

**YENİ TÜR MAKROHALKALI YAPILARIN
SENTEZİ VE KANSER TEDAVİ
POTANSİYELİNİN İN VİTRO SAPTAMASI**

Ersan HARPUTLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NANOTEKNOLOJİ VE İLERİ MALZEMELER
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERSİN

ARALIK – 2014

**YENİ TÜR MAKROHALKALI YAPILARIN
SENTEZİ VE KANSER TEDAVİ
POTANSİYELİNİN İN VİTRO SAPTAMASI**

Ersan HARPUTLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NANOTEKNOLOJİ VE İLERİ MALZEMELER
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Yrd Doç. Dr. Mine İNCE OCAKOĞLU**

MERSİN

ARALIK – 2014

Ersan HARPOTLU tarafından Yrd.Doç.Dr. Mine İNCE OCAKOĞLU danışmanlığında hazırlanan “Yeni Tür Makrohalkalı Yapıların Sentezi ve Kanseri Tedavi Potansiyelinin *in vitro* Saptanması” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT

Doç. Dr. Kasım OCAKOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Mine İNCE OCAKOĞLU

İmza



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 25/121 / 2015 tarih ve 2015.02 / 72 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Doç. Dr. Mehmet KÜÇÜKASLAN
Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

YENİ TÜR MAKROHALKALI YAPILARIN SENTEZİ VE KANSER TEDAVİ POTANSİYELİNİN İN VİTRO SAPTAMASI

Ersan HARPUTLU

ÖZ

Ftalosiyanimler ve türevleri olan subftalosiyanimler yüksek ışık absorblama kapasitelerinden dolayı opto-elektronik sistemlerde kullanılan ideal foto aktif bileşenlerdir. Ftalosiyanimler görünür ve yakın infrared bölgede güçlü absorbsiyon yapmalarına karşın, bu moleküller güçlü π - π etkileşimlerinden dolayı genel organik çözücüler içerisinde agregasyon özellik gösterirler. Fotosensör olarak kullanılan molekülün agregasyon özelliği bu moleküllerin kullanım alanını etkileyen en önemli parametrelerden birisidir. Genellikle, agregasyon, molekülün ışık absorblayarak uyarılmasından sonra molekülün ışısız geçişler ile temel enerji seviyesine dönmesini sağlar. Bu durum ise uyarılmış yarı ömrün kısalmasına, singlet (Uyarılmış triplet seviyedeki fotosensör enerjisini moleküler oksijene aktararak reaktif oksijen türleri denilen radikal ve singlet oksijeni meydana getirmesidir) oksijen veriminin düşmesine ve buna bağlı olarak ta fotodinamik aktivitenin azalmasına ya da tamamen yok olmasına sebep olur. Bu bağlamda, subftalosiyanimler, organik çözücülerde agregasyon göstermemeleri ve güçlü ışık absorblama kapasitelerinden dolayı fotodinamik terapi uygulamaları için dikkat çekici moleküllerdir. Benzer türde subftalosiyanimlerin sitotoksik etkileri olduğu literatürde mevcuttur. Bu nedenle bu sentez ürünlerinin sitotoksitelerinin tespiti yeni bir kemoterapi ajanı olma yolundaki ilk basamak olarak değerlendirilebileceği gibi yapılacak ileri çalışmalar için toksit dozun tespit edilmesi önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ftalosiyanim, Subftalosiyanim, Fotodinamik Terapi.

Danışman: Yrd Doç. Dr. Mine İNCE OCAKOĞLU, Mersin Üniversitesi,
Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Ana Bilim Dalı

SYNTHESIS OF NOVEL MACROCYCLIC STRUCTURES AND INVESTIGATION OF THEIR CANCER TREATMENT POTENTIAL BY IN VITRO METHOD

Ersan HARPUTLU

ABSTRACT

Phthalocyanines and its being derivatives subphthalocyanines are photoactive component due to having highly light absorbing capacities and used in opto-electronic systems. Despite Phthalocyanines make a strong absorption in the visible and near infrared region, owing to these molecules contain strong π - π interactions in organic solvents they shown like aggregation features. The molecule used as the photosensor because of making aggregation that is the most important parameters affecting the use of these molecules area. Typically, aggregation provide to rotate the main energy level with radiative transitions, after aggregation of the molecule excited by light absorbed. This situation cause to excited half-life shortening to, loss of singlet oxygen (excited triplet level of Photosensors energy transfer to molecular oxygen called reactive oxygen species such as radical and singlet oxygen are created) yield and in parallel with will cause a reduction or complete disappearance photodynamic activity. In this context, due to subphthalocyanines don't show aggregation in organic solvent and strong light absorbing capability, they are notable for photodynamic therapy applications. Similar types of sub-phthalocyanine's cytotoxic effects that are available in the literature. Therefore it is important to identify the toxic dose for further studies such as determining the cytotoxicity of these synthesis products can be evaluated as a first step towards becoming a new chemotherapy agents.

Key Words: Phthalocyanine, Subphthalocyanine, Photodynamic Therapy.

Advisor: Assoc. Prof. Mine İNCE OCAKOĞLU, , Department of Nanotechnology and Advanced Materials, University of Mersin

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi (Proje No: BAP-FBE NTİMB (EH) 2014-4 YL tarafından desteklenen bir araştırma projesi olup, Yrd. Doç. Dr. Mine İNCE OCAKOĞLU yöneticiliğinde gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmam boyunca her konuda benden desteğini esirgemeyen, bilgisi ve tecrübesiyle beni her konuda yönlendiren, tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Mine İNCE OCAKOĞLU'na

Yardımlarını esirgemeyen Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler ABD başkanı Doç. Dr. Kasım OCAKOĞLU'na

Ege Üniversitesinde yapılan Laboratuvar çalışmaları yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Fatma YURT LAMBRECHT'e

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen, Aslıhan ŞENZEYBEK, A. Celil YÜZER'e,

teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. FTALOSİYANİN	2
2.1.1. Ftalosiyaninlerin Kullanım Alanları.....	3
2.1.2. Subftalosiyaninler	4
2.2. SPEKTROSKOPİK ÇALIŞMALAR.....	8
2.2.1. Subftalosiyaninlerin Fotofiziksel Özellikleri.....	9
2.2.2. Fotodinamik Terapi	10
2.3 TEZİN AMACI.....	14
2.4. TEZİN ÖNEMİ.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. MATERYAL	16
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	16
3.1.2. Kullanılan Cihazla.....	16
3.2 YÖNTEM	16
3.2.1. Subftalosiyanin Türevlerinin Sentezi	16
3.2.2. Fotodinamik Terapi İle Tümörlü Hücrelerin Yok Edilmesi	27
3.2.3. İn Vitro Sitotoksitenin Tespit	29
3.2.4. Subftalosiyanin moleküllerinin Singlet Oksijen Kapasitelerinin Tespiti	30
4. TARTIŞMA VE BULGULAR	32
4.1. Sitotoksitenin Analizi (XTT)	32
4.2. Singlet Oksijen Üretim Potansiyelleri:.....	35
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	40

KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Metalftalosiyanın ve metalsiz ftalosiyanınin moleküler yapısı.	3
Şekil 2.2. Ftalosiyanınlerin porfirin halkları ile ilişkisi.	3
Şekil 2.3. Subftalosiyanınlerin moleküler yapısı, 3 boyutlu gösterimi ve çözeltildeki görünümü.	5
Şekil 2.4. Simetrik mono substitüentli subftalosiyanınlerin sentezi, C1 ve C3 regioisomerlerin moleküler yapısı.	5
Şekil 2.5. Asimetrik subftalosiyanın sentezi ve elde edilen 4 farklı simetrik ve asimetrik subftalosiyanın (A3, A2B, AB2 ve B3) moleküler yapısı.	6
Şekil 2.6. Subftalosiyanınlerin kimyasal reaktivitesinin olduğu konumlar.	7
Şekil 2.7. Subftalosiyanın moleküllerinin genel UV-Vis absorpsiyon spektrumu.	8
Şekil 2.8. Subftalosiyanınin (kalın çizgi) ve Nikel ftalosiyanınin kloroform içindeki UV-vis spektrumları (T. Torres ve çalışma grubu, 2002).	9
Şekil 2.9. Subftalosiyanınin molekülünde periferel ve aksiyal konumlar.	9
Şekil 2.10. SubPc nin benzen içindeki absorpsiyon ve floresans spektrum.	10
Şekil 2.11. Jablonski diagramı: E, eksitasyon; ISC, sistemler arası geçiş; F, floresans; P, fosforesans; IC, iç geçiş.	12
Şekil 3.1. Sentezlenen farklı fonksiyonel gruplar içeren subftalosiyanınlerin moleküler yapısı.	17
Şekil 3.2. 1,1':4',1"-terfenil-4-ol (1) bileşiğinin sentezi.	18
Şekil 3.3. 4,5-Dikloro ftalonitril Sentezi.	18
Şekil 3.4. Difenilfenol ftalonitril (6) Sentezi.	20
Şekil 3.5. 2,6-Diisopropilfenoksi ftalonitril (7) Sentezi.	21
Şekil 3.6. 4-(4-tert- butilfeniltio) ftalonitril (8) Sentezi.	21
Şekil 3.7. SubPc (9) sentezi.	22
Şekil 3.8. SubPc 9 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu(CDCl ₃).	23
Şekil 3.9. SubPc 9 molekülünün CHCl ₃ içindeki UV/Vis absorpsiyon spektrumu (k: 1X10 ⁻⁵ M).	23

Şekil 3.10. SubPc (10) sentezi.	24
Şekil 3.11. SubPc 10 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu(CDCl ₃).	25
Şekil 3.12. SubPc 10 molekülünün CHCl ₃ içindeki UV/Vis absorpsiyon spektrumu (k: 1X10 ⁻⁵ M).....	25
Şekil 3.13. SubPc 11 sentezi.	26
Şekil 3.14. SubPc 11 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu(CDCl ₃).	27
Şekil 3.15. SubPc 11 molekülünün CHCl ₃ içindeki UV/Vis absorpsiyon spektrumu (k: 1X10 ⁻⁵ M).....	27
Şekil 3.16. Singlet oksijen ölçümleri için hazırlanan deney düzeneği.	31
Şekil 4.1. 24 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılık oranı.	32
Şekil 4.2. 48 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılık oranı.	33
Şekil 4.3. 24 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılık oranı.	33
Şekil 4.4. 48 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılık oranı.	34
Şekil 4.5. 24 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılık oranı.	34
Şekil 4.6. 48 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılık oranı.	35
Şekil 4.7. Işık altında DPBF nin SubPc 9 varlığında, absorbansındaki değişim grafiği.	36
Şekil 4.8. Singlet oksijen ölçümü esnasında SubPc 9 absorbansındaki değişim grafiği.	36
Şekil 4.9. Singlet oksijen ölçümü esnasında DPBF nin absorbans azalma eğilimi.	37
Şekil 4.10. Işık altında DPBF nin SubPc 10 varlığında, absorbansındaki değişim grafiği.	37
Şekil 4.11. Singlet oksijen ölçümü esnasında SubPc absorbansındaki değişim grafiği.	38
Şekil 4.12. Singlet oksijen ölçümü esnasında DPBF nin absorbans azalma eğilimi.	38
Şekil 4.13. Işık altında DPBF nin SubPc 11 varlığında, absorbansındaki değişim grafiği.	39
Şekil 4.14. Singlet oksijen ölçümü esnasında DPBF nin absorbans azalma eğilimi.	39

SİMGELER VE KISALTMALAR

- SubPc: Subftalosiyanin
- UV-Vis: Ultraviyole - Görünür spektroskopisi
- PDT: Foto Dinamik Terapi
- Pc: ftalosiyaninler
- ϕF : kuantum verimleri
- NMR: Nükleer manyetik rezonans

1. GİRİŞ

Subftalosiyeninler (SubPc) merkezde bor atomu bulunan üç izoindol üniteden oluşmuş koni biçimindeki aromatik bileşiklerdir. Kimyasal ve ısıl olarak kararlıdır. 14π -elektron sistemine sahiptirler ve π -elektronları aromatik halka içinde delokalize olmuştur. Subftalosiyeninler, halka merkezinde bulunan Bor (B) atomunun molekül yapısını koni biçimine dönüştürülmesinden dolayı düzlemsel değildirler. Subftalosiyeninlerin UV-Vis (Ultraviyole-Görünür spektroskopisi) spektrumlarında, ftalosiyeninlere benzer karakteristik 2 şiddetli bant gözlenir. Bunlar sırasıyla 500-700 nm ve 300 nm'lerdeki Q ve Soret-B bantlarıdır. Bu absorpsiyon aralıkları, subftalosiyeninlerin periferik konumuna bağlanan donör veya akseptör gruplar ile daha uzun dalga boyuna kayabilirler. Kimyasal ve termal olarak kararlı olmalarının yanı sıra koni şeklindeki yapılarından dolayı birçok aromatik molekülün aksine subftalosiyeninler kümeleşme (agregasyon) göstermezler. Bu özelliklerinden dolayı subftalosiyeninler ışık absorblayıcı molekül olarak, fotodinamik terapi ve fotovoltajik uygulamalar başta olmak üzere bir çok alanda kullanım imkanı bulmuşlardır.

Bu tezdeki amacımız farklı SubPc türevleri sentezleyerek, yeni subftalosiyenin türevlerinin EMT6 sıçan meme tümörü üzerinde in vitro sitotoksik etkilerini incelemektir. Ayrıca sentezlenen subftalosiyenin türevlerinin fotodinamik terapi ile kanser tedavisinde fotosensör olarak kullanılabilme potansiyellerinin tespit edilmesi için singlet oksijen oluşturabilme kapasiteleri incelenecektir. Çalışma sonunda sitotoksik etkisi yüksek olan subftalosiyenin potansiyeli ortaya konulmuş olacaktır. Ayrıca, yeni SubPc türevlerinin singlet oksijen üretim kapasiteleri kıyaslanıp, fotodinamik terapi uygulamalarında fotosensör olarak kullanılma potansiyelleri ortaya çıkarılacaktır.

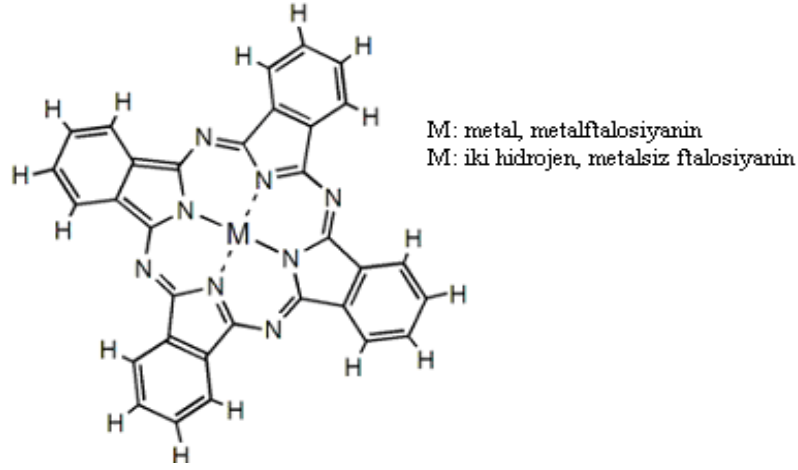
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

İlk olarak 1907'de Londra'da South Metropolitan Gas Company'de araştırmacı olan A. Braun ve J. Tcherniac, ftalimid ve asetik anhidritten, yüksek sıcaklıkta o-siyanobenzamid ürettikleri bir anda çözünür olmayan mavi bir madde gözlemlerler. 1927'de Londra'da, H. de Diesbach ve E. von der Wied, o-dibromobenzenle bakırsiyanür'ü tepkimeye sokup, benzenin nitrillerini yapmaya çalıştıkları bir anda mavi bir ürün elde ederler. 1928'de Scottish Dyes şirketinin tesislerinde, ftalikanhidrit ve amonyaktan ftalimid üretildiği bir sırada tepkime ortamında mavi-yeşil bir maddenin ortaya çıktığı görülür. Anlaşılmıştır ki bu madde, reaktörün cam astarında bulunan çatlaktan sızan ftalimidin, reaktörün demir gövdesiyle girdiği tepkime sonucu oluşmuştur.

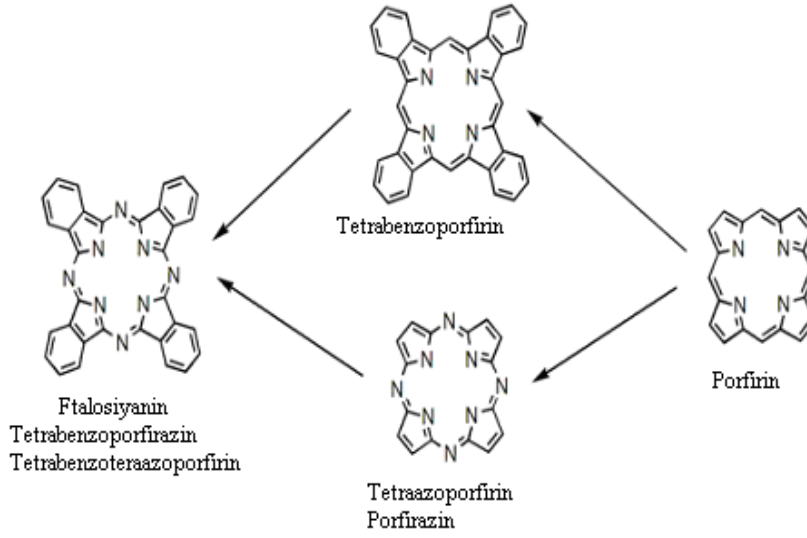
Bütünüyle rastlantısal olarak ortaya çıkan bu madde sonradan "ftalosiyanın" olarak adlandırılır. Linstead'ın incelemeleri ve Robertson'un x-ışını çalışmaları sonucu ftalosiyanın yapısı aydınlatılır. 1934 yılından itibaren ticari üretimine başlanmıştır [1].

