

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

PEPTİT BAĞLI ASİMETRİK FTALOSİYANİN TÜREVLERİNİN
SENTEZİ VE ANTİMİKROBİYAL FOTODİNAMİK TERAPİ
(aPDT) ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MUSTAFA GEDİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. AYŞE GÜL GÜREK

MAYIS 2025

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

PEPTİT BAĞLI ASİMETRİK FTALOSİYANİN
TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE ANTİMİKROBİYAL
FOTODİNAMİK TERAPİ (aPDT) ETKİNLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

MUSTAFA GEDİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. AYŞE GÜL GÜREK

MAYIS 2025

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**SYNTHESIS OF PEPTIDE-LINKED ASYMMETRIC
PHTHALOCYANINE DERIVATIVES AND
INVESTIGATION OF THEIR ANTIMICROBIAL
PHOTODYNAMIC THERAPY (aPDT) EFFECTIVENESS**

MUSTAFA GEDİK

A THESIS OF MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

ADVISOR: PROF. DR. AYŞE GÜL GÜREK

MAY 2025

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 12/05/2025 tarih ve 2025/26 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 21/05/2025 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Mustafa GEDİK'in tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Ayşe Gül GÜREK

ÜYE

: Prof. Dr. Devrim ATILLA

ÜYE

: Dr. Öğrt. Üyesi Çiğdem YILMAZ ÇOLAK

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR



Biricik yol arkadaşım ve aileme...

ÖZET

Fotodinamik terapi, kanserli veya bakteriyle enfekte olmuş dokuya, ışıkla uyarılan bir molekül (Fotosensitizer, FS) sayesinde yoğun elektron aktarımı ve singlet reaktif oksijen üretimi ile tedavi uygulanmasını sağlayan bir tedavi yöntemidir. Bu tedavi esnasında dokuya özgü hedefleme, yüksek reaktif oksijen üretimi ve yüksek dalga boylarında uyarılma gibi özelliklere sahip moleküller kullanılması elzemdir.

Bu çalışma kapsamında, iki adet yeni asimetrik Zn(II) ftalosiyanın türevleri (**10** ve **12**) ve bir adet peptid bağlı asimetrik Zn(II) ftalosiyanın türevi (**14**) sentezlenerek, antimikrobiyal fotodinamik terapi (aPDT) özellikleri tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan peptit, yumurta içerisinde bulunan ve bakteriyel savunma mekanizmasında yer alan bir amino asit sekansıdır (COO-Glisin-Alanin-Glisin-Lösin-Prolin-Lösin-Glutamik Asit- Fenil Alanin-NH).

Sentezlenen asimetrik Zn(II) ftalosiyanın türevlerinin yapıları FT-IR, kütle, NMR analizleri yapılarak aydınlatılmıştır. Yapı analizlerinden elde edilen spektrumlar değerlendirildiğinde önerilen yapıların doğruluğunu ve bileşiklerin saf olarak izole edildiği sonucunu destekler niteliktedir. Sentezlenen ftalosiyanın türevlerinin aPDT uygulamasında kullanılabilme potansiyellerini değerlendirebilmek için, UV-Vis, floresans ölümleri gerçekleştirildikten sonra singlet oksijen kuantum verimleri ve floresans kuantum verimleri ölçüldü.

Hazırlanan peptid zincirinin MIC analizleri ve Zn(II) ftalosiyanın türevlerinin aPDT deneyleri gerçekleştirildi. Sonuçlar istenilen gibi sentezlenen peptitlerin ftalosiyanın etkisini bakteriler üzerinde arttırdığını ve fotodinamik etki yarattığını göstermiştir. Fotodinamik etkinin gram negatif bakterilerde daha fazla olduğu aPDT çalışması ile gösterilmiştir. Ayrıca peptid bağlı ftalosiyanın türevi molekülün çifte etki gösterdiği ve peptitsiz analoguna göre daha fazla bakterisidal etki gösterdiği kanıtlanmıştır.

Çalışma sonuçları umut vaat edici olup *in vivo* deneyler ile daha ileri safhada daha etkili sonuçlar alınabileceğine işaret etmektedir. Bu çalışma ile literatüre yeni ftalosiyanın türevleri kazandırılmıştır. İlerleyen çalışmalarda, bu moleküllerin peptid bağlanmamış türevlerinin memeli kanser hücreleri üzerinde PDT çalışmaları da gerçekleştirilecektir.

Anahtar Kelimeler: APDT, Ftalosiyanın, Peptit.

ABSTRACT

Photodynamic therapy is a treatment method that provides treatment to cancerous or bacterially infected tissue with intense electron transfer and singlet reactive oxygen production via a molecule (Photosensitizer, FS) that is stimulated by light. During this treatment, it is essential to use molecules with properties such as tissue-specific targeting, high reactive oxygen production and high wavelength excitation.

In this study, peptide-linked asymmetric zinc phthalocyanines were synthesized to determine their antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) properties. The peptide used in the study is an amino acid sequence found in eggs and involved in the bacterial defense mechanism (COO-Glycine-Alanine-Glycine-Leucine-Proline-Leucine-Glutamic Acid-Phenyl Alanine-NH).

Tetra-substituted asymmetric phthalocyanines were synthesized using 4-phthalonitrile and their characterization was carried out by FT-IR, mass, NMR analyses. 3 types of phthalocyanines were synthesized; oxygen-bridged polyoxo phthalocyanine, sulfur-bridged polyoxo phthalocyanine and oxygen-bridged polyoxo, peptide-bound phthalocyanine. The structures of the compounds were formed as expected in the results obtained with the structural determinations. Then, UV-Vis, fluorescence measurements of the synthesized phthalocyanines were performed and then singlet oxygen quantum yields and fluorescence quantum yields were measured.

MIC analyses of synthesized peptides and aPDT experiments of zinc-phthalocyanine derivative compounds were performed. The results showed that synthesized peptides increased the effect of phthalocyanines on bacteria and created a photodynamic effect as desired. The photodynamic effect is shown to be greater in gram-negative bacteria by aPDT study. It has also been proven that the peptide-bound phthalocyanine derivative molecule exhibits double action and is more bactericidal than the peptide-free analogue.

The results of the study are promising and indicate that more effective results can be obtained with in vivo experiments at a later stage. With this study, new phthalocyanine derivatives have been introduced to the literature. In further studies, PDT studies of non-peptide-bound derivatives of these molecules on mammalian cancer cells will also be performed.

Keywords: APDT, Phthalocyanine, Peptide.

TEŞEKKÜR

Uzun süredir bu yolculuğu tamamlamamda bana katkısı ve desteği olan herkese teşekkür ediyorum.

Başladığımızdan bugüne her daim tecrübe, bilgi ve kaynaklarıyla bana destek olan, yön gösteren ve yeri geldiğinde beni ittiren, tanımakla çok mutlu olduğum, akademideki güzellikleri ve insaniyetliği bana gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ayşe Gül GÜREK'e

Vesilesi ile tanıştığım ve çalışmalarımda benimle yol yürüyen ve desteklerini esirgemeyen sayın Dr. Duygu AYDIN TEKDAŞ'a

Çalışmalarım esnasında bana yol gösteren, destekleyen, aradığımda her türlü yanıtı almamı ve yöntemleri öğrenmemi sağlayan, yanımda olduklarını bildiğim sayın Dr. Gizem GÜMÜŞGÖZ ÇELİK, sayın Dr. Öğ. Üyesi Çiğdem YILMAZ ÇOLAK, sayın Prof. Dr. Devrim ATILLA, sayın Prof. Dr. Meltem GÖKSEL ŞAHİN'e ve Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ŞEKER Lab'a

Beni yetiştiren aileme, kardeşlerime ve büyüklerime,

Uzarlarda olsak bile birbirimizin yanında olduğumuzu bildiğim dostlarım Uğur KAYA, Dilaver KILIÇ'a,

Son olarak bu yolculuğa çıkmamı sağlayan, her adımında yanımda olan, beni destekleyen, her sıkıntıda ve her bunalımda benimle olup bana yol gösteren, birinci danışmanım, can yoldaşım, hayat arkadaşım ve ailem sevgili eşim Melike Yağmur GEDİK'e sonsuz teşekkürlerimi ve minnettarlığımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Peptitler	3
2.1.1. Peptitlerin Kimyasal Yapısı	6
2.1.2. Peptitlerin Biyoaktivitesi	7
2.2. Fotodinamik Terapi	7
2.3. Ftalosiyanınlar	9
2.3.1. Ftalosiyanınların Moleküler Özellikleri	12
2.3.2. Ftalosiyanınların Sentezi	13
2.3.3. Ftalosiyanınların Fotofiziksel Özellikleri	14
2.4. Çalışmanın Literatürdeki Yeri ve Amacı	15
3. MATERYAL METOT	20
3.1. Kullanılan Kimyasallar	20
3.2. Kullanılan Cihazlar	21
3.3. Deneysel Bölüm	21
3.4. Başlangıç Maddelerinin Sentezi	23
3.4.1. 4-(2-(2-etoksietoksi)etoksi)ftalonitril (3) Sentezi	23
3.4.2. Metil 4-(3,4-disiyanofenoksi) benzoat (5) Sentezi	24
3.4.3. S-Köprülü Polioksolu Ftalonitril Sentezi	25
3.4.3.1. 2-(2-Etoksietoksi)etil 4-metilbenzensülfonat (7) Sentezi	26
3.4.3.2. 2-(2-Etoksietoksi)etan-1-tiyol (8) Sentezi	26
3.4.3.3. 4-(2-(2-Etoksietoksi)etoksi)ftalonitril (9) Sentezi	27
3.5. Ftalosiyanınların Sentezi	28
3.5.1. 2,[2-(Dimetilamino)etil-4-oksibenzoat] 9(10),16(17),23(24)- Tris{(2-(2-etoksietoksi)etoksi)}ftalosiyaniato Zn(II)(10) Sentezi	28
3.5.2. 2,[4-oksibenzoik asit]- 9(10), 16(17), 23(24)- Tris{(2-(2- etoksietoksi) etoksi)} ftalosiyaniato Zn(II) (11) Sentezi	29
3.5.3. 2,[2-(Dimetilamino)etil- 4-oksibenzoat]- 9(10),16(17),23(24)- Tris{(2-(2-etoksietoksi) etilsulfonyl)} ftalosiyaniato Zn(II) (12) Sentezi	31
3.5.4. Peptit Sekansının [(1-(1-((10-amino-6-(2-karboksietil)-2- izobütil-5,9-dioks-11-fenil-4,8-dioks-3,7-diazaundekanoil) oksi)pirrolidin-2-il)-4-izobütil-12-metil-1,5,9,13-tetraoks- 2,6,10,14-tetraoks-3,7,11,15-tetraazaheptadekan-17-oik asit)] Sentezi (13)	32
3.5.5. Peptit-Ftalosiyanın Konjugatının (14) Sentezi	35
3.6. Biyolojik Çalışmalar	37
3.6.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Belirlenmesi	38

3.6.2. Antimikrobiyal-Fotodinamik Terapi Etkisinin Belirlenmesi	38
4. SONUÇLAR	41
4.1. Ftalosiyanin Sentezinde Kullanılan Başlangıç Maddelerinin Karakterizasyonu	41
4.1.1. 3 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi	41
4.1.2. 5 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi	43
4.1.3. 7 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi	45
4.1.4. 8 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi	47
4.1.5. 9 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi	49
4.2. Ftalosiyaninlerin Karakterizasyonu	53
4.2.1. 10 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi	53
4.2.2. 11 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi	56
4.2.3. 12 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi	59
4.2.4. Peptit Molekülünün (13) Yapı Analizi	62
4.2.5. 14 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi	64
4.3. Fotofiziksel ve Fotokimyasal Özellikler	65
4.3.1. UV-Vis Spektrumlarının İncelenmesi	66
4.3.2. UV-Vis ve Floresans Çalışması	70
4.3.3. Floresans Kuantum Verimleri	74
4.3.4. Singlet Oksijen Kuantum Verimleri	75
4.4. Biyolojik Deneyler	76
4.4.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC)	76
4.4.2. Anti-Mikrobiyal Fotodinamik Terapi	78
5. TARTIŞMA	87
KAYNAKÇA	89
ÖZGEÇMİŞ	94

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μl	: Mikro litre
μM	: Mikromolar
^{13}C NMR	: Karbon nükleer manyetik rezonans
^1H NMR	: Proton nükleer manyetik rezonans
aPDT	: Antimikrobiyal-fotodinamik terapi
Ar	: Argon
CDCl_3	: Dötörökloroform
CHCl_3	: Kloroform
cm	: Santimetre
DCM	: Diklorometan
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DEGME	: Dietilenglikol monoetil eter
dH_2O	: Distile su
DHB	: 2,5-dihidroksibenzoik asit
DIC	: N,N'-Diizopropilkarbodimid
DIPEA	: N,N-diizopropiletilamin
DIT	: Ditranol
DMAE	: Dimetilaminoetanol
DMF	: Dimetilformamid
DMSO	: Dimetilsülfoksit
E.coli	: Escherichia coli
EtOH	: Etanol
FT-IR	: Fourier transform-infrared
g	: Gram
h	: Hacim
H	: Hidrojen
H_2O	: Su
HBTU	: Hekzaflorofosfat Benzotriazol Tetrametil Uranyum
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IR	: İnfra-red
K_2CO_3	: Potasyum karbonat
M	: Molar
MALDITOF-MS	: Matriks destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon-uçuş zamanı-kütle spektrometresi
MeOH	: Metanol
mmHg	: Milimetre cıva
mmol	: Milimol
Na_2SO_4	: Sodyum sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NIR	: Yakın infra red
nm	: Nanometre
NMP	: N-metilpirrolidon
O.D.	: Optik yoğunluk
Pc	: Ftalosiyenin
PDT	: Fotodinamik terapi

PEG	: Polietilenglikol
ppm	: Milyon başına partikül
PS	: Işığa duyarlı madde (<i>İng: Photosensitizers</i>)
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RPM	: Dakika başına dönüş
S.aureus	: Staphylococcus aureus
TFA	: Trifloroasetik asit
THF	: Tetrahidrofuran
TIS	: Triizopropilsilan
TLC	: İnce takaba kromatografisi
UV-Vis	: Ultra-viyole görünür bölge
Zn(OAc) ₂	: Çinko asetat



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 : Amino asitlerin genel yapısı.	3
Şekil 2.2 : Amino asitlerin kimyasal yapısı.	4
Şekil 2.3 : Peptitlerin a-sarmal ve B-tabaka yapıları [23].	6
Şekil 2.4 : Fotodinamik terapi etki mekanizması [29].	8
Şekil 2.5 : Ftalosiyanin (H ₂ Pc) genel yapısı.	10
Şekil 2.6 : Tetra sübstitüe ftalosiyaninlerde oluşabilecek izomerik yapılar.	12
Şekil 2.7 : Periferal ve non-periferal sübstitüe ftalosiyaninler [39].	13
Şekil 2.8 : Ftalosiyaninlerin sentezinde kullanılan başlangıç materyalleri.	14
Şekil 2.9 : Metalli ve metalsiz Pc'ler arası spektrum farklılıkları [41].	15
Şekil 2.10 : Zhang ve arkadaşları tarafından deneyin yapısı ve sonuçları.	17
Şekil 2.11 : Vazques ve arkadaşları tarafından sentezlenen Pc-peptit molekülü.	18
Şekil 2.12 : Peptit sekansını oluşturan amino asitler.	19
Şekil 3.1 : O-köprülü polioksoetilen zincirleri içeren ftalonitrilin (3) sentez şeması.	23
Şekil 3.2 : Esterli ftalonitrilin (5) sentez şeması.	24
Şekil 3.3 : S-köprülü polioksolu ftalonitril türevinin (9) sentez adımları.	25
Şekil 3.4 : O-köprülü ftalosiyanin (10) sentez şeması.	28
Şekil 3.5 : Asit bağlı AB ₃ tipi ftalosiyanin sentez şeması.	29
Şekil 3.6 : S-köprülü polioksolu ftalosiyaninin (12) sentez şeması.	31
Şekil 3.7 : Peptit sekansının uzama şeması.	32
Şekil 3.8 : Peptit sentezleyici reaksiyon kabı.	33
Şekil 3.9 : Peptit-ftalosiyanin konjugatının (14) sentez yöntemi.	35
Şekil 3.10 : Peptit-ftalosiyanin konjugatı.	36
Şekil 3.11 : Peptit-ftalosiyanin konjugasyonu için reaksiyon düzeneği.	36
Şekil 4.1 : 3 numaralı molekülün kimyasal yapısı.	41
Şekil 4.2 : 3 numaralı molekülün IR spektrumu.	41
Şekil 4.3 : 3 numaralı moleküle ait kütle spektrumu.	42
Şekil 4.4 : 3 numaralı moleküle ait ¹ H-NMR spektrumu.	42
Şekil 4.5 : 3 numaralı moleküle ait ¹³ C-NMR spektrumu.	43
Şekil 4.6 : 5 numaralı molekülün kimyasal yapısı.	43
Şekil 4.7 : 5 numaralı molekülün IR spektrumu.	44
Şekil 4.8 : 5 numaralı molekülün H ¹ NMR spektrumu.	44
Şekil 4.9 : 7 numaralı bileşiğin kimyasal yapısı.	45

Şekil 4.10	: 7 numaralı molekülün FT-IR spektrumu.	45
Şekil 4.11	: 7 numaralı molekülün kütle spektrumu.	46
Şekil 4.12	: 7 numaralı moleküle ait ^1H -NMR spektrumu.	46
Şekil 4.13	: 7 numaralı moleküle ait ^{13}C -NMR spektrumu.	47
Şekil 4.14	: 7 numaralı molekülün kimyasal yapısı.	47
Şekil 4.15	: 8 numaralı moleküle ait IR spektrumu.	48
Şekil 4.16	: 8 numaralı moleküle ait ^1H -NMR spektrumu.	48
Şekil 4.17	: 8 numaralı moleküle ait ^{13}C -NMR spektrumu.	49
Şekil 4.18	: 9 numaralı molekülün kimyasal yapısı.	49
Şekil 4.19	: 9 numaralı moleküle ait IR spektrumu.	50
Şekil 4.20	: 9 numaralı moleküle ait kütle spektrumu.	50
Şekil 4.21	: 9 numaralı moleküle ait ^1H -NMR spektrumu.	51
Şekil 4.22	: 9 numaralı moleküle ait ^{13}C -NMR spektrumu.	52
Şekil 4.23	: 10 numaralı molekülün kimyasal yapısı.	53
Şekil 4.24	: 10 numaralı moleküle ait IR spektrumu.	53
Şekil 4.25	: 10 numaralı moleküle ait kütle spektrumu.	54
Şekil 4.26	: 10 numaralı moleküle ait ^1H -NMR spektrumu.	54
Şekil 4.27	: 10 numaralı moleküle ait ^{13}C -NMR spektrumu.	55
Şekil 4.28	: 11 numaralı molekülün kimyasal yapısı.	56
Şekil 4.29	: 11 numaralı molekülün IR spektrumu.	56
Şekil 4.30	: 11 numaralı moleküle ait kütle spektrumu.	57
Şekil 4.31	: 11 numaralı moleküle ait ^1H -NMR spektrumu.	58
Şekil 4.32	: 11 numaralı moleküle ait ^{13}C -NMR spektrumu.	58
Şekil 4.33	: 12 numaralı molekülün kimyasal yapısı.	59
Şekil 4.34	: 12 numaralı moleküle ait FT-IR spektrumu.	59
Şekil 4.35	: 12 numaralı molekülün kütle spektrumu.	60
Şekil 4.36	: 12 numaralı moleküle ait ^1H -NMR spektrumu.	60
Şekil 4.37	: 12 numaralı moleküle ait ^{13}C -NMR spektrumu.	61
Şekil 4.38	: 13 numaralı molekülün kimyasal yapısı.	62
Şekil 4.39	: 13 numaralı moleküle ait FT-IR spektrumu.	62
Şekil 4.40	: 13 numaralı moleküle ait kütle spektrumu.	63
Şekil 4.41	: Peptit molekülünün HPLC spektrumu.	63
Şekil 4.42	: 14 numaralı molekülün kimyasal yapısı.	64
Şekil 4.43	: 14 numaralı molekülün IR spektrumu.	64
Şekil 4.44	: 14 numaralı molekülün kütle spektrumu.	65
Şekil 4.45	: 10 numaralı molekülün DMSO ortamında farklı konsantrasyonlardaki UV-Vis spektrumları.	66
Şekil 4.46	: 10 numaralı bileşiğe ait absorbanza karşı konsantrasyon grafikleri ve korelasyon katsayısı.	67
Şekil 4.47	: 12 numaralı molekülün DMSO ortamında farklı konsantrasyonlardaki UV-Vis spektrumları.	68
Şekil 4.48	: 12 numaralı bileşiğe ait absorbanza karşı konsantrasyon grafikleri ve korelasyon katsayısı.	68
Şekil 4.49	: 14 numaralı molekülün DMSO ortamında farklı konsantrasyonlardaki UV-Vis spektrumları.	69
Şekil 4.50	: 14 numaralı bileşiğe ait absorbanza karşı	69

	konsantrasyon grafikleri ve korelasyon katsayısı.	
Şekil 4.51	: Farklı çözücü ortamlarında 2 µM konsantrasyonda 10 numaralı moleküle ait a) UV-Vis, b) floresans spektrumları.	71
Şekil 4.52	: Farklı çözücü ortamlarında 2 µM konsantrasyonda 12 numaralı moleküle ait a) UV-Vis, b) floresans spektrumları.	72
Şekil 4.53	: Farklı çözücü ortamlarında 2 µM konsantrasyonda 14 numaralı moleküle ait a) UV-Vis, b) floresans spektrumları.	73
Şekil 4.54	: DMF çözücü ortamında alınan direkt singlet oksijen spektrumları.	75
Şekil 4.55	: MIC testi sonuçlarının grafiği.	77
Şekil 4.56	: 10 numaralı molekülün <i>E. coli</i> üzerindeki fotodinamik etkileri.	78
Şekil 4.57	: 10 numaralı molekülün fotodinamik olarak <i>E. coli</i> 'nin büyümesine etkisi.	79
Şekil 4.58	: 10 numaralı molekülün <i>S. aureus</i> üzerindeki fotodinamik etkileri.	80
Şekil 4.59	: 10 numaralı molekülün fotodinamik olarak <i>S. aureus</i> 'un büyümesine etkisi.	80
Şekil 4.60	: 12 numaralı molekülün <i>E. coli</i> üzerindeki fotodinamik etkileri.	81
Şekil 4.61	: 12 numaralı molekülün fotodinamik olarak <i>E. coli</i> 'nin büyümesine etkisi.	82
Şekil 4.62	: 12 numaralı molekülün <i>S. aureus</i> üzerindeki fotodinamik etkileri.	83
Şekil 4.63	: 12 numaralı molekülün fotodinamik olarak <i>S. aureus</i> 'un büyümesine etkisi.	83
Şekil 4.64	: 14 numaralı molekülün <i>E. coli</i> üzerindeki fotodinamik etkileri.	84
Şekil 4.65	: 14 numaralı molekülün fotodinamik olarak <i>E. coli</i> 'nin büyümesine etkisi.	84
Şekil 4.66	: 14 numaralı molekülün <i>S. aureus</i> üzerindeki fotodinamik etkileri.	85
Şekil 4.67	: 14 numaralı molekülün fotodinamik olarak <i>S. aureus</i> 'un büyümesine etkisi.	86

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1 :	Kullanılan kimyasallar. 20
Tablo 2 :	Sentezlenen bileşiklerin yapı aydınlatılmasında kullanılan cihazlar. 21
Tablo 3 :	Sentezlenen başlangıç maddeleri ve ftalosiyanin türevlerinin yapıları. 21
Tablo 4 :	Peptit sentezinde kullanılan amino asit miktarları. 34
Tablo 5 :	HBTU ve DIPEA çözeltilerinin içerikleri. 37
Tablo 6 :	Deneylerde kullanılan bakteri bilgileri. 38
Tablo 7 :	Besiyerlerinin hazırlanma ve marka bilgileri. 39
Tablo 8 :	Fotodinamik uygulama için kullanılan materyallerin miktarları. 39
Tablo 9 :	Ftalosiyaninlerin DMSO ortamında UV-Vis değerleri. 70
Tablo 10 :	Farklı çözücülerde 10 , 12 ve 14 numaralı moleküllerin maksimum absorbands verdiği dalga boyları. 74
Tablo 11 :	Moleküllere ait singlet oksijen kuantum verimi verileri. 76
Tablo 12 :	MIC testi sonuçları. 77

1.GİRİŞ

Hastalıklar geçmişten günümüze birçok uygarlığın yıkılmasına ve modern tıbbın doğup gelişmesine öncülük etmiştir. Enfektif hastalıklar (bakteri, virüs vb. yollar ile bulaşan) yüzlerce yıl boyunca insanların göç etmesine, tarım ve hayvancılığın bitmesine, toplu yok oluşlara ve nüfusun azalmasına sebep olmuşlardır. Bununla birlikte yine yüzyıllar boyunca birçok ecza, tıp, kimya ve biyoloji alanlarından bilim insanları, hastalıklardan korunma ve iyileşme üzerine sayısız çalışma gerçekleştirmişlerdir [1], [2].

İlaçların geliştirilmesi ile birlikte, enfeksiyon hastalıkları azalmış, insan ömrünün ortalama uzunluğu artmıştır. Geleneksel ilaçların yanı sıra, son teknoloji yeni ilaç ve ilaç sistemleri ortaya çıkmıştır. Son birkaç yıldır, bulaşıcı hastalıkların tedavisi ve bağışıklık güçlendirme çalışmaları devrim niteliğinde bir değişim geçirmiştir. Biyoteknoloji ve genetik mühendisliğinin ilerlemesi ile çok sayıda hastalığa özgü biyolojik ilaçlar geliştirilmiştir [3].

İlaç geliştirme ve hedefleme doğrultusunda sayısız yöntem geliştirilmiştir ve bunların yüzlercesi klinik olarak uygulanmaktadır. En çok tercih edilen yeni nesil hedefleme molekülleri ise genellikle ilaç nano-kristalleri, ilaç-polimer konjugatları ve ilaç-protein konjugatlarıdır [4].

Hedefli ilaç dağıtımı, verilen ilacın ilgili bölgeye, diğer bölgelere görece daha yoğun bir şekilde nüfuz ederek, yan etkileri azaltmayı ve etkinliği arttırmayı amaçlamaktadır. İlaç hedefleme ile, ilaçlar yalnızca istenen bölgedeki uygun reseptörlere ilerleyecek ve etkinliğini sadece ilgili alanda göstereceklerdir. Böylece ilgili bölge dışındaki ilacın etki mekanizması engellenecek ve toksisite en aza indirilecektir [5].

Hedeflemenin gerçekleştirileceği dokuya veya reseptörlere olan afinite, ilaç hedeflemesinde kritik rol oynar ve seçiciliği artırır. En yüksek seçiciliğe sahip olan moleküller monoklonal antikorlar olmasına rağmen, çok hassas ve oldukça pahalı olan moleküllerdir. Bunun yanı sıra kısa DNA veya RNA dizileri olan oligonükleotitler ve kısa protein dizileri olan peptitler, daha az afinitesi olmasına rağmen daha stabil, ucuz ve kolay şekilde elde edilebilen moleküllerdir. Peptitler bu bağlamda birkaç çeşit yöntemle sentezlenebilir ve daha kolay yapı analizi gerçekleştirilebilir. Ayrıca, in silico

analizleri daha kolay olan peptitler, serum proteazlarına karşı da daha dayanıklı ve daha güvenilir [6].

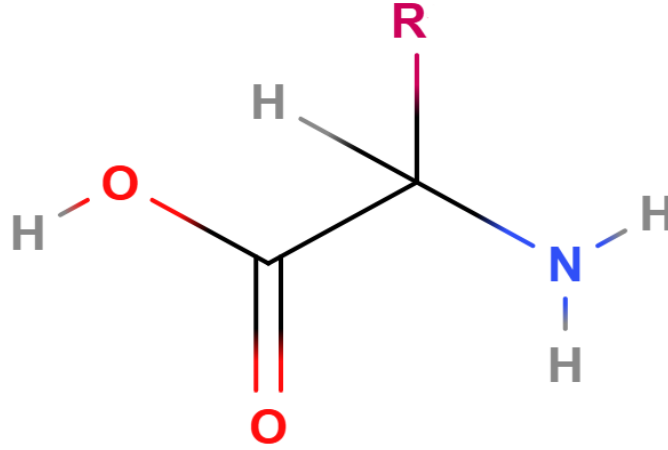
Peptitler oldukça kullanışlı küçük hedefleme ligandlarıdır. Oldukça fazla sayıda peptit dizisi çeşitli kanser türlerinde salgılanan belirteçlerin (tumor markers) hedeflenmesinde kullanılmaktadır [7]-[9]. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörleri (VEGF) veya Arjinilglisilaspartik asit (RGD) peptidleri gibi çeşitli hedef peptidleri ile konjuge edilmiş ftalosiyanın bileşikler kanser hücrelerinin hedeflenmesini ve hücre alımını oldukça artırmıştır [10]-[12]. Yapılan çalışmalar bakteriyel ortamlardaki fotodinamik terapi (PDT) uygulamalarında, hedefli tedavi amacıyla belirli peptid dizilerinin, ftalosiyanın gibi ışığa duyarlı bileşiklerle konjugasyonunun bakteri hücrelerini de hedefleyerek öldürdüğü, dolayısıyla fotoaktiviteyi artırdığı görülmektedir [13].

Bu tez kapsamında PDT uygulamalarında kullanılmak üzere iki farklı amaca yönelik asimetrik ftalosiyanın türevlerinin sentezi hedeflenmiştir. İlk olarak antimikrobial PDT uygulamalarında kullanılmak üzere hedefe yönelik ışığa duyarlı maddeler olarak, hedefe özgü peptid dizisi ile konjuge edilmiş yeni asimetrik Zn(II) ftalosiyanın türevinin sentezi amaçlanmıştır. İkinci olarak ise kanser hücreleri üzerindeki PDT etkinliğini belirlemek üzere S heteroatomaları üzerinden poliooksoetilen (A3) ve ester (B) grupları içeren diğer bir asimetrik ftalosiyanın türevi sentezlenmiştir. Bileşiklerin yapısal karakterizasyonu FT-IR, UV-Vis ve ¹H NMR MALDI-TOF teknikleri ile yapılmıştır. Ayrıca, sentezlenen ftalosiyanın moleküllerinin fotofiziksel ve fotokimyasal özellikleri de incelenmiştir.

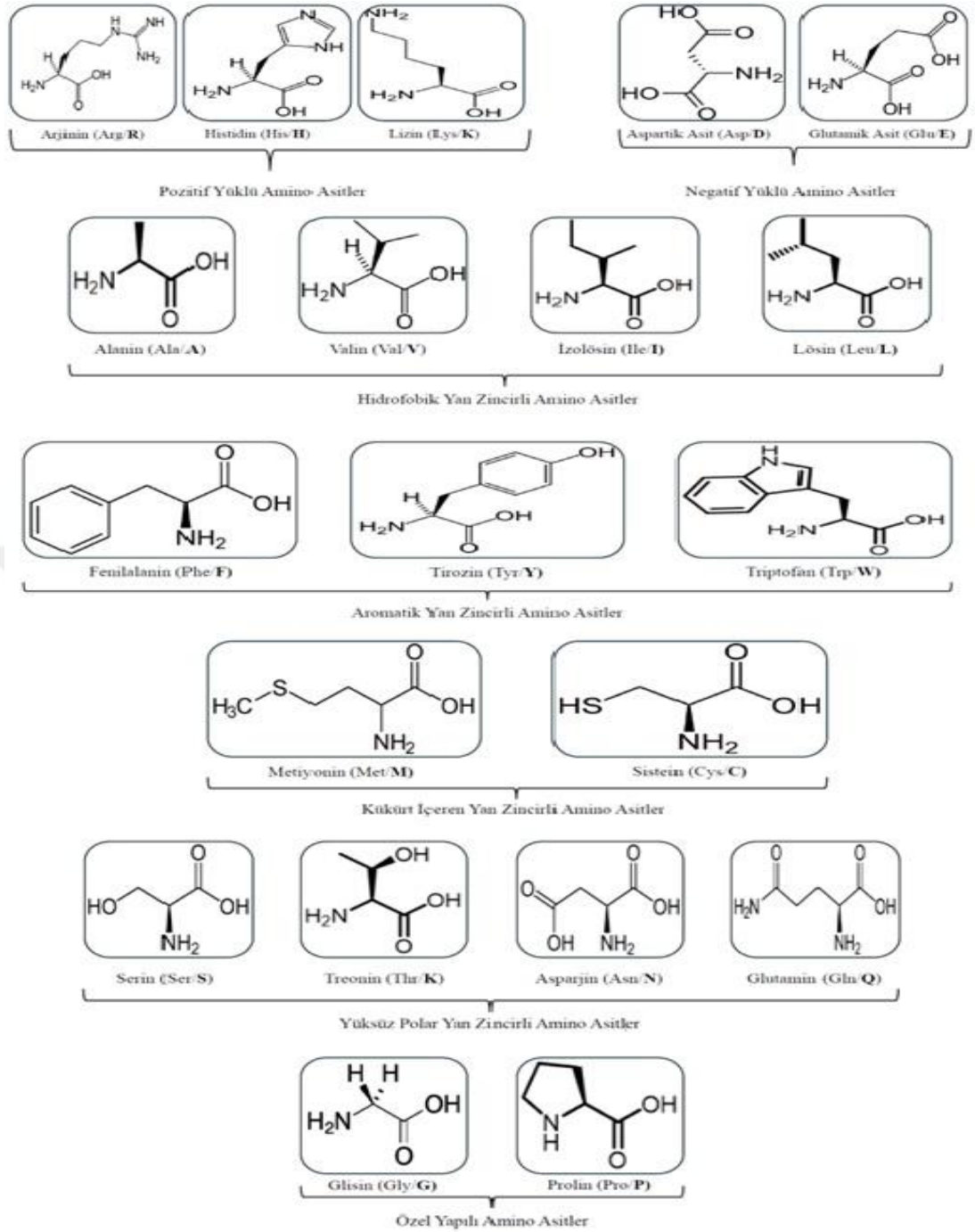
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Peptitler

Peptitler kısa amino asit dizileridir. Amino asitler, α -karbona bağlı amino ve karboksil grubu içermelerinin yanı sıra bir hidrojen ve bir de değişken yan zincir bulundurlar. En basit anlamda bir amino asit yapısı **Şekil 1.1'** de yer almaktadır. Bu amino asit dizileri üç boyutlu olarak bir konformasyona sahip olarak peptitleri oluşturmaktadır. Peptitler protein alt ünitelerini taklit edebilir ve ligand gibi davranarak hücre reseptörlerine spesifik afinite gösterebilirler ve böylece reseptör-spesifik bağlanma gerçekleştirebilirler [14]. Amino asitlerin dizilimi, iyon yükleri, üç boyutlu yapısı ve afinite bölgeleri, peptitlerin bağlanma ve spesiflik gösterme özellikleri üzerinde etki ederler. Biyolojik olarak bilinen 20 adet amino asit mevcuttur (**Şekil 2.1**) [15].



Şekil 2.1: Amino asitlerin genel yapısı.



Şekil 2.2: Amino asitlerin kimyasal yapısı.

Peptitlerin kontrol edilebilirliği ve spesifikliği, onları patojen ve tümörlerin fonksiyonlarına müdahale edebilen ajanlar ve hedefli terapötikler olarak ideal kılar. Peptitler ayrıca doğal protein yapılarının parçalarını taklit ederler ve böylece doğal ve biyolojik moleküller olarak reseptörlere kendi kendilerine bağlanarak hedefleme yapabilirler [16].

Roger Brand'in ilk defa peptitlerin hedefleme molekülleri olabileceğinden bahseden çalışmasından sonra peptitler üzerinde yapılan çalışmaların sayısı artmıştır [6], [17].

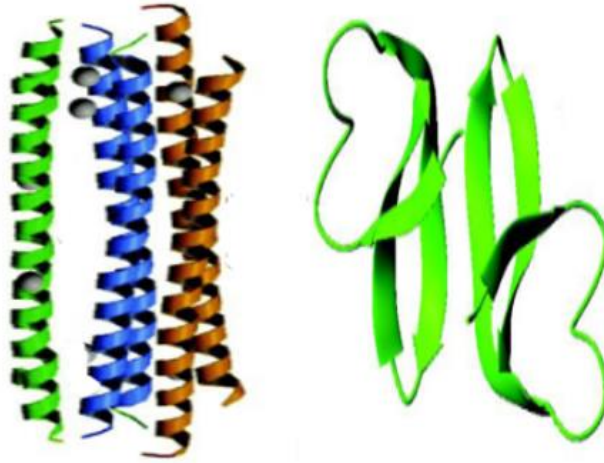
Şu anda bilinen 400'den fazla peptit yapılı molekül klinik çalışma aşamasındadır. Hızlı, etkili ve güvenilir sentez metodolojisi sebebi ile en çok ilgi gören moleküller arasındadırlar. İlk "peptit" adlandırması ve reaksiyonu Fisher ve Fournau tarafından gerçekleştirildikten sonra α -N ucu carbobenzoksi (Cbz) koruma grubu kullanılarak Bergmann ve Zervas tarafından ilk defa geri dönüşümlü peptit sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu sayede ilk defa oksitosin benzeri peptit molekülü 1953 yılında DuVigneaud ve Ark. Tarafından gerçekleştirilerek, ilk biyolojik protein yapısı kimyasal olarak sentezlenmiş oldu. Günümüzde bu sentez metodu katı-faz peptit sentezi ile gerçekleştirilerek pratiklik kazanmıştır. Katı-faz peptit sentezi (İng. Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) metodu, çözünmeyen katı bir destek (rezin) üzerine sırasıyla kovalent olarak bağlanan amino asitlerin, reaksiyon sonrasında destek üzerinden kopartılarak saf bir molekül olarak elde edilmesine dayanır [18]. Günümüzde Fmoc (9-florenilmetoksikarbonil) grubu kullanılarak amino asitlerin α -N yan zincirleri koruma altına alınır ve böylece diğer etmenlerin amino asit ile reaksiyona girmesi engellenir. Bunun temelinde Fmoc grubunun bazik ortamda amino asitten ayrılması yatar. Geçmişten günümüze kullanılan t-Bütiloksikarbonil (Boc) veya karbobenzoksi (Cbz) gibi amino asit koruyucu gruplarının birçoğu asidik ortamda amino asitten ayrılmaktadır. Bu özellikleri sebebi ile amino asit zincirinin uzaması esnasında koruyucu grupların tamamı ortamdaki uzaklaştığı için istenmeyen yan reaksiyonlar meydana gelebilmekteydi. Ancak Fmoc kullanımı ile yan zincirler bazik ortamda korunurken sadece uzatılmak istenen bölge Fmoc uzaklaştırması ile reaksiyona açık hale getirilir ve bu da zincirin daha etkili, hızlı ve güvenilir bir şekilde uzamasını sağlar. Peptit uzaması tamamlandıktan sonra kuvvetli bir asit kullanılarak peptit rezinden ayrılırken koruyucu gruplar da peptit üzerinden ayrılır ve böylece peptit zinciri yüksek verim ve saflıkta elde edilmiş olur [18]-[20].

2.1.1. Peptitlerin Kimyasal Yapısı

Peptitler, amino asit monomerlerinin α -karboksilik asit kısmı ile diğer amino asidin α -amino kısmı arasında bir molekül su açığa çıkması ile oluşan peptit bağı ile oluşur. Her amino asit eklenmesi esnasında bir molekül su açığa çıkarak bir biyo-polimerizasyon reaksiyonu sonucu meydana gelir. Tekrarlayan amid, merkezi karbon atomu, karboksil asit karbon atomu ve oksijen atomları, peptitin omurgasını meydana getirirken yan zincir grupları dışarı doğru yönelmiş halde bulunurlar. Peptit bağları ile oluşan peptitler proteine göre daha az sayıda monomere sahip olmaları sebebi ile, proteinin 4 farklı yapısal halinden ilk ikisini oluşturabilirler; bunlar α -sarmal ve β -tabaka konformasyonlarıdır.

Bir peptitin α -sarmal yapısında, her bir peptit bağının karbonil oksijen atomu, zincirin C- ucu yönünde dört amino asit sonra bulunan amino grubunun hidrojen atomu ile hidrojen bağı yaparak kıvrılmalar meydana getirir ve α -sarmal yapıya spiral bir omurga kazandırır.

Bir başka sekonder yapı olan β -tabaka yatay dizilmiş β -zincirlerinden oluşur. Basitçe pileli yapı denen bu yapıda, düzlemde bulunan hidrojen bağları β -zincirlerini bir arada tutarken, amino asit yan zincirleri bu düzlemden aşağı veya yukarı doğru yönelmiş olarak bulunur (Şekil 2.3) [21], [22].



Şekil 2.3: Peptitlerin α -sarmal ve β -tabaka yapıları [23].

2.1.2. Peptitlerin Biyoaktivitesi

Peptitler, oluşturabilecekleri üç boyutlu yapıya bağlı olarak bakteri ve fungusların hücre reseptörlerine bağlanıp antibakteriyel reaksiyonlara sebep olabilir, bağıışıklık hücrelerinde uyarılmalara yol açarak enfeksiyonlara karşı sinyal görevi görebilir, enzimlerle bağlanarak hücresel aktivitelerin yükselmesini sağlayabilir ve spesifik bağlanma ile molekül taşıyıcı özellik gösterebilir [24].

Peptitlerin hedefleme molekülü olarak spesifik özelliklere sahip olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmekle birlikte fotodinamik terapi için uygun bir taşıyıcı molekül olduğu gösterilmiştir.

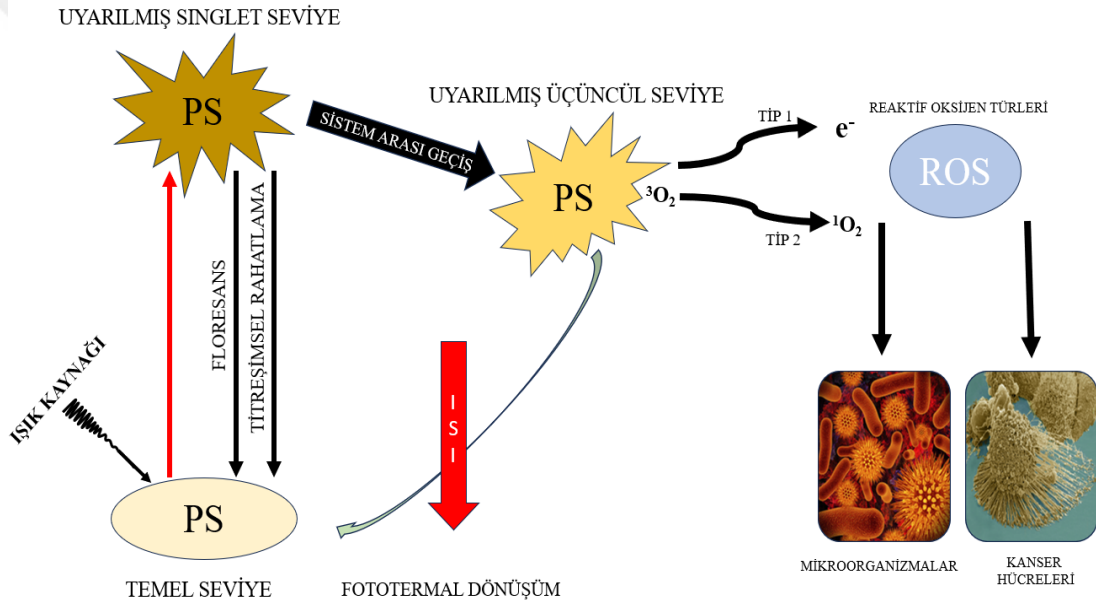
2.2. Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapi (PDT), ışığa duyarlı fotosensitizer olarak tanımlanan bir molekül ile belirli bir dalga boyundaki ışığın kombinasyonunu kullanarak kanser hücrelerini ve diğer hastalıklı dokuları hedef alan bir tedavi yöntemi olarak tanımlanabilir. Bu tedavi yöntemi, özellikle kanser, bazı cilt hastalıkları ve göz rahatsızlıkları gibi durumlarda uygulanır. Işığın aktive ettiği fotosensitizer, dokudaki moleküler oksijenle etkileşerek singlet oksijen veya reaktif oksijen türleri (ROS) üretir [25].

