



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİTRİK OKSİT AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ İÇİN YENİ BİR
FLOROJENİK PROB GELİŞTİRİLMESİ

Emin Ahmet YEŞİL

Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet ALTUN

Mayıs, 2017


İSTANBUL

Bu çalışma 25.05.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Doç. Dr. Mehmet ALTUN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. Süleyman TANYOLAÇ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. Kubilay GÜÇLÜ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Doç. Dr. Zeliha GÖKMEN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. Metin TÜLÜ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 21365 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Akademik kariyerimin başlangıcı olarak nitelendirdiğim bu süreçte, çalışmalarım özveriyle katkıda bulunan, her sorunumla yakından ve içtenlikle ilgilenen, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, üzerimde büyük emeği bulunan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet ALTUN'a;

Bilimsel ve akademik kimlikleriyle örnek aldığım; çalışmalarım süresince gerekli analizlerin yapılması hususunda tecrübelerinden yararlandığım ve aralarında yer almaktan mutluluk duyduğum değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Kubilay GÜÇLÜ ve Doç. Dr. Mustafa ÖZYÜREK'e;

Tezimle aynı adı taşıyan 21365 numaralı yüksek lisans tez projesine desteklerinden dolayı İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne;

Sevgili aileme ve çok değerli arkadaşlarıma yardımları ve destekleri için yürekten teşekkür ederim...

“Doğru bilgi, tecrübe ile desteklenmiş ve uygulanabilir özellik taşıyan ilimdir.”

“İyi bir fikre sahip olmak yeterli değildir. Önemli olan bu fikri uygulanabilir kılmaktır”

Mayıs 2017

Emin Ahmet YEŞİL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. OKSİDATİF STRES	3
2.2. NİTRİK OKSİT NEDİR?	3
2.3. NİTRİK OKSİTİN TAYİN EDİLMESİ VE GÖRÜNTÜLENMESİ	5
2.3.1. Griess Reaksiyonu.....	6
2.3.2. Kemilüminesans.....	6
2.3.3. Elektron Paramanyetik Rezonans Yöntemi (EPR)	7
2.3.4. Floresans Spektroskopisi.....	8
2.3.5. Prob Mekanizmaları.....	9
2.3.6. NO Tayin ve Görüntülenmesinde Kullanılan Floresan Problar.....	10
2.3.6.1. Diaminonaftalen.....	10
2.3.6.2. Diklorofloresin	11
2.3.6.3. o-diaminobenzen Yapısı İçeren Floresan Problar	11
2.3.6.4. Metal Kompleksi Esaslı Floresan Problar.....	14
2.3.6.5. Bakır (Cu) Kompleksi Esaslı Floresan Problar.....	16
2.3.6.6. Herhangi Bir Gruba Dahil Olmayan NO'ya Spesifik Floresan Problar	19
2.4. YAKIN KIZILÖTESİ (NEAR INFRARED, NIR) ESASLI FLORESAN PROBLAR	21
2.5. NİTRİK OKSİTE SEÇİCİ YAKIN İNFRARED (NIR) FLORESAN PROBLAR....	28
3. MALZEME VE YÖNTEM	32
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR	32

3.2. KİMYASAL MADDELER	32
3.3. NİTRİK OKSİT İÇİN GELİŞTİRİLEN YENİ PROBUN SENTEZİ	33
3.3.1. Proben Genel Molekül Yapısı	33
3.3.1. Proben Sentezlenmesi	36
3.3.1.1. 2,4-Dihidroksibenzaldehit (rezorsinal) Sentezi (2):	36
3.3.1.2. 1,3-dihidroksi-4-(1H)-benzimidazol (HBI) Sentezi (4):	36
3.3.1.3. 2-kloro-1-formil-3-hidroksimetilen sikloheksen Sentezi (6):	36
3.3.1.4. 1-metil-2,3,3-trimetil-3H-indolyum iyodür Sentezi (10):	37
3.3.1.5. Cy7-Cl Sentezi (11):	37
3.3.1.6. NIR-HBI Sentezi:	37
3.3.1.7. NIR-CuHBI Sentezi (prob):	38
3.4. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI	38
3.4.1. Nitrik Oksitin Doğrudan Tayini ve Aktivite Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	38
3.4.1.1. CuCl ₂ Çözeltisinin Hazırlanması	38
3.4.1.2. NIR-HBI Çözeltisinin Hazırlanması	38
3.4.1.3. Nitrik Oksit Hazırlanması	39
3.4.1.4. Biyotiyollerin Hazırlanması	39
3.5. UYGULANAN YÖNTEMLER	39
3.5.1. NIR-HBI Molekülünün Yapısının Aydınlatılmasında Kullanılan Yöntemler	39
3.5.2. Nitrik Oksit Aktivite Tayininde Uygulanan Yöntemler	39
3.5.2.1. Florometrik Yöntem	39
4. BULGULAR	40
4.1. NIR-HBI'NİN YAPISININ AYDINLATILMASI İÇİN UYGULANAN TEKNİKLERDEN ELDE EDİLEN BULGULAR	40
4.1.1. HRMS Spektrumu	40
4.1.2. FT-IR Spektrumu	41
4.1.3. ¹ H-NMR Spektrumları	42
4.1.4. ¹³ C-NMR Spektrumu	43
4.1.5. COSY, HMBS ve HSQC Spektrumları	44
4.2. NIR-CuHBI'NİN NİTRİK OKSİT AKTİVİTESİNİN TAYİNİ	46
4.2.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi	46
4.2.1.1. Optimum Dalgaboyunun Belirlenmesi ve Metal Kompleksinin Oluşturulması	46
4.2.1.2. pH'nın Prob Üzerine Etkisi	47

4.2.2. NIR-CuHBI ile NO Tayini	48
4.2.2.1. NIR-CuHBI ile NO Arasındaki Etkileşimin Zamana Bağlı Değişimi....	48
4.2.2.2. NIR-CuHBI ile NO Arasındaki Etkileşimin Konsantrasyona Bağlı Değişimi.....	50
4.2.2.3. NIR-CuHBI ile NO Arasındaki Etkileşime pH Etkisi	51
4.2.3. Biyotiyoller Varlığında NIR-CuHBI ile NO Tayini.....	52
4.2.3.1. NIR-CuHBI ile NO Arasındaki Etkileşime Biyotiyol Etkisi	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	58
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ.....	74



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Organizmada Gerçekleşen Nitrik Oksit Sentez Mekanizması.	4
Şekil 2.2: Lüminolün Uyarılması ve Tekrar Temel Hale Geçiş Mekanizması.....	7
Şekil 2.3: Lüminolün Gerçekleştirdiği Kemilüminesans Işıma.....	7
Şekil 2.4: EPR’de Kullanılan Fe(DTCS)2 Kompleksi.	8
Şekil 2.5: PET Mekanizmasının Etkin Olduğu Floresan Prob.	9
Şekil 2.6: Siklizasyon Mekanizmasının Etkin Olduğu Floresan Prob.....	10
Şekil 2.7: Diaminonaftalen Bileşiği ve ·NO ile Etkileşimi Sonucu Naftatriazol Oluşumu.	11
Şekil 2.8: Diklorofloresein Bileşiği ve ·NO ile Etkileşim Mekanizması.	11
Şekil 2.9: <i>o</i> -diaminobenzen Halkası İçeren Floresan Prob Örnekler.	12
Şekil 2.10: <i>o</i> -diaminobenzen Yapılarının DHAA ile Etkileşimi Sonucu Oluşan Ürünler.	14
Şekil 2.11: Kompleks Bozulmaksızın Floroforun Nitrozolanmasına Dayalı Prob Örnekleri ve Etki Mekanizması.	16
Şekil 2.12: Bakırın İndirgenerek ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$) Yapıdan Ayrıldığı Floresan Prob Örnekleri.	17
Şekil 2.13: ·NO’ya Spesifik Benzimidazol Türevi Florojenik Prob Örnekleri.....	18
Şekil 2.14: ·NO’ya Selektif AZO ₅₅₀ Florojenik Prob ve Çalışma Mekanizması.	19
Şekil 2.15: Aromatik Halkanın Deaminasyonuna Dayalı ·NO Prob ve Çalışma Mekanizması.	20
Şekil 2.16: Kumarin Esaslı ·NO Probu.	20
Şekil 2.17: <i>o</i> -hidroksiamino Grubu Esaslı Florojenik ·NO Probu.	21
Şekil 2.18: Near-Infrared Bölgede Absorbsiyon Değerlerine Sahip Polimetinsiyanin (A) ve BODIPY (B) Floroforları.	23

Şekil 2.19: Heptametin (ICG) ve Kloro-heptametin (Cy7-Cl) Siyanin Yapıları ve Türevleri.....	24
Şekil 2.20: Yeni NIR Siyanin Bileşiklerinin Sentez Mekanizması.....	25
Şekil 2.21: Karakteristik Hidroksil (-OH) Grubuna Sahip Florofor Yapılar.....	25
Şekil 2.22: Yeni NIR Siyanin Molekülü Üzerinden Geliştirilen Floresan Prob Örnekleri.....	26
Şekil 2.23: ·NO İçin Geliştirilen Florojenik İlk NIR Prob (DAC-P) ve Floresans İntensitesi Değişim Spektrumu.....	28
Şekil 2.24: NRNO Probu ve Floresans İntensitesi Değişim Spektrumu.....	29
Şekil 2.25: SiRB-NO Probu ve Floresans İntensitesi Değişim Spektrumu.....	30
Şekil 2.26: 1-NO Probu ve Floresans Değişim Spektrumu.....	30
Şekil 2.27: NIR-MA probu ve Etki Mekanizması.....	31
Şekil 3.1: Tez Kapsamında Geliştirilen ·NO'ya Seçici Florojenik NIR Prob (NIR-CuHBI).....	33
Şekil 3.2: 1,3 - Dihidroksi Benzen Sübstitüe Benzimidazol Molekülünde Gerçekleşen Bakır(II) Kompleksi ve Nitrozolanma.....	34
Şekil 3.3: ·NO'ya Selektif NIR-CuHBI Probu'nun Çok Aşamalı Sentez Prosedürü.....	35
Şekil 4.1: NIR-HBI Molekülünün HRMS Spektrumu.....	40
Şekil 4.2: NIR-HBI Molekülünün FT-IR (ATR) Spektrumu.....	41
Şekil 4.3: NIR-HBI Molekülüne Ait ¹ H-NMR Spektrumu.....	42
Şekil 4.4: NIR-HBI Molekülünün ¹ H-NMR (döteryum değişimli) Spektrumu (CDCl ₃).....	42
Şekil 4.5: NIR-HBI Molekülünün ¹³ C-NMR Spektrumu (CDCl ₃).....	43
Şekil 4.6: NIR-HBI Molekülüne Ait COSY Spektrumu.....	44
Şekil 4.7: NIR-HBI Molekülüne Ait HMBC Spektrumu.....	44
Şekil 4.8: NIR-HBI Molekülünün HSQC Spektrumu.....	45
Şekil 4.9: NIR-HBI ve Cu Metali Arasında Öngörülen Kompleks Oluşumu.....	46
Şekil 4.10: NIR-HBI ve Bakır Metali Arasındaki Kompleksleşme Oranına Dayalı Floresans İntensite Değişimi Grafiği.....	47

Şekil 4.11: NIR-HBI ve NIR-CuHBI Bileşiklerinin Floresans İntensitelerine pH Etkisi.	47
Şekil 4.12: ·NO İlavesi (1 mL) Sonucu NIR-CuHBI'nın Floresans İntensitesinde Meydana Gelen Değişim.....	48
Şekil 4.13: NIR-CuHBI ve 40 µM ·NO Etkileşiminin Zamana Bağlı Değişim Grafikleri.....	49
Şekil 4.14: NIR-CuHBI ve ·NO Arasındaki Konsantrasyona Bağlı İntensite Değişim Grafikleri.	50
Şekil 4.15: NIR-CuHBI ve ·NO Etkileşimine pH Etkisi.....	51
Şekil 4.16: Ortamda Bulunan ve Oluşan Maddelerin $\lambda_{em} = 745$ nm'deki İntensite Değerleri.....	52
Şekil 4.17: NIR-CuHBI ve ·NO Arasındaki Etkileşime NAC Etkisi.....	53
Şekil 4.18: NIR-CuHBI ve ·NO Arasındaki Etkileşime GSH Etkisi.	54
Şekil 4.19: NIR-CuHBI ve ·NO Arasındaki Etkileşime Cys Etkisi.....	55
Şekil 4.20: NIR-CuHBI ve ·NO Arasındaki Etkileşime HCy Etkisi.	56
Şekil 4.21: Florometrik Yöntemde NIR-CuHBI + NO + Biyotiyol Etkileşiminin Zamana Bağlı İntensite Değişimi.....	57
Şekil 5.1: NIR-HBI Molekülünün Karakterizasyonu Sırasında Kullanılan Numaralandırma Sistemi.....	59
Şekil 5.2: NIR-CuHBI ve ·NO Arasında Gerçekleştiği Öngörülen Reaksiyon Mekanizması.	60
Şekil 5.3: Nitrozotiyol Örnekleri.	61
Şekil 5.4: NIR-CuHBI Yapısına Biyotiyol Etkisi (ekivalen kons. ·NO'ya karşı).	62
Şekil 5.5: Geliştirilen Yeni Prob Üzerinde Muhtemel Biyotiyol Katılma Ürünleri.	63

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler

Açıklama

R(r)	:Lineer Korelasyon Katsayısı
λ_{ex}	:Eksitasyon Dalga Boyu
λ_{em}	:Emisyon Dalga Boyu
ϵ	:Molar Absorptivite
I	:İntensite
c	:Konsantrasyon
M	:Molarite

Kisaltmalar

Açıklama

AA	:5-(1,2-dihydroxyethyl)-3,4-dihydroxyfuran-2(5 <i>H</i>)-one, Askorbik Asit
BODIPY	:4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene
CHNI	:4-chloro-2-(1 <i>H</i> -naphtho[2,3- <i>d</i>]imidazol-2-yl)phenol
Cy7-Cl	:2-[2-[2-Chloro-3-[(1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-ethyl-2 <i>H</i> -indol-2-ylidene)ethylidene]-1-cyclohexen-1-yl]ethenyl]-3,3-dimethyl-1-ethylindolium iodide
DAF-2	:4,5-diamino-2-(6-hydroxy-3-oxo-3 <i>H</i> -xanthen-9-yl)benzoic acid
DAR-4M	:3',6'-Bis(dimethylamino)-9-[2-acetomethoxycarbonyl-3-amino-4-(<i>N</i> -methylamino)phenyl]xanthylium iodide
DAQ	:1,2-diaminoanthracene-9,10-dione
DAMBO	:1,3,5,7-tetramethyl- 8-(3',4'-diaminophenyl) difluoroboradiaza-s-indacene
DANPBO-H	:8-(3,4-Diaminophenyl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-di(1,2-dihydro) naphtho[b, g]s-indacene
DHAA	:5-(1,2-dihydroxyethyl)oxolane-2,3,4-trione, Dehidroaskorbik asit
DA-SR	:Diamino spiro lactam rhodamin
Ds-HAMP	:5-(dimethylamino)- <i>N</i> -[(pyridin-2-yl)methyl]naphthalene-1-sulfonamide
Ds-HAQ	:5-(dimethylamino)- <i>N</i> -(quinolin-8-yl)naphthalene-1-sulfonamide
FA-OMe	:5-amino-2-(6-hydroxy-3-oxo-3 <i>H</i> -xanthen-9-yl)methylbenzoate
Fe(DTCS)₂	:Demir(II)- <i>N</i> -ditiyo karboksi sarkozin
Hbpg	: <i>N</i> -(quinolin-8-yl)pyridine-2-carboxamide
ICG	:sodium 4-[2-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i> ,5 <i>E</i> ,7 <i>Z</i>)-7-[1,1-dimethyl-3-(4-sulfonatobutyl)benzo[<i>e</i>]indol-2-ylidene]hepta-1,3,5-trienyl]-1,1-dimethylbenzo[<i>e</i>]indol-3-ium-3-yl]butane-1-sulfonate
LysoNO-Naph	:5,6-diamino-2-[2-(morpholin-4-yl)ethyl]-1 <i>H</i> -benzo[<i>de</i>]isoquinoline-1,3(2 <i>H</i>)-dione
MNIP	:5-methoxy-2-(1 <i>H</i> -naphtho[2,3- <i>d</i>]imidazol-2-yl)phenol
NO₅₅₀	:2-[3-(dimethylamino)phenyl]-5-isocyanonaphthalen-1-amine
SiRB	:Silisyum İçerikli Rodamin

Cys	:Sistein
EDRF	:Endotel Kökenli Rahatlatıcı Faktör
ESR/EPR	:Elektron Spin Rezonans
ESI	:Elektrosprey İyonizasyon
FT-IR	:Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi
FRET	:Rezonans Etkisiyle Gerçekleşen Enerji Transferi
GSH	:Glutasyon
HBI	:Hidroksibenzimidazol
HBT	:Hidroksibenzotiyazol
Hcy	:Homosistein
HMBC	:Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu
HRMS	:Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrumu
HSQC	:Heteronükleer Tek-Kuantum Korelasyonu
ICT	:Molekül İçi Yük Transferi
KI	:Potasyum İyodür
LOD	:Dedeksiyon Limiti - Tayin Edilebilen Minimum Miktar
LIF	:Lazer Destekli İndirgeme Özelliğine Sahip Floresans Teknikler
MR	:Manyetik Rezonans
NMR	:Nükleer Manyetik Rezonans
NADP	:Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
N-Ac-Cys/NAC	:N-asetil sistein
NO	:Nitrik Oksit
NIR	:Yakın Kızılötesi, Near İnfrared
OLED	:Organik Işık Yayan Diyot
PET	:Uyarılmış Elektron Transferi
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
RNS	:Reaktif Azot Türleri
Ref	:Referans

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİTRİK OKSİT AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ İÇİN YENİ BİR FLOROJENİK PROB GELİŞTİRİLMESİ

Emin Ahmet YEŞİL

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Mehmet ALTUN

Nitrik oksit ($\cdot\text{NO}$), azot atomu üzerindeki ortaklanmamış bir adet elektron bulundurması, çeşitli protein ve serbest radikal türler ile hızlı bir şekilde etkileşim göstermesi sebebiyle serbest radikal moleküller sınıfı içerisinde yer almaktadır. Vücutta damar endotel hücrelerinde gaz formda sentezlenmektedir. Organizmada kana karışmasıyla birlikte düz kasların gevşemesini sağlamaktadır. Bunun yanı sıra birçok fizyolojik (anti tümör ve anti mikrobiyal etki, sinir sistemi içerisinde sinyalizasyonun sağlanması, burun soğanındaki koku duyarlık derecesinin ayarlanması, trombosit taşınması ve kan basıncının düzenlenmesi, kan akışının organlara yönlendirilmesi vs.) ve patolojik (damar ve doku sertleşmesi, hipertansiyon, kanser, AIDS ve Alzheimer, ülser ve genç yaşta görülen diyabet gibi kronik hastalıklar, dolaylı DNA parçalanması vs.) etkiye sahiptir. Kısa ömürlü ve son derece reaktif bir moleküldür. Oksijen veya süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ile reaksiyonu sonucunda ise toksik etkiye sahip nitrit, nitrat (NO_x), peroksinitrit (OONO^{\cdot}) gibi yükseltgenme ürünleri meydana gelmektedir. Nitrik oksitin sentezinin, etki mekanizmasının ve organizmadaki çok yönlü biyolojik etkilerinin kapsamlı bir şekilde araştırılması için kemilüminesans, elektron spin rezonans (ESR), kolorimetri, elektrokimya ve florometri gibi çeşitli elektrokimyasal ve spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır. Uygulaması kolaylıkla yapılabilen, seçici ve hassas olarak ilgili reaksiyonun oluşum zamanı ve yerinin eş zamanlı tespit edilip üzerinde değerlendirme

yapılmasına imkânı sunan ve daha az maliyetli olan floresans esaslı florometrik yöntemler, ·NO görüntülenmesi için daha ziyade tercih edilmekte ve kullanılmaktadır.

Genel olarak literatürde ·NO tespit ve görüntülenmesi için çeşitli floresans özellikli problemler sentezlenmiştir. İlk olarak diaminonaftalen bileşiği ·NO tayini için kullanılmıştır; fakat uygulama asidik şartlar gerektirdiğinden ve uyarılma dalga boyu görünür bölge içerisinde kaldığından hücrede hasara yol açtığı ve dolayısıyla ·NO tayini için uygun bir prob olmadığı anlaşılmıştır. Daha sonra bu metoda alternatif olarak kullanılan 2,7-diklorofloresein bileşiği ise diğer reaktif oksijen türleri ile de etkileşim göstermiş ve ·NO'ya karşı düşük seçicilikte olduğu saptanmıştır. Molekül yapısında iki adet komşu amin (orto-diamin) grubu içeren ve fizyolojik şartlara yakın koşullarda uygulaması yapılabilen problemler ile gerçekleştirilen denemelerde ise ·NO ölçümleri için yüksek seçicilik ve hassas ölçümler kaydedilmiştir; problemlerin floresans şiddetlerinde çok ciddi artışlar saptanmıştır. Fakat ·NO'nun haricinde, dehidroaskorbik asit ve askorbik asitin de orto-diamin yapısını içeren problemler ile etkileşim göstermesi dezavantaj oluşturmaktadır. Günümüzde ise metal kompleksi esaslı sentezlenmiş olan problemler ·NO'nun anlık oluşum yeri ve zamanının eş zamanlı olarak seçici ve hassas olarak ölçülmesinde ve değerlendirilmesinde güvenle kullanılmaktadır. Literatürde bu mekanizma üzerine sentezlenmiş olan problemlerin çoğu görünür bölgede absorpsiyon yapmaktadır. Floresans esaslı problemlerin kullanıldığı *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarda, yüksek doku hücrelerinin yapısından kaynaklanan arka plan ışımalar ile problemlerin floresans ışınması girişim yapmakta ve sonuçları doğrudan etkilemektedir. Bu sorunun, yakın kızılötesi (near-infrared, NIR) bölgede uyarılma dalga boyuna sahip floresans esaslı problemler kullanılarak aşılabileceği düşünülmekte ve yapılan uygulamalarda da bu düşünce doğrulanmaktadır. Ayrıca NIR bölgede absorpsiyon yapacak olan problemlerin kullanılmasıyla, hasar veya ölüme neden olmaksızın hücre ve dokuların daha derinlemesine görüntüleneceği, böylece çalışmaların daha kapsamlı bir şekilde yapılmasına olanak sağlanacağı öngörülmektedir.

Tez kapsamında, bakır(II) merkezli metal kompleksine dayalı, near-infrared (NIR) teknolojisinde sıklıkla kullanılan siyanin boyası türevleri ile yapısındaki elektron akışı zenginleştirilmiş, NIR bölgede (650 – 900 nm aralığında) eksitasyon ve emisyon dalga boylarına sahip olduğu denemeler sonucunda kanıtlanan; sitotoksik etkisinin minimum düzeyde olduğu gözlemlenen; kolaylıkla uygulanabilen, nitrik oksite selektif; ayrıca literatürdeki aynı mekanizma üzerinden etki gösteren diğer problemlere zaman içerisinde üstünlük sağlayacağı düşünülen floresans esaslı yeni bir florojenik prob geliştirilmiştir.

Mayıs 2017, 90 sayfa.

Anahtar kelimeler: Nitrik Oksit Prob, Nitrik Oksit Aktivite Ölçümü, Reaktif Oksijen ve Azot Türleri, Siyanin ve Hemisiyanin Boyaları, Yakın İnfrared Prob

SUMMARY

M.Sc. THESIS

DEVELOPMENT OF A NOVEL FLUROGENIC PROBE FOR THE MEASUREMENT OF NITRIC OXIDE ACTIVITY

Emin Ahmet YESIL

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mehmet ALTUN

Nitric Oxide is located inside the free radical molecules because it contains an unpaired electron on its structure and show interaction with metabolic constituents like proteins and free radical species. It synthesized vascular endothelial cells in the body in gaseous form. It provides relaxation of smooth muscle when the mixing with blood in the organism. And also it has many physiological (antitumor and antimicrobial activity, providing signaling in the nervous system, adjusting the sensitivity level in the nose smell of onions, transporting platelet, regulating of blood pressure, and directing blood flow to organs etc.) and pathologically (arteriosclerosis and sclerosis, hypertension, cancer, AIDS, Alzheimer, ulcer and chronic diseases such as diabetes which is seen at a young age, and indirect DNA fragmentation etc.) effects. It is short-lived and highly reactive molecule. Its reactions with oxygen and superoxide radical ($O_2^{\cdot -}$) leads to form oxidation products such as nitrite, nitrate and peroxynitrite.

Various electrochemical and spectroscopic methods are used for the determination of nitric oxide formation, its mechanism of action and versatile biological effects in organism such as chemiluminescence, electron spin resonance (ESR), colorimetry, electrochemistry and fluorimetry. Fluorescence-based fluorometric methods have been used mostly which can be easily applied, provides the possibility to detection and

assessing for corresponding reaction's occurrence time and location simultaneously, and less costly.

In general, various fluorescence-based probes for detection of $\cdot\text{NO}$ is synthesized in the literature. First, diaminonaphthalene compound is used for determination of $\cdot\text{NO}$; but it's application required acidic conditions and their excitation wavelength remained within visible region, and thus was concluded that it's not a suitable probe for $\cdot\text{NO}$ determination. Subsequently, the alternative used 2,7-dichlorofluorescein compound has interacted with the other reactive oxygen species and it was showed lower selectivity towards $\cdot\text{NO}$. Then using the probes, which contains two neighboring amine groups (ortho-diamine) on the molecular structure, made applications under the conditions close to physiological conditions recorded high selectivity and sensitivity for nitric oxide, and also significant increases in fluorescence intensity of probes were observed. But except for $\cdot\text{NO}$, dehydroascorbic acid and ascorbic acid are also showed interfering with these ortho-diamine containing probes, which is a disadvantage. Nowadays based on metal complexes probes are used safely for sensitive and selective determination and assessing instant formation and location for $\cdot\text{NO}$. Most of the probes which was synthesized via this mechanism in literature, makes absorption in the visible region. Using fluorescence-based probes *in vivo* and *in vitro* studies, high tissue cells structure-mediated background fluorescence radiation and probes fluorescence radiation are interfering and directly affects the results. To overcome this problem fluorescence-based probe was considered, studied probe was designed to monitor absorption in near-infrared region and this idea was confirmed with practical/experimental results. In addition, using probes which is absorption in NIR region, is foreseen that, without causing injury or death of cells and tissues to deeper penetration will take place and studies shall be more comprehensive manner.

At this thesis fluorescence-based novel fluorogenic probe has been developed which was created based on copper(II) cation-based metal complexes, to enrich electron stream in the structure by cyanine dye derivatives which are commonly used in NIR fluorescence imaging technology, and proved to be result of the experiments it has excitation and emission wavelength in NIR region (650-900 nm); by correlating with the literature, our developed probe has shown, minimum of cytotoxic effect, easy to apply, selective to nitric oxide, so it is believed with the current properties it may be superior to probes used in determination and activity measurement through the same mechanisms in the literature.

May 2017, 90 pages.

Keywords: Nitric Oxide Probe, Nitric Oxide Activity Measurement, Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Cyanine and Hemicyanine Dyes, NIR Probe

1. GİRİŞ

Canlı organizmalar çok sayıda hücreden meydana gelmektedir. Hücrelerde ise muazzam sayıda ve çeşitlilikte biyoaktif moleküller bulunmaktadır. Bu moleküllerin miktarları, kimyasal değişimleri ve etki mekanizmaları, oluşum yeri ve zamanına bağlı olarak kontrol edilebilmekte ve çeşitli tayinler yapılabilmektedir. Hücrelerin içerisinde ve hücreler arasında gerçekleşen karmaşık sistemi aydınlatılabilmek biyolojinin nihai amaçlarından biridir. Bu amaç doğrultusunda bilim insanları, farklı analiz teknikleri kullanarak bir takım tayinler yapmaktadırlar. Her yapının belirgin özelliklerinden yararlanılarak görsel olarak takibi gerçekleştirilebilmektedir [1]. Bu amaçla elektrokimyasal veya spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır. Kemilüminesans, floresans, spektrofotometri, elektron paramanyetik rezonans (elektron spin rezonans olarak da bilinmektedir, EPR/ESR), elektrokimyasal metotlar ve çeşitli diğer teknikler bu yöntemlere örnek verilebilir [2,3]. Bu noktada önemli olan, kullanılacak metodun avantaj ve dezavantajlarını iyi bir şekilde yorumlayarak tayinin doğru, hassas ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesidir. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında floresans görüntüleme, sağladığı yüksek hassasiyet, hücrede meydana gelen değişime eş zamanlı ve güvenilir veri alabilme gibi birçok özelliği nedeniyle daha avantajlı görülmektedir [1-3]. Floresans görüntüleme teknikleri, organizmadaki bazı biyoaktif moleküllerin tespitinde, organizma içerisinde doğal olarak oluşumları ve etki mekanizmalarının detaylıca incelenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu alanda, günümüzde oldukça hızlı bir ilerleme kaydedilmektedir. Bu teknik, biyolojik görüntüleme ve tanılamada büyük öneme sahiptir. Genellikle molekül için seçici hale getirilmiş çeşitli floresans esaslı boyarmaddelerin kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Bu boyarmaddelere “prob” denilmektedir. Floresan problemlerin ilgili biyoaktif moleküllere yüksek hassasiyet göstermesi, biyoaktif moleküllerin organizmada oluşum ve etki mekanizmasının sürecini anlık olarak laboratuvar koşullarında izlenmesine olanak sağlaması önem arz etmektedir [4].

Oksidatif stres, oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki mevcut dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur. Hücrede normal şartlarda pro-oksidanlar ve antioksidanlar dengededirler. Fakat bu denge reaktif oksijen ve azot türlerinin üretiminin

artması veya antioksidan miktarındaki azalma sebebiyle pro-oksidanlar yönüne kaymaktadır. Reaktif oksijen ve azot türlerine örnek olarak nitrik oksit ($\cdot\text{NO}$), süperoksit ($\text{O}_2\cdot^-$), hidroksil ve peroksil radikalleri ($\text{HO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ve peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$) gösterilebilir. Genel olarak reaktif azot türleri nitrik oksit türevi olarak bilinmektedir ve organizmada önemli roller üstlenmektedirler [5,6]. Nitrik oksit, nörodejeneratif hastalıkların ve inflamasyonların meydana gelmesi, vasodilatasyon (damar genişlemesi), kanser oluşumu ve birçok fizyolojik olayın gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. Bu sebeple görüntülenmesi, tayin edilmesi ve etki mekanizmasının daha detaylıca araştırılması büyük önem arz etmektedir. Bu amaç doğrultusunda en doğru sonuçlar floresans esaslı tekniklerin kullanılmasıyla elde edilmektedir [7].

Tez kapsamında geliştirilen yeni prob ve tayin yönteminde ölçüm yapılan dalgaboyunun (near infrared bölge: 650-900 nm) sadece proba özgü olması, diğer spektrofotometrik yöntemlere göre daha duyarlı olması (UV-Vis bölgede eksitasyon ve emisyon dalgaboyları) ve HPLC yöntemlerinden daha az maliyetli ve kolay uygulanabilir olması yöntemin üstünlükleri olarak özetlenebilmekte ve bu yönüyle literatürdeki boşluğu doldurabilecek niteliktedir. Sonuçta sentezlenen yeni floresan prob ve geliştirilen $\cdot\text{NO}$ aktivite ölçümü yönteminin antioksidan araştırmacıları, biyokimyacılar, tıp ve gıda bilimcileri tarafından pratik olarak kullanılabilirliğinin yanı sıra maliyet, enerji ve zamandan tasarruf sağlanması da hedeflenmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

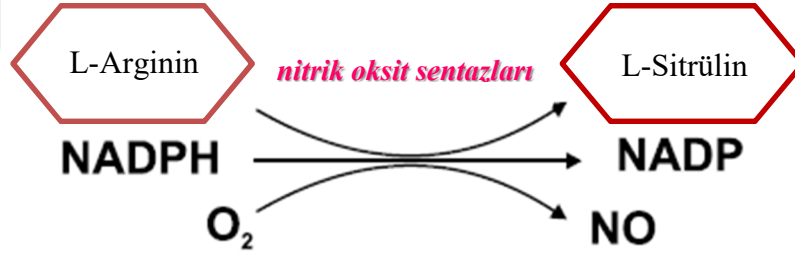
2.1. OKSİDATİF STRES

Oksijen yaşam için gereklidir. Tüm canlı sistemler moleküler oksijen varlığında hayatta kalabilmektedir. Oksijenin oksidatif etkisi birçok biyolojik olayın gerçekleşmesinde hayati önem taşımaktadır. Serbest radikaller, organizmada mevcut olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenmediği zaman “oksidatif stres” koşulları oluşmaktadır. Serbest radikaller son derece reaktif moleküllerdir ve molekül yapısında ortaklanmamış elektron içeren yapıların moleküler oksijenle etkileşimi sonucunda oksidatif stres koşullarında oluşurlar. Kısa ömürlü ve kararsızdırlar. DNA, lipid ve proteinlerin yapılarına zarar verebilme potansiyeline sahiptirler. Organizmada gerçekleşen birçok fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerin sonucunda yan ürün olarak oksijen temelli serbest radikaller oluşmaktadır. Bu radikallerin olağan miktarın üzerinde üretilmesi birçok biyomolekülün oksidatif olarak hasar görmesine ve sonuç olarak kanser, diyabet, erken yaşlanma gibi kronik rahatsızların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır [8].

