

Amiloid Fibrillerin Etkili Tayini İçin Siyanin Boyalarının Metal Genişletilmiş Floresans Problarının Geliştirilmesi

Program Kodu: 1001

Proje No: 114Z391

Proje Yürütücüsü:
Doç.Dr. Nuriye AKBAY

Araştırmacı(lar):

Dr. Vladyslava B. Kovalska
Yük. Kimyager Şule Özkan
Okan Uçar
Cihan Erdoğan

ŞUBAT 2017
İSTANBUL

ÖNSÖZ

Amiloid, organlarda ve dokularda biriken lif oranı yüksek, hücreye ait olmayan, proteince zengin kalıntıları tanımlamakta kullanılır. İnsanlarda görülen 20'den fazla önemli hastalığın patogeneğinde görülmektedir. Bu hastalıklar Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Diyabet tip II ve spongiform encephalopathies (Deli dana hastalığı) gibi hastalığın ilerlemesine bağılı olarak ölüm oranı ve riski yükselen çok ciddi hastalıkları içermektedir. Bütün amiloid türleri ortak karakteristik özellikler gösterse de her amiloid türünün başlangıç proteini olan öncülü farklıdır. Öncül proteinlerin birikmesi amiloid oluşumunun ilk basamağıdır. Şimdiye kadar amiloid yapıların tayininde en yaygın kullanılan yöntem bir benzotiyazol boyası olan Thioflavin T'nin floresans emisyonunu izlemektir. Thioflavin T amiloid fibrillere bağlandığında floresans emisyon şiddetinde artış gözlenen çok kullanışlı bir floresan boyasıdır. Fakat öncül proteinlerdeki ve amiloid türlerindeki artan çeşitlilik, seçimli amiloid tayini yöntemlerine duyulan acil ihtiyacı beraberinde getirmektedir. Proje kapsamında amiloid tayinlerinde kullanılmak üzere bir tane mono-, altı tane trimetinsiyanin boyasının metal genişletilmiş floresans (MEF) probu özellikleri incelenmiştir. İncelenen boyalardan monometinsiyanin boyası ve iki trimetinsiyanin boyası analitik açıdan anlamlı MEF göstermiştir. Yine proje kapsamında dokuz tane β -ketoenol boyasının MEF özelliği incelenmiştir. İki β -ketoenol boyasının MEF özelliği gösterdiği saptanmıştır.

Bu proje **114Z391** nolu proje olarak **TÜBİTAK** tarafından desteklenmiştir. Katkılarından dolayı teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ŞEKİLLER LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
ÖZ.....	vi
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	12
3.1. Reaktif ve çözeltilerin hazırlanması	12
3.2. Kullanılan cihazlar.....	12
3.3. Gümüş nanopartiküllerin (AgNP) ve gümüş adacıklı fimlerin (SIF) eldesi.....	12
3.3.1. Lee - Meisel protokolü ile AgNP eldesi:.....	12
3.3.2. Formaldehit indirgemesi ile AgNP eldesi:.....	13
3.3.3. NaBH ₄ indirgemesi ile AgNP eldesi:	13
3.3.4. Askorbik asit indirgemesi ile AgNP eldesi:	13
3.3.5. Gümüş Adacıklı filmlerin (SIF) eldesi:	13
3.4. Siyanin boyalarının eldesi ve karakterizasyonu.....	14
3.5. β -ketoenole boyalarının eldesi ve karakterizasyonu	16
3.6. Amiloid fibril eldesi	19
3.6.1. İnsülin fibrillerinin eldesi	19
3.6.2. Lizozim fibrillerinin eldesi	19
3.6.3. Thio T testi	20
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	20
4.1. Gümüş nanopartiküller ve gümüş adacıklı filmlerin karakterizasyonu.....	20
4.2. Amiloid fibril karakterizasyonu.....	27

4.3. Gümüş nanopartiküller (AgNP) ve gümüş adacıklı filmler (SIF) ile boyaların etkileşimi.....	28
4.3.1. AgNP ve SIF varlığında siyanin boylarının fibriller ile etkileşimleri.....	28
4.3.2. β -ketoenole boylarının monomerik ve fibriler insulin ve lizozim varlığında spektral özelliklerinin incelenmesi.....	33
5. SONUÇLAR.....	39
6. REFERANSLAR	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Amiloid fibrillerin oluşumu	4
Şekil 2. A β (1-40) fibrillerinin yapısal modeli	5
Şekil 3. İnsan ve maya sistemlerindeki prion proteinlerden elde edilen yapılar. (A) PrP'den elde edilen paralel β -tabaka yapıdaki amyloid fibriller. (B) Enfekte olmuş dokudan alınan insan PrP'inin oluşturduğu β -heliks yapısı. (C) Katı hal NMR ile elde edilen Het-S prion yapısı.	6
Şekil 4. Metal florofor etkileşimlerini içeren modifiye Jablonski diyagramı.....	8
Şekil 5. Metalik yüzey yakınında bulunan florofor	9
Şekil 6. Lee-Miesel protokolü ile elde edilen AgNP'ler	20
Şekil 7. Çeşitli derişimlerde elde edilen AgNP'lar.....	21
Şekil 8. Çeşitli derişimlerde elde edilen AgNP'lar.....	22
Şekil 9. Çeşitli derişimlerde elde edilen AgNP'ler.....	23
Şekil 10. Askorbik asit indirgemesi ile elde edilen AgNP'ler.....	24
Şekil 11. Çeşitli derişimlerde AgNO ₃ kullanılarak elde edilen AgNP'lerin absorpsiyon spektrumları	24
Şekil 12. SIF yüzeylerin SEM (sol)ve AFM (sağ) görüntüsü.....	26
Şekil 13. SIF yüzeylerin absorpsiyon spektrumu.....	26
Şekil 14. İnsülininden elde edilen amiloid fibrillerin SEM görüntüsü (sol); Fibrillerin Thio T testi ile kontrolü (sağ).....	27
Şekil 15. Lizozimden elde edilen amiloid fibrillerin AFM görüntüsü (sol); görüntünün Z profili (sağ).....	28
Şekil 16. D51-amiloid fibril sisteminin serbest ve AgNP'ler varlığında emisyon spektrumu (AgNP1: Lee-Miesel yöntemi; AgNP2: Formaldehit indirgemesi)	29
Şekil 17. D51-amiloid fibril sisteminin cam ve SIF üzerindeki emisyon spektrumu ve amiloid fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi	31

Şekil 18. D151-amiloid fibril sisteminin cam ve SIF üzerinde ki emisyon spektrumu ve amiloid fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi	31
Şekil 19. SH-395-amiloid fibril sisteminin cam ve SIF üzerindeki emisyon spektrumu ve amiloid fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi	32
Şekil 20. Monomerik ve fibriler insulin varlığında 50-dimethylaminopropylamino türevinin uyarılma ve emisyon spektrumu	33
Şekil 21. Boya 14-fibriler insülin sisteminin cam ve SIF üzerindeki emisyon spektrumu ve fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi	36
Şekil 22. Boya 14-fibriler lizozim sisteminin cam ve SIF üzerindeki emisyon spektrumu ve fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi	37
Şekil 23. Boya 54-fibriler insülin sisteminin cam ve SIF üzerindeki emisyon spektrumu ve fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi	38
Şekil 24. Boya 54-fibriler lizozim sisteminin cam ve SIF üzerindeki emisyon spektrumu ve fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi	38

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Amiloid proteinleri ve öncülleri	3
Tablo 2. Farklı metodlarla elde edilen gümüş kolloidlerin boyutları.....	25
Tablo 3. β -ketoenol boyalarının monomerik veya fibriler insülin varlığındaki floresans spektral özellikleri	34
Tablo 4. β -ketoenol boyalarının monomerik veya fibriler lizozim varlığındaki floresans spektral özellikleri	35

ÖZ

Amiloid, organlarda ve dokularda biriken lif oranı yüksek, hücreye ait olmayan, proteince zengin kalıntıları tanımlamakta kullanılır. İnsanlarda görülen 20'den fazla önemli hastalığın patogeneğinde görülmektedir. Bu hastalıklar Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Diyabet tip II ve spongiform encephalopathies (Deli dana hastalığı) gibi hastalığın ilerlemesine bağılı olarak ölüm oranı ve riski yükselen çok ciddi hastalıkları içermektedir. Yapılan çalışmalar amiloidlerdeki fibriler yapıların kararlı olduğunu ve karakteristik çapraz- β konformasyonunda β -tabakalı yapılardan oluştuklarını göstermektedir. Bütün amiloid türleri ortak karakteristik özellikler gösterse de her amiloid türünün öncül proteini farklıdır. Şimdiye kadar amiloid yapıların tayininde en yaygın kullanılan yöntem bir benzotiyazol boyası olan Thioflavin T'nin floresans emisyonunu izlemektir. Thioflavin T amiloid fibrillere bağlandığında floresans emisyon şiddetinde artış gözlenen çok kullanışlı bir floresan boyadır. Fakat öncül proteinlerdeki ve amiloid türlerindeki artan çeşitlilik, seçimli amiloid tayin yöntemlerine duyulan acil ihtiyacı beraberinde getirmektedir.

Son 20 yılda yüksek-hassasiyetli floresans ölçümüne dayanan DNA sekans analizi, DNA fragman analizi, elektroforez ile ayırmalarda floresans jel boyama ve çeşitli immünotestleri içeren bir çok yeni yöntemle tanışılmıştır. Fakat bu yöntemlerin hepsi kullanılan floroforun parlaklığı ve fotokararlılığı ile sınırlıdır. Yeni gelişmeler metalik nanoparçacıkların yakınına yerleştirilen floroforların kullanılması ile bu sınırlamaların üstesinden gelinebileceğini göstermektedir. Floroforların metalik nanoparçacıklar ile etkileşiminden floroforun kuantum veriminde artış, fotokararlılıkta iyileşme, rezonans enerji transferi için gerekli mesafede artış ve floresans ömürde kısalma gibi faydalı değişiklikler elde edilebilir. Bu özellikler metal genişletilmiş floresans (MEF) olarak adlandırılmaktadır.

Proje kapsamında mono- ve trimetinsiyanin boyaarı ile β -ketoenol boyaarı olmak üzere iki grup boyanın amyloid fibril tayininde metal genişletilmiş floresans (MEF) probu olarak kullanılma olasılıkları incelenmiştir. Bir tanesi mono-, altı tanesi trimetin siyanin boyası olmak üzere toplam yedi siyanin boyasının gümüş adacıklı yüzeyler (SIF) üzerinde MEF özellikleri incelenmiştir. Bu boyalardan monometinsiyanin boyası olan SH-395 ve trimetinsiyanin boyaarı olan D-51 ve D-151 ile analitik açıdan anlamlı MEF elde edilmiştir. İncelenen β -ketoenol boyaarından ise iki tanesi MEF özelliğı göstermiştir.

Anahtar kelimeler : Metal genişletilmiş floresans (MEF), amiloid fibriller, siyanin boyaarı

ABSTRACT

Amyloid refers to the abnormal fibrous, extracellular, proteinaceous deposits found in organs and tissues. They have been associated with the pathology of more than 20 serious human diseases. These diseases include Alzheimer's disease (AD), Parkinson disease (PD), Diabetes type II, and spongiform encephalopathies (Mad cow disease), all of which are progressive disorders with associated high morbidity and mortality. The fibrillar assemblies are inherently stable and structural studies have revealed that they are composed predominantly of β -sheet structure in a characteristic cross- β conformation. Despite the all amyloids have common characteristics, their precursor proteins are different. Up to now the most common method for detection of amyloid structures was the following the fluorescence emission of benzothiazole dye Thioflavin T. Thioflavin T is a very useful fluorescent dye exhibits enhanced fluorescence upon binding to amyloid fibrils. But the increased diversity of the precursor proteins and amyloid types bring the urgent need to development of the specific amyloid detection methods.

During the last twenty years numerous methods based on high-sensitivity fluorescence detection have been introduced, including DNA sequencing, DNA fragment analyses, fluorescence staining of gels following electrophoretic separation, and a variety of immunoassays. But all these methods are limited by the brightness and photostability of used fluorophore. These limitations can be bypassed using fluorophores placed near metallic nanostructures. The interactions of fluorophores with metallic nanostructures can have a number of useful effects, including increased quantum yields, increased photostability, increased distances for resonance energy transfer, and decreased lifetimes. These effects are called metal enhanced fluorescence (MEF).

In this project, possibility of using the mono- and trimethinecyanine dyes and β -ketone dyes as metal enhanced fluorescence (MEF) probe in the determination of amyloid fibrils were investigated. MEF properties of seven cyanine dyes, one of the mono-, six of them trimethinecyanine, were investigated on silver island films (SIF). The MEF results obtained from monomethinecyanine dye SH-395 and trimethinecyanine dyes D-51 and D-151 were meaningful in analytical manner. The two of the β -ketone dyes showed MEF property.

Keywords: Metal enhanced fluorescence (MEF), amyloid fibrils, cyanine dyes

1. GİRİŞ

19. yüzyılın ortalarında önce Schleiden daha sonra Virchow tarafından ortaya atılan amiloid terimi, özellikle son yıllarda bilim dünyasında önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Bunun şüphesiz en önemli sebebi, Alzheimer hastalığı (AD), tip II diyabet, Parkinson hastalığı ve spongiform encephalopathies (deli dana hastalığı) gibi günümüzün en yaygın hastalıklarında amiloid patogenezinin görülüyor olmasıdır. İlk olarak bir otopside karaciğerde gözlenen iyot ile boyanmış parçacıkların adlandırılmasında kullanılan amiloid terimi çeşitli klinik bozukluklarda vücudun birçok doku ve organında hücreler arasında depolanan ve çözünmeyen protein agregatlarını tanımlamaktadır. Katı, dallanma göstermeyen ve belirli bir uzunluğu olmayan fibrillerden oluşan amiloid, proteolitik sindirime dirençli ve kolay çözünmeyen bir yapıdır. Amiloid yapıların çözünmez olmaları yanı sıra fibrillerin beta tabakası oluşturarak uzaması bir diğer karakteristik özelliğidir. Amiloid oluşumu gerçekleşen dokuda, hücreler arası iletişimin bozulmasından dolayı, hücre ölümü artmakta ve sonuçta doku (ya da organ) işlev göremez hale gelmektedir.

Amiloid fibril tayininde bir benzotiyazol boyası olan Thioflavin T'nin evrensel prob haline geldiği görülmektedir. Bu boya fibril yapılara bağlandığı zaman boyanın floresans şiddetinde artış, emisyon bandında ise spektral kayma gözlenmektedir. Doğal proteine bağlanması durumunda bu değişiklikler gözlenmemektedir. Thioflavin T'nin yaygın kullanımına karşın nicel amiloid tayininde tutarsız ve yanlış sonuçlar verdiği saptanmıştır. Bu gerçeğe rağmen literatürde daha iyi sonuçlar veren testler bulunamadığından Thio T amiloid protein oluşumunun habercisi olarak kullanılmaya devam edilmiştir. Siyanin boyaları biyomoleküllerin tayininde oldukça etkin ve yaygın kullanılan bir gruptur. Bu boyalar özellikle homojen analizlerde çok özel karakteristikleri ile öne çıkmaktadır. Yarmoluk araştırma grubu tarafından yapılan çalışmalar siyanin boyalarının amiloid fibril tanı ve tayininde önemli olacağını göstermiştir.

Biyolojik araştırmaların çoğunun temelini oluşturan ve 1950'li yıllarda biyokimya alanına giren floresans uygulamalar ve prensipleri büyük gelişmeler göstermiştir. Bu yeniliklerden biri olarak metalik yüzeylerin floresans analizlerde kullanımı olarak karşımıza çıkmaktadır. Metal genişletilmiş floresans klasik floresansa göre farklı yönleri ile dikkat çekmektedir. Klasik floresansda örnek hakkında bilgi genellikle floroforun bir söndürücü ile çarpışması k_q ve floresans rezonans enerji aktarımı k_T (FRET) sonucu ışımsız geçiş hızında k_{nr} meydana

gelen değişimden elde edilir. k_q veya k_T değişimi florofoforların emisyon şiddetlerinde ve ömürlerinde değişime neden olur. MEF ise metal nanoparçacıklara (NP) yakın bölgelerde lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) ile ışımanın bölgesel genişletilmesi temeline dayanmaktadır. MEF’da florofoforun parlaklığı ve ömrü klasik floresans yöntemlerden farklı olarak aynı zamanda ışımalı geçiş hızına Γ' da bağlıdır. Siyanin boyalarının amiloid fibril tayininde kullanılma olasılıklarını MEF’ın avantajları ile birleştirek birçok nörodejeneratif hastalığın patojeni olan amiloid fibriller için MEF problemleri geliştirmek bu projenin amacını oluşturmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

Amiloid, organlarda ve dokularda biriken lif oranı yüksek, hücreye ait olmayan, proteince zengin kalıntıları tanımlamakta kullanılır. İnsanlarda görülen 20’den fazla önemli hastalığın patogeneğinde görülmektedir. Bu hastalıklar Alzheimer Hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Diyabet tip II ve spongiform encephalopathies (Deli dana hastalığı) gibi hastalığın ilerlemesine bağlı olarak ölüm oranı ve riski yükselen çok ciddi hastalıkları içermektedir (Rambaran, 2008; Taşkıran, 2000). Yapılan çalışmalar amiloidlerdeki fibriller yapıların kararlı olduğunu ve karakteristik çapraz- β konformasyonunda β -tabakalı yapılardan oluştuklarını göstermektedir. Bütün amiloid türleri ortak karakteristik özellikler gösterse de her amiloid türünün öncül proteini farklıdır. Öncül proteinlerin birikmesi amiloid oluşumunun ilk basamağıdır. Şimdiye kadar amiloid yapıların tayininde en yaygın kullanılan yöntem bir benzotiyazol boyası olan Thioflavin T’nin floresans emisyonunu izlemektir. Thioflavin T amiloid fibrillere bağlandığında floresans emisyon şiddetinde artış gözlenen çok kullanışlı bir floresan boyasıdır. Fakat öncül proteinlerdeki ve amiloid türlerindeki artan çeşitlilik, seçimli amiloid tayini yöntemlerine duyulan acil ihtiyacı beraberinde getirmektedir (Sipe, 2000; Merlini, 2003).

İlk olarak bir otopside karaciğerde gözlenen iyot ile boyanmış parçacıkların adlandırılmasında kullanılan amiloid terimi çeşitli klinik bozukluklarda vücudun birçok doku ve organında hücreler arasında depolanmaktadır. Katı, dallanma göstermeyen ve belirli bir uzunluğu olmayan fibrillerden oluşan amiloid, proteolitik sindirime dirençli ve kolay çözölemeyen bir yapıdır (Sipe, 2000). Yapılan incelemeler amiloidler ile Kongo Kırmızısı arasında seçimli bir bağlanma olduğunu ve polarize ışık altında mikroskopta elma yeşili renginde göröldüklerini ortaya koymuştur. Tüm amiloid tiplerinde görülen bu karakteristik özellik amiloidin histopatolojik olarak tanısında kullanılmaktadır. Amiloid yapıların çözünmez

olmaları yanı sıra fibrillerin beta tabakası oluşturarak uzaması bir diğer karakteristik özelliğidir. Amiloid oluşumu gerçekleşen dokuda, hücreler arası iletişimin bozulmasından dolayı, hücre ölümü artmakta ve sonuçta doku (ya da organ) işlev göremez hale gelmektedir (Taşkiran, 2007; Merlini, 2003).