Fotodinamik terapi, yeni bir tedavi yöntemi olmamakla birlikte bununla ilgili klinik gelişmeler geçtiğimiz yüzyılın ortalarına başlamıştır. İlk çalışma akrilidin ve ışık ile paramesyum üzerinde denendikten üç yıl sonrasında hasta tedavisinde kullanılmıştır. Bununla beraber ilk kanser tedavisi olarak 1976 yılında geliştirilmiştir [26]. Fotodinamik terapide, fotosensitizer (PS) olarak adlandırılan, ışığa duyarlı moleküller, belirli dalga boyunda ışığa maruz bırakıldıkları zaman yüksek kuantum verimleri sayesinde serbest radikaller ve singlet oksijenler ($^1\text{O}_2$) üreterek, kanser hücrelerinin hücre zarı üzerinde bulunan biyolojik materyalleri parçalar ve kanser hücrelerini öldürür [27].

Genel olarak temel halde bulunan PS'ler düşük enerji orbitallerinde bulunan zıt yönlü iki adet elektrona sahiplerdir. Işığın absorbsiyon ile, bu elektronlardan bir tanesi, spin değişikliği meydana gelmeden daha yüksek bir enerji seviyesine geçer ve buna uyarılmış tekil seviye denir. Ancak bu seviyede hücre zarı ile herhangi bir etkileşim içerisine girmez. Bunda elektronun bu seviyede çok kısa süre kalması (nano ve piko

saniyeler) etkilidir. Uyarılmış PS'nin temel hale dönme eğilimi sebebi ile uyarılmış PS'ler hem floresans ışık formunda enerji saçılımı gerçekleştirir hem de iç enerji dönüşümü boyunca ısı enerjisi ortaya çıkarması sebebi ile seçici olmayan bozunmaya uğrar. Bu esnada uyarılmış elektron, nispeten daha uzun süre bulunabildiği uyarılmış üçlü seviyede kalır. Bu uyarılmış üçlü seviyede bulunan elektron, biyolojik bir çevrede oksijenlenmiş biyolojik moleküller oluşturmak üzere elektron transferi yaparak hücresel substratlar ile reaksiyona girer (Tip 1 reaksiyon) veya yüksek reaktivlik özelliği olan singlet oksijen üretimine öncülük eden moleküler oksijene enerji transferi gerçekleştirirler (Tip 2 reaksiyon) (Şekil 2.4) [28]. Fotodinamik terapi, toksik olmayan üç ajanın kombine etkisine dayanmaktadır: Işık, fotosensitizer, oksijen.



Şekil 2.4: Fotodinamik terapi etki mekanizması [29] (PS: Fotosensitizer, ROS: Reaktif Oksijen Türleri (İng: *Reactive Oxygen Species*)).

Fotodinamik terapi etkili bir tedavi olmasının yanında riskler de barındırmaktadır. Bu risklerin genel anlamda kaynağı, kullanılan PS molekülleridir. Bu sebeple kullanılacak PS molekülleri şu özellikleri barındırmalıdır;

- Biyolojik açıdan yeterli saflıkta olmalıdır. Kullanılan PS molekülü ne kadar saf ve stabil olursa o kadar uzun raf ömrü ve güvenilirliği olur. Ayrıca üretiminde yapılacak olan kalite kontrol testlerinden başarılı bir şekilde geçmesi de PS'in verimi ve güvenilirliği ile ilgili bilgi verir.

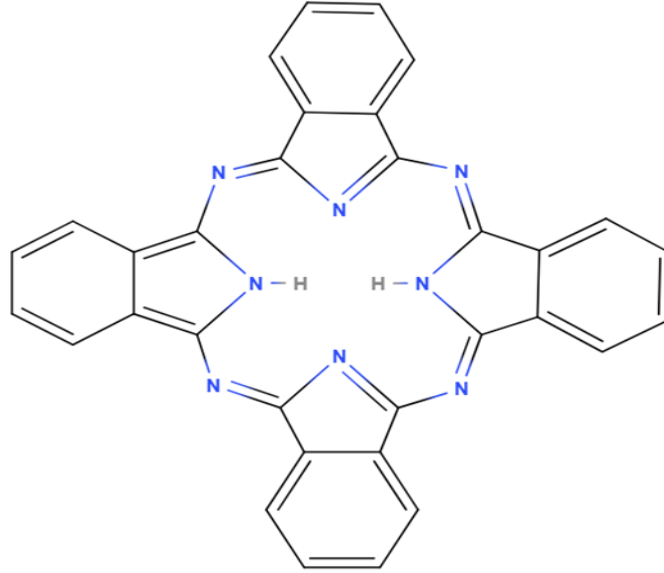
- Doku derinliklerine nüfuz edecek kadar fazla ışık absorplamalıdır. 650-800 nm arasında yüksek absorpsiyon göstermelidir: İdeal PS'lerin en iyi uygulamaları bu seviyede gerçekleşir. 800 nm dalga boyundan sonra oksijen verimliliği düşer ve hücre ölümlerinde yetersiz verimlilik elde edilir. Ayrıca daha düşük dalga boyunda yüksek absorpsiyon göstermesi durumunda güneş ışığından gelen UV ışığı, tedavi dışında da vücutta ROS üretimini tetiklemesi gerçekleşir ve toksik etki yaratabilir.
- Karanlık ortamda toksik olmamalıdır ve buna bağlı olarak hızlı şekilde vücuttan temizlenebilir olmalıdır. Böylece foto-hasara neden olması engellenir ve normal dokulardaki etkinliği ve yan etkisi azaltılır [30].
- Yüksek singlet oksijen kuantum verimine sahip olmalıdır.
- Doku seçiciliğine sahip olmalıdır.

Yoğun olarak çalışılan bazı PS molekülleri; porfirinler, ftalosiyeninler, BODIPY'ler (Boron dipirometen), DPP'ler (Diketopirrolopirol) ve çeşitli metal kompleksleridir [31].

2.3. Ftalosiyeninler

1928'de Scottish Dyes Ltd. demir kaplarda hazırlanan ftalik anhidrit ve amonyaktan hazırlanan ftalimid kullanarak koyu mavi ve çözünmeyen bir kompleksin ticaretini yapmaya başladığını duyurdu. Bu ürün neticede demirli ftalosiyenin olan üründü. Daha sonra bunun üzerine sayısız makale yazıldı ve patent alındı. Ftalosiyenin bileşiğinin yapısı, 1930'ların başında İngiltere Kraliyet Koleji'nde Sir Patrick Linstead ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir. Linstead ve arkadaşları ftalosiyenin (kısaca Pc) aza nitrojen atomları ile köprü kuran dört adet izoindol biriminin oluşturduğu bir halkasal yapıda olduğunu göstermişlerdir. Ftalosiyeninler 18 π elektron sistemli düzlemsel bir makro halkadan oluşmaktadırlar. Ftalosiyeninler yapısal olarak porfirinlerle benzer olmalarına rağmen hemoglobin, klorofil A ve vitamin B12 gibi doğal olarak bulunmazlar. Yapısal olarak makrohalkada porfirinlerdeki metin grupları yerine aza gruplarının bulunması ftalosiyeninleri farklı kılar. Porfirinle benzer analogiyi göstermesi sebebi ile ftalosiyenin fiziksel ve kimyasal davranışlarının anlaşılması, doğal hayatın süreçlerinin uzun süreli incelenmesi açısından önem teşkil etmektedir. Merkezdeki iki adet hidrojen atomu, geniş metal ve metalloid çeşitleri tarafından yerleri değiştirilebilir durumdadır. Kompleksler yoğun olarak mor, mavi

veya yeşildir. Ftalosiyaninlerin çoğu termal olarak da kararlıdır. Ftalosiyaninler çoğunlukla X-ray difraksiyon teknikleri ile ayırt edilebilen iki veya daha fazla polimorfik bir yapı gösterir [32].



Şekil 2.5: Ftalosiyanin (H₂Pc) genel yapısı.

Ftalosiyaninler yarı iletken materyaller, fotovoltaipler, fotodinamik terapi, optik ölçüm materyalleri vb. olarak birçok alanda kullanılmaktadır [33]-[35].

Ftalosiyaninler görünür ışık dalga boylarında ve özellikle daha yüksek bantlarda oldukça yüksek absorpsiyon ve floresans özellik gösterirler. Bu özellikleri fotodinamik terapide kullanılabilme özellikleri açısından oldukça elzemdir. Porfirinlere benzer olarak Pc sistemleri de fotodinamik terapi süreçlerinde kullanılmak üzere anahtar gerekliliklerden biri olan singlet oksijen üretebilme kapasiteleri açısından metal kullanılarak sentezlenmeleri, onları fotodinamik terapi için yüksek verimli bir hale getirir. Klinik faz aşamasında olan Pc bazlı bazı ilaçlar olmakla birlikte henüz datalar yayınlanmış değildir. Bunlardan başarılı olarak görülen alüminyum metali içeren Photosens® ilacı Rusya’da geliştirilmiş ve deri, sindirim sistemi ve solunum sistemi üzerinde kötü huylu tümörlere karşı mücadelede etkili olduğu gözlemlenmiştir. Pc-bazlı bileşikler arasında tetra-sülfürlenmiş alüminyum bazlı Pc, suda çözünürlüğü ve istenen fotofiziksel özellikleri sebebi ile denemelere başlanmıştır. Ancak bunun da

tavşanlar üzerinde nörotoksisiteye sebep olduğu görülmüş ve dört adet sülfür bağlantısı ikiye düşürülmüştür [34].

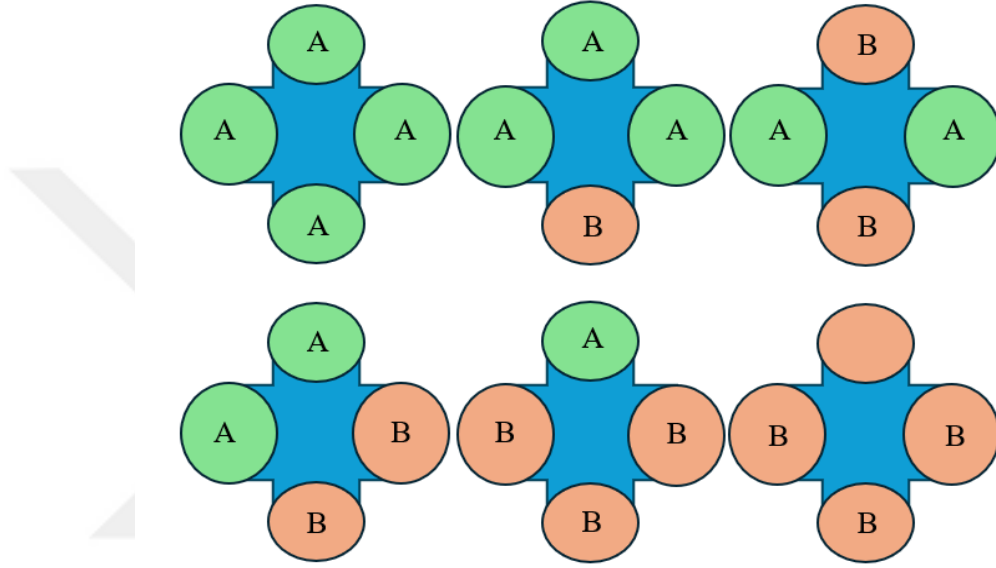
Pc'lerin bazıları, ışığa maruz kaldıklarında, fotodegradasyon ürünleri üretebilmektedir ve bu da organ toksisitesine sebep olmaktadır. Bu problemin üzerinden biyobozunur moleküller ile konjugasyon yoluyla başa çıkılabilmektedir. Bir başka diğer problem ise ftalosiyanın hedef bağlanmasındaki zayıflığıdır. Molekül hedefleme doğrultusunda biyolojik moleküller ile Pc konjugasyonu oldukça başarılı bir yöntemdir [35].

Pc'ler periyodik tablodaki 70 elementten daha fazlası ile koordine edilebilirler ancak tüm Pc'ler PDT için gerekli olan reaktif oksijen üretimi için uygun değildir. Tedavinin başarılı olması açısından bu özelliklerinin optimizasyonu kritik bir önem taşımaktadır. Örneğin, serbest bazlı Pcs, karşılık gelen ZnPcs ile karşılaştırıldığında genellikle daha düşük singlet oksijen kuantum verimi gösterir. Si^{4+} , Al^{3+} ve Ga^{3+} gibi eksenel konumları ile işlevsel açıdan bağ kurabilen iyonlar ile oluşturulan Pc'ler sıklıkla tercih edilir, çünkü bu yapılar metallo-Pc'lerde uzun ömürlü triplet seviyede kalma durumu artarken ve eksenel yönde yer alan süstitüentler agregasyonu azaltır. Buna karşılık Fe, Cu ve Gd gibi paramanyetik doğaya sahip metaller PS olarak uygulama için pek uygun değildir [36].

Genel olarak, Pc'ler için iki agregasyon formu mevcuttur, biri geniş temas alanı (planar düzlem) ve güçlü π - π etkileşiminden kaynaklanan H-agregasyonu; diğeri ise düşük temas alanı (uç uca eklenme) ve zayıf π - π etkileşimi ile J-agregasyonudur [27]. Eksenel modifikasyonun H-agregasyonunu etkili bir şekilde önleyebileceği ve Pc'lerin absorpsiyon spektrumlarını kırmızıya kaydırabileceği ve bunun da PDT verimliliğini artırabileceği bulunmuştur. Huang ve çalışma arkadaşları, 6,8-disülfonat-2-naftiloksi tetra süstitüe Zn(II) ftalosiyanın ve mitoksantronun (MA, bir antikanser ilaç) birlikte çökeltilmesiyle suda dağılabilir nanopartiküller'ler hazırlamıştır. Nanopartiküller, gelişmiş geçirgenlik ve tutunma etkisi nedeniyle tümörde yüksek bir birikim etkinliği gösterir ve nükleik asit tarafından aktive edilebilir floresan ve $^1O_2$ üretimine sahiptir [34].

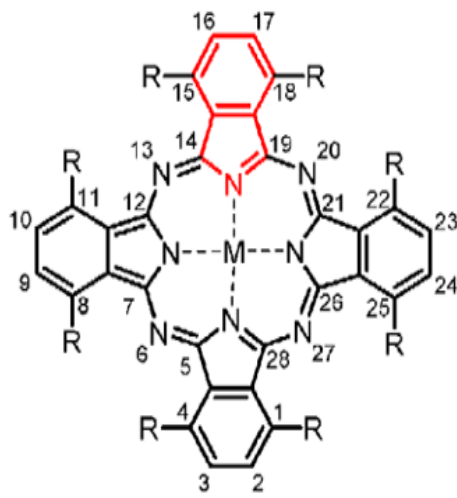
2.3.1. Ftalosiyaninlerin Moleküler Özellikleri

Ftalosiyaninler, mono-, di-,tetra-, okta-sübstitüe gruplar içeren farklı yapılarda oluşabilen sınıflara ayrılabilir. Tetra sübstitüe ftalosiyaninlerde sübstitüe grupların aynı olması durumunda simetrik (A_4 , B_4), farklı olmaları durumunda asimetrik (A_3B , AB_3) veya yarı simetrik olarak (A_2B_2 , $AABB$) olarak da adlandırılabilir (Şekil 2.6) [37].

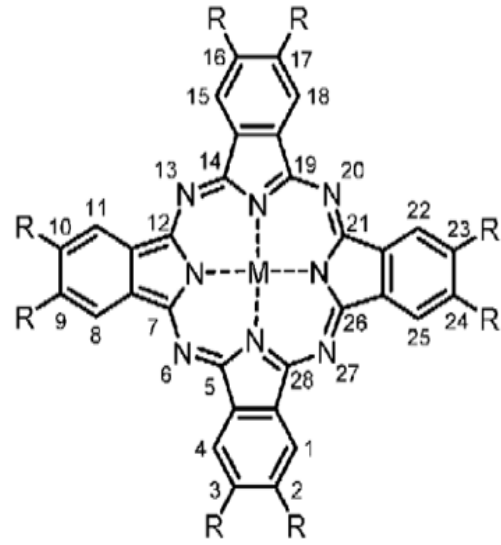


Şekil 2.6: Tetra sübstitüe ftalosiyaninlerde oluşabilecek izomerik yapılar: simetrik (A_4 ve B_4 ile A_2B_2) ve asimetrik (A_3B ve AB_3) ftalosiyaninler.

Ftalosiyaninlerin yapısını değiştirmek için birkaç temel yöntem bulunmaktadır. Bunlardan ilki, merkez atomunun veya eksenel koordinasyonunun değiştirilmesidir. Diğer bir yöntem ise, ftalosiyanin makrohalkasının mezo-atomlarının değiştirilmesi ve çevresel modifikasyonların yapılmasıdır. Yapılan araştırmalar, bu yöntemler arasında çevresel modifikasyonların ftalosiyanin yapısını değiştirmede en verimli yaklaşım olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, ftalosiyaninlerin sübstitüe gruplarının bağlı olduğu bölgeler, yapılarında belli bir dallanma gösterir ve bu dallanma, sübstitüsyonların etkisine bağlı olarak değişiklik gösterir. Bu adlandırmalar, ftalosiyaninlerin “periferik” veya “non-periferik” yapılarını ortaya koyar. Ftalosiyanin halkasının 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 ve 25. pozisyonlarında (α -pozisyonları) yer alanlar α -sübstitüentleri olarak adlandırılırken, 2, 3, 9, 10, 16, 17, 23 ve 24. pozisyonlarda (β -pozisyonları) yer alanlar β -sübstitüentleri olarak kabul edilir (Şekil 2.7) [38].



Non-Periferal Pc

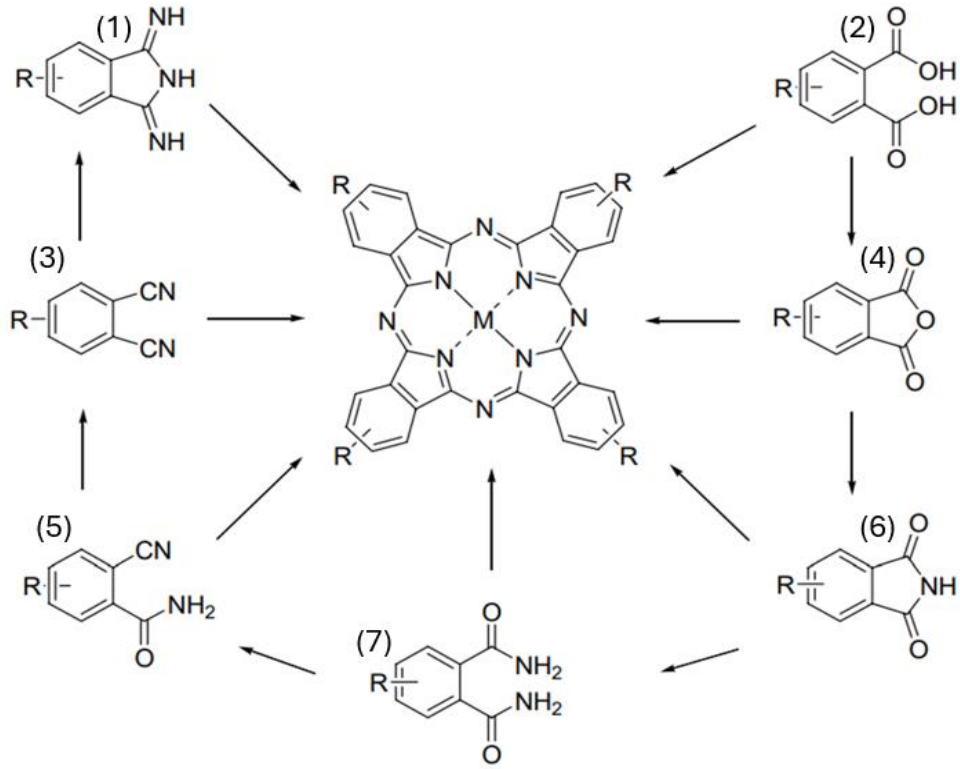


Periferal Pc

Şekil 2.7: Periferal ve non-periferal süstitüe ftalosiyaninler [39].

2.3.2. Ftalosiyaninlerin Sentezi

Periferal süstitüentler, iki temel yöntemden biri kullanılarak ftalosiyanin çekirdeğine eklenebilir. İlk yaklaşım, aromatik elektrofilik ikame reaksiyonlarının yanı sıra siklokatalma reaksiyonları kullanılarak halihazırda mevcut olan ftalosiyanin çekirdeğinin modifikasyonunu içerir. İkinci temel yaklaşım, süstitüe edilmiş ftalosiyanin öncüllerinin tetramerizasyonunu içerir ve bu da hedef ftalosiyanin üzerinde kontrollü sayıda süstitüent oluşmasına yol açar. Bu yöntem için kullanılan başlangıç maddeler, arasında orto-ftalik asidin süstitüe türevleri (yani anhidritler, imidler, amidler ve dinitriller) yer alır. Ftalonitril türevleri en çok kullanılan bileşiklerdir [40]. Ftalosiyanin sentezinde genel olarak kullanılan başlangıç molekülleri; 1,3-diiminoizindolin, Ftalik Asit, Ftalonitril, Ftalik Anhidrit, 2-Siyanobenzamid, Ftalimid, Ftalamid'dir (Şekil 2.8).



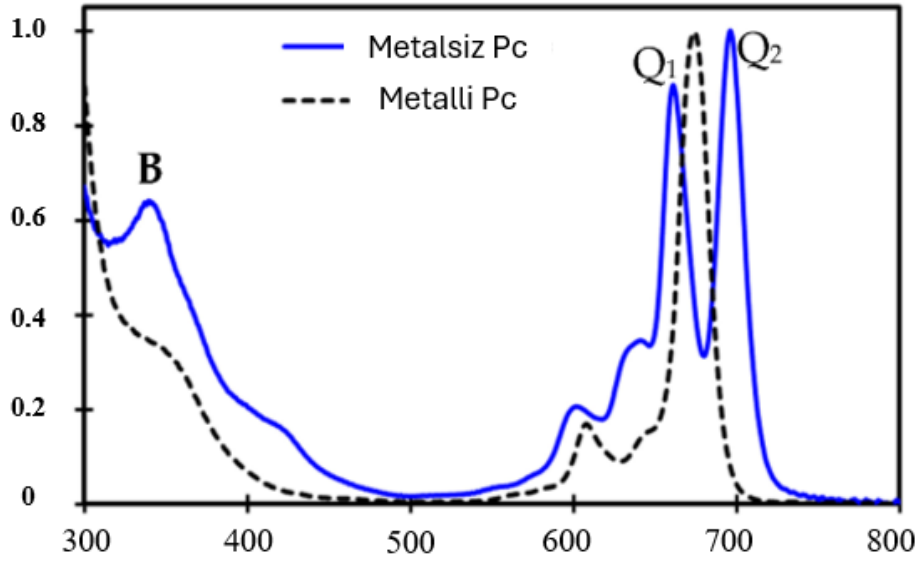
Şekil 2.8: Ftalosiyanın sentezinde kullanılan başlangıç materyalleri (1: 1,3-diiminoizindolin, 2: Ftalik Asit, 3: Ftalonitril, 4: Ftalik Anhidrit, 5: 2-siyanobenzamid, 6: Ftalimid, 7: Ftalamid) [38].

Metalli ftalosiyanın sentezinde reaksiyon verimi, metalsiz türevlerin sentezlerine kıyasla daha yüksektir. Bunun sebebi metal iyonunun halkalaşma üzerine olan kalıp etkisinden kaynaklanmaktadır [39].

2.3.3. Ftalosiyanın Fotofiziksel Özellikleri

UV-vis spektrumunda, yaklaşık 680 nm'de (450 cm^{-1} yarı maksimumda tam genişlik) $S_0 \rightarrow S_1$ geçişinden kaynaklanan Q bandı olarak adlandırılan keskin, şiddetli bir absorpsiyon bandı gözlenir [40]. Ftalosiyanın 18 π elektronu içermesi sebebiyle $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine karşılık gelen absorpsiyon banları verirler. 300-350 nm arasında gözlemlenen diğer karakteristik pikler ise B-bandı olarak adlandırılmaktadır [27].

Metalsiz ftalosiyanın 650-800 nm dalga boyu aralığında ikiye yarılmış şekilde güçlü pikler verirken metalli ftalosiyanın da ise genelde bu iki dalga boyunun arasında tek ve daha şiddetli tek pik görülür. Bunun sebebi, metalli ftalosiyanın şablon etkisinden kaynaklanan stabilitesi ve simetri sabitliğidir (Şekil 2.9) [27].



Şekil 2.9: Metalli ve metalsiz Pc’ler arası spektrum farklılıkları [41].

2.4. Çalışmanın Literatürdeki Yeri ve Amacı

Peptit ve ftalosiyanın konjugasyonu çalışmaları çeşitli alanlarda denenmek üzere gerçekleştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olanı yine bizim de yaptığımız gibi hedefleme üzerinedir. Bu çalışmalardan birçoğu kanser hücrelerini hedeflemek için gerçekleştirilmiş olup başarılı sonuçlar elde edilmiştir [42]-[44].

Ongarora ve ark. tarafından yapılan çalışmada, Pc-peptit konjugatı, kanser hücrelerindeki büyüme faktörlerini hedefleyerek 700 nm’de yakın IR bölgesinde kanser hücrelerini öldüren bir çalışmayı gerçekleştirmişlerdir [42].

Yine Göksel ve ark. tarafından gerçekleştirilen ve HeLa hücreleri üzerinde yapılan deneyler sonucunda, Pc-peptit konjugatlarının, kanser hücrelerinin hayatta kalım oranlarını 50%’nin altına indirdiklerini göstermektedir [45].

Yu ve arkadaşları, EGFR hücre yüzey proteinini hedeflenmesi için sentezledikleri GE11 peptit sekansını, ftalosiyanın ile konjuge ederek in vitro çalışmalar yapmış ve Balb/c nude fareler üzerinde denemeler gerçekleştirmişlerdir. Çalışmaları için tirozince zengin 12 amino asitlik GE11 peptitini katı faz peptit sentezi ile sentezlemiş ve ftalosiyanın ile konjuge etmişlerdir. Bulgulara göre; in vitro çalışmalarda, memeli hücrelerde karanlık ortamda toksik bir özellik gözlemlenmemiş ve ışık ortamında

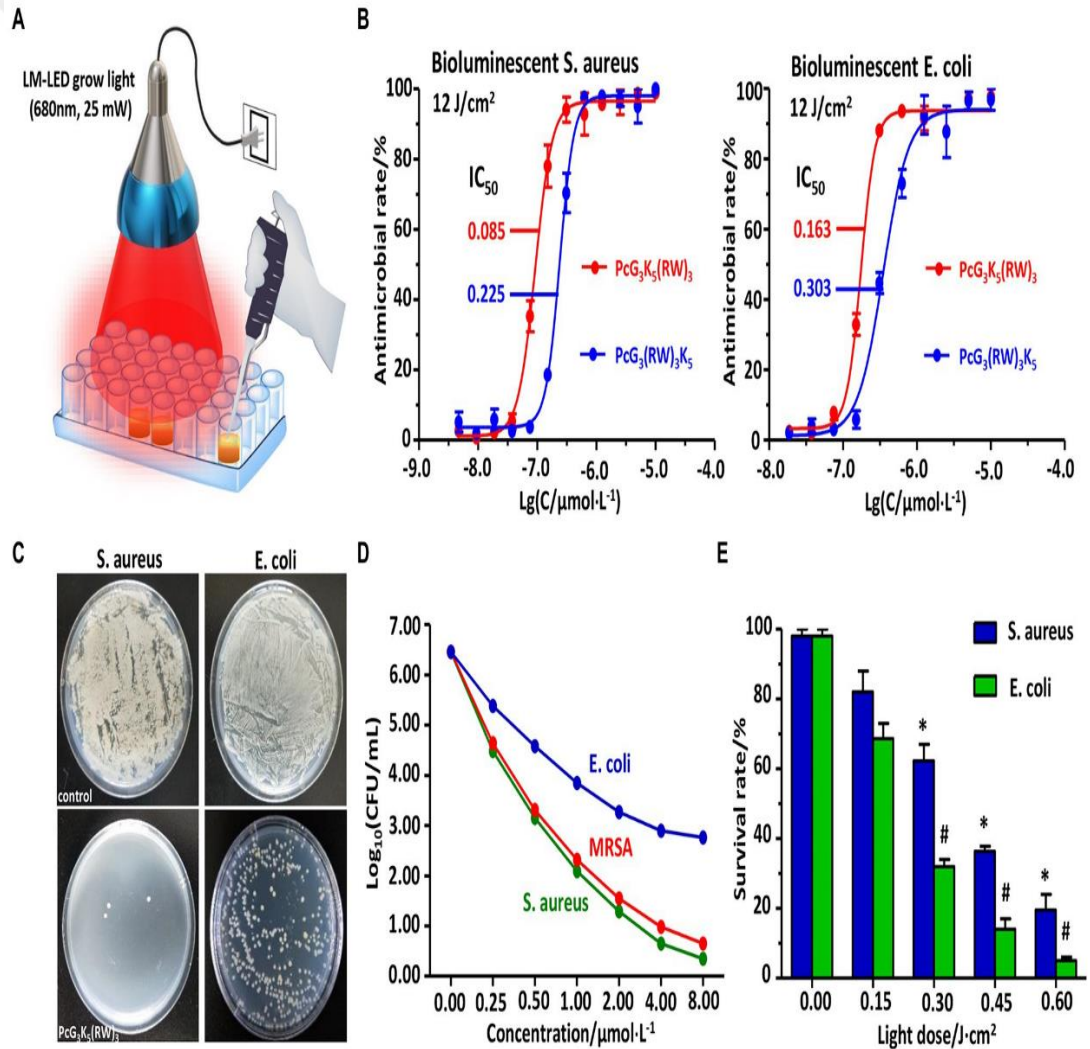
sitotoksitenin arttığı belirlenmiştir. Fare deneyinde ise, sentezlenen Pc-peptit molekülünün kanserli dokuda biriktiği yani kanserli dokuyu hedeflediği gösterilmiştir [46]. Yine EGFR hedeflemesi yapılan başka bir çalışmada ise, 5 amino asit dizili peptit sekansı, okzalo gruplu bir ftalosiyenin ile konjuge edilmiş ve in vitro ile in vivo çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre ise yine memeli hücreler üzerinde karanlık ortamda toksik etki gözlemlenmemiş ve farelerde ise enjeksiyon sonrası 22 günlük izleme sürecinin sonunda, molekül enjekte edilmiş ve ışıkla uyarılmış farelerdeki kanserli dokunun, enjekte olmayan farelere göre anlamlı şekilde hızlı iyileştiği ortaya koyulmuştur [47].

Başka bir çalışmada Leo ve arkadaşları, oldukça büyük ve siklik yapıda bir peptit sentezleyerek bunu ftalosiyenin ile konjuge etmişlerdir. Siklik amino asit elde etmek için N ve C terminal uçlarındaki amino asitler sistein olan bir sekans tasarlanmış ve sistein içerisindeki sülfid gruplarının disülfid bağ yapma özellikleri kullanılarak peptit sekansı halkasal bir yapıya dönüştürülmüştür. Bu sekans daha sonra peptit bağlanış bir PC molekül ile konjuge edilmiş ve çift aktivasyon özelliği ölçülmüştür. Buna göre FDT için gerekli olan aktivasyonda, hücrenin büyüme yolağında kullanılan Cathepsin B proteini ve glutatyon (GSH) bolca üretildiği için bu moleküller varlığında, sentezlenen moleküller aktive olmaktadır ve tümör hücrelerinde seçici olarak bağlanma göstermektedir [48].

Rukh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise anti-bakteriyel bir Pc-peptit sekansı sentezlenmesi amaçlanmıştır. Sentezlenen konjugat (Pc-GGG(RW)3) gram pozitif bakterilerde anti-bakteriyel özellik gösterirken, gram negatif bakterilerde, diğerine oranla daha az etki gösterdiği ortaya koyulmuştur [49].

Zhang ve arkadaşları, GGG(RW)3 peptit sekansını kullanarak antimikrobiyal peptit sentezlemeyi amaçlamışlardır. Farklı olarak bu sekansa ek olarak 3 adet lizin amino asidi ekleyerek hem suda çözünürlüğü arttırmayı hem de gram pozitif bakterilerde etkiyi arttırmayı amaçlamışlardır. Bir diğer lizin sekansı eklenmesinin sebebi ise, FDA tarafından onaylı bu sekansın yiyecek koruyucusu olarak kullanılmasıdır. Pc ile peptit konjugasyonu sonucu elde edilen peptitler, antimikrobiyal özellik göstermesi hedef ile bakteri hücre kültürü ve fareler üzerinde deneyler gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre; sentezlenen konjugat, gram pozitif bakterilerde güçlü bir anti-bakteriyel özellik göstermesinin yanında gram negatif bakterilerde de beklenenden daha fazla toksik özellik göstermesi ile anlamlı bir etki yaratmıştır. Fare denelerinde ise, *S.aureus*

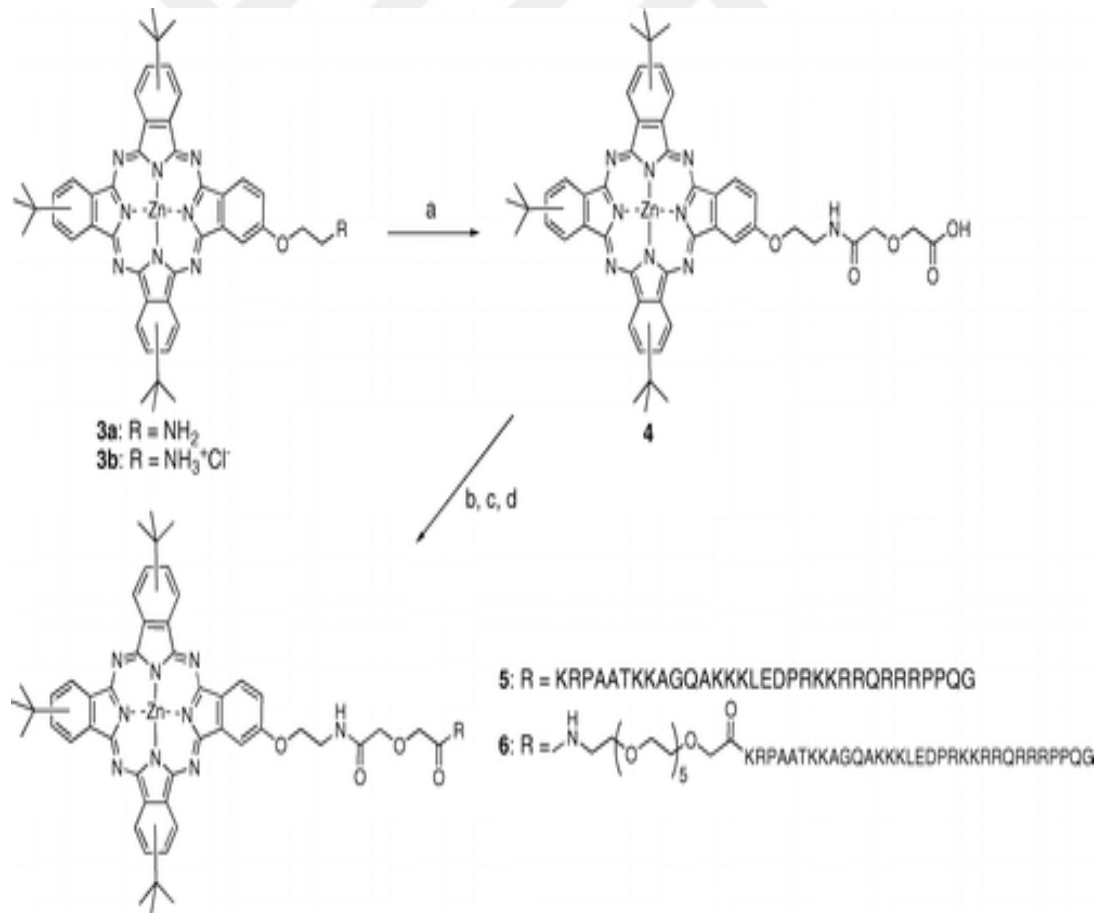
tarafından enfekte edilmiş farelerin yara bölgeleri, sentezlenen molekülün en yüksek absorpsiyon gösterdiği dalga boyu olan 680 nm ile uyarılmış ve uyarılma sonucunda uygulama yapılan farelerin yaraları, yapılmayan kontrol gruplarına göre daha hızlı iyileştiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, enjekte edilen molekülün hangi organlarda dağılım gösterdiği de fareler üzerindeki deneyler sonucunda tespit edilmiş ve molekül yoğunluğunun en fazla karaciğer ve böbreklerde olduğu tespit edilmiştir. Bu organlardan alınan örneklerde karaciğerde 35 nM ve böbreklerde 12 nM molekül tespit edilmiş ve zamanla bunların azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca yine fareler üzerindeki çalışmalar sonucunda, molekülün kandaki yarılanma ömrü 11,2 saat olarak tespit edilmiştir [50].



Şekil 2.10: Zhang ve arkadaşları tarafından deneyin yapılışı ve sonuçları.

Ranyuk ve arkadaşları ise görüntüleme için peptit-Pc konjugasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bunun için GRPR (gastrin salgılamasını sağlayan bir peptit reseptörü) ile kuvvetli bir afinite oluşturan bombessin (14 amino asitlik bir peptit) peptitini kullanmışlardır. Bu peptit sekansı ile, molekülün kanser hücrelerinde hızlı bir emilime uğradığını ve PET ile gözlem yapılabildiğini göstermişlerdir [51].

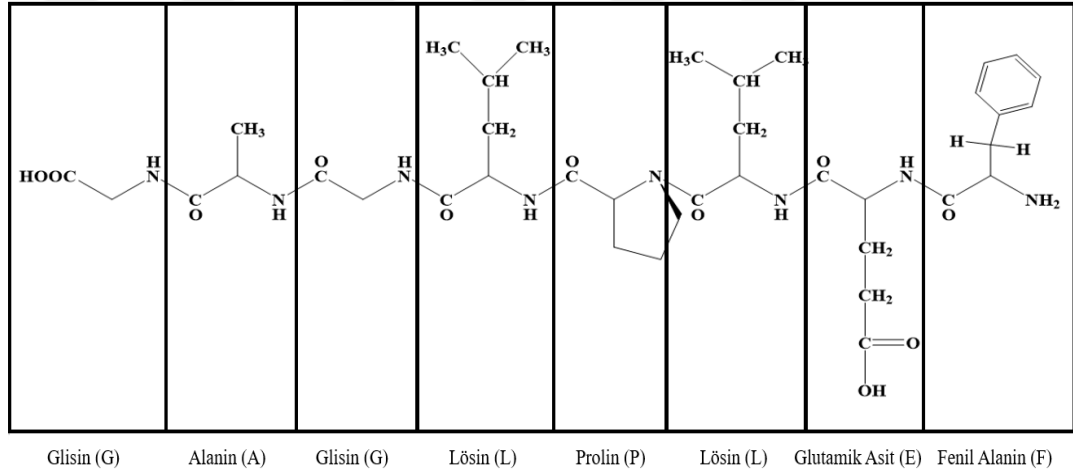
Son olarak Vazques ve arkadaşları, peptit-Pc konjugasyonu yaparak, molekülün nerede lokalize olduğunu belirlemek için İnsan İmmünyetersizlik Virüsü (HIV) *tat* geninin 48-60. amino asitlerini kullanarak polietilen glikol (PEG) içeren ve içermeyen konjugatlarını sentezlemişlerdir. Bunun yanında bir de nükleoplazmin geninin amino asit sekanslarını sentezlemişlerdir. Bulgularında; her üç molekülünde lizozim organelinde lokalize olduklarını ve PEG içeren Pc-peptit konjugatının hem suda çözünürlüğünün daha fazla olduğunu hem de kararlılığının daha uzun süre korunduğunu göstermişlerdir [52].



Şekil 2.11: Vazques ve arkadaşları tarafından sentezlenen Pc-peptit molekülü.

Bu tez çalışmasının amacı, Çinko-ftalosiyanın'e peptit molekülü bağlayarak anti-mikrobiyal PDT etkinliğinin araştırılmasıdır. Bu çalışma kapsamında kullanılacak olan peptit dizisi Pimpcan T. ve arkadaşlarının yayınında belirttiği FELPLGAG (Fenilalanin-Glutamik Asit-Lösin-Prolin-Lösin-Glisin-Alanin-Glisin) sekansıdır [53]. Bu sekansın seçilme amacı; moleküler kütlesi 2 kDa'dan küçük olması, bu sebeple üretilebilirliğinin daha kolay olması ve de novo skorunun 80 olması ile biyoinformatik olarak güvenilir olmasıdır.

Sonuç olarak tez kapsamında, peptid zinciri içeren Zn(II) ftalosiyanın türevi hem ftalosiyanın halkasından kaynaklanan aPDT etkinliği hemde peptid zincirinin göstereceği antimikrobiyal etki bir araya getirilerek daha etkili olacağı düşünülen antimikrobiyal ajan sentezi hedeflenmiştir.



Şekil 2.12: Peptit sekansını oluşturan amino asitler.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Sentezlerde ve saflaştırmalar esnasında kullanılan kimyasallar **Tablo 1**'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Kullanılan kimyasallar.

No.	Kimyasal Adı
1	4-Ftalonitril
2	Dimetil Formamid (DMF)
3	Dietilenglikol Monoetil Eter (DEGME)
4	Potasyum Karbonat
5	Argon Gazı
6	Etil Asetat
7	Metil Alkol (Metanol)
8	Dietil Eter
9	Sodyum Sülfat
10	Tetrahidrofuran (THF)
11	Saf Su
12	p-Toluensülfonilklorid
13	Sodyum Hidroksit
14	Tiyoüre
15	Hidroklorik Asit (HCl)
16	Dimetil Amino Etanol (DMAE)
17	Çinko Asetat
18	Metil-4-Hidroksibenzoat
19	Dikloro Metan (DCM)
20	Etil Alkol (Etanol)
21	Azot Gazı
22	Hekzan
23	Dimetil Sülfoksit (DMSO)
24	Petrolyum Eter
25	Sodyum Hidroksit
26	Rink Amide Rezin
27	Glisin-Fmoc
28	Alanin-Fmoc
29	Lösin-Fmoc
30	Fenilalanin-Fmoc
31	Glutamik Asit-Fmoc
32	Prolin-Fmoc
33	Pirrolidin
34	Oxyma
35	N,N'-diizoheksilkarbodiimid (DIC)
36	Trifloro Asetik Asit (TFA)

Tablo 1: Devam.

