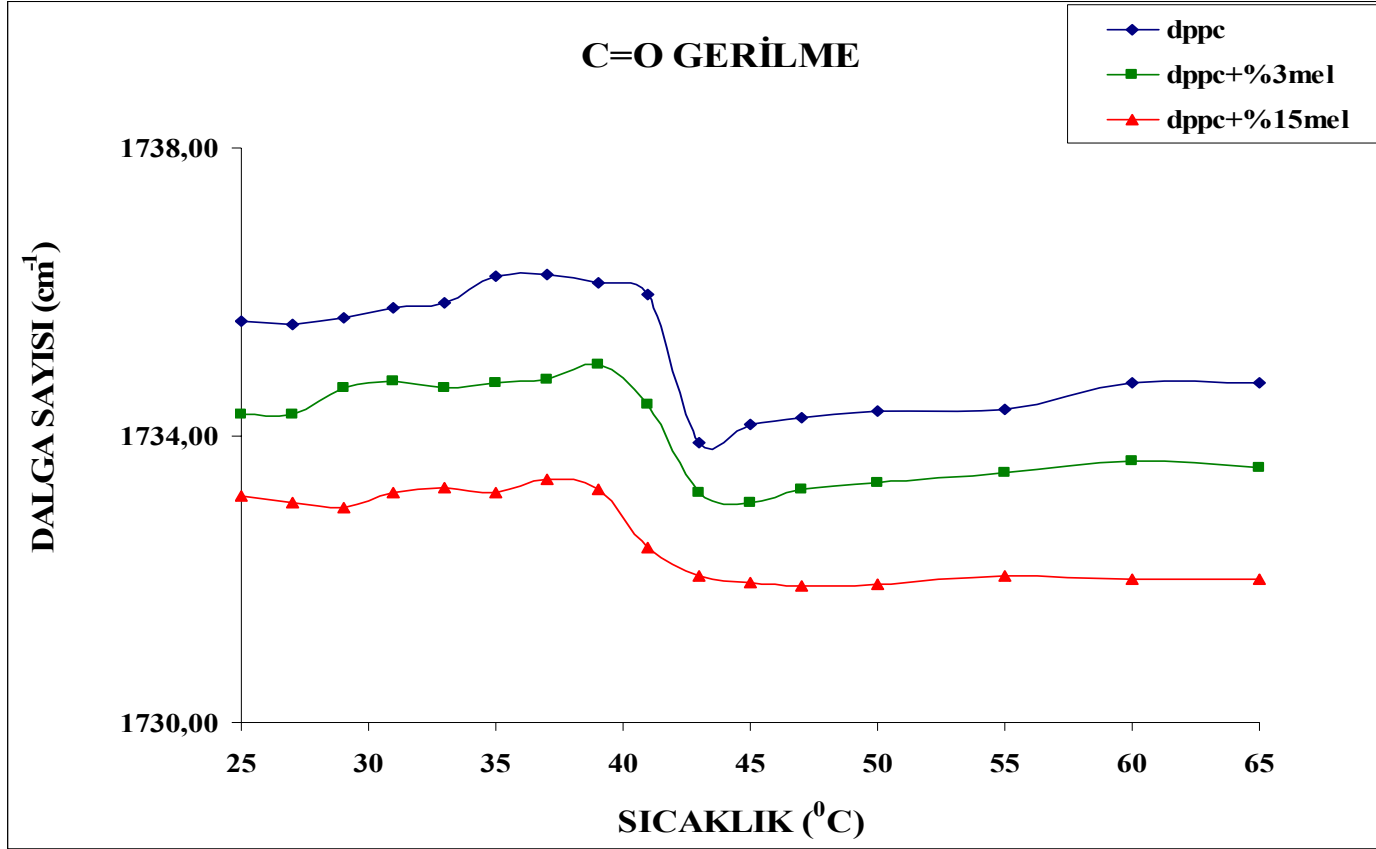
### 3.2.1.2 BAŞ GRUP GERİLME BÖLGESİ

#### 3.2.1.2.1 C = O Gerilme

Şekil 3.10'daki C = O gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde; saf DPPC (LUV) lipozomuna melatoninin farklı konsantrasyonlarının eklenmesi sonucunda, hem jel hem de sıvı kristal fazda, frekans değerlerinde azalma görülmüştür.

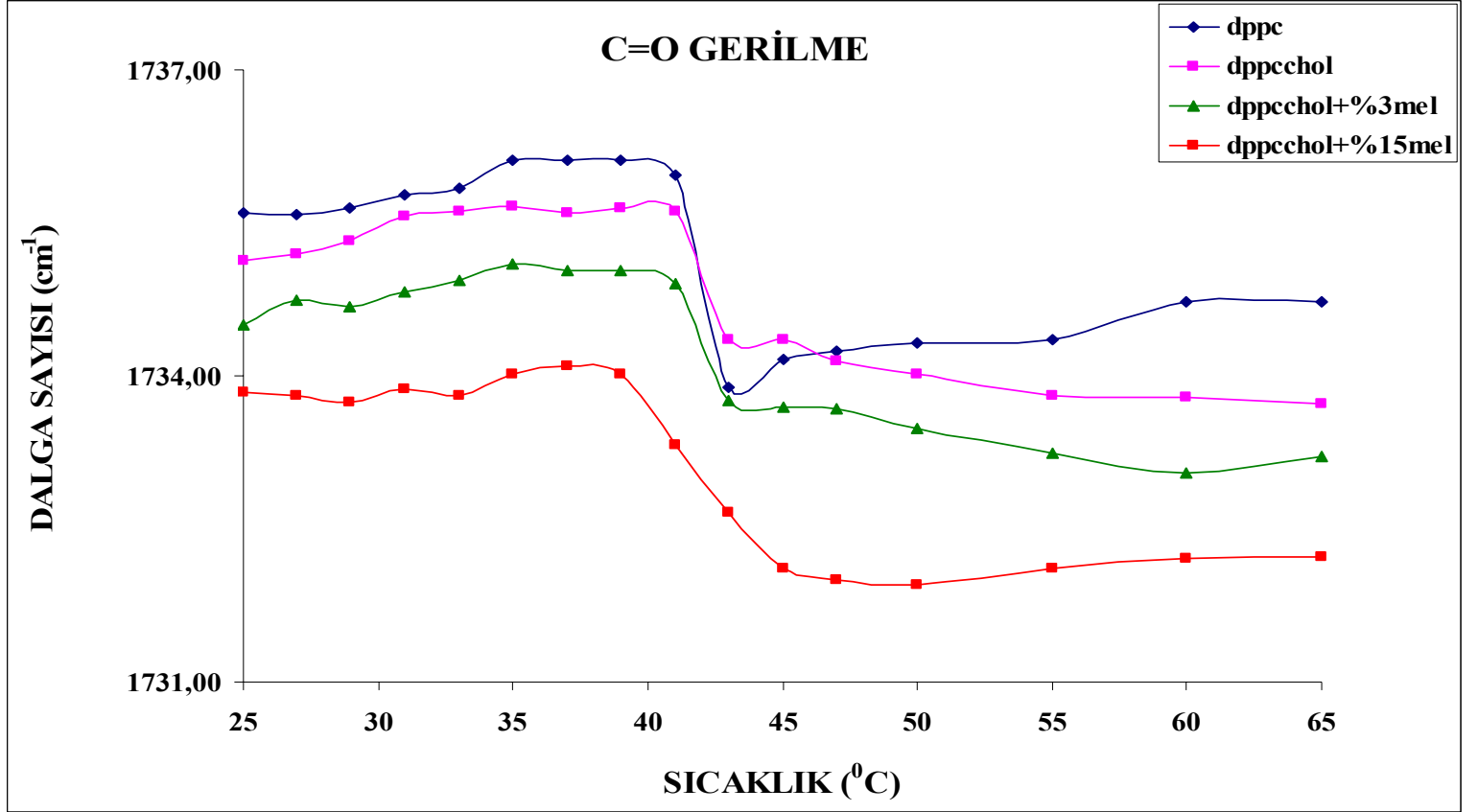
C = O gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerlerindeki bu değişimler değerlendirildiğinde;

- Hem jel hem de sıvı kristal fazda, DPPC (LUV) lipozomuna eklenen melatonin konsantrasyonlarının frekans değerlerini düşürmesi, melatoninin fosfolipitlerin karbonil grupları ile kuvvetli hidrojen bağı yaptığını gösterir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC (LUV) lipozomunun C=O gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.

Şekil 3.11'deki C = O gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerleri saf DPPC, DPPC/Kolesterol ve DPPC/Kolesterol/melatonin sistemi için incelendiğinde; saf DPPC lipozomuna sadece kolesterol ve kolesterolle birlikte artan melatonin konsantrasyonları eklendiğinde yine hem jel hem de sıvı kristal fazda, hem kolesterolün hem de kolesterolle birlikte eklenen melatonin konsantrasyonlarının frekans değerlerini düşürdüğü gözlenmiştir. Bu da melatoninin DPPC lipozomunun karbonil grupları ile de kuvvetli hidrojen bağı yaptığını gösterir.

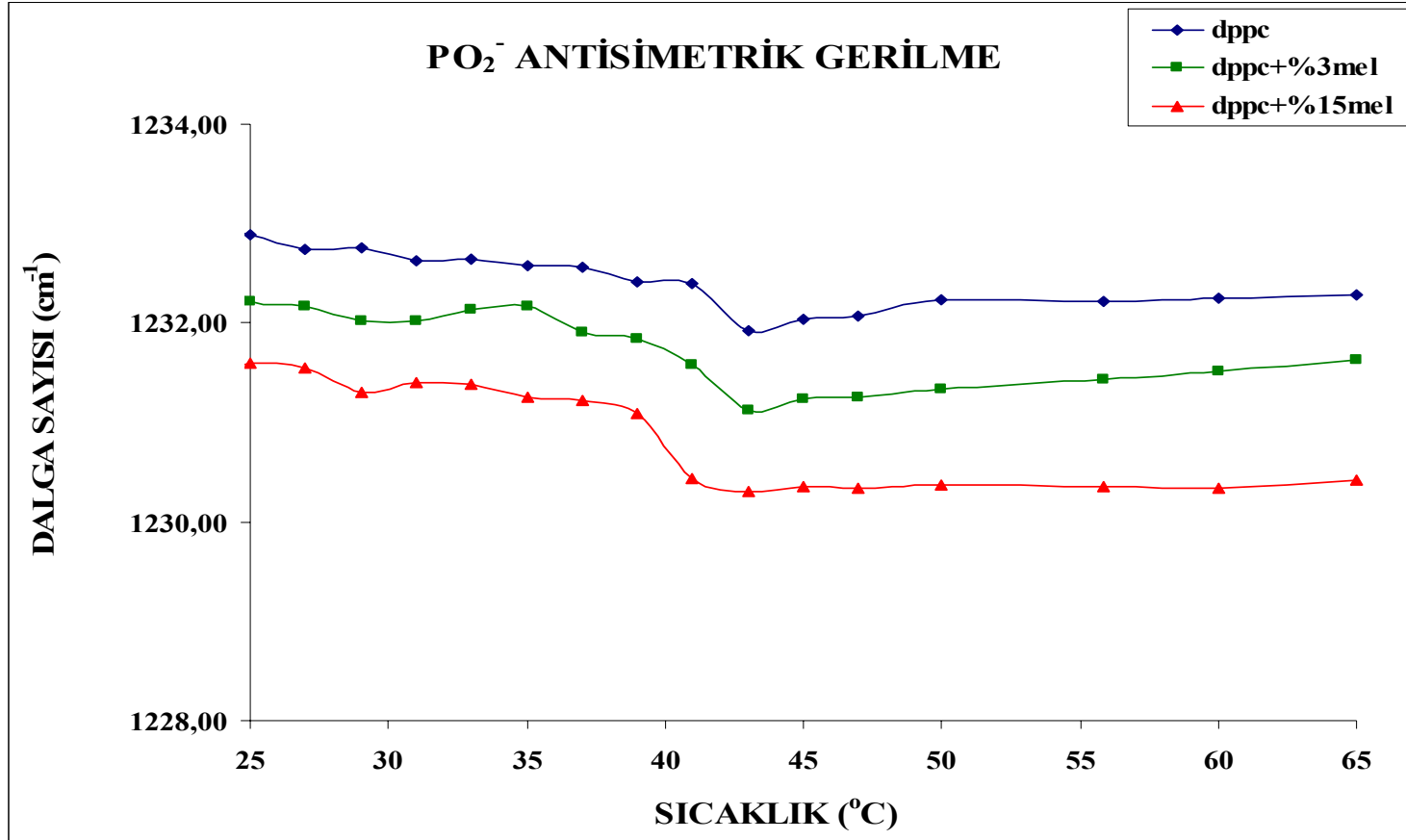


Şekil 3.11 Saf, kolesterol ve kolesterol ile birlikte farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun C=O gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.

### 3.2.1.2.2 $PO_2^-$ Antisimetrik Gerilme

Melatoninin DPPC ve DPPC/Kolesterol (LUV) lipozomlarının baş grupları ile etkileşimi  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme bandının analizi ile incelenmiştir.

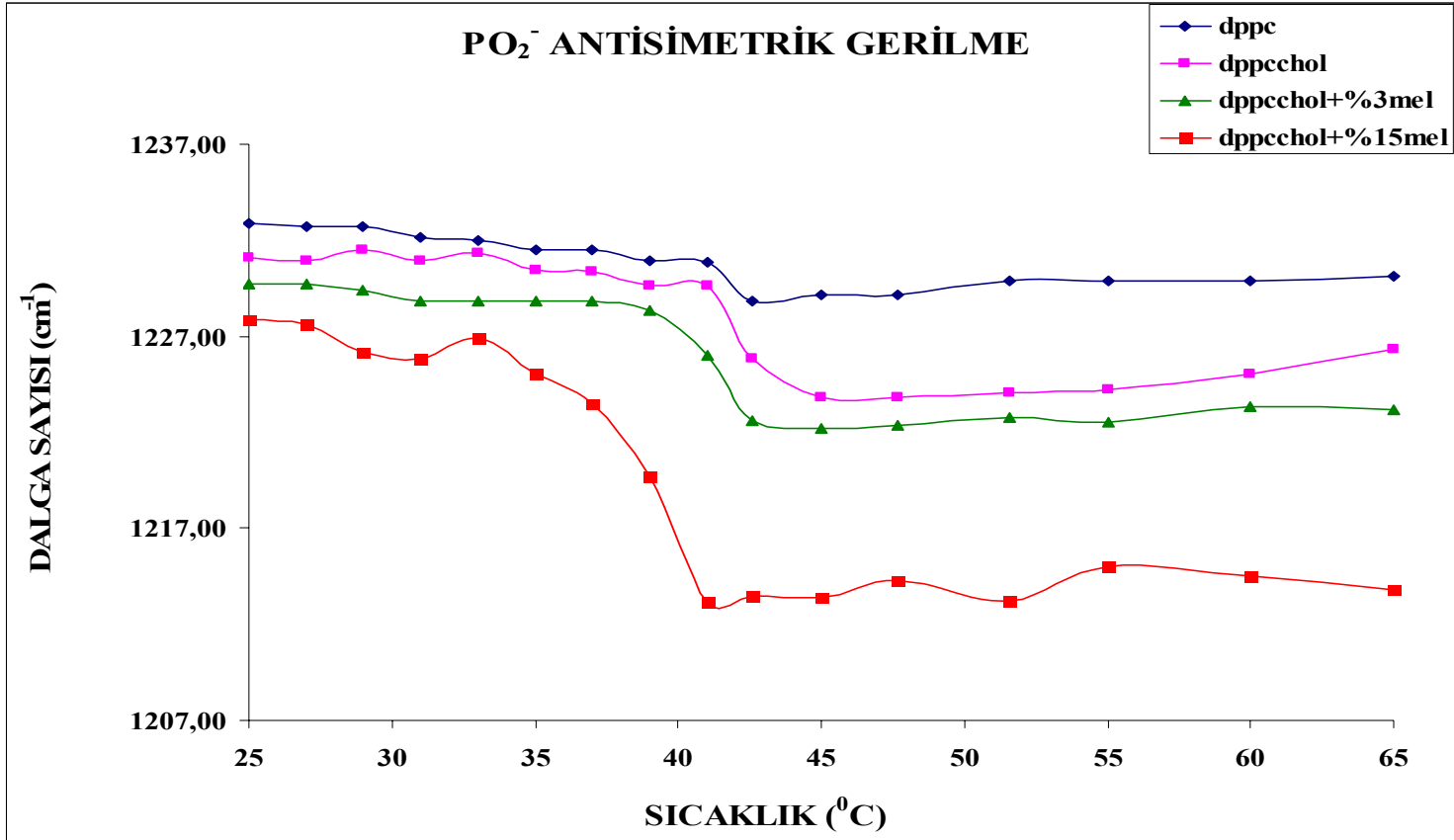
Şekil 3.12'deki  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde saf DPPC membranlarına artan melatonin konsantrasyonları eklendiğinde frekans değerlerinde C = O gerilme titreşim frekansında olduğu gibi azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.12 Saf ve farklı % mol melatonin içeren DPPC (LUV) lipozomunun  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.

Şekil 3.13'deki  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme titreşim frekansının sıcaklığa bağlı değerlerinde de yine C = O gerilme titreşim frekansında olduğu gibi hem jel hem de sıvı kristal fazda saf DPPC lipozomuna hem sadece kolesterol eklenmesi ile hem de kolesterol içeren DPPC lipozomuna artan melatonin konsantrasyonunun eklenmesi ile frekans değerlerinde yine bir azalma gözlenmiştir.

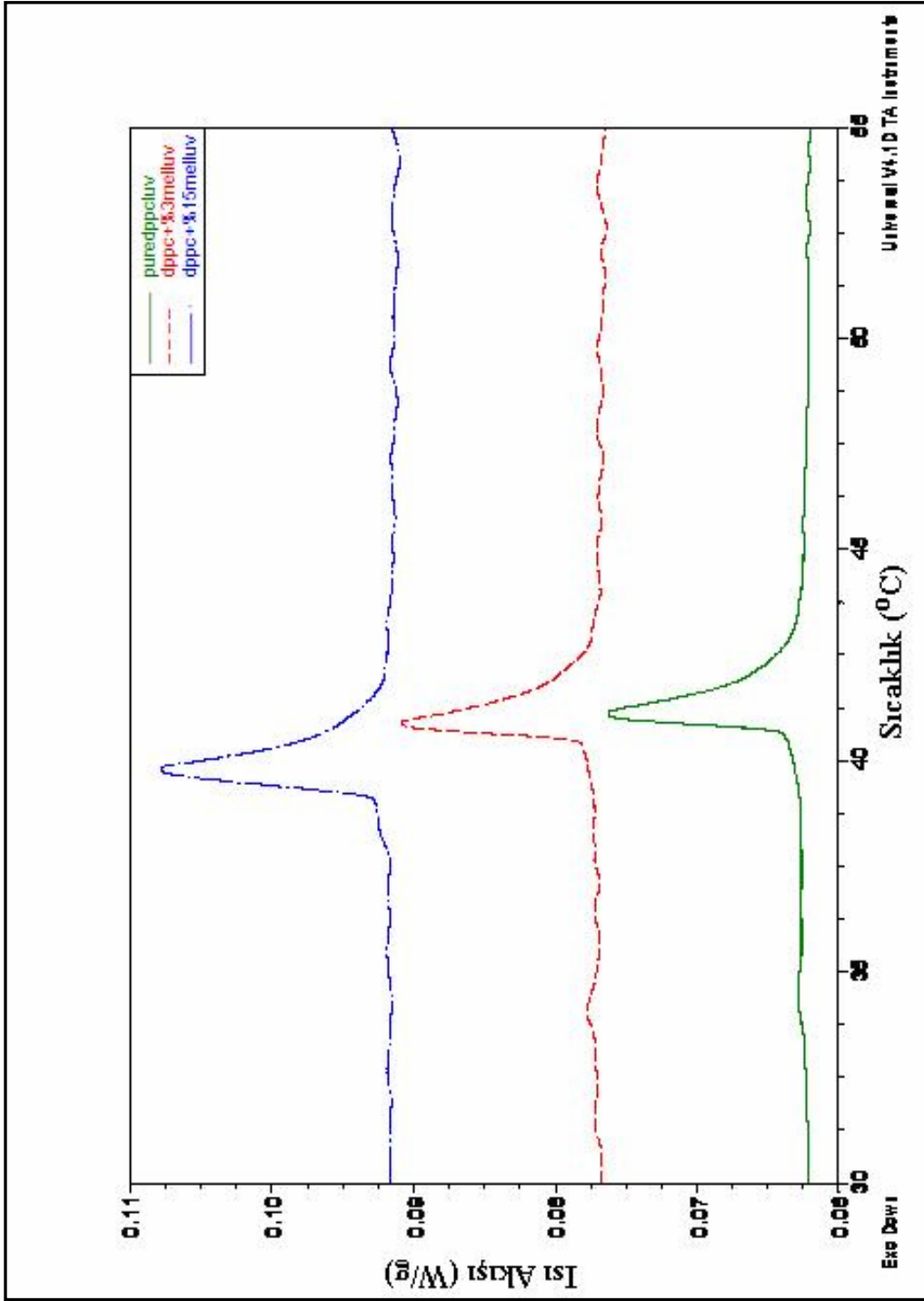
Hem jel hem de sıvı kristal fazda, artan melatonin konsantrasyonları ile DPPC ve DPPC/Kolesterol sisteminin frekans değerlerinin azalması yine melatoninin fosfolipitlerin baş grupları ile kuvvetli hidrojen bağı yaptığını gösterir.



Şekil 3.13 Saf, kolesterol ve kolesterol ile birlikte farklı % mol melatonin içeren DPPC lipozomunun PO<sub>2</sub><sup>-</sup> antisimetrik gerilme modu frekansının sıcaklığa bağlı değişimi.

