

FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ (FTIR) SPEKTROSKOPİSİ İLE HASTALIK NEDENLİ OLUŞAN MOLEKÜLER DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

I. AMAÇ: Bu laboratuvar dersi sonunda edinilebilecek deneysel beceriler aşağıdaki gibidir:

- ✓ Hassas terazi kullanımının öğrenilmesi ve küçük miktarda maddeleri tartabilme becerisinin edinilmesi,
- ✓ Dondurucu kurutucu kullanımının öğrenilmesi,
- ✓ Havan ve havan topu kullanılarak havan kullanımının geliştirilmesi
- ✓ Kurutulmuş örnekler kullanılarak katı peletlerin eldesi,
- ✓ FTIR spektrometre kullanımının öğrenilmesi.

Bunun yanı sıra, FTIR spectral bantlarının tanımlanması ve yorumlanması için gerekli literature taramasının nasıl yapılacağı ve özel spectral analiz programının kullanımı ile araştırma amaçlı bilgisayar kullanımı hakkında deneyim kazanılacaktır.

II. KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ İLE MOLEKÜLER YAPI VE FONKSİYON HAKKINDA ELDE EDİLEBİLECEK BİLGİLER:

Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi incelenmek istenen örnek makromolekülleri fonksiyonel gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel bilgilerin elde edilmesini sağlayan bir tekniktir. Bu spektroskopik teknik, boyama, işaretleme gibi ek maddelerin kullanımını içeren uzun örnek hazırlama prosedürlerine gerek duyulmadan, örneğe zarar vermeden hızlı, hassas ve etkin sonuçların göreceli olarak daha ucuz bir biçimde elde edilmesi sağlaması bakımından diğer tekniklerle karşılaştırıldığında daha avantajlıdır. FTIR spektroskopisi, elde edilen parmakizi benzeri bilgiler ışığında moleküllerin fonksiyonel gruplarının tespit edilmesi ve dolayısıyla farklı doku yapılarının ayırt edilmesine olanak sağlamaktır. Bu teknik kullanılarak, doku ve hücrelerde lipit, protein, DNA, RNA gibi biyomoleküllerdeki fiziksel, örneğin yapısal, değişimlerin izlenmesi mümkün olabilmektedir. Bu bilgiler, öncelikle doğru bant tanımlamalarının yapılması, sonrasında ise ilgilenilen bantların bant pozisyonu, sinyal şiddeti/alanı ve bant genişliği değerlerinin hesaplanması ile elde edilebilir.

FTIR pektrumlarından kimyasal konsantrasyon, kompozisyon, konformasyon ve içerilen fonksiyonel gruplar gibi pek çok kalitatif ve kantitatif bilgi elde etmek mümkündür. Örneğin, değişik makromoleküllere ait fonksiyonel grupların konsantrasyonları aynı spektrumdan sinyal şiddeti ya da daha hassas olarak bant alanı hesaplanarak Beer-Lambert yasasına uygun olarak elde edilebilir. Buna ilaveten, bir örnekteki moleküllerin kompozisyonu sinyal şiddeti ya da ilgili bantların alanlarının oranlarının hesaplanması ile (doymamış lipitlerin doymuş lipitlere ya da lipitlerin proteinlere oranı gibi) hızla analiz edilebilir. Temel olarak lipitlerden kaynaklanan CH₂ simetrik ve antisimetrik titreşimlerinin bant genişlikleri sistemin dinamiğini görüntülemek için kullanılabilir. Bant pozisyonlarındaki kaymalar ise yapısal değişimlere işaret eder. Örneğin, 3000-2800 cm⁻¹ bölgesindeki C-H gerilme bant pozisyonundaki kaymalar lipitlerin düzen/düzensizliklerinde olan değişimler hakkında, 1730 cm⁻¹ civarında görülen C=O gerilme bandının bant pozisyonundaki değişimler ise bu fonksiyonel grup etrafındaki hidrojen bağlanması hakkında bilgi verir. Bunun yanı sıra, kontrole karşı olarak yapılan ölçümlerde ana protein bantlarının (amid I) frekans değerlerindeki kaymalar ise proteinlerin yapılarında oluşabilecek değişimleri işaret eder. FTIR spektroskopisinin diğer önemli bir avantajı ise protein ikincil yapılarında oluşan bu değişimlerin 1650 cm⁻¹ ve 1550 cm⁻¹ civarında gözlenen sırasıyla amid I ve amid II ana protein bantları kullanılarak detaylı olarak incelenebilmesidir.

