Int. J. Adv. Eng. Pure Sci. 2025, 37(1): <73-91>
DOI: 10.7240/jeps.1558538

RESEARCH ARTICLE / ARAŞTIRMA MAKALESİ

Mikroakışkan Temelli Floresans Mikroskop Sistemi ile Otofloresan Flavin Koenzimlerinin Fotofiziksel Geçişleri Üzerine Nümerik Modelleme Çalışmaları

Numerical Modeling Studies on Photophysical Transitions of Autofluorescent Flavin Coenzymes with A Microfluidic-based Fluorescence Microscope System

Selim Can DİRİCAN [1], Bahar TEZCAN [2], Süleyman Yiğit DÖLEK [3], Barış DEMİRBAY [4]

[1]*Makine Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Özyeğin Üniversitesi, İstanbul, Türkiye*
[2]*Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Özyeğin Üniversitesi, İstanbul, Türkiye*
[3]*Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Özyeğin Üniversitesi, İstanbul, Türkiye*
[4]*Mühendislik Temel Bilimleri Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Özyeğin Üniversitesi, İstanbul, Türkiye*

Öz

Bu araştırmada ışığa ve çözücü ortamına oldukça hassas, çok küçük uyarım kesit alanına sahip ve zayıf floresan ışıma yapabilen flavin mononükleotit (FMN) ve flavin adenin dinükleotit (FAD) koenzimlerinin fotofiziksel geçişlerini çözümleme kapasitesine sahip mikroakışkan temelli bir floresans mikroskop sistemi için nümerik modelleme çalışmaları sunulmuştur. FMN ve FAD'nin moleküler yapısı, fotofiziksel özellikleri ve girdikleri kimyasal reaksiyonlar dikkate alınarak her iki molekül için farklı fotofiziksel modeller kullanılmıştır. Bu modellerde yer alan elektronik durumlar 1. mertebeden lineer diferansiyel denklem sistemi olarak ele alınmış olup her bir elektronik durum popülasyonu zamana bağlı olarak çözülmüş, mikroakışkan çip ile lazer uyarım alanının geometrik boyutları ve mikroskop parametreleri kullanılarak görüntü ve sinyal verisi olarak elde edilmiştir. İki farklı akış hızında lazer uyarım şiddeti, çözücüye eklenen etanol, askorbat ve triptofan gibi redoks ajanlarının normalize floresan sinyaline ve elektronik durum popülasyonlarına olan etkisi simüle edilmiştir. Sinyal ve elektronik durum analizlerine ek olarak sinyallerin oluşturulmasında kullanılan sCMOS görüntü verileri farklı deneysel koşullar için simüle edilmiş ve lazer uyarım alanıyla kıyaslanmıştır. Araştırmada önerilen yöntem farklı akış hızlarında farklı karanlık durum popülasyonlarının birbirinden ayırt edilebilirliğini ve farklı deneysel koşullarda değişen karanlık durumların normalize floresan sinyaline ve kamera görüntülerine olan etkisini çözümleme kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Mevcut yöntemlerle kıyaslandığında, elde edilen sayısal bulgular, çalışmada sunulan yöntemin flavin foto-bozunumunu büyük ölçüde önleyebilme potansiyelini ispatlamıştır ve farklı moleküllerin fotofiziksel özelliklerinin hangi koşullarda gözlemlenebileceği ile ilgili optimizasyon çalışmalarının yapılmasına olanak sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Flavin mononükleotit, flavin adenin dinükleotit, fotofizik, floresans spektroskopisi ve mikroskobu, elektronik durum modeli, nümerik simülasyon.

Abstract

In this research, numerical modeling studies are presented for a microfluidic-based fluorescence microscope system capable of resolving photophysical transitions of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) coenzymes that are very sensitive to light and solvent environment, have very small excitation cross-section and weak fluorescence. Different photophysical models were used for both molecules considering the molecular structure, photophysical properties and chemical reactions of FMN and FAD. The electronic states in these models were considered as a first order linear differential equation system and each electronic state population was solved in time, and image and signal data were obtained using the geometric dimensions of the laser excitation area and microscope parameters with the microfluidic chip. The laser excitation intensity at two different flow rates and the effects of redox agents such as ethanol, ascorbate and tryptophan added to the solvent on the normalized fluorescence signal and electronic state populations were simulated. In addition to signal and electronic state analyses, sCMOS image data used in generating the signals were simulated for different experimental conditions and compared with the laser excitation field. The method proposed in the study showed that it has the capacity to distinguish different dark state populations from each other at different flow rates and to resolve the effect of different dark states on normalized fluorescence signals and camera images under different experimental conditions. When compared with existing methods, the numerical findings demonstrate the potential of the method presented in the study to prevent flavin photodegradation to a large extent and enable optimization studies to be conducted regarding the conditions under which photophysical properties of different molecules can be observed.

Keywords: Flavin mononucleotide, flavin adenine dinucleotide, photophysics, fluorescence spectroscopy and microscopy, electronic state model, numerical simulation.

Sorumlu Yazar: BARIŞ DEMİRBAY, **Tel:** 0212 564 91 40-dahili, **E-posta:** baris.demirbay@ozyegin.edu.tr

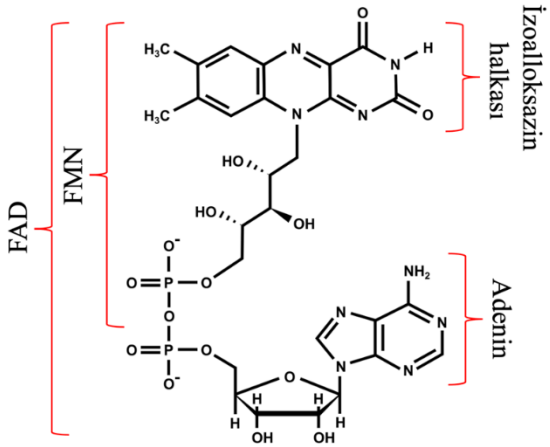
Gönderilme: 30.09.2024, **Düzenleme:** 27.02.2025, **Kabul:** 07.03.2025

I. GİRİŞ

Biyolojik araştırmalarda floresans temelli yöntemler özellikle son on yıl içinde yüksek çözünürlüklü mikroskopların geliştirilmesi ve hedef moleküllere konjuge edilebilen akıllı floresan işaretleyicilerin (florofor) ortaya çıkmasıyla birlikte büyük bir önem kazanmıştır [1, 2]. Hücrelerde yer alan spesifik organel, vezikül, eksozom, protein veya ribonükleik asit (RNA) gibi makro boyutlu molekülleri işaretleyebilen ve lazer uyarımı altında floresan ışıma yapabilen floroforlar, yüksek çözünürlüklü floresans mikroskoplarda dedektör olarak kullanılan CCD veya sCMOS kameralar yardımıyla lokalize edilebilmektedir [3]. Özellikle de floresans temelli biyolojik görüntüleme alanında kullanılan floroforların yüksek şiddetteki lazer uyarımlarına karşı dayanıklı olması ve yüksek uyarım kesit alanına ($\sigma_{exc} \sim 10^{-16}$ cm^2) sahip olmaları tercih edilir [4]. Bu tip işaretleyici floresan moleküller genellikle düşük lazer uyarımlarında bile yüksek parlaklık değerlerinde ışıma yapmaktadır ve rodamin bazlı floroforlar bu sınıfa örnek olarak verilebilir. Düşük uyarım kesit alanına ($\sigma_{exc} \sim 10^{-17}$ cm^2) sahip ve aynı zamanda Keratakonus gibi göz rahatsızlıklarında çapraz bağlayıcı malzeme olarak kullanılan flavin gibi otofloresan koenzim moleküller ise oldukça zayıf ışıma yaptıklarından dolayı bu tip moleküllerde optimal seviyede foton emisyonunun elde edilebilmesi için daha yüksek lazer uyarımına ihtiyaç duyulmaktadır [5-8]. Ancak bu tip zayıf moleküllerde yüksek uyarım şiddetlerinin kullanılması ışıkla ağartma (photobleaching) reaksiyonuna, yani kullanılan floroforların kalıcı olarak floresans ışıma yapamayacak şekilde fotokimyasal bozunumuna sebep olmaktadır. Görüntülemede yüksek dozda ışık şiddetinin özellikle hayvan hücresi gibi yaşamsal faaliyetler gösteren ortamlarda uygulanması hücre içinde flavin ve benzeri koenzimlerin bozunumuna ve fototoksisiteye neden olmaktadır [9]. Bu tür, dışarıdan ekstra bir molekülle işaretlenmeye ihtiyacı olmayan otofloresan koenzimler optimal dozlarda uygulanan uyarım şiddeti ile fotokimyasal bozunuma uğramadan ışıma yapma kapasitesine sahiptir. Ancak düşük veya ortalama dozlarda uygulanan lazer uyarım şiddetlerinde bu moleküllerden zayıf floresans ışıma sinyali elde edilir ve görüntüleme çalışmalarında düşük sinyal gürültüye neden olmaktadır. Lazer uyarım şiddetindeki kademeli artış, moleküllerdeki floresans ışımanın satürasyon seviyesine ulaşması sonrasında ölçülen floresans sinyalinde artış yerine kısa süre içinde azalmalar görülebilmektedir. Sinyallerde görülen bu zayıflamanın sebebi başlangıçta yalnızca ışığın ağartma reaksiyonu gibi düşünülse de sürekli uyarım kesildikten kısa bir süre sonra bu moleküller yeni bir lazer uyarımı ile tekrar uyarıldıklarında başlangıçtakine benzer şiddette ışıma yapabilmektedirler. Sürekli uyarım altında floresans sinyalinin azalmasının temel sebeplerinden biri floresan molekülün uyarılmış singlet halinde yer alan elektronların kuantum mekaniksel olarak yasaklı olan üçlü (triplet) duruma geçişleri veya triplet halden redoks reaksiyonlarının gerçekleştiği radikal durumlara geçişlerinden kaynaklanmaktadır [10, 11]. Uyarılmış singlet durumdan triplet veya redoks gibi floresans ışımaya göre daha uzun ömürlü olan bu durumlar arasındaki elektronik geçişler, esasında floroforların bulunduğu hücre veya bir çözelti içinde gözden kaçan biyokimyasal mekanizmalar ve moleküller arası etkileşimler hakkında oldukça önemli bilgi taşımaktadır. Genellikle nanosaniyeler içinde gerçekleşen floresans ışımaya kıyasla mikrosaniyeler (μs) ve milisaniyeler (ms) içinde oluşan bu elektronik durumlar karanlık hal olarak tanımlanmaktadırlar [12]. Deney ortamındaki oksijen konsantrasyonu [13], çözücünün viskozitesi [14], ortamda veya molekül yapısında yer alan ağır atomlar [15, 16], polarite [17], floresan molekülün konformasyonel değişimi [18-20], foto-redüksiyon [21] ve foto-oksidasyon [22] gibi redoks reaksiyonları floroforların karanlık elektronik durum popülasyonlarını etkileyen önemli faktörlerdir. Sürekli lazer uyarımı altında bu tür fotofiziksel fenomenlerin gerçekleşmesi durumunda ölçülen floresans sinyalinde zayıflama görülmesi kaçınılmazdır.

Floresan moleküllerin karanlık elektronik durum popülasyonlarını kantitatif olarak ölçmek amacıyla geliştirilmiş iki önemli yöntem mevcuttur. Bu yöntemlerden birincisi 1972'de ilk kez Madge, Elson ve Webb tarafından ortaya atılan, floroforların konsantrasyonunu, difüzyonunu, triplet durum popülasyonunu ve moleküllerdeki protonasyonu ölçebilen floresans korelasyon spektroskopisidir (FCS) [23, 24]. Biyofizikte analitik bir metot olarak kullanılan FCS, konfokal mikroskop, sürekli lazer uyarımı ve fotodedektörlerden oluşan kompleks bir sistemdir [25, 26]. Bu yöntem mikroskop objektifinde femtolitre büyüklüğünde elipsoit şekilli bir algılama hacmi içine difüzyonla rastgelen giren moleküllerden floresans ışımayla yayılan fotonları zamana bağlı olarak ölçmektedir [27]. Aynı tip 2 dedektör tarafından belirli bir süre eş zamanlı olarak kaydedilen foton sayıları birbiri ile korele edilerek logaritmik zamana göre değişen korelasyon eğrisi elde edilir. Korelasyon eğrileri birkaç μs içinde gerçekleşen protonasyon ve triplet geçişleri hakkında bilgi verirken, ms skalasında floresan moleküllerin difüzyon süreleri kantitatif olarak tayin edilebilmektedir. FCS yönteminde moleküllerin lazerle uyarıldığı algılama hacminin boyutu oldukça küçük ($\sim 10^{-15}$ L) olduğu için genellikle nanomolar (nM) çözelti konsantrasyonu kullanılmaktadır [28]. Bu tür düşük konsantrasyonlu florofor çözeltilerindeki

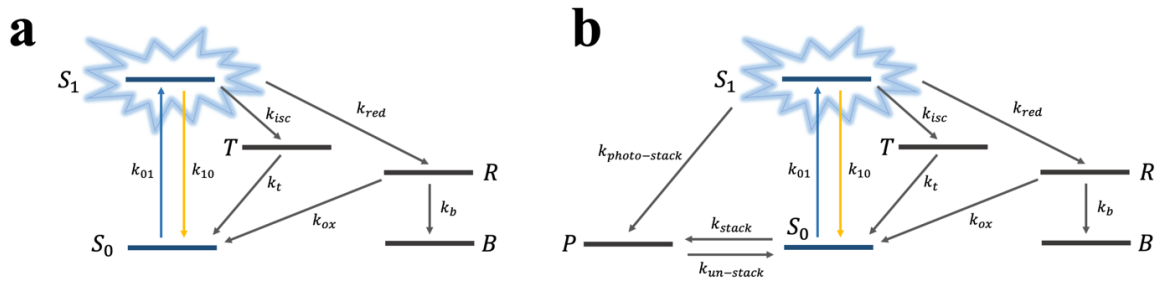
floresan molekül sayısı tek molekül seviyesinde olduğundan, yeterli miktarda foton, yani floresans sinyali elde edebilmek için seçilen floroforların yüksek parlaklık değerlerine sahip olması gerekmektedir [29]. Düşük parlaklık ve küçük uyarım kesit alanına sahip floresan moleküllerde çok yüksek seviyede lazer uyarımları kullanılarak FCS sinyali artırılabilir ancak bu durum kullanılan moleküllerin fotokimyasal bozunumuna doğrudan sebep olmaktadır. Bu nedenle flavin gibi otofloresan moleküllerin fotofiziksel özellikleri ve karanlık durumlara geçişleri, FCS gibi tek molekül algılama temelli spektroskopik bir yöntem ile doğru bir biçimde tayin edilemez.