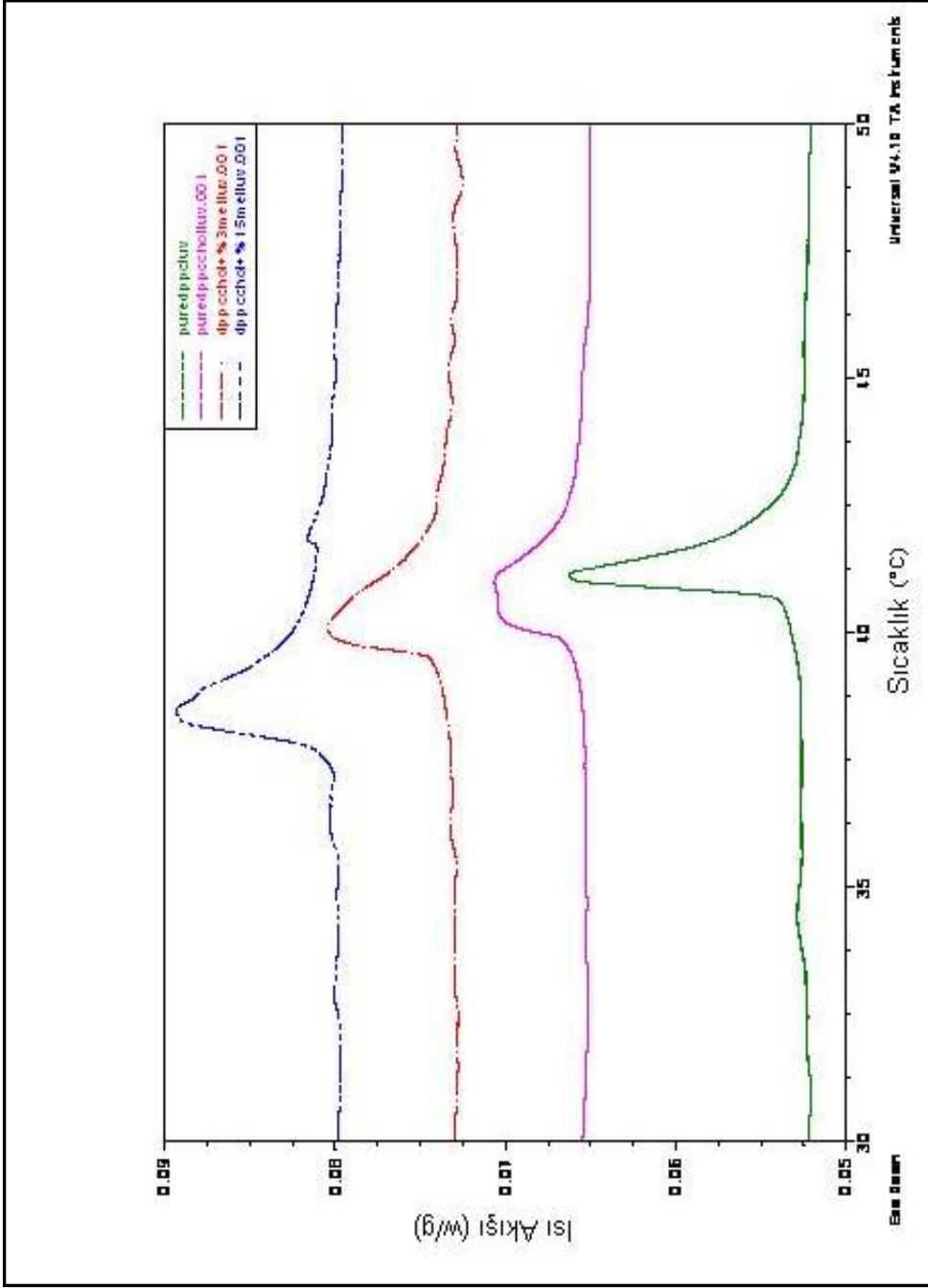
### 3.2.2 DSC SONUÇLARI

Sıcaklığa bağı olarak saf DPPC ve değişik melatonin konsantrasyonları içeren LUV lipozomlarının DSC kalorimetrik eğrileri Şekil 3.14'de gösterilmiştir. Bu eğrilerden görüldüğü gibi, melatoninin saf DPPC (LUV) lipozomlarına eklenmesi ile ön geçiş eğrisi kaybolur ve ana faz geçiş eğrisinde düşük sıcaklıklara kayma gözlenir.



Şekil 3.14 Saf ve farklı %mol melatonin içeren DPPC (LUV) lipozomunun DSC kalorimetrik eğrisi.

Şekil 3.15’de ise saf, sadece kolesterol ve kolesterolle birlikte değişik melatonin konsantrasyonları içeren DPPC lipozomlarının DSC kalorimetrik eğrileri görülmektedir. Şekilden de görüleceği gibi DPPC’ye kolesterolün eklenmesi ile 41 °C’de esas faz geçiş sıcaklığında gözlenen pik de genişleme söz konusudur. Melatonin konsantrasyonu arttıkça esas faz geçiş sıcaklığı daha düşük sıcaklıklara kaymıştır.

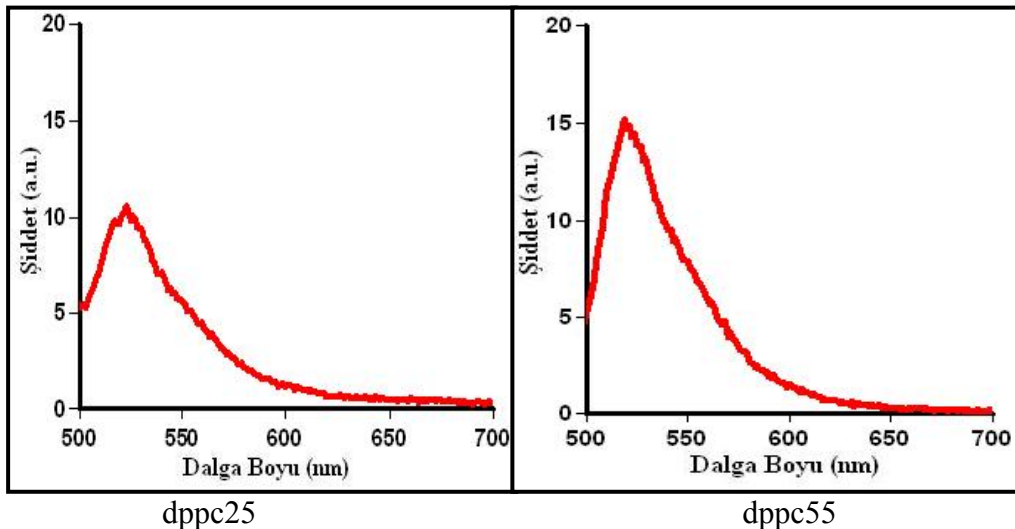


Şekil 3.15 Saf, kolesterol ve kolesterol ile birlikte farklı %mol melatonin içeren DPPC lipozomunun DSC kalorimetrik eğrisi.

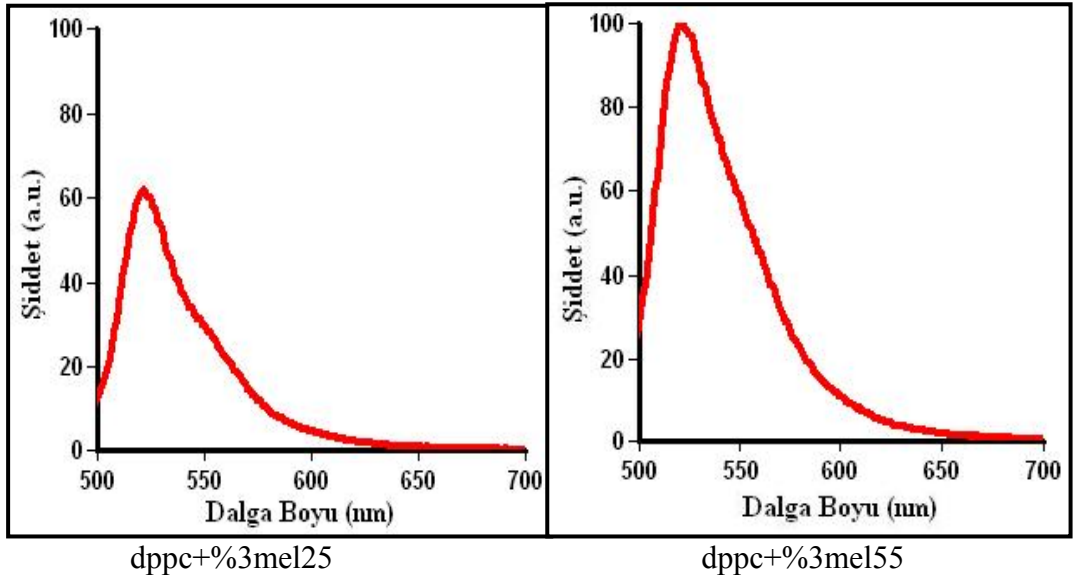
### 3.2.3 FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ SONUÇLARI

Melatoninin DPPC ve DPPC/Kolesterol karışımından oluşan LUV membranları üzerindeki etkisi FTIR ve DSC teknikleri yanı sıra Floresans Spektroskopisi tekniği ile de incelenmiştir. Melatonin etkisi floresans emisyon spektrumları değerlendirilerek incelenmiştir. Floresans emisyon spektrumları LUV membranlarına SP-DiOC<sub>18</sub>(3) boyası eklenerek ve 480-700 nm aralığında ve 470 nm eksitasyon dalga boyunda elde edilmiştir. Emisyon spektrumları kullanılan model membran lipitinin hem jel faz sıcaklığında (25 °C) hem de sıvı kristal faz sıcaklığında (55 °C) alınmıştır.

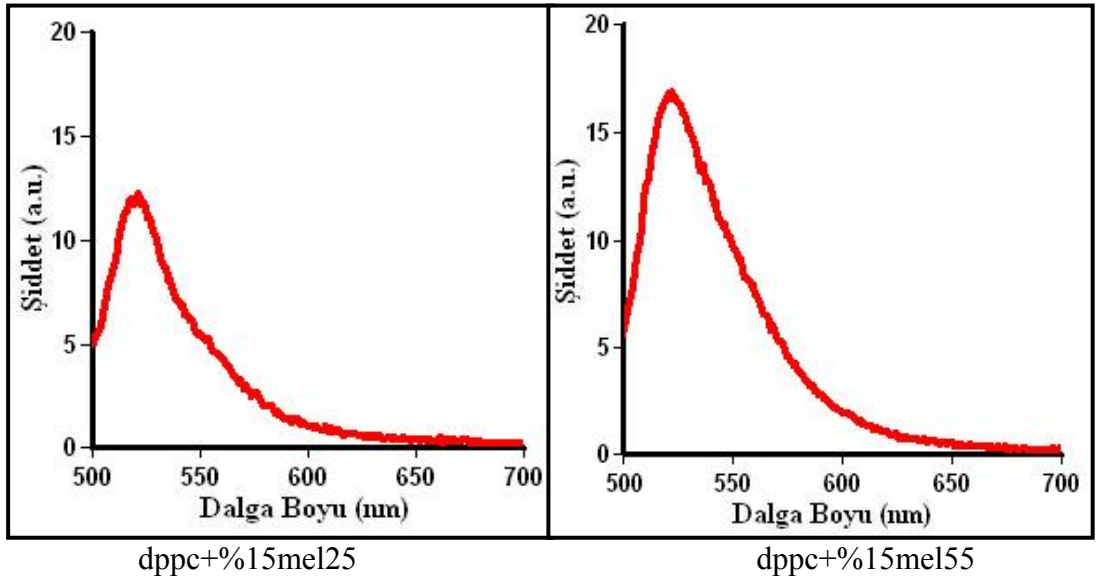
Şekil 3.16 (a,b,c), saf ve farklı konsantrasyonlarda melatonin içeren DPPC LUV membranları için 25 ve 55 °C de elde edilmiş emisyon spektrumlarını göstermektedir. İki farklı sıcaklıktaki emisyon spektrumları incelendiğinde, sıvı kristal faz sıcaklığında elde edilen emisyon spektrumlarında genişleme olduğu ve saf DPPC LUV membranına melatonin eklenmesi ile floresans şiddetinin % 3 mol melatonin konsantrasyonu için her iki sıcaklıkta da arttığı görülürken, % 15 mol melatonin konsantrasyonu için her iki sıcaklıkta da hemen hemen aynı kaldığı görülmektedir.



(a)

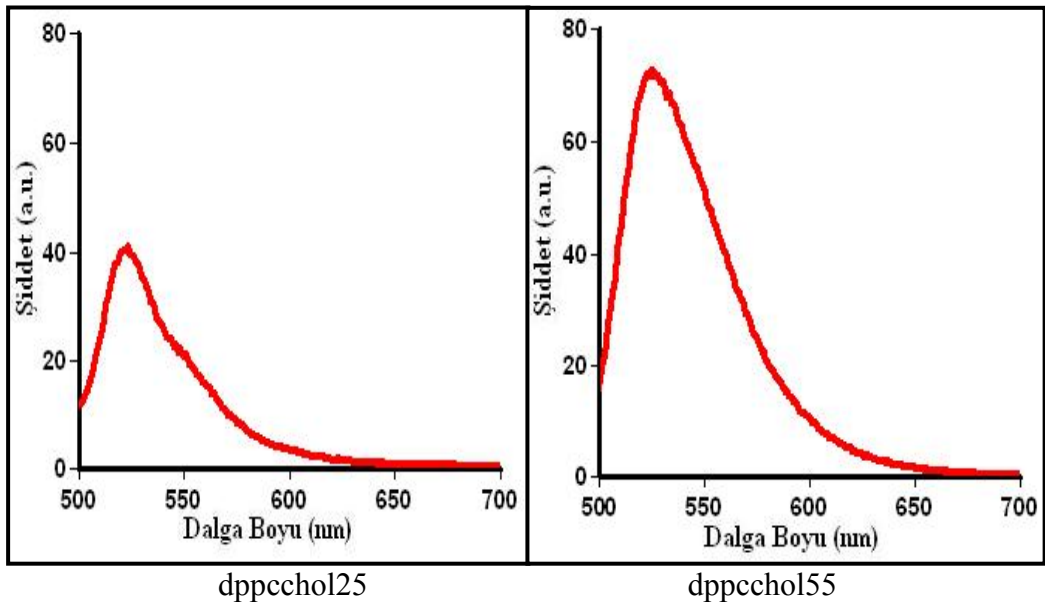


(b)

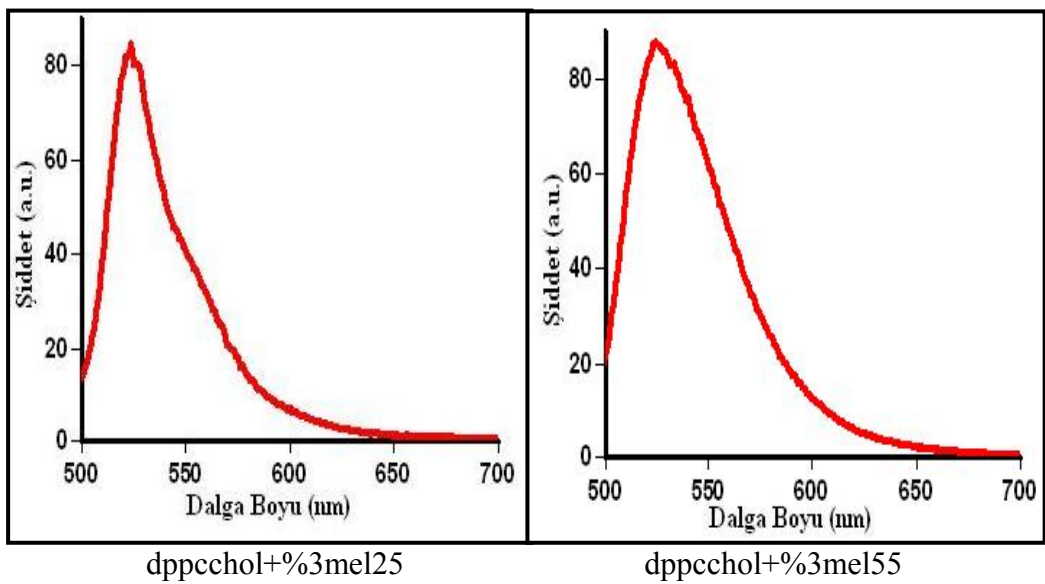


(c)

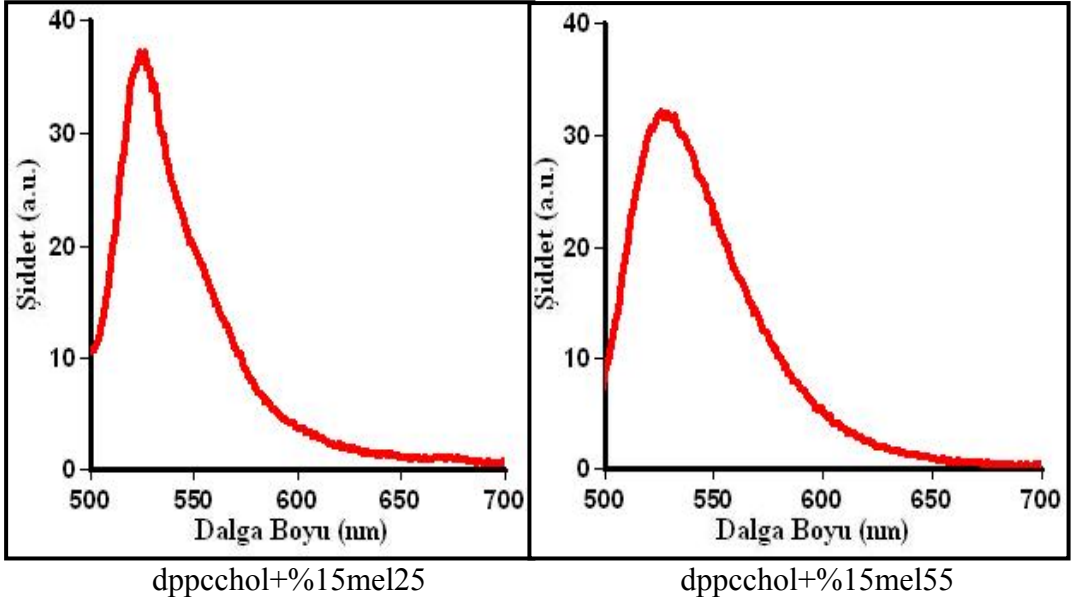
Şekil 3.16 Saf ve farklı konsantrasyonlarda melatonin içeren DPPC LUV membranları için 25 ve 55 °C'de elde edilen emisyon spektrumları. (a) saf DPPC LUV membranı (b) % 3 mol melatonin içeren DPPC LUV membranı (c) % 15 mol melatonin içeren DPPC LUV membranı.



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.17 Saf ve farklı konsantrasyonlarda melatonin içeren DPPC/Kolesterol LUV membranları için 25 ve 55 °C’de elde edilen emisyon spektrumları. (a) saf DPPC/Kolesterol LUV membranı (b) % 3 mol melatonin içeren DPPC/Kolesterol LUV membranı (c) % 15 mol melatonin içeren DPPC/Kolesterol LUV membranı.

Şekil 3.17 (a,b,c), farklı melatonin konsantrasyonu içeren DPPC/Kolesterol karışımından oluşan LUV membranlarına ait 25 ve 55 °C de elde edilmiş emisyon spektrumlarını göstermektedir. Saf DPPC LUV membranı için elde edilen emisyon spektrumu ile saf DPPC/Kolesterol LUV membranı için elde edilen emisyon spektrumlarındaki emisyon şiddeti karşılaştırıldığında saf DPPC lipozomuna kolesterol eklendiğinde emisyon şiddetinin her iki sıcaklık için de saf DPPC lipozomundan daha fazla olduğu görülmektedir. Emisyon şiddetinin bu karışımda daha fazla olmasının nedeni kolesterol etkisidir. DPPC oda sıcaklığında jel fazdadır ve kolesterolün

eklenmesiyle sistem jel fazdan daha düzensiz bir faz olan sıvı-düzenli (*lo*) fazına geçmiştir. Sıcaklığın membran faz geçiş sıcaklığının üzerinde bir sıcaklığa artması ile de membran sıvı kristal faza geçip daha düzensiz bir hal almıştır. Kolesterol ve sıcaklık etkisi ile daha düzensiz bir yapıda bulunan boya molekülleri sistemde daha serbest halde buldukları için emisyon şiddetinde artış gözlenmiştir. DPPC/Kolesterol LUV membranına melatonin eklenmesi ile, her iki sıcaklıkta da, % 3 mol melatonin konsantrasyonu için elde edilen emisyon şiddeti incelendiğinde, saf DPPC/Kolesterol karışımı için elde edilen emisyon şiddetinden fazla olduğu görülmektedir. % 15 mol melatonin konsantrasyonu içeren DPPC/Kolesterol LUV membranı için elde edilen emisyon şiddeti incelendiğinde, saf DPPC/Kolesterol karışımı için elde edilen emisyon şiddetinden daha düşük olduğu görülmektedir.

### 3.3 PROB–MEMBRAN ETKİLEŞİMLERİ

Melatonin-membran etkileşimlerini Floresans Spektroskopisi ile incelerken floresans özelliği olan bir prob kullandık. Floresans problemler biyolojik materyallerin görüntülenmesinde ve çalışılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Biyolojik araştırmalarda kullanılan bu problemler aynı zamanda sistemdeki moleküller ile etkileşerek sistemi bozabilir. Bizim kullandığımız floresans probun sistemi bozup bozmadığını anlayabilmek için ayrıca membran-prob etkileşimlerini de inceledik.

