

Biyoaktif Giemsa Boyama Ajanı İle Suda Çözünen Sülfonat Kaliksaren Moleküllerinin Etkileşiminin Spektrofotometrik Olarak İncelenmesi

Mevlüt BAYRAKCI^{1*}

Bahar YILMAZ¹

ÖZET: Bu çalışmada, Giemsa floresan boyasının suda çözünür sülfonat kaliksaren türevleri ile etkileşimleri spektrofotometrik yöntemlerle incelenmiştir. Bu araştırmanın amacı sülfonat kaliks[n]arenler ve Giemsa arasındaki olası moleküller arası etkileşimi değerlendirmektir. Spektrofotometrik veriler, bu etkileşimin absorpsiyon ve emisyon ölçümlerindeki değişimlere bağlı olarak kaliks[n]arenler ve Giemsa arasında muhtemel bir bağlanma meydana geldiğini göstermiştir. Sülfonat kaliks[n]arenler ve Giemsa arasındaki moleküler etkileşim, Giemsa'nın, lökosit, eritrosit, nükleus ve sitoplazma morfolojisi gibi biyolojik boyama uygulamaları sırasında kullanılmasına ilişkin bazı durumlara yön verebilir.

Anahtar Kelimeler: Giemsa, moleküler etkileşim, kaliksaren, floresans boya, spektrofotometre

The Spectrophotometric Investigation of Interaction of Water-Soluble Calixarene with Coloring Agent Bioactive Giemsa Dye

ABSTRACT: In this study, the interactions of Giemsa fluorescent dye with water-soluble sulfonate calixarene derivatives were investigated by spectrophotometry methods. The purpose of this research is to evaluate the possible interaction between sulfonate calix[n]arenes and Giemsa. The spectrophotometric data showed that this interaction was due to possible binding between calix[n]arenes and Giemsa, depending on the changes in absorption and emission measurements. Molecular interaction between sulfonate calix[n]arenes and Giemsa could give direction to some status related to the using of Giemsa during biological staining applications as leucocytes, erythrocytes, nucleus and cytoplasm morphology.

Keywords: Giemsa, molecular interaction, calix[n]arene, fluorescence dye, spectrophotometry

¹ Mevlüt BAYRAKCI (Orcid ID: 0000-0002-0416-2870), Bahar YILMAZ (Orcid ID: 0000-0002-0416-2870), Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Karaman, Türkiye

* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mevlüt BAYRAKCI, e-mail: mevlutbayrakci@gmail.com

GİRİŞ

Kan ve kemik iliği yaymalarının klasik boyası olan Giemsa, alkol-bazlı bir boyadır ve vücut sıvılarından ya da dokulardan hazırlanan yaymalarda en başarılı boyalardan biridir. Özellikle lökositlerin, eritrositlerin, trombosit ve parazitlerin nükleus ve sitoplazma morfolojilerini ayırt etmek için kullanılır (Rowley, 1973; Hayashi ve ark., 1990). Ayrıca, yine parazitolojide diğer kan protozoonlarının (özellikle hemoflajellatların), mikroflaryaların tanısında, bazı örneklerde inklüzyon cisimciklerinin aranmasında da yararlanılır. Diğer bazı bakteriyel, viral, fungal ajanların doku invazyonlarında gelişen patolojilerin incelenmesi dahil klinik mikrobiyolojide pek çok durumda Giemsa boyası önemli bir tanı aracıdır (Perry ve Wolff, 1974). Giemsa boyasının canlı üzerinde veya ortamda istenilen bölgeyi boyaması için bazı moleküller ile kompleks oluşturup kullanılmalıdır ve zamanla molekülden salınıp boyama işlemi yapması değerlendirilmelidir.

