

Cholesteryl Octanoate Tek Kristalinde Işınlama ile Oluşan Radikalin ESR Tekniği Kullanılarak Belirlenmesi

Ülkü SAYIN^{1,2*}, Sami BÜYÜKÇELEBİ², Ayhan ÖZMEN^{1,2}

¹Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, Konya, Türkiye

²Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Konya, Türkiye

(Geliş / Received : 11.01.2016 ; Kabul / Accepted : 30.03.2016)

ÖZ

Bu çalışmada tıbbi öneme sahip Cholesteryl octanoate ($C_{35}H_{60}O_2$) kolesterol esterinde gama ışınlamasının oluşturduğu radikaller ESR tekniği ile tespit edildi. Etanol çözeltisinde kristallendirilen örnekler $^{60}Co-\gamma$ kaynağı ile ışınladı ve ışınlama öncesi diyamanyetik özellik taşıyan moleküllerin ışınlama sonrası paramanyetik hale geldiği belirlendi. ESR spektrumları Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan JEOL JESFA-300 X-band ESR spektrometresi ile tek kristalin birbirine dik üç ekseninde 10° aralıklarla, farklı mikrodalga güçlerinde ve farklı sıcaklıklarda kaydedildi. Cholesteryl octanoate molekülünün kimyasal yapısı ve ESR spektrumları göz önüne alınarak radyasyonun örneklerin yapısında kararlı ve uzun ömürlü $R-\dot{C}H_{30}CH_6CH_{27}$ radikali oluşturduğu tespit edildi. Manyetik alan içinde yönelime bağlı anizotropik özellik taşıyan radikalin spektroskopik yarıma çarpanı değerleri ve aşırı ince yapı sabitleri elde edildi. Ayrıca tespit edilen radikal için ESR simülasyonu yapıldı ve deneysel spektrumlarla uyum gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Elektron Spin Rezonans (ESR), Kolesterol, Cholesteryl octanoate, paramanyetik merkez, Gama ışınlaması

Determination of Radicals Produced by Irradiation in Cholesteryl Octanoate Single Crystals Using ESR Technique

ABSTRACT

In this study, the radicals produced by gamma irradiation was determined using ESR technique in cholesteryl octanoate ($C_{35}H_{60}O_2$), a cholesterol ester, which has medical importance. The samples that crystallized in ethanol solution were irradiated with $^{60}Co-\gamma$ source. The molecules that have diamagnetic property become paramagnetic after irradiation. ESR spectra were recorded in different microwave powers and different temperatures at 10° intervals in the magnetic field applied along each of the perpendicular axes using JEOL JESFA-300 X-band ESR spectrometer located in Selçuk University Advanced Technology Research and Application Center. By considering the chemical structure and ESR spectra of Cholesteryl octanoate molecule, it was identified that radiation produced stable and long lived radical, $R-\dot{C}H_{30}CH_6CH_{27}$, in the sample. The hyperfine splitting and spectroscopic splitting values which have anisotropic property due the location of crystal in the magnetic field were obtained. In addition, simulations were made for identified radical and a good agreement was found with the experimental spectra.

Keywords: Electron Spin Resonance (ESR), Cholesterol, Cholesteryl octanoate, paramagnetic center, Gamma Irradiation

GİRİŞ (INTRODUCTION)

Serbest radikaller; kanser, diyabetik hastalıklar, akciğer ve karaciğer bozuklukları, kas hastalıkları, göz hastalıkları, yaşlanma, bağ ve doku hastalıkları, hematolojik bozukluklar, hipertansiyon, infektif hastalıklar gibi ciddi hastalıkların nedenidir. Serbest radikallerin insan hayatındaki önemi, bu radikallerin tespit edilmesini, manyetik özelliklerinin ve oluşturdukları etkilerin araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir. Temelinde manyetik rezonans kavramı yatan Elektron Spin Rezonans (ESR) tekniği çiftlenimsiz elektronların manyetik alan içindeki yönelimini ve

mikrodalga enerji bölgesindeki geçişlerini inceleyen ve radikal tespitinde kullanılan tek yöntemdir[1].