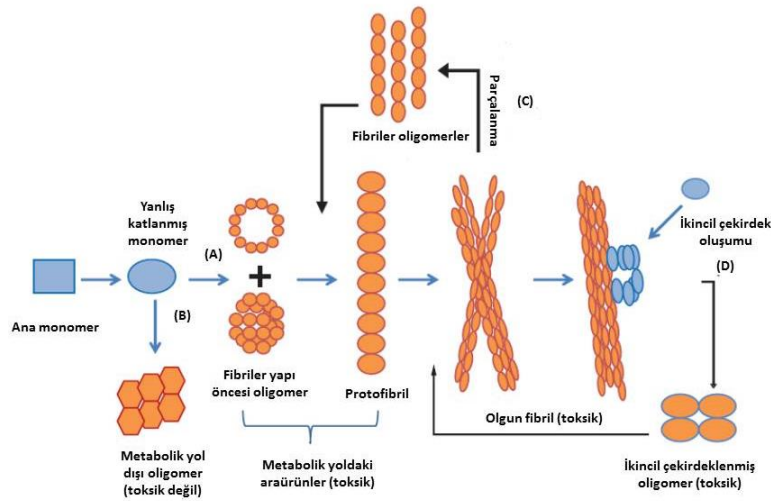
Bir seri hasarlı dokudan elde edilmiş amiloid fibrillerdeki proteinlerin amino asit içerikleri ve sekans analizleri her bir amiloid hastalığın belirli bir protein veya peptit ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Amiloid proteinleri, depolandıkları doku, organlar ve hastalığa göre farklılık göstermektedir. Amiloid tipleri, yapı itibarıyla birbirine benzese de öncül proteinleri birbirinden farklıdır. Örneğin Alzheimer's hastalığına amiloid beta (A β) (Chaudhuri, 2006), tip II diyabete amilin (IAPP) (Glennier, 1984), Parkinson hastalığına α -synuclein (Cooper, 1987) ve memeli prion hastalığına ise prion protein (PrP) (Spillantini, 1997) sebep olmaktadır. Öncül proteinin birikimi amiloid oluşumunu başlatan ilk basamaktır. Aynı amiloid öncül proteinleri bir araya gelerek amiloid fibrillerini oluşturur (Prusiner, 1982). Bu nedenle farklı amiloid tiplerinin içerdiği proteinler birbirinden farklıdır. İnsan hastalıklarında yaygın olarak görülen bazı amiloid tipleri ve öncül proteinleri Tablo 1'de verilmiştir (Westermarck, 2005).

Tablo 1. Amiloid proteinleri ve öncülleri

Amiloid proteini	Öncül Protein	Yayılım	Tip	Hastalık veya görüldüğü doku
A β	APP (A β protein öncülü)	Lokalize	Kazanılmış,kalıtımsal	Alzheimer hastalığı
APrP	Prion proteini	Lokalize	Kazanılmış,kalıtımsal	Creutzfeldt-jakob hastalığı
ABri	ABri protein öncülü	Lokalize	Kalıtımsal	İngiliz ailesel demansı
ACys	Sistatin C	Lokalize	Kalıtımsal	Kalıtımsal serebral amiloid
A β 2M	Beta2-mikroglobulin	Lokalize,Sistemik	Kazanılmış	Ronik hemodiyaliz
AL	İmmüoglobulin hafif zincirleri	Lokalize,Sistemik	Kazanılmış	Miyeloma ilişkili primer amiloid
AA	Serum amiloid A	Sistemik	Kazanılmış	Sekonder amiloid inflamasyon
ATTR	Transtiremin	Sistemik	Kazanılmış,kalıtımsal	Ailesel amiloid polinöropati
AAp A	Apolipoprotein A-I	Sistemik	Kalıtımsal	Karaciğer,böbrek,kalp
AApoAII	Apolipoprotein A-II	Sistemik	Kalıtımsal	Böbrek,kalp
AGel	Gelsolin	Sistemik	Kalıtımsal	Fin kalıtsal amiloidoz
AFi	Fibrinojen A α zinciri	Sistemik	Kalıtımsal	Böbrek

In vitro ortamda hemen hemen bütün proteinlerden çevre şartları değiştirilerek amiloid elde edilebilmektedir. Ancak *in vivo* ortamda amiloid gelişimi bu kadar kolay gerçekleşmemektedir. 2008 yılına kadar 20'den fazla plazma proteininin amiloid oluşturduğu belirlenmiştir (Westermarck, 2005). Amiloid öncülü proteinlerin konsantrasyonu arttığında veya bu proteinleri kodlayan genlerdeki bir mutasyon ya da polimorfizm sonucunda sentezlenen öncül proteinlerin proteazlar tarafından yeterince yıkılamaması sonucunda amiloid yapısını

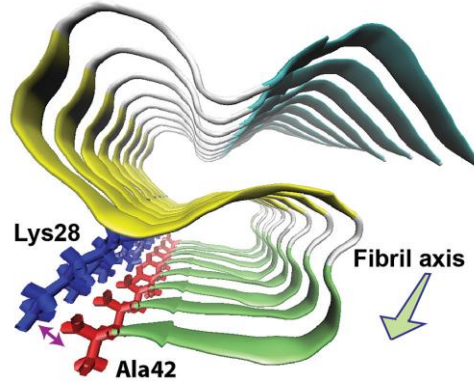
oluşturacak olan amiloid proteinleri meydana gelmektedir. Bu proteinler kararsız yapıda olup, çevresel faktörlerin etkisiyle (sıcaklık, pH, metal iyonları, okside edici ajanlar gibi) beta tabakası yapısı kazanmaktadır. Beta tabakası oluşturan proteinler biraraya gelerek fibril öncülü agregatları oluşturur. Bu aşamaya çekirdek fazı da denilmektedir. Amiloid çekirdeği veya protofibril olarak tanımlanan bu yapıların, hücreleri apoptozise yönlendirdiği düşünülmektedir. Amiloid uzaması bu aşamanın devamında görülmektedir. Amiloid agregatlarının biyokimyasal analizi sonucunda fibrillerin yanı sıra serum amiloid protein (SAP) ve pretoglikanlarında bulunduğu ortaya çıkmıştır. Glikozaminoglikanların tüm amiloid tiplerinde bulunduğu ve amiloid proteinlerini biraraya getirdikleri, SAP'inin ise amiloidleri kararlı hale getirdiği düşünülmektedir (Hawkins, 1988; La Spada, 1991). Hücreler arası bölgede biriken amiloid proteinleri, fibril öncüllerine hızla katılarak uzama fazını sürdürür. Son olarak fibrillere, fibriler yapıda olmayan serum amiloid proteininin (SAP) katılmayla çözünmez yapıdaki amiloid oluşmaktadır. Amiloid fibrillerin oluşum şeması Şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1. Amiloid fibrillerin oluşumu

Muhtemelen en iyi aydınlatılmış fibril yapısı Alzheimer'da oluşan A β proteinidir. NMR ve taramalı electron mikroskobu (TEM) ile yapılan analizler A β (1-40) tarafından oluşturulan çeşitli yapılar olduğunu göstermiştir (Chan, 2011; Tycka, 2011; Petkova, 2002; Sachse, 2008). *In vitro* fibril eldesinde, fibril morfolojisi ve subunit peptit yapısının inkübasyon

şartlarına bağlı olduğu ve belirgin heterojen özelliklerini hem TEM hem NMR analizleri ile ortaya çıkartılmıştır. Şekil 2’de A β (1-40) fibrillerine bir örnek görülmektedir.

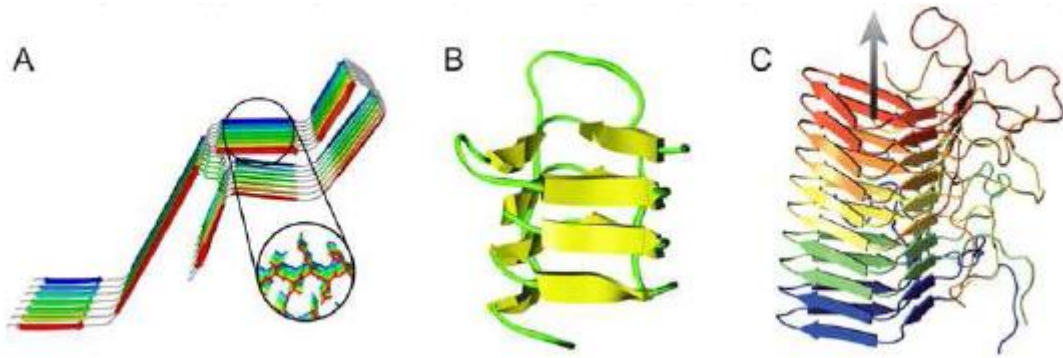


Şekil 2. A β (1-40) fibrillerinin yapısal modeli

1982 yılında Prusiner **prion** hipotezini ortaya atmıştır. Bu hipotez enfekte olmuş bir protein parçasının koyunlarda scrapie’ye (kalıcı nörodejeneratif hastalık) neden olduğunu açıklamaktadır (Prusiner, 1982). Bu protein amiloidojenik olmakla beraber infektif olması yönü ile diğer amiloid oluşturan proteinlerden farklıdır ve prion olarak adlandırılmıştır (Walsh, 2011). 2 yıl sonra, Alzheimer’lı beyin bölgesindeki amiloid plakların oluşumundan sorumlu peptit, A β , biyokimyasal olarak teşhis edilerek karakterize edilmiştir. 1986 yılında ise İngiltere’de büyük baş hayvanlarda görülen yıkıcı salgın nedeniyle gözler tekrar priona çevrilmiştir. Bu hayvanlar Bovine spongiform encephalopathy (BSE) nedeni ile ölüyordu ve bunun koyunlarda görülen bir prion hastalığı olan Scarpie ile bağlantı olduğuna inanılıyordu. 10 yıl sonra ölümcül bir nörodejeneratif prion hastalığı insanlar arasında aniden yayılmaya başlamıştır. Creutzfeldt- Jacob hastalığı (vCJD) olarak adlandırılan bu yeni hastalıkta prionların bir türden diğerine bulaşma şekli BSE ajanları ile benzerliğini açıkça ortaya koymuş ve insanlar için kabus başlamıştır.

Prion proteini (PrP), koyunlarda scrapie, büyük baş hayvanlarda BSE ve insanlarda CJD gibi nörodejeneratif prion hastalıklarının en büyük etken maddesidir. Protein; monomerik, hücresel primer heliks formu yapıyı (PrPC) büyük miktarda β -yapısı içeren infektif, oligomerik scrapie forma (PrPSc) dönüştürür. PrP ile amino asit dizilimi farklı fakat fibriller içerik, infektif olma özelliği gibi ortak özellikleri paylaşan bir kaç fungal prion protein vardır. Amiloid proteinlerden elde edilen fibriller ile bazı ortak özellikleri olmasına rağmen aralarında

bazı çarpıcı farklılıklar vardır. Örneğin, fungal Het-S prion protein yapısı katı hal NMR ile aydınlatıldığında amyloidlerin tipik çapraz- β istiflenmesi yerine selonoid merdiveninin her basamağında 2 protein molekülü içeren β -selonoid yapıda oldukları gözlenmiştir (Wasmer, 2008). İnsan ve maya sistemlerindeki prion proteinlerden elde edilen yapılar Şekil 3'de görülmektedir. Buna karşılık *in vitro* ortamda PrP'den elde edilen maya prion proteinler Ure2 (Baxa, 2007) ve Sup35 (Shewmaker, 2006) amiloid fibriller benzeri paralel β tabakalı yapılar göstermektedir. Enfekte olmuş beyinden elde edilen PrP'nin infektif formu olan PrPSc'nin elektron kristalografi ile elde edilen yapısında ise *in vitro* ortamda elde edilen amiloid fibrillerden farklı fakat Het-S ile benzer β -heliks veya β -solenoid yapılar gözlenmiştir (Govaerts, 2004). Gün geçtikçe ortaya çıkan yeni yapılar tehlikenin büyüklüğüne işaret etmektedir.



Şekil 3. İnsan ve maya sistemlerindeki prion proteinlerden elde edilen yapılar. (A) PrP'den elde edilen paralel β -tabaka yapıdaki amyloid fibriller. (B) Enfekte olmuş dokudan alınan insan PrP'inin oluşturduğu β -heliks yapı. (C) Katı hal NMR ile elde edilen Het-S prion yapısı.

Son 25 yılda genomik, preotomik, biyomühendislik, tıbbi teşhis ve mikrobiyoloji gibi temel ve uygulamalı canlı bilimindeki floresans uygulamalarda görülen patlama araştırmaların yönünü bu alana çevirmiştir. Floresans temelli yöntemler biyoloji ve biyomedikal uygulamalarda karşılaşılan sorunların hızla başvuru adresi haline gelmektedir (Nardo, 2012; Nord, 2014). Günümüzde sık kullanılan floresans yöntemlere biyomoleküller için kullanılan testler, metabolik enzimler, DNA sekans analizi ve dokularda DNA ve/veya RNA sekans analizleri için floresans hibritleşme (FISH) yöntemleri örnek gösterilebilir (Gines, 2014; Zhang, 2014). Biyoloji ve tıpta bu bağlamdaki gelişmeler floresans ölçümlerin kapasitesi ile orantılı

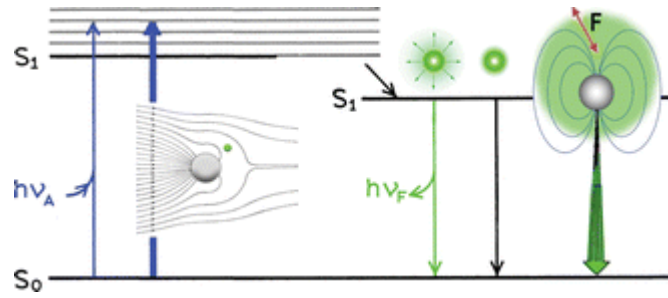
görülmektedir. Örneğin birçok klinik testin hassasiyeti analitin otofloresansı ile, tek-molekül tayini floroforun kararlılığı ve parlaklığı ile, hücre görüntülerinin çözünürlüğü ise kullanılan ışımının yarı dalgaboyu ile sınırlıdır (Mughal, 2014). Yakın geçmişte yapılan çalışmalar floresans ve metalik nanoparçacıkların birleşiminin, floresans teknolojisinde temel değişikliklere yol açacağı ve kapasitelerini arttıracacağı umudunu vermektedir.

Lakowicz araştırma laboratuvarında yapılan çalışmalar sonucunda ilk olarak ışımalı geçiş mühendisliği (RDE) ve metal genişletilmiş floresans (MEF) kavramları ile tanışılmıştır. Bundan önce yapılan çalışmaların hemen hepsinde floresansın kullanımı fotonların her yöne izotropik emisyonlarının ölçümüne dayanmaktadır (Lakowicz, 2006). Örnek hakkında bilgi genellikle floroforun bir söndürücü ile çarpışması k_q ve floresans rezonans enerji aktarımı k_T (FRET) sonucu ışımsız geçiş hızında k_{nr} meydana gelen değişimden elde edilmektedir. k_q veya k_T değişimi floroforların emisyon şiddetlerinde ve ömürlerinde değişime neden olmaktadır. MEF ise metal nanoparçacıklara (NP) yakın bölgelerde lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) ile ışımının bölgesel genişletilmesi temeline dayanmaktadır. MEF'da floroforun parlaklığı ve ömrü klasik floresans yöntemlerden farklı olarak aynı zamanda ışımalı geçiş hızına Γ' da bağlıdır.

Metalik parçacıklara baktığımız zaman flororlardan 10^5 kat daha büyük kesit yüzeylerine ve ekstinksiyon katsayısına sahip oldukları görülmektedir (Ygerabide, 1998; Yguerabide, 1998). Geniş kesit yüzeylerine sahip olmaları metalik parçacıkları biyolojik görüntüleme ve ölçümlerde kıymetli problemler sınıfına dahil etmektedir. Bu özellik metalik parçacıklar ile etkileşimlerin, boya agregasyonu mekanizmalarının veya çeşitli biyomoleküllerin etkileşimlerinin yüksek floresans verimi ile çalışılmasına olanak sağlar (Zhang, 2013; Lakowicz, 2001; Gryczynski, 2006). Metal parçacıkların yakınında bulunan floroforların kullanımı bu floroforlara metal parçalarının büyük ekstinksiyon katsayılarından faydalanma şansı vermektedir (Sokolov, 2003; Schultz, 2000). Işımaya maruz kaldıklarında kolloidlerin etrafında elektrik alanları yoğunlaşmaktadır. Bu bölgesel alanlar metallerin yakınındaki florforların ekstinksiyon katsayılarında artışa neden olur. Aynı zamanda daha önemli bir etki gözlenmektedir. Uyarılmış enerji düzeyindeki florofor metal parçacıklar ile plazmon oluşturmak üzere etkileşime girebilir ve florofor bazlı plazmonlar gözlenebilir emisyon verebilir. Bu emisyon floresans ömürlerinde azalmaya neden olacak kadar hızlıdır. Gözlenen emisyon spektrumu, floroforun emisyon spektrumu ile aynı kalır. Floresans emisyon spektrumunda değişiklik meydana gelmemesinden dolayı hangi türün emisyon yaptığı tam olarak anlaşılamamaktadır. Plazmon geçiş sürelerinin yaklaşık 50 fs olması ve gözlenen

floresans ömürlerinin kısılması metalin emisyon yaptığını düşündürmektedir (Pelton, 2006). Buna karşın emisyon spektrumunun floroforunki ile aynı kalması floroforun emisyon yaptığını düşündürmektedir. Bu durumda en iyi yaklaşım florofor-metal kompleksinin emisyon yapan tür olduğunu varsaymaktır. Emisyon spektrumu hem floroforun hem metalin özelliklerini barındırmaktadır. Bu bilgilerin ışığında emisyon yapan tür *plazmofor* olarak adlandırılmıştır.

Plazmoforun emisyon yaptığı düşünüldüğünde metallerin etkisi florofor yönünden açıklanabilmektedir. Kuantum verimi (Φ) ve floresans ömrü (τ) klasik floresans deneylerinde de ışısız geçiş hızındaki değişiklikler nedeni ile artıp azalmaktadır. Fakat bu iki parametredeki değişiklik MEF'dan farklı olarak her zaman aynı yönlü gözlenmektedir. Plazmofor emisyonunun özellikleri, floresans şiddetinde büyük artış, floresans ömründe kısalma ve fotokararlılıkta iyileşme olarak özetlenebilir. Şekil 4'de bu yaklaşımı açıklamakta kullanılan MEF için düzenlenmiş Jablonski diyagramı görülmektedir (Lakowicz, 2008).



Şekil 4. Metal florofor etkileşimlerini içeren modifiye Jablonski diyagramı

Klasik floresansa göre MEF'da gözlenen farklılıkların sebebi kuantum verimi (1) ve floresans ömrünü (2) tanımlayan eşitlikler incelendiğinde daha kolay anlaşılmaktadır.

$$\Phi_0 = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1)$$

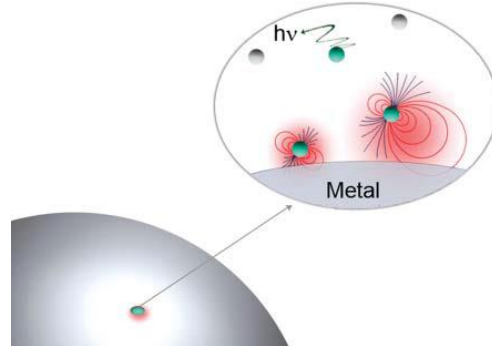
$$\tau_0 = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2)$$

Φ_0 ve τ_0 floroforun kuantum verimini ve floresans ömrünü simgelemektedir. Γ ışıklı geçiş hızını, k_{nr} ise ışısız geçiş hızını göstermektedir. Metalik parçacığın yakınında bulunan bir floroforu ele aldığımızda eşitlikler aşağıdaki şekilde değişecektir (Lakowicz, 2006).

$$\Phi_m = \frac{\Gamma + \Gamma_m}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}} \quad (3)$$

$$\tau_m = \frac{1}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}} \quad (4)$$

Eşitlikler metal parçacıkların varlığında floroforların kuantum verimleri (3) yükselirken neden floresans ömürlerinin (4) kısaldığını açıkça göstermektedir. Metal parçacıklara yakın floroforları Şekil 5’de gösterildiği gibi düşünebiliriz.



