

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

**İNSAN SERUM ALBUMİN VE İNSAN HEMOGLOBİN PROTEİNLERİ İLE
5-AZASİTİDİN VE TRAMADOL HİDROKLORÜR İLAÇLARI ARASINDAKİ
ETKİLEŞİMLERİN SPEKTROSKOPİK METOTLARLA İNCELENMESİ**

Ahmet ÇETİNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

2012

**İNSAN SERUM ALBUMİN VE İNSAN HEMOGLOBİN PROTEİNLERİ İLE
5-AZASİTİDİN VE TRAMADOL HİDROKLORÜR İLAÇLARI ARASINDAKİ
ETKİLEŞİMLERİN SPEKTROSKOPİK METOTLARLA İNCELENMESİ**

Ahmet ÇETİNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

**Yüksek Lisans Tez çalışması 2011.02.0121.020 nolu proje ile Akdeniz Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2012

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN SERUM ALBUMİN VE İNSAN HEMOGLOBİN PROTEİNLERİ İLE
5-AZASİTİDİN VE TRAMADOL HİDROKLORÜR İLAÇLARI ARASINDAKİ
ETKİLEŞİMLERİN SPEKTROSKOPİK METOTLARLA İNCELENMESİ

Ahmet ÇETİNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez ^{13.07}13.07/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (95) not takdir edilerek
Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Sibel TUNÇ (Danışman)

Doç. Dr. Pınar ÇAMURLU

Yrd. Doç. Dr. Memduh Sami TANER

.....
.....
.....

ÖZET

İNSAN SERUM ALBUMİN VE İNSAN HEMOGLOBİN PROTEİNLERİ İLE 5-AZASİTİDİN VE TRAMADOL HİDROKLORÜR İLAÇLARI ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLERİN SPEKTROSKOPİK METOTLARLA İNCELENMESİ

Ahmet ÇETİNKAYA

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sibel TUNÇ

Haziran 2012, 107 Sayfa

Bu çalışmada, insan serum albumin (HSA) ve insan hemoglobin (HMG) proteinleri ile miyelodisplastik sendromlu ve miyeloid lösemili hastaların tedavisi için terapötik ajan olarak kullanılan 5-azasitidin (AZA) ve sentetik bir ağrı kesici olan tramadol hidroklorür (THC) ilaçları arasındaki etkileşimler floresans ve dairesel dikroizm (CD) spektroskopik metotları ile incelenmiştir. 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C’de elde edilen emisyon spektrumlarından yararlanılarak protein ve ilaç molekülleri arasında bir etkileşimin olup olmadığı belirlenmiştir. Van’t Hoff eşitliğinden termodinamik parametreler hesaplanmıştır. Ayrıca, proteinlerin sekonder yapısındaki değişiklikler CD spektroskopisiyle incelenmiştir.

DeneySEL sonuçlar, AZA ilacının hem HSA hem de HMG proteinleri ile etkileşmediğini, oysa THC ilacının her iki protein ile etkileştiğini göstermiştir. HSA-THC ve HMG-THC sistemleri için elde edilen floresans verileri, proteinlerin sönmelenme mekanizmasının statik sönmelenme mekanizması üzerinden gerçekleştiğini göstermiştir. THC’nin HSA ve HMG proteinlerine bağlanması prosesleri için negatif ΔH ve ΔG ve pozitif ΔS değerleri elde edilmiştir. Bağlanma sabiti değerleri, THC’nin HMG’ye HSA’dan daha kuvvetli bağlandığını göstermiştir. HSA-THC ve HMG-THC sistemleri için bağlanma yeri sayısı bir olarak bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELEER: İnsan serum albumin proteini, insan hemoglobin proteini, ilaç, protein-ilac etkileşimleri, floresans spektroskopisi, dairesel dikroizm spektroskopisi

JÜRİ: Doç. Dr. Sibel TUNÇ

Doç. Dr. Pınar ÇAMURLU

Yrd. Doç. Dr. Memduh Sami TANER

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE INTERACTIONS OF 5-AZACITIDINE AND TRAMADOL HYDROCHLORIDE DRUGS WITH HUMAN SERUM ALBUMIN AND HUMAN HEMOGLOBIN PROTEINS BY SPECTROSCOPIC METHODS

Ahmet ÇETİNKAYA

M.Sc. Thesis in Chemistry

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Sibel TUNÇ

June 2012, 107 Pages

In this study, the interactions of 5-azacitidine (AZA), the therapeutic agent for the treatment of myelodysplastic syndromes and myelogenous leukemias, and tramadol hydrochloride (THC), a synthetic analgesic, drugs with human serum albumin (HSA) and human hemoglobin (HMG) proteins were investigated by fluorescence and circular dichroism (CD) spectroscopic methods. It was determined from the emission spectra obtained at 15 °C, 25 °C, 37 °C and 45 °C that whether there was an interaction between protein and drug molecules or not. Thermodynamic parameters were calculated from van't Hoff equation. In addition, the changes in the secondary structure of proteins were investigated by CD spectroscopy.

The experimental results illustrated that AZA drug did not interact with neither HSA nor HMG proteins, whereas THC drug showed the interactions with both of them. Fluorescence data obtained for HSA-THC and HMG-THC systems exhibited that quenching mechanism of proteins carried out through a static quenching mechanism. Negative ΔH and ΔG and positive ΔS values were obtained for the binding processes of THC to HSA and HMG proteins. The binding constant values showed that the binding of THC to HMG was stronger than the binding of this drug molecule to HSA protein. The number of binding site was found as one for HSA-THC and HMG-THC systems.

KEY WORDS: Human serum albumin protein, human hemoglobin protein, drug, protein-drug interactions, fluorescence spectroscopy, circular dichroism spectroscopy

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Sibel TUNÇ

Assoc. Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU

Asst. Prof. Dr. Memduh Sami TANER

ÖNSÖZ

Serum albumin ve hemoglobin proteinleri, insan vücudunda önemli işlevlere sahiptir. Bu proteinler organizma içerisinde ilaçların hedefi durumundadırlar. İlaç molekülleri organizmada bulunan proteinlerle etkileşerek, proteinlerin fizyolojik ve kimyasal özelliklerini etkileyebilmektedir. Bu yüzden, protein-ilaç etkileşimleri farmakokinetik ve farmakodinamik açıdan oldukça önemlidir. İlaçların tasarlanması ve geliştirilmesinde protein ile ilaç arasındaki etkileşimlerin belirlenmesi sadece etkileşimin kimyasal prosesini açıklamakla kalmaz, aynı zamanda ilaçların araştırılmasında değerli bilgiler elde edilmesine de olanak sağlar.

Bu tez çalışması, insan serum albumin ve insan hemoglobin proteinleri ile 5-azasitidin ve tramadol hidroklorür ilaçları arasındaki etkileşimlerin incelenmesi ile ilgilidir. Tez çalışması, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne "İnsan serum albumin ve insan hemoglobin proteinleri ile 5-azasitidin ve tramadol hidroklorür ilaçları arasındaki etkileşimlerin spektroskopik metotlarla incelenmesi" başlığı altında sunulmuş ve aynı birim tarafından 2011.02.0121.020 nolu proje ile desteklenmiştir.

Yüksek lisans tezimin yönetiminde ve yürütülmesinde bana destek olan, her aşamasında bana yol gösteren, bilgisi ve becerisiyle beni yönlendiren, eşsiz desteği ile bana her konuda yardımcı olan, hoşgörüsünü ve anlayışını hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sibel TUNÇ'a (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi), engin bilgisi, tecrübesi ve yardımlarıyla tez çalışmamda büyük katkıları olan Sayın Doç. Dr. Osman DUMAN'a (Akdeniz Üniversitesi Eğitim Fakültesi), çalışmam için gerekli olan UV/Visible/NIR spektrofotometre cihazının kullanımına izin veren Sayın Prof. Dr. Ertuğrul ARPAÇ'a (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi) ve çalışma ekibine, Kimya Bölümü değerli öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine, beni bugünlere getiren ve benden her türlü desteğini esirgemeyen aileme ve 2011.02.0121.020 nolu proje ile çalışmaya destek veren Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xx
1.GİRİŞ	1
1.1. Amino Asitler	1
1.1.1. Amino asitlerin genel yapıları ve sınıflandırılması	2
1.1.2. Amino asitlerin özellikleri ve fonksiyonları	5
1.2. Proteinler	7
1.2.1. Proteinlerin genel özellikleri ve yapıları	7
1.2.2. Proteinlerin sınıflandırılması	10
1.2.3. İnsan serum albumin (HSA) proteini	11
1.2.3.1. HSA proteininin yapısı	12
1.2.3.2. HSA proteininin özellikleri ve fonksiyonları	14
1.2.3.3. HSA proteini üzerindeki bağlanma yerleri	14
1.2.4. İnsan hemoglobin (HMG) proteini	16
1.2.4.1. HMG proteininin yapısı	16
1.2.4.2. HMG proteininin özellikleri ve fonksiyonları	17
1.2.4.3. HMG proteini üzerindeki bağlanma yerleri	19
1.3. İlaçlar	21
1.3.1. İlaçların sınıflandırılması	21
1.3.2. 5-Azasitidin (AZA) ilacı	22
1.3.3. Tramadol hidroklorür (THC) ilacı	23
1.3.4. Proteinler ve ilaçlar arasındaki etkileşimlerin önemi	24
1.4. Floresans Spektroskopisi	24
1.5. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi	29
1.6. Araştırmanın Amacı	32

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI	33
3. MATERYAL VE METOT	36
3.1. Materyal	36
3.2. Metot	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	42
4.1. HSA ve HMG Proteinleri ile AZA ve THC İlaçları Arasındaki Etkileşimlerin Floresans Ölçümleriyle Karakterizasyonu	42
4.2. HSA ve HMG Proteinlerine THC İlacının Bağlanmasına İlişkin Bağlanma Sabitleri ve Bağlanma Yeri Sayıları	80
4.3. Termodinamik Parametreler ve Bağlanma Kuvvetleri	87
4.4. HSA ve HMG Proteinleri ile THC İlacı Arasındaki Etkileşimlerin Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisiyle İncelenmesi	91
5. SONUÇ	94
6. KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

[Q]	Protein-ilaç karışım çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu
ΔG	Gibbs serbest enerji değişimi
ΔH	Entalpi değişimi
ΔS	Entropi değişimi
$^{\circ}C$	Santigrat derece cinsinden sıcaklık birimi
A	Absorbans
Å	Angström, uzunluk birimi
A_{em}	Emisyon dalga boyundaki absorpsiyon
A_{uy}	Uyarılma dalga boyundaki absorpsiyon
cm	Santimetre
F	İlaç maddesi varlığındaki floresans şiddeti değeri
F_0	İlaç maddesi yokluğundaki floresans şiddeti değeri
g/mol	Molekül kütlesi birimi
J	Joule
K	Kelvin cinsinden sıcaklık birimi
K_a	Bağlanma sabiti
kcal	Kilokalori
kJ	Kilojoule
kPa	Kilopascal
k_q	Protein sönmleme hız sabiti
K_{SV}	Stern-Volmer sönmleme sabiti
L	Litre
M	Molarite
m/s	Hız birimi
mdeg	Miliderece
n	Bağlanma yeri sayısı
ng	Nanogram
nm	Nanometre

R	İdeal gaz sabiti
r	Regresyon katsayısı
S ₀	Singlet halin temel enerjisi
S ₁ ve S ₂	Elektronik singlet hallerin enerji seviyesi
T ₁	Birinci elektronik triplet halin enerji seviyesi
ϵ	Molar absorptivite
ϵ_R ve ϵ_L	Sağ ve sol dairesel polarize ışık için molar absorpsiyon katsayısı
λ_1 ve λ_2	Uyarılma dalga boyu değerleri
λ_{maks}	Maksimum absorplamanın olduğu dalga boyu
τ_0	İlaç yokluğundaki floresansın ömür süresi

Kısaltmalar

Arg	Arjinin
Asp	Asparajin
AZA	5-Azasitidin
BPG	2,3-bisfosfo gliserat
CD	Dairesel dikroizm
FRET	Förster rezonans enerji transferi
FTIR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
Glu	Glutamik asit
His	Histidin
HMG	İnsan hemoglobin proteini
HSA	İnsan serum albumin proteini
Lys	Lizin
NIR	Yakın infrared
Pro	Prolin
R	Hemoglobin yapısının gevşek hali
T	Hemoglobin yapısının gergin hali
THC	Tramadol hidroklorür
Thr	Treonin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
UV	Ultraviyole
Val	Valin
Vis	Görünür

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. α -Amino asitin kimyasal yapısının gösterilişi	2
Şekil 1.2. Proteinlerdeki 20 standart amino asitin kimyasal yapısı (Yapısal formüller pH 7,0'daki iyonizasyon durumlarını göstermektedir. Gölgesiz bölgeler tüm amino asitler için ortak; kırmızı gölgeli kısımlar R gruplarıdır)	3
Şekil 1.3. 1,0 mM triptofan, tirozin ve fenilalanin çözeltisinin UV absorpsiyon spektrumu	4
Şekil 1.4. Kondenzasyonla peptit bağı oluşumu	6
Şekil 1.5. Proteinlerin 4 farklı yapısının şematik gösterimi. (a) Primer yapı, (b) sekonder yapı (c) tersiyer yapı ve (d) kuaterner yapı	9
Şekil 1.6. Protein ve denatüre protein arasındaki dönüşüm. (a) denatürasyon (bozunma) (b) renatürasyon (eski haline geri dönme)	10
Şekil 1.7. HSA yapısının şematik gösterimi. Her bir bölgedeki alt kısımlar Farklı renklerle gösterilmiştir. (Alt kısım IA: koyu yeşil, IB: yeşil, IIA: kırmızı, IIB: pembe, IIIA: koyu mavi, IIIB: açık mavi renkleri ile gösterilmiştir)	13
Şekil 1.8. HMG molekülünün (a) ve hem grubunun (b) şematik gösterimi. Her polipeptit zinciri farklı renklerle (α_1 : pembe, α_2 : turuncu, β_1 : yeşil, β_2 : mor, hem grubu: mavi, Fe^{+2} : kırmızı) gösterilmiştir	17
Şekil 1.9. Hemoglobindeki α ve β zincirlerinin etkileşimi	20
Şekil 1.10. İlaçların vücut içerisindeki yöneliminin şematik gösterimi. A: Absorpsiyon, B: dağılım ve C: metabolizma	21
Şekil 1.11. AZA ilacının kimyasal yapısı	23
Şekil 1.12. THC ilacının kimyasal yapısı	23
Şekil 1.13. Elektromagnetik dalganın üç boyutlu olarak gösterimi	25
Şekil 1.14. Jablonski diyagramı. Bu diyagramda çözücü etkileşimleri, sönmelenme ve enerji transferi gibi etkileşimler hariç tutulmuştur	26
Şekil 1.15. Elips merkezinin oluşumu	30
Şekil 1.16. Pozitif ve negatif CD'nin gösterimi	31

- Şekil 4.1. HSA-AZA ve HMG-AZA sistemleri için 15 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf AZA çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M (i) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $120,0 \times 10^{-6}$ M 44
- Şekil 4.2. HSA-AZA ve HMG-AZA sistemleri için 25 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf AZA çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M (i) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $120,0 \times 10^{-6}$ M 44
- Şekil 4.3. HSA-AZA ve HMG-AZA sistemleri için 37 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf AZA çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M (i) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $120,0 \times 10^{-6}$ M 45
- Şekil 4.4. HSA-AZA ve HMG-AZA sistemleri için 45 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf AZA çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M (i) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $120,0 \times 10^{-6}$ M 45
- Şekil 4.5. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M 46
- Şekil 4.6. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M 46

- Şekil 4.7. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M47
- Şekil 4.8. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M47
- Şekil 4.9. HSA-THC sistemi için 15 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $20,0 \times 10^{-6}$ M (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $40,0 \times 10^{-6}$ M 48
- Şekil 4.10. HSA-THC sistemi için 25 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $20,0 \times 10^{-6}$ M (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $40,0 \times 10^{-6}$ M 48
- Şekil 4.11. HSA-THC sistemi için 37 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $20,0 \times 10^{-6}$ M (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $40,0 \times 10^{-6}$ M 49
- Şekil 4.12. HSA-THC sistemi için 45 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $20,0 \times 10^{-6}$ M (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $40,0 \times 10^{-6}$ M 49
- Şekil 4.13. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M50

- Şekil 4.14. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M50
- Şekil 4.15. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M51
- Şekil 4.16. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M51
- Şekil 4.17. HMG-AZA sistemi için 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M52
- Şekil 4.18. HMG-AZA sistemi için 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M52
- Şekil 4.19. HMG-AZA sistemi için 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M53

- Şekil 4.20. HMG-AZA sistemi için 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M53
- Şekil 4.21. HMG-THC sistemi için 15 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (g) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (h) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (k) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (m) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $9,0 \times 10^{-6}$ M54
- Şekil 4.22. HMG-THC sistemi için 25 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (g) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (h) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (k) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (m) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $9,0 \times 10^{-6}$ M54
- Şekil 4.23. HMG-THC sistemi için 37 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (g) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (h) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (k) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (m) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $9,0 \times 10^{-6}$ M55
- Şekil 4.24. HMG-THC sistemi için 45 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (g) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (h) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (k) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (m) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $9,0 \times 10^{-6}$ M55
- Şekil 4.25. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (n) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (o) $9,0 \times 10^{-6}$ M56

- Şekil 4.26. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (n) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (o) $9,0 \times 10^{-6}$ M56
- Şekil 4.27. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (n) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (o) $9,0 \times 10^{-6}$ M57
- Şekil 4.28. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (n) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (o) $9,0 \times 10^{-6}$ M57
- Şekil 4.29. $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C’deki emisyon spektrumları58
- Şekil 4.30. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M59
- Şekil 4.31. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M59
- Şekil 4.32. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M60

- Şekil 4.33. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M60
- Şekil 4.34. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M61
- Şekil 4.35. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M62
- Şekil 4.36. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M62
- Şekil 4.37. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M63
- Şekil 4.38. $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C’deki emisyon spektrumları65
- Şekil 4.39. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M66

Şekil 4.47. 15 °C’de HSA-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği	73
Şekil 4.48. 25 °C’de HSA-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği	73
Şekil 4.49. 37 °C’de HSA-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği	74
Şekil 4.50. 45 °C’de HSA-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği	74
Şekil 4.51. 15 °C’de HMG-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği	75
Şekil 4.52. 25 °C’de HMG-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği	75
Şekil 4.53. 37 °C’de HMG-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği	76
Şekil 4.54. 45 °C’de HMG-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği	76
Şekil 4.55. 15 °C’de HSA-THC sistemi için $\log (F_0-F)/F'$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği	81
Şekil 4.56. 25 °C’de HSA-THC sistemi için $\log (F_0-F)/F'$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği	81
Şekil 4.57. 37 °C’de HSA-THC sistemi için $\log (F_0-F)/F'$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği	82
Şekil 4.58. 45 °C’de HSA-THC sistemi için $\log (F_0-F)/F'$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği	82
Şekil 4.59. 15 °C’de HMG-THC sistemi için $\log (F_0-F)/F'$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği	83
Şekil 4.60. 25 °C’de HMG-THC sistemi için $\log (F_0-F)/F'$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği	83
Şekil 4.61. 37 °C’de HMG-THC sistemi için $\log (F_0-F)/F'$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği	84
Şekil 4.62. 45 °C’de HMG-THC sistemi için $\log (F_0-F)/F'$ ’ye karşı $\log [Q]$ grafiği	84
Şekil 4.63. THC’nin HSA’ya bağlanmasına ait van’t Hoff grafiği	87
Şekil 4.64. THC’nin HMG’ye bağlanmasına ait van’t Hoff grafiği	88
Şekil 4.65. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin dairesel dikroizm spektrumları. Çözeltideki [THC]= (a) 0 M, (b) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $20,0 \times 10^{-6}$ M ve (ç) $40,0 \times 10^{-6}$ M	91
Şekil 4.66. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin dairesel dikroizm spektrumları. Çözeltideki [THC]= (a) 0 M, (b) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $20,0 \times 10^{-6}$ M ve (ç) $40,0 \times 10^{-6}$ M	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Çalışılan proteinlerin ve ilaçların kısaltmaları ve molekül kütleleri	36
Çizelge 4.1.	Fizyolojik pH'ta ve farklı sıcaklıklarda THC'nin HSA ile etkileşimine ilişkin K_{SV} , r ve k_q değerleri	77
Çizelge 4.2.	Fizyolojik pH'ta ve farklı sıcaklıklarda THC'nin HMG ile etkileşimine ilişkin K_{SV} , r ve k_q değerleri	78
Çizelge 4.3.	Fizyolojik pH'ta ve farklı sıcaklıklarda THC'nin HSA'ya bağlanmasına ilişkin prosese ait K_a , n ve r değerleri	85
Çizelge 4.4.	Fizyolojik pH'ta ve farklı sıcaklıklarda THC'nin HMG'ye bağlanmasına ilişkin prosese ait K_a , n ve r değerleri	85
Çizelge 4.5.	Fizyolojik pH'ta THC'nin HSA'ya bağlanmasına ilişkin prosese ait termodinamik parametre değerleri	89
Çizelge 4.6.	Fizyolojik pH'ta THC'nin HMG'ye bağlanmasına ilişkin prosese ait termodinamik parametre değerleri	89

1. GİRİŞ

Proteinler ile ilaç molekülleri arasındaki etkileşimlerin belirlenmesi çok eskilere dayanmaktadır. Bu alandaki ilk çalışmalar 1904 yılında Moore ve Roaf tarafından yapılmıştır. Uzun bir süre bu etkileşimler üzerine yapılan çalışmalarda istenilen sonuçlar elde edilememiştir. 1943'te proteinlerde bulunan bazı amino asit kalıntılarının organik bileşikler ile etkileştiği verilerle ortaya konmuştur. Daha sonra spesifik ilaç gruplarının (sülfonamit ve türevlerinin) kandaki plazma proteinlerine bağlandığı belirtilmiştir (Davis 1943). Plazma proteinine bağlanmalarda ilacın yapısı ve kompleks grubun etkisi üzerine yapılan çalışmalar artmış ve elde edilen sonuçlar ilacın doğasının önemli olduğunu göstermiştir. Goldstein, 1949'da protein-ilac bağlanması üzerine bir çalışma gerçekleştirmiş ve kompleksin kimyasal yapısının etkileşimlerde önemli ipuçlar verdiğini belirtmiştir (Goldstein 1949). Ayrıca, ilaç ile protein arasındaki etkileşim çalışmaları ilaçların araştırılması ve tasarımında önemli bilgiler sunmaktadır (Hu vd 2009). Plazma proteinlerine ilaç bağlanmasının mekanizması üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır, ancak bu etkileşimlerin doğasını tanımlamak için detaylı bilgiler sınırlı kalmaktadır. Plazma proteinine bağlanan ilacın etkisi, farmakokinetik ve farmakositik açıdan büyük önem taşımaktadır. Bağlanma prosesindeki mekanizmaların çok çeşitli olması, insan plazmasında 40'tan fazla proteinin çeşitli konsantrasyonlarda bulunmasından ileri gelmektedir (Geicy 1984).

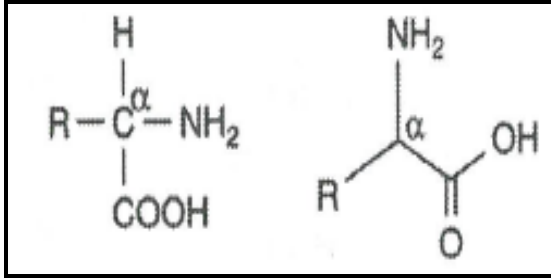
1.1. Amino Asitler

Amino asitler proteinlerin temel bileşenidir. Doğada birbirinden farklı 300'den fazla amino asit görülmesine karşın, bunlardan sadece 20'si proteinlerin polipeptit omurgalarını oluşturan monomer birimlerine katılır (Murray vd 2004).

Proteinlerin farklı spesifik özelliklere sahip olması, polipeptit zinciri üzerindeki amino asitlerin farklı şekilde sıralanmalarından ileri gelmektedir. Polipeptit zinciri üzerindeki amino asit kalıntılarının birbirleriyle etkileşimi sonucunda meydana gelen tersiyer yapıyı da amino asitlerin farklı dizilimleri belirlemektedir (Casadio vd 2007).

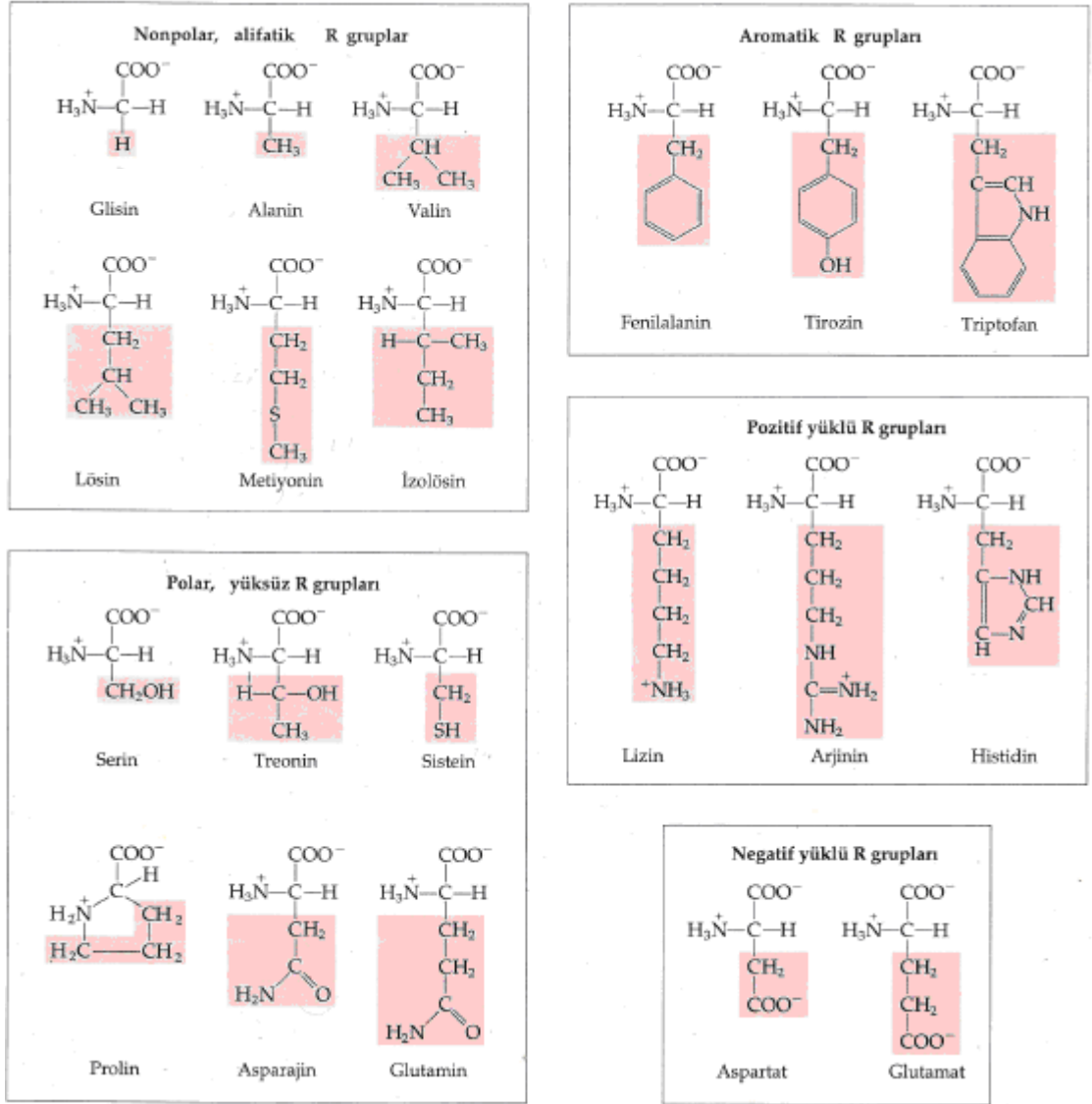
1.1.1. Amino asitlerin genel yapıları ve sınıflandırılması

Amino asitler, hem işlevsel amino hem de işlevsel karboksilik asit grupları içermektedir. Bir α -amino asitte her iki grup aynı karbon atomuna bağlanmıştır (Şekil 1.1). Üzerinde dört farklı grubun bağlı olduğu karbon atomuna kiral karbon atomu denilmektedir. Glisin hariç amino asitlerin α -karbon atomuna bağlı dört grubun dördü de birbirinden farklıdır. Bu dört farklı grubun α -karbon atomu çevresinde tetrahedral konumda yer alması, amino asitlere optikçe aktiflik (polarize ışığın polarizasyon düzlemini çevirme yeteneği) sağlamaktadır. pH 7,0'da, proteinlerde bulunan bazı amino asitlerin polarize ışığı sağa (dekstrorotator) bazılarının da sola çevirmesine (levorotator) karşın, bunların hepsi L- α -amino asit olarak bilinmektedir (Murray vd 2004).



Şekil 1.1. α -Amino asitin kimyasal yapısının gösterilişi

Standart amino asitlerin kimyasal özellikleri, biyokimyanın anlaşılmasında oldukça önemlidir. Bu amino asitlerin kimyasal yapıları Şekil 1.2'de gösterilmektedir (Nelson ve Cox 2005).

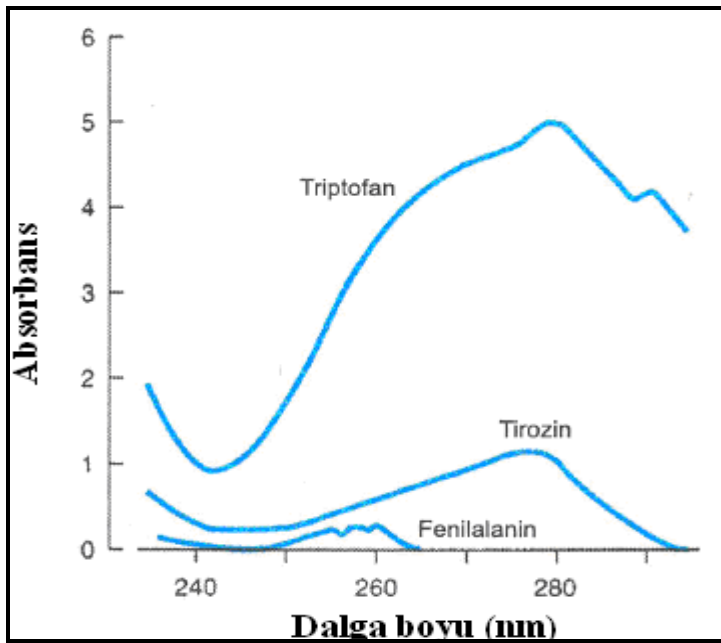


Şekil 1.2. Proteinlerdeki 20 standart amino asitin kimyasal yapısı (Yapısal formüller pH 7,0'daki iyonizasyon durumlarını göstermektedir. Gölgesiz bölgeler tüm amino asitler için ortak; kırmızı gölgeli kısımlar R gruplarıdır)

Amino asitler, R gruplarının özelliklerine göre 5 sınıfta toplanmaktadır.

i) Polar olmayan (nonpolar) alifatik R grupları: Bu amino asit sınıfındaki R grupları polar olmayan ve hidrofobik özellik gösteren yapılardır. Proteinlerde alanin, valin, lösin ve izolösinin yan grupları bir araya gelip kümeleşerek, hidrofobik etkileşimlerle protein yapısını sabitlemektedir. Glisin, en basit yapıya sahiptir ve hidrofobik etkileşimlere katılmamaktadır. Sülfür içeren iki amino asitten biri olan metiyonin ise yan zincirde polar olmayan tiyoeter grubu içermektedir (Nelson ve Cox 2005).

ii) Aromatik R grupları: Hidrofobik özellikli aromatik yan zincire sahip amino asitler arasında fenilalanin, tirozin ve triptofan yer almaktadır. Bunların tamamı hidrofobik etkileşimlere katılabilmektedir. Tirozin, hidroksil grubundan ve triptofan da indol halkasındaki azottan dolayı, fenilalanine göre daha polar özellik göstermektedir. Triptofan ve tirozin, bir dereceye kadar da fenilalanin, ultraviyole ışığı absorplamaktadır (Şekil 1.3) (Murray vd 2004). Bu özellik proteinlerin tanımlanmasında araştırmacılara yardımcı olmaktadır (Nelson ve Cox 2005).



Şekil 1.3. 1,0 mM triptofan, tirozin ve fenilalanin çözeltisinin UV absorpsiyon spektrumu

iii) Polar yüksüz R grupları: Bu gruptaki amino asitler, polar olmayan amino asitlere göre suda daha çözünebilirdir ve daha hidrofildir. Çünkü, içerdikleri işlevsel gruplar suyla hidrojen bağı yapmaktadır. Serin, treonin, sistein, prolin, asparajin ve glutamin amino asitleri bu grup içerisinde bulunmaktadır. Serin ve treonin hidroksil gruplarıyla, sistein sülfidril grubuyla ve asparajin ve glutamin de amit gruplarıyla polariteye katkıda bulunmaktadır. Prolin ise farklı bir halka yapısına sahiptir ve prolin kalıntısındaki ikincil amino grubu (imino), prolin içeren polipeptit bölgelerinde yapısal esnekliği azaltıp katı konformasyona sebep olmaktadır (Nelson ve Cox 2005).

iv) Pozitif yüklü (bazik) R grupları: Hidrofilik R gruplarının çoğu pozitif veya negatif yüklüdür. Alifatik zincirin ϵ pozisyonunda ikinci bir amino grubuna sahip lizin, pozitif yüklü guanidin grubuna sahip arjinin ve imidazol grubu içeren histidin pozitif yüklü R grubu içeren amino asitlerdir. Birçok enzim katalizli tepkimede histidin kalıntısı proton alıcısı veya vericisi olarak tepkimeyi kolaylaştırmaktadır (Nelson ve Cox 2005).

v) Negatif yüklü (asidik) R grupları: İkinci bir karboksil grubuna sahip aspartat ve glutamat pH 7,0'da net negatif yüke sahip R grubu içeren iki amino asittir (Nelson ve Cox 2005).

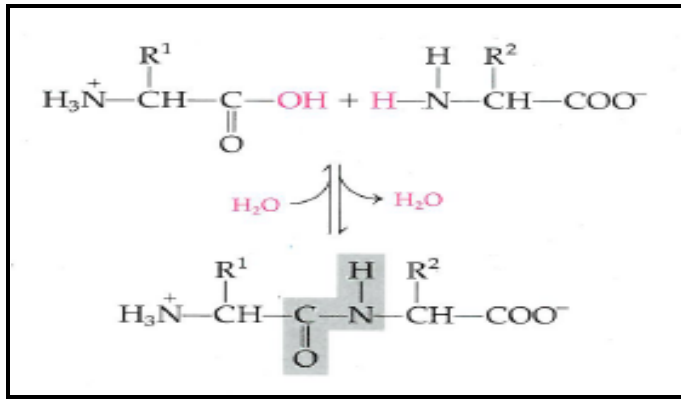
1.1.2. Amino asitlerin özellikleri ve fonksiyonları

Amino asitler çözünürlük özelliklerine göre geniş bir dağılım göstermektedirler (Gözükara 1997). Genellikle amino asitler suda, asitlerde ve alkalilerde kolay; etanolde ise az çözünürler. Dietileterde hiç çözünmezler. Prolin ve hidroksi prolin gibi bazı amino asitler de tam aksine etanolde ve dietileterde çok çözünürler. Amino asitler tat olarak da farklılıklar göstermektedirler. Örneğin; lösin amino asiti tatsız, izolösin ve arjinin gibi amino asitler acı ve diğer amino asitler de tatlıdır (Ası 1996). Amino asitlerin erime noktaları genellikle 200 °C'nin üstündedir (Murray vd 2004). Ancak, yüklü gruplar amino asitlerin erime noktasında farklılıklara yol açabilmektedir. Bu gruplar arasındaki elektrostatik kuvvetlerin oluşturduğu kafes yapısı, kristal haldeki amino asitleri daha dayanıklı kılmakta ve erime noktalarını arttırmaktadır. Eğer amino asitler iyonik olmayan formlarda kristalize edilirse, onları bir arada tutacak olan van der Waals kuvvetleri daha zayıf olacaktır ve bu durum, amino asit kristallerinin dayanıksız olmasına sebep olmakla birlikte erime noktalarını düşürecektir (Gözükara 1997).

Amino asitler kristal yapılarından dolayı fizyolojik ortamlarda çift iyon veya dipolar formda kristalize olmaktadır (Gözükara 1997). Bu durum **amfolit özellik** olarak adlandırılmaktadır. Amfolitler, Brönsted-Lowry'nin asit-baz kavramı tanımına da uymaktadır (Gökalp vd 2002). Amino asitler, amin ve karboksil grubu içerdiğinden dolayı hem asit hem de baz özelliği göstermektedir. Karboksil (COOH) grubu alkali bir ortamda karboksilat (COO⁻) iyonu ve H⁺ iyonlarına dissosiyasyon olurken, amin (NH₂)

grubu ise asidik bir ortamda H^+ iyonu alarak NH_3^+ iyonuna dönüşmektedir. İzoelektrik noktada (net elektrik yükünün sıfır olduğu pH değerinde) bir amino asit molekülünde COO^- ve NH_3^+ iyonlarının aynı anda bulunduğu yapıya **zwitteriyon** denilmektedir (Nelson ve Cox 2005). Zwitteriyon yapı, yüklü yapıların incelenmesi ve saptanmasının yanı sıra, bileşiklerin elektriksel alanda nasıl hareket edeceğini öngörmeye ve ayırma için uygun tamponların seçiminde de değer taşımaktadır (Murray vd 2004).

Fizyolojik sistemlerde amino asit molekülleri birbirleriyle peptit bağı adı verilen bir amit bağıyla kovalent olarak bağlanabilmekte ve sonuçta dipeptit oluşturabilmektedir. Bu bağ, bir amino asitin α -karboksil grubu ile diğer bir amino asitin α -amino grubu arasında kondenzasyon tepkimesi vererek oluşmaktadır (Şekil 1.4) (Nelson ve Cox 2005).



Şekil 1.4. Kondenzasyonla peptit bağı oluşumu

Peptit bağları ile birbirine eklenen amino asitlerin sayısı oluşan peptidin isimlendirilmesinde önemlidir. Genellikle 10'dan az amino asit içerenler oligopeptit, 10-100 arasında amino asit içerenler polipeptit ve 100'den çok amino asit içerenler makropeptit olarak isimlendirilmektedir (Ası 1996). Bir peptitte serbest α -amino grubunu içeren amino asit kalıntısı amino-terminal (veya N-terminal) kalıntı, diğer uçtaki serbest karboksil grubu içeren kalıntı ise karboksil-terminal (veya C-terminal) kalıntı olarak ifade edilmektedir (Nelson ve Cox 2005). Protein-protein etkileşimleri esnasında, bu iki uçtaki amino asit kalıntısı vasıtasıyla proteinler birbirlerine bağlanabilmekte ve böylelikle peptit bağı oluşturabilmektedir (Peters 1996).

1.2. Proteinler

Protein eski Yunanca'da "önde gelen" anlamına gelmektedir (Ası 1996). Proteinler, insan vücudunda sayılamayacak kadar çok işlev gerçekleştirmektedirler. Bu işlevler arasında oksijen ve karbon dioksiti taşımanın yanı sıra yapısal, kinetik, katalitik ve bilgi aktarıcı rolleri de bulunmaktadır (Murray vd 2004). Proteinlerin biyolojik fonksiyonları yerine getirebilmesi, ayrıca fiziksel ve kimyasal özellikler gösterebilmesi için konformasyonel yapılarını kazanmaları gerekmektedir (Gökalp vd 2002).

1.2.1. Proteinlerin genel özellikleri ve yapıları

Proteinler, tüm organizmalarda bulunan biyolojik makromoleküllerdir. Bunlar, polipeptitler olarak bilinen 20 farklı amino asitin dizilimi sonucunda oluşan bir polimerdirler. Yapısında karbon, oksijen, azot, hidrojen ve kükürt gibi elementleri bulundurmaktadır. Proteinler birbirini tamamlayan başlıca 4 yapı göstermektedirler (Petsko ve Ringe 2004):

a) Primer yapı: Primer olarak bilinen yapı, farklı amino asitlerin dizilimi sonucu meydana gelmektedir. Bu yapı, peptit birimine rijitlik ve düzlemsellik sağlayan kovalent bağlar içermektedir. Amino asit zincirinin son iki ucu karbonil ve amino kalıntısı bulundurmaktadır. Proteinlerin özelliği ve yapısı, amino asitlerin eşsiz dizilimine bağlı olarak değişmektedir (Branden ve Tooze 1999).

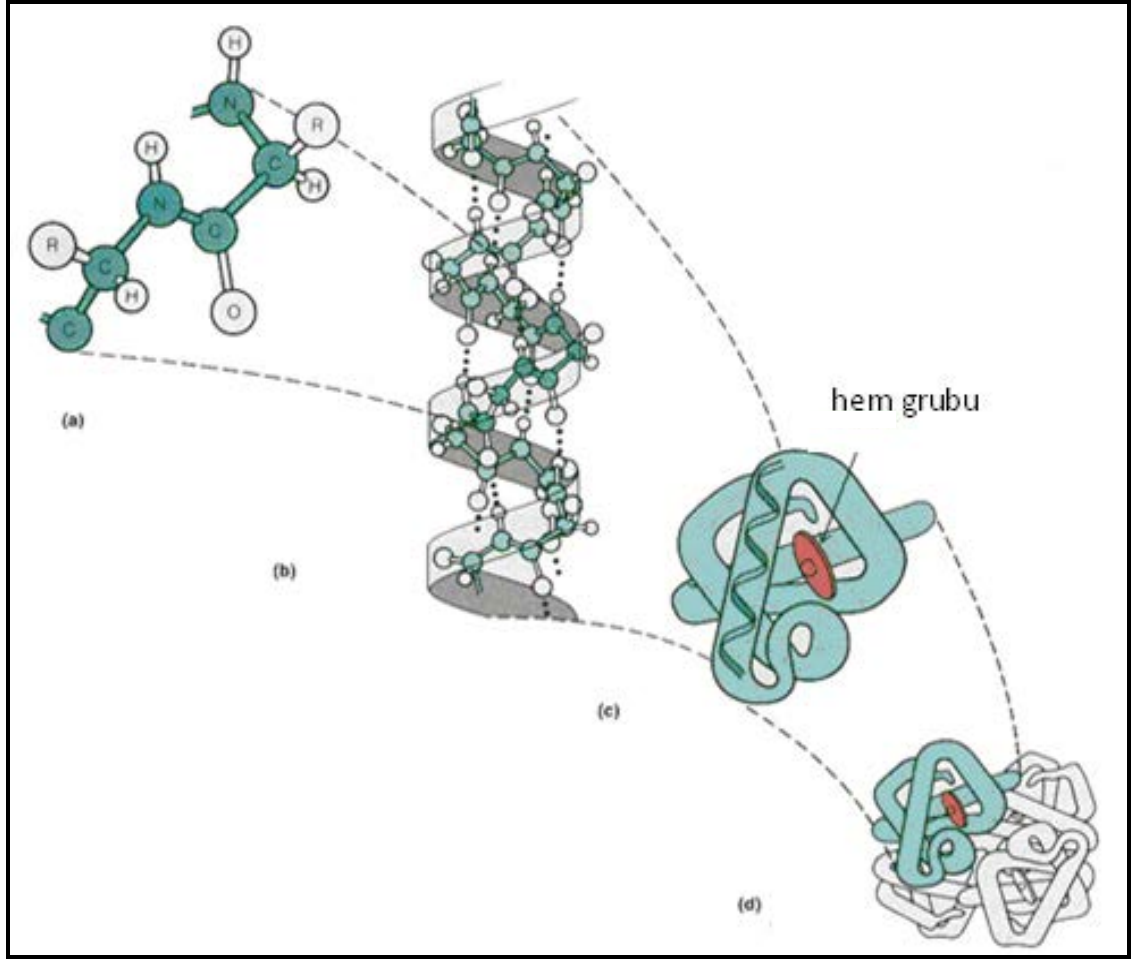
b) Sekonder yapı: Sekonder yapı, karbonil (-C=O) ve amit (-NH) grupları arasındaki hidrojen bağı ile oluşmaktadır. Amino asit kalıntıları arasındaki hidrojen bağına bağlı olarak α -heliks ve β -tabakalı yapı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Darby ve Creighton 1993). Peptit bağının N (elektronegatif merkez atom) ve O (dördüncü karbonil oksijen atomu) atomları arasında hidrojen bağı oluşumuyla α -heliks yapısı oluşmaktadır. Keratinler gibi fibröz yapılı proteinler başlıca α -heliks yapısından meydana gelmektedir. β -tabakalı yapı ise birbirine yakın polipeptit zincirlerinin etkileşiminden oluşmaktadır. β -tabakalı yapının kararlılığı ilk zincir üzerindeki N-H grupları ile başka bir zincir üzerindeki C=O grupları arasındaki hidrojen bağından kaynaklanmaktadır. Bazı

proteinler benzer bir polipeptit zinciri üzerinde hem α -heliks hem de β -tabakalı yapıyı içerebilmektedir (Purves vd 2006).

c) Tersiyer yapı: Domenler (polipeptit omurgası ile birbirine bağlanmış yoğun birimler) olarak bilinen kompakt globüler kısımlar ile sekonder yapı elemanları arasında meydana gelen katlanmalar sonucunda üç boyutlu yapılar oluşmaktadır. Bu spesifik katlanmalar polipeptit zinciri üzerindeki bağlanmadan ileri gelmektedir. Amino asit zinciri üzerinde bulunan gruplar arasındaki etkileşimler tersiyer yapının oluşumunu belirlemektedir. Hidrojen bağı, disülfid bağı ve iyonik etkileşimler bu tersiyer yapıyı kararlı kılmaktadır (Purves vd 2006).

d) Kuaterner yapı: Kuaterner yapılar, alt birimler olarak bilinen tersiyer yapı ile polipeptit zincirleri arasındaki etkileşimlerden meydana gelmektedir. Bu alt birimler disülfid bağları ile birbirlerine bağlanmaktadır. Tüm proteinler kuaterner yapı oluşturmayabilir. Bu yapılar iyonik bağlanma, hidrojen bağı ve van der Waals etkileşimleri ile kararlı olmaktadır (Branden ve Tooze 1999).