Kolesterol hücre zarlarının inşası ve bakımı için tüm vücutta yaygın olarak bulunan yaşam için gerekli yağmı bir maddedir. Kolesterol ve kolesterol esterlerinin özellikleri bu moleküllerin biyolojik mekanizmalardaki işlevi nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmiştir [2-5]. Biyolojik açıdan önemli olan bu maddelerin manyetik özelliklerinin tespit edilmesi amacıyla yapılan ESR çalışmalarında radyasyonun kolesterol esterlerinde kararlı sigma radikalleri oluşturduğu tespit edilmiştir [6-10].

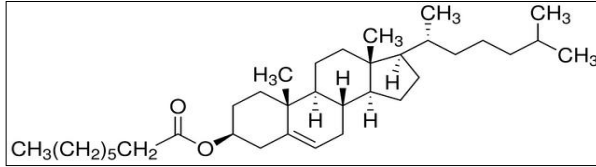
Bu çalışmada tıbbi öneme sahip cholesteryl octanoate tek kristallerinde radyasyonun oluşturduğu radikaller

* Sorumlu Yazar (Corresponding Author)

e-posta: uakpinar@selcuk.edu.tr

Digital Object Identifier (DOI) : 10.2339/2016.19.3 343-348

ESR tekniği ile tespit edildi ve özellikleri belirlendi. Şekil 1’de moleküler yapısı verilen cholesteryl octanoate kolesterol esterini tıpta katı gıdaların mideden ince bağırsak içine hangi hızda geçtiğini belirlemek için kullanılmaktadır. ¹³C-Oktanoik Asit Nefes Testi olarak bilinen bu test genellikle şeker hastalığı ile ilişkili bir durum olan katı gıdaların gecikmiş gastrik boşaltılmalarını teşhis eder ve daha fazla invaziv olan radyoaktif prosedüre iyi bir alternatiftir [11-13].



Şekil 1. Cholesteryl octanoate moleküler yapısı (The molecular structure of cholesteryl octanoate)

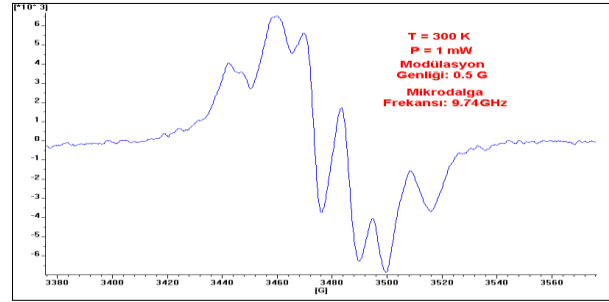
DENEYSSEL (EXPERIMENTAL)

Toz halde Sigma-Aldrich’den satın alınan ve etanol çözeltisinde yavaş buharlaşmayla 1 haftada kristallenen cholesteryl octanoate örneğinin tek kristalleri, renksiz ve dikdörtgenler prizması biçiminde oluşmuştur. Elde edilen kristaller Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK) Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi-(SANAEM)’de bulunan doz hızı 0,99 kGray/saat olan Cell Px-γ-30 “ISSLODOVATEL” kaynağıyla oda sıcaklığında toplam 110 kGy doz olacak şekilde ışınıldı. Işınlama sonrası kristallerin rengi değişmedi.

ESR spektrumları Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK) ESR Laboratuvarında bulunan Bruker EMX-081 model X-band ESR spektrometresi ile farklı sıcaklıklarda ve farklı mikrodalga güçlerinde tek kristalin birbirine dik üç ekseninde 10° açı aralıkları kaydedildi. Paramanyetik merkezin tayini için 120 K sıcaklığında kaydedilen spektrumlar esas alındı. Eksen çalışmalarında kullanılan spektrometre parametreleri 1 mW mikrodalga gücü, 9.41 GHz mikrodalga frekansı, 100 kHz modülasyon frekansı, 3354 G merkez alanı, 156 G tarama alanı ve 2 G modülasyon genliği şeklindedir. Spektrumlardaki ESR piklerinin manyetik alan içindeki yönelimleri EPRES (*EPR Resolution Program*) programı ile belirlendi [14].

