

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

**SPEKTROFLORİMETRİK METOTLA İNSAN SERUM ALBUMİN PROTEİNİ
İLE NEOHESPERİDİN DİHİDROKALKON VE MAPROTİLİN
HİDROKLORÜR ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLERİN İNCELENMESİ**

Bahar KANCI BOZOĞLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

2012

**SPEKTROFLORİMETRİK METOTLA İNSAN SERUM ALBUMİN PROTEİNİ
İLE NEOHESPERİDİN DİHİDROKALKON VE MAPROTİLİN
HİDROKLORÜR ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLERİN İNCELENMESİ**

Bahar KANCI BOZOĞLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

**Yüksek Lisans Tez çalışması 2011.02.0121.017 nolu proje ile Akdeniz Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2012

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPEKTROFLORİMETRİK METOTLA İNSAN SERUM ALBUMİN PROTEİNİ
İLE NEOHESPERİDİN DİHİDROKALKON VE MAPROTİLİN
HİDROKLORÜR ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLERİN İNCELENMESİ

Bahar KANCI BOZOĞLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez ~~27/07~~2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (100) not takdir edilerek
Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Sibel TUNÇ (Danışman)

Prof. Dr. Erol AYRANCI

Doç. Dr. Meltem ASİLTÜRK


.....

.....

.....

ÖZET

SPEKTROFLORİMETRİK METOTLA İNSAN SERUM ALBUMİN PROTEİNİ İLE NEOHESPERİDİN DİHİDROKALKON VE MAPROTİLİN HİDROKLORÜR ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLERİN İNCELENMESİ

Bahar KANCI BOZOĞLAN

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sibel TUNÇ

Haziran 2012, 81 Sayfa

Bu çalışmada, kan plazmasında en fazla miktarda bulunan protein olan insan serum albumin proteini (HSA) ile neohesperidin dihidrokalkon (NHD) antioksidan maddesi ve maprotilin hidroklorür (MHC) ilaç maddesi arasındaki etkileşimler floresans ve dairesel dikroizm spektroskopisi ile incelenmiştir. Floresans ölçümleri, dört farklı sıcaklıkta (15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C’de) ve fizyolojik pH değeri olan pH 7,4’te gerçekleştirilmiştir. Floresans ölçümlerinden, HSA ile MHC arasında değil, HSA ile NHD arasında bir etkileşim var olduğu bulunmuştur. NHD’nin HSA proteinine bağlanması prosesi için Stern-Volmer sönmüleme sabiti, sönmüleme hız sabiti, bağlanma sabiti, bağlanma yeri sayısı ve termodinamik parametre (ΔH , ΔS ve ΔG) değerleri hesaplanmıştır.

HSA-NHD sisteminin sönmüleme mekanizmasında statik sönmüleme etkindir. HSA-NHD sisteminin bağlanma sabitlerinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C’de sırası ile $4,01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $2,79 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $2,11 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve $1,16 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olduğu bulunmuştur. Sıcaklıktaki bir artış bağlanma sabiti değerinde bir azalmaya yol açmıştır. Ayrıca, HSA proteini üzerinde bir adet NHD bağlanma yeri vardır. Bağlanma prosesi kendiliğinden gerçekleşmiştir ve ekzotermiktir. Termodinamik parametre değerleri, HSA ve NHD molekülleri arasındaki esas etkileşim kuvvetlerinin hidrojen bağı oluşumu ve van der Waals kuvvetleri olduğunu göstermiştir. Ayrıca; NHD’nin HSA’ya bağlanması, proteinin sekonder yapısında bir değişikliğe neden olmuştur. Dairesel dikroizm analizi,

HSA proteinindeki α -heliks miktarının artan NHD konsantrasyonuyla azaldığını belirtmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: İnsan serum albumin, neohesperidin dihidrokalkon, maprotilin hidroklorür, floresans spektroskopisi, dairesel dikroizm spektroskopisi

JÜRİ: Doç. Dr. Sibel TUNÇ

Prof. Dr. Erol AYRANCI

Doç. Dr. Meltem ASİLTÜRK

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE INTERACTIONS OF NEOHESPERIDIN DIHYDROCHALCONE AND MAPROTILINE HYDROCHLORIDE WITH HUMAN SERUM ALBUMIN PROTEIN BY SPECTROFLUORIMETRIC METHOD

Bahar KANCI BOZOĞLAN

M.Sc. Thesis in Chemistry

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Sibel TUNÇ

June 2012, 81 Pages

In this study, the interactions of neohesperidin dihydrochalcone (NHD) antioxidant substance and maprotilin hydrochloride (MHC) drug substance with human serum albumin (HSA) protein, the most abundant protein in blood plasma, were investigated by fluorescence and circular dichroism spectroscopy. Fluorescence measurements were carried out at four different temperatures (15 °C, 25 °C, 37 °C and 45 °C) and at physiological pH value of 7.4. It was found from fluorescence measurements that there was an interaction between HSA and NHD, on the contrary to HSA-MHC system. Stern-Volmer quenching constant, quenching rate constant, binding constant, number of binding site and thermodynamic parameter (ΔH , ΔS and ΔG) values were calculated for the binding process of NHD to HSA protein.

Static quenching was effective for the quenching mechanism of HSA-NHD system. Binding constants of HSA-NHD system were found to be $4.01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $2.79 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $2.11 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $1.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ at 15 °C, 25 °C, 37 °C and 45 °C, respectively. This result indicated that an increase in the temperature led to a decrease in the binding constant value. Furthermore, there was one NHD binding site on HSA protein. Binding process occurred spontaneously and was exothermic. Thermodynamic parameter values showed that the main interaction forces between HSA and NHD

molecules were the formation of hydrogen bonding and van der Waals forces. In addition, the binding of NHD to HSA caused a change in the secondary structure of protein. Circular dichroism analysis indicated that the amount of α -helix in HSA protein decreased with increasing NHD concentration.

KEY WORDS: Human serum albumin, neohesperidin dihydrochalcone, maprotiline hydrochloride, fluorescence spectroscopy, circular dichroism spectroscopy

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Sibel TUNÇ

Prof. Dr. Erol AYRANCI

Assoc. Prof. Dr. Meltem ASİLTÜRK

ÖNSÖZ

İlaçlar ile insan serum albumin proteini arasında gerçekleşen etkileşimlerin araştırılması ilaçların farmakolojik ve farmakodinamik özellikleri bakımından önemlidir. Ayrıca, bu çalışmalar yeni ilaçların araştırılması ve tasarımı konularında çok değerli bilgiler elde edilmesini sağlamaktadır. İlaçların dağılımı, kandaki serbest ilaç konsantrasyonu ve ilaçların eliminasyon hızı, ilaçların HSA proteinine bağlanmaları sonucunda etkileşimin kuvvetine bağlı olarak değişmektedir. Antioksidan maddeler ile insan serum albumin proteini arasında meydana gelen etkileşimler ise antioksidan özellikli maddelerin taşınmasında, biyolojik aktivitesinde ve antioksidan özelliklerinde değişikliklere sebep olabilmektedir. Bu etkileşimler, proteinlerin fizyolojik ve kimyasal özellikleri ile sekonder yapılarında değişikliklere yol açabilmektedir.

Bu tez çalışması, insan serum albumin proteini ile antioksidan özelliğe sahip bir gıda katkı maddesi olan neohesperidin dihidrokalkon ve depresyon önleyici bir ilaç olarak kullanılan maprotilin hidroklorür arasında meydana gelen etkileşimlerin araştırılmasını kapsamaktadır. Tez çalışması, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne "Spektroflorimetrik metotla insan serum albumin proteini ile neohesperidin dihidrokalkon ve maprotilin hidroklorür arasındaki etkileşimlerin incelenmesi" başlığı ile sunulmuş ve aynı birim tarafından 2011.02.0121.017 nolu proje ile desteklenmiştir.

Tez çalışmamın tüm aşamalarında yakın ilgi gösteren ve desteği ile beni yönlendiren, bilgisi, deneyimleri ve hoşgörüsü ile yardımlarını esirgemeyen sevgili danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sibel TUNÇ'a (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi), bilgisi, tecrübesi, sonsuz sabrı ve yardımlarıyla tez çalışmama büyük katkıları olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Osman DUMAN'a (Akdeniz Üniversitesi Eğitim Fakültesi), UV/VIS/NIR spektrofotometre cihazının kullanımına izin veren Sayın Prof. Dr. Ertuğrul ARPAÇ'a (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi), bölümümüzün değerli öğretim üyelerine, sonsuz destekleri ile her zaman yanımda olan anneme, babama ve eşime ve 2011.02.0121.017 nolu proje ile bu çalışmaya destek veren Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ	1
1.1. Amino Asitler	1
1.1.1. Amino asitlerin genel yapıları ve sınıflandırılmaları	2
1.1.2. Amino asitlerin özellikleri ve fonksiyonları	6
1.2. Proteinler	7
1.2.1. Proteinlerin genel özellikleri ve fonksiyonları	7
1.2.2. Proteinlerin sınıflandırılması	10
1.2.3. İnsan serum albumin (HSA) proteini	11
1.2.3.1. HSA proteininin yapısı	11
1.2.3.2. HSA proteininin özellikleri ve fonksiyonları	12
1.2.3.3. HSA proteini üzerindeki bağlanma yerleri	13
1.3. Antioksidanlar	14
1.4. İlaçlar	15
1.5. İlaçlar ve Antioksidan Maddeler ile Proteinler Arasındaki Etkileşimlerin Önemi	17
1.6. Neohesperidin Dihidrokalton ve Maprotilin Hidroklorür	18
1.6.1. Neohesperidin dihidrokalton (NHD)	18
1.6.2. Maprotilin hidroklorür (MHC)	19
1.7. Floresans Spektroskopisi	20
1.8. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi	24
1.9. Çalışmanın Amacı	26
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI	27

2.1. Antioksidan Maddeler ve İlaçlar ile Serum Albumin Proteini Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi Konusunda Literatürde Yapılan Çalışmalar	27
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1. Materyal	31
3.2. Metot	32
3.2.1. Protein, ligant ve protein-ligant karışım çözeltilerinin hazırlanması	32
3.2.2. HSA ile NHD ve HSA ile MHC arasında gerçekleşen etkileşimlerin incelenmesi	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	38
4.1. HSA – NHD ve HSA – MHC Sistemlerindeki Etkileşimlerin Floresans Spektroskopisi ile İncelenmesi	38
4.2. HSA-NHD Sistemi İçin Bağlanma Sabiti Değerleri ve Bağlanma Yeri Sayısı	59
4.3. HSA-NHD Sistemine Ait Termodinamik Parametreler ve Bağlanma Kuvvetleri	63
4.4. HSA ile NHD Arasındaki Etkileşimin Senkronize Floresans Spektroskopisi ile İncelenmesi	65
4.5. HSA ile NHD Arasındaki Etkileşimin Dairesel Dikroizm Spektroskopisi ile İncelenmesi	68
5. SONUÇ	71
6. KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

$\Delta\lambda$	Emisyon ve uyarılma dalga boyları arasında fark
Å	Angström
A_{em}	Emisyon dalga boyunda maddenin sahip olduğu absorbands değeri
A_{uy}	Uyarılma dalga boyunda maddenin sahip olduğu absorbands değeri
F	Protein çözeltisinin ligant varlığındaki floresans şiddeti
F_0	Protein çözeltisinin ligant yokluğundaki floresans şiddeti
h	Plank sabiti
K	Kelvin cinsinden sıcaklık birimi
K_a	Bağlanma sabiti
kg	Kilogram
kj	Kilojoule
k_q	Sönümlleme hız sabiti
K_{SV}	Stern – Volmer sönümlleme sabiti
L	Litre
M	Molarite
mdeg	Miliderece
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece cinsinden sıcaklık birimi
R	İdeal gaz sabiti
r	Regresyon katsayısı
T	Santigrat derece cinsinden sıcaklık
ν	Frekans
ΔG	Gibbs serbest enerji değışimi
ΔH	Entalpi değışimi
ΔS	Entropi değışimi
λ	Dalga boyu
τ_0	Ligant yokluğunda proteinin floresans yarı ömür süresi

Kısaltmalar

BSA	Sığır serum albumin
BSP	Bromsülfalein
CD	Dairesel dikroizm
CNPB	(5-kloro-2-nitro-N-(4-(6-okso-1,4,5,6-tetrahidropiridazin-3-il)fenil)benzamid
CPNT	N-(p-klorofenil)-N-(1-naftil) tiyoüre
DEX	Dekzamethazon
FA	Yağ asiti
FTIR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HSA	İnsan serum albumin
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MHC	Maprotilin hidroklorür
NHD	Neohesperidin dihidrokalkon
NIR	Yakın infrared
NMR	Nükleer magnetik rezonans
Phy	Fenilalanin
QUC	Kuinklorak
TAB	Tabersonin
Trp	Triptofan amino asiti
Tyr	Tirozin amino asiti
UV-VIS	Ultraviyole-görünür

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. α -Amino asitin genel yapısı	2
Şekil 1.2. İki amino asit arasında gerçekleşen kondenzasyon reaksiyonu ile peptit bağı oluşumu	2
Şekil 1.3. Gliseraldehitin ve genel bir amino asitin D- ve L- stereoizomerleri	3
Şekil 1.4. Proteinlerde bulunan 20 amino asitin gruplarına göre ayrılmış yapısı (Renkli kısımlar amino asitin R grubunu göstermektedir)	4
Şekil 1.5. Tamamen protonlanmış bir amino asitten protonların ayrılması	7
Şekil 1.6. Proteinlerin primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapıları	8
Şekil 1.7. HSA proteinindeki yağ asitlerinin bağlanma bölgeleri (FA: Yağ asiti)	14
Şekil 1.8. Neohesperidin dihidrokalkonun kimyasal yapısı	19
Şekil 1.9. Maprotilin hidroklorürün kimyasal yapısı	19
Şekil 1.10. Molekülün spin halleri	21
Şekil 1.11. Bir molekülün floresans ve fosforesans ışımalarını gösteren enerji diyagramı	22
Şekil 1.12. Fenilalanin, tirozin ve triptofanın piklerini gösteren CD spektrumu	25
Şekil 4.1. 15 °C’de farklı konsantrasyonlardaki NHD maddesinin absorpsiyon spektrumları. [NHD] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M	39
Şekil 4.2. 25 °C’de farklı konsantrasyonlardaki NHD maddesinin absorpsiyon spektrumları. [NHD] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M	39
Şekil 4.3. 37 °C’de farklı konsantrasyonlardaki NHD maddesinin absorpsiyon spektrumları. [NHD] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M	40

- Şekil 4.4. 45 °C’de farklı konsantrasyonlardaki NHD maddesinin absorpsiyon spektrumları. [NHD] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M 40
- Şekil 4.5. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [NHD] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M 41
- Şekil 4.6. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [NHD] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M 41
- Şekil 4.7. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [NHD] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M 42
- Şekil 4.8. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [NHD] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M 42
- Şekil 4.9. 15 °C’de farklı konsantrasyonlardaki MHC maddesinin absorpsiyon spektrumları. [MHC] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M 43
- Şekil 4.10. 25 °C’de farklı konsantrasyonlardaki MHC maddesinin absorpsiyon spektrumları. [MHC] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M 43

- Şekil 4.11. 37 °C’de farklı konsantrasyonlardaki MHC maddesinin absorpsiyon spektrumları. [MHC] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M44
- Şekil 4.12. 45 °C’de farklı konsantrasyonlardaki MHC maddesinin absorpsiyon spektrumları. [MHC] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M44
- Şekil 4.13. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [MHC] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M45
- Şekil 4.14. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [MHC] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M45
- Şekil 4.15. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [MHC] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M46
- Şekil 4.16. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [MHC] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M46
- Şekil 4.17. $3,0 \times 10^{-6}$ M saf HSA çözeltisinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C’deki emisyon spektrumları47

Şekil 4.25. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. Çözeltideki $[MHC] =$ (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M	54
Şekil 4.26. 15 °C’de HSA-NHD sistemi için Stern-Volmer grafiği	55
Şekil 4.27. 25 °C’de HSA-NHD sistemi için Stern-Volmer grafiği	56
Şekil 4.28. 37 °C’de HSA-NHD sistemi için Stern-Volmer grafiği	56
Şekil 4.29. 45 °C’de HSA-NHD sistemi için Stern-Volmer grafiği	57
Şekil 4.30. 15 °C’de HSA-NHD sistemi için $\log (F_0-F)/F'$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği	59
Şekil 4.31. 25 °C’de HSA-NHD sistemi için $\log (F_0-F)/F'$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği	60
Şekil 4.32. 37 °C’de HSA-NHD sistemi için $\log (F_0-F)/F'$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği	60
Şekil 4.33. 45 °C’de HSA-NHD sistemi için $\log (F_0-F)/F'$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği	61
Şekil 4.34. NHD’nin HSA’ya bağlanmasına ait van’t Hoff grafiği	64
Şekil 4.35. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin senkronize floresans spektrumu. $\Delta\lambda = 15$ nm. Çözeltideki $[NHD] =$ (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M	66
Şekil 4.36. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin senkronize floresans spektrumu. $\Delta\lambda = 60$ nm. Çözeltideki $[NHD] =$ (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M	67
Şekil 4.37. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin dairesel dikroizm spektrumları. Çözeltideki $[NHD] =$ (a) 0 M, (b) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $18,0 \times 10^{-6}$ M ve (ç) $30,0 \times 10^{-6}$ M	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada protein ve ligant olarak kullanılan maddelerin isimleri, kısaltmaları ve molekül kütleleri	31
Çizelge 4.1. Fizyolojik pH'ta ve farklı sıcaklıklarda NHD'nin HSA ile etkileşimine ilişkin K_{SV} , r ve k_q değerleri	57
Çizelge 4.2. Fizyolojik pH'ta ve farklı sıcaklıklarda NHD'nin HSA'ya bağlanmasına ait K_a , n ve r değerleri	61
Çizelge 4.3. Fizyolojik pH'ta NHD'nin HSA'ya bağlanmasına ilişkin prosese ait termodinamik parametre değerleri	64

1. GİRİŞ

Kan plazmasında en çok bulunan protein insan serum albumin proteinidir (Carter ve Ho 1994, Bordbar ve Kafrani 2007) ve bu proteinin vücut içerisinde birçok önemli görevi vardır. Albumin proteini, kan içerisinde birçok organik molekülün, amino asitin, yağ asitinin, hormonun, iyonun ve çeşitli ilaçların taşınmasında ve dağıtılmasında rol oynar (Liu vd 2004, Cui vd 2006, 2009a). İnsan serum albumin proteini, ilaçlar da dahil olmak üzere birçok madde ile etkileşime girebilmektedir. Klinik ve farmakolojik öneminden dolayı sentetik veya doğal ilaçlar ile insan serum albumin proteini arasında gerçekleşen etkileşimlerin bağlanma sabitinin ve bağlanma yeri sayısının araştırılması oldukça önemlidir (Ding vd 2009, Naik vd 2010). Bu araştırmalar, hassas ve kolay uygulanabilir bir teknik olan floresans spektroskopisi ve proteinin yapısındaki değişikliklerin anlaşılmasını sağlayan dairesel dikroizm spektroskopisi yöntemi ile gerçekleştirilebilmektedir (Kelly vd 2005, Cui vd 2006, 2009a).

1.1. Amino Asitler

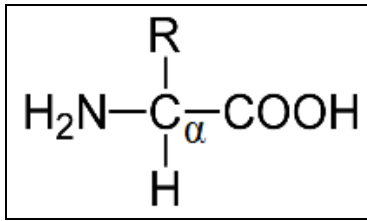
Proteinler, hücrelerin tüm kısımlarında en çok bulunan biyolojik makromoleküllerdir. Tek bir hücre içerisinde binlerce çeşitlilikte, küçük peptitlerden büyük polimerlere kadar uzanan farklı boylarda ve farklı molekül ağırlıklarında proteinler bulunabilir (Nelson ve Cox 2005). Karakteristik üç boyutlu şekillere, yüksek çeşitliliğe ve farklı biyolojik fonksiyonlara sahip olan proteinlerin temel yapı taşı birbirlerine kovalent bağlar ile bağlanmış olan amino asitlerdir (Voet vd 1998).

Proteinler, birçok metot ile kendisini oluşturan amino asitlere parçalanabilir. Proteinlerin içerisinde yirmi farklı amino asit bulunur. 1806 yılında ilk keşfedilen amino asit asparajindir. En son bulunan amino asit olan treonin ise 1938 yılına kadar tam olarak tanımlanamamıştır. Tüm amino asitlerin bir ismi vardır. Amino asitler bazı durumlarda isimlerini izole edildiği kaynaktan alırlar. Asparajin amino asiti ilk olarak kuşkonmaz bitkisi (Yunanca asparagus) içerisinde bulunmuştur. Glutamat amino asiti adını buğday gluteninden, tirozin amino asiti adını peynirden (Yunanca tyros) ve glisin

amino asiti de adını şekerli tadından (Yunanca glykos) almaktadır (Nelson ve Cox 2005).

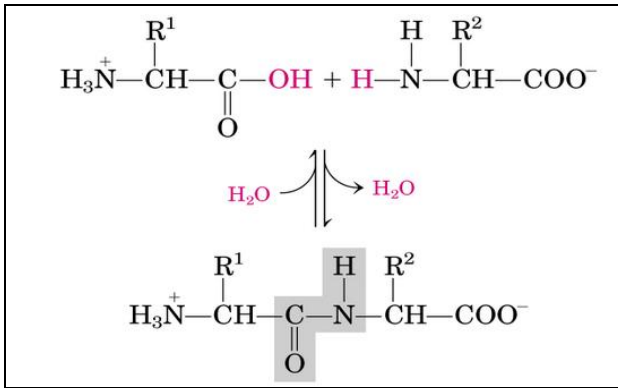
1.1.1. Amino asitlerin genel yapıları ve sınıflandırılmaları

Bilinen yirmi amino asitin tamamı α -amino asittir. Tüm amino asitler, karbon atomuna bağlanmış bir karboksil ve bir amino grubu içerir. Bir α -amino asitin genel yapısı Şekil 1.1’de gösterilmektedir (Nelson ve Cox 2005).



Şekil 1.1. α -Amino asitin genel yapısı

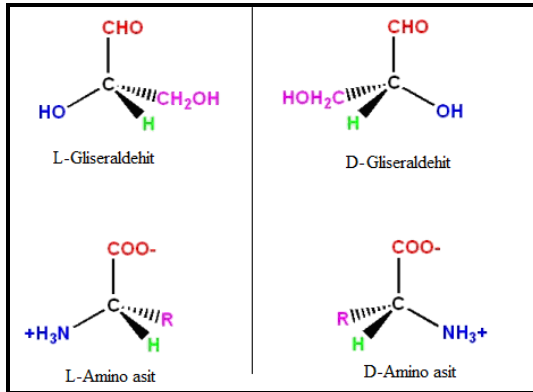
Amino asitler bir zincir oluşturmak üzere polimerleştirilebilir. Bu işlem kondenzasyon reaksiyonu ile gerçekleştirilir. Gerçekleşen reaksiyon Şekil 1.2’de gösterilmektedir. Reaksiyon sonucunda iki amino asit molekülünden bir adet H_2O molekülü uzaklaşır ve karbonil grubu ile amin grubu arasında bir peptit bağı oluşur. İki amino asitin birleşmesiyle oluşan yapıya dipeptit, üç amino asitin birleşmesiyle oluşan yapıya tripeptit, birkaç amino asitin birleşmesiyle oluşan yapıya oligopeptit ve çok fazla sayıda amino asitin birleşmesiyle oluşan yapıya ise polipeptit ismi verilir (Nelson ve Cox 2005).



Şekil 1.2. İki amino asit arasında gerçekleşen kondenzasyon reaksiyonu ile peptit bağı oluşumu

Amino asitler birbirlerinden R ile gösterilen yan zincirin farklılığı ile ayrılırlar. R grubu yapı, uzunluk ve elektrik yükü bakımından farklılıklar gösterebilir. Tüm bu farklılıklar amino asitlerin sudaki çözünürlüklerini etkiler (Voet vd 1998).

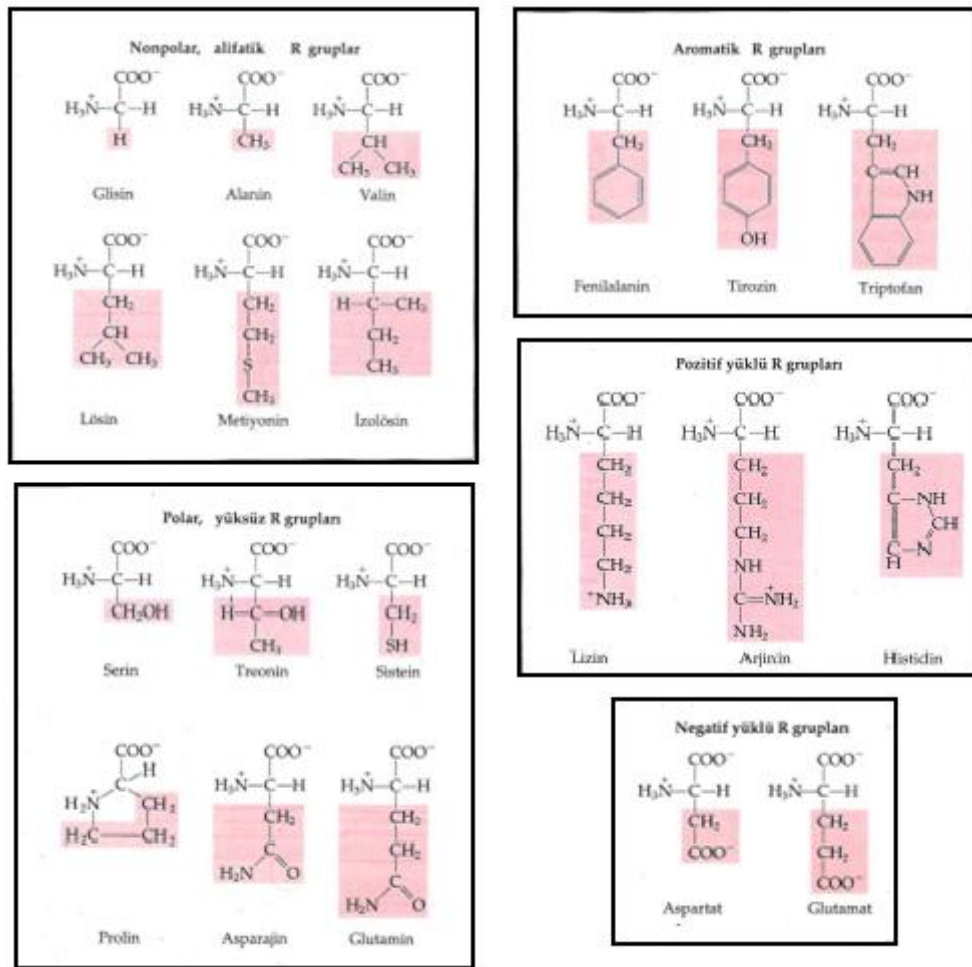
Amino asitlerde α -karbonundan sonra gelen R grubundaki diğer karbonlar sırası ile β , γ , δ , ϵ şeklinde isim almaya devam ederler. Glisin amino asitinde R grubu olarak tek hidrojen atomu bulunmaktadır. Glisin dışındaki tüm amino asitlerin α -karbonları dört farklı gruba bağlanmıştır. Bu asimetric α -karbon atomu kiral merkezdır. α -Karbonuna bağlı bu dört farklı grup tetrahedral yapı oluşturur ve uzay düzleminde iki farklı şekilde bulunur. Dolayısıyla, iki farklı stereoizomeri vardır. Bu iki stereoizomer birbirlerinin üst üste çakışmayan ayna görüntüleridir. Bu durumdaki stereoizomere enantiyomer denilmektedir (Nelson ve Cox 2005). Kiral merkeze sahip tüm moleküller optikçe aktiftir ve düzlem polarize ışığı çevirirler. Glisin dışındaki tüm amino asitler optikçe aktiftir (Voet vd 1998, Nelson ve Cox 2005). Asimetric karbona bağlı dört grubun uzay düzlemindeki dizilişleri için bir isimlendirme geliştirilmiştir. Basit şekerlerin ve amino asitlerin isimlendirilmesinde konfigürasyonlarına bağlı olarak D- ve L- harfleri kullanılmaktadır. Emil Fischer tarafından 1891'de geliştirilen bu isimlendirme yönteminde molekülün asimetric merkezi etrafındaki grupların diziliş, gliseraldehitin asimetric merkezine bağlı grupların diziliş ile karşılaştırılır. Gliseraldehitin stereoizomerleri D-gliseraldehit ve L-gliseraldehittir. Şekil 1.3'te görüldüğü gibi, amino asitteki α -karbona bağlı amino, karboksil, R ve H gruplarına, gliseraldehitte sırası ile hidroksil, aldehit, CH_2OH ve H grupları karşılık gelmektedir (Araki ve Ozeki 1992, Voet vd 1998, Nelson ve Cox 2005).



Şekil 1.3. Gliseraldehitin ve genel bir amino asitin D- ve L- stereoizomerleri

Proteinden elde edilen tüm amino asitler L- konfigürasyonu gösterir. Ayrıca, tüm amino asitlerde α -karbonuna bağlı gruplar aynı konfigürasyona sahiptir (Voet vd 1998).

Protein biyokimyasının anlaşılabilmesi için yaygın amino asitlerin kimyasal özelliklerinin bilinmesi çok önemlidir. Amino asitler α -karbonlarına bağlı olan R gruplarının özelliklerine göre beş sınıfa ayrılabilir. Bu amino asit sınıfları Şekil 1.4'te gösterilmektedir. R gruplarının doğasında apolar ve hidrofobik yapıdan polar ve hidrofilik yapıya kadar çeşitlilik mevcuttur (Voet vd 1998, Nelson ve Cox 2005).



Şekil 1.4. Proteinlerde bulunan 20 amino asitin gruplarına göre ayrılmış yapısı (Renkli kısımlar amino asitin R grubunu göstermektedir)

Apolar ve alifatik R grupları olan amino asitlere alanin, valin, lösin ve izölösin örnek verilebilir. Bu amino asitler, kümeleşme eğilimi gösterir ve hidrofobik etkileşim ile proteinin yapısını kararlı hale getirirler. Glisin, en basit yapıya sahip olan amino

asittir. Glisin amino asiti polar olmamasına rağmen, hidrofobik yapıya çok fazla katkıda bulunmaz. Metiyonin, sülfür içeren iki amino asitten birisidir ve metiyoninin yan zincirinde apolar tiyoeter grubu bulunur. Prolin, siklik yapıda alifatik yan zincire sahiptir. Polipeptitlerin prolin içeren kısımlarının esnekliği düşüktür. Bu durumun sebebi, prolinin yapısındaki sekonder amino grubunun konformasyonu sabit tutmasıdır (Nelson ve Cox 2005).

Aromatik R gruplarına sahip olan amino asitler fenilalanin, tirozin ve triptofandır. Bu amino asitlerdeki R grupları apolardır ve hidrofobik etkileşime katılırlar. Tirozinin hidroksil grubu hidrojen bağı yapar ve bu bağ bazı enzimler için önemli bir fonksiyonel grup oluşturur. Tirozin, yapısındaki hidroksil grubundan dolayı; triptofan ise yapısındaki indol halkasında bulunan azot atomundan dolayı fenilalanine göre daha polar yapıya sahiptir. Tirozin, triptofan ve fenilalanin amino asitleri UV ışığını absorplamaktadırlar. 280 nm'de birçok protein karakteristik olarak güçlü absorbans göstermektedir (Nelson ve Cox 2005).

Polar ve yüksüz R grubuna sahip olan amino asitler suda kolaylıkla çözünürler. Bu amino asitler, su ile hidrojen bağı yapan fonksiyonel gruplara sahip oldukları için apolar amino asitlere göre daha fazla hidrofilitirler (Nelson ve Cox 2005). Bu gruba ait amino asitler; serin, treonin, sistein, asparajin ve glutamindir. Serin ve treoninin polarlığı sahip oldukları hidroksil grubundan, sisteininki sülfidril grubundan, asparajin ve glutamininki ise amit gruplarından kaynaklanmaktadır (Voet vd 1998).

Pozitif yüklü (bazik) R grubu olan amino asitler lizin, arjinin ve histidindir. Bu amino asitler pH 7,0'da pozitif yüklü R grubuna sahiptir. Lizin amino asiti, alifatik zincirin ϵ pozisyonunda pozitif yüklü ikinci bir primer amin grubu taşır. Arjinin amino asiti pozitif yüklü guanidin grubuna sahiptir. Histidin ise imidazol halkası içerir ve enzim katalizli reaksiyonlarda proton alıcısı ve vericisi olarak görev yapmaktadır (Nelson ve Cox 2005).

Negatif yüklü (asidik) R grubuna sahip olan amino asitler aspartat ve glutamattır. Bu amino asitler pH 7,0'da negatif yüklü ikinci bir karboksil grubuna sahiptir (Nelson ve Cox 2005).

1.1.2. Amino asitlerin özellikleri ve fonksiyonları

Glisin ve alanin gibi az sayıda karbon atomuna sahip amino asitler de dahil olmak üzere tüm amino asitler oda sıcaklığında katı halde bulunurlar. Amino asitlerin kaynama noktaları 200 ile 300 °C arasında değişmektedir (Araki ve Ozeki 1992).