2.1. FTALOSIYANİN

Ftalosiyanınlar dört isoindol ünitesinden oluşan 18 π -elektron sistemine sahip aromatik planar makrosiklik bileşiklerdir ve tetraazaporfirinlerin en iyi bilinen türevleridir (Şekil 2.1). Almanca phthalozyanine, Fransızca phthalocyanine olarak yazılır. Molekülde merkezde bulunan hidrojen ve metal katyon dört isoindol azot atomu ile koordinasyon bağı yapar. Birçok element ftalosiyanın halkası oluşturabileceğinden çeşitli ftalosiyanın kompleksler bulunmaktadır (Şekil 2.2). Ftalosiyanınların moleküler yapısı doğal elde edilen porfirin sistemi ile bağlantılıdır.



Şekil 2.1. Metalftalosiyanın ve metalsiz ftalosiyanınin moleküler yapısı.



Şekil 2.2. Ftalosiyanınların porfirin halkaları ile ilişkisi.

2.1.1. Ftalosiyanınların Kullanım Alanları

Supramoleküller sınıfından sayılan bu maddeler çok koyu yeşil ve mavi renkleri, her türlü kimyasal ve fiziksel dış etkenlere karşı sağlamlığı ile pigment ve boyar madde olarak kullanılmaları yanı sıra yüksek teknolojide tıptan elektronik sanayine kadar çok geniş bir alanda kullanım imkânı oluşturmaktadır. Şimdilerde, tükenmez kalemelerin mürekkeplerinde, fotokopi cihazlarında, fotoğrafçılıkta,

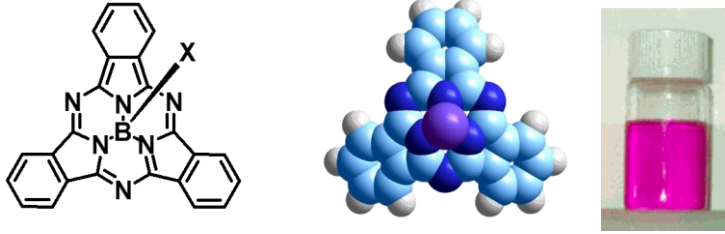
bilgisayarlarda hafıza depolamada, deri kanserinin tedavisinde, tekstilde, toksik olmaması nedeniyle gıda sanayinde boya maddesi olarak da kullanılır. (Ftalosiyanimler 650-800 nm aralığında göstermiş oldukları yüksek moleküler absorpsiyon katsayısı nedeniyle, bu dalga boyları için tatbik edildikleri dokuyu geçirgen hale getirirler. Bu özelliklerinden dolayı karanlıkta toksik etki göstermezler). Bu maddeler, kullanılan metale bağı olarak farklı özellikler göstermektedir. Kimya araştırmacılarının yanı sıra biyolog, fizikçi ve malzeme bilimcilerinin de ilgiyle kullandıkları bu bileşiklere; katalizör, nonlineer optik, sıvı kristal, fotodinamik terapi ve gaz algılayıcı (sensör) özellikleri gibi çeşitli özellikler kazandırıcı grupların takılması ve sentez yöntemlerinin belirlenmesi çalışmaları tüm dünyada çok önem kazanır. İleri malzemeler olan ftalosiyanim, oksim ve çeşitli makrosiklik bileşikler çok değişik alanlarda kullanılır. Bu alanlar boyamadan, tepkime katalizlemeye, analize, kromatografik ayırma, nükleer kimyaya, fotodinamik terapiye, optik veri depolamaya kadar geniş bir yelpaze sunar.

- Genel kullanım alanları:
- Boya ve pigment endüstrisinde,
- Katalizör olarak,
- Fotoiletken materyaller,
- Gaz sensörü olarak,
- Fotodinamik kanser tedavisinde sensör (Al ve Zn) vs.
- Elektron transfer ve yükseltgenme- indirgenme yeteneği nedeniyle;
- Elektrofotografide,
- Optik veri kayıt sistemlerinde,
- Fotovoltaik hücrelerde,
- Yakıt hücreleri ve
- Elektrokromik görüntü araçlarında kullanılır.

2.1.2. Subftalosiyanimler

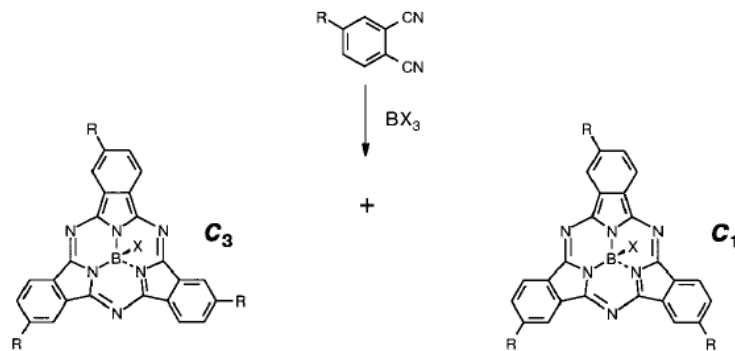
Subftalosiyanimler (SubPc) merkezde bor atomu bulunan üç isoindol üniteden oluşmuş aromatik kompleks yapılardır. Düzlemsel değildirler ve 14π -elektron sistemi ftalosiyanimlerde olduğu gibi delokalize olmuştur [2-6]. Bor atomu merkezde bulunarak molekül eksenini belirtirken yapıyı da koni biçimine getirir (Şekil 2.3).

Aromatik bileşiklerdir. Diğer bir özellikleri ise kimyasal (inorganik asitlere dayanır) ve ısıl (10-4mmHg ve 350 °C de süblimleşir) kararlılıklarıdır.



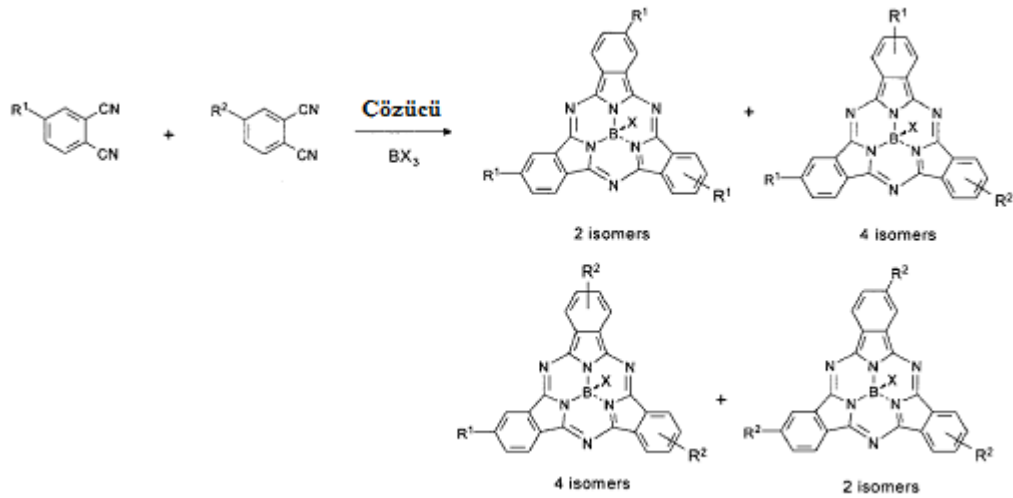
Şekil 2.3. Subftalosiyanın moleküler yapısı, 3 boyutlu gösterimi ve çözeltideki görünümü.

Subftalosiyaninler, başlangıç maddesi olarak kullanılan ftalonitrillerin bor halojenür (BX_3) varlığında, p-xylene gibi yüksek kaynama noktasına sahip bir çözgen içerisinde siklotrimerizasyonu ile oluşur. Bortriklorür (BCl_3), subftalosiyanın sentezinde en fazla kullanılan bor türevidir. Başlangıç maddesi olarak mono substitüent içeren ftalonitril kullanıldığında A3 formunda simetrik subftalosiyanın elde edilir. Bu simetrik subftalosiyanın C1 ve C3 regioizomer karışımı halinde bulunur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Simetrik mono substitüentli subftalosiyanın sentezi, C1 ve C3 regioisomerlerin moleküler yapısı.

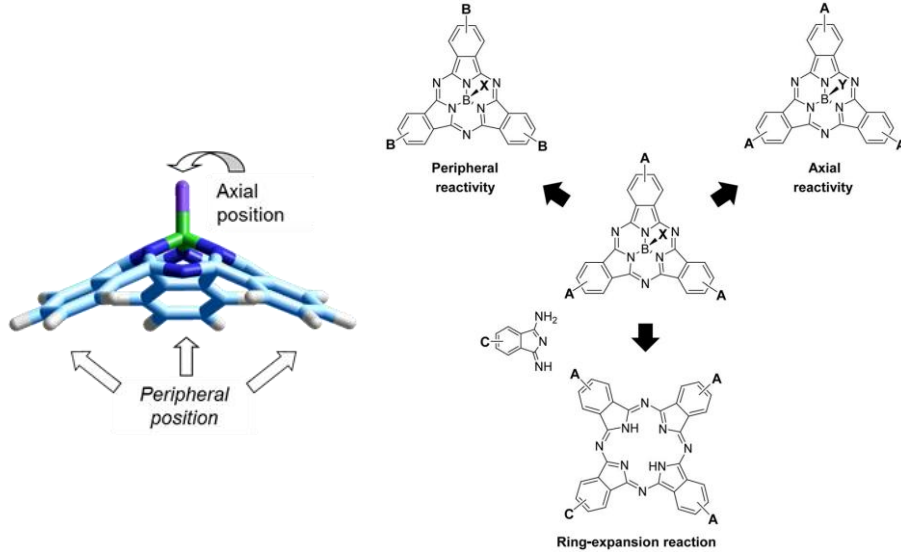
Eğer iki farklı ftalonitril başlangıç maddesi olarak kullanılırsa, siklotrimerizasyon sonucu 4 farklı simetrik ve asimetrik subftalosiyenin (A3, A2B, AB2 ve B3) içeren karışım elde edilir (Şekil 2.5). Bu karışım içerisinde istenilen asimetrik molekülün verimi kullanılan ftalonitrillerin stokiyometrik oranına bağlıdır. Ftalosiyeninlerden farklı olarak subftalosiyeninlerin agregasyon göstermeme özelliğinden dolayı, kolon kromatografisi ile subftalosiyeninleri saflandırmak ftalosiyeninlere göre daha kolaydır.



Şekil 2.5. Asimetrik subftalosiyenin sentezi ve elde edilen 4 farklı simetrik ve asimetrik subftalosiyenin (A3, A2B, AB2 ve B3) moleküler yapısı.

Subftalosiyeninlerin genel olarak aksiyal ve peripheral konum olmak üzere iki konumdan kimyasal reaksiyonlara karşı etkindir. Ayrıca ftalosiyenin sentezi için halka genişletme reaksiyonunda da kullanılır. Bu üç konumda reaktivite açısından farklı özelliklere sahiptir.

- Aksiyal reaktivite; B-X bağı üzerinden nükleofilik yerdeğiştirme reaksiyonlarına karşı etkindir.
- Periferel reaktivite; periferel grubun aromatik karbon atomu ile reaksiyonu üzerinden yürür.
- Halka genişleme reaksiyonu; imin türü reaksiyondur (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Subftalosiyanın kimyasal reaktivitesinin olduğu konumlar.

Üç koordinasyona sahip bor bileşiği, bor atomuna bağlı olan halojenin yerdeğiştirdiği nükleofilik yerdeğiştirme reaksiyonlarına oldukça yatkındır. Sonuç olarak fenol gibi nükleofillerin yerdeğiştirme reaksiyonu ile subftalosiyanın aksiyal konumuna bağlanması, hem molekülün saflandırılmasını kolaylaştırır hem de kromatografik saflaştırma çalışmalarında halojenli subftalosiyanın (SubPcCl, SubPcBr gibi) kolon kromatografisinde hidrolizini engeller.

2.1.2.1. Subftalosiyanın Kullanım Alanları

Asimetrik ftalosiyanın sentezinde halka genişletme aracı olarak

Fotosensör

Foto Dinamik Terapi (PDT)

Likit Kristal

Langmiur Blodgett Filmlerinde

Optik Kayıt Araçlarında

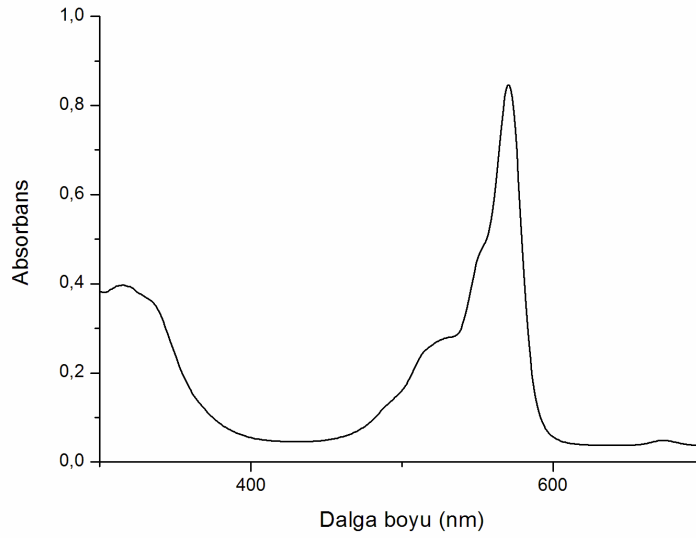
Elektroluminesans

Potansiyel Optik Boyalar

DVD-R (Digital Versatile Disc-Recordable)

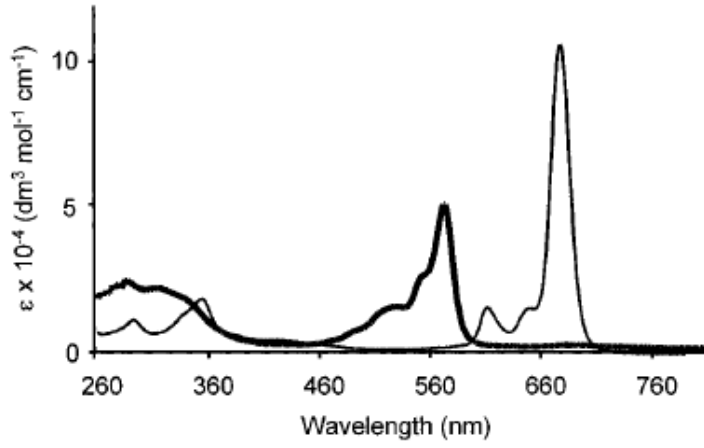
2.2. SPEKTROSKOPİK ÇALIŞMALAR

Agregasyon göstermemeleri ve 500-700 nm arasında güçlü absorpsiyon yapma kapasitelerinden dolayı subftalosiyaninler özellikle son yıllarda yapay fotosentetik sistemlerin ve optoelektronik çalışmaların aranılan, dikkate değer ışık absorblama fotosensörleri olmuştur [7-13]. Şekil 2.7’ de subftalosiyanin moleküllerinin tipik UV-Vis absorpsiyon spektrumunu göstermektedir.

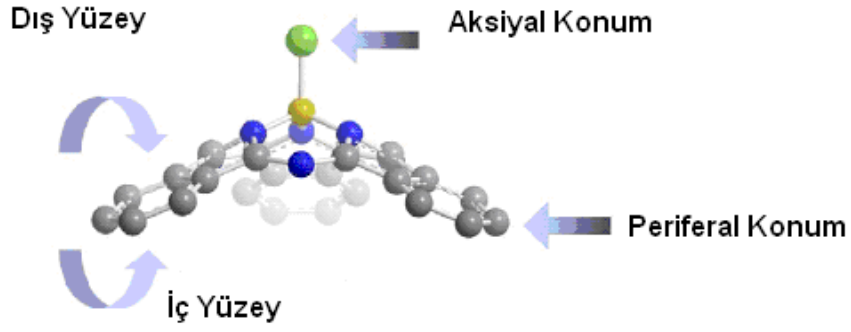


Şekil 2.7. Subftalosiyanin moleküllerinin genel UV-Vis absorpsiyon spektrumu.

Subftalosiyaninlerin UV-görünür spektrumlarında, ftalosiyaninlere benzer karakteristik 2 şiddetli bant gözlenir. Bunlar 560 nm de Q-bandı ve 300 nm de Soret-B bandıdır (Şekil 2.8). Bu bantlar subftalosiyaninlerin (14- π elektronuna sahip) ftalosiyaninlere (18- π elektronuna sahip) göre π -konjugasyonunda azalmadan dolayı kısa dalga boyuna (maviye kayma) kaymıştır. SubPc'ler de ($\epsilon=(5-6) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) her iki bantın absorpsiyon katsayıları da ftalosiyaninler (Pc) den daha düşüktür ($\epsilon=8-24 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).



