



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ESR SPİN – ETİKETLEME TEKNİĞİ İLE SAĞLIKLI ve ENFEKSİYONLU KAN ve SÜTLERİN İNCELENMESİ

Leyla PALALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fizik Anabilim Dalını

Ocak-2013

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESR SPİN – ETİKETLEME TEKNİĞİ İLE SAĞLIKLI ve ENFEKSİYONLU KAN ve SÜTLERİN İNCELENMESİ

Leyla PALALI

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Fizik Anabilim Dalı

Öğr. Gör. Dr. Ülkü SAYIN
2013, 88 Sayfa

Jüri
Öğr. Gör. Dr. Ülkü SAYIN
Prof. Dr. Ayhan ÖZMEN
Prof. Dr. Recep TAPRAMAZ

Bu çalışmada, Mastitisli ve sağlıklı süt örneklerinin liyofilize edilmiş tozları ve liyofilize olmamış sıvı halleri ile Brucellozisli ve sağlıklı kan serum örnekleri TEMPO kararlı nitroksit radikali kullanılarak 123-243K sıcaklık aralığında ESR spin etiketleme tekniği ile incelenmiştir. Çalışılan örneklerde, farklı sıcaklıklarda TEMPO spin etiketlerinin dönme ilgi zamanları, τ, spektroskopik yarılma çarpanının dik ve paralel bileşenleri, $g_{\perp}$, $g_{//}$, orta pikin çizgi genişliği, ΔH_o, aşırı ince yapı sabitinin dik ve paralel bileşenleri, $A_{\perp}$, $A_{//}$ hesaplanmıştır. Kan ve sütler için hastalıklı ve sağlıklı örneklerin spektrumlarından hesaplanan ESR parametreleri kıyaslanarak TEMPO spin etiketinin "Brucellozis" hastalığı için ayırt edici bir davranış sergilediği fakat "Mastitis" hastalığı için bu ayırt ediciliğin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca ESR spin etiketleme çalışmaları için süt örneklerinin liyofilize edilmesine gerek olmadığı anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: ESR spin etiketleme tekniği, brucellozis, mastitis, TEMPO spin etiketi

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF HEALTHY AND INFECTION BLOOD AND MILKS BY ESR SPIN – LABELLING TECHNIQUE

Leyla PALALI

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN PHYSICS

Öğr. Gör. Dr. Ülkü SAYIN

2013, 88 Pages

Jury
Öğr. Gör. Dr. Ülkü SAYIN
Prof. Dr. Recep TAPRAMAZ
Prof. Dr. Ayhan ÖZMEN

In this study, lyophilized powders and not lyophilized liquid states of Mastitis infected and healthy milk samples and also Brucellozised and healthy blood serum samples were examined using TEMPO stable nitroxide radical between the temperature range of 123-243K with ESR spin labeling technique. In studied examples, rotation corelation times, τ, of TEMPO spin labels at different temperatures, perpendicular and parallel components of spectroscopic splitting factor, $g_{\perp}$, $g_{//}$, line width of mid-peak, ΔH_o, perpendicular and parallel components of hyperfine coupling constant, $A_{\perp}$, $A_{//}$ were calculated. By comparing ESR parameters measured from spectra of healthy and infected blood and milk samples, it was determined that TEMPO spin label is exhibited a different behavior for "Brucellozis" infected samples, but did not show any difference "Mastitis" disease. Also it was understood that there was no need to lyophilize the milk samples for ESR spin labeling studies.

Key words: ESR spin labeling technique, brucellosis, mastitis, TEMPO spin label

ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca gerek derslerde ve gerekse deneysel çalışmalarımda karşılaştığım zorlukları aşmam için bilgi, tecrübe ve manevi desteklerini esirgemeyen saygı değer danışman hocalarım Prof. Dr. Hüseyin YÜKSEL ve Öğr. Gör. Dr. Ülkü SAYIN' a,

Bilgi ve desteğini gördüğüm Prof. Dr. Ayhan ÖZMEN ve Prof Dr. Recep TAPRAMAZ 'a ve mikrobiyoloji çalışmalarında yardımını esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Zafer SAYIN 'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca bana maddi ve manevi olarak her zaman güç veren başta sevgili eşim Öğr. Gör. Abdurrahman PALALI ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Leyla PALALI

KONYA-2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET…. iv

ABSTRACT v

ÖNSÖZ vi

İÇİNDEKİLER vii

ŞEKİLLER DİZİNİ ix

SİMGELER VE KISALTMALAR xiii

1. GİRİŞ 1

2. TEMEL KAVRAMLAR 3

2.1. Manyetik Moment 3
2.2. Manyetik Rezonans 5
2.2.1. Spektroskopi 5
2.2.2. Paramanyetik rezonans 6
2.2.3. ESR de rezonans şartı 8
2.2.4. Spin hamiltoniyeni 10
2.3. Paramanyetizma 11
2.4. ESR Spin Etiketleme 13
2.5. Aşırı İnce Yapı Etkileşmesi 15
2.5.1. Anizotropik aşırı ince yapı etkileşmesi (dipolar etki) ve A tensörü 17
2.5.2. İzotropik aşırı ince yapı etkileşmesi (Fermi etkileşmesi) 22
2.6. Elektron Zeeman Etkileşmesi ve g Çarpanı 24
2.7. Dönme İlgi Zamanı 30

3. DENEYSEL YÖNTEM 32

3.1. ESR Spektrometresi 32
3.1.1. Kaynak sistemi 34
3.1.2. Kavite-Kılavuz sistemi 34
3.1.3. Mıknatıs sistemi 34
3.1.4. Modülasyon - Dedeksiyon sistemi 35
3.1.5. Tarama zamanı ve filtre zaman sabiti 35
3.1.6. Çizgi biçimi 35
3.2. İncelenen Örnekler 36
3.2.1. Kan örnekleri (Brucellozis) incelemesi 36
3.2.2. Süt örnekleri (Mastitis) incelemesi 37
3.2.2.1. Subklinik (Gizli) mastitis 38
3.2.2.2. Klinik (Görünür) mastitis 39
3.3. Örnek Hazırlama 39

3.3.1. Brucellozis'li(Brucella hastalıklı) ve sağlıklı kan örnekleri 39
3.3.1.1. Kan örneklerinde mikrobiyolojik analiz ve kan serumunun alınması .. 39
3.3.1.2. Kan örneklerinde spin etiketleme 40
3.3.2. Mastitis hastalıklı ve sağlıklı süt örnekleri 41
3.3.2.1. Süt örneklerinde mikrobiyolojik analiz ve liyofilizasyon (kurutma) işlemi..... 41
3.3.2.2. Süt örneklerinde spin etiketleme..... 43

4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 44

4.1. KAN ÖRNEKLERİ 44
4.2. SÜT ÖRNEKLERİ 59

5. SONUÇ 72

KAYNAKLAR 73

EKLER 76

ÖZGEÇMİŞ 88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Çiftlenmemiş bir elektronun manyetik alan içindeki enerji düzeyleri arasında geçişe karşı gelen soğurma ve birinci türev eğrileri 4

Şekil 2.2. Elektromanyetik spektrum..... 5

Şekil 2.3. Bohr yörüngesinde $\vec{v}$ çizgisel hızı ile hareket eden -q yüklü parçacığın açısal momentumu $\vec{L}$ ve manyetik momenti $\vec{\mu}$ 6

Şekil 2.4 Dış manyetik alan içindeki elektronun enerji düzeylerinin yarılması 10

Şekil 2.5. Nitroksit radikalin genel formülü 12

Şekil 2.6. Spin etiketleme tekniğinin basit gösterimi 13

Şekil 2.7. Tempo tolüen çözeltisinin 123K deki ESR spektrumu 15

Şekil 2.8. Çekirdek spini I=1/2 ve I=1 olan sistemlerin ESR spektrumları..... 17

Şekil 2.9.Deneysel koordinat sisteminde $\vec{H}$ manyetik alan vektörü ve yön kosinüsleri . 27

Şekil 2.10. Eksensel simetrili toz EPR spektrumu. a) Çekirdek spini I=0 olan bir yapıda çekirdek spini I=3/2 olan bir yapıda 29

Şekil 2.11. 1/1280 titreli Brucella kan serumunda tempo etiketinin 183K deki spektrumu..... 31

Şekil 3.1. JEOL JESFA-300 X-Band CW ESR Spektrometresi..... 32

Şekil 3.2. ESR Spektrometresinin blok diyagramı 33

Şekil 3.3. (a) Lorentz ve Gauss biçimlerinin toplamı şeklindeki 1. Türev eğrisi, (b) Lorentz biçimli 1. türev eğrisi, (c) Gauss biçimli 1. türev eğrisi 36

Şekil 3.4. Mastitisli meme örnekleri..... 38

Şekil 3.5. Brucella Rose Bergal Plate Test Pozitif ve Negatif örneği 40

Şekil 3.6. Süt örneklerinin besi yerine ekilmesi 41

Şekil 3.7. Liyofilizasyon cihazı 42

Şekil 4.1. Negatif kontrol kan serum örneklerinin farklı sıcaklıklarda kaydedilen ESRspektrumları..... 46

Şekil 4.2. Pozitif kontrol kan serum örneklerinin farklı sıcaklıklarda kaydedilen ESR spektrumları 47

Şekil 4.3. Hareket serbestliğinin farklı durumlarında TEMPO spin etiketli yapının ESR spektrumları hareket serbestliğinin kuvvetli olduğu anizotropik durum (b) Orta hareket serbestliğinde anizotropik durum (c) Hareket serbestliğinin zayıf olduğu izotropik durum 48

Şekil 4.4. TEMPO spin etiketli 1/1280 titreli kan serumunun farklı sıcaklıklardaki ESR spektrumu..... 50

Şekil 4.5. TEMPO spin etiketli farklı titreli kan serum örneklerinin 163K sıcaklığında ESR spektrumları..... 51

Şekil 4.6. TEMPO spin etiketli farklı titreli kan serum örneklerinin 183K sıcaklığında ESR spektrumları..... 51

Şekil 4.7. Farklı titreli kan serumlarının dönme ilgi zamanlarının sıcaklığa bağlı değişimi..... 53

Şekil 4.8. Kan serumlarının $A_{\perp}$ ve $A_{//}$ değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimleri..... 55

Şekil 4.9. Kan serumlarının $g_{\perp}$ ve $g_{//}$ değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimleri..... 56

Şekil 4.10. Kan serumlarının ΔH_o (G) çizgi genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimleri .. 57

Şekil 4.11. TEMPO etiketli liyofilize olmamış süt örneklerinin 123K sıcaklığındaki ESR spektrumları..... 62

Şekil 4.12. TEMPO etiketli liyofilize edilmiş süt örneklerinin 123K sıcaklığında ESR spektrumları 63

Şekil 4.13. Liyofilize olmamış hastalıklı sütlerin 153K sıcaklığındaki ESR spektrumları 65

Şekil 4.14. Liyofilize olmamış sağlıklı sütlerin 153K sıcaklığındaki ESR spektrumları 65

Şekil 4.15. Liyofilize edilmiş hastalıklı süt örneklerinin 153K'deki ESRspektrumları . 66

Şekil 4.16. Liyofilize edilmiş sağlıklı süt örneklerinin 153K'deki ESRspektrumları 66

Şekil 4.17. Liyofilize olmamış süt örneklerinin 163K'deki ESR spektrumları..... 67

Şekil 4.18. Liyofilize edilmiş süt örneklerinin 163K'deki ESR spektrumları..... 68

Şekil 4.19. Liyofilize olmamış süt örneklerinin 183K'deki ESR spektrumları..... 69

Şekil 4.20. Liyofilize edilmiş süt örneklerinin 183K'deki ESR spektrumları..... 70

Şekil 4.21. Liyofilize edilmiş süt örneklerinin $A_{\perp}$, $A_{//}$ değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi 76

Şekil 4.22. Liyofilize edilmiş süt örneklerinin $g_{\perp}$, $g_{//}$ değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi 77

Şekil 4.23.Liyofilize edilmiş süt örneklerinin çizgi genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi 78

Şekil 4.24. Liyofilize edilmemiş süt örneklerinin çizgi genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi..... 78

Şekil 4.25. Liyofilize edilmemiş süt örneklerinin $A_{\perp}$, $A_{//}$ değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi 79

Şekil 4.26. Liyofilize edilmemiş süt örneklerinin $g_{\perp}$, $g_{//}$ değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi 80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Spin etiketinin molekül yapısı 15

Çizelge 2.2. Bazı seçilmiş çekirdeklerin spin kuantum sayıları 16

Çizelge 2.3. Seçilen deneysel eksen sistemine göre g^2 fonksiyonlarının yön kosinüslerine göre ifadeleri 29

Çizelge 3.1. Farklı band aralıklarında çalışan ESR spektrometreleri 32

Çizelge 4.1. Farklı titreli kan serumlarının dönme ilgi zamanı değerleri 53

Çizelge 4.2. T = 163K de brucella kan serum örneklerinin ESR parametreleri 58

Çizelge 4.3. T = 143K de brucella kan serum örneklerinin ESR parametreleri 58

Çizelge 4.4. T = 123K de brucella kan serum örneklerinin ESR parametreleri 58

Çizelge 4.5. Liyofilize olmamış süt örneklerinin 123K sıcaklığında ESR parametreleri 61

Çizelge 4.6. Liyofilize edilmiş süt örneklerinin 123K sıcaklığında ESR parametreleri 61

Çizelge 4.7. T=133K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri 81

Çizelge 4.8. T= 143K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri 81

Çizelge 4.9. T= 153K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri 82

Çizelge 4.10. T= 163K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri 82

Çizelge 4.11. T= 173K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri 83

Çizelge 4.12. T= 183K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri 83

Çizelge 4.13. T=193K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri 84

Çizelge 4.14. T= 203K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri 84

Çizelge 4.15. T= 213K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri 85

Çizelge 4.16. T=133K de liyofilize edilmemiş süt örneklerinin ESR parametreleri 85

Çizelge 4.17. T= 143K de liyofilize edilmemiş süt örneklerinin ESR parametreleri ... 86

Çizelge 4.18. T= 153K de liyofilize edilmemiş süt örneklerinin ESR parametreleri 86

Çizelge 4.19. T= 163K de liyofilize edilmemiş süt örneklerinin ESR parametreleri 87

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

a_o : Aşırı ince yapı sabitinin izotropik bileşeni

$A_{//}$: Anizotropik aşırı ince sabitinin alana paralel bileşeni

$A_{\perp}$: Anizotropik aşırı ince sabitinin alana dik bileşeni

H : Manyetik alan

β :Bohr manyetonu

E : Enerji özdeğeri

g : Spektroskopik yarılma çarpanı

g_o : spektroskopik yarılma çarpanın izotropik bileşeni

$g_{\perp}$: Spektroskopik yarılma çarpanın alana dik bileşeni

$g_{//}$: Spektroskopik yarılma çarpanın alana paralel bileşeni

$\hbar$: Planck sabiti

$\mathcal{H}$: Enerji Hamiltoniyeni

k : Boltzman sabiti

L : Yörünge açısal momentumu,

m_s : Elektronun spin manyetik kuantum sayısı

$\vec{S}$: Spin açısal momentumu

λ : Spin-yörünge etkileşme sabiti

τ : Dönme ilgi zamanı

ω : Açısal hız

μ : Manyetik moment

υ : Mikrodalga frekansı

ΔH_o :ESR çizgi genişliği

Kısaltmalar

EPR :Elektron Paramanyetik Rezonans

ESR :Elektron Spin Rezonans

MD :Mikrodalga

1. GİRİŞ

Çiftlenmemiş elektron spinlerinin bir dış magnetik alanla etkileşmesini inceleyen spektroskopik tekniğe Elektron Spin Rezonans (ESR) tekniği adı verilir. ESR tekniğini kullanan ilk deney 1945 yılında Zavoisky tarafından gerçekleştirilmiştir. 1946'dan sonra ise Manyetik Rezonans'ın çalışma alanı Purcel, Pound, Torrey, Bloch, Hansen ve Parkard'ın başarılı deneyleri ile hızla gelişmiştir. Günümüzde ESR tekniği fizik, kimya, biyoloji gibi temel bilimlerde önemli uygulama alanları bulmuştur. Özellikle son yıllarda biyolojik örneklerin ESR tekniği ile incelenmesi üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

ESR'de incelenen örneğin paramanyetik olması gerekir. Eğer örnek kendiliğinden paramanyetik değilse ışınlama, spin etiketleme, spin tuzaklama gibi yollarla paramanyetik hale getirilir. ESR Spin Etiketleme tekniği ilk kez 1965 yılında Mc Connell tarafından biyolojik yapıların incelenmesinde kullanılmıştır (Mc Connell ve ark., 1965). Bu yöntemde, kendiliğinden paramanyetik olmayan büyük biyolojik moleküllerin yapısına nitroksit radikalleri gibi kararlı spin etiketlerinin bağlanması sağlanarak, incelenecek molekül paramanyetik hale getirilir. ESR tekniği kullanılarak etiketlenen bu molekülün yapısı, çevresi ve dinamiği hakkında önemli bilgiler elde edilir.

ESR spin etiketleme tekniğiyle birçok farklı biyolojik molekül incelenebilir. Örneğin; hücre zarında bulunan yağ ve protein etkileşimleri (Ashikawa ve ark., 1994, Feix ve Klug, 2002; Doğan, 2006), kanserli hastalardan alınan kan ve sigara içen kişilerden alınan tükürük örnekleri (Yavuz, 1987), proteinlerin çevreleriyle etkileşimleri (Yerli, 1995), RNA'nın biyolojik yapısı (Macoska ve ark., 1999) ESR spin etiketleme tekniğiyle incelenmiştir.

Bu tez çalışmasında mastitis (meme iltihabı) hastalıklı büyük baş hayvanlardan alınan süt örnekleri ve brucellozisli (brucella hastalıklı) büyükbaş hayvanlardan alınan kan örnekleri çalışılmıştır. Mastitisli süt örnekleri ve brucellozis kan örneklerinden elde edilen ESR parametreleri ile sağlıklı süt örnekleri ve sağlıklı kan örneklerinden elde edilen ESR parametreleri kıyaslanmış ve tartışılmıştır.

Mastitis, süt hayvancılığında en çok rastlanan ve son derece önemsenmesi gereken bir meme hastalığıdır. Bu hastalık sadece süt verimini azaltmakla kalmayıp, memenin bir veya birkaç lobunun(bölümünün) körleşmesine, hatta tümünün süt

veremez hale gelmesiyle hayvanın kasaplık olmasına neden olabildiği gibi bazen de ölümüne sebep olabilmektedir.

Brucella ise bakterilerin sebep olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Bu hastalık zoonoz bir türdür yani hayvandan insana, insandan hayvana, hayvandan hayvana bulaşabilir. Hayvandan insana bulaşması çiğ süt içilmesi, çiğ et yenmesi ya da direk temas edilmesi şeklinde olur. İnsanlarda yüksek ateş, halsizlik, eklem ağrılarına ve hatta erkeklerde kısırlığa neden olabilir.

Mastisis ve brucellanın insan hayatındaki bu önemli etkilerinden dolayı bu çalışmada ESR Spin Etiketleme tekniğiyle bu tür hayvanlardan alınan örneklerin incelenmesine karar verilmiştir. İncelenen örneklerin spektroskopik yarılma çarpanı g, aşırı ince yapı sabiti a, dönme ilgi zamanı τ, çizgi genişliği ΔH_o gibi ESR parametreleri hesaplanmış ve sonuçlar tartışılmıştır.

Çalışmalarımızda kullandığımız ESR spektrometresi; Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İLTEK)' nde bulunan JEOL marka JESFA-300 model X-band mikrodalga üreten bir ESR spektrometresidir.

2. TEMEL KAVRAMLAR

2.1. Manyetik Moment

Elektronun manyetik momenti, manyetik momentin temel birimi sayılan Bohr magnetonu cinsinden ifade edilir. Spin açısal momentumu $\vec{S}$ olan çiftlenmemiş bir elektronun manyetik momenti;

$$\vec{\mu} = -g\,\frac{\beta}{\hbar}\vec{S} \tag{2.1}$$

şeklinde yazılır. Burada $\beta=e\hbar/2m_e$ Bohr magnetonu, $\hbar = \frac{h}{2\pi}$ olup h Planck sabiti, ve g çiftlenmemiş elektronun spektroskopik yarılma çarpanı olup, serbest elektron için değeri g= 2.0023' tür.

Kuantum mekaniğinde $\vec{S}$ spin açısal momentum vektörü manyetik alanda kesikli yönelimler aldığı için $\vec{\mu}$=-g $\beta\vec{S}/\hbar$ bağıntısı uyarınca manyetik moment vektörü de kesikli değerler alır. Başka bir deyişle manyetik moment kuantumlanmıştır. Kuantum mekaniğine göre büyüklüğü $\hbar\{s(s+1)\}^{1/2}$ değeri ile sınırlanmış olan $\vec{S}$ spin açısal momentum vektörünün yalnızca bir bileşeni kesin olarak belirlenebilir. Bu bileşen s, s-1, …….,-s olmak üzere toplam (2s+1) tane değer alır (Apaydın, 1996).

Manyetik momenti $\vec{\mu}$ olan çiftlenmemiş bir elektron üzerine $\vec{H}$ gibi bir dış manyetik alan uygulanırsa;

$$E = \vec{\mu}\cdot\vec{H} = g\,\frac{\beta}{\hbar}\vec{S}\cdot\vec{H} \tag{2.2}$$

şeklinde bir manyetik enerji oluşur. Zeeman enerjisi olarak bilinen bu enerji, $\vec{H}$ manyetik alanın yönü z ekseni olarak seçilirse

$$E = g\,\frac{\beta}{\hbar}HS_z = g\,\beta H m_s \tag{2.3}$$

biçiminde ifade edilir. Burada m_s elektronun spin manyetik kuantum sayısıdır. Spin seviyeleri arasındaki ESR geçişleri elektron için; $\Delta m_s = \pm 1$ ve $\Delta m_I = 0$ kuralına uygun iseler izinlidirler. Elektronun spin kuantum sayısı s=1/2 olduğu için $m_s = \pm 1/2$ şeklinde iki ayrı değer alır. Buna göre (2.3) enerji bağıntısı,

$E_{+1/2}=g\,\beta H(+1/2) = +1/2g\,\beta H$ (2.4)

$E_{-1/2}=g\,\beta H(-1/2) = -1/2g\,\beta H$ (2.5)

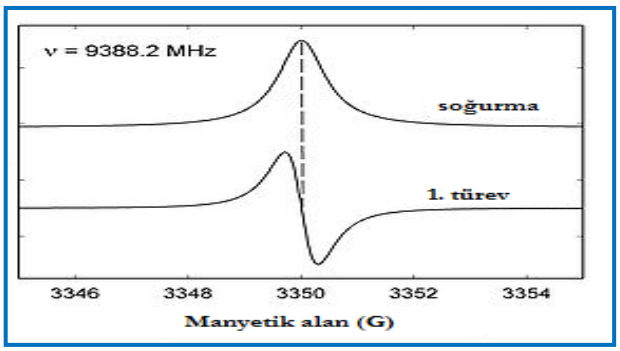
şeklinde yazılabilir. Burada $E_{-1/2}$ taban enerji düzeyini, $E_{+1/2}$ üst enerji düzeyini gösterir. O halde elektron üzerine uygulanan H manyetik alanı, enerjiyi ikiye yarar. Bu iki durum arasındaki enerji farkı ise

$$\Delta E = E_{+1/2} - E_{-1/2} = \left(+\frac{1}{2}\right) g\,\beta H - \left(-\frac{1}{2}\right) g\,\beta H = g\,\beta H \quad (2.6)$$

olur. $E_{-1/2}$ taban enerji düzeyinde olan bir elektronun $E_{+1/2}$ üst enerji düzeyine geçebilmesi için elektrona $\Delta E= h\upsilon$ enerjili bir elektromanyetik dalga gönderilmelidir. Böylece (2.6) bağıntısı;

$h\upsilon = g\,\beta H$ (2.7)

şeklini alır. Burada υ uygulanan mikrodalganın frekansıdır. Bu ifade ESR geçisinin olabilmesi için için gerekli şarttır. Bu şart sağlanmadıkça de geçişler gözlenemez. (2.7) bağıntısına rezonans şartı adı verilir. Bu şartın sağlanabilmesi için, ya υ sabit tutulup H_z değiştirilir ya da H_z sabit tutulup υ değiştirilir. ESR spektroskopisinde uygulama kolaylığı bakımından çoğu kez mikrodalga frekansı sabit tutulup, manyetik alan değiştirilerek ya soğurma enerjisi ya da onun birinci türevi çizdirilir.



Şekil 2.1. Çiftlenmemiş bir elektronun manyetik alan içindeki enerji düzeyleri arasında geçişe karşı gelen soğurma ve birinci türev eğrileri

Bu yolla çizdirilen birinci türev spektrumlarının tepeden tepeye yüksekliği veya soğurma eğrisinin altında kalan alan, örnek içindeki çiftlenmemiş elektron sayısının bir ölçüsüdür (Poole, 1983).

2.2. Manyetik Rezonans

2.2.1. Spektroskopi

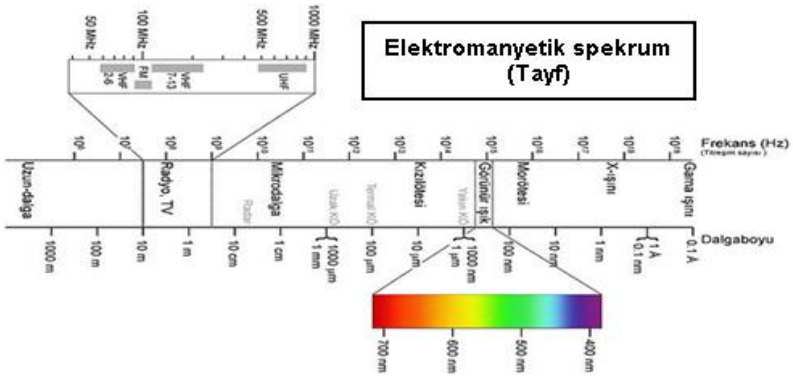
Spektroskopi ilke olarak, atomların, moleküllerin, örgülerin, iyonların ve çekirdeklerin kuantumlanmış enerji düzeylerini belirleyen bir yöntemdir. Deneysel olarak yalnızca frekans ölçümünü içerir, çünkü olası geçişlere karşılık gelen iki düzey arasındaki enerji farkı, incelenmekte olan atom ya da çekirdek tarafından soğurulan ya da salınan ışımanın frekansı ile orantılıdır. Yani,

$$h\upsilon = E_1 - E_2 \qquad (2.8)$$

bağıntısı uyarınca, iki düzey arasındaki geçişe karşılık gelen soğurma enerjisine uygun bir spektral çizgi ya da spektrum gözlenir.

Elektronların ya da çekirdeklerin farklı manyetik özelliklerine göre farklı uyarılmış düzeyleri bulunduğu için bu düzeyler arasındaki geçişlere karşılık gelen spektrum çizgileri, elektromanyetik spektrumun oldukça farklı aralıklarına düşerler.

Genelde bir atom üzerine uygulanan manyetik alanla elektron spinin etkileşmelerini inceleyen spektroskopiye, Elektron Paramanyetik Rezonans (EPR) ya da Elektron Spin Rezonans (ESR) denir, çalışma bölgesi $10^{9\text{-}12}$ Hz çarpan frekansına karşılık gelen mikrodalga bölgesidir.



Şekil 2.2. Elektromanyetik spektrum

2.2.2. Paramanyetik rezonans

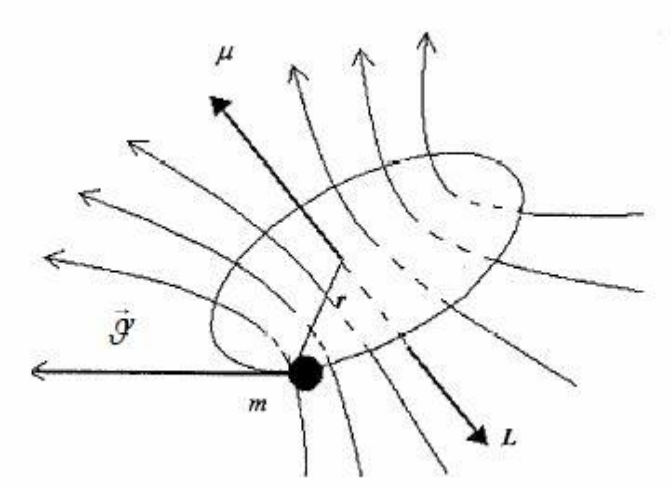
Klasik fizikte sürekli değerler alabilen ve doğrultusu $\vec{r}$ $\vec{v}$'nin oluşturduğu düzleme dik olan büyüklüğe açısal momentum denir. Kuantum mekaniğinde ise açısal momentum ancak belirli değerler alabilen vektörel büyüklüktür, xy düzleminde izafi olmayan bir hızla dönen bir parçacığın klasik açısal momentumu

$$\vec{L} = \vec{r} \times m\vec{v} \tag{2.9}$$

biçimindedir. Yarıçapı r olan Bohr yörüngesinde $\vec{v}$ çizgisel hızı ile hareket eden m kütleli , q yüklü bir parçacığı ele alırsak, parçacık yörüngede

$$\vec{I} = \frac{q\vec{v}}{2\pi r} \tag{2.10}$$

büyüklüğünde bir akım meydana getirir. Bu ifadede, m parçacığın kütlesi, $\vec{v}$ hızı ve r dönme yarıçapıdır. Meydana gelen akımdan dolayı dönme düzlemine dik doğrultuda bir manyetik moment oluşur.



Şekil 2.3. Bohr yörüngesinde $\vec{v}$ çizgisel hızı ile hareket eden -q yüklü parçacığın açısal momentumu $\vec{L}$ ve manyetik momenti $\vec{\mu}$.

Parçacığın xy düzleminde göreli olmayan bir hızla hareket ettiği varsayılırsa, manyetik dipol moment z doğrultusuna yönelir. Parçacığın yörüngesinin çevrelediği kapalı alan A olmak üzere, dipol momentin değeri,

$$\vec{\mu} = I\vec{A} \tag{2.11}$$

$$|\mu| = \frac{qv}{2\pi r}\pi r^2 = \frac{qvr}{2} \tag{2.12}$$

olur. Bu parçacığın kütlesi m ile çarpılıp bölünür ve (2.9) bağıntısı kullanılarak düzenlenirse,

$$|\mu| = \frac{qmvr}{2m} = \frac{q}{2m}|L| \tag{2.13}$$

bulunur. $\beta = \frac{q\hbar}{2m}$ tanımından

$$|\mu| = g\frac{\beta}{\hbar}|L| \tag{2.14}$$

biçiminde yazılır. Açısal momentumun z bileşeni kuantumludur ve büyüklüğü $m_\ell\hbar$ dır. Burada m_ℓ , $+\ell$ den $-\ell$ ye kadar değerler alır ve yörüngesel manyetik açısal momentum kuantum sayısı olarak bilinir. L nin özdeğeri olan $m_\ell\hbar$ ifadesi bağıntı (2.14) de yerine yazılırsa,

$$\mu = g\beta m_\ell \tag{2.15}$$

olur.

Elektron, atomun çekirdeği etrafında dolanım hareketi sonucu sahip olduğu yörüngesel açısal momentumu yanında spinine de sahiptir.

Elektronun spini kendi içindeki yük dağılımından kaynaklanır. Yörüngesel dipol moment yaklaşımı esas alınır ve spin kuantum sayısı s=1/2 deneysel değeri kullanılırsa spinin büyüklüğü,

$$S = \sqrt{s(s+1)}\hbar \tag{2.16}$$

ve spinin z bileşeni (manyetik alan doğrultusu üzerindeki izdüşümü) de;

$$S_z = m_s\hbar \tag{2.17}$$

biçiminde tanımlanır. Spinin ve açısal momentum arasındaki ilişki, yörünge durumuna benzer olarak ele alındığında,

$$\vec{\mu}_s = -g\frac{e}{2m_e}\vec{S} = -g\frac{\beta}{\hbar}\vec{S} \quad (2.18)$$

$$\mu_{sz} = g\beta m_s \quad (2.19)$$

olur. Burada m_s spin manyetik kuantum sayısıdır ve –s den +s ye kadar (2s+1) tane değer alır. Yukarıdaki ifadelere göre elektronun ve çekirdeğin manyetik momentleri,

$$\vec{\mu}_s = -g\frac{e}{2m_e}\vec{S} = -g\frac{\beta}{\hbar}\vec{S} \quad (2.20)$$

$$\vec{\mu}_N = g_N\frac{e}{2m_p}\vec{I} = g_N\frac{\beta_N}{\hbar}\vec{I} \quad (2.21)$$

biçiminde yazılabilir. Burada $\vec{S}$ ve $\vec{I}$ sırasıyla elektron ve çekirdeğin spin vektörleri, m_e ve m_p'de elektron ve protonun kütleleridir. β ve β_N ile tanımlanan katsayılar ise sırasıyla elektron için Bohr manyetonu ve çekirdek için Bohr manyetonudur. Bu değerler sırasıyla $\beta=9.27408\times10^{-21}$ erg/Gauss ve $\beta_N=5.05095\times10^{-24}$ erg/Gauss'tur.