Şekil 5. Metalik yüzey yakınında bulunan florofor

Matveeva ve çalışma grubu kardiyak işaretleyici myoglobin (Myo) tayini için metal genişletilmiş floresans kullanarak bir sandviç-tipi immünotest geliştirmiştir. Çalışmalarında MEF için anti-Myo antibadiler ile etiketlenmiş gümüş filmlerini (SIF) kullanmışlardır. Sistemin control grubu olarak kuartz üzerinde ölçümler tekrarlanmıştır. SIF üzerinde gerçekleştirilen deneylerde floresans emisyon şiddetinde 10-15 kat artış ile beraber fotokararlılıkta artışta gözlenmiştir. Sonuçlar myoglobinin 50 ng/ml'nin altındaki derişimlerde tayin edilebileceğini göstermektedir. SIF yüzeylerinin homojenliği arttırılabilirse daha verimli sonuçlar elde edilebileceği belirtilmektedir (Matveeva, 2005).

Zhang ve çalışma grubu tek molekül floresans mikroskopisi ile hücre görüntüleme için avidin-bağlı gümüş parçacıklar geliştirmiştir. Çalışmada Cy-5-avidin bağlı gümüş nanoparçacıklar kullanılmıştır. Metal- serbest avidin sistemlerine göre metal-avidin kompleksi daha şiddetli floresans emisyonu, daha kısa floresans ömrü ve daha iyi fotokararlılık göstermiştir. Taramalı konfokal mikroskop ile elde edilen görüntülerde avidin-metal kompleksinin PM1 hücre çizgilerinin biotin- kısımları ile konjuge olduğu görülmüştür. Hücre yüzeyine bağlanan avidin-metal komplekslerinin izole emisyon noktaları gösterdiği fark edilmiştir. Hücre görüntülerinde bağlanan avidin-metal kompleks sayısı arttıkça emisyonun arttığı, floresans ömrünün azaldığı gözlenmiştir. Avidin-metal kompleksinin miktarı ile emisyon şiddeti veya floresans ömrü arasındaki oran kullanılarak antitatif bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bu eğri

kullanılarak hücre yüzeylerindeki hedef moleküllerin tayinine olanak sağlayacak yöntemler geliştirilebileceği söylenmektedir (Zhang, 2009).

Volkava ve grubu tarafından 2007 yılında amyloid yapılar için floresan prob araştırması mono-, tri-, penta- ve benzotiyazol heptametinsiyanin boyalarının β -laktoglobülin fibrillerinin tayininde etkin olduğunu ortaya koymuştur. Boyaların protein agreagatlarına bağlanabilme özelliklerinin boyaların kimyasal yapısı ile değiştiği gözlenmiştir. Hetero halkalı yapılarında amino grupları ile mezo-dallanmış siyaninlerin, dallanma göstermeyen boyalara göre BLG fibrillerine bağlanma eğilimi olduğu ve protein agragatlarının varlığında floresans sinyallerinde önemli yükselme olduğu gözlenmiştir. Benzimidazol pentametinsiyanin boyaları ile ise hem doğal protein varlığında hem de fibriller varlığında floresans emisyonunda artış elde edilmiştir. Trimetinsiyanin T-49 ve SH-516 boyalarının ise seçimli olarak BLG fibrilleri varlığında floresans emisyon şiddetleri yükselmiştir. Çalışma sonucunda bu boyaların BLG agreagatlarına en az Thioflavin T kadar seçimli ve hassas oldukları gözlenmiştir (Volkova, 2007).

Thioflavin T amiloid yapıların tayininde en yaygın kullanılan floresan boyalardan biridir (Glennner, 1980; Naiki, 1989; LeVine, 1993). Bu boya fibril yapılara bağlandığı zaman boyanın floresans şiddetinde artış, emisyon bandında ise spektral kayma gözlenmektedir. Doğal proteine bağlanması durumunda bu değişiklikler gözlenmemektedir. Thioflavin T'nin yaygın kullanımına karşın nicel amiloid tayininde tutarsız ve yanlış sonuçlar verdiği saptanmıştır. Bu gerçeğe rağmen literatürde daha iyi sonuçlar veren testler bulunamadığından Thio T amiloid protein oluşumunun habercisi olarak kullanılmaya devam edilmiştir (Hawe, 2008; Masuda, 2006). Yarmoluk araştırma grubu alfa-synuclein amiloidinin (ASN) nicel tayini için Thioflavin T'ye alternatif olarak siyanin boyalarından mono (T-284) ve trimetinsiyanin (SH-516) boyalarını önermektedir. Floresans spektroskopisi ve AFM ile yapılan çalışmalarda T-284 ve SH-516 boyalarının wild-type ASN fibrillerinin nicel tayinine 1,5-20 mg/ml derişim aralığında cevap verdiği gözlenmiştir. Her iki boyanında ASN türlerinin (wild-tip ve mutant A30P, A53T) *in vitro* ortamda fibriler yapıya geçişini takipte Thioflavin T'den daha iyi ve daha kararlı olduğu saptanmıştır. En önemli noktalardan biri ise T-284 ve SH-516 siyanin boyalarının çeşitli amino asit bileşimindeki amiloid proteinlerini seçimli olarak tayin edebilmesidir. T-284 wild-tip ve A53T ASN'e kısmi seçicilik gösterirken SH 156'nın ise lysozyme dışındaki protein fibrillerine yaklaşık aynı cevabı verdiği gözlenmiştir (Volkova, 2009).

Lee ve grup arkadaşları α -synuclein fibrilleşme sürecinin sürekli analizi için JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazol karbosiyanin iyodür) kullanımını önermiştir. JC-1 delokalize pozitif yüke sahip bir karbosiyanin boyasıdır. Bileşik mitokondriyal tamamlanma için membran-potansiyel-bağımlı ajan olarak kullanılmaktadır. JC-1 seçimli olarak mitokondriyal matrikste depolanır ve karbosiyaninlerin multimerizasyonu sonucu J agregatlara dönüşür (Smiley, 1991). Monomerik JC-1 527 nm'de yeşil floresans emisyonu yaparken J agregatlar 590 nm'de kırmızı ışık emisyonu yapar. Farklı yollarla elde edilmiş alfa-synuclein fibrilleri varlığında JC-1 probunun floresans sinyalleri kaydedilmiştir. Aynı zamanda Thioflavin T ile JC-1 arasındaki FRET (floresans rezonans enerji aktarımı) çalışmaları da alfa-synuclein amiloid fibrillerinin oluşumunu izlemede kullanılmıştır. Çalışmanın bütünü JC-1 floresan probunun *in vitro* ortamlarda fibril oluşum mekanizmaları için güçlü ve kullanışlı bir prob olduğunu göstermiştir. Çalışma Parkinson hastalığının moleküler sebebini ve anlama ve tedavisi için strateji geliştirme yolunda yapılan çalışmalar arasında yer almaktadır (Lee, 2009).

Tobar ve grubu amiloid fibrillerin tayininde neredeyse evrensel prob haline gelmiş olan Thioflavin T'nin gümüş nanoparçacıklar üzerine adsorpsiyonunu ve tayinini yüzey genişletilmiş Raman spektroskopisi (SERS) ile incelemiştir. Thioflavin T'nin birçok spektral yöntem ile yapısı ve davranışları incelenmiş olmasına rağmen titreşim karakterizasyonu 2013 yılında yapılan bu çalışmaya kadar yapılmamıştır. SERS çok düşük derişimlerde çalışmaya olanak sağlaması nedeni ile oldukça önemli yöntemler arasındadır. Çalışma prensibi olarak MEF'a benzer olması nedeni ile bu iki yöntem birbirinin alternatifi kabul edilebilir. Çalışmanın amacı Thioflavin T'nin çok düşük derişimlerinde özellikle amiloid fibrillerin tayinine olanak sağlayacak biyolojik uygulamalarını geliştirmektir Thioflavin T'nin metalik yüzeylere kuvvetle adsorbe olduğu ve yüzeye tutunmuş boya moleküllerinin çözelti içerisindeki serbest boya molekülleri ile aynı yapıda olduğu gözlenmiştir. Thioflavin T için SERS yüzeylerindeki tayin limiti 442 nm'de 10^{-9} M olarak bulunmuştur (Lopez-Tobar, 2013).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Reaktif ve çözeltilerin hazırlanması

- Tüm çalışma çözeltileri günlük olarak, stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlandı. Çalışmalarda sulu çözeltilerde çift destile su kullanıldı. Bütün reaktifler analitik saflıkta olup ileri saflaştırma yapılmadan kullanıldı.
- 1×10^{-2} M'lık siyanin ve β -ketoenol çözeltileri DMF içerisinde hazırlandı.
- Monomerik veya fibriler proteinlerin çözeltileri 0.1 M HCl içerisinde hazırlandı.
- Çalışma çözeltileri 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 7.9) içerisinde seyreltilerek kullanıldı.
- Çalışma çözeltilerinde boya derişimleri 100 μ M olarak kullanıldı.
- İnsulin ve lizozim fibril derişimleri sırası ile 34 μ M ve 80 μ M olarak kullanıldı.
- Çalışma yüzeylerini PVP ile kaplamada sulu %1'lik PVP çözeltisi kullanıldı.

3.2. Kullanılan cihazlar

- Floresans çalışmalar bu proje kapsamında alınan Edinburgh FS-5 spektrofiorimetre ile yürütüldü. Fluoracle programı içeren, 150 watt ksenon lamba ışık kaynaklı cihaz ile tüm çalışmalarda PMT voltajı 700 V olarak ayarlandı.
 - UV absorpsiyon ölçümleri yine Edinburgh FS-5 spektrofiorimetrenin absorpsiyon ölçme özelliğinden faydalanılarak ölçülmüştür.
 - pH ölçümleri Ohaus (Starter 3100) pH'metre ile kaydedildi.
- Sentezlenen koloidal nanopartiküller (AgNP) ve gümüş adacıklı filmler (SIF) AFM, SEM ve UV-Vis spektroskopileri ile karakterize edildi.

3.3. Gümüş nanopartiküllerin (AgNP) ve gümüş adacıklı fimlerin (SIF) eldesi

3.3.1. Lee - Meisel protokolü ile AgNP eldesi: Bu yöntem gümüş katyonlarının sitrat ile indirgenmesine daymaktadır. AgNP'lerin eldesi için 50 ml, 1×10^{-3} M AgNO_3 kaynama noktasına kadar ısıtılarak üzerine 10 ml, 1% trisodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$) çözeltisi eklendi. 1 saat kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakılan çözelti daha sonra santrifüjlenerek

çözeltilisinden ayrıldı (Lee, 1982). Ayırma işleminin ardından 2 kez deiyonize su ile yıkanarak sulu süspansiyon halinde karanlıkta muhafaza edildi.

3.3.2. Formaldehit indirgemesi ile AgNP eldesi: Bu yöntemde koruyucu olarak PVP, indirgeme ajanı olarak da formaldehit kullanılmaktadır. PVP, AgNO_3 ve reaksiyonu başlatmak için kullanılan NH_3 çözeltilerinin derişimleri tanecik büyüklüğüne etki etmektedir. Sıcaklık ise tanecik büyüklüğüne etki eden bir diğer parametredir. Bu yöntemde 50 mL su içerisinde çözülen PVP ve AgNO_3 üzerine 1 mL, % 37'lik CH_2O eklenir ve son olarak % 28'lik NH_3 ilave edilerek reaksiyon başlatılır. Karışım 30 dakika farklı sıcaklıklarda karıştırılarak reaksiyon tamamlanır (Liu, 2011). Bu yöntem ile elde edilen çeşitli büyüklükteki AgNP'lar ve kullanılan protokoller aşağıda verilmiştir.

Protokol 1: 50 mL, 0.2 - 0.5 mM AgNO_3 üzerine 5 mL, %0.25'lik PVP, 1 mL Formaldehit ve 0.6 mL, % 28'lik NH_3 çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 30 dk karıştırıldı.

Protokol 2: 50 mL, 2.5 mM AgNO_3 üzerine 5 mL, %1'lik PVP, 1 mL Formaldehit ve 2.4 mL % 28'lik NH_3 çözeltisi eklenerek 30 ve 40°C'de 30 dk karıştırıldı. Daha büyük AgNP eldesi için ise sıcaklık 60 °C'ye çıkarılırken NH_3 miktarı da 12 mL olarak değiştirildi.

3.3.3. NaBH_4 indirgemesi ile AgNP eldesi: Bu yöntemde değişen derişimlerde AgNO_3 çözeltilisinden NaBH_4 indirgenmesi ile AgNP eldesi gerçekleştirildi. Koruyucu olarak PVA kullanıldı. Reaksiyon oda sıcaklığında gerçekleştirildi (Bacero, 2015).

3.3.4. Askorbik asit indirgemesi ile AgNP eldesi: Bu yöntemde 3 mM AgNO_3 çözeltisinde bulunan gümüş iyonlarının molar oranı $\text{AgNO}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6 = 1.2$ olacak şekilde hazırlanan askorbik asit çözeltisi ile indirgenmesine dayanmaktadır. Koruyucu olarak 5 mL %1'lik PVPçözeltisi kullanılan yöntemde reaktif sürekli karıştırma ortamında damla damla eklenir. Oda sıcaklığında 1 saat karıştırılarak reaksiyon tamamlanır (Zeilinska, 2009).

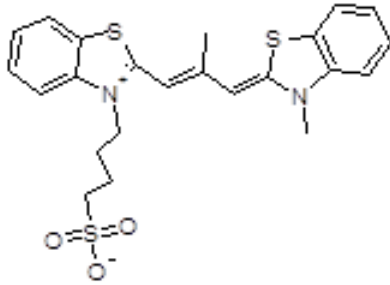
3.3.5. Gümüş Adacıklı filmlerin (SIF) eldesi: Çalışmamızda kolloidal yapıdaki AgNP'lere alternatif olarak gümüş adacıklı filmler (SIF) hazırlanmıştır. Literatürde oldukça yaygın kullanılan SIF yüzeyler Aslan ve ark (Aslan, 2005) tarafından kullanılan protokole göre hazırlanmıştır.

Protokol: 50 mM, 60 mL AgNO₃ çözeltisi üzerine kahverengi renk gözleninceye kadar damla damla %5'lik NaOH çözeltisi eklendi. Oluşan çökelek üzerine %30'luk NaOH çözeltisinden yaklaşık 1.5 mL damla damla çözelti berraklaşınca kadar ilave edildi. Reaksiyonlar sürekli karıştırma ortamında gerçekleştirildi. Çözelti 5 dk buz banyosunda yaklaşık 5 °C'ya kadar soğutulduktan sonra karışıma 720 mg, 15 mL glukoz çözeltisi eklendi. Renk değişiminin de gözlemlendiği bu basamakta SIF kaplanmak istenen cam yüzeyler çözeltiye daldırıldı. Yaklaşık 10 dakika süren kaplama işleminden sonra yüzeyler saf su ile yıkanarak kullanıma kadar saf su içersinde saklandı.

3.4. Siyanin boyalarının eldesi ve karakterizasyonu

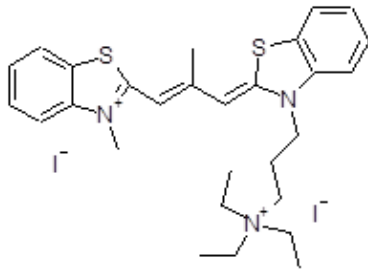
Proje kapsamında yedi tane siyanin boyası sentezlenerek deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Boyaların yapısal formülleri ve karakterizasyon verileri aşağıda sunulmuştur.

- 1. D-51 ve D-150:** D-51 ve D-150 boyaları kuaternize 2-metilbenzotiyazoliyum tuzunun 2-β-etil-tiyovinil ile alkol ve trietilenamin ortamındaki rekasiyonundan elde edilmiştir (Hamer, 1928; Hamer, 1964). Yapısal formülü, ¹H NMR ve CHN elemental analiz sonuçları aşağıda görülmektedir.



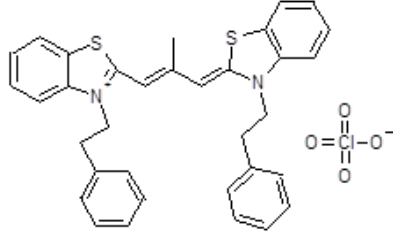
D-51: Verim: 49%; ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 1.85 (2H,m), 1.93 (2H,m), 2.57 (2H,t,J=6.6Hz), 2.59 (3H,s), 3.91 (3H,s), 4.43 (2H,t,J=6.3Hz), 6.49 (1H,s), 6.59 (1H,s), 7.41 (2H,m), 7.60 (2H,dd,J=7.8Hz), 7.80 (1H,d,J=8.5Hz), 7.86 (1H,d,J=8.3Hz), 8.03 (1H,d,J=6.6Hz), 8.20 (1H,m). Hesaplanan analiz sonuçları,

C₂₃H₂₄N₂O₃S₃: C 58.45; H 5.12; N 5.93. Bulunan: C 58.59; H 5.07; N 5.85.



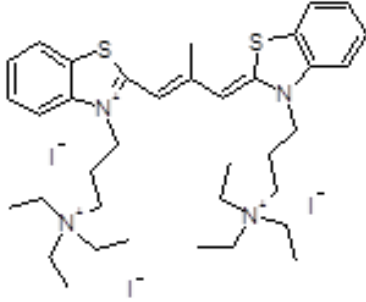
D-150: Verim: 41%; ¹H NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 1.22 (9H,bs), 2.06 (2H,m), 2.62 (3H,s), 3.26 (6H,m), 3.61 (2H,t,J=7.1Hz), 3.97 (3H,s), 4.58 (2H,t,J=6.4Hz), 6.65 (2H,bs), 7.43 (2H,m), 7.61 (2H,m), 7.85 (1H,d,J=7.3Hz), 7.89 (1H,d,J=7.1Hz), 8.10 (2H,m). Hesaplanan analiz sonuçları, C₂₈H₃₇N₃S₂I₂: C 45.85; H 5.08; N 5.73. Bulunan: C 45.97; H 5.15; N 5.64.

D-35 ve D-151: D-35 ve D-151 boyları kuaternize 2-metilbenzotiyaziliyum tuzunun etil ortoasetat ile piridin ortamında rekasyonundan elde edilmiş ve perkloratlara dönüştürülmüştür (Moskalenko, 1972; Abramenko, 1972) Yapısal formülleri, ^1H NMR ve CHN elemental analiz sonuçları aşağıda görülmektedir.



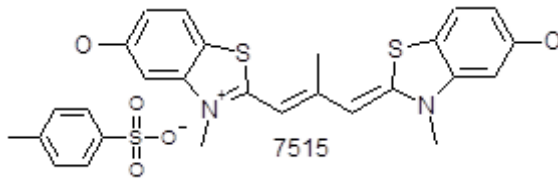
D-35: Verim: 56% ; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 2.55 (3H,s), 3.15 (4H,t,J=4.4 Hz), 4.73 (4H,t,J=6.3 Hz), 6.48 (2H,s), 7.21-7.32 (10H,m), 7.42 (2H,dd,J=6.8Hz), 7.55 (2H,dd,J=7.6Hz), 7.72 (2H,d,J=7.6Hz), 7.97 (2H, d,J=8.1Hz). Hesaplanan analiz sonuçları, $\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{S}_2\text{ClO}_4$: C

64.70; H 4.95; N 4.44. Bulunan: C 64.52; H 4.99; N 4.32.



