

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BİYOLOJİK UYGULAMALARDA DEMİR ŞELASYONU
AMACIYLA KULLANILABİLİR LİGANDLARIN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gülüzar ÖZBOLAT

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Abdullah TULİ**

ADANA-2017

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BİYOLOJİK UYGULAMALARDA DEMİR ŞELASYONU
AMACIYLA KULLANILABİLİR LİGANDLARIN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gülüzar ÖZBOLAT

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Abdullah TULİ**

**Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri fonundan (TDK-2015-3577)
desteklenmiştir.**

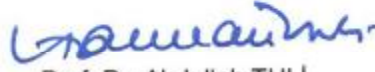
**TEZ NO:.....
ADANA-2017**

KABUL ONAY

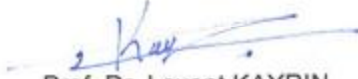
Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“Biyolojik Uygulamalarda Demir Şelasyonu Amacıyla Kullanılabilir Ligandların Değerlendirilmesi”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 05 / 12 / 2017

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr. Abdullah TULI
Çukurova Üniversitesi
Başkan



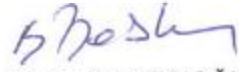
Prof. Dr. Levent KAYRIN
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Sait POLAT
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Berrin İmge ERGÜDER
Ankara Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Kadir BATÇIOĞLU
İnönü Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 05./12/2017



Gülizar ÖZBOLAT

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Biyokimya
Tezin Konusu : İlaç tasarımı, kimyasal sentez ve sitotoksite araştırması

Tezin Türü : Yüksek Lisans : Doktora: X

Danışmanın Adı-Soyadı : Abdullah Tuli
Danışmanın İletişim Bilgileri
Telefon : 05334570408
E-Posta : tuliabd@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon : 05393731801
E-Posta : guluzarozbolat@gmail.com
Adresi : Çukurova Üniversitesi, Tıp
Fakültesi, Sarıçam/ADANA

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Değerli hocam Prof. Dr. Abdullah TULİ' ye eğitimime ve tezime verdiği değerli katkılardan dolayı saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim sırasındaki katkıları nedeniyle, Prof. Dr. Nurten DİKMEN'e, Prof. Dr. Levent Kayrın'a, Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK ile Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Tamer Cevat İNAL'a ve Doç. Dr. Özlem Görüroğlu ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez izleme komitesindeki katkıları ve manevi desteği nedeniyle Prof. Dr. Sait Polat'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen, sürekli destek olan, değerli arkadaşım Doktora öğrencisi İrem ÇETİN, Biyolog Melis Gülşah ÜNVER ve Yrd. Doç. Arash Alizadeh YEGANI'ye, manevi destekleri benden esirgemeyen her daim yanımda olan değerli arkadaşlarım Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı asistan ve Lisansüstü öğrencilerine ve Teknisyenlerine sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca manevi destekleri ile her daim yanımda olan değerli dostlarım Dr.Nevin YILMAZ, Arş. Gör. Yusuf DÖĞÜŞ ve Arş. Gör. Zehra Gül KOÇAKLI' ya sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi destekleriyle hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da yanımda olan canım babam M. Murtaza ÖZBOLAT ve canım annem Meliha ÖZBOLAT'a ve sevgili kardeşlerim Gökçe Gümüş ve Nur Gürbüz'e, aileme sonsuz teşekkürler...

Gülzar ÖZBOLAT

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xx
SİMGELER ve KISALTMALAR	xxi
ÖZET	xxii
ABSTRACT	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Demirin Biyolojik Önemi	4
2.2. Demir Metabolizması	6
2.3. Demir Döngüsü ve Depolanması	7
2.4. Demir Fazlalığı	9
2.4.1. Primer demir fazlalığı	11
2.4.2. Sekonder demir fazlalığı	12
2.5. Demir Toksisitesi	13
2.5.1. Toksisitenin mekanizması	14
2.6. Şelat Yapıcı Ligandlar ve Şelasyon	17
2.6.1. Şelasyon Tedavisi	19
2.6.2. Demir Bağlayıcı Ligandların Yapıları	21
2.6.2.1. Desferoksamin B	22
2.6.2.2. Deferasiroks	24
2.6.2.3. Deferipron	25
2.7. Klinikte deneme aşamasında olan yeni demir bağlayıcı ligandlar	26
2.7.1. Aroylhidrozonlar	26
2.7.2. Deferitazole	28
2.7.3. Tiyosemikarbazonlar	29
2.7.4. GT56-252	31
2.7.5. 40SD02	32

2.8. Fe ³⁺ e seçici uygun ligandlar	33
2.8.1. Kateşoller	33
2.8.2. Hidroksamatlar	34
2.8.3. Aminokarboksilat	35
2.8.4. Hidroksipiridinonlar	35
2.8.5. Hidroksikarboksilatlar	37
2.8.6. Hidroksipironlar	37
2.9. Fe ³⁺ e seçici şelatörlerin tasarım özellikleri.....	38
2.9.1. Toksikite	38
2.9.2. Kompleks Kararlılığı.....	39
2.9.3. Metal seçiciliği	40
2.9.4. Komplekslerin uygun redoks aktivitesi.....	41
2.9.5. Enzim İnhibisyonu	41
2.9.6. Lipofilik ve molekül ağırlık	42
2.9.7. Kompleks yapısı.....	42
2.9.8. Şelatlayıcı ve endojen ligandlar arasında demirin hızlı kinetik değişimi	43
3. MATERYAL ve METOD	44
3.1. Materyal	44
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	44
3.1.2. Kullanılan cihazlar	45
3.2. Metod	46
3.2.1. Ligand sentezi	47
3.2.1.1. Asetilaseton (2,4-Pentanedione) alkilasyonu	47
3.2.1.2. Asetilasetonun alkilasyonu ile 3-metil-2,4-pentandion eldesi	48
3.2.1.2.1. Dimetil sülfat ile alkilleme.....	48
3.2.1.2.2. Azot atmosferinde alkilleme	49
3.2.1.2.3. Tetra-n-bütül amonyum bromür katalizörlüğünde alkilleme.....	49
3.2.1.3. Asetilasetonun alkilasyonu ile 3-bütül-2,4-pentandion eldesi	50
3.2.1.3.1. N-bütül iyodür alkilleme	50
3.2.1.4. Oksimler	51
3.2.1.4.1. <i>Anti</i> -monoklorogliksim sentezi (AMCG)	51
3.2.1.4.2. Dimetilgliksim sentezi (DMG)	53

3.2.2. Ligandların Fe(III) ile komplekslerin sentezi	53
3.2.2.1. 3-metil-2,4-pentandion-Fe(III) Kompleksi Sentezi	53
3.2.3.2. 3-bütül-2,4-pentandion-Fe(III) Kompleksi Sentezi	55
3.2.3.3. Antimonokloroglioksim-Fe(III) Kompleksi Sentezi	56
3.2.3.4. Dimetilglioksim-Fe(III) Kompleksi Sentezi	57
3.2.3.5. Asetilaseton – Fe(III) Kompleksi Sentezi	59
3.2.3.6. 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit-Fe(III) Kompleksi Sentezi	60
3.2.3.7. Oksalat- Fe(III) Kompleksi Sentezi	61
3.2.3.8. Piridin-2,6-dikarboksilikasit – Fe(III) Kompleksi Sentezi.....	62
3.2.3.9. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit – Fe(III) Kompleksi Sentezi.....	64
3.2.3.10. Salisilik Asit – Fe(III) Kompleksi Sentezi	65
3.2.3.11. Nitrilotriasetikasit - Fe(III) Kompleksi Sentezi.....	66
3.2.3.12. Sitrik asit - Fe(III) Kompleksi Sentezi	68
3.2.3.13. Glisin – Fe(III) Kompleksi Sentezi	69
3.2.4. Uv-Vis taramalar ve Fe (III)' ün tayini için standart hazırlanması.....	70
3.2.5. Siklik voltometre.....	70
3.2.6. Hücre Kültürü ile sitotoksik etkinin MTT ile belirlenmesi.....	71
3.2.6.1. Hücre Dizileri ve Çoğaltılması.....	71
3.2.6.2. Hücre Canlılığı.....	71
3.2.6.3. Hücre Kültürü.....	71
3.2.6.4. MTT	72
3.2.6.5. Sitotoksite.....	72
4. BULGULAR.....	74
4.1. Safsu ve Plazmada Kompleksleştirme Çalışmaları.....	74
4.1.1. 3-metil-2,4-pentandion, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su)	74
4.1.2. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	75
4.1.3. 3-metil-2,4-pentandion, Fe(III) ve Kompleks Dalga boyu taraması (Plazma).....	76
4.1.4. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	77
4.1.5. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	78

4.1.6. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)	80
4.1.7. Hücre kültürü ve Sitotoksisite	82
4.2. 3-bütül-2,4-pentandion, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu)	84
4.2.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	85
4.2.2. 3-bütül-2,4-pentandion, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)	86
4.2.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	87
4.2.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	88
4.2.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)	90
4.2.6. Hücre kültürü ve Sitotoksisite	91
4.3. Antimonoklorogliksim, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu)	93
4.3.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	94
4.3.2. Antimonoklorogliksim, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma).....	95
4.3.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	96
4.3.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	97
4.3.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)	98
4.3.6. Hücre Kültürü ve Sitotoksisite	100
4.4. Dimetilgliksim, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su).....	102
4.4.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	102
4.4.2. Dimetilgliksim, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)	103
4.4.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	104
4.4.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	105
4.4.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)	107
4.4.6. Hücre Kültürü ve Sitotoksisite	108
4.5.7. Asetilaseton, Fe(III)ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su)	110
4.5.8. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	111
4.5.9. Asetilaseton, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)	112
4.5.10. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	113
4.5.11. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	114
4.5.12. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)	115
4.5.13. Hücre Kültürü ve Sitotoksisite	117

4.6. 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu).....	119
4.6.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	119
4.6.2. 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma).....	120
4.6.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	121
4.6.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	122
4.6.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)	124
4.6.6. Hücre Kültürü ve Sitotoksisite	125
4.7. Oksalat, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu).....	127
4.7.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	128
4.7.2. Oksalat, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)	129
4.7.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	130
4.7.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	131
4.7.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)	132
4.7.6. Hücre kültürü ve Sitotoksisite.....	133
4.8. Piridin-2,6-dikarboksilik asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu)	136
4.8.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	136
4.8.2. Piridin-2,6-dikarboksilik asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)	137
4.8.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	138
4.8.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	139
4.8.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)	140
4.8.6. Hücre kültürü ve Sitotoksisite.....	142
4.9. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu)	143
4.9.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	144
4.9.2. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma).....	145
4.9.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	146
4.9.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	147

4.9.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre: CV).....	148
4.9.6. Hücre Kültürü ve Sitotoksiste	150
4.10. Salisilik Asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su).....	152
4.10.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	153
4.10.2. Salisilik Asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)	154
4.10.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	155
4.10.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	156
4.10.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre: CV).....	157
4.10.6. Hücre Kültürü ve Sitotoksiste	159
4.11. Nitriлотriasetikasit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su).....	161
4.11.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	161
4.11.2. Nitriлотriasetikasit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)	162
4.11.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	163
4.11.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	164
4.11.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre: CV).....	166
4.12. Sitrik asit Fe(III)ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su)	169
4.12.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	170
4.12.2. Sitrik asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)	171
4.12.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	172
4.12.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	173
4.12.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)	174
4.12.6. Hücre kültürü ve Sitotoksiste.....	175
4.13. Glisin, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su).....	178
4.13.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)	178
4.13.2. Glisin, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)	179
4.13.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma).....	180
4.13.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	181
4.13.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre: CV).....	183
4.13.6. Hücre Kültürü ve Sitotoksiste	184
4.14. Erime Noktası, Renk, Verim Bulgularının Değerlendirilmesi.....	186
4.15. Elementel Analiz Bulgularının Değerlendirilmesi.....	187

4.16. FT-IR Spektrum Bulgularının Değerlendirilmesi	189
4.17. UV-vis Spektrum ve Manyetik Süsseptibilite Bulgularının Değerlendirilmesi	189
4.18. Elektrokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi.....	191
4.19. ICP Sonuçları	191
4.20. Hücre Kültürü sonuçları	192
5. TARTIŞMA	194
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	204
6.1. Öneriler	206
KAYNAKLAR	208
ÖZGEÇMİŞ	220

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. Vucutta demir dağılımı ²⁴	5
Şekil 2. Demir metabolizması ve geri dönüşüm süreci ³⁶	7
Şekil 3. Hücre içi demir trafiği, depolanması ve kullanımı ³⁷	8
Şekil 4. Labil demir havuzu kaynaklı oksidatif stress ve zararları ⁴²	9
Şekil 5. Özgül dokularda demir birikimi ve ilişkili hastalıklar ⁵¹	10
Şekil 6. NTBI hücre ölümü ve fibrozisle sonuçlanması ⁷⁵	14
Şekil 7. Demirin redoks döngüsü ⁷⁹	14
Şekil 8. Lipid peroksidasyonunu ⁹⁰	16
Şekil 9. OH [•] radikalinin zararlı etkileri ⁹³	17
Şekil 10. Demir iyonunun şelat yapıcı ajan (DFO) tarafından hapsedilmesi ⁹⁷	18
Şekil 11. Tek, iki ve çok dişli ligandlar kullanılarak metal ligand komplekslerinin oluşumu ¹⁰⁰	19
Şekil 12. Şelasyon tedavisinin prensibi ¹⁰⁵	19
Şekil 13. Şelatörlerin hücrel toksiteyi azaltması ¹⁰⁷	20
Şekil 14. Şelasyon tedavisinde kullanılan şelatörler ⁷⁸	22
Şekil 15. Desferriksamin metansülfanatın kimyasal formülü ¹¹⁸	22
Şekil 16. Desferriksaminin açık ve kapalı halkalı yapıları ¹¹⁷	23
Şekil 17. ICL670'in açık ve kapalı halkalı yapıları ¹¹⁷	24
Şekil 18. DFP'nin açık ve kapalı halkalı yapıları ¹¹⁷	25
Şekil 19. PIH kimyasal yapısı ve üç dişli (2: 1) demir kompleksi ³⁷	27
Şekil 20. Lipofilik aroylhidrazonlardan demir şelatör SIH ve NIH'ın kimyasal yapısı ³⁷	27
Şekil 21. PKIH kimyasal yapısı ve demir kompleksi ³⁷	28
Şekil 22. Deferitazole kimyasal yapısı ¹³⁶	29
Şekil 23. Triapine kimyasal yapısı ve demir ile kompleksi ³⁷	30
Şekil 24. Tiyosemikarbazon "çift yumruk" sitotoksik etkisi ³⁷	31
Şekil 25. GT56-252 kimyasal yapı ¹⁴⁶	32
Şekil 26. S-DFO kimyasal yapı ¹⁴⁹	33
Şekil 27. Altı dişli Kateşoller ¹⁵⁴	34
Şekil 28. Altı dişli (DFO) ve iki dişli (L-lisinhidroksamik asit) Hidroksamatlar ¹⁵⁴	35
Şekil 29. EDTA ve DPTA kimyasal yapı ¹⁵⁴	35
Şekil 30. İki dişli ve altı dişli HPO ¹⁵⁴	36
Şekil 31. Hidroksikarboksilatlar ¹⁵⁴	37
Şekil 32. Kojik asit ve türevleri ¹⁵⁴	37
Şekil 33. Şelasyon tedavisinde kullanılan şelatörler ¹¹¹	40
Şekil 34. Asetilasetonun alkilasyonu	48
Şekil 35. Asetilasetonun DMS ile metillenmesi	49

Şekil 36. Asetilaseton ligandının metillenmesi tepkimesi	49
Şekil 37. Asetilasetonun TBAB katalizörlüğünde metillenmesi.....	50
Şekil 38. Asetilaseton ligandının bütillenmesi tepkimesi	51
Şekil 39. <i>Amfi</i> -kloro glioksim eldesi tepkimesi	52
Şekil 40. <i>Anti</i> -kloro glioksim eldesi tepkimesi	52
Şekil 41. 3-metil-2,4-pentandion ligandının Fe (III) ile kompleksi sentezi	54
Şekil 42. 3-metil-2,4-pentandion ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi.....	54
Şekil 43. 3-butil-2,4-pentandion ligandının Fe (III) ile kompleksi sentezi.....	55
Şekil 44. 3-butil-2,4-pentandion ligandının Fe(III) kompleksi elde edilişi.....	56
Şekil 45. <i>Antimonokloro</i> glioksim ligandının Fe (III) kompleksi sentezi	56
Şekil 46. <i>Anti</i> -monokloro glioksim ligandının Fe (III) kompleksinin elde edilişi	57
Şekil 47. Dimetilglioksim ligandının Fe(III) kompleksi sentezi.....	58
Şekil 48. Dimetilglioksim ligandının Fe(III) kompleksi elde edilişi	58
Şekil 49. Asetilaseton ligandının Fe (III) kompleksi sentezi	59
Şekil 50. Asetilaseton ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi.....	60
Şekil 51. 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit ligandının Fe(III) kompleksi sentezi	60
Şekil 52. 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi.....	61
Şekil 53. Oksalat ligandının Fe(III) kompleksi sentezi.....	62
Şekil 54. Oksalat ligandının Fe(III) kompleksi elde edilişi	62
Şekil 55. Piridin-2,6-dikarboksilikasit ligandının Fe(III) kompleksi sentezi	63
Şekil 56. Piridin-2,6-dikarboksilikasit ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi.....	64
Şekil 57. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit ligandının Fe (III) kompleksi sentezi	64
Şekil 58. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi.....	65
Şekil 59. Salisilik Asit ligandının Fe(III) kompleksi sentezi	66
Şekil 60. Salisilik Asit ligandının Fe(III) kompleksi elde edilişi.....	66
Şekil 61. Nitrotriasetik asit ligandının Fe (III) kompleksi sentezi.....	67
Şekil 62. Nitrotriasetik asit ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi.....	67
Şekil 63. Sitrik asit ligandının Fe (III) kompleksi sentezi	68
Şekil 64. Sitrik asit ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi	69
Şekil 65. Glisin ligandının Fe(III) kompleksi sentezi	69
Şekil 66. Glisin ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi.....	70
Şekil 67. Dalga boyu tarama grafiği	74
Şekil 68. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saat fiziksel görünümü	74
Şekil 69. Standart grafik	75
Şekil 70. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	76
Şekil 71. Dalga boyu tarama grafiği	76
Şekil 72. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saat fiziksel görünüm	76
Şekil 73. Standart grafik	77
Şekil 74. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	78

Şekil 75. Asetilaseton ligandının FT-IR Spektrumu	78
Şekil 76. 3-metil-2,4-pentandion ligandının FT-IR Spektrumu	79
Şekil 77. Kompleks FT-IR Spektrumu	79
Şekil 78. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	80
Şekil 79. Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu	81
Şekil 80. Ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu	81
Şekil 81. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	82
Şekil 82. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10.....	83
Şekil 83. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	83
Şekil 84. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X	83
Şekil 85. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X	83
Şekil 86. [3MACAC-Fe ³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi.....	84
Şekil 87. Dalga boyu tarama grafiği	84
Şekil 88. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saat fiziksel görünüm	85
Şekil 89. Standart grafik	85
Şekil 90. Dalga boyu tarama grafiği	86
Şekil 91. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleksin 2. saati fiziksel görünüm	86
Şekil 92. Standart grafik	87
Şekil 93. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	87
Şekil 94. Asetilaseton ligandının FT-IR Spektrumu	88
Şekil 95. 3-bütül-2,4-pentandion ligandının FT-IR Spektrumu.....	89
Şekil 96. Kompleksin FT-IR Spektrumu	89
Şekil 97. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	89
Şekil 98. Ligandın dönüşümlü voltamogramı.....	90
Şekil 99. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	91
Şekil 100. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10.....	92
Şekil 101. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	92
Şekil 102. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	92
Şekil 103. 5. Derişim (50 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X	92
Şekil 104. [3BACAC-Fe ³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi	93
Şekil 105. Dalga boyu tarama grafiği	93
Şekil 106. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saat fiziksel görünümü	94
Şekil 107. Standart grafik	94
Şekil 108. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	95
Şekil 109. Dalga boyu tarama grafiği	95

Şekil 110. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 3. saat fiziksel görünüm (Plazma)	95
Şekil 111. Standart grafik	96
Şekil 112. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	97
Şekil 113. Antimonokloroglioksim ligandının FT-IR Spektrumu	97
Şekil 114. Kompleksin FT-IR Spektrumu	98
Şekil 115. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	98
Şekil 116. Ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu	99
Şekil 117. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	100
Şekil 118. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10.....	100
Şekil 119. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	100
Şekil 120. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	101
Şekil 121. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X.....	101
Şekil 122. [AMCG -Fe ³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi	101
Şekil 123. Dalga boyu tarama grafiği	102
Şekil 124. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 3. saat fiziksel görünüm	102
Şekil 125. Standart Grafik	103
Şekil 126. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	103
Şekil 127. Dalga boyu tarama grafiği	104
Şekil 128. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 3. Saat fiziksel görünüm.....	104
Şekil 129. Standart Grafik	105
Şekil 130. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	105
Şekil 131. Dimetilglioksim ligandının FT-IR Spektrumu.....	106
Şekil 132. Kompleksin FT-IR Spektrumu	106
Şekil 133. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	107
Şekil 134. Ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu	107
Şekil 135. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	108
Şekil 136. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10.....	109
Şekil 137. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	109
Şekil 138. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	109
Şekil 139. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X.....	109
Şekil 140. [DMG-Fe ³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi	110
Şekil 141. Dalga boyu tarama grafiği	110
Şekil 142. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 3. saat fiziksel görünüm	111
Şekil 143. Standart grafik	111
Şekil 144. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	112

Şekil 145. Dalga boyu tarama grafiği	112
Şekil 146. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleksin 2. saati fiziksel görünüm	112
Şekil 147. Standart grafik	113
Şekil 148. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	114
Şekil 149. Asetilaseton ligandının FT-IR Spektrumu	114
Şekil 150. Kompleksin FT-IR Spektrumu	115
Şekil 151. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	115
Şekil 152. Ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu.....	116
Şekil 153. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	116
Şekil 154. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10.....	117
Şekil 155. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	117
Şekil 156. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	118
Şekil 157. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X.....	118
Şekil 158. [ACAC-Fe ³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi	118
Şekil 159. Dalga boyu tarama grafiği	119
Şekil 160. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saat fiziksel görünüm	119
Şekil 161. Standart Grafik	120
Şekil 162. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	120
Şekil 163. Dalga boyu tarama grafiği	121
Şekil 164. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saat fiziksel görünüm	121
Şekil 165. Standart Grafik	122
Şekil 166. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	122
Şekil 167. 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit ligandının FT-IR Spektrumu	123
Şekil 168. Kompleksin FT-IR Spektrumu	123
Şekil 169. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	123
Şekil 170. Ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu	124
Şekil 171. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	125
Şekil 172. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10.....	126
Şekil 173. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	126
Şekil 174. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	126
Şekil 175. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X.....	126
Şekil 176. [4,5db-1,3-disülfonik-Fe ³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi	127
Şekil 177. Dalga boyu tarama grafiği	128
Şekil 178. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 1. saat fiziksel görünüm	128

Şekil 179. Standart grafik	128
Şekil 180. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	129
Şekil 181. Dalga boyu tarama grafiği	129
Şekil 182. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 3. saat fiziksel görünüm	129
Şekil 183. Standart grafik	130
Şekil 184. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	131
Şekil 185. Oksalat ligandının FT-IR Spektrumu	131
Şekil 186. Kompleksin FT-IR Spektrumu	132
Şekil 187. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	132
Şekil 188. Ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu	133
Şekil 189. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	133
Şekil 190. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10.....	134
Şekil 191. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	134
Şekil 192. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	135
Şekil 193. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X.....	135
Şekil 194. [Oksalat-Fe ³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi	135
Şekil 195. Dalga boyu tarama grafiği	136
Şekil 196. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saat fiziksel görünüm	136
Şekil 197. Standart grafik	137
Şekil 198. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	137
Şekil 199. Dalga boyu tarama grafiği	138
Şekil 200. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleksin 2. saati fiziksel görünüm	138
Şekil 201. Standart grafik	139
Şekil 202. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	139
Şekil 203. Piridin-2,6-dikarboksilikasit ligandının FT-IR Spektrumu.....	140
Şekil 204. Kompleksin FT-IR Spektrumu	140
Şekil 205 Ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu	141
Şekil 206. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	141
Şekil 207. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	142
Şekil 208. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10.....	143
Şekil 209. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	143
Şekil 210. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	143
Şekil 211. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X.....	143
Şekil 212. Dalga boyu tarama grafiği	144
Şekil 213. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 3. saat fiziksel görünüm	144

Şekil 214. Standart grafik	145
Şekil 215. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	145
Şekil 216. Dalga boyu tarama grafiği	146
Şekil 217. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleksin 2. saati fiziksel görünüm	146
Şekil 218. Standart grafik	147
Şekil 219. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	147
Şekil 220. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit ligandının FT-IR Spektrumu	147
Şekil 221. Kompleksin FT-IR Spektrumu	148
Şekil 222. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	148
Şekil 223. Ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu	149
Şekil 224. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu	150
Şekil 225. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10.....	151
Şekil 226. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	151
Şekil 227. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	151
Şekil 228. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X.....	151
Şekil 229. [8-HQ-5-SA-Fe ³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi	152
Şekil 230. Dalga boyu taramalar.....	152
Şekil 231. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 3. saat fiziksel görünüm	153
Şekil 232. Standart grafik	153
Şekil 233. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	154
Şekil 234. Dalga boyu taramalar.....	154
Şekil 235. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleksin 3. saati fiziksel görünüm	154
Şekil 236. Standart grafik	155
Şekil 237. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	156
Şekil 238. Salisilik asit ligandının FT-IR Spektrumu	156
Şekil 239. Kompleksin FT-IR Spektrumu	157
Şekil 240. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	157
Şekil 241. Ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu	158
Şekil 242. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	159
Şekil 243. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	159
Şekil 244. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	160
Şekil 245. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X.....	160
Şekil 246. [Salisilikasit-Fe ³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi.....	160
Şekil 247. Dalga boyu tarama grafiği	161
Şekil 248. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 3. saat fiziksel görünüm	161
Şekil 249. Standart grafik	162

Şekil 250. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	162
Şekil 251. Dalga boyu tarama grafiği	163
Şekil 252. Fiziksel özellikler	163
Şekil 253. Standart grafik	164
Şekil 254. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	164
Şekil 255. Nitritotriasetik asit ligandının FT-IR Spektrumu	165
Şekil 256. Kompleksin FT-IR Spektrumu	165
Şekil 257. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	165
Şekil 258. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	166
Şekil 259. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	167
Şekil 260. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10.....	168
Şekil 261. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	168
Şekil 262. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	168
Şekil 263. 2. Derişim (100 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	168
Şekil 264. [NTA-Fe ³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi	169
Şekil 265. Dalga boyu tarama grafiği	169
Şekil 266. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 3. saat fiziksel görünüm	170
Şekil 267. Standart grafik	170
Şekil 268. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	171
Şekil 269. Dalga boyu tarama grafiği	171
Şekil 270. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 3. saat fiziksel görünüm	171
Şekil 271. Standart grafik	172
Şekil 272. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	173
Şekil 273. Sitrik asit ligandının FT-IR Spektrumu	173
Şekil 274. Kompleksin FT-IR Spektrumu	173
Şekil 275. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	174
Şekil 276. Ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu	175
Şekil 277. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	175
Şekil 278. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10.....	176
Şekil 279. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	176
Şekil 280. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	177
Şekil 281. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	177
Şekil 282. [Sitrik asit-Fe ³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi	177
Şekil 283. Dalga boyu taramalar.....	178
Şekil 284. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saat fiziksel görünüm	178

Şekil 285. Standart grafik	179
Şekil 286. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	179
Şekil 287. Dalga boyu tarama grafiği	180
Şekil 288. Ligand, Fe(III), Kompleks ve Kompleksin 2. saati fiziksel görünüm	180
Şekil 289. Standart grafik	181
Şekil 290. Zamana bağlı kompleksleşme miktarı	181
Şekil 291. Glisin ligandının FT-IR Spektrumu	182
Şekil 292. Kompleksin FT-IR Spektrumu	182
Şekil 293. Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı	183
Şekil 294. Ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu	184
Şekil 295. Ligand, Kompleksin ve Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu.....	184
Şekil 296. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20.....	185
Şekil 297. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	186
Şekil 298. 2. Derişim (12,5 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X.....	186
Şekil 299. [Glisin-Fe ³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi	186

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 1. Demir içeren bileşik ve enzimler	6
Çizelge 2. Demir fazlalığının sınıflandırılması ⁵³	11
Çizelge 3. İdeal bir şelatörün genel özellikleri ^{108,109}	21
Çizelge 4. Karşılaştırılmalı toksisite özellikleri ¹³	39
Çizelge 5. Akış Şeması	47
Çizelge 6. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	82
Çizelge 7. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	91
Çizelge 8. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	100
Çizelge 9. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	108
Çizelge 10. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	117
Çizelge 11. Kompleksinin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	125
Çizelge 12. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	134
Çizelge 13. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	142
Çizelge 14. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	150
Çizelge 15. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	159
Çizelge 16. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	167
Çizelge 17. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	176
Çizelge 18. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	185
Çizelge 19. Ligand ve komplekslerinin fiziksel özellikleri.....	187
Çizelge 20. Elementel Analiz Sonuçları	188
Çizelge 21. Sentezlenen bileşiklerin FT-IR spektrum verileri.....	189
Çizelge 22. Manyetik süsseptibilite değerleri ve absorpsiyon dalga boyları	190
Çizelge 23. ICP sonuçlar	192
Çizelge 24. Karşılaştırmalı sonuçlar	193

SİMGELER ve KISALTMALAR

LIP	: Labil demir havuzu
MDS	: Miyelodisplastik sendromlar
TBI	: Transferrine bağlanan demir
NTBI	: Transferrine bağlı olmayan demir
VDCC	: Voltaja bağımlı kalsiyum kanalları
DFO	: Desferrioksamin
DFP	: Deferipron
PIH	: Piridoksal izonikotinoil hidrazon
SIH	: Salisilaldehit izonikotinoil hidrazon
NIH	: Naftilaldehid izonikotinoil
PKIH	: Piridilketon izonikotinoil hidrazon
TSCZ	: Tiyosemikarbazonlar
RR	: Ribonükleotit redüktaz
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
HPO	: Hidroksipiridinonlar
FTIR	: Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrofotometre
ICP-MS	: İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrometresi
CV	: Siklik Voltametri
DMSO	: Dimetilsülfoksit
HUVEC	: Human Umbilical Vein Endotel Hücreler

ÖZET

Biyolojik uygulamalarda demir şelasyonu amacıyla kullanılabilir ligandların değerlendirilmesi

Vücutta aşırı biriken demiri uzaklaştırmak amacıyla Fe(III) iyonu ile bileşik oluşturabilecek ligantların sentezi\kompleksleşme derecesini ve insan plazmasından demirin uzaklaştırılmasında etkinliğinin belirlenmesi tedavi sürecinde klinikte kullanılabilme potansiyeli olan uygulamaların ilk basamağı niteliğindedir.

Bu çalışma da ilk olarak asetilaseton üzerinde bulunan iki karbonil bileşiği arasındaki karbon atomu üzerindeki aktif hidrojen ile alkil gruplarının yer değiştirmesi ile farklı uzunluktaki zincir sayısına sahip asetilaseton türevleri olan 3-metil-2,4-pentandion ve 3-butil-2,4-pentandion başarılı bir şekilde sentezlendi ve ligand olarak kullanıldı. Kloralhidrat, hidroksilamin hidroklorür çıkış bileşiği olarak kullanılarak oksim gurubuna dahil olan *anti*-monoklorogliksim ve dimetilgliksim ligandları başarılı bir şekilde sentezlendi. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit, 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit, Piridin 2,6-Dikarboksilik, Nitrilotriasetik asit, Sitrik asit, Oksalat, Glisin, Salisilik asit' te ligand olarak kullanıldı.

Demir ile kompleksleri safsu ve plazmada sentezlendi. Sentezlenen bileşiklerin yapıları FT-IR, manyetik suseptibilite, elementel analiz analiz ve UV-Vis gibi spektroskopik metodlar ile aydınlatılmıştır. Kompleksleşme derecesi ICP-MS ve UV-Vis yöntemleriyle belirlenmiştir. Komplekslerin, ligandların elektrokimyasal davranışları Siklik Voltametri ile incelendi. Daha sonra hücre kültürü yöntemi ile sentezlenen komplekslerin *in vitro* sitotoksik etkisi belirlenmiştir. MTT testi kullanılarak 12,5, 25, 50, 100 ve 200 μ M'lık 5 farklı derişim aralığında kompleksler HUVEC hücre dizisi üzerine uygulanarak sitotoksik etkiye sahip olup olmadığı ve hücre proliferasyonuna etkisi incelenmiştir. Araştırmada kullanılan komplekslerin hemen hemen hepsinde artan dozlarda yüzde sitotoksisite cevapları arasında negatif bir ilişki gözlemlendi. Ayrıca komplekslerin birçoğunun HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği hatta iyileştirici etkisi olduğunun tespit edilmesi ilaç geliştirme aşamasında deneysel hayvan modeli araştırması için ümit verici olarak görülmektedir.

Bu çalışmada kullanılan ligandların şelasyona etkisinin araştırılması *in vivo* denemelerin gerçekleştirilebilmesinde ilk basamak çalışması olmuştur. *In vitro* yapılan bu çalışmada bulunan sonuçlar ileriki dönemlerde *in vivo* çalışmalar ile de desteklenirse demir şelasyonuna uyumun optimum olacağı etkin demir şelatörlerin geliştirilmesini öngörmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Demir(III), şelasyon, ligand, hücre kültürü, siklik voltametri.

ABSTRACT

Assessment of usable ligand for iron chelating in biological applications.

In order to remove excess iron from the body, the synthesis\complexation degree of the ligands that can form a compound with the Fe (III) ion and the efficiency of iron removal from human plasma is the first line of applications that have potential for clinical use in the treatment process.

In this study, Initially, 3-methyl-2,4-pentanedione and 3-butyl-2,4-pentanedione which are acetylacetonone derivatives with different chain lengths were successfully synthesized by displacement of alkyl groups with active hydrogen on the carbon atom between the two carbonyl compounds present on acetylacetonone. Chloralhydrate, Hydroxylamine hydrochloride was used as the starting compound and the anti-monochloroglucosime and dimethylglyoxime ligands were successfully synthesized. 8-Hydroxyquinoline-5-sulfonic acid, 4,5-Dihydroxybenzene-1,3-disulfonic acid, Pyridine 2,6-Dicarboxylic acid, Nitrilotriacetic acid, Citric acid, Sodium oxalate, Glycine and Salicylic acid were used as the ligand. Iron complexes were synthesized in pure water and plasma. The degree of complexation was determined by ICP-MS and UV-Vis methods. The electrochemical behavior of complexes, ligands was studied by CV. Platinum disk electrode, platinum counter electrode and Ag-AgCl reference electrode were used in the studies. Then the in vitro cytotoxic effect of the complexes synthesized by the cell culture method was determined. MTT assay was used to examine whether the complexes had cytotoxic effect on HUVEC cell line at 5 different concentration ranges (12.5, 25, 50, 100 and 200 μ M) and their effect on cell proliferation. Almost all of the complexes used in the study had a negative correlation between the percent cytotoxicity responses at increasing doses. Furthermore, it has been determined that many of the complexes do not have cytotoxic effect on HUVEC and they do not affect cell proliferation or even have therapeutic effect, it appears to be promising for an experimental animal model study during the drug development phase.

Investigation of the effect of chelating ligands used in this study has been the first step in the realization of in vivo assays. We anticipate the development of effective iron chelators that will be optimal for iron chelation if the results of this in vitro study are supported by in vivo studies in the future.

Keywords: Iron (III), chelation, ligand, cell culture, cyclic voltammetry.

1. GİRİŞ

Vücutta birçok yapısal ve işlevsel bileşenlerin ayrılmaz bir parçası olan metallerin fizyolojik, patolojik ve biyokimyasal süreçlerde ki kritik rolleri her zaman araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Bu metallerden en önemlisi olarak kabul edilen demir insan organizması için çok önemli tepkimelerde kullanılan (oksijen taşıma, enerji üretimi, elektron transferi, DNA sentezi ve hücre döngüsü aşamalarında, azot sabitleştirilmesi gibi) bir elementtir. Demirin tüm yaşam formları için kritik bir öneme sahip olması onun biyokimyasal tepkimelerde rol alan anahtar enzimlerin aktif bölgelerinde bir kofaktör olarak hareket etmesi ve oksijene karşı gösterdiği yüksek ilgiden dolayı girdiği yükseltgenme indirgenme tepkimelerinden kaynaklanmaktadır^{1,2,3,4,5,6,7}.

Demir yaşamımız için vazgeçilmez olmasına rağmen hem aşırı derişimi hem de reaktif oksijen türleri oluşturma yeteneği ve insanda demir atılımı düzenleyici mekanizmalarının eksikliği onu son derece zararlı hale getirmektedir. Çünkü insan demir dengesini sağlamakta güçlük çeken ve demir fazlalığına kolaylıkla ulaşabilen tek memeli organizmadır. Özellikle organlarda birikmesi, vücut için güvenli olan depo seviyesini aştığında, potansiyel olarak durumun ciddiyeti maruz kalınan demirin fazlalığına bağlı olup, özellikle karaciğer, pankreas ve kalp gibi hedef organlarda ölümcül doku hasarı meydana getirmektedir^{8,9,10}.

Bu ölümcül hasarın engellenmesinde bugün için tek tedavi yöntemi dokuda biriken aşırı derişimdeki demire spesifik ligandlarla şelasyon yapılarak organizmadan demirin uzaklaştırılması esasına dayanan şelasyon tedavisidir. Bu tedavinin amacı, organizmada serbest halde bulunan demirin kompleksleşmesini sağlayarak demir birikiminin toksik etkisinin olmadığı güvenli seviyelerde sürdürmektir. Bu amaca ulaşınca kadar aşırı demiri detoksifiye ederek organizmayı demir toksisitesine korumaktır. Demir şelasyon tedavisi, son yıllarda aşırı demir yükü ile karakterize olmayan bozuklukların tedavisinde dahi kullanılması söz konusudur (erişkin solunum sıkıntısı sendromu, miyokardiyal iskemi, kanser ve sıtma gibi)^{11,12,13}.

Günümüzde bu amaç için kullanılan ilaç, ağızdan alındığında inaktif oluşuyla büyük bir dezavantajı olan doğal bir siderofor olan desferrioksamin-B (DFO)' dir. Aynı zamanda DFO' in plazma yarı ömrünün kısa olması, pahalı olması ve yüksek

derişimlerde toksik etki göstermesi gibi önemli kısıtlamaları söz konusudur. Hem bu kısıtlamalar hemde yetersiz demir şelasyonu ile birlikte organ hasarların kaçınılmaz oluşu ve demir şelasyonuna uyumun optimum olacağı etkin demir şelatörlerin geliştirilmesi yönündeki ilgiyi ve çabayı hep yüksek tutmuştur. Bundan dolayı çok sayıda oral aktif şelatlayıcı grupları çalışılmış ve bu demir şelatlayıcılar hala tatmin edici düzeylerde değildir. Son zamanlarda bunlar arasında en dikkate değerinin piridinon türevleri olduğu belirlenmiştir. Fakat demir dengesini sağlamak için gerekli dozun oldukça yüksek oluşu, çeşitli yan etkilere neden olmaktadır. Klinik kullanım için ideal bir demir şelatörler hala aranmaktadır. Bu sebeple, demir şelatlanması ve daha etkin demir şelatörlerin geliştirilmesi, son yıllarda üzerinde yoğun olarak çalışılan konulardan biri haline gelmiştir^{14,15,16,17,18}.

Vücutta aşırı biriken demiri uzaklaştırmak amacıyla Fe(III) iyonu ile bileşik oluşturabilecek ligantların sentezi\kompleksleşme derecesini ve insan plazmasından demirin uzaklaştırılmasında etkinliğinin belirlenmesi tedavi sürecinde klinikte kullanılabilme potansiyeli olan uygulamaların ilk basamağı niteliğindedir. Bu çalışma da Fe(III) iyonunu ile şelasyon yapılacak demire spesifik ligandlar sentezlenmiş ve demir molekülünün in vitro koşullarda plazma ve saf suda seçici birleşme derecesini farklı yöntemlerle belirlenmiştir. İlk olarak asetilaseton üzerinde bulunan iki karbonil bileşiği arasındaki karbon atomu üzerindeki aktif hidrojen ile alkil gruplarının yer değiştirmesi ile farklı uzunluktaki zincir sayısına sahip asetilaseton türevleri olan 3-metil-2,4-pentandion ve 3-butil-2,4-pentandion sentezlendi ve ligand olarak kullanıldı. Demir fazlalığı oluşan durumlarda bu durumu hafifletmek için bir şelatör olarak kullanılıp kullanılmayacağı ve özellikle asetilaseton üzerinden yağda çözünen grubun (alkil) grubunun hem saf suda hemde plazmada şelasyona etkisinin nasıl olacağı literatürde ilk defa incelenmiştir. Alkil grubu uzadıkça demir ile kompleksleşme miktarı saptanmıştır. Ve bu çalışmada oksim bileşiği olan dimetilgliksim ve kloralhidrat, hidroksilamin hidroklorür çıkış bileşiği olarak kullanılarak *anti*-monoklorogliksim ligandları sentezlendi. Demir(III) ile kompleksleşme kapasitesi incelenerek ilk defa şelatlama amacıyla kullanılabilceği belirlenmiştir. Aynı zamanda 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit, 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit, Piridin 2,6-Dikarboksilik, Nitrilotriasetik asit, Sitrik asit, Oksalat, Glisin, Salisilik asit'in bir şelatör olarak kullanılıp kullanılmayacağı hakkında ilk basamak araştırması yapılmıştır. Bütün

ligandların demir ile kompleksleri safsu ve plazmada sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları FT-IR, manyetik suseptibilite, elementel analiz analiz ve UV-Vis gibi spektroskopik metodlar ile aydınlatılmıştır. Kompleksleşme derecesi hem safsuda hem plazmada ICP-MS ve UV-Vis gibi farklı yöntemlerle belirlenmiştir. Komplekslerin, ligandların elektrokimyasal davranışları Siklik Voltametre (CV) ile incelendi. Çalışmalarda platin disk elektrot, platin karşıt (counter) elektrot ve Ag-AgCl referans elektrot kullanılmıştır. Daha sonra hücre kültürü yöntemi ile sentezlenen komplekslerin in vitro sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Sitotoksisite deneyleri MTT test yöntemi uygulanarak yapılmıştır. Çalışmamızda öncelikle mL'de 10^4 HUVEC hücresi olacak şekilde 12 kuyucuklu plakta 7 kuyucuga ekim yapıldı. 24 saat sonunda her bir kompleksi seri dilüsyonla sulandırarak 5 farklı derişim elde edildi. Kontrol olarak DMSO kuyucuga yerleştirildikten sonra hücre süspansiyonları üzerine farklı derişimler de sentezlenen kompleksler eklendi. 48 saat komplekslerle ile inkübe edilen hücrelerde sitotoksisite oranları tespit edildi.

Bu çalışmada günümüzde tedavi süresinde tercih edilen az sayıdaki liganda alternatif olabilecek bir potansiyel molekülün yada moleküllerin sentezlenmesi aynı zamanda tıp alanında tedavi amacıyla kullanılan mevcut bilimsel birikim ve tedavi yöntemlerine alternatif olabilecek bir tedavi sürecinin geliştirmeye yönelik moleküllerin tanıtılması söz konusu olacağı değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

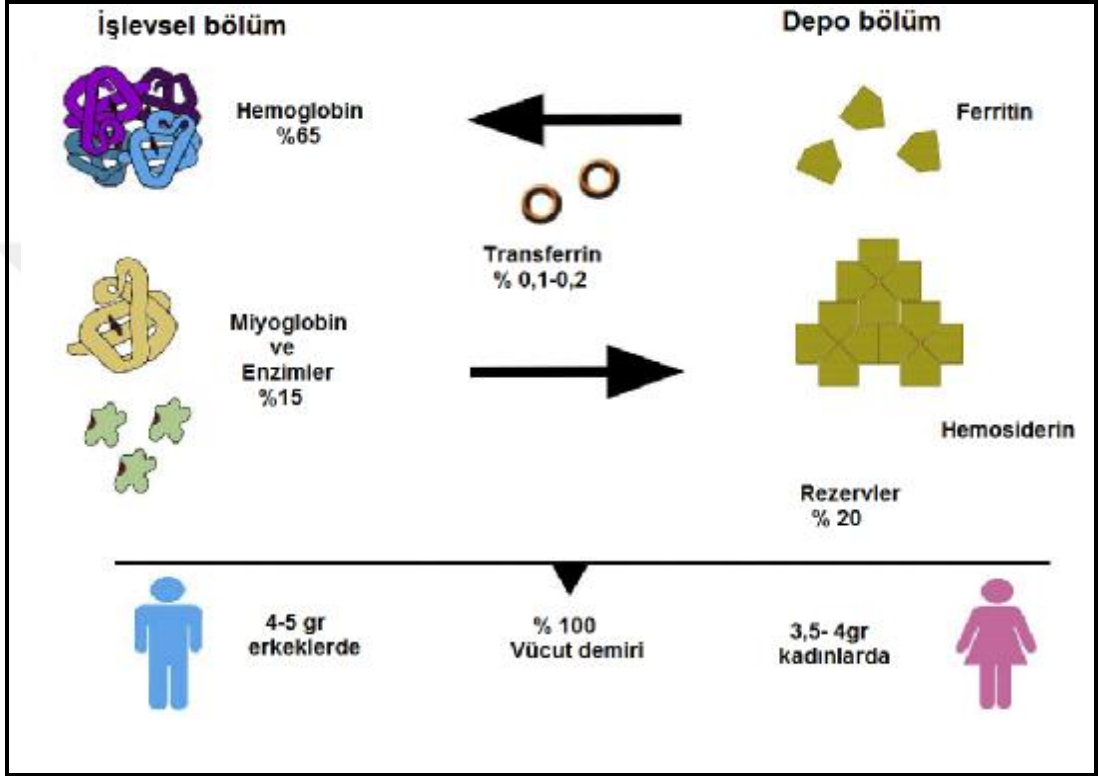
2.1. Demirin Biyolojik Önemi

Demir; mikrobiyal, kanser ve normal insan hücreleri dahil olmak üzere hemen hemen bütün organizmalarda bulunan ve yaşam için gerekli olan bir geçiş metalidir. Aynı zamanda elektron transferi, oksijen taşınması ve aktivasyonu, azot sabitleştirilmesi ve DNA sentezi gibi çok sayıda biyolojik işlemlerde önemli roller oynamaktadır. Özellikle hücrelerde demirin baskılanması hücre siklusunun G1/S fazında durmasına yol açması demirin hücre siklusunun sürdürülmesinde, büyümede ve bölünmede esansiyel metal olduğunu göstermektedir. Bu kadar elzem bir metal olmasına rağmen fazla bulunması halinde de ciddi zararlar verebilmektedir. Bundan dolayı organizma demiri karmaşık mekanizmalarla diyet yolla sağlamakta, toksik olmayan bir şekilde depolayabilmekte ve gerekli olduğu yerlerde kullanmaktadır^{4,19,20,21,22,23}.

Vücutta demir 2 bölümde dağılım gösterir. Birincisi hemoglobin, miyogloblin, transferrin ve enzimler dahil olmak üzere ve her biri demir gerektiren bir kofaktör veya prostetik (iyon ya da hem) gruptan oluşan sayısız bileşiklerin oluşturduğu işlevsel bölümken, ikincisi vücudun mineral rezervleri oluşturan ferritin ve hemosiderin oluşan bir depo bölümüdür (Şekil 1). Normal bir yetişkinde yaklaşık olarak 4-5 gr demir vardır ve 70 kg'lık bireyin vücut demir içeriği yaklaşık 50 mg/kg'dır. Kadınlarda 3,5-4 gr, erkeklerde 4-5 gr demir mevcuttur. Demirin vücuttaki dağılımı incelendiğinde, ortalama olarak Hb'de % 65 (2300 mg), demir depolarında (ferritin ve hemosiderin) % 20 (~700 mg), miyogloblin ve enzimlerde % 15 (~500) oranındadır. Transferrin bağlı olan demir ise sadece % 0,1-0,2 civarındadır.^{24,25,26}

Vücut demir içeriğini, çok sıkı bir aralık içinde devam ettiren mekanizmalar vardır. Bu demir düzeyi aşırı atılımdan çok (vücudun demiri aktif olarak vücuttan atılmasını sağlayan fizyolojik bir mekanizma olmaması) vücuda alınımındaki kısıtlamalar ile sıkı kontrol ve koruma altındadır. Demirin korunmasını sağlayan bu sistem hem demirin tekrar kullanılabilmesi hem de günlük hemoglobin sentezi için gerekli olan miktarı (35 mg) sağlamaya çalışır. Vücuttaki demirin büyük çoğunluğu oksijen bağlayan hem molekülünde yer alır. Miyogloblinin yapısına katılır. Ayrıca pekçok yaşamsal ve biyokimyasal önemi olan olaylarda (hücre büyümesi ve çoğalması gibi) birçok protein ve enzimlerin yapı ve işlevinde görev almaktadır (Çizelge 1).

Örneğin; DNA sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan ribonükleotid redüktazın katalizlediği tepkimede demir kritik rol oynar. Ayrıca bu geçiş metali üzerine yaşam bağımlılığı, kritik biyokimyasal yollarda yer alan anahtar enzimlerin aktif olan bölgelerinde bir kofaktör olarak hareket etmesinden kaynaklanmaktadır (Demir-protoporfirin (hem) ve demir sülfür bileşikleri enzim kofaktörü gibi)^{27,28,29,30}.



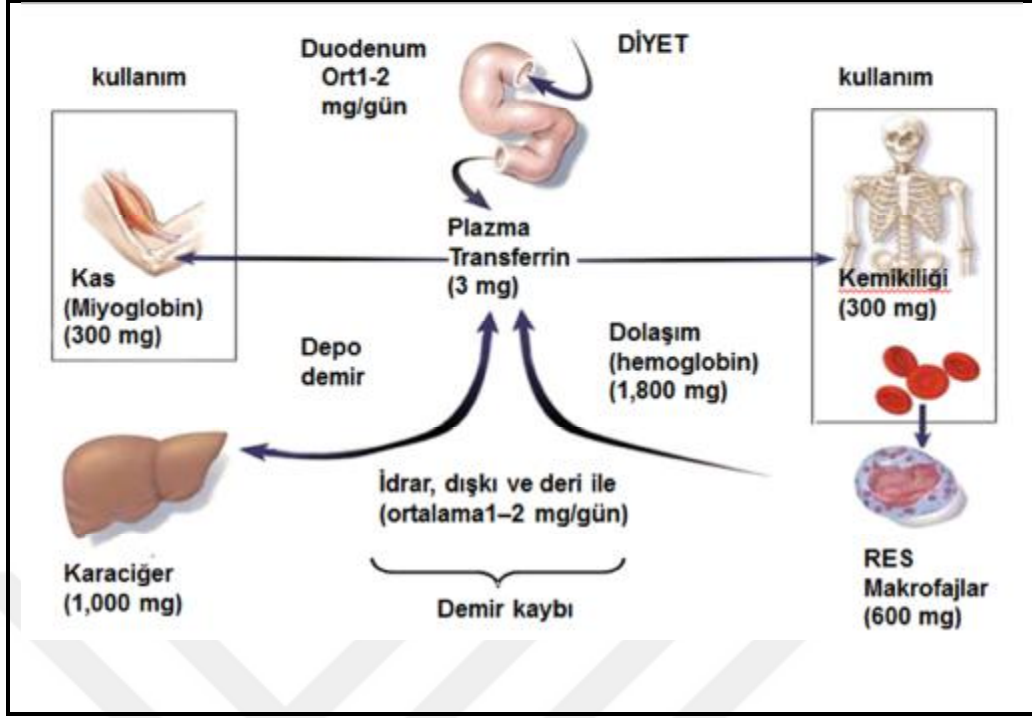
Şekil 1. Vucütte demir dağılımı²⁴

Çizelge 1. Demir içeren bileşik ve enzimler

DEMİR İÇEREN BİLEŞİKLER	DEMİR İÇEREN ENZİMLER
Hemoglobin, Miyoglobin (Oksijen taşıma)	NAD dehidrogenaz
Sitokromlar a,b,c (Oksidatif enerji)	Ksantin oksidaz
Sitokrom P450 (ilaç metabolizması)	Ribonukleotit redüktaz
Katalaz, peroksidaz (elektron alıcı)	Süksinat dehidrogenaz

2.2. Demir Metabolizması

İnsan organizmasında demirin metabolizması klinik bir öneme sahiptir. Bu kadar önemli olan bir elementin vücuttaki değişimi de çok ekonomik şekilde sağlanmakta olup, demir kaybı mümkün olan en az düzeyde tutulmaktadır. Organizmada demir dengesinin korunması, esas olarak diyetteki demir alımı ve kayıplar arasında hassas denge ile düzenlenmektedir. Demir, vücuttan sadece deskuamasyon ve kanama yoluyla kaybedilir. İdrarda çok az demir bulunur. Deskuamasyonla günde yaklaşık 1 mg demir kaybı olur. Menüstrüel kayıp ise 28 mg/siklus kadardır. Böylece, herhangi başka bir yerde kanama yoksa doğurgan çağda erkeklerde 1 mg/gün, kadınlarda 2 mg/gün demir kaybı olmaktadır. Bunun dışında organizmada gerekli olan demirin çoğu, mevcut demirin yeniden kullanımıyla sağlanmaktadır. Eritrositlerin her gün yaklaşık %1'i makrofajlar tarafından fagosite edilmekte ve bu yolla yaklaşık 25–35 mg demir makrofajlara geçmektedir. Diyetle alınan demir ile makrofajlardan sağlanan demir, kanda transferrin (Tf) ile taşınarak, büyük oranda kemik iliğine ulaştırılmaktadır. Plazma Tf bölümünde göreceli olarak az miktarda demir bulunmaktadır; ancak bu demir sürekli hareket halinde olup, birkaç saat içinde yenilenmektedir. Aşırı demir karaciğer ve retikuloendotelyal makrofajlarda parankimal hücreler tarafından depolanır (Şekil 2). Demir hemostazisini bozan durumlarda, insanda demir atılımını sağlayan fizyolojik başka mekanizmalar olmamasından dolayı demir fazlalığına kolaylıkla oluşabilmektedir. Aşırı demir yükü gibi demir dengesi bozuklukları, insanlarda en sık görülen hastalıklar arasında yer almaktadır^{31,32,33,34,35}.

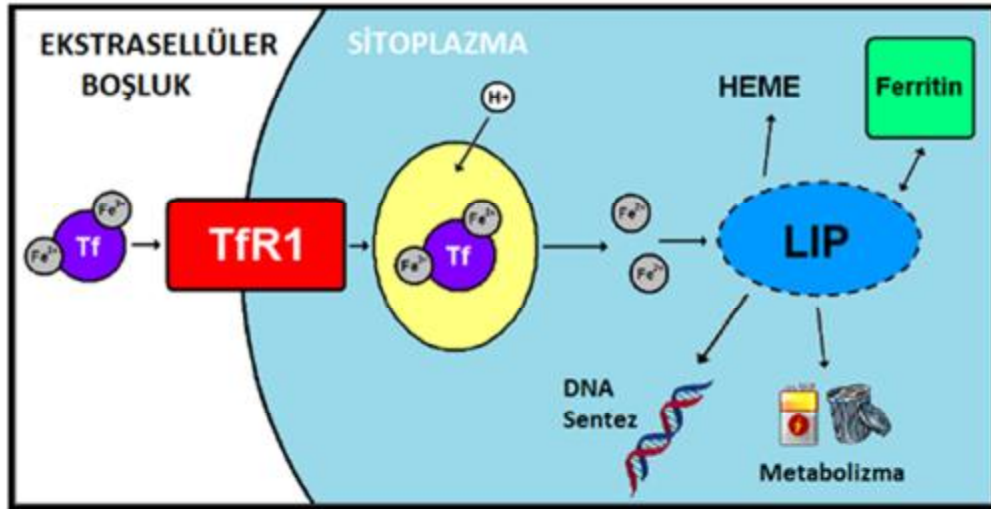


Şekil 2. Demir metabolizması ve geri dönüşüm süreci³⁶

2.3. Demir Döngüsü ve Depolanması

Demir karaciğerde sentezlenen 2 adet demir bağlama bölgesi ihtiva eden (diferrik) glikoprotein yapıda olan ve dolaşımda transferrin ile taşınan bir metaldir. Enterositin bazolateral tarafından ferroportin ile dışarı verildikten ve ferrik (Fe^{+3}) hale getirildikten sonra Tf'e yüksek affinite ile bağlanan demir (diğer moleküllerle tepkimeye girmesini önleyerek) transferrin reseptörü yoluyla eritrosit öncüllerine ve tüm vücut hücrelerine taşınır. Serbest demir eritrosite geçemez. Hemoglobin üreten hücrelerin dışındaki demir ferritin olarak depolanır. Transferrin reseptörü seçici olarak diferrik transferrine bağlanarak oluşan Tf-TfR1 kompleksi, membrandan endositoz yolu ile hücre içine alınır. Tf-TfR1 kompleksindeki demir kompleksten ayrılır. Serbest kalan Fe^{+3} , ferriredüktaz Steap3 proteini ile Fe^{+2} 'ye redükte edilerek endozomdan hücre sitoplazmasına geçer. Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte bu hücre içi serbest demir dayanıksız demir olarak tarif edilir ve labil demir havuzunda (LIP: Labil iron pool) birikir. LIP fizyolojik önemi sahip hem gibi ya da metabolik enzimler gibi çeşitli proteinlerin yapısına dahil edilebilir ve hücre tarafından kullanılması için bir demir hazır kaynağı oluşturur (Şekil 3). Ferritin bağlanma sırasında demirin tekrar Fe^{3+} haline yükseltgenmesi gerçekleştirilir. Hem biyosentezi sırasında demirin porfirin

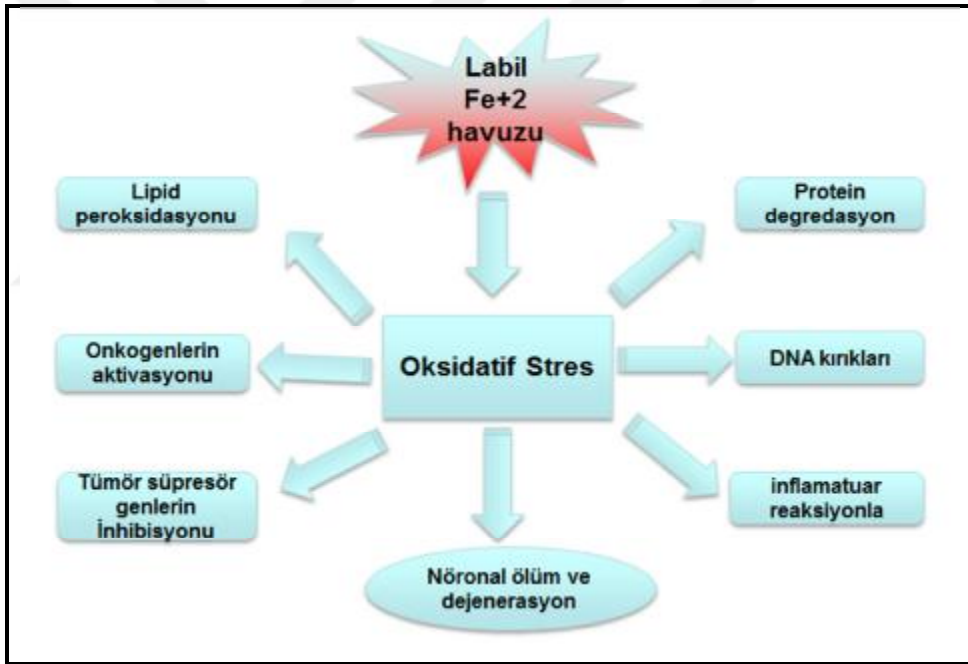
molekülüne katılması, ferroşelataz enzimi üzerinden gerçekleştirilirken, diğer taraftan yaşam süreleri dolan hemoglobince zengin eritrositler parçalanarak içerisindeki demir ferritinde depolanarak tekrar aynı işleme katılır. Taşınım formu, transferrin, aynı zamanda demiri çeşitli enzimler ve miyoglobin yapımında kullanılmak üzere karaciğere taşır. Gerektiğinde, Fe^{+2} bağırsaklarda mukoz membrandan tekrar emilir ve membran içerisindeki kullanılmayacak ise ferritin şeklinde depo edilir. Ferritin molekülü çok fazla miktarda demiri sekestre edebilir ve demiri nontoksik olan ferrik-soluble formunda tutar. Ferritin bir apoprotein alt birimden oluşur ve bu alt birimden 24 tanesi birleşerek ferrihidritfosfat $[(Fe(O)(OH)8FeOPO_3H_2) \cdot H_2PO_4]$ şeklinde depolanır. Bu alt birim 4500 demir atomu içeren bir merkezi (kor) çevreler. Demirin bu karışık yapıya girme ve vücutta kullanılmak üzere ayrılma mekanizması henüz bilinmemektedir, fakat demirin bu nüveden ayrılması için Fe^{+2} 'e indirgenmesi ve Fe^{+2} in şelat oluşturması gerekmektedir. Bu mekanizmanın tersi ile de yine karmaşık molekülün içerisine girer^{2,4,15, 19,36,37,38,39}.



Şekil 3. Hücre içi demir trafiği, depolanması ve kullanımı³⁷

Demir taşınma ve depolanma sırasında hücrelerde ve vücut sıvılarında daima iki oksidasyonu durumu olan ferröz (Fe^{+2}) ve ferrik (Fe^{+3}) şekilde bulunur. Demirin bu benzersiz redoks aktivitesi, bir elektron alıcısı ve vericisi olarak hareket etmesini sağlar. Bu durum bir taraftan gerekli ve yararlı olurken (oksijenasyon, hidroksilasyon ve benzeri birçok metabolik olayı katalize etmesi) diğer taraftan demir fazlalığı sırasında oluşan serbest ya da labil (kararsız) demir, prooksidan olarak serbest oksijen

radikallerinin yapılmasına yol açarak zararlı olabilir. Bunlardan en önemlisi hidroksil radikali olup en fazla reaktif olan radikaldır; yarılanma süresi yalnızca 10^{-9} sn' dir. Hidroksi radikali lipid peroksidasyonu, mutagenез, DNA kırıkları, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inhibisyonu gibi zararlı etkilere neden olabilir. Oksidatif stres yaratarak birçok patolojik olayda yer alır (protein degradasyonu, inflamatuvar reaksiyonlar, yaşlanma gibi) (Şekil 4). Sonuç olarak, serbest demir oksidatif stresde özellikle demir depolarının fazla yüklenmesi ya da inflamatuvar reaksiyonlar sırasında süperoksitlerin fazla üretilmesi gibi durumlarda önemli bir rol oynar. Bu nedenlerden dolayı organizma demiri hiçbir zaman serbest halde bırakmamaya çalışır. Demirin organizmadaki miktarı ve dengesi büyük oranda proksimal bağırsaktan emiliminin ve makrofajlardan salınımının kontrolü ile sağlanmaktadır^{36,40,41,42,43}.



Şekil 4. Labil demir havuzu kaynaklı oksidatif stress ve zararları⁴²

2.4. Demir Fazlalığı

İnsanda hem demir eksikliği hemde demir fazlalığı önemli klinik patolojilere yol açabilmektedir. Özellikle organlarda demir birikmesi vücut için “güvenli olan depo seviyesini” aştığında, potansiyel olarak durumun ciddiyeti maruz kalınan demirin fazlalığına bağlı olup, özellikle karaciğer, pankreas ve kalp gibi hedef organlarda doku hasarı meydana getirerek sağ kalımı olumsuz etkiler. Özgül dokulardaki demir fazlalığı

infeksiyon, neoplazi, kardiyomiyopati, artropati ve birçok endokrin ve nörolojik bozukluklara yol açar (Şekil 5)^{11,44,45,46,47,48,49,50,51}.

Organ	Sonuçlar
Hipofiz	Hipogonadotropik hipogonadizm
Tiroid	Hipotiroidi
Paratiroid	Hipoparatiroidizm
Kalp	Kardiyomiyopati
Karaciğer	Siroz, Karsinom
Pankreas	Diabet
Deri	Pigmentasyon
Gonadlar	Hipogonadotropik hipogonadizm
Eklemler	Artropati

Şekil 5. Özgül dokularda demir birikimi ve ilişkili hastalıklar⁵¹

İnsanda demir fazlalığı iki farklı nedenle ortaya çıkabilir (Çizelge 2);

- 1. Primer demir fazlalığı:** Kalıtsal hemokromatoziste olduğu gibi besinlerden demir emiliminin artması veya gıdalarla aşırı demir alımı neden olur^{52,53}.
- 2. Sekonder demir fazlalığı:** Sürekli kan alımı tedavilerinde olduğu gibi damardan demir alımı neden olur^{52,53}.

Gerçekte hemokromatozis terimi, bütün demir birikim hastalıklarını kapsamaktadır. Demir birikim hastalıklarınının bazılarında hastalığı oluşturacak herhangi ikincil bir bozukluk bulunmamaktadır ve bunlar primer demir fazlalığı olarak isimlendirilir. Diğerleri başka bir hastalığa, özellikle inefektif eritropoez ile ilişkili hastalıklara bağlı gelişir ki bunlar sekonder demir fazlalığı olarak tanımlanır^{54,55}.

Çizelge 2. Demir fazlalığının sınıflandırılması⁵³

1-Primer demir fazlalığı	
Kalıtsal Hemokromatozis	Tip 1 HFE (6p21) gen mutasyonları
	Tip 2 Alt tip A: Hemojuvelin gen (1q21) mutasyonu Alt tip B: Hepsidin gen (19q13) mutasyonu
	Tip 3 Transferrin reseptör 2 gen (7q22) mutasyonu
	Tip 4 Ferroportin gen (2q32) mutasyonu
Ferritin gen mutasyonu	H-ferritin gen mutasyonu
Seruloplazmin gen mutasyonu	
Atransferrinemi	Transferrin gen mutasyonu
2-Sekonder demir fazlalığı	
İnefektif eritropoez	Myelodisplastik Sendrom, Talasemi, Sideroblast anemi
Uzun periyodlar boyunca demir yönetimi	Ağızdan veya damar içi enjeksiyon ile demir almak
Uzun periyodlar boyunca transfüzyon	
Diyet demir fazlalığı	
Karaciğer fonksiyon bozukluğu	Kronik hepatit, Alkolik karaciğer rahatsızlığı, Nonalkolik karaciğer yağlanması
Diğerleri	Porfiri (Porphyria)

2.4.1. Primer demir fazlalığı

Demir homeostazı sırasında görev alan genlerdeki kalıtsal mutasyonlar demir fazlalığı ile sonuçlanır. Bu durum da intestinal demir emiliminin artması ve demir

metabolizmasının bozulmasına neden olur. Yaygın olarak görülen primer demir fazlalığı, kalıtsal hemokromatozis olarak da adlandırılır^{56,57,58}.

Hemokromatozis 4 tip olarak sınıflandırılmıştır. En yaygın Tip I veya HFE hemokromatozistidir. HFE'nin iki ana mutasyonu (C282Y ve H63D) sonucu oluşan hepsidin üretimini azalması bağırsaklardan demir emilimini arttırdığı düşünülmektedir. Hemokromatozisin diğer üç tipi çok daha nadir görülmektedir. Tip II (juvenil hemokromatozis) hepsidinin hatalı üretimi nedeniyle daha ağır demir fazlalığı ile karakterize edilen bir hastalıktır. İki genetik mutasyon içerir. Tip 2A, hemojuvelin (HJV) mutasyonunu içeren tipi iken, Tip 2B HAMP gen mutasyonunun görüldüğü hepsidinin ağır işlev kaybıyla seyreden tipidir. Tip III' de ise transferin reseptörü kusurluyken (kanda demir alımı yapılamaz), Tip IV'de ferroportin mutasyonundan kaynaklanan bir kusur söz konusudur. Tip IV ayrıca bağırsaktan kontrolsüz demir emilimi ile sonuçlanan ve hepsidine karşı duyarsız hale gelmesine neden olabilir. Diğer kalıtsal primer demir fazlalığı bozuklukları son derece nadirdir. Bunlar atranferrinemi (transferrin demir taşıyıcı olmaması) gibi, Ferritin geninde mutasyon ve beyinde demir birikimi (NBIA) ile sonuçlanan nörodejenerasyondur. (Çizelge.2)^{59,60,61,62,63}.

2.4.2. Sekonder demir fazlalığı

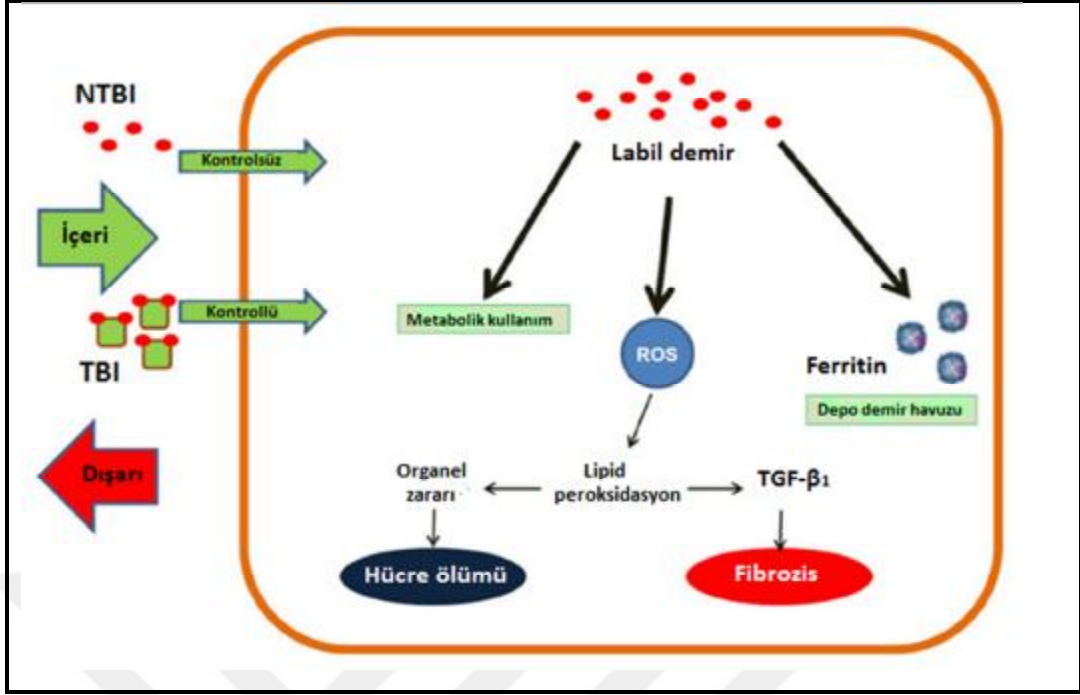
Sekonder demir fazlalığı genellikle vücutta biriken demirin düzenleme sistemi ile ilgili genlerdeki kalıtsal kusurların doğrudan sonucu olmadığı durumu tanımlamak için kullanılır. Genellikle demir fazlalığına neden olan başka bir hastalık veya duruma bağlı olarak gelişir. Sekonder demir fazlalığı hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu, alkolik karaciğer hastalığı ve alkolik olmayan karaciğer yağlanması gibi kronik karaciğer hastalıklarında tetiklenen çok basamaklı bir süreç olabilir. Karaciğerin stresle alakalı bu durumu demir düzenleyici genlerin ekspresyonunu değiştirebilir. Örneğin ROS üretiminin artması ile C / EBP α inhibisyonu yoluyla hepsidinin regülasyonu ve demir düzenleyici genlerin ifadesini değiştirebilir. Buna ek olarak, hepatositler ve karaciğer stres altında hasar görebilir. Bu durum serumdaki hepsidin seviyesinin azalması ve nekrotik hepatositlerden demir salınımına neden olur. Demir homeostazı hepatositlerde ve sonunda diğer dokularda demir birikmesi neden olacak şekilde bozulur. Ayrıca sekonder demir fazlalığına büyük ölçüde transfüzyon bağımlı kalıtsal veya kazanılmış anemilerde örneğin Hemoglobinopatiler, miyelodisplastik sendromlar

(MDS), miyelofibroz ,aplastik anemi, sideroblastik anemi gibi sık kan transfüzyonu yüküne maruz kalan hastalarda görülebilmektedir^{59,64,65,66,67}.

2.5. Demir Toksisitesi

Demir redoks tepkimelerine katılımında merkezi bir rol oynayan, önemli bir geçiş metalidir. İnsan vücudunda redoks olayı sonucu oluşan oksidatif hasarı, güvenli bir şekilde önlemek için transferrin ve ferritin gibi (normal şartlarda intravenöz demir transferrine bağlanarak taşınmakta ve hepatositlerde ferritine bağlı olarak bulunmaktadır) sıkı korunmuş mekanizmalar mevcuttur. Demirin hücrelere alınması ve depolanmasının kontrolünü sağlayan proteinler ve sitozolik demir düzeyi arasındaki etkileşimler normal şartlar altında toksik sitozolik kararsız demir havuzlarının büyümesini önler. Bu koruyucu mekanizma her zaman yeterli olmayabilir (herediter hemokromatozis sendromlarında olduğu gibi). Aşırı demir fazlalığı olan bu gibi durumlarda transferrinin demir taşıma kapasitesi (satürasyonu) dolar ve plazmada transferrine bağlı olmayan demir oluşur^{68,69,70}.

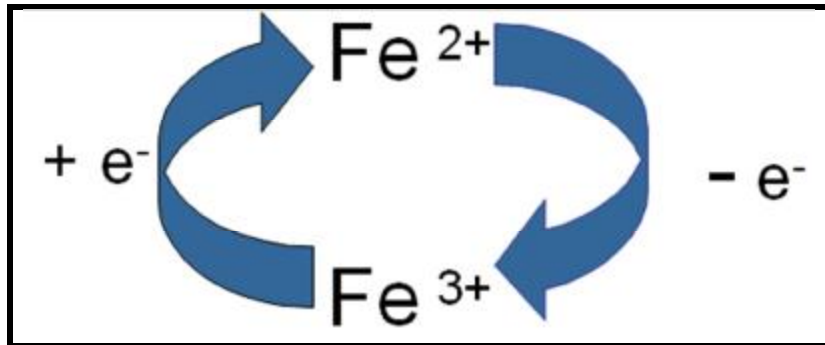
Transferrine bağlı olmayan demirin (NTBI) yapısı ve metabolik aktivitesi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Serbest demir dayanıklı değildir ve organlara nüfuz eden, redoks aktif formudur. Transferine bağlanan demir (TBI) toksik değil iken, NTBI toksiktir ve zararlı hidroksi radikallerin üretimine katılır. Dolasındaki transferrine bağlı demir, reseptörler aracılığıyla hücreler tarafından alınırken, NTBI kontrolsüz bir şekilde dokular tarafından alınır. Bu durum sitoplazmada kararsız demir havuzlarının artmasına neden olur ve bu durum oksiradikallerin oluşumunu katalize eder. Lipid peroksidasyonu, organel hasar ve TGF- β 1 üretimine neden ROS üretimine neden olur Bu durumda hücresel bölümleri hasarlandırarak hücre nekrozu ve fibrozise neden olur (Şekil 6)^{71,72,73,74,75}.



Şekil 6. NTBI hücre ölümü ve fibrozisle sonuçlanması⁷⁵

2.5.1. Toksisitenin mekanizması

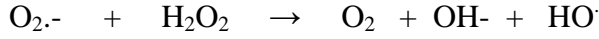
Demirin hücrelere alınması ve depolanmasının kontrolünü sağlayan düzenleyici proteinler ile sitozolik demir düzeyi arasındaki etkileşimler normal koşullarda toksik etkideki kararsız stoplazma demir havuzlarının büyümesini önler. Fazla miktarda demirin özgün doku ve hücrelerde birikimi, serbest demirin artmasını önleyen transferrin ve ferritin gibi bazı proteinlerin kullanılabilirliğini engelleyebilir. Bu durumda, demir dolaşımında serbest kalır ya da dokularda birikebilir. Serbest demir dayanıklı değildir. Çok kolaylıkla elektron kazanabilen yada kaybedebilen serbest demirin kararsızlığı Fenton ve Haber-Weiss tepkimesinde yer almasında önemli bir etmendir (Şekil 7)^{68,76,77,78}.



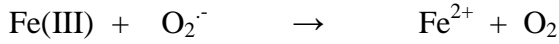
Şekil 7. Demirin redoks döngüsü⁷⁹

Fe^{+2} 'nin katalizör olarak rol oynadığı Haber-Weiss tepkimesinde süperoksit anyonu ($\cdot O_2^-$) ile H_2O_2 tepkimeye girerek zararlı hidroksil ($\cdot OH$) radikallerini oluşturur. Aynı zamanda demir iyonları, hidroperoksitlerin zararlı hidroksi radikaline dönüştüğü "Fenton-tipi tepkimeleri" de katalizlemektedir^{43,71,80,81,82,83,84}.