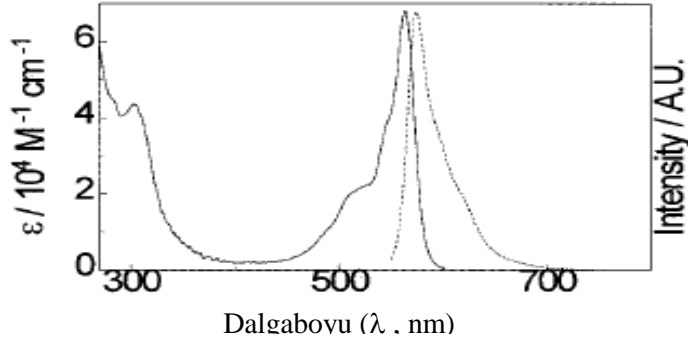
Şekil 2.8. Subftalosiyenin (kalın çizgi) ve Nikel ftalosiyenin kloroform içindeki UV-vis spektrumları (T. Torres ve çalışma grubu, 2002).



Şekil 2.9. Subftalosiyenin molekülünde periferal ve aksiyal konumlar.

Periferal donör ve akseptör substitüentler (Şekil 2.9) bu bantları daha uzun dalga boyuna kaydırırken, aksiyal substitüentlerin etkisi çok azdır [14].

2.2.1. Subftalosiyeninlerin Fotofiziksel Özellikleri



Şekil 2.10. SubPc nin benzen içindeki absorpsiyon ve floresans spektrum.

SubPc ler floresan maddelerdir (Şekil 2.10) ve kuantum verimleri $\Phi_F=0,25$ olup Pc (AlPcCl için $\Phi_F=0,58$) lerin yaklaşık yarısı kadardır. Bütün bileşiklerin uyarılmış hal yarı ömürleri, τ_s , 3 ns civarında olup yine Pc lerin yarısı kadardır. Singlet-triplet enerji aralığı SubPc lerde $30-40 \text{ kJ mol}^{-1}$, Pc lerde $50-70 \text{ kJ mol}^{-1}$. Buna bağlı olarak SubPc lerde sistemler arası geçiş hızı ve kuantum verimi daha yüksektir. SubPc lerin triplet kuantum verimleri Pc lerden daha büyüktür. SubPc ler çok iyi fotosensörlerdir, büyük miktarda singlet oksijen, $O_2(1\Delta_g)$ üretirler [15].

Ftalosiyaninlerin aksine SubPc ler koni yapılarından dolayı kloroform ($CHCl_3$) içinde 1mM konsantrasyonda bile agregasyon oluşturmayıp monomer olarak kalırlar. Bu özellikleri de SubPc lerin fotosensör olarak kullanılmaları için büyük bir avantajdır. SubPc ler genellikle, Pc lere göre daha kararsızdırlar. Sadece polar çözümler de daha erken bozunurlar, apolar çözümler de daha kararlıdırlar [16].

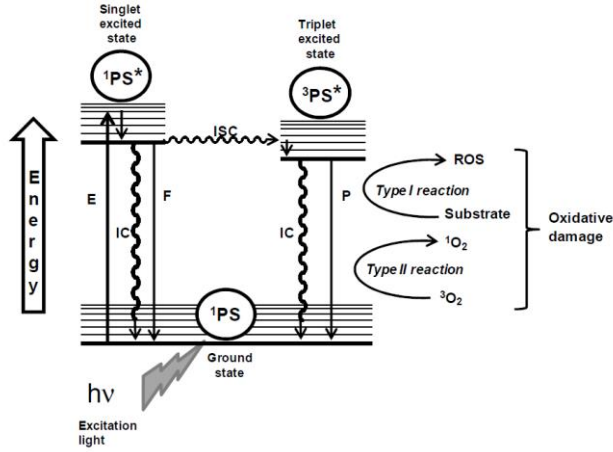
2.2.2. Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapi, toksik olmayan bir fotosensörün zararsız ışık altında reaktif oksijen türlerinin üretildiği ve bu oksijen türler ile hastalıklı hücrelerin öldürülmesine dayanan bir tedavi yöntemidir [16]. Bu tedavi yöntemi genel olarak kanserli hücrelerin yok edilmesi için kullanılmakta ve kullanılan fotosensör uygun dalga boyunda ışık ile uyarıldığında, moleküler oksijenin reaktif oksijen türlerine dönüşmesine dayanır. Bu tedavi yöntemi tek başına kullanıldığı gibi, kemoterapi ve radyoterapi gibi diğer tedavi yöntemleri ile beraber kullanılabilir. Bu tedavinin

avantajı, sağlıklı dokulara zarar vermemesinden dolayı birçok kez tedavi tekrar edilebilir olmasıdır. Cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi ile karşılaştırıldığında foto dinamik terapinin bir çok avantajı vardır [17-19];

1. Cerrahi uygulama yapılamayan dokulara uygulanabilir;
2. Cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi için uygun olmayan hastalar için kullanılabilir;
3. Güvenli ve etkin bir şekilde yeniden kullanılabilir;
4. Bağışıklık sağlamaz;
5. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi sonrası kullanılabilir veya bu tedavi yöntemleri ile birlikte kullanılabilir.

Fotosensörün (PS) uygun dalga boyunda ışık ile etkileşmesi ile birlikte temel seviyede bulunan fotosensör uyarılarak birinci uyarılmış singlet seviyeye geçer (1PS*). Uyarılmış fotosensör bu seviyeden sistemler arası geçiş ile (intersystem crossing, ISC) daha uzun ömürlü olan uyarılmış triplet seviyeye geçer(3PS*). Bu triplet uyarılmış seviyenin yarılanma ömrü mikrosaniye aralığındadır (genellikle $> 0.5 \mu s$) ve uyarılmış fotosensörün etrafında bulunan biyomoleküller ile etkileşimi için yeterlidir. Uyarılmış triplet seviyedeki fotosensör enerjisini moleküler oksijene aktararak reaktif oksijen türleri denilen radikal ve singlet oksijeni meydana getirir. Oluşan singlet oksijen fotosensörün bulunduğu kanser hücrelerini öldürür. Ek olarak uyarılmış seviyedeki fotosensör enerjisini: termal yolla (internal conversion, IC), flüoresans ve/veya fosforesans ışımaya ile (fosforesans; uyarılmış triplet seviyeden olan emisyon, flüoresans; uyarılmış singletten olan emisyon) vererek temel hale dönebilir. Şekil 2.11. de bir molekülün ışık ile uyarılması ve bu uyarılmış molekülün hangi yollarla temel enerji seviyesine döndüğü Jablonski diyagramı ile gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Jablonski diagramı: E, eksitasyon; ISC, sistemler arası geçiş; F, floresans; P, fosforesans; IC, iç geçiş.

Uyarılmış triplet enerji seviyesindeki fotosensör 2 farklı mekanizma ile reaksiyon verebilir. 1. mekanizma, elektron transferine dayanmakta olup, reaktif oksijen türlerinin oluşturularak kanserli hücrenin parçalanması sağlanır. 2. Tip mekanizma ise enerji transferine dayanmaktadır. Moleküler oksijenin triplet seviyedeki fotosensör ile etkileşimi sonucu daha reaktif olan singlet oksijen oluşur. Oluşan singlet oksijen kanser hücresiyle etkileşerek onun parçalanmasını sağlar.

İdeal Fotosensör:

Fotodinamik terapide kullanılacak olan ideal bir fotosensör aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmalıdır:

- Kimyasal olarak saf ve bilinen bir bileşime sahip olmalıdır. hedef doku tarafından tutulması gerekmektedir.
- Karanlıkta toksik etkisinin en az olması ve sadece fotoaktivasyon ile sitotoksik olması.
- Yüksek fotokimyasal reaktiviteye ve yüksek kuantum verimine sahip olan uzun ömürlü triplet seviyeye sahip olması, yeterli singlet oksijen üretmesi.
- Güçlü ışık absorblama kapasitesi ve yüksek abasorbisyon katsayısına sahip olması.

- Vücuttan hızlı bir şekilde atılması gerekmektedir.

Subftalosiyanimler koni yapılarından dolayı ftalosiyanimler gibi agregasyon özelliği göstermezler ve genel çözgenler içerisinde daha iyi çözünürlüğe sahiptirler. Ayrıca yüksek triplet ve singlet oksijen kuantum verimlerinden dolayı subftalosiyanimler, birçok foto-uygulama alanının arandığı fotosensörleridir. Subftalosiyanimler floresans özelliği gösterirler, genel olarak floresans kuantum verimleri $\phi_F \sim 0.25$ aralığında olup, singlet oksijen kuantum verimleri $\Phi_{\Delta} \sim 0.2-0.7$ aralığındadır [3]. Bu açıdan bir çok subftalosiyanimin türevi fotodinamik terapi uygulamalarında fotosensör olarak kullanılmaktadır. Örneğin, aksiyal konumda fenol ve etilen glikol türevleri içeren subftalosiyanim türevlerinin fotodinamik aktiviteleri insan kolon kanser hücreleri olan HepG2 (insan hepatokarsinoma) ve HT29 (İnsan kolon adenokarsinoma) hücreleri üzerinde test edilmiştir [20]. Aksiyal konumda fenol türevleri içeren subftalosiyanim moleküllerinin bu kanser hücrelerini %90 a kadar öldürdüğü tespit edilmiştir. Ayrıca pozitif yüklü katyonik subftalosiyanimler sentezlenmiş ve fotoaktiviteleri nötr subftalosiyanimler ile karşılaştırılmıştır [21]. Katyonik subftalosiyanimlerin singlet oksijen üretimi ve floresans kuantum verimi göstermiştir ki katyonik subftalosiyanim molekülleri, gram-negative bakterilerinin yok edilmesi için uygun fotodinamik ajanlardır. Ayrıca, İnce ve arkadaşları tarafından periferik konumda hidrofilik gruplar içeren tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)SubPcB(OH) sentezlenmiş ve fotodinamik aktiviteleri gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) ve gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) bakteriler üzerinde test edilmiştir [22]. Beklendiği gibi, karanlık ortamda hidrofilik subftalosiyanimin fotoaktivesinin olmadığı gözlenmiştir. Subftalosiyanimin molekülünün ışıkla uyarılması sonucunda, üretilen singlet oksijene bağlı olarak özellikle gram pozitif bakteriler üzerinde önemli bir fotodinamik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

2.3 TEZİN AMACI

Bu yüksek lisans tez çalışmamızda, yeni subftalosiyeninler sentezlenecek, fotofiziksel özellikleri araştırılacak ve yapı tayinleri yapılacaktır. Bu amaçlar için öncelikle farklı ftalonitril türevleri sentezlenerek, yapıları aydınlatılacak ve SubPc lerin hazırlanmasında başlangıç materyalleri olarak kullanılacaktır. Sentezlenen yeni bileşiklerin yapıları ve saflık dereceleri çeşitli spektral tekniklerle ortaya çıkarılacaktır. Çalışmanın uygulama aşamasında, elde edilen SubPc türevlerinin EMT6 sıçan meme tümörü üzerinde in vitro sitotoksik potansiyelleri karşılaştırılarak kemoterapi etkinliğine sahip olup olmadıkları ortaya konulacaktır. Ayrıca yeni moleküllerin singlet oksijen üretim kapasiteleri tespit edilip, fotodinamik terapi uygulamalarında kullanılabilecek fotosensör potansiyelleri incelenecektir.

2.4. TEZİN ÖNEMİ

Ftalosiyeninler ve türevleri olan subftalosiyeninler yüksek ışık absorblama kapasitelerinden dolayı opto-elektronik sistemlerde kullanılan ideal foto aktif bileşenlerdir. Ftalosiyeninler görünür ve yakın infrared bölgede güçlü absorpsiyon yapmalarına karşın, bu moleküller güçlü π - π etkileşimlerinden dolayı genel organik çözücüler içerisinde agregasyon özellik gösterirler. Fotosensör olarak kullanılan molekülün agregasyon özelliği bu moleküllerin kullanım alanını etkileyen en önemli parametrelerden birisidir. Genellikle, agregasyon, molekülün ışık absorblayarak uyarılmasından sonra molekülün ışımsız geçişler ile temel enerji seviyesine dönmesini sağlar. Bu durum ise uyarılmış yarı ömrün kısalmasına, singlet oksijen veriminin düşmesine ve buna bağlı olarak ta fotodinamik aktivitenin azalmasına ya da tamamen yok olmasına sebep olur [23,24]. Bu bağlamda, subftalosiyeninler, organik çözenlerde agregasyon göstermemeleri ve güçlü ışık absorblama kapasitelerinden dolayı fotodinamik terapi uygulamaları için dikkat çekici moleküllerdir. Benzer türde subftalosiyeninlerin sitotoksik etkileri olduğu literatürde mevcuttur [6]. Bu nedenle bu sentez ürünlerinin sitotoksik etkilerinin tespiti yeni bir kemoterapi ajanı olma yolundaki ilk basamak olarak değerlendirilebileceği gibi yapılacak ileri çalışmalar için toksit dozunun tespiti önem arz etmektedir. Bu

tez çalışmasından agregasyon özellik göstermeyen yeni subftalosiyanınların sentezlenmesi, yapı tayini ve sitotoksitesinin saptanması için sıçan ve insan meme tümörü hücrelerinde deneyler yapılacaktır. Ayrıca, elde edilen yeni SubPc türevlerinin singlet oksijen üretim kapasitesi tespit edilecek olup, bu sayede moleküllerin fotodinamik terapi uygulamalarında fotosensör olarak kullanılma potansiyelleri belirlenmiş olacaktır. Deneyler sonucunda subftalosiyanınların toksik dozları karşılaştırılarak in vitro olarak kemoterapi etkinliği ve singlet oksijen üretim kapasiteleri saptanacaktır. Bu malzemelerin daha kontrollü ve maliyeti düşük yöntemlerle sentezlenmesi bakımından bilimsel kaynak oluşturacaktır. Moleküllerin saptanan sitotoksik değerleri ve singlet oksijen üretim potansiyelleri referans alınarak çalışmanın ilerleyen aşamalarında subftalosiyanınların fotodinamik terapi uygulamalarında gerçekleştirilebilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Bütün kimyasallar Sigma-Aldrich'den satın alındı ve daha fazla saflaştırılmadan kullanıldı. Kolon kromatografisinde Merck-60 marka (230-400 mesh, 60 Ao) silika jel, TLC içinde alüminyum kâğıt üzerine kaplanmış silika jel 60 F254 (E.Merck) kullanıldı. İn vitro çalışmalar için elde edilen subftalosiyanın türevlerinin Sitotoksisit etkileri EMT6 sıçan meme tümörü ticari hücre hatları kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazla

Sentezlenen moleküllerin IR analizleri Perkin Elmer Spectrum BX, FTIR spektrofotometre ile NMR analizleri ise Varian AS 400 Mercury, 1H-NMR (400 MHz), ile oda sıcaklığında (2980K) yapıldı. Maddelerin spektrofotometrik özellikleri, Specord500 UV-VIS Spektrofotometre ile incelendi. Elde edilen subftalosiyanın türevlerinin sitotoksisit etkileri EMT-6 sıçan meme tümörü üzerinde incelenmiştir. Moleküllerin singlet oksijen üretim kapasiteleri için 300 W lık ksenon lamba ve Jenger Glaswerk Schott & Gen. Mainz OG 515 filtre kullanıldı.

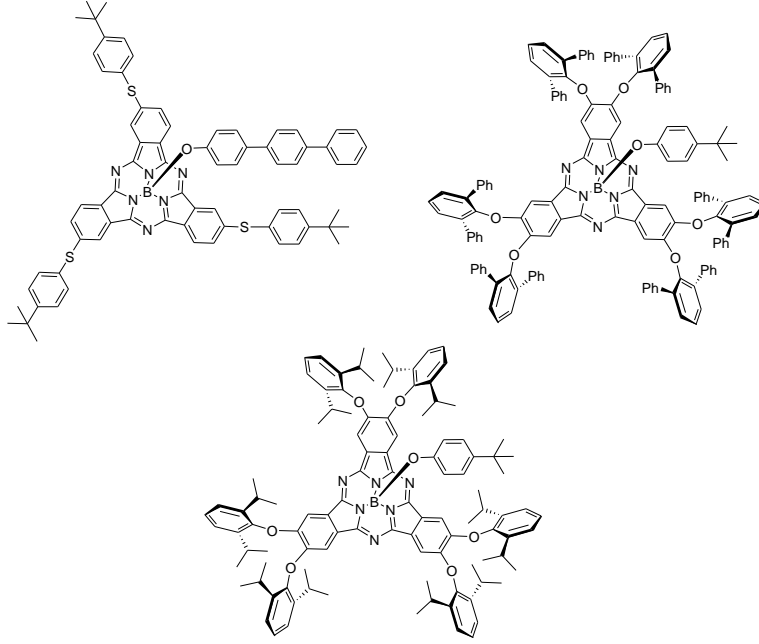
3.2 YÖNTEM

3.2.1. Subftalosiyanın Türevlerinin Sentezi

Bu tez çalışmasında aksiyal ve periferik konumda farklı fonksiyonel gruplar içeren 3 farklı subftalosiyanın türevi sentezlenmiştir. Periferik konum için farklı özelliklere sahip gruplar seçilmiştir. Bunlar aşağıdaki amaçlara göre tercih edilmiştir: 4-tert butil benzotiyol: tiyol gruplarının elektron donör etkisi ile absorpsiyonun uzun dalga boyuna kaydırılması

2,6 difenil fenol: bu grupların hacimli yapıları sayesinde muhtemel oluşabilecek agregasyonun en aza indirilmesi

2,6 diisopropil fenol: bu gruplarında hacimli yapıları sayesinde muhtemel oluşabilecek agregasyonun en aza indirilmesi ile birlikte isopropil gruplar ile çözünürlüğün artırılması.