2.2. NİTRİK OKSİT NEDİR?

Nitrik Oksit ($\cdot\text{NO}$), yaygın olarak memeli, bitki, bakteri ve omurgasızların organizmalarında L-Arginin’in L-Sitrülin’e dönüşümü sırasında nitrik oksit sentazları tarafından endojen olarak sentezlenmektedir (Şekil 2.1). Reaktif azot türlerinin (RNS) ilk örneğidir ve diğer azot merkezli serbest radikallerin başlangıç molekülüdür (peroksinitrit, nitrit, nitrat vs.). Üç farklı izoformu mevcuttur [6,9]. Molekül yapısını oluşturan azot atomu üzerinde ortaklanmamış elektron bulundurduğundan serbest radikal molekül sınıfı içerisinde yer almaktadır. Çeşitli metal içerikli protein ve serbest radikal türler ile hızlı bir şekilde etkileşim göstererek bir takım fizyolojik ve patofizyolojik etkiler meydana getirir [10]. İlk olarak 1987’de canlı organizmasında doğal olarak sentezlenen endotel kökenli rahatlatıcı faktör (EDRF) olarak tanımlanmıştır [11]. 1998’de ise Nobel Ödülü’ne layık görülen bir çalışma sonucunda nitrik oksitin organizmada sinyalizasyonu sağlayan çok önemli bir radikal olduğu anlaşılmıştır. Vücutta olağan miktarda sentezlendiğinde (nanomolar ve mikromolar mertebelerindeki oranlarda) antitümör ve antimikrobiyal etki

gösterdiği, kalbi koruduğu, kan basıncını düzenlemeye ve çeşitli organlara yeterli düzeyde kan akışının sağlanmasına yardımcı olduğu, düz kasların gevşemesini sağladığı, beyni uyardığı ve zararlı bakterilerin yok edilmesini sağladığı saptanmıştır. Ayrıca nörotransmitter madde merkezi sinir sisteminde düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Bağışıklık, kardiyovasküler ve sinir sistemi içerisinde sinyalizasyonu sağlayan ana kaynak olarak değerlendirilmektedir [6,8,11-13]. Organizmada yüksek veya biyolojik aktivite sağlayamayacak konsantrasyonlarda sentezlenmesi ve doğada uzun süre etkisine maruz kalınması durumunda ise bir takım patofizyolojik etkilerin görülmesine sebep olmaktadır. Damar ve doku sertleşmesi, hipertansiyon, kanser, epilepsi, AIDS, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif rahatsızlıkların, ülser ve genç yaşta görülen diyabet gibi kronik hastalıkların meydana gelmesine, dolaylı olarak DNA parçalanmasına sebep olduğu belirtilmektedir [14-16].



Şekil 2.1: Organizmada Gerçekleşen Nitrik Oksit Sentez Mekanizması.

Yaklaşık olarak 1-10 mM konsantrasyon aralığındaki $\cdot\text{NO}$ miktarı, guanil siklaz enzimini aktive etmek için yeterli olmaktadır. Bu sayede organizmada hücrelere dışarıdan gelen sinyaller hücrelerin içine doğru iletilmektedir. Ayrıca endotel hücrelerinde $10\mu\text{M}$ 'dan daha az konsantrasyonda $\cdot\text{NO}$ sentezlenmesi, vücut içerisinde kan basıncının kontrol edilmesi için yeterli olmaktadır. Dolayısıyla, biyolojik olarak birçok etkiye sahip olan bu molekülün düşük konsantrasyon değerlerinde bile doğrudan tespit edilebilmesi, fizyolojik sistemlerdeki rolünün daha detaylı olarak incelenmesine ve sebep olduğu işlevsel bozuklukların ortaya çıkarılmasında büyük önem taşımaktadır. Fakat yarılanma ömrünün birkaç saniye (maksimum 10 saniye) ile sınırlı olması, gaz formunda sentezlenmesi ve

çok reaktif bir serbest radikal molekül olması nedeniyle organizmada diğer radikallerle çok çabuk etkileşim göstermesi ve çeşitli yeni reaktif moleküllere dönüşmesinden dolayı doğrudan tespiti oldukça güçtür [13,17,18].

2.3. NİTRİK OKSİTİN TAYİN EDİLMESİ VE GÖRÜNTÜLENMESİ

Nitrik oksitin, özellikle düşük konsantrasyon değerlerinde bile doğrudan tespit edilmesi, miktarının belirlenmesi ve görüntülenmesi, organizmadaki fizyolojik ve patolojik etkilerinin detaylıca araştırılmasında oldukça önemlidir [10,13]. Fakat $\cdot\text{NO}$ 'nun çok reaktif ve kısa ömürlü bir radikal olması, düşük konsantrasyon değerlerinde ve az miktarda sentezlenmesi bu işlemi oldukça zorlaştırmaktadır. Bu gibi dezavantaj veya zorluklardan yola çıkarak, nitrik oksit tayini için uygulanacak olan metotlarda yüksek duyarlılık ve hassasiyet ön plana çıkmaktadır. Daha da önemlisi metodun, nitrik oksitin oksidasyon ürünlerine veya diğer reaktif oksijen/azot türlerine oranla $\cdot\text{NO}$ 'ya daha seçici olması istenmektedir [17].

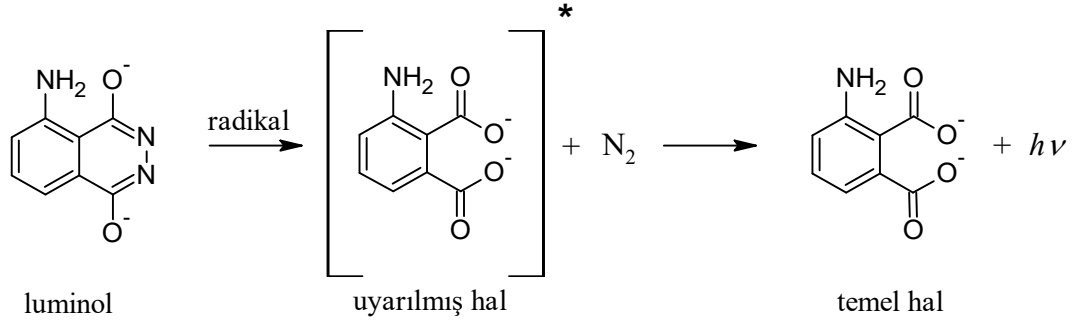
Nitrik oksit tayini için literatüre kazandırılmış birçok metot vardır. Bunlar elektrokimyasal ve spektroskopik metotlar olmak üzere iki ana başlık altında toplanmıştır. Elektrokimyasal metotlar elektronların doğrudan veya katalitik süreçler sonucu redüksiyon ve oksidasyonuna bağlı olarak uygulanmaktadır [20]. Spektroskopik tayin metotları da iki başlık altında gruplanmaktadır. Bunlardan ilki, $\cdot\text{NO}$ üzerinden oluşan ürünlerin tespiti yoluyla dolaylı olarak $\cdot\text{NO}$ değerlerinin hesaplanmasına olanak sağlayan Griess Reaksiyonu ve kemilüminesans özellikli metotlardır. Diğeri ise elektron spin rezonans (ESR) spektroskopisi ve floresans esaslı metotlar kullanılarak doğrudan $\cdot\text{NO}$ tayininin gerçekleştirildiği spektroskopik yöntemlerdir [9,17]. Bunların dışında da herhangi bir gruba dâhil edilmeksizin kullanılan yöntemler vardır. Manyetik rezonans (MR) [21,22], zamana bağlı olarak gönderilen fotonlar yardımıyla çözünmeye başlayan iyon ve elektronların kullanıldığı veya kalsiyum iyonunun çoğaltılması esasına dayalı uygulanan görüntüleme teknikleri [23], hemoglobinin yapısının değişiminin spektral olarak görüntülenmesi ve lazer destekli indirgeme özelliğine sahip floresan esaslı teknikler (LIF) bu yöntemlere örnek olarak gösterilebilmektedir [24].

2.3.1. Griess Reaksiyonu

Metoda ismini veren Griess reaktifi, %1 sülfonamid, %0.1 N-(1-Naftil)-etilendiamin ve %2 ortofosforik asit karışımından elde edilen ve $\cdot\text{NO}$ tayini için kullanılan bir kimyasaldır. Metotta kullanılan diğer bir reaktif olan sodyum nitroprussiyat, fizyolojik pH koşullarında ($\text{pH} = 7.3-7.4$) bozunarak $\cdot\text{NO}$ üretir ve ortamdaki oksijen ile etkileşim göstererek nitrit iyonları oluşur (NO_2^-). Oluşan nitrit iyonları da Griess reaktifi kullanılarak 543 nm'de spektrofotometrede tayin edilmektedir [8,25]. Her ne kadar bu metot $\cdot\text{NO}$ tayini için kullanılsa da, doğrudan $\cdot\text{NO}$ tayini yerine $\cdot\text{NO}$ 'dan daha kararlı olan nitrit iyonlarının tayini gerçekleştirilmiş olmaktadır. Metodun dedeksiyon limiti (tayin edilebilir minimum konsantrasyon değeri) 0.1-1 μM aralığında olup bunun yeterli hassasiyette olmadığı belirtilmektedir [26].

2.3.2. Kemilüminesans

Nitrik oksit tayini için hassas bir yöntem olarak gösterilmektedir. Bu metotta $\cdot\text{NO}$ tayin ve görüntülenmesi için gaz ve sıvı fazların kullanıldığı belirtilmektedir. Hidrojen peroksit ve luminol gibi kimyasallar kullanılmaktadır. Gaz fazında kemilüminesans metodu uygulanırken genellikle ozon gazı kullanılarak $\cdot\text{NO}$ üzerinden $\cdot\text{NO}_2^-$ (nitrit) oluşturulur. Bu radikal nitrit iyonu tarafından uyarılan luminol, enerji salınımı yaparak temel elektron düzenine geri döner (Şekil 2.2). Ortama salınan bu enerji ile yaklaşık 600 nm dalgaboyunda kemilüminesans ışımaya meydana gelir (Şekil 2.3). Bu sayede $\cdot\text{NO}$ görüntülenmesi gerçekleştirilebilmektedir. Fakat kullanılan moleküllerin hücre içerisine nüfuz edememesi sebebiyle, yöntem sadece hücre yüzeyi ortamlarından görüntüleme yapılmasına imkân tanımaktadır. Ayrıca $\cdot\text{NO}$ 'nun oluşum zaman ve yerini eş zamanlı olarak izlemeye de olanak sağlayamamaktadır. Yapılan çalışmalarda luminolün sadece $\cdot\text{NO}$ 'ya değil diğer serbest radikallere de cevap verdiği, çalışmaların hemoglobin içeren ortamlarda yapılamadığı gözlenmiştir. Kullanılan hidrojen peroksitin sitotoksik etkisi ve yöntemin maliyetli oluşu da dezavantaj oluşturmaktadır [9,16,26-28].



Şekil 2.2: Lüminolün Uyarılması ve Tekrar Temel Hale Geçiş Mekanizması.

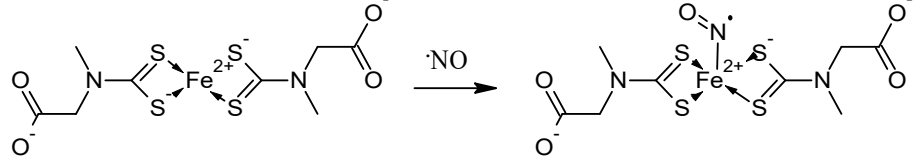


Şekil 2.3: Lüminolün Gerçekleştirdiği Kemilüminesans Işıma.

2.3.3. Elektron Paramanyetik Rezonans Yöntemi (EPR)

Elektron spin rezonans (ESR) yöntemi olarak da bilinmektedir. Serbest radikallerin ortaklanmamış elektronları ile paramanyetik metal iyonları (nitrik oksite olan affinitesinden dolayı genellikle demir metali tercih edilmektedir.) arasındaki manyetik momentin biyolojik matrislerde incelenmesine dayalı gerçekleştirilen bir tayin yöntemidir (Şekil 2.4). EPR/ESR spektroskopisi, serbest radikallerin noninvaziv olarak (herhangi bir enjeksiyon veya fiziksel müdahale gerektirmeksizin) yüzeysel dağılımının gözlenebileceği etkili bir metottur. Biyolojik örneklerde, endojen serbest radikallerin EPR/ESR ile tayin edilebilmesi için radikal konsantrasyonlarının 0.01 - 0.1 μM aralığında olması ve uzun yarılanma ömrüne sahip olması gerekmektedir. Bazı durumlarda bu koşullar sağlanabilirken; çoğu serbest radikalin çok kısa bir sürede oluşup parçalandığı ve çok az bir konsantrasyonda üretildiği göz önünde bulundurulduğunda, hücre içinde yapılacak olan testlerde bu yöntemin kullanılması büyük oranda kısıtlanmaktadır. Ayrıca demir (Fe) metali merkezli oluşturulan bazı komplekslerin suda çözünmemesi, diğer

enzim yapılarıyla ve nitrit iyonlarıyla etkileşim göstermesi de yöntemin dezavantajlı olduğu noktalardır [9,16,29,30].



Şekil 2.4: EPR’de Kullanılan Fe(DTCS)₂ Kompleksi.

2.3.4. Floresans Spektroskopisi

Organizmada endojen olarak sentezlenen ve birçok biyolojik olayın gerçekleşmesinde önemli roller üstlenen nitrik oksit in tam olarak hangi bölgelerde oluştuğu, biyolojik aktiviteleri nasıl gerçekleştirdiği, etki mekanizması, ne kadar miktarda üretilip ne kadar miktarda kullanıldığı gibi sorular, kullanılan tayin ve görüntüleme yöntemlerinin bir takım dezavantajlarından dolayı genellikle tam olarak cevap bulamamıştır. Bu belirsizliklere çözüm olarak belirli dalgaboylarında floresans ışına gerçekleştiren problemlerin kullanıldığı metotlar günümüz bilimsel çalışmalarında yoğun ilgi görmektedir.

Floresans spektroskopisi, ·NO’nun hücre içinde detaylıca araştırılmasına önemli derecede olanak sağlayan bir metottur [31]. Son yıllarda floresans esaslı problemlerin oldukça yoğun bir şekilde geliştirilmesi ve yapılan analizler sonucunda alınan verilerin değerlendirilmesiyle, ·NO tayin ve görüntülenmesinde bu metodun hassas ve spesifik bir test sistemi olduğu kanıtlanmıştır [32-37].

·NO’nun çok reaktif bir molekül olması ve bulunduğu ortamdaki oksijen, kükürt gibi atomlar içeren yapılar ve metal içerikli proteinlerle çok ani bir şekilde reaksiyon vererek çeşitli ve yeni reaktif türlere dönüşmesi, saniyeler ile ifade edilen çok kısa zaman dilimi içerisinde sentezlenip parçalanması gibi faktörler doğrultusunda tayin işlemini gerçekleştirmenin oldukça güç olduğu vurgulanmaktadır [17].

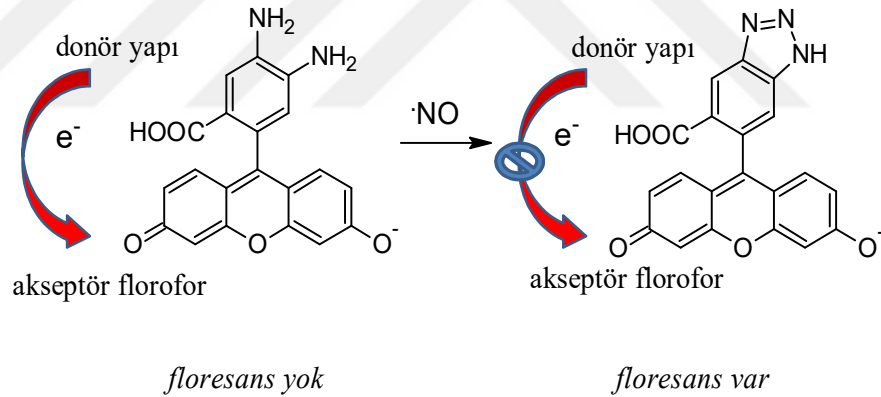
Diğer metotlar ile karşılaştırıldığında bu yöntemin ·NO tayininde birçok avantaj sağladığı belirtilmektedir. Yüksek derecede hassasiyetle doğrudan ve seçici ölçüm alınmasına olanak sağlaması, noninvaziv bir uygulama tekniği olması, oluşum yeri ve zamanını anlık

olarak takibin gerçekleştirilmesi, geliştirilen problemlerin sitotoksik etkisinin minimum düzeyde olması ve hücre ortamında çalışılmaya imkan tanınması, sonuçların doğruluk derecesinin yüksek olması, basit uygulanabilirliğin ve maliyetinin de ucuz olması bu avantajlardan birkaçını oluşturmaktadır [1,5,14,17,19,38].

2.3.5. Prob Mekanizmaları

·NO tayini için kullanılan floresans esaslı organik problemler genellikle şu 4 tip mekanizma üzerinden etki göstermektedir:

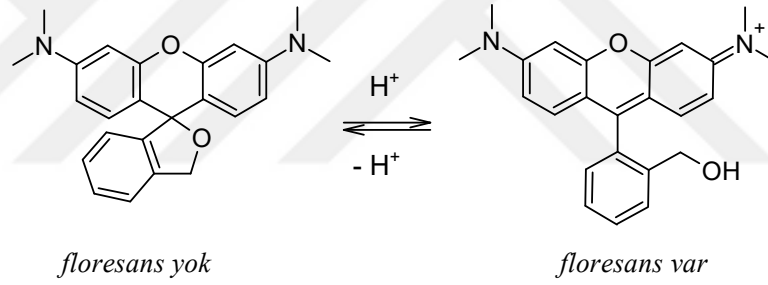
- **PET (Uyarılmış Elektron Transferi):** Uyarılmış haldeki elektronların molekül üzerinde yer değiştirmesine dayalı bir mekanizma işlemektedir. Prob üzerinde donör ve akseptör olarak adlandırılan kısımlar arasındaki elektron transferi söz konusudur. Donörden akseptör florofora elektron akışıyla floresans etki gözlenmediği gibi, aksi şekilde, florofor akseptörden donör yapıya elektron akışı sağlandığı durumlarda da floresans etki gözlenmeyebilir (Şekil 2.5) [39].



Şekil 2.5: PET Mekanizmasının Etkin Olduğu Floresan Prob.

- **FRET (Rezonans Etkisiyle Gerçekleşen Enerji Transferi):** Uyarılmış haldeki enerjinin herhangi bir ışığa olmaksızın donör florofordan akseptör florofora aktarılmasına dayanmaktadır. Donör ve floroför yapıların spektral örtüşmelerine, birbirlerine olan uzaklık ve yönlenme açlarına bağlıdır [40]. FRET mekanizmasının geçerli olduğu problemler hücresel görüntüleme için oldukça uygun yapılar olmakla birlikte, bazı problemlerin hücrelere genetik kodlama ile tanımlanması gerekmektedir [9].

- **ICT (Molekül İçi Yük Transferi):** Florofor bir yapı üzerinde, elektronca zengin bir süstitüe grup bulunuyorsa (amin grubu gibi) ve elektron verme isteğinde olan bu grup, yine aynı florofor üzerinde elektronca zengin olmayan bir yapıya konjuge olarak bağlı ise, ışımaya yoluyla uyarılma gerçekleştiğinde iki yapı arasında elektron transferi olur. Bu sayede dipol momentinin değişimine bağlı olarak Stoke kayması meydana gelir. Katyonların donör ve akseptör yapılarla olan yakın etkileşimi florofor üzerinde fotofiziksel değişimlere sebep olmakta ve molekül içi yük verimliliği buna göre değişmektedir [41].
- **Spirosiklizasyon:** Floresan probun, temel halde floresans ışımaya göstermediği ve halkalı bir yapıda bulunduğu; ancak analizi istenilen bileşikler ile etkileşim gösterdiğinde halkanın açılması sonucu elektron akışının sağlanmasıyla floresans ışımaya gözlemlendiği mekanizmadır (Şekil 2.6) [42].



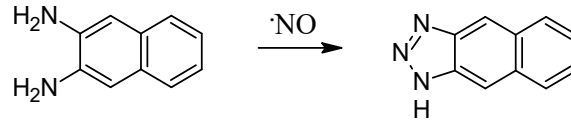
Şekil 2.6: Siklizasyon Mekanizmasının Etkin Olduğu Floresan Prob.

2.3.6. NO Tayin ve Görüntülenmesinde Kullanılan Floresan Problar

2.3.6.1. Diaminonaftalen

Nitrik oksit'in floresans esaslı problemler ile tayin edilmesi ve görüntülenmesi 1990'ların başlarından itibaren kullanılan bir tekniktir. Kullanılan ilk floresans prob diaminonaftalen (DAN) bileşiğidir. ·NO'nun oksidasyon ürünü olan NO₂⁻ iyonları ile etkileşim göstererek triazol sistemi oluşturur (Şekil 2.7). Bu sayede floresans şiddetine 100 kat kadar artış olduğu tespit edilmiştir [43-45]. Minimum dedeksiyon limitinin (tayin edilebilirlik sınırı, LOD) 10 nM olduğu belirtilmiştir. Günümüzde hala ticari olarak satılmakta olup dolaylı yoldan ·NO ve NO₂⁻ tayini için kullanılmaktadır. Fakat bu problemin reaksiyonu asidik

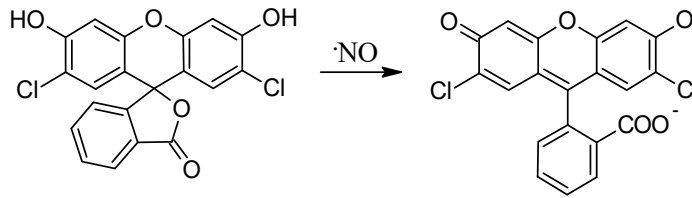
şartlar gerektirdiğinden ve analiz ultraviyole (UV) bölgede olan λ_{em} : 375 nm'de gerçekleştirildiğinden hücrede hasara yol açtığı, dolayısıyla sitotoksik etkisi tespit edilmiştir. Bu nedenle de analiz için uygun bir prob olmadığı kanısına varılmıştır [9,46,47].



Şekil 2.7: Diaminonaftalen Bileşiği ve ·NO ile Etkileşimi Sonucu Naftatriazol Oluşumu.

2.3.6.2. Diklorofloresein

·NO tayini için kullanılan diğer bir florojenik bileşik 2,7-diklorofloresein'dir. Başlangıçta herhangi bir floresans göstermeyen molekül, ·NO ile etkileşim gösterdiğinde okside olarak floresans göstermektedir (Şekil 2.8). Ancak dedeksiyon limiti 10 μ M mertebesindedir. Otoksidasyon olayının gerçekleşmesi ve birçok reaktif oksijen/azot türü ile etkileşim gösterdiği; dolayısıyla ·NO'ya spesifik olmadığı belirlenmiştir [48].

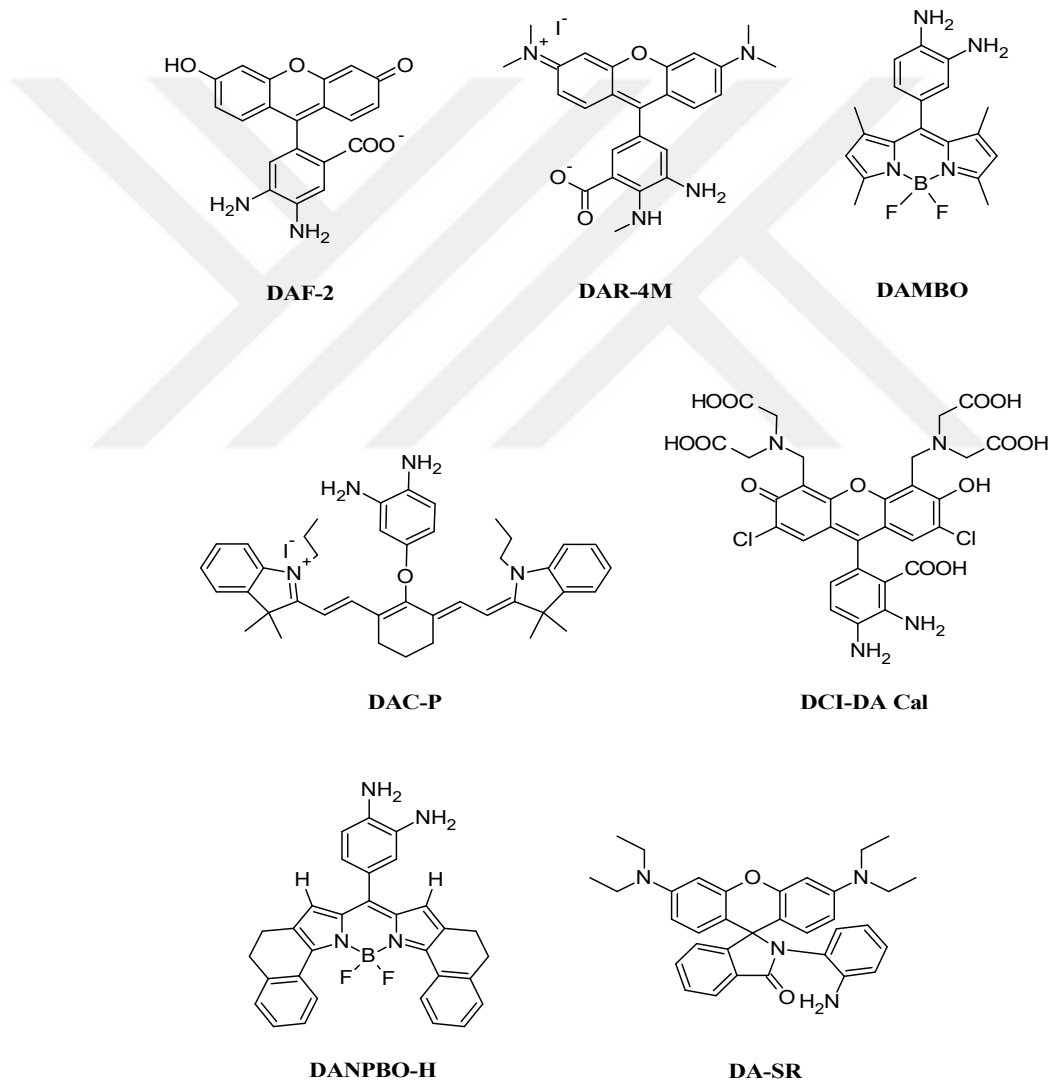


Şekil 2.8: Diklorofloresein Bileşiği ve ·NO ile Etkileşim Mekanizması.

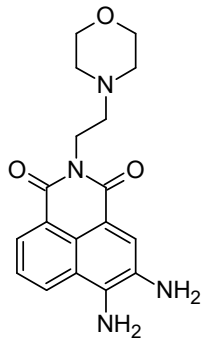
2.3.6.3. *o*-diaminobenzen Yapısı İçeren Floresan Problar

·NO tayin ve görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılan organik problar, molekül yapısı üzerinde *o*-diaminobenzen grubu bulunduran problardır (Şekil 2.9). Birbirine komşu olan ve elektronca zengin olan bu iki amin grubu, benzen halkasından floroforma aktarılan elektron miktarını artırarak PET mekanizması gereğince yapının floresansının sönmelenmesini sağlar. Ortama ·NO'nun girmesiyle birlikte, aynı DAN bileşiğinde olduğu gibi (Şekil 2.7) elektronca zayıf olan triazol yapısı meydana gelir [49]. Böylece PET mekanizması devre dışı kalır ve floresans ışığa gerçekleşir. Bu mekanizmaya dayalı

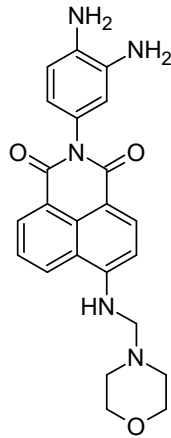
probların en büyük dezavantajı olarak doğrudan $\cdot\text{NO}$ üzerinden değil, $\cdot\text{NO}$ 'nun oksidasyon ürünlerine (NO_2^- , N_2O_3) bağlı veri alınmasıdır [5,7,19,38]. Ayrıca *o*-diaminobenzen yapısının dehidroaskorbik asit ve askorbik asit ile etkileşim gösterdiği ve diamin yapısı ile $\cdot\text{NO}$ 'nun etkileşimine benzer floresans ışımanın gerçekleştiği saptanmıştır. Bu sebeple *o*-diaminobenzen yapısı üzerinden gerçekleştirilen $\cdot\text{NO}$ tayin ve görüntülemesinin tam anlamıyla spesifik olmadığı; ortamdaki dehidroaskorbik asit ile de reaksiyon verebileceği ve kinoksalin türevi yapıların oluşabileceği yapılan deneyler sonucu ortaya çıkarılmıştır (Şekil 2.10) [50,51].



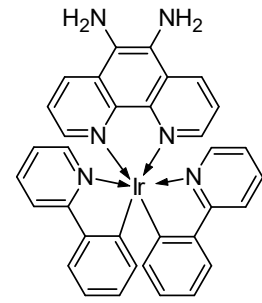
Şekil 2.9: *o*-diaminobenzen Halkası İçeren Floresan Prob Örnekler.