37	Triizopropilsilan (TIS)
38	N,N,N',N'-Tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uranyum hekzaflorofosfat (HBTU)
39	Diizopropil Etilamin (DIPEA)
40	N-metil Pirrolidon (NMP)

3.2. Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında sentezlenen moleküllerin spektroskopik ve yapısal özelliklerinin karakterizasyonu ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, FT-IR, MALDI-TOF, UV-Vis, HPLC ve Floresans Spektrofotometre teknikleri kullanılmıştır. Bu spektroskopik cihazlar Gebze Teknik Üniversitesi alt yapısında yer almaktadır (**Tablo 2**).

Tablo 2: Sentezlenen bileşiklerin yapı aydınlatılmasında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Cihazın Modeli	Cihazın Bulunduğu Yer
NMR Spektrofotometresi	Varian 500 MHz	Gebze Teknik Üniversitesi
FT-IR Spektrofotometresi	Perkin Elmer Spectrum 100	Gebze Teknik Üniversitesi
Kütle Spektrometresi	Bruker Microflex-LT MALDI-TOF MS	Gebze Teknik Üniversitesi
UV-Vis Spektrofotometresi	Schimadzu UV-1800	Gebze Teknik Üniversitesi
Floresans Spektrofotometresi	Varian Cary Eclipse	Gebze Teknik Üniversitesi
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Agilent ChemStation	Gebze Teknik Üniversitesi

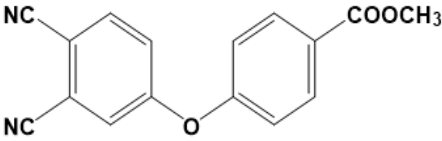
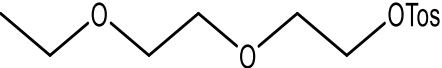
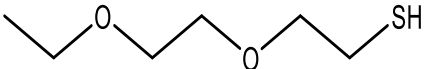
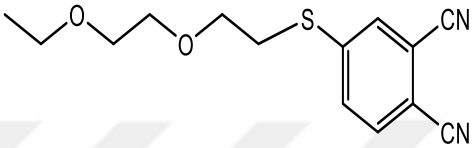
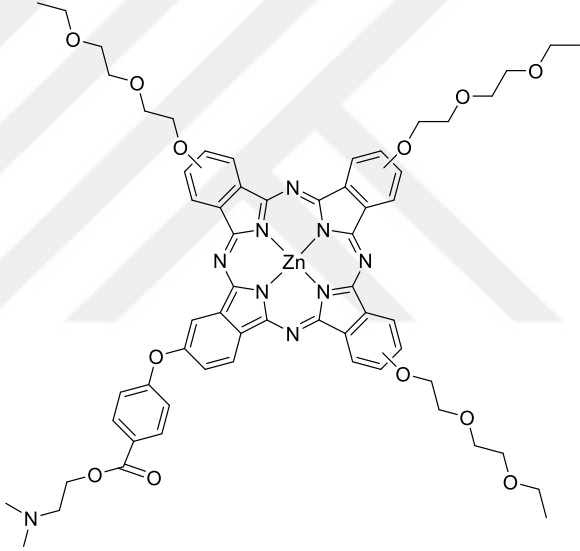
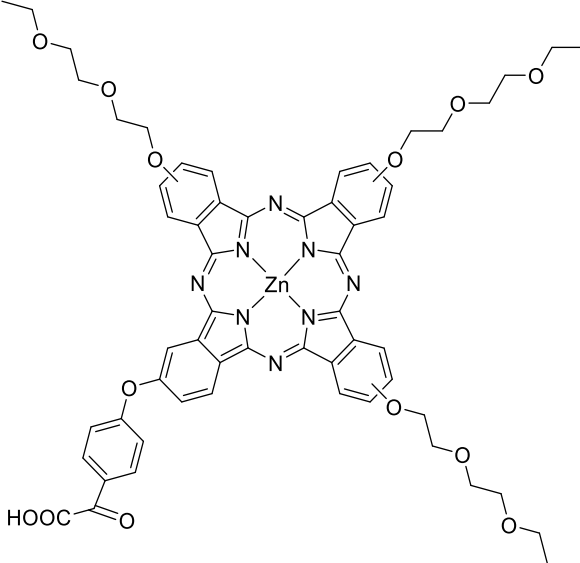
3.3. Deneysel Bölüm

Tez kapsamında, yapılan sentez çalışmalarıyla sentezlenen başlangıç maddeleri, peptit ve ftalosiyanın türevlerinin yapıları **Tablo 3**'te verilmiştir.

Tablo 3: Sentezlenen başlangıç maddeleri ve ftalosiyanın türevlerinin yapıları.

Madde No	Bileşiğin Yapısı
3	

Tablo 3: Devam.

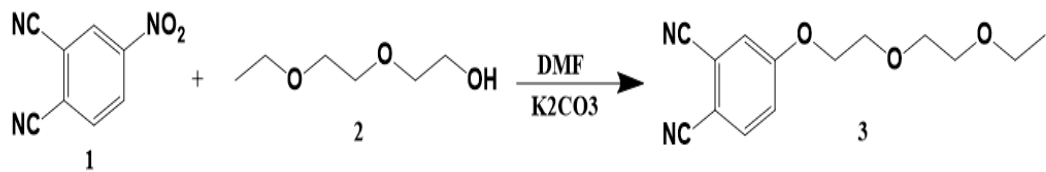
5	 <chem>CN(C)c1ccc(cc1C(=O)c2ccc(C#N)c(C#N)c2)C#N</chem>
7	 <chem>CCOCCOCCOC(C)(C)COC(=O)c1ccc(C)cc1</chem>
8	 <chem>CCOCCOCCOCCS</chem>
9	 <chem>CCOCCOCCOCCSc1ccc(C#N)c(C#N)c1</chem>
10	 <chem>CCOCCOCCOc1ccc2c(c1)c3c4c5c2n(c3n4)C6=CC(=CC=C6)Oc7ccc(OC(=O)CN(C)C)cc7</chem>
11	 <chem>CCOCCOCCOc1ccc2c(c1)c3c4c5c2n(c3n4)C6=CC(=CC=C6)Oc7ccc(C(=O)O)cc7</chem>

Tablo 3: Devam.

12	
13	
14	

3.4. Başlangıç Maddelerinin Sentezi

3.4.1. 4-(2-(2-etoksietoksi)etoksi)ftalonitril (3) Sentezi

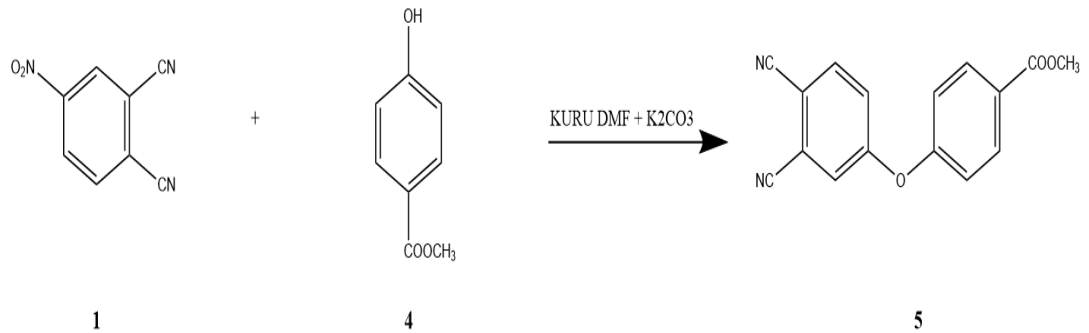


Şekil 3.1: O-köprülü polioksietilen zincirleri içeren ftalonitrilin (3) sentez şeması.

3 nolu bileşiğin sentez yöntemi **Şekil 3.1** de görülmektedir. 4-nitroftalonitril (500 mg, 2.89 mmol) (**1**), 0.5 mL dietilen glikol monoetil eter (**2**) (465 mg, 3.47 mmol) ve 5 mL kuru DMF, Ar(g) atmosferinde uygun bir reaksiyon balonuna ilave edilerek karıştırıldı. Üzerine kuru K₂CO₃ (1 g, 7,22 mmol) postalar halinde eklenerek oda şartlarında 1 gece karıştırıldı (**Şekil 3.1**). Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım, etil asetat ve su kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapıldı. Organik fazlar Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu, süzüldü ve sonra çözücü vakum altında uzaklaştırıldı. Elde edilen ham ürün, öncelikle DCM:EtOH 50:1 ve sonrasında DCM:EtOH 20:1 yürütücü sistemleri kullanılarak silika jel kolonda kromatografik olarak ayrıldı. Saflaştırma işlemi sonucunda **3** nolu ürün katı olarak elde edildi (**Şekil 3.1**). Verim: 84 % (0.631 g). C₁₄H₁₆N₂O₃, MA: 260.29 g/mol.

- FT-IR[(ATR) $\nu_{\text{maks}}/\text{cm}^{-1}$]: 2800-3000 (A-CH), 3000-3100 (Ar-CH) (2200-2250 (C≡N) (**Şekil 4.2**).
- MALDI-TOF-MS (DHB): m/z Calcd: 260.29 g/mol, Found: 262.102 [M+H]⁺ (**Şekil 4.3**).
- ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.69 (1 H, d, J = 8.8 Hz), 7.30 (1 H, d, J = 2.5 Hz), 7.22 (1 H, dd, J = 8.8, 2.5 Hz), 4.25 – 4.20 (2 H, m), 3.91 – 3.85 (2 H, m), 3.72 – 3.66 (2 H, m), 3.62 – 3.56 (2 H, m), 3.51 (2 H, q, J = 7.0 Hz), 1.19 (3 H, t, J = 7.0 Hz) (**Şekil 4.4**).
- ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ ppm: 162.14, 135.26, 119.96, 119.66, 117.43, 115.78, 115.36, 107.46, 77.16, 71.15, 69.88, 69.33, 68.77, 66.83, 15.23 (**Şekil 4.5**).

3.4.2. Metil 4-(3,4-disiyanofenoksi) benzoat (**5**) Sentezi



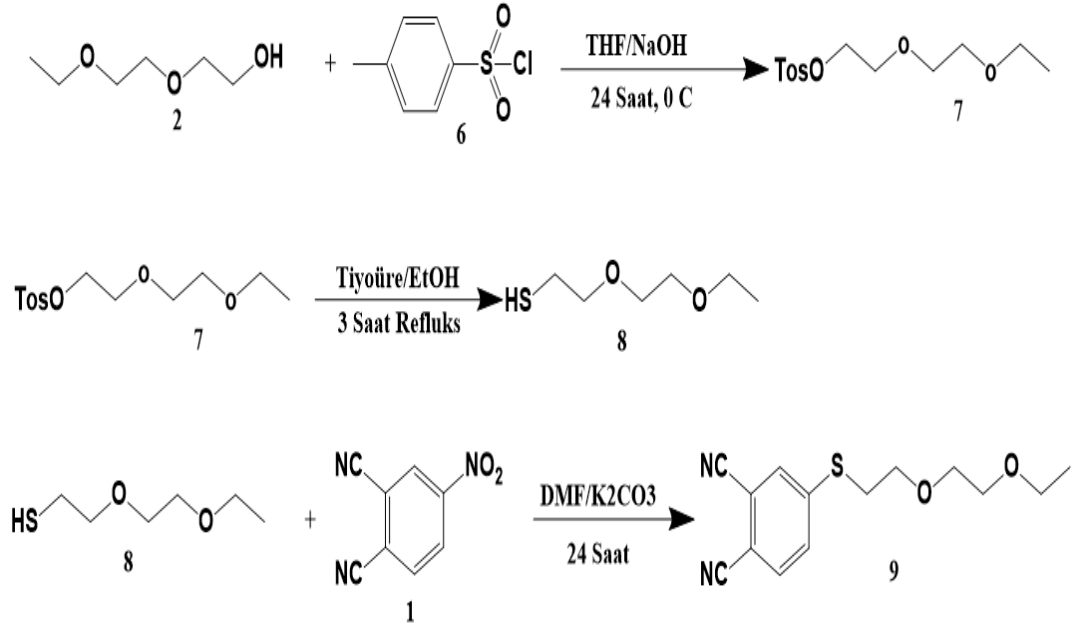
Şekil 3.2: Esterli ftalonitrilin (**5**) sentez şeması.

5 nolu bileşik literatürde verilen sentez yöntemine göre sentezlenmiştir (Şekil 3.2) [55]. 4-nitroftalonitril (1) (1.038 g, 6 mmol) ve 4-oksimetil benzoat (4) (1.094 g, 7.2 mmol) 25 ml'lik üç boyunlu balonda 10 ml DMF içinde azot gazı ortamında çözüldü. K₂CO₃ (2.48 g, 0,018 mol) 1 saat içerisinde yavaş yavaş eklendi. Karışım, 80 °C'de 5 saat ısıtılarak karıştırıldı. Sonra karışım, buzlu su karışımına (150 ml) döküldü ve oluşan çökelti filtreden süzülde, vakumda kurutuldu. Ürün kolon kromatografisi (silika jel, hekzan: etil asetat, 3:1, v/v) ile ayrılarak saflaştırıldı. Elde edilen ürün 1.1 g, verim % 66'dır. C₁₆H₁₀N₂O₃, Mw= 278.27.29 g/mol.

- FT-IR[(ATR)v_{maks}/cm⁻¹]: 3040 (Ar-CH), 2977 (alifatik-CH) (2225 (C≡N), 1715 (COOR), 1590, 1561, 1488, 1437, 1313, 1299, 1251, 1114-1050 (C-O), 954, 873, 775,693 (Şekil 4.7).

- ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃,) δ ppm: 8.16 (d, J = 7.5, 2H, ArH), 7.78 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.37 (s, 1H, ArH), 7.30 (d, 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.14 (d, J = 7.5 2H, ArH), 3.96 (s, 3H, CH₃) (Şekil 4.8).

3.4.3. S-Köprülü Polioksolu Ftalonitril Sentezi



Şekil 3.3: S-köprülü polioksolu ftalonitril türevinin (9) sentez adımları.

Polioksoetilen zincirleri içeren tiyol bileşiği (8) iki adımda literatüre göre sentezlenmiştir (Şekil 3.3) [56].

3.4.3.1. 2-(2-Etoksietoksi)etil 4-metilbenzensülfonat (7) Sentezi

2.28 gram (57 mmol) NaOH, 12 ml distile su içerisinde çözündürülerek üç boyunlu balon içerisine alındı ve argon atmosferi altında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve içerisine, 5.37 gram (40 mmol) dietilenglikol monoeter (DEGME) (2) 10 ml THF içinde çözülerek eklendi. Reaksiyon karışımı buz banyosuyla 0°C'ye soğutuldu. Soğutulan karışıma 7.62 gram (40 mmol) p-toluen sülfonil klorür (6) 15 ml THF içinde çözülerek argon atmosferinde damlatma hunisiyle damla damla eklendi. Reaksiyon oda sıcaklığında kabı 24 saat karıştırıldı. Bu sürenin sonunda karışım, 30 ml dietil eter ile 3 defa ekstrakte edildi. Daha sonra eter fazı su ile yıkanarak nötrale edildi. Ayırma hunisi ile ayrılan eter fazı Na₂SO₄ ile kurutulup süzüldü. Eter döner buharlaştırıcıda distillendi. Renksiz sıvı olarak elde edilen madde 9.92 g (%86) olarak elde edildi. C₁₃H₂₀O₅S, MA: 288.36 g/mol.

- FT-IR[(ATR) $\nu_{\text{maks}}/\text{cm}^{-1}$]: 2977-2871 (Alifatik-CH), 1598, 1451, 1354 (S=O), 1189-1175 (C-O-C), 1111-1096, 1014, 918, 815, 774 (Şekil 4.10).
- MALDI-TOF-MS (DHB): m/z hesaplanan: 288.36 g/mol, bulunan: 270.8 [M-CH₃-3H]⁺ (Şekil 4.11).
- ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.71 (2H, d, J = 8.2 Hz, ArH), 7.26 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 4.08(2H, t, J = 7.8 Hz, OCH₂), 3.40 (2H, t, J = 7.8 Hz, OCH₂), 3.49 (2H, t, J = 7.8 Hz, OCH₂), 3.44-3.39 (4H, m, OCH₂), 2.35 (3H, s, CH₃) 1.10 (t, 3H, t, J = 7.0 Hz, CH₃) (Şekil 4.12).
- ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 144.84, 132.96, 129.83, 127.94, 70.76, 69.69, 69.30, 68.63, 66.60, 21.59, 15.11. (Şekil 4.13).

3.4.3.2. 2-(2-Etoksietoksi)etan-1-tiyol (8) Sentezi

1.5 g (5.47 mmol) 7 numaralı bileşik, 3 ml susuz etanol, 0.42 g. (5.52 mmol) tiyoüre ve 3 mL su bir reaksiyon balonu içinde argon atmosferinde geri soğutucu altında 3 saat refluks edildi. Sürenin sonunda 0.3 g NaOH (7,5 mmol), 3.75 ml distile su içerisinde çözüldü ve içinden argon geçirilerek reaksiyon balonuna eklendi ve 3,5 saat refluks edildi. Sonrasında reaksiyon karışımının hacmi 2 ml olacak şekilde evaporatörde

çözücü distillendi. 4 ml distile su ile seyreltilen karışıma HCl eklenerek nötralize edildi. Karışım 2 defa 5'er ml DCM ile ekstrakte edilerek ayırma hunisi ile ayrıldı. Ayrılan organik fazlar Na₂SO₄ ile kurutulduktan sonra evaporatörde kuruyana kadar distile edildi. Geriye kalan yağsı madde 1 mmHg basınçta 50°C distillenerek yağsız bir sıvı olarak elde edildi. Verim 450 mg (%79). C₆H₁₄O₂S, MA: 150.24 g/mol.

- FT-IR [(ATR)v_{maks}/cm⁻¹]: 2974-2864 (alifatik-CH), 2580-2570 (SH), 1144, 1376, 1349, 1110-1005 (C-O-C), 939, 842, 753, 667. 800-600 (S-C) (Şekil 4.15).
- ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 3.67 (t, 2H, OCH₂), 3.52-3.46 (m, 6H, OCH₂), 2.73 (t, 2H, OCH₂), 1.4 (brs, 1H, SH) 1.05 (t, 3H, CH₃) (Şekil 4.16).
- ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 72.85, 70.22, 69.67, 66.60, 24.15, 15.08 (Şekil 4.17).

3.4.3.3. 4-(2-(2-Etoksietoksi)etoksi)ftalonitril (9) Sentezi

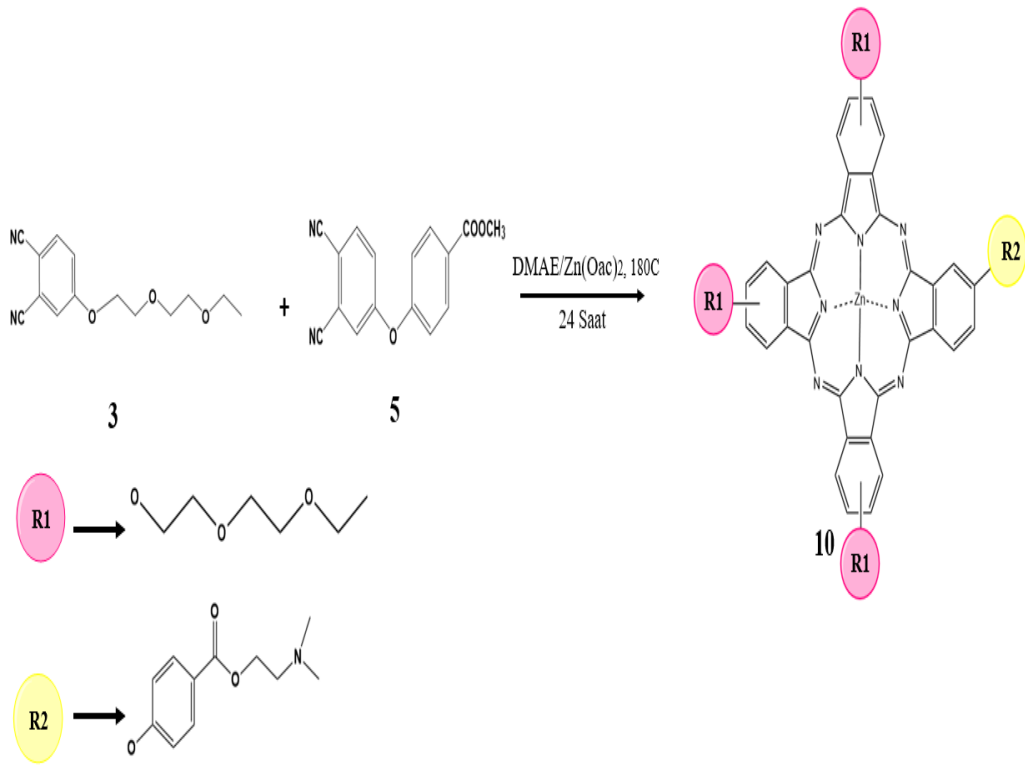
345 mg (2 mmol) 4- nitro ftalonitril (1) alınarak argon atmosferi altında 4 ml susuz DMSO içerisinde çözüldü ve üzerine 2-(2-etoksietoksi)etan-1-tiyol (8) bileşiğinden 300 mg (2 mmol) eklendi. 20 dakika 50°C'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra, ince toz halindeki potasyum karbonat (414 mg, 3 mmol) 20 dakika içerisinde porsiyonlar halinde reaksiyon kabına eklendi ve 50°C'de 48 saat boyunca karıştırıldı. Soğutulan karışım, parçalanmış buzun (100 ml) içine döküldü. Daha sonra dikloro metan (DCM) ile ekstrakte edilen sulu karışım, ayırma hunisi içinde ayrıldı 4 defa 25 ml DCM ile karıştırıldı ve ekstrakte edildi. Organik fazlar birleştirilip sodyum sülfat üzerinden kurutuldu ve çözücü ürün edildi. Saf ürün, metanol/n-heksan (40:60 h/h) karışımında kristalize edildi. Oluşan ürün 495 mg olup, verim 90 %'dir. C₁₄H₁₆N₂O₂S (M_w= 276.35).

- FT-IR[(ATR) [v_{max}/cm⁻¹]: 3070 (ArH), 2974-2873 (CH₂), 2233 (C≡N), 1567, 1455, 1427, 1397, 1276, 1199, 1124 (C-O-C), 1000, 858, 793, 750. (Şekil 4.19).
- MALDI-TOF-MS (DHB) m/z: 276.677 [M]⁺, 280.611[M+4H]⁺, 298.893 [M+Na]⁺ (Şekil 4.20).
- ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.55-7.65 (m, 3H, ArH), 3.74 (t, 2H, CH₂), 3.51 (t, 2H, OCH₂), 3.59 (t, 2H, OCH₂), 3.45 (q, 2H, OCH₂), 3.21 (t, 2H, SCH₂), 1.14 (t, 3H, CH₃) (Şekil 4.21).

- ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ ppm: 147.01 (Ar CS), 133.14 (ArC), 130.45, 130.36, 115.97 (ArC), 115.61 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 115.21 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 110.78 (ArC), 70.73 (OCH_2), 69.70 (OCH_2), 69.70 (OCH_2), 66.63(OCH_2), 31.94 (SCH_2), 15.12 (CH_3) (Şekil 4.22)

3.5. Ftalosiyanın Sentezi

3.5.1. 2,[2-(Dimetilamino)etil- 4-oksibenzoat]- 9(10),16(17),23(24)-Tris{(2-(2-etoksietoksi)etoksi)} ftalosiyaninato Zn(II) (10) Sentezi



Şekil 3.4: O-köprülü ftalosiyanın (10) sentez şeması.

10 ml lik bir balon içine konulan 780 mg (3 mmol) 3 numaralı ftalonitril ve 83 mg (0.3 mmol) 5 numaralı ftalonitril türevleri 3.5 ml DMAE içinde çözülerek argon atmosferinde karıştırıldı. Birkaç dakika argon atmosferi altında karıştırıldıktan sonra, 300 mg (1.64 mmol) çinko asetat ($\text{Zn}(\text{OAc})_2$) eklenerek 180 °C'de 24 saat karıştırılarak ısıtıldı. Sürenin sonunda karışım içerisindeki dimetil amino etanol (DMAE) 65°C'de ve 1 bar basınçta evapore edilerek uzaklaştırıldı. Ham ürün 10:1 DCM:etanol sistemi kullanılarak silika jel kolonda kromatografik olarak ön bir temizleme işlemine tabi tutuldu. Daha sonra simetrik ve asimetrik Pc türevleri preperatif ince tabaka

yöntemiyle silika jel plaklarla 10:1 DCM:EtOH çözücü sisteminde ayrılarak saflaştırıldı. Verim: %10 (40 mg, 0.03 mmol). C₆₁H₆₅N₉O₁₂Zn (Mw=1181.62 g/mol)

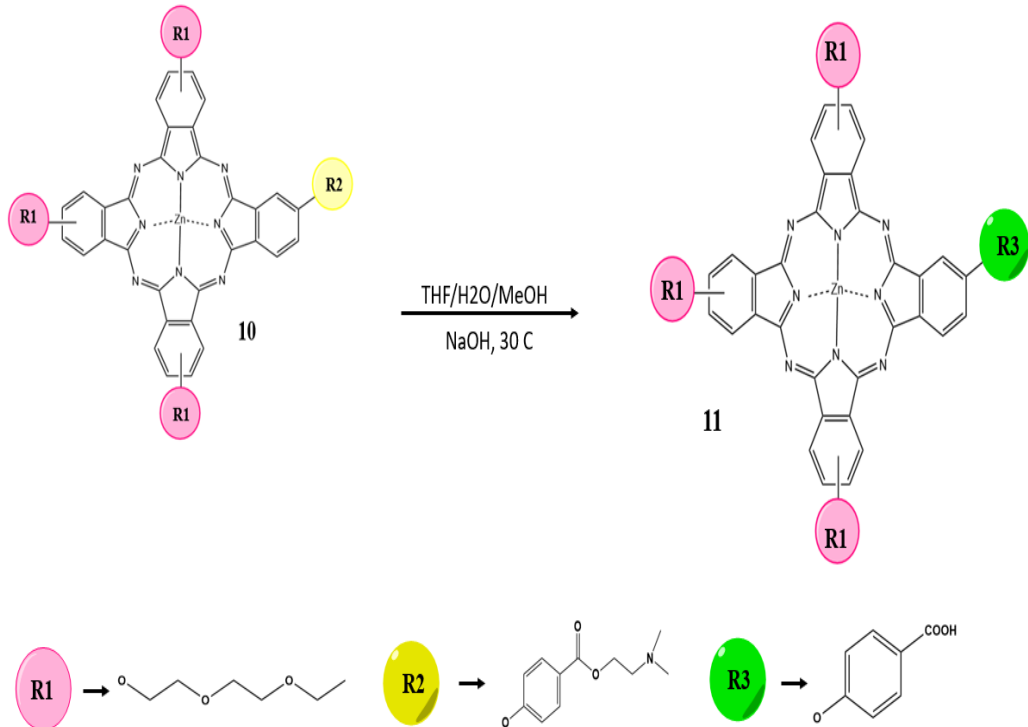
- FT-IR[(ATR)v_{maks}/cm⁻¹]: 3050 (Ar-CH), 2970-2870 (alifatik), 1717 (O-C=O), 1603, 1487, 1453, 1393, 1336, 1234, 1087-1058 (C-O-C), 951, 825, 745. (Şekil 4.24).

- MALDI-TOF-MS (DHB): m/z hesaplanan: 1181,62 g/mol, bulunan: 1180,14 [M-H]⁺ (Şekil 4.25).

- ¹H NMR (500 MHz, d₈-THF) δ ppm: 8.99 (m, 1H, ArH), 8.77 (m, 3H, ArH), 8.40 (m, 3H, ArH), 8.03- 7.98 (m, 2H, ArH), 7.66(M, 1H, ArH), 7.47-7.28 (m, 6H, ArH), 4.52 (m 6H, OCH₂), 4.19-4.00, (m, 8H, OCH₂), 3.75-3.61 (m, 16H, OCH₂), 3.38-3.32 (m, 4H, CH₂), 1.62 (s, 6H, N-CH₃), 1.12 (t, 9H, CH₃) (Şekil 4.26).

- ¹³C NMR (125 MHz, d₈-THF) δ ppm: 164.94, 162.51, 160.91, 160.04, 152.75, 151.51, 140.47, 131.93, 129.23, 123.21, 117.71, 117.31, 105.76, 105.48, 71.01, 70.82, 70.64, 70.17, 69.94, 69.79, 68.21, 61.03, 43.85 (N-CH₃), 14.83 (CH₃) (Şekil 4.27).

3.5.2.2,[4-oksibenzoik asit]- 9(10), 16(17), 23(24) –Tris {(2-(2-etoksietoksi) etoksi)} ftalosiyanimato Zn(II) (11) Sentezi



Şekil 3.5: Asit bağlı AB3 tipi ftalosiyanimato Zn(II) (11) Sentezi.

40 mg (36 mmol) **10** numaralı ftalosiyanin balon içerisine alındı ve içerisine, NaOH (220 mg, 5.5 mmol) toplamda 8 ml THF/H₂O/metanol (2:1:5, h/h/h) karışımında çözüldü ve bu karışımdan 4.5 ml ftalosiyanin üzerine ilave edildi. Karışım 30°C’de 20 saat karıştırıldı. Bu sürenin sonunda karışım içerisine 5M HCl çözeltisinden, damla damla ilave ederek asidik ortamda **11** nolu ftalosiyanin türevinin çökmesi sağlandı. kelti santrifüjlenerek ayrıldı ve su yıkanarak ntralleştirildi. Koyu mavi renkli ham ürün silika jel kolonda 10:1(h/h) /DCM:MeOH zc sistemi kullanılarak ayrıldı. Verim: 30 mg (%77) C₅₇H₅₆N₈O₁₂Zn (Mw=1110.50 g/mol)

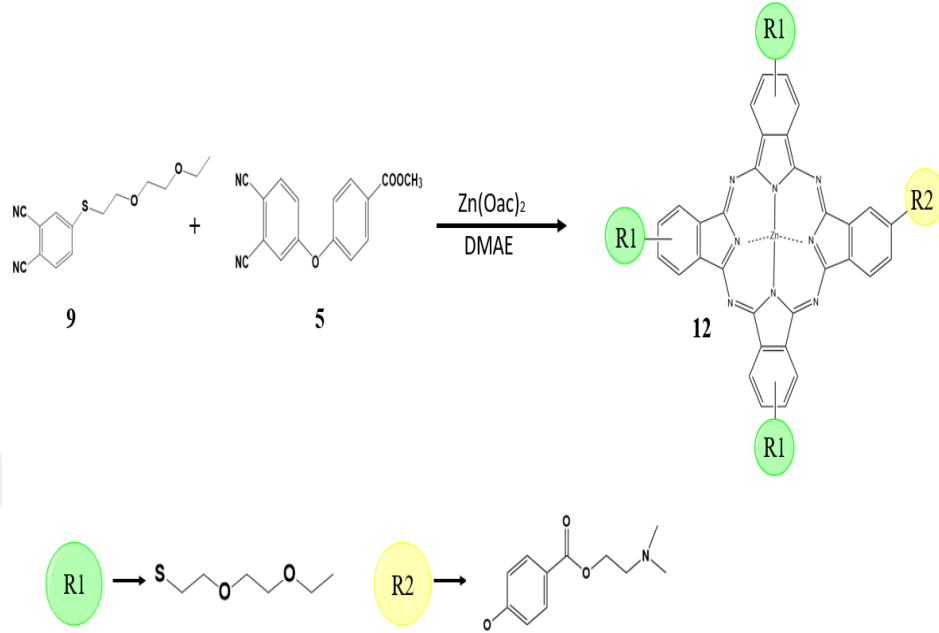
- FT-IR[(ATR)v_{maks}/cm⁻¹]: 3500-2400 (OH), 3050 (Ar-CH), 2974-2862 (alifatik CH), 1716 (C=O), 1601, 1474, 1399, 1344, 1229, 1190-1044 (C-O-C), 950, 825, 745 (**Şekil 4.29**).

- MALDI-TOF-MS (DIT): m/z hesaplanan: 1110.50 g/mol, bulunan: 1110.349 [M]⁺ (**Şekil 4.30**).

- ¹H NMR (500 MHz, DMF) δ ppm: 8.94- 8.16 (m, 8H, ArH), 7.88-7.49 (m, 8H, ArH), 4.53-4.06 (m, 12H, OCH₂), 3.78- 3.47 (m, 18H, OCH₂), 1.09 (t, 9H, CH₃) (**Şekil 4.31**).

- ¹³C NMR (125 MHz, DMF) δ ppm: 167.11, 132.25, 129.80, 128.93, 126.29, 126.04, 123.85, 118.23, 118.10, 112.71, 111.80, 106.53, 70.86, 69.74, 68.49, 66.17, 15.02 (**Şekil 4.32**).

3.5.3. 2,[2-(Dimetilamino)etil- 4-oksibenzoat]- 9(10),16(17),23(24)-Tris{(2-(2-etoksietoksi) etilsulfonil)} ftalosiyanimato Zn(II) (14) Sentezi



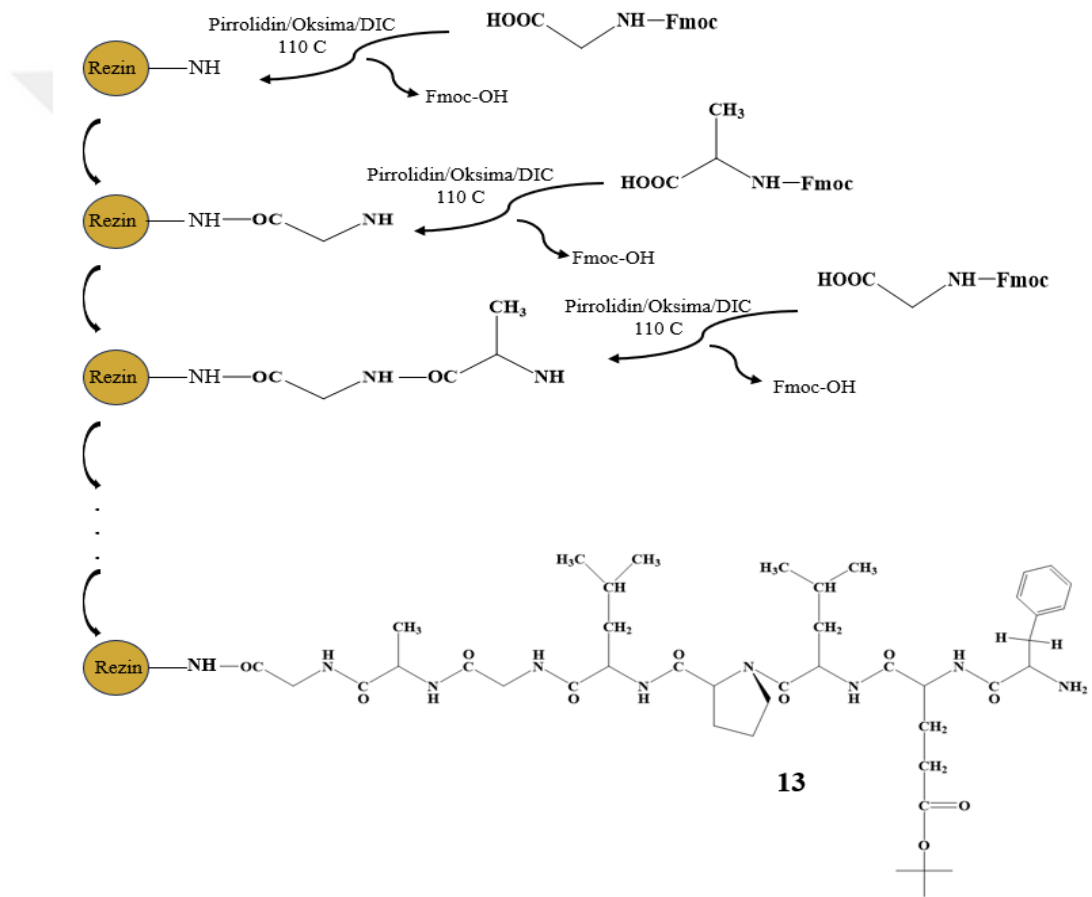
Şekil 3.6: S-köprülü polioksolu ftalosiyanimin (12) sentez şeması.

Polioksoetilen grupları süstitüe ftalaonitril (**9**) (829 mg, 3 mmol), esterli dinitril türevi **5** (85 mg, 0.3 mmol), çinko asetat (300 mg, 1.64 mmol) ve 3.5 ml dimetilaminoetanol (DMAE) 10 ml'lik bir balona konarak argon atmosferi altında 48 saat boyunca karıştırılarak kaynatıldı. Daha sonra tüm çözücü, evaporatör ile vakum altında destillendi. Yağsı haldeki madde, n-hekzan ile karıştırıldı organik kirlilikleri uzaklaştırmak için 3 defa 10 ml n-hekzan ile muamele edilerek n-heksan fazları dekante edildi. Ham üründen asimetrik ftalosiyanim bileşiği preparatif ince tabaka kromatografisi ile 20:1 (h/h) DCM:EtOH çözücü sistemi ile ayrıldı. Verim: %5 (18 mg, 0.015 mmol) .C₆₁H₆₅N₉O₉S₃Zn (Mw=1229.80 g/mol).

- FT-IR[(ATR)v_{maks}/cm⁻¹]: 3040 (Ar-CH), 2963-2863 (alifatik CH), 1722 (C=O), 1600, 1485, 1384, 1334, 1306, 1095-1028 (C-O-C), 908, 822, 743, 682 (**Şekil 4.34**).
- MALDI-TOF-MS (DHB): m/z: hesaplanan 1229.80 g/mol, bulunan: 1157.77 [M-(C₂H₅-N-(CH₃)₂)]⁺, 1228.3 [M-H]⁺, (**Şekil 4.35**).
- ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.51- 9.00 (m, 8H, ArH), 8.47 (m, 2H, Ar H) 8.14- 7.32 (m, 6H, ArH) 4.30- 4.09 (m, 10H, CH₂), 3.80-3.58 (m, 40H, CH₂), 1.22 (t, 9H, CH₃) (**Şekil 4.36**).

- ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ ppm: 165.49, 145.77, 145.56, 139.90, 139.27, 138.46, 135.73, 134.17, 129.94, 129.08, 124.38, 122.82, 120.95, 118.18, 70.51, 70.38, 69.85, 69.76, 69.69, 67.57, 66.14, 64.10, 57.60, 55.42, 45.85 (N-CH₃), 38.67 (S-CH₂), 15.65 (Şekil 4.37).

3.5.4. Peptit Sekansının [(1-(1-((10-amino-6-(2-karboksietil)-2-izobütil-5,9-diokso-11-fenil-4,8-dioksa-3,7-diazaundekanoil)oksi)pirrolidin-2-il)-4-izobütil-12-metil-1,5,9,13-tetraokso-2,6,10,14-tetraoksa-3,7,11,15-tetraazaheptadekan-17-oik asit)] Sentezi (13)



Şekil 3.7: Peptit sekansının uzama şeması.

Kullanılacak olan peptit CEM mikrodalga-yardımcılı katı faz peptit sentezleyici cihazında gerçekleştirildi (Şekil 3.8). Peptit sentezi, cihazın kullanım rehberinde yazdığı şekilde ve miktarlarda hazırlanarak kullanıldı. Kullanılan tüm amino asitler Fmoc koruma grubuna sahip olup, final koruma grubu kaldırılması (*Final Deprotection*) yapılarak kesim gerçekleştirildi. Peptit sentezi için Rink amide resin kullanıldı. Bu resinin özelliği ise rezine bağlı NH grubunun da Fmoc grubuna sahip

olmasıdır. Bu sebeple, ilk olarak rezindeki koruma grubu kaldırıldı. Koruma gruplarının (Fmoc) kaldırılması kuvvetli bir baz olan pirrolidin ile gerçekleşmektedir. Bu koruma grubu ayrılması sonrasında, DIC (N,N'-diizohexilkarbodiimid) ve ticari bir kimyasal olan Oxima, amino asidin karboksil grubunun aktifleştirilmesini, reaksiyon süresinin kısalmasını, ürün stabilitesinin artmasını ve yan zincir reaksiyonlarının engellenmesini sağlamaktadır. Böylelikle, tüm amino asitler sırayla rezine bağlanmakta ve zincir uzamaktadır.



Şekil 3.8: Peptit sentezleyici reaksiyon kabı.

Her bir lot için, 0.169 g ProTile® (Rink Amide) rezin (0.1 mmol) tartılarak 5 ml DMF ile 10 dakika şişirildi. Daha sonra sisteme yerleştirilen rezin yıkamaya alındı. Yıkama işlemi DMF ile gerçekleştirildi. Bütün reaktif ve amino asitler, DMF içerisinde çözünerek kullanıldı. 50,48 gram DIC (0.4 mol) tartılarak 200 ml DMF içerisinde çözüldü (2 M). 17,76 gram oksima (0.125 mol) tartılarak 500 ml DMF içerisinde çözüldü (0.25 M). 75 ml pirrolidin, 225 ml DMF ile karıştırıldı (%25). Hazırlanan tüm çözeltiler, cihazın ilgili hatlarına takıldıktan sonra amino asitler cihazın verdiği miktarlar doğrultusunda tartılarak DMF içerisinde çözüldü (Cihazın hesaplamaları, sekanstaki her bir amino asit için 0.6 mmol olarak gerçekleşmiştir. Birden fazla kullanılan amino asitler için, kullanıldığı miktarın 0.6 ile çarpımı sonucunda elde edilen mol miktarı kadar kullanılmıştır. Örneğin sekansta glisin amino asidinden iki tane olduğu için 1.2 mmol kullanılmıştır. Mol hesabındaki molar kütleler, amino asitlerin Fmoc'lu yapısı baz alınarak kullanılmıştır. Kullanılan DMF miktarı için ise her bir amino asit 0.5 M konsantrasyon hesabı gerçekleştirilmiştir). Her bir amino asidin kullanım miktarı **Tablo 4'**te gösterilmiştir.

Tablo 4: Peptit sentezinde kullanılan amino asit miktarları.