Fakat, FTIR spektroskopisinin en önemli dezavantajı suyun kızılötesi dalgaboyunda kuvvetli bir sinyal vermek suretiyle FTIR spektrumunda baskın olması ve biyolojik sistemlerde başta protein bantları olmak üzere bazı bantları maskeleyesidir. Su ile oluşan bu etkileşimi ve kısıtlamayı önleyebilmek için örnek hazırlama sırasında su yerine döteryum oksit (D₂O) kullanılabilir ya da örnekler kuru halde incelenebilir. Fakat, bu yöntemlerin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. D₂O kullanımında hidrojen ve döteryum çok hızlı bir biçimde değişmekte ve kuru halde incelenen örnekler su içeren gerçek sistemi tam olarak yansıtmamaktadır. Bu yöntemlere göre daha fazla tercih edilen inceleme yöntemi ise örnekleri sulu ortamda çekilen örnek spektrumlarından kullanılan tampon çözelti spektrumunun dijital olarak çıkarılması ile uygulanan fark spektroskopisi yöntemidir.

III. KURUTMA: Bu deneyde, kurutulmuş iskelet kası örnekleri FTIR spektroskopisi ile incelenecektir. Kurutma genel olarak su ya da organik çözücülerin buharlaştırma ile ortamdaki uzaklaştırılması olarak tanımlanabilir. Bu metot, tarım, kimyasal, ilaç, tekstil ve kağıt üretimi gibi geniş endüstri dallarında kullanılmaktadır.

En çok kullanılan kurutma metodu örneği açıkta bırakarak gerçekleştirilen hava ile kurutma yöntemidir. Nerdeyse hiç masrafsız olması açısından bu yöntem diğer yöntemlere göre daha çok tercih edilebilir. Fakat, bu metot daha uzun zaman almakta ve açıkta bırakıldığı süre zarfında örnek toz ya da diğer maddeler tarafından kontaminasyona açık olmakta, bununla beraber küf oluşumunu engellemek için nemi uzaklaştırmak mümkün olmayabilir.

Biyolojik materyaller genellikle depolama ya da dağıtma amacı ile kurutularak stabilize edilmektedir. Güneş ile ya da elektrik ile kurutan pek çok yöntem olduğu halde, maalesef bu yöntemler örneklerde aktivite kaybı ya da başka zararlara neden olabilmektedir. **Liyofilizasyon**, diğer bir adı ile dondurarak kurutma, ısıya duyarlı örneklerde bu zararları ve aktivite kayıplarını önemli oranda önleyen bir yöntemdir. Bu metot, örneğin ısıtılması sonucu oluşan denaturasyonu kurutma işlemi boyunca örneği dondurduğu için önlemektedir. Sulu bir örneği kurutma sırasında en avantajlı olacak yöntem budur. Bu metot ile, su donmuş halde uzaklaştırılırken örneğin morfolojisi, çözünürlüğü ve kimyasal bütünlüğü korunmaktadır. Bunun yanı sıra, daha hızlı ve etkin biçimde ortamdaki suda kurtulmak mümkün olduğu için bakteri ya da diğer kontaminasyon riski azalmaktadır.

IV. METOTLAR:

Diyabetik ve Kontrol Sıçan İskelet Kas Dokularının Hazırlanması: Erkek Wistar sıçanlar (250-300g) standart diyet ve su ile beslendiler. Diyabet 0.05 mol/L pH4.5 sitrat tampon çözeltisi içerisinde çözülmüş 50mg/kg'lık tek doz Streptozotosinin (STZ) intraperitoneal olarak enjekte edilmesi ile oluşturuldu. Kontrol grubu bireylerine sadece sitrat tampon çözeltisi enjekte edildi. Enjeksiyondan 3 gün sonra glukometre kullanılarak kan şekeri seviyeleri ölçülmüş ve 300mg/dl'den yüksek kan şekere sahip olalar diyabetik olarak ayrılmıştır. 8 hafta sonunda sıçanlar dekapite edilmiş, iskelet kasları çıkarılmış ve örnekler incelemelere kadar -80°C'de saklanmıştır.