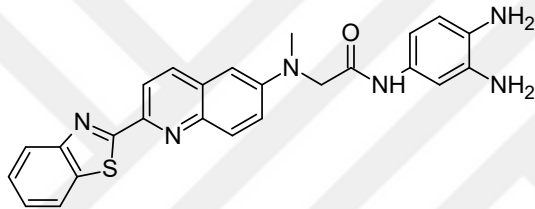
LysoNO-Naph



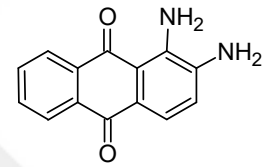
LNO



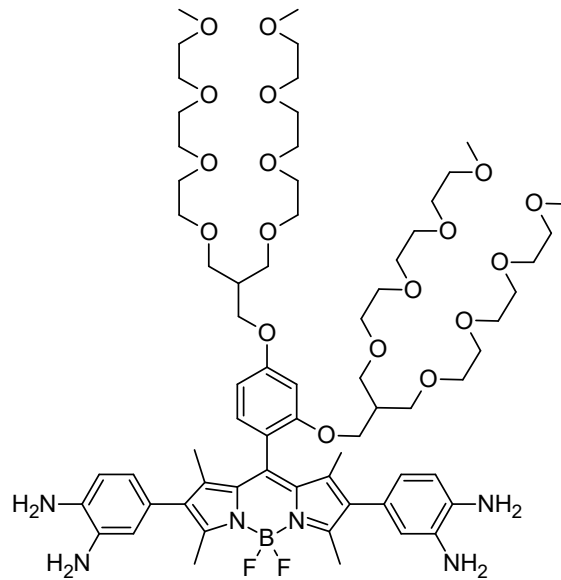
Ir-ppy



QNO

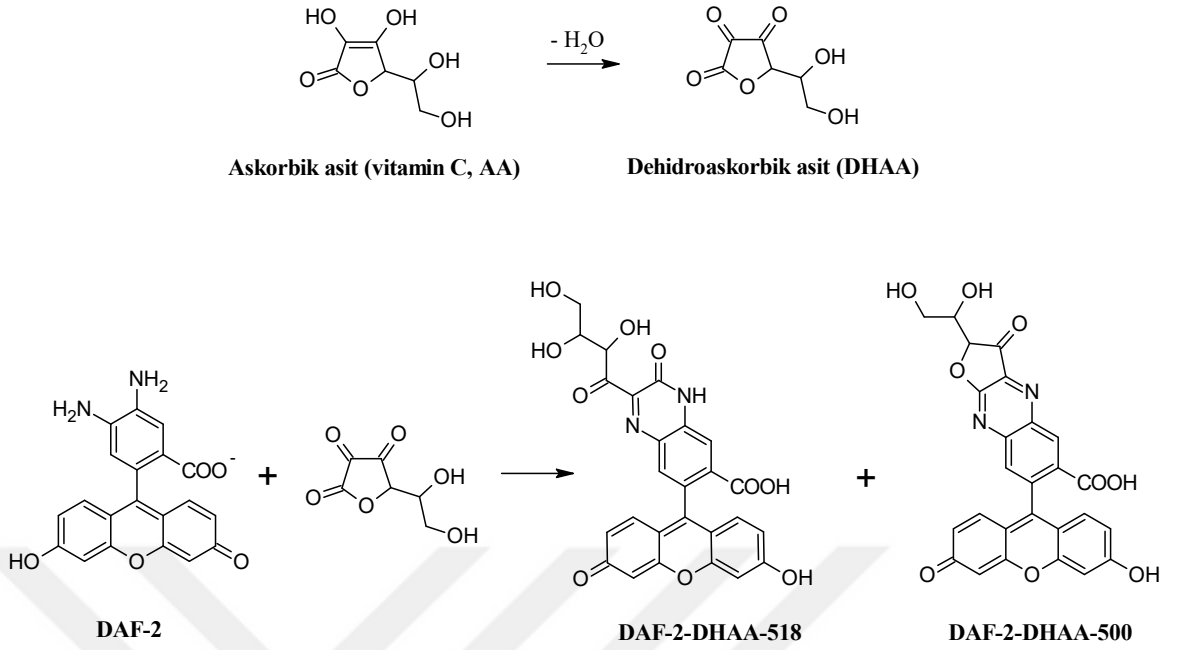


DAQ



BODIPY-A

Şekil 2.9 (devam): *o*-diaminobenzen Halkası İçeren Floresan Prob Örnekler.



Şekil 2.10: *o*-diaminobenzen Yapılarının DHAA ile Etkileşimi Sonucu Oluşan Ürünler.

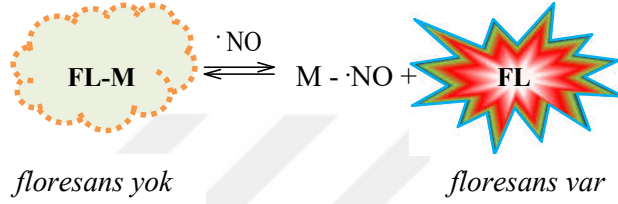
2.3.6.4. Metal Kompleksi Esaslı Floresan Problar

$\cdot\text{NO}$ 'nun metal içerikli olan protein yapılarına olan affinitesi incelendiğinde, $\cdot\text{NO}$ molekülü ve metaller arasında doğrudan ve reversible (geri dönüşümlü) olarak bağların oluştuğu gözlemlenmiştir. Literatürde nitrik oksit tayini için geliştirilen problemlerin çoğunda, yapılan analizler sonucunda zamanla bir takım dezavantajlar veya kısıtlamalar tespit edilmiştir [5]. Bilim insanları, d orbitalleri tam dolu olmayan, paramanyetik özellik gösteren geçiş metallerinin, floroforun floresansını sönmüleme özelliğinden yararlanarak [5,52,53] florofor-metal kompleksine dayalı problemlere yönelmiş ve $\cdot\text{NO}$ 'ya selektif birçok problemin geliştirilmesini sağlamışlardır. Bakır, kobalt, rutenyum, rodyum ve demir metalleri, bu işlem için sıklıkla kullanılmıştır [54-59]. Demir (Fe) metali kullanıldığında, floroforun $\cdot\text{NO}$ ile etkileşimi sonucu floresans şiddeti beklenenin aksi yönünde, azalma yönünde eğilim göstermiştir [52]. Kobalt (Co), rutenyum (Ru) ve rodyum (Rh) metallerinin kullanıldığı floresan problemlerde ise sulu ortamda çalışma koşullarının oluşmaması ve genel olarak istenilen dedeksiyon limitlerine ulaşamaması, sağlıklı sonuçların alınmasında büyük engel oluşturmuştur [5,17]. Fakat bakır (Cu) metali kullanılarak karşılaşılan sorunların üstesinden gelinmiştir [17].

Genel olarak $\cdot\text{NO}$ tayininde, geçiş metalleri kullanılarak florofor bir molekülün floresans özelliğinin sönmülmesi, 3 ayrı mekanizma kullanılarak gerçekleştirilmektedir [7]:

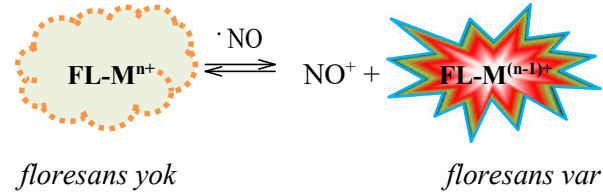
1. Oluşturulan metal-ligand kompleksinde ligandın değişmesi.

- ✓ Bu stratejide başlangıçta metal ile kompleksi oluşturulan ve bu sayede floresansı sönmülenen florofor(L), $\cdot\text{NO}$ 'nun ortama dâhil olmasıyla $\cdot\text{NO}$ ile yer değiştirir. Böylece serbest hale gelen florofor floresans gösterirken $\cdot\text{NO}$ ise metalle şelat oluşturur.



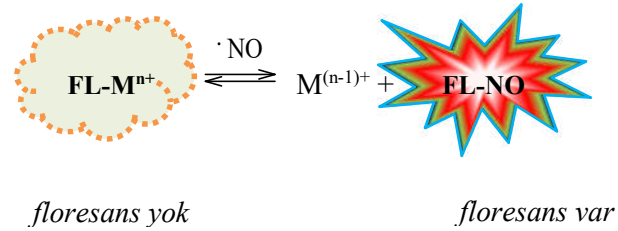
2. Metalin indirgenmesi.

- ✓ $\cdot\text{NO}$ 'nun ortama dahil olmasıyla birlikte oluşturulan florofor(L)-metal kompleksi bozulmaz; fakat metal kompleks halindeyken indirgenir. $\cdot\text{NO}$ 'nun ise oksidasyon ürünleri oluşur. Genellikle bakır metalinin kullanıldığı sistemlerde gözlemlenir (Şekil 2.11).



3. Ligandın nitrozolanması ve metalin indirgenmesi.

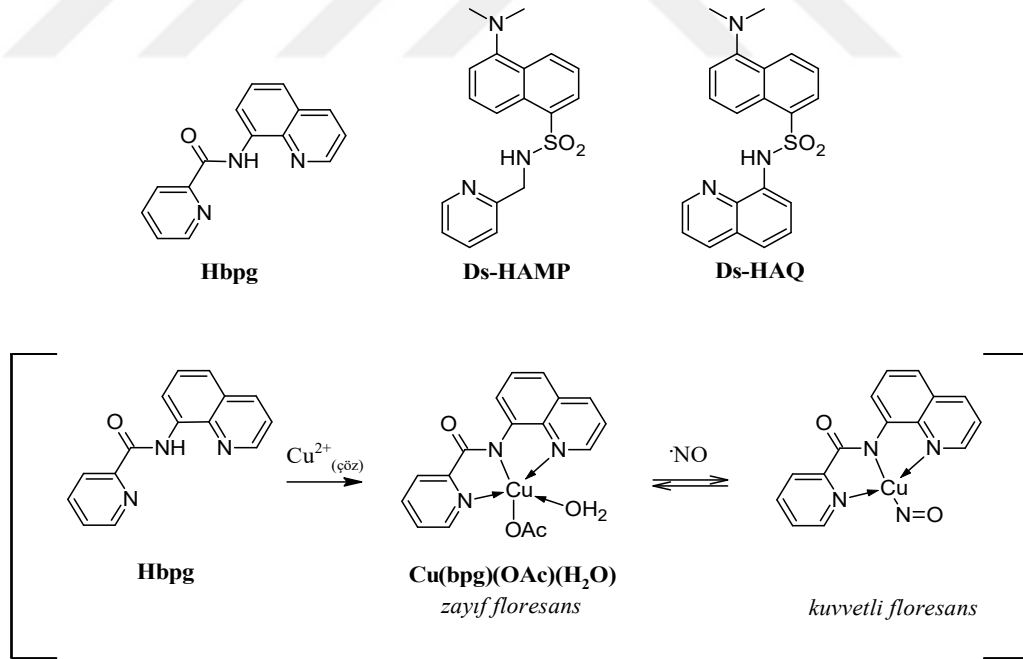
- ✓ $\cdot\text{NO}$ 'nun indirgeyici özelliği sayesinde kompleksteki metal katyonu indirgenerek kompleksten ayrılır (diamanyetik özellik kazanır). Florofor(L) üzerinde bulunan sekonder amin grubundan ise yapıya nitrozo grubu dahil olur. Böylece floresans ışımaya gerçekleşir.



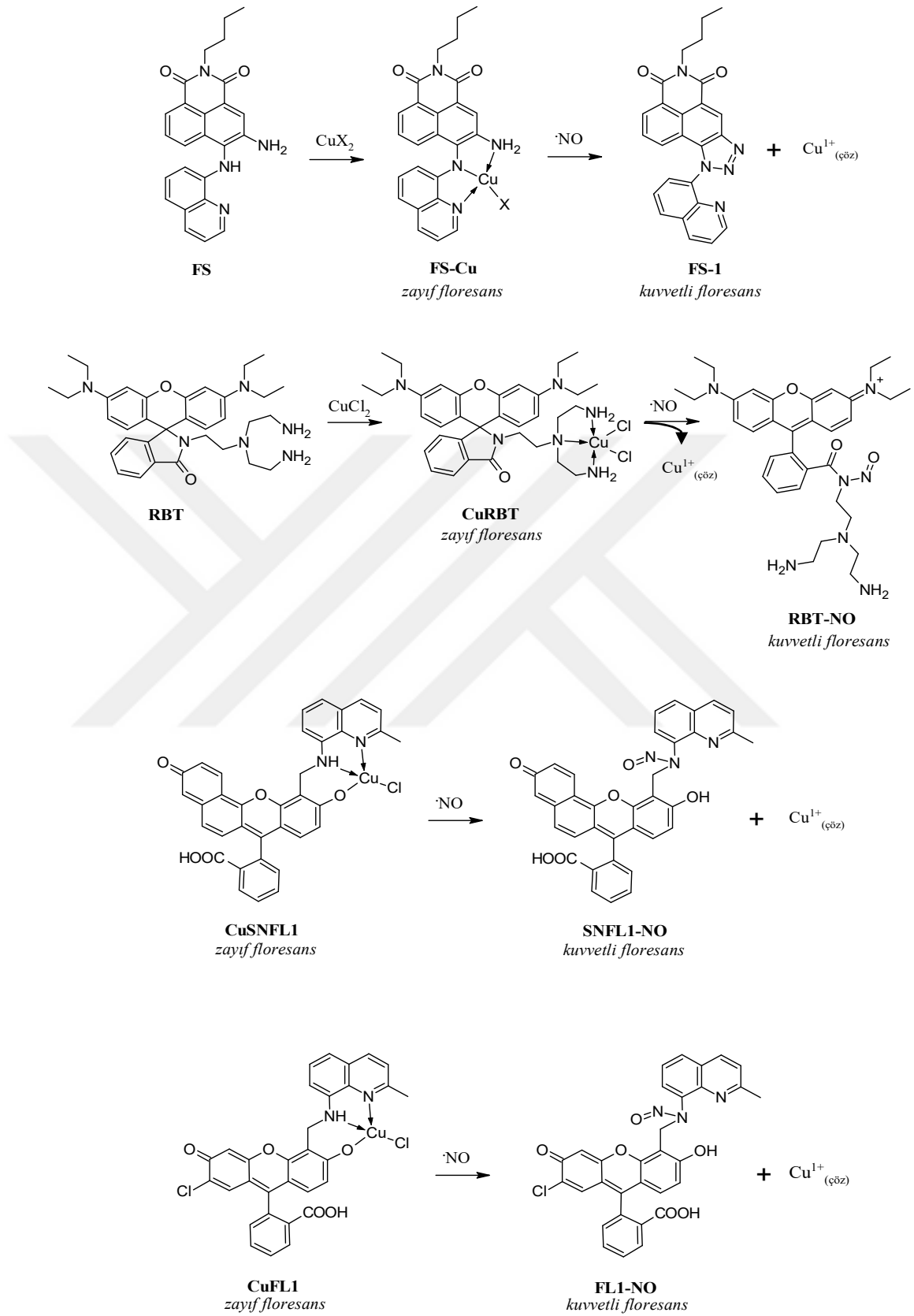
FL: florofor, *L*: Ligand, *M*: Metal, *n*: Metalin Değerliği, NO^+ : $\cdot\text{NO}$ 'nun Oksidasyon Ürünleri

2.3.6.5. Bakır (Cu) Kompleksi Esaslı Floresan Problar

Florofofor(L)-Metal kompleksi şeklinde oluşturulan $\cdot\text{NO}$ problemlerinde kullanılan geçiş metalleri arasında bakır(Cu), bu sistemin başarıya ulaştığı en iyi metal olarak belirlenmiştir. Genellikle florofofor(L) üzerindeki sekonder amin grubunun nitrozolanması ve iki değerlikteki bakır kationunun, bir değerlikli bakır kationuna ($\text{Cu}^{2+} \longrightarrow \text{Cu}^{1+}$) indirgenmesine dayalı olan mekanizma etkin olmaktadır (Şekil 2.12) [60,61]. $\cdot\text{NO}$ için geliştirilmiş olan *o*-diaminobenzen yapısı içeren problemlerin aksine, analiz işlemi sırasında moleküler oksijene gerek duyulmamaktadır. Bu tip problemler hücre membranlarından kolaylıkla geçebilmektedir. Böylece doğrudan, hızlı ve spesifik $\cdot\text{NO}$ tayini gerçekleştirilmektedir. Buna bağlı olarak, genellikle organizmada oksijen oranı az olan bölgelere yerleşmiş olan ve kansere neden olan tümörler üzerinde de çalışmalar rahatlıkla yapılabilmektedir [9,17]. Literatürde, bu mekanizmanın etkin olduğu problemler ile yapılan çalışmalarda, diğer reaktif oksijen ve azot türlerinin yanı sıra, askorbik asit ve dehidroaskorbik asit ile de ciddi ölçüde herhangi bir girişim tespit edilmemiş; yöntemin sadece $\cdot\text{NO}$ 'ya seçici olduğu veriler doğrultusunda kanıtlanmıştır [62-64].

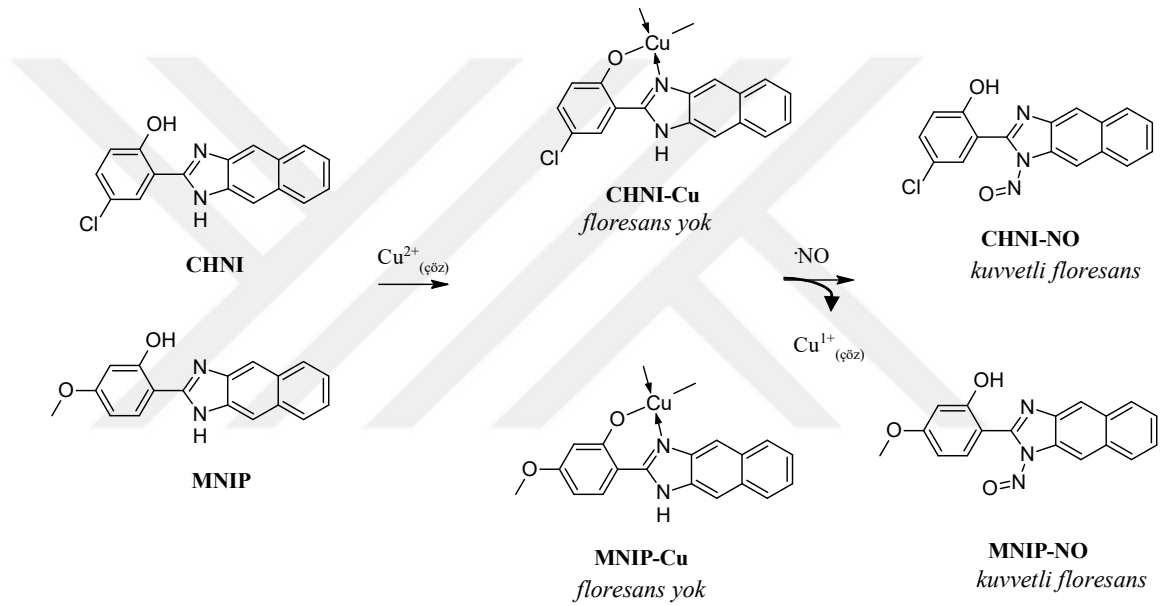


Şekil 2.11: Kompleks Bozulmaksızın Florofoforun Nitrozolanmasına Dayalı Prob Örnekleri ve Etki Mekanizması.



Şekil 2.12: Bakırın İndirgenerek ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$) Yapıdan Ayrıldığı Floresan Prob Örnekleri.

Bu başlık altında oldukça başarılı problemler geliştirilmiştir. Hücre kültüründe $\cdot\text{NO}$ tayin ve görüntülenmesinde oldukça başarılı sonuçlar alınmasına rağmen, kullanılan metalin taşıdığı potansiyel sitotoksik etki ve bakır komplekslerinin *in vivo* ortamda kararlı davranmaması nedeniyle yöntemin bazı olumsuz yanları ortaya konmuştur [5]. Bu konudaki çekincelerin giderilmesi amacıyla biyolojik aktiviteye sahip, yapısında fenol grubu bulunduran benzimidazol türevi moleküller (2-(2-hidroksifenil)-1H-benzimidazol türevleri) prob olarak kullanılmıştır (Şekil 2.13). Böylece *in vivo* koşullarda kompleksin kararlı yapıda bulunması sağlanmış ve sitotoksik etki azaltılmıştır [63,65].



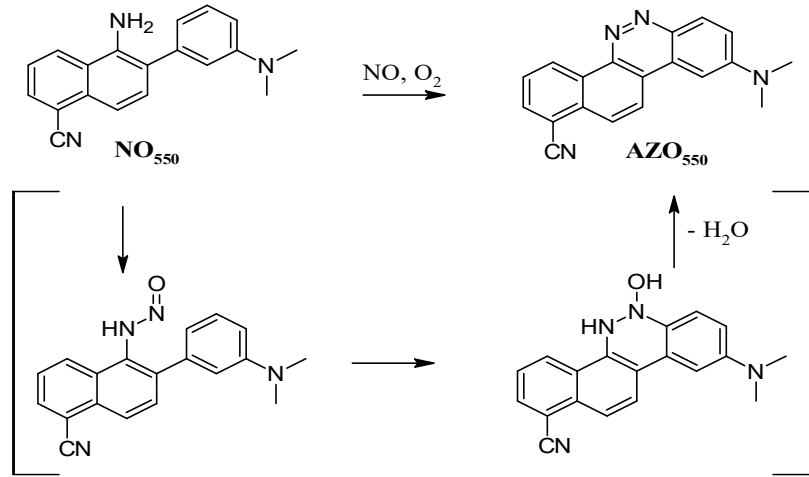
Şekil 2.13: $\cdot\text{NO}$ 'ya Spesifik Benzimidazol Türevi Florojenik Prob Örnekleri.

Hücre membranlarından kolaylıkla geçebilme, düşük dedeksiyon limitlerinde seçici ve hassas olarak doğrudan nitrik oksit tayin ve görüntülenmesinin sağlanması, *in vivo* çalışma ortamında yüksek kararlılık göstermesi bu tip problemlerin üstünlükleri olarak belirtilse de; analizlerin yapıldığı dalgaboyunun halen UV-Vis bölge (görünür bölge ve mor ötesi arasında, 400-650 nm) sınırları içerisinde kalması sonucu, çalışmalar başta otoksidasyon ve büyük yapılu moleküllerin (kullanılan floroforların) yapısal kaynaklı ışımalarının gölgesinde gerçekleştirilmektedir. Bu durum karşısında da hatalı sonuçların alınması kaçınılmaz olmaktadır. Sorunun giderilmesi için daha yüksek dalgaboyunda floresans ışımaya kapasitesine, özellikle de elektromanyetik spektrumun yakın-kızılötesi

(near-infrared, NIR, 650-900 nm) bölgesinde emisyon yapabilme özelliğine sahip florofor yapıların kullanılması gerektiği ifade edilmektedir [9].

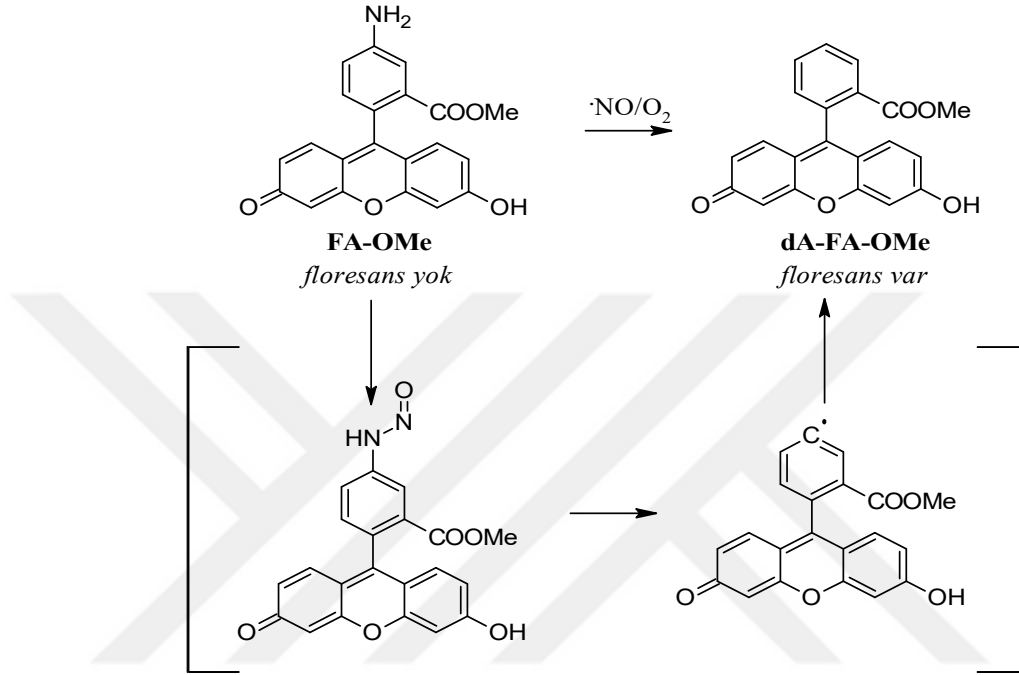
2.3.6.6. Herhangi Bir Gruba Dahil Olmayan $\cdot\text{NO}$ 'ya Spesifik Floresan Problar

Literatürde $\cdot\text{NO}$ tayin ve görüntülenmesinde kullanılmak üzere birçok florojenik prob geliştirilmiştir. Bu problemlerin analizlerde kullanılması sonucu birtakım eksiklikler veya dezavantajlar ortaya çıkmış; bunun akabinde araştırmacıların bir bölümü bu sorunların üstesinden gelebilmek için mevcut yapılar üzerinde iyileştirme metotları uygulayarak çözüm arayışı içerisine girmiş ve diğer kısım da yeni mekanizma ve yapılar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu gelişme doğrultusunda, Yang ve ekibi, mevcut etkileşimlerin tekrarlanmaması için oluşturdukları yeni yapıda elektronca zengin *o*-diaminobenzen yapısını kullanmaktan kaçınmışlardır. Bunun yerine $\cdot\text{NO}$ ile etkileşim sonucu molekül üzerinde diazo yapısının oluşmasıyla birlikte bu diazo yapısının halka kapanmasına uğramasıyla meydana gelen siklizasyon sonucu konjugasyonun artmasını sağlayarak, yeni bir probun literatüre kazandırılmasını sağlamışlardır (Şekil 2.14) [66].



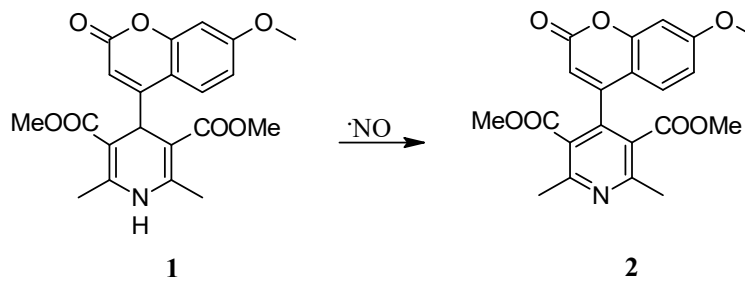
Şekil 2.14: $\cdot\text{NO}$ 'ya Selektif AZO₅₅₀ Florojenik Prob ve Çalışma Mekanizması.

Shiue ve ekibi ise, sentezledikleri yeni probun molekül yapısı üzerinde bulunan elektronca zengin amin grubunun (NH_2), $\cdot\text{NO}$ tarafından nitrozolanması ve daha sonrasında da yapıdan hidroliz olup ayrılmasına dayalı yeni bir yöntem ortaya koymuşlardır (Şekil 2.15) [19].



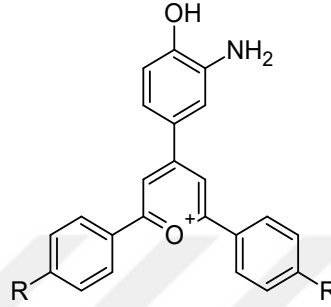
Şekil 2.15: Aromatik Halkanın Deaminasyonuna Dayalı $\cdot\text{NO}$ Prob ve Çalışma Mekanizması.

Ma ve ekibi, florofor moleküller sınıfında önemli bir yere sahip olan ve birçok biyolojik çalışmada prob olarak kullanılmakta olan kumarin molekülünü, kantitatif olarak reaksiyona giren dihidropiridin türevleriyle yeni bir yapıya dönüştürmüş ve bunu $\cdot\text{NO}$ 'ya seçici prob olarak kullanmışlardır (Şekil 2.16) [67-69].



Şekil 2.16: Kumarin Esaslı $\cdot\text{NO}$ Probu.

Beltrán ve ekibi de bu alanda farklı bir prob örneği geliştirmiştir. Sıklıkla kullanılan *o*-diaminobenzen yapısının dezavantajlarından uzak ama bu yapıya çok benzeyen bir mekanizma üzerinden çalışmışlardır. Farklılık ise, birbirine komşu iki amin grubu yerine birbirine komşu hidroksil ve amin gruplarının kullanıldığı (*o*-hidroksiamino) heteroatom içerikli pirilyum yapısı üzerinden oluşturulmuştur (Şekil 2.17) [51].



Şekil 2.17: *o*-hidroksiamino Grubu Esaslı Florojenik NO Probu.

2.4. YAKIN KIZILÖTESİ (NEAR INFRARED, NIR) ESASLI FLORESAN PROBLAR

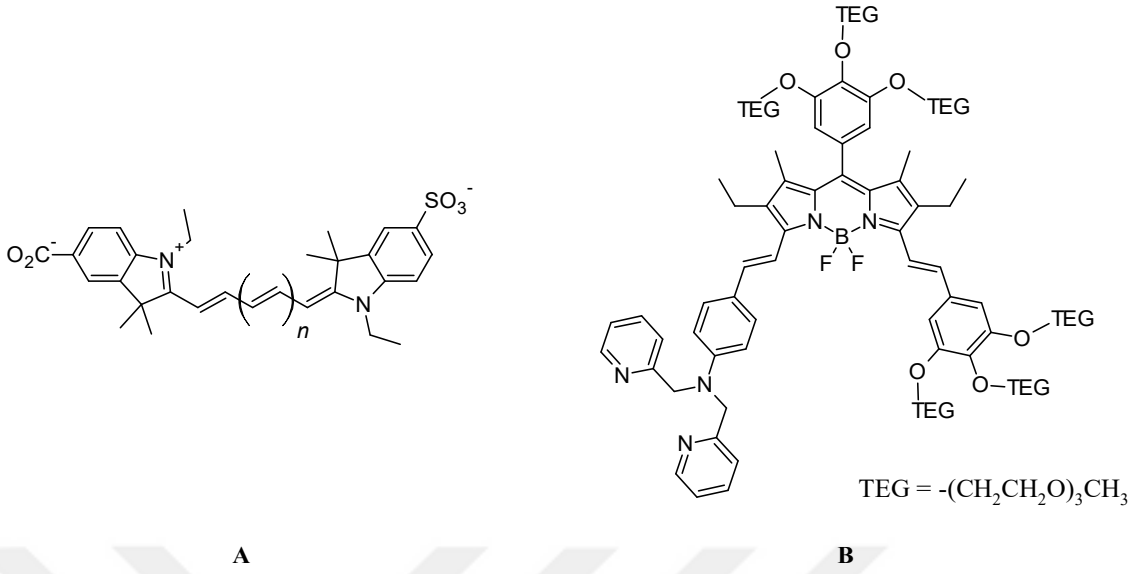
Hedef olarak tayin edilen biyoaktif bileşene özgü duyarlılık ve etkileşim gösteren ve etkileşim sonucu yapısında gözlenebilir derecede floresans değişimi meydana gelen floresan esaslı sentetik bileşiklere “floresans prob” denmektedir. Floresan proplar ile gerçekleştirilen tayin ve görüntüleme teknikleri modern biyolojide, biyolojik olay ve bileşenleri görüntülemek için vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir [70,71]. Mikroskop altında hücrelerin görüntülenmesi ile karşılaştırıldığında, dokuların ve küçük deney hayvanlarının üzerinde gerçekleştirilen görüntülemelerin daha zor ve karmaşık bir işlem olduğu aşikârdır. Organizmada bazı hormon ve proteinlerin sudaki dağılımı sırasında 200-650 nm dalgaboyu değerlerinde birtakım ışık saçılmaları meydana gelmektedir. Ayrıca dokular, yapılarından kaynaklı olarak fotonlar saçarlar veya saçılan fotonları yansıtmaktadır [72]. Günümüze kadar gelen süreçte literatüre giren ve birçok alanda çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılan çok sayıda floresan prob sentezlenmiştir. Fakat bu propların çoğu elektromanyetik spektrumun UV-görünür bölge aralığında (400-650) eksitasyon (uyarılma) ve emisyon (absorpsiyon) değerlerine sahiptir. Bahsedildiği gibi, yüksek doku hücrelerinin yapısından ve birtakım vücut içi emilimlerden kaynaklanan otofloresansın da aynı değerler arasında gerçekleşiyor olması nedeniyle bu propların

kullanımı zorlaşmakta veya kullanıldıklarında alınan ölçümlerin ve görüntüleme verilerinin doğruluğuna şüphe düşmektedir. Ayrıca bu dalgalı boylarındaki ışığa, özellikle su ve hemoglobın gibi biyomoleküller tarafından çok iyi bir şekilde emilir. Bu nedenle ışığının dokulara nüfuz etmesi tam anlamıyla gerçekleşmiş olmaz [71-72].

Ortaya konulan mevcut problemlerin çözümü için yakın kızılötesi bölgede (near-infrared, NIR) eksitasyon ve emisyon dalgalı boylarına (650-900 nm) sahip yapılar florofor olarak kullanılmaktadır. Bu sayede görüntüleme esnasında doku ve hücrelerde herhangi bir hasar meydana gelmeksizin, dokulara derinlemesine nüfuz ile daha detaylı görüntüleme ve analiz işlemleri yapılmaktadır. Proben floresansının dokulardan kaynaklanan otofloresans ile girişim yapması engellenmektedir. Sonuç olarak biyolojik prosesler hakkında moleküler düzeyde daha sağlıklı verilerin alınması sağlanmaktadır [73].