Supramoleküller kompleks oluşumu, farklı özelliklere sahip olan iki veya daha fazla molekül, iyon veya koordinasyon bileşiklerinin molekül içi etkileşimler ile birleşmesi sonucu oluşmaktadır. Bu etkileşimlerin çoğu konakçı ve konuk tipinde olmaktadır ve konakçı moleküller kriptandlar, taç eterler, kaliksarenler, siklofanlar ve siklodekstrinler (SD) gibi kafes yapısında olan bileşiklerdir. Bu konakçı moleküller arasında en kullanışlı moleküller kaliksarenlerdir. Çünkü bu bileşikler diğer makrosiklik bileşiklerden daha kolay sentezlenip fonksiyonlandırılabilirler (Akceylan, 2011). Ayrıca kaliksarenler supramoleküler kimyada, makrosiklik bileşikler içerisinde son zamanlarda en popüler bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Bu bileşikler, supramoleküler kimyada, organik bileşikleri hidrofobik boşluklarına kapsülleme kabiliyetlerinden dolayı bir konakçı molekül

olarak yaygın şekilde kullanılmıştır (Bayrakçı ve ark 2012). Kaliksaren iskeletine bağlı olarak, bu moleküller nötr veya yüklü konaklar için “moleküler sepetler” olarak işlev görebilirler (Bayrakçı ve ark., 2011). Kaliksaren molekülleri, genel organik çözücüler içinde daha fazla çözünebilir bileşiklerdir, fakat en önemlisi hidrofilik birimler içeren yapıların suda çözünür olmasıdır. Örneğin, sülfonat kaliksaren türevleri, özellikle biyolojik uygulamalarda daha iyi suda çözünürlük özelliklerine sahip olmaları nedeniyle, küçük yüklü konuk moleküllerini boşluklarında kapsülleyen daha uygun konakçı moleküllerdir (Fei ve ark., 2013).

Bu çalışmanın amacı; kolay sentezlenebilen, çözünürlük ve inklüzyon kompleks yeteneği gibi çeşitli avantajlara sahip suda çözünür sülfonat kaliks[n]aren (n: 4, 6 veya 8) moleküllerinin floresan özellik taşıyan Giemsa boyası ile etkileşimini araştırmak ve incelemektir. Etkileşim kompleksleri için kaliks[n]aren molekülleri ile Giemsa floresan söndürme ve emisyon verileri elde edilmiştir (Lakowicz, 2006; Agudelo ve ark., 2012). Ayrıca, elde edilen etkileşim ile biyolojik boya çalışmalarında Giemsa kullanımı ve yönlendirilebilirliği ortaya konulabilir.

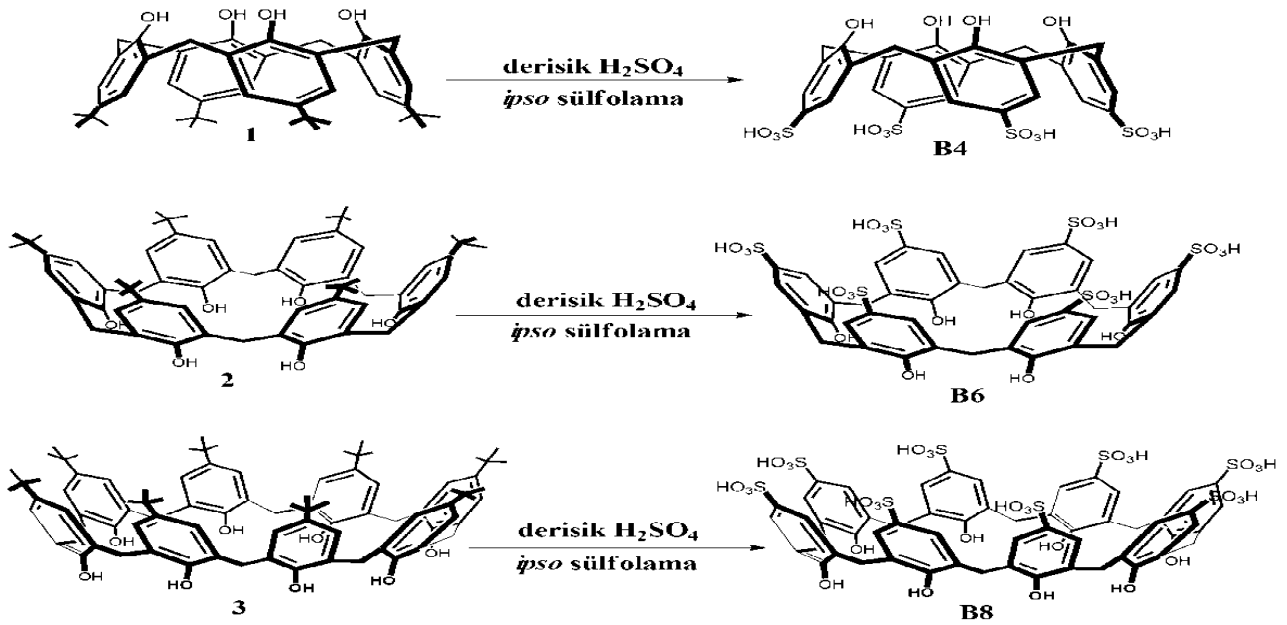
MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma temel olarak iki aşamada gerçekleştirilmiş olup bunlar bileşiklerin sentezi ve spektroskopik uygulamalarıdır. Bu bilgiye bağlı olarak yapılan çalışmada; başlangıç materyalleri *para-t*-butilkaliks[n]arenler (n: 4, 6 veya 8) (bileşik 1, 2 ve 3), Gutsche tarafından tarif edilen prosedür izlenerek hazırlanmıştır (Gutsche ve Lin, 1986). Sentezlenen bileşiklerin Giemsa ile etkileşim çalışmalarında; spektrofotometrik ölçümler için Shimadzu UV 1800, florometrik ölçümler için Hitachi F-7100 kullanılmıştır.