Şekil 1. FMN ve FAD moleküllerinin kimyasal yapısı

Floroforların hem karanlık hal popülasyonlarını ölçebilmek hem de zayıf floresan ışımasına sahip molekülleri ideal lazer uyarımlarında hasar vermeden görüntülemek amacıyla Widengren ve arkadaşları TRAST adını verdikleri floresans temelli spektroskopik bir yöntem geliştirmişlerdir [30, 31]. TRAST spektroskopisi mikroskop objektifi üzerinde konfokal uyarıma alternatif olarak geniş uyarım alanı da sağlamakta olup, yüksek konsantrasyonlarda florofor çözeltilerinin kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır [32]. Moleküllerin lazerle uyarılmasında geniş uyarım alanı kullanıldığında lazer şiddetinin ortalama etkisi daha düşük olduğundan moleküllerin fotokimyasal bozunumu yüksek ölçüde önlenmektedir. TRAST spektroskopisi yöntem olarak 100 ns ve 10 ms zaman aralığında rastgele seçilen, kesikli (pulsed) lazer uyarımlarına karşı moleküllerden yayılan floresans sinyalini ölçmekte olup ölçülen bu değerleri logaritmik zamana göre değişen grafik verisi olarak vermektedir [33]. Normalize edilmiş floresans sinyal değerlerinin zamana göre değişimlerine bakarak triplet, protonasyon, redoks veya trans-cis durum popülasyonlarına ait fotofiziksel geçiş hızları tayin edilebilmektedir [34]. Bu yöntem aynı zamanda hücrelerde floresan moleküllerle işaretlenmiş olan organel veya makromoleküllerin fotofiziksel özelliklerini de inceleyebilmektedir. Ancak immunoişaretlenmiş (immunostained) hücreler petri kabında veya lamel üzerine sabitlendiği için ve ölçümler sırasında aynı hedef moleküller tekrar ışıkla uyarılacağı için hem işaretleyici moleküllerde hem de otofloresan flavinlerde fotokimyasal bozunuma sebebiyet vermektedir. Işıkla ağartmadan kaynaklanan fotokimyasal bozunum, Şekil 1'de kimyasal yapısı verilen, ölçümler sırasında çözücü içinde serbest Brownian hareketi yapan flavin mononükleotit (FMN) ve flavin adenin dinükleotit (FAD) molekülleri için TRAST spektroskopisi kullanılarak deneysel olarak kanıtlanmıştır [35]. Bu nedenle zayıf ışıma yapan ve ışığa hassas olan bu tür moleküllerin karanlık hal geçişlerini çalışabilmek için yeni nesil spektroskopik yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu makalede, bahsedilen problemleri çözümleyebilen ve mevcut spektroskopik yöntemlere alternatif olarak kullanılabilecek mikroakışkan temelli, geniş alan uyarımlı bir floresans mikroskop tasarımı geliştirilmiş; bu sistemin flavin fotofiziği için uygulaması nümerik simülasyon sonuçları ile sunulmuştur. Önerilen spektroskopik tasarımda amaç floroforların elektronik geçiş parametrelerini, mikroakışkan çipin geometrisini ve ayrıca geniş alan mikroskobunun optik parametrelerini kullanarak normalize floresans sinyallerini simüle etmek ve floroforların karanlık durum popülasyonlarını kantitatif olarak belirleyebilmektir. Bu sayede ışığa duyarlı, zayıf moleküller deneysel olarak mikroskopta ölçülmeden önce, nümerik simülasyonlar yapılarak özellikle deneysel çalışan araştırmacılara yapılması planlanan deneylerle ilgili optimizasyon imkânı ve ölçümlerle ilgili öngörü sağlayacaktır. Nümerik simülasyonlarla sunulan bu tasarımın iki önemli deneysel avantajı olacaktır. Bunlardan birincisi, mikroakışkan çip içinde sabit akış hızıyla hareket ederek uyarım alanından geçen floroforların floresans sinyali bir sCMOS kamera yardımıyla kaydedilerek çok sayıda görüntü verisi elde edilecek ve bu nedenle küçük uyarım kesit alanına sahip otofloresan moleküller için yeterli foton istatistiği sağlayacaktır. İkinci avantaj olarak ise; floresan moleküller lazer uyarım alanından yalnızca bir kez geçeceği için kullanılan lazerin her bir molekülü ağartma riski önemli derecede azaltılacak olup bu yöntem ile elde edilen sinyaller daha güvenilir fotofiziksel analizler sağlayacaktır. Önerilen yöntemin başarısını ispatlamak amacıyla, foto-fiziksel modelleri ve karanlık hal geçiş parametreleri raporlanmış FMN ve FAD molekülleri için çeşitli nümerik simülasyonlar yapılmıştır. Bu moleküller için kullanılan foto-fiziksel



Şekil 2. (a) FMN ve **(b)** FAD molekülünün elektronik durum (fotofizik) modeli.

modellere ilişkin ayrıntılar, seçilen deneysel parametreler ve nümerik simülasyonlarla karanlık duruma geçişlerin hangi ideal koşullarda gözlemlenebileceği sırasıyla aşağıdaki başlıklarda verilmiştir.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

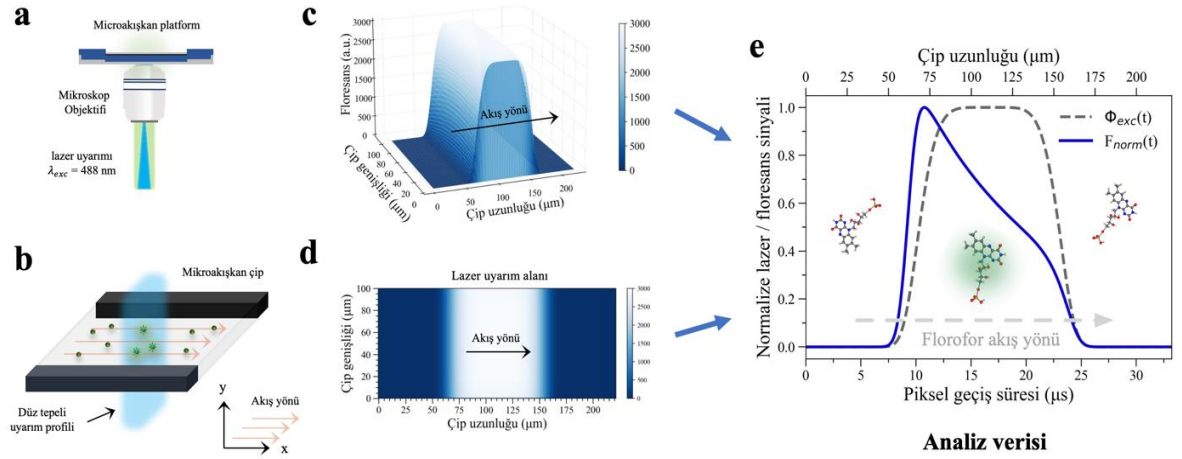
2.1. FMN ve FAD İçin Elektronik Durum (Fotofizik) Modelleri

FMN ve FAD moleküllerinin floresans sinyallerini simüle etmeden önce bu moleküller için singlet ve karanlık hal durumlarının birbiriyle etkileştiği elektronik durum modellerinin oluşturulması gereklidir. Karanlık, geçici elektronik durumları içeren floresans sinyalini nümerik olarak modelleme aşamasında belkemiği olarak kullanılacak elektronik durum modelini örneklendirmek ve kuramsal yöntemi açıklamak amacıyla FMN ve FAD moleküllerinin fotofiziksel modelleri sırasıyla Şekil 2(a) ve (b)'de verilmiştir [35]. Her iki modelde de 5 temel durum olan singlet taban durum (S_0), floresan ışıma yapan 1. uyarılmış singlet durum (S_1), triplet durum (T), redoks reaksiyonlarını temsil eden radikal durum (R) ve ışıkla ağartılmış durum (B) ortak olarak yer almaktadır. İki modelde de T, R ve B uzun ömürlü, karanlık geçici elektronik durumları temsil etmektedir. FAD floroforu FMN'den farklı olarak molekül yapısında izomerizasyona sebep olan adenin grubu barındırmaktadır (Şekil 1). İzomerizasyona bağlı olarak adenin grubunun izoalloksazin halkası ile çarpışması durumunda oluşan katlanmış yapı P ile temsil edilen farklı bir karanlık durumu oluşturur ve katlanmış durumdaki FAD molekülleri floresan ışıma yapamaz. FAD molekülü P durumuna hem S_0 hem de S_1 durumundan geçiş yapabilmektedir. Geniş alan mikroskobu üzerinde oluşturulan düz tepeli lazer uyarım alanı konfokal mikroskoba kıyasla oldukça geniş olduğundan molekülün lazerle uyarım hızı (k_{01}) oldukça düşüktür. Bu sebeple daha yüksek seviyelerde uyarılmış singlet ve triplet durumları Şekil 2'deki modellere dahil edilmemiştir. Singlet S_0 ve S_1 durumları FMN ve FAD dahil ışıma yapan her florofor için var olan temel elektronik durumlardır. İki molekülde de S_0 durumunda bulunan elektronlar lazerle uyarıldıklarında S_1 durumuna k_{01} hızı ile geçiş yapar ve bu hızın matematiksel ifadesi aşağıda gibi verilebilmektedir [36]:

$$k_{01} = \sigma_{exc}\Phi_{exc} = \sigma_{exc}\frac{I_0}{E_{foton}} \qquad (1)$$

Denklem 1'de yer alan σ_{exc} , Φ_{exc}, I_0 ve E_{foton} parametreleri sırasıyla floroforların uyarım kesit alanı, uyarılma akısı, lazer uyarım şiddeti ve foton enerjisidir. Sürekli lazer uyarımına maruz kalan floroforlarda, S_1 durumuna uyarılan elektronlar taban durumuna k_{10} hızı ile geçiş yaparak floresan ışıma yapmaktadır. S_1 durumuna yüksek I_0 değeri ile uyarılan moleküller floresan satürasyonuna uğrayarak, S_1 durumundaki elektronlar T durumuna sistemler arası geçiş (intersystem crossing) hızı olarak bilinen k_{isc} ile geçiş yapar. T durumundaki elektronlar S_0 durumuna k_t hızı ile gevşemektedir. Moleküllerin lazerle uyarımı, µs'ler içinde oluşan T ve P durumlarına ek olarak daha uzun ömürlü (birkaç ms) olan redoks temelli radikallerin (R) oluşumuna sebep olmaktadır. Şekil 2'de verilen fotofiziksel modellerde T durumundan R durumuna geçiş foto-redüksiyon, k_{red} hızı ile belirlenmektedir. R durumundaki elektronlar S_0 durumuna foto-oksidasyon, k_{ox} parametresi ile geri dönerek tüm elektronik sistem geçici olarak dengeye ulaşır. FMN ve FAD molekülleri çok daha yüksek I_0 değerinde uyarıldığında moleküller R durumundan B durumuna kalıcı olarak ışıkla ağarmaktadır. Bu geçişler k_b hızı ile ölçülmektedir. FMN koenziminin floresan ışıma şiddetini doğrudan etkileyen k_{10} hızının matematiksel ifadesi diğer geçiş hızları cinsinden aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$k_{10} = \frac{1}{\tau_f} - k_{isc} - k_{red} \qquad (2)$$



Şekil 3. (a) Floroforlar mikroskop objektifinin arka açıklığına odaklanmış lazer (mavi) ile uyarılmaktadır ve floresan ışıma (açık yeşil) görüntü verisi olarak hesaplanmaktadır. **(b)** Mikroakışkan platformun içine gömülü çipin gösterimi: çip üzerinde akış yönüne dik yönde uzatılmış düz tepeli uyarma ışını (mavi) sabit hızla hareket eden tüm molekülleri benzer lazer şiddetinde uyararak floroforların karanlık elektronik durumlara geçişlerine sebep olmaktadır. Oklar, x ekseni boyunca moleküllere uygulanan ideal, laminer akışın yönünü göstermektedir. Düz tepeli lazer uyarım alanının **(c)** 3-boyutlu ve **(d)** 2-boyutlu simülasyonu. **(e)** Yöntemle elde edilebilecek temsili bir veri örneği: nümerik simülasyonlarla elde edilen lazer profilinin (Φ_{exc}) ve zamana bağlı değişen karanlık elektronik durumların $F_{norm}(t)$'ye etkisi gösterilmektedir. Burada karanlık durumlara geçişlerin olmaması durumunda $F_{norm}(t)$ sinyalinin Φ_{exc} sinyali ile tamamen örtüşmesi beklenmektedir.

Denklem 2'de yer alan τ_f floroforun floresan ışıma ömrüdür ve organik moleküller için bu değer genellikle birkaç nanosaniyedir. Hesaplanan k_{10} değeri FAD için sabit bir değerdir ve bu değer 131 μs^{-1} olarak bulunmuştur [35]. Şekil 2(b)'de verilen FAD molekülünün elektronik durum modeli göz önüne alındığında, uyarılmış S_1 durumundan P durumuna geçiş hızı olan $k_{photo-stack}$ hızını ifade etmek için aşağıdaki denklem kullanılmaktadır:

$$k_{photo-stack} = \frac{1}{\tau_f} - k_{10} - k_{isc} \qquad (3)$$

FAD molekülü S_0 durumundan karanlık P durumuna k_{stack} hızı ile geçerek katlanmış yapı oluşturmaktadır. P durumundan S_0 durumuna geçerek ise molekül açık formuna $k_{un-stack}$ hızı ile geri dönebilmektedir. Fotofiziksel modellerde verilen k_{isc}, k_t, k_{red}, k_{ox}, k_b, k_{stack} ve $k_{un-stack}$ gibi geçiş hızları, TRAST spektroskopisi kullanılarak elde edilmiş olup bu çalışmadaki nümerik simülasyonlarda kullanılmıştır [35]. Bu yöntemle ölçülerek belirlenen bu parametreler bulgular ve tartışma bölümünde Tablo 1, 2, 3 ve 4'te listelenmiştir. Bununla birlikte k_{01} ve k_{10} hızlarını simüle edebilmek amacıyla σ_{exc} = 1.9 × 10^{-17} cm^2 olarak belirlenmiş olup, fosfat tamponlu tuzlu su (phosphate buffered saline) içinde çözdürülerek ölçümü yapılan FMN ve FAD molekülleri için τ_f değerleri $\tau_{FMN} = 4.7$ ns ve $\tau_{FAD} = 2.7$ ns olarak kullanılmıştır. E_{foton} değerlerinin hesaplanabilmesi için lazer uyarım dalga boyu (λ_{exc}) 488 nm olarak seçilmiştir.