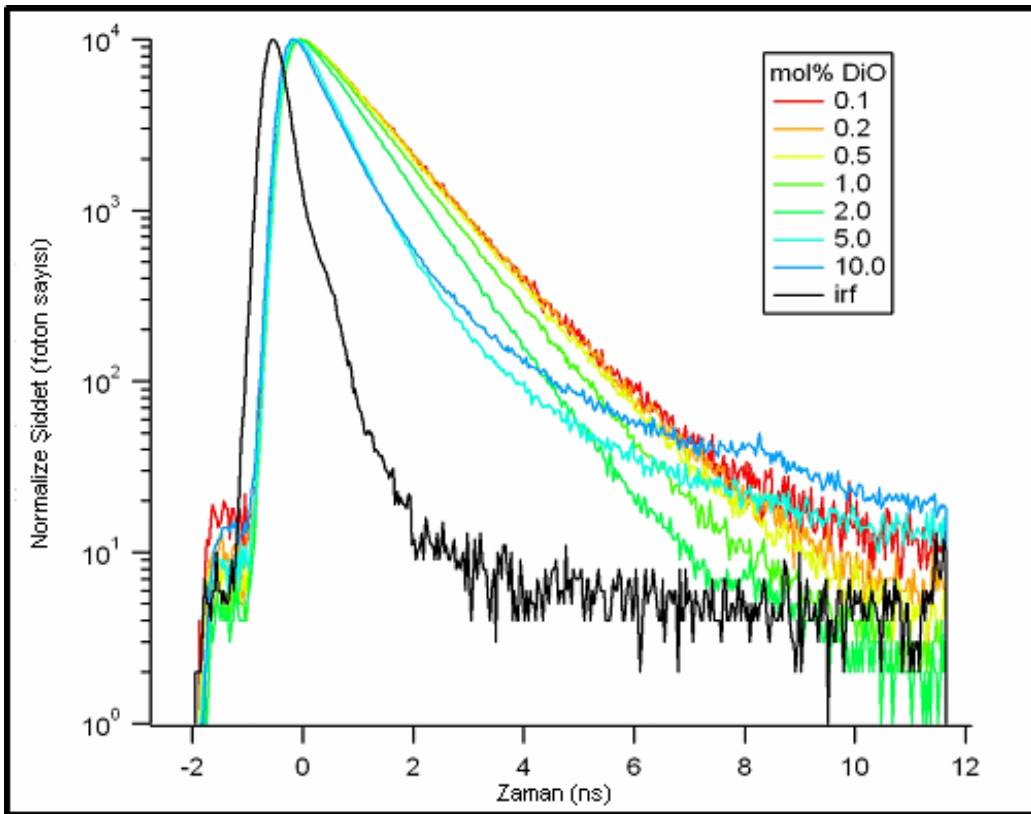
Kullandığımız probun membranlarla nasıl etkileştiğini Floresans mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilen Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) tekniği, Floresans spektroskopisi tekniği ve ayrıca FTIR ve DSC teknikleri ile inceledik. Bu çalışmada farklı faz geçişlerine sahip lipitler 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) ve kolesterol kullanarak hazırladığımız model membranlara artan boya konsantrasyonları ekledik. Bu çalışmalarda da lipofilik karbosiyanin bir boya olan SP-DiOC<sub>18</sub>(3) kullanıldı.

TCSPC tekniğini kullanarak pek çok deney gerçekleştirildi. Bu teknikte gerçekleştirilen deneyler, bu tip floresans boyaların davranışları hakkında daha detaylı bilgi edinilmesine yardımcı olur.

#### 3.3.1 TCSPC SONUÇLARI

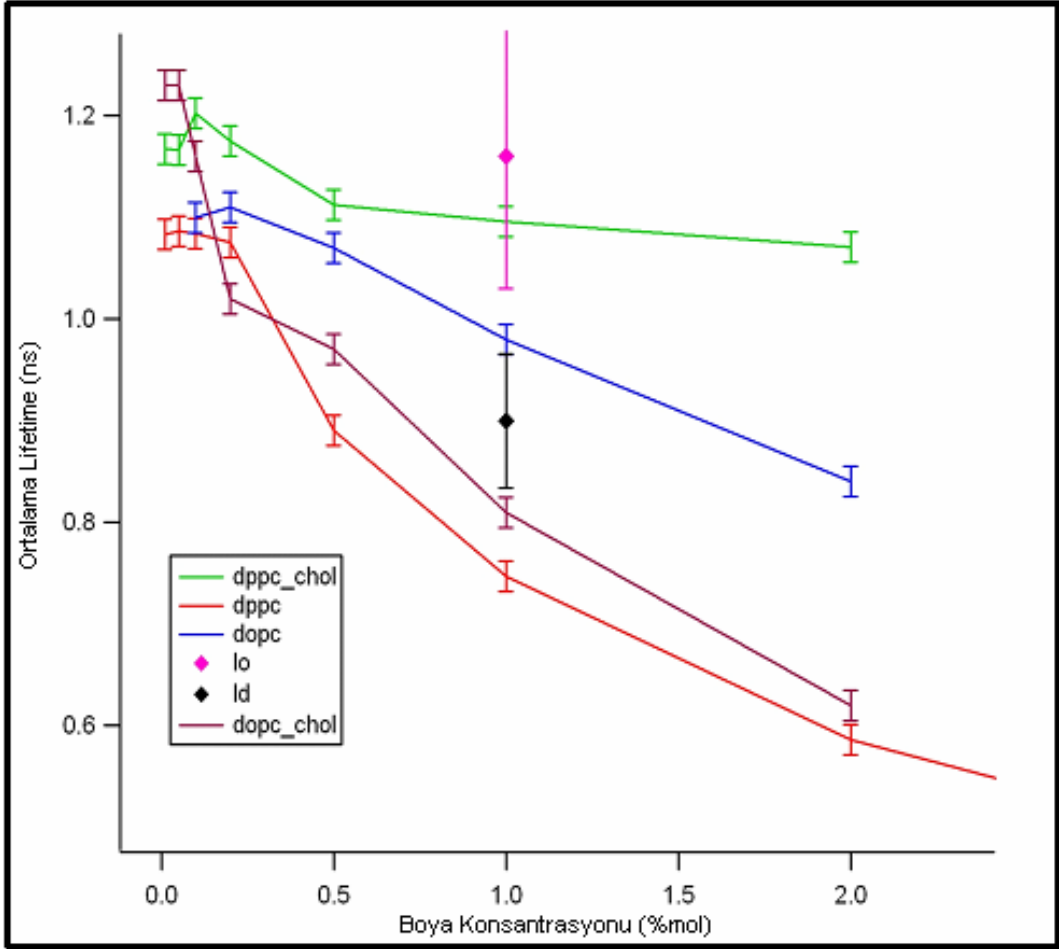
DOPC, DPPC ve DOPC/DPPC/Kolesterol veziküllerine boya konsantrasyonları ekleyip, boya konsantrasyonlarının yaşam süresi değerlerini nasıl etkilediğini görebilmek için TCSPC tekniği kullanılmıştır. Hem DPPC ve DOPC için bireysel olarak hem de DOPC/Kolesterol (2:1), DPPC/Kolesterol (2:1) karışımlarından oluşan model membranlar için boya konsantrasyonunun yaşam süresi değerlerini nasıl etkilediğini görebilmek

için, %0.1 , %0.2 , % 0.5 , %1, %2 , %5 ve %10 mol oranlarında artan boya konsantrasyonları eklenmiştir.



Şekil 3.18 DOPC ve farklı boya konsantrasyonları için yaşam süresi bozunma eğrileri.

Her bir lipit, lipit/kolesterol karışımı ve her bir boya konsantrasyonu için ayrı ayrı Time Harp bozunma eğrileri elde edilmiştir. Elde edilen eğrilerde, Igor analiz programı kullanılarak her bir örnek için yaşam süresi değerleri elde edilmiştir. Şekil 3.18’de DOPC ve farklı boya konsantrasyonları için elde edilen yaşam süresi bozunma eğrileri görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi konsantrasyon arttıkça bozunma eğrileri daha düşük değerlere kaymaktadır.



Şekil 3.19 Farklı lipid sistemlerinin boya konsantrasyonuna bağlı yaşam süresi değerleri.

Şekil 3.19’da hem saf DOPC ve DPPC için bireysel olarak hem de DOPC/Kolesterol ve DPPC/Kolesterol karışımları için artan boya konsantrasyonları ile elde edilen bozunma eğrilerinin Igor analiz programı ile analiz edilmesi sonucunda, bulunan yaşam süresi değerleri grafiği görülmektedir. Şekil incelendiğinde saf DOPC için yaşam süresi değerlerinin boya konsantrasyonundan oldukça etkilendiği görülmektedir. Saf DOPC’ye kolesterolün eklenmesiyle yaşam süresi değerleri, artan boya konsantrasyonuyla, saf DOPC değerlerine göre oldukça değişmiştir. DOPC

oda sıcaklığında sıvı-düzensiz (*ld*) fazdadır ve kolesterolün eklenmesiyle membran, *ld* fazından daha düzenli bir faza geçer. Yaşam süresi değerleri kolesterolün eklenmesiyle azalmıştır.

Saf DPPC için artan boya konsantrasyonları ile elde edilen bozunma eğrilerinin analizi sonucunda, bulunan yaşam süresi değerlerinde de artan boya konsantrasyonlarından etkilendiği görülmüştür. Kolesterolün saf DPPC'ye eklenmesiyle, yaşam süresi değerleri saf DPPC değerlerine göre artan boya konsantrasyonu ile değişim göstermiştir. DPPC oda sıcaklığında jel fazdadır ve kolesterolün eklenmesiyle sistem jel fazdan daha düzensiz bir faz olan sıvı-düzenli (*lo*) fazına geçmiştir.

Time Harp sonuçlarına göre saf DPPC yaşam süresi değerleri, saf DOPC yaşam süresi değerlerinden daha düşüktür. Bunun nedeni boya moleküllerinin farklı lipit sistemlerinde farklı şekilde bulunması olarak düşünülmüştür. Boya molekülleri DOPC membranında rastgele bulunurken, DPPC' de ise kümeler halinde bulunmaktadır.

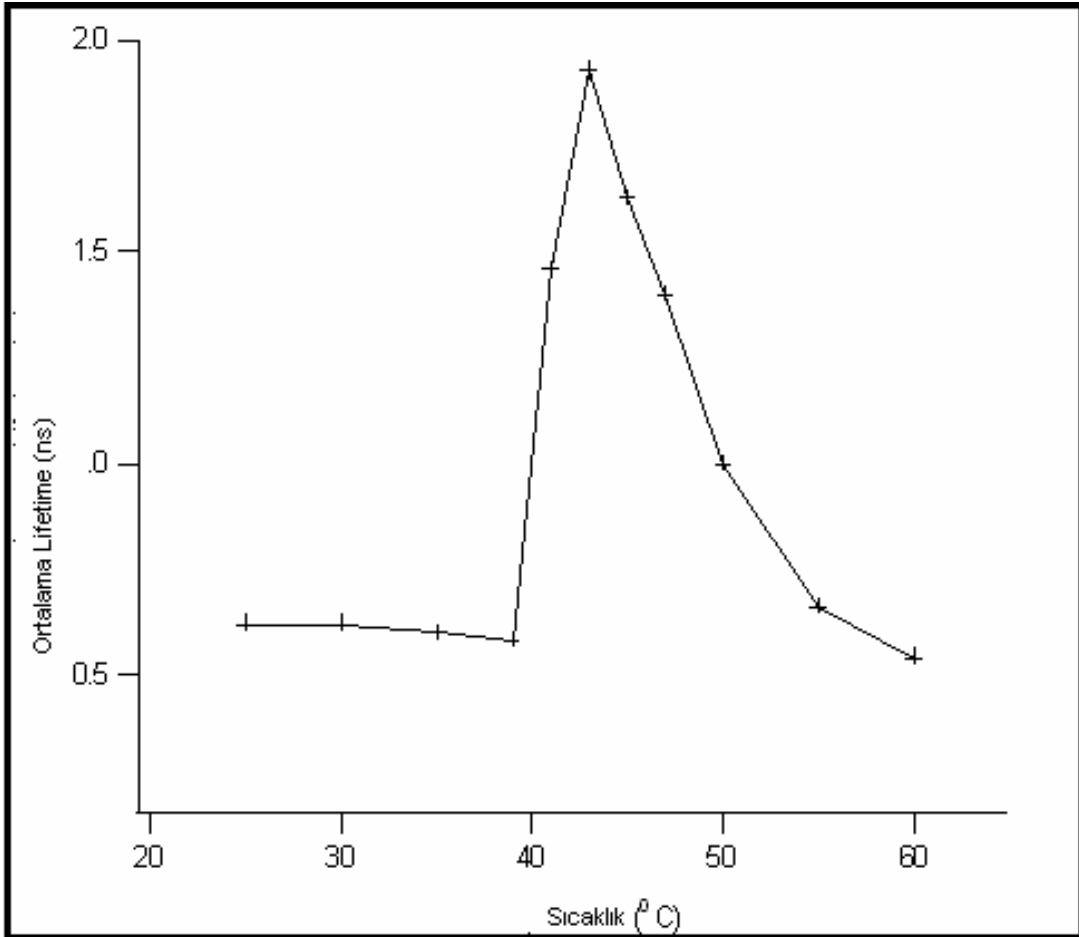
Şekilde DOPC/Kolesterol ve DPPC/Kolesterol karışımları için elde edilen değerler incelendiğinde, yaşam süresi değerlerinin farklı olduğu görülür. DOPC/Kolesterol karışımı için elde edilen değerler saf DPPC için elde edilen değerlere yakinken, DPPC/Kolesterol karışımı için bulunan değerler saf DOPC değerlerine yakındır. Bu sonuç yine kolesterolün farklı lipit sistemleri üzerindeki etkisiyle açıklanabilir. Kolesterol düzenli sistemleri daha düzensiz hale getirirken, düzensiz sistemleri daha düzenli hale getirmektedir.

Boyanın farklı lipit sistemlerinde farklı yaşam süresi değerlerine sahip olmasının nedenin boya moleküllerinin farklı lipit sistemlerinde farklı agregasyonlarda bulunup bulunmadığından kaynaklandığının daha iyi anlaşılması için farklı deneyler gerçekleştirilmiştir.

Boya moleküllerinin yaşam süresi kontrastına neden olmasının sebebinin lipit sistemlerindeki farklı agregasyonu olup olmadığının anlaşılması için, önce faz geçiş sıcaklığı 41°C olan ve oda sıcaklığında jel fazda bulunan DPPC lipiti kullanılmıştır. Sıcaklığa bağlı ölçümler alınmıştır. Sıcaklık oda sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklara arttırılmıştır. DPPC oda sıcaklığında jel fazdadır, sıcaklığın artması ile daha düzensiz bir faz olan sıvı kristal faza geçecektir. Bu durumda jel fazda elde edilen yaşam süresi değerleriyle sıvı kristal fazda elde edilen yaşam süresi değerlerini karşılaştırmak mümkündür. Aynı zamanda DPPC için sıvı kristal faz için elde edilen yaşam süresi değerleriyle, DOPC için elde edilen değerleri de kıyaslamak mümkün olacaktır. Bunun sonucunda DPPC sıvı kristal faz yaşam süresi değerleriyle DOPC değerleri sıcaklık artışıyla aynı azalma ya da artma eğilimini gösterirse, bu durumda boya moleküllerinin aynı faza sahip lipitlerde aynı agregasyon şeklini, farklı faza sahip lipitlerde ise farklı agregasyon şeklini gösterdiği açıklanmış olacaktır.

Şekil 3.20, DPPC ve %2mol boyaya ait sıcaklık artışıyla değişen yaşam süresi değerlerinin eğrisini göstermektedir.

Şekil incelendiğinde, yaşam süresi değerlerinin esas geçiş sıcaklığına kadar jel faz bölgesinde aynı kaldığı, faz geçiş sıcaklığında ani bir artış gösterdiği ve sıvı kristal faz bölgesinde ise derece derece azaldığı görülmektedir. Bu grafik üç bölgeye ayrılarak incelenebilir: jel faz bölgesi, esas faz geçiş sıcaklığı bölgesi ve sıvı kristal faz bölgesi. Birinci bölge yani jel faz bölgesinde yaşam süresi değerlerinin aynı kalması statik sönümleme ile açıklanabilir.



Şekil 3.20 DPPC ve % 2 mol SP-DiOC<sub>18</sub> boya karışımının sıcaklığa bağlı yaşam süresi değerleri.

Bu tip sönmeme florofofor ile söndürücü (quencher) arasında floresans olmayan bir kompleks oluşumu sonucunda ortaya çıkar. Bu kompleks ışığı absorbe ettiğinde, bir foton yayınlamaksızın hemen temel duruma döner. Statik sönmeme, florofofor ve söndürücü istifleme etkileşiminde gözlenen bir durumdur.

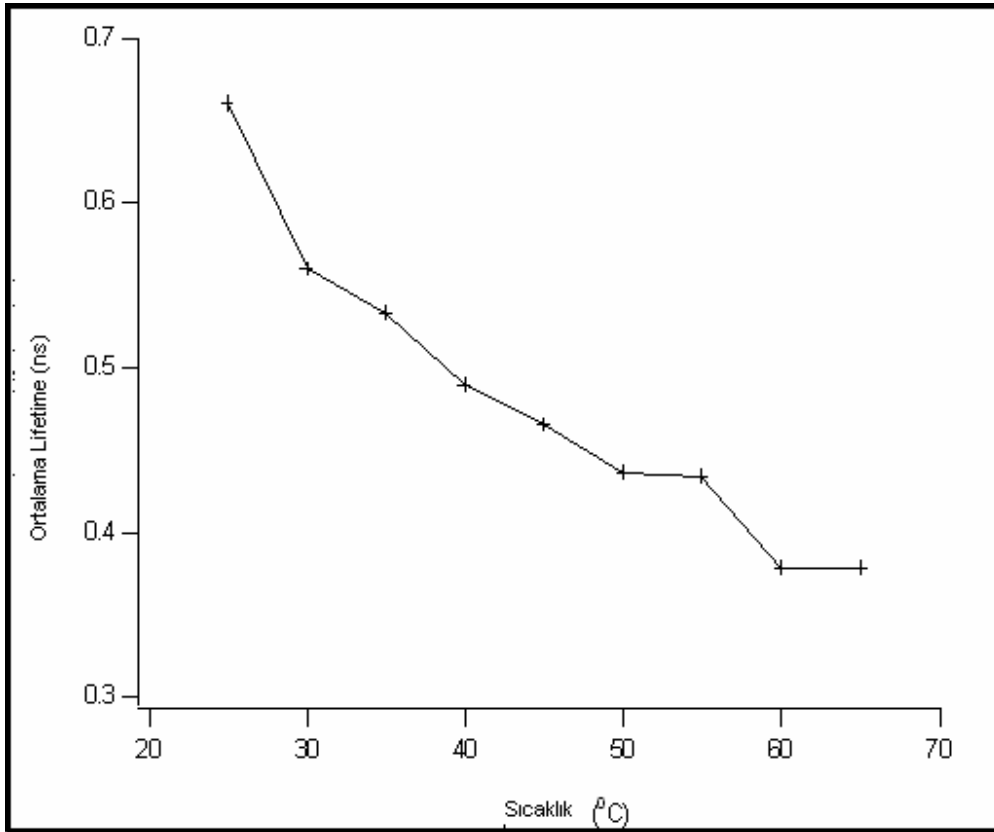
İkinci bölgede, yaşam süresi değerinin ani artış göstermesi boya moleküllerinin aralarındaki uzaklığın ani artmasıyla açıklanabilir. Sıcaklık arttığında matris daha akışkan ve daha kararsız hale gelecek ve faz

değiştirecektir. Bunun sonucunda da boya molekülleri sistemde birbirinden uzakta olacaklardır.

Üçüncü bölgede yani sıvı kristal faz bölgesinde, yaşam süresi değerlerinin azalması dinamik sönmleme olayı ile açıklanabilir. Artan sıcaklıkla boya molekülleri arasında çarpışma ve difüzyon olacaktır.

Dinamik sönmleme difüzyona bağlıdır. Daha yüksek sıcaklıklar, daha büyük difüzyon katsayıları ile sonuçlandığı için bimoleküler sönmleme sabitlerinin sıcaklık artışıyla artması beklenir. Dinamik sönmleme sadece uyarılmış durumdaki floroforları etkiler, bu nedenle absorpsiyon spektrumunda bir değişiklik beklenmez. Temel durum kompleks oluşumu ise florofor absorpsiyon spektrumunda pertürbasyonla sonuçlanacaktır.

Statik ve dinamik sönmleme, sıcaklık ve vizkoziteye bağlılıklarındaki farklılıklar ve ayrıca yaşam süresi ölçümleriyle birbirlerinden ayrılabilir. Yüksek sıcaklıklar daha hızlı difüzyonla ve dolayısıyla daha büyük ölçüde çarpışmadan kaynaklanan sönmleme ile sonuçlanır. Yüksek sıcaklıklar ayrıca zayıf bağlara sahip olan komplekslerin bağlarının ayrılmasına ve bu nedenle de daha az ölçüde statik sönmlemeye neden olur.



Şekil 3.21 DOPC ve % 2 mol SP-DiOC<sub>18</sub> boya karışımının sıcaklığa bağlı yaşam süresi değerleri.

Sıcaklığa bağlı ölçümler DPPC için olduğu kadar aynı şartlarda DOPC için de gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.21 DOPC ve %2 mol boya konsantrasyonu için oda sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça elde edilmiş yaşam süresi değerlerini göstermektedir.