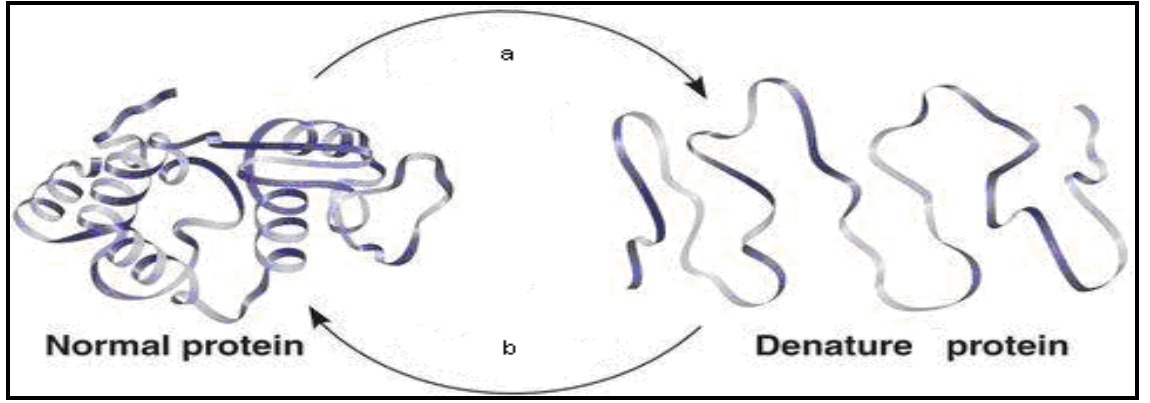
Proteinlerin primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapıları Şekil 1.5'te gösterilmektedir (<http://www.sosnick.uchicago.edu/precpcquastru.html>).



Şekil 1.5. Proteinlerin 4 farklı yapısının şematik gösterimi. (a) Primer yapı, (b) sekonder yapı (c) tersiyer yapı ve (d) kuaterner yapı

Tek başlarına zayıf olup bir araya geldiklerinde önem kazanan çok sayıda kovalent olmayan etkileşim, protein konformasyonunu kararlı hale getirmektedir (Murray vd 2004). Hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri gibi başlıca 4 farklı etkileşim bulunmaktadır (Hu vd 2005, Banga 2006, Jang vd 2009). Hidrojen bağları, globüler proteinlerin yüzeyinde genellikle polar R grupları ile su molekülleri veya diğer polipeptit zincirlerindeki amino asit kalıntıları arasında gerçekleşen bağıdır. Elektrostatik etkileşimler, peptitlerin amino ucu ile karboksil ucu grupları ve polar aminoasit kalıntılarının yüklü R grupları gibi zıt yüklü gruplar arasında oluşur. Hidrofobik etkileşimler, globüler proteinlerde proteinin iç kısmında yer alan polar olmayan R grupları ile ilgilidir. Van der Waals etkileşimleri, son derece zayıf bir etkileşim olup kısa mesafelerde etkindir (Murray vd 2004).

Proteinler, konformasyonları arasında yapısal değişikliklere maruz kalabilmektedir (Degim ve Celebi 2007). Bu değişim **denatürasyon** yani proteinlerdeki sekonder ve tersiyer yapıların bozulması olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.6) (<http://www.bio.miami.edu>). Sıcaklık, pH, organik çözücü ve denatüre edici bazı kimyasal maddelerin ilavesi gibi çeşitli faktörler proteinlerde denatürasyona neden olmaktadır ve bu dönüşüm ya tersinir ya da tersinmez olarak gerçekleşmektedir. Tersinmez dönüşümde bozunma, tersinir bozunmadaki gibi geri dönüşümlü değildir. Tersinmez dönüşüm, yapının parçalanması veya aktif grupların tamamen inaktif olmuş şekilde açılması olarak tanımlanmaktadır (Lai ve Topp 1999).



Şekil 1.6. Protein ve denatüre protein arasındaki dönüşüm. (a) Denatürasyon (bozunma), (b) renatürasyon (eski haline geri dönme)

1.2.2. Proteinlerin sınıflandırılması

Proteinler biyolojik işlevlerine ve yapı temellerine göre iki şekilde sınıflandırılabilir:

a) Biyolojik işlevlerine göre proteinler şu şekilde sınıflandırılmaktadır (Murray vd 2004).

- Enzimler (dehidrogenaz, kinaz),
- Depo proteinleri (ferritin, miyogloblin),
- Düzenleyici proteinler (peptit hormonları),
- Yapısal proteinler (kolajen),

- Koruyucu proteinler (kan pıhtılaşma faktörleri, immünoglobülinler),
- Taşıma proteinleri (hemoglobin, plazma lipoproteinleri),
- Kasılma proteinleri veya hareketli proteinler (aktin)

b) Yapı bakımından proteinler basit, konjüge ve türev proteinler olmak üzere üç şekilde sınıflandırılmaktadır:

- Basit proteinler; albuminler (serum albumin), globulinler (fibrinojen), histonlar (timohiston), protaminler (salmin), prolaminler (gluten) ve albuminoidler (keratin ve kolajen)'dir (Ası 1996, Gözükara 1997).
- Konjüge veya bileşik proteinler; nükleoproteinler (virüsler), glikoproteinler (transferrin), lipoproteinler (serum ve yumurta sarısı lipoproteinleri), fosfoproteinler (kazein), kromoproteinler (hemoglobin ve miyoglobin) ve metalloproteinler (hemoglobin, miyoglobin ve stokromlar)'dir (Ası 1996, Gözükara 1997).
- Türev proteinler ise primer türev proteinler (denatüre protein ve koagüle protein) ve sekonder türev proteinler (peptitler ve polipeptitler)'dir (Ası 1996).

1.2.3. İnsan serum albumin (HSA) proteini

İnsan vücudundaki yaklaşık 75 trilyon hücrenin her birinin homeostatik dengesinde (yıkım ve yapım reaksiyonları varlığındaki dengede) önemli görevler sağlayan kan, vücuttaki başlıca taşıyıcıdır. Kan, vücut sıcaklığının stabilize olmasında, patojen ve toksiditeye karşı savunmada, hormonların, besinlerin, vücuttaki çeşitli bileşenlerin ve çözülmüş gazların taşınmasında ve pH'ın düzenlenmesinde önemli görevler üstlenmektedir. Kan, plazma ve diğer bileşenler (kandaki hücre bileşenleri) olmak üzere ikiye ayrılır (Martini vd 2002). Plazma, kanın hücre içermeyen kısmıdır ve çözülmüş proteinlerin önemli bir miktarını içermektedir. Plazma proteinleri temel olarak

albuminler, globulinler ve fibrinojenler olmak üzere üç kısma ayrılmaktadır (Peters 1996).

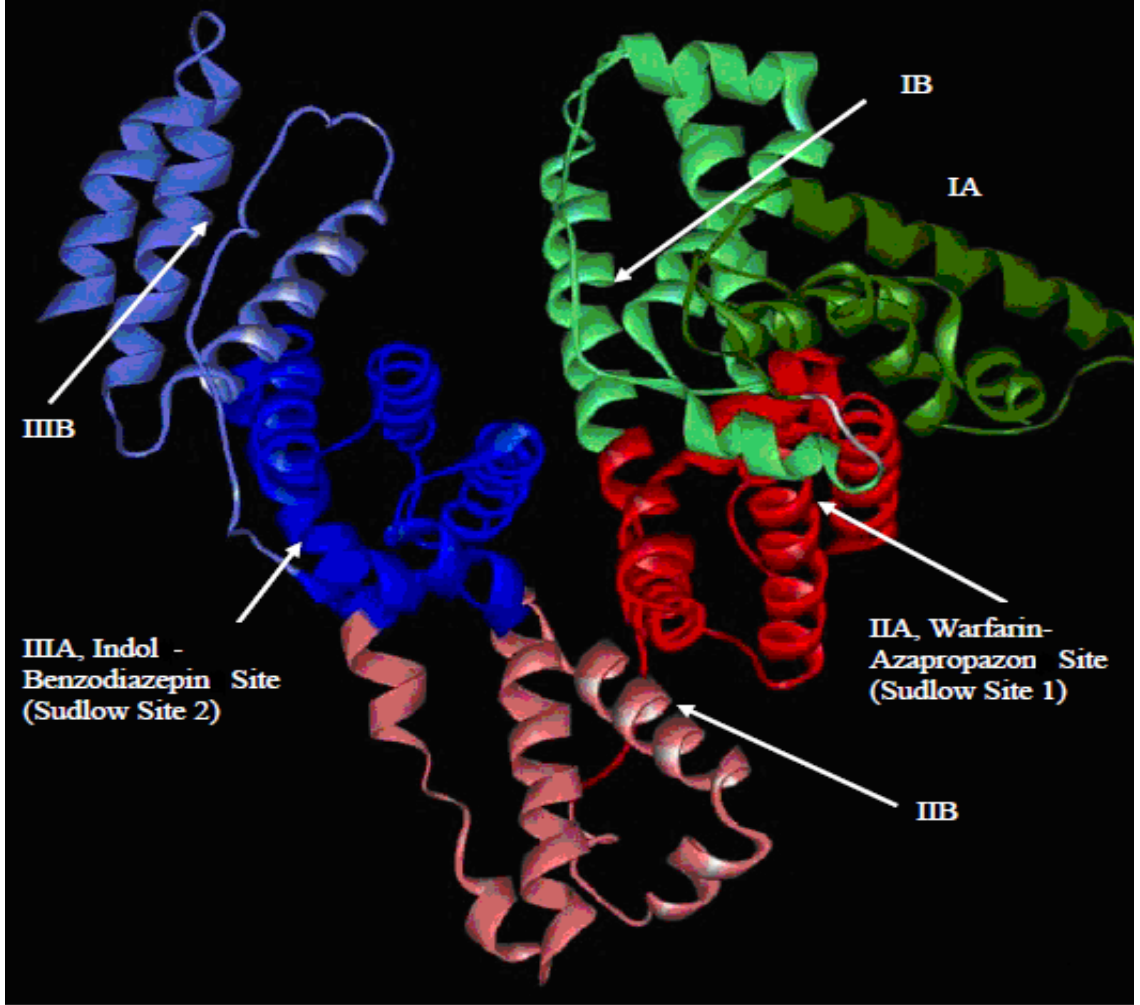
İnsan serum albumin (HSA) proteini, vücut içerisinde pek çok bileşenin taşınmasında önemli bir rol oynayan plazma proteinlerinin yaklaşık % 60'ını oluşturmaktadır (Peters 1996). Bu protein, karaciğer tarafından sentezlenmektedir ve kandaki miktarı yaklaşık 40 mg/mL'dir (Peters 1996, Cui vd 2006, Cui vd 2009a). Genelde stabil, çok çözünen ve asidik karakterli bir proteindir (Sen vd 2009). Bu nedenle de statik bir molekül değil, dinamik bir moleküldür. Yapısı oldukça esnektir ve hızlı bir şekilde konformasyonu değişebilmektedir (Peters 1996).

1.2.3.1. HSA proteininin yapısı

HSA proteini 585 adet amino asit içeren tek bir polipeptit zincirinden oluşan ve 66500 g/mol'lük molekül kütesine sahip bir plazma proteindir (Carter ve Ho 1994, Dockal vd 1999, Langer vd 2008). HSA'nın iyonlaşabilir grupları toplam olarak 116 adet asidik (98 karboksil ve 18 fenolik hidroksil) grup ve 100 adet de bazik (60 amino, 16 imidazolil ve 24 guanidil) grup ihtiva etmektedir (Bordbar ve Taheri-Kafrani 2007).

HSA proteininin büyük bir kısmı α -heliks yapıya sahiptir. HSA'nın yapısında az miktarda β -kıvrımlı yapı yer almaktadır. Bu proteinin yaklaşık dörtte birlik kısmı düz zincir şeklindedir (Peters 1975, Carter ve Ho 1994).

HSA'nın kristal yapısı (bkz. Şekil 1.7), X-ışını kristalografisi ile belirlenmiştir (He ve Carter 1992, Carter ve Ho 1994). Bu yapıya bakıldığında, kalp şekli görünümünü veren üç homolog bölgenin olduğu görülmektedir. Ayrıca, bu bölgelerin her biri A ve B olmak üzere IA, IB, IIA, IIB, IIIA ve IIIB şeklinde iki alt kısma ayrılmaktadır (Bhattacharya vd 2000).



Şekil 1.7. HSA yapısının şematik gösterimi. Her bir bölgedeki alt kısımlar farklı renklerle gösterilmiştir. (Alt kısım IA: koyu yeşil, IB: yeşil, IIA: kırmızı, IIB: pembe, IIIA: koyu mavi, IIIB: açık mavi renkleri ile gösterilmiştir) (Ghuman vd 2005)

Büyük oranda α -heliks yapı içeren bölgeler 17 adet disülfid bağı ile birbirlerine çapraz bağlanmıştır (Sjöholm ve Ljungstedt 1973, Foster 1977, Carter ve Ho 1994). Çapraz bağlanmalar sisteinler arasında gerçekleşmektedir. HSA molekülü üzerinde 35 sistein kalıntısı mevcuttur ve bu çapraz bağlanmalar sayesinde proteinin yapısı daha kararlı olmaktadır (Brown 1975, He ve Carter 1992).

HSA'nın yapısında alt bölge IIA ve IIIA'nın bulunduğu hidrofobik boşluklar, sırasıyla 1. ve 2. bağlanma yeri olarak isimlendirilen iki temel bağlanma bölgesinde yer almaktadır (Jang vd 2009). Sudlow 1 bağlanma yeri, yüksek warfarin ve azapropazon

bağlanma bölgesi olarak, Sudlow 2 bağlanma yeri ise indol-benzodiazepin bağlanma bölgesi olarak adlandırılmaktadır (Ghuman vd 2005, Sudlow vd 1975a).

1.2.3.2. HSA proteininin özellikleri ve fonksiyonları

HSA proteininin çok önemli fizyolojik görevleri bulunmaktadır. HSA, dolaşım sistemindeki kanın ozmotik basıncının ayarlanmasında yaklaşık % 80 oranında katkı sağlamaktadır (Figge vd 1991, Sen vd 2009) ve kanın pH'ını sabit tutmada büyük bir rol oynamaktadır (Figge vd 1991). Yağ asitleri, amino asitler, hormonlar, katyonlar, anyonlar ve çeşitli ilaçlar gibi metabolitlerin taşınmasında ve salınmasında önemli görevler üstlenmektedir (Timerbaev vd 2006). Aynı zamanda, Ca^{2+} gibi iyonların ve suda çözünürlüğü düşük olan küçük organik bileşiklerin bağlanmasını da sağlamaktadır (Pedersen 1971, Kragh-Hansen 1990, Kragh-Hansen vd 2002).

Ayrıca, HSA vücuttaki pek çok endojen ve ekzojen bileşenin transferinde taşıyıcı bir protein olarak görev almaktadır (Peters 1996). Ekzojen toksinleri bir arada tutmasıyla da (Neuzil ve Stocker 1994) antioksidant özellikli bir madde gibi davranmaktadır (Smith vd 1989). Cu^{2+} iyonlarının HSA'ya bağlanması sonucunda da HSA'nın antioksidant özellik gösterdiği bulunmuştur (Zawadzki vd 1991). Buna ilaveten lipoproteinlerde lipaz aktivitesini de arttırmaktadır (Campbell vd 1964).

HSA proteini, lipidlerin metabolizması için de oldukça önemlidir. Penisilinler, sülfonamidler, indol bileşenleri ve benzodiazepinler gibi çok sayıda terapötik ilaçları bağlama gibi spesifik özelliklere de sahiptir (Kratz 2008).

1.2.3.3. HSA proteini üzerindeki bağlanma yerleri

Albuminin amino asit diziliminde yüksek miktarda sistein kalıntısı, düşük miktarlarda glisin, metionin ve bir tane de triptofan kalıntısı bulunmaktadır. HSA'nın triptofan kalıntısı (Trp-214) alt kısım IIA'da yer almaktadır (Jang vd 2009). Albuminin sıra dışı bir özelliği de boş sistein kalıntısı içermesidir. Bu kalıntıda azot monoksit bağlanması gerçekleştirilebilmektedir (Keaney vd 1993).

HSA'nın yapısındaki bölgeler farklı bağlanmalar göstermektedir. HSA'nın amino asit dizilimindeki 1-195. amino asit kalıntıları bölge I'i, 196-383. amino asit kalıntıları bölge II'yi ve 384-585. amino asit kalıntıları bölge III'ü oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar, farklı tür ligantlar için farklı tür bölgelerin tepki verdiğini göstermiştir (Curry vd 1998). Örneğin; uzun zincirli yağ asitleri, warfarin, indol bileşenleri ve Ni²⁺ ve Cu²⁺ gibi metal iyonları bölge I'e; kısa zincirli yağ asitleri ve bilirubin gibi maddeler bölge II'ye (Sen vd 2009, Bhattacharya vd 2000) ve diazepam maddesi bölge III'e bağlanmaktadır (Sen vd 2009).

Çoğu ligantlar spesifik olmayan bağlanmalar gerçekleştirir. HSA polipeptit zincirinde, IIA ve IIIA alt kısımları yüksek afiniteye sahip olan kısımlardır. Buralara bağlanmalar zordur (Müller ve Wollert 1979, Hsia ve Kwan 1981). Çünkü IIA, IIIA, IB ve IIB alt kısımları arasında allosterik (bir bölgeye bağlı ligantın, başka bir bölgenin bağlanma özelliklerini etkilemesi) etkileşimler mevcuttur (Soltys ve Hsia 1978, Hsia vd 1982).

HSA, Sudlow tarafından ilk olarak tanımlanan iki ana bağlanma bölgesine (1. bağlanma yerindeki IIA alt kısmına ve 2. bağlanma yerindeki IIIA alt kısmına) sahiptir (Sudlow vd 1976). IIA alt kısmı, lizin-199 (Lys-199)'dan başlayıp glutamik asit-292 (Glu-292) ile biten polipeptit kısmını içermektedir. Bu kısım büyük hacimli heterosiklik anyonlar ile oldukça pozitif merkezli moleküllerin bağlanmasından sorumludur (Petersen vd 1995). IIIA alt kısmı ise lösin-387'den başlayıp glutamik asit-450 ile biten polipeptit kısmını içermektedir. Bu bölgenin iç kısımları hidrofobik olmasına rağmen, polipeptit zincirinde yer alan arjinin-410 (Arg-410) ve tirozin-411 (Tyr-411) amino asit kalıntıları ligantlarla hidrojen bağı oluşturabilmektedir (Watanabe vd 1982). IIIA alt kısmı ise aromatik nötral moleküllerin bağlanmasından sorumludur (Peters 1975, Silvio vd 2002).

HSA kompleksinin yüksek çözünürlüklü kristal yapısına bakıldığında triptofan-214 (Trp-214); Lys-195, Lys-199, Arg-218 ve Arg-222 olmak üzere dört temel kalıntı tarafından çevrilmiştir (Ghuman vd 2005, Buttar vd 2010). Ligantlar, Trp-214'ü çevreleyen bu amino asit kalıntılarının asidik ve elektronegatif gruplarına yönelerek

hidrojen bağı oluşturabilmektedir. Aynı zamanda i boşluklarda bulunan Tyr-150, histidin-242 (His-242) ve Arg-257 gibi gruplarla da hidrojen bağı yapabilmektedir (Petitpas vd 2001, Ghuman vd 2005, Buttar vd 2010, Ryan vd 2011). IIA alt kısmına ligant bağlanmasını sağlayan diğer önemli bir amino asit kalıntısı Arg-218'dir (Petersen vd 1995, Petersen vd 1996, Petersen vd 1997).

HSA'da yüksek bağlanma afinitesine sahip IIA ve IIIA alt kısımları, diğer alt kısımların etkisinde kalarak bağlanma afinitelerinde değişiklikler gösterebilmektedir. Alt kısım IIB; IA ve IB alt kısım bölgeleriyle hidrofobik etkileşim gösterirken ve hidrojen bağı oluştururken, IIIA ve IIIB alt kısımlarıyla sadece karşılıklı zayıf bir etkileşim gerçekleştirmektedir. Buna ilaveten, bölge I ve bölge II arasındaki karşılıklı etkileşimler; IB, IIIA ve IIIB alt kısımları etkisiyle IIB alt kısmı üzerinde yapısal değişikliğe sebep olmaktadır (Curry vd 1998).

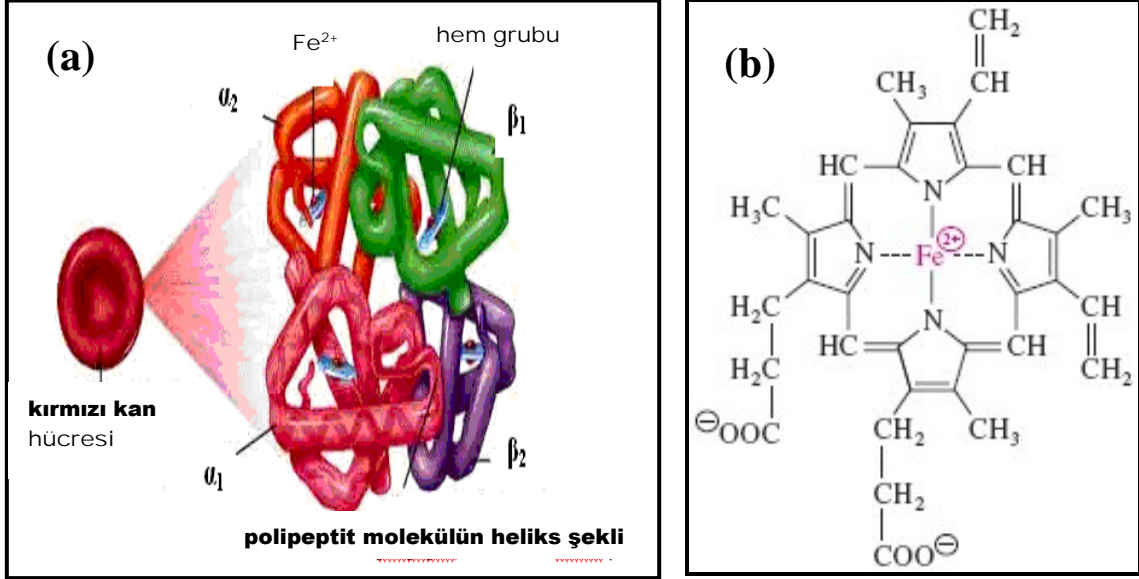
1.2.4. İnsan hemoglobin (HMG) proteini

Hücreler arası iletişim, taşınım ve denge üzerinde önemli bir taşıyıcı olan kanın bileşenleri arasında diğer bileşenler olarak adlandırılan kan hücreleri yer almaktadır. Bu kısımda % 99,9 kırmızı kan hücresi, % <0,1 beyaz kan hücresi ve % <0,1 de trombosit bulunmaktadır. Yüzde bileşeni fazla olan kırmızı kan hücrelerinin, hem fonksiyonel hem de yapısal yönden en önemli üyesi hemoglobindir (Peters 1996). İnsan kanında mililitre başına yaklaşık 5 milyon kırmızı kan hücresi bulunmaktadır. Bu kan hücreleri ortalama 280 milyon hemoglobini eritrositlerde üretmektedir (Dickerson ve Geis 1983).

1.2.4.1. HMG proteininin yapısı

Hemoglobin; 64500 g/mol'lük molekül kütesine sahip (Perutz vd 1968, Jang vd 2009), 2 adet α ve 2 adet β zincirinden oluşmuş tetramerik bir proteindir. HMG'nin α polipeptit zinciri 141 amino asit kalıntısı ve β polipeptit zinciri de 146 amino asit kalıntısı içermektedir (Dickerson ve Geis 1983, Lei vd 2002, Jang vd 2009, Zhang vd 2009). Tetramerik polipeptit zinciri toplamda 574 amino asit kalıntısına sahiptir. HMG, prostetik grup olarak halkalı bir tetrapirrol olan hem grubu içermektedir. Tetrapirroller

düzlemsel bir halka içinde α -metilen köprüleri ile birbirine bağlanmış dört pirol molekülünden oluşmuştur (Murray vd 2004). HMG molekülünün ve hem grubunun şematik gösterimi Şekil 1.8’de yer almaktadır (Linberg vd 1998).



Şekil 1.8. HMG molekülünün (a) ve hem grubunun (b) şematik gösterimi. Her polipeptit zinciri farklı renklerle (α_1 : pembe, α_2 : turuncu, β_1 : yeşil, β_2 : mor, hem grubu: mavi, Fe^{2+} : kırmızı) gösterilmiştir.

Düzlemsel halkanın merkezinde demir(II) iyonu bulunmaktadır. Fe^{2+} , porfirin azotları ile koordine bağ oluşturmaktadır (Dickerson ve Geis 1983). Merkezde bulunan Fe^{2+} iyonu diğer sistemlerdeki iyonlar gibi Fe^{3+} iyonuna yükseltgenmemelidir. Aksi takdirde, biyolojik etkinliğin sonlanmasına neden olmaktadır (Linberg vd 1998).

1.2.4.2. HMG proteininin özellikleri ve fonksiyonları

HMG'nin en önemli fizyolojik görevlerinden birisi ATP sentezinin gerçekleştirilebilmesi için oksijen taşımalarıdır (Jang vd 2009). HMG'nin oksijene bağlanması, pO_2 'nin yaklaşık 13,3 kPa olduğu yer olan akciğerlerde etkin bir şekilde başlar ve pO_2 'nin yaklaşık 4 kPa olduğu dokularda oksijeni serbest bırakmasıyla son bulur (Nelson ve Cox 2005).

Bağlanma ile ilgili 1970'lerde çalışmalar yapan Perutz, kuaterner ve tersiyer yapılar arasında bir geçişin olduğunu ve bu geçişin büyük konformasyon değişikliğine yol açtığını belirtmiş ve protein yapısındaki bu değişikliklerin O₂ bağlanmasıyla meydana geldiğini açıklamıştır (Perutz vd 1987). HMG'deki bu değişiklikler **T** (taut=gergin) **hali** ve **R** (relaxed=gevşek) **hali** olarak bilinmektedir. T formu oksijene karşı düşük afinite gösterirken, R formu ise daha yüksek afinite göstermektedir (Monod vd 1965, Murray vd 2004).

Hemoglobinin doğal olarak bulunduğu (ligant etkileşiminin olmadığı durumda) ve kararlı olduğu hal T halidir. T halindeki alt birimler birbirlerine elektrostatik etkileşimle bağlanmakta, ligant bağlanmasıyla da bu bağlar kırılıp daha kararlı bir yapı olan R haline dönüşmektedir. T halinden R haline dönüşüm, belirli miktarda ligant bağlanması sonucunda gerçekleşmektedir (Koshland vd 1966, Murray vd 2004).

HMG'nin diğer önemli bir özelliği dokularda oluşan CO₂ ve H⁺ı bağlayabilmesidir. Bunu da hemoglobinin α-amino grubuna CO₂ bağlayarak karbamat ve H⁺ iyonu oluşturmasıyla sağlamaktadır (Murray vd 2004). Bağlanma **Bohr etkisi** olarak bilinen düşük pH ve yüksek CO₂ konsantrasyonunda gerçekleşmektedir (Christiansen vd 1914, Henderson 1920).



Böylelikle amino ucun artıdan eksi bir yüke dönüşü, α ve β zincirleri arasında elektrostatik etkileşim oluşmasını teşvik etmektedir. Bu durum oksijensiz hal olan T formunun kararlı hali için karakteristik olup, dokularda oksijen bağlanmasını engelleyerek CO₂ bağlanmasını sağlamaktadır (Weissbluth 1974, Murray vd 2004).

HMG'nin T formunu kararlı hale getiren diğer bir yapı BPG (2,3-bisfosfo gliserat)'dir. Bu yapı, hemoglobindeki alt birimlerin oluşturduğu merkez boşluğuna bağlanmaktadır. β zincirlerinin arasındaki boşluk fazla olduğundan BPG molekülü bu

boşluğa yerleşmektedir ve oksijen atomlarını β zincirindeki amino ucuna bağlayarak yapıyı kararlı hale getirmektedir (Wyman 1964, Murray vd 2004).

HMG'nin bir başka özelliği, kuaterner yapısından kaynaklanan **allosterik özellik** göstermesidir. Homotropik ve heterotropik olmak üzere iki allosterik etki modülüne sahiptir. Ligant bağlanma bölgesinde proteine etki ediyorsa homotropik, ligant bağlanma bölgesinden farklı bir yerde proteine etki ediyorsa heterotropik modül olarak adlandırılmaktadır (Antonini ve Brunori 1971).

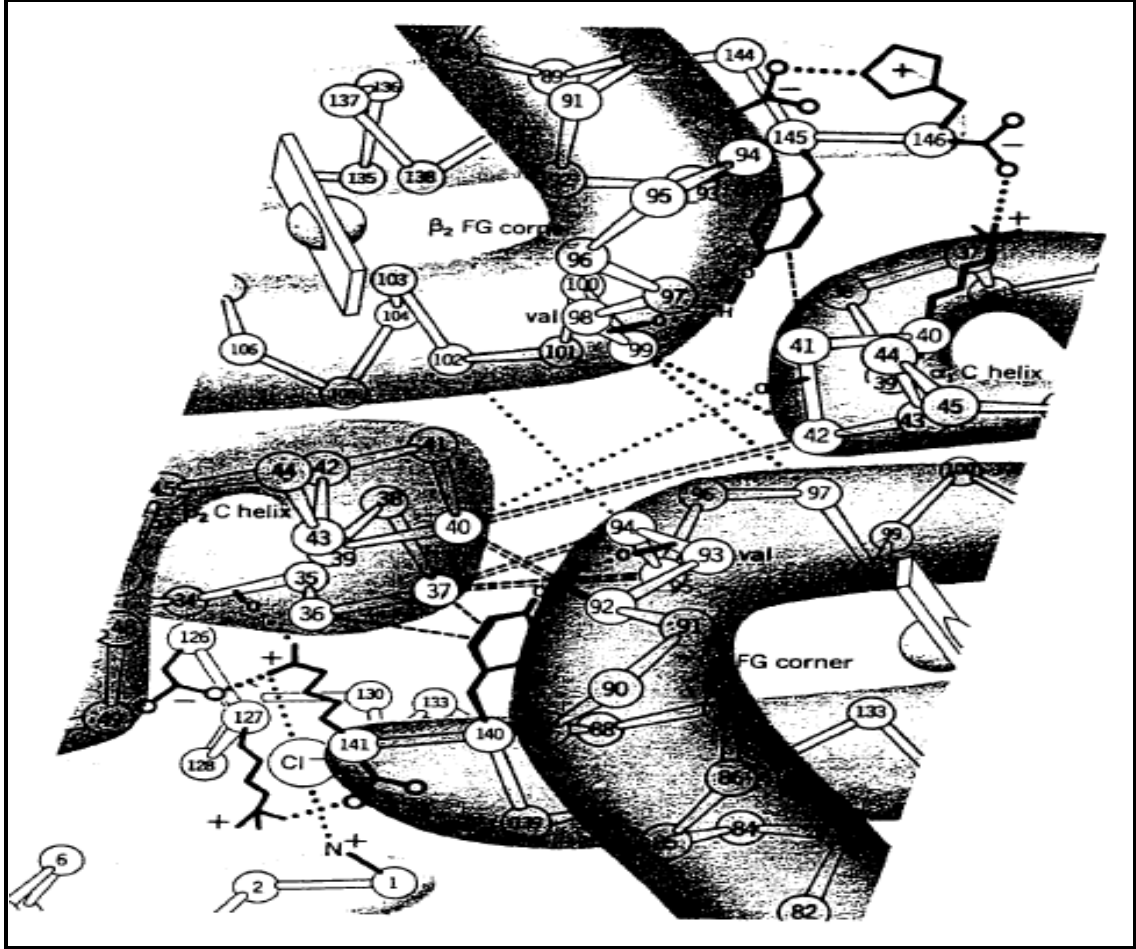
1.2.4.3. HMG proteini üzerindeki bağlanma yerleri

HMG proteini; endojen ve ekzojen pek çok ilaçla tersinir olarak bağlanma gerçekleştirebilmektedir (Mandal vd 2004, Liu vd 2006, Jang vd 2009). Bu bağlanmalar, polipeptit zincirlerin oluşturduğu merkez boşluğunda meydana gelmektedir. HMG'nin polipeptit zinciri üzerinde bulunan amino asit kalıntıları sadece ligantlarla değil, aynı zamanda diğer polipeptit zinciri üzerindeki amino asit kalıntılarıyla da etkileşime girmektedir (Baldvin ve Cyrus 1979).

HMG'nin yapısındaki merkez boşluk, β zincirinin N-terminal kısmı gibi değişebilen gruplarla uyum içerisindedir (His β 2, Lys β 82 ve His β 143 gibi). Merkez boşluğun oluşması karşılıklı zincirlerin etkileşimi açısından oldukça önemlidir. Bu bölgeler, BPG (deoksi-HMG) için bağlanma bölgesi olarak davranmaktadır. Bu durum, HMG'nin fonksiyonları açısından önem taşımaktadır. Bağlanmalar T ve R formlarda da farklılık gösterebilmektedir. Örneğin; deoksi-HMG'de His β 97; Thr α 41 ve Pro α 44 ile etkileşim gösterirken, bunun tersine oksi-HMG'nin His β 97'si Thr α 41 ve Thr α 38 ile kovalent olmayan etkileşimler gerçekleştirmektedir. Bunun sebebi ise iki farklı bağlanma etkileşimi gösteren T ve R formlarının, ligantların durumuna göre stabil etki göstermesinden kaynaklanmaktadır (Baldvin ve Cyrus 1979).

Deoksi-T formu, alt birim zincirler arasında belirli amino asit kalıntıları ile hem elektrostatik hem de hidrojen bağı oluşumu gibi etkileşimler gerçekleştirerek yapıyı

daha uygun hale getirmektedir. Bu etkileşimlerin yan grupları Şekil 1.9'da gösterilmektedir.



Şekil 1.9. Hemoglobindeki α ve β zincirlerinin etkileşimi (Dickerson ve Geis 1983)

β_1 zincirinin C-terminali ile $\text{Lys}\alpha_240$, $\text{His}\beta_1146$ imidazolü ile $\text{Asp}\beta_194$ ve α_1 zincirinin C-terminali ile $\text{Lys}\alpha_2127$ arasında elektrotatik etkileşimler gerçekleşmektedir. $\text{Tyr}\alpha_1141$ ile $\text{Val}\alpha_193$ 'ün peptit karbonil grubu, $\text{Arg}\alpha_1141$ ile $\text{Asp}\alpha_2126$ ve $\text{Val}\alpha_193$ 'ün peptit karbonil grubu arasında hidrojen bağı meydana gelmektedir. α_2 'nin N-terminali ile $\text{Arg}\alpha_1141$ arasında elektrotatik etkileşim ve $\text{Tyr}\beta_1145$ ile $\text{Val}\alpha_193$ 'ün peptit karbonil grubu arasında hidrojen bağı oluşumu gibi kovalent olmayan etkileşimler gerçekleşmektedir. Tüm bu etkileşimler, HMG'ye ligant bağlanmaları olduğunda kırılabilir (Perutz 1970).

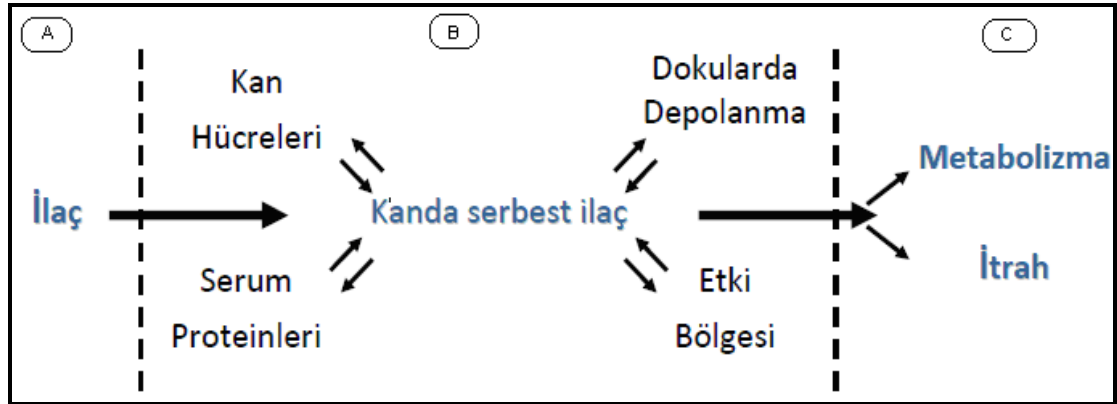
1.3. İlaçlar

İlaç, biyolojik etkinliği olan (biyoaktif) saf bir kimyasal madde ya da ona eşdeğer olan bitkisel veya hayvansal kaynaklı, standart miktarda aktif madde içeren bir karışım olarak tanımlanmaktadır (Kayaalp 2005).

Dünya Sağlık Örgütü ise ilacı "fizyolojik sistemleri veya patolojik durumları, alanın yararına değiştirmek veya incelemek amacıyla kullanılan bir madde ya da ürün" olarak açıklamaktadır (Kayaalp 2005).

1.3.1. İlaçların sınıflandırılması

İlaçların vücut içerisinde etkinlik gösterebilmesi için bunların absorpsiyon, dağılım ve metabolizma şeklinde bir dizi aşamadan geçmesi gerekmektedir. Bu aşamalar genel olarak Şekil 1.10'da şematize edilmektedir (http://www.tfd.org.tr/eski/KTCG_Kurs_042010/02_AK.pdf).



Şekil 1.10. İlaçların vücut içerisindeki yöneliminin şematik gösterimi. A: Absorpsiyon, B: dağılım ve C: metabolizma

Proteinlerle etkileşim içerisinde olan ilaçların kendilerine özgü pek çok özellikleri bulunmaktadır. Genel olarak ilaçları kimyasal yapısına, etki yerine ve kullanıldığı yere göre üç şekilde sınıflandırmak mümkündür.

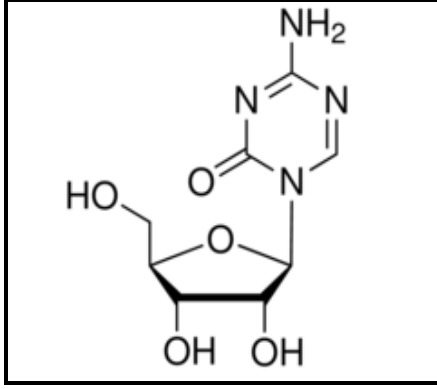
İlk sınıflandırma, ilaçların kimyasal yapısına göredir. Bu yapı ile farmakolojik etki arasında yakın bir ilişki vardır. Bu bakımdan belirli bir yapıdan türeyen ilaçlar genellikle belirli bir ortak etki profili göstermektedir. Bundan dolayı, ilaçlar ortak yapıya göre gruplandırılabilir (kolin esterleri, organik fosfatlar, fenotiazin türevleri ve süstitü benzamit türevleri gibi) (Kayaalp 2005).

Diğer bir sınıflandırma türü, ilaçların etki yerlerine göredir. Örneğin, otonom sinir sistemini etkileyen ilaçlar otonom sinir sistemi ilaçları veya eritrositlerin yapım yeri olan kemik iliğini etkileyen ilaçlar hematopoietik (kan hücrelerini yapımı) ilaçlar olarak adlandırılmaktadır (Kayaalp 2005).

Son olarak ilaçlar, kullanıldığı durumlara ve kullanılma amaçlarına göre sınıflandırılır. Uygulamada yararlı olmasından ve kullanıldığı hastalıkları anımsatmasından dolayı, böyle bir sınıflandırma çok sık kullanılmaktadır. Örneğin, vücut sıcaklığını düşürmek için kullanılan ilaçlar antipiretik (ateş düşürücüler) ilaçlar, öksürüğe karşı kullanılan ilaçlar antitusif (öksürük refleksini inhibe eden) ilaçlar olarak gruplandırılmaktadır. Ağrı kesmek için kullanılan ilaçlar analjezikler (ağrı kesiciler) ve cerrahi girişime elverişli tam bir duyusuzluk durumu oluşturmak için kullanılan ilaçlar genel anestezipler başlığı altında yer alır (Kayaalp 2005).

1.3.2. 5-Azasitidin (AZA) ilacı

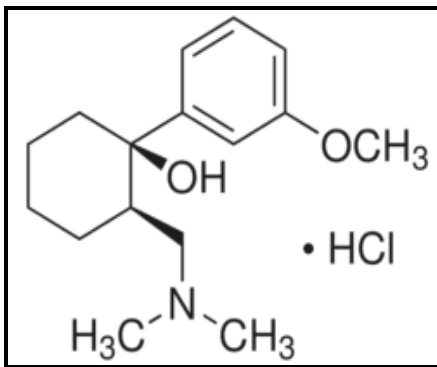
5-Azasitidin (AZA), insan hücrelerinde DNA metilasyon inhibitörü olarak davranan sitidinin kimyasal benzeridir (Argemi vd 2009). Son zamanlarda miyelodisplastik sendromlu ve miyeloid lösemili hastaların tedavisi için terapötik ajan olarak kullanılmaktadır (Khan vd 2006, Claus vd 2007, Guo vd 2008). AZA'nın sitotoksik mekanizmaları, farmakokinetik, farmakodinamik ve klinik çalışmaları tam olarak bilinmediğinden hastalar için problem oluşturabilmektedir (Khan vd 2006, Khan vd 2008). Bu yüzden doz aralığı tahmin edilememektedir (Khan vd 2006). Şekil 1.11'de AZA'nın kimyasal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 1.11. AZA ilacının kimyasal yapısı

1.3.3. Tramadol hidroklorür (THC) ilacı

Tramadol hidroklorür (THC), aminosikloheksanol grubu içeren sentetik bir ağrı kesicidir (Hennies vd 1988, Saccomanni vd 2010). Genellikle, yapısında HCl'yi koordineli şekilde içerdiğinden ticari olarak tramadol hidroklorür olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.12). Tramadolün klinik aktivitesi, birbirinin enantiomeri olan rasemik (\pm) karışımların farklı etki bölgelerine karşı gösterdiği mekanizmalarla açıklanmaktadır. Tramadol (+), serotonin geri emilimini inhibe ederek beyindeki serotonin etkinliğini geliştirirken, tramadol (-) ise sadece noradrenalin geri emilimini inhibe etmeye karşı duyarlıdır (Frink vd 1996). Genelde kronik hastalıklar ve cerrahi operasyonlar sonucunda oluşan fiziksel ağrıları hafifletmek için ağrı kesici olarak yaygın bir şekilde kliniklerde kullanılmaktadır (Lebitasy vd 2009, Chen vd 2010). İlacın terapik plazma konsantrasyonu 100 ile 300 ng.L⁻¹ aralığında değişmekte ve hastanın vereceği tepkiye göre doz miktarı ayarlanmaktadır (Abu-Shawish vd 2010).