Şekil 3.1. Sentezlenen farklı fonksiyonel gruplar içeren subftalosiyanın moleküler yapısı.

Elde edilen bütün bileşiklerin kimyasal yapıları ve saflık dereceleri, $^1\text{H-NMR}$, IR ve UV-Vis absorpsiyon analizleri ile kanıtlanacaktır.

3.2.1.1. SubPc lerin sentezinde kullanılan başlangıç maddelerinin sentezi.

1,1':4',1''-terfenil-4-ol (1) sentezi:

1,1':4',1''-terfenil-4-ol (**1**) literatürde belirtilen prosedüre göre sentezlenmiştir. (Şekil 3.2).

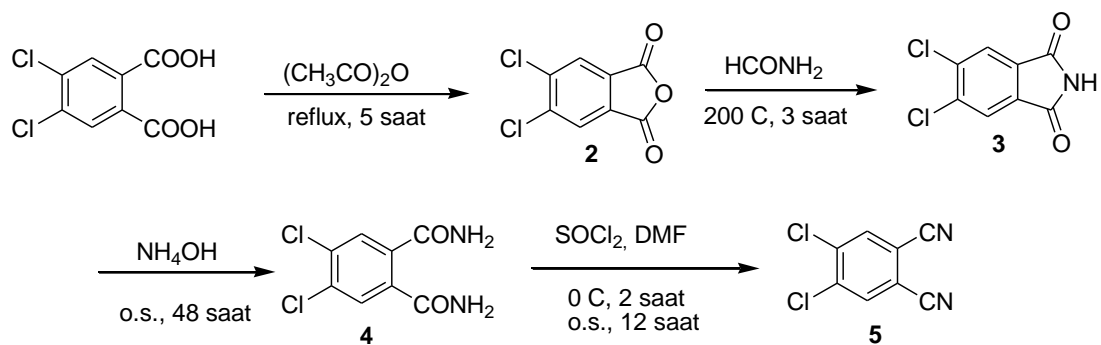


Şekil 3.2. 1,1':4',1''-terfenil-4-ol (1) bileşiğinin sentezi.

4-bromo-4'-hidroksibifenil (200 mg, 0.8 mmol), fenil boronik asit (133 mg, 1.09 mmol), tetrakis(trifenilfosfine) palladyum(0) (50 mg, 0.04 mmol) and Na₂CO₃ (2 mL of a 2 N) dimetoksietan içerisinde (10 mL) azot atmosferi altında 80 °C bir gece karıştırılır. Elde edilen süspansiyon oda sıcaklığına soğutulur ve 1 N NH₄Cl çözeltisi (100 mL) içine eklenir. Karışım etilasetat ile ekstrakte edilir ve organik faz Na₂SO₄ ile kurutulur ve çözgen evapore edilir. Ham ürün etanol ile kristallendirilerek saflandırılır %55 verimle 108 mg madde elde edilir. IR (KBr): $\nu = 3387, 3033, 2360, 1608, 1509, 1454, 1402, 1373, 1263, 1002, 822 \text{ cm}^{-1}$. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.69 (d, J = 4 Hz, 6H), 7.53 (d, J = 9 Hz, 2H), 7.45 (t, J = 7 Hz, 2H), 7.22 (t, J = 7 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 9 Hz, 2H), 4.75 (s, 1H).

4,5-Dikloro ftalonitril Sentezi

4,5 dikloro ftalonitril (5) literatürde belirtilen prosedüre göre sentezlenmiştir (Şekil 3.3) [25].



Şekil 3.3. 4,5-Dikloro ftalonitril Sentezi.

4 5- Dikloro Ftalikanhidrit (2)

Asetik anhidrit (2.5 ml) ve 4,5-dikloroftalik asit (1.5 g, 6.4 mmol) reflux altında 165 oC sıcaklıkta ve 5 saat boyunca karışmaya bırakıldı. 5 saat sonunda reaksiyondan kalan fazla asetik asit ortamdan vakum distilasyonu ile uzaklaştırıldı. 30 ml petrol eteri eklenerek oda sıcaklığında 12 saat karışmaya bırakıldı. 12 saatin sonunda madde petrol eteri ile yıkandı ve süzüldü. Bej renkli 4,5-dikloroftalik asit (1.24 gr, 5.7 mmol) %89 verim ile elde edildi. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) = 8.1 (s, 2H)

4, 5-Dikloroftalimid (3)

4,5-dikloroftalik anhidrit (2) (1.24 gr, 5.7 mmol) ve formamit (3 ml) karışımı 200 oC sıcaklıkta 3 saat karışmaya bırakıldı. Karışım oda sıcaklığına soğutuldu ve oluşan katı su ile yıkanarak süzüldü. Bej renkli 4, 5-dikloroftalimide (1.21 gr, 5.6 mmol) 98 % verim ile elde edildi. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 8.1 (s, 2H).

4, 5-Dikloroftalamid (4)

4, 5-Dikloroftalimid (1.21 gr, 5.6 mmol) ve 25 % amonyum hidroksit solüsyonu (18 ml) oda sıcaklığında 24 saat karışmaya bırakıldı. 24 saat sonra, 33 % amonyum hidroksit solüsyonu (8ml) daha eklenerek yine oda sıcaklığında ve 24 saat karışmaya bırakıldı. Elde edilen beyaz katı su ile yıkanarak süzüldü. 4, 5-dikloroftalamid (828 mg, 3.55 mmol) % 63.4 verimle elde edildi. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 7.9 (s, br, 2H, NH₂), 7.7 (s, 2H, H-3, H-6), 7.4 (s, br, 2H, NH₂).

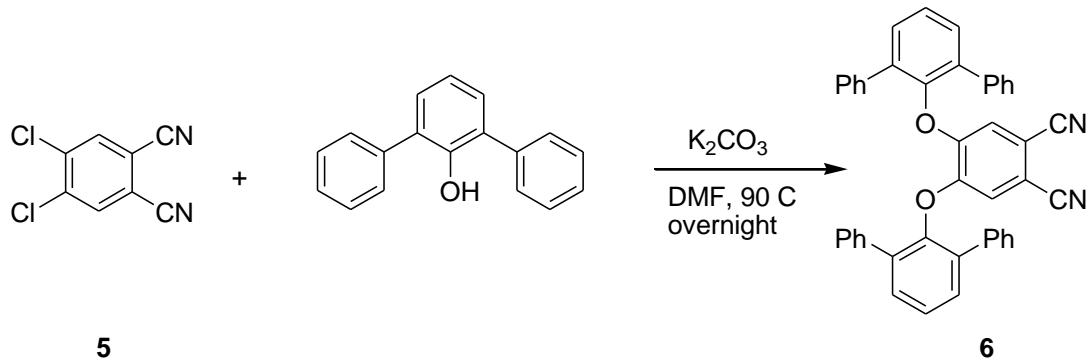
4, 5-Dikloroftalonitril (5)

Tiyonül klorür (3 ml) ve kuru DMF (6 ml) solüsyonu 0 oC'de ve azot altında 2 saat karışmaya bırakıldı. 2 saatin sonunda 4, 5-ftalamid (828 mg, 3.55 mmol) bu karışıma eklendi ve oda sıcaklığında 12 saat karışmaya devam etti. 12 saat sonra 100 ml buz içine madde döküldü ve 10-15 dakika daha karışmaya bırakıldı. Daha sonra bu karışım su ile yıkanarak süzüldü. Elde edilen bu katı metanol ile kristallendirildi. 4,5-

dikloroftalonitril bej renkli katı halinde (559.5 mg, 2.84 mmol) % 80 verimle elde edildi. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 7.9 (s, 2H).

2,6-Difenilfenol ftalonitril (6) Sentezi

2,6-Difenilfenol ftalonitril (2) literatürde belirtilen prosedüre göre sentezlenmiştir (Şekil 3.4) [26].

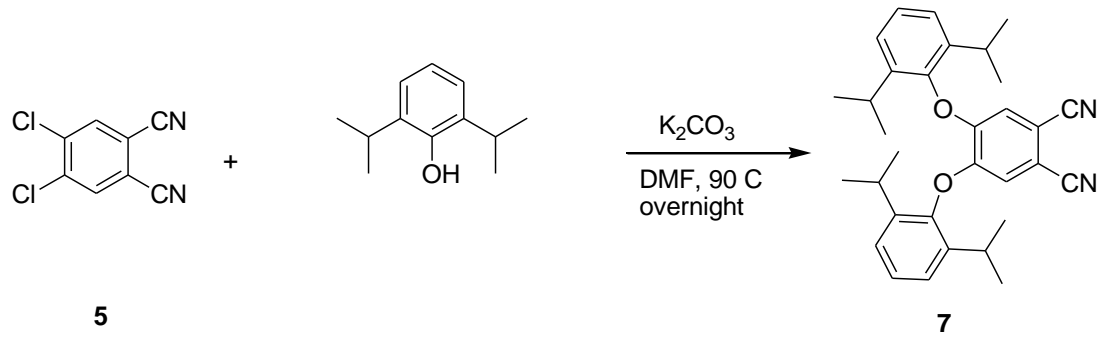


Şekil 3.4. Difenilfenol ftalonitril (6) Sentezi.

2,6-Difenilfenol (1.88 g, 7.5 mmol), 4,5-dikloroftalonitril (0.5 g, 2.5 mmol), K₂CO₃ (3.5 g, 25.0 mmol) kuru DMF (5 mL) içerisinde 100 °C azot atmosferi altında 36 saat karıştırılır. Reaksiyon karışımı 50 ml su içerisine dökülür ve sulu faz 3 x 50 mL CH₂Cl₂ ile ekstrakte edilir. Organik faz MgSO₄ ile kurutulur ve çözügen evapore edilir. Elde edilen katı silika jel kolon kromatografisi ile CH₂Cl₂ kullanılarak saflandırılır. Metanol ile kristallendirilerek 600 mg madde %46 verim ile elde edilir. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 7.44 (s, 6H, ArH), 7.41 (d, 8H, J = 8.0 Hz, ArH), 7.14 (4H, t, J = 7.6 Hz, ArH), 7.04 (8H, t, J = 7.6 Hz, ArH), 6.20 (2H, s, ArH).

2,6-Diisopropilfenoksi ftalonitril (7) Sentezi

2,6-Difenilfenol ftalonitril (2) literatürde belirtilen prosedüre göre sentezlenmiştir (Şekil 3.5) [26].

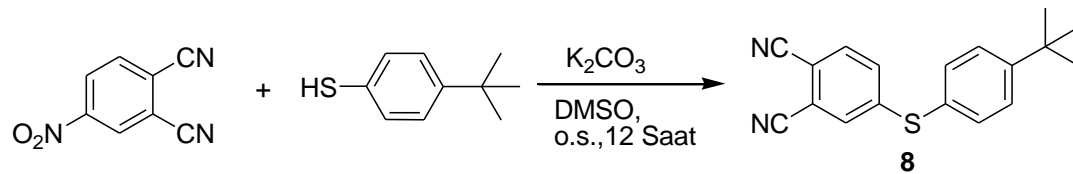


Şekil 3.5. 2,6-Diisopropilfenoksi ftalonitril (7) Sentezi.

2,6-Di-isopropilphenol (2.2 g, 12.5 mmol), 4,5-dikloroftalonitril (1 g, 5.07 mmol), K₂CO₃ (3 g, 21.7 mmol) kuru DMF (5 mL) içerisinde 100 oC azot atmosferi altında 24 saat karıştırılır. Reaksiyon karışımı 50 ml su içerisine dökülür ve sulu faz 3 x 50 mL CH₂Cl₂ ile ekstrakte edilir. Organik faz MgSO₄ ile kurutulur ve çözgen evapore edilir. Metanol ile kristallendirilerek 1.2 g bileşik 7 %70 verim ile elde edilir. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) =7.25 (m, 6H, Ar-H), 6.70 (s, 2H, Pc Ar-H), 2.88 (m,4H), 1.20 (d, 12H), 1.10 (d, 12H).

4-(4-tert-butylphenylthio) ftalonitril (8) Sentezi

4-(4-tert-butylphenylthio) ftalonitril (8) sentezi literatürde verilen yöntemin modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6) [29].



Şekil 3.6. 4-(4-tert-butylphenylthio) ftalonitril (8) Sentezi.

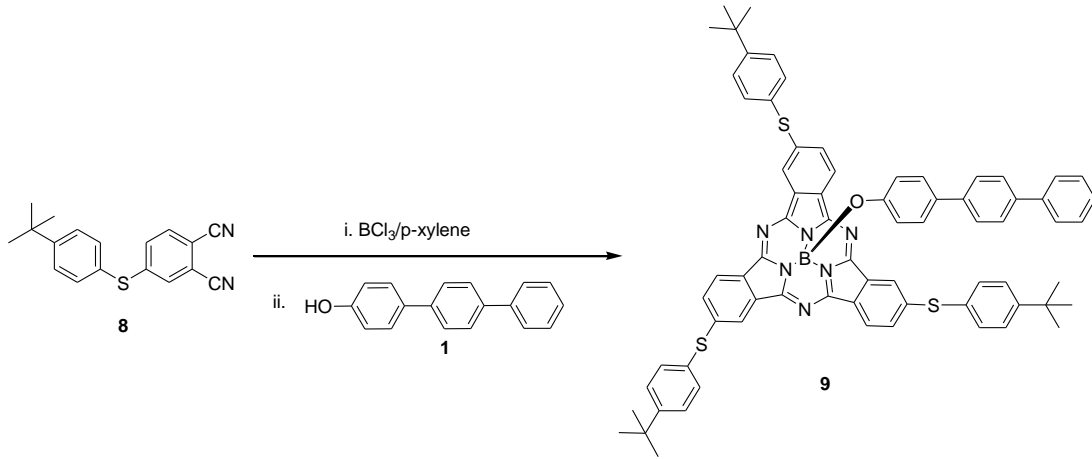
520 mg (3 mmol) 4-nitroftalonitril, 3 mmol of 4-tertiyerbutilbenzotiol ve 455 mg (4.5 mmol) K₂CO₃, 10 mL DMSO içerisinde azot atmosferi altında 12 saat oda sıcaklığında karıştırılır. Karışım 100 ml su içine dökülür ve CH₂Cl₂ ile ekstrakte

edilir. Organik faz Na₂SO₄ ile kurutulur ve çözgen evapore edilir. Ham ürün metanolde kristallendirilerek, %80 verimle beyaz katı elde edilir. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 7.2-7.4 (m, 3H), 7.42-7.60 (m, 4H), 1.44 (s, 9H).

3.2.1.2. Subftalosiyanın Sentezi

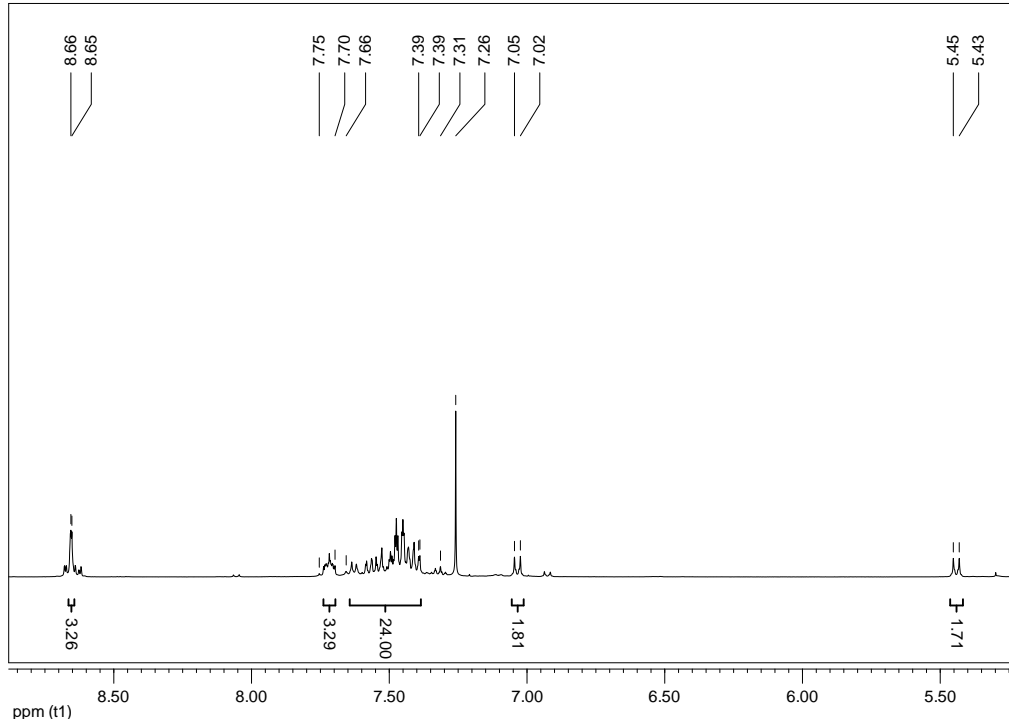
1,1':4',1''-terfeniloksi(-2(3),9(10),16(17) - tris(4-tert-butiltiofenoksi) (subftalosiyanın) boron(III) (9)

SubPc (**9**) Şekil 3.7 de belirtilen prosedüre göre sentezlenmiştir.