Şekilden de görüleceği üzere faz geçiş sıcaklığı -22 °C yani oda sıcaklığında sıvı kristal fazda bulunan DOPC için elde edilen yaşam süresi değerleri incelendiğinde, artan sıcaklıkla değerlerin azaldığı görülmektedir. Bu sonuç DPPC sıvı kristal faz bölgesi için elde edilen sonuçlarla

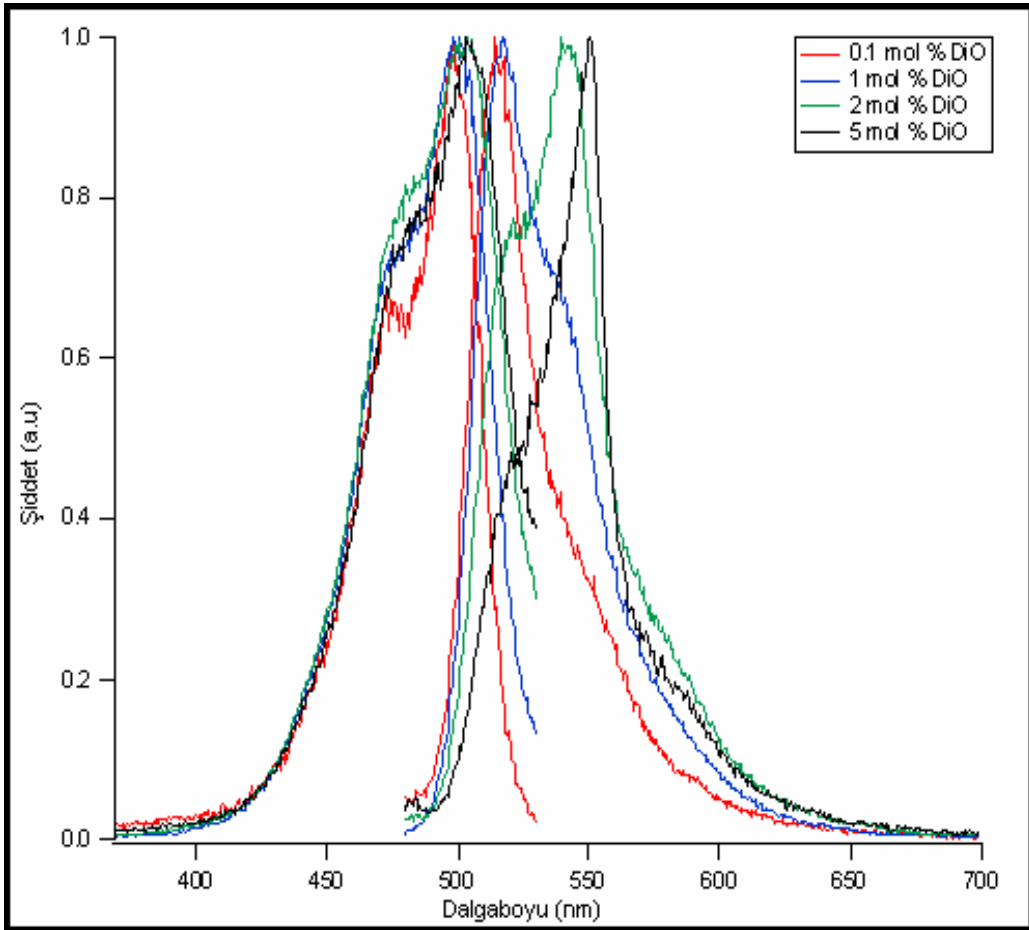
karşılaştırıldığında aynı fazda bulunan DPPC ve DOPC lipitleri için yaşam süresi değerlerinin benzer şekilde azalma eğiliminde olduğu görülmüştür.

### **3.3.2 FLORESANS SPEKTROSKOPİ SONUÇLARI**

Aynı lipit bileşenleri ve karışımları için boya konsantrasyonları arttırılarak TCSPC ölçümlerine ek olarak spektroskopik ölçümler alınmıştır. TCSPC ölçümlerinde elde edildiği gibi eğer boya molekülleri farklı lipit sistemlerinde farklı şekillerde dağılıyorsa, farklı lipit ve boya sistemlerinde spektral değişimlerde olacaktır.

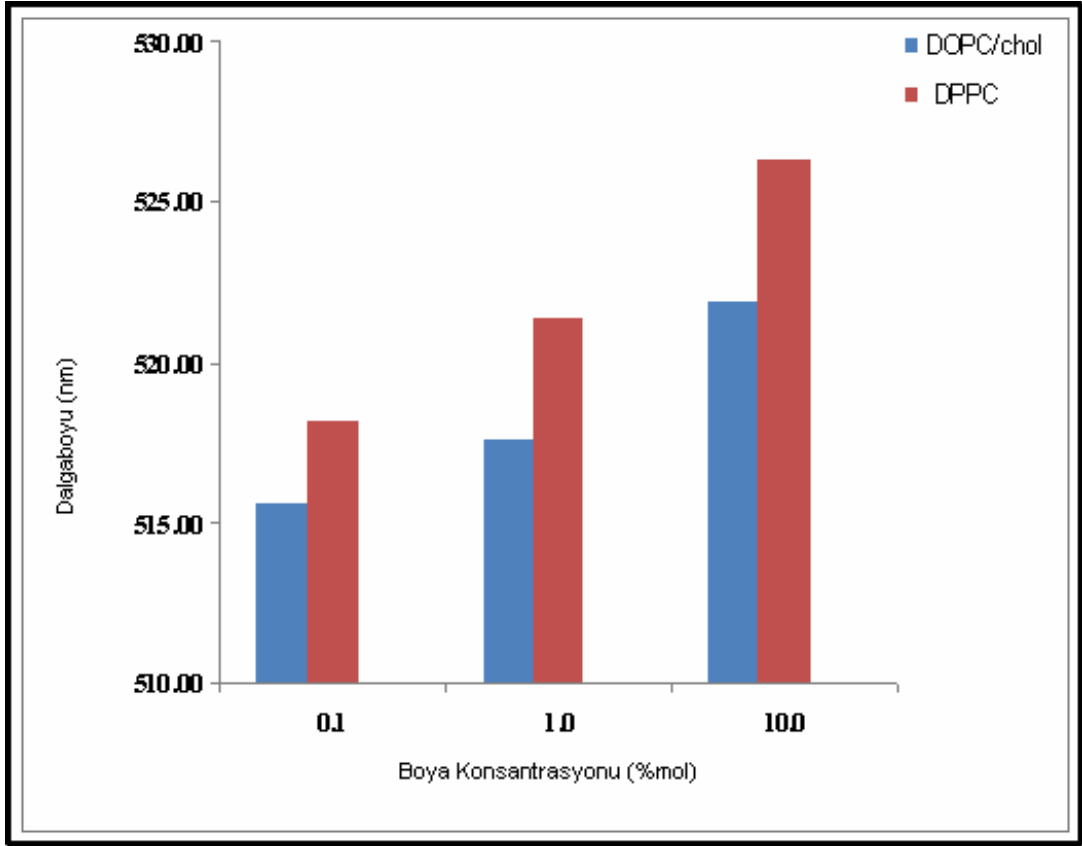
Şekil 3.22, DPPC/Kolesterol (2:1) karışımı ve farklı boya konsantrasyonları için elde edilmiş eksitasyon ve emisyon spektrumlarını göstermektedir. 500-700 nm aralığındaki spektruma bakıldığında boya konsantrasyonlar arttıkça DPPC/Kolesterol karışımının emisyon spektrumunun daha büyük dalga boylarına kaydığı görülmektedir.

Dalga boyunun daha büyük değerlere kayması boya moleküllerinin farklı lipit ortamlarında farklı agregasyonlarda olduğunu göstermektedir.



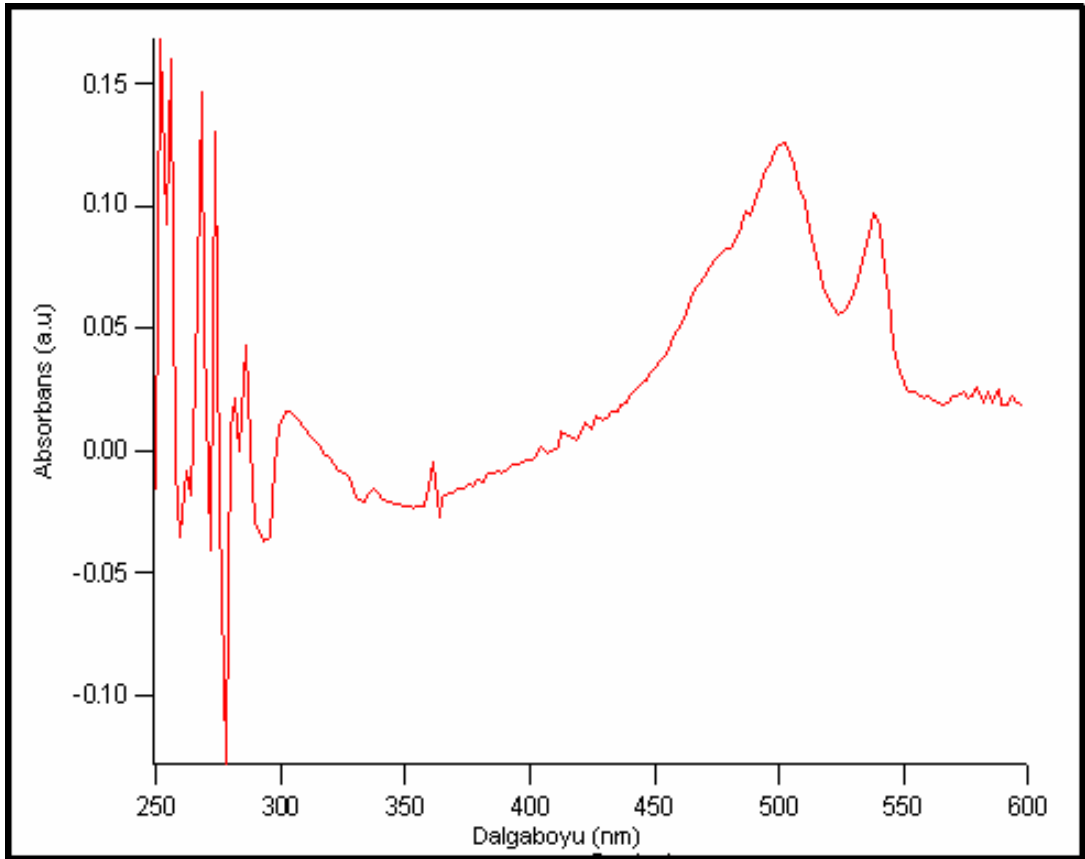
Şekil 3.22 Farklı boya konsantrasyonları içeren DPPC/Kolesterol sisteminin eksitasyon ve emisyon spektrumları.

DPPC/Kolesterol karışımı için dalga boyunda gözlenen bu değişim DOPC, DOPC/Kolesterol ve DPPC sistemleri için de gözlenmiştir (Şekil 3.23).



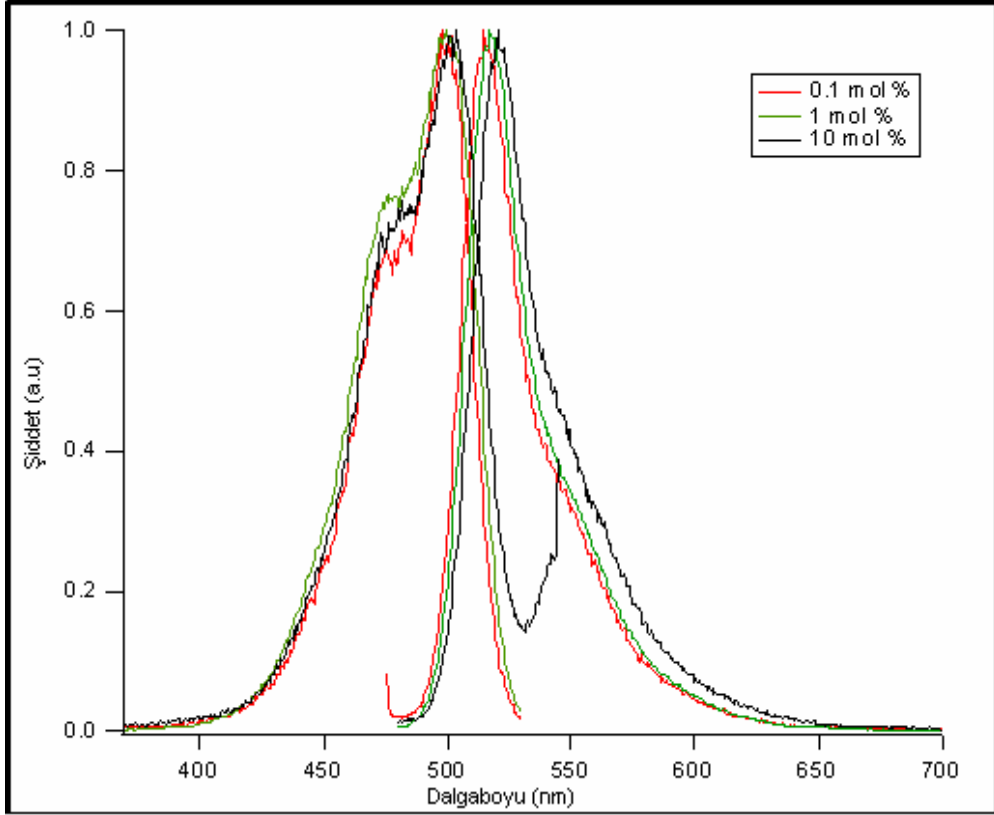
Şekil 3.23 DOPC/Kolesterol ve DPPC sistemlerinde farklı boya konsantrasyonu içi gözlenen emisyon spektrumlarının maksimum dalga boyu değerleri.

Boya moleküllerinin hangi tür agregasyonda bulunduğunu saptamak için boya ve lipid karışımlarının absorpsiyon spektrumları da alınmıştır.



Şekil 3.24 DOPC/Kolesterol (2:1) ve % 10 mol boya konsantrasyonu için elde edilen absorpsiyon spektrumu.

DOPC/Kolesterol (2:1) karışımı ve % 10 mol boya konsantrasyonu için elde edilen absorpsiyon spektrumunda ikinci bir absorpsiyon bandı gözlenmiştir (Şekil 3.24).



Şekil 3.25 Farklı boya konsantrasyonları içeren DOPC/Kolesterol karışımının eksitasyon ve emisyon spektrumları.

DOPC/Kolesterol karışımı ve % 10 mol boya konsantrasyonu için gözlenen absorpsiyon bandı, eksitasyon spektrumunda da gözlenmiştir (Şekil 3.25).

### 3.3.3 FTIR SONUÇLARI

Boyanın yaşam süresi kontrastına neden olduğu lipid sistemleri buraya kadar perturbing teknik olan Floresans Mikroskopisi ve Spektroskopisi ile incelenmiştir. Aynı boya konsantrasyonlarının kullanıldığı boya lipid sistemlerinin aralarındaki etkileşim aynı zamanda non-perturbing teknikler olan FTIR ve DSC ile de incelenmiştir.

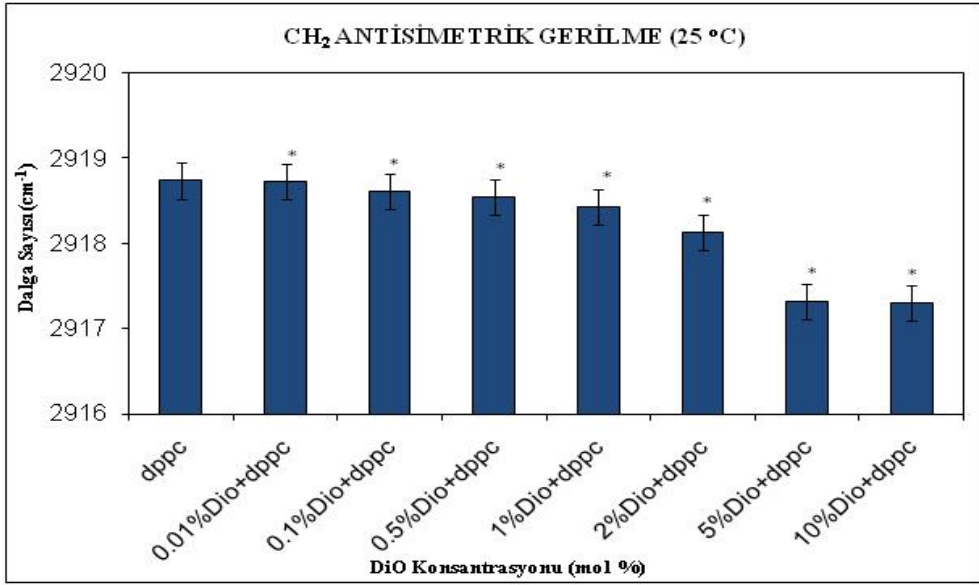
Bu bölümde FTIR tekniği ile elde edilen sonuçlar verilecektir. Farklı boya konsantrasyonları ve DPPC kullanılarak LUV örnekleri elde edildi ve örnekler jel (25 °C) ve sıvı kristal faz (55 °C) olmak üzere iki farklı sıcaklık bölgesi için incelendi. Her deney her bir sıcaklık için 5 kez tekrarlandı ve sonuçlara Mann-Whitney U testi uygulandı. İstatistiksel olarak anlamlı olan sonuçlar grafiklerde yıldızla gösterildi.

Infrared verileri, baş grup ve hidrokarbon zincir spektral karakteristiklerini temsil eden iki farklı spektral bölge için elde edilmiştir.

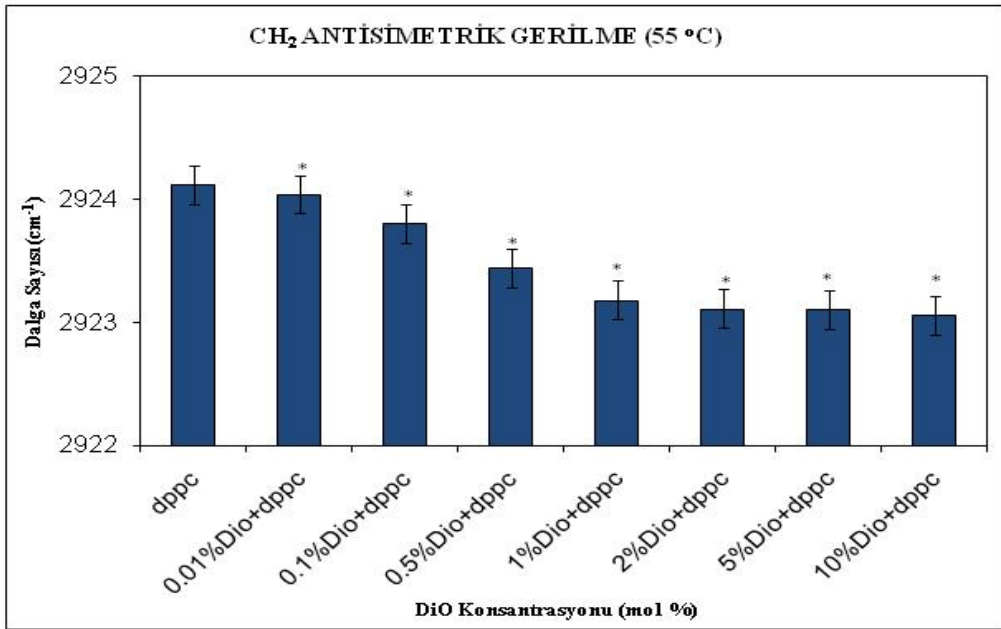
#### 3.3.3.1 C – H GERİLME BÖLGESİ

##### 3.3.3.1.1 CH<sub>2</sub> Antisimetrik Gerilme (Jel Faz–25 °C ve Sıvı Kristal Faz–55 °C)

Şekil 3.26 ve Şekil 3.27'den de görüleceği gibi saf DPPC lipozomlarına farklı konsantrasyonlarda (%0.01, %0.1, %0.5, %1, %2, %10 mol) boya eklenmesi ile faz geçişinin altındaki sıcaklıklarda yani jel fazda ve faz geçişinin üzerindeki sıcaklıklarda yani sıvı kristal fazda, frekansta konsantrasyona bağlı olarak farklı değişimler gözlenmiştir. Frekanstaki bu değişimler değerlendirildiğinde; jel ve sıvı kristal fazda, artan boya konsantrasyonlarının DPPC lipozomlarına eklenmesi ile frekansın azalması, sistemde gauche konformerlerinin sayısının azalmasına ve bu da sistemin asil zincir (hidrokarbon zincir) düzeninin artmasına neden olmaktadır.



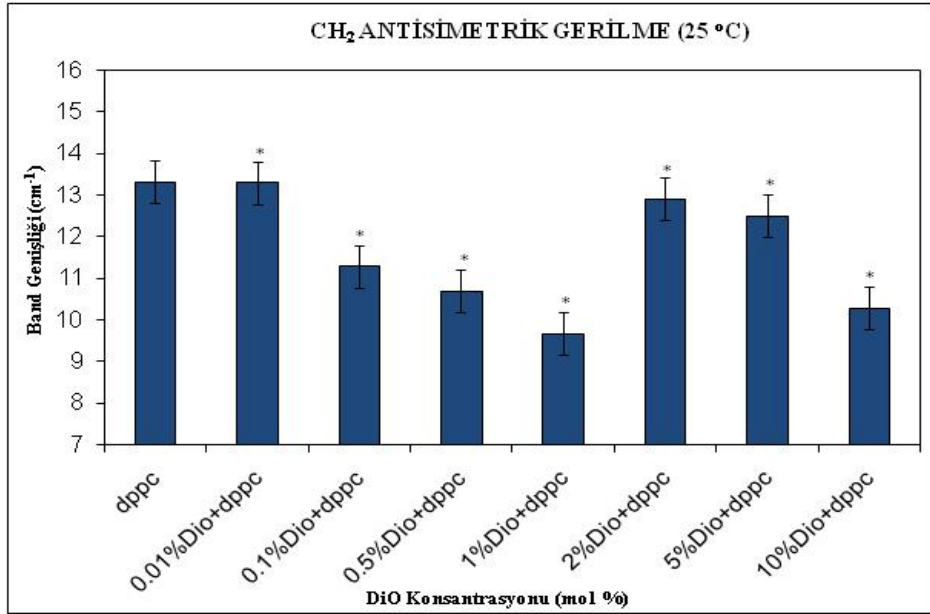
Şekil 3.26 Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu frekansının 25 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değişimi (\*) P<0.05.