2.2.3. ESR de rezonans şartı

$\vec{H}$ şiddetinde bir manyetik alan içine manyetik dipol momenti $\vec{\mu}$ olan bir parçacık yerleştirildiğinde dipol momentin alanla etkileşim enerjisi,

$$E = -\vec{\mu}.\vec{H} \quad (2.22)$$

olur. Burada parçacığın elektron olduğunu kabul edersek, elektronun spininden dolayı manyetik alanda kazandığı enerji, açısal momentumu $\hbar$ birimlerinde alındığında,

$$E = g\beta\vec{S}.\vec{H} \quad (2.23)$$

olacaktır. Manyetik alanı +z yönünde seçersek, elektron spini z doğrultusunda kuantumlanacaktır. Elektron s=1/2 spin kuantum sayısına sahip olduğundan $\hbar$ birimlerinde

$$S = \sqrt{s(s+1)} = \sqrt{1/2(1/2+1)} = \sqrt{3/4} \quad (2.24)$$

spin açısal momentum büyüklüğüne sahiptir. z ekseni üzerinde ise $\hbar$ birimlerinde S_z= ±1/2 şeklinde iki değere sahiptir. Yani S_z büyüklük olarak hiçbir zaman S değerine ulaşamaz. Elektron spininin S_z değerine göre bu enerji değerleri;

$$E_{m_s} = g\frac{\beta}{\hbar}HS_z = g\beta Hm_s \tag{2.25}$$

olur ve buradan,

$$E_{+1/2} = g\beta H(+\tfrac{1}{2}) = \left(+\tfrac{1}{2}\right)g\beta H \tag{2.26}$$

$$E_{-1/2} = g\beta H\,(-\tfrac{1}{2}) = \left(-\tfrac{1}{2}\right)g\beta H \tag{2.27}$$

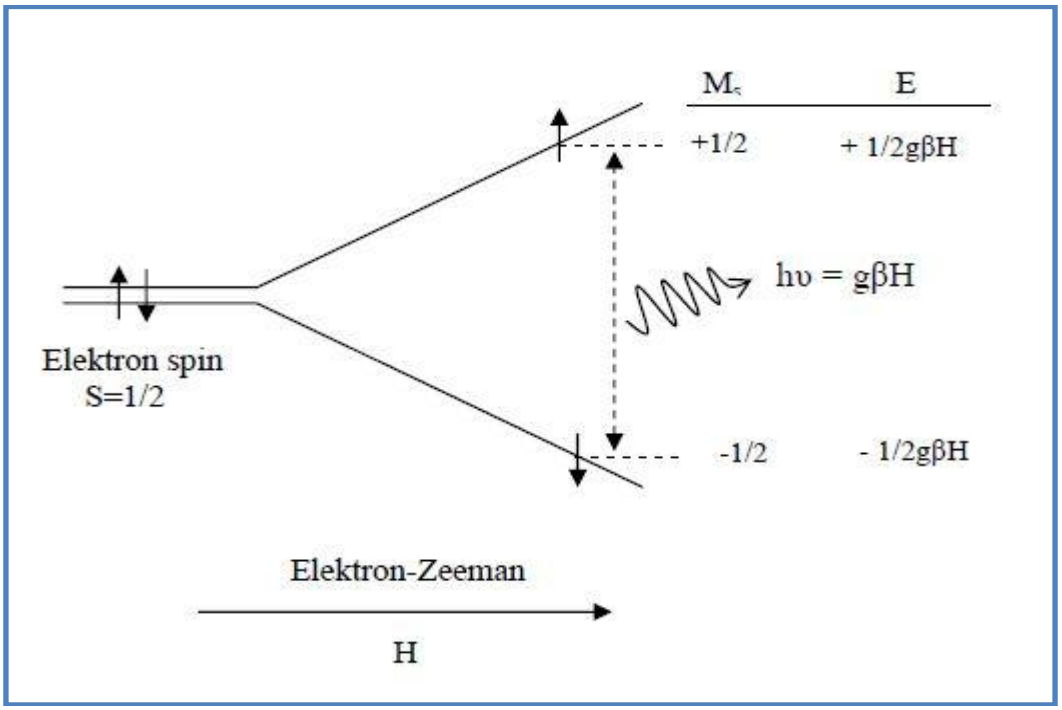
şeklinde yazılabilir. Bu iki durum arasındaki enerji farkı da,

$$\Delta E = \left(E_{+1/2}\right) - \left(E_{-1/2}\right) = (+\tfrac{1}{2})g\beta H - (-\tfrac{1}{2})g\beta H = g\beta H \tag{2.28}$$

olur. Bu iki düzey arasında bir geçiş olabilmesi için $m_s = -\frac{1}{2}$ kuantum sayısına sahip elektrona h Planck sabiti, v frekans olmak üzere ΔE= hv enerjili bir elektromanyetik dalga gönderilmelidir. Böylece bağıntı (2.28);

$$h\upsilon = g\beta H \tag{2.29}$$

biçimini alır. Bu ifade ise Elektron Spin Rezonans (ESR) için rezonans şartıdır, bu şart sağlanmadıkça ESR de geçişler gözlenemez. Bu geçiş, serbest elektron için g=2.0023 olup v = 9.4 GHz frekanslı bir mikrodalgada ESR geçişi H=3354 G değerinde gözlenir (Wertz ve Bolton 1972). Şekil 2.4 de ESR geçişi gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Dış manyetik alan içindeki elektronun enerji düzeylerinin yarılması

2.2.4. Spin hamiltoniyeni

Atomların ve moleküllerin farklı enerji düzeylerine karşılık gelen hamiltoniyeni birçok terimden oluşur. Bu terimler, dönme titreşim ve elektronik yapıya karşılıktır ve enerji büyüklükleri $E_{dönü}<E_{tit}<E_{el}$ biçimindedir. Elektromanyetik spektrum, düşük frekanslı radyo dalgalarından yüksek frekanslı gama ışınlarına kadar uzanan geniş bir spektrumu içerir. Elektromanyetik spektrumun (3-35 GHz) mikrodalga bölgesine karşılık gelen hamiltoniyenlerle ilgilenilir. Bu bölgeyi ilgilendiren önemli hamiltoniyen terimleri,

$$\mathcal{H} = \beta\vec{H}.\bar{\bar{g}}.\vec{S} - \beta_N\vec{H}.\bar{\bar{g}}_N.\vec{I} + \vec{S}.\bar{\bar{A}}.\vec{I} + \vec{S}.\bar{\bar{D}}.\vec{S} + \vec{I}.\bar{\bar{Q}}.\vec{I} + \lambda(r)\vec{L}.\vec{S} + \cdots \qquad (2.30)$$

şeklindedir. Bağıntı (2.30) de yer alan terimleri kısaca açıklayalım:

$\mathcal{H}_1 = \beta\vec{H}.\bar{\bar{g}}.\vec{S}$: Dış manyetik alan ile elektron spini arasındaki elektron-Zeeman etkileşme enerjisi,

$\mathcal{H}_2 = -\beta_N\vec{H}.\bar{\bar{g}}_N.\vec{I}$: Dış manyetik alan ile çekirdek spini arasındaki çekirdek-Zeeman etkileşme enerjisi,

$\mathcal{H}_3 = \vec{S}.\bar{\bar{A}}.\vec{I}$: Elektron spini ile çekirdek spini arasındaki aşırı ince yapı etkileşme enerjisi,

$\mathcal{H}_4 = \vec{S}.\bar{\bar{D}}.\vec{S}$: İki veya daha fazla elektron spinleri arasındaki ince yapı etkileşme enerjisi,

$\mathcal{H}_5 = \vec{I}.\bar{\bar{Q}}.\vec{I}$: Çekirdek spinleri arasındaki çekirdek kuadrupol etkileşme enerjisi,

$\mathcal{H}_6 = \lambda(r)\vec{L}.\vec{S}$: Spin- yörünge etkileşme enerjisini

temsil ederler. Bazı özel durumlarda bu terimlere ek olarak, sıcaklığa bağlı spin-dönme, manyetik alan yörünge ve kristal alanı gibi terimler de eklenebilir. İlgilenilen konuya bağlı olarak uygun terimler göz önüne alınır, diğerleri ihmal edilir. Bu seçim tamamen problemin niteliğine bağlıdır.

ESR spektroskopisinden elde edilen bilgiler, yukarıda belirtilen spin hamiltoniyenindeki çeşitli değişkenler ve bu değişkenlerin özelliklerine bağlı olarak elde edilir. En fazla kullanılan ve faydalı bilgiler veren değişkenler;

a) Çizginin yeri (g-çarpanı),
b) Çizgiler arası uzaklık (aşırı ince yapı etkileşme sabiti)
c) Çizgi sayısı (aşırı ince yapı veren çekirdek sayısı)
d) Çizgi şiddeti (rezonans çizgisi altında kalan alan)

gibi niceliklerdir (Berliner,1956; Atherton,1973).

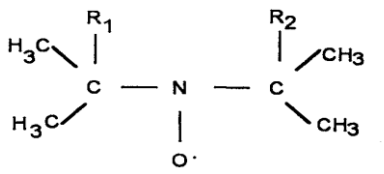
2.3. Paramanyetizma

Maddeler, manyetik alan etkisine bırakıldıklarında manyetik alandan etkilenme özelliğine göre; diyamanyetik, ferromanyetik ve paramanyetik maddeler olarak isimlendirilirler.

Diyamanyetik maddelerdeki atom, iyon ya da molekülün son yörüngesindeki elektronlar çiftlenmiştir, paramanyetik ve ferromanyetik maddelerdeki atom, iyon ya da molekülün son yörüngesindeki elektronlar çiftlenmemiştir. Bu nedenle diyamanyetik maddeler de etkileşmesi yoktur. ESR, çiftlenmemiş elektrona sahip kuantum sistemleri olan paramanyetik maddeleri içerir.

Paramanyetizma; mıknatıslanmanın, elektronların sahip oldukları spinden veya yörünge açısal momentumundan kaynaklanan manyetik momentin etkisiyle oluşmasıdır.

ESR spin etiketleme uygulamalarında paramanyetik olmayan numunelerin davranışlarını incelemek için nitroksit radikaller (kökçeler) kullanılır. Kararlı serbest radikallerin bir sınıfı olan Nitroksit radikalleri 1956 yılında keşfedildi. Nitroksit radikalleri moleküler hareketlilik, koenzim, inhibitör veya spin etiketi gibi tanıtılabilir. Bir başka şekilde nitroksit protein veya diğer makro moleküle direk olarak katılabilir, bu durumda spin etiketleme molekülün yapısı ve onun sistemlerdeki biçimsel değişimleri hakkında bilgi verir. Bunların anlaşılmasından sonra bu tür sentezleme ve bu radikallerin özellikleri artarak ilgi gördü.



Şekil 2.5. Nitroksit radikalin genel formülü

Şekil 2.5. deki R_1 ve R_2 aminoasit ya da belli bir grupla reaksiyon oluşturacak kenar gruplarıdır. Bu yüzden spin-etiketleme seçimi etiketlenecek yere göre yapılır. Nitroksit radikallerin özellikleri;

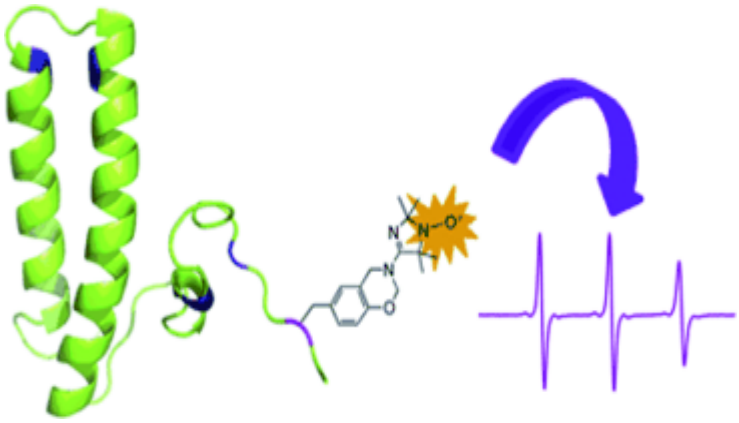
- ✓ Biyolojik sistemlerde nitroksit radikalleri kararlıdır,
- ✓ Nitroksit kısmın çözünürlüğü, polar ve apolar çözücülerin her ikisinde de mükemmeldir,
- ✓ Nitroksit serbest radikalleri birbirleriyle reaksiyon vermezler,
- ✓ Biyolojik sistemlere uyum sağlarlar,
- ✓ Anizotropik olan aşırı ince yapı etkileşimi basittir ve çözücüye kuvvetli olarak bağımlı değildir.

2.4. ESR Spin Etiketleme

Doğal olarak paramanyetik olmayan ya da paramanyetikliği çok zayıf olan ortamlara nitroksit serbest radikalleri (kökçeleri) katarak ortam hakkında bilgi edinmeye spin etiketleme (spin labeling) denir. Kullanılan serbest radikaller ortama bağlanıyorsa 'spin etiketi', ortama bağlanmayıp girip çıkıyorsa 'spin probe' denir. Her bir etiket üç ana bölümden oluşur. Bunlar:

- Bir ESR sinyali sağlayan paramanyetik kısım (N-Ȯ),
- Belirli protein gruplarına bağlanmayı sağlayan kimyevi aktif kısım ve
- Bir dizi atomdan oluşan zincir kısımdır.

Zincir kısmının yapısı (uzunluk, esneklik, hidrofobik tabiat ve polarite) protein fazına ilave edilen etiketlerin davranışını belirler.



Şekil 2.6. Spin etiketleme tekniğinin basit gösterimi

Spin etiketlerinin en önemli özelliği, biyolojik moleküllerin incelenmesinde kullanılan şartlar altındaki kararlığıdır. Bunlar pH değeri 2-10 olan sulu çözeltilerde, yüksek ve düşük tuz konsantrasyonlarında ve geniş bir sıcaklık aralığında kararlılıklarını muhafaza ederler (Berliner, 1976).

Etiketlemenin sağladığı bilgi ve avantajlar şunlardır:

i. Fonksiyonel protein grupları ve diğer gruplar arasındaki uzaklıkların belirlenmesi, biyolojik fazlarda etiketlerin girdiği yerlerin derinliğinin belirlenmesi,

ii. Bağlı etiketlerin çevresindeki su-protein, zar ve diğer fazlardaki farklı katmanların hareketliliği ve yerel kısımların incelenmesi,

iii. Proteinler, enzimler ve daha başka yapılardaki konformosyonel değişmelerin belirlenmesi,

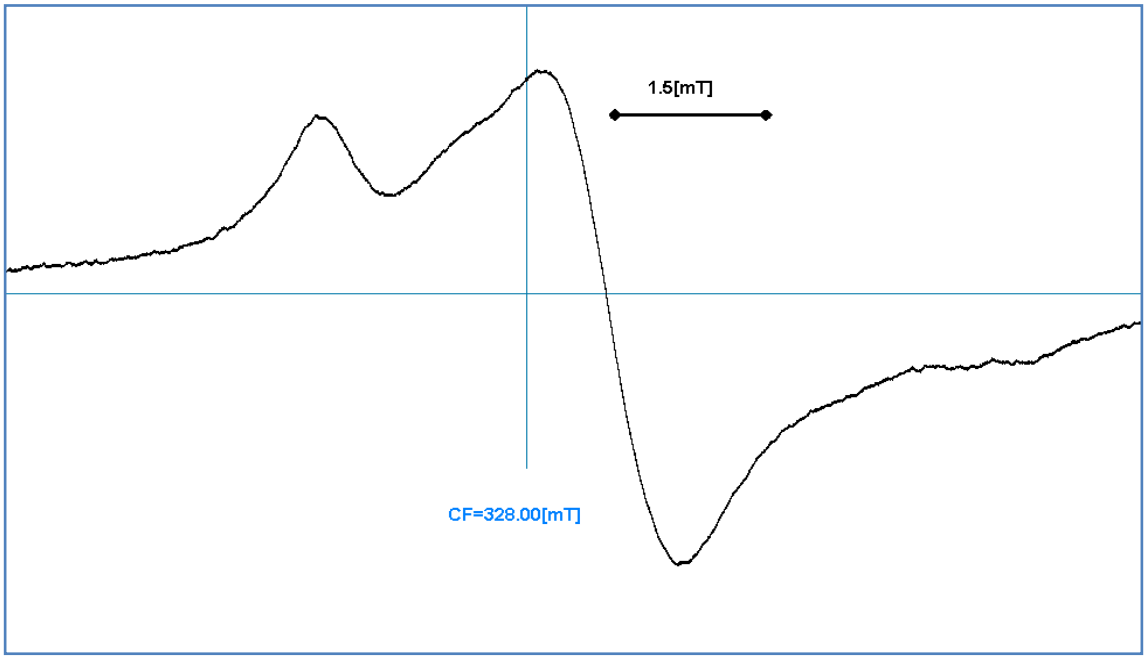
iv. Proteinleri, enzimler ve başka sistemlerin sulu çözeltileri ile çalışma imkanı,

v. Bir biyolojik fazın farklı kısımlarının dinamik karakteristiği üzerine bilgi elde etme imkanı,

vi. Çok hızlı moleküler hareketi ölçme imkanı sağlaması.

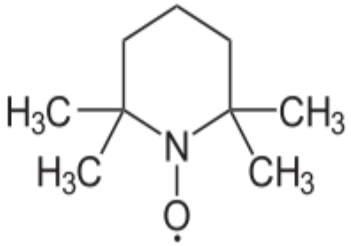
Nitroksit radikallerin ESR spektrumlarından elde edilen A_N çekirdek aşırı ince yapı yarılma sabiti ve g-çarpanının çözücüye bağlı olduğu bilinmektedir (Atherton ve ark., 1977). İşte bu özellik nedeniyle spin etiketleme tekniği çeşitli biyolojik ortamların polaritesi hakkında bilgi verir. Ayrıca anizotropik ortamlarda A ve g değerleri radikallerin ortam içindeki yönelmelerine bağlıdır. Böylece sokulduğu ortam hakkında yapısal ve dinamik bilgiler elde edilmektedir (Berliner, 1976). Spin etiketleme yöntemiyle protein moleküllerinin yapısındaki hassas değişmeler, zarlar, enzimler gibi sistemlerin incelenmesi sağlanır.

Bu çalışmada, spin etiketi olarak nitroksit kararlı radikallerinden olan 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinyloxy (TEMPO) kullanılmıştır. Bu etiketin kimyasal yapısı ve molekül ağırlığı Çizelge (2.1) de verilmiştir. Tempo-tolüen çözeltisinin 123K sıcaklığındaki spektrumu Şekil 2.7 de verilmiştir.



Şekil 2.7. Tempo tolüen çözeltisinin 123K deki ESR spektrumu

Çizelge 2.1. Tempo spin etiketinin molekül yapısı

Adı	Kimyasal Yapısı	Moleküler Ağırlığı
TEMPO 2,2,6,6 – tetrametil -1- piperidinyloxy		156.25 g/mol

2.5. Aşırı İnce Yapı Etkileşmesi

Paramanyetik örneklerin ESR spektrumları Gauss mertebesinden birkaç kilograma kadar alana yayılırlar. Bu spektrum çizgilerinin dağılımı çoğu kez merkez noktasına göre simetriktir. Böyle spektrumlar paramanyetik örnekteki elektron ve çekirdek spinleri arasındaki manyetik etkileşme sonucu oluşur. Bu manyetik etkileşme aşırı ince yapı etkileşmesi olarak tanımlanır. Çiftlenmemiş elektronun yakınında çekirdek spin kuantum sayısı $I \neq 0$ olan bir çekirdek varsa, çekirdek sahip olduğu

manyetik momentin etkisiyle elektronun bulunduğu yerde bir manyetik alan meydana getirecektir. Böylece çiftlenmemiş elektron yalnızca dış manyetik alan etkisinde değil, aynı zamanda çekirdeğin oluşturduğu manyetik alanın etkisinde de kalacaktır. Bu manyetik alanın büyüklüğü serbest radikalin toplam elektronik yapısı, çekirdeğin manyetik momenti ve çekirdek spininin toplam alan içindeki yönüyle belirlenir. Bu durumda elektrona etki eden toplam manyetik alan, dış manyetik alan ($\vec{H}_d$) ve çekirdeğin alanıdır ($\vec{H}_ç$).

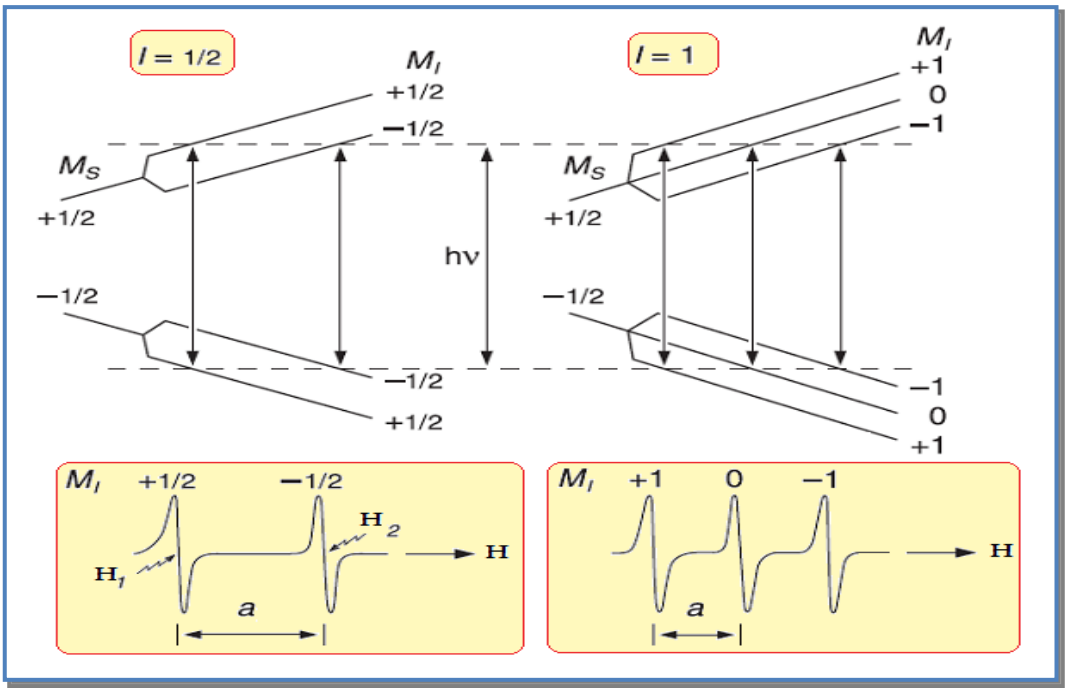
$$\vec{H}_{etkin} = \vec{H}_d + \vec{H}_ç \tag{2.31}$$

I spinine sahip olan çekirdekler $\vec{\mu}_I = g_N \frac{\beta_N}{\hbar} \vec{I}$ ile verilen bir manyetik momente sahiptirler. Eşitlikte g_N çekirdek spektroskopik yarılma çarpanı, β_N ise çekirdek bohr manyetonu olarak tanımlanır. SI birim sisteminde; $\beta_N = |e|\hbar/2m_p = 5.0508x10^{-27} JT^{-1}$ olarak verilir. Çizelge 2.2 de ESR sıkça karşımıza çıkan çekirdeklerin spin kuantum sayıları verilmektedir.

Çizelge 2.2. Bazı seçilmiş çekirdeklerin spin kuantum sayıları

çekirdek	spin	çekirdek	spin	çekirdek	spin
^{1}H	$1/2$	^{15}N	$1/2$	^{35}Cl	$3/2$
^{2}H	1	^{19}F	$1/2$	^{51}V	$7/2$
^{13}C	$1/2$	^{23}Na	$3/2$	^{55}Mn	$5/2$
^{14}N	1	^{31}P	$1/2$	^{59}Co	$7/2$

I spinine sahip çekirdeğin m_I manyetik kuantum sayısı toplam $(2I+1)$ tane değer alacağı için, çekirdeğin oluşturacağı yerel manyetik alan da $(2I+1)$ tane değer alacaktır. Bunun sonucu olarak da elde edilen ESR rezonans çizgileri $(2I+1)$ tane çizgiye yarılacaktır. Bu duruma örnek $I = 1/2$ ve $I = 1$ için Şekil 2.8 de verilmektedir.



Şekil 2.8. Çekirdek spini I=1/2 ve I=1 olan sistemlerin ESR spektrumları

Aşırı ince yapı etkileşmesi izotropik olabileceği gibi anizotropik de olabilir. Yani manyetik sistemlerde aşırı ince yapı yarılmasının iki temel kaynağı vardır. Bunlar; çiftlenmemiş bir elektron ile proton arasındaki yönelmeden bağımsız olarak ortaya çıkan izotropik aşırı ince yapı etkileşmesi (Fermi etkileşmesi) ve eşlenmemiş elektron ile çekirdek arasındaki dipol-dipol (dipolar) etkileşmeleri sonucu yönelime bağlı anizotropik aşırı ince yapı etkileşmeleridir. Bir sistemdeki toplam aşırı ince yapı etkileşmesi Fermi etkileşmesi ile dipolar etkileşmelerin toplamıdır.

2.5.1. Anizotropik aşırı ince yapı etkileşmesi (dipolar etki) ve A tensörü

İki spin sistemi arasındaki dipol-dipol etkileşimini incelemek için $\vec{H}_0$ manyetik alanı içinde manyetik momentleri $\vec{\mu}_1$ ve $\vec{\mu}_2$ olan iki dipol göz önüne alınır. Klasik elektromanyetik teoriye göre, bu manyetik dipollerden biri diğerinin bulunduğu noktada bir manyetik alan oluşturacaktır. Bu iki dipol arasındaki etkileşme hamiltoniyeni;

$$\mathcal{H} = \frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{r^3} - \frac{3}{r^5}(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r}) \qquad (2.32)$$

olarak yazılır. Burada r iki dipol arasındaki uzaklıktır. Şimdi bu hamiltoniyeni elde edelim.

Orijinde bulunan ve $\vec{\mu}_1$ manyetik momentine sahip olan çekirdekten dolayı, r kadar uzaklıktaki bir noktada, $\vec{\phi}$ kadar bir vektörel potansiyel oluşur. Burada $\vec{\phi}$;

$$\vec{\phi} = \frac{\mu_0}{4\pi}\frac{\vec{\mu}_1 \times \vec{r}}{r^3}$$

$$\vec{\phi} = \frac{\mu_0}{4\pi r^3}\left(\vec{\mu}_1 \times \vec{r}\right) \tag{2.33}$$

Bu potansiyelden hareketle çekirdeğin oluşturduğu manyetik alan şöyledir.

$$\vec{H} = \vec{\nabla} \times \vec{\phi} \tag{2.34}$$

Bir (x, y, z) koordinat sisteminde,

$$|\vec{r}| = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$$

$$\vec{H} = \begin{vmatrix} \hat{i} & \hat{j} & \hat{k} \\ \partial/\partial x & \partial/\partial y & \partial/\partial z \\ \phi_x & \phi_y & \phi_z \end{vmatrix} \tag{2.35}$$

şeklindedir. $\vec{H}$ yi bulabilmek için önce $\vec{\phi}$ yi yazmaya çalışalım.

$$\vec{\phi} = \frac{\mu_0}{4\pi r^3}\begin{vmatrix} \hat{i} & \hat{j} & \hat{k} \\ \mu_{1_x} & \mu_{1_y} & \mu_{1_z} \\ x & y & z \end{vmatrix}$$

$$\vec{\phi} = \frac{\mu_0}{4\pi r^3}\left[\hat{i}\left(\mu_{1_y} z - \mu_{1_z} y\right) - \hat{j}\left(\mu_{1_x} z - \mu_{1_z} x\right) + \hat{k}\left(\mu_{1_x} y - \mu_{1_y} x\right)\right] \tag{2.36}$$

Böylece $\mu_0/4\pi$ dışındaki terimleri $\vec{H}$ determinantına taşıyalım, ϕ_x , ϕ_y , ϕ_z bileşenlerini $\vec{H}$ de yerine yazalım.

$$\vec{H}=\begin{vmatrix} \hat{i} & \hat{j} & \hat{k} \\ \dfrac{\partial}{\partial x} & \dfrac{\partial}{\partial y} & \dfrac{\partial}{\partial z} \\ \dfrac{\mu_{1_y} z-\mu_{1_z} y}{\left(x^2+y^2+z^2\right)^{3/2}} & \dfrac{\mu_{1_z} x-\mu_{1_x} z}{\left(x^2+y^2+z^2\right)^{3/2}} & \dfrac{\mu_{1_x} y-\mu_{1_y} x}{\left(x^2+y^2+z^2\right)^{3/2}} \end{vmatrix} \tag{2.37}$$

Bu determinant kurala uygun açılırsa ve düzenleme yapılırsa;

$$\begin{aligned} \vec{H}=&\left(\frac{2\mu_{1_x}}{r^3}\right)\hat{i}+\left(\frac{2\mu_{1_y}}{r^3}\right)\hat{j}+\left(\frac{2\mu_{1_z}}{r^3}\right)\hat{k} \\ &-\left[\frac{3\mu_{1_x}}{r^5}\left(x^2+y^2+z^2\right)\right]\hat{i}+\left(\frac{3\mu_{1_x}x^2}{r^5}\right)\hat{i}+\left[\frac{3\mu_{1_y}yx}{r^5}+\frac{3\mu_{1_z}zx}{r^5}\right]\hat{i} \\ &-\left[\frac{3\mu_{1_y}}{r^5}\left(x^2+y^2+z^2\right)\right]\hat{j}+\left(\frac{3\mu_{1_y}y^2}{r^5}\right)\hat{j}+\left[\frac{3\mu_{1_x}xy}{r^5}+\frac{3\mu_{1_z}zy}{r^5}\right]\hat{j} \\ &-\left[\frac{3\mu_{1_z}}{r^5}\left(x^2+y^2+z^2\right)\right]\hat{k}+\left(\frac{3\mu_{1_z}z^2}{r^5}\right)\hat{k}+\left[\frac{3\mu_{1_x}xz}{r^5}+\frac{3\mu_{1_y}yz}{r^5}\right]\hat{k} \end{aligned} \tag{2.38}$$

biçiminde elde edilir. Bu manyetik alan etkisinde ikinci manyetik momentin hamiltoniyeni ise;

$$\mathcal{H}=-\vec{\mu}_2\cdot\vec{H} \tag{2.39}$$

$$\mathcal{H}=-\left(\mu_{2x}\hat{i}+\mu_{2y}\hat{j}+\mu_{2z}\hat{k}\right)\cdot\vec{H} \tag{2.40}$$

olarak yazılır. Bağıntı (2.40) da manyetik alan değeri yerine yazılır ve gerekli kısaltmalar yapılırsa $\vec{H}$ manyetik alanındaki $\vec{\mu}_2$ manyetik momentinin enerji hamiltoniyeni;

$$\mathcal{H}=\frac{\vec{\mu}_1\cdot\vec{\mu}_2}{r^3}-\frac{3}{r^5}\left(\vec{\mu}_1\cdot\vec{r}\right)\left(\vec{\mu}_2\cdot\vec{r}\right) \tag{2.41}$$

alıp bu hamiltoniyene aynı zamanda manyetik momentleri $\vec{\mu}_1$ ve $\vec{\mu}_2$ olan etkileşme hamiltoniyeni de diyebiliriz. Özel olarak $\hbar$ birimlerinde; $\vec{\mu}_1 = g_N \beta_N \vec{I}$ ve $\vec{\mu}_2 = -g_e \beta_e \vec{S}$ alınıp gösterildiğinde ve $r \neq 0$ durumunda;

$$\mathcal{H} = g_N \beta_N g_e \beta_e \left\{ \frac{3}{r^5} \left(\vec{I} \cdot \vec{r} \right) \left(\vec{S} \cdot \vec{r} \right) - \frac{1}{r^3} \left(\vec{I} \cdot \vec{S} \right) \right\} \tag{2.42}$$

biçiminde elde edilir. Bağıntı (2.42) deki hamiltoniyeni açalım.

$$\mathcal{H} = g_N \beta_N g_e \beta_e \left\{ \begin{array}{l} \frac{3}{r^5} \left(I_x x + I_y y + I_z z \right) \left(S_x x + S_y y + S_z z \right) \\ -\frac{1}{r^3} \left(I_x S_x + I_y S_y + I_z S_z \right) \end{array} \right\} \tag{2.43}$$

$$= g_N \beta_N g_e \beta_e \left\{ \begin{array}{l} I_x S_x \left(\frac{3x^2 - r^2}{r^5} \right) + I_y S_y \left(\frac{3y^2 - r^2}{r^5} \right) + I_z S_z \left(\frac{3z^2 - r^2}{r^5} \right) \\ + \frac{3xy}{r^5} \left(I_x S_y + I_y S_x \right) + \frac{3xz}{r^5} \left(I_x S_z + I_z S_x \right) + \frac{3yz}{r^5} \left(I_y S_z + I_z S_y \right) \end{array} \right\}$$

Burada $r = \left(x^2 + y^2 + z^2 \right)^{1/2}$ dir. Bu hamiltoniyen ifadesini matris biçiminde düzenlersek;

$$\mathcal{H} = g_N \beta_N g_e \beta_e \left\{ \begin{array}{l} \left[\left(\frac{3x^2 - r^2}{r^5} \right) I_x + \left(\frac{3xy}{r^5} \right) I_y + \left(\frac{3xz}{r^5} \right) I_z \right] S_x \\ + \left[\left(\frac{3y^2 - r^2}{r^5} \right) I_y + \left(\frac{3xy}{r^5} \right) I_x + \left(\frac{3yz}{r^5} \right) I_z \right] S_y \\ + \left[\left(\frac{3z^2 - r^2}{r^5} \right) I_z + \left(\frac{3xz}{r^5} \right) I_x + \left(\frac{3yz}{r^5} \right) I_y \right] S_z \end{array} \right\} \tag{2.44}$$

$$\mathcal{H} = g_N \beta_N g_e \beta_e \begin{bmatrix} I_x & I_y & I_z \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \frac{3x^2 - r^2}{r^5} & \frac{3xy}{r^5} & \frac{3xz}{r^5} \\ \frac{3xy}{r^5} & \frac{3y^2 - r^2}{r^5} & \frac{3yz}{r^5} \\ \frac{3xz}{r^5} & \frac{3yz}{r^5} & \frac{3z^2 - r^2}{r^5} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} S_x \\ S_y \\ S_z \end{bmatrix} \qquad (2.45)$$

$$\mathcal{H} = \vec{I} \cdot \vec{\vec{A}}^0 \cdot \vec{S} \qquad (2.46)$$

buluruz.