Sülfonato Kaliks[n]aren Sentezi (B4, B6 ve B8)

Başlangıç malzemeleri *para-t*-butilkaliks[n]arenler hazırlandıktan sonra, suda çözünür sülfonat kaliks[n]arenler (B4, B6 ve B8) hazırlanmış, literatür prosedürlerinin modifiye edilip ipso sülfonasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 1). Kısaca, 3 mmol'e karşılık gelen *para-t*-butilkaliks[n]arenleri (n: 4, 6 veya 8), 10 mL konsantre sülfürik asit ile

karıştırılmış ve daha sonra çözelti, 24 saat 60 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Reaksiyonun tamamlanmasından sonra, çözelti içerisindeki fazla miktardaki sülfürik asidi çıkarmak için dietil eter ile karıştırılmış ve elde edilen ürün çöktürülmüştür. B4, B6 ve B8 kaliksaren yapılarının arındırılması için elde edilen analitik verilerin, daha önce yayımlanmış sonuçlarla benzer olduğu görülmüştür (Shinkai ve ark., 1987).



Şekil 1. Suda çözünür sülfonat kaliks[n]arenler (n: 4, 6 veya 8) a) B4, b) B6 ve c) B8

Spektrofotometrik Çalışmalar

Giemsa boyasının (G) %3'lük çalışma çözeltisi metil alkol: aseton (1:1) içinde çözünerek hazırlanmıştır. B4, B6 ve B8 çözeltileri ise 0.5 M olacak şekilde suda çözüldürülerek hazırlanmıştır. Stok çözeltisi hazırlanan kaliksaren molekülleri farklı konsantrasyonlarda (100-1000 µM) içinde %3'lük G bulunan quarz küvetlere eklenerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen karışım daha sonra, UV-Vis spektrofotometrede 200-600 nm aralığında kaliksaren türevlerinin varlığında

ve yokluğunda G'nin absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir. Aynı zamanda hem uyarım hem de emisyon için 565 nm'de floresan yoğunluğu, 480 nm dalga boyunda uyarım altında belirlenmiştir.