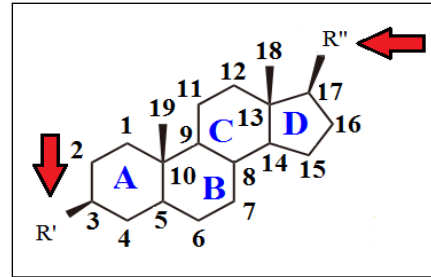
SONUÇLAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

Kimyasal yapısı Şekil 1’ de verilen cholesteryl octanoate (C₃₅H₆₀O₂) kolesterol esterinin moleküler ağırlığı 512.86 g/mol ve erime noktası 110 °C değerindedir. Işınlamadan önce diyamanyetik özellik taşıyan cholesteryl octanoate toz örneğinde ışınlama sonrası paramanyetik merkezler oluştuğu tespit edildi. Şekil 2’ de 1 mW mikrodalga gücü ve oda sıcaklığında kaydedilen toz ESR spektrumu gösterildi.



Şekil 2. Cholesteryl octanoate toz örneğinin ESR spektrumu (ESR spectrum of cholesteryl octanoate powder sample)

Kolesterol türevlerinin moleküler yapısı oldukça büyüktür. Şekil 3’ de gösterildiği gibi A, B, C ve D benzen halkası gruplarına farklı R’ ve R’’ molekül grupları bağlanır ve farklı kolesterol türevleri oluşur. Farklı esterler için bu halkalara bağlanan hidrojen sayıları da farklı olabilir.



Şekil 3. Kolesterol türevlerinin genel moleküler yapısı (General molecular structure of cholesterol derivatives)

Kolesteroler çoğunlukla manyetik momente sahip olan yapılar değildir yani diyamanyetik özellik taşırlar. Ancak kolesterol molekülleri gama radyasyonuna maruz kalırlarsa kimyasal bağları oluşturan çiftlenmiş elektronlardan biri uzaklaşarak tek elektrona sahip serbest radikaller meydana gelir. Kolesterolerde oluşan bu serbest radikaller uzun ömürlü ve yüksek konsantrasyona sahipse çok zararlı yapısal bir hasar olduğu anlamına gelir. Kolesterol ve türevleri halkalı yapıya sahip ve radyasyona karşı yüksek duyarlılık gösteren yapılardır. Gama radyasyonuna maruz kalan kolesterol moleküllerinde uzun ömürlü serbest radikallerin oluşması ile ilgili çok sayıda çalışma vardır. X-ışınlarıyla ışınlanmış bazı lipid, hormon ve vitaminlerin toz ESR spektrum analizleri ilk kez 1959 yılında Rexroad ve Gordy tarafından yapılmış ve kararlı radikaller oluştuğu tespit edilmiştir. Rexroad ve Gordy ışınlanmış kolesterol tozlarında 3 protondan kaynaklanan bir triplet ve bunları yaran bir dublet olduğunu gözlemişlerdir [6].