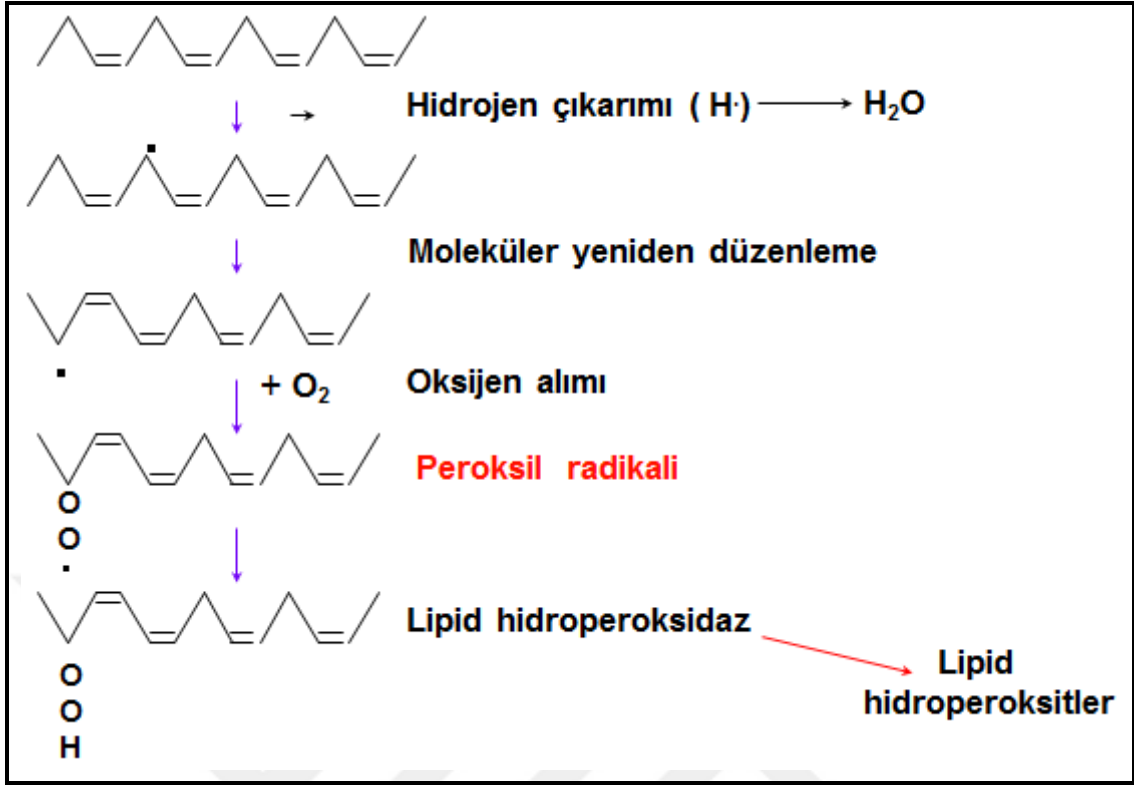
Haber Weiss tepkimesi



Fenton tepkimesi

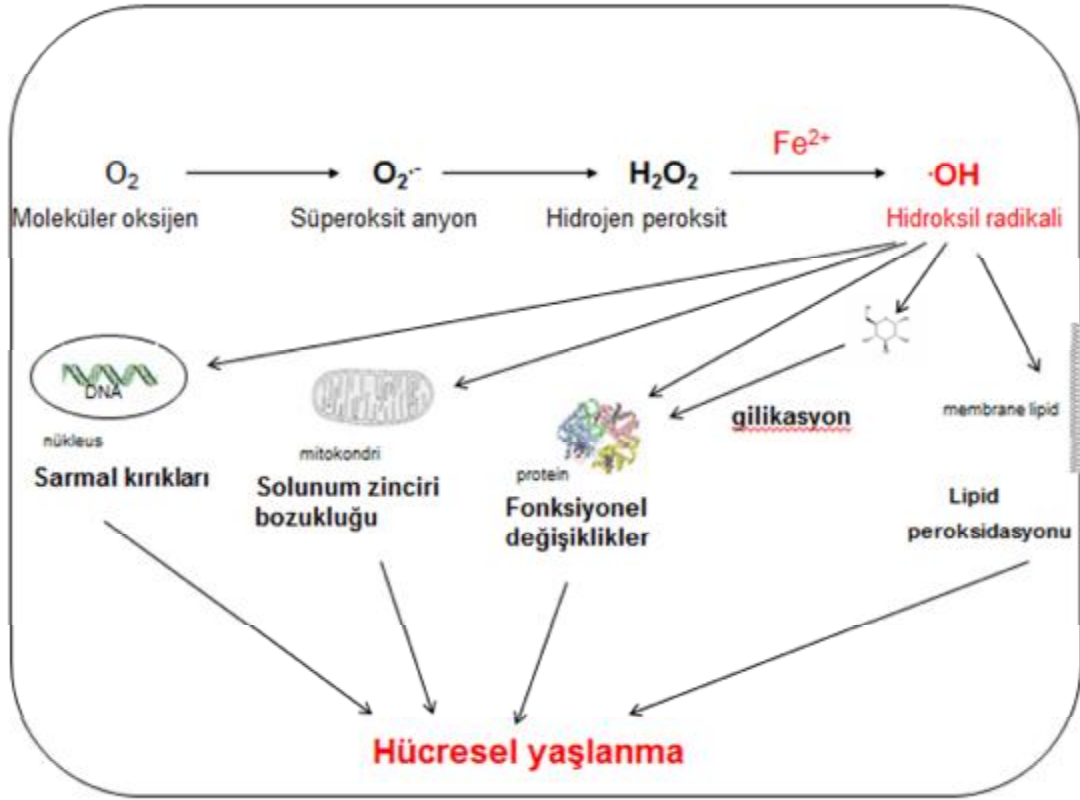


Reaktif oksijen türleri arasında en yüksek toksisiteye sahip olan hidroksi radikali poliansatüre yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırarak lipid peroksidasyonunu başlatmaktadır. Serbest radikal, lipid molekülünden bir hidrojen atomu çıkartarak karbon merkezli lipid radikalinin ($R\cdot$) oluşmasına yol açmaktadır. Lipid radikali kararsız bir bileşik olup bir dizi moleküler değişikliğe uğrar. Daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijen ile tepkimeye girmesi ile lipid peroksil radikali ($ROO\cdot$) oluşmaktadır. Oluşan lipid peroksil radikalleri yüksek tepkime yeteneğine sahip olup diğer bir doymamış yağ asidinden hidrojen atomunu çekerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta ve kendisi de lipid hidroperoksidlere ($ROOH$) dönüşmektedir. Lipid hidroperoksitlerin birikmesi membran yapısını, işlevlerini ve zar bütünlüğünü geri dönüşümsüz olarak bozabilmektedir^{85,86,87,88,89}.



Şekil 8. Lipid peroksidasyonunu⁹⁰

Hidroksil radikali lipid peroksidasyonundan başka mutageniz, DNA kırıkları, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inhibisyonuna neden olur. Aynı zamanda proteinlerin oksidasyonu ve nükleik asit modifikasyonuna neden olarak ilerleyici parankimal hücre hasarı oluşmasına yol açmaktadır. Oksidatif stres yaratarak birçok patolojik olayda yer alır (diyabet, yaşlanma gibi)^{86,90,91,92,93}.

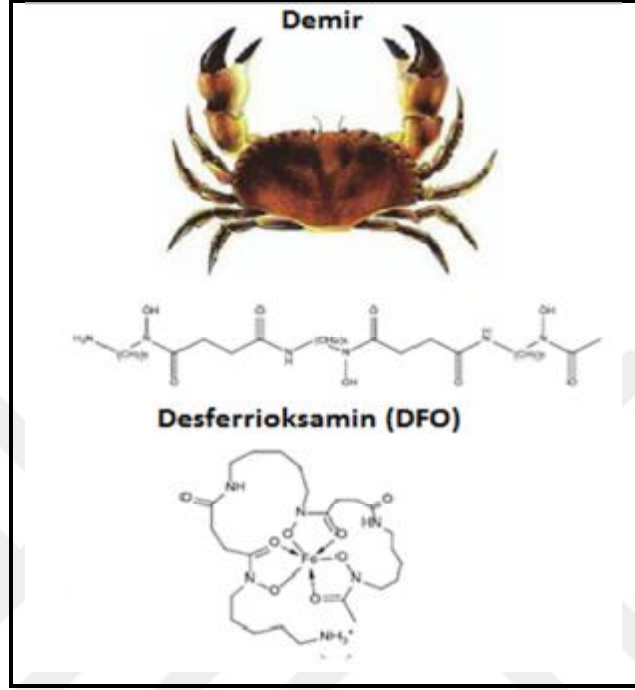


Şekil 9. OH^{\cdot} radikalinin zararlı etkileri⁹³

2.6. Şelat Yapıcı Ligandlar ve Şelasyon

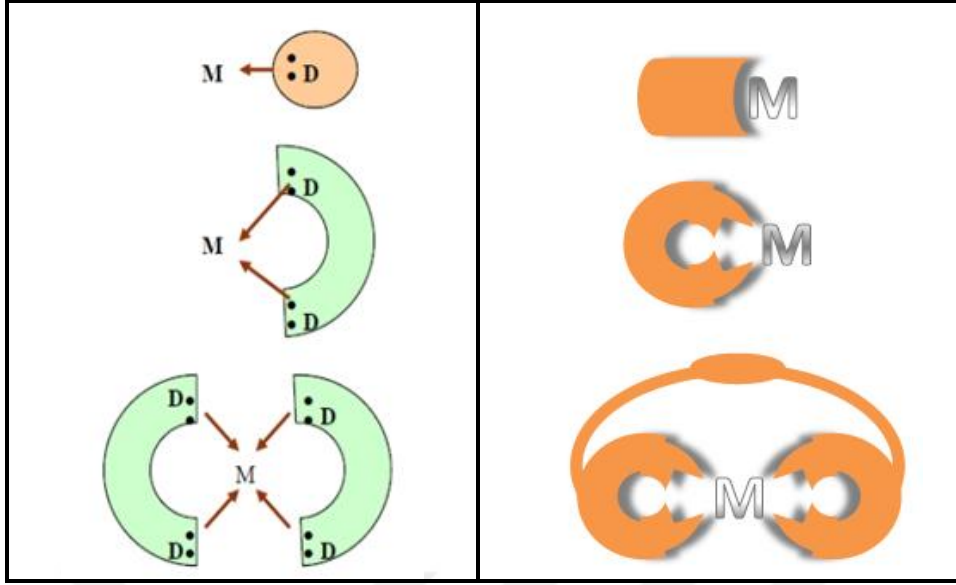
Bir merkez atomunun, ligand adı verilen değişik sayıda atom veya atom gruplarınca koordine edilmesi ile oluşan bileşiğe koordinasyon bileşiği veya kompleks adı verilir. Koordinasyon bileşiklerinde bir metal iyonu, elektron verici (donör) grup ile bağ oluşturmuş durumdadır. Koordinasyon bileşiğinin adı “koordine kovalent bağ” dan gelmektedir. Koordinasyon bileşiklerinde genellikle liganttan metale bir elektron çifti verilmektedir. Koordine kovalent bağlar ile kovalent bağların özellikleri birbirinin aynıdır, sadece oluşumları farklıdır. Kovalent bağlarda, bağı oluşturan her bir atom birer elektron verir, bu iki bağı sadece formal elektron yükleri farklandırabilir. Koordinasyon bileşikleri aynı zamanda bir asit-baz katılma bileşiğidir bir yükü varsa kompleks iyon ismini alır. Metaller, donör atoma sahip ligandlar ile tepkimesi sonucunda bir veya birden çok halkalı bileşikler meydana getirirler. Bu tepkimeler sonunda oluşan koordinasyon bileşiğine “metal şelatlar” denir. Özetle; bir ligandın metal ile şelat oluşturabilmesi için, ilk olarak uygun işlevsel gruplara sahip olması ve daha sonra bu işlevsel gruplardaki N, O, S ve P gibi atomlarla metal arasında kapalı bir hetero-halka

oluşturması gerekir. Şelat deyimi bu bileşiği karşılamaktadır. Şelat kelimesi Yunancada pençe anlamına gelen “chele” kelimesinden gelmektedir, bunu yengecin avını pençelemesine benzetilebilir. Bu durum bir metal iyonunun şelat yapıcı ajan tarafından hapsedilmesinin moleküller işlevini anlamamıza yardımcı olur (Şekil 10)^{94,95,96,97}.



Şekil 10. Demir iyonunun şelat yapıcı ajan (DFO) tarafından hapsedilmesi⁹⁷

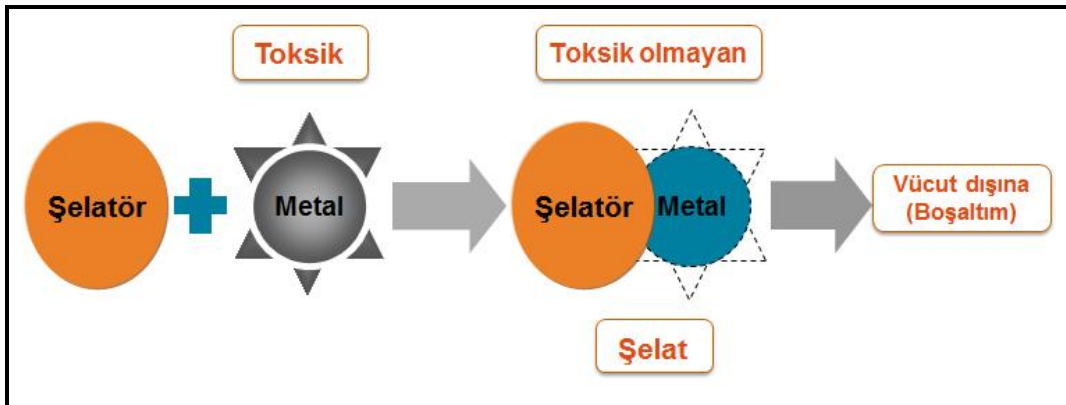
Ligandlar her bir moleküldeki verici atomların sayısına göre yapısal olarak sınıflandırılabilirler. Ligandtaki metal iyonu tutan bağları tanımlamada dişlilik terimi kullanılır. İki veya daha fazla verici atom içeren ligandlar iki dişli, üç dişli ve genellikle de çok dişli olarak adlandırılırlar (Şekil 11). Koordinasyon bileşiğinde yer alan merkezi Fe^{3+} atomu için en uygun oktahedral olarak tanımlanan altı dişli yapıdır. Koordinasyon bileşiğinde yer alan merkezi Fe^{3+} atomu için en uygun oktahedral olarak tanımlanan altı dişli yapıdır. İki atomun bağ oluşturmak üzere bir araya geldiği zaman uygun simetrideki atom orbitallerinin üst üste çakıştığını ve spinleri zıt bir çift elektronun bu yörüngeleri doldurarak bir kovalent bağ oluşturduğunu var sayar. Atom orbitallerinin karışıp kaynaşarak yeni melez orbitaller oluşturmasına hibritleşme denir. Demir atomunun koordinasyon sayısı 6 olmasından dolayı d^2sp^3 hibritleşme gösterir. Bu yüzden oktahedral geometriye sahiptir^{98,99,100}.



Şekil 11. Tek, iki ve çok dişli ligandlar kullanılarak metal ligand komplekslerinin oluşumu¹⁰⁰

2.6.1. Şelasyon Tedavisi

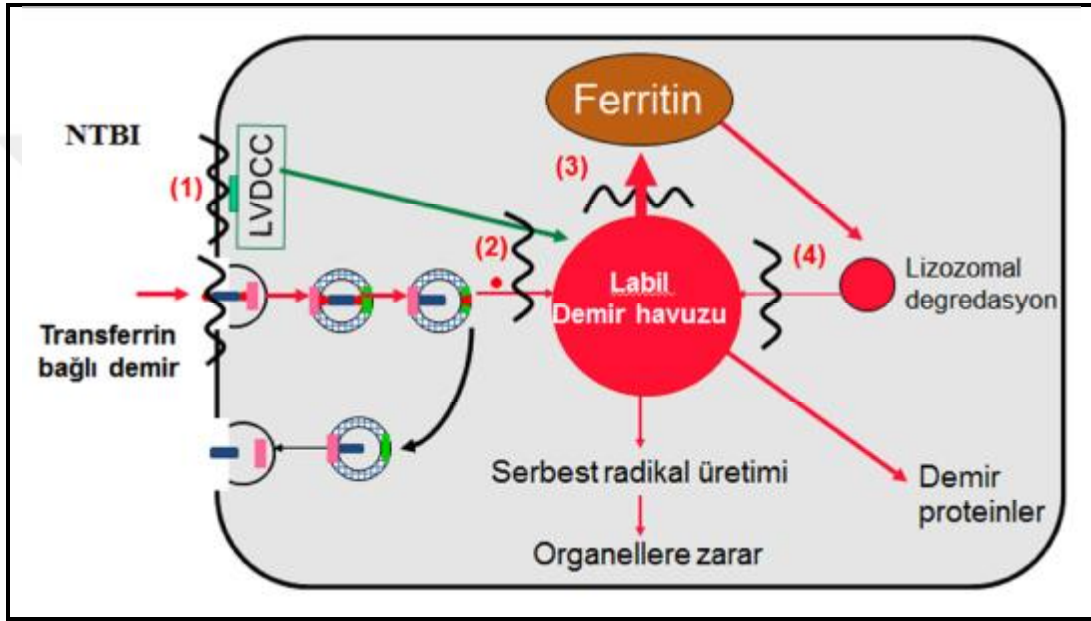
Son yıllarda metallerin farklı ligandlarla oluşturdukları karışık kompleksler üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Demir şelasyon tedavisi, son yıllarda aşırı demir yükü ile karakterize olmayan bozuklukların tedavisinde dahi kullanılması bugün için söz konusudur. (erişkin solunum sıkıntısı sendromu, miyokardiyal iskemi, kanser ve sıtma). Demir şelasyon tedavisinin amacı demir yükünü toksik etkisinin olmadığı güvenli seviyelerde sürdürmektir. Ayrıca bu amaca ulaşıncaya kadar aşırı demiri detoksifiye ederek organizmayı demir toksisitesinden korumaktır^{12,101,102,103,104}.



Şekil 12. Şelasyon tedavisinin prensibi¹⁰⁵

Özetle; demir fazlalığı oluşmuş olgularda;

- Demir toksisitesinden sorumlu tutulan parankimal labil demir havuzu,
- Tf'e bağlı olmayan plazma demiri,
- Retikuloendotelial sistemde eritrosit katabolizmasından salınan demir, demir şelasyonunun başlıca hedeflerini oluşturur (Şekil 13). Böylece demir toksisitesi ve demir fazlalığına bağlı komplikasyonlar önlenmiş olur¹⁰⁶.



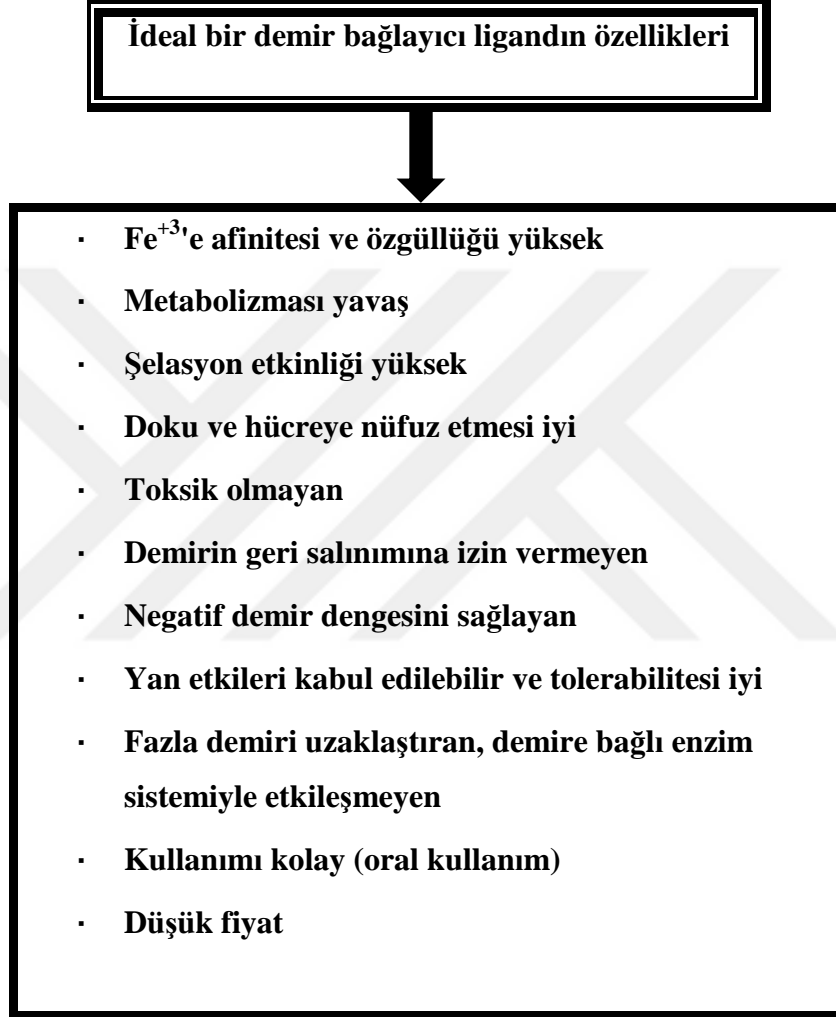
Şekil 13. Şelatörlerin hücre toksisiteyi azaltması¹⁰⁷.

Demir fazlalığı oluşan olgularda NTBI alımı, dağıtım yolları ve şelasyon tedavisi için potansiyel hedefler kırmızı renklerle gösterilmiştir. Normalde demir hücre içerisine transferinle alınırken demir fazlalığı olduğunda voltaja bağımlı kalsiyum kanalları (VDCC) ile hücre içine alınır. NTBI hücre içine girişi hızla devam etmesi labil demir havuzunun aşırı genişlemesine yol açarak, oksiradikal oluşumunu katalize eder. Parankimal hücrelerde şelasyon tedavisi için etkili mekanizmalar: (1) NTBI alımını inhibe ederek; (2) doğrudan labil hücre içi demirin şelatlanması (3) bu demirin yeniden Ferritin sentezine dahil edilmesini önleyerek ve (4) ferritin'in lizozomal yıkımından türetilen demirin kesilmesi yoluyla. Kararsız plazma demirin net etkisi azalır ve bu nedenle devam eden hücresel hasar azalır.

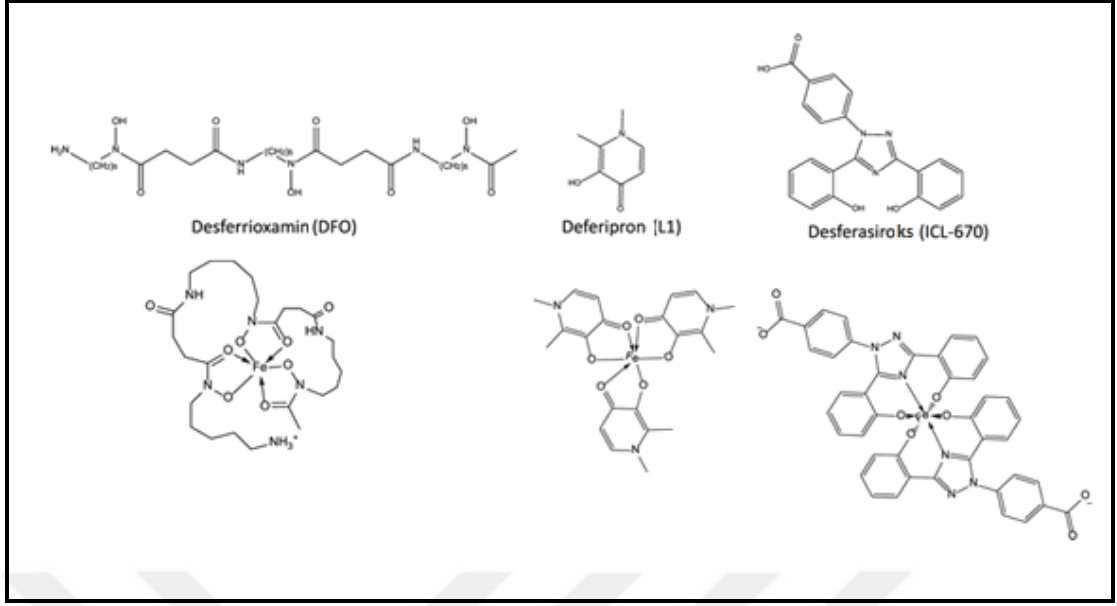
2.6.2. Demir Bağlayıcı Ligandların Yapıları

İdeal bir şelatör sentezlemek için molekülünün kimyasal ve biyomedikal özellikleri dikkate alınmalıdır. (Çizelge 3)^{103,108,109}.

Çizelge 3. İdeal bir şelatörün genel özellikleri^{108,109}



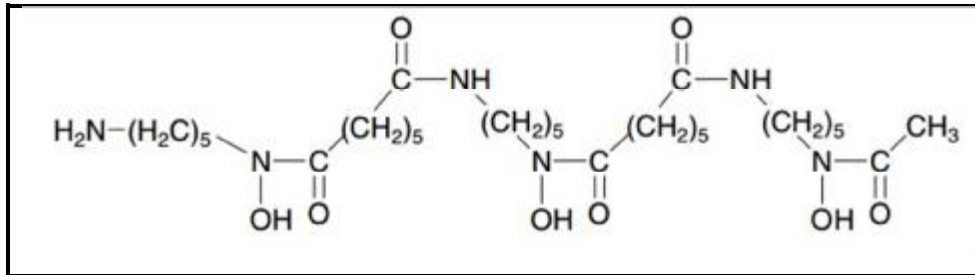
Demir şelasyonu için kullanılan başlıca ligand doğal bir siderofor olan desferrioxamin B'dir. 1970'li yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra oral yoldan aktif demir şelatörler olan deferipron 1990'lı yıllarda, Deferasiroks ise 2000'li yıllarda kullanıma girmiştir. Bugün bu üç demir şelatörü ruhsatlı olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra diğer oral aktif demir şelatörler geliştirme aşamasında olup çalışmalar devam etmektedir(Şekil 14)¹¹⁰.



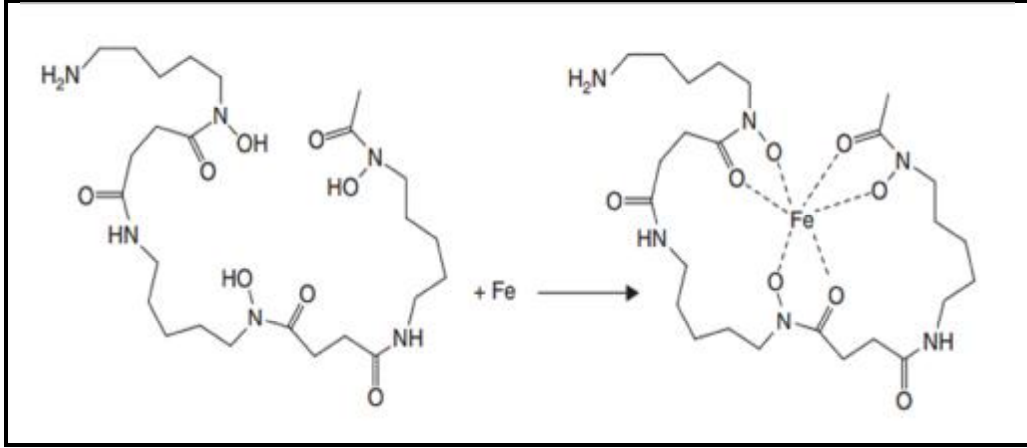
Şekil 14. Şelasyon tedavisinde kullanılan şelatörler⁷⁸

2.6.2.1. Desferoksamin B

Kimyasal yapısı: Desferrioksamin B (Desferal, DFO) , hidroksamat yapısında aktinobakter sınıfından *Streptomyces pilosus* adlı mikroorganizmadan saflaştırılan trihidroksamik asit türevidir. $C_{25}H_{48}N_6O_8$ şeklinde kapalı kimyasal formüle ve 560,684 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Piyasada satılan şekli metansülfanat ile bileşik formda olup kimyasal formülü; N-[5-[3-[(5-aminopentil) hidroksikarbamol] propionamido] pentil]-3-[[5 (N hidroksiasetamid) pentil] karbamol] propionohidroksamik asit monometanosülfonat'tır (Şekil 15). DFO heksadentat (altı dişli) ve Fe^{3+} 'e yüksek afinitesi olan bir şelatördür (Şekil 14). Tek bir DFO molekülü, bir demir atomunun 6 koordinasyon alanının tamamını sağlar ve stabil bir demir şelatör kompleksi oluşturur (Şekil 16)^{79,112,113,114,115,116,117}.



Şekil 15. Desferroksamin metansülfanatın kimyasal formülü¹¹⁸



Şekil 16. Desferrioksamin açık ve kapalı halkalı yapıları¹¹⁷

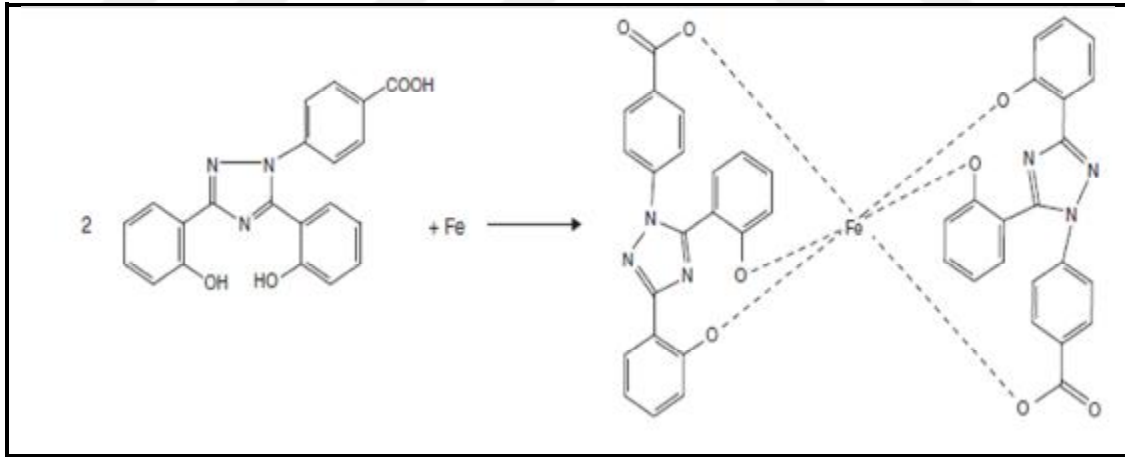
Genel özellikleri: DFO yarılanma ömrü 8-10 dakika olup, plazma klirensi çok hızlı olduğundan subkutan ya da uzun süreli infüzyon yoluyla uygulanabilmektedir. Hidrofilik ve büyük moleküler ağırlıklı bir şelatördür. Bu nedenle oral emilimi yoktur; üriner ve feçes yoluyla atılır. Desferoksamin iki şekilde etkili olur. Birinci yol, plazma ya da hücrelerde bulunan serbest demiri bağlayarak ferrioksamin 4'e dönüştürüp demiri vücuttan atmak; ikinci yol, serbest radikaller üzerinden demirin zararlı etkilerini azaltmaktır. Ferritin ve hemosiderin yapısı içerisinde bulunan +3 değerlikli ferrik formdaki demire bağlanma gösterir ve kararlı bir kompleks haline gelir. Bu durum da demirin Haber-Weiss tepkimesine girmesini engellemektedir. DFO'nun çok ve çeşitli nöroprotektif özellikleri vardır. Bu özellik serbest demirin kullanılabilirlik özelliğini düşürerek hidroksil radikallerinin üretimini azaltmakta ve glutasyon tükenmesi ile indüklenen apoptozisi önlemektedir. Ancak DFO, transferrin, hemoglobin veya hem içeren diğer maddelerdeki demire tutunma göstermez. Başta karaciğer olmak üzere organ ve doku hasarına yol açan fazla demiri azaltarak hasar önleyici rol oynar. DFO spesifik hücre tiplerinde inflamatuvar mediatörlerin salınımını ve ekspresyonlarının düzenlenmesini sağlayabilir. Hücre proliferasyon ve apoptoz çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir moleküldür. Aynı zamanda DFO; sıtma, romatoid artrit, alzheimer, talasemi, demir zehirlenmesi, tümör, böbrek yetmezliği gibi hastalıkların tedavisinde geniş kullanıma sahiptir^{30,112,118,119,120,121,122}.

Ancak oral olarak DFO alındığında etkinliğinin düşük olması, plazma yarı ömrünün kısa olması ve yüksek derişimlerde toksik etki göstermesi gibi önemli kısıtlamalar söz konusudur. Aynı zamanda uzun süreli DFO kullanımında büyüme

geriliği, kemik değişiklikleri ve yüksek frekanslarda sensorinöral işitme kaybına neden olabilmektedir. En önemli yan etkisi agranülositoz ve nötropenidir^{18,30,100,123}.

2.6.2.2. Deferasiroks

Kimyasal yapısı: Deferasiroks (ICL670,DFX), Fe^{+3} 'e afinitesi yüksek, oral yoldan etkili, N-katkılı bis-hidroksifenil-triazol yapısında tridentate (üç dişli) bir demir şelatörüdür (Şekil 14). Bir demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlamak için 2 deferasiroks molekülü gerekir. $C_{21}H_{15}N_3O_4$ şeklinde kapalı kimyasal formüle ve 373.362 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Kimyasal ismi; 4- [bis (2-hidroksifenil)-1H-1,2,4-triazol-1] benzoik asittir. ICL670'in DFO'e kıyasla lipofilik olması ve nispeten daha küçük moleküler ağırlığı olması, hücreye nüfuz etmesi ve demir mobilizasyonunu (uzaklaştırma) desteklemektedir. ICL670 lineer kinetik sergiler ve oral alımı takiben plazma derişimu tepe noktasına 1-4 saat arasında ulaşır. Biyoyararlılığı %70'dir. Ortalama plazma yarı ömrü 8-16 saat olması nedeniyle günde bir kez alıma uygundur. ICL670 demir şelatının metabolizması başlıca glukronidasyon ile olur. % 99 oranında albumine bağlanır. Hepatobiliyer yoldan feçes ile atılır^{17,72,114,109}.



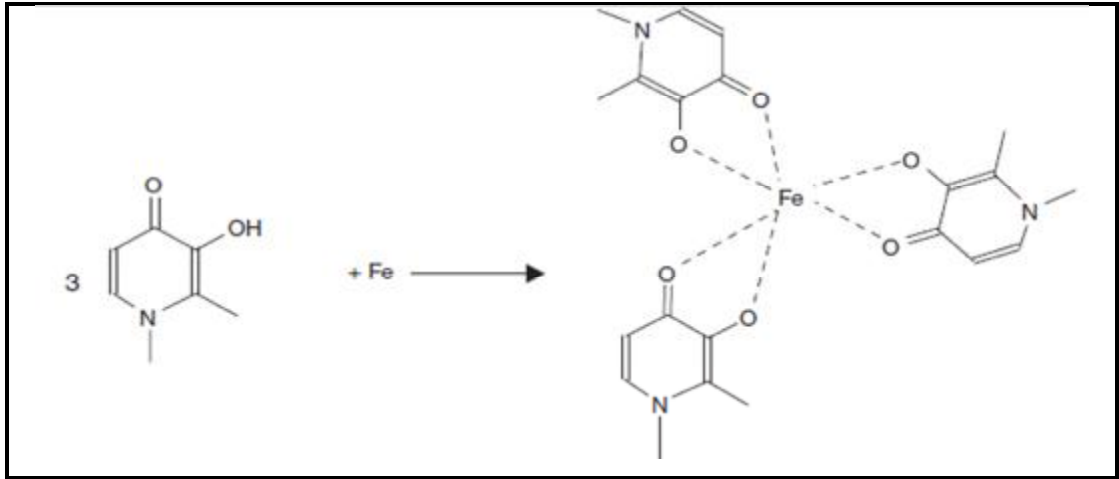
Şekil 17. ICL670'in açık ve kapalı halkalı yapıları¹¹⁷

Genel özellikleri: ICL670, hepatoseluler labil demir havuzunu ve sirkulasyondaki demiri (retiküloendotelial makrofajlardan salınan demir ve NTBI mobilize eder. ICL670'in kalp hücreleri ve subseluler bölümlere girebildiği ve kalp hücrelerinden demiri uzaklaştırdığı gösterilmiştir. ICL670 hayvan modelinde depolanmış kardiyak demiri çıkarmada DFP kadar etkili bulunmuştur Preklinik

çalışmalarda ICL670'in hücreye girişi ve hücreden demir çıkarımı gösterilmiştir. ICL670' in 1998'den beri Faz I ve Faz II klinik çalışmalarda kullanılmakta olup, 2003 yılında Faz III çalışması FDA onayı (FDA tarafından onaylanan ilk oral demir bağlayıcı ajandır. Mart 2008'de ülkemizde ruhsatlandırılmıştır. En sık meydana gelen yan etkiler serum kreatin ve AST, ALT düzeylerinde artış, ishal, bulantı, kusma, baş ağrısı, abdominal ağrı, ateş, öksürüktür. GİS semptomları ve deri döküntüleri doz ile ilişkilidir^{17,72,103,124,125}.

2.6.2.3. Deferipron

Kimyasal yapısı: Deferipron (DFP) bidentate (iki dişli) bir demir şelatörüdür (Şekil 14). Bir demir atomunu bağlamak için 3 DFP molekülü gerekir. $C_7H_9NO_2$ şeklinde kapalı kimyasal formüle ve 139,152 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Kimyasal ismi (1,2-dimetil-3-hidroksi-4-piridinon)'dir. DFP, küçük ve lipofilik bir şelatördür. Oral alımını takiben barsaklardan emilir. Plazma klirensi 3 dozda kullanımında, yeterli plazma derişiminin sürdürülmesini sağlayacak kadar uzundur. Lipofilik oluşu dokuya nüfuz etmesinin daha iyi olmasını sağlamaktadır. Glukuronidasyonunu izleyerek başlıca böbrekler yoluyla atılır^{17,103,126,127}.



Şekil 18. DFP'nin açık ve kapalı halkalı yapıları¹¹⁷

Genel özellikleri: Etkisi esas olarak plazmadaki transferine bağlı olmayan demirin mobilizasyonu ve atılımı şeklindedir. Demir-deferipron şelat kompleksinin hiç yük taşımamasından dolayı membranlardan kolayca geçerek dokularda potansiyel

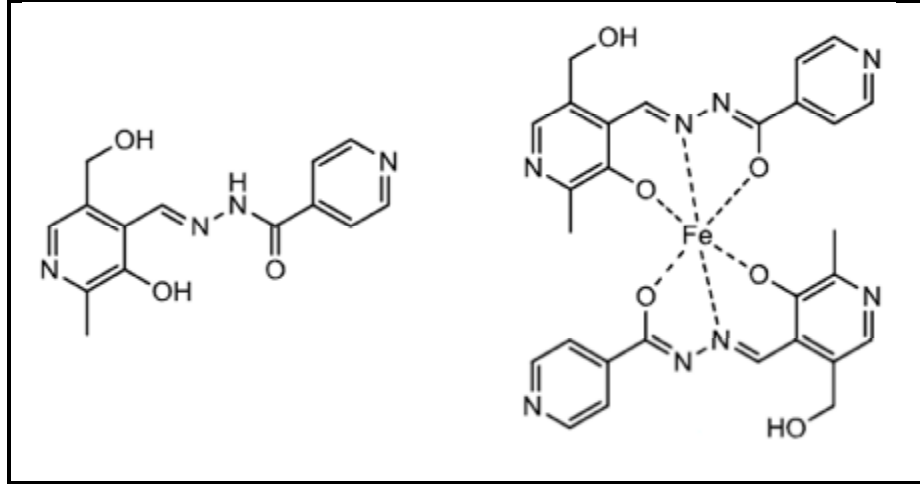
toksik demiri temizlemesi bir avantajdır. DFP, üç şelatör arasında en düşük molekül ağırlığına sahiptir. Molekül ağırlığı düşük ve lipofilik yapıda olması ağızdan uygulamaya olanak verir. Lipofilik yapıda olması membranlardan ve kan-beyin engelini kolayca geçmesini sağlamaktadır. 1994'ten beri lisanslı demir şelatörüdür. Türkiye'de 2004 yılından beri ruhsatlı demir şelatörüdür ve 2006 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı, demir yükü olgularında ilk basamak tedavisi olarak kabul etmiştir^{17,103,109,124,125,128}.

2.7. Klinikte deneme aşamasında olan yeni demir bağlayıcı ligandlar

Son yıllarda, oral yoldan aktif demir şelatörler, deferipron ve deferasiroks'a artan bir ilgi olması nedeniyle her ikisi de kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bu bileşiklerin kalpten demiri harekete geçirebilme yeteneği ilk terapötik demir şelatör desferoksamin göre bazı avantajları klinisyenlere sunulmuştur. Diğer oral olarak aktif demir şelatörleri şu anda geliştirme aşamasındadır¹²⁹.

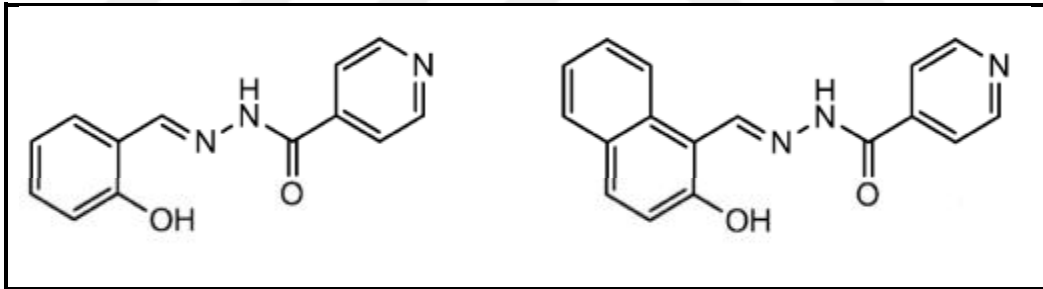
2.7.1. Aroylhidrozonlar

Aroylhidrozonlar sınıfının ilk bulunan bileşiği olan piridoksal izonikotinoil hidrazon (PIH), güçlü demir şelat aktivitesi Ponka ve arkadaşları tarafından 1979 yılında ortaya çıkarıldı. PIH ⁵⁹Fe yüklü retikülosit hücrelerinin inkübasyonu sırasında Hem sentez inhibitörü olarak kaza sonucu (yanlışlıkla) keşfedildi. Şekil 19'da gösterildiği gibi PIH, 2:1 oranında oktahedral demir kompleksi oluşturan üç dişli bir liganttır. PIH düşük moleküler ağırlıklı olması (MA: 287 g/mol), in vivo olarak belirgin şekilde düşük toksisite göstermesi ve nispeten basit ve ucuz bir yolla sentezlenmesi gibi sahip olduğu dikkate değer özellikler nedeniyle son derece ilgi uyandırmıştır. Aynı zamanda PIH diğer metallerle kıyasla Fe⁺³ seçiciliği yüksek seviyededir (Mg⁺² ve Ca⁺², a ilgisi çok zayıfken, Zn⁺² nispeten daha zayıftır). DFO ile karşılaştırıldığında oral olarak aktif olduğu ve PIH'un elverişli şekilde lipofilik oluşu özellikle hücre içi bölmeleri nüfuz etme olasılığını da arttırmaktadır. Diğer şelatörlerle karşılaştırıldığında hızlı membran geçirgenliği ve mükemmel bir antioksidan özellik göstermektedir^{7,37,129}.



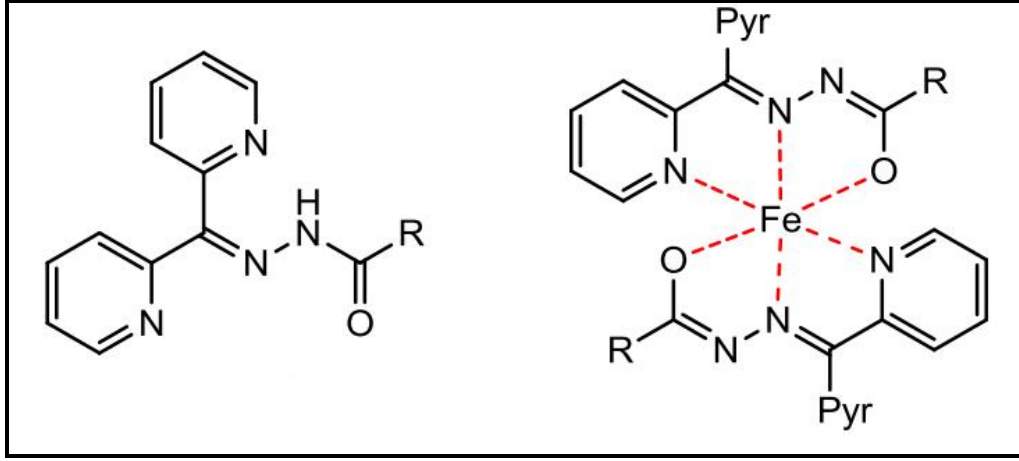
Şekil 19. PIH kimyasal yapısı ve üç dişli (2: 1) demir kompleksi³⁷

PIH analoglarının birçoğu nötr pH'de yüksüz ve bu nedenle hücre erişimi daha hızlı olmaktadır. Bunların en önemlileri salisilaldehit izonikotinoil hidrazon (SIH) ve naftilaldehid izonikotinoil (NIH)'dir. Çok hızlı bir şekilde hücre içine nüfuz etmektedirler (Şekil 20)³⁷.



Şekil 20. Lipofilik aroylhidrazonlardan demir şelatör sırasıyla SIH ve NIH'in kimyasal yapısı³⁷

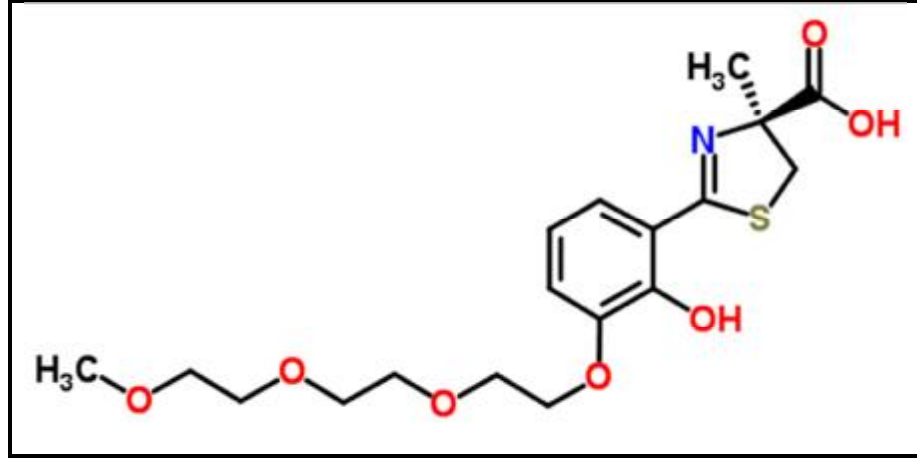
Son zamanlarda SIH ve NIH' den daha fazla lipofilik olan ve anti-tümör aktivitesi yüksek olan yeni bir bileşik piridilketon izonikotinoil hidrazon (PKIH) sentezlenmiştir. N, N, O atomları demiri koordine etmek için kullanılır (Şekil 20). Transferinin demire bağlanmasını önleyen ve kısmen Fenton tepkimesi yoluyla serbest radikal oluşumuna sebep olmasından dolayı hücre büyümesinin güçlü inhibitörleridir. Örneğin PKIH demir komplekslerinin redoks özelliklerinden etkilenen kanser hücrelerine karşı önemli anti-proliferatif etkinliğe sahiptir^{37,130,131,132,133}.



Şekil 21. PKIH kimyasal yapısı ve demir kompleksi³⁷

2.7.2. Deferitazole

Deferitazole FBS0701 (SSP-004184SS) yeni oral kullanıma uygun siderefor sınıfından desazadesferritiosin üyesi üç dişli bir poliyeter türevidir ve klinik olarak geliştirilme aşamasında olan bir ilaçtır. Moleküler ağırlığı 399.459 g/mol ve formülü $C_{18}H_{25}NO_7S$ ’dür. Sistematik bir araştırma sonrasında, gelecek vaat eden biyolojik özelliklere sahip Faz 1 ve 2 klinik çalışmalarına girmiş ve 2015 yılında Faz II çalışması tamamlanmıştır. Bununla birlikte, şimdiye kadar, bu şelatörün detaylı fiziko-kimyasal özellikleri rapor edilmemiştir. Fe(III)- FBS0701 kompleksi fizyolojik koşullar altında kararlıdır ve redoks döngüsü yoktur. Diğer oral şelatörlere göre güvenlik profili yüksek bulunmuştur. FBS0701 günlük tez doz uygulanabilmesi nedeniyle diğer demir şelatörler; DFO ve DFP ile karşılaştırıldığında, farmakokinetik özellikleri açısından daha iyi sonuç göstermiştir. Erişkin ve pediatrik hastalarda, periferik nöropati gibi yan etkiler açısından yakın izlem altında klinik program sürdürülmektedir^{134,135,136}.



Şekil 22. Deferitazole kimyasal yapısı¹³⁶

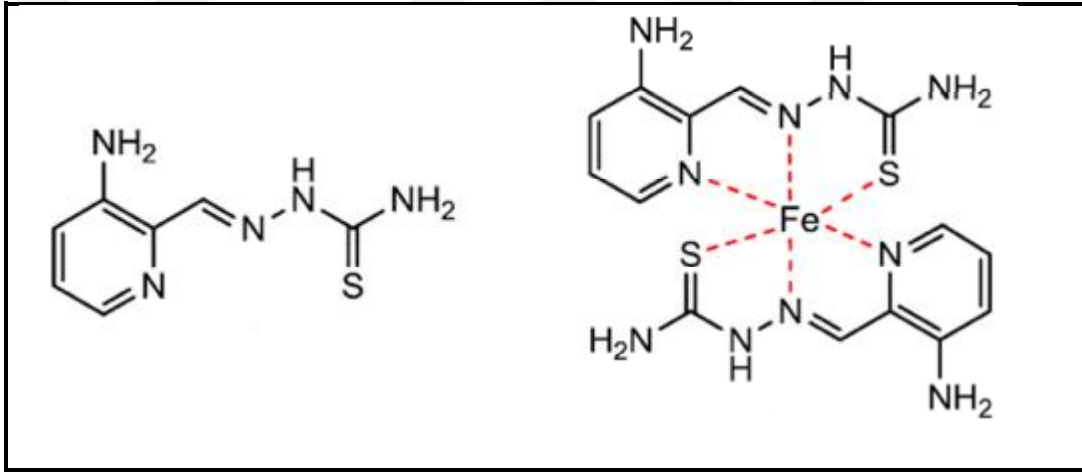
2.7.3. Tiyosemikarbazonlar

Şelatörler arasında güçlü bir anti-tümör aktivitesiyle karakterize edilen tiyosemikarbazon antikanser aktivite göstermesi özelliğinden dolayı tıp dünyasındaki önemi giderek artmaktadır ve kanserle mücadelede reaktif olarak kullanılması araştırılmaktadır. Biyolojik ve farmakolojik etkilerinden dolayı kimya ve biyolojide büyük ilgi görmektedir. Aynı zamanda antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiparazitik, antitüberküloz gibi çok sayıda biyolojik aktiviteye sahiptir^{37,137}.

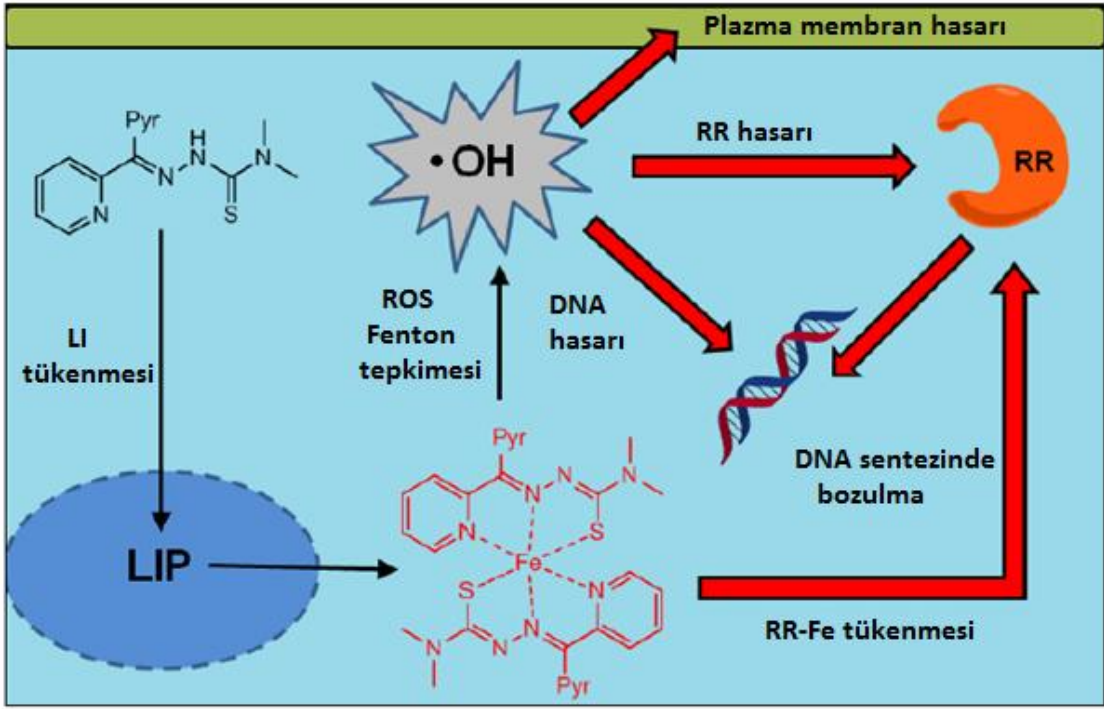
Bu şelatör ailesinin en iyi karakterize elemanı 3-aminopiridin-2-karboksaldehit tiyosemikarbazondur (Triapin:3-AP). Bir anti-kanser madde olarak geliştirilmiş olup Faz II klinik test aşamasındadır. Kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi hala araştırma konusudur. Triapin bir sülfür, iki nitrojen atomuyla demiri bağlayan üç dişli bir liganttır (Şekil 22). En etkili ribonükleotit redüktaz (RR) inhibitörüdür. Klinik olarak RR inhibitörü olarak kullanılan hidroksiüre sadece R₂ inhibe ederken Triapine hem R₂ hemde p53R₂ engelleyerek DNA tamir ve sentezi önlemektedir*.

* Ribonükleotid redüktaz R₁ ve R₂ olarak adlandırılan iki alt birimden oluşur ve deoksiribonükleozid trifosfatın sentezinde hız belirleyen basamağında katalizör olarak rol almaktadır. Son yıllarda p53R₂ diye yeni bir alt birimi de tanımlanmıştır ve p53-bağımlı bir şekilde DNA onarım öncülleri sağlanmasında önemli bir rol oynar. Ribonükleotid difosfatın redüktazın inhibe edilmesi molekül içinde deoksiribosid trifosfatın seviyesini düşürdüğünden, önemli derecede DNA biosentezinin bloke edilmesinde etkilidir. Ribonükleotid difosfat redüktazın inhibe edilmesi kansere karşı mücadelede oldukça yararlıdır.

Triapin demir ile bir kompleks oluşturarak esas olarak antiproliferatif aktivite sergiler. Gerçekten de Triapine Fe^{+3} ile bir kompleks oluşturduktan sonra Fe^{+2} indirgenir ve ROS oluşturulması için bir katalizör olarak hareket eder. Oluşturulan ROS kökü RR tirozil radikali ve onun inaktivasyonuna yol açar. Triapin demir kompleksi redoks olarak aktiftir. Daha güncel çalışmalar Triapin-Fe kompleksinin serbest liganttan daha fazla sitotoksik olduğunu gösterilmiştir. Bu kompleksin redoks dengesine katıldığını göstermektedir. Genellikle kabul edilen görüşe göre basit bir demir tükenmesine bağlı olarak sitotoksite redoks-aktif kompleksinden ROS üreterek hücre içi makromoleküllere zarar verir. Bu etki bazen “double-punch” (çift yumruk) sitotoksik etki olarak isimlendirilir (Şekil 23)^{37,137,138,139}.



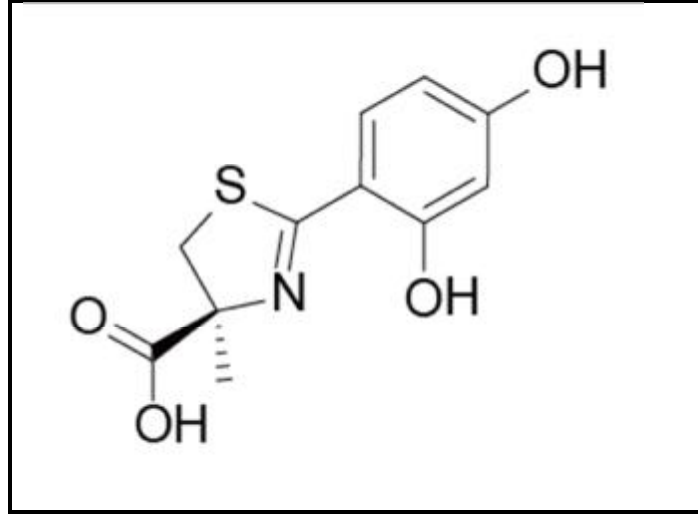
Şekil 23. Triapin kimyasal yapısı ve demir ile kompleksi³⁷



Şekil 24. Tiyosemikarbazon "çift yumruk" sitotoksik etkisi³⁷

2.7.4. GT56-252

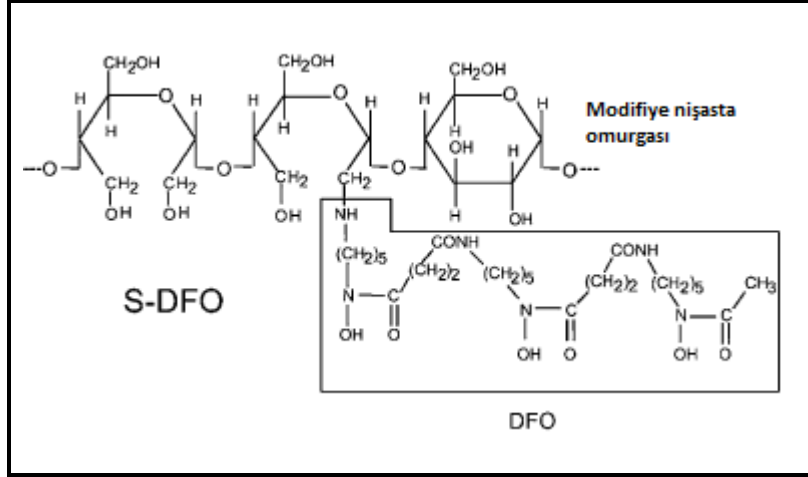
GT56-252 (Deferitrin), deferritiosinden türetilen üç dişli demir şelatörler sınıfından bir ligandır. Moleküler ağırlığı 253.277 g/mol, formülü $C_{11}H_{11}NO_4S$ ' dir. Deferitrin, kronik aşırı demir yükünün tedavisi için klinik gelişiminin erken aşamasında olan, ağızdan alınan yeni bir demir şelatördür (Şekil 25). Genzyme Corp tarafından beta-talasemi major gibi kronik anemi tedavisinde tekrarlanan eritrosit transfüzyonu gerektiren kişilerde aşırı demir yükünün tedavisi için bir oral ilaç olarak geliştirilmektedir. İlk klinik çalışmalar da iyi absorbe edildiği ve büyük ölçüde dışkı yoluyla demir atılımını gerçekleştirdiği görülmüştür. Beta-talasemi erişkinlerin Faz I çalışmasında, deferitrin doza bağlı bir şekilde, demir salınımını teşvik ettiği hiçbir ciddi yan etki veya önemli laboratuvar anormallikleri olmadığı tespit edilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı deferitrin şelasyon monoterapisi eğer onun olumlu farmakokinetik profili, etkinlik, güvenlik ve tolere olarak yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Faz I ve II çalışmaları bitmiştir^{144,145,146}.



Şekil 25. GT56-252 kimyasal yapı¹⁴⁶

2.7.5. 40SD02

Nişasta konjuge deferoksamin (S-DFO hidroksietil-niştastaya bağlı), sık sık transfüzyon gerektiren hastalarda demir dengesini sağlamak için tasarlanmış uzun etkili, polimerik bir şelatördür. S-DFO kovalent olarak modifiye nişasta polimerine DFO takılarak üretilir (Şekil.26). Fe^{+3} için DFO'nun afinitesi ve özgünlüğünü koruması yanında ve DFO'nun hipotansiyon etkileri gibi akut toksik etki göstermez. İlacın nişasta omurgası bölünmeye karşı hassastır ve öncelikle böbrek yoluyla atılır. Beta talasemi bulunan 16 hastada artan tek dozlu bir çalışmadan elde edilen sonuçlar, S-DFO'nun 7 günlük demir dengesini elde edebildiğini göstermiştir. Bu çalışma sonunda karaciğer demir içeriğinde % 13' lük bir azalma gerçekleşirken, S-DFO' nun kardiyak demir durumu üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür. S-DFO'nun akut demir zehirlenmesinin tedavisi için de uygun olabileceği görüşüne varılmıştır. Bu sonuçlar, talasemi ve diğer aşırı demir yükü bozukluğu olan hastalarda S-DFO'nun çoklu doz çalışmalarına başlamayı desteklemektedir. Klinik çalışmaları hala devam etmektedir^{147,148,149}.



Şekil 26. S-DFO kimyasal yapı¹⁴⁹

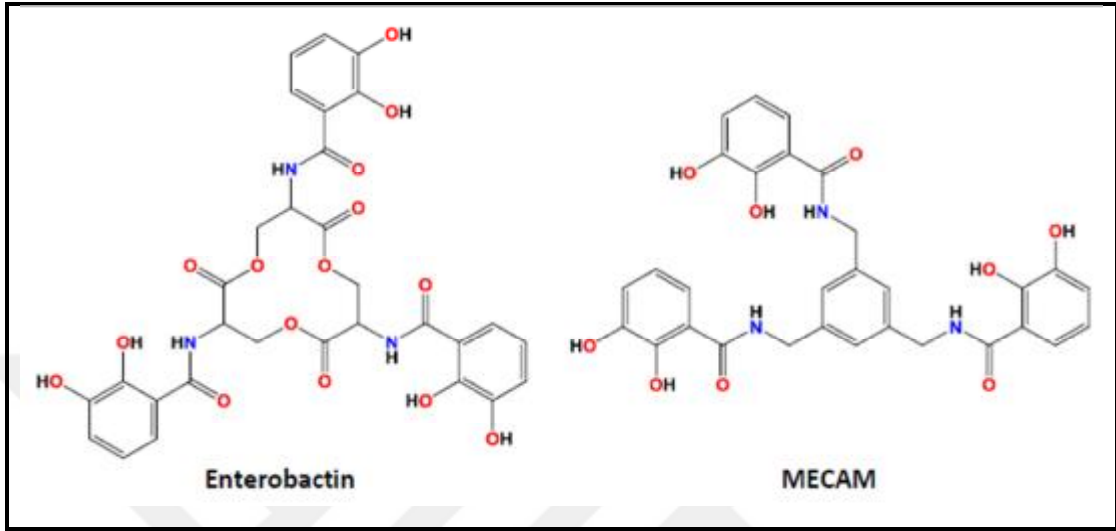
2.8. Fe⁺³'e seçici uygun ligandlar

Yüksek sipinli Fe⁺³ küresel simetrik 0.65 Å çapında artı üç değerli katyondur. Yüksek yük yoğunluğu nedeniyle sert Lewis asidi olarak sınıflandırılır ve oksijen gibi zayıf polarize atom içeren ligandlarla en kararlı bağları oluşturabilir (Kateşoller, Hidroksamatlar, Aminokarboksilatlar, Hidroksikarboksilatlar, Hidroksipiridinonlar ve Hidroksipironlar gibi)^{150,151}.

2.8.1. Kateşoller

Kateşoller (1,2-dihidroksibenzen), fonksiyonel grup olarak, mikrobiyal sistemler için demir elde eden bir siderofor olan, enterobaktin ihtiva eder. Bu esas olarak gram negatif bakterilerde *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* da bulunur. Basit iki dişli kateşoller için 2:1 Fe⁺³ kompleksi fizyolojik pH'de baskındır. Bu tür komplekslerde demir tamamen solventten sakınılamaz ve hidrojen peroksit ve oksijenle etkileşime, dolayısıyla muhtemel hidroksil radikallerin oluşumuna açıktır ve redoks çevirimi sonucunda oluşan demire ulaşabilir. Kateşol bazlı ligandların diğer bir problemi de yükseltgenmeye açık olmalarıdır. Aynı zamanda doğal siderofor molekülün taklit etmek amacıyla MECAM [1,3,5-N,N,N-tris (2,3 dihidroksibenzoil) triaminobenzen] sentezlenmiştir (Şekil 27). MECAM güçlü bir şekilde demir bağlamaktadır. Sadece kateşollün yarı parçası göz önüne alındığında, her bir oksijen atomunda yüksek elektron yoğunluğuna sahiptir. Bununla birlikte, bu yüksek yük yoğunluğu protonlar için yüksek affinite göstermektedir. Böylece, kateşol ile kationların bağlanması pH'ye oldukça

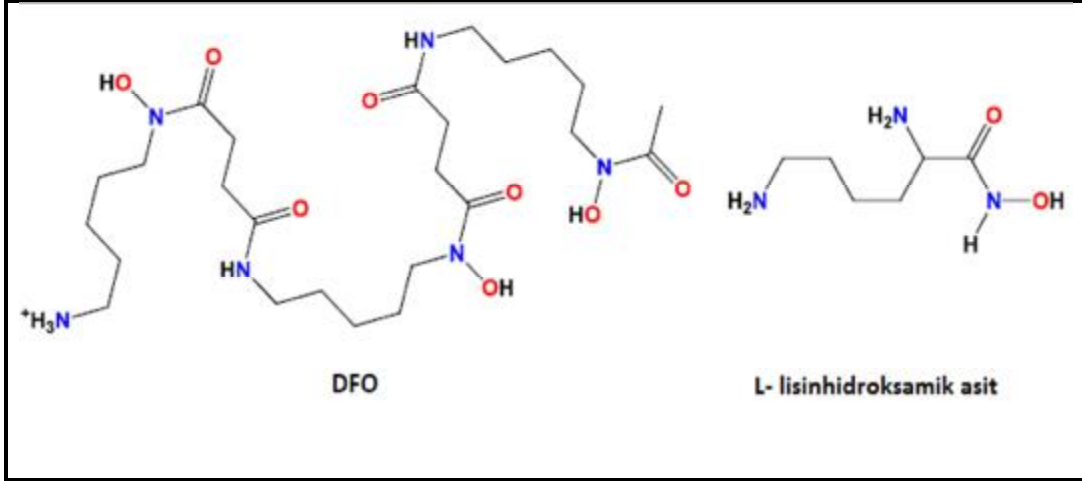
duyarlıdır. Öte yandan, bir ligand, fizyolojik (pH 7,4), tamamen protonlanmış formu ve bunun sonucu olarak da sıfıra eşit olan bir net yüke sahip olan bir yüklü molekülün daha verimli bir şekilde, hücre membranları içine nüfuz edebilmektedir (Şekil 27)^{13,152,153,154}.



Şekil 27. Altı dişli Kateşoller¹⁵⁴

2.8.2. Hidroksamatlar

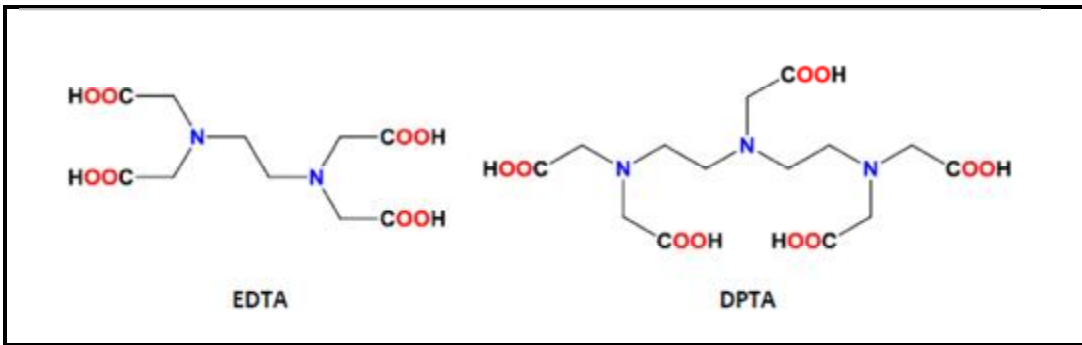
Hidroksamatların demire affinitesi kateşolden daha düşüktür. Ancak kompleks nötral tris-kompleks oluşturma avantajları aynıdır. Önemli doğal altı dişli ligand DFO bu gruba dahildir ve üç hidroksamat kısım içermektedir (Şekil 28). Sadece bir hidroksamat ihtiva eden bileşikler iki dişlidir ve pH 7,4, yeterli ligand derişimunda 3:1 kompleks oluşturabilirler. Ancak, iki dişli hidroksamatlarının Fe^{+3} affinitesi klinik olarak demiri temizlemek için yeterli değildir. Bu yüzden sadece dört dişli ve altı dişli hidroksamatlar, fizyolojik koşullar altında etkilidir. Kateşoller gibi hidroksamatlarda dibazik katyonlara göre tribazik katyonları tercih ederler. Bağıl olarak düşük protonlanma sabiti nedeniyle ($pK_a \approx 9$) güçlü demir-ligand kompleks oluşumunu sağlar. Aynı zamanda birçok hidroksamatlar metabolik olarak kararsız olup sadece oral yoldan emilimleri zayıftır. Bugüne kadar bu sorunu çözmek için çok sayıda yeni yaklaşımla deri altı uygulanan DFO' ya benzer aktiviteye sahip uygun bir hidroksamat türevi araştırılmasına rağmen bulunamamıştır^{13,122,154,155,156}.



Şekil 28. Altı dişli (DFO) ve iki dişli (L-lisinhidroksamik asit) Hidroksamatlar¹⁵⁴

2.8.3. Aminokarboksilat

Aminokarboksilat ligandlar Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ve dietilentriamin penta asetik ait (DTPA) gibi mükemmel Fe^{+3} şelatlayıcı ajanlardır. Ancak bu moleküllerin Fe^{+3} seçicilikleri oldukça düşüktür. Bu yüzden çinko gibi vücuttan diğer yararlı metallerin uzaklaştırılmasına neden olmaktadır. Özellikle DTPA ligandını kullanan hastalarda çinko azalması gözlenmiştir. Ayrıca, demir ile oluşturulan kompleksler redoks tepkimelerini katalize serbest radikalleri üretir. Nitekim $Fe^{+3}/EDTA$ kompleksinin redoks potansiyeli fizyolojik indirgeyici tarafından azalmasını sağlar^{13,122,154}.

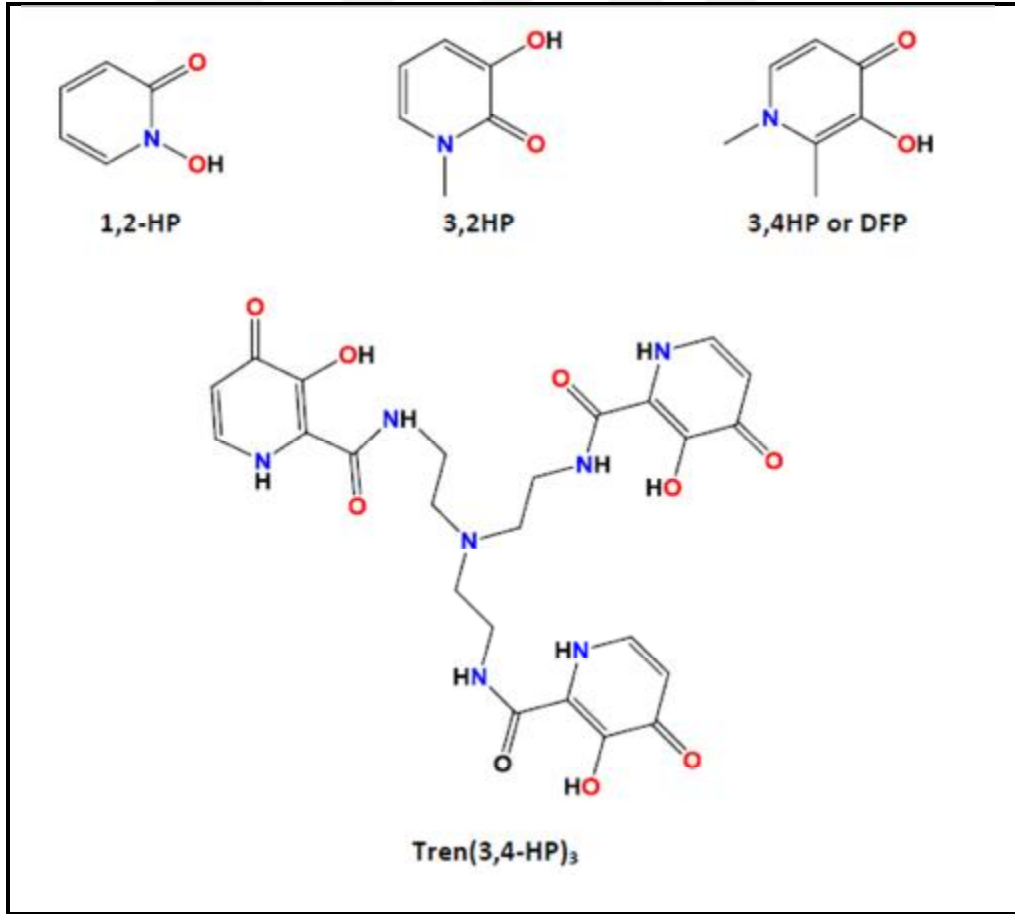


Şekil 29. EDTA ve DTPA kimyasal yapı¹⁵⁴

2.8.4. Hidroksipiridinonlar

Hidroksipiridinonlar (HPO) Hidroksamatlar ve kateşollerin işlevsel gruplarının karakteristiklerini birlikte gösteren N-heterosiklik çekirdek şelatör ailesidir. Hem

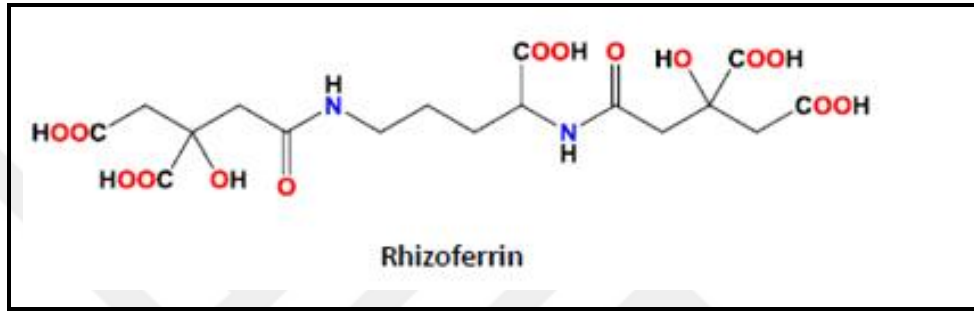
yüksek şelasyon kapasiteleri hem demire seçiciliği gibi özelliklerinden dolayı en çok çalışılan bileşiklerdir. Metalin iki visinal oksijen atomu ile koordine edildiği beşli şelat halkası oluştururlar. İki dişli ligand olarak hareket eden HPO'lar 1-hidroksipiridin-2-on, 3-hidroksipiridin-2-on ve 3-hidroksipiridin-4-on olmak üzere üç sınıfa ayrılır. (Şekil 30). Şu an kullanımda olan önemli bir oral şelatör olan 1,2- dimetil-3-hidroksipiridin-4-on (DFP) bu gruba dâhildir. Dibazik katyonlara göre tribazik katyonlara afiniteleri daha yüksektir. Karbonil fonksiyonel grubunun yüksek pKa değeri, halkadaki azot atomunun ortaklanmamış elektronlarından kaynaklanmaktadır. 3-Hidroksipiridin-4-on Fe^{+3} ile geniş bir pH aralığında kararlı 3:1 kompleks oluşturur. HPO'ların ikili ve üçlü kombinasyonlarıyla birçok türevi sentezlenmiştir. Hidroksipiridinonlardan Tren(3,4-HP)₃ Fe^{3+} e yüksek affinite göstermektedir. Ne yazık ki çok yüksek moleküler ağırlığından dolayı gastrointestinal yol içinde iyi emilmemektedir. Sonuç olarak ağızdan tatbik edilemez^{13,154,157}.



Şekil 30. İki dişli ve altı dişli HPO¹⁵⁴

2.8.5. Hidroksikarboksilatlar

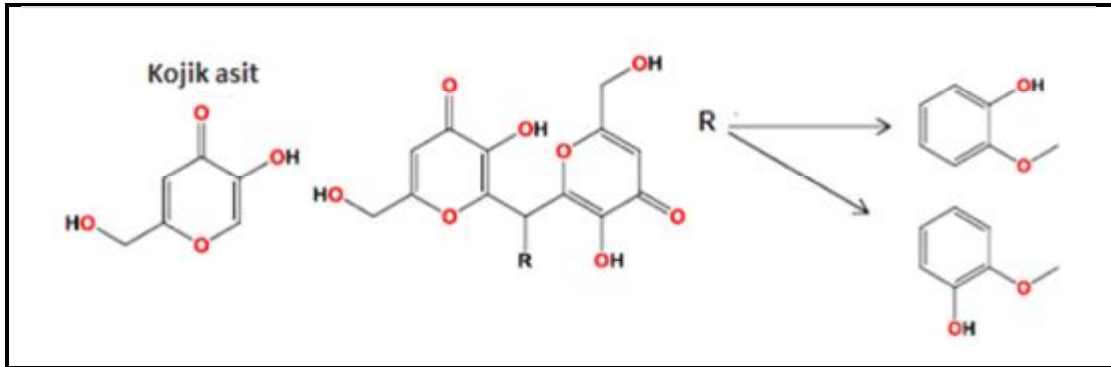
Hidroksikarboksilat ligandlar, tüm koordinasyon atomları oksijen olduğu için aminokarboksilatlar göre Fe^{+3} için daha seçici ve kuvvetli şelatlayıcı ajanlardır. Bu kategoriye rizoferrin ve onun prekürsörü sitrat dahildir (Şekil 31). *Rhizopus microsporus*' dan ilk olarak izole edilen altı dişli hidroksikarboksilat ligandı olan Rizoferrin, DFO' ya benzer bir şekilde 1:1 kompleks baskın it Fe^{+3} kompleks kimyalarına sahiptirler^{13,154}.



Şekil 31. Hidroksikarboksilatlar¹⁵⁴

2.8.6. Hidroksipironlar

HPO' lara benzeseler de demi rila kararlı beş üyeli halkalı yapı oluştururlar. Literatürde en çok çalışılan hidroksipironlardan biri kojik asittir. Oksidasyon ve indirgeme, alkilasyon, nükleofilik ve elektrofilik süstitüsyon tepkimeleri gibi ek tepkimelerin ortaya çıkmasını sağlayan altı üyeli heteroaromatik bir halka içerir. Günümüzde kojik asit daha güçlü türevlerinin geliştirilmesi için ümit verici bir moleküldür. Türevlendirme üzerine çok çalışılmaktadır^{13,154,158}.



Şekil 32. Kojik asit ve türevleri¹⁵⁴

2.9. Fe(III)' e seçici şelatörlerin tasarım özellikleri

Terapötik açıdan yararlı oral aktif demir şelatörlerin tasarımı için gerekli olan kritik özellikler, son çalışmalar ışığında bu başlık altında toplanmaya çalışılmıştır. Yeni ortaya çıkacak demir şelatörleri klinisyenlere demir şelasyon metodolojisini, hastalık durumlarına uygulamalarını ve kişisel şelasyon rejimleri tasarlamalarını sağlayacaktır. Bu yüzden oral olarak aktif, toksik olmayan, seçici bir demir şelatöre ait başarılı tasarım, çok aranan bir hedef haline gelmiştir. Yeni geliştirilmiş demir şelatörlerin tasarımı yapılırken yıllar içinde daha iyi tanımlanmış belirli kimyasal özellikler şu şekilde özetlenebilir:

- Şelatlayıcı molekülün ve komplekslerinin uygun toksisite profili;
- Komplekslerinin kararlılığı;
- Demire karşı seçicilik;
- Komplekslerin uygun redoks potansiyeli;
- Enzim inhibisyonu, kompleks yapısı, lipofilik ve moleküler ağırlığı;
- Vücutta aktif olmayan metabolitlere dönüştürülmemesi;
- İyi bağırsak absorpsiyonu ve hedef hücreler de iyi biyoyararlanımı;
- Şelatlayıcı ve endojen ligandlar arasında demirin hızlı kinetik değişimi;
- Oluşan komplekslerin atılımını kolaylaştıran faktörler;
- Vücut sıvıları metabolik metal dengesini bozmamaları^{13,129,159}.

2.9.1. Toksikite

Demir şelatörlerinin yarattığı toksisite demir içeren metalloenzimlerin inhibisyonu; metal seçiciliğinin olmaması nedeniyle fizyolojik olarak çok önemli Zn⁺² gibi metallerin kaybı; demir komplekslerinin Fe⁺² - Fe⁺³ arasında redoks döngüsü ve dolayısıyla serbest radikal oluşturma olasılıkları, demir kompleksinin kinetik hareketliliğiyle demirin vücutta yeniden dağılımı gibi çok sayıda faktörle ortaya çıkabilir. Fe⁺³'e özgül şelatörlerinin karşılaştırmalı toksisitesi Çizelge 4'de verilmiştir^{13,158}.