NIR esaslı floroforların geliştirilmesi son yıllarda oldukça büyük bir önem kazanmıştır. Fotodinamik tedavide, OLED (organik ışık yayan diyot) teknolojisinde, biyo-görüntüleme ve biyo-etiketleme işlemlerinde ve optik sensörlerde oldukça yaygın bir kullanıma sahiptir [73].

Ciddi bir disiplin içerisinde ve çok yönlü araştırmalar sonucunda bilim insanları biyoloji alanında kullanılan çeşitli özelliklerde ve seçicilikte birçok NIR floresan prob geliştirmişlerdir [71,74,75]. Bu konudaki potansiyel uygulamaların gelişmekte olduğu bu süreçte, NIR özellikli yeni florofor gruplarının (yeni molekül yapısı olarak) geliştirilmesi ise oldukça sınırlı sayıda olmuştur. Her ne kadar yeni teoriler oluşturulmuş olsa da, near-infrared bölgede eksitasyon ve emisyon değerlerine sahip problemlerin oluşturulması için genellikle mevcut kullanılan floroforlar (kumarin, floresein, BODIPY çekirdeği ve siyanin boyları) üzerinde konjuge sistemin uzatılması işlemi uygulanmaktadır. Örneğin polimetilen siyanin boyları üzerinde konjuge sistem ikili bağların (C=C) çoğaltılması veya BODIPY boylarının başka heterosiklik yapılar ve konjuge sistemler ile birleştirilmesiyle moleküllerin daha uzun dalgalı boylarında uyarılması sağlanmıştır (Şekil 2.18) [76-78].

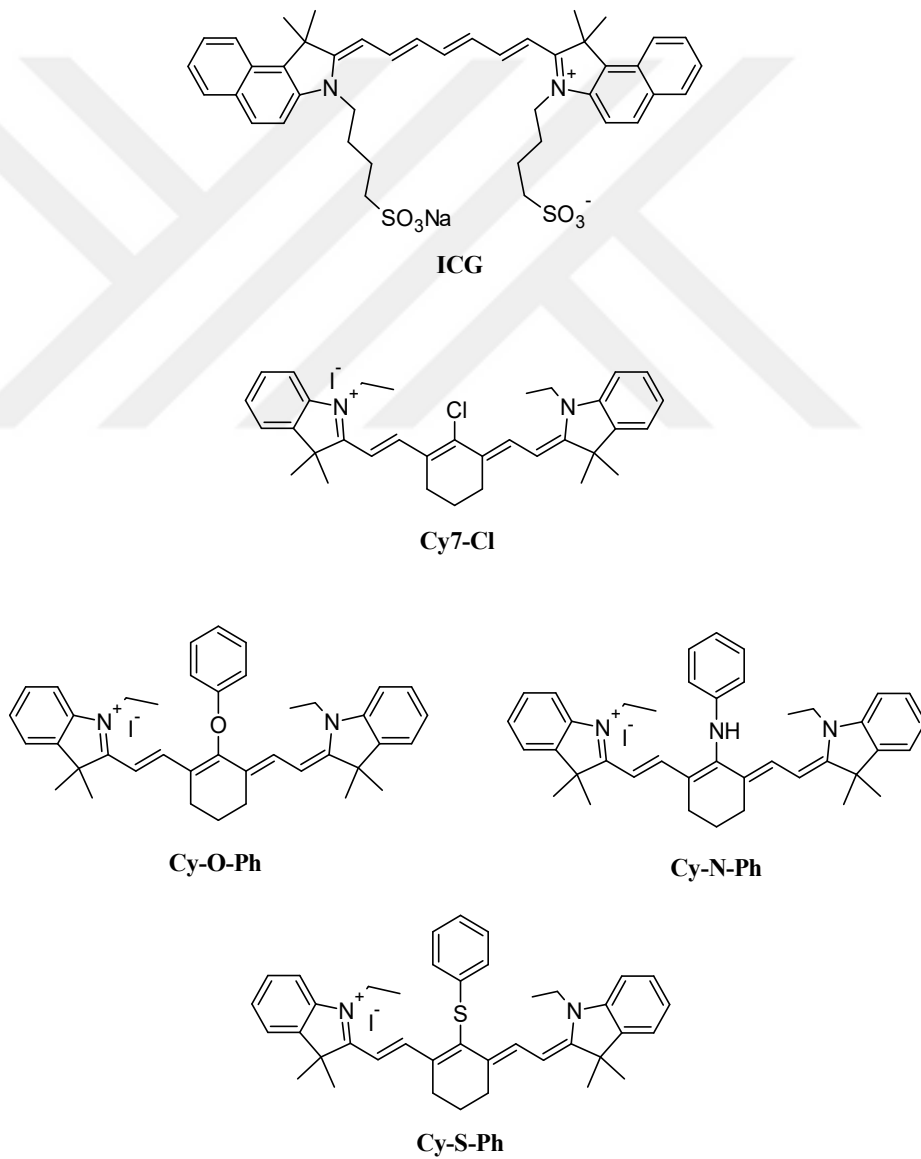


Şekil 2.18: Near-Infrared Bölgede Absorbsiyon Değerlerine Sahip Polimetinsiyenin (A) ve BODIPY (B) Floroforları.

Florofor grupları içerisinde yaklaşık olarak yüz yıllık bir geçmişe sahip olan siyanin boyaları diğer yapılara göre her zaman daha fazla ilgi görmüştür. Yüksek molar ekstinksiyon katsayısına (ϵ , 1M çözeltinin 1 cm'lik küvette verdiği absorbans değeri.) sahip olmaları, elektromanyetik spektrumun yakın infrared bölgesinde uyarılma, biyoyumluluk ve düşük miktarda sitotoksik özellik gösterme gibi avantajlarından dolayı sensörlerde, biyo-etiketleme ve biyo-görüntüleme tekniklerinde araştırmacılar tarafından sıklıkla NIR floresan yapısı olarak kullanılmıştır [72,79]. Genel olarak molekül yapıları üzerinde iki adet azot atomu (N) vardır. Bu azot atomlarından bir tanesi kuaterner formda (NR_4^+ , artı yüklü katyon olarak) ve diğer yüksüz azot atomuna konjuge olarak (polimetin zinciri ile) bağlanmış halde bulunmaktadır. Molekül üzerindeki konjuge bağlar üzerinden azot atomları arasında yük (elektron) akışı sağlanmakta ve uzun dalgaboylarında uyarılmalar gerçekleşmektedir [79]. Yapılan araştırmalarda polimetin zincirinin belirli bir uzunlukta genişletilmesiyle yüksek dalgaboylarında uyarılma kapasitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Fakat polimetin zincirinin uzamasına bağlı olarak molekül içerisinde agregasyon olarak nitelendirilen zincir üzerindeki grupların belirli yerlerden kıvrılarak kümelenmeye gittiği oluşum gözlemlenmiştir. Ayrıca molekülün kuantum verimi ve güçlü nükleofillerin bulunduğu ortamlarda molekülün gösterdiği kararlılık düşmektedir.

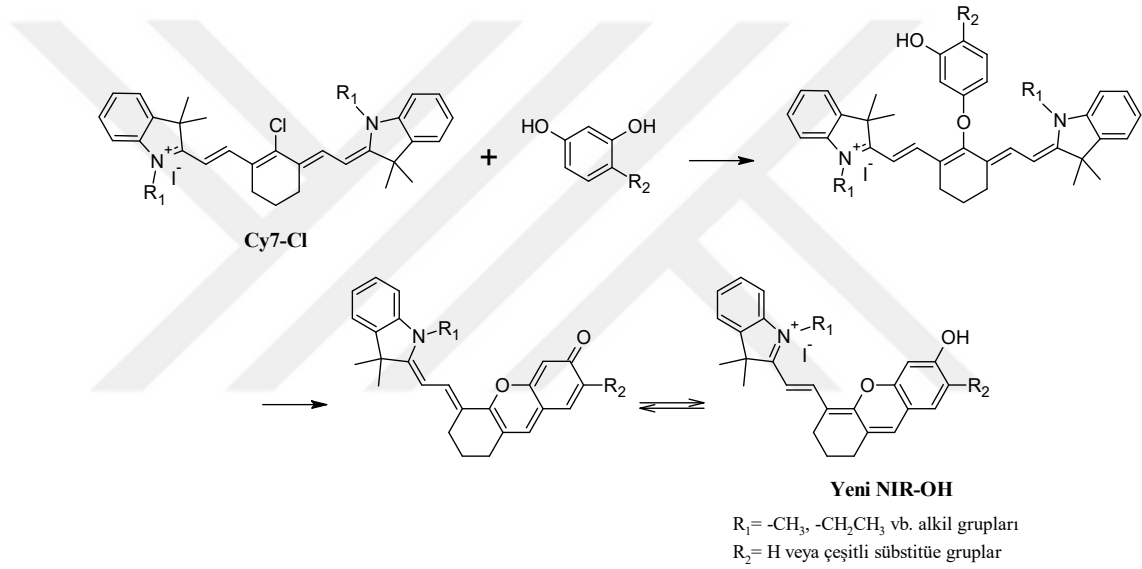
Bu sebeple siyanin molekülleri üzerinde bir takım modifikasyonlar yapılması kaçınılmaz olmuştur [73,79].

Birçok siyanin boyası sentezlenmiş olmasına rağmen, bunlar arasında bazı yapılar dikkatleri üzerine çekmiştir. Heptametinin yapılarının benzoksazol, indol veya kinolin türevi yapılar ile kondenzasyonu sonucu meydana gelen, kloro-heptametinin olarak isimlendirilen heterosiklik bileşikler de bu grupta yer almaktadır [80]. Molekül yapısı üzerinde bulunan klor atomu, birçok tiyol, amin ve fenolik (alkolat) nükleofiller ile kolaylıkla yer değiştirebilme özelliğine sahiptir (Şekil 2.19) [81-83].

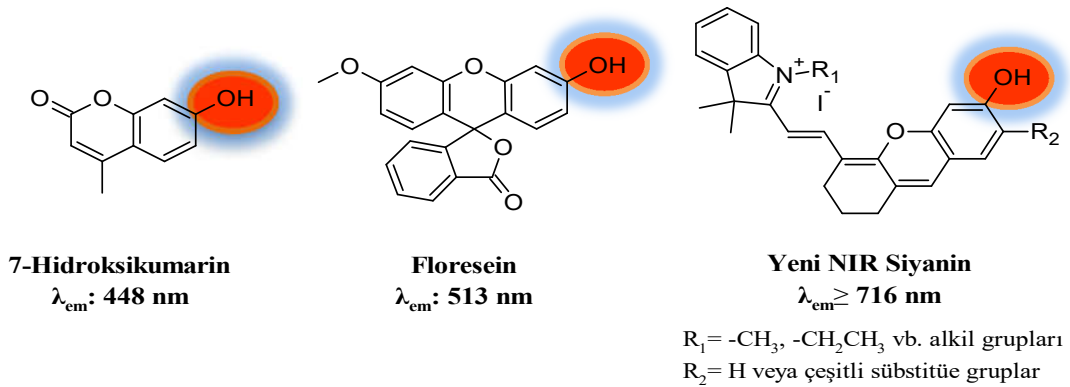


Şekil 2.19: Heptametinin (ICG) ve Kloro-heptametinin (Cy7-Cl) Siyanin Yapıları ve Türevleri.

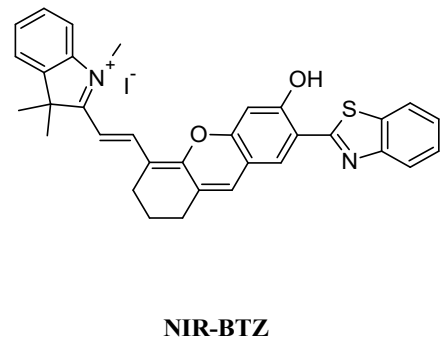
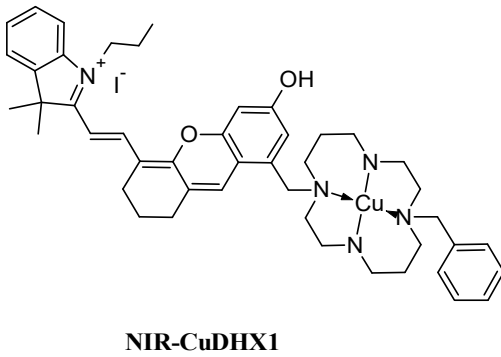
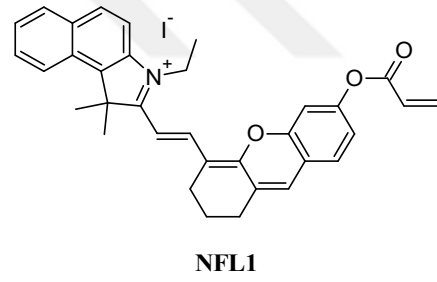
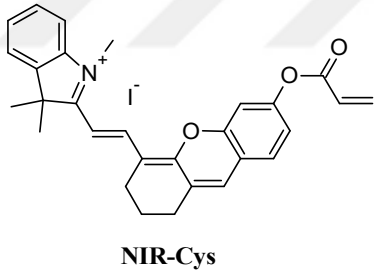
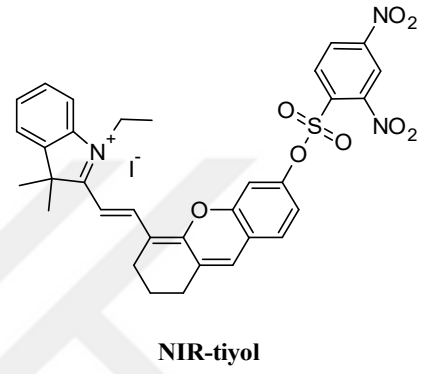
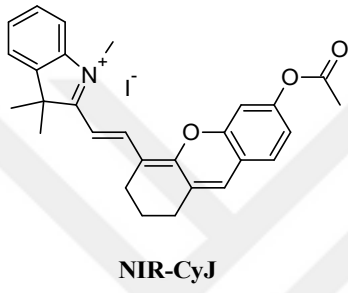
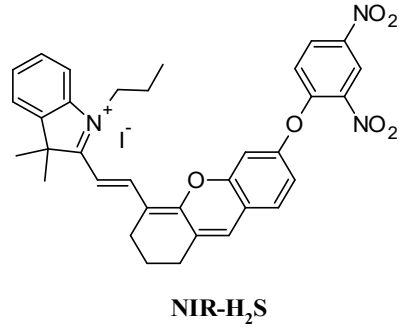
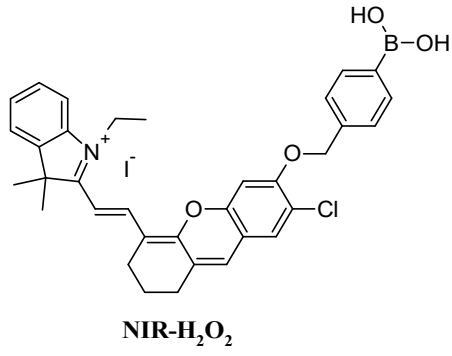
Kloro-heptametin bileşiği üzerinden nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu ile yeni bileşikler oluşturulması konusunda, Yuan ve ekibi çok önemli bir gelişme sağlamıştır (Şekil 2.20). Tıpkı 7-hidroksikumarin ve floresein floroforlarının sahip olduğu ve floresans özelliklerinin ana kaynağı olan karakteristik OH grubunu, siyanin boyaları üzerinde de oluşturmayı başarmışlardır (Şekil 2.21). Böylece NIR floresan boyaları alanında yeni bir grubun literatüre girmesi sağlanmıştır. Daha da önemlisi, kumarin ve floresein floroforları ile dizayn edilen tüm floresans esaslı sensör ve problemlerin near infrared bölgeye taşınmasının ve buna bağlı olarak yeni floresan moleküllerin geliştirilmesinin önü açılmıştır (Şekil 2.22) [73,84-90].



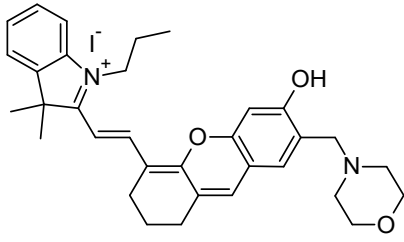
Şekil 2.20: Yeni NIR Siyanin Bileşiklerinin Sentez Mekanizması.



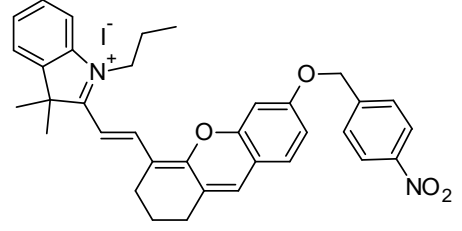
Şekil 2.21: Karakteristik Hidroksil (-OH) Grubuna Sahip Florofor Yapılar.



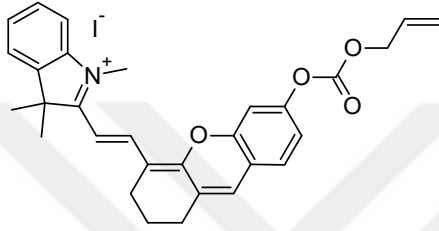
Şekil 2.22: Yeni NIR Siyanin Molekülü Üzerinden Geliştirilen Floresan Prob Örnekleri.



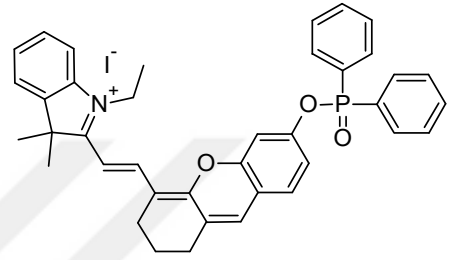
Lyso-pH



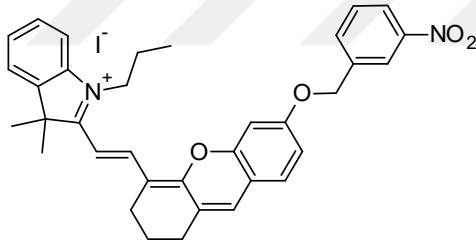
probe-1



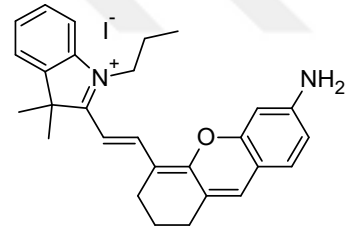
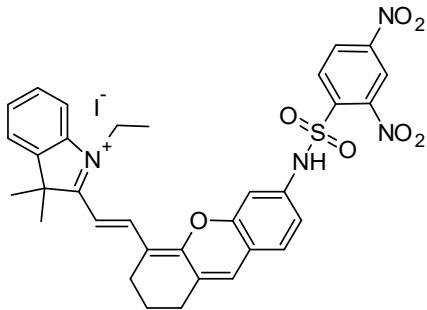
CyPd



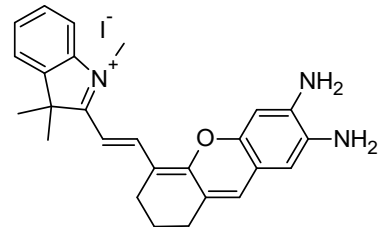
CyR



model-1

HD-NH₂

HD-Sec

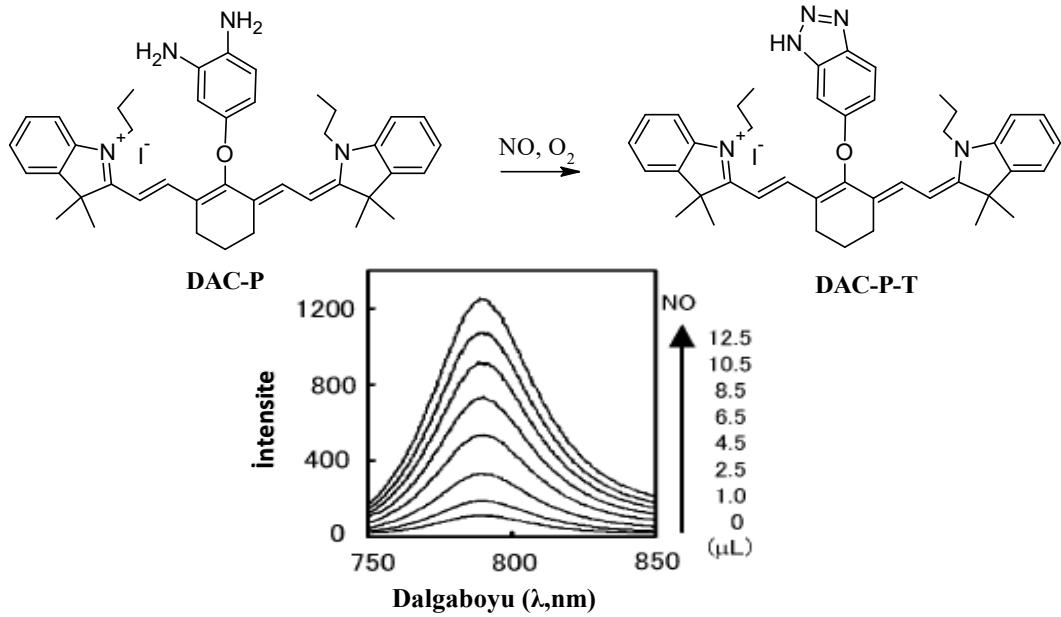
NIR-H₂Se

Şekil 2.22 (devam): Yeni NIR Siyanin Molekülü Üzerinden Geliştirilen Floresan Prob Örnekleri.

2.5. NİTRİK OKSİTE SEÇİCİ YAKIN İNFRARED (NIR) FLORESAN PROBLAR

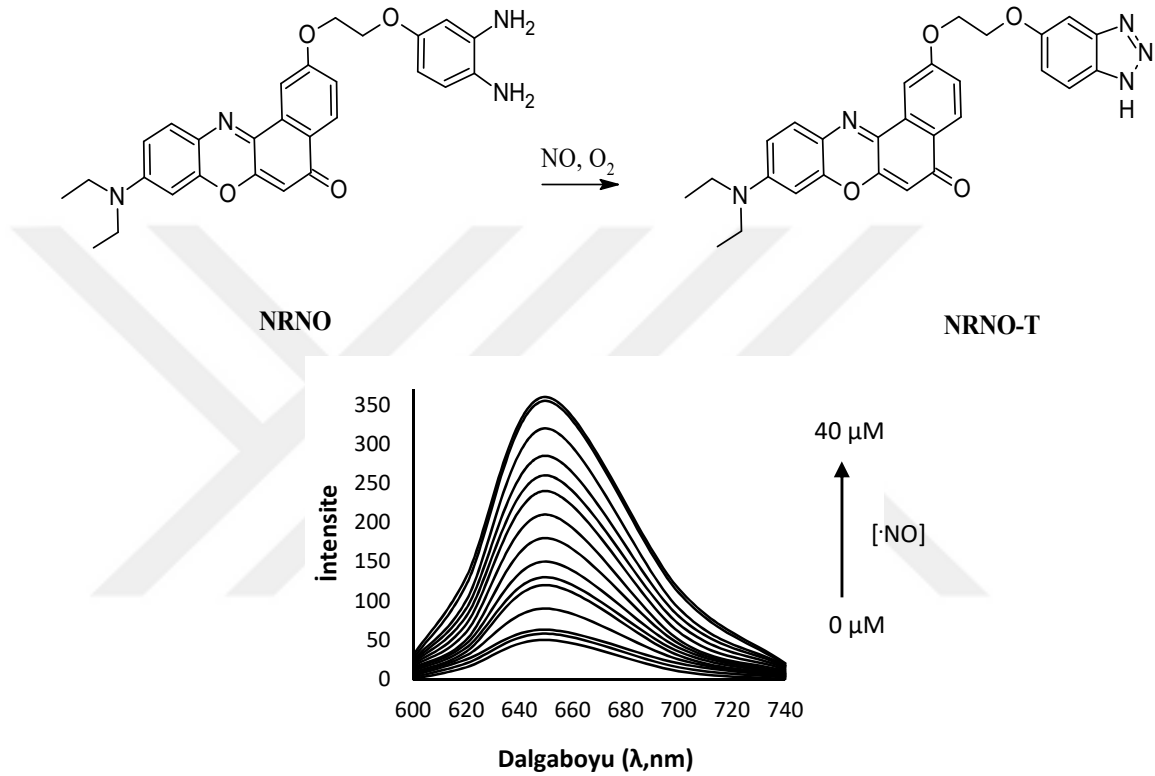
Yakın infrared florojenik problemleri alanında önemli düzeyde gelişmeler meydana gelmekle birlikte, bu florojenlerin biyo-görüntüleme amaçlı olarak biyoaktif moleküllere seçici hale getirilmesi oldukça yoğun ve prensipli bir çalışma disiplini gerektirmektedir. Geliştirilen problemlerin kimi zaman istenilen seçicilikte cevap vermemesi ise bu gelişmelerin sınırlı sayıda kalmasına neden olmaktadır.

Literatürde nitrik oksit tayini ve görüntülenmesi için birçok florojenik prob geliştirilmiştir. Ancak detaylı inceleme yapıldığında bu problemlerin neredeyse tamamının elektromanyetik spektrumun görünür bölge sınırları içerisinde (400-650 nm) kaldığı bir gerçektir. Günümüzde $\cdot\text{NO}$ 'ya spesifik olan ve near infrared bölgede tayin yapabilmek imkanı tanıyan sınırlı sayıda florojenik prob geliştirilebilmiştir. Bunlardan ilki, Nagano ve ekibi tarafından klor sübstitüye heptametin molekülünde nükleofilik sübstitüsyona dayalı olarak molekül üzerine o-diaminobenzen yapısının entegre edilmesiyle geliştirilmiştir (Şekil 2.23). Tıpkı diğer o-diaminobenzen yapısı üzerinden $\cdot\text{NO}$ tayini yapılabilen problemlerin etki mekanizması geçerli olmakla birlikte tüm bu mekanizma üzerinden çalışan problemlere üstünlük olarak, tayin ve görüntülemenin near infrared bölgede yapılmasına imkân tanınmıştır [91].



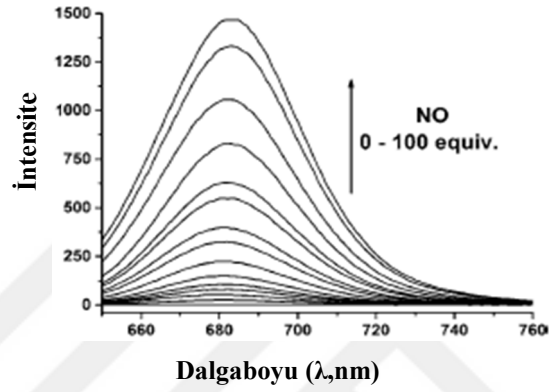
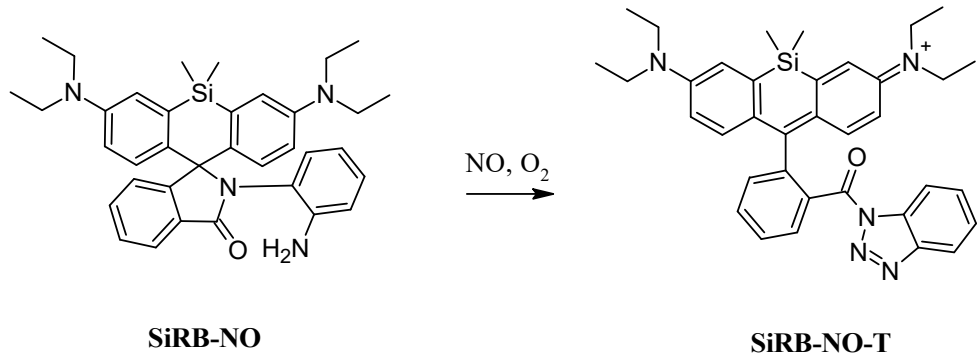
Şekil 2.23: $\cdot\text{NO}$ İçin Geliştirilen Florojenik İlk NIR Prob (DAC-P) ve Floresans İntensitesi Değişim Spektrumu.

Bu konuda diğerk bir örnek ise Mao ve ekibi tarafından geliştirilmiştir. “Nile Red” adı verilen florofoz üzerinden nitrik oksit için spesifik olarak geliştirilen bu prob 650 nm’de emisyon dalga boyuna sahiptir. Etki mekanizması, o-diaminobenzen yapısının $\cdot\text{NO}$ ile reaksiyonu sonucu triazol oluşumuna bağılı olarak gerçekleşmektedir (Şekil 2.24) [92].



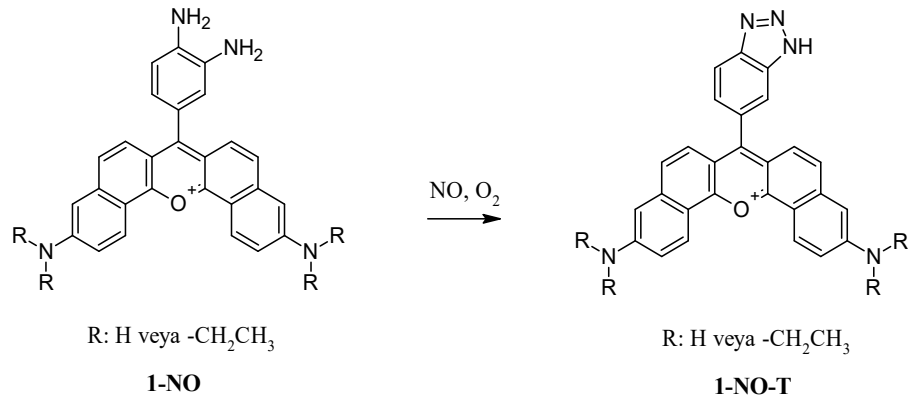
Şekil 2.24: NRNO Probu ve Floresans İntensitesi Değişim Spektrumu.

2015 yılındaki bir çalışmada Wang ve ekibi, yapısında silisyum elementi bulunan rodamin florofozunu (SiRB, Si-Rhodamin) o-fenilendiamin yapısı kullanılarak $\cdot\text{NO}$ 'ya spesifik hale getirmiş ve 680 nm emisyon dalga boyuna sahip olan NIR probu geliştirerek bu alanda literatüre yeni bir yapı kazandırmışlardır (Şekil 2.25) [93].

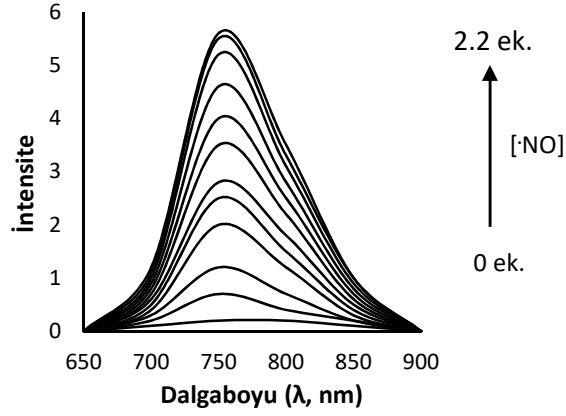


Şekil 2.25: SiRB-NO Probu ve Floresans İntensitesi Değişim Spektrumu.

Bu alandaki NIR emisyon absorpsiyon dalga boyuna sahip bir diğer prob ise Liu ve ekibi tarafından literatüre kazandırılmıştır. Bu çalışmada 3,4-diaminobenzen süstitüe dibenzoksanten bileşiği sentezlenmiş olup, bu yapı da mevcut problemler gibi nitrik oksit tayininde sıklıkla kullanılan triazol oluşumu mekanizması üzerinden NIR bölgede nitrik oksite selektif prob olarak kullanılmıştır (Şekil 2.26) [76].

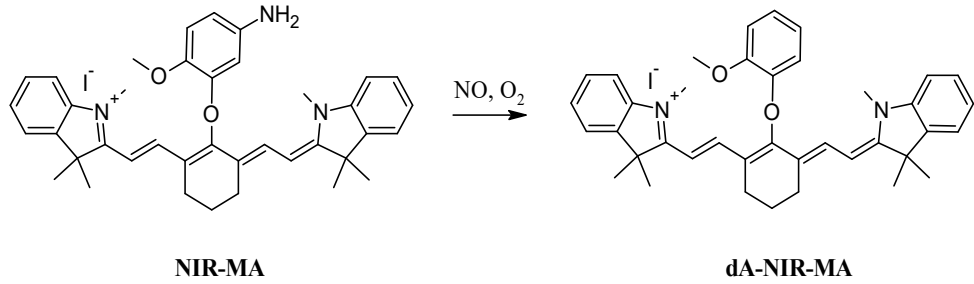


Şekil 2.26: 1-NO Probu ve Floresans Değişim Spektrumu.