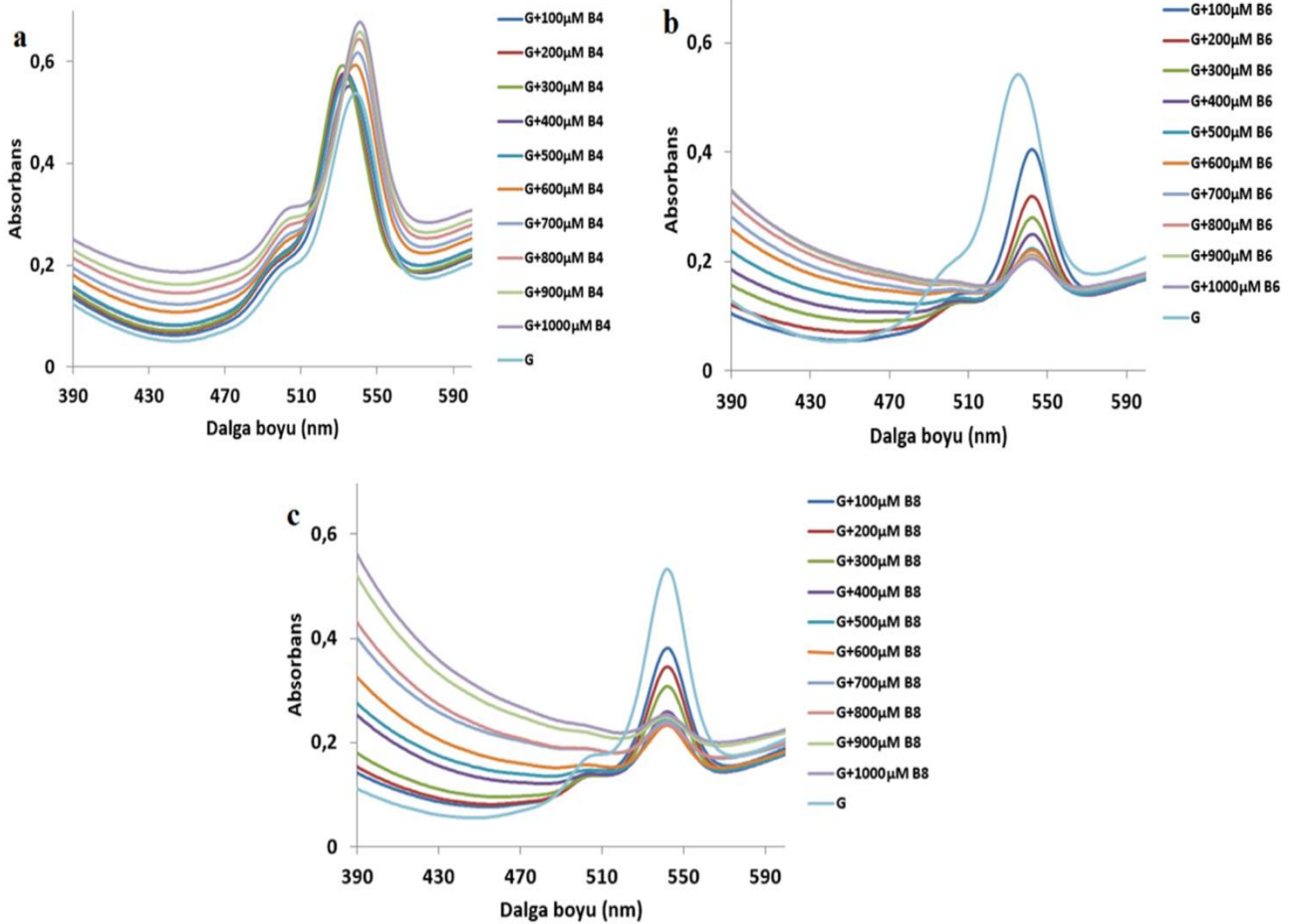
BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapmış olduğumuz çalışmada son ürün olarak üç adet suda çözünür bileşik elde edilmiştir (B4, B6 ve B8). Çalışmanın ikinci aşamasında ise sentezlenen bileşiklerin floresan özellik taşıyan G ile etkileşimleri araştırılmıştır.

Bununla beraber sentezlenen suda çözünür bileşik türlerinden hangisinin G ile daha fazla etkileşim içinde olduğu tespit edilmiş, spektroskopik değişimlere bağlı olarak G'nin biyolojik boya çalışmaları için kontrollü kullanımı araştırılmıştır.

Şekil 2'de gözlemlenen B4, B6 ve B8 için gerçekleştirilen absorpsiyon çalışmasında; etanol/su karışımında, G çözeltisi ile farklı konsantrasyonlarda B4, B6 ve B8 çözeltileri (100-1000 μM) hazırlanmış ve bu çözeltilere absorpsiyon, uygulamaları kaydedilmiştir. B4'ün

absorpsiyon spektrumu temel olarak iki farklı geçiş ortaya koymuş (515 ve 535 nm), bu noktalarda hipsokromik ve hiperkromik kaymalar gözlemlenmiştir (Şekil 2a). B6 ve B8 eklendiğinde ise yaklaşık 510 nm civarında tek geçiş meydana gelmiştir. B6 bileşiğinde hipokromik kayma meydana gelmişken (Şekil 2b), B8 bileşiği ile G etkileşiminde de hipokromik oluşumlar takip edilmiştir (Şekil 2c). Burada gözlemlenen geçişler farklı aromatik gruplar arasında $\pi-\pi^*$ gibi etkileşim geçişlerine işaret etmektedir (Bayrakçı ve Yılmaz, 2018).