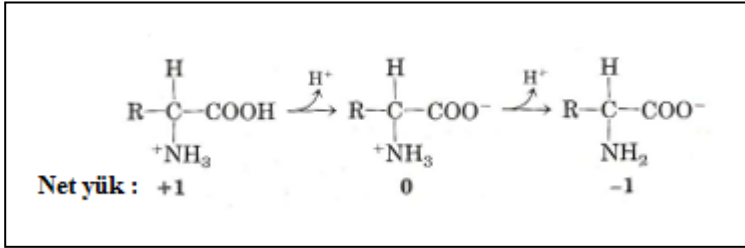
Amino asitlerin çeşitli kristal şekilleri vardır. 23 amino asitin X-ışını ile kristalografik analizi yapılmıştır. Glisin monoklinik prizma yapısında iken, L-alanin ortorombik yapıdadır (Hirayama vd 1980, Araki ve Ozeki 1992). L-glutamik asit, α ve β olmak üzere iki farklı polimorfik durumda bulunabilmektedir ve bu amino asitin α formu endüstriyel proseslerde çok kullanılmaktadır (Araki ve Ozeki 1992).

Tüm amino asit moleküllerinde α -karbon atomuna bağlı amino ve karboksil gruplarından kaynaklanan, zıt işaretle ve eşit büyüklükte iki yük bulunmaktadır. Amino asit çözeltilerinin dielektrik sabitleri çok yüksektir. Amino asitlerin iyonik dipolar yapıları raman ve IR gibi titreşim spektrumlarıyla ve özgül hacim ve özgül ısı gibi karakteristik özelliklerin ölçülmesiyle anlaşılabilir (Greenstein ve Wintz 1961, Araki ve Ozeki 1992)

Glisin dışındaki tüm amino asitler çözüne ve iyonlaşma derecesine bağlı olarak ışığı sağa (+) veya sola (-) çevirme yeteneğine göre karakterize edilen en az bir tane asimetric karbon atomuna sahiptir. Amino asitler ayrıca gliseraldehitin konfigürasyonu temeline dayanarak asimetric karbonun stereokimyasal özellikleri ile de ayırt edilir. D- ve L- gösterimi amino asitler için yaygın olarak kullanılır, ancak R- ve S- gösterimi kirallığın belirlenmesinde daha kesindir (Araki ve Ozeki 1992).

Bir amino asit suda çözüldüğü zaman dipolar veya zwitter iyon şeklinde bulunur. Bir zwitter iyon, asit (proton verici) veya baz (proton alıcı) olarak davranabilir. Bu

şekilde davranabilen maddelere amfoterik madde denir. Basit bir monoamino monokarboksilik α -amino asitin hem karboksilik asit grubu hem de amino grubu protonlandığında diprotik asit haline gelir (bkz. Şekil 1.5) (Nelson ve Cox 2005).



Şekil 1.5. Tamamen protonlanmış bir amino asitten protonların ayrılması

1.2. Proteinler

Proteinler hücrelerin temel yapı bileşenleridir. Ayrıca, biyolojik proseslerin gerçekleştiği merkezlerdir. Proteinleri meydana getiren polipeptit zincirlerini oluşturmak için yirmi farklı amino asit bir araya gelebilir. Dolayısıyla, çok sayıda protein molekülü elde etmek mümkündür (Voet vd 1998).

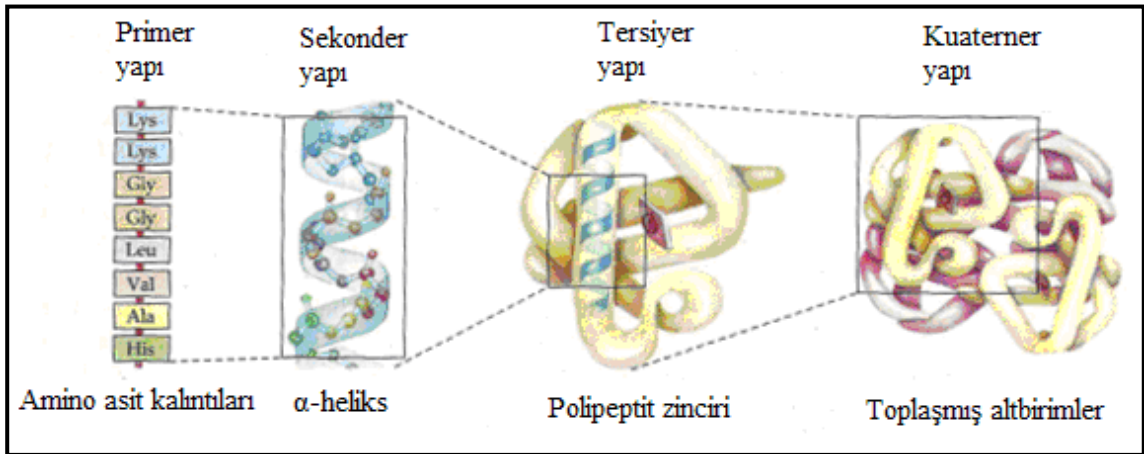
1.2.1. Proteinlerin genel özellikleri ve fonksiyonları

Protein molekülündeki amino asit zincirlerinin farklı kombinasyonları o proteine özgü yapısal özellikler ve fonksiyonlar kazandırır. Proteinlerin büyüklük, net elektrik yükü ve çözünürlük gibi özellikleri protein saflaştırma yöntemleri ile ortaya çıkarılabilmektedir. Proteinler, santrifüj ile yoğunluklarına ve şekillerine göre ayrılabilir. Proteinin kütlesi gibi net yükü de elektroforez ile anlaşılabilir. Kromatografik yöntem ile proteinlerin ayrılması, gözenekli materyal ile doldurulmuş kolondan proteinin geçirilmesi ile sağlanır. Protein karışımları boyutlarına göre ayrılmak istenirse boyut eleme kromatografisi, yüklerine göre ayrılmak istenirse iyon değiştirme kromatografisi veya adsorpsiyon kromatografisi tercih edilir (Scopes 1987, Nambudripad ve Smith 1996).

Proteinlerin fonksiyonlarını moleküler düzeyde anlayabilmek için onların üç boyutlu yapılarını bilmek gerekmektedir (Nambudripad ve Smith 1996). Birçok

proteine başka moleküller tersinir bir şekilde bağlanabilmektedir. Proteine tersinir bir şekilde bağlanan moleküle ligant denir. Ligantın proteine bağlandığı kısma bağlanma noktası ismi verilmektedir. Bağlanma noktası ligantın şeklinden, boyutundan, yükünden ve hidrofobik veya hidrofilik karakterinden etkilenir. Belirli konformasyonel değişiklikler de protein fonksiyonu için önemlidir. Proteinler esnek yapıdır. Proteinin yapısında meydana gelebilecek küçük bir konformasyonel değişiklik, moleküler titreşimlere ve amino asit kalıntılarının yer değiştirmelerine sebep olabilmektedir (Nelson ve Cox 2005).

Atomlar arasındaki bağın etrafında gerçekleşen dönme hareketinin verdiği esneklikten dolayı proteinlerin yapılarında çeşitlilikler görülebilmektedir. (Nambudripad ve Smith 1996). Proteinlerin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları Şekil 1.6'da gösterilmektedir (Nelson ve Cox 2005).



Şekil 1.6. Proteinlerin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları

Bir proteindeki amino asitlerin dizilişi, o proteinin primer yapısını oluşturmaktadır. Amino asitler arasında peptit ve disülfid kovalent bağları bulunmaktadır (Voet vd 1998).

Proteinlerin sekonder yapısı, primer yapıda bulunan amino asitlerin protein içerisindeki konformasyonları sonucunda oluşur. Proteinin sekonder yapısı, düzenli polipeptit katlanmaları olan heliks ve tabaka yapılarıdır (Voet vd 1998). Bu iki sekonder yapının anlaşılabilmesi için amino asitler hidrofilik (polar) ve hidrofobik (apolar) olarak

sınıflandırılabilir. Protein katlanması, amino asit zincirindeki hidrojen bağları sayısının artması ve yan zincir (R grubu) sayısının azalması doğrultusunda gerçekleşmek ister. Katlanmış proteinin oluşumunda hidrofobik etkiden dolayı amino asit zincirindeki hidrojen bağları çözüngenden proteinin iç kısmına doğru, apolar amino asit yan zincirleri ise proteinin dış kısmına doğru yönelmektedir (Nambudripad ve Smith 1996).

Düzenli sekonder yapılar α -heliks ve β -tabaka yapılarıdır. α -Heliks yapısı, bir insan sağ elinin parmaklarının kıvrıldığı yönde bir sarmal oluşturur (Voet vd 1998). Peptit bağları ve α -karbon atomu polipeptit zincirinin iskeletini oluşturur. α -Heliks sarmalının tam ortasından geçen hayali eksen etrafında dolandığı kabul edilir. Amino asitlerin R grupları bu sarmaldan dışarıya doğru yönelmektedir (Nelson ve Cox 2005). Sarmal yapının her kıvrımının arasında 3,6 amino asit kalıntısı bulunur ve her bir kıvrım arasındaki mesafe 5,4 Å'dür. α -Heliks yapısı içinde hidrojen bağları da oluşmaktadır. n sayılı amino asitin karbonil grubu ile sarmal boyunca yukarı doğru çıkıldığında ($n+4$) sayılı amino asitin amit grubu arasında hidrojen bağı oluşmaktadır. α -Heliks yapısında bulunan bu hidrojen bağları yapının dayanıklılığını arttırmaktadır (Voet vd 1998). β -tabaka yapısında da α -heliks yapısında olduğu gibi polipeptit zincirinin iskeletinde çok sayıda hidrojen bağı bulunmaktadır. İki çeşit β -tabaka vardır. Bunlardan ilki antiparalel β -tabakadır. Bu yapıda, polipeptit zincirinde bulunan hidrojen bağları birbirlerine ters yönlerde ilerlemektedir. Diğer yapı olan paralel β -tabakada ise hidrojen bağları aynı doğrultuda yönelmektedir. β -tabaka yapısının kenarlarında dalgalı bir görünüm vardır. Bu sebepten dolayı, bu yapı β -kırmalı tabaka ismini de alır. Ayrıca, β -kırmalı tabakadaki ardışık yan zincirler tabaka boyunca zıt yönlerde bulunmaktadır. Tabaka boyunca tekrarlayan iki amino asit kalıntısı arasındaki mesafe 7,0 Å'dür (Nambudripad ve Smith 1996, Voet vd 1998).

Bir proteinin tersiyer yapısı, onun sekonder yapısının katlanmış halini ifade eder ve yan zincirler de dahil olmak üzere proteindeki tüm atomların yerini açıkça belirtir (Voet vd 1998). Tersiyer yapı, polipeptit zincirinin üç boyutlu halini gösterir. Tersiyer yapıdaki proteinler genel olarak fibröz proteinler ve globüler proteinler olmak üzere ikiye ayrılır. Fibröz proteinlerde polipeptit zinciri uzun iplikler veya tabakalar halinde bulunur. Globüler proteinlerde ise polipeptit zincirleri küresel biçimde katlanmıştır. Bu

iki protein türü yapı olarak birbirinden farklıdır. Fibröz proteinler yapı olarak çoğunlukla tek çeşit sekonder yapıdan oluşur. Öte yandan, globüler proteinler yüksek çeşitlilikte sekonder yapı içerir. Bu proteinler fonksiyonel açıdan da farklılık gösterir. Fibröz proteinler omurgalılara destek, şekil ve dış koruma sağlarken, globüler proteinler genellikle enzimler ve düzenleyici proteinlerdir (Nambudripad ve Smith 1996, Nelson ve Cox 2005).

Bazı proteinler iki veya daha fazla sayıda farklı polipeptit zincirlerinden veya alt birimlerden oluşur. Bu alt birimlerin oluşturduğu üç boyutlu kompleks yapı, kuaterner yapıdır (Nelson ve Cox 2005). Polipeptit alt birimleri kuaterner yapıyı oluştururken kendilerine özgü bir geometride birleşirler (Voet vd 1998).

1.2.2. Proteinlerin sınıflandırılması

Ribonükleaz A enzimi gibi proteinler sadece amino asit kalıntısı içerir, başka hiçbir kimyasal bileşen içermez. Bu tür proteinler basit protein olarak isimlendirilir. Basit proteinler; albuminler, globulinler, gluteninler, prolaminler, protaminler, histonlar ve sklero proteinlerdir. Albuminler, memeli canlılarda en fazla bulunan proteindir ve çeşitli ilaçların ve iyonların taşınmasında büyük rol oynarlar (Candiano vd 2009). İnsanda bulunan albumin serum albumin, sütte bulunan albumin laktalbumin ve yumurtada bulunan albumin ovalbumindir. Globulin, suda değil tuzlu çözeltide çözünür. İnsanda serum globulin, kaslarda miyozin ismini alır (Nelson ve Cox 2005, Choi ve Ma 2006). Glutenin, bitkisel kaynaklı bir proteindir. Sindirilebilen bu protein buğdayda çok fazla bulunur (Chen vd 2010). Prolaminler alkolde çözünen proteinlerdir. Tahıllarda yüksek miktarda bulunurlar (Sami-Subbu vd 2000). Farklı amino asit dizilimindeki dört farklı peptidin karışımı olan protamin, balıktan elde edilmiş katyonik peptitlerdir (Liang vd 2005). Antibakteriyel özellik gösteren protamin proteini medikal uygulamalarda ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Protaminin molekül ağırlığı yaklaşık 5 kDa'dır (Gill vd 2006). Histonlar, büyük oranda pozitif yüke sahip amino asitlerden oluşmuş proteinlerdir (Voet vd 1998). Küçük ve bazik yapıdadırlar. Arjinin ve lizin bakımından zengindirler (Nelson ve Cox 2005). Nonglobüler bir protein olan sklero protein, hayvan

dokularında fazla miktarda bulunur ve büyük fibröz protein gruplarından oluşur (Sashina vd 2006).

Amino asitlerin yanında başka bileşenleri de içeren proteinler, konjüğe veya bileşik proteinler olarak isimlendirilirler. Konjüğe proteinlerin amino asit içermeyen kısımlarına prostetik grup denir. Bu proteinler prostetik grubun kimyasal doğasına göre sınıflandırılırlar. Lipit içeren lipoproteinler, şeker grubu içeren glikoproteinler ve metal içeren metalloproteinler konjüğe proteinlere örnek olarak gösterilebilir. Bu örnekler dışında fosfoprotein, hemoprotein, flavoprotein de konjüğe proteinlerdir (Nelson ve Cox 2005).

1.2.3. İnsan serum albumin (HSA) proteini

İnsan serum albumin (HSA) proteini kanda en fazla miktarda bulunan taşıyıcı proteindir. Kan plazmasındaki miktarı yaklaşık olarak 46 mg/mL'dir (Basken ve Green 2009). HSA, kandaki toplam proteinin yaklaşık % 60'ını oluşturur (Ding vd 2009, Sen vd 2009). Bu protein karaciğerde sentezlenir (Cui vd 2006, 2009b). Ozmotik kan basıncına büyük oranda katkı sağlar ve kan içerisinde yağ asiti, amino asit, hormon, kation, anyon, ilaç gibi birçok endojen ve ekzojen maddenin taşınmasında görev alır (Carter ve Ho 1994, Cui vd 2009b, Naik vd 2010). Molekül kütlesi 66500 g/mol'dür (Seedher ve Bhatia 2006).

1.2.3.1. HSA proteininin yapısı

Son yıllarda en çok çalışılan proteinlerden birisi serum albumindir. Bunun sebebi, serum albumin proteininin primer yapısının uzun zamandır bilinmesi ve proteinin üç boyutlu yapısının X-ışını kristalografisi ile tespit edilmiş olmasından kaynaklanmaktadır (Carter ve Ho 1994, Naik vd 2010). HSA proteininin iki florofor grubu (triptofan (Trp-214) ve tirozin (Tyr)) vardır (Boelens vd 1985, Peters 1985, Bi vd 2005). HSA proteini, tek bir polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Bu polipeptit zincirinin bilinen bir amino asit dizilimi vardır. HSA proteini 116 adet asidik (98 karbonil ve 18 fenolik-OH) ve 100 adet de bazik (60 amino, 16 imidazolil ve 24 guanidil)

iyonlaşabilen gruba sahiptir (Peters 1992, Haynes ve Norde 1994, Bordbar ve Kafrani 2007).

Globular bir protein olan HSA proteini çoğunlukla α -heliks yapıdan oluşmaktadır (Bian vd 2004). Kalp şekli oluşturan bu protein üç bölgeye sahiptir (bölge I, II ve III). Her bir bölge kendi içinde A ve B olmak üzere iki alt kısma ayrılmaktadır (bölge IA, IB, IIA, IIB, IIIA ve IIIB). Bu alt kısımlar heliks yapıdadır ve çapraz bağlı disülfid köprüleri ile birbirine bağlanmıştır. HSA'nın amino asit diziliminde toplamda 17 adet disülfid köprüsü, bir adet serbest tiyol (Cys-34) ve bir adet de triptofan (Trp-214) bulunmaktadır (Kragh-Hansen 1981, Bian vd 2004). HSA'nın her bir bölgesi kendisine özgü bağlanma özelliği gösterir (He ve Carter 1992, Narazaki vd 1997, Sen vd 2009). Bölge I, uzun zincirli yağ asitleri, warfarin, indol türevleri, boya, bakır ve nikel gibi maddelerin bağlanma yeridir. Bölge II, benzodiazepin ile kısa zincirli yağ asitleri, steroid ve bilirubin gibi maddelerin bağlanma noktasıdır. Bölge III'e ise diazepam bağlanmaktadır (Sen vd 2009).

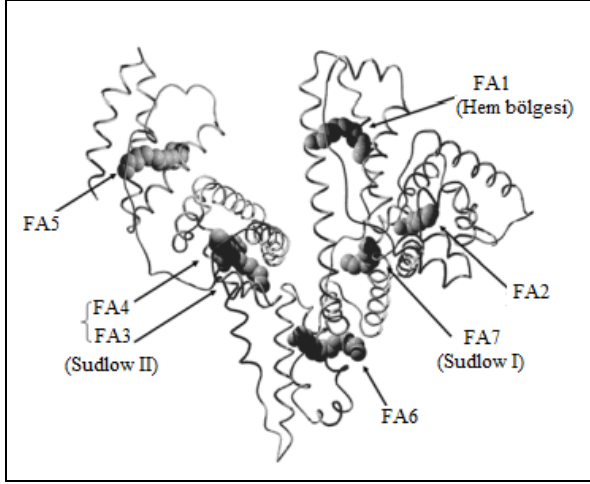
1.2.3.2. HSA proteininin özellikleri ve fonksiyonları

585 adet amino asit içeren ve tek bir polipeptit zincirinden oluşan HSA proteini birçok önemli fizyolojik fonksiyona sahiptir. Ozmotik kan basıncının ayarlanmasında yaklaşık % 80 oranında pay sahibidir (Sen vd 2009). Kanın pH değerinin sabit tutulmasında önemli rol oynar (Figge vd 1991). Yağ asitleri, amino asitler, hormonlar, katyonlar, anyonlar ve ilaçlar gibi birçok molekülün taşınmasında ve bu moleküllerin vücut içerisinde dağıtımında görev alır (Liu vd 2004, Cui vd 2009a). HSA proteini, kan plazmasının taşıma kapasitesini artırır (Bhattacharya vd 2000). HSA proteininin 1 molü, sulu ortamda çok az çözünen yağ asiti moleküllerinin 0,3 ile 1 mol arasında değişen miktarlarda taşınmasını sağlamaktadır. HSA, aynı zamanda önemli bir antioksidandır, enzimatik özellikleri vardır ve birçok molekül için depo konumundadır (Kragh-Hansen vd 2006).

1.2.3.3. HSA proteini üzerindeki bağlanma yerleri

HSA proteininin öne çıkan özelliklerinden birisi yüksek çeşitlilikteki ligantları tersinir bir şekilde bağlayabilme yeteneğidir (Peters 1985). Bu proteinin üç boyutlu yapısı IA, IB+IIA, IIB+IIIA ve IIIB isimli dört globüler bölgenin birleşiminden oluşmaktadır. Bu yapısal düzen, çeşitli ligantlar için bağlanma bölgeleri sağlar (Ascenzi vd 2005). 1970'li yıllarda yapılan kapsamlı biyokimya çalışmalarında HSA proteininin ilaçlar ile etkileşimlerinde iki esas bağlanma bölgesi bulunduğu kabul edilmiştir. Bu bölgeler Sudlow I ve Sudlow II olarak isimlendirilmiştir (Sudlow vd 1976, Zhu vd 2008). Alt kısım IIA'da bulunan Sudlow I bölgesi, büyük heterosiklik ve negatif yüklü bileşikleri tercih ederken; alt kısım IIIA'da yer alan Sudlow II bölgesi ise daha çok küçük aromatik karboksilik asitleri tercih etmektedir (Sudlow vd 1975, 1976, Ascenzi vd 2005, Zhu vd 2008).

HSA proteininin IB alt kısmında D-şeklinde hidrofobik yapılı dar bir boşluk vardır. Hem olarak isimlendirilen bu boşlukta Tyr-161 amino asit kalıntısı demir atomuna oksijen verilmesini sağlar. Sudlow I, II ve hem bölgeleri Şekil 1.7'de gösterilmektedir. Hem boşluğu, Sudlow I bölgesi gibi sadece bir tane yağ asiti (FA) anyonuna ev sahipliği yapabilmektedir. Sudlow II bölgesine ise iki tane yağ asiti anyonu bağlanabilmektedir. Alt kısım IA ve IB arası ile alt kısım IIA ve IIB arasındaki boşluklara ve IIIB alt kısmına birer tane yağ asitinin bağlanması söz konusudur (Ascenzi vd 2005). Sudlow I, Sudlow II ve hem bölgelerine yağ asitlerinin bağlanma yerleri Şekil 1.7'de gösterilmektedir (Fanali vd 2012). HSA proteininin konformasyonel durumuna göre oldukça fazla sayıda minör bağlanma bölgeleri mevcuttur (Sengupta ve Hage 1999, Bhattacharya vd 2000, Zunszain vd 2003, Ascenzi vd 2005, Ghuman vd 2005, Zhu vd 2008).



Şekil 1.7. HSA proteinindeki yağ asitlerinin bağlanma bölgeleri (FA: Yağ asiti)

1.3. Antioksidanlar

Antioksidanlar, reaktif oksijen veya azotları temizleyerek radikal zincir reaksiyonlarını durduran veya reaktif oksidanları oluştukları yerde inhibe eden maddelerdir (Huang vd 2005, Wootton-Beard ve Ryan 2011). Antioksidan maddeler, serbest radikaller sebebiyle ortaya çıkan oksidatif baskının üstesinden gelebilmesi için organizmalara yardımcı olur. Serbest radikaller bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektronu olan kimyasal yapılardır. Radikallerin üzerinde bulunan çiftleşmemiş elektronlar oldukça kararsızdır. Radikaller kendi kararlılığını arttırmak amacıyla diğer moleküllerin elektronlarını alarak onlara zarar vermektedir. Süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit reaktif oksijen türleridir ve canlı ortamda oluşurlar. Bu reaktif oksijen türleri insan vücudunda üretilmektedir. Bağışıklık sistemini güçlendirici, toksinleri uzaklaştırıcı görevleri olmakla birlikte enerji kaynağı olarak da gereklidir (Sharif Ali vd 2008).

Vücut, oksidatif baskı sebebiyle oluşmuş serbest radikallere karşı savunma mekanizması oluşturmuştur. Bunlar; önleyici mekanizma, onarıcı mekanizma, fiziksel savunma ve antioksidan savunmadır. Vücuttaki doğal antioksidan maddeler ve besin takviyesi ile alınan antioksidan maddeler kronik hastalıkların riskini azaltır ve ilerlemesini önler (Stanner vd 2004, Sharif Ali vd 2008).

Antioksidan maddeler sentetik ve doğal olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Sentetik antioksidan maddelere bütillenmiş hidroksi toluen ve bütillenmiş hidroksi anisol örnek olarak verilebilir (Branen 1975, Sharif Ali vd 2008). Son zamanlarda doğal antioksidanların güvenli olduklarının düşünülmesi, tedavi edici olmaları ve besleyici olmaları nedeniyle gıda ürünlerinde ve diğer biyolojik maddelerde yaygın biçimde kullanılmaktadır (Ajila vd 2007, Sharif Ali vd 2008). Meyvelerden, sebzelerden, baharatlardan ve tahıllardan elde edilen antioksidan maddeler oldukça etkilidir. Doğal antioksidanlar çoğunlukla bitkilerden fenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asitler ve alkoller), askorbik asit ve karotenoitler şeklinde elde edilirler (Sharif Ali vd 2008).

Antioksidanlar, endojen ve ekzojen maddeler olarak da gruplandırılabilir. Endojen antioksidanlar redoks proteinleri, hormonlar, lipid efektörleri ve enzimlerdir. Ekzojen antioksidan maddeler ise karotenoitler, polifenoller, vitaminler, mineraller, sülfür içeren kimyasallar, stilbenler, steroidler ve saponinlerdir (Wootton-Beard ve Ryan 2011).

1.4. İlaçlar

Kanda bulunan ilaç molekülleri çoğu zaman kan plazmasındaki proteinlere bağlanırlar. İlaçların bağlandığı plazma proteini çoğunlukla albumin proteindir. Bağlanma oranı her ilaç için farklıdır (Kayaalp 2005). Albumin proteininin yüksek ilaç bağlama kapasitesine sahip olması ve bağlanma işleminin kendiliğinden gerçekleşebilmesi nedeniyle albumin proteini ilaç farmakokinetiğinde büyük öneme sahiptir (Zhu vd 2008).

Dünya Sağlık Örgütü, ilacı “fizyolojik sistemleri veya patolojik durumları, alanın yararına değiştirmek veya incelemek amacıyla kullanılan veya kullanılması öngörülen bir madde veya üründür” şeklinde tanımlamıştır (Cingi ve Erol 1996).

İlaç moleküllerinin vücut içerisinde emilmesini ve dağılmasını etkileyen bazı parametreler vardır. Bunlardan birisi ilaç maddesinin molekül büyüklüğüdür. Küçük moleküllü ilaçların absorpsiyon hızları, büyük moleküllü ilaçların absorpsiyon hızlarına göre daha büyüktür. Absorpsiyon kelimesinin farmakolojideki anlamı, ilacın uygulandığı noktadan kan dolaşımına geçmesi işlemidir. Kan dolaşımı ile dokulara

taşınması ise ilaçların dağılımını ifade eder. Diğer parametreler lipofiliklik, ilacın farmasötik şekli, çözücünün fiziksel özellikleri, ilaç konsantrasyonu ve ilacın farmakolojik özellikleridir (Kayaalp 2005).

İlaçlar sade ve pratik bir şekilde anlaşılabilir üzere çeşitli kriterlere göre sınıflandırılabilir. İlk kriter ilaçların kimyasal yapılarıdır. İlaçların farmakolojik etkileri kimyasal yapıları ile doğrudan ilişkilidir. Aynı yapıdan türetilmiş olan ilaçlar çoğunlukla aynı ortak etkiyi gösterme eğilimindedirler. Bundan dolayı, ilaçlar sınıflandırılırken ortak kimyasal yapılarına göre ayrılabilirler. Kimyasal olarak sınıflandırılmış ilaçlara örnek olarak kolin esterler, organik fosfatlar, fenotiazin türevleri ve benzamit türevleri gösterilebilir (Kayaalp 2005).

İlaçların etki yerleri, ilaçların sınıflandırılmasına yarayan bir başka kriterdir. Eritrositlerin üretim yeri olan kemik iliğini ve yine aynı yerde gerçekleşen hematopoiez olayını etkileyen ilaçlara hematopoietik ilaçlar adı verilir. Kalbi etkileyen ilaçlara kalp ilaçları denir. Otonom sinir sistemini ve otonom sistemini harekete geçiren efektör hücrelerini etkileyen ilaçlar da otonom sinir sistemi ilaçları olarak isimlendirilir (Kayaalp 2005).

İlaçların sınıflandırılmasını sağlayan bir başka kriter ise ilaçların kullanım amaçları ve kullanıldığı durumlardır. Bu sınıflandırma kriterinin avantajı, kullanıldığı hastalığı kolaylıkla anımsattığı için ilaç öğreniminde ve uygulamada kolaylık sağlamasıdır. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlara antihipertansif ilaçlar denilmektedir. Ağrı kesici ilaçlara ağrı hissetmeme anlamına gelen analjezi kelimesinden türetilmiş analjezik ilaçlar adı verilir. Diürez yapabilmek amaçlı kullanılan ilaçlara diüretik ilaçlar denir. Ateş düşürmek amacıyla kullanılan ilaçlar ise ateş anlamına gelen pirezis kelimesinden türetilmiş antipiretik ilaçlar başlığı altında sınıflandırılmaktadır (Kayaalp 2005).

1.5. İlaçlar ve Antioksidan Maddeler ile Proteinler Arasındaki Etkileşimlerin Önemi

Kanda bulunan ilaç moleküllerinin çoğu, özellikle asidik ilaçlar, plazma proteini olan albumine bağlanırlar. Bağlanma oranı her ilaç için farklılık göstermektedir. İlaç molekülleri ile albumin proteini arasında meydana gelen bağlanma seçici değildir. Dolayısıyla, aynı bağlanma noktasına aralarında benzerlik olmayan birden çok ilaç aynı anda bağlanabilir. Böyle bir durumda bağlanma bölgesine ilgisi yüksek olan ilaç, aynı bölgeye ilgisi düşük olan ilacı o bölgeden ayırarak serbest hale getirir. İlaç molekülleri, albumine ve diğer makromoleküllere tersinir bir şekilde bağlanır (Kayaalp 2005). İlaçların proteine olan ilgisi bağlanma bölgesindeki ilaç konsantrasyonuna ve ilacın etki süresine doğrudan etki etmektedir (Colmenarejo 2003, Xie vd 2006, Han vd 2009). Proteine bağlı ilaçlar, kılcal damarlardan dokulara serbestçe geçemez. İlaçların proteinlere bağlanma durumlarında teşhis ve tedavi edici ilaçların farmakokinetiği ile dağılımı değişmektedir. Dolayısıyla, ilaçlar ile proteinler arasında meydana gelen etkileşimler farmakokinetik çalışmalar için önemli bir parametre haline gelmektedir (Basken vd 2008). İlaçların proteinler ile yaptıkları etkileşimler farmakolojide ve farmakodinamikte büyük öneme sahiptir (Cui vd 2006).

Çeşitli ilaçların dağıtımı, serbest ilaç konsantrasyonu ve etkisi ilaçların HSA proteinine bağlanmaları sonucunda değişmektedir. İlaçların proteinlere bağlanması ilacın dağılım hacmini ve eliminasyon hızını etkilemektedir. Bu konuda yapılan araştırmalar ilacın tedavi edici görevine etki eden yapısal özellikleri hakkında bilgi edinilmesini sağlar. Bu durum bilim, kimya ve klinik tıp için yeni bir ilgi alanı haline gelmektedir (Kragh-Hansen 1981, Bian vd 2004).

İlaçlar gibi yağ asitleri, hormonlar, anyonlar, katyonlar ve flavonoidler de proteinlere bağlanabilmektedir (Liu vd 2004, Cui vd 2009a). Flavonoidlerin bir üyesi olan antioksidanlar bazı gıda ürünlerinde bol miktarda bulunmakta ve bu gıdalar insanlar tarafından tüketilmektedir (Dufour ve Dangles 2005). Antioksidan maddeler serbest radikallerin oksidasyonunu önleyerek veya geciktirerek kronik hastalıkların tekrarlamasını önlemektedir (Kanakis vd 2006). Antioksidan maddeler ile serum

proteinleri arasında meydana gelen etkileşimler antioksidan özellikli maddelerin taşınmasına ve bunların biyolojik aktivitesine etki etmektedir. Bu etkileşimler, proteinlerin sekonder yapılarında da değişikliklere neden olmaktadır. Dolayısıyla, antioksidan maddelerin serum proteinleri ile etkileşimlerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır (Dufour ve Dangles 2005, Kanakis vd 2006, Roy vd 2012).

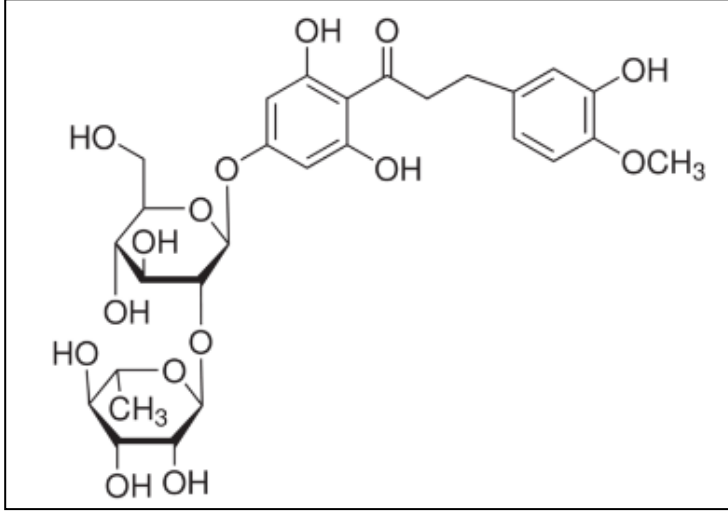
1.6. Neohesperidin Dihidrokalon ve Maprotilin Hidroklorür

Bu çalışmada HSA proteini ile neohesperidin dihidrokalon (NHD) ve maprotilin hidroklorür (MHC) arasındaki etkileşimler araştırılmıştır.