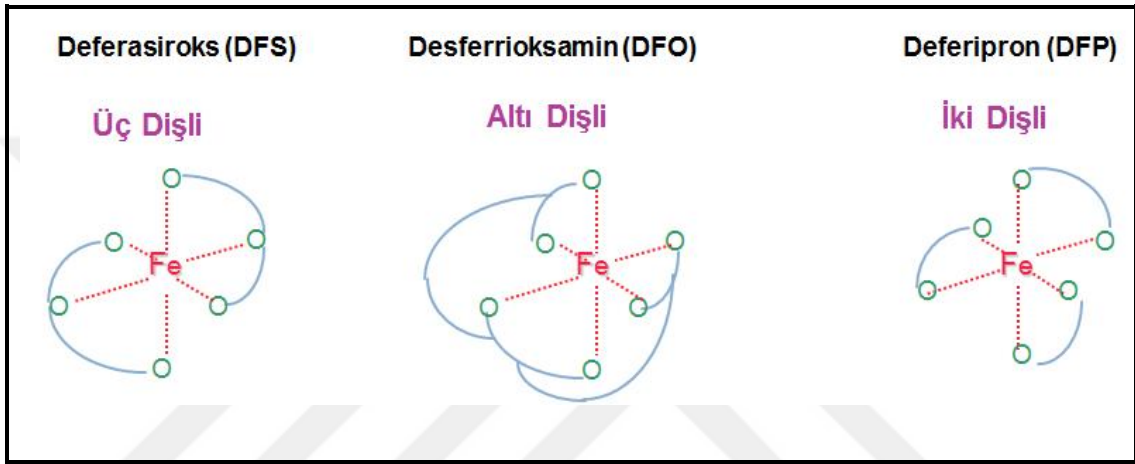
Çizelge 4. Karşılaştırılmalı toksisite özellikleri¹³

İki Dişli	Üç dişli	Altı dişli
Tüm koordinasyon atomlarının “sert” oksijen merkezleri olması Fe(III) yüksek seçicilik sağlayabilir.	Tüm koordinasyon atomlarının “sert” oksijen merkezleri olması zordur. Bu nedenle metal seçiciliği azdır.	Tüm koordinasyon atomlarının “sert” oksijen merkezleri olması Fe(III) yüksek seçicilik sağlayabilir.
Demir çekim gücü derişime bağlıdır.	Demir çekim gücü derişime bağlıdır.	Demir çekim gücü derişime bağlıdır.
Kinetik olarak hareketlidir demirin yeniden dağılımı muhtemeldir	Kinetik olarak hareketlidir demirin yeniden dağılımı muhtemeldir	Kinetik olarak hareketsizdir demirin yeniden dağılımı gözlenmez
Kısmen koordine olmuş 2:1 kompleks oluşturur.	Kısmen koordine olmuş 1:1 kompleks oluşturur	Tamamen koordine olmuş 1:1 kompleks oluşturur
Polimerik kompleks oluşturmazlar	Hücrede polimerik kompleksler oluştururlar	Polimerik kompleks oluşturmazlar

2.9.2. Kompleks Kararlılığı

Belirli bir metal iyonunu aynı anda bağlayabilen koordinat gruplarının sayısına bağlı olarak, bir şelatör iki dişli, üç dişli ve altı dişli olarak sınıflandırılır. Oluşan komplekslerin ve bunların stokiyometreleri ligandın dişlilik sayısı ile belirlenir (Şekil.32). Yani bir metal kompleksinin kararlılığına ilişkin en önemli faktörü elde edilen ligand-metal kompleksinde oluşan şelat halkalarının sayısı ve büyüklüğüdür. En uygun şelat halka boyutları, beş veya altı atomdan oluşur. Şelat halkalarının sayısı, tek bir şelatör bağlı donör atomlarının sayısını artırarak geliştirilebilir. Örneğin, koordinasyon sayısı altı olan bir metal iyonu, iki dişli ligand ile üç halka veya altı dişli ligandla beş halka oluşturabilir. Dolayısıyla Fe(III) kompleksinin termodinamik kararlılığını en üst düzeye çıkarmak üzere tüm altı vericiyi tek bir molekülde bulundurmak, yani altı dişli ligand oluşturmak gereklidir. Demir-ligand komplekslerinin kararlılığı, altı dişli > üç dişli > iki dişlilik sırasını izler. Altı dişli şelatörler Fe⁺³ için idealdir, zira toplam ligand derişimuna ve metal / ligand oranına bağlı miktarlarda

değişken stokiyometri sadece 1: 1 oranında kompleks oluştururlar. Daha düşük stokiyometrik demir kompleksleri bazen tehlikelidir, örneğin Fe^{+3} , ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesini önlemezler, çünkü Fenton tepkimesi yoluyla ROS üretimi gerçekleşir. Buna karşılık, iki dişli ve üçlü dişli ligandlar, daha düşük moleküler ağırlıklarından dolayı oral kullanılabilirler için, altı dişli şelatörler açısından tercih edilebilir. Tedavi maliyetini düşürmesi ve hastalar tarafından tolere edilebilirliği artırması nedeniyle oral etkinlik, biri ilaç için yüksek talep edilme özelliği sağlar^{13,108,159,160,161}.



Şekil 33. Şelasyon tedavisinde kullanılan şelatörler¹¹¹

2.9.3. Metal seçiciliği

Şelatlama ajanları Fe^{+2} ve Fe^{+3} oksidasyon durumuna göre tasarlanabilir. Yüksek spinli Fe^{+3} , 0.65 Å yarıçaplı tripozisyonda bir katyonudur ve DFO'da bulunan yüklü hidroksamat oksijen atomları gibi ligandlarla en kararlı bağları oluşturur. Buna karşın daha düşük yük yoğunluğuna sahip Fe^{+2} katyonu, 2,2-bipiridil ve 1,10 fenantrolin gibi yumuşak azot içeren ligandları tercih ederler. Bu ligandlar Cu^{+2} ve Zn^{+2} gibi biyolojik öneme sahip ve organizma için gerekli olan divalent metal iyonlarına karşı da afinite gösterebilirler. Dolayısıyla Fe^{+2} ye karşı seçici nontoksik ligand tasarımı oldukça zor ve hatta imkansız olabilir. Aksine Fe^{+3} seçici ligandlar, dibazik katyonlara göre tribazik katyonlara (Tribazik katyonların çoğu, Al^{+3} ve Ga^{+3} gibi canlı hücreler için gerekli değildir) daha seçicidirler. Fe^{+3} klinik şelatör tasarımı için daha uygun bir hedefdir. Şelatlayıcı maddelerin metal iyonları ile etkileşimi, ilaç biyoyararlanımı ve muhtemel yan etkiler için belirleyici olabilir. Bu nedenle komplekslerin termodinamik parametrelerinin Cu, Zn, Ca, Mg gibi ana endojen çift değerli metal iyonlarıyla titiz bir

şekilde belirlenmesi, biyolojik sıvıyı temsil eden standart koşullarda gerçekleştirilmelidir^{13,124}.

2.9.4. Komplekslerin uygun redoks aktivitesi

Bir metal iyonunun toksik etkisi, dokulara ve organlara karşı belirgin yaralanmalara neden olan reaktif oksijen türlerinin oluşumuna bağlıdır. Organizmada ROS oluşumunu önlemek için serbest demir miktarı, demir bağlayıcı proteinler tarafından sınırlanır. Bununla birlikte demir, dengesiz koşullarda bu proteinlerden harekete geçirilebilir ve bu gibi durumlarda redoks tepkimelerine katılır ve ROS üretir. Bu olaylar antioksidan korumanın ötesine geçtiğinde, oksidatif hasar oluşur. Bu gibi durumlarda demir redoks potansiyeli, ROS üretimini engelleyen uygun şelatörler kullanılarak kontrol edilebilir. Fe⁺³ için yüksek seçiciliğe sahip Siderofor molekülleri, demirin biyolojik koşullarda redoks döngüsünü önler. Aksine, azalan redoks potansiyelleri ile nitelendirilen azot esaslı ligandlar kullanıldığında, koordine edilmiş demir daha fazla korunmaz ve enzimatik olarak indirgenebilir. Bu durum demir yakalamak için kullanılan moleküller için istenmeyen bir özelliktir^{13,108,159}.

2.9.5. Enzim İnhibisyonu

Hem-içeren enzimler genellikle demir şelatörleri tarafından doğrudan inhibe edilmez, çünkü porfirin grupları demir sıkıca bağlıdır. Aksine, lipoksijenaz, aromatik hidroksilaz ve ribonükleotid redüktaz gibi hem olmayan demir içeren enzimler, demir kenetleme maddeleri tarafından inhibe edilebilir. Örneğin; Lipoksijenazlar genellikle hidrofobik şelatörler tarafından engellenmektedir, bu nedenle bir şelatöre hidrofilik özellikler getirilmesi, bu tür engelleme potansiyelini en aza indirmeye eğilimindedir. Bu ilişki, Hidroksipiridinonlar da piridinon halkasındaki 1-alkil boyutu doğrusal olarak arttığında lipoksijenazları inhibe etme eğilimindedir Ancak artan 2-sübstituent büyüklüğü için daha az belirgindir. Demir şelatörlerin fiziko kimyasal özelliklerinin dikkatli modifikasyonu ile, metalloenzimlere daha az etki edecek şekilde tasarlanmalar mümkündür^{13,108}.

2.9.6. Lipofilik ve molekül ağırlık

Demire spesifik şelatör moleküllerin için terapötik etkisini optimize etmek amacıyla yeterli derişimde hedef bölgelere ulaşması gerekir. Oral olarak aktif bir demir şelatlayıcı, gastrointestinal sistemden etkili bir şekilde emilme ve hedef bölgelere erişerek biyolojik membranları çaprazlama yeteneğine sahip olmalıdır. Hider'e göre biyolojik zarlar yoluyla difüzyonu yöneten üç ana faktör (geçirgenliği etkileyen faktör) moleküler büyüklük, lipofiliklik ve net yüküdür (iyonizasyon). İyi emilim veya nüfuza sahip bir bileşik, 5'ten az hidrojen bağı vericisi, 10'dan az hidrojen bağı alıcısı, 500 Da'dan daha düşük bir molekül ağırlığı olmalıdır Bileşiğin iyonik durumu membran geçirgenliğini de etkiler, yüklü olmayan türler genellikle biyolojik membranlara yüklü olanlardan daha hızlı nüfuz eder. Bu koşullara uymak için, demir şelatörlerin seçimi sınırlıdır ve çoğu heksadentat ligandları, molekül ağırlığı 500 Da'dan fazla olduğu için bu durumdan hariç tutulur. Daha düşük molekül ağırlıkları nedeniyle iki dişli ve üç dişli ligandlar daha yüksek emilim için üstün adaylardır^{13,159,162}.

2.9.7. Kompleks yapısı

Serbest radikal üretimini önlemek için demir oksijen ve hidrojen peroksitten doğrudan kaçınacak şekilde koordine edilmelidir. DFO gibi çoğu altı dişli ligandlar kinetik olarak etkisizdir (inerttir) ve demir yüzeyini maskeleyerek hidroksil radikal üretimini minimuma indirir. Bununla birlikte, tüm altı dişli ligandlara bağlı demirin yüzeyini tamamen maskelemek için yeterli boyuta sahip olmayabilir; bu durumda oluşan kompleks, demirin serbest radikaller üretme kabiliyetini artırabilir. Bu durum özellikle kompleksleşmemiş Fe(III)'ün çözünürlüğünün çok düşük olduğu nötral veya alkali pH'lerde önem kazanır. Bu tür davranışlara ait klasik örnek, yedinci bir koordinasyon alanının su molekülü tarafından işgal edildiği EDTA tarafından gösterilmektedir. Bu su molekülü, kinetik olarak kararsızdır ve biyolojik ortamda bulunan oksijen, hidrojen peroksit ve diğer birçok ligand ile hızla değiş tokuş yapabilir. İki dişli ve üçlü ligandlar ise kinetik olarak daha kararsızdır ve Fe(III) kompleksleri, düşük ligand derişimlerinde ayrışma eğilimindedir. İki ve üç dişli ligandlarla demir komplekslerinin kısmen ayrışması Fe⁺³ katyon yüzeyini diğer ligandlara açık hale getirir¹³.

2.9.8. Şelatlayıcı ve endojen ligandlar arasında demirin hızlı kinetik değişimi

Şelatör maddelerin davranışı, kompleks oluşum termodinamiğinin yanı sıra kinetik faktörlere de bağlıdır:

- 1- Şelatör maddesinin bozulması: Birçok şelatör madde, vücutta ana molekülün şelatlama özelliklerini kaybeden türe dönüştürülür. Bu tepkimeler, hidrokspiridinin glukuronidasyonundan Trien'in asetilasyonuna veya BAL ve SH içeren ligandlar arasındaki -S-S-bağlarının oluşumundan çok farklı olabilir. Doğru ilaç seçimi, metabolik dönüşümün hızlı olması durumunda, örneğin deferoksamin'in deri altı infüzyon olarak uygulanması hayati öneme sahiptir.
- 2- Plazmada serbest metal iyonu ve şelatlayıcı arasındaki kompleks oluşumu; Plazmada dolaşımdaki toksik demir iyonları genelde transferrin olarak büyük makro moleküllerden sitrat gibi düşük molekül ağırlıklı ligandlara kadar değişen farklı endojen moleküllere bağlanır.
- 3- Endojen moleküllere bağlı olan metal ile şelatör maddesi arasındaki tepkime değişim reaksiyonu; Endojen moleküllere bağlı ferrik iyon ile şelatör maddeler arasındaki değişim tepkimesinin kinetiği, şelatlayıcı maddelerin yapısı, dişlilik sayısı ve boyutu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır¹⁵⁹.

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (ÇÜBAP) birimi tarafından TDK-2015-3577 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- Asetilaseton ($C_5H_8O_2$)
- Metil iyodür (CH_3I)
- Bütil iyodür (C_4H_9I)
- Etanol (C_2H_5OH)
- Hidroksilamin hidroklorür ($NH_2.HCl$),
- Kloral hidrat ($CCl_3CH(OH)_2$),
- Benzen
- Tetrabütil Amonyum bromür (TBAB)
- Hidroklorik asit(HCl),
- Sitrik asit ($C_6H_8O_7$)
- 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit ($C_6H_6O_8S_2$)
- Glisin ($C_2H_5NO_2$)
- 8-Hidroksikuinolin-5-sülfonik asit ($C_9H_7NO_4S$)
- Nitrilotriasetik asit ($C_6H_9NO_6$)
- Oksalat ($Na_2C_2O_4$)
- Piridin 2,6-Dikarboksilik
- Salisilik asit ($C_7H_6O_3$)
- Tetrahidrofuran(THF)
- Sodyum hidroksit (NaOH)
- Metanol (CH_3OH)
- Demir(III)klorür ($FeCl_3$)
- Kloroform ($CHCl_3$)
- Etanol (C_2H_5OH)
- Dimetil sülfat (DMS)

- Potasyum karbonat (K_2CO_3)
- MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue)
- Fosfat Buffer Saline
- Hepes
- Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- **Elementel Analiz** (Thermo Scientific Flash 2000, CHNS elementel analyses)
- **FT- IR Spektroskopisi** (Thermo FT-IR spectrophotometer; Smart ITR diamond attenuated total reflection (ATR); $4000-400cm^{-1}$)
- **UV-görünür bölge spektrometre**; Perkin Elmer Lambda 25
- **Erime Noktası Tayin cihazı**; Gallenkamp
- **pH metre**; pH 211 Hanna Instruments
- **Manyetik karıştırıcı ısıtıcı**; Velp
- **Etüv**; Binder
- **Elektronik teraziler**
- **Vakum desikatörü**
- **Mekanik karıştırıcı**
- **Manyetik susseptibilite**
- **Siklik voltametri**; CHI 660D cihazı
- **İndüktif eşleşmiş plazma (ICP-MS)**
- **Manyetik karıştırıcı ısıtıcı**
- **Erime Noktası Tayin cihazı**
- **Elektronik teraziler**
- **CO₂ İnkübatör**
- **Derin Dondurucu** ($-80\text{ }^{\circ}C$)
- **Santrifüj**;
- **Mikroplate Okuyucu**

3.1.3. Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR)

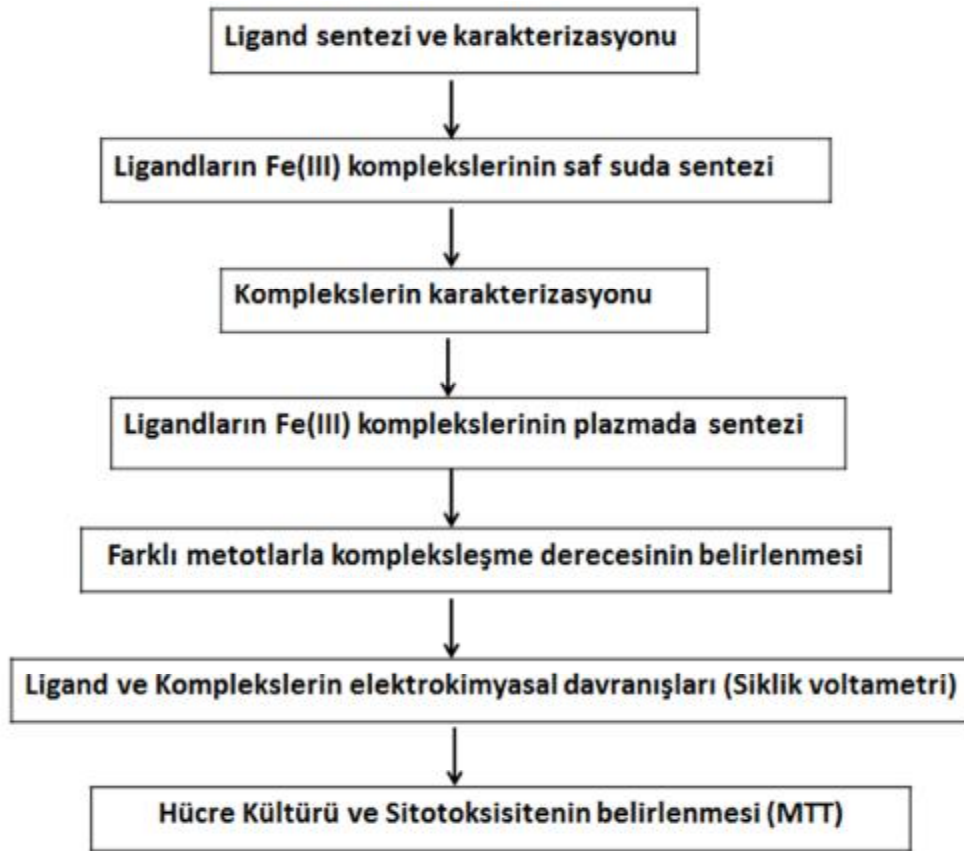
Akademik alanda ve endüstri laboratuvarlarında çok geniş uygulama alanına sahip olan Kızılötesi Spektroskopisi bir molekül veya bileşik yapısında bulunan bağlar hakkında tanımlayıcı bilgiler verir. Kızılötesi (IR) Spektroskopisi temel olarak kızılötesi ışığın incelenen madde tarafından soğurulmasına dayanır. FTIR, organik veya inorganik bileşiklerin karakterize edilmesinde kullanılan bir cihazdır. IR spektrumu, maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimiyle oluşan frekanslarına karşılık gelen absorpsiyon pikleri ile örneğin parmak izini göstermektedir. Her maddenin kendine has bir spektrumu vardır. Organik madde spektrumlarının özellikle de 2000 cm^{-1} den sonra gelen kısmı daha ayrıntılıdır. Bu bölgeye parmak izi bölgesi denir ve spektrumu iki kat genişleterek alınır. Böylece madde hakkında daha ayrıntılı bilgi elde edilmektedir. Veri, farklı moleküler bağlardan kaynaklanan farklı titreşim frekanslarını temsil eder¹⁶³.

3.2. Metod

Vücutta aşırı biriken demiri uzaklaştırmak amacıyla Fe(III) iyonu ile bileşik oluşturabilecek ligantların sentezi/kompleksleşme derecesi ve insan plazmasından demirin uzaklaştırılmasında etkinliğinin belirlenmesi tedavi sürecinde klinikte kullanılabilir potansiyeli olan uygulamaların ilk basamağı niteliğindedir. Bu çalışma da Fe(III) iyonunu ile şelasyon yapılacak demire özgül ligand sentezlenmiş ve demir molekülünün in vitro koşullarda plazma ve saf suda seçici birleşebilme derecesini farklı yöntemlerle belirlenmiştir. İlk olarak asetilaseton da bulunan iki karbonil bileşiği arasında yer alan karbon atomundaki aktif hidrojenin alkil gruplarıyla yer değiştirmesi sonucu farklı uzunluktaki zincir sayısına sahip asetilaseton türevleri olan 3-metil-2,4-pentandion ve 3-butil-2,4-pentandion sentezlendi ve ligand olarak kullanıldı. Ayrıca oksim grubu olan dimetilgliksim ve kloralhidrat ve hidroksilamin hidroklorür çıkış bileşiği olarak kullanılarak anti-monoklorogliksim ligandı sentezlendi. Bunlara ek olarak Sitrik asit, 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit, Glisin, 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit, Nitrilotriasetik asit, Oksalat, Piridin 2,6-Dikarboksilik ve Salisilik asit 'de ligand olarak kullanılmıştır. Sentezlenen tüm bileşiklerin yapıları Çizelge 5' de gösterilen akış şemasına göre; Uv-Visible, FT-IR, elementel analiz, manyetik süsseptibilite ve diğer tekniklerle analiz edildi. Su içerisinde kompleksleşme sonucu kalan demir miktarı ICP tekniği ile analiz edildi. Kompleks ve ligandların elektrokimyasal davranışları siklik voltametri ile araştırıldı. Daha sonra hücre kültürü

yöntemi ile sentezlenen komplekslerin in vitro sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Sitotoksosite deneyleri MTT test yöntemi uygulanarak yapılmıştır. Çalışmamızda öncelikle mL'de 10^4 HUVEC hücresi olacak şekilde 12 kuyucuklu plakta 7 kuyucuga ekim yapıldı. 24 saat sonunda her bir kompleksi seri dilüsyonla sulandırarak 4 farklı derişim elde edildi. Kontrol olarak DMSO kuyucuga yerleştirildikten sonra hücre süspansiyonları üzerine farklı derişimlerde sentezlenen kompleksler eklendi. 48 saat komplekslerle ile inkübe edilen hücrelerde sitotoksosite oranları tespit edildi.

Çizelge 5. Akış Şeması

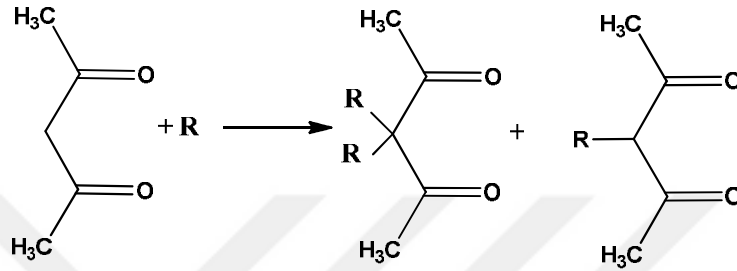


3.2.1. Ligand sentezi

3.2.1.1. Asetilaseton (2,4-Pentanedione) alkilasyonu

β -diketon bileşikleri “aktif metilen” bileşikleri olarak bilinir. İki karbonil grubunun bir karbon atomuyla ayrılmış olması nedeniyle çok sayıda ilginç ve spesifik özelliklere sahiptir. Çünkü iki karbonil atomu arasındaki karbondaki H çok aktiftir ve

alkillerle rahatlıkla yer deęiřtirirler¹⁶⁴. Bu çalışmada ilk olarak asetilaseton üzerinde bulunan iki karbonil bileşiği arasındaki karbon atomu üzerindeki aktif hidrojen ile alkil gruplarının yer değiştirmesi ile farklı uzunluktaki zincir sayısına sahip asetilaseton türevleri olan 3-metil-2,4-pentandion ve 3-butil-2,4-pentandion sentezlendi ve ligand olarak kullanılmıştır.



Bilesik	Metil	Bütil
R	CH ₃	C ₄ H ₉

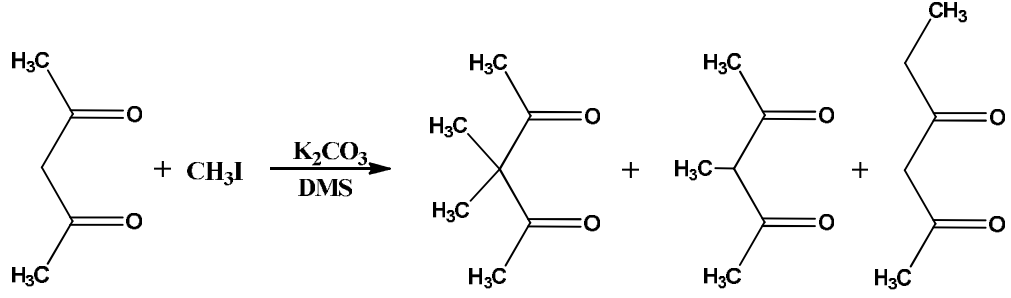
şekil 34. Asetilasetonun alkilasyonu

3.2.1.2. Asetilasetonun alkilasyonu ile 3-metil-2,4-pentandion eldesi

Asetilasetonun alkilasyonu ile 3-metil-2,4-pentandion eldesi 3 farklı yöntem denendi.

3.2.1.2.1. Dimetil sülfat ile alkilleme

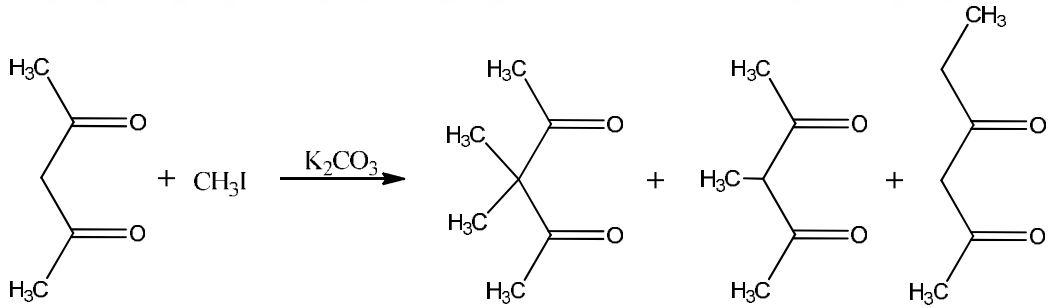
100 mL THF içerisine 1,0752 g K₂CO₃ zerine 5 mL asetilaseton konularak 40 dakika geri soğutucu altında bir müddet ısıtıldı. zerine 5 mL dimetilsülfat eklendi. Bu süre zarfında sarı renkli olan zelti şeffaf hale geldi. Ardından deney durduruldu ve ince tabaka kromatografisi (TLC)'de yürütülerek deney takip edildi. Asetilaseton ve dimetilslfattan farklı yerlerde spot elde edildi. Ancak kolondan geçirilince saf madde elde edilemedi (şekil.35)^{165,166,167}.



Şekil 35. Asetilasetonun metil iyodür (CH_3I) varlığında DMS ile metillenmesi

3.2.1.2.2. Azot atmosferinde alkilleme

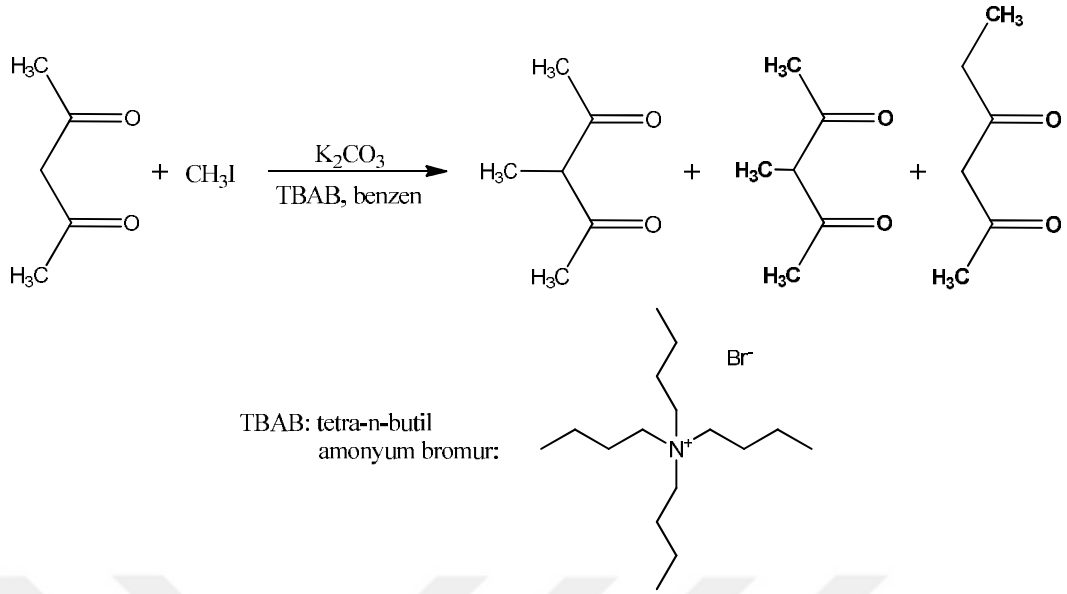
0,51 mL asetilaseton, önceden kurutulmuş 0,648 g K_2CO_3 , 20 mL susuz asetilaseton içerisinde oda sıcaklığında 5 dakika boyunca azot atmosferinde bekletildi. Ardından 0,383 mL metil iyodür damla damla eklendi ve karışım 20 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Bu süre sonunda 50 mL dietil eter eklenip ve elde edilen karışım süzülerek çözücü evaporatörde kuruyana kadar ısıtıldı. Deney silika TLC ile kontrol edildiğinde dört farklı spot elde edildi. Kalan çözelti 1/10 etil asetat/hekzan yürütücü fazıyla kolondan geçirildi. Saflaştırılmadı^{166,167,168}.



Şekil 36. Asetilaseton ligandının metil iyodür (CH_3I) varlığında metillenmesi tepkimesi

3.2.1.2.3. Tetra-n-bütül amonyum bromür katalizörlüğünde alkilleme

0,625 mL asetilaseton 25 mL benzende çözüldü. Üzerine 1,3965g susuz K_2CO_3 ve 0,4 mL metil iyodür eklendi. Son olarak 0,4970 g tetra-n-bütül amonyum bromür (TBAB) katalizör olarak eklendi. Bu karışım oda sıcaklığında 5 gün karıştırıldı. Bu süre sonunda organik kısım süzülerek ayrıldı ve benzen evaporatörde buharlaştırıldı. Deney silika TLC ile kontrol edildiğinde dört farklı spot elde edildi. Bunlardan ilk gelen asetilasetonla aynı yerdeki spottur. Kalan çözelti 1/10 etil asetat/hekzan yürütücü fazıyla kolondan geçirildi. Daha sonra saflaştırıldı^{166,167,168}.

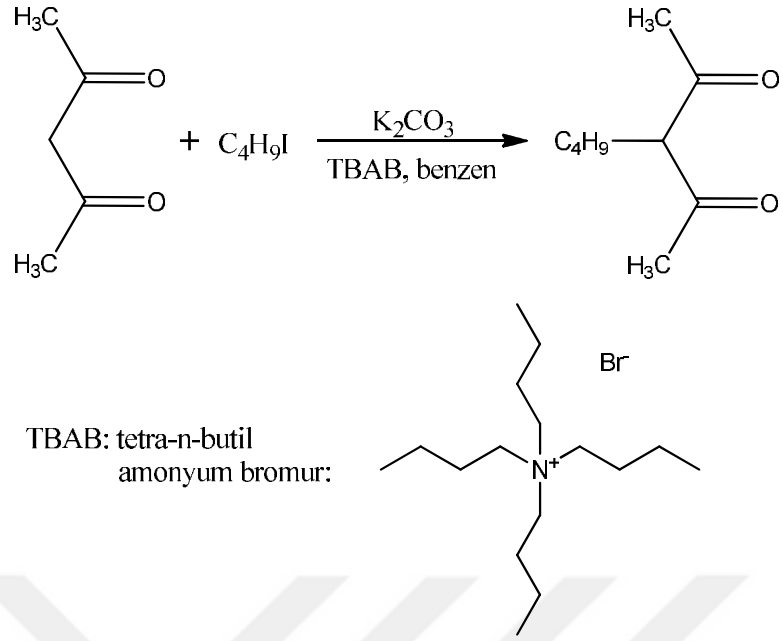


Şekil 37. Asetilasetonun TBAB katalizörlüğünde metil iyodür (CH_3I) varlığında metillenmesi

3.2.1.3. Asetilasetonun alkilasyonu ile 3-bütül-2,4-pentandion eldesi

3.2.1.3.1. N-bütül iyodür alkilleme

Tetra-n-bütül amonyum bromür katalizörlüğünde; 0,625 mL asetilaseton 25 mL benzende çözüldü: Üzerine 1,3965g susuz K_2CO_3 ve 0,7 mL bütül iyodür eklendi. Son olarak 0,4962 g tetra-n-bütül amonyum bromür (TBAB) katalizör olarak eklendi. Bu karışım oda sıcaklığında 5 gün karıştırıldı. Bu süre sonunda organik kısım süzülerek ayrıldı ve benzen evaporatörde buharlaştırıldı. Deney silika TLC ile kontrol edildiğinde iki farklı spot elde edildi. Bunlardan ilk gelen asetilasetonla aynı yerdeki spottur. Kalan çözelti 1/10 etil asetat/hekzan yürütücü fazıyla saflaştırıldı^{165,166,167}.



Şekil 38. Asetilaseton ligandının bütillenmesi tepkimesi

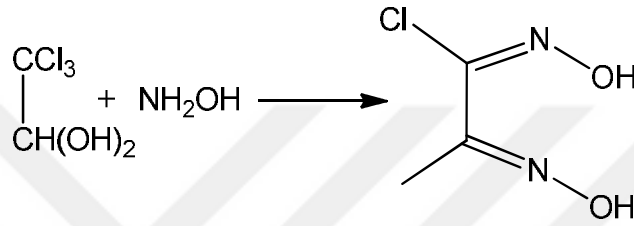
3.2.1.4. Oksimler

Koordinasyon kimyasında ligand olarak kullanılan ve C=N-OH grubu taşıyan maddelere Mayer tarafından oksi-imin kelimelerinin kısaltılmasıyla oluşan 'oksim' adı verilmiştir. Zayıf bazik karakterdeki azot atomu ve asidik karakterdeki hidroksil gruplarından oluştuğundan oksimler, amfoterik maddelerdir. Oksim bileşikleri şelat oluşturma, biyolojik olarak parçalanabilme, oksijen tutma özelliklerinin yanısıra biyolojik ve fotokimyasal reaksiyonlardaki farklı etkinlikleriyle tanınmaktadır. Oksim bileşikleri ve bu bileşiklerin metal komplekslerinin tıp alanında ve biyoorganik sistemlerde, katalizlerde, farmakolojide, biyoorganik sistemlerde katalitik kimya vb. gibi alanlarda büyük ilgi görmektedir. Bu çalışmada oksim bileşiği olan Antimonoklorogliksim ve Dimetilgliksim sentezlenerek ligand olarak kullanılmıştır^{168,169,170,171,172}.

3.2.1.4.1. Anti-monoklorogliksim sentezi (AMCG)

0.3 mol kloral hidrat, 0.5 mol sodyum karbonat ve 0.9 mol hidroksil aminhidroklorür içeren bir çözeltiye katılarak bir gece kendi halinde bırakıldı. Derişik çözeltide tabakalar halinde kristaller oluştu. Buz-tuz karışımıyla soğutulan çözeltiye 54 g NaOH' in 100 mL sudaki çözeltisi damla damla çözelti sıcaklığı $-5\text{ }^\circ\text{C}$ 'ı aşmayacak şekilde ilave edildi. Bu ilave sonucunda sarımsı renk gözlendi. Daha sonra çözeltiye 32

mL, % 98'lik H₂SO₄ ilave edildi ve süzülüp kurutulduktan sonra eterle klor *amfi*-glioksim alınıp, eter fazı uçuruldu ve her iki madde birleştirilerek sudan kristallendirildi. Kristaller vakumda H₂SO₄ üzerinden kurutuldu. İşlem sonucunda *amfi*-kloroglioksim elde edildi. Kurutulup toz hale getirilen *amfi*-kloroglioksim az miktarda (maksimum 10 mL) derişik hidroklorik asitle çamur haline getirilip ezilerek *anti* izomere çevrildi^{172,173,174}.



Şekil 39. *Amfi*-kloro glioksim eldesi tepkimesi

% verim: % 38

Renk: Beyaz kristal

DSC'de erime noktası: 162 °C

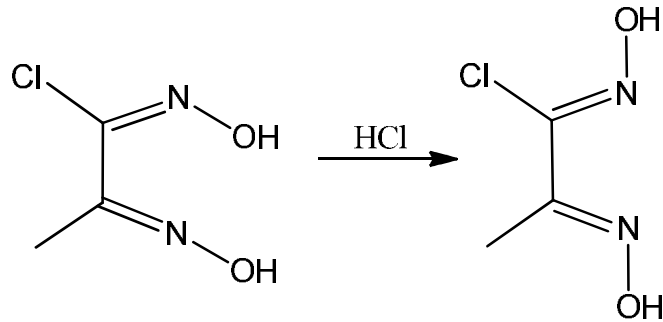
Kapalı formül: C₂H₃ClN₂O₂

MA: 122,51g mol⁻¹

Elementel analiz (bulunan): C, 19.01; H, 2.37; N, 22.17

Elementel analiz (hesaplanan): C, 19.61; H, 2.47; N, 22.87

IR (mmax/cm⁻¹): 3317 (O-H), 1590 (C=N), 950 (N-O), 705 (C-Cl)



Şekil 40. *Anti*-kloro glioksim eldesi tepkimesi

% verim: %99,9

Renk: Sarı

DSC'de erime noktası: 151,99°C

Kapalı formül: C₂H₃ClN₂O₂

MA: 122,51 g mol⁻¹

Elementel analiz (bulunan): C, 19.75; H, 2.88; N, 21.05

Elementel analiz (hesaplanan): C, 19.61; H, 2.47; N, 22.87

IR (mmax/cm⁻¹): 3500-3200 (O-H), 1590 (C=N), 950 (N-O), 746 (C-Cl)

3.2.1.4.2. Dimetilglioksim sentezi (DMG)

25 ml su içerisinde 1,74 gr (25 mmol) NH₂OHHCl ve 2,05 gr (25 mmol) sodyum asetat çözülerek üzerine 0,86 gr (10 mmol) 2,3-butanedione ilave edilir. Bu karışım mikrodalga cihazı ile 5 dk. 400W mikrodalga gücünde reflux edildi. Oluşan beyaz çökelekler süzülerek su ile yıkanır ve vakumda kurutulur¹⁷⁵.

% verim: %89,9

Renk: Beyaz

DSC'de erime noktası: 244°C

Kapalı formül: C₄H₈N₂O₂

MA: 116,12 g mol⁻¹

Elementel analiz (bulunan): C, 27.46; H, 4.88; N, 25.13

Elementel analiz (hesaplanan): C, 28,12; H, 4.47; N, 26.52

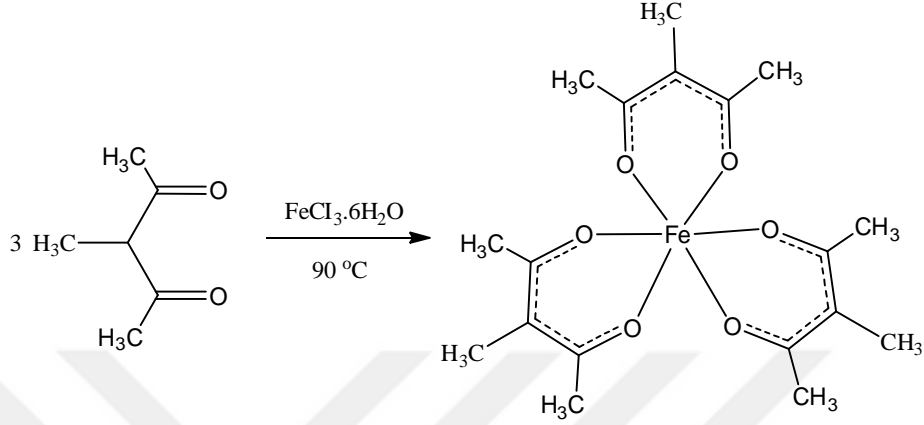
IR (mmax/cm⁻¹): 3000-3300 (O-H), 2930 (C-H), 980 (N-O), 1438 (C=N)

3.2.2. Ligandların Fe(III) ile komplekslerin sentezi

3.2.2.1. 3-metil-2,4-pentandion-Fe(III) Kompleksi Sentezi

3-metil-2,4-pentandion (0,75 mL) ligandı 20 mL asetonitril çözüldü. Çözücü yarı yarıya ısıtıldı. Üzerine 10 mL asetonitril çözünmüş FeCl₃.6H₂O (0,4826gr, 1,8 mmol) eklendi. Manyetik karıştırıcı ısıtıcı ile geri soğutucu altında 90 °C de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi. 0,1M NaOH ile pH 7 ya ayarlandı. Bu süre sonunda bordo renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek

MN 640 (siyah bant, 1-2 μm) Whatman süzgeç kağıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutulurken renkli bir kiremit kırmızısı çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi.



Şekil 41. 3-metil-2,4-pentandion ligandının Fe (III) ile kompleksi sentezi

EN= 190°C

Renk: kahverengi kırmızımsı

% verim: %90

Kapalı formül: $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{FeO}_6$

MA: $395,25\text{ g mol}^{-1}$

μ_{eff} (Manyetik moment): 5,80 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 62,30; H, 9,60;

Elementel analiz (hesaplanan): C, 62,23; H, 9,52;

IR(mmax/cm^{-1}): 2922 (C-H), 1709 (C=O), 1620 (C=C)

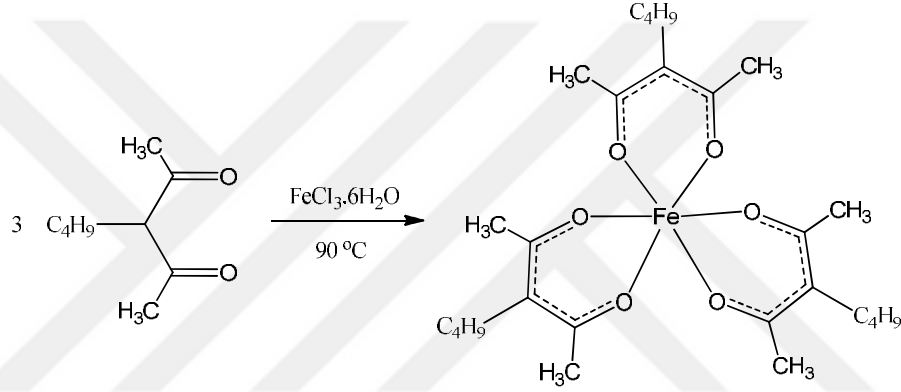
UV-Vis(nm): 228, 243, 268, 298, 324, 495, 565 nm



Şekil 42. 3-metil-2,4-pentandion ligandının Fe (III) kompleksi elde edişi

3.2.3.2. 3-bütül-2,4-pentandion-Fe(III) Kompleksi Sentezi

3-bütül-2,4-pentandion (0,75 mL) ligandı 20 mL asetonitril çözüldü. Çözücü yarı yarıya ısıtıldı. Üzerine 10 mL asetonitril çözünmüş $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,4826, 1,8 mmol) eklendi. Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile geri soğutucu altında 90°C de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi. 0,1M NaOH ile pH 7 ya ayarlandı. Bu süre sonunda bordo renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek MN 640 (siyah bant, 1-2 μm) Whatman süzgeç kâğıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutulularak renkli bir açık kahverengi çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi.



Şekil 43. 3-bütül-2,4-pentandion ligandının Fe (III) ile kompleksi sentezi

EN= 200°C

Renk: açık kahverengi

% verim: %82

Kapalı formül: $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{FeO}_6$

MA: $521,49\text{ g mol}^{-1}$

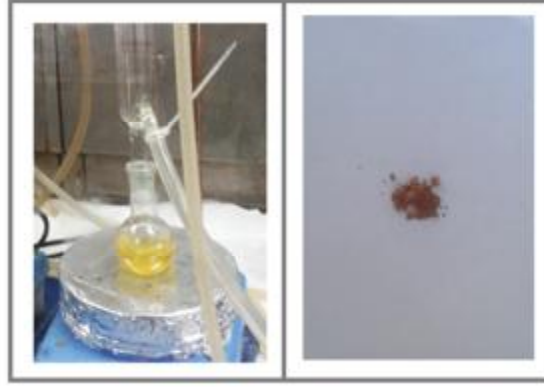
μ_{eff} (Manyetik moment): 5,84 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 62,02; H, 8,51;

Elementel analiz (hesaplanan): C, 62,78; H, 9,10;

IR(max/cm^{-1}): 2965 (C-H(al)), 1597 (C=N), 1707 (C=O), 1610 (C=C),

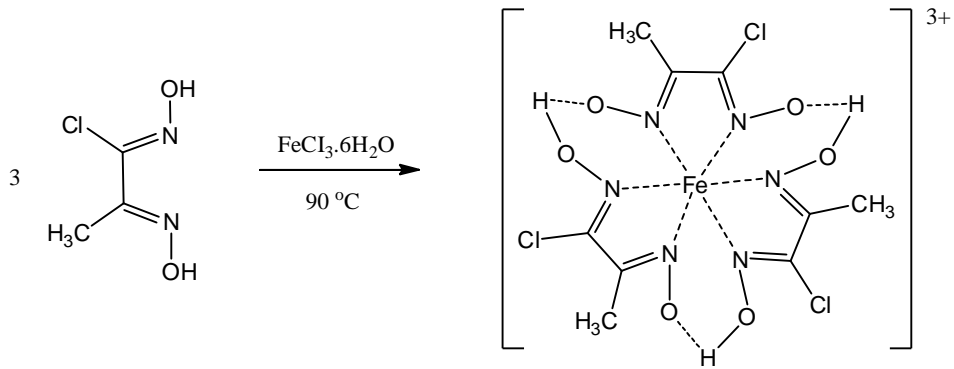
UV-Vis(nm): 228, 242, 255, 282, 336, 580 nm



Şekil 44. 3-butil-2,4-pentandion ligandının Fe(III) kompleksi elde edilişi

3.2.3.3. Antimonoklorogliksim-Fe(III) Kompleksi Sentezi

Antimonoklorogliksim (1,024 g, 7,49 mmol) ligandı 25 mL etanol çözüldü. Üzerine, FeCl₃.6H₂O (0,6760 g, 2,50 mmol) eklendi. FeCl₃.6H₂O açık sarımsı renkteydi. AMKG ligandı eklenince renk koyulaştı. Çözelti 30 dakika karıştırıldı. Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile geri soğutucu altında 90 °C de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi. 0,1M NaOH ile pH 7 ya ayarlandı. Bu süre sonunda koyu kahve renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek MN 640 (siyah bant, 1-2 µm) Whatman süzgeç kâğıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutularak kahve renkli bir çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi.



Şekil 45. Antimonoklorogliksim ligandının Fe (III) kompleksi sentezi

EN=258°C

Renk: kahverengi

% verim: %84

Kapalı formül: C₉H₁₂Cl₃N₆ Fe O₆

MA: 462,43 g mol⁻¹

μ_{eff} (Manyetik moment): 2,25 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 23.12; H, 2.51; N,18.02

Elementel analiz (hesaplanan): C, 23.78; H, 2.62; N,18.17

IR(mmax/cm⁻¹): 1655-1612(C=N),1384-970 (N-O), 729 (C-Cl), 457(Fe-N)

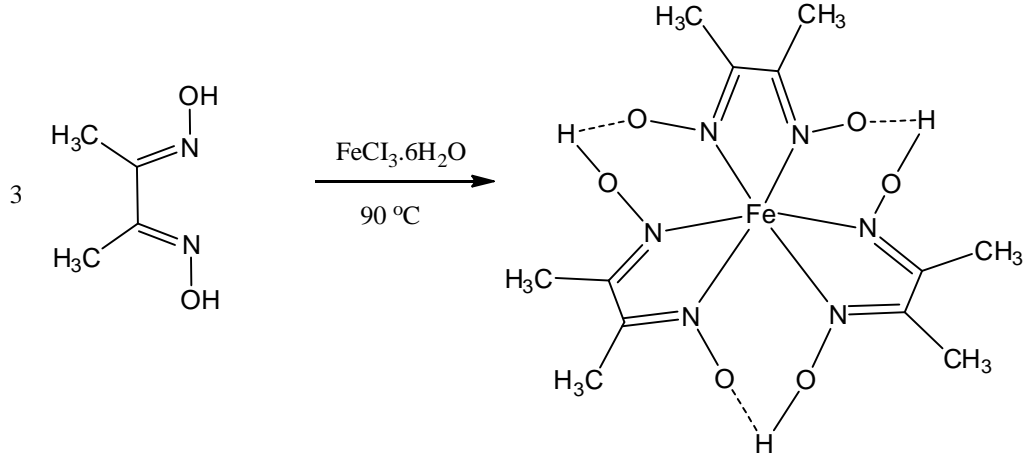
UV-Vis(nm): 230, 238, 246, 271,290, 482, 652 nm.



Şekil 46. Anti-monoklorogliksim ligandının Fe (III) kompleksinin elde edilmesi

3.2.3.4. Dimetilgliksim-Fe(III) Kompleksi Sentezi

Dimetilgliksim (0,8712 g, 7,50 mmol) ligandı 25 mL metanol çözüldü. Üzerine FeCl₃.6H₂O (0,6760 g, 2,50 mmol) eklendi. FeCl₃.6H₂O açık sarımsı renkteydi. Dimetilgliksim eklenince renk koyulaştı. Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile geri soğutucu altında 90 °C de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi. 0,1M NaOH ile pH 7 ya ayarlandı. Bu süre sonunda koyu bordo renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek MN 640 (siyah bant, 1-2 µm) Whatman süzgeç kağıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutularak siyah renkli bir çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi.



Şekil 47. Dimetilglioksim ligandının Fe(III) kompleksi sentezi

EN>240°C

Renk: siyah

% verim: %80

Kapalı formül: C₁₂H₂₁N₆O₆Fe

MA: 401.18 g mol⁻¹

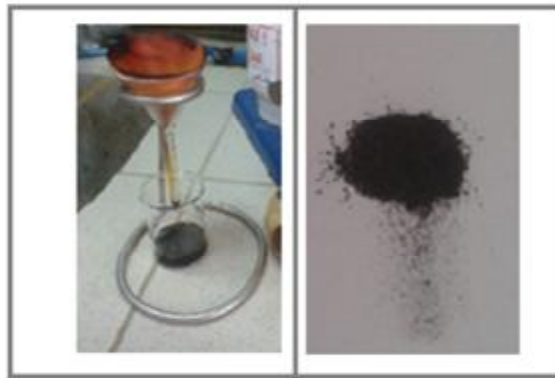
μ_{eff} (Manyetik moment): 2,20 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 35.75; H, 4.91; N,20.52

Elementel analiz (hesaplanan): C, 34.93; H, 5.28; N,21.05

IR(mmax/cm⁻¹): 2926 (C-H), 1437 (C=N), 905-980-1143 (N-O), 462(Fe-N)

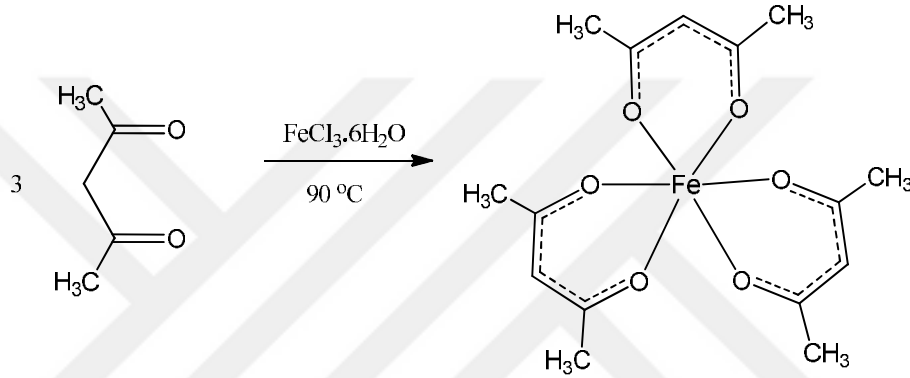
UV-Vis(nm): 228, 246, 271, 283, 420, 590 nm



Şekil 48. Dimetilglioksim ligandının Fe(III) kompleksi elde edişi

3.2.3.5. Asetilaseton – Fe(III) Kompleksi Sentezi

Asetilaseton (0,75 mL) ligandı 50 mL asetonitril çözüldü. Çözücü yarı yarıya ısıtıldı. Üzerine $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,4505 g, 1,66 mmol) eklendi. Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile geri soğutucu altında 90°C de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi. 0,1M NaOH ile pH 7 ya ayarlandı. Bu süre sonunda bordo renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek MN 640 (siyah bant, 1-2 μm) Whatman süzgeç kağıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutularak renkli bir kiremit kırmızısı çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi.



Şekil 49. Asetilaseton ligandının Fe (III) kompleksi sentezi

EN= 180°C

Renk: kahverengi

% verim: % 88,72

Kapalı formül: $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{FeO}_6$

MA: $353.17 \text{ g mol}^{-1}$

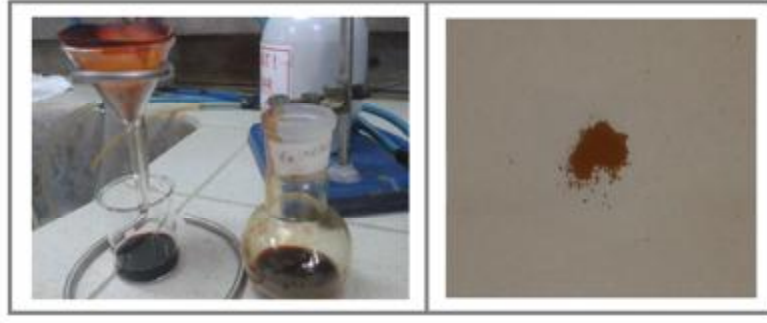
μ_{eff} (Manyetik moment): 5,90 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 50.95; H, 5.51;

Elementel analiz (hesaplanan): C, 51.01; H, 5.99;

IR(max/cm^{-1}): 3000-3700 (O-H), 2921 (C-H(al)), 1567 (C=O), 1549-1525 (C=C),

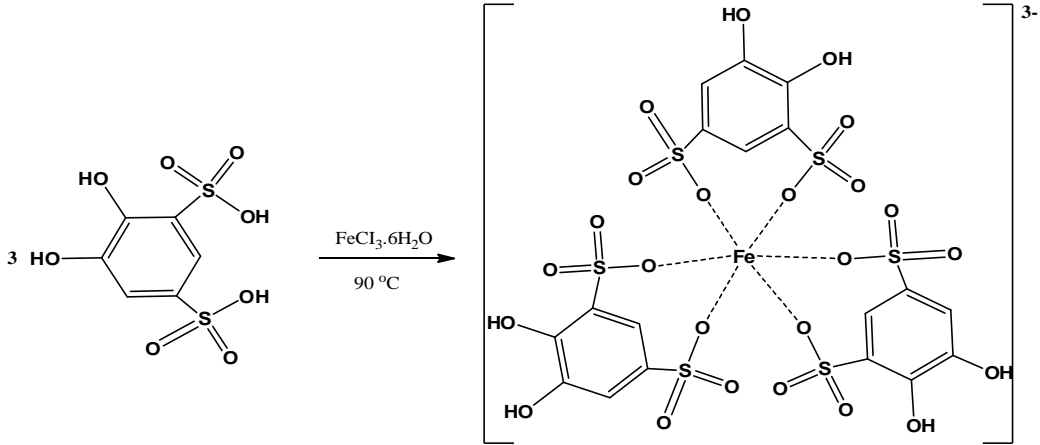
UV-Vis(nm): 212, 270, 352, 461, 616 nm



Şekil 50. Asetilaseton ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi

3.2.3.6. 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit-Fe(III) Kompleksi Sentezi

4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit (0,9775 g, 2,99 mmol) ligandı 30 mL etanol çözüldü. Üzerine $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2700 g, 0,35 mmol) eklendi. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ açık sarımsı renkteydi. Ligand eklenince renk koyulaştı. Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile geri soğutucu altında 90 °C de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi. 0,1M NaOH ile pH 7 ya ayarlandı. Bu süre sonunda koyu renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek MN 640 (siyah bant, 1-2 μm) Whatman süzgeç kağıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutularak koyu açık kahve renkli bir çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi.



Şekil 51. 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit ligandının Fe(III) kompleksi sentezi

EN>220°C

Renk: kahverengi

% verim : % 92

Kapalı formül: $C_{18}H_{12}FeO_{24}S_6$

MA: $860.51 \text{ g mol}^{-1}$

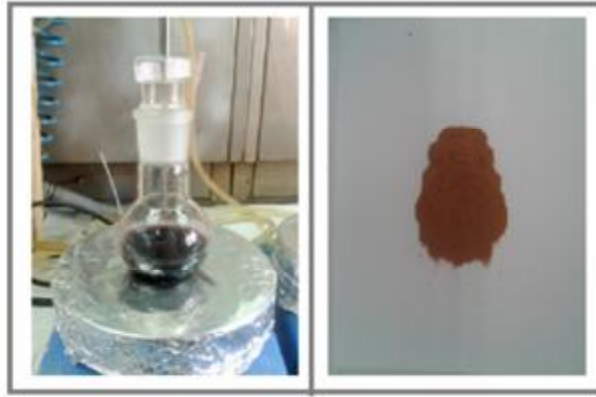
μ_{eff} (Manyetik moment): 2,25 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 25.05; H, 1.12; N,22.02

Elementel analiz (hesaplanan): C, 25.43; H, 1.41; S,22.32

IR(mm^{-1}): 3000-3400 (O-H), 3081 (C-H(ar)), 1636 (C=C), 1334 (S=O), 501(Fe-O)

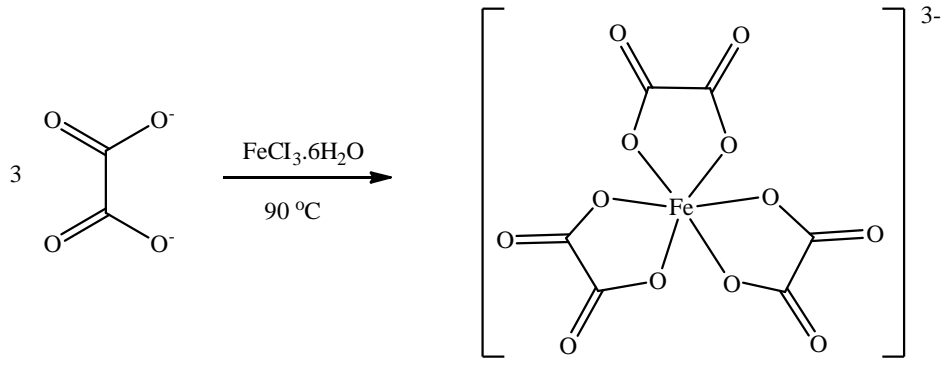
UV-Vis(nm): 230, 259, 269, 296, 396, 440, 462 nm



Şekil 52. 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit ligandının Fe (III) kompleksi elde edilşi

3.2.3.7. Oksalat- Fe(III) Kompleksi Sentezi

Oksalat (0,3886g, 3,500 mmol) ligandı 35 mL aseton çözüldü. Üzerine $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,3154 g 1,166 mmol) eklendi. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ açık sarımsı renkteydi. Oksalat eklenince renk açık sarıydı. Manyetik karıştırıcı ile geri soğutucu altında $90 \text{ }^\circ\text{C}$ de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi. 0,1M NaOH ile pH 7 ya ayarlandı. Bu süre sonunda koyu renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek MN 640 (siyah bant, 1-2 μm) Whatman süzgeç kâğıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutularak turuncu-kırmızısı renge bir çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi.



Şekil 53. Oksalat ligandının Fe(III) kompleksi sentezi

EN= 100°C

Renk: Turuncu-sarımtırak

% verim : %76

Kapalı formül: C₆ Fe O₁₂

MA: 319.90 g mol⁻¹

μ_{eff} (Manyetik moment): 2,12 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 22.75

Elementel analiz (hesaplanan): C, 22.53

IR(mmax/cm⁻¹): 3438 (O-H), 1672 (C=O), 519 (Fe-O)

UV-Vis(nm): 229, 238, 259, 264,483, 580 nm

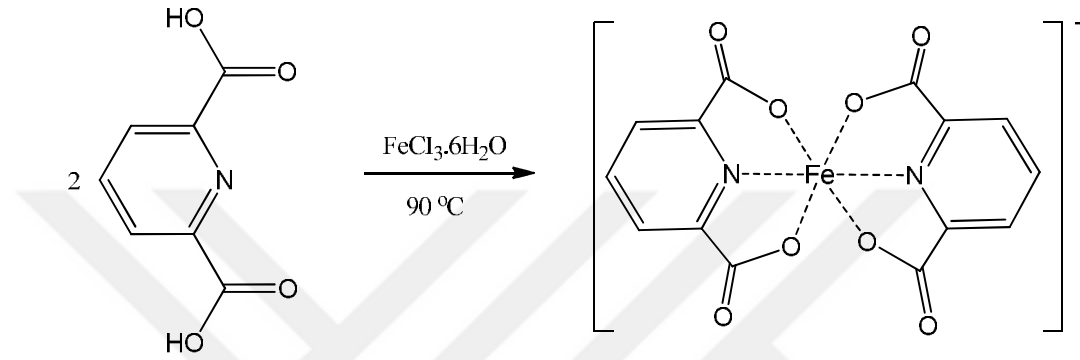


Şekil 54. Oksalat ligandının Fe(III) kompleksi elde edilişi

3.2.3.8. Piridin-2,6-dikarboksilikasit – Fe(III) Kompleksi Sentezi

Piridin-2,6-dikarboksilikasit (0,8365 g, 5,005 mmol) ligandı 50 mL aseton çözüldü. Üzerine FeCl₃·6H₂O (0,6765, 2,502 mmol) eklendi. Manyetik karıştırıcı

ısıtıcı ile geri soğutucu altında 90 °C de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi.0,1M NaOH ile pH 7 ya ayarlandı. Bu süre sonunda koyu renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek MN 640 (siyah bant, 1-2 µm) Whatman süzgeç kağıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutularak açık yeşil renge bir çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi.



Şekil 55. Piridin-2,6-dikarboksilikasit ligandının Fe(III) kompleksi sentezi

EN=225

Renk: açık yeşil

% verim: % 66

Kapalı formül: $\text{C}_{14}\text{H}_6\text{N}_2\text{FeO}_8$

MA: $386.05 \text{ g mol}^{-1}$

μ_{eff} (Manyetik moment): 2,22 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 43.12; H, 1.21; N, 7.02

Elementel analiz (hesaplanan): C, 43.56; H, 1.57; N,7.26

IR(cm^{-1}):3000-3400 (O-H), 3050-3100 (C-H), 1702 (C=O), 1574 (C-N), 526 (Fe-O), 439 (Fe-N)

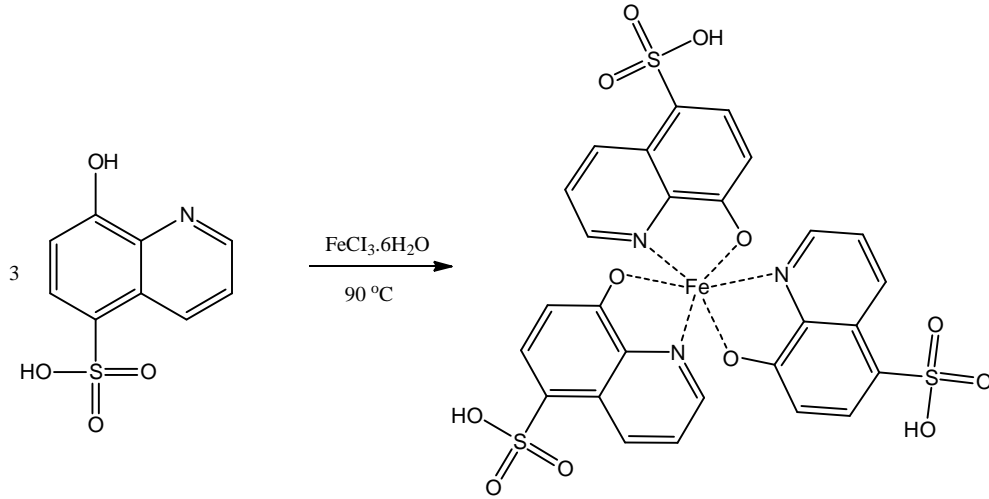
UV-Vis(nm): 228, 242, 272, 323 nm



Şekil 56. Piridin-2,6-dikarboksilikasit ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi

3.2.3.9. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit – Fe(III) Kompleksi Sentezi

8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit (1,1270 g, 5,003 mmol) ligandı 50 mL aseton çözüldü. Üzerine $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,4509 g, 1,666 mmol) eklendi. Manyetik karıştırıcı ısıtıcı ile geri soğutucu altında $90\text{ }^\circ\text{C}$ de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi. 0,1M NaOH ile pH 7 ya ayarlandı. Bu süre sonunda koyu renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek MN 640 (siyah bant, $1\text{-}2\text{ }\mu\text{m}$) Whatman süzgeç kağıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutularak koyu yeşil renge bir çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi.



Şekil 57. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit ligandının Fe (III) kompleksi sentezi

EN=318°C

Renk: koyu yeşil

% verim: % 91,3

Kapalı formül: $C_{27}H_{18}N_3O_{12}S_3Fe$

MA: 728,48 g mol⁻¹

μ_{eff} (Manyetik moment): 2,40 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 44.24; H, 2.63; N,11.84

Elementel analiz (hesaplanan): C, 44.22; H, 2.59; N,11.98

IR(mmax/cm⁻¹): 3091 (O-H), 3442(C-H), 1605 (C=N), 1305 (S=O), 968 (N-O), 567 (Fe-O)

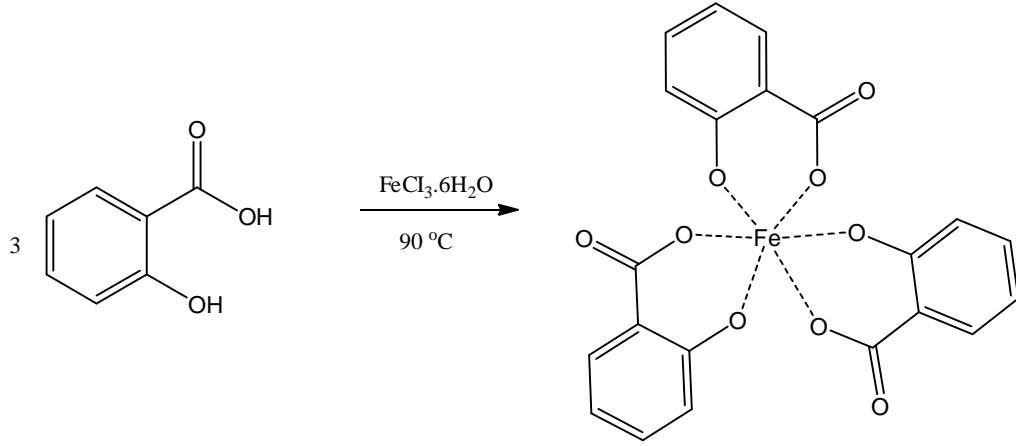
UV-Vis(nm): 232,259, 292, 342, 386, 438, 560 nm



Şekil 58. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi

3.2.3.10. Salisilik Asit – Fe(III) Kompleksi Sentezi

Salisilik Asit (0,6907 g, 5,007 mmol) ligandı 50 mL aseton çözüldü. Üzerine $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,4505 g, 1,66 mmol) eklendi. Manyetik karıştırıcı ile geri soğutucu altında 90 °C de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi. 0,1M NaOH ile pH 7 ya ayarlandı. Bu süre sonunda koyu renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek MN 640 (siyah bant, 1-2 μm) Whatman süzgeç kağıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutularak koyu kahverenginde bir çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi.



Şekil 59. Salisilik Asit ligandının Fe(III) kompleksi sentezi

EN: 190°C

Renk: kahverengi

% verim: % 91,26

Kapalı formül: $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{Cl}_3\text{N}_6\text{O}_6\text{Fe}$

MA: $464,16 \text{ g mol}^{-1}$

μ_{eff} (Manyetik moment): 2,36 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 53,98; H, 2,51

Elementel analiz (hesaplanan): C, 54,34; H, 2,61

IR(mmax/cm^{-1}): 3384 (O-H), 3110(C-H (ar)), 1604 (C=O), 586 (Fe-O)

UV-Vis(nm): 227, 258, 270, 362, 510, 620 nm

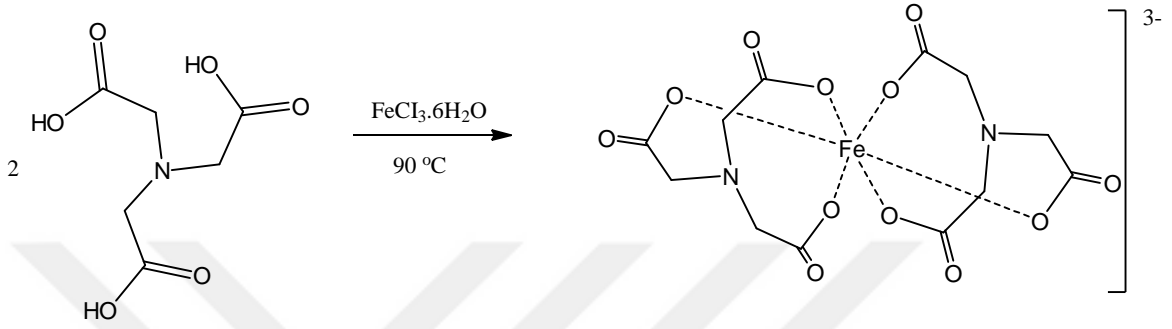


Şekil 60. Salisilik Asit ligandının Fe(III) kompleksi elde edişi

3.2.3.11. Nitrilotriasetik asit - Fe(III) Kompleksi Sentezi

Nitrilotriasetik asit (0,6725 g, 3,5 mmol) ligandı 35 mL etanol çözüldü. Üzerine $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,4731 g 2,5 mmol) eklendi. Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile geri soğutucu

altında 90 °C de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi.0,1M NaOH ile pH 7 ya ayarlandı. Bu süre sonunda koyu renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek MN 640 (siyah bant, 1-2 µm) Whatman süzgeç kâğıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutularak açık kahve sarısı bir çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi.



Şekil 61. Nitrilotriasetik asit ligandının Fe (III) kompleksi sentezi

EN: 220°C

Renk: açık kahve

% verim: % 82

Kapalı formül: C₁₂H₁₂N₂ Fe O₁₂

MA: 432,07 g mol⁻¹

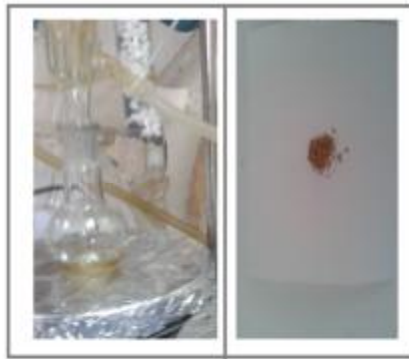
μ_{eff} (Manyetik moment): 2,18 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 41,12; H, 2,73; N,11,74

Elementel analiz (hesaplanan): C, 41,21; H, 2,69; N,11,82

IR(mmax/cm⁻¹): 3426 (O-H), 3040(C-H), 1730 (C=O), 484 (Fe-O)

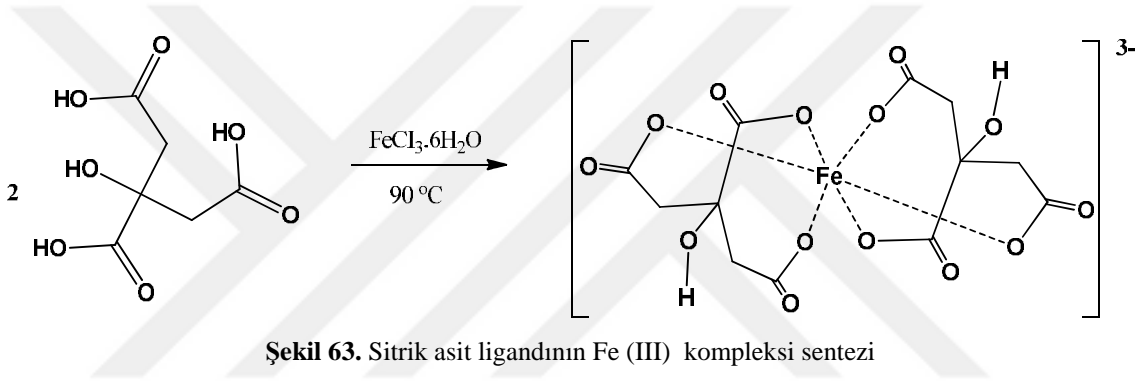
UV-Vis(nm): 244, 250, 271, 320 nm



Şekil 62. Nitrilotriasetik asit ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi

3.2.3.12. Sitrik asit - Fe(III) Kompleksi Sentezi

Sitrik asit (0,6861 g, 3,57 mmol) ligandı 30 mL etanol çözüldü. Üzerine $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,4826 g, 1,8 mmol) eklendi. Manyetik karıştırıcı ısıtıcı ile geri soğutucu altında 90°C de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi. 0,1M NaOH ile pH 7 ya ayarlandı. Bu süre sonunda koyu renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek MN 640 (siyah bant, 1-2 μm) Whatman süzgeç kağıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutularak koyu sarımsak bir çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi.



EN: 220°C

% verim: % 75,52

Renk: sarımsak

Kapalı formül: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{FeO}_{14}$

MA: $434,04\text{ g mol}^{-1}$

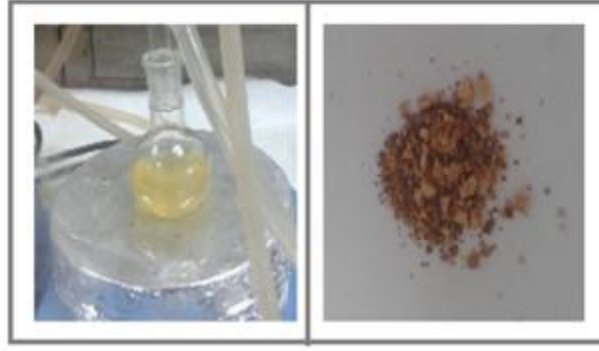
μ_{eff} (Manyetik moment): 2,28 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 33.06; H, 2.19;

Elementel analiz (hesaplanan): C, 34.11; H, 2.32;

IR (mmax/cm^{-1}): 3397 (O-H), 1727 (C=O), 505 (Fe-O)

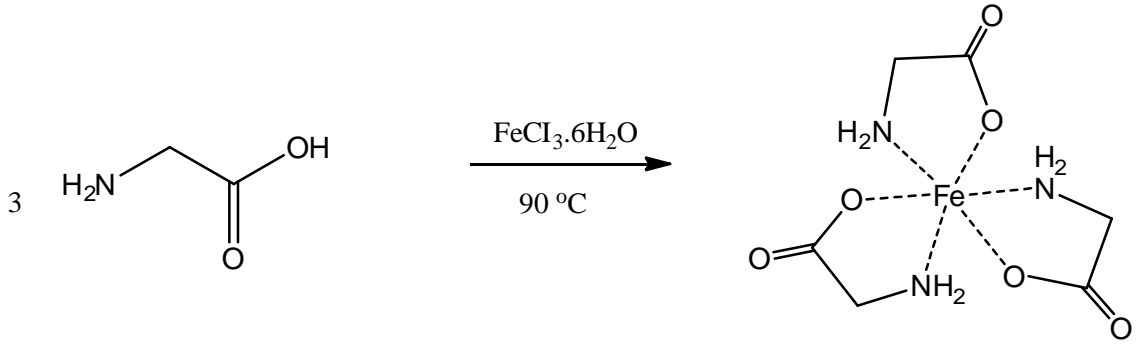
UV-Vis(nm): 220, 232, 260, 271, 362, 572 nm



Şekil 64. Sitrik asit ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi

3.2.3.13. Glisin – Fe(III) Kompleksi Sentezi

Glisin (0,2253 g, 3 mmol) ligandı 30 mL etanol çözüldü. Üzerine $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2705 g, 1 mmol) eklendi. Manyetik karıştırıcı ile geri soğutucu altında 90°C de karıştırarak ısıtıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH kontrol edildi. 0,1M NaOH ile pH 7 ye ayarlandı. Bu süre sonunda koyu renkli bir çökelek oluştu. Oluşan çökelek MN 640 (siyah bant, 1-2 μm) Whatman süzgeç kağıdı ile süzüldü. Daha sonra vakum desikatöründe kurutularak tuğla kırmızısı bir çökelek elde edildi. Elde edilen kompleks FT-IR, UV, manyetik süsseptibilite, erime noktası ve elementel analiz cihazları ile karakterize edildi



Şekil 65. Glisin ligandının Fe(III) kompleksi sentezi

EN $>220^\circ\text{C}$

Renk: turuncu

% verim: % 68

Kapalı formül: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_3 \text{Fe O}_6$

MA: $278,02 \text{ g mol}^{-1}$

μ_{eff} (Manyetik moment): 2,24 BM

Elementel analiz (bulunan): C, 25.57; H, 4.62; N, 14.32

Elementel analiz (hesaplanan): C, 25.86; H, 4.35; N,15.11

IR(mmax/cm⁻¹): 3406 (O-H), 2894 (C-H), 1609 (C=O), 584(Fe-O)

UV-Vis(nm): 229, 248, 271, 302, 480 nm



Şekil 66. Glisin ligandının Fe (III) kompleksi elde edilişi

3.2.4. Uv-Vis taramalar ve Fe (III)' ün tayini için standart hazırlanması

İlk olarak ligandlar ile Fe (III) kompleksleştirilerek UV-vis spektrofotometresinde tarama yapılarak kompleksin, ligand ve demir çözeltisinden farklı olan pikleri tespit edildi. Daha sonra kompleksleşme derecesi 2 şekilde belirlendi İlki UV de standart çözeltilerle belirlenme yöntemi. Bu yöntemde elde edilen kompleksten derişimi 5×10^{-5} ve 5×10^{-3} mol/L arasında olan 5 standart çözelti hazırlandı bulunan farklı absorbanslarda bu standart çözeltiler okutuldu ve kalibrasyon grafiği elde edildi. Kompleksten belirli zaman aralıklarında örnek alınarak zamana bağlı kompleksleşme grafiğinden kompleksleşme miktarı bulundu. İkincii olarak ekstraksiyon yapılarak ICP (Inductively coupled plasma: İndüktif eşleşmiş plazma) ölçüm yöntemi ile kompleksleşme miktarı bulundu.

3.2.5. Siklik voltometre

Komplekslerin, ligandların elektrokimyasal davranışları siklik voltametri (CV) ile incelendi. Çalışmalarda platin disk elektrot, platin karşıt (counter) elektrot ve Ag-AgCl referans elektrot kullanılmıştır. Çalışma sırasında sıcaklık oda sıcaklığıydı.

Çalışma Elektrodu: Karbon pasta ve modifiye karbon pasta elektrotlar.

Referans Elektrot: Gümüş-gümüş klorür elektrot (Ag/ AgCl, 3 M KCl).

Karşı Elektrot: 2cm² yüzey alanına sahip platin levha.