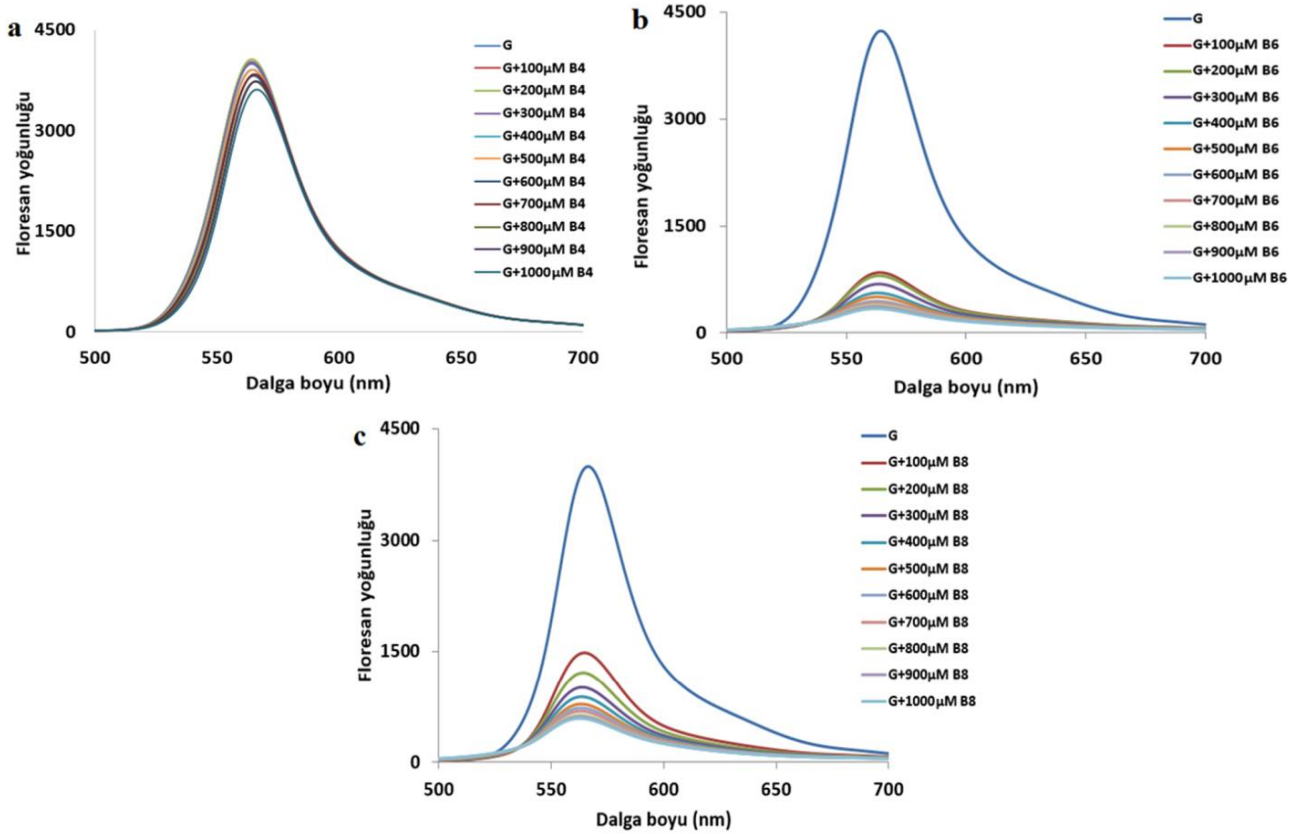
Şekil 2. Farklı konsantrasyonlardaki; a) B4, b) B6 ve c) B8 bileşikleri (100-1000 μM) varlığında G'nin absorpsiyon spektrumları

Absorpsiyon spektrumlarındaki değişimleri destekleyebilmek amacıyla aynı karışımların emisyon spektrumları da alınmıştır.