1.6.1. Neohesperidin dihidrokalon (NHD)

Çalışmada HSA proteini ile etkileşimi incelenen maddelerden birisi olan NHD'nin yoğun bir şeker tadı vardır. Sükrozdan yüzlerce kat fazla şekerliliğe sahip olan bu madde, yaklaşık 40 yıldır gıda ürünlerinde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Avrupa Birliği, NHD maddesinin gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin vermiştir. Gıda ürünlerinin içerisinde 10-40 mg/kg veya mg/L miktarında bulunabileceği (European Parliament and Council Directive 1994, Choi vd 2007), güvenli olduğu ve toksik olmadığı (Smith vd 1996, Choi vd 2007) belirtilmiştir. NHD'nin gastrik ülser seviyesini düşürdüğü görülmüştür (Suarez vd 1996, Choi vd 2007). NHD, antioksidan özellik göstermektedir. NHD'nin antioksidan özelliği iltihapsız mide-bağırsak hastalıklarının iyileştirilmesinde etkili olabilmektedir (Choi vd 2007).

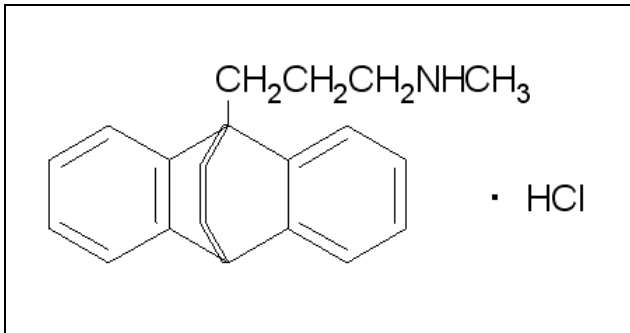
NHD tatlandırıcı maddesi turunçgillerde bol miktarda bulunmaktadır. Portakal, limon ve greyfurt meyvelerinin çekirdeklerinde neohesperidin yoğun tadı hissedilmektedir. Hidrokalonlar, bisiklik flavonoidlerin bir türüdür. İki benzenoid halkasının üç-karbon köprüsü ile bağlanması yoluyla oluşur. NHD, neohesperidin hidrojene edilmesi ile üretilir (Waalkens-Berendsen vd 2004, Choi vd 2007). NHD'nin kimyasal yapısı Şekil 1.8'de gösterilmektedir.



Şekil 1.8. Neohesperidin dihidrokalkonun kimyasal yapısı

1.6.2. Maprotilin hidroklorür (MHC)

MHC, trisiklik görünümlü ancak esasında tetrasiklik bir yapıya sahip olan bir ilaç maddesidir. Bu ilaç, depresyon tedavisinde kullanılmaktadır. Beyin ve çevresindeki dokulara noradrenalin alımını engeller (Kepekçi ve Öztunç 2004, 2005). Noradrenalin, atardamar basıncını değiştirir (Dubniks ve Grände 2008). MHC, norepinefrini inhibe ederek sinir hücreleri tarafından norepinefrinin alınmasını engeller (Wells ve Gelenberg 1981). Norepinefrin, strese bağlı olarak ortaya çıkan kaygı bozukluğu ve depresyona sebep olan bir maddedir (Dazzi vd 2003). Kan içerisinde yüksüz maprotilinin biyolojik yarı ömrü 43 saattir. Standart trisiklik antidepresan ilaçlardan farklı olarak, MHC ilacının yan etkileri arasında düşük tansiyon ve kalp çarpıntısı görülme oranının daha az olması sayılabilir (Wells ve Glenberg 1981). MHC'nin kimyasal yapısı Şekil 1.9'da yer almaktadır.

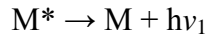
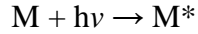


Şekil 1.9. Maprotilin hidroklorürün kimyasal yapısı

1.7. Floresans Spektroskopisi

Elektromagnetik ışımaya ile madde arasında meydana gelen etkileşimi inceleyen bilim dalına spektroskopik denir. Spektroskopik yöntemler, maddelerin kantitatif ve kalitatif analizi, yapılarının aydınlatılması, stereokimyasal özelliklerinin belirlenmesi gibi bir çok uygulama alanına sahiptir. UV-VIS (mor ötesi-görünür bölge), IR (kırmızı ötesi), NMR (nükleer magnetik rezonans), CD (daireysel dikroizm), floresans spektroskopisi gibi bir çok spektroskopik yöntem bulunmaktadır (Erdik 2007).

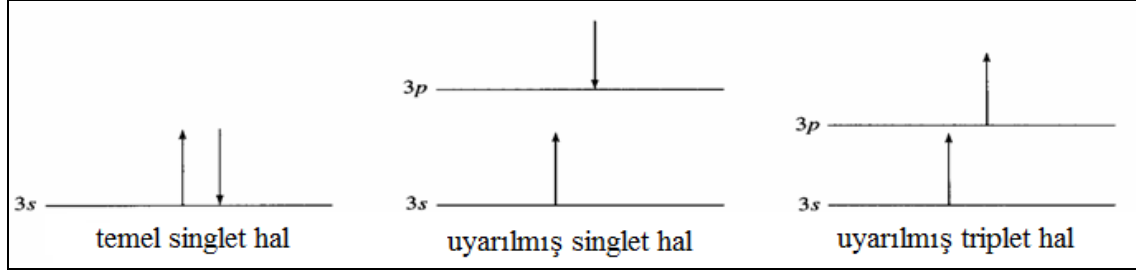
Fosforesans, maddenin lüminesans özelliklerinden birisidir. Moleküler fosforesans ve kemilüminesans maddelerin diğer lüminesans özellikleridir (Gündüz 2004). Uyarılmanın fotonların absorpsiyonu sebebiyle gerçekleşmesinden dolayı floresans ile fosforesans birbirleri ile benzerdir. Bu iki olaya fotolüminesans ismi verilmektedir (Skoog vd 1998). Floresans ve fosforesans maddelerin ışın ile etkileşmesi



şeklinde gerçekleşmektedir. $h\nu$ ışın enerjisini madde (M) absorplar ve uyarılmış hali olan M^* durumuna gelir. Uyarılmış halde bir süre kaldıktan sonra $h\nu_1$ enerjisini yayarak temel hali olan M durumuna döner. Çoğunlukla $h\nu$ enerjisi, $h\nu_1$ 'in enerjisinden büyüktür. İkisinin eşit olduğu durumlara ise rezonans floresans denilmektedir (Gündüz 2004).

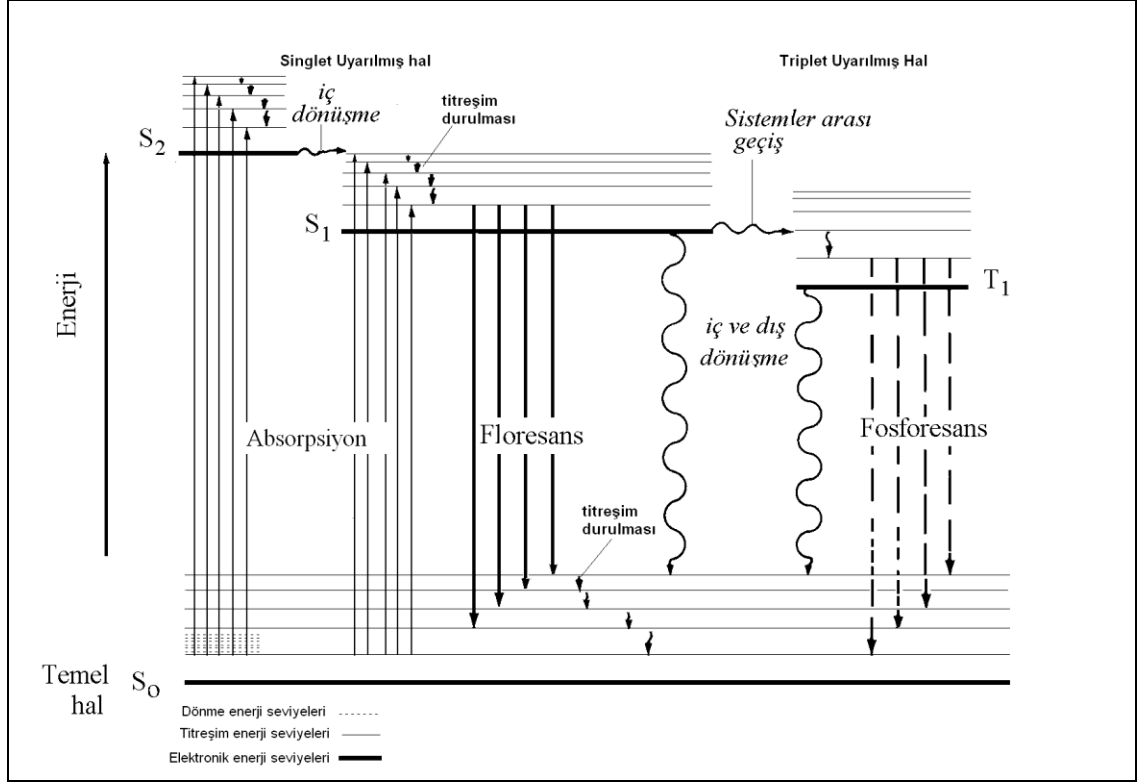
Floresans ışınması yapan maddelerin yaydıkları ışınlar, fosforesans ışın yayan maddelerin yaydıkları ışınlara göre daha kısa ömürlüdür. Floresans ışınması $10^{-5} - 10^{-8}$ saniye sürerken, fosforesans ışınma süresi 10^{-4} saniyeden dakikalara ve saatlere kadar devam edebilmektedir. Floresans veya fosforesans olayında maddenin kromofor grubunda bulunan elektron üzerine gönderilen ışın 10^{-14} saniye gibi kısa bir sürede absorplanır ve üst enerji seviyesine çıkar. Bir süre sonra temel hale döner. Madde floresans ışınması yapıyor ise elektronların spini değişmez ve uyarılmış singlet halde diamagnetiktir. Madde fosforesans ışınması yapıyor ise spini değişir. Uyarılmış triplet

hale gelir ve paramagnetik olur. Uyarılmış molekülün spin halleri Şekil 1.10’da gösterilmektedir (Gündüz 2004).



Şekil 1.10. Molekülün spin halleri

Floresans veya fosforesans ışınması yapan bir molekülün uyarılma ve temel hale dönme mekanizmaları basit bir gösterim ile Şekil 1.11’de yer almaktadır (Skoog vd 1998). Şekilde görünen temel hal enerjisi S_0 ile belirtilmiştir. S_1 ve S_2 ile uyarılmış haller gösterilmektedir. Her enerji seviyesinin en altında bulunan kalın çizgiye elektronik seviyesi, üzerindeki ince çizgilere titreşim seviyeleri denilmektedir. Sağdaki tek çizgi T_1 triplet halinin elektronik enerji seviyesini gösterir. Bu molekül uyarıldığında $S_0 \rightarrow S_1$ ve $S_0 \rightarrow S_2$ absorpsiyonları meydana gelebilir. Molekülün çok sayıda uyarılmış titreşim halinden bir tanesine dönmesi ile uyarılma işlemi bitmektedir. Uyarılan elektron, S_1 elektronik seviyesinden hem temel halin en alt titreşim seviyesine hem de öteki titreşim seviyelerinin herhangi birine geçebilir. Buna $S_1 \rightarrow S_0$ geçişi denir. Uyarılma ile S_2 seviyesine geçen bir elektron buradan temel hale geçemez. Elektron öncelikle S_2 seviyesinin en alt titreşim seviyesine iner. Buradan iç dönüşüm ile S_1 seviyesine geçer. İç dönüşüm, bir molekülün, ışın yaymadan daha düşük seviyeli bir enerji seviyesine geçmesini sağlayan ve molekülün içinde gerçekleşen bir olaydır. S_1 seviyesine gelen elektron yine en düşük titreşim seviyesine iner ve buradan temel hale geçebilir. Böyle bir geçiş sonucu ışın yayılır ve temel hale dönme işlemi gerçekleşmiş olur. Temel hale dönüş işlemi sonucunda çevreye çeşitli dalga boylarında ışınlar yayılır. Bunlar floresans ışınlarıdır (Skoog vd 1998, Gündüz 2004).



Şekil 1.11. Bir molekülün floresans ve fosforesans ışımlarını gösteren enerji diyagramı

Fosforesans ışımasında ise uyarılan elektron S_1 veya S_2 seviyesinden S_1 elektronik seviyesine gelir. Elektronun bulunduğu S_1 seviyesi, molekülün triplet halinin üst titreşim seviyelerinden birisi ile çakışırsa elektron S_1 seviyesinden T_1 halinin titreşim seviyelerinden birine geçer. Bu duruma sistemler arası geçiş ismi verilmektedir. Triplet halin titreşim seviyelerinden T_1 seviyesine gelen elektron buradan temel hale dönerek fosforesans ışıması yapar (Skoog vd 1998, Gündüz 2004).

Floresans ışımları çoğunlukla $\pi^* \rightarrow \pi$ ve $\pi^* \rightarrow n$ geçişlerinde görülür. $\pi^* \rightarrow \pi$ geçişlerinde daha kuvvetli ışımaya görülür. $\pi^* \rightarrow \pi$ geçişinin molar absorptivitesi $\pi^* \rightarrow n$ geçişinin molar absorptivitesinden 100-1000 kat daha fazladır. Dolayısıyla, $\pi^* \rightarrow \pi$ geçişinin ömrü $10^{-7} - 10^{-9}$ saniye, $\pi^* \rightarrow n$ geçişinin ömrü ise $10^{-5} - 10^{-7}$ saniyedir. $\pi^* \rightarrow \pi$ geçişlerinde, uyarılmış hal olan π^* orbitalinde elektronun spin değiştirmesi zor olduğu için singlet halden triplet hale geçiş olmaz ve kuvvetli floresans ışımları meydana gelir (Skoog vd 1998, Gündüz 2004).

En şiddetli floresans ışımalarına $\pi^* \rightarrow \pi$ geçişleri olan aromatik fonksiyonel grupları içeren bileşiklerde rastlanmaktadır. Yapısında konjüge çift bağlar içeren alifatik ve alisiklik aromatik halkalar da floresans ışması yapar (Gündüz 2004). Süstitüe olmayan aromatik hidrokarbonların birçoğu floresans ışması yapar. Benzen halkalarında meydana gelen süstitüsyonlar sonucunda floresans piklerinin maksimum dalga boylarında kaymalar ve şiddetlerinde farklılıklar oluştuğu gözlenmiştir. Halojen süstitüsyonunda, halojenin atom numarası arttıkça floresans şiddetinde azalma görülmektedir ve ağır atom etkisinden dolayı triplet hale geçişin gerçekleştiği düşünölmektedir (Skoog vd 1998).

Esneme miktarı düşük olan rijit moleküllerde floresans daha fazla görölmektedir. Sıcaklık ise birçok molekül için floresans ile ters orantılıdır. Sıcaklık arttıkça çarpışma sayısı artacaktır ve gerçekleşen dış dönüştüm ile floresans şiddeti azalacaktır. Dış dönüştüm olayı, bir molekülün sahip olduğu uyarılma enerjisini ortamda bulunan safsızlık moleküllerine aktararak temel hale dönmesidir. Dış dönüştüm olayı çözgenin viskozitesinin azalması ile artmaktadır. Bu sebeple, floresans şiddeti de azalmaktadır. Aromatik bileşiklerin asidik veya bazik substitüentleri varsa bu bileşiklerin floresans şiddetleri çoğunlukla pH'ya bağlıdır. Bileşiğin iyonlaşma durumuna göre floresans şiddeti ve dalga boyu farklılık göstermektedir. Bu bileşiklerin floresans şiddetlerindeki değışiklikler, bileşiklerin rezonans türlerinin asidik veya bazik yapılarına göre değışiklik göstermesinden kaynaklanmaktadır. Floresans miktarı, ortamda bulunan çözönmüş oksijen etkisi ile de değışir. Çözeltide bulunan oksijen, floresans özelliği gösteren maddeleri fotokimyasal olarak yükseltgemesinden dolayı bu maddelerin floresans şiddetlerini azaltmaktadır. Ayrıca, oksijenin paramagnetik özelliğinden dolayı uyarılmış moleküllerin triplet hale geçişı artar, sistemler arası geçiş meydana gelir ve sönümlenme göröür. Paramagnetik özellik taşıyan diğer maddeler de floresansı azaltmaktadır (Skoog vd 1998). Maddelerin floresans şiddetlerini etkileyen diğer faktör ise konsantrasyondur. Maddenin yaydığı floresans ışınının şiddeti numunenin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bu durum düşük konsantrasyonlar için geçerlidir. Konsantrasyon arttıkça kendi kendine sönümlenme ve kendi kendine absorpsiyon olayları gelişmektedir. Uyarılmış moleküllerin çarpışmaları sonucu kendi kendine

sönümlenme gerçekleşir. Maddenin emisyon ve absorpsiyon dalga boyları örtüşüyor ise kendi kendine absorpsiyon olayı gözlenir (Skoog vd 1998, Gündüz 2004).

Floresans sönümlenme tekniği, bağlanma reaksiyonlarının doğasının anlaşılmasında önemli bir rol oynar (Bi vd 2005). Floresans spektroskopisi hassas, kolay uygulanabilen bir tekniktir. Küçük moleküller ile biyomoleküller arasında gerçekleşen etkileşimlerin anlaşılmasında etkilidir (Cui vd 2006). Senkronize floresans taraması da önemli bir floresans tekniğidir. Lloyd ve Evett (1977)'in ilk kez uygulamalarından sonra, senkronize floresans tekniği ilgi çekici bir analiz yöntemi haline gelmiştir. Senkronize floresans spektroskopisinde spektral bant genişliği azaltılmaktadır. Emisyon spektrumları sadeleşmekte ve spektral aralık değişmektedir (Cui vd 2009a). Senkronize floresans ölçümleri kolaylıkla uygulanır, etkilidir ve kantitatif sonuçlar verir. Son zamanlarda proteinler ile ilaçlar arasındaki etkileşimlerin incelenmesinde de sıklıkla kullanılmaktadır (Cui vd 2009a).

1.8. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi

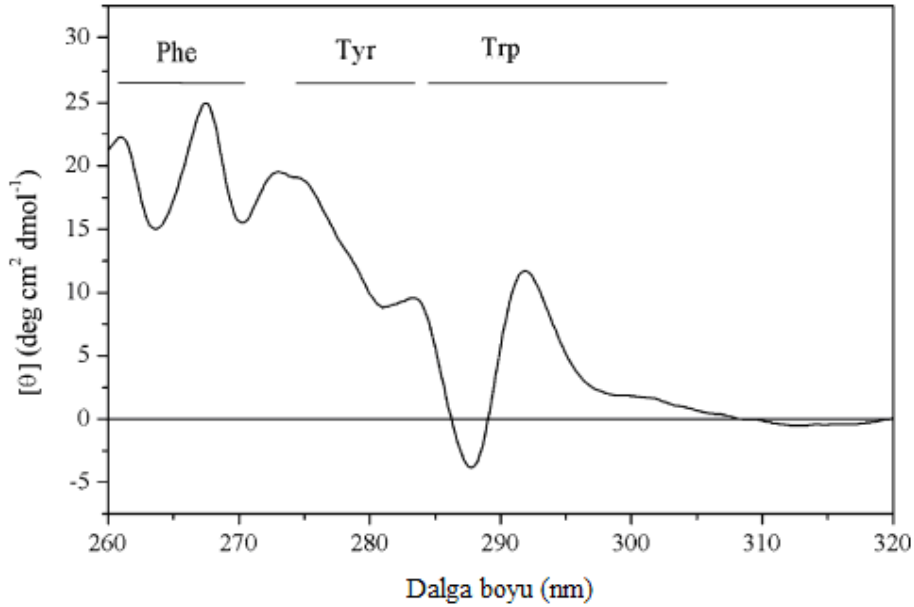
Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi, çözeltide bulunan proteinlerin ve nükleik asitlerin konformasyonlarının anlaşılmasını sağlayan bir metottur. NMR ve X-ışını kristalografisi gibi belirli ve detaylı bilgiler vermese de CD'nin iki önemli özelliği vardır. Bunlardan ilki, fizyolojik tamponlar içinde bulunan ve miktarı çok az olan maddelere uygulanma imkanı sağlar. Diğeri ise sıcaklık, pH, iyonik şiddet gibi çevresel faktörlerden kaynaklanan yapısal değişiklikleri gözlemlemede en iyi metotlardan birisi olmasıdır (Martin ve Schilstra 2008).

Kiral moleküller ile polarize ışın arasındaki etkileşimin belirli özellikleri vardır. Hem küçük moleküllerin hem de makromoleküllerin yapılarının karakterizasyonu için bu özelliklerin anlaşılması CD yöntemi ile sağlanabilmektedir. CD, polarize ışığın asimetric moleküller üzerine olan etkisinin anlaşılmasını sağlar (Ranjbar ve Gill 2009). Düzlem polarize ışık, saat yönünde (R) ve saatin tersi yönde (L) dairesele olarak dönen eşit büyüklükte iki bileşenden oluşur (Kelly vd 2005). Bu yöntem, optikçe aktif maddelerin polarize ışığı sağa ve sola döndürmelerinden kaynaklanan absorbans

farklarını inceler (Ranjbar ve Gill 2009). CD ölçümleri; proteinler, nükleik asitler, ilaçlar, karbonhidratlar ve likit kristaller gibi maddelerin enantiyomerleri ve yapıları hakkında detaylı bilgi sunar (Fasman 1996, Ranjbar ve Gill 2009).

CD tekniği, proteinlerin yapısı hakkında bilgi edinilmesini sağlar. 240 nm ve altında gözlenen peptit bağlarının absorpsiyonundan yola çıkılarak proteinlerin sekonder yapıları hakkında bilgi edinilmektedir. 210 – 220 nm aralığında gözlenen peptit bağının en düşük enerjili geçişi $n \rightarrow \pi^*$ geçiştir. Bu geçiş, karbonilin oksijenine ait olan eşleşmemiş elektronlardan kaynaklanır. En güçlü geçiş ise karbonilde bulunan π elektronlarının sebep olduğu $\pi \rightarrow \pi^*$ geçiştir. $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi 190 nm’de görülür (Kelly vd 2005, Ranjbar ve Gill 2009).

Proteinin 250 – 320 nm aralığında gözlenen CD spektrumu, onun tersiyer yapısı hakkında fikir vermektedir. Bu dalga boyu aralığındaki kromofor gruplar aromatik amino asitlerdir. Her amino asit kendisine özgü bir dalga boyu aralığına sahiptir. Triptofan (Trp) amino asiti 290 ile 305 nm arasında belirgin bir pik gösterirken, tirozin (Tyr) amino asiti ise 275 – 282 nm arasında omuzlu bir pik verir. Fenilalanin (Phe) amino asiti 225 – 270 nm arasında keskin pikler vermektedir. Piklerin görünümü Şekil 1.12’de gösterilmektedir (Kelly vd 2005, Ranjbar ve Gill 2009).



Şekil 1.12. Fenilalanin, tirozin ve triptofanın piklerini gösteren CD spektrumu

1.9. Çalışmanın Amacı

Çalışmanın amacı, farklı sıcaklıklarda ve fizyolojik pH'ta insan serum albumin proteini ile neohesperidin dihidrokalkon ve maprotilin hidroklorür maddeleri arasında gerçekleşen etkileşimleri floresans spektroskopisi ve dairesel dikroizm spektroskopisi teknikleri ile incelemek ve etkileşim gösteren sistemler için bağlanma sayısı, bağlanma sabiti ve termodinamik parametre (ΔH , ΔS ve ΔG) değerlerini belirlemektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Antioksidan Maddeler ve İlaçlar ile Serum Albumin Proteini Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi Konusunda Literatürde Yapılan Çalışmalar

Bian vd (2004), bir flavonoit olan genistein maddesinin HSA proteinine bağlanmasını floresans ve CD spektroskopisi yöntemleriyle araştırmışlardır. Yapılan deneyler sonucunda, genistein ile protein arasında bir etkileşimin meydana geldiği ve ligantın bağlanması ile proteinin sekonder yapısında değişikliklerin olduğu saptanmıştır. Van't Hoff eşitliği kullanılarak entalpi değişimi (ΔH) -22,24 kJ/mol ve entropi değişimi (ΔS) 19,60 kJ/mol K olarak bulunmuştur. Ayrıca, genistein ile insan serum albumin proteini arasında meydana gelen etkileşimde hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerin etkili olduğu görülmüştür (Bian vd 2004).

Ding vd (2009), kloramfenikol isimli ilaç ile HSA proteini arasında gerçekleşen etkileşimi dört farklı sıcaklıkta incelemişlerdir. Kloramfenikol - HSA sistemi için Stern - Volmer sönümlenme sabiti (K_{SV}) değerleri 287 K'de $2,852 \times 10^4 M^{-1}$, 295 K'de $2,765 \times 10^4 M^{-1}$, 303 K'de $2,638 \times 10^4 M^{-1}$ ve 311 K'de $2,542 \times 10^4 M^{-1}$ olarak bulunmuştur. Kloramfenikol ile HSA arasındaki etkileşime ait ΔH değeri -3,634 kJ/mol ve ΔS değeri 72,66 J/mol K olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu termodinamik verilere dayanılarak ilaç maddesi ile HSA proteini arasında hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerin meydana geldiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca; ilaç maddesi, HSA proteinine IIA alt kısmından bağlanmıştır (Ding vd 2009).

Subramanyam vd (2009)'nin yaptıkları çalışmada, kanser önleyici ve anti HIV aktivitesine sahip bir ilaç olan betulinik asit (BA) ile HSA proteini arasındaki etkileşimi kütle, UV-VIS, floresans ve CD spektroskopileri yöntemleriyle araştırılmıştır. Gerçekleştirilen bu çalışmada, bağlanma sabiti $1,685 \times 10^6 M^{-1}$ olarak hesaplanmış ve buradan BA ile HSA proteini arasında güçlü bir etkileşimin gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Yapılan kütle spektroskopisi analizlerinde serbest HSA'nın kütlesi 65199 Da ve BA varlığında HSA'nın kütlesi 65643 Da olarak bulunmuştur. 444 Da

değerindeki kütle farkının HSA'ya bağlanan BA ilaç maddesinden kaynaklandığı düşünülmüştür (Subramanyam vd 2009).

Serum albumin proteini ile ligantlar arasında meydana gelen etkileşimi araştırmak amacıyla X-ışını kristalografisi yöntemi de kullanılmaktadır. Zhu vd (2008) çalışmalarında 3'-azido-3'-deoksitimidin ilaç maddesi ile HSA arasında meydana gelen etkileşimi X-ışını kristalografisi yöntemi ile araştırmışlar ve ilaç maddesinin HSA üzerinde Sudlow I bölgesine bağlandığını bulmuşlardır (Zhu vd 2008).

Wang vd (2008), yaptıkları çalışmada kalp rahatsızlıklarında kullanılan (5-kloro-2-nitro-N-(4-(6-okso-1,4,5,6-tetrahidropiridazin-3-il)fenil) benzamit (CNPB) ilaç maddesi ile HSA proteini arasındaki etkileşimi 290 K ve 300 K'de incelemişlerdir. Sisteme ait bağlanma sabiti 290 K'de $4,22 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve 300 K'de $3,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuş, ayrıca sıcaklık arttıkça bağlanma sabitinin azaldığı görülmüştür. Hesaplanan termodinamik parametre değerlerine dayanılarak CNPB ile HSA arasındaki etkileşimde hidrojen bağlarının ve elektrostatik etkileşimlerin önemli rol oynadığı düşünülmüştür. Moleküler modelleme tekniği ile CNPB ilaç maddesinin HSA proteinine alt kısım IIA'da bulunan Sudlow I bölgesinden bağlandığı anlaşılmıştır (Wang vd 2008).

HSA ile ilaç maddeleri arasında meydana gelen etkileşimler incelenirken, ortamda bulunan metal iyonlarının etkisini araştıran çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. Cheng vd (2006), çalışmalarında bromsülfalein (BSP) ilaç maddesi ile HSA proteini arasında gerçekleşen etkileşimi incelemişlerdir. Deneyler 298 K ve 308 K'de ve pH 7,24'te yapılmıştır. Yapılan deneylerde, BSP ile HSA arasında güçlü bir etkileşimin meydana geldiği ve statik sönümlenmenin gerçekleştiği bulunmuştur. Çalışılan sistem için ΔH değeri $-9,3 \text{ kJ/mol}$ ve ΔS değeri de $22,3 \text{ J/mol K}$ olarak hesaplanmıştır. Entalpi değişiminin negatif ve entropi değişiminin pozitif olmasından dolayı etkileşimde hidrofobik etkileşimin etkin olduğu düşünülmüştür. Bağlanma sabiti 298 K'de $3,33 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve 308 K'de $2,62 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, ortamda bulunan Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının bağlanma sabiti değerini % 30 – 55 oranında azalttığı belirtilmiştir (Cheng vd 2006).

Antioksidan maddelerin HSA proteinine bağlanmaları ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Lu vd (2007), floresans sönümlenme, senkronize floresans, UV-VIS absorpsiyon ve CD spektroskopileri ile moleküler modelleme tekniklerini kullanarak resvatrol maddesi ile HSA ve hemoglobin proteinleri arasındaki etkileşimleri araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlar, resvatrolün albumin ve hemoglobine bağlanmasının statik sönümlenme ile gerçekleştiğini ve her iki proteinin de resvatrol ilaç maddesi için tek bir bağlanma noktasına sahip olduğunu göstermiştir. Resvatrolün albumine bağlanması, hemoglobine bağlanmasından daha kuvvetli gerçekleşmiştir. Bu durum, ilaç maddesinin albumine olan ilgisinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Resvatrolün, HSA ve hemoglobin proteinlerine bağlanmasından sonra proteinlerin sekonder yapılarında değişiklikler görülmüştür. α -heliks yapısının albuminde % 18,75 ve hemoglobinde % 9,43 oranında azaldığı bulunmuştur. Resvatrol – albumin sisteminde hidrofobik etkileşimlerin baskın olduğu ve bağlanmanın alt kısım IB ve IIA'da olduğu görülmüştür. Resvatrol – hemoglobin sisteminde hidrojen bağlarının etkili olduğu anlaşılmıştır (Lu vd 2007).

Flavonoidlerin bir üyesi olan flavonoidlerin HSA'ya bağlanması üzerine yapılmış çalışmalar da mevcuttur. Xie vd (2006), bitkisel ilaç olarak kullanılan morin flavonol maddesi ile HSA proteini arasında gerçekleşen etkileşimi floresans, UV absorpsiyon ve FTIR spektroskopisi yöntemleri ile incelemiştir. Tampon pH değerinin 6,4'ten 8,4'e çıkarılması ile morin ve HSA proteini arasındaki etkileşimin azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni, morinin yapısındaki hidroksil gruplarının protonlanması olarak açıklanmıştır (Xie vd 2006).

Bi vd (2012); naringenin, hesperitin ve apigenin antioksidan maddeleri ile sığır serum albumin (BSA) proteini arasında gerçekleşen etkileşimi 291 K'de ve pH 7,4'te araştırmışlardır. Yapılan çalışmaların sonucunda, tüm sistemlerde statik sönümlenmenin gerçekleştiği görülmüştür. Stern – Volmer sönümlenme sabiti, naringenin – BSA sistemi için $4,08 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, hesperitin – BSA sistemi için $5,40 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve apigenin – BSA sistemi için $5,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, ligantlar ile BSA proteini arasında elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin baskın olduğu sonucuna varılmıştır (Bi vd 2012).

Flavonoitler ile HSA proteini arasındaki etkileşimleri inceleyen başka bir çalışmada Bi vd (2004); kuersetin, rutin, hiperin ve baisalinin ile HSA arasındaki etkileşimleri araştırmışlardır. Dört flavonoitin HSA'ya olan ilgileri kuersetin > hiperin > baisalin > rutin sırasında azalmıştır. Ayrıca, ortama ilave edilen metal iyonlarının bağlanma sabiti değerlerini büyük ölçüde azalttığı görülmüştür. Ölçümler 26 ve 37 °C'de gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık arttıkça sönümlenme hız sabitlerinin azaldığı görülmüştür (Bi vd 2004).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada protein maddesi olarak insan serum albumin proteini kullanılırken, ligant olarak antioksidan özelliğe sahip bir tatlandırıcı olan neohesperidin dihidrokalkon ve bir ilaç olan maprotilin hidroklorür maddeleri kullanılmıştır. Protein ve ligant olarak kullanılan maddelerin isimleri, kısaltmaları ve molar kütleleri Çizelge 3.1’de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada protein ve ligant olarak kullanılan maddelerin isimleri, kısaltmaları ve molekül kütleleri

Madde adı	Kısaltma	Molar kütlesi
İnsan serum albumin proteini	HSA	66 500 g/mol
Neohesperidin dihidrokalkon	NHD	612,58 g/mol
Maprotilin hidroklorür	MHC	313,86 g/mol

Hazırlanan çözeltilerin pH değerlerini fizyolojik pH değeri olan 7,4’te sabit tutmak amacıyla tris(hidroksimetil)aminometan tampon maddesinden yararlanılmıştır. Protein, ligant ve tampon maddeleri Sigma firmasından satın alınmıştır. İyonik şiddeti ayarlamak için kullanılan NaCl tuzu ise Sigma - Aldrich firmasından temin edilmiştir. Çözeltilerin hazırlanması aşamasında tartımlar 0,1 mg hassasiyete sahip Mettler marka ML204/01 model analitik terazide alınmıştır.

