

Esra AYAN

**BİOMOLEKÜL BAĞLI PORFİRİNLERİN SENTEZLENMESİ
VE
LİPOZOM İÇERİSİNE YERLEŞTİRİLMESİ**

**Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Esra AYAN

Haziran 2011

Haziran 2011

**BIOMOLEKÜL BAĞLI PORFİRİNLERİN SENTEZLENMESİ
VE LİPOZOM İÇERİSİNE YERLEŞTİRİLMESİ**

Esra AYAN

Kimya Bölümü

Haziran 2011
İstanbul, Türkiye

ONAYLAMA SAYFASI

Bu tezin şekil ve içerik açısından Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tez Yazım Kılavuzunda belirtilen kurallara uygun formatta yazıldığını onaylıyorum.

Prof. Dr. Cevdet NERGİZ
Anabilim Dalı Başkanı

Kimya Anabilim Dalı 50220911 numaralı öğrencisi Esra AYAN tarafından hazırlanan bu tezin Yüksek Lisans Tezinde bulunması gereken yeterliliğe, kapsama ve niteliğe sahip olduğunu onaylıyorum.

Yrd. Doç. Dr. Ramazan ÖZTÜRK
Tez Danışmanı

Tez Sınavı Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Ramazan ÖZTÜRK

Yrd. Doç. Dr. Burak ESAT

Yrd. Doç. Dr. Sevim IŞIK

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tez Yazım Kılavuzunda belirtilen kurallara uygun formatta yazıldığını onaylıyorum.

Doç. Dr. Nurullah ARSLAN
Müdür

Haziran 2011

**BIOMOLEKÜL BAĞLI PORFİRİNLERİN SENTEZLENMESİ
VE
LİPOZOM İÇERİSİNE YERLEŞTİRİLMESİ**

Esra AYAN

Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2011

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ramazan ÖZTÜRK

ÖZET

Fotodinamik Terapi (PDT)'de fotosensitizör (PS) olarak kullanılmak üzere meso-tetra (4-karboksifenil) porfirin (TCPP), Protoporfirin IX (PPIX) moleküllerine biyoaktif gruplar olan; 2-amino-N-oktil propan amit(Oktil Ala), histidin metil ester ve - α,γ -Didesil glutamat ester bağlanarak; PPIX Oktil Ala, TCPP-Oktil Ala, TCPP-Metilhistidin ester, PPIX- α,γ -Didesil Glutamat Ester (PPIX-Glu) molekülleri sentezlenerek, $^1\text{H-NMR}$, FT-IR ve UV-Vis. spektroskopi teknikleri ile karakterizasyonları yapıldı. Hidrasyon-Film metodu ile DPPC (Dipalmitoyil-sn-gliserofosfatidilkolin) ve DOPC (Dioleyil-sn-gliserofosfatidilkolin) fosfolipitleri kullanılarak porfirinlerin lipozomları hazırlandı. Hazırlanan lipozomların UV-vis, DLS, Zeta-potansiyel ve SEM karakterizasyonları yapıldı.

Anahtar kelimeler: Fotodinamik Terapi, fotosensitizör, porfirin, lipozom.

SYNTHESIS OF BIOMOLECULE ATTACHED PORPHYRINS AND THEIR INCORPORATION INTO LIPOSOMES

Esra AYAN

M.S.Thesis-Chemistry Department
June 2011

Supervisor: Yrd. Doç. Ramazan ÖZTÜRK

ABSTRACT

In this study, meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphine (TCPP) and Protoporphyrin IX (PPIX) molecules were conjugated with bioactive groups of 2-amino-N-octyl propane amide (Octyl Ala), methyl histidine ester, α,γ -Didecyl glutamat ester to get PPIX-Octyl Ala, TCPP- Octyl Ala, TCPP-Methyl histidine ester, PPIX- α,γ -Didecyl glutamat ester (PPIX-Glu) molecules. The structures of porphyrine derivatives were characterized by ^1H NMR, Uv-Vis, FT-IR. The bioactivated porphyrins were encapsulated into DPPC (Dipalmitoyl-sn-glycerophosphatidylcholine) and DOPC (Dioleoyl-sn- glycerophosphatidylcholine) liposomes by Hydration-Film method and they were characterized by UV-Vis, DLS, Zeta Potential and SEM.

Keywords: Protodynamic Therapy (PDT), photosentizer (PS), porphyrin, liposome.

İTHAF

EZ ZOR ANLARIMDA YANIMDA OLAN BENDEN

İLGİ VE SABIRLARINI ESİRGEMEYEN

SEVGİLİ ANNEME VE BABAMA...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince verdiği bilgi, yaptığı yönlendirme ve her türlü yardımlarıyla tez çalışmamın bu seviyeye gelmesinde büyük emeği olan danışman hocam sayın Yrd. Doç. Ramazan Öztürk'e teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve becerilerini benimle paylaşan ve her türlü yardımlarından dolayı arkadaşım Emine Temizel'e çok teşekkür ederim.

Kimya Bölümündeki değerli arkadaşlarım Hilal DOĞAN, Fatime EREN, Şeyda GÖLCÜK, Hamide AYDIN, Ayşe ASLAN'a ve adını sayamadığım bütün arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerinden dolayı başta ANNEM ve BABAM olmak üzere kardeşlerime; Fethi, Yasemin ve Hülya'ya çok minnettarım. Ayrıca yüksek lisans öğrenimim boyunca anlayış ve desteğini esirgemeyen nişanlım Hüseyin ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İTHAF.....	v
TEŞEKKÜR SAYFASI.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
KISALTMALAR VE SEMBOLLER LİSTESİ.....	xiv
BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2 PORFİRİNLER.....	3
2.1 Porfirinlerin Tanımı ve Genel Yapısı.....	3
2.2 Porfirinlerin Genel Özellikleri.....	5
2.3 Biyoaktif Molekül Bağlı Porfirinler.....	6
BÖLÜM 3 FOTODİNAMİK TERAPİ.....	8
3.1 Fotodinamik Terapi.....	8
3.2 Fotodinamik Terapi ile Tedavi.....	8
3.3 Fotodinamik Terapide Fotokimyasal Olaylar.....	10
3.4 Fotosensitizörler.....	10
3.5 Fotodinamik Terapide Işık ve Dalga Boyu.....	12
3.6 Fotodinamik Terapinin Etkin Mekanizması.....	13
3.6.1 Tip I Reaksiyonları.....	14
3.6.2 Tip II Reaksiyonları.....	14
3.7 Fotodinamik Terapide Oksijen Oluşumu.....	14
3.8 Fotodinamik Terapinin Tümör Seçiciliği.....	15
BÖLÜM 4 LİPOZOMLAR.....	16
4.1 Lipozomların Tanımı ve Genel Yapısı.....	16
4.2 Lipozomların Sınıflandırılması.....	18
4.3 Lipozomların Hazırlanmasında Kullanılan Fosfolipidler.....	18

4.4 Fosfolipidlerin Özerlikleri.....	21
4.5 Lipozomların Hazırlanması.....	21
4.5.1 Çok Tabakalı Lipozomların ('Multilamellar Vesicle', MLV) Hazırlanması	21
4.5.2 Küçük Tek Tabakalı Lipozomlar ('Small unilamellar vesicles', SUV) ...	21
4.5.3 Büyük Tek Tabakalı Lipozomlar ('Large unilamellar vesicles', LUV) ...	22
4.5.4 Ters Faz Buharlaştırma Yöntemi ile Hazırlanan Lipozomlar	22
4.6 Lipozomların Karakterizasyonları	22
4.6.1 Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayini	22
4.6.2 Lipozomların Şekillerinin Belirlenmesi	23
4.6.3 Lipozomların Yüklerinin Belirlenmesi	23
4.7 Lipozomların Kullanım Alanları.....	24
4.8 Lipozomların Diğer İlaç Salınım Sistemlerine Üstünlükleri	25
4.9 Lipozomlar ile Hücreler Arasındaki Etkileşim Çeşitleri.....	25
BÖLÜM 5 DENEYSEL KISIM.....	26
5.1 Kimyasallar	26
5.2 Cihazlar	26
5.3 Biomolekül Bağlı Porfirinlerin Sentezlenmesi	27
5.3.1 Oktil Alanin Yapısının Sentezlenmesi	27
5.3.2 ProtoporfirinIX -Oktil Alanin Yapısının Sentezlenmesi (PPIX-Oktil Ala).	28
5.3.3 Meso-tetra(4karboksifenil)porfin-Oktil Ala Yapısının Sentezlenmesi (TCPP-Oktil- Ala)	30
5.3.4 Meso-tetra(4karboksifenil)porfin-Metil Histidin Ester Yapısının Sentezlenmesi (TCPP-His)	32
5.3.5 α,γ -Didesil Glutamat Ester Sentezi	34
5.3.6 ProtoporfirinIX- α,γ -Didesil Glutamat Ester Yapısının Sentezlenmesi) ...	34
5.4 Sentezlenen Porfirinlerin Lipozomlarının Hazırlanması	36
5.4.1 Materyal ve Metod	36
5.4.2 PPIX- Oktil Ala-DOPC Lipozomunun Hazırlanışı.....	37
5.4.3 PPIX- Oktil Ala DPPC Lipozomunun Hazırlanışı.....	38
5.4.4 TCPP-Oktil Ala DPPC Lipozomunun Hazırlanışı.....	39
5.4.5 TCPP-His -DOPC Lipozomunun Hazırlanışı.....	39
5.4.6 PPIX- Glu - DOPC Lipozomunun Hazırlanışı.....	40

5.4.7 PPIX- Glu - DPPC Lipozomunun Hazırlanışı.....	41
BÖLÜM 6 BULGULAR VE TARTIŞMA	42
6.1 Biomolekül Bağlı Porfirinlerin Karakterizasyonu	42
6.1.1 Protoporfirin IX Oktil-Alanin (PPIX- Oktil-Ala)	42
6.1.2 Meso-tetra(4karboksifenil)porfin-OktilAla (TCPP-Oktil-Ala)	45
6.1.3 Mesotetra(4karboksifenil)Porfin-Metil Histidin Ester (TCPP-His)	48
6.1.4 ProtoporfirinIX- α,γ -Didesill Glutamat Ester (PPIX-Glu)	51
6.2 LİPOZOMLAR.....	54
6.2.1 PPIX-Oktil Ala -DOPC Lipozomu	55
6.2.2 PPIX-Oktil Ala -DPPC Lipozomu	57
6.2.3 TCPP-Oktil Ala -DPPC Lipozomu	58
6.2.4 TCPP-His–DOPC Lipozomu	60
6.2.5 PPIX-Glu-DOPC Lipozomu	61
6.2.6 PPIX-Glu-DPPC Lipozomu.....	64
BÖLÜM 7 SONUÇ	67
REFERANSLAR	69
EK 1 PPIX-Oktil Ala molekülüne ait FT-IR spektrumu.....	72
EK 2 PPIX-Oktil Ala molekülünün UV-Vis Spektrumu	73
EK 3 PPIX-Oktil Ala molekülünün ^1H NMR Spektrumu.....	74
EK 4 TCPP- Oktil Ala molekülüne ait FT-IR spektrumu	75
EK 5 TCPP-Oktil Ala molekülünün UV-Vis Spektrumu.....	76
EK 6 PPIX-Oktil Ala molekülünün ^1H NMR Spektrumu.....	77
EK 7 TCPP-His molekülüne ait FT-IR spektrumu.....	78
EK 8 TCPP-His molekülünün UV-Vis Spektrumu	79
EK 9 TCPP-His molekülünün ^1H NMR Spektrumu	80
EK 10 PPIX-Glu molekülüne ait FT-IR spektrumu	81
EK 11 PPIX-Glu molekülünün UV-Vis Spektrumu	82
EK 12 PPIX-Glu molekülünün ^1H NMR Spektrumu.....	83
EK 13 PPIX-Glu molekülünün Kütle Spektrumu	84

ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL

2.1 ProtoporfirinIX molekülünün yapısı.....	3
2.2 a) Hemoglobin yapısındaki Demir-Heme grubu	
b) Klorofil yapısındaki Mg - porfirin.....	5
2.3 ProtoporfirinIX molekülüne ait UV-Vis Spektrumu	6
2.4 V. Serra ve arkadaşlarının sentezlediği porfirin türevleri.....	7
3.1 PDT Yöntemiyle Tedavinin Şematik Diagramı.....	9
3.2 Meso-tetra-hidroksifenil-klorin (mTHPC) yapısı.....	11
3.3 Verteporfirin (Visudin) yapısı	12
3.4 Fotodinamik Terapinin Etkin Mekanizması (R. M. Jon 1996)	13
4.1 Lipozom oluşumu ve yapısı	17
4.2 Hücre zarı ile lipozom etkileşimi.....	17
4.3 Bazı fosfolipidlerin yapısı.....	19
4.4: Porfirin içeren lipozomların SEM görüntüsü	23
4.5 Lipozomlar ile hücreler arasındaki farklı etkileşim çeşitleri	25
5.1 N-Oktil Alanin yapısı.....	27
5.2 Protoporfirin IX-Oktil Ala molekülünün sentez reaksiyonu (PPIX-Oktil Ala)	29
5.3 meso-tetra (4 karboksifenil)porfin-Oktil Ala molekülünün sentez reaksiyonu (TCPP-Oktil Ala)	31
5.4 meso-tetra(4 karboksifenil)porfin-Metil histidin ester molekülünün reaksiyonu (TCPP-His)	33
5.5 α,γ -Didesil Glutamat Ester yapısı	34
5.6 ProtoporfirinIX- α,γ -Didesil Glutamat Ester molekülünün reaksiyonu (PPIX-Glu)	35
5.7 ProtoporfirinIX-Oktil Ala ve DOPC yapısı	38

5.8 PPIX-Oktil Ala ve DPPC yapısı	38
5.9 TCPP-Oktil Ala ve DPPC yapısı	39
5.10 TCPP-His ve DOPC yapısı	40
5.11 PPIX-Glu ve DOPC yapısı	40
5.12 PPIX-Glu ve DPPC yapısı	41
6.1 Protoporfirin-Oktil-Ala	42
6.2 PPIX Oktil-Ala molekülüne ait FT-IR spektrumu.....	43
6.3 a) PPIX molekülünün (DMSO içerisinde) b) PPIX-Oktil-Ala molekülünün (CHCl ₃ içinde) UV-Vis Spektrumu	44
6.4 Meso-tetra(4karboksifenil)porfin-Oktil Ala	45
6.5 TCPP-Oktil-Ala molekülüne ait FT-IR spektrumu	46
6.6 a) TCPP molekülünün (DMSO içerisinde) b) TCPP-Oktil Ala molekülünün (CHCl ₃ içinde) UV-Vis Spektrumu	47
6.7 Mesotetra(4karboksifenil)porfin-Metil histidin ester	48
6.8 TCPP-His bileşiğine ait FT-IR spektrumu.....	49
6.9 a) TCPP molekülünün (DMSO içerisinde) n b) TCPP-His molekülünün (CHCl ₃ içerisinde) UV-Vis Spektrumu	50
6.10 ProtoporfirinIX- α,γ -Didecyl Glutamat Ester	51
6.11 PPIX-Glu molekülüne ait FT -IR spektrumu.....	52
6.12 a) PPIX molekülünün(DMSO içerisinde) b) PPIX-Glu molekülünün (CHCl ₃ içerisinde) UV-Visible Spektrumu.	53
6.13 PPIX-Glu molekülünün Kütle spektrumu.....	54
6.14 PPIX-Oktil Ala molekülünün DOPC lipozomu içerisine alınması	55
6.15 PPIX- Oktil Ala -DOPC Lipozomunun UV – Vis Spektrumu	56
6.16 PPIX- Oktil Ala -DOPC Lipozomunun DLS Grafiği	56
6.17 PPIX-Oktil Ala molekülünün DPPC lipozomu içerisine alınması	56
6.18 PPIX- Oktil Ala -DPPC Lipozomunun UV–Vis Spektrumu.....	57
6.19 PPIX- Oktil Ala -DPPC Lipozomunun DLS Grafiği.....	57
6.20 TCPP-Oktil Ala molekülünün DPPC lipozomu içerisine alınması	58
6.21 TCPP-Oktil Ala-DPPC Lipozomunun UV–Vis Spektrumu	58
6.22 TCPP-Oktil Ala-DPPC Lipozomunun DLS Grafiği.....	59
6.23 TCPP-His molekülünün DOPC lipozomu içerisine alınması	59
6.24 TCPP-His-DOPC Lipozomunun UV–Vis Spektrumu.....	60
6.25 TCPP-His-DOPC Lipozomunun DLS Grafiği	60

6.26 PPIX-Glu molekülünün DOPC lipozomu içerisine alınması	61
6.27 PPIX-Glu-DOPC Lipozomunun UV-Vis Spektrumu	61
6.28 PPIX-Glu-DOPC Lipozomunun DLS Grafiği	62
6.29 PPIX-Glu-DOPC Lipozomuna ait SEM fotoğrafları	62
6.30 PPIX-Glu molekülünün DPPC lipozomu içerisine alınması	63
6.31 PPIX-Glu-DPPC Lipozomunun UV-Vis Spektrumu	64
6.32 PPIX-Glu-DPPC Lipozomunun DLS Grafiği	64
6.33 PPIX-Glu-DPPC Lipozomuna ait SEM fotoğrafları	65

ÇİZELGE DİZİNİ

ÇİZELGE

4.1 Lipozom oluşturmak için kullanılan fosfolipidlerin özellikleri	20
5.1 Hazırlanan lipozomlar ve bunların hazırlanış koşulları	37
6.1 Hazırlanan lipozomların özellikleri.....	55

KISALTMALAR VE SEMBOLLER

SEMBOL/KISALTMA

- DCC : N,N¹-disikloheksilkarbondiimit
DLS : Dinamik ışık saçılımı
DMF : Dimetilformamit
DMSO : dimetilsülfoksit
DOPC : Dioleyil-sn-gliserofosfatidilkolin
DPPC : Dipalmitoyil-sn-gliserofosfatidilkolin
E.R : Endoplazmik retikulum
FT-IR : Fourier transform infrared spektroskopi
Glu : α,γ -Didesil Glutamat
His : Metil histidin ester
LDL : Düşük yoğunluklu lipoprotein
LUV : Büyük tek tabakalı lipozom
MLV : Çok tabakalı lipoom
nm : Nanometre
NMR : Nükleer manyetik rezonans
Oktil Ala : 2 amino -N- oktil propanamid
PBS : Fosfat tampon çözeltisi
PC : Fosfatidilkolin
PDT : Fotodinamik Terapi
PE : Fosfatidiletanolamin
PI : Fosfatidilinozitol
PPIX : Protoporfirin IX
PS : Fosfatidilserin
PS : Fotosensitizör

ROS : Reaktif oksijen türü

SEM : Taramalı elektron mikroskopisi

SUV : Küçük tek tabakalı lipozom

TCPP : meso-tetra(4-karboksifenil)porfin

UV-vis. : Ultraviyole görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi

λ_{\max} : Maksimum absorbans değeri

BÖLÜM 1

1.1 GİRİŞ

Fotodinamik Terapi (PDT) son yıllarda araştırmacıların dikkatlerini üzerine çekmiş yeni bir kanser tedavisi yöntemidir. Kısaca bu teknik; kanserli doku üzerine gönderilen belirli dalga boyundaki yakıcı olmayan ışığın ortamda bulunan fotosensitizör tarafından absorplanıp etrafındaki moleküler oksijeni (O_2), reaktif oksijen çeşidi (ROS) olan singlet oksijene (1O_2) dönüştürmesi ve böylece kanserli tümör hücrelerini yok etmesi şeklinde özetlenebilir. Bu yöntemde esas unsur kendisi toksik olmayan fotosensitizörün fototoksik olmayan ışık kaynağı ile uyarılması sonucu üretilen reaktif oksijenin tümörle etkileşirken etrafındaki sağlıklı hücrelere zarar vermemesi ve böylece diğer kanser tedavilerine göre çok daha az yan etkisi olan ve kontrol edilebilen bir tedavi yönteminin uygulanmasıdır. Fotodinamik Terapide en çok kullanılan fotosensitizörler porfirin molekülleridir. Bu amaçla kullanılan Photofrin ilacı bir protoporfirin türevidir. Porfirinler tetrapireol türevlerinden olup görünür bölgede kuvvetli absorplama yapabilen makrosiklik yapıda moleküllerdir. Fotodinamik Terapinin en önemli gereklilikleri; kullanılacak fotosensitizörün iyi bir çözünürlüğe sahip olması, belirli bir biyoafiniteye sahip olması ve reaktif oksijen çeşidi (ROS) üretme kapasitesinin yüksek olmasıdır. Porfirin fotosensitizörlerinin sudaki çözünürlüğü konusu önemli bir sorun olmakla beraber bazı çözünür grupların moleküle bağlanmasıyla kısmen iyileştirilebilmektedir. Bununla beraber porfirin fotosensitizörlerinin sudaki çözünme zorunluluğunun giderilmesi ve hedef hücrelere yönlendirilmesi konusunda son zamanlarda uygulanan tekniklerden birisi de biyoaktif gruplar bağlanmış porfirinlerin belirli özellikleri olan lipozomlar içine yerleştirilip böylece hücre zarından içeriye rahat geçişinin sağlanabilmesidir.

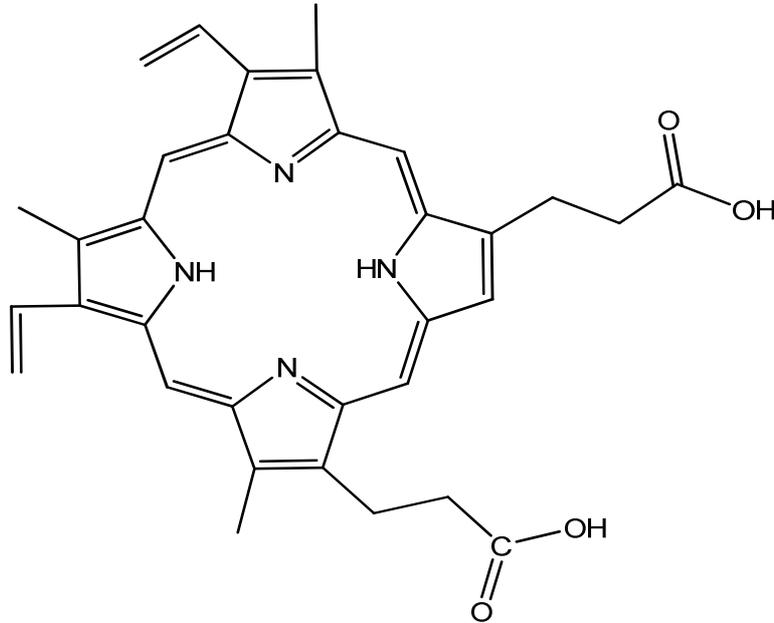
Bu tezde, aminoasit ve şeker yapılarına sahip gruplar içeren porfirin molekülleri sentezlenip lipozom kapsülleri içerisine yerleştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada kullanılan porfirin molekülleri: protoporfirin IX, meso-tetra (4 karboksi fenil) porfirindir. Aminoasit ve şeker grupları ile modifiye edilmiş porfirinlerin 1,2-dipalmitoyil-sn-glisero-3 fosfakolin (DPPC), 1,2 -dioleyil-sn-glisero-fosfakolin(DOPC) fosfolipidler lipozomları hazırlanmıştır.

BÖLÜM 2

PORFİRİNLER

2.1 PORFİRİNLERİN TANIMI VE GENEL YAPISI

Porfirinler; dört pirol halkasından oluşan makrosiklik ligandlardır. Porfirinler yirmi karbon ve dört azot atomu içermektedir. Bir büyük halka, kendi içinde dört karbon ve bir azot içeren küçük halkalardan oluşmaktadır. Dört pirol halkası birbirine vinilik karbon atomu üzerinden bağlı olup (R. Miligram, 1997) bu karbon atomunda süstitüe olmuş gruplar (aril, alkil, nitro vb) mevcut ise, bu bileşiklere meso süstitüe porfirinler, dört meso bağlı gruplar var ise bunlara simetrik olmayan porfirinler denir. Simetrik olmayan porfirinler polar çözücülerde simetrik olanlara göre daha fazla çözünebilir ve saflaştırılmalarında daha kolaydır (Sun ve ark, 1986).

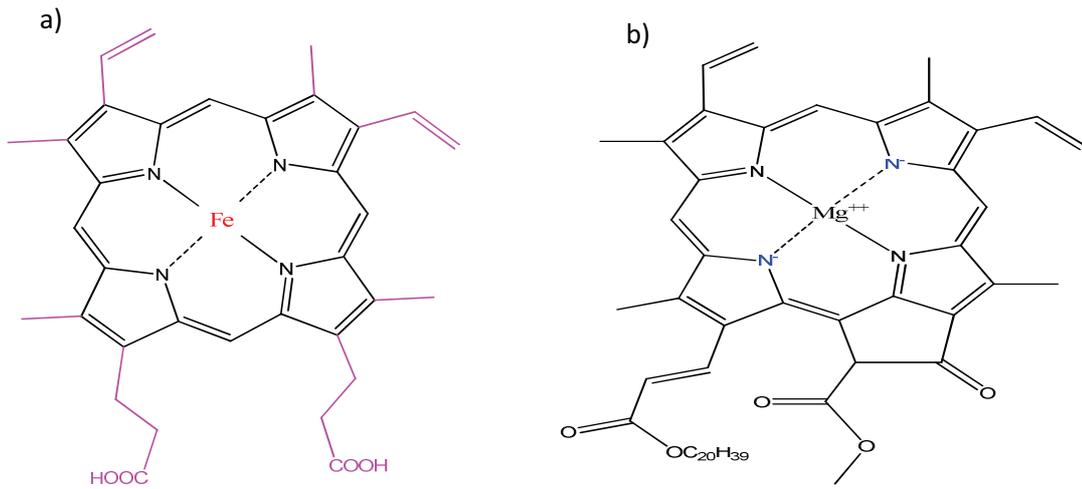


Şekil 2.1 Protoporfirin IX molekülünün yapısı

Porfirin Yunancadan türemiş bir kelime olup Yunancada mor demektir. Porfirinler çok belirgin renktedirler. Bu nedenle porfirinlerin en önemli özelliklerinde biri de renkleridir.

Porfirin halka sistemindeki pirol halkalarının N azot atomlarına Fe, Mg, Co, Zn, Ni, Cu gibi metal iyonlarının bağlanmasıyla metalloporfirin diye tanımlanan çeşitli porfirin bileşikleri oluşur.

Porfirin yapısı doğada bulunan bitki ve hayvanlardaki önemli biokimyasal fonksiyonlarda bulunmaktadır ve bu sebepten dolayı biyolojik sistemlerdeki en önemli gruplar olarak bilinmektedir (Balaz ve ark, 2005).Porfirinler vücuttaki hücrelerin oksijen kullanmalarını sağlamak gibi yaşamsal bir işleve sahip, kırmızı bir pigment olan hem molekülünü oluşturmak üzere demire bağlandıklarından vücut için önemlidirler. Genellikle demir ya da magnezyum metal kompleks yapısında olan porfirinler, doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve hemoglobin, miyogloblin, sitokrom, katalaz, peroksidaz, klorofil ve bakteriyoklorofil gibi önemli metabolitlerde prostetik grup olarak yer almaktadırlar (Vicente ve Smith,2000). Normal dokuya nispeten neoplazma dokusunda birikme eğiliminde oldukları için porfirinler, fotodinamik terapide(PDT) oldukça yaygın olarak kullanılırlar ve dioksijeni, ışınla etkileştiğinde kanser hücrelerini yok eden singlet haldeki oksijene çevirebilirler (Ali ve Lier,1999, Sternberg ve Bruckner, 1998, Kadish 2000) Porfirinler günümüzde cilt hastalıklarının tedavisinde, vücuttaki tümörlerin yok edilmesinde, kalpteki daralan koroner damarların açılmasında, enfeksiyon hastalıklarına yol açan bakterilerin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Birçok araştırmacı, porfirinlerin ve porfirinlerin yapıtaşı olan pirolerin sentezi amacıyla kullanışlı metotlar bulmak için çalışmışlardır. Bulunan metotların birçoğu çok fazla sentetik basamak içermektedir ve sonuçta oluşan pirol ve porfirin türevlerinin verimleri yeteri kadar yüksek olmamaktadır. Fakat son zamanlarda bu tür bileşiklerin ve türevlerinin sentezi için oldukça etkin çalışmalar yapılmış ve halen yapılmaktadır.



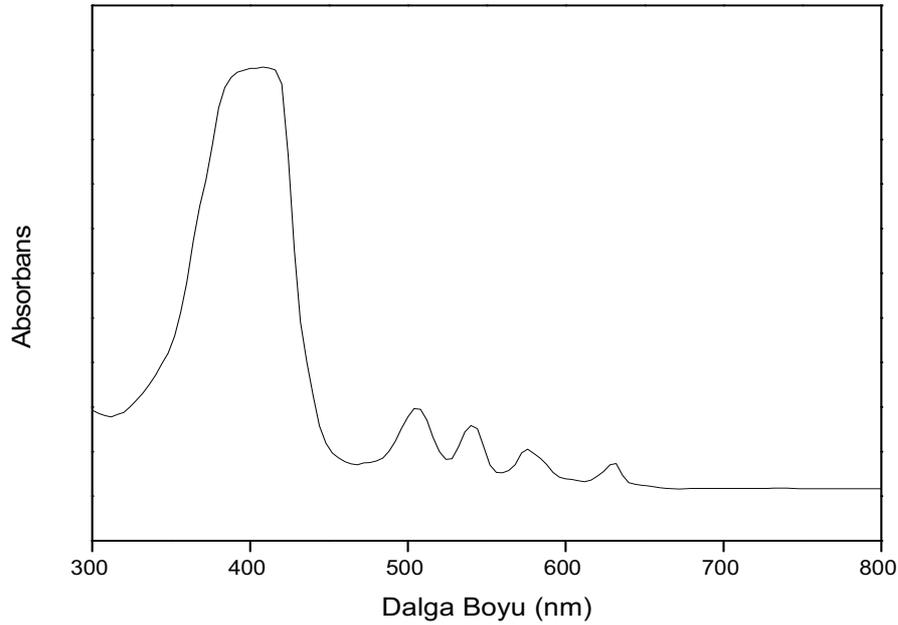
Şekil 2.2 a) Hemoglobin yapısındaki Demir-Heme grubu **b)** Klorofil yapısındaki Mg-porfirin

2.3 PORFİRİNLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Pirol halkalarında bulunan azot atomları dolayısıyla bütün porfirinler zayıf bazdır. Genellikle yan zincirlerindeki karboksil gruplarından dolayı asit olduklarında zayıf amfoter özellik gösterirler.

Porfirinler ihtiva ettikleri konjuge bağların rezonans özelliği dolayısıyla karakteristik absorpsiyon spektrumu verirler. Organik çözücülerdeki veya inorganik asitlerdeki çözeltileri çok kuvvetli kırmızı floresans gösterirler. Bu floresanstan porfirinlerin aranması ve miktar tayininde yararlanılır.

Porfirinler, belli dalga boylarında radyasyon enerjisi absorbladıklarından (görünür ve spektral aralıklar da dahil) radyasyona hassas maddeler olarak kullanılabilir. 400 nm de absorpsiyon badnı oluştururlar. Bazı porfirin türevlerinin tümör ve hızlı gelişen dokularda toplandığı ve kanserli hastalarda kanserli dokunun belirlenmesinde floresans indikatör olarak kullanılabileceği bulunmuştur. (Badger ve ark, 1964).