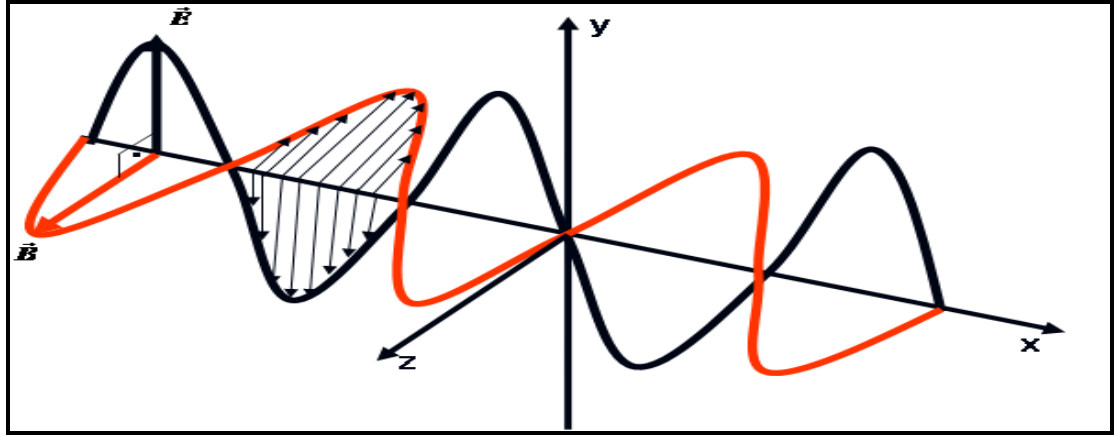
Şekil 1.12. THC ilacının kimyasal yapısı

1.3.4. Proteinler ve ilaçlar arasındaki etkileşimlerin önemi

Organizma içerisinde bulunan proteinler, ilaçların hedefi durumundadırlar. Farmakokinetik ve farmakodinamik açısından protein-ilaç etkileşimleri oldukça önemlidir. İlaçların tasarlanması ve geliştirilmesinde protein ile etkileşimlerin belirlenmesi sadece etkileşimin kimyasal prosesini açıklamakla kalmaz, aynı zamanda ilaçların araştırılmasında değerli bilgiler elde edilmesine de olanak sağlar (Cui vd 2009a, Hu vd 2009). Özellikle de yeni ilaç tasarımı süresince protein bağlama mekanizmasında iki anahtar durum iyi değerlendirilmelidir. Bunlardan ilki, klinik öncesi çalışmalara dayanmaktadır. Bu çalışmalar toksisite, farmakokinetik, farmakodinamik ve kullanılabilir doz aralıkları gibi pek çok çalışma içermektedir. Diğer önemli bir çalışma ise proteinlerin bağlanma prosesindeki karakterizasyonlarının belirlenmesidir. Bunlar da absorpsiyon (emilim), dağılım, metabolizma ve atılım gibi çalışmalardan oluşmaktadır (<http://www.fda.gov/cder/guidance/old032fn.pdf>). Bu çalışmalar protein-ilaç bağlanma mekanizması hakkında yararlı bilgiler sunmaktadır (Sudlow vd 1975a, Sudlow vd 1975b, Sudlow vd 1976) ve birçok bilim dalı açısından büyük önem taşımaktadır (Bogdan vd 2008).

1.4. Floresans Spektroskopisi

Elektromagnetik ışımının madde ile etkileşimini konu alan bilim dalına **spektroskopi** denir. Işımanın madde (atomlar veya moleküller) tarafından soğurulması absorpsiyon (soğurma), yayılması ise emisyon (yayılma) spektroskopisi olarak adlandırılmaktadır. Elektromagnetik ışımının organik moleküller tarafından soğurulması, moleküldeki atomların türüne, düzenlenmesine, molekül şekline ve büyüklüğüne bağlı olarak değişmektedir. Elektromagnetik ışımının dalga ve tanecik olmak üzere iki özelliği bulunmaktadır (Erdik 2007). Kırınım ve girişim olayları elektromagnetik ışımının dalga özelliği ile, emisyon ve absorpsiyon olayları ise tanecik özelliği ile açıklanmaktadır (Beiser 1997). Elektromagnetik dalgaların hepsi aynı hızda ($3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$) yayılmakta ve birbirine dik düzlemler içinde elektriksel ve magnetik bileşenlerden oluşmaktadır (bkz. Şekil 1.13).

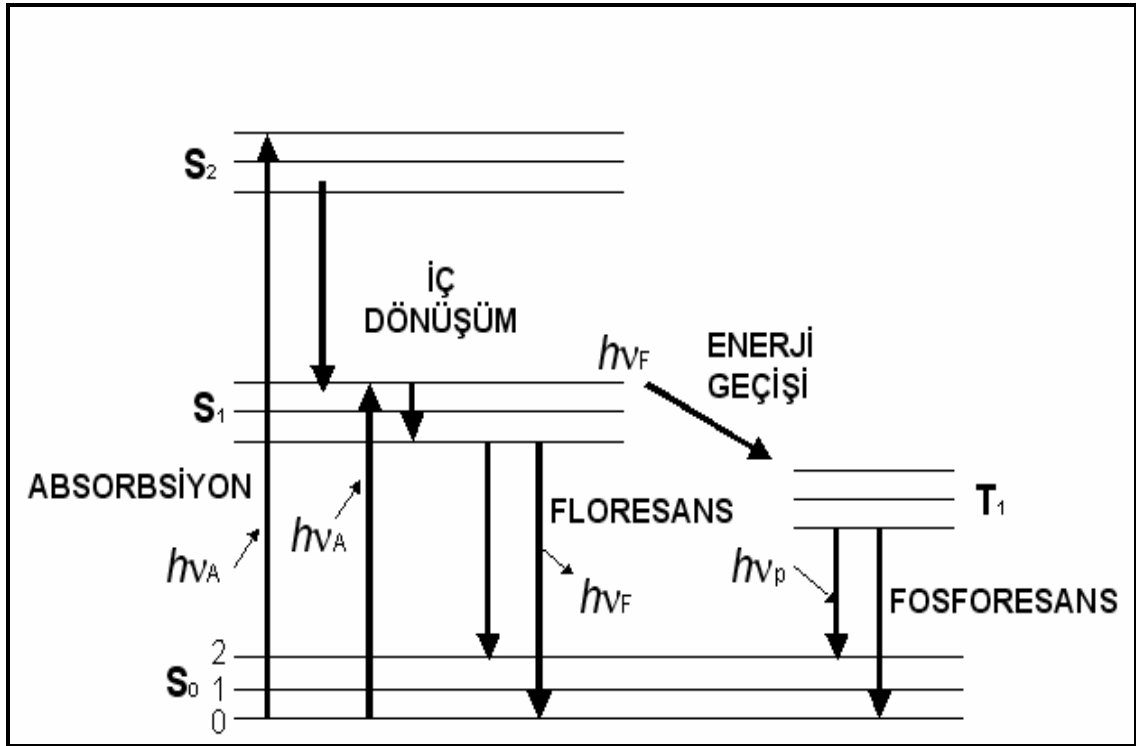


Şekil 1.13. Elektromagnetik dalganın üç boyutlu olarak gösterimi (Atkins 1998)

Floresans spektroskopisi son zamanlarda kullanılan önemli bir analitik yöntemdir. Absorpsiyon ve emisyon mekanizması üzerine dayalıdır. **Absorpsiyon** (soğurma), çeşitli dalga boylarındaki ışın demetinin bir ortamdan geçirilmesi sonucunda belirli dalga boylarının kaybolması olarak ifade edilirken, **emisyon** (yayılma) ise molekülün yüksek enerjiden düşük enerjiye geçişinde fazla enerjiyi foton olarak yayması şeklinde tanımlanmaktadır (Lakowicz 1999a). Üzerine uygun dalga boyunda ışın gönderildiğinde bu ışını absorplayan ve daha sonra da emisyonla uğratan maddeler **lüminesans maddeler**, gerçekleşen olay da **lüminesans** olarak ifade edilir (Skoog vd 1998). Soğurulmuş ışının yayılması olayı **fotolüminesans** olarak da tanımlanmaktadır (Lakowicz 1986). Lüminesans genelde **kemolüminesans** (kimyasal reaksiyonlar sonucu) ve **biyolüminesans** (biyolojik reaksiyonlar sonucu) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Gerçekleştiği süreye göre de floresans ve fosforesans olmak üzere iki şekilde incelenmektedir (Lakowicz 1999a). **Floresans** hemen yok olan ($<10^{-5}$ s) bir lüminesans olup, kısa ömürlüdür. Buna karşılık **fosforesans** hemen yok olmayan ($>10^{-5}$ s) lüminesansın uzun ömürlü kısmıdır (Skoog vd 1998, Lakowicz 1999a). Floresans ile fosforesans arasındaki farklardan birisi uyarılma durumudur. Floresans uyarılmış singlet geçişiyle, fosforesans ise uyarılmış triplet geçişiyle oluşmaktadır. Uyarılmış singlet halde, uyarılmış elektronun spini hâlâ temel haldeki elektronla eşleşmiş durumda iken, triplet halde ise elektron spinleri eşleşmemiş durumda ve paraleldir. Spinlerin yönünün değişikliği de diğer bir farkıdır (Skoog vd 1998). Absorplanan ışının frekansında hiçbir değişiklik olmaksızın temel hale dönerken absorpsiyonla aynı miktarda ışın yayması durumuna **rezonans ışınım** veya **rezonans floresans** denilmektedir (Lakowicz 1986).

Bununla birlikte moleküler floresans bantları rezonans çizgisinden daha uzun dalga boylarında bulunabilmektedirler. Bu uzun dalga boylarına veya düşük enerjili duruma **Stokes kayması** denilmektedir (Skoog vd 1998, Lakowicz 1999a).

Alexander Jablonski tarafından çizilen ışığın absorpsiyon ve emisyon enerji düzeyleri diyagramı Şekil 1.14'te gösterilmektedir.



Şekil 1.14. Jablonski diyagramı. Bu diyagramda çözücü etkileşimleri, sönmürlenme ve enerji transferi gibi etkileşimler hariç tutulmuştur (Lakowicz 1999a)

Şekil 1.14'te tipik bir fotoluminesans molekülünde gerçekleşecek durumların kısmi bir enerji seviyesi diyagramı verilmiştir. En alttaki yatay çizgi, normal olarak singlet haldeki molekülün temel enerjisini göstermekte olup S_0 ile belirtilmiştir. Çözelti içerisindeki tüm moleküller oda sıcaklığında hemen hemen bu enerji durumunda bulunmaktadır. En üstteki çizgiler, üç uyarılmış elektronik halin enerji seviyelerini göstermektedir. Soldaki S_1 ve S_2 çizgileri, elektronik singlet halleri belirtmektedir. Sağdaki tek çizgi (T_1), birinci elektronik triplet halin enerjisini göstermektedir. Normal olarak, birinci uyarılmış triplet halin enerjisi, karşılık gelen singlet halin enerjisinden

daha düşüktür (Skoog vd 1998). Bunun sebebi, triplet hale geçmesi sırasında spin yönünün değişmesi için harcadığı enerji kaybından dolayıdır (Lakowicz 1986). Diyagrama bakıldığında, molekülün uyarılması λ_1 ve λ_2 dalga boyu ile gerçekleştirilmiştir. Daha düşük enerjili, uzun dalga boylu λ_1 ($S_0 \rightarrow S_1$) ve daha yüksek enerjili, kısa dalga boylu λ_2 ($S_0 \rightarrow S_2$) civarında merkezilenmiş iki ışın bandının absorpsiyonu ile uyarılma meydana gelmiştir. Uyarılma işlemi, molekülün çok sayıda uyarılmış titreşim halinden herhangi birine dönüşümü ile gerçekleştirilebilmektedir (Lakowicz 1986, Skoog vd 1998).

Bu dönüşümler ışıklı ve ışısız olarak meydana gelmektedir. Işıklı olanlar floresans ve fosforesanstır (Robinson 2002). Işıksız olanlar da diğer titreşim basamakları arasında oluşan kayıplar olarak tanımlanmaktadır. Bu kayıplar; titreşimsel durulma, iç dönüşüm, dış dönüşüm ve sistemler arası geçişten oluşmaktadır (Lakowicz 1986, Skoog vd 1998). Titreşimsel durulma; aşırı titreşim enerjisi, çözücüde uyarılmış türlerin molekülleri ile çözücü molekülleri arasındaki çarpışmalar sonucunda enerji aktarımına sebep olmaktadır ve bununla birlikte çözücü sıcaklığında bir artış gerçekleşmektedir. Bir molekülün, ışın yaymadan daha düşük bir elektronik seviyeye geçmesi iç dönüşüm olarak ifade edilmektedir. Bu olaylar tam olarak açıklanamamıştır. Uyarılmış bir elektronik halin sönümlenmesi; uyarılmış molekül, çözücü ve çözünenlerin hem etkileşimlerini hem de enerji transferini içerebilmektedir. Bu durumun tamamı dış dönüşüm olarak ifade edilmektedir. Son olarak sistemler arası geçişte, bir elektronun spini ters dönmekte ve bunun sonucunda molekülün enerjisi değişmektedir. Bu geçiş, özellikle iyot veya brom gibi ağır atom içeren moleküllerde gerçekleşmektedir (Skoog vd 1998).

Floresans, belirli dalga boylarında moleküler enerjiden kaynaklanan farklı geçiş tiplerini göstermektedir. 250 nm'den daha küçük dalga boylarındaki ultraviyole ışınların absorpsiyonu sonucu, floresansın nadiren gerçekleştiği bilinmektedir. Çünkü, bu tür ışımlar ön ayrışma ve ayrışma ile uyarılmış halin sönümüne neden olacak kadar enerjik davranmaktadırlar. Örneğin, 200 nm'lik bir ışın yaklaşık 140 kcal mol⁻¹'e karşılık gelmektedir; birçok organik molekül bu büyüklükteki enerjiler ile bazı bağlarını ($\sigma^* \rightarrow \sigma$) kopartabilmektedir. Bu bağların kopmasıyla floresans özellik nadir

görülmektedir. Bunun yerine floresans emisyonu, daha az enerjili $\pi \rightarrow \pi^*$ ve $\pi^* \rightarrow n$ geçişleri ile mümkün olmaktadır (Skoog vd 1998).

Floresansın en düşük enerjili geçişlerinden birisi olan $\pi^* \rightarrow \pi$ geçişi, $\pi^* \rightarrow n$ geçişine göre bileşiklerde daha fazla görülmektedir ve kuantum verimi (lüminesans yapan moleküllerin toplam uyarılmış molekül sayısına oranı olarak tanımlanır) de daha büyüktür. Bu nedenle en şiddetli ve en faydalı floresans, düşük enerjili $\pi^* \rightarrow \pi$ geçişlerine sahip aromatik fonksiyonel grupları içeren bileşiklerde meydana gelmektedir. Ayrıca, alifatik ve alisiklik (halkalı yapıyı oluşturan karbon atomları arasında çift bağın bulunmadığı bileşikler) karbonil gruplarında veya fazla sayıda konjüge çift bağlı yapılar içeren bileşiklerde de floresans özellik gerçekleşebilmektedir (Skoog vd 1998).

Aromatik hidrokarbonların süstitüe olmamış bileşikleri, çözeltilerde floresans özellik gösterebilmektedir. Piridin, furan, tiyofen ve pirol gibi heterosiklik bileşiklerin floresans özellik göstermediği bilinmektedir. Bunun sebebi, heterosiklik bileşiklerin en düşük enerjili elektronik geçişten triplet hale geçmesi sırasında floresansı önleyen $n \rightarrow \pi^*$ geçişinin olmasından kaynaklanmaktadır. Bununla beraber benzen ile heterosiklik bir halkanın bir arada bulunduğu bileşiklerin de floresans özellik gösterdiği bilinmektedir. Böyle yapılara kinolin, izokinolin ve indol gibi bileşikler örnek verilebilir. Benzen halkasındaki süstitüsyonlar, maksimum absorpsiyon dalga boyunda kaymalara neden olabilmektedir (Skoog vd 1998).

Floresans şiddetine yapısal rijitlik, sıcaklık, çözücü, pH, konsantrasyon ve çözünmüş oksijen gibi çeşitli faktörler etki etmektedir. Floresansın özellikle rijit yapılara sahip moleküllerde daha fazla olduğu kuantum verimleri ile bulunmuştur. Bu farklılık metilen grubunun köprü yapmasıyla oluşan rijitlik artışının bir sonucu olarak yorumlanmıştır. Bifenil ve floren bu özellikleri içeren yapılara örnek verilebilir. Rijit olan yapıların, rijit olmayan yapılara göre avantajı, molekülün farklı kısımlarının farklı titreşimler yapmaması nedeniyle bazı enerji kayıpları göstermemesinden ileri gelmektedir. Genelde bir molekülün kuantum verimi sıcaklık ile değişmektedir. Sıcaklığın artması kuantum verimini azaltmaktadır. Çünkü, yüksek sıcaklıklarda

çarpışma frekansının artması dış dönüşüm ile sönümlenme olasılığını arttırmaktadır. Çözücü viskozitesindeki azalma da benzer şekilde dış dönüşümü arttırmakta ve sönümlenmede bir artışa neden olmaktadır. Asidik veya bazik sübstitüentler içeren aromatik bileşiklerin floresansı pH'a bağlı olarak değişmektedir. Bileşiğin iyonlaşmış veya iyonlaşmamış halleri için emisyon şiddetleri farklıdır. Fenol ve anilin bu etkiyi gösteren bileşiklerdir. Bu tip bileşiklerin emisyonundaki değişimler, moleküllerin asidik ve bazik formları ile ilgili rezonans türlerinin sayısının farklılığından meydana gelmektedir. Diğer önemli bir etki olan konsantrasyon, floresans şiddetinin değişmesine neden olmaktadır. Konsantrasyonun artması floresansı azaltır ve bu da kendi-kendine sönümlenme ve absorpsiyon olmak üzere iki faktöre bağlıdır. Kendi-kendine sönümlenme uyarılmış moleküller arasındaki çarpışmaların sonucu iken, kendi-kendine absorpsiyon ise emisyon ile absorpsiyon piklerinin örtüşmesi sonucu meydana gelmektedir. Bir çözültide çözülmüş oksijen bulunması genellikle floresansı azaltır. Bu durum, floresans yapan türlerin fotokimyasal olarak yükseltgenmesinin bir sonucu olarak açıklanmaktadır (Skoog vd 1998).

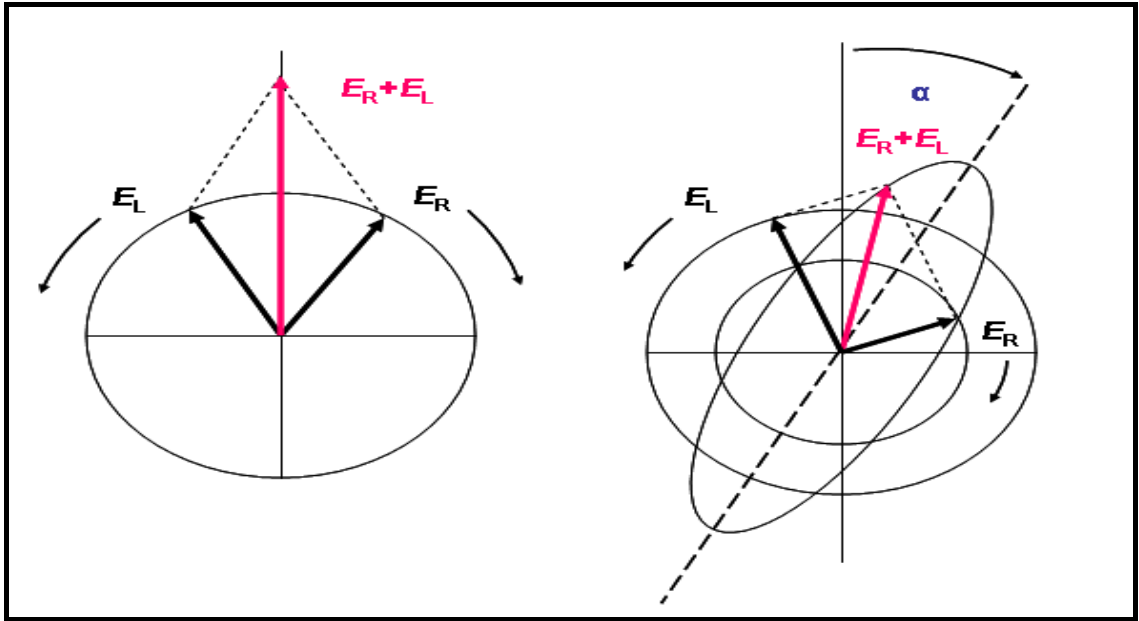
Floresans spektroskopisi, özellikle de protein gibi biyolojik moleküllerin yapı ve özelliklerinin tanınmasında, uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Weber, Teale, Konev, Burstein, Brand gibi pek çok bilim adamı proteinlerin lüminesans özelliklerinin bulunduğunu yaptıkları çalışmalarla göstermişlerdir (Lakowicz 1999b).

1.5. Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi

Dairesel dikroizm (CD), sağ ve sol dairesel polarize ışığın absorpsiyon farkını ölçebilen bir spektroskopi türüdür. Asimetrik veya kiral moleküller absorpsiyon spektroskopisinde CD bantları göstermektedir. Çünkü, optikçe aktif olduklarından sağ ve sol dairesel polarize ışığı farklı şekillerde absorplamaktadırlar. CD, sadece absorpsiyonun meydana geldiği spektral bölgelerde gözlenmektedir. Absorpsiyonun oluşmadığı yani sıfır olduğu durumda CD bantları elde edilememektedir. Aşağıda verilen formülde absorpsiyon farkının sıfırdan farklı olduğu vurgulanmaktadır. Formüle göre ϵ_R ve ϵ_L sırasıyla sağ ve sol dairesel polarize ışık için molar absorpsiyon katsayısını göstermektedir (Lambert vd 1998).

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_R - \varepsilon_L \neq 0 \quad (1.2)$$

Linear polarize ışık, eşit ve zıt genliğe sahip olan dairesel polarize ışık için süper pozisyon olarak görülmektedir. Çünkü, sağ ve sol polarize ışık genliğinin kombinasyonu sonucu oluşan dikey çizgi elipsin oluşumunu sağlamaktadır (Snatzke ve Woody 2000). Elips merkezinin oluşumu Şekil 1.15'te gösterilmektedir.

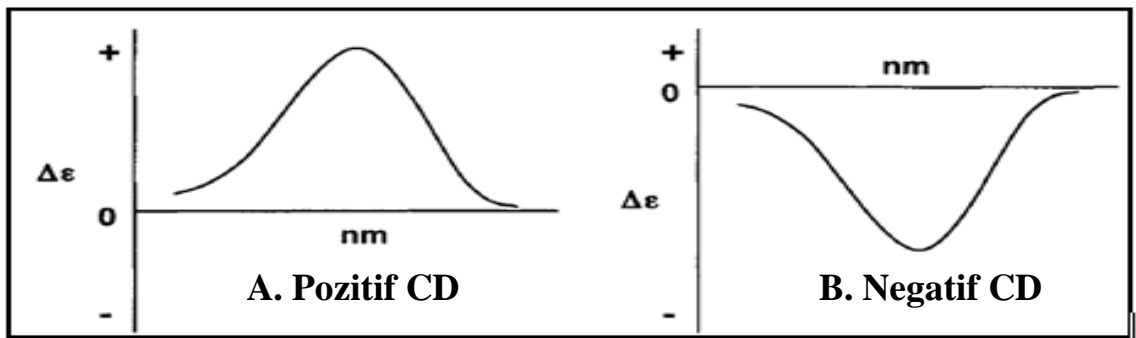


Şekil 1.15. Elips merkezinin oluşumu (Snatzke ve Woody 2000)

Son yirmi yıl içinde protein sentezindeki ve protein mühendisliğindeki büyük ilerlemeler, CD tekniği kullanılarak proteinlerin sekonder yapılarının belirlenmesi çalışmalarına neden olmuştur. Detaylı değerlendirmeler sonucunda proteinlerin yapısının belirlenmesinde CD'nin faydalı bir teknik olduğu yapılan yayınlarla ortaya konmuştur (Cantor ve Schimmel 1980, Van Mierlo vd 2000). Proteinlerin optikçe aktifliği, yapısında L-amino asiti olmasından ve yüksek oranda α -heliks yapı içermesinden ileri gelmektedir. Üstelik proteinde bulunan amino asit kalıntıları arasındaki elektronik geçişler optikçe aktiflik ile sağlanmaktadır. Uzak UV (170-250 nm) ve UV (250-400 nm) bölgesinde elde edilen CD ölçümleri, simetrik peptit bağları ve asimetrik amino asit zincirlerinde bulunan kromoforlar sayesinde proteinlerin

ve asimetrik amino asit zincirlerinde bulunan kromoforlar sayesinde proteinlerin sekonder yapısı hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (Greenfield ve Fasman 1969, Cantor ve Schimmel 1980).

Proteinin sekonder yapısındaki elektronik geçişler peptit bağlarında bulunan kromoforların farklı yönelimi sonucunda meydana gelmektedir. Böylelikle farklı elektronik geçişler oluşmaktadır. Bu geçişler; α -heliks, β -tabaka ve bunların karışımını içeren temel sekonder yapının üçü için de ayrı ayrı bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Peptit bağındaki kromoforun en düşük enerjili geçişi $n \rightarrow \pi^*$ geçiştir ve bu geçiş sırasında 210-220 nm'de çok zayıf bir pik gözlenmektedir ($\epsilon_{\text{maks}} \sim 100$). α -heliks polipeptit zinciri ise $n \rightarrow \pi^*$ geçişi sırasında 220 nm yakınlarında küçük bir omuz piki vermektedir. α -heliks polipeptitleri için en güçlü bağlanma $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinin olduğu 190 nm'de gözlenmektedir. Bu geçiş özellikle büyük peptit bağlarının absorpsiyonlarından sorumludur ($\epsilon_{\text{maks}} \sim 7000$). $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinin uyarılma dalga boyunda α -heliks polipeptitler için negatif bağlanmanın 208 nm'de, pozitif bağlanmanın ise 192 nm'de gerçekleştiği bilinmektedir (Greenfield ve Fasman 1969, Cantor ve Schimmel 1980, Kelly vd 2005). Pozitif ve negatif bağlanmanın CD'ye etkisi Şekil 1.16'da şematize edilmektedir.



Şekil 1.16. Pozitif ve negatif CD'nin gösterimi (Lambert vd 1998)

1.6. Araştırmanın Amacı

İnsan serum albumin (HSA) ve insan hemoglobin (HMG) proteinleri ile 5-azasitidin (AZA) ve tramadol hidroklorür (THC) ilaçları arasındaki etkileşimleri floresans ve dairesel dikroizm spektroskopileriyle incelemek, etkileşim gösteren ilaç-protein sistemleri için bağlanma sabiti, bağlanma sayısı ve termodinamik parametre değerlerini belirlemek ve etkileşim sonrasında proteinlerin sekonder yapılarında oluşabilecek değişiklikleri tespit etmektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

Cheng vd (2006), karaciğer fonksiyonunu test eden bromsülfalein ile HSA arasındaki etkileşimleri farklı sıcaklıklarda ve pH 7,24'te floresans spektroskopisi yöntemiyle incelemişlerdir. Bu çalışmada, HSA-bromsülfalein arasındaki bağlanma sabiti değeri Stern-Volmer eşitliği kullanılarak belirlenmiş ve bağlanma sabiti değeri üzerine çeşitli metal iyonlarının etkisi araştırılmıştır. Termodinamik parametre değerlerinden entalpi değişimi ve entropi değişimi sırasıyla $9,3 \text{ kJmol}^{-1}$ ve $22,3 \text{ Jmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bromsülfalein ile HSA arasındaki etkileşim sonucu proteinin floresans şiddetindeki sönümlenmenin statik sönümlenme mekanizması üzerinden meydana geldiği elde edilen verilerle belirtilmiştir. HSA-bromsülfalein sistemi için bağlanma sabiti değerinin çeşitli iyonlar varlığında % 30-55 oranında azaldığı görülmüştür. Ayrıca, protein-ilaç bağlanma bölgelerinde hidrofobik etkileşimlerin önemli rol oynadığı bulunmuştur. Gao vd (2010), HSA ile bronşit, tümör, eklem iltihabı, romatizma, hipertansiyon ve kalp rahatsızlıkları gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanılan syringin ilacı arasındaki etkileşimleri CD, FTIR, moleküler modelleme, UV-vis ve floresans spektroskopisi metotlarıyla araştırmışlardır. Floresans sonuçlarından, HSA ve syringin arasındaki floresans şiddetinin ortamdaki ilaç konsantrasyonuyla değişebileceği belirtilmiştir. Bu veriler Bhattacharya vd (1994) tarafından geliştirilen eşitlik ile analiz edilmiştir. 295 K 'de $2,97 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ lik bağlanma sabiti değeri ile syringinin HSA üzerine tek bir bölgeden bağlandığı bulunmuştur. Termodinamik parametreler van't Hoff eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Entalpi değişim (ΔH) ve entropi değişim (ΔS) değerleri sırasıyla $-5,23 \text{ kJmol}^{-1}$ ve $103,34 \text{ Jmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu durum, bağlanma bölgelerinde hidrofobik etkileşimlerin olduğunu göstermiştir.

Yuan vd (2007), HSA ile maydanozdaki etken maddelerden birisi olan ve kardiyovasküler gibi hastalıklara doğal ilaç etkisi gösteren apigenin maddesi arasındaki etkileşimleri CD, molekül modelleme, floresans ve UV-vis absorpsiyon spektroskopisi metotlarıyla incelemişlerdir. HSA'ya apigeninin bağlanması sonucunda elde edilen veriler, proteindeki sönümlenmenin statik sönümlenme mekanizması üzerinden gerçekleştiğini göstermiş ve ΔH ile ΔS değerleri sırasıyla $17,497 \text{ kJmol}^{-1}$ ve $37,04$

$\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu da HSA-apigenin kompleksinin bağlanma bölgelerinde hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerin etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, apigenin maddesi HSA proteininin sekonder yapısında herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır. HSA ve apigenin arasındaki bağlanma uzaklığı Förster rezonans enerji transferi (FRET) ile 3,21 nm olarak bulunmuştur. Ge vd (2010), HSA ile theasinesin arasındaki bağlanma özelliklerini UV-vis ve floresans spektroskopisi kullanarak araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlar, theasinesin tarafından neden olunan protein floresans şiddetindeki sönümlenmenin statik sönümle mekanizması üzerinden gerçekleştiğini göstermiştir. FRET aracılığıyla theasinesinin triptofana olan uzaklığının 4,64 nm olduğu bulunmuştur. HSA-theasinesin sistemi için 298 K, 310 K ve 323 K'deki sönümlenme sabitleri sırasıyla $2,55 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $2,16 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ve $1,75 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Termodinamik parametreler $\Delta H > 0$ ve $\Delta S > 0$ olarak bulunmuştur. Bu da theasinesin-HSA bağlanma bölgesinde sadece elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin olduğunu göstermiştir.

Cheng vd (2011), kemoterapi tedavisinde kullanılan, tümör ve kanser gibi hastalıkların büyümesini engelleyen etken maddelerden dosetaksel ile HMG arasındaki etkileşimleri floresans sönümlenme tekniği, CD, UV-vis ve FTIR spektroskopisi gibi çeşitli spektroskopik teknikleri kullanarak incelemişlerdir. Floresans analiz verileri protein-ilaç etkileşimlerinin dinamik sönümlenme mekanizması üzerinden gerçekleştiğini göstermiştir. ΔH ve ΔS değerleri sırasıyla $9,18 \text{ kJmol}^{-1}$ ve $116 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ olarak hesaplanmış ve HMG ile dosetaksel arasındaki bağlanmada hidrofobik etkileşimlerin önemli rol oynadığı görülmüştür. Farklı spektroskopik metotlardan elde edilen veriler, dosetaksel varlığında HMG'nin konformasyonunun değiştiğini göstermiştir. Ayrıca, moleküler modelleme yöntemiyle dosetakselin HMG boşluğuna yerleştiği bulunmuştur. Zhou vd (2009), HMG ile cilt hastalıkları tedavisinde fototerapi ajanı olarak kullanılan, parazit mantarların ekstraktlarından elde edilen ve doğal bir pigment olan hipokrellin arasındaki etkileşimleri spektrofotometrik ve spektroflorimetrik yöntemlerle araştırmışlardır. Sonuçta proteinin floresans şiddetinin, artan hipokrellin konsantrasyonu ile azaldığı ve pik pozisyonunun maviye kaydığı belirtilmiştir. Ayrıca, 25 °C ve 42 °C'deki sönümlenme hız sabitleri sırasıyla $5,0 \times 10^{12} \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ ve $3,9 \times 10^{12} \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Hipokrellinin HMG'ye bağlanma sayıları 25 °C için 0,90 ve 42

$^{\circ}\text{C}$ için de 0,83 olarak bulunmuştur. Termodinamik parametrelerin belirlenmesi sonucunda HMG-hipokrellin arasında elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin olduğu görülmüştür.

Maitra vd (2007), antidepresan ilaç olarak kullanılan alprazolam ile HMG arasındaki etkileşimleri çeşitli yöntemlerle çalışmışlardır. Elde edilen sonuçlar, HMG proteini ile alprazolam arasında kuvvetli bir etkileşim olduğunu göstermiştir. Ayrıca, CD spektrumu analiziyle HMG'nin alt birimi olan α -heliks yapısında büyük değişimlerin meydana geldiği görülmüştür. Alprazolamın HMG'ye bağlanması sonucunda molekülde hacimsel bir büyümenin olduğu dinamik ışık saçılım deneyi ile ispatlanmıştır. Jang vd (2009), antitümör terapisi için kliniklerde yaygın bir şekilde kullanılan mitomisin C ile iki kan proteini olan HSA ve HMG arasındaki etkileşimleri CD, floresans sönümlenme ve senkronize floresans yöntemleriyle araştırmışlardır. Floresans verileri, proteinlere bağlanan mitomisin C'nin güçlü bir floresans sönümlenmesi yaptığını ve sadece bir bağlanma bölgesinden etkileşime girdiğini göstermiştir. Bağlanma sabitleri 298 K'de HSA ve HMG için sırasıyla $2,71 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ve $2,56 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Farklı sıcaklıklarda elde edilen termodinamik parametreler sonucunda, mitomisin C'nin HSA'ya ve HMG'ye bağlanmasında hem hidrofobik etkileşimin hem de hidrojen bağının etkili olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca, CD spektroskopisi analiziyle her iki proteinin sekonder yapılarında herhangi bir değişikliğin olmadığı belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada protein olarak insan serum albumin ve insan hemoglobin proteinleri ve ilaç maddesi olarak 5-azasitidin ve tramadol hidroklorür kullanılmıştır. Bu proteinlerin ve ilaçların kısaltmaları ve molekül kütleleri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Çözeltilerin pH değerinin fizyolojik pH değerinde sabit tutulmasını sağlamak amacıyla tris(hidroksimetil)aminometan tamponu ve iyonik şiddet ayarlayıcı olarak NaCl kullanılmıştır. Kullanılan kimyasal maddelerin tümü Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışılan proteinlerin ve ilaçların kısaltmaları ve molekül kütleleri

Proteinlerin ve ilaçların adları	Kısaltma	Molekül kütlesi (g/mol)
İnsan serum albumin proteini	HSA	66500
İnsan hemoglobin proteini	HMG	64500
5-Azasitidin	AZA	244,20
Tramadol hidroklorür	THC	299,84

Spektrofotometrik ölçümler sırasıyla sıcaklık kontrol ünitesine sahip Varian marka Cary 5000 model UV/Vis/NIR spektrofotometre cihazında ve Varian marka Cary Eclipse model floresans spektrofotometre cihazında gerçekleştirilmiştir. Tartımlar 0,1 mg hassasiyete sahip Mettler marka ML204/01 model hassas terazide alınmıştır. Çözeltilerin pH değerleri Jenway marka 3040 Ion Analyser model potansiyometreye bağlı kombine cam elektrot ile ölçülmüştür.

3.2. Metot

Protein-ilaç etkileşim çalışmasının ilk aşamasında $4,0 \times 10^{-5}$ M'lık stok HSA çözeltisi ve $1,0 \times 10^{-2}$ M'lık stok AZA ve THC çözeltileri hazırlanmıştır. HSA protein çözeltisinin hazırlanmasında insan serum albumin proteininin molekül kütlesi 66500 g/mol olarak kullanılmıştır (Carter ve Ho 1994, Dockal vd 1999, Langer vd 2008, Jang vd 2009). Stok protein ve ilaç çözeltileri kullanılarak sabit HSA konsantrasyonuna ve farklı ilaç konsantrasyonlarına sahip bir seri protein-ilaç karışım çözeltisi hazırlanmıştır. Protein-ilaç etkileşim deneyleri için hazırlanan çözeltilerdeki HSA konsantrasyonu $4,0 \times 10^{-6}$ M olarak sabit tutulurken, ilaç konsantrasyonları HSA-AZA sistemi için $1,0 \times 10^{-6}$ M - $120,0 \times 10^{-6}$ M aralığında ve HSA-THC sistemi için $1,0 \times 10^{-6}$ M - $40,0 \times 10^{-6}$ M aralığında değiştirilmiştir.

İkinci aşamada ise HMG-ilaç sistemleri arasındaki etkileşimler incelenmiştir. Bunun için, $4,0 \times 10^{-5}$ M'lık stok HMG çözeltisi ve $1,0 \times 10^{-2}$ M'lık stok AZA ve THC çözeltileri hazırlanmıştır. HMG protein çözeltisinin hazırlanmasında insan hemoglobin proteininin molekül kütlesi 64500 g/mol olarak kullanılmıştır (Perutz 1968, Jang vd 2009). Protein-ilaç etkileşimleri için tüm çözeltiler stok protein ve ilaç çözeltilerinden hazırlanmıştır. Bu çözeltilerde HMG konsantrasyonu $4,0 \times 10^{-6}$ M olarak sabit tutulurken, ilaç konsantrasyonları HMG-AZA sistemi için $1,0 \times 10^{-6}$ M - $120,0 \times 10^{-6}$ M aralığında ve HMG-THC sistemi için $0,5 \times 10^{-6}$ M - $9,0 \times 10^{-6}$ M aralığında değiştirilmiştir. Protein, ilaç ve protein-ilaç karışım çözeltilerinin tamamı çözgen olarak 0,1 M NaCl içeren 0,05 M'lık tris(hidroksimetil)aminometan tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan protein-ilaç çözeltilerinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'de hem absorpsiyon spektrumları hem de emisyon spektrumları elde edilmiştir. Çözeltilerin absorpsiyon spektrumlarını ölçmek için sıcaklık kontrol ünitesine sahip Varian marka Cary 5000 model UV/Vis/NIR spektrofotometre cihazı kullanılırken, emisyon spektrumlarını ölçmek için ise peltier ünitesine sahip Varian marka Cary Eclipse model floresans spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Tüm bu ölçümler 1,0 cm'lik kuartz hücrelerin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde floresans spektrofotometre

cihazında uyarılma ve emisyon slit (yarık) genişlikleri 5,0 nm'ye, uyarılma dalga boyu 280 nm'ye ve emisyon dalga boyu aralığı da 285-500 nm'ye ayarlanmıştır. Hem absorpsiyon hem de emisyon spektrumları ölçülmeden önce sıcaklık kontrol ünitesinden sıcaklık ayarlaması yapılmış ve her bir numune çözeltisinin termal dengeye gelmesi için numuneler 15 dakika süresince cihazın numune bölmesinde bekletilmiştir. Daha sonra da çözeltilerin absorpsiyon ve emisyon spektrumları kaydedilmiştir.

Protein, ilaç ve protein-ilaç çözeltilerinin farklı sıcaklardaki absorpsiyon ve emisyon spektrumlarının ölçülmesinde referans madde olarak ilgili sisteme göre ya 0,1 M NaCl içeren 0,05 M'lık tris(hidroksimetil)aminometan içeren tampon çözeltisi ya da protein-ilaç karışım çözeltisindeki ile aynı konsantrasyona sahip tamponda hazırlanmış saf ilaç çözeltisi kullanılmıştır.

Protein-ilaç sistemlerinin floresans sönümlenme mekanizmalarını anlamak için protein-ilaç sistemlerine ait floresans sönümlenme verileri farklı sıcaklıklarda Stern-Volmer eşitliği kullanılarak analiz edilmiştir. Stern-Volmer eşitliği;

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (3.1)$$

şeklindedir (Cui vd 2009a, Ge vd 2010). Buradaki F_0 ve F sırasıyla ilaç maddesi yokluğundaki ve varlığındaki protein çözeltisinin floresans şiddetini, k_q proteinin sönümlenme hız sabitini, τ_0 ilaç maddesi yokluğundaki floresansın ömür süresini, $[Q]$ protein-ilaç karışım çözeltisindeki ilaç konsantrasyonunu ve K_{SV} ise Stern-Volmer sönümlenme sabitini göstermektedir.

Protein-ilaç sistemlerinde kompleks oluşumu, enerji transferi, uyarılmış hal reaksiyonları gibi pek çok etki sönümlenme ile sonuçlanabilmektedir. Sönümlenme mekanizmaları temelde iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi dinamik sönümlenme, diğeri statik sönümlenmedir (Kandagal vd 2007). Dinamik sönümlenme, florofor ve sönümlendirici arasındaki çarpışma sonucunda oluşurken, statik sönümlenme ise florofor ve sönümlendirici arasındaki kompleks oluşumundan kaynaklanmaktadır. Genellikle dinamik ve statik sönümlenme viskozite ve sıcaklığa

bağlı olarak da ayırt edilebilmektedir. Statik sönümlemede sıcaklığın artmasıyla sönümleme sabiti değeri azalırken, dinamik sönümlemede ise tam tersi durum söz konusudur (Lacowicz 1999b, Cui vd 2009b, Ge vd 2010). Bu durum dinamik sönümleme için yüksek sıcaklıkta difüzyon katsayısının artmasına neden olduğundan biyomoleküllerin sönümleme sabiti değerini arttırmaktadır (Eftink ve Ghiron 1982, Cui vd 2009b).

Sönümleme mekanizmalarının belirlenmesiyle her bir protein-ilaç sistemi için ilaç maddesi ile protein molekülü arasındaki bağlanma reaksiyonları hakkında ayrıntılı bilgilere ulaşılabilmektedir. Protein-ilaç sistemleri için farklı sıcaklıklarda protein molekülü başına ilaç maddesi bağlanma yeri sayısının (n 'nin) ve bağlanma sabitinin (K_a 'nın) değeri;

$$\log ((F_0-F)/F) = \log K_a + n \log [Q] \quad (3.2)$$

eşitliği yardımıyla hesaplanmıştır (Xie vd 2006, Han vd 2009). Buradaki F_0 , F ve $[Q]$ parametreleri Eşitlik (3.1)'de tanımlanan parametrelerle aynıdır. F_0 ve F sırasıyla ilaç maddesi yokluğundaki ve varlığındaki protein çözeltisinin floresans şiddetini, $[Q]$ protein-ilaç karışım çözeltisindeki ilaç konsantrasyonunu göstermektedir. Eşitlik (3.2)'ye göre, $\log (F_0-F)/F$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiğinin çizilmesiyle elde edilen doğrusal grafiklerin eğim ve kayım değerlerinden yararlanılarak K_a ve n değerleri hesaplanmıştır.