D-151: Verim: 46%; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 1.24 (18H,bs), 2.09 (4H,m), 2.68 (3H,s), 3.27 (12H,m), 3.71 (4H,t,J=7.1Hz), 4.66 (4H,t,J=6.5Hz), 6.99 (2H,bs), 7.48 (2H,m), 7.67 (2H,m), 7.93 (2H,m), 8.11 (2H,m). Hesaplanan analiz sonuçları, $\text{C}_{36}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{S}_2\text{I}_3$: C 43.73; H 5.61; N 5.67. Bulunan: C 43.61; H 5.68; N 5.61.

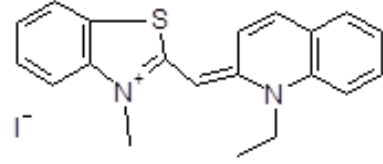
2. 7515 (SL-1867): 7515 (SL-1867) boyası metil p-toluensülfonat 6- (veya 5-)hidoksibenzotiyazol ve ortoasetik asit kullanılarak N,N'-dietil analoglarının elde edildiği yoldan sentezlenmiştir (Kiprianov, 1949). Boyanın yapısal formülü ve analiz sonuçları aşağıda görülmektedir.



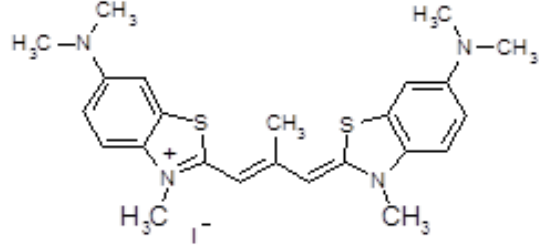
DMSO- d_6 : 2.278 (s, 3H, CH₃), 3.787 (s, 6H N-CH₃), 6.348 (s, 2H, α -H chain), 6.867 (d J=9.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.103– 7.121 (m (s+d), 4H, Ar-H), 7.480 (d J=8.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.777

(d J=9.0 Hz, 2H, Ar-H), 10.230 (s, 2H, OH). E.N.: 276–277 °C

3. **SH-395:** Monometin siyanin boylarından olan SH-395 Hamer'a göre sentezlenerek kullanıldı (Hamer, 1964).



4. **T-49:** 6- pozisyonundan bağlı 2,3-dimetil-1,3-benzotiyazoliyum iyodürün (veya 3- etil-2-metil-1,3-benzotiyazoliyum iyodür) trietilortoasetat ile kondenzasyon reaksiyonu ile referansa (Kiprianov, 1949; Hamer 1964) göre sentezlenerek kullanıldı.

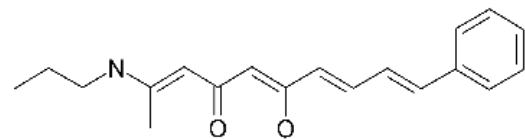


3.5. β -ketoenole boylarının eldesi ve karakterizasyonu

Proje kapsamında yeni tür MEF prob olanaklarının araştırılması için bir seri β -ketoenol boyası sentezlenmiştir. ((2E,5Z,7E,9E)-6-hidroksi-2-(alkilamino)-10-fenildeka-2,5,7,9-tetraen-4-on) boylarının genel sentez prosedürü ve sentezlenen boyların karakterizasyonuna ait veriler aşağıda sunulmuştur.

Prosedür: Boyalar, 5 mM 4-hidroksi-6-metil-3-((2E,4E)-5-fenilpenta-2,4-dienoil)-2H-piran-2-on'nun 10 mL DMF içerisinde %10'luk amin çözeltisinin fazlası ile karıştırılması ile elde edildi. Sentezler Referans [1]'e göre yapılmıştır. Karışım 100 °C'de 30 dakika boyunca ısıtılarak reaksiyon tamamlandı. Reaksiyon sonrasında rengin kırmızıya döndüğü gözlemlendi. CO₂ çıkışı tamamlanincaya kadar ısıtmaya devam edildi. Soğutulan reaksiyon karışımı su ile çöktürüldü. Ürün iki kez yıkandı ve DMF-etanol karışımından kristallendirildi. Süzöldükten sonra etanol ile iki kez yıkandı ve kurutuldu. Elde edilen bütün bileşiklerin sarı-turuncu renkli, iyi kristal yapıya sahip oldukları gözlemlendi.

1. **13-propilamino [(2E,5Z,7E,9E)-6-hidroksi-10-fenil-2-(propilamino)deka-2,5,7,9-tetraen-4-on]:** Verim: 67%. M.p. = 255-259 °C. Hesaplanan analiz sonuçları (%), C₁₉H₂₃NO₂: C, 76.73; H, 7.80; N, 4.71. Bulunan (%): C, 76.79; H, 7.74; N, 4.64. ¹H



NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 14.99 (s, 1H), 10.43 (s, 1H), 7.44 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (dd, J = 13.4, 6.2 Hz, 2H), 7.26 (dd, J = 9.8, 4.7 Hz, 1H), 7.17 (dd, J = 15.0, 10.8 Hz, 1H), 7.01 – 6.71 (m, 2H), 6.01 (d, J = 15.1 Hz, 1H), 5.20 (s, 1H), 4.78 (s, 1H), 3.24 (dd, J = 13.3, 6.7 Hz, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.65 (dd, J = 14.4, 7.2 Hz, 2H), 1.09 – 0.96 (m, 3H).

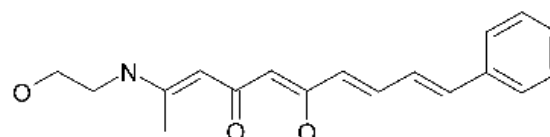
2. 14-2-hidroksietilamino [(2E,5Z,7E,9E)-6-hydroxy-2-((2-hydroxyethyl)amino)-10-phenyldeca-2,5,7,9-tetraen-4-one]:

Verim: 69%. M.p. = 273-275 °C.

Hesaplanan analiz sonuçları (%),

C₁₈H₂₁NO₃: C, 72.22; H, 7.07; N, 4.68.

Bulunan (%): C, 72.14; H, 7.02; N, 4.63. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 14.84 (s, 1H), 10.44 (s, 1H), 7.46 (dd, J = 12.9, 7.2 Hz, 2H), 7.40 – 7.30 (m, 2H), 7.30 – 7.22 (m, 1H), 7.18 (dd, J = 15.0, 10.8 Hz, 1H), 6.91 (ddd, J = 23.8, 20.0, 13.2 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 6.00 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.83 (s, 1H), 3.79 (dt, J = 10.7, 5.2 Hz, 2H), 3.45 (dt, J = 11.4, 5.6 Hz, 2H), 2.29 (s, 1H), 2.01 (s, 3H).



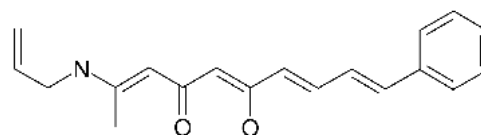
3. 47-alilamino [(2E,5Z,7E,9E)-2-(allylamino)-6-hydroxy-10-phenyldeca-2,5,7,9-tetraen-4-one]: Verim: 44%. M.p. = 143-144

°C. Hesaplanan analiz sonuçları (%),

C₁₉H₂₁NO₂: C, 77.26; H, 7.17; N, 4.74. Bulunan

(%): C, 77.11; H, 7.12; N, 4.70. ¹H NMR (400

MHz, DMSO) δ 15.13 (s, 1H), 10.30 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.36 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 7.28 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.06 (dd, J = 9.2, 4.8 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 6.15 (dd, J = 14.0, 6.4 Hz, 1H), 6.02 – 5.86 (m, 1H), 5.34 (s, 2H), 4.89 (s, 1H), 3.97 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 1.98 (s, 3H).



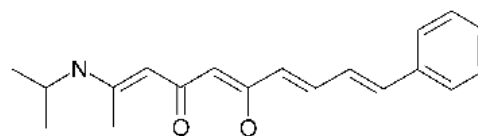
4. 48-isopropilamino [(2E,5Z,7E,9E)-6-hydroxy-2-(isopropylamino)-10-phenyldeca-2,5,7,9-tetraen-4-one]: Verim: 7%.

Hesaplanan analiz sonuçları (%), C₁₉H₂₃NO₂:

C, 76.73; H, 7.80; N, 4.71. Bulunan (%): C,

76.65; H, 7.74; N, 4.73. ¹H NMR (400 MHz,

DMSO) δ 15.05 (s, 1H), 10.25 (s, 1H).



5. **50-dimetilaminopropilamino [(2E,5Z,7E,9E)-2-((3-(dimethylamino)propyl)amino)-6-hydroxy-10-phenyldeca-2,5,7,9-tetraen-4-one].** Verim: 40%. M.p. = 121-123 °C.

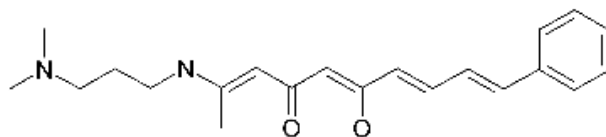
Hesaplanan analiz sonuçları (%),

C₂₁H₂₈N₂O₂: C, 74.08; H, 8.29; N,

8.23. Bulunan (%): C, 74.02; H, 8.24;

N, 8.19. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ

15.19 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 7.52 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.36 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.28 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.11 – 6.98 (m, 2H), 6.88 (dd, J = 15.4, 6.4 Hz, 1H), 6.15 (d, J = 14.0 Hz, 1H), 5.31 (s, 1H), 4.82 (s, 1H), 3.32 (dd, J = 13.0, 6.3 Hz, 2H), 2.25 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.13 (s, 6H), 1.99 (s, 3H), 1.75 – 1.57 (m, 2H).



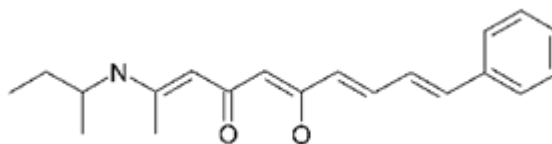
6. **51-sec-butilamino [(2E,5Z,7E,9E)-2-(sec-butylamino)-6-hydroxy-10-phenyldeca-2,5,7,9-tetraen-4-one.** Verim: 36%. M.p. = 159-162 °C. Hesaplanan analiz sonuçları (%), C₂₀H₂₅NO₂: C, 77.14; H, 8.09; N, 4.50. Bulunan (%): C, 77.22; H, 7.97; N, 4.46.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 15.05 (s, 1H), 10.30 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.36 (t, J = 7.5 Hz, 2H),

7.28 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.04 (dt, J =

14.3, 7.4 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 6.23 – 6.08 (m, 1H), 5.31

(s, 1H), 4.81 (s, 1H), 3.68 – 3.53 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.50 (dt, J = 14.0, 6.9 Hz, 2H), 1.16 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.89 (t, J = 7.3 Hz, 3H).



7. **52-isobutilamino [(2E,5Z,7E,9E)-6-hydroxy-2-(isobutylamino)-10-phenyldeca-2,5,7,9-tetraen-4-one]:** Verim: 45%.

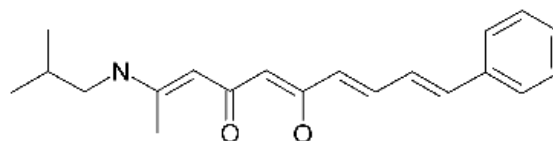
M.p. = 170-173 °C. Hesaplanan analiz

sonuçları (%), C₂₀H₂₅NO₂: C, 77.14; H,

8.09; N, 4.50. Bulunan (%): C, 76.96;

H, 8.01; N, 4.39. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 15.06 (s, 1H), 10.44 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.37 (dd, J = 14.1, 6.9 Hz, 2H), 7.28 (t, J = 7.3 Hz, 1H),

7.12 – 6.98 (m, 2H), 6.89 (t, J = 11.3 Hz, 1H), 6.27 – 6.03 (m, 1H), 5.32 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 3.15 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 1.99 (s, 3H), 1.78 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 0.94 (d, J = 6.7 Hz, 6H).



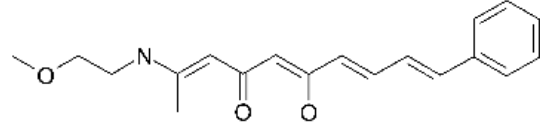
8. **53-2-methoksietilamino [(2E,5Z,7E,9E)-6-hydroxy-2-((2-methoxyethyl)amino)-10-phenyldeca-2,5,7,9-tetraen-4-one]:** Verim: 65%. M.p. = 153-155 °C. Hesaplanan

analiz sonuçları (%), C₁₉H₂₃NO₃: C,

72.82; H, 7.40; N, 4.47. Bulunan (%):

C, 72.89; H, 7.34; N, 4.49. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 15.15 (s, 1H),

10.30 (s, 1H), 7.52 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.37 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.28 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.14 – 6.96 (m, 2H), 6.98 – 6.80 (m, 1H), 6.16 (dd, J = 13.4, 6.8 Hz, 1H), 5.32 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 3.49 (d, J = 6.6 Hz, 4H), 3.30 (s, 3H), 2.00 (s, 3H).



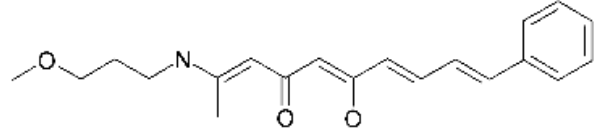
9. 54-metoksipropilamino [(2E,5Z,7E,9E)-6-hydroxy-2-((3-methoxypropyl)amino)-10-phenyldeca-2,5,7,9-tetraen-4-one]: Verim: 57%. M.p. = 106-107 °C. Hesaplanan

analiz sonuçları (%), C₂₀H₂₅NO₃: C,

73.37; H, 7.70; N, 4.28. Bulunan (%):

C, 73.45; H, 7.65; N, 4.25. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 15.18 (s, 1H),

10.30 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.59 – 7.47 (m, 2H), 7.36 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.28 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.15 – 6.97 (m, 2H), 6.89 (dd, J = 14.3, 7.6 Hz, 1H), 6.21 – 6.01 (m, 1H), 5.31 (s, 1H), 4.85 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 3.38 (dd, J = 10.8, 4.7 Hz, 4H), 3.25 (d, J = 2.4 Hz, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.78 (dd, J = 12.7, 6.2 Hz, 2H).



3.6. Amiloid fibril eldesi

3.6.1. İnsülin fibrillerinin eldesi

Protokol: 2 mg/mL insulin çözeltisi 0.1 M HCl çözeltisi içerisinde hazırlandı. Eppendorf Thermomixer ile 750 rpm hızla 65°C de karıştırılmaya bırakıldı. Fibril oluşumu Thioflavin T (Thio T) testi ile takip edildi. Thio T'nin amiloid fibriller ile etkileşimi sonucu floresans şiddetinde belirgin artış gözlenmektedir. Floresans şiddetindeki artışın platoya ulaştığı noktaya kadar sabit sıcaklıkta karıştırma işlemine devam edildi.

3.6.2. Lizozim fibrillerinin eldesi

Protokol: 10 mM lizozim çözeltisi 1 mM HCl asit çözeltisi içerisinde hazırlandı. Eppendorf Thermomixer ile 750 rpm hızla 65°C de karışmaya bırakıldı. Fibril oluşumu Thioflavin T (Thio T) testi ile takip edildi. Thio T'nin amiloid fibriller ile etkileşimi sonucu floresans şiddetinde

belirgin artış gözlenmektedir. Floresans şiddetindeki artışın platoya ulaştığı noktaya kadar sabit sıcaklıkta karıştırma işlemine devam edildi.

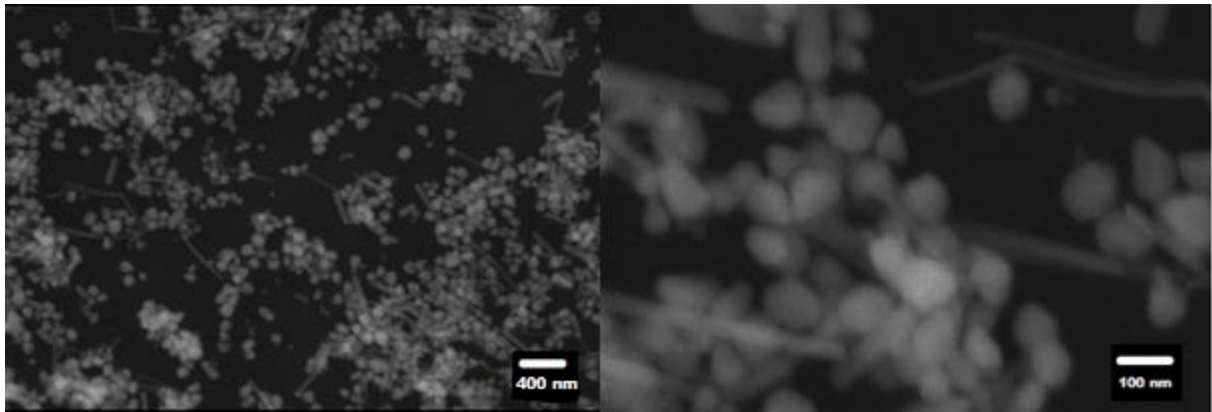
3.6.3. Thio T testi

Elde edilen amiloid fibrillerin oluşumunun tamamlanması Thio T testi ile takip edilmiştir. İnsülin fibrillerinin takibinde pH 7.9'da Tris-HCl tamponu içerisinde hazırlanan 40 μ M Thio T çözeltisi, lizozim fibrillerinin takibinde ise pH 7.4'de PBS tamponu içerisinde hazırlanan 2×10^{-3} M'lık Thio T çözeltisi kullanılmıştır. Proteinlerin karıştırma ve ısıtma işlemine başladıktan 90, 150, 240 ve 300 dakika sonra sabit oranda Thio T (2 μ l) ve fibril (25 μ l) karışımının tampon içerisindeki floresans emisyonu ölçülerek fibril oluşumu takip izlendi. Bu işleme floresans sinyalindeki artış sabit kalıncaya kadar devam edildi.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

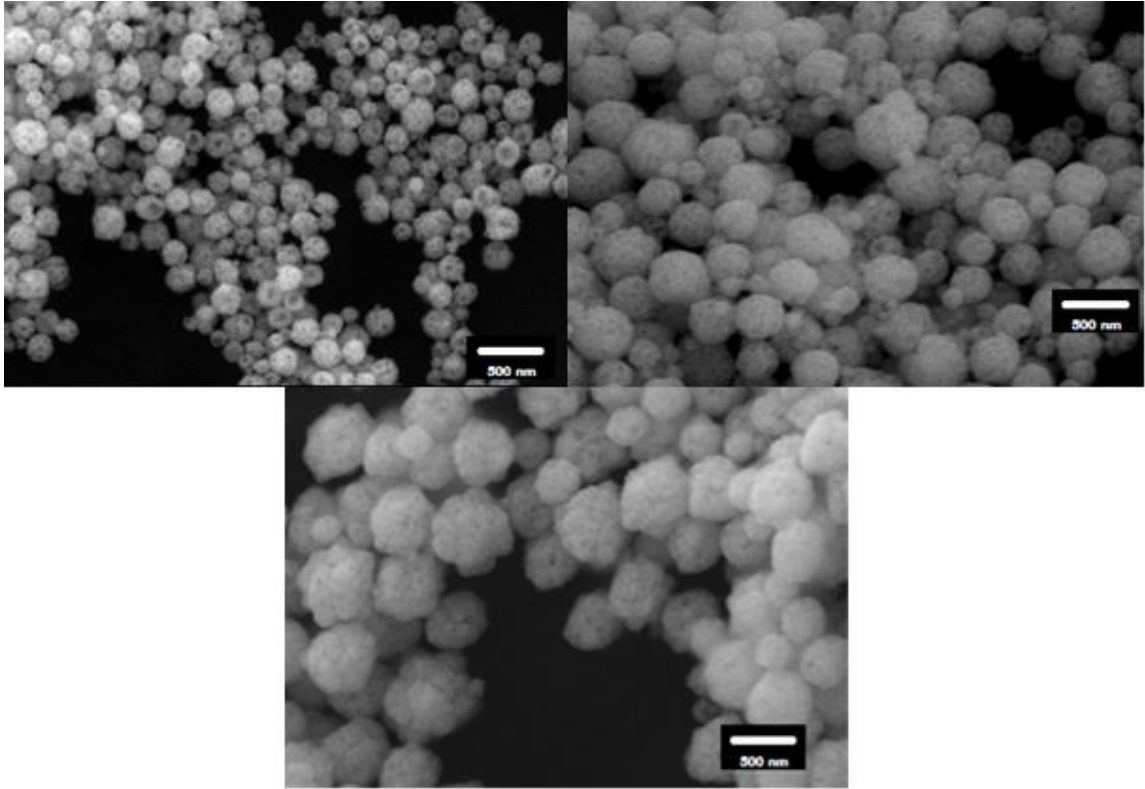
4.1. Gümüş nanopartiküller ve gümüş adacıklı filmlerin karakterizasyonu

Lee- Meisel yöntemi ile elde edilen AgNP'lerin büyük yüzdesi küresel yapılar olmakla beraber gümüş çubuklarda içerdiği gözlemlendi. Bu yöntem ile elde edilen AgNP'lerin SEM görüntüleri Şekil 6'da görülmektedir. Bu yöntem ile elde edilen taneciklerin büyüklüğü ortalama 40-50 nm olarak saptandı. Verimli ve kolay uygulanabilir bir yöntem olmakla beraber AgNP'lerin boyutlarının kontrollü sentezlenememesi bu yöntemin sınırlayıcı tarafıdır.