Şekil 2.3 ProtoporfirinIX molekülüne ait UV-Vis Spektrumu

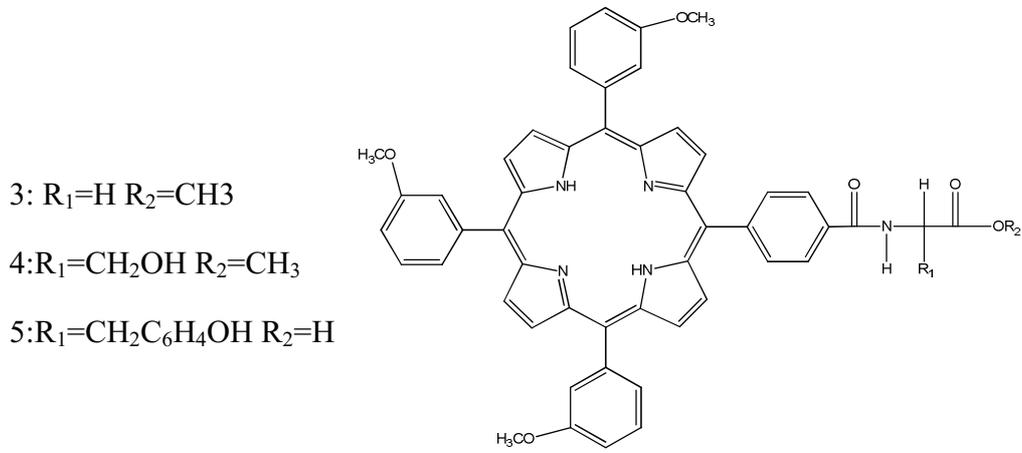
2.3 Bioaktif Molekül Bağlı Porfirinler

Porfirinler sahip oldukları fotofiziksel ve fotokimyasal özelliklerinden dolayı fotodinamik terapi (PDT)'de kullanılmaktadır. Son yıllarda birçok porfirin ve porfirin türevleri PDT'de fotosensitizör olarak yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır.

Son zamanlarda, porfirinlerin biyolojik etkisini arttırmak için fotosensitizör olarak kullanılan porfirinlerin protein (Cavanaugh,2002, Nagae 1998) , peptid (Chaloin,2001) ve şekerler (Cavaleiro,2009) gibi farklı maddelerle konjugasyonları araştırılmaktadır. Özellikle aminoasitlerle modifiye edilmiş porfirinlerin PDT için karakteristik özellik gösterdiği belirtilmiştir. Aminoasitler ile modifiye edilmiş porfirinlerde aminoasit kısımların sulu çözeltilerde çözünürlüğü arttırdığından PDT için iyi bir fotosensitizör adaydır (V. Serra ve ark,2010) .

V. Serra ve arkadaşları fotodinamik terapi için fotosensitizör olarak yeni aminoasit bağlı yeni porfirinlerin tümoral (HeLa) ve tümoral olmayan (HaCat) hücrelerdeki etkisini incelemişlerdir. Tümörlü hücrelerin normal hücrelere göre daha yüksek fototoksinite gösterdiğini görmüşlerdir. Bu aminoasit içeren yeni porfirinlerin (3,4,5,6)

Fotodinamik terapi için güçlü fotosensitizör olduğunu belirlemişlerdir (V. Serra ve ark,2010) .



Şekil 2.4 V. Serra ve arkadaşlarının sentezlediği porfirin türevleri

BÖLÜM 3

FOTODİNAMİK TERAPİ

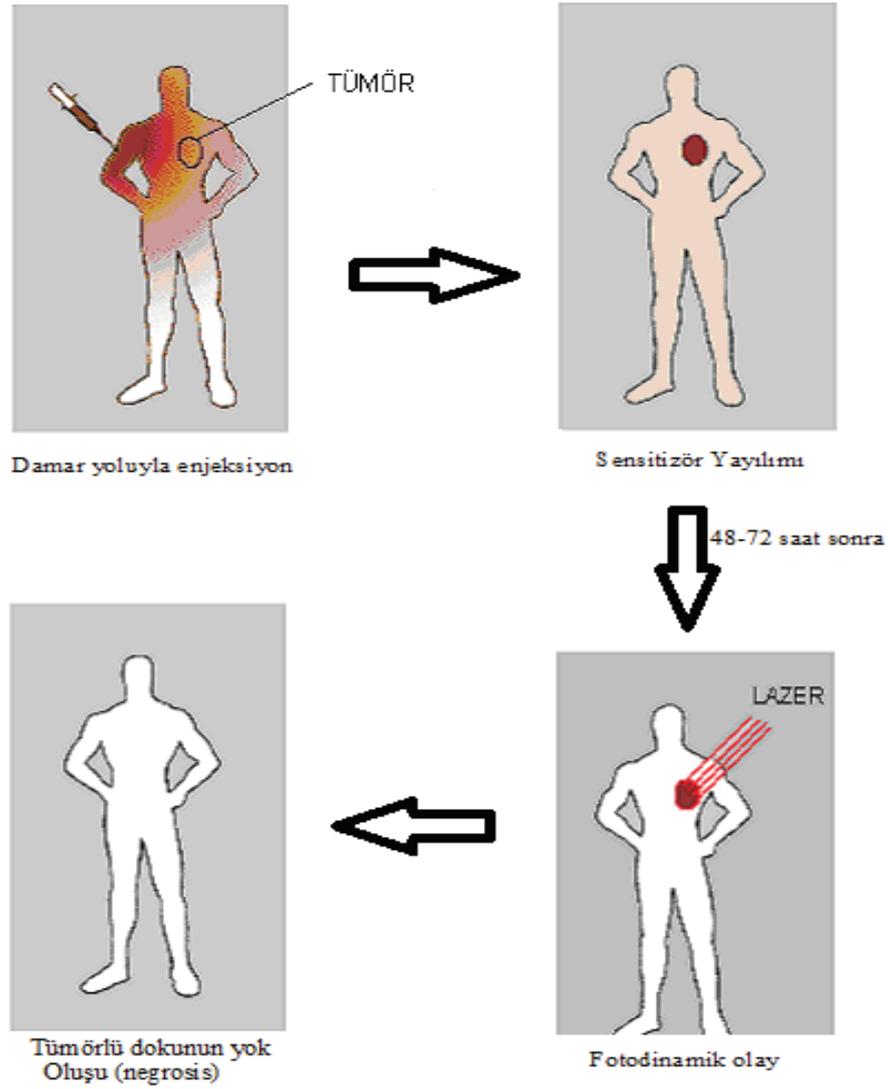
3.1 FOTODİNAMİK TERAPİ

Fotodinamik Terapi (PDT), ışığa duyarlı ilacın (fotosensitizör) hastaya verilmesi ve bu ilacın tümörlü dokuda birikmesinden sonra, uygun dalga boyundaki ışık ile uyarılarak tümörün yok edilmesi işlemidir. Işığa-duyarlı bu ilaçların normal dokuya göre tümörlü dokuda birikme ve muhafaza edilebilme eğilimleri çok daha fazladır.

Fotodinamik Terapi (PDT) kanser tedavisi için alternatif bir yöntemdir. Seçici olarak, tümörlü doku tahribatını neden olur ve fotosensitizör olarak isimlendirilen bir ilaç ile lazer ışığının kombinasyonunu kullanır.

3.2 FOTODİNAMİK TERAPİ İLE TEDAVİ

Son 20 yıldır uygulanan tedavi de ilk olarak ışığa duyarlı fotosensitizör damar yoluyla vücuda enjekte edilir ve fotosensitizör hızlıca tüm dokulara yayılır. Enjeksiyondan 48 -72 saat sonra, fotosensitizör konsantrasyonu normal dokulara oranla tümörlü dokularda daha fazla artmaktadır. Bu esnada fiber optik veya endoskopi ile yoğun lazer ışığı gönderilir ve fotokimyasal reaksiyon başlar. Fotokimyasal reaksiyon sonucu sitotoksik türler oluşur ve bu da tümörlü dokunun nekrosis yoluyla ölümüne neden olur (Phillips D, 1997).



Şekil 3.1 PDT Yöntemiyle Tedavinin Şematik Diagramı (Phillips D..Progress in Kinetics).

3.3 FOTODİNAMİK TERAPİDE FOTO KİMYASAL OLAYLAR

PDT, toksik olmayan üç faktörün kombinasyonuna dayanmaktadır. Bunlar; fotosensitizör (ışık absorplayıcı molekül), ışık ve oksijendir. PDT' nin temeli belirli dalga boyundaki ışıkla uyarılan fotosensitizör tarafından başlatılan bazı fotokimyasal reaksiyonlardır.

Bir molekülün elektronik olarak uyarıldığı zaman, temel hale dönüşü için birkaç olasılık söz konusudur. Bunlardan biri fotonun geri verilmesi olayı emisyon prosesidir. Floresans da denilen bu proses de, ışık yüksek enerjili düzeyden daha düşük enerjili düzeye geçmektedir (Stepp H, 2003). Molekülün ısı veya floresans ile temel hale dönmesi nanosaniyelerle ifade edilebilecek kadar hızlı bir prosesdir. Bir molekülün potansiyel bir fotosensitizör olabilmesi için, absorpladığı enerjiyi en azından mikro veya milisaniye düzeyinde depolayabilmesi gerekir. Bu da ancak uyarılmış olan elektronun spinini değiştirmesiyle mümkündür. Elektronun dönüş yönünü değiştirmesi sistemler arası geçiş olarak adlandırılır. Uyarılmış haldeki fotosensitizör ise triplet haldedir. Triplet haldeki fotosensitizör depoladığı enerjisini bir substrat molekülüne transfer edip, yeniden temel haline dönebilir ve yeni bir foton absorplamak için hazır bulunabilir. Kuantum mekaniğine göre; direkt olarak fotonlar tarafından uyarılamayacak olan substrat molekülü (genellikle oksijen), fotosensitizör tarafından aktarılan enerjiyle uyarılmış hale geçer. Böylece fotosensitizör, ışık enerjisini oksijen molekülüne transfer eden ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna sebep olan bir katalizör görevi görmektedir. İşlem sonunda fotosensitizörler, ROS tarafından değiştirilebilir veya yıkıma uğrayabilir (Acar,2007).

3.4 FOTOSENSİTİZÖRLER

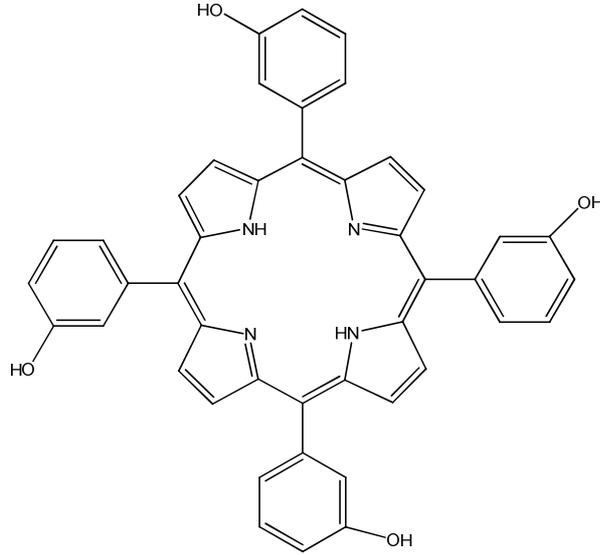
Fotosensitizörlerin fiziko-kimyasal özellikleri PDT' nin etkinliği açısından oldukça önemlidir. İdeal bir fotosensitizör, olabildiğince suda çözünür olmalıdır (Phillips D.) Seçici olarak neoplastik dokuda birikebilmeli ve kimyasal olarak saf olmalıdır. Optimal doku geçirgenliği sağlayan dalga boyunda aktif olmalıdır. Tümörlü dokuda kısa süre içerisinde en yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmeli, normal dokudan

kısa sürede uzaklaşabilmelidir. Singlet oksijen oluşumu için yüksek kuantum verimine sahip olmalıdır. Karanlıkta toksik etki göstermemelidir (Luksiene Z, 2003).

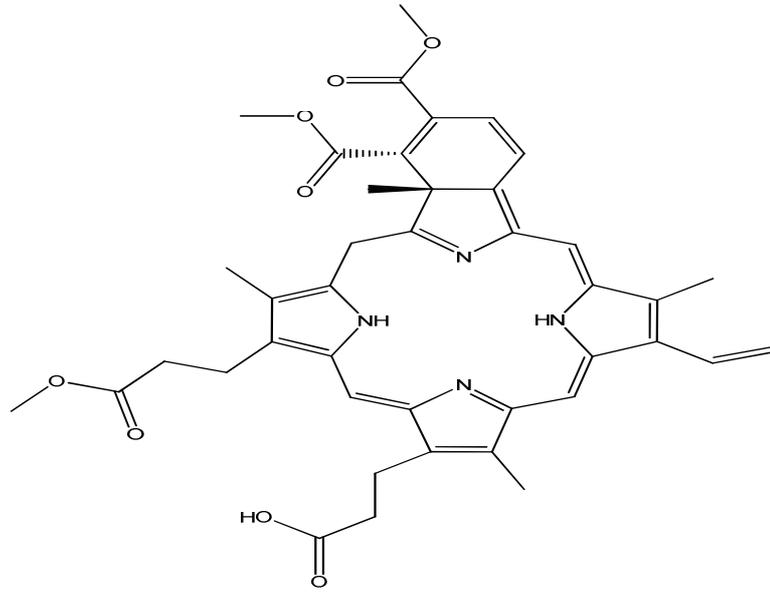
Klinik tedavilerde uygulanmaya başlanmış Amerika Kanser Derneği (American Cancer Society=ACS, 2007) tarafından belirlenen birkaç fotosensitizer bulunmaktadır.

Bunlar:

1. Porfimer Sodyum (photofrin)
2. Aminolevulinik Asit (ALA ya da Levulan)
3. Aminolevulinik Asit'in Metil Esteri (Metvixia)
4. Meso-tetra-hidroksifenil-klorin (mTHPC)
5. Verteporfirin (Visudin) dir .



Şekil 3.2 Meso-tetra-hidroksifenil-klorin (mTHPC) yapısı



Şekil 3.3 Verteporfirin (Visudin) yapısı

3.5 FOTODİNAMİK TERAPİDE IŞIK VE DALGA BOYU

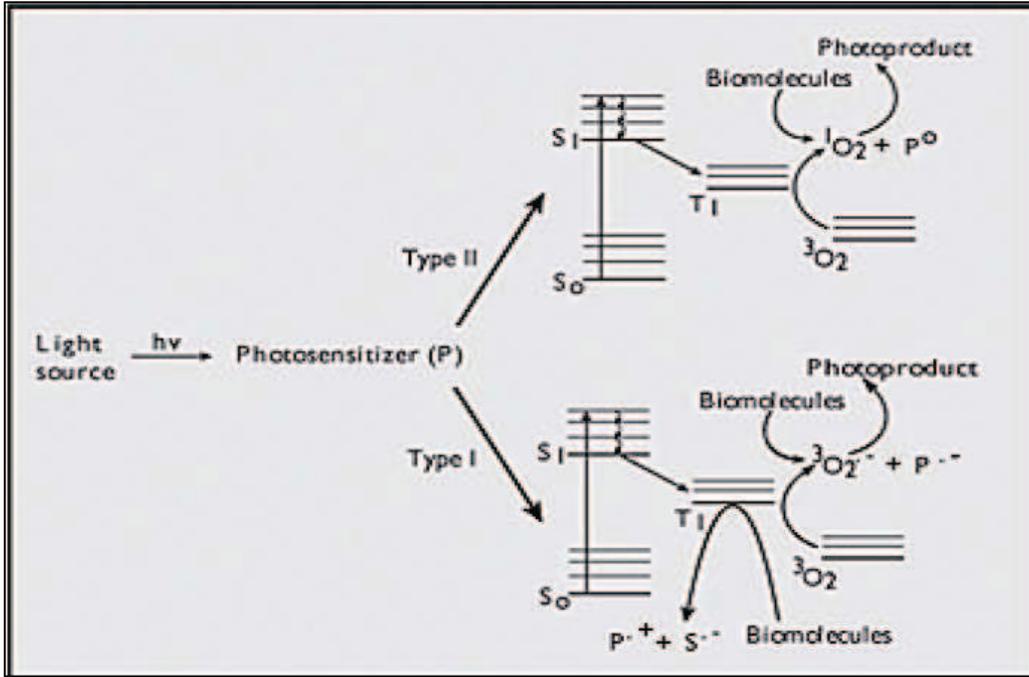
PDT’de kırmızı ya da kızılötesi denilen, gözle görünmeyen, uzun dalga boyundaki ışık kullanılır. Fotobiyolojik reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ışığın dalga boyunun PS’in absorpsiyon spektrumu ile uygunluk göstermesi gereklidir (Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, and Jakub G , 2005).

PDT’de ışık kaynağı, kullanılan PS’nin *in vivo*’daki aktivasyon spektrumuna uygunluk gösteren dalga boyundaki ışığı sağlamalıdır. Bir çok PS geniş bir dalga boyu aralığında aktive olabilir fakat PS’ nin maksimum absorpsiyonunu veren dalga boyu ile aktive edilmesi,¹O₂ gibi toksik foto ürünlerin daha yüksek miktarda üretilmesine olanak sağlar.

Kullanılan ışığın dalga boyu ile ışığın doku içinde ulaşabildiği derinlik (penetrasyon) ilişkilidir fakat dalga boyu ile birlikte, ışığın hücreler ve diğer mikro yapılar tarafından kırılması ve bazı moleküller tarafından (özellikle hemoglobin, melanin ve su) absorbe edilmesi de penetrasyonu etkiler. 630 nm civarında ışığın etkili olabildiği derinlik (penetrasyon) 2 – 3 mm iken, 600 nm üzerindeki dalga boylarında hemoglobinin absorpsiyonu düştüğünden, ışığın dokuya penetrasyonu 5 – 6 mm’ ye ulaşır.

800 nm'nin üzerinde ise, ışık fotonlarının enerjisi dalga boyuyla ters orantılı olduğundan, $^1\text{O}_2$ oluşumuna yetecek foton enerjisi ortaya çıkmaz. Bu sebeple derinde yer alan, geniş çaplı kanser dokularında çalışırken, PS' nin maksimum absorpsiyon değeri ile uyumlu olmasa da uzun dalga boyundaki ışık uygulandığında daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Wilson, B, 2003).

3.6 FOTODİNAMİK TERAPİNİN ETKİN MEKANİZMASI



Şekil 3.4 Fotodinamik Terapinin Etkin Mekanizması (R. M. Jon 1996)

3.6.1 Tip I Reaksiyonları

Tip I reaksiyonunda serbest radikaller substrat ile etkileşime girer. Tip I reaksiyonlarında, uyarılmış haldeki fotosensitizörün sahip olduğu hidrojen atomunu, hücrenel bir moleküle aktarmasıyla ortaya çıkan yüksek reaktif özelliği olan radikaller, özellikle hidroksi ve hidrojen peroksit radikalleri, moleküler oksijen ile reaksiyona girerek oksijenlenmiş ürünler oluşturur (Dost, 2006).

3.6.2 Tip II Reaksiyonları

Tip II reaksiyonunda moleküler oksijene enerji transferi ile singlet oksijen meydana gelir. PDT' de kullanılan birçok fotosensitizör etkisini çoğunlukla bir reaktif oksijen türü olan O_2 üzerinden Tip II reaksiyonlarıyla gösterir. Tip II reaksiyonlarında uyarılmış durumdaki fotosensitizör enerjisini doğrudan moleküler oksijene verir ve singlet oksijen oluşmasına neden olur. O_2 'nin elektronik olarak uyarılmış hali olan singlet oksijen, biyomolekülleri oksitleyerek hücrenel tahribata neden olur (Dost, 2006).

7 Fotodinamik Terapide Oksijen Oluşumu

Oksijenin PDT' deki önemi, singlet oksijen meydana gelmesinden kaynaklanır. Singlet oksijenden başka diğer ROS'ler (hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları gibi) de hücrenel tahribat için önemli olan diğer bileşenlerdir. PDT etkisinin oksijenle ilgili olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir (Henderson, et al. 2006; Foster et al., 1991; Schunck and Poulet, 2000). Uyarılan singlet oksijende reaktivite çok yüksektir. Singlet oksijen aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip yeniden moleküler oksijene dönüşebilir. Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileşime girdiğinde sahip olduğu enerjiyi ya transfer eder ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon karbon çifte bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Hipoksik hücrelerde yapılan araştırmalarda, PDT ye karşı direnç oluşumu gözlemlenmiştir.(Mitra, et al., 2006).

3.8 Fotodinamik Terapinin Tümör Seçiciliği

PDT, yalnızca hasta bölgenin ışınlanması ve fotosensitizörün tümörlü bölgede konumlanabilme özelliğinden dolayı özel bir tedavi yöntemidir. Fotosensitizörün hedeflenen dokuda toplanması, fotosensitizörün biyokimyasal özelliklerine bağlıdır. (Reddi, 1997). Hücresel hasarın meydana geldiği ilk yer olması açısından fotosensitizör lokalizasyonu, PDT sonucu ortaya çıkan hücre ölümü için de belirleyici rol oynar.

Normal doku ve tümörlü doku arasındaki fizyolojik farkların, fotosensitizörün seçici olarak tümör dokusunda birikmesine neden olduğu düşünülmektedir. Bu farklılıklar:

► Tümörlü dokuda düşük oksijen miktarı ve yüksek glikolitik aktiviteden dolayı hücre dışı pH'nın, normal dokuya göre daha düşük olması (düşük pH'da fotosensitizörün hücre içine alınması daha kolay gerçekleşir) (Kessel, et al.,1987).

► Tümörlü dokuda daha çok makrofajın bulunması (hidrofobik fotosensitizörlerin bu bölgede toplanmasını kolaylaştırır).

► Tümörde lenfatik drenajın normal dokuya kıyasla düşük olması,

► Tümör dokusunun normal dokuya göre daha büyük bir iç hacime sahip olması,

► Tümör dokusunda bulunan mikrodamarlarda çatlakların bulunması,

► Tümörün normalden fazla miktarda kollajen içermesi ,

► Tümör dokusundaki hücrelerin normal hücrelerden daha çok lipoprotein

reseptörüne sahip olmasıdır (Jori, et al., 1984; Tuncer).

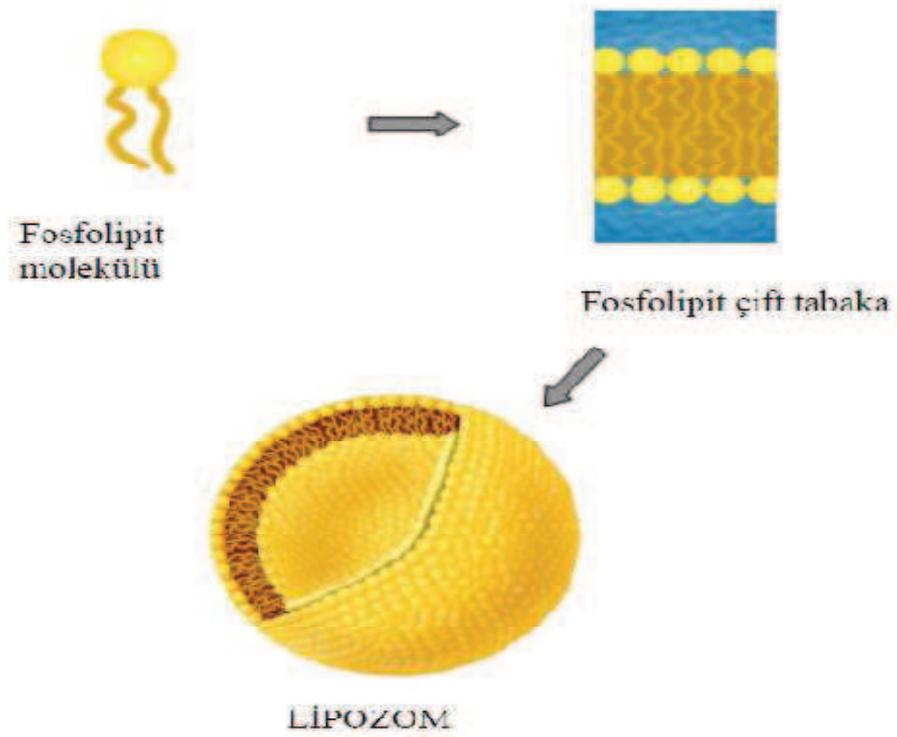
BÖLÜM 4

LİPOZOMLAR

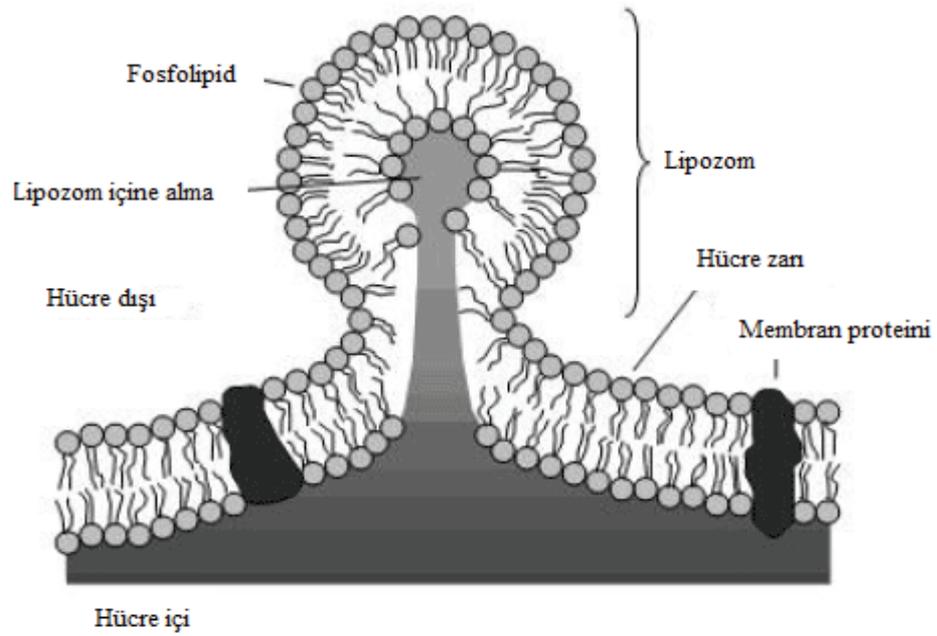
4.1 LİPOZOMLARIN TANIMI VE GENEL YAPISI

Lipozomlar katmanlı fosfolipitlerin bileşimiyle meydana gelen çok küçük (nanometre boyutunda) sulu faz içeren kabarcıklardır (Gürsoy 2002, Schwendener 2007). Çapları 0.02-3.5 µm arasında değişir. Lipozomlar, ilk olarak Alec Bangham tarafından 1964 yılında hücre zarı çalışmalarında kullanılmıştır (Düzgüneş and Gregoriadis 2005). Hazırlanmaları için temel olarak doğal veya benzeri lipitler kullanılmaktadır. Lipozomlar lipit tabaka ve sulu faz olmak üzere iki bölümden oluşurlar. Lipit tabakanın temel yapıtaşı fosfolipitlerdir.

Lipozomların içine aldıkları ilacı taşıyabilecek üç bölgesi vardır. İlaç molekülü fosfolipit tabakaya (lipofilik etkin maddeler), sulu kısma (hidrofilik etkin maddeler) veya su-lipit ara yüzeyine (peptid ve küçük proteinler) alınarak taşınabilir. Bu şekilde hem lipofilik hem de hidrofilik etkin maddeler hatta orta derecede lipofiliteye sahip etkin maddeler lipozom şeklinde formüle edilebilir (Uhumwangho MU ve ark,2005 Allen TM,1997, Matteucci ve ark,2000).



Şekil 4.1 Lipozom oluşumu ve yapısı. (Liposome farmulator and Manufacturer.)



Şekil 4.2 Hücre zarı ile lipozom etkileşimi (Dhand R. , 2004)

4.2 LİPOZOMLARIN SINIFLANDIRILMASI

Lipozomlar boyutlarına göre küçük (Small) ve büyük (Large) olarak, katman sayılarına göre tek tabakalı (Monolayer), iki tabakalı (Bilayer) ve çok tabakalı (Multiplelayer) olarak sınıflandırılırlar (Gürsoy, 2002).

Çok tabakalı lipozomlar (MLV) : Birçok lipit tabaka ile bu tabakaların aralarında yer alan sulu çözüldüden oluşurlar.

Büyük tek tabakalı lipozomlar (LUV): Sulu fazı çevreleyen tek bir lipit tabakadan oluşurlar.

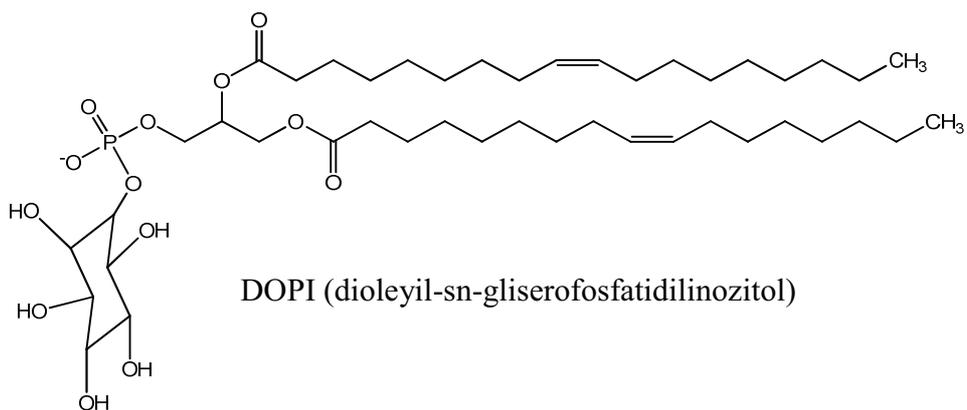
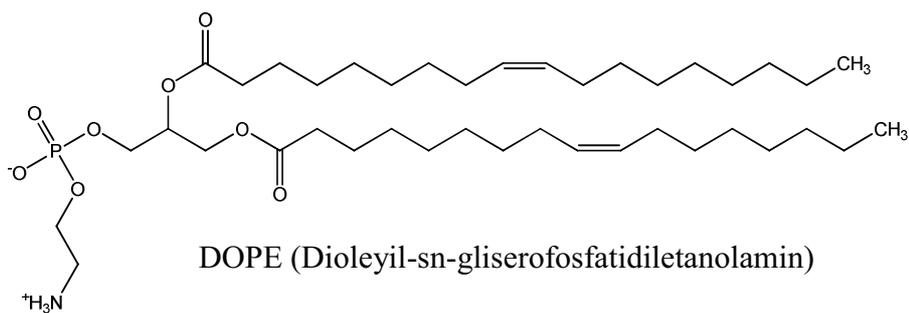
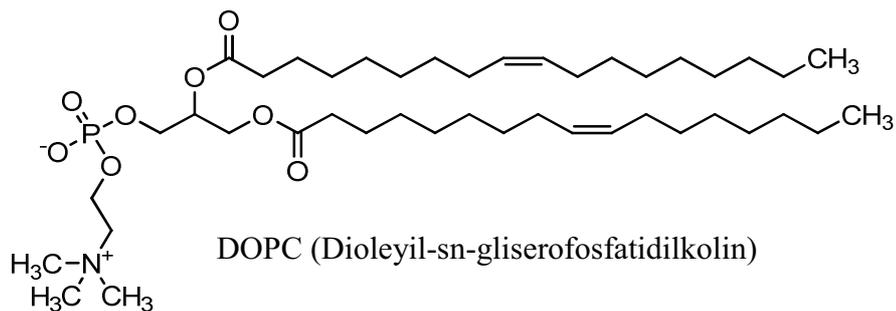
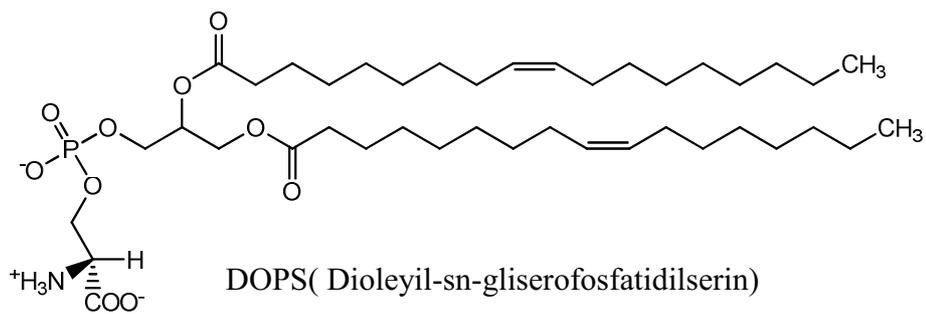
Küçük tek tabakalı lipozomlar (SUV): Sulu fazı çevreleyen tek bir lipit tabakadan oluşurlar.