Saf ligant, saf protein ve protein - ligant karışımlarını içeren çözeltilerin floresans ölçümleri sıcaklık ayarlama fonksiyonuna sahip Varian marka Cary Eclipse model floresans spektrofotometre cihazı ile ve absorbans ölçümleri de Varian marka Cary 5000 model UV-Vis-NIR spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin pH değerleri kombine cam elektrot kullanılarak ölçülmüştür. Deneysel çalışmaların tamamında deiyonize su kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Protein, ligant ve protein-ligant karışım çözeltilerinin hazırlanması

HSA – NHD ve HSA – MHC sistemlerinde gerçekleşen etkileşimlerin araştırılması için önce HSA, NHD ve MHC maddelerinin stok çözeltileri hazırlanmıştır. Protein çözeltisinin hazırlanmasında HSA'nın molekül ağırlığı 66500 g/mol olarak kullanılmıştır (Seedher ve Bhatia 2006, Li vd 2007). Hesaplanan miktarlarda maddeler tartıldıktan sonra balon jöjelere alınmış, daha sonra üzerlerine bir miktar 0,1 M NaCl içeren 0,05 M'lık tampon çözelti eklenmesiyle katı maddelerin çözünmeleri sağlanmış ve ardından NaCl içeren tampon çözelti ile belirli bir hacme seyreltilerek $3,0 \times 10^{-5}$ M'lık stok HSA protein çözeltisi ve $1,0 \times 10^{-4}$ M'lık stok NHD ve MHC ligant çözeltileri hazırlanmıştır. Kullanılan tampon çözelti sayesinde deney süresince çözeltilerin pH değerlerinin 7,4 seviyesinde sabit tutulması sağlanmıştır.

Daha sonra, stok çözeltilerin kullanılmasıyla belirli bir konsantrasyona sahip ($3,00 \times 10^{-6}$ M) saf protein çözeltisi ve farklı konsantrasyonlara sahip saf ligant çözeltileri hazırlanmıştır. Hem NHD hem de MHC için hazırlanan saf ligant konsantrasyonları sırasıyla $0,5 \times 10^{-6}$ M, $1,0 \times 10^{-6}$ M, $1,5 \times 10^{-6}$ M, $2,0 \times 10^{-6}$ M, $3,0 \times 10^{-6}$ M, $4,0 \times 10^{-6}$ M, $5,0 \times 10^{-6}$ M, $6,0 \times 10^{-6}$ M, $8,0 \times 10^{-6}$ M, $10,0 \times 10^{-6}$ M, $12,0 \times 10^{-6}$ M, $15,0 \times 10^{-6}$ M, $18,0 \times 10^{-6}$ M, $21,0 \times 10^{-6}$ M, $24,0 \times 10^{-6}$ M ve $30,0 \times 10^{-6}$ M'dır. Saf protein ve saf ligant çözeltilerinden sonra bir seri protein-ligant karışım çözeltisi hazırlanmıştır. Protein-ligant karışım çözeltilerinin tamamında protein konsantrasyonu $3,00 \times 10^{-6}$ M olarak sabit tutulurken, ligant konsantrasyonları ise 0,0 M, $0,5 \times 10^{-6}$ M, $1,0 \times 10^{-6}$ M, $1,5 \times 10^{-6}$ M, $2,0 \times 10^{-6}$ M, $3,0 \times 10^{-6}$ M, $4,0 \times 10^{-6}$ M, $5,0 \times 10^{-6}$ M, $6,0 \times 10^{-6}$ M, $8,0 \times 10^{-6}$ M, $10,0 \times 10^{-6}$ M, $12,0 \times 10^{-6}$ M, $15,0 \times 10^{-6}$ M, $18,0 \times 10^{-6}$ M, $21,0 \times 10^{-6}$ M, $24,0 \times 10^{-6}$ M ve $30,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde arttırılmıştır. Hazırlanan tüm çözeltilerde çözgen olarak 0,1 M NaCl içeren 0,05 M'lık tris(hidroksimetil)aminometan tamponu kullanılmıştır.

3.2.2. HSA ile NHD ve HSA ile MHC arasında gerçekleşen etkileşimlerin incelenmesi

Hazırlanan tüm çözeltilerin emisyon spektrumları sıcaklık ayarlama imkanı sağlayan peltier ünitesine sahip olan floresans spektrofotometresi (Varian - Cary Eclipse) ile gerçekleştirilmiştir. Protein - ligant etkileşimine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla ölçümler 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'de gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde 1,0 cm'lik kuartz hücre kullanılmıştır. Floresans spektrofotometre cihazının uyarılma ve emisyon yarık (slit) aralıkları 5 nm'ye ayarlanmıştır. Uyarılma dalga boyu 280 nm olarak uygulanmıştır. Ölçümlere başlanmadan önce cihazdaki sıcaklık, peltier ile istenilen değere ayarlanmış ve çözeltinin burada termal dengeye ulaşması için 15 dakika beklemesi sağlanmıştır.

Hazırlanan çözeltilerin absorpsiyon spektrumları UV-Vis-NIR spektrofotometre cihazı (Varian - Cary 5000) ile kaydedilmiştir. Ölçümler 1,0 cm'lik kuartz hücreler kullanılarak 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'de gerçekleştirilmiştir. Her ölçümden önce termal dengenin sağlanması için çözeltiler cihazın numune bölmesinde 15 dakika bekletilmiştir. Absorpsiyon spektrumları 200 – 600 nm dalga boyu aralığında kaydedilmiştir.

Saf HSA çözeltisine ve saf ligant çözeltilerine ait ölçümlerde referans madde olarak NaCl içeren tampon çözelti kullanılırken, HSA – ligant karışımlarına ait ölçümlerde ise karışımdakilerle aynı konsantrasyona sahip saf ligant çözeltileri kullanılmıştır.

Çalışmada, HSA proteini ile NHD maddesi arasında meydana gelen etkileşim sonucunda triptofan ve tirozin amino asit kalıntılarının mikroçevreleri hakkında bilgi edinilmesini sağlayan senkronize floresans ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Cui vd 2009a). Ölçümler fizyolojik sıcaklık olan 37 °C'de, $\Delta\lambda = 15$ nm ve $\Delta\lambda = 60$ nm değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Emisyon spektrumu 250 – 320 nm dalga boyu aralığında kaydedilmiştir. HSA-NHD karışımlarına ait senkronize floresans

ölçümlerinde referans madde olarak karışımdakiler ile aynı konsantrasyona sahip saf NHD çözeltileri kullanılmıştır.

Floresans ölçümlerinde, iç filtre etkisiyle protein molekülünü uyarmak için gönderilen ışığın bir kısmı çözeltideki ligant tarafından absorplanmak suretiyle azaltılabilir veya uyarılmış protein molekülü tarafından yayılan ışığın bir kısmı ligant tarafından absorplanabilir. Bu olayın floresans ölçümlerinde hatalara neden olmasını önlemek amacıyla, floresans ölçümlerinde iç filtre etkisi dikkate alınmalıdır. Bu amaç doğrultusunda ölçülen floresans şiddetlerine Eşitlik (3.1) yardımı ile düzeltme işlemi uygulanmıştır.

$$F_{\text{düz}} = F_{\text{göz}} \cdot e^{(A_{\text{uy}} + A_{\text{em}})/2} \quad (3.1)$$

Buradaki $F_{\text{düz}}$ ve $F_{\text{göz}}$ sırasıyla düzeltilmiş ve gözlenen floresans şiddetlerini temsil ederken; A_{uy} ve A_{em} de uyarılma ve emisyon dalga boylarında sistemin sahip olduğu absorbans değerlerini göstermektedir (Ding vd 2009).

HSA ile ligantlar arasında meydana gelen etkileşimlerin mekanizmasını ve bağlanma sabiti değerlerini belirlemek amacıyla floresans spektroskopisi ile yapılan ölçümlerden elde edilen veriler Stern – Volmer eşitliğinde (Eşitlik (3.2)) kullanılmaktadır (Lakowicz 1999, Bian vd 2004).

Stern – Volmer eşitliği;

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (3.2)$$

şeklindedir. Eşitlikteki F_0 ve F protein çözeltilisinin sırasıyla ligant yokluğundaki ve varlığındaki floresans şiddetlerini gösterir. Ayrıca, k_q sönmeme hız sabitini, τ_0 ligant yokluğunda proteinin floresans yarı ömür süresini, $[Q]$ ligantın konsantrasyonunu, K_{SV} ise Stern – Volmer sönmeme sabitini ifade etmektedir (Cui vd 2009a). Protein biyomolekülünün yarı ömrü olan τ_0 değeri 10^{-8} s'dir (Lakowicz ve Weber 1973, Cui vd 2009a).

15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C’de etkileşim gösteren protein-ligant sistemi için her bir sıcaklıkta F_0/F değerlerine karşı $[Q]$ değerleri grafiği (Stern – Volmer grafiği) çizilmiştir. Bu grafiklerin eğiminden K_{SV} (Stern – Volmer sönümlenme sabiti) değerleri elde edilmiştir (Lakowicz 2006, Sen vd 2009).

HSA ile ligant arasında gerçekleşen bağlanma olayına ait bağlanma sabiti değerinin ve HSA molekülü başına ligant bağlanma yeri sayısının (n ’nin) hesaplanması için Eşitlik (3.3) kullanılmıştır.

$$\log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \log K_a + n \log [Q] \quad (3.3)$$

Burada, Eşitlik (3.2)’den farklı olarak bulunan K_a bağlanma sabitini ve n ise bir HSA molekülü başına ligant bağlanma yeri sayısını ifade etmektedir (Xie vd 2006, Han vd 2009). HSA – ligant sistemine ait K_a ve n değerleri $\log (F_0 - F)/F$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiğinin çizilmesi ile hesaplanabilmektedir. Bu lineer grafiğin eğiminden n değeri ve kayımından K_a değeri elde edilmektedir (Han vd 2012).

Protein ile ligant arasında meydana gelen etkileşimin doğasını anlamak için termodinamik parametre değerlerinin hesaplanması gerekmektedir. Termodinamik parametre değerleri arasında entalpi değişimi (ΔH), entropi değişimi (ΔS) ve Gibbs serbest enerji değişimi (ΔG) yer almaktadır. Van’t Hoff eşitliği sayesinde ΔH ve ΔS değerleri hesaplanabilmektedir.

Van’t Hoff eşitliği;

$$\ln K_a = - \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3.4)$$

şeklinde ifade edilmektedir. Eşitlikteki K_a değeri çalışılan T sıcaklığındaki bağlanma sabitini ve R ideal gaz sabitini ifade etmektedir. Van’t Hoff eşitliğine göre $\ln K_a$ ’ya karşı $1/T$ grafiğinin eğiminden ΔH değeri ve kayımından da ΔS değeri elde edilmektedir

(Cui vd 2006, Han vd 2009). ΔG değeri ise çalışılan tüm sıcaklıklar için ayrı ayrı Eşitlik (3.5)'in kullanılması ile hesaplanabilmektedir (Han vd 2009).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3.5)$$

Eşitlikler (3.4) ve (3.5)'in kullanılmasıyla elde edilen termodinamik parametre değerlerinin büyüklükleri ve işaretleri değerlendirilerek ligantların HSA'ya bağlanmasında ne tür etkileşimlerin meydana geldiği konusunda bilgi sağlanmıştır (Bian vd 2004).

Protein-ligant etkileşimleri sonucunda proteinin sekonder yapıları değişebilmektedir. Proteinin sekonder yapısında meydana gelebilecek değişiklikler, proteinin fonksiyonel özelliklerinde farklılıklara yol açabilmektedir. Protein-ligant etkileşimlerinde proteinin sekonder yapısı üzerinde ligant maddesi etkisinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla, farklı konsantrasyonlarda NHD içeren sabit konsantrasyondaki HSA çözeltisinin dairesel dikroizm (CD) spektrumları çekilmiştir. CD ölçümleri, TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

CD ölçümleri için bir seri protein-ligant karışım çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm karışımlardaki HSA konsantrasyonu $3,0 \times 10^{-6}$ M olarak sabit tutulurken; NHD konsantrasyonları ise 0 M, $6,0 \times 10^{-6}$ M, $18,0 \times 10^{-6}$ M ve $30,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde arttırılmıştır. CD ölçümlerinde referans çözelti olarak; ligant içermeyen saf HSA çözeltisi için 0,1M NaCl içeren 0,05M'lık tris(hidroksimetil)aminometan tampon çözeltisi ve HSA-NHD karışım çözeltileri için karışımdakilerle aynı konsantrasyona sahip 0,1M NaCl içeren 0,05M'lık tris(hidroksimetil)aminometan tamponunda hazırlanmış saf NHD çözeltileri kullanılmıştır.

CD ölçümleri; 25 °C sıcaklıkta, 200-250 nm dalga boyu aralığında, 1 nm'lik dalga boyu aralıklarında, 20 nm/dakika'lık tarama hızında, her bir CD spektrumu için 3 tarama ortalamasının alınmasıyla 0,5 mm'lik küvet kullanılarak Jasco marka J-815 model CD spektrometresinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan CD ölçümlerinde, farklı

dalga boylarında saf protein çözeltisinin ve bazı protein-ligant karışım çözeltilerinin ellipsiti, θ , (mdeg) değerleri elde edilmiştir. Daha sonra, ligant yokluğundaki ve varlığındaki HSA proteininin CD spektrumlarından yararlanılarak ligantla etkileşim sonucunda proteinin sekonder yapısı üzerinde meydana gelmiş herhangi bir değişikliğin olup olmadığı belirlenmiştir.

CD spektrumları ortalama kalıntı elliptisiti (θ_{MRD}) terimiyle $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ olarak aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir (Jin ve Zhang 2008):

$$\theta_{MRD} = [\text{CD}_g] / [C_p \cdot l \cdot n_r \cdot 10] \quad (3.6)$$

buradaki CD_g gözlenen elliptisiti değerini, C_p protein konsantrasyonunu, l ışık yolunu ve n_r proteindeki amino asit kalıntı sayısını göstermektedir. Saf proteinin ve protein-ligant karışım çözeltilerindeki proteinin α -heliks içeriği 208 nm'deki θ_{MRD} değerlerinden yararlanılarak Eşitlik (3.7)'nin kullanılmasıyla hesaplanmıştır (Jin ve Zhang 2008):

$$\alpha\text{-heliks (\%)} = [-\theta_{MRD208} - 4000] \cdot 100 / [33000 - 4000] \quad (3.7)$$

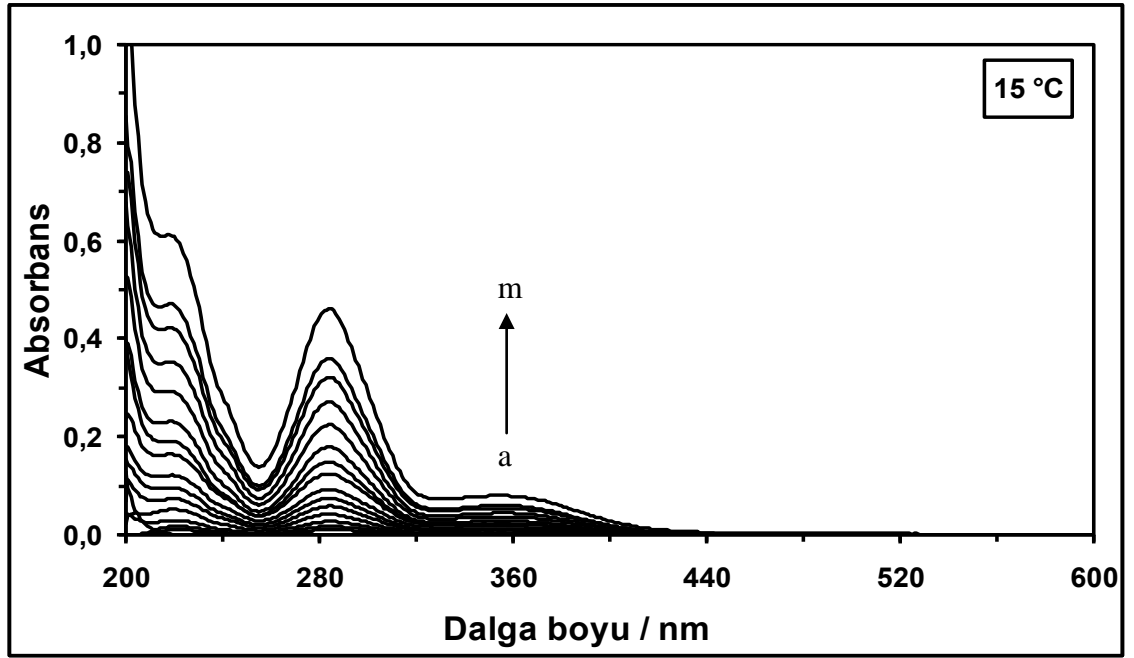
buradaki θ_{MRD208} 208 nm'de belirlenmiş θ_{MRD} değerini göstermektedir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

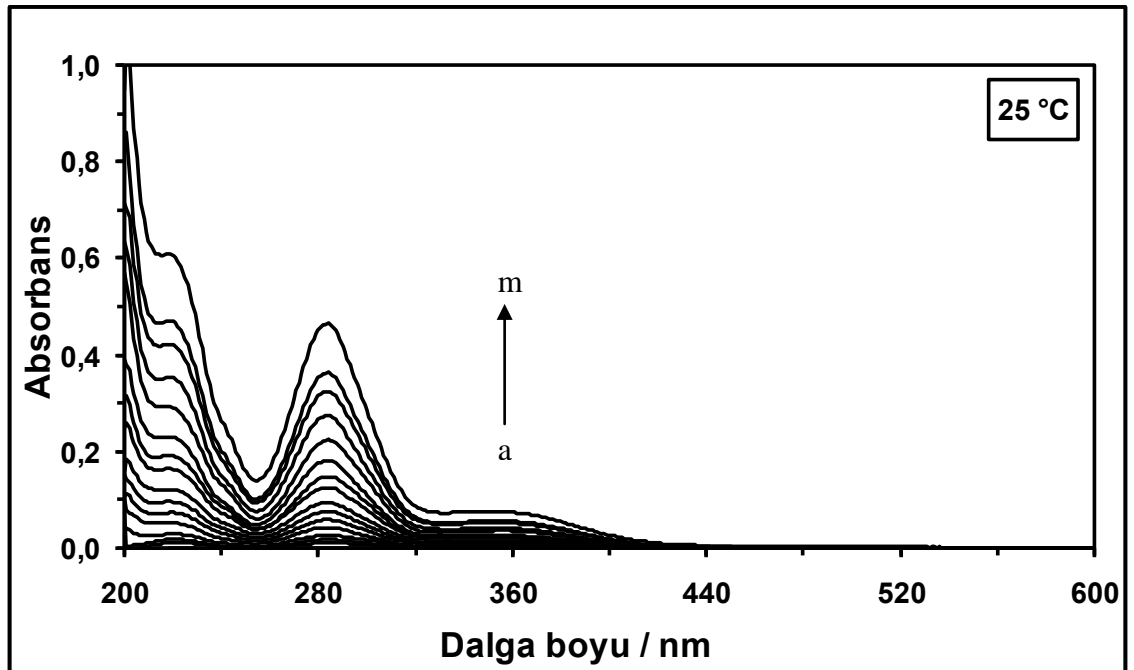
4.1. HSA – NHD ve HSA – MHC Sistemlerindeki Etkileşimlerin Floresans Spektroskopisi ile İncelenmesi

Çalışmada, HSA – NHD ve HSA – MHC sistemlerindeki etkileşimler floresans spektroskopisi tekniği ile 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C sıcaklıklarda araştırılmıştır. Floresans spektroskopisi ile yapılan çalışmalarda iç filtre etkisi göz önünde bulundurulmalıdır. İç filtre etkisi, madde konsantrasyonu ile floresans şiddeti arasındaki doğru orantının sapmasına ve floresans şiddeti ölçümlerinde hatalara sebep olmaktadır (Lutz ve Luisi 2004, Ding vd 2009). Floresans spektroskopisi ile yapılan bazı çalışmalarda iç filtre etkisi göz önünde bulundurulmamıştır (Kubista vd 1994, Ding vd 2009). Gerçekleştirilen bu çalışmada, iç filtre etkisi nedeniyle floresans şiddeti ölçümlerinde meydana gelebilecek hataları ortadan kaldırmak amacıyla çalışılan her bir sistem için ölçülmüş floresans şiddeti değerlerinin Eşitlik (3.1)'de kullanılmasıyla düzeltilmiş floresans şiddeti değerleri elde edilmiştir ve çalışmada bu değerler kullanılmıştır. Ölçülen floresans şiddeti değerlerinin düzeltilebilmesi için sistemin uyarılma ve emisyon dalga boylarında sahip olduğu absorbans değerlerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla, ilk olarak HSA-NHD sistemi için çalışılan konsantrasyonlardaki saf NHD, saf HSA ve HSA-NHD karışım çözeltilerinin ve HSA-MHC sistemi için çalışılan konsantrasyonlardaki saf MHC, saf protein ve HSA-MHC karışım çözeltilerinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'deki UV-visible absorpsiyon spektrumları elde edilmiştir.

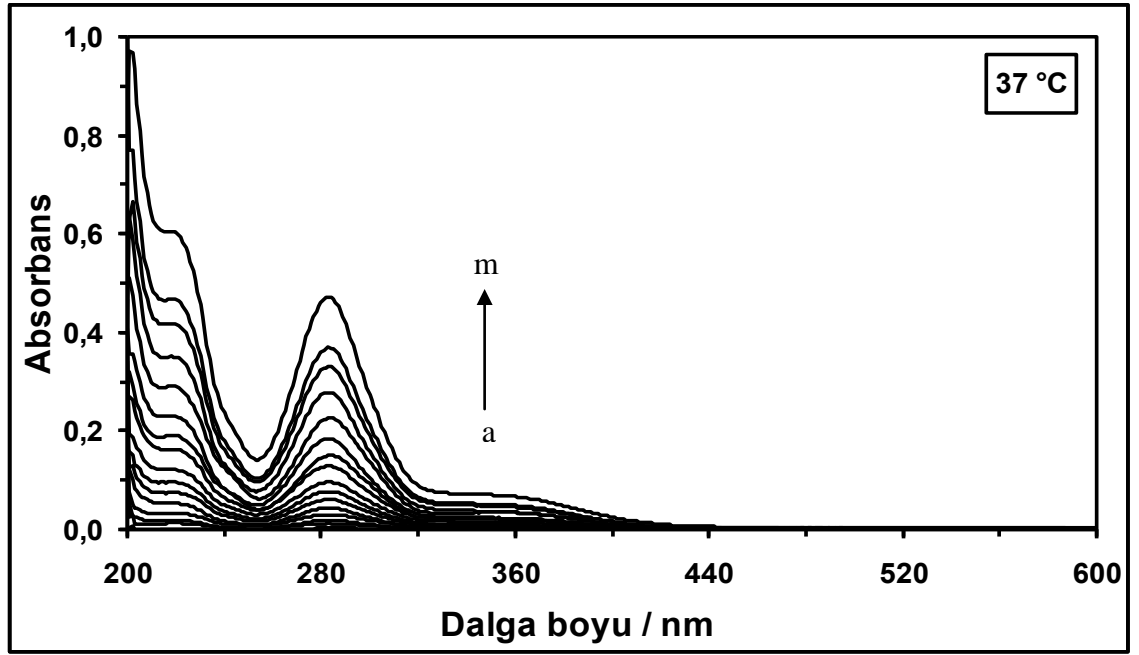
15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C sıcaklıklarda kaydedilen absorpsiyon spektrumları saf NHD için sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te, saf HSA ve HSA-NHD karışımları için Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de, saf MHC için Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de ve saf HSA ve HSA-MHC karışımları için Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



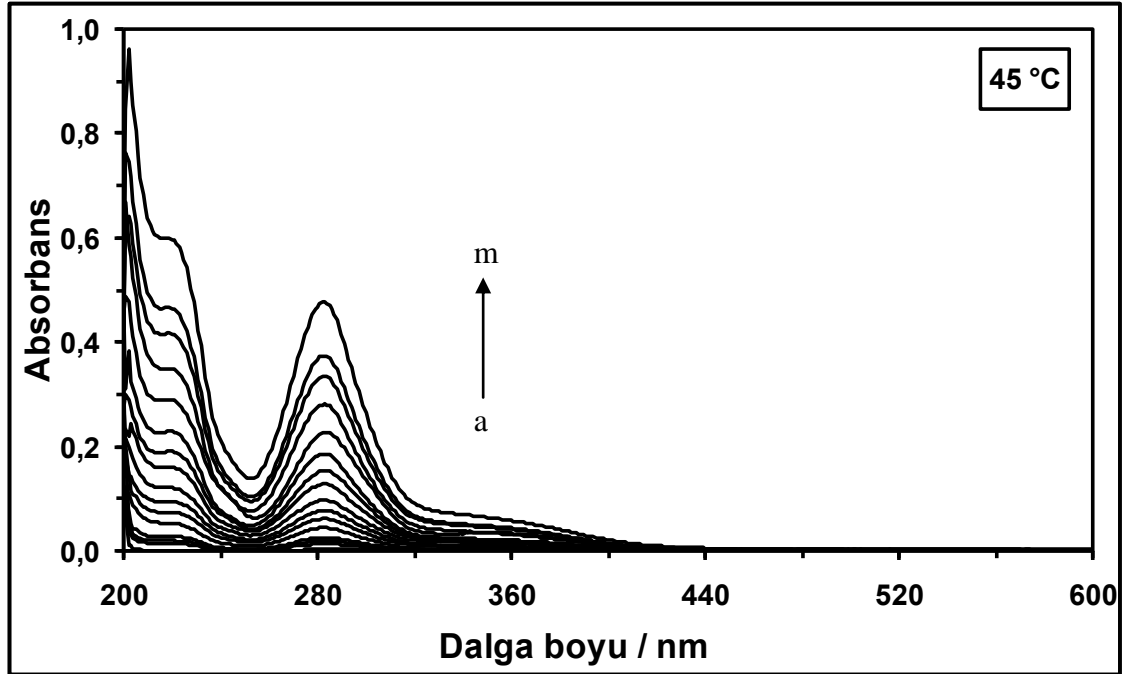
Şekil 4.1. 15 °C’de farklı konsantrasyonlardaki NHD maddesinin absorpsiyon spektrumları. [NHD] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M



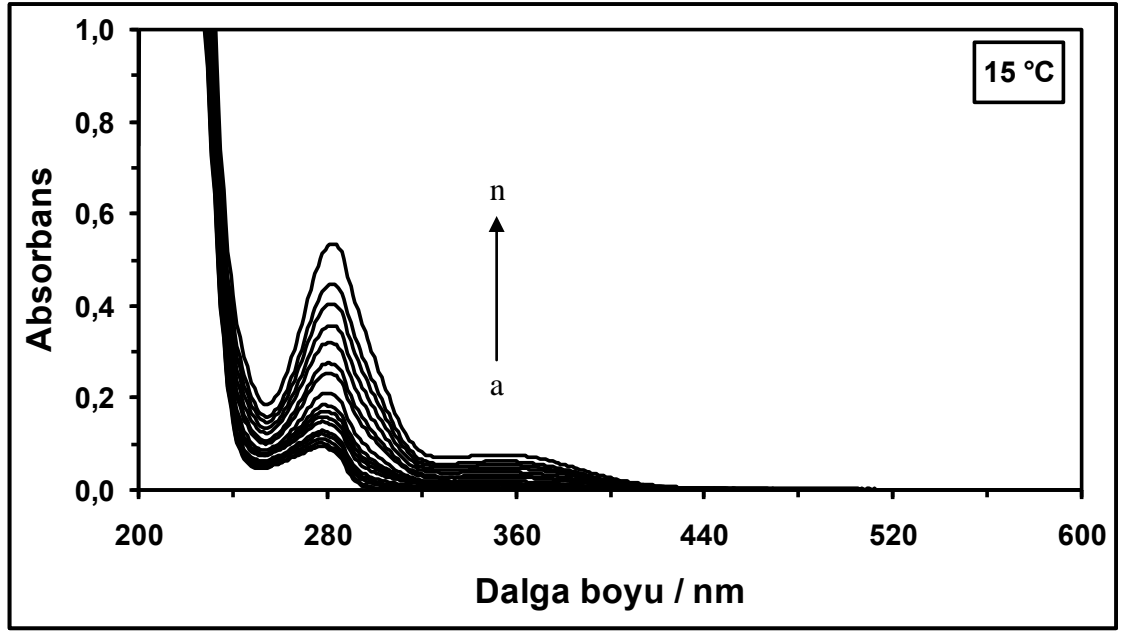
Şekil 4.2. 25 °C’de farklı konsantrasyonlardaki NHD maddesinin absorpsiyon spektrumları. [NHD] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M



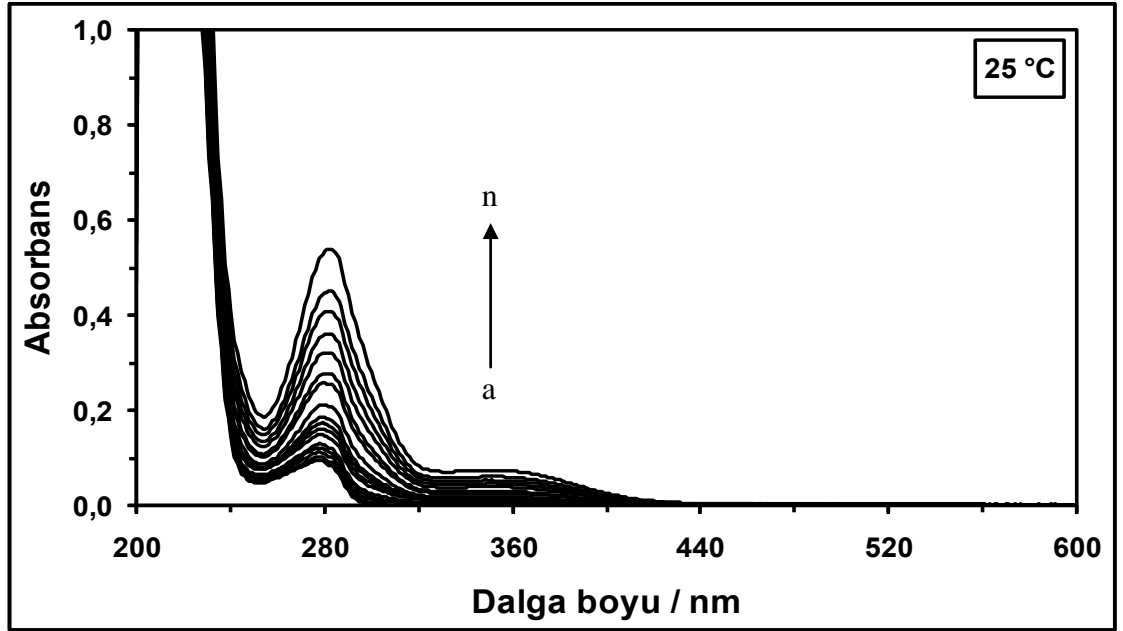
Şekil 4.3. 37 °C’de farklı konsantrasyonlardaki NHD maddesinin absorpsiyon spektrumları. [NHD] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M



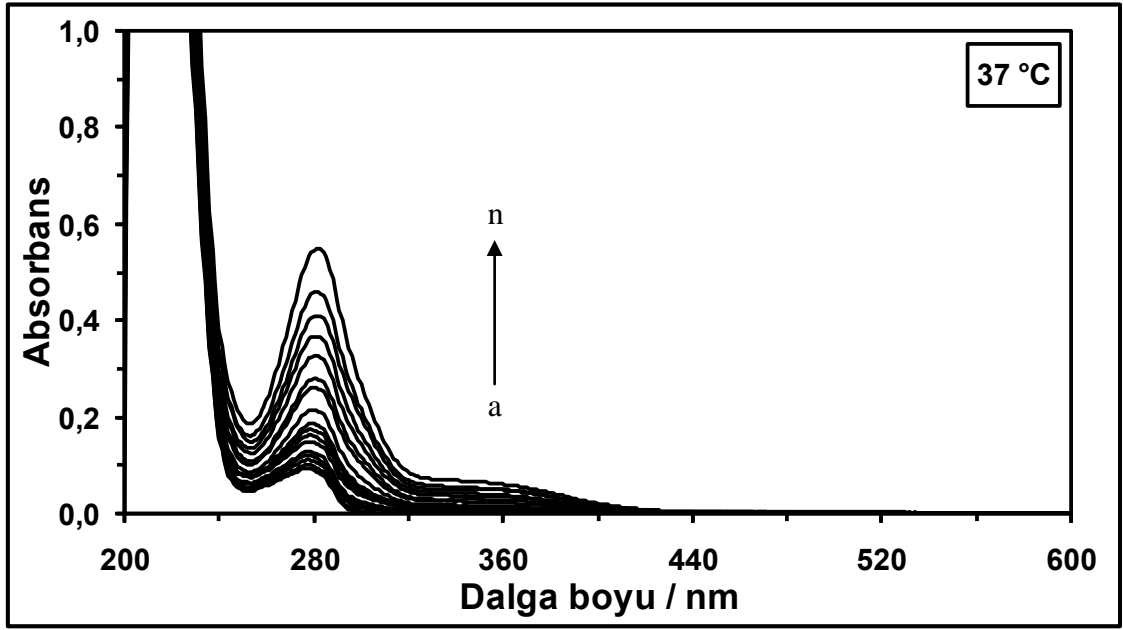
Şekil 4.4. 45 °C’de farklı konsantrasyonlardaki NHD maddesinin absorpsiyon spektrumları. [NHD] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M