2.2. Mikroakışkan Çip Sistemi Ve Lazer Uyarım Alanının Nümerik Simülasyonu

Önerilen yöntemde lazerle sabit uyarım alanı üzerinden geçerek hareket eden FMN ve FAD moleküllerinin iki boyutlu floresans görüntü verileri, $F(x, y)$, nümerik simülasyonlarla oluşturulmuştur. Simüle edilen $F(x, y)$ görüntülerindeki her piksel farklı floresan sinyal değerine sahip olup bu ifadedeki x akış yönünü, y ise akış yönüne dik yöndeki Kartezyen koordinatları temsil etmektedir. Mikroakışkan çip sistemindeki akış hızı ve görüntü verisinin piksel boyutu bilgisiyle, moleküllerin her bir pikselden geçiş süresi hesaplanmıştır. Görüntü verisindeki moleküller için akış yönü boyunca simüle edilen floresans sinyali $F(x)$ ile gösterilecek olup $t = x/v$ (piksel uzunluğu/molekülün akış hızı) denklemi kullanılarak zaman ortalamalı floresans sinyali, $F_{ort}(t)$, elde edilmiştir. Uygulanan akış hızları, mikroakışkan çipin geometrik boyutu, kullanılan I_0 değerleri ve elektronik geçiş hızlarına bağlı olarak floroforların karanlık geçici durumları, normalize edilmiş, zaman ortalamalı floresans sinyalindeki $F_{norm}(t)$ değişimlere bakılarak analiz edilmiştir. Analizlerin doğru bir biçimde yapılabilmesi için, mikroakışkan çipin geometrik boyutlarının yanı sıra lazer uyarım alanının geometrisinin de dikkate alınması gerekmektedir.

Yapılan simülasyonlarda gerçek bir sCMOS kamera görüntü verisinin özellikleri sayısal veri olarak kullanılmıştır. sCMOS kameralarda üretilen görüntü verisi yatay ve dikey boyutlarda 2048 kare pikselden oluşmakta olup her bir pikselin uzunluk değeri yaklaşık 6.5 µm olarak belirlenmiştir [39]. Deneysel ölçümlerde sCMOS kameranın çok daha hızlı kayıt yapabilmesi için toplam piksel sayısı 4×4 gruplama yöntemiyle genişletilerek 512 piksele düşürülebilmektedir. Gruplama ile bu sayede objektifte oluşan görüntü verisinin 1 piksel uzunluğu 26 µm olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada üretilen lazer ve normalize floresans sinyalleri için görüntü verileri Python ortamında 2 boyutlu ızgara (grid) içinde simüle edilmiştir. Simüle edilen görüntüde çip genişliği (akış doğrultusuna dik yön) boyunca toplam 233, çip uzunluğu, yani akış yönü doğrultusunda ise toplam 512 piksel barındırmaktadır. Şekil 3(a) ve (b)'de resmedilen mikroskop üzerine yerleştirilmiş 60x büyütmeli su ile odaklanabilen mikroskop objektifinde oluşan görüntü verisinde bir piksel uzunluğu 0.43 µm/piksel olarak hesaplanmıştır. Simülasyonlarda sCMOS kameranın görüş alanına giren mikroakışkan çipin uzunluğu ve yüksekliği bu durumda 220.16 µm ve 50 µm olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda simüle edilmiş görüntü verilerinin akışa dik boyutu, yani çip genişliği 100.19 µm olacak şekilde belirlenmiştir. Bu ebatlardaki çipler Micronit isimli mikroakışkan sistemler geliştiren bir ticari firma tarafından kolaylıkla üretilebilmektedir [40]. Şekil 3(b)'da resmedilen mikroakışkan sistem ile karanlık durumlara geçişleri tetiklenmektedir. Süpergauss lazer ışın profilinin genelleştirilmiş matematiksel ifadesi, $n > 2$ mertebesindeki x ve y Kartezyen koordinatlarındaki optiksel yoğunluk profili $I(x,y)$ ile Denklem 4'teki gibi ifade edilebilmektedir [41, 42]:

$$I(x,y) = \begin{cases} I_0 \cdot e^{-2\left(\frac{x-x_0}{w}\right)^n} & y \in [0, L] \\ 0 & \text{diğer} \end{cases} \qquad (4)$$

Denklem 4'te yer alan L çip genişliğini, w ise Gausyen profilin kiriş bel yarı çapını ve n düz tepeli lazer profilinin mertebesini göstermektedir. Denklem 4 ile nümerik simülasyonlarda kullanılacak olan düz tepeli lazer uyarım alanı parametreleri sırasıyla $I_0 = 3000$ a.u., $L = 100.19$ µm, $w = 50$ µm ve $n = 6$ olarak seçilmiştir. Lazer ışınının simetri merkezinin koordinatı, çipin akış yönü boyunca tam orta noktasında ($x_0 = 110.08$ µm) olacak şekilde belirlenmiştir. İlk olarak 512 piksel değerine sahip çip uzunluğu boyunca $I(x, 0)$ sinyali $y = 0$ için Denklem 4 ile simüle edilmiştir. Aynı simülasyon çip genişliği boyunca yer alan 233 piksel için bir döngü algoritması (for loop) içinde tekrar edilerek $I(x,y)$ değerleri $y = L = 100.19$ µm'ye ulaşana dek hesaplanmıştır. Hesaplanan $I(x,y)$ değerleri 512 x 233 piksel^2 boyutunda oluşturulan grid içine kaydedilmiştir. Grid içinde her piksel için kaydedilen $I(x,y)$ değerlerinin oluşturulmasında kullanılan lazer profilinin 3 ve 2 boyutlu gösterimleri sırasıyla Şekil 3(c) ve (d)'de verilmiştir. Mikroakışkan çip içinde hareket eden flavin koenzimlerini lazerle uyarmak için kullanılan efektif optik güç P_{eff}, $I(x,y)$ cinsinden aşağıdaki bağıntıyla hesaplanabilmektedir:

$$P_{eff} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{0}^{L} I_0 e^{-2\left(\frac{x-x_0}{w}\right)^6} \, dy \, dx \qquad (5)$$

Denklem 5'te P_{eff} için tanımlanan integralin I_0 için w, L ve gamma fonksiyonu (Γ) cinsinden çözümü aşağıdaki ifade ile bulunmuştur:

$$I_0 = \frac{1}{\Gamma(1/6)} \frac{3\sqrt[6]{2} P_{eff}}{wL} \qquad (6)$$

FMN ve FAD için farklı lazer şiddetlerinin normalize floresans sinyallerine olan etkisi Denklem 6'da bulunan çözüm kullanılarak incelenmiştir. Yapılan simülasyonlarda $\Gamma(1/6)$ değeri 5.57 olarak alınmıştır [43]. Floroforların I_0'a bağlı karanlık durumlara geçişlerini kontrol etmek amacıyla Denklem 1'deki k_{01} hızı kullanılmaktadır ve bu denklemde yer alan I_0 değeri (kW/cm^2 cinsinden) Denklem 6'daki çözüm ile elde edilmektedir. 488 nm uyarım dalga boyuna sahip lazerlerde maksimum P_{eff} değeri 300 mW'a kadar ulaşabildiğinden, nümerik simülasyonlardaki I_0 değer aralığı 0.06 - 3.62 kW/cm^2 olarak belirlenmiş ve bu aralıkta farklı I_0 değerleri simülasyonlarda kullanılmıştır.

2.3. Zamana Bağlı Elektronik Durum Popülasyonları İle Normalize Floresans Sinyalinin Nümerik Simülasyonu

Lazer, mikroskop ve çip parametrelerini k_{01} hızını hesaplamak amacıyla belirledikten sonra karanlık durumları içeren floresan sinyallerinin simüle edilmesi için kullanılacak hesaplamalı yöntem bu başlıkta FMN molekülünün fotofiziksel modeli için örneklenmiştir. Şekil 2(a)'da FMN için verilen 5 temel elektronik durum ve bu durumlar arası geçiş hızları 1. mertebeden lineer diferansiyel denklem sistemi olarak ele alınıp, aynı yöntem FAD molekülüne uyarlanarak sayısal çözümler yapılmıştır. Diferansiyel denklem sisteminin çözümü özdeğer ve özvektör problemi olarak ele alınmış olup elektronik durum popülasyonlarını gösteren $\bar{S}(t)$ vektörü aşağıdaki ifade ile yazılabilmektedir [35]:

$$\frac{d}{dt}\bar{S}(t) = M \cdot \bar{S}(t) \qquad (7)$$

$$\frac{\mathrm{d}}{\mathrm{dt}}\begin{bmatrix}\mathrm{S_0(t)}\\ \mathrm{S_1(t)}\\ \mathrm{T(t)}\\ \mathrm{R(t)}\\ \mathrm{B(t)}\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}-\mathrm{k_{01}} & \mathrm{k_{10}} & \mathrm{k_t} & \mathrm{k_{ox}} & 0\\ \mathrm{k_{01}} & -\mathrm{k_{10}}-\mathrm{k_{isc}}-\mathrm{k_{red}} & 0 & 0 & 0\\ 0 & \mathrm{k_{isc}} & -\mathrm{k_t} & 0 & 0\\ 0 & \mathrm{k_{red}} & 0 & -\mathrm{k_{ox}}-\mathrm{k_b} & 0\\ 0 & 0 & 0 & \mathrm{k_b} & 0\end{bmatrix}\cdot\begin{bmatrix}\mathrm{S_0(t)}\\ \mathrm{S_1(t)}\\ \mathrm{T(t)}\\ \mathrm{R(t)}\\ \mathrm{B(t)}\end{bmatrix} \quad (\mathbf{8})$$

Denklem 7'de yer alan $\bar{\mathrm{S}}(\mathrm{t})$ zamana bağlı elektronik durum popülasyon vektörünü temsil etmektedir, M ise bu durumlar arasındaki elektronik geçiş hızlarını kapsayan bir birleştirme matrisidir. FMN'nin fotofiziksel modeli baz alınarak M matrisi açık bir şekilde Denklem 8'deki gibi yazılmaktadır. FMN moleküllerinin elektronik durum popülasyonları olasılık değeri olarak göz önüne alındığında $\mathrm{S_0(t)+S_1(t)+T(t)+R(t)+B(t)=1}$ $\forall \mathrm{t}$ koşulunun sağlanması gerekir. FMN molekülleri, $\mathrm{t}=0$ anında henüz uyarım alanından geçmedikleri ve lazerle uyarılmamış oldukları için elektronların tamamen taban durumunda ($\mathrm{S_0}$) olduğu varsayılır [6] ve $\mathrm{S_0}$ değeri bu durumda 1 olarak alınır. Elektronik durum vektörü için nümerik olarak çözülecek olan özdeğer-özvektör probleminde bu nedenle başlangıç koşulu vektör formunda aşağıdaki gibi ifade edilebilmektedir:

$$\begin{bmatrix}\mathrm{S_0(t)}\\ \mathrm{S_1(t)}\\ \mathrm{T(t)}\\ \mathrm{R(t)}\\ \mathrm{B(t)}\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}1\\ 0\\ 0\\ 0\\ 0\end{bmatrix} \quad (\mathbf{9})$$

$\mathrm{t}=0$'da başlatılan sabit bir uyarım sonrasında FMN moleküllerinin herhangi bir t anında floresan ışıma yapan $\mathrm{S_1}$ durumunda bulunma olasılığı aşağıda verilen denklem ile hesaplanmaktadır [19]:

$$\mathrm{S_1(t)}=\frac{\mathrm{k_{01}}}{\mathrm{k_{01}}+\mathrm{k_{10}}}\left[1-e^{-\lambda_{ab}t}-\sum_{\mathrm{i=1}}^{\mathrm{p}}\left(\mathrm{A_i}-\mathrm{A_i}\mathrm{e}^{-\lambda_\mathrm{i}\mathrm{t}}\right)\right] \quad (\mathbf{10})$$

Bu denklemde yer alan p, $\mathrm{S_0}$ ve $\mathrm{S_1}$ dışındaki karanlık durum sayısını, λ_{ab} ve λ_i özdeğerleri ve $\mathrm{A_i}$ ise kararlı durumdaki elektronik durum popülasyonlarının genlik değerlerini göstermektedir. Lazer ışınlarındaki fotonların düzensiz dağılımının singlet $\mathrm{S_0}$ - $\mathrm{S_1}$ durumları arasındaki denge süresi (anti-bunching) $\tau_{ab}=1/\lambda_{\mathrm{ab}}$ ile elde edilmektedir [44]. Bu ifade $\lambda_{\mathrm{ab}}=1/(k_{01}+\mathrm{k_{10}})$ şeklinde tanımlanmaktadır [45-47]. $\mathrm{S_0(t=0)}=1$ başlangıç koşulunu kullanarak λ_i ve $\mathrm{A_i}$ değerleri, Şekil 2(a)'da görülen $\mathrm{S_0}$, $\mathrm{S_1}$, T, R ve B popülasyonları, Denklem 8'de verilen elektronik geçiş parametreleri cinsinden analitik olarak çözülmüştür. Denklem 10'da zamana bağlı olan $\mathrm{k_{01}(t)}$ hızı moleküllerde floresan ışımanın görüldüğü $\mathrm{S_1(t)}$ popülasyonunu etkileyen en önemli parametredir. Mikroakışkan çipte uyarılan floroforların ışıma yapması ve karanlık durumlara geçmesi durumunda $\mathrm{S_1(t)}$ popülasyonu doğrudan etkilenmektedir. Moleküller uyarım alanı üzerinde hareket ederken simüle edilen/kaydedilen görüntülerde çip uzunluğu ve genişliği boyunca yer alan her piksel farklı $\mathrm{I(x,y)}$ değerine sahip olacağından Denklem 10'da verilen $\mathrm{k_{01}(t)}$ hızı her $\mathrm{I(x,y)}$ için farklı ancak birbirine yakın değerler almaktadır. Floresans sinyal şiddetinin zamana bağlı simülasyonunda ilk olarak toplam 512 piksel değerine sahip çip uzunluğu boyunca, $\mathrm{I(t=x/v,0)}$ sinyali $\mathrm{y}=0$ için Denklem 4 ile elde edildikten sonra bulunan $\mathrm{I(t,0)}$ değeri Denklem 1 içinde kullanılarak $\mathrm{k_{01}(t)}$ değerleri zamana bağlı olarak hesaplanmıştır. Aynı simülasyon çip genişliği boyunca yer alan 233 piksel için bir döngü algoritması içinde tekrar edilerek $\mathrm{k_{01}(t)}$ değerleri $y=L=$100.19 μm'ye ulaşana dek elde edilmiştir. Her piksel için hesaplanan $\mathrm{k_{01}}$ hızları Denklem 10 içinde kullanılarak 512 x 233 piksel^2 boyutunda oluşturulan başka bir 2 boyutlu grid içinde $\mathrm{S_1(t)}$ popülasyonları elde edilmiştir. Şekil 3(c) ve 3(d)'deki görüntülerde kameranın grid içindeki her bir piksel için ölçebileceği, zamana bağlı ortalama floresan sinyali ($\mathrm{F_{ort}(t)}$) aşağıdaki denklemle elde edilmektedir:

$$\mathrm{F_{ort}(t)}=\mathrm{k_{10}}\mathrm{q_f}q_D\mathrm{S_1(t)} \quad (\mathbf{11})$$