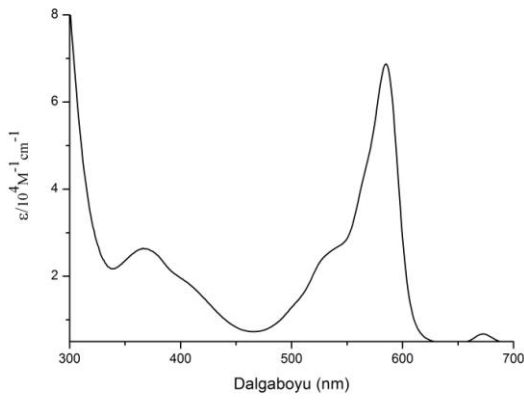


Şekil 3.7. SubPc (**9**) sentezi.

4-(4-tert-butylfeniltio) ftalonitril (**8**) (100 mg, 0.34 mmol) ve BCl₃ (0.34 ml, 1 M p-xilen çözeltisi) azot atmosferi altında 150 C de 4 saat karıştırılır. Karışım oda sıcaklığına soğutulduktan sonra çözgen evapore edilir. Elde edilen katı kuru toluen (4 ml) içinde çözünür ve 1,1':4',1''-terfenil-4-ol (1) (250 mg, 1.02 mmol) eklenerek azot atmosferi altında 110 C de 3 saat karıştırılır. Çözgen evapore edilir. Elde edilen katı Hexan/Dioxan (8:1) çözgen karışımı kullanarak silika jel kolon kromatografisinde saflandırılır. %36 verimle 54 mg, 0.04 mmol kırmızı renkli saf madde elde edilir. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 8.6-8.5 (m, 3H), 7.75-7.69 (m, 3H), 7.65-7.38 (m, 24H), 7.04 (d, J=8, 2H), 5.44 (d, J=8, 2H), 1.37 (s, 27H). IR (ATR): ν, cm⁻¹: 2954, 2921, 2851, 1730, 1603, 1483, 1459, 1258, 1180, 1055, 824, 765, 699, 560. UV-vis (CHCl₃): λ_{max}, nm (log ε) 585 (4.83), 532 (4.39), 368 (4.4).



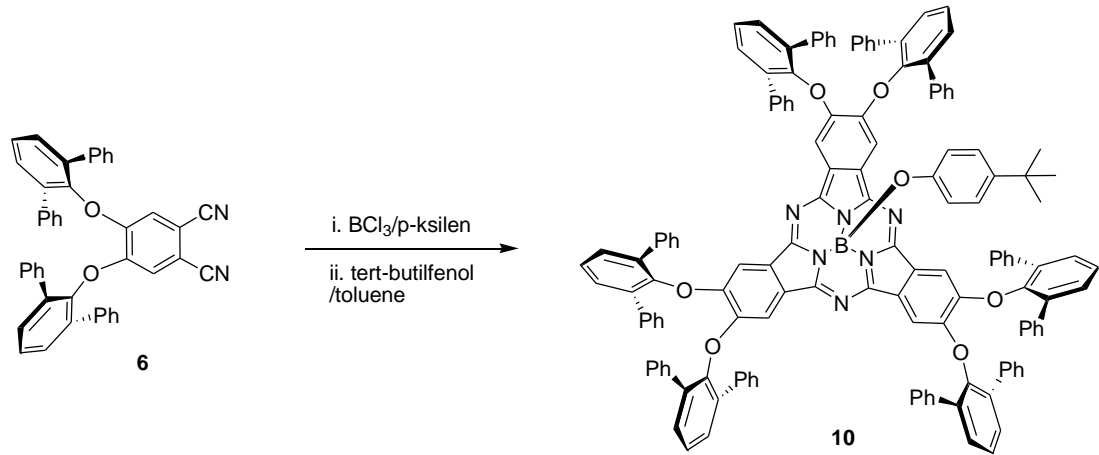
Şekil 3.8. SubPc 9 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu(CDCl₃).



Şekil 3.9. SubPc 9 molekülünün CHCl₃ içindeki UV/Vis absorpsiyon spektrumu (k: 1X10⁻⁵ M).

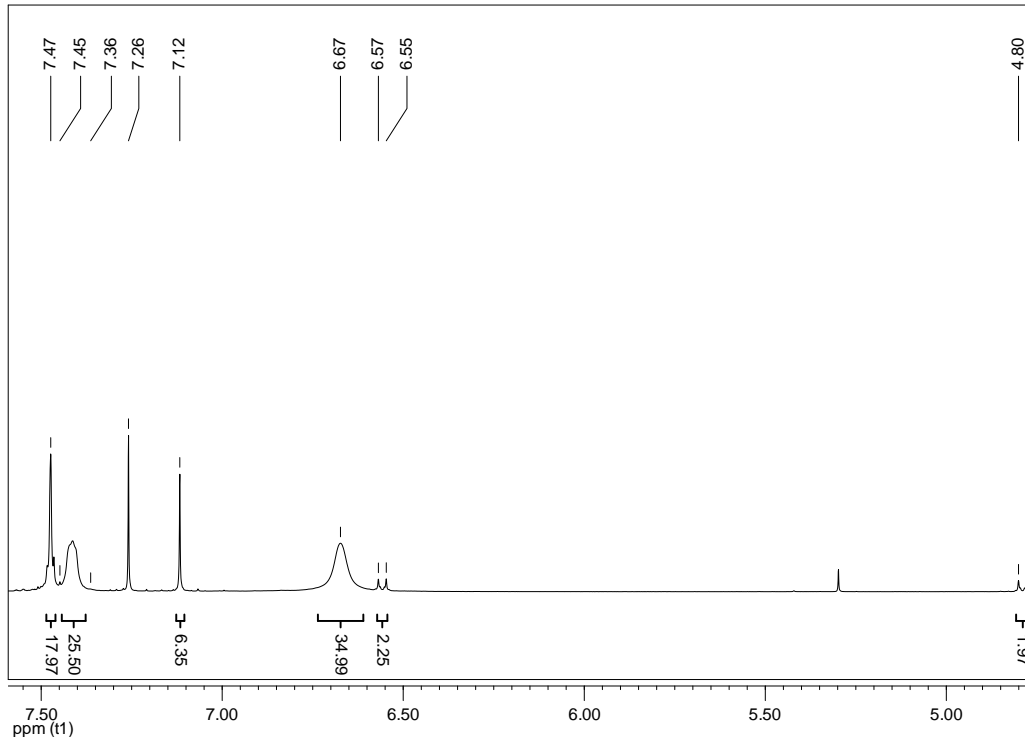
4'-Tert-butilfenoksi(-2,3,9,10,16,17-hekza(2,6-difenilfenoksi)-subftalosiyenin)boron(III) (10)

SubPc (10) Şekil 3.10 da belirtilen prosedüre göre sentezlenmiştir.

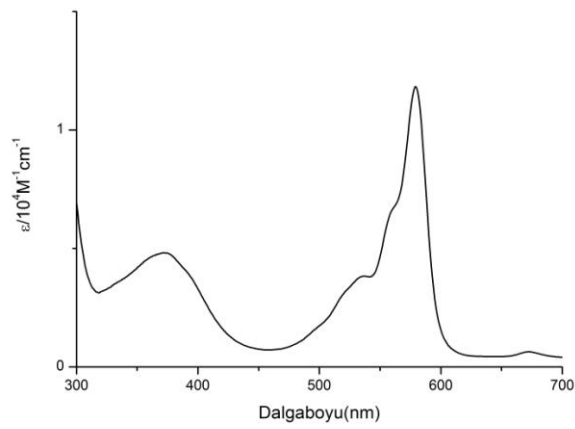


Şekil 3.10. SubPc (**10**) sentezi.

2,6 difenilfenol ftalonitril (**6**) (150 mg, 0.24 mmol) ve BCl₃ (0.25 ml, 1 M p-ksilen çözeltisi) azot atmosferi altında 150 C de 4 saat karıştırılır. Karışım oda sıcaklığına soğutulduktan sonra çözücü evapore edilir. Elde edilen katı kuru toluen (4 ml) içinde çözünür ve 4-tertbutilfenol (180 mg, 1.2 mmol) eklenerek azot atmosferi altında 110 C de 3 saat karıştırılır. Çözücü evapore edilir. Elde edilen katı diklorometan/hekzan (3:1) çözücü karışımı kullanarak silika jel kolon kromatografisinde saflandırılır. %25 verimle 42 mg, 0,02 mmol kırmızı renkli saf madde elde edilir. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz,): δ (ppm) = 7.47 (s, 18H), 7.45-7.36 (m, 25H), 7.12 (s, 6H), 6.67 (br.s. 35H), 6.54 (d, J=8, 2H), 4.79 (d, J=8, 2H), 1.04 (s, 9H). IR (ATR): ν, cm⁻¹: 2921, 2850, 1733, 1611, 1553, 1497, 1455, 1412, 1274, 1195, 1150, 826, 762. UV-vis (CHCl₃): λ_{max}, nm (log ε) 579 (5.07), 534 (4.58), 372 (4.68).



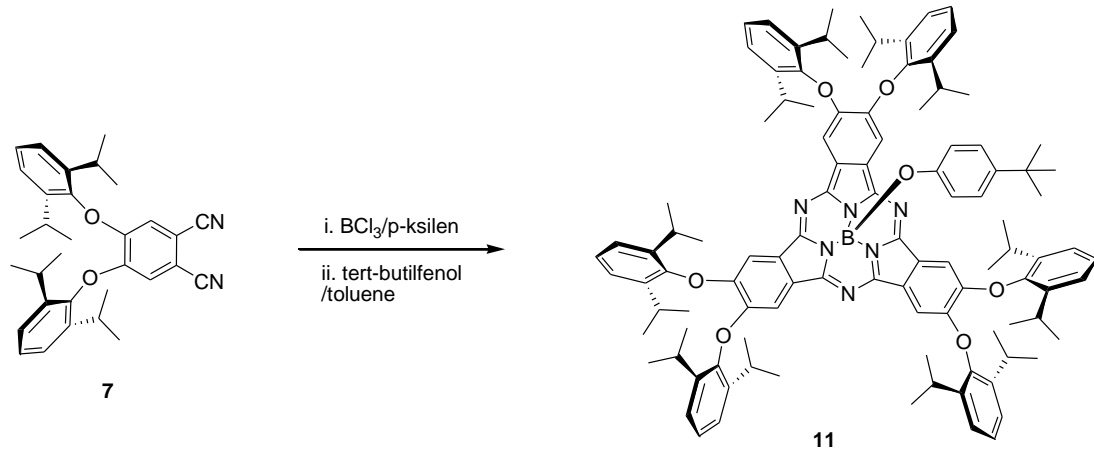
Şekil 3.11. SubPc **10** bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu(CDCl₃).



Şekil 3.12. SubPc **10** molekülünün CHCl₃ içindeki UV/Vis absorpsiyon spektrumu (k: 1X10⁻⁵ M).

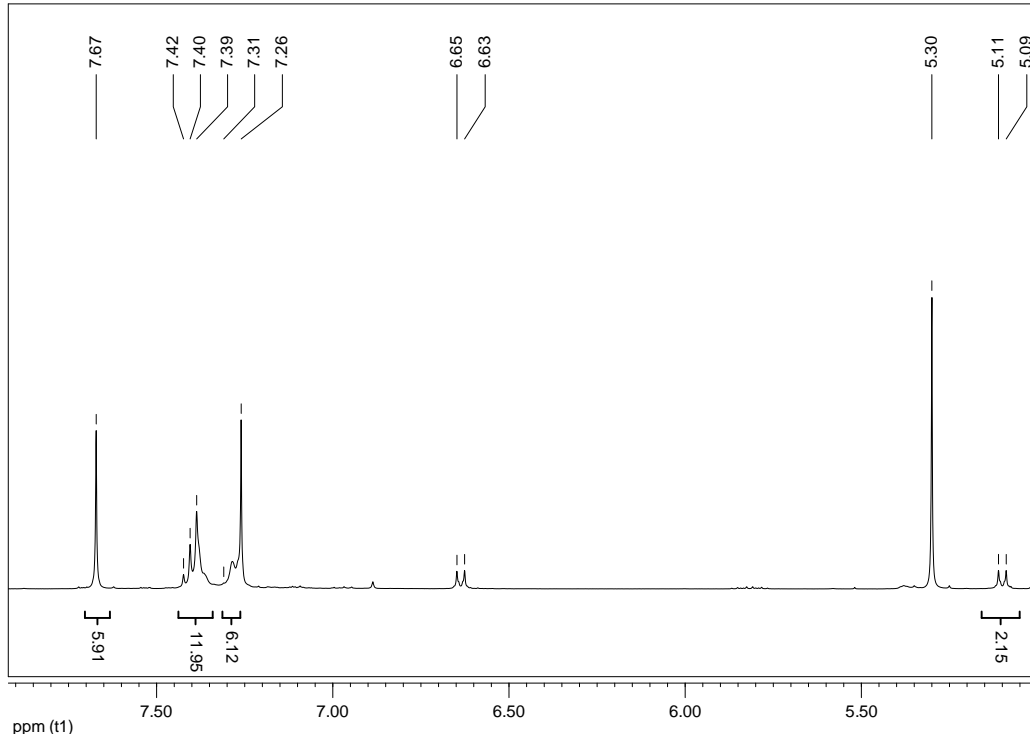
4'-Tert-butylphenoxy(-2,3,9,10,16,17-hekza(2,6-isopropilfenoksi)-subftalosiyenin)boron(III) (11)

SubPc **11** Şekil 3.13 de belirtilen prosedüre göre sentezlenmiştir.

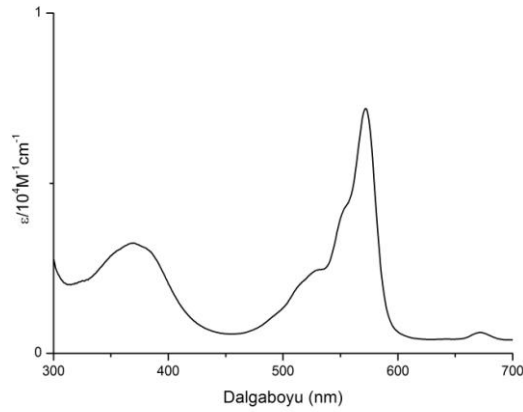


Şekil 3.13. SubPc 11 sentezi.

2,6 diisopropilfenol ftalonitril (**7**) (100 mg, 0.2 mmol) ve BCl_3 (0.2 ml, 1 M p-ksilen çözeltisi) azot atmosferi altında 150 C de 4 saat karıştırılır. Karışım oda sıcaklığına soğutulduktan sonra çözümlenir ve 4-tertbutilfenol (150 mg, 1 mmol) eklenerek azot atmosferi altında 110 C de 3 saat karıştırılır. Çözgen evapore edilir. Elde edilen katı diklorometan/hekzan (1:2) çözgen karışımı kullanarak silika jel kolon kromatografisinde saflandırılır. %33 verimle 39 mg, 0,02 mmol kırmızı renkli saf madde elde edilir. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) = 7.67 (s, 6H), 7.4-7.3 (m, 12H), 7.3-7.2 (m, 6H), 6.64 (d, J=8, 2H), 5.10 (d, J=8, 2H), 3.4-3.3 (m, 6H), 2.8-2.7 (m, 6H), 1.3-1.2 (m, 72H), 0.9 (s, 9H). IR (ATR): ν , cm^{-1} : 2950, 2921, 2851, 1726, 1698, 1610, 1553, 1462, 1438, 1383, 1328, 1276, 1183, 1131, 1054, 826, 762. UV-vis (CHCl_3): λ_{max} , nm (log ϵ) 572 (4.85), 527 (4.38), 371 (4.51).



Şekil 3.14. SubPc **11** bileşiğinin 1H-NMR spektrumu(CDCl₃).



Şekil 3.15. SubPc **11** molekülünün CHCl₃ içindeki UV/Vis absorpsiyon spektrumu (k: 1X10⁻⁵ M).

3.2.2. Fotodinamik Terapi İle Tümörlü Hücrelerin Yok Edilmesi

Fotodinamik terapide deki önemli unsur ışık absorpsiyonu ve enerji transferidir. Temel haldeki fotosensörün (Ps) moleküler orbitallerinde ters spinli

olarak yerleşmiş iki elektrona sahiptir ve bu duruma singlet hal denmektedir. Işığa duyarlı olan fotosensör (Ps) 'ün iki elektronundan birisi ışık 'a maruz bırakıldığında temel halden daha üst bir mertebeye yani singlet enerji seviyesine uyarılır. Bu singlet hali oldukça kısa ömürlüdür ve sahip olduğu enerji ortama birincisi floresans yaparak ve Ps'ler arasında (sistemler arası) geçiş yaparak ortama verir. Ps sistemler arası geçişle nispeten daha uzun ömüre sahip triplet halidir ki buda enerji dönüşümünde iki tip reaksiyon mekanizmasından birini izleyerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu sağlar [28]. Tip-I reaksiyonunda PS direkt olarak substratla etkileşmektedir ve bu etkileşim sonucunda PS'ten substrata bir elektron ya da bir proton transferiyle radikalik anyon ve radikalik katyon oluşmaktadır. Oluşan bu radikalik anyon ve radikalik katyonlar hidroksil radikali (OH), süperoksit anyonu (O_2^-), ya da peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri oluşturmak üzere oksijenle reaksiyona girerler. Tip-II reaksiyonunda PS doğrudan doğada triplet halde bulunan oksijen molekülü ile etkileşerek uyarılmış singlet oksijen üretmektedir.