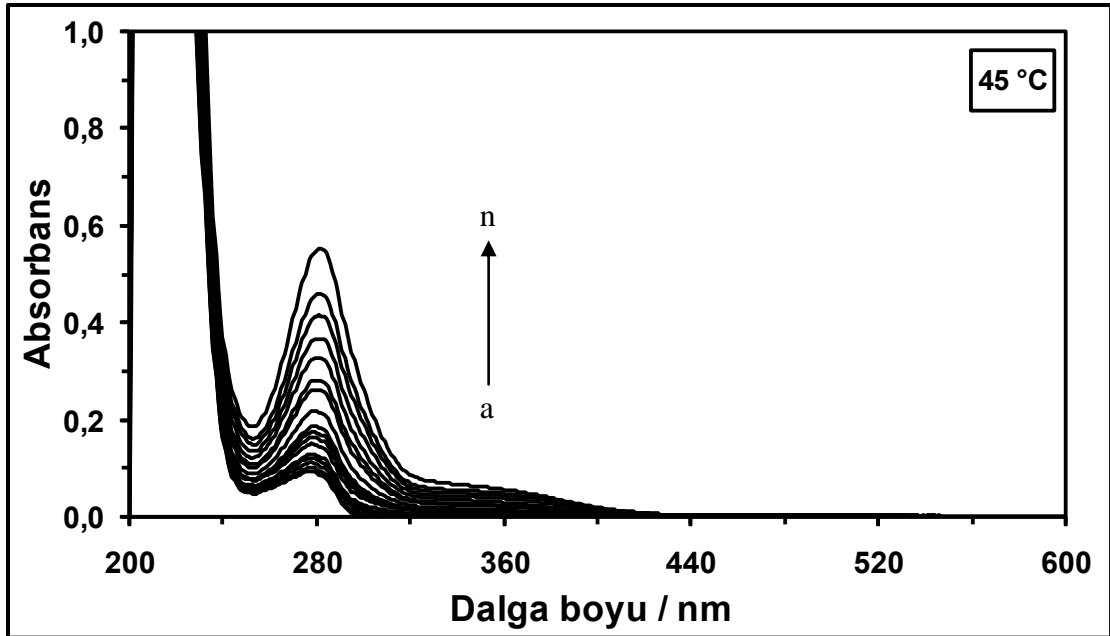
Şekil 4.5. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [NHD] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M



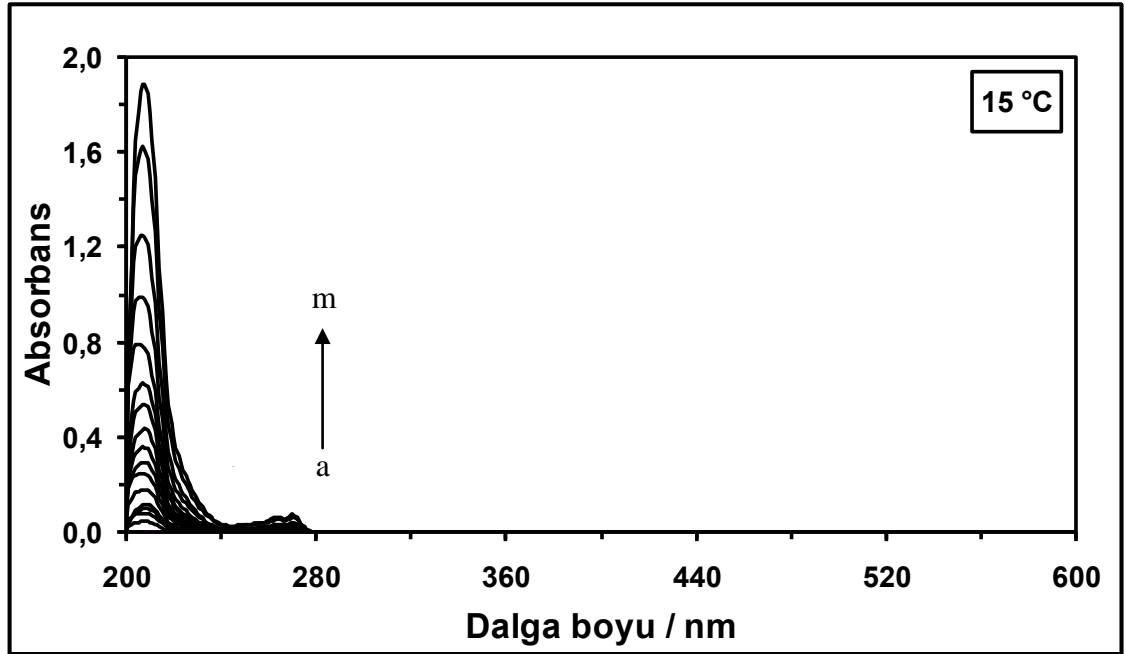
Şekil 4.6. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [NHD] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M



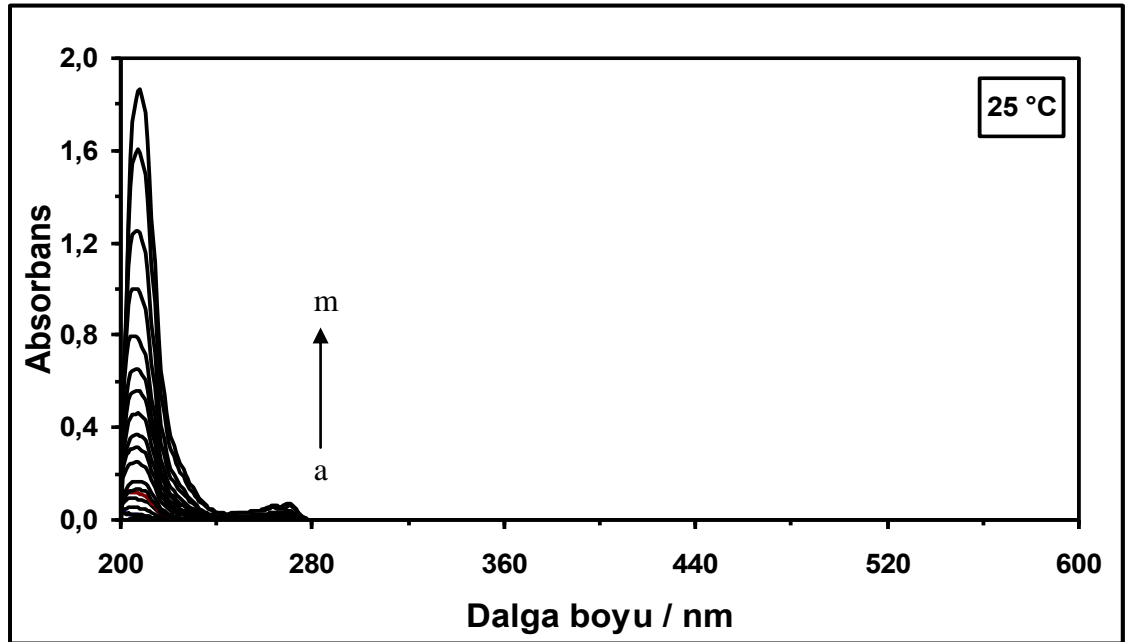
Şekil 4.7. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [NHD] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M



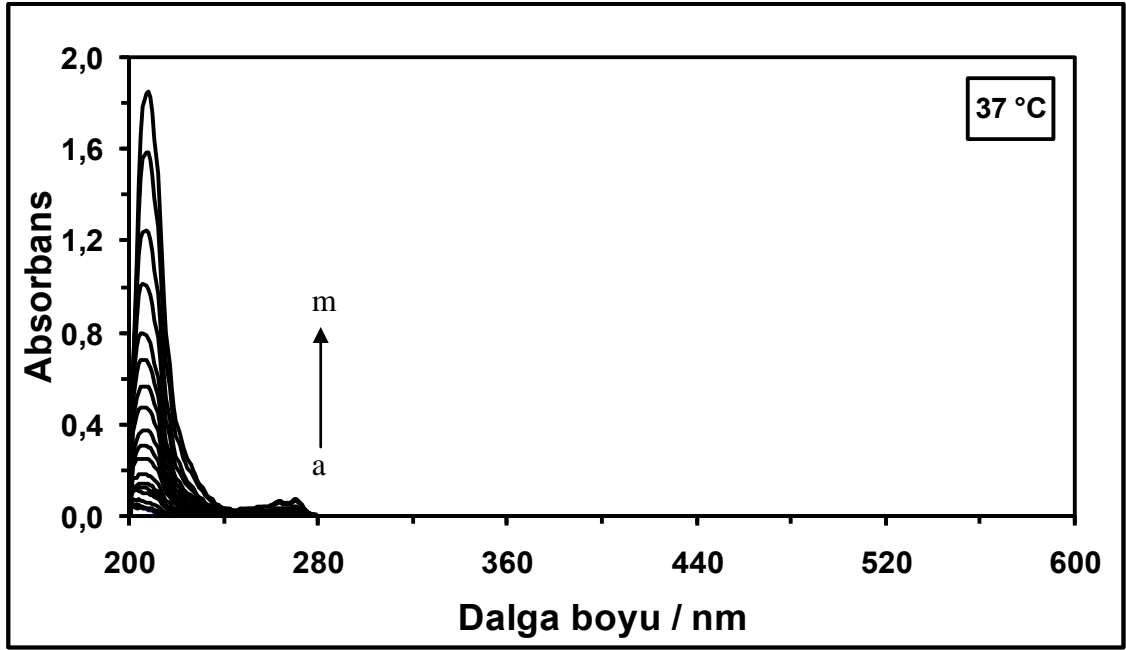
Şekil 4.8. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [NHD] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M



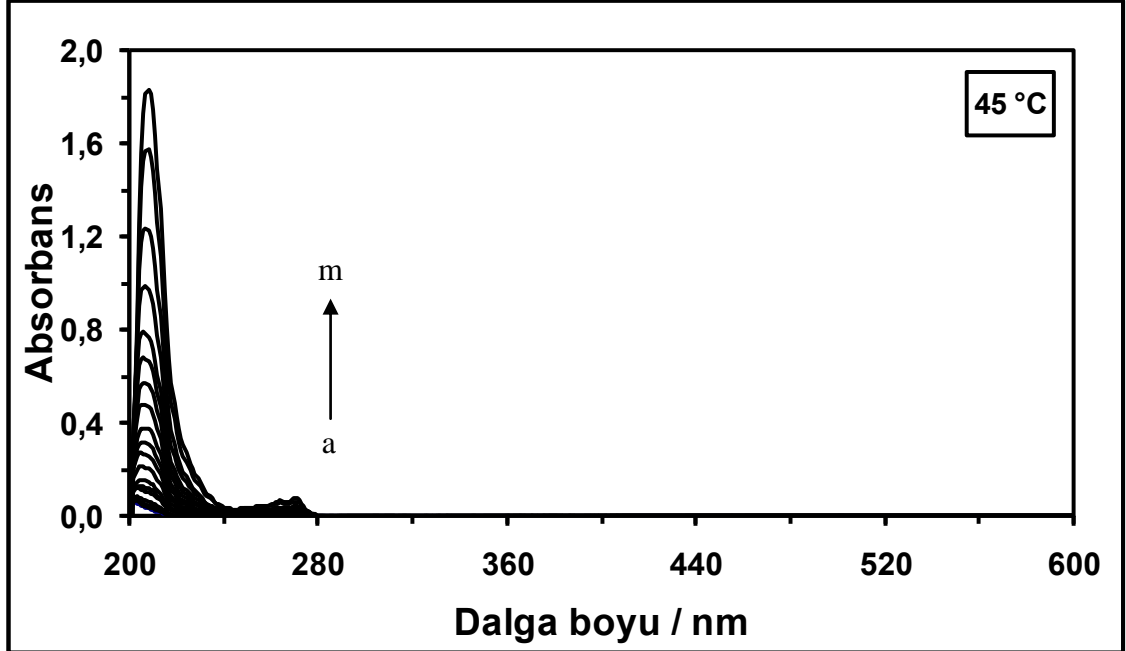
Şekil 4.9. 15 °C’de farklı konsantrasyonlardaki MHC maddesinin absorpsiyon spektrumları. [MHC] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M



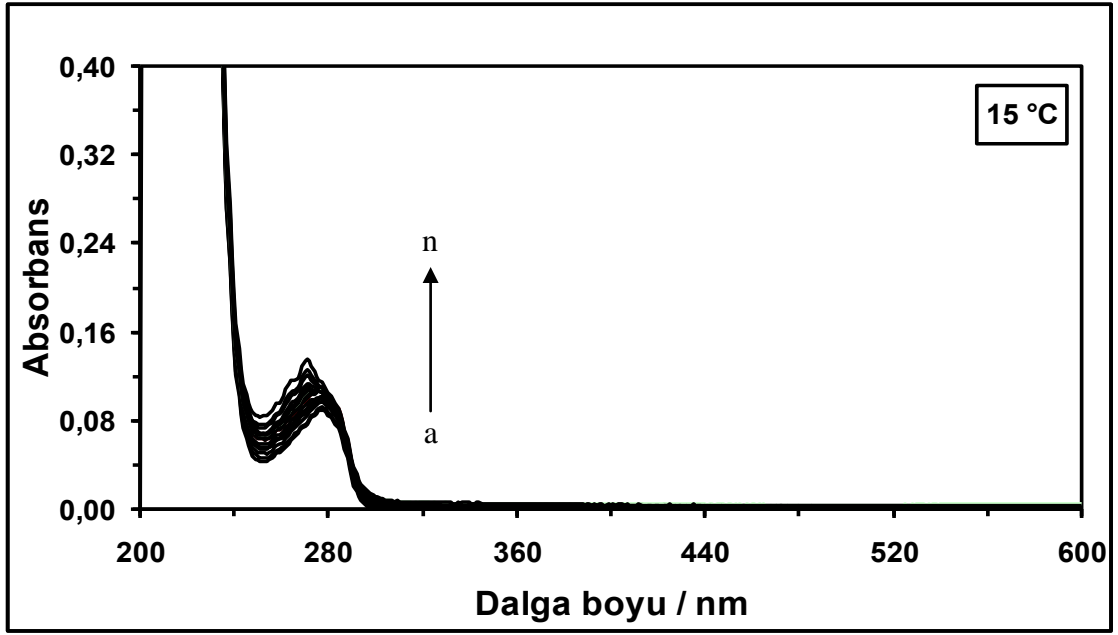
Şekil 4.10. 25 °C’de farklı konsantrasyonlardaki MHC maddesinin absorpsiyon spektrumları. [MHC] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M



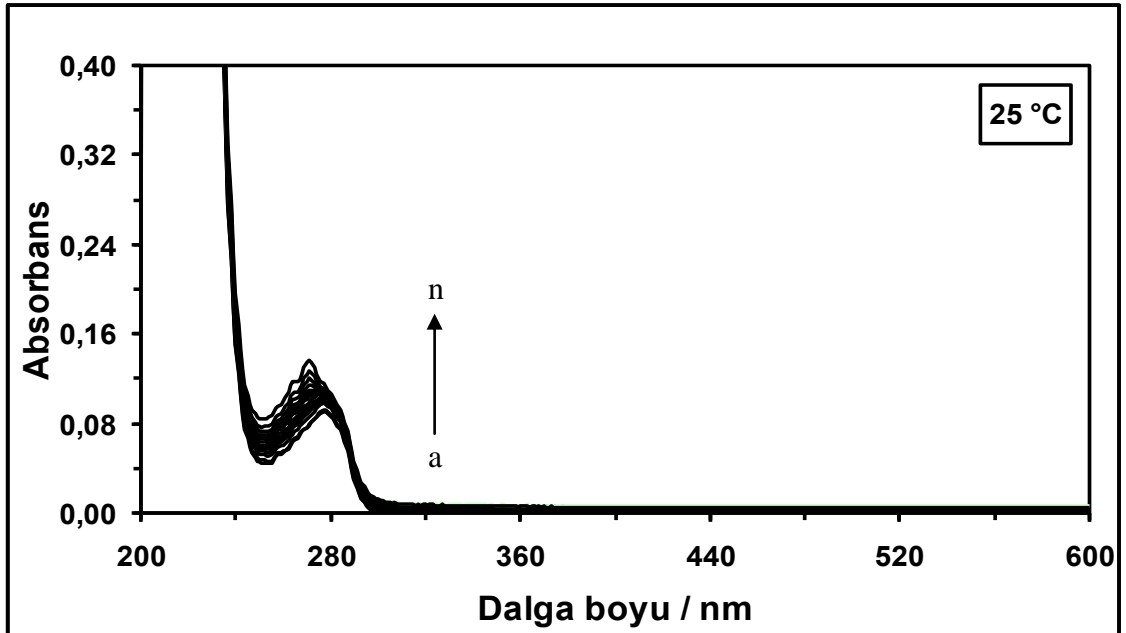
Şekil 4.11. 37 °C'de farklı konsantrasyonlardaki MHC maddesinin absorpsiyon spektrumları. [MHC] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M



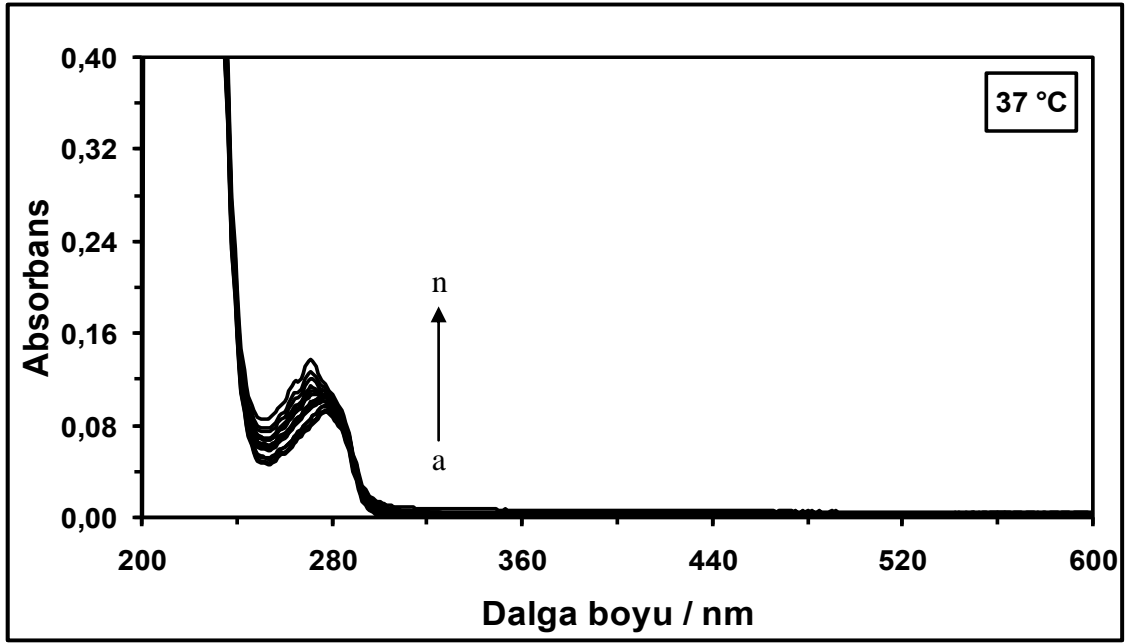
Şekil 4.12. 45 °C'de farklı konsantrasyonlardaki MHC maddesinin absorpsiyon spektrumları. [MHC] = (a) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $30,0 \times 10^{-6}$ M



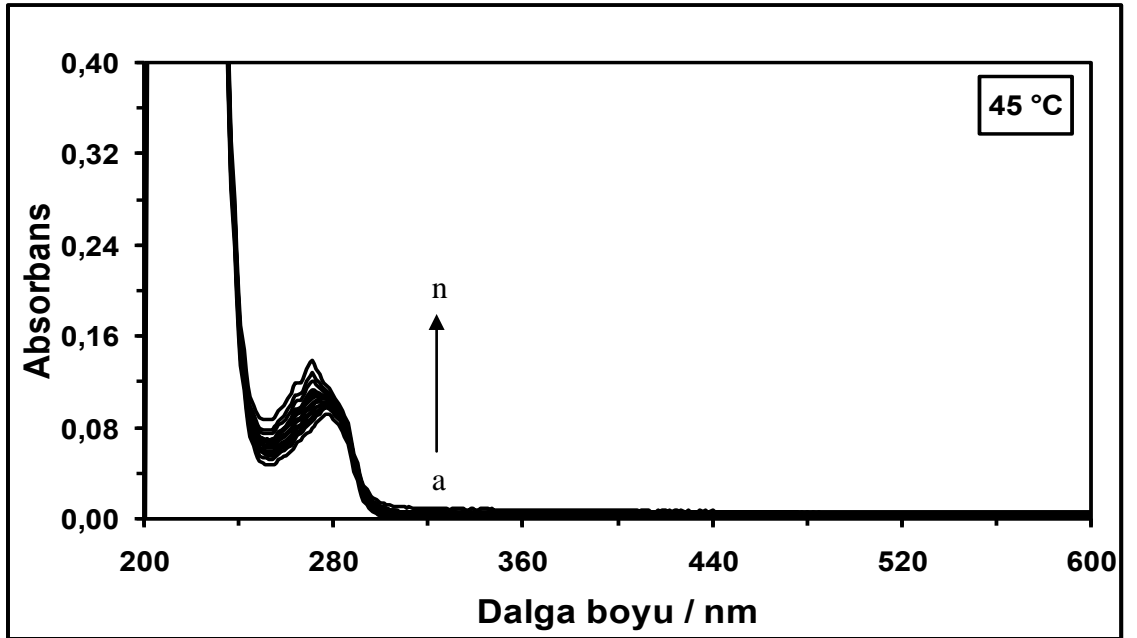
Şekil 4.13. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [MHC] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M



Şekil 4.14. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [MHC] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M

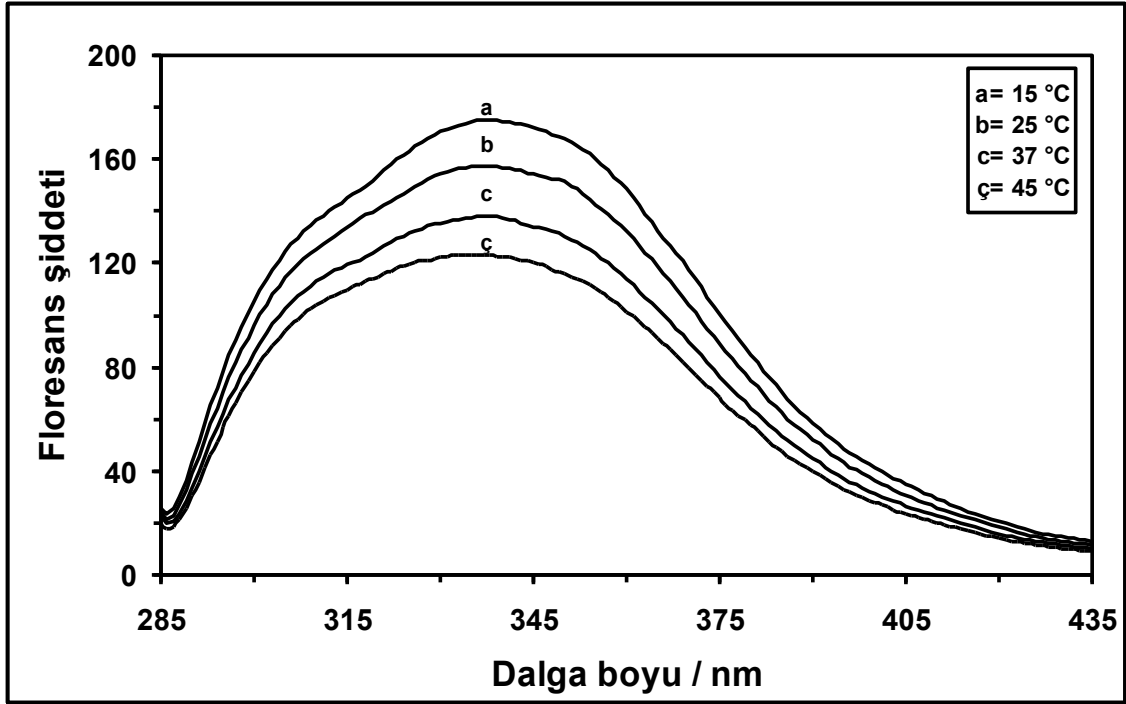


Şekil 4.15. 37 °C'de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [MHC] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M



Şekil 4.16. 45 °C'de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. Çözeltideki [MHC] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M

HSA-NHD ve HSA-MHC sistemlerindeki etkileşimler floresans spektroskopisi yöntemi ile incelenirken öncelikle $3,0 \times 10^{-6}$ M'lık saf HSA çözeltisine ait floresans şiddeti değerleri ölçülmüştür. 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C sıcaklıklarda kaydedilmiş saf HSA proteinine ait emisyon spektrumları Şekil 4.17'de gösterilmiştir.

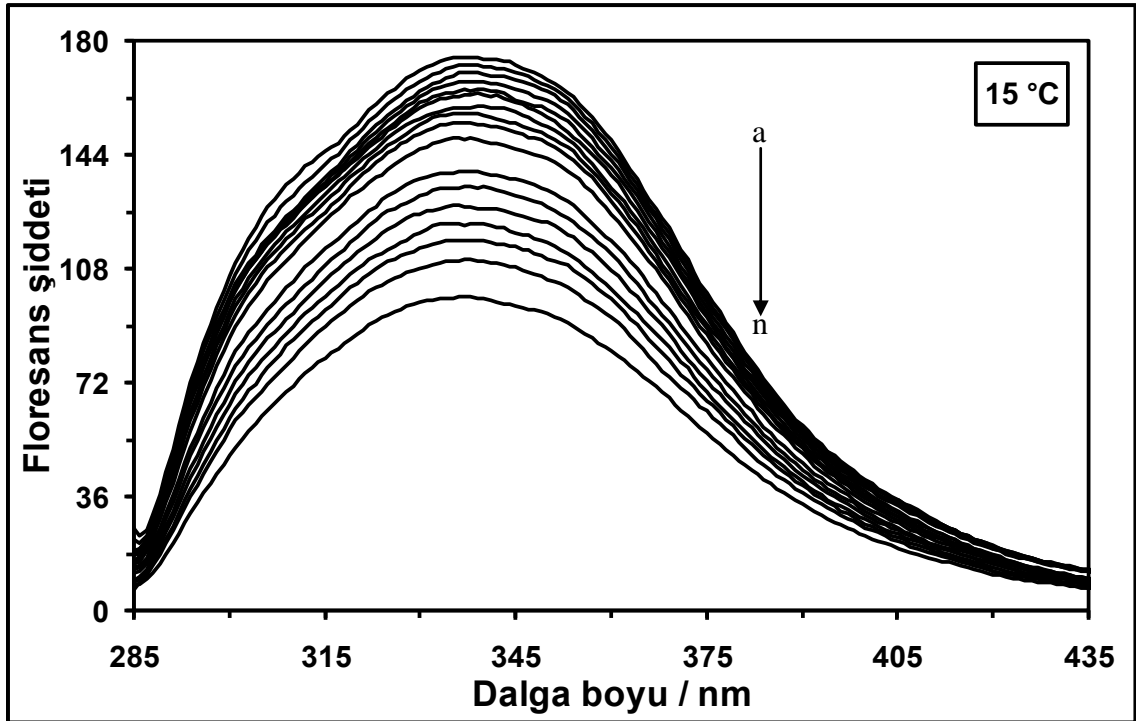


Şekil 4.17. $3,0 \times 10^{-6}$ M saf HSA çözeltisinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'deki emisyon spektrumları

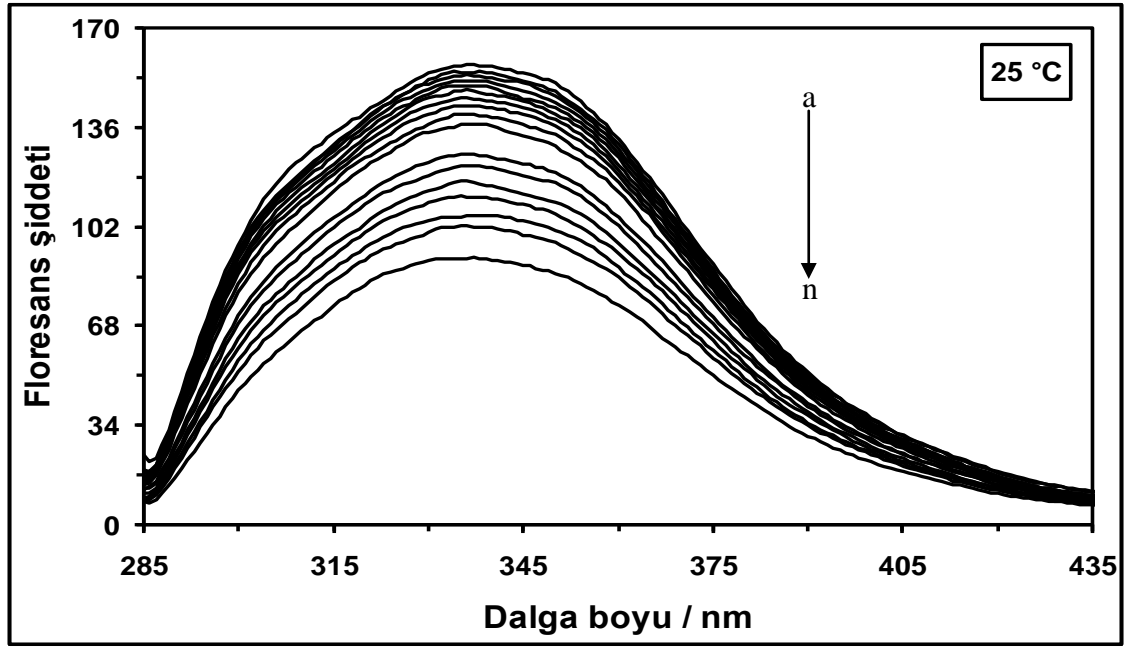
Şekil 4.17 incelendiğinde, 15 °C'de $3,0 \times 10^{-6}$ M'lık saf HSA çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyunun 335 nm olduğu görülmektedir. Ayrıca, çözelti sıcaklığının artması, maksimum emisyon dalga boyu değerinde herhangi bir kaymaya yol açmamaktadır. Ancak, artan sıcaklık ile birlikte saf HSA proteininin maksimum emisyon dalga boyundaki floresans şiddetinde bir azalma meydana gelmektedir. Jang vd (2009) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, 280 nm dalga boyunda $2,00 \times 10^{-6}$ M'lık HSA çözeltisinin uyarılması gerçekleştirilmiş ve proteinin maksimum emisyon dalga boyu 336 nm'de gözlenmiştir (Jang vd 2009). Naik vd (2010) tarafından yapılan bir başka çalışmada da benzer şekilde, $5,00 \times 10^{-6}$ M'lık HSA çözeltisi 280 nm'de uyarılmış ve protein çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyu 336 nm olarak belirlenmiştir (Naik vd 2010). Li vd (2007)'nin gerçekleştirmiş olduğu çalışmada ise HSA çözeltisi

280 nm dalga boyunda uyarılmış ve maksimum emisyon piki 334 nm’de gözlenmiştir (Li vd 2007).