Şekil 2.26 (devam): 1-NO Probu ve Floresans Değişim Spektrumu.

Bu alanda literatüre en son kazandırılan NIR özellikli $\cdot\text{NO}$ probu ise Huo ve ekibi tarafından geliştirilmiştir. Bu çalışmada, sentezlenen molekülün üzerinde bulunan amino (NH_2) grubunun $\cdot\text{NO}$ tarafından yapıdan uzaklaştırılması sonucu (deaminasyon) florofor olarak kullanılan heptametin-siyanin, PET mekanizmasının etkisini kaybetmesiyle floresans özellik kazanmaktadır [94].



Şekil 2.27: NIR-MA probu ve Etki Mekanizması.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışmada kullanılan cihazlar; kimyasal maddelerin tartımı için RADWAG marka Was 220X model analitik terazi, sentezlenen maddelerin solventlerinin uzaklaştırılmasında Buchi marka rotavapor, erime noktası tayini için Buchi marka erime noktası cihazı, sentez esnasında maddelerin karıştırılması ve ısıtma işleminin gerçekleştirildiği Heidolph marka manyetik karıştırıcı, çözeltilerin pH'larının belirlenmesinde Mettler Toledo pH-metre, floresans ölçümlerinde Varian Cary Eclipse model spektrofotometre ve ölçüm yapmak için HELMA marka 10 mm ışık yollu kuartz küvet, molekülün kütesinin belirlenmesinde Thermo Scientific™ Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap marka spektrometre, molekülün proton ve karbon yapılarının karakterizasyonu için Varian VNMRS 600 MHz spektrometre, Bruker marka FT-IR Spektrometre (ATR), distile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 distile su sistemi kullanılmıştır.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler: 1,3-dihidroksibenzen (rezorsin), fosfor(V) oksiklorür (POCl_3), dimetilformamid (DMF), etanol (EtOH), asetonitril (CH_3CN), potasyum karbonat (K_2CO_3), sodyum metabisülfid (NaHSO_3), 1,2-diaminobenzen, sikloheksanon, fenil hidrazin, metil iyodür, n-Butanol, benzen, Bakır(II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), N-asetil sistein (NAC), sistein (Cys), homosistein (HCy), glutatyon (GSH), fosfat tamponu (PBS) için disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), nitrik oksit donörü olarak 1,1-Diethyl-2-hydroxy-2-nitroso-hydrazine sodium (NONOate) ve kolon kromatografisi için silika jel kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

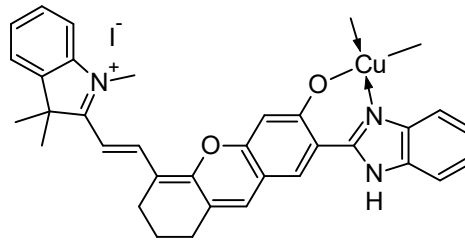
3.3. NİTRİK OKSİT İÇİN GELİŞTİRİLEN YENİ PROBUN SENTEZİ

3.3.1. Probu Genel Molekül Yapısı

Near-infrared bölgede emisyon dalgaboyuna sahip olan probur incelendiğinde, kullanılan floroforların sıklıkla siyanin boyaları olduğu göze çarpmaktadır. Nitrik oksit tayini için Nagano ve ekibi tarafından geliştirilen ilk NIR probun (DAC-P, Şekil 2.23) temelinde de bu florofor türü yer almaktadır [91]. ·NO için bundan sonraki çalışmaların tamamında farklı florofor yapılar üzerinden NIR probur geliştirilmiştir.

Bu tez kapsamında geliştirilen probun yapısı da siyanin floroforuna dayanmakla birlikte, bugüne kadar mevcut NIR ·NO proburlarının tamamından farklı ve özgün bir çalışma olacağı ön görülmektedir. Bu kapsamda, mevcut NIR proburların ·NO'ya seçici olmasını sağlayan fakat birçok yapı ile etkileşim gösterdiği saptanan ve ölçümlerin güvenilirliğinin eleştirildiği o-diaminobenzen yapısının aksine, yakın zamanda Li ve ekibi tarafından literatüre kazandırılan XL-Cu probunda olduğu gibi [95], bakır(II) metali kullanılarak oluşturulan metal kompleksi üzerinden NIR bölgede ·NO ile etkileşim sağlaması açısından literatürde emsal olacak niteliktedir.

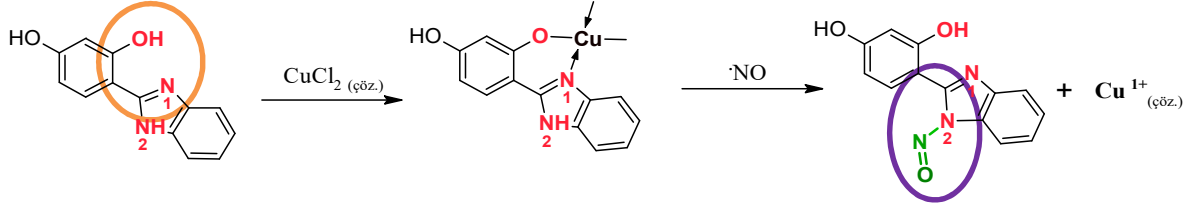
Geliştirilen NIR özellikli ·NO probunun genel yapısı Şekil 3.1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.1: Tez Kapsamında Geliştirilen ·NO'ya Seçici Florojenik NIR Prob (NIR-CuHBI).

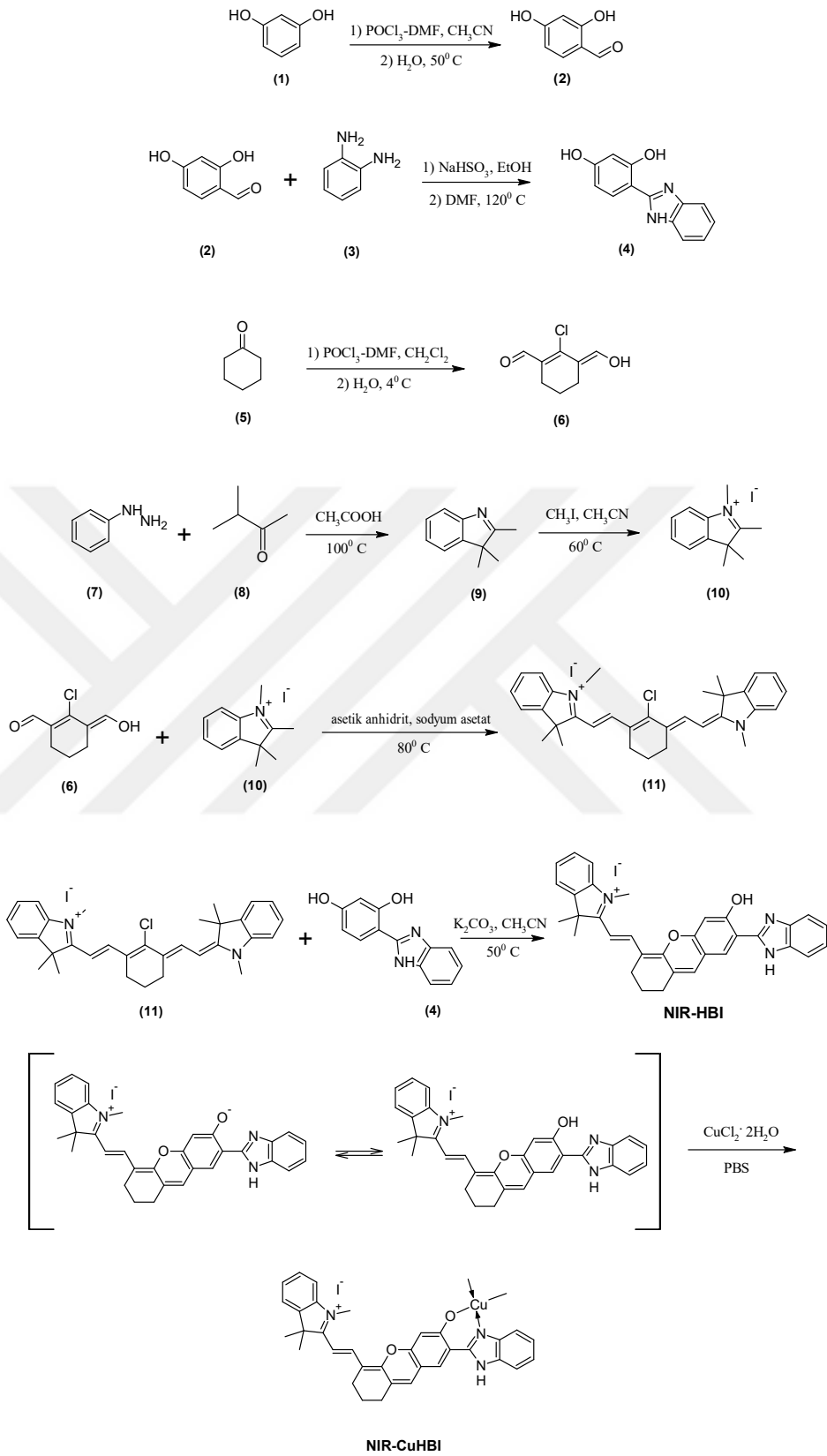
Bu yapının geliştirilmesinde temel olarak Şekil 2.23'te molekül yapıları ve etki mekanizması gösterilen ·NO proburları dikkate alınmıştır. Şekil 3.2'de görüleceği gibi, bu tip yapıların etki mekanizması, benzimidazol molekülü üzerindeki 1 nolu tersiyer azot atomu ve sübtitüe benzen halkası üzerindeki hidroksil grupları arasında bakır metali kompleksinin gerçekleşmesine; nitrik oksitin ortama dâhil olmasıyla birlikte bakır(II) metal kompleksinin bozulması sonucu iki değerlikli bakır metalinin, bir değerlikli bakır

kationuna indirgenerek (Cu^{I}) yapıdan ayrılmasına ve benzimidazol üzerinde bulunan 2 nolu sekonder amin yapısındaki protonun nitrozolanmasına dayanmaktadır [63,65,96].



Şekil 3.2: 1,3 - Dihidroksi Benzen Sübstitüe Benzimidazol Molekülünde Gerçekleşen Bakır(II) Kompleksi ve Nitrozolanma.

İlk aşamada sentezlenen 1,3 - dihidroksi benzen sübstitüe benzimidazol bileşiğinin near-infrared bölgede emisyon dalga boyuna sahip bir prob haline getirilmesi klor sübstitüe heptametin-siyanin bileşiği kullanılarak sağlanmıştır. Bunun benzer bir örneği olarak hidroksi benzen sübstitüe benzotiazol bileşiğinin çeşitli amaçlarda kullanılmak üzere NIR prob olarak nasıl sentezlendiği Li ve ekibinin 2015 yılındaki çalışmasında anlatılmış, yapının karakterizasyonu sağlanarak istenilen bileşiğin oluştuğu ispatlanmıştır (Şekil 2.22, NIR-BTZ) [90]. Bu bilgi ve uygulanan prosedürden yola çıkılarak, tez kapsamında geliştirilen $\cdot\text{NO}$ 'ya seçici probun sentez aşaması planlanmıştır. NIR-CuHBI olarak literatüre kazandırılacak olan bu $\cdot\text{NO}$ probu, çok aşamalı bir prosedür üzerinden sentezlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: ·NO'ya Selektif NIR-CuHBI Probenun Çok Aşamalı Sentez Prosedürü.

3.3.1. Probun Sentezlenmesi

3.3.1.1. 2,4-dihidroksibenzaldehit (rezorsinal) Sentezi (2):

250 mL'lik balon içerisinde soğutulan 60 mL asetonytril (ACN) ve 10 mL dimetilformamid (DMF) solvent karışımına, damlatma hunisi yardımıyla POCl₃ (110 mmol, 11 mL) ilave edildi. Bu karışım oda sıcaklığında ve azot atmosferinde yaklaşık olarak 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Sarımsı renkli Haack Reaktifinin oluştuğu gözlemlendi ve tekrar 0 °C'ye soğutuldu. Soğuk karışım üzerine 50 mL asetonytril içerisinde çözülen 1,3-dihidroksibenzen (**1**; rezorsin, 100 mmol, 11 g.) ilave edildi. 5 °C'de 3 saat karıştırıldı. Oluşan beyaz renkli katı süzüldü. Soğuk asetonytril ile iyice yıkandı. Daha sonra 250 mL'lik beherde 60 °C'de 2 saat hidroliz edildi. Soğumaya bırakıldığında beyaz renkli kristaller oluştuğu gözlemlendi. Süzülerek alındı ve soğuk su ile defalarca yıkandı. 50 °C'de kurutuldu. Verim: %72, 9.93 g, e.n: 134-136 °C, beyaz renkli kristal [97].

3.3.1.2. 1,3-dihidroksi-4-(1H)-benzimidazol (HBI) Sentezi (4):

2,4-dihidroksibenzaldehit (**2**; 50 mmol, 7 g) ve sodyum meta-bisülfid (NaHSO₃, 50.5 mmol, 5.25 g) 100 mL etanolde ve oda sıcaklığında 3 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra 50 mL DMF içerisinde çözülen 1,2-diaminobenzen (**3**; 50 mmol, 5.4 g) yavaşça ilave edildi. Bu karışım 2 saat reflüks edildi. Bu sürenin sonunda, 500 mL buz-su karışımına döküldü. Yaklaşık olarak 12 saat boyunca soğukta bekletildi. Oluşan sarı renkli çökelti süzüldü. Su ile yıkandı, kurutuldu. Etanolde yeniden kristallendirildi. Verim: %70, 7.9 g, e.n: 274-276 °C, bej renkli katı [96].

3.3.1.3. 2-kloro-1-formil-3-hidroksimetilen sikloheksen Sentezi (6):

250 mL'lik balon içerisinde soğutulan 20 mL diklorometan ve 15 mL dimetilformamid (DMF) solvent karışımına, damlatma hunisi yardımıyla POCl₃ (130 mmol, 12 mL) ilave edildi. Bu karışım oda sıcaklığında ve azot atmosferinde yaklaşık olarak 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Sarımsı renkli Haack Reaktifinin oluştuğu gözlemlendi ve tekrar 0 °C'ye soğutuldu. Soğuk karışım üzerine sikloheksanon (**5**; 50 mmol, 5.2 mL) ilave edildi ve 4 saat boyunca reflüks edildi. Bu sürenin sonunda, 500 mL buz-su karışımına döküldü. Yaklaşık olarak 12 saat boyunca soğukta bekletildi. Oluşan sarı

renkli çökelti süzüldü. Soğuk su ile iyice yıkandı, kurutuldu. Verim: %88, 7.5 g, sarı renkli katı [82].

3.3.1.4. 1-metil-2,3,3-trimetil-3H-indolyum iyodür Sentezi (10):

40 mL asetik asit içerisine fenil hidrazin (7, 74 mmol, 7.3 mL) ve 3-metil-2-bütanon (8; 74 mmol, 8 mL) ilave edildi. 3 saat boyunca 100 °C'de reflüks edildi. Süre sonunda su ve diklorometan ilave edilerek istenilen ürünün organik faza geçmesi sağlandı. Ayırma hunisinde solvent fazı alındı. Solvent vakumda uzaklaştırıldı. 2,3,3-trimetil-3H-indol (9) bileşiği siyah renkli sıvı olarak elde edildi. Herhangi bir saflaştırmaya işlemi uygulanmaksızın, maddenin üzerine 100 mL asetonitril ve yaklaşık 15 mL metil iyodür ilave edildi. 55 °C'de 6 saat boyunca reflüks edildi. Çökelti miktarının artması için balon dolapta soğutuldu. Süzülerek ürün alındı, kurutuldu. Verim: %65, 13 g, açık pembe-sarı renkli kristal [98,99].

3.3.1.5. Cy7-Cl Sentezi (11):

2-kloro-1-formil-3-hidroksimetilen sikloheksen (6; 55 mmol, 9.75 g), 1-metil-2,3,3-trimetil-3H-indolyum iyodür (10; 110 mmol, 33 g) ve sodyum asetat (110 mmol, 10 g) tartılarak balon içerisindeki 150 mL asetik anhidrit üzerine ilave edildi. Azot gazı varlığında, 80 °C'de 1 saat reflüks edildi. İşlem sonrası balon soğutulduğunda parlak renkli yeşil kristallerin çöktüğü gözlemlendi. Çökelti süzülerek alındı. Sırasıyla distile su, bikarbonatlı su ve eter ile yıkandı. Etüvde 50 °C'de bir gece boyunca kurutuldu. Verim: %90, 30 g, yeşil renkli kristal [82,100].

3.3.1.6. NIR-HBI Sentezi:

1,3-dihidroksi-4-(1H)-benzimidazol (4; 6 mmol, 1.35 g) ve potasyum karbonat (K₂CO₃, 6 mmol, 850 mg) 25 mL asetonitril içerisinde, azot atmosferinde ve oda sıcaklığında 30 dk manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı (renk değişimi gözlenir) Daha sonra, ayrı bir beherde asetonitril-diklorometan-metanol (3:1:1) solvent karışımı içerisinde çözeltisi hazırlanmış olan Cy7-Cl (11; 3 mmol, 1.85 g) cam şırınga yardımıyla mevcut karışımın içerisine enjekte edildi. 6 saat süreyle 50 °C'de manyetik karıştırıcıda ve azot atmosferinde reflüks edildi. Oda şartlarına soğutulan balon süzüldü. Solvent vakumda uzaklaştırıldı. Madde kolon kromatografisi uygulanarak saflaştırıldı. (Yürütücü faz olarak

önce 100:1 oranında diklorometan – metanol ve devamında solvent polaritesinin artırılması sonucu 10:1 oranında diklorometan-metanol oranının sağlandığı solvent karışımı kullanıldı.) Verim: %20, 376 mg, e.n. 287.3-288.5 °C, yeşil renkli toz kristal.

3.3.1.7. NIR-CuHBI Sentezi (prob):

Nitrik oksit aktivite tayininde kullanılmak üzere tez kapsamında önerilen ve sentez aşamasının da son basamağı olan florojenik prob, spektrofotometrik analizler için NIR-HBI molekülü üzerinden geliştirildi. Belirli bir konsantrasyonda çözeltisi hazırlanan NIR-HBI, ekivalen miktarda konsantrasyon değerine sahip $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile PBS varlığında (fosfat tamponu, 20 mM, pH: 7.4) muamele edildi. Kompleks oluşumu spektrofotometre ile gözlemlendi.

3.4. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.4.1. Nitrik Oksitin Doğrudan Tayini ve Aktivite Ölçümü İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1.1. CuCl_2 Çözeltisinin Hazırlanması

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ metal tuzundan 17,05 mg tartıldı. Bir miktar distile su ile çözünmesi sağlanıp 10^{-3} M konsantrasyonda çalışma stok çözeltisi için balon jodede distile su kullanılarak hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3.4.1.2. NIR-HBI Çözeltisinin Hazırlanması

Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen NIR-HBI bileşiğinden (Şekil 3.3) 15,68 mg tartıldı. 2 mL diklorometan ve bir miktar etanol ile çözünmesi sağlanıp 10^{-3} M konsantrasyonda çalışma stok çözeltisi için balon jodede etanol kullanılarak hacim 25 mL'ye tamamlandı.

3.4.1.3. Nitrik Oksit Hazırlanması

Nitrik oksit üretimi için 1,1-Diethyl-2-hydroxy-2-nitroso-hydrazine sodium (DEA NONOate) nitrik oksit donörü kullanıldı. DEA NONOate bileşiğinden 3,88 mg tartıldı. Bir gün boyunca içerisinde azot gazı geçirilen 25 mL 0.01 M NaOH içerisinde çözünmesi sağlandı. Çalışmaların yapıldığı günlerde günlük olarak hazırlandı. Kullanılana dek azot gazı altında ve soğukta muhafaza edildi.

3.4.1.4. Biotiyollerin Hazırlanması

Nitrik oksitin aktivite tayini için kullanılan biotiyoller (glutasyon, sistein, homosistein, N-asetil sistein) 10^{-3} M konsantrasyonda çalışma stok çözeltisi olarak distile su kullanılarak ve çalışma günlerinde günlük olarak hazırlandı.

3.5. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.5.1. NIR-HBI Molekülünün Yapısının Aydınlatılmasında Kullanılan Yöntemler

Tez kapsamında sentezlenen NIR-HBI molekülü üzerine $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, COSY, HSQC, HMBC, FT-IR (ATR) ve HRMS teknikleri kullanılarak yapının karakterizasyonu sağlandı.

3.5.2. Nitrik Oksit Aktivite Tayininde Uygulanan Yöntemler

3.5.2.1. Florometrik Yöntem

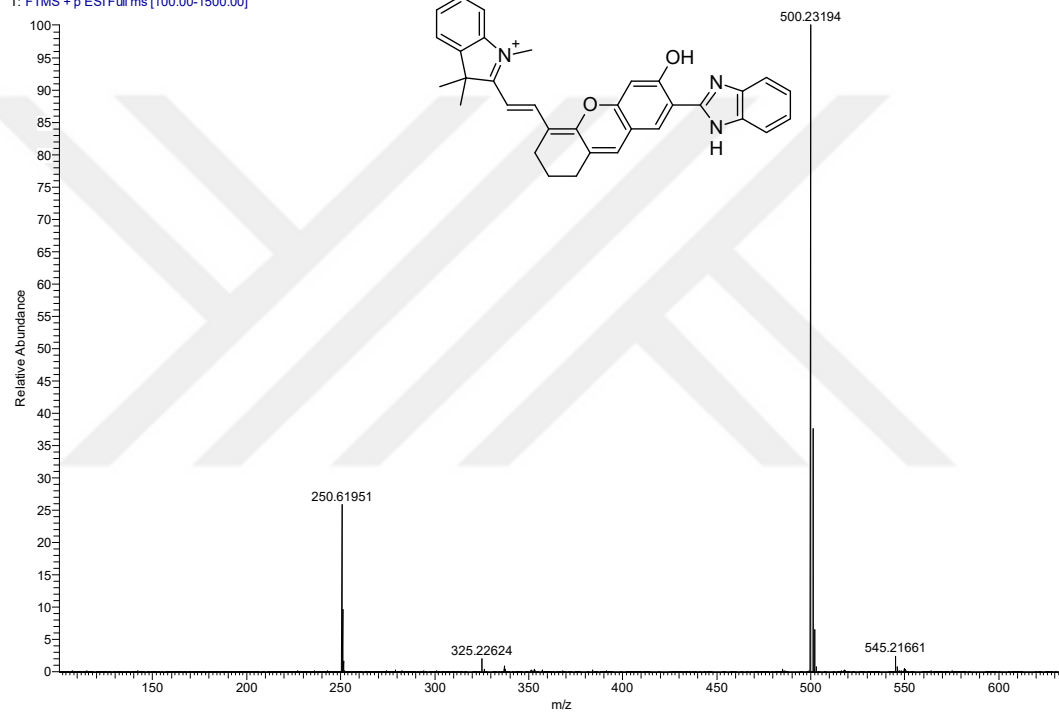
Tez kapsamında geliştirilen yeni yöntemde $1 \mu\text{M}$ NIR-HBI çözeltisi ile $1 \mu\text{M}$ CuCl_2 çözeltisi kullanılarak metal kompleksi oluşturuldu. $\cdot\text{NO}$ ilavesiyle probun floresans intensitesinde meydana gelen değişimler değerlendirildiğinde, geliştirilen yeni florojenik probun net bir şekilde $\cdot\text{NO}$ 'ya cevap verdiği kanıtlandı. Ayrıca çözelti ortamına ilave edilen çeşitli biotiyollerin (glutasyon, sistein, homosistein, N-asetil sistein) varlığında floresans intensitesindeki değişim tespit edildi.

4. BULGULAR

4.1. NIR-HBI'NİN YAPISININ AYDINLATILMASI İÇİN UYGULANAN TEKNİKLERDEN ELDE EDİLEN BULGULAR

4.1.1. HRMS Spektrumu

NO_probe #7-17 RT: 0.09-0.23 AV: 11 NL: 3.28E9
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1500.00]

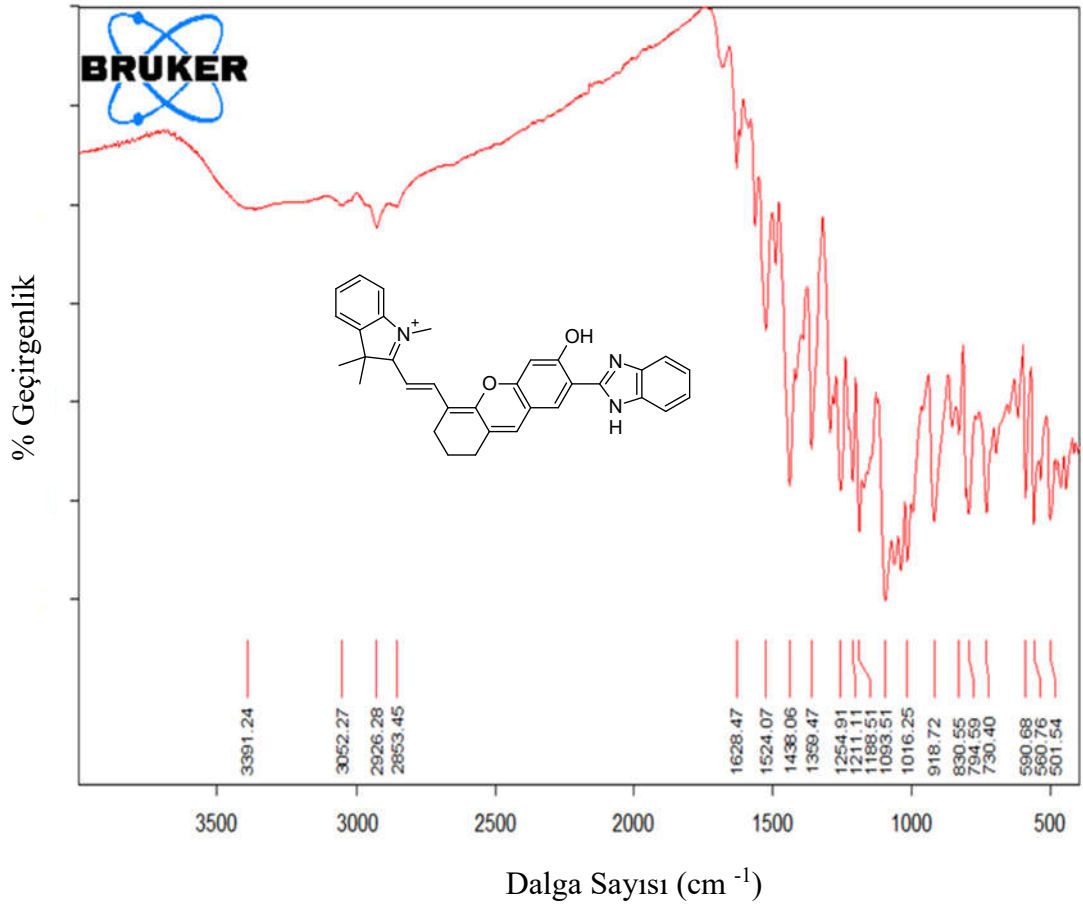


Şekil 4.1: NIR-HBI Molekülünün HRMS Spektrumu.

m/z	Tahmini Kütle	Delta (ppm)	RDB ek.	K. Molekül Formülü
500.23194	500.23325	-2.63	20.5	C ₃₃ H ₃₀ O ₂ N ₃

HRMS (+ESI): m/z [M-I]⁺ = 500.23194 (C₃₃H₃₀N₃O₂I: 627.51467 g.mol⁻¹)

4.1.2. FT-IR Spektrumu

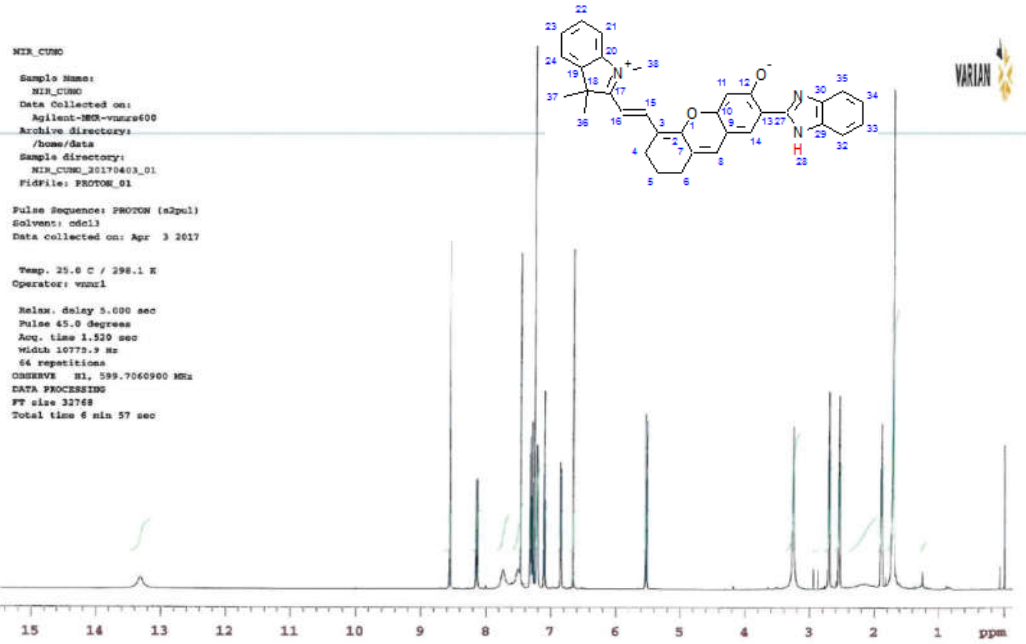


Şekil 4.2: NIR-HBI Molekülünün FT-IR (ATR) Spektrumu.