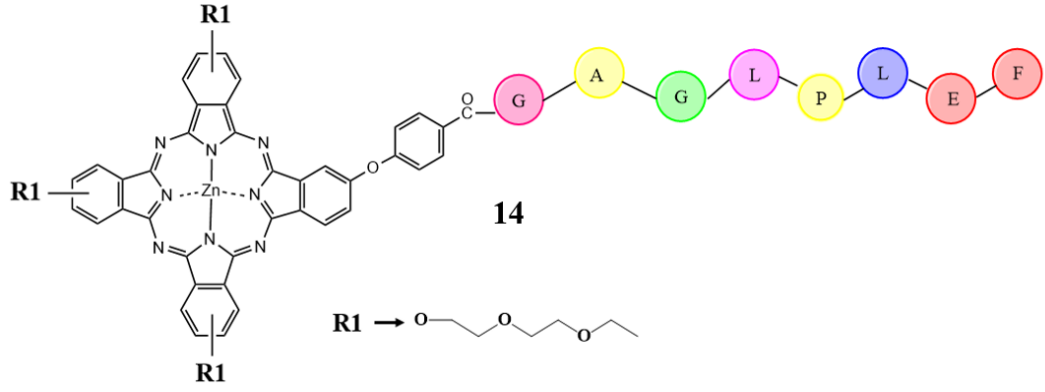
Amino Asit Adı	Miktarı (gr)	Çözüldüğü DMF Miktarı (ml)
Alanin	2.81	18
Glutamik Asit	3.83	18
Glisin	5.21	35
Lösin	6.19	35
Fenilalanin	3.49	18
Prolin	3.04	18

Tüm bu miktarlar 15 lot sentezlenecek şekilde hesaplandı. Rezin yıkaması gerçekleştiikten sonra, cihazın ilgili hatlarına hazırlanan amino asitler bağlandı. Cihaz ilk olarak pirrolidin kullanarak resin üzerindeki Fmoc grubunu kopardı ve 1 ml glisin (G) çekerek resinin üzerine aktardı. Bunun üzerine cihaz, 1 ml DIC solüsyonu ve 1 ml Oxima solüsyonu çekerek resinin bulunduğu kaba aktararak mikrodalga aracılığı ile kap sıcaklığını 110 °C'ye çıkardı. 1 dakikada reaksiyon gerçekleştiikten sonra, kap içerisindeki tüm solüsyonlar vakumla çekilerek atıldı ve kap 3 defa DMF ile yıkandı. Bu işlem, peptit sentezi tamamlanana kadar devam edildi. Tüm peptit sekansı tamamlandıktan ve final Fmoc grubunun ayrılması gerçekleştiikten sonra amino asit eklenmedi ve böylece koruma grupları ve NH₂ ucu bulunan rezine bağlı peptit sekansı sentezlendi. Daha sonra sentezlenen rezine bağlı peptitler DMF ile yıkanması sonrası, liyofilizatör aracılığı ile kurutuldu.

İki lot peptit analiz için rezinden kesildi. Bunun için TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5, h/h/h) kokteyli hazırlandı. Rezine bağlı peptitler, CEM Razor® (Peptit kesim sistemi) tüplerine aktarıldıktan sonra hazırlanan karışımdan 10 ml tüpün içerisine aktarıldı, karıştırıldı ve 40 °C'de 45 dakika bekletildi. Sürenin sonunda razor vakum sistem çalıştırıldı ve peptitler filtreden süzüntü şeklinde falkonlar içerisine aktarıldı. Peptitlerin çökelti oluşturması amacı ile süzüntünün içerisine 20 ml dietil eter eklenerek, 3500 g'de 10 dakika 4°C'de santrifüjlendi. Dibe çöken peptitler, TFA'dan uzaklaştırılması amacı ile 3 defa 30 ml dietil eter ile aynı şartlarda yıkanarak santrifüjlendi. Yıkama sonrası dietil eter dökülerek, peptitler oda sıcaklığında bekletildi ve eter uçurularak kuru toz şeklinde peptitler elde edildi. Her bir lottaki peptit yaklaşık 23 mg olarak tartıldı (verim 4.2%).

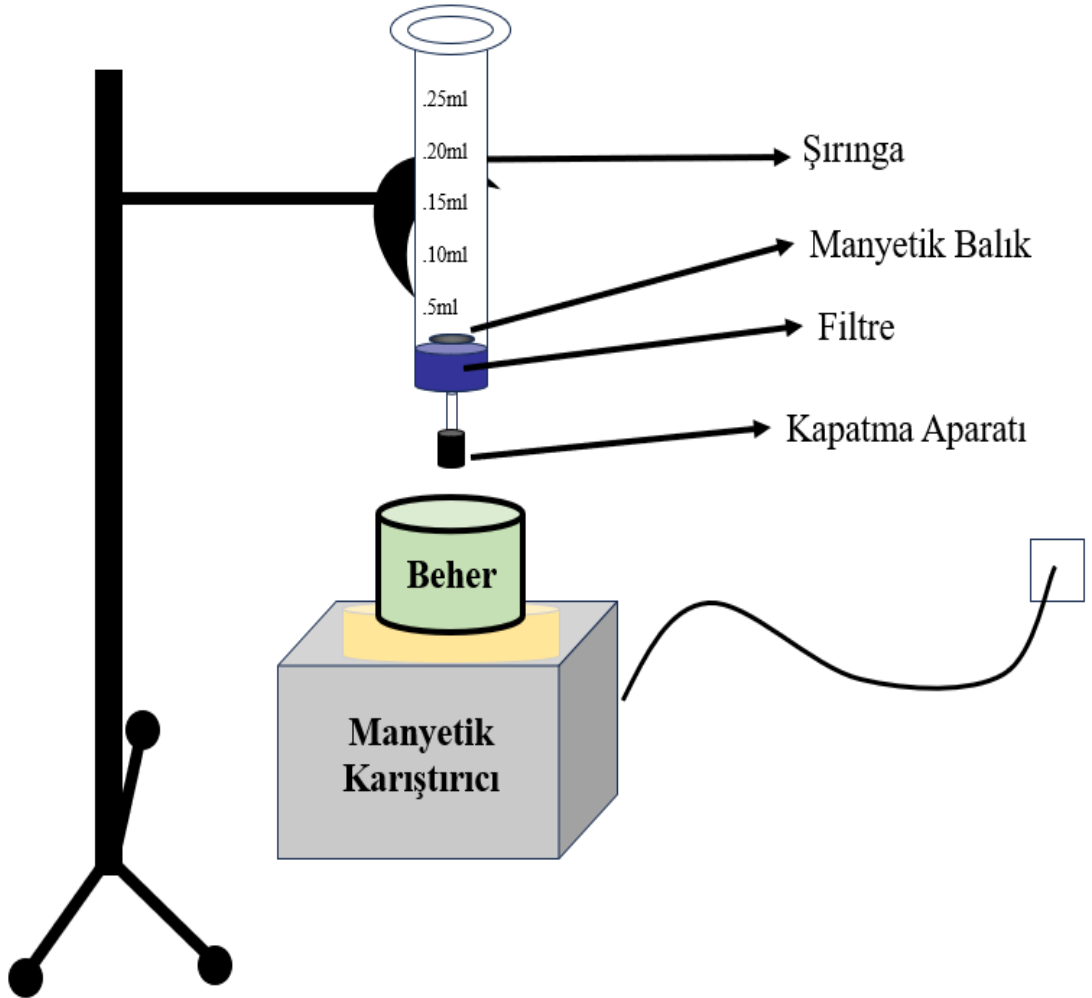
- ### 3.5.5. Peptit-Ftalosiyenin Konjugatı'nın (14) Sentezi





Şekil 3.10: Peptit-ftalosiyenin konjugatı (G: Glisin, A: Alanin, L: Lösin, P: Prolin, E: Glutamik Asit, F: Fenilalanin).

N-ucu koruma grubu koparılmış olan peptit dizisi (**13**) ile ftalosiyenin (**11**) konjugasyonu için öncelikle rezin, DCM çözücüsü kullanılarak 1 saat süreyle karıştırılarak şişmesi sağlandı. Süre sonunda DCM süzülerek ortamdan uzaklaştırıldı.



Şekil 3.11: Peptit-ftalosiyenin konjugasyonu için reaksiyon düzeneği.

Tablo 5. HBTU ve DIPEA çözeltilerinin içerikleri.

Reaktif	Reaktif Miktarı (gr)	Çözücü (NMP) Miktarı (ml)	Mol Miktarı (mmol)	Molar Miktarı (M)
HBTU	3,79	25	10	0,4
DIPEA	7	25	50	2

Oksijen hetero atomları üzerinden poliooksoetilen grupları içeren ftalosiyanın türevi **11** (1 eşdeğer), HBTU (1 eşdeğer) ve DIPEA (1 eşdeğer) içerisinde çözüldü. Bu karışım 10 dakika süreyle karıştırılarak aktiveleştirildi. Bu süre sonunda N-ucu serbest peptit dizisi (1 eşdeğer) üzerine ilave edildi. Reaksiyon karışımı 4 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Süre sonunda reaksiyon karışımı filtreden süzülerek ortamda reaksiyona girmeden kalan Pc ve peptit bileşenlerinin uzaklaştırılması için NMP (2 × 20 mL) ve CH₂Cl₂ (2 × 30 ml) ile yıkandı. Peptit bağlı rezin şırınga içerisinde kaldı. Bu aşamadan sonra rezinden Pc-peptit konjugatını ayırmak için şırıngaya TFA ilavesi yapılarak 2 saat karıştırıldı. Süre sonunda şırıngadan alınan süzüntü konjugatın bulunduğu eluenttir. TFA vakum altında uzaklaştırıldı. Sonrasında soğuk dietil eter ilavesiyle çöktürülen katı santrifüjlenerek ayrıldı ve süpernatant kısmı atılarak vakumda kurutuldu. Kapalı formülü C₉₅H₁₁₂N₁₆O₂₂Zn (1895.41 g/mol) olan molekül için ulaşılan verim % 80'dir.

- FT-IR[(ATR)v_{maks}/cm⁻¹]: 3500-3200 (N-H), 2800-3000 (A-CH), 3000-3100 (Ar-CH), 1690-1640 (C=O), 1650-1640 (peptit bağı, N-C), 1300-1000 (C-N), 1150-1050 (R-O-R), 700-500 (Pyr, C-N) (**Şekil 4.43**).
- MALDI-TOF-MS (DHB): m/z hesaplanan 1895.41 g/mol, bulunan: 1878 [M-H₂O-2H]⁺, 1898.38 [M+3H]⁺ (**Şekil 4.44**).

3.6. Biyolojik Çalışmalar

Tez kapsamında yapılan biyolojik çalışmalar iki grupta değerlendirilebilir. Birinci grupta oksijen heteroatomları içerinden poliookso grupları içeren ZnPc türevi (**11**) antimikrobiyal aktiviteye sahip peptit molekülü (**13**) ile konjuge edilen Pc-peptid konjugatı **14**'ün gram negatif ve gram pozitif bakteriler üzerindeki aPDT etkinliği belirlenmeye çalışılmıştır.

3.6.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Belirlenmesi

Besiyeri hazırlanması için LB besiyerinden (Neogen, Cat No: LAB169) 25 gram tartılarak 1 L distile su ile karıştırıldı ve 121°C’de 20 dakika otoklavlandı. Sentezlenen peptitin antibakteriyel özelliğinin olup olmadığını gözlemlemek için MIC testi gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle 0.5 McFarland’a ayarlanmış bakterilerden ayrı ayrı 100 µl alınarak 9900 µl besiyerlerine eklendi ve vortekslendi. 96 kuyucuklu plakaya 2 tekrarlı olacak şekilde 100’er µl besiyeri eklendi ve içlerine DMSO’da çözülmüş 100’er µl peptit (8 mg/ml) eklendi. İlk konsantrasyon 4 mg/ml olduktan sonra her iki kuyucuktan yan kuyucuklara 1:1 oranında peptit ve besiyeri eklenerek 10 adet seri dilüsyon yapıldı. Her sıralı iki kuyucuğun peptit konsantrasyonu yarılanacak şekilde dilüsyon sonrasında kuyucuklardaki hacim 100 µl olarak bırakıldı. Daha sonra her kuyucuğa 100’er µl bakteri hücre kültüründen eklendi. Pozitif ve negatif kontroller için ise sırasıyla 3’er kuyucuğa sırasıyla 100 µl besiyeri ve bakteri ile besiyeri ve peptit (her kuyucuk 200 µl) eklendi. Ekim işlemi sonrasında plaka, 35±2 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda Microplate okuyucu ile kuyucuklardaki absorbanslar 600 nm’de okundu.

3.6.2. Antimikrobiyal-Fotodinamik Terapi Etkisinin Belirlenmesi

Tüm moleküller 4 mg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde DMSO ile çözüldü ve 0.45 µm por genişliğinde şırınga filtresinden geçirildi (GVS, Cat.No.: EXP2020-2, REF: FJ25ASCCA004FL01). Bakteri deneyleri için gram pozitif ve gram negatif bakteri suşları sırasıyla *S. aureus* ATCC 29213 ve *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı (Tablo 6).

Tablo 6: Deneylerde kullanılan bakteri bilgileri.

Bakteri İsmi	Suş Numarası	Gram Pozitif	Gram Negatif
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	+	-

Katı besiyeri, **Tablo 7**’de verilen miktarlarda agar ve Nutrient Broth kullanılarak 1 litre distile su ile karıştırıldı. Hücre büyümeleri için besin ortamı olarak (LB) besiyeri kullanıldı. Tüm besiyerleri 121 °C’de 20 dakika boyunca otoklavlandı. Katı besiyeri, bir miktar soğumadan sonra (yaklaşık 80 °C) petri kaplarına 15-20 ml olacak şekilde

paylaştırıldı. Büyüyen hücrelerin dilüsyonları MHB (Mueller Hinton Broth) besiyerinde yapıldı. Tüm besiyerlerinin hazırlanış miktarları **Tablo 7**'de verilmiştir.

Tablo 7: Besiyerlerinin hazırlanma ve marka bilgileri.

Besiyeri Adı	Marka	Katalog No	Miktarlar (gram)	Çözünme Ortamı ve Miktar (L)	Fiziksel Form
Luria-Bertani (LB)	Neogen	LAB169	25	1	Sıvı
Nutrient Broth	Neogen	LAB068	13	1	Katı
Agar	Merck	1016130500	15		
MHB besiyeri (Mueller Hinton Broth)	Neogen	LAB114	21	1	Sıvı

3 ml besiyeri içerisine 6×10^6 CFU/ml konsantrasyonuna sahip bakterilerden 60 μ l (2%) inoküle edildi ve 18-24 saat 35 ± 2 °C'de inkübatör içerisinde çoğaltıldı. Inkübasyon sonrasında bakteriler 4000 rpm'de 20 dakika $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüjlendi, supernatant atıldı ve peletin üzerine fizyolojik tuzlu sudan (0.85-0.90% NaCl) 1 ml eklenerek süspanse edildi. Daha sonra McFarland cihazı ile hücre konsantrasyonu 0.5 McFarland'a denk gelecek şekilde (yaklaşık 108 hücre/ml) fizyolojik tuzlu su ile seyreltildi. Daha sonra hücreler, 1:99 oranında MHB besiyeri ile seyreltildi. 96 kuyucuklu plaka üzerinde üç tekrarlı şekilde **Tablo 8**'de yazan miktarlarda besiyeri, bakteri hücre kültürü ve ftalosiyanın bazlı moleküller karıştırıldı. Karıştırılan ortamlar iki ayrı plakada yapıldı ve biri ışık oramı için diğeri ise karanlık ortam etkisinin gözlemlenmesi için 1'er saat karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Işık deneyi için plakalardan bir tanesi ışık kaynağında (LumaCare LC122) 680 nm dalga boyunda 45 dakika ışığa maruz bırakıldı.

Tablo 8: Fotodinamik uygulama için kullanılan materyallerin miktarları.

Molekül Konsantrasyonu (mg/ml)	Bakteri Hücre Kültürü Miktarı (μ l)	Besiyeri Miktarı (MHB) (μ l)	Pc Miktarı (μ l)
0.00 (Büyüme Kontrolü)	100	100	0
0.5	100	75	25
1.0	100	50	50
1.5	100	25	75

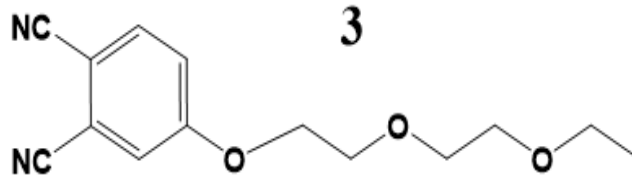
Hem karanlıkta hem de ışıktaki bırakılan bakteriler, 10^{-5} seyreltmeye kadar seyreltilerek katı besiyerine 3 tekrarlı şekilde ve her seyreltme aşamasını kapsayacak şekilde 10 µl alınarak ekildi. Her seyreltme işlemi, 50 µl bakteri hücre kültürü ve 450 µl fizyolojik tuzlu su (10 kat) karışımı ile gerçekleştirildi. Biyogüvenlik kabini içerisinde ekilen bakterilerin kurutulması sonrası her petri, 18-24 saat boyunca 35 ± 2 °C’de inkübe edildi. İnkübatörden alınan hücrelerin koloni sayımı gerçekleştirildi.



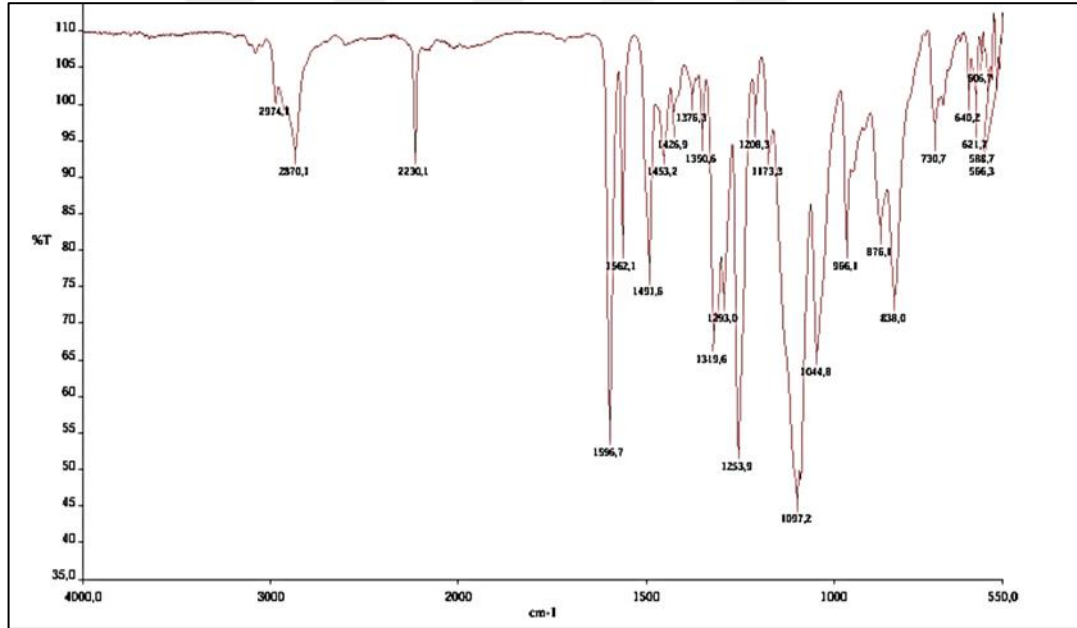
4.SONUÇLAR

4.1. Ftalosiyanın Sentezinde Kullanılan Başlangıç Maddelerinin Karakterizasyonları

4.1.1. 3 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi

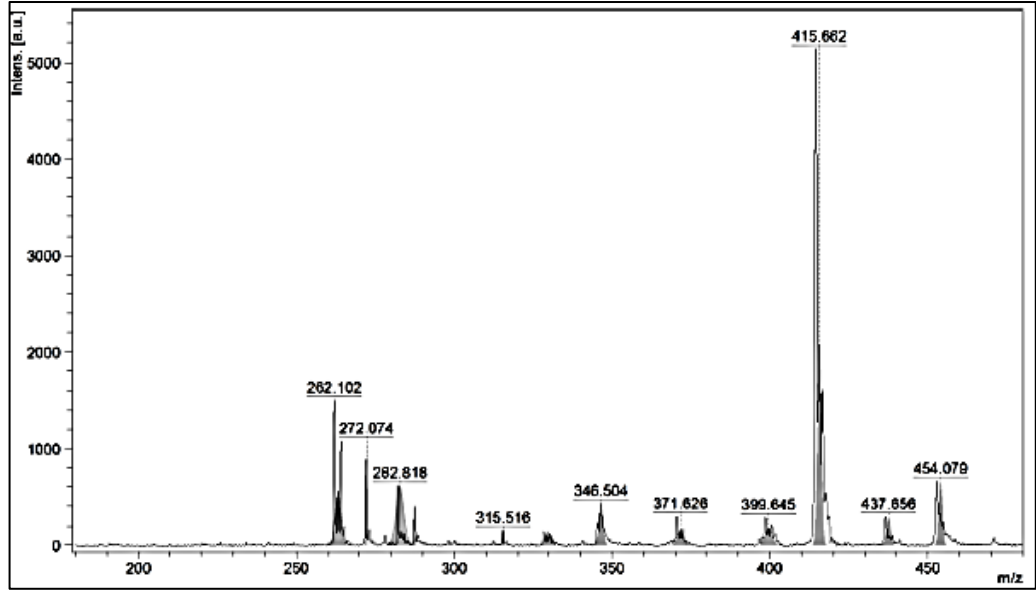


Şekil 4.1: 3 numaralı molekülün kimyasal yapısı.



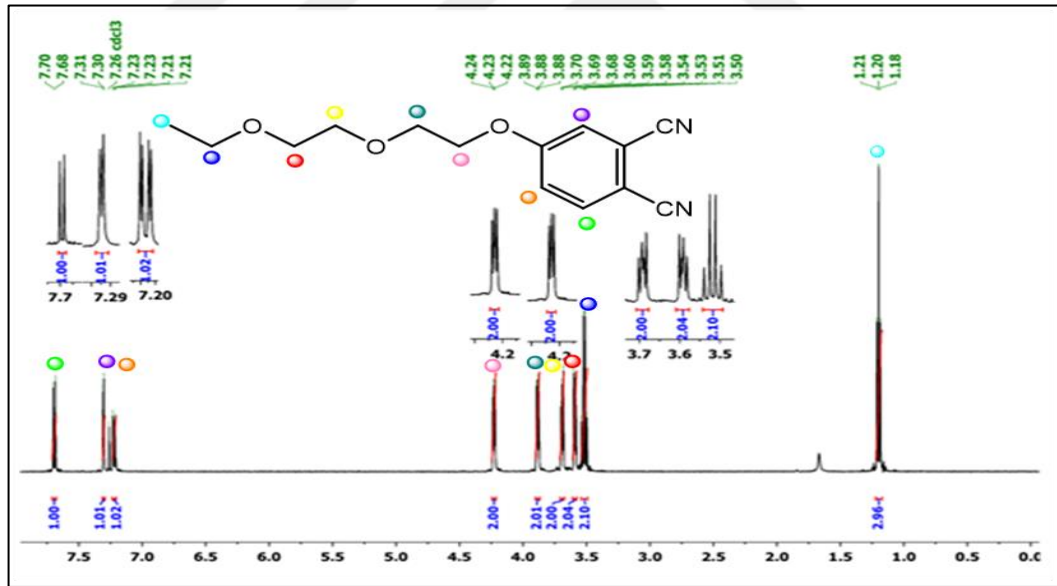
Şekil 4.2: 3 numaralı molekülün IR spektrumu.

IR spektrumunda görülen C-H bağları (sp³ hibritleşmesi) 2900-2800 cm⁻¹ bölgesinde pikler oluşturmuştur. Bunun yanı sıra 2300 cm⁻¹'de bulunan pik ise C≡N grubuna ait gerilmeyi göstermekte olup, 3040 cm⁻¹'de bulunan aromatik C-H gerilmeleri yapının doğruluğu desteklenmektedir.



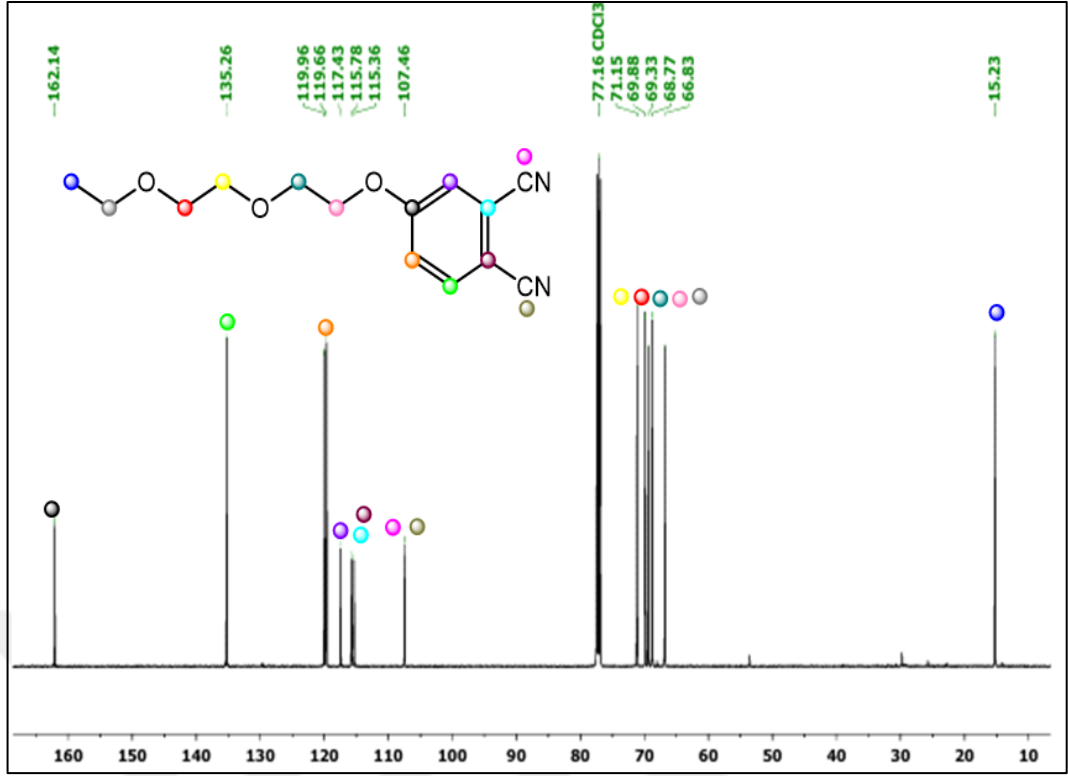
Şekil 4.3. 3 numaralı moleküle ait kütle spektrumu.

ESI tekniği ile yapılan kütle analizi sonucunda elde edilen spektrumdaki 262.102 $[M+2H]^+$ piki yapıyı desteklemektedir.



Şekil 4.4: 3 numaralı moleküle ait ¹H-NMR spektrumu (çözücü: CDCl₃).

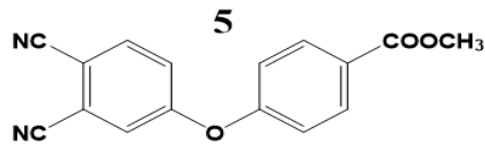
3 numaralı bileşiğe ait ¹H-NMR spektrumu üzerinde kimyasal kayması farklı olan tüm protonlar bileşiğin yapısı üzerinde farklı renklerde işaretlenerek tanımlanmıştır. Tüm kimyasal kaymalar yapı ile uyumludur.



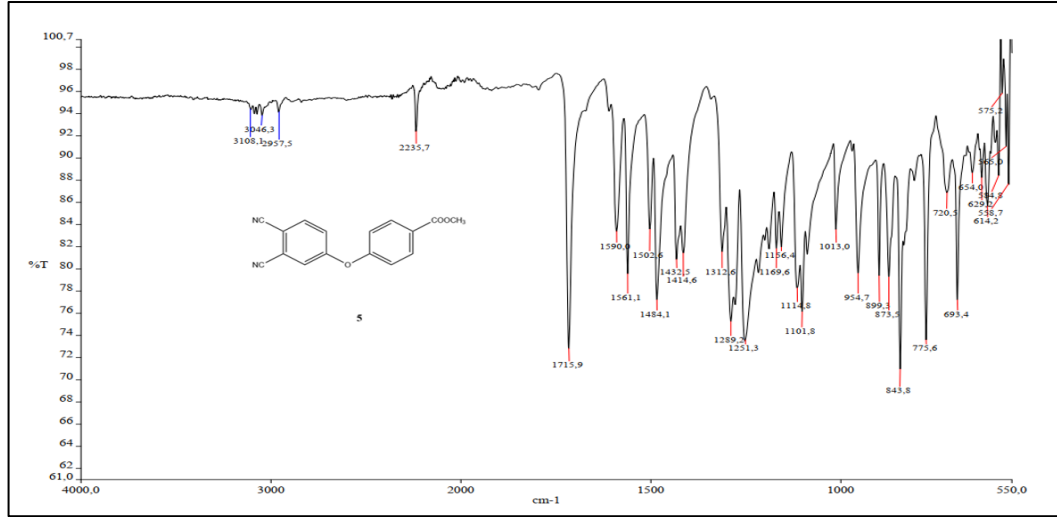
Şekil 4.5: 3 numaralı moleküle ait ^{13}C -NMR spektrumu (çözücü: CDCl_3).

3 numaralı bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu üzerinde kimyasal kayması farklı olan tüm karbonlar bileşiğin yapısı üzerinde farklı renklerde işaretlenerek tanımlanmıştır. Karbonlara ait tüm kimyasal kaymalar yapı ile uyumludur ve yapıyı desteklemektedir.

4.1.2. 5 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi

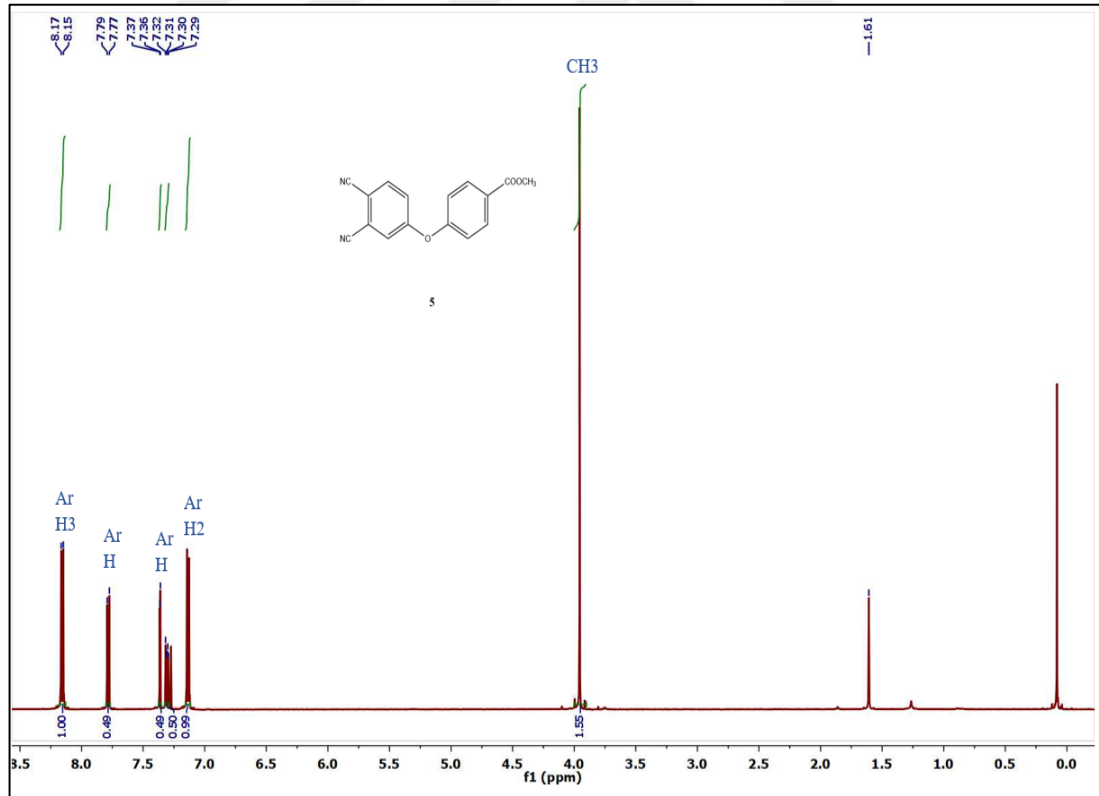


Şekil 4.6: 5 numaralı molekülün kimyasal yapısı.



Şekil 4.7: 5 numaralı molekülün IR spektrumu.

5 numaralı bileşiğin FTIR spektrumunda görülen 3040 cm^{-1} deki 3108 : aromatik C-H gerilmesi, 2235 cm^{-1} deki $\text{C}\equiv\text{N}$ ve 1715 cm^{-1} ester $\text{C}=\text{O}$ ait pikleri ile 1100 cm^{-1} deki C-O-C titreşimleri, belirtilen yapıyı desteklemektedir.

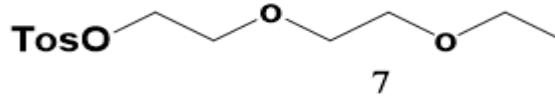


Şekil 4.8: 5 numaralı molekülün ^1H NMR spektrumu (DMSO).

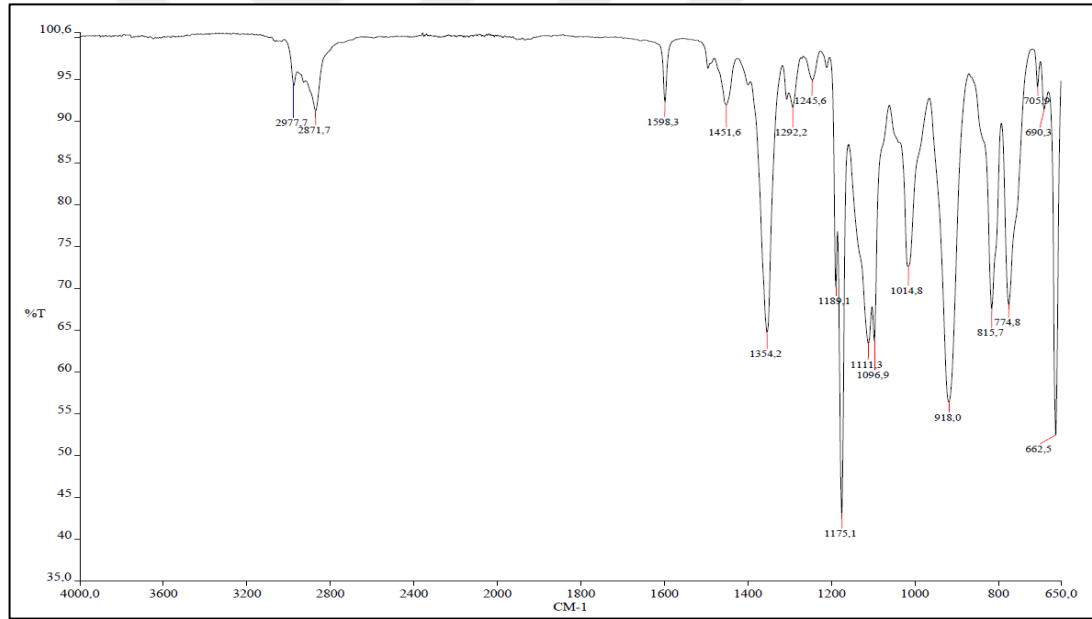
5 numaralı bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde; 8.16 ppm ve 7.78 ppm de görülen iki dublet sinyal ester grubunun bağlı olduğu benzen halkasındaki aromatik

protonlara ait kimyasal kaymalardır. Dinitiril grubunun bağlı olduğu benzen halkasındaki diğer aromatik protonlarda 7.37, 7.30 ve 7.14 ppm’lerde gözlemlenmiştir. Alifatik bölgede 3.96 ppm’deki singlet de ester grubunda yer alan metil protonlarına ait sinyal olarak görülmektedir.

4.1.3. 7 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi

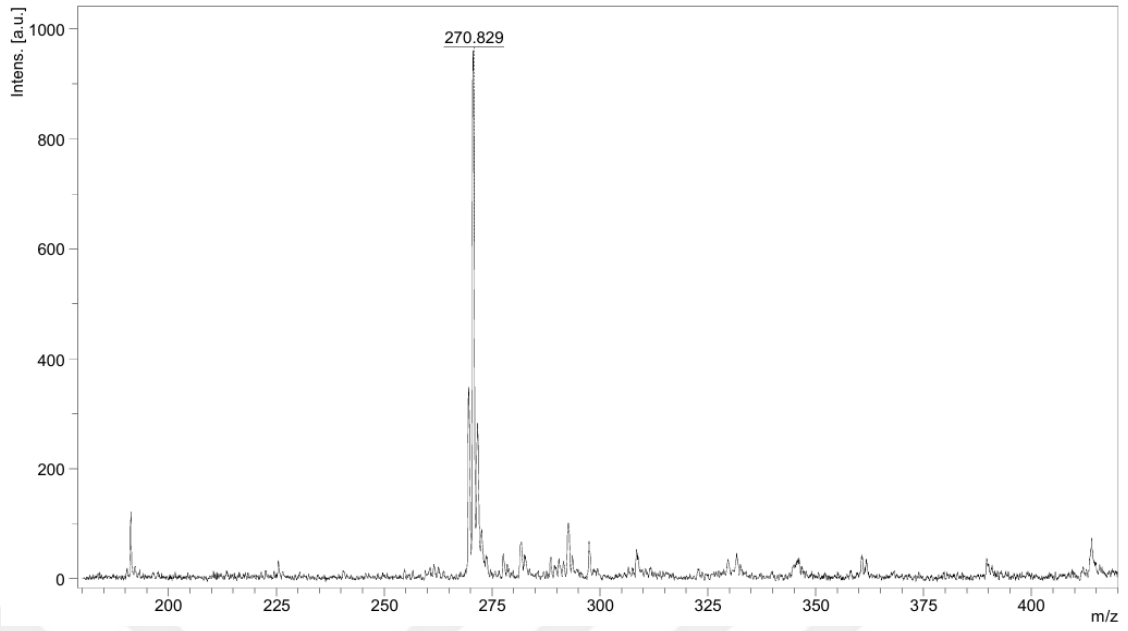


Şekil 4.9: 7 numaralı bileşiğin kimyasal yapısı.



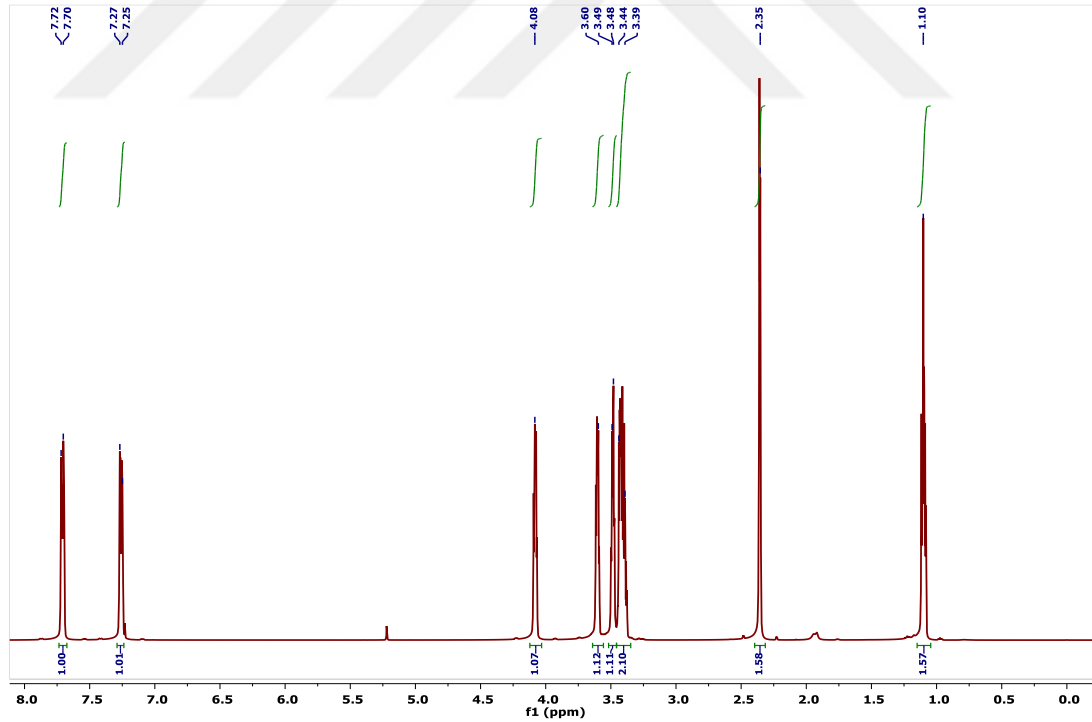
Şekil 4.10: 7 numaralı molekülün FT-IR spektrumu.

2900-2800 cm^{-1} bölgesinde bulunan alifatik ve 3040 cm^{-1} deki aromatik C-H gerilimleri, 1175 cm^{-1} ’de bulunan C-O-C eter bağı gerilmesi ve 800-600 cm^{-1} bölgesindeki S-C titreşimleri, bahsedilen yapıyı desteklemektedir.



Şekil 4.11: 7 numaralı molekülün kütle spektrumu.

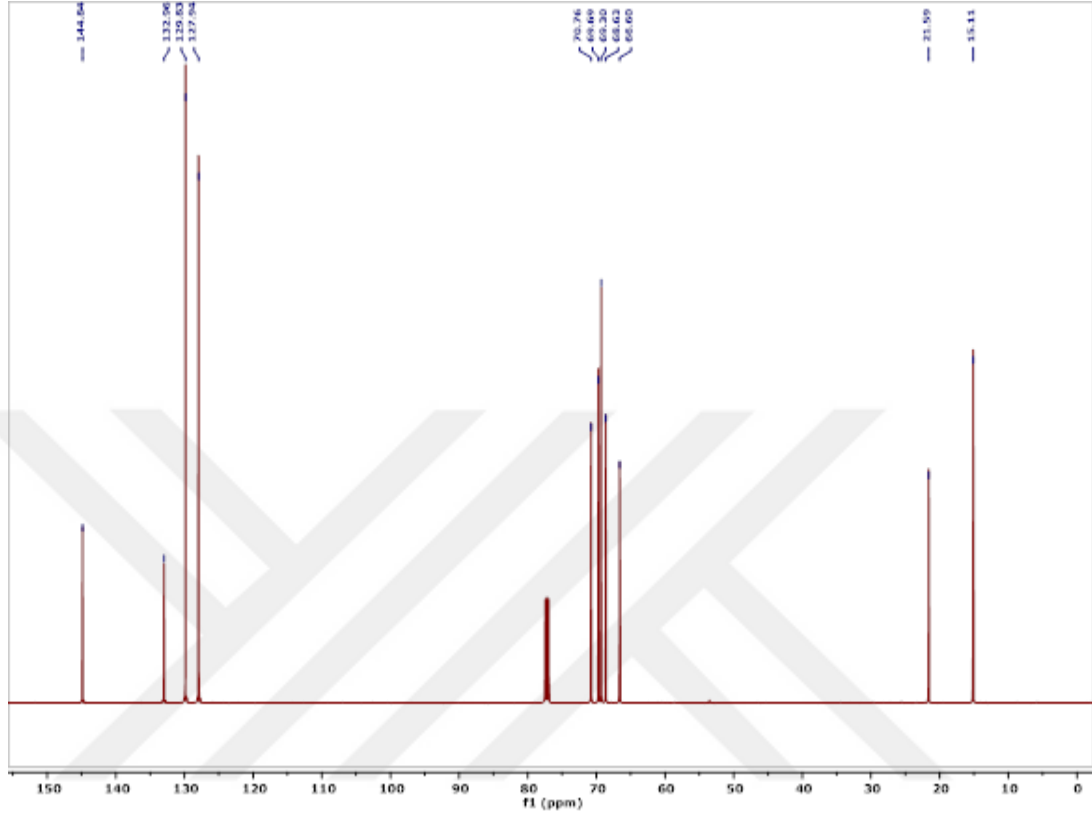
MALDI-TOF kütle spektrumu incelendiğinde, 270.83 gözlenen $[M-CH_3-3H]^+$ molekül iyon piki yapıyı desteklemektedir.



Şekil 4.12: 7 numaralı moleküle ait ^1H -NMR spektrumu (Çözücü: $CDCl_3$).