Şekil 6. Lee-Meisel protokolü ile elde edilen AgNP'ler

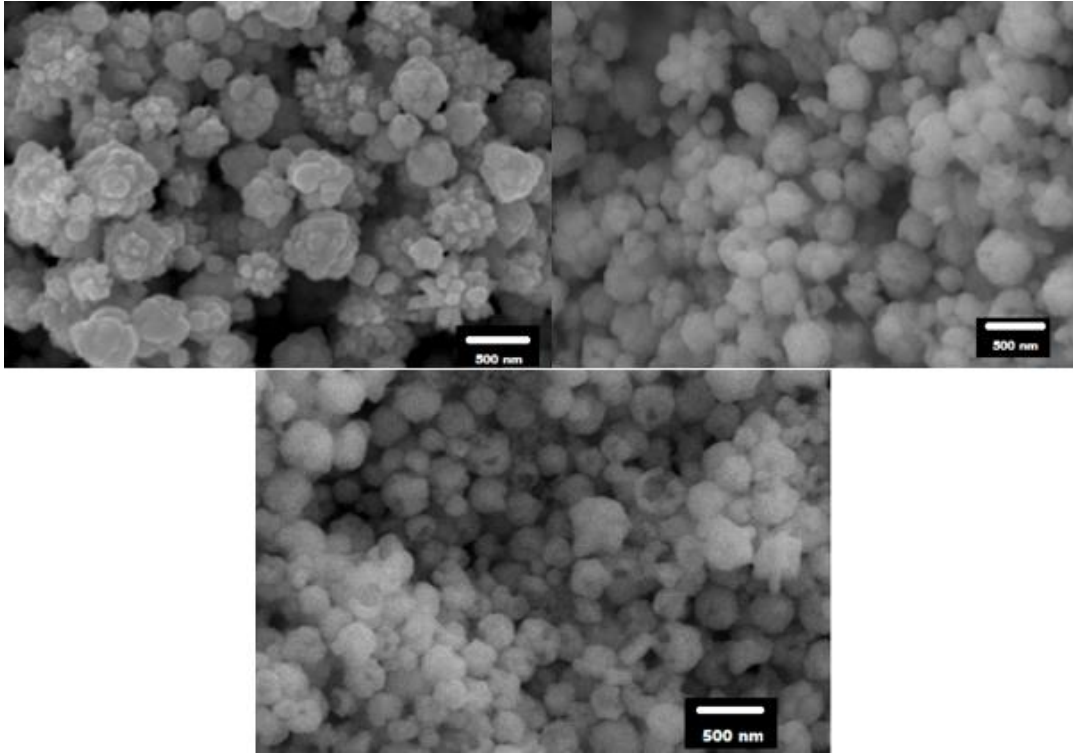
Formaldehit indirgemesi ile AgNP eldesinde kullanılan PVP, AgNO₃ ve NH₃ çözeltilerinin derişimleri tanecik büyüklüğüne etki etmektedir. Deneysel kısımda detaylı olarak verilmiş olan protokoller kullanılarak çeşitli boyutlarda partiküller elde edilmiştir. Farklı derişimlerde AgNO₃ kullanılarak elde edilen AgNP'lerin SEM görüntüleri Şekil 7'de görölmektedir. Farklı derişimlerde AgNO₃ kullanılarak elde edilen AgNP'lerin boyutları 80-350 nm arasında değışmektedir. Elde edilen partiküllerin küresel yapıda olduğı görölmektedir. Bu yöntem ile elde ettiğimiz AgNP'lerin literatürde rapor edilen boyutlardan daha büyük olduğı gözlandı. Partikül büyüklüğüne AgNO₃ çözeltilisinin başlangıç derişiminin önemli bir etkisi olduğı görölmektedir.



Şekil 7. Çeşitli derişimlerde elde edilen AgNP'lar

- a)** 0.2 mM AgNO₃ (sol üst)
- b)** 0.4 mM AgNO₃ (sağ üst)
- c)** 0.5 mM AgNO₃ (alt)

AgNO₃ derişimi sabit tutularak farklı miktarlarda PVP ve NH₃ varlığında elde edilen AgNP'lerde sıcaklık değişimi ile ciddi değişiklikler olduğu gözlemlendi. 30 °C'de elde edilen AgNP'lerin belirgin şekillere sahip oldukları fakat küresel yapılarını korumakla beraber yüzeylerde heterojenliğin arttığı gözlemlendi. Sıcaklık artışı ile beraber tanecik büyüklüğünde önemli ve düzenli bir artış olmamamakla beraber serbest koloidal yapıdan ziyade bütün bir gümüş tabakası şeklinde bir oluşum gözlemlendi. Yüksek sıcaklıkta reaksiyonun hızının artması nedeni ile koruyucu maddenin etkin olamadığı düşünülmektedir. Farklı sıcaklıklarda elde edilen partiküllerin SEM görüntüleri Şekil 8'de sunulmuştur.

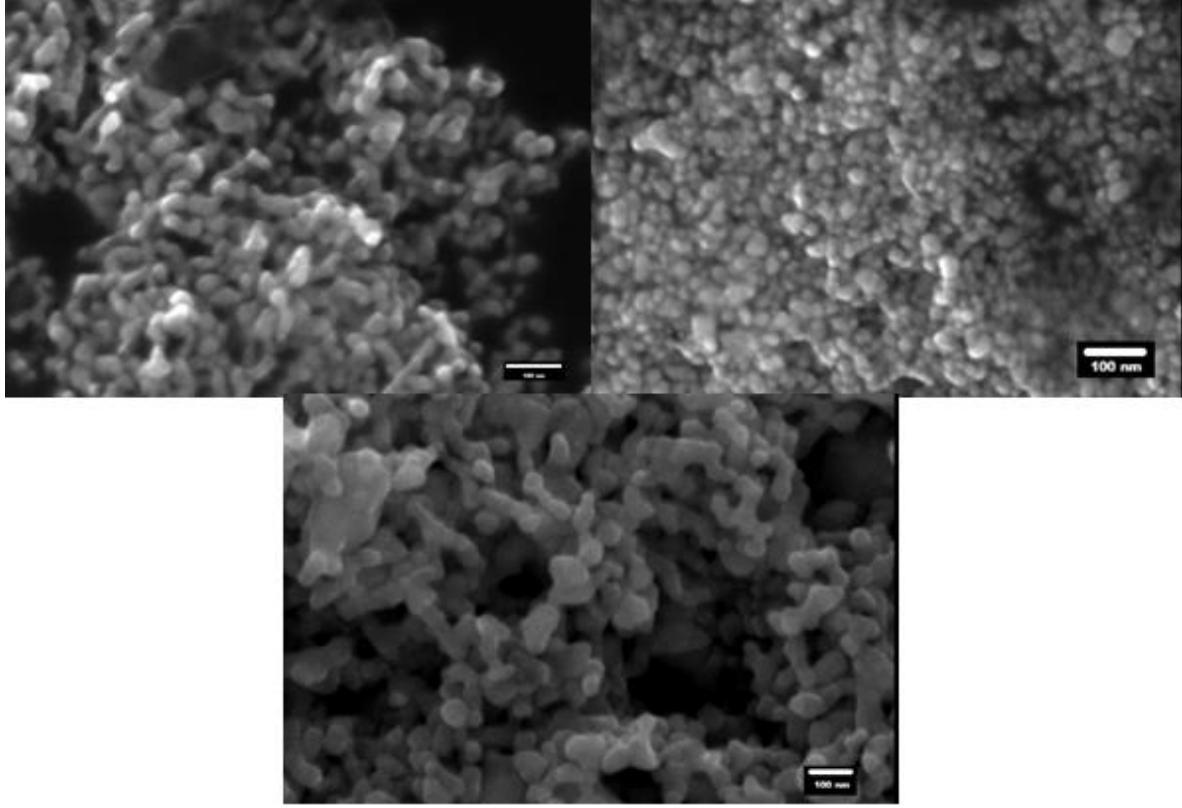


Şekil 8. Çeşitli derişimlerde elde edilen AgNP'lar

- a)** 2.5 mM AgNO₃, %1'lik PVP; 2.4 mL, %28 NH₃ (sol üst), 30 °C
- b)** 2.5 mM AgNO₃, %0.75'lik PVP; 2.4 mL, %28 NH₃, 40 °C (sağ üst)
- c)** 2.5 mM AgNO₃, %1'lik PVP; 12 mL, %28 NH₃, 60 °C (alt)

NaBH₄ indirgemesi ile AgNP eldesinde değişen derişimlerde AgNO₃ çözeltileri kullanıldı. Bu yöntem ile elde edilen AgNP'lerin tanecik boyutları 100 nm'nin altında olmakla beraber küresel yapıda serbest tanecikler gözlemlenemedi. Koruyucu madde olarak kullanılan PVA'nın yeterli olmadığı düşünülmektedir. Yaygın kullanılan koruyucu maddelerden PVP kullanıldığı

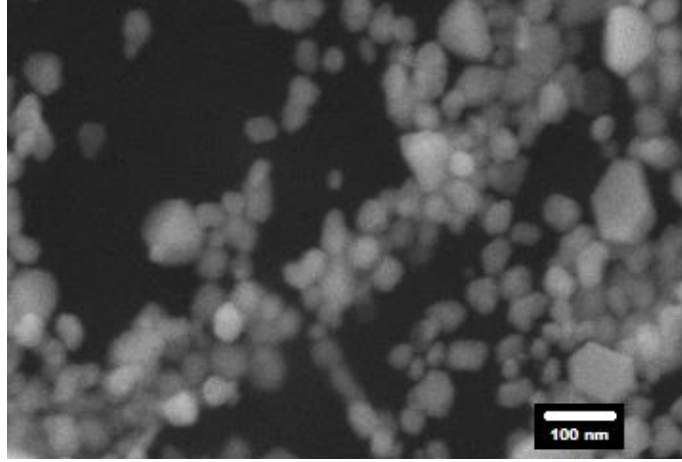
zaman ise bu yöntemle sonuç alınamamıştır. Çeşitli derişimlerde AgNO_3 çözeltisi kullanılarak elde edilen AgNP'lerin SEM görüntüleri Şekil 9'da görölmektedir.



Şekil 9. Çeşitli derişimlerde elde edilen AgNP'ler

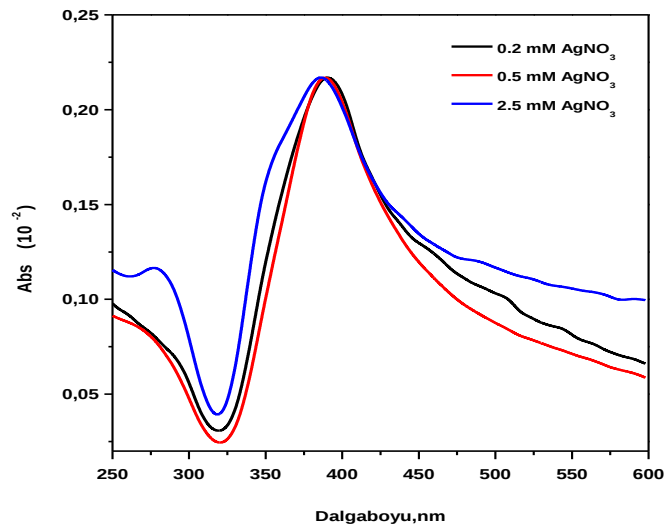
- a)** 1.25 mM AgNO_3 ;15 mM PVA (sol üst)
- b)** 2.5 mM AgNO_3 ;30 mM PVA (sağ üst)
- c)** 5 mM AgNO_3 ;60 mM PVA (alt)

Askorbik asit indirgemesi ile elde edilen ortalama AgNP büyüklüğünün 50-60 nm olduğu saptanmıştır. NP'lerin büyük çoğunluğu küçük boyutlu olmakla beraber ortalamanın üzerinde boyutlara sahip AgNP'lerin varlığı da dikkat çekmektedir. Askorbik asit indirgemesi ile elde edilen AgNP'lerin SEM görüntüleri Şekil 10'da görölmektedir.



Şekil 10. Askorbik asit indirgemesi ile elde edilen AgNP'ler

AgNP'lerin absorpsiyon maksimumlarının 350-400 nm aralığında olduğu bilinmektedir. Elde ettiğimiz partiküllerin absorpsiyon maksimumları yaklaşık 400 nm olarak gözlenmiştir. Çeşitli AgNO_3 derişimlerinde elde edilen partiküllerin absorpsiyon spektrumları Şekil 11'de görülmektedir. Çeşitli yöntemler ve deneysel koşullarda elde edilen koloidal AgNP'lerin çalışma şartları ve elde edilen partiküllerin ortalama büyüklükleri Tablo 2'de sunulmuştur.

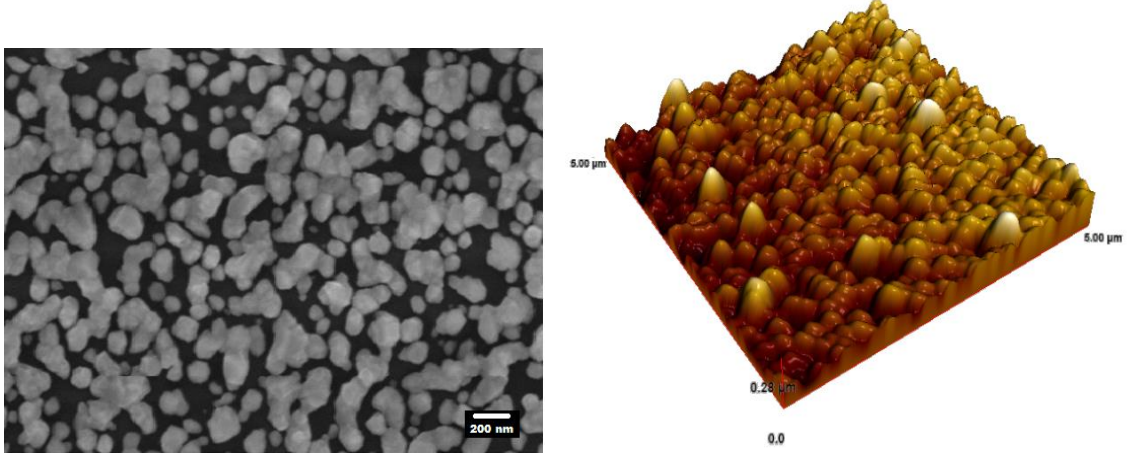


Şekil 11. Çeşitli derişimlerde AgNO_3 kullanılarak elde edilen AgNP'lerin absorpsiyon spektrumları

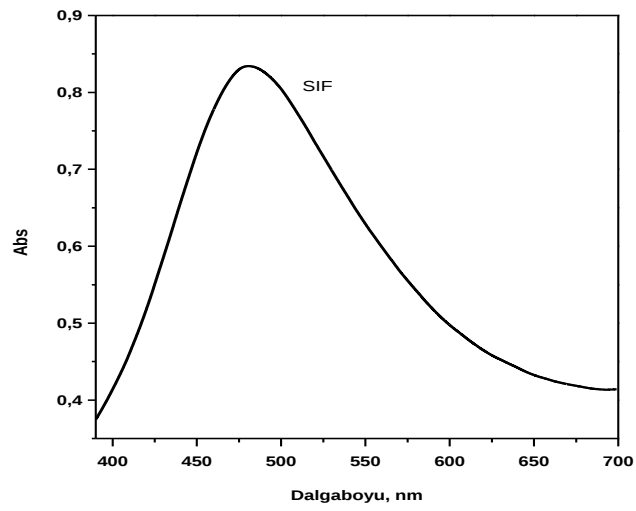
Tablo 2. Farklı metodlarla elde edilen gümüş kolloidlerin boyutları

Numara	AgNO ₃ (mM)	İndirgen Madde	Koruyucu Madde	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Sıcaklık (°C)
1	1.0	Trisodyum sitrat	-	40-50	100
2	0.2	Formaldehit	PVP	80-100	25
3	0.4	Formaldehit	PVP	150-200	25
4	0.5	Formaldehit	PVP	300-350	25
5	2.5	Formaldehit	PVP	250-300	25
6	2.5	Formaldehit	PVP	300-370	40
7	2.5	Formaldehit	PVP	250-300	60
8	1.25	NaBH ₄	PVA	>100	25
9	2.5	NaBH ₄	PVA	>100	25
10	5.0	NaBH ₄	PVA	>100	25
11	0.3	Askorbik asit	PVP	50-60	25

Elde edilen gümüş adacıklı filmlerin (SIF) yüzey görüntüleri SEM ve AFM ile gözlenmiştir. Yüzeylerin AFM ve SEM görüntüleri Şekil 12’de görülmektedir. SIF yüzeyler AgNP’ler ile benzer bant şekline sahip absorpsiyon bandı vermekle beraber absorpsiyon maksimumlarının daha uzun dalgaboyunda olduğu gözlenmektedir. Yüzeylerden elde edilmiş olan absorpsiyon spektrumu Şekil 13’de görülmektedir.