Denklem 11'de verilen $\mathrm{q_f}$ ve $\mathrm{q_D}$ sırasıyla floresans kuantum verimi ve kameranın floresans algılama kuantum verimi olarak bilinen sabit terimlerdir. Flavinler için normalize floresan sinyalleri ($\mathrm{F_{norm}(t)}=\mathrm{F_{ort}(t)}\,/\,\mathrm{F_{ort_{max}}(t)}$) simüle edileceği için $\mathrm{q_f}$ ve $\mathrm{q_D}$ terimleri birbirini yok etmektedir ve bu terimlerin simüle edilen eğrilere bir katkısı bulunmamaktadır. Bu çalışmada FMN ve FAD molekülleri için simüle edilen görüntü verileri üzerinden moleküllerin akış yönü boyunca $\mathrm{F_{norm}(t)}$ sinyalleri hesaplanarak analizler yapılmıştır. Elde edilen normalize floresans sinyali $\mathrm{F_{norm}(t)}$ Şekil 3(e)'de örneklenmiştir. $\mathrm{F_{norm}(t)}$ sinyalinin zamana bağlı değişim grafiğinin lazerin uyarım profilinden farklı olduğu durumlarda, bu değişimlerin fiziksel sebeplerinin hangi karanlık durumlara geçişlerden kaynaklandığı bulgular ve tartışma kısmında detaylıca açıklanmıştır.

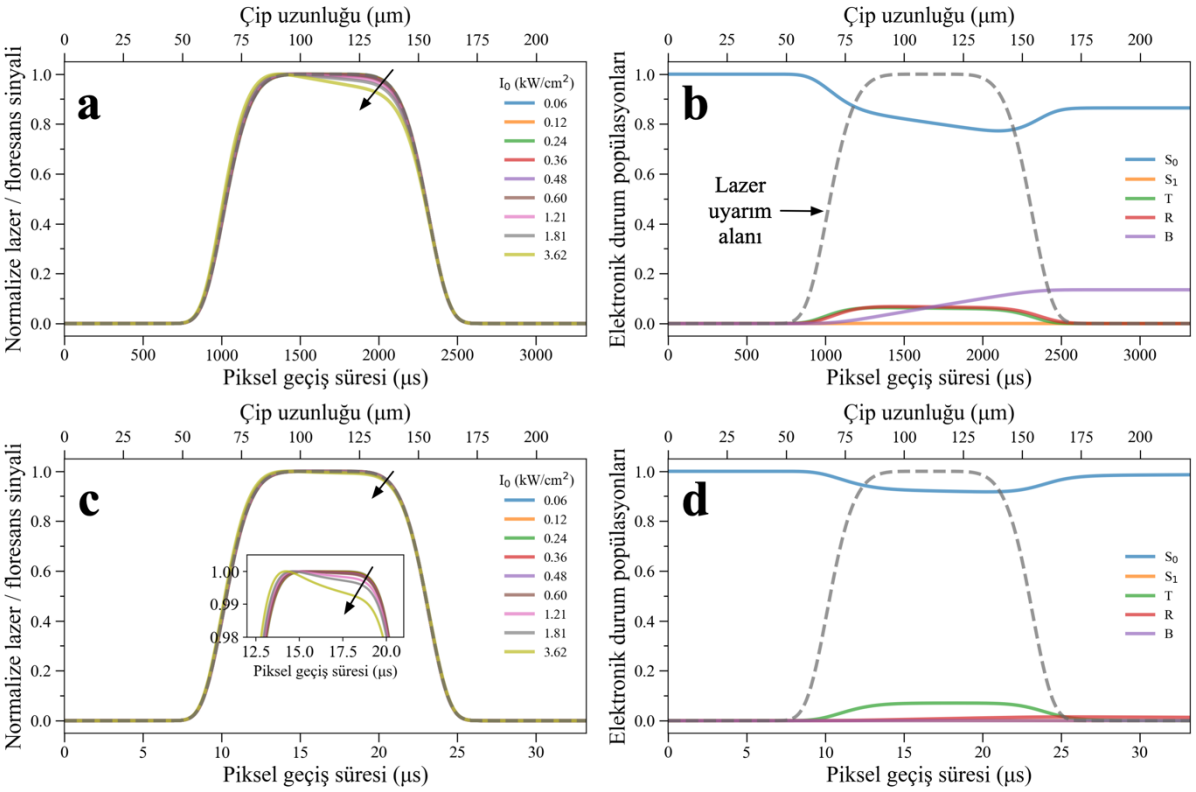
III. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. FMN Molekülü İçin Simülasyon Sonuçları

488 nm dalga boylu, düz tepeli lazer uyarımı alanından farklı akış hızlarında geçen FMN moleküllerinin normalize floresans sinyalleri Şekil 2(a)'da verilen fotofiziksel model kullanılarak ve Denklem 11 normalize edilerek farklı koşullar için simüle edilmiştir. Tornmalm ve Widengren tarafından TRAST kullanılarak belirlenmiş fotofiziksel geçiş hızları, önerilen mikroakışkan temelli floresans mikroskop sistemine uyarlanarak hangi elektronik geçişlerin net bir şekilde gözlemlenebileceği test edilmiştir. TRAST yöntemi ile elde edilen tüm ölçüm parametreleri Tablo 1, 2, 3 ve 4'te listelenmiştir [35]. FMN floroforu için ilk olarak I_0 etkisi araştırılmış olup 20 µL/dk ve 2000 µL/dk akış hızları için simüle edilen normalize floresans sinyali eğrilerinde kullanılan parametreler Tablo 1'de, simülasyon sonuçları ise sırasıyla Şekil 4(a) ve (c)'de verilmiştir. 20 µL/dk akış hızıyla uyarım alanından geçen FMN floroforuna ait normalize floresans sinyal eğrisinin lazer uyarım alanı boyunca I_0 şiddetinin artmasıyla kademeli olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Lazerin konumlandığı bölgede normalize sinyal genliğindeki zamana bağlı azalmanın sebebinin floresan ışıma yapan S_1 durumundan karanlık T, R ve B durumlarına geçişlerden kaynaklandığı açıktır. 20 µL/dk gibi bir akış hızında lazer uyarım şiddetine oldukça hassas olan FMN molekülü lazer uyarım alanından ortalama 1500 µs gibi

Tablo 1. FMN molekülünün elektronik durumlarına I_0 değerinin etkisinin araştırılmasında kullanılan molekül akış hızları ve fotofiziksel parametreler.

Akış hızları (µL/dk)	τ_{FMN} (ns)	k_{isc} (μs^{-1})	k_t (μs^{-1})	k_{red} (μs^{-1})	k_{ox} (μs^{-1})	k_b (μs^{-1})
20-2000	4.7	82	0.81	0.017	0.020	0.0016



Şekil 4. (a) Akış hızı 20 µL/dk olan FMN molekülünün normalize floresans sinyalinin farklı lazer uyarım şiddetlerinde incelenmesi, **(b)** aynı akış hızında FMN molekülünün elektronik durum popülasyonlarının 3.62 kW/cm^2 uyarım şiddeti altında zamana göre değişimi. **(c)** Akış hızı 2000 µL/dk olan FMN molekülünün normalize floresans sinyalinin farklı lazer uyarım şiddetlerinde incelenmesi, **(d)** aynı akış hızında FMN molekülünün elektronik durum popülasyonlarının 3.62 kW/cm^2 uyarım şiddeti altında zamana göre değişimi. 4 grafikte de yer alan gri kesikli çizgi karanlık durumların olmadığı, lazerin kendi uyarım profilini göstermektedir.

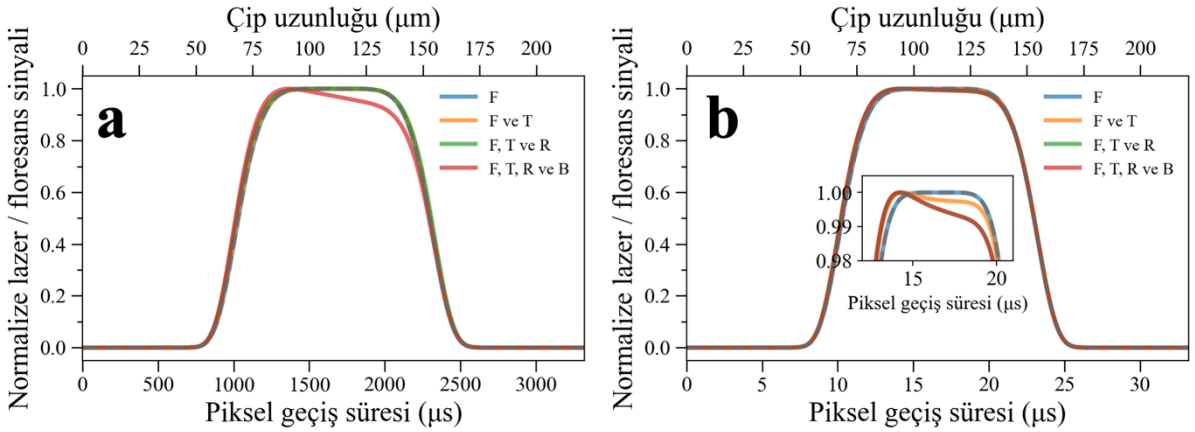
bir sürede geçişini tamamlamaktadır ve bu süre içinde ışıkla ağararak foto-bozunuma uğrayıp B durumuna geçiş yapması beklenmektedir. Şekil 4(c)'de 2000 µL/dk akış hızı için simüle edilen normalize sinyallerdeki zamana bağlı bu düşüş daha zayıftır.

Her iki akış hızında da hangi spesifik karanlık duruma geçişin sinyal genliğinde düşüşe sebep olduğunu anlamak amacıyla bütün elektronik durum popülasyonlarının zamana bağlı değişim grafikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. 3.62 kW/cm^2 uyarım şiddeti altında uyarılan FMN molekülü için 20 µL/dk ve 2000 µL/dk akış hızındaki $S_0(t)$, $S_1(t)$, $T(t)$, $R(t)$ ve $B(t)$ popülasyonları Şekil 4(b) ve (d)'de sırasıyla verilmiştir. Her iki akış hızında FMN moleküllerinin lazer uyarım alanına girmeden önce moleküllerin tamamen S_0 durumunda olduğu açıkça görülmektedir. 20 µL/dk akış hızında (Şekil 4(b)) bu moleküller uyarım alanına girmeye başladığı andan itibaren S_0 durumundaki FMN molekülleri ışıkla uyarılarak S_1 durumuna ve hemen akabinde karanlık T, R ve B durumlarına da geçiş yapmaya başlamıştır. Düşük akış hızında bile moleküllerin R durumuna geçmeden önce T durumuna geçtikleri açıkça görülmektedir. Bu sonuç oldukça anlamlıdır çünkü T durumuna geçişler yalnızca birkaç µs sürerken, redoks radikallerinin oluşumu ms'ler içinde gerçekleşmektedir. Moleküller uyarım alanının en düz tepeli kısmına ulaştığında ise geri dönüşü olmayan B durumuna geçişlerin yüksek oranda artışı açık bir şekilde ortaya çıkmıştır. FMN moleküllerinin bir kısmı lazer uyarım alanından uyarılarak çıktıkları bölgede B durumuna geçerek foto-bozunuma uğradıkları için S_0 popülasyonunda başlangıca göre yaklaşık %10 oranında düşüş gözlemlenmiştir. Diğer yandan T, R ve B popülasyonlarına kıyasla S_1 popülasyonu uyarım alanı bölgesinde oldukça düşüktür ancak popülasyon değeri 0'a eşit değildir, bu sebeple diğer popülasyonlara kıyasla sinyal eğrisi düz çizgi olarak gözlemlenmiştir. Bu davranış fiziksel olarak oldukça

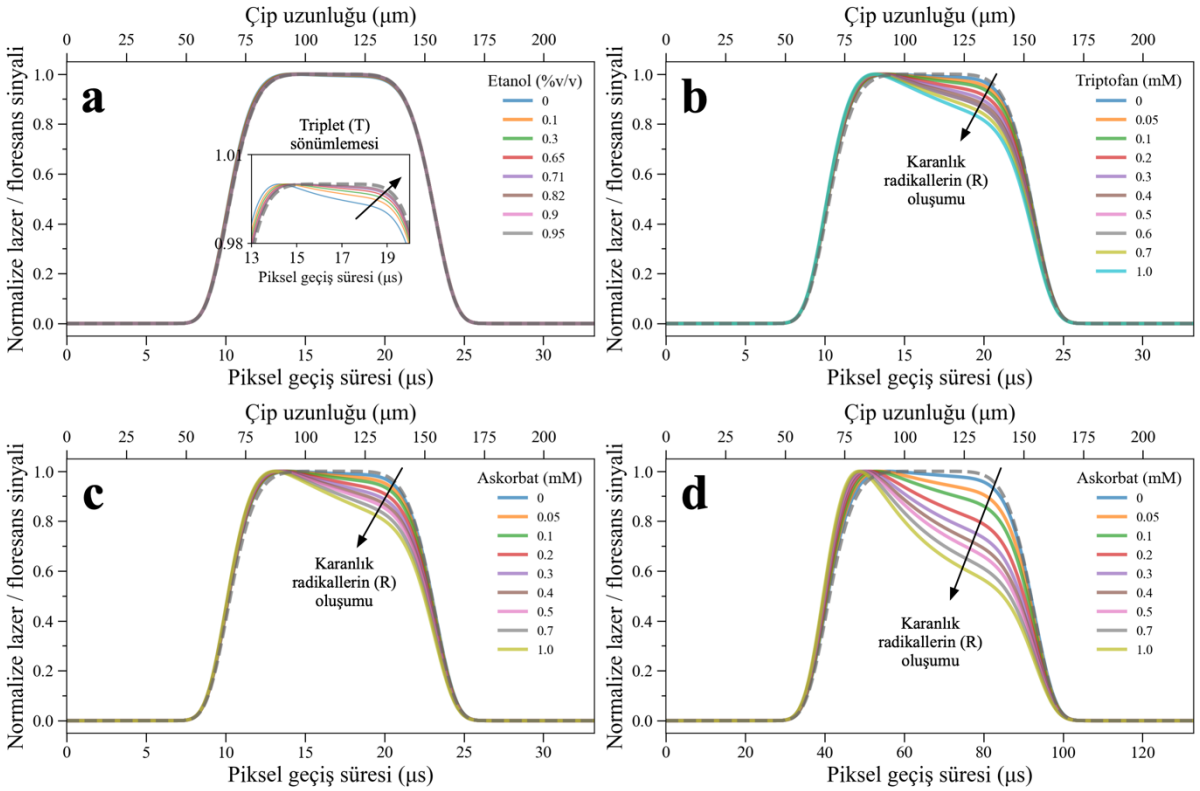
Tablo 2. FMN molekülünün elektronik durumlarına farklı konsantrasyonlarda eklenen etanol, askorbat ve triptofan moleküllerinin etkisinin araştırılmasında kullanılan molekül akış hızları ve fotofiziksel parametreler.