Protein ile ilaç molekülleri arasında van der Waals kuvveti, hidrojen bağı, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler olmak üzere dört esas etkileşim bulunmaktadır (Hu vd 2005, Jang vd 2009, Ge vd 2010). Protein-ilaç etkileşimlerinde herhangi bir yapısal bozunma olmaksızın etkileşimlerin farklı sıcaklıklardaki doğasını belirlemek için termodinamik parametre değerleri hesaplanmıştır. Van't Hoff eşitliği kullanılarak entalpi değişim (ΔH) ve entropi değişim (ΔS) değerleri belirlenmiştir. Van't Hoff eşitliği;

$$\ln K_a = - \Delta H/RT + \Delta S/R \quad (3.3)$$

şeklindedir. Bu eşitlikteki K_a çalışılan sıcaklıktaki bağlanma sabiti değerini, T çözelti sıcaklığını ve R ideal gaz sabitini göstermektedir. Her bir sisteme ait ΔH ve ΔS değerlerini hesaplamak için $\ln K_a$ değerlerine karşı $1/T$ grafiği çizilmiştir. Van't Hoff grafiğindeki verilerin lineer regresyon analiziyle işlenmesi sonucunda elde edilen doğrusal grafiğin eğim ve kayım değerlerinden sırasıyla ΔH ve ΔS değerleri hesaplanmıştır. Protein-ilaç sistemindeki bağlanma prosesine ait Gibbs serbest enerji değişim (ΔG) değerlerinin hesaplanmasında Eşitlik (3.4)'ten yararlanılmıştır.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3.4)$$

Protein-ilaç etkileşimleri sonucunda proteinlerin sekonder yapıları değişebilmektedir. Proteinlerin sekonder yapılarında meydana gelebilecek değişiklikler, proteinlerin fonksiyonel özelliklerinde farklılıklara yol açabilmektedir. Protein-ilaç etkileşimlerinde proteinin sekonder yapısı üzerinde ilaç maddesi etkisinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla, sabit protein konsantrasyonuna ve farklı ilaç konsantrasyonlarına sahip bir seri protein-ilaç karışım çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerin dairesel dikroizm (CD) spektrumları çekilmiştir. CD ölçümleri, TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Floresans spektroskopisiyle gerçekleştirilen ölçümler sonucunda aralarında etkileşim gerçekleşen HSA-THC ve HMG-THC sistemlerinin CD ölçümleri kaydedilmiştir. HSA-THC sisteminin CD ölçümleri için hazırlanan tüm protein-ilaç karışım çözeltilerinde HSA konsantrasyonu $4,0 \times 10^{-6}$ M olarak sabit tutulmuş ve THC konsantrasyonu da 0 M, $4,0 \times 10^{-6}$ M, $20,0 \times 10^{-6}$ M ve $40,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde arttırılmıştır. HMG-THC sisteminin CD ölçümleri için hazırlanan tüm protein-ilaç karışımı çözeltilerinde protein konsantrasyonu $4,0 \times 10^{-6}$ M olarak sabit tutulmuş ve THC konsantrasyonu da 0 M, $4,0 \times 10^{-6}$ M ve $8,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde arttırılmıştır. CD ölçümlerinde referans çözelti olarak ilaç içermeyen saf HSA veya saf HMG çözeltisi için 0,1M NaCl içeren 0,05M'lık tris(hidroksimetil)aminometan tampon çözeltisi ve HSA-THC veya HMG-THC karışım çözeltileri için karışımdakilerle aynı

konsantrasyona sahip 0,1M NaCl içeren 0,05M'lık tris(hidroksimetil)aminometan tamponunda hazırlanmış saf THC 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 HSA çözeltisinin, saf HMG çözeltisinin ve bazı HSA-THC ve HMG-THC karışım çözeltilerinin ellipsiti, θ , (mdeg) değerleri elde edilmiştir. Daha sonra, ilaç molekülü yokluğundaki ve varlığındaki HSA veya HMG proteininin CD spektrumlarından yararlanılarak ilaçla etkileşim sonucunda ilgili 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):

$$\theta_{MRD} = [\text{CD}_g] / [\text{C}_p \cdot l \cdot n_r \cdot 10] \quad (3.5)$$

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 (3.6)'nın kullanılmasıyla hesaplanmıştır (Jin ve Zhang 2008):

$$\alpha\text{-heliks (\%)} = [-\theta_{MRD208} - 4000] \cdot 100 / [33000 - 4000] \quad (3.6)$$

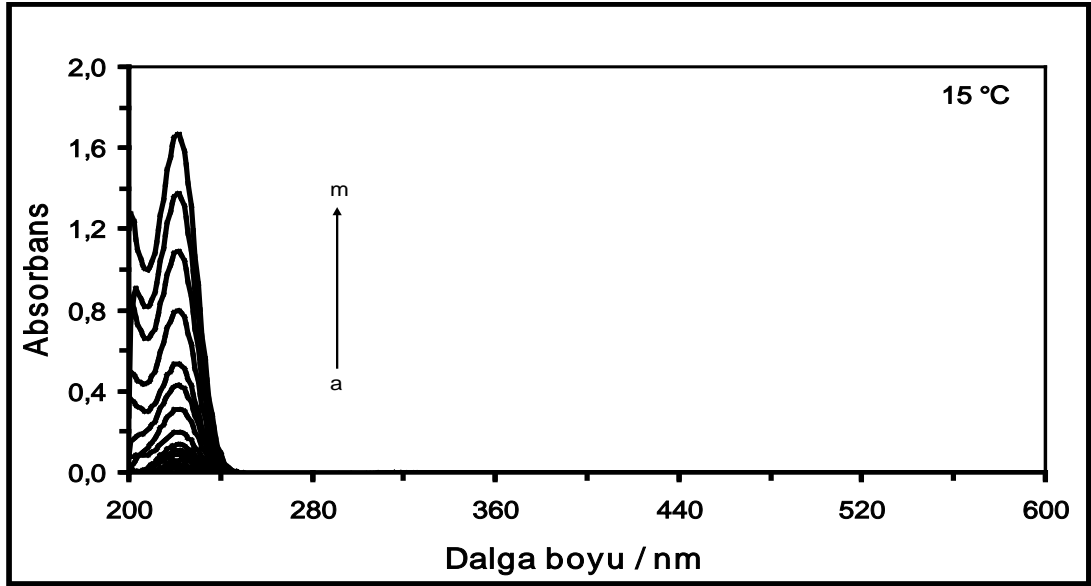
buradaki θ_{MRD208} 208 nm'de belirlenmiş θ_{MRD} değerini göstermektedir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

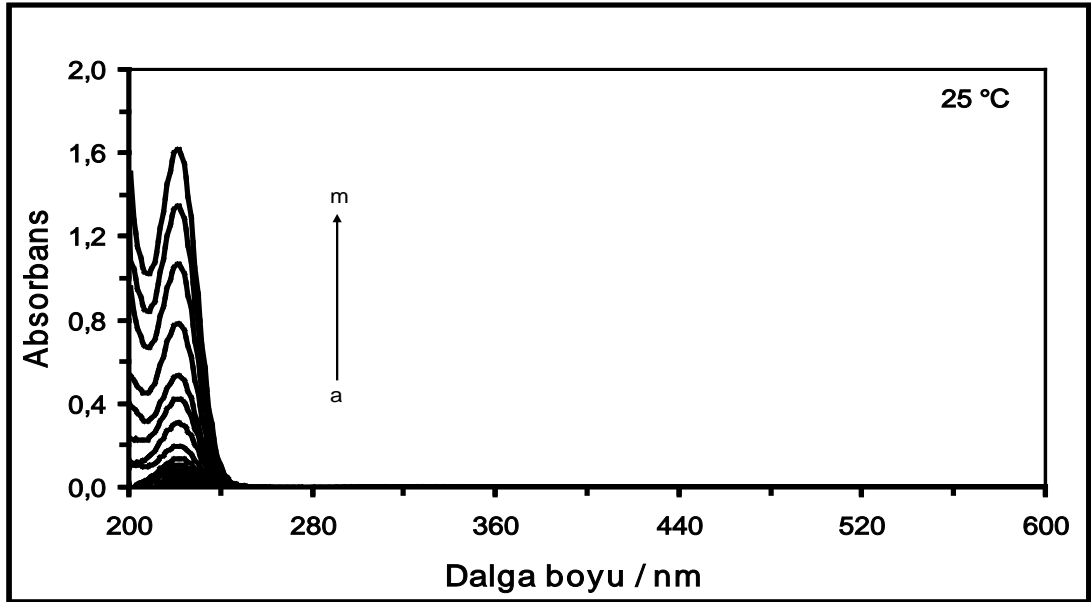
4.1. HSA ve HMG Proteinleri ile AZA ve THC İlaçları Arasındaki Etkileşimlerin Floresans Ölçümleriyle Karakterizasyonu

Protein-ilaç etkileşimlerinin floresans ölçümleri çalışmalarında iç filtre etkisi göz önünde bulundurulmalıdır. Proteinlerin floresans özellikleri, sıcaklık ve konsantrasyon gibi faktörlerden etkilenmektedir. Sıcaklığın ve konsantrasyonun yüksek olması, floroforun hem absorplanma hem de ligant varlığında sönümlenme özelliğini arttırmaktadır. Uyarılma veya emisyon dalga boyu bölgesinde çözeltide absorplama yapan bir maddenin bulunması, uyarılma ya da emisyon sırasında enerjinin bir kısmının absorplanmasına yol açar ve bu durum daha düşük floresans şiddeti ölçülmesine neden olur (Lakowicz 1999a). Ayrıca, ışının geliş açısı da numunenin uyarılması ve emisyonu için önem taşımaktadır. Numuneler için gelen ışının en ideal açısı 90° olup, bu açıdan farklı bir açıyla yapılan uyarılmalar ve emisyonlar gelen ışının saçılımına veya dağılımına sebep olmaktadır. Düşük konsantrasyonlarda, küvette yer alan numunenin her yerinde ışının uyarılması ve emisyonu hemen hemen aynıdır. Konsantrasyonun artması, küvette yer alan numunenin ışın kaynağına yakın yerleri ile diğer kısımları arasında farklı uyarılmalara ve emisyonlara neden olmaktadır. Bu da doğru ölçümlerin elde edilmemesiyle sonuçlanmaktadır. Protein-ilaç etkileşimlerinin uyarılma ve emisyon ölçümleri sırasında bu gibi faktörler önem taşımaktadır. İç filtre etkisi olarak bilinen uyarılma ve emisyon enerji kayıpları, floresans şiddeti değerini olumsuz etkilemektedir (<http://www.chemistry.rutgers.edu/grad/chem585/lecture2.html>). Literatürde bu konuyla ilgili yapılan bazı çalışmalarda iç filtre etkisi göz ardı edilmiştir (Jang vd 2009, Hu vd 2009). HSA ve HMG proteinleri ile AZA ve THC ilaçları arasındaki etkileşimlerin floresans spektroskopisiyle incelenmesinde iç filtre etkisini düşürmek amacıyla floresans ölçümlerinin uyarılma ve emisyon dalga boylarında ilgili her bir sistem için absorbans değerleri elde edilmiştir.

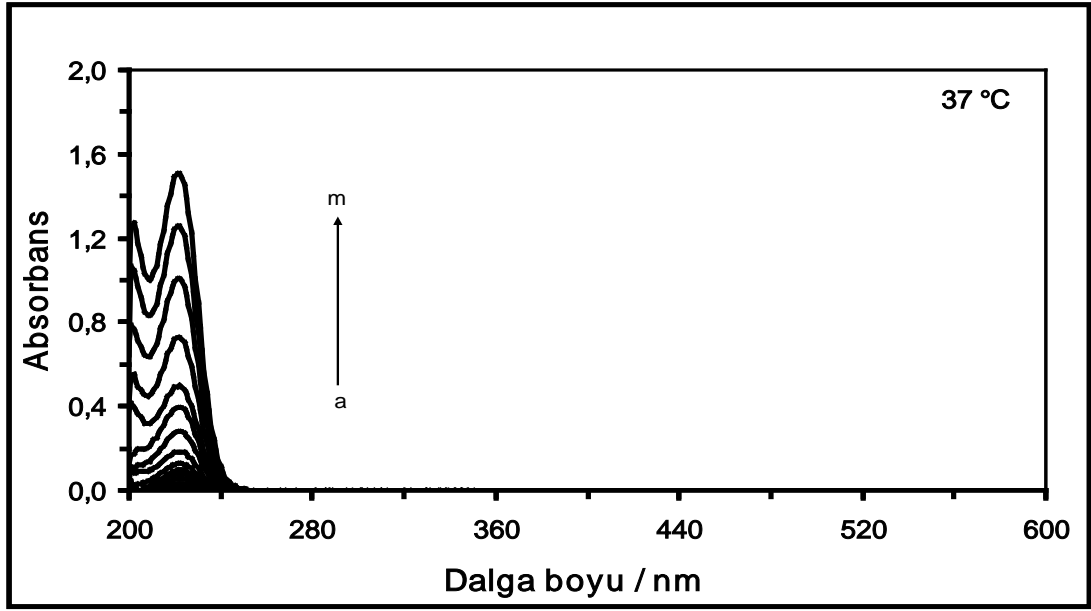
HSA-AZA sisteminde kullanılan farklı konsantrasyonlardaki saf AZA ilacının 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'deki absorpsiyon spektrumları sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te, farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'deki absorpsiyon spektrumları sırasıyla Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de, HSA-THC sisteminde kullanılan farklı konsantrasyonlardaki saf THC ilacının 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'deki absorpsiyon spektrumları sırasıyla Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de ve farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'deki absorpsiyon spektrumları sırasıyla Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da yer almaktadır. HMG-AZA sisteminde ve HSA-AZA sisteminde aynı ilaç konsantrasyonları kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG proteininin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'deki absorpsiyon spektrumları sırasıyla Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de, HMG-THC sisteminde kullanılan farklı konsantrasyonlardaki saf THC ilacının 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'deki absorpsiyon spektrumları sırasıyla Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'te ve farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'deki absorpsiyon spektrumları sırasıyla Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de gösterilmektedir.



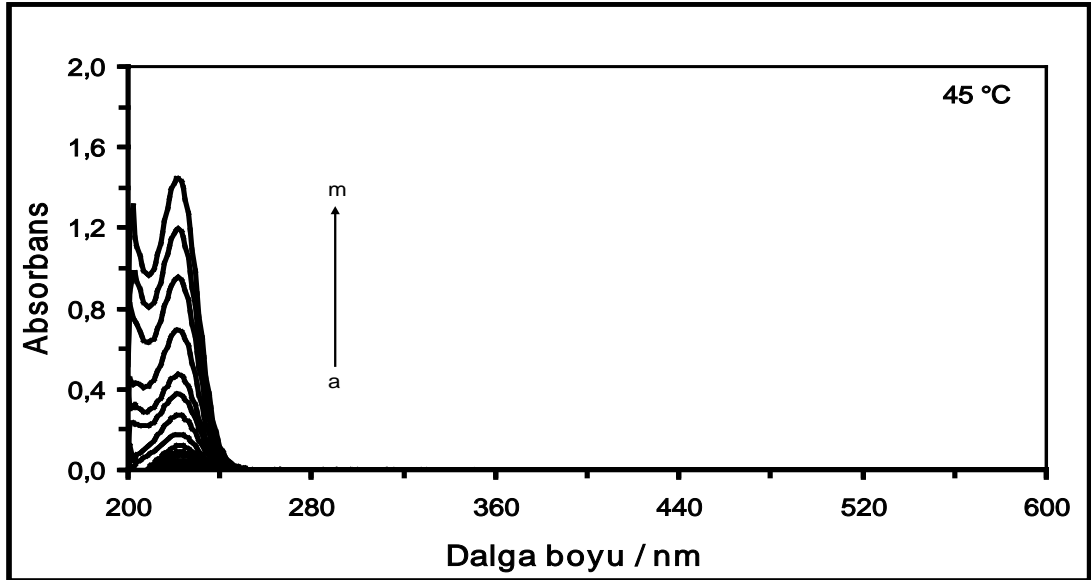
Şekil 4.1. HSA-AZA ve HMG-AZA sistemleri için 15 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf AZA çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $32,0 \times 10^{-6}$ M (i) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



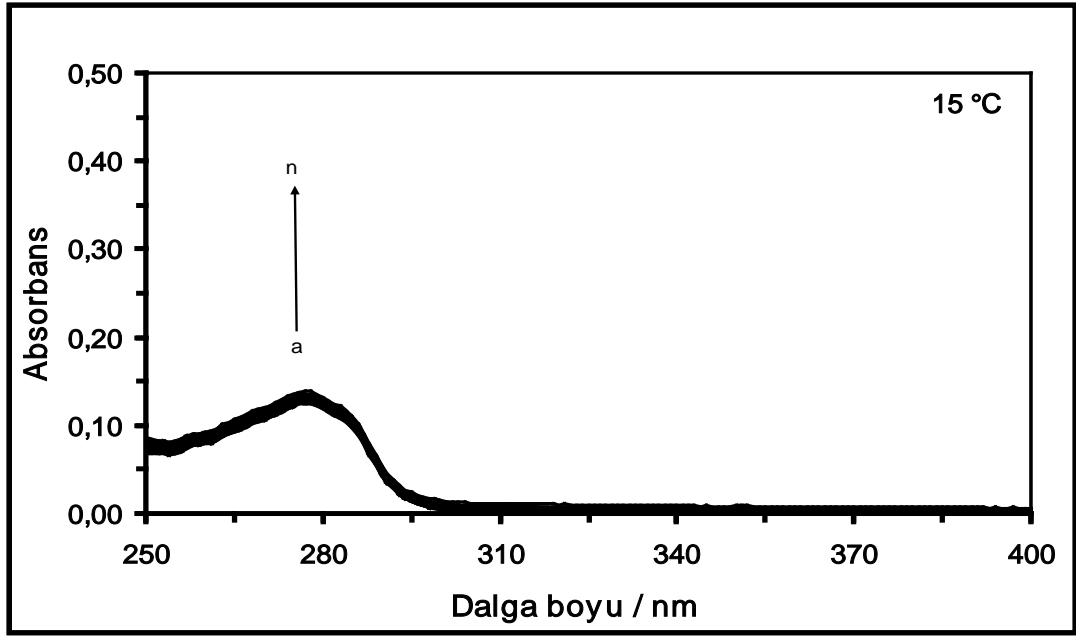
Şekil 4.2. HSA-AZA ve HMG-AZA sistemleri için 25 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf AZA çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $32,0 \times 10^{-6}$ M (i) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



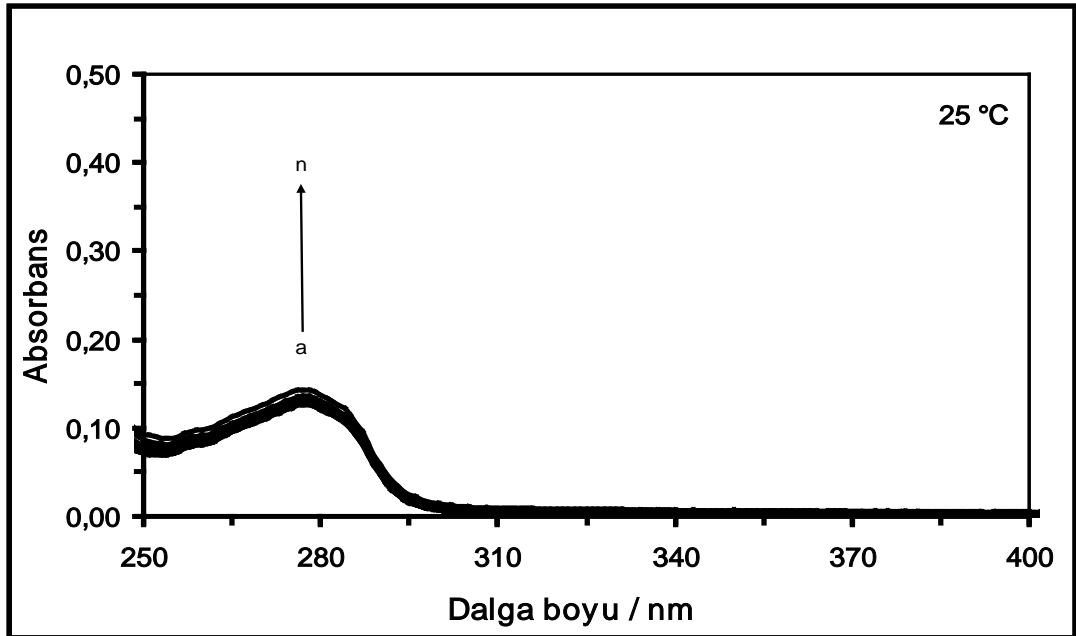
Şekil 4.3. HSA-AZA ve HMG-AZA sistemleri için 37 °C'de farklı konsantrasyonlardaki saf AZA çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $32,0 \times 10^{-6}$ M (i) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



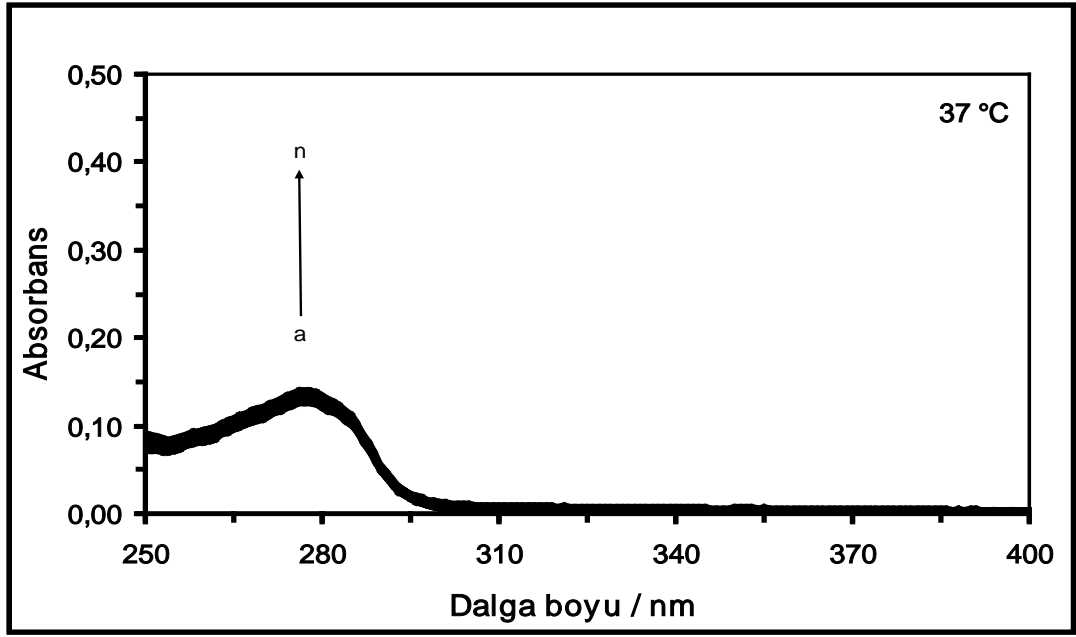
Şekil 4.4. HSA-AZA ve HMG-AZA sistemleri için 45 °C'de farklı konsantrasyonlardaki saf AZA çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $32,0 \times 10^{-6}$ M (i) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



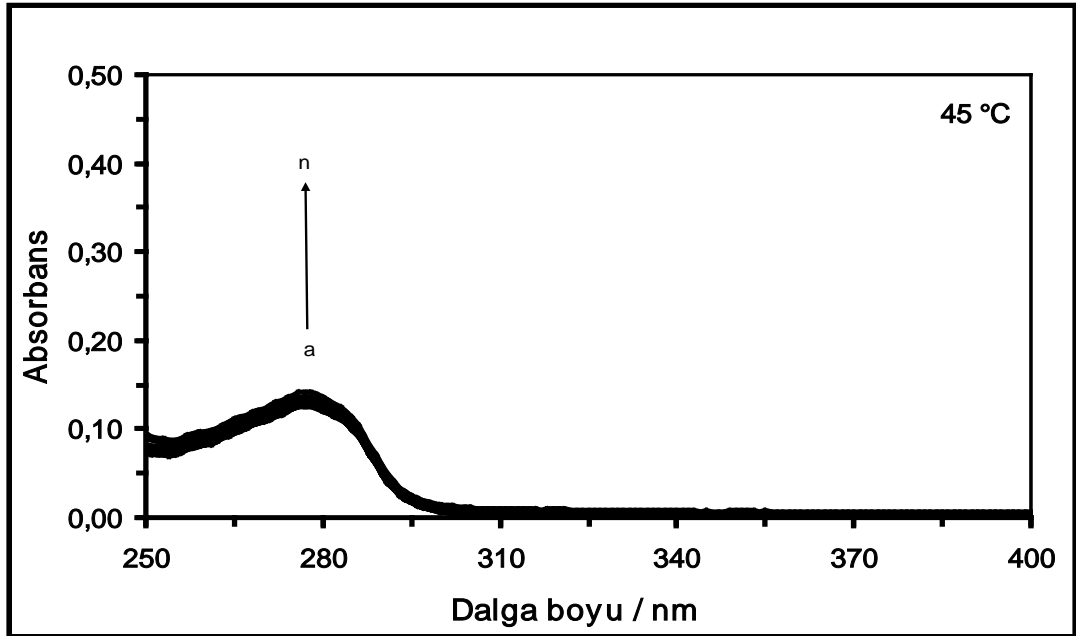
Şekil 4.5. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



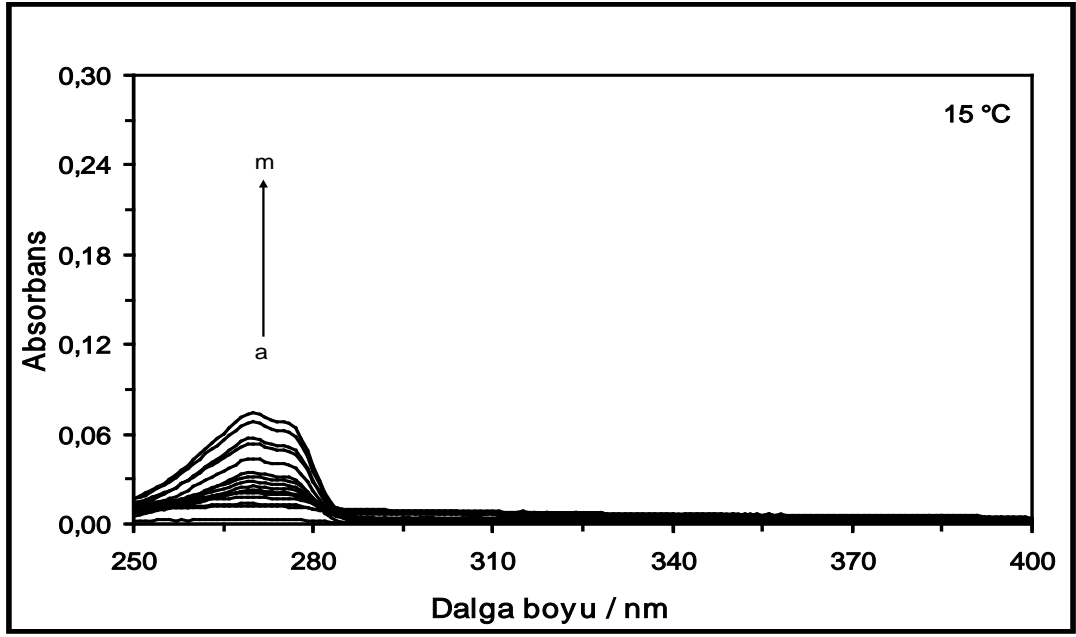
Şekil 4.6. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



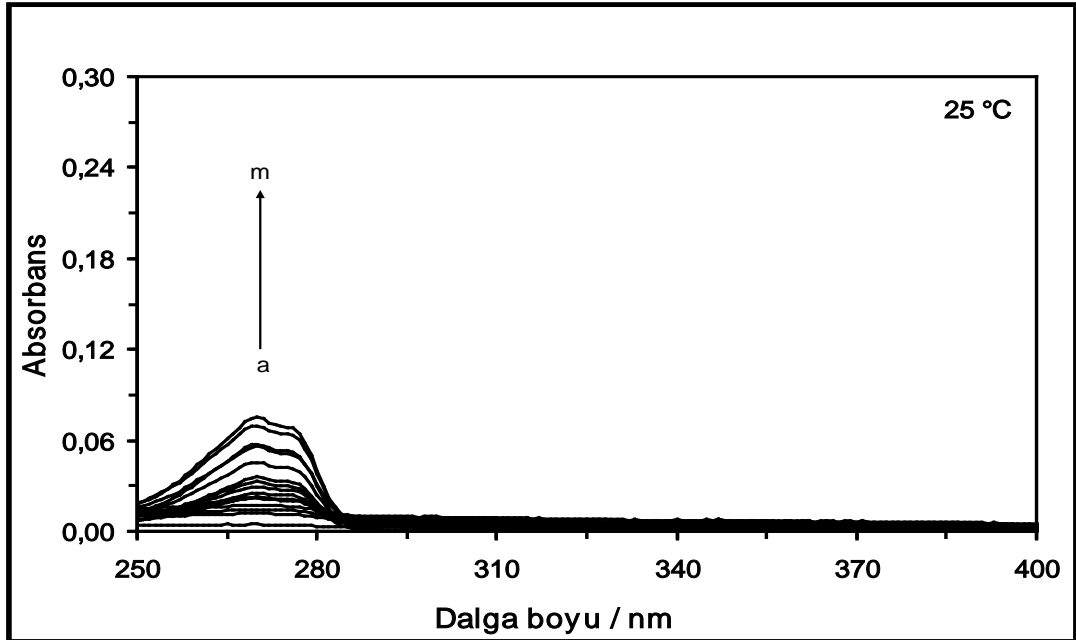
Şekil 4.7. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



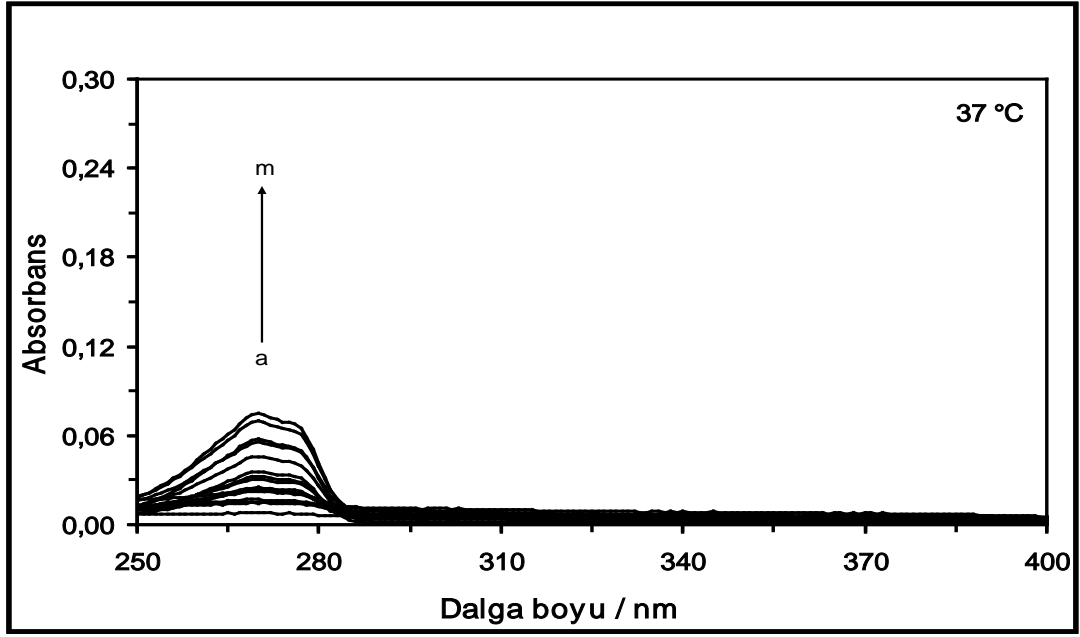
Şekil 4.8. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



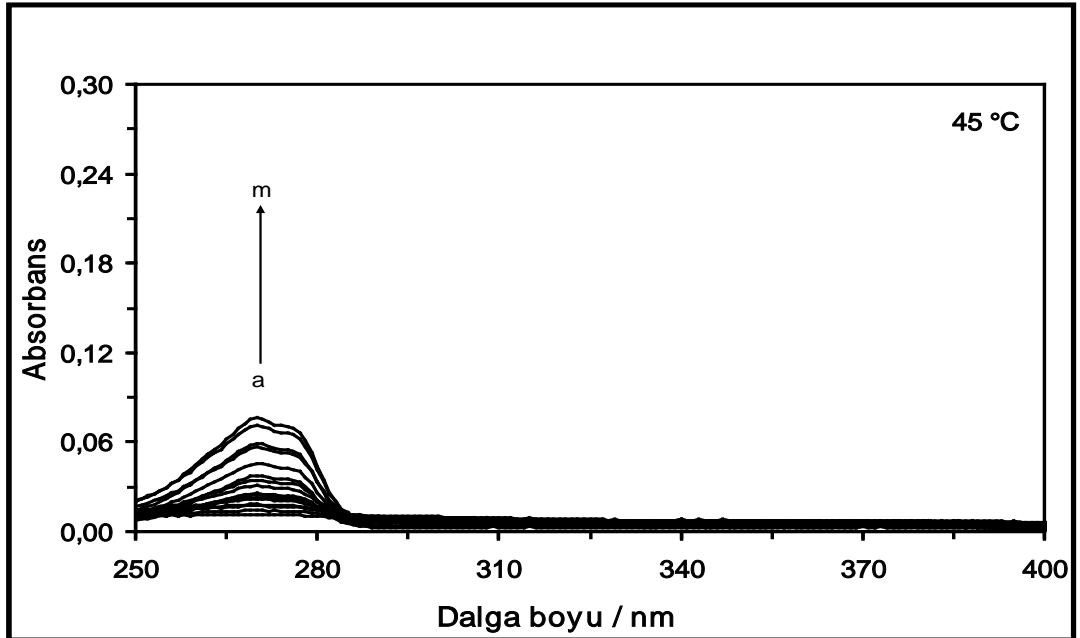
Şekil 4.9. HSA-THC sistemi için 15 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $20,0 \times 10^{-6}$ M (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $40,0 \times 10^{-6}$ M.



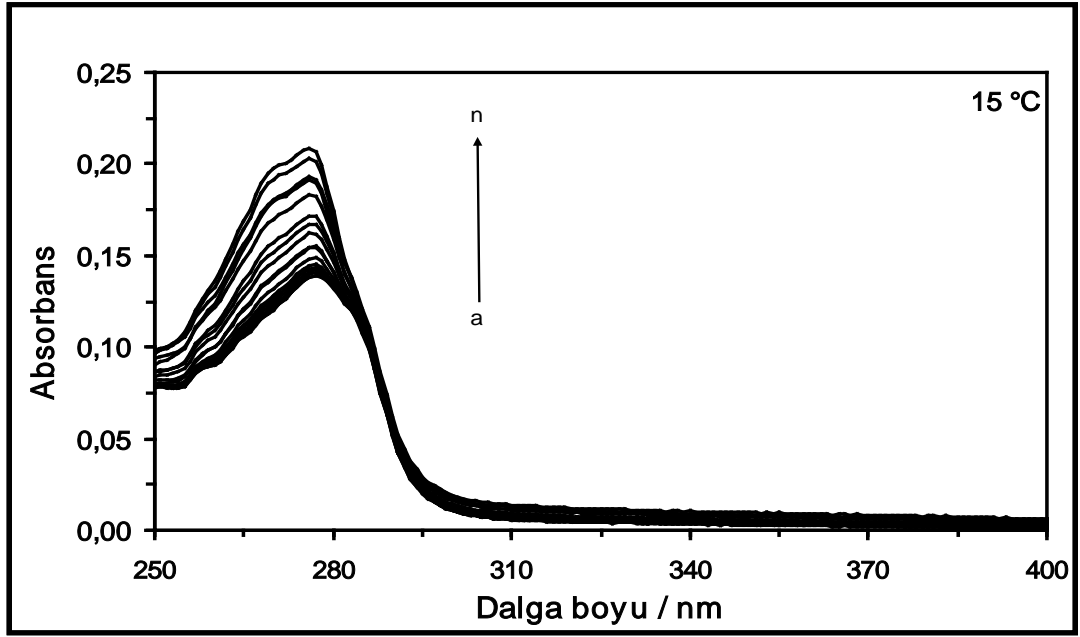
Şekil 4.10. HSA-THC sistemi için 25 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $20,0 \times 10^{-6}$ M (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $40,0 \times 10^{-6}$ M.



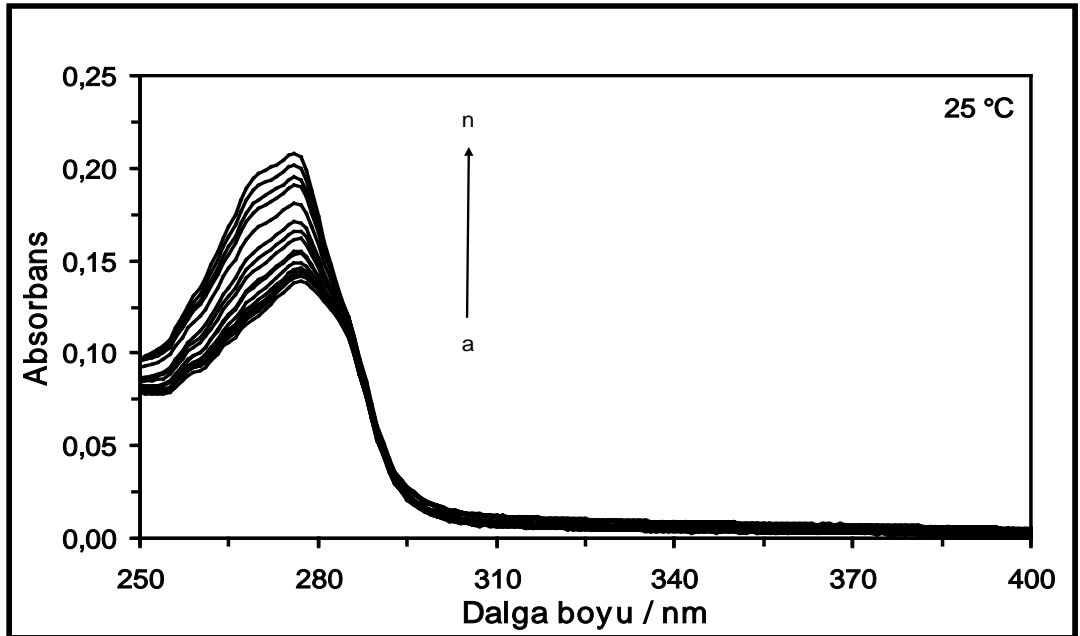
Şekil 4.11. HSA-THC sistemi için 37 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $20,0 \times 10^{-6}$ M (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $40,0 \times 10^{-6}$ M.



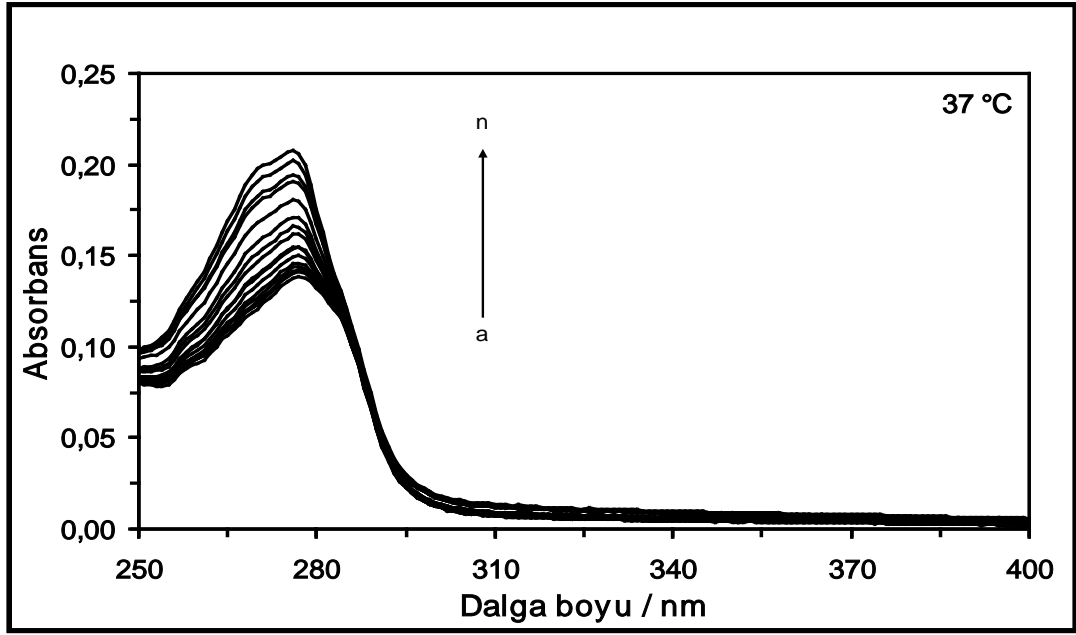
Şekil 4.12. HSA-THC sistemi için 45 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (b) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $20,0 \times 10^{-6}$ M (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (m) $40,0 \times 10^{-6}$ M.



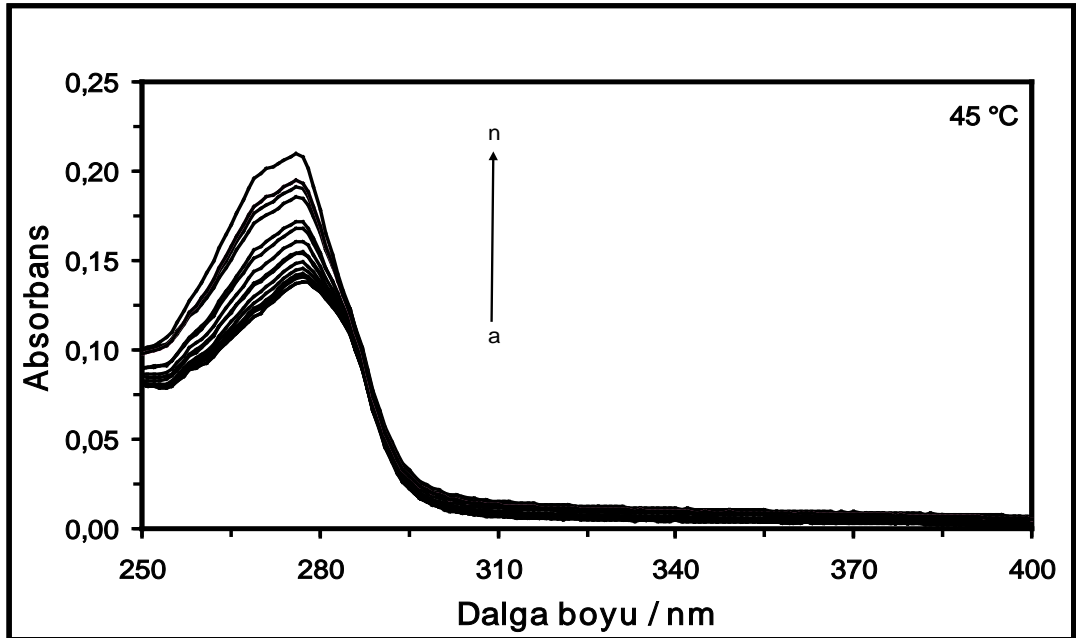
Şekil 4.13. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M.



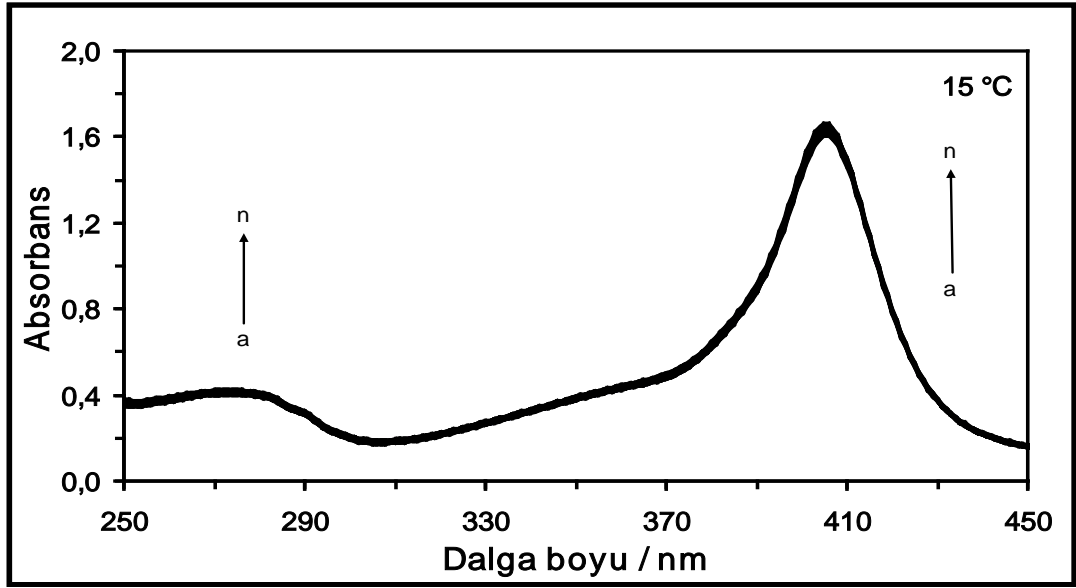
Şekil 4.14. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M.



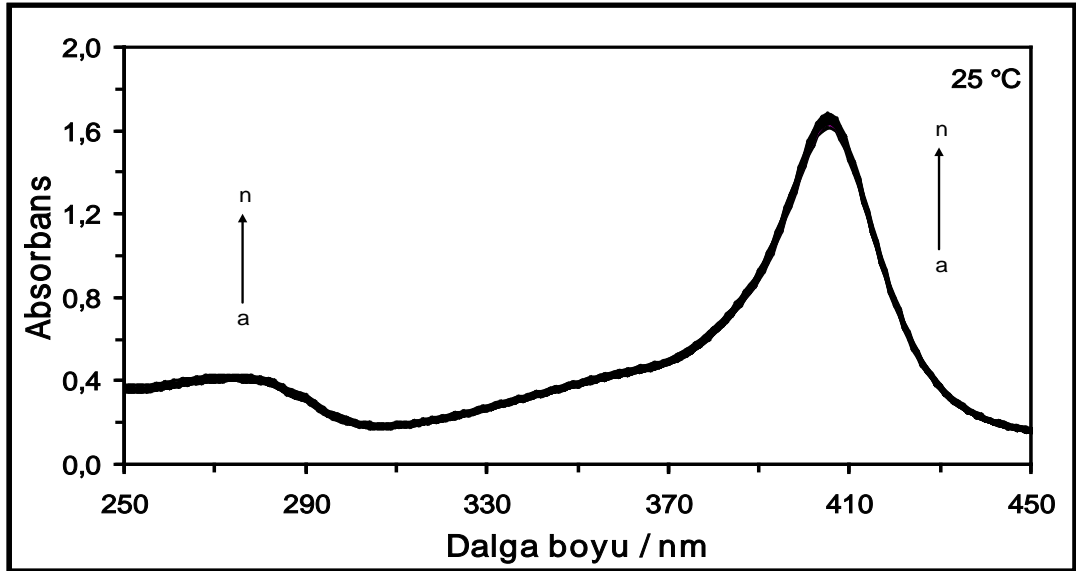
Şekil 4.15. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M.