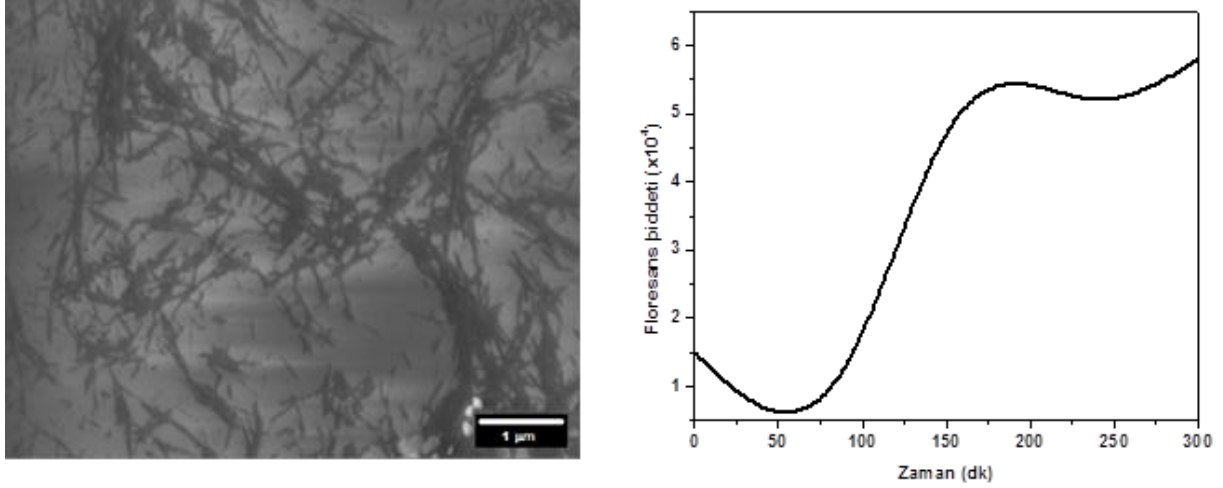
Şekil 12. SIF yüzeylerin SEM (sol)ve AFM (sağ) görüntüsü



Şekil 13. SIF yüzeylerin absorpsiyon spektrumu

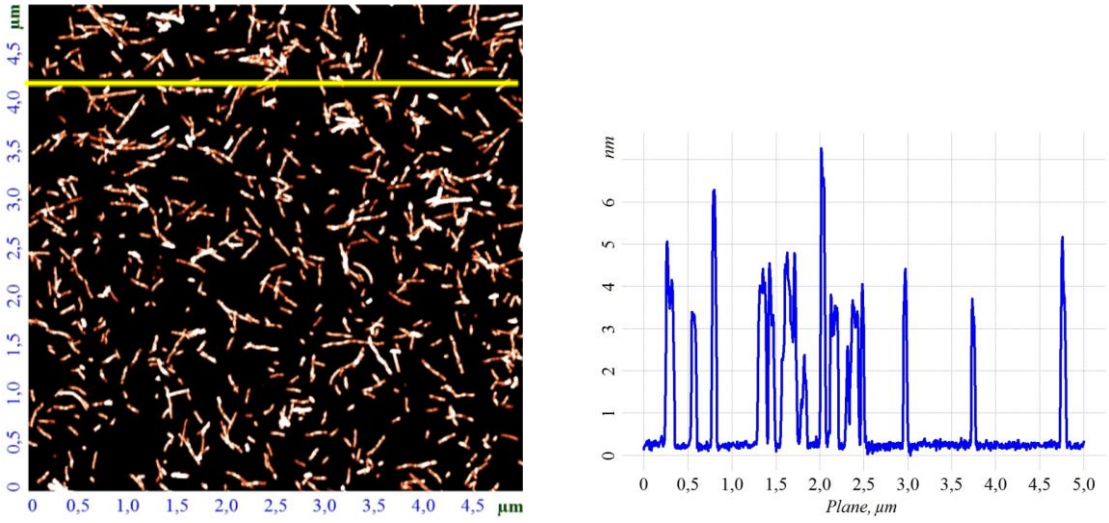
4.2. Amiloid fibril karakterizasyonu

Elde edilen insülin fibrilleri SEM, lizozim fibrilleri ise AFM ile karakterize edilmiştir. İnsülin fibrillerinin SEM görüntüsü ve Thio T testi ile takibini gösteren grafik Şekil 14’de görülmektedir. Yaklaşık olarak 150 dakikada insülin fibrillerinin oluşumunu tamamladığı görülmektedir.



Şekil 14. İnsülinde elde edilen amiloid fibrillerin SEM görüntüsü (sol); Fibrillerin Thio T testi ile kontrolü (sağ)

Deneyisel kısımda tarif edilmiş olan protokole göre elde edilen lizozim fibrillerinin AFM görüntüleri Şekil 15’de görülmektedir. Lizozim, çapları 3-5 nm, uzunluğu 0.1-0.6 µm arasında değişen kısa, düzlemsel agreagatlar oluşturmaktadır. Lizozim amiloid fibrillerinin oluşması durumunda ayrık fibriler kısımlar reaksiyonun ana ürünüdür. Lizozim amiloid agregasyonunda lateral agregasyon beklenmemektedir (Kovalska, 2017). Bizim elde ettiğimiz yapılarda da lateral agregasyonlu fibril kümeleri gözlenmemektedir.



Şekil 15. Lizozimden elde edilen amiloid fibrillerin AFM görüntüsü (sol); görüntünün Z profili (sağ)

4.3. Gümüş nanopartiküller (AgNP) ve gümüş adacıklı filmler (SIF) ile boyaların etkileşimi

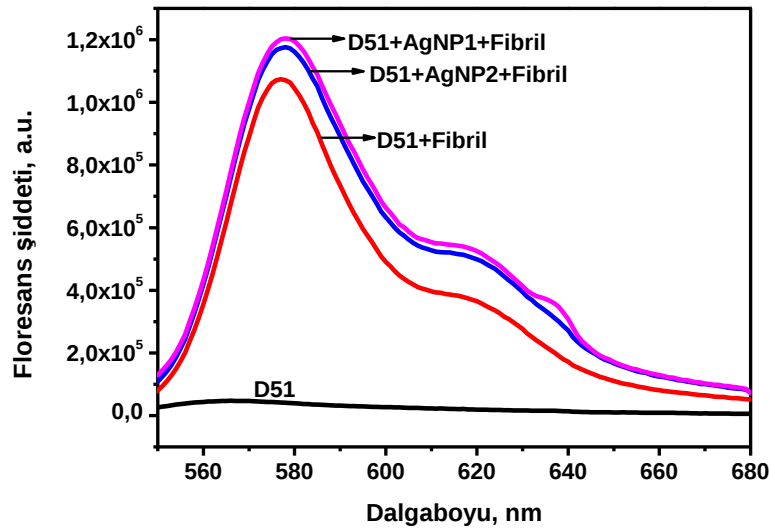
4.3.1. AgNP ve SIF varlığında siyanin boylarının fibriller ile etkileşimleri

Bu çalışma kapsamında deneysel kısımda molekül yapıları ve karakterizasyonları verilmiş olan yedi siyanin boyasının AgNP ve SIF varlığında fibriller ile etkileşimleri incelenmiştir. Koloidal yapıdaki AgNP'ler ile amiloid fibrillerin etkileşimi incelenirken farklı sentez yöntemleri ile elde edilen AgNP'lerin hepsi ile ön çalışma gerçekleştirilmiş buna karşın en düzgün spektrumların elde edildiği en homojen ve düzgün partikül şekline sahip olan partiküller detaylı çalışma için tercih edilmiştir. Bu nedenle formaldehit indirgemesi (80-100 nm) ve Lie-Miesel yöntemi (40-50 nm) ile elde edilen kolloidler değişik yoğunluklarda kullanılarak boya-fibril sistemleri ile etkileşimleri incelenmiştir.

Deneysel çalışmalar sonucunda koloidal yapıdaki AgNP'lerin fibril-boya sistemlerinin floresans sinyalinde analitik açıdan kayda değer bir artışa neden olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen floresans spektrumları boya-fibril sistemlerinin Ag kolloidlere tutunmadığını göstermektedir. Bu sonuca varmamızın nedeni MEF'in uzaklığa bağımlılığından kaynaklanmaktadır. MEF çalışmalarında, belirli bir uzaklığın altında metallerin (~ 5nm) floresans şiddetinde sönüme neden olduğu ve belirli bir uzaklığın üzerinde de (genellikle ~ 20

nm) metalin floresan problemler ile etkileşime giremediği gözlenmiştir. D51 kodlu boyanın iki farklı yöntemle sentezlenmiş olan AgNP varlığında gösterdiği floresans emisyon spektrumu Şekil 16'da görülmektedir.

Boyaların yüzeye kolay tutunabilmesi için en iyi yüzey aktivasyon ajanlarından APS ile yüzeyler aktive edilmiştir. Fakat yüzey aktivasyonundan sonra reaktifin fazlasını uzaklaştırmak için yapılan yıkama işlemlerinden sonra koloidal yapının bozulduğu gözlenmiştir. Bu nedenle yüzeyleri aktive edilmemiş AgNP'ler deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Diğer boyalardan da AgNP varlığında benzer sonuçlar elde edilmiştir.



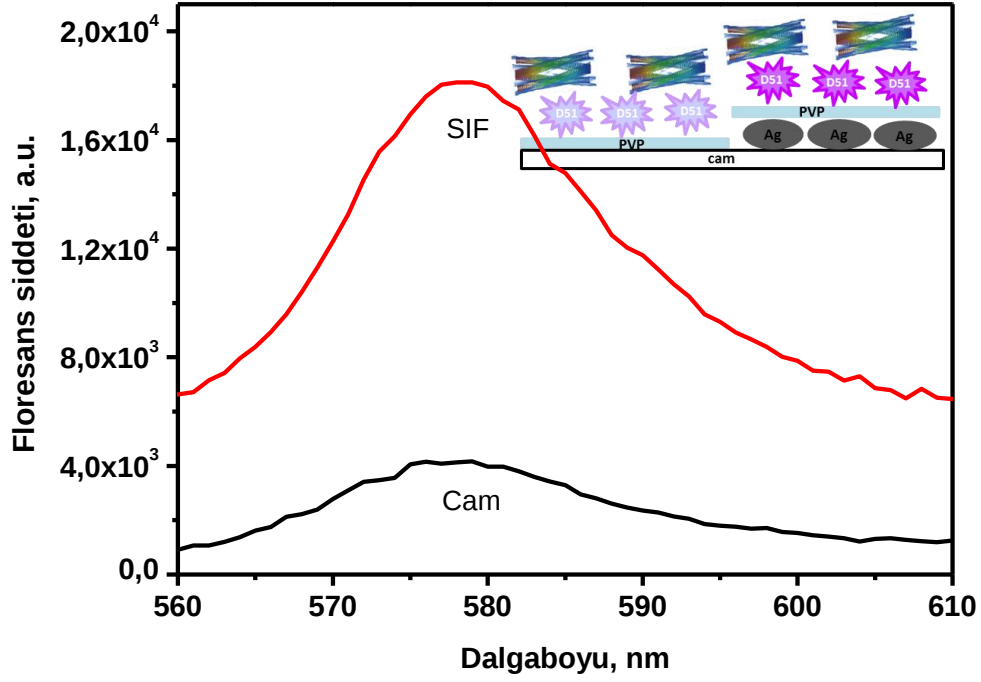
Şekil 16. D51-amiloid fibril sisteminin serbest ve AgNP'ler varlığında emisyon spektrumu (AgNP1: Lee-Miesel yöntemi; AgNP2: Formaldehit indirgemesi)

Gümüş adacıklı filmler (SIF) koloidal AgNP'lere avantajlı bir alternatif oluşturmaktadır. SIF yüzeyleri koloidal yapıdaki parçacıklara göre bir desteğe tutunmuş olmalarından dolayı çalışma kolaylığı ve daha yüksek kararlılık göstermektedir. Boyaların ve incelenecek olan biyomoleküllerin (protein, nükleik asit vb.) AgNP'lere bağlanması sürecinde yapılan yıkama ve santrifüj işlemleri koloidal yapıların bozulması riskini taşımakla beraber SIF yüzeyler bu basamakta kolay kullanılabilirlik açısından önemli bir fark yaratmaktadır. Ayrıca yüzeylerin

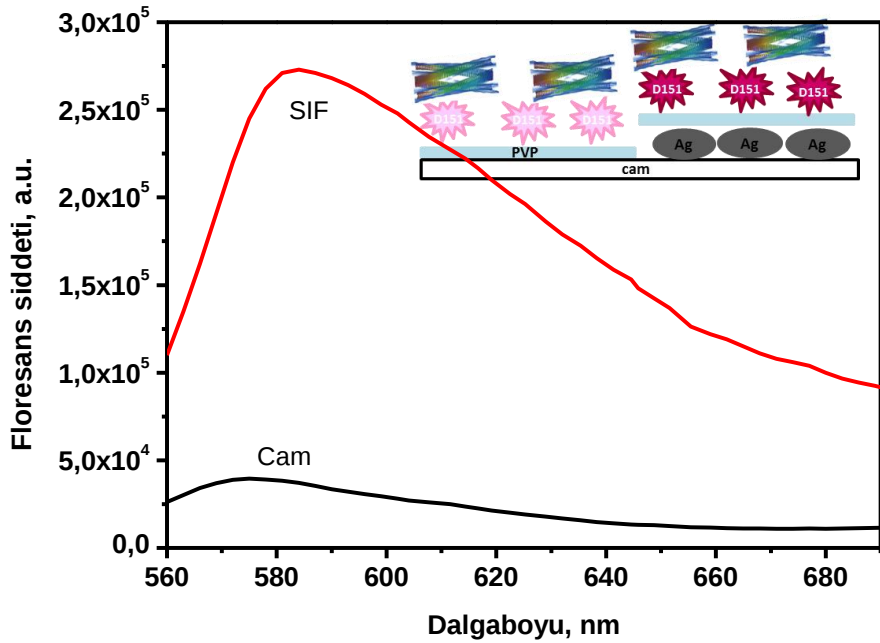
kolay yıkanabilirliği serbest haldeki boya ve biyomolekölün kolaylıkla uzaklaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Bu avantajlar SIF yüzeyleri cazip kılmaktadır.

Deneyisel çalışmalarda kullanılan yedi siyanin boyasının SIF yüzeyler üzerinde amiloid fibriller ile etkileşimi incelenmiştir. SIF yüzeyleri ve kontrol cam yüzeyleri boya ve fibril ile etkileştirilmeden önce PVP ile kaplamıştır. PVP ile kaplamada iki konuda fayda beklenmektedir. Birincisi MEF'in mesafeye olan bağımlılığı bilindiği için metalik yüzey ile floresan prob arasına mesafe sağlamak ikincisi ise floresan probun yüzeye daha yüksek verim ile bağlanmasını sağlamaktır. Yüzeyler boya ve fibril ile etkileştirilmeden önce 1 saat süre ile PVP çözeltisine daldırılmıştır. Bu işlemde sonra boyanın yüzeylere immobilizasyonu için yüzeyler boya ile yarım saat karanlıkta etkileştirilmiştir. Serbest boyanın saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmasından sonra amiloid fibril yüzeyler ile etkileştirilerek floresans emisyon ölçümleri alınmıştır.

Deneyisel çalışmalar sonucunda MEF probu olarak incelenen siyanin boyalarından D-51, D-151 ve SH-395 kodlu üç boyanın SIF varlığında analitik açıdan anlamlı emisyon genişlemesi gösterdiği bulunmuştur. D-51 ve D-151 boyaalarının her ikisi de trimetin siyanin boya grubuna dahil olup aynı köprü grubu içermektedir. Buna karşın D-51 boyası yalnızca N-, D-151 boyası ise N,N'- pozisyonlarından türevlendirilmiştir. N,N'- pozisyonlarından türevlendirilmiş olan D-151 boyasının floresans sinyalinde yaklaşık 7 kat artış gözlenirken, N- pozisyonundan türevlendirilmiş olan D-51 boyasının floresans emisyon şiddetinde yaklaşık 5 kat artış gözlenmiştir. D-51 ve D-151 boyaalarının SIF yüzeyler ve kontrol cam yüzeyler üzerinde amiloid fibril ile etkileşiminden elde edilen floresans emisyon spektrumları ile amiloid fibril ve boyaaların yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi Şekil 17 ve 18'de görülmektedir.

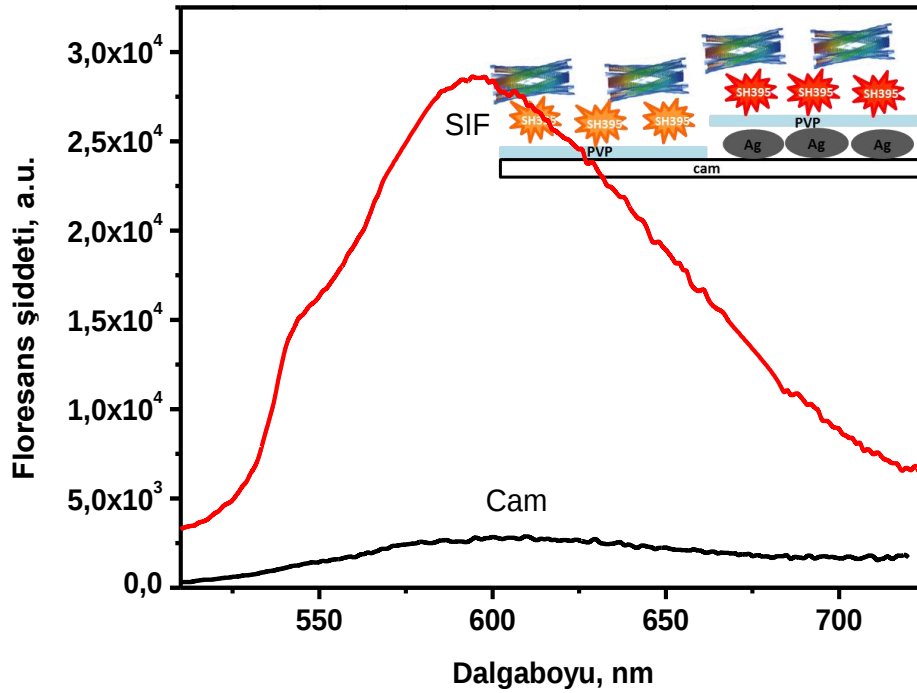


Şekil 17. D51-amiloid fibril sisteminin cam ve SIF üzerindeki emisyon spektrumu ve amiloid fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi



Şekil 18. D151-amiloid fibril sisteminin cam ve SIF üzerinde ki emisyon spektrumu ve amiloid fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi

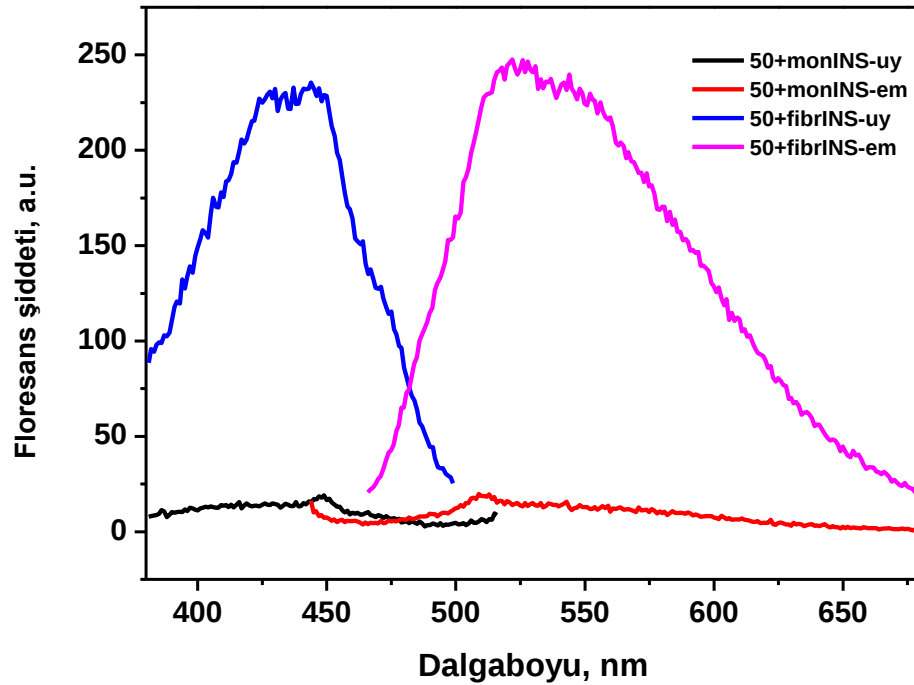
Momometin siyanin boya grubuna ait olan SH-395 kodlu boya ile ise yaklaşık 10 kat artış gözlenmiştir. İncelenen boyalar arasında en yüksek emisyon genişlemesi SH-395 ile elde edilmiştir. Sulu çözeltisinde hemen hemen en düşük kuantum verimine sahip olan SH-395 boyası ile en yüksek artışın gözlenmesi MEF’da ışımalı geçiş hızının değişmesi ile açıklanabilir. SH-395 boyasının SIF yüzeyler ve kontrol cam yüzeyler üzerinde amiloid fibril ile etkileşiminden elde edilen floresans emisyon spektrumları ile amiloid fibril ve boyaların yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi Şekil 19’da görülmektedir. İncelenen boyalardan SL-1867 ile ise artış gözlenmekle birlikte analitik açıdan kayda değer bir sonuç elde edilememiştir. İncelenen D-150, D-35 ve T-49 kodlu diğer üç siyanin boyasında ise SIF yüzeyler üzerinde kontrol cam yüzeylere oranla anlamlı bir emisyon artışı gözlenmemiştir.