7 numaralı bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde; 7.71 ve 7.26 ppm de tosil grubundaki iki farklı kimyasal çevreye sahip aromatik protonlar iki farklı dublet olarak görülmektedir. Polioksietilen zincirinde yer alan OCH_2 ait kimyasal kaymalar 4.08 ile

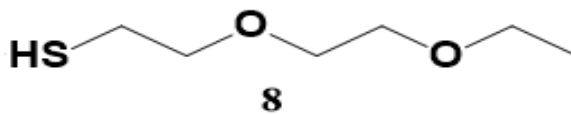
3.40 ppm'ler arasında 4 farklı sinyal olarak spektrumda yer almaktadır. 2.35 ppm'deki singlet tosil grubunda yer alan CH₃ protonlarına aittir. Polioetilen zinciri ucunda yer alan CH₃ ait kimyasal kaymada 1.10 ppm'de bir triplet olarak görülmüştür.



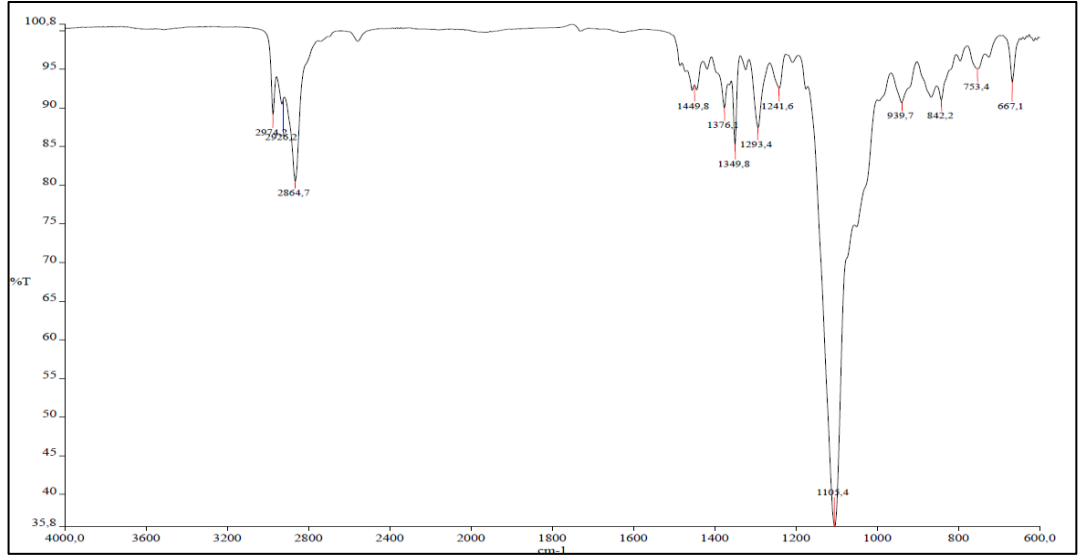
Şekil 4.13: 7 numaralı moleküle ait ¹³C-NMR spektrumu (Çözücü: CDCl₃).

7 numaralı bileşiğe ait ¹³C-NMR spektrumu incelendiğinde; Aromatik karbonlara ait sinyaller 144-122 ppm aralığında yer almaktadır. Alifatik bölgeye bakıldığında, 66-70 ppm aralığında polioetilen zincirindeki -OCH₂- gruplarına ait karbonlar sinyal vermektedir. Özellikle, tosil metili 21.59 ppm'de ve polioetilen zinciri ucundaki metil karbonunun 15.11 ppm'de sinyalleri gözlenmektedir. ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları yapıyı desteklemektedir.

4.1.4. 8 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi

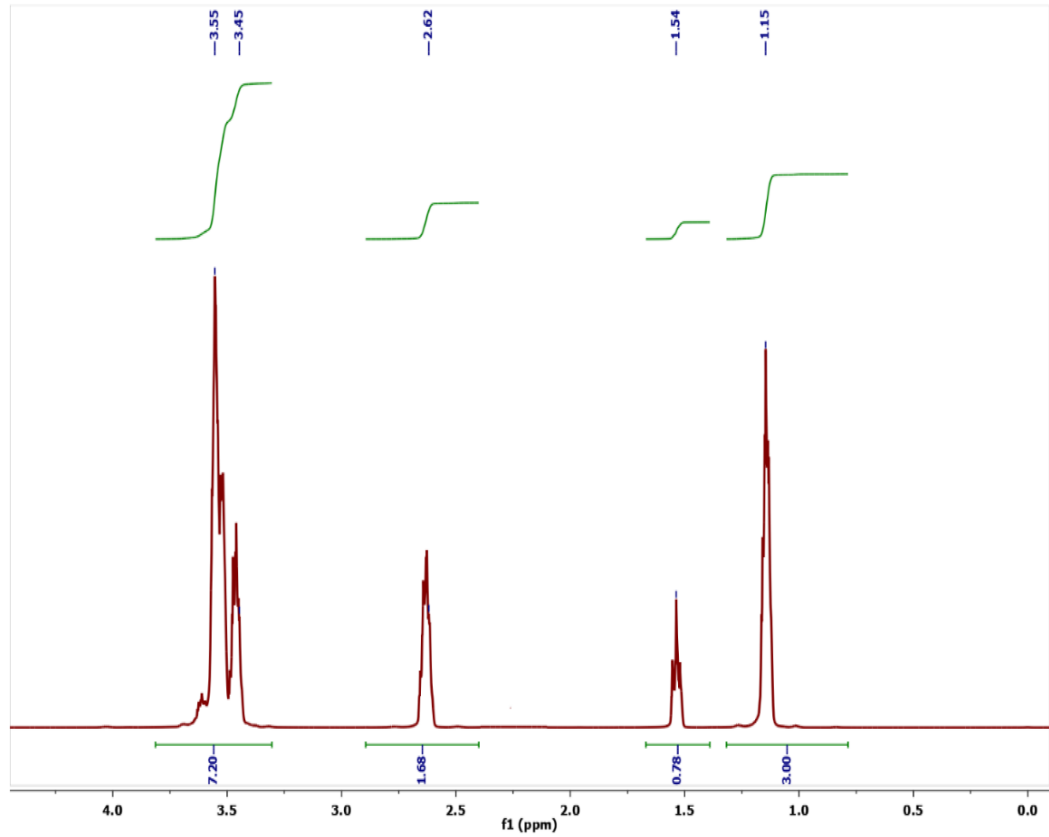


Şekil 4.14: 8 numaralı molekülün kimyasal yapısı.



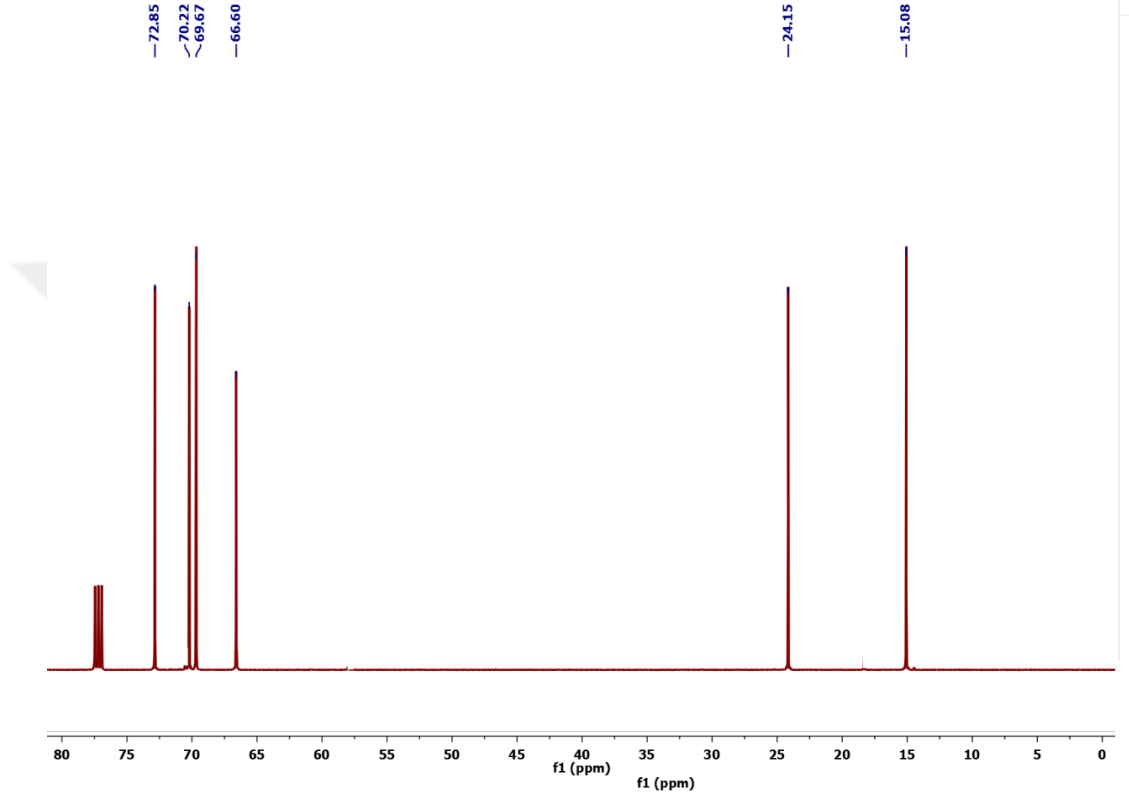
Şekil 4.15: 8 numaralı moleküle ait IR spektrumu.

8 numaralı moleküle ait IR spektrumu incelendiğinde; 2900-2800 cm^{-1} bölgesinde bulunan C-H gerilmeleri, 2580 cm^{-1} 'deki düşük şiddeti SH gerilmesine ait pik, 1105 cm^{-1} bölgesindeki -C-O-C- titreşimleri ve 800-600 cm^{-1} aralığındaki S-C titreşimleri, ilgili yapıyı desteklemektedir.



Şekil 4.16: 8 numaralı moleküle ait ^1H -NMR spektrumu (Çözücü: CDCl_3).

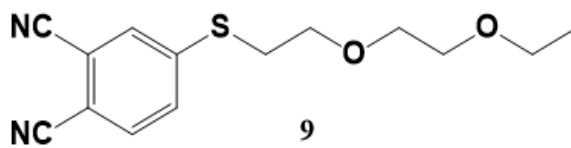
8 numaralı bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde; 3.6-3.4 ppm arasında ve 2.73 ppm de yer alan pikler, polioeksoetilen zincirindeki $-\text{OCH}_2-$ gruplara ait olup S- CH_2 ye ait kimyasal kayma da 2.73 ppm de triplet olarak gözlenmiştir. 1.54 ppm de SH a ait kimyasal triplet olarak spektrumda yer almaktadır. 1.15 ppm deki sinyaller ise polioeksoetilen zincirindeki terminal metil protonlarını (CH_3) işaret etmektedir.



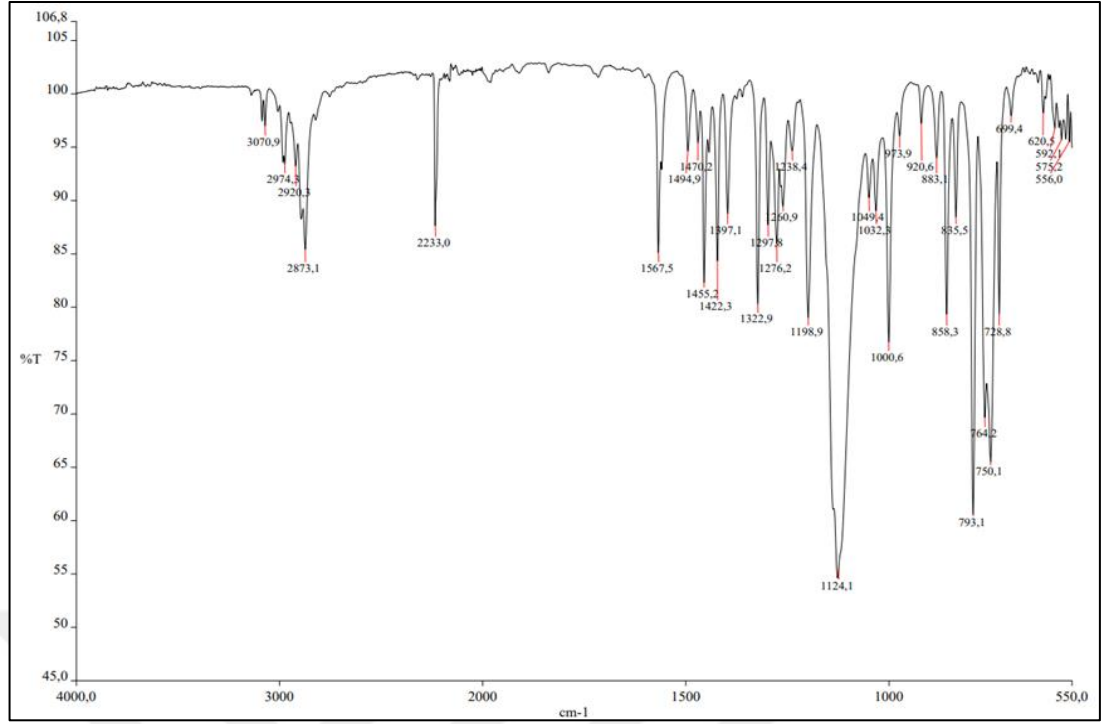
Şekil 4.17: 8 numaralı moleküle ait ^{13}C -NMR spektrumu (Çözücü: CDCl_3).

8 numaralı bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde; 72-66 aralığında yer alan sinyaller polioeksoetilen zincirindeki $-\text{OCH}_2$ karbon atomlarından, 24.15 ppmdeki sinyal S CH_2 ve 15.08 ppm de ise metil (CH_3) karbonlarından kaynaklanmaktadır.

4.1.5. 9 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi

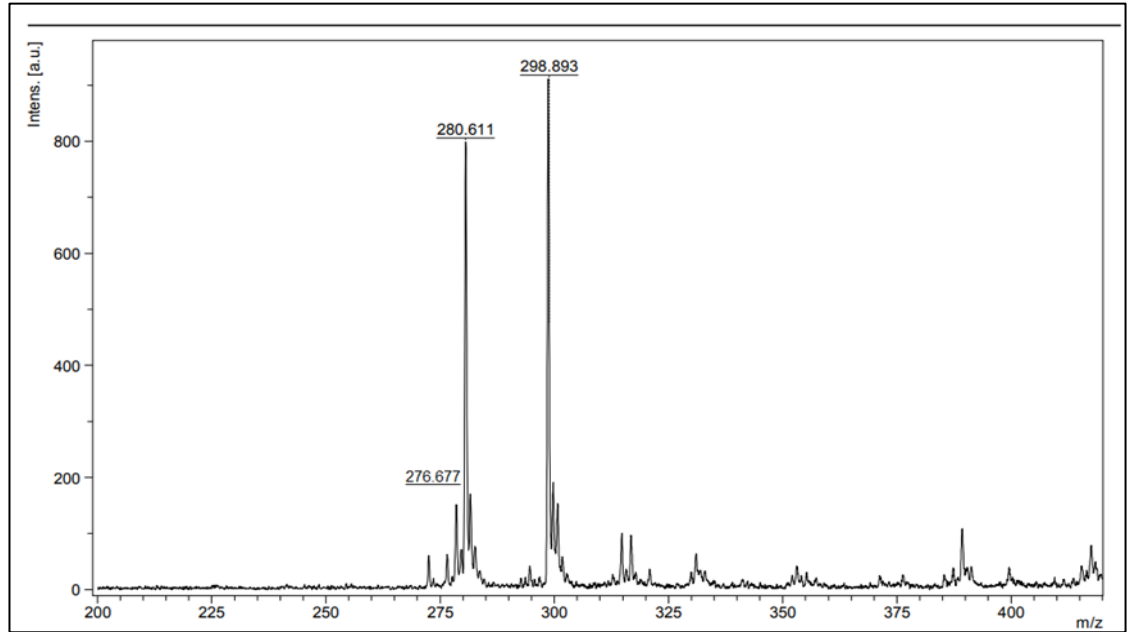


Şekil 4.18: 9 numaralı molekülün kimyasal yapısı.



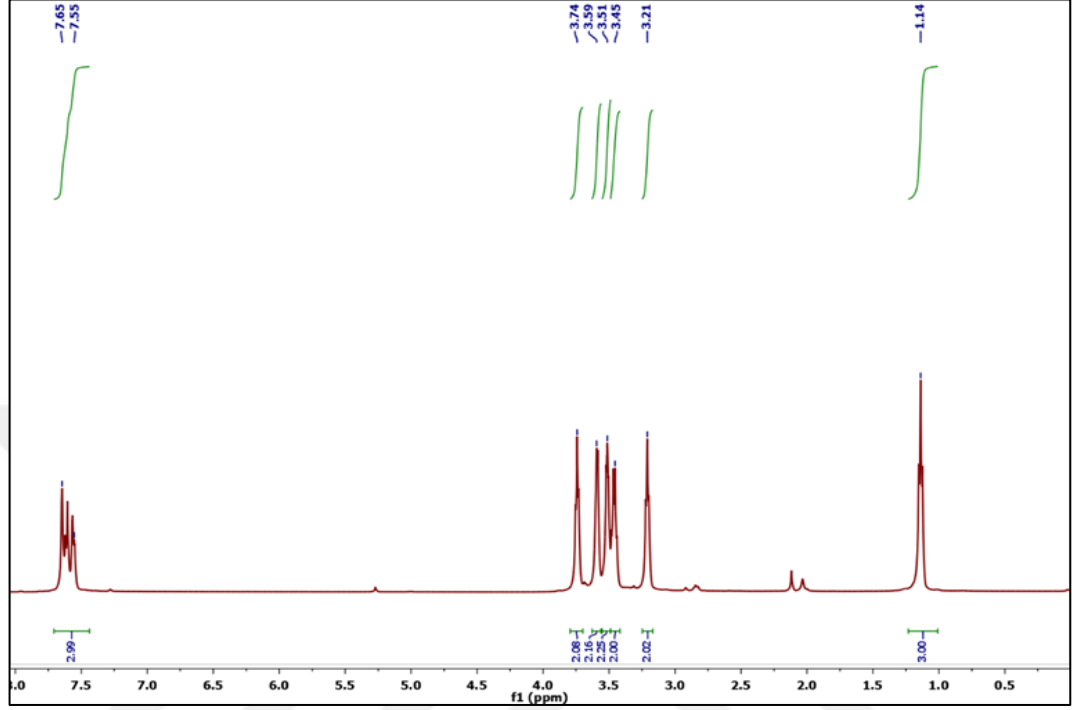
Şekil 4.19: 9 numaralı moleküle ait IR spektrumu.

9 numaralı moleküle ait IR spektrumu incelendiğinde; 3100-3050 cm^{-1} bölgesindeki aromatik CH gerilmeleri, 2950-2800 cm^{-1} bölgesindeki alifatik CH gerilmeleri, 2223 cm^{-1} 'deki $\text{C}\equiv\text{N}$ grubuna ait keskin pik, 1124 cm^{-1} bölgesindeki C-O-C ester bağı titreşimi, 9 numaralı molekülün yapısını desteklemektedir.



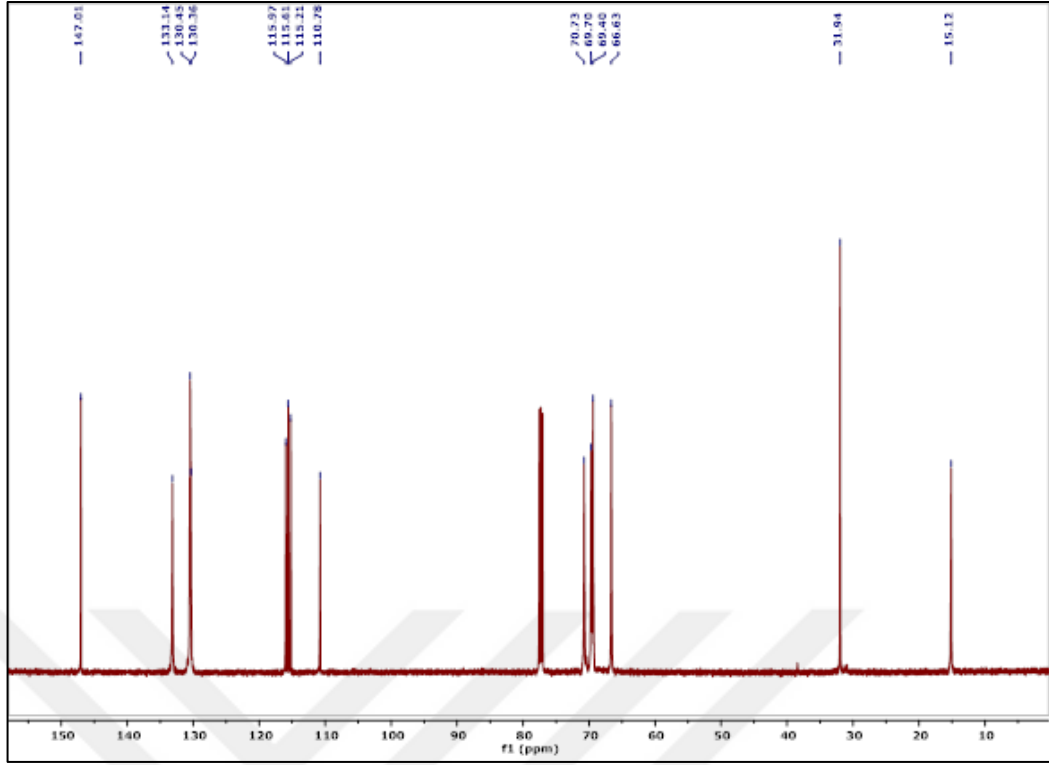
Şekil 4.20: 9 numaralı moleküle ait kütle spektrumu.

MALDI-TOF kütle spektrumu incelendiğinde, 276.77 gözlenen $[M]^+$ molekül piki yapıyı desteklemektedir. Spektrumda gözlemlenen diğer pikler ise 280.611 $[M+4H]^+$, 298.893 $[M+Na]^+$ iyonlara ait pikler olarak görülmektedir.



Şekil 4.21: 9 numaralı moleküle ait ^1H -NMR spektrumu.

9 numaralı bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde; 7.55-7.65 ppm aralığında dinitril grubunun bağlı olduğu benzen halkasına ait aromatik protonlara ait sinyalleri ifade etmektedir. 3.7-3.4 ppm aralığında ise polikso etilen zincirindeki $-OCH_2-$ gruplarına ait proton sinyallerini, 3.21 ppm de ise S atomuna bağlı metilen ($-CH_2-$) protonlarına ait sinyallerdir. 1.14 ppm de ise polikso etilen zincirindeki metil ($-CH_3$) protonlarına ait sinyaller de yapı ile uyumludur.

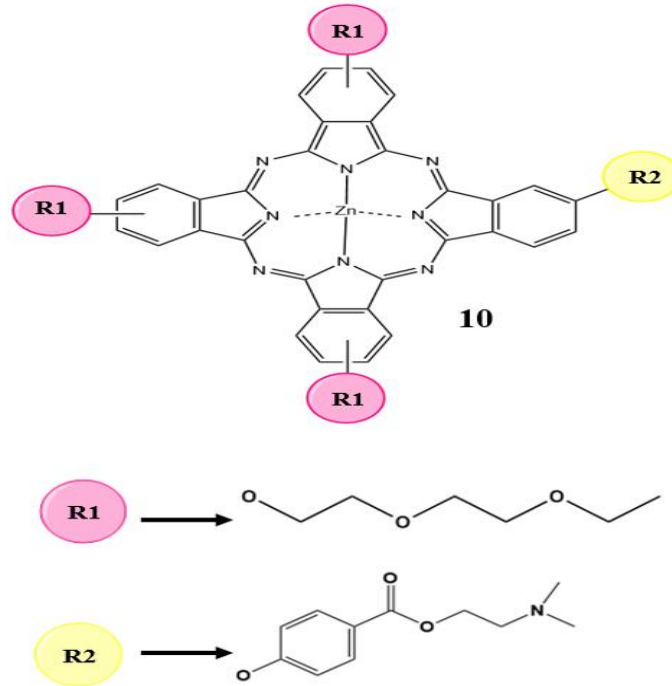


Şekil 4.22: 9 numaralı moleküle ait ^{13}C -NMR spektrumu.

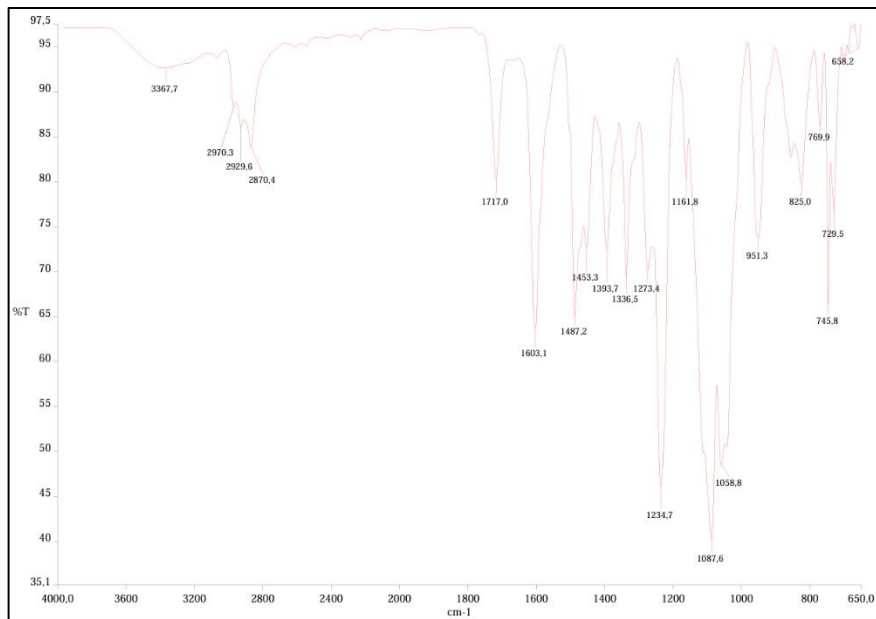
9 numaralı bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu değerlendirildiğinde, 150-110 ppm aralığında aromatik halkaya ait karbonların sinyallerini, 115 ppm’lerde ise $\text{C}\equiv\text{N}$ grubuna ait iki kimyasal kaymayı görmek mümkündür. Poliokso etilen zincirinde yer alan $-\text{OCH}_2$ ’ler 70-66 ppm aralığında 4 farklı kimyasal kayma olarak görülmektedir. 31.94 ppm de ise S atomlarına bağlı metilen karbonu ile 15.12 ppm de de polioksoetilen zinciri ucundaki CH_3 grubuna ait sinyaller yapıyı destekler veriler olarak elde edilmiştir.

4.2. Ftalosiyanın Karakterizasyonu

4.2.1. 10 Numaralı Bileşğin Yapı Analizi

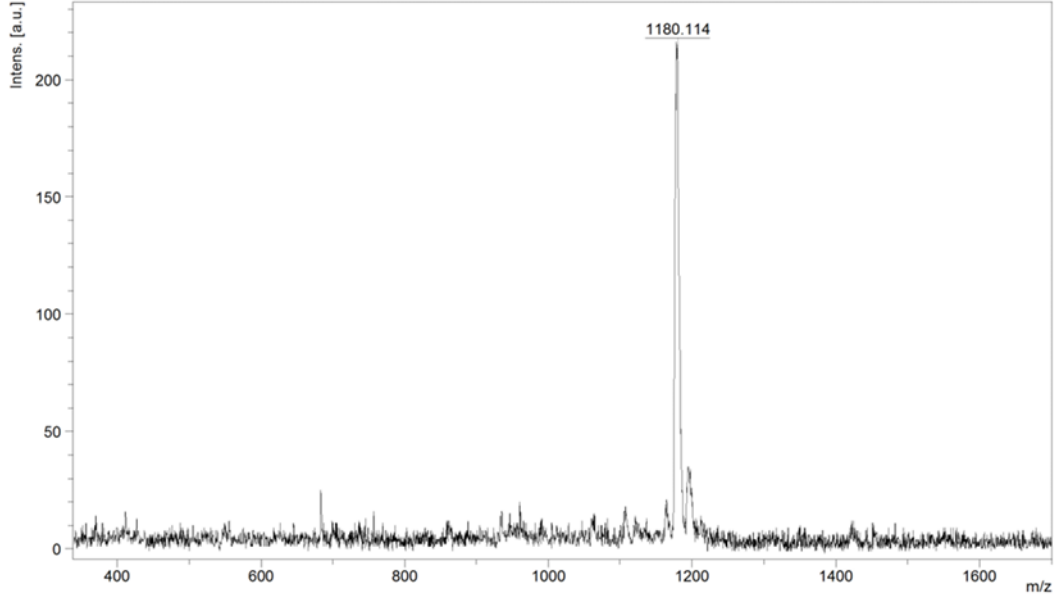


Şekil 4.23: 10 numaralı molekülün kimyasal yapısı.



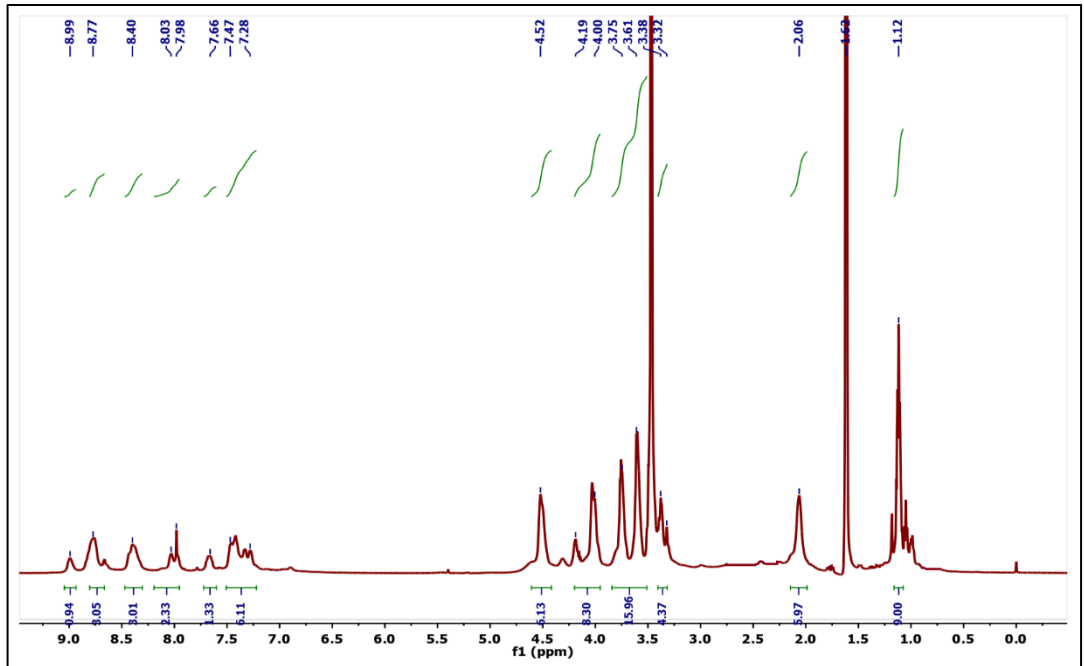
Şekil 4.24: 10 numaralı moleküle ait IR spektrumu.

10 numaralı moleküle ait IR spektrumu incelendiğinde; 3050 cm^{-1} 'deki aromatik CH, 2900-2800 cm^{-1} 'deki alifatik CH gerilmeleri, 1717 cm^{-1} 'deki ester C=O gerilmeleri, 1100-1087 cm^{-1} 'deki C-O-C titreşimleri, molekülün yapısını desteklemektedir.



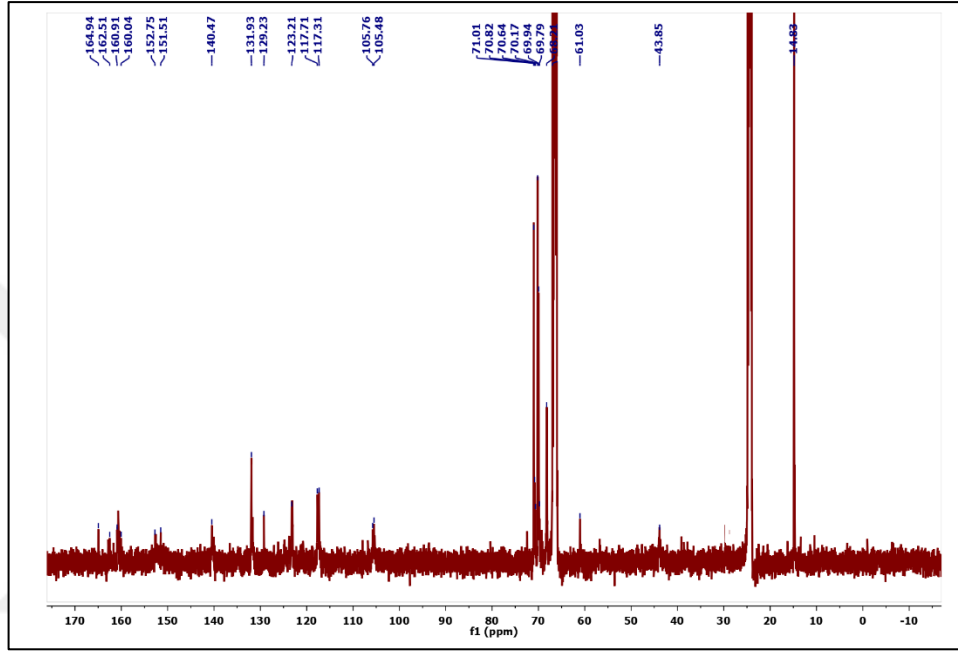
Şekil 4.25: 10 numaralı moleküle ait kütle spektrumu.

MALDI-TOF kütle spektrumu incelendiğinde, $[\text{C}_{61}\text{H}_{65}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{Zn}]^+$ için hesaplanan 1181.62 ve gözlenen 1180.11'de $[\text{M}-\text{H}]^+$ molekül iyon piki yapıyı desteklemektedir.



Şekil 4.26: 10 numaralı moleküle ait ^1H -NMR spektrumu.

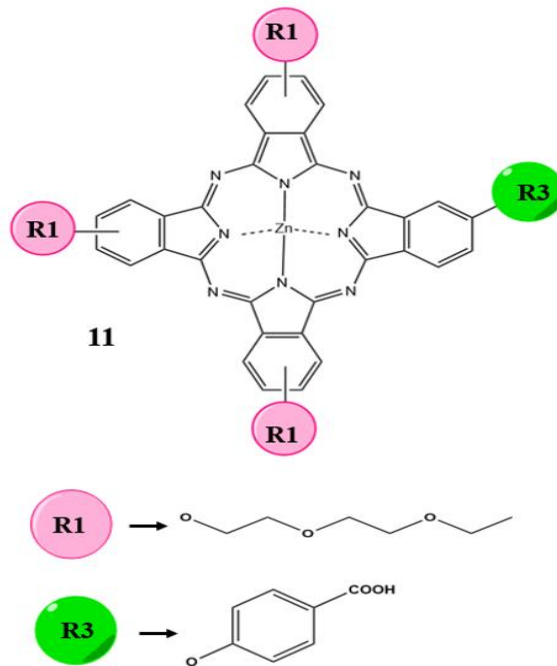
10 numaralı bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde; aromatik protonların kimyasal kaymalarını 8.99-7.24 ppm aralığında olduğu görülmektedir. Bu bölgedeki çoklu sinyaller, ftalosiyanin halkasındaki aromatik protonlar ve fenil gruplarından kaynaklanmaktadır. Alifatik zincirler (etoksi grupları), 3.3-4.5- ppm aralığında görülen sinyalleri oluşturur. 2.06 ppm de azota bağlı CH_3 ait kimyasal kaymalar görülürken, 1.12 ppm deki pik ise polioksoetilen zincirlerinde yer alan metil protonların aittir.



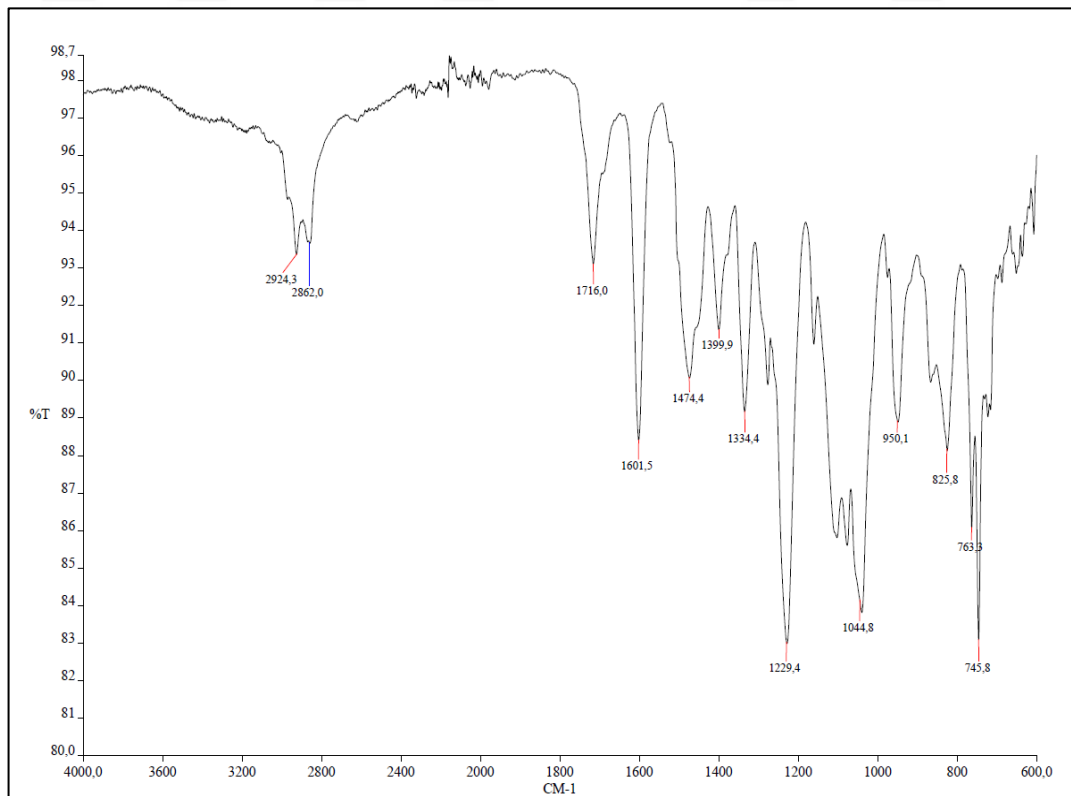
Şekil 4.27: 10 numaralı moleküle ait ^{13}C -NMR spektrumu.

10 numaralı bileşiğe ait ^{13}C -NMR spektrumu değerlendirildiğinde, 165 ppm de $\text{C}=\text{O}$ karbonuna ait kimyasal kayma görülmektedir. 160-105 ppm aralığında ftalosiyanin çekirdeğine ait aromatik karbonların sinyalleri, 70-60 ppm aralığında poliokso etilen zincirindeki eterik karbonların ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) karakteristik sinyalleri, 43 ppm de dimetil amin grubundaki metillerin karbonları gözlemlenirken poliokso etilen zincirindeki metiller ise 15 ppm’lerde kimyasal kayma vermektedir.

4.2.2. 11 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi

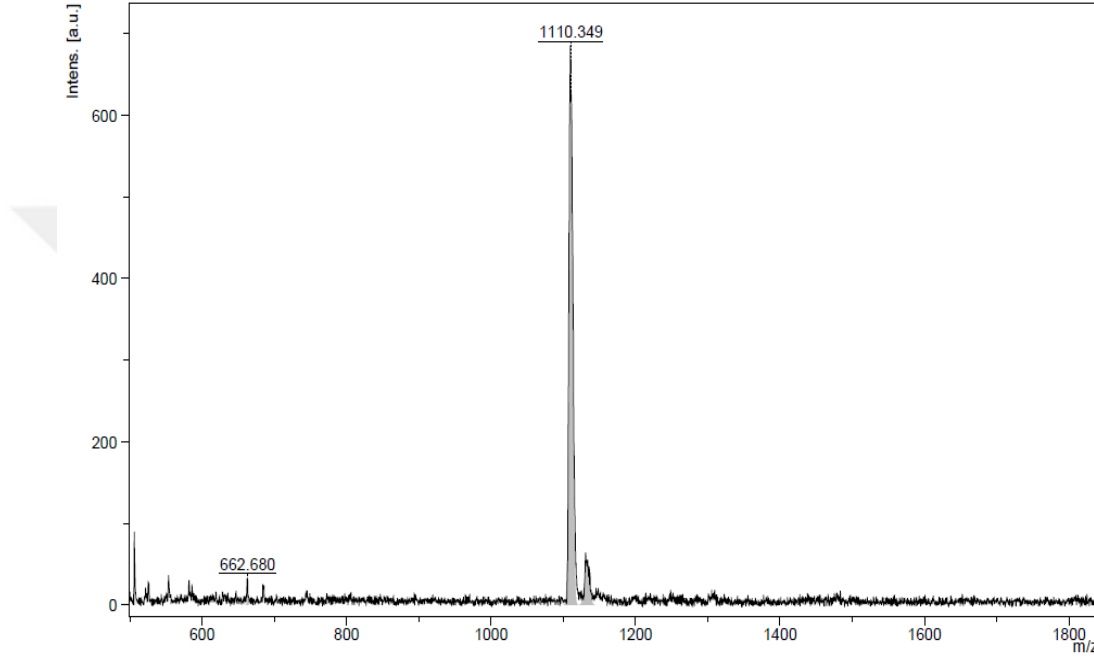


Şekil 4.28: 11 numaralı molekülün kimyasal yapısı.



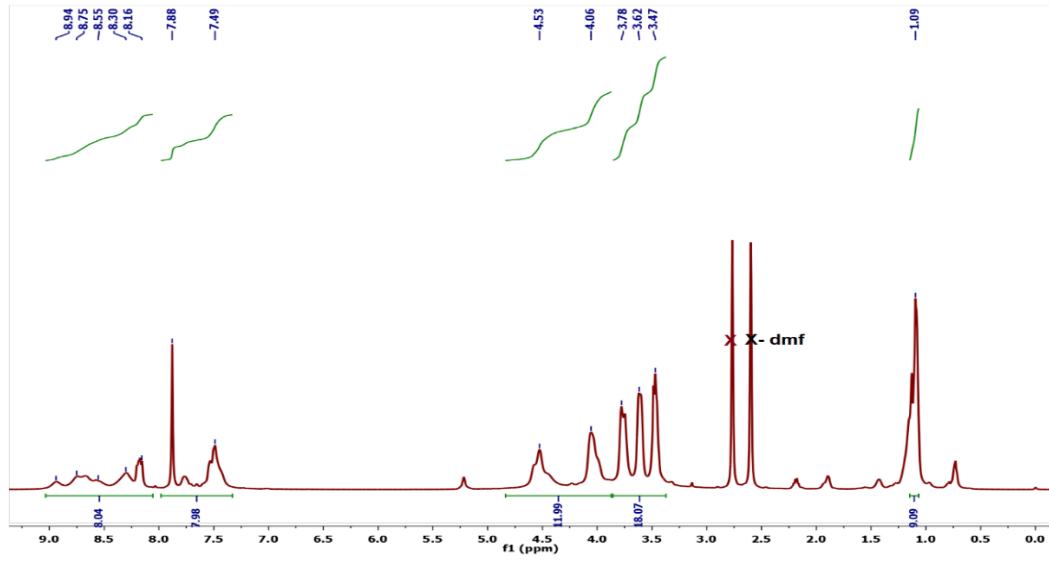
Şekil 4.29: 11 numaralı molekülün IR spektrumu.