Eklenen Molekül	C* (%v/v-mM)	Akış hızları (µL/dk)	τ_{FMN} (ns)	k_{isc} (μs^{-1})	k_t (μs^{-1})	k_{red} (μs^{-1})	k_{ox} (μs^{-1})	k_b (μs^{-1})
Etanol	0.0	20-2000	4.7	82	0.81	0.017	0.030	0.0016
	0.1				1		0.025	
	0.3				1.20		0.021	
	0.65				1.52		0.018	
	0.71				1.98		0.015	
	0.82				2.48		0.013	
	0.9				3.04		0.011	
	0.95				3.62		0.009	
Askorbat	0.0	20-2000	4.7	82	0.72	0.027	0.019	0.0018
	0.05					0.077		
	0.1					0.127		
	0.2					0.227		
	0.3					0.327		
	0.4					0.427		
	0.5					0.527		
	0.7					0.727		
	1.0					1.027		
Triptofan	0.0	20-2000	4.7	82	0.76	0.035	0.028	0.0016
	0.05					0.085		
	0.1					0.135		
	0.2					0.235		
	0.3					0.335		
	0.4					0.435		
	0.5					0.535		
	0.6					0.635		
	0.7					0.735		
	1.0					1.035		

*C eklenen molekülün konsantrasyon değerini temsil etmektedir.



Şekil 5. (a) 20 µL/dk ve **(b)** 2000 µL/dk akış hızıyla 3.62 kW/cm^2 uyarım şiddeti altında lazer uyarım alanından geçen FMN moleküllerinin normalize sinyal eğrilerine triplet (T), radikal (R) ve ışıkla ağarma (B) durumlarının tekil etkisi. Gri kesikli çizgi karanlık durumların olmadığı, lazerin kendi uyarım profilini göstermektedir.



Şekil 6. Maksimum lazer uyarım şiddeti (3.62 kW/cm^2) altında 2000 µL/dk akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FMN moleküllerinin normalize floresans sinyallerine farklı kütle fraksiyonlarında **(a)** etanol, **(b)** triptofan ve **(c)** askorbat moleküllerinin etkisi. **(d)** Aynı uyarım şiddeti altında askorbat etkisinin 500 µL/dk akış hızında incelenmesi. Gri kesikli çizgi karanlık durumların olmadığı, lazerin kendi uyarım profilini göstermektedir.

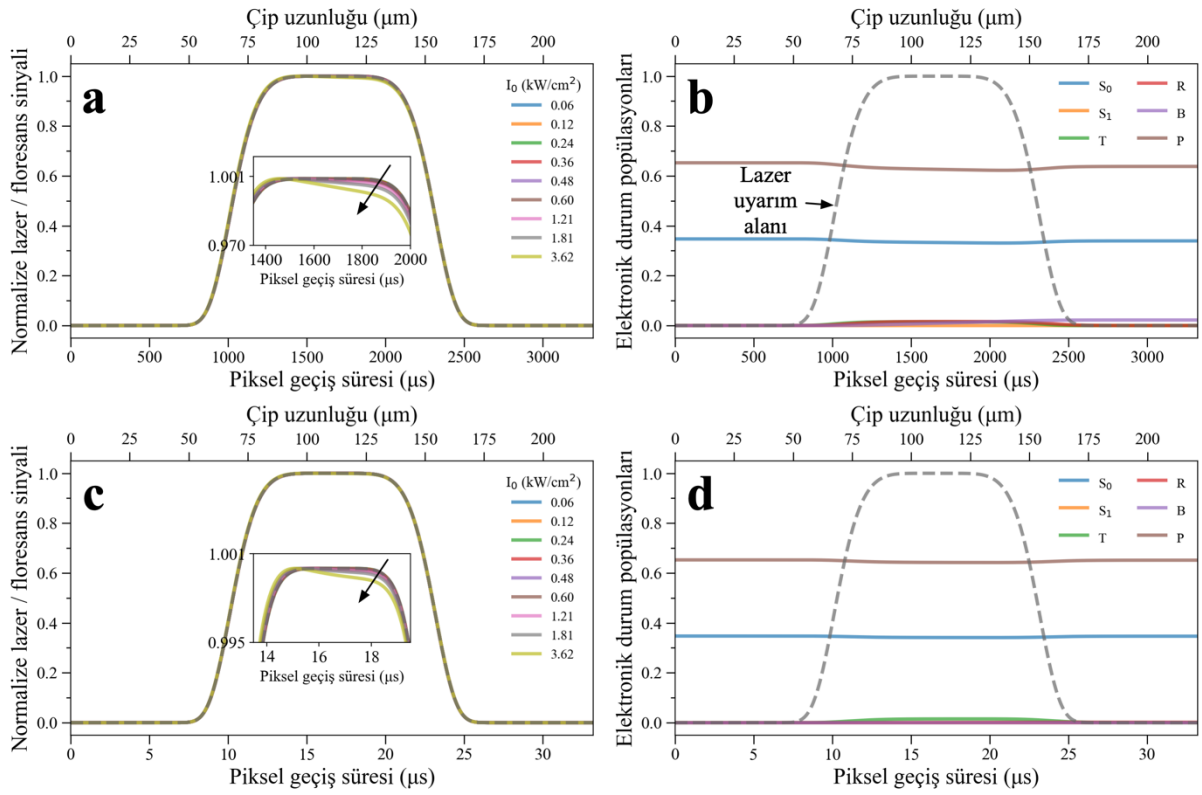
anlamlıdır ve FMN molekülünün neden zayıf ışıma yaptığını açık bir şekilde göstermektedir. Şekil 4(d)'de FMN molekülleri için 2000 µL/dk akış hızında simüle edilen elektronik durum popülasyonlarına bakıldığında ise T durumuna geçişlerin diğer karanlık durumlara göre çok daha belirgin bir şekilde görüldüğü ortaya çıkmıştır. Yüksek hızda hareket eden FMN molekülleri uyarım alanından yalnızca birkaç µs içinde geçtikleri için ms zaman skalasında gerçekleşen foto-bozunum veya redoks reaksiyonlarına girecek süreye sahip değillerdir. Bu sebeple simüle edilen R ve B popülasyonlarının T popülasyonuna göre çok daha düşük seviyede olduğu gözlemlenmiştir. 2000 µL/dk akış hızı için yapılan elektronik popülasyon

simülasyonlarında S_1 popülasyonunun 20 µL/dk akış hızında elde edilene göre bir miktar daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle Şekil 4(c)'deki normalize floresans sinyallerinin genlik değerlerindeki zayıflamanın Şekil 4(a)'da simüle edilen eğrilere göre daha az olduğu anlaşılmıştır.

Bu bulguları doğrulamak amacıyla Şekil 2(a)'da sunulan fotofiziksel modeldeki her bir karanlık durumun iki farklı akış hızındaki tekil etkisi ayrıca araştırılmıştır ve 3.62 kW/cm^2 uyarım şiddeti altında simüle edilen normalize floresans sinyalleri Şekil 5(a) ve (b)'de 20 µL/dk ve 2000 µL/dk akış hızları için sırasıyla verilmiştir. Her iki grafikte de F sinyali (mavi çizgi) tüm karanlık durumların ihmal edildiği normalize floresans sinyalini, F ve T sinyali (turuncu çizgi) F ile tek karanlık durum olarak tripletin var olduğu sinyali, F, T ve R sinyali (yeşil çizgi) F ile birlikte triplet ve radikal durumların var olduğu sinyali, F, T, R ve B (kırmızı çizgi) ise floresans sinyali dahil diğer tüm karanlık durumların var olduğu sinyali göstermektedir. Şekil 5(a)'da sunulduğu gibi 20 µL/dk akış hızı boyunca simüle edilen normalize sinyaldeki genliğin azalmasının temel sebebi FMN moleküllerinin geri dönüşü olmayan B durumuna geçişleridir ve bu analiz önceki simülasyon sonuçlarını doğrulamaktadır [48]. B durumuna geçişin ihmal edilip yalnızca T ve/veya R durumları kullanılarak simüle edilen sinyaller (turuncu ve yeşil sinyaller) molekülün yalnızca F sinyaliyle (mavi sinyal) kıyaslandığında aralarında büyük bir fark olmadığı anlaşılmıştır. Yalnızca sürekli lazer uyarımının olduğu, redoks reaksiyonuna sebep olan ek ajan moleküllerinin eklenmediği bir deney ortamında R durum popülasyonunun önemli derecede değişmesi beklenmemektedir, dolayısıyla bu bulgular oldukça anlamlıdır. FMN moleküllerinin 2000 µL/dk akış hızında F ile yalnızca T durumunun dahil edilerek simüle edildiği eğriden T durumuna geçişler Şekil 5(b)'de net bir biçimde ayırt edilebilmektedir. Bu tür yüksek akış hızında moleküller birkaç µs içinde uyarım alanında geçtiklerinden dolayı T durumuna geçişlerin çözümlenebilmesi beklenmektedir. R ve B durumlarına geçişlerin var olduğu sinyal eğrileri yalnızca tripletin olduğu (turuncu) eğri ile birbirine yakındır. Yalnızca B durumunun ihmal edildiği simülasyon eğrisi (yeşil) ile B durumunun dahil edildiği simülasyon eğrisinin (kırmızı) üst üste binmesi, B durumunun bu akış hızında etkisiz olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu hız değerinde molekülün uyarım alanından geçiş süresi floroforların ışıkla ağarması için yeterli değildir ve foto-bozunum önlenmektedir. Bu çalışma sonuçları önerilen yöntemin FMN gibi ışığa duyarlı olan otofloresan koenzimlere ait karanlık elektronik durum popülasyonlarının hangi akış hızlarında ölçülebileceğini ve hangi deneysel parametrelerle manuel şekilde kontrol edilebileceğini ispatlamıştır.

FMN moleküllerinde T popülasyonu ortamdaki oksijen konsantrasyonuna doğrudan bağlıdır ve moleküler oksijen T popülasyonunu sönümleyebilme (triplet quenching) özelliğine sahiptir [49]. FMN çözeltisine farklı hacim fraksiyonlarında etanol eklendiğinde oksijen çözünürlüğünün kontrol edilebileceği tartışılmaktadır. FMN çözeltisine eklenen etanolün T durumuna etkisi TRAST ile araştırılmış olup bu yöntemle elde edilen fotofiziksel parametreler Tablo 2'de verilmiştir. Bu çalışmada sunulan spektroskopik yöntem kullanılarak FMN molekülündeki karanlık T durumunun çözeltiye eklenen etanol miktarı ile kontrol edilip edilemeyeceğini ortaya çıkarmak amacıyla nümerik simülasyonlar yapılmıştır ve sonuçlar Şekil 6(a)'da sunulmuştur. 3.62 kW/cm^2 lazer uyarım şiddeti altında ve 2000 µL/dk akış hızında FMN çözeltisindeki etanol miktarının artırılmasıyla ortamda oksijen konsantrasyonu artmıştır. Bu artışa bağlı olarak T popülasyonunun giderek azaldığı ve 95 %v/v etanol kütle fraksiyonuna ulaşıldığında ise T durumunun neredeyse tamamen sönümlendiği açıkça gözlemlenmiştir. Bu bulgular önerilen yöntemin FMN molekülünün T popülasyonunu kontrol edebilme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.