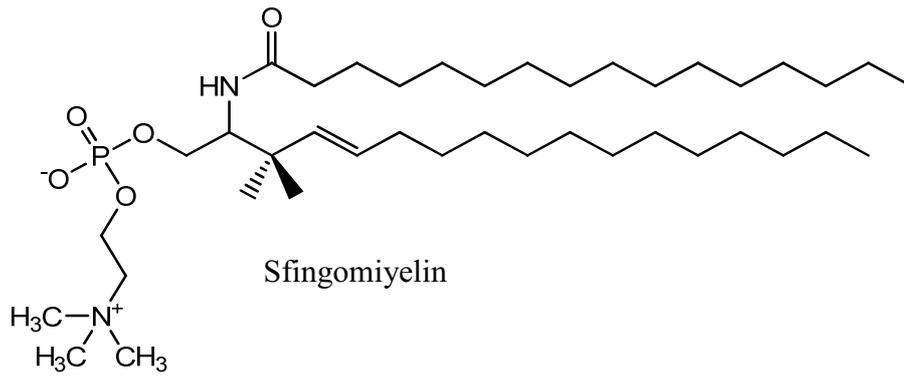
Ters faz tekniğı ile hazırlanan lipozomlar (REV): Sulu fazı çevreleyen tek bir lipit tabakadan oluşurlar.

4.3 LİPOZOMLARIN HAZIRLANMASINDA KULLANILAN FOSFOLİPİDLER

Lipozomların temel bileşeni fosfolipitlerdir. Fosfolipitlerden oluşan yapıya kolesterol, tokoferol gibi moleküllerin eklenmesiyle dayanıklılık artırılır. Ayrıca, immünoglobülinlerin, glikolipidlerin ve monoklonal antikorların bağlanmasıyla lipozomların istenilen organ ve dokuya hedeflendirilmesi sağlanabilmektedir. (Gürsoy 2002).

Lipozom hazırlanmasında kullanılan fosfolipitlerin içerdikleri başlıca doymamış yağ asitleri oleik, linoleik, linolenik ve araşidonik asit, doymuş yağ asitleri de laurik, miristik, palmitik, stearik, ve araşidik asitlerdir. En çok kullanılan doğal ve sentetik fosfolipitler; yumurta ve soya kaynaklı fosfatidilkolin (PC), dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC),dioleilfosfatidilkolin (DOPC), distearilfosfatidilkolin (DSPC), fosfatidilserin (PS), fosfatidilinozitol (PI), fosfatidiletanolamin (PE) ve sfingomiyelindir.





Şekil 4.3 Bazı fosfolipidlerin yapısı.

LİPİT TİPİ	KISALTILMASI	YÜKÜ	Tc (°C)
Tek Komponent			
Yumurta Fosfatidilkolini	Yumurta(egg) PC	0	-15, -7
Dioloilfosfatidilkolin	DOPC	0	-22
Dilaurilfosfatidilkolin	DLPC	0	0
Dimiristoilfosfatidilkolin	DMPC	0	+23
Dipalmitoilfosfatidilkolin	DPPC	0	+41
Distearoilfosfatidilkolin	DSPC	0	+58
Diizostearoilfosfatidilkolin	DIPC	0	---
Sığır Beyni Sfingomiyelin	Brain SM	0	+32
Yumurta Fosfatidiletanolamaineni	Yumurta (egg) PE	0	---
Dimristoilfosfatidiletanolamin	DMPE	0	+48
Dimristoilfosfatidilgliserol	DMPG	(-)	+23
Dimristoilfosfatidik Asit	DMPA	(-)	+52
Sığır Beyni Fosfatidilserini	Brain PS	(-)	+5
Disetilfosfat	DCP	(-)	
Stearilamin	SA	(+)	
Karışımlar			
Ps/Dspc/Dppc (1:4, 5:4,5)		(-)	+43
Dppd/Kolesterol (1:1)		0	YOK

Çizelge 4.1 Lipozom oluşturmak için kullanılan fosfa lipidlerin özellikleri (A.

Yurdakul, R. Atav,2007) (Tc (°C) : Camsı geçiş sıcaklığı)

4.4 FOSFOLİPİDLERİN ÖZELLİKLERİ

Fosfolipitlerin seçimi, genellikle fosfatidilkolinler ve fosfatidilgliserollerle sınırlıdır. Bu seçimde, fosfolipitlerin toksik olmamaları, saf olarak kolaylıkla bulunabilmeleri, ucuz olmaları gibi faktörler etkili olmaktadır.

4.5 LİPOZOMLARIN HAZIRLANMASI

4.5.1 Çok Tabakalı Lipozomların ('Multilamellar Vesicle', MLV) Hazırlanması

Bu tür lipozomlar Bangham tarafından geliştirilmiş yöntemle hazırlanırlar, ilk olarak uygun bir lipit bileşiminin kloroformdaki çözeltisi oluşturulur. Daha sonra bu çözeltinin çözücüsü rotary evaporatör ile uzaklaştırılarak ince bir lipit tabakası haline getirilir. Son olarak bu kuru tabaka üzerine sulu faz ilave edilir ve çalkalanır. Lipit kısmı sulu faz içinde çözünerek şişer ve iç içe kapalı tabakaları oluşturur. Bu kapalı tabakaların arasında da sulu faz vardır. Hidratasyonun tamamlanması için lipozom dispersiyonu buzdolabında bir gece bekletilir. Elde edilen lipozomlar homojenizatörden veya mikrofluidizatörden geçirilerek homojen hale getirilebilirler. Son yıllarda, bu tür lipozomların büyük oranda üretimini kolaylaştırmaya yönelik araştırmalar yapılmaktadır.

4.5.2 Küçük Tek Tabakalı Lipozomlar ('Small unilamellar vesicles', SUV)

Bu tür lipozomların hazırlanmaları sırasında sıklıkla çubuk veya banyo tipi sonikatörlerden yararlanılır. Sonikasyon aracılığıyla oluşmuş olan çok tabakalı lipozomlar parçalanarak tek tabakalı lipozomlara dönüşürler. Bu lipozomların eldesinde kullanılan başka bir yöntem deterjan diyaliz yöntemidir. Bu yöntemde ince lipit tabakası üzerine içinde deterjan (örn. sodyum kolat) bulunan bir tampon çözeltisi eklenir ve iyi bir dağılım oluşana kadar çalkalanır. Bu sırada fosfolipitler sodyum kolat ile bir karışım miseli oluşturur, daha sonra kolat diyaliz veya jel filtrasyonu uzaklaştırılır. Uygulanan bir başka yöntem de enjeksiyon yöntemidir. Sulu faz, camsı geçiş sıcaklığının üzerindeki bir sıcaklığa ısıtıldıktan sonra yavaş yavaş karıştırılırken içine bir hipodermik iğne aracılığıyla lipitler (etanoldeki çözeltisi) enjekte edilir. İki faz karşılaştığında lipozomlar oluşur. Bu yöntemin etanol gerektirmesi biyolojik maddelerin lipozomlanmasında kullanımını sınırlamaktadır.

4.5.3 Büyük Tek Tabakalı Lipozomlar ('Large unilamellar vesicles', LUV)

Bu tür lipozomların hazırlanmaları sırasında çeşitli yaklaşımlar kullanılır. Eter enjeksiyonu yönteminde, fosfolipitlerin eterdeki çözeltisi hazırlandıktan sonra 55-60 °C sıcaklıktaki sulu faza enjekte edilir, eter uçurulduğunda lipozomlar elde edilmiş olur. Bu lipozomların eldesinde kullanılan bir diğer yöntemde asidik fosfolipitlerden elde edilmiş tek tabakalı küçük lipozomlar üzerine kalsiyum ilavesiyle büyük silindirik ve kıvrık çok tabakalı yapıların oluşturulması prensibine dayanır. Kokleat olarak adlandırılan bu yapıların üzerine etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) konulunca büyük tek tabakalı lipozomlar elde edilir. LUV hazırlanması aşamalarında petrol eteri buharlaştırılması, deterjan diyaliz ve ters buharlaştırma yöntemleri de kullanılmıştır.

4.5.4 Ters Faz Buharlaştırma Yöntemi ile Hazırlanan Lipozomlar

Bu lipozomların hazırlanış şekilleri ve bazı özellikleri biraz farklıdır. İlaç kapsülleme verimleri % 35-65 arasında olup tutulan kısmın hacmi 15 µL/mL civarındadır. Hazırlanmaları sırasında, fosfolipitleri ve uçucu organik çözücüyü içeren çözeltiye sulu tampon ilave edilir, sonikasyon işleminden sonra çözücü alçak basınç altında uçurulur. Bu sırada fosfolipitleri içeren çözeltiyle sulu tamponun birlikte sonikasyonu su damlacıklarının fosfolipit tabakasıyla çevrilmesini sağlar. Organik fazın uçurulması sırasında da damlacıklar jel benzeri viskoz yapıda çökerler.

4.6 LİPOZOMLARIN KARAKTERİZASYONLARI

4.6.1 Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayini

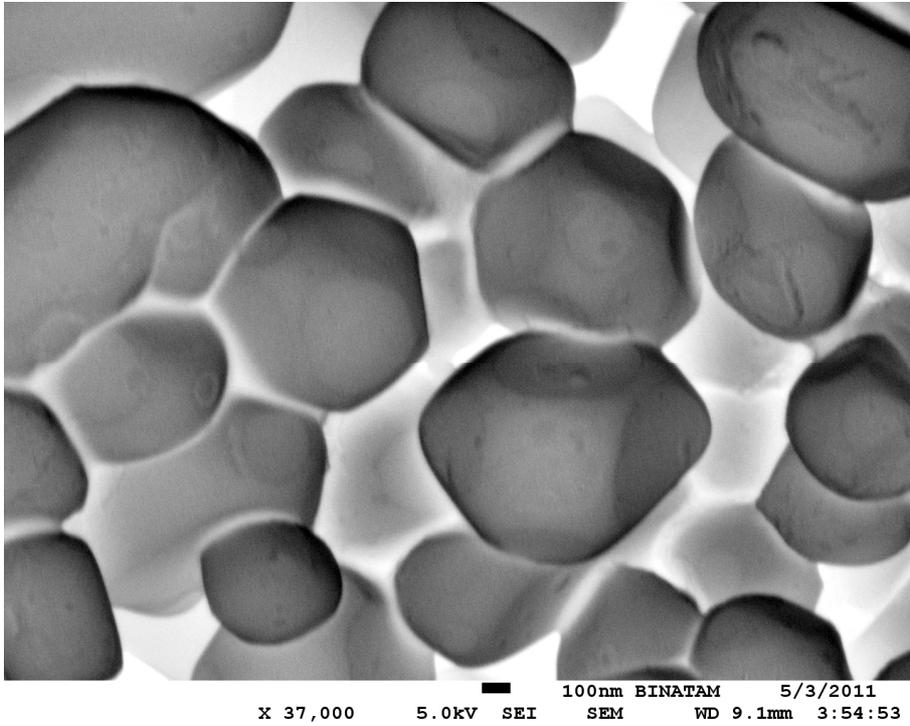
Lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımı dinamik ışık saçılımı spektrometresi (DLS) aleti ile ölçülmektedir.

Dinamik ışık saçılımı methodu (DLS) seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, parçacığın hareketine buna bağlı olarak da parçacığın büyüklüğüne, ortamın viskozitesine ve sıcaklığa bağlıdır (centrallab).

6.2 Lipozomların Şekillerinin Belirlenmesi

Lipozomların şekilleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gözlemlenmektedir.

Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir.



Şekil 4.4: Porfirin içeren lipozomların SEM görüntüsü

4.6.3 Lipozomların Yüklerinin Belirlenmesi

Lipozomların yükleri zeta potansiyel ölçümleri ile Zeta Sizer aleti kullanılarak yapılmaktadır.

Zeta Sizer aletinin çalışma prensibi elektroforezdir. Elektroforez ortamda bulunan partiküllerin elektriksel alandaki hareketini ifade eder. Elektroforetik hız, elektroforetik

mobilité ile orantılıdır. Elektroforetik mobilité. ölçülebilir bir parametredir. Elektroforetik mobilité de zeta potansiyeli ile ilişkilidir.

4.7 LİPOZOMLARIN KULLANIM ALANLARI

Lipozomlar tıpta tanı, tedavi ve koruyucu amaçlar için kullanılmaktadır. Vücudun yapı taşı olan fosfolipitlerden yapılmaları nedeniyle bağışıklık sistemini uyarılmazlar ve toksik etki göstermezler (Gürsoy 2002).

Lipozomlar, temel olarak aktif maddelerin etkinliğini arttıracak ve istenmeyen toksik özelliklerini azaltacak şekilde, çok seçici olarak maddelerin taşınmasında kullanılmaktadır.

Diğer durumlarda, lipozomlar etkinin uzatılmasında adsorbsiyonun geliştirilmesinde veya basitçe aktif maddelerin stabilize edilmesinde kullanılmaktadır.

Lipozomların başlıca;

- topikal (lokal),
- transdermal (deri içerisinde kan dolaşımına aktarma),
- oral (ağız yolu ile),
- intraperitoneal (karın zarı boşluğunun içerisinde, karınla ilgili organları içeren bölge),
- oküler (gözle ilgili bölge),
- intramusküler (kasın içerisine zerk edilen),
- subcutaneous (deri altına zerk edilerek),
- inhaled (solukla içeri çekme)

gibi mümkün olan tüm medikal alanlarda kullanılmış ve her birinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

4.8 LİPOZOMLARIN DİĞER İLAÇ SALINIM SİSTEMLERİNE ÜSTÜNLÜKLERİ

- Doğal yapıtaşı olan fosfolipitlerden oluşurlar.
- Kendileri veya yıkım ürünleri toksik değildir.
- Bazı yapısal eklentilerle etkinin istenen bölgeye hedeflenmesi sağlanabilir.
- Biyolojik olarak yıkımları mümkündür.

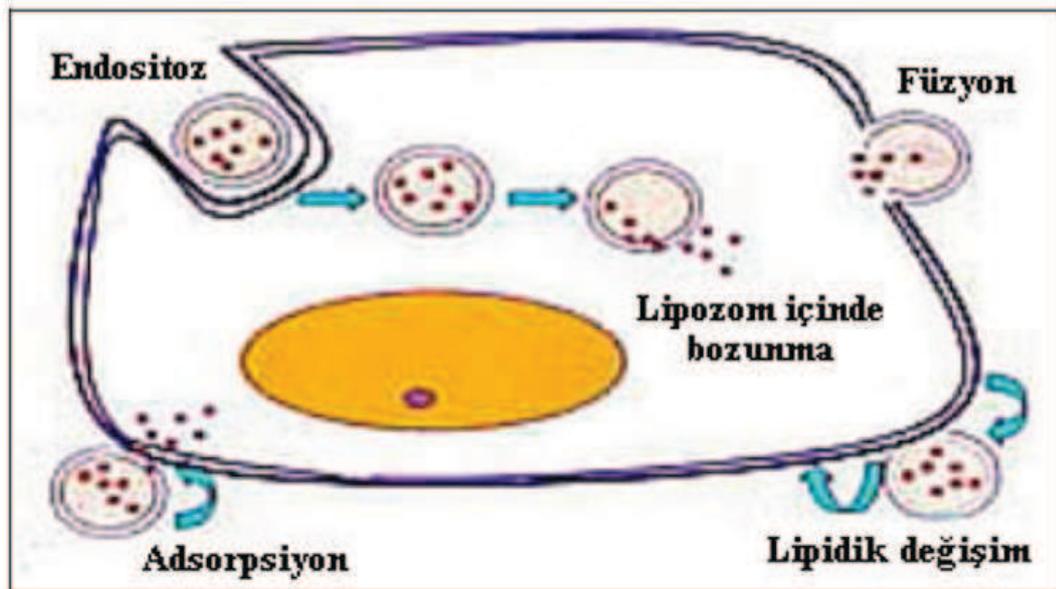
4.9 LİPOZOMLAR İLE HÜCRELER ARASINDAKİ ETKİLEŞİM ÇEŞİTLERİ

1. **Füzyon:** Lipozomun en dış tabakasının hücre membranıyla birleşmesidir.

2. **Adsorpsiyon:** Lipozomun hücre yüzeyine sıkıca tutunmasıdır.

3. **Lipit değişimi:** Hücre membran yapısındaki lipitlerin, lipozom yapısında bulunan lipitlerle karşılıklı değişimidir.

4. **Endositoz:** Hücre yüzeyine temasta bulunan lipozomların fagositoz yoluyla hücre içine alınmasıdır.



Şekil 4.5 Lipozomlar ile hücreler arasındaki farklı etkileşim çeşitleri (A. Yurdakul, R. Atav ,2007).

BÖLÜM 5

DENEYSEL KISIM

5.1 KİMYASALLAR

Protoporfirin (PPIX), meso-tetra(4karboksifenil)porfin (TCPP), N hidroksisüksinimid (NHS), N,N¹ disikloheksilkarbondiimit (DCC), dimetilaminopiridin (DMAP), dimetilformamit (DMF), diklorometan (CH₂Cl₂), sodyumsülfat (Na₂SO₄), metanol (CH₃OH), kloroform (CHCl₃), dimetilsülfoksit (DMSO), n hekzan (CH₃(CH₂)₄CH₃), metil histidin ester, glikozamin, asetonitril toluen, sülfirik asit (H₂SO₄), dekanol (C₁₀H₂₁OH) eter, magnezyum sülfat (MgSO₄), etilasetat, hidroklorik asit (HCl), sodyum bikarbonat (NaHCO₃), trifloroasetikasit (TFA), etilendiamin (H₂N-CH₂-CH₂-NH₂), potasyumhidroksit (KOH), fosfat tampon çözeltisi (PBS), çözülmüş benzotriazol 1-yl-oksi-tris-(dimetil amino)-fosfontum hekza florofosfat (BOP),1,2-dipalmitoyil-sn-glisero-3 fosfaditilkolin (DPPC), -1,2 dioleyil-sn- glisero fosfaditilkolin (DOPC).

5.2 CİHAZLAR

Bioaktif porfirinlerin IR spektrumları Perkin Elmer 600-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ATR modülü kullanılarak incelenmiştir.

Bioaktif porfirinlerin karakterizasyonunda 400MHz'lik Bruker Ultra NMR spektrometresi kullanıldı. Karakterizasyonda CDCl₃ çözücüsü kullanıldı.

Sentezlenen porfirinlerin UV-görünür bölge spektrumları UNICAM marka UV cihazı kullanılarak 300-800 nm aralığında alındı.

Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğü ve dağılımı 25°C'de Malvern Zetasizer dinamik ışık saçılımı (DLS) aleti ile ölçüldü.

Lipozomların UV-görünür bölge spektrumları UNİCAM 300-800 nm aralığında alındı.

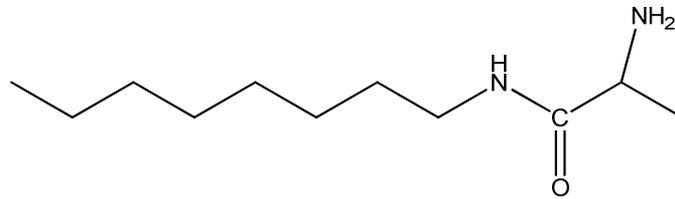
Hazırlanan lipozomların Zeta potansiyel ölçümleri 25 °C’de Malvern Zetasizer Nano ZS aleti ile yapıldı.

Hazırlanan lipozomların fotoğrafları Jeol JSM-7001F/JSM-7001FA Thermal FE SEM cihazı ile çekildi.

5.3 Biomolekül Bağlı Porfirinlerin Sentezlenmesi

5.3.1 Oktil Alanin Yapısının Sentezlenmesi

143 mg (1 mmol) oktil amin bileşiği, 442 mg (1 mmol) 189 mg (1 mmol) Ala-BOC molekülü 442 mg (1 mmol) BOP ve 180 mg (3 mmol) etilen diamin 50 ml asetonitril içerisinde 8 saat karıştırıldı. Reaksiyon sonunda asetonitril rotary evaporatör ile uçuruldu. Sonra sırasıyla 2 N HCl, doymun NaHCO₃ ve doymun NaCl ile yıkanır. Daha sonra MgSO₄ ile kurutulup solvent uçuruldu. 452 mg (0,001 mmol) Oktil Ala-BOC molekülü 10 ml CH₂Cl₂ ve 2 ml trifloroasetikasit (TFA) içerisinde çözülerek 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra madde sırasıyla 2 N ‘lik potasyumhidroksit (KOH) çözeltisi ile ve su ile yıkanarak CH₂Cl₂ ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz alınıp Na₂SO₄ ile kurutulup süzülür. CH₂Cl₂ rotary evaporatör ile uzaklaştırıldı. Açık sarı sıvı ürün elde edildi. IR : 3298 cm⁻¹, 2924 cm⁻¹, 2855 cm⁻¹, 1739 cm⁻¹ 1648 cm⁻¹ dir. ¹HNMR (CDCl₃, ppm) : δ 8,03 (s), δ 5,2 (s), δ 3,4 (t), δ 1,26 (m), δ 1,25 (d), δ 0,80 (t)

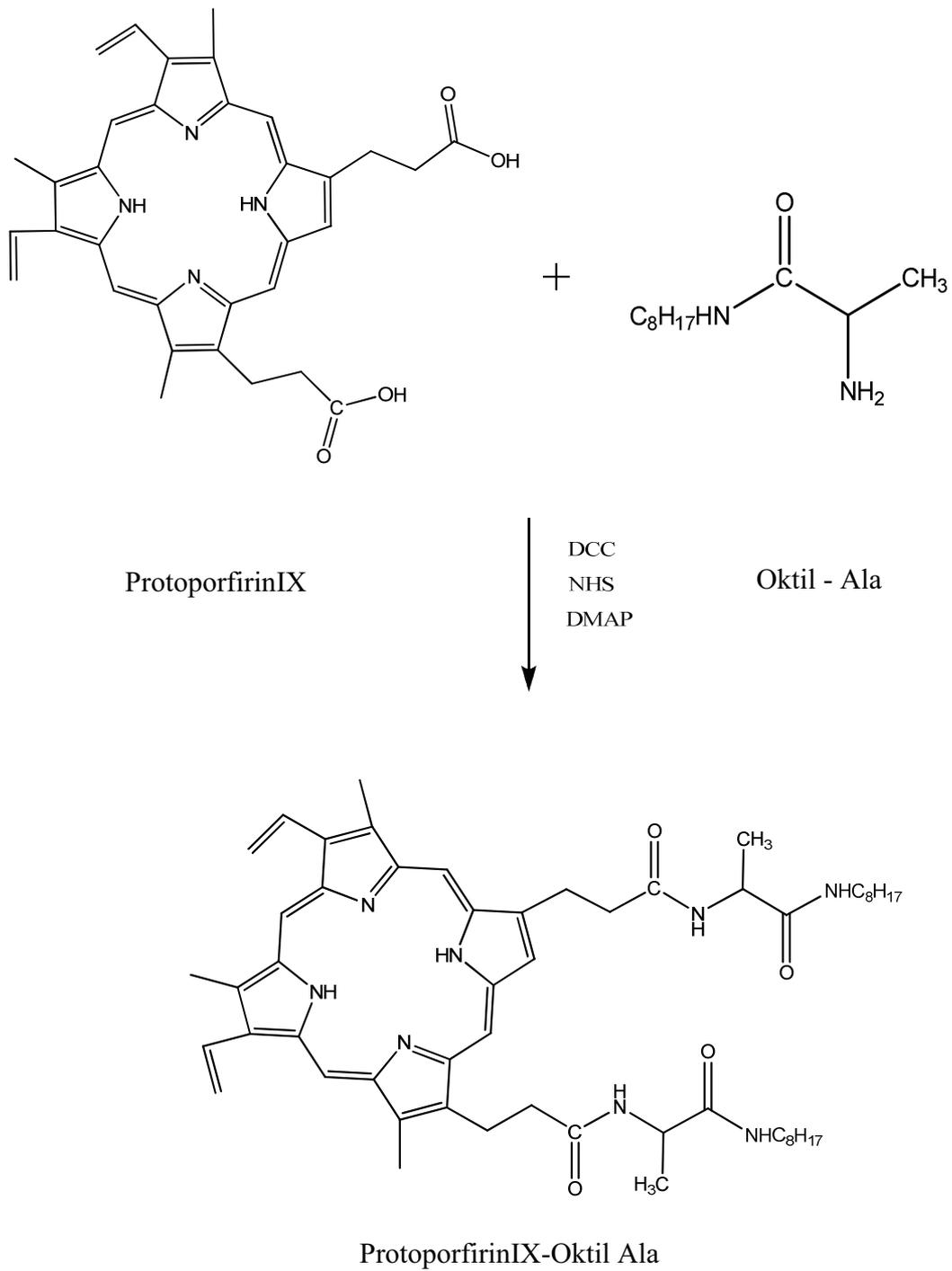


Şekil 5.1 N-Oktil Alanin yapısı

5.3.2 ProtoporfirinIX -Oktil Alanin Yapısının Sentezlenmesi (PPIX-Oktil Ala)

Bir balona 100 mg (0,18 mmol) protoporfirinIX, 73 mg (0,36 mmol) N,N¹-disikloheksilkarbondiimit (DCC), 40 mg (0,36 mmol) N hidroksisüksinimid (NHS) ve 1 mg dimetilaminopiridin (DMAP) ilave edilerek 10 ml dimetilformamit (DMF) içerisinde oda sıcaklığında 2 saat karıştırıldı. Daha sonra 2 ml DMF 'de çözülmüş 71 mg (0,36 mmol) oktil ala reaksiyon karışımına ilave edildi ve reaksiyon gece boyunca oda sıcaklığında devam ettirildi. Karışım süzülerek süzüntü kısmı alındı ve rotary evaporatör ile DMF uzaklaştırıldı. Katı ürün üç defa su ile yıkandı ve 2 defa diklorometan (CH₂Cl₂) ile ekstraksiyon yapıldı. Organik kısım sodyumsülfat (Na₂SO₄) ile kurutuldu ve süzüldü. Diklorometan rotary evaporatör ile uzaklaştırıldı. Koyu kahve renkli katı ürün elde edildi. FT IR: 3324 cm⁻¹, 2926-2850 cm⁻¹, 1625-1571 cm⁻¹. UV-Vis (CHCl₃, λ_{max}): 408 nm. ¹HNMR (CDCl₃, ppm) : δ 8,1 (s), δ 6,4 (t), δ 6,2 (s) δ 5,1 (d), δ 4,7 (s), δ 3,2 (t), δ 1,9 -0,8 (t), δ -3,6 (s).

FT-IR, UV-Vis ¹HNMR spektrumları sırasıyla Ek 1, Ek 2 ve Ek 3'de verilmiştir.

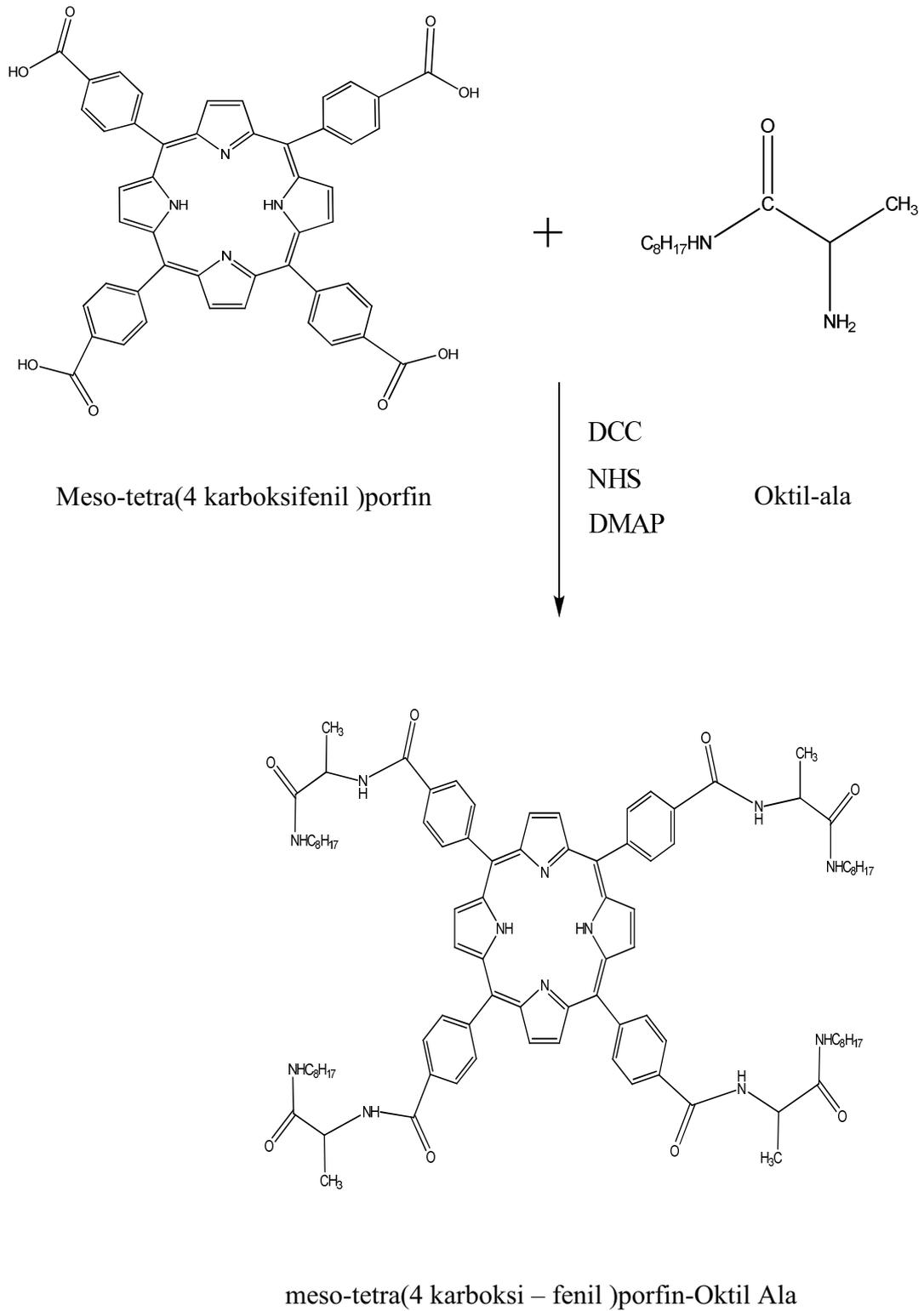


Şekil 5.2 ProtoporphirinIX-Oktıl Ala molekülünün sentez reaksiyonu.

5.3.3 Meso-tetra(4karboksifenil)porfin-Oktil Ala Yapısının Sentezlenmesi (TCPP-Oktil- Ala)

Bir balona 100 mg (0,12 mmol) meso-tetra(4karboksifenil)porfin (TCPP), 78 mg (0,38 mmol) disikloheksilkarbondiimit (DCC), 29 mg (0,25 mmol) N hidroksisüksinimid (NHS) ve 1 mg dimetilaminopiridin (DMAP) ilave edilerek 10 ml dimetilformnamit (DMF) içerisinde oda sıcaklığında 2 saat karıştırıldı. Daha sonra 2 ml DMF içerisinde çözülmüş 101 mg oktil ala reaksiyon karışımına ilave edildi ve reaksiyon gece boyunca oda sıcaklığında devam ettirildi. Karışım süzülerek süzüntü kısmı alındı ve rotary evaporatör ile DMF uzaklaştırıldı. Katı ürün 2 defa su ile yıkandı ve 2 defa kloroform (CH₃Cl₂) ile ekstraksiyon yapıldı. Organik kısım sodyumsülfat (Na₂SO₄) ile kurutuldu ve süzüldü. Rotary evaporatör ile kloroform uzaklaştırıldı. Katı ürüne metanol / kloroform (1/10) kolon kromatografisi yapıldı. Benzer olan tüpler belirlenerek tüpler birleştirildi. Çözücüsü rotary evaporatör ile uzaklaştırıldı. Koyu kahve renkli katı ürün elde edildi. FT IR: 3308 cm⁻¹, 2919-2850 cm⁻¹, 1628-1542 cm⁻¹. UV-Vis (CHCl₃, λ_{max}): 420 nm. ¹H NMR (CDCl₃, ppm): δ 8,7 (s), δ 8,1 (s), δ 7,9 (m), δ 7,4 (m), δ 6,68 (d), δ 6,5 (d) δ 4,7 (q), δ 3,3 (t), δ 3,4 (t), δ 1,5-0,88 (t) , δ -2,9 (s).

FT-IR, UV-Vis, ¹H NMR spektrumları sırasıyla Ek 4, Ek 5 ve Ek 6'da verilmiştir.