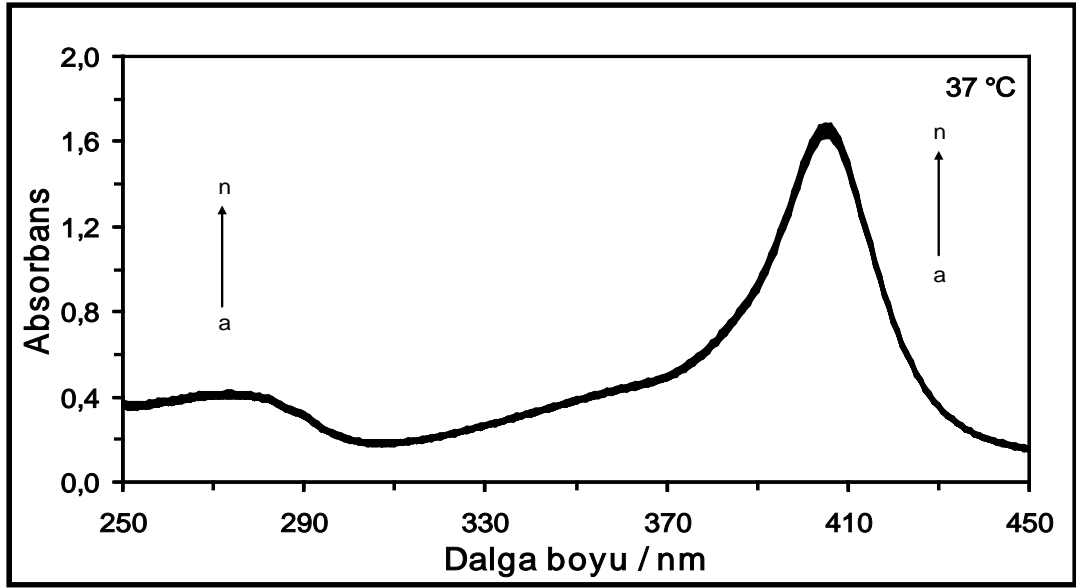
Şekil 4.16. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M.



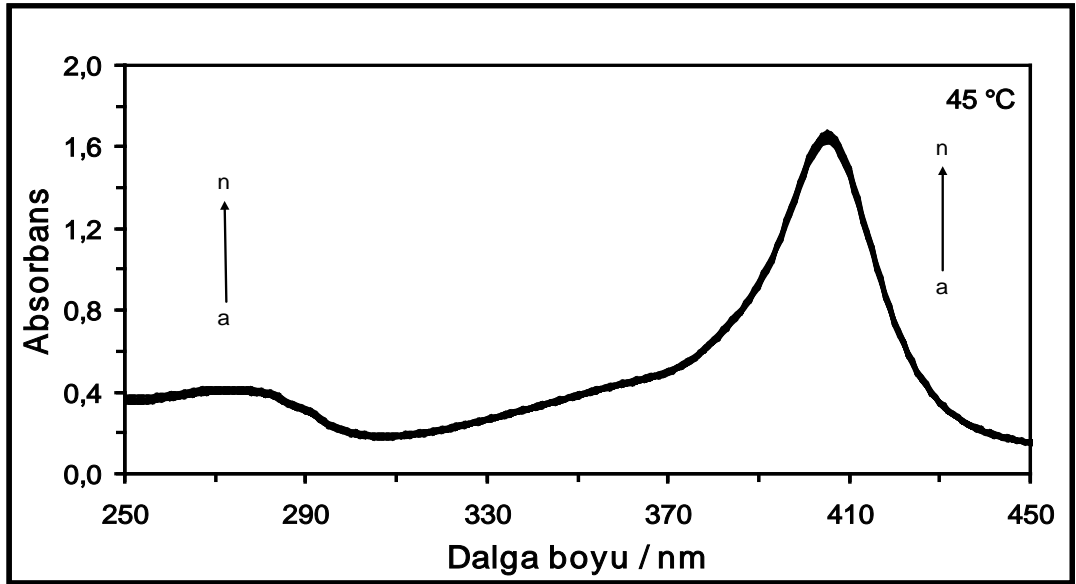
Şekil 4.17. HMG-AZA sistemi için 15 °C'de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



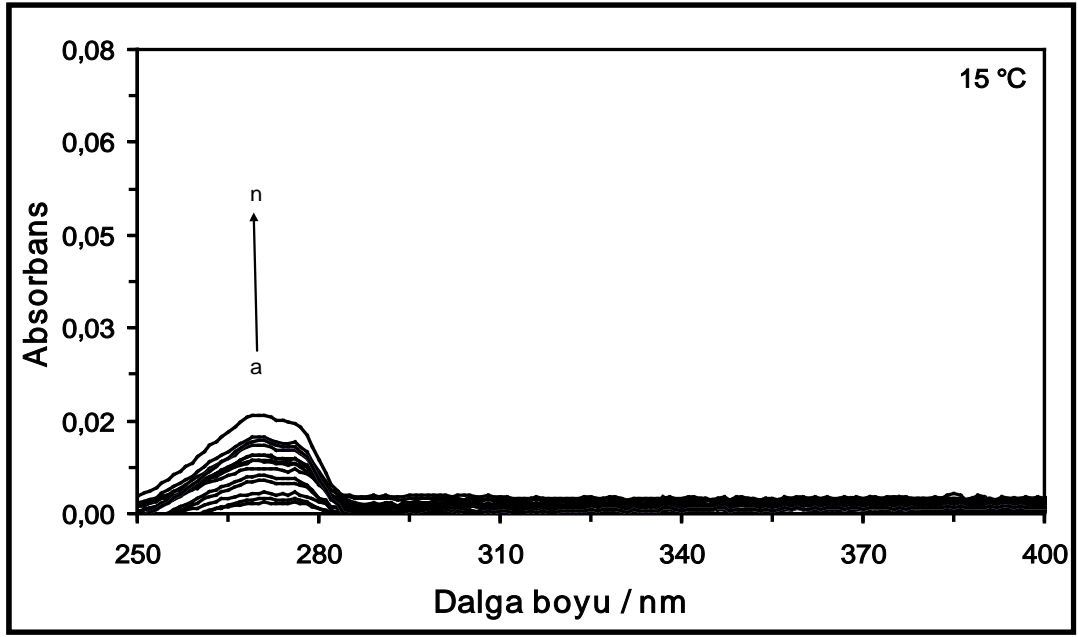
Şekil 4.18. HMG-AZA sistemi için 25 °C'de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



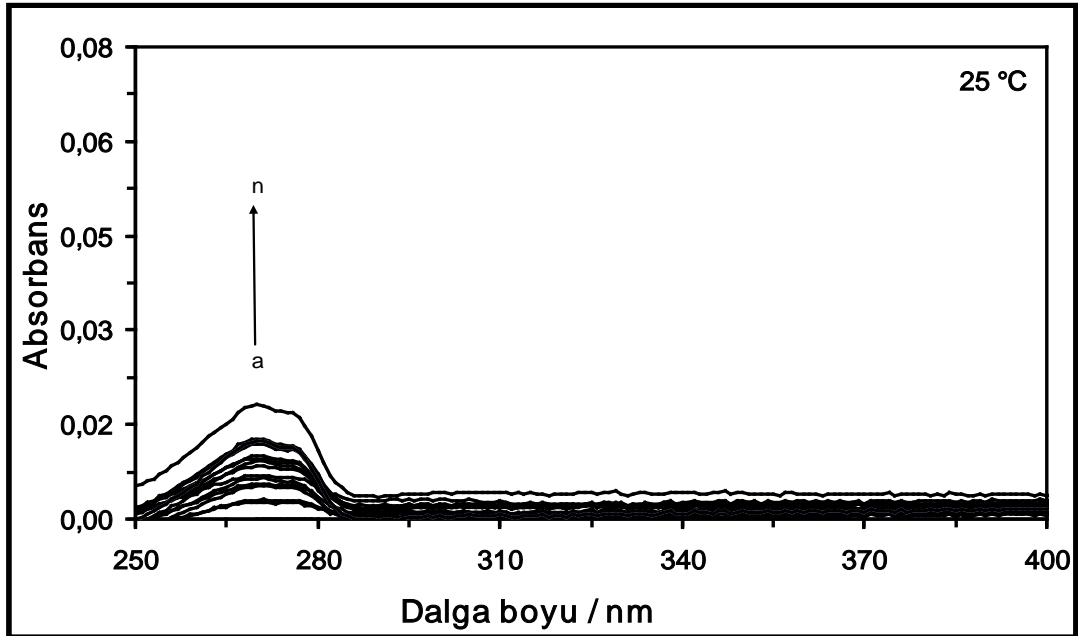
Şekil 4.19. HMG-AZA sistemi için 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



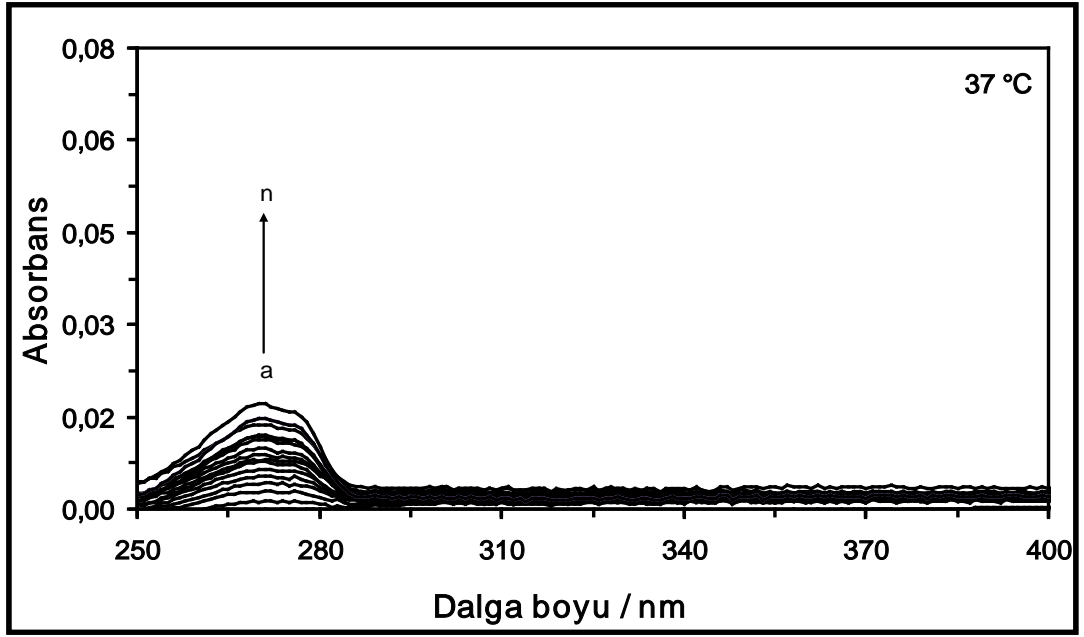
Şekil 4.20. HMG-AZA sistemi için 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



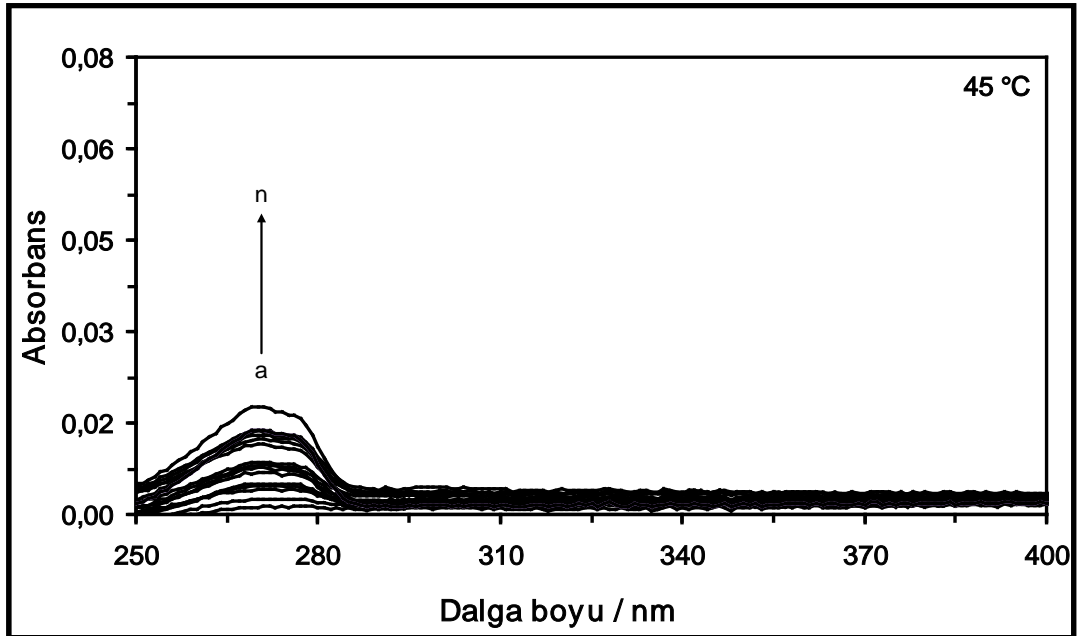
Şekil 4.21. HMG-THC sistemi için 15 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (g) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (h) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (k) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (m) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $9,0 \times 10^{-6}$ M.



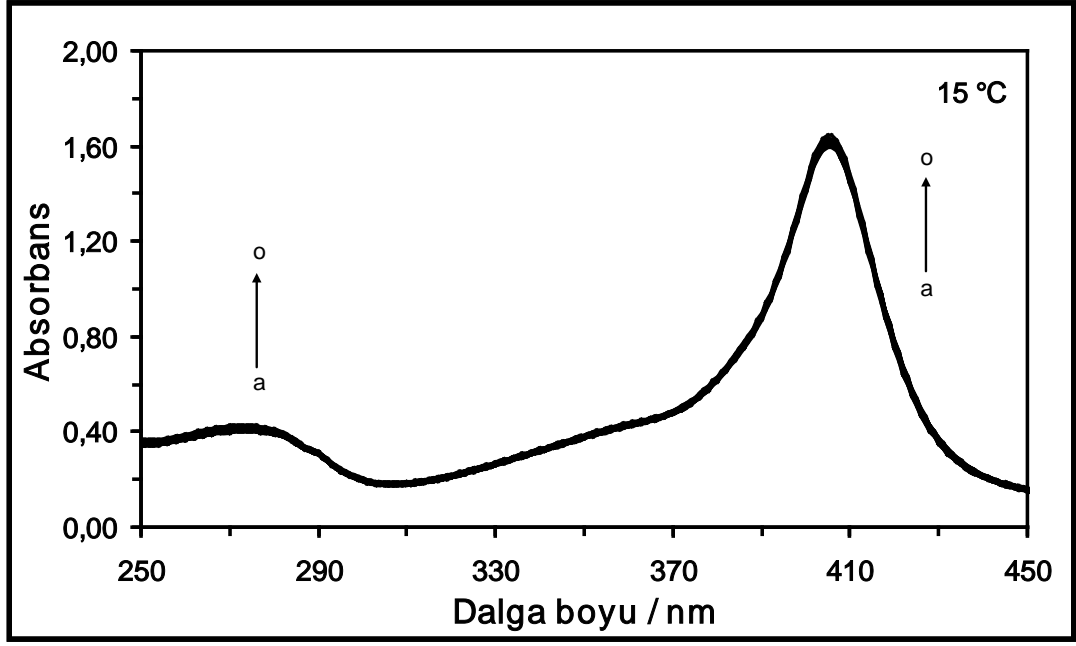
Şekil 4.22. HMG-THC sistemi için 25 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (g) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (h) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (k) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (m) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $9,0 \times 10^{-6}$ M.



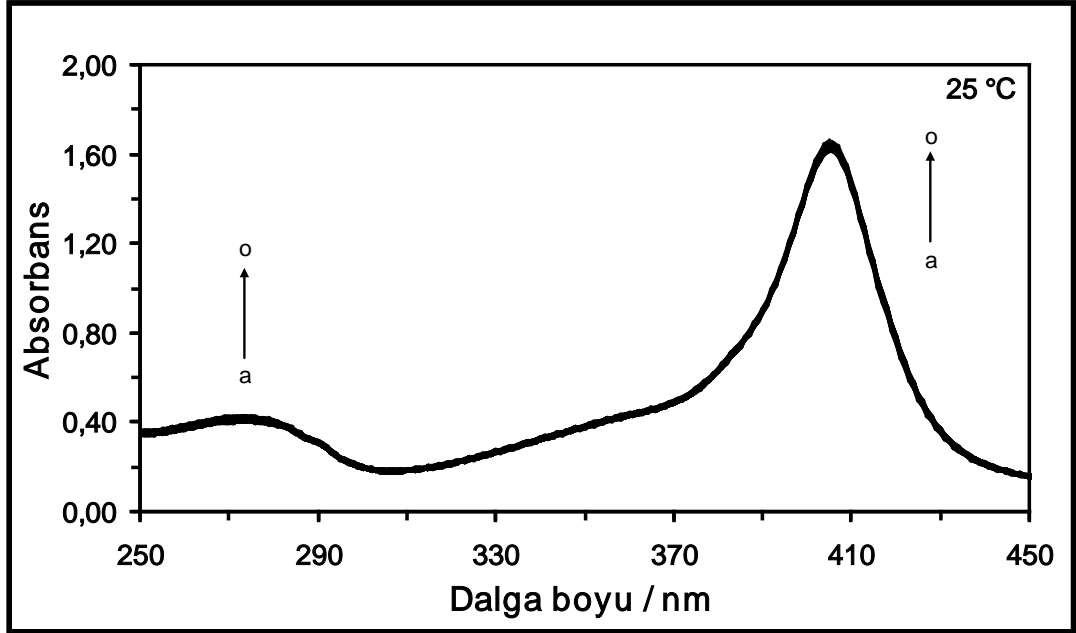
Şekil 4.23. HMG-THC sistemi için 37 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (g) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (h) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (k) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (m) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $9,0 \times 10^{-6}$ M.



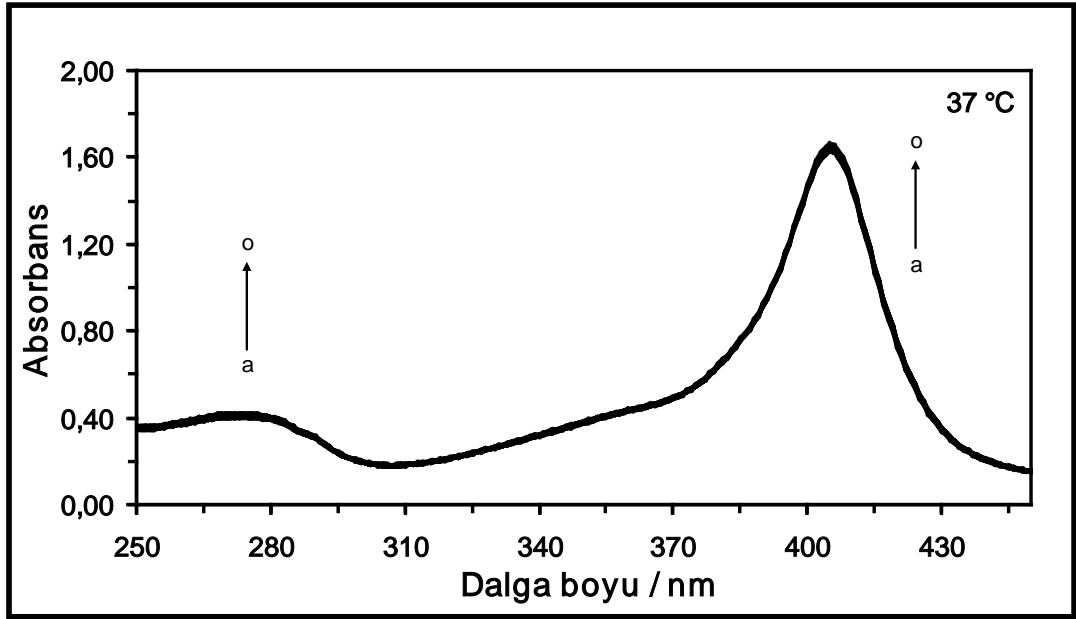
Şekil 4.24. HMG-THC sistemi için 45 °C’de farklı konsantrasyonlardaki saf THC çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (ç) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (e) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (g) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (h) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (k) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (m) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $9,0 \times 10^{-6}$ M.



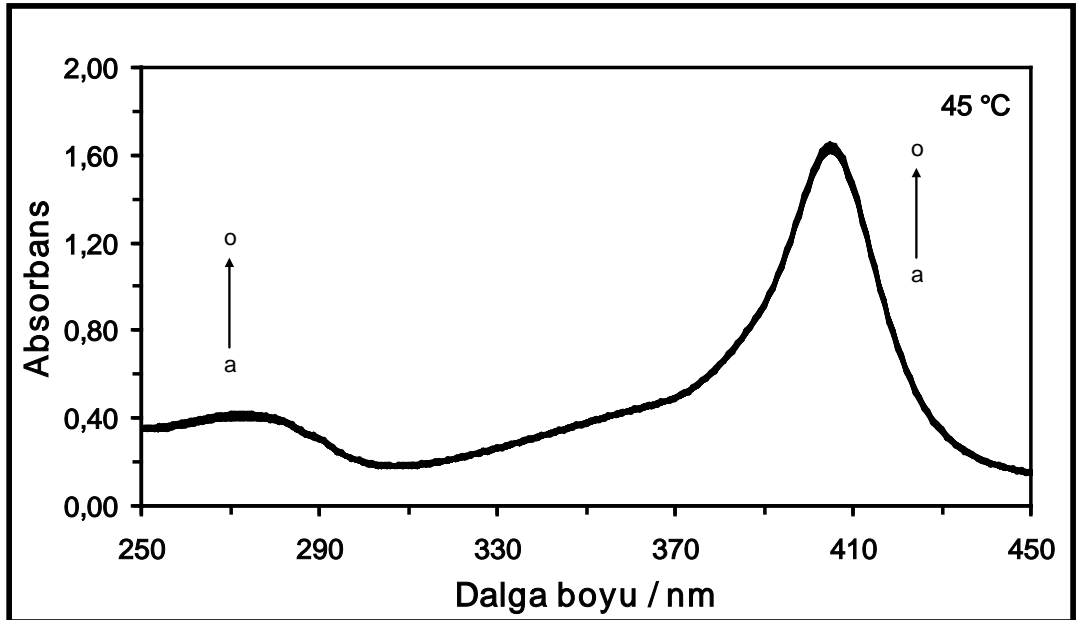
Şekil 4.25. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (n) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (o) $9,0 \times 10^{-6}$ M.



Şekil 4.26. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (n) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (o) $9,0 \times 10^{-6}$ M.



Şekil 4.27. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (n) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (o) $9,0 \times 10^{-6}$ M.



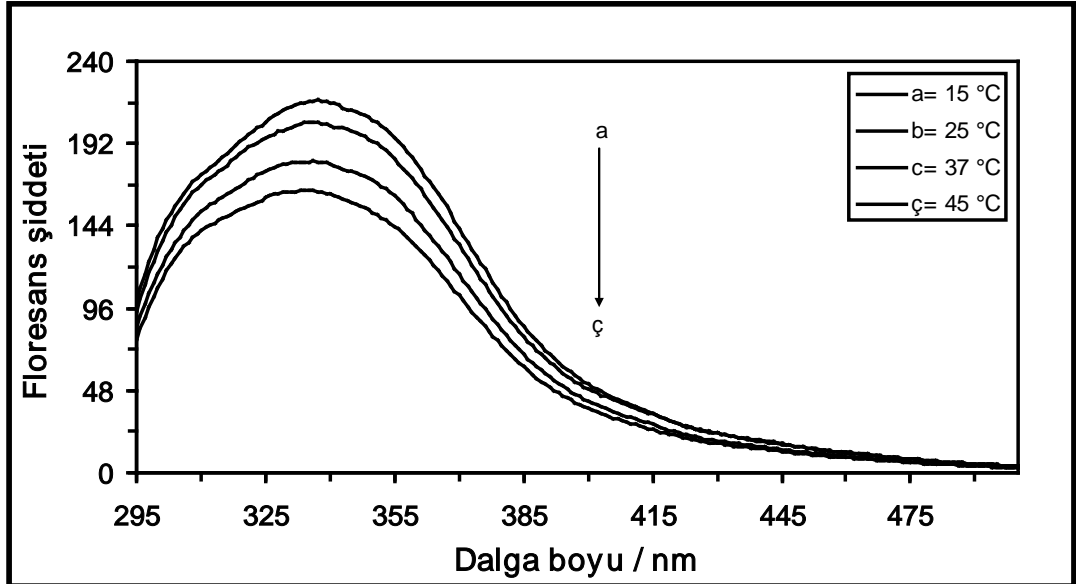
Şekil 4.28. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin absorpsiyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $0,50 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,50 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $2,50 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $3,50 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $4,50 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,50 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $6,50 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $7,50 \times 10^{-6}$ M, (n) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (o) $9,0 \times 10^{-6}$ M.

İç filtre etkisini düşürmek için HSA-AZA, HSA-THC, HMG-AZA ve HMG-THC sistemlerine ait floresans şiddetleri, Eşitlik (4.1)'in kullanılmasıyla düzeltilmiştir:

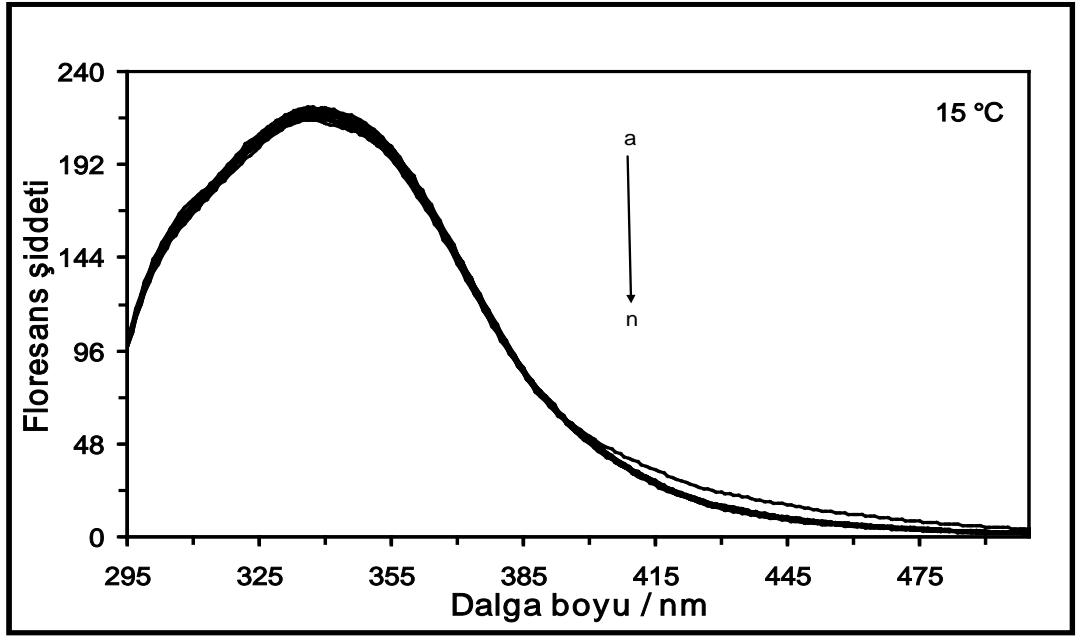
$$F_{\text{düz}} = F_{\text{göz}} \cdot e^{(A_{\text{uy}} + A_{\text{em}})/2} \quad (4.1)$$

buradaki $F_{\text{düz}}$ ve $F_{\text{göz}}$ sırasıyla düzeltilmiş floresans şiddetini ve gözlenen floresans şiddetini, A_{uy} ve A_{em} de sırasıyla uyarılma ve emisyon dalga boyunda sistemin absorbanans değerini göstermektedir (Ding vd 2009). Çalışmada, HSA ve HMG proteinleri ile AZA ve THC ilaçları arasındaki etkileşimlerin incelenmesinde düzeltilmiş floresans şiddetleri kullanılmıştır.

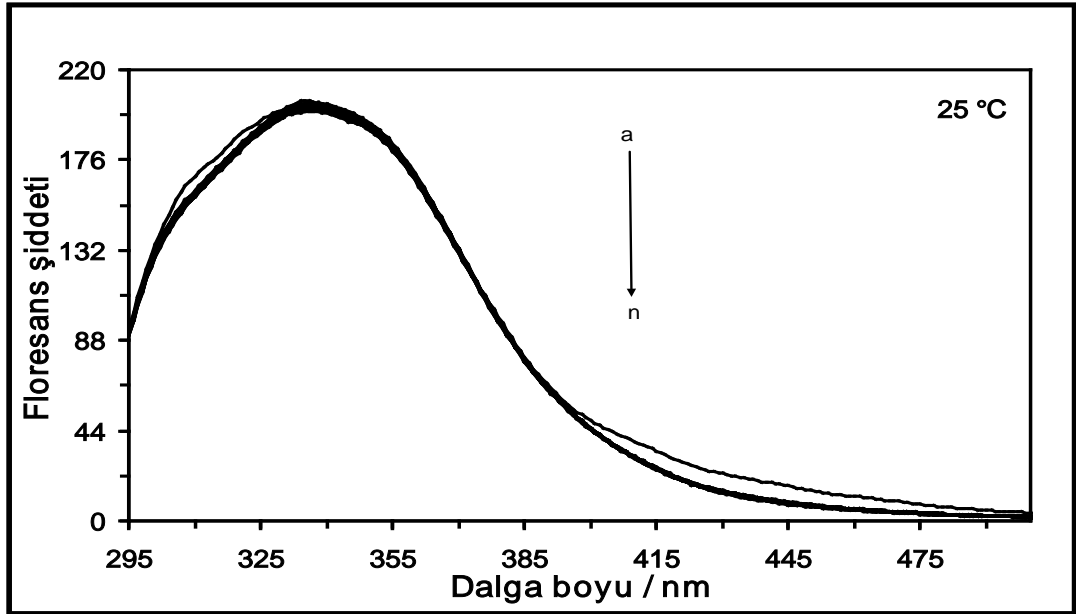
$4,0 \times 10^{-6}$ M'lık HSA çözeltisinin 15°C , 25°C , 37°C ve 45°C 'deki emisyon spektrumları Şekil 4.29'da, farklı konsantrasyonlarda AZA içeren $4,0 \times 10^{-6}$ M'lık HSA çözeltisinin 15°C 'deki emisyon spektrumları Şekil 4.30'da, 25°C 'deki emisyon spektrumları Şekil 4.31'de, 37°C 'deki emisyon spektrumları Şekil 4.32'de ve 45°C 'deki emisyon spektrumları Şekil 4.33'te gösterilmektedir.



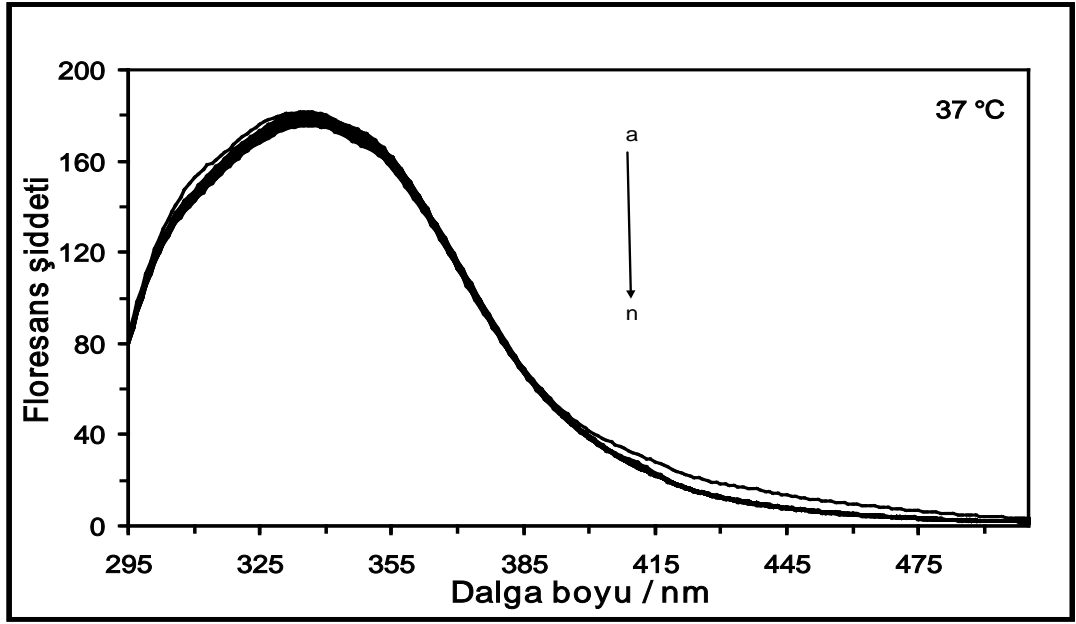
Şekil 4.29. $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin 15°C , 25°C , 37°C ve 45°C 'deki emisyon spektrumları



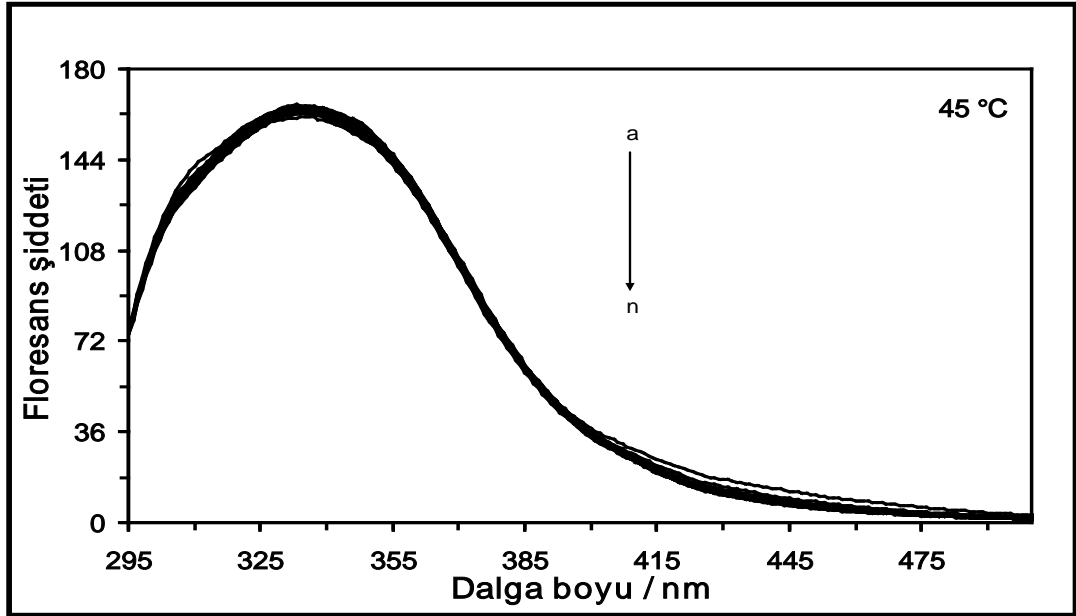
Şekil 4.30. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



Şekil 4.31. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



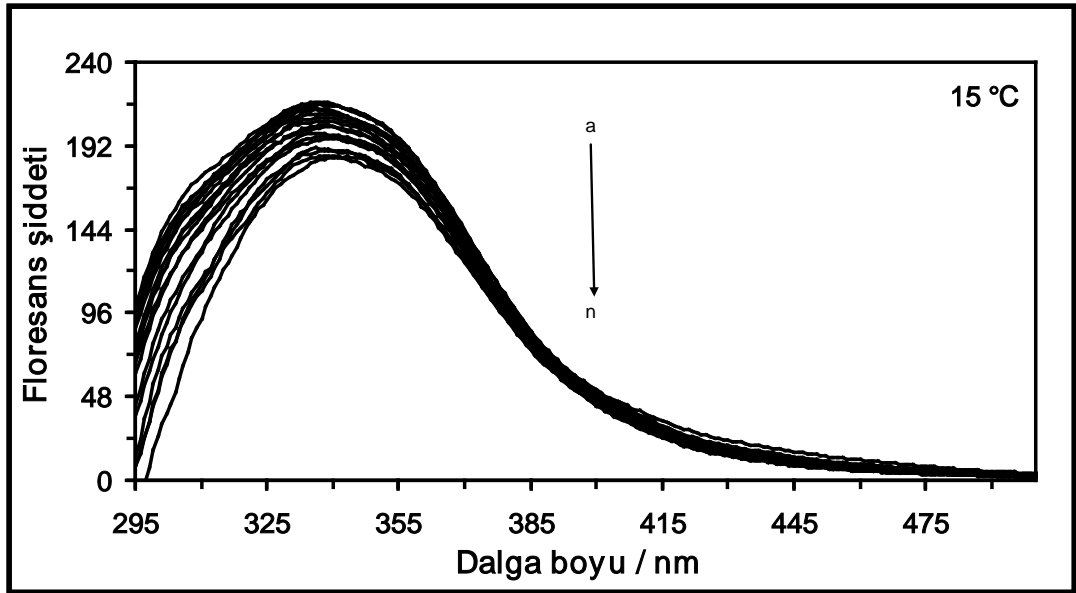
Şekil 4.32. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



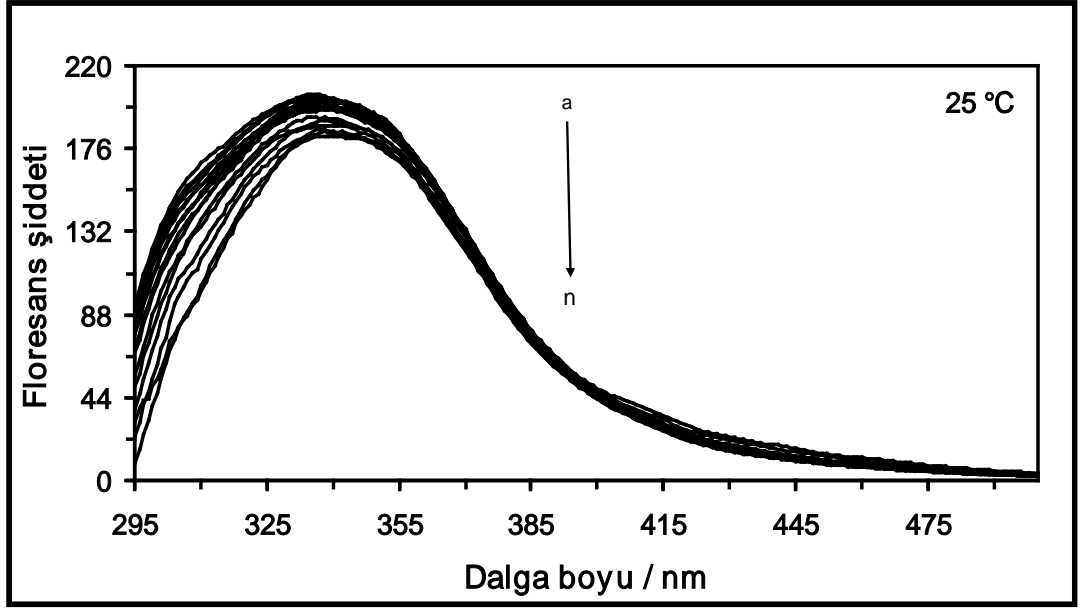
Şekil 4.33. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.

İlaç yokluğunda HSA protein çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyu değeri 335 nm olarak bulunmuş ve sıcaklığın artmasıyla proteinlerin floresans şiddetinde bir azalma görülmüştür (bkz. Şekil 4.29). Ayrıca, sıcaklığın artması protein çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyunda bir değişikliğe yol açmamıştır. Şekil 4.30-4.33'te yer alan HSA-AZA sistemine ait farklı sıcaklıklardaki emisyon spektrumları incelendiğinde, ilaç içermeyen $4,0 \times 10^{-6}$ M'lık HSA çözeltisinin emisyon spektrumu şiddetinde artan sıcaklıkla bir azalma meydana gelmektedir. Çözeltideki artan ilaç konsantrasyonu ile birlikte protein çözeltisinin emisyon spektrumunda herhangi bir sönümlenmenin meydana gelmemiş olması, HSA ile AZA arasında herhangi bir etkileşimin gerçekleşmediğini göstermektedir (bkz. Şekil 4.30-4.33).

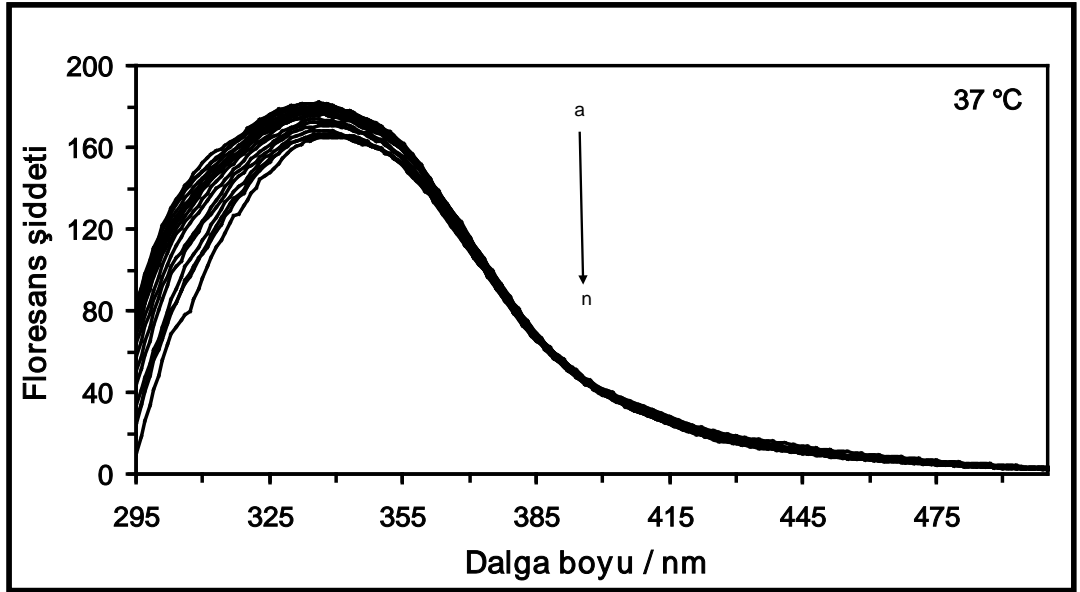
Farklı konsantrasyonlarda THC içeren $4,0 \times 10^{-6}$ M'lık HSA çözeltisinin 15 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.34'te, 25 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.35'te, 37 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.36'da ve 45 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.37'de gösterilmektedir.



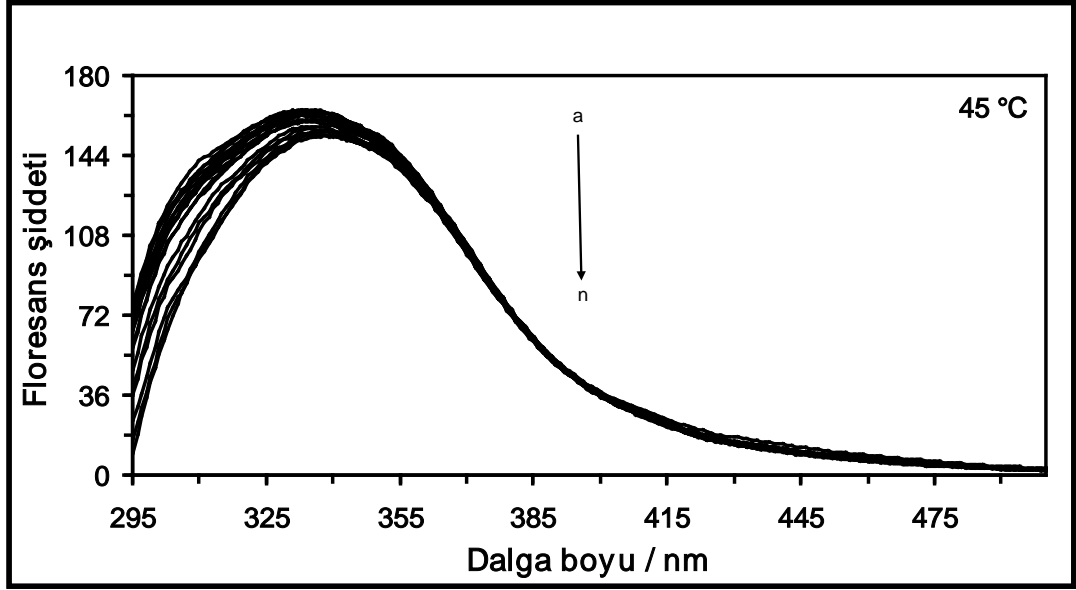
Şekil 4.34. 15 °C'de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $32,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M.



Şekil 4.35. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M.



Şekil 4.36. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M.



Şekil 4.37. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin emisyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $14,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $20,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $28,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $36,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $40,0 \times 10^{-6}$ M.