Bu iki tip reaksiyon aynı zamanda gerçekleşmekte ve reaksiyonların oranı kullanılan PS'in yapısına, ortamdaki oksijen derişimine, substrat (hücre zarı veya molekül) konsantrasyonuna ve PS'in substrata bağlanma derecesine bağlı olarak değişmektedir. ROS'un yüksek reaktivitesi ve kısa ömürlü olması nedeniyle yalnızca ROS'un üretildiği bölgeye çok yakın hücreler (PS'in lokalize olduğu bölge) hasar görmektedir. Singlet oksijenin biyolojik sistemlerdeki yaşam ömrü $<0.04 \mu s$ ve bun nedenle etkinlik yarıçapı $<0.02 \mu m$ 'dir (11). Fotodinamik terapinin dokuda yarattığı hasar miktarı pek çok değişkene bağlıdır. Bunlar kullanılan PS'in türü, hücre içi ve hücre dışındaki lokalizasyonu, alınan toplam doz miktarı ve ışığa maruz kalınan süre, kullanılan ışığın şiddeti, oksijenin derişimi, ışığın uygulanması ile PS'in alınması arasındaki süredir.

PDT'yi canlı dokularda uygulayabilmek için belli dalga boyundaki ışığın yeterli miktarda hedef dokuya iletilmesi gerekmektedir. Işık-doku etkileşmesinde kullanılan ışığın dalga boyu ve dokunun yapısına bağlı olarak ışık ya absorblanır veya saçılır. Absorbsiyon vücutta bulunan hemoglobin, miyoglobin ve sitokrom gibi kromoforlardan kaynaklanmaktadır. 2A PDT'de kullanılan ışığın dalga boyu PS'in

maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu aralığıyla eşleşmelidir [29]. PS'ler genellikle floresan özellik göstermektedir ve bu özellik onların optik görüntüleme kullanılmalarına imkân sağlamaktadır. Böylece ışığın hedef dokudaki PS'lere iletiminin sağlandığı gözlemlenebilmekte ve daha etkin bir biçimde PDT uygulanabilmektedir.

PDT uygulamasında PS'in tümörlü dokuya geçmesi ve orada yığılma yapması gerekmektedir. PS hücre zarında ve hücre temek kısımlarında (organellerinde) tutulum göstermektedir. PS'nin hücre içine alınması farklı yollarla gerçekleşmektedir ve PS'nin net iyonik yüküne, hidrofilik veya hidrofobik özelliklerine ve asimetriklik derecesine bağlı olmaktadır. Örneğin, hidrofobik ve -2'den daha az negatif yüke sahip PS'ler plazma zarından içeriye difüzlenerak girebilmektedir ancak hidrofilik özellikteki PS'ler hücre içine hücre zarının içe doğru bir cep oluşturmasıyla alınmaktadır [30] PS'in kanserli hücredeki kümülasyonu PDT etkinliği açısından önemlidir çünkü oluşan ROS'lar kısa ömürlü olduğundan sadece yakın çevresindeki dokulara etki etmektedirler.

PDT'nin tümör üzerindeki etkisi üç farklı mekanizma üzerinden gerçekleşir [30,31]. İlkinde PDT tarafından üretilen ROS'lar tümör hücrelerine doğrudan etki ederek hücre ölümüne yol açabilmektedir [32]. İkinci mekanizma PDT tümör çevresindeki tümöre besin ve oksijen taşıyan damarlı yapıya zarar verir ve besin ve oksijen yoksunluğundan tümörün yıkımı sağlanmaktadır. Son mekanizmada ise PDT sayesinde tümörlü dokuda akut inflamasyon ve sitokinlerin salınımı gerçekleştirilir ve bağışıklık sisteminden bir tepki oluşturulur böylece lökositler tümörü düşman olarak görür ve tümör hücreleri yok edilir [28,33]. Daha önce yapılan bir çalışmada (Barbara Henderson ve arkd. 1989) bir fibrosarcoma fare modelinde Photofrin-temelli PDT (Photofrin bir photosensitizerdir)'nin vasküler tıkanmaya sebep olduğunu gözlemlemişlerdir böylece tümöre oksijen iletimi de engellenmiştir.

3.2.3. İn Vitro Sitotoksitenin Tespit

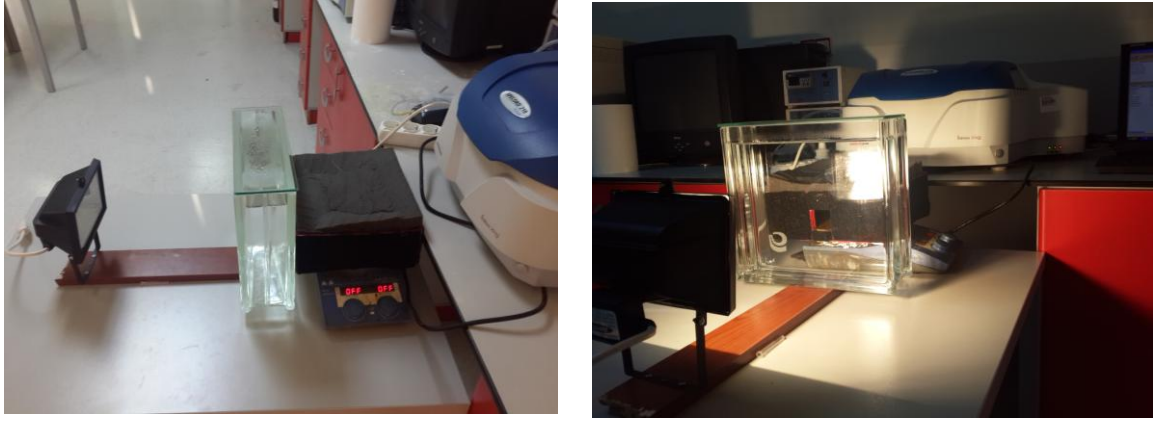
Elde edilen subftalosiyanın türevlerinin in vitro çalışmalarda sitotoksik etkisi EMT-6 sıçan meme tümörü üzerinde incelenmiştir.

EMT-6 hücre hattı %10'luk FBS içeren besi ortamında çoğaltılmıştır. 3 pasaj sayısından sonra hücreler çalışma grubu oluşturmak için 96'luk plakelere ekilmiştir. Kuyucuk başına yaklaşık 105 hücre 200 µl besiyer ile ekilmiş ve yüzeye tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

IC50 dozunu (canlı hücrelerin %50'sini öldüren doz) hesaplayabilmek için SubPc 9, SubPc 10 ve SubPc 11 maddeleri 5, 10, 20, 40 ve 80 µM olarak değişik konsantrasyonlarda hazırlanmışlardır. Bir gün inkübasyon süresinden sonra hücrelerin üzerindeki besiyer alınmış ve değişik konsantrasyonlarda ki maddeler 200 µl olarak hücrelerin üstüne eklenmiştir. IC50dozunu belirlemek için 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri belirlenmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda plakeler için hazırlanan XTT kiti hücrelerin üstüne 50 µl olarak uygulanmıştır. 3 saat inkübasyon sonunda plakeler mikropate okuyucu ile okunmuş ve kuyucuklardaki canlı hücre % oranı kontrole göre belirlenmiştir.

3.2.4. Subftalosiyanın moleküllerinin Singlet Oksijen Kapasitelerinin Tespiti

Moleküllerin singlet oksijen üretim kapasiteleri, singlet oksijen tuzağı olarak kullanılan 1,3-difenil-iso-benzofuran (DPBF) maddesinin fotodegradasyonu ile tespit edildi. Ölçümler her bir molekül için üç kez tekrarlanmıştır ve elde edilen veriler bu üç deneyin ortalama bir değerini temsil eder. Moleküllerin singlet oksijen üretim kapasiteleri DMSO çözeltisi içinde gerçekleştirildi. Singlet oksijen tayini çalışmalarında ışık kaynağı olarak 300 W lık ksenon lamba ve 515 nm altındaki ışık etkisini ve sıcaklık etkisini engellemek için Jenger Glaswerk Schott & Gen. Mainz OG 515 filtre kullanılmıştır. Singlet oksijen ölçümleri için hazırlanan deney düzeneği şekil 3.16 da gösterilmiştir.



Şekil 3.16. Singlet oksijen ölçümleri için hazırlanan deney düzeneği.

Ölçümler için, 1,3-difenil-iso-benzofuran (DPBF) maddesinin DMSO içinde absorptans değeri yaklaşık olarak 1 olan çözeltisi ve subftalosiyenin moleküllerinin DMSO içersinde absorptans değeri 0.1 olan çözeltileri hazırlandı. 2ml DPBF çözeltisi UV küveti konulup yaklaşık 1 dakika hava geçirilidikten sonra absorptansı ölçüldü. SubPc molekülü DPBF çözeltisi içine eklenip karıştırıldı ve ksenon lamba altında ışımaya bırakıldı. Işıma ile birlikte singlet oksijen tuzak maddesi olan 1,3-difenil-iso-benzofuran (DPBF)'ın 419 nm de ki absorptans değişimi yaklaşık 15 sn aralıklar ile izlendi. Ölçümler her bir subftalosiyenin molekülü için üç kez tekrarlandı. Ölçümler sonucunda DPBF nin absorpsiyonunda singlet oksijen oluşumuna bağlı olarak azalma görülürken, subftalosyaninlerin Q band absorpsiyonun değişmediği görülmüştür. Bu sonuç subftalosyaninlerin ölçümler boyunca kararlı kalmasını ve bozulmadığını göstermektedir.

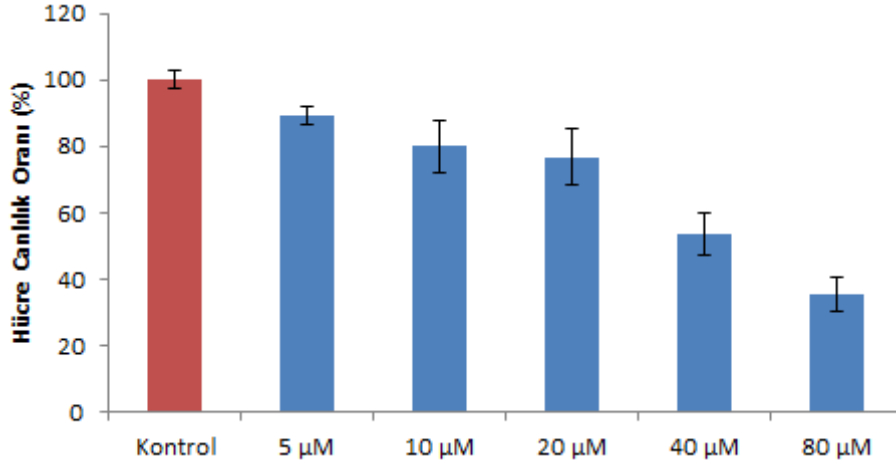
4. TARTIŞMA VE BULGULAR

Elde edilen SubPc türevlerinin etkinlik ölçütü hücrelerin %50 sini öldüren inhibitör konsantrasyon 50 (IC50) değerleri hesaplandı.

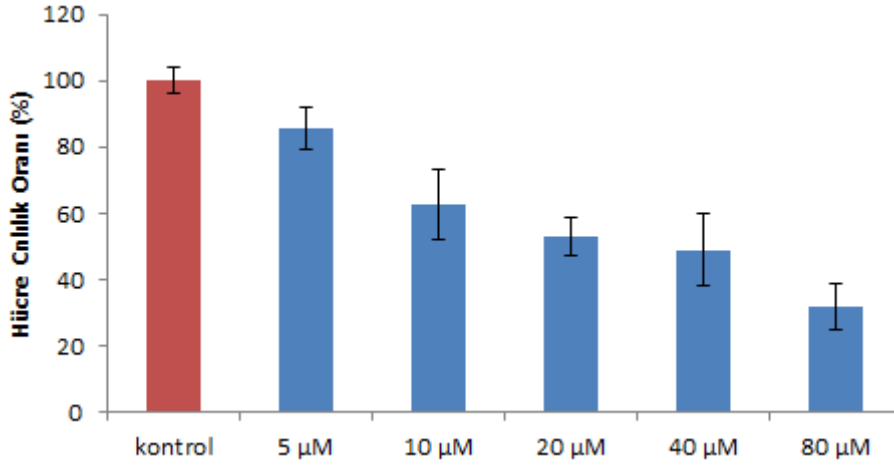
4.1. Sitotoksosite Analizi (XTT)

SubPc 9 maddesi için;

Kontrol grubundaki canlılık oranı %100 olarak kabul edildiğinde 24 saat inkübasyon sonrasında 40 μ M madde eklenen kuyucuklardaki canlılık oranının % 53'e düştüğü görülmüştür. Bununla birlikte 80 μ M madde eklenen kuyucuklardaki canlılık oranı oldukça azalmıştır (%35) (Şekil 4.1). 48 saat inkübasyon sonundaki canlılık oranlarına bakıldığında 20 μ M'daki canlılık oranının % 52 olduğu görülmektedir ve 80 μ M'da bu oran %32'e düşmüştür (Şekil 4.2). Bu durumda IC50 değeri 24 saatte 40 μ M iken 48 saat sonunda 20 μ M olduğu tespit edilmiştir.



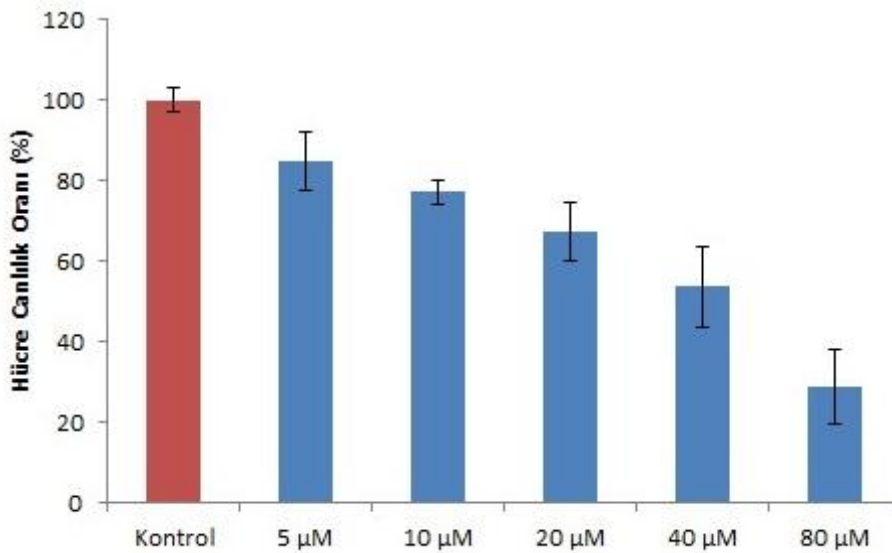
Şekil 4.1. 24 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılık oranı.



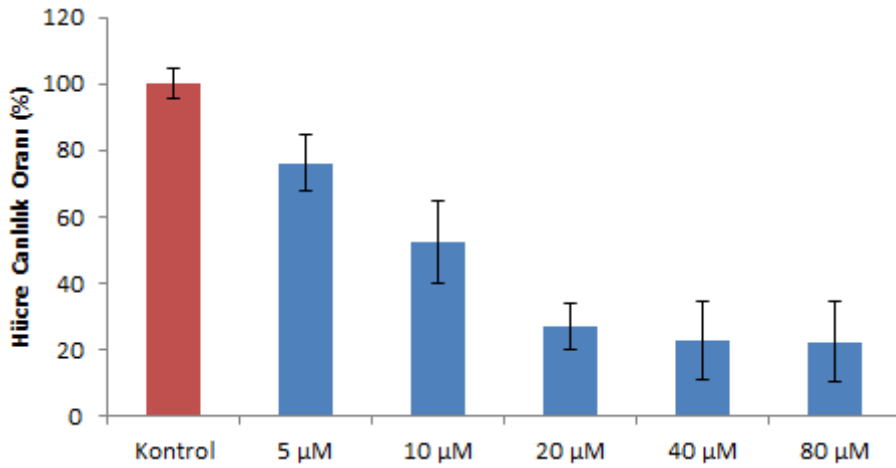
Şekil 4.2. 48 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılık oranı.

SubPc 10 maddesi için;

Kontrol grubundaki canlılık oranı % 100 olarak alındığında 24 saat sonunda 40 µM ve 80 µM madde eklenen kuyucuklardaki canlılık oranı sırasıyla % 54 ve % 29 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3). 48 saat inkübasyon sonundaki sonuçlara bakıldığında 5 µM ve 10 µM kuyucuklardaki canlılık oranları % 76 ve %52 iken bu oranın 20 µM’da birden % 27’ye düştüğü görülmektedir (Şekil 4.4). Bu durumda, 24 saatteki IC50 değeri 40 µM iken 48 saat sonundaki IC50 değeri 10 µM olarak tespit edilmiştir.