FTIR Spektroskopisi İçin Örnek Hazırlama: İskelet kasları:

- Liyofilizatörde 18 saat (gece boyunca) kurutulur,
- Sıvı nitrojen ile havanda öğütülür,
- Öğütülmüş dokular 1 saat daha kurutulur,
- Bu dokulardan 1mg tartılır ve 100mg önceden kurutulmuş potasyum bromür (KBr) ile karıştırılarak 1:100 ağırlık oranında karışım hazırlanır,
- Bu homojen karışım basınca maruz bırakılmadan önce 2 saat daha kurutulur,
- Kurutulmuş karışım özel kap içerisine konur, yaklaşık 100 kg/cm² basınçta 6 dakika bekletilerek katı diskler elde edilir.

Bu disklerin FTIR spektrumları 4000-400 cm⁻¹ aralığında 4 cm⁻¹ spektral çözünürlüğü ile toplanılır. Bu sırada 100 spektrumun ortalaması alınarak örnek spektrumu elde edilir.

Spektral Analiz: Elde edilen spektrumlar üzerinde uygulanacak olan spektral analiz iki basamağa ayrılabilir. İlk basamakta bant genişliği, sinyal şiddeti ya da bant alanı ve bant frekans değerlerinin belirlenmesini içeren kantitatif analiz yer alır. Bu analizde original ham data kullanılır. İkinci basamakta yer alan kalitatif analiz ise spektrumların gösterimi için gerçekleştirilmektedir. Bu analizin temelini yapılan normalizasyon oluşturmaktadır.

Spektral analiz basamakları şöyle sıralanabilir:

Düzleştirme: Bu işlem, gürültü miktarı yüksek olan spektrumlarda gürültüyü azaltmak için gerçekleştirilir.

Baseline Düzeltmesi: Bu işlem, spektrumda absorbans değerleri en düşük olan noktaların birleştirilerek spektrumu x-eksenine yaklaştırmaya yarar.

Dekonvolüsyon: Bu işlem, zayıf bantlar olması ya da bazı bantların üst üste binerek birbirlerini kapattığı durumlarda bu bantları ortaya daha iyi çıkarmak ve spectral çözünürlüğü artırmak için kullanılır.

Normalizasyon: Normalizasyon, seçilen bir spektral bölgede maksimum absorbans değerinin 1'e ve minimum absorbans değerinin 0'a çakıştırılması ile değişik gruplara ait spektrumların üst üste çakıştırılması ve görsel olarak farklılıkların gözlenmesi için kullanılan bir yöntemdir.

Uygulanan bu matematiksel transformasyon ile normalize edilmiş spektrumlar, sadece başka bir grup ile karşılaştırmalı olarak değişimler hakkında fikir sahip olunmasını sağlar ve sadece gösterim için kullanılır.

Kontrol ve diyabetik spektrumlardaki değişimlerin tespiti ve detaylı kalitatif analizler için ise original spektrumlar kullanılır. Bu detaylı analizler, spektrumlardaki bantların frekans değerlerinin, sinyal şiddeti /bant alanı ve bant genişliklerinin belirlenmesini içerir.

- ✓ Belirlenen frekans değerleri, spektral bantların hangi fonksiyonel gruplardan ve hangi biyomoleküllerden kaynaklandığının belirlenmesi ve bant tanımlarının yapılması için kullanılmaktadır.
- ✓ Bant frekanslarında kontrole göre gerçekleşen kaymalar, örnek moleküllerinde meydana gelen yapısal değişimler hakkında bilgi verir.
- ✓ Bant sinyal şiddeti değerleri ile bantın kaynaklandığı fonksiyonel grubun konsantrasyonu belirlenebilir.
- ✓ CH₂ gerilim bant genişliği değerleri ise örnekte bulunan lipitlerin dinamiği hakkında bilgi edinilmesini sağlar.

V. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME: Bu bölümde, kontrol ve diyabetik sıçan iskelet kası dokularına ait FTIR spektrumları kullanılarak spectral analizler gerçekleştirilecek ve elde edilen sonuçların nasıl yorumlanacağı incelenecektir.