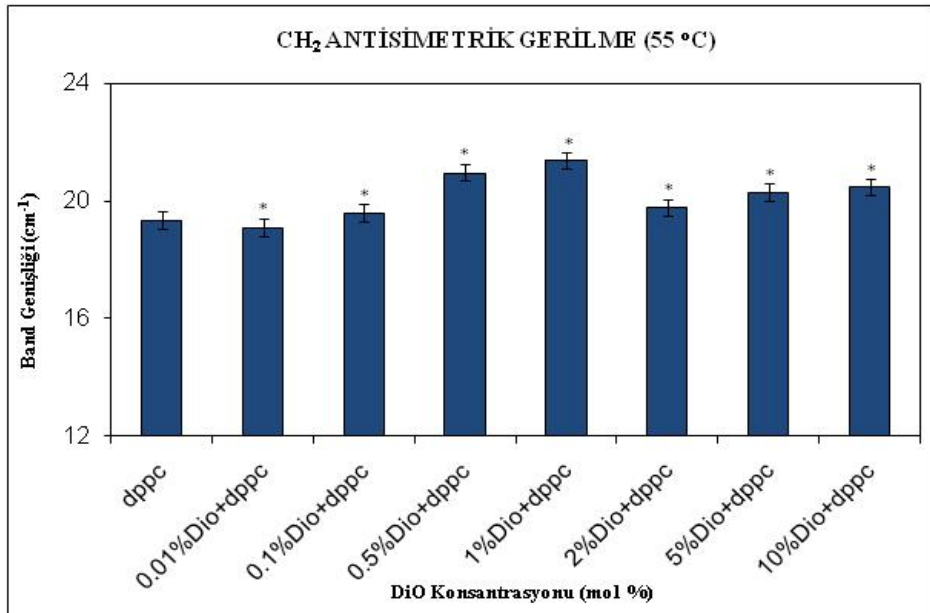
Şekil 3.27 Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu frekansının 55 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değişimi (\*) P<0.05.

Şekil 3.28 ve Şekil 3.29'daki  $\text{CH}_2$  antisimetrik gerilme titreşiminin band genişliğinin sıcaklığa bağlı değerleri incelendiğinde; artan boya konsantrasyonlarının eklenmesi jel fazda değerler saf DPPC lipozomu değerlerine göre azalmış, sıvı kristal fazda ise değerler saf DPPC lipozomu değerlerine göre artmıştır.

Band genişliği değerlerindeki bu değişimler değerlendirildiğinde; jel fazda artan boya konsantrasyonları ile band genişliği değerlerinin saf DPPC değerlerine göre azalması; lipit asil zincirlerinin hareket özgürlüğünün jel fazda azalması anlamına gelir. Sıvı kristal fazda artan boya konsantrasyonları ile band genişliği değerlerinin saf DPPC değerlerine göre artması ise artan boya konsantrasyonlarının membran dinamiğini arttırıcı etkisinin olduğunu gösterir.



şekil 3.28 Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu band genişliği değerlerinin 25 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değerleri (\*) P<0.05.



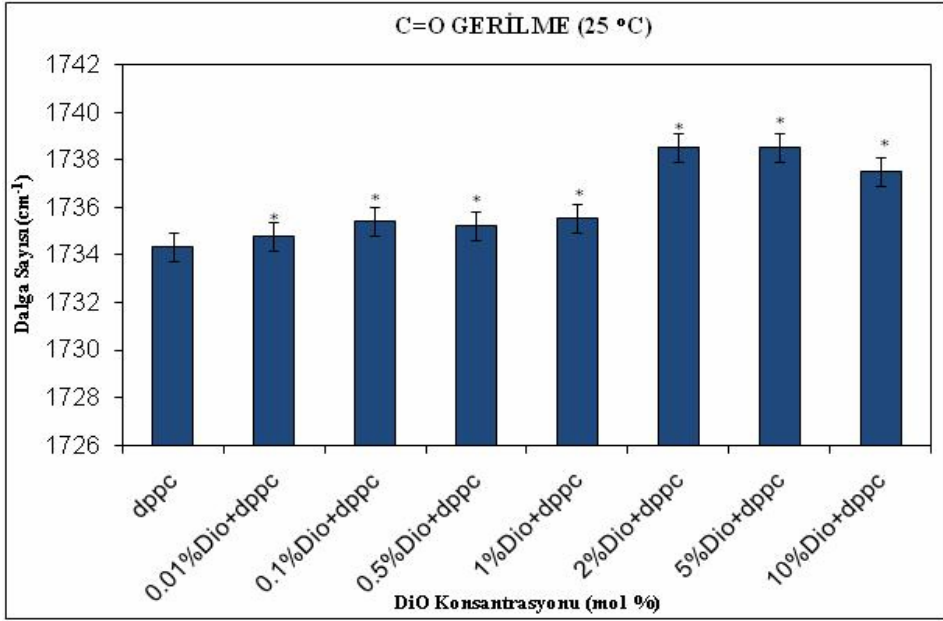
şekil 3.29 Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun CH<sub>2</sub> antisimetrik gerilme modu band genişliği değerlerinin 55 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değerleri (\*) P<0.05.

### **3.3.3.2 BAŞ GRUP GERİLME BÖLGESİ**

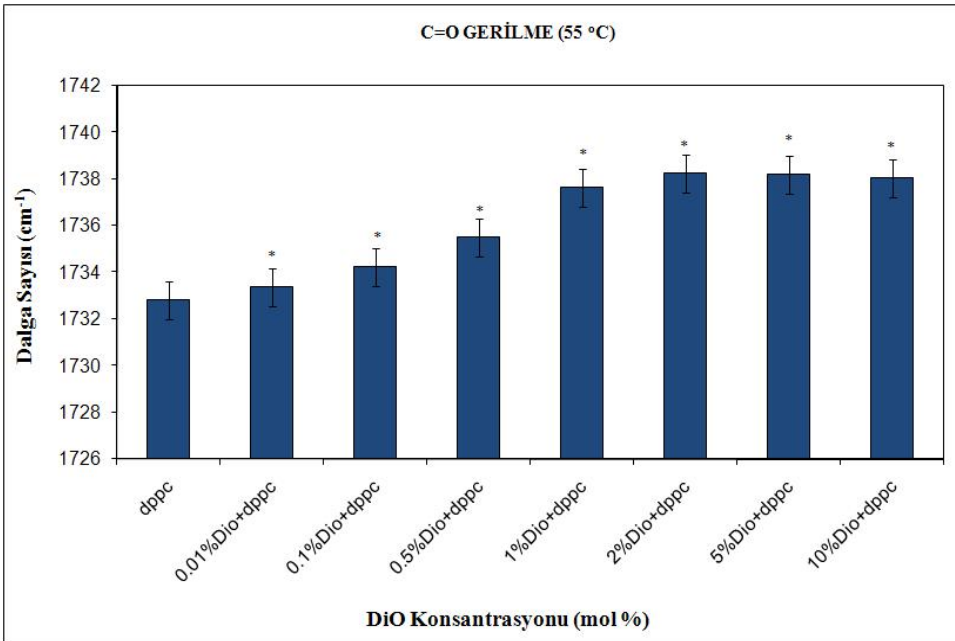
#### **3.3.3.2.1 C = O Gerilme (Jel Faz–25 °C ve Sıvı Kristal Faz–55 °C)**

Şekil 3.30 ve Şekil 3.31'deki C = O gerilme titreşim frekansının hem jel hem de sıvı kristal fazda boya konsantrasyonuna bağlı değerleri incelendiğinde; DPPC lipozomlarına eklenen artan boya konsantrasyonları ile frekans değerlerinin arttığı görülmüştür.

Hem jel hem de sıvı kristal fazda, DPPC lipozomlarına eklenen boya konsantrasyonlarının frekans değerlerini düşürmesi, lipit polar kısmındaki bu fonksiyonel grupların çevresinde boya moleküllerinin dehidrasyona neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.30 Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun C=O gerilme nodu frekansının 25 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değişimi (\*) P<0.05.



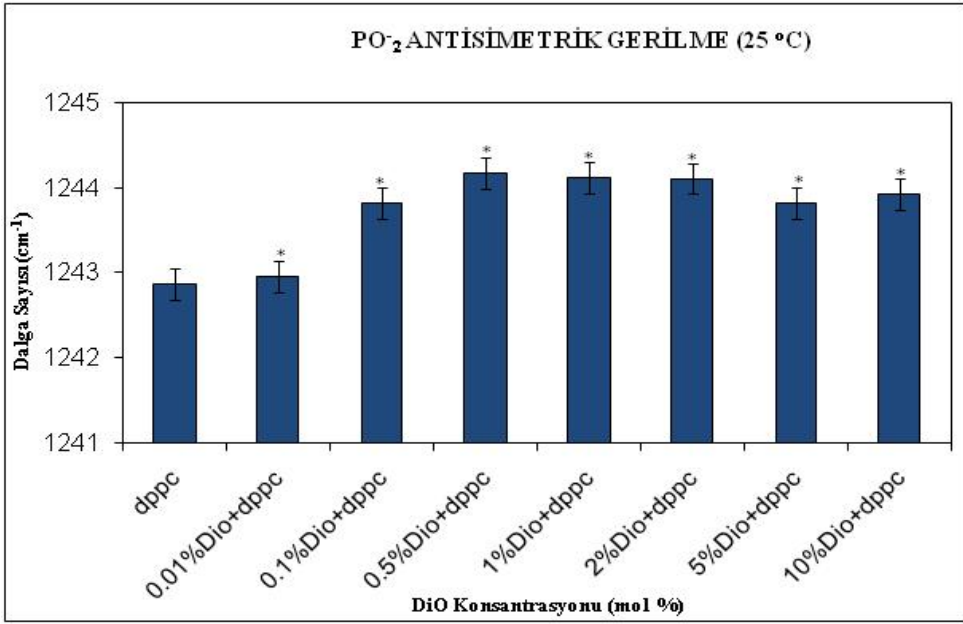
Şekil 3.31 Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun C=O gerilme modu frekansının 55 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değişimi (\*) P<0.05.

### 3.3.3.2.2 $PO_2^-$ Antisimetrik Gerilme

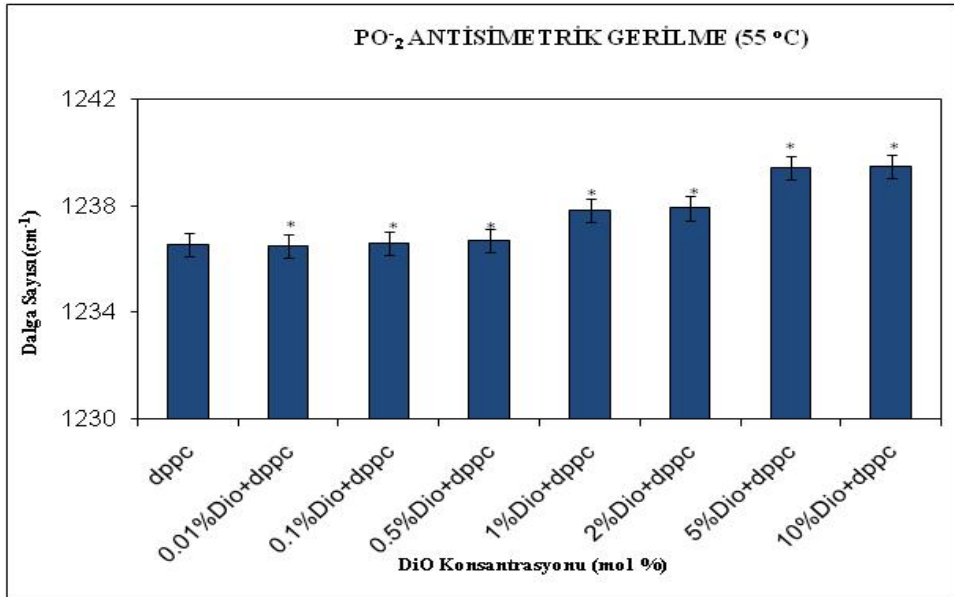
DPPC lipozomlarının baş grubu ve boya konsantrasyonu arasındaki etkileşimler  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme bandının analizi ile incelenmiştir.

Şekil 3.32 ve Şekil 3.33’de görüldüğü üzere  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme titreşim frekansının konsantrasyona bağlı değerlerinde de yine C = O gerilme titreşim frekansında olduğu gibi hem jel hem de sıvı kristal fazda saf DPPC frekans değerlerine göre artan boya konsantrasyonları ile azalma gözlenmiştir.

Sonuçlar, artan boya konsantrasyonunun lipitlerin polar kısımlarındaki bu fonksiyonel grupların etrafında dehidrasyon yarattığını göstermektedir.



Şekil 3.32 Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme modu frekansının 25 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değişimi (\*)  $P < 0.05$ .

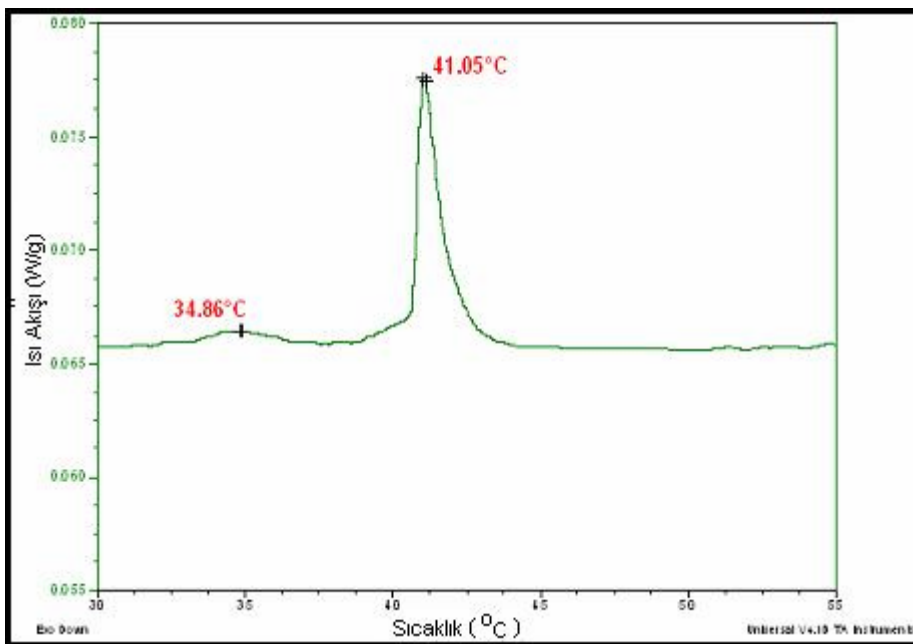


Şekil 3.33 Saf ve farklı % mol boya içeren DPPC lipozomunun  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme modu frekansının 55 °C’de boya konsantrasyonuna bağlı değişimi (\*)  $P < 0.05$ .

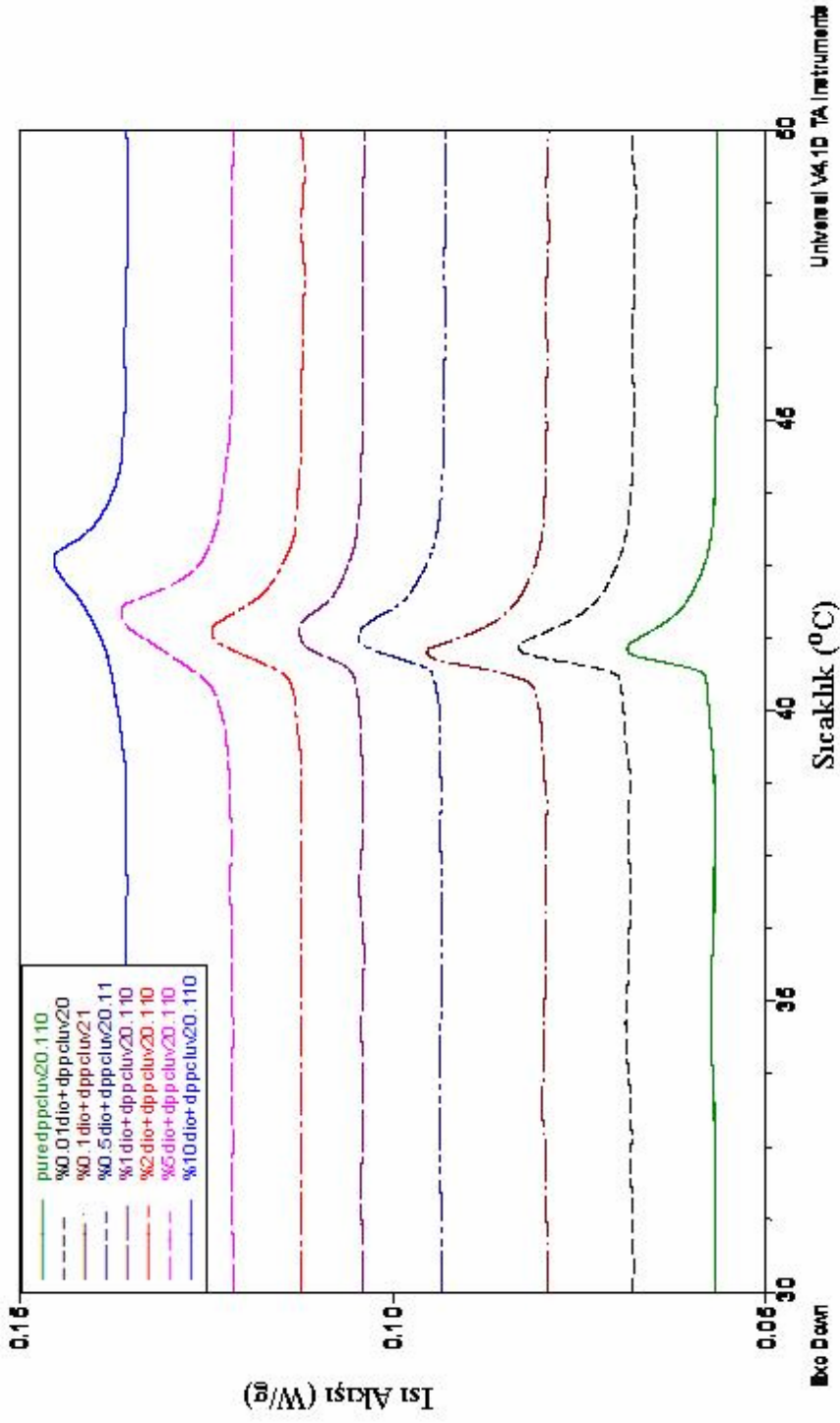
### 3.3.4 DSC SONUÇLARI

DPPC LUV örneklerinin boya moleküllerinin varlığında ve yokluğundaki kalorimetrik araştırmaları 25-70 °C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir.

Saf DPPC LUV örneği için elde edilen DSC kalorimetrik eğrisi Şekil 3.34'de gösterilmiştir. Şekilde de görüleceği üzere DPPC LUV örneği 34.86 °C'de karakteristik ön geçiş sıcaklığına, 41.05 °C'de de esas faz geçiş sıcaklığına sahiptir.



Şekil 3.34 Saf DPPC LUV örneğinin DSC kalorimetrik eğrisi.



Şekil 3.35 Saf ve farklı %mol boya içeren DPPC LUV örneklerinin DSC kalorimetrik eğrisi.

Sıcaklığa bağlı olarak saf DPPC ve değişik boya konsantrasyonları içeren DSC kalorimetrik eğrileri Şekil 3.35’de gösterilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi boya konsantrasyonları arttıkça ön geçiş sıcaklığı kaybolmuş ve esas faz geçiş sıcaklığı ise artan boya konsantrasyonu ile daha yüksek sıcaklıklara kaymıştır. Ayrıca boya konsantrasyonunun DPPC lipozomunda artması ile esas faz geçiş sıcaklığı pikinde bir genişleme gözlenmiştir.

## 4.TARTIŞMA

### 4.1 MELATONİN VE NEGATİF YÜKLÜ MODEL MEMBRAN (DPPG) ETKİLEŞİMİ

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

Sıcaklık arttığında çift tabaka, hidrokarbon zincirlerin düzenli olduğu rijid jel fazdan zincirlerin farklı konformasyonlarda olduğu daha akışkan sıvı kristal faza geçer. Bu faz geçişi karakteristik sıcaklık değeri;  $T_m$ 'de ki değişimler ile ilgilidir ve ortam şartlarından etkilenebilir. Fosfolipitlerdeki faz geçişlerinin yapıda değişim meydana getirdiği için membran foksionlarını etkilediği bilinmektedir (Nassar et al, 1998).

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

Fosfolipitlerin faz geçişi,  $CH_2$  gerilme frekansındaki değişimleri izlenerek incelenebilir (Sanchez-Migallon et al, 1996). Bu çalışmada FTIR ve DSC sonuçları, melatoninin DPPG membran sistemine eklenmesi ile ön geçişin kaybolduğunu ve esas geçiş sıcaklığı  $T_m$ 'nin düşük sıcaklıklara

kaydığını göstermiştir. Daha önceki çalışmalarda da Saija ve arkadaşları (Saija et al, 2002) ve Severcan ve arkadaşları (Severcan et al, 2005) nötr model membranlarla yaptıkları çalışmalarda, melatoninin varlığının  $T_m$ ' de azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir (Prenner et al, 1999; Kazancı et al, 2001). Faz geçiş sıcaklığının daha düşük sıcaklıklara kayması, bütün transların gauche konformerlerine değişiminin daha düşük sıcaklıklarda meydana gelmesi demektir. Fosfolipitlerdeki  $CH_2$  gerilme frekansları lipit çift tabakadaki asil zincirlerin konformasyonel düzenini görüntülemektedir (Flach et al, 1993).

Pek çok biyolojik proses membranların yüzeyinde ya da hidrofobik bölgelerinde gerçekleşir. Biyolojik membranların yüzeyleri genellikle net bir yük taşır. Bu da iyonize gruplara sahip yüklü ve yüksüz moleküller için farklı bağlanma özelliklerine yol açar (Rooney et al, 1983, Louro et al, 1994). İlaçların etki mekanizmalarını anlamak için pek çok çalışma olmasına rağmen, model sistem üzerinde yapılan çalışma sayısı azdır (Yushmanov et al, 1994; Borissevitch et al, 1996).