11 numaralı molekülün IR spektrumu incelendiğinde; 3200-2600 cm^{-1} deki yayvan pik yapıdaki mono alt grubuna ait OH gerilmesi olarak görülmektedir. 3040 cm^{-1} deki aromatik CH ve 2900-2800 cm^{-1} de alifatik CH gerilmeleri, 1716 cm^{-1} bölgesinde bulunan C=O titreşimi, 1600 cm^{-1} 'deki aromatik C=C titreşimleri, 1200 cm^{-1} 'deki C-N, titreşimleri ve 1190-1044 cm^{-1} 'lerdeki C-O-C eter bağı titreşimleri ilgili yapıyı desteklemektedir.



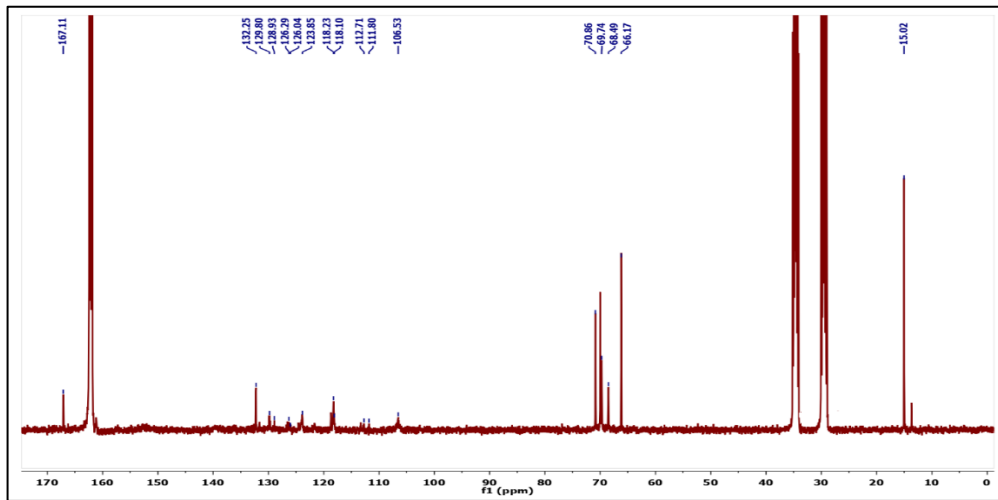
Şekil 4.30: 11 numaralı moleküle ait kütle spektrumu.

MALDI-TOF kütle spektrumu incelendiğinde, $[\text{C}_{57}\text{H}_{56}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{Zn}]^+$ için hesaplanan 1110.50 g/mol ve bulunan: 1110.349 $[\text{M}]^+$ moleküler iyon piki yapıyı desteklemektedir.



Şekil 4.31: 11 numaralı moleküle ait ^1H -NMR spektrumu.

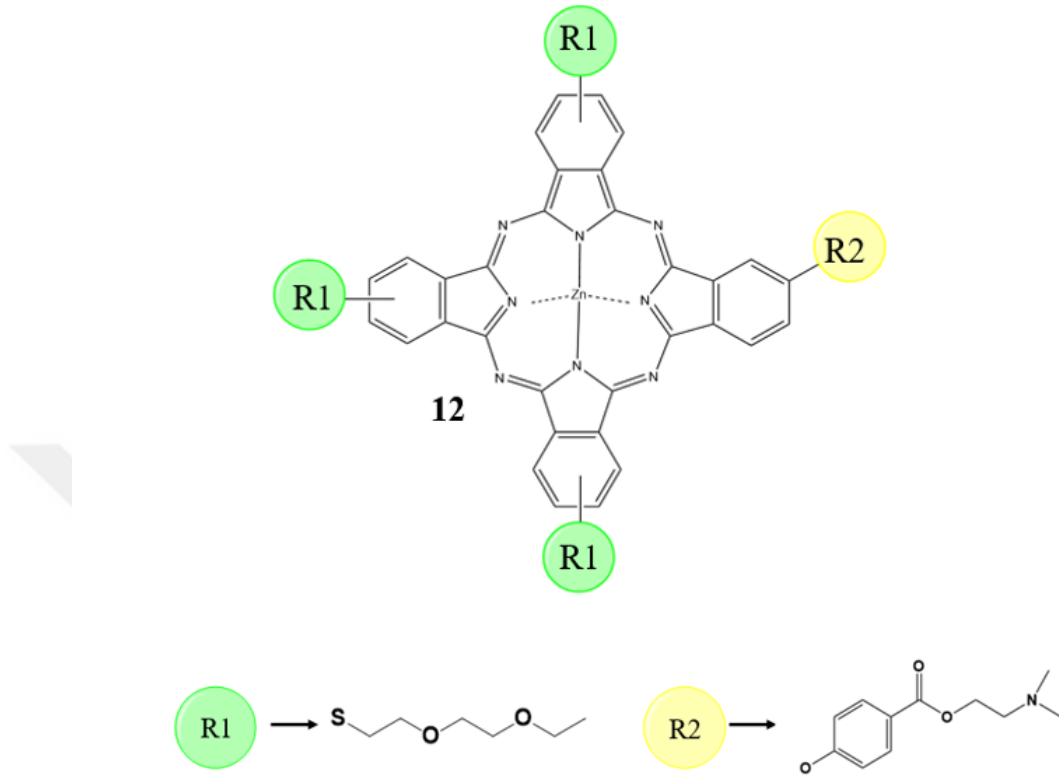
11 numaralı bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde; aromatik protonların kimyasal kaymalarını 9-7.5 ppm aralığında olduğu görülmektedir. Bu bölgedeki çoklu sinyaller, ftalosiyanın halkasındaki aromatik protonlar ve fenil gruplarından kaynaklanmaktadır. Alifatik zincirler (etoksi grupları), 3.5-4.5 ppm aralığında görülen sinyalleri oluşturur. 1 ppm de görülen sinyaller ise polioksoetilen zincirlerinde yer alan metil protonlarına aittir.



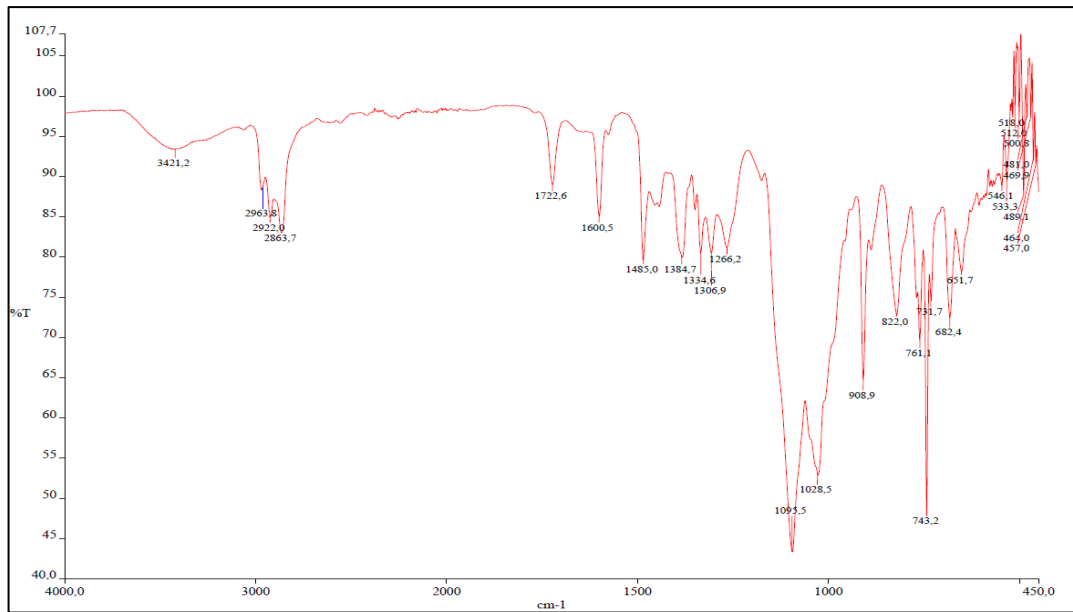
Şekil 4.32: 11 numaralı moleküle ait ^{13}C -NMR spektrumu.

11 numaralı bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde; aromatik karbon atomları 120-160 ppm aralığında sinyaller göstermiştir. Eter gruplarındaki karbonlar, 60-80 ppm bölgesinde sinyal vermektedir. Bunlar yapı ile uyumludur.

4.2.3. 12 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi

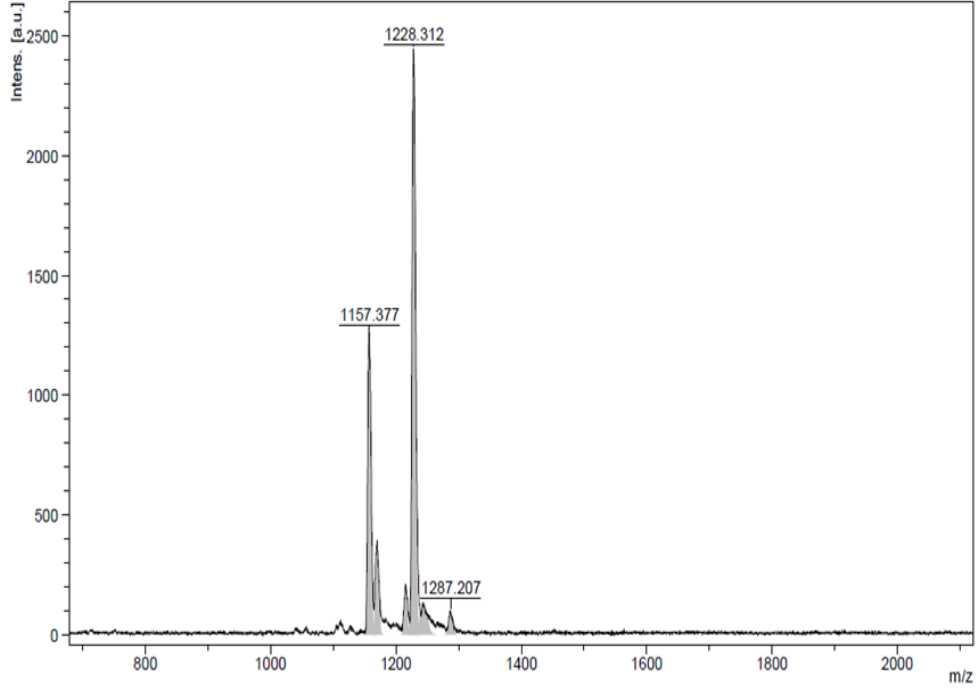


Şekil 4.33: 12 numaralı molekülün kimyasal yapısı.



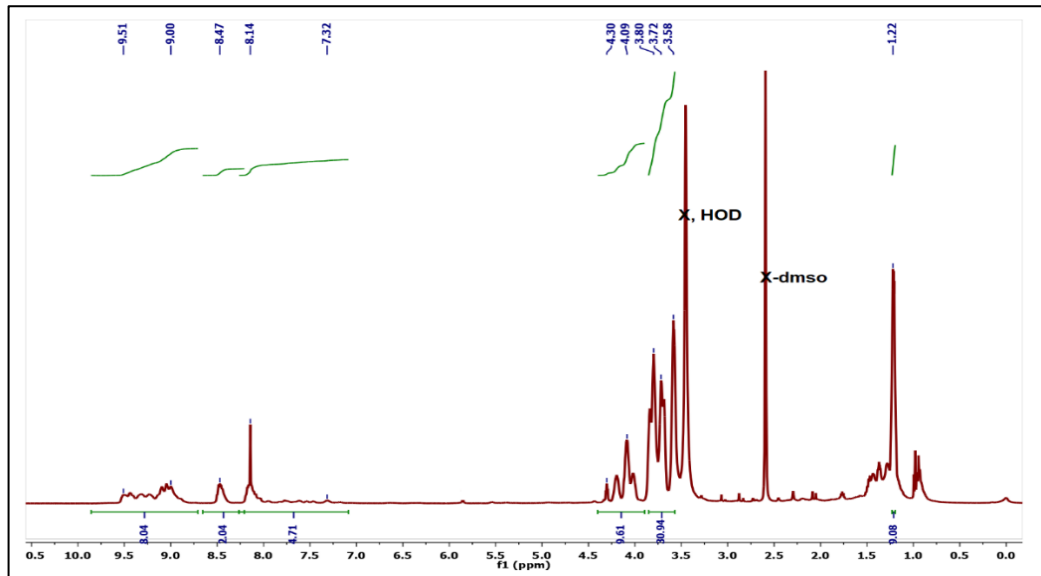
Şekil 4.34: 12 numaralı moleküle ait FT-IR spektrumu.

12 numaralı molekülün FT-IR spektrumu incelendiğinde gözlemlenen 3040 cm^{-1} 'deki aromatik C-H gerilmeleri, 2900-2800 cm^{-1} 'de alifatik CH gerilmesi, 1200-1000 cm^{-1} 'deki C-N titreşimleri, 1095-1028 cm^{-1} 'deki C-O-C titreşimleri, ilgili molekülün yapısını desteklemektedir.



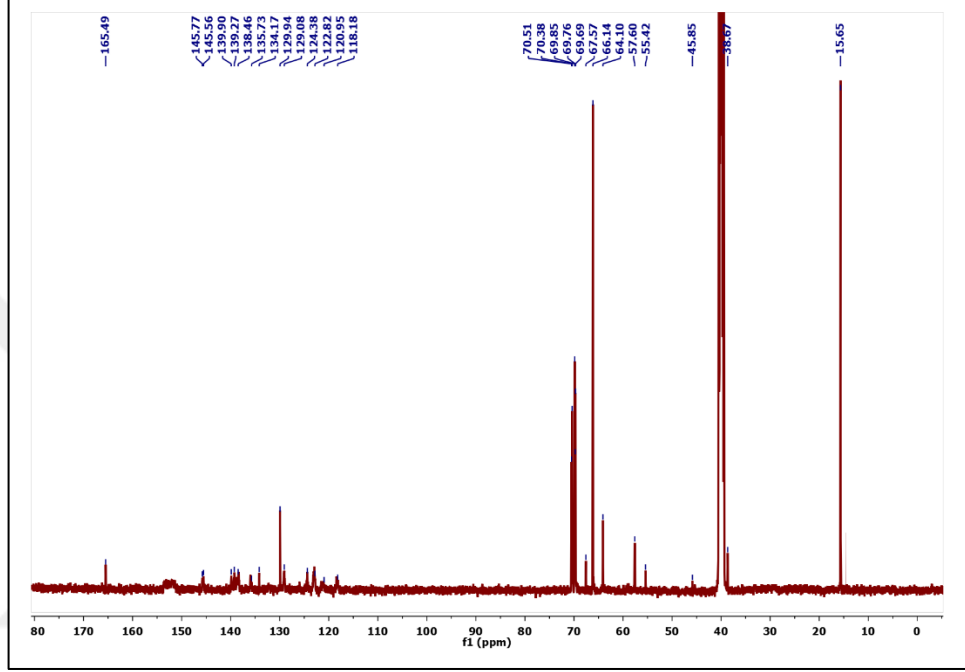
Şekil 4.35: 12 numaralı molekülün kütle spektrumu.

12 numaralı bileşiğe ait MALDI-TOF kütle spektrumu incelendiğinde, 1157[M-(C₂H₅-N-(CH₃)₂)]⁺, ve 1228'de gözlenen [M-H]⁺ molekül iyon piki yapıyı desteklemektedir.



Şekil 4.36: 12 numaralı moleküle ait ¹H- NMR spektrumu.

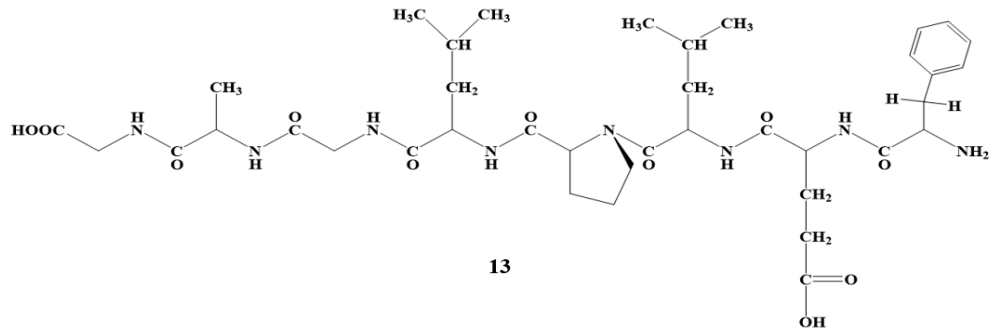
12 numaralı bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde; 9.51-7.32 ppm aralığında görülen piklerin ftalosiyanin çekirdeğine bağlı aromatik protonlar ile aromatik ester grubuna ait protonların karakteristik sinyallerini ifade ettiği görülmektedir. Poliookso etilen zincirindeki metilen grupları 4.3-3.5 ppm aralığında görülmüştür. Ayrıca metil grupları ait protonlarda 1.22 ppm’lerde sinyal vermiştir.



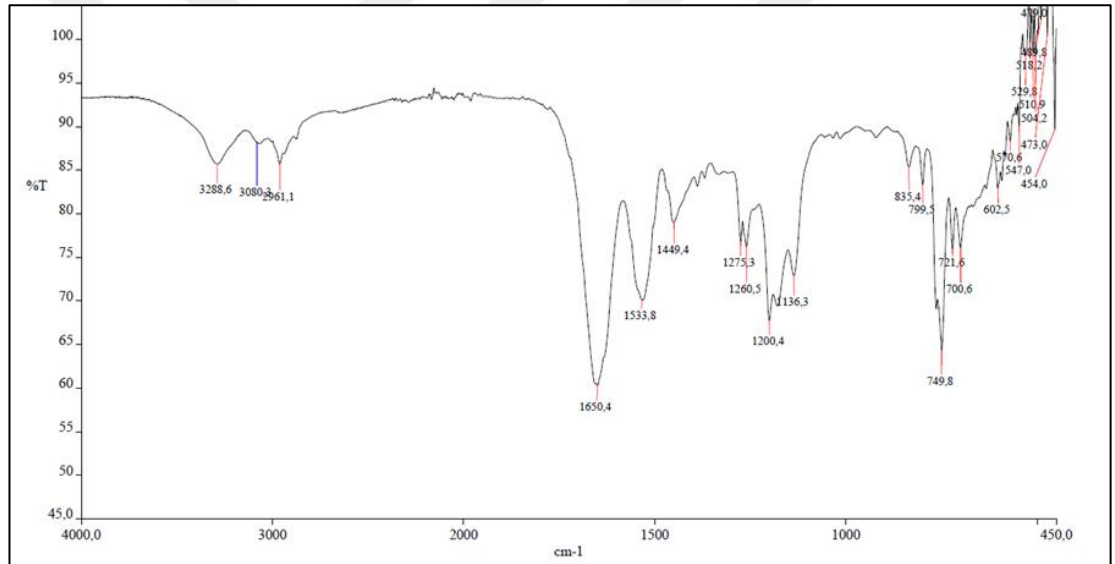
Şekil 4.37: 12 numaralı moleküle ait ^{13}C -NMR spektrumu.

^{13}C -NMR spektrumu değerlendirildiğinde, 165 ppm de $\text{C}=\text{O}$ karbonuna ait kimyasal kayma görülmektedir. Ftalosiyanin çekirdeğine ait karbonların sinyalleri 150-120, aralığında poliookso etilen gruplarındaki eterik karbonların ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) karakteristik sinyalleri 70-45 ppm aralığında, SCH_2 grubuna ait karbonlar 38 ppm’lerde, dimetil amino grubundaki metillerin 46 ppm’lerde ve poliookso etilen zincirindeki metil karbonlarının da 16 ppm’lerde kimyasal kaymalarını verdikleri belirlenmiştir.

4.2.4. Peptit Molekülünün (13) Yapı Analizi

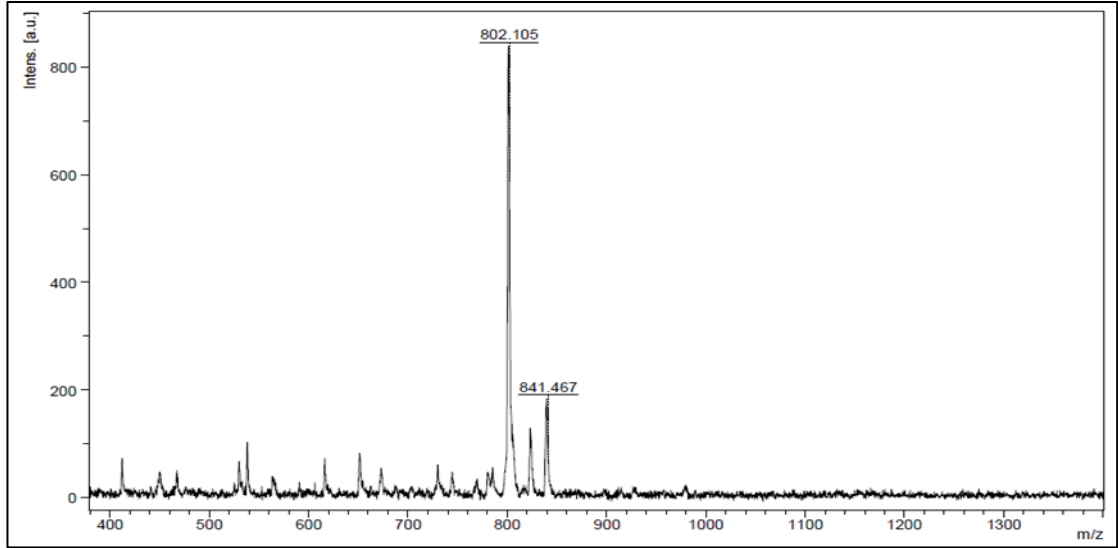


Şekil 4.38: 13 numaralı molekülün kimyasal yapısı.



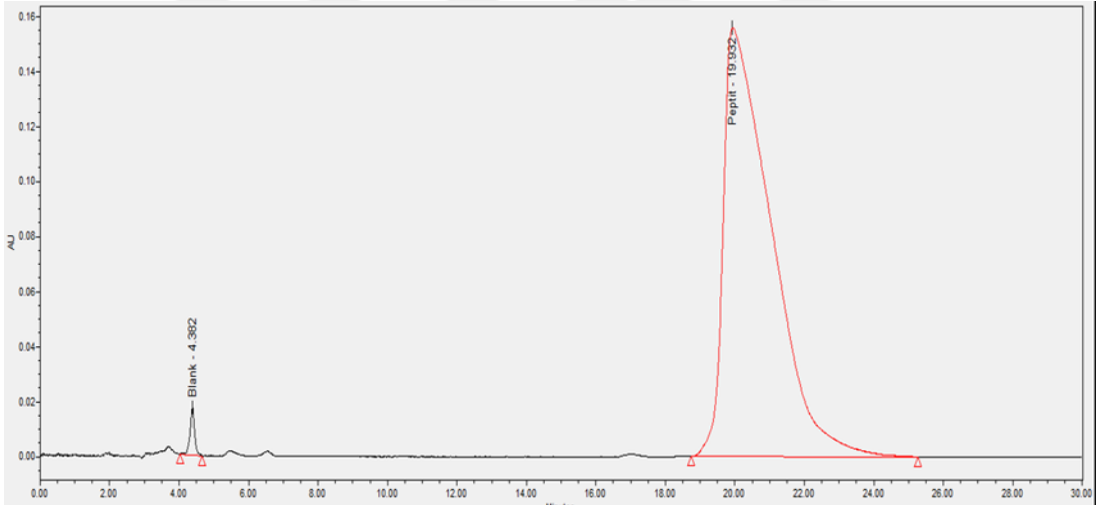
Şekil 4.39: 13 numaralı moleküle ait FT-IR spektrumu.

IR spektrumu incelendiğinde; 3500-3200 cm^{-1} 'deki N-H piki, 3000-2800 cm^{-1} 'deki alifatik CH gerilmesi, 3100-3000 cm^{-1} 'deki aromatik CH gerilmesi, 1650-1640 cm^{-1} 'deki peptit bağı (N-C), 1300-1000 cm^{-1} 'deki C-N titreşimi, 700-500 cm^{-1} bölgesindeki prolinde bulunan pirol grubu C-N titreşimi ilgili yapıyı desteklemektedir.



Şekil 4.40: 13 numaralı moleküle ait kütle spektrumu.

MALDI-TOF tekniği ile matriks olarak DIT kullanılarak alınan kütle spektrumu incelendiğinde, 802’de gözlenen $[M]^+$ molekül iyon piki ve 841.47 $[M+K]^+$ iyon piki yapıyı desteklemektedir.

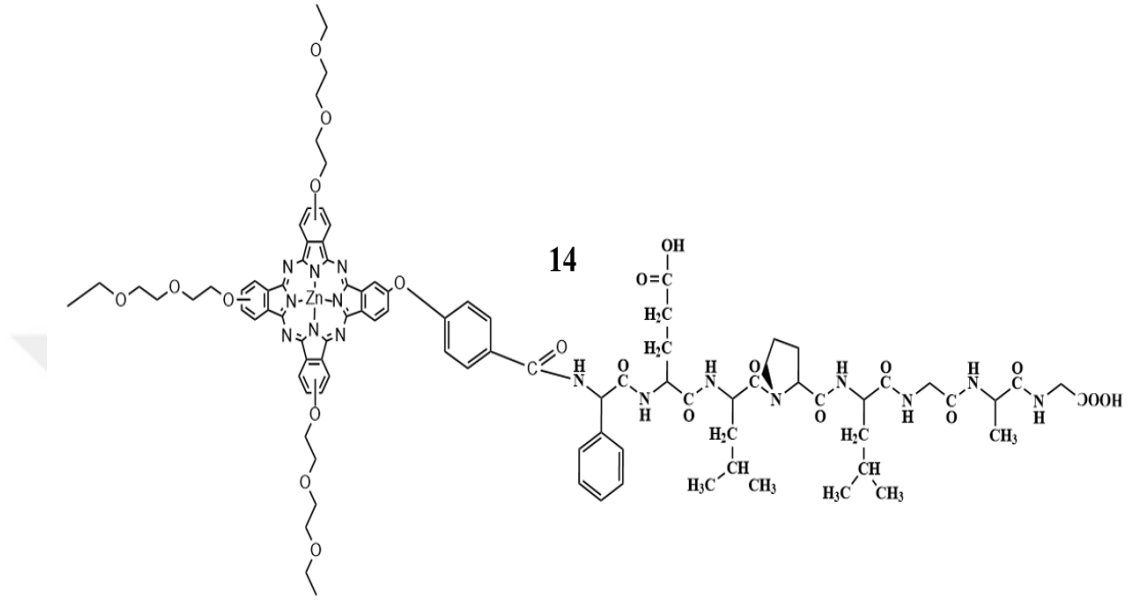


Şekil 4.41: Peptit molekülünün HPLC spektrumu.

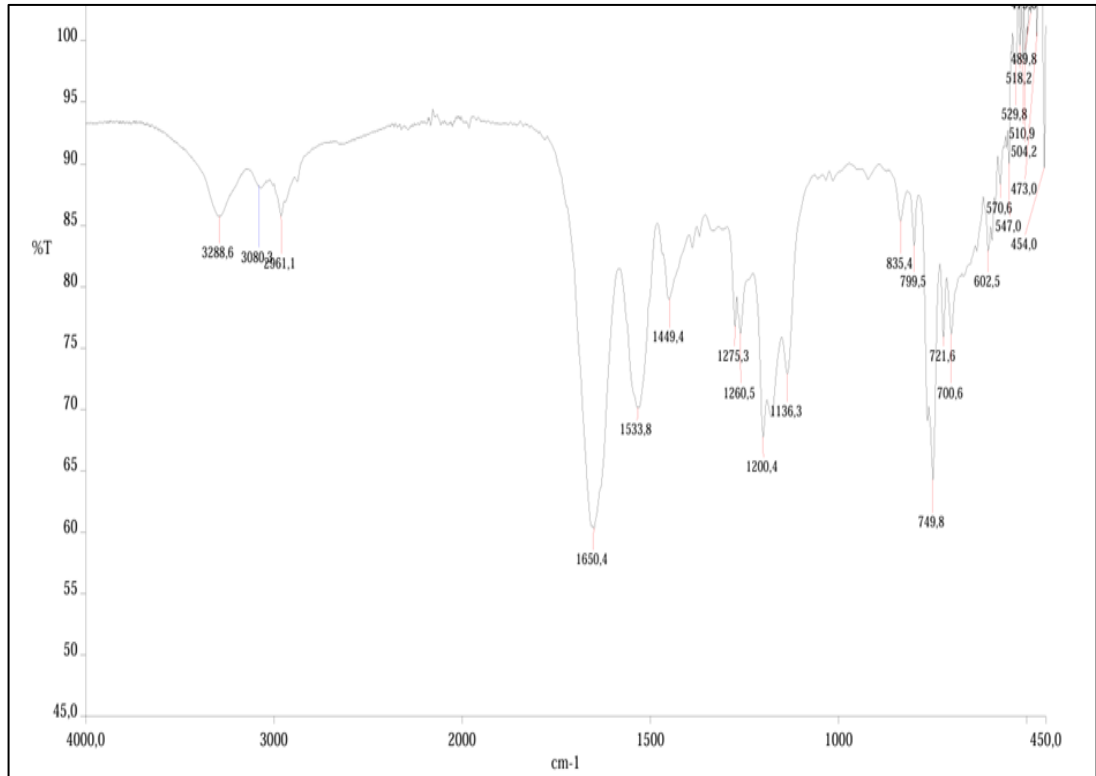
Peptit molekülü 0.1 mg/ml olacak şekilde tartıldı ve distile H_2O ile çözüldükten sonra HPLC sisteminde alıkonma zamanı gözlemlendi. Mobil faz olarak %50 metanol kullanıldı ve akış hızı 1.0 ml/dakika şeklinde ayarlandı. Kolon olarak Inertsil ODS-3V kolon (GL Science, Cat No: 5020-01802) kullanıldı. İlk örnek olarak blank (dH_2O) verilmesinin ardından, boş çözücünün oluşturacağı pikler tespit edildikten sonra numune enjekte edildi. Peptit molekülünün alıkonma zamanı yaklaşık 20 dakika olarak tespit edildikten sonra pik saflığı, cihaz parametreleri üzerinden kontrol edildi. Saflık

eşğinin, saflık açısından daha büyük olduğu tespit edilerek, elde edilen pikin saf olduğu teyit edildi (Saflık Açısı: 0.260, Saflık Eşği: 0.370).

4.2.5. 14 Numaralı Bileşiğin Yapı Analizi

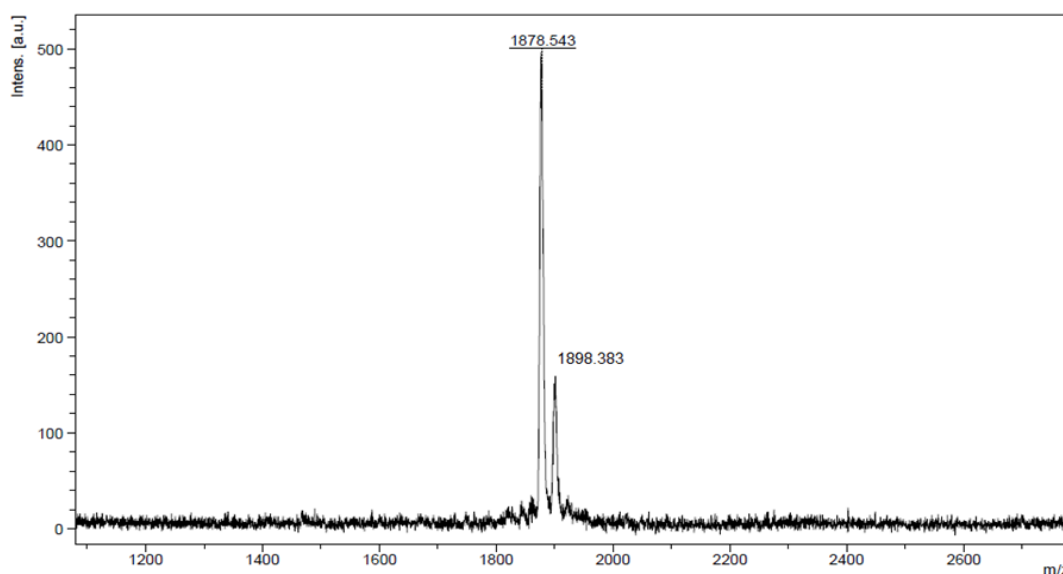


Şekil 4.42: 14 numaralı molekülün kimyasal yapısı.



Şekil 4.43: 14 numaralı molekülün IR spektrumu.

14 numaralı molekülün IR spektrumu incelendiğinde; 3500-3200 cm^{-1} 'deki yayvan N-H gerilmesi, 3000-2800 cm^{-1} 'deki alifatik CH gerilmesi, 1690-1640 cm^{-1} 'deki C=O titreşimleri, 1650-1640 cm^{-1} 'deki peptit bağı (N-C) titreşimleri, 1300-1000 cm^{-1} 'deki N-C titreşimleri, 1150-1050 cm^{-1} bölgesindeki C-O-C eter bağı titreşimleri ve 700-500 cm^{-1} 'deki pirol C-N titreşimleri, ilgili yapıyı desteklemektedir.



Şekil 4.44: **14** numaralı molekülün kütle spektrumu.

14 numaralı bileşiğin MALDI-TOF kütle spektrumu incelendiğinde, 1878 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$, 1898.38 $[\text{M}+3\text{H}]^+$ iyon pikleri yapıyı desteklemektedir.

4.3. Fotofiziksel ve Fotokimyasal Özellikler

Tez kapsamında sentezlenen bütün moleküllerin fotofiziksel ve fotokimyasal davranışları UV-Vis ve floresans spektroskopisi kullanılarak incelendi. Molar absorbtivite katsayılarını belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda örnekler hazırlanarak 300-800 nm dalga boyu aralığında UV-Vis ölçümleri alındı. Daha sonra konsantrasyona karşı absorbands değerleri grafiğe geçilerek ekstintisyon katsayıları DMSO ortamında hesaplandı. Bu kapsamda yapılan çalışmalara kısım 4.3.1'de yer verilmiştir. Ftalosiyanın farklı çözücülerdeki absorpsiyon ve emisyon davranışları 2 μM konsantrasyonda, oda sıcaklığında; dimetilformamid (DMF), dimetilsülfoksit (DMSO), tetrahidofuran (THF), kloroform (CHCl_3) ve distile su (dH_2O) ortamlarında araştırıldı. Daha sonra hedef yapıların floresans kuantum

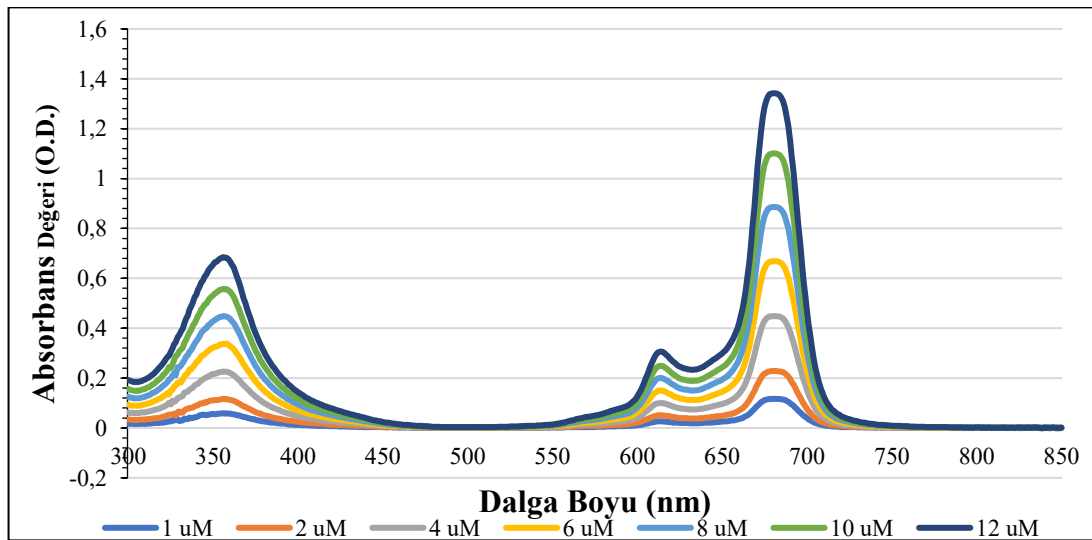
verimleri DMSO ortamında ve direkt singlet oksijen verimleri DMF ortamında araştırılarak gerekli hesaplamalar yapıldı. Bu kapsamda yapılan çalışmalara sırasıyla kısım 4.3.3 ve 4.3.4'te yer verilmiştir.

4.3.1. UV-Vis Spektrumlarının İncelenmesi

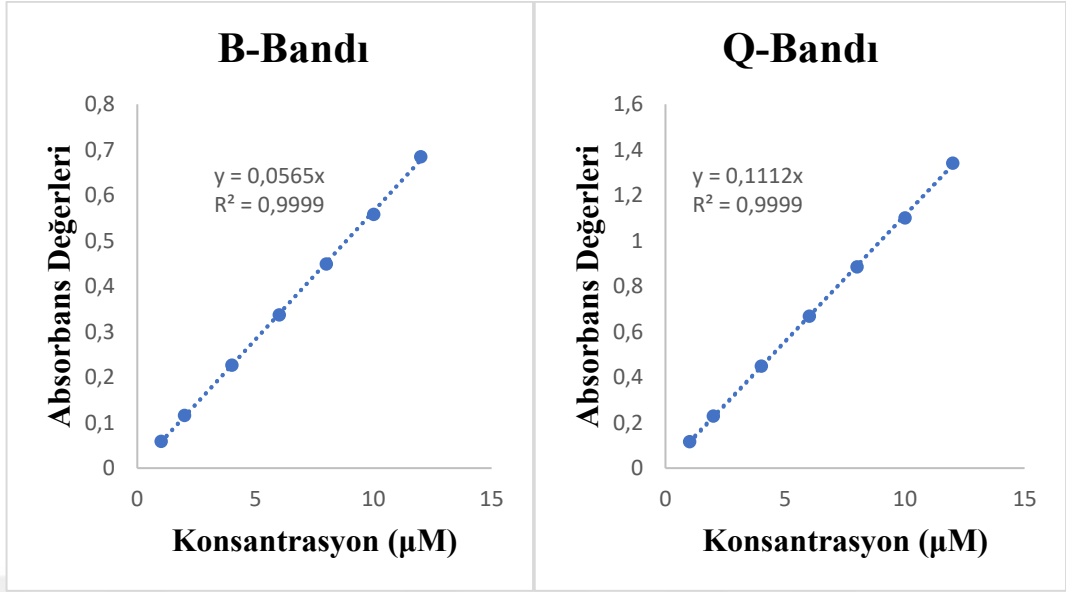
Ftalosiyanin türevlerinin daha önce bahsedildiği gibi J ve H-tip agregasyon eğilimleri olabilmektedir. Bu sebeple farklı konsantrasyonlarda ftalosiyanin türevi moleküller DMSO içerisinde çözülerek B-bandı ve Q-bandı için pik tepe noktaları belirlenerek, konsantrasyona karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilmiş ve değişimler incelenmiştir. Bu bantlarda meydana gelen kaymalar, pik yoğunlukları ve piklerin simetrisi gibi parametreler agregasyon hakkında bilgiler vermektedir. **10**, **12** ve **14** numaralı moleküller farklı konsantrasyonlarda DMSO içerisinde çözülerek ve 300-850 nm arasında UV-Vis ölçümleri alınmıştır.

Şekil 4.45'te verilen **10** numaralı moleküle ait spektrum incelendiğinde; en yüksek absorbans değerleri B-bandı için 356 nm ve Q-bandı için 681 nm olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.46'da verilen B ve Q bantlarına ait absorbansa karşı konsantrasyon grafikleri incelendiğinde; pik tepe noktalarında hipsokromik (maviye) ya da bathokromik (kırmızıya) kayma gözlemlenmemesi ve konsantrasyon ile absorbansın lineer olarak değişmesi, Lambert-Beer yasasına uygun olarak değişim gösterdiğini ve çalışılan konsantrasyon aralığında, DMSO içerisinde agregasyon davranışı sergilemediğini göstermektedir.

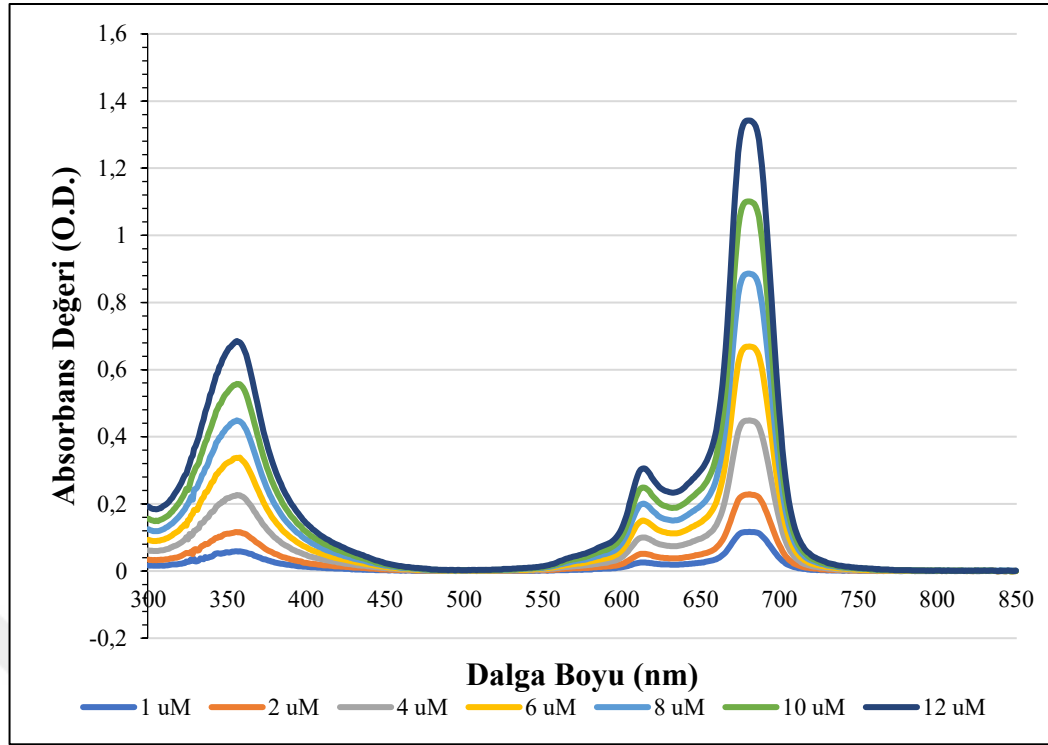


Şekil 4.45: **10** numaralı molekülün DMSO ortamında farklı konsantrasyonlardaki UV-Vis spektrumları.