T'nin yanı sıra enzimatik reaksiyonlarda aktif olarak rol alan FMN molekülleri için radikal durumların oluşumları test edilmiştir. Tornmalm ve Widengren, FMN çözeltisine farklı konsantrasyonlarda triptofan ile askorbat ekleyerek FMN molekülünde radikal durumların nasıl etkilendiğini araştırmıştır ve buldukları fotofiziksel geçiş hızları Tablo 2'de raporlanmıştır. Redoks ajanlarının varlığında tekrar belirlenen geçiş hızları, bu çalışmada önerilen mikroskop sisteminde kullanılarak normalize sinyal eğrileri simüle edilmiştir. Şekil 6(b) ve (c)'de görüldüğü gibi FMN çözeltisindeki triptofan ve askorbat miktarı sistematik olarak artırıldığında karanlık R durumuna olan geçişlerin artması sebebiyle normalize sinyal eğrilerinde önemli miktarda zayıflama gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar TRAST yöntemiyle elde edilen deneysel bulgularla oldukça uyumludur [35]. Genlik değerindeki bu azalmanın temel sebebi statik sönümleme olup bu fiziksel fenomen simüle edilen floresans sinyalinde şiddetli zayıflama olarak ortaya çıkmıştır [50]. Triptofan ve askorbat eklendiğinde T durumundan R durumuna elektron transferine bağlı olarak foto-indirgenmiş radikallerin oluştuğu düşünülmektedir ve bu radikallerin oluşması 2000 µL/dk gibi yüksek akış hızında bile normalize floresans sinyal genliğinde düşüşe sebep olmuştur. Askorbat konsantrasyonuna bağlı bu etkinin daha düşük bir



Şekil 7. (a) Akış hızı 20 µL/dk olan FAD molekülünün normalize floresans sinyalinin farklı lazer uyarım şiddetlerinde incelenmesi, **(b)** aynı akış hızında FAD molekülünün elektronik durum popülasyonlarının 3.62 kW/cm^2 uyarım şiddeti altında zamana göre değişimi. **(c)** Akış hızı 2000 µL/dk olan FAD molekülünün normalize floresans sinyalinin farklı lazer uyarım şiddetlerinde incelenmesi, **(d)** aynı akış hızında FAD molekülünün elektronik durum popülasyonlarının 3.62 kW/cm^2 uyarım şiddeti altında zamana göre değişimi. 4 grafikte de yer alan gri kesikli çizgi karanlık durumların olmadığı, lazerin kendi uyarım profilini

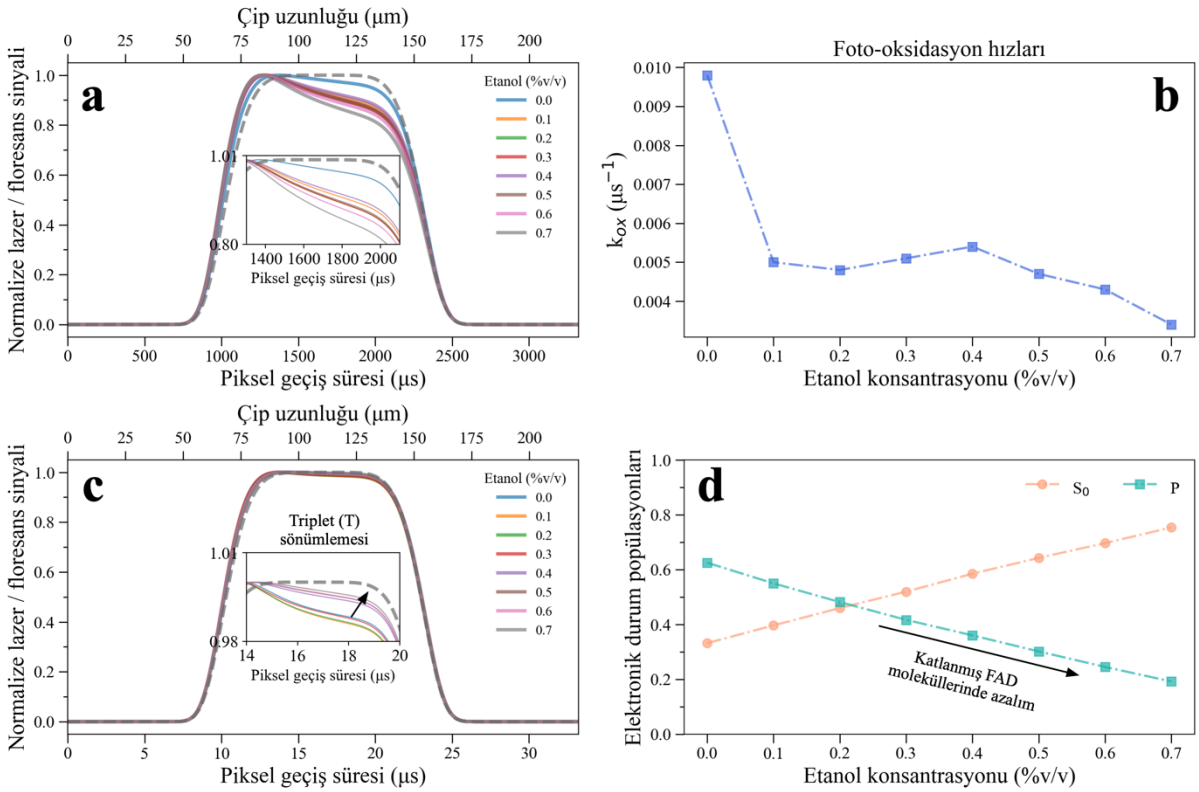
molekül akış hızında da (500 µL/dk) gözlemlenebildiği Şekil 6(d)'de ayrıca araştırılmıştır. Bu akış hızında FMN molekülleri uyarım alanından daha uzun sürede geçtikleri için foto-indirgenmiş radikal R popülasyonlarının daha fazla elektron kazanarak artması ve floresans ışıma değerini daha yüksek oranda düşürmesi oldukça anlamlı bir sonuçtur.

3.2. FAD Molekülü İçin Simülasyon Sonuçları

FMN koenzimlerinde fotofiziksel geçişler kapsamlı bir biçimde incelendikten sonra farklı bir flavin türevi olan FAD molekülü için benzer simülasyonlar yapılmıştır. FAD koenzimi için yapılan simülasyonlarda Şekil 2(b)'deki fotofiziksel model referans alınarak, her bir elektronik durum popülasyonu için Denklem 7 ve 9 nümerik olarak Python ortamında çözdürülmüştür. Analizlerde ilk adım olarak I_0 etkisi araştırılmış olup 20 µL/dk ve 2000 µL/dk akış hızları için simüle edilen normalize floresans sinyali eğrilerinde kullanılan parametreler Tablo 3'te, grafik veriler ise sırasıyla Şekil 7(a) ve (c)'de verilmiştir. FMN'ye benzer şekilde, 20 µL/dk akış hızıyla uyarım alanından geçen FAD moleküllerine ait normalize floresans sinyal eğrilerinin lazer uyarım alanı boyunca I_0 şiddetinin artmasıyla kademeli olarak azaldığı ortaya çıkmıştır. Aynı trend 2000 µL/dk akış hızı için de gözlemlenmiştir. FAD molekülleri bu yüksek akış hızında karanlık durumlara geçebilmek için yeterli zamana sahip olmadığı için genlikteki azalım daha düşük çıkmıştır. Ancak bu iki akış hızında da elde edilen normalize genlik değerindeki azalımın FMN molekülüne kıyasla (Şekil 4(a) ve (c)) çok daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu

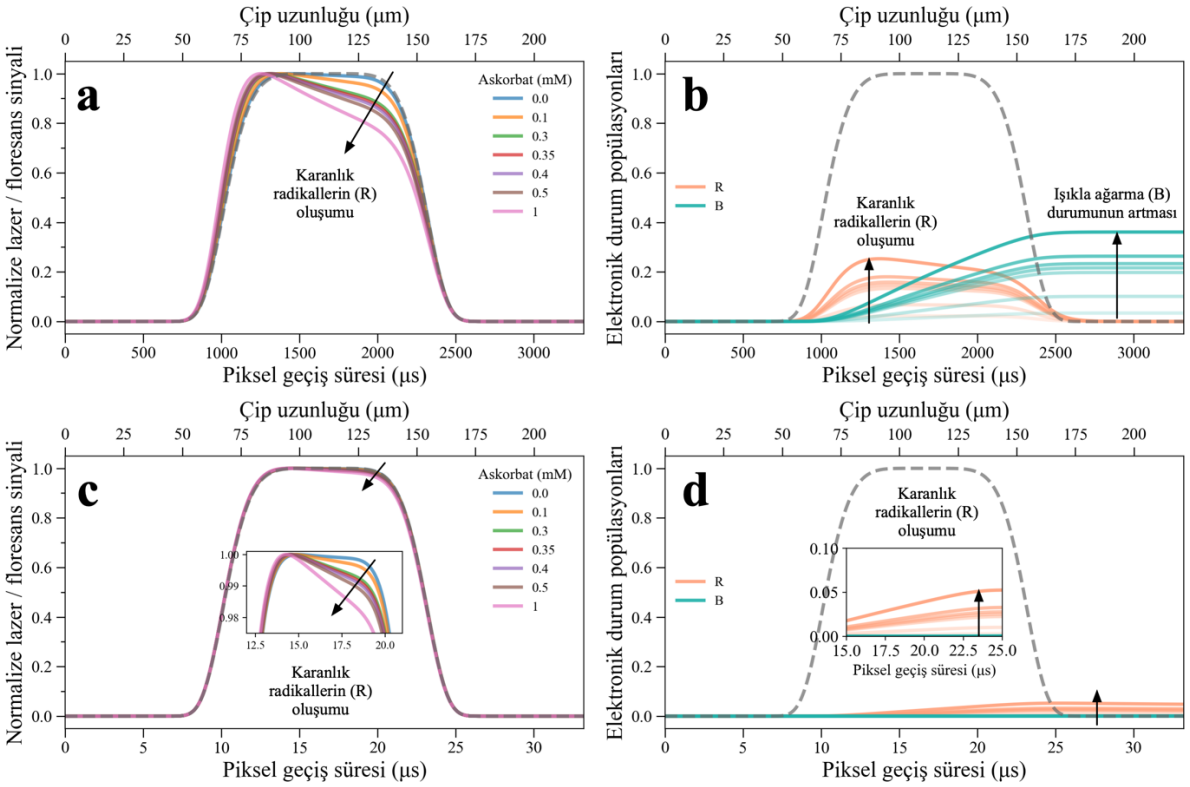
Tablo 3. FAD molekülünün elektronik durumlarına I_0 değerinin etkisinin araştırılmasında kullanılan molekül akış hızları ve fotofiziksel parametreler.

Akış hızları (µL/dk)	τ_{FAD} (ns)	k_{isc} (μs^{-1})	k_t (μs^{-1})	k_{red} (μs^{-1})	k_{ox} (μs^{-1})	k_b (μs^{-1})	k_{stack} (μs^{-1})	$k_{un-stack}$ (μs^{-1})
20-2000	2.7	82	0.81	0.010	0.0081	0.0011	62	33



Şekil 8. (a) Maksimum lazer uyarım şiddeti (3.62 kW/cm^2) altında 20 µL/dk akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FAD moleküllerinin normalize floresans sinyallerine farklı kütle fraksiyonlarında etanol etkisi. **(b)** Foto-oksidasyon hızının etanol konsantrasyonuna göre değişimi. **(c)** Maksimum lazer uyarım şiddeti (3.62 kW/cm^2) altında 2000 µL/dk akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FAD moleküllerinin normalize floresans sinyallerine farklı kütle fraksiyonlarında etanol etkisi. **(d)** Farklı etanol fraksiyonlarında S_0 ve P popülasyonlarının değişimi. **(a)** ve **(c)**'de gri kesikli çizgi ile gösterilen sinyal karanlık durumların oluşmadığı, lazer uyarımının normalize sinyalini göstermektedir.

durumun bir sebebi FAD molekülünün floresan ışıma ömrünün (τ_{FAD} = 2.7 ns) FMN molekülünün ışıma ömründen (τ_{FMN} = 4.7 ns) çok daha kısa olmasıdır. Bir diğer sebebi ise FAD molekülünde yer alan adenin grubunun izoalloksazin halkasına çarparak oluşturduğu katlanmış yapıda (P durumunda) bulunma olasılığıdır. FAD molekülleri farklı akış hızlarında lazer uyarım alanının dışında da S_0 ve P durumunda bulunma olasılığına sahiptir. Bu elektronik durum popülasyonlarının zamana göre değişim grafikleri 20 µL/dk ve 2000 µL/dk akış hızları için Şekil 7(b) ve (d)'de sırasıyla verilmiştir. Elde edilen grafiklerde görüldüğü gibi FAD moleküllerinin iki akış hızında da P durumunda bulunma olasılığı S_0, S_1, T, R ve B durumlarında bulunma olasılıklarına göre çok daha yüksektir. FMN molekülüne kıyasla FAD koenzimlerinde çok daha düşük oranda oluşan floresan S_1 durumundan T, R ve B durumlarına geçişler daha zayıftır ve bu durum Şekil 7(a) ve (c)'deki zayıf genlik kaybına sebebiyet vermektedir. Şekil 7(b)'de görüldüğü üzere 20 µL/dk gibi yavaş akış hızlarında FAD molekülü için T, R ve B popülasyonlarının artışı açıkça gözlemlenmiştir. 2000 µL/dk gibi daha yüksek akış hızlarında ise T geçişleri oldukça net bir şekilde ortaya çıkmıştır. Bu sonuç ile FMN'e göre çok daha zayıf olan FAD gibi koenzimlerin karanlık durumlara geçişlerinin farklı akış hızlarında ayrı ayrı çözümlenebileceği ispatlanmıştır. Lazer uyarım alanına girmeden önce, katlanmış durumda olan FAD molekül popülasyonunun (P) katlanmamış açık yapıdaki molekül popülasyonuna (S_0) oranı 65:35 olarak bulunmuş olup bu sonuç TRAST yöntemi ve farklı deneysel yöntemler ile elde edilen oranlara oldukça yakındır [35, 51, 52]. Bu sonuca ek olarak 2000 µL/dk akış hızında uyarım alanına giren FAD'lerde P durum popülasyonunun 20 µL/dk akış hızına göre arttığı gözlemlenmiştir. Yüksek akış hızlarında FAD molekül yapısında bulunan adenin grubunun izoalloksazin halkasına çarpma olasılığı çok daha yüksek olduğu için P popülasyonundaki artış fiziksel olarak oldukça anlamlıdır. FAD molekülünün katlanma kinetiğinin kontrol edilebilirliğini tespit etmek ve karanlık durum popülasyonlarının nasıl etkilendiğini araştırmak amacıyla farklı konsantrasyonlarda etanol, sulu FAD çözeltisine eklenmiş olup TRAST yöntemi ile deneysel olarak çalışılmıştır. Bu deneylerden elde edilen



Şekil 9. Maksimum lazer uyarım şiddeti (3.62 kW/cm^2) altında 20 µL/dk akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FAD moleküllerinin **(a)** normalize floresans sinyallerine ve **(b)** R ile B popülasyonlarına askorbat etkisi. Aynı lazer uyarım şiddeti altında 2000 µL/dk akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FAD moleküllerinin **(b)** normalize floresans sinyallerine ve **(c)** R ile B popülasyonlarına askorbat etkisi. Gri kesikli çizgi ile gösterilen sinyal karanlık durumların oluşmadığı, lazer uyarımının normalize sinyalini göstermektedir. **(b)** ve **(d)**'de verilen eğrilerde askorbat konsantrasyonunun 0 mM'den 1 mM'ye artışı, renklerin açıktan koyuya doğru kademeli değişimi ile gösterilmiştir.