3.2.6. Hücre Kültürü ile sitotoksik etkinin MTT ile belirlenmesi

Hücre kültürü yöntemi ile sentezlenen komplekslerin in vitro sitotoksik etki belirlenmesi çalışmaları için HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells = İnsan göbek bağından elde edilen endotel hücreleri) hücre hattı kullanıldı. Sitotoksikite deneyleri MTT test yöntemi uygulanarak yapılmıştır. HUVEC hücreleri uygun besiyerinde ve 25 cm'lik flasklarda yetiştirilmiş ve % 95 hava ve % 5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe kültüre edilmişlerdir.

3.2.6.1. Hücre Dizileri ve Çoğaltılması

Çalışmamızda hücre medyumunu olarak glutaminli Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) kullanıldı. Medyuma ek olarak HEPES, FBS ve PSA eklendi. Final hacimde hücre medyumunu % 10 FBS (v/v), % 1 PSA ve 25 mM HEPES içermektedir. HEPES öncelikle bir miktar DMEM ile çözülüp daha sonra 0,20 µm'lik steril filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir. 48-72 saat CO₂ inkübatöründe bekletilen flask içindeki HUVEC hücrelerinin yoğunluğuna ışık mikroskopunda bakıldı ve yoğun görünen flasklardan hücreler pasajlanarak çoğaltıldı.

3.2.6.2. Hücre Canlılığı

HUVEC hücreleri için hücre sayımı yapıldı ve trypan blue atılım testi ile hücrelerin canlılığına bakıldı. Lam üzerine 10µL. Hücre +10µL. trypan blue koyularak ışık mikroskopunda boya almayan hücreler sayılarak canlılık belirlendi. Alanda 100 hücre sayılarak boya almayan hücrelerin % oranı hesaplandı.

3.2.6.3. Hücre Kültürü

Daha sonra hücre serisinde mL'de 10⁴ hücre olacak şekilde medium ile birlikte hücreler hazırlandı. Her bir kompleks için ayrı bir 12 kuyucuklu kültür plağına 6 kuyucuga 3'er mL. hücre süspansiyonu koyuldu. Tüm plaklar CO₂ inkübatöründe 37 °C'de %5 CO₂ içeren ortamda 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. inkübasyon sonrası HUVEC hücre serilerinden oluşan 12 kuyucuklu plaklara eklediğimiz hücre derişimlerinin üzerine 1 kuyucuga hücre ve medium, 2. kuyucuga DMSO içeren çözücünün kontrol olarak belirlenmesi ile her bir kuyucuga 5 farklı derişimde (200

μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM) olacak şekilde kompleksler ilave edildi. Tekrar plaklar CO_2 inkübatöründe 48 saat inkübe edildi.

3.2.6.4. MTT

Endotel hücre proliferasyonu ve sitotoksikite tayini Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) metodu ile yapıldı. MTT, bir ilacın veya ajanın hücre üzerindeki sitotoksik etkisini renk değişikliğine bağlı yorumlamaya yarayan bir yöntemdir. MTT metodu Tetrazolyum bromid tuzuna dayanan kolorimertrik bir metoddur. Tetrazolyum bromid normalde sarı renktedir ve metabolik olarak aktif, çekirdekli hücre mitokondrilerinde dehidrojenaz enzim aktivitesi sonucu mor renkte olan formazana dönüşmektedir. Görülen renk değişimi 570 nm. absorbansta spektrofotometre yardımı ile ölçülerek hücre proliferasyon ve canlılığı analiz edilmektedir. Canlılığın ve proliferasyonun çok olduğu hücre koyu mor boyanırken, sitotoksik etki oluşmuş canlılığını azalmış veya kaybolmuş hücreler açık mor veya pembe renkte boyanır.

3.2.6.5. Sitotoksikite

48 saat sonunda HUVEC hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her kuyucuga 100 μL . hücre süspansiyonu olacak şekilde aktarıldı ve her bir kuyucuga 10 μL . MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat süre ile inkübe edildi. MTT solüsyonu 5 mg/mL olacak şekilde PBS içinde çözülüp steril filtrasyon ile bir şişeye transfer edilerek hazırlandı. Daha sonra kuyuculara 100'er μL . DMSO eklenerek MTT ile oluşan formazon kristallerini çözmek için 10 dakika 37°C'de CO_2 inkübatöründe bekletilip mikroplate okuyucu (Biotek Eon) ile her bir kuyucuk 570 nm dalga boyunda okutuldu ve okunan absorban değerine göre sitotoksikite düzeyi belirlendi. Sitotoksikite düzeyleri aşağıdaki formül ile hesaplandı. Sitotoksikite düzeyleri aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$1 - \frac{\text{(test kuyucugunun absorbanı)} - \text{(kontrol kuyucugunun absorbanı)}}{\text{test kuyucugunun absorbanı}} \times 100$$

Kontrole göre %50 oranında sitotoksik etki gösteren derişim sitotoksik doz olarak kabul edildi.

Çalışmamızda öncelikle mL'de 10^4 HUVEC hücresi olacak şekilde 12 kuyucuklu plakta 7 kuyucuga ekim yapıldı. 24 saat sonunda her bir kompleksi seri dilüsyonla sulandırarak 5 farklı derişim elde edildi. Kontrol olarak DMSO kuyucuga

yerleştirildikten sonra hücre süspansiyonları üzerine Daha önce seri dilüsyon yoluyla ayarlanan derişimlerde kompleksler eklendi. 48 saat kompleksler ile inkübe edilen hücrelerde sitotoksite oranları tespit edildi. Hücre proliferasyonu oranındaki değişimler Anova testiyle SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi.

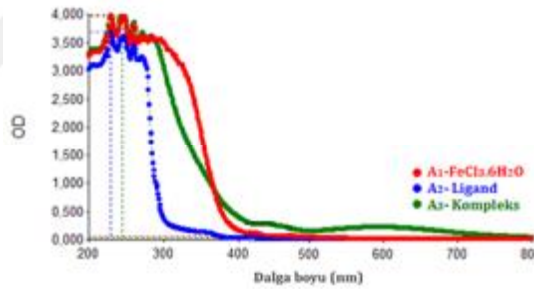


4. BULGULAR

4.1. Safsu ve Plazmada Kompleksleştirme Çalışmaları

4.1.1. 3-metil-2,4-pentandion, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su)

Fe(III) ile 3-metil-2,4-pentandion ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-vis spektrofotometresinde 200-800 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A_1): 228,242,268,271,310,582 nm; 3-bütül-2,4-pentandion ligandı için (A_2): 228,242,272,280 nm iken kompleks için (A_3): 228,243,268,298,324,465,565 nm' de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil.67'de gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil.68).



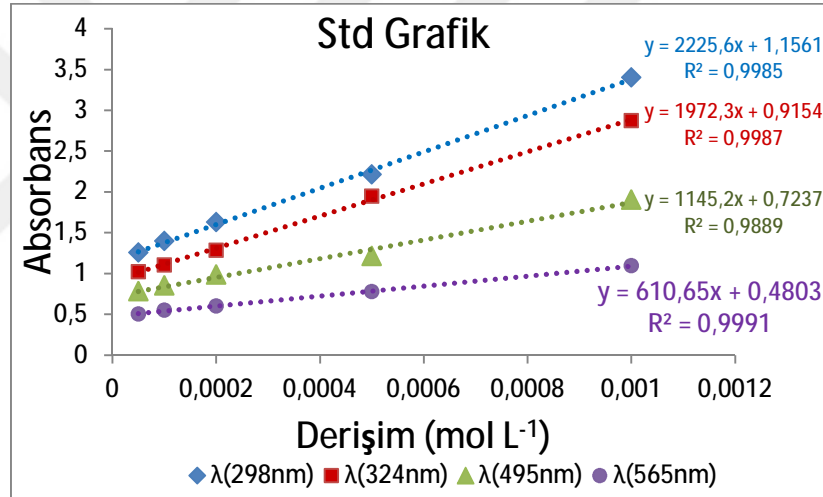
Şekil 67. 3-metil-2,4-pentandion, Fe(III) ve kompleksin safsuda dalga boyu tarama grafiği



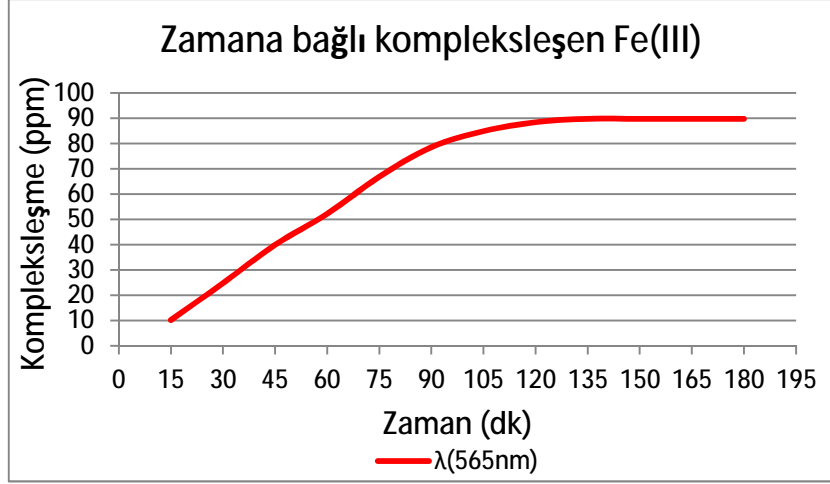
Şekil 68. 3-metil-2,4-pentandion, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünümü

4.1.2. Standart ve Zamana bağı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 298, 324, 465, 565 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiğı elde edildi (Şekil 69). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, dk) kompleksin absorbans değerlerindeki değışimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 70). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nin 3-metil-2,4-pentandion ile kompleksleşme süresi 135 dk sürdüğü ve zamana bağı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 89,42 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp ve uyumlu olduğu gözlemlendi.



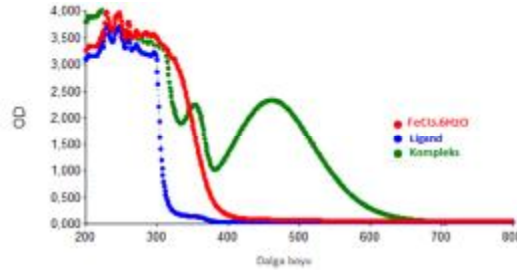
Şekil 69. [3MACAC-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiğı



Şekil 70. [3MACAC-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.1.3. 3-metil-2,4-pentandion, Fe(III) ve Kompleks Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile 3-metil-2,4-pentandion ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 236, 260, 278, 292, 327, 347, 595 nm; 3-metil-2,4-pentandion ligandı için (A₂): 240, 260, 345, 390, 470 nm iken kompleks için (A₃): 242, 258, 330, 370, 482, 582 nm'de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 71' de gösterilmiştir.



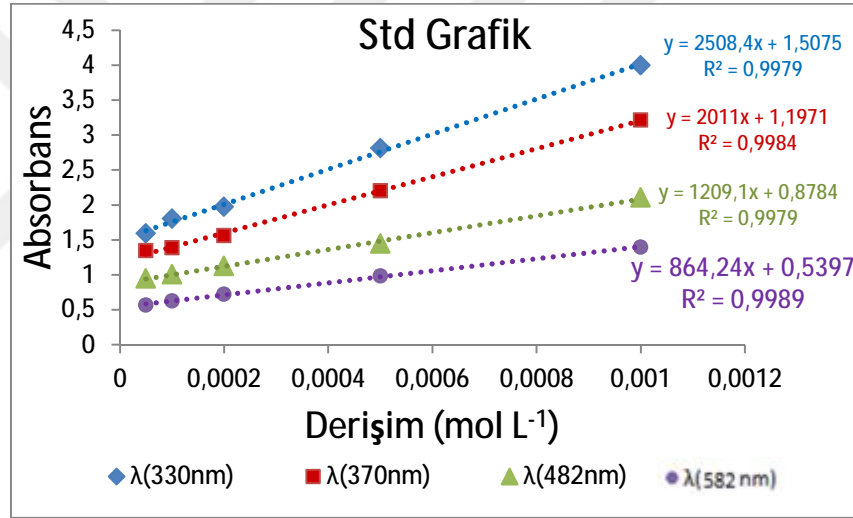
Şekil 71. 3-metil-2,4-pentandion, Fe(III) ve kompleksin plazmada dalga boyu tarama grafiği



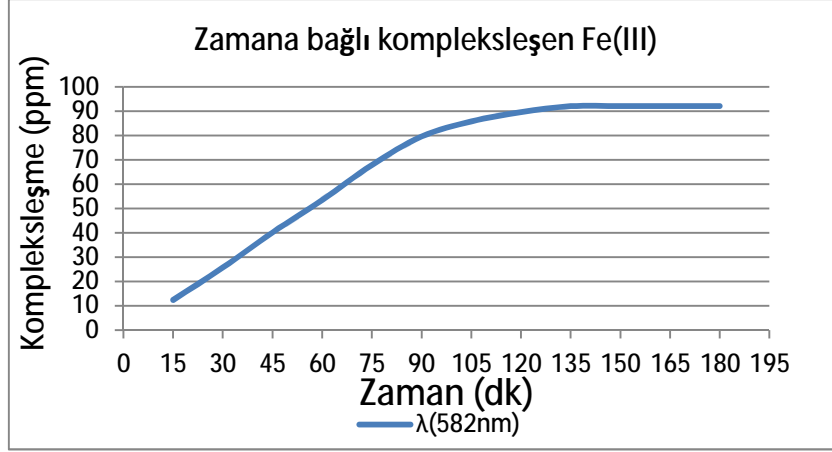
Şekil 72. 3-metil-2,4-pentandion, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.1.4. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 330, 370, 482, 582 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 73). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 210 dk) kompleksin absorbans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 74). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nin 3-metil-2,4-pentandion ile kompleksleşme süresi 140 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 92,66 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



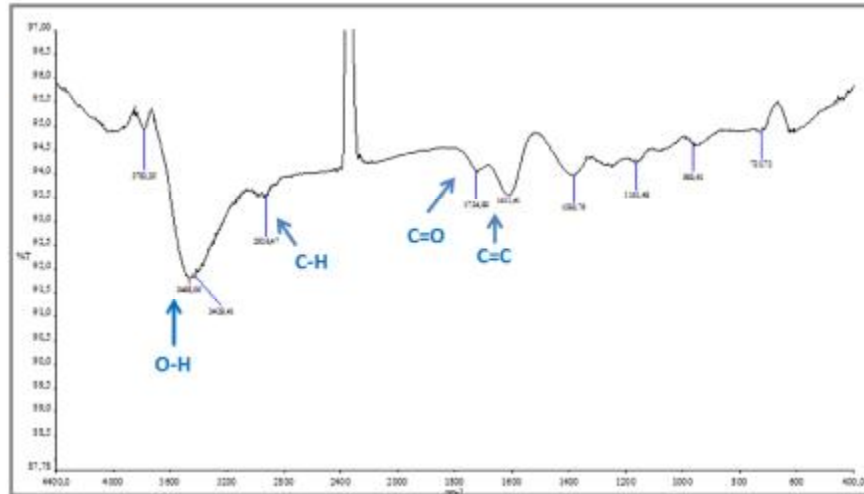
Şekil 73. [3MACAC-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



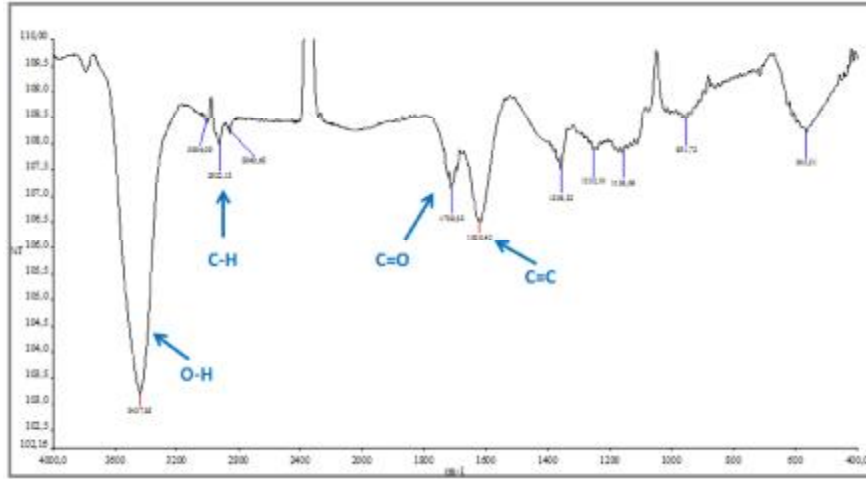
Şekil 74. [3MACAC-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.1.5. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

Asetilasetonun FT-IR spektrumları; 3000-3700 cm⁻¹'de O-H titreşim piki, 2926 cm⁻¹'de alifatik C-H titreşim piki, 1567 cm⁻¹'de C=O titreşim piki, 1549-1525 cm⁻¹'de C=C titreşim piki gözlenmiştir (Şekil 75). 3-metil-2,4-pentandionun FT-IR spektrumu incelendiğinde 3200-3700 cm⁻¹'de O-H titreşim piki, 2922 cm⁻¹'de alifatik C-H titreşim piki, 1709 cm⁻¹'de C=O titreşim piki, 1620 cm⁻¹'de C=C piki gözlenmiştir. Alkilenmenin göstergesi olarak 3-metil-2,4-pentandionda elde edilen piklerin asetilasetondan farklı yerde olduğu gözlemlendi (Şekil 75).

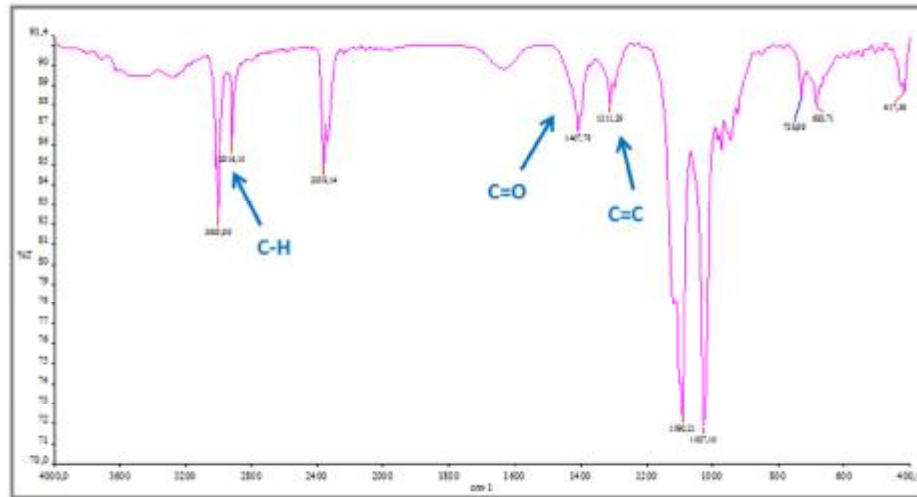


Şekil 75. Asetilaseton ligandının FT-IR Spektrumu

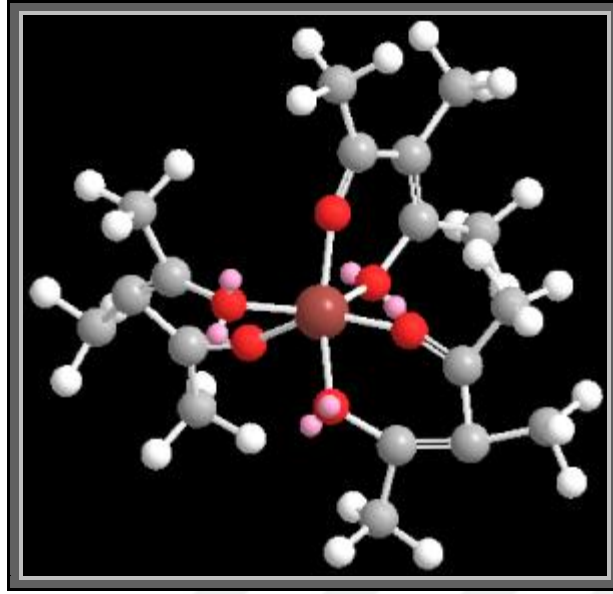


Şekil 76. 3-metil-2,4-pentandion ligandının FT-IR Spektrumu

Kompleksin FT-IR spektrumu incelendiğinde 2922 cm^{-1} (C-H), 1709 cm^{-1} (C=O), 1620 cm^{-1} (C=C) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Komplekste, ligandan farklı olarak piklerin kaydığı ve liganda ait O-H pikinin komplekste gözlenmediği görülmüştür (Şekil.77). O-H piki, asetilasetonun keto-enol tautomerleşmesi sonucu oluşan enol formundan kaynaklanmaktaydı. Ancak kompleks oluşumu keto-enol tautomerinin bozulmasına ve sadece keto formda olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle O-H piki komplekste kaybolmaktadır. Bu da kompleksin varlığına işaretir.



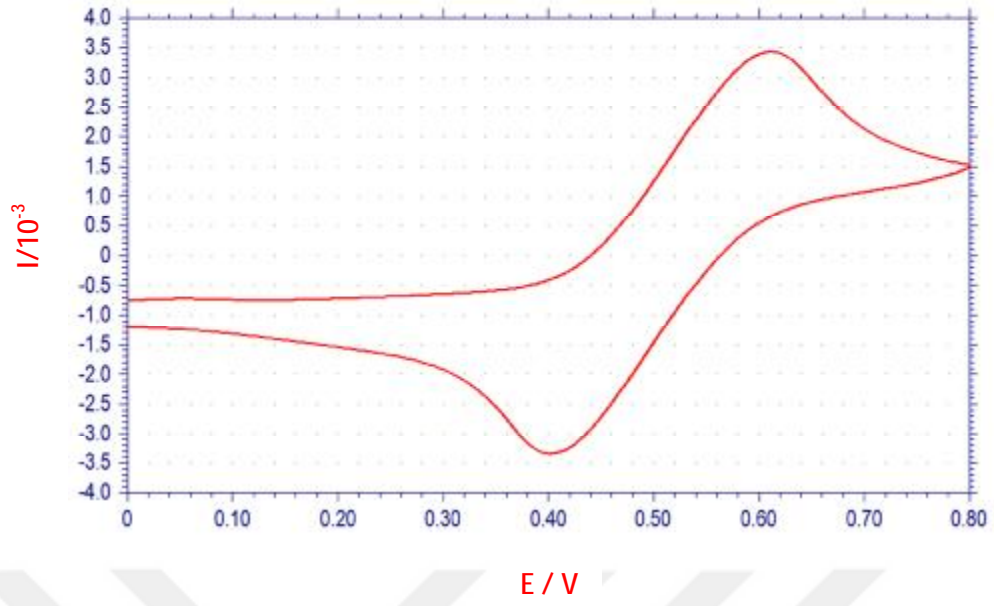
Şekil 77. [3MACAC-Fe³⁺] kompleksinin FT-IR Spektrumu



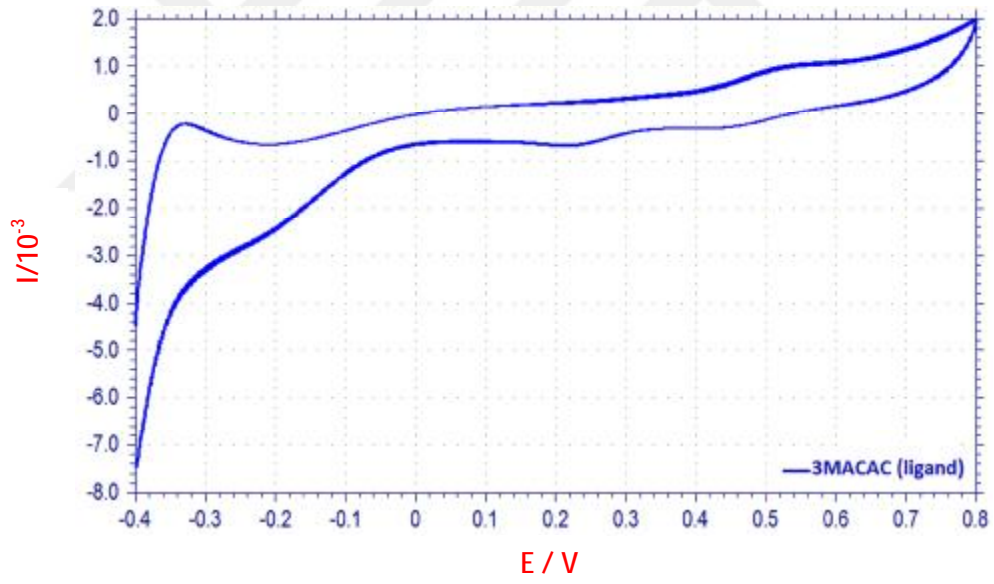
Şekil 78. [3MACAC-Fe³⁺] kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

4.1.6. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)

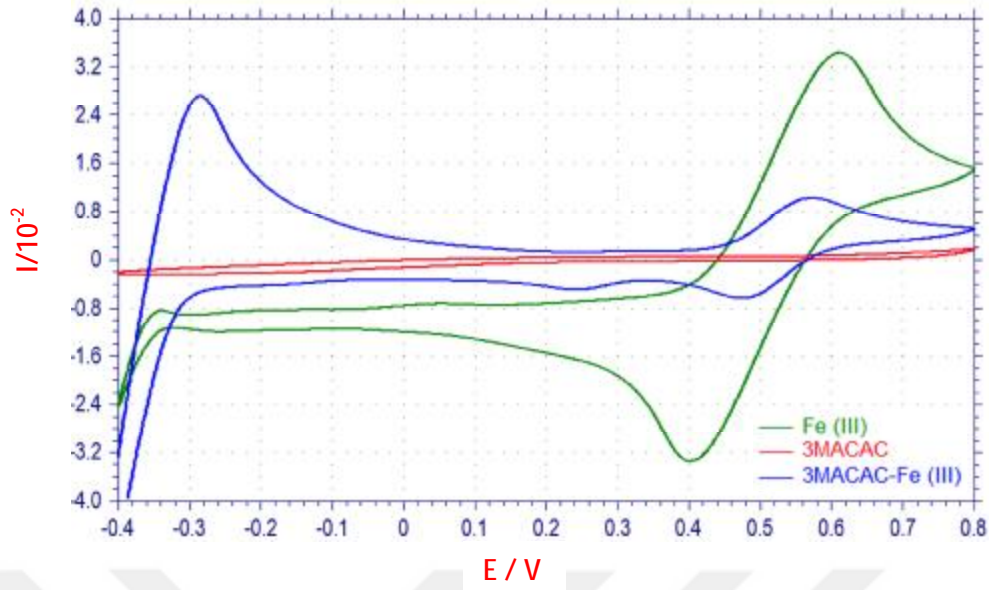
Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmıştı. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı olarak 0,56 V ve -0,28 V' ta oksidasyon pik potansiyelleri görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı olarak 0,24 V ve 0,48V civarında redüksiyon pikler gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligant hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 79. Fe(III)'ün dönüşümlü voltomogram sonucu



Şekil 80. 3MACAC ligandının dönüşümlü voltomogram sonucu



Şekil 81. 3MACAC ligandı, Fe (III), [3MACAC-Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu

4.1.7. Hücre kültürü ve Sitotoksisite

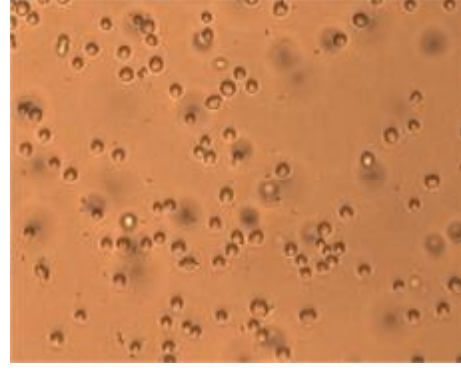
[3MACAC-Fe³⁺] kompleksinin uygulandığı HUVEC hücreleriyle yapılan MTT testi ile sitotoksisite çalışmasında tüm derişimde kontrole göre zamana bağlı olarak anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Kontrole göre sitotoksik etkisi en yüksek olan en büyük derişime sahip (200µM) kompleksin olduğu ortaya çıktı. (Çizelge.6). Aynı zamanda doz miktarı azaldıkça sitotoksitenin paralel bir oranda azaldığı tespit edildi. DMSO ile kompleksin 12,5 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir. (p>0.05).

Çizelge 6. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doz (200 µM)	2.Doz (100 µM)	3.Doz (50µM)	4.Doz (25 µM)	5.Doz (12.5 µM)
Elisa Sonuçları	1,120	1,042	0,510	0,524	0,545	0,559	0,576
% Sitotoksite		6,96	54,56	53,21	51,33	50,08	48,57



Şekil 82. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskobik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10

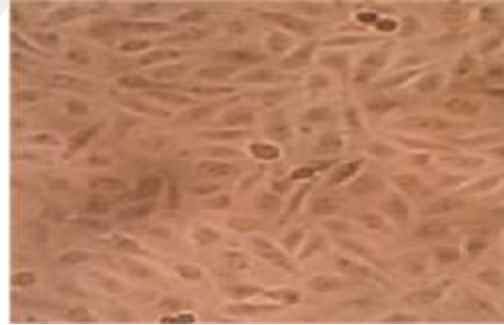


Şekil 83. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskobik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil.82'de de 12'lik plağa her kuyucuga 10^4 hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan sonra kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

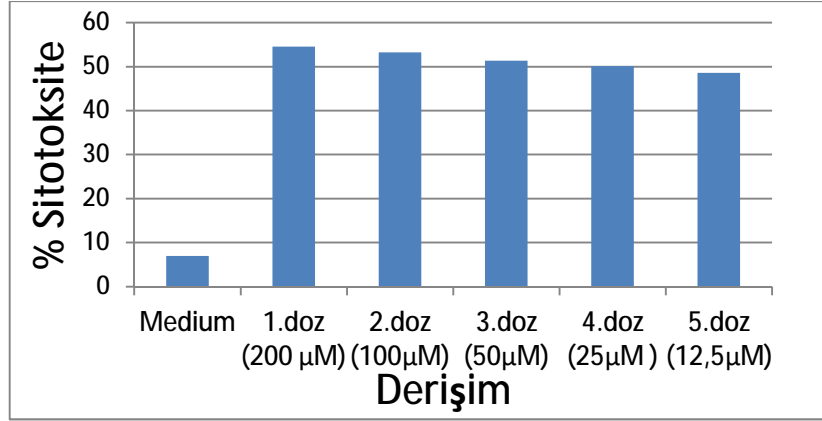


Şekil 84. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskobik görüntü 40X



Şekil 85. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikroskobik görüntü 40X

200 µM kompleks eklendikten 48 saat sonraki hücre proliferasyonunun (Şekil.84) 12,5 µM kompleks eklenen gruba (Şekil.85) göre daha az olduğu ve diğer uygulanan derişimlerde 48 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından çok büyük fark yoktur. En fazla hücre proliferasyonu en düşük dozda tespit edilmiştir.

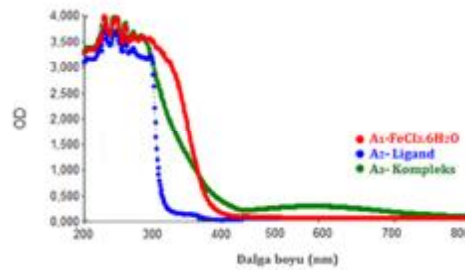


Şekil 86. [3MACAC-Fe³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi

Şekil.84'te kompleksin HUVEC hücreleri üzerine doza bağımlı sitotoksik etkisi görülmektedir. 1. 2. 3. ve 4. dozda sitotoksik etki %50' nin üzerinde iken diğer son 5. dozda biraz daha düşük değer görülmektedir. Sitotoksiste değişen derişimlerde paralel bir etki göstermektedir.

4.2. 3-bütül-2,4-pentandion, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu)

Fe(III) ile 3-bütül-2,4-pentandion ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 228,242,270, 282,312,582 nm; 3-bütül-2,4-pentandion ligandı için (A₂): 228,240,270,290,312 nm iken kompleks için (A₃): 228,242,255,282,336,580 nm' de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil.87'de gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil.88).



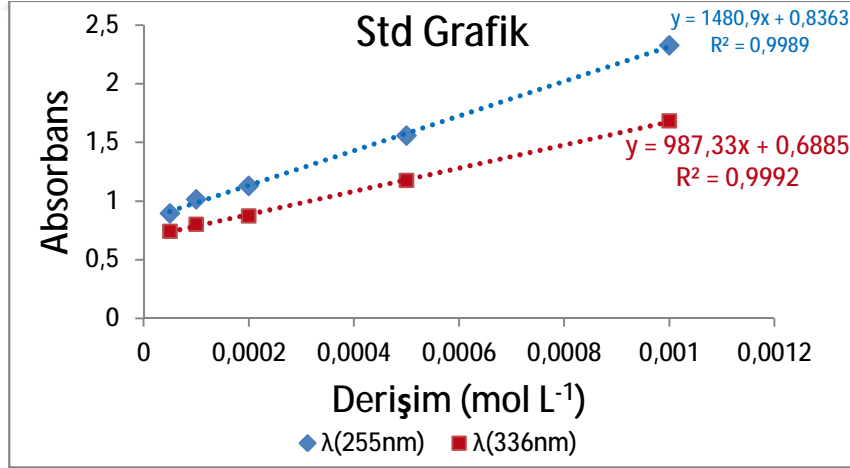
Şekil 87. 3-bütül-2,4-pentandion, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



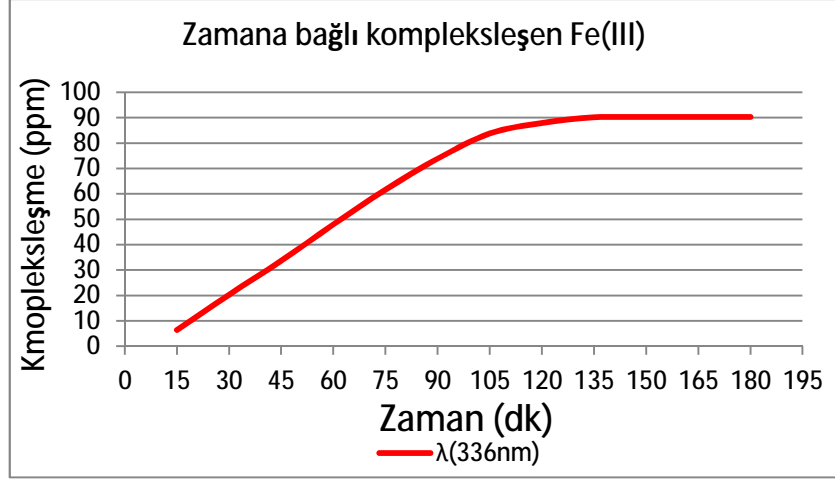
Şekil 88. 3-bütül -2,4-pentandion, Fe(III), Kompleks ve Kompleksin 2. saatteki fiziksel görünüm

4.2.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 255, 336 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 89). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 90). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nin 3-bütül-2,4-pentandion ile kompleksleşme süresi 150 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 91,24 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



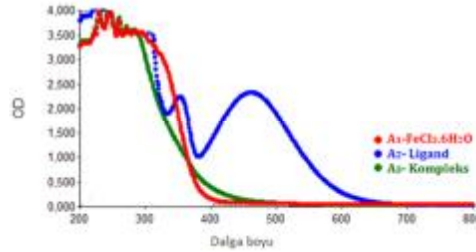
Şekil 89. [3BACAC-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



Şekil 90. [3BACAC-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.2.2. 3-bütül-2,4-pentandion, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile 3-bütül-2,4-pentandion ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 236, 260, 278, 292, 327, 347, 582 nm; 3-bütül-2,4-pentandion ligandı için (A₂): 240, 270, 345, 390, 470 nm iken kompleks için (A₃): 242, 258, 294, 342, 372, 482 nm'de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 91' de gösterilmiştir.



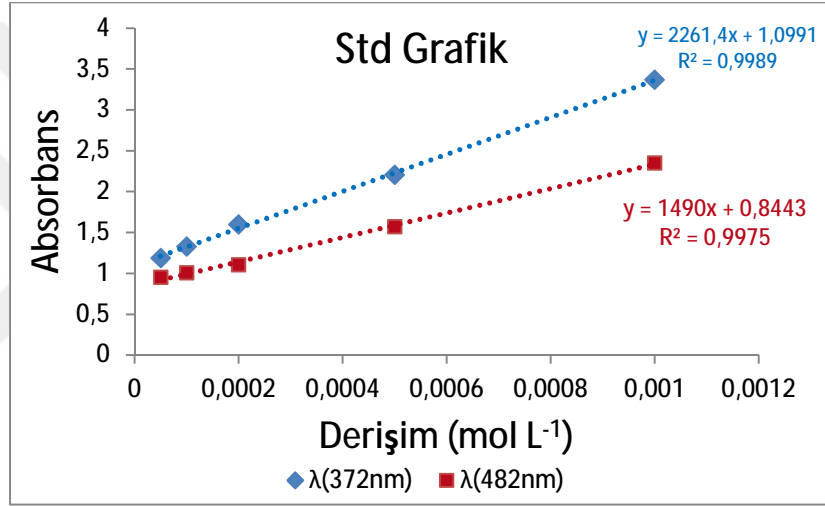
Şekil 90. 3-bütül-2,4-pentandion, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



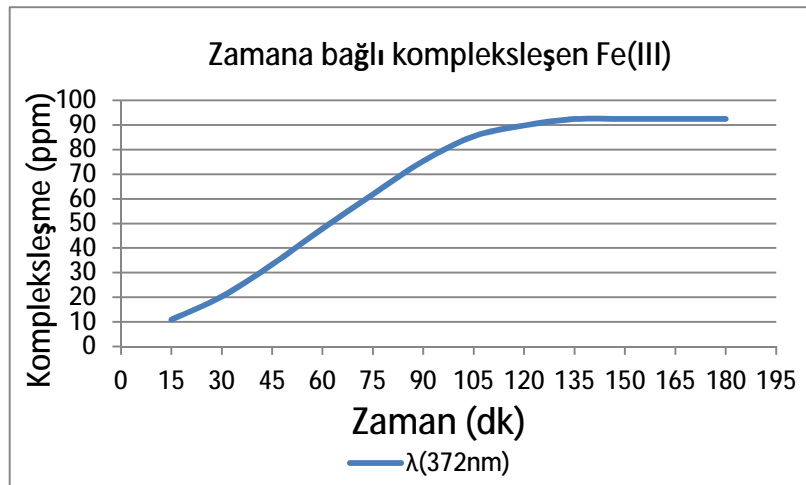
Şekil 91. 3-bütül -2,4-pentandion, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.2.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 372, 482 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 93). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 94). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın 3-bütül-2,4-pentandion ile kompleksleşme süresi 160 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 93,42 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



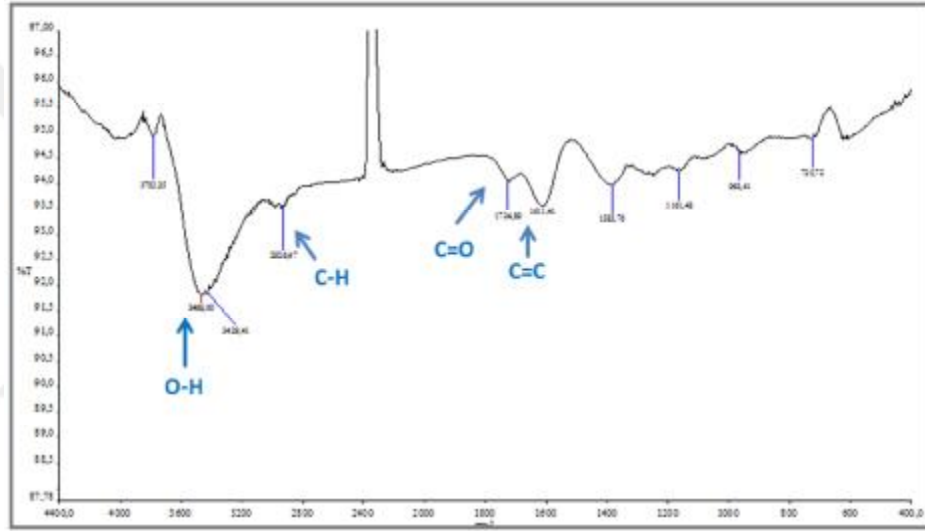
Şekil 92. [3BACAC-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



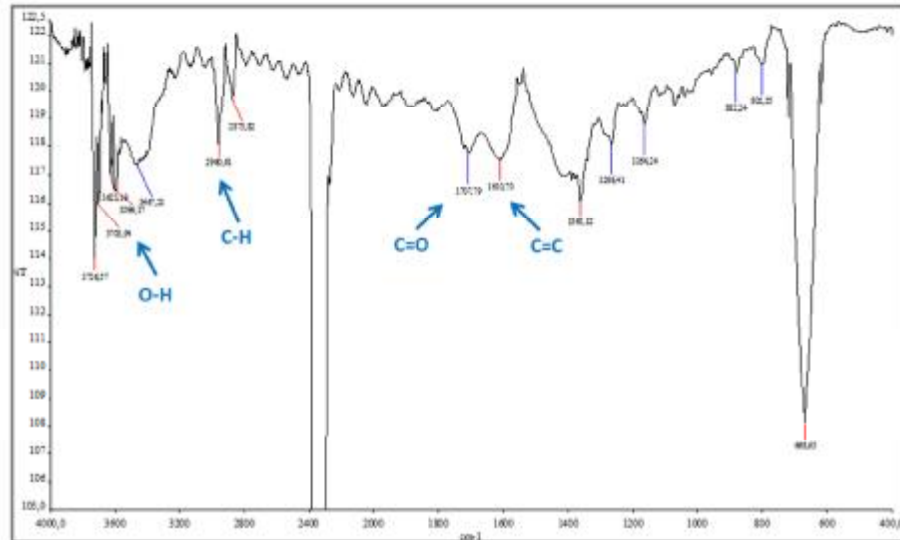
Şekil 93. [3BACAC-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.2.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

Asetilasetonun FT-IR spektrumları; 3000-3700 cm^{-1} 'de O-H titreşim piki, 2926 cm^{-1} 'de alifatik C-H titreşim piki, 1567 cm^{-1} 'de C=O titreşim piki, 1549-1525 cm^{-1} 'de C=C titreşim piki gözlenmiştir (Şekil.92). 3-bütül-2,4-pentandionun FT-IR spektrumu incelendiğinde 3200-3700 cm^{-1} 'de O-H titreşim piki, 2960 cm^{-1} 'de alifatik C-H titreşim piki, 1707 cm^{-1} 'de C=O titreşim piki, 1610 cm^{-1} 'de C=C piki gözlenmiştir. Alkilenmenin göstergesi olarak 3-bütül-2,4-pentandionda elde edilen piklerin asetilasetondan farklı yerde olduğu gözlemlendi (Şekil 95).

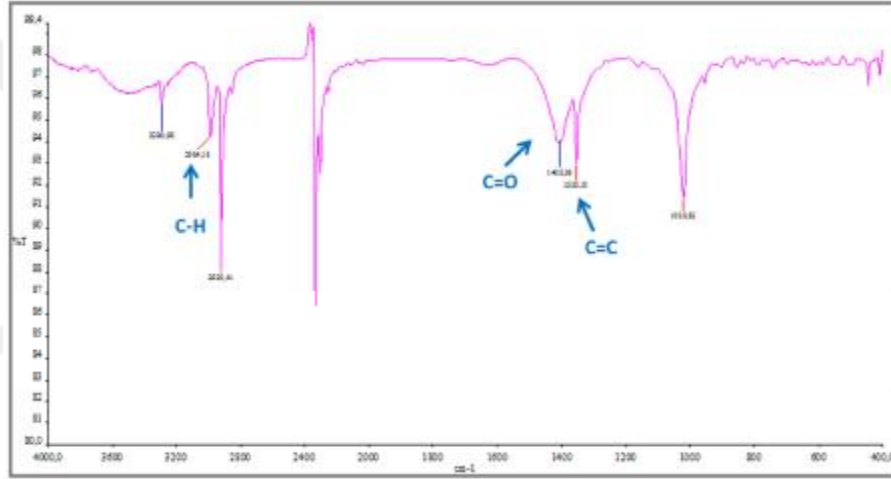


Şekil 94. Asetilaseton ligandının FT-IR Spektrumu

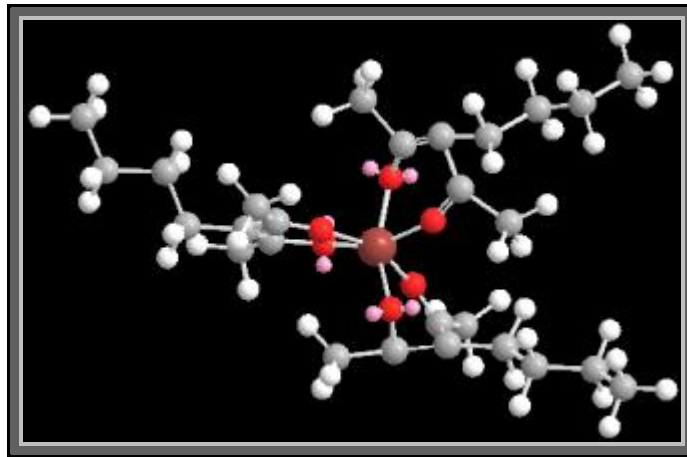


Şekil 95. 3-bütül-2,4-pentandion ligandının FT-IR Spektrumu

Kompleksin FT-IR spektrumu incelendiğinde 2965 cm^{-1} (C-H(al)), 1597 cm^{-1} (C=N), 1707 cm^{-1} (C=O), 1610 cm^{-1} (C=C), gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Komplekste, ligandan farklı olarak piklerin kaydığı ve liganda ait O-H pikinin komplekste gözlenmediği görülmüştür (Şekil.97). O-H piki, asetilasetonun keto-enol tautomerleşmesi sonucu oluşan enol formundan kaynaklanmaktaydı. Ancak kompleks oluşumu keto-enol tautomerinin bozulmasına ve sadece keto formda olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle O-H piki komplekste kaybolmaktadır. Bu da kompleksin varlığına işarettir.



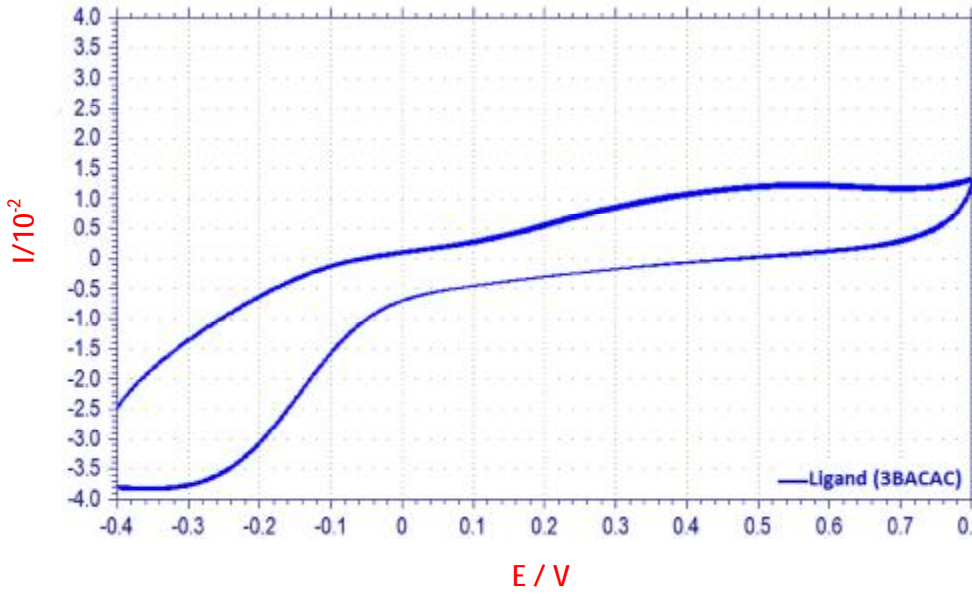
Şekil 96. $[3\text{BACAC-Fe}^{3+}]$ kompleksinin FT-IR Spektrumu



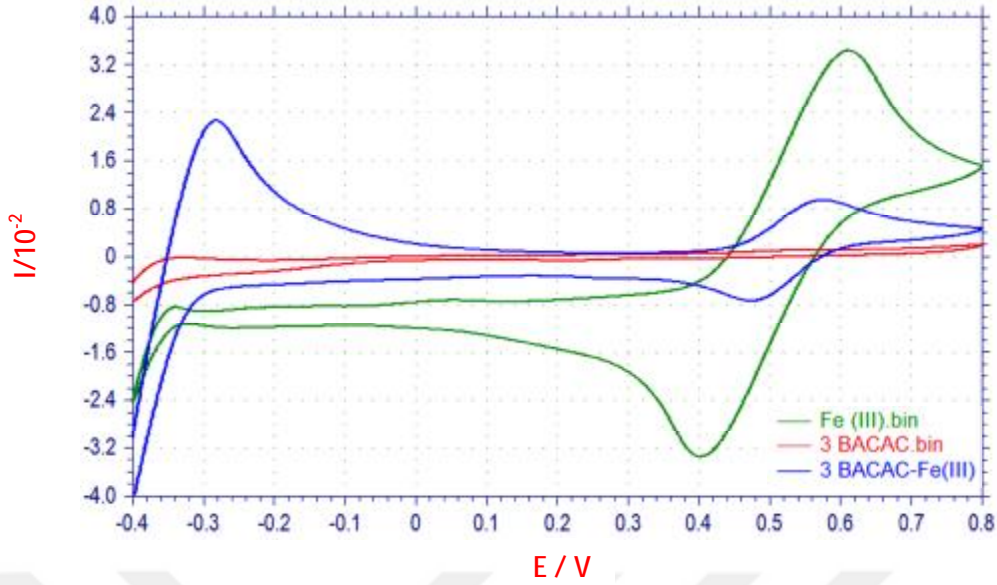
Şekil 97. $[3\text{BACAC-Fe}^{3+}]$ kompleksinin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

4.2.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmıştı. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı olarak 0,56 V ve -0,28 V' ta oksidasyon pik potansiyelleri görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı olarak 0,47 V civarında redüksiyon piki gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligand hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 98. 3MACAC ligandın dönüşümlü voltamogramı



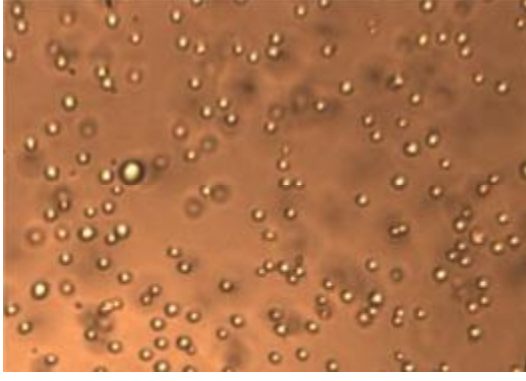
Şekil 99. 3BACAC ligandı, Fe (III), [3MACAC-Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu

4.2.6. Hücre kültürü ve Sitotoksosite

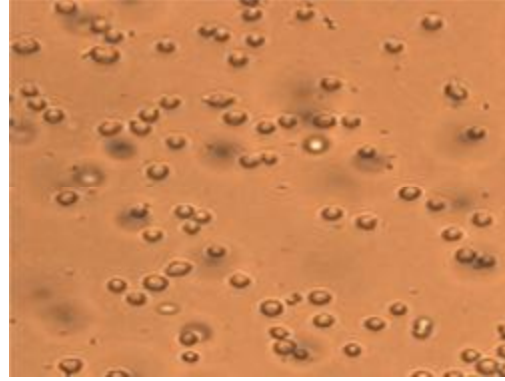
[3BACAC-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksosite çalışmasında 1. ve 2. derişimde kontrole göre anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Kontrole göre sitotoksik etkisi en yüksek olan en büyük derişimli (200µM) kompleksin olduğu ortaya çıktı. (Çizelge.6). En etkili 3. sitotoksik kompleksinin [3BACAC-Fe³⁺] olduğu tespit edildi. Aynı zamanda doz miktarı azaldıkça sitotoksitenin azaldığı tespit edildi. DMSO ile kompleksin 12,5, 25 ve 50 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir. (p>0.05).

Çizelge 7. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doz (200 µM)	2.Doz (100 µM)	3.Doz (50µM)	4.Doz (25 µM)	5.Doz (12.5 µM)
Elisa Sonuçları	1,112	1,036	0,528	0,542	0,816	0,703	0,687
% Sitotoksite		6,83	52,51	51,25	26,61	36,78	38,21

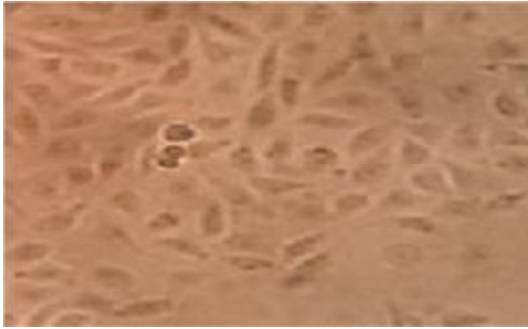


Şekil 100. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10

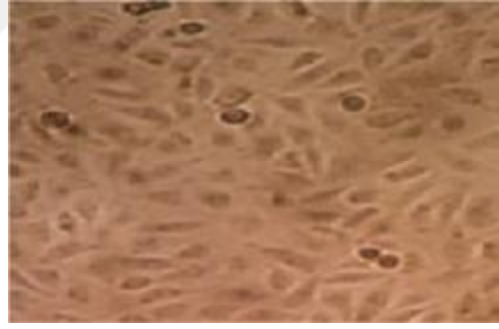


Şekil 101. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil 100'de 12'lik plağa her kuyucuga 10^4 hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan sonra kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

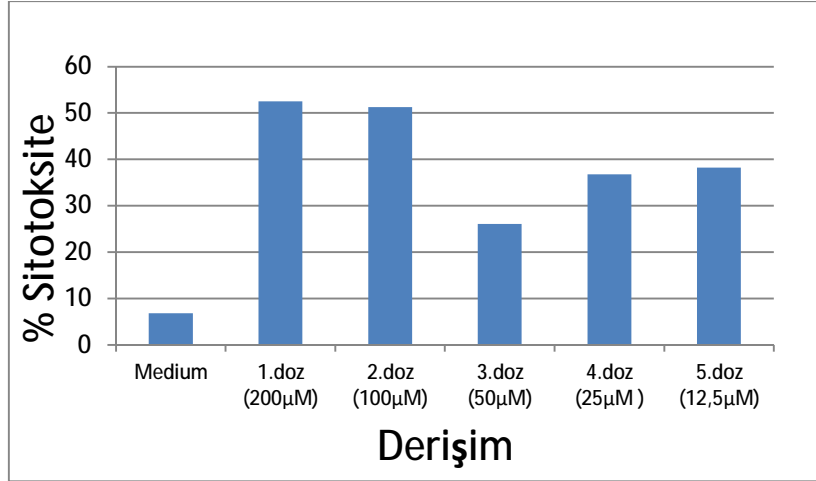


Şekil 102. 1. Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X



Şekil 103. 5. Derişim (50 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X

200 µM kompleks eklendikten 48 saat sonraki hücre proliferasyonunun (Şekil 102) 50 µM kompleks eklenen gruba (Şekil 103) göre daha az olduğu ve diğer uygulanan derişimlerde 48 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından çok büyük fark yoktur. En fazla hücre proliferasyonu 3. dozda (50 µM) tespit edilmiştir.

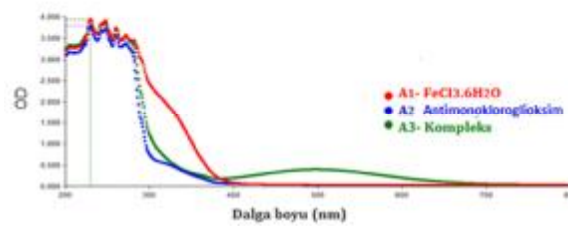


Şekil 104. [3BACAC-Fe³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi

Şekil 104'de kompleksin HUVEC hücreleri üzerine doza bağımlı sitotoksik etkisi görülmektedir. 1. ve 2. dozda sitotoksik etki %50' nin üzerinde iken diğer son 3. 4 ve 5. dozda daha düşük değer görülmektedir. Sitotoksikite değişen derişimlerde paralel bir etki göstermemektedir.

4.3. Antimonoklorogliksim, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu)

Fe(III) ile antimonoklorogliksim ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 228, 242, 270, 290, 312, 582 nm; antimonoklorogliksim ligandı için (A₂): 229, 237, 246, 259, 272 nm iken kompleks için (A₃): 230, 238, 246, 271, 290, 482, 652 nm' de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 105'de gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 106).



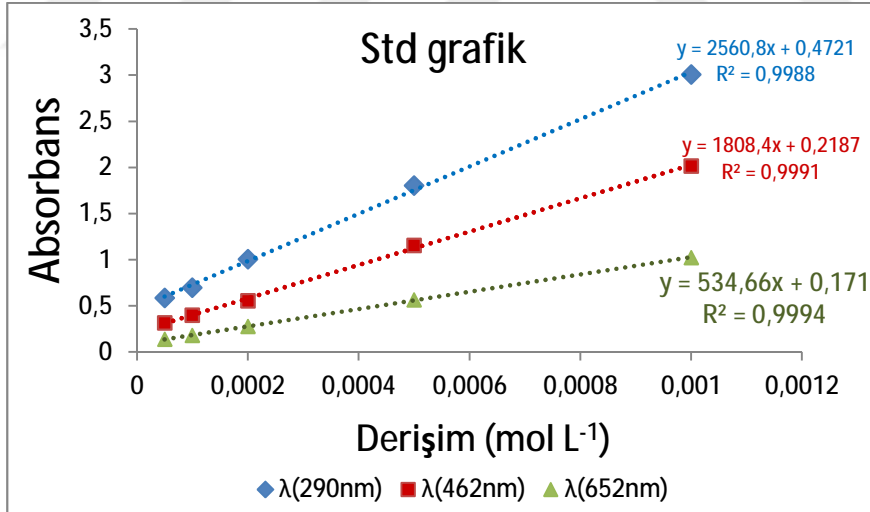
Şekil 105. Antimonoklorogliksim, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



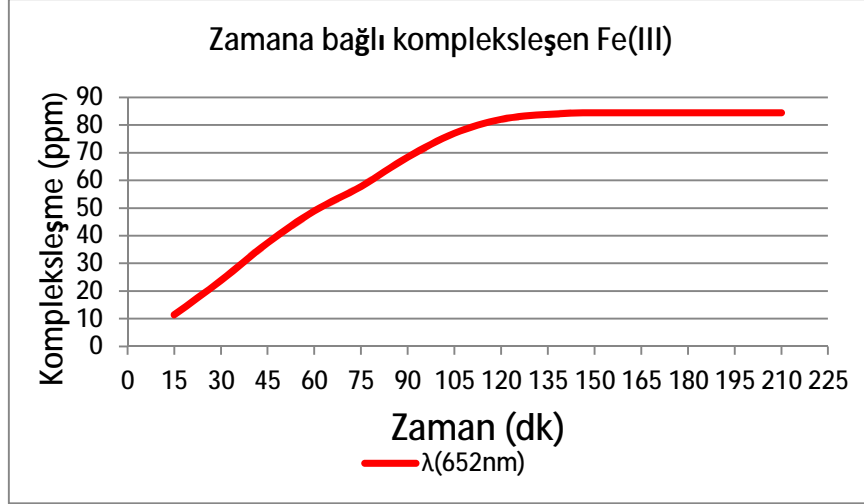
Şekil 106. Antimonoklorogliksim, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.3.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 290, 482, 652 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 107). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 108). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nin antimonoklorogliksim ile kompleksleşme süresi 180 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 84,44 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



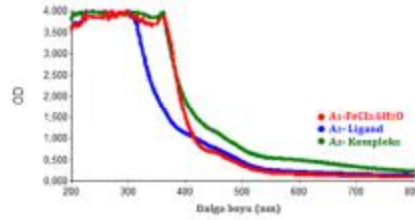
Şekil 107. [AMCG-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



Şekil 108. [AMCG-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağıli kompleksleşme miktarı

4.3.2. Antimonoklorogliksim, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile antimonoklorogliksim ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 230, 260, 272, 452, 483 nm; Antimonoklorogliksim ligandı için (A₂): 240, 292, 350, 370, 452 nm iken kompleks için (A₃): 242, 258, 294, 330, 372, 498, 696 nm'de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 109' da gösterilmiştir.



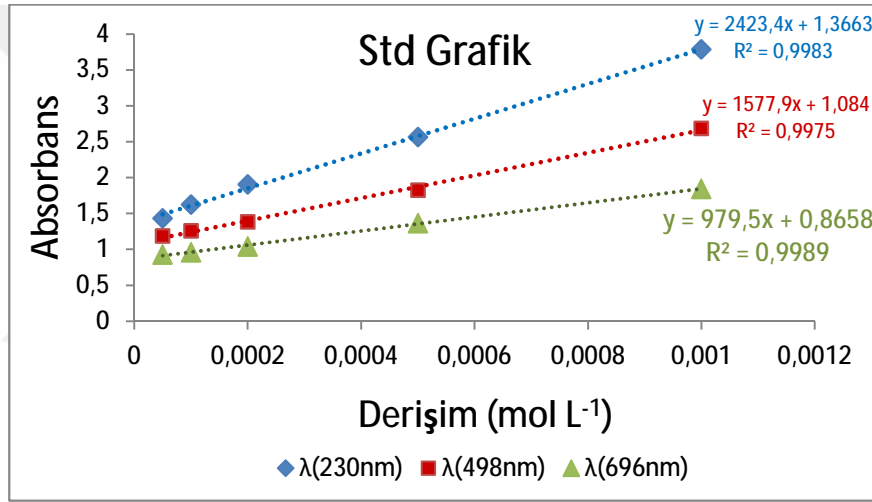
Şekil 109. Antimonoklorogliksim, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



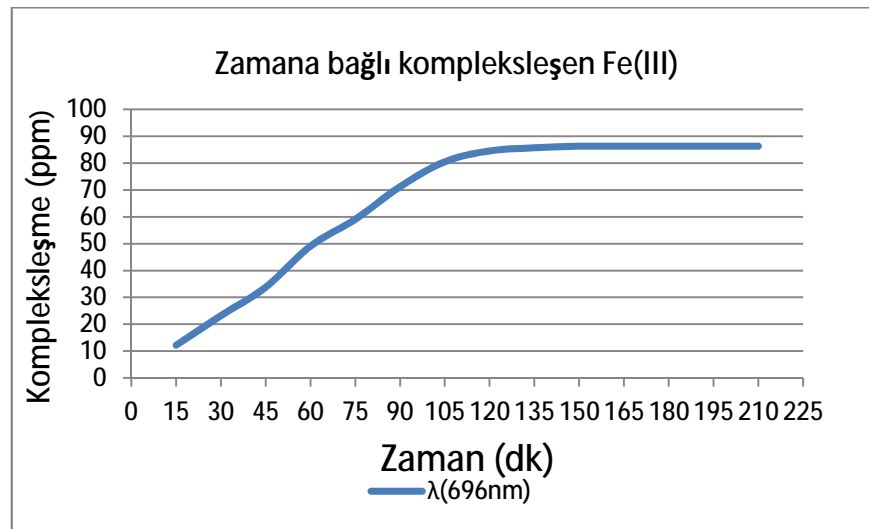
Şekil 110. Antimonoklorogliksim, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 3. saat fiziksel görünüm

4.3.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 330, 498, 696 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 111). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 112). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın antimonokloroglikosim ile kompleksleşme süresi 185 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 86,3 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



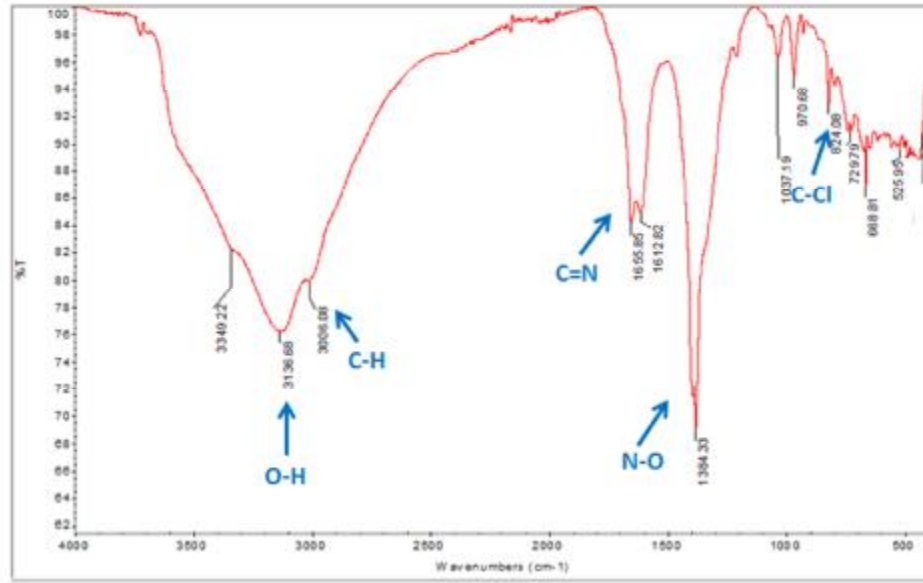
Şekil 111. [AMCG-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



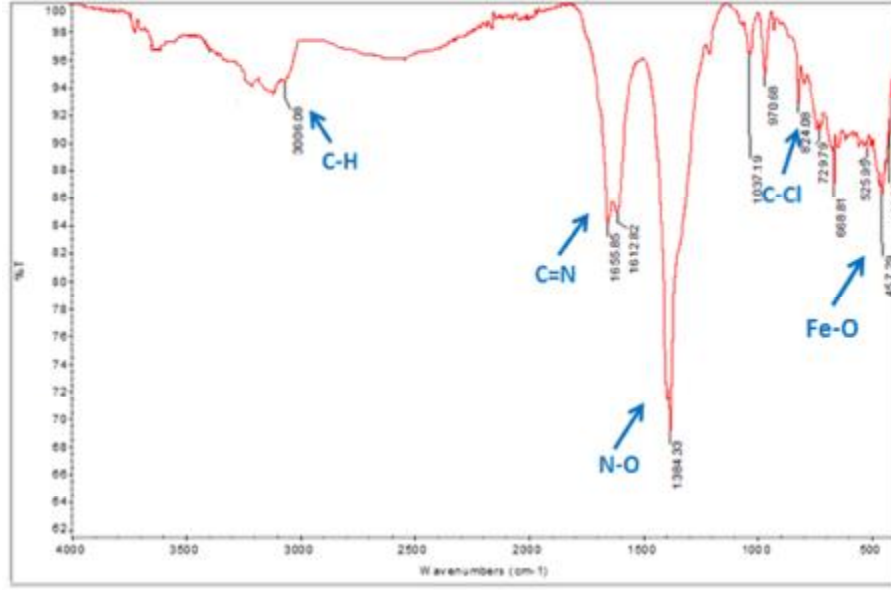
Şekil 112. [AMCG -Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.3.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

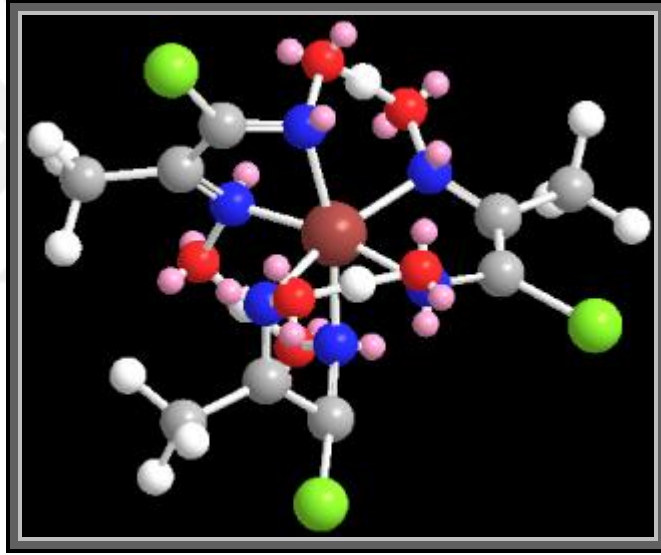
Antimonoklorogliksim bileşiğinin FT-IR spektrumu incelendiğinde; 3500-3200 cm⁻¹, de O-H, 1590 cm⁻¹, de C=N, 950 cm⁻¹, de N-O, 746 cm⁻¹, de C-Cl gerilme titreşimlerine ait piklerin görülmesi bu bileşiğin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir. Bu değerler literatürlerle uyum içerisindedir (Şekil 113). Kompleksin IR spektrumu incelendiğinde 1655-1612 cm⁻¹ (C=N), 1384-970 cm⁻¹ (N-O), 729 cm⁻¹ (C-Cl), 457 cm⁻¹ (Fe-N) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Kompleksleşme sırasında iki oksim ligandı hidrojen köprüsü oluşturarak birer tane H⁺ iyonu verirler. FT-IR spektrumu incelendiğinde kompleksin OH gerilme piki kaybolmuştur. Kompleksteki piklerin kaymış olması kompleksleşmenin olduğunu göstermektedir.



Şekil 113. Antimonoklorogliksim ligandının FT-IR Spektrumu



Şekil 114. [AMCG-Fe³⁺] kompleksinin FT-IR Spektrumu

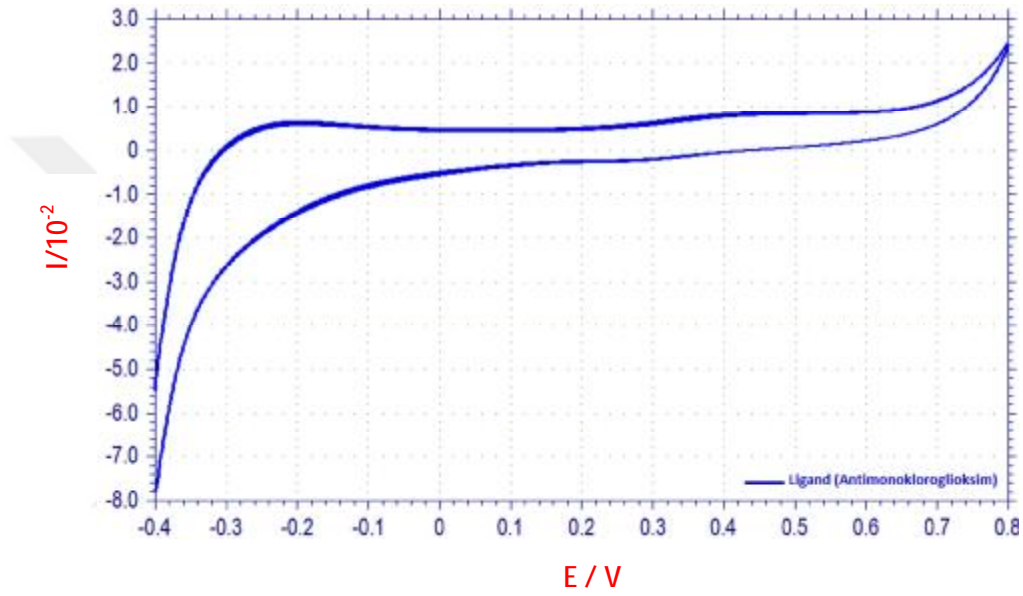


Şekil 115. [AMCG-Fe³⁺] kompleksinin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

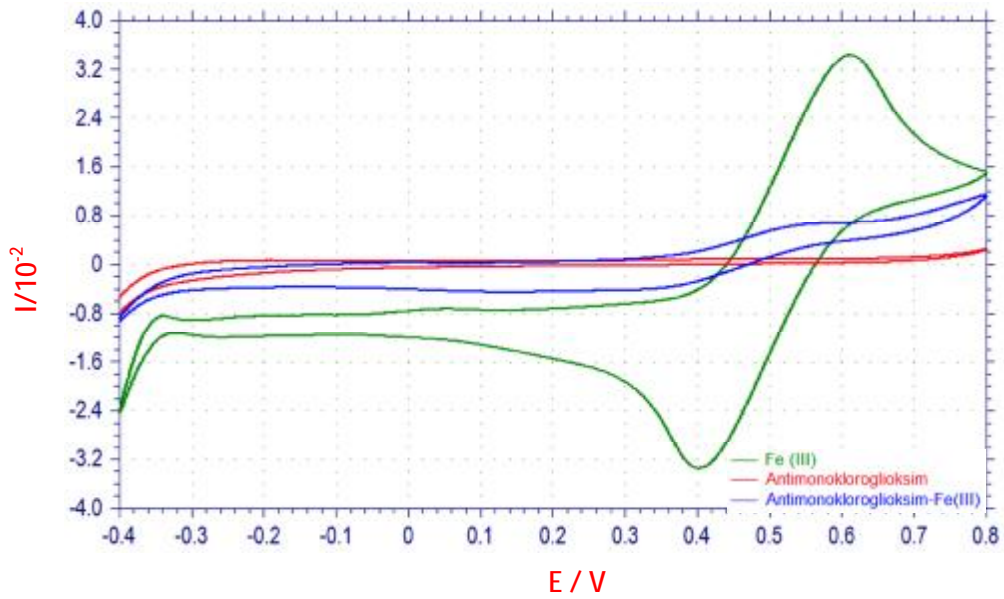
4.3.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmıştı. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı olarak 0,55 V oksidasyon pik potansiyeli görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III) 'den farklı olarak 0,32 V civarında redüksiyon piki gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligant hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyelerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 116. Antimonokloroglikسيم ligandının dönüşümlü voltomogram sonucu



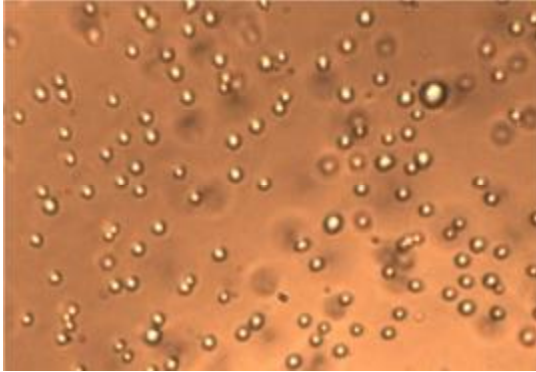
Şekil 117. Antimonoklorogliksim ligandı, Fe (III), [3MACAC-Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu

4.3.6. Hücre Kültürü ve Sitotoksisite

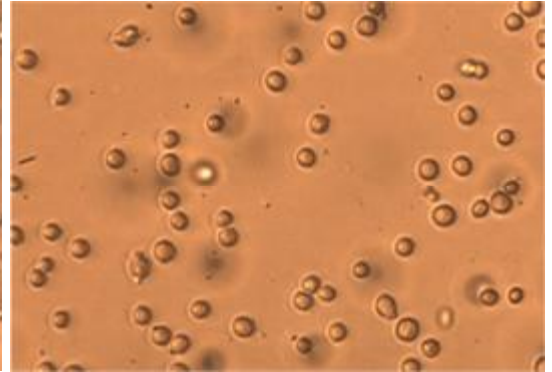
[AMCG-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksisite çalışmasında 1. 2. ve 3. derişimde kontrole göre anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Kontrole göre sitotoksik etkisi en yüksek olan en büyük derişimli (200µM) kompleksin olduğu ortaya çıktı. (Çizelge.6). Aynı zamanda doz miktarı azaldıkça sitotoksitenin azaldığı tespit edildi. DMSO ile kompleksin 12,5 ve 25 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir (p>0.05).

Çizelge 8. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doç (200 µM)	2.Doç (100 µM)	3.Doç (50µM)	4.Doç (25 µM)	5.Doç (12.5 µM)
Elisa Sonuçları	1,194	1,097	0,572	0,586	0,590	0,782	0,843
% Sitotoksite		8,12	52,09	50,92	50,46	34,50	29,39



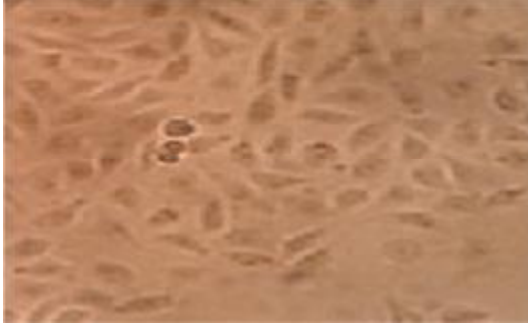
Şekil 118. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10



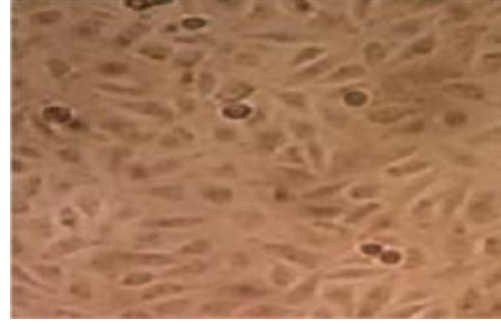
Şekil 119. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil 118'de 12'lik plağa her kuyucuga 10⁴ hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan sonra

kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

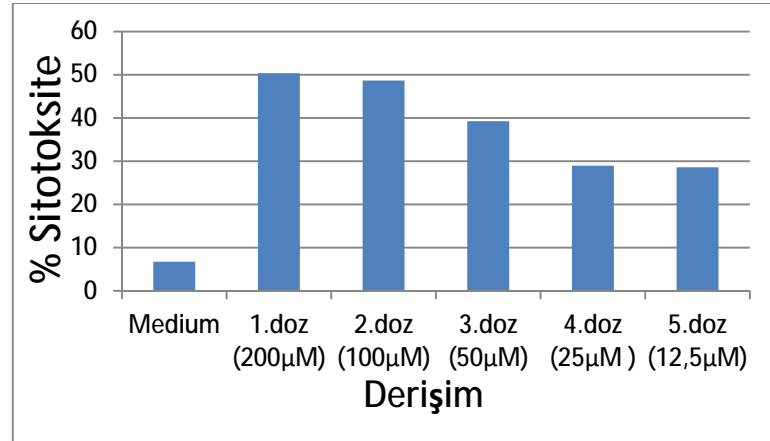


Şekil 120. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X



Şekil 121. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X

200 µM kompleks eklendikten 48 saat sonraki hücre proliferasyonunun (Şekil 120) 12,5 µM kompleks eklenen gruba (Şekil 121) göre daha az olduğu ve diğer uygulanan derişimlerde 48 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından istatistiksel olarak çok büyük fark yoktur ($p>0.05$). En fazla hücre proliferasyonu 1. dozda (12,5 µM) tespit edilmiştir.

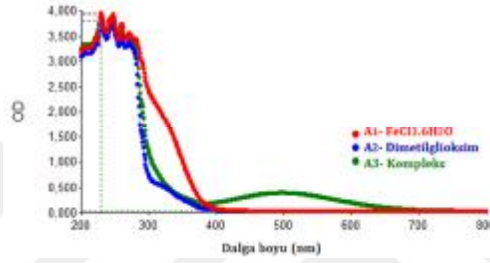


Şekil 122. [AMCG -Fe³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi

Şekil 122'de kompleksin HUVEC hücreleri üzerine doza bağımlı sitotoksik etkisi görülmektedir. 1. 2. ve 3. dozda sitotoksik etki % 50' nin üzerinde iken 4. ve 5. dozda daha düşük değerler görülmektedir. Sitotoksitate değişen derişimlerde paralel bir etki göstermektedir.

4.4. Dimetilglioksim, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su)

Fe(III) ile dimetilglioksim ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A_1): 228, 245, 259, 270, 362, 580 nm; dimetilglioksim ligandı için (A_2): 228, 252, 271, 290, 370 nm iken kompleks için (A_3): 228, 246, 271, 283, 420, 590 nm'de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 123'de gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 124).