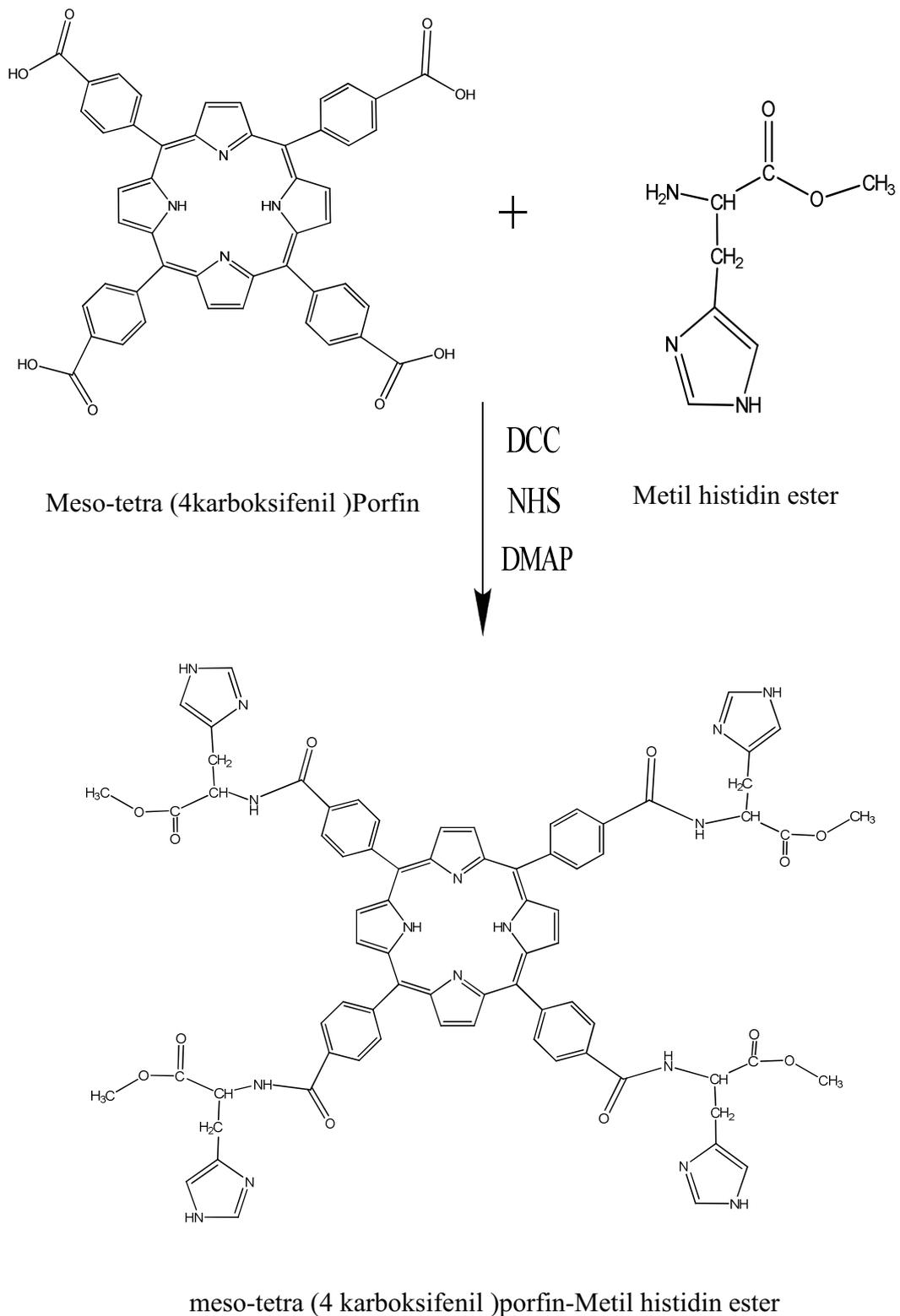


Şekil 5.3 meso-tetra (4 karboksifenil)porfin-Oktil Ala molekülünün sentez reaksiyonu

5.3.4 Meso-tetra(4karboksifenil)porfin-Metil Histidin Ester Yapısının Sentezlenmesi (TCPP-His)

Bir balona 100 mg (0,12 mmol) meso-tetra (4karboksifenil)porfin (TCPP), 125 mg (0,60 mmol) disikloheksilkarbondiimit (DCC), 58 mg (0,50 mmol) N hidroksisüksinimid (DCC) ve 1 mg dimetilaminopiridin (DMAP) ilave edilerek 10 ml dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 2 ml DMSO'da çözülmüş 85 mg (0.50 mmol) metil histidin ester reaksiyon karışımına ilave edildi ve reaksiyon gece boyunca oda sıcaklığında devam ettirildi. Karışım süzüldü. Süzüntü kısmı alındı ve rotary evaporatör ile DMSO uzaklaştırıldı. Katı ürün üzerine su ilave edildi ve 2 saat oda koşullarında karıştırıldı. Sulu kısım santrifüj yapılarak ayrıldı. Daha sonra, oluşan ürüne n heksan çözeltisi ilave edildi ve gece boyunca soğukta karıştırıldı. Sıvı kısım santrifüj yapılarak uzaklaştırıldı. Katı kısım da kurutuldu. Kahve-kırmızı renkli katı ürün elde edildi. FT IR: 3321 cm^{-1} , 2929-2851 cm^{-1} , 1772-1734 cm^{-1} , 1624-1575 cm^{-1} . UV-Vis (CHCl_3 , λ_{max}): 421 nm. $^1\text{HNMR}$ (CDCl_3 , ppm) : δ 13,5 (s), δ 8,8 (s), δ 8,4 (s), δ 7,9 (m), δ 7,2 (m), δ 6,7 (d), δ 5,6 (d), δ 4,6 (t), δ 3,9 (s), δ 3,1 (d), δ -2.9 (s).

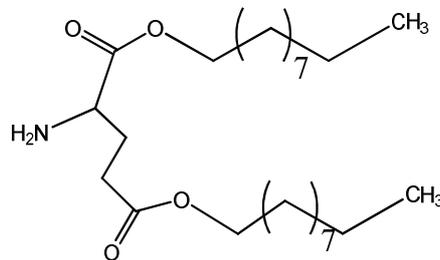
FT-IR, UV-Vis, ^1H NMR, spektrumları sırasıyla Ek 7, Ek 8, Ek 9 'da verilmiştir.



Şekil 5.4 meso-tetra(4 karboksifenil)porfin-Metil histidin ester molekülünün reaksiyonu.

5.3.5 α,γ -Didekil Didesil Glutamat Ester Sentezi

100 ml toluen içerisinde çözülmüş 5 g (34 mmol) glutamik asit üzerine 1,04 ml H_2SO_4 , 13 ml dekanol ilave edilerek reflux altında 16 saat karıştırıldı. Daha sonra, toluen kahverengi-turuncu renkli ürün elde edilinceye kadar rotary evaporatör ile buharlaştırıldı. Ürün su ile yıkanarak 3 defa eter ile ekstarksiyon yapıldı. Organik kısım Mg_2SO_4 ile kurutuldu ve süzüldü. Eter rotary evaporatör ile uzaklaştırıldı. Kahverengi katı ürün elde edildi. FT IR ν (NH) : 3200 - 3370 cm^{-1} ; ν (COOR) : 1743 cm^{-1} . 1H NMR ($CDCl_3$, ppm) : δ 0,90 (t), δ 1,28 (m), δ 1,56 (m), δ 1,66ppm (m), δ 4,06(m), δ 4,16 (m), δ 2,36 (m), δ 2,10 (m), δ 3,36 (m).

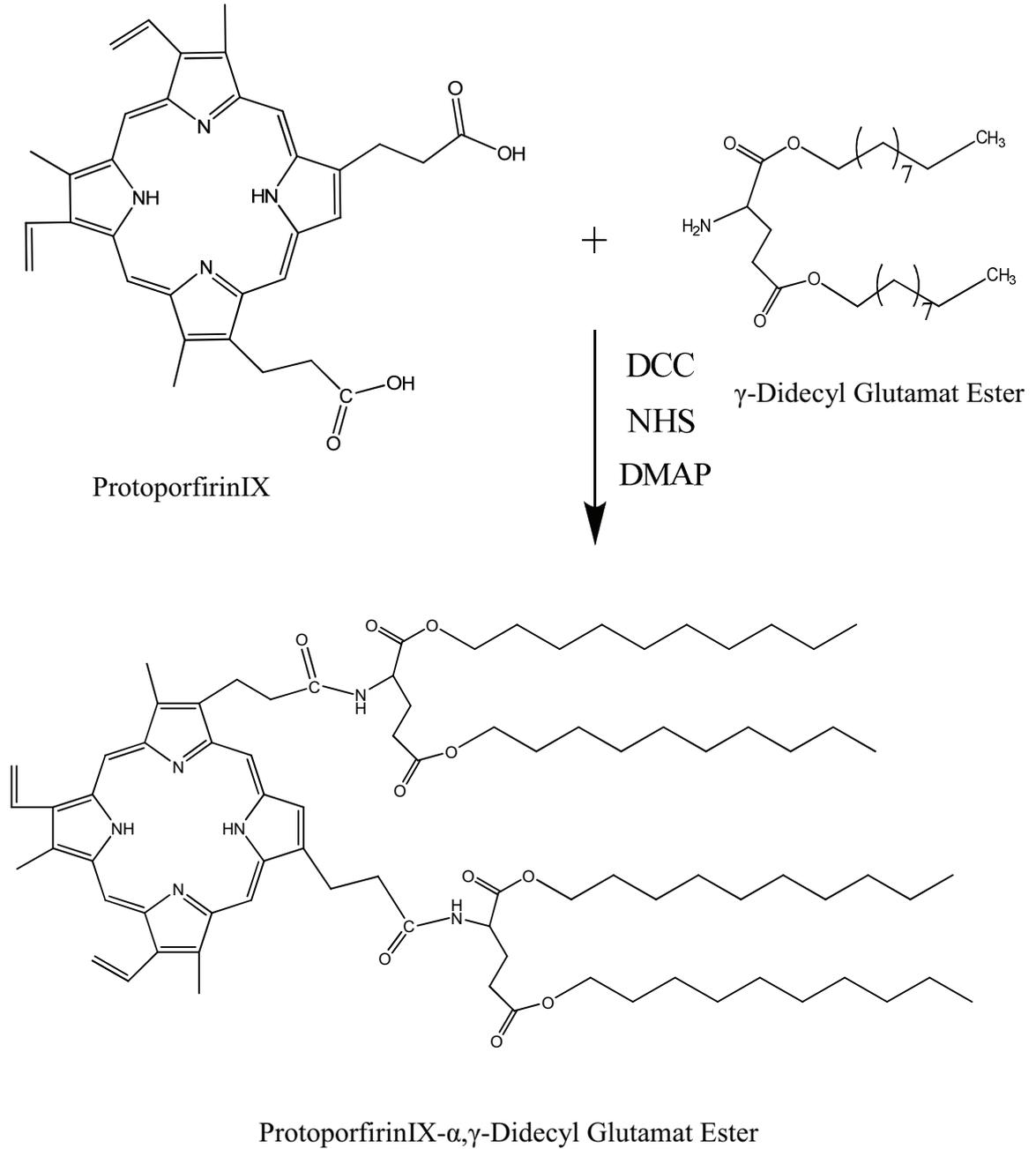


Şekil 5.5 α,γ -Didekil Didesil Glutamat Ester yapısı

5.3.6 ProtoporfirinIX- α,γ -Didekil Glutamat Ester Yapısının Sentezlenmesi

20 ml asetonitril içerisinde çözülmüş 0,35 mmol protoporfirinIX çözeltilisine, 10 ml asetonitrilde çözülmüş trietilamin (3ek), 10 ml asetonitrilde çözülmüş benzotriazol 1-yl-oksi-tris-(dimetil amino)-fosfontum hekza florofosfat (BOP) (1ek) ve 10 ml asetonitrilde çözülmüş α,γ -didekil glutamat ester ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında 4 saat karıştırıldı. Daha sonra karışım süzüldü ve birkaç kere asetonitril ile yıkandı. Çözücü düşük basınç altında buharlaştırıldı ve kalıntı 100 ml etilasetat da çözüldü. Organik faz 2N 20 ml sulu HCl, 20 ml tuzlu su 20 ml doymuş $NaHCO_3$ çözeltilisi ve 50 ml tuzlu su ile yıkandı. Organik kısım magnezyumsülfat ($MgSO_4$) ile kurutuldu ve süzüldü. Çözelti düşük basınç altında buharlaştırıldı. Oluşan katı silika jel ile kromatografi yapılarak saflaştırıldı. FT IR: 3302 cm^{-1} , 2921-2852 cm^{-1} , 1735 cm^{-1} , 1643-1547 cm^{-1} . UV-Vis ($CHCl_3$, λ_{max}): 407 nm. 1H NMR ($CDCl_3$, ppm) : δ 8,3 (s), δ 6,4 (t), δ 6,1 (s), δ 5,1 (d), 4,4 (t), 4,1 (t), δ 1,7-0,8 (t), δ -3,8 (s). MALDI-Toff MS spektrumunda $[M^+]$: 1383 m/z dir.

FT-IR, UV-Vis, ^1H NMR, MALDI-Toff MS spektrumları sırasıyla Ek 10, Ek 11 Ek 12 ve Ek 13'de verilmiştir.



Şekil 5.6 ProtoporfirinIX- α,γ -Didesil Glutamat Ester molekülünün reaksiyonu.

5.4 SENTEZLENEN PORFİRİNLERİN LİPOZOMLARININ HAZIRLANMASI

5.4.1 Materyal ve Metod

Sentezlenen bioaktif porfirinlerin lipozomları 1,2-dipalmitoyil-sn-glisero-3 fosfaditilkolin (DPPC) ve -1,2 dioleyil-sn- glisero fosfaditilkolin (DOPC) fosfolipidleri kullanılarak Hidrasyon-Film Metodu ile hazırlandı .Bu yöntemde porfirin/fosfolipid mol oranı 10/100 olarak alınmıştır.

Bir balonda 10 ml kloroform içerisinde sentezlenen belirli mikardaki porfirin molekülü ve lipid çözülerek vortex yardımıyla iyice karıştırılıp homojen bir karışım elde edildi. Rotary evaporatör yardımıyla kloroform uzaklaştırılmasıyla film tabaka elde edildi. Oluşan film tabaka şeklindeki ürün desikatörde 1 gün bekletildi. Daha sonra üzerine 10 ml fosfat tampon çözeltisi (PBS) ilave edildi ve 2 saat oda koşullarında sonikatörde karıştırıldı. Oluşan lipozomların aynı boyutlarda olmasını sağlamak için 0,1 µm lık karbon filtrelerinden 3 defa geçirildi. Freze dryer yardımıyla lipozomların suyu uzaklaştırıldı. Oluşan katı lipozomlar +4°C de buzdolabında saklandı.

Hazırlanan lipozomların karakterizasyonu için UV, DLS, Zeta Potansiyel ve SEM ölçümleri yapıldı.

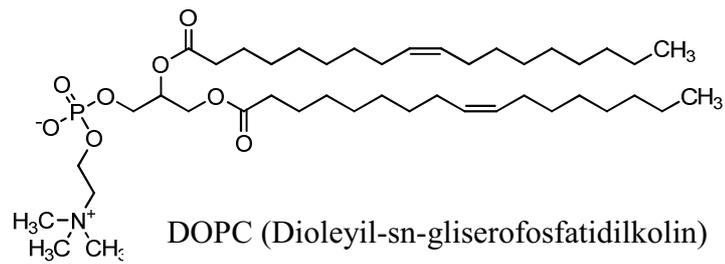
Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüğü, dağılımı ve zeta potansiyel ölçümleri yapıldı. Ölçümler, aletin küvet sisteminde az miktarda lipozomun PBS içinde dağıtılmasıyla elde edilen dispersiyon kullanılarak yapıldı.

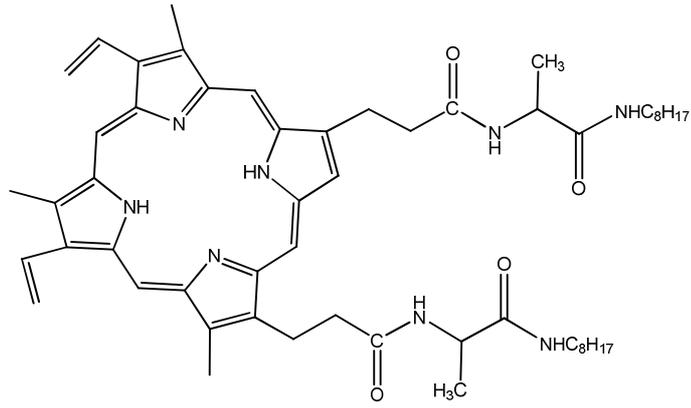
Hazırlanan lipozomların karakterizasyonunda tarmalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü almak için freze-dryer ile suyu giderilen numune, SEM cihazının aparatı üzerindeki 0,25 cm² lik karbon bandı üzerini kapatacak şekilde sürülerek, iletkenliğini sağlamak için Au-Pd kaplama yapıldıktan sonra SEM ölçümü alındı.

Lipozom	Kullanılan porfirin ve miktarı	Kullanılan lipid ve miktarı
PPIX-Oktil-Ala-DOPC	1 mg (0,001 mmol) PPIX-Oktil-Ala	8 mg (0,01 mmol) DOPC
PPIX-Oktil-Ala-DPPC	1 mg (0,001 mmol) PPIX-Oktil-Ala	8,5 mg (0,01 mmol) DPPC
TCPP- Oktil-Ala-DPPC	1 mg (0,006 mmol) TCPP-Oktil-Ala	5 mg (0,06 mmol) DPPC
TCPP-His-DOPC	2 mg (0,001 mmol) TCPP-His	10 mg (0,01 mmol) DOPC
PPIX-Glu-DOPC	3 mg (0,002 mmol) PPIX-Glu	9 mg (0,02 mmol) PPIX-Glu-DOPC
PPIX-Glu-DPPC	4 mg (0,003 mmol) PPIX-Glu	10 mg (0,03 mmol)PPIX-Glu-DPPC

Çizelge 5.1 Hazırlanan lipozomlar ve bunların hazırlanış miktarları

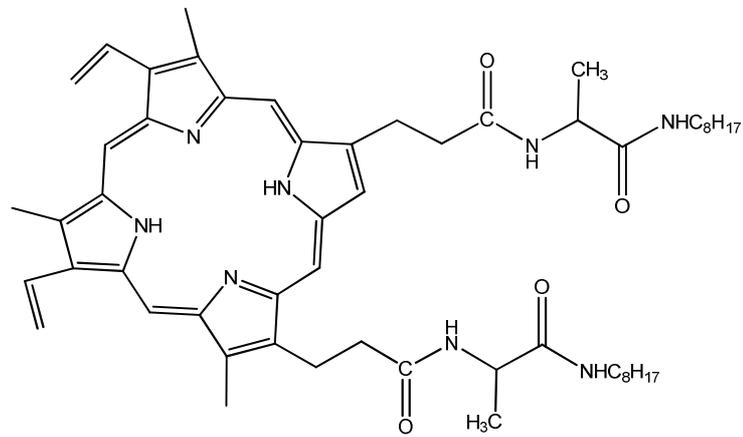
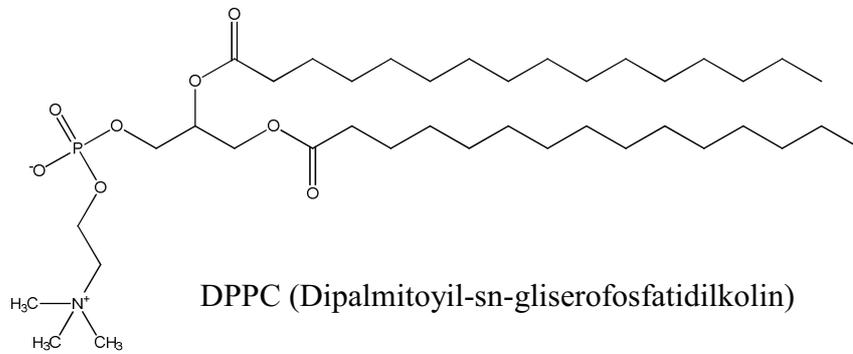
5.4.2 PPIX- Oktil Ala-DOPC Lipozomunun Hazırlanışı





Şekil 5.7 ProtoporfirinIX-Oktil Ala ve DOPC yapısı

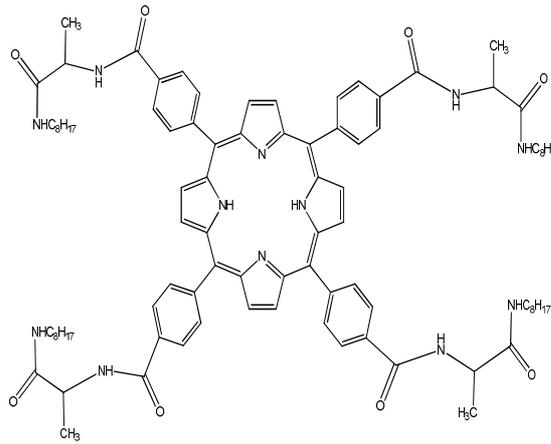
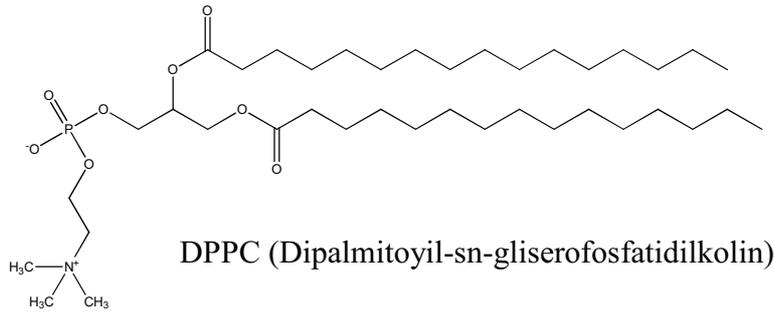
5.4.3 PPIX- Oktil Ala DPPC Lipozomunun Hazırlanışı



PPIX-Oktil Ala

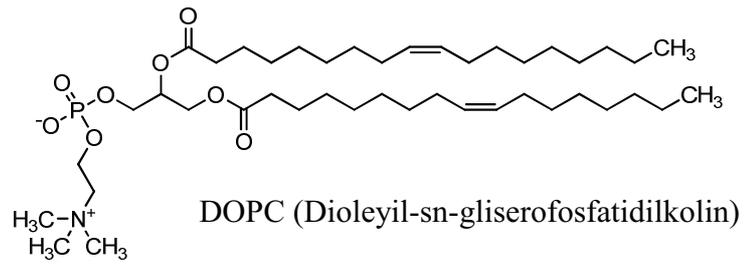
Şekil 5.8 PPIX-Oktil Ala ve DPPC yapısı

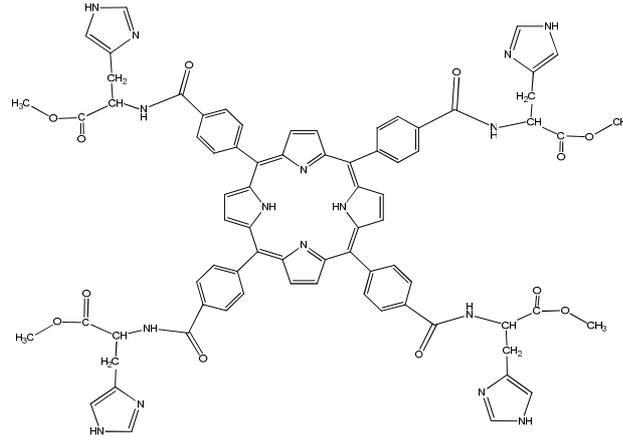
5.4.4 TCPP-Oktil Ala DPPC Lipozomunun Hazırlanışı



Şekil 5.9 TCPP-Oktil Ala ve DPPC yapısı

5.4.5 TCPP-His -DOPC Lipozomunun Hazırlanışı

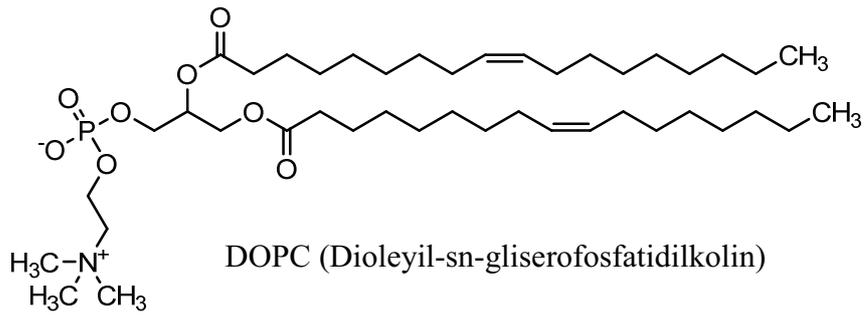




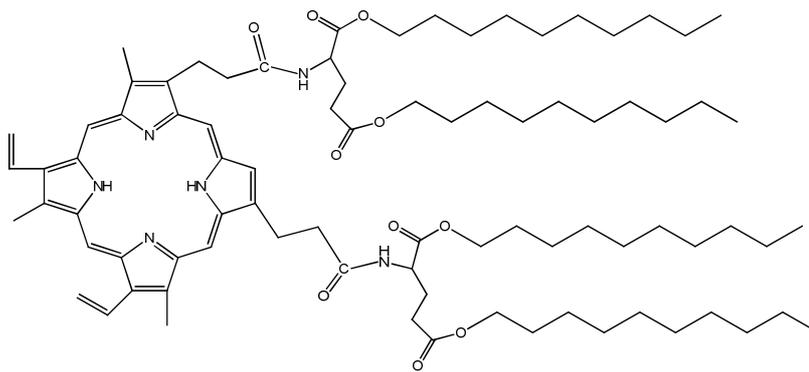
TCPP-His

Şekil 5.10 TCPP-His ve DOPC yapısı

5.4.6 PPIX- Glu - DOPC Lipozomunun Hazırlanışı



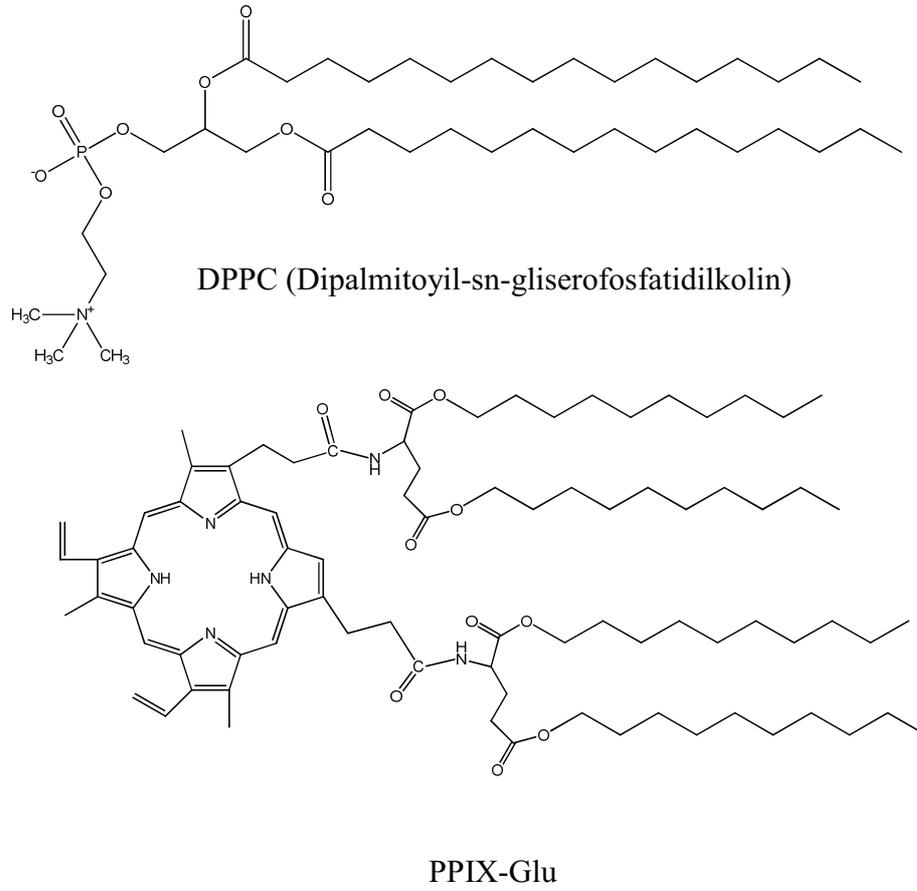
DOPC (Diioleyil-sn-gliserofosfatidilkolin)



PPIX-Glu

Şekil 5.11 PPIX-Glu ve DOPC yapısı

5.4.7 PPIX- Glu - DPPC Lipozomunun Hazırlanışı



Şekil 5.12 PPIX-Glu ve DPPC yapısı

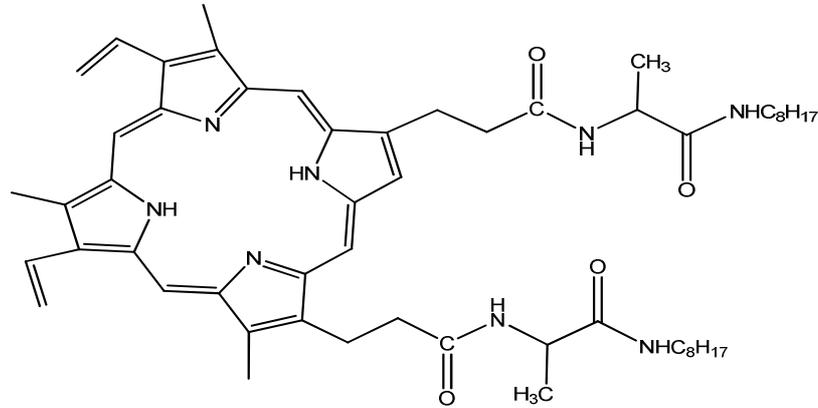
BÖLÜM 6

BULGULAR VE TARTIŞMA

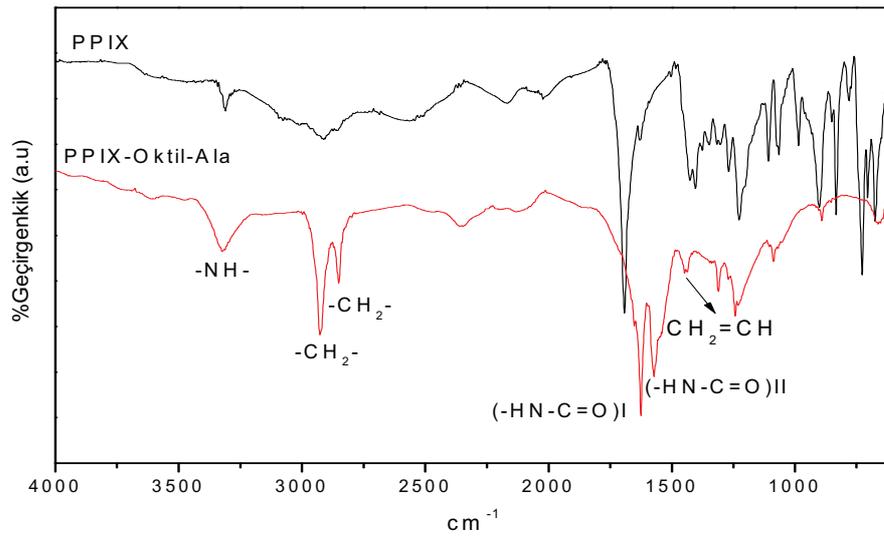
6.1 BİOMOLEKÜL BAĞLI PORFİRİNLERİN KARAKTERİZASYONU

6.1.1 Protoporfirin IX Oktil-Alanin (PPIX- Oktil-Ala)

PPIX-Oktil Alanin molekülü; oktilamin ile konjuge edilmiş alanin aminoasitinin protoporfirin IX ile NHS-DCC amitleşme reaksiyonuyla elde edilmiştir. (Şekil 6.1) PPIX-Oktil Ala molekülüne ait FT-IR spektrumunda; 1625 cm^{-1} ve 1571 cm^{-1} de görülen pikler porfirin molekülündeki amit grubu ile amino asite bağlı amit gruplarının örtüşmesinden kaynaklanan amit I ve amit II piklerinin varlığı ve 1692 cm^{-1} deki protoporfirin IX e ait karboksilikasit pikinin kaybolması beklenen ürünün oluştuğuna işaret etmektedir. Ayrıca spektrumdaki 1430 cm^{-1} civarındaki pikler porfirin halkasına ait C=C grupları ile periferal konumlardaki $\text{CH}_2=\text{CH}$ gruplarının örtüşmesinden kaynaklanan piklerdir. Porfirin halkasındaki pirol gruplarına ait NH gerilim piki 3324 cm^{-1} de çıkarken aminoasit gruplarındaki alifatik hidrokarbonlara ait C-H gerilim pikleri porfirine ait CH_2 gruplarıyla örtüşerek $2926\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülmektedir. (Şekil 6.2)