(Şekil 3) Absorpsiyon ölçümlerinin paralelinde B4 ile G arasındaki etkileşimde G'nin floresan yoğunluğunda önemli bir değişim

gözlenmemiştir (Şekil 3a). B6 ve B8 varlığında ise G boyasının 565 nm'de gösterdiği floresan yoğunluğunda belirgin bir azalma meydana

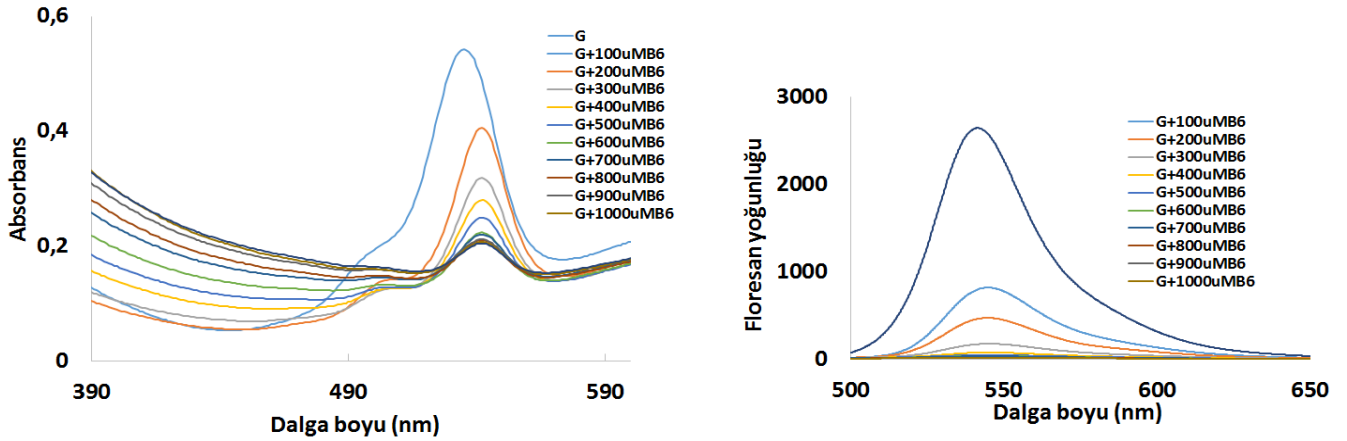
gelmiştir (Şekil 3b, 3c). Bu etkileşim sayesinde floresan özellik taşıyan G boyasının hangi bileşiğe karşı daha seçici olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3. Farklı konsantrasyonlardaki; a) B4, b) B6 ve c) B8 bileşikleri (100-1000 μM) varlığında G'nin emisyon spektrumları

Yine bu çalışmada G ile en iyi etkileşimi veren B6 molekülünün emisyon ve absorpsiyon çalışmaları, G molekülünün asidik ortamdaki davranışları dikkate alınarak fosfat tamponunda (pH 7.02) gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneylerde Şekil 4'de görüleceği üzere Şekil 2 ve 3'deki gibi B6 molekülü için benzer sönümlenme sonuçları gözlemlenmiştir. Bu sonuçlardan G molekülü ile kaliksaren molekülü B6'nın etkileşimi net olarak ortaya koymuştur. Çünkü tamponsuz çalışmalarda ortamın pH değeri çalışılan kaliksaren moleküllerinin sahip