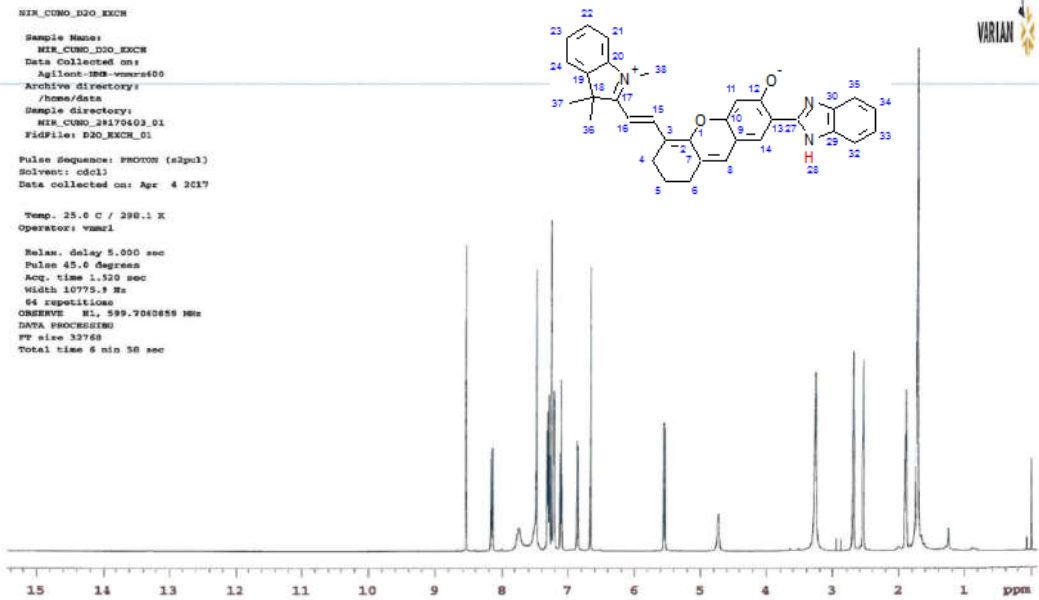
NIR-HBI için bazı karakteristik infrared değerleri:

FT-IR (ν , cm⁻¹): 3391 (OH), 3052 (NH), 2926 (C-H_{aromatik}), 2853, 1359 (C-H_{alifatik}), 1628 (C=C_{aromatik}), 1524 (C=C_{alken}), 1438 (C=N), 1254, 1188 (C-O-C), 1093 (C-OH), 900-700 (NH ve benzen halkaları için düzlem eğilim titreşimleri)

4.1.3. $^1\text{H-NMR}$ Spektrumları



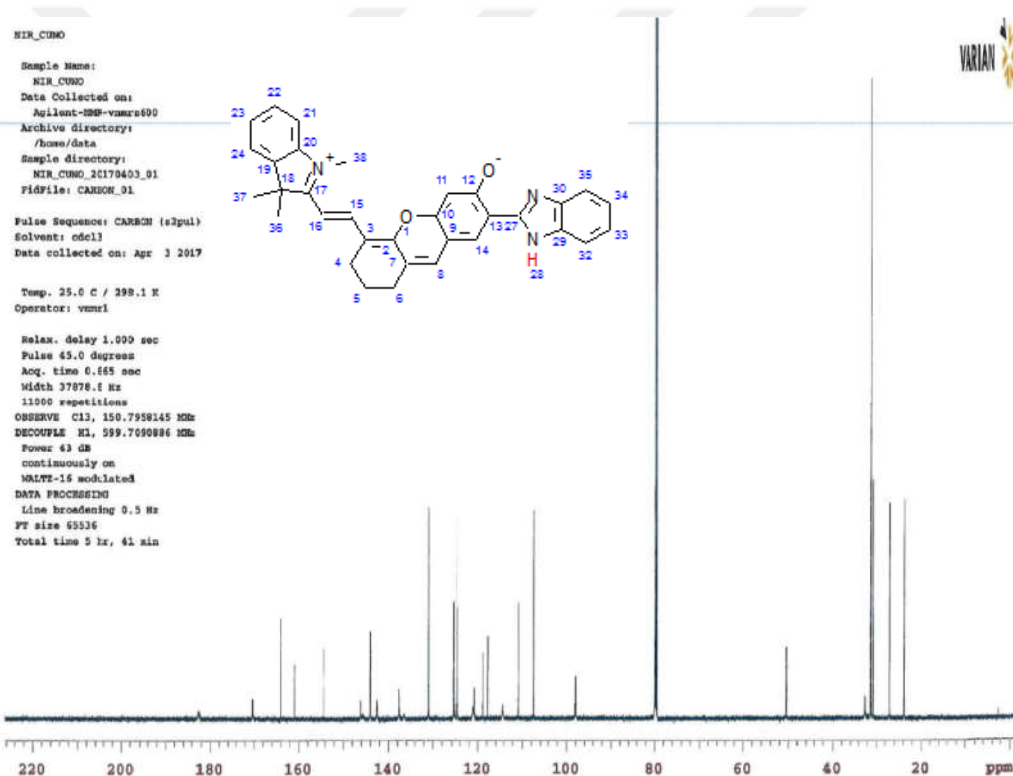
Şekil 4.3: NIR-HBI Molekülüne Ait $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu.



Şekil 4.4: NIR-HBI Molekülünün $^1\text{H-NMR}$ (döteryum değişimli) Spektrumu (CDCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 13.31 (m, NH), 8.56 (s, 1H, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-H}$), 8.15 (d, $j=13.51$ Hz, 1H, CH=CH), 7.79 (broad, 1H, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-H}$), 7.47 (s, 1H, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-H}$), 7.50 (broad, 1H, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-H}$), 7.32 (m, 1H, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-H}$), 7.29 (d, 1H, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-H}$), 7.23 (m, 2H, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-H}$), 7.09 (m, 1H, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-H}$), 6.85 (d, 1H, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-H}$), 6.66 (s, 1H, $\text{C}_{\text{arom.}}\text{-H}$), 5.53 (d, $j=13.51$ Hz, 1H, CH=CH), 3.26 (s, 3H, =N-CH₃), 2.71 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂), 2.55 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂), 1.88 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂), 1.72 (s, 6H, 2CH₃).

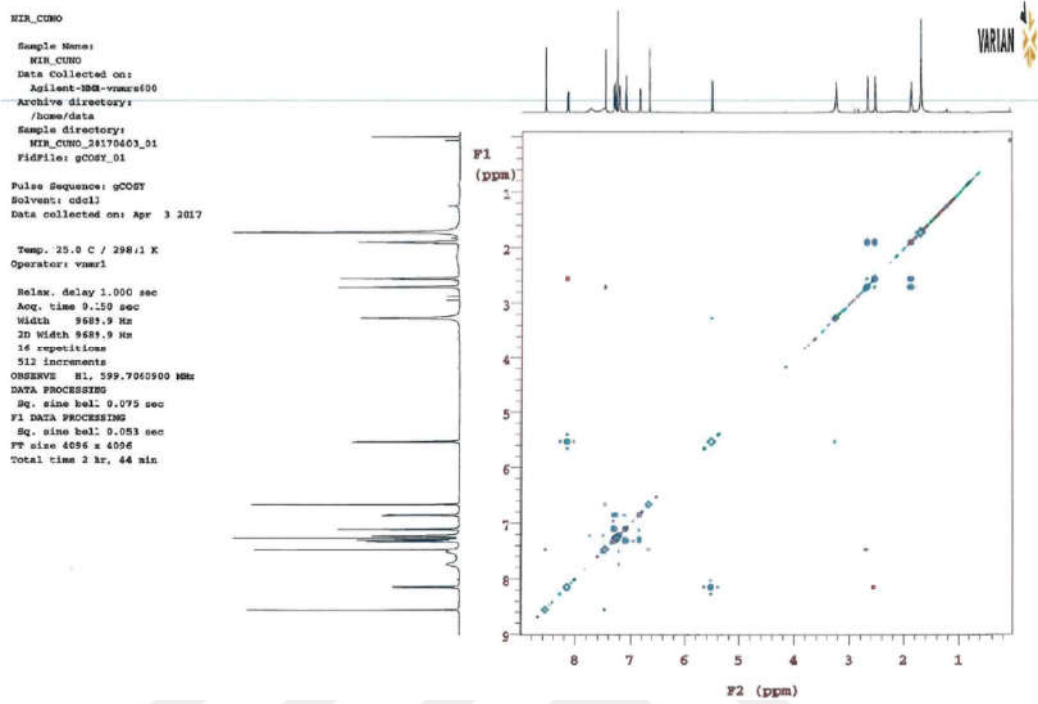
4.1.4. $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrumu



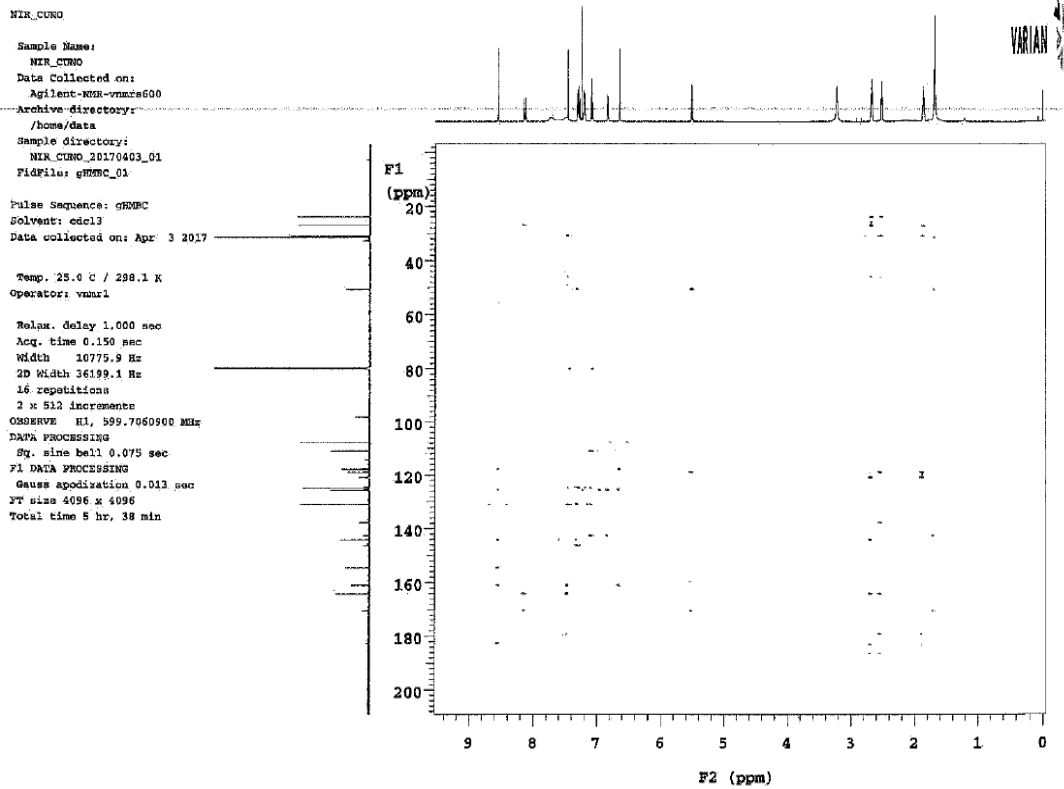
Şekil 4.5: NIR-HBI Molekülünün $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrumu (CDCl_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta=182.34$ (C₂₇), 170.32 (C₁₇), 164.04 (C₂), 160.88 (C₁₀), 154.44 (C₁₃), 146.10 (C₁₉), 145.43 (C₂₉), 143.98 (C₈), 142.49 (C₂₀), 137.53 (C₁₅), 136.47 (C₃₀), 130.94 (C₂₄), 130.86 (C₁₄), 125.57 (C₂₃), 125.43 (C₁₂), 124.71 (C₂₂), 124.67 (C_{33,34}), 120.99 (C₃₂), 120.76 (C₇), 118.88 (C₃), 117.51 (C₉), 114.19 (C₃₅), 110.88 (C₂₁), 107.49 (C₁₁), 97.96 (C₁₆), 50.44 (C₁₈), 32.56 (N-C₃₈), 31.31 (C₃₆, C₃₇), 30.80 (C₆), 27.03 (C₄), 23.80 (C₅).

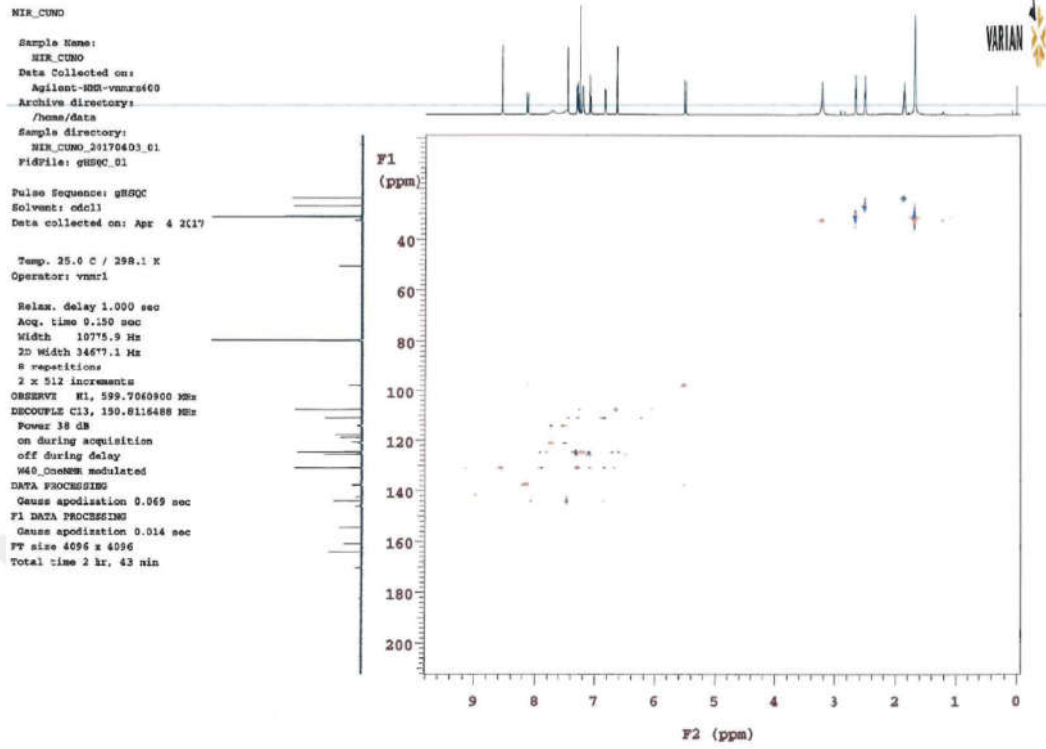
4.1.5. COSY, HMBS ve HSQC Spektrumları



Şekil 4.6: NIR-HBI Molekülüne Ait COSY Spektrumu.



Şekil 4.7: NIR-HBI Molekülüne Ait HMBC Spektrumu.



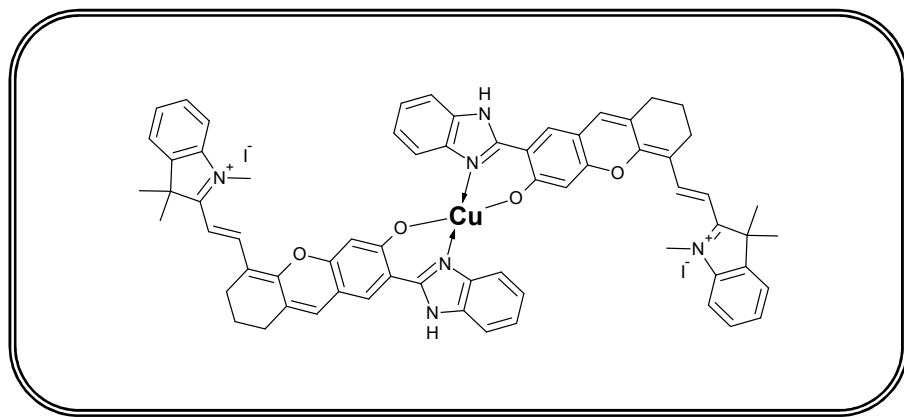
Şekil 4.8: NIR-HBI Molekülünün HSQC Spektrumu.

4.2. NIR-CuHBI'NİN NİTRİK OKSİT AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

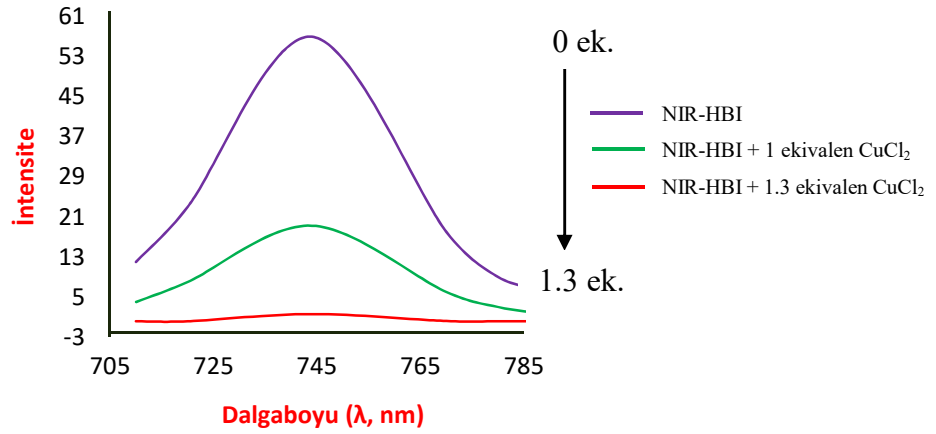
4.2.1. Optimum Deneş Koşullarının Belirlenmesi

4.2.1.1. Optimum Dalgaboyunun Belirlenmesi ve Metal Kompleksinin Oluşturulması

Tez kapsamında geliştirilen NIR-CuHBI bileşiğinin optimum emisyon ve eksitasyon dalgaboyları spektrofloretrade art arda yapılan 3 tekrar okuma ile tespit edildi. NIR-HBI bileşiği çözeltisinden (1 μM) tüp içerisine 1 mL alındı. Üzerine CuCl_2 çözeltisinden (1 μM) belirli hacimlerde (0-1-1,3 mL) ilave edildi. Son hacim 4 mL olacak şekilde geriye kalan kısım etanol ve PBS (20 mM, pH:7.4) ile tamamlandı. Tüp iyice karıştırıldıktan sonra kuvars küvet içerisine alınan çözelti karışımına, spektrofloretrade ön tarama işlemi uygulandı. Eksitasyon dalgaboyunun (λ_{ex}) 695 nm, emisyon dalgaboyunun (λ_{em}) ise 745 nm olduğu tespit edildi. Belirlenen bu eksitasyon ve emisyon dalgaboylarında floresans intensite değerlerindeki azalma doğrultusunda minimum intensite değerinin sağlanması için ortama 1,3 mL CuCl_2 çözeltisinden ilave edilmesi gerektiği tespit edildi (Şekil 4.9). Bu kompleksleşme oranı konusunda Li ve ekibi tarafından yakın zamanda benzer molekül yapısı ile gerçekleştirilen ölçümler ile uyumlu ve çalışmalar arası verilerin birbirini doğrular nitelikte olduğu sonuçlar elde edildi [95]. Floresans intensitesinin oldukça düşük değere sönümlenmesiyle (Şekil 4.10) $\cdot\text{NO}$ tayini için tez çalışmasına konu olan prob (NIR-CuHBI) başarıyla sentezlendi.



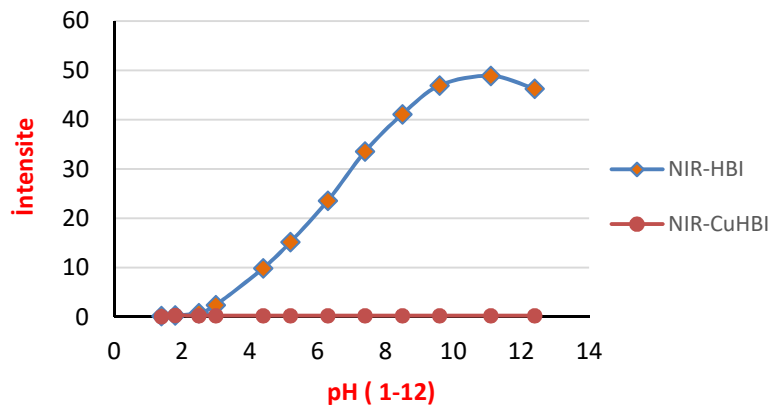
Şekil 4.9: NIR-HBI ve Cu Metali Arasında Öngörülen Kompleks Oluşumu.



Şekil 4.10: NIR-HBI ve Bakır Metali Arasındaki Kompleksleşme Oranına Dayalı Floresans İntensite Değişimi Grafiği.

4.2.1.2. pH'nun Prob Üzerine Etkisi

NIR-HBI ve NIR-CuHBI (prob) bileşiklerinin etanoldeki çözeltilerinin 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH kullanılmasıyla oluşturulan belirli pH değerlerindeki (1-13) floresans intensite değişim grafiği Şekil 4.11'de olduğu gibi elde edildi. Çalışmaların PBS tamponu ortamında (pH = 7.4) yapılmasının uygun koşulları sağladığı belirlendi.

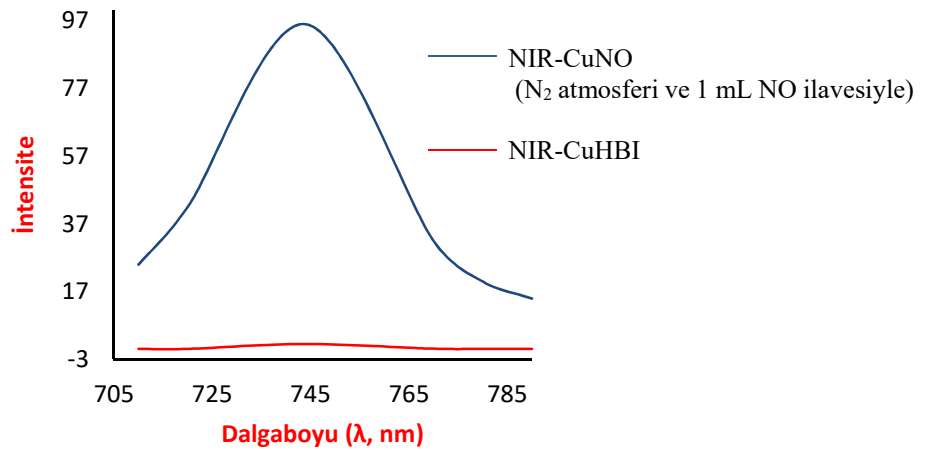


Şekil 4.11: NIR-HBI ve NIR-CuHBI Bileşiklerinin Floresans İntensitelerine pH Etkisi.

4.2.2. NIR-CuHBI ile ·NO Tayini

·NO'nun çok reaktif bir radikal olduğu ve oksijen gibi çeşitli molekül yapıları varlığında çok hızlı bir şekilde yükseltgenerek farklı reaktif türlere dönüşeceği [17] göz önünde bulundurularak NIR-CuHBI ile ·NO arasındaki reaksiyonun maksimum verimle sağlanabilmesi ve oluşabilecek muhtemel etkileşimlerin minimum seviyede gerçekleşmesi açısından ölçümlerin inert ortamda yapılmasına özen gösterildi.

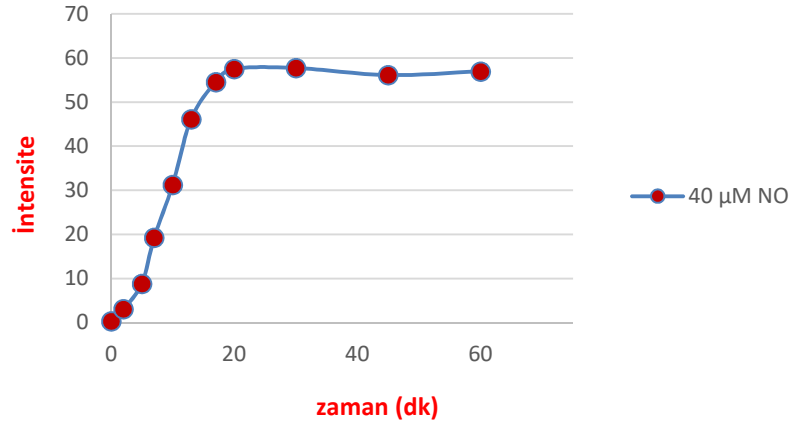
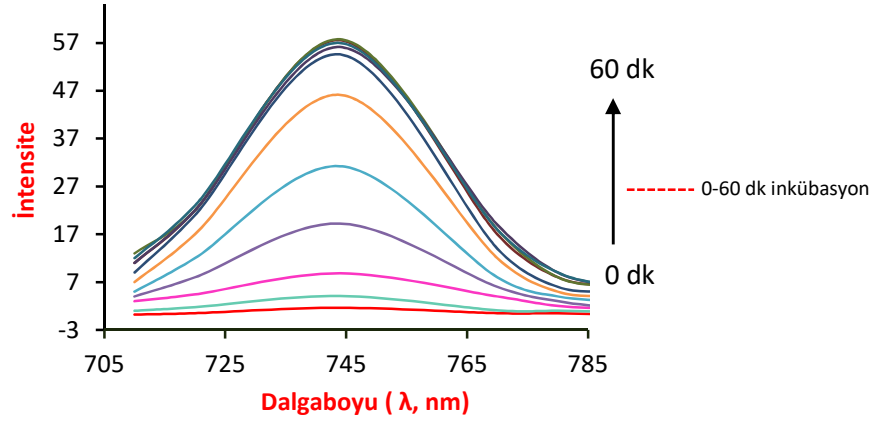
NIR-CuHBI çözelti karışımına (prob, 1 mL 1 μ M NIR-HBI + 1,3 mL 1 μ M CuCl₂) 0,7 mL 20 mM PBS ve 10⁻³ M stok çözeltisi hazırlanıp inert ortamda muhafaza edilen ·NO çözeltisinden 1 mL ilave edildi (V_{toplam}: 4 mL). 15 dakika oda sıcaklığında ve azot gazı altında inkübasyonu sağlandıktan sonra floresans intensitesinde meydana gelen değişim spektrofloretrade ölçüldü (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: ·NO İlavesi (1 mL) Sonucu NIR-CuHBI'nın Floresans İntensitesinde Meydana Gelen Değişim.

4.2.2.1. NIR-CuHBI ile ·NO Arasındaki Etkileşimin Zamana Bağlı Değişimi

NIR-CuHBI çözelti karışımı hazırlandıktan sonra üzerine 1 mL PBS ve 40 μ M (160 μ L) ·NO çözeltisinden ilave edildi. 0,6 mL etanol ilavesiyle son çözelti hacmi 4 mL'ye tamamlandı. Kronometre yardımıyla, 0-60 dakika aralığındaki zaman diliminde inert ortamdaki NIR-CuHBI (prob) - NO etkileşimi, floresans intensite değişimi gözlemlenerek tespit edildi (Şekil 4.13).

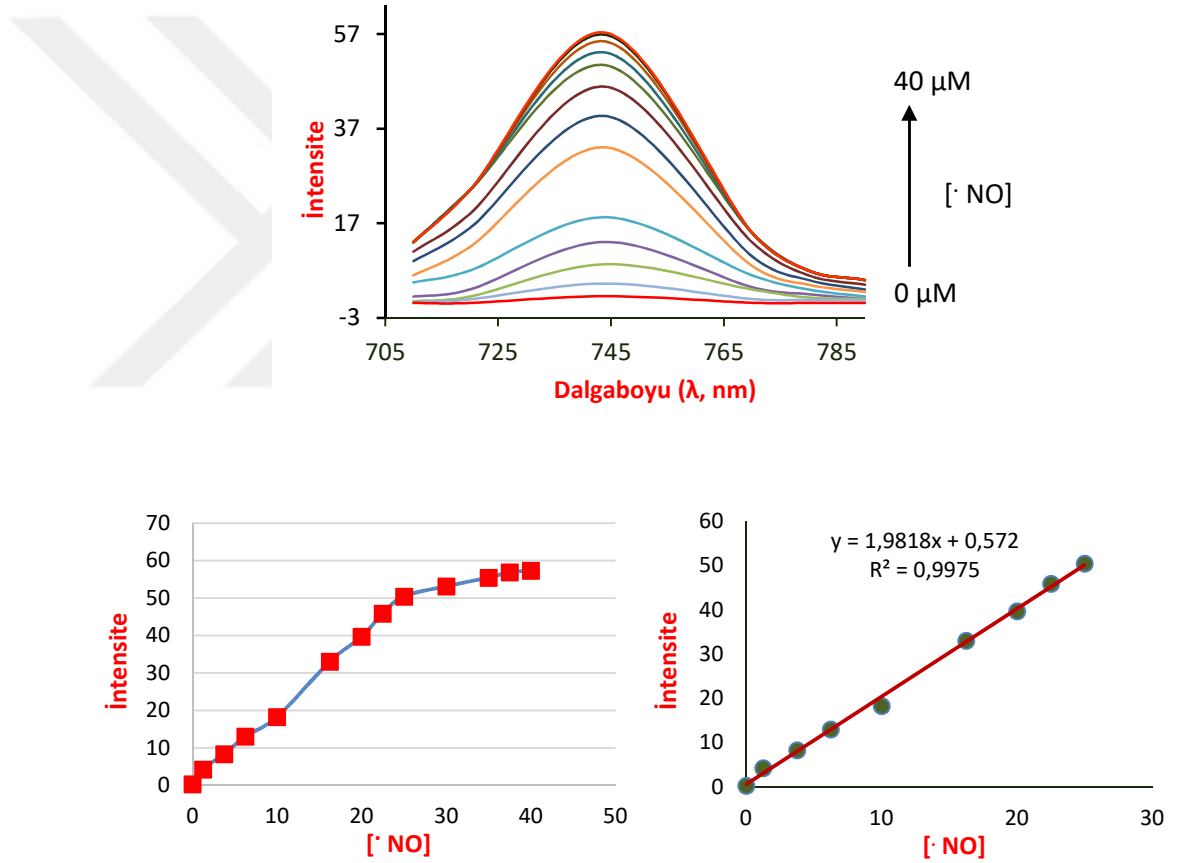


Şekil 4.13: NIR-CuHBI ve 40 μM ·NO Etkileşiminin Zamana Bağlı Değişim Grafikleri.

0-15 dakika aralığında probun floresans intensitesinde devamlı olarak artış meydana geldi. Fakat 15. dakikadan sonraki zaman diliminde floresans intensitesi çok az bir artış gösterdi (15-20 dk) veya yaklaşık olarak aynı değerlerde okundu (20-60 dk). Verilerin bu şekilde zamana bağlı olarak farklılık göstermesinde ·NO donörü olarak kullanılan DEA-NONOate bileşiğinin yarılanma ömrü büyük rol oynamaktadır. Literatürde Zhegalova ve ekibi tarafından yapılan çalışmada, kullanılan donörün bazik ortam koşullarında herhangi bir değişime uğramadığı; ancak nötral ve asidik koşullarda donörün ·NO üretmek üzere bozunmaya uğradığı; ayrıca donörün bu koşullar altında yarılanma ömrünün 16 dakika olduğu grafikler eşliğinde belirtilmiştir [101]. Sonuç olarak geliştirilen yeni yöntemde optimum etkileşim zamanı 15 dakika olarak belirlendi.

4.2.2.2. NIR-CuHBI ile \cdot NO Arasındaki Etkileşimin Konsantrasyona Bağlı Değişimi

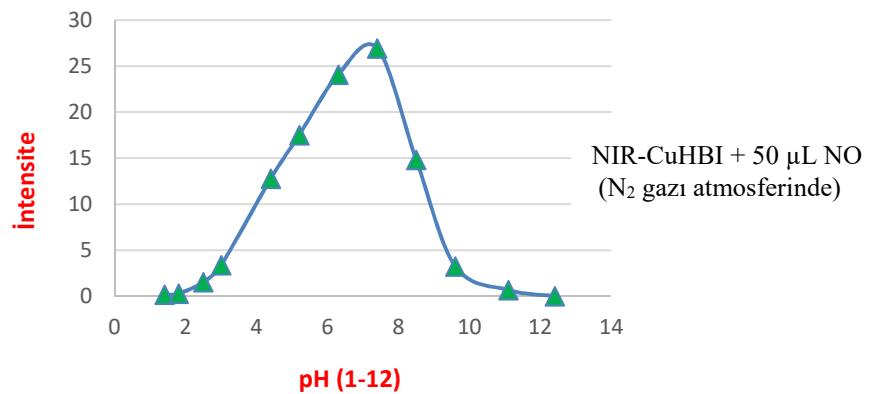
NIR-CuHBI çözelti karışımı hazırlandıktan sonra üzerine 1 mL PBS ve (0-40) μ M aralığında değişen konsantrasyonlarda \cdot NO çözeltisi ilave edildi. Son çözelti hacimleri 4 mL olacak şekilde etanol ile tamamlama yapıldı. Oda sıcaklığında ve azot gazı altında 15 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Çözeltiler kuvars küvete aktarıldı. İnert ortam altında spektrofloremetrede floresans intensite değerleri ölçüldü (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: NIR-CuHBI ve \cdot NO Arasındaki Konsantrasyona Bağlı İntensite Değişim Grafikleri.

4.2.2.3. NIR-CuHBI ile ·NO Arasındaki Etkileşime pH Etkisi

NIR-CuHBI çözelti karışımı hazırlandı. Üzerine 1,65 mL etanol ilave edildi. İşlem öncesinde bir süre azot gazından geçirilen 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH çözeltileri kullanılarak çözelti pH'ları 1-14 aralığında olacak şekilde pH-metrede hassas bir şekilde ayarlandı. Son olarak 50 µL ·NO çözeltisi ilave edildi. Oda sıcaklığında, azot atmosferi altında 15 dakika inkübasyon sağlandı. Kuvars küvete alınan çözeltilerin floresans intensiteleri ölçüldü. Ölçülen intensite değerleri NIR-CuHBI'nın çok düşük ve çok yüksek pH aralıklarında (0-3, 11-14) ·NO'ya karşı cevap vermediğini gösterdi. Bu durum hem ·NO donörünün hem de NIR-CuHBI probunun molekül yapılarının pH'ya duyarlı olması ve belirli pH aralıklarında verimli şekilde etkileşmesinden kaynaklanmaktadır. Şekil 4.11'de görüleceği üzere NIR-HBI çözeltisinin (probun ·NO ile etkileşiminden sonra oluşan bileşiğin bu yapıya çok benzemesinden dolayı bu veriler esas alınarak değerlendirilme yapılmıştır.) floresans intensitesi pH 3-10 değerleri arasında artış gösterdi. ·NO donörü ise bazik şartlarda herhangi bir bozunmaya uğramazken, nötral ve asidik şartlar altında ise bozularak ortama ·NO sağlamaktadır. Bu iki durumun kesiştiği pH aralığı ise prob ve ·NO'nun tam verimle etkileşim gösterdiği aralık olarak değerlendirildi. İntensite verileri doğrultusunda bu etkileşimin en verimli şekilde pH 6-8 aralığında olduğu tespit edildi (Şekil 4.15).