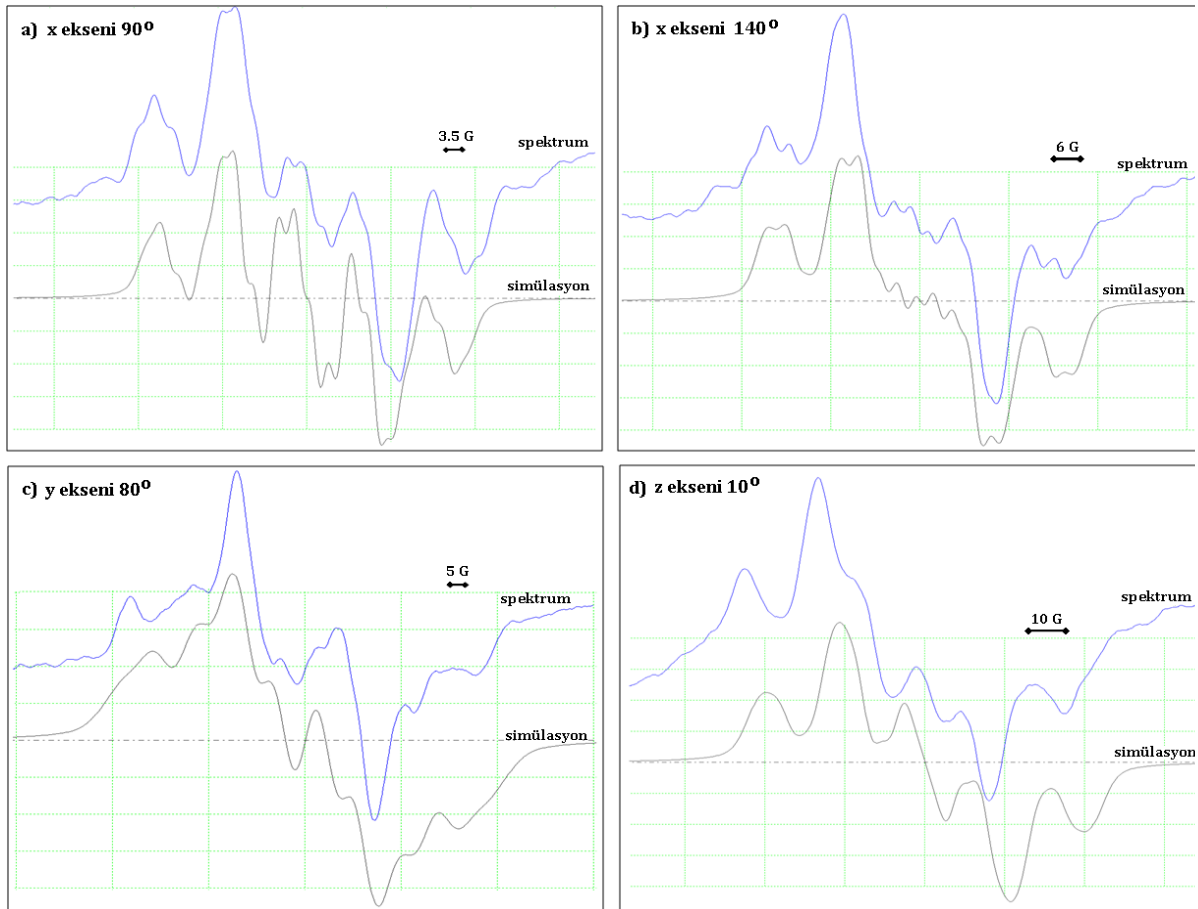
Cholesteryl octanoate kristalinin moleküler yapısı, farklı mikrodalga güçlerinde ve farklı sıcaklıklarda kaydedilen ESR spektrumları ve üç eksende 10° aralıklarla alınan toplam 57 ESR spektrumları incelendiğinde iyonize radyasyonun moleküler yapıda tek radikal oluşturduğu ve bu radikalın $R\text{-CH}_3\alpha\text{CH}_\beta\text{CH}_2\gamma$ moleküler yapısında olduğu tespit edildi. Radikale ait çiftlenimsiz elektron ile üç farklı hidrojen grubu arasında aşırı ince yapı etkileşmesi olduğu belirlendi. Manyetik eşdeğer üç alfa hidrojeni nedeniyle 1:3:3:1 şiddet oranında ortaya çıkan ESR piklerinin her biri beta hidrojeni nedeniyle 1:1 şiddet oranında ikiye yarıldı. Bu pikler ise özdeş iki gama hidrojeni nedeniyle 1:2:1 şiddet oranında tekrar yarıldı. Cholesteryl octanoate tek kristalinin ESR spektrumlarının manyetik alanın yönelimine bağlı olarak değiştiği ve spektroskopik yarıma çarpanı, g , ve aşırı ince yapı sabiti, a , değerlerinin anizotropik özellik gösterdiği tespit edildi. Buna göre her üç eksende alınan spektrumlarda alfa ve beta hidrojenlerinin aşırı ince yapı sabitleri hesaplandı ve tensör oluşturularak izotropik ve anizotropik değerler belirlendi. Bazı açılarda piklerin üst üste gelerek zarf oluşturması nedeniyle gama hidrojenlerine ait aşırı ince yapı sabiti her üç eksende ölçülemedi ve yaklaşık değeri elde edildi.