Hamiltoniyeni bağıntı (2.46) da olduğu gibi tensörel biçimde yazabiliriz. Burada $\vec{\vec{A}}^0$; dipolar çiftlenim tensörü veya anizotropik aşırı ince yapı tensörü adını alır. Tensörün köşegen elemanları;

$$A_{ii}^0 = g_N \beta_N g_e \beta_e \left\langle \frac{3i^2 - r^2}{r^5} \right\rangle \quad , \quad i = x, y, z \qquad (2.47)$$

Benzer olarak tensörün köşegen olmayan elemanları;

$$A_{ij}^0 = g_N \beta_N g_e \beta_e \left\langle \frac{3ij}{r^5} \right\rangle \quad , \quad i = x, y, z \qquad (2.48)$$

$\vec{\vec{A}}^0$ tensörü gerçek ve simetriktir. Tensörün köşegen elemanlarına bakılırsa tensörün İz' inin (köşegen elemanlarının toplamı) sıfır olduğu görülecektir. Dolayısıyla benzerlik dönüşümü altında tensör köşegen hale getirilirse İz yine sıfır olacaktır. Yani dipolar etkileşmenin ortalama değeri sıfırdır. Sıvı ve gaz fazında kaydedilen ESR spektrumlarında hızlı ve rastgele dönme hareketlerinden dolayı dipolar kısım ortalanacağı için gözlenmez ve sadece izotropik kısım gözlenir.

$\vec{\vec{A}}^0$ ın İz' siz oluşu, S elektronlarından başka elektronların çekirdekle izotropik etkileşme yapmayacağını gösterir. Tensörün simetrik oluşu ise, bir tek çiftlenmemiş elektron, örneğin $2p$ yörüngesinde ise uygun bir dönüşümle tensörün köşegen hale getirilebileceğini gösterir ve bu durumda esas eksen $2p$ yörüngesinin simetri ekseni olur. p foksiyonları silindirik simetriye sahip olduğundan köşegen haldeki tensör de

silindirik simetriye sahip olacaktır. Yani, anizotropi küresel dışı bir simetriye sahiptir (Atherton 1973, Poole 1972).

2.5.2. İzotropik aşırı ince yapı etkileşmesi (Fermi etkileşmesi)

Eşlenmemiş bir elektron ile çekirdek spini arasındaki yönelimden bağımsız olarak ortaya çıkan etkileşmeye izotropik aşırı ince yapı etkileşmesi veya Fermi etkileşmesi adı verilir.

Fermi etkileşmesinin olabilmesi için elektronun çekirdeğin üzerinde bulunabilme ihtimalinin sıfırdan farklı olması gerekir. Elektronun s atomik yörüngeleri bu koşulu sağlar. Ancak elektronun p , d , f.... atomik yörüngelerde bulunması durumu bu koşulu sağlamaz. Çünkü p , d , f.... yörüngelerinin hepsi çekirdekte düğüm noktalarına sahiptir. Yani çekirdek üzerinde elektronun bulunma olasılığı sıfırdır. Fermi bir elektronlu sistemler için izotropik etkileşme enerjisinin,

$$E_{izotropik} = -\frac{8\pi}{3}\mu_N \mu_e |\psi(0)|^2 \tag{2.49}$$

ile verildiğini göstermiştir. Burada $|\psi(0)|^2$ çekirdekte değerlendirilen elektron dalga fonksiyonunun karesini temsil eder, yani elektronun çekirdek üzerinde bulunma olasılığıdır. Çekirdek ve elektronun manyetik dipol momentleri sırasıyla $\vec{\mu}_N = g_N \beta_N \vec{I}$, $\vec{\mu}_e = -g_e \beta_e \vec{S}$ olarak yazılırsa spin hamiltoniyeni işlemcisi,

$$\mathcal{H} = \frac{8\pi}{3} g_e g_N \beta_e \beta_N |\psi(0)|^2 \vec{S} \cdot \vec{I} \tag{2.50}$$

olarak gösterilir, sabitler a ile gösterilirse hamiltoniyen ifadesi aşağıdaki gibi elde edilir.

$$a = \frac{8\pi}{3} g_e g_N \beta_e \beta_N |\psi(0)|^2 \tag{2.51}$$

$$\mathcal{H} = a\vec{S} \cdot \vec{I} \tag{2.52}$$

Burada a, izotropik etkileşme (Fermi etkileşme) sabitidir ve kaynaklanan çekirdek üzerinde bulunma olasılığı $|\psi(0)|^2$ ile orantılıdır. Bu değer spinden yerel manyetik alanın varlığında gözlenen iki çizgi arasındaki farktır.

Teorik olarak birçok paramanyetik iyon ve radikalde izotropik ince yapı etkileşmesinin gözlenmemesi gerekir fakat manyetik sistemin uyarılmış düzeyinin s atomik yörüngesine benzemesi durumunda izotropik aşırı ince yapı yarılması ortaya çıkar (Gordy 1973, Weil ve ark. 1993).

Dipolar etkileşme, bağıntı (2.46) ile Fermi etkileşmesinin bağıntı (2.52) toplamını, toplam aşırı ince yapı etkileşmesi olarak alınırsa;

$$\mathcal{H} = \vec{S} \cdot \vec{\vec{A}}^0 \cdot \vec{I} + a\,\vec{S} \cdot \vec{I} \tag{2.53}$$

$$\mathcal{H} = \vec{S} \cdot \vec{\vec{A}} \cdot \vec{I} \tag{2.54}$$

biçiminde elde edilir. $\vec{\vec{U}}$ birim (üniter) tensör olmak üzere; toplam aşırı ince yapı tensörü $\vec{\vec{A}}$ aşağıda verildiği gibidir.

$$\vec{\vec{A}} = a\vec{\vec{U}} + \vec{\vec{A}}^0 \tag{2.55}$$

Uygun bir benzerlik dönüşümü altında $\vec{\vec{A}}^2$ tensörü diagonal hale getirilebilir. Benzerlik dönüşüm matrisine $\vec{\vec{R}}$, diagonal $\vec{\vec{A}}^2$ tensörüne de $\left(\vec{\vec{A}}^2\right)^d$ denilirse;

$$\left(\vec{\vec{A}}^2\right)^d = \vec{\vec{R}}\left(\vec{\vec{A}}^2\right)\vec{\vec{R}}^T \tag{2.56}$$

$$\left(\vec{\vec{A}}^2\right)^d = \begin{bmatrix} (A_1)^2 & 0 & 0 \\ 0 & (A_2)^2 & 0 \\ 0 & 0 & (A_3)^2 \end{bmatrix} \tag{2.57}$$

biçiminde yazılır. Burada $A_i = a + A_i^0$ eşitliğinden yararlanarak $\vec{\vec{A}}$ tensörünün dipolar ve izotropik bileşenleri bulunabilir.

$$\vec{\vec{A}} = \begin{pmatrix} A_1 & 0 & 0 \\ 0 & A_2 & 0 \\ 0 & 0 & A_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a & 0 & 0 \\ 0 & a & 0 \\ 0 & 0 & a \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} A_1^0 & 0 & 0 \\ 0 & A_2^0 & 0 \\ 0 & 0 & A_3^0 \end{pmatrix} \tag{2.58}$$

Bu eşitliğin sağındaki ilk terim Fermi etkileşmesini, ikinci terim de dipol-dipol etkileşmesini göstermektedir. Burada izotropik aşırı ince yapı etkileşme sabiti;

$$a = \frac{1}{3}\left(A_1 + A_2 + A_3\right) \tag{2.59}$$

olarak elde edilir. Yani anizotropik değerlerin ortalaması izotropik değerdir. Sadece izotropik a değeri sıvı fazda olan evreler için gözlenebilir. Çünkü bu fazda molekül serbestçe hareket eder ve $\vec{\vec{A}}$ nın yöne bağlı kısımları birbirini yok eder.

Aşırı ince yapı etkileşme sabitinin esas eksen bileşenlerinin farklı değerleri için ortaya çıkacak spektrumlar üç farklı durum için incelenir.

İlk durum; $A_1 = A_2 = A_3$ durumudur. Bu durumda $\vec{\vec{A}}$ tensörü izotropiktir. Kristalin her yönelimi için elde edilecek ince yapı değeri ile toz spektrumdan elde edilen değer aynı olacaktır.

İkinci durum; $A_1 = A_2 \neq A_3$ eksensel simetrik durumdur. Eksene dik $A_\perp = A_1 = A_2$ ve eksene paralel $A_{//} = A_3$ bileşen değiştirmesi ile izotropik a değeri,

$$a = \frac{1}{3}\left(A_{//} + 2A_\perp\right) \tag{2.60}$$

biçiminde yazılabilir. Buradan a değeri, çizgi genişliğinin ince yapı sabitinden küçük olduğu durumda, kristalin toz spektrumunun $A_{//}$ ve $A_\perp$ değerleri ölçülerek bulunabilir.

Son durum; $A_1 \neq A_2 \neq A_3$ olarak bilinen anizotropik durumdur ve en iyi ortorombik yapılarda gözlenebilir. (Poole ve Farah, 1972).

2.6. Elektron Zeeman Etkileşmesi ve g Çarpanı

ESR de g-çarpanı, uygulanan H manyetik alanı ile etkin alan arasındaki farkın bir göstergesidir. Bir radikal veya kompleks bir bileşikte olduğu gibi, bir ortamda

bulunan elektron uygulanan H manyetik alanı dışında ortamın yerel manyetik alanından da etkilenir. Uygulanan alan ile gerçek alan arasındaki fark g-çarpanı içinde saklıdır ve rezonans koşulunda g_e yerine g yerleştirilir. Böylece, eğer elektron moleküler bir yörüngede değilse, $g = g_e$ ve elektron bir atoma aitse, $g = g_j$ yani Lande g çarpanı olur. Elektronun, manyetik alanda spinden dolayı sahip olacağı hamiltoniyen (H_{ez}),

$$H_{ez} = g\beta\vec{S}.\vec{H} \tag{2.61}$$

şeklinde verilir. Atomik bir yörüngedeki elektronun belirli bir yörüngesi olduğundan g-çarpanı hem spin hem de yörünge katkıları nedeniyle farklı değerler alır. Spin-yörünge çiftleniminin (Russel-Sounders çiftlenimi) göz önüne alınması ile bu çarpan,

$$g = 1 + \frac{j(j+1)+s(s+1)l(l+1)}{2j(j+1)} + \delta g_r \tag{2.62}$$

şeklinde verilir. Bağıntı (2.62) deki δg_r göreceli hareketten gelen katkıdır. Serbest elektron için (ℓ=0) g_e=2 olması beklenirken, göreceli hareket etkisi nedeniyle g_e=2.0023 olur. Göreceli Dirac denkleminin çözümünden ise bu değer kuramsal olarak g_e=2.002319288 bulunmuştur. Eşlenmemiş elektronun yörüngeleri genel olarak homojen olmadığından ve uygulanan manyetik alanın değişik yönlerinde ℓ farklı olduğundan, farklı g değerleri gözlenmektedir. Bu nedenle g çarpanı, ikinci mertebeden simetrik, gerçel bir tensördür ve

$$\bar{\bar{g}} = \begin{bmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{bmatrix} \tag{2.63}$$

şeklinde gösterilir. Genel olarak

$$H_{ez} = g_e\beta\vec{H}\cdot\vec{S} - \lambda\vec{L}\cdot\vec{S} + \beta\vec{H}\cdot\vec{L} \tag{2.64}$$

biçiminde yazılır. Burada λ spin-yörünge etkileşme sabitidir. Üçüncü terim, manyetik alan-yörünge etkileşme terimidir ve geçiş elementleri dışında hamiltoniyene dikkate değer bir katkı getirmez. Bağıntı (2.64) ile verilen hamiltoniyenin enerji özdeğerleri, uygun moleküler yörüngelerle pertürbasyon yaklaşımı kullanılarak, yönelime bağlı bir g tensöründe tüm etkileşmeleri içine alan;

$$H_{ez} = \beta\vec{H}\cdot\bar{\bar{g}}\cdot\vec{S} \tag{2.65}$$

hamiltoniyen yardımıyla bulunur. Kartezyen koordinat sisteminde

$$\vec{H} = H_x\vec{\imath} + H_y\vec{\jmath} + H_z\vec{k} \tag{2.66}$$

$$\vec{S} = S_x\vec{\imath} + S_y\vec{\jmath} + S_z\vec{k} \tag{2.67}$$

ve $\bar{\bar{g}}$ de ikinci dereceden gerçek bir tensör alınarak

$$\bar{\bar{g}} = \begin{bmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{bmatrix} \tag{2.68}$$

biçiminde yazılırsa hamiltoniyen daha açık olarak,

$$H_{ez} = \beta\begin{bmatrix} H_x & H_y & H_z \end{bmatrix}\begin{bmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{bmatrix}\begin{bmatrix} S_x \\ S_y \\ S_z \end{bmatrix} \tag{2.69}$$

biçiminde yazılır. Seçilen keyfi bir koordinat sisteminde oluşturulan $\bar{\bar{g}}$ tensörü $g_{ij} = g_{ji}$; i, j = x, y, z uygun bir benzerlik dönüşümü kullanılarak köşegen olduğu esas eksen takımına dönüştürülür. Buradan $\bar{\bar{g}}$ tensörünü oluşturmak için bağıntı (2.69) ifadesinden,

$$H_{etkin} = \frac{1}{g_e}\overline{\overline{g^T}}.H, \qquad H^T{}_{etkin} = \frac{1}{g_e}H^T\bar{\bar{g}} \tag{2.70}$$

yazabiliriz. Buradan etkin alanın büyüklüğü

$$H_{etkin} = \frac{1}{g_e}\left[(\overline{\overline{g^T}}.H)^T(\overline{\overline{g^T}}H)\right]^{1/2}. \tag{2.71}$$

biçiminde yazılır. İç çarpım yer değiştirmeden bağımsız olduğu için

$$H_{etkin} = \frac{1}{g_e}\left[H^T\bar{\bar{g}}.H.\overline{\overline{g^T}}\right]^{1/2} = \left\{\frac{1}{g_e}\left[\vec{n}^T.(\bar{\bar{g}}.\bar{\bar{g}}^T).\vec{n}\right]^{\frac{1}{2}}\right\} \tag{2.72}$$

olarak yazılabilir. $\vec{n}$, H yönünde birim vektör olmak üzere,

$$\vec{H}=H\,\vec{n};\quad \vec{n} = (cos\,\theta_x\vec{\imath} + cos\,\theta_y\vec{\jmath} + cos\,\theta_z\vec{k}) = (c_x\vec{\imath} + c_y\vec{\jmath} + c_z\vec{k}) \tag{2.73}$$

ifadesi bağıntı (2.72) de yerine yazılırsa,

$$H_{etkin} = \frac{1}{g_e}\left[\overrightarrow{n^T}(\bar{\bar{g}}.\overline{\overline{g^T}}).\vec{n}\right]^{\frac{1}{2}} H \tag{2.74}$$

ifadesine dönüşür. Dolayısıyla ölçülen yönelime bağlı g^2 değeri,

$$g^2=\overrightarrow{n^T}\left(\bar{\bar{g}}.\overline{\overline{g^T}}\right).\vec{n} \tag{2.75}$$

olur. Burada;

$$\vec{n} = \begin{bmatrix} C_x \\ C_y \\ C_z \end{bmatrix} \quad \text{ve} \quad \vec{n}^T = [C_x \quad C_y \quad C_z] \tag{2.76}$$

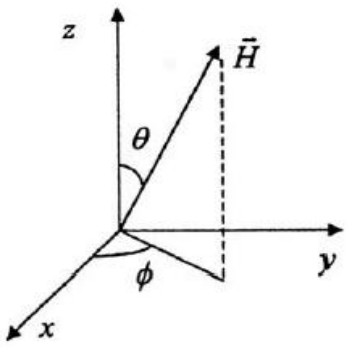
olmak üzere;

$$g^2(\theta) = [C_x \quad C_y \quad C_z]\begin{bmatrix} g_{xx}^2 & g_{xy}^2 & g_{xz}^2 \\ g_{yx}^2 & g_{yy}^2 & g_{yz}^2 \\ g_{zx}^2 & g_{zy}^2 & g_{zz}^2 \end{bmatrix}\begin{bmatrix} C_x \\ C_y \\ C_z \end{bmatrix} \tag{2.77}$$

olur. Bu durumda, $g^2 = \left(\overline{\overline{g.g^T}}\right)$ tensörü simetriktir ve gerçektir. Bu tensörün elemanları manyetik alan xy, xz ve yz düzlemleri içinde kalacak biçimde kristalin döndürülmesi ile bulunabilir. Yön kosinüsleri Şekil 2.9'a göre küresel koordinatlarda ;

$C_x = \sin\theta\cos\phi$; $C_y = \sin\theta\sin\phi$; $C_z = \cos\theta$

şeklinde yazılır.



Şekil 2.9. Deneysel koordinat sisteminde $\vec{H}$ manyetik alan vektörü ve yönelme açıları

H alanı xz düzlemi içinde, $\phi = 0^o$ durumunda, θ ise 0^o ile 180^o arasında değiştirildiğinden,

$C_x = \sin\theta\cos\phi = \sin\theta$

$C_y = \sin\theta\sin\phi = 0$

$C_z = \cos\theta$

olur. Bağıntı (2.76) daki denklem takımında yerine yazılırsa,

$$g^2(\theta) = [\sin\theta \quad 0 \quad \cos\theta] \begin{bmatrix} g_{xx}^2 & g_{xy}^2 & g_{xz}^2 \\ g_{yx}^2 & g_{yy}^2 & g_{yz}^2 \\ g_{zx}^2 & g_{zy}^2 & g_{zz}^2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sin\theta \\ 0 \\ \cos\theta \end{bmatrix} \tag{2.78}$$

olur, burada $\phi = 0^o$ y ekseni etrafında hareket edildiği için

$$(g^2)_{yy}(\theta) = (g^2)_{xx}\sin^2\theta + (g^2)_{zz}\cos^2\theta + 2(g^2)_{xz}\sin\theta\cos\theta \tag{2.79}$$

olacaktır. Benzer işlemler diğer eksenler için yapıldığında manyetik alan H'nın içinde kaldığı düzlemlere bağlı olarak g^2 fonksiyonları Çizelge 2.3 de görüldüğü gibi elde edilir. g tensörü gerçel, simetrik ($g_{ij} = g_{ji}$;i, j= x, y, z) ve ikinci dereceden bir tensördür.

Çizelge 2.3. Seçilen deneysel eksen sistemine göre g^2 fonksiyonlarının ifadeleri

Dönme ekseni	Manyetik alan ile paralel düzlem	g^2 fonksiyonu
z	xy	$(g^2)_{zz}(\phi) = (g^2)_{xx}\cos^2\phi + (g^2)_{yy}\sin^2\phi + 2(g^2)_{xy}\sin\phi\cos\phi$
y	zx	$(g^2)_{yy}(\theta) = (g^2)_{zz}\cos^2\theta + (g^2)_{xx}\sin^2\theta + 2(g^2)_{xz}\sin\theta\cos\theta$
x	yz	$(g^2)_{xx}(\theta) = (g^2)_{yy}\cos^2\theta + (g^2)_{zz}\sin^2\theta + 2(g^2)_{yz}\sin\theta\cos\theta$

Deneysel hatalarda, birbirine yakın olan ortak terimlerin ortalamasını alarak bağıntı (2.77) de verilen $\bar{\bar{g}}^2$ tensörünü elde edebiliriz. Bu simetrik ve gerçel tensörü uygun bir benzerlik dönüşümü altında köşegen hale getirebiliriz. Benzerlik dönüşümü matrisine R, köşegen g^2 tensörüne de $(\bar{\bar{g}}^2)_d$ dersek,

$$(\bar{\bar{g}}^2)_d = R(\bar{\bar{g}}^2)R^T \tag{2.80}$$

$$(\bar{\bar{g}}^2)_d = \begin{bmatrix} R_{xx} & R_{xy} & R_{xz} \\ R_{yx} & R_{yy} & R_{yz} \\ R_{zx} & R_{zy} & R_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} (g^2)_{xx} & (g^2)_{xy} & (g^2)_{xz} \\ (g^2)_{yx} & (g^2)_{yy} & (g^2)_{yz} \\ (g^2)_{zx} & (g^2)_{zy} & (g^2)_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R_{xx} & R_{yx} & R_{zx} \\ R_{xy} & R_{yy} & R_{zy} \\ R_{xz} & R_{yz} & R_{zz} \end{bmatrix} \tag{2.81}$$

$$(\bar{\bar{g}}^2)_d = \begin{bmatrix} (g_x)^2 & 0 & 0 \\ 0 & (g_y)^2 & 0 \\ 0 & 0 & (g_z)^2 \end{bmatrix} \quad (2.82)$$

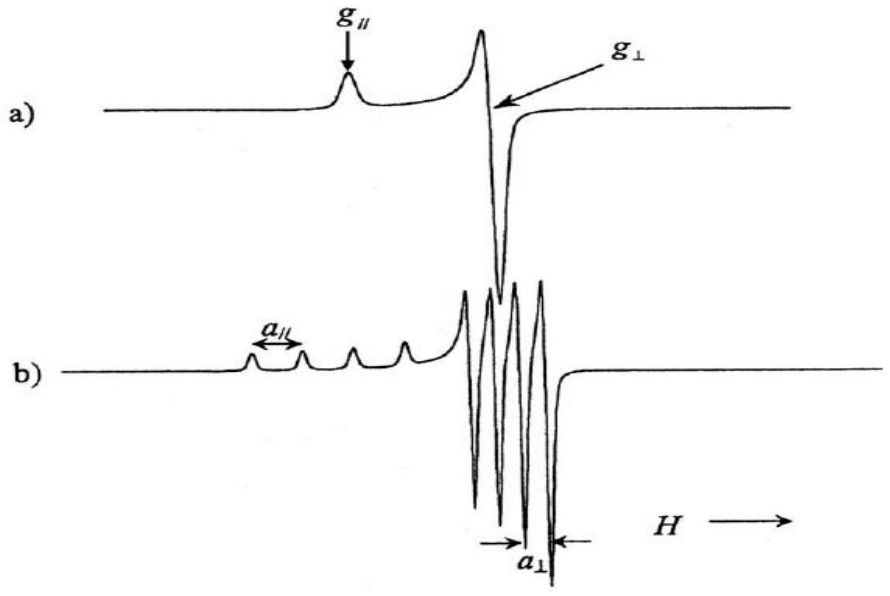
olur. Burada g_x, g_y ve g_z , $\bar{\bar{g}}$ tensörünün esas eksen değerleridir. R^T ise R'nin transpozudur. Simetrik matrisler için $R^T = R^{-1}$olacağı için doğrudan R^{-1}yerine R^T kullanılmıştır. g tensörünün esas eksen değerlerinin ortalaması $\bar{\bar{g}}$'nin izotropik değerini verir.

$$g = \frac{1}{3}(g_x + g_y + g_z) \quad (2.83)$$

olur. Tek kristallerde bütün yönelimler için aynı g değeri ölçülürse yani $g_x=g_y=g_z$ ise bu durum $\vec{g}$ tensörünün izotropik durumu olarak bilinir. Eğer $g_{//}=g_z$, $g_\perp=g_x=g_y$ ise bu durum seçilen $\vec{g}$ tensörünün eksensel simetrik durumuna karşılık gelir ve bu durumda denklem

$$g = \frac{1}{3}(g_\parallel + 2g_\perp) \quad (2.84)$$

biçiminde yazılabilir. Burada, manyetik alan simetri eksenine paralel olduğunda ölçülen esas eksen değerine $g_{paralel}$, $g_{//}$ ve dik doğrultuda ölçülene ise g_{dik}, $g_\perp$ denir. Şekil 2.10 da gösterildiği gibi eksensel simetrili bir spektrumda $g_{//}$ ve $g_\perp$ gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Eksensel simetrili toz EPR spektrumu. a) Çekirdek spini I=0 olan bir yapıda, b) Çekirdek spini I=3/2 olan bir yapıda

2.7. Dönme İlgi Zamanı

Molekül hareketinin dönme biçiminde olması durumunda dönme ilgi zamanı (τ), bir molekülün 1 radyan kadar dönmesi için gerekli zaman olarak tanımlanır.

McConnell ve Kivelson tarafından verilen, moleküler hareketin serbestlik derecesine bağlı dönme ilgi zamanı

$$\tau = \frac{\pi\sqrt{3}}{b} W_0 \left[\frac{4\Delta\gamma.H}{15} + \frac{b}{8}\right]^{-1} \left[\frac{W_{-1}}{W_0} - 1\right] \quad (2.85)$$

şeklindedir (McConnell, 1956; Kivelson, 1960).

Burada $\Delta\gamma = |\beta|.\{g_{zz}\text{-}(g_{xx}+g_{yy})/2\}.\hbar^{-1}$ ve $b=4\pi.(A\text{-}B)/3$ olup, sırasıyla g ve A'nın anizotropik değeridir. W_0 ve W_{-1} orta alan ve yüksek alan birinci türev eğrilerinin tepeden tepeye çizgi genişliğinin gauss cinsinden genişlikleridir. H manyetik alanıdır.

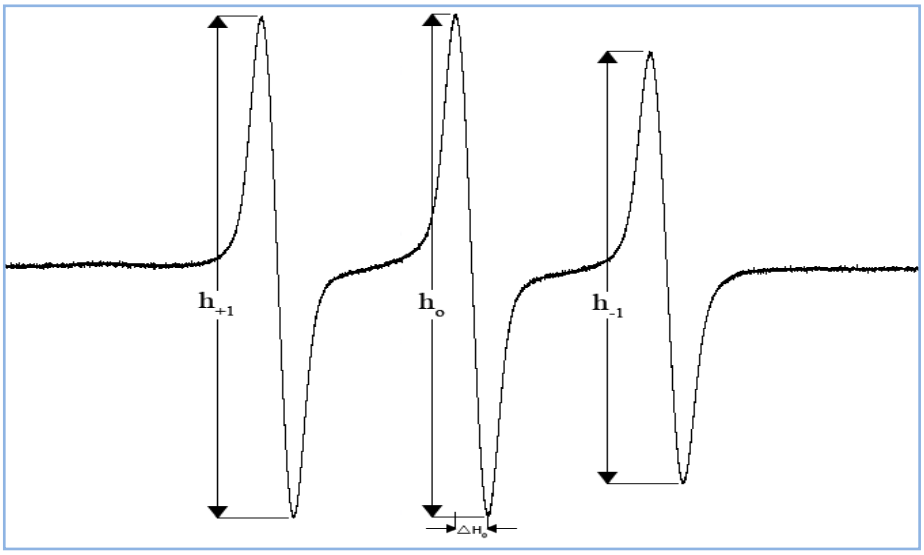
Yükseklikler çizgi genişliklerine göre daha kolay ve kesin ölçülebildiğinden W_0/W_{-1} yerine $(h_0/h\text{-}_1)^{\mathbf{1/2}}$ ve O.H. Griffith, D.W. Cornell ve H.M. McConnell tarafından verilen tek kristal tensör elemanlarını kullanarak

$$\tau=kW_0 \left[\left(\frac{h_0}{h_{-1}}\right)^{1/2}\text{-}1\right] \quad (2.86)$$

şekline dönüşür (Griffith, 1965). Burada h_0 ve $h\text{-}_1$ sırasıyla orta alan ve yüksek alan birinci türev eğrilerinin yükseklikleri ve $k=6{,}5 \times 10^{-10}$ $s.G^{-1}$'dir. Sabit faktör k değeri nitroksit aşırı ince yapı ve g değerlerinin anizotropisinden türetilmiştir, moleküler harekete göre bu değerlerin modülasyonunun oranı bu katsayıyı verir. Bağıntı 2.86' yı düzenlersek;

$$\tau=6{,}5\text{x}10^{-10}\Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1\right) \quad (2.87)$$

şeklindedir (Griffith, 1965). Burada ΔH_0 orta çizginin Gauss cinsinden çizgi genişliğidir.



Şekil 2.11. 1/1280 titreli brucellozisli kan serumunda tempo etiketinin 183K deki ESR spektrumu

3. DENEYSEL YÖNTEM

3.1. ESR Spektrometresi

Deneylerimizdeki spektrum alımlarında, Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İLTEK) ESR laboratuarında bulunan bilgisayar kontrollü JEOL JESFA-300 X-Band CW ESR Spektrometresi kullanılmıştır.

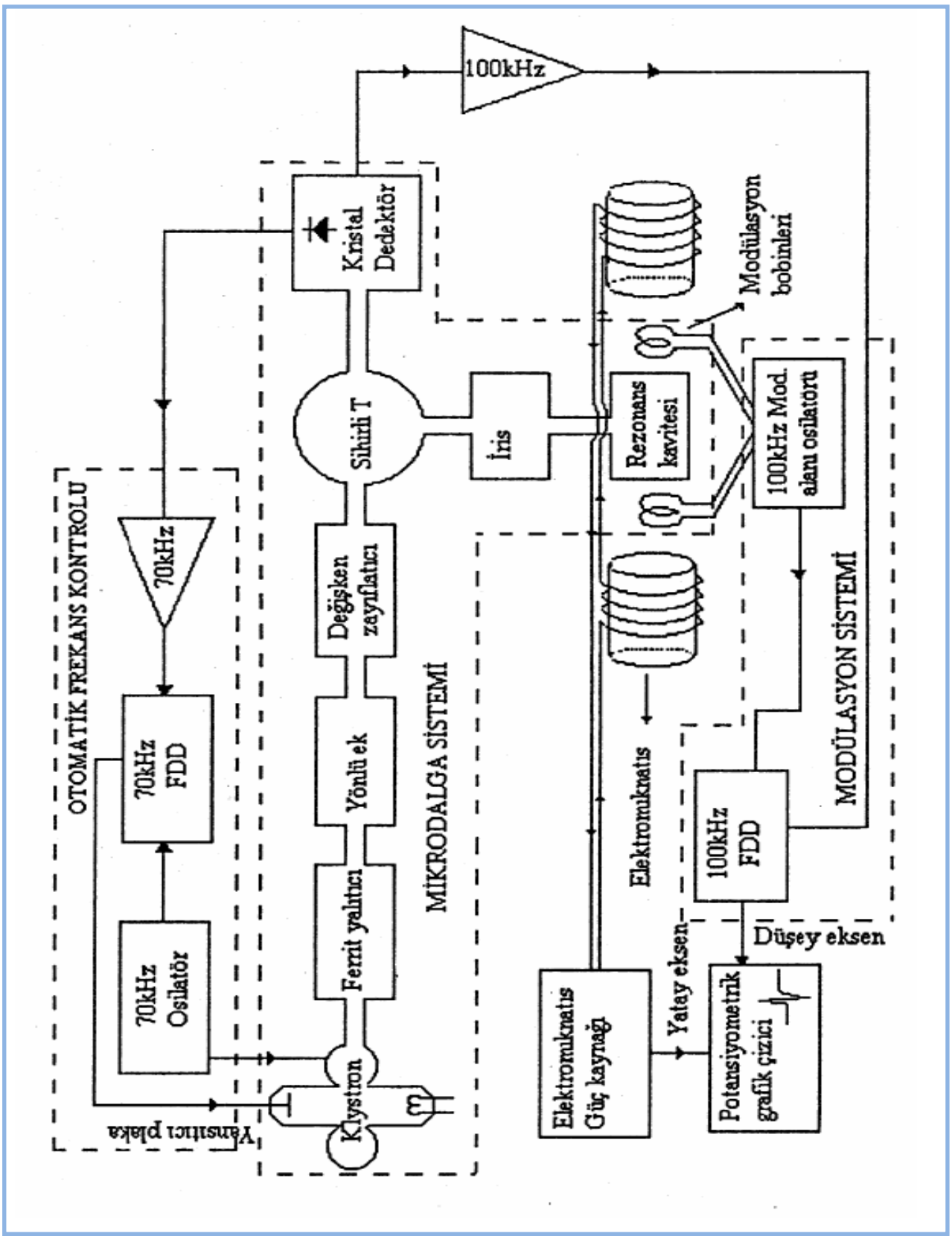


Şekil 3.1. JEOL JESFA-300 X-Band CW ESR Spektrometresi

Belirli bir mikrodalga frekansı için mikrodalga devre elemanlarının tümü bu mikrodalga frekansına uygun olmalıdır. Bu durum, mikrodalga teknolojisinde bazı farklı bantların ve belirlenmesine neden olmuştur. Bunlar arasında S, X ve Q bantları ve bu adlarla anılan sürekli dalga ESR spektrometreleri en çok bilinen ve kullanılan cihazlardır.

Çizelge 3.1. Farklı band aralıklarında çalışan ESR spektrometreleri

Bandı	S	X	K	Q	E	W	Birimi
Frekansı	3	9,5	24	35	70	95	GHz
Dalga Boyu	9	3	1,2	0,8	0,4	0,3	cm



Şekil 3.2. ESR spektrometresinin blok diyagramı

Bir ESR spektrometresi, sabit frekansta mikrodalga oluşturabilen bir kaynak (klystron veya gunn diyodu), örnek üzerine ve örnekten yansıyan dalgayı da kristal algıca taşıyabilen bir dalga kılavuzu ve bu kılavuz boyunca taşınan mikrodalgayı incelenen örnek üzerinde yoğunlaştıran kavite, değeri çizgisel olarak değiştirilebilen kararlı ve homojen dış manyetik alan yaratan elektromıknatıs, bir çift modülasyon bobini, kristal algıç, sinyal yükseltici, faz duyarlı algıç ve kaydediciden oluşan algılama sisteminden oluşur (Weil ve ark., 1993, Weber ve ark., 1998).

3.1.1. Kaynak sistemi

ESR spektrometresinde mikrodalga kaynağı olarak klystron veya Gunn diyodu kullanılır. Klystron dar bir frekans aralığında merkezlenmiş, düşük güçte mikrodalga üreten bir elektron tüpüdür. Temel ilke, serbest elektronların bir potansiyel altında hızlandırılmasıyla mikrodalga bölgesinde bir hız modülasyonuna maruz kalmasıdır. Yalıtıcı tek yönlü iletime sahip bir devre elemanıdır.

3.1.2. Kavite-Kılavuz sistemi

Spektrometrenin dikkate alınması gereken parçası, örneğin konulduğu dikdörtgen prizması şeklindeki rezonans kavitesidir. Değişik amaçlar için kavitenin boyutları, şekli ve modları farklı seçilebilir.

Kavite sistemi, durgun manyetik alana dik alternatif manyetik alan oluşturacak ve elektromanyetik dalganın manyetik alan bileşeninin maksimum olduğu yere numunenin yerleştirilmesine izin verebilecek şekilde kavite moduna sahip olmalıdır. Ayrıca kavitede, örnek soğutulup ısıtılabilmeli ve bunun yanı sıra ışınlama da yapılabilmelidir. Bu nedenle kavitenin yapıldığı maddenin sıcaklık genleşme katsayısı küçük olmalıdır.