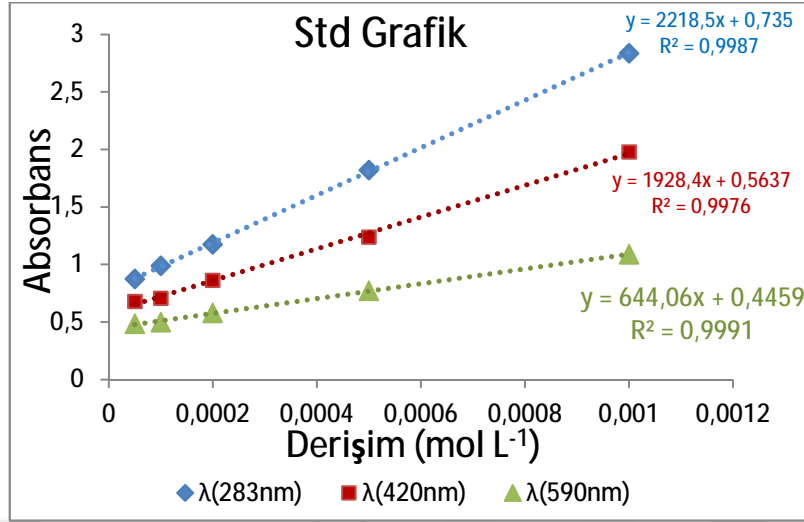
Şekil 123. Dimetilglioksim, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



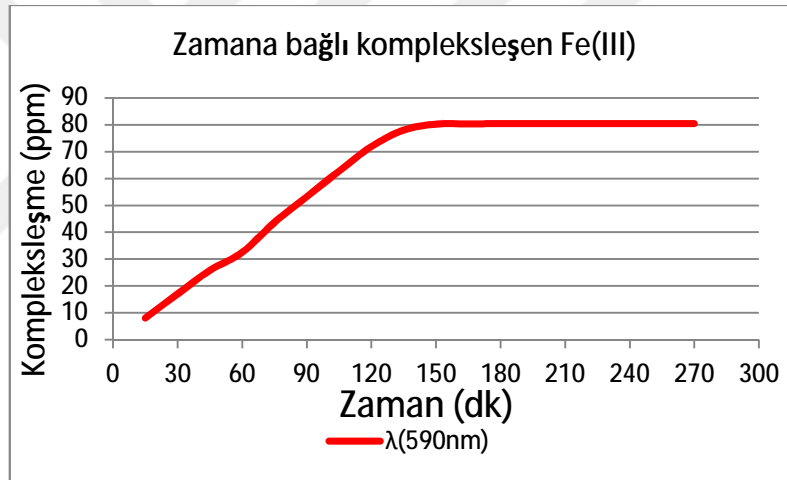
Şekil 124. Dimetilglioksim, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.4.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözeltiden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 283, 420, 590 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 125). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 126). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın dimetilglioksim ile kompleksleşme süresi 160 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 80,42 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



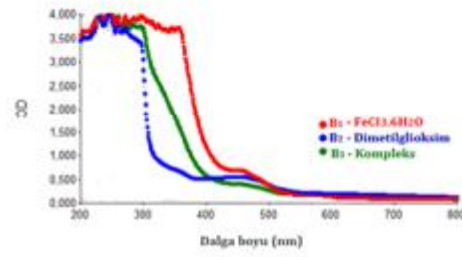
Şekil 125. [DMG-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



Şekil 126. [DMG-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.4.2. Dimetilglioksim, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile dimetilglioksim ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 230, 260, 270, 282, 337, 483, 585 nm; dimetilglioksim ligandı için (A₂): 230, 272, 292, 335, 347, 353, 394, 470 nm iken kompleks için (A₃): 232, 258, 297, 320, 460, 612 nm'de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 127'de gösterilmiştir.



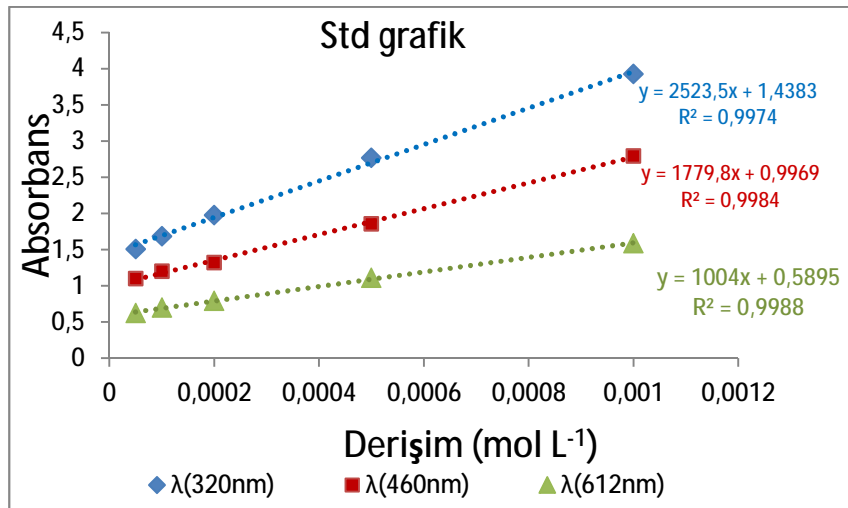
Şekil 127. Dimetilglioksim, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



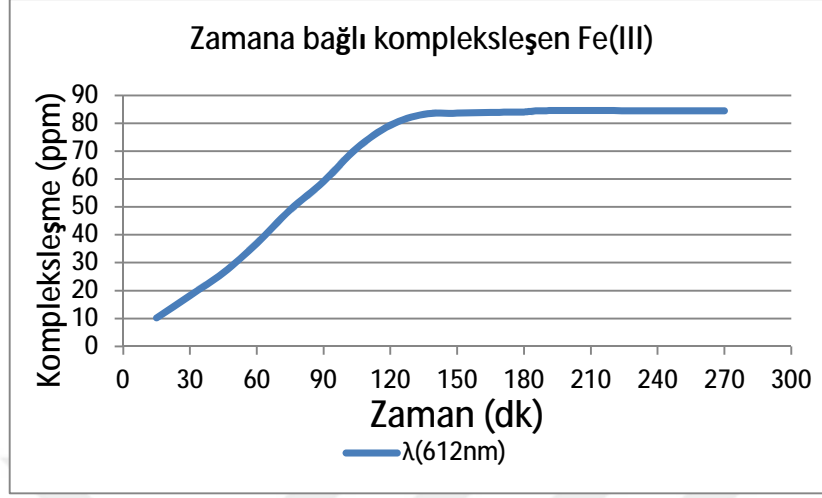
Şekil 128. Dimetilglioksim, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.4.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 320, 260, 612 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorptans grafiği elde edildi (Şekil 129). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorptans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 130). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nin dimetilglioksim ile kompleksleşme süresi 170 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 84,5 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



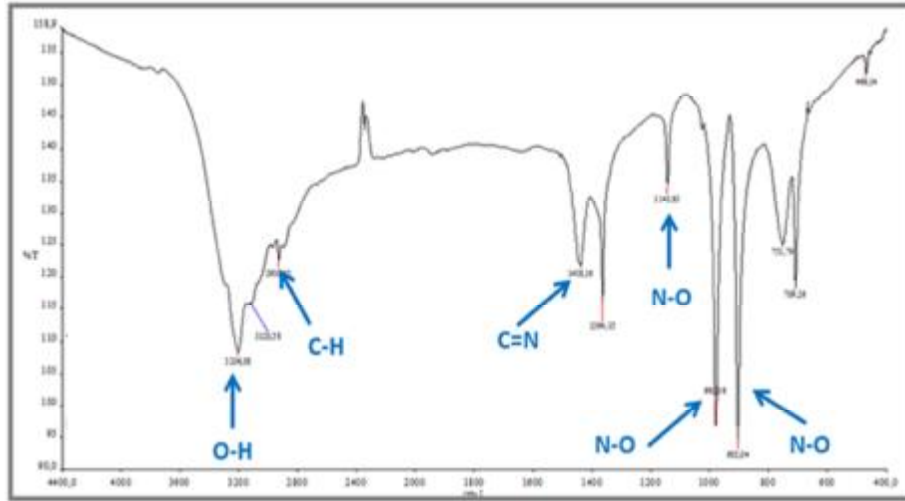
Şekil 129. [DMG-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



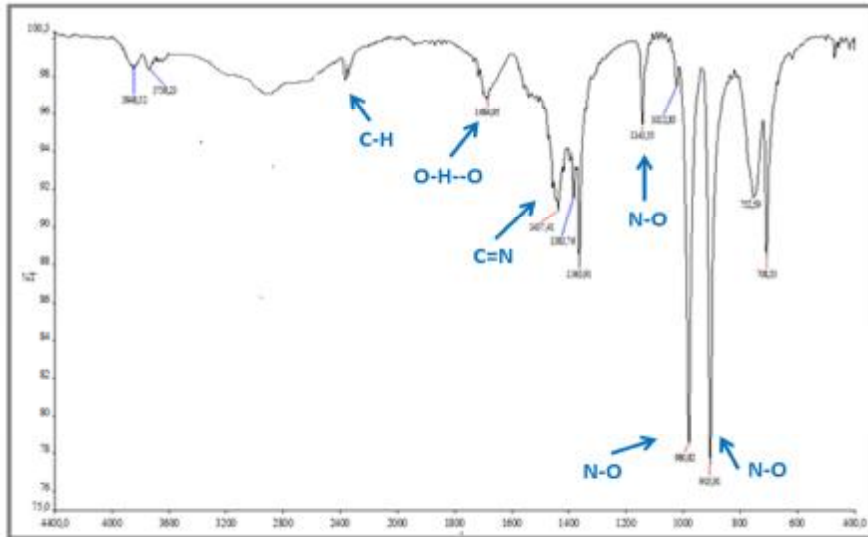
Şekil 130. [DMG-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.4.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

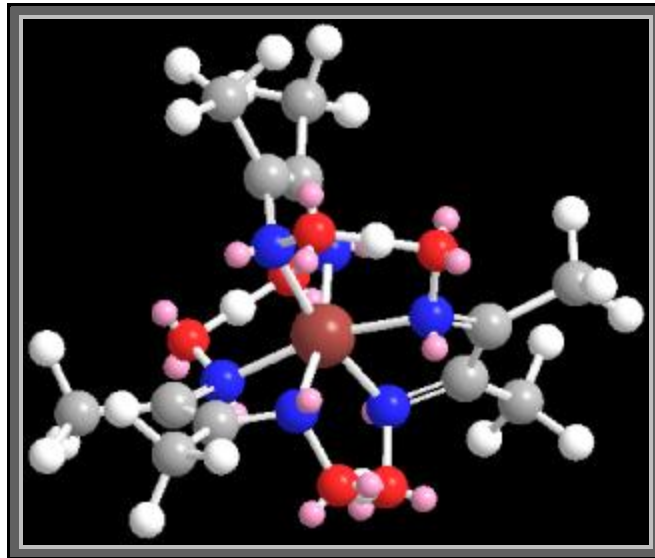
Dimetilglioksim bileşiğinin FT-IR spektrumu incelendiğinde; 3000-3300 cm⁻¹, de O-H, 1438 cm⁻¹, de C=N, 980 cm⁻¹, de N-O, 2930 cm⁻¹, de C-H gerilme titreşimlerine ait piklerin görülmesi bu bileşiğin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir. Bu değerler literatürlerle uyum içerisindedir. Kompleksin IR spektrumu incelendiğinde 3209 cm⁻¹ (O-H), 2926 cm⁻¹ (C-H), 1437 cm⁻¹ (C=N), 905-980-1143 cm⁻¹ (N-O), 462 cm⁻¹ (Fe-N) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Kompleksleşme sırasında iki oksim ligandı hidrojen köprüsü oluşturarak birer tane H⁺ iyonu verirler. FT-IR spektrumu incelendiğinde kompleksin OH gerilme piki kaybolmuştur. Kompleksteki piklerin kaymış olması kompleksleşmenin olduğunu göstermektedir.



Şekil 131. Dimetilglioksim ligandının FT-IR Spektrumu



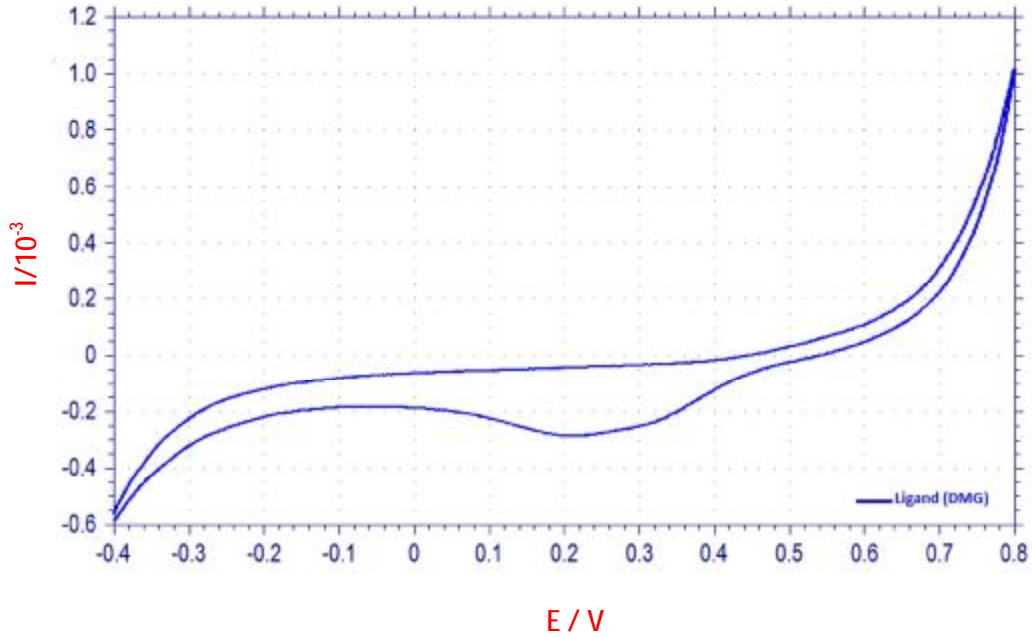
Şekil 132. [DMG-Fe³⁺] kompleksinin FT-IR Spektrumu



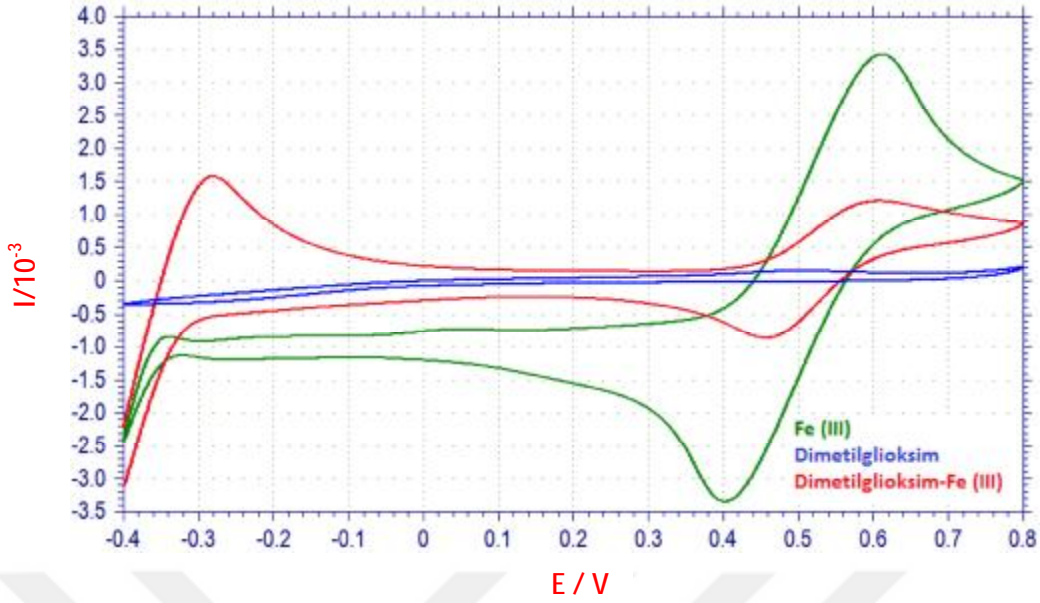
Şekil 133. [DMG-Fe³⁺] kompleksinin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

4.4.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmıştır. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı 0,6 V ve -0,28 V' ta oksidasyon pik potansiyelleri görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III) 'den farklı olarak 0,46 V civarında redüksiyon piki gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligant hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 134. Dimetilglioksim ligandının dönüşümlü voltomogram sonucu



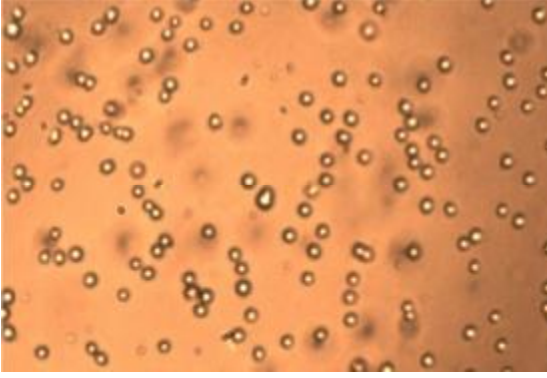
Şekil 135. Dimetilgliksim ligandı, Fe (III), [DMG-Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu

4.4.6. Hücre Kültürü ve Sitotoksisite

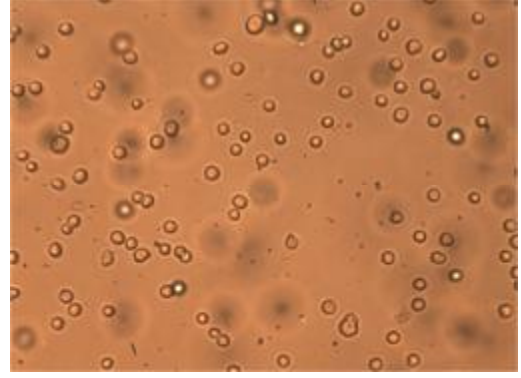
[DMG-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksisite çalışmasında 1. ve 2. derişimlerde kontrole göre anlamlı fark görüldü. Fakat doz düşürüldüğünde etkilenen hücre oranının yani sitotoksitenin azaldığı ama yine de büyük değerli olduğu gözlemlendi. Kontrole göre sitotoksik etkisi en yüksek olan en büyük derişimli (200µM) kompleksin olduğu ortaya çıktı (Çizelge.9). DMSO ile kompleksin 12,5, 25 ve 50 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir. (p>0.05).

Çizelge 9. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doz (200 µM)	2.Doz (100 µM)	3.Doz (50µM)	4.Doz (25 µM)	5.Doz (12.5 µM)
Elisa Sonuçları	1,196	1,105	0,590	0,597	0,638	0,759	0,787
% Sitotoksite		7,60	50,66	50,08	46,65	36,53	34,19

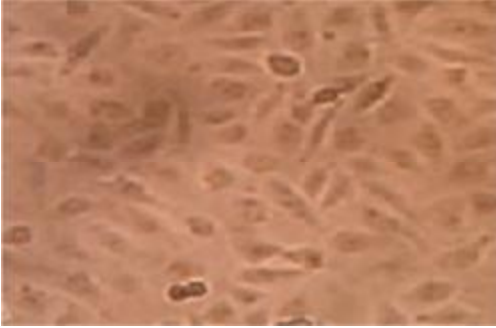


Şekil 136. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskobik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10

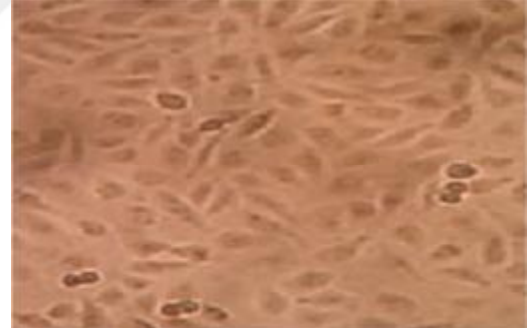


Şekil 137. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskobik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil 136'da 12'lik plağa her kuyucuga 10^4 hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan sonra kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

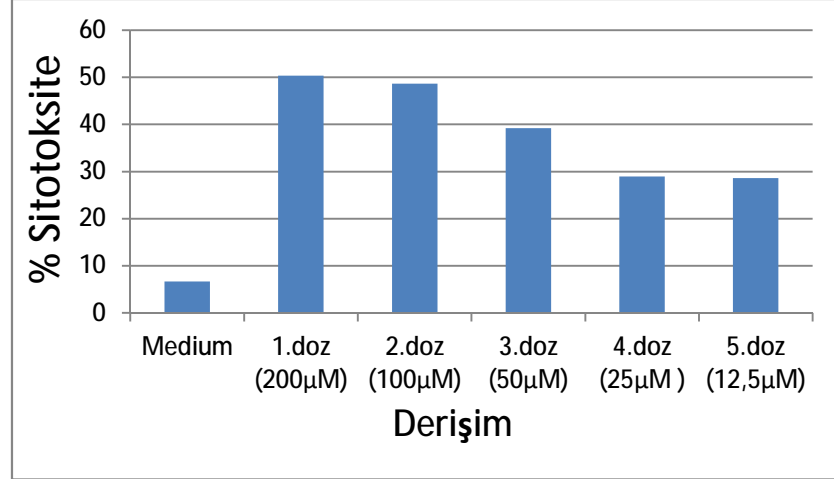


Şekil 138. 1. Derişim (200 µM) sonrası mikroskobik görüntü 40X



Şekil 139. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikroskobik görüntü 40X

200 µM kompleks eklendikten 48 saat sonraki hücre proliferasyonunun (Şekil 137) 12,5 µM kompleks eklenen gruba (Şekil 138) göre daha az olduğu ve diğer uygulanan derişimlerde 48 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından çok büyük fark yoktur. En fazla hücre proliferasyonu 5. dozda (12,5 µM) tespit edilmiştir.

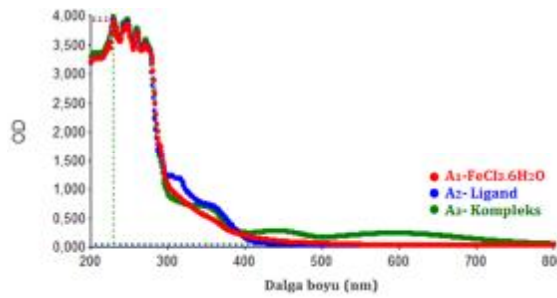


Şekil 140. [DMG-Fe³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi

Şekil 134'te kompleksin HUVEC hücreleri üzerine doza bağımlı sitotoksik etkisi görülmektedir. 1. ve 2. dozda sitotoksik etki % 50' nin üzerinde iken 3. 4. ve 5. dozda daha düşük değerler görülmektedir. Sitotoksiste değişen derişimlerde paralel bir etki göstermektedir.

4.5.7. Asetilaseton, Fe(III)ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su)

Fe(III) ile asetilaseton ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm arasında dalga boyu aralığında taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 229, 252, 268, 271, 279, 572 nm; asetilaseton ligandı için (A₂): 227, 252, 271, 282, 350 nm iken kompleks için (A₃): 214, 270, 352, 461, 616 nm' de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 141 gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 142).



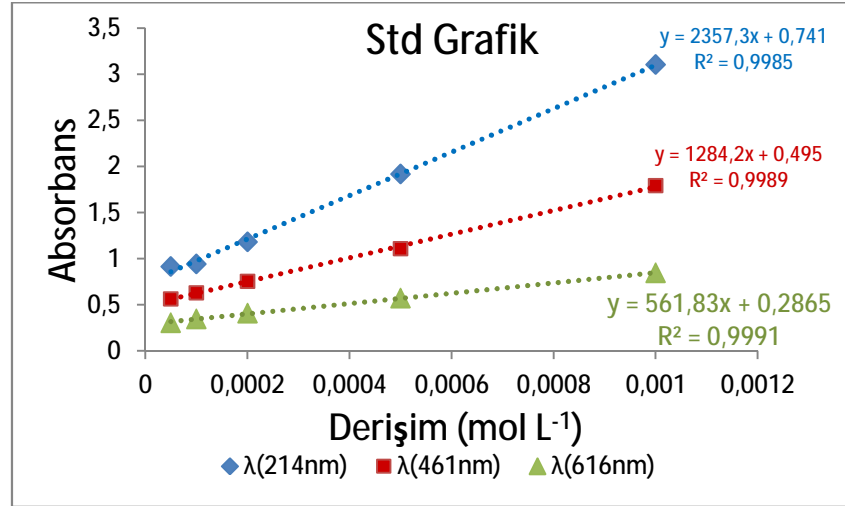
Şekil 141. ACAC, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiğı



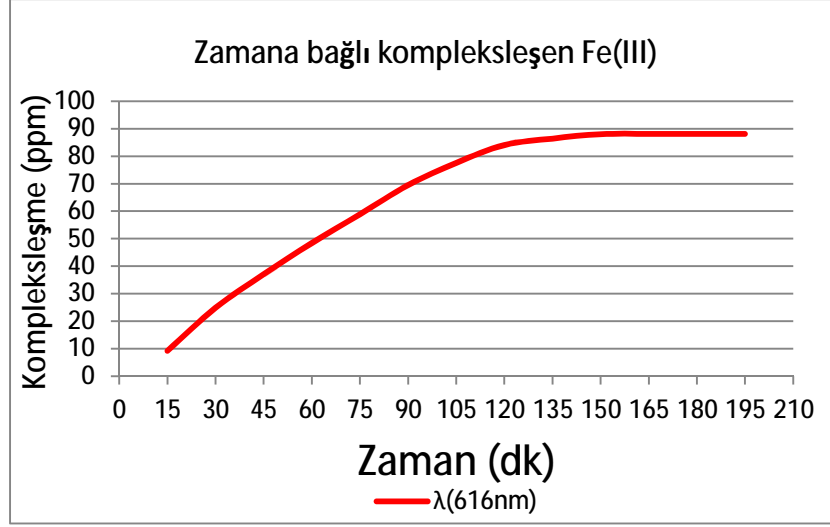
Şekil 142. ACAC, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.5.8. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 214, 461, 616 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiğı elde edildi (Şekil 143). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değışimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 144). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın ACAC ile kompleksleşme süresi 125 dk sürdüğü ve zamana bağılı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 88,12 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



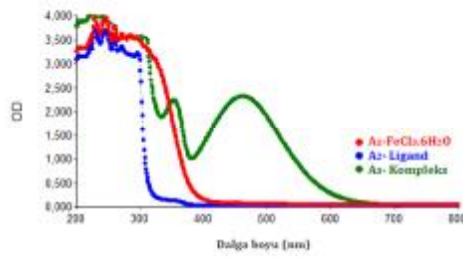
Şekil 143. [ACAC-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiğı



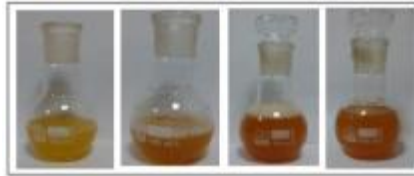
Şekil 144. [ACAC-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.5.9. Asetilaseton, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile asetilaseton ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 230, 260, 270, 282, 327, 483, 585 nm; ligand için (A₂): 232, 258, 290, 318, 495 nm iken kompleks için (A₃): 230, 256, 294, 320, 330, 384, 470, 652 nm' de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil.145'de gösterilmiştir.



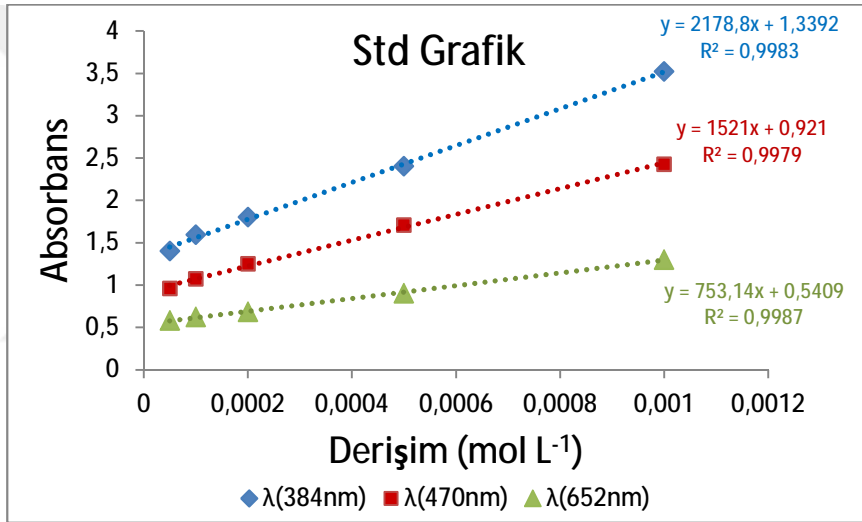
Şekil 145. ACAC, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



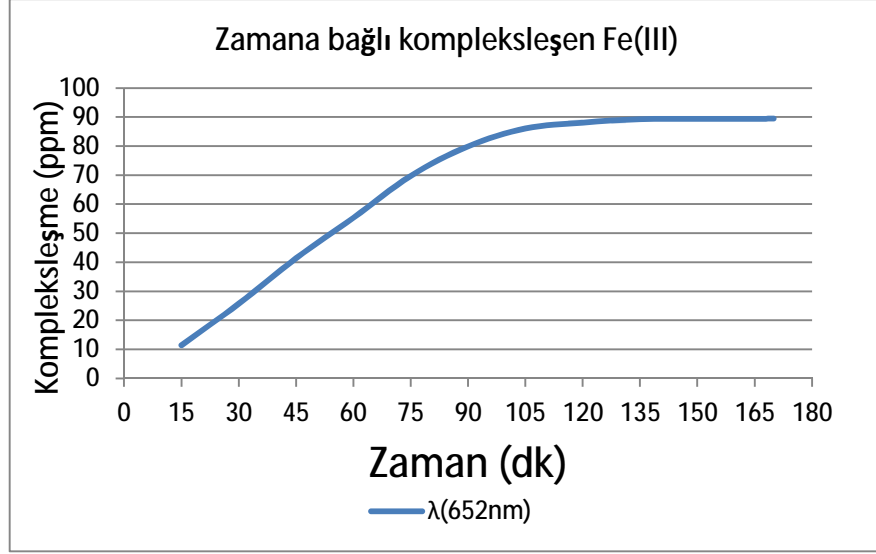
Şekil 146. ACAC, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.5.10. Standart ve Zamana bağı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 384, 470, 652 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiğı elde edildi (Şekil 147). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değışimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 148). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın ACAC ile kompleksleşme süresi 135 dk sürdüğü ve zamana bağı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 89.06 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



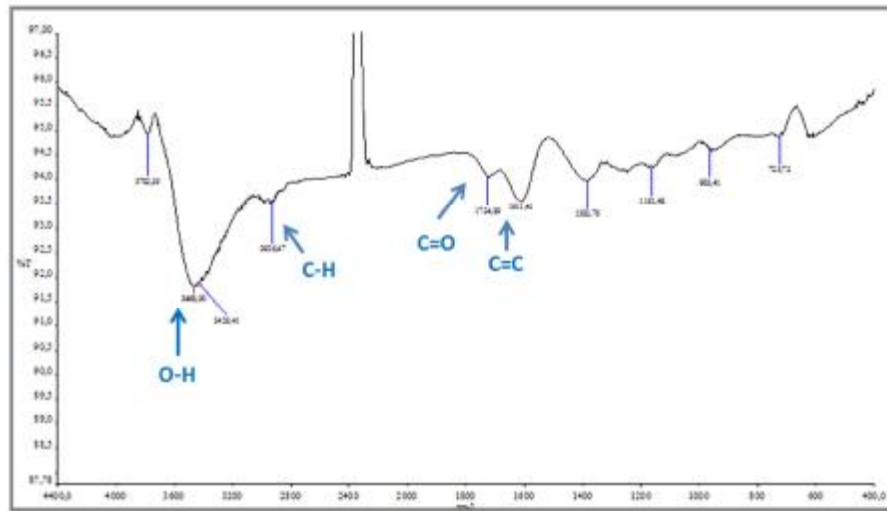
Şekil 147. [ACAC-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiğı



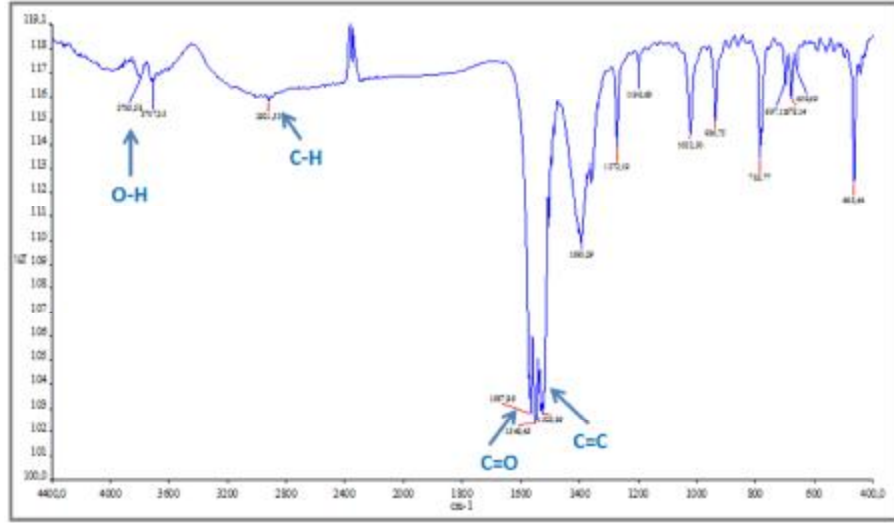
Şekil 148. [ACAC-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.5.11. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

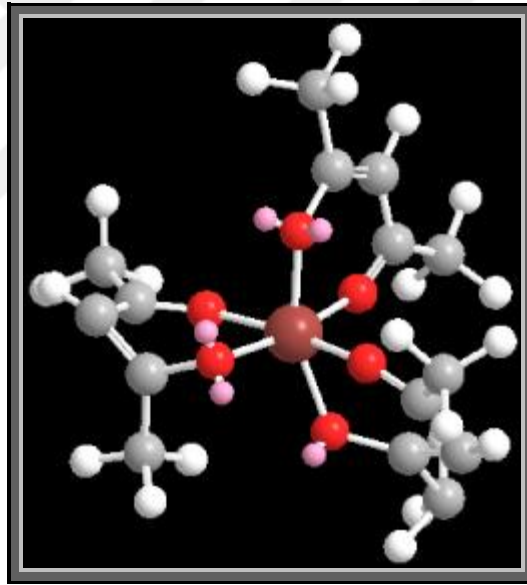
Asetilasetonun FT-IR spektrumları incelendiğinde; 3000-3700 cm⁻¹'de O-H titreşim piki, 2926 cm⁻¹'de alifatik C-H titreşim piki, 1567 cm⁻¹'de C=O titreşim piki, 1549-1525 cm⁻¹'de C=C titreşim piki gözlenmiştir. Kompleksin FT-IR spektrumu incelendiğinde 3000-3700 cm⁻¹ (O-H), 2921 cm⁻¹ (C-H(al)), 1567 cm⁻¹ (C=O), 1549-1525 cm⁻¹ (C=C), gerilimlerine ait pikler görülmektedir ve ligandın spektrumunda dalga sayılarında pikler bulunmamaktadır. Kompleksleşme sırasında OH gerilme piki küçülmüştür. Aynı zamanda kompleksdeki piklerin kaymış olması kompleksleşmenin olduğunu göstermektedir.



Şekil 149. Asetilaseton ligandının FT-IR Spektrumu



Şekil 150. [ACAC-Fe³⁺] kompleksinin FT-IR Spektrumu

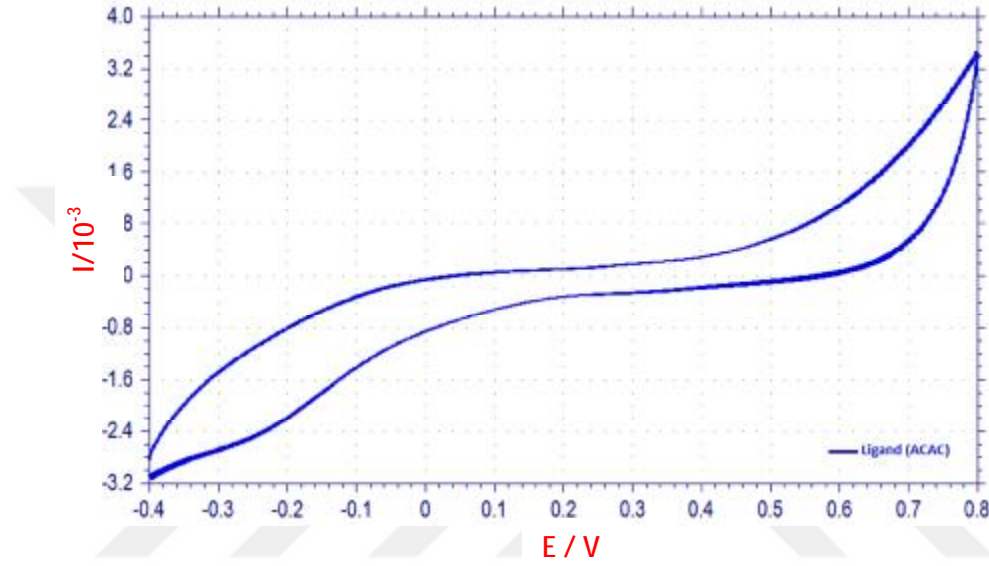


Şekil 151. [ACAC-Fe³⁺] kompleksinin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

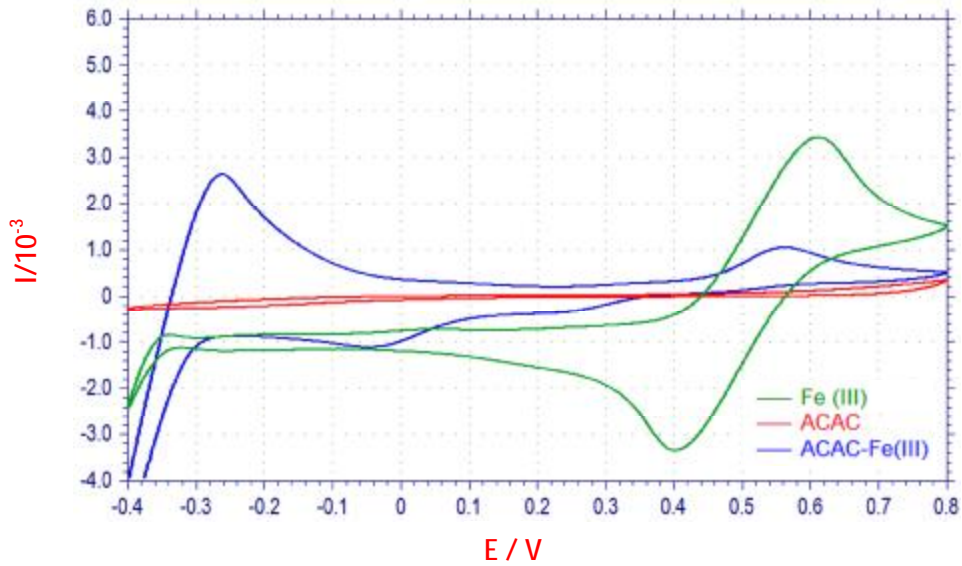
4.5.12. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmıştı. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı 0,56 V ve -0,34 V' ta oksidasyon pik potansiyelleri görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III) 'den farklı olarak 0,18 V civarında redüksiyon piki gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı

yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligant hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 152. ACAC ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu



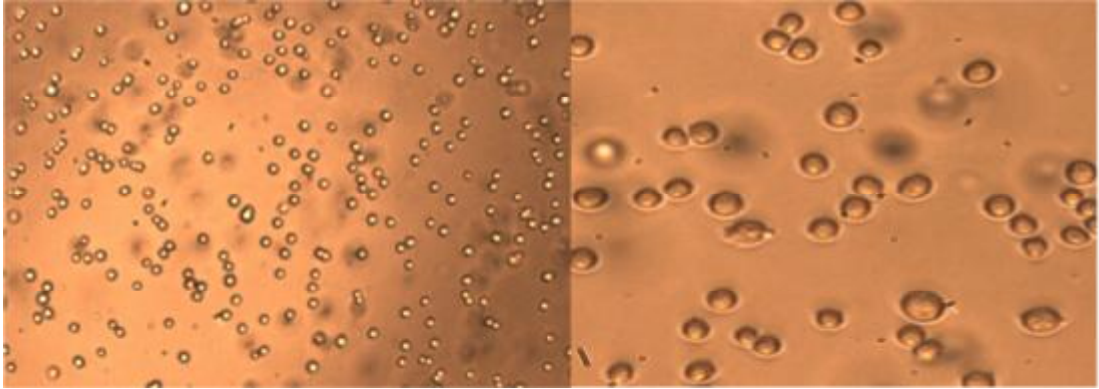
Şekil 153. ACAC ligandı, Fe (III), [ACAC-Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu

4.5.13. Hücre Kültürü ve Sitotoksiste

48 saat sonunda [ACAC-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksiste çalışmasında 1. derişimde kontrole göre anlamlı fark görüldü. Fakat doz düşürüldüğünde etkilenen hücre oranının yani sitotoksitenin azaldığı gözlemlendi. Kontrole göre sitotoksik etkisi en yüksek olan en büyük derişimli (200µM) kompleksin olduğu tespit edildi. (Çizelge 10). Aynı zamanda doz miktarı azaldıkça sitotoksiste paralel bir şekilde azalmaktadır. DMSO ile kompleksin 12,5, 25, 50 ve 100 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir. (p>0.05).

Çizelge 10. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

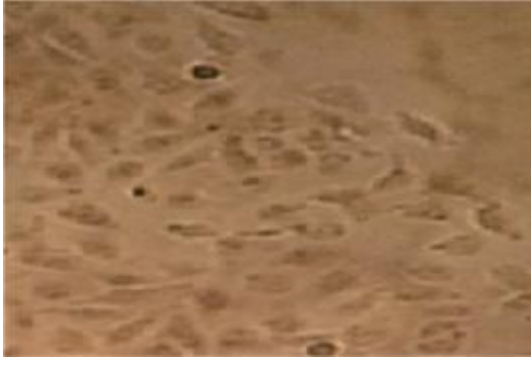
	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doç (200 µM)	2.Doç (100 µM)	3.Doç (50µM)	4.Doç (25 µM)	5.Doç (12.5 µM)
Elisa Sonaçları	1,122	1,047	0,557	0,576	0,682	0,797	0,801
% Sitotoksiste		6,68	50,35	48,66	39,21	28,96	28,60



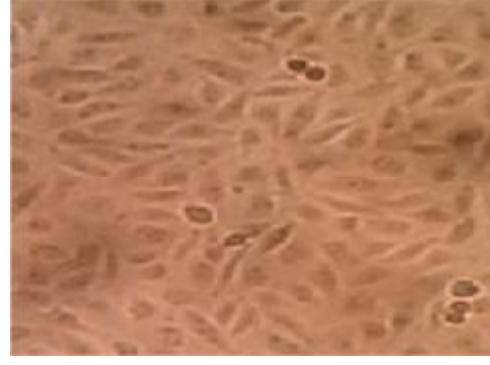
Şekil 154. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10

Şekil 155. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil 149'da de 12'lik plağa her kuyucuga 10⁴ hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan sonra kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

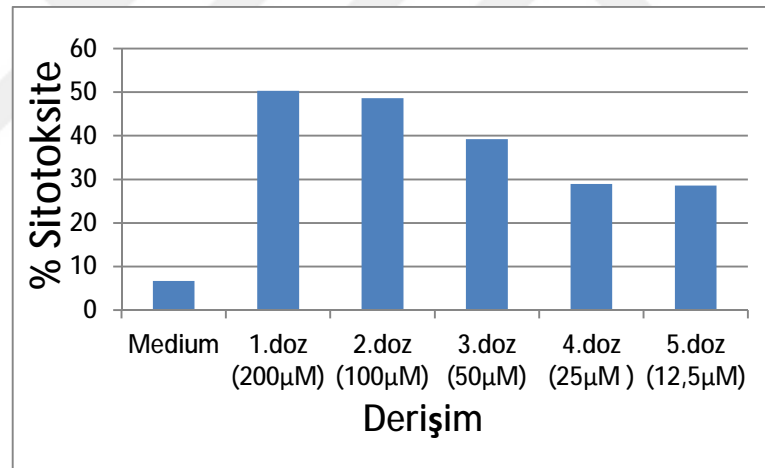


Şekil 156. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskobik görüntü 40X



Şekil 157. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikroskobik görüntü 40X

200 µM kompleks eklendikten 48 saat sonraki hücre proliferasyonunun (Şekil 151) 12,5 µM kompleks eklenen gruba (Şekil 152) göre daha az olduğu ve diğer uygulanan derişimlerde 48 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından çok büyük fark yoktur. En fazla hücre proliferasyonu 5. dozda (12,5 µM) tespit edilmiştir.

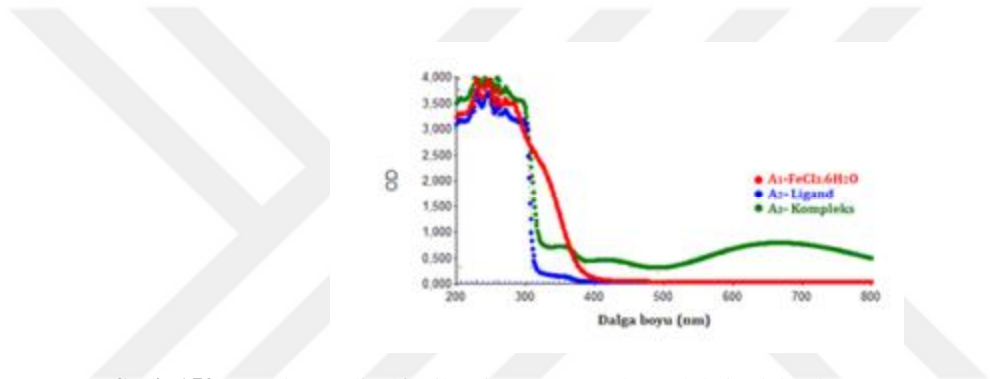


Şekil 158. [ACAC-Fe³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi

Şekil 154'te kompleksin HUVEC hücreleri üzerine doza bağımlı sitotoksik etkisi görülmektedir. 1. dozda sitotoksik etki % 50' nin üzerinde iken 2. 3. 4. ve 5. dozda daha düşük değerler görülmektedir. Sitotoksisite değişen derişimlerde paralel bir etki göstermektedir.

4.6. 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu)

Fe(III) ile 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A_1): 228, 245, 259, 264, 362 nm; 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit ligandı için (A_2): 228, 242, 259, 266, 298, 320 nm iken kompleks için (A_3): 230, 259, 269, 296, 396, 440, 462 nm'de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 159'da gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 160).



Şekil 159. 4,5Db-1,3-disülfonik asit, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği

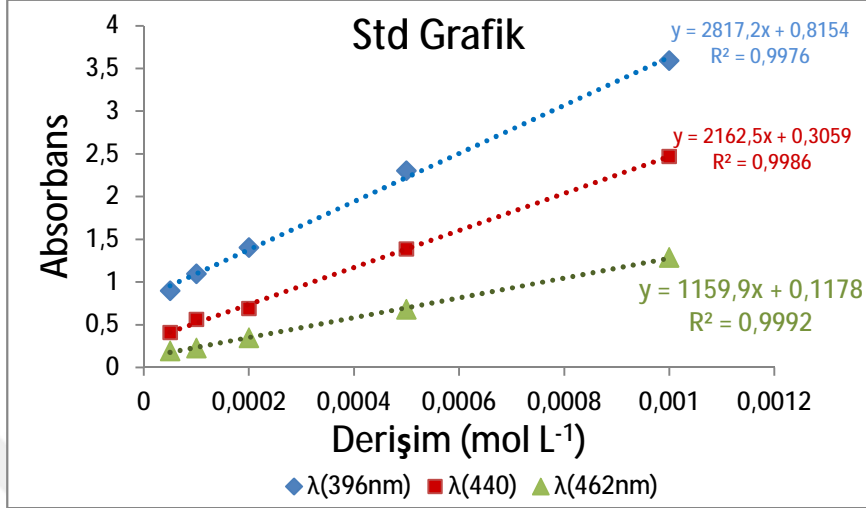


Şekil 160. 4,5Db-1,3-disülfonik asit, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

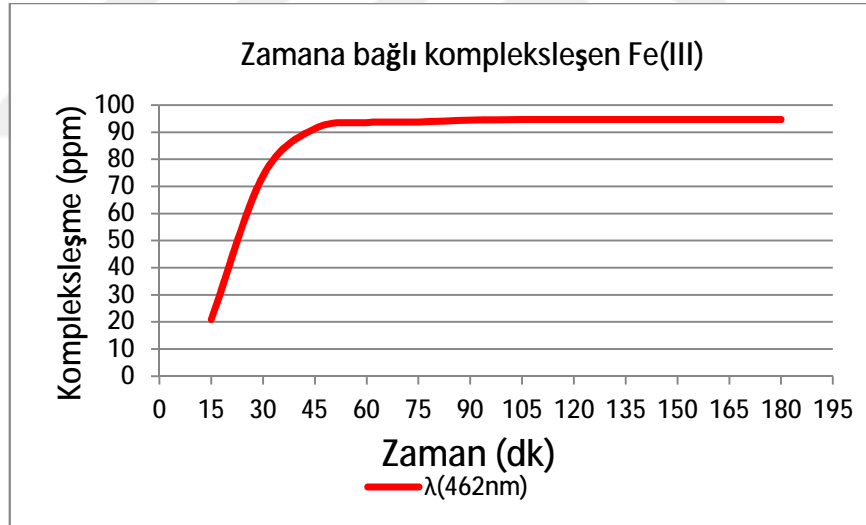
4.6.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 396, 440, 462 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 161). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki derişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 162). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın 4,5Db-1,3-disülfonik asit ile kompleksleşme süresi 105 dk sürdüğü ve zamana bağlı

kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 94,21 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



Şekil 161. [4,5Db-1,3-disülfonik-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği

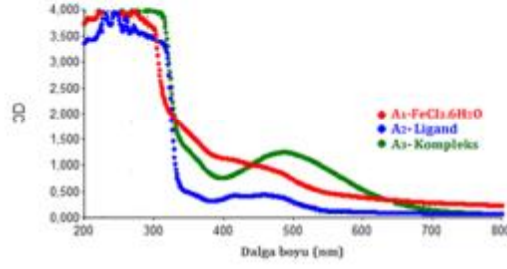


Şekil 162. [4,5Db-1,3-disülfonik-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği

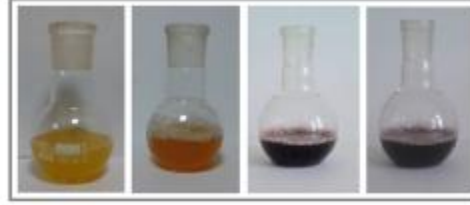
4.6.2. 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 236, 260, 270, 343, 452, 462 nm; ligand için (A₂): 234, 255, 270, 302, 435 nm

iken kompleks için (A_3): 218, 312, 372, 414, 480 nm’ de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 163’ de gösterilmiştir.



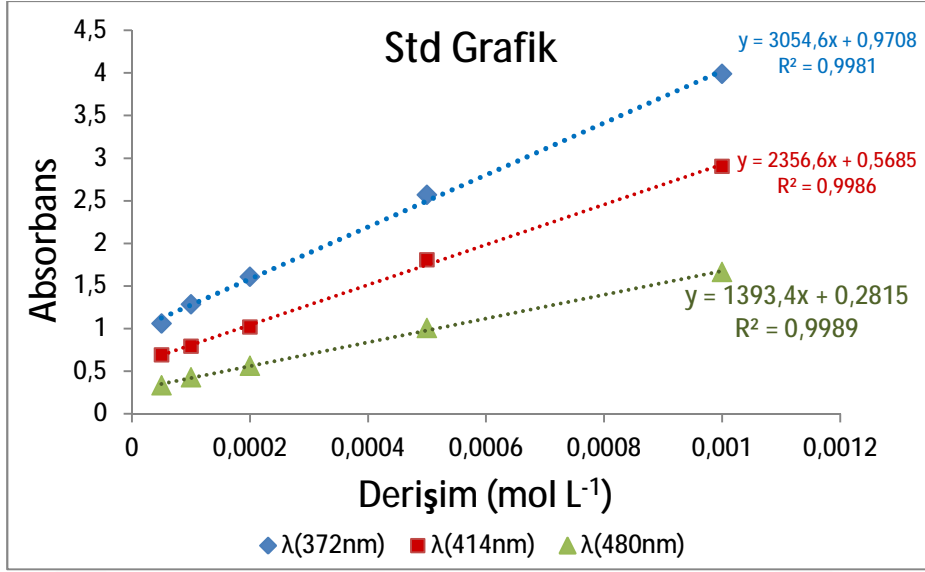
Şekil 163. 4,5Db-1,3-disülfonik, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



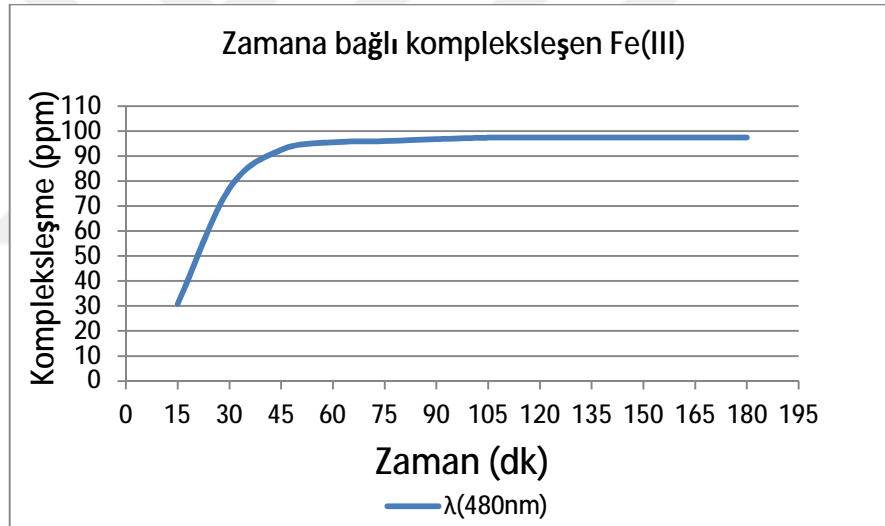
Şekil 164. 4,5Db-1,3-disülfonik, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.6.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 372, 414, 480 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 165). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 166). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)’nın 4,5Db-1,3-disülfonik asit ile kompleksleşme süresi 110 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 97,44 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlendi.



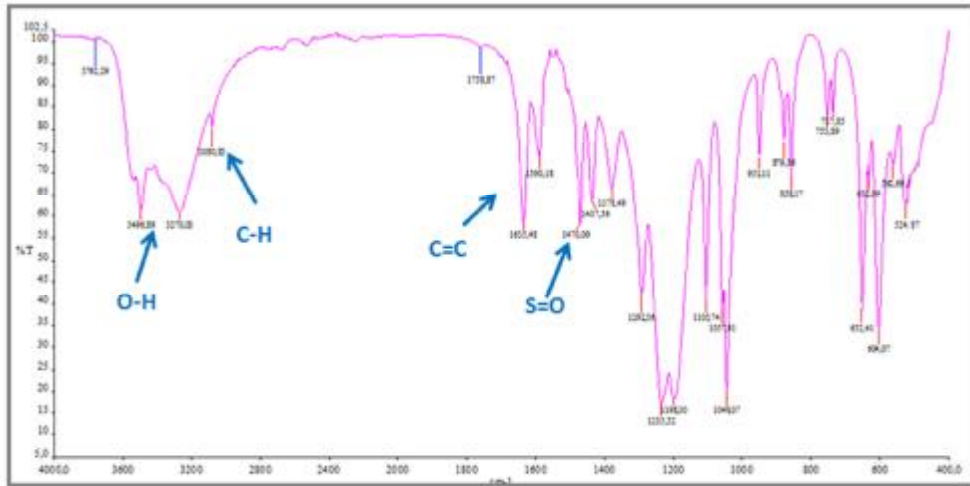
Şekil 165. [4,5Db-1,3-disülfonik asit -Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



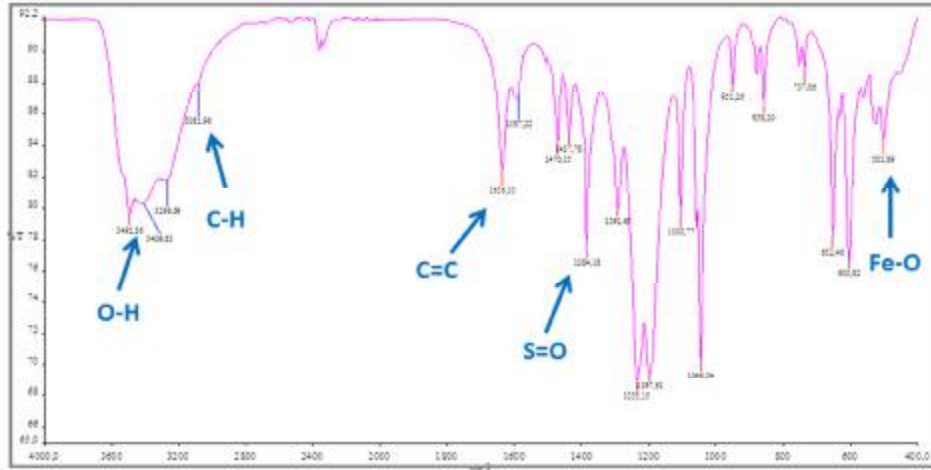
Şekil 166. [4,5Db-1,3-disülfonik asit -Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.6.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

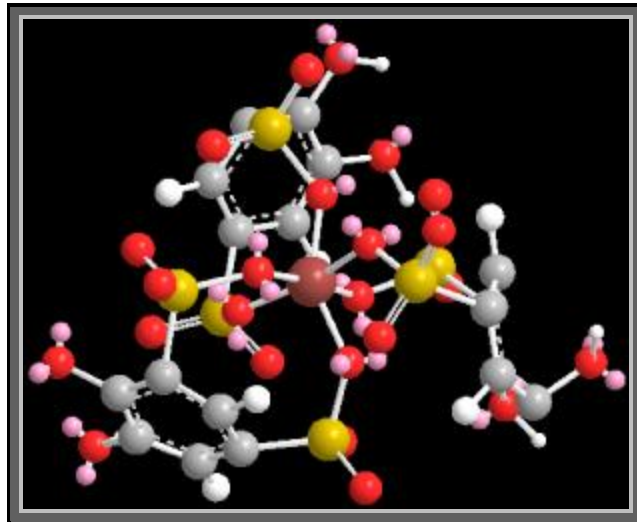
Kompleksin FT-IR spektrumu incelendiğinde 3000-3400 cm⁻¹ (O-H), 3081 cm⁻¹ (C-H(ar)), 1636 cm⁻¹ (C=C), 1334 cm⁻¹ (S=O), 501 cm⁻¹ (Fe-O) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Ligandın spektrumunda 501 cm⁻¹ (Fe-O) dalga sayılarında pikler bulunmamaktadır. Kompleks pikinde kaymalar da kompleksleşmenin olduğunu göstermektedir.



Şekil 167. 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit ligandının FT-IR Spektrumu



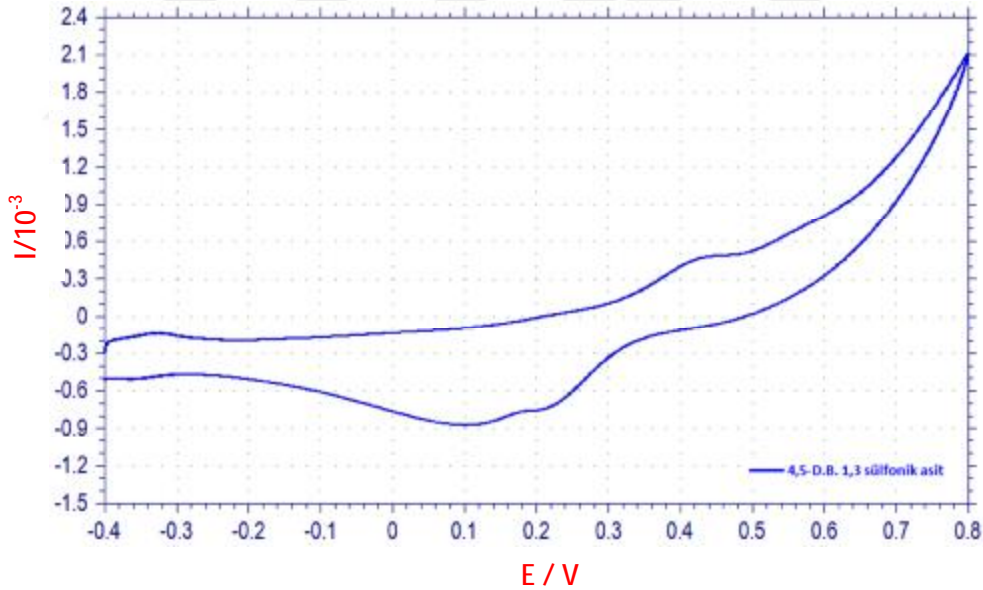
Şekil 168. [4,5Db-1,3-disülfonik asit -Fe³⁺] kompleksinin FT-IR Spektrumu



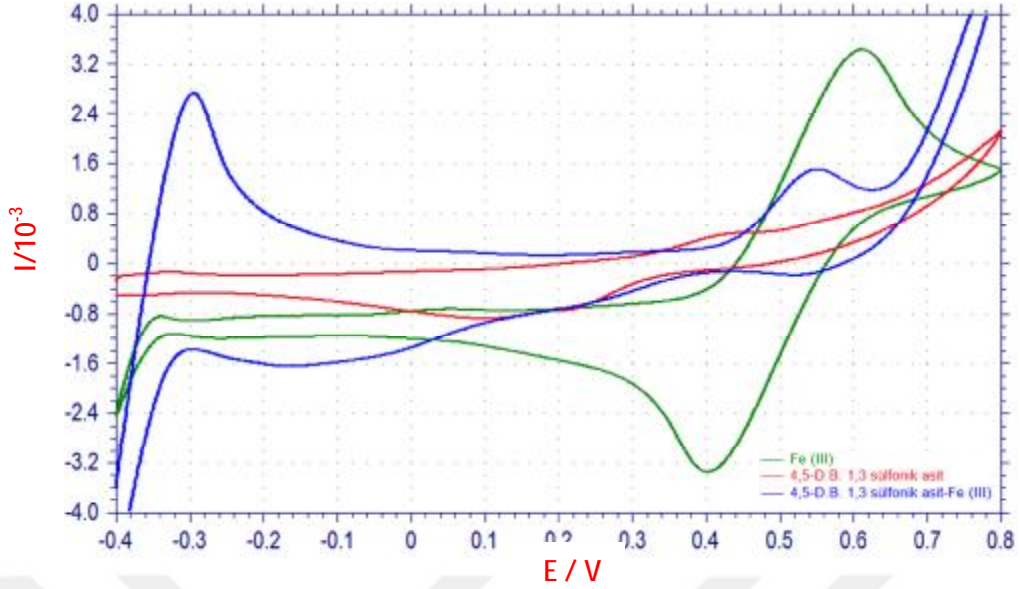
Şekil 169. [4,5Db-1,3-disülfonik asit -Fe³⁺] kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

4.6.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmışdı. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı 0,54 V ve -0,29 V' ta oksidasyon pik potansiyelleri görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III) 'den farklı olarak 0,50 V civarında redüksiyon piki gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligant hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 170. 4,5Db-1,3-disülfonik asit ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu



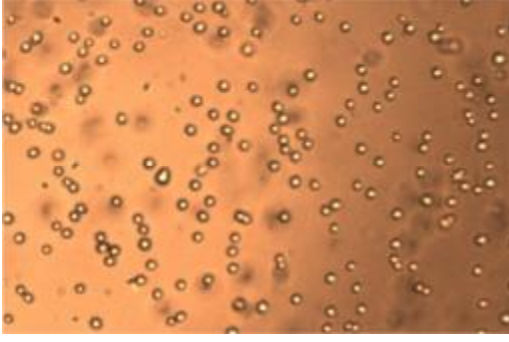
Şekil 171. 4,5Db-1,3-disülfonik asit ligandı, Fe (III), [4,5Db-1,3-disülfonik asit-Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu

4.6.6. Hücre Kültürü ve Sitotoksosite

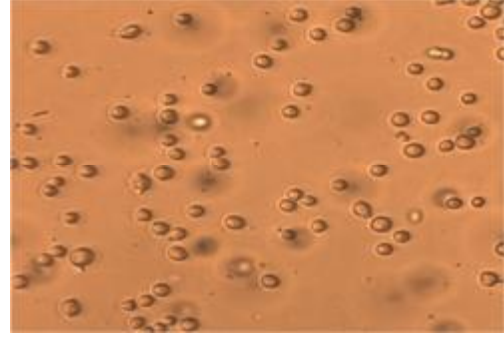
[4,5Db-1,3-disülfonik-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksosite çalışmasında 1. derişimde (200 µM) kontrole göre anlamlı fark görüldü. Fakat doz düşürüldüğünde etkilenen hücre oranının yani sitotoksitenin azaldığı gözlendi. Diğer derişimlerde sitotoksosite oranı düşük olarak saptandı (Çizelge.11). DMSO ile kompleksin 12,5, 25, 50 ve 100 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir. (p>0.05).

Çizelge 11. Kompleksinin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doz (200 µM)	2.Doz (100 µM)	3.Doz (50µM)	4.Doz (25 µM)	5.Doz (12.5 µM)
Elisa Sonuçları	1,202	1,036	0,564	0,886	0,891	0,918	0,920
% Sitotoksite		13,81	53,07	26,28	25,87	23,62	23,46



Şekil 172. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskobik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10

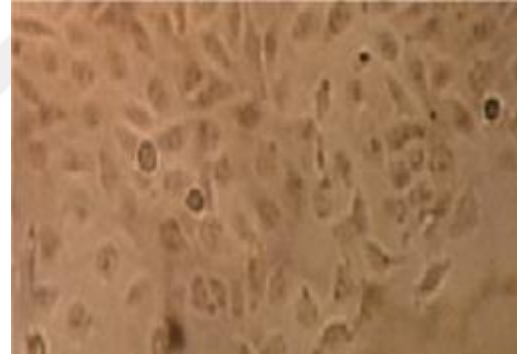


Şekil 173. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskobik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil 168'de de 12'lik plağa her kuyucuga 10^4 hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan sonra kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

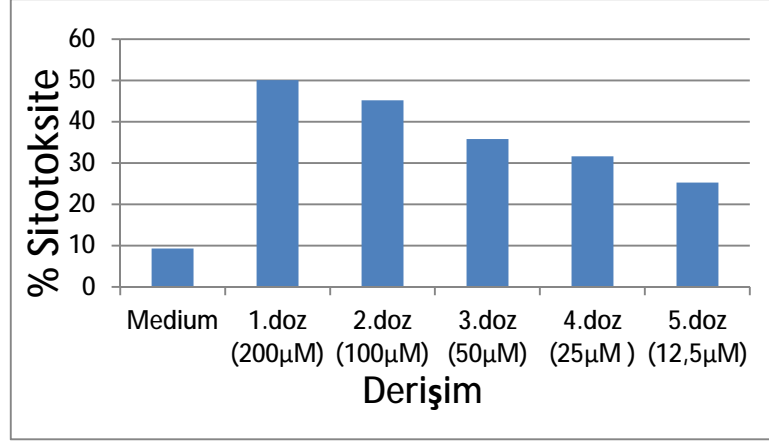


Şekil 174. 1.Derişim ($200 \mu\text{M}$) sonrası mikroskobik görüntü 40X



Şekil 175. 5. Derişim ($12,5 \mu\text{M}$) sonrası mikroskobik görüntü 40X

$200 \mu\text{M}$ kompleks eklendikten 48 saat sonraki hücre proliferasyonunun (Şekil 170) $12,5 \mu\text{M}$ kompleks eklenen gruba (Şekil 170) göre daha az olduğu ve diğer uygulanan derişimlerde 48 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından çok büyük fark yoktur. En fazla hücre proliferasyonu 5. dozda ($12,5 \mu\text{M}$) tespit edilmiştir.

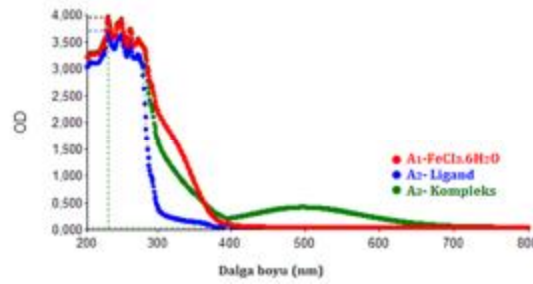


Şekil 176. [4,5db-1,3-disulfonik-Fe³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi

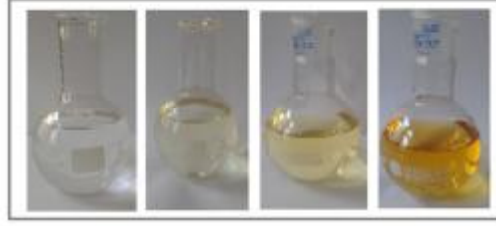
Şekil 171'te kompleksin HUVEC hücreleri üzerine doza bağımlı sitotoksik etkisi görülmektedir. 1. dozda sitotoksik etki % 50' nin üzerinde iken 2. 3. 4. ve 5. dozda daha düşük değerler görülmektedir. Sitotoksitate değişen derişimlerde paralel bir etki göstermektedir.

4.7. Oksalat, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu)

Fe(III) ile oksalat ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 228, 243, 259, 268 nm; oksalat ligandı için (A₂): 228, 242, 259, 267, 298, 570 nm iken kompleks için (A₃): 229, 238, 259, 264,483, 580 nm' de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil.177'de gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 178).



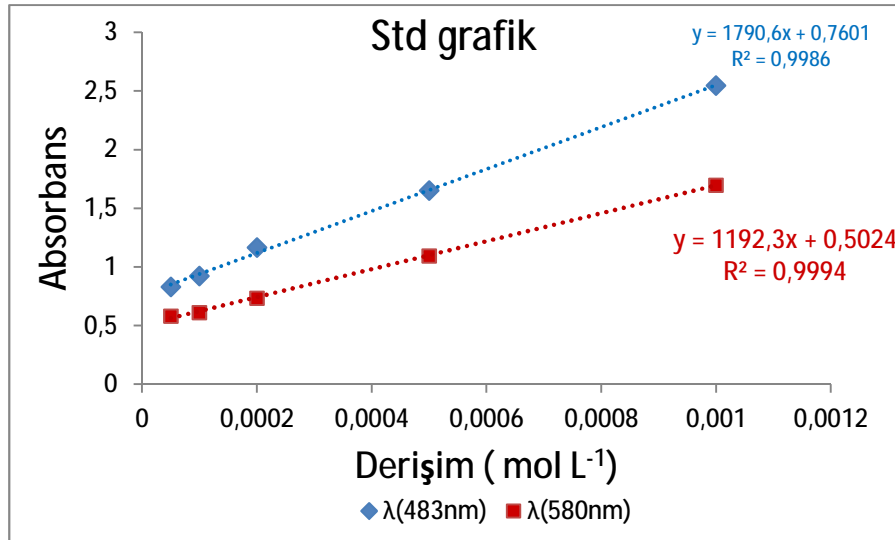
Şekil 177. Oksalat, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



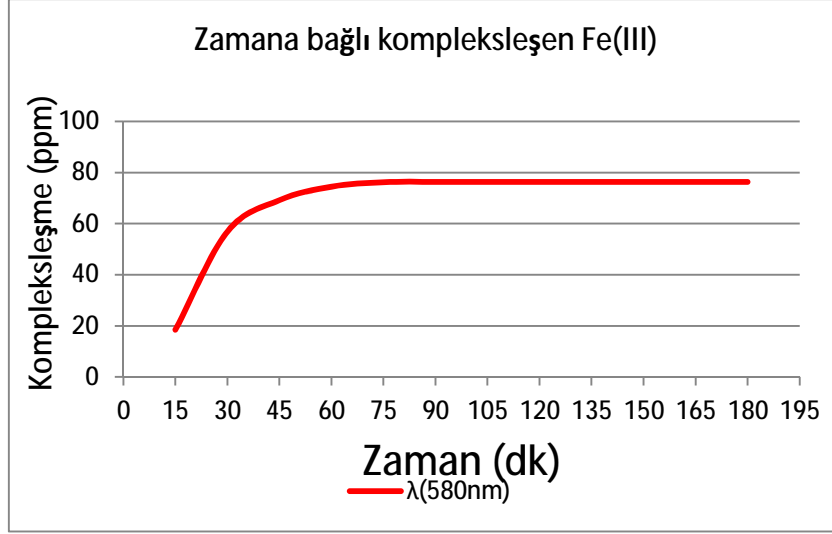
Şekil 178. Oksalat, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.7.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganattan farklı olarak verdiği 483, 580 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 179). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 180). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nin Oksalat ile kompleksleşme süresi 60 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 76,36 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



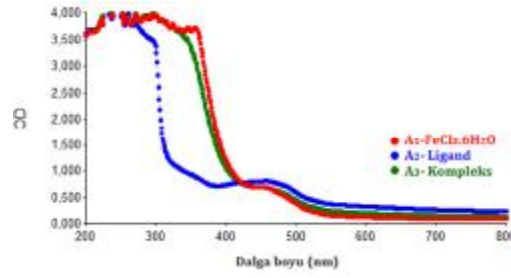
Şekil 179. [Oksalat -Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



Şekil 180. [Oksalat-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.7.2. Oksalat, Fe(III), Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile oksalat ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 230, 260, 270, 343, 452, 483 nm; ligand için (A₂): 256, 268, 272, 340, 450, 590 nm iken kompleks için (A₃): 254, 272, 298, 384, 590 nm' de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil.181'de gösterilmiştir.



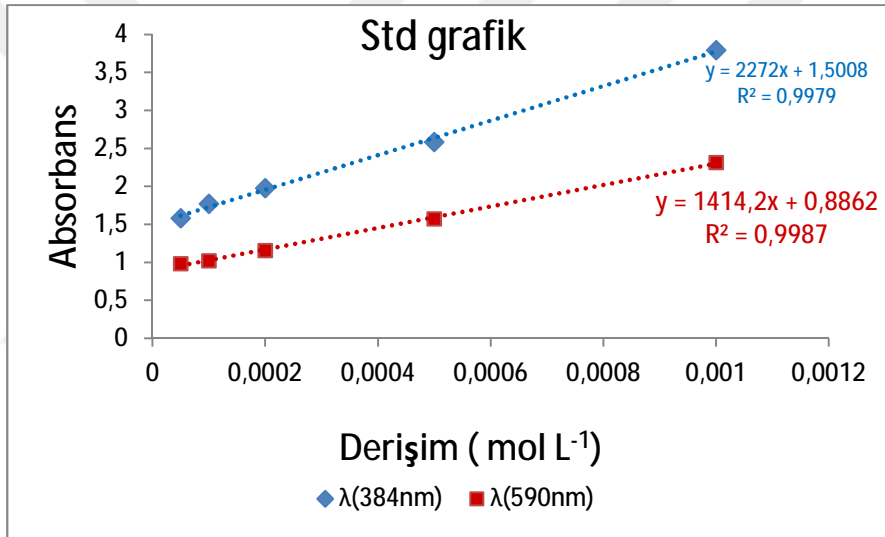
Şekil 181. Oksalat, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



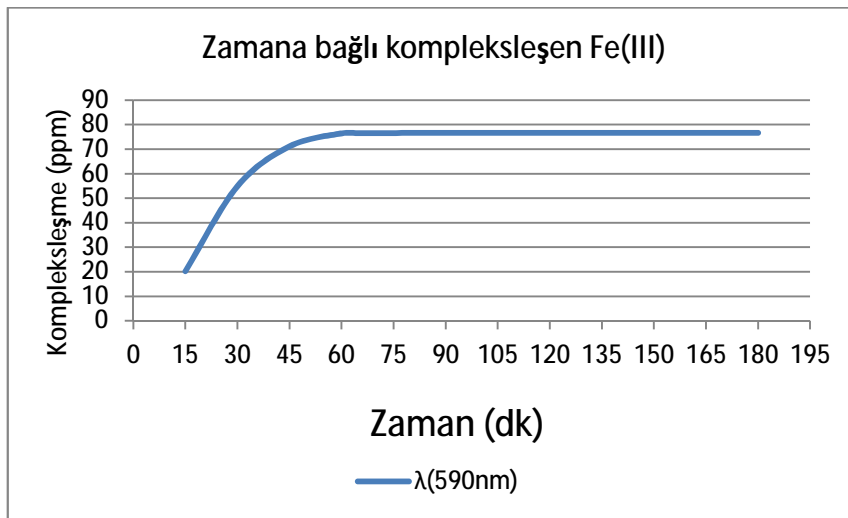
Şekil 182. Oksalat, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünümü

4.7.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 384, 590 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 183). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 184). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın Oksalat ile kompleksleşme süresi 65 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 76,64 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



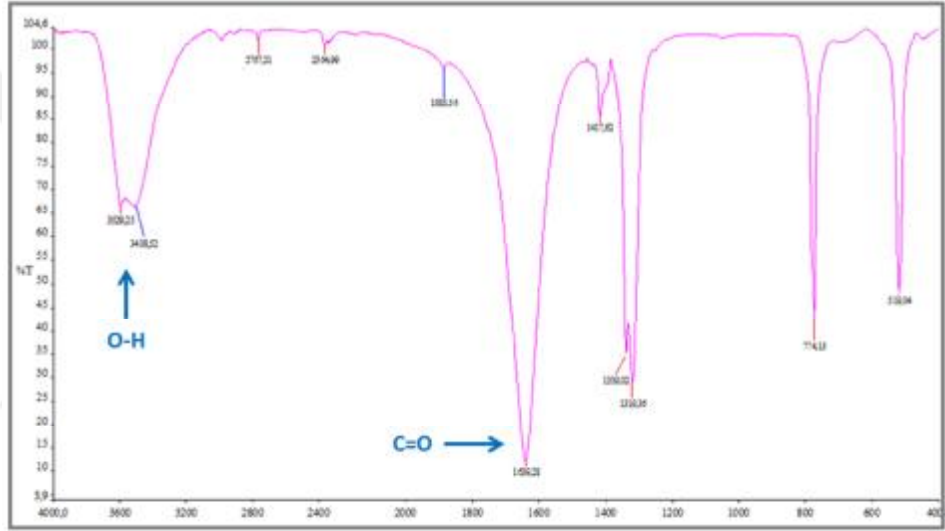
Şekil 183. [Oksalat -Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



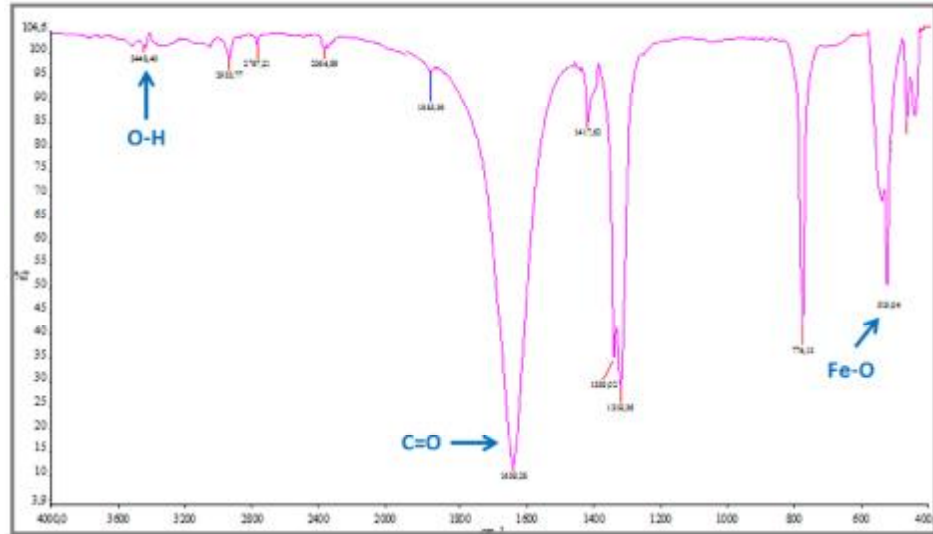
Şekil 184. [Oksalat -Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.7.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

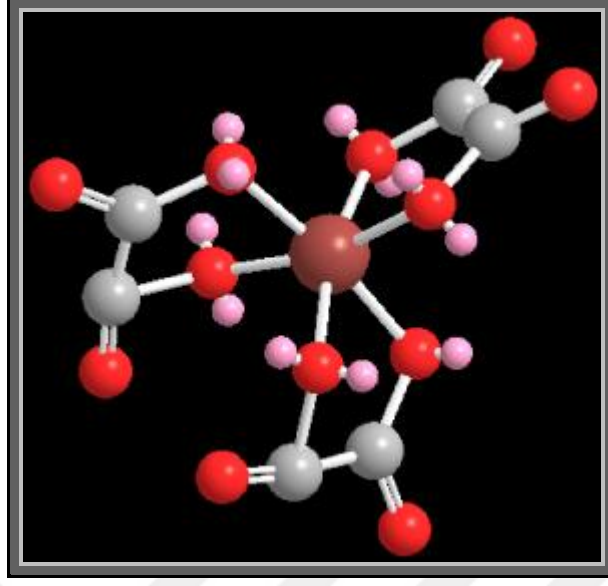
Kompleksin IR spektrumu incelendiğinde 3438 (O-H), 1672 (C=O), 519 (Fe-O) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Ligandın spektrumunda 519 (Fe-O) dalga sayılarında pikler bulunmamaktadır. Kompleksleşme sırasında iki oksim ligandı hidrojen köprüsü oluşturarak birer tane H⁺ iyonu verirler. FT-IR spektrumunda bu O-H bağının küçülmesi ve kompleksdeki piklerin kaymış olması kompleksleşmenin olduğunu göstermektedir.