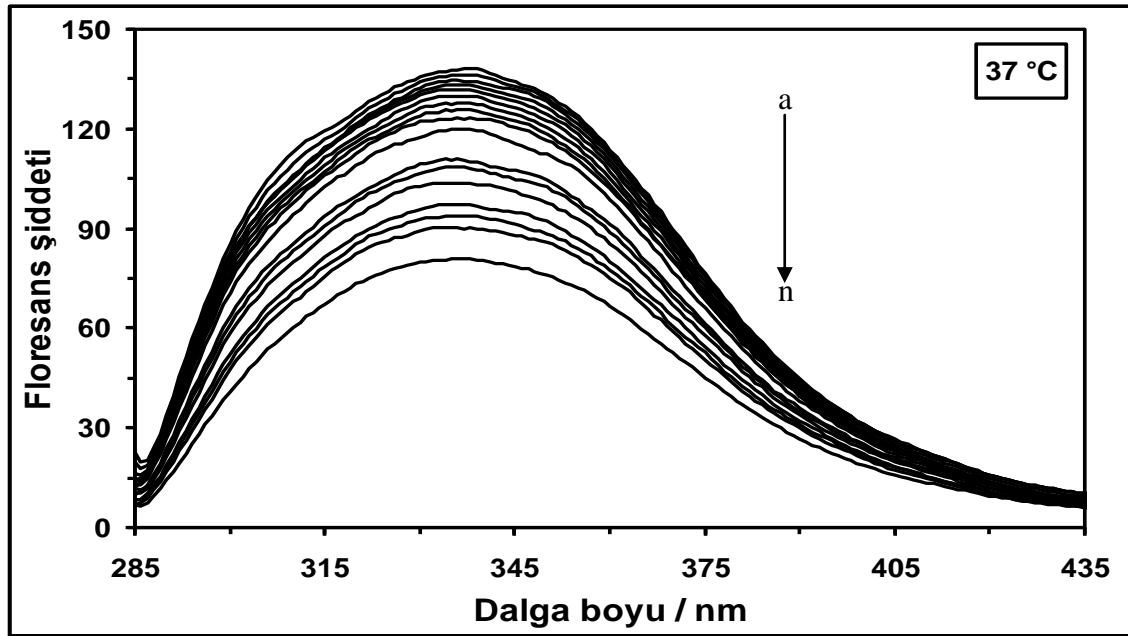
HSA proteinine ait emisyon spektrumları elde edildikten sonra, farklı konsantrasyonlarda NHD maddesi varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M’lık HSA çözeltisinin emisyon spektrumları 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C’de alınmıştır. Farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında kaydedilmiş olan $3,0 \times 10^{-6}$ M’lık HSA çözeltisinin emisyon spektrumları 15 °C için Şekil 4.18’de, 25 °C için Şekil 4.19’da, 37 °C için Şekil 4.20’de ve 45 °C için Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



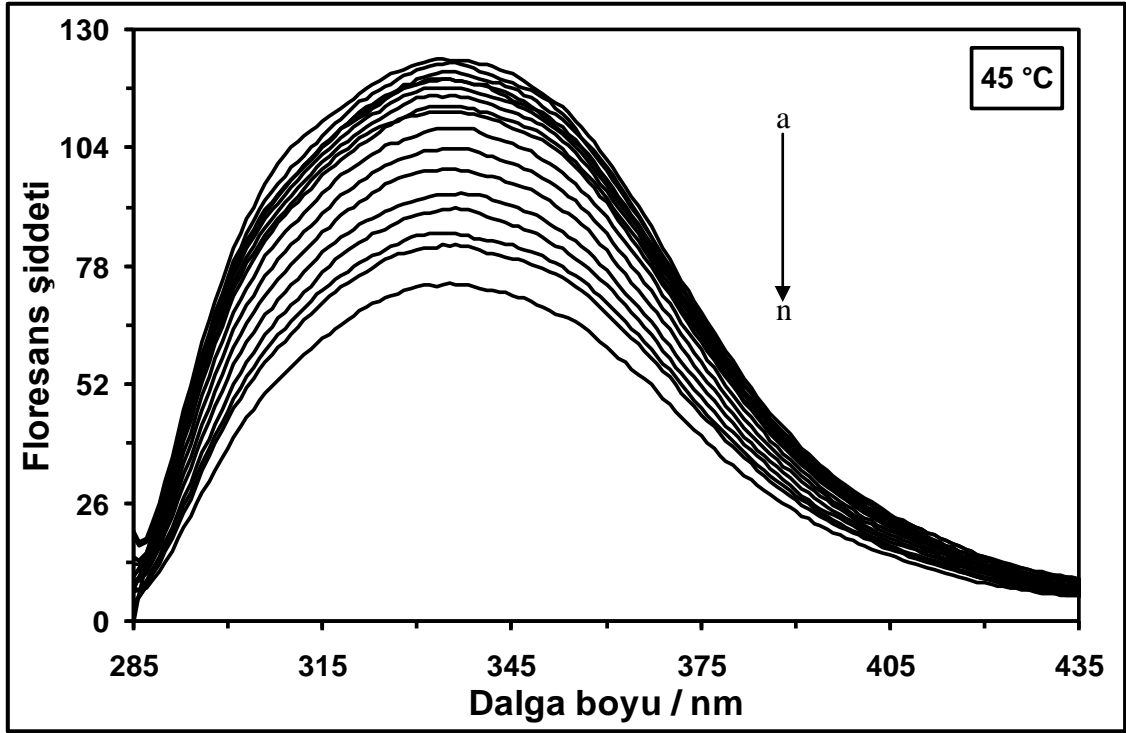
Şekil 4.18. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. Çözeltideki [NHD] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M



Şekil 4.19. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. Çözeltideki $[NHD] =$ (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M



Şekil 4.20. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. Çözeltideki $[NHD] =$ (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M



Şekil 4.21. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. Çözeltideki $[NHD] =$ (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M

HSA proteininin floresans özelliği triptofan, tirozin ve fenilalanin amino asit kalıntılarından kaynaklanır. Ancak, HSA proteininin floresans özelliği çoğunlukla triptofan amino asitindedir. Fenilalanin amino asitinin kuantum verimi çok düşüktür. Tirozin amino asiti, iyonlaşmış ise veya bir amino grubuna, bir karboksil grubuna veya triptofan amino asitine yakın konumda bulunuyorsa, HSA’nın sönmüleme prosesine bir katkıda bulunmamaktadır. HSA proteinine bağlanan maddeler, HSA proteininin floresans şiddetini azaltmaktadır. Bu azalma, HSA proteininin yapısında bulunan triptofan amino asitinin mikro çevresinin değişmesinden kaynaklanmaktadır (Wang vd 2008, Cui vd 2009b).

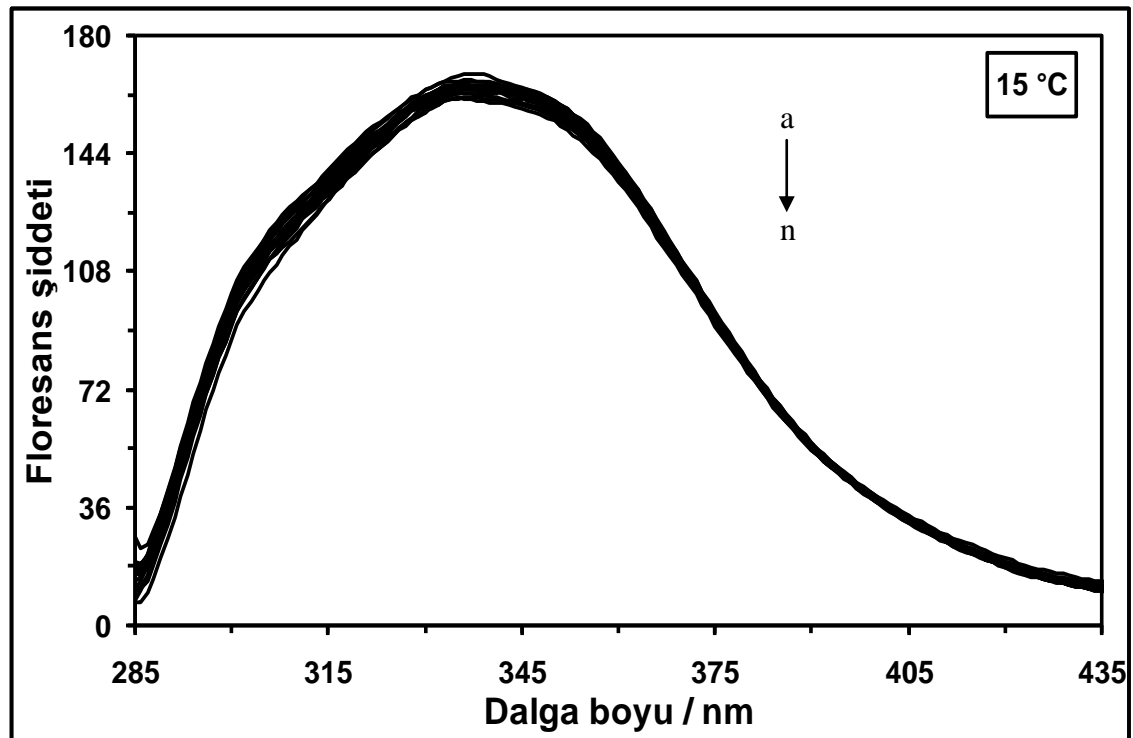
Elde edilen emisyon spektrumları incelendiğinde (bkz. Şekil 4.18-4.21), çözeltideki artan NHD konsantrasyonu ile birlikte HSA proteininin maksimum emisyon dalga boyundaki floresans şiddetinde bir azalma meydana geldiği görülmektedir. Bu

durum, HSA proteini ile NHD maddesi arasında bir etkileşimin gerçekleştiğini göstermektedir. HSA proteini, 335 nm dalga boyunda maksimum emisyon göstermektedir. NHD maddesinin eklenmesi ile proteinin floresans şiddetinde bir azalma meydana gelirken, maksimum emisyon dalga boyunda ise herhangi bir kayma gözlenmemektedir. Maksimum emisyon dalga boyunda bir değişikliğin olmaması, proteinin lokal dielektrik çevresinde bir değişiklik olmadığını gösterir. HSA proteini ile NHD maddesi arasındaki etkileşim, çalışılan tüm sıcaklık değerlerinde (15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'de) gerçekleşmektedir.

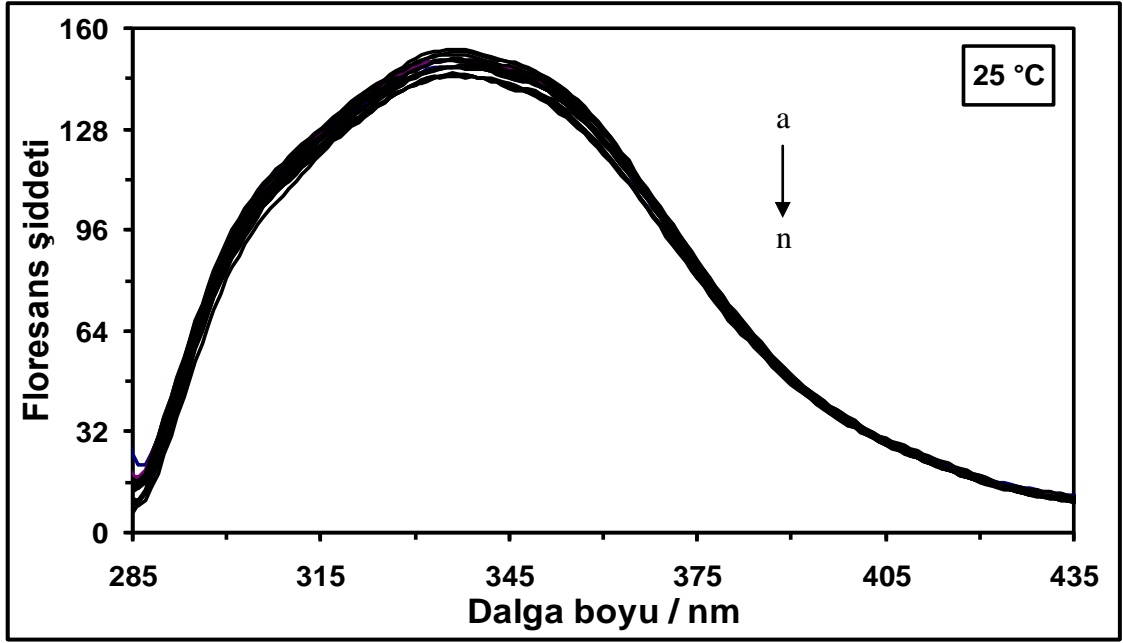
Cui vd (2009a) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 5-metilüridin maddesi ile HSA proteini arasında meydana gelen etkileşim incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada, HSA proteininin floresans şiddeti, 5-metilüridin konsantrasyonunun artırılması ile fazla miktarda azalmıştır. Bu durum, HSA proteini ile 5-metilüridin arasında güçlü bir etkileşimin meydana geldiğini göstermiştir. Ayrıca; gerçekleşen etkileşim, triptofan amino asitinin mikro çevresinde ve HSA proteininin tersiyer yapısında değişikliklere neden olmuştur (Cui vd 2009a). Wang vd (2008) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise farmakolojik aktiviteye sahip piridazinon türevi bir bileşik olan (5-kloro-2-nitro-N-(4-(6-okso-1,4,5,6-tetrahidropiridazin-3-il)fenil)benzamin (CNPB'nin), HSA proteinine bağlanması araştırılmıştır. Benzer şekilde, sabit konsantrasyonda HSA proteini varlığında CNPB ilaç maddesi konsantrasyonunun düzenli bir şekilde artırılması ile yapılan floresans spektroskopisi ölçümlerinde, HSA proteinine ait floresans şiddetinde bir azalmanın gerçekleştiği görülmüştür. Ayrıca, maksimum emisyon dalga boyunun 350,6 nm'den CNPB ilaç maddesinin eklenmesi ile 355,8 nm'ye doğru kaydığı gözlenmiştir. Bu durum, CNPB maddesi ile HSA proteini arasında bir etkileşimin gerçekleştiğini ve ortama ilaç maddesinin eklenmesi ile HSA proteininin yapısında bir değişikliğin meydana geldiğini göstermiştir (Wang vd 2008). Li vd (2007) tarafından yapılan benzer bir çalışmada da rein ilaç maddesi ile HSA proteini arasında bir etkileşimin gerçekleştiği, HSA proteinine ait floresans şiddetinin rein ilaç maddesi eklenmesi ile azalmasından anlaşılmıştır. İlaç konsantrasyonunun artırılması ile protein emisyon spektrumundaki sönümlenmenin de arttığı görülmüştür (Li vd 2007). Cui vd (2006) yaptıkları çalışmada, farklı konsantrasyonlarda tiyoüre türevi bir ilaç maddesi olan N-(p-klorofenil)-N-(1-naftil) tiyoüre (CPNT) ile sabit konsantrasyonda HSA

proteininden oluşan karışımların floresans spektrumlarını incelemişler ve proteinin floresans emisyon şiddetinin artan CPNT miktarı ile azaldığını ve maksimum emisyon dalga boyunda herhangi bir kaymanın olmadığını belirtmişlerdir. Bu sonuç, HSA ile CPNT arasında bir etkileşimin meydana geldiğini göstermiştir. Ayrıca, bağlanma işlemi, proteinin lokal dielektrik çevresinde bir değişikliğe yol açmamıştır.

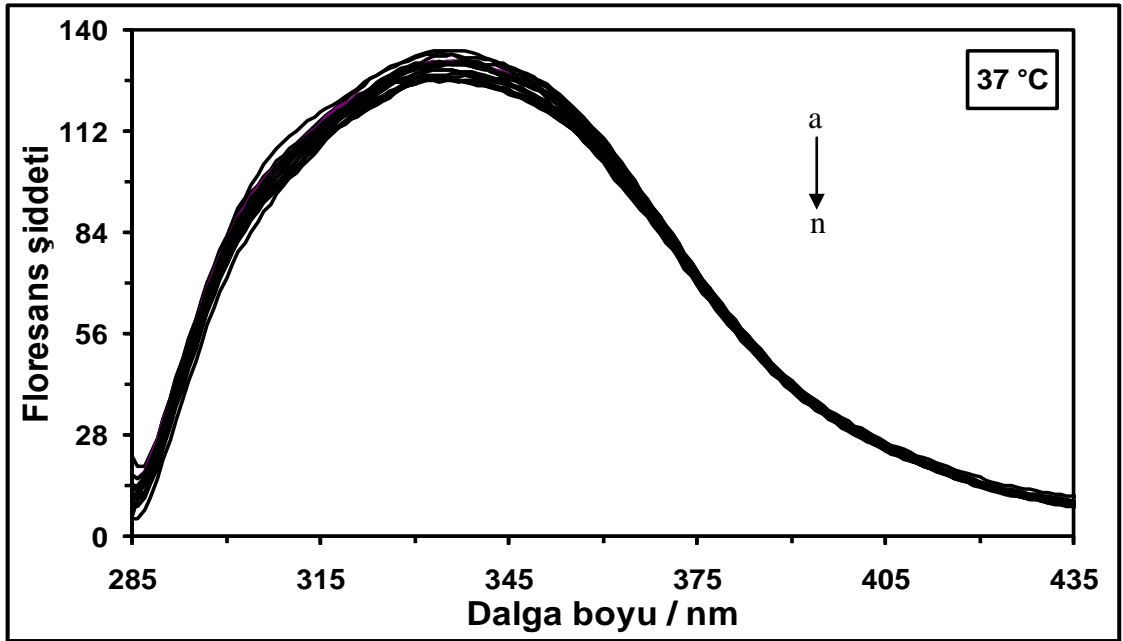
Bu çalışmada kullanılan diğer bir ligant MHC ilaç maddesidir. Farklı sıcaklıklarda HSA proteini ile MHC ilacı arasındaki etkileşimi incelemek için $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA proteini ile farklı konsantrasyonlara sahip MHC maddesinden oluşan karışım çözeltilerinin emisyon spektrumları alınmıştır. HSA-MHC sistemine ait 15 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.22'de, 25 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.23'te, 37 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.24'te ve 45 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.25'te gösterilmiştir.



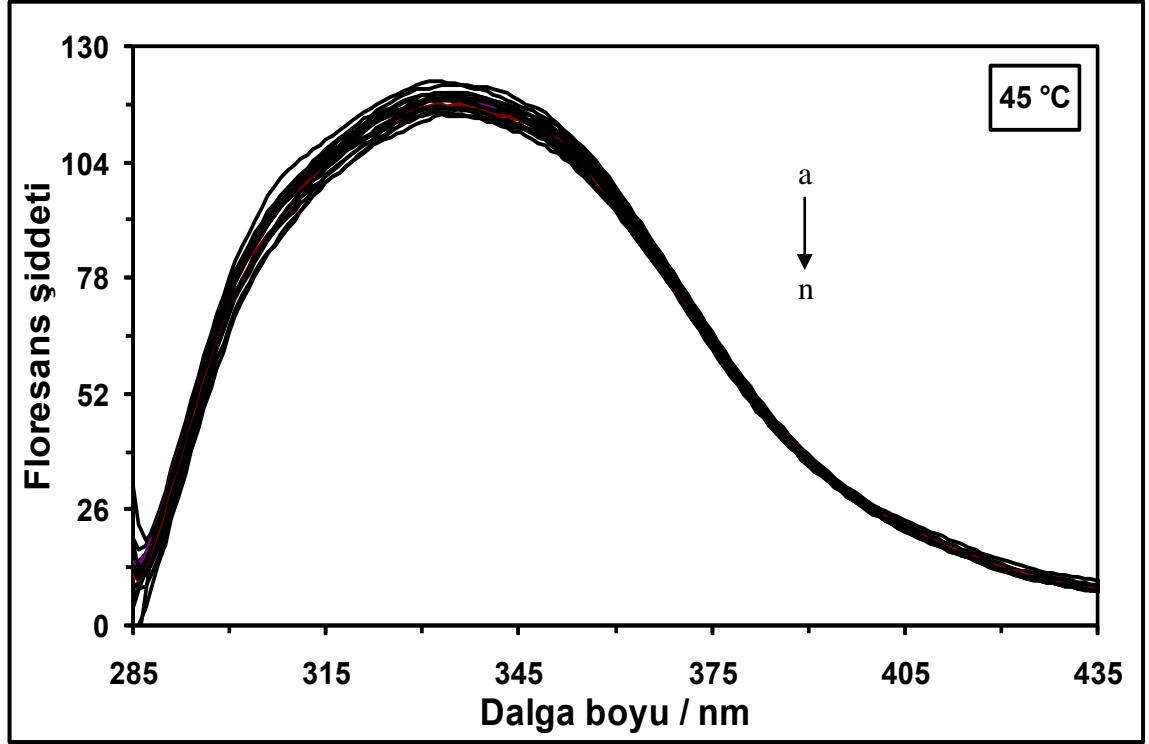
Şekil 4.22. 15 °C'de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. Çözeltideki $[MHC] = (a) 0$ M, $(b) 0,5 \times 10^{-6}$ M, $(c) 1,0 \times 10^{-6}$ M, $(ç) 1,5 \times 10^{-6}$ M, $(d) 2,0 \times 10^{-6}$ M, $(e) 3,0 \times 10^{-6}$ M, $(f) 4,0 \times 10^{-6}$ M, $(g) 5,0 \times 10^{-6}$ M, $(ğ) 6,0 \times 10^{-6}$ M, $(h) 8,0 \times 10^{-6}$ M, $(ı) 10,0 \times 10^{-6}$ M, $(i) 12,0 \times 10^{-6}$ M, $(j) 15,0 \times 10^{-6}$ M, $(k) 18,0 \times 10^{-6}$ M, $(l) 21,0 \times 10^{-6}$ M, $(m) 24,0 \times 10^{-6}$ M ve $(n) 30,0 \times 10^{-6}$ M



Şekil 4.23. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. Çözeltideki [MHC] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M



Şekil 4.24. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. Çözeltideki [MHC] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M



Şekil 4.25. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda MHC varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. Çözeltideki [MHC] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M

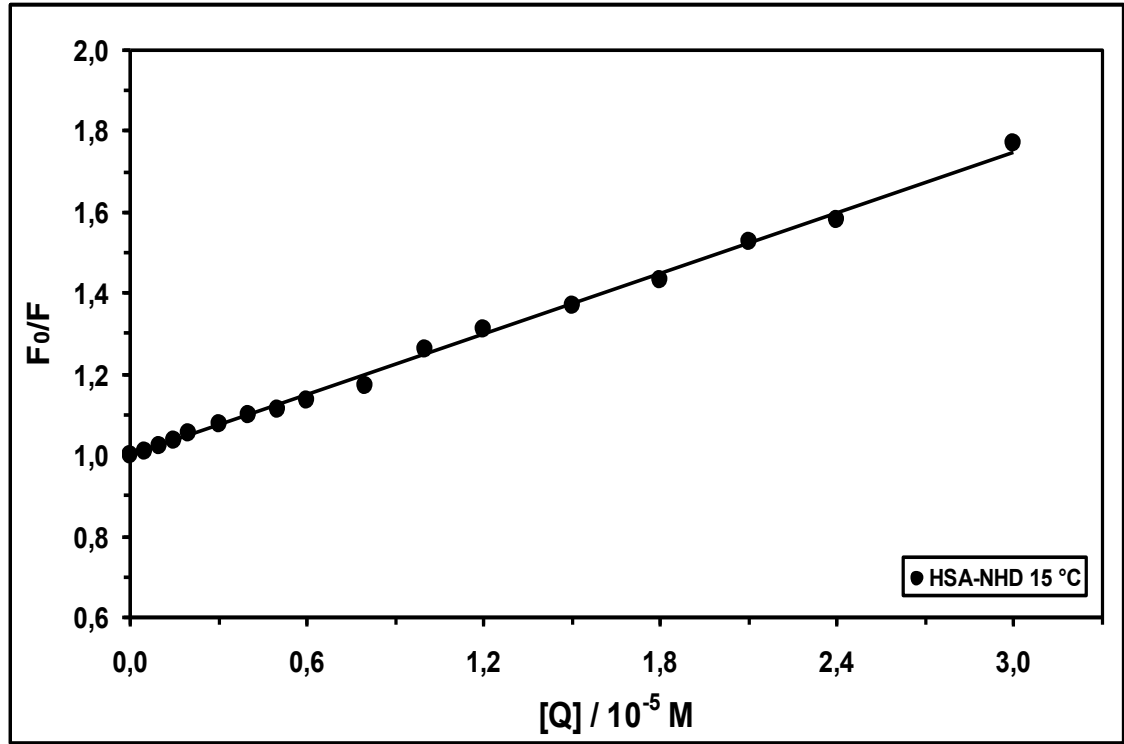
Elde edilen emisyon spektrumlarına bakıldığında (Şekil 4.22-4.25), sıcaklığın artması ile HSA proteininin floresans şiddetinin azaldığı görülmektedir. Ancak, çalışılan tüm sıcaklıklarda, artan MHC konsantrasyonu ile HSA proteininin floresans şiddetinde önemli bir değişiklik gerçekleşmemektedir. Dolayısıyla, buradan HSA proteini ile MHC ilaç maddesi arasında bir etkileşimin meydana gelmediği sonucuna varılmıştır.

MHC maddesi ile HSA arasında bir etkileşimin gerçekleşmemesinden dolayı, HSA-MHC sistemine ait Stern-Volmer sönmüleme sabiti (K_{SV}), sönmüleme hız sabiti (k_q), bağlanma sabiti (K_a), bağlanma yeri sayısı (n) ve termodinamik parametre (ΔH , ΔS ve ΔG) değerleri hesaplanamamıştır.

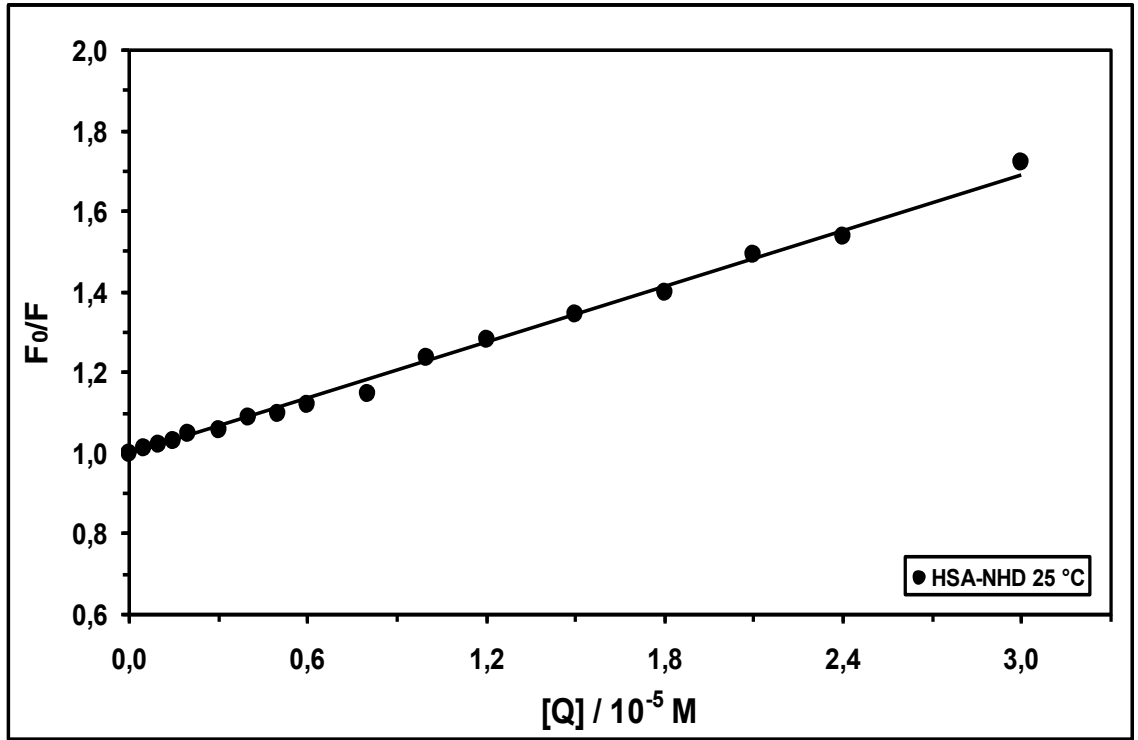
HSA proteini ile ligantlar arasında meydana gelen etkileşimlerin mekanizmasını anlamak amacıyla floresans spektroskopisi metodu ile elde edilen verilerden Stern –

Volmer eşitliği (Eşitlik (3.2)) ile Stern – Volmer sönümlenme sabiti (K_{SV}) değerlerine ulaşılmaktadır. K_{SV} değerleri, çalışılan her bir sıcaklıkta etkileşim gösteren sistem için çizilen F_0/F değerlerine karşı $[Q]$ değerleri grafiklerinin eğimlerinden elde edilebilmektedir.

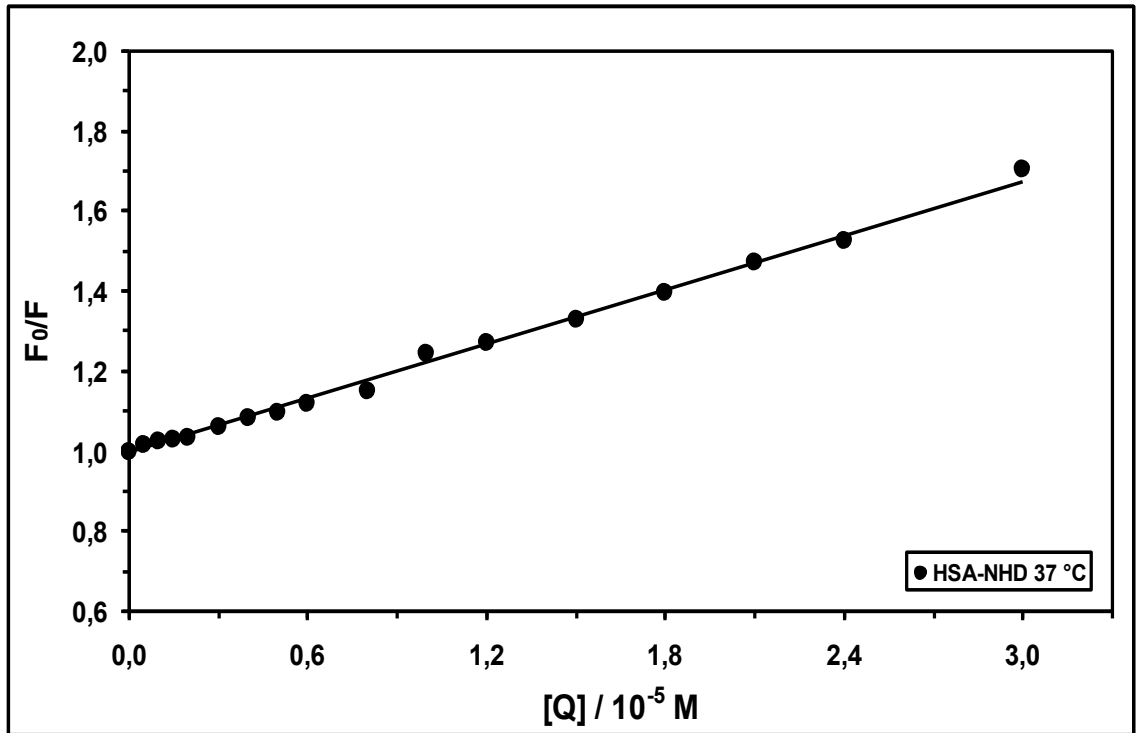
Çalışmada, HSA ile NHD arasında bir etkileşim meydana geldiği için HSA–NHD sistemi için K_{SV} değerleri hesaplanmıştır. HSA–NHD sistemine ait K_{SV} değerlerinin bulunmasını sağlayan Stern – Volmer grafikleri 15 °C için Şekil 4.26’da, 25 °C için Şekil 4.27’de, 37 °C için Şekil 4.28’de ve 45 °C için Şekil 4.29’da gösterilmiştir.



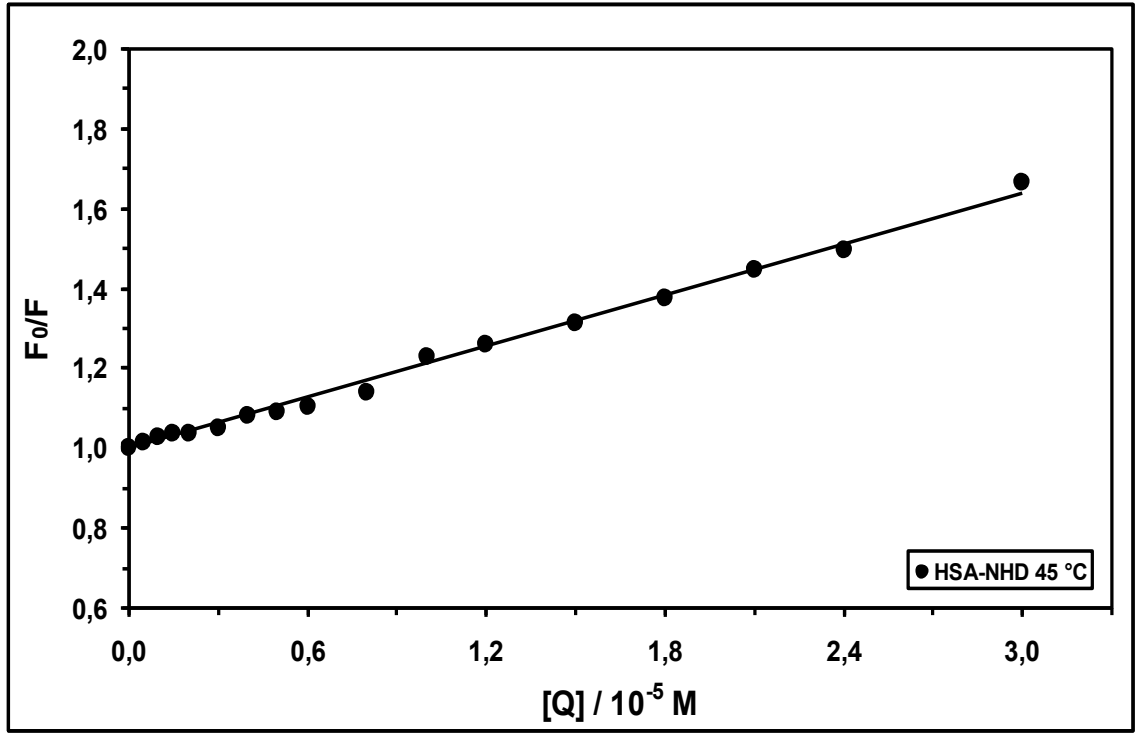
Şekil 4.26. 15 °C’de HSA-NHD sistemi için Stern-Volmer grafiği



Şekil 4.27. 25 °C’de HSA-NHD sistemi için Stern-Volmer grafiği



Şekil 4.28. 37 °C’de HSA-NHD sistemi için Stern-Volmer grafiği



Şekil 4.29. 45 °C’de HSA-NHD sistemi için Stern-Volmer grafiği

Şekil 4.26-4.29’da görüldüğü üzere, çalışılan tüm sıcaklıklarda HSA-NHD sisteminin Stern – Volmer grafikleri lineerdir. Bu grafiklerin eğim değerlerinden K_{SV} değerleri elde edilmiştir. Elde edilen K_{SV} değerleri ve regresyon katsayısı değerleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur. HSA-NHD sisteminin k_q değerleri Eşitlik (3.2) kullanılarak, τ_0 değerinin 10^{-8} s olarak alınması ile hesaplanmıştır (Cui vd 2009a, Naik vd 2010) ve bu değerler Çizelge 4.1’in son sütununda verilmiştir.