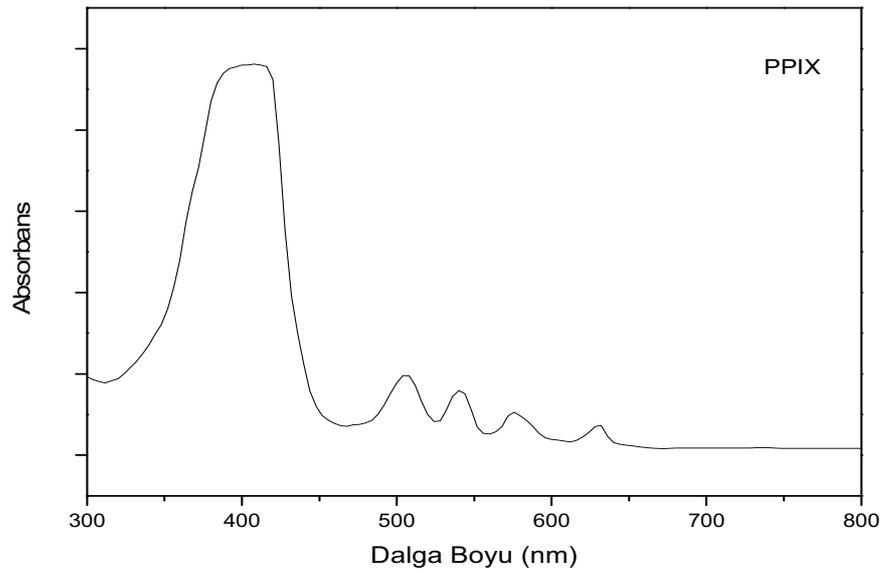
Şekil 6.1 Protoporfirin-Oktil-Ala



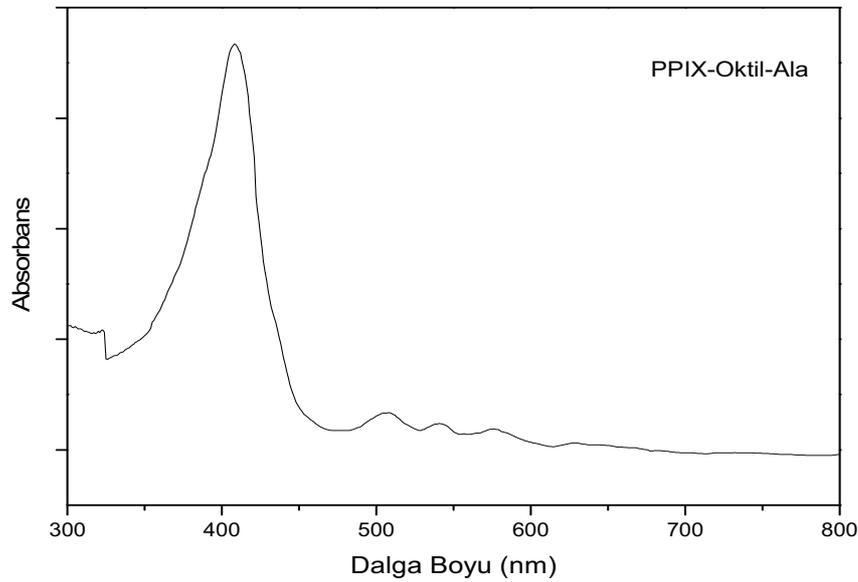
Şekil 6.2 PPIX Oktıl-Ala molekülüne ait FT-IR spektrumu

Protoporfirin IX (DMSO içerisinde) ve PPIX-Oktıl Ala (kloroform içerisinde) moleküllerine ait UV-Vis spektrumları incelendiğinde, PPIX-Oktıl Ala bileşiğine ait B bandı 408 nm'de Q bandları sırasıyla 506 nm, 541 nm, 576 nm, 629 nm de görülmüştür. Protoporfirin karboksilik asitleri üzerinden oluşan konjugasyon yapılarında porfirin halkasının oluşturduğu elektronik absorpsiyona bir etkisi olmadığından, absorpsiyon piklerinde önemli bir kayma gözlenmemiştir.

a)



b)



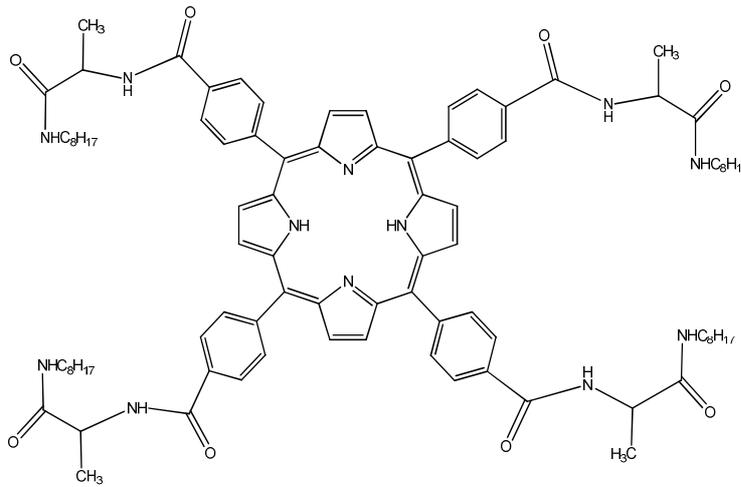
Şekil 6.3 a) PPIX molekülünün (DMSO içerisinde) **b)** PPIX-Oktıl-Ala molekülünün (CHCl₃ içinde) UV-Vis Spektrumu

PIX-Oktıl Ala molekülüne ait ¹H-NMR spektrumları Ek 3'de verilmiştir. Spektrumda, aminoasit gruplarında bulunan sekonder –NH- gruplarına ait protonların 8,1 ppm 'de singlet pik, porfirin yapısındaki protonların 6,4 ppm'de triplet pik, 5,1 ppm'de dublet pik, pirol halkasına ait protonun 6,2 ppm'de singlet pik, aminoasit yapısındaki –CH- grubuna ait protonların 4,7 ppm'de quartet pik, aminoasit yapısındaki –NH-CH₂- grubundaki –CH₂- grubuna ait protonların 3,2 ppm' de triplet pik, porfirin yapısındaki –NH- grubuna ait protonun -3,6 ppm'de singlet verdiği

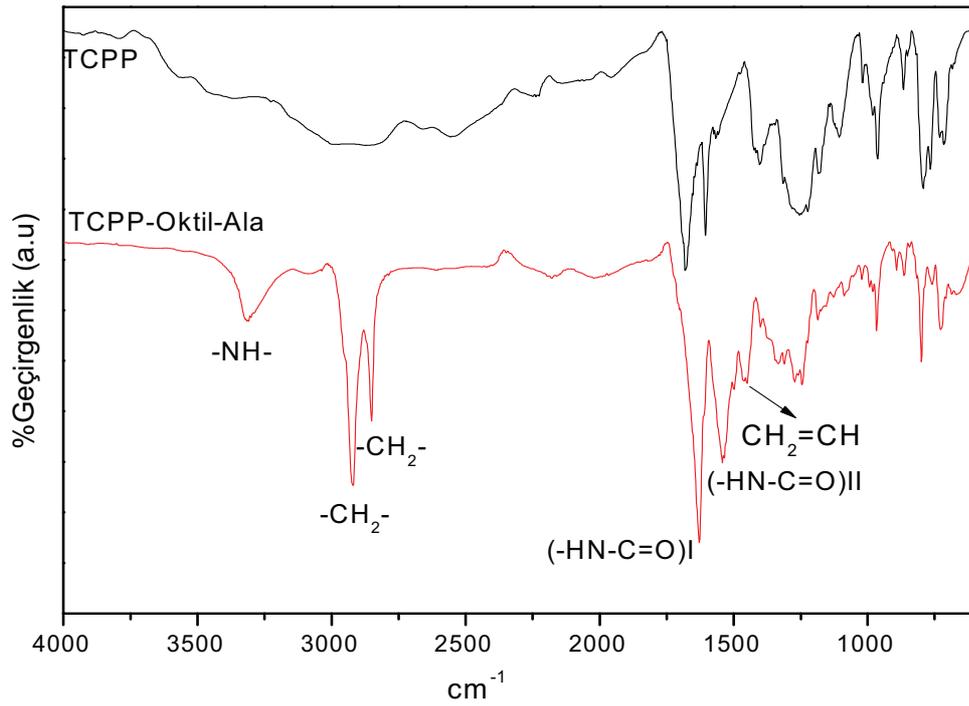
görülmektedir. Bunların yanı sıra, uzun zincirli aminoasit yapısındaki $-CH_2-$ gruplarına ait protonların pikleri 1,9 ppm ile 0,80 ppm arasında görülmektedir.

6.1.2 Meso-tetra(4karboksifenil)porfin-OktilAla (TCPP-Oktil-Ala)

TCPP- Oktil Alanin molekülü; oktilamin ile konjuge edilmiş alanin aminoasitinin TCPP ile NHS-DCC amitleşme reaksiyonuyla elde edilmiştir. (Şekil 6.4) TCPP-Oktil Ala molekülüne ait FT-IR spektrumunda; porfirin molekülündeki amit grubu ile amino asite bağlı amit gruplarının örtüşmesinden kaynaklanan amit I ve amit II pikleri 1628 cm^{-1} ve 1542 cm^{-1} de pik vermesi ve porfirin halkasına bağlı benzoik asit gruplarına ait 3000 cm^{-1} - 2500 cm^{-1} arasındaki yayvan pikin kaybolması beklenen ürünün oluştuğuna işaret etmektedir. Ayrıca spektrumdaki 1430 cm^{-1} civarındaki pikler porfirin halkasına ait C=C gruplarından kaynaklanan piklerdir. Porfirin halkasındaki pirol gruplarına ait NH gerilim piki 3308 cm^{-1} de çıkarken aminoasit gruplarındaki alifatik hidrokarbonlara ait C-H gerilim pikleri $2919\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülmektedir. (Şekil 6.5).



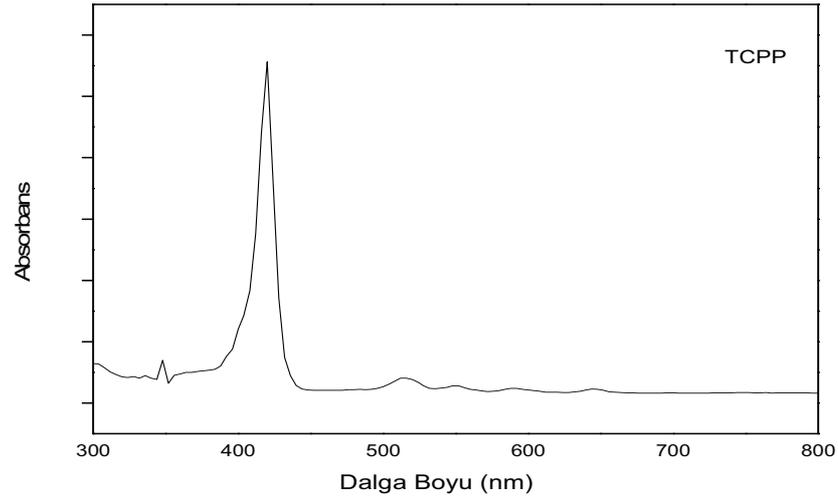
Şekil 6.4 Meso-tetra(4karboksifenil)porfin-Oktil Ala



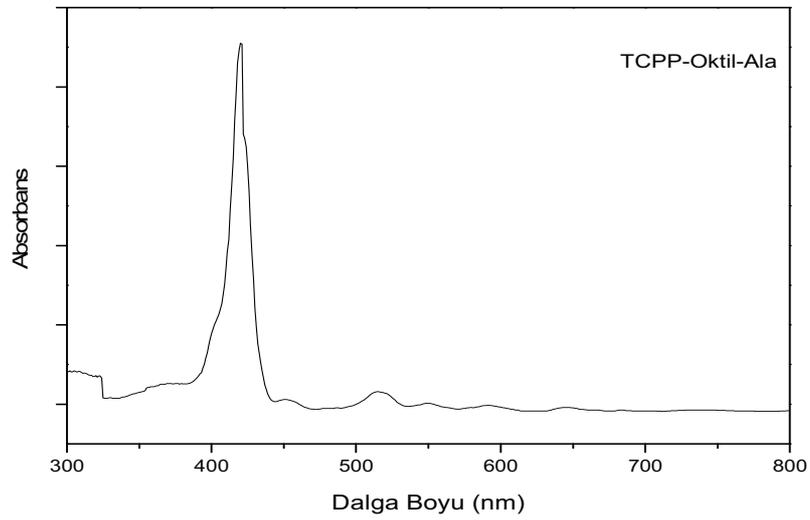
Şekil 6.5 TCPP-Oktil-Ala molekülüne ait FT-IR spektrumu

TCPP (DMSO içerisinde) ve TCPP-Oktil Ala (kloroform içerisinde) moleküllerine ait UV-Vis spektrumları incelendiğinde, TCPP-Oktil Ala bileşiğine ait B bandı 420 nm'de Q bandları sırasıyla 514 nm, 555 nm, 590 nm ve 650 nm de görülmüştür. Meso-tetra(4karboksifenil)porfin karboksilik asitlerin üzerinden oluşan konjugasyon yapılarında porfirin halkasının oluşturduğu elektronik absorpsiyona bir etkisi olmadığından, absorpsiyon piklerinde önemli bir kayma gözlenmemiştir.

a)



b)



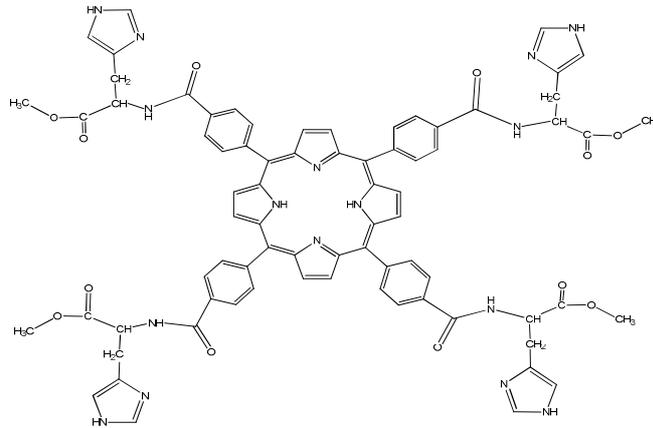
Şekil 6.6 a) TCPP molekülünün (DMSO içerisinde) **b)** TCPP-Oktil Ala molekülünün (CHCl₃ içinde) UV-Vis Spektrumu

TCPP-Oktil Ala molekülüne ait ¹H-NMR spektrumları Ek 6'da verilmiştir. Spektrumlara bakıldığında, aminoasit gruplarında fenil-CO- grubuna bağlı sekonder –NH- gruplarına ait protonların 8,7 ppm 'de singlet pik, aminoasit gruplarındaki R-CO grubuna bağlı sekonder –NH gruplarına ait protonların 8,1 ppm'de singlet pik, benzen halkasına bulunan CH=CH gruplarına ait protonların 7.9 ppm ve 7.4 ppm' de multiplet pik, pirol halkalarına ait protonların 6,6 , 6,5 ve 5,2 ppm de dublet pik, aminoasit yapısındaki NH–CH₂- grubundaki –CH₂- grubuna ait protonların 4,7 ppm 'de, aminoasit grubundaki –CH₂- grubuna ait protonların 3,2 ppm'de triplet pik, porfirin halkasındaki –NH- gruplarına ait protonların ise – 2,9 ppm'de singlet pik verdiği

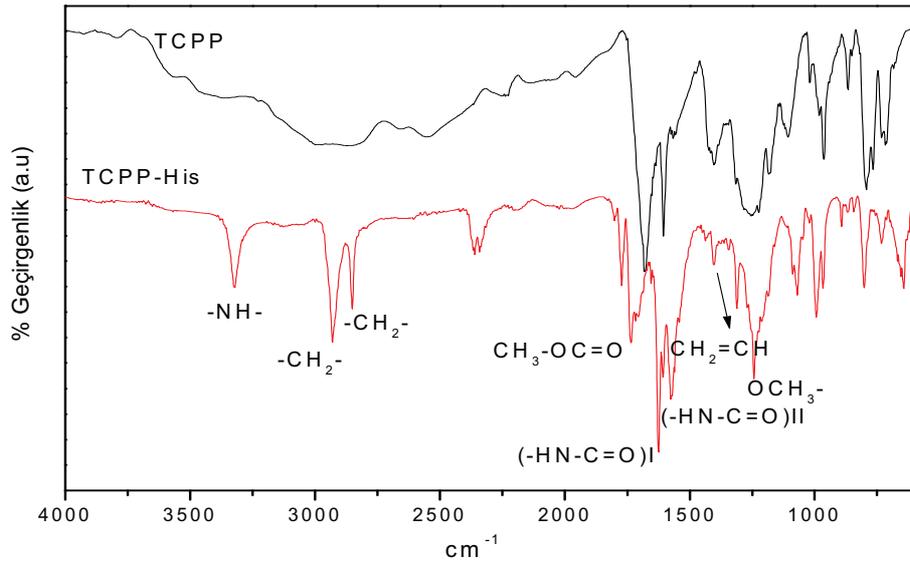
görülmektedir. Bunların yanı sıra, uzun zincirli aminoasit yapısındaki $-CH_2-$ gruplarına ait protonların pikleri 1,5 ppm ile 0,81 ppm arasında görülmektedir.

6.1.3 Mesotetra(4karboksifenil)Porfin-Metil Histidin Ester (TCPP-His)

TCPP-His molekülü; metil histidin ester aminoasitinin TCPP ile NHS-DCC amitleşme reaksiyonuyla elde edilmiştir. (Şekil 6.7). TCPP-His molekülüne ait FT-IR spektrumunda; 1624 cm^{-1} ve 1575 de görülen pikler porfirin molekülündeki amit grubu ile amino asite bağlı amit gruplarının örtüşmesinden kaynaklanan amit I ve amit II piklerinin varlığı ve 3000 cm^{-1} - 2500 cm^{-1} arasındaki TCPP molekülüne ait yayvan COOH pikinin kaybolması beklenen ürünün oluştuğuna işaret etmektedir. Ayrıca spektrumdaki 1430 cm^{-1} civarındaki pikler porfirin halkasına ait C=C gruplarından kaynaklanan piklerdir. 1772 - 1734 cm^{-1} de görülen pikler de histidin yapısında bulunan $CH_3-O-C=O$ gruplarına ait piklerdir. Porfirin halkasındaki pirol gruplarına ait NH gerilim piki 3308 cm^{-1} de çıkarken aminoasit gruplarındaki alifatik hidrokarbonlara ait C-H gerilim pikleri 2929 - 2851 cm^{-1} aralığında görülmektedir. (Şekil 6.8).

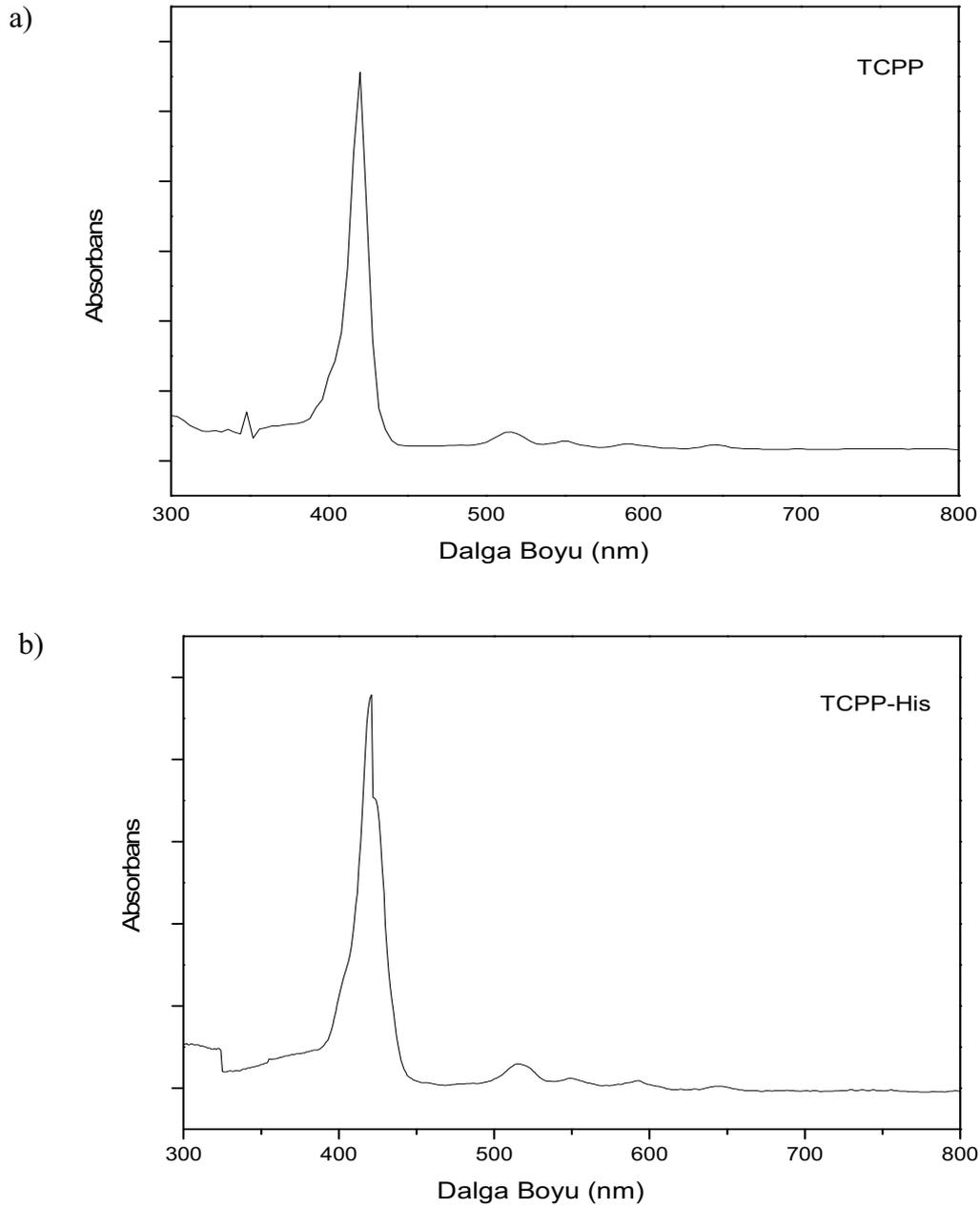


Şekil 6.7 Mesotetra(4karboksifenil)porfin-Metil histidin ester



Şekil 6.8 TCPP-His bileşiğine ait FT-IR spektrumu

TCPP (DMSO içerisinde) ve TCPP-His (kloroform içerisinde) moleküllerine ait UV-Vis spektrumları incelendiğinde, TCPP-His bileşiğine ait B bandı 421 nm'de Q bandları sırasıyla 516 nm, 550 nm, 592 nm, 644 nm de görülmüştür. Meso-tetra(4karboksifenil)porfirin karboksilik asitlerin üzerinden oluşan konjugasyon yapılarında porfirin halkasının oluşturduğu elektronik absorpsiyona bir etkisi olmadığından, absorpsiyon piklerinde önemli bir kayma gözlenmemiştir.



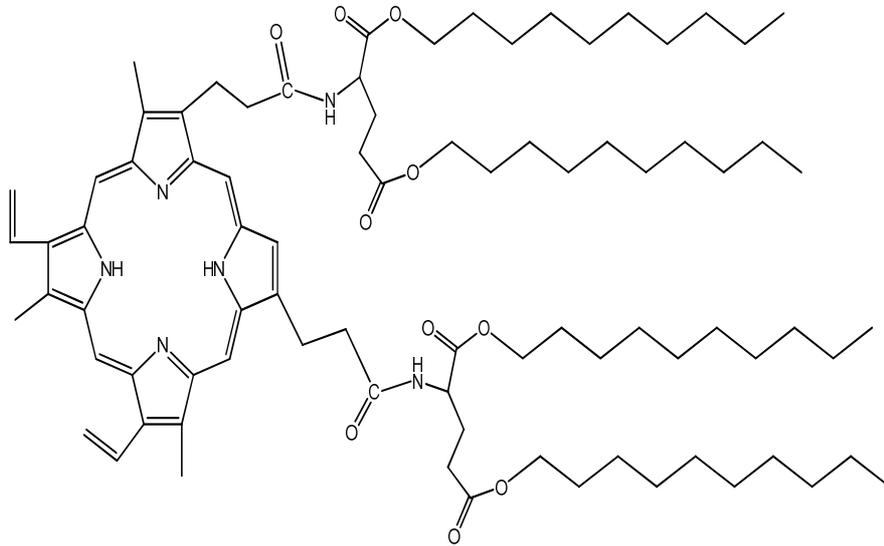
Şekil 6.9 a) TCPP molekülünün (DMSO içerisinde) **n b)** TCPP-His molekülünün (CHCl₃ içerisinde) UV-Vis Spektrumu

TCPP - His bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumları Ek 9'da verilmiştir. Spektrumlara bakıldığında, imidazol halkasında bulunan -NH- grubuna ait protonun 13,5 ppm'de singlet pik, imidazol halkasında bulunan -CH=N grubuna ait protonun 8,9 ppm 'de singlet pik, metil histidin yapısında bulunan sekonder -NH- grubuna ait protonun 8,4 ppm'de singlet pik, benzen halkasında bulunan -CH=CH- gruplarına ait protonların 7,9 ppm ve 7,2 ppm de multipler pik, pirol halkasına ait protonların 6,7 ve 5,6 ppm'de dublet pik, metil histidin ester yapısındaki -CH- protonun ait 4,6 ppm'de triplet pik, metil histidin ester yapısında bulunan -OCH₃ grubuna ait protonun 3,9 ppm' de singlet

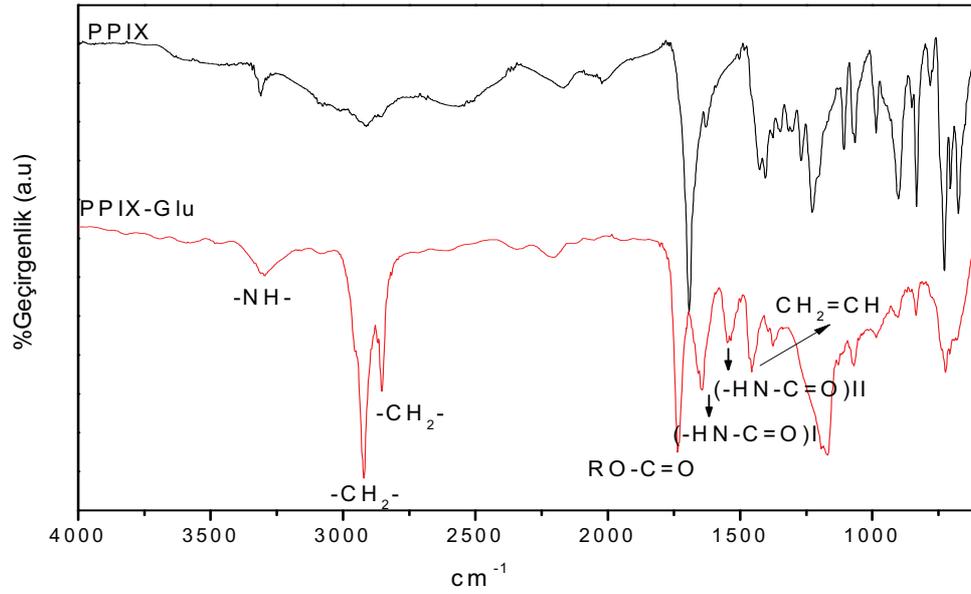
pik, imidazol halkasına bağlı $-\text{CH}_2-$ gruplarına ait protonların 3,1 'de dublet pik , porfirin halkasındaki $-\text{NH}-$ gruplarına ait protonların ise $- 2,9$ ppm'de singlet pik verdiği görülmektedir.