Bu çalışmada moleküler düzeni tanımlayan yapısal parametreler ve moleküler dinamiği tanımlayan hareketsel parametreler incelenmiştir. FTIR spektrumlarında  $CH_2$  gerilme titreşimlerinin görüntülenmesi sonucunda yüksek ve düşük konsantrasyonlardaki melatoninin DPPG membran düzen ve dinamiği üzerinde zıt etkiye sahip olduğu görülmüştür. Düşük melatonin konsantrasyonları gauche konformerlerinin sayısını ve membran dinamiğini azaltırken yüksek melatonin konsantrasyonları lipitlerin konformasyonel düzensizliğini ve dinamiğini arttırmıştır. Bu tip davranış daha önceki vitamin D ve/veya tamoxifen-DPPC membran etkileşimlerinin incelendiği çalışmalarda da görülmüştür (Kazancı et al, 2001; Kazancı et al, 2000). Yüksek melatonin konsantrasyonlarının neden olduğu membran

dinamiğindeki artış bir önceki melatonin ve nötr membran etkileşimlerini incelediğimiz çalışmayla uyum içindedir (Severcan et al, 2005).

Çalışmamızda, melatoninin DPPC membranının hidrofilik kısmı olan gliserol iskeleti üzerine etkisini C=O gerilme bandını analiz ederek inceledik. Polar baş grup bölgesindeki değişimler  $PO_2^-$  antisimetrik çift bağ gerilme modları ile de incelenebilmektedir.  $PO_2^-$  grubunun fosfolipitlerin esas hidrasyon bölgesi olduğu bilinmektedir. Bu bandın frekansı hidrasyon durumu hakkında bilgi verir. Frekanstaki azalma fosfat grubunun hidrasyonunun artması, frekanstaki artma ise dehidrasyonu ile ilgilidir (Dluhy et al, 1983).

DPPG membranının ara yüzey bölgesi ve polar baş grubu bölgesi etkileşimleri incelendiğinde, melatonin konsantrasyonları arttıkça, lipid ester gruplarının C=O ve  $PO_2^-$  fonksiyonel grup frekansları daha düşük değerlere kaymıştır. Bu sonuç karbonil gruplarının hidrasyonundaki artışı göstermektedir. PG moleküllerinin fosfat kısımlarının komşu moleküllerin gliserol hidroksil grupları ile güçlü bir hidrojen bağlanması yaptığı bilinmektedir. PG moleküllerinin bu davranışı fosfat grubunun antisimetrik gerilme titreşimlerinin neden düşük frekanslarda olduğunun kanıtıdır (Zhang et al, 1997). Melatonin varlığında fosfat grubunun antisimetrik gerilme bandı frekansının, saf DPPG frekansından daha düşük değerlere kayması, bu grubun melatoninin NH grubu ile hidrojen bağı oluşturduğunu göstermektedir. Melatoninin CO, indolik ve amidik NH gibi polar grupları güçlü hidrojen bağı oluşturmaya yatkındır veya CO grubunun etrafındaki su molekülleri ile hidrojen bağı oluşturmasında yardımcı olur (Bongiorno et al, 2004; Severcan et al., 2005).

FTIR spektroskopisi ve DSC sonuçlarına göre DPPG membranlarındaki karbonil ve fosfat gruplarında melatoninin neden olduğu güçlü hidrojen

bağlanma ve faz geçişi eğrisindeki genişlemenin azlığı melatoninin asil zincirlerin (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) bölgesine girmediğini ve muhtemelen melatonin moleküllerinin hidrofobik iç bölgeden daha çok çift tabakanın ara yüzeyinde lokalize olduğunu göstermektedir (Boyar et al, 1997). Melatoninin antioksidan özelliği de bu şekildeki tercihli lokasyonu ile ilgilidir. Melatonin polar ve apolar bölgeler arasındaki ara yüzeyde, koruyucu bir ajan olarak rol oynar. Benzer sonuçlar diğer çalışmalarda da gözlenmiştir. Melatoninin kolesterol/lesitin içeren misellerdeki lokalizasyonunun ve etkileşimlerin <sup>1</sup>H-NMR ve FTIR spektroskopileri kullanılarak incelendiği bu çalışmalarda da; melatoninin kolesterol ve lesitinin hidrofilik gruplarının oluşturduğu nanobölgede lokalize olduğu bulunmuştur. Ayrıca melatoninin nötr model membranlarla etkileşimini incelediğimiz bir önceki çalışmamızda da melatoninin ara yüzeyde lokalize olduğunu ve melatoninin karbonil grupları veya etraftaki su molekülleri ile kuvvetli hidrojen bağlanması yaptığını göstermiştik (Bongiorno et al, 2005; Severcan et al, 2005).

Melatonin oldukça polar bir moleküldür ve yüksek bir dipol momente sahiptir. Bu nedenle çevresindeki moleküllerle kolayca etkileşebilir. Melatoninin indol zinciri üzerindeki negatif yük bu molekülü radikaller için oldukça çekici hale getirir (Zavodnik et al, 2006). DPPG anyonik bir lipittir ve anyonik fosfat baş grubuna sahiptir. Anyonlar bir dipolün pozitif ucuna bağlanırlar. İyonlar üzerindeki yükler ve polar moleküllerdeki yük dağılımı aralarında güçlü iyon-iyon etkileşimleri, daha zayıf iyon-dipol etkileşimleri ve daha da zayıf dipol-dipol etkileşimleri meydana gelir. Polar moleküller iyonlarla etkileşebilir ve DPPG ve melatonin arasındaki etkileşim iyon-dipol etkileşimi olabilir (Sahin et al., 2007).

Melatoninin çok katmanlı (MLV) DPPG vezikülleri üzerindeki etkilerini incelediğimiz bu çalışmamızla (Sahin et al., 2007), melatoninin çok katmanlı (MLV) DPPC vezikülleri üzerindeki etkisini FTIR ve DSC teknikleri ile ve yine artan melatonin konsantrasyonlarına (%1, %3, %6, %9, %15, %24 ve %30 mol) ve sıcaklığa bağlı olarak incelediğimiz daha önceki yüksek lisans çalışmamızı (Severcan et al., 2005) karşılaştırdığımızda; FTIR sonuçlarımıza göre; her iki tip membrana melatonin eklenmesi ile esas faz geçiş sıcaklığının daha düşük sıcaklıklara kaydığını, melatoninin düşük konsantrasyonlarının (% 3, % 6 ve % 9 mol) negatif yüklü membranların hem jel hem de sıvı kristal fazda düzenini arttırırken dinamiğini azalttığını, yüksek konsantrasyonlarının (% 15, % 24 ve % 30 mol) ise hem jel hem de sıvı kristal fazda DPPG membranlarının düzenini azaltırken dinamiğini de arttırdığını gördük. Bununla birlikte artan melatonin konsantrasyonları (%1, %3, %6, %9, %15, %24 ve %30 mol) nötr membranların (DPPC MLV) düzenini jel fazda arttırırken, membran dinamiğini hem jel hem de sıvı kristal fazda arttırmıştır.

Bu iki çalışmanın karşılaştırılmasında ayrıca melatoninin negatif yüklü ve nötr membranların polar baş gruplarıyla güçlü etkileştiğini ve bu membranların karbonil ve fosfat gruplarıyla güçlü hidrojen bağı kurduğunu gördük.

DSC sonuçlarımızı kıyasladığımızda ise melatoninin artan konsantrasyonlarının yine negatif yüklü ve nötr membranların esas faz geçiş sıcaklıklarını daha düşük sıcaklıklara kaydırıldığını gördük.

Bu sonuçlar bize melatoninin bu membranların polar ve polar kısma yakın bölgesinde yerleştiğini, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> bölgesine girmediğini göstermektedir.

## 4.2 MELATONİNİN DPPC VE DPPC/KOLESTEROL MODEL MEMBRANLARI (LUV) ÜZERİNE ETKİSİ

Bu çalışmada, melatoninin DPPC ve DPPC/Kolesterol LUV membranlarının faz geçişlerini, membran düzeni ve dinamiğini nasıl etkilediği FTIR, DSC ve Floresans spektroskopisi teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Melatoninin membranın hidrofilik kısım üzerindeki etkisini C=O gerilme bandını ve  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme bandını inceleyerek, hidrofobik kısım üzerindeki etkisini ise C-H gerilme bölgesini inceleyerek araştırdık.

FTIR çalışmalarımız sonucunda, %3 ve %15 mol melatoninin saf DPPC ve DPPC/Kolesterol LUV model membranlara eklenmesi ile faz geçiş sıcaklığının daha düşük sıcaklıklara kaydığı görülmüştür. Melatoninin bu etkisi daha önce DPPC ve DPPG MLV model membranları ile gerçekleştirdiğimiz çalışmalarımızda (Severcan et al, 2005; Sahin et al, 2007) ve DPPC'den daha kısa asil zincirlere sahip DMPC MLV model membranları ile yapılan bir başka çalışmada da görülmüştür (Saija et al, 2002).

Şekil 3.6 ve Şekil 3.8'deki melatonin içeren DPPC ve sadece kolesterol ve kolesterol ile birlikte melatonin içeren DPPC LUV membranlarının  $CH_2$  antisimetrik gerilme bandları incelendiğinde, özellikle jel fazda, melatoninin saf DPPC membranlarına eklenmesi ile frekans değerlerinde bir azalma gözlenmiştir. Aynı sonuç melatoninin çok katlı (MLV) DPPC membranları ile etkileşimini incelediğimiz daha önceki çalışmamızda da görülmüştür.  $CH_2$  antisimetrik gerilme frekansındaki azalma konformasyonel düzeni yansıtır ve asil zincirlerdeki trans konformerlerinin artışı anlamındadır. Melatoninin düzen stabilize etkisi, DPPC asil zincirleri ve melatonin arasındaki kuvvetli hidrofobik etkileşim ve melatoninin neden olduğu kuvvetli hidrojen bağlanması nedeni ile olabilir. Bu lipit membranın düzenindeki artış ile sonuçlanır (Severcan et al, 2005).

Saf DPPC membranlarına sadece kolesterol eklenmesi durumunda frekans değerleri, jel fazda saf DPPC değerlerine göre artarken sıvı kristal fazda ise saf DPPC değerlerine göre azalmıştır (Şekil 3.8). Kolesterol jel fazda lipit membranın düzenini azaltırken sıvı kristal fazda lipit membranın düzenini arttırmıştır. Kolesterolün faz geçiş sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklarda yapısal olarak daha düzenli bir membrana neden olduğu, faz geçiş sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda daha düzensiz membranlara neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca kolesterol yüksek erime sıcaklığına sahip doymuş lipitlerle daha güçlü etkileşir (Silvius, 2003). Saf DPPC membranlarına kolesterolün varlığında artan melatonin konsantrasyonları eklendiğinde, hem jel hem de sıvı kristal fazda, frekans değerleri artan melatonin konsantrasyonu ile saf DPPC değerlerine göre azalmıştır. Bu sonuç melatoninin kolesterol varlığında saf DPPC membranlarının düzenini her iki fazda da arttırdığı anlamına gelmektedir.

Aynı zamanda melatoninin artan konsantrasyonlarının saf DPPC ve DPPC/Kolesterol LUV membranlarına eklenmesi ile faz geçiş eğrisinde önemli bir genişleme görülmemiştir. Bu durum, melatoninin, fosfolipit zincirler arasındaki Van der Waals etkileşimini yok etmediğini bu nedenle lipitlerin aynı sıcaklıkta eridiğini yani geçişin hep birlikte olduğunu göstermektedir. Buna işbirlikçi geçiş denir (Jain and Wu, 1977).

Melatonin içeren DPPC membranlarının band genişliği değerleri incelendiğinde (Şekil 3.7), hem jel hem de sıvı kristal fazda, melatonin konsantrasyonunun artmasıyla dikkate değer bir artış görülmüştür. Sadece kolesterol ve kolesterol ile birlikte melatonin içeren DPPC membranlarının band genişliği değerleri incelendiğinde (Şekil 3.9), kolesterolün jel fazda dinamiği arttırdığı sıvı kristal fazda ise azalttığı görülmüştür. Sistemde kolesterol ve melatoninin bir arada bulunması durumunda ise band genişliği değerleri her iki fazda da artmıştır. Band genişliği lipit dinamiği hakkında

bilgi vermektedir (Lopez-Garcia et al, 1993; Toyran and Severcan, 2003; Kazancı et al, 2001). Melatoninin membran dinamiğini nasıl etkilediğine ilişkin literatürde çok sayıda çalışma yoktur. Garcia ve arkadaşları sıçan mikrozomal membranlarıyla gerçekleştirdikleri çalışmalarında melatoninin membran rijiditesini azalttığını bulmuşlardır (Garcia et al, 1998). Dimiristolfosfatidilkolin (DMPC) kullanılarak hazırlanan MLV ve LUV membranlarıyla gerçekleştirilen diğer bir DSC çalışmasında da melatoninin membran akışkanlığını arttırdığı bulunmuştur (Saija et al, 2002). Melatonin lipit peroksidasyonu önleyici etkiye sahiptir. Lipit peroksidasyonunun hücre membranlarının akışkanlığını azalttığı bilinmektedir (Niki, 2009; Watanabe et al, 2000). Melatoninin sebep olduğu akışkanlık etkisi, lipit peroksidasyonunun membran dinamiği üzerindeki etkisini azaltabilir (Bekyarova et al, 2009; Sheth et al, 2009; Shilian et al, 2009).

Saf DPPC (LUV) lipozomuna melatoninin farklı konsantrasyonlarının eklenmesi sonucunda, hem jel hem de sıvı kristal fazda, C = O gerilme titreşim ve  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme bandının frekans değerlerinde azalma görülmüştür (Şekil 3.10 ve Şekil 3.12). Saf DPPC lipozomuna sadece kolesterol ve kolesterolle birlikte farklı konsantrasyonlarda melatonin eklenmesi durumunda da jel ve sıvı kristal fazda, hem sadece kolesterol hem de kolesterolle birlikte melatoninin farklı konsantrasyonlarının eklenmesi ile C = O gerilme titreşim ve  $PO_2^-$  antisimetrik gerilme bandının frekans değerlerinde azalma görülmüştür (Şekil 3.11 ve Şekil 3.13). Bongiorno ve arkadaşları da yaptıkları çalışmalarda kolesterolün OH grubu ile lesitin hidrofilik polar baş grubu arasında etkileşim olduğunu ve hidrojen bağı oluştuğunu bulmuşlardır (Bongiorno et al, 2005). Kolesterolün zayıf bir şekilde hidrofilik olan OH grubunun lipit baş grup bölgesi ile etkileştiği

başka çalışmalarda da gösterilmiştir (Gliss et al., 1999; Smondyrev and Berkowitz, 2000).

Çalışmamızda melatoninin, jel ve sıvı kristal fazda, hem saf DPPC (Şekil 3.10 ve Şekil 3.12) hem de kolesterolün varlığındaki DPPC membranlarının (Şekil 3.11 ve Şekil 3.13) C=O ve  $PO_2^-$  fonksiyonel gruplarının hidrojen bağlanmasını arttırdığını gördük. Melatonin, bu grupların neden olduğu bandların frekansının, hem saf DPPC için hem de kolesterolün varlığındaki DPPC membranları için daha düşük frekans değerlerine kaymasına neden olmuştur. Bu değişim, karbonil gruplarının oldukça yüksek hidrasyonunu gösterebilir. Bunun sonucunda da hidrojen bağlı karbonillerin sayısında artış olur.  $PO_2^-$  grubunun fosfolipitlerin esas hidrasyon bölgesi olduğu bilinmektedir. Bu bandın frekansı hidrasyon durumu hakkında bilgi verir. Frekanstaki azalma fosfat grubunun hidrasyonu ile azalma ise dehidrasyonu ile ilgilidir (Dluhy et al, 1983). Bu durum, DPPC ve DPPC/Kolesterol LUV membranlarının karbonil ve fosfat gruplarının oksijen molekülleri ve bu fonksiyonel grupların etrafındaki su molekülleri arasında ve/veya melatoninin karbonil grupları ve etraftaki su molekülleri ile kuvvetli hidrojen bağlanması yaptığını gösterir. DMPC model membranı ile etkileşimleri UV spektroskopisi tekniği ile incelenen diğer bir çalışmada (Ceraulo et al, 1999) melatoninin polar baş grup bölgesiyle güçlü etkileştiği ve kuvvetli hidrojen bağlanması yaptığı görülmüştür. DMPC model membran kullanılarak, UV spektroskopi ve DSC tekniği ile incelenen çalışmada (Saija et al, 2002) melatoninin güneş ışınlarından koruyucu aktivitesi ve Fluorescence ve ESR teknikleri ile incelenen çalışmada (Costa et al,1997) yine DMPC model membran kullanılarak melatoninin lipit çift tabakalarla nasıl etkileştiği araştırılmıştır.

Bongiorno ve arkadaşları, FTIR ve <sup>1</sup>H-NMR teknikleriyle, kolesterol ve lesitin kullanarak hazırladıkları ters misel model membranlarıyla yaptıkları bir diğer çalışmada da; kolesterol ve lesitin sistemine melatonin eklediklerinde, NH bantlarının kolesterol-OH gerilme bantlarıyla üst üste bindiğini ve melatoninin çok güçlü hidrojen bağı kurduğunu görmüşlerdir. Lesitinin PO<sub>4</sub><sup>-</sup> antisimetrik gerilme bandı, sistemde hem kolesterol hem de melatonin varlığında daha düşük frekanslara değişmiştir. Lesitin bu grubunun kolesterolün OH ve melatoninin NH gruplarıyla hidrojen bağı yaptığını bulmuşlardır. Bu nedenle de kolesterolün varlığında bile melatoninin miselin hidrofilik çekirdeğinde lokalize olduğunu bulmuşlardır. Melatoninin kolesterole göre daha etkili olmasının sebebini de yüksek anizotropik perdeleme etkisine ve/veya lesitin baş grupları tarafından tamamen hapsedilmesine bağlamışlardır. Aksine PO<sub>4</sub><sup>-</sup> grubuyla hidrojen bağı yapan kolesterolün ise daha derin bir şekilde hidrofobik alkil zincirler arasında yerleştiğini bulmuşlardır (Bongiorno et al, 2005). Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla uyum içindedir. Ancak melatoninin, DPPC ve kolesterol içeren DPPC kullanılarak elde edilen büyük tek katmanlı veziküllerle (LUV) moleküler düzeyde etkileşimini FTIR ve DSC tekniği ile inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Biz bu çalışmamızda ilk kez melatoninin DPPC ve kolesterol içeren DPPC LUV membranlarıyla güçlü etkileştiğini ve kuvvetli hidrojen bağı kurduğunu gösterdik.

Şekil 3.14 ve Şekil 3.15'deki DSC eğrilerinden açıkça görüleceği üzere DPPC ve DPPC/Kolesterol LUV membranlarına melatoninin artan konsantrasyonları eklendiğinde, ana faz geçiş sıcaklığının melatonin konsantrasyonu arttıkça daha düşük sıcaklıklara kaydığı gözlenmiştir. DPPC/Kolesterol membranlarının faz geçiş eğrilerinde saf DPPC membranına göre kolesterolün neden olduğu bir genişleme söz konusudur. Kolesterol fosfolipit çift tabaka üzerinde birçok etkiye sahiptir. En açık

etkilerden birisi esas faz geçişinin genişlemesidir (de Kruffy et al., 1972). DPPC LUV membranlarına eklenen melatonin faz geçiş eğrisinde bir genişlemeye neden olmamakta fakat C=O ve  $PO_2^-$  gerilmeleri ile kuvvetli hidrojen bağlanması meydana getirmektedir. Bu sonuçlar bize melatoninin membranın polar ve polar kısma yakın bölgesinde yerleştiğini, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> bölgesine girmediğini göstermektedir.

Melatoninin DPPC ve DPPC/Kolesterol karışımından oluşan LUV membranları ile etkileşimi Floresans Spektroskopisi tekniği ile de incelenmiştir. Elde edilen emisyon spektrumları değerlendirildiğinde, % 3 mol melatonin konsantrasyonu içeren DPPC LUV membranı için elde edilen emisyon şiddetinin hem jel hem de sıvı kristal fazda saf DPPC LUV membranı için elde edilen emisyon şiddetinden daha fazla olduğu görülmektedir. % 15 mol melatonin konsantrasyonu için ise şiddetin her iki sıcaklıkta da hemen hemen saf DPPC LUV membranı ile aynı kaldığı görülmektedir. Farklı melatonin konsantrasyonu içeren DPPC/Kolesterol karışımından oluşan LUV membranlarına ait emisyon spektrumları incelendiğinde ise, % 3 mol melatonin konsantrasyonu için elde edilen emisyon şiddetinin her iki fazda da hem saf DPPC hem de saf DPPC/Kolesterol karışımından oluşan membranlar için elde edilen emisyon şiddetinden fazla olduğu, % 15 mol melatonin konsantrasyonu içeren DPPC/Kolesterol LUV membranı için elde edilen emisyon şiddetinin ise saf DPPC membranı için elde edilen emisyon şiddetinden daha yüksek olduğu görülmektedir.

Floresans ölçümleri almada kullandığımız boya diğer ölçümlerimizde de kullandığımız boya olan SP-DiOC<sub>18</sub>(3) boyasıdır. Bu boya uzun hidrofobik zincirlere sahiptir.

Floresans spektroskopisi ölçümleri florofor ve etrafındaki moleküller arasındaki bağlanmaları açığa çıkarır. Floresans şiddeti, florofor ve molekül

bağlanmalarının bir sonucu olarak değişir ve floroforun yapısına bağlı olarak azalır ya da artar. Çoğu zaman, bir florofor polar çevreden polar olmayan çevreye hareket ettiğinde emisyon şiddetinde bir artış ve dalga boyunda azalma görülür (Permyakov, 1993; Burstein et. al, 1973).