İlk hafta için hedefleriniz şöyle sıralanabilir:

1) Size temin edilecek iskelet kası spektrumunda yer alan bantların nasıl tanımlanabileceklerinin ve bu bantların hangi biyomoleküllerden kaynaklandığının, yani muhtemel bant tanımlarının belirlenmesi ve araştırılması.

2) Bu bantlardan hangilerinin lipit içeriğinin protein içeriğine oranlanması ve yorumlanması sırasında kullanılabileceğinin araştırılıp tartışılması.

İkinci hafta için hedefleriniz ise şöyle özetlenebilir:

3) Raporunuzda kullanacağınız ve size asistanınız tarafından nasıl hazırlanacağı gösterilecek olan spektrumların hazırlanması. Bu normalize spektrumlar raporunuzdaki şekilleri oluşturacaktır.

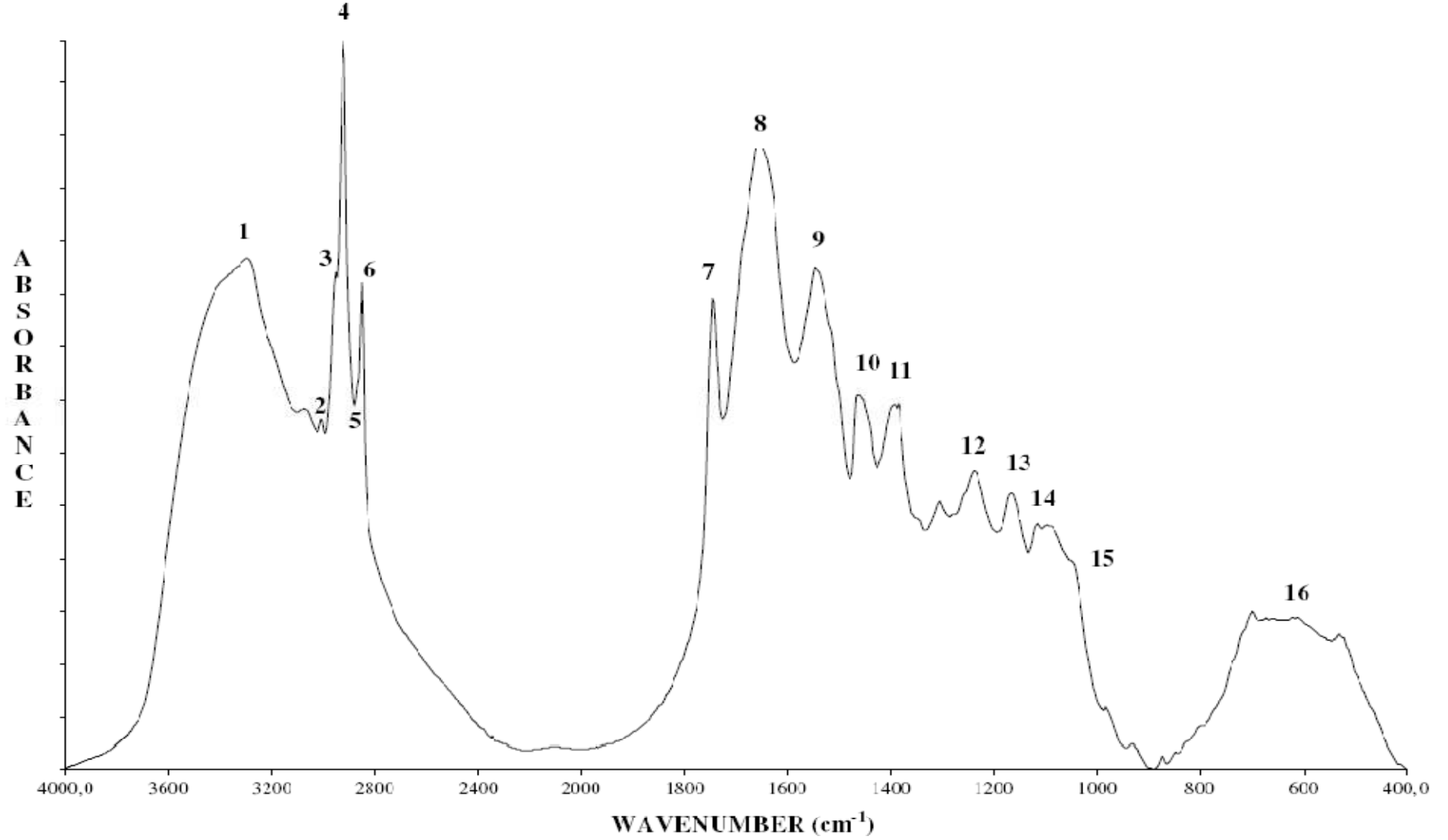
a) Baseline Düzeltmesi:, gerekli ise düzleştirilmiş, Amid A bandına göre normalize edilmiş 4000-400 cm^{-1} spektral aralığındaki kontrol ve diyabetik spektrumlar.