6.1.4 ProtoporfirinIX- α,γ -Didesill Glutamat Ester (PPIX-Glu)

PPIX-Glu molekülü; α,γ -Didesill Glutamat Esterin Protoporfirin IX ile NHS-DCC amitleşme reaksiyonuyla elde edilmiştir. (şekil 6.10) PPIX-Glu molekülüne ait FT-IR spektrumunda; 1643 cm^{-1} ve 1547 cm^{-1} de görülen pikler porfirin molekülündeki amit I ve amit II piklerinin varlığı ve 1692 cm^{-1} deki protoporfirin IX e ait karboksilikasit pikinin kaybolması beklenen ürünün oluştuğuna işaret etmektedir. 1735 cm^{-1} de görülen pik de α,γ -Didecyl Glutamat Ester yapısındaki $-\text{CH}_2-$ $\text{O}-\text{C}=\text{O}$ gruplarına aittir. Ayrıca spektrumdaki 1430 cm^{-1} civarındaki pikler porfirin halkasına ait $\text{C}=\text{C}$ grupları ile periferal konumlardaki $\text{CH}_2=\text{CH}$ gruplarının örtüşmesinden kaynaklanan piklerdir. Porfirin halkasındaki pirol gruplarına ait NH gerilim piki 3324 cm^{-1} de çıkarken aminoasit gruplarındaki alifatik hidrokarbonlara ait C-H gerilim pikleri porfirine ait CH_2 gruplarıyla örtüşerek $2926-2850\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülmektedir. (şekil 6.11)

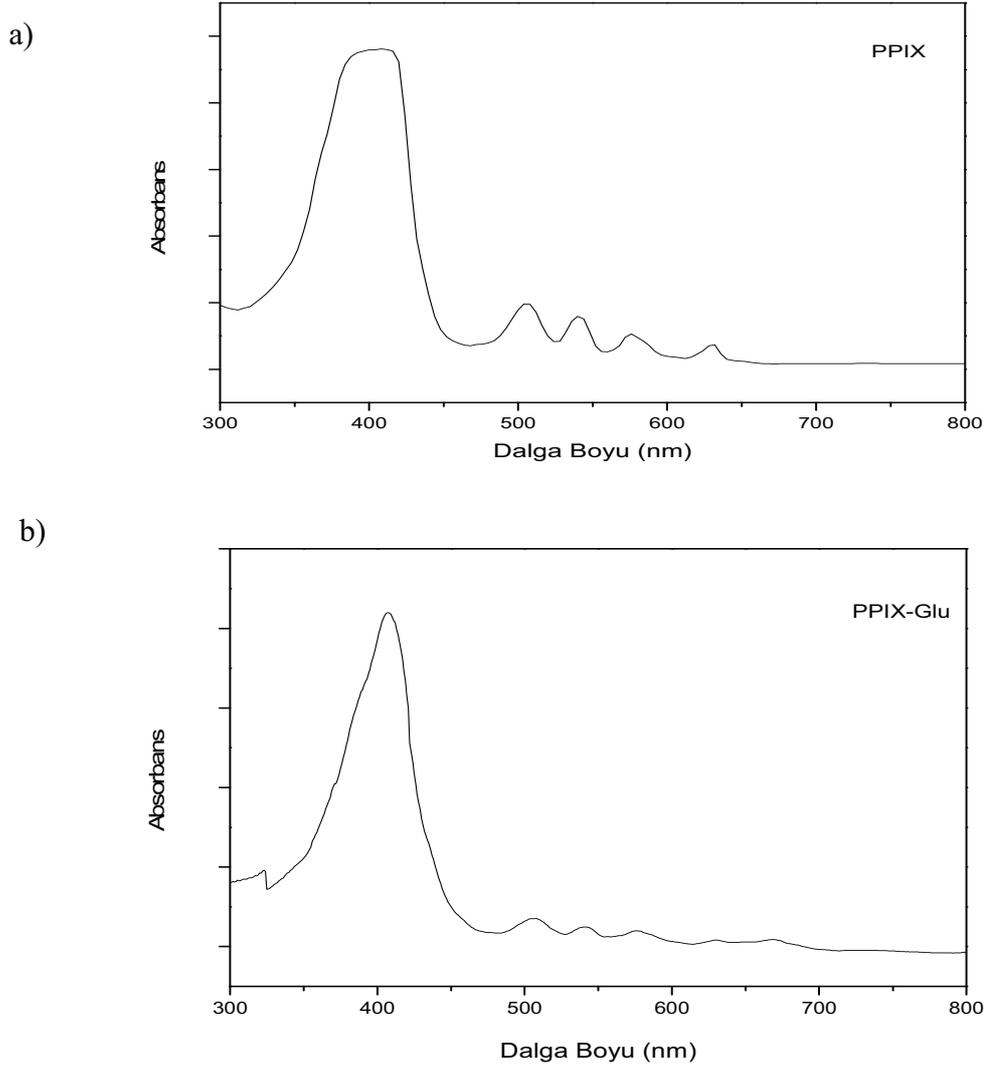


şekil 6.10 ProtoporfirinIX- α,γ -Didecyl Glutamat Ester



Şekil 6.11 PPIX-Glu molekülüne ait FT -IR spektrumu

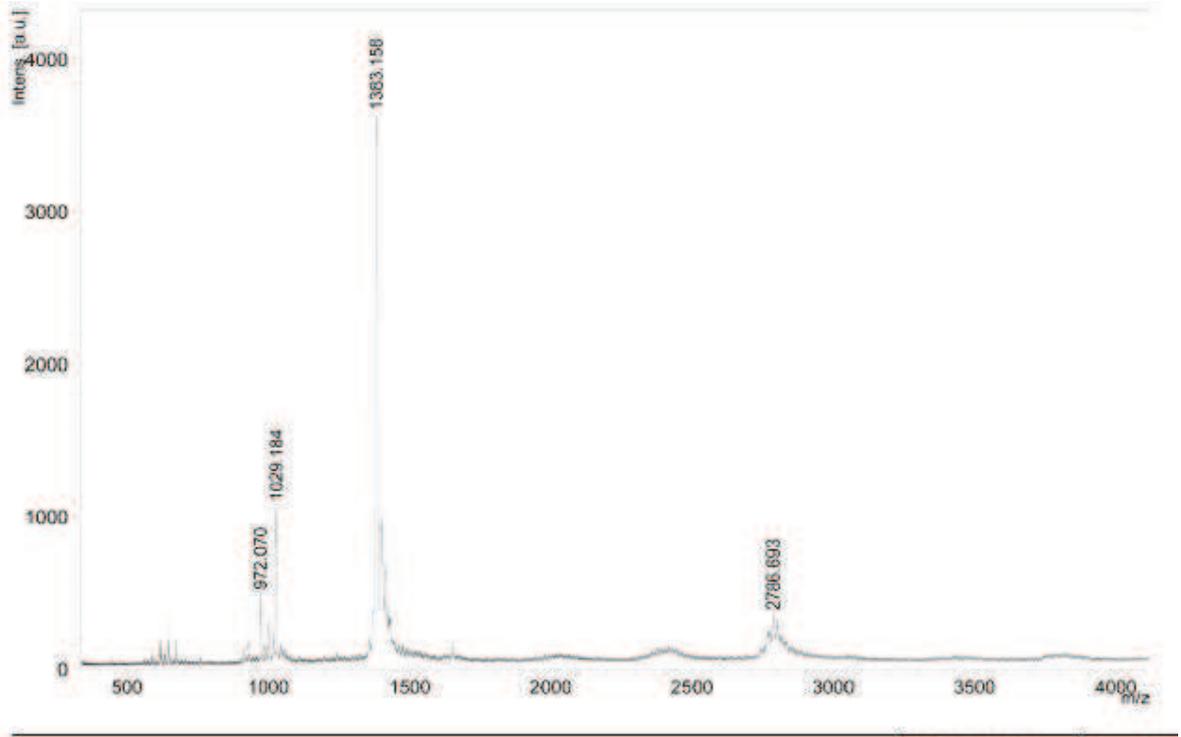
Protoporfirin IX (DMSO içerisinde) ve PPIX-Glu (kloroform içerisinde) moleküllerine ait UV-Vis spektrumları incelendiğinde, B bandı 407 nm'de Q bandları sırasıyla 507 nm, 542 nm, 577 nm ve 630 nm de görülmüştür. Protoporfirinin karboksilik asitlerin üzerinden oluşan konjugasyon yapılarında porfirin halkasının oluşturduğu elektronik absorpsiyona bir etkisi olmadığından, absorpsiyon piklerinde önemli bir kayma gözlenmemiştir.



Şekil 6.12 a) PPIX molekülünün(DMSO içerisinde) **b)** PPIX-Glu molekülünün (CHCl_3 içerisinde) UV-Visible Spektrumu.

PPIX-Glu molekülüne ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumları Ek 12'de verilmiştir. Spektrumlara bakıldığında, glutamat ester yapısında bulunana sekonder $-\text{NH}$ -grubuna ait protonun 8,3 ppm'de singlet pik, porfirin yapısındaki protonların 6,4 ppm'de triplet ve 5,1 ppm'de dublet pik, pirol halkasına ait protonun 6,1 ppm'de singlet pik ,glutamat ester yapısındaki $-\text{COO-CH}_2$ grubuna ait protonun 4,4 ppm'de triplet pik ve $-\text{COO-CH}_2$ grubuna ait protonun 4,1 ppm'de triplet pik ve porfirin halkasındaki $-\text{NH}$ -protonun -3,8 ppm'de singlet pik verdiği görülmektedir. Bunların yanı sıra glutamat ester yapısındaki uzun zincirli $-\text{CH}_2-$ gruplarına ait protonlar 1,7 ppm ile 0,8 ppm aralığında pik verdiği görülmektedir.

PPIX-Glu molekülüne ait MALDI-Toff MS spektrumunda moleküler iyon piki[M⁺]: 1383 m/z 'de görülmüştür.



Şekil 6.13 PPIX-Glu molekülünün Kütle spektrumu

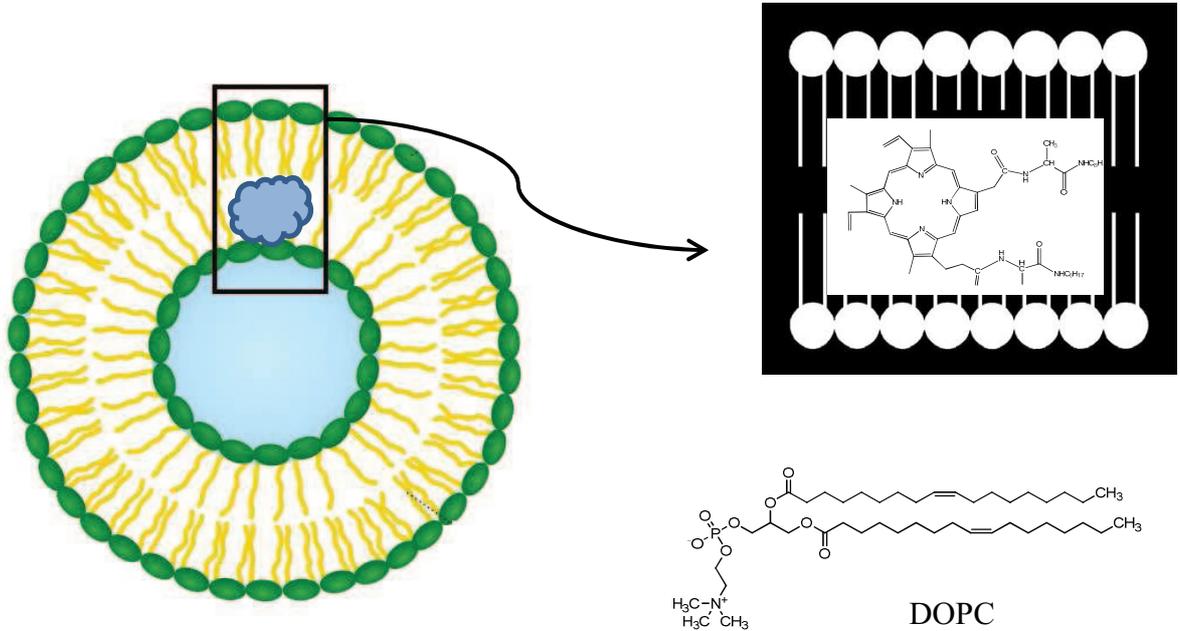
6.2 LİPOZOMLAR

Sentezlenen bioaktif porfirinler Hidrasyon-Film metodu kullanılarak Dipalmitoyil-fosfatidilkolin (DPPC) ve Dioleil-fosfatidilkolin (DOPC) fosfalipidleri kullanılarak lipozomları hazırlandı. Hazırlanan lipozomların UV, DLS , Zeta Potansiyel ve SEM ölçümleri alındı.

Fotosensitizör	Lipozom	Boyut (nm)	Zeta Potansiyel(mV)	λ_{\max} (nm)
PPIX-Oktil Ala	DOPC	150	-2,92	408
PPIX- Oktil Ala	DPPC	78,8	-2,24	376
TCPP- Oktil Ala	DPPC	180	-2,25	420
TCCP-His	DOPC	122,8	-9,22	420
PPIX-Glu	DOPC	182	-4,96	407
PPX-Glu	DPPC	128	-2,99	411

Çizelge 6.1 Hazırlanan lipozomların özellikleri

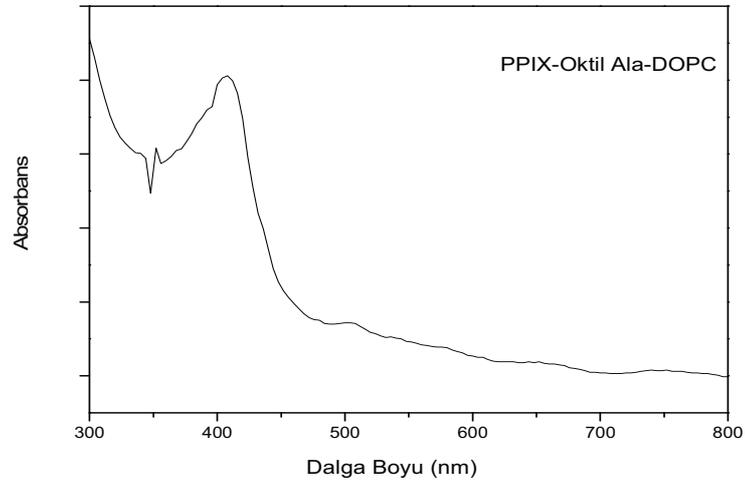
6.2.1 PPIX-Oktil Ala -DOPC Lipozomu



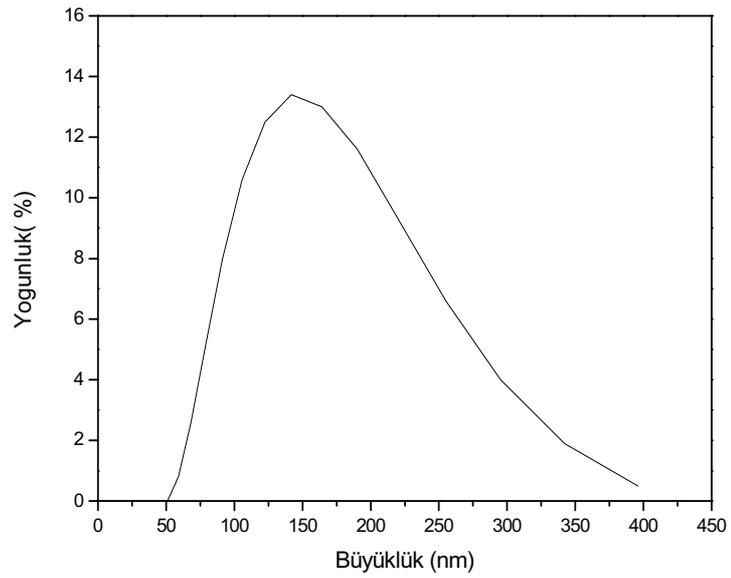
Şekil 6.14 PPIX-Oktil Ala molekülünün DOPC lipozomu içerisine alınması

PPIX-Oktil Ala-DOPC lipozomuna ait UV-Vis Spektrumunda λ_{\max} 408 nm olarak ölçülmüştür. PPIX-Oktil Ala-DOPC lipozomunun Işık Saçılımı (DLS) cihazı ile ortalama büyüklüğü 150 nm olarak belirlenmiştir. 25°C de yapılan Zeta Potansiyel ölçümü sonucunda, yüzey yükü de -2,92 mV olarak bulunmuştur. DLS ölçümüyle elde edilen sonuçlara göre lipozom veziküllerin boyutları küçük olduğundan agregasyon

oluşturmaya yatkınlıkları ölçülen düşük seviyedeki zeta potansiyeli ile de doğrulanmaktadır.

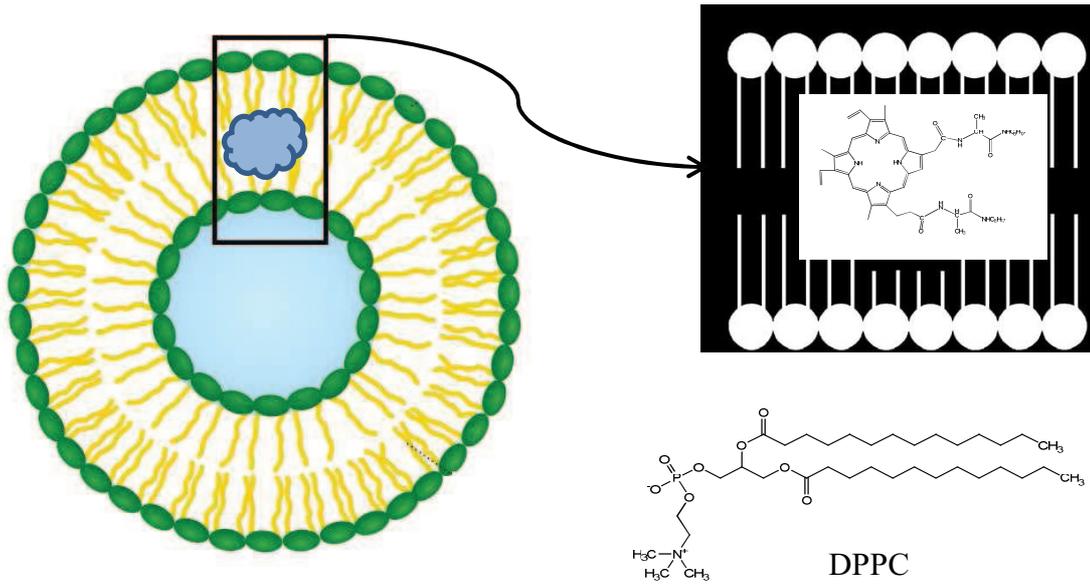


Şekil 6.15 PPIX- Oktil Ala -DOPC Lipozomunun (PBS içersinde) UV – Vis Spektrumu



Şekil 6.16 PPIX- Oktil Ala -DOPC Lipozomunun DLS Grafiği

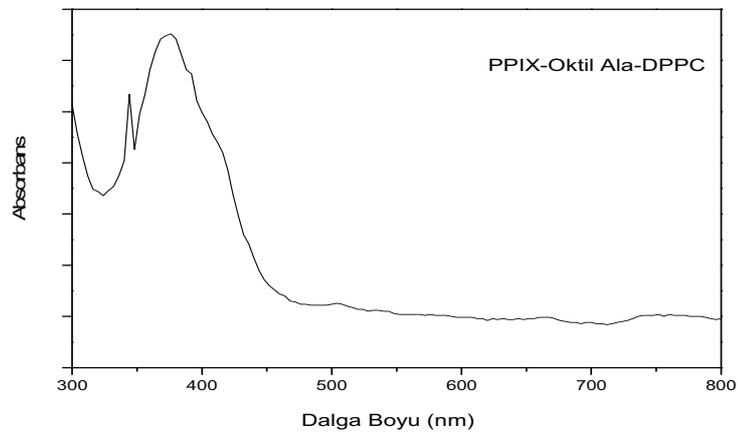
6.2.2 PPIX-Oktil Ala -DPPC Lipozomu



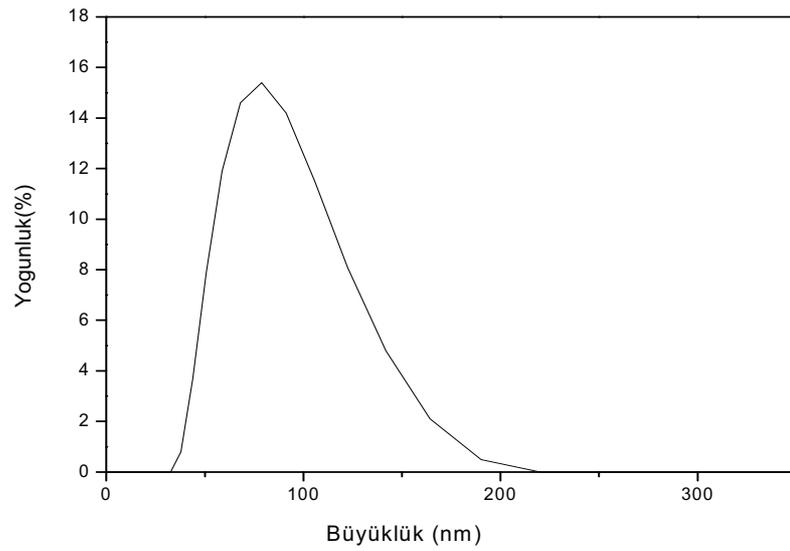
Şekil 6.17 PPIX-Oktil Ala molekülünün DPPC lipozomu içerisine alınması

PPIX-Oktil Ala -DPPC lipozomuna ait UV-Vis Spektrumunda λ_{mak} 376 nm olarak ölçülmüştür.

PPIX-Oktil Ala-DPPC lipozomunun Işık Saçılımı (DLS) cihazı ile ortalama büyüklüğü 78,8 nm olarak belirlenmiştir. 25°C de yapılan Zeta Potensiyel ölçümü sonucunda, yüzey yükü de -2,24 mV olarak bulunmuştur. DLS ölçümüyle elde edilen sonuçlarda lipozom veziküllerinin boyutları küçük olduğundan agregasyon oluşturmaya yatkınlıkları ölçülen düşük seviyedeki zeta potansiyeli ile de doğrulanmaktadır.

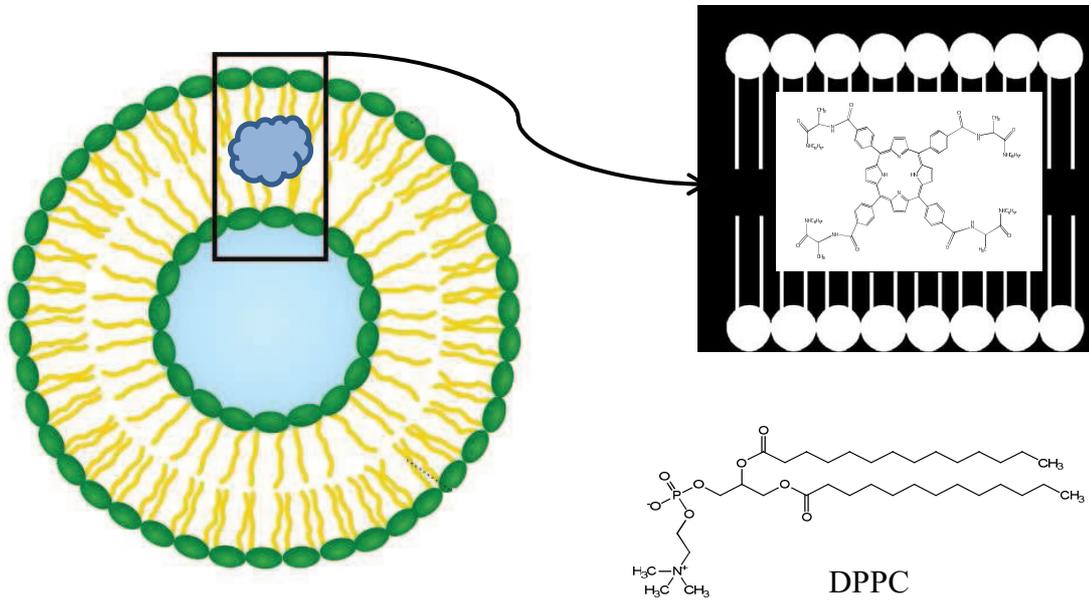


Şekil 6. 18 PPIX- Oktil Ala -DPPC Lipozomunun (PBS içersinde) UV-Vis Spektrumu



Şekil 6.19 PPIX- Oktıl Ala -DPPC Lipozomunun DLS Grafiği

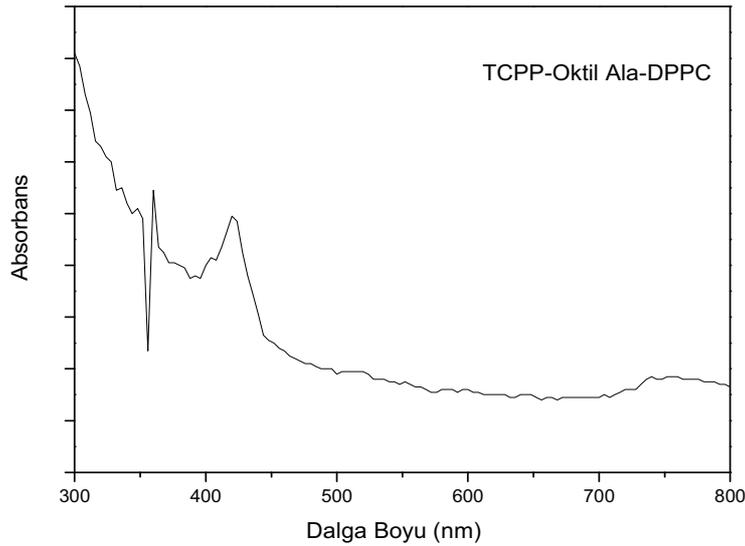
6.2.3 TCPP-Oktıl Ala -DPPC Lipozomu



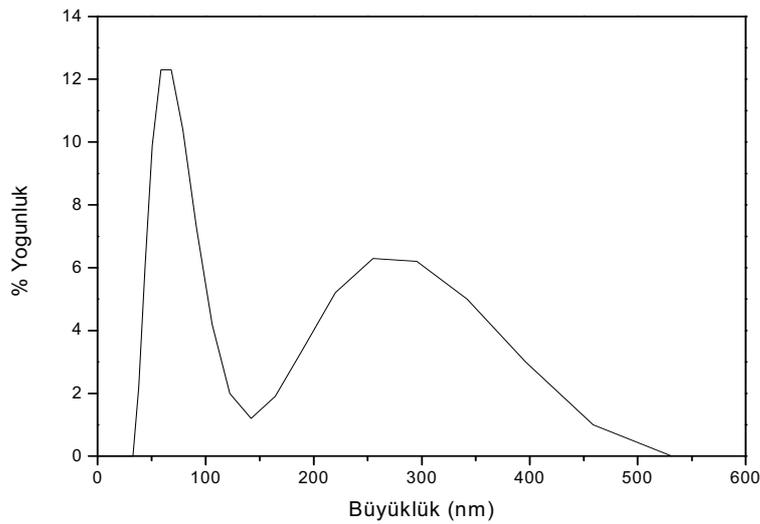
Şekil 6.20 TCPP-Oktıl Ala molekülünün DPPC lipozomu içerisine alınması

TCPP-Oktıl Ala -DOPC lipozomuna ait UV-Vis Spektrumunda λ_{mak} 420 nm olarak ölçülmüştür.

TCPP-Oktil Ala-DOPC lipozomunun Işık Saçılımı (DLS) cihazı ile ortalama büyüklüğü 180 nm olarak belirlenmiştir. 25°C de yapılan Zeta Potansiyel ölçümü sonucunda, yüzey yükü de -2,25 mV olarak bulunmuştur. DLS ölçümüyle elde edilen sonuçlara göre lipozom veziküllerin boyutları küçük olduğundan agregasyon oluşturmaya yatkınlıkları ölçülen düşük seviyedeki zeta potansiyeli ile de doğrulanmaktadır.

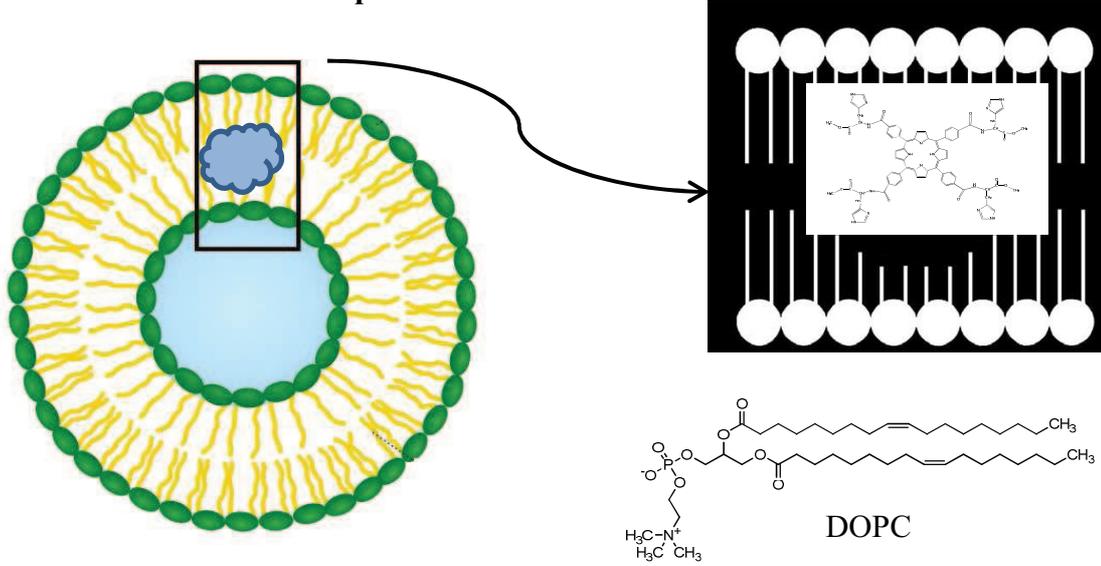


Şekil 6.21 TCPP-Oktil Ala-DPPC Lipozomunun (PBS içersinde) UV–Vis Spektrumu



Şekil 6.22 TCPP-Oktil Ala-DPPC Lipozomunun DLS Grafiği

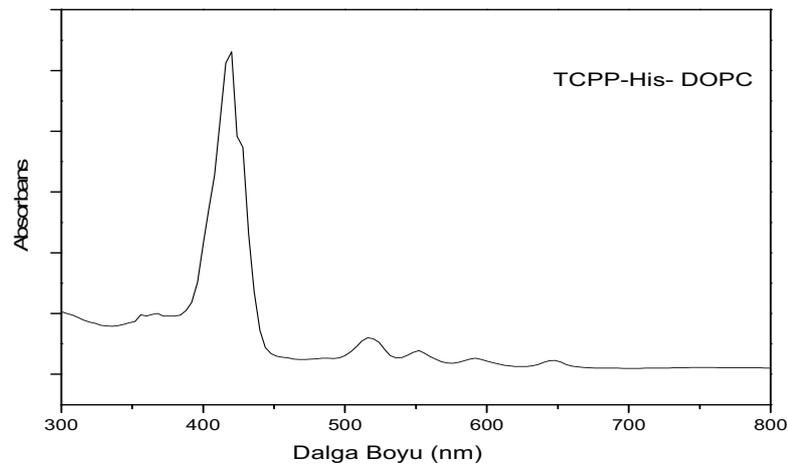
6.2.4 TCPP-His-DOPC Lipozomu



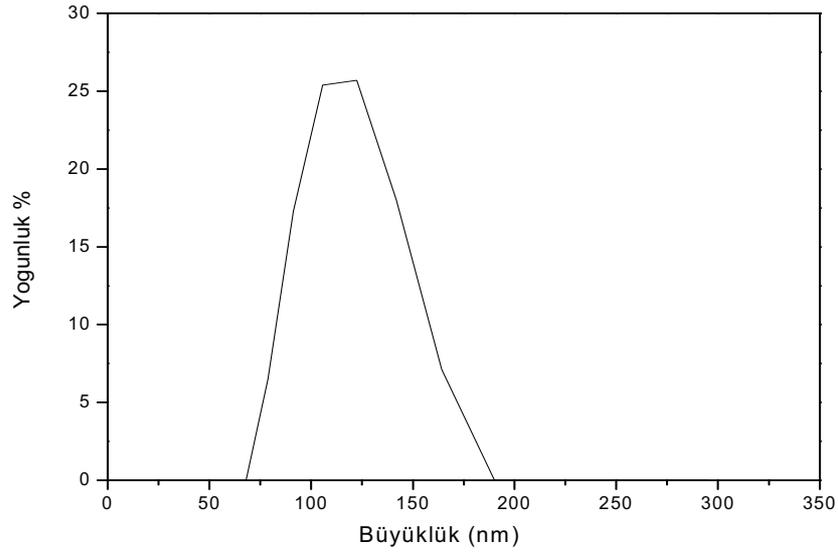
Şekil 6.23 TCPP-His molekülünün DOPC lipozomu içerisine alınması

TCPP-His-DOPC lipozomuna ait UV-Vis Spektrumunda λ_{mak} 420 nm olarak ölçülmüştür.

TCPP-His-DOPC lipozomunun Işık Saçılımı (DLS) cihazı ile ortalama büyüklüğü 122,8 nm olarak belirlenmiştir. 25°C de yapılan Zeta Potensiyel ölçümü sonucunda, yüzey yükü de -9,22 mV olarak bulunmuştur. Zeta potensiyel değerinin artmasıyla agregasyon azalmaktadır.