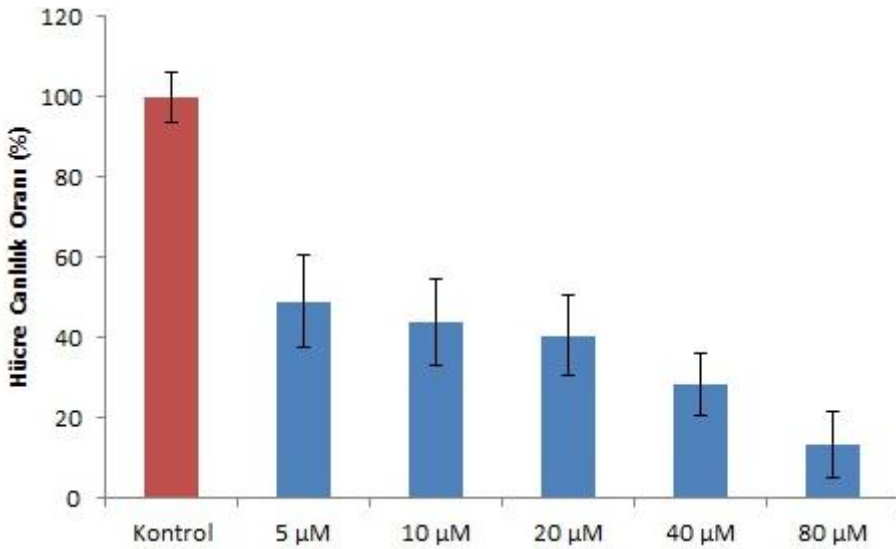
Şekil 4.3. 24 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılık oranı.



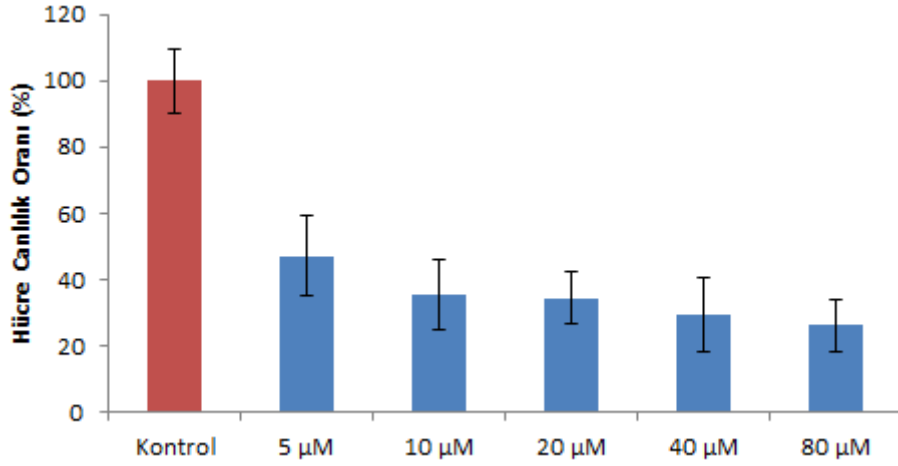
Şekil 4.4. 48 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılık oranı.

SubPc 11 maddesi için;

Kontrol grubundaki canlılık oranı % 100 olarak alındığında 24 saat inkübasyon sonunda 5 µM kuyucuklardaki canlılık oranının % 49'a düştüğü görülmüştür (Şekil 4.5). 48 saat sonunda 5 µM kuyucuklardaki canlılık oranı % 47 olarak hesaplanmıştır. Bu durumda 24 ve 48 saatlerdeki IC50 değerinin 5 µM olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. 24 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılık oranı.



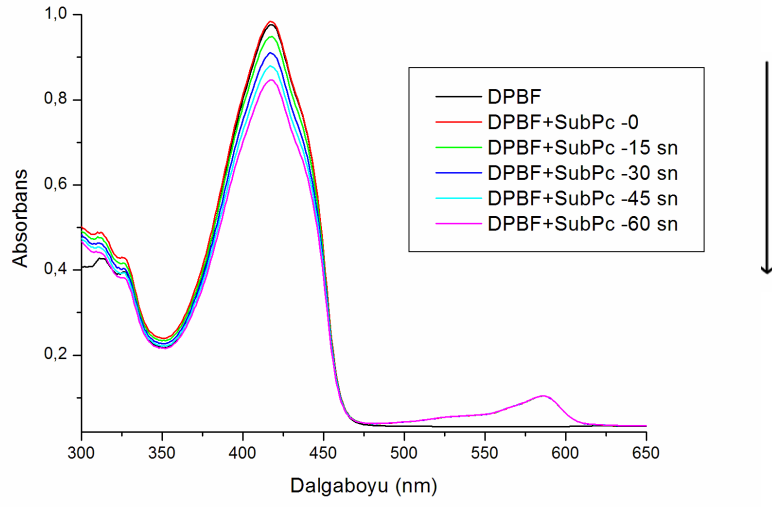
Şekil 4.6. 48 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılık oranı.

4.2. Singlet Oksijen Üretim Potansiyelleri:

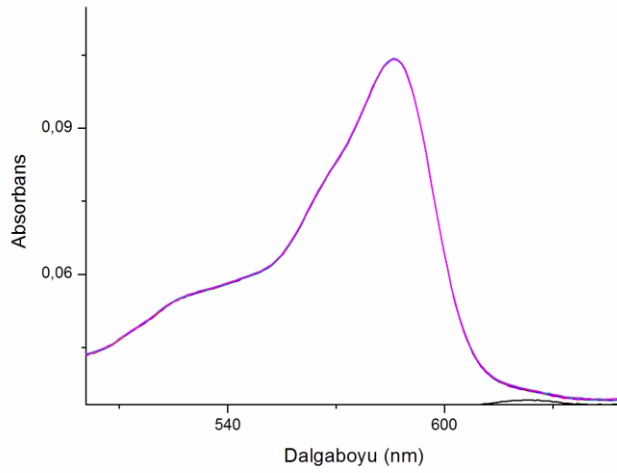
Suftalosiyenin moleküllerinin, foto dinamik terapi uygulamalarının en önemli fototoksik türü olan singlet oksijen üretim kapasiteleri, singlet oksijen için tuzak madde olarak kullanılan 1,3-difenil-iso-benzofuran molekülünün, ışık altında subftalosiyeninlerin etkisi ile absorbas değerinin azalması ile saptandı.

SubPc **9** molekülü için:

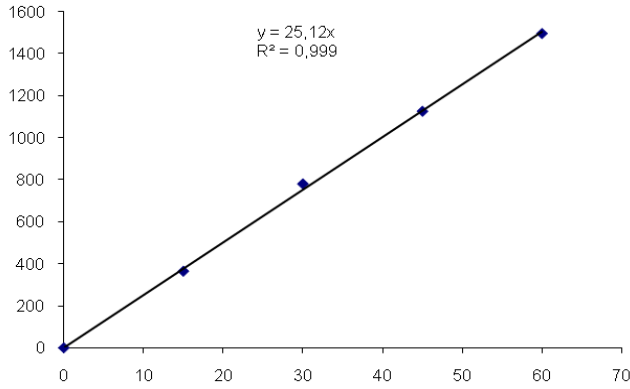
Subpc **9** molekülünün singlet oksijen üretim kapasitesi, DPBF molekülünün 419 nm deki absorbas değışiimi her 15 sn de ışıma yapılarak izlenerek tespit edildi (Şekil 4.7). Şekil 4.7 de görüldüğü gibi DPBF nin absorbas değeri ve çözeltiye SubPc ekledikten sonra karanlık ortamda (ışıma yapılmadan) hiç bir değışikliğe uğramamıştır (DPBF+SubPc-0). Başka bir deyişle, SubPc molekülü karanlıkta (ışıma yapılmadan) singlet oksijen üretmemekte ve buna bağılı olarak ta DPBF nin absorbas değeri her hangi bir değışiklik gözlenmemektedir. Öte yandan 15 sn aralıklarla yapılan ışımalar sonucunda DPBF nin absorbas değeri belirgin bir azalma gözölmüştür. Bununla birlikte DPBF absorbasında azalma olurken, singlet oksijen üretimi sağılayan SubPc molekülünün 585 nm deki absorbasında herhangi bir değışim gözlenmemiştir (Şekil 4.8). DPBF nin absorbas azalma eğilimi Şekil 4.9 da gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Işık altında DPBF nin SubPc 9 varlığında, absorbansındaki değişim grafiği.



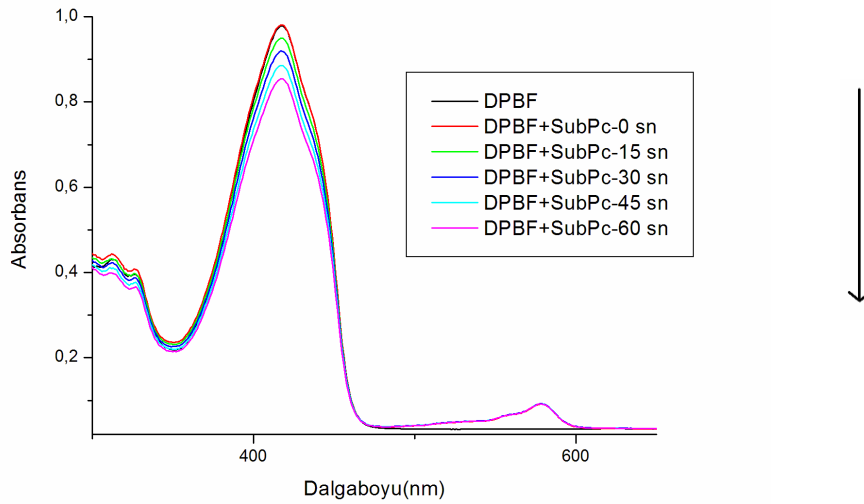
Şekil 4.8. Singlet oksijen ölçümü esnasında SubPc 9 absorbansındaki değişim grafiği.



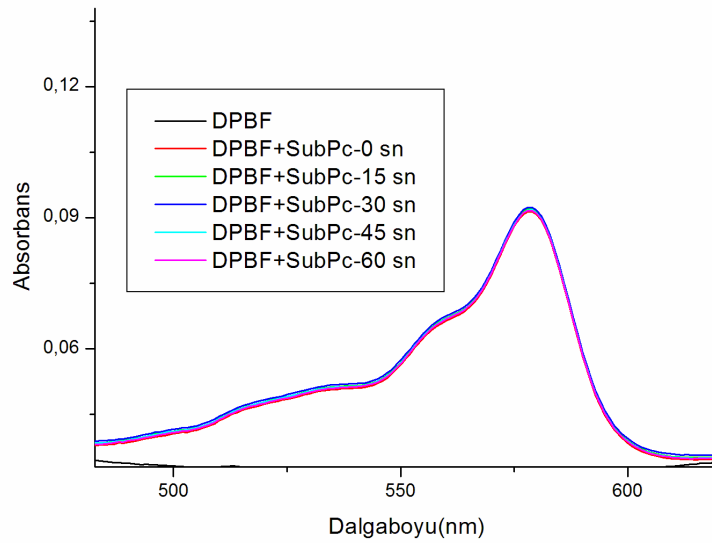
Şekil 4.9. Singlet oksijen ölçümü esnasında DPBF nin absorbans azalma eğilimi.

SubPc **10** molekülü için:

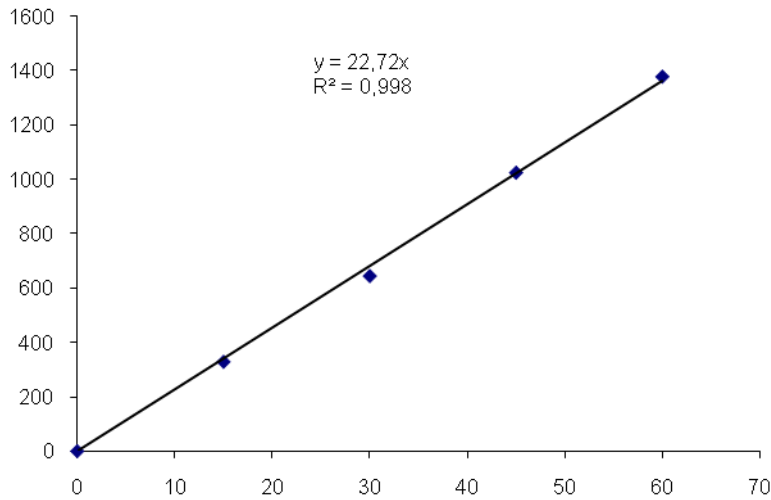
SubPc **10** molekülünün singlet oksijen üretim kapasitesi, DPBF molekülünün absorbans değerinin azalmasına bağlı olarak Şekil 4.10 da gösterilmiştir. Ölçümler her 15 sn de olmak üzere toplam 60 sn de tamamlanmış olup, DPBF molekülünün 419 nm deki absorbans değeri azalırken SubPc **10** molekülün 579 nm deki absorbansında hiç bir değişiklik gözlenmiştir (Şekil 4.11). Şekil 4.12, DPBF molekülünün absorbans değerininm SubPc varlığında ve ışık altında azalma eğilimini göstermektedir.



Şekil 4.10. Işık altında DPBF nin SubPc **10** varlığında, absorbansındaki değişim grafiği.



Şekil 4.11. Singlet oksijen ölçümü esnasında SubPc absorbansındaki değişim grafiği.

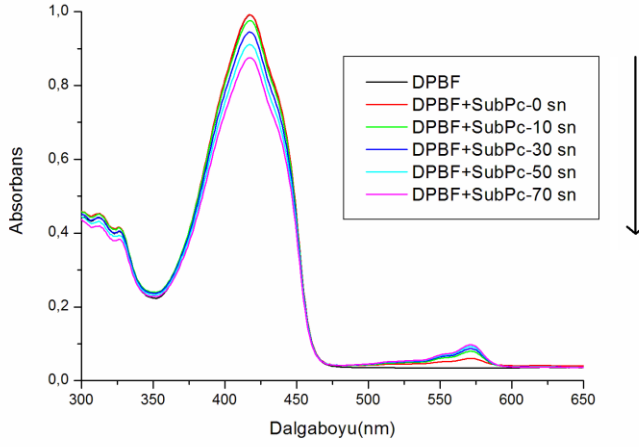


Şekil 4.12. Singlet oksijen ölçümü esnasında DPBF nin absorbans azalma eğilimi.

Subpc **11** molekülü için:

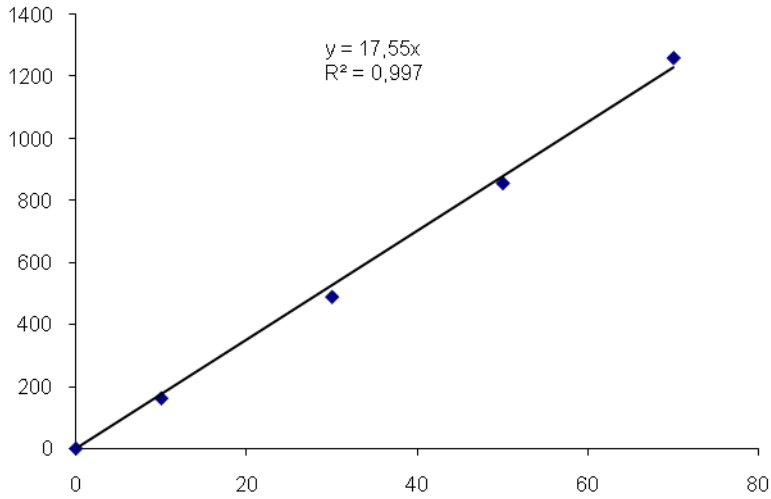
SubPc **11** molekülün singlet oksijen ölçümleri, DPBF molekülünün subftalosiyanın varlığında toplam 70 sn ışığa altında gerçekleştirilmiştir. DPBF molekülün 419 nm

deki absorbans değerindeki değişim ve absorbans değerinin azalma eğilimi sırasıyla Şekil 4.13 ve 4.14 de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Işık altında DPBF nin SubPc 11 varlığında, absorbansındaki değişim grafiği

Şekil 4.13. DPBF molekülünün absorbans değerininm SubPc varlığında ve ışık altında azalma eğilimini göstermektedir.