Bu çalışmamızda artan melatonin konsantrasyonlarının hem sadece saf DPPC hem de kolesterol içeren DPPC LUV membranlarına eklenmesi ile emisyon şiddetinin saf DPPC membranlarına göre artmasının farklı nedenleri olabilir. Bu nedenler şu şekilde sıralanabilir: melatoninin hem sadece saf DPPC hem de kolesterol varlığındaki DPPC membranlarının akışkanlığını hem jel hem de sıvı kristal fazda arttırdığını FTIR çalışmalarımızla göstermiştik. Melatoninin her iki fazda da membran akışkanlığını hem kolesterol varlığındaki DPPC hem de saf DPPC membranlarında arttırması ile boya molekülleri sistemde daha serbest halde bulunurlar dolayısı ile de emisyon şiddeti artar. Ayrıca melatoninin lipit ve kolesterol/lipit karışımından oluşan membranların polar baş grup bölgesiyle güçlü etkileştiğini ve kuvvetli hidrojen bağlanması yaptığını, daha önceden DPPC ve DPPG lipitleri kullanarak hazırladığımız MLV model membranlarında ve bu çalışmamızda yine DPPC ve DPPC/Kolesterol kullanarak hazırladığımız LUV model membranlarında FTIR ve DSC tekniği kullanarak göstermiştik (Severcan et al, 2005, Sahin et al, 2007). Melatoninin bu özelliği başka grupların yaptıkları çalışmalarda da görülmüştür ( Ceraulo et al, 1999, Bongiorno et al, 2005). Artan boya konsantrasyonunun DPPC lipiti üzerindeki etkisini incelemek için LUV membran örnekleri kullanarak elde ettiğimiz FTIR ve DSC teknikleri sonuçlarında, hem jel hem de sıvı kristal fazda, lipit polar kısmındaki fonksiyonel grupların çevresinde boya moleküllerinin dehidrasyona neden olduğunu bulduk. Daha önceki çalışmalarda, kullanılan floroforun membranlarla etkileşmesi sonucunda floresans şiddetindeki artış, kullanılan floroforların hidrofilik bölgeden çok

hidrofobik bölgede lokalize olduğunu göstermiştir (Radda and Vanderkool, 1972). Melatoninin DPPC ve DPPC/Kolesterol karışımından oluşan LUV membranlarının polar baş gruplarıyla kuvvetli hidrojen bağı yapması sonucunda, uzun hidrofobik zincirlere sahip boya moleküllerinin de lipitlerin asil zincirleriyle hidrofobik etkileşime girdiği söylenebilir.

Yapılan diğer çalışmalarda da floresans şiddetinin artması ortamın hidrofobikliğinin artmasına bağlanmıştır (McAlpine and Garcia-Garibay, 1998).

Çalışmamızın buraya kadar olan kısmında melatoninin negatif yüklü (DPPG), nötr (DPPC) ve kolesterol içeren nötr membranlarla nasıl etkileştiğini farklı spektroskopik ve kalorimetrik tekniklerle inceledik. Melatoninin negatif yüklü, nötr ve kolesterol içeren nötr membranlarla etkileşim sonuçlarını karşılaştırdığımızda; düşük melatonin konsantrasyonlarının (% 3, % 6 ve % 9 mol) negatif yüklü membranların hem jel hem de sıvı kristal fazda düzenini arttırırken dinamiğini azalttığını, yüksek konsantrasyonlarının (% 15, % 24 ve % 30 mol) ise hem jel hem de sıvı kristal fazda DPPG membranlarının düzenini azaltırken dinamiğini de arttırdığını bulduk. Melatonin nötr ve kolesterol içeren nötr membranlarla nasıl etkileştiğini incelediğimizde ise melatoninin artan konsantrasyonlarının (%3 ve % 15 mol) hem saf DPPC hem de kolesterol içeren DPPC membranlarının düzenini jel fazda arttırdığını bulduk. Sıvı kristal fazda melatoninin bu konsantrasyonları saf DPPC membranlarında her hangi bir etkiye sahip değilken, kolesterol içeren DPPC membranlarının düzenini arttırmıştır. Ayrıca melatonin bu konsantrasyonları hem saf DPPC hem de kolesterol içeren DPPC membranlarının dinamiğini her iki fazda da arttırmıştır.

Ayrıca melatoninin negatif yüklü, nötr ve kolesterol içeren membranların polar baş gruplarıyla güçlü etkileştiğini ve bu membranların karbonil ve fosfat gruplarıyla güçlü hidrojen bağı kurduğunu gördük.

DSC sonuçlarımızı kıyasladığımızda melatoninin yine negatif yüklü, nötr ve kolesterol içeren nötr membranların esas faz geçiş sıcaklıklarını daha düşük sıcaklıklara kaydırıldığını gördük.

Bu sonuçlar bize melatoninin bu membranların polar ve polar kısma yakın bölgesinde yerleştiğini, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> bölgesine girmediğini göstermektedir.

### 4.3 PROB–MEMBRAN ETKİLEŞİMLERİ

Melatonin-membran etkileşimlerinde floresans spektroskopisi ile sonuçlar elde edebilmek için kullandığımız boyanın sistemi perturbe edip etmediğini anlayabilmek için boyanın membranlarla nasıl etkileştiğini de inceledik.

Boya moleküllerinin membranlar üzerindeki etkileri öncelikle TCSPC tekniği kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; hem saf DOPC ve DPPC için bireysel olarak hem de DOPC/Kolesterol ve DPPC/Kolesterol karışımları için artan boya konsantrasyonları ile yaşam süresi değerlerinin oldukça etkilendiği görülmüştür (Şekil 3.19). Analizler sonucunda her bir sistem için boya konsantrasyonu arttıkça yaşam süresi değerlerinin azaldığı görülmüştür. Yaşam süresi değerlerinin düşmesinin bir nedeninin de kolesterol etkisi olduğu düşünülmüştür. Saf DPPC ve saf DOPC'ye kolesterol eklenmesi ve boya konsantrasyonunun arttırılması ile yaşam süresi değerleri saf DPPC ve DOPC yaşam süresi değerlerine göre azalmıştır. DPPC oda sıcaklığında jel fazdadır. Lipit moleküler yüzey alanı jel fazda küçüktür. Kolesterolün yüzey alanı hem jel hem de sıvı fazda PC molekülünden daha küçüktür. Kolesterolün DPPC membranına eklenmesi ile esas moleküler alan jel fazdan daha da küçük bir hal alır ve yoğunlaştırıcı etkinin sonucunda *lo* fazı oluşur. Bu da prob yüzey yoğunluğunun artması demektir (de Almeida et al, 2005). Daha önce yapılan benzer çalışmalarda da kolesterolün yaşam süresi değerinde düşmeye neden olduğu görülmüştür. Almeida ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada DOPC'ye kolesterol eklenmesi ile yaşam süresi değeri 2.6 ns'den 2.3 ns'ye düşmüştür. DOPC'ye kolesterol eklenmesi lipit membranın esas yüzey moleküler alanının azalmasına, bu da prob konsantrasyonunun yoğun olmasına ve bu nedenle de floresans yaşam süresi değerinin daha düşük olmasına neden olur (de Almeida et al, 2007).

Boya moleküllerinin neden olduğu yaşam süresi kontrastın daha iyi anlaşılması için DPPC ve DOPC membranları kullanılarak ayrıca sıcaklığa bağlı ölçümler alınmıştır. Sıcaklık her iki lipit için de oda sıcaklığından başlayıp 70 °C'ye kadar arttırılmıştır. DPPC faz geçiş sıcaklığı 41 °C, DOPC faz geçiş sıcaklığı ise -22 °C'dir. Oda sıcaklığında sıvı kristal fazda bulunan DOPC için elde edilen yaşam süresi değerleri ile DPPC sıvı kristal faz bölgesi için elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında aynı fazda bulunan DPPC ve DOPC lipitleri için yaşam süresi değerlerinin benzer şekilde azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. Bunun nedeni dinamik sönümlenme prosesinin *ld* fazında etkin olmasıdır. Yüksek sıcaklıklar daha hızlı difüzyonla ve dolayısıyla daha büyük ölçüde çarpışmadan kaynaklanan sönümlenme ile sonuçlanır (Lakowicz, 2003).

Aynı lipit bileşenleri ve karışımları için boya konsantrasyonları arttırılarak mikroskopik ölçümlere ek olarak spektroskopik ölçümler alınmıştır. Her bir lipit bileşeni ve lipit/kolesterol karışımı için boya konsantrasyonunun arttırılmasıyla elde edilen sonuçlarda emisyon spektrumunun daha büyük dalga boylarına kaydığı görülmüştür. Dalga boyunun daha büyük değerlere kayması boya moleküllerinin farklı lipit ortamlarında farklı agregasyonlarda olduğunu göstermektedir.

Kullanılan boya karbosiyanin bir boyadır. Siyanin boyalar için iki tip agregasyon şekli vardır: H- agregasyon ve J- agregasyon. J- agregasyonuna sahip boyalar emisyon spektrumunda daha büyük dalga boylarına kayma gösterirler (red-shifted) (Dixon et al, 2005).

Siyanin boyalarda gözlenen bu tip agregasyonun spektroskopik özellikleri, J- bandı adı verilen yeni bir absorpsiyon bandı ile karakterize edilir. Bu absorpsiyon bandı daha büyük dalga boylarında ortaya çıkar (Yonezawa et al, 2005).

Aynı boya konsantrasyonlarının kullanıldığı boya lipit sistemlerinin aralarındaki etkileşim aynı zamanda non-perturbing teknikler olan FTIR ve DSC ile de incelenmiştir.

Jel ve sıvı kristal fazda, frekans değerleri incelendiğinde; artan boya konsantrasyonlarının DPPC lipozomlarına eklenmesi ile sistemin asil zincir (hidrokarbon zincir) düzeninin arttığı görülmektedir. Jel fazda artan boya konsantrasyonları ile band genişliği değerlerinin saf DPPC değerlerine göre azalması; lipit asil zincirlerinin hareket özgürlüğünün azalması anlamına gelirken, sıvı kristal fazda artan boya konsantrasyonları ile band genişliği değerlerinin saf DPPC değerlerine göre artması ise artan boya konsantrasyonlarının membran dinamiğini arttırıcı etkisinin olduğunu gösterir. Kullanılan boya SP-DiOC<sub>18</sub>, lipofilik anyonik sulfonilkarbosiyanin bir boyadır. Negatif yük bu problemlerin lipit çift tabakada lateral ve enine dağılımlarının değişmesine neden olur. Bu özellik plazma membran lipit domenlerinin tanımlanmasında önemlidir (Leung et al., 1996).

DPPC lipozomlarının polar kısmındaki baş grubu ve boya konsantrasyonu arasındaki etkileşimler C = O gerilme titreşim ve PO<sub>2</sub><sup>-</sup> antisimetrik gerilme bantlarının analizi ile incelenmiştir. DPPC lipozomlarına eklenen boya konsantrasyonlarının frekans değerlerini düşürmesi, hem jel hem de sıvı kristal fazda, lipit polar kısmındaki bu fonksiyonel grupların çevresinde boya moleküllerinin dehidrasyona neden olduğunu göstermektedir.

DPPC membranlarına artan boya konsantrasyonu eklenerek elde edilen kalorimetrik eğri incelendiğinde; ön geçiş sıcaklığının kaybolduğu ve esas faz geçiş sıcaklığının ise artan boya konsantrasyonu ile daha yüksek sıcaklıklara kaydığı gözlenmiştir. Ayrıca boya konsantrasyonunun DPPC

lipozomunda artması ile esas faz geçiş sıcaklığı pikinde bir genişleme gözlenmiştir.

FTIR ve DSC sonuçlarımızdan da anlaşılacağı gibi boya moleküllerinin fosfolipit membranlarla etkileşime girdiğini söyleyebiliriz.

Kullandığımız boya SP-DiOC<sub>18</sub>(3) lipofilik sülfonlu karbosiyenin bir boyadır. Uzun hidrofobik zincirlere sahiptir. Bu tip boyalar canlı doku ve hücre çalışmalarında etiketlemede kullanılmaktadır. Lipofilik karbosiyenin boyalar ayrıca membran fizyonu ve hücre geçirgenliğini görüntülemeye de kullanılmaktadır (Abidor et al., 1994; Bakker et al., 1993; Dimitrov and Sowers, 1990). Hidrofilik/hidrofobik yapılara sahiptirler. Kullandığımız boyanın (SP-DiOC<sub>18</sub>(3)) fosfolipit model membranlarla bağ yaptığı bilinmektedir (Leung et al., 1996).

Floresans spektroskopide oldukça yaygın olarak kullanılan problemlerin buldukları ortamda etrafındaki moleküllerle etkileşim içine girdikleri bilinmektedir. Bu etkileşimler kullanılan floroforun etrafındaki moleküllerle bağlanması şeklinde olabilir. Bu durumda da floresans şiddeti, florofor ve molekül bağlanmalarının bir sonucu olarak değişir ve floroforun yapısına bağlı olarak azalır ya da artar. Yapılan pek çok çalışmada kullanılan problemlerin lipit membranlarla ya da ortamdaki moleküllerle etkileştiği bulunmuştur (Adams and Feltz, 1977; Frank et al., 1996). Problemlerin membranlara bağlanmalarının alkil zincir uzunluğu ile arttığı söylenmektedir. Ayrıca problemlerin membrana bağlanmış olduğu, emisyon şiddetindeki artış ve emisyon dalga boyunun daha küçük dalga boylarına kaymasından anlaşılır. Bu sonuçlar da floroforun daha düşük polariteli bölgede bulunduğunu gösterir. Bu değişimler problem alkil zincir uzunluğu arttıkça artar (Radda and Vanderkool, 1972).

Floresans spektroskopisi ve mikroskopisi gibi ölçüm elde edebilmek için dışarıdan prob gerektiren tekniklerde kullanılmakta olan bu boyalar, membranlarla ya da etrafındaki moleküllerle etkileştikleri için, prob moleküllerinin varlığı veri analizi için birçok karmaşık faktörler üretir. Ayrıca, bu tip tekniklerle inceleme altındaki sistem hakkında bilgi çıkarmak için prob moleküllerinin bu etkileşimlerinin de göz önünde bulundurulması gerekebilir. Bu durumda, incelenecek sistem hakkında, dışarıdan prob gerektiren bu tip tekniklerden elde edilen veriler, sistemi bozmadan ölçüm alınabilen diğer tekniklerden (FTIR ve DSC gibi) elde edilen verilere göre daha farklı olabilir ya da non-perturbing tekniklere göre daha farklı sonuçlar elde edilmesine neden olabilir. Bu nedenle bu tip problemlerin deneysel çalışmalarda dikkatli kullanılması gerekmektedir.

## 5. DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada incelenen melatonin antioksidan olup pek çok hastalıkta tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Melatoninin etki mekanizmalarının tayini için pek çok çalışma yapılmıştır ve yapılmaktadır. Fakat bu çalışmaların pek çoğu klinik seviyededir. Moleküler düzeydeki çalışmalar henüz kısıtlı sayıdadır (Saija et al, 2002; Ceraulo et al, 1999; Costa et al, 1997; Bongiorno et al, 2004, 2005) dolayısı ile melatoninin membran içindeki konumu ve konformasyonu henüz tam belirli değildir. Bu tip çalışmalar melatoninin tedavideki kullanımı ile ilgili mekanizmaları anlamada yardımcı olacak değerli bilgiler verecektir.

Bu çalışmada ilk defa melatoninin negatif yüklü lipit (DPPG) model membranlar (MLV), nötr (DPPC) ve kolesterol içeren nötr lipitlerden (DPPC/Kolesterol) oluşan model membranlar (LUV) üzerine etkisi sıcaklığa ve melatonin konsantrasyonlarına bağlı olarak FTIR, DSC ve Floresans Spektroskopisi teknikleri kullanarak incelenmiştir.

Melatoninin model membranlarla etkileşmesini anlamak, incelenecek sistemin gerçek membranlara benzemesi nedeni ile hem gerçek sistemlerdeki etkileşmeleri anlamamız açısından değerli bilgiler verecektir hem de melatoninin etki mekanizmasını daha fazla anlamamıza yardımcı olacaktır.

İlaç olarak potansiyel vaad eden melatoninin negatif yüklü ve nötr model membranlar üzerindeki fiziksel etkileri spektroskopik ve kalorimetrik olarak incelenmiştir. Melatoninin jel ve sıvı kristal fazda lipitin asil zinciri, karbonil grubu ve fosfat baş grubu ile nasıl etkileştiği, membran içindeki konumu ve dolayısı ile membran düzen ve dinamiğini nasıl değiştirdiği incelenmiştir.

Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde;

- FTIR ve DSC sonuçlarımıza göre, biz bu çalışmamızda ilk kez, negatif yüklü DPPG membranlarına melatonin eklenmesi ile

esas faz geçiş sıcaklığının daha düşük sıcaklıklara kaydığını, melatoninin düşük konsantrasyonlarının (% 3, % 6 ve % 9 mol) negatif yüklü membranların hem jel hem de sıvı kristal fazda düzenini arttırırken dinamiğini azalttığını, yüksek konsantrasyonlarının (% 15, % 24 ve % 30 mol) ise hem jel hem de sıvı kristal fazda DPPG membranlarının düzenini azaltırken dinamiğini de arttırdığını gösterdik. Ayrıca melatoninin negatif yüklü membranların polar baş gruplarıyla güçlü etkileştiğini ve bu membranların karbonil ve fosfat gruplarıyla güçlü hidrojen bağı kurduğunu gösterdik.

Melatoninin nötr ve kolesterol içeren nötr membranlarla nasıl etkileştiğinin FTIR, DSC ve Floresans Spektroskopisi teknikleri kullanılarak ilk kez incelendiği bu çalışmamızda da;

- Nötr ve kolesterol içeren nötr membranlara melatonin eklenmesi ile esas faz geçiş sıcaklığının daha düşük sıcaklıklara kaydığını, melatoninin artan konsantrasyonlarının (%3 ve % 15 mol) hem saf DPPC hem de kolesterol içeren DPPC membranlarının düzenini jel fazda arttırdığını bulduk. Sıvı kristal fazda melatoninin bu konsantrasyonları saf DPPC membranlarında her hangi bir etkiye sahip değilken, kolesterol içeren DPPC membranlarının düzenini arttırmıştır. Ayrıca melatonin bu konsantrasyonları hem saf DPPC hem de kolesterol içeren DPPC membranlarının dinamiğini her iki fazda da arttırmıştır. Ayrıca melatoninin hem saf DPPC hem de kolesterol içeren DPPC membranlarının baş gruplarıyla güçlü etkileştiğini ve hem kolesterolün hem de kolesterol varlığında melatoninin bu membranların karbonil ve fosfat gruplarıyla güçlü hidrojen bağı kurduğunu gösterdik.

Bu çalışma, melatoninin hastalık tedavilerindeki rolünü, bu rolün arkasındaki mekanizmaları moleküler düzeyde anlamak böylece ilaç membran etkileşmelerini açıklamak açısından çok faydalı olacaktır. Ayrıca çeşitli hastalıkların tedavisinde ve hastalıklardan korunmak amacıyla kullanılan antioksidanların, gerçek sistemdeki etki mekanizmasını daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır. Melatonin-membran etkileşmesini anlamak, melatoninin membran geçirgenliğindeki rolünü açıklamak açısından faydalı olacaktır.

## **6. GELECEKTEKİ PLANLAR**

Deneysel olarak gerçekleştirilen çalışmalar teorik çalışmalarla desteklenecektir.

Klasik moleküler dinamik simülasyon metotları kullanılarak ilaç-membran etkileşimleri ve fosfolipit membranların dinamik, yapısal ve oluşum özellikleri incelenecektir.

**KAYNAKLAR**

**Abidor, I.G., Li, L.H., Hui, S.W.**, 1994, Studies of cell pellets: II. Osmotic properties, electroporation, and related phenomena: membrane interactions, *Biophys J*, 67:1 427-435

**Adams, P.R. and Feltz, A.**, 1977, Interaction of a fluorescent probe with acetylcholine-activated synaptic membrane, *Nature*, 269:609 - 611

**Alakoskela, J-M. I., Kinnunen, P. K. J.**, 2004, Phospholipid main phase transition assessed by fluorescence spectroscopy, *Rev. Fluoresc.* 1: 257–297.

**Alakoskela, J-M.**, 2005, Interactions in Lipid-Water Interface Assessed by Fluorescence Spectroscopy, Academic Dissertation, University of Helsinki, Finland.

**Alpert, M., Carome, E., Kubulins, V., Hansler, R.**, 2009, Nighttime use of special spectacles or light bulbs that block blue light may reduce the risk of cancer, *Medical Hypotheses*, 73:324-325

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

**Bakker Schut, T.C., Kraan, Y.M., Barlag, W., de Leij, L., de Grooth, B.G., Greve, J.**, 1993, Selective electrofusion of conjugated cells in flow, *Biophys J*, (65):2 568-572.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Bangham, A. D., Standish, M. M., Watldm, J. C.**, 1965, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.*, 13: 238-52.

**Bekyarova, G., Galunska, B., Ivanova, D., Yankova, T.**, 2009, Effect of melatonin on burn-induced gastric mucosal injury in rats, *Burns*, 35: 863-868.

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

**Blask, D.E.**, 1984, The pineal an oncostatic gland, In: Reiter RJ, editor. Pineal gland. New York: Raven Press, 253-284.

**Blask, D.E.**, 2009, Melatonin, sleep disturbance and cancer risk, *Sleep Medicine Reviews*, 13:257-264

**Boggs, J. M.**, 1987, Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function, *Biochim. Biophys. Acta* 906: 353–404.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Bongiorno, D., Ceraulo, L., Ferrugia, M., Filizzola, F., Ruggirello, A., Liveri, V. T.**, 2004, H-NMR and FT-IR study of the state of melatonin confined in membrane models: location and interactions of melatonin in water free lecithin and AOT reversed micelles, *Arkivoc*, 5: 251–262.