3.1.3. Mıknatıs sistemi

Elektromıknatıs, kutupları arasında olabildiğince düzgün, çizgisel ve kararlı manyetik alan üreten bir çift bobinden ibarettir. Bir yüksek akım kaynağı bu bobinlere değiştirilebilen akım sağlar ve manyetik alanın büyüklüğü bu akımla oldukça hassas biçimde kontrol edilebilir.

3.1.4. Modülasyon - Dedeksiyon sistemi

Homojen durgun manyetik alana parelel doğrultuda uygulanan küçük genlikli alternatif manyetik alan, kavitenin iki yanındaki küçük bobinlerle sağlanır ve 25, 50, 100 kHz'lik osilatörlerle beslenir. Manyetik alanı modüle eden bobinlerle birlikte bu sistem modülasyon sistemi olarak adlandırılır. Burada amaç, elektronik işlemler için gerekli olan alternatif bir sinyal elde etmek ve kavitede örnekle etkileştikten sonra yansıyan mikrodalganın modülasyon frekansına modüleli olmasını sağlamaktır.

Kristal Detektör; üzerine düşen mikrodalgayı akıma çeviren ve katkılandırılmış yarı iletkenden yapılmış bir elemandır. Rezonans kavitesinden gelen mikrodalganın bir kısmı soğurulduktan sonra geriye kalan kısmı mikrodalga düzenleyicisi olarak kristal detektör üzerine düşer. Dedektöre gelen mikrodalganın şiddeti Sihirli T'den kaviteye gelen mikrodalganın şiddetinden küçüktür. Eğer detektör üzerine zamanla sabit sayıda foton düşüyor ise kristal detektörde oluşan akım DA, zamanla değişen sayıda foton düşüyor ise AA şeklinde olacaktır. Bununla beraber mikrodalga alan modülasyonu ve OFK (Otomatik Frekans Kontrolü) (AFC:Automatic Frequency Control) sinyali frekanslarında modüleli olduğundan çıkış akımı bu frekanslarda alternatif akım olur.

3.1.5. Tarama zamanı ve filtre zaman sabiti

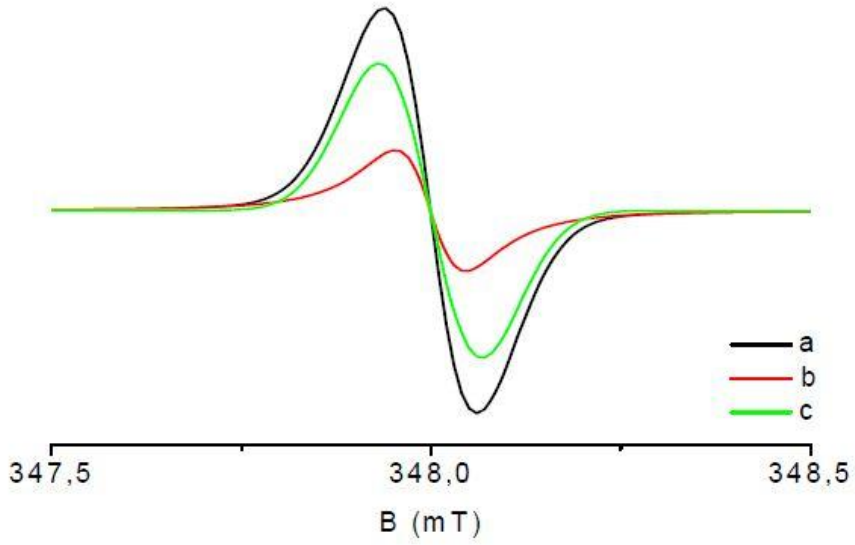
Tarama zamanı, DA manyetik alanını belirli bir tarama aralığında yavaşça değiştirmek için gerekli zamandır. Bu zaman örneğe göre spektrumu değişitrmeyecek biçimde uygun seçilmelidir. Tarama zamanının kısalmasıyla meydana gelen bozulma, tarama zamanını sabit tutup, tarama aralığının artırılmasıyla da meydana gelebilir. Filtreleme zaman sabiti arttırıldıkça spektrum, soğurma eğrisine yanaşır.

Filtreleme zaman sabiti ayarlamada tercih edilen bir yol, zaman sabitini bir ESR çizgisini taramak için gerekli zamandan çok daha kısa tutmaktır.

3.1.6. Çizgi biçimi

ESR spektrometresinin biyolojik uygulamalarında, çizgi biçiminin yorumlanması çok önemlidir. Çizgi biçimi yapıdaki hareketler üzerinde bilgi verir. ESR spekturmları soğurma eğrisinin birinci türevi şeklinde çizdirilir.

Çizgi genişliğini ifade etmenin iki yaygın yolu vardır. Birincisi absorbsiyon eğrisinin yarı yükseklikteki yarı genişliği, ikincisi birinci türev eğrisinin maksimum ve minumum pikleri arasındaki tam genişliğidir.



Şekil 3.3. (a) Lorentz ve Gauss biçimleri toplamının 1. Türev eğrisi,
(b) Lorentz biçimli 1. türev eğrisi,
(c) Gauss biçimli 1. türev eğrisi

Lorentzian şekillerinin, genellikle paramanyetik merkez konsantrasyonu düşük olan sıvı çözeltilerdeki sistemlerin ESR spektrumlarında gözlenir. Eğer çizgi çok sayıda bileşenin üst üste binmesinden meydana gelirse çizgi Gaussian şekline yaklaşır.

3.2. İncelenen Örnekler

3.2.1. Kan örnekleri (Brucellozis) incelemesi

Brusellozis (Brucella hastalığı, Mal hastalığı, Peynir hastalığı), bakterilerin sebep olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Bu bakteriler hayvanlar arasında geçiş yaparlar ve birçok farklı omurgalı hayvanlarda hastalıklara sebep olurlar. Değişik Brucella türleri, koyun, keçi, sığır, geyik, domuz, köpek ve diğer öteki hayvanları etkilerler. İnsanlar bu bakteriler tarafından bulaşık olan bu hayvanlarla ve bu hayvanlardan üretilen çeşitli ürünlerle yapılan temaslar sonucu hastalığa yakalanırlar. hayvanlarda; yavru atıklarına sebep olurken, insanlarda ateş, terleme, baş ağrıları, sırt ağrıları ve fiziksel zayıflıklar göstererek gribe, erkeklerde kısırlığa (orşitise bağlı), benzer bir çok belirtilere sebep

olabilir. Merkezi sinir sistemini ve kalp zarını etkileyen ciddi enfeksiyonlar oluşabilir. Özellikle bel eklemlerine yerleştiğinde çoğunlukla bel fıtığı benzeri rahatsızlıklara yol açar ve hekimler tarafından çoğu zaman göz ardı edildiğinden, hasta uzun zaman bel fıtığı tedavisi görmesine rağmen iyileşemez.

Hastalık ilk olarak Malta adasında saptandığından 'Malta humması veya Akdeniz humması, klinik seyirdeki tipik dalgalı ateş nedeni ile dalgalı humma, hayvanlardan insanlara bulaşması nedeni ile halk arasında mal hastalığı, süt hastalığı olarak bilinmektedir. İnsandan-insana bulaşma görülmemektedir.

Brucellozis insanlara üç şekilde bulaşır:

1. Brucellozis ile bulaşık herhangi bir şeyi yemek veya içmekle,
2. Brucellozis bakterisi tenefüs etmekle,
3. Deri üzerindeki yaralardan bakterilerin vücuda girmesiyle,

En yaygın bulaşma yolu brucellozis bulaşmış süt ürünlerini yemek ve içmektir. Koyun, keçi, sığır ve develer brucellozis ile bulaştıkları zaman, onların sütleri de bakteriler ile bulaşmışlardır. Eğer sütler pastörize edilmezse (kaynatılmazsa), bu sütü içen veya bundan yapılan peyniri yiyen insanlara bu bakteriler bulaşır.

Brucellozis bakterilerinin tenefüs edilmesi pek yaygın bir bulaşma yolu değildir, fakat labaratuvar gibi yerlerde çalışarak brucella bakterisi kültürü ile uğraşan insanlar için önemli bir tehlike arzetmektedir. İçe çekme (inhilasyon), yani teneffüs edilerek, bulaşmanın önemli bir yüzdesi kesimhanelerde çalışan insanlarda önem arz etmektedir. Deri üzerindeki yaralardan geçerek insana bulaşma, kesimhanelerde, et paketleme işinde çalışanlar ve veterinerlik hizmetlerinde çalışanlar için problem olabilir.

3.2.2. Süt örnekleri (Mastitis) incelemesi

Mastitis, süt hayvancılığında en çok rastlanan ve son derece önemli bir meme hastalığıdır. Süt üretimi yapan işletmelerde az veya çok oranda daima karşılaşılan bir problemdir. Mastitis sadece süt verimini azaltmakla kalmayıp, memenin bir veya birkaç lobunun(bölümünün) körleşmesine, hatta tümünün süt veremez hale gelmesiyle hayvanın kasaplık olmasına neden olabildiği gibi bazen de ölümüne sebep olabilir.

Mastitis hastalığı küçümsenmeyecek miktarda süt kayıplarına, tedavi giderlerine ve zaman kaybına sebebiyet verdiğinden işletme sahiplerine yüklü faturalar getirir. Bu nedenle hayvanlardaki meme hastalıkları arasında en önemli yeri mastitis almaktadır.

Mastitisin temel nedeni mikroplar olmakla birlikte, mikroplar tek başlarına hastalık yapma özelliğine sahip değillerdir. Hastalığın oluşmasına yardımcı olan birçok neden vardır. Bunların başında sağımda yapılan hatalar ve sağım esnasında yapılan temizlik ihmalleri gelmektedir. Aslında süt, mikropların üreyebilmeleri için mükemmel bir ortamdır. Ancak mikropların bu ortamı bulmaları için meme içine girebilmeleri gerekmektedir.

Mastitisin bulaşma kaynakları şunlardır;

1. Sürüde bulunan mastitisli hayvanlar,
2. Sağımcıların kirli elleri, kirli bezleri ve düzensiz çalışan sağım makinaları,
3. Meme ve meme başı yaralarıdır.

3.2.2.1. Subklinik (Gizli) mastitis

Sürüde hastalık olduğu halde bunu hastalık olarak gözlemleme olanağı yoktur. Süt işletmelerinde sağmal hayvanların büyük bir kısmı bu tip hastalık tehdidi altındadır. Bu hayvanlardan elde edilen süt normal görünümdedir, ama miktarında bir azalma vardır fakat fark edilmeyebilir. Bu tip mastitisin varlığı ancak bazı maddelerin sütteki miktarlarını saptayan özel testlerle ortaya çıkarılabilir. Bu tür mastitisler alevlenerek klinik (görünebilir) mastitise dönüşebilir.

Bu nedenle periyodik olarak sağmal hayvanların sağım öncesi ilk damlalarının siyah bakalit bir kaba alınarak sütte bir değişiklik olup olmadığının tespit edilmesi sürü sağlığı açısından önem arz eder. Bunun dışında memelerin periyodik olarak kontrol edilerek her 15 günde bir CMT testinin de uygulanması gereklidir.



Şekil 3.4 Mastitisli meme örnekleri

Enfekte sütlerin insanlar tarafından tüketilmesi sonucu enfeksiyonlar, mastitis tedavisi nedeniyle hayvanlarda yoğun antibiyotik kullanılması sonucu, antibiyotikli sütlerin insanlar tarafından tüketilmesine sonuç olarak insanlarda bulunan bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmesine sebep olabilmektedir.

3.2.2.2. Klinik (Görünür) mastitis

Hastalık titreme ile başlar. Sonra vücut sıcaklığı yükselir. Nabız hızlı ve dolgundur. Kısa ve hızlı bir soluma vardır ve hayvan huzursuz bir görünüm sergiler. Memede ağrı vardır. Memenin muayenesinde bir veya daha fazla bölümün şiştiği, gergin, kızarmış ve dokununca sıcak ve ağrılı olduğu görülür. Kısa sürede memenin görünümü değişerek rengi koyu mor veya mavimsi renk alır. Şiş ilerler, ilk birkaç saat meme başından sarımsı bir sıvı gelir.

3.3. Örnek Hazırlama

3.3.1. Brucellozis'li(Brucella hastalıklı) ve sağlıklı kan örnekleri

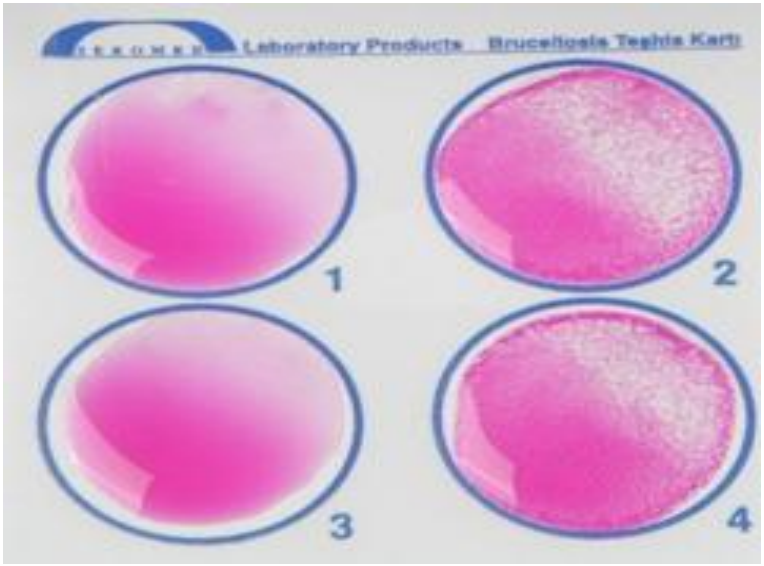
3.3.1.1. Kan örneklerinde mikrobiyolojik analiz ve kan serumunun alınması

Mikrobiyolojik Analiz: Brucellozis laboratuvar tanısı için muayene maddesi olarak genellikle kan kullanılmaktadır. Kan temelli testler arasında en çok, inaktif brucella etkenleri ile kan serumundaki antikorların vücut dışında karşı karşıya getirilmesi ve bağlanması sonucu şekillenen çökelmeyi göstermeyi amaçlayan Rose Bengal Plate test ve Serum Aglutinasyon testleri kullanılmaktadır (Anonim 2009).

Brucellozis teşhisi için 2 aşamalı yol izlenir.

- **Aşama 1: Brucella Rose Bengal Plate Test (RBPT)**

Lam üzerinde uygulanabilen bu testte Rose Bengalile boyanmış standart antijen kullanılır. İnaktif Brucella antijenleri hastalıklı ya da sağlıklı olduğu düşünülen örneklere ilave edilir. Antijen, yapısından dolayı antikorlara yapışmak ister. Antibrucella antikorlarına yapışıp Aglutinasyon (çökelme) oluştururursa brucellozis, çökelme yoksa sağlıklı olduğu teşhisine varılır.



Şekil 3.5. Brucella Rose Bergal Plate Test Pozitif ve Negatif örneği

- **<u>Aşama 2:</u> Brucella Serum Aglutinasyon Test (Titre:t)**

Brucella RBPT pozitif kan serumlarındaki antikor düzeyini belirlemek için yapılır. Serum örneklerinin fizyolojik tuzlu su ile 10'ar katlı (1/10, 1/20, 1/40……) sulandırmaları yapılarak tüm sulandırmalara eşit miktarda inaktif, Brucella Serum Aglutinasyon Test antijeni eklenerek 37 ° C'de 16-24 saat inkübe edilerek sulandırılmış serum örneklerindeki antikorların test antijenini bağlama gücü değerlendirilir.

<u>Kan Serumunun Alınması:</u> Kan serumu kanın pıhtılaştıktan sonra kalan sarı renkli sıvı kısmıdır. Kan örnekleri antikoagülansız (pıhtılaşmayı sağlayan) tüplere alınmış ve oda sıcaklığında 1-2 saat bekletilerek pıhtılaşması sağlanmıştır. Pıhtılaşan örnekler santrifüj edilerek üstte kalan kan serumu alınmıştır. Kan örneklerinin serum kısmının alınmasının nedeni antikorların kan serumunda bulunmasıdır.

3.3.1.2. Kan örneklerinde spin etiketleme

Mikrobiyolojik yöntemlerle elde edilen kan serum örneklerinin her birinden mikropipet yardımıyla eppendorf tüplere 100µL konulmuştur. Spin etiketi olarak kullanılan 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinyloxy (TEMPO) nitroksit radikali toluen içinde çözülmüş ve hazırlanan TEMPO-Toluen çözeltisinden mikropipetle 20µL alınarak oda sıcaklığında eppendorf tüplerdeki kan serumlarına eklenmiştir. Homojen olacak şekilde iyice karıştırılan örneklerin etiketlenmesi sağlanmıştır. Spin etiketlenmiş kan serum

örneklerinin her birinin spektrumu 123-263K (10K sıcaklık aralıklarıyla) arasında 0.5mm çaplı kuvars ESR tüplerinde alınmıştır.

3.3.2. Mastitis hastalıklı ve sağlıklı süt örnekleri

3.3.2.1. Süt örneklerinde mikrobiyolojik analiz ve liyofilizasyon (kurutma) işlemi

Mikrobiyolojik Analiz: Mastitis şüphesi olduğu düşünülen süt örnekleri besi yeri (canlı vücudunun taklidi) malzemenin içine ekilerek 37^{o}C' de 16-24 saat etüvde bekletilir. Bakteri üremesi sağlandıktan sonra, üreyen bakteri sınıflandırıp hastalığın teşhisi konulur.



Şekil 3.6. Süt örneklerinin besi yerine ekilmesi

Liyofilizasyon: Isıya hassas materyallerin kurutulma veya deriştirilmesinde kullanılan en etkili metotlardan biridir. Ayrıca, biyolojik materyallerin taşınması veya depolanması gibi durumlarda da tercih edilmektedir. Liyofilizasyon, donmuş bir materyalden bir çözücünün (su) doğrudan vakum altında buharlaştırma ile uzaklaştırılması işlemiyle yapılan bir kurutma tekniğidir. Ürünlerin içinde bulunan su en başta dondurulur ve bu haldeyken süblimasyonla su uzaklaştırılır. Süblimasyon maddenin katı (buz) halden gaz (su buharı) haline, maddenin sıvı hali atlanarak yani buzun erimesine imkan olmaksızın geçişidir. Buz haline gelmiş su, düşük basınç ortamında, belli belirsiz bir sıcaklık artışı durumunda doğrudan buharlaşır. Böylelikle kurumanın elde edilmesi için yüksek sıcaklıklara ihtiyaç kalmaz. Ayrıca ürünlerin moleküler ve hücre yapısında yarılma vb. değişikliklere yol açmaz. İç ve dış yapısı

bozulmaz yani neredeyse en baştaki hallerini korurlar. Liyofilizasyon cihazı Şekil 3.7 de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Liyofilizasyon cihazı

Genel hatlarıyla liyofilizasyon işlemi üç temel aşamadan meydana gelir. Bu aşamalar; dondurma, birincil kurutma (süblimasyon), ikincil kurutma (dezorpsiyon) şeklindedir. Önce ürün dondurma işleminden geçirilir. Ürün tipine göre dondurma işleminin süresi iyice uzun veya biraz daha kısa tutulur. Birincil kurutma aşamasında ürünün içinde bulunduğu liyofilizasyon kabininde hafif bir vakum uygulanır ve sıcaklık giderek düştükçe yüksek enerjideki moleküller kendiliğinden dışarı uçarlar. İkincil kurutma aşamasında ise vakum maksimum seviyeye çıkarılır ve kristalleşmiş maddeye tutunup kalmış son su molekülleri maddeden dışarı çekilir.

3.3.2.2. Süt örneklerinde spin etiketleme

Bu tez çalışmasında hastalıklı ve sağlıklı her bir süt örneği santrifüj kullanılarak yağından ayrılmıştır. Daha sonra her bir örneğin yarısı liyofilize edilmiş diğer yarısı liyofilize edilmemiş yani sıvı halde incelenmiştir.

Liyofilize olmuş süt örneklerinin her birinden 10mg alınarak eppendorf tüplere konulmuş ve üzerlerine mikropipet yardımıyla TEMPO-Toluen çözeltisinden 20μL spin etiketi eklenmiştir. Bir baget ile çözeltinin tamamen liyofilize olmuş süt tozlarına karıştırılması sağlanmış ve örnekler vakumlu etüvde 15^{o}C'de 15dk süre bekletilerek kurutulmuştur. Kuruyan örnekler 0.5mm çaplı kuvars tüplere alınmış ve örneklerin 10K sıcaklık aralıklarıyla 123-263K sıcaklıkları arasında ESR spektrumları kaydedilmiştir.

Liyofilize olmamış süt örneklerinin her birinden mikropipet yardımıyla eppendorf tüplere 100μL konulmuştur. Hazırlanan TEMPO-Toluen çözeltisinden 20μL alınarak oda sıcaklığında eppendorf tüplerdeki süt örneklerine eklenmiş ve homojen olacak şekilde iyice karıştırılan örneklerin etiketlenmesi sağlanmıştır. Bu örneklerinin her birinin ESR spektrumu 123-243K (10K sıcaklık aralıklarıyla) arasında alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, insan ve hayvan sağlığında önemli yeri olan "Brucellozis" ve "Mastitis" ESR spin etiketleme tekniği ile incelenmiştir. Bu örnekler Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı' ndan temin edilmiş ve örneklerin mikrobiyolojik analizleri aynı bölümün mikrobiyoloji laboratuarında yaptırılmıştır. Mikrobiyolojik analiz sonucunda hastalıklı ve sağlıklı olarak tespit edilen örnekler etiketlenerek Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İLTEK) ESR Laboratuarı' nda JEOL marka JESFA-300 model X-band ESR spektrometresiyle incelenmiştir. Spektrumlar 100 kHz modülasyon genliğinde 1 mW mikrodalga gücünde kaydedilmiştir. Düşük sıcaklık çalışmaları JEOL marka ES-DVT4 model sıvı azot sıcaklık kontrol ünitesi ile gerçekleştirilmiştir.

Kan örnekleri ve süt için tespit edilen hastalıklı ve sağlıklı örneklerin ESR parametreleri hesaplanarak kıyaslanmış ve sonuçlar tartışılmıştır. Elde edilen bulguların literatüre kazandırılması ve sağlık sektöründe uygulama alanı bulması amaçlanmaktadır.

4.1. KAN ÖRNEKLERİ

Brucellozis Bölüm 3.2. de anlatıldığı gibi zoonoz bir hastalık olması nedeniyle incelenmesi önemlidir. Brucellozisin laboratuar tanısı için muayene maddesi olarak kan kullanılır. Bu hastalığın şüphesinde kan kültürleri birkaç kez tekrarlanmalıdır.

Kan, bütün canlıların yaşamlarını sürdürmelerinde önemli rol oynayan bir unsurdur yani vücudun tüm organlarının işlevlerini sürdürebilmesi için kan gereklidir. Bu yüzden kan, bütünlüğü oluşturan organellerle sıkı bir ilişki içinde etkileşir. Bu etkileşmeden dolayı organellerdeki herhangi bir bozukluk kana yansır ve kanın incelenmesi sonucunda organelin bozukluğu ve derecesi hakkında fikir edinilebilir. Bu nedenle hastalık teşhis ve tedavisi için kan testi ilk yapılan işlemlerdendir.

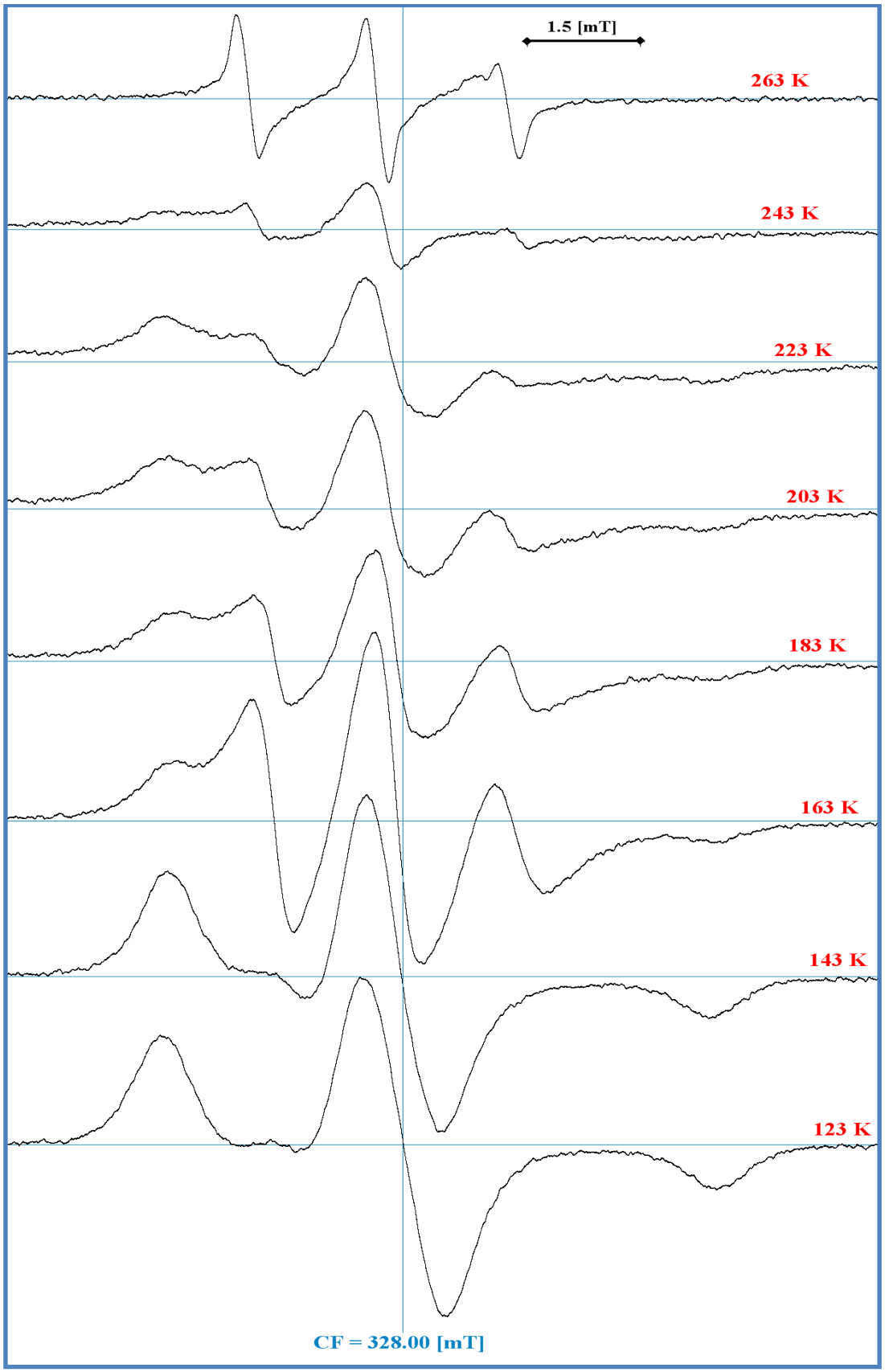
Hasta kanlarla sağlıklı kanların farklı su yapılaşmalarından dolayı farklı viskozitelere sahip oldukları gösterilmiştir (Sportelli ve ark., 1983). Bu tez çalışmasında brucellozisin ESR ile incelenmesi için brucellozisli hayvanlardan alınan kan örnekleri kullanılmıştır.

Örneklerin ESR tekniğiyle incelenmek üzere hazırlanması için bazı ön işlemler yapılmıştır. Her bir örnek TEMPO kararlı spin etiketi ile etiketlendikten sonra ESR spektrumları 10K sıcaklık aralıklarıyla 123-263K sıcaklık aralığında kaydedilmiştir.

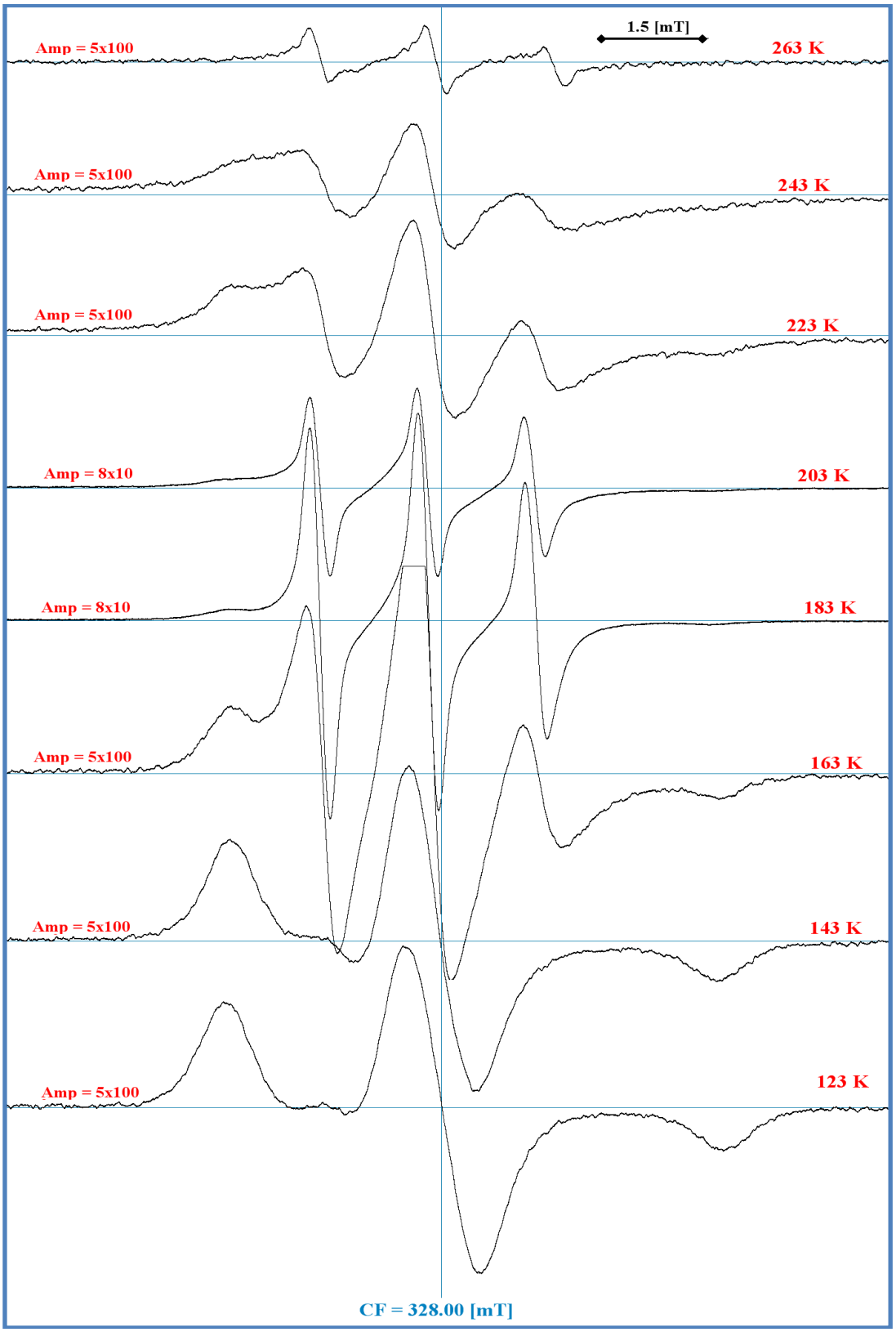
Negatif kontrol(sağlıklı) ve pozitif kontrol(hastalıklı) kan serumlarının ESR spektrumları Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 de görülmektedir. Bu spektrumlar 1mW mikrodalga gücü, 100kHz modülasyon frekansı, 3G modülasyon genişliği, 75G manyetik alan tarama genişliği, 30s tarama zamanı, 0.03s zaman sabiti spektrometre parametrelerinde kaydedilmiştir.

Negatif kontrol kan serum örneğinin farklı sıcaklıklarda alınan spektrumlarının genliği 5x100 değerindedir ve sıcaklık artışıyla sinyal şiddeti çok fazla artmamıştır. Fakat pozitif kontrol kan serum örneğinin 183K sıcaklığında ESR sinyal şiddeti dikkate değer bir şekilde artmış bu nedenle genlik bu sıcaklıkta 5x100 yerine 8x10 olarak alınmıştır.

Her iki pozitif ve negatif kontrol kan serum örneğinin 123K sıcaklığındaki spektrumları birbirine benzemektedir ve burada nitroksit radikalinin eksensel simetrik bir davranış sergilediğini söylemek mümkündür. Spektrumlarda gözlenen pikler ^{14}N atomunun $m_I = +1 \quad m_I = 0$, $m_I = -1$ çekirdek spin manyetik momentlerine karşılık gelmektedir. Çiftlenmemiş elektron oksijen-azot bandının $2p\pi$ orbitalinde lokalize olmuştur. Bu nedenle çiftlenmemiş elektronun azotun çekirdek spiniyle etkileşmesi spin etiketleme spektrumunun aşırı ince yapısı olarak karakteristik üç çizgi şeklinde görülür. Bu durum, aşırı ince yapı yarılmasının manyetik alan yönelimine uyan anizotropisidir. Spektrumların aşırı ince yapı sabiti ve spektroskopik yarılma çarpanının paralel ve dik bileşenleri hesaplanarak bu değerlerden izotropik değerleri bulunmuştur. Negatif kontrol kan serum örneği için hesaplanan bu değerler; $A_{II} = 36.9\,G$, $A_{\perp} = 7.5\,G$, $a_o = 17.3\,G$, $g_{II} = 2.00276$, $g_{\perp} = 2.00786$, $g_o = 2.00616$ şeklindedir. Pozitif kontrol kan serum örneği için ise; $A_{II} = 37.1\,G$, $A_{\perp} = 7.6\,G$, $a_o = 17.4\,G$, $g_{II} = 2.00227$, $g_{\perp} = 2.00780$, $g_o = 2.00596$ olarak bulunmuştur. Hesaplanan bu değerler nitroksit spin etiketinin literatürdeki değerleriyle uyumludur (Hansen ve ark. 2004, Tudose ve ark. 2008, Berliner, 1976).