Şekil 4.14. Singlet oksijen ölçümü esnasında DPBF nin absorbans azalma eğilimi

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu tezde öncelikle farklı substitüe (2,6-Difenilfenoksi, 2,6-Diizopropilfenoksi, 1,1':4',1"-terfeniloksi ve 4-tert-butiltiofenoksi)-gruplar içeren ftalonitril türevleri, birkaç basamakta sentezlenmiştir. Elde edilen ftalonitril türevleri SubPc sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılmıştır. Mevcut ftalosnitril türevlerinin aksiyal ve periferel konumda bulunduğu üç farklı SubPc türevi sentezlenmiştir. Elde edilen ürünlerin yapıları UV-görünür, floresans, FT-IR, ¹H NMR ile aydınlatılarak, Sitotoksitate Analizleri ve singlet oksijen üretim kapasiteleri incelenerek, antikanser ve fotodinamik terapi uygulamalarında fotosensör potansiyelleri incelenmiştir. Bütün maddelerin 24 saatteki IC₅₀ değerlerine bakıldığında, SubPc **11** maddesinin 5 µM'lık değeri sitotoksik etkisinin diğer maddelere göre daha yüksek olduğunu görülmektedir. Bununla birlikte, SubPc **9** ve SubPc **10** maddeleri ancak 40 µM ve daha yüksek molaritelerinde efektif olabilirler. Literatürde Xu ve arkadaşları, subftalosiyeninler ile yaptıkları çalışmada sentezledikleri bileşiklerin HepG2 insan hepatokarsinoma ve HT29 insan kolon adenokarsinoma hücre hatlarında toksik etkisini incelemişlerdir. HepG2 hücre hattı için farklı sentezlerin IC₅₀ değerleri 0,23-0,02 µM arasında, HT29 hücre hattı için ise 0,46-0,02 µM konsantrasyonlar arasında olduğu belirlemişlerdir [31]. Moleküllerin singlet oksijen üretim kapasiteleri, singlet oksijen tutucu olarak kullanılan DPBF molekülünün absorbsan değerindeki azalmaya göre tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, bütün subftalosiyenin molekülleri singlet oksijen üretirken, en yüksek üretim kapasitesi, DPBF molekülün absorbsan değerindeki azalmaya bağlı olarak, %25 lik bir azalma ile SubPc **9** molekülüne aittir. Öte yandan SubPc **10** molekülü SubPc **11** molekülünden daha yüksek singlet oksijen üretim kapasitesine sahiptir. SubPc **9** ve SubPc **10** molekülleri singlet oksijen üretimi sırasında kararlı olup, absorbsanlarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. SubPc **11** molekülünde ise ölçüm esnasında absorbsan değerinde bazı değişiklikler saptanmıştır. Bu azalmanın ve SubPc **11** molekülünün singlet oksijen veriminin diğer subftalosiyeninlere kıyasla daha düşük olmasının sebebi, SubPc **11** molekülünün DMSO içindeki çözünürlüğün diğer molkeüllere kıyasla daha az olması olabilir.

Sonuç olarak, sentezlediğimiz SubPc 9, SubPc 10, SubPc 11 bileşiklerinden sitotoksik etkisi en yüksek olanı SubPc 11 olarak tespit edilirken kemoterapi uygulamalarında kullanılabilirliği düşünülmektedir. Diğer bir ölçüm olan singlet oksijen üretim kapasitesi en fazla SubPc 9 molekülünde gözlenmiştir. Bu sonuç sentezlenen yeni moleküllerin singlet oksijen üretim kapasitesine sahip olduğunu ve fotodinamik terapi uygulamalarında fotosensör olarak kullanılabilme potansiyelini ortaya koymuştur. Bununla birlikte bileşiklerin antikanser potansiyeli, apoptatik etkilerine bakılarak ve singlet oksijen kuantum verimleri daha sonraki çalışmalar ile tespit edilecektir.

KAYNAKLAR

- [1] Bekaroglu, Ö., “Suprasüper Moleküller ve Bir Bilim Adamı”, Bilim ve Teknik Dergisi Mayıs, 2001
- [2] Meller, A., Ossko, A., “Phthalocyaninartige Bor-Komplexe”, Monatsh. Chem., 103, 150, (1972).
- [3] Del Rey, B., Keller, U., Torres, T., Rojo, G., Agullo-Lopez, F., Nonell, S., Marti, C., Brasselet, S., Ledoux, I., Zyss, J., “Synthesis and Nonlinear Optical, Photophysical, and Electrochemical Properties of Subphthalocyanines”, J. Am. Chem. Soc., 120, 12808, (1998).
- [4] Claessens, C. G., Torres, T., “Phthalocyanines: The Need for Selective Synthetic Approaches”, Chem. Eur. J., 6, 2168, (2000).
- [5] Claessens, C. G., Gonzalez-Rodriguez, D., Torres, T., “Subphthalocyanines: Singular nonplanar aromatic compounds-synthesis, reactivity, and physical properties”, Chem. Rev., 102, 835, (2002).
- [6] Torres, T., “From Subphthalocyanines to Subporphyrins”, Angew. Chem., 118, 2900, (2006).
- [7] Gonzalez-Rodriguez, D., Torres, T., Guldi, D. M., Rivera, J., Echegoyen, L., “Energy transfer processes in novel subphthalocyanine-fullerene ensembles”, Org. Lett., 4, 335, (2002).
- [8] Claessens, C. G., Torres, T., “Inclusion of C₆₀ fullerene in a M3L2 subphthalocyanine cage”, Chem. Commun., 1298, (2004).
- [9] Gonzalez-Rodriguez, D., Torres, T., Guldi, D. M., Rivera, J., Herranz, M. A., Echegoyen, L., “Subphthalocyanines: tuneable molecular scaffolds for intramolecular electron and energy transfer processes”, J. Am. Chem. Soc., 126, 6301, (2004).
- [10] Gonzalez-Rodriguez, D., Claessens, C. G., Torres, T., Liu, S., Echegoyen, L., Vila, N., Nonell, S. “Activating multistep charge-transfer processes in fullerene-subphthalocyanine-ferrocene molecular hybrids as a function of π - π orbital overlap”, Chem. Eur. J., 11, 3881, (2005).

- [11] Iglesias, R. S., Claessens, C. G., Torres, T., Rahman, G. M., Guldi, D. M. “Synthesis and photophysical characterization of a subphthalocyanine fused dimer-C60 dyad”, *Chem. Commun.*, 2113, (2005).
- [12] Medina, A., Claessens, C. G., Rahman, G. M. A., Lamsabhi, A. M., Mo, O., Yanez, M., Guldi, D. M., Torres, T., “Accelerating charge transfer in a triphenylamine-subphthalocyanine donor-acceptor system”, *Chem. Commun.*, 1759, (2008).
- [13] Gonzalez-Rodriguez, D., Carbonell, E., De Miguel Rojas, G., Atienza Castellanos, C., Guldi, D. M., Torres, T. “Activating Multistep Charge-Transfer Processes in Fullerene–Subphthalocyanine–Ferrocene Molecular Hybrids as a Function of π – π Orbital Overlap”, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 16488, (2010).
- [14] Claessens, G. C., Rodryguez, G. D., Torres, T., “Subphthalocyanines: Singular Nonplanar Aromatic Compoundssynthesis, Reactivity, and Physical Properties”, *Chem. Rev.*; 102, 835-853, (2002)
- [15] Okumura, O. E., Sakamoto, K., Kato, T., Hatano, T., Fukui, K., Karatsu, T., Kitamura, A., Urano, T., “Synthesis of subphthalocyanine derivatives and their Characterization”, *Dyes and Pigments*; 53, 57–65, (2002).
- [16] Brown, S. “Photodynamic therapy: two photons are better than one”, *Nat. Photonics*, 2, 394–395, (2008).
- [17] R. K. Pandey, “Recent advances in photodynamic therapy,” *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 4, 368–373, (2000).
- [18] J. F. Lovell, T. W. B. Liu, J. Chen, and G. Zheng, “Activatable photosensitizers for imaging and therapy,” *Chemical Reviews*, 110(5), 2839–2857, (2010).
- [19] R. Bonnett and G.Mart´inez, “Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy,” *Tetrahedron*, 57(47), 9513– 9547,(2001).
- [20] Spesia, M. B., Durantini, E. N., “Synthesis, properties and photodynamic inactivation of Escherichia coli by novel cationic fullerene C60 derivatives”, *Dyes and Pigments*, 77, 1, 229-237, (2008).

- [21] Ince, M., SEVEN, O., Dindar, B., “Synthesis, Characterization and the Photodynamic Activity against Some Gram Negative and Positive Bacteria of Novel Subphthalocyanine Derivative”, *GU J Sci.*, 26, 1-10, (2013).
- [22] Jia, X., Yang, F-F., Li, J., Liu, J-Y., Xue, J-P. J. “Synthesis and in vitro photodynamic activity of oligomeric ethylene glycol-quinoline substituted zinc(II) phthalocyanine derivatives”, *Med. Chem.*, 56, 5797–5805. (2013)
- [23] Liu, J. Y., Lo, P. C., Fong, W. P., Ng, D. K. P., “Effects of the number and position of the substituents on the in vitro photodynamic activities of glucosylated zinc(II) phthalocyanines”, *Org. Biomol. Chem.*, 7, 1583–1591. (2009)
- [24] S. Mori, M. Nagata, Y. Nakahata, K. Yasuta, R. Goto, M. Kimura, M. Taya, “Enhancement of incident photon-to-current conversion efficiency for phthalocyanine-sensitized solar cells by 3D molecular structuralization”, *J. Am. Soc.*, 132, 4054. (2010)
- [25] A. Tuhl, W. Chidawanayika, H. M. Ibrahim, N. Al-Awadi, C. Litwinski, T. Nyokong, H. Behbehani, H. Manaa, S. Makhseed, “Tetra and octa(2,6-di-isopropylphenoxy)-substituted phthalocyanines: a comparative study among their photophysicochemical properties”, *J. Porphyrins Phthalocyanines*; 16: 170–174. (2012)
- [26] A. Sastre, B. del Rey, T. Torres, “Synthesis of novel unsymmetrically substituted push-pull Phthalocyanines”, *J. Org. Chem.*, 61, 8591-8597. (1996)
- [27] H. Xu, X-J. Jiang, E. Y. M. Chan, W-P. Fong, Ng D. K. P. Synthesis, photophysical properties and in vitro photodynamic activity of axially substituted subphthalocyanines. *Org. Biomol. Chem.*, 5, 3987–3992. (2007)
- [28] D. Nowis, T. Stoklosa, M. Legat, T. Issat, M. Jakobisiak, J. Golab, “The influence of photodynamic therapy on the immune response”, *Photodiag. Photodyn. Ther.* 2, 283–298. (2005)
- [29] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich, Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects, *Laser. Med. Sci.* 1, 1–15. (2008)

- [30] C.L. Roland, A.H. Harken, M.G. Sarr, C.C. Barnett, Evidence-based surgical hypothesis: ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer, *J. Surg.* 141 705–707. (2007)
- [31] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamictherapy: part three–photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction, *Photodiag. Photodyn. Ther.* 291 106. (2005)
- [32] F.S. De Rosa, M.V.L.B. Bentley, Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives, *Pharm. Res.* 17, 1447–1455. (2000)
- [33] C.A. Robertson, D. Hawkins Evans, H. Abrahamse, Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96, 1–8, (2009).

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Ersan HARPUTLU

Doğum Tarihi: 03/08/1981

Öğrenim Durumu: Yüksek lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Fen Bilimleri	Amasya lisesi-Kütahya Kılıçaslan Lisesi	1995-1998
Lisans	Fen Fak./Fizik	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	2001-2008
Yüksek Lisans	Fen Fak./ Fizik	Mersin Üniversitesi	2011-2013
Yüksek Lisans	Fen Bilimleri Enst. / Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler ABD	Mersin Üniversitesi	2013-2014

(Varsa) Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş.Gör.	Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler ABD	2013-

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

Makaleler

1. Kasim Ocakoglu, K. S. Joya, Ersan Harputlu, Anna Tarnowska, Daniel T. Gryko. 2014. Nanoscale bio-inspired light-harvesting system develop from self-assembled alkyl-functionalized metallochlorins nano-aggregates. Nanoscale, 6, 9625-9631

2. Kasım Ocakoglu, Tomasz Krupnik, Bart van den Bosch, Ersan Harputlu, Maria Pia Gullo, Julian David Janna Olmos, Saadet Yıldırımcan, Ram K. Gupta, Fahrettin Yakuphanoglu, Andrea Barbieri, Joost N. Reek, and Joanna Kargul. 2014. Photosystem I-based Biophotovoltaics on Nanostructured Hematite. *Adv. Funct. Mater.*, DOI: 10.1002/adfm.20140139
3. Engin Kaplan, Tuncan İnce, Esra Yorulmaz, Fadile Yener, Ersan Harputlu, Nelisa Lacin Turkoglu. 2014. Controlled Delivery of Ampicillin and Gentamycin from Cellulose Hydrogels and Their Antibacterial Efficiency. *JOURNAL OF BIOMATERIALS AND TISSUE ENGINEERING*. Volume: 4 Issue: 7 Pages: 543-549, DOI: 10.1166/jbt.2014.1198
4. Kasım Ocakoglu, Ersan Harputlu, Pinar Guloglu, Pinar, Sule Erten-Ela. 2012. Design and synthesis of heteroleptic ruthenium (II) complexes and their applications in nanocrystalline TiO₂ solar cells. *Inorganic Chemistry Communications*, 24, 118-124, DOI:10.1016/j.inoche.2012.08.006
5. Kasım Ocakoglu, Ersan Harutlu, Pinar Guloglu, Sule Ertan-Ela. 2012. The photovoltaic performance of new ruthenium complexes in DSSCs based on nanorod ZnO electrode. *SYNTHETIC METALS* 162, 23, 2125-2133. DOI: 10.1016/j.synthmet.2012.10.006

Bildiriler

1. Joanna Kargul, Krupnik, Julian David Janna Olmos, Bart van den Bosch, Vincent Friebe, Ersan Harputlu, Maria Pia Gullo, Saadet Yıldırımcan, Raoul Frese, Andrea Barbieri, Joost N. Reek and Kasım Ocakoğlu. Application of highly robust photosystem I from extremophilic red microalgae in artificial, photosynthesis nanodevices. *ESF EUROSOLARFUELS Network meeting*, vol. 1, 23, Nisan 12-15, 2014, Passau Germany (Almanya)
2. Kasım Ocakoğlu, Ersan Harputlu, Saadet Yıldırımcan, Süleyman Gökhan Çolak. Strategies for responsive matrix desing: biomolecule immobilization

- on electrode surfaces. ESF EURO SOLAR FUELS Network meeting, vol. 1, 25, Nisan 12-15 2014, Passau Germany (Almanya).
3. Tomasz Krupnik, Joanna Kargul, Julian David Janna Olmos, Bart van den Bosch, Ersan Harputlu, Saadet Yıldırımcan, Joost N. Reek and Kasım Ocakoğlu. Characterization and modification of highly stable and photosystem I from *Cyanidioschyzon merolae*, suitable for implementation into a Solar to Fuel nano device. ESF EUROSOLARFUELS Network meeting, vol. 1, 35, Nisan 12-15 2014, Passau Germany (Almanya).
 4. Suleyman Gokhan Çolak, Fatma Aslihan Senzeybek, Ersan Harputlu, Saadet Yıldırımcan, Abdulcelil Yuzer, Mine Ince, Kasim Ocakoglu. Novel Unsymmetrical Zn-Phthalocyanines; Synthesis, Characterization and Surface Organization for Optoelectronic Applications. INTERNATIONAL WORKSHOP ON FLEXIBLE BIO- AND ORGANIC PRINTED ELECTRONICS May 1-3, 2014 Konya/TURKIYE
 5. Kasim Ocakoglu, Ersan Harputlu, Anna Tarnowska, Saadet Yildirimcan, Suleyman Gokhan Colak a, Khurram S. Joya d, and Daniel T. Gryko. Biomimetic light-harvesting system develop from metallochlorins nano-aggregates inside alkyl-functionalized nano-channels materials. Eighth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-8) June 22-27, 2014 Istanbul, TÜRKİYE
 6. Ersan Harputlu, Mine Ince, Suleyman Gökhan Colak, Fatma AslihanSenzeybek, Kasim Ocakoglu. Investigation of Surface Behaviors of Chlorosomal RodSelf-Aggregates. Eighth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-8) June 22-27, 2014 Istanbul, TÜRKİYE
 7. Olena Vakuliuk, Kasim Ocakoglu, Khurram S. Joyad, Ersan Harputlu, Anna Tarnowsk and Daniel T. Gryko. Biomimetic Metallochlorens as Heart of Artificial Photosynthetic DeviceEighth International Conference on

Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-8) June 22-27, 2014 Istanbul, TURKIYE

8. Kasim Ocakoglu, Ersan Harputlu, Evgeny Ostroumov, Chavdar Slavov, Alfred R. Holzwarth. A bio-inspired light-harvesting system derived from self-assembled metallochlorins inside nanochannels. Solar Energy For World Peace Congress / August 17-19 2013. İstanbul/ TÜRKİYE
9. Kasim Ocakoglu, Sule Erten Ela, Khurram Saleem Joya, Ersan Harputlu. Bio-inspired Zinc Chlorins for Dye Sensitized Solar Cells Solar Energy For World Peace Congress / August 17-19. İstanbul / TÜRKİYE
10. Kasim Ocakoglu, Ersan Harputlu, Anna Tarnowska, Daniel T. Gryko. Investigation of Physical Properties of Self-assembled Zinc chlorin Nanorods Suitable for Artificial Light-Harvesting Materials. Solar Energy For World Peace Congress / August 17-19 2013. İstanbul / TÜRKİYE
11. Kasim Ocakoglu, Joanna Kargul, Tomasz Krupnik, Ersan Harputlu, Saadet Yildirimcan, Fahrettin Yakuphanoglu. Photosystem I-based biophotovoltaics on nanostructured hematite. Solar Energy For World Peace Congress / August 17-19 2013. İstanbul / TÜRKİYE