**Bongiorno, D., Ceraulo, L., Ferrugia, M., Filizzola, F., Ruggirello, A., Liveri, V.T.**, 2005, Localization and interactions of melatonin in dry cholesterol/lecithin mixed reversed micelles used as cell membrane models, *J Pineal Res.*, 38: 292–298.

**Borissevitch, I.E., Borges, C.P.F., Borissevitch, G.P., Yushmanov, V.E., Louro, S.R.W., Tabak, M.**, 1996, Binding and location of dipyrindamole derivatives in micelles: The role of drug molecular structure and charge, *Z. Naturforsch.*, 51c:578–590.

**Boyar, H., Severcan, F.**, 1997, Oestrogen phospholipid membrane interactions: An FTIR study, *J. Mol. Structure*, 408: 269-277.

**Bray, D. and Alberts, B.**, 1994, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, New York, 1294 p.

**Brezinski, A.**, 1997, Melatonin in humans, *New Eng. J. Med.*, 336:186-195.

**Burstein, E.A., Vedenkia, N.S., Ivkova, M.N.**, 1973, Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules, *Photochem. Photobiol.*, 18:263-279

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

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

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

**Cametti, C., Luca, F., D'Ilario, A., Macrì, M. A., Briganti, G., Maraviglia, B.**, 1991, The ripple phase in model membrane systems. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 84: 465–469.

**Casal, H.L., Cameron, D.G., Smith, I.C., Mantsch, H.H.**, 1980, Acholeplasma laidlawii membranes: a Fourier transform infrared study of the influence of protein on lipid organization and dynamics. *Biochemistry*, 19(3):444–451.

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

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

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Ceckler, T. L., Cunningham, B. A.,** 1997, Transition State Thermodynamics of Lipid Bilayers Characterized by Differential Scanning Calorimetry. *The Chemical Educator*. 2(6): 1-17.

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

**Cevc, G.,** 1988, Effect of lipid headgroups and (nonelectrolyte) solution on the structural and phase properties of bilayer membranes. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 92: 953–961.

**Cevc, G.,** 1991, Isothermal lipid phase transitions, *Chem. Phys. Lipids*, 57: 293–307.

**Chapman, D.Q.,** 1975, Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes, *Rev. Biophys.*, 8:185-235.

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

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**de Almeida, R.F.M., Loura, L.M.S., Federov, A., and Prieto, M.,** 2005, Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study, *J. Mol. Biol.*, 346: 1109-1120.

**de Almedia, R.F.M, Borst, J., Fedorov, A., Prieto M., Visser, A.J.W.G,** 2007, Complexity of Lipid Domains and Rafts in Giant Unilamellar Vesicles Revealed by Combining Imaging and Microscopic and Macroscopic Time-Resolved Fluorescence, *Biophysical Journal*, 93:539-553.

**Dean, J. A.,** 1995, In: *The Analytical Chemistry Handbook*, McGraw Hill, Inc. New York, 15.1–15.5p.

**de Kruyff, B., Demel R.A., and van Deenen L.L.,** 1972, The effect of cholesterol and epicholesterol incorporation on the permeability and on the phase transition of intact *Acholeplasma laidlawii* cell membranes and derived liposomes, *Biochim Biophys Acta*, 255(1): 331-47.

**Dimitrov, D.S., Sowers, A.E.,** 1990, A delay in membrane fusion: lag times observed by fluorescence microscopy of individual fusion events induced by an electric field pulse, *Biochemistry*, (29):36 8337-8344

**Dixon, A., Duncan, C., Samha, H.,** 2005, Self Assembly of Cyanine Dye on Clay Nanoparticles, *American Journal of Undergraduate Research*, 3: 29-34.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Dluhy, R.A., Cameron, D., Mantsch, H.H. and Mendelsohn, R.,** 1983, Fourier Transform Infrared Spectroscopic Studies of the Effects of Calcium Ions on Phosphatidylserine, *Biochemistry*, 22:6318-6325.

**Dobretsov, G.E, Borschevskaya, T.A, Petrov, V.A., Vladimirov, Y.A,** 1977, The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation, *FEBS Letters*, 84(1), 125-128.

**Ebel, H., Grabitz, P., and Heimburg, T.,** 2001, Enthalpy and volume changes in lipid membranes. I. The proportionality of heat and volume changes in the lipid melting transition and its implication for the elastic constants, *J. Phys. Chem. B* 105: 7353–7360.

**Enders, A., Nimtz, G.,** 1984, Dielectric relaxation study of dynamic properties of hydrated phospholipid bilayers, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 88: 512–517.

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

**Frank, J., Zouni, A., van Hoek, A., Visser, A.J.W.G., Clarke, R.J.,** 1996, Interaction of the fluorescent probe RH421 with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and with Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase membrane fragments, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes*, 1280: 51-64.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Freifelder, D.**, 1982. In: *Physical Biochemistry*, Chapter 14. W. H. Freeman and Company, New York.

**Garcia, J.J., Reiter, R.J., Ortiz, G.G., Oh, C.S., Tang, L., Yu, B.P., Escames, G.**, 1998, Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation, *The Journal of Membrane Biology*, 162:59-65.

**Gershfeld, N. L.**, 1989a, The critical unilamellar lipid state: a perspective for membrane bilayer assembly, *Biochim. Biophys. Acta* 988: 335–350.

**Gershfeld, N. L.**, 1989b, Spontaneous assembly of a phospholipid bilayer as a critical phenomenon: influence of temperature, composition, and physical state, *J. Phys. Chem.* 93: 5256–5261.

**Gershfeld, N. L., Ginsberg, L.**, 1997, Probing the critical unilamellar state of membranes, *J. Membrane Biol.* 156: 279–286.

**Gershfeld, N. L., Mudd, C. P., Tajima, K., Berger, R. L.**, 1993, Critical temperature for unilamellar vesicle formation in dimyristoylphosphatidylcholine dispersions from specific heat measurements. *Biophys. J.* 65: 1174–1179.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Gliss, C., Randel, O., Casalta, H., Sackmann, E., Zorn, R. and Bayerl, T.,** 1999, Anisotropic Motion of Cholesterol in Oriented DPPC Bilayers Studied by Quasielastic Neutron Scattering: The Liquid-Ordered Phase, *Biophysical Journal*, 77: 331-340.

**Gustafson, I.,** 2003, Phospholipid membranes in biosensor applications Stability, activity and kinetics of reconstituted proteins and glycolipids in supported membranes, Swedish Defence Research Agency Division of NBC Defence, Sweden, 58p.

**Halstenberg, S., Heimburg, T., Hianik, T., Kaatz, U., Krivanek, R.,** 1998, Cholesterol-induced variations in the volume and enthalpy fluctuations of lipid bilayers, *Biophys. J.* 75: 264–271.

**Haris, P. and Severcan, F.,** 1999, FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media, *J. Molecular Catalysis: B (Enzymatic)*, 7:207-221.

**Heimburg, T.,** 1998, Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta* 1415: 147–162.

**Heimburg, T.,** 2000, A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting, *Biophys. J.* 78: 1154–1165.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H.**, 1982, Biophysik., Ein Lehrbuch, Springer Verlag.

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

**Ipsen, J.H., Karlström, G., Mouritsen, O.G., Wennerström, H., Zuckermann, M.J.**, 1987, Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system, *Biochim. Biophys. Acta.*, 905(1):162-72.

**Israelachvili, J.N.**, 1991, Intermolecular & Surface Forces. Academic Press, London, 450p.

**Jackson, M., Mantsch, H.H.**, 1993, Biomembrane structure from FTIR spectroscopy, *Spectrochim. Acta*, 15:53-69.

**Jain, M. K., Wu, N.M.**, 1977, Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer, *J. Membr. Biol.*, 34: 157-201.

**Jin, A. J., Edidin, M., Nossal, R., Gershfeld, N. L.**, 1999, A singular state of membrane lipids at cell growth temperatures, *Biochemistry* 38: 13275–13278.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Jönsson, B., Lindman, B., Holmberg, K., Kronberg, B.**, 1999, Surfactant and Polymers in Aqueous Solution, Jhon Willey& Sons, Chichester, England.

**Jutila, A., Kinnunen, P. K. J.**, 1997, Novel features of the main transition of dimyristoylcholine bilayers revealed by fluorescence spectroscopy, *J. Phys. Chem. B.* 101: 7635–7640.

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

**Kazancı, N., Severcan, F., Zorlu, F.**, 2000, Tamoxifen increases membrane fluidity at high concentrations, *Biosci. Rep.*, 20: 177–184.

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

**Kazancı, N., Severcan, F.**, 2007, Concentration dependent different action of tamoxifen on membrane fluidity, *Bioscience Reports*, 27: 247-255.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Kharakoz, D. P., Shlyapnikova, E. A.**, 2000, Thermodynamics and kinetics of the early steps of solid-state nucleation the fluid bilayer, *J. Phys. Chem. B.* 104: 10368–10378.

**Kocevar, K.** , Study Of Ordering And Forces In Liquid Crystal-Solid Interfaces, 2001, Phd Thesis, University of Ljubljana.

**Korkmaz, F., Severcan, F.**, 2005, Effect of progesterone on DPPC membrane: Evidence for lateral phase separation and inverse action in lipid dynamics , *Arch.ofBiochem.andBiophysics*, 440: 141-147.

**Koshinuma, M.,Tajima, K., Nakamura, A. Gershfeld, N. L.**, 1999, Influence of surface charge and hydrocarbon chain length on the sponge-vesicle transformation of an ionized phospholipid. *Langmuir* 15:3430–3436.

**Lakowicz, J.R.**, 2003, Principle of Fluorescence, Springer-Verlag New York, 954p.

**Langner, M., Hui, S. W.**, 1993, Dithionite penetration through phospholipid bilayers as a measure of defects in lipid molecular packing, *Chem. Phys. Lipids* 65: 23–30.

**Lee, A.G.**, 1975, Lipid phase transitions and phase diagrams. I. Lipid phase transitions, *Biochim. Biophys.Acta*, 472:237-81.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Lehtonen, J. Y. A., Kinnunen, P. K. J.**, 1994, Changes in the lipid dynamics of liposomal membranes induced by poly(ethylene glycol): free volume alterations revealed by inter- and intramolecular excimerforming phospholipid analogs, *Biophys. J.*, 66: 1981–1990.

**Leung, W-Y, et al.**, 1996, Lipophilic Sulfophenylcarbocyanine Dyes: Synthesis of a New Class of Fluorescent Cell Membrane Probes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (6):na 1479-1479

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

**Lichtenberg, D., Menashe, M., Donaldson, S., Biltonen, R. L.**, 1984, Thermodynamic characterization of the pretransition of unilamellar dipalmitoyl-phosphatidylcholine vesicles, *Lipids* 19: 395–400.

**London, E., Brown, D.**, 2000, Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (raft), *Biochim. Biophys. Acta*, 1508: 182-195.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

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

**Louro, S.R.W., Nascimento, O.R., Tabak, M.**, 1994, Charge- and pH-dependent binding sites for dibucaine in ionic micelles: a fluorescence study, *Biochim.Biophys. Acta*, 1190: 319–328.

**Maestroni, G.J.**, 1993, The Immunoneuroendocrine Role of Melatonin, *Journal of Pineal Research*, 14:1-10.

**Mahieu, S., Contini, M. del C., González, M., Millen, N.**, 2009, Melatonin reduces oxidative damage induced by aluminium in rat kidney *Toxicology Letters*, 190:9-15

**Makay, B., Ünsal, E.**, 2009, Altered circadian rhythm: Possible trigger of familial Mediterranean fever attacks, *Medical Hypotheses*, 73:630-631

**Marsh, D.**, 1991. General features of phospholipid phase transitions. *Chem. Phys. Lipids* 57: 109–120.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Mason, P. C., Gaulin, B. D., Epand, R. M., Wignall, G. D., Lin J. S.,** 1999, Small angle neutron scattering and calorimetric studies of large unilamellar vesicles of the phospholipid dipalmitoylphosphatidylcholine, *Phys. Rev. E* 59: 3361–3367.

**McAlpine, S.R. and Garcia-Garibay, M.A.,** 1998, Studies of Naphthyl-Substituted  $\alpha$ -Cyclodextrins. Self-Aggregation and Inclusion of External Guests, *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 4269-4275.

**Melchoir, D.L., Steim, J.M.,** 1976, Thermotropic transitions in biomembranes, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 5:205-38.

**Mellier, A., Diaf, A.,** 1988, Infrared study of phospholipid hydration. Main phase transition of saturated phosphatidylcholine/water multilamellar samples, *Chem. Phys. Lipids* 46: 51–56.

**Mellier, A., Ech-Chahoubi, A., Le Roy, A.,** 1993, Infrared kinetic study of the main phase transition of saturated phosphatidylcholines/water multilamellar systems: determination of the cooperative unit and the activation energies, *J. Chim. Phys.* 90: 51–62.

**Metso, A., Jutila, A., Mattila, J.-P., Holopainen, J. M., Kinnunen, P. K. J.,** 2003, Nature of the main transition of dipalmitoylphosphocholine bilayers inferred from fluorescence spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 107: 1251–1257.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Meyer, H.W., Semmler, K., Quinn, P.J.**, 1997, The effect of sterols on structures formed in the gel/subgel phase state of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers, *Mol. Membr. Biol.*, 14(4):187\_93.

**Mortimer, C. E.**, 1993, Modern Üniversite Kimyası, Cilt I, Çağlayan Kitapevi, İstanbul.

**Mouritsen, O. G.**, 1991, Theoretical models of phospholipid phase transitions, *Chem. Phys. Lipids* 57: 179–194.

**Nagle, J., Tristram-Nagle, S.**, 2000, Structure of lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1469: 159–195.

**Nassar, P.M., de Almeida, L.E., Tabak, M.**, 1998, Binding of dipyrindamole to DPPG and DPPC phospholipid vesicles: Steady-state fluorescence and fluorescence anisotropy decay studies, *Langmuir* 14: 6811–6817.

**Nielsen, M., Miao, L., Ipsen, J.H., Zuckermann, M.J., Mouritsen, O.G.**, 1999, O<sub>2</sub>-lattice model for the phase behavior of lipid-cholesterol bilayers, *Phys. Rev. E. Stat. Phys. Plasmas. Fluids. Relat. Interdiscip. Topics*, 59(5 Pt B):5790\_803.

**Niki, E.**, 2009, Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects, *Free Radical Biology & Medicine*, 47:469-484.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Ohline, S. M., Campbell, M. L., Turnbull, M. T., Kohler, S. J.,** 2001, Differential Scanning Calorimetric Study of Bilayer Membrane Phase Transitions: A Biophysical Chemistry xperiment. *J Chem Ed.* 78(9): 1251-1256.

**Permyakov E.A.,** 1993, Luminescent Spectroscopy of Proteins, CRC Press, Boca Raton, FL.

**Petrosillo, G., Moro, N., Ruggiero, F.M., Paradies, G.,** 2009, Melatonin inhibits cardiolipin peroxidation in mitochondria and prevents the mitochondrial permeability transition and cytochrome *c* release, *Free Radical Biology and Medicine*, 47:969-974

**Phillips, M.C.,** 1972, In Progress in Surface Science,. Academic, New York and London, 139-221p.

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

**Radda, G.K. and Vanderkool, J.M.,** 1972, *Biochim. Biophys. Acta*, 265: 509-549

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Raghunathan, V.A., Katsaras, J.**, 1995, Structure of the Lc' phase in a hydrated lipid multilamellar system, *Phys. Rev. Lett.* 74: 4456–4459.

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

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

**Rooney, E.K. and Lee, A.G.**, 1983, Binding of hydrophobic drugs to lipid bilayers and to the (Ca<sup>2+</sup>++Mg<sup>2+</sup>)- ATPase, *Biochim. Biophys. Acta* 732: 428–440.

**Sahin, I., Severcan, F., Kazancı, N.**, 2007, Melatonin induces opposite effects on order and dynamics of anionic DPPG model membranes *Journal of Molecular Structure*, 834-836:195-201.

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

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

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

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

**Schrader, W., Ebel, H., Grabitz, P., Hanke, E., Heimburg, T., Hoeckel, M., Kahle, M., Wentz, F., Kaatz, U.**, 2002, Compressibility of lipid mixtures studied by calorimetry and ultrasonic velocity measurements, *J. Phys. Chem. B* 106: 6581–6586.

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

**Severcan, F., Sahin, I., Kazanci, N.**, 2005, Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes—evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta*, 1668: 215–222.

**Sheth, D. S., Tajuddin, N. F., Drusea, M. J.**, 2009, Antioxidant neuroprotection against ethanol-induced apoptosis in HN2-5 cells, *Brain Research*, 1285: 14-21.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Shilian, H., Shi, Y., Xiaodong, J., Dabing, H., Gan, S.**, 2009, Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis, *European Journal of Pharmacology*, 616: 287-292.

**Silver, B.L.**, 1985, *The Physical Chemistry of Membranes: An introduction to the structure and dynamics of biological membranes*, Allen & Unwin and The Solomon Press, New York, London.

**Silvius, J. R.**, 2003, Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems, *Biochim. Biophys. Acta*, 1610:174-183.

**Simons, K., Toomre, D.**, 2000, Lipid rafts and signal transduction, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*,1(1):31-9.

**Singer, S.J., Nicolson, G.L.**, 1972, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 175(23):720-31.

**Smondyrev, A.M. and Berkowitz, M.L.**, 2000, Molecular Dynamics Simulation of Dipalmitoylphosphatidylcholine Membrane with Cholesterol Sulfate, *Biophysical Journal*, 78:1672–1680.

**Snyder, R. G., Tu, K., Klein, M. L., Mendelssohn, R., Strauss, H. L., Sun, W.**, 2002, Acyl chain conformation and packing in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers from MD simulation and IR spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 106: 6273–6288.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Söderlund, T., Jutila, A., Kinnunen, P. K. J.**, 1999, Binding of adriamycin to liposomes as a probe for membrane lateral organization, *Biophys. J.* 76: 896–907.

**Stuart, B.**, 1997, *Biological Applications of infrared spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd., England, 187p.

**Stuart, B.**, 2004, In: *Infrared Spectroscopy, Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd.

**Szoka, F., Papahadjopoulos, D.**, 1980, Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles(Liposomes), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9: 467-508.

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

**Tamura, H., Nakamura, Y., Korkmaz, A., Manchester, L.C., Tan, D.X., Sugino, N., Reiter, R.J.**, 2009, Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications, *Fertility and Sterility*, 92:328-343.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Tien, H.T., Ottova-Leitmannova, A.**, 2000, Membrane Biophysics, As Viewed from Experimental Bilayer Lipid Membranes, Amsterdam Elsevier, 640p.

**Toyran, N., Severcan, F.**, 2002, Infrared spectroscopic studies on the dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer interactions with calcium phosphate: effect of vitamin D<sub>2</sub>, *Spectroscopy*, 16:399-408.

**Toyran, N., Severcan, F.**, 2003, Competitive effect of Vitamin D<sub>2</sub> and Ca<sup>2+</sup> on phospholipid model membranes: a FTIR study, *Chemistry and Physics of Lipids*, 123:165-176.

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

**Vist, M.R., Davis, J.H.**, 1990, Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry*, 29(2):451-64.

**Viswanathan, A.N., Schernhammer, E.S.**, Circulating melatonin and the risk of breast and endometrial cancer in women, *Cancer Letters*, 281:1-7

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Vries, A. H. de, Yefimov S., Mark A. E., Marrink S. J.**, 2005, Molecular structure of the lecithin ripple phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 5392–5396.

**Watanabe, A., Noguchi, N., Fujisawa, A., Kodama, T., Tamura, K., Cynshi, O., Niki, E.**, 2000, Stability and reactivity of aryloxy radicals derived from a novel antioxidant BO-653 and related compounds. Effects of substituents and side chain in solution, and in membranes, *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 5438–5442.

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

**Yeagle, P.L.**, 2004, *The Structure of Biological Membranes*, 2<sup>nd</sup> edition, Florida, USA.

**Yonezawa, Y., Yamaguchi A., Kometani N.**, 2005, Exciton delocalization of the J-aggregate of oxacyanine dye and thiacyanine dye in LB films, *Phys. Stat. Sol. (b)*, 242: 803-806.

**Yushmanov, V.E., Perussi J.R., Imasato H., Ruggiero A.C., Tabak M.**, 1994, Ionization and binding equilibria of papaverine in ionic micelles studied by  $^1\text{H}$ -NMR and optical-absorption spectroscopy, *Biophys. Chem.*, 52: 157–163.

**KAYNAKLAR (DEVAM)**

**Zavodnik, I.B., Domanski, A.V., Lapshina, E.A., Bryszewska, M and Reiter, R.J.**, 2006, Melatonin directly scavenges free radicals generated in red blood cells and a cell-free system: Chemiluminescence measurements and theoretical calculations, *Life Sciences* 79: 391–400.

**Zhang, Y-P, Lewis, R.N.A.H, McElhaney, R.N.**, 1997, Studies of binary mixtures of dimyristoyl phosphatidylcholine and dimyristoyl phosphatidylglycerol: Evidence for the formation of molecular complexes in mixed PC:PG bilayers, *Biophys. J.*, 72: 779–793.

**Zhang, J.Z. , Wang, Z., Liu, J., Chen, S., Liu, G., Lockwood D.J.** (Series Eds.), 2002, *Self-Assembled Nanostructures*, Kluwer Academic Publishers, U.S.A.

## ÖZGEÇMİŞ

İpek Şahin T.C. vatandaşı olup, 27.04.1975 İzmir doğumludur. İlk, orta ve lise tahsilini Isparta'da tamamladı. 1998 yılında İstanbul Üniversitesi Fizik Bölümü'nden mezun oldu. Halen Ege Üniversitesi Fizik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak öğrenimine devam etmektedir.