b) Baseline Düzeltmesi: gerekli ise düzleştirilmiş, dekonvolüte edilmiş ve CH_2 bandına göre normalize edilmiş 3050-2800 cm^{-1} spektral aralığındaki kontrol ve diyabetik spektrumlar

c) Baseline Düzeltmesi:, gerekli ise düzleştirilmiş, Amid I bandına göre normalize edilmiş 1800-400 cm^{-1} spektral aralığındaki kontrol ve diyabetik spektrumlar.

4) Sadece düzleştirilmiş original kontrol ve diyabetik spektrumları kullanarak seçilmiş bantların bant şiddeti ve bant frekans değerlerinin hesaplanması.

5) Spektrumlarda yer alan bantlardan ne gibi bilgiler elde edilebileceğinin ve hesapladığınız spectral verilerin nasıl yorumlanabileceğinin araştırılması, böylelikle diyabetin iskelet kası üzerine etkilerinin FTIR spektroskopisi kullanılarak nasıl açıklanabileceğinin incelenmesi. Diğer bir deyişle, bant absorbans ve frekans değerleri ile lipit/protein oranının ne gibi değişimleri işaret ettiğinin tartışılması.



Şekil 1.. 4000-400 cm⁻¹ spektral bölgede kontrol sıçan kas örneklerine ait FTIR spektrumu

Tablo 1. Sıçan Kas dokusuna ait FTIR spektrumunda yer alan bazı bantların bant frekans tanımları

| Bant # | WAVENUMBER (cm⁻¹) | DEFINITION OF THE SPECTRAL ASSIGNMENT |
|---------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | 3343 | Başlıca proteinlerin N-H gerilimi (Amide A) ,az miktarda polisakkaritlerin O-H gerilimi ve intermoleküler H bağları |
| 2 | 3010 | Olefinik HC=CH gerilimi:doymamış lipiler, kolesterol esterler |
| 3 | 2956 | CH ₃ asimetrik, başlıca lipit ve az oranda protein, karbohidrat, nükleik asit |
| 4 | 2925 | CH ₂ asimetrik gerilimi: başlıca lipit ve az oranda protein, karbohidrat, nükleik asit |
| 5 | 2871 | CH ₃ simetrik gerilimi:başlıcaprotein ve az oranda lipid, karbohidrat, nükleik asit proteins, |
| 6 | 2853 | CH ₂ simetrik gerilimi:başlıca lipit ve az oranda protein, karbohidrat, nükleik asit |
| 7 | 1744 | Ester Karbonil C=O gerilimi: trigliserit ve kolesterol esterleri |
| 8 | 1652 | Amide I (büyük oranda C=O gerilimi ve az oranda C-N gerilimi ve and N-H bükülme): protein |
| 9 | 1541 | Amide II (N-H bülülme, C-N stretching): proteins |
| 10 | 1457 | CH ₂ bükülme: büyük oranda lipid ve az oranda protein |
| 11 | 1391 | COO ⁻ simetrik gerilimi: yağ asitleri |
| 12 | 1236 | PO ₂ ⁻ asimetrik gerilimi: başlıca nükleik asitler ve az miktarda fosfolipitler |
| 13 | 1166 | CO-O-C asimetrik gerilimi: fosfolipitler, trigliseritler ve kolesterol esterleri |
| 14 | 1097 | PO ₂ ⁻ simetrik gerilimi: nükleik asit ve fosfolipit |
| 15 | 1045 | C-O gerilimi: oligosakkarit, karbohidratlar, |
| 16 | 615 | Nükleik Asit |