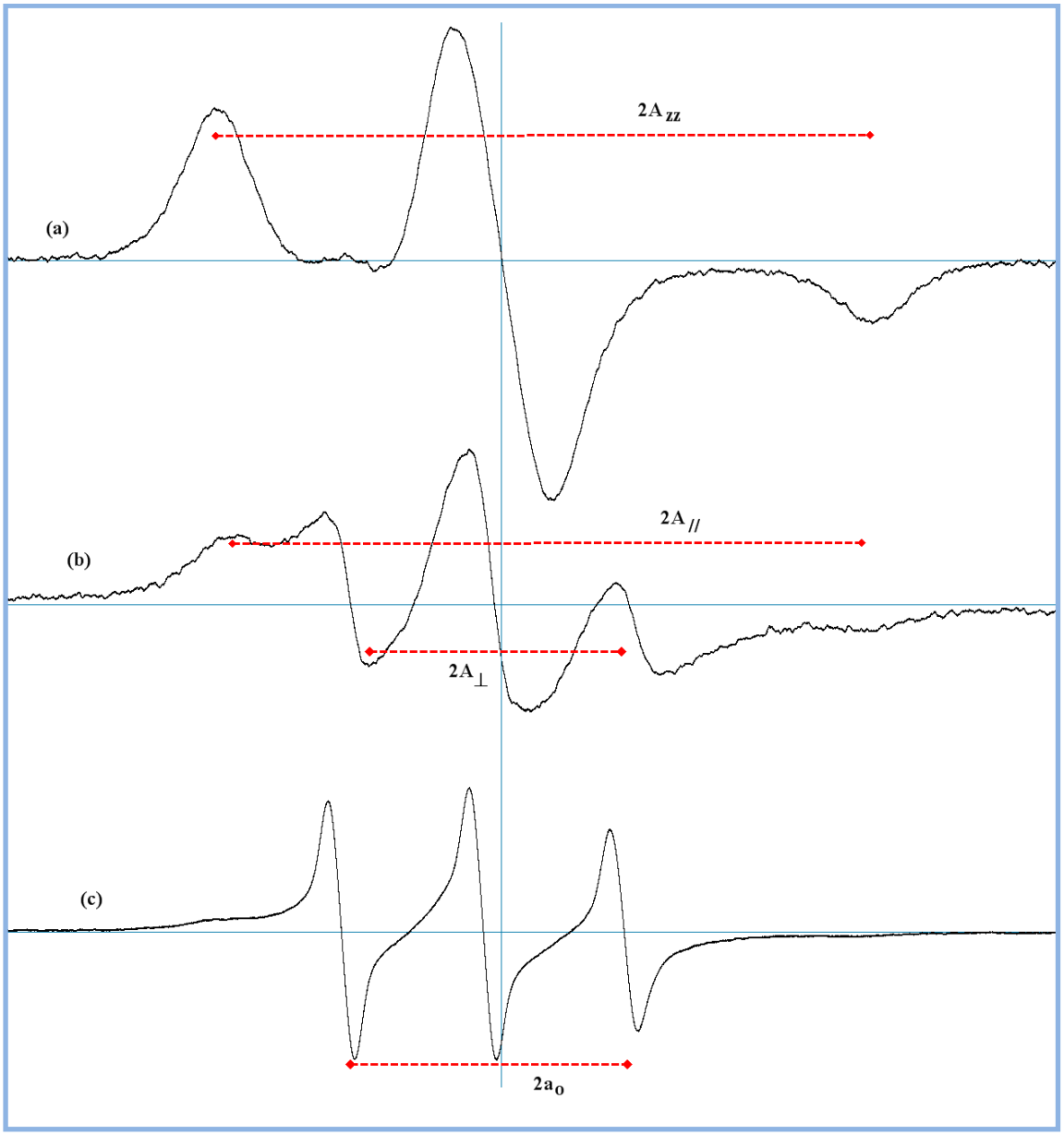


Şekil 4.1. Negatif kontrol kan serum örneklerinin farklı sıcaklıklarda kaydedilen ESR spektrumları (CF: merkez alan)



Şekil 4.2. Pozitif kontrol kan serum örneklerinin farklı sıcaklıklarda kaydedilen ESR spektrumları (Amp: genlik, CF: merkez alan)

Nitroksit grubu hızlı ve izotropik hareket ettiğinde ESR spektrumu yükseklikleri birbirine eşit üç komşu çizgi içerir. Hareket serbestliğinin bu yüksek derecesi etiketlenen bölgedeki spin etiketlerinin serbestçe dönmelerini ifade eder. Hareket serbestliğinin farklı durumları Şekil 4.3 de verildiği gibidir. Spin etiketi hareket serbestliğinin azalması spektrumda diferansiyel çizgi genişlemesine sebep olur. Bahsedilen çizgi genişlemesi Şekil 4.1 ve 4.2 de negatif ve pozitif kontrol kan serum örneklerinin ESR spektrumlarında açıkça gözlenmektedir.



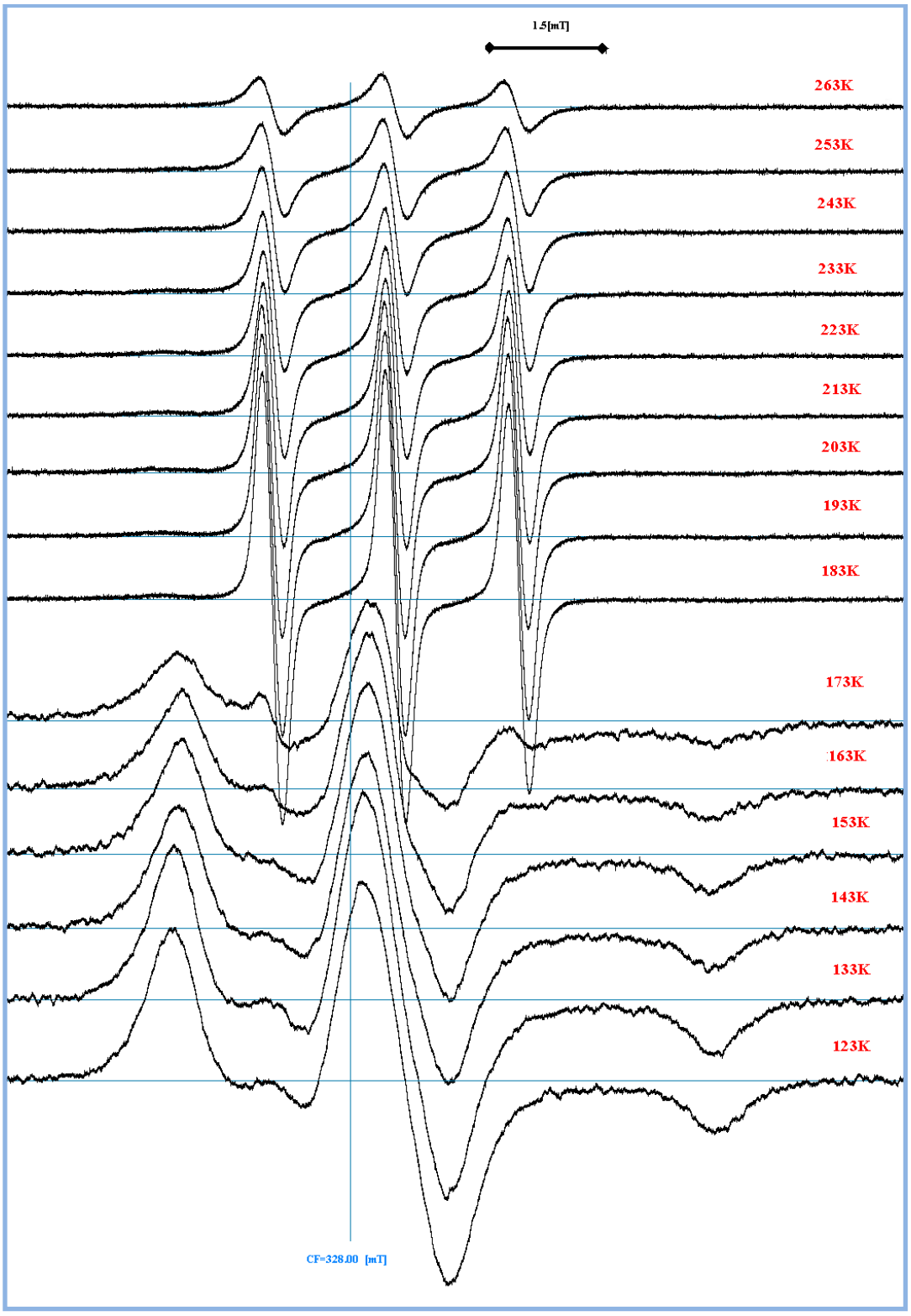
Şekil 4.3. Hareket serbestliğinin farklı durumlarında TEMPO spin etiketli yapının ESR spektrumları
(a) Hareket serbestliğinin az olduğu anizotropik durum (b) Orta hareket serbestliğindeki anizotropik durum (c) Hareket serbestliğinin fazla olduğu izotropik durum

Şekil 4.1 ve 4.2 de verilen negatif ve pozitif kontrol kan serum örneklerinin ESR spektrumlarının sıcaklığa bağlı olarak farklı davranış sergilemeleri bu örneklere etiketlenen TEMPO radikalinin hareket serbestliğinin her iki örnekte farklı olduğunu anlatır. Yani negatif ve pozitif kan serumlarının dinamikleri farklıdır. Özellikle pozitif kan serumu için 183K sıcaklığında spektrumun aniden izotropik hale gelmesi bunun açık bir göstergesidir.

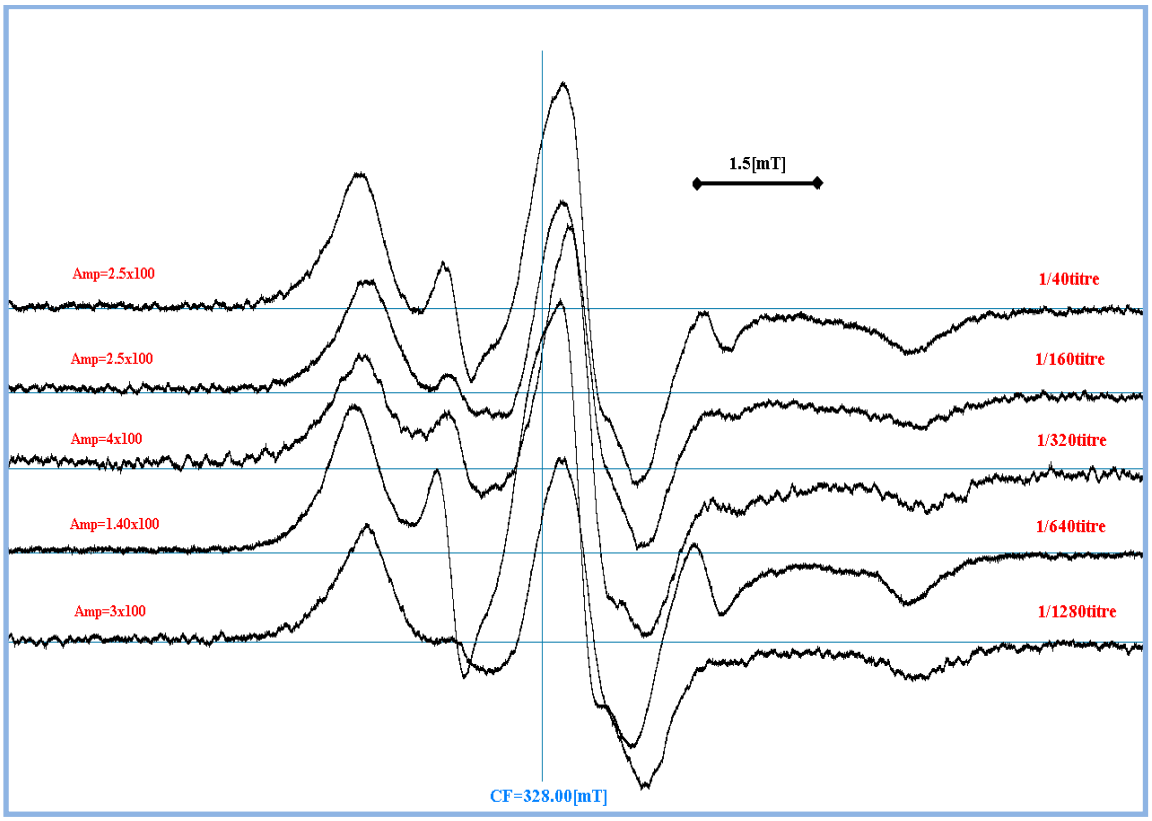
Brucellozisli ve bu hastalığın derecesini anlatan farklı titreli kan serum örnekleri TEMPO nitroksit radikaliyle etiketlenmiş ve ESR spektrumları kaydedilmiştir. Hastalık derecesi en fazla olandan en düşük olana doğru sıralaması; 1/1280 titre, 1/640 titre, 1/320 titre, 1/160 titre, 1/40 titre şeklindedir.

Mikrodalga gücü 1mW, mikrodalga frekansı 9.23GHz, modülasyon frekansı 100kHz, modülasyon genişliği ± 3G, merkez alanı 3280G, tarama alanı ±75G ve genliği 3x100 ESR spektrometre parametreleriyle kaydedilen 1/1280 titreli spin etiketlenmiş kan serum örneğinin ESR spektrumları Şekil 4.4 de verilmiştir. 123K sıcaklığında alınan spektrumlar eksensel simetrik yapıya karşılık gelir. Pozitif kan serum örneğinde olduğu gibi 1/1280 titreli kan serum örneğinde de 183K sıcaklığında spektrum izotropik hale geldiği görülmüştür. Bu örnek için izotropik aşırı ince yapı sabiti ve spektroskopik yarılma çarpanı sırasıyla; $a_o = 15.6\,G$, $g_o = 2.00636$ olarak hesaplanmıştır.

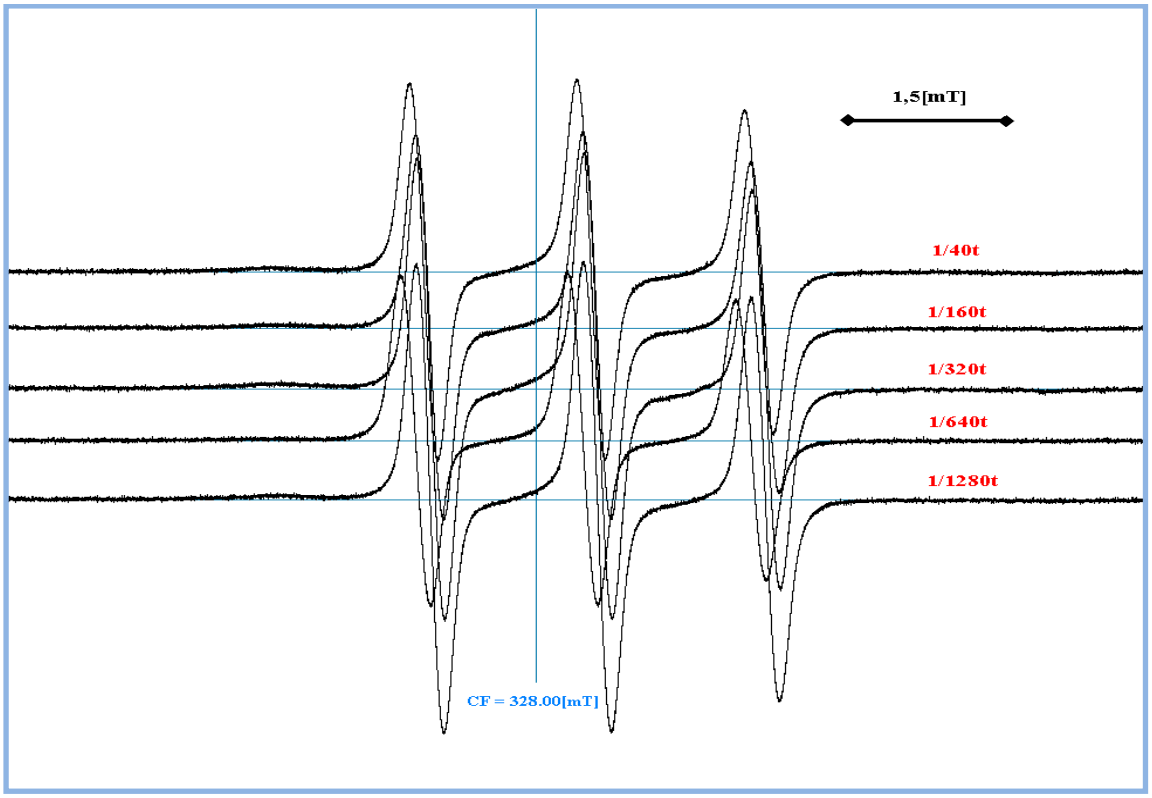
TEMPO spin etiketli farklı titreli kan serum örneklerinin sırasıyla 163K ve 183K sıcaklığında kaydedilen ESR spektrumları Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 da verildiği gibidir. Şekil 4.5 deki spektrumlar hareket serbestliğinin orta dereceli olduğu duruma Şekil 4.6 daki spektrumlar ise hareket serbestliğinin fazla olduğu yani kuvvetli hareketlilik durumuna örnektir. Ayrıca tüm örnekler için 183K sıcaklığında alınan spektrumların izotropik davranış sergilediği gözlenmektedir. Farklı titreli kan serum örneklerinin ESR spektrumlarının davranışının negatif kan serum spektrumundan farklı ve pozitif kan serum spektrumuna benzer oluşu Brucellozis için ESR spin etiketleme tekniğinin kullanılabileceğinin açık bir göstergesidir.



Şekil 4.4. TEMPO spin etiketli 1/1280 titreli kan serumunun farklı sıcaklıklardaki ESR spektrumu (CF: merkez alan)



Şekil 4.5. TEMPO spin etiketli farklı titreli kan serum örneklerinin 163K sıcaklığında ESR spektrumları (Amp: genlik, CF: merkez alan)



Şekil 4.6. TEMPO spin etiketli farklı titreli kan serum örneklerinin 183K sıcaklığında ESR spektrumları (CF: merkez alan)

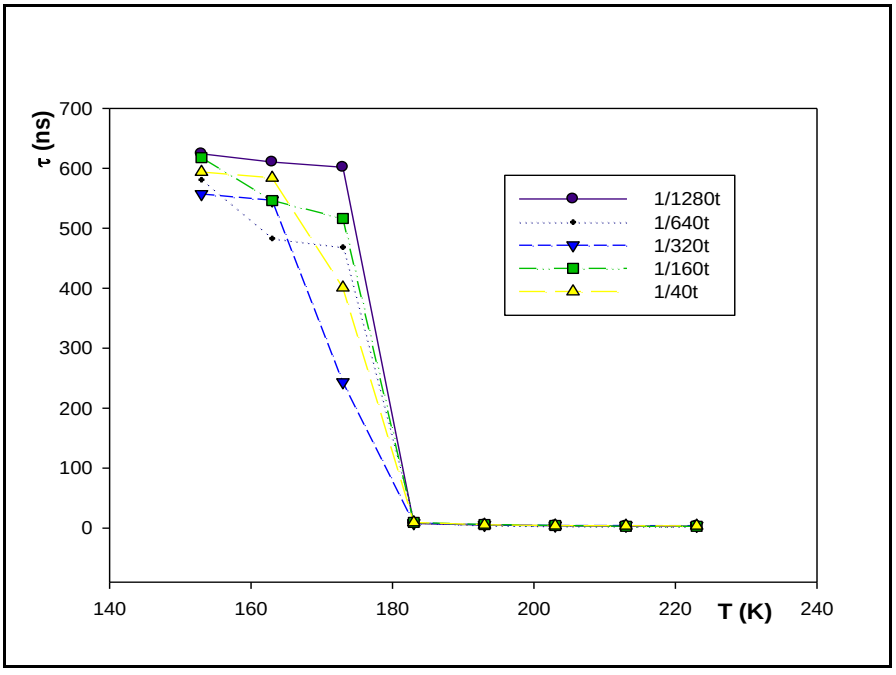
Dönme ilgi zamanı (korelasyon zamanı), τ, molekülün belirlenen herhangi bir yönde hareket ettiği ortalama zamanı olarak düşünülebilir. Spin etiketinin hareketi hareket serbestliği az olduğunda yavaşlar ve dönme ilgi zamanı artar. Nitroksit spektrumunda dönme ilgi zamanının artmasıyla son derece karakteristik değişimler gözlenir. Hareket serbestliğinin az olduğu durumda yüksek alana karşı gelen çizgi diğer iki çizgiye göre daha geniştir. Moleküler hareketin sağladığı spektral anizotropinin modülasyonundan kaynaklanan bir durulma zamanı etkisi olan bu genişleme yüksek alan çizgisinin çizgi yüksekliğinin azalmasından kolayca görülmektedir. Spin etiketi hareketinin değeri azaldıkça spektrumda ilerleyen bir diferansiyel genişleme olacaktır. Bu genişleme orta dereceli hareketlilik spektrumuna doğru artar. Bu durumun sebebi dönme tekrar yönelimlerin spektral anizotropiyi kaldırmak için yeterince hızlı olmamasıdır. Sonuç olarak etiketin hareket serbestliğinin derecesi bağlantı noktasının çevresine çok duyarlı olacak olan kovalent bağın esnekliğine bağlıdır.

Bir proteinin spin etiket hareketliliği dönme ilgi zamanı ile belirlenir. Dönme ilgi zamanı model spektrumla karşılaştırma yaparak veya durulma teorisini kullanarak bağıl çizgi genişliği yardımıyla hareket serbestliğinin fazla olduğu durumdan orta olduğu duruma doğru belirlenebilir ($\tau = 10^{-10}\text{s} - 10^{-9}\text{s}$). Dönme ilgi zamanı değerleri; $\tau = 6{,}5\text{x}10^{-10}\Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1\right)$ eşitliğinden hesaplanmıştır.

Farklı titreli kan serum örnekleri için hesaplanan dönme ilgi zamanı değerleri Çizelge 4.1 de ve bu değerlerin grafiği Şekil 4.7 de verilmiştir. Çizelgeden ve grafikten de anlaşılacağı gibi sıcaklık arttıkça dönme ilgi zamanı azalmış yani hareket serbestliğinin derecesi artarak spektrum izotropik hale gelmiştir.

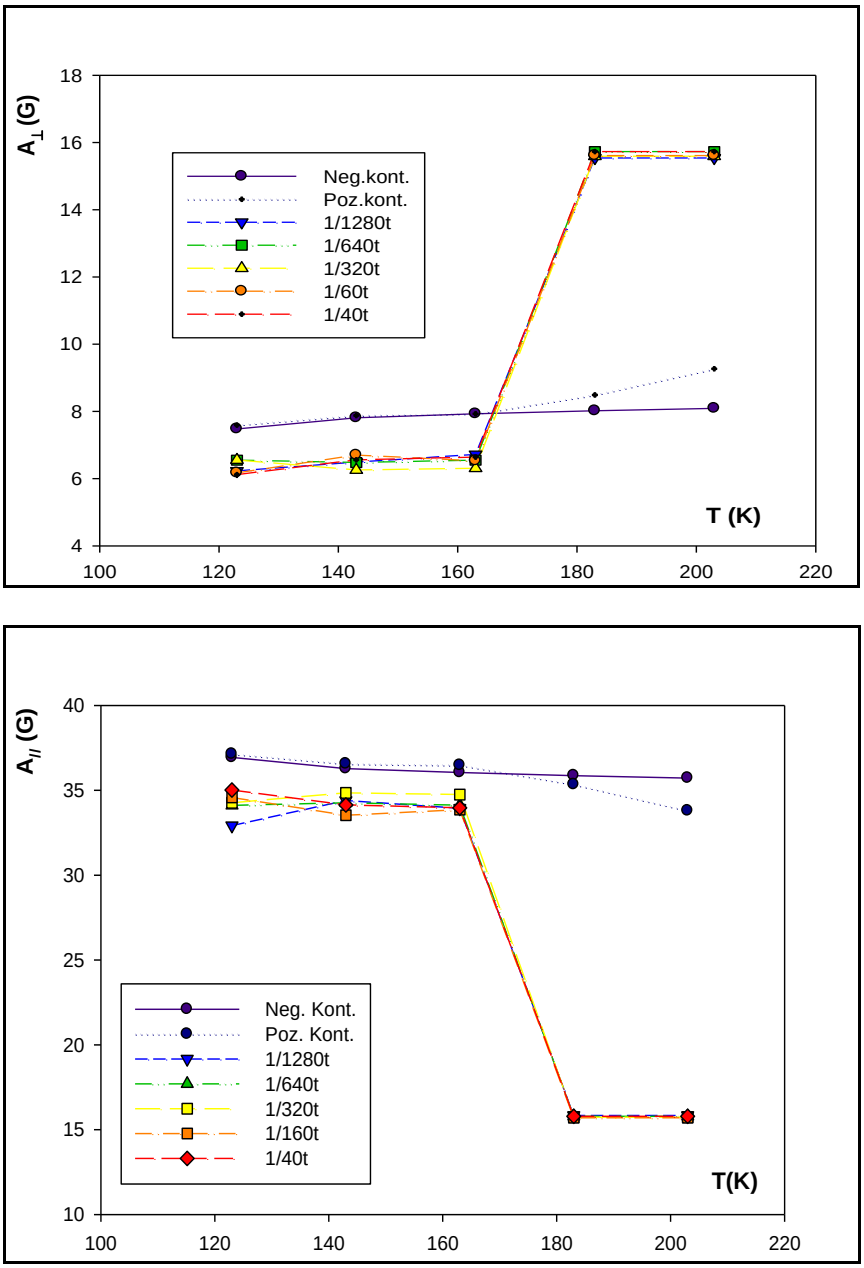
Çizelge 4.1. Farklı titreli kan serumlarının dönme ilgi zamanı değerleri

τ (ns) / T(K)	1/1280t	1/640t	1/320t	1/160t	1/40t
153	624.41	581.09	557.27	617.79	593.88
163	610.44	483.06	546.76	546.17	584.11
173	601.81	468.71	243.35	516.27	401.01
183	7.85	9.83	8.38	9.57	9.62
193	5.3	4.94	5.59	5.95	5.61
203	3.89	3.55	4.4	4.32	4.18
213	3.39	3.23	4.1	3.12	3.99
223	3.33	2.8	4.08	3.11	3.98

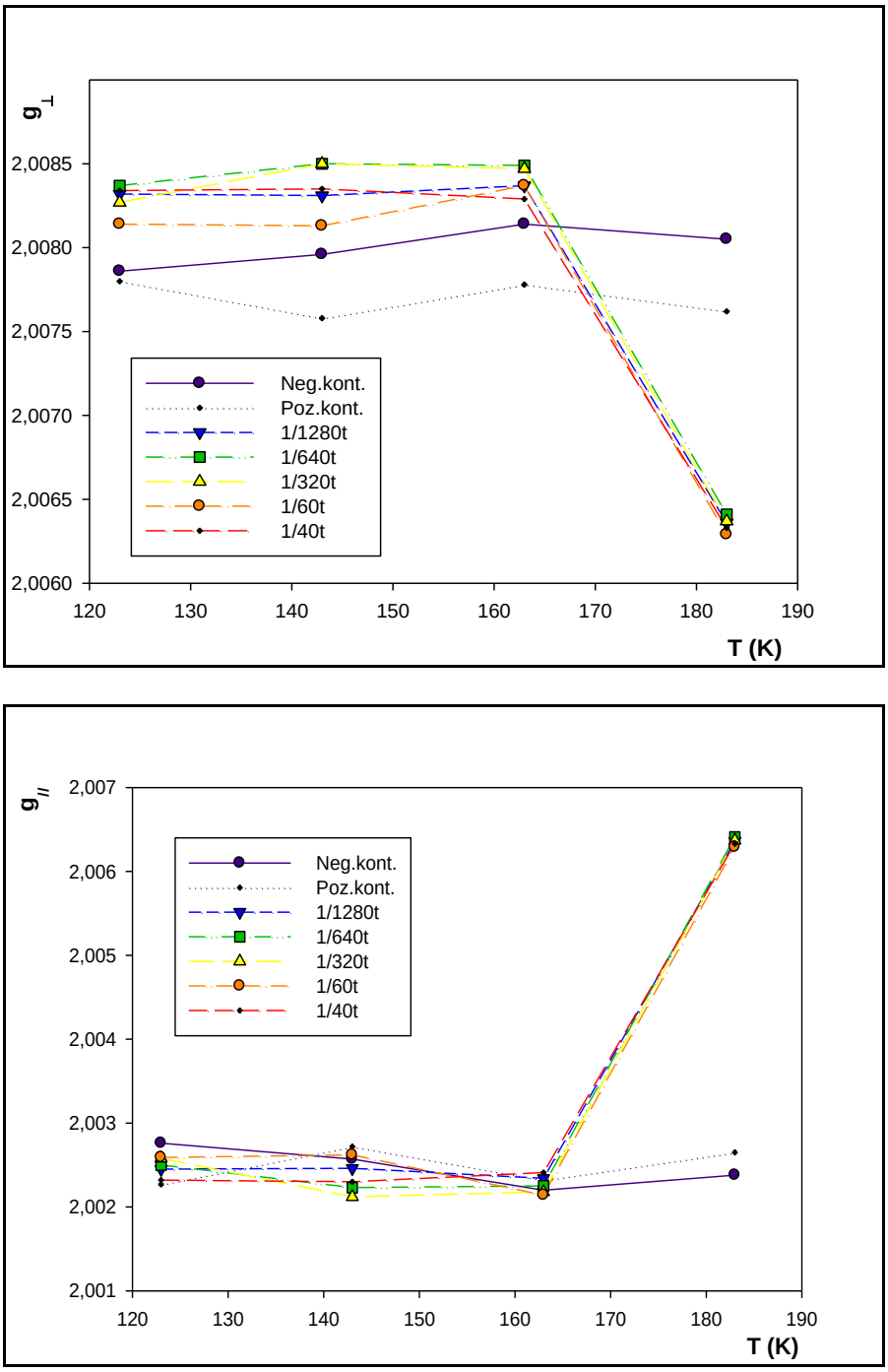


Şekil 4.7. Farklı titreli kan serumlarının dönme ilgi zamanlarının sıcaklığa bağlı değişimi

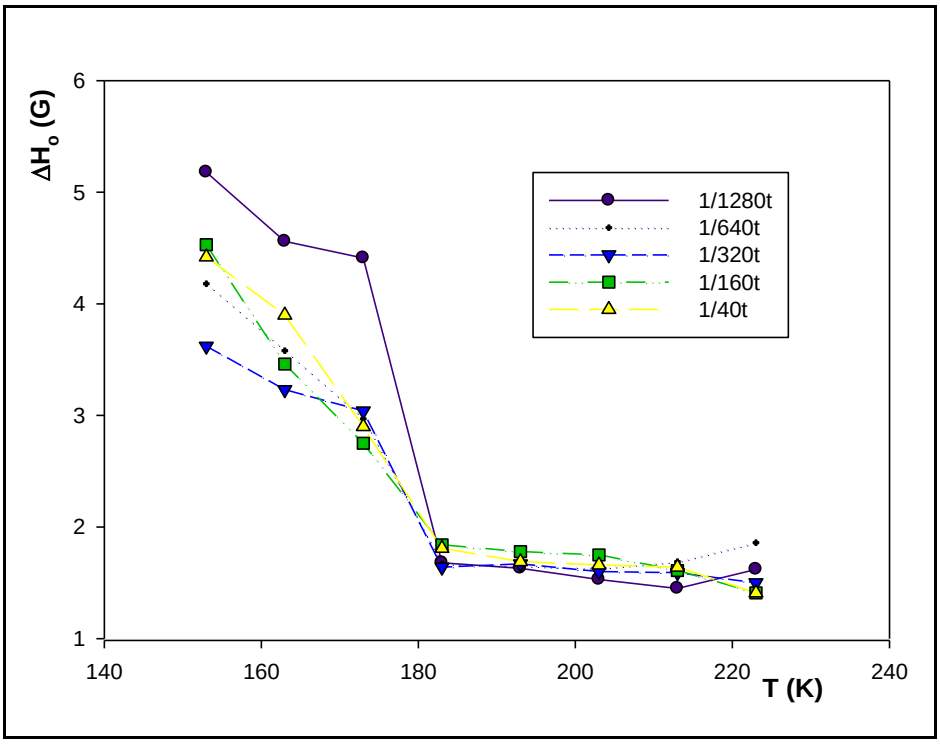
Negatif kontrol, pozitif kontrol ve farklı titreli spin etiketlenmiş kan serum örneklerinin farklı sıcaklıklardaki anizotropik spektrumları için aşırı ince yapı sabitlerinin dik ve paralel bileşenlerinin $A_{\perp}$, $A_{//}$, spektroskopik yarılma çarpanının dik ve paralel bileşenleri $g_{\perp}$, $g_{//}$ ve çizgi genişliği ΔH_o değerlerinin sıcaklığa bağlı değişim grafikleri sırasıyla Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 da verilmiştir. Şekil 4.8 de verilen hastalıklı ve titreleri farklı olan örneklerin dik ve paralel bileşenlerinin değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimlerinin pozitif kontrol için hesaplanan değerlere benzediği görülmektedir. Bu durum aslında hastalıklı olan bu örneklerin belli bir sıcaklıktan sonra izotropik hale gelmesinin fakat negatif kontrol örneğinin bu sıcaklıkta hala anizotropik davranmasının bir sonucudur. Hastalıklı örnekler için sıcaklık arttıkça aşırı ince yapı sabitinin dik bileşeni artmakta, paralel bileşeni azalmaktadır yani bu iki değer birbirine yaklaşarak spektrum izotropik hale gelmektedir. Halbuki sağlıklı negatif kan serum örneğinde sıcaklık arttıkça aşırı ince yapı sabitinin dik ve paralel bileşenleri hala birbirinden çok farklıdır yani spektrum anizotropiktir. Buradan hastalıklı ve sağlıklı kan örnekleri için aşırı ince yapı sabitinin dik ve paralel bileşenlerinin de ayırt edici faktör olarak kullanabileceğini söylenebilir.