Şekil 185. Oksalat ligandının FT-IR Spektrumu



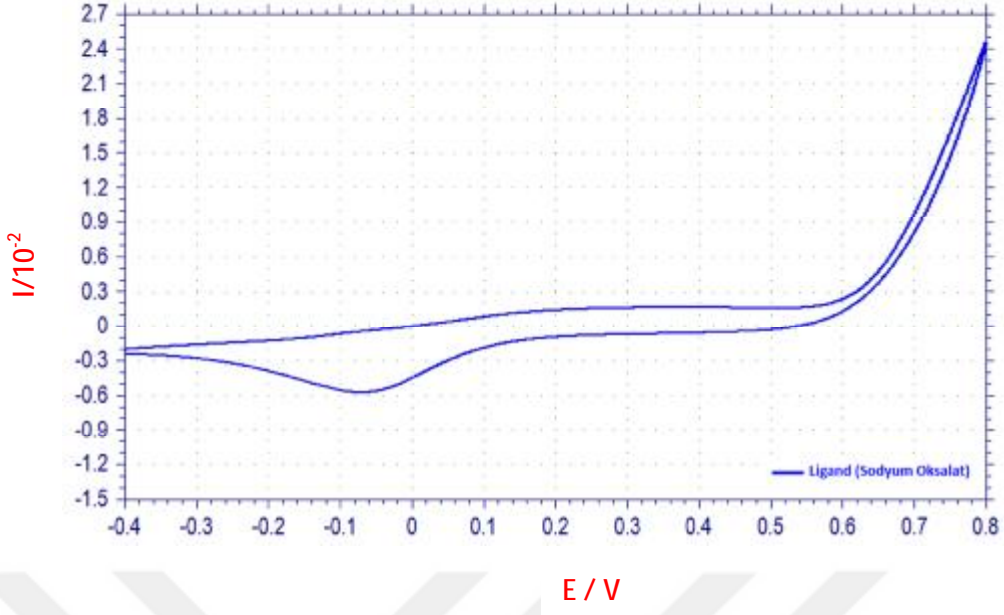
Şekil 186. [Oksalat -Fe³⁺] kompleksinin FT-IR Spektrumu



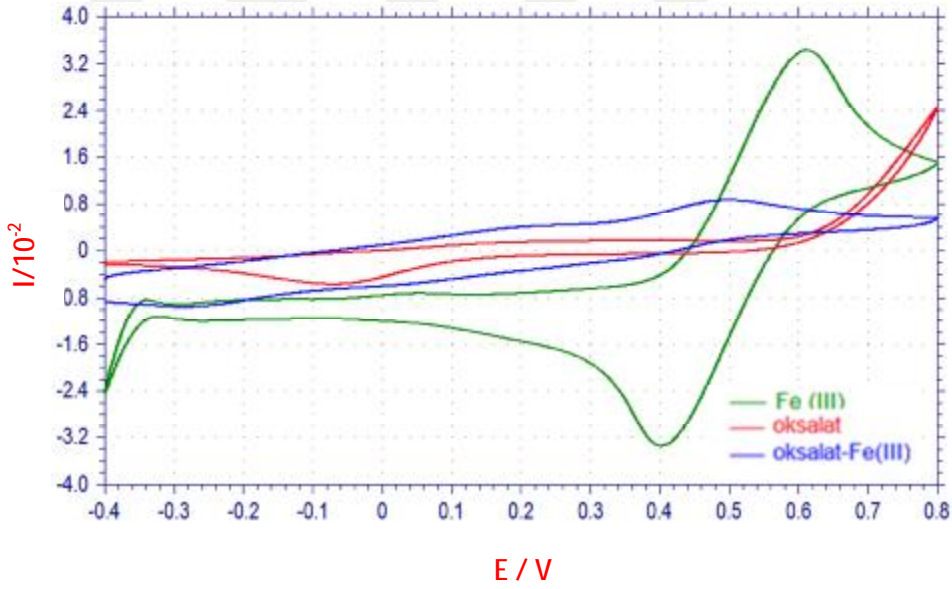
Şekil 187. [Oksalat -Fe³⁺] kompleksinin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

4.7.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmıştı. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı 0,49 V' ta oksidasyon pik potansiyeli görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III) 'den farklı olarak -0,29 V V civarında redüksiyon piki gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligant hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 188. Oksalat ligandının dönüşümlü voltomogram sonucu



Şekil 189. Oksalat ligandı, Fe (III), [4,5Db-1,3-disülfonik asit-Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu

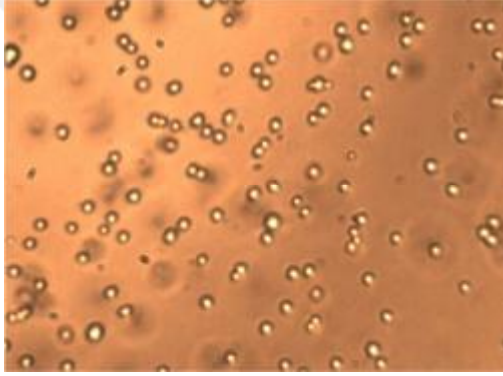
4.7.6. Hücre kültürü ve Sitotoksisite

[Oksalat-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksisite çalışmasında 48 saat sonunda farklı derişimlerde kontrole göre anlamlı farklılıklar gözlenmedi. Kontrole göre sitotoksik etkisi en yüksek olan derişim en düşük derişimli (50µM) metal kompleksi olduğu ortaya çıktı. (Çizelge.12). Aynı zamanda doz miktarı azaldıkça sitotoksite artmaktadır. DMSO ile kompleksin 12,5, 25, 50, 100 ve 200 µM lık derişim aralığında

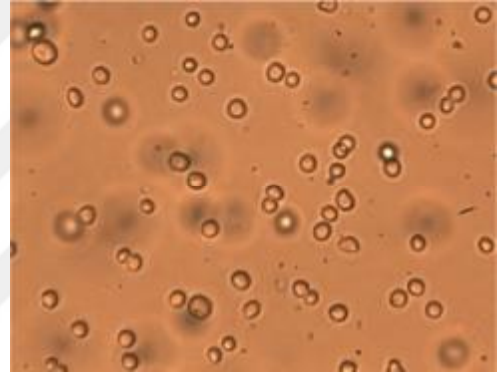
HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği hatta iyileştirici etkisi olduğu kontrolle aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Çizelge 12. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doç (200 µM)	2.Doç (100 µM)	3.Doç (50µM)	4.Doç (25 µM)	5.Doç (12.5 µM)
Elisa Sonuçları	1,108	1,032	0,896	0,867	0,848	0,842	0,784
% Sitotoksite		6,85	19,13	21,75	23,46	24	24,29



Şekil 190. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10



Şekil 191. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil 185'de de 12'lik plağa her kuyucuga 10^4 hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan sonra kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

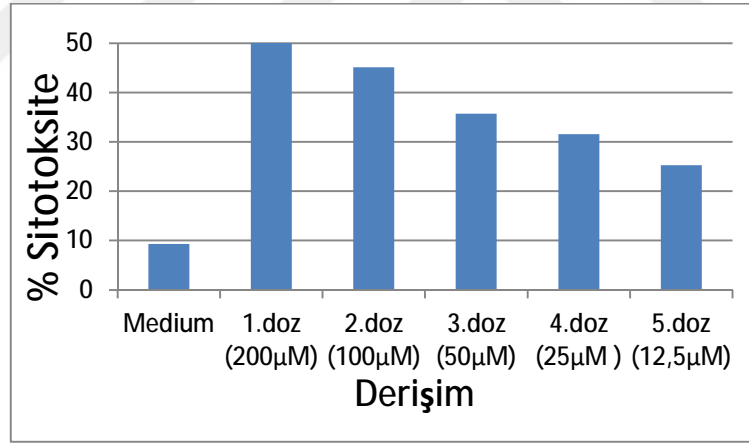


Şekil 192. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskobik görüntü 40X



Şekil 193. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikroskobik görüntü 40X

200 µM kompleks eklendikten 48 saat sonraki hücre proliferasyonunun (Şekil 186) 12,5 µM kompleks eklenen gruba (Şekil 187) göre daha fazla olduğu ve diğer uygulanan derişimlerde 48 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından çok büyük fark yoktur. En fazla hücre proliferasyonu 1. dozda (200 µM) tespit edilmiştir.

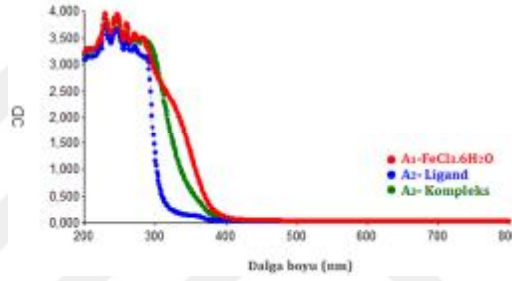


Şekil 194. [Oksalat-Fe³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi

Şekil 188'de kompleksin HUVEC hücreleri üzerine doza bağımlı sitotoksik etkisi görülmektedir. Tüm uygulanan dozlarda sitotoksik etki % 50' nin altındadır. Sitotoksiste değişen derişimlerde paralel bir etki göstermemektedir

4.8. Piridin-2,6-dikarboksilik asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu)

Fe(III) ile Piridin-2,6-dikarboksilik ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin ayrı ayrı Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A_1): 228, 245,259,270,362 nm; Piridin-2,6-dikarboksilik asit ligandı için (A_2): 226, 243, 270,348 nm iken kompleks için (A_3): 228, 242, 272, 323 nm' de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 195'de gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 196).



Şekil 195. 2,6piridindikarboksilikasit, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği

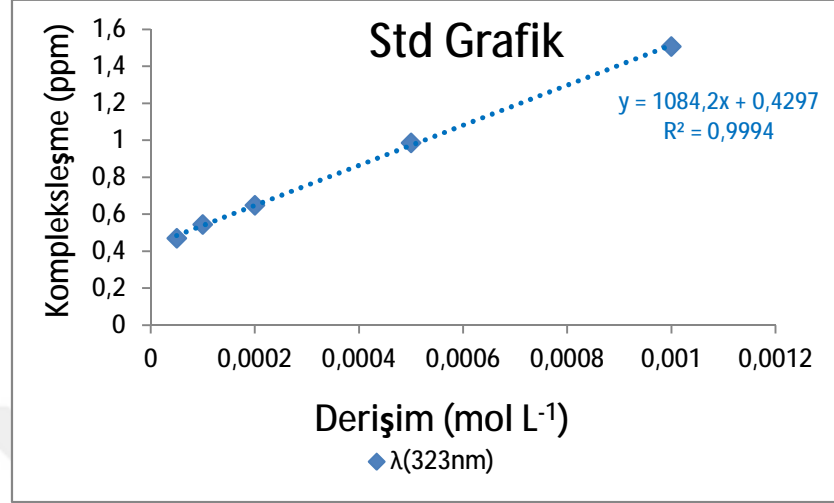


Şekil 196. 2,6piridindikarboksilikasit, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

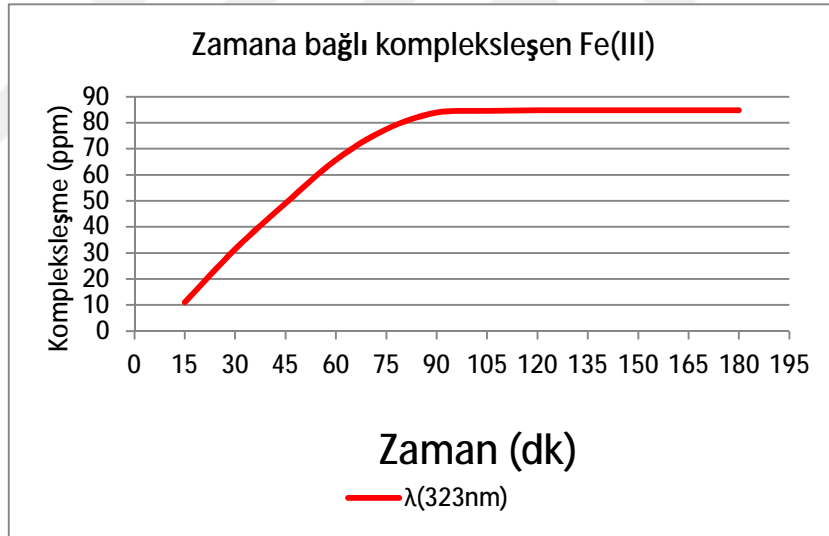
4.8.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 323 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 197). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki derişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 197). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nin Piridin-2,6-dikarboksilik ile kompleksleşme süresi 120 dk sürdüğü ve zamana bağlı

kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 76,64 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



Şekil 197. [2,6piridindikarboksilikasit-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği

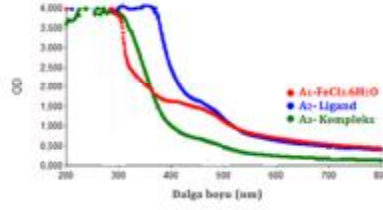


Şekil 198. [2,6piridindikarboksilikasit-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.8.2. Piridin-2,6-dikarboksilik asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile Piridin-2,6-dikarboksilikasit ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için, (A₁): 230, 260, 272, 452, 483

nm; Ligand için (A₂): 244, 265, 274, 292, 445 nm; Kompleks için (A₃): 225, 240, 272, 290, 365, 446 nm' de pikler vermiştir.



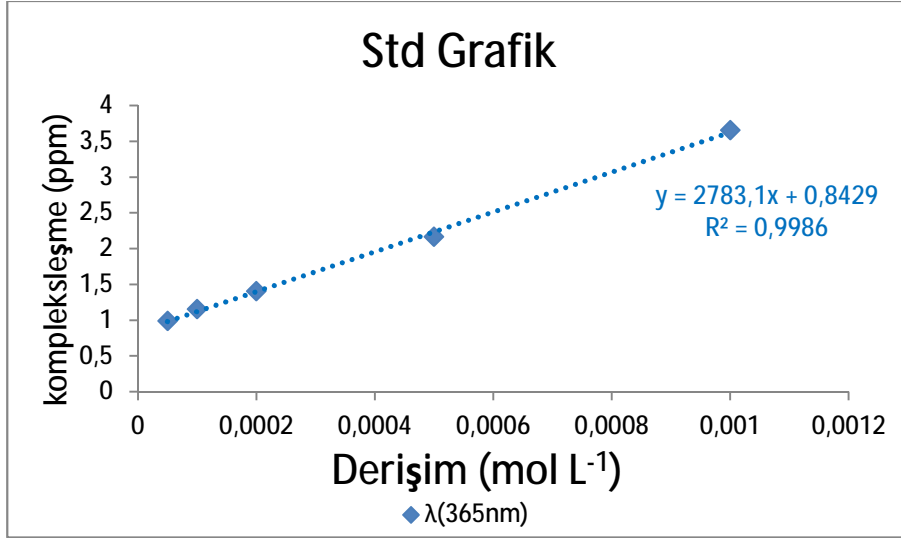
Şekil 199. 2,6piridindikarboksilikasit, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



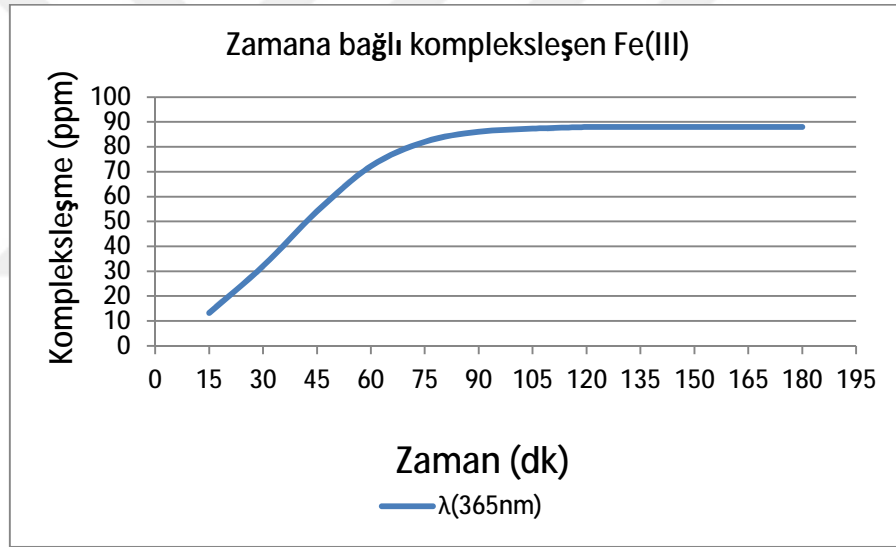
Şekil 200. 2,6piridindikarboksilikasit, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.8.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 365 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 201). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 202). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın Piridin-2,6-dikarboksilik ile kompleksleşme süresi 125 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 80,96 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



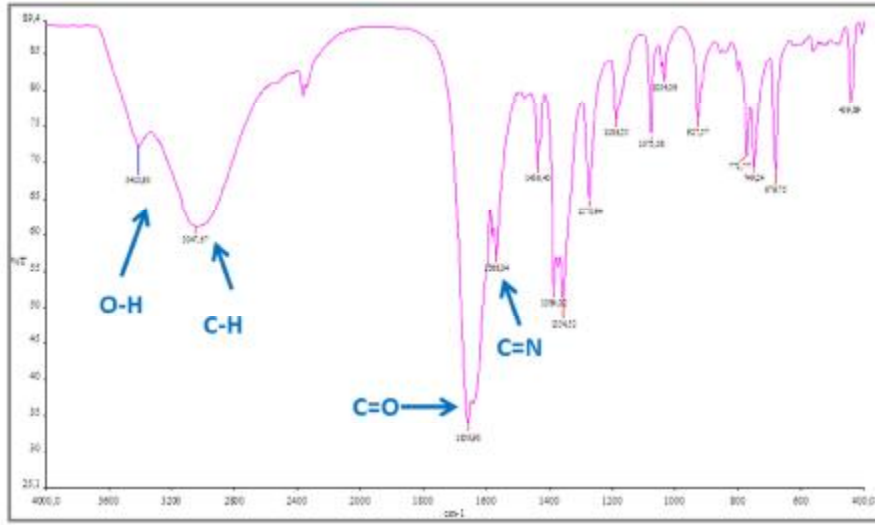
Şekil 201. [2,6piridindikarboksilikasit-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



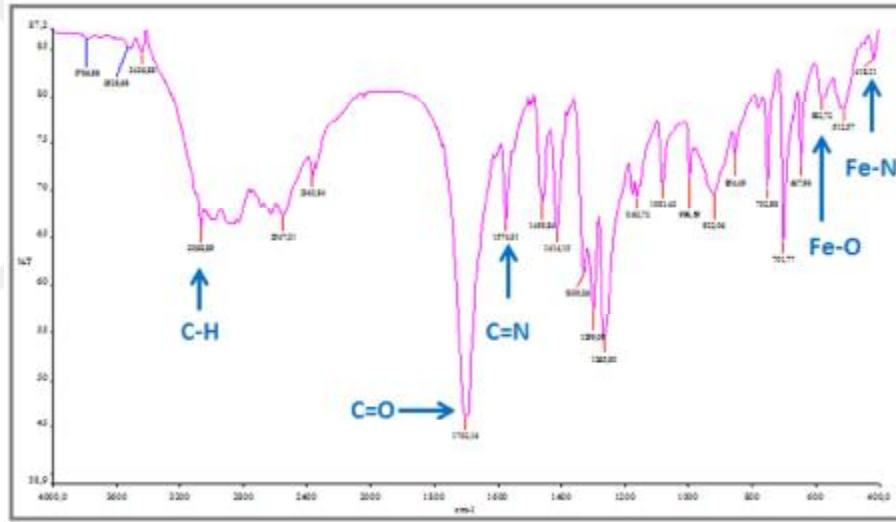
Şekil 202. [2,6piridindikarboksilikasit-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği

4.8.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

Kompleksin IR spektrumu incelendiğinde 3000-3400 cm⁻¹ (O-H), 3050-3100 cm⁻¹ (C-H), 1702 cm⁻¹ (C=O), 1574 cm⁻¹ (C-N), 526 cm⁻¹ (Fe-O), 439 cm⁻¹ (Fe-N) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Ligandın spektrumunda 526 cm⁻¹ (Fe-O), 439 cm⁻¹ (Fe-N) dalga sayılarında pikler bulunmamaktadır. Kompleksleşme sırasında OH gerilme piki kaybolmuştur. Aynı zamanda kompleksdeki piklerin kaymış olması kompleksleşmenin olduğunu göstermektedir.



Şekil 203. Piridin-2,6-dikarboksilikasit ligandının FT-IR Spektrumu

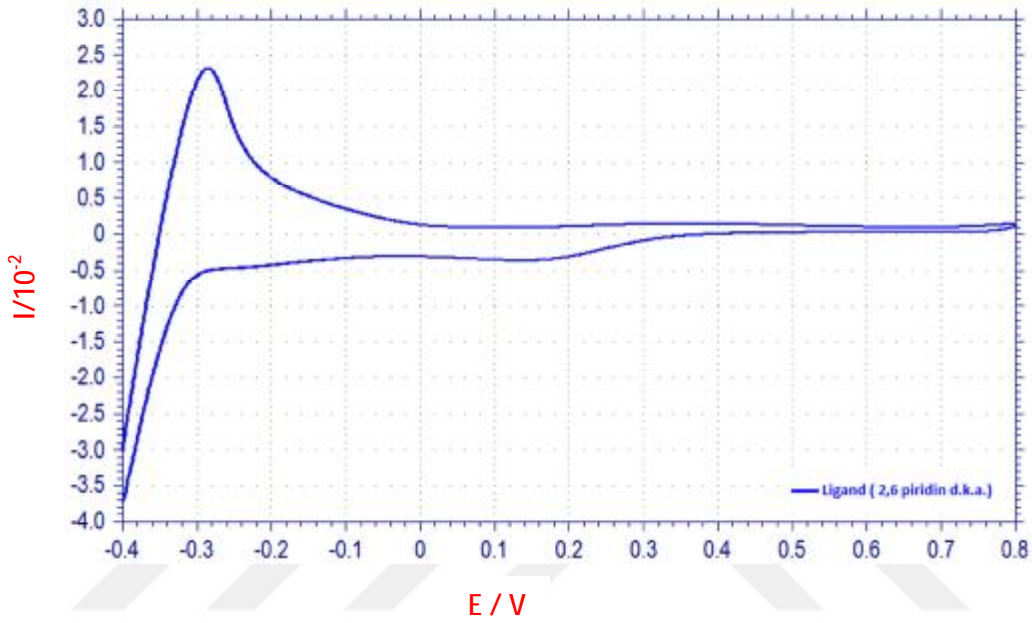


Şekil 204. [2,6piridindikarboksilikasit-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği

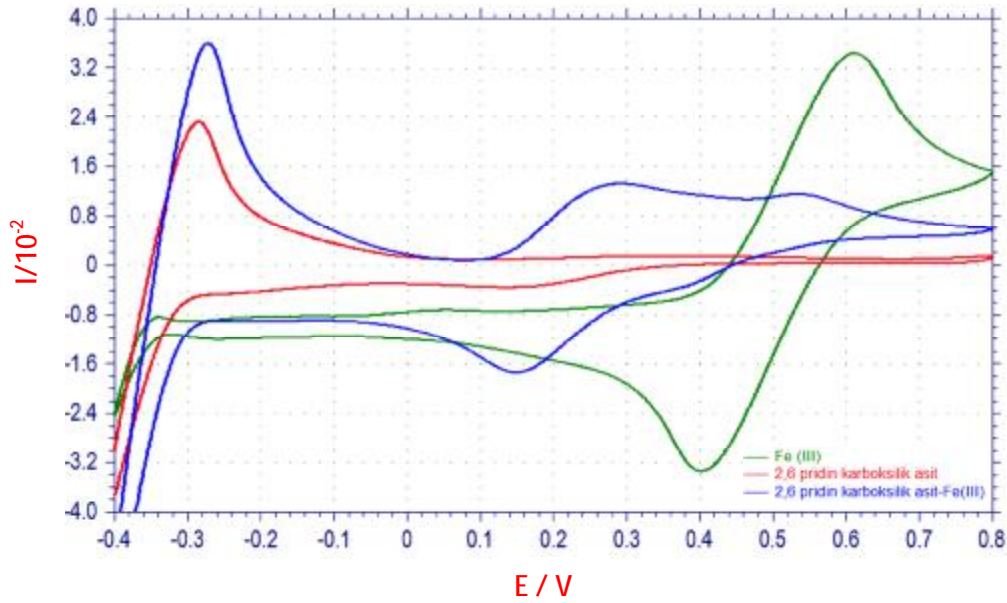
4.8.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmıştı. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı 0,26 V, 0,53 V ve -0,27 V' ta oksidasyon pik potansiyelleri görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı olarak 0,15 V civarında redüksiyon piki gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi

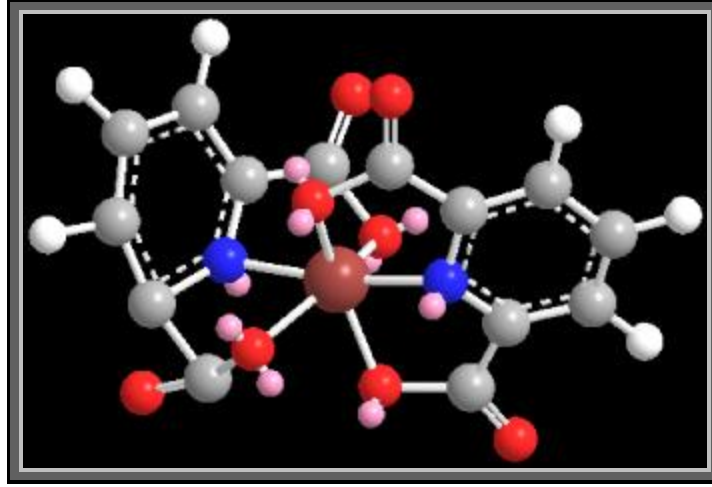
diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligant hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 205 2,6piridindikarboksilikasit ligandının dönüşümlü voltomogram sonucu



Şekil 206. 2,6piridindikarboksilikasit ligandı, Fe (III), [2,6piridindikarboksilikasit-Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu



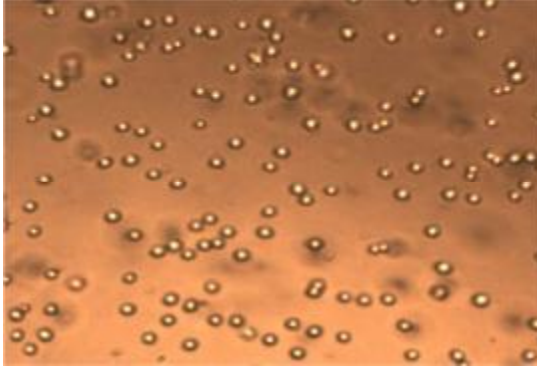
Şekil 207. [2,6piridindikarboksilikasit-Fe³⁺] kompleksinin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

4.8.6. Hücre kültürü ve Sitotoksiste

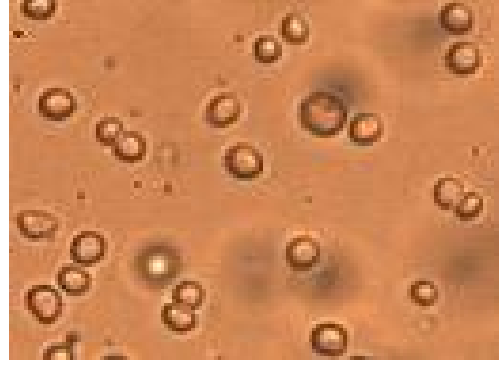
[2,6piridindikarboksilikasit-Fe³⁺] kompleksinde hücre proliferasyonuna da anlamlı farklar gözlenmedi. En yoğun derişimde sitotoksiste %12,26 olarak hesaplandı (Çizelge.13). Doz düşürüldükçe bu oran azaldı. Sonuç itibarıyla [2,6piridindikarboksilikasit-Fe³⁺]'ün HUVEC hücre dizisine bu metal bileşiminin bütün derişimlerde herhangi bir sitotoksik etki göstermediği tespit edildi. DMSO ile kompleksin 12,5, 25, 50, 100 ve 200 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği hatta iyileştirici etkisi olduğu kontrolle aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. (p<0.05).

Çizelge 13. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doç (200 µM)	2.Doç (100 µM)	3.Doç (50µM)	4.Doç (25 µM)	5.Doç (12.5 µM)
Elisa Sonuçları	1,862	0,843	0,768	0,781	0,834	0,860	0,882
% Sitotoksiste		2,20	10,90	9,36	3,24	8,26	0

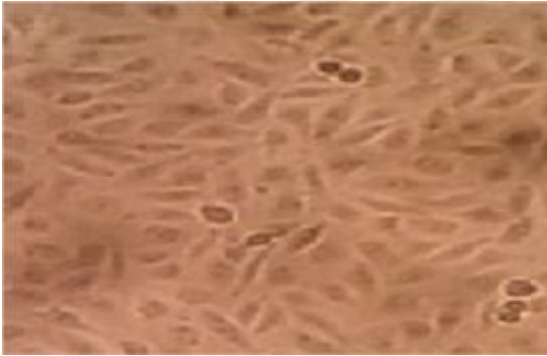


Şekil 208. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskobik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10

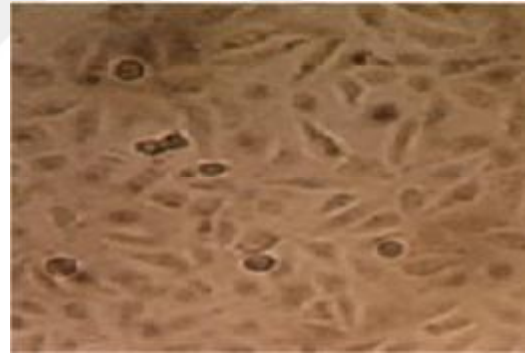


Şekil 209. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskobik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil 208'de de 12'lik plağa her kuyucuga 10^4 hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan sonra kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.



Şekil 210. 1.Derişim (200 μ M) sonrası mikroskobik görüntü 40X



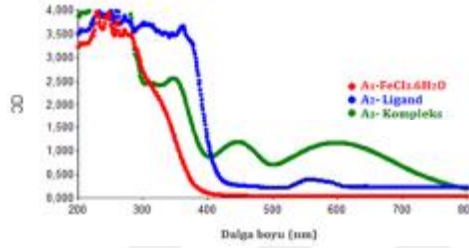
Şekil 211. 5. Derişim (12,5 μ M) sonrası mikrosobik görüntü 40X

48 saat sonunda 200 μ M [2,6piridindikarboksilikasit- Fe^{3+}] kompleksi ile muamele edilen HUVEC hücrelerinde farklılık gözlenmemiştir.

4.9. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu)

Fe(III) ile 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A_1): 228, 246, 259, 272, 362

nm; 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit, ligandı için (A_2): 251, 253, 272, 300, 387, 576 nm iken kompleks için (A_3): 232, 259, 292, 342, 386, 438, 560 nm’ de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 212’de gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)’ den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 213).



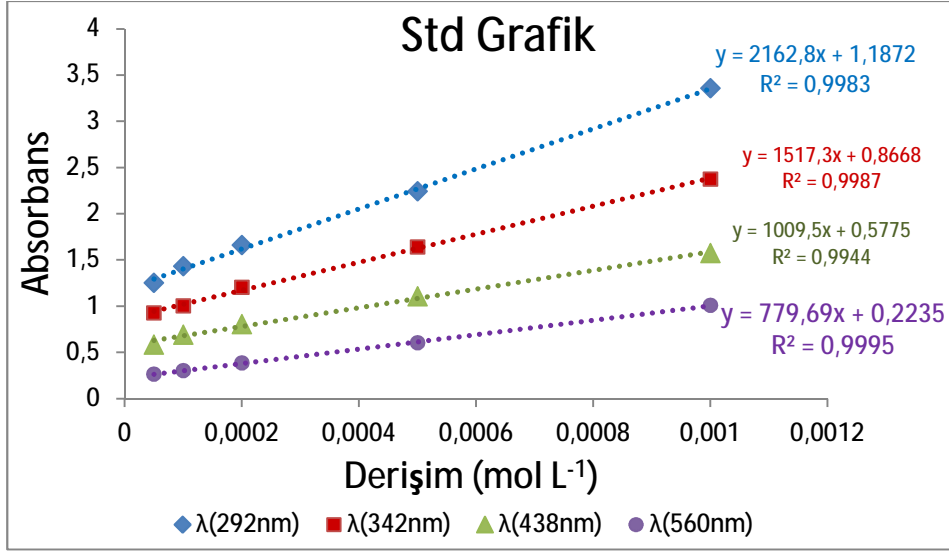
Şekil 212. 8-HQ-5-SA, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



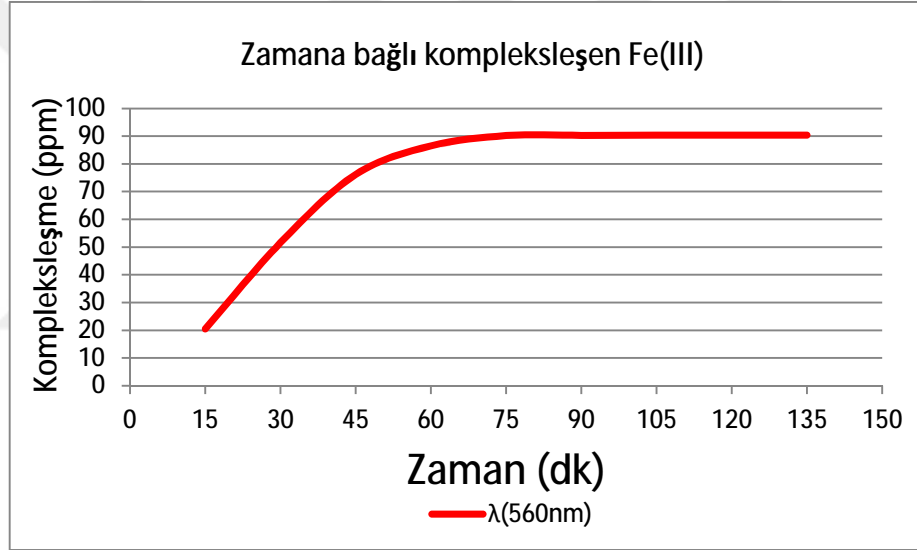
Şekil 213. 8-HQ-5-SA, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.9.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 292, 342, 438, 560 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 214). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki derişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 215). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)’nın 8-HQ-5-SA ile kompleksleşme süresi 120 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 90,38 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



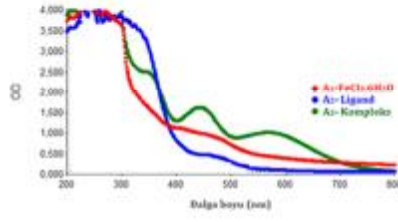
Şekil 214. 8-HQ-5-SA, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



Şekil 215. 8-HQ-5-SA, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.9.2. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asi ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için, (A₁): 230, 260, 270, 343, 452, 483 nm; ligand için, (A₂): 222, 255, 259, 293, 457, 586 nm; kompleks için, (A₃): 233, 258, 316, 343, 397, 443, 574 nm' de pikler vermiştir.



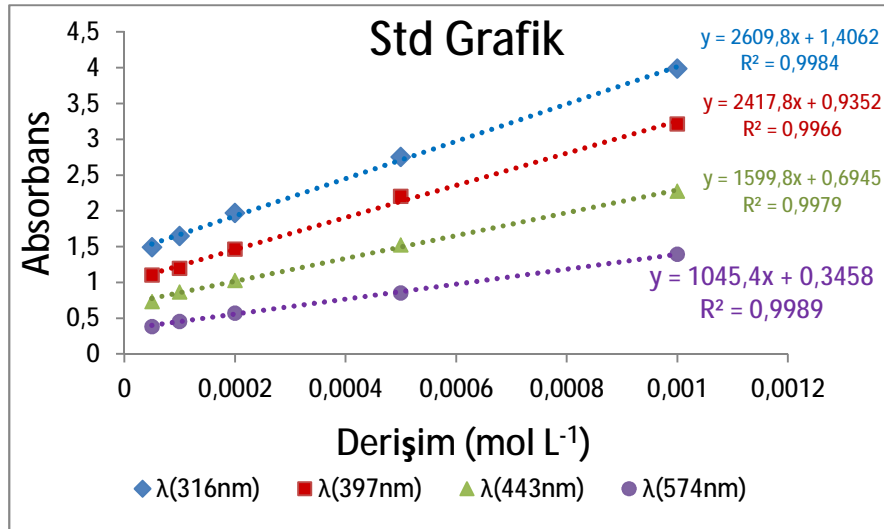
Şekil 216. 8-HQ-5-SA, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



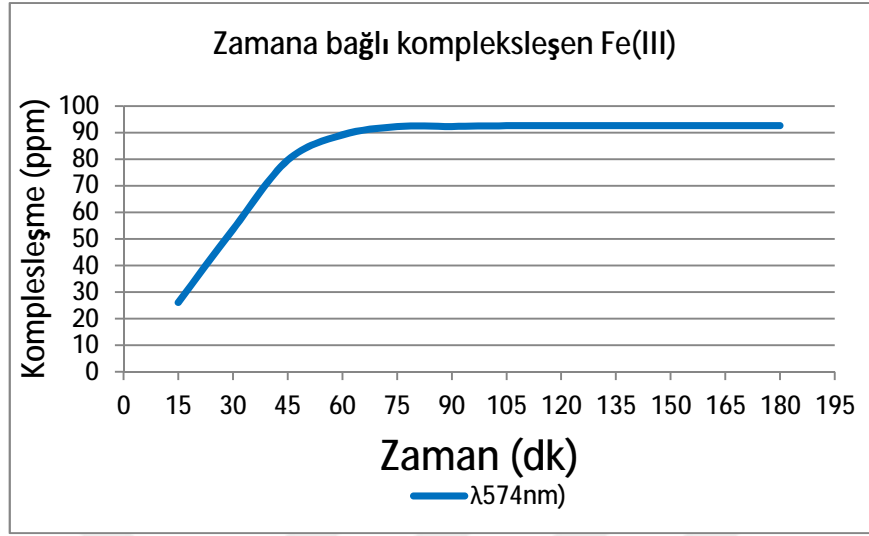
Şekil 217. 8-HQ-5-SA, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.9.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 316, 97, 443, 574 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbands grafiği elde edildi (Şekil 218). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbands değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 219). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın 8-HQ-5-SA ile kompleksleşme süresi 125 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 92,6 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



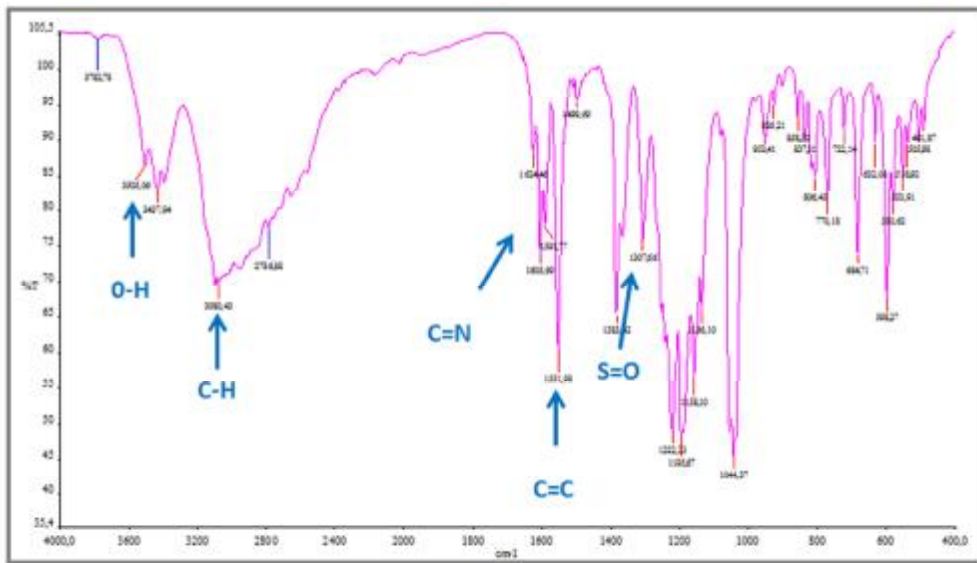
Şekil 218. [8-HQ-5-SA-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



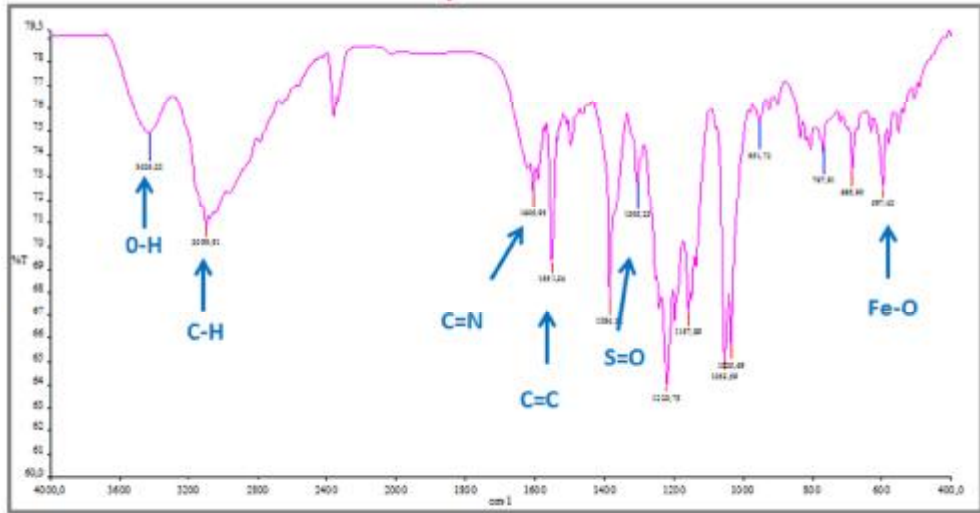
Şekil 219. [8-HQ-5-SA-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.9.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

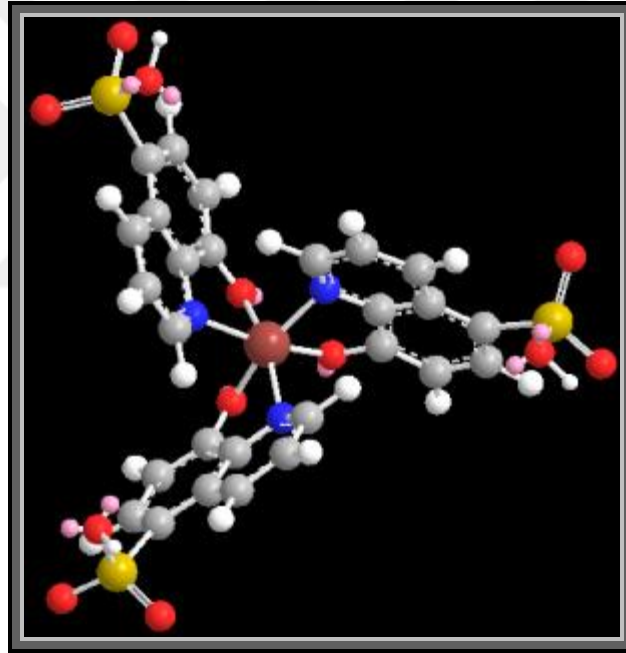
Kompleksin IR spektrumu incelendiğinde 3099 cm⁻¹ (O-H), 3442 cm⁻¹ (C-H), 1605 cm⁻¹ (C=N), 1305 cm⁻¹ (S=O), 968 cm⁻¹ (N-O), 567 cm⁻¹ (Fe-O) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Ligandın spektrumunda, 567 cm⁻¹ (Fe-O) dalga sayılarında pik bulunmamaktadır. Kompleksteki piklerin kaymış olması kompleksleşmenin olduğunu göstermektedir.



Şekil 220. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit ligandının FT-IR Spektrumu



Şekil 221. [8-HQ-5-SA-Fe³⁺] kompleksinin FT-IR Spektrumu

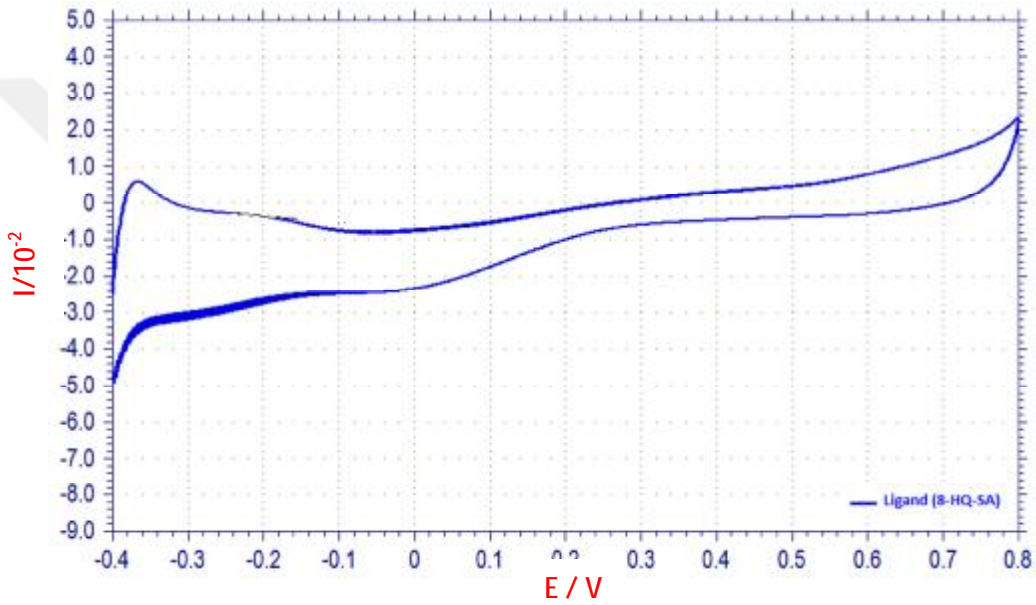


Şekil 222. [8-HQ-5-SA-Fe³⁺] kompleksinin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

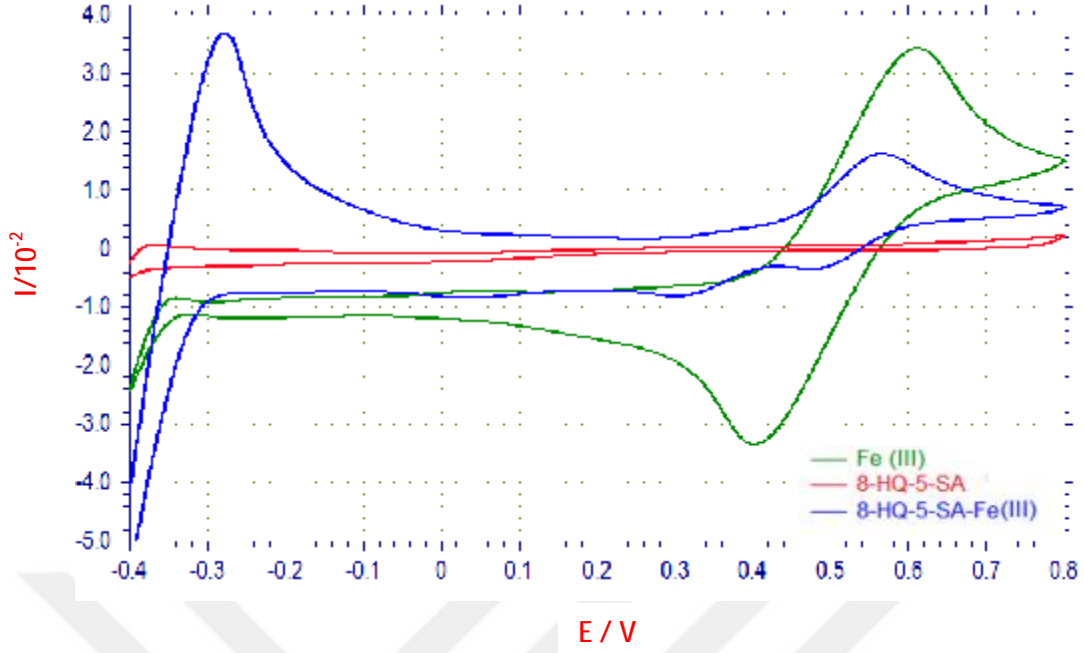
4.9.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre: CV)

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmıştı. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı 0,56 V ve -0,27'ta oksidasyon pik potansiyelleri görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III) 'den farklı olarak

00,30 V ve 0,48 V civarında redüksiyon pikleri gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligand hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 223. 8-HQ-5-SA ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu



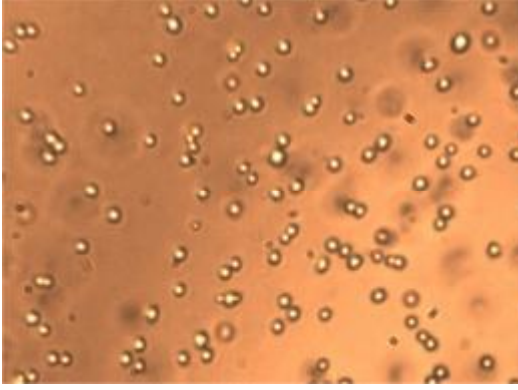
Şekil 224. 8-HQ-5-SA, Fe (III), [8-HQ-5-SA -Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu

4.9.6. Hücre Kültürü ve Sitotoksosite

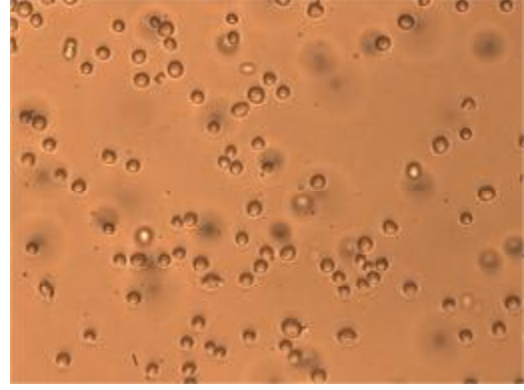
[8-HQ-5-SA-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksosite çalışmasında 1. ve 2. derişimlerde kontrole göre anlamlı fark görüldü. Fakat doz düşürüldüğünde etkilenen hücre oranının yani sitotoksitenin azaldığı ama değerlerin büyük olduğu gözlendi. Kontrole göre sitotoksik etkisi en yüksek olan 2. büyük derişimli (100µM) kompleksin olduğu ortaya çıktı (Çizelge 14). DMSO ile kompleksin 12,5, 25 ve 50 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir (p>0.05).

Çizelge 14. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doç (200 µM)	2.Doç (100 µM)	3.Doç (50µM)	4.Doç (25 µM)	5.Doç (12.5 µM)
Elisa Sonaçları	1,202	1,097	0,591	0,584	0,687	0,904	0,882
% Sitotoksite		8,173	50,92	51,41	42,84	24,79	26,62

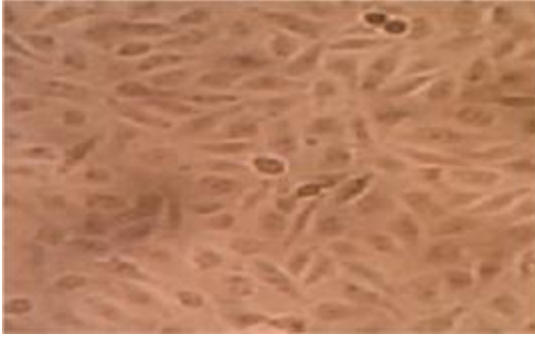


Şekil 225. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskobik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10

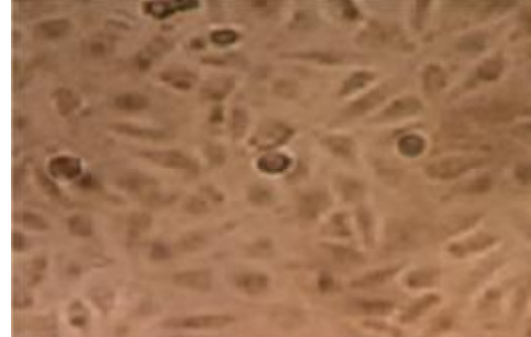


Şekil 226. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskobik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil 225'de de 12'lik plağa her kuyucuga 10^4 hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan sonra kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

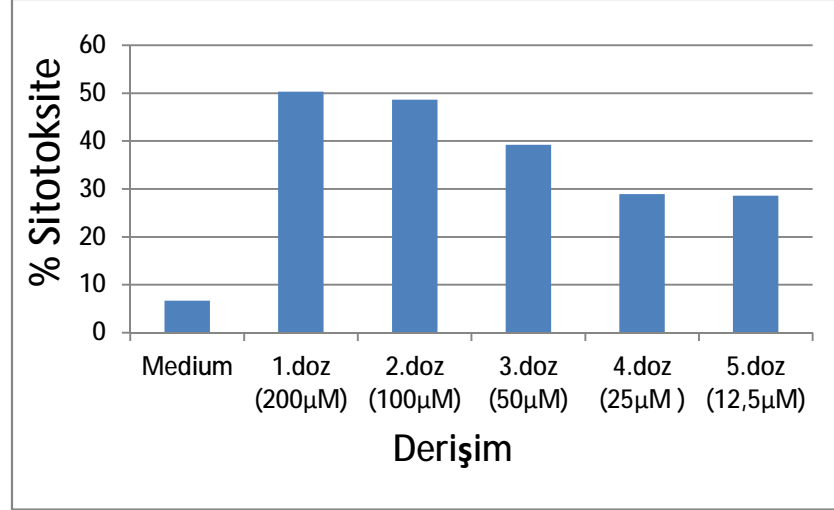


Şekil 227. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskobik görüntü 40X



Şekil 228. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X

100 µM kompleks eklendikten 48 saat sonraki hücre proliferasyonunun (Şekil 226) 25 µM kompleks eklenen gruba (Şekil 227) göre daha az olduğu ve diğer uygulanan derişimlerde 48 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından çok büyük fark yoktur. En fazla hücre proliferasyonu 4. dozda (25 µM) tespit edilmiştir.

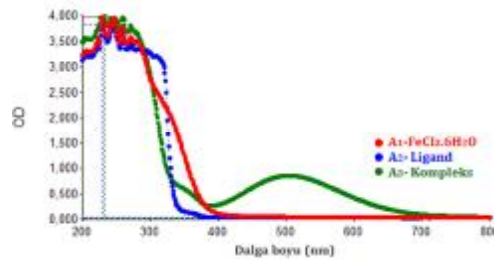


Şekil 229. [8-HQ-5-SA-Fe³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi

Şekil 228'de kompleksin HUVEC hücreleri üzerine doza bağımlı sitotoksik etkisi görülmektedir. 1. ve 2. dozda sitotoksik etki % 50' nin üzerinde iken 3. 4. ve 5. dozda daha düşük değerler görülmektedir. Sitotoksosite değişen derişimlerde paralel bir etki göstermektedir.

4.10. Salisilik Asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su)

Fe(III) ile salisilik asit ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 220, 256, 268, 272, 362 nm; salisilik asit ligandı için (A₂): 227, 246, 259, 269, 340 nm iken kompleks için (A₃): 227, 258, 270, 362, 510, 620 nm' de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 230'da gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 231).



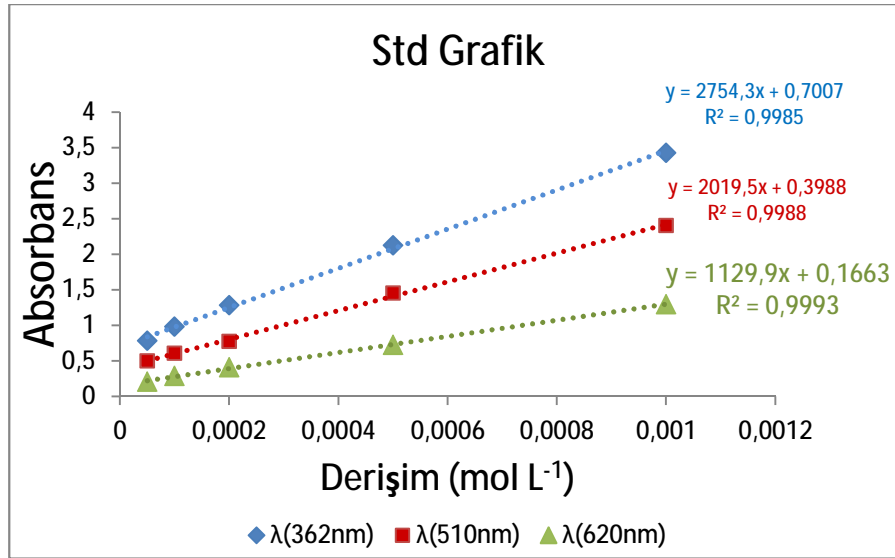
Şekil 230. Salisilik asit, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



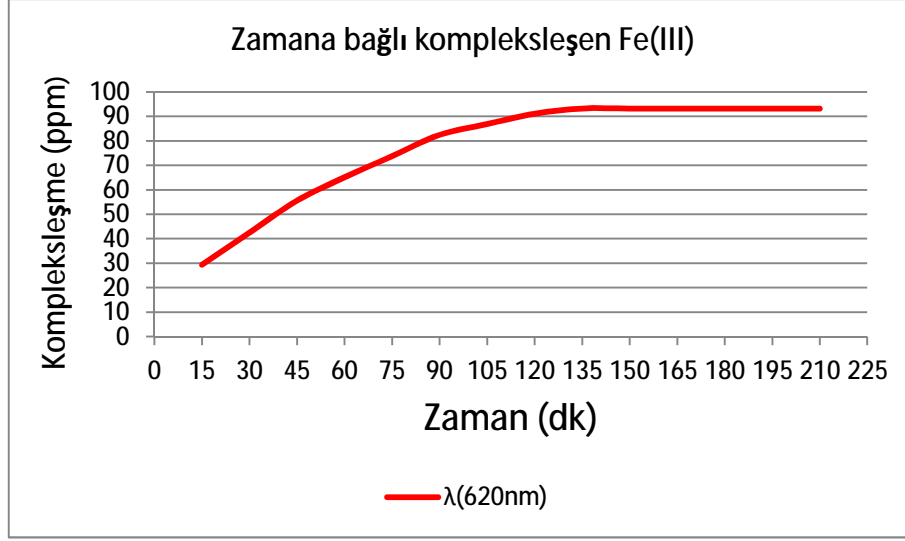
Şekil 231. Salisilik asit, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.10.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 362, 510, 620 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 232). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 233). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın salisilik asit ile kompleksleşme süresi 150 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 93,2 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



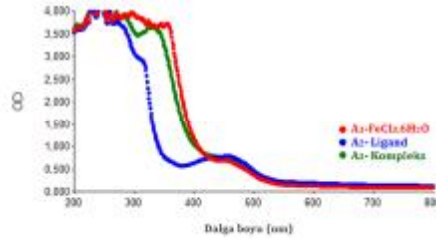
Şekil 232. [Salisilikasit-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



Şekil 233. [Salisilikasit-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağılı kompleksleşme miktarı

4.10.2. Salisilik Asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile salisilik asit ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için, (A₁): 230, 258, 270, 282, 327, 480 nm; ligand için (A₂): 228, 241, 258, 270, 443 nm; Kompleks için (A₃): 257, 272, 323, 394, 444, 542, 654 nm'de pikler vermiştir.



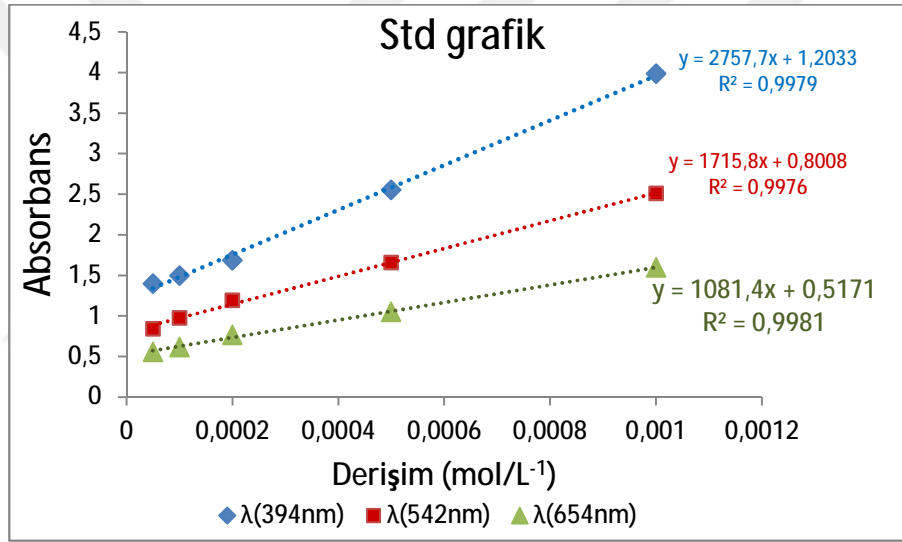
Şekil 234. Salisilik asit, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



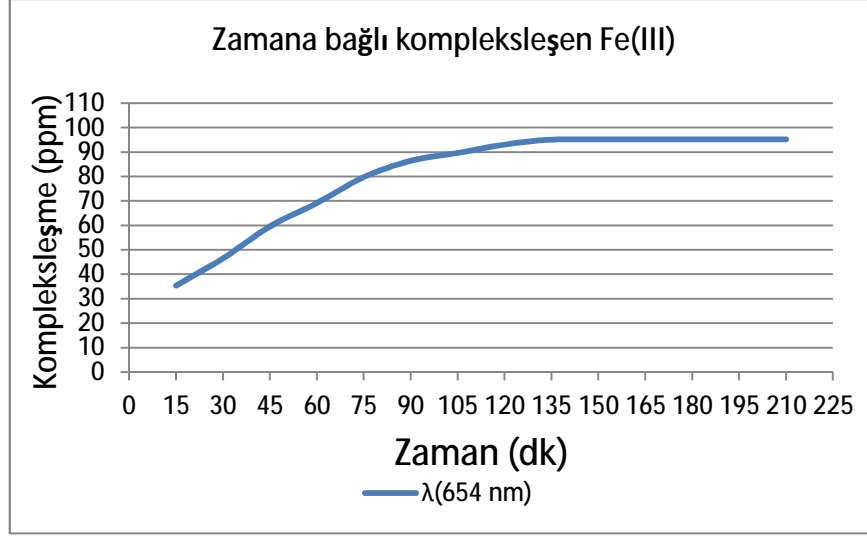
Şekil 235. Salisilik asit, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği

4.10.3. Standart ve Zamana bağı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 394, 542, 654 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiğı elde edildi (Şekil 236). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değışimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 237). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın salisilik asit ile kompleksleşme süresi 155 dk sürdüğü ve zamana bağı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 95,2 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



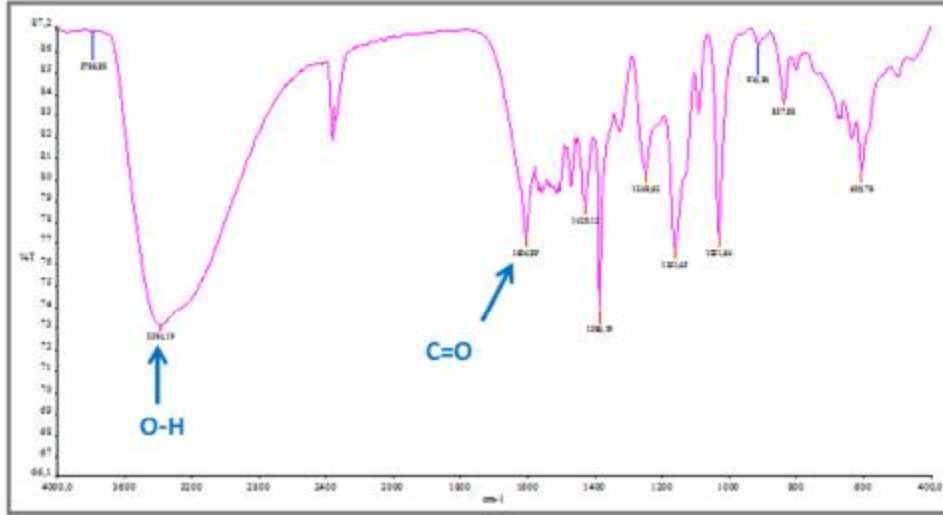
Şekil 236. [Salisilikasit-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiğı



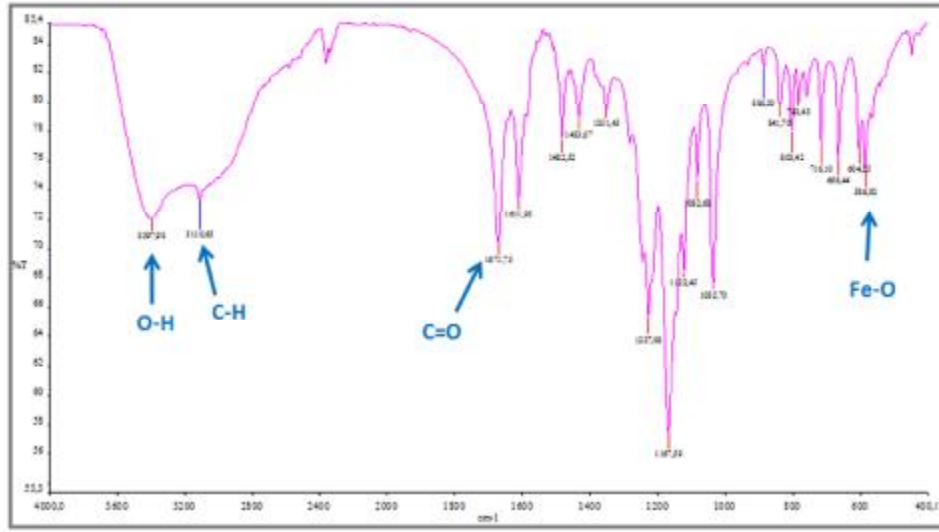
Şekil 237. [Salisilikasit-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.10.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

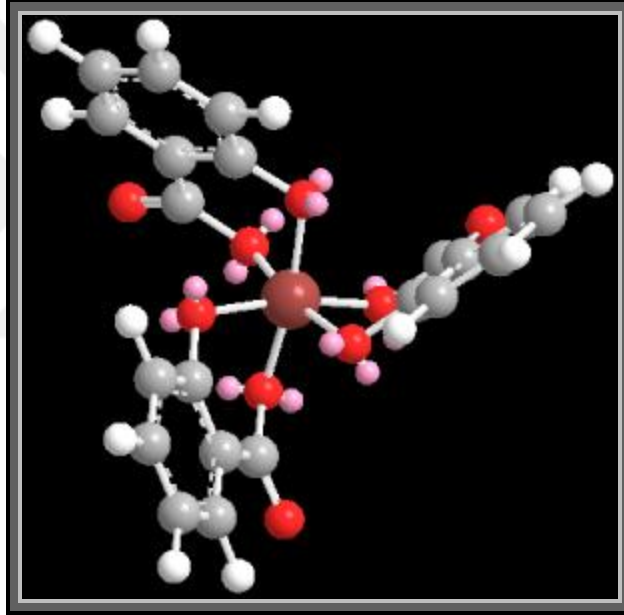
Kompleksin IR spektrumu incelendiğinde 3384 cm⁻¹ (O-H), 3110 cm⁻¹ (C-H (ar)), 1604 cm⁻¹ (C=O), 586 cm⁻¹ (Fe-O) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Ligandın spektrumunda 586 cm⁻¹ (Fe-O) dalga sayılarında pikler bulunmamaktadır. Kompleksleşme sırasında OH gerilme piki küçülmüştür. Aynı zamanda kompleksdeki piklerin kaymış olması kompleksleşmenin olduğunu göstermektedir.



Şekil 238. Salisilik asit ligandının FT-IR Spektrumu



Şekil 239. [Salisilikasit-Fe³⁺] kompleksin FT-IR Spektrumu

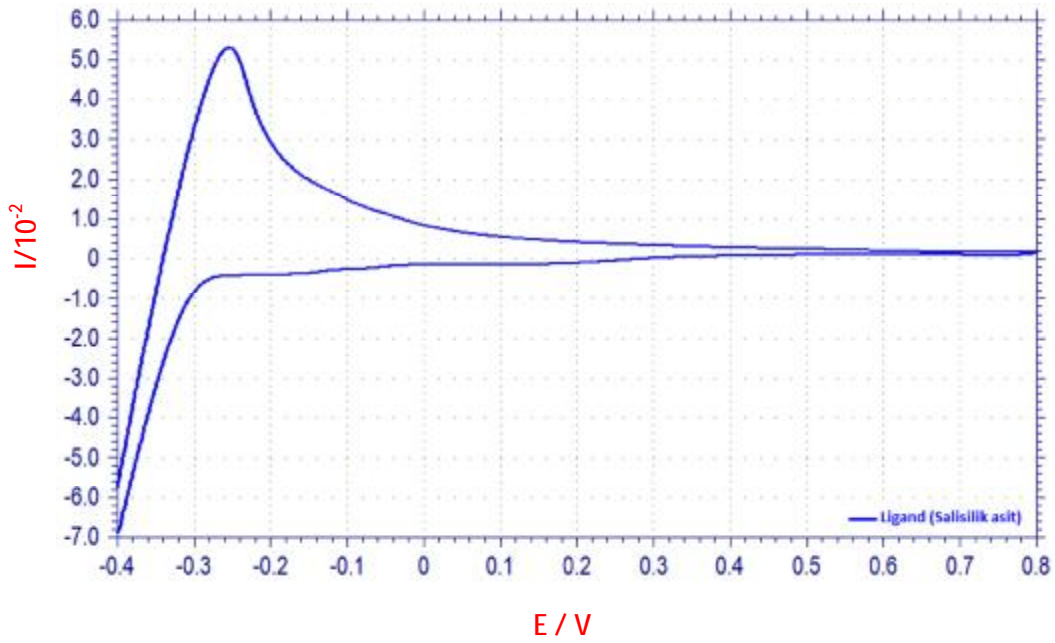


Şekil 240. [Salisilikasit-Fe³⁺] kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

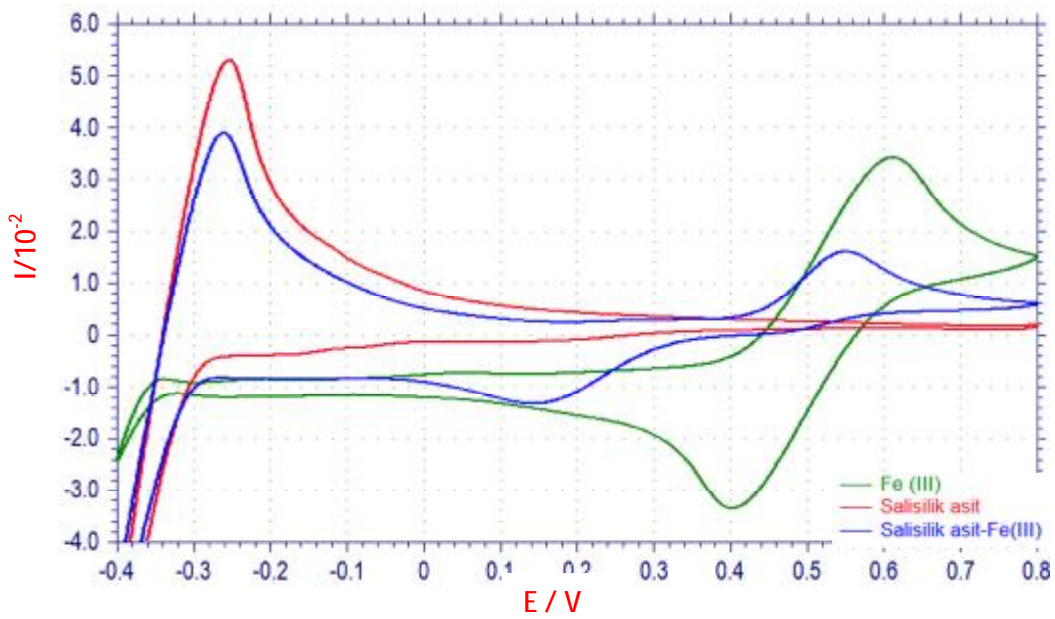
4.10.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre: CV)

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmıştı. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı 0,54 V ve -0,26 V 'ta oksidasyon pik potansiyelleri görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III) 'den farklı olarak 0,14 V civarında redüksiyon piki gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı

düşünülmektedir. Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligant hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 241. Salisilik asit ligandının dönüşümlü voltomogram sonucu



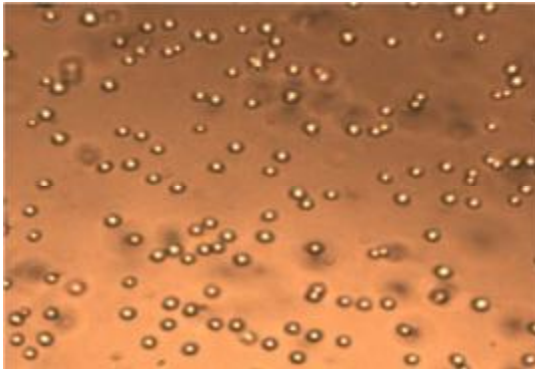
Şekil 242. Salisilik asit, Fe (III), [Salisilikasit-Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu

4.10.6. Hücre Kültürü ve Sitotoksisite

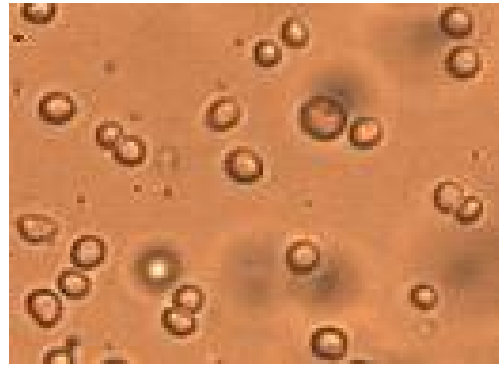
[Salisilikasit-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksisite çalışmasında 48 saat sonunda farklı derişimlerde kontrole göre anlamlı farklılıklar gözlenmedi. Kontrole göre sitotoksik etkisi en yüksek olan en yüksek derişimli (200µM) metal kompleksi olduğu ortaya çıktı. (Çizelge 15). Aynı zamanda doz miktarı azaldıkça sitotoksiste paralel bir şekilde azalmaktadır. DMSO ile kompleksin 12,5, 25, 50, 100 ve 200 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir (p>0.05).

Çizelge 15. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doç (200 µM)	2.Doç (100 µM)	3.Doç (50µM)	4.Doç (25 µM)	5.Doç (12.5 µM)
Elisa Sonuçları	1,201	1,102	0,742	0,942	0,985	0,997	1,004
% Sitotoksiste		8,24	38,21	21,56	17,98	16,98	16,40



Şekil 243. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10



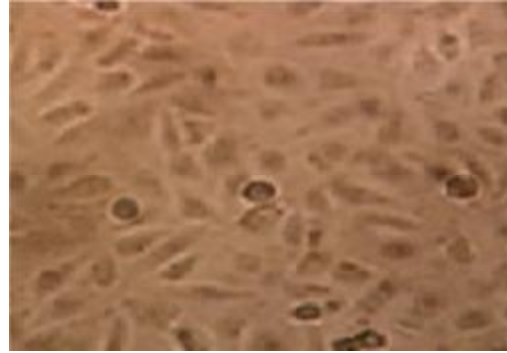
Şekil 243. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil 243'de de 12'lik plağa her kuyucuga 10⁴ hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan

sonra kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

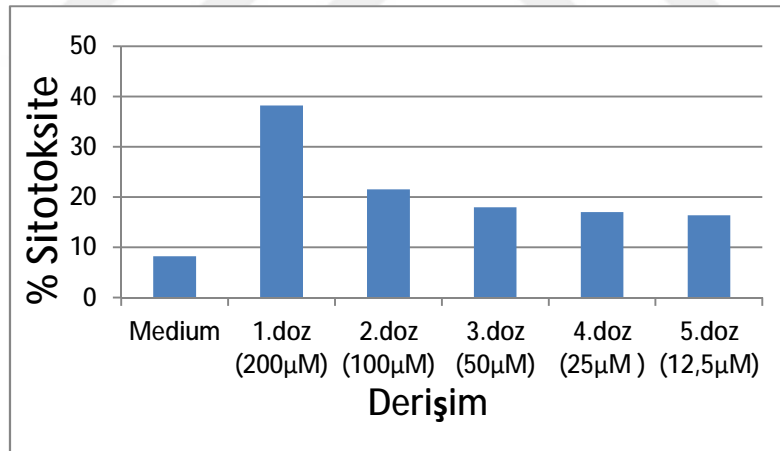


Şekil 244. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X



Şekil 245. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikroskopik görüntü 40X

200 µM kompleks eklendikten 48 saat sonraki hücre proliferasyonunun (Şekil 245) 12,5 µM kompleks eklenen gruba (Şekil 246) göre daha az olduğu ve diğer uygulanan derişimlerde 48 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından çok büyük fark yoktur. En fazla hücre proliferasyonu 5. dozda (12,5 µM) tespit edilmiştir.