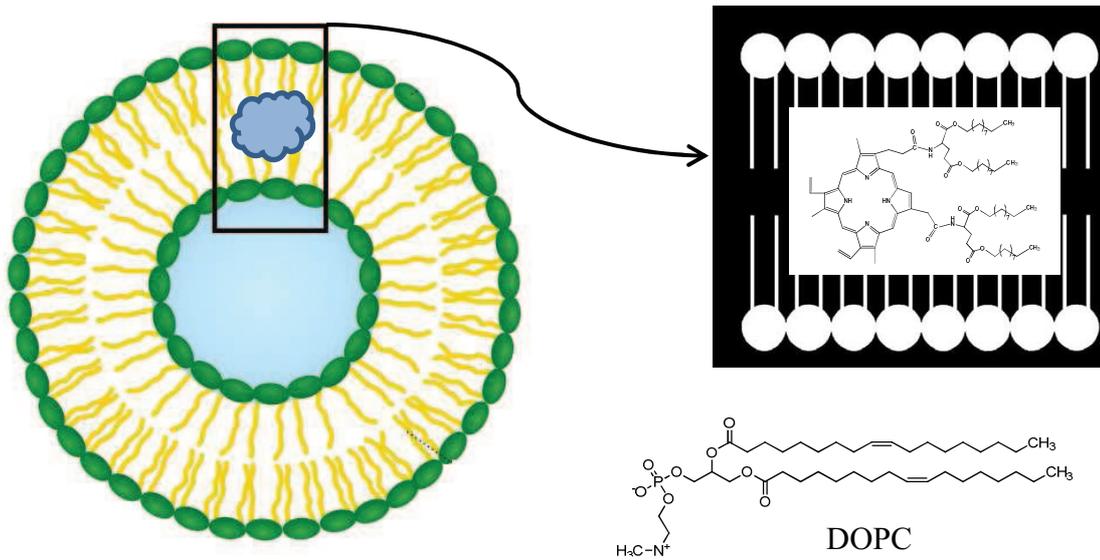


Şekil 6.24 TCPP-His-DOPC Lipozomunun (PBS içerisinde) UV-Vis Spektrumu



Şekil 6.25 TCPP-His-DOPC Lipozomunun DLS Grafiği

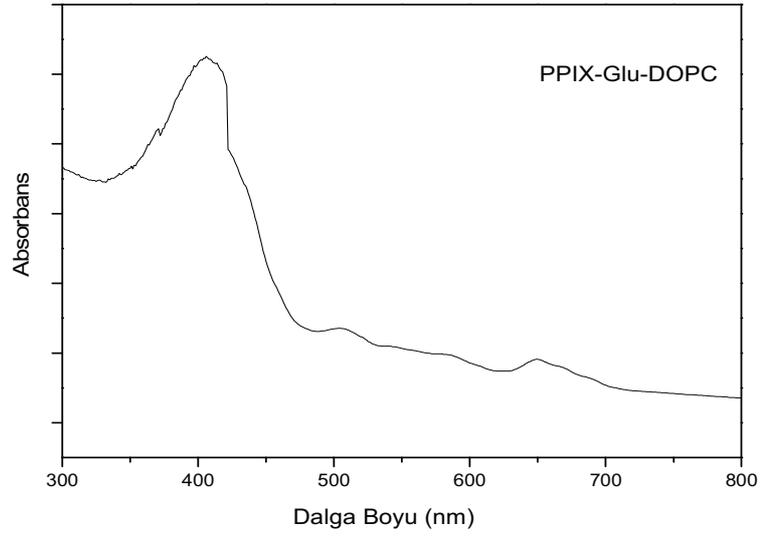
6.2.5 PPIX-Glu-DOPC Lipozomu



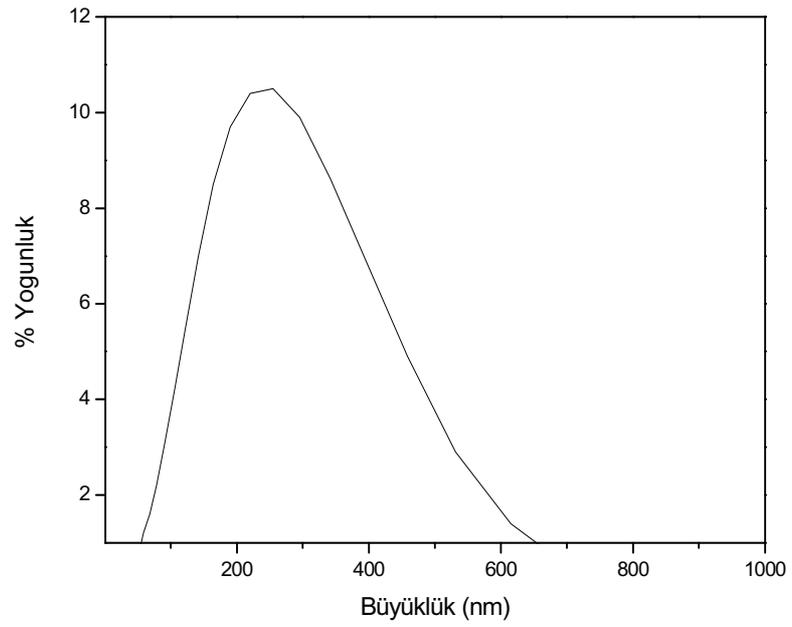
Şekil 6.26 PPIX-Glu molekülünün DOPC lipozomu içerisine alınması

PPIX-Glu-DOPC lipozomuna ait UV-Vis Spektrumunda λ_{mak} 407 nm olarak ölçülmüştür.

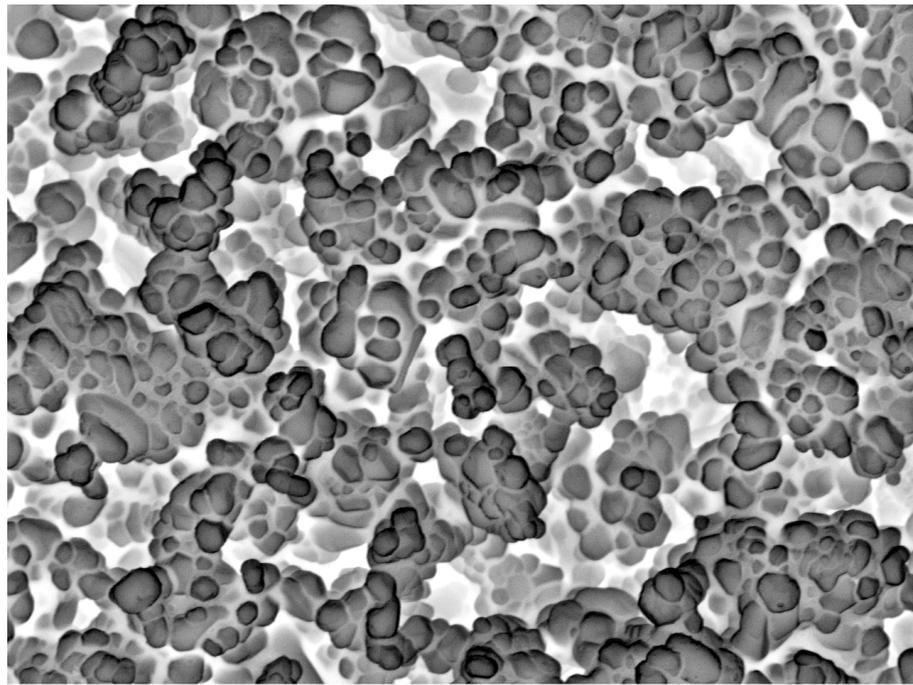
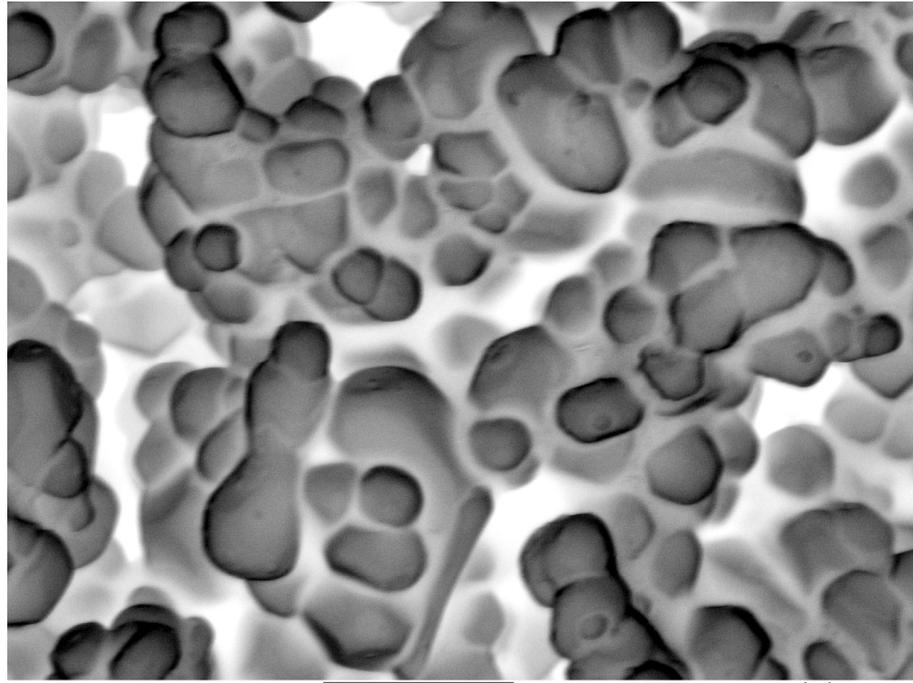
PPIX-Glu-DOPC lipozomunun Işık Saçılımı (DLS) cihazı ile ortalama büyüklüğü 182 nm olarak belirlenmiştir. 25°C de yapılan Zeta Potansiyel ölçümü sonucunda, yüzey yükü de -4,96 mV olarak bulunmuştur. DLS ölçümüyle elde edilen sonuçlara göre lipozom veziküllerin boyutları küçük olduğundan agregasyon oluşturmaya yatkınlıkları ölçülen düşük seviyedeki zeta potansiyeli ile de doğrulanmaktadır..



Şekil 6.27 PPIX-Glu-DOPC Lipozomunun (PBS içerisinde) UV-Vis Spektrumu



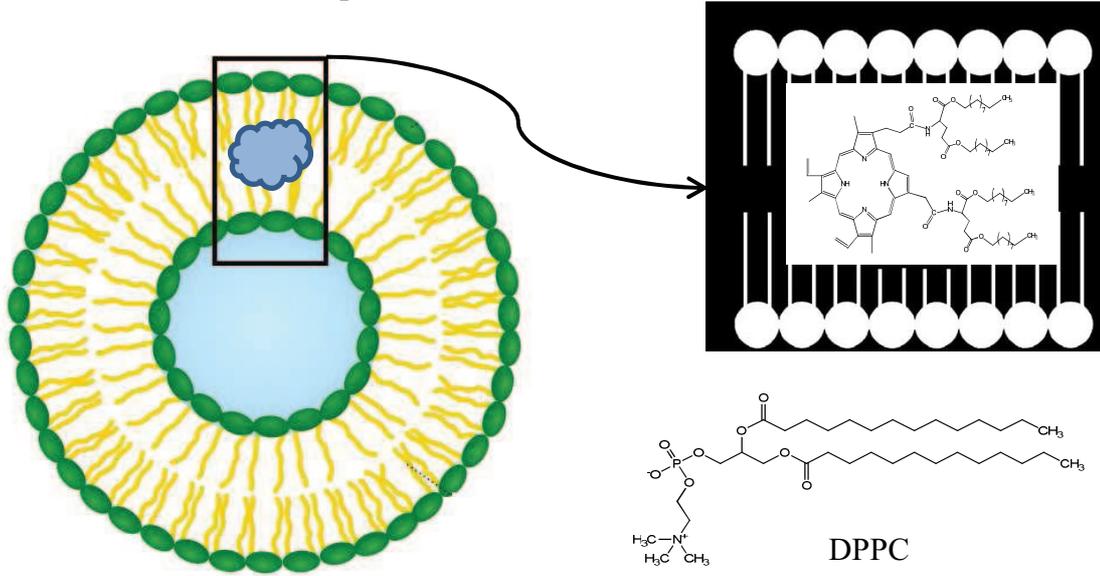
Şekil 6.28 PPIX-Glu-DOPC Lipozomunun DLS Grafiği



Şekil 6.29 PPIX-Glu-DOPC Lipozomuna ait SEM fotoğrafları

PPIX-Glu-DOPC lipozmlarının SEM görüntüleri incelendiğinde lipozom boyutlarının dağılımının homojenliği düşük olmakla beraber DLS ölçümleriyle uyumlu olan boyutların varlığı da gözlemlenmiştir.

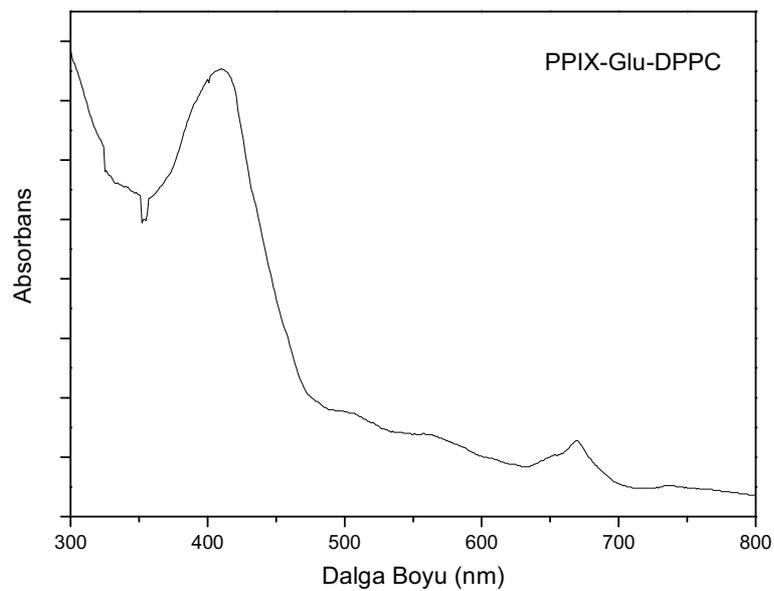
6.2.6 PPIX-Glu-DPPC Lipozomu



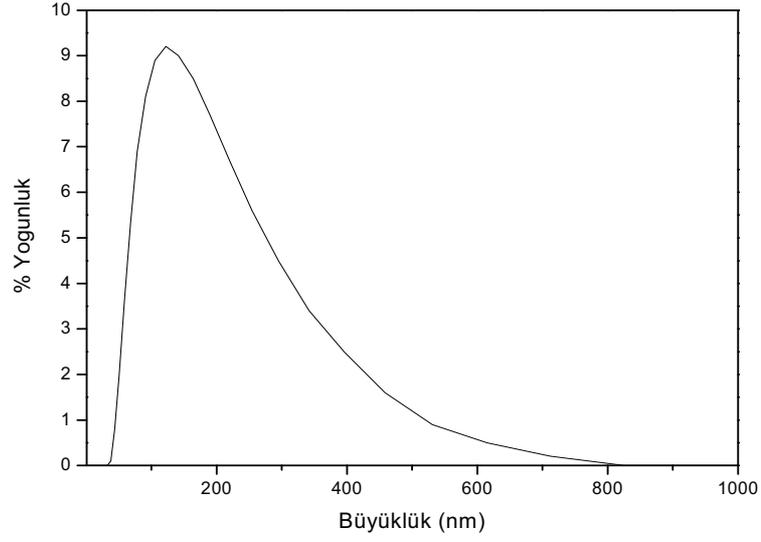
Şekil 6.30 PPIX-Glu molekülünün DPPC lipozomu içerisine alınması

PPIX-Glu-DPPC lipozomuna ait UV-Vis Spektrumunda λ_{mak} 411 nm olarak ölçülmüştür.

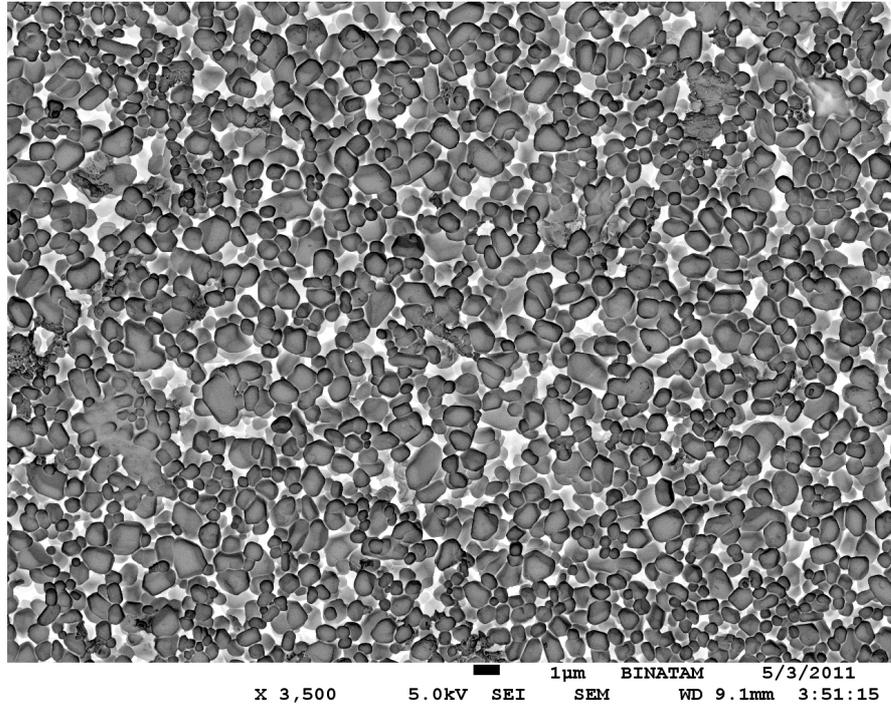
PPIX-Glu-DPPC lipozomunun Işık Saçılımı (DLS) cihazı ile ortalama büyüklüğü 128 nm olarak belirlenmiştir. 25°C de yapılan Zeta Potansiyel ölçümü sonucunda, yüzey yükü de -2,99 mV olarak bulunmuştur. DLS ölçümüyle elde edilen sonuçlara göre lipozom veziküllerin boyutları küçük olduğundan agregasyon oluşturmaya yatkınlıkları ölçülen düşük seviyedeki zeta potansiyeli ile de doğrulanmaktadır.

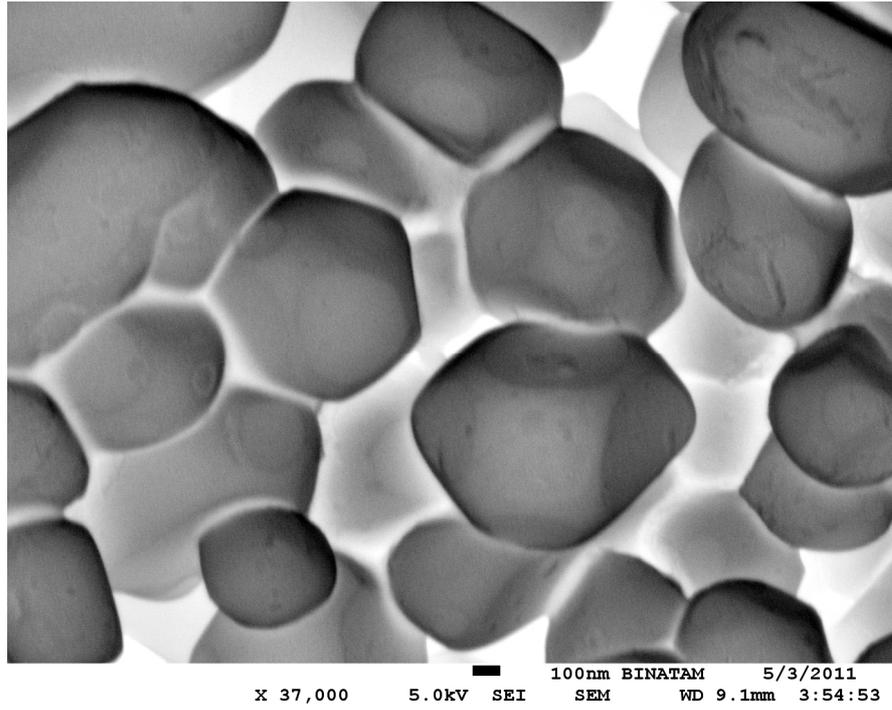


Şekil 6.31 PPIX-Glu-DPPC Lipozomunun (PBS içersinde) UV-Vis Spektrumu



Şekil 6.32 PPIX-Glu-DPPC Lipozomunun DLS Grafiği





Şekil 6.33 PPIX-Glu-DPPC Lipozomuna ait SEM fotoğraları

PPIX-Glu-DPPC lipozmlarının SEM görüntüleri incelendiğinde lipozom boyutlarının dağılımının homojen olduğu ve DLS ölçümleriyle uyumlu olan boyutların varlığı da gözlemlenmiştir.

BÖLÜM 7

SONUÇLAR

Bu tez kapsamında Fotodinamik Terapi (PDT)'de fotosensitizör (PS) olarak kullanılmak üzere meso-tetra (4-karboksifenil) porfin (TCPP), Protoporfirin IX (PPIX) moleküllerine biyoaktif gruplar olan; 2-amino-N-oktil propan amit(Oktil Ala), histidin metil ester ve - α,γ -Didesil glutamat ester bağlanarak; PPIX Oktil Ala, TCPP-Oktil Ala, TCPP-Metilhistidin ester, PPIX- α,γ -Didesil Glutamat Ester (PPIX-Glu) molekülleri sentezlenerek, $^1\text{H-NMR}$, FT-IR ve UV-vis spektroskopi teknikleri ile karakterizasyonları yapıldı. Hidrasyon-Film metodu ile DPPC (Dipalmitoyil-sn-gliserofosfatidilkolin) ve DOPC (Dioleyil-sn-gliserofosfatidilkolin) fosfolipitleri kullanılarak porfirinlerin lipozomları hazırlandı. Hazırlanan lipozomların UV-vis, DLS, Zeta-potansiyel ve SEM karakterizasyonları yapıldı.

Fotosensitizörlerin hedef dokuda lokalizasyonu, biyokimyasal özelliklerine bağlı olmakla birlikte, bazı taşıma sistemleri sayesinde seçiciliğin artırılması mümkündür. Bazı fotosensitizörlerin seçici olarak tümör dokusunda birikmesi, tümör dokusu ile normal doku arasındaki bazı fizyolojik farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Tümörlü dokudaki hücrelerin normal hücrelerden daha fazla lipoprotein reseptörlerine sahip olmasından dolayı lipofilik özellikteki porfirinik fotosensitizörler tümörlü dokularda daha fazla birikir.

Bu çalışma ile lipofilik özellikteki biomoleküllerin porfirinlere konjugasyonu ile porfirinlerin tümör etkileşimlerinin artırılmasının yanında bu porfirinlerin lipozomlar içerisine konularak hücreye taşınım sistemleri geliştirilmek istenmiştir. Elde edilen lipozomların boyutları hücre ile etkileşebilecek büyüklükte olduğu DLS ve SEM analizleri ile gösterilmiştir.

Yaptığımız lipozomlar içerisinde PPIX-Glu bileşimine ait lipozomların fotodinamik terapi için daha etkili olacağını düşünüyoruz. Glu yapısı hem protoporfirin lipofilitesini arttırmakta hemde aminoasit türevi olduğundan bioaktivitesini arttırmaktadır.

Porfirin içeren lipozomların fotodinamik terapide normal porfirinlerden daha fazla aktivasyon göstereceği umulmakta olup ileri biyolojik uygulamalarla bu tez desteklenebilecektir.

REFERANSLAR

A. Yurdakul, R. Atav

A.Süha Yalçın , Yüksek lisans tezi, 2008

Acar,2007

Ali ve Lier,1999, Sternberg ve Bruckner, 1998 Kadish 2000

Allen TM. Liposomes : Opportunities in drug delivery. *Drugs* 1997; 4: 8-14.

Aslı Görgülü, Doktora tezi,2008

Badger, G. M.; Jones R. A. and Laslett R. L., 1964, Porphyrins *Aust. J. Chem.* 1028-1035

Cavaleiro. J.A.S. Faustino, M.A.F Tomé. *J.P.C IN Carbohydrate Chemistry*; Rauter A.p., Lindhorst, T.K., Eds.; Chemical and Biological Approaches; RSCPublishing: .Cambridge 2009: Vol 35, pp 199-227

Cavanaugh. P.G.*Breast Cancer Res.Treat.*2002,72,117

Central Lab

Chaloin,L. Bigey,P.; Loup,C.; Marin,M.;Galeotti,N.; Piechaczyk,M.;Heitz,F.; Meunier,*Bioconjugate Chem.* 2001.12,691

Dhand R. New frontiers in aerosol delivery during mechanical ventilation. *Respir Care* 2004; 49: 666-677.

Dost, Z., 2006, Efficient synthesis of novel near IR emitting distyrylboradiazandacene sensitizers for photodynamic therapy, MS thesis, Middle East Technical University, 91p (unpublished)

Düzgüneş N, Gregoriadis G. (2005). The origins of liposomes: Alec Bangham at Babraham. *Meth Enzymology*, 391: 1-3.

Ecz. Çiğdem Yücel, Yüksek lisans tezi

Ecz. N. Başaran Mutlu, Yüksek lisans tezi,2007

Elif Türker Acar Yüksek lisans tezi,2008

Foster, T.H., Murant, R.S., Bryant, R.G., Knox, R.S., Gibson, S.L. and Hilf, R., 1991, Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy, *Radiation Research*, 126(3), 296-303

Gürsoy A. (2002). *Lipozomlar, Kontrollü Salım Sistemleri* (Ed. A.Z. Gürsoy), *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını*, İstanbul.

20. Henderson, B.W., Busch, T.M., Snyder, J.W., 2006, Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms, *Lasers in Surgery and Medicine*, 38(5), 489–493

Jori, G., Beltramini, M., Reddi, E., Salvato, B., Pagnan, Ziron, A., 1984, Evidence for

Kessel, D., Thompson, P., Saatio, K. and Naturiri, K.D., 1987, Tumor localization and photosensitization by sulfoned derivates of tetraphenylporphirine, *Photochem. Photobiol.*, 45, 787-790

Liposome farmulator and Manufacturer

Luksiene Z., Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carries in vivo, *Cancer Letters*, 26, 291 297

Matteucci ML, Thrall DE. The role of liposomes in drug delivery and diagnostic imaging: a review. *Vet Rad Ultrasound* 2000; 41: 100- 107.

Mitra, S., Cassar, S.E., Niles, D.J., Puskas, J.A., Frelinger, J.G. and Foster, T.H., 2006, Photodynamic therapy mediates the oxygen-independent activation of hypoxiainducible factor 1 , *Mol Cancer Ther.*, 5: 3268–3274

Nagae. T.; Louie, A.Y.;Aizawa, K.; Ishimaru,S.;Wilson, S.E.J.*Cadiovasc.Surg.*(Torino) 1998,39,709.

Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, and Jakub G (2005) Direct tumor damage mech of photodynamic therapy. *Acta Biochim Polon.* Vol. 52, 339–352.

PDT Overview.

Phillips D., *Progress in Reaction Kinetics*, 1997: 22 ; 3/4, 173-300
photodynamic reactions in cells cultured on microbeads, 2000 *Phys. Med. Biol.* 45, 103-119

R. Miligram 1997

R.M.Ion,Rom.J.Biophys.6 (1996)205.

Reddi, E., 1997, Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours, *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 37, 189-195

Schunck, T. and Poulet, P., 2000, Oxygen consumption through metabolism and Liposomes in Biology and Medicine. In: Bio- Applications of Nanoparticles (Ed: Chan WCW). Landes Bioscience.

Sibrian-Vazquez. M.; Jensen. T.J.; Fronzek, F.R.; Hammer ,R.P .; Vicente, M.G.H,Bioconjugate Chem 2005 16 852

Sinem Tuncer, Yüksek lisans tezi,2007

Stepp H., Principles of Clinical Photodynamic Therapy, University of Munich, Germany, 2003, 33, 4

Sun, Y., Martell A. E. And Tsutsui M. 1986, Heterocyclic Chem. 23, 561-565.

The Porphyrin Handbook, 2000-2003; Balaz ve ark, 2005.

Uhumwangho MU, Okor RS. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. J Med Biomed Res 2005; 4: 9-21.

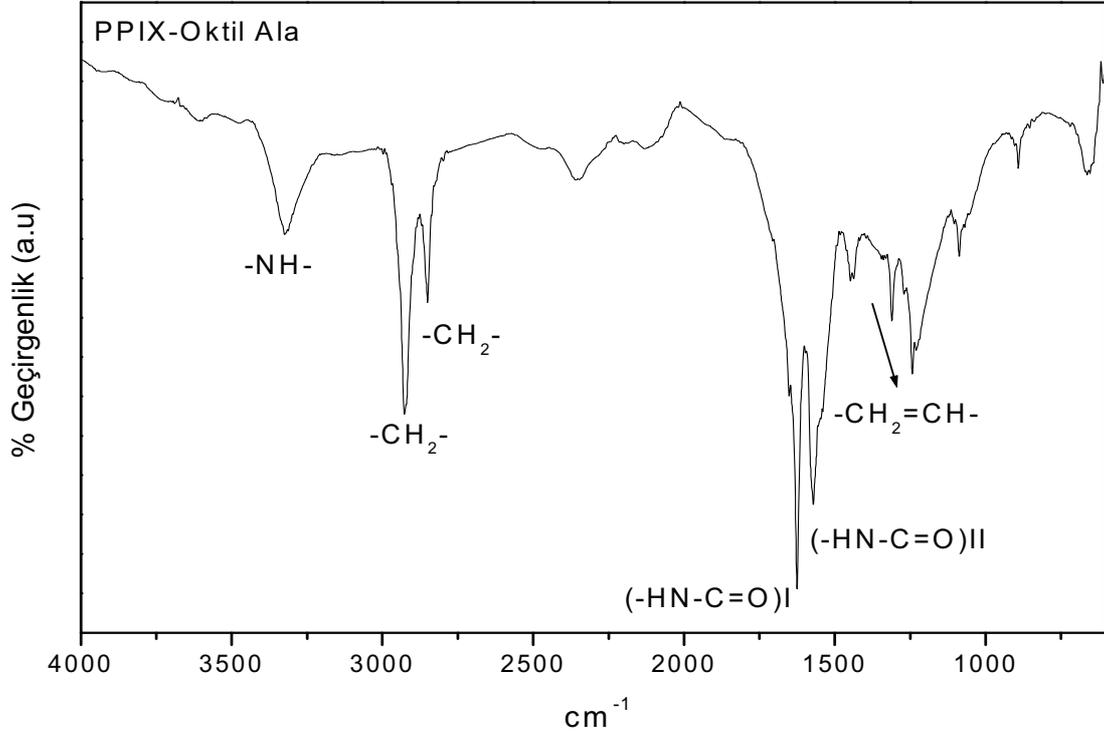
V.Vaz Serra, A Zammaron, M.A.F Faustino, M.C. Iglesias-de la Cruz, A. Blaquez, J. M. M.Rodrigues, M.GM.P.S Neves J.A.S Caveleiro, A Juarranz , F.Sanz-Rodriguez, Bioorganic Medicinal Chemistry

Vicente ve Smith,2000

Wilson, B., (2003) Photodynamic Therapy. Technologies and Biophysical Techniques for PDT. Photodynamic Therapy Patrice T., Ed.), Sun Fung Offset Binding Co. Ltd., Hong Kong.