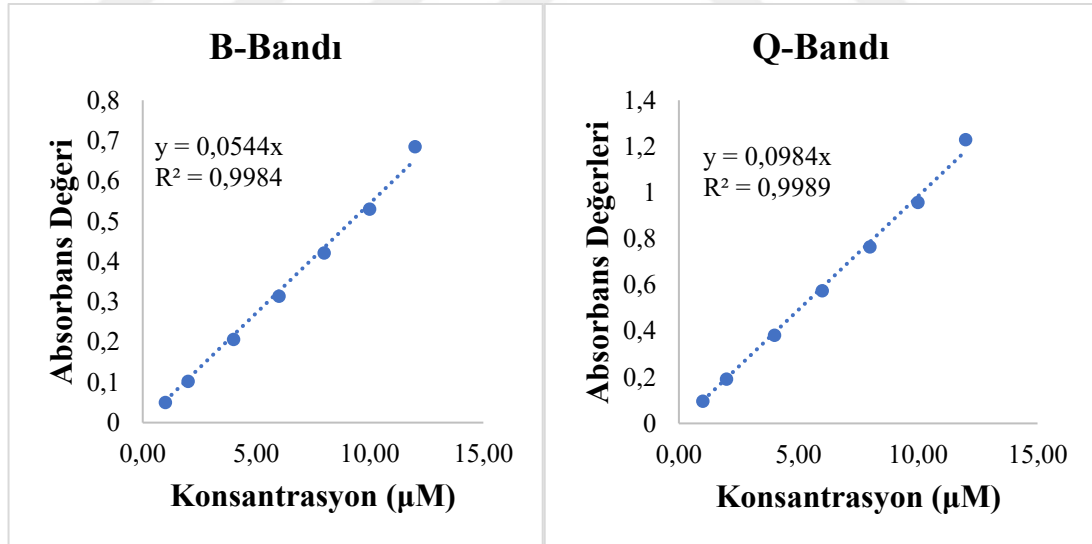


Şekil 4.46:10 numaralı bileşiğe ait absorbansa karşı konsantrasyon grafikleri ve korelasyon katsayısı.

Şekil 4.47'de verilen 12 numaralı moleküle ait spektrum incelendiğinde; en yüksek absorbans değerleri B-bandı için 356 nm ve Q-bandı için 682 nm olarak belirlenmiştir. **Şekil 4.48'**de verilen B ve Q bantlarına ait absorbansa karşı konsantrasyon grafikleri incelendiğinde; bileşik 10'a benzer şekilde hipsokromik ya da bathokromik kaymanın gözlemlenmemesi ve değişimin Lambert-Beer yasasına uygun olması, çalışılan konsantrasyon aralığında, DMSO içerisinde agregasyon davranışı sergilemediğini göstermektedir.



Şekil 4.47: 12 numaralı molekülün DMSO ortamında farklı konsantrasyonlardaki UV-Vis spektrumları.

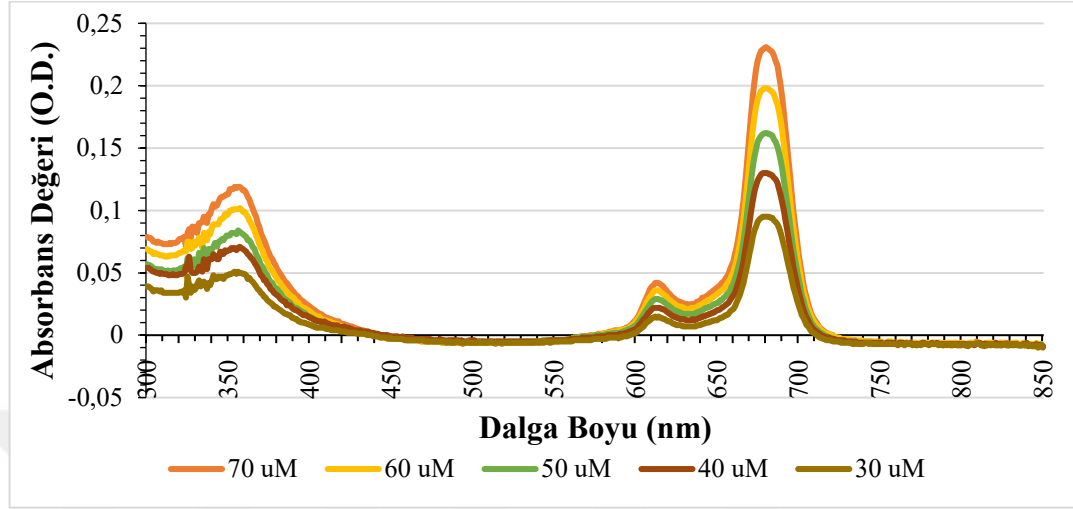


Şekil 4.48: 12 numaralı bileşiğe ait absorbansa karşı konsantrasyon grafikleri ve korelasyon katsayısı.

Şekil 4.49’da verilen 14 numaralı moleküle ait spektrum incelendiğinde; en yüksek absorbans değerleri B-bandı için 357 nm ve Q-bandı için 680 nm olarak belirlenmiştir.

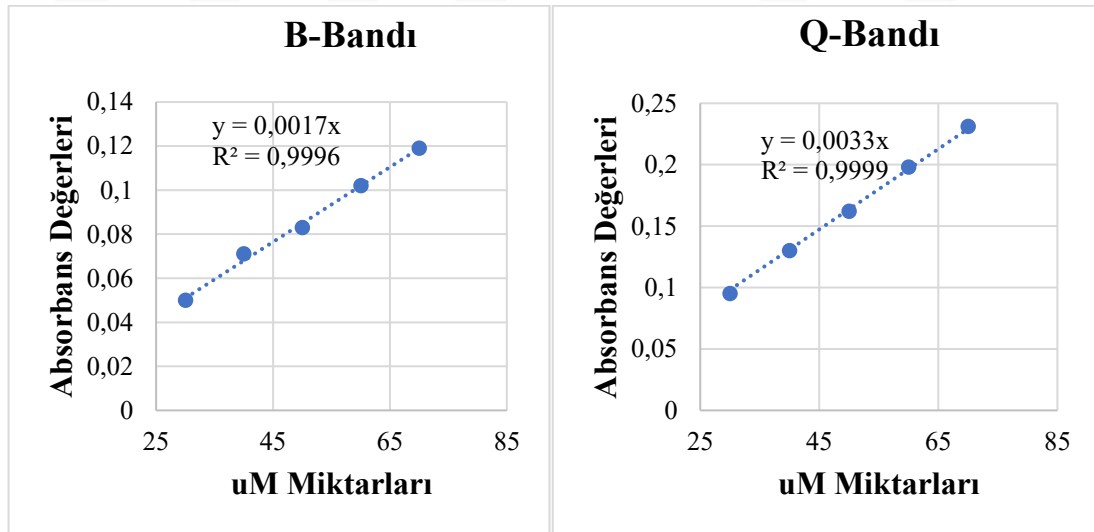
Şekil 4.50’de verilen B ve Q bantlarına ait absorbansa karşı konsantrasyon grafikleri incelendiğinde; önceki bileşiklere benzer şekilde hipsokromik ya da bathokromik

kaymanın gözlemlenmemesi ve değişimin Lambert-Beer yasasına uygun olması, çalışılan konsantrasyon aralığında, DMSO içerisinde agregasyon davranışı sergilemediğini göstermektedir.



Şekil 4.49: 14 numaralı molekülün DMSO ortamında farklı konsantrasyonlardaki UV-Vis spektrumları.

Sonuçlar, 14 numaralı molekülün B-bandı için en yüksek absorbans değeri olarak 357 nm ve Q-bandı için en yüksek absorbans değeri olarak 680 nm'yi göstermektedir.



Şekil 4.50: 14 numaralı bileşiğe ait absorbansa karşı konsantrasyon grafikleri ve korelasyon katsayısı.

Sentezlenen tüm ftalosiyanın türevlerine ait çalışılan konsantrasyonlarda DMSO ortamında elde edilen B ve Q bantları için absorbans değerleri, korelasyon katsayıları (R^2) ve hesaplanan molar absorbtivite kat sayılarına ait değerlere **Tablo 9**'da yer verilmiştir.

Tablo 9: 10, 12 ve 14 numaralı moleküllerin farklı derişimlerdeki B ve Q bantlarına ait UV-Vis verileri.

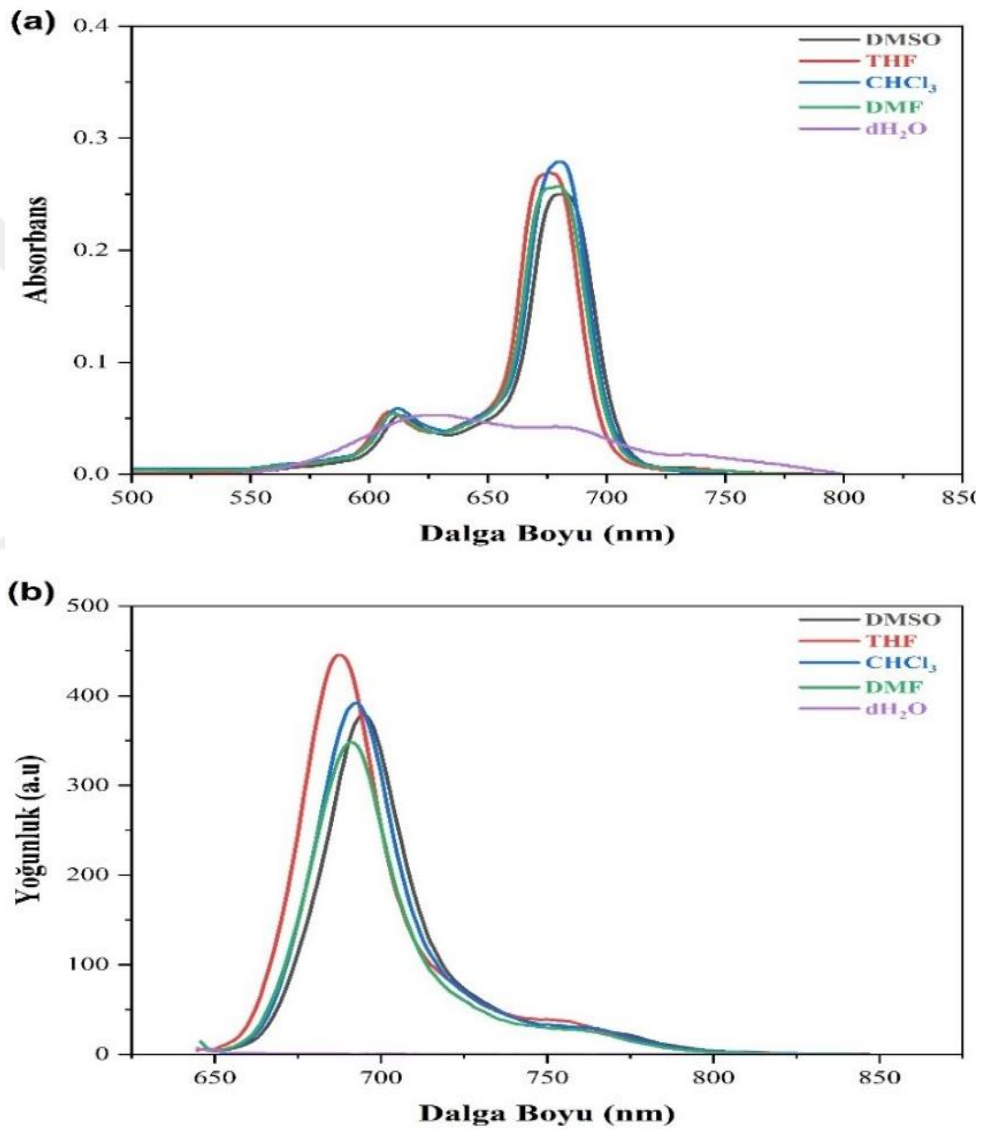
Madde Kodu	Derişim (μM)	Ab (B bandı)	R^2 (B-Bandı)	Log ϵ (B-Bandı)	Abs (Q-Bandı)	R^2 (Q-Bandı)	Log ϵ (Q-Bandı)
10	1	0,059			0,117		
	2	0,116			0,229		
	4	0,227			0,449		
	6	0,337	0,9999	4,75	0,669	0,999	5,05
	8	0,449			0,886		
	10	0,558			1,101		
	12	0,685			1,342		
12	1	0,05			0,096		
	2	0,103			0,193		
	4	0,207			0,383		
	6	0,314	0,9958	4,74	0,575	0,9966	4,99
	8	0,421			0,765		
	10	0,53			0,958		
	12	0,685			1,23		
14	70	0,119			0,231		
	60	0,102			0,198		
	50	0,083	0,9996	3,23	0,162	0,9999	3,52
	40	0,071			0,13		
	30	0,05			0,095		

4.3.2. UV-Vis ve Floresans Çalışması

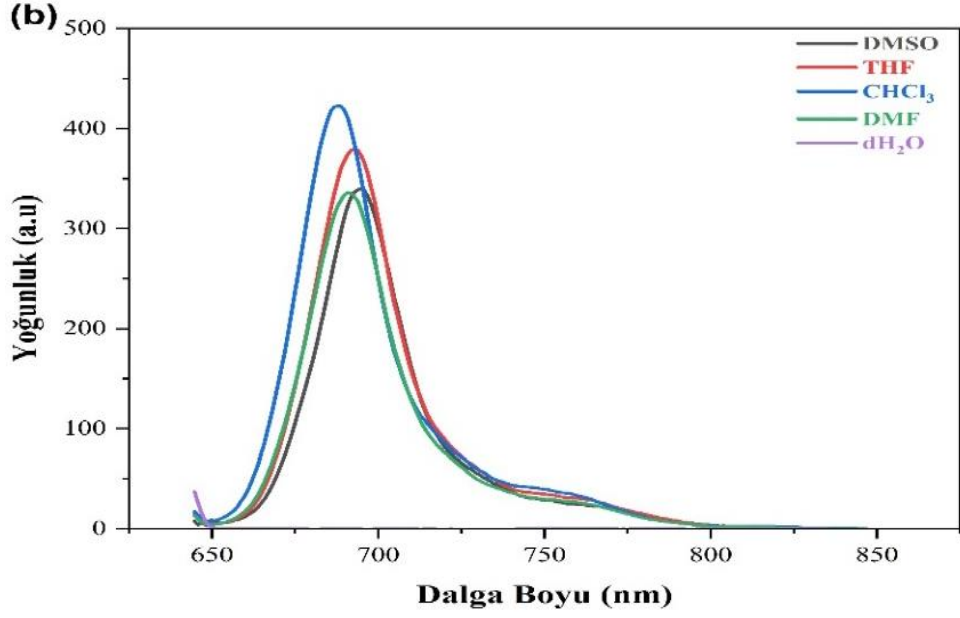
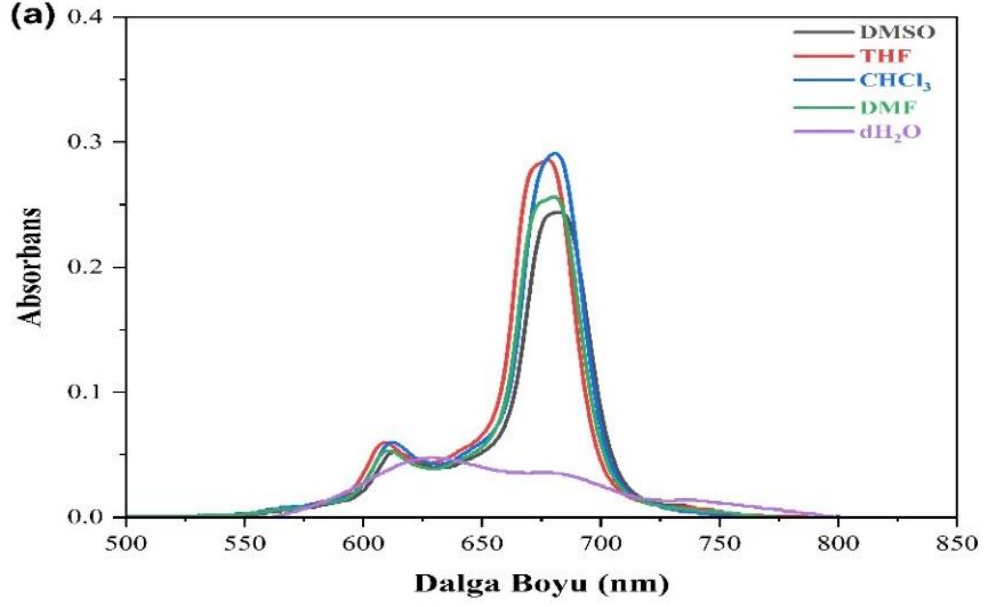
Sentezlenen tüm bileşiklerin farklı çözücü ortamlarında fotofiziksel davranışlarını araştırmak amacıyla; dimetilformamid (DMF), dimetilsülfoksit (DMSO), tetrahidrofuran (THF), kloroform (CHCl_3) ve distile su (dH_2O) kullanılarak 2 μM konsantrasyonda örnekler hazırlanmış UV-Vis ve tüm bileşikler 640 nm dalga boyundan uyarılarak floresans emisyon ölçümleri alınmıştır. Elde edilen spektrumlara Şekil 4.51, 4.52 ve 4.53'te yer verilmiştir.

Sentezlenen tüm bileşiklerde farklı solvent ortamlarında UV-Vis ve emisyon davranışlarının benzer şekilde değiştiği gözlemlenmiştir. DMSO, THF, CHCl_3 ve DMF ortamlarında Q bantlarında meydana gelen hem absorbans hem de emisyon şiddetlerindeki değişimlerin ufak kaymalar halinde gözlemlenmesi, moleküllerin bu çözücüler içerisinde benzer fotofiziksel davranışlar sergilediğini göstermektedir. Fakat destile su içerisinde alınan absorbans ölçümlerinde pik tepe noktalarının daha düşük

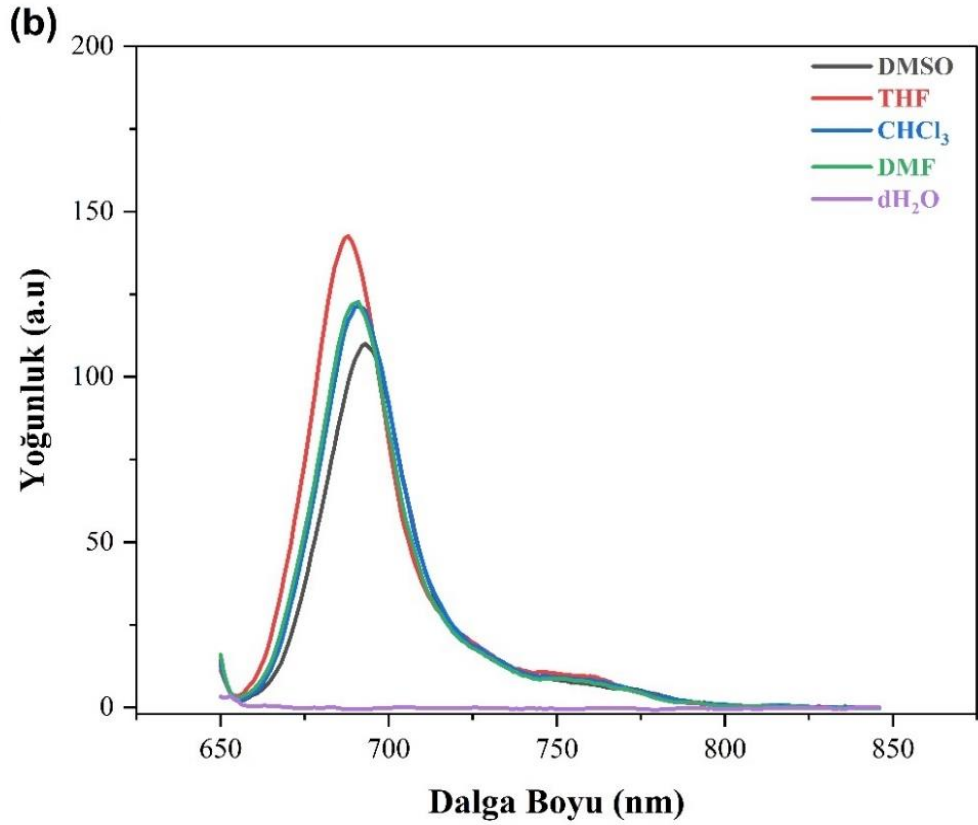
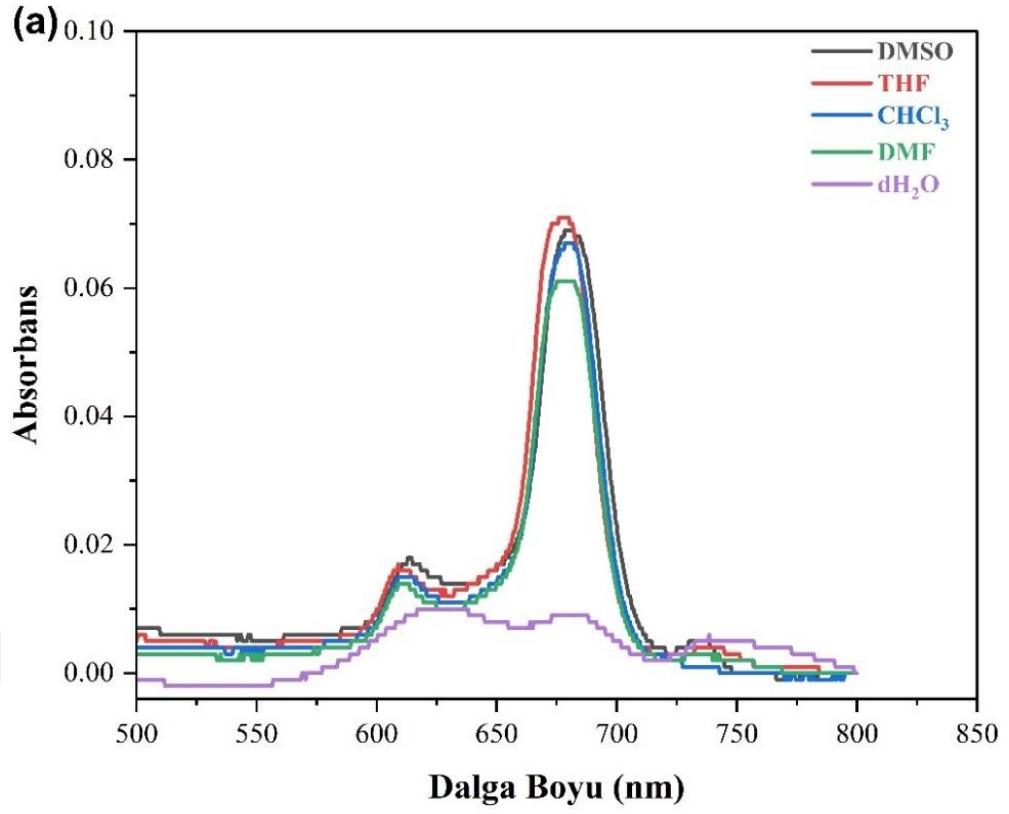
şiddette ve hipsokromik kayma (maviye kayma) şeklinde gözlemlenmesi; ayrıca emisyon şiddetlerinin (sıfıra yakın) sönümlenmesi; **10**, **12** ve **14** numaralı moleküllerin distile su ortamında aynı konsantrasyonda çözünürlüklerinin azaldığını ve yüz yüze π - π etkileşimlerinin baskın hale gelerek H tipi agregasyona uğradığını göstermektedir. Yapılan ölçümler sırasında kaydedilen maksimum absorbans (λ_{max}^{abs}), maksimum floresans (λ_{max}^{em}) ve stokes kayması (Δ_{ST}) değerlerine ait verilere **Tablo 10**'da yer verilmiştir.



Şekil 4.51: Farklı çözücü ortamlarında 2 μ M konsantrasyonda **10** numaralı moleküle ait a) UV-Vis, b) floresans spektrumları.



Şekil 4.52: Farklı çözücü ortamlarında 2 μ M konsantrasyonda 12 numaralı moleküle ait a) UV-Vis, b) floresans spektrumları.



Şekil 4.53: Farklı çözücü ortamlarında 2 μ M konsantrasyonda **14** numaralı moleküle ait a) UV-Vis, b) floresans spektrumları.

Tablo 10: Farklı çözücülerde 10, 12 ve 14 numaralı moleküllerin maksimum absorbans verdiği dalga boyları.

Madde Kodu	Çözücü	λ_{max}^{abs} (nm)	λ_{max}^{em} (nm)	Δ_{ST}^{em} (nm)
10	DMSO	681	695	14
	THF	676	688	12
	CHCl ₃	680	693	13
	DMF	680	691	11
	dH ₂ O	628	-	-
12	DMSO	682	695	13
	THF	677	688	11
	CHCl ₃	680	693	13
	DMF	679	691	12
	dH ₂ O	627	-	-
14	DMSO	680	693	13
	THF	679	688	9
	CHCl ₃	680	691	11
	DMF	678	691	13
	dH ₂ O	628	-	-

4.3.3. Floresans Kuantum Verimleri

Sentezlenen tüm ftalosiyanın türevleri için DMSO içerisinde sabit konsantrasyonda (2µM) çözeltiler hazırlanarak 640 nm uyarma dalga boyundan uyarılarak, 645- 800 nm aralığında floresans ölçümleri kaydedilmiştir. Elde edilen spektrumlardan floresans kuantum verimlerini hesaplayabilmek için süstitüe grup bulundurmeyen Zn-ftalosiyanın (unSub-ZnPc) bileşiği de aynı konsantrasyonda ve çözücünde hazırlanarak aynı dalga boyundan uyarılmış ve floresans ölçümleri kaydedilmiştir. UnSub-ZnPc bileşiğine ait floresans kuantum verimi DMSO içerisinde 0.20 olarak kullanılmış [54] ve hesaplamalar Eşitlik 4.1’de verilen formül vasıtasıyla bağımlı değişken olarak hesaplanmıştır.

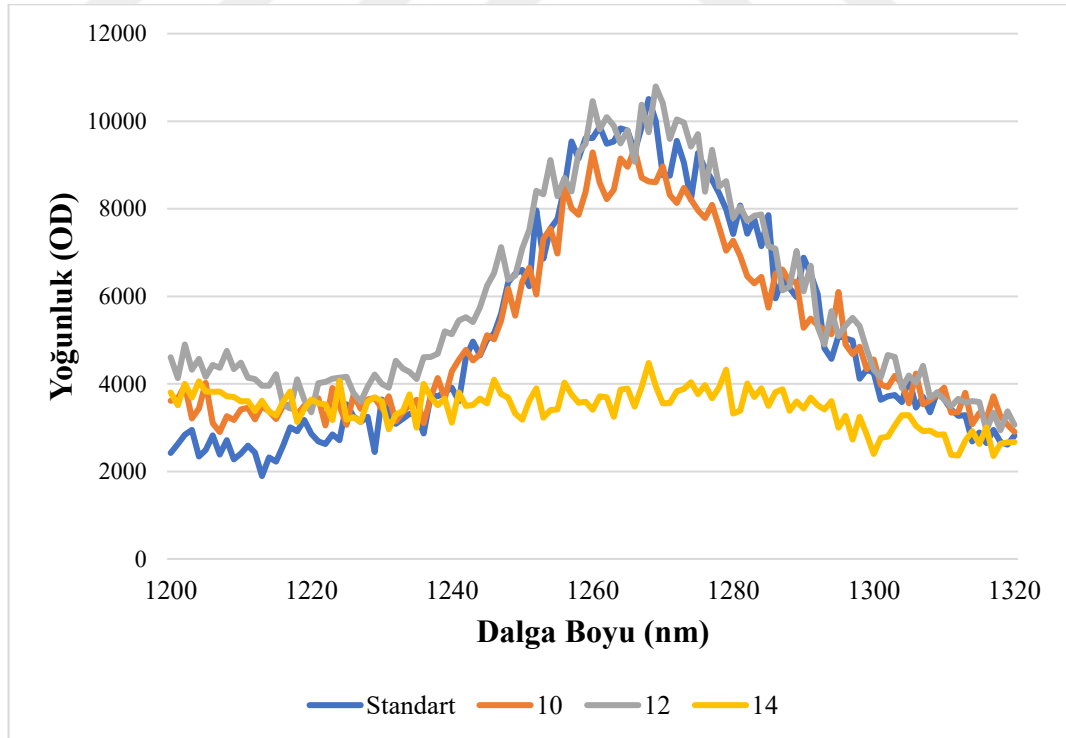
$$\Phi_{Fn} = \Phi_{Fstd} \times \left(\frac{\eta_n^2}{\eta_s^2}\right) \times \left(\frac{A_s}{A_n}\right) \times \left(\frac{F_n}{F_s}\right) \quad (4.1)$$

Burada; Φ_{Fn} ve Φ_{Fs} sırasıyla örneğin ve standardın floresans kuantum verimini, η_n ve η_s örnek ve standardın çözüldüğü çözücünün refraktif indeksini, A_n ve A_s örnek ve standardın absorbansını ve F_n ve F_s ise örnek ve standardın grafik alanlarını temsil

etmektedir. Tüm moleküller aynı çözücüde çalışıldığı için refraktif indeksler hesaba dahil edilmemişlerdir. Hesaplamalar sonucunda sentezlenen tüm moleküllerin floresans kuantum verimleri standarttan daha yüksek olup, en düşük floresans kuantum verimi ise **14** numaralı moleküle ait olduğu belirlenmiştir. Floresans kuantum verimlerine ait sonuçlar **Tablo 11**'de singlet oksijen dataları ile beraber verilmiştir.

4.3.4. Singlet Oksijen Kuantum Verimi

Singlet oksijen kuantum ölçümü, ışığa duyarlı bir molekülün temel halde bulunan oksijen atomunu ($^3O_2$), singlet oksijen $^1O_2$ formuna çevirebilmesi prensibine dayanmaktadır. Literatürde bilinen iki farklı metot olan direkt ve indirekt metotlar vasıtasıyla belirlenebilir. Tez kapsamında, direkt metot kullanılarak, ftalosiyanin türevlerinin uygun dalga boylarından uyarılması ile ortamda bulunan triplet oksijenin $^1O_2$ formuna dönüşen kararsız oksijen türünün temel hal enerji seviyesine dönerken yaydığı yakın kızılötesi (NIR) fotoluminesans (~ 1270 nm) sinyalleri Horiba-Jobin Yvon-SPEX Fluorog 3-2iHR spektrofotometre cihazı vasıtasıyla kaydedilmiştir. Elde edilen spektrumlar **Şekil 4.54**'te verilmiştir.



Şekil 4.54: DMF çözücü ortamında alınan direkt singlet oksijen spektrumları.

Bu yöntemde ftalosiyenin türevleri ışığa duyarlılaştırıcı bileşik olarak kullanılmak amacıyla her biri DMF ortamında ve 0.23 absorbans değerinde olacak şekilde hazırlanmıştır. Singlet oksijen kuantum verimi hesaplamalarında standart olarak kullanılmak üzere unSub-ZnPc çözeltisi de aynı koşullarda hazırlanmıştır. Tüm bileşikler kendi absorbans maksimumundan uyarılarak 1200-1350 nm aralığında spektrumlar kaydedilmiştir. Singlet oksijen kuantum verimini hesaplayabilmek için unSub-ZnPc değeri 0.56 [54] olarak kullanılarak Eşitlik 4.2’de verilen formül aracılığıyla hesaplanmıştır.

$$\Phi_{\Delta n} = \Phi_{\Delta std} \times \left(\frac{\eta_n^2}{\eta_s^2}\right) \times \left(\frac{A_s}{A_n}\right) \times \left(\frac{I_n}{I_s}\right) \quad (4.2)$$

Burada; $\Phi_{\Delta n}$ ve $\Phi_{\Delta s}$ sırasıyla örneğin ve standardın singlet oksijen kuantum verimini, η_n ve η_s örnek ve standardın çözöldüğü çözücünün refraktif indeksini, A_n ve A_s örnek ve standardın absorbansını ve I_n ve I_s ise örnek ve standardın grafik alanlarını temsil etmektedir. Tüm moleküller aynı çözöcöde çalışıldığı için refraktif indeksler hesaba dahil edilmemişlerdir. Sentezlenen bileşiklere ait fotofiziksel ve fotokimyasal parametrelere **Tablo 11**’de yer verilmiştir.

Tablo 11: Sentezlenen bileşiklere ait fotofiziksel ve fotokimyasal parametreler.

Molekül No	$\lambda_{max}^{Abs(Q)}$ (DMSO)	λ_{ex} (DMSO)	Φ_F (DMSO)	Φ_{Δ}^{direct} (DMF)
Standart	672	640	0,20	0,56
10	681	640	0,27	0,56
12	682	640	0,22	0,64
14	680	640	0,21	0

4.4. Biyolojik Deneyler

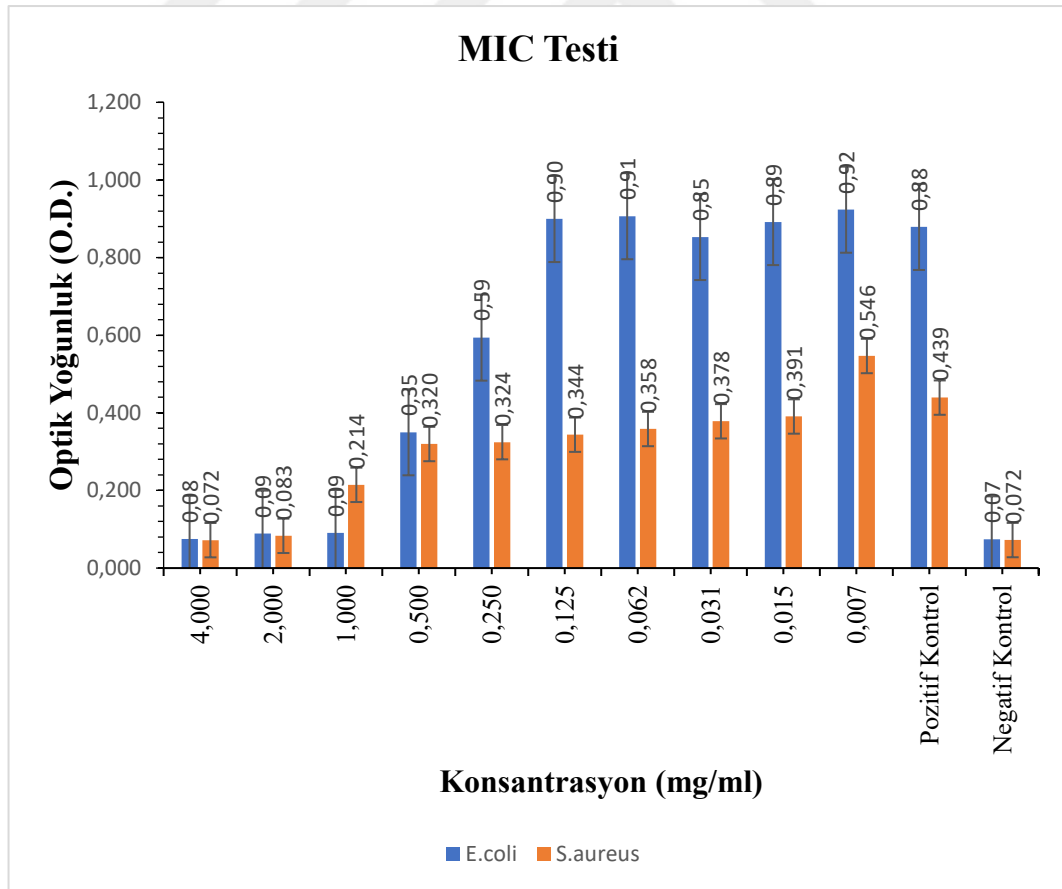
4.4.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC)

MIC testi için gram negatif olarak *E. coli* ve gram pozitif olarak *S. aureus* bakterileri iki tekrarlı şekilde 96 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. Bu ekimlerde ekilen bakteri yoğunluğu sabit kalıp içlerine eklenen peptit konsantrasyonu değiştirilerek peptitlerin bakterilere etkisi için minimum inhibisyon konsantrasyonu belirlendi. MIC testi için

absorbans yoğunluğu ölçüldü. Kullanılan peptit konsantrasyonuna göre büyüme oranları Tablo 12 ve Şekil 4.55'te verilmiştir.

Tablo 12: MIC testi sonuçları.

Konsantrasyonlar (mg/ml)	<i>E. coli</i> (Ortalama)	<i>S. aureus</i> (Ortalama)
4,000	0,075	0,072
2,000	0,089	0,083
1,000	0,090	0,214
0,500	0,350	0,320
0,250	0,594	0,324
0,125	0,899	0,344
0,062	0,907	0,358
0,031	0,853	0,378
0,015	0,892	0,391
0,007	0,923	0,546
Pozitif Kontrol	0,879	0,439
Negatif Kontrol	0,074	0,072

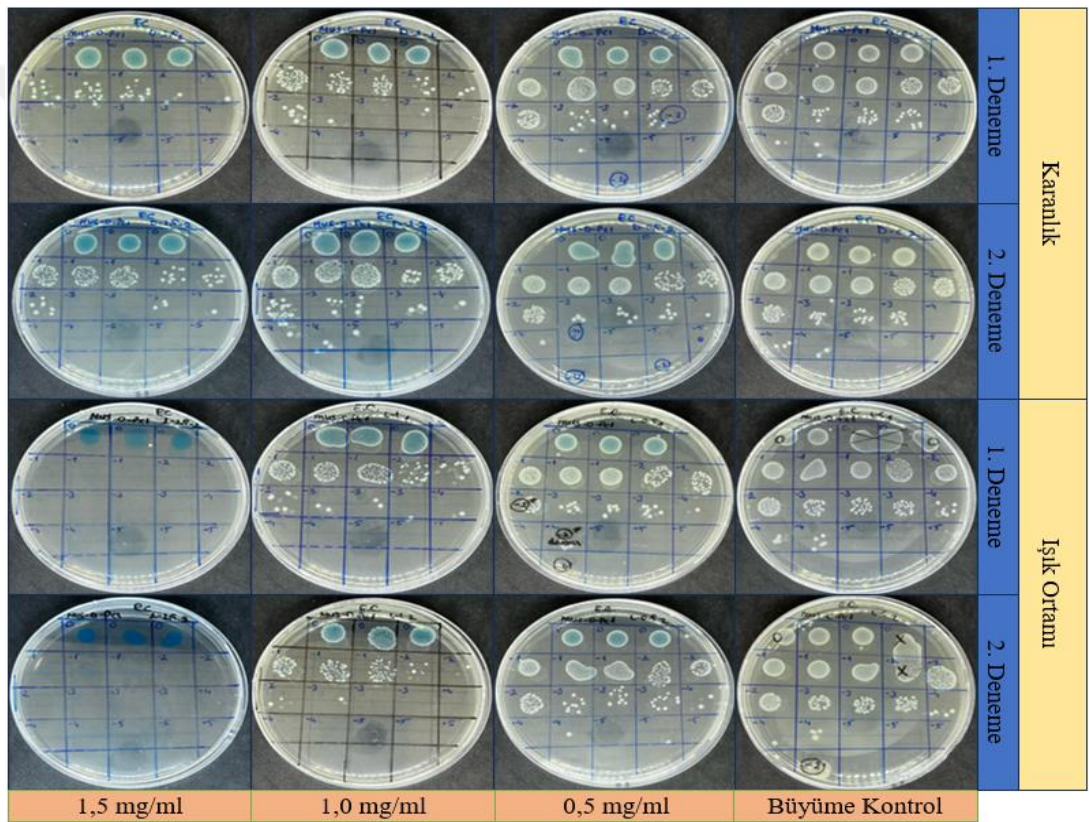


Şekil 4.55: MIC testi sonuçlarının grafiği.

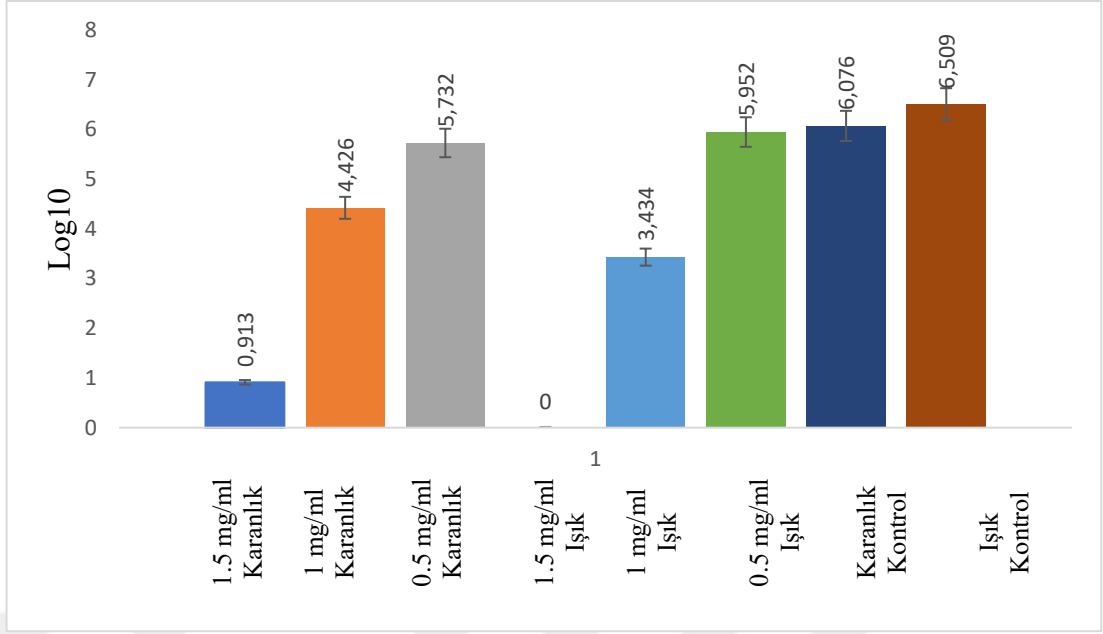
Sonuçlara göre peptitin minimum inhibisyon konsantrasyonu *E. coli* için 1 mg/ml ve *S. aureus* için 2 mg/ml olarak belirlenmiştir.

4.4.2. Anti-Mikrobiyal Fotodinamik Terapi

Antimikrobiyal fotodinamik terapi çalışmaları için 10, 12 ve 14 numaralı moleküllerden 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml ve 1,5 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlandı ve ekim sonrası üreme ile sayılabilir (1-25 arası) koloni hücreleri seçilerek seyreltme katsayısı ve koloni sayısı çarpımı elde edildi. Logaritmaları alınarak grafikleri oluşturuldu.