Şekil 4.8. Kan serumlarının $A_{\perp}$ ve $A_{//}$ değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimleri (t:titre)



Şekil 4.9. Kan serumlarının $g_{\perp}$ ve $g_{//}$ değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimleri (t:titre)



Şekil 4.10. Kan serumlarının ΔH_o (G) çizgi genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimleri(t:titre)

Hastalıklı kan örnekleri için çizgi genişlikleri ^{14}N atomunun $m_I = 0$ değerine karşılık gelen orta pikten hesaplanmıştır. Beklendiği gibi orta pikin çizgi genişliği sıcaklık arttıkça azalmaktadır. Yani spektrumda ^{14}N atomunun aşırı ince yapı yarılma pikleri olan üç çizgi keskinleşmekte ve pik şiddetleri birbirine yaklaşmaktadır.

Negatif kontrol, pozitif kontrol ve titreli kan serum örnekleri için spektrumlardan ESR parametreleri hesaplanmış ve çizelgelerde verilmiştir. Bu değerlerin hesaplanmasında nitroksit radikalleri için literatürde verilen matematiksel ifadeler kullanılmıştır (Coderch ve ark. 2000, Lucaciu ve ark. 2005, Marsh 1990, Leslie ve ark. 2002, Berliner 1976). Tüm kan serum örnekleri için hesaplanan ESR parametreleri göz önüne alındığında zoonoz bir hastalık olan brucellozis için ESR spin etiketleme tekniğinin kullanılabileceğini söylemek mümkündür.

Çizelge 4.2. T = 163K de brucella kan serum örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_0 (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	H_r (G)	υ (GHz)
Poz.Kont.	34.67	7.93	17.44	2.00232	2.00778	2.00596	3285.3	9.207
Neg.Kont.	36.05	7.93	17.3	2.0022	2.00814	2.00616	3285.85	9.208
1/40t	33.97	6.64	15.75	2.00241	2.00829	2.00633	3291.57	9.225
1/160t	33.86	6.53	15.64	2.00214	2.00837	2.00629	3292.36	9.226
1/320t	34.75	6.31	15.64	2.00218	2.00847	2.00637	3292.65	9.227
1/640t	34.12	6.55	15.75	2.00225	2.00849	2.00641	3291.12	9.223
1/1280t	33.93	6.72	15.64	2.00234	2.00837	2.00636	3292.4	9.227

Çizelge 4.3. T = 143K de brucella kan serum örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_0 (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	H_r (G)	υ (GHz)
Poz.Kont.	36.56	7.88	17.44	2.00272	2.00758	2.00596	3285	9.208
Neg.Kont.	36.28	7.81	17.3	2.00257	2.00796	2.00616	3284.88	9.207
1/40t	34.14	6.56	15.75	2.0023	2.00835	2.00633	3291.74	9.225
1/160t	33.53	6.7	15.64	2.00262	2.00813	2.00629	3291.93	9.227
1/320t	34.85	6.26	15.64	2.00212	2.0085	2.00637	3292.75	9.227
1/640t	34.26	6.48	15.75	2.00223	2.0085	2.00641	3291.16	9.223
1/1280t	34.4	6.49	15.64	2.00246	2.00831	2.00636	3292.2	9.227

Çizelge 4.4. T = 123K de brucella kan serum örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_0 (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	H_r (G)	υ (GHz)
Poz.Kont.	37.13	7.595	17.44	2.00227	2.0078	2.00596	3286.1	9.209
Neg.Kont.	36.94	7.48	17.3	2.00276	2.00786	2.00616	3284.94	9.208
1/40t	35.02	6.12	15.75	2.00232	2.00834	2.00633	3291.72	9.225
1/160t	34.58	6.17	15.64	2.00259	2.00814	2.00629	3291.98	9.227
1/320t	34.26	6.555	15.64	2.00258	2.00827	2.00637	3292.00	9.227
1/640t	34.11	6.55	15.75	2.0025	2.00837	2.00641	3290.71	9.223
1/1280t	32.92	6.23	15.64	2.00245	2.00832	2.00636	3292.22	9.227

4.2. SÜT ÖRNEKLERİ

Mastitis; meme dokusunun bakteriyel, kimyasal, termal veya mekanik etkilere karşı oluşturduğu yangısal reaksiyondur. Hasarlı dokuyu onarmak ve normal işlevine döndürmek için gelişen bu reaksiyonun sonucu olarak meme dokusunda ve sütte protein yapısında değişiklikler ve somatik hücre sayısında artış olur. Mastitise sebep olan bakteriyel etkenler arasında Staphylococcus aureus, Koagulaz negatif Staphylococcus ssp. türleri, Streptococcus ssp. türleri, Escherichia coli, Arcanobacter pyogenes önem arz etmektedir. Mastitis; meme dokusunda oluşturduğu hasarlar nedeni ile süt verim kayıplarına, sütün protein yapısında bozulmalara ve enfeksiyon tedavisinde yoğun antibiyotik kullanımına neden olarak dünya süt endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bakteriyel kökenli mastitislerde, enfekte süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi sonucu insanlarda bakteriyel enfeksiyonlar şekillenebilmekte, antibiyotikli sütlerin tüketilmesi neticesinde bakterilere karşı antibiyotik direnci oluşabilmektedir (Claxton ve Ryan, 1980, Bradley 2002).

Bahsedilen bu önemli nedenlerden dolayı bu tez çalışmasında büyükbaş hayvanlardan alınan mastisisli ve sağlıklı süt örnekleri ESR spin etiketleme tekniğiyle incelenmiştir. Daha önce Bölüm 3'te anlatıldığı gibi sütler liyofilize edilmiş ve edilmemiş şeklinde iki farklı durumda değerlendirilmiştir. Liyofilizasyon işlemi süt örneklerinde bulunan suyun spektrumları etkileyip etkilemeyeceğini tartışmak amacıyla yapılmıştır. Süt örneklerinin hastalıklı olup olmadığı mikrobiyolojik analiz sonucu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre hastalıklı ve sağlıklı sütler şu şekildedir;

mast1……sağlıklı
mast2……hastalıklı
mast3……hastalıklı
mast4……sağlıklı
mast5……sağlıklı
mast6……hastalıklı
mast7……sağlıklı
mast8……sağlıklı
mast9……hastalıklı
mast10…..hastalıklı
mast11…..hastalıklı
mast12…..hastalıklı
mast16…..hastalıklı
mast17…..hastalıklı
mast18…..hastalıklı
mast21…..sağlıklı
mast22…..sağlıklı

Tüm süt örnekleri liyofilize edilmiş ancak liyofilize olanların bazılarına TEMPO radikali etiketlenememiştir. Etiketlemenin gerçekleştiği örnekler mast1, mast2, mast3, mast4, mast5, mast6, mast7, mast8, mast10, mast11, mast12, mast16, mast17' dir.

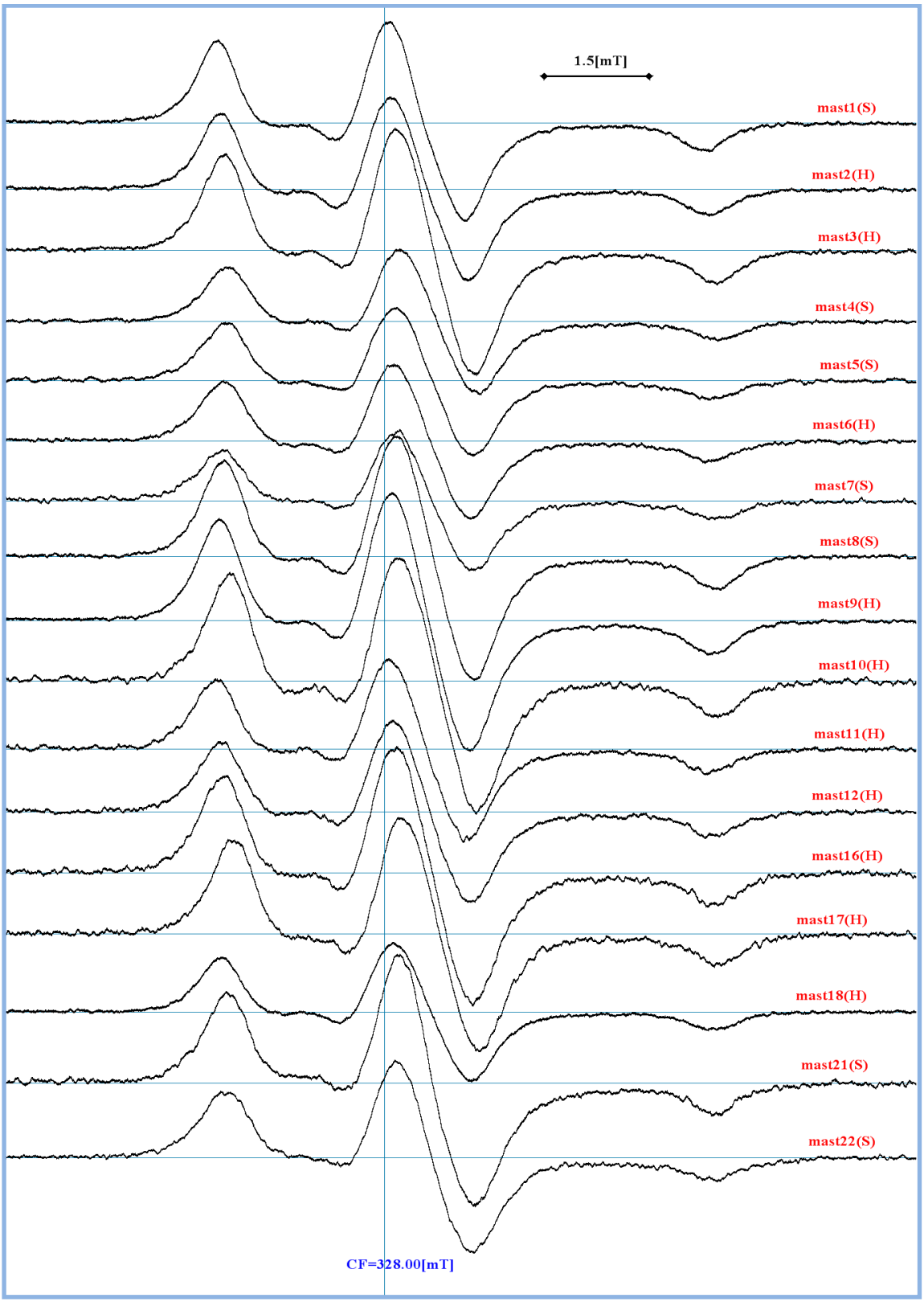
Kan örneklerinde olduğu gibi süt örnekleri de TEMPO radikali ile etiketlenmiş ve JEOL JES-FA 300 X-band ESR spektrometresiyle spektrumları kaydedilmiştir. Her bir liyofilize edilmemiş spin etiketli süt örneği için 123K sıcaklığında alınan ESR spektrumları Şekil 4.11 de verildiği gibidir. ESR spektrometre parametreleri; mikrodalga gücü 1mW, mikrodalga frekansı 9.23 GHz, modülasyon frekansı 100kHz, modülasyon genişliği ±2G, merkez alanı 3280G, tarama alanı ±75G, tarama zamanı 30s, zaman sabiti 0.03s olarak alınmıştır. Spektrumlarda parantez içinde verilen "S" harfi sağlıklı "H" harfi ise hastalıklı süt örneğini temsil etmektedir. Spektrumlardan yapının eksensel simetrik olduğu tespit edilmiştir. TEMPO spin etiketli liyofilize edilmiş süt örneklerinin aynı sıcaklıkta ve aynı ESR spektrometre parametrelerinde spektrumları kaydedilmiş ve Şekil 4.12 de verilmiştir. Şekil 4.11 ve 4.12 kıyaslandığında liyofilize olmuş sütlerdeki yapının da eksensel olduğu fakat bu örneklerin spektrumlarının daha gürültülü ve daha zayıf olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum; liyofilizasyon işleminden dolayı yapıdaki proteinlerin su kaybetmesi ve büzülmesi nedeniyle spin etiketlemenin daha zor gerçekleşmesi şeklinde açıklanabilir. Liyofilize olmamış ve liyofilize edilmiş sütler için 123K sıcaklığında alınan spektrumlardan hesaplanan aşırı ince yapı sabiti ve spektroskopik yarılma çarpanı, ^{14}N atomunun $m_I = 0$ durumuna karşılık gelen orta pikin çizgi genişliği değerleri sırasıyla Çizelge 4.5 ve 4.6 da verilmiştir. Her iki tablodaki değerler dikkatle incelendiğinde hastalıklı ve sağlıklı sütler için aşırı ince yapı sabitlerinin ve spektroskopik yarılma çarpanının izotropik değerlerinin birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Bu nedenle bu parametreler mastitis hastalığı için ayırt edici bir değer olarak kullanılmasının zor olduğunu göstermektedir. Ayrıca liyofilize olmamış ve liyofilize edilmiş sütler için TEMPO spin etiketinin ESR parametreleri birbirine çok yakındır, bunun anlamı ise etiketin her iki örnekte aynı bölgeye tutunmasıdır. Liyofilize edilmiş örneklerde orta pikin çizgi genişliği liyofilize olmamış örneklere göre çok az büyüktür bunun nedenin liyofilizasyon sırasında örneklerin suyunun tamamen alınması ve TEMPO spin etiketinin hareket serbestliğinin daha az olmasıdır.

Çizelge 4.5. Liyofilize olmamış süt örneklerinin 123K sıcaklığında ESR parametreleri

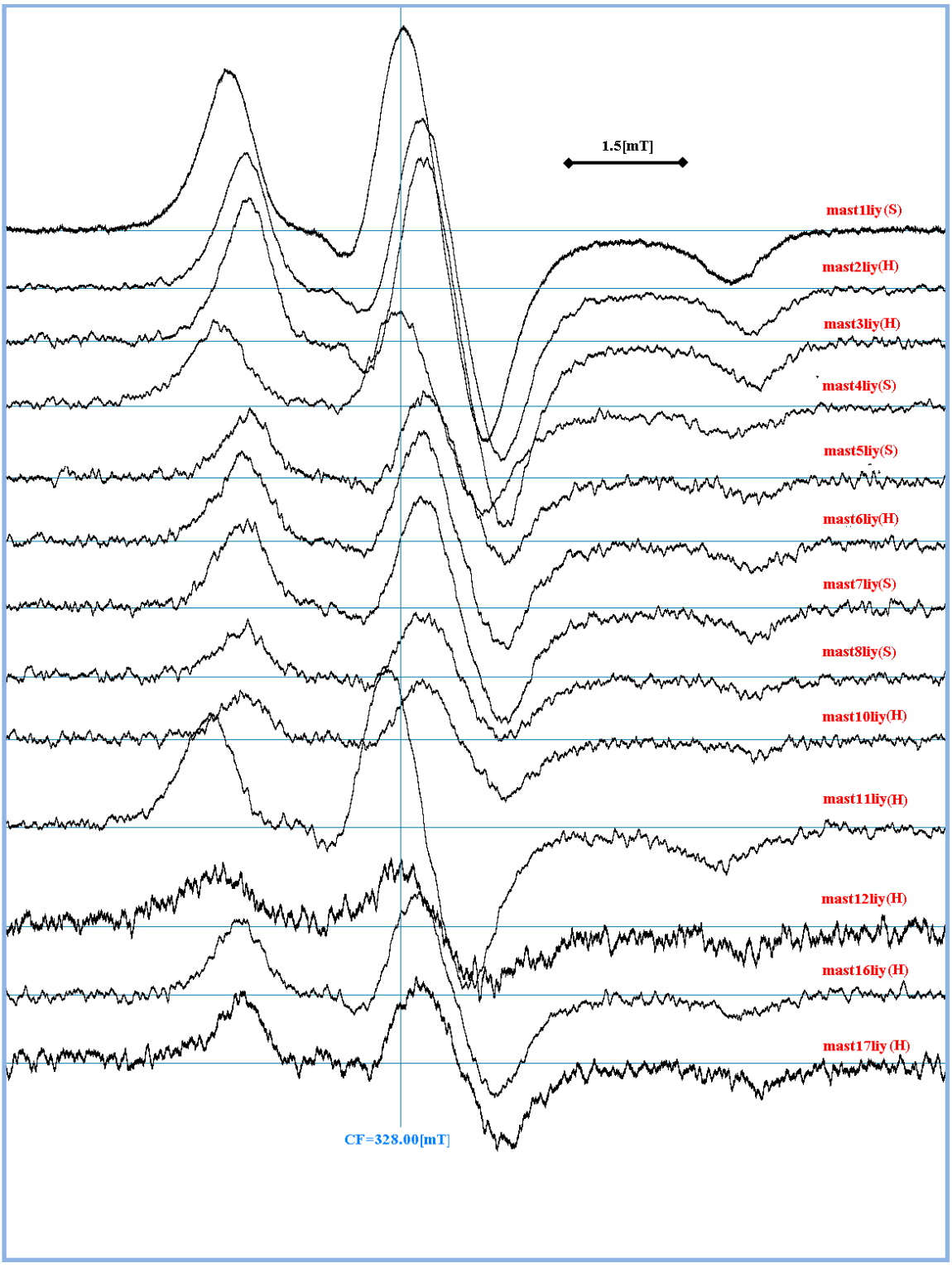
	$A_{//}$(G)	$A_{\perp}$(G)	a_o(G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_o(G)
mast1(S)	34.86	6.12	15.70	2.00238	2.00835	2.00639	4.88
mast2(H)	34.64	6.22	15.69	2.00238	2.00841	2.00640	4.90
mast3(H)	34.25	6.43	15.70	2.00229	2.00846	2.00640	4.81
mast4(S)	33.76	6.91	15.86	2.00248	2.00838	2.00641	4.84
mast5(S)	34.64	6.25	15.71	2.00200	2.00860	2.00640	4.02
mast6(H)	34.91	6.17	15.75	2.00250	2.00829	2.00636	4.96
mast7(S)	34.80	6.23	15.75	2.00238	2.00843	2.00641	4.90
mast8(S)	34.31	6.47	15.75	2.00219	2.00842	2.00634	4.61
mast10(H)	34.64	6.38	15.80	2.00263	2.00826	2.00638	4.46
mast11(H)	34.82	6.38	15.86	2.00220	2.00844	2.00636	4.46
mast12(H)	34.87	6.56	15.86	2.00271	2.00817	2.00635	4.56
mast17(H)	34.36	6.45	15.75	2.00272	2.00818	2.00636	4.67
mast18(H)	34.71	6.11	15.64	2.00246	2.00839	2.00641	4.55
mast21(S)	34.64	6.31	15.75	2.00232	2.00843	2.00639	4.44
mast22(S)	34.36	6.45	15.75	2.00228	2.00846	2.00640	4.37

Çizelge 4.6. Liyofilize edilmiş süt örneklerinin 123K sıcaklığında ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_0 (G)
mast1liy(S)	34.35	6.45	15.75	2.00262	2.00834	2.00643	4.91
mast2liy(H)	34.40	6.26	15.64	2.00237	2.00842	2.00640	4.90
mast3liy(H)	34.59	6.17	15.64	2.00221	2.00847	2.00638	4.85
mast4liy(S)	35.40	5.76	15.64	2.00238	2.00826	2.00630	5.11
mast5liy(S)	34.45	6.07	15.53	2.00248	2.00832	2.00637	4.82
mast6liy(H)	34.78	6.07	15.64	2.00240	2.00837	2.00638	4.67
mast7liy(S)	34.54	6.19	15.64	2.00231	2.00843	2.00639	4.56
mast8liy(S)	34.78	6.07	15.64	2.00240	2.00827	2.00631	4.92
mast10liy(H)	34.87	6.36	15.86	2.00239	2.00835	2.00636	4.97
mast11liy(H)	34.68	6.45	15.86	2.00233	2.00827	2.00629	4.93
mast12liy(H)	35.89	5.61	15.69	2.00228	2.00821	2.00623	5.56
mast16liy(H)	33.84	6.38	15.53	2.00272	2.0082	2.00637	4.95
mast17liy(H)	35.15	5.80	15.58	2.00218	2.00832	2.00627	5.33



Şekil 4.11. TEMPO etiketli liyofilize olmamış süt örneklerinin 123K sıcaklığındaki ESR spektrumları (Genlik:2x100, CF: merkez alan)

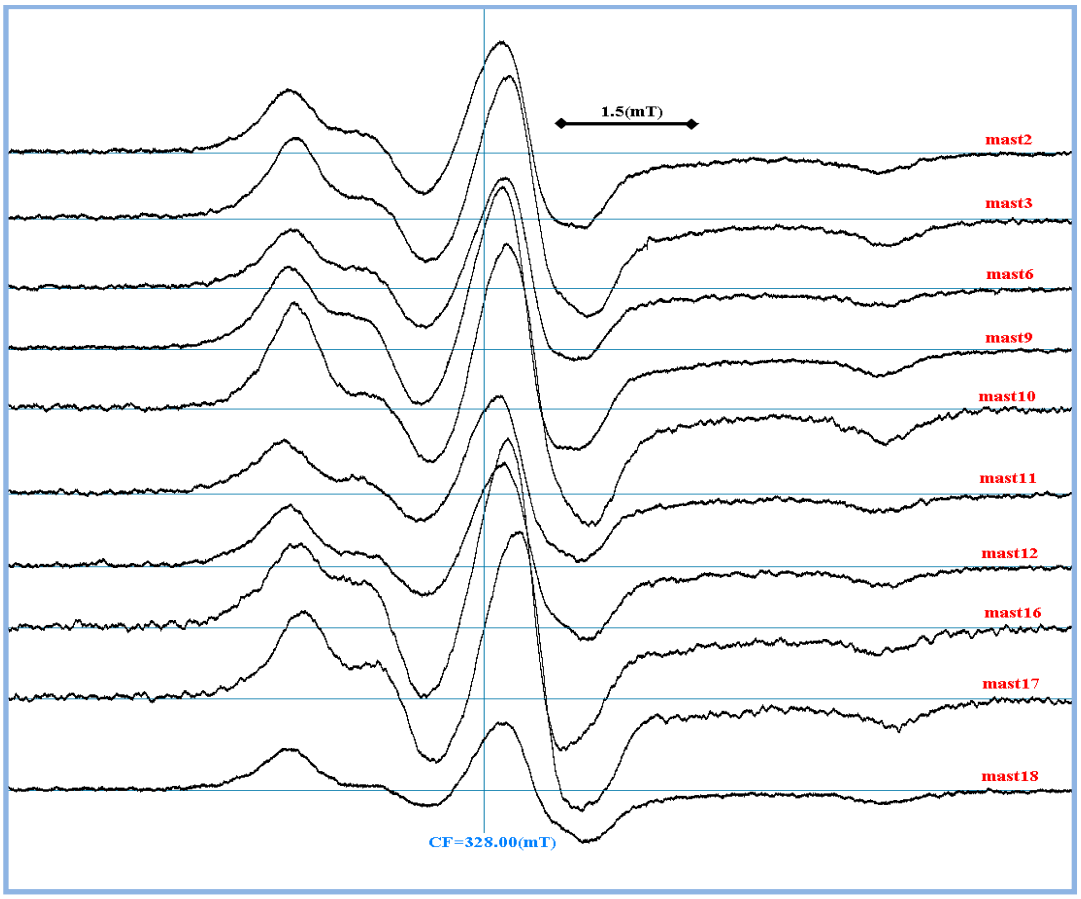


Şekil 4.12. TEMPO etiketli liyofilize edilmiş süt örneklerinin 123K sıcaklığında ESR spektrumları (Genlik: 2x100 alınmıştır. CF: merkez alanı ve "S" sağlıklı "H" hastalıklı süt örneklerini temsil eder.)

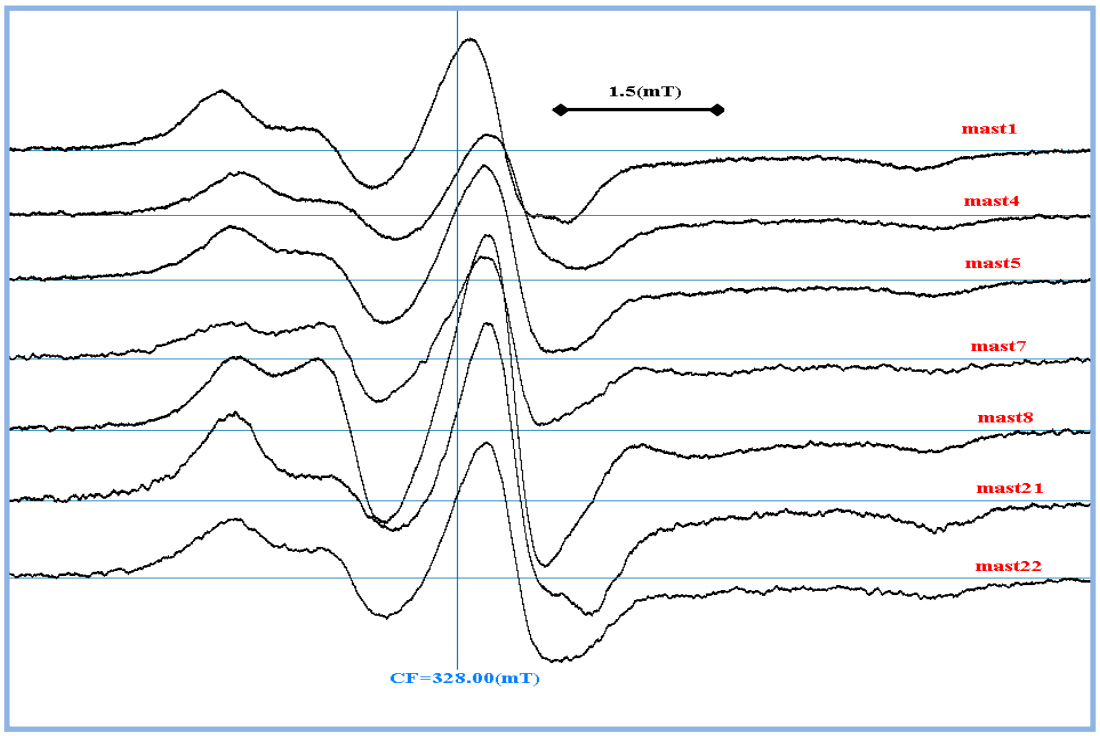
Mastitis hastalıklı ve sağlıklı sütler kendi arasında değerlendirilmiş ve liyofilize olmamış örnekler için şırasıyla Şekil 4.13 ve 4.14 de, liyofilize edilmiş sütler için ise sırasıyla Şekil 4.15 ve 4.16 da 153K sıcaklığında kaydedilen spektrumlar alt alta verilmiştir. Spektrumlar göz önüne alındığında bu sıcaklıkta spin etiketinin hareket serbestliğinin hala az olduğunu ve daha önce bahsedildiği gibi mastitis hastalığı açısından spektrumda önemli bir değişiklik gözlenmediğini söyleyebiliriz.

TEMPO spin etiketinin hareketliliğini tartışmak için liyofilize edilmemiş ve liyofilize edilmiş hastalıklı ve sağlıklı sütlerde 163K sıcaklığında kaydedilen spektrumlar Şekil 4.17 ve 4.18 de verilmiştir. Liyofilize olmamış sütlerin neredeyse hepsinde spektrumlar anizotropik ve TEMPO spin etiketinin orta dereceli hareketlidir. Yalnızca mast2 örneğinin spektrumu izotropik ve spin etiketinin hareket serbestliği fazladır. Liyofilize olanlarda ise durum iyice karışmış, bazı örnekler için spektrumunun merkezinde kaymalar gözlenmiş bazılarında anizotropi devam etmekle birlikte bazılarında ise spektrum izotropik hale gelmiştir. Spektrumdaki bu ani değişikliklerin sebebi olarak TEMPO spin etiketinin liyofilize edilmiş örneklerde iki farklı bölgeye etiketlenmiş olabileceği söylenebilir. Bu farklı bölgelerdeki etiketlerin hareket serbestliğinin de farklı olduğunu söylemek mümkündür. Böylece 163K sıcaklığında hareket serbestliği fazla olan etiketler hareketliliği orta dereceli olan etiketlerden ayrılmakta ve bazı örneklerde spektrum anizotropik, bazıların da ise izotropik olarak gözlenmektedir.

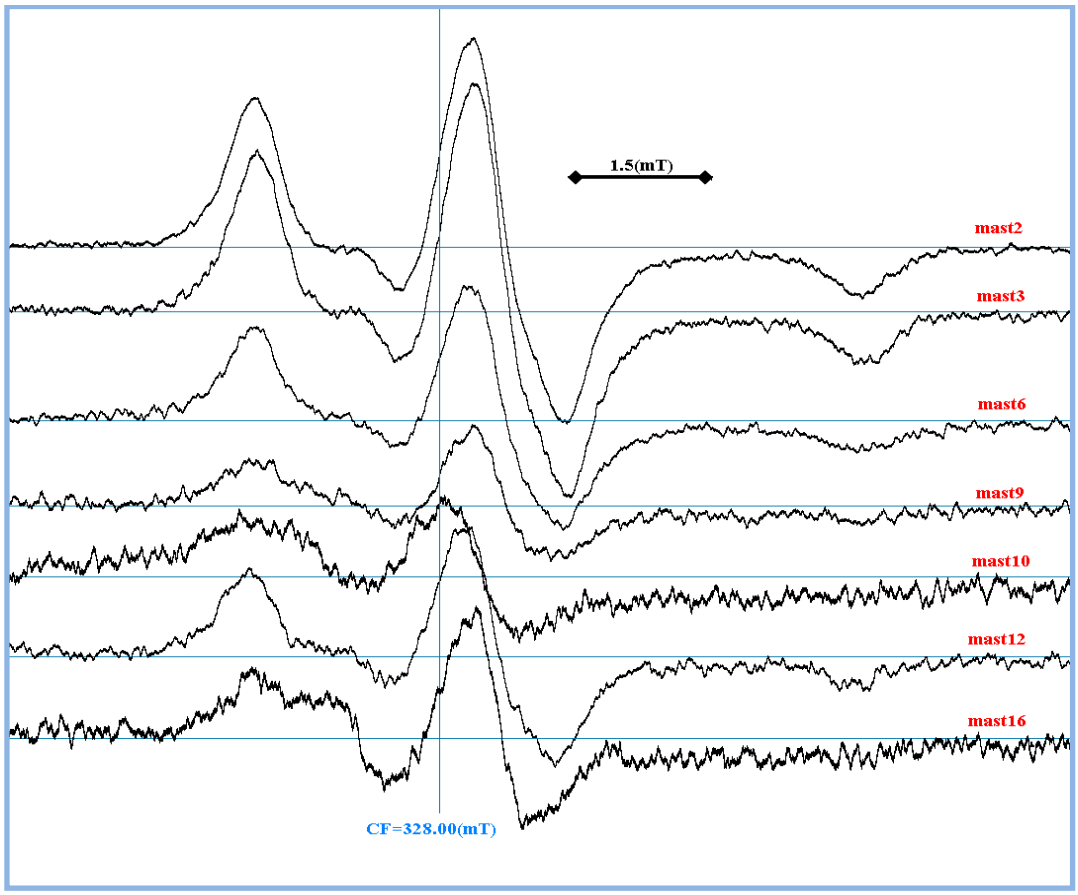
ESR spektrumları liyofilize olmamış örnekler için 183K sıcaklığında, liyofilize edilmiş örnekler için ise 223K sıcaklığında izotropik hale gelmiştir yani bu sıcaklıklarda etiketlerin hareket serbestliği artmıştır. Bu durumu ifade eden spektrumlar Şekil 4.19 ve 4.20 de verilmiştir.