Şekil 19. SH-395-amiloid fibril sisteminin cam ve SIF üzerindeki emisyon spektrumu ve amiloid fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi

4.3.2. β -ketoenole boyalarının monomerik ve fibriler insulin ve lizozim varlığında spektral özelliklerinin incelenmesi

Yapılan bazı çalışmalarda β -ketoenol boyalarının da amiloid fibril tayininde kullanıldığı görülmektedir. Projemiz kapsamında dokuz tane β -ketoenol boyasının floresan karakterleri ve amiloid fibril tayininde MEF probu olarak kullanıma olasılıkları incelenmiştir. Sentezlenen β -ketoenol boyalarının floresan karakterleri serbest halde, monomerik ve fibriler insulin ve lizozim varlığında incelenmiş ve elde edilen değerler Tablo 1'de sunulmuştur. Elde edilen boyaların serbest haldeki uyarılma dalgaboyları 414 - 428 nm arasında, emisyon dalgaboyları ise 530 - 607 nm arasında değişmektedir. Monomerik insulin varlığında β -ketoenol boyalarının uyarılma dalgaboyları 413 - 427 nm, fibriler insulin varlığında ise 430 - 441 nm aralığında olduğu gözlenmiştir. Monomerik ve fibriler insülin varlığında emisyon dalgaboyları ise sırası ile 522 - 607 nm ve 524-588 nm arasında değişmektedir. Monomerik ve fibriler lizozim varlığında emisyon dalgaboyları ise sırası ile 525 - 571 ve 517 - 560 nm arasında değişmektedir. 50-dimetilaminopropilamino türevinin uyarılma ve emisyon spektrumu Şekil 20'de görülmektedir.



Şekil 20. Monomerik ve fibriler insulin varlığında 50-dimethylaminopropylamino türevinin uyarılma ve emisyon spektrumu

Boyalar üzerine fibriler insülin eklenmesi sonucu ketoenol boyalarının çoğunda (alilamino, isopropilamino, dimetilaminopropilamino, sec-bütilamino, isobütilamino ve metoksietilamino grubu içeren) 20 nm'ye kadar kırmızıya kayma gözlenmiştir. Metoksipropilamino grubu içeren türevde ise fibriler yapıda lizozim eklenmesi sonucu uyarılma dalgaboyunda 25 nm'ye kadar kırmızıya kayma gözlenmiştir. Propilamino, alilamino, sec-bütilamino ve isobütilamino içeren boyalarda fibriler insulin veya lizozim eklenmesi sonucu emisyon dalgaboylarında 25 nm'ye kadar maviye kayma gözlenmiştir. β -ketoenol boyalarının çoğunda serbest halde 109-192 nm, fibriler insulin varlığında 87 - 157 nm veya fibriler lizozim varlığında 76 - 147 nm arasında değişen miktarlarda geniş Stokes kaymaları gözlenmiştir. Gözlenen bu geniş Stokes kaymaları β -ketoenol boyalarına amiloid fibril tayini için önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Tablo 3. β -ketoenol boyalarının monomerik veya fibriler insülin varlığındaki floresans spektral özellikleri

Boya	Serbest boya			mon INS			fibr INS			
	λ_{ex}, nm	λ_{em}, nm	$I_0, a.u.$	λ_{ex}, nm	λ_{em}, nm	$I^M, a.u.$	λ_{ex}, nm	λ_{em}, nm	$I^F, a.u.$	I^F / I_m
13	427	542	1.7	413	542	3,7	441	528	80	22
14	426	539	1.3	426	539	1,6	430	545	97	61
47	415	545	2.6	415	433/607	4,7/7,3	436	528	49.7	8
48	417	530	6.6	419	546	5,4	437	530	45.5	8
50	414	523	0.8	427	526	2	436	524	25	13
51	417	554	5.5	415	539	6,8	437	528	20.9	3
52	414	545/606	7.5/15	415	553	6,2	435	535	17	3
53	415	535	0.7	427	522	4,3	434	525/591	22	5
54	428	560	3.6	420	536	4,9	436	545/588	33.7/39.6	8

Tablo 2. β -ketoenol boyalarının monomerik veya fibriler lizozim varlığındaki floresans spektral özellikleri

Boya	Serbest boya			mon LYZ			fibr LYZ			
	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	I_0 , a.u.	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	I^M , a.u.	λ_{ex} , nm	λ_{em} , nm	I^F , a.u.	I^F/I_M
13	427	542	1.7	427	525	17,7	441	517	10	
14	426	539	1.3	426	540	10	427	540	37	4
47	415	545	2.6	410	541	1,9	426	532	5,9	3
48	417	530	6.6	419	531	4,7	420	560	4,5	1
50	414	523	0.8	427	526	7,7	426	522	27,7	4
51	417	554	5.5	415	543	10	415	543	8,5	
52	414	545/606	7.5/15	415	571	9,3	408	555	9,2	
53	415	535	0.7	423	525	2,6	440	526	22,7	9
54	428	560	3.6	427	525	17,7	441	517	10	

mon – ilgili proteinin monomerik formu

fibr- ilgili proteinin fibriler formu

λ_{ex} , λ_{em} – floresans uyarılma ve emisyon dalga boyu

I_0 – serbest boyanın floresans şiddeti

I_M – monomerik formdaki insülin ve lizozim varlığında boyanın floresans emisyon şiddeti

I_F – fibriler formdaki insülin ve lizozim varlığında boyanın floresans emisyon şiddeti

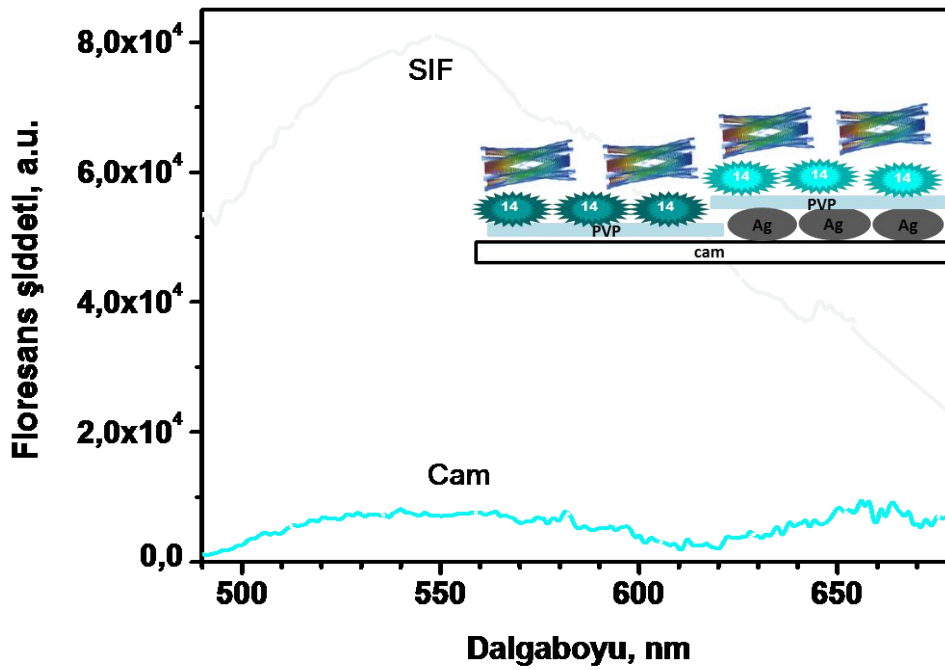
I_F/I_M – ilgili protein varlığında emisyonda elde edilen artış oranı

a.u. - arbitrary units

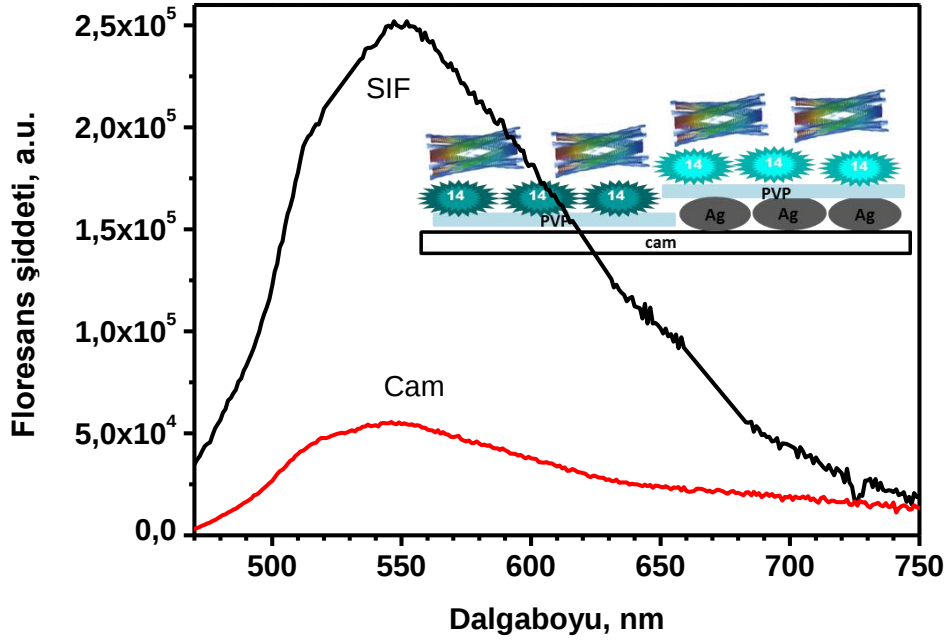
İncelenen boyaların hepsi serbest halde 1.2 - 6.6 a.u. arasında değişen çok zayıf floresans emisyonları göstermektedir. Yalnızca 52-isobutilamino boyası 15 a.u. şiddetinde floresans emisyonuna sahiptir. Monomerik insülin varlığında 0.7 - 6 kat arasında değişen oranlarda floresans şiddetlerinde artış gözlemlendi. Monomerik insülin varlığında dimetilaminopropilamino ve isobutilamino içeren boyaların floresans emisyonlarında ise azalma gözlemlendi. Fibriler insülin varlığında boyaların floresans emisyonlarında 3 - 61 kat artış gözlemlendi. Fibriler protein varlığında kısa, dallanmasız fonksiyonel gruplar içeren boyaların (propilamino ve hidroksietilamino) en yüksek artış oranını gösterdiği saptandı. Bu boyalardan sırası ile 22 ve 61 kat artış elde edildi. Ayrıca alilamino, isopropilamino, dimetilaminopropilamino ve metoksi propilamino grupları içeren boyalar ile de 8 - 13 kat

arasında değişen yüksek artışlar gözlemlendi. Boyaların fibriller lizozim ve fibriller insülin varlığındaki davranışları karşılaştırıldığında insülin fibrillerine karşı daha hassas oldukları gözlemlendi.

β -ketoenol boyalarının SIF yüzeyler varlığında amiloid fibril tayininde MEF probu olarak kullanılabilirliği incelenmiştir. Çalışmalarda yine yüzeyler prob ve fibril ile etkileştirilmeden önce PVP ile kaplanmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda yalnızca 14 ve 54 kodlu boyalarda SIF varlığında floresans emisyonunda cam yüzeylere göre artış elde edilmiştir. 14 kodlu boyanın floresans emisyonunda insülin fibril ve lizozim fibril varlığında SIF yüzeyler üzerinde yaklaşık sırası ile 10 kat ve 5 kat artışlar elde edilmiştir. 14 kodlu boyanın SIF yüzeyler ve kontrol cam yüzeyler üzerinde insülin ve lizozim fibril ile etkileşiminden elde edilen floresans emisyon spektrumları ile amiloid fibril ve boyaların yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi Şekil 21 ve 22’de görölmektedir.

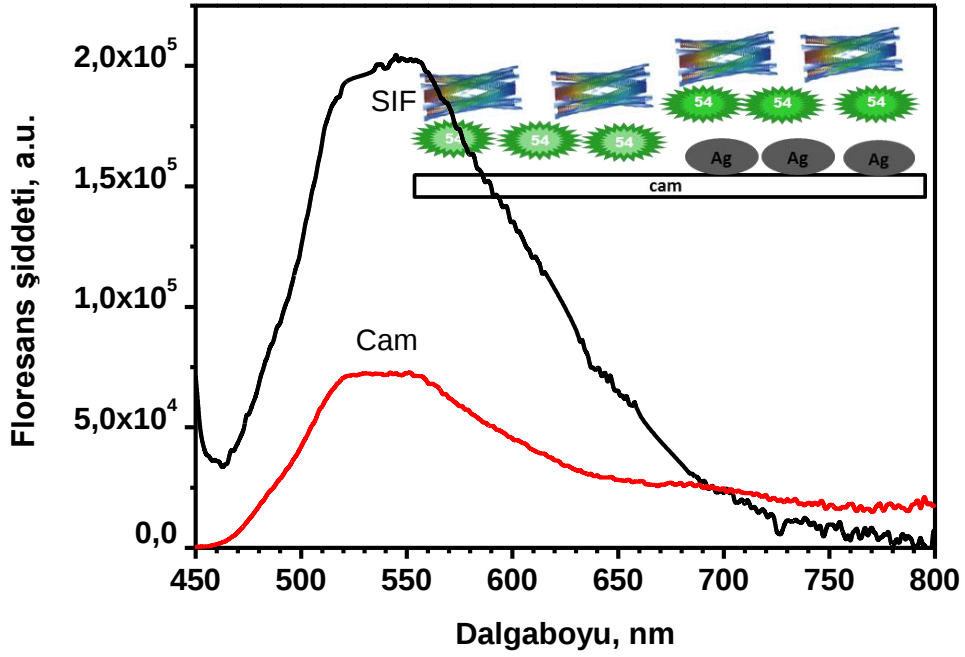


Şekil 21. Boya 14-fibriller insülin sisteminin cam ve SIF üzerindeki emisyon spektrumu ve fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi

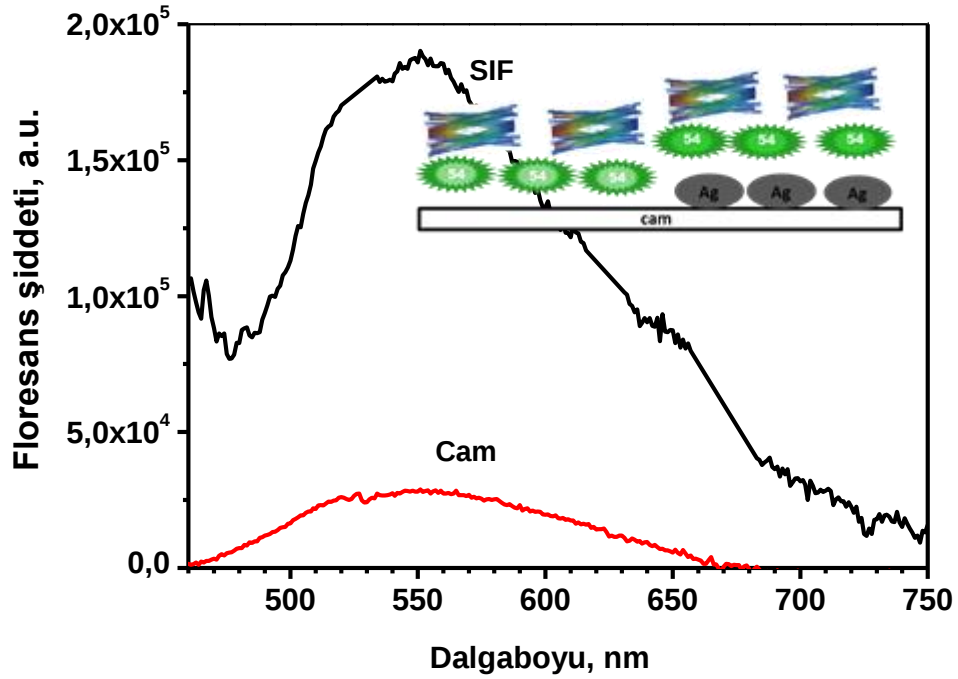


Şekil 22. Boya 14-fibriler lizozim sisteminin cam ve SIF üzerindeki emisyon spektrumu ve fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi

Boya 54 ise fibriler insülin varlığında SIF yüzeyler üzerinde ortalama 6 kat, lizozim fibril varlığında ise floresans emisyon şiddetinde kontrol yüzeylere oranla 3 kat artış göstermiştir. Boya 54'ün SIF yüzeyler ve kontrol cam yüzeyler üzerinde insülin ve lizozim fibril ile etkileşiminden elde edilen floresans emisyon spektrumları ile amiloid fibril ve boyaların yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi Şekil 23 ve 24'de görülmektedir.



Şekil 23. Boya 54-fibriler insülin sisteminin cam ve SIF üzerindeki emisyon spektrumu ve fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi



Şekil 24. Boya 54-fibriler lizozim sisteminin cam ve SIF üzerindeki emisyon spektrumu ve fibril ile boyanın SIF ve cam yüzeylere immobilizasyonunun şematik gösterimi

Her iki β -ketoenol boyası da SIF yüzeyler üzerinde fibriler insülin ile fibriler liozime oranla iki kat fazla artış göstermiştir. Sulu çözelti ortamında da boyaların fibriler insülin ile daha kuvvetli etkileşim göstermesi deneysel sonuçların tutarlılığını desteklemektedir. Buna karşın SIF yüzeyler üzerinde analitik açıdan önemli miktarda artış gösteren boya 14'ün sulu çözeltilerinde de fibril ile etkileşim sonrası floresans emisyonunda yüksek artış göstermesi MEF probu olarak tercihini azaltmaktadır. Bunun yanısıra burada dikkate alınması gereken nokta SIF yüzeyler üzerindeki emisyon artışının fibril varlığındaki artışa ek olarak gerçekleşmiş olmasıdır.