parametreler Tablo 4'te listelenmiştir. Şekil 8(a)'da gösterildiği gibi 20 µL/dk akış hızında hareket eden FAD moleküllerine 0.7 %v/v oranına kadar farklı konsantrasyonlarda etanol eklendiğinde eğrilerdeki değişimlerde düzenli azalım veya düzenli artış elde edilmemiştir. Normalize floresan sinyal genliğinde sistematik olmayan bu değişimin Şekil 8(b)'de sunulan ve TRAST yöntemiyle elde edilmiş olan k_{ox} değerleri ile paralel olarak değiştiği anlaşılmıştır. Kademeli olarak etanolün eklenmesi ve ortamdaki oksijen seviyesinin artması ile FAD moleküllerinde triplet durumun sönümlenmesi beklenmektedir. Bu fenomeni araştırmak amacıyla, aynı parametreler kullanılarak 2000 µL/dk akış hızıyla uyarım alanından geçen FAD molekülleri için normalize floresans sinyalleri simüle edilmiş ve bulgular Şekil 8(c)'de verilmiştir. 0 ile 0.3 %v/v arasındaki etanol konsantrasyonları için normalize floresans sinyal genliğinde artış görülmüş olup 0.3 %v/v ve üzeri etanol konsantrasyonlarında genlik kademeli olarak azalmaya başlamıştır. 0 ile 0.3 %v/v etanol değer aralığında genlikte azalma yerine artışın görülme sebebi, çözücü ortamında triplet popülasyonunu azaltmak için yeterli miktarda oksijenin çözünememesi ile açıklanabilir. Çözücü olarak suya göre daha polar olan etanol kademeli olarak eklendiğinde FAD moleküllerindeki katlanmış yapıların oluşma olasılığının azalması, yani P popülasyonunda düşüş beklenmektedir. Şekil 8(d)'de 2000 µL/dk akış hızı için simüle edilen P ve S_0 popülasyonlarının ortalama değerlerinin artan etanol konsantrasyonuna karşı nasıl değiştiği grafik veri ile sunulmuştur. Ortalama P değeri etanol konsantrasyonunun artması ile azalmış olup katlanmış durumdaki FAD moleküllerinin floresan ışıma yapabilen açık yapılar haline dönüştüğü ortaya çıkmıştır [53]. Böylelikle artan S_0 durumu ile FAD koenzimleri doğrudan karanlık P durumuna geçmek yerine S_1 durumuna geçerek floresan sinyalinde artışa sebebiyet vermiştir.

FMN gibi enzimatik reaksiyonlarda koenzim olarak rol alan FAD molekülleri için radikal grupların oluşumu ayrıca araştırılmıştır. FAD çözeltisine farklı konsantrasyonlarda askorbat eklenerek FAD koenzimlerinde radikal durumların nasıl etkilendiği TRAST spektroskopisi ile araştırılmış olup ölçülen

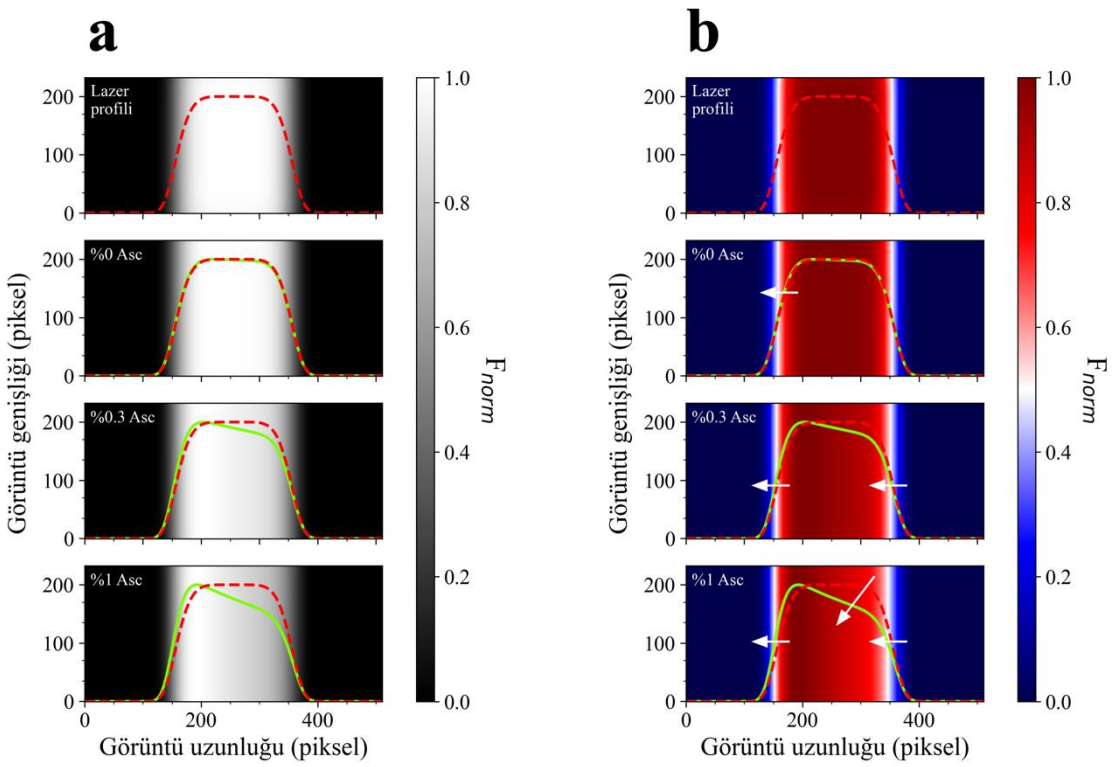
Tablo 4. FAD molekülünün elektronik durumlarına farklı konsantrasyonlarda eklenen etanol ve askorbat moleküllerinin etkisinin araştırılmasında kullanılan molekül akış hızları ve fotofiziksel parametreler. Bu parametreler kullanılarak 20 µL/dk ve 2000 µL/dk akış hızları için karşılaştırmalı simülasyonlar yapılmıştır.

Eklenen Molekül	C* (%v/v-mM)	τ_{FAD} (ns)	k_{isc} (μs^{-1})	k_t (μs^{-1})	k_{red} (μs^{-1})	k_{ox} (μs^{-1})	k_b (μs^{-1})	k_{stack} (μs^{-1})	$k_{un-stack}$ (μs^{-1})
	0.0	2.7		0.62		0.0098		62	33
	0.1	3.0		0.66		0.0050		56.3	40.7
	0.2	3.1		0.72		0.0048		50.6	48.4
Etanol	0.3	3.4	82	0.82	0.011	0.0051	0.00077	44.9	56.1
	0.4	3.5		1.12		0.0054		39.2	63.8
	0.5	3.8		1.32		0.0047		33.5	71.5
	0.6	4.0		1.44		0.0043		27.8	79.2
	0.7	4.2		1.78		0.0034		22.1	86.9
	0.0				0.017				
	0.1				0.057				
	0.3				0.137				
Askorbat	0.35	2.7	82	0.81	0.157	0.011	0.0012	52	33
	0.4				0.177				
	0.5				0.217				
	1.0				0.417				

yeni fotofiziksel geçiş hızları Tablo 4'te listelenmiştir. Bu geçiş hızları kullanılarak önerilen mikroskop sistemi için normalize floresans sinyal eğrileri ve elektronik durum popülasyonları 20 µL/dk ve 2000 µL/dk akış hızları için ayrı ayrı simüle edilmiştir. Şekil 9(a)'da görüldüğü gibi FAD çözeltisindeki askorbat miktarı 0 mM'den 1 mM'ye kademeli olarak artırıldığında karanlık R durumuna olan geçişlerin artışı sebebiyle normalize sinyal eğrilerinde önemli miktarda zayıflama gözlemlenmiştir. Bu zayıflamanın R ve B popülasyonlarındaki artıştan kaynaklandığı Şekil 9(b)'de simüle edilen popülasyon eğrileri ile ispatlanmıştır. Bu akış hızında yüksek konsantrasyonda eklenen askorbat moleküllerinin özellikle B popülasyonundaki artışı tetikleyerek foto-bozunuma sebebiyet verdiği açıkça ortaya çıkmıştır. Bu akış hızında FAD molekülleri uyarım alanından ms'ler içinde geçtikleri için foto-indirgenmiş R popülasyonlarının daha fazla elektron kazanarak artması ve floresans ışıma değerinin düşmesi oldukça anlamlı bir sonuçtur. Askorbat konsantrasyonuna bağlı bu etkinin 2000 µL/dk akış hızında nasıl değiştiği ayrıca araştırılmış ve sonuçlar Şekil 9(c) ve 9(d)'de özetlenmiştir. Bu akış hızında B durumuna geçişler tamamen önlenmiş olup normalize floresan sinyalindeki azalımın sebebinin temel olarak R durumuna olan geçişlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Şekil 9(d)). Bu sonuçlar FMN için elde edilen simülasyon sonuçları ve TRAST yöntemiyle elde edilen ölçüm verileriyle oldukça uyumludur [35]. Karanlık durum popülasyonlarındaki değişimlerin temel sebebi statik sönümleme (static quenching) mekanizması olup bu fiziksel fenomen simüle edilen floresans sinyalinde şiddetli zayıflama olarak ortaya çıkmıştır. Florofor çözeltisine askorbat kademeli olarak eklendiğinde, T durumundan R durumuna geçişlerde elektron transferine bağlı olarak foto-indirgenmiş radikallerin oluştuğu düşünülmektedir ve Şekil 9(c)'de de görüldüğü gibi bu radikallerin oluşması yüksek akış hızında bile normalize floresans sinyalinde zayıflamaya sebep olmuştur.

3.3. sCMOS Kamera Görüntü Verilerinin Isı Haritaları Yöntemi İle Karşılaştırılması

Mikroakışkan çip içinde uyarım alanından geçen FMN ve FAD molekülleri için farklı deneysel koşullarda elde edilen normalize floresan sinyalleri sCMOS kamera görüntü verisinden üretilmektedir. Deneysel ölçüm esnasında mikroskop sistemine entegre edilmiş bir kamera ile bu koenzimlere veya farklı floroforlara ait karanlık durum geçişlerinin kaydedilerek bilgisayar ekranından canlı olarak takip edilmesi mümkündür [19]. sCMOS kamera görüntü boyutları akış alanına dik yönde 233 piksel ve akış yönü boyunca 512 piksel olarak belirlenmiş olup bu görüntüler üzerinde analizler yapılmıştır. 3.62 kW/cm^2 altında 20 µL/dk akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FAD moleküllerine askorbat etkisi Şekil 10(a)'da görüntü verisi olarak sunulmuştur. Burada ilk görüntü verisi karanlık durumların oluşmadığı, yalnızca lazerin uyarım alanını



Şekil 10. 3.62 kW/cm^2 altında 20 µL/dk akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FAD moleküllerine farklı kütle fraksiyonlarında askorbat eklendiğinde oluşması beklenen kamera görüntülerinin ve normalize floresans sinyallerinin değişimleri. Simüle edilen görüntü verisinin **(a)** 2 renk ile (standart sCMOS kamera renk paleti) ve **(b)** 3 renkli ısı haritası yöntemleri ile gösterimi. Her görüntü verisinde yer alan kırmızı kesikli çizgi karanlık durumların oluşmadığı, lazerin kendi sinyalini göstermektedir.

gösterirken kırmızı kesikli çizgi ise bu uyarım alanından akış yönü boyunca elde edilen normalize uyarım sinyalini temsil etmektedir. Diğer görüntülerdeki yeşil çizgi ise akış yönü doğrultusunda görüntü verisinden elde edilen normalize floresan sinyalini temsil etmektedir. Kuvvetli redoks ajanı olan askorbatın kademeli olarak 0 mM'den 1'mM'ye artırılırken simüle edilen görüntülerin akış yönü boyunca parlaklık değerlerinin giderek zayıfladığı ve normalize floresans sinyal eğrilerinin lazerin kendi uyarım profiline göre giderek azaldığı açık bir şekilde gözlemlenmiştir. Lazer uyarım alanı boyunca oluşan bu zayıflamayı daha kapsamlı incelemek amacıyla aynı görüntü verileri 3 renkli ısı haritası yöntemi ile Şekil 10(b)'de yeniden simüle edilmiştir. Elde edilen ısı haritalarında askorbat miktarının artırılmasıyla oluşan görüntü alanının giderek sol tarafa doğru kaydığı ve görüntü alanının genişlediği açık bir biçimde gözlemlenmiştir. Karanlık radikallerin ve ışıkla ağarmış durumun oluşumunun üretilen ısı haritalarında kolaylıkla gözlemlenebilmesi, bu çalışmada önerilen yöntemin karanlık durum dedektörü olarak kullanılabileceğini kanıtlamıştır.