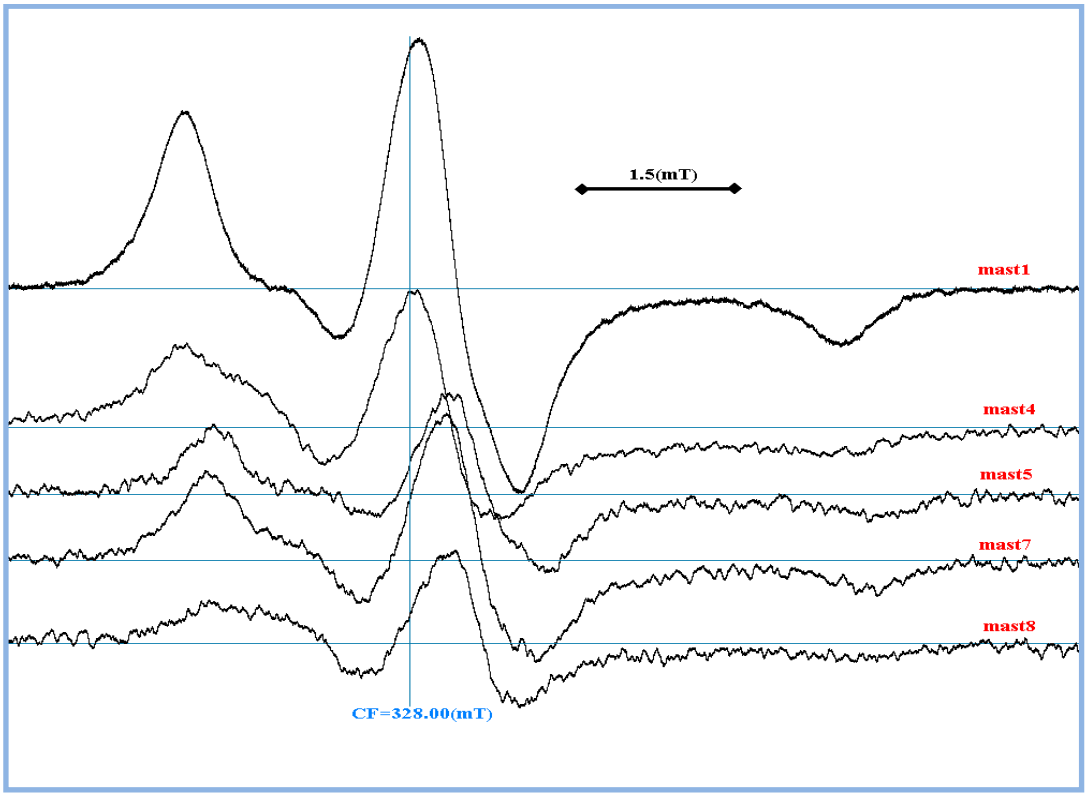
Şekil 4.13. Liyofilize edilmemiş hastalıklı sütlerin 153K sıcaklığındaki ESR spektrumları (genlik:2x100)



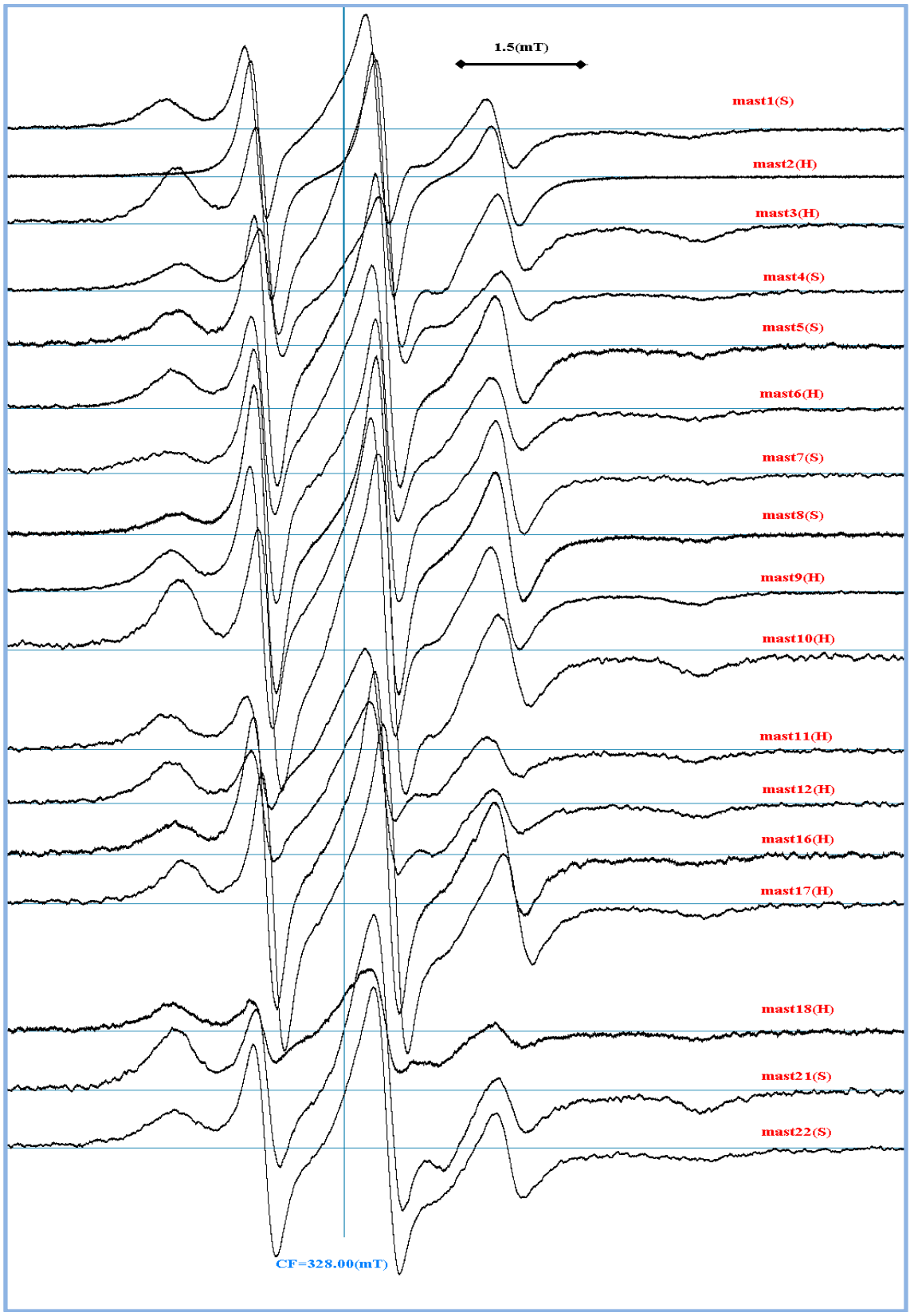
Şekil 4.14. Liyofilize edilmemiş sağlıklı sütlerin 153K sıcaklığındaki ESR spektrumları (genlik: 2x100)



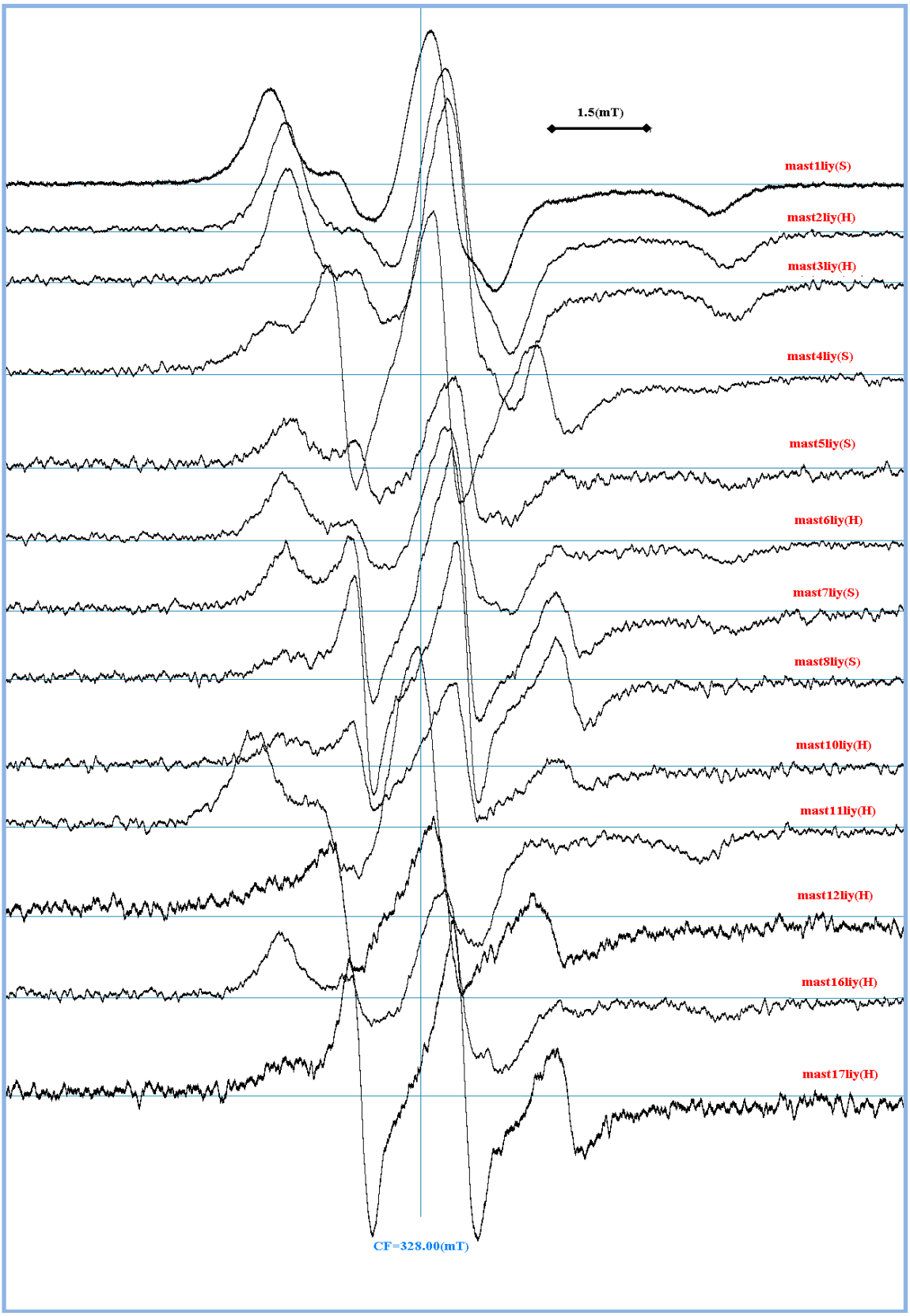
Şekil 4.15. Liyofilize edilmiş hastalıklı süt örneklerinin 153K deki ESR spektrumları (genlik: 2x100)



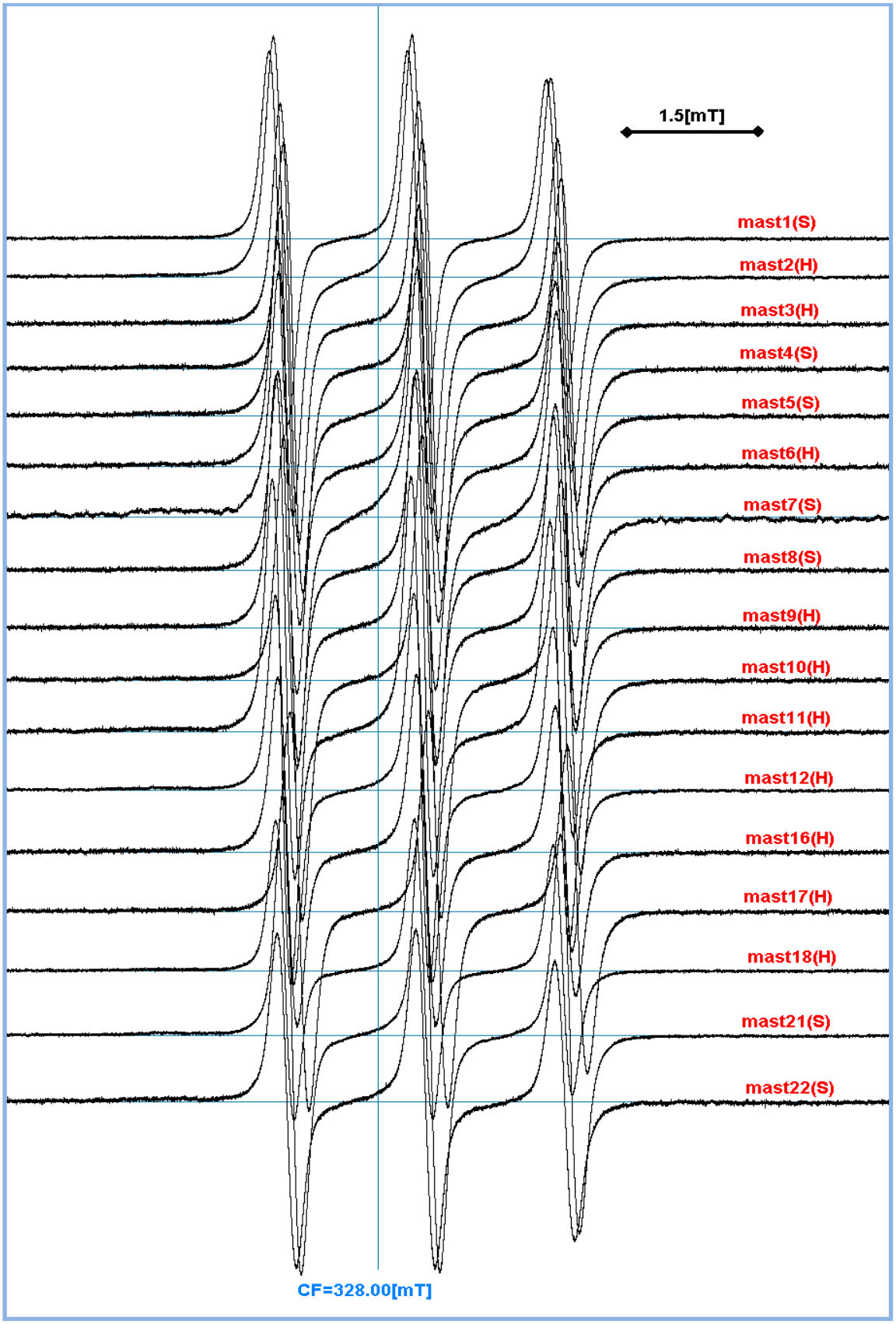
Şekil 4.16. Liyofilize edilmiş sağlıklı süt örneklerinin 153K deki ESR spektrumları (genlik: 2x100)



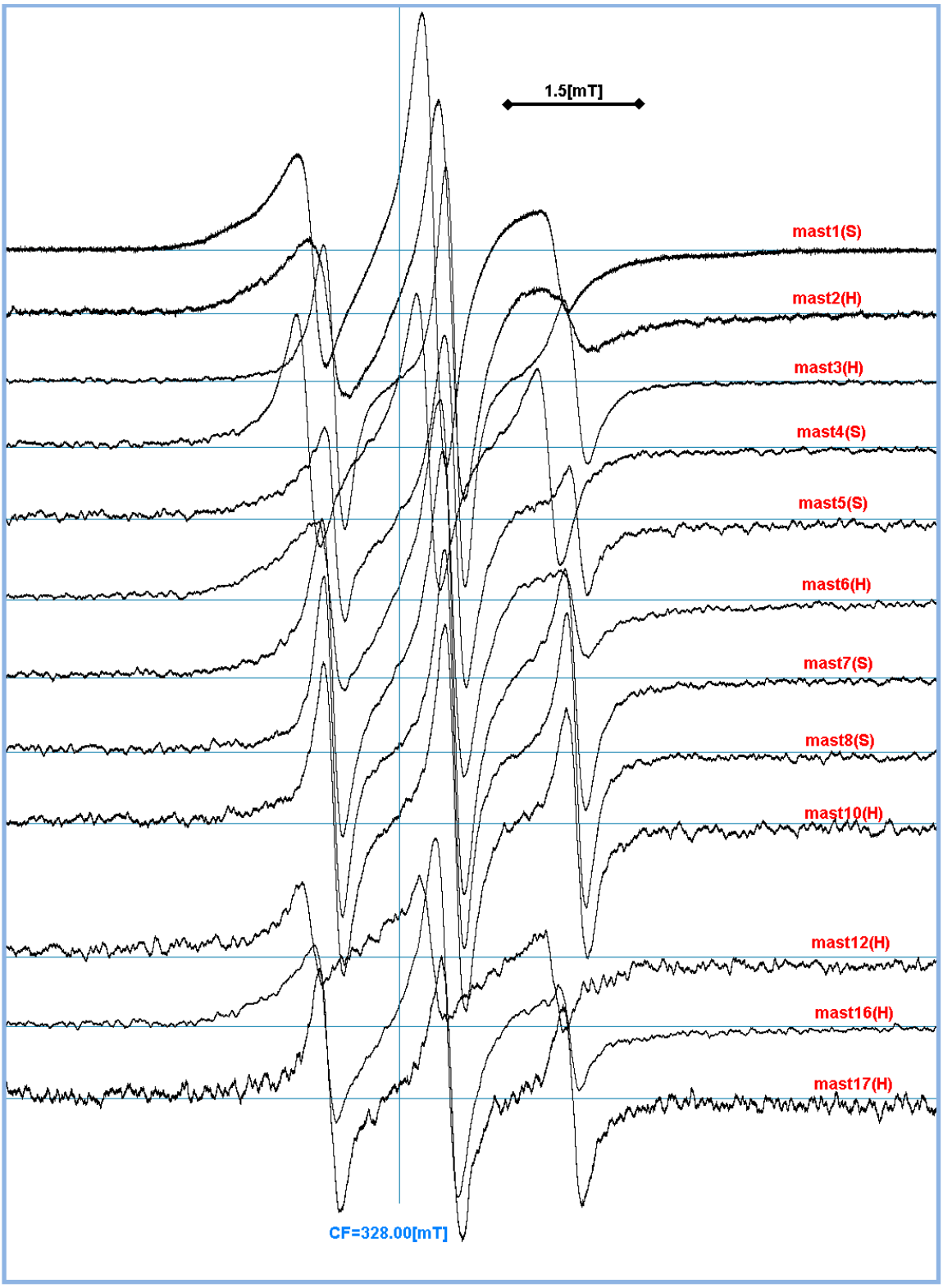
Şekil 4.17. Liyofilize olmamış süt örneklerinin 163K deki ESR spektrumları (genlik: 2x100)



Şekil 4.18. Liyofilize edilmiş süt örneklerinin 163K deki ESR spektrumları
(genlik: 2x100 alınmıştır. "S" sağlıklı "H" hastalıklı süt örneklerini temsil eder.)



Şekil 4.19. Liyofilize olmamış süt örneklerinin 183K deki ESR spektrumları



Şekil 4.20. Liyofilize edilmiş süt örneklerinin 183K deki ESR spektrumları

Süt örnekleri için çizgi genişlikleri, ^{14}N atomunun $m_I = 0$ değerine karşılık gelen orta pikten hesaplanmıştır. Beklendiği gibi orta pikin çizgi genişliği sıcaklık arttıkça azalmaktadır. Yani spektrumda ^{14}N atomunun aşırı ince yapı yarılma pikleri olan üç çizgi keskinleşmekte ve pik şiddetleri birbirine yaklaşmaktadır.

Hastalıklı ve sağlıklı sütlerin (liyofilize edilmiş ve edilmemiş) farklı sıcaklıklarda alınan spektrumlara ait ESR parametreleri ve bu parametrelerin sıcaklığa bağlı değişim grafikleri "EKLER" bölümünde verilmiştir.

İncelenen tüm ESR parametreleri hastalıklı ve sağlıklı sütler açısından değerlendirilmiş ve kıyaslanmıştır. Bu değerlendirme sonucunda TEMPO kararlı nitroksit radikali ile etiketlenmiş süt örneklerinde mastitis hastalığı ile ilgili moleküler dinamikler açısından ayırt edici bir özellik olmadığı tespit edilmiştir.

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında kan ve süt örnekleri ESR spin etiketleme tekniği kullanılarak Brucellozis ve Mastitis açısından incelenmiştir. İncelenen kan ve süt örneklerine etiketlenen TEMPO radikalinin ESR parametreleri tespit edilmiştir.

Hastalıklı ve sağlıklı örneklerin ESR parametreleri açısından değerlendirilmesi TEMPO spin etiketinin Brucellozis(Brucella hastalığı) için ayırt edici bir davranış sergilediği fakat Mastitis(meme iltihabı) hastalığı için bu ayırt ediciliğin olmadığını ortaya koymuştur.

Mastitis için bu ayırt ediciliğin olmamasının nedeni, sütü çok fazla etkileyebilecek olan yaş, ırk, cins, beslenme, iklim koşulları gibi faktörler olabilir. Bunun yanı sıra süt örnekleri için spin etiketinin yapıştığı proteinde hastalık belirtisi olmayabilir veya hastalıklı bölge spin etiketinin yapıştığı yere uzak olabilir.

Ayrıca ESR parametrelerinin değerlendirilmesi sonucunda süt örneklerinin spin etiketleme çalışması için liyofilize edilmesine gerek olmadığı ve hatta bu işlemin spektrumları gürültülü hale getirerek hesaplamaları zorlaştırdığı anlaşılmıştır. Sonraki çalışmalarda mastitis hastalığı ile ilgili olarak TEMPO spin etiketi yerine farklı spin etiketleri denenerek ayırt edici sonuçları olup olmadığı araştırılabilir.

KAYNAKLAR

Anonim, World Organisation For Animal Health. Terrestrial Manual. Bovine Brucellosis. 2009. Chapter 2 . 4 . 3.

Apaydın, F. (1996), "Manyetik Rezonans", Beytepe, Ankara,432-454.

Ashikawa I, Jun-Jie Yin , Witold K. Subczynski , Tsutomu Kouyama , James S. Hyde , Akihiro Kusumi, (1994), Molecular Organization and Dynamics İn Bacteriorhodopsin-Rich Reconstituted Membranes: Discrimination Of Lipid Environments By The Oxygen Transport Parameter Using a Pulse ESR Spin-Labeling Technique, Biochemistry, , 33 (16), Pp 4947–4952

Assenheim, H.M., 1966, Introduction To Electron Spin Resonance, Hilger and Watts Ltd, London.

Atherton, N.M., 1973, Electron Spin Resonance Theory and Applications, John Wiley&Sons Inc., 435p., New York.

Atherton, N.M., Manterfielo, M.R., Oral B., Zorlu F., (1977) Interaction Of Dtbn With Alkonals : Esr Measurements, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 73,430-433.

Bradley A.J. (2002), Bovine Mastitis: An Enveloping Diseases. The Veterinary Journal,. 163, 1-3.

Berliner, L.J., (1976), Ed., Spin Labeling Theory and Applications I, Academic Press N.Y.

Claxton P.D., Ryan D., (1980), Bovine Mastitis Bacteriology. Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases.

Coderch, L., Fonollosa J., De Pera M., Estelrich J., De La Maza A., Parra J.L., (2000), Influence Of Cholesterol On Liposome Fluidity by Epr Relationship With Percutaneous Absorption, Journal Of Controlled Release, 85-95.

Frank R. Landsberger, John Lenard, John Paxtont, and Rıchard W. Coivipans, 1971, Spin-Label Electron Spin Resonance Study Of The Lipid-Containing Membrane Of Influenza Virus, Proc. Nat. Acad. Sci. USA (68), No. 10, Pp. 2579-2583.

Feix J., Candice S. Klug , (2002), Site-Directed Spin Labeling Of Membrane Proteins and Peptide-Membrane Interactions, Biological Magnetic Resonance Biological Magnetic Resonance V 14, , Pp 251-281

Gordy, W., (1973), '' Theory And Aplications of Electron Spin Resonance'' , Mc Graw, Newyork, 4-75.

Griffith, O.H., (1965) ,Cornell D.W. and Mcconnell, H.M., J. Chem. Physc., 43, 2909.

Hansen E., Lauridsen L., Skibsted L.H., Moawad R.K., Andersen M.L., 2004, Oxidative Stability Of Frozen Pork Patties: Effect Of Fluctating Temperature On Lipid Oxidation, Meat Science, 68(2), 185-191.

Kivelson, D., (1960), Theory Of ESR Linewidths Of Free Radicals, J. Chem. Phys., 33, 1094.

Leslie E. W., (2002), Laconte, Vincent Voelz, Wendy Nelson, Michael Enz And David D. Thomas, Molecular Dynamics Simulation Of Site-Directed Spin Labelling: Experimental Validation İn Muscle Fibers, Biophysical Journal Vol. 83 P1854-1866.

Lucaciu, C.M., Danşoreanu M., Damain G., Miclauş V., (2005), EPR Study Of The Dynamics Of Some Spin Labels Inclusion İn Cyclodextrins, Romanian J. Biophys., Vol.15, 1-4, P.55-60, Bucharest.

Macosko J, M S Pio, I Tinoco, Jr, Et Al.,(1999), A Novel 5 Displacement Spin-Labeling Technique For Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy Of RNA, 5: 1158-1166

Marsh Derek, (1990), Studies Of Membrane Dynamics Using Nitroxide Spin Labels, Pure&Appl. Chem., Vol.62,No.2, Pp.265-270.

Mcconnell, H.M. (1956), Effect Of Anisotropic Hyperfine Interactions On Paramagnetic Relaxation İn Liquids, J. Chem. Phys., 25, 709.

Poole, C.P. And Farach, H.A. 1972, The Theory Of Magnetic Resonance, John Wiley and Sons Inc., U.S.A.

Poole, C.,(1983), Electron Spin Resonance A Compresehensive Treatise On Exp. Tech. Ed. 1,2., New York.

R. Lowell Fey, Mılton Workman, Harry Marcellos, and Michael J. Burke,1979, Electron Spin Resonance Of 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-Oxyl (TEMPO)-Labeled Plant Leaves, Department Of Horticulture, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523.

Sportelli, L., Rosi, A. and Indovina, P.L., Brancati, C., Tagarelli, A., (1983), Physical Properties Of Pathological Human Erytrocytes. I.A Spin Label Study On The International Microviscosity Of Homozygous β-Thalassemic Erythrocytes. İl Nuova Cimento Serie 1, Vol. 2D, 993-1004,Luglio-Agosto.

Stone, T.J.; Buckman, T., Nordio, P.L., Mcconnell, H.M. (1965). "Spin-Labeled Biomolecules". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54 (4): 1010–1017.

T. W. Graham Solomons- Craig B. Fryhle, 2002, Çeviri Editörleri: Gürolokay-Yılmaz Yıldırır Organik Kimya, Yedinci Basımdan Çeviri, Literatür Yayınları: 84.

Tudose M., Constantinescu T., Balaban A.T., Ionita P., 2008, Syntehesis and Electron Paramagnetic Resonance Study Of A Nitroxide Free Radical Covalently Bonded On Aminopropyl-Silica Gel, Aplied Surface Science, 254(7), 1904-1908.

Weber, R. D., Jiang, J. and Barr, D.P., 1998, Bruker EMX User's Manual, Bruker Instruments, Inc., Billerica, MA USA, 2.Bölüm, 10-23.

Weil, J. A., Bolton, J.R. and Wertz, J.E., 1993, Electron Paramagnetic Resonance, Elemetary Theory And Practical Applications, John Wiley and Sons Inc., USA, 471-515.

Wertz, J.E., (1955), '' Nuclear and Electron Spin Magnetic Resonance'', Chemical Rewievs, Newyork , 98-102.

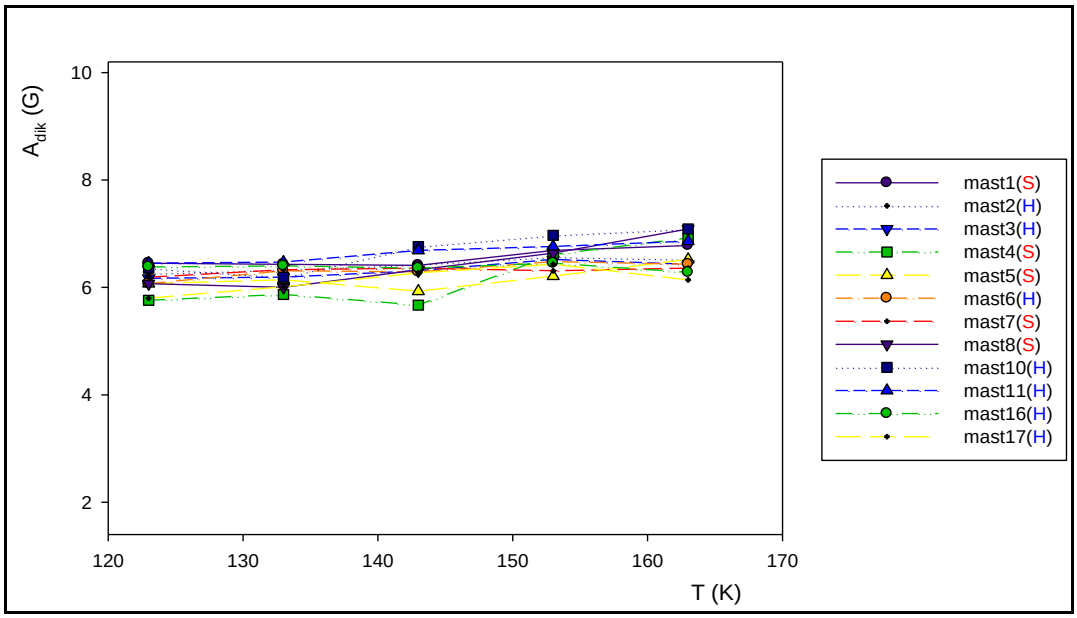
Wertz, J.E. And Bolton, J.R., 1972. Electron Spin Resonance Elementary Theory and Practical Applications, Mc-Graw- Hill, Newyork.

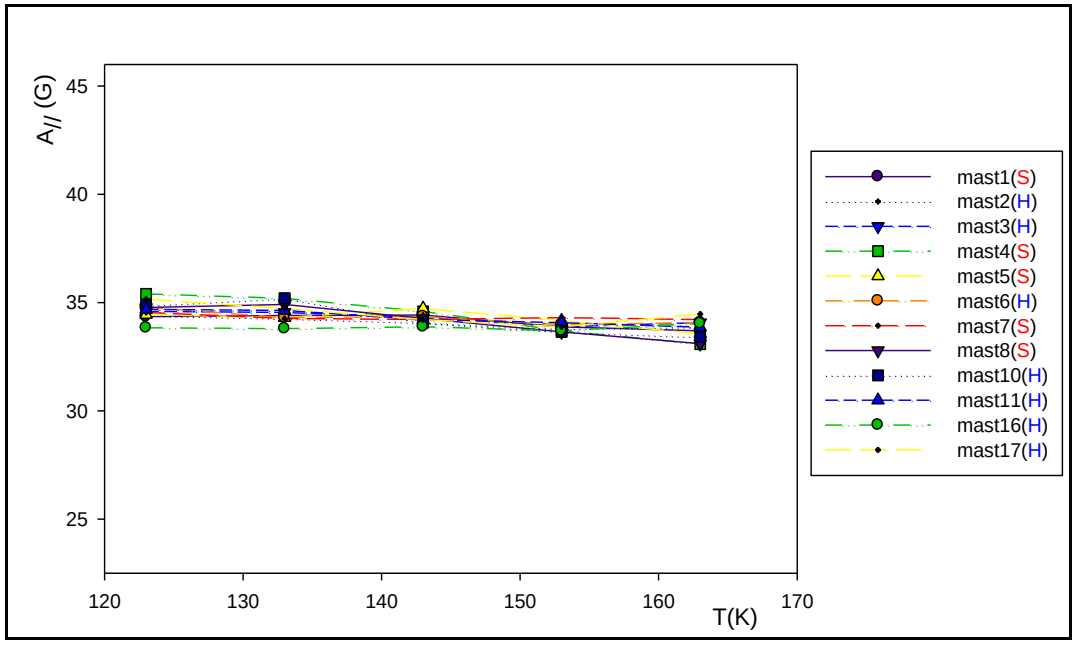
Yerli, Y.,1995, Bovine Albuminin Sulu Çözelisinde 16 Doxyl Stearic Acid Ve Tempo Radikallerinin Spin Etiketleme Tekniği Kullanılarak EPR ile İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

Yerli, Y., 2002, Bazı İnorganik Yapılarda Katkılama ve Işınlama İle Oluşturulan Bozuklukların EPR İle İncelenmesi, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

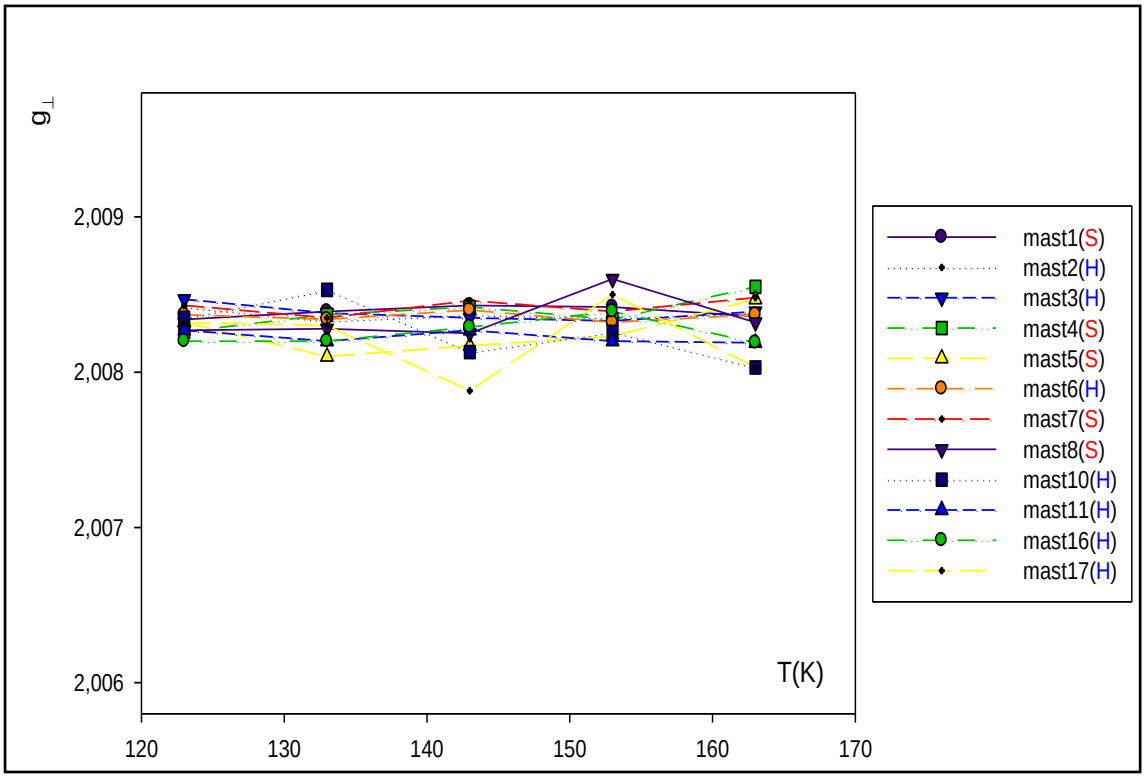
EKLER

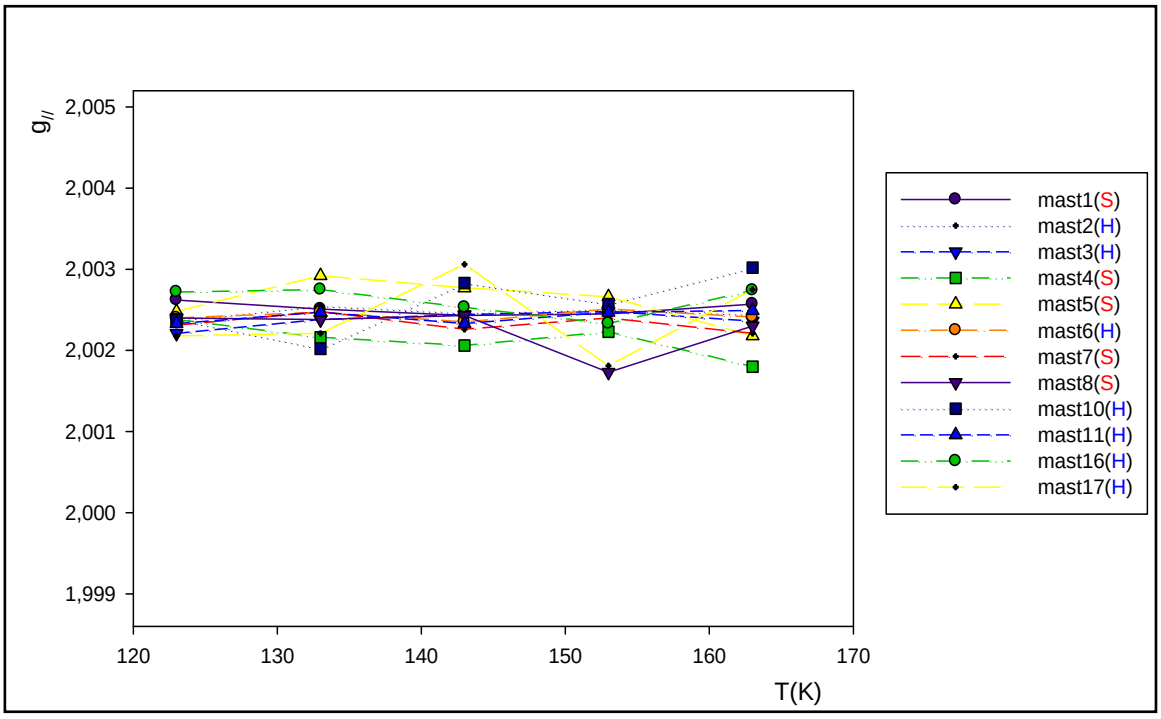
Süt Örnekleri



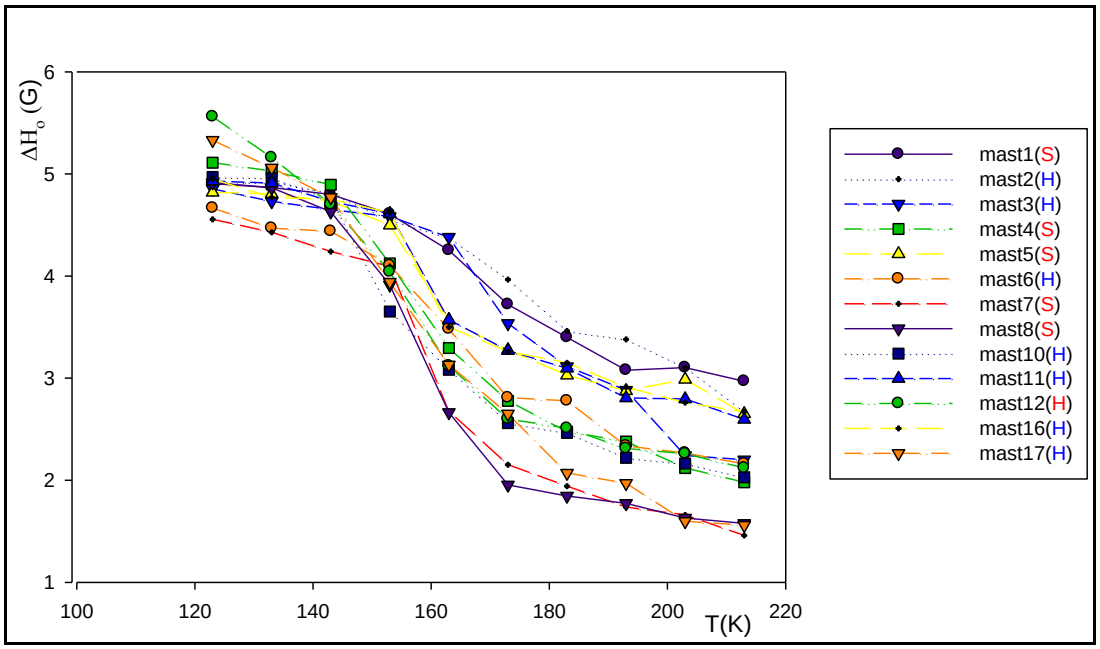


Şekil 4.21. Liyofilize edilmiş süt örneklerinin $A_{dik}(A_{\perp})$, $A_{//}$ değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi