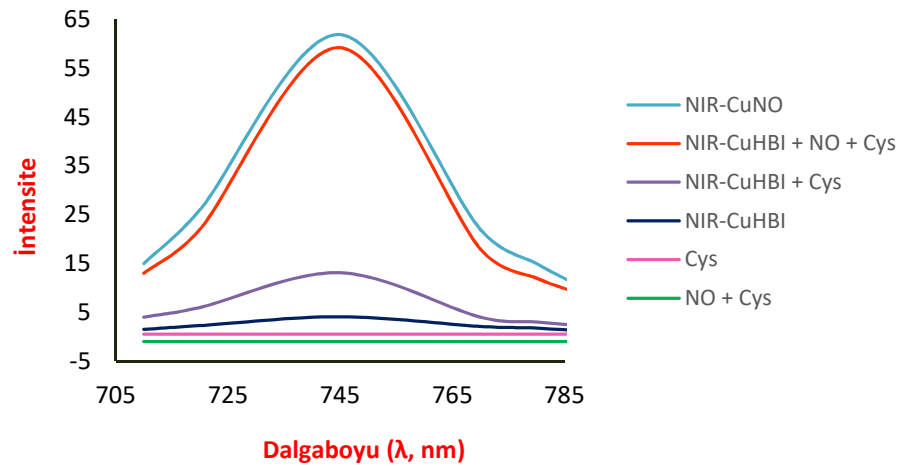
Şekil 4.15: NIR-CuHBI ve ·NO Etkileşimine pH Etkisi.

4.2.3. Biyotiyoller Varlığında NIR-CuHBI ile ·NO Tayini

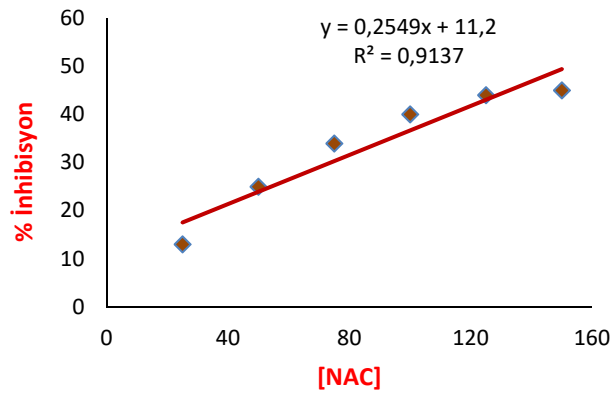
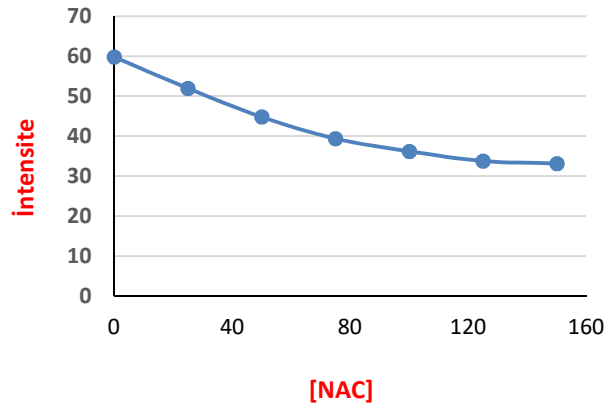
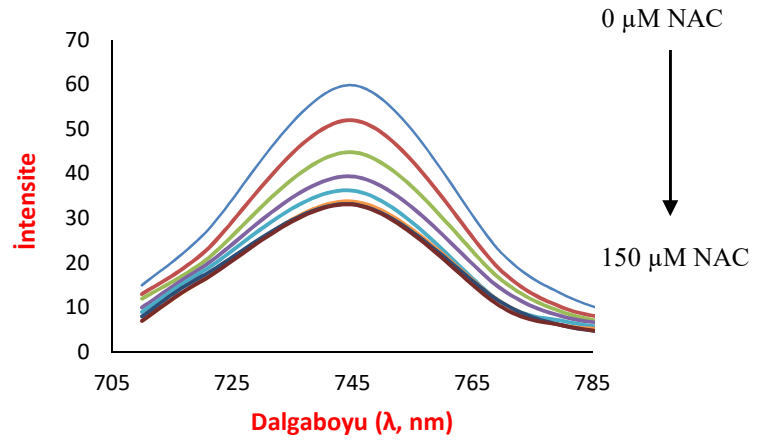
Tez kapsamında geliştirilen NIR bölgede emisyon özelliğine sahip probun ·NO'ya karşı olan hassasiyet ve seçiciliğinin denetlenmesi; ayrıca analitik olarak geliştirilen yeni yöntem ile ·NO aktivite tayini yapılabilmesi açısından bazı biyotiyoller kullanılarak emisyon spektrumları ve kalibrasyon grafikleri elde edildi. Ayrıca ortamda bulunan tüm maddelerin birbiri ile etkileşimleri de ölçüm yapılan dalgaboyunda ($\lambda_{em} = 745$ nm) incelendi. (Şekil 4.16 - 4.21).

4.2.3.1. NIR-CuHBI ile NO Arasındaki Etkileşime Biyotiyol Etkisi

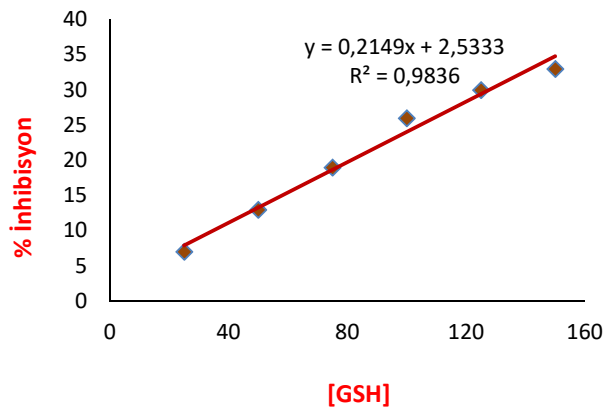
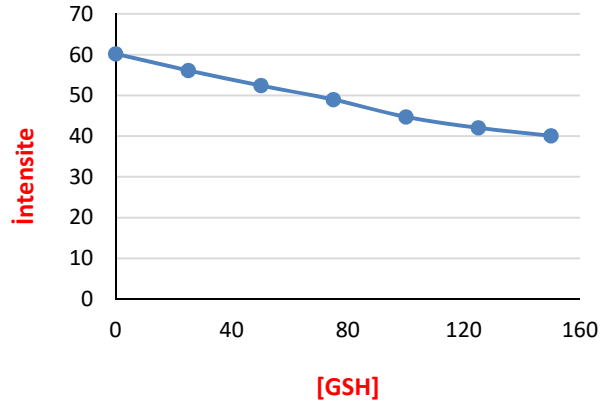
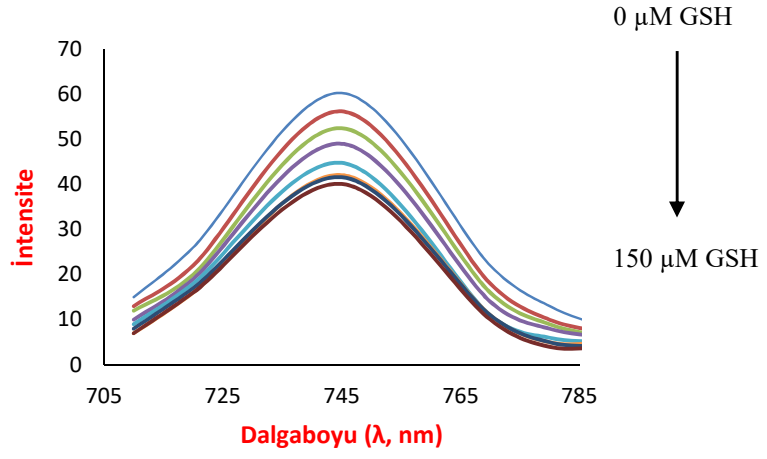
NIR-CuHBI çözelti karışımına (prob, 1 mL 1 μ M NIR-HBI + 1,3 mL 1 μ M CuCl₂) 1 mL PBS ilave edildi. Günlük olarak hazırlanan 10⁻³ M biyotiyollerden (glutasyon, sistein, homosistein, N-asetil sistein) son çözelti hacmindeki konsantrasyon değerleri 0-150 μ M arasında bu karışıma ilave edildi. Ortamdaki ·NO konsantrasyonu sabit tutulmak koşuluyla (40 μ M), her bir karışım içerisinde inert koşullarda 160 μ L ·NO ilavesi yapıldı. Son çözelti hacmi 4 mL olacak şekilde etanol kullanılarak tamamlandı. İntert ortamda optimum inkübasyon sağlandıktan sonra yine inert ortamda olmak koşuluyla spektrofloretrerede floresans intensite ölçümleri gerçekleştirildi.



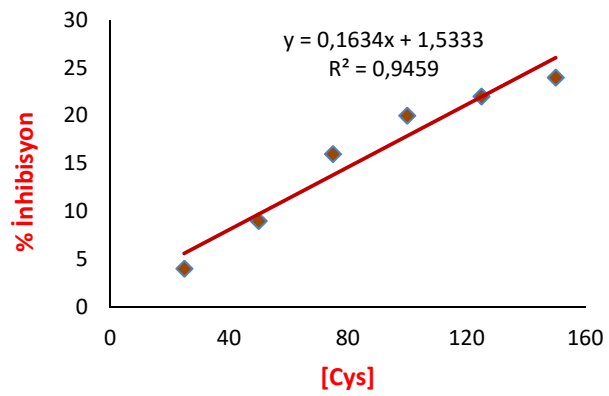
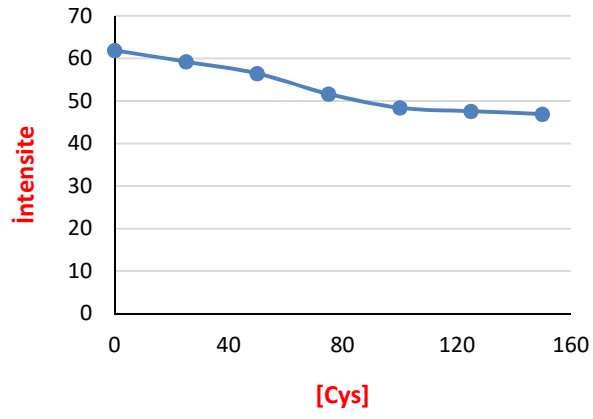
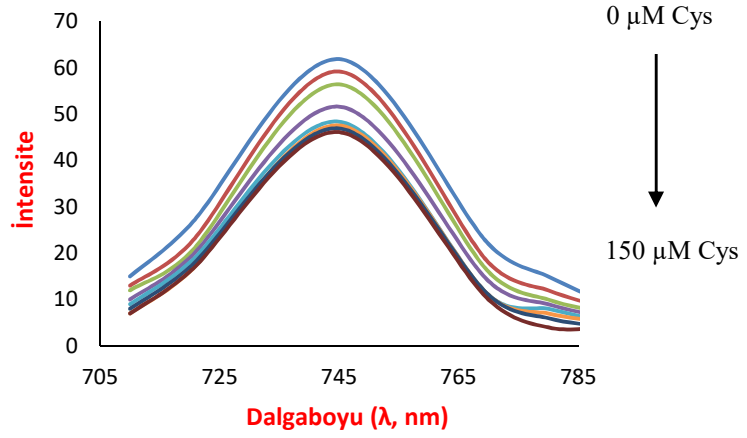
Şekil 4.16: Ortamda Bulunan ve Oluşan Maddelerin $\lambda_{em} = 745$ nm'deki İntensite Değerleri.



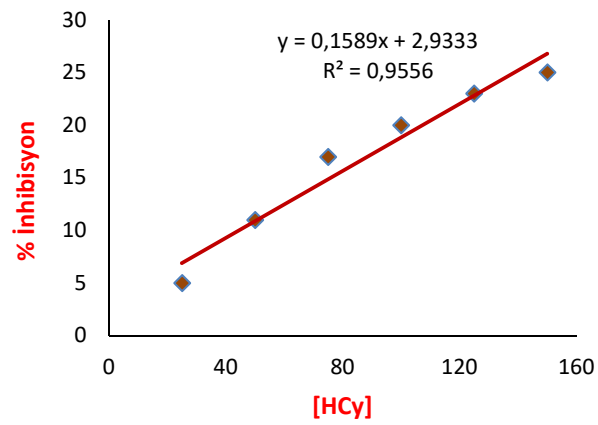
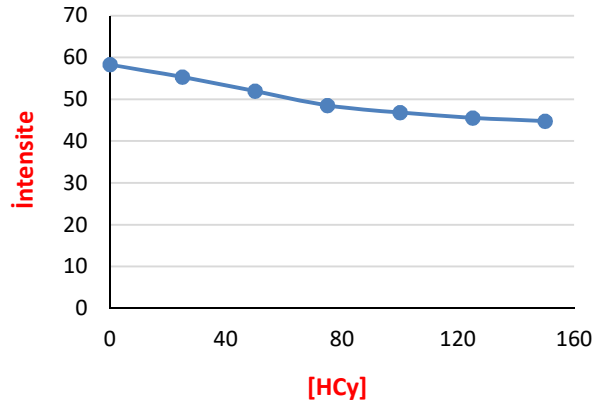
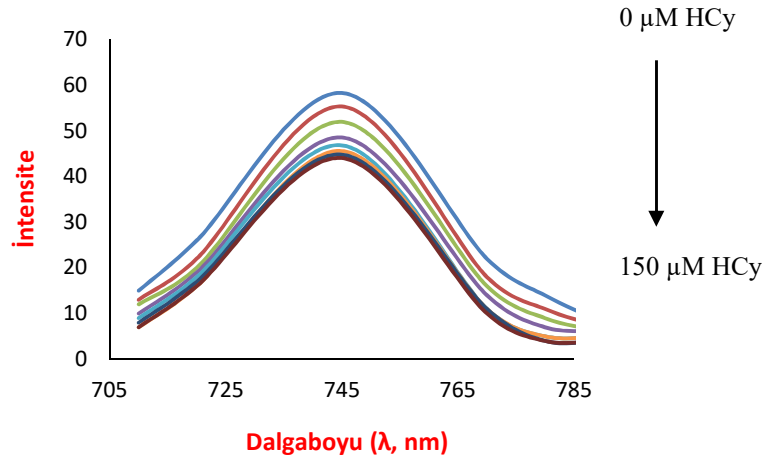
Şekil 4.17: NIR-CuHBI ve ·NO Arasındaki Etkileşime NAC Etkisi.



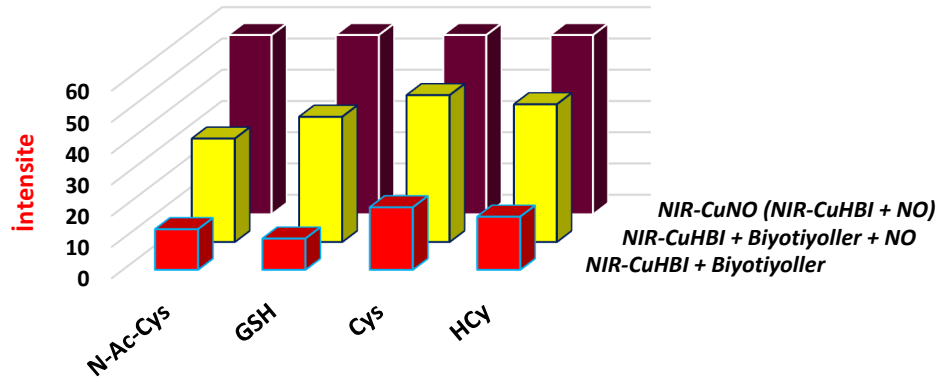
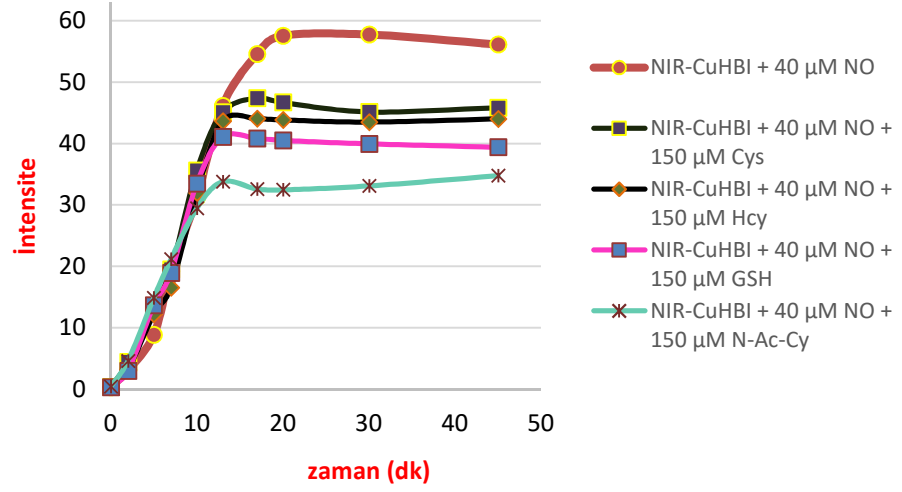
Şekil 4.18: NIR-CuHBI ve NO Arasındaki Etkileşime GSH Etkisi.



Şekil 4.19: NIR-CuHBI ve NO Arasındaki Etkileşime Cys Etkisi.



Şekil 4.20: NIR-CuHBI ve NO Arasındaki Etkileşime Hcy Etkisi.



Şekil 4.21: Florometrik Yöntemde NIR-CuHBI + NO + Biyotiyol Etkileşiminin Zamana Bağlı Intensite Değişimi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında geliştirilen yeni florojenik prob ve yöntem ile öncelikle nitrik oksit aktivitesi tayin edildi. Ticari olarak satın alınan donör kullanılarak fizyolojik pH olan 7.4'te nitrik oksit üretimi sağlandı ve bu pH'da donörün ürettiği ·NO ile geliştirilen yeni florojenik probun etkileşimi 745 nm'de florometrik olarak gözlemlendi. ·NO'nun çok kısa yarılanma ömrü olduğu ve oksijen ile etkileşimin çok çabuk gerçekleştiği, dolayısıyla ortamda çeşitli reaktif azot türlerinin meydana geldiği yapılan çalışmalarda belirtildiğinden ve ayrıca geliştirilen prob doğrudan ·NO'ya duyarlı olduğundan, çalışmaların inert ortamda yapılmasına hassasiyetle dikkat edildi.

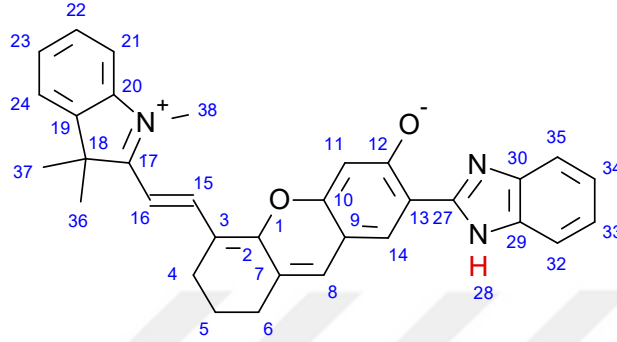
Prob olarak, tez kapsamında ilk defa sentezlenen ve kısaca NIR-CuHBI olarak adlandırılan bileşik kullanıldı. Bu yeni prob 1,25 - 25 µM çalışma aralığında 2×10^6 M sönmüleme katsayısına sahip floresan bir bileşik olup, LOD değeri 0.178 µM olarak hesaplandı.

·NO aktivite tayini için geliştirilen yeni florojenik prob ve yöntem, probun intensite değerinin ·NO varlığında artmasına dayanmaktadır. ·NO aktivitesinin doğru bir şekilde belirlenebilmesi, nitrik oksit ve geliştirilen prob arasında öngörülen reaksiyon mekanizmanın (Şekil 5.2) [102] gerçekleşmesiyle birlikte, neredeyse sıfır değerinde olan probun floresans intensitesini belirli bir zaman içerisinde etkilemesine bağlıdır.

Sentezlenen NIR-HBI bileşiğinin kapalı molekül formülü $C_{33}H_{30}N_3O_2I$ şeklindedir. Teorik olarak hesaplanan molekül kütlesi $627.51 \text{ g.mol}^{-1}$ dür. Uygulanan HRMS-ESI tekniği ile kütle spektrumu alındı. Bileşiğin moleküler iyon piki $m/z [M-I]^+ = 500.23 \text{ g.mol}^{-1}$ olarak belirlendi (Şekil 4.1).

NIR-HBI molekülünün yapısında bulunan bazı grup ve bağların titreşimleri, FT-IR tekniği uygulanarak alınan IR spektrumu ile değerlendirildi. Bu spektruma bakıldığında molekül yapısı üzerindeki OH grubuna ait karakteristik bantın (ν_{OH}) 3391 cm^{-1} ; benzimidazol yapısı üzerindeki sekonder amin grubuna ait bantın (ν_{NH}) 3052 cm^{-1} ; aromatik C-H bağlarına ait gerilme bantlarının 2926 cm^{-1} ; alifatik C-H bağlarına ait gerilme bantlarının $2853-1359 \text{ cm}^{-1}$; aromatik C=C bağlarına ait gerilme bantlarının 1628

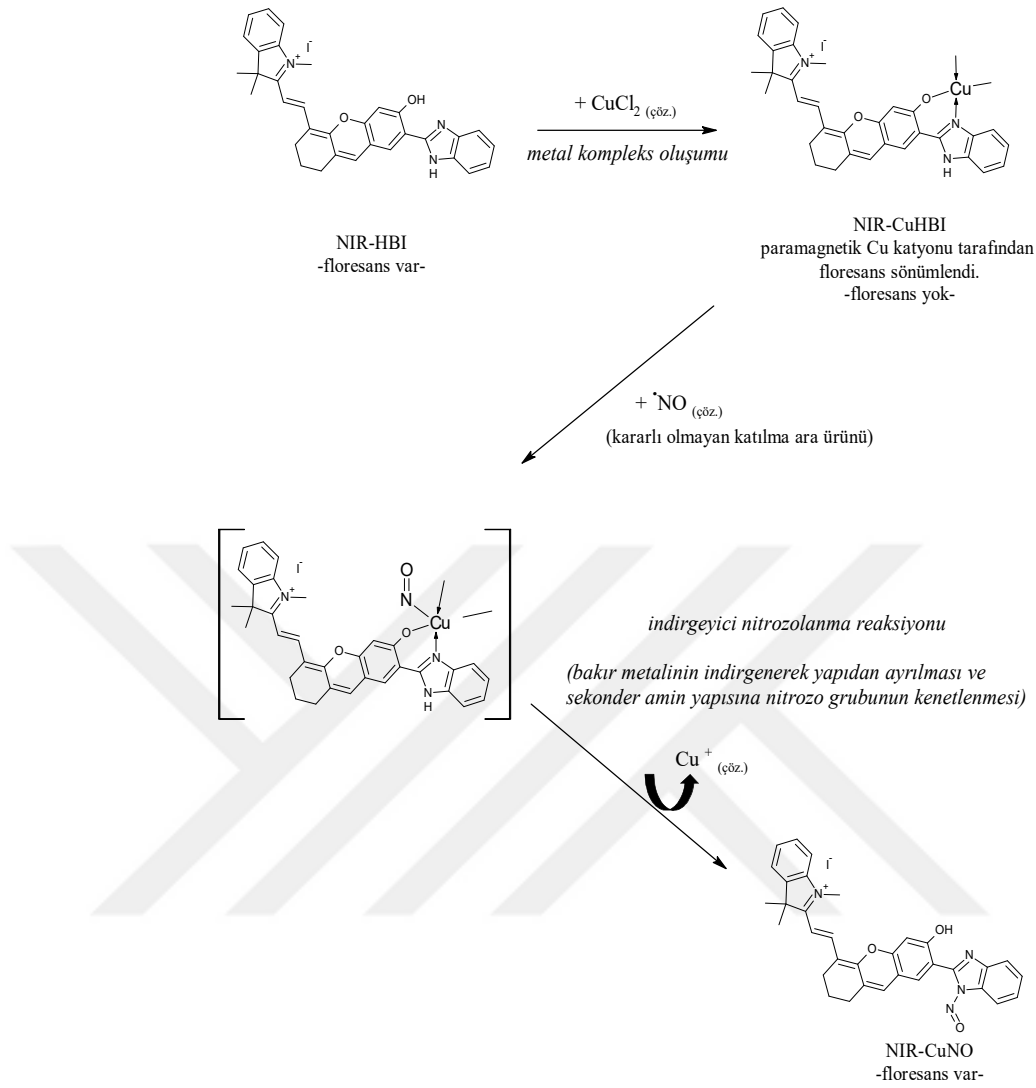
cm^{-1} ; alifatik $\text{C}=\text{C}$ bağlarına ait gerilme bantlarının 1524 cm^{-1} ; $\text{C}=\text{N}$ gerilme bantının 1438 cm^{-1} ; $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ eterik yapısındaki ve $\text{C}-\text{OH}$ bağındaki $\text{C}-\text{O}$ gerilmesine ait karakteristik bantların $1254-1188-1093 \text{ cm}^{-1}$ ve molekülü oluşturan aromatik halkalara ait düzlem içi eğilmelerin $900-700 \text{ cm}^{-1}$ de olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 5.1: NIR-HBI Molekülünün Karakterizasyonu Sırasında Kullanılan Numaralandırma Sistemi.

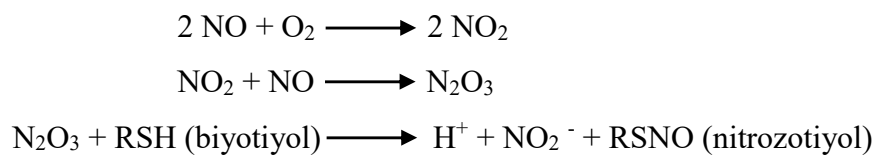
Sentezlenen yeni NIR-HBI molekülünün yapısı COSY (proton-proton eşleştirmeleri), HSQC (proton-karbon eşleştirmeleri) ve HMBC (kuaterner karbonların etrafı) teknikleriyle aydınlatıldı. Şekil 5.1’de numaralandırılması gösterilen moleküle ait karbon ve proton eşleşmeleri detaylı olarak Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5’te açıklandı.

D_2O değişimi yapıldıktan sonra (Şekil 4.4) sadece imin piki olduğunu düşündüğümüz proton kayboldu. Ancak piklerde OH pikine karşılık gelen herhangi bir proton değişimi olmadı. Bunun sebebinin ise maddenin saflaştırılması sırasında bazik alüminyum oksit kullanılması olduğu düşünülmektedir [72]. Ayrıca D_2O değişimi sırasında 4.7 ppm ’de yeni bir pik oluştuğu gözlemlendi. Muhtemelen bu pikin D_2O gelen su piki olduğu düşünülmektedir.

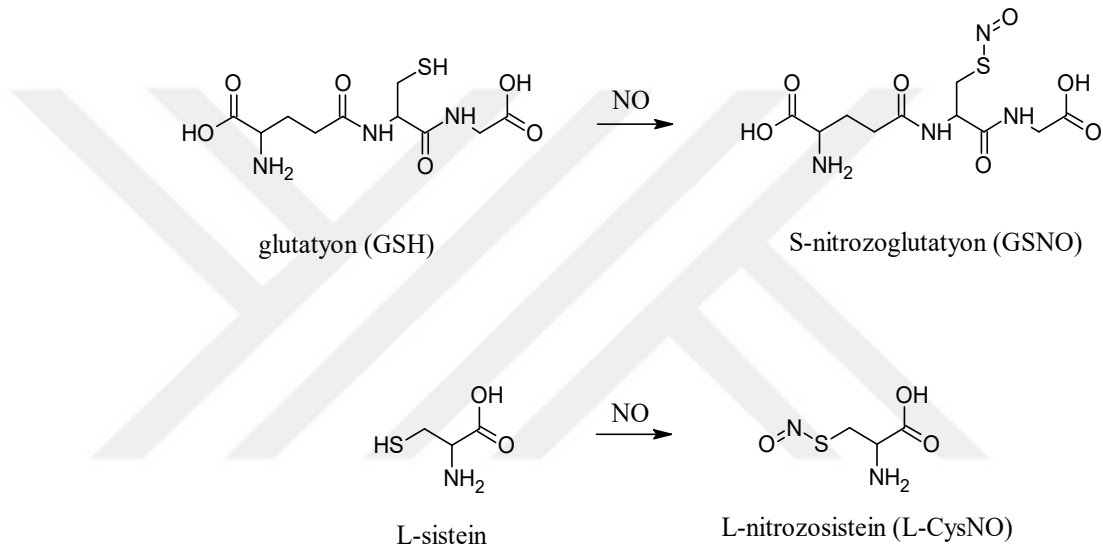
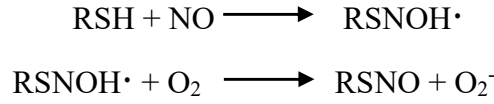


Şekil 5.2: NIR-CuHBI ve ·NO Arasında Gerçekleştiği Öngörülen Reaksiyon Mekanizması.

Geliştirilen yeni probun hem ·NO'ya karşı seçici ve hassas olduğunun ortaya çıkarılması hem de aktivite tayininin yapılabilmesi amacıyla ortama çeşitli biyotiyoller ilave edildi. Literatürde, oda koşullarında, ·NO ve biyotiyoller arasında çok hızlı bir reaksiyon olduğu ve nitrozotiyol bileşiklerinin meydana geldiği belirtilmiştir (Şekil 5.3) [103-107].

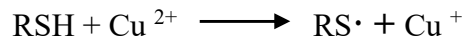


Yukarıdaki reaksiyon denkleminde belirtildiği gibi $\cdot\text{NO}$ 'nun oksidasyon ürünü olan N_2O_3 (diazot trioksit) üzerinden tiyollerin nitrozolanması gerçekleşeceği gibi, $\cdot\text{NO}$ 'nun doğrudan tiyol grubuna katılması ile radikalik olarak da S-nitrozotiyol yapıları meydana gelebilmektedir [106].



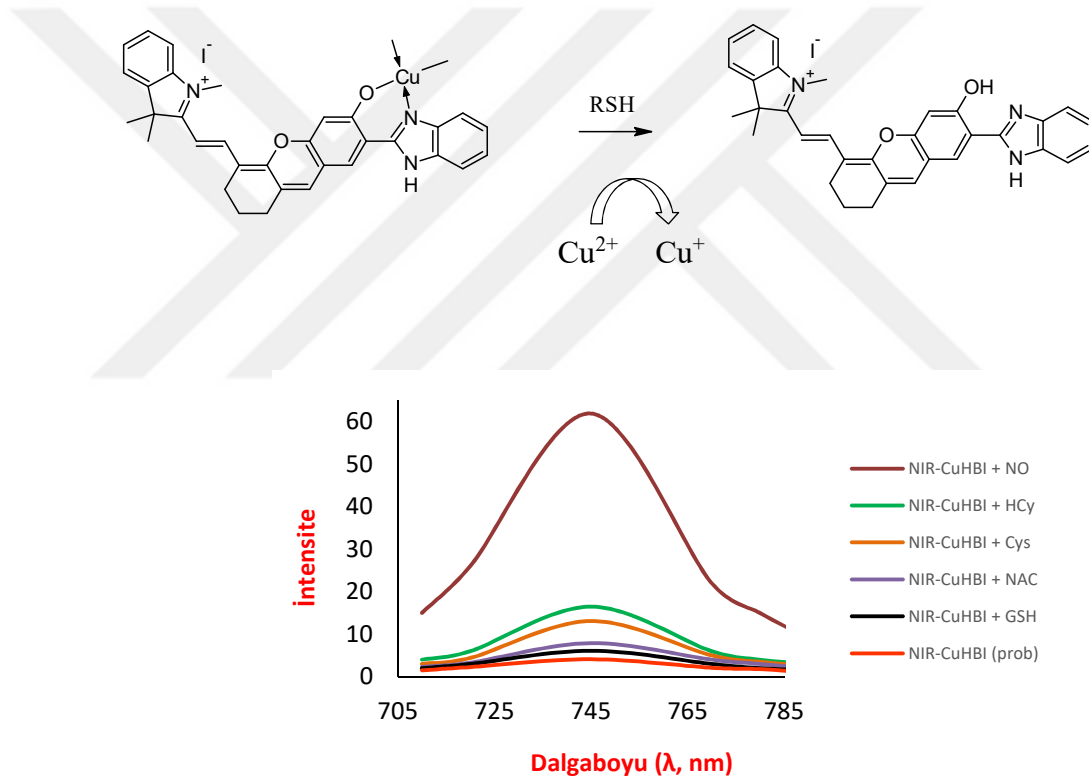
Şekil 5.3: Nitrozotiyol Örnekleri.