5. SONUÇLAR

Güncel çalışmalara baktığımızda nörodejeneratif hastalıklarla ilgili çok fazla çalışma bulunmaktadır. Buna karşın tanı ve tayinlerine yönelik ilerlemenin oldukça yavaş olduğunu görmekteyiz. Nörodejeneratif hastalıklardan son yıllarda adını en çok duyduğumuz Alzheimer Hastalığına (AH) daha yakından bakacak olursak 2015 yılından itibaren ortaya çıkmaya başlayan sonuçlar hastalığın tanısında izlenecek yeni yolları işaret etmektedir. Kesin tanısı yalnızca otopsi sırasında yapılabilen AH'nın erken teşhisinde beyin omurilik sıvısında (BOS) yapılan çalışmaların kullanılabileceği görülmektedir. Çalışmalar AH'nın üç biyobelirteci olarak kabul edilen amiloid beta, toplam tau ve fosforilize tau tayinini hedef almaktadır. Klinik teşhisde henüz rutin olarak kullanılmaya başlanmamış olsa da BOS'da yapılan biyobelirteç tayinleri en muhtemel tanı yol olarak görülmektedir. Bu çalışmalar biyobelirteçlerin tek başlarına tayinleri kadar biyobelirteçlerin zaman içerisinde miktarlarının birbirlerine oranının hastalığın kesin teşhisi ve evre tayininde kullanılabileceğini göstermektedir (Huynh ve Mohan, 2017). Bu noktada ise tayin yöntemlerinin analitik açıdan duyarlılığı devreye girmektedir. Otopsi sırasında elde edilen miktarlara oranla çok daha düşük seviyelerde amiloid içeren BOS içerisinde amiloidin miktarını veya göreceli olarak oranını tayin etmek çok daha zor olacaktır. Projemiz kapsamında elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda incelenen floresan probalar arasında sulu ortamda kuantum verimi en düşük boyalardan biri olan SH-395 kodlu boyanın en yüksek floresans emisyon artışı gösterdiği görülmektedir. Bu sonuç metal genişletilmiş floresans yöntemi ile düşük amiloid fibril derişimlerinde klasik floresans prob uygulamalarına göre daha verimli sonuçlar alabileceğimizi göstermektedir.

Son bir kaç yılda amiloid fibrillerin tayininde kullanılan floresan problemler olarak okzazin, BODIPY, kurkumin, styryl, fluorescein ve benzotiyazol türevleri literatürde yer almaktadır (Rajasekhar ve ark., 2017). Bu problemlerin ortak dezavantajı ise seçimli olmamalarıdır. Deneysel sonuçlarımız gözönüne alındığında incelen β -ketoenol boyalarından 14 ve 54 kodlu boyaaların insülin fibriller yapılarına lizozim fibriller yapılarına oranla iki kat daha hassas olduğu görülmektedir. Bu sonuç tam olarak bir seçimlilik ifade etmese de bu boyaaların yapıları üzerinden yeni boyalar geliştirilmesi gerektiğini işaret etmektedir. İncelenen siyanin boyaalarının yapılarına bakıldığında zaman ise birbirine çok benzer yapıda olan D-150 boyası ve D-151 boyaalarının birinin amiloid tayini için MEF probu olarak kullanılabilirliği değerinin ise kullanılamaması şaşırtıcı ve olumlu bir sonuçtur. Problemlerin yapı formüllerine bakıldığında birbirine çok benzer yapılardan biri floresan prob olarak kullanılabilirken değerinin etkin olmadığı görülmektedir. Problemlerin yapılarındaki küçük değişikliklerin amiloidler ile etkileşimlerde büyük değişikliklere neden oluyor olması seçimli problemlerin dizaynı için umut vadetmektedir. Bu durumun nedeninin tam olarak anlaşılabilmesi için uyarılmış enerji düzeyinde gerçekleşen etkileşimlerin fotokimyasal yönden incelenmesi gerekmektedir. Amiloid fibrillerin etkili tayini için seçimli problemlerin dizaynında daha hızlı yol alınabilmesi için bu etkileşimlerin aydınlatılması çok önemli olmakla birlikte floresans çalışmalarının farklı bir alanını oluşturmakta ve farklı cihazlar gerektirmektedir. Bu durumun grubumuz adına en sınırlayıcı noktalardan biri olduğunu söyleyebiliriz. Buna karşın çalışmalarımız bu yönde planlanmaktadır.

6. REFERANSLAR

- Abramenko, P.I., Ponomareva, T.K., 1972, "Polymethine dyes-Indolo[3,2-d]thiazole derivatives", *Chem. Heterocycl. Comp.*, 8, 1455-1459.
- Aslan, K., Leonenko, Z., Lakowicz, J.R., Geddes, C.D., 2005, "Annealed Silver-Island Films for Applications in Metal-Enhanced Fluorescence: Interpretation in Terms of Radiating Plasmons", *Journal of Fluorescence*, 15, 643-654.
- Baxa, U., Wickner, R.B., Steven, A.C., Anderson, D.E., Marekov, L.N., Yau, W.M., Tycko, R. 2007. "Characterization of beta-sheet structure in Ure2p1-89 yeast prion fibrils by solid-state nuclear magnetic resonance", *Biochemistry*, 46 (45), 13149-13162.
- Becaro, A.A., Jonsson, C.M., Puti, F.C., Siqueira, M.C., Mattoso, LHC., Correa, D.S.,

- Ferreira, M.D., 2015, "Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans", *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.*, 3, 22-29.
- Chan, J.C. 2011. "Solid-State NMR Techniques for the Structural Determination of Amyloid Fibrils", *Topics in Current Chemistry*, 2011, 1.
- Chaudhuri, T.K., Paul, S. 2006. "Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches" *FEBS Journal*, 273, 1331-1349.
- Cooper, G.J., Willis, A.C., Clark, A., Turner, R.C., Sim, R.B., Reid, K.B. 1987. "Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84 (23), 8628-8632.
- Glennner, G.G., Wong, C.W., 1984. "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120 (3), 885-90.
- Glennner, G.G. 1980. "Amyloid deposits and amyloidosis", *The New England Journal of Medicine*, 302, 1283-1292.
- Gines, G., Saint-Pierre, C., Gasparutto, D. 2014. "On-bead fluorescent DNA nanoprobe to analyze base excision repair activities", *Analytica Chimica Acta*, 812, 168-175.
- Gryczynski, Z., Borejdo, Z., Calander, J. N., Matveeva, E.G., Gryczynski, I. 2006. "Minimization of detection volume by surface plasmon-coupled emission", *Analytical Biochemistry*, 356, 125–131.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. 2004. "Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, (22), 8342-8347.
- Hamer, F.M., 1928, "Carbocyanine dyes with substituents attached to the three-carbon chain", *J. Chem. Soc. , CCCCXVIII.*, 3160-3163.
- Hamer, F. M., 1964, "The Cyanine Dyes and Related Compounds", Wiley: New York, Chapter IV, 148–192.
- Hawe, A., Sutter, M., Jiskoot, W. 2008. "Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization", *Pharmaceutical Researches*, 7, 1487-1499.
- Hawkins, P.N., Myers, M.J., Lavender, J.P. 1988. "Diagnostic radionuclide imaging of amyloid: biological targeting by circulating human serum amyloid P component", *Lancet*, 1, 1413- 1418.
- Huynh, R.A., Mohan, C., 2017, "Alzheimer's Disease: Biomarkers in the Genome, Blood, and Cerebrospinal Fluid", *Frontiers in Neurology*, 8, 102, doi: 10.3389/fneur.2017.00102.
- Kiprianov, A., Dashevskaya, B., 1949, "Cyanine dyes from isomeric 2-methylhydroxy

- benzotiazoles", *Zh Obshch Khim.*, 19, 1158–1166.
- Kovalska, V., Chernii, S., Cherepanov, V., Losytskyi, M., Chernii, V., Varzatskii, O., Naumovets, A., Yarmoluk, S. 2017, "The impact of binding of macrocyclic metal complexes on amyloid fibrillization of insulin and lysozyme", *J Mol Recognit.*, 30, 1-10.
- La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., 1991. "Androgen receptor gene mutations in X- linked spinal and bulbar muscular atrophy", *Nature*, 352, 77- 79.
- Lakowicz, J.R. 2001. "Radiative decay engineering: Biophysical and biomedical applications", 298 (1), 1-24.
- Lakowicz, J.R., Ray, K., Chowdhury, M., Szmajcinski, H., Fu, Y., Zhang, J., Nowaczyk, K. 2008. "Plasmon-controlled fluorescence: a new paradigm in fluorescence spectroscopy", *Analyst*, 133, 1308-1346.
- Lee, P.C., Meisel, D., 1982, "Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols", *J. Phys. Chem.*, 86, 3391–3395.
- Lee, J.H., Lee, I.H., Choe, Y.J., Kang, S., Kim, H.Y., Gai, W.P., Hahn, J.S., Paik, S.R. 2009. "Real-time analysis of amyloid fibril formation of α -synuclein using a fibrillation-state-specific fluorescent probe of JC-1", 418, 311-323.
- LeVine, H. 1993. "Thioflavin T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: Protein detection of amyloid aggregation in solution", *Science*, 2, 404-410.
- Liu, T. Li, D., Yang, D., Jiang, M., 2011, " Size controllable synthesis of ultrafine silver particles through a one-step reaction", *Mater. Lett.*, 65, 628-631.
- Lopez-Tobar, E., Antalik, M., Jancura, D., Cañamares, M.V., García-Leis, A., Fedunova, D., Fabriciova, G., Sanchez-Cortes, S. 2013. "Adsorption and Detection of Amyloid Marker Thioflavin T on Ag Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering", *Journal of Physical Chemistry C*, 117, 3996-4005.
- Masuda, M., Suzuki, N., Taniguchi, S., Oikawa, T., Nonaka, T., Iwatsubo, T., Hisanaga, S., Goedert, M., Hasegawa, M. 2006. "Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly", *Biochemistry*, 45, 6085-6094.
- Matveeva, E.G., Gryczynski, Z., Lakowicz, J.R. 2005. "Myoglobin immunoassay based on metal particle-enhanced fluorescence", *Journal of Immunological Methods* , 302, 26 – 35.
- Merlini, G., Bellotti, V. 2003, "Molecular mechanisms of amyloidosis", *The New England Journal of Medicine*, 349, 583-96.
- Moskalenko, Z.I., 1972, "Polymethine dyes from isomeric 2- ethylthionaphthenothiazoles", *Chem. Heterocycl. Comp.* 8, 1074-1077.
- Mughal, F., Baldock, S.J., Karimiani, E.G., Telford, N., Goddard, N.J., Day, P.J.R. 2014.

"Microfluidic Channel-Assisted Screening of Hematopoietic Malignancies", *Genes Chromosomes&Cancer*, 53 (3), 255-263.

- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., Takeda, T. 1989. "Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye thiofavin T", *Analytical Biochemistry*, 177, 244-249.
- Nardo, L., Tosi, G., Bondani, M., Accolla, R.S., Andreoni, A. 2012. "Typing of a Polymorphic Human Gene Conferring Susceptibility to Insulin-Dependent Diabetes Mellitus by Picosecond-Resolved FRET on Non-Purified/Non-Amplified Genomic DNA", *DNA Research*, 19 (4), 347-355.
- Nord, K.H., Macchia, G., Tayebwa, J., Nilsson, J., Vult von Steyern, F., Brosjö, O., Mandahl, N., Mertens, F. 2014. "Integrative genome and transcriptome analyses reveal two distinct types of ring chromosome in soft tissue sarcomas", *Human Molecular Genetics*, 23 (4), 878-888.
- Pelton, M., Liu, M., Park, S., Scherer, N.F., Guyor-Sionnest, P. 2006. "Ultrafast resonant optical sensing from single gold nanorods: Large nonlinearities and plasmon saturation", *Physical Reviews B*, 73, 155419.
- Petkova, A.T., Ishii, Y., Balbach, J.J., Antzutkin, O.N., Leapman, R.D., Delaglio, F., Tycko, R. 2002. "A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (26), 16742-16747.
- Prusiner, S.B. 1982. "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie", *Science*, 216 (4542), 136-144.
- Rajasekhar, K., Narayanaswamy, N., Murugan, N.A., Kuang, G., Ågren, H., Govindaraju, T., 2016, "A High Affinity Red Fluorescence and Colorimetric Probe for Amyloid β Aggregates", *Scientific Reports*, 6, 23668, DOI: 10.1038/srep23668.
- Rambaran, R.N., Serpell, L.C. 2008. "Amyloid Fibrils", *Prion*, 2 (3), 112-117.
- Sachse, C., Fandrich, M., Grigorieff, N. 2008. "Paired beta-sheet structure of an Abeta (1-40) amyloid fibril revealed by electron microscopy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (21), 7462-7466.
- Schultz, S., Smith, S.R., Mock, J. J., Schulz, D.A. 2000. "Single target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels", *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97, 996–1001.
- Shewmaker, F., Wickner, R.B., Tycko, R. 2006. "Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel beta-sheet structure", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (52), 19754-19759.

- Sipe, J.D., Cohen, A.S. 2000. "History of the amyloid fibril", *Journal of Structural Biology*, 130, 88-98.
- Smiley, S.T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Glenn, D., Steele, J., Chen, L.B. 199. "Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1", *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 88, 3671–3675.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R. Goedert, M. 1997. "Alpha-synuclein in Lewy bodies", *Nature*, 388(6645), 839-840.
- Sokolov, K., Follen, M., Aaron, J., Pavlova, I., Malpica, A., Lotan, R., Richards, R. 2003. "Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles", *Cancer Research*, 63, 1999–2004.
- Taşkıran, E.Z., Yılmaz, E. 2007. "Amiloid birikiminin moleküler temeli ve yeni tedavi yaklaşımları", *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2007, 38, 20-25.
- Tycko, R. 2011. "Solid-state NMR studies of amyloid fibril structure", *Annual Reviews of Physical Chemistr*, 62, 279-299.
- Volkova, K.D., Kovalska, V.B., Balanda, A.O., Vermeij, R.J., Subramaniam, V., Slominskii, Yu. L., Yarmoluk, S.M. 2007. "Cyanine dye–protein interactions: Looking for fluorescent probes for amyloid structures", *Journal of Biochemistry and Biophysic Methods*, 70, 727–733.
- Volkova, K.D., Kovalska, V.B., Segers-Nolten, G.M., Veldhuis, G., Subramaniam, V., Yarmoluk, S.M. 2009. "Explorations of the application of cyanine dyes for quantitative a-synuclein detection", *Biotechnic & Histochemistry*, 84 (2), 55-61.
- Walsh, P., Sharpe, S. 2011. "Structure-Toxicity Relationships of Amyloid Peptide Oligomers, Advanced Understanding of Neurodegenerative Diseases ". Editör: Chuen, R., Chang, C. ISBN:978-953-307-529-7.
- Wasmer, C., Lange, A., Van Melckebeke, H., Siemer, A.B., Riek, R., Meier, B.H. 2008. "Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core", *Science*, 319 (5869), 1523-1526.
- Westermarck, P. 2005. "Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides", *FEBS Journal*, 272, 5942-5949.
- Yguerabide, J., Yguerabide, E.E. 1998. "Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications: I. theory", *Analytical Biochemistry*, 262, 137–156.
- Yguerabide, J., Yguerabide, E.E. 1998. "Light-scattering submicroscopic particles as highly

- fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications: II. experimental characterization", *Analytical Biochemistry*, 262, 157–176.
- Zhang, K., Wang, K., Xie, M., Zhu, X., Xu, L., Yang, L., Huang, B., Zhu, X. 2014. "DNA-templated silver nanoclusters based label-free fluorescent molecular beacon for the detection of adenosine deaminase", 52,124–128.
- Zhang, Y., Buddha, M.L., Aitken, C., Geddes, C.D. 2013 . "Highly Sensitive Quantitation of Human Serum Albumin in Clinical Samples for *Hypoproteinemia* using Metal-Enhanced Fluorescence", *Journal of Fluorescence*, 23, 187-192.
- Zhang, J., Fu, Y., Liang, D., Zhao, R.Y., Lakowicz, J.R. 2009. "Fluorescent Avidin-Bound Silver Particle: A Strategy for Single Target Molecule Detection on a Cell Membrane", *Analytical Chemistry*, 81, 883–889.
- Zielinska, A., Skwarek, E., Zaleska, A., Gazda, M., Hupka, J., 2009, "Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size", *Procedia Chem.*, 2, 1560–1566.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. NURİYE AKBAY
Proje No:	114Z391
Proje Başlığı:	Amiloid Fibrillerin Etkili Tayini İçin Siyanin Boyalarının Metal Genişletilmiş Floresans Problemlerinin Geliştirilmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	26
Araştırmacılar:	VLADYSLAVA KOVALSKA (Yurt Dışı)
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İSTANBUL MEDENİYET Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/11/2014 - 15/01/2017
Onaylanan Bütçe:	319374.0
Harcanan Bütçe:	295984.36
Öz:	Amiloid, organlarda ve dokularda biriken lif oranı yüksek, hücreye ait olmayan, proteince zengin kalıntıları tanımlamakta kullanılır. İnsanlarda görülen 20'den fazla önemli hastalığın patogeneğinde görülmektedir. Bu hastalıklar Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Diyabet tip II ve spongiform encephalopathies (Deli dana hastalığı) gibi hastalığın ilerlemesine bağlı olarak ölüm oranı ve riski yükselen çok ciddi hastalıkları içermektedir. Yapılan çalışmalar amiloidlerdeki fibriller yapıların kararlı olduğunu ve karakteristik çapraz-β konformasyonunda β-tabakalı yapılardan oluştuklarını göstermektedir. Bütün amiloid türleri ortak karakteristik özellikler gösterse de her amiloid türünün öncül proteini farklıdır. Şimdiye kadar amiloid yapıların tayininde en yaygın kullanılan yöntem bir benzotiyazol boyası olan Thioflavin T'nin floresans emisyonunu izlemektir. Thioflavin T amiloid fibrillere bağlandığında floresans emisyonu şiddetinde artış gözlenen çok kullanışlı bir floresan boyadır. Fakat öncül proteinlerdeki ve amiloid türlerindeki artan çeşitlilik, seçimli amiloid tayin yöntemlerine duyulan acil ihtiyacı beraberinde getirmektedir. Son 20 yılda yüksek-hassasiyetli floresans ölçümüne dayanan DNA sekans analizi, DNA fragman analizi, elektroforez ile ayırmalarda floresans jel boyama ve çeşitli immünotestleri içeren bir çok yeni yöntemle tanışılmıştır. Fakat bu yöntemlerin hepsi kullanılan floroforun parlaklığı ve fotokararlılığı ile sınırlıdır. Yeni gelişmeler metalik nanoparçacıkların yakınına yerleştirilen floroforların kullanılması ile bu sınırlamaların üstesinden gelinebileceğini göstermektedir. Floroforların metalik nanoparçacıklar ile etkileşiminden floroforun kuantum veriminde artış, fotokararlılıkta iyileşme, rezonans enerji transferi için gerekli mesafede artış ve floresans ömürde kısalma gibi faydalı değişiklikler elde edilebilir. Bu özellikler metal genişletilmiş floresans (MEF) olarak adlandırılmaktadır. Proje kapsamında mono- ve trimetinsiyanin boyaları ile β-ketoenol boyaları olmak üzere iki grup boyanın amyloid fibril tayininde metal genişletilmiş floresans (MEF) probu olarak kullanıma olasılıkları incelenmiştir. Bir tanesi mono-, altı tanesi trimetin siyanin boyası olmak üzere toplam yedi siyanin boyasının gümüş adacıklı yüzeyler (SIF) üzerinde MEF özellikleri incelenmiştir. Bu boyalardan monometinsiyanin boyası olan SH-395 ve trimetinsiyanin boyaları olan D-51 ve D-151 ile analitik açıdan anlamlı MEF elde edilmiştir. İncelenen β-ketoenol boyalarından ise iki tanesi MEF özelliği göstermiştir.
Anahtar Kelimeler:	Metal genişletilmiş floresans (MEF), amiloid fibriller, siyanin boyaları
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Metal-enhanced fluorescence of mono- and trimethine cyanine dyes bound to amyloid fibrils on SIF (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 2- Çeşitli Hidrozon Türevleri ile Nükleik Asitlerin Bağlanma Mekanizmalarının Florimetrik Yöntemle İncelenmesi (Yeni Proje - Ulusal Proje - BAP), 3- Çeşitli Hidrozon Türevleri ile Nükleik Asitlerin Bağlanma Mekanizmalarının Florimetrik Yöntemle İncelenmesi (Yeni Proje - Ulusal Proje - BAP),