IV. SONUÇ

Bu makalede ışığa ve çözücü ortamına duyarlı, çok küçük uyarım kesit alanına sahip ve zayıf floresan ışıma yapabilen FMN ve FAD koenzimlerinin fotofiziksel geçişlerini çözümleme kapasitesine sahip mikroakışkan temelli bir floresans mikroskop sistemi için nümerik modelleme çalışmaları sunulmuştur. FMN ve FAD'nin moleküler yapısı, fotofiziksel özellikleri ve girdikleri reaksiyonlar göz önünde bulundurularak her iki molekül için farklı elektronik durum modeli kullanılmıştır. Bu modellerde yer alan elektronik durumlar 1. mertebeden lineer diferansiyel denklem sistemi olarak ele alınmış olup her bir elektronik durum popülasyonu zamana bağlı olarak çözülmüş, mikroakışkan çip ile lazer uyarım alanının geometrik boyutları ve mikroskop parametreleri kullanılarak görüntü ve sinyal verisi olarak elde edilmiştir. 20 µL/dk ve 2000 µL/dk akış değerleri için farklı deneysel koşullarda TRAST yöntemiyle ölçülmüş fotofiziksel geçiş hızları mevcut çalışmalardan toplanarak bu çalışmada önerilen yönteme uyarlanmıştır. İki akış hızında da FMN ve FAD moleküllerinde lazer uyarım şiddetinin artırılmasıyla karanlık durumlara geçişlerin arttığı gözlemlenmiş olup normalize floresan

sinyalinde zayıflama gözlemlenmiştir. FMN molekülüne farklı miktarlarda etanol eklenerek ortamdaki oksijen miktarının artması sebebiyle triplet sönümlemesi 2000 µL/dk akış hızında başarılı bir şekilde gözlemlenmiştir. Farklı akış hızlarında FMN molekülüne askorbat ve triptofan gibi redoks ajanları eklendiğinde simüle edilen sinyal eğrilerinde zayıflama görülerek foto-indirgenmiş karanlık radikallerin oluştuğu ortaya çıkmıştır. Normalize floresan sinyalindeki aynı zayıflama FAD molekülü için de gözlemlenmiş olup özellikle 20 µL/dk akış hızında foto-indirgenmiş karanlık radikallerin oluşumuna ek olarak bu moleküllerin kuvvetli bir şekilde foto-bozunuma uğradığı ortaya çıkmıştır. FAD molekülüne kademeli olarak etanol eklenmesi sonucunda triplet sönümlemesinin ancak yüksek etanol konsantrasyonlarında gerçekleşebildiği ve etanol eklenmesi ile katlanmış yapıdaki FAD molekül popülasyonunun giderek azaldığı ortaya çıkmıştır. Sinyal analizlerine ek olarak, sinyallerin oluşturulmasında kullanılan görüntü verilerinin analizleri kapsamlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. FAD fotofiziğine askorbat etkisi 2 renkli sCMOS kamera görüntü verisi olarak simüle edilmiş olup daha sonrasında 3 renkli ısı haritasına dönüştürülerek birbiriyle kıyaslanmıştır. Üretilen ısı haritalarından FAD moleküllerinde oluşan karanlık durumlar, lazer uyarım alanı üzerinde oluşan görüntüde genişleme, daralma ya da kayma gibi etkiler olarak ortaya çıkmıştır. Farklı deneysel yöntemlerle elde edilen fotofiziksel parametreler kullanılarak yapılan nümerik simülasyonlar, bu araştırmada önerilen yöntemin flavin gibi zayıf moleküllerin fotofiziksel geçişlerini başarılı bir şekilde çözümleyebildiğini kanıtlamıştır. Sunulan yöntem ve simülasyonlar ışıma yapabilen farklı tip floroforlara uyarlanabilecek olup hangi deneysel koşullarda daha etkin bir şekilde ölçümler yapılabileceği ile ilgili öngörü ve optimizasyon imkanı sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu makale Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) tarafından fon desteğine hak kazanan 124F110 numaralı 3501 projesinin bilimsel bir ürünüdür. Yazarlar ve proje ekibi olarak bu araştırmaya katkılarından dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

[1] T. Ozawa, H. Yoshimura, and S. B. Kim, (2013). "Advances in fluorescence and bioluminescence imaging," *Analytical chemistry*, 85(2), 590-609.

[2] C. Li, G. Chen, Y. Zhang, F. Wu, and Q. Wang, (2020). "Advanced fluorescence imaging technology in the near-infrared-II window for biomedical applications," *Journal of the American Chemical Society*, 142(35), 14789-14804.

[3] S. Saurabh, S. Maji, and M. P. Bruchez, (2012). "Evaluation of sCMOS cameras for detection and localization of single Cy5 molecules," *Optics express*, 20(7), 7338-7349.

[4] M. A. Albota, C. Xu, and W. W. Webb, (1998). "Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm," *Applied optics*, 37(31), 7352-7356.

[5] P. A. van den Berg, J. Widengren, M. A. Hink, R. Rigler, and A. J. Visser, (2001). "Fluorescence correlation spectroscopy of flavins and flavoenzymes: photochemical and photophysical aspects," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 57(11), 2135-2144.

[6] J. Tornmalm, E. Sandberg, M. Rabasovic, and J. Widengren, (2019). "Local redox conditions in cells imaged via non-fluorescent transient states of NAD (P) H," *Scientific Reports*, 9(1), 15070.

[7] B. Demirbay *et al.*, (2017). "Rheological properties of dextrin-riboflavin solutions under thermal and UV radiation effects," *Journal of Molecular Liquids*, 240, 597-603.

[8] B. Demirbay, C. Akaoğlu, İ. Ulusaraç, and F. G. Acar, (2017). "Thermal and UV radiation effects on dynamic viscosity of gelatin-based riboflavin solutions," *Journal of Molecular Liquids*, 225, 147-150.

[9] I. E. Kochevar, (1981). "Phototoxicity mechanisms: chlorpromazine photosensitized damage to DNA and cell membranes," *Journal of Investigative Dermatology*, 77(1), 59-64.

[10] J. Widengren, (2022). "Transient State (TRAST) Spectroscopy and Imaging: Exploiting the Rich Information Source of Fluorophore Dark State Transitions in Biomolecular and Cellular Studies," Springer.

[11] B. Demirbay, G. Baryshnikov, M. Haraldsson, J. Piguet, H. Ågren, and J. Widengren, (2023). "Photo-physical characterization of high triplet yield brominated fluoresceins by transient state (TRAST) spectroscopy," *Methods and applications in fluorescence*, 11(4), 045011.

[12] G. Donnert, C. Eggeling, and S. W. Hell, (2007). "Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation," *Nature methods*, 4(1), 81-86.

[13] R. Zondervan, F. Kulzer, S. B. Orlinskii, and M. Orrit, (2003). "Photoblinking of rhodamine 6G in poly (vinyl alcohol): Radical dark state formed through the triplet," *The Journal of Physical Chemistry A*, 107(35), 6770-6776.

[14] P. Changenet, H. Zhang, M. Van der Meer, M. Glasbeek, P. Plaza, and M. Martin, (1998). "Ultrafast twisting dynamics of photoexcited auramine in solution," *The Journal of Physical Chemistry A,* 102(34), 6716-6721.

[15] Y. Sasaki, N. Yanai, and N. Kimizuka, (2022). "Osmium complex–chromophore conjugates with both singlet-to-triplet absorption and long triplet lifetime through tuning of the heavy-atom effect," *Inorganic chemistry,* 61(16), 5982-5990.

[16] S. C. Dirican and B. Demirbay, (2025). "A Novel Microfluidic-Based Fluorescence Detection Method Reveals Heavy Atom Effects on Photophysics of Fluorophores With High Triplet Quantum Yield: A Numerical Simulation Study," *Luminescence,* 40(1), e70090.

[17] Y. Dong *et al.*, (2021). "Twisted BODIPY derivative: Intersystem crossing, electron spin polarization and application as a novel photodynamic therapy reagent," *Physical Chemistry Chemical Physics,* 23(14), 8641-8652.

[18] E. Sandberg, J. Piguet, U. Kostiv, G. Baryshnikov, H. Liu, and J. Widengren, (2023). "Photoisomerization of Heptamethine Cyanine Dyes Results in Red-Emissive Species: Implications for Near-IR, Single-Molecule, and Super-Resolution Fluorescence Spectroscopy and Imaging," *The Journal of Physical Chemistry B,* 127(14), 3208-3222.

[19] E. Sandberg, B. Demirbay, A. Kulkarni, H. Liu, J. Piguet, and J. Widengren, (2023). "Fluorescence Bar-Coding and Flowmetry Based on Dark State Transitions in Fluorescence Emitters," *The Journal of Physical Chemistry B,* 128(1), 125-136.

[20] A. Kitamura, J. Tornmalm, B. Demirbay, J. Piguet, M. Kinjo, and J. Widengren, (2023). "Trans-cis isomerization kinetics of cyanine dyes reports on the folding states of exogeneous RNA G-quadruplexes in live cells," *Nucleic acids research,* 51(5), e27-e27.

[21] E. Sandberg, C. V. Srambickal, J. Piguet, H. Liu, and J. Widengren, (2023). "Local monitoring of photosensitizer transient states provides feedback for enhanced efficiency and targeting selectivity in photodynamic therapy," *Scientific Reports,* 13(1), 16829.

[22] H. Hevekerl, J. Tornmalm, and J. Widengren, (2016). "Fluorescence-based characterization of non-fluorescent transient states of tryptophan–prospects for protein conformation and interaction studies," *Scientific Reports,* 6(1), 35052.

[23] D. Magde, E. Elson, and W. W. Webb, (1972). "Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy," *Physical review letters,* 29(11), 705.

[24] D. Magde, E. L. Elson, and W. W. Webb, (1974). "Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization," *Biopolymers: Original Research on Biomolecules,* 13(1), 29-61.

[25] S. A. Kim, K. G. Heinze, and P. Schwille, (2007). "Fluorescence correlation spectroscopy in living cells," *Nature methods,* 4(11), 963-973.

[26] E. L. Elson, (2011). "Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future," *Biophysical journal,* 101(12), 2855-2870.

[27] E. L. Elson, (2018). "Introduction to fluorescence correlation Spectroscopy—Brief and simple," *Methods,* 140, 3-9.

[28] S. Sterrer and K. Henco, (1997). "Minireview: Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)-A highly sensitive method to analyze drug/target interactions," *Journal of Receptors and Signal Transduction,* 17(1-3), 511-520.

[29] P. Rigler and W. Meier, (2006). "Encapsulation of fluorescent molecules by functionalized polymeric nanocontainers: investigation by confocal fluorescence imaging and fluorescence correlation spectroscopy," *Journal of the American Chemical Society,* 128(1), 367-373.

[30] J. Widengren, (2010). "Fluorescence-based transient state monitoring for biomolecular spectroscopy and imaging," *Journal of the Royal Society Interface,* 7(49), 1135-1144.

[31] T. Spielmann, H. Blom, M. Geissbuehler, T. Lasser, and J. Widengren, (2010). "Transient state monitoring by total internal reflection fluorescence microscopy," *The Journal of Physical Chemistry B,* 114(11), 4035-4046.

[32] V. Chmyrov, T. Spielmann, H. Hevekerl, and J. Widengren, (2015). "Trans–cis isomerization of lipophilic dyes probing membrane microviscosity in biological membranes and in live cells," *Analytical chemistry,* 87(11), 5690-5697.

[33] Z. Du *et al.*, (2022). "Imaging Fluorescence Blinking of a Mitochondrial Localization Probe: Cellular Localization Probes Turned into Multifunctional Sensors," *The Journal of Physical Chemistry B,* 126(16), 3048-3058.

[34] J. Mücksch, T. Spielmann, E. Sisamakis, and J. Widengren, (2015). "Transient state imaging of live cells using single plane illumination and arbitrary duty cycle excitation pulse trains," *Journal of Biophotonics,* 8(5), 392-400.

[35] J. Tornmalm and J. Widengren, (2018). "Label-free monitoring of ambient oxygenation and redox conditions using the photodynamics of flavin compounds and transient state (TRAST) spectroscopy," *Methods,* 140, 178-187.

[36] E. Sandberg, J. Piguet, H. Liu, and J. Widengren, (2023). "Combined Fluorescence Fluctuation and Spectrofluorometric Measurements Reveal a Red-Shifted, Near-IR Emissive Photo-Isomerized Form of Cyanine 5," *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1990.

[37] N. Silaparasetty, (2020). Machine learning concepts with python and the jupyter notebook environment: Using tensorflow 2.0. Springer.

[38] N. Silaparasetty and N. Silaparasetty, (2020). "Python programming in jupyter notebook," *Machine Learning Concepts with Python and the Jupyter Notebook Environment: Using Tensorflow 2.0*, 119-145.

[39] B. Fowler *et al.*, (2009). "Wide dynamic range low light level CMOS image sensor," in *Proc. Int. Image Sensor Workshop*, 1-4.

[40] N. Blow, (2007). "Microfluidics: in search of a killer application," *Nature Methods*, 4(8), 665-670.

[41] R. Chityala and S. Pudipeddi, (2020). *Image processing and acquisition using Python*. CRC Press.

[42] K. Gillen-Christandl, G. D. Gillen, M. Piotrowicz, and M. Saffman, (2016). "Comparison of Gaussian and super Gaussian laser beams for addressing atomic qubits," *Applied Physics B*, 122, 1-20.

[43] R. Vidunas, (2005). "Expressions for values of the gamma function," *Kyushu Journal of Mathematics*, 59(2), 267-283.

[44] M. Ehrenberg and R. Rigler, (1974). "Rotational brownian motion and fluorescence intensify fluctuations," *Chemical Physics*, 4(3), 390-401.

[45] Ü. Mets, J. Widengren, and R. Rigler, (1997). "Application of the antibunching in dye fluorescence: measuringthe excitation rates in solution," *Chemical Physics*, 218(1-2), 191-198.

[46] P. Kask, P. Piksarv, and Ü. Mets, (1985). "Fluorescence correlation spectroscopy in the nanosecond time range: Photon antibunching in dye fluorescence," *European Biophysics Journal*, 12, 163-166.

[47] T. Basché, W. Moerner, M. Orrit, and H. Talon, (1992). "Photon antibunching in the fluorescence of a single dye molecule trapped in a solid," *Physical review letters*, 69(10), 1516.

[48] W. Holzer *et al.*, (2005). "Photo-induced degradation of some flavins in aqueous solution," *Chemical Physics*, 308(1-2), 69-78.

[49] H. Görner, (2007). "Oxygen uptake after electron transfer from amines, amino acids and ascorbic acid to triplet flavins in air-saturated aqueous solution," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 87(2), 73-80.

[50] P. Heelis, (1982). "The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines)," *Chemical Society Reviews*, 11(1), 15-39.

[51] H. Chosrowjan, S. Taniguchi, N. Mataga, F. Tanaka, and A. J. Visser, (2003). "The stacked flavin adenine dinucleotide conformation in water is fluorescent on picosecond timescale," *Chemical physics letters*, 378(3-4), 354-358.

[52] P. A. Van den Berg, K. A. Feenstra, A. E. Mark, H. J. Berendsen, and A. J. Visser, (2002). "Dynamic conformations of flavin adenine dinucleotide: simulated molecular dynamics of the flavin cofactor related to the time-resolved fluorescence characteristics," *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(34), 8858-8869.

[53] T. Nakabayashi, M. S. Islam, and N. Ohta, (2010). "Fluorescence decay dynamics of flavin adenine dinucleotide in a mixture of alcohol and water in the femtosecond and nanosecond time range," *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(46), 15254-15260.