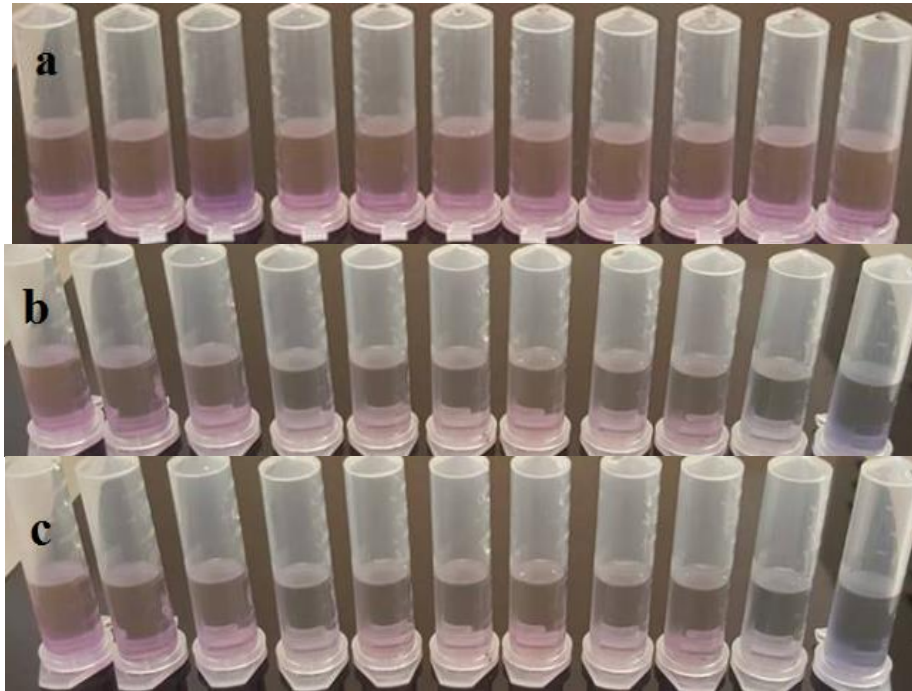
olduğu sülfonik asit gruplarından dolayı düşebilmektedir. G molekülü literatürde daha çok pH 6.8 ile 7.2 değerleri arasında boyama çalışmalarında tercih edilmekte olup düşük pH aralıklarında ise G molekülünün bu yeteneği ortadan kaybolmaktadır. Ancak tampon ortamında ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) yapılan emisyon deneylerinden artan kaliksaren B6 varlığında kademeli olarak G'nin emisyon yoğunluğunun azaldığı net olarak görülmektedir. Buda B6 ile G molekülü arasındaki etkileşimi net olarak göstermektedir.



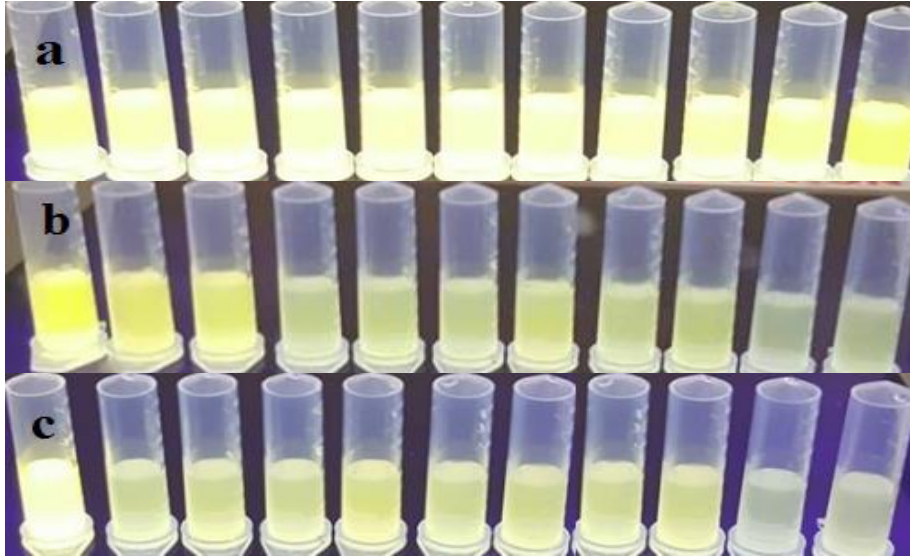
Şekil 4. Fosfat tamponunda (pH 7.02) farklı konsantrasyonlardaki B6 (100-1000 μM) varlığında G'nin absorpsiyon ve emisyon spektrumları.

Çalışmada incelenen etkileşim için yapılması gereken bir diğer işlem ise farklı konsantrasyonlardaki (100 μM , 200 μM , 300 μM , 400 μM , 500 μM , 600 μM , 700 μM , 800 μM , 900 μM ve 1000 μM) B4, B6 ve B8 bileşikleriyle G karışımının gün ışığı ve UV-

lambda altında alınan görüntülerini incelemektir. Bu görüntüler, kaliksaren türevlerinin boya bağlama ve sensör çalışmalarında kullanılabileceğini net olarak ortaya koymuştur. (Şekil 5 ve Şekil 6)