Şekil 4.34-4.37’de yer alan HSA-THC sistemine ait farklı sıcaklıklardaki emisyon spektrumlarından görüldüğü üzere, çözeltideki artan ilaç konsantrasyonu ile birlikte $4,0 \times 10^{-6}$ M’lık HSA çözeltisinin emisyon spektrumunda bir azalma meydana gelmektedir. Bu durum, THC ilacı ile HSA proteini arasında bir etkileşimin gerçekleştiğini göstermektedir (Cui vd 2009b, Sen vd 2009). Ayrıca, artan ilaç konsantrasyonu varlığında HSA proteininin sönmülleme miktarı artan sıcaklıkla değişmektedir. Sönmülleme miktarı üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde; 15 °C’deki HSA proteininin sönmülleme miktarının (bkz. Şekil 4.34), 45 °C’deki HSA proteininin sönmülleme miktarından (bkz. Şekil 4.35) daha fazla olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Üstelik, saf protein çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyu değeri, çözeltide artan ilaç konsantrasyonu ile birlikte 335 nm’den 342 nm’ye yani kırmızıya kayma (batokromik etki) göstermektedir.

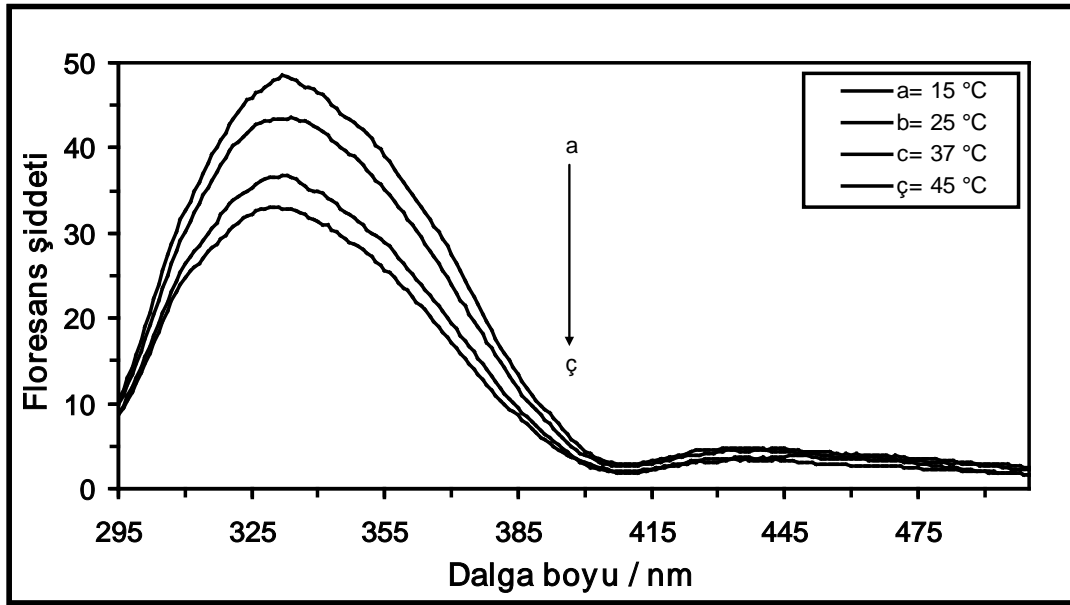
Benzer durum, Jang vd (2009) tarafından gerçekleştirilen mitomisin C ile HSA arasındaki etkileşimin farklı sıcaklıklarda floresans spektroskopisiyle incelenmesi çalışmasında da gözlenmiştir. Bu çalışmada, HSA proteininin

maksimum emisyon dalga boyu değeri 336 nm olarak bulunmuş ve mitomisin C konsantrasyonunun artmasıyla maksimum emisyon dalga boyu değerinin azaldığı ve maviye kaymanın (hipsokromik etkinin) gerçekleştiği belirtilmiştir. Kandagal vd (2006), kanser önleyici bir ilaç olan gemitabin hidroklorür ile HSA arasındaki etkileşimi 288 K, 298 K ve 309 K sıcaklıkta ve 280 nm uyarılma dalga boyunda floresans spektroskopisiyle incelemişler ve $1,20 \times 10^{-5}$ M'lık HSA çözeltisinin ilaç yokluğundaki maksimum emisyon dalga boyu değerinin 340 nm civarında olduğunu ve sıcaklığın artmasıyla da bu değer azaldığını belirtmişlerdir. Ayrıca, artan ilaç konsantrasyonu ile proteinin floresans şiddetinin azaldığını, ancak emisyon dalga boyu değerinde herhangi bir değişikliğin meydana gelmediğini rapor etmişlerdir. Hu vd (2005), kromolin sodyum ilacı ile HSA arasındaki etkileşimi, 280 nm uyarılma dalga boyunda ve 298 K, 304 K ve 310 K sıcaklıkta floresans spektroskopisiyle incelemişlerdir. İlaç yokluğunda $1,0 \times 10^{-5}$ M'lık HSA çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyu değerinin 337,5 nm'den artan ilaç konsantrasyonu ile 349,5 nm'ye yani kırmızıya kaydığını belirtmişlerdir. Bi vd (2005), antrasenozit bileşenler ile HSA arasındaki etkileşimleri araştırmışlar ve 280 nm uyarılma dalga boyunda, ilaç içermeyen $1,0 \times 10^{-5}$ M'lık HSA protein çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyu değerini 340 nm olarak bulmuşlardır. Ayrıca, proteinin pik pozisyonunda artan ilaç konsantrasyonu ile birlikte herhangi bir sapmanın olmadığını belirtmişlerdir.

HSA proteininin ilaç molekülleri ile sönümlenme gerçekleştirmesi proteindeki belirli amino asit kalıntılarının floresans özelliğinden ileri gelmektedir. HSA'nın floresans özelliğine triptofan, tirozin ve fenilalanin kalıntıları katkı sağlamaktadır. Bu üç kalıntıdan triptofan kuvvetli floresans özellik sağlarken, fenilalanin ve tirozin ise düşük kuantum veriminden dolayı zayıf floresans özellik göstermektedir. Bunların dışında triptofan kalıntısının karboksil ve amino grubu ile bunların yakınında yer alan iyonlaşabilen grupların neredeyse tamamı da yine sönümlenebilme özelliğine neden olmaktadır (Jang vd 2009). Ancak, HSA proteininin floresans özelliğindeki değişimler uygun emisyon dalga boyunda triptofan kalıntısının uyarılmasından meydana gelmektedir. Çünkü HSA proteini 280 nm dalga boyunda uyarılınca maksimum emisyon dalga boyu değeri 334 nm olmakta ve bu da proteine güçlü bir floresans özellik sağlamaktadır. HSA polipeptit

zincirinde bu özelliği sağlayan ve kuantum verimi yüksek olan tek amino asit kalıntısı Trp-214'dür (Yuan vd 2007). İlaç molekülleri proteinin bu amino asit kalıntısı ile etkileşime girerek konformasyonunda değişikliklere neden olmaktadır. Böylelikle de sönümlenme gerçekleşmektedir.

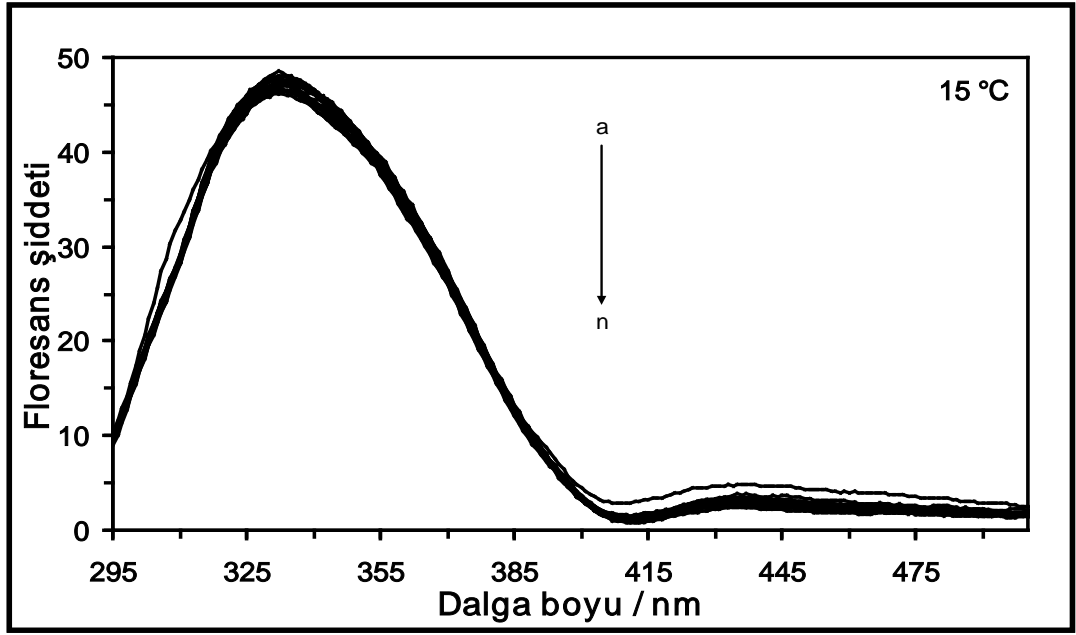
$4,0 \times 10^{-6}$ M'lık HMG çözeltisinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.38'de verilmektedir.



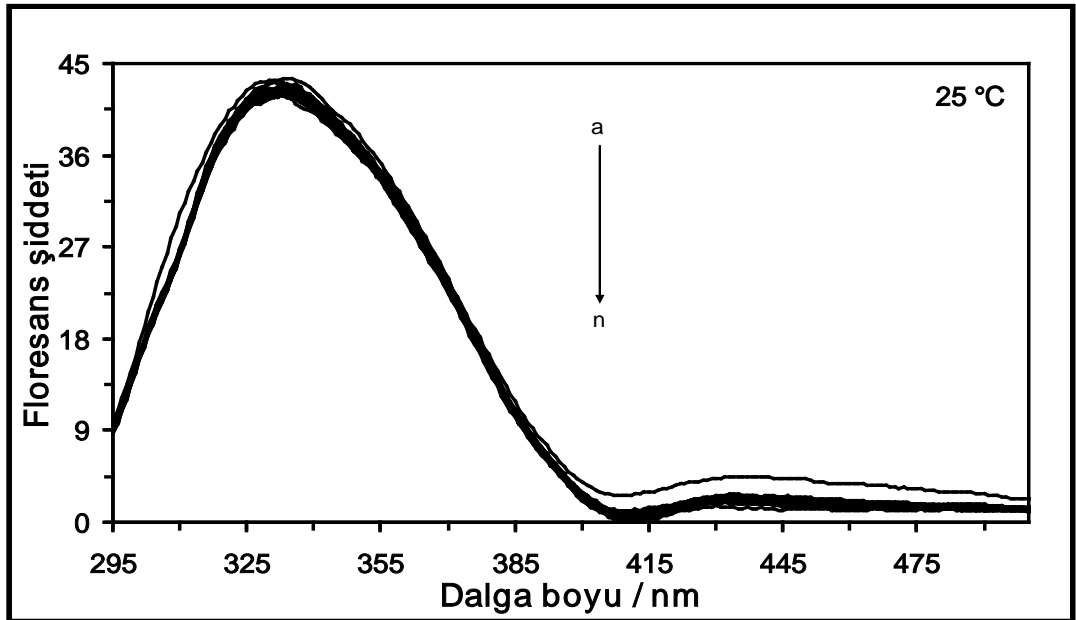
Şekil 4.38. $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'deki emisyon spektrumları

HMG protein çözeltisinin ilaç yokluğunda maksimum emisyon dalga boyu değeri 332 nm olarak bulunmuş ve sıcaklığın artmasıyla da proteinin floresans şiddetinde bir azalma görülmüştür (bkz. Şekil 4.38).

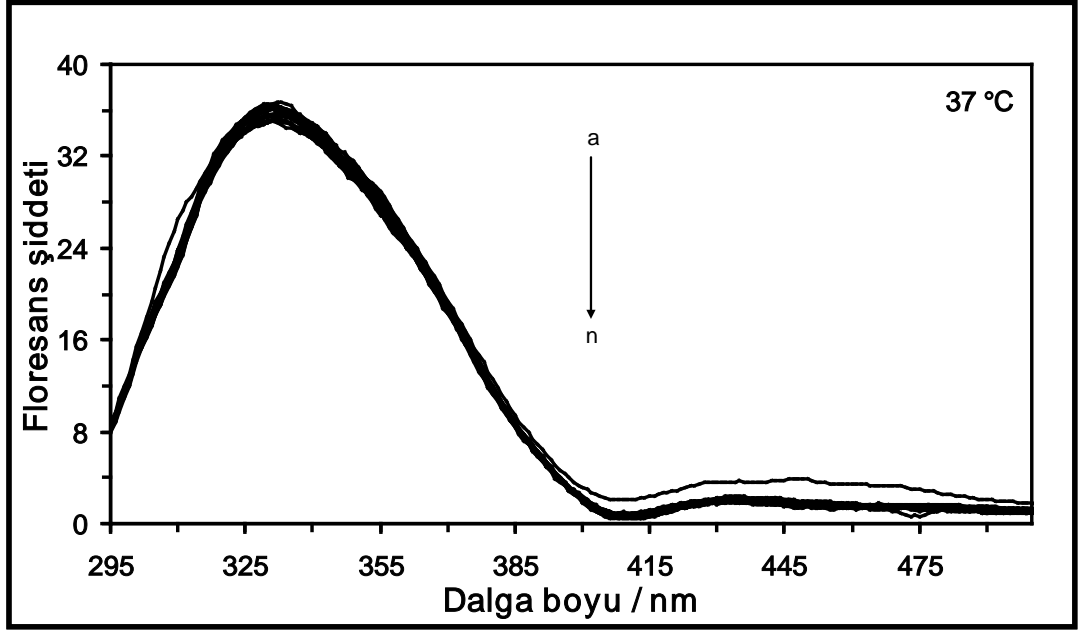
Farklı konsantrasyonlarda AZA içeren $4,0 \times 10^{-6}$ M'lık HMG çözeltisinin 15 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.39'da, 25 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.40'ta, 37 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.41'de ve 45 °C'deki emisyon spektrumları Şekil 4.42'de gösterilmektedir.



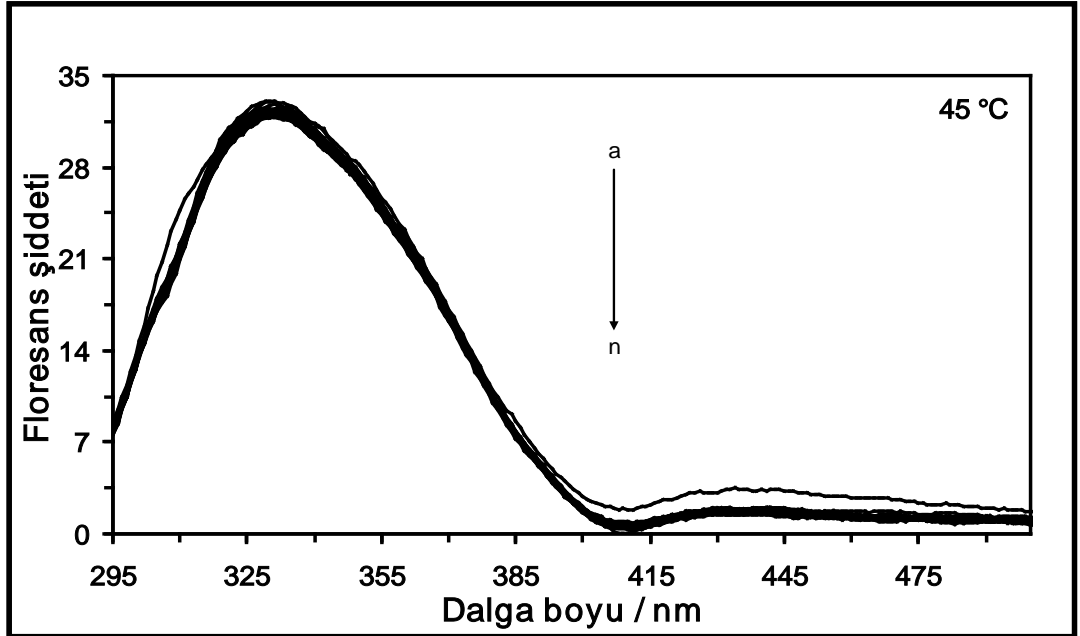
Şekil 4.39. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



Şekil 4.40. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



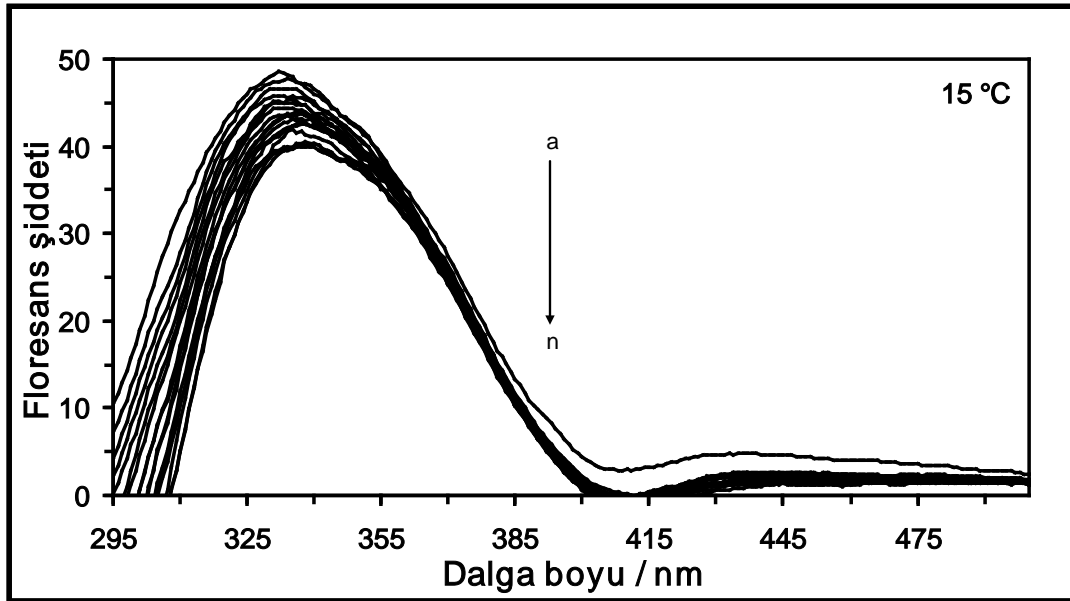
Şekil 4.41. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.



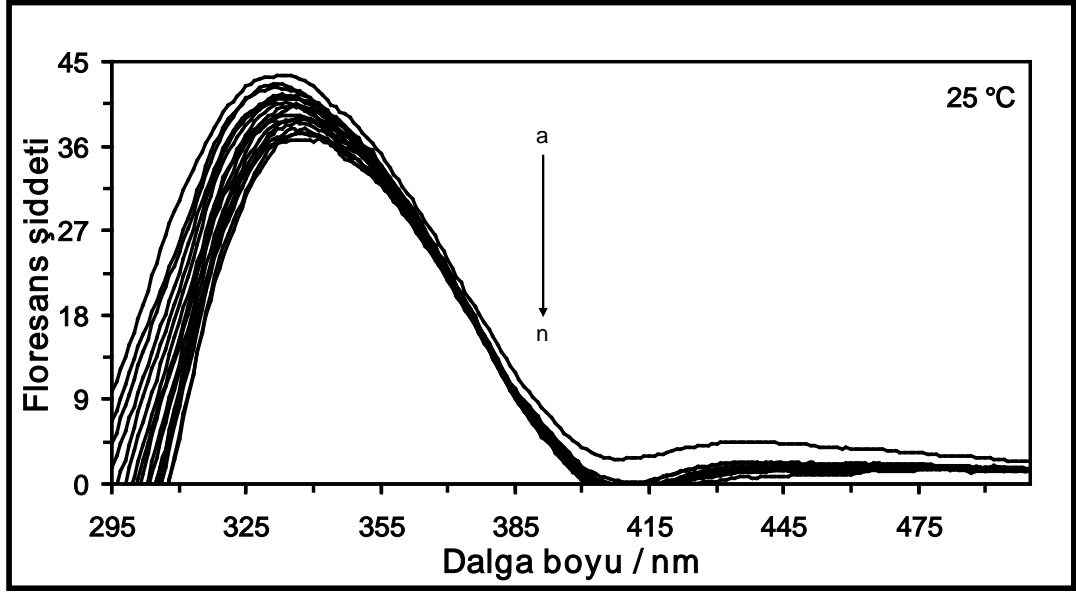
Şekil 4.42. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda AZA varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin emisyon spektrumları. [AZA]= (a) 0 M, (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (d) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (f) $8,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $10,0 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $12,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $16,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $24,0 \times 10^{-6}$ M, (i) $32,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $40,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $60,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $80,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $100,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $120,0 \times 10^{-6}$ M.

Şekil 4.39-4.42’de yer alan HMG-AZA sistemine ait farklı sıcaklıklardaki emisyon spektrumları incelendiğinde, ilaç içermeyen $4,0 \times 10^{-6}$ M’lık HMG çözeltisinin emisyon spektrumu şiddetinde artan sıcaklıkla bir azalmanın olduğu görülmektedir. Çözeltideki artan ilaç konsantrasyonu ile birlikte protein çözeltisinin emisyon spektrumunda herhangi bir sönümlenmenin meydana gelmemiş olması (bkz. Şekil 4.39-4.42), HMG ile AZA arasında herhangi bir etkileşimin gerçekleşmediğini göstermektedir.

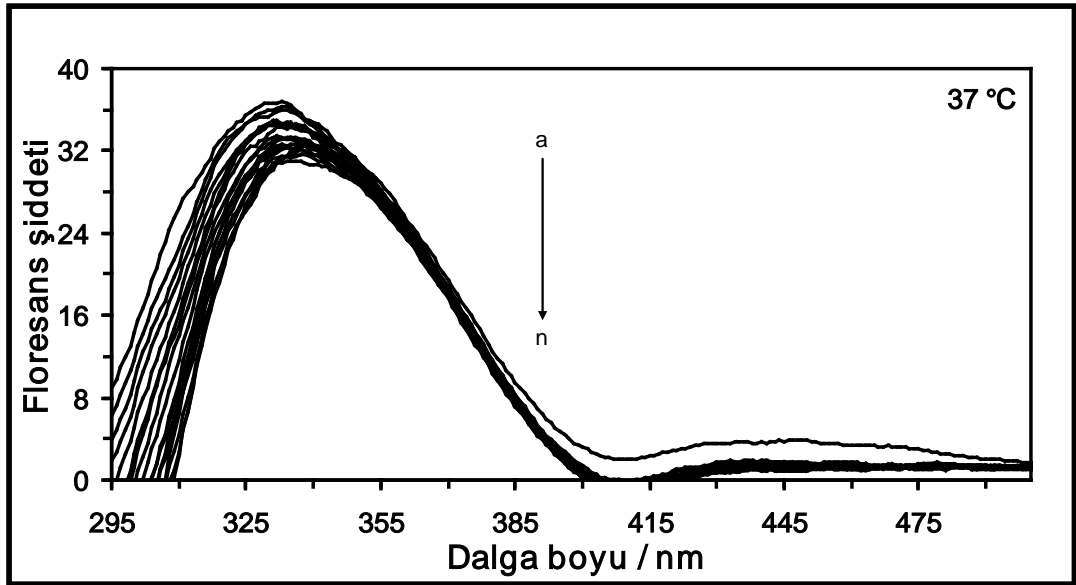
Farklı konsantrasyonlarda THC içeren $4,0 \times 10^{-6}$ M’lık HMG çözeltisinin 15 °C’deki emisyon spektrumları Şekil 4.43’te, 25 °C’deki emisyon spektrumları Şekil 4.44’te, 37 °C’deki emisyon spektrumları Şekil 4.45’te ve 45 °C’deki emisyon spektrumları Şekil 4.46’da yer almaktadır.



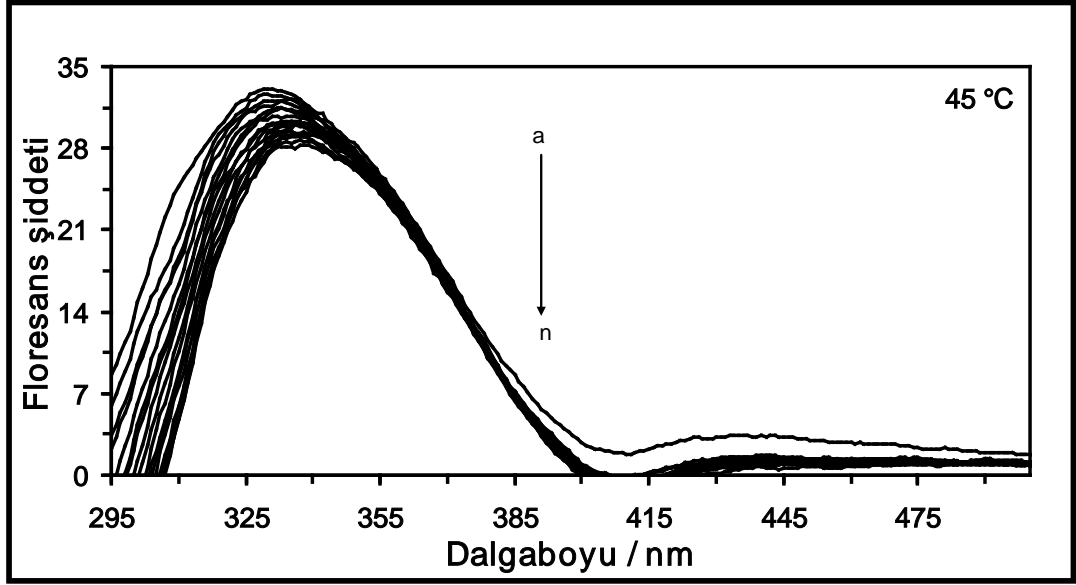
Şekil 4.43. 15 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin emisyon spektrumları. [THC]= (a) 0 M, (b) $0,5 \times 10^{-6}$ M, (c) $1,0 \times 10^{-6}$ M, (ç) $1,5 \times 10^{-6}$ M, (d) $2,0 \times 10^{-6}$ M, (e) $2,5 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $3,5 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $4,5 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $5,5 \times 10^{-6}$ M, (k) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $6,5 \times 10^{-6}$ M, (m) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (n) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $9,0 \times 10^{-6}$ M.



Şekil 4.44. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin emisyon spektrumları. [THC]= (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) $2,5 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $3,5 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $4,5 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,5 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $6,5 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $9,0 \times 10^{-6}$ M.



Şekil 4.45. 37 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin emisyon spektrumları. [THC]= (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) $2,5 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $3,5 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $4,5 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (ı) $5,5 \times 10^{-6}$ M, (j) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (k) $6,5 \times 10^{-6}$ M, (l) $7,0 \times 10^{-6}$ M, (m) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $9,0 \times 10^{-6}$ M.



Şekil 4.46. 45 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin emisyon spektrumları. [THC]= (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) $2,5 \times 10^{-6}$ M, (f) $3,0 \times 10^{-6}$ M, (g) $3,5 \times 10^{-6}$ M, (ğ) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (h) $4,5 \times 10^{-6}$ M, (i) $5,0 \times 10^{-6}$ M, (j) $5,5 \times 10^{-6}$ M, (k) $6,0 \times 10^{-6}$ M, (l) $6,5 \times 10^{-6}$ M, (m) $8,0 \times 10^{-6}$ M ve (n) $9,0 \times 10^{-6}$ M.

Şekil 4.43-4.46’da yer alan HMG-THC sistemine ait farklı sıcaklıklardaki emisyon spektrumları incelendiğinde, ilaç içermeyen $4,0 \times 10^{-6}$ M’lık HSA çözeltisinin emisyon spektrum şiddetinde artan sıcaklıkla birlikte bir azalma olmaktadır. Çözeltideki artan ilaç konsantrasyonu ile birlikte $4,0 \times 10^{-6}$ M’lık HMG çözeltisinin emisyon spektrumunda bir azalmanın olması, THC ilacı ile HMG proteini arasında bir etkileşimin gerçekleştiğini göstermektedir (Jang vd 2009, Zhou vd 2009). Ayrıca, artan ilaç konsantrasyonu ve sıcaklık HMG proteininin sönmülleme miktarını değiştirmektedir. Sönmülleme miktarı üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde; 15 °C’deki HSA proteininin sönmülleme miktarının (bkz. Şekil 4.43), 45 °C’deki HSA proteininin sönmülleme miktarından (bkz. Şekil 4.46) daha fazla olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, saf protein çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyu değeri, çözeltide artan ilaç konsantrasyonu ile 332 nm’den 338 nm’ye yani kırmızıya kayma (batokromik etki) göstermektedir.

Benzer sonuçlar çeşitli HMG-ilacı sistemlerinde de görülmüştür. Zhou vd (2009), hipokrellin ile HMG arasındaki etkileşimi incelemişler ve 280 nm uyarılma

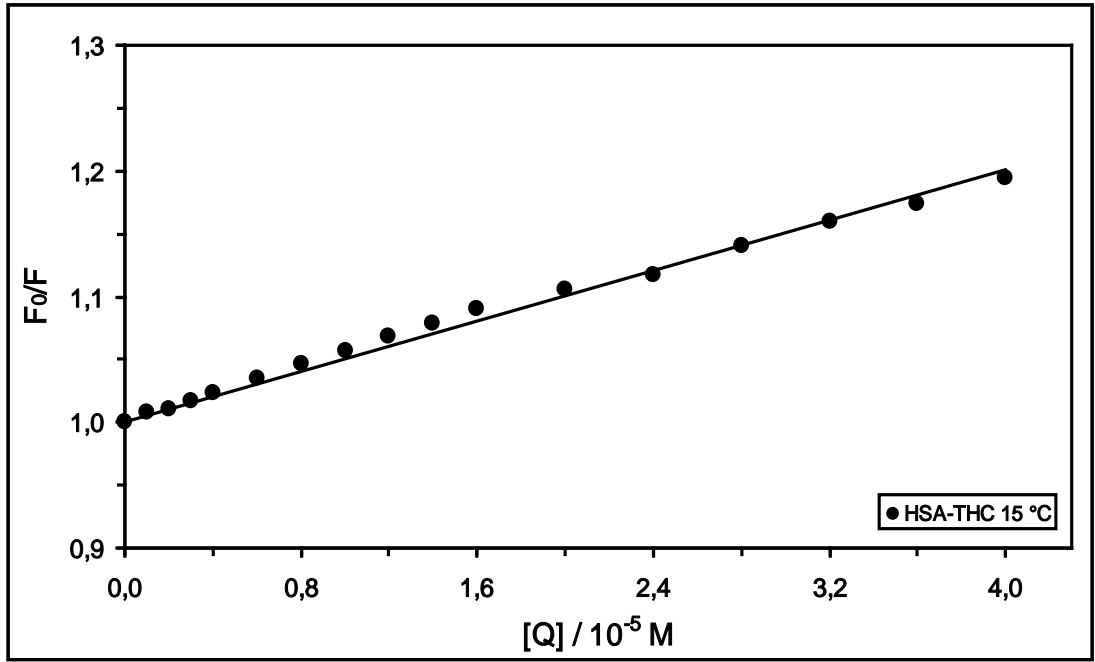
dalga boyunda ilaç içermeyen $2,6 \times 10^{-6}$ M'lık protein çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyu değerini 340 nm olarak bulmuşlardır. Ayrıca, ilaç konsantrasyonunun artmasıyla floresans şiddeti değerinin azaldığını ve pik pozisyonunun daha düşük dalga boyuna yani maviye kaydığını belirtmişlerdir. Jang vd (2009) mitomisin C ile kan proteinlerinden birisi olan HMG arasındaki etkileşimi araştırmışlar ve 280 nm uyarılma dalga boyunda üç farklı sıcaklık için emisyon spektrumlarını elde etmişlerdir. Bu spektrumlardan yararlanarak ilaç molekülü ile etkileşen HMG proteininin maksimum emisyon dalga boyu değerini 330 nm olarak bulmuşlardır. Artan ilaç konsantrasyonu ile emisyon şiddeti değerinin azaldığını ve pik pozisyonunun maviye kaydığını belirtmişlerdir. Maitra vd (2007), alprazolam ile HMG arasındaki etkileşimleri incelemişler ve 280 nm uyarılma dalga boyunda $3,0 \times 10^{-6}$ M'lık ilaç içermeyen HMG çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyu değerinin 330 nm civarında olduğunu, artan ilaç konsantrasyonu ile emisyon şiddeti değerlerinin azaldığını ve pik pozisyonunda herhangi bir değişikliğin olmadığını belirtmişlerdir. Lu vd (2007), kalp-damar ve sinir hastalıkları için kullanılan resveratrol ile kan proteinlerinden olan HMG arasındaki etkileşimi floresans spektroskopisiyle incelemişlerdir. 280 nm uyarılma dalga boyunda ve ilaç yokluğunda $3,0 \times 10^{-6}$ M'lık HMG çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyu değerini 330 nm olarak bulmuşlardır. Artan ilaç konsantrasyonu ile emisyon şiddeti değerinin azaldığını ve pik pozisyonunun değişmediğini belirtmişlerdir. Ayrıca, çalışılan üç farklı sıcaklık (288 K, 298 K ve 308 K) değerinde, emisyon şiddeti değerinin artan sıcaklıkla azaldığı sonucunu da vurgulamışlardır. Cheng vd (2011)'nin dosetaksel ile HMG arasındaki etkileşimlerin incelenmesi konusunda yaptıkları çalışmada, ilaç içermeyen 3×10^{-6} M'lık HMG çözeltisinin maksimum emisyon dalga boyu değerinin 334 nm olduğu bulunmuştur. Ayrıca, ilaç konsantrasyonunun artmasıyla proteinin emisyon şiddeti değerinin azaldığı ve maksimum emisyon dalga boyu değerinin 338 nm'ye yani kırmızıya kaydığı belirtilmiştir.

HMG proteininin ilaç molekülleri ile güçlü sönümlenme gerçekleştirmesi, belirli bir zincirde yer alan amino asit kalıntılarının floresans özelliğinden ileri gelmektedir. HMG molekülü 2 adet α ve 2 adet β zincirinden oluşmuş tetramerik bir

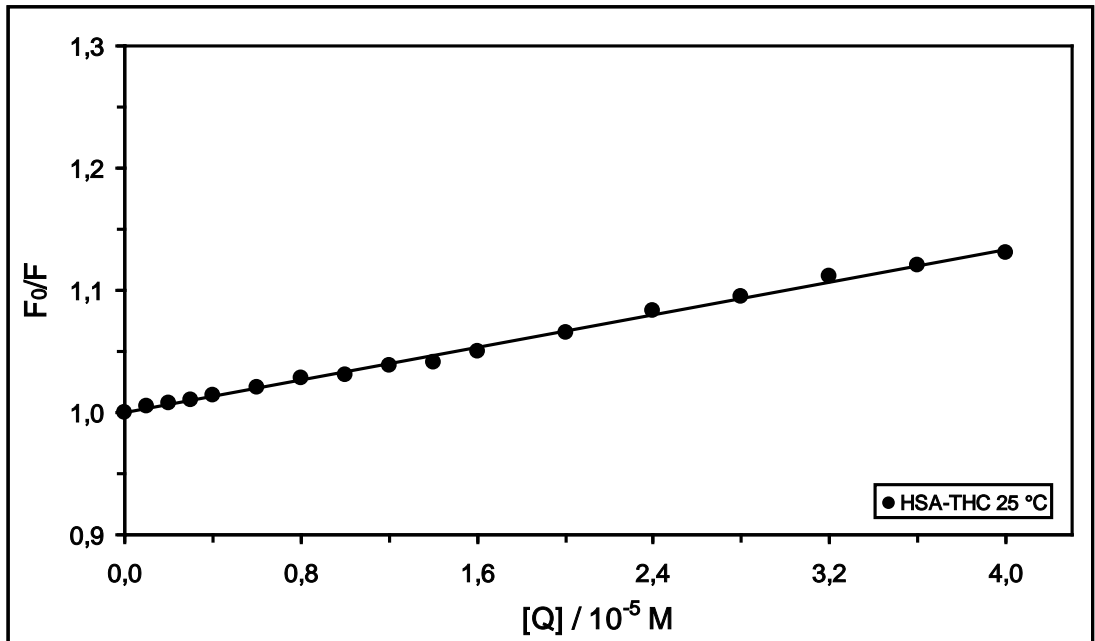
protein olduğundan, $\alpha_1\beta_1$ ve $\alpha_2\beta_2$ alt kısımlarının her biri α -Trp¹⁴, β -Trp¹⁵ ve β -Trp³⁷ kalıntıları olmak üzere üç triptofan kalıntısı içermektedir (Cheng vd 2001, Jang vd 2009). Bu amino asit kalıntılarında α -Trp¹⁴ ve β -Trp¹⁵ kalıntıları, altbirimlerin dış kısmında bulunduğundan dolayı florofor özellik gösterememektedir (Venkatesh Rao ve Manoharan 2004, Jang vd 2009). Ancak, β -Trp³⁷ kalıntısı $\alpha_1\beta_2$ altbirimlerinin ara kısmında yer aldığından temel floresans kaynağı olarak tanımlanmaktadır (Jang vd 2009). HMG'nin ligant etkileşimlerinde β -Trp³⁷ kalıntısı güçlü bir florofor özellik göstermektedir. Triptofan kalıntısı, bulunduğu çevrede meydana gelen değişikliklere karşı yüksek duyarlılık gösterdiğinden, proteinin konformasyon değişimleri hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Ayrıca, α -Tyr⁴², α -Tyr¹⁴⁰ ve β -Tyr¹⁴⁵'in aromatik kalıntıları da $\alpha_1\beta_2$ altbirimlerin ara kısmında yer almaktadır (Li vd 2000).

THC ilacı tarafından neden olunan HSA ve HMG proteinlerinin floresans sönümlenme mekanizmalarını anlamak için HSA-THC ve HMG-THC sistemlerine ait farklı sıcaklıklardaki floresans verileri Eşitlik (3.1)'deki Stern-Volmer eşitliği kullanılarak analiz edilmiştir (Eftink ve Ghiron 1982).

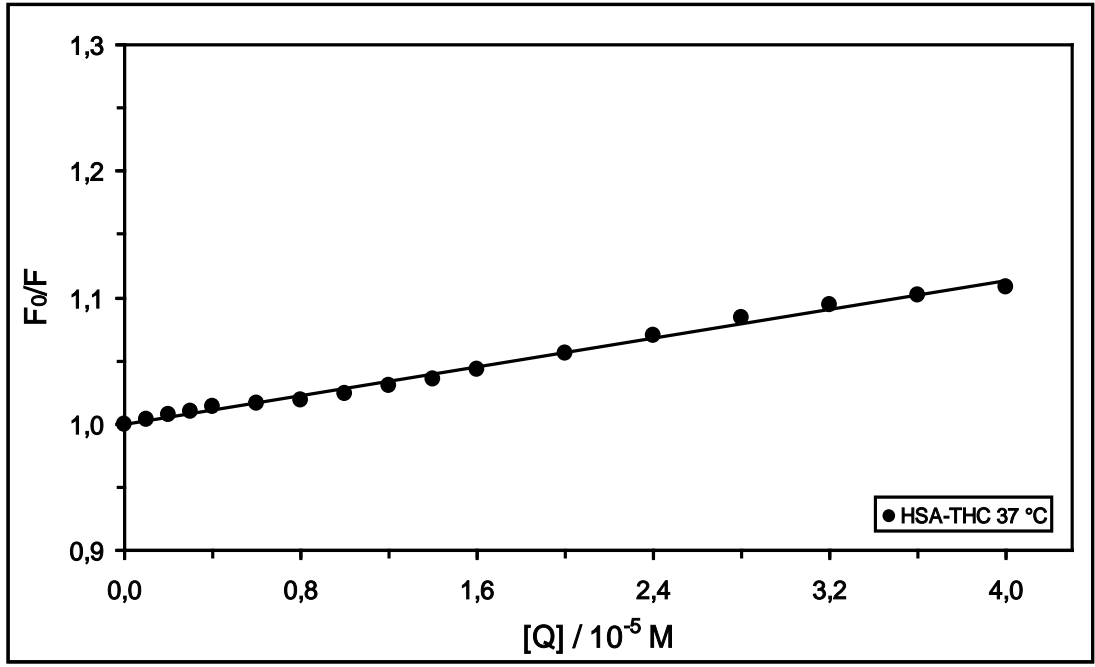
Protein-ilac sistemleri için çalışılan her bir sıcaklıkta (F_0/F) değerlerine karşı $[Q]$ değerleri grafiği çizilmiştir. HSA-AZA ve HMG-AZA sistemlerine ait Stern-Volmer grafikleri etkileşim olmadığından dolayı çizilmemiştir. HSA-THC sistemi için çizilen 15 °C'deki Stern-Volmer grafiği Şekil 4.47'de, 25 °C'deki Stern-Volmer grafiği Şekil 4.48'de, 37 °C'deki Stern-Volmer grafiği Şekil 4.49'da ve 45 °C'deki Stern-Volmer grafiği Şekil 4.50'de ve HMG-THC sistemi için çizilen 15 °C'deki Stern-Volmer grafiği Şekil 4.51'de, 25 °C'deki Stern-Volmer grafiği Şekil 4.52'de, 37 °C'deki Stern-Volmer grafiği Şekil 4.53'te ve 45 °C'deki Stern-Volmer grafiği Şekil 4.54'te gösterilmektedir.



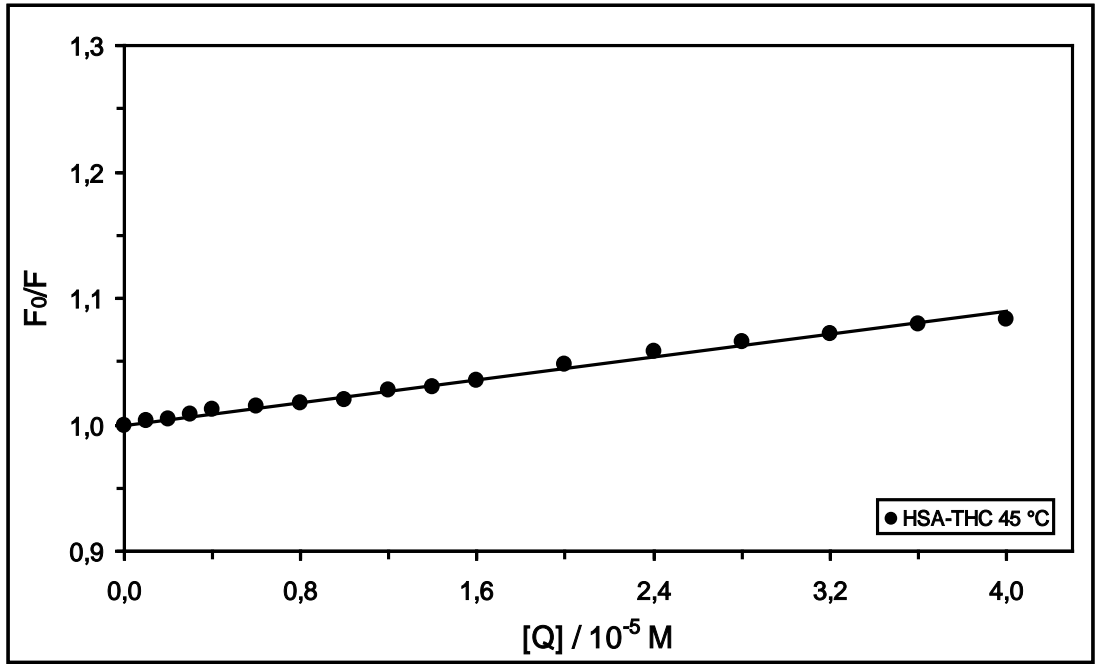
Şekil 4.47. 15 °C'de HSA-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği.



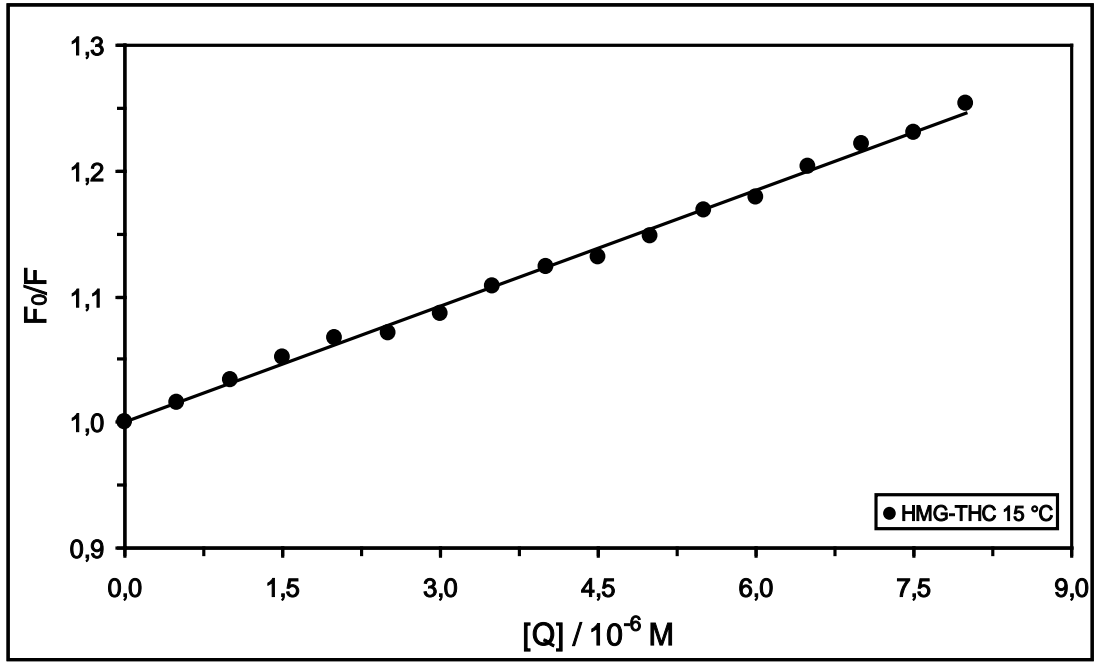
Şekil 4.48. 25 °C'de HSA-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği.