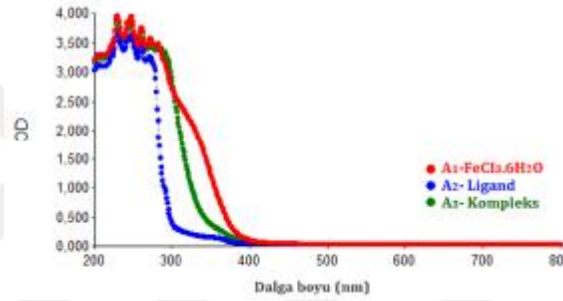


Şekil 246. [Salisilikasit-Fe³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi

Şekil 246'da kompleksin HUVEC hücreleri üzerine doza bağımlı sitotoksik etkisi görülmektedir. Tüm uygulanan dozlarda sitotoksik etki % 50' nin altındadır. Sitotoksiste değişen derişimlerde paralel bir etki göstermemektedir.

4.11. Nitrilotriasetikasit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Safsu)

Fe(III) ile nitrilotriasetikasit ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A_1): 228, 245, 259, 270, 362 nm; nitrilotriasetikasit ligandı için (A_2): 220, 235, 244, 252, 356 nm iken kompleks için (A_3): 244, 250, 271, 320 nm'de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 247'de gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)'den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 248).



Şekil 247. NTA, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği

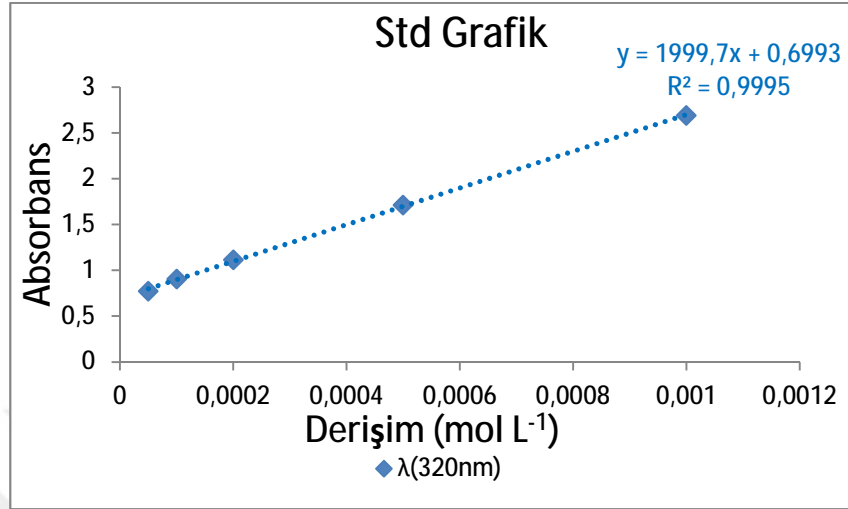


Şekil 248. NTA, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

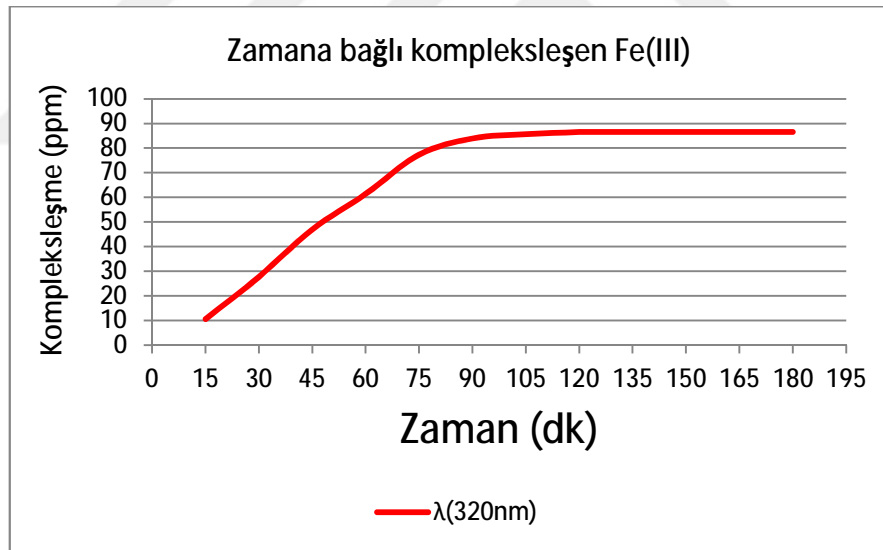
4.11.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözülden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 320 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 249). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki derişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 250). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın NTA ile kompleksleşme süresi 105 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme

miktarının bu süre sonunda 87,7 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



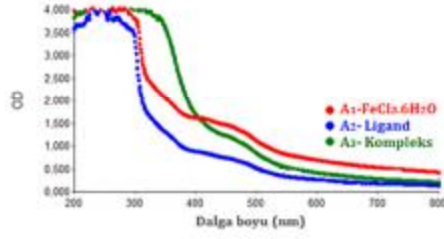
Şekil 249. [NTA-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



Şekil 250. [NTA-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.11.2. Nitrilotriasetik asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile nitrilotriasetik asit ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 230, 260, 270, 280, 483, 585 nm; nitrilotriasetik asit ligandı için (A₂): 228, 235, 259, 268, 324, 480 nm; kompleks için (A₃): 227, 258, 362, 484 nm'de pikler vermiştir.



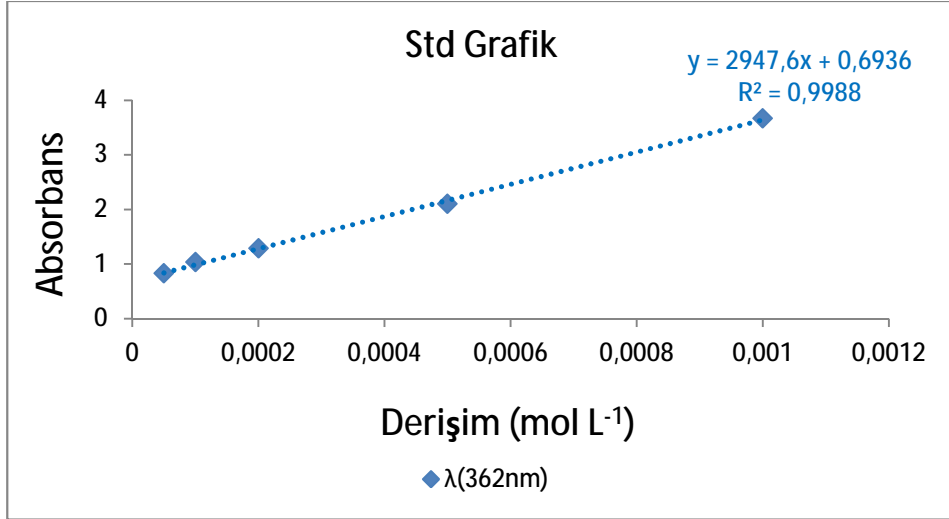
Şekil 251. NTA, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



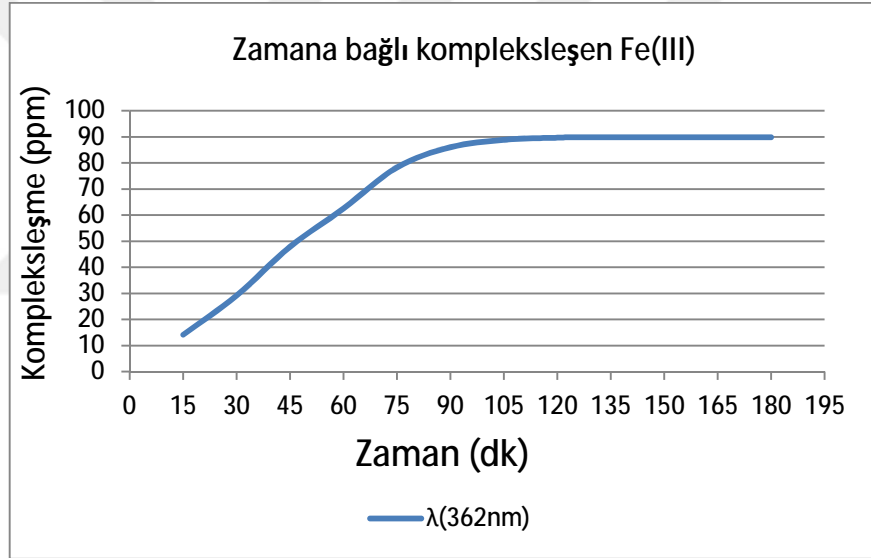
Şekil 252. NTA, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.11.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 362 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 253). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki derişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 254). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın NTA ile kompleksleşme süresi 110 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 89,9 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



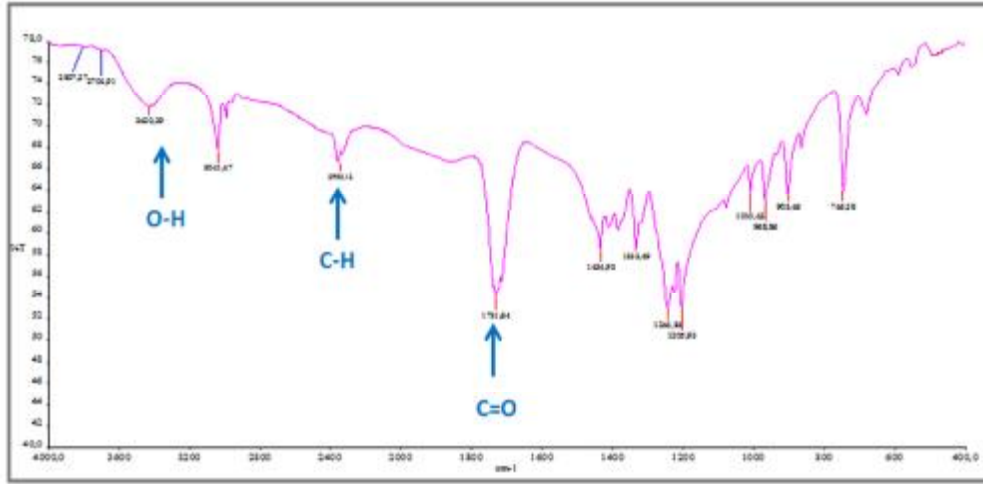
Şekil 253. [NTA-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



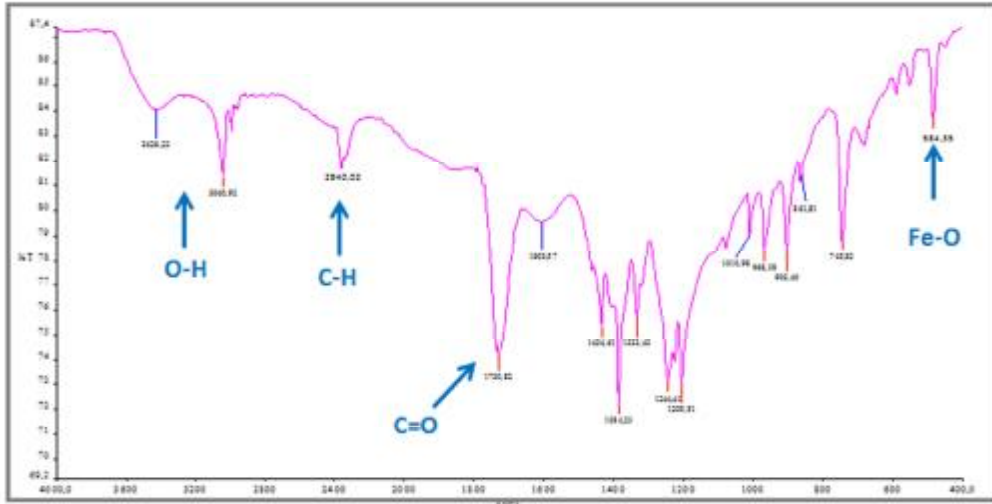
Şekil 254. NTA-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.11.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

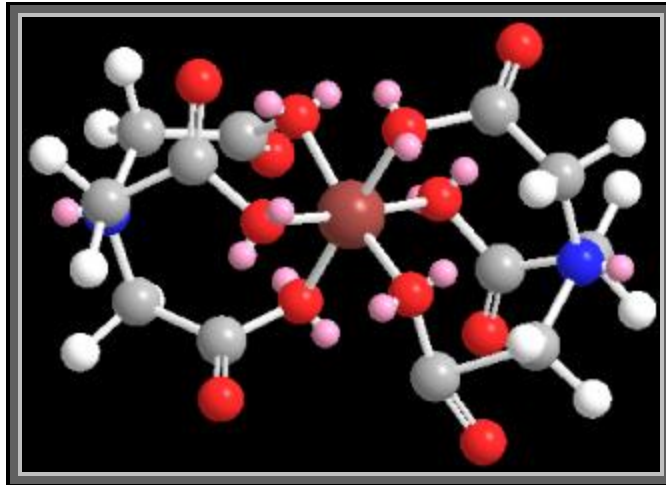
Kompleksin IR spektrumu incelendiğinde 3426 cm⁻¹ (O-H), 3040 cm⁻¹ (C-H), 1730 cm⁻¹ (C=O), 564 cm⁻¹ (Fe-O) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Ligandın spektrumunda 564 cm⁻¹ (Fe-O) dalga sayılarında pikler bulunmamaktadır. Kompleksleşme sırasında OH gerilme piki küçülmüştür. Aynı zamanda kompleksteki piklerin kaymış olması kompleksleşmenin olduğunu göstermektedir.



Şekil 255. NTA ligandının FT-IR Spektrumu



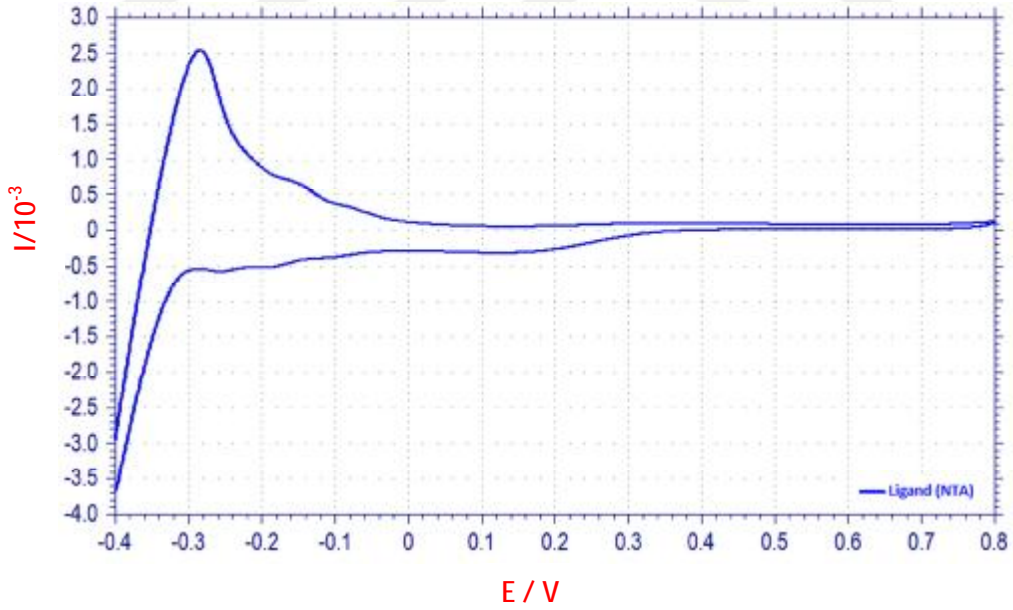
Şekil 256. NTA-Fe³⁺] kompleksinin FT-IR Spektrumu



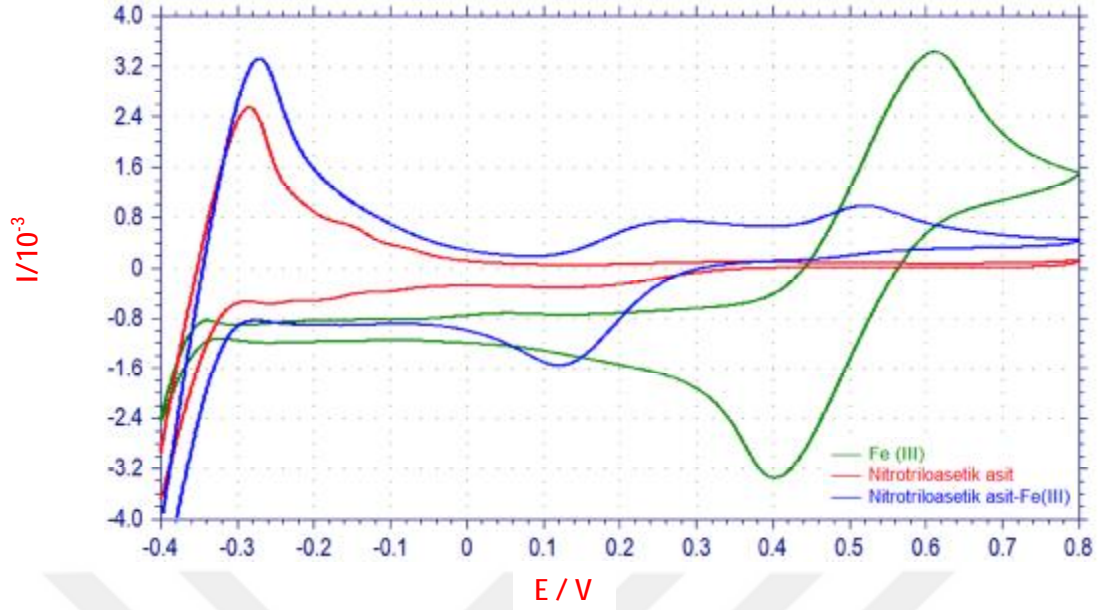
Şekil 257. NTA-Fe³⁺] kompleksinin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

4.11.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre: CV)

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmışdı. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı 0,25 V, 0,51 V ve -0,28 V'ta oksidasyon pik potansiyelleri görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı olarak 0,11 V civarında redüksiyon piki gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligand hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 258. NTA ligandının dönüşümlü voltomogram sonucu



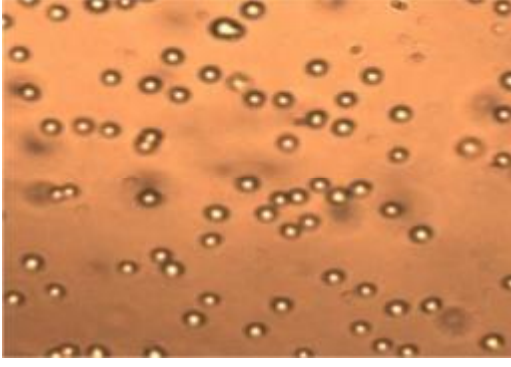
Şekil 259. NTA, Fe (III), [NTA-Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu

4.11.6. Hücre kültürü ve sitotoksosite

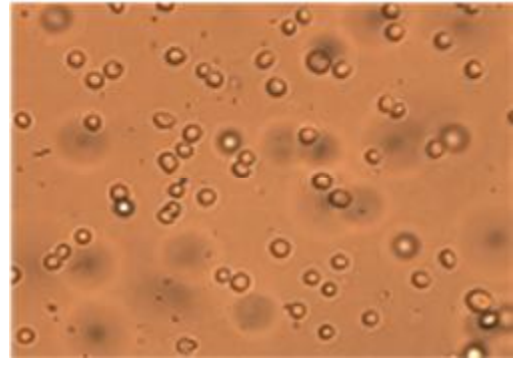
[NTA-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksosite çalışmasında 48 saat sonunda farklı derişimlerde kontrole göre anlamlı farklılıklar gözlenmemekle birlikte 1. Dozda yüksek bir sitotoksik etki görülmektedir. Kontrole göre sitotoksik etkisi en yüksek olan en yüksek derişimli (200µM) metal kompleksi olduğu ortaya çıktı. (Çizelge.6). Aynı zamanda doz miktarı azaldıkça sitotoksite paralel bir şekilde azalmaktadır. DMSO ile kompleksin 12,5, 25, 50, 100 ve 200 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir. (p>0.05).

Çizelge 16. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doç (200 µM)	2.Doç (100 µM)	3.Doç (50µM)	4.Doç (25 µM)	5.Doç (12.5 µM)
Elisa Sonaçları	1,224	1,113	0,703	0,981	0,849	0,962	0,974
% Sitotoksite		8,24	42,56	19,85	30,63	21,40	20,42

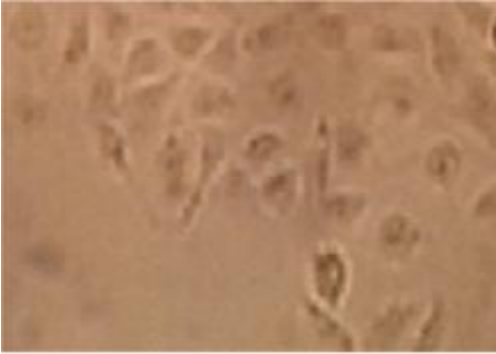


Şekil 260. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10



Şekil 261. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil 262'de de 12'lik plağa her kuyucuga 10^4 hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan sonra kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

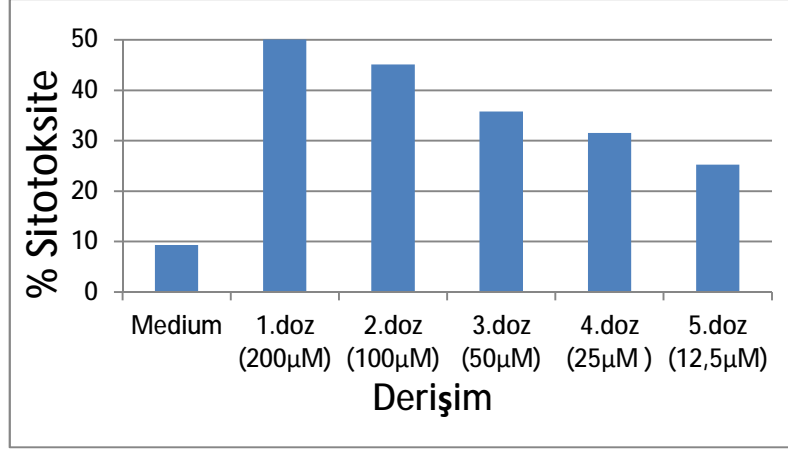


Şekil 262. 1. Derişim (200 μ M) sonrası mikroskopik görüntü 40X



Şekil 263. 2. Derişim (100 μ M) sonrası mikroskopik görüntü 40X

200 μ M kompleks eklendikten 48 saat sonraki hücre proliferasyonunun (Şekil 262) 12,5 μ M kompleks eklenen gruba (Şekil 263) göre daha az olduğu ve diğer uygulanan derişimlerde 48 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından çok büyük fark yoktur. En fazla hücre proliferasyonu 2. dozda (100 μ M) tespit edilmiştir.

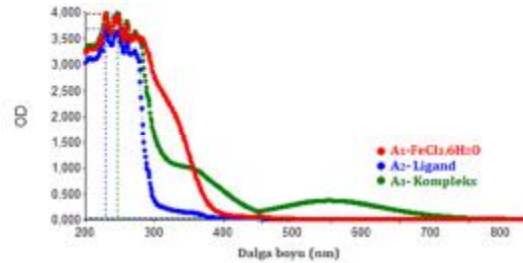


Şekil 264. [NTA-Fe³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi

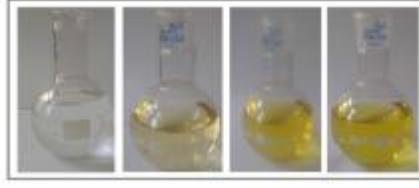
Şekil 264'de kompleksin HUVEC hücreleri üzerine doza bağımlı sitotoksik etkisi görülmektedir. Tüm uygulanan dozlarda sitotoksik etki % 50' nin altındadır. Sitotoksiste değişen derişimlerde paralel bir etki göstermemektedir.

4.12. Sitrik asit Fe(III)ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su)

Fe(III) ile sitrik asit ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 220, 252, 268, 271, 362 nm; sitrik asit ligandı için (A₂): 222, 251, 270, 280, 364 nm iken kompleks için (A₃): 220, 232, 260, 271, 362, 572 nm' de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 265'de gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 266).



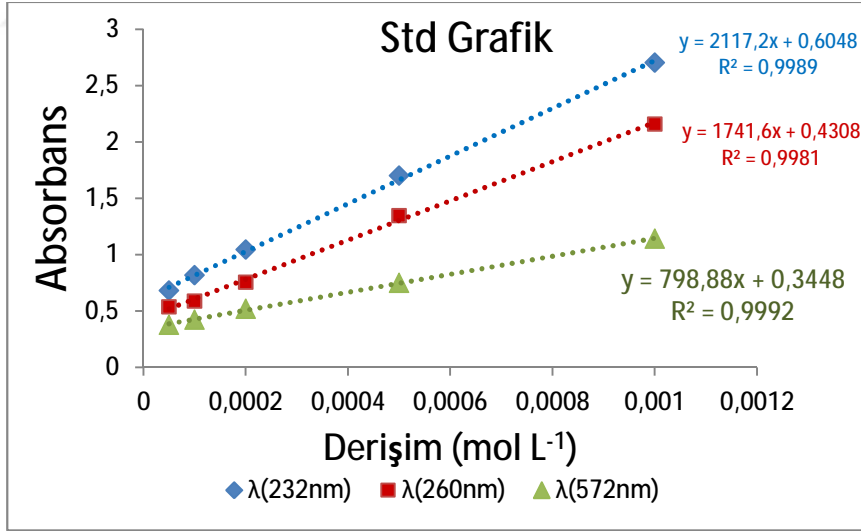
Şekil 265. Sitrik asit, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



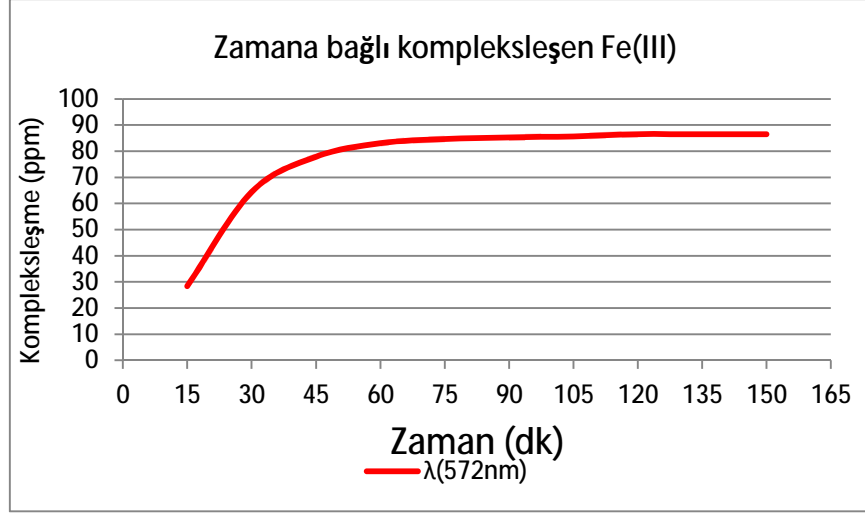
Şekil 266. Sitrik asit, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.12.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 232, 260, 572 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 267). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 268). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın sitrik asit ile kompleksleşme süresi 135 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 86,5 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



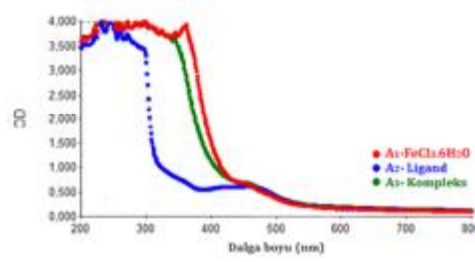
Şekil 267. . [Sitrikasit -Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



Şekil 268. . [Sitrikasit -Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği

4.12.2. Sitrik asit, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile sitrik asit ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 230, 258, 270, 282, 325, 452, 483 nm; ligand için (A₂): 226, 234, 259, 293, 402, 457 nm; Kompleks için (A₃): 226, 268, 290, 310, 456 nm' de pikler vermiştir.



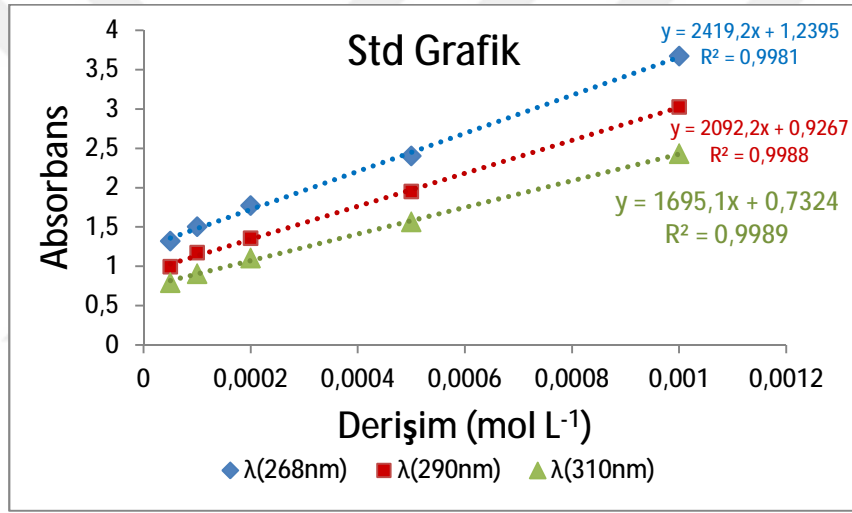
Şekil 269. Sitrik asit, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



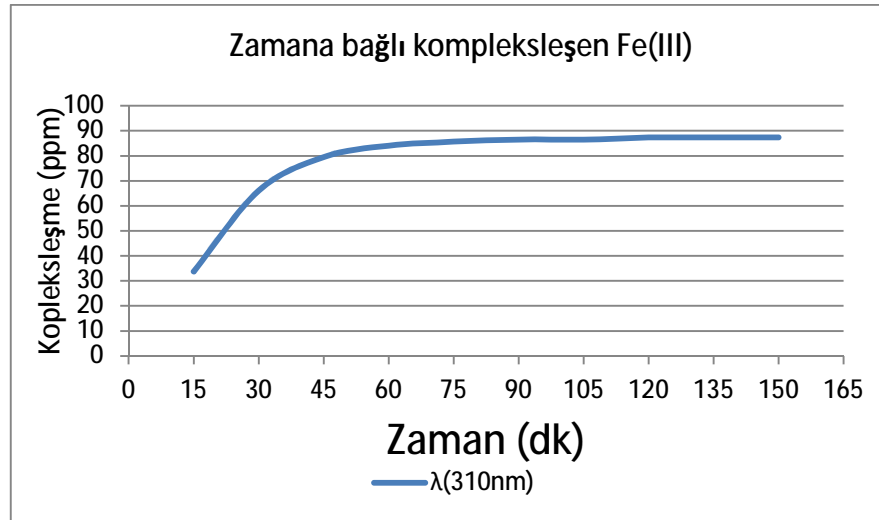
Şekil 270. Sitrik asit, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.13.3. Standart ve Zamana bağı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 268, 290, 310 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiğı elde edildi (Şekil 271). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki değışimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 272). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nın sitrik asit ile kompleksleşme süresi 140 dk sürdüğü ve zamana bağı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 87,36 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



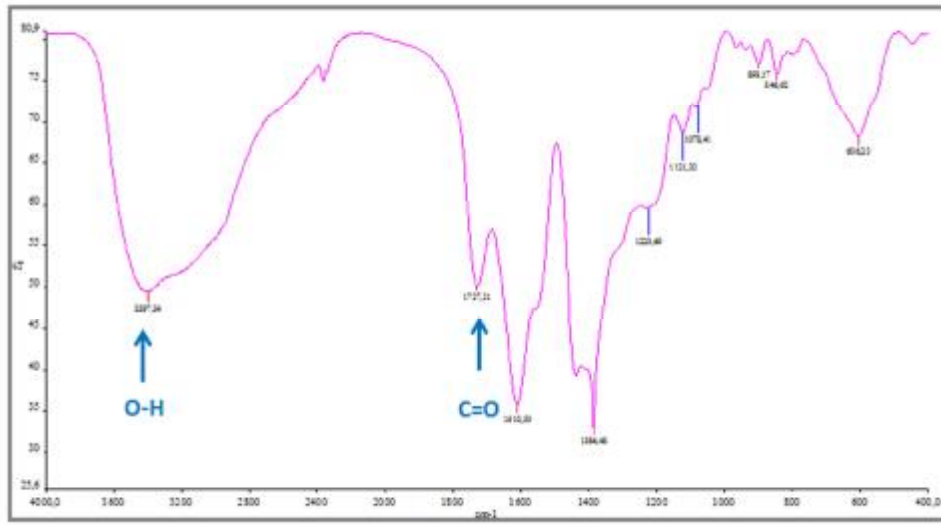
Şekil 271. [Sitrikasit-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiğı



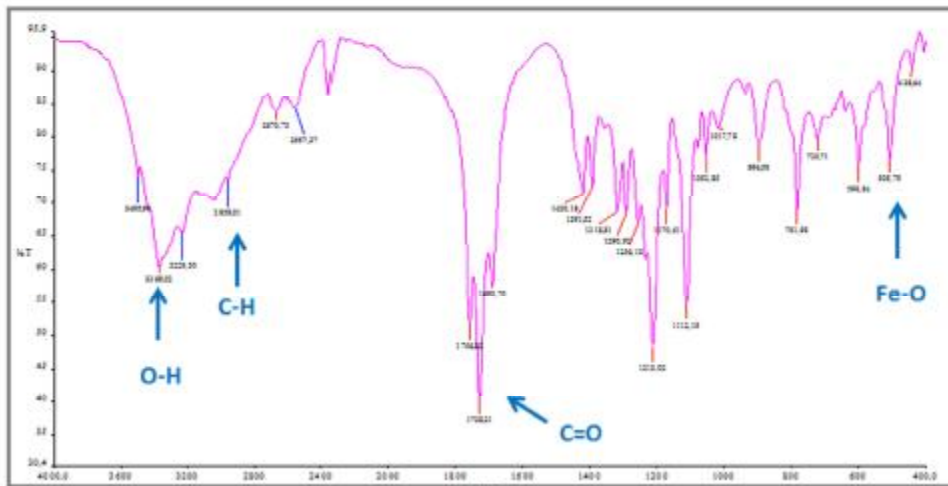
Şekil 272. [Sitrikasit-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.12.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

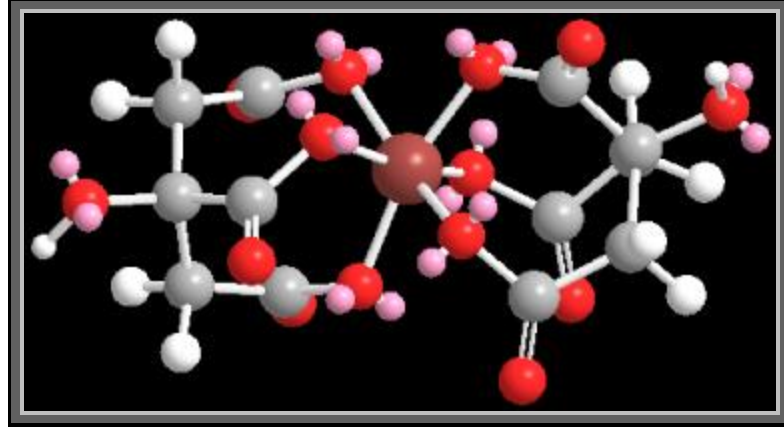
Kompleksin IR spektrumu incelendiğinde 3397 cm⁻¹ (O-H), 1727 cm⁻¹ (C=O), 505 cm⁻¹ (Fe-O) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Ligandın spektrumunda 505 cm⁻¹ (Fe-O) dalga sayılarında pikler bulunmamaktadır. Kompleksleşme sırasında OH gerilme piki küçülmüştür. Aynı zamanda kompleksteki piklerin kaymış olması kompleksleşmenin olduğunu göstermektedir.



Şekil 273. Sitrik asit ligandının FT-IR Spektrumu



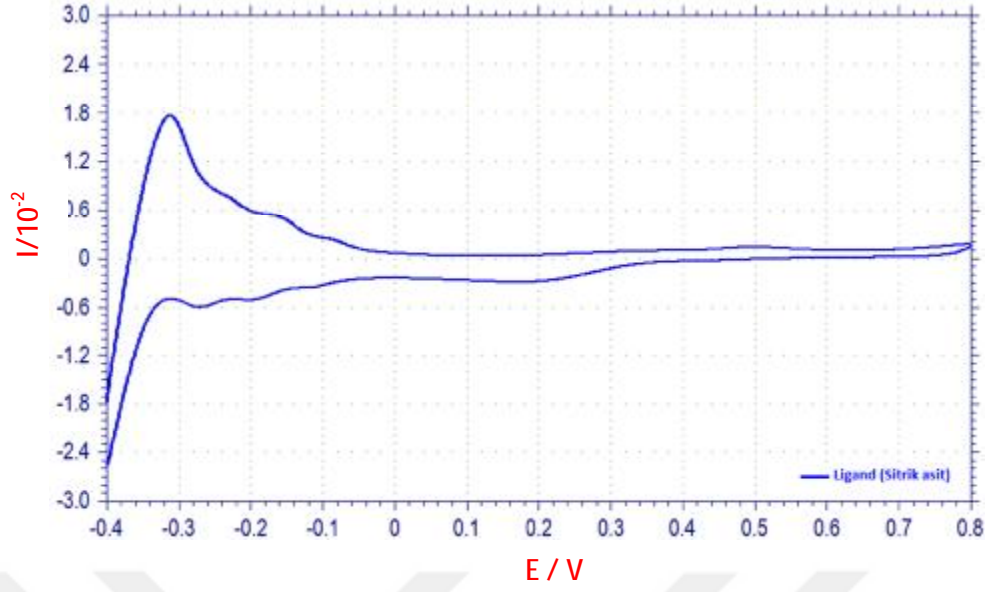
Şekil 274. [Sitrikasit-Fe³⁺] kompleksin FT-IR Spektrumu



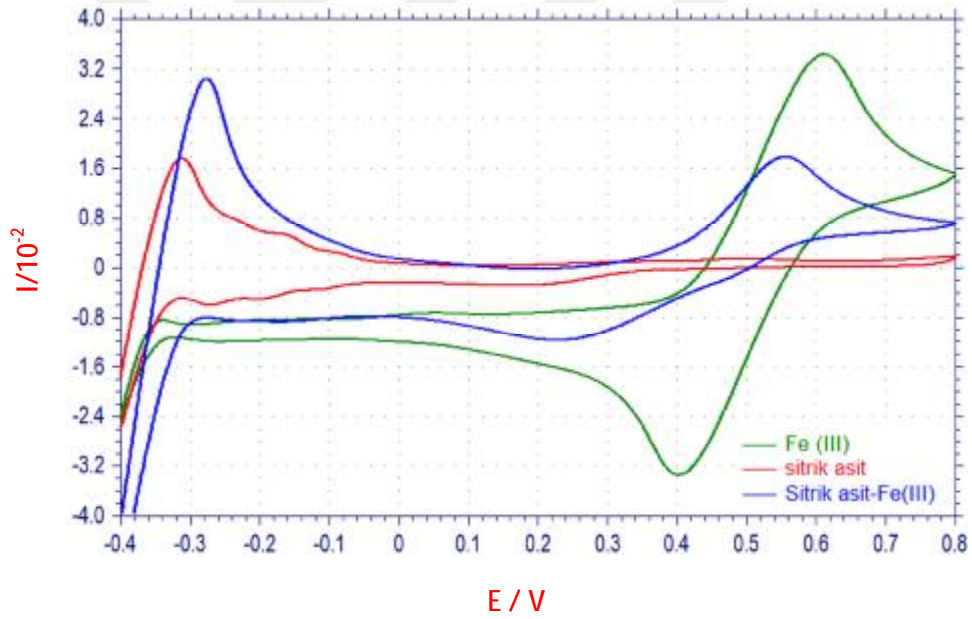
Şekil 275. [Sitrikasit -Fe³⁺] kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

4.12.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre)

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmıştı. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı 0,25 V 0,55 V ve -0,27 V'ta oksidasyon pik potansiyelleri görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III) 'den farklı olarak 0,21 V civarında redüksiyon piki gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligant hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 276. Sitrik asit iğandın dönüşümlü voltomogram sonucu



Şekil 277. Sitrik asit, Fe (III), [Sitrikasit-Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu

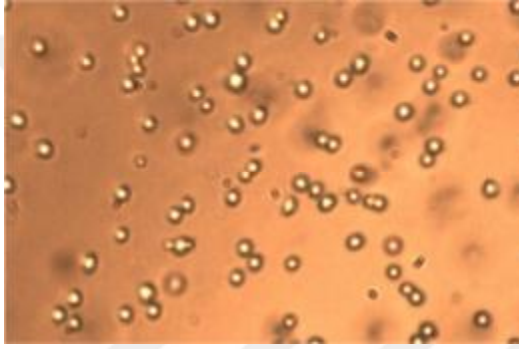
4.12.6. Hücre kültürü ve Sitotoksisite

[Sitrik asit-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksisite çalışmasında 1. derişimde kontrole göre anlamlı fark görüldü. (Çizelge.17). Kontrole göre sitotoksik etkisi en yüksek olan en yüksek derişimli (200µM) metal kompleksi olduğu ortaya çıktı. (Çizelge 17). Aynı zamanda doz miktarı azaldıkça sitotoksite paralel bir şekilde azalmaktadır. DMSO ile kompleksin 12,5, 25, 50 ve 100 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine

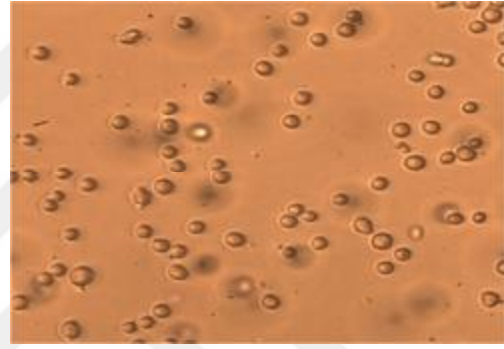
sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir. ($p>0.05$).

Çizelge 17. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doç (200 µM)	2.Doç (100 µM)	3.Doç (50µM)	4.Doç (25 µM)	5.Doç (12.5 µM)
Elisa Sonuçları	1,183	1,075	0,588	0,971	0,994	1,002	1,045
% Sitotoksite		9,12	50,29	17,92	15,97	15,30	11,66



Şekil 278. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10

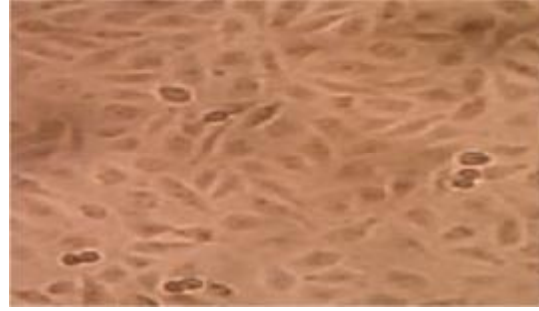


Şekil 279. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil 228'de de 12'lik plağa her kuyucuga 10^4 hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan sonra kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

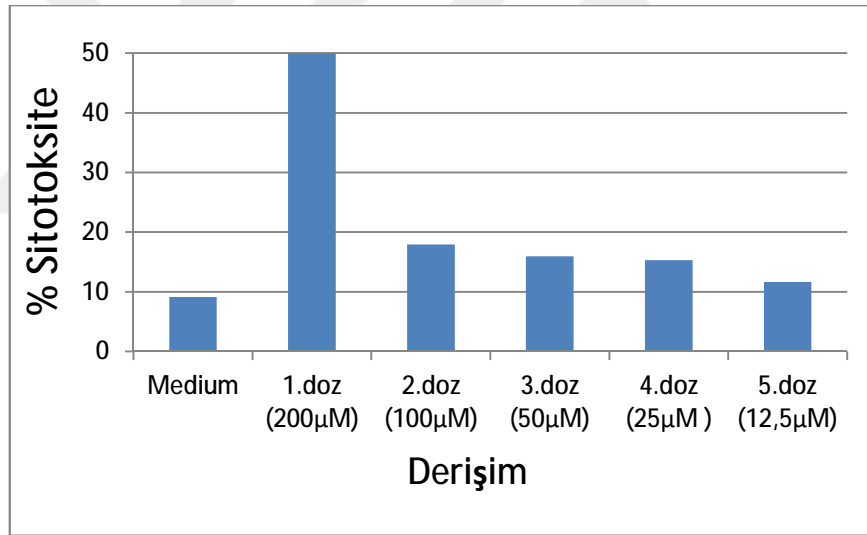


Şekil 280. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikroskobik görüntü 40X



Şekil 281. 5. Derişim (12,5 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X

100 µM kompleks eklendikten 48 saat sonraki hücre proliferasyonunun (Şekil 230) 25 µM kompleks eklenen gruba (Şekil 231) göre daha az olduğu ve diğer uygulanan derişimlerde 48 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından çok büyük fark yoktur. En fazla hücre proliferasyonu 5. dozda (12,5 µM) tespit edilmiştir.

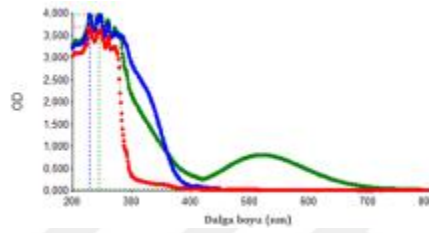


Şekil 282. [Sitrik asit-Fe³⁺] 'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi

Şekil 232'de kompleksin HUVEC hücreleri üzerine doza bağımlı sitotoksik etkisi görülmektedir. 1. dozda sitotoksik etki % 50' nin üzerinde iken 2. 3. 4. ve 5. dozda daha düşük değerler görülmektedir. Sitotoksosite değişen derişimlerde paralel bir etki göstermektedir.

4.13. Glisin, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Saf-su)

Fe(III) ile glisin ligandı kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 220, 252, 268, 271, 362 nm; glisin ligandı için (A₂): 222, 244, 255, 269, 272, 360 nm iken kompleks için (A₃): 235, 255, 270, 360, 590 nm' de pikler vermiştir. Spektrumlar Şekil 283'de gösterilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı dalga boyunda pikler vermesi ve kompleks renginin tepkimeye girenlerden farklı olması tepkimenin ve kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 284).



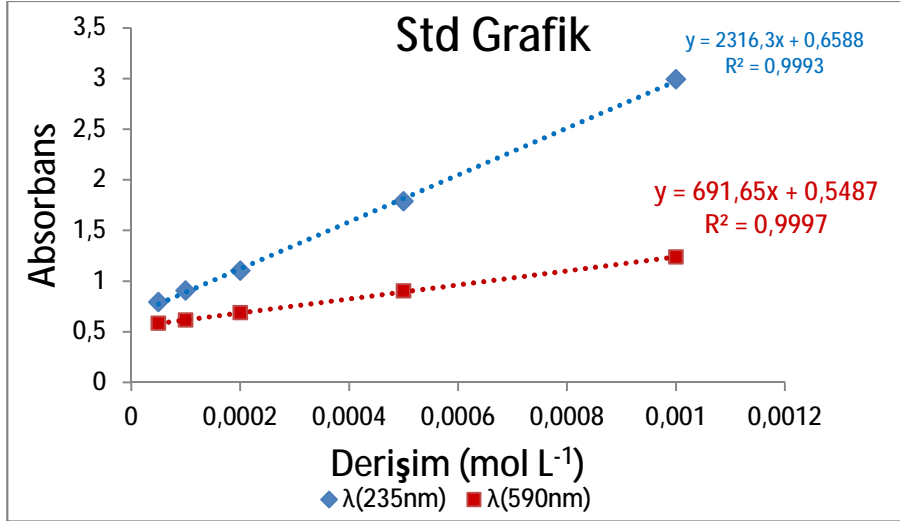
Şekil 283. Glisin, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



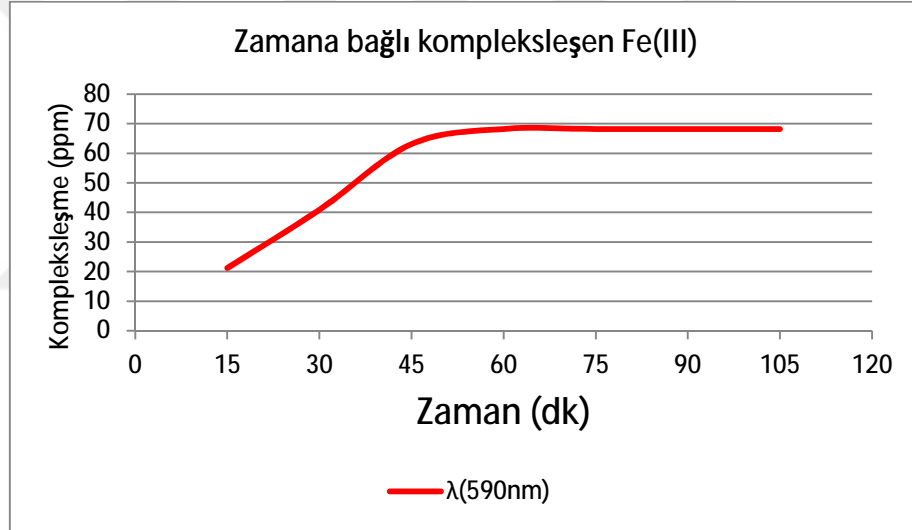
Şekil 284. Glisin, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği

4.13.1. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Safsu)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 235, 590 nm dalga boylarında elde edilen absorbansa göre derişime karşı absorbans grafiği elde edildi (Şekil 285). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbans değerlerindeki derişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 286). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nin glisin ile kompleksleşme süresi 45 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 68,2 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



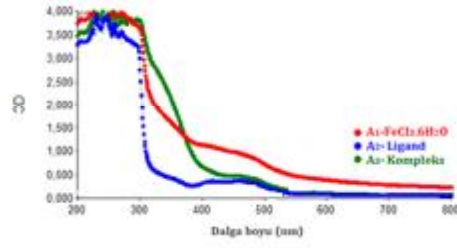
Şekil 285. [Glisin-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



Şekil 286. [Glisin-Fe³⁺] kompleksinin zamana bağlı kompleksleşme miktarı

4.13.2. Glisin, Fe(III) ve Kompleksin Dalga boyu taraması (Plazma)

Fe(III) ile glisin ligandı plazmada kompleksleştirilerek, ligandın, Fe(III)'ün ve kompleksin Uv-Vis spektrofotometresinde 200-800 nm aralığında dalga boyu taraması yapılmıştır. Fe(III) için (A₁): 230, 260, 270, 282, 327, 483, 585 nm; ligand için (A₂): 232, 260, 278, 292, 380, 482 nm; kompleks için, (A₃): 229, 248, 271, 302, 480 nm' de pikler vermiştir.



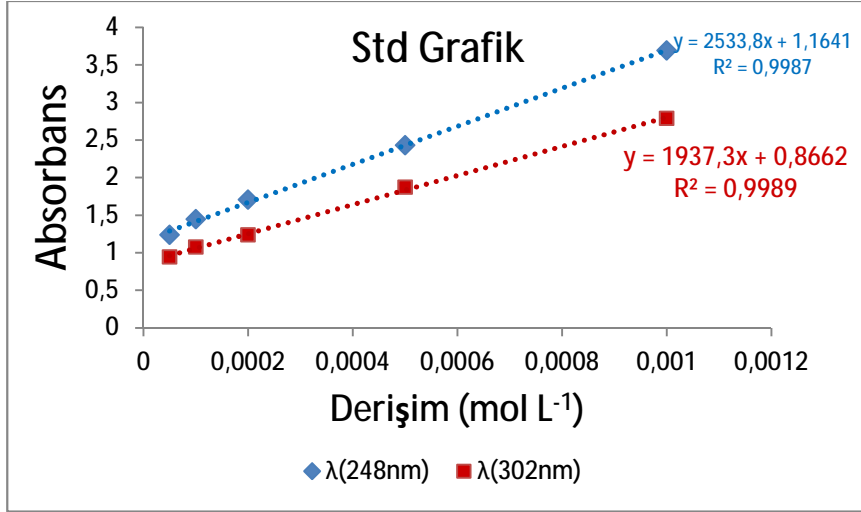
Şekil 287. Glisin, Fe(III) ve kompleksin dalga boyu tarama grafiği



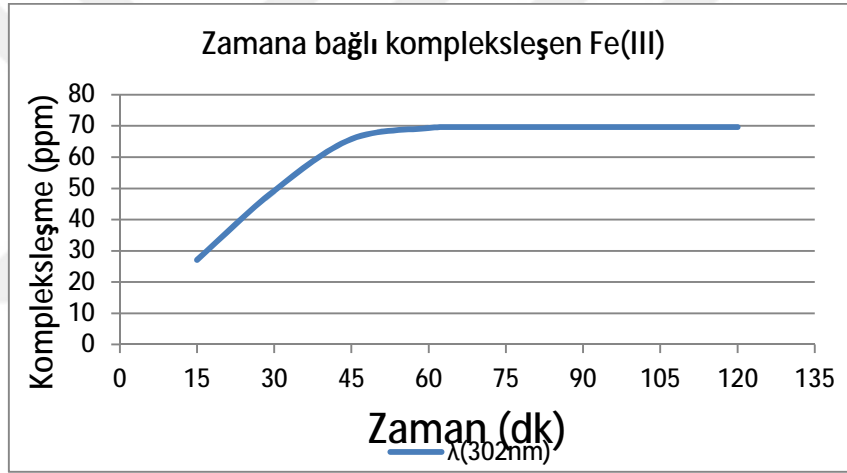
Şekil 288. Glisin, Fe(III), Kompleks ve Kompleks 2. saatteki fiziksel görünüm

4.13.3. Standart ve Zamana bağlı kompleksleşme grafikleri (Plazma)

Standart çözeltilerden hazırlanan farklı derişimlere karşı kompleksin liganttan farklı olarak verdiği 248, 302 nm dalga boylarında elde edilen absorbanse göre derişime karşı absorbanse grafiği elde edildi (Şekil 289). Ölçümde oluşacak hatalar, her derişimde 3 kez ölçümün ortalaması alınarak engellenmeye çalışılmıştır. Belirlenen zamanlarda kompleksin absorbanse değerlerindeki değişimler incelenerek zamana karşı kompleksleşme miktarı belirlendi (Şekil 290). Deneysel ölçümler sonucunda Fe(III)'nin glisin ile kompleksleşme süresi 50 dk sürdüğü ve zamana bağlı kompleksleşme miktarının bu süre sonunda 69,66 ppm olduğu saptandı. Bu metod ile elde edilen kompleksleşme miktarı ICP analizi ile doğrulanıp uyumlu olduğu gözlemlendi.



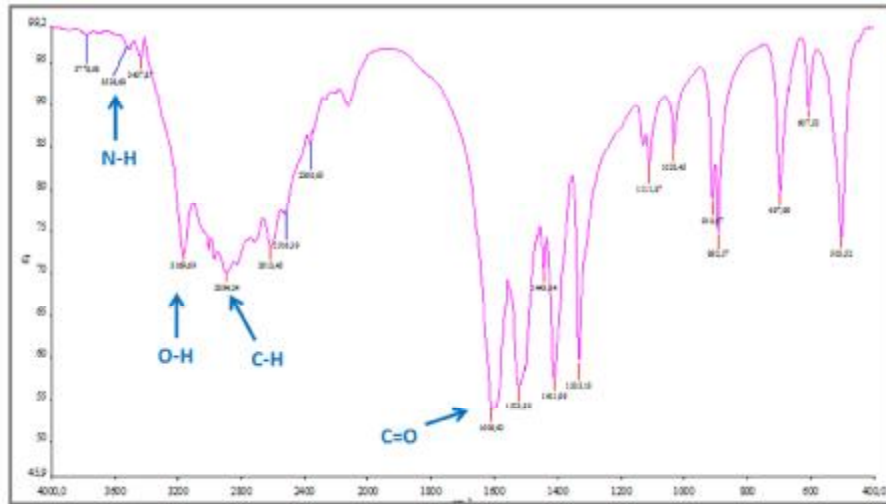
Şekil 289. [Glisin-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği



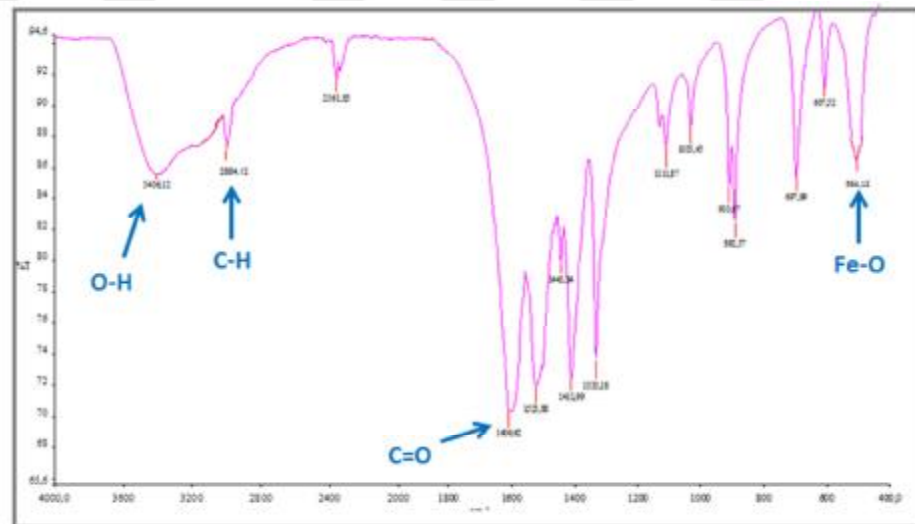
Şekil 290. [Glisin-Fe³⁺] kompleksinin standart grafiği

4.13.4. FT-IR verileri ve Kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

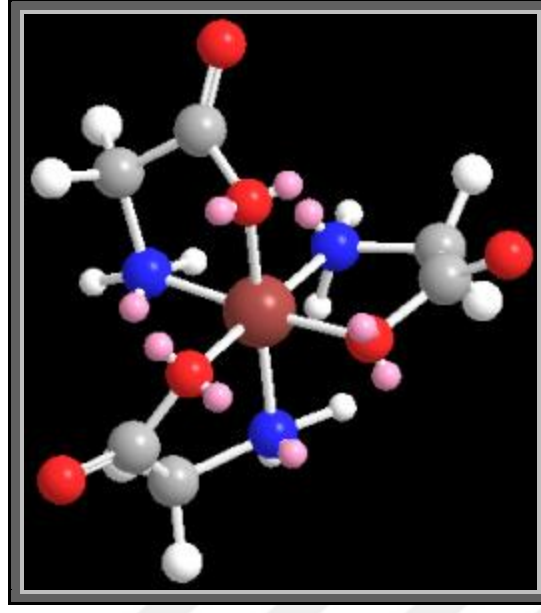
Kompleksin IR spektrumu incelendiğinde 3406 cm⁻¹ (O-H), 2894 cm⁻¹ (C-H), 1609 cm⁻¹ (C=O), 584 cm⁻¹ (Fe-O) gerilimlerine ait pikler görülmektedir. Ligandın spektrumunda 505 cm⁻¹ (Fe-O) dalga sayılarında pikler bulunmamaktadır. Kompleksleşme sırasında OH gerilme piki küçülmüştür. Aynı zamanda kompleksteki piklerin kaymış olması kompleksleşmenin olduğunu göstermektedir.



Şekil 291. Glisin ligandının FT-IR Spektrumu



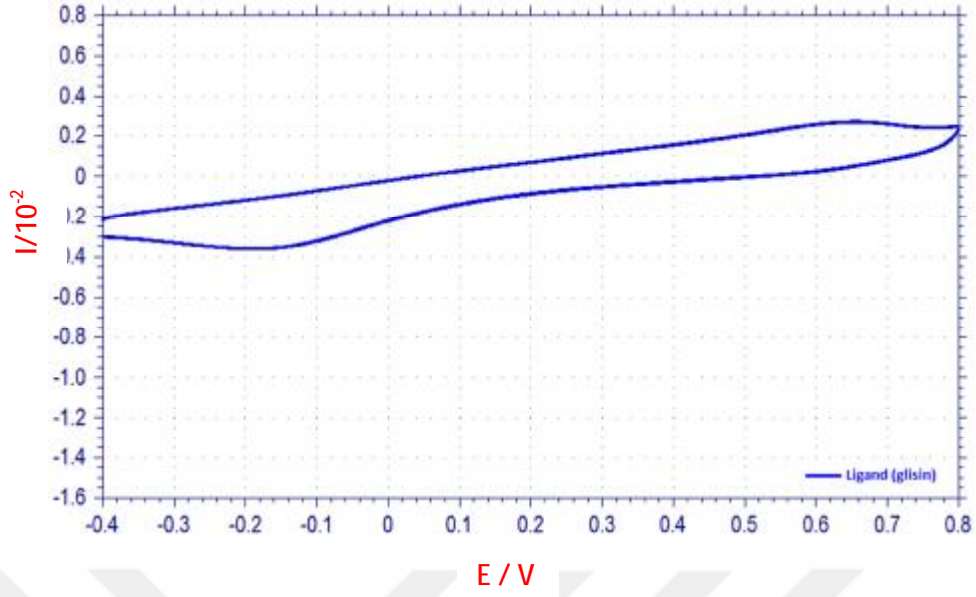
Şekil 292. [Glycine-Fe³⁺] kompleksin FT-IR Spektrumu



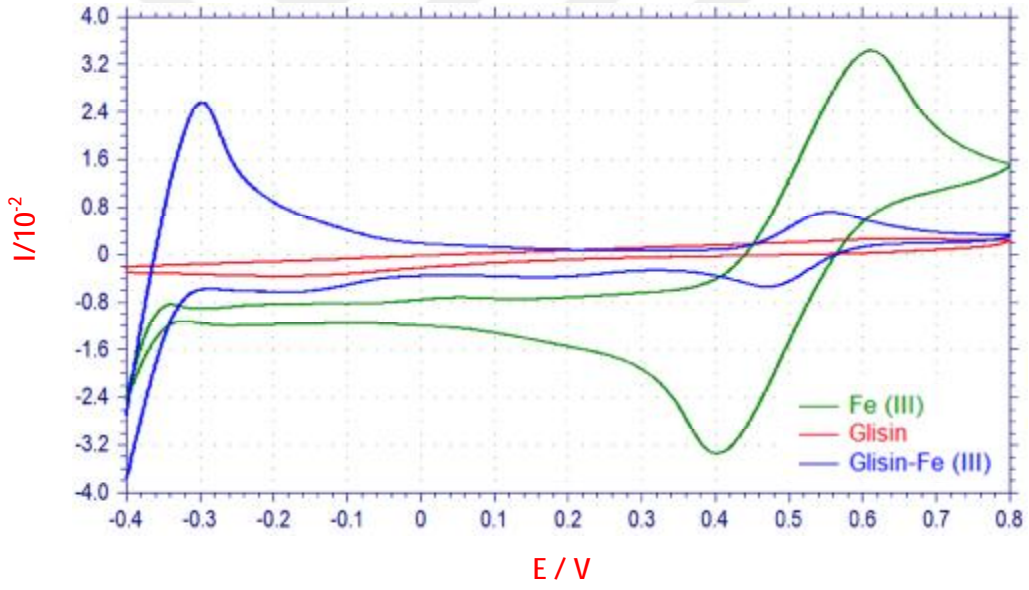
Şekil 293. [Glisin-Fe³⁺] kompleksin optimize edilmiş 3 boyutlu yapısı

4.13.5. Dönüşümlü Voltomogram (Siklik voltametre: CV)

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible (dönüşümlü) olarak saptanmıştı. Elde edilen eğrilerden de görüldüğü gibi yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin ligand ve Fe(III)' den farklı 0,55 V ve -0,29 V'ta oksidasyon pik potansiyelleri görülmüştür. Aynı şekilde kompleksin ligand ve Fe(III) 'den farklı olarak 0,47 V civarında redüksiyon piki gözlemlendi. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Voltomogramda kompleks için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligant hem de metal kompleksin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü bir olaydır.



Şekil 294. Glisin ligandın dönüşümlü voltomogram sonucu



Şekil 295. Glisin, Fe (III), [Glisin-Fe³⁺] kompleksinin dönüşümlü voltomogram sonucu

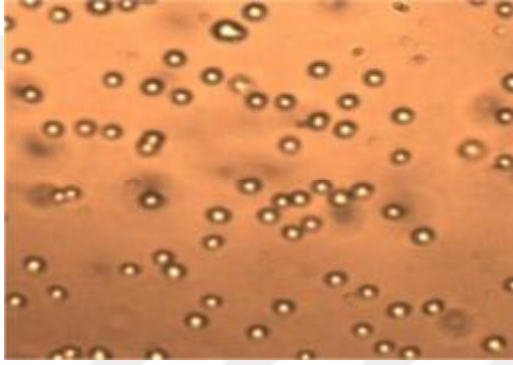
4.13.6. Hücre Kültürü ve Sitotoksosite

[Glisin-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksosite çalışmasında 1. derişimde kontrole göre anlamlı fark görüldü. Doz düşürüldüğünde etkilenen hücre oranının yani sitotoksitenin azaldığı fakat değerlerin yüksek olduğu gözlemlendi. (Çizelge.18). DMSO ile

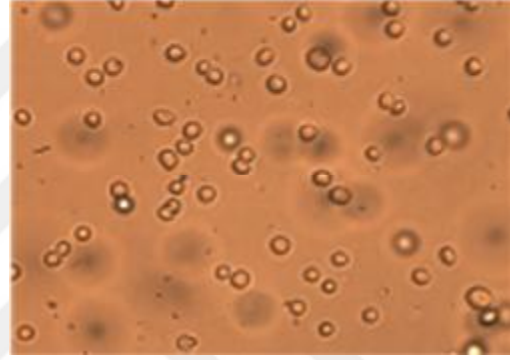
kompleksin 12,5, 25, 50 ve 100 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir (p>0.05).

Çizelge 18. Kompleksin farklı derişimlerde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	Kontrol (DMSO)	Hücre Mediumu	1.Doç (200 µM)	2.Doç (100 µM)	3.Doç (50µM)	4.Doç (25 µM)	5.Doç (12.5 µM)
Elisa Sonuçları	1,172	1,063	0,585	0,643	0,753	0,802	0,876
% Sitotoksite		9,30	50,08	45,13	35,75	31,56	25,25



Şekil 296. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X10



Şekil 296. 12'lik plağa metal kompleks eklenmeden inkübasyon öncesi mikroskopik görüntüsü (hücreler tutunmadan önce) X20

Şekil 296'da de 12'lik plağa her kuyucuga 10^4 hücre olacak şekilde HUVEC hücre serilerinden oluşan hücre süspansiyonunun görüntüsü mevcuttur. Bu aşamadan sonra kontrol olarak DMSO ve 5 farklı dozda kompleks eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

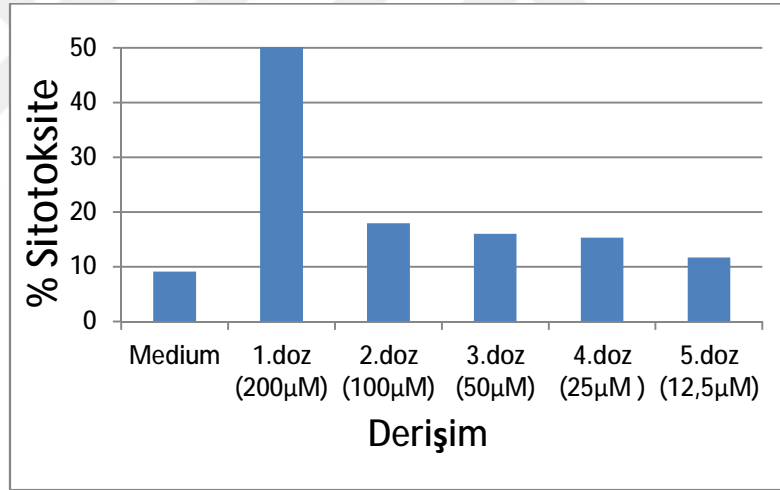


Şekil 297. 1.Derişim (200 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X



Şekil 298. 2. Derişim (12,5 µM) sonrası mikrosobik görüntü 40X

200 µM kompleks eklendikten 48 saat sonraki hücre proliferasyonunun (Şekil 298) 12,5 µM kompleks eklenen gruba (Şekil 289) göre daha az olduğu ve diğer uygulanan derişimlerde 48 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından çok büyük fark yoktur. En fazla hücre proliferasyonu 5. dozda (12,5 µM) tespit edilmiştir.



Şekil 299. [Glisin-Fe³⁺]'ün HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin grafik ile gösterimi

Şekil 300'de kompleksin HUVEC hücreleri üzerine doza bağımlı sitotoksik etkisi görülmektedir. 1. dozda sitotoksik etki % 50' nin üzerinde iken 2. 3. 4. ve 5. dozda daha düşük değerler görülmektedir. Sitotoksiste değişen derişimlerde paralel bir etki göstermektedir.

5.14. Erime Noktası, Renk, Verim Bulgularının Değerlendirilmesi

Sentezlenen antimonoklorogliksim ligandı ve komplekslerinin erime noktaları DSC analizleri sonucunda belirlenmiştir. Elde edilen maddelerin renkleri, erime

sıcaklıkları ve % verimleri çizelge 19’de verilmiştir. Komplekslerin erime sıcaklıkları ligandların erime sıcaklığından daha yüksek çıkmıştır. Komplekslerin renkleri ligandlardan farklıdır.

Komplekslerin çözünürlüğü önemli bir konu olup karakterizasyonunda organik çözücülerde çözünmesi gerekmektedir. Çünkü bu maddelerin UV-görünür bölge gibi cihazlarda analiz edilebilmesi için çözünmesi gerekmektedir. Elde edilen komplekslere çözünürlük testleri uygulandığında etanol, metanol, aseton iyi çözüldüğü gözlenmiştir.

Çizelge 19. Ligand ve komplekslerinin fiziksel özellikleri

Kompleks	Renk	% Verim	Erime noktaları (°C)
<i>Anti-MCG</i>	Sarı	99	151.99
[AMCG - Fe ³⁺]	Açık kahverengi	84.0	258
DMG	Beyaz	98	240-241
[DMG- Fe ³⁺]	Siyah	80	>300
[4,5Db-1,3-disülfonik- Fe ³⁺]	Kahverengi	92	>220
[Oksalat-Fe ³⁺]	Turuncu	74	100
[2,6piridindikarboksilikasit- Fe ³⁺]	Açık yeşil	66	225
[8-HQ-5-SA- Fe ³⁺]	Koyu yeşil	91,3	318
[Salisilik asit- Fe ³⁺]	Koyu kahverengi	91,26	190
[NTA-Fe ³⁺]	Açık kahverengi	82	230
[Sitrikasit-Fe ³⁺]	Koyu sarı - kahverengi	70.0	220
[Glisin-Fe ³⁺]	Turuncu	68	258
[ACAC- Fe ³⁺]	Kırmızımsı	88,72	180
[3MACAC- Fe ³⁺]	kırmızı-kahverengi	90	190
[3BACAC- Fe ³⁺]	Kahverengi	82	200

4.15. Elementel Analiz Bulgularının Değerlendirilmesi

Elementel analiz bir maddenin yapısı hakkında çok önemli bilgiler sunar. Sentezlenen ligand ve metal komplekslerinin elementel analizleri yapılmış ve

hesaplanan C,H,N miktarlarının cihazın ölçtüğü değerlerle uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir. Buna göre ligand ve metal kompleksleri hedeflenen şekilde sentezlenmiştir.

Komplekslerinin elementel analiz sonuçları, metallerin koordinasyon sayısı dolayısıyla geometrisi hakkında bilgi verir. Elementel analiz, FT-IR, manyetik süseptibilite, UV-görünür bölge verilerinden yola çıkarak tez kapsamındaki demir komplekslerinin oktahedral düzlem geometriye sahip olduğu belirlenmiştir. Çizelge.20' de Elementel Analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 20. Elementel Analiz Sonuçları

Bileşik	Molekül formülü	M.A., g/mol	Bileşimi (bulunan/hesaplanan), %		
			C	N	H
[AMCG]	[C ₂ H ₃ ClN ₂ O ₂]	122.51	19.75/19.61	21.05/22.87	2.88/2.47
[AMCG - Fe ³⁺]	[C ₉ H ₁₂ C ₁₃ N ₆ O ₆ Fe]	462,43	23.78/23.12	18.02/18.17	2.51/2.62
DMG	[C ₄ H ₈ O ₂ N ₂]	116.12	41.37	24.12	6.94
[DMG- Fe ³⁺]	[C ₁₂ H ₂₁ N ₆ O ₆ Fe]	401.18	35.75/34.93	20.52/21.05	4.91/5.12
[4,5Db-1,3-disülfonik-Fe ³⁺]	[C ₁₈ H ₁₂ O ₂₄ S ₆ Fe]	860.51	25,05/25.43	22.02/22.54	1.12/1.41
[OKSALAT-Fe ³⁺]	[C ₆ O ₁₂ Fe]	319.90	22.53/22.75	-	-
[2,6piridindikarboksilik asit-Fe ³⁺]	[C ₁₄ H ₆ N ₂ O ₈ Fe]	386.05	43.12/44.10	5.52/6.69	1.39/1.12
[8-HQ-5-SA- Fe ³⁺]	[C ₂₇ H ₁₈ N ₃ O ₁₂ S ₃ Fe]	728,48	28.46/29.59	6.17/6.47	2.13/2.49
[Salisilik asit- Fe ³⁺]	[C ₉ H ₁₂ C ₁₃ N ₆ O ₆ Fe]	464,16	53,98/54.34	-	2.51/2.61
[NTA-Fe ³⁺]	[C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₁₂ Fe]	432,07	41,12/41,22	11,74/11,82	2.73/2.69
[Sitrikasit-Fe ³⁺]	[C ₁₂ H ₁₀ O ₁₄ Fe]	434,04	33.06/34.11	-	2.19/2.32
[Glisin-Fe ³⁺]	[C ₆ H ₁₂ N ₃ O ₆ Fe]	278,02	25.57/25,86	14.32/15.11	4.62/4.35
[ACAC- Fe ³⁺]	[C ₁₅ H ₂₁ O ₆ Fe]	353.17	50.95/51.01	-	5.51/5.99
[3MACAC- Fe ³⁺]	[C ₁₈ H ₂₇ O ₆ Fe]	395.25	54.65/55.24	-	6.51/6.99
[3BACAC- Fe ³⁺]	[C ₂₇ H ₄₅ O ₆ Fe]	521.49	62.02/62.78	-	8.51/9.10

4.16. FT-IR Spektrum Bulgularının Değerlendirilmesi

Sentezlenen ligandlar ve metal komplekslerin IR spektrumu değerlendirilmesi, sonucunda gözlenen pikler önerilen yapıları doğrular niteliktedir ve IR spektrumu değerlendirilerek toplu halde Çizelge 21’de verilmiştir.

1- [AMCG-Fe³⁺], **2-** [DMG-Fe³⁺] **3-** [4,5Db-1,3-disülfonik– Fe³⁺] **4-**[Oksalat-Fe³⁺] **5-** [2,6piridindikarboksilikasit-Fe³⁺] **6-** [8-HQ-5-SA- Fe³⁺] **7-** [Salisilik asit- Fe³⁺] **8-** [NTA-Fe³⁺], **9-** [Sitrikasit-Fe³⁺], **10-**[Glisin-Fe³⁺] **11-**[ACAC- Fe³⁺], **12-** [3MACAC-Fe³⁺], **13-** [3BACAC- Fe³⁺].

Çizelge 21. Sentezlenen bileşiklerin FT-IR spektrum verileri

Fonksiyonel Gruplar (cm ⁻¹)										
	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{S=O})$	$\nu(\text{C-N})$	$\nu(\text{C-H})$	$\nu(\text{N-O})$	$\nu(\text{C=C})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{Fe-N})$	$\nu(\text{Fe-O})$
1	3136	-	-	-	1384-970	-	-	1655-1612	457	-
2	-	-	1437	2926	950-980	-	-	-	462	-
3	3000-3400	1334	-	3081	-	1636	-	-	501	-
4	3438	-	-	-	-	-	1672	-	-	519
5	3000-3400	-	1574	3050-3100	-	-	1702	-	439	526
6	3099	1305	-	3442	968	-	-	1605	951	535
7	3384	-	-	3110	-	-	1604	-	-	586
8	3426	-	-	3040	-	-	1730	-	-	484
9	3397	-	-	-	-	-	1727	-	-	505
10	3406	-	-	2894	-	-	1609	-	-	584
11	3000-3700	-	-	2921	-	1549-1525	1567	-	-	-
12	3200-3700	-	-	2922	-	1620	1709	-	-	-
13	3200-3700	-	-	2965	-	1610	1707	1597	-	-

4.17. UV-vis Spektrum ve Manyetik Süsseptibilite Bulgularının Değerlendirilmesi

Moleküllerin bağ elektronlarının geçişini tayin etmek için kullanılan UV-görünür bölge spektrofotometresinde ölçümler 200-800 nm aralığında yapılmıştır. komplekslerinin elektronik spektrumu ve spektral değerler (Çizelge 22)’de verilmiştir.

Yüksek dalga boyunda gözlenen bandlar metallerin d-d geçişlerinden kaynaklanmaktadır. Kompleksler için pikler ligandlara göre daha büyük dalga boylarında pikler gözlenmiştir. Absorpsiyon piklerinin daha büyük dalga boylarına kayma sebebi demirin bağlanmasıdır. Komplekslere ait olan 273-332 ve 346-356 nm aralıklarındaki bandlar sırayla p-p* ve n-p* geçişlerini göstermektedir. Buna ek olarak, yeni bandlar oluşmuştur. Oluşan bandlar metalden liganda veya ligandan metale yük transfer geçişlerinin olduğunu göstermektedir.

Manyetik moment ölçümleri yapıdaki eşleşmemiş elektron sayısını belirlemek için kullanılmış olup komplekslerin geometrisini tespit etmek için önemli ipuçları verir. Demir kompleksleri için yapılan ölçümlerde manyetik momentlerin 2.24-2.40 BM aralığında değiştiği tespit edilmiştir. UV-görünür bölge ve manyetik moment verileri kullanılarak geometrinin oktahedral olduğu tespit edilmiştir. Çizelge.22' de Uv-Vis sonuçları verilmiştir.

Çizelge 22. Komplekslerin absorpsiyon dalga boyları

Kompleks	λ (nm)	Geçişler	Renk
[AMCG-Fe ³⁺]	230,238,246,271,290,482,652	n-p* p-p* d-d	kahverengi
[DMG- Fe ³⁺]	228, 246,271,283,420,590	n-p* p-p* d-d	Siyah
[4,5Db-1,3-disülfonik- Fe ³⁺]	230, 259,269,296,396,440,462	n-p* p-p* d-d	Kahverengi
[Oksalat-Fe ³⁺]	229, 238, 259, 264,483, 580	n-p* p-p* d-d	Turuncu
[2,6piridindikarboksilikasit-Fe ³⁺]	228,242,272,323	n-p* p-p*	Açık yeşil
[8-HQ-5-SA- Fe ³⁺]	232,259, 292,342,386,438,560	n-p* p-p* d-d	Koyu yeşil
[Salisilik asit- Fe ³⁺]	227,258,270,362,510,620	n-p* p-p* d-d	Koyu kahverengi
[NTA-Fe ³⁺]	244,250,271, 320	n-p* p-p*	Açık kahverengi
[Sitrikasit-Fe ³⁺]	220, 232,260,271,362, 572	n-p* p-p* d-d	Koyu sarı - kahverengi
[Glisin-Fe ³⁺]	229,248,271,302,480	n-p* p-p* d-d	Turuncu
[ACAC- Fe ³⁺]	212,270,352,461,616	n-p* p-p* d-d	Kırmızımsı
[3MACAC- Fe ³⁺]	228,243,268,298,324,495,565	n-p* p-p* d-d	Kırmızı- kahverengi
[3BACAC- Fe ³⁺]	228,242,255,282,336,580	n-p* p-p* d-d	Kahverengi

4.18. Elektrokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi

Kompleksinin elektrokimyasal ölçümü 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Kompleksin CV' si reversible olarak saptanmıştır. Voltametri ile elektrokimyası çalışılan komplekslerin tamamında yükseltgenme ve indirgenme pikleri gözlenmiştir. Eğriler geri dönüşümlüdür.