Şekil 5. G'nin a) B4, b) B6 ve c) B8 ile gün ışığında görünümü



Şekil 6. G'nin a) B4, b) B6 ve c) B8 ile UV lamba altında görünümü

SONUÇ

Bu çalışmada kompleks oluşturabilme, etkileşim yapabilme gibi birçok özelliğe sahip kaliksaren türevleri farklı sentez metotları kullanılarak hazırlanmış ve bu moleküllerin Giemsa gibi biyolojik floresan boya ile etkileşim özellikleri spektroskopik metotlarla araştırılmıştır. Bu kapsamda ilk olarak kaliksaren molekülleri sentezlenmiş ve suda çözünür türevleri elde edilmiştir. Bu bağlamda son ürün olarak 3 adet bileşik sentezlenmiş ve bunlar B4, B6 ve B8 olarak isimlendirilmiştir. Bu bileşiklerin floresan Giemsa boyası ile etkileşerek Giemsa'nın sönümlenmesine neden olması sensör çalışmalarına ışık tutabilir, aynı zamanda bu bileşikler boya bağlama çalışmalarında da kullanılabilirler. Öyle ki absorpsiyon ve emisyon bandlarındaki kayma ve genişlemeler, UV ışık altındaki sönümlenmeler bu etkileşimleri kanıtlamaktadır. Elde edilen tüm veriler dahilinde B6 ve B8 bileşikleri Giemsa gibi floresan boyalar için sensör olarak kullanılabilirliğinin yanında biyolojik boya çalışmalarında boya bağlayıcı olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Gutsche 1985 yılında bakteriler üzerinde yaptığı ames testi ile kaliksarenlerin toksik aktivite

göstermediğini belirlemiştir (Ozyılmaz, 2016). Yapılan bu çalışma ile, kaliksaren türevleri ve biyolojik boyalar arasındaki etkileşimin in vivo ortamlarda da kontrollü biyolojik boya çalışmalarına ışık tutacağı ön görülmektedir. Bu çalışma ile; boyalar ve makromoleküller arasındaki olası etkileşimlerin daha iyi anlaşılmasının, mümkün olan yöntemlerden daha kesin ve özel olarak belirli doku bileşenleriyle reaksiyona girebilen biyolojik boyalar ve boyama yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayacağı tahmin edilmektedir.

KAYNAKÇA

- Agudelo D, Beauregard M, Bérubé G, Tajmir-Riahi HA, 2012. Antibiotic doxorubicin and its derivative bind milk β -lactoglobulin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117: 185-192.
- Akceylan E, Yılmaz, M, 2011. Synthesis of water-soluble calixarenes catalyzed one-pot Mannich-Type reaction in aqueous media. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 36: 801-816.

- Bayrakçı M, Ertul S, Yılmaz M, 2012. Synthesis of new water-soluble phosphonate calixazacrowns and their use as drug solubilizing agents. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 74: 293–303.
- Bayrakçı M, Ertul S, Yılmaz M, 2011. Transportation of poorly soluble drugmolecules from the organic phase to the aqueous phase by using phosphorylatedcalixarenes. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 56: 4473–4479.
- Bayrakçı M, Yılmaz B, 2018. Intermolecular interactions and binding mechanism of inclusion complexation between sulfonate calix[n]arenes and ethidium bromide. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 90: 341-349.
- Ozyılmaz E, Bayrakci M, Yılmaz M, 2016. Improvement of catalytic activity of *Candida rugosa* lipase in the presence of calix[4]arene bearing iminodicarboxylic/phosphonic acid complexes modified iron oxide nanoparticles. *Bioorganic Chemistry*, 65: 1-8.
- Fei X, Zhang Y, Zhu S, Liu L, Yu L, 2013. Spectral study and protein labeling of inclusion complex between dye and calixarene sulfonate. *Applied Spectroscopy*, 67: 520–525.
- Gutsche CD, Lin LG, 1986. Calixarene 12: the synthesis of functionalized calixarene. *Tetrahedron*, 42: 1633-1640.
- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate JM, 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research Letters*, 245: 245-249.
- Lakowicz JR, 2006. Plasmonics in biology and plasmon-controlled fluorescence. *Plasmonics*, 1: 5-33.
- Perry P, Wolff S, 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251: 156-158.
- Rowley JD, 1973. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243: 290-293.
- Shinkai S, Araki K, Tsubaki T, Arimura T, Manabe O, 1987. New syntheses of calixarene-p-sulphonates and p-nitrocalixarenes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*: 2297-2299.