Ortama ilave edilen biyotiyoller ile ilgili olarak dikkatle incelenmesi gereken bir diğer husus ise, tiyol gruplarının bakır (II) katyonunu indirgeme özelliğidir.



Nitrik oksit tayini için geliştirilen yeni probun mekanizması incelendiğinde, $\cdot\text{NO}$ ile etkileşim sağlaması için bakır(II) metali kullanılarak floresans intensitesi sönmülmüş olan yapının (NIR-CuHBI) elde edildiği görülecektir. Bu aşamadan sonra ortama dâhil edilen $\cdot\text{NO}$ 'nun bakır(II) metalini bakır(I) katyonuna indirgemesiyle oluşturulan metal

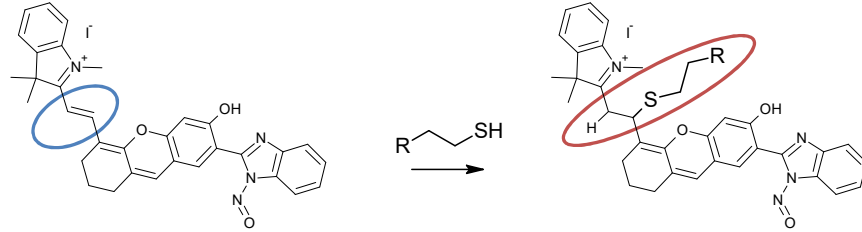
kompleksi bozulmakta, benzimidazol yapısı üzerindeki sekonder amin grubu nitrozolanmakta ve buna bağlı olarak ölçüm yapılan dalgaboyu değişmeksizin probun floresans intensitesinde artış meydana gelmektedir. Tam bu noktada değerlendirilmesi gereken ise tıpkı $\cdot\text{NO}$ gibi tiyol gruplarının da bakır(II) metalini indirgeme özelliğinin bulunmasıdır [108]. Bu bilgi doğrultusunda NIR-CuHBI probunun, tez çalışmalarında kullanılan tüm biyotiyoller ile ayrı ayrı etkileşimleri incelendi. Bu inceleme sonucunda biyotiyollerin, probun yapısında mevcut olan bakır kompleksine $\cdot\text{NO}$ kadar bozucu etkisinin olmadığı ve en iyi intensite artışının seçici bir şekilde $\cdot\text{NO}$ ilavesiyle gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 5.4).



Şekil 5.4: NIR-CuHBI Yapısına Biyotiyol Etkisi (ekivalen kons. $\cdot\text{NO}$ 'ya karşı).

Liu ve ekibi tarafından literatüre kazandırılan bir çalışmada, Micheal Katılma Reaksiyonuna benzer bir mekanizma ile alifatik yapıdaki $-\text{C}=\text{C}-$ çifte bağına biyotiyollerin katılmasının çok kısa bir sürede gerçekleştiği belirtilmiştir [109]. Geliştirilen probun (NIR-CuHBI) yapısı incelendiğinde yapı üzerinde alifatik $\text{C}=\text{C}$ bağının bulunduğu ve ortama dâhil edilen biyotiyollerin bu çifte bağa katılarak floresans

intensitesinde azalmaya sebep olabileceği hususu dikkate alındı ve olası girişimler elde edilen grafikler üzerinde incelendi (Şekil 4.16 – 4.20, 5.4 ve 5.5).



Şekil 5.5: Geliştirilen Yeni Prob Üzerinde Muhtemel Biyotiyol Katılma Ürünleri.

Sonuç olarak, reaksiyon ortamında $\cdot\text{NO}$ ile aynı anda bulunan biyotiyollerin veya reaksiyon sonucunda oluşan yan ürünlerin NIR-CuHBI probunun $\cdot\text{NO}$ 'ya karşı olan hassasiyet ve seçiciliğine etkisinin oldukça düşük seviyelerde olduğu görüldü.

Buna göre 15 dakikalık süre içerisinde, inert atmosferde ve $\cdot\text{NO}$ 'ya ekivalen konsantrasyon değerinde ortama ilave edilen maddelerin proba ait intensite değerlerinde belirgin bir değişime neden olmadığı; ancak ortamdaki $\cdot\text{NO}$ konsantrasyonu sabit tutulup biyotiyol miktarı artırıldığında floresans intensitesinde bir miktar floresans intensite azalması gözlemlendi. Bu sönümlenmenin yukarıda açıklanan etkilerin meydana gelmesiyle oluştuğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışması sonucunda nitrik oksit aktivite tayini için floresans esaslı ve near infrared bölgede emisyon-eksitasyon özelliğine sahip yeni bir prob ve spektrofotometrik yöntem geliştirildi. Çeşitli analitik uygulamalar yapılarak sentezlenen florojenik yapının belirlenen amaç doğrultusunda kontrolü sağlandı. Sentezlenen probun yapısı $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC, HRMS ve FT-IR (ATR) teknikleri uygulanarak detaylı bir şekilde karakterize edildi. Sonuçta şu ana kadar literatürde bildirilen near infrared bölgede emisyon yapabilme özelliğine sahip problemler arasında $\cdot\text{NO}$ 'ya duyarlı, hızlı ve kolay uygulanabilir olan; sonuçların doğru ve güvenilir olarak alınmasına olanak sağlayan yeni bir $\cdot\text{NO}$ probu ve tekrarlanabilir bir aktivite tayin yöntemi kazandırıldı.

KAYNAKLAR

- [1]. Terai, T., Tetsuo, N., 2008, Fluorescent probes for bioimaging applications, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12, 515-521.
- [2]. Tonzetich, Z.J., McQuade, L.E., Lippard, S.J., 2010, Detecting and understanding the role of nitric oxide in biology, *Inorg. Chem.*, 49, 6338-6348.
- [3]. Lim, M.H., Lippard, S.J., 2007, Metal-based turn on fluorescent probes for sensing nitric oxide, *Acc. Chem. Res.*, 40, 41-51.
- [4]. Gabe, Y., Urano, Y., Kikuchi, K., Kojima, H., Nagano, T., 2004, Highly sensitive fluorescent probes for nitric oxide based on dipyrromethane chromophore-Rational design of potentially useful bioimaging fluorescence probe, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 3357-3367.
- [5]. Sun, X., Xu, Y., Zhu, W., He, C., Xu, L., Yang, Y., Qian, X., 2012, Copper-promoted probe for nitric oxide based on o-phenyldiamine: Large blue-shift in absorption and fluorescence enhancement, *Anal. Methods*, 4, 919-922.
- [6]. Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C., 2006, Use of fluorescence probe for detection of reactive nitrogen species, *J. Fluoresc.*, 16, 119-139.
- [7]. Lim, M.H., Lippard, S.J., 2006, Fluorescent nitric oxide detection by copper complexes bearing anthracenyl and dansyl fluorophore ligands, *Inorg. Chem.*, 45, 8980-8989.
- [8]. Singh, D., Mishra, M., Gupta, M., Singh, P., Gupta, A., Nema, R., 2012, Nitric oxide radical scavenging assay of bioactive compounds present in methanol extract of centella asiatica, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3, 42-44.
- [9]. Hong, H., Sun, J., Cai, W., 2009, Multimodality imaging of nitric oxide and nitric oxide synthases, *Free Rad. Bio. Med.*, 47, 684-698.
- [10]. Yoshimura, T., 2002, Bioimaging of nitric oxide, 2002, *Chem. Rev.*, 102, 1235-1269.
- [11]. Sato, M., Hida, N., Umezawa, Y., 2005, Imaging the nanomolar range of nitric oxide with an amplifier-coupled fluorescent indicator in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 12754-12758.
- [12]. McQuade, L.E., Lippard, S.J., 2010, Fluorescence-based nitric oxide sensing by Cu(II) complexes that can be trapped in living cells, *Inorg. Chem.*, 49, 7464-7471.

- [13]. Wu, D.G., Cahen, D., Graf, P., Naaman, R., Nitzan, A., Shvarts, D., 2001, Direct detection of low-concentration NO in physiological solutions by a new gas-based sensor, *Chem. Eur. J.*, 7, 1743-1749.
- [14]. Yu, H., Zhang, X., Xiao, Y., Zou, W., Wang, L., Jin, L., 2013, Targetable fluorescent probe for monitoring exogenous and endogenous NO in mitochondria of living cells, *Anal. Chem.*, 85, 7076-7084.
- [15]. Rodriguez, R.R., Simonsen, U., 2012, Measurement of nitric oxide and reactive oxygen species in the vascular wall, *Curr. Anal. Chem.*, 8, 1-10.
- [16]. O. von Bohlen und Halbach, 2003, Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes, *Nitric Oxide* 9, 217-228.
- [17]. Hu, W., Boateng, D., Kong, J., Zhang, X., 2015, Advancement of fluorescent methods for detection of nitric oxide, *Austin J. Biosens & Bioelectron*, 1, 1003.
- [18]. Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T., 1998, Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins, *Anal. Chem.*, 70, 2446-2453.
- [19]. Shiue, T.W., Chen, Y.H., Wu, C.M., Singh, G., Chen, H.Y., Hung, C.H., Liaw, W.F., Wang, Y.M., 2012, Nitric oxide turn-on fluorescent probe based on deamination of aromatic primary monoamines, *Inorg. Chem.*, 51, 5400-5408.
- [20]. Privett, B.J., Shin, J.H., Schoenfisch, M.H., 2010, Electrochemical nitric oxide sensors for physiological measurements, *Chem. Soc. Rev.*, 39, 1925-1935.
- [21]. Mulsch, A., Lurie, D.J., Seimenis, I., Fichtlscherer, B., Foster, M.A., 1999, Detection of nitrosyl-iron complexes by proton-electron-double-resonance imaging, *Free Rad. Bio. Med.*, 27, 636-646.
- [22]. Foster, M.A., Seimenis, I., Lurie, D.J., 1998, The application of PEDRI to the study of free radicals in vivo, *Phys. Med. Biol.*, 43, 1893-1897.
- [23]. Form, N.T., Whitaker, B.J., Poisson, L., Soep, B., 2006, Time-resolved photoion and photoelectron imaging of NO₂, *Phys. Chem.*, 8, 2925-2932.
- [24]. Yang, Q., Zhang, X., Bao, X., Lu, H., Zhang, W., Wu, W., Miao, H., Jiao, B., 2008, Single cell determination of nitric oxide release using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, 1201, 120-127.
- [25]. Boora, F., Chirisa, E., Mukanganyama, S., 2014, Evaluation of nitrite radical scavenging properties of selected zimbabwean plant extracts and their phytoconstituents, *J. Food Process.*, 2014, Article ID: 918018.

- [26]. T. Nagano, 1999, Practical methods for detection of nitric oxide, *J. Lumin.*, 14, 283-290.
- [27]. Kikhuchi, K., Nagano, T., Hayakawa, H., Hirata, Y., Hirobe, M., 1993, Detection of nitric oxide production from a perfused organ by luminol-H₂O₂ system, *Anal. Chem.*, 65, 1794-1799.
- [28]. Leone, A.M., Furst, V.W., Foxwell, N.A., Cellek, S., Moncada, S., 1996, Visualisation of nitric oxide generated by activated murine macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221, 37-41.
- [29]. Komarov, A., Mattson, D., Jones, M.M., Singh, P.K., Lai, C.S., 1993, In vivo spin trapping of nitric oxide in mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195, 1191-1198.
- [30]. Zweier, J.L., Wang, P., Kuppusamy, P., 1995, Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, 270, 304-307.
- [31]. Soh, N., Katayama, Y., Maeda, M., 2001, A fluorescent probe for monitoring nitric oxide production using a novel detection concept, *Analyst*, 126, 564-566.
- [32]. Misco, T.P., Schilling, R.J., Salvemini, D., Moore, W.M., Currie, M.G., 1993, A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples, *Anal. Biochem.*, 214, 11-16.
- [33]. Kojima, H., Hirotsu, M., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Urano, Y., Higuchi, T., Hirata, Y., Nagano, T., 2001, Bioimaging of nitric oxide with fluorescent indicators based on the rhodamine chromophore, *Anal. Chem.*, 73, 1967-1973.
- [34]. Miller, E.W., Chang, C.J., 2007, Fluorescent probes for nitric oxide and hydrogen peroxide in cell signaling, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 11, 620-625.
- [35]. Zhang, H.Z., Chen, J.B., Guo, X.F., Wang, H., Zhang, H.S., 2014, Highly sensitive low-background fluorescent probes for imaging of nitric oxide in cells and tissues, *Anal. Chem.*, 86, 3115-3123.
- [36]. Franz, K.J., Singh, N., Lippard, S.J., 2000, Metal-based NO sensing by selective ligand dissociation, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, 2120-2122.
- [37]. Katayama, Y., Takahashi, S., Maeda, M., 1998, Design, synthesis and characterization of a novel fluorescent probe for nitric oxide, *Anal. Chim. Acta*, 365, 159-167.
- [38]. Kumar, P., Kalita, A., Mondal, B., 2011, Reduction of copper(II) complexes of tridentate ligands by nitric oxide and fluorescent detection of NO in methanol and water media, *Dalton Trans.*, 40, 8656-8663.

- [39]. Nagano, T., 2010, Development of fluorescent probes for bioimaging applications, *Proc. Jpn. Acad. Ser B, Phys Biol. Sci.*, 86, 837-847.
- [40]. Miyawaki, A., 2003, Visualization of the spatial and Dynamics of intracellular signaling, *Developmental Cell.*, Vol 4, 295-305.
- [41]. Valeur, B., Leray, I., 2000, Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition, *Coord. Chem. Rev.*, 205, 3-40.
- [42]. Kenmoku, S., Urano, Y., Kojima, H., Nagano, T., 2007, Development of a highly specific Rhodamine-based fluorescence probe for hypochlorous acid and its application to real-time imaging of phagocytosis, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 7313-7318.
- [43]. Misko, T.P., Schilling, R.J., Salvemini, D., Moore, W.M., Currie, M.G., 1993, A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples, *Anal. Biochem.*, 214, 11-16.
- [44]. Rao, A.M., Dogan, A., Hatcher, J.F., Dempsey, R.J., 1998, Fluorometric assay of nitrite and nitrate in brain tissue after traumatic brain injury and cerebral ischemia, *Brain Res.*, 793, 265-270.
- [45]. Nakatsubo, N., Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Nagoshi, H., Hirata, Y., Akaike, T., Maeda, H., Urano, Y., Higuchi, T., Nagano, T., 1998, Improved nitric oxide detection using 2,3-diaminonaphthalene and its application to the evaluation of novel nitric oxide synthase inhibitors, *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 1247-1250.
- [46]. Nussler, A.K., Glanemann, M., Schirmeier, A., Liu, L., Nussler, N.C., 2006, Fluorometric measurement of nitrite/nitrate by 2,3-diaminonaphthalene, *Nat. Protoc.*, 1, 2223-2226.
- [47]. Kleinhenz, D.J., Fan, X., Rubin, J., Hart, C.M., 2003, Detection of endothelial nitric oxide release with the 2,3-diaminonaphthalene assay, *Free Rad. Biol. Med.*, 34, 856-861.
- [48]. Imrich, A., Kobzik, L., 1997, Fluorescence-based measurement of nitric oxide synthase activity in activated rat macrophages using dichlorofluorescein, *Nitric Oxide*, 1, 359-369.
- [49]. Zheng, H., Shang, G.O., Yang, S.Y., Gao, X., Xu, J.G., 2008, Fluorogenic and chromogenic Rhodamine spirolactam based probe for nitric oxide by spiro ring opening reaction, *Org. Lett.*, 10, 2357-2360.
- [50]. Zhang, X., Kim, W.S., Hatcher, N., Potgieter, K., Moroz, L.L., Gillette, R., Sweedler, J.V., 2002, Interfering with nitric oxide measurements – 4,5-diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid, *J. Biol. Chem.*, 277, 48472-48478.

- [51]. Beltán, A., Burguete, M.I., Abánades, D.R., Pérez-Sala, D., Luis, S.V., Galinado, F., 2013, Turn-on fluorescent probes for nitric oxide sensing based on the ortho-hydroxyamino structure showing no interference with dehydroascorbic acid, *Chem. Commun.*, 50, 3579-3581.
- [52]. Franz, K.J., Singh, N., Spingler, B., Lippard, S.J., 2000, Aminotroponimines as ligands for potential metal-based nitric oxide sensors, *Inorg. Chem.*, 39, 4081-4092.
- [53]. Bergonzi, R., Fabbrizzi, L., Licchelli, M., Mangano, C., 1998, Molecular switches of fluorescence operating through metal centered redox couples, *Coord. Chem. Rev.*, 170, 31-46.
- [54]. Smith, R.C., Tennyson, A.G., Lim, M.H., Lippard, S.J., 2005, Conjugated polymerbased fluorescence turn-on sensor for nitric oxide, *Org. Lett.*, 7, 3573-3575.
- [55]. Lim, M.H., Lippard, S.J., 2005, Copper complexes for fluorescence-based NO detection in aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 12170-12171.
- [56]. Hilderbrand, S.A., Lim, M.H., Lippard, S.J., 2004, Dirhodium tetracarboxylate scaffolds as reversible fluorescence-based nitric oxide sensors, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 4972-4978.
- [57]. Lim, M.H., Lippard, S.J., 2004, Fluorescence-based nitric oxide detection by ruthenium porphyrin fluorophore complexes, *Inorg. Chem.*, 43, 6366-6370.
- [58]. Lim, M.H., Kuang, C., Lippard, S.J., 2006, Nitric oxide-induced fluorescence enhancement by displacement of dansylated ligands from cobalt, *ChemBioChem*, 7, 1571-1576.
- [59]. Hilderbrand, S.A., Lippard, S.J., 2004, Nitric oxide reactivity of fluorophore coordinated carboxylate-bridged diiron(II) and dicobalt(II) complexes, *Inorg. Chem.*, 43, 5294-5301.
- [60]. Díaz, A., Ortiz, M., Sánchez, I., Cao, R., Mederos, A., Sanchiz, J., Brito, F., 2003, Interactions of nitric oxide with copper(II) dithiocarbamates in aqueous solution, *J. Inorg. Biochem.*, 95, 283-290.
- [61]. Tsuge, K., DeRosa, F., Lim, M.D., Ford, P.C., 2004, Intramolecular reductive nitrosylation: reaction of nitric oxide and a copper(II) complex of a cyclam derivative with pendant luminescent chromophores, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 6564-6565.
- [62]. Lim, M.H., Xu, D., Lippard, S.J., 2006, Visualization of nitric oxide in living cells by a copper-based fluorescent probe, *Nat. Chem. Bio.*, 2, 375-380.

- [63]. Ouyang, J., Hong, H., Shen, C., Zhao, Y., Ouyang, C., Dong, Lei, Zhu, J., Guo, Z., Zeng, K., Chen, J., Zhang, C., Zhang, J., 2008, A novel fluorescent probe for the detection of nitric oxide in vitro and in vivo, *Free Rad. Biol. Med.*, 45, 1426-1436.
- [64]. Lim, M.H., Wong, B.A., Pitcock, W.H., Mokshagundam, D., Baik, M.H., Lippard, S.J., 2006, Direct nitric oxide detection in aqueous solution by copper(II) fluorescein complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 14364-14373.
- [65]. Ouyang, J., Hong, H., Zhao, Y., Shen, H., Shen, C., Zhang, C., Zhang, J., 2008, Bioimaging nitric oxide in activated macrophages in vitro and hepatic inflammation in vivo based on a copper-naphthoimidazol coordination compound, *Nitric Oxide*, 19, 42-49.
- [66]. Yang, Y., Seidlits, S.K., Adams, M.M., Lynch, V.M., Schmidt, C.E., Anslyn, E.V., Shear, J.B., 2010, A highly selective low-background fluorescent imaging agent for nitric oxide, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 13114-13116.
- [67]. Ma, S., Fang, D.C., Ning, B., Li, M., He, L., Gong, B., 2014, The rational design of a highly sensitive and selective fluorogenic probe for detecting nitric oxide, *Chem. Commun.*, 50, 6475-6478.
- [68]. Itoh, T., Nagata, K., Okada, M., Ohsawa, A., 1995, The aromatization of hantzsch dihydropyridines with nitric oxide, *Tetrahedron Lett.*, 36, 2269-2272.
- [69]. Itoh, T., Nagata, K., Matsuya, Y., Miyazaki, M., Ohsawa, A., 1997, Reaction of nitric oxide with amines, *J. Org. Chem.*, 62, 3582-3585.
- [70]. Yuan, L., Lin, W., Cao, Z., Long, L., Song, J., 2011, Photocontrollable analyte-responsive fluorescent probes: a photocaged copper-responsive fluorescence turn-on probe, *Chem. Eur. J.*, 17, 689-696.
- [71]. Yuan, L., Lin, W., Zheng, K., He, L., Huang, W., 2013, Far-red to near infrared analyte-responsive fluorescent probes based on organic fluorophore platforms for fluorescence imaging, *Chem. Soc. Rev.*, 42, 622-661.
- [72]. Wang, B.L., Jiang, C., Li, K., Liu, Y.H., Xie, Y., Yu, X.Q., 2015, Molecular engineering of a dual emission near-infrared ratiometric fluorophore for the detection of pH at the organism level, *Analyst*, 140, 4608-4615.
- [73]. Chen, H., Lin, W., Cui, H., Jiang, W., 2015, Development of unique xanthene-cyanine fused near-infrared fluorescent fluorophores with superior chemical stability for biological fluorescence imaging, *Chem. Eur. J.*, 21, 733-745.

- [74]. Guo, Z., Park, S., Yoon, J., Shin, I., 2014, Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications, *Chem. Soc. Rev.*, 43, 16-29.
- [75]. Escobedo, J.O., Rusin, O., Lim, S., Strongin, R.M., 2010, NIR dyes for bioimaging applications, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 14, 64-70.
- [76]. Liu, W., Fan, C., Sun, R., Xu, Y.J., Ge, J.F., 2015, Near-infrared emission of dibenzoxanthenium and its application in the design of nitric oxide probes, *Org. Biomol. Chem.*, 13, 4532-4538.
- [77]. Atılgan, S., Ozdemir, T., Akkaya, E.U., 2008, A sensitive and selective ratiometric near IR fluorescent probe for zinc ions based on the distyryl-bodipy fluorophore, *Org. Lett.*, 10, 4065-4067.
- [78]. Han, J., Burgess, K., 2010, Fluorescent indicators for intracellular pH, *Chem. Rev.*, 110, 2709-2728.
- [79]. Shi, C., Wu, J.B., Pan, D., 2016, Review on near-infrared heptamethine cyanine dyes as theranostic agents for tumor imaging, targeting and photodynamic therapy, *J. Biomed. Opt.*, 21, 050901.
- [80]. Yang, X., Shi, C., Tong, R., Qian, W., Zhau, H.E., Whang, R., Zhu, G., Cheng, J., Yang, V.W., Cheng, T., Henary, M., Streckowski, L., Chung, L.W.K., 2010, Near IR heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging, *Clin. Cancer Res.*, 16, 2833-2844.
- [81]. Kiyose, K., Aizawa, S., Sasaki, E., Kojima, H., Hanaoka, K., Terai, T., Urano, Y., Nagano, T., 2009, Molecular design strategies for near-infrared ratiometric fluorescent probes based on the unique spectral properties of aminocyanines, *Chem. Eur. J.*, 15, 9191-9200.
- [82]. Kang, N.Y., Park, S.J., Ang, X.W.E., Samanta, A., Driessen, W.H.P., Ntziachristos, V., Vasquez, K.O., Peterson, J.D., Yun, S.W., Chang, Y.T., 2014, A macrophage uptaking near-infrared chemical probe CDnir7 for in vivo imaging of inflammation, *Chem. Commun.*, 50, 6589-6591.
- [83]. Wang, X., Lv, J., Yao, X., Li, Y., Huang, F., Li, M., Yang, J., Ruan, X., Tang, B., 2014, Screening and investigation of a cyanine fluorescent probe for simultaneous sensing of glutathione and cysteine under single excitation, *Chem. Commun.*, 50, 15439-15442.

- [84]. Yuan, L., Lin, W., Zhao, S., Gao, W., Chen, B., He, L., Zhu, S., 2012, A unique approach to development of near-infrared fluorescent sensors for in vivo imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 13510-13523.
- [85]. Zhang, J., Wang, J., Liu, J., Ning, L., Zhu, X., Yu, B., Liu, X., Yao, X., Zhang, H., 2015, Near-infrared and naked-eye fluorescence probe for direct and highly selective detection of cysteine and its application in living cells, *Anal. Chem.* 87, 4856-4863.
- [86]. Wrobel, A.T., Johnstone, T.C., Liang, A.D., Lippard, S.J., Rivera-Fuentes, P., 2014, A fast and selective near-infrared fluorescent sensor for multicolor imaging of biological nitroxyl, *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 4697-4705.
- [87]. Kong, F., Ge, L., Pan, X., Xu, K., Liu, X., Tang, B., 2016, A highly selective near-infrared fluorescent probe for imaging H₂Se in living cells and in vivo, *Chem. Sci.*, 7, 1051.
- [88]. Zhang, L., Zheng, X.E., Zou, F., Shang, Y., Meng, W., Lai, E., Xu, Z., Liu, Y., Zhao, J., 2016, A highly selective and sensitive near-infrared fluorescent probe for imaging of hydrogen sulphide in living cells and mice, *Sci. Rep.*, 6, 18868.
- [89]. Zhang, J., Ning, L., Liu, J., Wang, J., Yu, B., Liu, X., Yao, X., Zhang, Z., Zhang, H., 2015, Naked-eye and near-infrared fluorescence probe for hydrazine and its application in in vitro and in vivo bioimaging, *Anal. Chem.*, 87, 9101-9107.
- [90]. Li, Y., Wang, Y., Yang, S., Zhao, Y., Yuan, L., Zheng, J., Yang, R., 2015, Hemicyanine-based high resolution ratiometric near-infrared fluorescent probe for monitoring pH changes in vivo, *Anal. Chem.* 87, 2495-2503.
- [91]. Sasaki, E., Kojima, H., Nishimatsu, H., Urano, Y., Kikuchi, K., Hirata, Y., Nagano, T., 2005, Highly sensitive near-infrared fluorescent probes for nitric oxide and their application to isolated organs, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 3684-3685.
- [92]. Mao, Z., Feng, W., Li, Z., Zeng, L., Lv, W., Liu, Z., 2016, NIR in, far-red out: developing a two-photon fluorescent probe for tracking nitric oxide in deep tissue, *Chem. Sci.*, 7, 5230-5235.
- [93]. Wang, B., Yu, S., Chai, X., Li, T., Wu, Q., Wang, T., 2016, A lysosome-compatible near-infrared fluorescent probe for targeted monitoring of nitric oxide, *Chem. Eur. J.*, 22, 5649-5656.
- [94]. Huo, Y., Miao, J., Li, Y., Shi, Y., Shi, H., Guo, W., 2017, Aromatic primary monoamine-based fast-response and highly specific fluorescent probes for

imaging the biological signaling molecule nitric oxide in living cells and organisms, *J. Mater. Chem. B*, 5, 2483-2490.

- [95]. Li, Y., Sun, M., Zhang, K., Zhang, Y., Yan, Y., Lei, K., Wu, L., Yu, H., Wang, S., 2017, A near-infrared fluorescent probe for Cu²⁺ in living cells based on coordination effect, *Sens. Act. B*, 243, 36-42.
- [96]. Tavman, A., Birteksöz, A.S., 2009, Spectral characterization and antimicrobial activity of 4-(5-H/Me/Cl/NO₂-1H-benzimidazol-2-yl)-benzene-1,3-diols and some metal complexes, *Rev. Inorg. Chem.*, 29, 255-272.
- [97]. Gudipudi, G., Sagurthi, S.R., Perugu, S., Achaiah, G., Krupadanam, G.L.D., 2014, Rational design and synthesis of novel 2-(substituted-2H-chromen-3-yl)-5-aryl-1H-imidazole derivatives as an anti-angiogenesis and anti-cancer agent, *RSC Adv.*, 4, 56489-56501.
- [98]. Gaur, P., Kumar, A., Dey, G., Kumar, R., Bhattacharyya, S., Ghosh, S., 2016, Selenium incorporated cationic organochalcogen: live cell compatible and highly photostable molecular stain for imaging and localization of intracellular DNA, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8, 10690-10699.
- [99]. Li, T., Yu, L., Jin, D., Chen, B., Li, L., Chen, L., Li, Y., 2013, A colorimetric and fluorescent probe for fluoride anions based on a phenanthroimidazole-cyanine platform, *Anal. Methods*, 5, 1612-1616.
- [100]. Han, C., Yang, H., Chen, M., Su, Q., Feng, W., Li, F., 2015, Mitochondria-targeted near-infrared fluorescent off-on probe for selective detection of cysteine in living cells and in vivo, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7, 27968-27975.
- [101]. Zhegalova, N.G., Gonzales, G., Berezin, M.Y., 2013, Synthesis of nitric oxide probes with fluorescence lifetime sensitivity, *Org. Biomol. Chem.*, 11, 8228-8234.
- [102]. Sarma, M., Kalita, A., Kumar, P., Singh, A., Mondal, B., 2010, Reduction of Copper(II) Complexes of Tripodal Ligands by Nitric Oxide and Trinitrosation of the Ligands, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 7846-7847.
- [103]. Vriesman, M.F., Haenen, G.R.M.M., Westerveld, G.J., Paquay, J.B.G., Voss, H.P., Bast, A., 1997, A method for measuring nitric oxide radical scavenging activity: Scavenging properties of sulfur-containing compounds, *Pharm. World Sci.*, 19, 283-286.

- [104]. Kharitonov, V.G., Sundquist, A.R., Sharma, V.S., 1995, Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen, *J. Biol. Chem.*, 270, 28158-28164.
- [105]. Seneviratne, U., Godoy, L.C., Wishnok, J.S., Wogan, G.N., Tannenbaum, S.R., 2013, Mechanism-based triarylphosphine-ester probes for capture of endogenous RSNOs, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 7693-7704.
- [106]. Broniowska, K.A., Hogg, N., 2012, The chemical biology of S-nitrosothiols, *Antiox. Red. Sign.*, 16, 476-485.
- [107]. Wynia-Smith, S.L., Smith, B.C., 2017, Nitrosothiol formation and S-nitrosation signaling through nitric oxide synthases, *Nitric Oxide*, 63, 52-60.
- [108]. Lee, K.S., Park, J., Park, H.J., Chung, Y.K., Park, S.B., Kim, H.J., Shin, I.S., Hong, J.I., 2016, Regenerative fluorescence "turn on" probe for biothiols through Cu(II)/Cu(I) redox conversion, *Sens. Act. B.*, 237, 256-261.
- [109]. Liu, X.D., Sun, R., Xu, Y., Xu, Y.J., Ge, J.F., Lu, J.M., 2013, A benzoxazine-hemicyanine based probe for the colorimetric and ratiometric detection of biothiols, *Sens. Act. B.*, 178, 525-531.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Emin Ahmet YEŞİL
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	29.09.1990
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	-
E-Posta Adresi	ahmeteminyesil@hotmail.com
Web Adresi	-



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniveristesi
Fakülte	Mühendislik Fakültesi
Bölümü	Kimya
Mezuniyet Yılı	2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri
Anabilim Dalı	Kimya
Programı	Organik Kimya
Mezuniyet Tarihi	2017