Kristal yapıda ışınlama ile oluşturduğu düşünülen radikalın deneysel olarak ölçülen g değerleri ve aşırı ince yapı

sabitleri kullanılarak ESR spektrumları simüle edildi. Simülasyon için JEOL izotropik simülasyon programı kullanıldı. Şekil 4' de farklı eksenlerde ve açılarda 120K sıcaklığı, 1mW mikrodalga gücü, 3354G merkez alanı, 156G tarama alanı ve 2G modülasyon genliğinde kaydedilen ESR spektrumları ve bu spektrumlar için yapılan simülasyon sonuçları gösterildi. Simülasyon çalışmaları deneysel olarak tespit edilen radikalın ve hesaplanan ESR parametrelerinin doğruluğunu görmek amacıyla yapıldı. Her spektrum için yapılan simülasyonlarda kullanılan aşırı ince yapı sabitleri Tablo 1' de verildi. Yapılan simülasyonlar ile kaydedilen spektrumlar arasındaki uyum radikal tespitinin ve ölçülen ESR parametrelerinin doğru olduğunu desteklemektedir.

Çizelge 1. Şekil 4' deki simülasyonların aşırı ince yapı sabitleri (Hyperfine splitting values of simulations given in Figure 4)

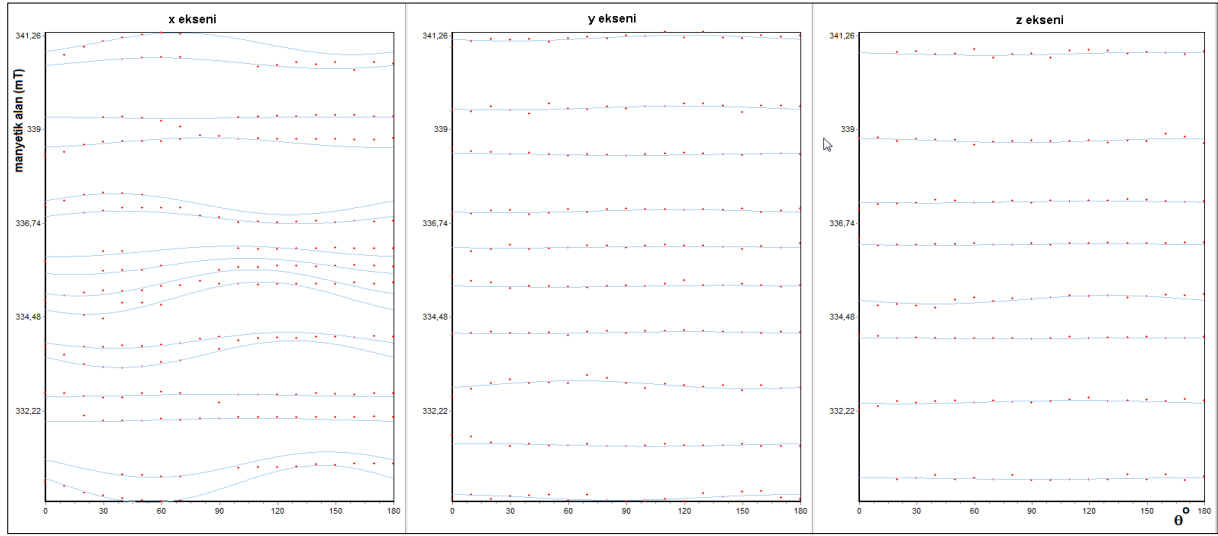
Şekil 4a	$a_{(\text{CH}_3)} = 28\text{G}$, $a_{(\text{CH})} = 16\text{G}$, $a_{(\text{CH}_2)} = 6\text{G}$
Şekil 4b	$a_{(\text{CH}_3)} = 26\text{G}$, $a_{(\text{CH})} = 13\text{G}$, $a_{(\text{CH}_2)} = 7\text{G}$
Şekil 4c	$a_{(\text{CH}_3)} = 27\text{G}$, $a_{(\text{CH})} = 11\text{G}$, $a_{(\text{CH}_2)} = 11\text{G}$



Şekil 4. Işınlanmış Cholesteryl octanoate kristalinin farklı eksen ve açılarda ESR spektrum ve simülasyonları (ESR spectra and simulations of irradiated cholesteryl octanoate single crystals in different axes)