Çizelge 4.1. Fizyolojik pH’ta ve farklı sıcaklıklarda NHD’nin HSA ile etkileşimine ilişkin K_{SV} , r ve k_q değerleri

T / °C	K_{SV} / M^{-1}	r	$k_q / M^{-1}s^{-1}$
15	$2,49 \times 10^4$	0,9985	$2,49 \times 10^{12}$
25	$2,31 \times 10^4$	0,9974	$2,31 \times 10^{12}$
37	$2,25 \times 10^4$	0,9977	$2,25 \times 10^{12}$
45	$2,12 \times 10^4$	0,9973	$2,12 \times 10^{12}$

Çizelge 4.1'den görüldüğü üzere, HSA – NHD sistemine ait K_{SV} değerleri, çözelti sıcaklığının 15 °C'den 45 °C'ye doğru artması ile azalmaktadır. Bu sonuç, floresans sönümlenme mekanizmasının statik sönümlenme yolu ile gerçekleştiğini göstermektedir.

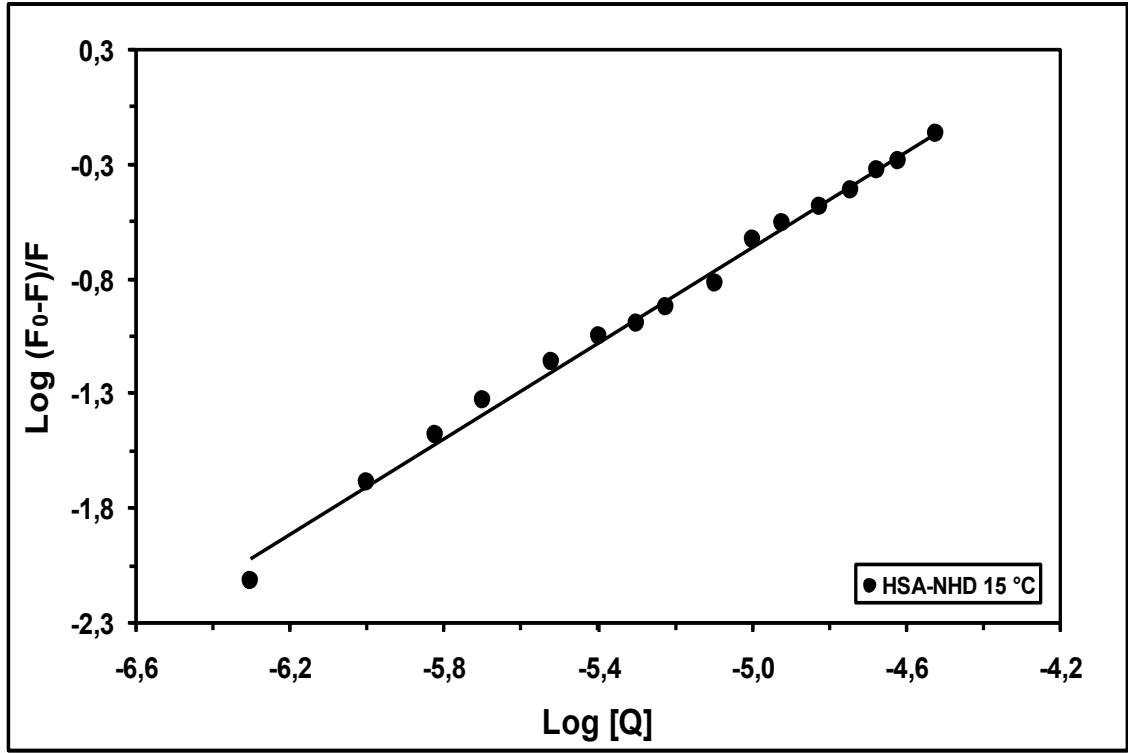
Sönümlenme mekanizmaları, dinamik sönümlenme ve statik sönümlenme olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Dinamik ve statik sönümlenme, sıcaklığa ve viskoziteye bağılılıkları bakımından birbirlerinden ayrılırlar. Dinamik sönümlenme difüzyona dayanır. Sıcaklık arttıkça difüzyon katsayısı artar ve sönümlenme katsayısının artması beklenir. Statik sönümlenmede ise sıcaklık arttıkça, oluşan kompleks yapıların kararlılıklarında azalma gerçekleşir ve sönümlenme sabiti değerleri azalır (Cui vd 2009b).

HSA-NHD sistemine ait K_{SV} değerleri $10^4 M^{-1}$, k_q değerleri $10^{12} M^{-1}s^{-1}$ mertebesindedir (Çizelge 4.1). k_q değerlerinin birçok biyomolekül-sönümlenleyici madde sistemi için maksimum dağılıma-çarpışma sönümlenme sabiti değeri olan $2,00 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$ 'den büyük olması da HSA-NHD sisteminde statik sönümlenmenin baskın olduğunu göstermektedir (Ding vd 2009).

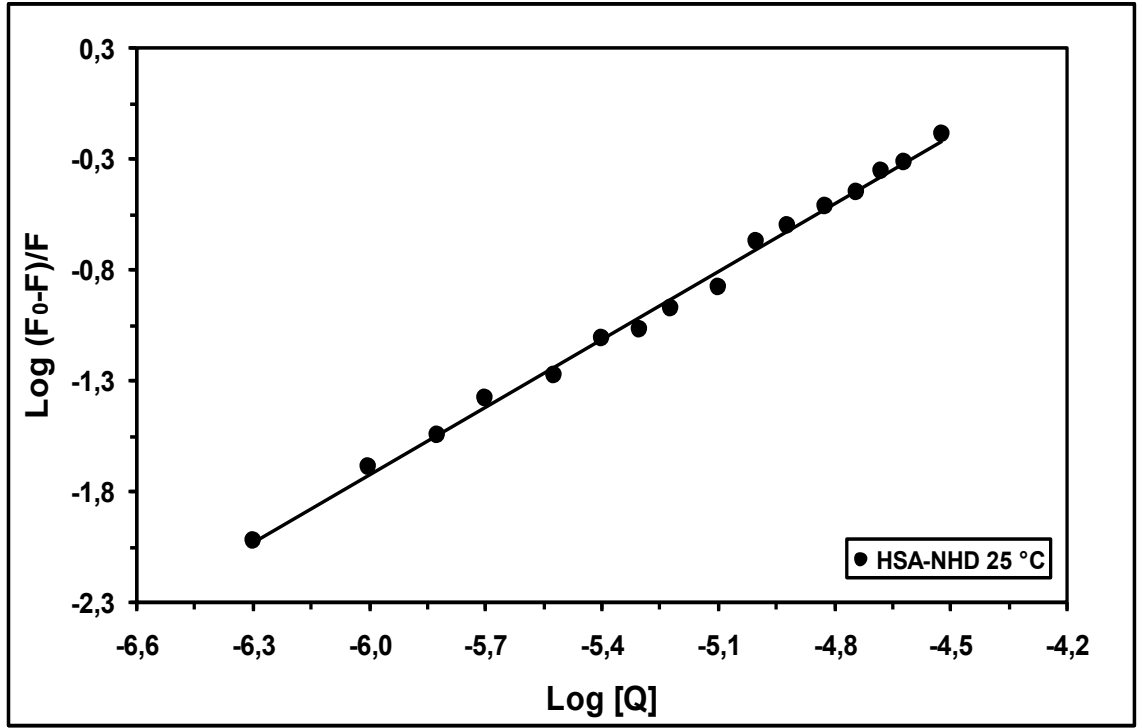
Bian vd (2004) yaptıkları çalışmada, genistein flavonoiti ile HSA arasında meydana gelen etkileşime ait K_{SV} değerlerini 296 K'de $8,8077 \times 10^4 M^{-1}$, 303 K'de $7,3792 \times 10^4 M^{-1}$ ve 310 K'de $5,8530 \times 10^4 M^{-1}$ olarak bulmuşlar ve buradan genistein ile HSA arasında statik sönümlenmenin gerçekleştiği sonucuna ulaşmışlardır (Bian vd 2004). Naik vd (2010) tarafından yapılan benzer bir çalışmada da dekzametazon (DEX) ilaç maddesi eklenmesi ile HSA proteininin sönümlenme mekanizması araştırılmış ve HSA-DEX sistemine ait K_{SV} değerlerinin artan sıcaklık ile azalmasından dolayı statik sönümlenmenin meydana geldiği sonucuna varılmıştır (Naik vd 2010). Han vd (2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise sığır serum albumin (BSA) proteini ile kuinklorak (QUC) arasındaki bağlanma mekanizmasına ait K_{SV} değerleri 292 K, 298 K, 304 K ve 310 K sıcaklıklarda araştırılmış ve bu sıcaklıklardaki K_{SV} değerleri sırası ile $6,555 \times 10^4 M^{-1}$, $7,070 \times 10^4 M^{-1}$, $7,444 \times 10^4 M^{-1}$ ve $7,972 \times 10^4 M^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanılarak, BSA ile QUC arasında meydana gelen etkileşimin dinamik sönümlenme yoluyla gerçekleştiği rapor edilmiştir (Han vd 2009).

4.2. HSA-NHD Sistemi İçin Bağlanma Sabiti Değerleri ve Bağlanma Yeri Sayısı

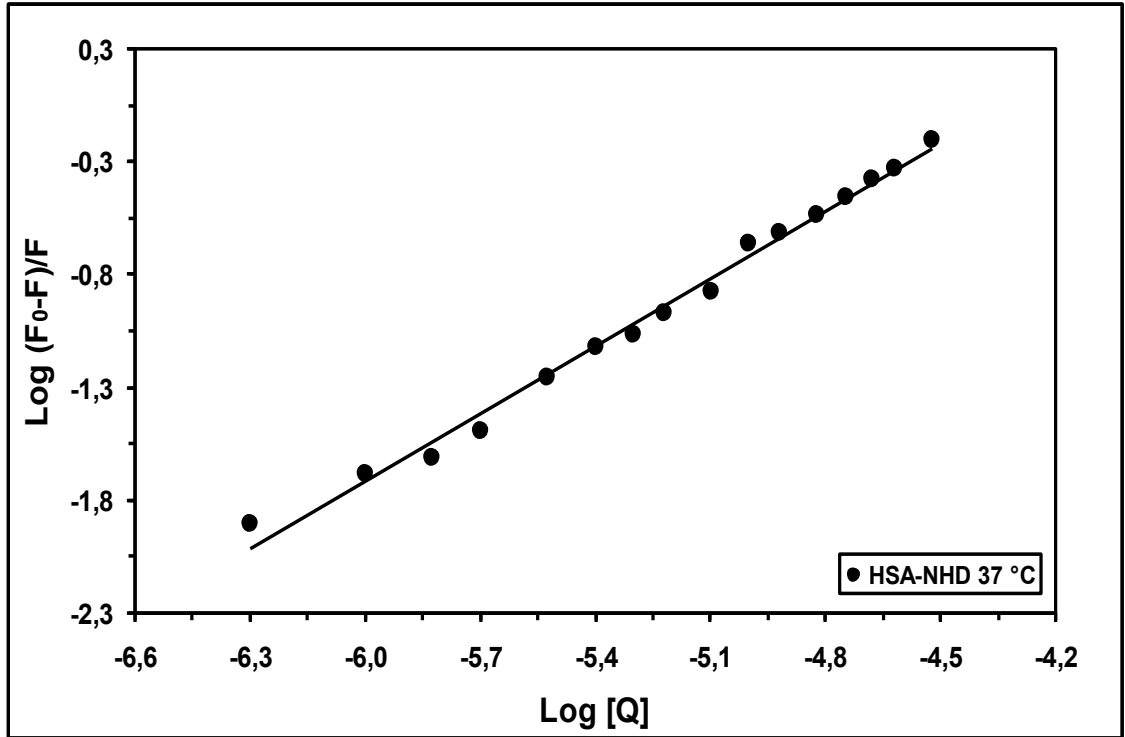
NHD maddesi ile HSA proteini arasında 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C’de gerçekleşen etkileşimin bağlanma sabiti (K_a) değerlerini ve bağlanma yeri sayısını (n 'yi) hesaplamak amacıyla Eşitlik (3.3)'ten yararlanılmıştır. Bu eşitlikten yola çıkılarak 15 °C için Şekil 4.30’da, 25 °C için Şekil 4.31’de, 37 °C için Şekil 4.32’de ve 45 °C için Şekil 4.33’te gösterilen $\log (F_0-F)/F$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafikleri çizilmiştir. Elde edilen lineer grafiklerin eğimlerinden n değerlerine ve kayımlarından K_a değerlerine ulaşılmış ve sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.



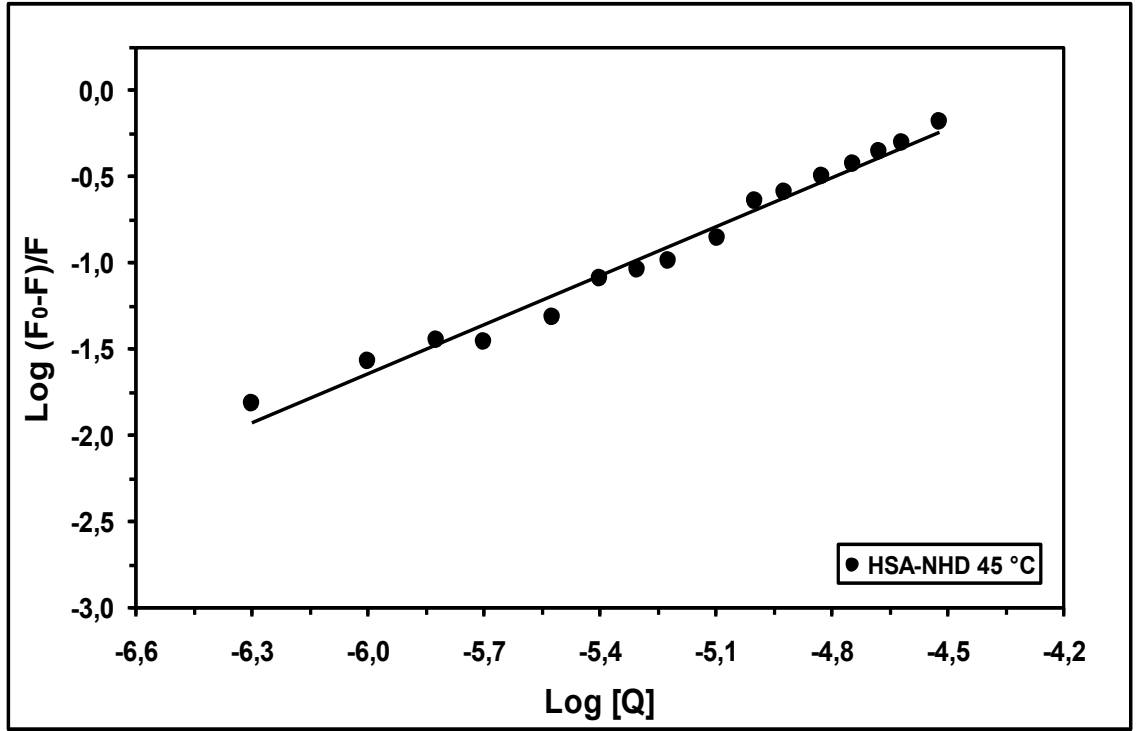
Şekil 4.30. 15 °C’de HSA-NHD sistemi için $\log (F_0-F)/F$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği



Şekil 4.31. 25 °C’de HSA-NHD sistemi için $\log (F_0-F)/F$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği



Şekil 4.32. 37 °C’de HSA-NHD sistemi için $\log (F_0-F)/F$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği



Şekil 4.33. 45 °C’de HSA-NHD sistemi için log (F₀-F)/F’ye karşı log [Q] grafiği

Çizelge 4.2. Fizyolojik pH’ta ve farklı sıcaklıklarda NHD’nin HSA’ya bağlanmasına ait K_a, n ve r değerleri

T / °C	K _a / M ⁻¹	n	r
15	4,01x10 ⁴	1,04	0,9973
25	2,79x10 ⁴	1,02	0,9979
37	2,11x10 ⁴	1,00	0,9954
45	1,16x10 ⁴	0,95	0,9908

Çizelge 4.2’de yer alan sonuçlar incelendiğinde, sıcaklığın 15 °C’den 45 °C’ye çıkarılması ile HSA-NHD kompleksine ait bağlanma sabiti değerinin 4,01x10⁴ M⁻¹’den 1,16x10⁴ M⁻¹’e düştüğü görülmektedir. Dolayısıyla, oluşan HSA-NHD kompleksinin kararlılığı artan sıcaklık ile birlikte azalmaktadır. Ayrıca, NHD maddesinin HSA proteinine 1 noktadan bağlandığı ve sıcaklığın artırılması ile n değerlerinde çok az miktarda bir azalmanın gerçekleştiği görülmektedir (Çizelge 4.2).

Ligantın hedef dokuya dolaşım sistemi ile difüze olması, onun HSA proteinine bağlanma kuvveti değeri ile ilişkilidir. Ligantlar vücut içerisinde HSA proteini aracılığı ile taşınır (Ding vd 2009). K_a değerleri, ilaçların plazma içerisindeki dağılımını anlamak açısından önemlidir. Düşük K_a değerleri veya zayıf bağlanma, kısa yarı ömür süresini ve zayıf dağılımı ifade eder. Yüksek K_a değerleri veya güçlü bağlanma ise plazma içerisinde serbest halde bulunan ilaçların düşük oranda olduğunu gösterir (Naik vd 2010).

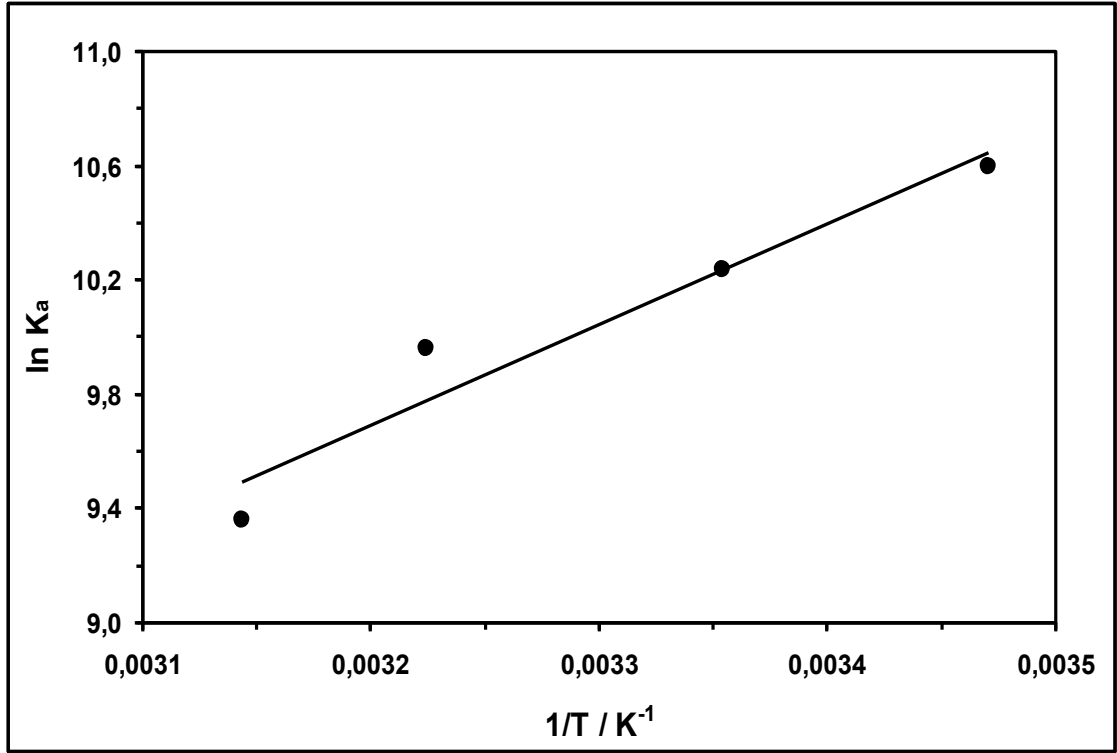
Cheng vd (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, bromsülfalein (BSP) ilaç maddesi ile HSA arasında gerçekleşen etkileşime ait K_a değerleri 25 °C ve 35 °C sıcaklıklarda araştırılmış ve 25 °C'deki K_a değeri $3,333 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve 35 °C'deki K_a değeri $2,620 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Cheng vd 2006). Seedher ve Bhatia (2006), yaptıkları çalışmada selesoksip ve veldesoksip isimli iki ilaç maddesinin HSA proteini ile oluşturdukları komplekslere ait K_a değerlerini belirlemişlerdir. HSA-selesoksip sistemi için K_a değerleri 300,15 K, 305,15 K ve 310,15 K sıcaklıkta sırası ile $7,038 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $5,972 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve $5,022 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. HSA-veldesoksip kompleksi için ise aynı sıcaklıklarda K_a değerleri sırası ile $2,040 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,630 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ve $1,272 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Sıcaklık arttıkça kararlılığın azaldığı görülmüştür. Çalışmada, bağlanma yeri sayısı 1 olarak rapor edilmiştir (Seedher ve Bhatia 2006). Naik vd (2010) tarafından yapılan çalışmada ise dekzametazon (DEX) ilaç maddesi ile HSA proteininin oluşturduğu kompleks yapının K_a değerleri ve bağlanma yeri sayıları hesaplanmıştır. K_a değerleri 288 K, 298 K ve 308 K sıcaklıkta sırası ile $3,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve $0,71 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bağlanma yeri sayısı değerleri ise 288 K'de 1,004, 298 K'de 0,996 ve 308 K'de 1,059 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, sıcaklığın artmasıyla HSA ile DEX ilaç maddesi arasındaki etkileşimin zayıfladığı sonucuna ulaşılmıştır (Naik vd 2010).

4.3. HSA-NHD Sistemine Ait Termodinamik Parametreler ve Bağlanma Kuvvetleri

Ligantların proteinlere bağlanmalarında hidrojen bağı, van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşim ve hidrofobik etkileşim olmak üzere dört çeşit etkileşim rol oynamaktadır (Sen vd 2009). Bu etkileşimlerin yorumlanması için ΔH , ΔS ve ΔG parametrelerinin belirlenmesi gerekir.

Termodinamik parametrelerin büyüklüğü ve işareti etkileşim türünün belirlenmesinde önemlidir. Pozitif ΔS , hidrofobik etkileşim varlığını temsil etmektedir. Negatif ΔH ve ΔS değerleri de hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetlerinin etkin olduğunu gösterir. Düşük ve pozitif ΔH ile negatif ΔS ise iyonik etkileşimler ile karakterize edilir (Timaseff 1972, Ross ve Subramanian 1981, Maiti vd 2006). İyonik parçacıklar arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşim ise pozitif ΔS ve negatif ΔH ile anlaşılır (Naik vd 2010). ΔG değeri işaretinin negatif olması bağlanma işleminin kendiliğinden gerçekleştiğini gösterir (Timaseff 1972, Ross ve Subramanian 1981, Maiti vd 2006).

HSA-NHD sistemine ait 288 K, 298 K, 310 K ve 318 K sıcaklıkta hesaplanan K_a değerleri kullanılarak, van't Hoff eşitliğine ((Eşitlik (3.4)'e) göre çizilen $\ln K_a$ 'ya karşı $1/T$ grafiği Şekil 4.34'te gösterilmiştir.



Şekil 4.34. NHD'nin HSA'ya bağlanmasına ait van't Hoff grafiği (r= 0,9676)

Van't Hoff grafiğinin eğiminden elde edilen ΔH , kayımından elde edilen ΔS ve Eşitlik (3.5)'in kullanılması ile hesaplanan ΔG termodinamik parametre değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3 Fizyolojik pH'ta NHD'nin HSA'ya bağlanmasına ilişkin prosese ait termodinamik parametre değerleri

T / °C	ΔH / kJ.mol ⁻¹	ΔS / J.mol ⁻¹ .K ⁻¹	ΔG / kJ.mol ⁻¹
15	- 29,22	- 12,91	- 25,50
25			- 25,37
37			- 25,22
45			- 25,11

HSA-NHD sistemine ait termodinamik parametre değerlerinin tümü negatiftir (Çizelge 4.3). Bu durum, NHD maddesinin HSA proteinine bağlanmasında hidrojen

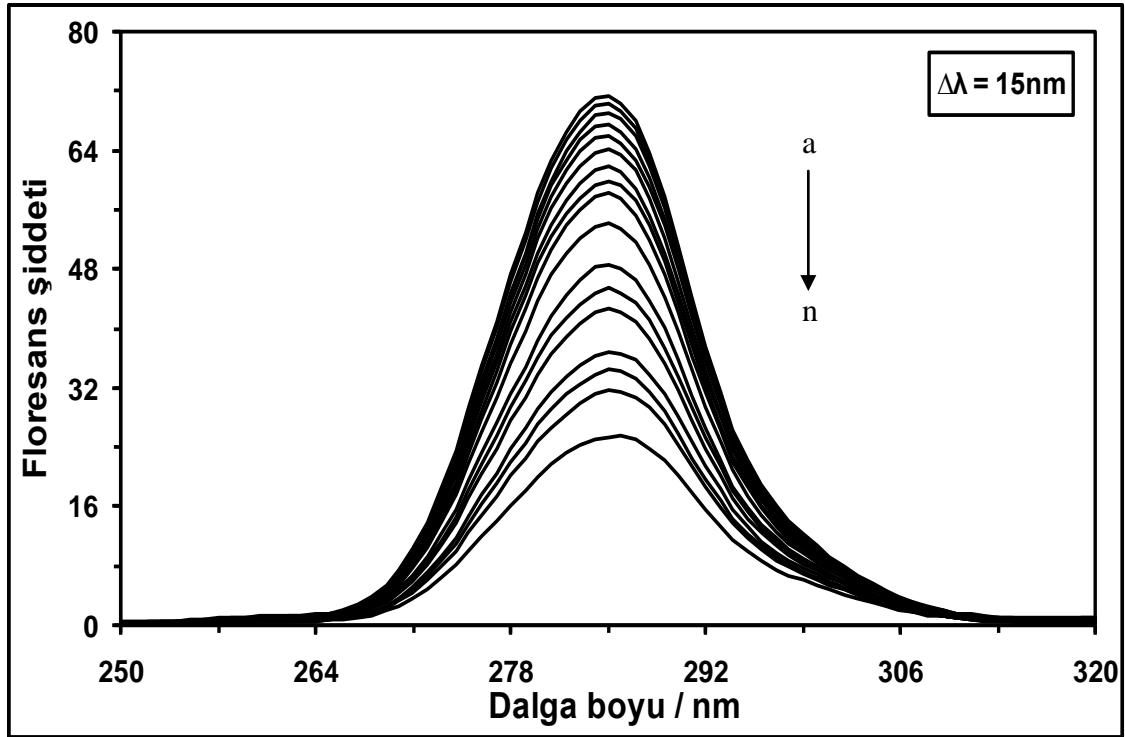
bağının ve van der Waals kuvvetlerinin etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, HSA-NHD sistemine ait ΔH değerinin negatif olması bağlanma işleminin ekzotermik bir prosesle gerçekleştiğini ifade etmektedir. Bağlanma işlemine ait diğer bir parametre olan Gibbs serbest enerji değişimi de negatif bir değere sahiptir. Bu sonuç, NHD maddesinin HSA proteinine istemli bir şekilde bağlandığını göstermektedir. Naik vd (2010) tarafından yapılan çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir. Dekzametazon (DEX) ilaç maddesi ile HSA proteini arasındaki bağlanma işleminde ΔH değeri $-61,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$, ΔS değeri $-126,4 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ve ΔG değeri $-24,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan, HSA-DEX kompleksinin oluşumunda hidrojen bağları ile van der Waals kuvvetlerinin etkili olduğu görülmüştür (Naik vd 2010). Hu vd (2005)'nin yaptığı bir çalışmada da benzer şekilde ΔH , ΔS ve ΔG termodinamik parametrelerinin tümünün negatif işarete sahip olduğu bulunmuştur. Çalışmada, kolkisin isimli ilaç maddesi ile HSA proteininin oluşturduğu kompleksin ΔH değeri $-28,705 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ve ΔS değeri $-7,645 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ olarak bulunmuş ve buradan, etkileşimde hidrojen bağları ile van der Waals kuvvetlerinin etkin olduğu ve etkileşimin istemli bir şekilde gerçekleştiği sonucuna varılmıştır (Hu vd 2005). Zang vd (2008) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise ikarin isimli flavonoit ile HSA arasında gerçekleşen etkileşime ait termodinamik parametreler hesaplanmıştır. ΔH değeri $12,29 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ve ΔS değeri $47,08 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ olarak bulunmuş ve bağlanma işleminde hidrofobik etkileşimlerin etkili olduğu, ayrıca ΔG değerinin de negatif bulunması sebebi ile etkileşimin istemli bir şekilde gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır (Zhang vd 2008).

4.4. HSA ile NHD Arasındaki Etkileşimin Senkronize Floresans Spektroskopisi ile İncelenmesi

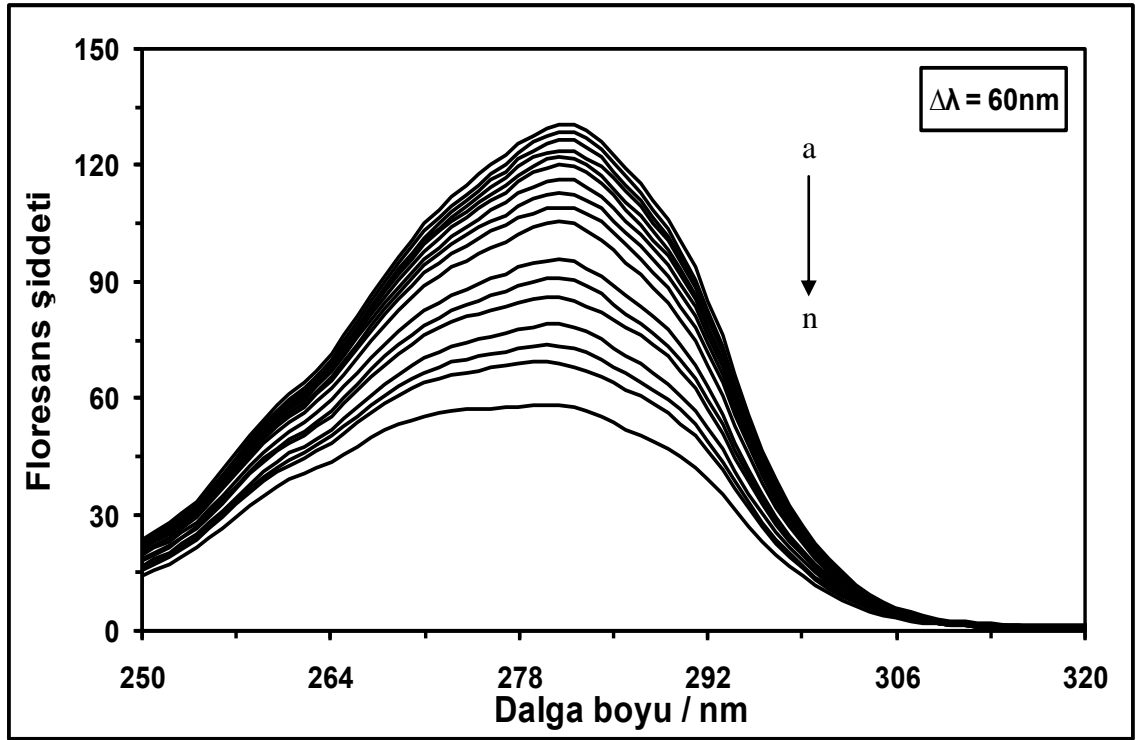
Senkronize floresans spektroskopisi, HSA proteininde bulunan tirozin ve triptofan amino asit kalıntılarına ait karakteristik bilgilerin elde edilmesine imkan sağlar. Bu bilgiler, HSA proteininin yapısında meydana gelen konformasyonel değişikliklerin anlaşılmasında faydalı olur. Çalışmada $\Delta\lambda$ değerleri, uyarma ve emisyon dalga boyları arasındaki farkı temsil etmektedir. $\Delta\lambda$ değeri, 15 nm dalga boyuna ayarlandığında tirozin amino asiti, 60 nm dalga boyuna ayarlandığında ise triptofan amino asiti hakkında bilgi sağlanmaktadır. Senkronize floresans ölçümü, kromofor molekülün

mikro çevresinde meydana gelen değişimler ile ilgili bilgiler verir. Bu sebeple, senkronize floresans spektroskopisi yöntemi ile yapılan ölçümlerde maksimum emisyon dalga boyunda gözlenen kaymalar ile amino asit kalıntılarının mikroçevresinde meydana gelen değişimler araştırılabilmektedir (Zhang vd 2008, Han vd 2009).

HSA-NHD sistemine ait senkronize floresans ölçümleri 37 °C’de ve fizyolojik pH değerinde kaydedilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda NHD içeren $3,0 \times 10^{-6}$ M’lık HSA çözeltisinin $\Delta\lambda$ değerinin 15 nm ve 60 nm’ye ayarlanması sonucunda kaydedilmiş senkronize floresans spektrumları sırasıyla Şekil 4.35 ve Şekil 4.36’da gösterilmiştir.