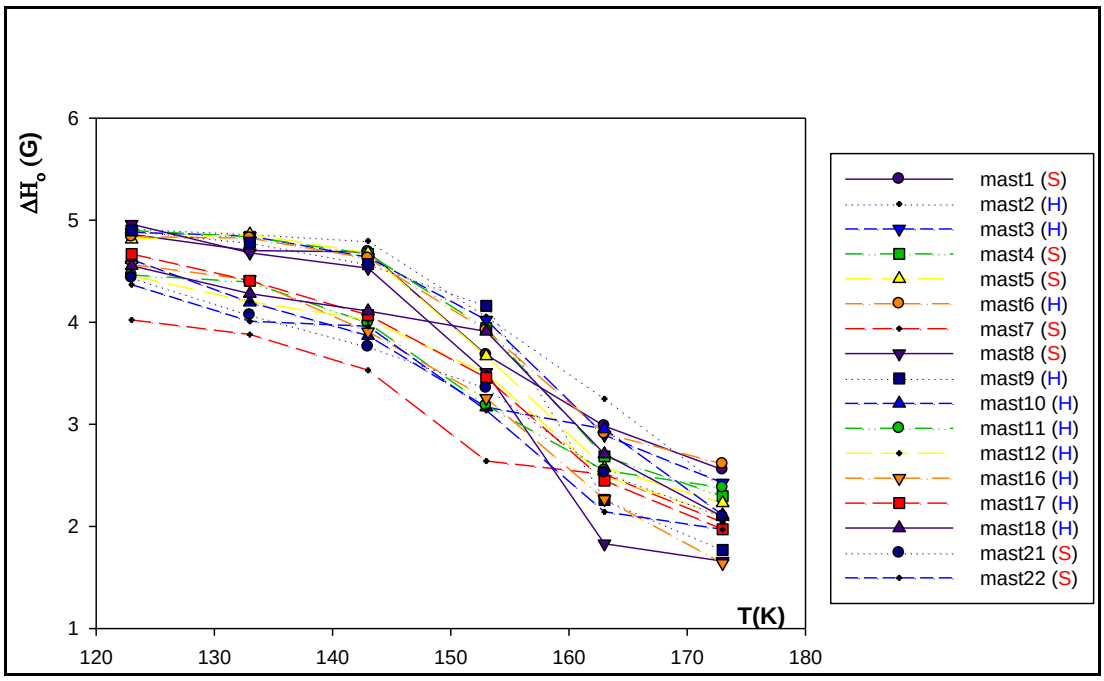




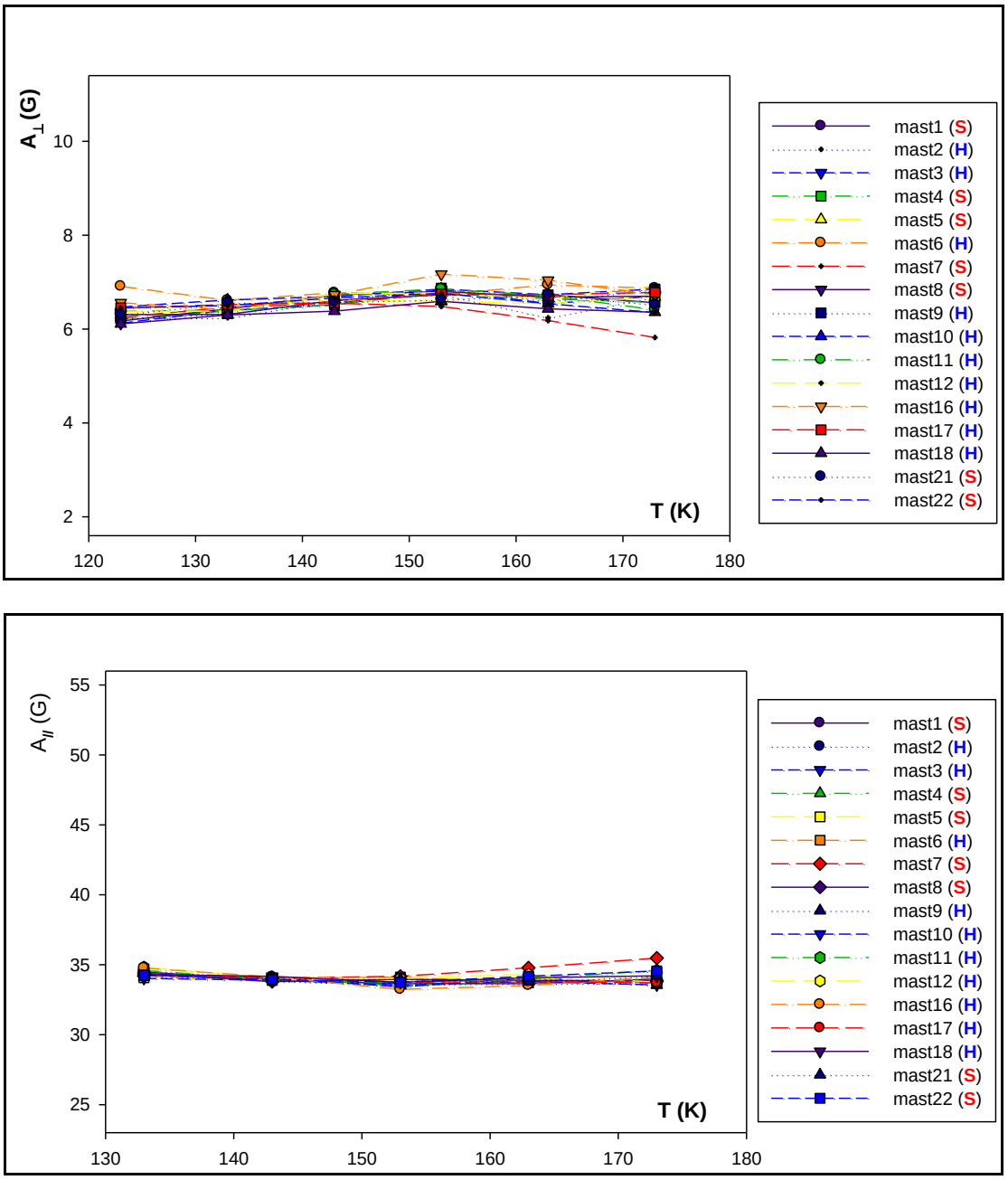
Şekil 4.22. Liyofilize edilmiş süt örneklerinin $g_{dik}(g_{\perp})$ $g_{//}$ değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi



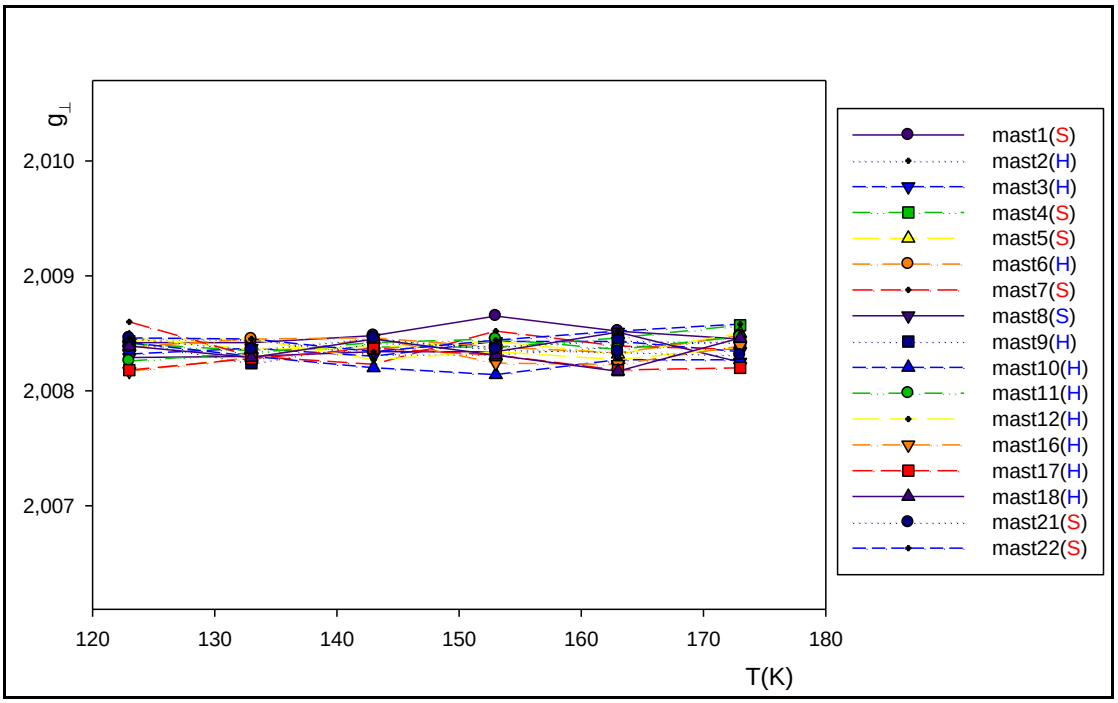
Şekil 4.23. Liyofilize edilmiş süt örneklerinin çizgi genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi

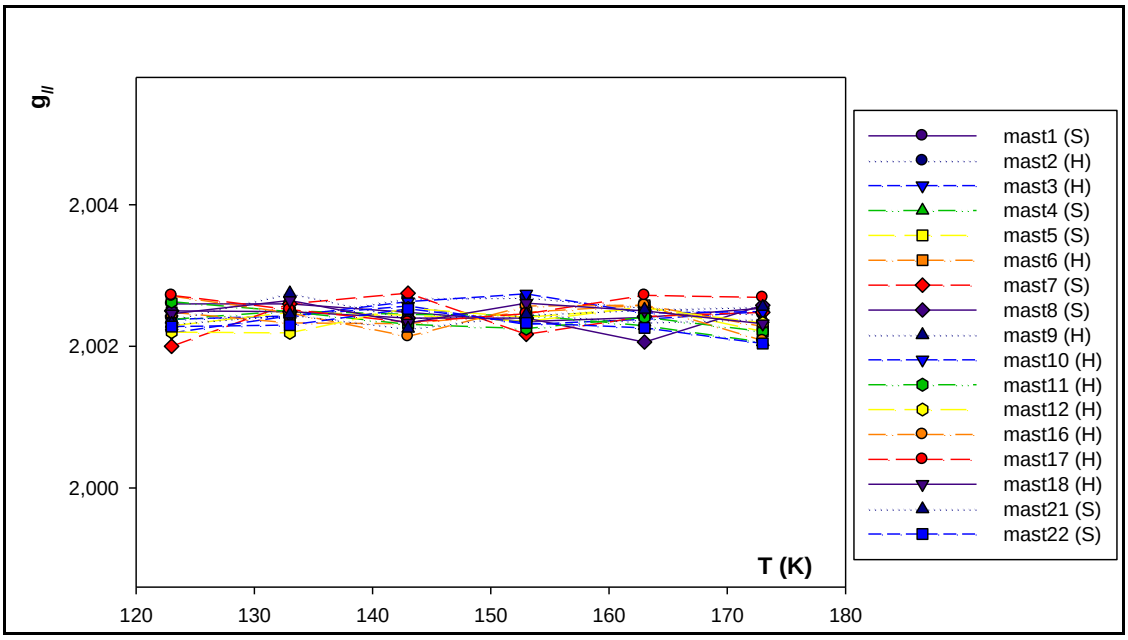


Şekil 4.24. Liyofilize edilmemiş süt örneklerinin çizgi genişliğinin sıcaklığa bağlı değişimi



Şekil 4.25. Liyofilize edilmemiş süt örneklerinin A_{dik}, $A_{//}$ değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi





Şekil 4.26. Liyofilize edilmemiş süt örneklerinin $g_{dik}(g_{\perp})$, $g_{//}$ değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi

Çizelge 4.7. T=133K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_0 (G)
mast1liy(S)	34.40	6.43	15.75	2.00251	2.00839	2.00643	4.87
mast2liy(H)	34.26	6.33	15.64	2.00255	2.00833	2.00640	4.93
mast3liy(H)	34.54	6.19	15.64	2.00238	2.00838	2.00638	4.73
mast4liy(S)	35.20	5.87	15.64	2.00216	2.00837	2.00630	5.03
mast5liy(S)	34.31	6.14	15.53	2.00292	2.00810	2.00637	4.80
mast6liy(H)	34.31	6.31	15.64	2.00247	2.00834	2.00638	4.47
mast7liy(S)	34.26	6.33	15.64	2.00248	2.00835	2.00639	4.43
mast8liy(S)	34.92	6.00	15.64	2.00238	2.00828	2.00631	4.87
mast10liy(H)	35.20	6.19	15.86	2.00202	2.00853	2.00636	4.96
mast11liy(H)	34.64	6.47	15.86	2.00247	2.00820	2.00629	4.91
mast12liy(H)	34.92	6.08	15.69	2.00191	2.00840	2.00623	5.16
mast16liy(H)	33.79	6.40	15.53	2.00275	2.00820	2.00637	4.77
mast17liy(H)	34.73	6.01	15.58	2.00221	2.00830	2.00627	5.06

Çizelge 4.8. T= 143K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_0 (G)
mast1liy(S)	34.43	6.41	15.75	2.00243	2.00843	2.00643	4.80
mast2liy(H)	34.07	6.43	15.64	2.00246	2.00837	2.00640	4.81
mast3liy(H)	34.31	6.31	15.64	2.00244	2.00835	2.00638	4.65
mast4liy(S)	34.59	5.67	15.64	2.00206	2.00842	2.0063	4.89
mast5liy(S)	34.73	5.93	15.53	2.00277	2.00817	2.00637	4.73
mast6liy(H)	34.35	6.29	15.64	2.00235	2.00840	2.00638	4.44
mast7liy(S)	34.21	6.36	15.64	2.00226	2.00846	2.00639	4.24
mast8liy(S)	34.26	6.33	15.64	2.00243	2.00825	2.00631	4.63
mast10liy(H)	34.07	6.76	15.86	2.00283	2.00813	2.00636	4.75
mast11liy(H)	34.21	6.69	15.86	2.00233	2.00827	2.00629	4.73
mast12liy(H)	34.12	6.48	15.69	2.00294	2.00788	2.00623	4.70
mast16liy(H)	33.88	6.36	15.53	2.00253	2.00829	2.00637	4.75
mast17liy(H)	34.21	6.27	15.58	2.00306	2.00788	2.00627	4.77

Çizelge 4.9. T= 153K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_0 (G)
mast1liy(S)	33.88	6.69	15.75	2.00245	2.00842	2.00643	4.61
mast2liy(H)	33.79	6.57	15.64	2.00251	2.00835	2.00640	4.55
mast3liy(H)	33.88	6.52	15.64	2.00248	2.00833	2.00638	4.58
mast4liy(S)	33.69	6.61	15.64	2.00223	2.00834	2.00630	4.12
mast5liy(S)	34.17	6.21	15.53	2.00266	2.00823	2.00637	4.49
mast6liy(H)	33.98	6.48	15.64	2.00251	2.00832	2.00638	4.10
mast7liy(S)	34.31	6.31	15.64	2.00240	2.00839	2.00639	4.09
mast8liy(S)	33.65	6.64	15.64	2.00173	2.0086	2.00631	3.91
mast10liy(H)	33.65	6.97	15.86	2.00257	2.00826	2.00636	3.65
mast11liy(H)	34.07	6.76	15.86	2.00247	2.00820	2.00629	4.61
mast12liy(H)	34.35	6.36	15.69	2.00521	2.00674	2.00623	4.04
mast16liy(H)	33.70	6.45	15.53	2.00233	2.00839	2.00637	4.62
mast17liy(H)	33.88	6.43	15.58	2.00181	2.00850	2.00627	3.94

Çizelge 4.10. T= 163K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_0 (G)
mast1liy(S)	33.	6.78	15.75	2.00257	2.00836	2.00643	4.25
mast2liy(H)	33.88	6.52	15.64	2.00244	2.00838	2.00640	4.37
mast3liy(H)	34.07	6.43	15.64	2.00236	2.00839	2.00638	4.38
mast4liy(S)	33.09	6.92	15.64	2.00180	2.00855	2.00630	3.29
mast5liy(S)	33.56	6.52	15.53	2.00218	2.00847	2.00637	3.57
mast6liy(H)	34.07	6.43	15.64	2.00241	2.00837	2.00638	3.48
mast7liy(S)	34.21	6.36	15.64	2.00221	2.00848	2.00639	2.68
mast8liy(S)	33.10	7.09	15.64	2.00230	2.00832	2.00631	2.66
mast10liy(H)	33.41	7.09	15.86	2.00302	2.00803	2.00636	3.08
mast11liy(H)	33.86	6.86	15.86	2.00249	2.00819	2.00629	3.57
mast12liy(H)	31.25	7.91	15.69	2.00399	2.00735	2.00623	3.12
mast16liy(H)	34.03	6.28	15.53	2.00274	2.00819	2.00637	3.50
mast17liy(H)	34.47	6.14	15.58	2.00275	2.00803	2.00627	3.13

Çizelge 4.11. T= 173K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_0 (G)
mast1liy(S)	33.70	6.78	15.75	2.00232	2.00849	2.00643	3.72
mast2liy(H)	33.70	6.61	15.64	2.00244	2.00838	2.00640	3.97
mast3liy(H)	33.6	6.93	15.64	2.00247	2.00834	2.00638	3.54
mast4liy(S)	32.00	7.46	15.64	2.00250	2.00820	2.00630	2.78
mast5liy(S)	33.65	6.48	15.53	2.00229	2.00841	2.00637	3.28
mast6liy(H)	33.51	6.71	15.64	2.00218	2.00848	2.00638	2.81
mast7liy(S)	34.03	6.45	15.64	2.00239	2.00839	2.00639	2.15
mast8liy(S)	izotropik	izotropik	15.64	izotropik	izotropik	2.00631	1.95
mast10liy(H)	32.44	6.07	15.86	2.00252	2.00828	2.00636	2.56
mast11liy(H)	33.80	6.89	15.86	2.00265	2.00811	2.00629	3.27
mast12liy(H)	izotropik	izotropik	15.69	izotropik	izotropik	2.00623	2.60
mast16liy(H)	33.21	6.69	15.53	2.00273	2.00819	2.00637	3.26
mast17liy(H)	izotropik	izotropik	15.58	izotropik	izotropik	2.00627	2.65

Çizelge 4.12. T= 183K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_0 (G)
mast1liy(S)	33.27	6.99	15.75	2.00237	2.00846	2.00643	3.40
mast2liy(H)	33.27	6.83	15.64	2.00266	2.00827	2.00640	3.46
mast3liy(H)	32.76	7.08	15.64	2.00243	2.00836	2.00638	3.11
mast4liy(S)	izotropik	izotropik	15.64	izotropik	izotropik	2.00630	2.48
mast5liy(S)	33.32	6.64	15.53	2.00251	2.00830	2.00637	3.03
mast6liy(H)	33.84	6.54	15.64	2.00224	2.00844	2.00638	2.79
mast7liy(S)	33.41	6.76	15.64	2.00262	2.00828	2.00639	1.94
mast8liy(S)	izotropik	izotropik	15.64	izotropik	izotropik	2.00631	1.85
mast10liy(H)	izotropik	izotropik	15.86	izotropik	izotropik	2.00636	2.46
mast11liy(H)	33.09	7.25	15.86	2.00206	2.00841	2.00629	3.10
mast12liy(H)	izotropik	izotropik	15.69	izotropik	izotropik	2.00623	2.51
mast16liy(H)	32.90	6.85	15.53	2.00253	2.00829	2.00637	3.15
mast17liy(H)	izotropik	izotropik	15.58	izotropik	izotropik	2.00627	2.07

Çizelge 4.13. T=193K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_0 (G)
mast1liy(S)	33.87	7.19	15.75	2.00244	2.00843	2.00643	3.08
mast2liy(H)	33.82	7.05	15.64	2.00240	2.00840	2.00640	3.38
mast3liy(H)	32.88	7.02	15.64	2.00215	2.00850	2.00638	2.88
mast4liy(S)	izotropik	izotropik	15.64	izotropik	izotropik	2.00630	2.38
mast5liy(S)	33.15	6.72	15.53	2.00183	2.00864	2.00637	2.88
mast6liy(H)	32.88	7.02	15.64	2.00271	2.00822	2.00638	2.34
mast7liy(S)	34.09	6.42	15.64	2.00204	2.00857	2.00639	1.74
mast8liy(S)	izotropik	izotropik	15.64	izotropik	izotropik	2.00631	1.77
mast10liy(H)	izotropik	izotropik	15.86	izotropik	izotropik	2.00636	2.22
mast11liy(H)	33.48	7.05	15.86	2.00228	2.00830	2.00629	2.81
mast12liy(H)	izotropik	izotropik	15.69	izotropik	izotropik	2.00623	2.31
mast16liy(H)	32.71	6.94	15.53	2.00254	2.00829	2.00637	2.91
mast17liy(H)	izotropik	izotropik	15.58	izotropik	izotropik	2.00627	1.97

Çizelge 4.14. T= 203K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_0 (G)
mast1liy(S)	32.33	7.46	15.75	2.00186	2.00872	2.00643	3.10
mast2liy(H)	31.25	7.84	15.64	2.00254	2.00834	2.00640	3.10
mast3liy(H)	izotropik	izotropik	15.64	izotropik	izotropik	2.00638	2.24
mast4liy(S)	izotropik	izotropik	15.64	izotropik	izotropik	2.00630	2.12
mast5liy(S)	31.02	7.79	15.53	2.00213	2.00849	2.00637	2.99
mast6liy(H)	30.74	8.09	15.64	2.00228	2.00843	2.00638	2.27
mast7liy(S)	30.78	8.07	15.64	2.00296	2.00811	2.00639	1.66
mast8liy(S)	izotropik	izotropik	15.64	izotropik	izotropik	2.00631	1.63
mast10liy(H)	izotropik	izotropik	15.86	izotropik	izotropik	2.00636	2.16
mast11liy(H)	30.03	8.78	15.86	2.0029	2.00799	2.00629	2.80
mast12liy(H)	izotropik	izotropik	15.69	izotropik	izotropik	2.00623	2.26
mast16liy(H)	30.31	8.14	15.53	2.00259	2.00826	2.00637	2.76
mast17liy(H)	izotropik	izotropik	15.58	izotropik	izotropik	2.00627	1.60

Çizelge 4.15. T= 213K de liyofilize edilmiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$ (G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_0 (G)
mast1(S)	33.15	7.05	15.75	1.99998	2.00970	2.00643	2.97
mast2(H)	31.06	7.93	15.64	2.00144	2.00888	2.00640	2.67
mast3(H)	izotropik	izotropik	15.64	izotropik	izotropik	2.00638	2.21
mast4(S)	izotropik	izotropik	15.64	izotropik	izotropik	2.00630	1.98
mast5(S)	izotropik	izotropik	15.53	2.00215	2.00848	2.00637	2.65
mast6(H)	31.89	7.52	15.64	2.00674	2.00620	2.00638	2.16
mast7(S)	izotropik	izotropik	15.64	izotropik	izotropik	2.00639	1.46
mast8(S)	izotropik	izotropik	15.64	izotropik	izotropik	2.00631	1.58
mast10(H)	izotropik	izotropik	15.86	izotropik	izotropik	2.00636	2.03
mast11(H)	izotropik	izotropik	15.86	2.00310	2.00789	2.00629	2.60
mast12(H)	izotropik	izotropik	15.69	izotropik	izotropik	2.00623	2.12
mast16(H)	izotropik	izotropik	15.53	izotropik	izotropik	2.00637	2.67
mast17(H)	izotropik	izotropik	15.58	izotropik	izotropik	2.00627	1.56

Çizelge 4.16. T=133K de liyofilize edilmemiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$(G)	$A_{\perp}$(G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_o(G)
mast1(S)	34.49	6.31	15.70	2.00260	2.00842	2.00648	4.70
mast2(H)	34.59	6.24	15.69	2.00242	2.00845	2.00644	4.87
mast3(H)	34.30	6.40	15.70	2.00243	2.00837	2.00639	4.84
mast4(S)	34.30	6.39	15.69	2.00250	2.00835	2.00640	4.84
mast5(S)	34.07	6.51	15.70	2.00248	2.00836	2.00640	4.86
mast6(H)	34.35	6.61	15.86	2.00233	2.00845	2.00641	4.82
mast7(S)	34.21	6.46	15.71	2.00260	2.00830	2.00640	3.88
mast8(S)	34.40	6.43	15.75	2.00249	2.00830	2.00636	4.68
mast9(H)	34.59	6.33	15.75	2.00275	2.00824	2.00641	4.78
mast10(H)	34.02	6.62	15.75	2.00243	2.00830	2.00634	4.19
mast11(H)	34.59	6.40	15.80	2.00249	2.00833	2.00638	4.39
mast12(H)	34.82	6.38	15.86	2.00219	2.00845	2.00636	4.24
mast16(H)	34.76	6.41	15.86	2.00247	2.00829	2.00635	4.18
mast17(H)	34.21	6.52	15.75	2.00252	2.00828	2.00636	4.41
mast18(H)	34.31	6.30	15.64	2.00265	2.00829	2.00641	4.28
mast21(S)	34.16	6.56	15.75	2.00245	2.00836	2.00639	4.07
mast22(S)	34.26	6.50	15.75	2.00230	2.00845	2.00640	4.01

Çizelge 4.17. T= 143K de liyofilize edilmemiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$(G)	$A_{\perp}$(G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_o(G)
mast1(S)	33.88	6.61	15.700	2.00248	2.00848	2.00648	4.69
mast2(H)	33.84	6.62	15.69	2.00268	2.00832	2.00644	4.79
mast3(H)	34.07	6.51	15.70	2.00257	2.00830	2.00639	4.63
mast4(S)	34.02	6.52	15.69	2.00245	2.00838	2.00640	4.67
mast5(S)	33.88	6.61	15.70	2.00244	2.00838	2.00640	4.68
mast6(H)	34.03	6.77	15.86	2.00232	2.00846	2.00641	4.63
mast7(S)	34.03	6.55	15.71	2.00275	2.00823	2.00640	3.53
mast8(S)	33.79	6.73	15.75	2.00240	2.00834	2.00636	4.53
mast9(H)	34.02	6.61	15.75	2.00240	2.00842	2.00641	4.57
mast10(H)	33.88	6.69	15.75	2.00263	2.00820	2.00634	3.87
mast11(H)	33.93	6.74	15.80	2.00231	2.00842	2.00638	3.99
mast12(H)	34.07	6.75	15.86	2.00254	2.00827	2.00636	4.02
mast16(H)	34.12	6.73	15.86	2.00214	2.00846	2.00635	3.91
mast17(H)	34.12	6.56	15.75	2.00234	2.00837	2.00636	4.07
mast18(H)	34.17	6.38	15.64	2.00233	2.00845	2.00641	4.11
mast21(S)	34.09	6.58	15.75	2.00225	2.00846	2.00639	3.76
mast22(S)	33.93	6.66	15.75	2.00253	2.00834	2.00640	3.96

Çizelge 4.18. T= 153K de liyofilize edilmemiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$(G)	$A_{\perp}$(G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_o(G)
mast1(S)	33.65	6.73	15.7	2.00235	2.00856	2.00648	3.68
mast2(H)	33.60	6.74	15.69	2.00269	2.00832	2.00644	4.54
mast3(H)	33.41	6.84	15.70	2.00231	2.00843	2.00639	4.02
mast4(S)	33.51	6.78	15.69	2.00244	2.00838	2.00640	3.94
mast5(S)	33.93	6.59	15.70	2.00235	2.00843	2.00640	3.67
mast6(H)	34.12	6.73	15.86	2.00248	2.00838	2.00641	3.92
mast7(S)	34.17	6.48	15.71	2.00217	2.00852	2.00640	2.64
mast8(S)	33.96	6.80	15.75	2.00240	2.00834	2.00636	3.51
mast9(H)	33.51	6.87	15.75	2.00246	2.00839	2.00641	4.16
mast10(H)	33.55	6.85	15.75	2.00274	2.00814	2.00634	3.17
mast11(H)	33.70	6.85	15.80	2.00225	2.00845	2.00638	3.18
mast12(H)	34.03	6.77	15.86	2.00241	2.00834	2.00636	3.49
mast16(H)	33.23	7.17	15.86	2.00257	2.00824	2.00635	3.25
mast17(H)	33.74	6.75	15.75	2.00246	2.00831	2.00636	3.46
mast18(H)	33.74	6.59	15.64	2.00261	2.00831	2.00641	3.91
mast21(S)	33.98	6.63	15.75	2.00245	2.00836	2.00639	3.36
mast22(S)	33.74	6.76	15.75	2.00233	2.00844	2.00640	3.14

Çizelge 4.19. T= 163K de liyofilize edilmemiş süt örneklerinin ESR parametreleri

	$A_{//}$ (G)	$A_{\perp}$(G)	a_o (G)	$g_{//}$	$g_{\perp}$	g_o	ΔH_o(G)
mast1(S)	33.65	6.73	15.70	2.00241	2.00852	2.00648	2.99
mast2(H)	33.65	6.24	15.69	2.00255	2.00839	2.00644	3.25
mast3(H)	34.03	6.54	15.70	2.00231	2.00843	2.00639	2.89
mast4(S)	33.79	6.64	15.69	2.00229	2.00846	2.00640	2.69
mast5(S)	34.03	6.54	15.70	2.00256	2.00832	2.00640	2.57
mast6(H)	33.70	6.94	15.86	2.00258	2.00833	2.00641	2.91
mast7(S)	34.78	6.18	15.71	2.00242	2.00839	2.00640	2.51
mast8(S)	33.88	6.68	15.75	2.00206	2.00851	2.00636	1.83
mast9(H)	34.07	6.59	15.75	2.00234	2.00844	2.00641	2.26
mast10(H)	33.79	6.73	15.75	2.00247	2.00827	2.00634	2.95
mast11(H)	33.98	6.71	15.80	2.00241	2.00836	2.00638	2.55
mast12(H)	34.31	6.64	15.86	2.00254	2.00827	2.00636	2.49
mast16(H)	33.51	7.04	15.86	2.00258	2.00823	2.00635	2.27
mast17(H)	33.79	6.73	15.75	2.00272	2.00818	2.00636	2.45
mast18(H)	34.07	6.43	15.64	2.00250	2.00817	2.00641	2.71
mast21(S)	33.79	6.73	15.75	2.00252	2.00834	2.00639	2.53
mast22(S)	34.17	6.54	15.75	2.00216	2.00852	2.00640	2.14

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	:	Leyla PALALI
Uyruğu	:	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	:	KONYA-1985
Telefon	:	0544 8994409
Faks	:	-
e-mail	:	leylapalali@gmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Konya Lisesi (Yb. Dil Ağ. Böl) Meram-KONYA	2003
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi, KONYA	2009

UZMANLIK ALANI

ESR Spin Etiketleme Tekniği

YABANCI DİLLER

İngilizce