Şekil 4d $a_{(CH_3)} = 31\text{ G}$, $a_{(CH)} = 17\text{ G}$, $a_{(CH_2)} = 8\text{ G}$

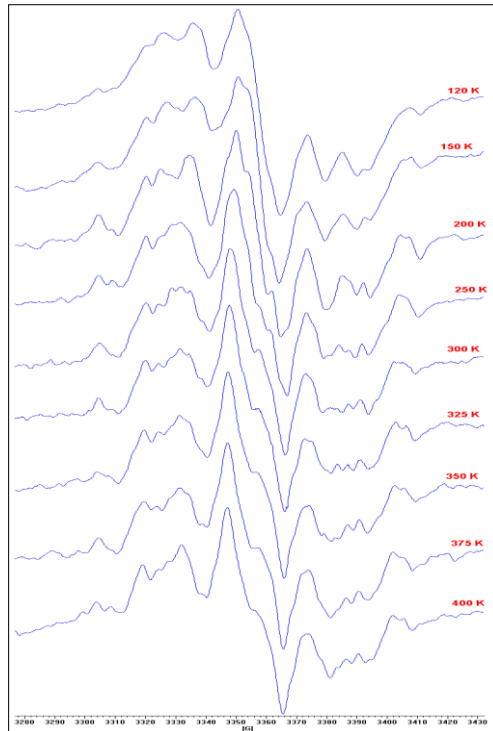
Radikalin sıcaklığa bağlı değişimini incelemek üzere ESR spektrumları farklı spektrometre sıcaklıklarında



Şekil 5.Cholesteryl octanoate tek kristalinin ESR spektrumuna ait pik takibi (EPRES) (EPRES graphics of cholesteryl octanoate single crystal)

Radikal tespiti ve/veya tespit edilen radikalin doğrulanması için ESR spektrumunda ortaya çıkan piklerin manyetik alana bağlı davranışlarını belirlemek gerekebilir. Bu çalışmada cholesteryl octanoate tek kristalinin spektrumuna ait piklerin manyetik alana bağlı değişimlerini anlamak üzere EPRES programı kullanılarak pik takibi yapıldı [14], EPRES'te çizdirilen pikler Şekil 5'te gösterildi. Yalnızca bazı açılarda gözlenen ve sinyal şiddeti zayıf olan pikler karışıklığa sebep olmamak için gösterilmedi. Bu piklerin varlığı yapılan simülasyonlarla doğrulandı.

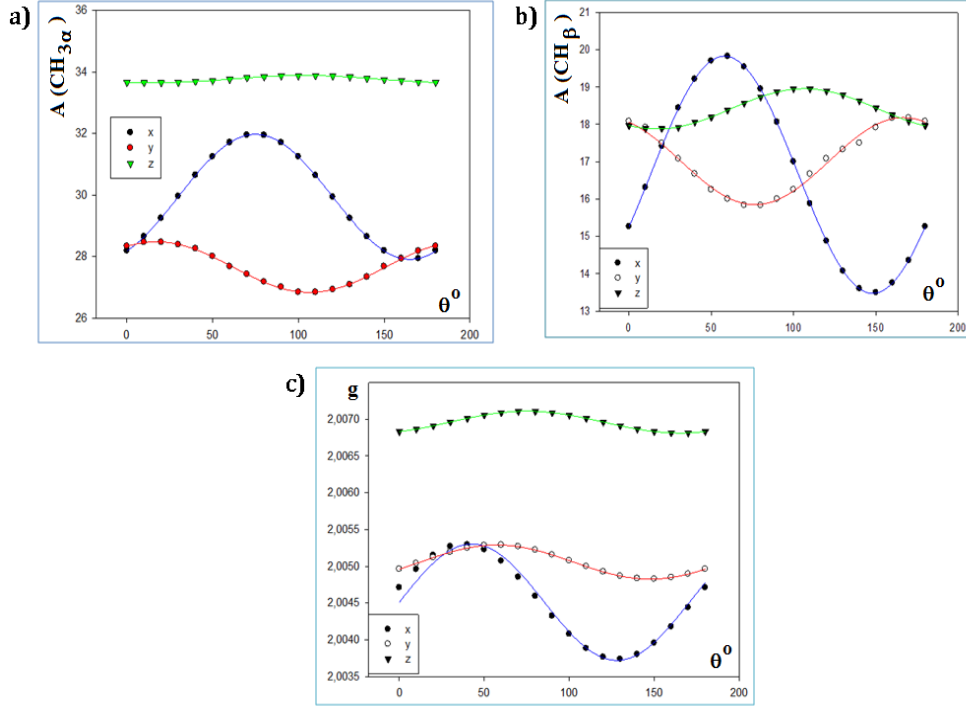
kaydedildi. Bu spektrumlar incelendiğinde radikale ait aşırı ince yapı sabiti değerlerinin ve g faktörlerinin sıcaklığa bağlılık göstermediği, radikalin 400 K sıcaklığına kadar kararlı kaldığı ve ışılama ile yapıda yalnızca tek radikal türü olduğu belirlendi. Ayrıca 120 K sıcaklığında kaydedilen ESR spektrumunda piklerin sinyal şiddetinin oda sıcaklığına göre daha büyük ve gürültü piklerinin daha zayıf olduğu gözlemlendi, buna göre radikale ait ESR spektrumunun en iyi gözlemlendiği sıcaklığın 120 K sıcaklığı olduğu anlaşıldı ve tek kristal çalışmaları bu sıcaklıkta yapıldı. Şekil 6' da farklı