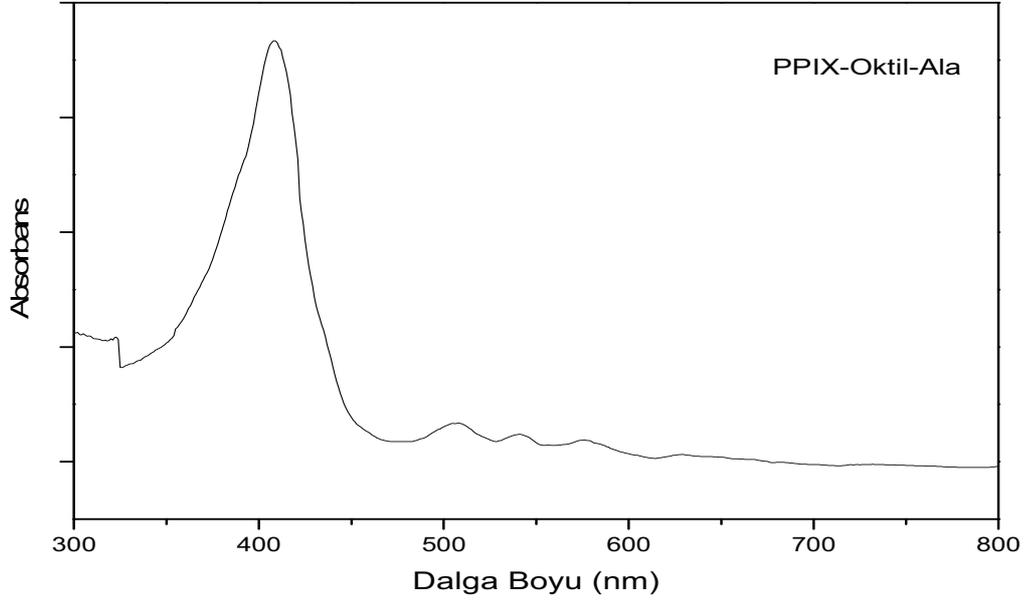
EKLER

EK 1



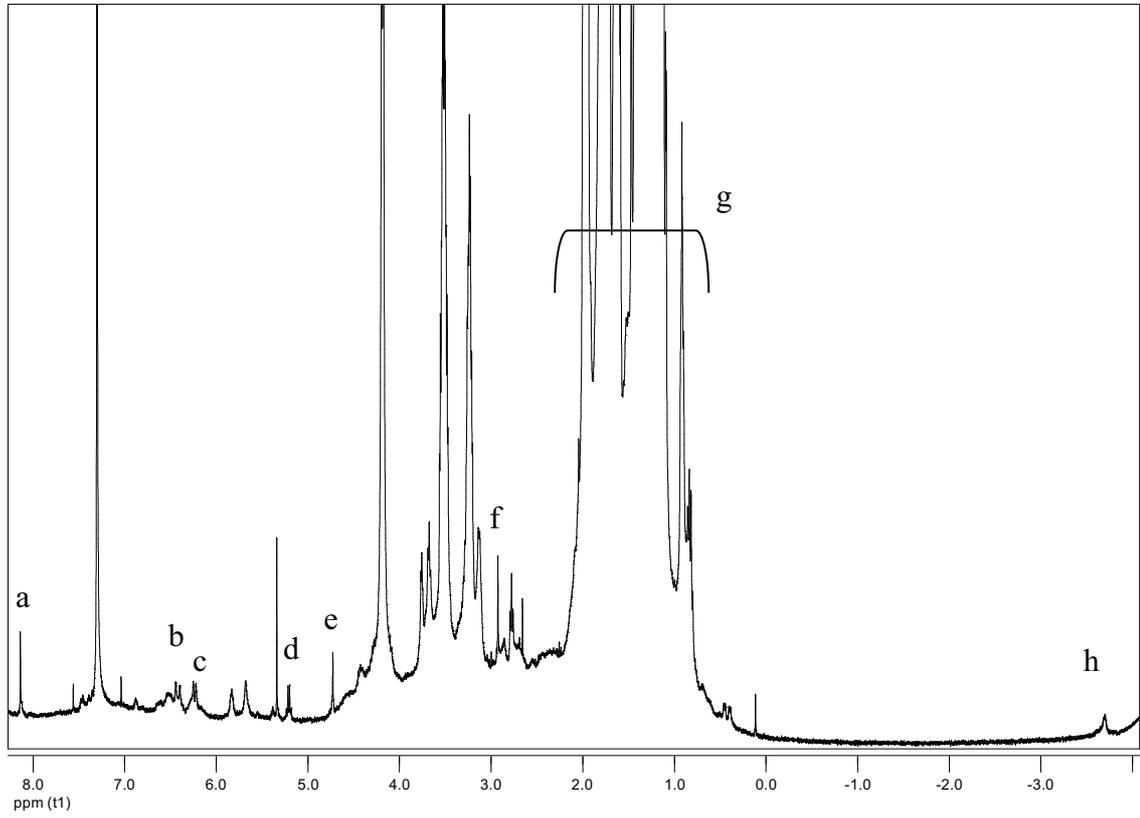
PPIX Oktil-Ala molekülüne ait FT-IR spektrumu

EK 2

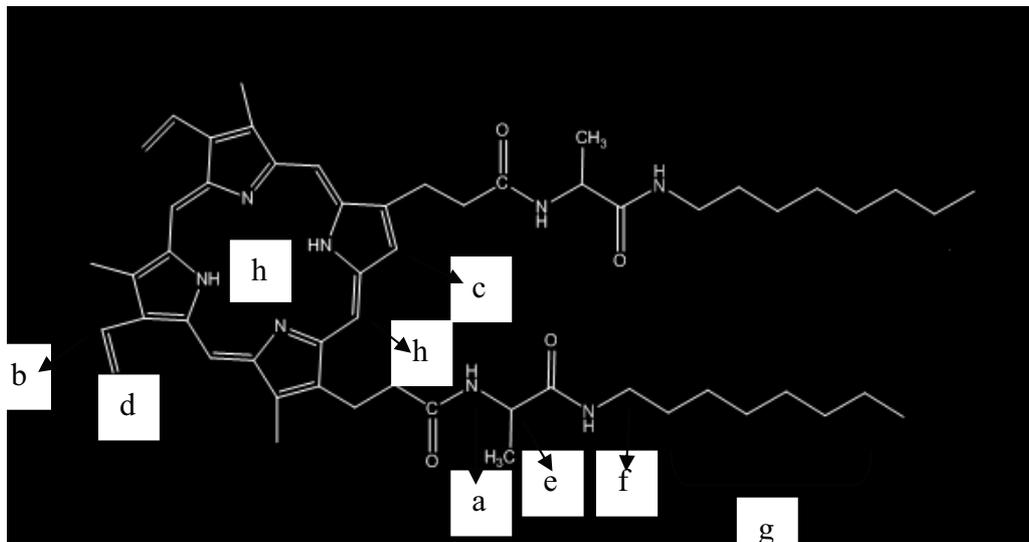


PPIX-Oktil-Ala molekülünün UV-Vis Spektrumu (CHCl₃ içinde)

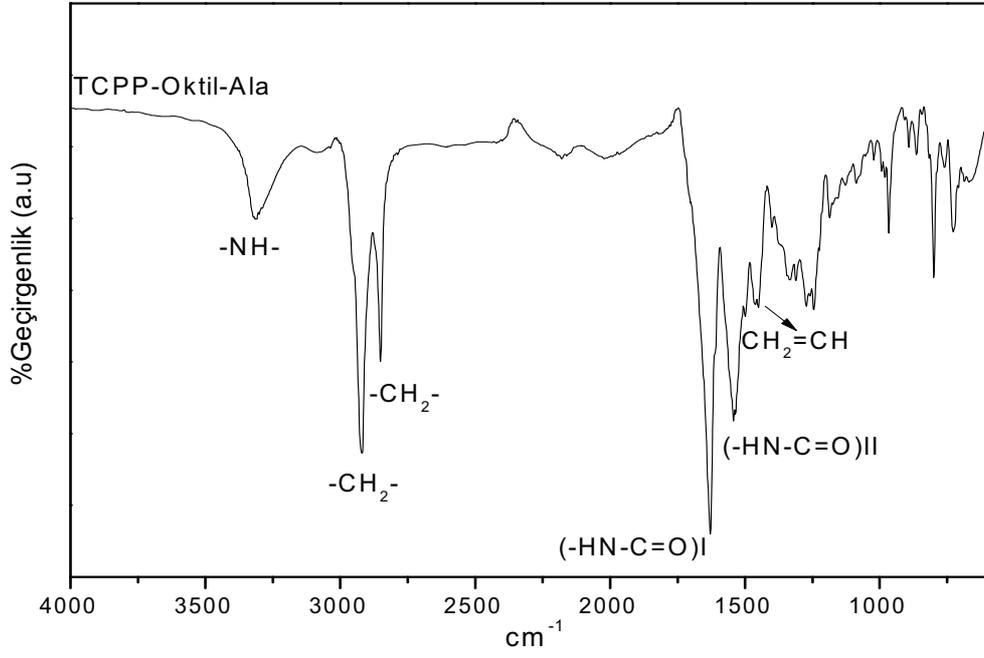
EK 3



PPIX-Octil-Ala molekülünün ^1H NMR Spektrumu

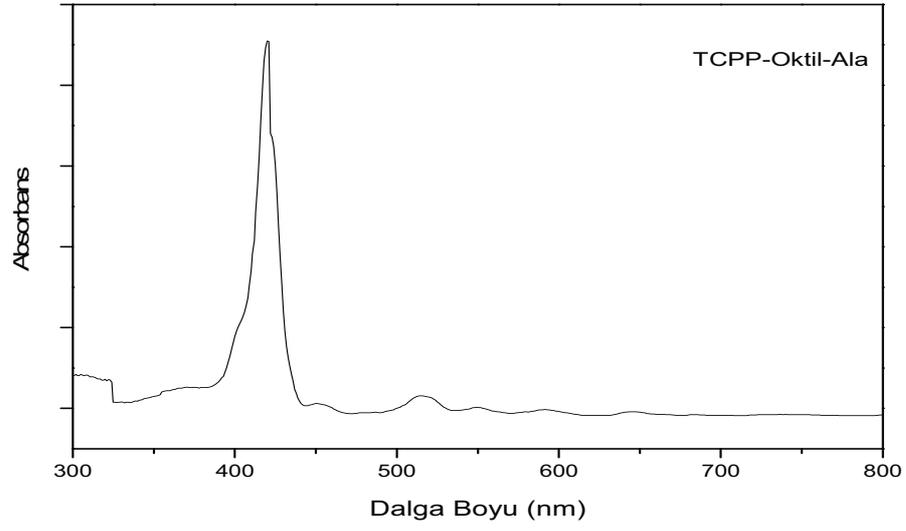


EK 4



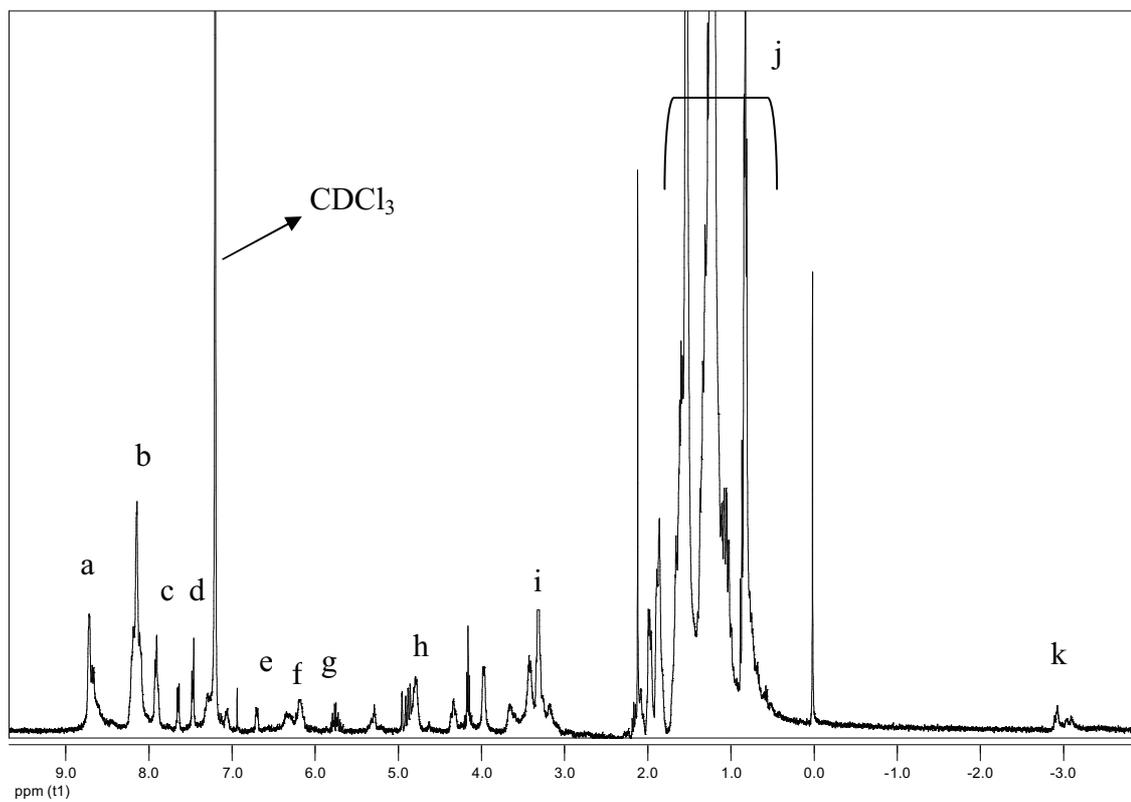
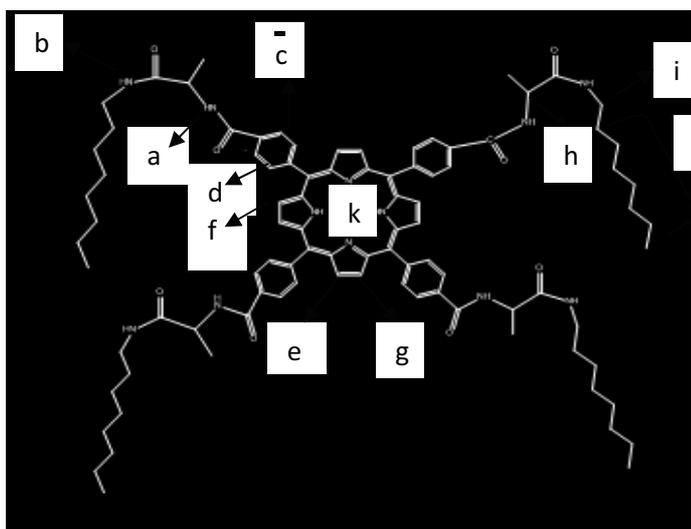
TCPP-Oktil-Ala molekülüne ait FT-IR spektrumu

EK 5

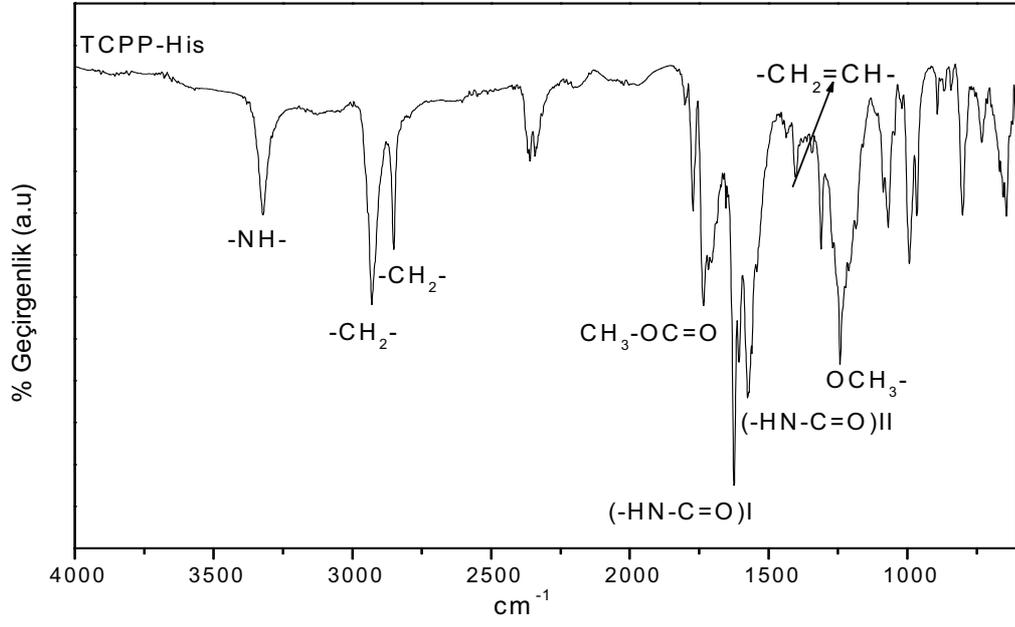


TCPP-Octil Ala molekülünün UV-Vis Spektrumu (CHCl_3 içinde)

EK 6

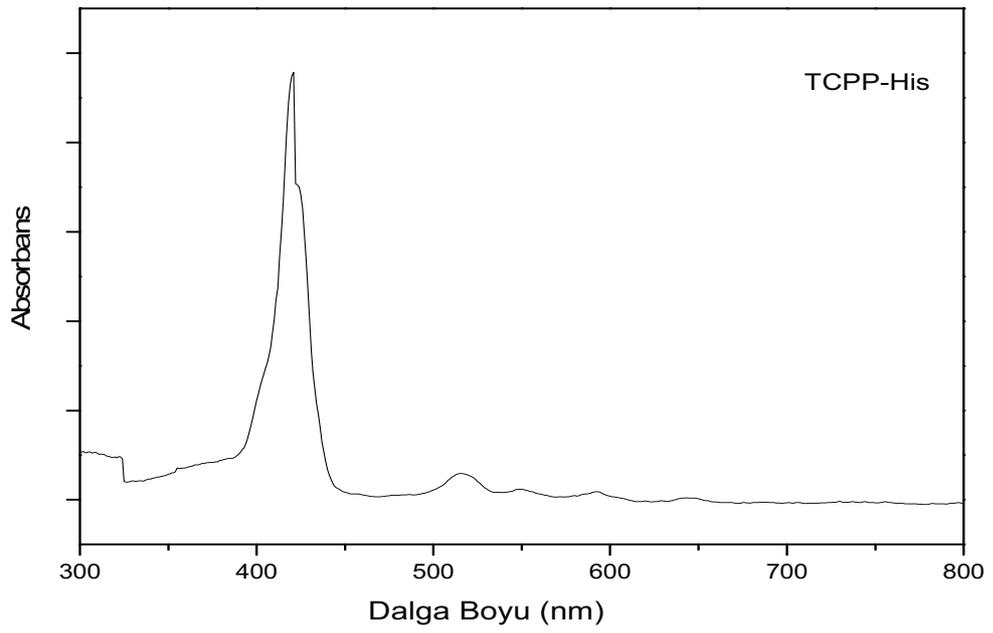
TCPP-Octil-Ala molekülüne ait ^1H NMR Spektrumu

EK 7



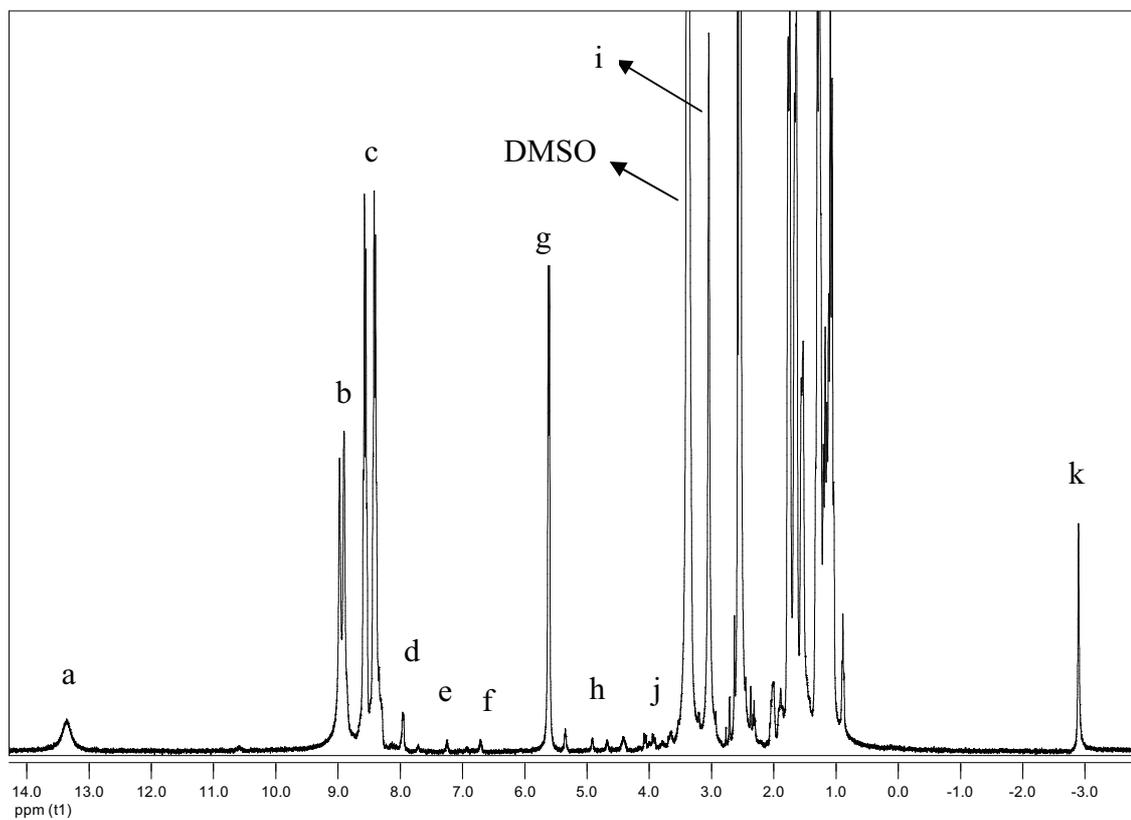
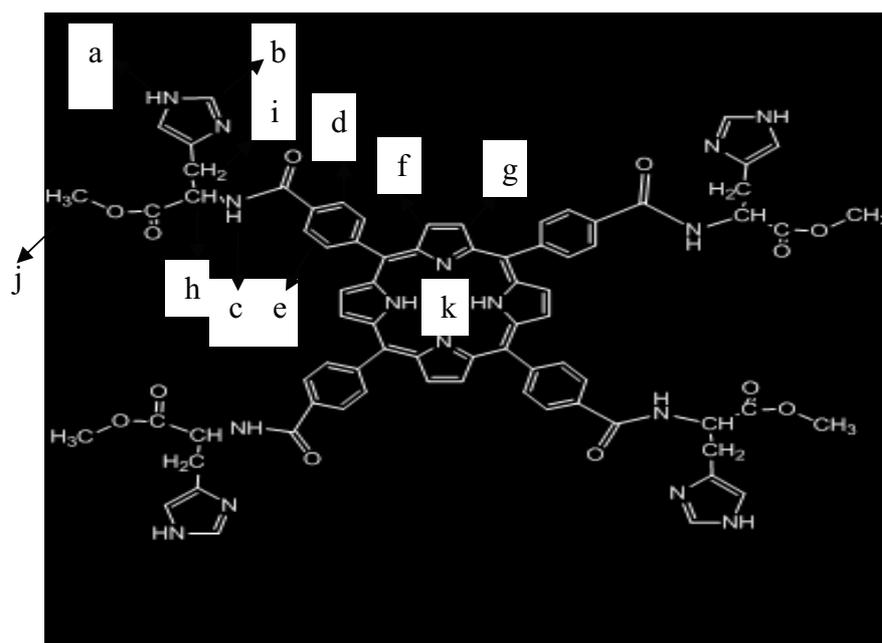
TCPP-His bileşiğine ait FT-IR spektrumu

EK 8

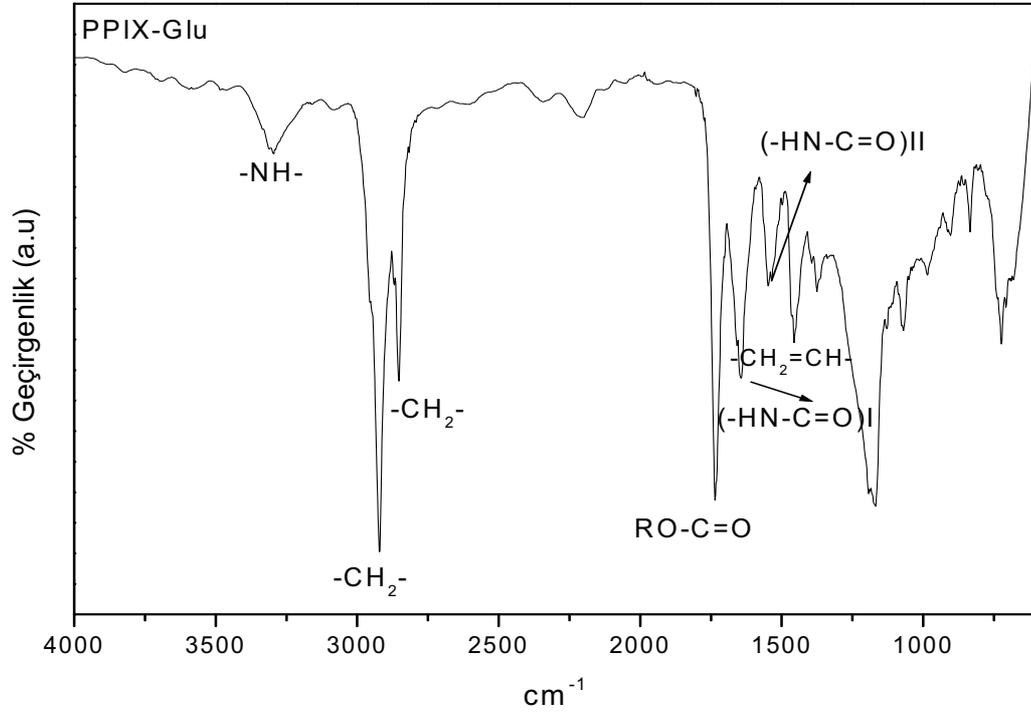


TCPP-His molekülünün Uv-Vis Spektrumu (CHCl₃ içinde)

EK 9

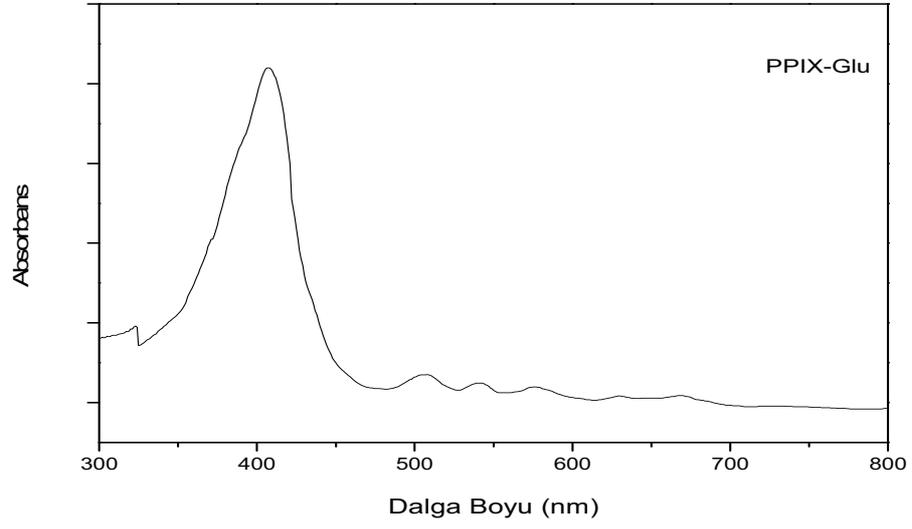
TCPP-His molekülünün ait ^1H NMR Spektrumu

EK 10



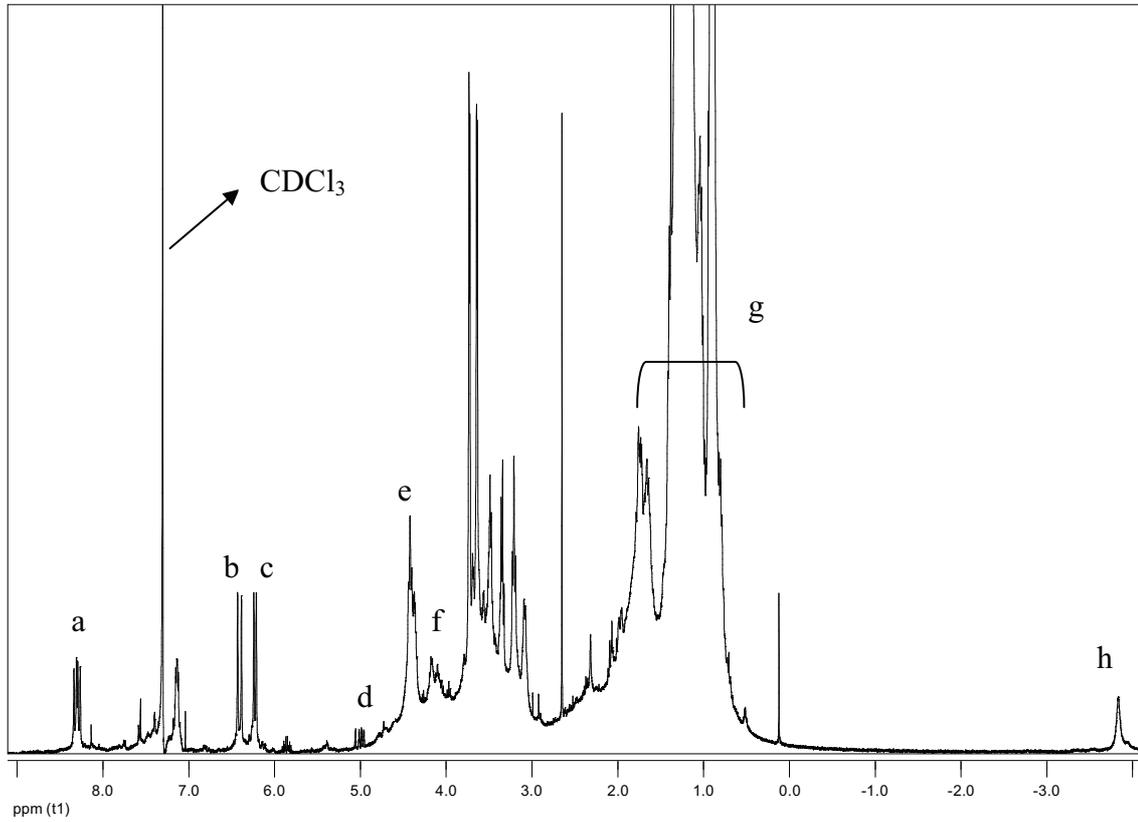
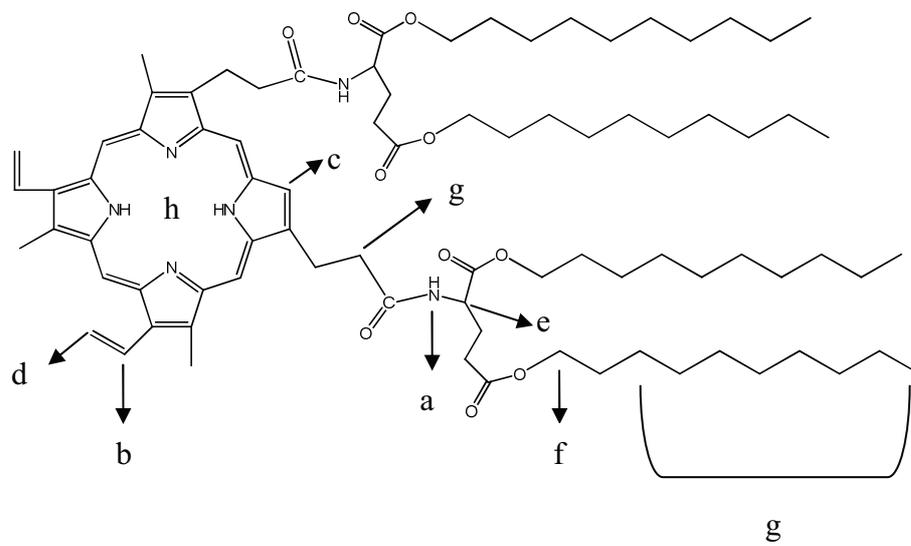
PPIX-Glu molekülüne ait FT -IR spektrumu

EK 11

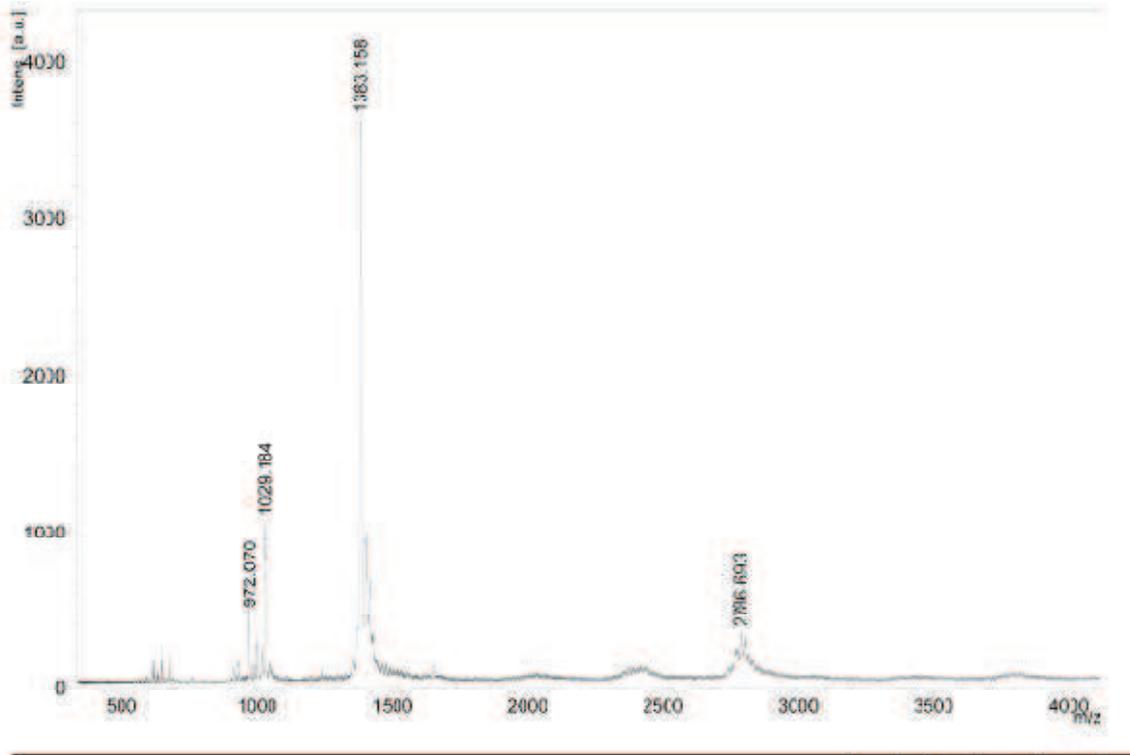


PPIX-Glu molekülünün UV-Vis Spektrumu (CHCl_3 içinde)

EK 12

PPIX-Glu molekülünün ait ^1H NMR Spektrumu

EK 13



PPIX-Glu molekülünün Kütle spektrumu