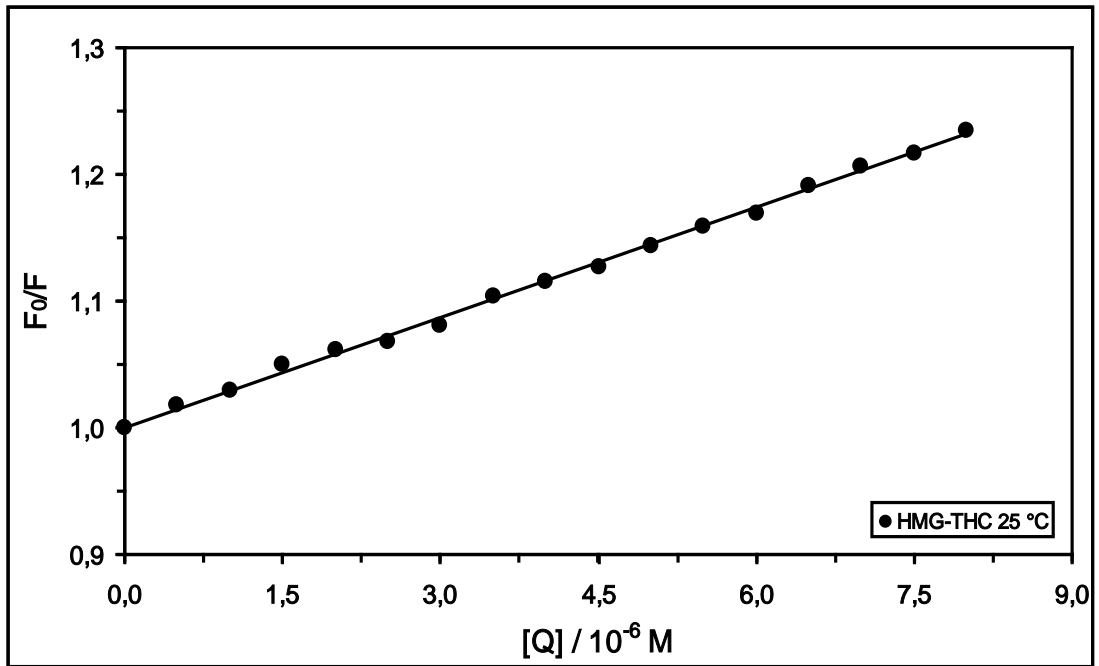
Şekil 4.49. 37 °C’de HSA-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği.



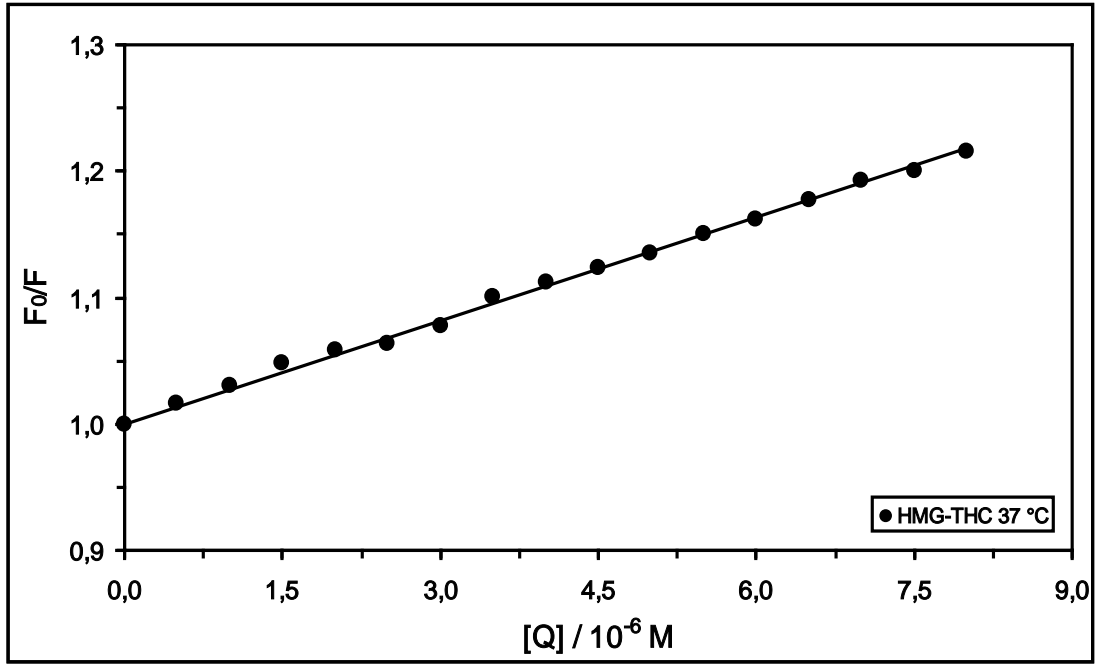
Şekil 4.50. 45 °C’de HSA-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği.



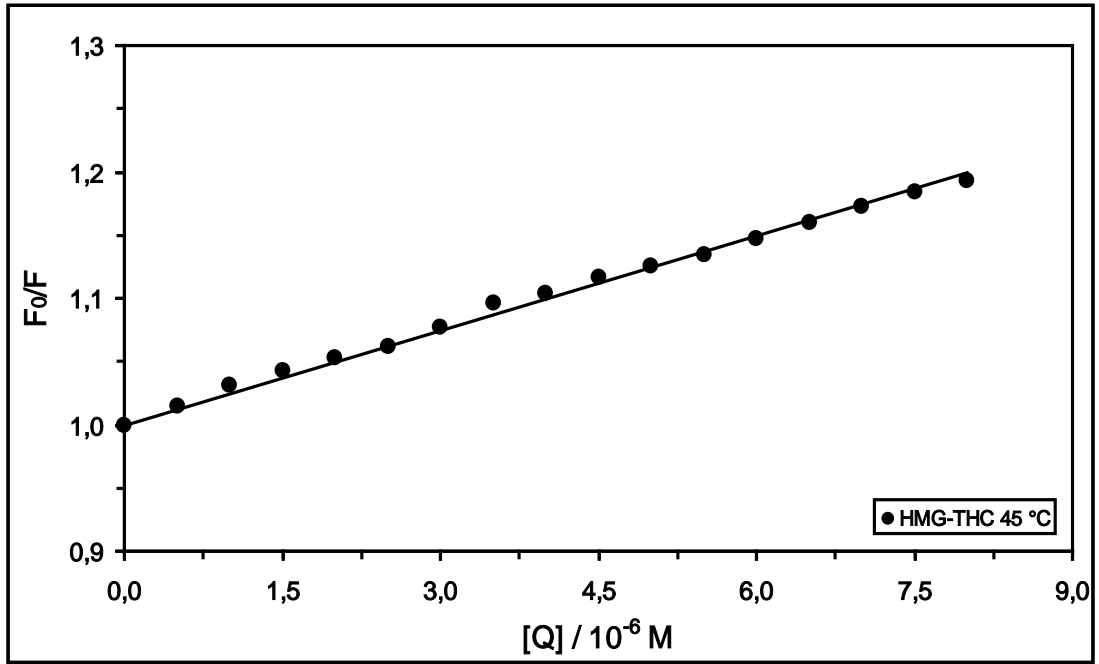
Şekil 4.51. 15 °C’de HMG-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği.



Şekil 4.52. 25 °C’de HMG-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği.



Şekil 4.53. 37 °C’de HMG-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği.



Şekil 4.54. 45 °C’de HMG-THC sistemi için Stern-Volmer grafiği.

Kompleks oluşumu, enerji transferi ve uyarılma hal reaksiyonları gibi çeşitli moleküler etkileşimler sönümlenmeyle sonuçlanabilmektedir. Sönümlenmeler, dinamik ve statik sönümlenme mekanizmaları üzerinden gerçekleşmektedir. Statik sönümlenmede sıcaklık arttıkça sönümlenme sabiti değeri azalırken, dinamik sönümlenmede ise sıcaklık arttıkça sönümlenme sabiti değeri artmaktadır (Kandagal vd 2007).

Stern-Volmer grafiğinden elde edilen veriler kullanılarak etkileşimlerin hangi sönümlenme mekanizması ile gerçekleştiği konusunda bilgi elde edilebilmektedir. Eşitlik (3.1)'in kullanılmasıyla HSA-THC ve HMG-THC sistemleri için sırasıyla Şekil 4.47-4.50 ve Şekil 4.51-4.54'te yer alan verilerin lineer regresyon analiziyle işlenmesi sonucu elde edilen doğrusal grafiklerin eğim değerlerinden K_{SV} değerleri bulunmuştur. Fizyolojik pH'ta ve farklı sıcaklıkta THC ilacının HSA ile etkileşimine ilişkin hesaplanmış K_{SV} ve regresyon katsayısı (r) değerleri Çizelge 4.1'de ve THC ilacının HMG ile etkileşimine ilişkin hesaplanmış K_{SV} ve r değerleri Çizelge 4.2'de verilmektedir.

Çizelge 4.1. Fizyolojik pH'ta ve farklı sıcaklıklarda THC'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	$5,04 \times 10^3$	0,9958	$5,04 \times 10^{11}$
25	$3,34 \times 10^3$	0,9983	$3,34 \times 10^{11}$
37	$2,82 \times 10^3$	0,9960	$2,82 \times 10^{11}$
45	$2,24 \times 10^3$	0,9964	$2,24 \times 10^{11}$

Çizelge 4.2. Fizyolojik pH'ta ve farklı sıcaklıklarda THC'nin HMG ile etkileşimine ilişkin K_{SV} , r ve k_q değerleri

T / °C	K_{SV} / M^{-1}	r	$k_q / M^{-1}s^{-1}$
15	$3,08 \times 10^4$	0,9982	$3,08 \times 10^{12}$
25	$2,90 \times 10^4$	0,9989	$2,90 \times 10^{12}$
37	$2,72 \times 10^4$	0,9987	$2,72 \times 10^{12}$
45	$2,48 \times 10^4$	0,9974	$2,48 \times 10^{12}$

HSA ve HMG proteinlerinin farklı sıcaklıklardaki k_q değerleri, τ_0 değerinin $10^{-8} s^{-1}$ olarak alınmasıyla Eşitlik (3.1) kullanılarak hesaplanmıştır (Lu vd 2007, Jang vd 2009). Farklı sıcaklıklar için elde edilen k_q değerleri HSA-THC sistemi için Çizelge 1'in son sütununda ve HMG-THC sistemi için ise Çizelge 2'nin son sütununda gösterilmektedir.

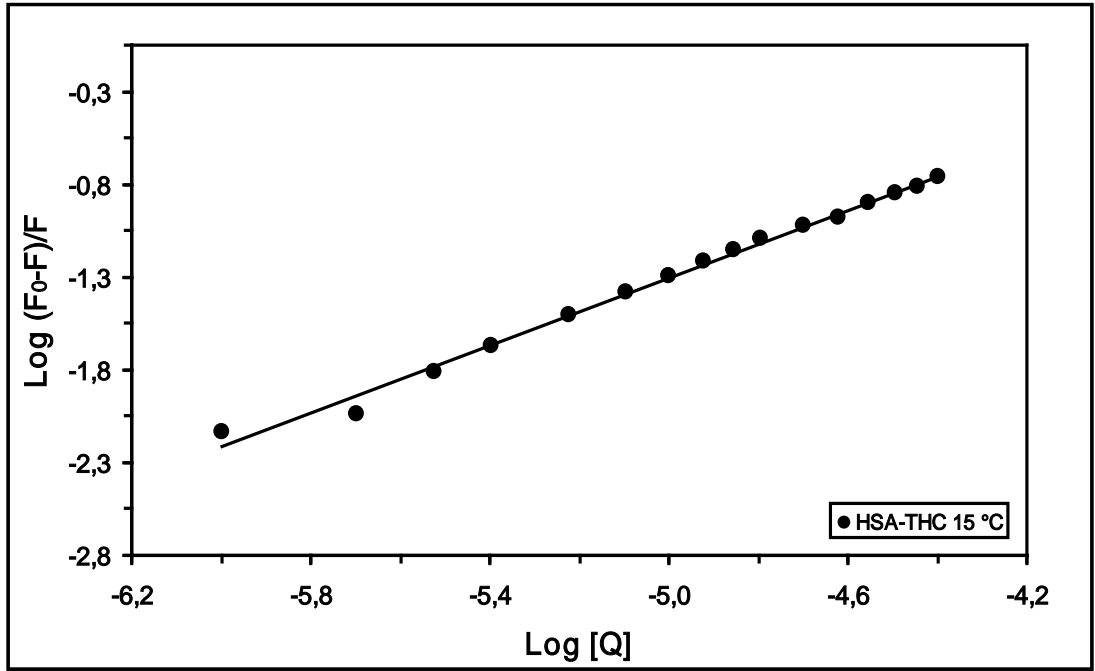
Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'den görüldüğü üzere, çözeltinin sıcaklığı arttırıldığında ilaç-protein sistemlerinin K_{SV} değerlerinde bir azalma meydana gelmektedir. Sıcaklık artışıyla birlikte K_{SV} değerlerinde bir azalmanın gerçekleşmesi, çalışılan protein-ilac sistemlerindeki floresans sönümlenme mekanizmasının statik sönümlenme yoluyla meydana geldiğini göstermektedir (Jang vd 2009). Farklı sıcaklıklar için hesaplanan k_q değerlerinin tamamının büyüklüğü Çizelge 4.1'de $10^{11} M^{-1}s^{-1}$ mertebesinde iken, Çizelge 4.2'de ise $10^{12} M^{-1}s^{-1}$ mertebesinde dir. Elde edilen k_q değerlerinin $2,0 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$ değerinden büyük olması, hem HSA hem de HMG proteinlerinin THC ilacı etkileşimlerinde statik sönümlenmenin baskın olduğunu göstermektedir (Xie vd 2005, Cui vd 2009, Hu vd 2009). THC ilacının HSA proteini ile etkileşiminde çalışılan sıcaklıklardaki K_{SV} değerleri $10^3 M^{-1}$ mertebesinde iken, aynı ilacın HMG proteini ile etkileşiminde çalışılan sıcaklıklardaki K_{SV} değerleri $10^4 M^{-1}$ mertebesinde dir.

HSA ve HMG proteinlerinin ilaç molekülleri ile etkileşimi sonucunda sönümlenme mekanizmasını belirlemeye yönelik yapılan benzer çalışmalarda Jang vd (2009), mitomisin C ile sırasıyla HSA ve HMG'yi etkileştirerek bağlanma parametrelerini incelemişlerdir. 288 K, 298 K ve 308 K'de HSA ile mitomisin C'nin etkileşimi sonucunda K_{SV} değerleri sırasıyla $2,57 \times 10^4 M^{-1}$, $2,12 \times 10^4 M^{-1}$ ve $1,9 \times 10^4 M^{-1}$, k_q değerleri de sırasıyla $2,57 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$, $2,12 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$ ve $1,9 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$; HMG ile mitomisin C'nin etkileşimi sonucunda K_{SV} değerleri sırasıyla $2,02 \times 10^4 M^{-1}$, $1,80 \times 10^4 M^{-1}$ ve $1,77 \times 10^4 M^{-1}$, k_q değerleri ise sırasıyla $2,57 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$, $2,12 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$ ve $1,9 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca, sönümlenme mekanizmasının statik sönümlenme ile gerçekleştiği belirtilmiştir. Ding vd (2009), HSA'ya kloramfenikol ilacının bağlanmasını çalışmışlardır. Bu çalışma sonucunda, dört farklı sıcaklık (287 K, 295 K, 303 K ve 310 K) için K_{SV} değerleri sırasıyla $2,929 \times 10^4 M^{-1}$, $2,832 \times 10^4 M^{-1}$, $2,769 \times 10^4 M^{-1}$ ve $2,709 \times 10^4 M^{-1}$; k_q değerleri sırasıyla $2,929 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$, $2,832 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$, $2,769 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$ ve $2,709 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$ olarak bulunmuş ve artan sıcaklık ile K_{SV} değerinin azalması nedeniyle sönümlenmenin statik sönümlenme mekanizması üzerinden gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır. Yuan vd (2007), apigeninin HSA ile etkileşimini incelemişler ve 288 K, 298 K ve 308 K sıcaklıkta K_{SV} değerlerini sırasıyla $11,55 \times 10^4 M^{-1}$, $9,85 \times 10^4 M^{-1}$ ve $8,06 \times 10^4 M^{-1}$; k_q değerlerini ise sırasıyla $11,55 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$, $9,85 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$ ve $8,06 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$ olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada, K_{SV} değerinin artan sıcaklıkla azalması ve k_q değerinin $2.0 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$ değerinden büyük olması nedeniyle sönümlenme mekanizmasının kompleks oluşumuyla olduğu yani sönümlenmenin statik sönümlenme mekanizması ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Cheng vd (2011), dosataksel ile HMG arasındaki etkileşimleri incelemişler ve artan sıcaklıkla birlikte K_{SV} değerlerinin artması nedeniyle oluşan etkileşimin dinamik sönümlenme mekanizması üzerinden gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Zhou vd (2009) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, hipokrellin A ile HMG arasındaki etkileşim incelenmiş ve K_{SV} değerleri 25 °C ve 42 °C'de sırasıyla $9,0 \times 10^4 M^{-1}$ ve $5,52 \times 10^4 M^{-1}$ olarak; k_q değerleri de sırasıyla $5,0 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$ ve $3,90 \times 10^{12} M^{-1}s^{-1}$ olarak bulunmuştur.

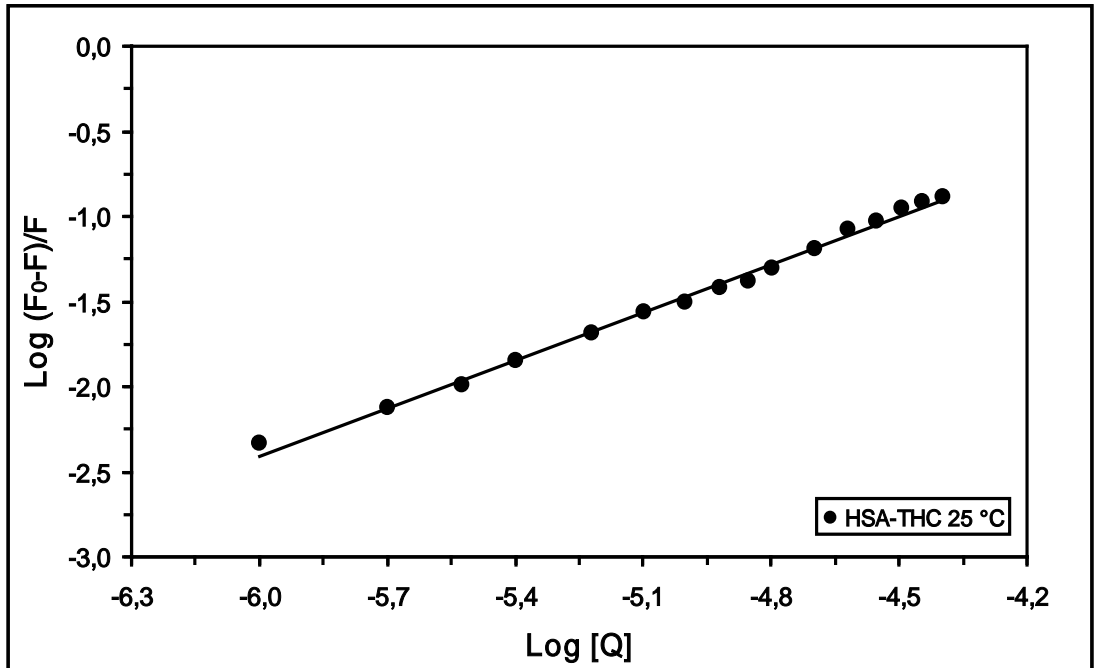
4.2. HSA ve HMG Proteinlerine THC İlacının Bağlanmasına İlişkin Bağlanma Sabitleri ve Bağlanma Yeri Sayıları

HSA-THC ve HMG-THC sistemleri için farklı sıcaklıklarda protein molekülü başına ilaç maddesi bağlanma yeri sayısı (n) ve bağlanma sabiti (K_a) değerleri Eşitlik (3.2)'nin kullanılmasıyla bulunmuştur (Xie vd 2006, Han vd 2009). Eşitlik (3.2)'ye göre, $\log (F_0-F)/F'$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiğinin çizilmesiyle elde edilen doğrusal grafiklerin eğim ve kayım değerlerinden yararlanılarak K_a ve n değerleri hesaplanmıştır.

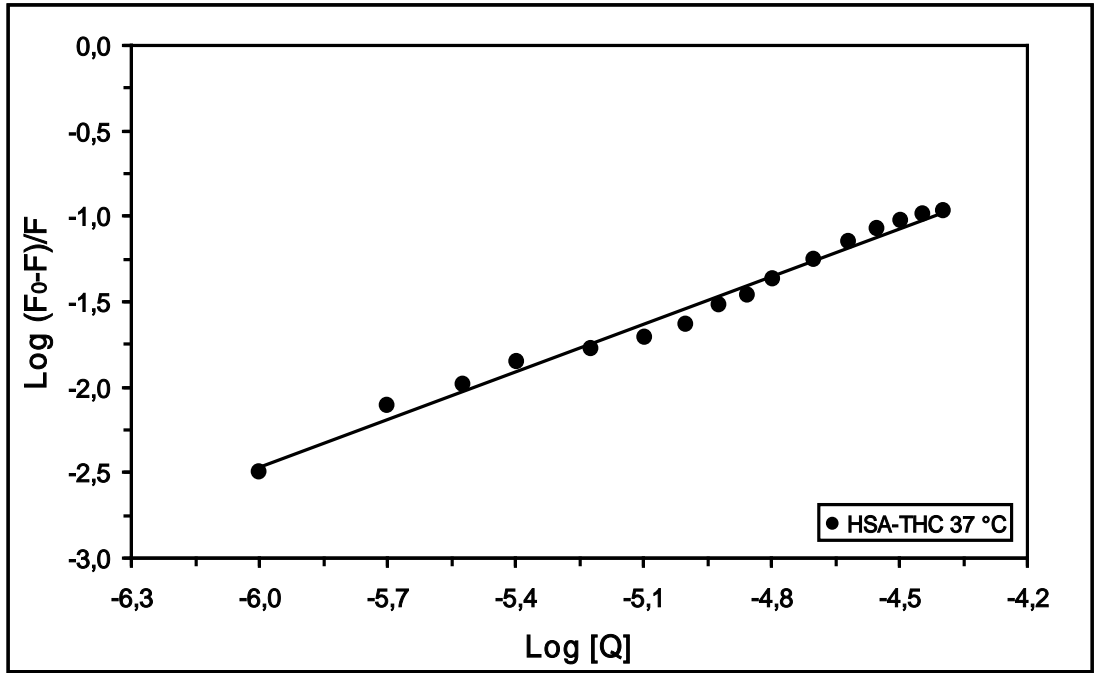
15 °C'de HSA-THC sistemi için çizilen $\log (F_0-F)/F'$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiği Şekil 4.55'te, 25 °C'de HSA-THC sistemi için çizilen $\log (F_0-F)/F'$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiği Şekil 4.56'da, 37 °C'de HSA-THC sistemi için çizilen $\log (F_0-F)/F'$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiği Şekil 4.57'de, 45 °C'de HSA-THC sistemi için çizilen $\log (F_0-F)/F'$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiği Şekil 4.58'de, 15 °C'de HMG-THC sistemi için çizilen $\log (F_0-F)/F'$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiği Şekil 4.59'da, 25 °C'de HMG-THC sistemi için çizilen $\log (F_0-F)/F'$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiği Şekil 4.60'ta, 37 °C'de HMG-THC sistemi için çizilen $\log (F_0-F)/F'$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiği Şekil 4.61'de ve 45 °C'de HMG-THC sistemi için çizilen $\log (F_0-F)/F'$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiği Şekil 4.62'de gösterilmektedir.



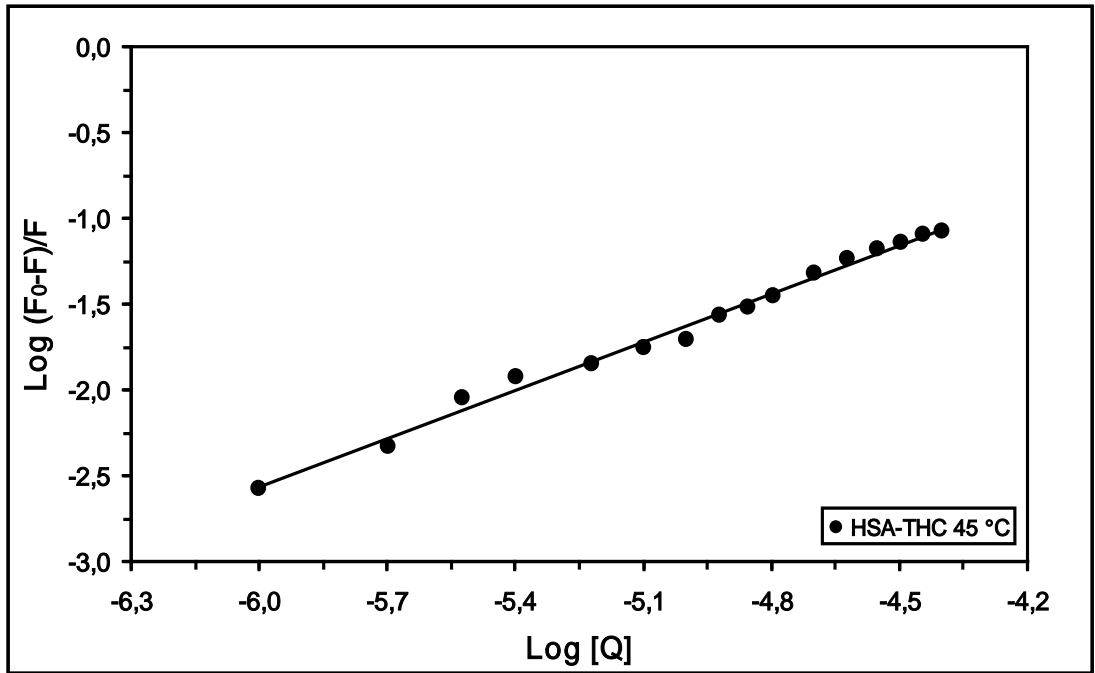
Şekil 4.55. 15 °C'de HSA-THC sistemi için $\log (F_0-F)/F$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiği.



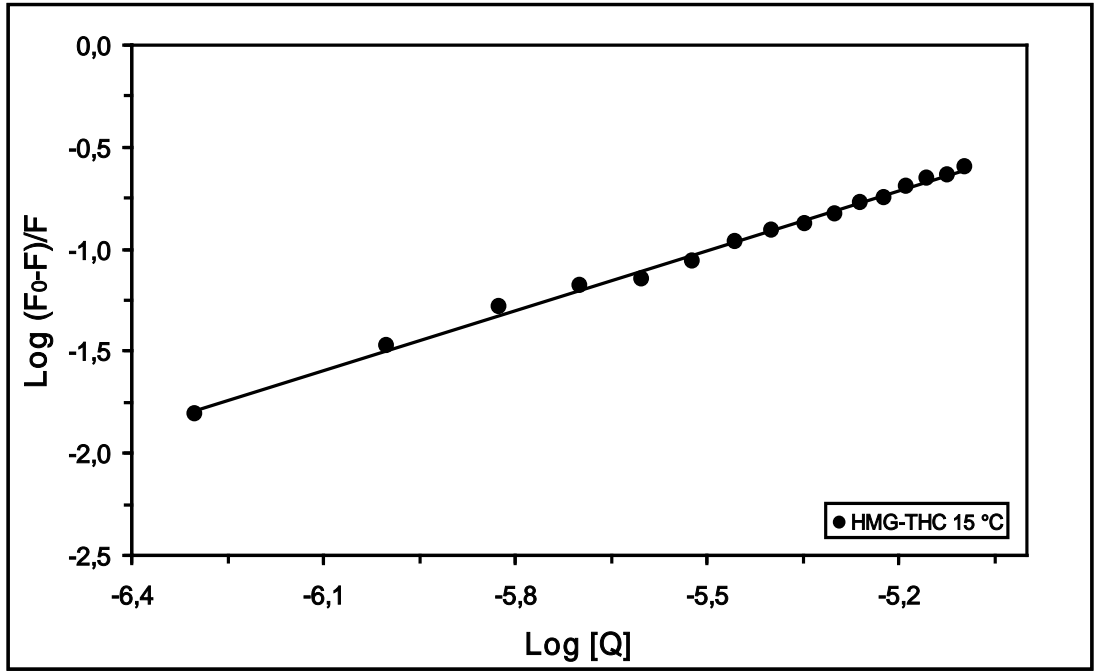
Şekil 4.56. 25 °C'de HSA-THC sistemi için $\log (F_0-F)/F$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiği.



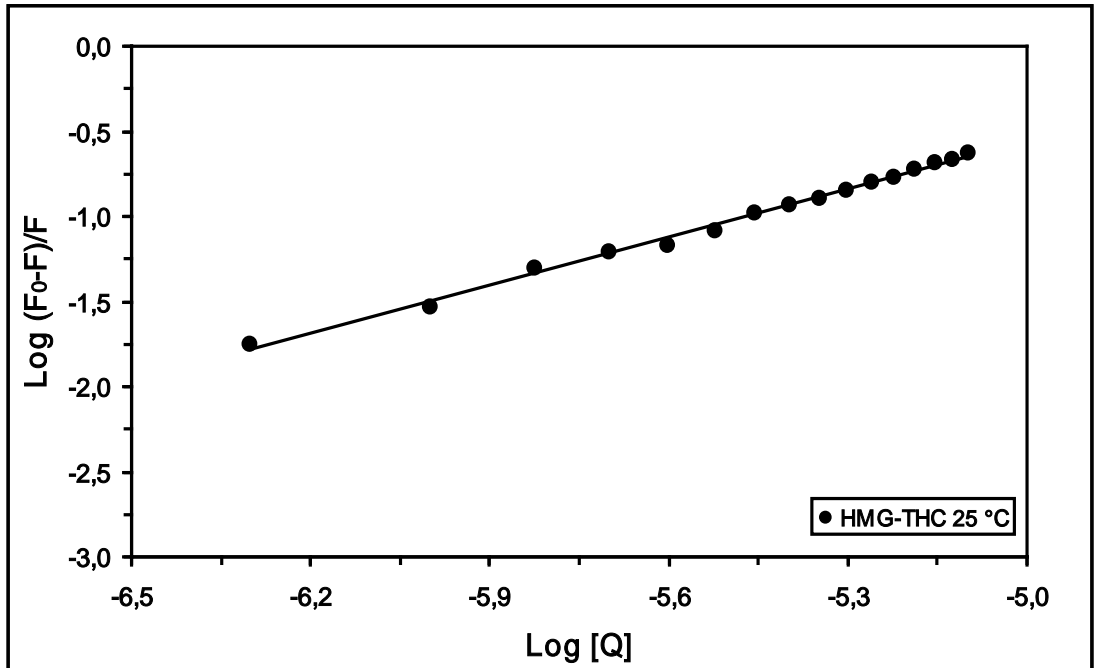
Şekil 4.57. 37 °C’de HSA-THC sistemi için $\text{log } (F_0-F)/F$ ’ye karşı $\text{log } [Q]$ grafiği.



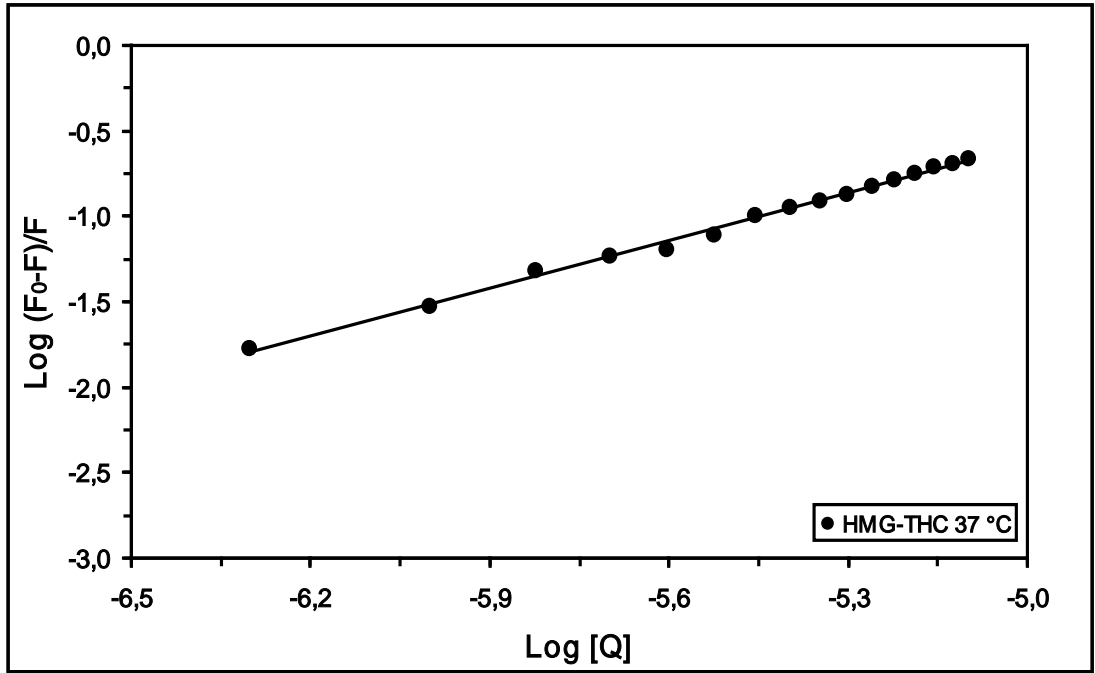
Şekil 4.58. 45 °C’de HSA-THC sistemi için $\text{log } (F_0-F)/F$ ’ye karşı $\text{log } [Q]$ grafiği.



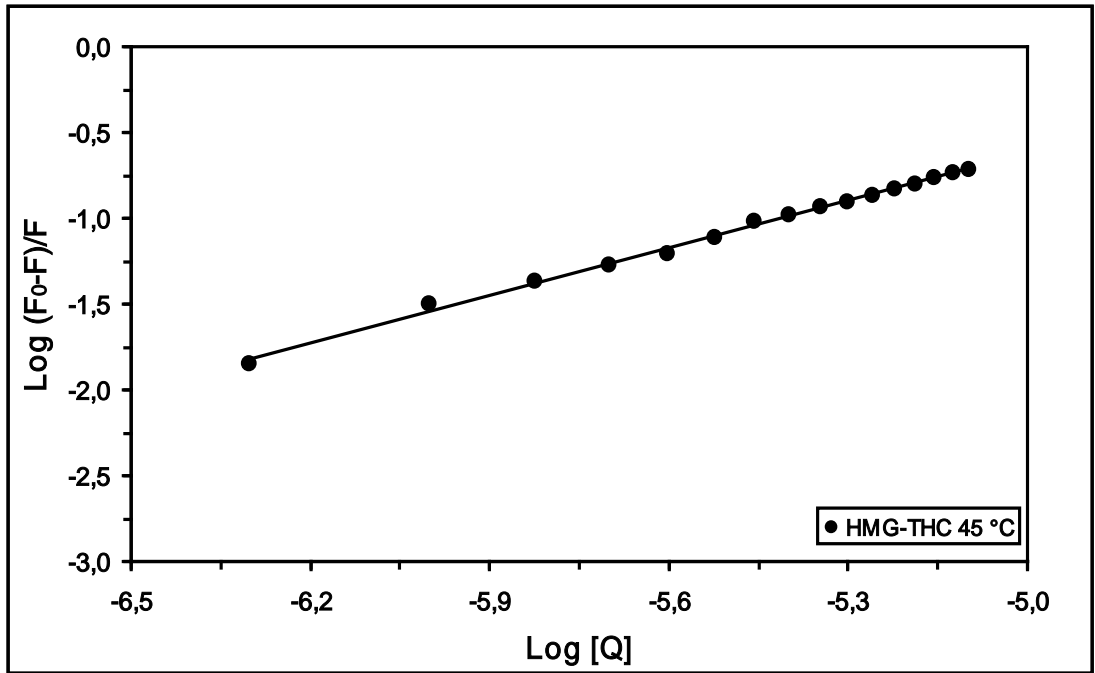
Şekil 4.59. 15 °C’de HMG-THC sistemi için $\text{log } (F_0-F)/F$ ’ye karşı $\text{log } [Q]$ grafiği.



Şekil 4.60. 25 °C’de HMG-THC sistemi için $\text{log } (F_0-F)/F$ ’ye karşı $\text{log } [Q]$ grafiği.



Şekil 4.61. 37 °C’de HMG-THC sistemi için $\text{log } (F_0-F)/F$ ’ye karşı $\text{log } [Q]$ grafiği.



Şekil 4.62. 45 °C’de HMG-THC sistemi için $\text{log } (F_0-F)/F$ ’ye karşı $\text{log } [Q]$ grafiği.

HSA-THC ve HMG-THC sistemleri için $\log (F_0-F)/F$ 'ye karşı $\log [Q]$ grafiklerindeki verilerin (bkz. Şekil 4.55-4.58 ve Şekil 4.59-4.62) lineer regresyon analiziyle işlenmesi sonucunda elde edilen doğrusal grafiklerin eğim ve kayım değerlerinden yararlanılarak hesaplanmış K_a ve n değerleri sırasıyla Çizelge 4.3'te ve Çizelge 4.4'te yer almaktadır.

Çizelge 4.3. Fizyolojik pH'ta ve farklı sıcaklıklarda THC'nin HSA'ya bağlanmasına ilişkin prosese ait K_a , n ve r değerleri

T / °C	K_a / M^{-1}	n	r
15	$1,95 \times 10^3$	0,91	0,9968
25	$1,75 \times 10^3$	0,94	0,9973
37	$1,33 \times 10^3$	0,93	0,9931
45	$1,18 \times 10^3$	0,94	0,9959

Çizelge 4.4. Fizyolojik pH'ta ve farklı sıcaklıklarda THC'nin HMG'ye bağlanmasına ilişkin prosese ait K_a , n ve r değerleri

T / °C	K_a / M^{-1}	n	r
15	$2,23 \times 10^4$	0,97	0,9978
25	$1,45 \times 10^4$	0,94	0,9975
37	$1,15 \times 10^4$	0,93	0,9980
45	$0,95 \times 10^4$	0,92	0,9983

Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'e bakıldığında, THC ilacının hem HSA hem de HMG proteinine bağlanması prosesi için bağlanma sabiti değerlerinin artan çözelti sıcaklığıyla birlikte azaldığı görülmektedir. Protein-ilaç sistemlerinde çözelti sıcaklığının artırılması ile bağlanma sabiti değerinde bir azalmanın meydana

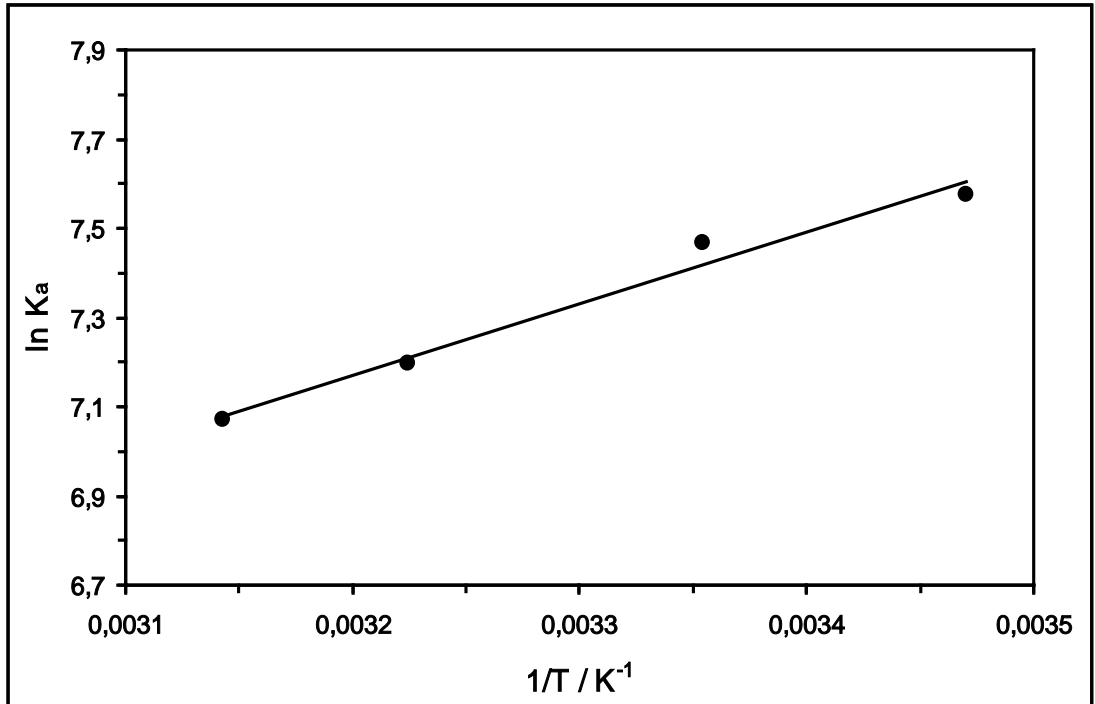
gelmesi, kararsız bileşenlerin kısmi ayrışması ile yapının kararsız özellik göstermesinden ileri gelmektedir (Ge vd 2010). THC ilacının HSA ve HMG proteinleri üzerine bağlanma yeri sayısı yaklaşık bir adettir ve ilaç bağlanma yeri sayısı sıcaklığın artmasıyla önemli ölçüde değişmemektedir (He vd 2005). Elde edilen sonuçlar THC ilacının HMG proteinine HSA proteininden daha kuvvetli bağlandığını göstermektedir.

Bağlanma sabiti değeri ve bağlanma yeri sayısının belirlenmesine yönelik benzer bir çalışma Ding vd (2009) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, kloramfenikol ilacı ile HSA arasındaki etkileşimlerde bağlanma sabiti değerleri 287 K, 295 K, 303 K ve 310 K'de sırasıyla $2,852 \times 10^4 M^{-1}$, $2,765 \times 10^4 M^{-1}$, $2,638 \times 10^4 M^{-1}$ ve $2,542 \times 10^4 M^{-1}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca, proteine ilaç bağlanmasının sadece bir yerden olduğu ve bunun da uyarılan dalga boyunda güçlü bir florofor özelliğe sahip olan Trp-214'den kaynaklandığı belirtilmiştir. Jang vd (2009), mitomisin C ile HSA ve HMG proteinlerinin 288 K, 298 K ve 308 K'deki bağlanma sabiti değerlerini ve bağlanma yeri sayısını hesaplamışlardır. 288 K, 298 K ve 308 K'de, HSA ile mitomisin C arasındaki etkileşimlerin bağlanma sabiti değerlerini sırasıyla $3,35 \times 10^4 M^{-1}$, $2,71 \times 10^4 M^{-1}$ ve $2,07 \times 10^4 M^{-1}$ ve bağlanma yeri sayısını da sırasıyla 1,02, 1,02 ve 1,01 olarak; HMG ile mitomisin C arasındaki etkileşimlerin bağlanma sabiti değerlerini sırasıyla $2,77 \times 10^4 M^{-1}$, $2,56 \times 10^4 M^{-1}$ ve $2,15 \times 10^4 M^{-1}$ ve bağlanma yeri sayısını da sırasıyla 1,03, 1,03 ve 1,02 olarak bulmuşlardır. Sıcaklığın artmasıyla bağlanma sabiti değerinin azaldığını, ancak bağlanma yeri sayısının sıcaklıkla değişmediğini belirtmişlerdir. Cheng vd (2011), HMG ile dosataksel arasındaki etkileşimleri 298 K, 303 K ve 310 K'de incelemişler ve bağlanma sabiti değerlerinin sırasıyla $2,81 \times 10^4 M^{-1}$, $2,91 \times 10^4 M^{-1}$ ve $3,23 \times 10^4 M^{-1}$ olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada, dosatakselin HMG'ye bir noktadan bağlandığı ve bağlanma yerinin, $\alpha_1\beta_2$ ara kısmındaki hidrofobik boşluklarda bulunan β -Trp³⁷, de olduğu belirtilmiştir.