Şekil 6. Cholesteryl octanoate kristali x eksen 0° farklı sıcaklıklarda ESR spektrumları (ESR spectra of cholesteryl octanoate crystal at x axis 0° in different temperatures)

sıcaklıklarda kaydedilen ESR spektrumları gösterildi. Alfa ve beta hidrojenleri için her bir açıda hesaplanan aşırı ince yapı sabitleri ve g değerleri kullanılarak hesaplanan anizotropik ve izotropik parametreler ve yön kosinüsleri Tablo 2' de, her bir ESR parametresi için

Tespit edilen $R-\dot{C}H_{3\alpha}CH_{\beta}CH_{2\gamma}$ radikali için deneysel olarak ölçülen g değerleri ve aşırı ince yapı sabitleri kullanılarak yapılan simülasyonlar ile kaydedilen spektrumlar arasındaki uyum radikal tespitini desteklemektedir. $R-\dot{C}H_{3\alpha}CH_{\beta}CH_{2\gamma}$ radikali için hesaplanan değerler literatürde var olan benzer yapılar



Şekil 7. $R-\dot{C}H_{3\alpha}CH_{\beta}CH_{2\gamma}$ radikalinin ESR parametrelerinin açıya bağlı değişimleri (Orientation dependence of $R-\dot{C}H_{3\alpha}CH_{\beta}CH_{2\gamma}$ radical ESR parameters)

Çizelge 2. Cholesteryl octanoate kristalinde $R-\dot{C}H_{3\alpha}CH_{\beta}CH_{2\gamma}$ radikalinin ESR parametreleri (ESR parameters of $R-\dot{C}H_{3\alpha}CH_{\beta}CH_{2\gamma}$ radical in cholesteryl octanoate crystal)

ESR parametreleri	Esas Eksen Değerleri	Yön Kosinüsleri		
$A(CH_{3\alpha})$	$A_{xx} = 32.9$ G	0.0092	-0.9941	-0.1081
	$A_{yy} = 31.3$ G	0.9821	0.0293	-0.1861
	$A_{zz} = 27.3$ G	0.1882	-0.1044	0.9766
	$a_{ort} = 30.5$ G			
$A(CH_{\beta})$	$A_{xx} = 19.9$ G	0.3299	0.9423	0.0563
	$A_{yy} = 18.3$ G	-0.7796	0.3056	0.5467
	$A_{zz} = 13.5$ G	-0.5324	0.1365	0.8354
	$a_{ort} = 17.2$ G			
$A(CH_{2\gamma})$	$a_{ort} \approx 9$ G	a değeri bütün açılarda ölçülemediği için yön kosinüsleri hesaplanmadı.		
g	$g_{xx} = 2.0062$	0.6641	-0.7428	-0.0845
	$g_{yy} = 2.0059$	0.5952	0.5938	-0.5414
	$g_{zz} = 2.0044$	0.4523	0.3093	0.8365
	$g_{ort} = 2.0055$			

açıya bağlı değişim grafikleri ise Şekil 7' de gösterildi.

ile uyum içindedir [7-9, 15-23]. Ayrıca, bu ESR çalışmasıyla biyolojik ve tıbbi öneme sahip cholesteryl

octanoate molekülünde radyasyonun etkisiyle oluşan radikalin özellikleri ilk kez incelendi.