Elde edilen sonuçlara göre yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edilmiştir. Kompleksin Fe^{3+} den farklı olarak yükseltgenme pik potansiyelleri saptanmıştır. Aynı şekilde indirgenme yönünde ligandan ve Fe^{3+} 'den farklı olarak kompleksler için indirgenme pikleri gözlenmiştir. Bu piklerin kompleksin farklı yükseltgenme basamaklarına indirgenip yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Voltomogramda kompleksler için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligant hem de metal komplekslerinin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca yükseltgenme piklerine karşılık indirgenme pikleri mevcut olduğundan bu olay dönüşümlü (reversible) bir olaydır.

4.19. ICP Sonuçları

Komplekslerin ligandlardan farklı olarak verdiği dalga boyunda farklı derişimlerde hazırlanan standart çözeltiler vasıtasıyla derişime karşı absorbans grafiklerinden zamana karşı bulunan kompleksleşme miktarları ICP analizi ile karşılaştırılmıştır. İki yöntemle bulunan sonuçların birbiriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir. ICP sonuçları çizelge 23' de verilmiştir.

Çizelge 23. ICP sonuçlar

Kompleks	Fe (Derişim ppm)
[AMCG - Fe ³⁺]	15,502
[DMG- Fe ³⁺]	19,020
[4,5Db-1,3-disülfonik- Fe ³⁺]	5,295
[Oksalat-Fe ³⁺]	23,592
[2,6piridindikarboksilikasit-Fe ³⁺]	15,249
[8-HQ-5-SA- Fe ³⁺]	9,602
[Salisilik asit- Fe ³⁺]	6,692
[NTA-Fe ³⁺]	12,250
[Sitrikasit-Fe ³⁺]	13,223
[Glisin-Fe ³⁺]	31,680
[ACAC- Fe ³⁺]	11,532
[3MACAC- Fe ³⁺]	10,976
[3BACAC- Fe ³⁺]	9,867

4.20. Hücre Kültürü sonuçları

Günümüzde özellikle toksisite araştırmaları olmak üzere deneylerde hayvanların kullanımı önemli oranda kısıtlanmıştır. Son yıllarda ilaç geliştirilmesinde ve toksisite araştırmalarında in vivo testlerden önce deney hayvanı sayısını önemli oranda azaltan, hızlı, organ-dokuya özel, ekonomik, güvenilir hücre kültürü gibi in vitro testlerin yapılması gittikçe yaygınlaşmıştır. İlaç geliştirme çalışmalarının prelinik aşamasında ve toksikolojik araştırmalarda hücre kültürü yöntemi ile sitotoksikite çalışmalarını hem hayvan deneylerinin azaltılmasını; hem de sistemlere yönelik özel etkilerin anlaşılmasını sağladığından günümüzde zorunlu hale getirilmiştir. Çalışmamızda MTT testi kullanılarak, HUVEC hücre dizisinde komplekslerin sitotoksikite ve hücre proliferasyon etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Araştırmada kullanılan komplekslerin hemen hemen hepsinde artan doz ile yüzde sitotoksikite cevapları arasında pozitif bir ilişki gözlemlendi. Çalışmamızda kullanılan komplekslerden bir kısmının HUVEC hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ve bu etkiyi de yüksek dozlarda ortaya çıkardığı bazıları arasında herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 24 verilmiştir. Yapılan bu değerlendirmeler doğrultusunda in vitro olarak komplekslerin hemen hemen hepsinde yüksek düzeyde sitotoksikite görülmesi vücutta biriken demiri uzaklaştırmak amacıyla kullanılabilmesi öngörmemize neden olmaktadır. Sitotoksik etkinin derişime paralel bir artış göstermesi ilaç geliştirme aşamasında deneysel hayvan modeli araştırması için ümit verici olarak görölmektedir.

Çizelge 24. Karşılaştırmalı sonuçlar

	SİTOROKSİSİTE					KOMPLEKSLEŞME MİKTARI	SAFSU	PLAZMA
	1.Doç	2. Doç	3.Doç	4.Doç	5.Doç			
[3MACAC- Fe ³⁺]	%54,56	%53,21	%51,33	%50,08	% 48,57	ICP-MS	% 89,42	-
						UV (Std. Grafik)	% 89,972	% 92,66
[AMCG-Fe ³⁺]	%52.09	%50.92	%50.46	%34.50	%29,39	ICP-MS	% 83,99	-
						UV (Std. Grafik)	% 84,44	% 86,3
[3BACAC-Fe ³⁺]	%52.51	%51.25	%26.61	%36.78	%38.21	ICP-MS	% 91,24	-
						UV (Std. Grafik)	% 91,754	%93,42
[DMG- Fe ³⁺]	%50.66	%50.08	%46.65	%36.53	%34,54	ICP-MS	% 79,97	-
						UV (Std. Grafik)	%80,42	%84,5
[ACAC- Fe ³⁺]	%50.35	%48.66	%39.21	%28.96	%28.60	ICP-MS	% 88,032	-
						UV (Std. Grafik)	%88.12	%89.46
[4,5Db-1,3- disülfonik- Fe ³⁺]	%53.07	%26.28	%25.28	%23.62	%23.46	ICP-MS	% 94,21	-
						UV (Std. Grafik)	% 94,64	% 97,44
[8-HQ-5-SA- Fe ³⁺]	%50.92	%51.41	%42.84	%24.79	%26.62	ICP-MS	% 90,396	-
						UV (Std. Grafik)	% 90,38	% 92,6
[NTA-Fe ³⁺]	%42.56	%19.85	%30.63	%21.40	%20.42	ICP-MS	% 87,788	-
						UV (Std. Grafik)	% 87,7	% 89,9
[Glisin-Fe ³⁺]	%50.08	%45.13	%35.75	%31.56	%25.25	ICP-MS	% 68,204	-
						UV (Std. Grafik)	% 68,2	% 69,66
[Oksalat-Fe ³⁺]	%19.13	%21.75	%23.46	%24	%24.29	ICP-MS	% 76,172	-
						UV (Std. Grafik)	% 76,36	%76,64
[Salisilik asit- Fe ³⁺]	%38.21	%21.56	%17.98	%16.98	%16.40	ICP-MS	% 93,85	-
						UV (Std. Grafik)	% 93,2	% 95,2
[Sitrikasit-Fe ³⁺]	%50.29	%14.92	%15.97	%15.30	%11.66	ICP-MS	% 86,92	-
						UV (Std. Grafik)	% 86,5	% 87,36
[2,6 P.D.K.A.- Fe ³⁺]	%10.90	%9.36	%3.24	%8.26	0	ICP-MS	% 83,95	-
						UV (Std. Grafik)	% 84,74	% 87,96

5. TARTIŞMA

Vücutta birçok yapısal ve işlevsel bileşenlerin ayrılmaz bir parçası olan metallerin fizyolojik, patolojik ve biyokimyasal süreçlerde ki kritik rolleri her zaman araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Bu metallerden en önemlisi olan Demir hemen hemen tüm organizmalar için hayatsal öneme sahip bir elementtir. Demir yaşamımız için vazgeçilmez olmasına rağmen, hem aşırı derişimi hem de reaktif oksijen türleri oluşturma yetenekleri ve insanlarda demir atılımını düzenleyici mekanizmalarının bozukluğu onu son derece zararlı hale getirmektedir. Özellikle organlarda birikmesi, vücut için güvenli olan depo seviyesini aştığında, potansiyel olarak durumun ciddiyeti, maruz kalınan demirin fazlalığına bağlı olup, özellikle karaciğer, pankreas ve kalp gibi hedef organlarda ölümcül doku hasarı meydana getirmektedir. Bu ölümcül hasarın engellenmesinde bugün için tek tedavi yöntemi, dokuda biriken aşırı derişimdeki demire özgü ligandlarla şelasyon yapılarak, organizmadan demirin uzaklaştırılmasıdır. Bu tedavinin amacı, organizmada serbest halde bulunan demirin kompleksleşmesini sağlayarak, demir birikiminin toksik etkisinin olmadığı güvenli seviyelerde sürdürmek ve bu amaca ulaşıncaya kadar aşırı demiri detoksifiye ederek, organizmayı demir toksisitesine karşı korumaktır.

Günümüzde bu amaç için kullanılan ilaç, ağızdan alındığında inaktif oluşuyla büyük bir dezavantajı olan, doğal bir siderofor olan desferrioksamin-B' dir. Aynı zamanda DFO' in plazma yarı ömrünün kısa olması, uzun süre infüzyon gerektirmesi, pahalı olması ve yüksek derişimlerde toksik etki göstermesi gibi önemli kısıtlamaları söz konusudur. Hem bu kısıtlamalar hem de yetersiz demir şelasyonu ile birlikte organ hasarların kaçınılmaz oluşu ve demir şelasyonuna uyumun optimum olacağı etkin demir şelatörlerin geliştirilmesi yönündeki ilgiyi ve çabayı hep yüksek tutmuştur. Çok sayıda oral aktif şelatlayıcı grupları çalışılmış olmasına rağmen şelatlayıcılar, hala tatmin edici düzeylerde değildir. Bu sebeple demir şelatlanması ve daha etkin demir şelatörlerin geliştirilmesi, son yıllarda üzerinde yoğun olarak çalışılan konulardan biri haline gelmiştir.

Vücutta aşırı biriken demiri uzaklaştırmak amacıyla Fe(III) iyonu ile bileşik oluşturabilecek ligantların sentezi\kompleksleşme derecesini ve insan plazmasından demirin uzaklaştırılmasında etkinliğinin belirlenmesi tedavi sürecinde klinikte

kullanılabilme potansiyeli olan uygulamaların ilk basamağı niteliğindedir. Bu çalışma da ilk olarak asetilasetonun iki karbonil bileşiği arasında bulunan karbon atomu üzerindeki aktif hidrojen ile alkil gruplarının yer değiştirmesi sonucu farklı uzunluktaki zincir sayısına sahip asetilaseton türevleri olan 3-metil-2,4-pentandion ve 3-butil-2,4-pentandion sentezlendi ve ligand olarak kullanıldı. Ayrıca bu çalışmada oksim bileşiği olan dimetilgliksim ve kloralhidrat, hidroksilamin hidroklorür çıkış bileşiği olarak kullanılarak *anti*-monoklorogliksim ligandları sentezlendi. Aynı zamanda 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit, 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit, Piridin 2,6-Dikarboksilik, Nitrotriasetik asit, Sitrik asit, Oksalat, Glisin, Salisilik asit'in bir şelatör olarak kullanılıp kullanılmayacağı hakkında ilk basamak araştırması yapıldı. Bütün kompleksler hem safsu hemde plazmada incelendi. Komplekslerin yapıları, FT-IR, manyetik susseptibilite, elementel analiz ve UV-Vis gibi spektroskopik metodlar ile aydınlatıldı. Kompleksleşme derecesi hem saf suda hem plazmada ICP-MS ve UV-Vis gibi farklı yöntemlerle belirlendi. Komplekslerin ve ligandların elektrokimyasal davranışları Siklik Voltametre ile incelendi. Çalışmalarda platin disk elektrot, platin karşıt (counter) elektrot ve Ag-AgCl referans elektrot kullanıldı. Daha sonra hücre kültürü yöntemi ile sentezlenen komplekslerin in vitro sitotoksik etkisi belirlenmeye çalışıldı. Özellikle ilaç geliştirme çalışmalarının prelinik aşamasında ve toksikolojik araştırmalarda hücre kültürü yöntemi ile sitotoksisite çalışmaları, hem hayvan deneylerinin azaltılmasını hem de sistemlere yönelik özel etkilerin anlaşılmasını sağladığından, günümüzde zorunlu hale geldiğini düşünmekteyiz. Biz çalışmamızda sitotoksisite deneylerini MTT test yöntemi ile değerlendirdik. Çalışmamızda öncelikle mL'de 10^4 HUVEC hücresi olacak şekilde, 12 kuyucuklu plakta 7 kuyucuga ekim yapıldı. Yirmi dört saat sonunda her bir kompleksi seri dilüsyonla sulandırarak 4 farklı derişim elde edildi. Kontrol olarak DMSO kuyucuga yerleştirildikten sonra, kırk sekiz saat sonra komplekslerle ile inkübe edilen hücrelerde sitotoksisite oranları tespit edildi.

Çalışmamızda β -diketonlar sınıfına ait olan ACAC, 3MACAC, 3BACAC ligand olarak kullanıldı. β -diketonlar, ilginç kimyasal ve fiziksel özellikleri ile ünlü keto-enol tautomerizmi olan üstün optik, elektriksel ve manyetik özelliklere sahip yüksek işlevli bileşiklerin bir sınıfıdır. Bu sınıfın üyeleri, çoklu metal katyonları (alkali ve geçiş metalleri) ile güçlü bağlanmış kompleksler oluşturmaktadır. β -diketon ligandlarının farklı elementlerle olan komplekslerinin uzun dayanma ömrü olduğundan dolayı da

oldukça ilgi çekmektedir. Bu çalışma da ilk olarak asetilaseton üzerinde bulunan iki karbonil bileşiği arasındaki karbon atomu üzerindeki aktif hidrojen ile alkil gruplarının yer değiştirmesi ile farklı uzunluktaki zincir sayısına sahip asetilaseton türevleri olan 3-metil-2,4-pentandion ve 3-butil-2,4-pentandion başarılı bir şekilde sentezlendi ve ligand olarak kullanıldı. Demir fazlalığı oluşan durumlarda bu durumu hafifletmek için bu ligandların bir şelatör olarak kullanılıp kullanılmayacağı ve özellikle asetilaseton üzerinden yağda çözünen grubun (alkil) grubunun hem saf su hemde plazmada şelasyona etkisinin nasıl olacağı literatürde ilk defa incelendi. Alkil grubu uzadıkça demir ile kompleksleşme miktarının arttığı tespit edildi. Demir ile dayanıklı, renkli olarak elde edilebilen nötral (yüksüz) kompleksler meydana getirdi. Yüklü olmayan kompleksler, genellikle biyolojik membranlara yüklü olanlardan daha hızlı nüfuz eder. Bu durumda diğer kullanılan şelatörlere göre büyük bir avantajdır. Bu çalışma için seçtiğimiz β -diketonlar sınıfına ait üç ligandın günümüzde kullanılmakta olan Deferipron, Deferasiroks, Desferoksamine göre nispeten moleküler ağırlıklarının küçük olması nedeniyle gastrointestinal yol içinde daha iyi emileceği öngörülmektedir. Bu durum hücreye nüfuz etmesini ve demir mobilizasyonunu da desteklemektedir. Aynı zamanda, büyük moleküler ağırlıklı şelatörler, tıbbi personel müdahalesi gerektiren parental uygulama yöntemi ile uygulandıkları için tercih edilmeme dezavantajına sahiptir. Bu nedenle küçük moleküler ağırlığa sahip olmak, terapötik açıdan daha uygundur. Bir demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlamak için 2 tane ACAC, 3MACAC, 3BACAC molekülü gerektirir. Bu yüzden ligandlarımız 2 dişli demir şelatörleridir. Yapılan kompleksleştirme çalışmalarında Fe^{3+} 'e afinitesi yüksek olduğu özellikle saf suya oranla plazmada daha fazla kompleksleşme etkisi gösterdiği tespit edildi. Plazmada daha fazla kompleksleşme de bir avantajdır. Ayrıca seçtiğimiz ligandlar üzerinde bulunan iki oksijen atomu ile bağ oluşturarak, şelatör grup içerisinde Desferrioksamine'ne göre etkinliği fazla olmaktadır. Diğer taraftanda küçük molekül ağırlığından dolayı da hücre zarının içerisine kolaylıkla girebileceği öngörülmektedir. Aynı zamanda kullandığımız demir bağlayıcı ligandların fazla pahalı olmaması da avantaj teşkil etmektedir^{17,103,127,176,177,178,179,180,181,182}. Ayrıca HUVEC hücre dizisinde [ACAC- Fe^{3+}], [3MACAC- Fe^{3+}], [3BACAC- Fe^{3+}] komplekslerinin sitotoksitesini ilk kez teyit ederek, bu etkiyi de yüksek dozlarda ortaya çıkardıkları ve daha düşük dozlarda sitotoksik etki göstermedikleri hatta hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit

edilmiştir belirledik. Bu yüzden hayvan modeli araştırması için ümit verici olarak görülmektedir. Ayrıca, ligandlarımızın β -diketon sınıfına dahil olmasından dolayı antioksidan etkiye sahip olabileceği, bu etkinin sonucu olarak, lipid peroksidasyonunu ve oksidatif DNA hasarını inhibe edeceği, lipoksijenaz ve siklooksijenaz inhibisyonu sonucunda araşidonik asit salınımı azaltacağı düşünülmektedir. Bu yönden de piyasada kullanılan diğer şelatörlere göre avantaja sahip olacağı öngörülmektedir. Aynı zamanda *in vivo* deney izlenimleri yapılarak, günümüzde kullanımda olan şelatörlerle kıyaslanıp dokulardaki demir üzerine etkisi örneğin kalp, karaciğer gibi organlarda nasıl sonuçlar verdiği karşılaştırılmalıdır. Ayrıca Fe^{3+} ile yapılan kompleksleştirme çalışmalarında üç ligandımızda Fe^{+3} 'e afinitesi yüksek olduğu özellikle saf suya oranla plazmada daha fazla kompleksleşme etkisi gösterdiği tespit edildi. Plazma ile yapılan deneylerde farklılığın olması çözünmüş çok sayıda organik ve inorganik maddelerden kaynaklandığı öngörülmektedir. Bir şelatör için ligandımızın demir iyonuna ilgisi beklenen düzeyde olması umut vericidir.

Oksimler ve metal kompleksleri, tıp alanında ve biyoorganik sistemlerde, katalizlerde, geniş fizikokimyasal, reaktivite özellikleri açısından büyük ilgi gören yapılardır. Yapılarında karbon-azot çifte bağı taşırlar, bunun yanında antioksidan ve radikal süpürücü olarak davranan oksimler, özellikle ilaç sanayinin temel bileşiklerindedir. Oksimlerden elde edilen kompleksler ilginç yapıları ve sahip oldukları özellikler nedeniyle büyük önem taşımaktadırlar. Bu özelliklerinin yanında oldukça toksik organofosfor bileşiklerine maruz kalmış dokuların tedavisinde oksimlerin bilinen en iyi reaktiflerden olduğu rapor edilmesi bu çalışmada ligand olarak seçmemize neden oldu. Bu çalışmada dimetilglioksim ve kloralhidrat, hidroksilamin hidroklorür çıkış bileşiği olarak kullanılarak *anti-monokloroglioksim* ve dimetilglioksim ligandları sentezlendi. Fe^{3+} ile kompleksleşme kapasitesi incelenerek ilk defa şelatlama amacıyla kullanılıp kullanılmayacağını belirlemek amacıyla araştırıldı. Üzerinde azot karbon çift bağlarına sahip olmasından dolayı Deferipron, Deferasiroks, Desferoksamin ile karşılaştırıldığında, daha kararlı ve hidrolize karşı daha dirençlidirler. Aynı zamanda elde edilen komplekslerin ilginç bir özelliği de altı azot atomu ile demir arasında bağ oluşurken, moleküller arasında hidrojen köprüleri oluşmaktadır. Bu kompleksin daha kararlı olmasını ve suda çözünmeyi engelleyen bir durumdur. Bu yüzden günümüzde kullanılan şelatörlere göre daha verimli ve su

hapsetme yeteneği olan ligandlardır. Bir demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlamak için 3 tane AMCG, DMG molekülü gerekir. Bu yüzden ligandlarımız 2 dişli demir şelatörleridir. Molekül ağırlıklarının küçük olması nedeniyle ağızdan alınmasının daha kolay olması öngörülmektedir^{134,157,181,182,183,184,185,186,187,188}. HUVEC hücre dizisinde [AMCG-Fe³⁺], [DMG-Fe³⁺] komplekslerinin sitotoksitesini ilk kez teyit edildi. Komplekslerin 12,5 ve 25 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir. Yapılan kompleksleştirme çalışmalarında iki ligandımızda Fe³⁺'e afinitesi yüksek olduğu özellikle saf suya oranla plazmada daha fazla kompleksleşme etkisi gösterdiği tespit edildi. Bir şelatör için ligandımızın demir iyonuna ilgisi beklenen düzeydedir.

8-Hidroksikinolinler (8HQ) lipofilik etkili ve son derece kararlı kompleksler oluşturabilen ve organik çözücüler içerisinde kolaylıkla çözünebilen iyi bilinen şelatlama ajanlarıdır. 8HQ ve türevleri antinörodejeneratif, antioksidan, antimikrobiyal, anti-inflamatuar ve antidiyabetik aktiviteler gibi tıbbi özelliklere sahiptir. Bunun yanısıra aynı zamanda 8HQ ve 5-sülfonik asit türevinin kanserojen olmadığı bulundu ve genetik toksisite kadar in vitro deneylerde de kullanılmaktadır. Bu çalışmada bütün bu özellikleri göz önünde bulundurarak ideal bir demir şelatörü olabileceğini düşündüğümüz, bir hidroksikinolin türevi olan 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asiti ligand olarak kullanıp insan plazmasından demir metalinin giderilmesinde etkinliğinin belirlenmesi amacıyla ilk defa araştırıldı. Liganddaki halka azotu ile hidroksil grubunu yeri arasındaki özel ilişki nedeniyle ayrıcalıklar gösterir. Bu bağıntı nedeniyle 8-Hidroksikinolin demir(III) ile çözünmez olan şelat bileşimini oluşturur. Bir demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlamak için 3 tane 8-HQ-5-SA molekülü gerekir. Bu yüzden ligandımız 2 dişli demir şelatörüdür. Demir ile nötral (yüksüz) kompleks meydana getirmektedir. Hücreye nüfuz etmesi ve demir mobilizasyonunu (uzaklaştırma) desteklemektedir^{17,103,179,182,189,190,191,192,193,194}. Yapılan kompleksleştirme çalışmalarında Fe³⁺'e afinitesinin çok yüksek olduğu özellikle saf suya oranla plazmada daha fazla kompleksleşme etkisi gösterdiği tespit edildi. [8-HQ-5-SA-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksisite çalışmasında 1. ve 2. derişimlerde kontrole göre anlamlı fark görüldü (sırasıyla % 50,92, % 51,41). Fakat doz düşürüldüğünde etkilenen hücre oranının yani sitotoksitenin azaldığı ama değerlerin büyük olduğu gözlendi. Kompleksin 12,5, 25 ve 50 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye

sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmesi hayvan modeli araştırması için ümit verici olarak görülmektedir.

4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit, reaktif oksijen türleri (ROS) ile uyarılmış hücre ölümünden hücreyi kurtarmak için yaygın olarak kullanılan bir antioksidan olmasından dolayı demir fazlalığı oluşan durumlarda bu durumu hafifletmek için bir şelatör olarak kullanılıp kullanılmayacağı hakkında ilk basamak araştırması yapılmıştır. Bir demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlamak için 3 tane 4,5db-1,3-disülfonik molekülü gerekir. 2 dişli demir şelatörleridir^{182,195}. Yapılan kompleksleştirme çalışmalarında Fe^{3+} 'e afinitesi en yüksek olduğu özellikle saf suya oranla plazmada daha fazla etkili kompleksleşme etki gösteren kompleks olduğu tespit edildi. Ayrıca plazmada daha fazla kompleksleşme göstermesi avantajdır. Bir şelatör için ligandımızın demir iyonuna ilgisi beklenen düzeydedir. [4,5Db-1,3-disülfonik- Fe^{3+}] kompleksi için yapılan sitotoksikite çalışmasında kompleksin 12,5, 25, 50 ve 100 μM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilememesinden dolayı hayvan modeli araştırması için ümit verici olarak görülmektedir.

Piridin 2,6-Dikarboksilik asit genel olarak proton transfer sistemlerinde asit olarak kullanılmaktadır. Piridin dikarboksilik asitler, yapısında bulundurduğu iki karboksilik asit grubundaki dört oksijen ve piridin halkasında bulunan elektron verici azot atomu bulunduran organik asitlerdir. Piridin'in yapısı benzen molekülüne benzer. Yalnızca benzendeki bir =CH- grubu =N- grubu ile yer değiştirmiştir. Pirimidin türevleri gibi piridin türevleri de biyolojik ve farmasötik öneme sahip bileşiklerin yapılarında bulunmaktadır. Piridin dikarboksilik asitler insan organizması için yararlı bileşiklerdir ve vücutta gerekli olan bazı biyokimyasal oluşumlarda rol alırlar. Örneğin 3-piridinekarboksilik asit ligandı organizmada nikotinamid adenin dinükleotide dönüşerek iki-elektron transferine yardım eder. Piridin 2,6-Dikarboksilik asitin metal kompleksleri biyolojik olarak ilginç özelliklere sahiptirler. Metal komplekslerine olan ilgi çeşitli koordinasyon modları ile farklı yapısal özelliklere sahip olmalarından, orijinal yükseltgenme basamaklarının kararlılığından ve insülin mimetik etkilerinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada demir(III) ile kompleksleşme kapasitesi incelenerek şelatlama amacıyla kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı. Bir demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlamak için 2 tane piridin-2,6-dikarboksilik asit molekülü

gerekir. 3 dişli demir şelatörleridir. İki tane piridin-2,6-dikarboksilik asit ligandı bir azot ve iki oksijen atomu üzerinden merkez demir atomuna bağlanarak anyonik bir kompleks meydana getirir. Fe^{3+} metal iyonu ekvatorial düzlemde iki tane piridin-2,6-dikarboksilik asit ligandının oksijen atomları ve eksen boyunda da azot atomları üzerinden koordine olmuştur^{103,179,182,196,197,198,199,200}.HUVEC hücre dizisinde [2,6piridindikarboksilikasit- Fe^{3+}] sitotoksite çalışmalarında kompleksin hiçbir dozda sitotoksik etki göstermediğini ve hatta hücre proliferasyonunu iyileştirdiğini belirledik. hayvan modeli araştırması için ümit verici olarak görülmektedir. Yapılan kompleksleştirme çalışmalarında Fe^{3+} 'e afinitesi en yüksek olduğu özellikle saf suya oranla plazmada daha fazla etkili kompleksleşme etki gösteren kompleks olduğu tespit edildi.

Nitriлотriasetik asit (NTA) bir veya daha fazla azot atomuna bağlı birkaç karboksilat grubu içeren amino polikarboksilik asitler adı verilen geniş aileye aittir. Bu amino polikarboksilik birçok metal ile çok kararlı suda çözünür kompleksler oluşturabilme özelliğine sahip olmasından dolayı seçilmiştir. Bir demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlamak için 2 tane NTA molekülü gerekir. 3 dişli demir şelatörleridir. NTA demir ile kompleks oluştururken karboksil oksijeniyle fazladan bağ oluşturur. Bu metal-şelat kompleksinin daha güçlü olmasını sağlarken protein alıkonulmasını zayıflatır. Nispeten moleküler ağırlıklarının küçük olması nedeniyle gastrointestinal yol içinde daha iyi emileceği öngörülmektedir. Bu durum hücreye nüfuz etmesi ve demir mobilizasyonunu durumunu da desteklemektedir^{179,182,201,202,203}. Yapılan kompleksleştirme çalışmalarında Fe^{3+} 'e afinitesi yüksek olduğu özellikle saf suya oranla plazmada daha fazla kompleksleşme etkisi gösterdiği tespit edildi. Plazmada daha fazla kompleksleşme göstermesi avantajdır. Komplekslerin *in vivo* deney izlenimleri yapılarak günümüzde kullanımda olan şelatörlerle karşılaştırılmalıdır. [NTA- Fe^{3+}] kompleksi için yapılan sitotoksisite çalışmasında kompleksin 12,5, 25, 50 ve 100 μ M lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir. Hayvan modeli araştırması için ümit verici olarak görülmektedir

Sitrik asit doğada her yerde bulunan ve önemli biyolojik işlevlere sahip bir bileşiktir. *In vitro* düşük molekül ağırlıklı ligandlarla demirin baskın komplekslerinin araştırılması, bu eser elementin metabolizmasının güncel anlayışını geliştirmek için önemlidir. Bu yüzden sitrik asitin demir ile kompleksleşme derecesi incelenmiştir. Bu

çalışma için seçtiğimiz sitrik asit ligandı günümüzde kullanılmakta olan Deferipron, Deferasiroks, Desferoksamine göre nispeten moleküler ağırlıklarının küçük olması nedeniyle gastrointestinal yol içinde daha iyi emileceği öngörülmektedir. Bu durum hücreye nüfuz etmesi ve demir mobilizasyonunu durumunu da desteklemektedir. Bir demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlamak için 2 tane sitrik asit molekülü gerekir. 3 dişli şelatördür. Ayrıca günümüzde kullanılan diğer şelatörlere göre ticari olarak ucuzdur^{157,179,184,204,205}. HUVEC hücre dizisinde [Sitrik asit-Fe³⁺] sitotoksitesini ilk kez teyit ederek sitotoksik etki gösterdiği saptandı. Bu yüzden demir fazlalığı oluşan durumlarda bu durumu hafifletmek için bir şelatör kullanılmak üzere in vivo çalışmalarda değerlendirilmesini öngörmekteyiz. Yapılan kompleksleştirme çalışmalarında Fe³⁺'e afinitesi en yüksek olduğu özellikle saf suya oranla plazmada daha fazla en etkili kompleksleşme etki gösteren kompleks olduğu tespit edildi. Bir şelatör için ligandımızın demir iyonuna ilgisi beklenen düzeydedir. [Sitrik asit-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksikite çalışmasında 1. derişimde kontrole göre anlamlı fark görüldü (% 50,29). Kompleksin 12,5, 25, 50 ve 100 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir. Sitotoksik etki göstermesinden dolayı hayvan modeli araştırması için ümit verici olarak görülmektedir.

Glisinde bu çalışmada ligand olarak kullanılmıştır. Çünkü amino asitler tamamen toksik olmayan bir organik bileşik sınıfı oluştururlar. Amino asitler gibi kompleks oluşturan maddeler için demir (III) gibi ağır metallerin giderilmesinde kullanılması araştırılmalıdır. Çünkü glisinin diğer yüksek moleküllü şelatlarla göre daha düşük molekül kütlesi olması belki de onun daha iyi asimile olması ve vücuttaki metabolik süreçlerin düzgün bir şekilde çalışmasını sağlayacaktır. Bu görevi, en basit alfa-amino asit olan glisin ile başlattık. Glisin iki kutuplu gruba, yani bir amino grubu ve bir karboksil grubuna sahiptir. Karboksil grubunun azot atomu ve oksijen atomu vasıtasıyla metallerle koordine edebilir. Bir demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlamak için 3 tane glisin molekülü gerekir. 2 dişli demir şelatörleridir. Demir-glisin kompleksinin kimyasal/ fiziksel özellikleri, örneğin düşük moleküler ağırlık ve elektrik yükünün olmamasının, bağırsak villusundan emilim için pozitif bir element oluşturduğu öngörülebilir. Bu duruma göre kompleks ağızdan uygulanabilir. Diğer taraftanda küçük molekül ağırlığından dolayı da hücre zarının içerisine kolaylıkla

girebilir^{179,182,206,207,208,209}. Yapılan kompleksleştirme çalışmalarında Fe³⁺'e afinitesi yüksek olduğu özellikle saf suya oranla plazmada daha fazla kompleksleşme etkisi gösterdiği tespit edildi. Bir şelatör için ligandımızın demir iyonuna ilgisi beklenen düzeydedir. İlk kez HUVEC hücre dizisinde saptanmaya çalışılan [Glisin-Fe³⁺] kompleksinin sitotoksik etkiyi yüksek dozlarda ortaya çıkardığını gösterdik. Bu yüzden hayvan modeli araştırması için ümit verici olarak görülmektedir. Komplekslerin *invivo* deney izlenimleri yapılarak günümüzde kullanımda olan şelatörlerle karşılaştırılmalıdır. [Glisin-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksikite çalışmasında 1. derişimde kontrole göre anlamlı fark görüldü (% 50,08). Doz düşürüldüğünde etkilenen hücre oranının yani sitotoksitenin azaldığı fakat değerlerin yüksek olduğu gözlemlendi. Kompleksin 12,5, 25, 50 ve 100 µM lık derişim aralığında HUVEC üzerine sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir. Bu yüzden hayvan modeli araştırması için ümit verici olarak görülmektedir.

Oksalat' da bu çalışmada ligand olarak kullanılmıştır. Oksalat metalik iyonlarla şelatlayıcı bir ligandır. Aynı zamanda oksalat, koordinasyon kimyasında analitik, katalitik ve biyomedikal uygulamalarından dolayı uzun yıllar büyük ilgi görmüştür. Bu çalışmada demir(III) ile kompleksleşme kapasitesi incelenerek şelatlama amacıyla kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı. Bir demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlamak için 3 tane glisin molekülü gerekir. 2 dişli demir şelatörleridir. Ayrıca küçük molekül ağırlığından dolayı da hücre zarının içerisine kolaylıkla girebilir^{179,182,210}. [Oksalat-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksikite çalışmasında 48 saat sonunda farklı derişimlerde kontrole göre anlamlı farklılıklar gözlenmedi. Kontrole göre sitotoksik etkisi en yüksek olan en düşük derişimli (50µM) metal kompleksi olduğu ortaya çıktı. Aynı zamanda doz miktarı azaldıkça sitotoksikite artmaktadır.

Salisilik asit ve türevleri hidroksil, süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleri ile hızla tepkimeye girerek radikal süpürücü olarak görev yapan moleküldür. Salisilik asit klasik bir nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçtır. Demir fazlalığı oluşan durumlarda bu durumu hafifletmek için bir şelatör olarak kullanılıp kullanılmayacağını değerlendirmek amacıyla çalışmaya dahil edildi. Demir ile nötral (yüksüz) kompleksler meydana getirdi. Yüklü olmayan kompleksler genellikle biyolojik membranlara yüklü olanlardan daha hızlı nüfuz eder. Bu durumda diğer kullanılan şelatörlere göre büyük bir avantajdır. Bir demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlamak için 3 tane salisilik

asit molekülü gerekir. Günümüzde kullanılan diğer şelatörlere göre ticari olarak ucuzdur^{179,182,211,212}. HUVEC hücre dizisinde [salisilik asit-Fe³⁺] sitotoksitesini ilk kez teyit ederek sitotoksik etki gösterdiğini saptadık. Bu yüzden demir fazlalığı oluşan durumlarda bu durumu hafifletmek için bir şelatör kullanılmak üzere invivo çalışmalarda değerlendirilmesini öngörmekteyiz. [Salisilikasit-Fe³⁺] kompleksi için yapılan sitotoksikite çalışmasında kırk sekiz saat sonunda farklı derişimlerde kontrole göre anlamlı farklılıklar gözlenmedi. Kontrole göre sitotoksik etkisi en yüksek olan en yüksek derişimli (200µM) metal kompleksi olduğu ortaya çıktı. Aynı zamanda doz miktarı azaldıkça sitotoksikite paralel bir şekilde azalmaktadır. Bu yüzden hayvan modeli araştırması için ümit verici olarak görülmektedir.



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Son yıllarda tıpta demir şelatörlerinin önemi artmıştır. Bunun nedeni, demirin fazlalığına karşı insan hücrelerini korumak için etkili araçların bulunmaması ve serbest radikal oluşumunda demirin rolüne bağlı olmasıdır. Diğer bir neden ise demir şelasyon tedavisi, son yıllarda aşırı demir yükü ile karakterize olmayan bozuklukların tedavisinde dahi kullanımı söz konusu olmasıdır (erişkin solunum sıkıntısı sendromu, miyokardiyal iskemik, kanser ve sıtma gibi). Bu yüzden toksik olmayan oral demir şelatörlerin geliştirilmesi üzerinde durulan bir çalışma alanı olmuştur. Ne yazık ki, insanlardaki aşırı demir yüklenmeyi tedavi etmek için her açıdan ideal şelatlayıcı henüz tanımlanmamıştır.

Vücutta aşırı biriken demiri uzaklaştırmak amacıyla Fe^{3+} iyonu ile bileşik oluşturabilecek ligantların sentezi\kompleksleşme derecesini ve insan plazmasından demirin uzaklaştırılmasında etkinliğinin belirlenmesi tedavi sürecinde klinikte kullanılabilme potansiyeli olan uygulamaların ilk basamağı niteliğindedir. Bu çalışma da ilk olarak asetilaseton üzerinde bulunan iki karbonil bileşiği arasındaki karbon atomu üzerindeki aktif hidrojen ile alkil gruplarının yer değiştirmesi ile farklı uzunluktaki zincir sayısına sahip asetilaseton türevleri olan 3-metil-2,4-pentandion ve 3-butil-2,4-pentandion başarılı bir şekilde sentezlendi ve ligand olarak kullanıldı. Kloralhidrat, hidroksilamin hidroklorür çıkış bileşiği olarak kullanılarak oksim gurubuna dahil olan anti-monoklorogliksim ve dimetilgliksim ligandları başarılı bir şekilde sentezlendi. 8-Hidroksikinolin-5-sülfonik asit, 4,5-Dihidroksibenzen-1,3-disülfonik asit, Piridin 2,6-Dikarboksilik, Nitrilotriasetik asit, Sitrik asit, Oksalat, Glisin, Salisilik asit' te ligand olarak kullanıldı. Daha sonra demir ile kompleksleri safsu ve plazmada sentezlendi. Sentezlenen bileşiklerin yapıları FT-IR, manyetik suseptibilite, elementel analiz analiz ve UV-Vis gibi spektroskopik metodlar ile aydınlatılmıştır. Kompleksleşme derecesi ICP-MS ve UV-Vis yöntemleriyle belirlendi. Yapılan bu değerlendirmeler doğrultusunda in vitro olarak komplekslerin hemen hemen hepsinde yüksek düzeyde kompleksleşme görülmesi vücutta biriken demiri uzaklaştırmak amacıyla kullanılabilmesi öngörmemize neden olmaktadır. Bununla birlikte in vivo etkisinin gösterilebilmesiyle çalışmamızın daha anlamlı bir asamaya gelebileceğini düşünmekteyiz.

Komplekslerin, ligandların elektrokimyasal davranışları CV ile incelendi. Çalışmalarda platin disk elektrot, platin karşıt (counter) elektrot ve Ag-AgCl referans elektrot kullanılmıştır. Voltametri ile elektrokimyası çalışılan komplekslerin tamamında yükseltgenme ve indirgenme pikleri gözlemlendi. Eğriler geri dönüşümlüdür. Voltomogramda kompleksler için farklı pik potansiyellerinin gözlenmesi diğer analizlerle uyumlu olarak kompleks varlığını desteklemektedir. Aynı zamanda hem ligant hem de metal komplekslerinin negatif ve pozitif potansiyellerde elektrokimyasal aktivite göstermesi elektro-aktif özelliğe sahip olduklarının yani elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabilmesini göstermektedir.

Daha sonra hücre kültürü yöntemi ile sentezlenen komplekslerin in vitro sitotoksik etkisi belirlendi. MTT testi kullanılarak 12,5, 25, 50, 100 ve 200 µM'lık 5 farklı derişim aralığında kompleksler HUVEC hücre dizisi üzerine uygulanarak sitotoksik etkiye sahip olup olmadığı ve hücre proliferasyonuna etkisi incelenmiştir. Araştırmada kullanılan komplekslerin hemen hemen hepsinde artan doz ile yüzde sitotoksikite cevapları arasında pozitif bir ilişki gözlemlendi. Sadece [2,6piridindikarboksilikasit-Fe³⁺] kompleksinde herhangi bir sitotoksik etki gözlenmedi. Sitotoksik etkinin derişime paralel bir artış göstermesi ilaç geliştirme aşamasında deneysel hayvan modeli araştırması için ümit verici olarak görülmektedir.

Bu çalışmada kullanılan ligandların şelasyona etkisinin araştırılması in vivo denemelerin gerçekleştirilebilmesinde ilk basamak çalışması olmuştur. İn vitro yapılan bu çalışmada bulunan sonuçlar ileriki dönemlerde in vivo çalışmalar ile de desteklenirse demir şelasyonuna uyumun optimum olacağı etkin demir şelatörlerin geliştirilmesini öngörmekteyiz. Günümüzde tedavi süresinde tercih edilen az sayıdaki liganda alternatif olabilecek bir potansiyel molekülün ya da moleküllerin sentezlenmesi aynı zamanda tıp alanında tedavi amacıyla kullanılan mevcut bilimsel birikim ve tedavi yöntemlerine alternatif olabilecek bir tedavi sürecinin geliştirmeye yönelik moleküllerin tanıtılması ve varolan bazı moleküllerin bu amaç doğrultusunda da kullanılabilmesinin söz konusu olacağı öngörüldü.

6.1. Öneriler

- 1- Asetilasetonun çeşitli alkil halojenürlerle alkilenmesi ile oluşan 3-metil-2,4-pentandion ve 3-butil-2,4-pentandion' un ligand olarak kullanılması ve özellikle asetilaseton üzerinden yağda çözünen grubun (alkil) grubunun şelasyona etkisi, aynı zamanda oksim grubu ligandlar olan dimetilglioksim, antimonokloroglioksimin ve diğer ligandların da şelasyona etkisinin araştırılması in vivo denemelerin gerçekleştirilebilmesinde ilk basamak çalışması olmuştur.
- 2- İn vivo çalışmalara başlamadan önce, hücre kültürü metodları komplekslerin sitotoksitesi belirlenmiştir. Aynı zamanda in vitro çalışmalarda proliferasyon veya diğer etkinlik değerlendirmelerde test çeşitlerinin artırılması alınan sonuçların ve buna bağlı yapılan yorumların doğruluğunu da artıracaktır. Elde edilen sonuçlar hayvanlarda invivo etkilerinin gösterilebilmesiyle anlamlı bir aşamaya gelebileceğini düşünmekteyiz.
- 3- Hücre kültürü denemelerinden sonra mutlaka hayvan deneyleri yapılmalıdır. Bu maddelerin in vivo denemelerde nasıl sonuçlar vereceği, komplekslerin ve ligandların etki mekanizmalarına yönelik farklı deney protokollerinin hazırlanması ve araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. İn vitro yapılan bu çalışmada bulunan sonuçlar, in vivo çalışmalar ile de desteklenirse demir şelasyonuna uyumun optimum olacağı etkin demir şelatörlerin geliştirilmesini sağlayabilir.
- 4- Aynı zamanda farklı ağır metaller üzerine denemeler yapılarak ağır metal bağlayıcı ligandlar olarak kullanılıp, insan plazmasından yada atık sulardan da bu metallerin giderilmesinde kullanılabileceği öngörülmektedir.
- 5- Ayrıca çalışmada sentezlenen ve kullanılan ligandların Fe(III) tayini için kullanılabileceği düşünülmektedir. Bunun için daha detaylı ve bazı parametreler açısından optimize edilen deney şartları hazırlanarak belki de bu ligandların bazılarının spektrofotometrik olarak demir tayininde kullanılabileceği öngörülmektedir. Fe(III) ve diğer ağır metallerin tayini için AAS ve ICP-MS gibi gelişmiş yöntem olmasına karşın, spektrofotometri; düşük maliyetli ve sonuca hızlı erişilir olması nedeniyle avantajlı bir yöntemdir. Diğer tayin yöntemlerinde çoğunda ekstraksiyon işlemi yapılmaktadır. Bu durum maliyeti

yükselmesine ve fazla zaman almaktadır. Limitli bir bütçeyle yapılan analizler için popüler bir yöntem olabilir.



KAYNAKLAR

1. **Flora SJS, Pachauri V.** Chelation in metal intoxication. *Int J Environ Res Public Health*, **2010**;7(7):2745-2788.
2. **Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC.** Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, **2004**; 117:285-297.
3. **Richardson DR.** Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematology*. **2002**; 42:267-281.
4. **Winter WE, Bazydlo LA, Harris NS.** The molecular biology of human iron metabolism. *Laboratory Medicine*, **2014**; 45(2): 92-102
5. **Torti SV, Torti FM.** Iron and cancer: more ore to be mined. *Cancer*, **2013**; 13:342-355
6. **Chen JJ, Luo ZD, Zhao ZN, Xie LN, Zheng WJ, Chen TF.** Cellular localization of iron(II) polypyridyl complexes determines their anticancer action mechanisms. *Biomaterials*, **2015**; 71:168-177.
7. **Kalinowski DS, Richardson DR.** The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev*. **2005**;57:547-583.
8. **Crisponi G, Remelli M.** Iron chelating agents for the treatment of iron overload. *Coord. Chem. Rev.* **2008**; 252(10):1225-1240
9. **Angelucci E, Brittenham GM, McLaren CE.** Hepatic iron concentration and total body iron stores in Thalassemia Major. *N Engl. J Med.* **2000**; 343:327-331
10. **Olivieri NF.** The β thalassemyias. *N Engl J Med.*, **1999**; 341(2): 99-109.
11. **Hershko C, Konijn AM, Link G.** Iron chelators for thalasaemia. *Br J Haematol.* **1998**; 101:399-406.
12. **Faa G, Crisponi G.** Iron chelating agents in clinical practice. *Coordination Chemistry*; **1999**; 184(1):291-310
13. **Liu ZD, Hider RC.** Design of clinically useful iron (III)-selective chelators. *Med. Res. Rev.* **2002**;22:26-64.
14. **Whetherall DJ.** Pathophysiology of thalassemia. *Baillière's Clinical Hematology*. **1998**; 11(1): 127-146.
15. **Ganz T.** Hepcidin in iron metabolism. *Current Opinion in Hematology*. **2004**;11:251-254.
16. **Feng M, Does LV, Bantjees A.** Iron(III) chelating resins. VI. Stability constants of iron(III)-ligand complexes on insoluble polymeric matrices. *Journal of Applied polymer Science*, **1994**; 56, 1231-1237.
17. **Ellis J.** Neufeld oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions. *Blood*, **2006**; 107: 3436-3441
18. **Faa G, Crisponi G.** Iron chelating agents in clinical practice. *Coordination Chemistry Reviews*. **1999**; 184:291-310

19. **Kontoghiorghes CN, Kontoghiorghes GJ.** New developments and controversies in iron metabolism and iron chelation therapy. *W J Methodology.* **2016;** 26(1): 1-19.
20. **Yu Y, Kovacevic Z, Richardson DR.** Tuning Cell Cycle Regulation with an Iron Key. *Cell Cycle.* **2007;** 6(16): 1982-1994.
21. **Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L.** Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry.* **2012;**51(29): 5705–5724.
22. **Tyagia P, Kumarc Y, Guptaa D, Kumarb HSA.** Therapeutic advancements in management of iron overload. *Int J Pharm Pharm Sci.,* **2015;** 7(8):35-44
23. **Le NT, Richardson DR.** The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta.* **2002;** 1603: 31-46.
24. **Ibanez GB, Snachez AS, Penafiel R.** Iron deficiency anaemia. *Rev Med Hosp Gen Mex.,* **2016;**79(2):88-97.
25. **Iancu TC.** Ultrastructural aspects of iron storage, transport and metabolism. *J. Neural. Transm.,* **2011;** 118: 329–335.
26. **Gürsel O, Eker İ, Kürekçi AE.** Demir Metabolizması ve Bozuklukları. *Türkiye Çocuk Hastalıkları Derg.,* **2015;** 9(1): 71-77.
27. **Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I.** Heparin-central regulator of iron metabolism. *European Journal of Haematology Journal Compilation.* **2006;** 78 1-10.
28. **Siah CW, Ombiga J, Adams LA, Trinder D, Olynyk JK.** Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. *Clin Biochem Rev.,* **2006;**27:5-16.
29. **Lieu PT, Heiskala C, Peterson PA, Yang Y.** The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine.* **2001;** (22): 1-87.
30. **Emerit J, Beaumont C, Trivin F.** Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother.* **2001;** 55(6):333-9.
31. **Ganz T.** Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology.* **2006;**29-35.
32. **Kroot JJ, Tjalsma H, Fleming RE, Swinkels DW.** Heparin in human iron disorders: diagnostic Implications. *Clinical Chemistry.* **2011;**57:1650-1669.
33. **Scrimshaw NS.** Iron deficiency. *Sci. Am.,* **1994;** 265 (4): 46-52.
34. **Finch C.** Regulators of iron balance in humans. *Blood,***1994;** 84(6): 1697–1702
35. **Ganz T, Nemeth E.** Iron imports. IV. Heparin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.,* **2006;**290(2):199-203.
36. **Andrews NC.** Disorders of Iron Metabolism. *N Engl J Med* **1999;**341:1986–1995.
37. **Erişim:** http://opus.bath.ac.uk/44293/4/Chapter_1_introduction.pdf **2016.** Erişim tarihi: 05.09.2016.
38. **Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, Sharp JJ, Fujiwara Y, Barker JE, Fleming MD.** Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat. Genet.,* **2005;**37:1264-1269.
39. **Ponka P.** Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood.***1997;** 89:1–25.

40. Liu ZD, Piyamongkol S, Liu DY, Khodr HH, Lu SL, Hider RC. Synthesis of 2-amido-3-hydroxypyridin-4(1H)-ones: novel iron chelators with enhanced pFe³⁺ values. *Bioorg Med Chem.*, 2001; 9: 563-573.
41. Berber, I., Diri, H., Erkurt, M.A., Aydogdu, I., Kaya, E. and Kuku, I. Evaluation of Ferric and Ferrous Iron Therapies in Women with Iron Deficiency Anaemia. *Advances in Hematology.* 2014; 1-6.
42. Weinreb O, Amit, T, Mandel S, Kupersmidt L. Neuroprotective multifunctional iron chelators: from redox-sensitive process to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.*, 2010 13(6): 919-949
43. Evens AM, Mehta J, Gordon LI. Rust and corrosion in hematopoietic stem cell transplantation: the problem of iron and oxidative stress. *Bone Marrow Transplant* 2004;34(7):561-71.
44. Beutler E. Hemochromatosis: genetics and pathophysiology. *Annu Rev Med.*, 2006;57:331-47
45. Weinberg ED. Iron loading and disease surveillance. *Emerg Infect Dis.*, 1999;5(3):346-52.
46. Gattermann N, Rachmilewitz EA. Iron overload in MDS-pathophysiology, diagnosis, and complications. *Ann Hematol.* 2011;90(1):1–10.
47. Cabantchik ZI, Breuer W, Zanninelli G, Cianciulli P. LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005;18(2):277–287
48. Brittenham GM. Iron-chelating therapy for transfusional iron overload. *N Engl J Med.* 2011;364(2):146–156.
49. Musallam KM, Cappellini MD, Wood JC. Elevated liver iron concentration is a marker of increased morbidity in patients with β thalassemia intermedia. *Haematologica.*, 2011;96(11):1605–1612.
50. Corbett JV. Accidental poisoning with iron supplements. *MCN: Am J Maternal/Child Nursing* 1995; 20:234.
51. Taher A, Nathan D, Porter J. Evaluation of Iron Levels to Avoid the Clinical Sequelae of Iron Overload. *Semin Hematol.*, 2007; 44:S2-S6.
52. Yen AW, Fancher TL, Bowlus CL. Revisiting hereditary hemochromatosis: current concepts and progress. *Am J Med.*, 2006;119:391–9.
53. Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol.*, 2008; 88:7–15
54. Feder JN, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.*, 1996; 13(4): 399-408.
55. Franchini M. Hereditary iron overload: update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Am J Hematol.*, 2006;81:202– 9.
56. Bonkovsky HL, Lambrecht RW, Shan Y. Iron as a co-morbid factor in nonhemochromatotic liver disease. *Alcohol.* 2003;30:137–44.
57. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis—a new look at an old disease. *N Engl J Med.*, 2004;350:2383–2397

58. Siddique A, Kowdley KV. Review article: the iron overload syndromes. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2012; 35: 876-893.
59. Erişim:<http://www.lifeextension.com/protocols/metabolic-health/hemochromatosis/page-06?p=1> 2016. Erişim tarihi: 05.09.2016.
60. Bargaonkar MR. Hemochromatosis. More common than you think. *Can Fam Physician.*, 2003;49:36-43.
61. Gregory A, Hayflick SJ. Genetics of neurodegeneration with brain iron accumulation. *CurrNeurolNeurosci Rep*. 2011;11(3):254-261.
62. Sebastiani G, Walker AP. HFE gene in primary and secondary hepatic iron overload. *World J Gastroenterol*. 2007;21;13(35):4673-89.
63. Barton JC, Adams PC, Brissot P. Management of hemochromatosis. Hemochromatosis Management Working Group. *Ann Intern Med.*, 1998;129:932-9.
64. Heli H, Mirtorabi S, Karimian K. Advances in iron chelation: an update. *Expert Opin Ther Pat*. 2011;21(6):819-856.
65. Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loreal O. Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity. *BiochimBiophysActa.* 2012;1820(3):403-410.
66. Munoz M, Garcia-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload. *J. Clin. Pathol.*, 2011;64(4):287-296.
67. DiBisceglie AM, Axiostis CA, Hoofnagle JH. Measurement of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology*; 1992; 102: 2108-13.
68. Hershko C. Mechanism of iron toxicity. *Food and Nutrition Bulletin*. 2007; 28(4): 500-509
69. Kallianpur AR, Hall DL, Yadav M, Christman BW, Dittus RS, Haines LJ. Increased prevalence of the HFE C282Y Hemochromatosis allele in women with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13:205-12
70. Kell DB. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genom*. 2009; 8(2):2.
71. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;202:199-211.
72. Unal S, Hazirolan T, Eldem G, Gumruk F. The effects of deferasirox on renal, cardiac and hepatic iron load in patients with β -thalassemia major: preliminary results. *Pediatr Hematol Oncol.*, 2011; 28:217-21.
73. Okada S. Iron-induced tissue damage and cancer: the role of reactive oxygen species-free radicals. *Pathol In,t* 1996;46:311-32.
74. Mehrvar A, Azarkeivan A, Faranoush M, Mehrvar N, Saberinedjad J, Ghorbani R, Vossough P. Endocrinopathies in patients with transfusiondependent β thalassemia. *Pediatric Hematology and Oncology*, 2008; 25:187-194.

75. **Saliba AN, Harb AR, Taher AT.** Iron chelation therapy in transfusion-dependent thalassemia patients: current strategies and future directions. *Journal of Blood Medicine*, **2015**; 6:197-209.
76. **Vaziri ND.** Understanding iron: promoting its safe use in patients with chronic kidney failure treated by hemodialysis. *Am J Kidney Dis.*, **2013**; 61 (6): 992-1000.
77. **Emerit J, Beaumont C, Trivin F.** Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother.* **2001**;55(6):333-9
78. **Hamilton JL, Kizhakkedathu JN.** Polymeric nanocarriers for the treatment of systemic iron overload. *Mol Cell Ther.*,**2015**; 3:3-24.
79. **Porter JB.** Practical management of iron overload. *Br J Haematol.* **2001**; 115(2):239-52.
80. **Hori A, Mizoue T, Kasai H.** Body iron store as a predictor of oxidative DNA damage in healthy men and women. *Cancer Sci.*, **2010**;101:517-22- 35.
81. **Gözmen B, Erbatur G, Erbatur O.** Klofibrin asidin elektro-fenton ortamında bozundurulması. *Anadolu üniversitesi bilim ve teknoloji dergisi.***2003**; 4(1): 11-18.
82. **Koca N, Karadeniz F.** Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi.***2003**; 16, 32-37.
83. **Shander A, Cappellini MD, Goodnough LT.** Iron overload and toxicity: the hidden risk of multiple blood transfusions. *Vox Sang.*, **2009**; 97 (3):185-97.
84. **Meydani, M.** Antioxidants and cognitive function. ILSI. *Nutrition Reviews.*, **2001**;59(8); S75-S82.
85. **Pietrangelo A.** Mechanism of iron toxicity. *Adv Exp Med Biol.*, **2002**;509:19-43.
86. **Harrison SA, Bacon BR.** Hereditary hemochromatosis: update for 2003. *J Hepato.*, **2003**; 38:14–23.
87. **Southorn PA.** Free radicals in medicine. 1. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin. Proc.*,**1988**; 53:381-389.
88. **Horton AA, Fairhurst S.** Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol* **1987**;18:27-79.
89. **Halliwell B, Chirico S.** Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr.*,**1993**, 57: 715-725.
90. **Gutteridge JM, Halliwell B.** Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol.*, **1989**; 2(2):195-256.
91. **Wang J, Pantopoulos K.** Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.*, **2011**; **434** 365-381.
92. **Horton AA, Fairhurst S.** Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol* **1987**;18:27-79.
93. **Toyokuni S.** Iron-induced Carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic Biol Med.*,**1996**;20(4):553-66.
94. **Gupta KC, Sutar A.** Catalytic activities of Schiff Base transition metal complexes, Coordination Chemistry Reviews. *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**; 252, 1420–1450.

95. Olivieri NF, Brittenham GM. Iron chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood*, 1997;89:739-61.
96. Hershko C, Link GM, Konijn AM, Cabantchik ZI. Iron chelation therapy. *Curr Hematol Rep.*, 2005; 4:110-116.
97. Erişim:<http://www.chemistry.iitkgp.ac.in/faculty/PP/lecturers/Chelate%20Effect%202007.ppt> 2016. Erişim tarihi: 05.09.2016
98. Franz KJ. Clawing Back: Broadening The Notion Of Metal Chelators In Medicine. *Current Opinion In Chemical Biology*. 2013; 17: 143–149.
99. Grtunca S. Metal Őelatları. *Ankara niversitesi Veteriner Fakltesi Dergisi*. 1968; 15(2): 271-278
100. Gabutti V, Piga A. Results of long-term iron chelation therapy. *Acta Haematol.*, 1996, 95: 26-36.
101. Hagag AA, Elfatah MA. Therapeutic Value of Silymarin as Iron Chelator in Children with Beta Thalassemia with Iron Overload. *J Leuk.*, 2014; 2(1):2-6.
102. Rund D, Rachmilewitz E. β thalassemia. *N Engl J Med.*, 2005; 353(11): 1135-46.
103. Aydınok Y. Talasemide demir yk ve selasyon. *Talasemi ve Hemoglobinopatiler*. 2007;159-17
104. Leitch HA. Controversies surrounding iron chelation for MDS *Blood Rev* 2011;25;17-31
105. Leitch HA. Improving clinical outcome in patients with myelodysplastic syndrome and iron overload using iron chelation therapy, *Leukemia Res.*,2007; 31-7.
106. Yavuz Delibaş. Talasemi majorlu hastalarda kardiyolojik fonksiyonların değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı İstanbul Bakırky kadın doğum ve ocuk hastalıkları eğitim ve araştırma hastanesi, İstanbul, 2009.
107. Porter JB. Concepts and goals in the management of transfusional iron overload. *American Journal of Hematology*. 2007; 82(12):1136-9.
108. Zhou T, Ma Y, Kong, Hider RC. Design of iron chelators with therapeutic application. *Dalton Trans*.2012; 41(21): 6371-6389.
109. Gven S, Erdogan M. Talasemi majorda demir selasyon sagaltımı. *Bakırky Tıp Dergisi* 2007;4:125-9.
110. Cappellini MD, Piga A. Current status in iron chelation in hemoglobinopathies. *Curr Mol Med*. 2008;8(7):663–674.
111. Erişim: <http://www.ironcurriculum.esh.org> Erişim tarihi: 05.09.2016
112. Davis BA, Porter JB. Long term outcome of continuous 24-hour deferoxamine infusion via indwelling intravenous catheters in high risk beta-thalassemia. *Blood*. 2000; 95(4):36
113. Kushner JP, Portetr JP, Olivieri NF. Secondary iron overload. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001; 47-61. 42.
114. Choudhry VP, Naithani R. Current status of iron overload and chelation with deferasirox. *Indian J Pediatr.*,2007; 74 (8): 759-764.

115. **Hershko C.** Control of disease by selective iron depletion: a novel therapeutic strategy utilizing iron chelators. *Baillieres Clin Haematol.*, **1994**; 965-1000.
116. **Borgias B, Hugi AD, Raymond KN.** Isomerization and solution structures of desferrioxamine B complexes of A^{13} and Ga^3 . *Inorg Chem.*, 1989;28:3538–3545.
117. **Crosa JH, Walsh CT.** Genetics ve assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**;66: 223-49.
118. **Serbüilent Güzey.** Kritik boyutlu kemik defektlerinde desferroksamin uygulamasının kemik greft iyileşmesi üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi, Gülhane askeri tıp akademisi Plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahi anabilim dalı, Ankara, 2013; 39-40.
119. **Theil EC.** Mining ferritin iron: 2 pathways. *Blood.* **2009**; 114: 4325-4326.
120. **Taylor JE, Laity PR, Hicks J, Wong SS, Norris K., Khunkamchoo P.** Extent of iron pick-up in deferoxamine-coupled polyurethane materials for therapy of chronic wounds. *Biomaterials.* **2005**; 26(30), 6024-33.
121. **Nakamura T, Keep RF, Hua Y.** Deferoxamine–induced attenuation of brain edema and neuro in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Neurosurg Focus.* **2003**;15(4):1-9
122. **Krewulak KD, Vogel HJ.** Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008; 1778:1781-1804.
123. **Davies SC, Marcus RE, Hungerford JL, Miller MH, Arden GB, Huehns ER.** Ocular toxicity of high dose intravenous desferrioxamine. *Lancet.* **1983**; 2 (8343): 181-184.
124. **Cappellini M, Cohen A, Piga A.** A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with β -thalassemia. *Blood.* 2006; 107 (9): 3455-3462.
125. **Porter J, Waldmeier F, Bruin G.** Pharmacokinetics, metabolism and elimination of the iron chelator drug ICL670 in beta-thalassemia patient. *Blood.* **2002**; 11: 3720.
126. **Barman JA, Foster RH.** Deferiprone: a review of its clinical potential in iron overload in beta-thalassemia major and other transfusion-dependent disease. *Drugs.* **1999**; 58 (3): 553-578.
127. **Tanner MA, Smith GC, Westwood MA, Wonke B, Galanello R.** Randomized controlled trial of deferiprone or deferoxamine in beta-thalassemia major patients with asymptomatic myocardial siderosis. *Blood.* **2006**;107:3738-44.
128. **Piga A, Gaglioti C, Fogliacco E, Tricta F.** Comparative effects of deferiprone and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassemia major: a retrospective analysis. *Haematologica.* **2003**; 88: 489-496.
129. **Hider R.** Recent developments centered on orally active iron chelators. *Thalassemia Reports* **2014**; 2261(4): 19-27.
130. **Richardson DR, Tran, EH, Ponka P.** The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents. *Blood.* **1995**;86, 4295- 4306.
131. **Hershko C, Avramovici-Grisaru S, Link G, Gelfand L, Sarel S.** Mechanism of in vivo iron chelation by pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and other imino derivatives of pyridoxal. *J Lab Clin Med.*, 1981;98:99– 108.
132. **Edward JT, Ponka P, Richardson DR.** Partition-coefficients of the iron(III) complexes of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs and the correlation to iron chelation efficacy. *Biometals* **1995**;8:209–217.

133. **Bernhardt PV, Wilson GJ, Sharpe PC, Kalinowski DS, Richardson DR.** Tuning the antiproliferative activity of biologically active iron chelators: characterization of the coordination chemistry and biological efficacy of 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine hydrazone ligands. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2008**; 13:107–119.
134. **Hider RC, Kong X, Abbate V, Harland R, Collon K, Luker T.** Deferitazole, a new orally active iron chelator. *Dalton Trans.*, **2015**; 21;44(11):5197-204.
135. **Ferrer P, Tripathi AK, Clark MA, Hand CC, Rienhoff HY, Sullivan DJ.** Antimalarial Iron Chelator, FBS0701, Shows Asexual and Gametocyte Plasmodium falciparum Activity and Single Oral Dose Cure in a Murine Malaria Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **2015**; 59(3): 1418-1426
136. Erişim: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.23330184.htm>.06.05.2016. Erişim tarihi: 05.09.2015.
137. **Finch RA, Liu M, Grill SP, Rose WC, Loomis R, Vasquez KM, Cheng Y, Sartorelli AC.** Triapine (3-Aminopyridine-2-Carboxaldehyde-Thiosemicarbazone): A Potent Inhibitor of Ribonucleotide Reductase Activity With Broad Spectrum Antitumor Activity. *Bioc-hem. Pharmacol.*, **2000**; 15-59(8):983-991.
138. **Mackenzie MJ, Saltman D, Hirte H, Low J, Johnson C, Pond G, Moore, MJ.** A Phase II study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) and gemcitabine in advanced pancreatic carcinoma. A trial of the Princess Margaret hospital Phase II consortium. *Invest New Drugs.* **2007**; 25, 553-558.
139. **Knox JJ, Hotte SJ, Kollmannsberger C, Winqvist E, Fisher B, Eisenhauer EA.** Phase II study of Triapine in patients with metastatic renal cell carcinoma: a trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Invest New Drugs.* **2007**; 25, 471-477.
140. **Bergeron RJ, Wiegand J, Brittenham GM.** HBED: A Potential Alternative to Deferoxamine for Iron-Chelating Therapy. *Blood.* **1998**; 91(4): 1446-1452.
141. **Musa MA, Badisa VL, Latinwo LM.** Cytotoxic Activity of N, N'-Bis (2-hydroxybenzyl) ethylenediamine Derivatives in Human Cancer Cell Lines. *Anticancer research.* **2014**; 34: 1601-1608.
142. Erişim: <https://www.scbt.com/scbt/product/hbed-35369-53-0> Erişim tarihi: 06.09.2015.
143. Erişim: <http://portal.faf.cuni.cz/Groups/Cardioprotective-iron-chelators/Research/> Erişim tarihi: 07.02.2016.
144. **Barton JC.** Drug evaluation: deferitritin (GT-56-252; NaHBED) for iron overload disorders. *IDrugs.* **2007**; 10(4):270-81.
145. **Cunningham MJ, Macklin EA, Muraca G, Neufeld EJ.** Successful pregnancy in thalassemia major women in the Thalassemia Clinical Research Network. *Pediatr Res.* **2004**;55:294A
146. Erişim : http://www.pharmacodia.com/web/drug/1_5372.html Erişim tarihi:10.02.2016
147. **Grady RW, Bakke J, Steinmetz K, Bishop TR, Hedlund BE.** Pharmacokinetic and Toxicological Results of a 28-Day Multiple Dose Study of Starch-Conjugated Deferoxamine (S-DFO, 40SD02) in Iron-Loaded Dogs. *Blood.* **2007**; 110:2780.
148. **Dragsten PR, Hallaway PE, Hanson GJ, Berger AE, Bernard B, Hedlund BE.** First human studies with a high-molecular-weight iron chelator. *J Lab Clin Med.*, **2000**; 135(1):57-65.

149. Harmatz P, Grady RW, Dragsten P, Vichinsky E, Giardina P, Madden J, Miller B, Hanson G, Hedlund B. Phase Ib clinical trial of starch-conjugated deferoxamine (40SD02): a novel long-acting iron chelator. *British Journal of Haematology*, 2007; 138: 374–381.
150. Tafesse F. Comparative Studies on Prussian Blue or Diaquatetraaminocobalt(III) Promoted Hydrolysis of 4-Nitrophenylphosphate in Microemulsions. *Int. J. Mol. Sci.*, 2003, 4, 362-370
151. Singh S, Khodr H, Taylor MI, Hider RC. Therapeutic iron chelators and their potential side-effects. *Biochem. SOC. Symp.*, 1995; 61, 127-137.
152. Dertz EA, Xu, Stintzi JA, Raymond KN. Bacillibactin-Mediated Iron Transport in *Bacillus subtilis*, *Journal of the American Chemical Society*. 2005; 128:22-23.
153. Hider RC. Potential protection from toxicity by oral iron chelators. *Toxicol. Lett.* 1995;82-83: 961-967.
154. Titolo Tesi. Design, synthesis and characterization of new iron and aluminium chelating agents. PHD thesis, Università degli Studi di Cagliari, Scienze E Tecnologie Chimiche, 2013.
155. Hider RC, Hall AD. Clinically useful chelators of tripositive elements. *Prog Med Chem.*, 1991;28:41-173.
156. Winston A, Varaprasad DVPR, Metterville JJ, Rosenkrantz H. Evaluation of polymeric hydroxamic acid iron chelators for treatment of iron overload. *J Pharmacol Exp Ther.*, 1985;232:644–649.
157. Piyamongkol S, Zhou T, Liu ZD, Khodr HH, Hider RC. Design and characterisation of novel hexadentate 3-hydroxypyridin-4-one ligands, *Tetrahedron Lett.*, 2005; 46:1333-1336.
158. Nurchi VM, Lachowicz JI, Crisponi G, Murgia S, Arca M, Pintus A, Gans P, Niclos JG, Dominguez A, Remelli M, Szewczuk Z, Lis T. Kojic acid derivatives as powerful chelators for iron(III) and aluminium(III). *Dalton Trans.*, 2011; 40:5984-5998.
159. Crisponi G, Nurchi VM, Zoroddu MA. Iron Chelating Agents for Iron Overload Diseases. *Thalassemia reports.* 2014;4:2.
160. Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep.*, 2010; 27: 637-657.
161. Raymond KN, Carrano CJ. Coordination chemistry and microbial iron transport. *Acc Chem Res.*, 1979;12:183-90.
162. Hider RC, Liu ZD. Emerging understanding of the advantage of small molecules such as hydroxypyridinones in the treatment of iron overload. *Curr Med Chem.*, 2003;10:1051-64.
163. Büyüksırt T, Kuleşan H. Fourier dönüştürme kızılötesi (ftır) spektroskopisi ve gıda analizlerinde kullanımı. *Gıda*, 2014; 39 (4): 235-241.
164. Włodzimierz U, Katarzyna J, Katarzyna W. Properties and application of diketones and their derivatives. *Chemik*; 2011, 65:(4): 273-2.
165. Johnson AW, Markham E, Price R, Shaw KB. The synthesis of tri- and tetra-alkylpyrroles. *J. Chem. Soc.* 1958; 4254.
166. More PS, Sawant AD., Isonitroso-4-methyl-2-pentanone as an analytical reagent for platinum (IV), *J Ind Chem Soc*, 1994; (37):377-378.
167. Mao CL, Hauser CR. β -Diketones from Methyl Alkyl Ketones: 3-*n*-Butyl-2,4-Pentanedione. *Organic Syntheses*. 2003.

168. Dilworth JR. Parrott SJ. The biomedical chemistry of technetium and rhenium, *Chemical Society Reviews*, 1998; 27 (1): 43-55.
169. Singh RB. Garg BS. Singh RP. Oximes as Spectrophotometric Reagents-A Review. *Tetrahedron*, 1979; 26, 425-44.
170. Migrdichian V. Organic Synthesis, Open-Chain Saturated Compounds. Reinhold Pub. 1957.
171. Jurisson SS. Lydon JD. Potential technetium small molecule radiopharmaceuticals, *Chemical Reviews*, 1999; 99 (9): 2205-2218.
172. Panzio G. Baldrocco, F. Ricerche Sulle Diossime, *Gazzetto Chemica Italiana*, 1930; 60, 415-429.
173. Yildirim B. Özcan E. Deveci P. "New Glyoxime Derivatives and Their Transition Metal Complexes", Russian Journal of Coordination. *Chemistry*, 2007; 33:417-421.
174. Kurtoglu M. Ispir EN. Kurtoglu S. Serin. Novel vic-dioximes: Synthesis, complexation with transition metal ions, spectral studies and biological activity. *Dyes and Pigments*, 2008; (77): 75-80
175. Olofson R. Michelman J. "Furazan." *Journal of Organic Chemistry*, 1965; 30(6), 1854-1859.
176. Pradhan J. Goyal A. β -diketones: Important Intermediates for Drug Synthesis. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 2015; 4 (2): 01-18.
177. Wlodzimierz U. Katarzyna J. Katarzyna W. Properties and application of diketones and their derivatives. *Chemik*; 2011, 65:(4): 273-2.
178. Bhisea NA. Dingleb ST. Gaikwada ST. Rajbhoja AS. Conventional and Ultrasonic synthesis of β -diketone with Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes and their antimicrobial screening. *Der Pharma Chemica*, 2016, 8(19):338-344.
179. Hoffbrand AV. Deferiprone therapy for transfusional iron overload. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2005; 18(2): 299-317.
180. Hershko C. Abrahamov A. Konijn AM. Breuer W. Cabantchick IZ. Pootrakul P. Link G. Objectives and methods of iron chelation therapy. *Bioinorg Chem Appl*, 2003; 1:151-168.
181. Kalinowski DS and Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev*; 2005; 57:547-583.
182. Hider RC, Liu ZD. Piyamongkol S. The design and properties of 3-hydroxypyridin-4-one iron chelators with pFe³⁺ values. *Transfusion Science*, 2000; 23, 201-209.
183. Constantinos JM. Stamatatos TC. Perlepe S SP. The coordination chemistry of pyridyl oximes. *Polyhedron*, 2005; 25 : 134-194.
184. Taş M. Batı H. Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes of 1,4-di-(1-hydroxyimino-2-phenyl-2-oxoethylamino)benzene: Synthesis, characterization and thermal studies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2006; 85(2): 295-299.
185. Kaya M. Yenikaya C. Çolak AT. Çolak F. Synthesis, Spectral, Thermal and Biological Studies of Co(III) and Binuclear Ni(II) Complexes with a Novel Amine-Imine-Oxime Ligand. *Russian J. Gen. Chem*, 2008; 78(9): 1808-1815.

186. Berenyi A. Minorics R. Ivanyi Z. Ocsosvzki I. Ducza E. Thole H. Messinger J. Wolfling J. Motyan G. Mernyak E. Frank E. Schneider G. Zupko I. Synthesis and investigation of the anticancer effects of estrone-16-oxime ethers in vitro. *Steroids*, 2013; 78 (1): 69-78.
187. Wipf P. Fletcher JM. Scarone L. Microwave promoted oxazole synthesis: cyclocondensation cascade of oximes and acyl chlorides, *Tetrahedron Letters*, 2005; 46: 5 463–5466.
188. Portella R. Barcelos RP. Bem AF. Carratu VS. Bresolin L. Rocha, JBT. Soares FAA. Oximes as inhibitors of low density lipoprotein oxidation, *Life Sciences*, 2008; 83, 878–885.
189. Deraeve C. Pitie M. Mazarguil H. Meunier B. Bis-8-hydroxyquinoline ligands as potential anti-Alzheimer agents. *New J Chem*. 2007;31(2): 193–195.
190. Prachayasittikul V. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des Devel Ther*, 2013; 7: 1157–1178
191. Al-Busafi SN. Suliman FEO. Al-Alawi ZR. 8-Hydroxyquinoline and its Derivatives: Synthesis and Applications. *Research & Reviews: Journal of Chemistry*; 2014; 3(1):2319-9849.
192. Albrecht M. Fiege M. Osetska O. 8-Hydroxyquinolines in metallo-supramolecular chemistry. *Coord Chem Rev*. 2008;252(8-9):812-824.
193. Naik LR. Math NN. Photophysical properties of 8-hydroxy quinoline, *Indian Journal of Pure & Applied Physics*, 2005; 43:743-749.
194. Oliveri V. Giuffrida ML. Vecchio G. Aiello C. Viale M. Gluconjugates of 8-hydroxyquinolines as potential anti-cancer prodrugs. *Dalton Trans*. 2012;41(15):4530–4535.
195. Kim JS. Cho EW. Chung HW. Kim IG. Effects of Tiron, 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic acid, on human promyelotic HL-60 leukemia cell differentiation and death. *Toxicology*, 2006; 223: 36-45.
196. Seyfried B. Schink B. Fermentative degradation of dipicolinic acid (pyridine-2,6-dicarboxylic acid) by a defined coculture of strictly anaerobic bacteria. *Biodegradation*, 1990;1:1-7.
197. Aghabozor G H. Ghadermazi M. Sadr-khanlou E. Crystal Structure of Piperazine and Pyridine-2,6-dicarboxylic Acid Complex. *Analytical sciences*, 2006, 22:253-256.
198. Chauhan JS. Pandya AV. Spectrophotometric determination of Fe(II) by isocinchomeric acid -a study of synthesis and characterization. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2015; 4(09) :2165-2181.
199. Motaung MP. Ajibade PA. Ru(II) and Co(II) Complexes of bis(pyrazolyl)pyridine and pyridine-2,6-dicarboxylic Acid: Synthesis, Photo Physical Studies and Evaluation of Solar Cell Conversion Efficiencies. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2015; 10: 8087-8096.
200. Chauhan JS. Pandya AV. Spectrophotometric determination of Mn (II) ion by Pyridine 2, 6 dicarboxylic acid. *International Journal of Engineering Science Invention*; 2013; 2(2).
201. Abida OG. Litter MM. Bolte M. Impact of iron-complex (Fe(III)-NTA) on photoinduced degradation of 4-chlorophenol in aqueous solution. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2006; 5:395–402.
202. Özbolat G. Tuli A. Spectrophotometric and Cyclic Voltammetric Studies of Iron Complex with NTA Ligand and Investigation of Its Catalase-like Activities. *Der Pharma Chemica*, 2017, 9(14):119-122.

203. **Andrianirinaharivelo SLJ. Pilichowski F. Bolte M.** Nitrilotriacetic acid transformation photo-induced by complexation with iron(III) in aqueous solution. *Transition Met. Chem.* **1993**; 18:37–41.
204. **Dodge CDJ. Francisa A.** Photodegradation of a Ternary Iron(III)-Uranium(VI)-Citric Acid Complex Environ. *Sci. Technol.* **2002**, 36, 2094-2100.
205. **Milewska MJ.** Citric Acid-Its natural and synthetic derivatives. *Z Chem* . **1988**;28, 204–211.
206. Erişim: http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/25140/9/09_chapter%205.pdf. Erişim Tarihi:05.05.2015.
207. **Al-Jeboori FHA. Al-Shimiesawi TAM.** Synthesis and investigation of complex formation between amino acid (glycine) and various metal ion by using spectroscopic Methods. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2013**, 5(11):318-321.
208. Erişim: <https://www.tandj.co.uk/scripts/kcfinder/upload/files/Chelated%20Minerals.pdf> Erişim tarihi:06.09.2016.
209. Erişim: <http://www.rd2.co.nz/uploads/Conversations%20on%20chelation%20and%20mineral%20nutrition.pdf>. Erişim Tarihi:05.12.2016.
210. **Chylewska A. Sikorski A. Dąbrowska A. Chmurzynski L.** Potassium trans-[bis(oxalato)diaquacobaltate(II)] tetrahydrate: synthesis, structure, potentiometric and thermal studies. *Central European Journal of Chemistry*; **2013**, 11(1): 8-1.
211. **Sagone AJ. Husney RM.** Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: evidence that these drugs act as free radical scavengers in biological systems. *J Immunol.* **1987**; 1;138(7):2177-83.
212. **Fujimori T. Yamada S. Yasui H. Sakurai H. Ishida T.** Orally active antioxidative copper(II) aspirinate: Synthesis, structure characterization, superoxide scavenging activity, and in vitro and in vivo antioxidative evaluations. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**;10(8):831-841.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Kadirli’de doğdu. İlköğrenimini Orhangazi İlkokulu ve İstiklal ortaokulunda, Lise öğrenimini 19 Mayıs (Y.D.A) Lisesi’nde Adana’ da tamamladı. Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2006 yılında mezun olduktan sonra Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında eğitim almaya başladı.2012 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Doktora programına başladı. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Doktora programını tamamladı.