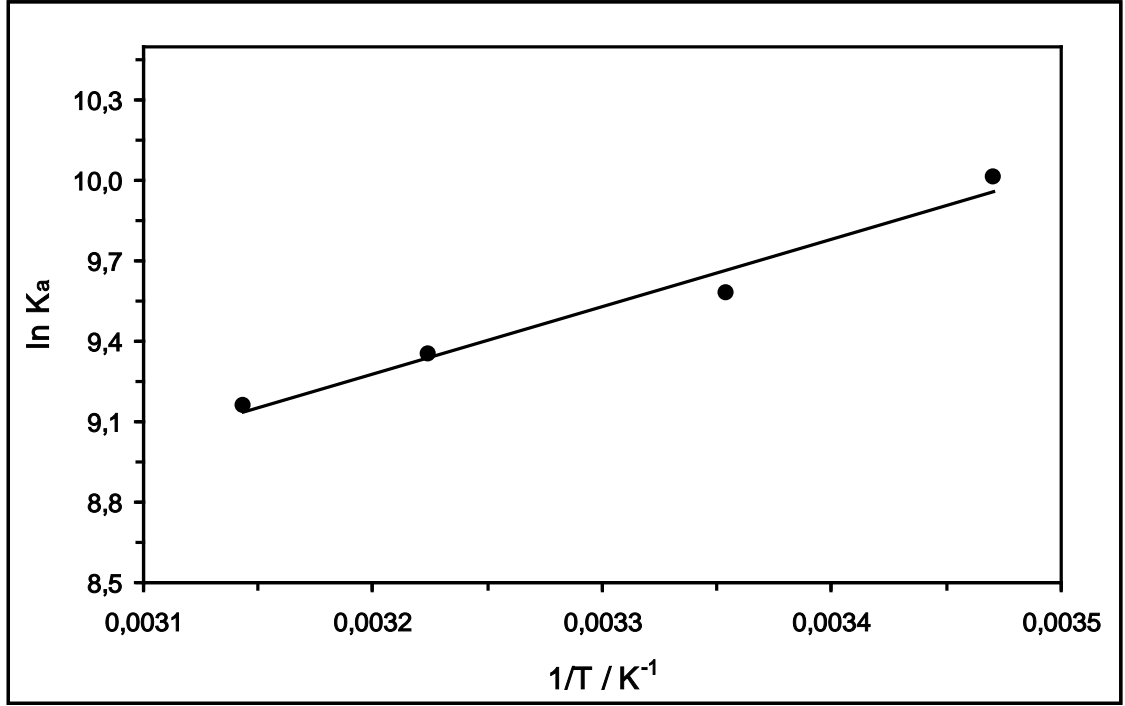
4.3. Termodinamik Parametreler ve Bağlanma Kuvvetleri

Proteinler ile ilaç molekülleri arasında hidrojen bağı, van der Waals kuvveti, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler olmak üzere dört esas etkileşim bulunmaktadır (Hu vd 2005, Jang vd 2009). HSA ve HMG proteinleri ile THC ilacı arasındaki etkileşimlerin doğasını belirlemek için termodinamik parametre değerleri hesaplanmıştır. Eşitlik (3.3) kullanılarak entalpi değişim (ΔH) ve entropi değişim (ΔS) değerleri belirlenmiştir. HSA-THC ve HMG-THC sistemlerine ait ΔH ve ΔS değerlerini hesaplamak için Eşitlik (3.3)'e göre, $\ln K_a$ 'ya karşı $1/T$ grafikleri çizilmiştir.

HSA-THC sistemi için çizilen $\ln K_a$ 'ya karşı $1/T$ grafiği Şekil 4.63'te ve HMG-THC sistemi için çizilen $\ln K_a$ 'ya karşı $1/T$ grafiği Şekil 4.64'te gösterilmektedir.



Şekil 4.63. THC'nin HSA'ya bağlanmasına ait van't Hoff grafiği ($r = 0,9891$).



Şekil 4.64. THC'nin HMG'ye bağlanmasına ait van't Hoff grafiği ($r = 0,9865$).

Van't Hoff grafiğindeki verilerin (bkz. Şekiller 4.63 ve 4.64) lineer regresyon analizi ile işlenmesi sonucunda elde edilen doğrusal grafiğin eğim ve kayım değerlerinden sırasıyla ΔH ve ΔS değerleri hesaplanmıştır. HSA-THC ve HMG-THC sistemlerindeki bağlanma proseslerine ait Gibbs serbest enerji değişim (ΔG) değerlerinin hesaplanmasında Eşitlik (3.4)'ten yararlanılmıştır.

THC ilacının HSA proteinine bağlanması prosesinde elde edilen termodinamik parametreler Çizelge 4.5'te ve THC ilacının HMG proteinine bağlanması prosesinde elde edilen termodinamik parametreler Çizelge 4.6'da verilmektedir.

Çizelge 4.5. Fizyolojik pH'ta THC'nin HSA'ya bağlanmasına ilişkin prosese ait termodinamik parametre değerleri

T / °C	$\Delta H / \text{kJ.mol}^{-1}$	$\Delta S / \text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$	$\Delta G / \text{kJ.mol}^{-1}$
15	- 13,32	17,0	- 18,22
25			- 18,39
37			- 18,59
45			- 18,73

Çizelge 4.6. Fizyolojik pH'ta THC'nin HMG'ye bağlanmasına ilişkin prosese ait termodinamik parametre değerleri

T / °C	$\Delta H / \text{kJ.mol}^{-1}$	$\Delta S / \text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$	$\Delta G / \text{kJ.mol}^{-1}$
15	- 20,87	10,38	- 23,86
25			- 23,96
37			- 24,09
45			- 24,17

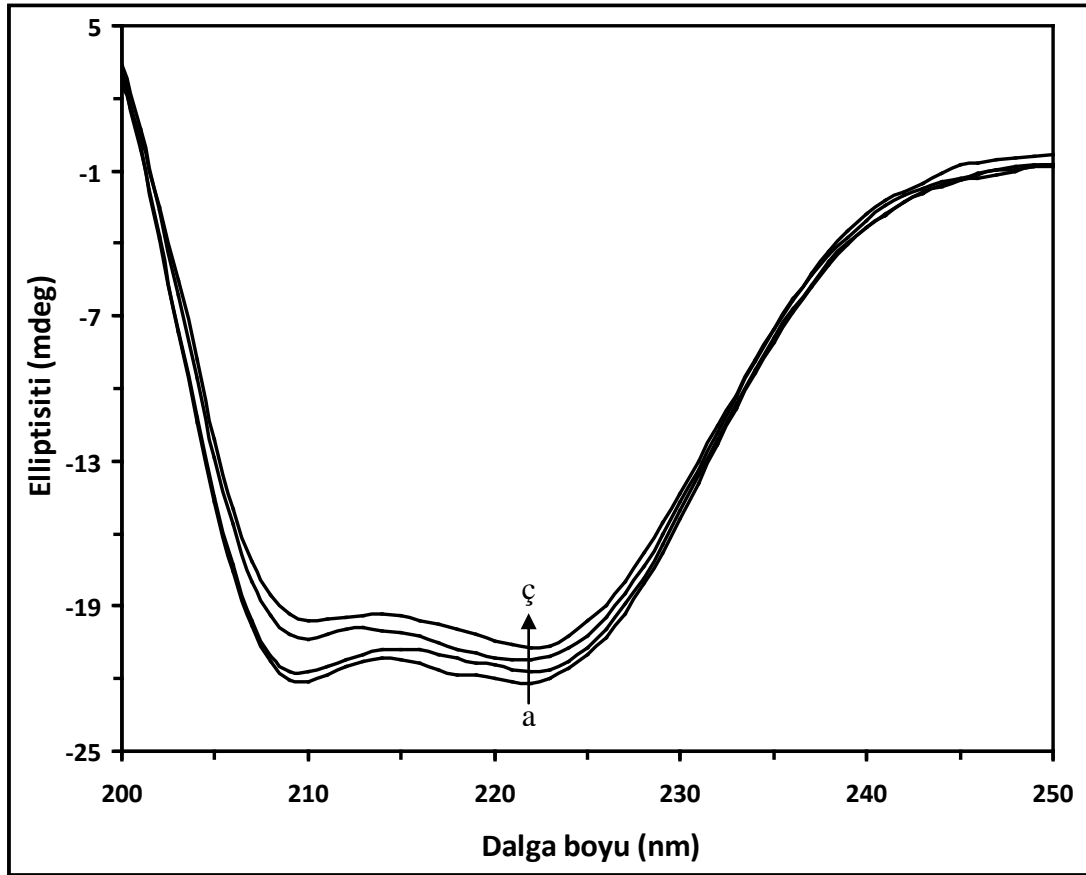
Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da bulunan değerlere bakıldığında, THC ilacının HSA ve HMG proteinlerine bağlanması prosesleri için elde edilen termodinamik parametre değerlerinden ΔH değerleri negatif, ΔS değerleri pozitif ve ΔG değerleri negatif olarak bulunmuştur. Elde edilen bu veriler, THC ilacı ile HSA ve HMG proteinleri arasında elektrostatik etkileşimin gerçekleştiğini göstermektedir (Ross and Subramanian 1981). Çalışılan deney koşullarında THC ilacı katyonik formdadır ve HSA ve HMG proteinleri de negatif yüzey yüküne sahiptir. Bu nedenle, THC ilacı ile HSA ve HMG proteinleri arasında elektrostatik etkileşimlerin meydana gelmesi söz konusudur. Sulu çözeltilerde iyonik türler arasındaki spesifik elektrostatik etkileşimler pozitif ΔS ve negatif ΔH değerleri ile karakterize edilmektedir (Cui vd 2009a). Sonuç olarak, THC-HSA ve THC-HMG komplekslerinin oluşum

proseslerinde elektrostatik etkileşimin olduğu söylenebilir. Ayrıca, HSA-THC ve HMG-THC sistemleri için negatif ΔH değerleri, proteinlere bağlanmaların ekzotermik proses üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. Negatif ΔG değerleri, THC-HSA ve THC-HMG komplekslerinin kendiliğinden oluştuğunu belirtmektedir.

4.4. HSA ve HMG Proteinleri ile THC İlacı Arasındaki Etkileşimlerin Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisiyle İncelenmesi

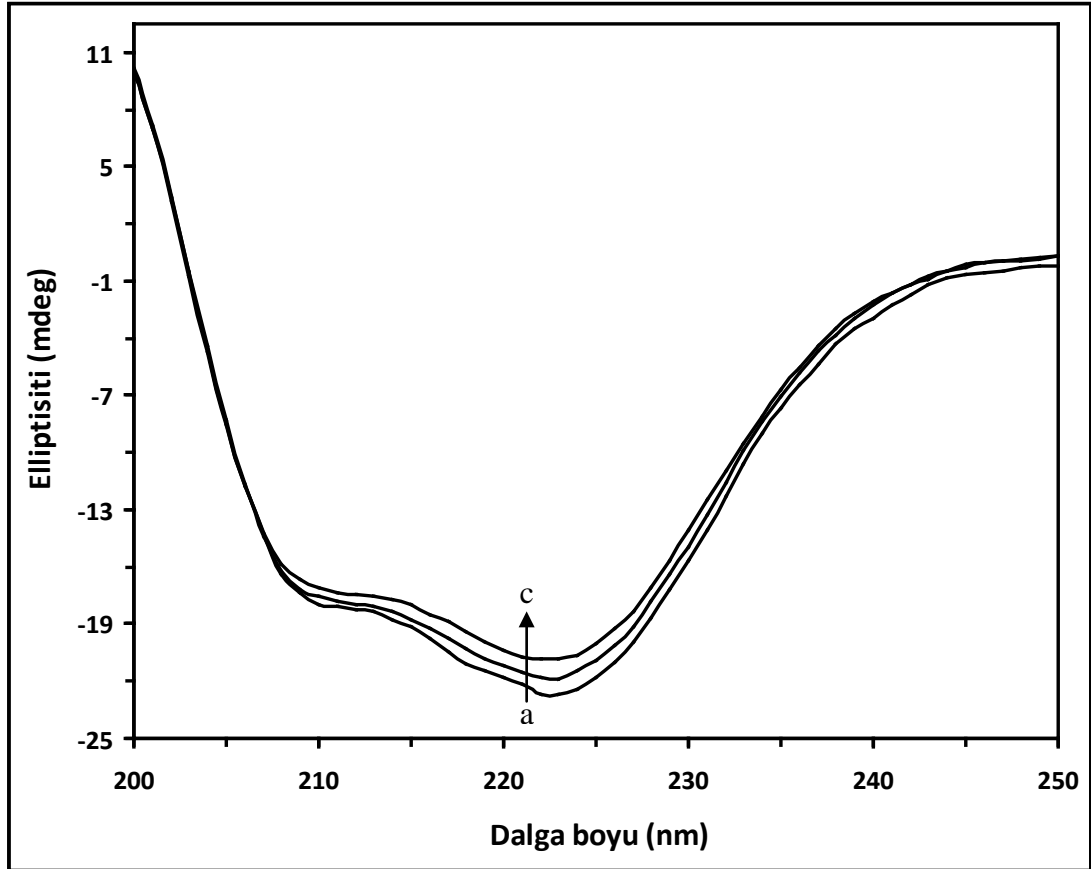
Proteinde bulunan amino asit kalıntılarının yapmış olduğu elektronik geçişlerden yararlanılarak gerçekleştirilen CD ölçümleri, proteinlerin sekonder yapısı hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (Cantor ve Schimmel 1980). HSA-THC ve HMG-THC sistemleri için CD tekniği kullanılarak proteinlerin sekonder yapıları incelenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda THC içeren $4,0 \times 10^{-6}$ M'lık HSA çözeltisinin 25 °C'de çizilen elliptisite değerlerine karşı dalga boyu grafiği Şekil 4.65'te ve farklı konsantrasyonlarda THC içeren $4,0 \times 10^{-6}$ M'lık HMG çözeltisinin 25 °C'de çizilen elliptisite değerlerine karşı dalga boyu grafiği ise Şekil 4.66'da gösterilmektedir.



Şekil 4.65. 25 °C'de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisinin dairesel dikroizm spektrumları. Çözeltideki [THC]= (a) 0 M, (b) $4,0 \times 10^{-6}$ M, (c) $20,0 \times 10^{-6}$ M ve (ç) $40,0 \times 10^{-6}$ M.

208 nm’de gözlenen elliptisiti değerlerinden faydalanılarak Eşitlik (3.5) ve Eşitlik (3.6)’nın kullanılmasıyla ilaç molekülü yokluğunda ve varlığında HSA proteininin yüzde α -heliks miktarı değeri hesaplanmıştır. 25 °C’de ilaç içermeyen saf HSA proteininin α -heliks miktarı % 48,9 olarak bulunmuştur (bkz. Şekil 4.65). $4,0 \times 10^{-6}$ M HSA çözeltisi içerisinde $4,0 \times 10^{-6}$ M, $20,0 \times 10^{-6}$ M ve $40,0 \times 10^{-6}$ M THC bulunması durumunda HSA proteininin α -heliks miktarı değerleri sırasıyla % 48,4, % 43,4 ve % 40,9 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, HSA-THC sisteminde çözeltideki artan ilaç konsantrasyonuyla birlikte HSA proteininin yüzde α -heliks miktarı değerinde bir azalmanın olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.66. 25 °C’de farklı konsantrasyonlarda THC varlığında $4,0 \times 10^{-6}$ M HMG çözeltisinin dairesel dikroizm spektrumları. Çözeltideki [THC]= (a) 0 M, (b) $4,0 \times 10^{-6}$ M ve (c) $8,0 \times 10^{-6}$ M.

HSA-THC sistemine benzer şekilde HMG-THC sistemi için de 208 nm’de gözlenen elliptisite değerlerinden faydalanılarak Eşitlik (3.5) ve Eşitlik (3.6)’nın kullanılmasıyla ilaç molekülü yokluğunda ve varlığında HMG proteininin yüzde α -heliks miktarı değeri hesaplanmıştır (bkz. Şekil 4.66). 25 °C’de saf HMG proteininin α -heliks miktarı değeri % 35,4 olarak hesaplanmıştır. Çözeltide $4,0 \times 10^{-6}$ M ve $8,0 \times 10^{-6}$ M THC bulunması durumunda bu değer % 35,4’ten sırasıyla % 35,0’a ve % 33,7’ye düşmüştür.

Benzer sonuçlar çeşitli HSA-ilaç ve HMG-ilaç sistemlerinde de görülmüştür. Kandagal vd (2006), gemistabin ilacı ile HSA arasındaki etkileşimlerde, proteinin sekonder yapısındaki değişimleri CD tekniği kullanarak incelemişler ve 208 nm’de elde edilen elliptisite değerlerini kullanarak $5,0 \times 10^{-6}$ M’lık HSA proteininin ilaç yokluğunda ve varlığında α -heliks miktarı değerini hesaplamışlardır. 25 °C’de HSA proteininin ilaç yokluğundaki α -heliks miktarı değeri % 34,82 olarak bulunmuş ve artan ilaç konsantrasyonu ile HSA proteininin yüzde α -heliks miktarı değeri % 34,82’den % 29,84’e düşmüştür. Cheng vd (2011), dosetaksel ile HMG arasındaki etkileşimleri içeren çalışmalarında, CD tekniği ile ilaç yokluğundaki $3,0 \times 10^{-6}$ M’lık saf HMG proteininin 208 nm’de elliptisite değerlerini kullanarak 25 °C’deki saf HMG proteininin α -heliks miktarı değerini % 45,31 olarak bulmuşlardır. HMG proteininin, artan ilaç konsantrasyonu ile yüzde α -heliks miktarı değeri % 45,31’den % 42,76’ya düştüğü belirtilmiştir.

5. SONUÇ

Yapılan bu çalışmada, HSA ve HMG proteinleri ile AZA ve THC ilaçları arasındaki etkileşimler floresans ve dairesel dikroizm spektroskopileri kullanılarak incelenmiştir.

$4,0 \times 10^{-6}$ M'lık HSA ve HMG çözeltilerinin 15 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C'deki emisyon spektrumlarından HSA ve HMG protein çözeltilerinin maksimum emisyon dalga boyu değerleri sırasıyla 335 nm ve 332 nm olarak bulunmuş ve sıcaklığın artmasıyla protein çözeltisinin floresans şiddetinde bir azalma görülmüştür.

HSA-AZA ve HMG-AZA sistemlerine ait farklı sıcaklıklardaki emisyon spektrumları incelendiğinde, çözeltide artan ilaç konsantrasyonu ile birlikte protein çözeltilerinin emisyon spektrumunda herhangi bir sönümlenmenin meydana gelmemiş olması her iki sistemde de etkileşimlerin gerçekleşmediğini göstermiştir.

HSA-THC ve HMG-THC sistemleri için çözeltideki artan ilaç konsantrasyonu ile birlikte proteinlerin emisyon spektrumlarında sönümlenme gerçekleşmiştir. 15 °C'deki HSA ve HMG proteinlerinin sönümlenme miktarı 45 °C'deki HSA ve HMG proteinlerinin sönümlenme miktarından daha fazla olmuştur. Ayrıca, artan ilaç konsantrasyonu ile HSA proteininin maksimum emisyon dalga boyu değeri 335 nm'den 342 nm'ye ve HMG proteininin maksimum emisyon dalga boyu değeri 332 nm'den 338 nm'ye yani kırmızıya kayma (batokromik etki) göstermiştir.

HSA-THC ve HMG-THC sistemlerinin her ikisinde de sönümlenme, statik sönümlenme ile gerçekleşmiştir.

THC ilacının HSA ve HMG proteinlerine bağlanmasına ilişkin bağlanma sabiti değerlerinin sırasıyla 10^3 ve 10^4 mertebesinde olduğu bulunmuştur. Ayrıca, THC ilacı HMG proteinine HSA proteininden daha kuvvetli bağlanmıştır. Her iki protein molekülü de THC ilacı için bir adet bağlanma yerine sahiptir.

Proteinler ile ilaç molekülleri arasındaki etkileşimin doğasını belirlemek için termodinamik parametre değerleri hesaplanmıştır. THC ilacının HSA ve HMG proteinleri ile etkileşiminde negatif ΔH ve ΔG değerleri ile pozitif ΔS değerleri elde edilmiştir. Bu durum, protein-ilaç sistemlerinin ekzotermik prosesle etkileştiğini göstermiştir. Negatif ΔG değeri, bağlanmanın istemli olduğunu göstermiştir. Pozitif ΔS ve negatif ΔH değerleri THC ilacı ile HSA ve HMG proteinleri arasındaki etkileşimlerde elektrostatik etkileşimlerin var olduğunu belirtmiştir.

HSA-THC ve HMG-THC sistemleri için, ilaç molekülü yokluğunda ve varlığında HSA proteininin yüzde α -heliks miktarı değerleri hesaplanmıştır. 25 °C'de ilaç içermeyen saf HSA ve HMG proteinlerinin α -heliks miktarı sırasıyla % 48,9 ve % 35,4 olarak bulunmuştur. THC konsantrasyonunun artmasıyla HSA ve HMG proteinlerinin α -heliks miktarı değerlerinin azaldığı görülmüştür. Bu sonuç, proteinlerin sekonder yapısında değişikliklerin olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

- ABU-SHAWISH, H.M., GHALWA, N.A., ZAGGOUT, F.R., SAADEH, S.M., AL-DALOU, A.R. and ASSI, A.A.A. 2010. Improved determination of tramadol hydrochloride in biological fluids and pharmaceutical preparations utilizing a modified carbon paste electrode. *Biochemical Engineering Journal*, 48 (2): 237-245.
- ANTONINI, E. and BRUNORI, M. 1971. Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 219.
- ARGEMI, A., VEGA, A., SUBRA-PATERNAULT, P. and SAURINA, J. 2009. Characterization of azacytidine/poly(l-lactic) acid particles prepared by supercritical antisolvent precipitation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50 (5): 847–852.
- ASI, TANJU. 1996. Tablolarla Biyokimya, Cilt 1, Nobel Yayınları, Ankara, 282 ss.
- ATKINS, P.W. 1998. Physical Chemistry, 6th Edition, Oxford University Press, W. H. Freeman Company, New York, pp. 701.
- BALDWIN, J. and CYRUS, C. 1979. Hemoglobin: The structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 129 (2): 175-220.
- BANGA, A.K. 2006. Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems. CRC/ Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, pp. 354.
- BEISER, A. 1997. Modern Fiziğin Kavramları. ONENGUT, G. (Editör), Akademi Yayınları, İstanbul, 537 ss.
- BHATTACHARYA, J., BHATTACHARYA, A., CHAKRABORTY, A., CHOWDHURY, U. and PODDER, R.K. 1994. Interaction of chlorpromazine with myoglobin and hemoglobin: A comparative study. *Biochemical Pharmacology*, 47 (11): 2049-2053.
- 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 Biology*, 303 (5): 721-732.
- 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.

- BOGDAN, M., PIRNAU, A., FLOARE, C. and BUGEAC, C. 2008. Binding interactions of indomethacin with human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47 (4): 981-984.
- BORDBAR, A.K. and TAHERI-KAFRANI, A. 2007. Binding and fluorescence study on interaction of human serum albumin (HSA) with cetylpyridinium chloride (CPC). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 55 (1): 84-90.
- BRANDEN, C. and TOOZE, J. 1999. Protein Function and Architecture. In: Introduction to Protein Structure. Garland Publishing, Inc., New York, pp. 410.
- BROWN, J. 1975. Structure of serum albumin. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34: 591.
- BUTTAR, D., COLCLOUGH, N., GERHARDT, S., MACFAUL, P.A., PHILLIPS, S.D., PLOWRIGHT, A., WHITTAMORE, P., TAM, K., MASKOS, K., STEINBACHER, S. and STEUBER, H. 2010. A combined spectroscopic and crystallographic approach to probing drug-human serum albumin interactions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18 (21): 7486-7496.
- CAMPBELL, J., MARTUCCI, A.D. and GREEN, G.R. 1964. Plasma albumin as an acceptor of free fatty acids. *Biochemical Journal*, 93 (1): 183-189.
- CANTOR, C.R. and SCHIMMEL, P.R. 1980. Biophysical Chemistry: Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function. W.H. Freeman Company, New York, pp. 410.
- CARTER, D.C. and HO, J.X. 1994. Structure of serum albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 45: 153-203.
- CASADIO, R., FARISELLI, P., MARTELLI, P.L. and TASCIO, G. 2007. Thinking the impossible: How to solve the protein folding problem with and without homologous structures and more. *Methods in Molecular Biology*, 350: 305-320.
- CHEN, Y., ZHOU, A., LIU, B. and LIANG, J. 2010. Tramadol hydrochloride/montmorillonite composite: Preparation and controlled drug release. *Applied Clay Science*, 49 (3): 108-112.
- CHENG, Y., LIN, H.K., XUE, D.P., LI, R.C. and WANG, K. 2001. Lanthanide ions induce hydrolysis of hemoglobin-bound 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG), conformational changes of globin and bidirectional changes of 2,3-DPGhemoglobin's oxygen affinity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1535 (2): 200-216.
- CHENG, F.Q., WANG, Y.P., LI, Z.P. and CHUAN, D. 2006. Fluorescence study on the interaction of human serum albumin with bromsulphalein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 65 (5): 1144-1147.

- CHENG, H., LIU, H., BAO, W. and ZOU, G. 2011. Studies on the interaction between docetaxel and human hemoglobin by spectroscopic analysis and molecular docking. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 105 (2): 126-132.
- CHRISTIANSEN, J., DOUGLAS, C.G. and HALDANE, J.S. 1914. The absorption and dissociation of carbon dioxide by human blood. *Journal of Physiology*, 48 (4): 244–271.
- CLAUS, R., RUTER, M. and LUBBERT, M. 2007. Targets of epigenetic therapy-gene reactivation as a novel approach in MDS treatment. *Cancer Treatment Reviews*, 33 (1): S47-S52.
- CUI, F., WANG, J., CUI, Y. and LI, J. 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 (7): 175–183.
- CUI, F.L., YAN, Y.H., ZHANG, Q.Z., YAO, X.J, QU, G.R. and LU, Y. 2009a. 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., YAN, Y., ZHANG, Q., QU, G., DU, J. and YAO X. 2009b. 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.
- CURRY, S., MANDELKOW, H., BRICK, P. and FRANKS, N. 1998. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Structural & Molecular Biology*, 5: 827-835.
- DARBY, N.J. and CREIGHTON, T.E. 1993. The Three-dimensional Structures of Proteins. In: Protein Structure. Oxford University Press Inc, New York, pp.99.
- DAVIS, B. 1943. The binding of sulfonamide drugs by plasma proteins. A factor in determining the distribution of drugs in the body. *Journal of Clinical Investigation*, 22 (5): 753-762.
- DEGIM, I.T. and CELEBI, N. 2007. Controlled delivery of peptides and proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 13 (1): 99-117.
- DICKERSON, R.E. and GEIS, I. 1983. Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology. Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, California, pp. 176.

- DING, F., ZHAO, G., CHEN, S., LIU, F., SUN, Y. and ZHANG, L.I. 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.
- DOCKAL, M., CARTER, D.C. and RUKER, F. 1999. The tree recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (41): 29303-29310.
- EFTING, M.R. and GHIRON, C.A. 1982. Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical Biochemistry*, 114 (2): 199-227.
- ERDİK, E. 2007. Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler. Gazi Kitabevi, Ankara, 531 ss.
- FIGGE, J., ROSSING, T.H. and FENCLE, V. 1991. The role of serum proteins in acid-base equilibria. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 117 (6): 453-467.
- FOSTER, J.F. 1977. Some Aspects of the Structure and Conformational Properties of Serum Albumin. In: ROSENOER, V. and ROTHSHILD, R. (Editors), Albumin, Structure, Function and Uses. pp. 53-84. Pergamon, New York.
- FRINK, M.C., HENNIES, H.H., ENGLBERGER, W., HAURAND, M. and WILFFERT, B. 1996. Influence of tramadol on neurotransmitter systems of the rat brain. *Arzneimittel Forschung*. 46 (11): 1029-1036.
- GAO, W., LI, N., CHEN, Y., XU, Y., LIN, Y., YIN, Y. and HU, Z. 2010. Study of interactions between syringin and human serum albumin by multi-spectroscopic method and atomic force microscopy. *Journal of Molecular Structure*, 983 (1-3): 133-140.
- GE, F., CHEN, C., LIU, D., HAN, B., XIONG, X. and ZHAO, S. 2010. Study on the interactions between theasinesin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Journal of Luminescence*, 130 (1): 168-173.
- GEICY, C. 1984. Geigy Scientific Tables, Volume 3., In: CORNELIUS, L. (Editor), Physical Composition of Blood, Hematology Somatometric Data. West Aldwell, Ciba Geigy Corporation, pp.136-139, New Jersey.
- 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.
- GOLDSTEIN, A. 1949. The interactions of drugs and plasma proteins. *Pharmacological Review*, 1: 102-165.

- GÖKALP, H.Y., NAS, S. ve CERTEL, M. 2002. Biyokimya-I, Temel Yapılar ve Kavramlar, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları:001, Ders Kitabı, Ankara, 392 ss.
- GÖZÜKARA, E.M. 1997. Biyokimya. Nobel Yayınları, Ankara, 571 ss.
- GREENFIELD, N. and FASMAN, G.D. 1969. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 10 (8): 4108-4116.
- GUO, G., LI, G., LIU, D., YANG, Q., LIU, Y., JING, Y. and ZHAO, L. 2008. Synthesis and antiproliferative activities of 5-azacytidine analogues in human leukemia cells. *Molecules*, 13 (7): 1487-1500.
- 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.
- HE, W., LI, Y., XUE, C., HU, Z., CHEN, X. and SHENG, F. 2005. Effect of Chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13 (5): 1837-1845.
- HE, X.M. and CARTER, D.C. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 358 (6382): 209-215.
- HENDERSON, L.J. 1920. The equilibrium between oxygen and carbonic acid in blood. *Journal of Biological Chemistry*, 41: 401-430.
- HENNIES, H.H., FRIDERICHS, E. and SCHNEIDER, J. 1988. Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids. *Arzneimittel-Forschung-Drug Research*, 38 (7): 877-880.
- HSIA, J. and KWAN, N. 1981. Human serum albumin: Binding specificity and allosteric effect of parinarate and stearate. A dianionic spin label study. *Journal of Biological Chemistry*, 256: 2242-2244.
- HSIA, J., ER, S., TAN, C. and TINKER, D. 1982. Human serum albumin: An allosteric domain model for bilirubin binding specificity. An enantiomeric spin label study. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 1724-1729.

<http://www.bio.miami.edu>

<http://www.chemistry.rutgers.edu/grad/chem585/lecture2.html>

<http://www.fda.gov/cder/guidance/old032fn.pdf>

<http://www.sosnick.uchicago.edu/precpsquastru.html>

[http://www.tfd.org.tr/eski/ KTCG_Kurs_042010/02_AK.pdf](http://www.tfd.org.tr/eski/KTCG_Kurs_042010/02_AK.pdf)

- HU, Y.J, LIU, Y., PI, Z.B. and QUA, S.S. 2005. Interaction of cromolyn sodium with human serum albumin: A fluorescence quenching study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13 (24): 6609–6614.
- HU, Y., XU, S., ZHU, X. and GONG, A. 2009. Study on the interaction between methyl violet and bovine serum albumin by spectral analyses. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74 (2): 526–531.
- 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.
- 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.
- KANDAGAL, P.B., ASHOKA, S., SEETHARAMAPPA, J., SHAIKH, S.M.T., JADEGOUD, Y. and IJARE, O.B. 2006. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (2): 393–399.
- KANDAGAL, P.B., SEETHARAMAPPA, J., SHAIKH, S. and MANJUNATHA, J. 2007. Binding of trazodone hydrochloride with human serum albumin: A spectroscopic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 185 (2-3): 239-244.
- KAYAALP, O. 2005. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11. Baskı, Hacettepe-Taş Yayınları, Ankara, 1524 ss.
- KEANEY, J., SIMON, D., STAMLER, J., JARAKI, O., SCHARFSTEIN, J., VITA, J. and LOSCALZO, J. 1993. NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing-factor like qualities. *Journal of Clinical Medicine*, 91 (4): 1582-1589.
- KELLY, S.M., JESS, T.J. and PRICE, N.C. 2005. How to do study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751 (2): 119-139.
- KHAN, R., AGGERHOLM, A., HOKLAND, P., HASSAN, M. and HELLSTROM-LINDBERG, E. 2006. A pharmacodynamic study of 5-azacytidine in the P39 cell line. *Experimental Hematology*, 34 (1): 35-43.
- KHAN, R., MENDE, J.S., KARIMI, M., GOGVADZE, V., HASSAN, M., EKSTRO T.J, ZHIVOTOSKY, B. and LINDBERG, E.H. 2008. Hypomethylation and apoptosis in 5-azacytidine-treated myeloid cells. *Experimental Hematology*, 36 (2): 149–157.

- KOSHLAND, D.E.J., NEMETHY, G. and FILMER, D. 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, 5 (1): 365-385.
- KRAGH-HANSEN, U. 1990. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Danish Medical Bulletin*, 37 (1): 57-84.
- KRAGH-HANSEN, U., CHUANG, V.T. and OTAGIRI, M. 2002. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25 (6): 695-704.
- KRATZ, F. 2008. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 132 (3): 171-183.
- LAI, M.C. and TOPP, E.M. 1999. Solid-state chemical stability of proteins and peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88 (5): 489-500.
- LAKOWICZ, J.R. 1986. Fluorescence studies of structural fluctuations in macromolecules as observed by fluorescence spectroscopy in the time, lifetime and frequency domains. *Methods in Enzymology*, 131: 518-567.
- LAKOWICZ, J.R. 1999a. Fluorophores. In: Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2th Edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 356.
- LAKOWICZ, J.R. 1999b. Protein Fluorescence. In: Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 6., 2th Edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 310.
- LAMBERT, J.B.S., SHURVELL, H.F., LIGHTNER, D.A. and COOKS, R.G. 1998. Organic Structural Spectroscopy. Prentice Hall, Inc., A Pearson Education Company, Upper Saddle River, New Jersey, pp. 568.
- LANGER, K., ANHORN, M.G., STEINHAUSER, I., DREIS, S., CELEBI, D., SCHRICKEL, N., FAUST, S. and VOGEL, V. 2008. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of particle preparation process and enzymatic degradation. *International Journal of Pharmaceutics*, 347 (1-2): 109-117.
- LEBITASY, M., HECQ, J.D., ATHANASSOPOULOS, A., VANBECKBERGEN, J., JAMART, J. and GALANTI, L. 2009. Effect of freeze-thawing on the long-term stability of calcium levofolinate in 5% dextrose stored on polyolefin infusion bags. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 34 (4): 423-428.
- LECKBAND, D., MULLER, W., SCHMITT, F.J. and RINGSDORF, H. 1995. Molecular mechanisms determining the strength of receptor-mediated intermembrane adhesion. *Biophysical Journal*, 69 (3): 1162-1169.

- LEI, C., WOLLENBERGER, U., BISTOLAS, N., GUISEPPI-ELIS, A. and SCHELLER, F.W. 2002. Electron transfer of hemoglobin at electrodes modified with colloidal clay nanoparticle. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372 (2): 235–239.
- LI, R., NAGAI, Y. and NAGAI, M. 2000. Changes of tyrosine and tryptophan residues in human hemoglobin by oxygen binding: Near- and far-UV circular dichroism of isolated chains and recombined hemoglobin, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 82 (1-4): 93–101.
- LINBERG, R., CONOVER, C.D., SHUM, K.L. and SHORR, R.G.L. 1998. Hemoglobin and oxygen carriers: How much methemoglobin is too much? *Artificial Cells, Blood Substitutes & Immobilization Biotechnology*, 26 (2): 133-148.
- LIU, H., REN, J., HAO, Y., DING, H., HE, P.E. and FANG, Y. 2006. Determination of metoprolol tartrate in tablets and human urine using flow-injection chemiluminescence method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42 (3): 384-388.
- 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.
- MAITRA, S., SAHA, B., SANTRA, C.R., MUKHERJEE, A., GOSWAMI, S., KUMAR, P.C. and KARMAKAR, P. 2007. Alprazolam induced conformational change in hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41 (1): 23-29.
- MANDAL, R., KALKE, R. and LI, X.F. 2004. Interaction of oxaliplatin, cisplatin and carboplatin with hemoglobin and the resulting release of heme group. *Chemical Research in Toxicology*, 17 (10): 1391–1397.
- MARTINI, F.H., BARTHOLOMEW, E.F. and BLEDSOE, B.E. 2002. *Anatomy and Physiology for Emergency Care*, Upper Saddle River, N.J: Pearson Education, New Jersey, pp. 603.
- MONOD, J., WYMAN, J.J. and CHANGEUX, J.P. 1965. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 12: 88-118.
- MULLER, W. and WOLLERT, U. 1979. Human serum albumin as a 'silent receptor' for drugs and endogenous substances. *Pharmacology*, 19 (2): 59-67.
- MURRAY, R.K, GRANNER, D.K, MAYES, P.A. ve RODWELL, V.W. 2004. *Harper Biyokimya*. DIKMEN, N. ve VICTOR, R.W. (Editörler). *Protein ve Enzimlerin Çatı ve İşlevi*, Nobel Yayınları, Ankara, 27-63 ss.

- NELSON, D.L ve COX, M.M. 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. KILIÇ, N. (Editör), Palme Yayınları, Ankara, 1150 ss.
- NEUZIL, J. and STOCKER, R. 1994. Free and albumin bound bilirubin are efficient co-antioxidants for α -tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 16712-16719.
- PEDERSEN, K.O. 1971. Binding of calcium to serum albumin. I. Stoichiometry and intrinsic association constant at physiological pH, ionic strength and temperature. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory*, 28 (4): 459-469.
- PERUTZ, M.F., MUIRHEAD, H., COX, J.M. and GOAMAN, L.C.G. 1968. Three-dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: The atomic model. *Nature*, 219 (5150): 131-139.
- PERUTZ, M.F. 1970. Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. *Nature*, 228 (46): 726-734.
- PERUTZ, M.F., GIULIO, F., BONAVENTURA, L., BOAZ, S. and LIDDINGTON, R.C. 1987. Stereochemistry of cooperative mechanisms in hemoglobin. *Accounts of Chemical Research*, 20 (9): 309-321.
- PETERS, T. 1975. Serum Albumin. In: PUTNAM, F.W. (Editör), The Plasma Proteins. pp. 133-175. New York.
- PETERS, T.J. 1996. All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. Academic Press, Inc., San Diego, pp. 432.
- PETERSEN, C.E., HA, C.E., MANDEL, M. and BHAGAVAN, N.V. 1995. Expression of a human serum albumin variant with high affinity for thyroxine. *Biochimica et Biophysica Research Communications*, 214 (3): 1121-1129.
- PETERSEN, C.E., HA, C.E., JAMESON, D.M. and BHAGAVAN, N.V. 1996. Mutations in a specific human serum albumin thyroxine binding site define the structural basis of familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (32): 19110-19117.
- PETERSEN, C.E., HAROHALLI, K., PARK, D. and BHAGAVAN, N.V. 1997. Mutagenesis studies of thyroxine binding to human serum albumin define important structural characteristics of subdomain 2A. *Biochemistry*, 36 (23): 7012-7017.
- PETITPAS, I., BHATTACHARYA, A.A., TWINE, S., EAST, M. and CURRY, S. 2001. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: Anatomy of drug site I. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (25): 22804-22809.
- PETSKO, G.A. and RINGE, D.R. 2004. Protein Function and Architecture. In: Protein Structure and Function. Blackwell Publishing, United Kingdom, pp. 195.

- PURVES, D.S., SADAVA, D., ORIAN, G.H. and HELLER, H.C. 2006. Protein Structure. In: *Life The Science of Biology*, Sinauer Associates Inc., Gordonsville, Virginia, pp. 694.
- ROBINSON, N. 2002. Protein deamidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 33 (8): 3787-3793.
- ROSS, D.P. and SUBRAMANIAN, S. 1981. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20: 3096-3102.
- RYAN, A.J., GHUMAN, J., ZUNZAIN, P.A., CHUNG, C.W. and CURRY, S. 2011. Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin. *Journal of Structure Biology*, 174 (1): 84–91.
- SACCOMANNI, G., CARLO, S.D., GIORGI, M., MANERA, C., SABA, C. and MACCHIA, M. 2010. Determination of tramadol and metabolites by HPLC-FL and HPLC-MS/MS in urine of dogs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53 (2): 194–199.
- SEN, P., FATIMA, 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.
- SILVIO, A., SIMONETTA, C., SIMONETTA, G.C. and ENZO, T. 2002. ¹H and ¹⁷O relaxometric investigations of the binding of Mn (II) ion to human serum albumin. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 40 (1): 41-48.
- SJÖHOLM, I. and LJUNGSTEDT, I. 1973. Studies on the tryptophan and drug-binding properties of human serum albumin fragments by affinity chromatography and circular dichroism measurements. *Journal of Biological Chemistry*, 248 (24): 8434-8441.
- SKOOG, D.A., HOLLER, F.J. ve NIEMAN, T.A. 1998. Moleküler Lüminesans Spektrometri. In: KILIÇ, E., KÖSEOĞLU, F. ve YILMAZ, H. (Çeviri Editörleri), Enstrümantal Analiz İlkeleri. Bilim Yayıncılık, Ankara, 355-379 ss.
- SMITH, B.A., GUATMANN, H.R. and SPRINGFIELD, J.R. 1989. Catalytic effect of serum albumin on the ortho-rearrangement of N-sulfooxy-2-acetylaminofluorene, a potential hepatocarcinogen in the rat, to nonmutagenic sulfuric-acid esters of ortho-amidofluorenols. *Biochemical Pharmacology*, 38 (22): 3987-3994.
- SNATZKE, G. and WOODY, R.W. 2000. Circular Dichroism: An Introduction. In *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2th Edition, In: BEROVA, N., NAKANISHI, K. and WOODY, R.W. (Editors). Wiley-VCH, New York, pp. 601.

- SOLTYS, B. and HSIA, J. 1978. Steroid modulation of human serum albumin binding properties. A spin label study. *Journal of Biological Chemistry*, 253 (12): 4266-4269.
- SUDLOW, G., BIRKETT, D.J. and WADE, D.N. 1975a. Spectroscopic techniques in the study of protein binding: The use of 1-anilino-8-naphthalenesulphonate as a fluorescent probe for the study of the binding of iophenoxic and acids to human serum albumin. *Molecular Pharmacology*, 9 (6): 649-657.
- SUDLOW, G., BIRKETT, D.J. and WADE, D.N. 1975b. 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.
- TIMERBAEV, A.R., HARTINGER, C.G., ALEKSENKO, S.S. and KEPPLER, B.K. 2006. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: Advances in characterization using modern analytical methodology. *Chemical Reviews*, 106 (6): 2224-2248.
- VAN MIERLO, C.P.M., DE JONGH, H.H.J. and VISSER, A.J.W.G. 2000. Circular dichroism of proteins in solution and at interfaces. *Applied Spectroscopy Reviews*, 35 (4): 277-313.
- VENKATESHRAO, S. and MANOHARAN, P.T. Conformational changes monitored by fluorescence study on reconstituted hemoglobins. 2004. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60 (11): 2523-2526.
- WATANABE, T., NARUMIYA, S., SHIMIZU, T. and HAYAISHI, O. 1982. Characterization of the biosynthetic pathway of prostaglandin D2 in human platelet-rich plasma. *Journal of Biological Chemistry*, 257 (24): 14847-14853.
- WEISSBLUTH, M. 1974. Hemoglobin: Cooperativity and Electronic Properties. *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, Springer-Verlag Publishing, New York, pp. 175.
- WYMAN, J.J. 1964. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: A second look. *Advances in Protein Chemistry*, 19: 223-286.
- XIE, M.X., XU, X.Y. and WANG, Y.D. 2005. Interaction between hesperetin and human serum albumin revealed by spectroscopic methods. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1724 (1-2): 215-224.
- 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.

- YUAN, J.L., IV, Z., LIU, Z.G, HU, Z. and ZOU, G.L. 2007. Study on interaction between apigenin and human serum albumin by spectroscopy and molecular modeling. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 19 (2-3): 104–113.
- ZAWADZKI, Z., MILNE, R.W. and MARCEL, Y.L. 1991. Cu²⁺-mediated oxidation of dialyzed plasma: Effects on low and high density lipoproteins and cholesteryl ester transfer protein. *The Journal of Lipid Research*, 32 (2): 243–250.
- ZHANG, H.M., WANG, Y.Q., ZHOU, Q.H. and WANG, G.L. 2009. Molecular interaction between phosphomolybdate acid and bovine hemoglobin. *Journal of Molecular Structure*, 921 (1-3): 156-162.
- ZHOU, J., WU, X., GU, X., LIN, Z., SONG, K., WE, S., FENG, Y. and SHEN, J. 2009. Spectroscopic studies on the interaction of hypocrellin A and hemoglobin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 72 (1): 151-155.

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet ÇETİNKAYA 1987 yılında Van'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Van'da tamamladı. 2005 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2009 yılında birincilikle mezun oldu. 2010 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime devam etmektedir.