REFERANSLAR (REFERENCES)

- 1) J.A. Weil, J.R. Bolton, and J.E. Wertz, **John Wiley and Sons Inc., USA**, 471-515 (1993)
- 2) S.C. Goheen, L.J. Lis, J.W. Kauffman, **Chem. Phys. Lipids**, 20, 253-262 (1977)
- 3) R. Faiman, K.Larsson, **J.Raman. Spectrosc.**, 5, 3-7 (1976)
- 4) D. Di Vizio, K.R. Solomon and M.R. Freeman, **Tumori**, 5, 633-639 (2008)
- 5) E.Ikonen, **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, 9, 125-138 (2008)
- 6) H.N. Rexroad and W.Gordy, **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 45, 256-269 (1959)
- 7) R.Krzyminiewski, J. Pietrzak, and R.Konopka, **J. Mol. Struct.**, 240, 133-140 (1990)
- 8) A.Szyczewski, J. Pietrzak and K.Möbius, **Acta Phys. Pol. A**, 108(1), 119-126 (2005)
- 9) B.T. Yiğit, A. Özmen, İ. Ercan, M. Eken, M. Birey, **Rad. Eff. Def.** 158, 833-837 (2003)
- 10) U. Sayin, O.Dereli, E.Turkkan, **J. Mol. Struct.**, 1007, 179-184 (2012)
- 11) Y.F. Ghoos, B.D. Maes, B.J. Geypens, G.Mys, M.I.Hielf, P.J. Rutgeerts, G. Vantrappen, **Gastroenterology**, 104, 1640-1647 (1993)
- 12) B.Pfaffenbach, M.Wegener, R.J. Adamek, H.Wissuwa, J.Schaffstein, S.Aygen and O. Hennemann, **Z.Gastroenterol.** 33(3), 141-5 (1995)
- 13) M.Ventrucci, A. Cipolla, G.M. Ubalducci, A.Roda and E.Roda, **Gut**, 42, 81-87 (1998)
- 14) R. Bıyık, M.Çemberci and R. Tapramaz, **Spectroscopy Letters**, 42, 8, 436-441 (2009)
- 15) C.L. Sevilla, D. Becker and M.D. Sevilla, **J. Phys.Chem.**, 90(13), 2963-2968 (1986)
- 16) R.Krzyminiewski, J. Masiakowski, J.Pietrzak and A. Szyczewski, **J. Magn. Res.**, 46, 300-305 (1982)
- 17) R. Krzyminiewski, A.M. Hafez, J. Pietrzak and A. Szyczewski, **J.Magn. Res.**, 51(2), 308-312 (1983)
- 18) R. Krzyminiewski, A.M. Hafez, A. Szyczewski and J. Pietrzak, **J.Mol.Struct.**, 160, 127-133 (1987)
- 19) A.M. Hafez, R.Krzyminiewski, A.Szyczewski and J. Pietrzak, **J. Mol.Struct.**, 130, 301-307 (1985)
- 20) A.Szyczewski, R. Krzyminiewski, A.M.Hafez and J.Pietrzak, **Int. J. Radiat. Biol.**, 50(5), 841-852 (1986)
- 21) A.Szyczewski and R. Krzyminiewski, **Organic Free Radicals**, H. Fischer, H. Heimgarten (Eds), p.201. Springer, Berlin (1988)
- 22) A.Szyczewski, B. Endewardand, K. Möbius, **Appl. Radiat. Isot.**, 49, 1-2, 59-65 (1998)
- 23) B. Çaliskan, E.Aras, B. Aşık, M.Büyüm, M. Birey, **Rad. Eff. Def.**, 159, 1-5 (2004)