Şekil 4.35. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin senkronize floresans spektrumu. $\Delta\lambda = 15$ nm. Çözeltideki [NHD] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M



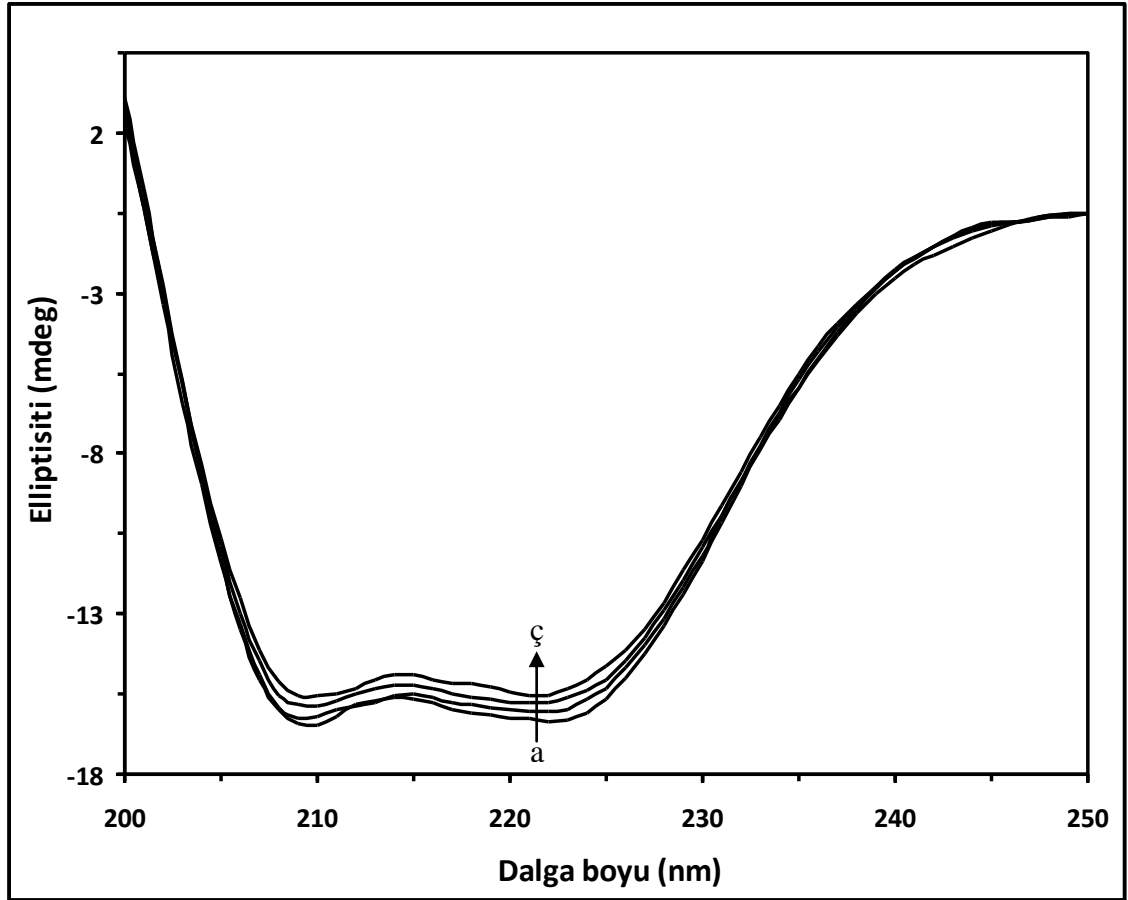
Şekil 4.36. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin senkronize floresans spektrumu. $\Delta\lambda = 60$ nm. Çözeltideki [NHD] = (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $15,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $18,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $21,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $24,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $30,0 \times 10^{-6}$ M

HSA-NHD sisteminin senkronize floresans ölçümlerine ait spektrumların her ikisinde de artan NHD konsantrasyonu ile saf HSA çözeltisinin floresans şiddetlerinde bir azalma meydana gelmektedir. $\Delta\lambda$ değerinin 15 nm olarak ayarlanması ile proteinin maksimum emisyon dalga boyunda bir kayma gözlenmemektedir. Bu durum, NHD maddesinin HSA proteinine bağlanması ile tirozin amino asiti kalıntılarının çevresinde polarlığın değişmediği anlamını taşımaktadır. $\Delta\lambda$ değeri 60 nm dalga boyuna ayarlandığında ise maksimum emisyon dalga boyu 282 nm’den 280 nm’ye doğru bir maviye kayma göstermektedir. Bu durum, NHD’nin HSA’ya bağlanması sonucunda HSA’nın yapısında bulunan triptofan amino asitinin çevresinde polarlığın azaldığını göstermektedir. Hossain vd (2012) yaptıkları çalışmada, kanser önleyici bir bitki olan sanguinarinin alkanolamin formu ile HSA arasındaki etkileşime ait senkronize floresans ölçümlerini $\Delta\lambda$ değerlerini 15 ve 60 nm dalga boyuna ayarlayarak gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, $\Delta\lambda$ değeri 60 nm dalga boyunda iken, maksimum emisyon dalga boyu

340 nm dalga boyundan 336 nm dalga boyuna doğru bir maviye kayma göstermiş ve buradan liganın HSA'ya bağlanması ile triptofan amino asitinin çevresinin daha hidrofobik hale geldiği sonucuna varılmıştır. $\Delta\lambda$ değeri 15 nm dalga boyuna ayarlandığında ise, maksimum emisyon dalga boyunda herhangi bir kayma gözlenmemiş ve buradan tirozin amino asitinin çevresinde polarlığın değişmediği sonucuna varılmıştır (Hossain vd 2012). Senkronize floresans spektroskopisi ile yapılan benzer bir çalışma Jiang vd (2012) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, ilaç maddesi tabersonin (TAB) ile HSA arasındaki etkileşim araştırılırken $\Delta\lambda$ değeri 15 nm ve 60 nm dalga boyuna ayarlanmıştır. $\Delta\lambda$ değeri 15 nm dalga boyuna ayarlandığında, maksimum emisyon dalga boyu değerinde 290 nm'den 288 nm'ye doğru bir maviye kayma gözlenmiştir. Tirozin amino asitinin çevresinde polarlığın azaldığı ve hidrofobik etkinin arttığı sonucuna varılmıştır. $\Delta\lambda$ değeri 60 nm dalga boyuna ayarlandığında ise bir kayma gözlenmemiş ve buradan triptofan amino asitinin mikroçevresinde bir değişimin olmadığı sonucuna varılmıştır (Jiang vd 2012). Ding vd (2009) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise kloramfenikol ilaç maddesi ile HSA arasındaki etkileşim $\Delta\lambda$ değeri 60 nm dalga boyunda iken senkronize floresans spektroskopisi ile incelendiğinde, maksimum emisyon dalga boyunda 280 nm'den 282 nm'ye doğru bir kırmızıya kaymanın meydana geldiği gözlenmiş ve triptofan amino asitinin çevresinde polarlığın arttığı, hidrofobikliğin azaldığı ve kloramfenikol maddesinin HSA proteininde bulunan hidrofobik boşluğa bağlandığı sonucuna varılmıştır. $\Delta\lambda$ değeri 15 nm iken maksimum emisyon dalga boyunda herhangi bir kayma gözlenmemiştir (Ding vd 2009).

4.5. HSA ile NHD Arasındaki Etkileşimin Dairesel Dikroizm Spektroskopisi ile İncelenmesi

Dairesel dikroizm tekniği ile HSA proteinine liganın bağlanması sonucu proteinin sekonder yapısında meydana gelen değişimler anlaşılabilir. NHD maddesinin HSA proteinine bağlanması ile HSA proteininin α -heliks yapısında meydana gelen değişimleri araştırmak amacıyla CD spektrumu kaydedilmiştir. HSA proteininin NHD maddesi yokluğunda ve varlığında elde edilen CD spektrumu Şekil 4.37'de gösterilmiştir.



Şekil 4.37. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda NHD varlığında $3,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin dairesel dikroizm spektrumları. Çözeltideki [NHD] = (a) 0 M, (b) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $18,0 \times 10^{-6}$ M ve (ç) $30,0 \times 10^{-6}$ M

208 nm’de gözlenen elliptisiti değerlerinden faydalanılarak Eşitlik (3.6) ve Eşitlik (3.7)’nin kullanılmasıyla NHD yokluğunda ve varlığında HSA proteininin yüzde α -heliks miktarı değeri hesaplanmıştır. 25 °C’de saf HSA proteininin α -heliks miktarı % 49,0 olarak bulunmuştur. Protein çözeltisinde $6,0 \times 10^{-6}$ M, $18,0 \times 10^{-6}$ M ve 30×10^{-6} M NHD varlığında HSA’nın α -heliks miktarı sırasıyla % 48,8’e, % 47,2’ye ve % 45,6’ya düşmüştür. Bu sonuç, HSA ile NHD arasında meydana gelen etkileşim sonucunda artan NHD konsantrasyonu ile birlikte proteinin α -heliks miktarında bir miktar azalmanın gerçekleştiğini göstermektedir. Bian vd (2004) yaptıkları çalışmada, genistein flavonoiti ile HSA arasında gerçekleşen etkileşimi CD tekniği ile incelemişler ve 207 nm dalga boyunda HSA proteinine ait α -heliks yapısının karakteristik negatif bandını gözlemişlerdir. Genistein yokluğunda ve varlığında HSA’ya ait CD spektrumunun şekli aynı kalırken elliptisiti değeri değişmiştir. Bu durum, HSA’nın α -heliks miktarında

azalma gerçekleştiğini göstermiştir (Bian vd 2004). Benzer bir çalışma da Subramanyam vd (2009) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, bir ilaç maddesi olan betulinik asit ile HSA arasındaki etkileşim araştırılmıştır. Yapılan CD analizinde, 208 nm dalga boyunda HSA proteininin % 57,9 oranında α -heliks yapısında olduğu, $1,0 \times 10^{-5}$ M, $5,0 \times 10^{-5}$ M ve 1×10^{-4} M betulinik asit varlığında HSA'nın α -heliks miktarının sırasıyla % 57,1'e, % 54,6'ya ve % 53,1'e düştüğü sonucuna varılmıştır (Subramanyam vd 2009).

5. SONUÇ

Bu çalışmada, 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C sıcaklıklarda ve fizyolojik pH değeri olan 7,4'te HSA proteini ile NHD ve MHC maddeleri arasındaki etkileşimler floresans ve dairesel dikroizm spektroskopisi yöntemleriyle araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

- Floresans spektroskopisi ölçümlerinde $3,0 \times 10^{-6}$ M'lık saf HSA çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyu 335 nm olarak bulunmuştur. Ayrıca, sıcaklığının 15 °C'den 45 °C'ye artırılması ile proteinin maksimum emisyon dalga boyu değerinde herhangi bir kayma gözlenmezken, floresans şiddetinde ise bir azalma olmuştur.

- HSA-NHD sistemine ait 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'de elde edilen emisyon spektrumlarında, artan NHD konsantrasyonu ile birlikte HSA proteininin maksimum emisyon dalga boyundaki floresans şiddetinde bir azalma meydana gelmiş ve buradan HSA proteini ile NHD maddesi arasında bir etkileşimin meydana geldiği sonucuna ulaşılmıştır.

- HSA-MHC sistemine ait emisyon spektrumları incelendiğinde, çalışılan tüm sıcaklıklarda MHC konsantrasyonunun artırılması ile HSA proteininin floresans şiddetinde önemli bir azalmanın gerçekleşmediği görülmüştür. Bu durum, HSA proteini ile MHC ilaç maddesi arasında bir etkileşimin meydana gelmediği sonucunu vermiştir.

- HSA-NHD sistemine ait Stern-Volmer sönümleme sabiti (K_{SV}) değerlerinin sıcaklığın artırılması ile azalması nedeniyle ve k_q değerlerinin birçok biyomolekül-sönümleyici madde sistemi için maksimum dağılma-çarpışma sönümleme sabiti değeri olan $2,00 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den büyük olması nedeniyle, HSA-NHD sisteminde proteinin floresans sönümleme mekanizmasının statik sönümleme yolu ile gerçekleştiği bulunmuştur.

- NHD maddesinin HSA proteinine bağlanmasına ait bağlanma sabiti değeri 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C sıcaklık değerlerinde sırası ile $4,01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $2,79 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$,

$2,11 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve $1,16 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak elde edilmiştir. Bu durum, kompleksin kararlılığının artan sıcaklık ile azaldığını göstermektedir. Ayrıca, yapılan hesaplamalar ile NHD maddesinin HSA proteinine tek bir nokta üzerinden bağlandığı sonucuna varılmıştır.

- HSA-NHD kompleksi için hesaplanan ΔH değeri $-29,22 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ve ΔS değeri $-12,91 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ 'dir. $15 \text{ }^\circ\text{C}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ve $45 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıklarda elde edilen ΔG değerleri sırası ile $-25,50 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $-25,37 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $-25,22 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ve $-25,11 \text{ kJ.mol}^{-1}$ 'dir. Termodinamik parametrelerden bağlanma işleminin istemli ve ekzotermik bir şekilde gerçekleştiği, sıcaklığın artması ile bağlanmanın zayıfladığı ve bağlanma prosesinde hidrojen bağının ve van der Waals kuvvetlerinin etkili olduğu sonuçları elde edilmiştir.

- Fizyolojik pH değeri olan 7,4'te ve $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de kaydedilen HSA-NHD sistemine ait senkronize floresans ölçümlerinde $\Delta\lambda$ değeri 15 nm iken, HSA'nın maksimum emisyon dalga boyunda herhangi bir kayma gözlenmemiş ve buradan tirozin amino asiti kalıntılarının çevresinde polarlığın değişmediği sonucuna varılmıştır. $\Delta\lambda$ değeri 60 nm iken ise, maksimum emisyon dalga boyu 282 nm'den 280 nm'ye doğru kaymış ve buradan, bağlanma prosesi sonucunda triptofan amino asitinin çevresindeki polarlığın azaldığı sonucu elde edilmiştir.

- NHD maddesinin HSA proteinine bağlanması ile HSA proteininin sekonder yapısında değişikliklerin meydana geldiği yapılan CD ölçümleri sonucunda bulunmuştur. $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilen CD ölçümlerinde, saf HSA proteininin α -heliks miktarı % 49,0 olarak bulunurken, çözültideki artan NHD konsantrasyonu ile birlikte proteinin α -heliks miktarında bir azalmanın olduğu görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- AJILA, C.M., NAIDU, K.A., BHAT, U.J.S. and RAO, P. 2007. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chemistry*, 105 (3): 982–988.
- ARAKI, K. and OZEKI, T. 1992. Amino acids. In: M. Howe-Grant (Editor), Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons, Inc., pp. 504-571, New York.
- ASCENZI, P., BOCEDI, A., NOTARI, S., MENEGATTI, E. and FASANO, M. 2005. Heme impairs allosterically drug binding to human serum albumin Sudlow's site I. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334 (2): 481–486.
- BASKEN, N.E. and GREEN, M.A. 2009. Cu(II) bis(thiosemicarbazone) radiopharmaceutical binding to serum albumin: Further definition of species dependence and associated substituent effects. *Nuclear Medicine and Biology*, 36 (5): 495 – 504.
- BASKEN, N.E., MATHIAS, C.J., LIPKA, A.E. and GREEN, M.A. 2008. Species dependence of [⁶⁴Cu]Cu-bis(thiosemicarbazone) radiopharmaceutical binding to serum albumins. *Nuclear Medicine and Biology*, 35 (3): 281 – 286.
- BHATTACHARYA, A.A., GRUNE, T. and CURRY, S. 2000. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 303 (5): 721-732.
- BI, S., DING, L., TIAN, Y., SONG, D., ZHOU, X., LIU, X. and ZHANG, H. 2004. Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 703 (1-3): 37–45.
- BI, S., SONG, D., KAN, Y., XU, D., TIAN, Y., ZHOU, X. and ZHANG, H. 2005. Spectroscopic characterization of effective components anthraquinones in Chinese medicinal herbs binding with serum albumins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 62 (1-3): 203–212.
- BI, S., YAN, L., PANG, B. and WANG, Y. 2012. Investigation of three flavonoids binding to bovine serum albumin using molecular fluorescence technique. *Journal of Luminescence*, 132 (1): 132–140.
- BIAN, Q., LIU, J., TIAN, J. and HU, Z. 2004. Binding of genistein to human serum albumin demonstrated using tryptophan fluorescence quenching. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34 (5): 275–279.
- BOELEN, R., SHEEK, R.M., DIJKSTRA, K. and KAPTEIN, R. 1985. Sequential assignment of imino- and amino-proton resonances in ¹H NMR spectra of

- oligonucleotides by two-dimensional NMR spectroscopy. Application to a lac operator fragment. *Journal of Magnetic Resonance*, 62 (3): 378-386.
- BORDBAR, A.K. and KAFRANI, A.T. 2007. Binding and fluorescence study on interaction of human serum albumin (HSA) with cetylpyridinium chloride (CPC). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 55 (1): 84–89.
- BRANEN, A.L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of American Oil Chemists Society*, 52 (2): 59–63.
- CANDIANO, G., PETRETTO, A., BRUSCHI, M., SANTUCCI, L., DIMUCCIO, V., PRUNOTTO, M., GUSMANO, R., URBANI, A. and GHIGGERI, G.M. 2009. The oxido-redox potential of albumin. Methodological approach and relevance to human diseases. *Journal of Proteomics*, 73 (2): 188 – 195.
- CARTER, D.C. and HO, J.X. 1994. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 45, 153–203.
- CHEN, T., TIAN, M.X., ZHANG, Y.D., ZHU, Z., ZHAO, L., HAO, Q.Y., LIN, J., ZHOU, L.H. and WANG, C.L. 2010. Development of simple functional markers for low glutelin content gene 1 (Lgc 1) in rice (*Oryza sativa*), *Rice Science*, 17 (3): 173-178.
- CHENG, F., WANG, Y., LI, Z. and DONG C. 2006. Fluorescence study on the interaction of human serum albumin with bromsulphalein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 65 (5):1144–1147.
- CHOI, J.M., YOON, B.S., LEE, S.K., HWANG, J.K. and RYANG, R. 2007. Antioxidant properties of neohesperidin dihydrochalcone: Inhibition of hypochlorous acid-induced DNA strand breakage, protein degradation, and cell death. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30 (2): 324-330.
- CHOI, S.M. and MA, C.Y. 2006. Extraction, purification and characterization of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. *Food Research International*, 39 (9): 974-981.
- CİNGİ, M.İ. ve EROL, K. 1996. Farmakoloji. Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi Yayınları: 108 / F. Ders Kitabı, Türkiye.
- COLMENAREJO, G. 2003. In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin. *Medicinal Research Reviews*, 23 (3): 275 – 301.
- CUI, F.L., YAN, Y.H., ZHANG, Q.Z., QU, G. R. and YAO, X.J. 2009a. A study on the interaction between 5-Methyluridine and human serum albumin using fluorescence quenching method and molecular modeling. *Journal of Molecular Modeling*, 16 (2): 255-262.

- CUI, F., YAN, Y., ZHANG Q., YAO, X., QU, G. and LU, Y. 2009b. Characterization of the interaction between 8-bromoadenosine with human serum albumin and its analytical application, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74 (4): 964–971.
- CUI, F.L., WANG, J.L., CUI, Y.R. and LI, J.P. 2006. Fluorescent investigation of the interactions between N-(p-chlorophenyl)-N'-(1-naphthyl) thiourea and serum albumin: Synchronous fluorescence determination of serum albumin. *Analytica Chimica Acta*, 571 (2): 175–183.
- DAZZI, L., SEU, E., CHERCHI, G. and BIGGIO, G. 2003. Antagonism of the stress-induced increase in cortical norepinephrine output by the selective norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine. *European Journal of Pharmacology*, 476 (1-2): 55– 61.
- DING, F., ZHAO, G., CHEN, S., LIU, F., SUN, Y. and ZHANG, L. 2009. Chloramphenicol binding to human serum albumin: Determination of binding constants and binding sites by steady-state fluorescence. *Journal of Molecular Structure*, 929 (1-3): 159–166.
- DUBNIKS, M. and GRÄNDE, P.O. 2008. Change in plasma volume from a state of hyper-, normo- or hypovolemia with or without noradrenalin infusion in the rat. *Microvascular Research*, 76 (2): 75–79.
- DUFOUR, C. and DANGLES, O. 2005. Flavonoid–serum albumin complexation: Determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721 (1-3): 164– 173.
- ERDİK, E. 2007. Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler. Gazi Kitabevi. 4. Baskı. Ankara, 531ss.
- EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL DIRECTIVE. 1994. 96/83/EC. *Official Journal of the European Communities*, 237, 3-12.
- FANALI, G., MASI, A.D., TREZZA, V., MARINO, M., FASANO, M. and ASCENZI, P. 2012. Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine*, 33 (3): 209-290.
- FASMAN, G.D. 1996. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. Plenum Press, pp. 738, New York.
- FIGGE, J., ROSSING, T.H. and FENCL, V. 1991. The role of serum proteins in acid-base equilibria. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 117 (6): 453–467.
- GHUMAN, J., ZUNZAIN, P.A., PETITPAS, I., BHATTACHARYA, A.A., OTAGIRI, M. and CURRY, S. 2005. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of Molecular Biology*, 353 (1): 38–52.

- GILL, T.A., SINGER, D.S. and THOMPSON, J.W. 2006. Purification and analysis of protamine. *Process Biochemistry*, 41 (8): 1875–1882.
- GREENSTEIN, J.P. and WINTZ, M. 1961. Chemistry of the Amino Acids, *John Willey & Sons, Inc.*, 1, ss. 46, 435, 523, 569. New York.
- GÜNDÜZ, T. 2004. İnrümentel Analiz. Gazi Kitabevi. 7. Baskı. Ankara, 1357 ss.
- HAN, X.L., MEI, P., LIU, Y., XIAO, Q., JIANG, F.L. and LI, R. 2009. Binding interaction of quinclorac with bovine serum albumin: A biophysical study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74 (3): 781–787.
- HAN, X.L., TIAN, F.F., GE, Y.S., JIANG, F.L., LAI, L., LI, D.W., YU, Q.L., WANG, J., LIN, C. and LIU Y. 2012. Spectroscopic, structural and thermodynamic properties of chlorpyrifos bound to serum albumin: A comparative study between BSA and HSA. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 109: 1–11.
- HAYNES, C.A. and NORDE, W. 1994. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2 (6): 517-566.
- HE, X.M. and CARTER, D.C. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 358 (6383): 209-215.
- HIRAYAMA, N., SHIRAHATA, K., OHASHI, Y. and SASADA, Y. 1980. Structure of alpha form of l-glutamic acid - alpha-beta transition. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 53 (1): 30-35.
- HOSSAIN, M., KHAN, A.Y. and KUMAR, G.S. 2012. Study on the thermodynamics of the binding of iminium and alkanolamine forms of the anticancer agent sanguinarine to human serum albumin. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 47: 90–99.
- HU, Y.J., LIU, Y., ZHAO, R.M. and QU, S.S. 2005. Interaction of colchicine with human serum albumin investigated by spectroscopic methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37 (3): 122–126.
- HUANG, D., OU, B. and PRIOR, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity as-says. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6): 1841–1856.
- JANG, J., LIU, H., CHEN, W. and ZOU, G. 2009. Binding of mitomycin C to blood proteins: A spectroscopic analysis and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, 928 (1-3): 72–77.

- JIANG, H., CHEN, R. and PU, H. 2012. Study on the interaction between tabersonine and human serum albumin by optical spectroscopy and molecular modeling methods. *Journal of Luminescence*, 132 (3): 592-599.
- JIN, J. and ZHANG, X. 2008. Spectrophotometric studies on the interaction between pazufloxacin mesilate and human serum albumin or lysozyme. *Journal of Luminescence*, 128: 81-86.
- KANAKIS, C.D., TARANTILIS, P.A., POLISSIOU, M.G., DIAMANTOGLU, S. and TAJMIR-RIahi, H.A. 2006. Antioxidant flavonoids bind human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 798 (1-3): 69–74.
- KAYAALP, O.S. 2005. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Hacettepe-Taş Yayınları, 11. baskı, Ankara, 1524 ss.
- KELLY, S.M., JESS, T.J. and PRICE, N.C. 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751 (2): 119 – 139.
- KEPEKÇİ, Ş.E. and ÖZTUNÇ, A. 2004. Extractive spectrophotometric methods for the determination of maprotiline hydrochloride in tablets. Adnan Menderes University, 4th AACD Congress, Kuşadası-AYDIN/ TURKEY
- KEPEKÇİ, Ş.E. and ÖZTUNÇ, A. 2005. Determination of maprotiline hydrochloride by ion-pair extraction using bromophenol blue and bromocresol purple. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 47 (1): 65-71.
- KRAGH-HANSEN, U. 1981. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacological Reviews*, 33 (1): 17-53.
- KRAGH-HANSEN, U., WATANABE, H., NAKAJOU, K., IWAO, Y. and OTAGIRI, M. 2006. Chain length-dependent binding of fatty acid anions to human serum albumin studied by site-directed mutagenesis. *Journal of Molecular Biology*, 363 (3): 702-712.
- KUBISTA, M., SJÖBACK, R., ERIKSSON, S. and ALBINSSON, B. 1994. Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra. *Analyst*, 119 (3): 417-419.
- LAKOWICZ, J.R. 1999. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd edition, Kluwer/Plenum, pp. 367–391, New York.
- LAKOWICZ, J.R. 2006. Principle of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition, Springer, pp. 958, Maryland.
- LAKOWICZ, J.R. and WEBER, J.G. 1973. Quenching of fluorescence by oxygen, probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry*, 12 (21): 4161-4170.

- LI, Y., YAO, X., JIN, J., CHEN, X. and HU, Z. 2007. Interaction of rhein with human serum albumin investigation by optical spectroscopic technique and modeling studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774 (1): 51 – 58.
- LIANG, J.F., YANG, V.C. and VAYNSHTEYN, Y. 2005. The minimal functional sequence of protamine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336 (2): 653–659.
- LIU, J.Q., TIAN, W.Y., TIAN, X., HU, Z.D. and CHEN, X.G. 2004. Interaction of isofraxidin with human serum albumin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12 (2): 469-474.
- LLOYD, J.B.F. and EVETT, I.W. 1977. Prediction of peak wavelengths and intensities in synchronously excited fluorescence emission spectra. *Analytical Chemistry*, 49 (12): 1710-1715.
- LU, Z., ZHANG, Y., LIU, H., YUAN, J., ZHENG, Z. and ZOU, G. 2007. Transport of a cancer chemopreventive polyphenol, resveratrol: Interaction with serum albumin and hemoglobin. *Journal of Fluorescence*, 17 (5): 580-587.
- LUTZ, H. P. and LUISI, P.L. 2004. Correction for inner filter effects in fluorescence spectroscopy. *Helvetica Chimica Acta*, 66 (7): 1929-1935.
- MAITI, T.K., GHOSH, K.S. DEBNATH, J. and DASGUPTA, S. 2006. Binding of all-trans retinoic acid to human serum albumin: Fluorescence, FT-IR and circular dichroism studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38 (3-5): 197–202.
- MARTIN, S.R. and SCHILSTRA, M.J. 2008. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. *Methods in Cell Biology*, 84: 263-293.
- NAIK, P.N., CHIMATADAR, S.A. and NANDIBEWOR, S.T. 2010. Interaction between a potent corticosteroid drug – Dexamethasone with bovine serum albumin and human serum albumin: A fluorescence quenching and fourier transformation infrared spectroscopy study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 100 (3): 147–159.
- NAMBUDRIPAD, R. and SMITH, T.F. 1996. Proteins. In: M. Howe-Grant (Editor), Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons, Inc., pp. 428-446, New York.
- NARAZAKI, R., MARUYAMA, T. and OTAGIRI, M. 1997. Probing the cysteine 34 residue in human serum albumin using fluorescence techniques. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1338 (2): 275-281.
- NELSON, D.L. and COX, M.M. 2005. Lehninger Principles of Biochemistry. W.H. Freeman & Co., 4th edition. pp. 75-186, New York.

- NELSON, D.L. ve COX, M.M. 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. KILIÇ, N. (Editör). Palme Yayınları:313, Ders Kitabı, Ankara, 1152 ss.
- PETERS, T. 1985. Serum albumin. In: ANFINSEN, C.B., EDSALL, J.T. and RICHARDS, F. (Editors), *Advances in Protein Chemistry*, 37: 161-245.
- PETERS, T. 1992. All about albumin, biochemistry, genetics, and medical applications, Academic Press, pp. 188-250, New York.
- RANJBAR, B. and GILL, P. 2009. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses-A review. *Chemical Biology & Drug Design*, 74 (2): 101–120.
- ROSS, P.D. and SUBRAMANIAN, S. 1981. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20 (11): 3096–3102.
- ROY, D., DUTTA, S., MAITY, S.S., GHOSH, S., ROY, A.S., GHOSH, K.S. and DASGUPTA, S. 2012. Spectroscopic and docking studies of the binding of two stereoisomeric antioxidant catechins to serum albumins. *Journal of Luminescence*. 132 (6): 1364–1375.
- SAMI-SUBBU, R., MUENCH, D.G. and OKITA, T.W. 2000. A cytoskeleton-associated RNA-binding protein binds to the untranslated regions of prolamine mRNA and to poly(A). *Plant Science*, 152 (2): 115–122.
- SASHINA, E.S., NOVOSELOV, N.P., TOROSHEKOVA, S.V. and PETRENKO, V.A. 2006. Quantum-chemical study of the mechanism of dissolution of scleroproteins in *N*-methylmorpholine *N*-oxide. *Russian Journal of General Chemistry*, 7 (1): 147-153.
- SCOPES, R. 1987. Protein Purification: Principle and Practice, 2nd ed., Springer – Verlag, pp. 282, Berlin.
- SEEDHER, N. and BHATIA, S. 2006. Reversible binding of celecoxib and valdecoxib with human serum albumin using fluorescence spectroscopic technique. *Pharmacological Research*, 54 (2): 77–84.
- SEN, P., FATİMA, S., AHMAD, B. and KHAN, R.H. 2009. Interactions of thioflavin T with serum albumins: Spectroscopic analyses. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 74 (1): 94–99.
- SENGUPTA, A. and HAGE, D.S. 1999. Characterization of minor site probes for human serum albumin by high-performance affinity chromatography. *Analytical Chemistry*, 71 (17): 3821–3827.
- SHARIF ALI, S., KASOJU, N., LUTHRA, A., SINGH, A., SHARANABASAVA, H., SAHU, A. and BORA, U. 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*. 41 (1): 1–15.

- SKOOG, D.A., HOLLER, F.J. ve NIEMAN, T.A. 1998. Moleküler Lüminesans Spektrometri. KILIÇ, E., KÖSEOĞLU, F. ve YILMAZ, H. (Çeviri Editörleri), Enstrümantal Analiz İlkeleri. Bilim Yayıncılık, pp. 355-379, Ankara.
- SMITH, R.L., NEWBERNE, P., ADAMS, T. B., FORD, R.A. and HALLAGAN J.B. 1996. GRAS flavoring substances 17. The 17th publication by the Flavors and Extract Manufacturers' Association's Expert Panel on recent progress in the consideration of flavoring ingredients generally recognized as safe under the Food Additives Amendment. *Food Technology*, 50 (10): 72-81.
- STANNER, S.A., HUGHES, J., KELLY, C.N. and BUTTRISS, J.A. 2004. Review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public Health Nutrition*, 7 (3): 407-422.
- SUAREZ, J., HERRERA, M.D. and MARHUENDA, E. 1996. Hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone on different experimental models of induced gastric ulcer. *Phytother Research*, 10 (7): 616-618.
- SUBRAMANYAM, R., GOLLAPUDI, A., BONIGALA, P., CHINNABOINA, M. and AMOORU, D. 2009. Betulinic acid binding to human serum albumin: A study of protein conformation and binding affinity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 94 (1): 8-12.
- SUDLOW, G., BIRKETT, D.J. and WADE, D.N. 1975. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology*, 11 (6): 824-832.
- SUDLOW, G., BIRKETT, D.J. and WADE, D.N., 1976. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology*. 12 (6): 1052-1061.
- TIMASEFF, S.N. 1972. In: H. Peeters (Editor), *Proteins of Biological Fluids*, Pergamon Press, Oxford, pp. 511-519.
- VOET, D., VOET, J.G. and PRATT, C.W. 1998. *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 77-194, United States of America.
- WAALKENS-BERENDSEN, D.H., KUILMAN-WAHL, M.E.M. and BÄR, A. 2004. Embryotoxicity and teratogenicity study with neohesperidin dihydrochalcone in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 40 (1): 74-79.
- WANG, T., XIANG, B., WANG, Y., CHEN C., DONG Y., FANG, H. and WANG M. 2008. Spectroscopic investigation on the binding of bioactive pyridazinone derivative to human serum albumin and molecular modeling. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65 (1): 113-119.

- WELLS, B.G. and GELENBERG, A.J. 1981. Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, adverse effects, and efficacy of the antidepressant maprotiline hydrochloride. *Pharmacotherapy*, 1 (2): 121-139.
- WOOTTON-BEARD, P.C. and RYAN, L. 2011. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 44 (10): 3135–3148.
- XIE, M.X., LONG, M. LIU, Y., QIN, C. and WANG. Y.D. 2006. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760 (8): 1184 – 1191.
- ZHANG, G., QUE, Q., PAN, J. and GUO, J. 2008. Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 881 (1-3): 132–138.
- ZHU, L., YANG, F., CHEN, L., MEEHAN, E.J. and HUANG, M. 2008. A new drug binding subsite on human serum albumin and drug–drug interaction studied by X-ray crystallography. *Journal of Structural Biology*, 162 (1): 40–49.
- ZUNSZAIN, P.A., GHUMAN, J., KOMATSU, T., TSUCHIDA, E. and CURRY, S. 2003. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Structural Biology*. 3 (1): 6-14.

ÖZGEÇMİŞ

Bahar KANCI BOZOĞLAN 1986 yılında Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. 2004 yılında girdiği Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nden 2009 yılında derece ile mezun oldu. 2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2010 yılının Haziran ayından bu yana Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görevine devam etmektedir.