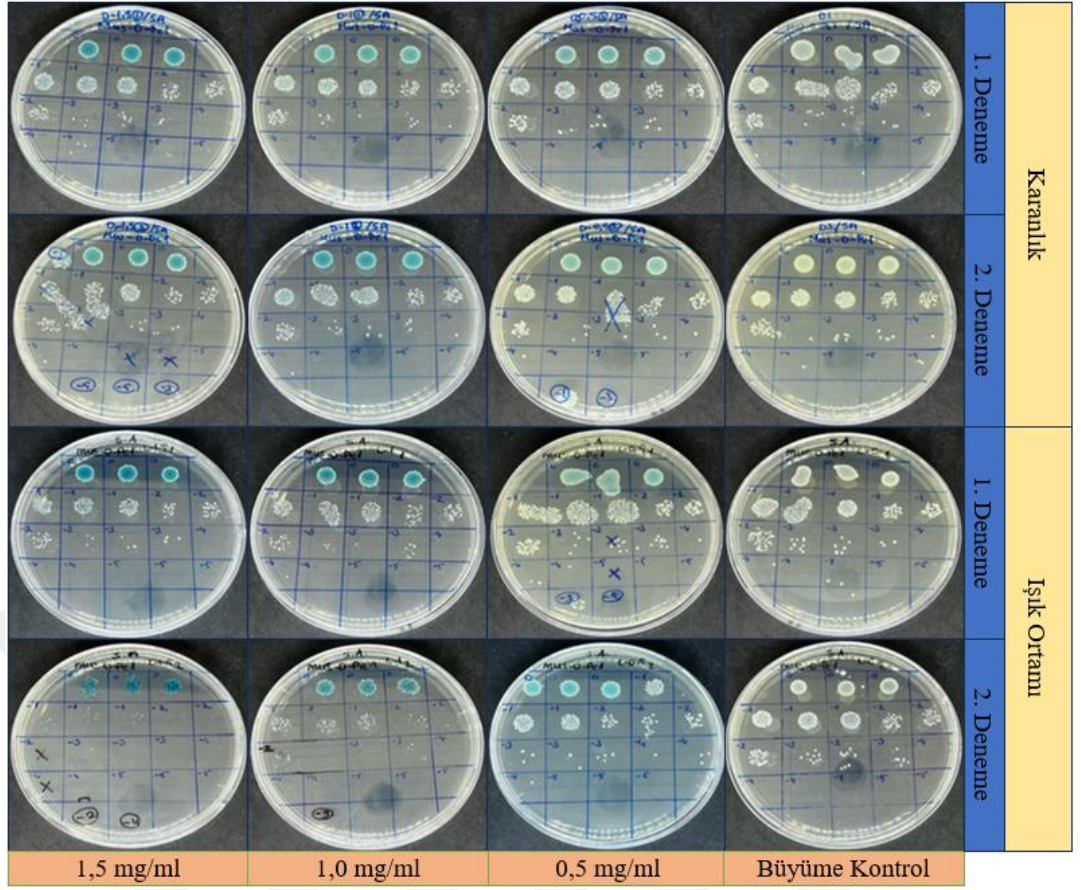


Şekil 4.56: 10 numaralı molekülün *E. coli* üzerindeki fotodinamik etkileri.

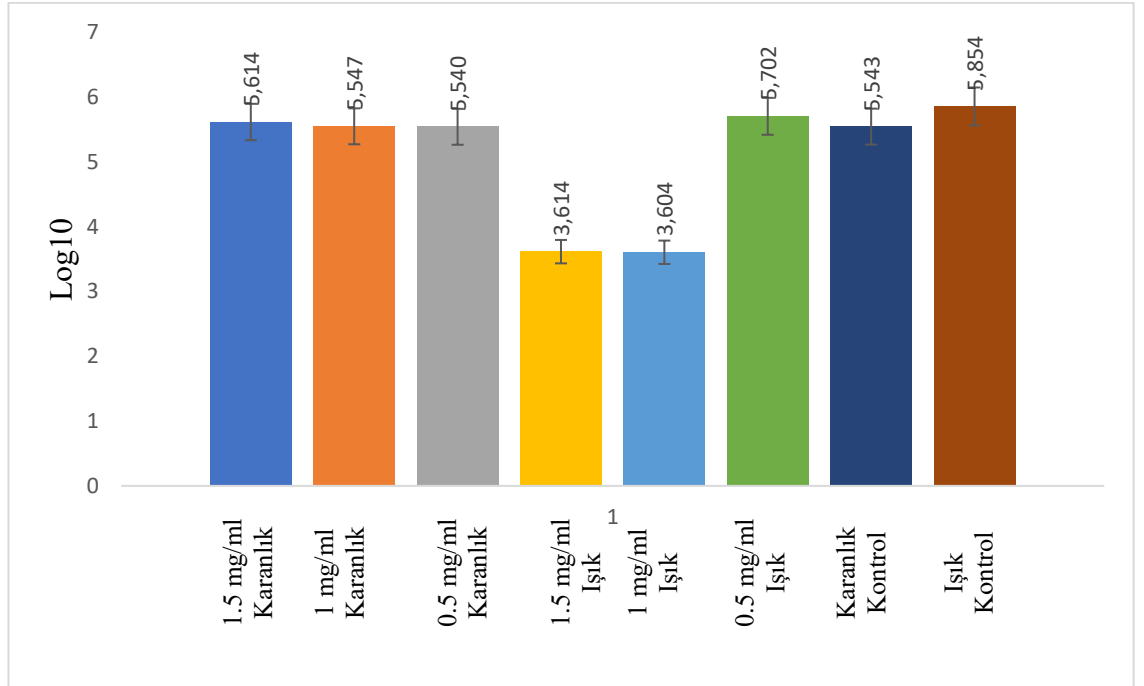


Şekil 4.57: **10** numaralı molekülün fotodinamik olarak *E. coli*'nin büyümesine etkisi.

Bakteri sayımları ve oluşturulan grafikler incelendiğinde, **10** numaralı molekülün *E. coli* için 1.5 mg/ml konsantrasyonda yüksek karanlık toksisitesi olduğunu ve ışık uygulaması sonucu ise bu konsantrasyonda hücrelerin tamamının öldüğünü söyleyebiliriz. 1 mg/ml konsantrasyonu incelendiğinde, bileşiğin karanlık ortamda yaklaşık 1.6 log'luk hücre azalmasına neden olduğu, ancak ışık uygulaması yapıldığında etkisinin artarak yaklaşık 3 log'luk düşüşe neden olarak oldukça etkili bir hücre ölümünü sağladığını görebiliriz. 0.5 mg/ml konsantrasyonun ise *E. coli* üzerinde bakterisidal bir etki oluşturmadığı görülmektedir.

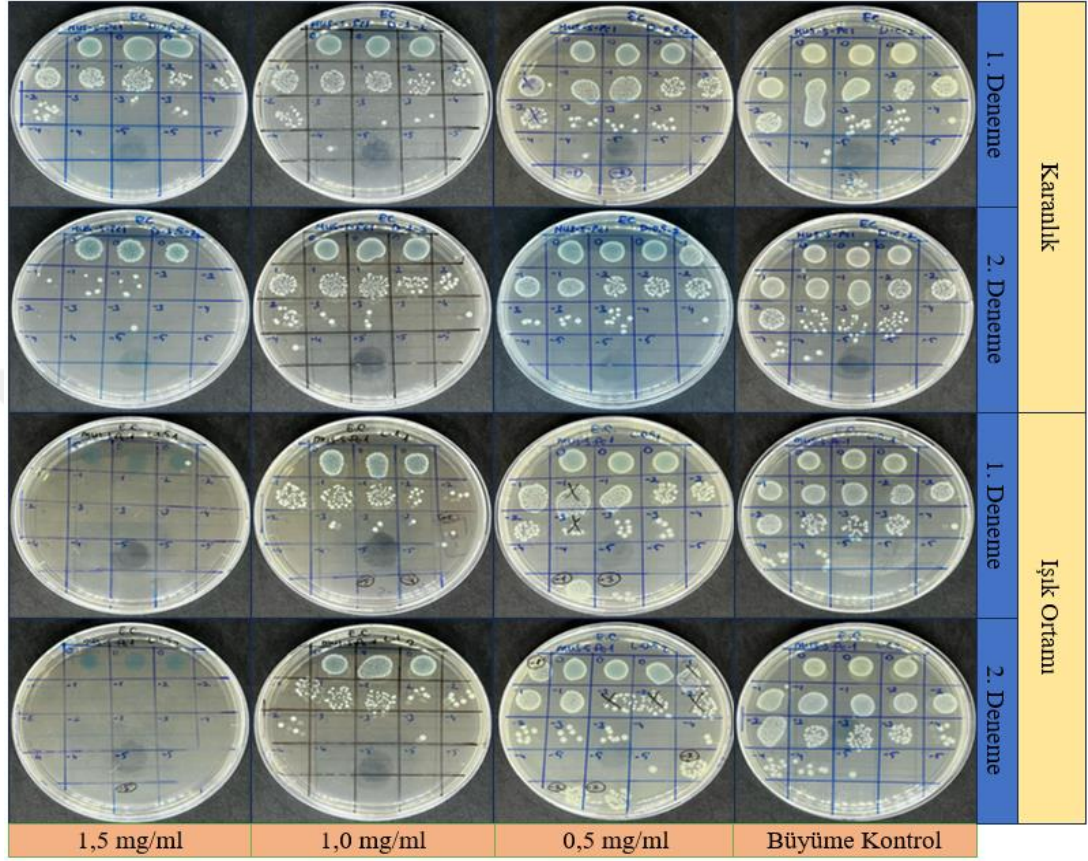


Şekil 4.58: 10 numaralı molekülün *S. aureus* üzerindeki fotodinamik etkileri.

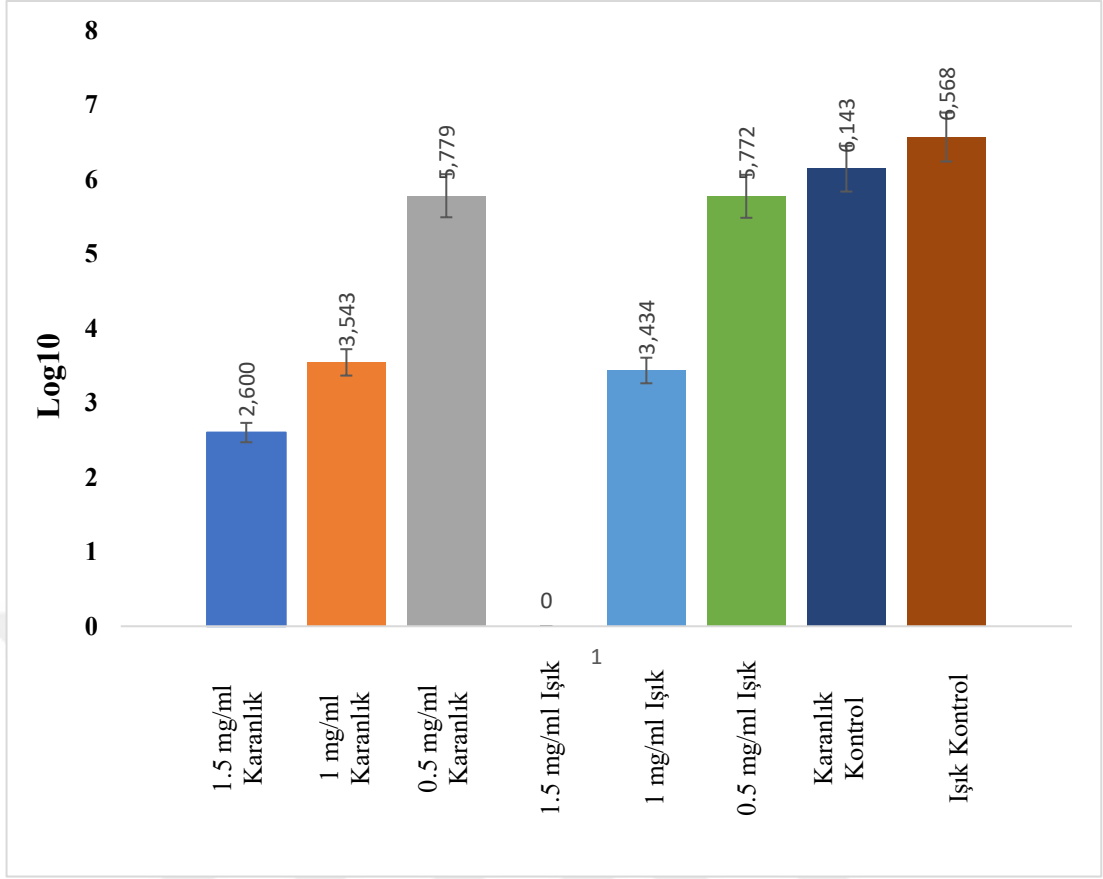


Şekil 4.59: 10 numaralı molekülün fotodinamik olarak *S. aureus*'un büyümesine etkisi.

10 numaralı bileşğin *S. aureus* üzerinde karanlık toksisitesinin olmadığını ve 1.5 ile 1.0 mg/ml konsantrasyonda yaklaşık 2.2 log'luk hücre azalmasına neden olarak anlamlı bir fotodinamik etki gösterdiğini görmekteyiz.

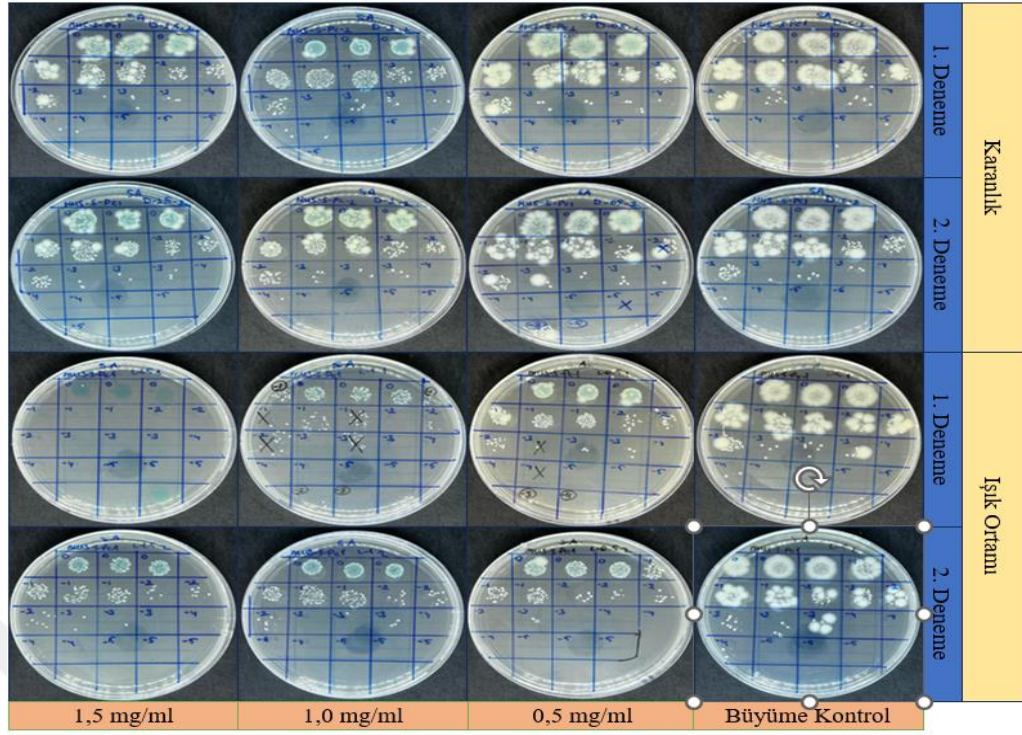


Şekil 4.60: 12 numaralı molekülün *E. coli* üzerindeki fotodinamik etkileri.

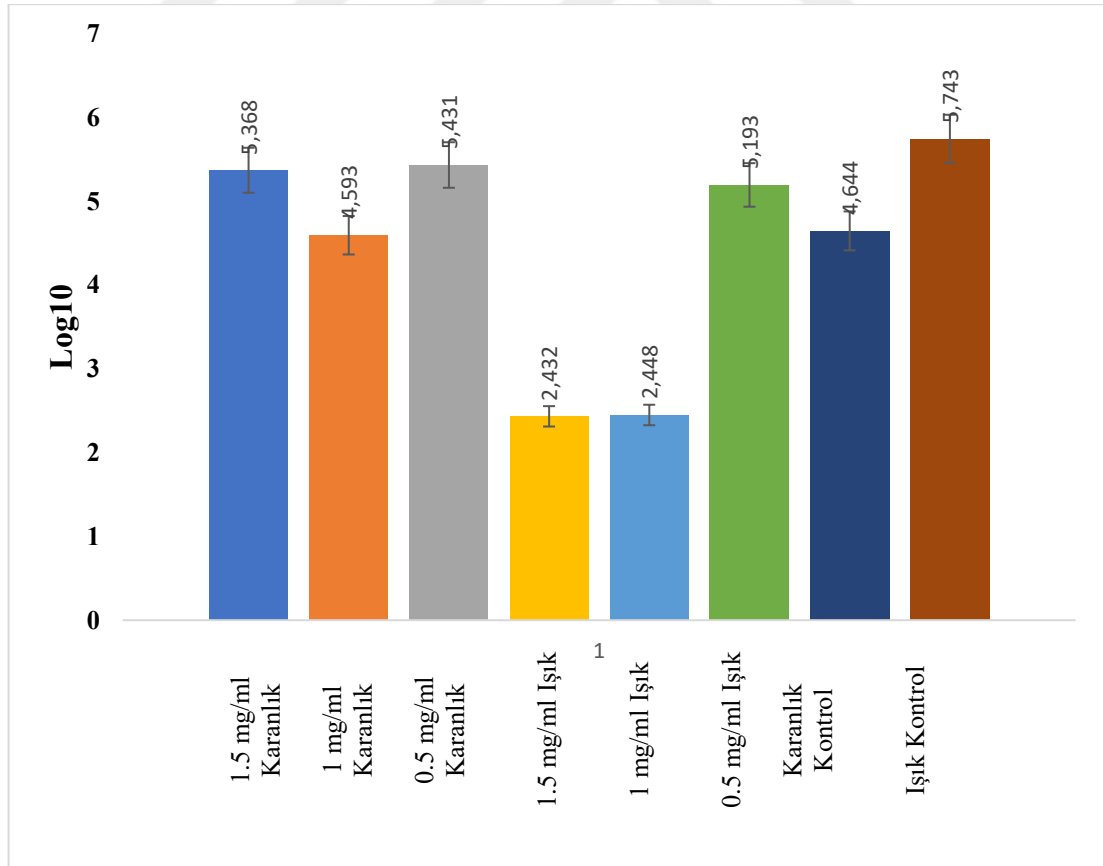


Şekil 4.61: 12 numaralı molekülün fotodinamik olarak *E. coli*'nin büyümesine etkisi.

12 numaralı bileşiğin fotodinamik etkisini incelediğimizde, yine 1.5 ve 1.0 mg/ml konsantrasyonda karanlık toksisitesi olduğunu görmekteyiz. 1.0 mg/ml konsantrasyonun hem karanlık hem de ışık ortamında sırasıyla yaklaşık 2.6 ve 3.1 log'luk azalış ile yakın miktarlarda hücre ölümüne neden olduğunu bu sebeple bu konsantrasyonda fotodinamik bir etki göstermediğini söylemek mümkün. Bununla beraber 1.5 m/ml konsantrasyonda ışık uygulaması sonrası hiç üreme olmaması bu konsantrasyonda 12 numaralı bileşiğin *E. coli* üzerinde fotodinamik etkisi olduğu gösterilmektedir.

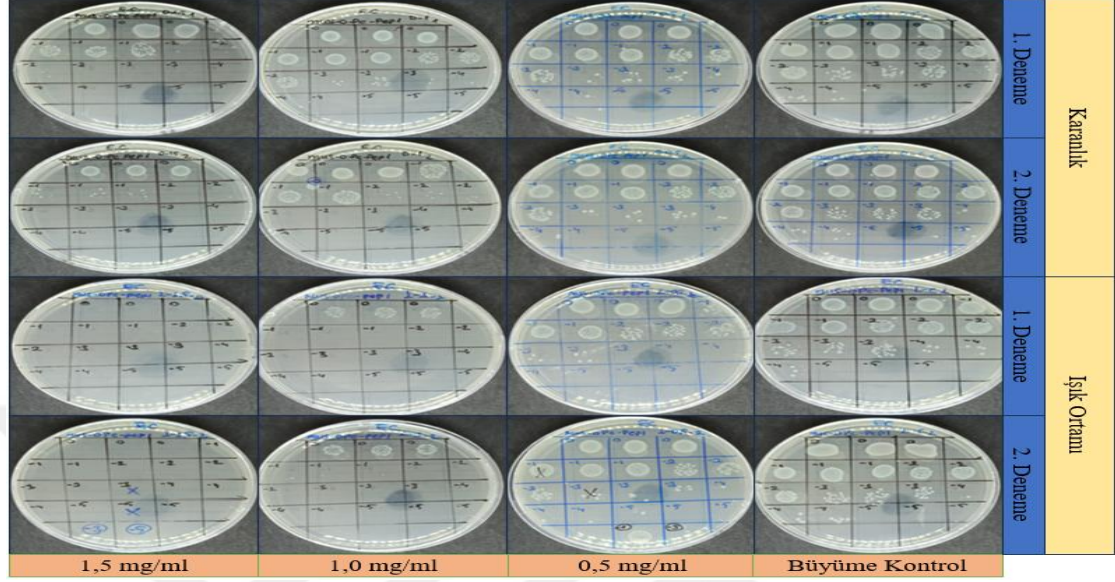


Şekil 4.62: 12 numaralı molekülün *S. aureus* üzerindeki fotodinamik etkileri.

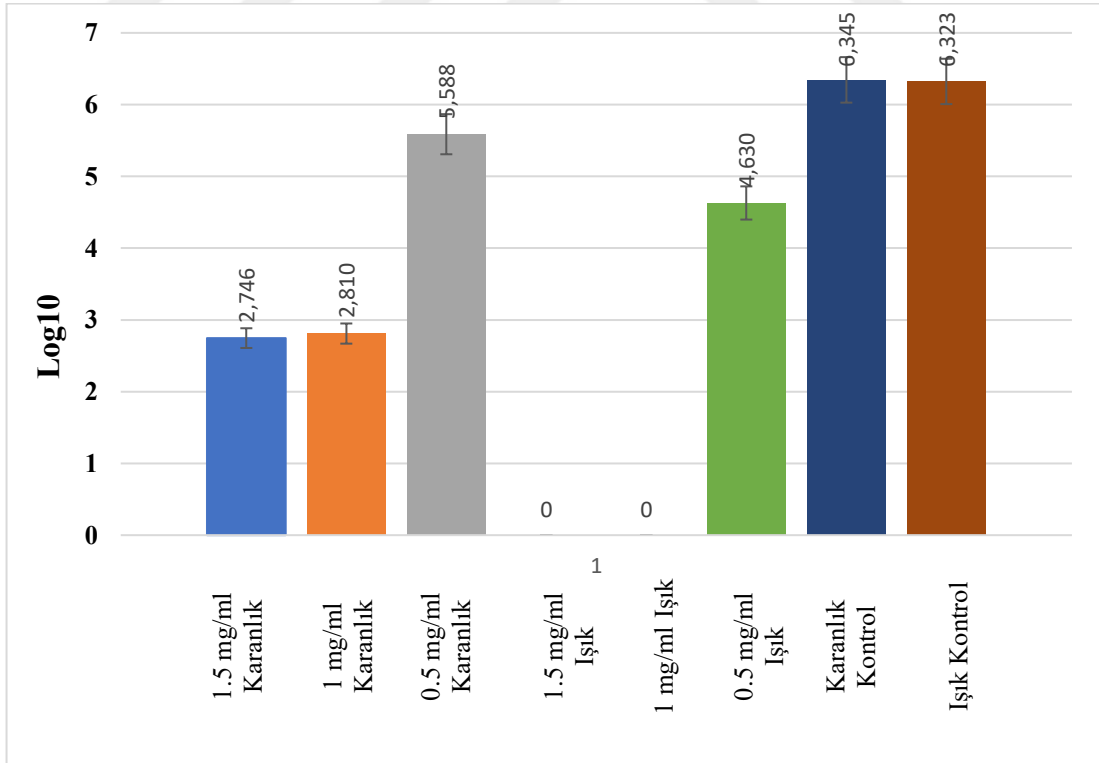


Şekil 4.63: 12 numaralı molekülün fotodinamik olarak *S. aureus*'un büyümesine etkisi.

12 numaralı bileşiğin *S.aureus* üzerinde 1.5 ve 1.0 mg/ml konsantrasyonda yaklaşık 3.3. log'luk hücre sayısı azalışına neden olarak fotodinamik bir etki gösterdiğini ve karanlık toksisitesinin olmadığını söyleyebiliriz.

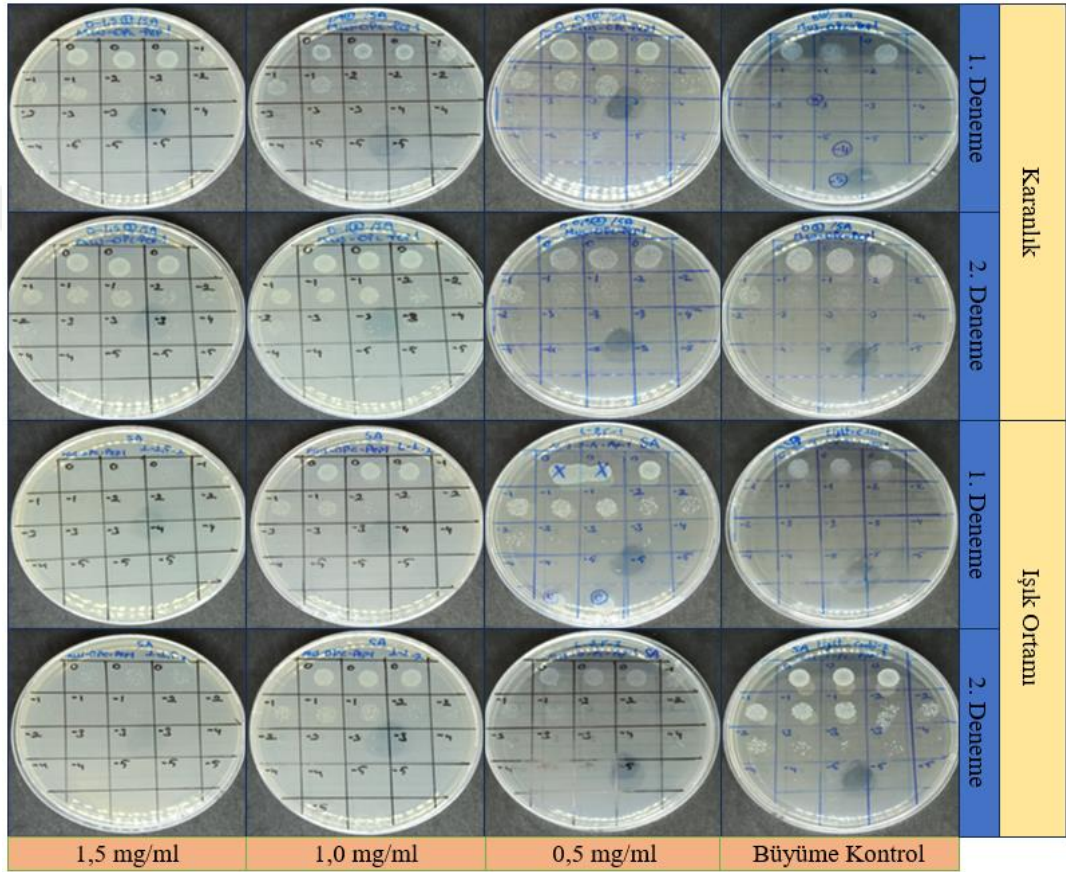


Şekil 4.64: 14 numaralı molekülün *E. coli* üzerindeki fotodinamik etkileri.

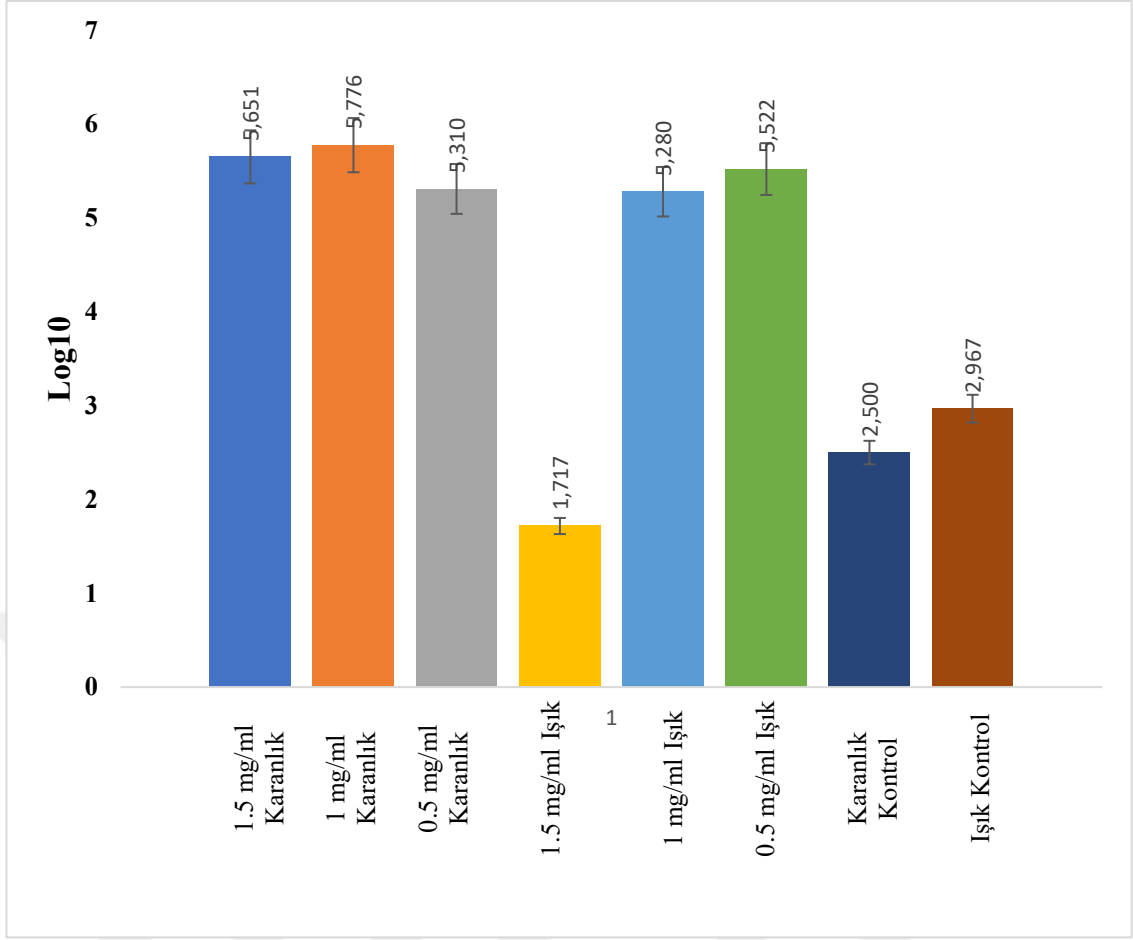


Şekil 4.65: 14 numaralı molekülün fotodinamik olarak *E. coli*'nin büyümesine etkisi.

14 numaralı (peptitli) Pc molekülünün fotodinamik etkisi incelendiğinde 1.5 ve 1.0 mg/ml konsantrasyonda *E. coli* hücre sayısında yaklaşık 3.6 log'luk azalışa neden olarak karanlık toksisite gösterdiğini söylenebilir. Ancak şaşırtıcı şekilde peptitsiz Pc analoguna göre (10 numaralı Pc) daha az karanlık toksisitesi olduğu görülmektedir. Bununla birlikte özellikle 1.0 mg/ml konsantrasyonda bakterisidal etki göstererek hücre sayısını sıfırlaması, **14** numaralı molekülün *E. coli* üzerinde çift etki gösterdiğini bizlere göstermektedir.



Şekil 4.66: **14** numaralı molekülün *S. aureus* üzerindeki fotodinamik etkileri.



Şekil 4.67: 14 numaralı molekülün fotodinamik olarak *S. aureus*'un büyümesine etkisi.

14 numaralı molekülün kontrol grupları ile karşılaştırıldığında *S.aureus* üzerinde anlamlı bir fotodinamik etkisinin olmadığını söyleyebiliriz.

Sonuçlar değerlendirildiğinde tüm bileşiklerin gram negatif bakterilerde daha etkili olduğu görülmüştür. Tüm bileşiklerde 1,5 mg/ml konsantrasyon en çok fotodinamik etkiye sahip konsantrasyon olarak gözlemlenmiştir ve aynı zamanda *E.coli* üzerinde bu konsantrasyonun karanlık toksisitesi olduğu da gösterilmiştir. 14 numaralı bileşiğin hem 1,5 mg/ml hem de 1,0 mg/ml konsantrasyonlarda *E. coli* hücrelerinde sayılabilir koloni miktarı oluşmamasını sağladığı tespit edildi.

5.TARTIŞMA

Bu tez kapsamında, asimetrik (**10**, **12** ve **14** numaralı bileşikler) ve peptit bağlı ftalosiyanin türevi bileşik (**14** numaralı bileşik) sentezlenerek aPDT etkisi araştırılmıştır. Literatürde daha önceden buna benzer bileşikler sentezlenmiş ve etkileri in vitro olarak incelenmiştir. Sentezlenen tüm bileşiklerin FT-IR, Kütle, ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumları alınarak karakterize edilmişlerdir.

Ftalosiyanin sentezi için başlangıç maddeleri sentezlendikten sonra karakterizasyonları yapılmış ve bu moleküller kullanılarak ftalosiyanin sentezleri gerçekleştirilmiştir.

Ftalosiyaninlerin UV-Vis ve floresans ölçümleri yapılmış, floresans kuantum verimi ile singlet oksijen kuantum verimleri hesaplanmıştır. Ölçümleri yapılan moleküllerden **10** ve **12** numaralı bileşiklerin singlet oksijen kuantum verimleri, kullanılan standart ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir verimi olduğu gözlemlenmiş ve **14** numaralı molekülün ise neredeyse hiç singlet oksijen üretmediği tespit edilmiştir. Yine floresans kuantum verimi ölçümlerinde tüm bileşiklerin standarda göre daha az floresans kuantum verimi olduğu görülmekle birlikte **14** numaralı bileşiğin de yine en az floresans kuantum verimine sahip olduğu görülmüştür.

UV-Vis ve floresans ölçümlerinde **10** ve **14** numaralı bileşiklerin THF içerisinde ve **12** numaralı molekülün ise CHCl_3 içerisinde maksimum absorbans gösterdiği bulunmuştur. Her üç bileşik için distile su içerisinde herhangi bir absorbans gözlemlenmemiştir.

Bakteri deneylerinde ise hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler kullanılmıştır. Öncelikle sentezlenen peptitin etkisinin incelenmesi için peptit ftalosiyanin ile bağlanmadan önce 23 mg rezinden kesildi ve hem karakterizasyon analizleri hem de bakteri deneyleri yapıldı. Bakteri deneylerinde kullanılmadan önce ilk olarak peptitin bakterisidal etkisinin ölçülmesi amacıyla MIC testi gerçekleştirildi. MIC testinin sonucunda peptitin gram negatif bakterilerde daha az miktarla etkili olduğu buna kıyasla gram pozitiflerde ise daha fazla miktarda peptit ile inhibisyonun gerçekleştirilebileceği tespit edildi.

En son yapılan fotodinamik terapi için ışıklı ve karanlık ortam deneylerinde, tüm moleküllerin *E.coli* üzerinde karanlık toksisitesinin olduğu görüldü. Bununla beraber *S.aureus* için sentezlenen tüm ftalosiyaninlerin daha az etkili olduğu tespit edildi.

Singlet oksijen kuantum veriminin çok az olmasına rağmen en yüksek bakterisidal etki 1,5 mg/ml konsantrasyonda **14** numaralı bileşikte görüldü. Bununla birlikte sonuçlar bizlere **14** numaralı molekülün hem ftalosiyanın hem de peptit zinciri sebebi ile çift etki oluşturduğunu göstermektedir.

Yapılan deneyler neticesinde, asimetrik ve peptit bağlı çinko-ftalosiyanın moleküllerinin antimikrobiyal fotodinamik terapide etkisinin olduğu tespit edildi. Bu çalışmaların daha da ilerletilerek in vivo çalışmaların gerçekleştirilmesi, peptit hedefli ftalosiyanın türevlerinin sentezinde yeni sekansların da sentezlenmesi, hedefleme sonrası peptit kesimi ve Pc'nin singlet oksijen kuantum veriminin yükseltilmesi gibi pek çok parametre denemesi gerçekleştirilebilir.

Bu çalışmada kullanılan peptit, biyo-organik bir temeli olan yumurta içerisinde savunma mekanizmasında kullanılan bir sekans olması ve yüksek etkili aPDT etki göstermesi, gelecek çalışmalar ve klinik deneyler için umut vaat etmektedir. Ayrıca **10** numaralı ve **12** numaralı moleküllerin kanser hücreleri üzerindeki PDT etkisi de ilerleyen çalışmalarda araştırılacaktır.

KAYNAKÇA

- [1] Schuster C. R., (2006), "History and current perspectives on the use of drug formulations to decrease the abuse of prescription drugs", *Drug and Alcohol Dependence*, 83, S8-S14.
- [2] Baker R. E., Mahmud A. S., Miller I. F., Rajeev M., Rasambainarivo F., Rice B. L., Metcalf C. J. E., (2022), "Infectious disease in an era of global change", *Nature Reviews Microbiology*, 20(4), 193-205.
- [3] Kazi K. M., Mandal A. S., Biswas N., Guha A., Chatterjee S., Behera M., Kuotsu K., (2010), "Niosome: a future of targeted drug delivery systems", *Journal Of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(4), 374-380.
- [4] Kwon I. K., Lee S. C., Han B., Park K., (2012), "Analysis on the current status of targeted drug delivery to tumors", *Journal of Controlled Release*, 164(2), 108-114.
- [5] Manish G., Vimukta S., (2011), "Targeted drug delivery system: a review". *Res J Chem Sci*, 1(2), 135-138.
- [6] Todaro B., Ottalagana E., Luin S., Santi M., (2023), "Targeting peptides: the new generation of targeted drug delivery systems", *Pharmaceutics*, 15(6), 1648.
- [7] Chaloin L., Bigey P., Loup C., Marin M., Galeotti N., Piechaczyk M., Meunier B., (2001), "Improvement of porphyrin cellular delivery and activity by conjugation to a carrier peptide", *Bioconjugate Chemistry*, 12(5), 691-700.
- [8] Rahimipour S., Ben-Aroya N., Ziv K., Chen A., Fridkin M., Koch Y., (2003), "Receptor-mediated targeting of a photosensitizer by its conjugation to gonadotropin-releasing hormone analogues", *Journal of medicinal chemistry*, 46(19), 3965-3974.
- [9] De Luca S., Tesauro D., Di Lello P., Fattorusso R., Saviano M., Pedone C., Morelli G., (2001), "Synthesis and solution characterization of a porphyrin-CCK8 conjugate", *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 7(7), 386-394.
- [10] Aina O. H., Sroka T. C., Chen M. L., Lam K. S., (2002), "Therapeutic cancer targeting peptides", *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 66(3), 184-199.
- [11] Conway C. L., Walker I., Bell A., Roberts D. J., Brown S. B., Vernon D. I., (2008), "In vivo and in vitro characterisation of a protoporphyrin IX-cyclic RGD peptide conjugate for use in photodynamic therapy", *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7, 290-298.
- [12] Tirand L., Frochot C., Vanderesse R., Thomas N., Trinquet E., Pinel S., Barberi-Heyob M., (2006), "A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells", *Journal of Controlled Release*, 111(1-2), 153-164.

- [13] Zhang D., Chen J., Jing Q., Chen Z., Ullah A., Jiang L., Huang M., (2021), "Development of a potent antimicrobial peptide with photodynamic activity", *Frontiers in Microbiology*, 12, 465-624.
- [14] Edwards C. M. B., Cohen M. A., Bloom S. R., (1999), "Peptides as drugs", *QJM*, 92(1), 1-4.
- [15] Sánchez A., Vázquez A., (2017), "Bioactive peptides: A review", *Food Quality And Safety*, 1(1), 29-46.
- [16] Warthen J. L., Lueckheide M. J., (2024), "Peptides as targeting agents and therapeutics: a brief overview", *Biomacromolecules*, 25(11), 6923-6935.
- [17] Colas P., Cohen B., Jessen T., Grishina I., McCoy J., Brent R., (1996), "Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2", *Nature*, 380(6574), 548-550.
- [18] Stawikowski M., Fields G. B., (2012), "Introduction to peptide synthesis", *Current Protocols In Protein Science*, 69(1), 18-1.
- [19] Fields G. B., & Noble R. L., (1990), "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids", *International Journal Of Peptide And Protein Research*, 35(3), 161-214.
- [20] Coin I., Beyermann M., Bienert M., (2007), "Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences", *Nature Protocols*, 2(12), 3247-3256.
- [21] Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P., (2011), "Molecular Cell Biology", 6th Edition, Palme Yayınevi, 64-78.
- [22] Li Q., Ming R., Huang L., Zhang R., (2024), "Versatile peptide-based nanosystems for photodynamic therapy", *Pharmaceutics*, 16(2), 218.
- [23] Wang G., (2014), "Human antimicrobial peptides and proteins", *Pharmaceutics*, 7(5), 545-594.
- [24] Corrêa J. A. F., de Melo Nazareth T., Rocha G. F. D., Luciano F. B., (2023), "Bioactive antimicrobial peptides from food proteins: perspectives and challenges for controlling foodborne pathogens", *Pathogens*, 12(3), 477.
- [25] Han K., Ma Z., Han H., (2018), "Functional peptide-based nanoparticles for photodynamic therapy", *Journal of Materials Chemistry B*, 6(1), 25-38.
- [26] Kübler A. C., (2005), "Photodynamic therapy", *Medical Laser Application*, 20(1), 37-45.

- [27] Göksel M., (2013), “Hedefli Kanser Tedavisi İçin Yeni Asimetrik Ftalosiyeninler”, Doktora Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [28] Chilakamarthi U., Giribabu L., (2017), “Photodynamic therapy: past, present and future”, *The Chemical Record*, 17(8), 775-802.
- [29] Ning X., He G., Zeng W., Xia Y., (2022), “The photosensitizer-based therapies enhance the repairing of skin wounds”, *Frontiers in Medicine*, 9, 915548.
- [30] Abrahamse H., Hamblin M. R., (2016), “New photosensitizers for photodynamic therapy”, *Biochemical Journal*, 473(4), 347-364.
- [31] Lan M., Zhao S., Liu W., Lee C. S., Zhang W., Wang, P., (2019), “Photosensitizers for photodynamic therapy”, *Advanced Healthcare Materials*, 8(13), 1900132.
- [32] Lever A. B. P., (1910), “Chemistry Department I”, Contract, 14(91-J).
- [33] Martinez-Diaz M. V., de la Torre G., Torres T., (2010), “Lighting porphyrins and phthalocyanines for molecular photovoltaics”, *Chemical Communications*, 46(38), 7090-7108.
- [34] Lo P. C., Rodríguez-Morgade M. S., Pandey R. K., Ng D. K., Torres T., Dumoulin F., (2020), “The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitisers for photodynamic therapy of cancer”, *Chemical Society Reviews*, 49(4), 1041-1056.
- [35] Hanack M., Schneider T., Barthel M., Shirk J. S., Flom S. R., Pong R. G., (2001), “Indium phthalocyanines and naphthalocyanines for optical limiting”, *Coordination Chemistry Reviews*, 219, 235-258.
- [36] Wang A., Long L., Zhang C., (2012), “Synthesis of unsymmetrical phthalocyanines: a brief overview”, *Tetrahedron*, 68(11), 2433-2451.
- [37] Swart G., Fourie E., Swarts J. C., (2022), “Octakis (dodecyl) phthalocyanines: influence of peripheral versus non-peripheral substitution on synthetic routes, spectroscopy and electrochemical behaviour”, *Molecules*, 27(5), 1529.
- [38] Nemykin V. N., Lukyanets E. A., (2010), “Synthesis of substituted phthalocyanines”, *ARKIVOC: Online Journal of Organic Chemistry*.
- [39] Geyer M., Plenzig F., Rauschnabel J., Hanack M., Del Rey B., Sastre A., Torres T., (1996), “Subphthalocyanines: preparation, reactivity and physical properties”, *Synthesis*, 1996(09), 1139-1151.
- [40] Wang M., Ishii K., (2022), “Photochemical properties of phthalocyanines with transition metal ions”, *Coordination Chemistry Reviews*, 468, 214626.
- [41] Oluwole D. O., Báthori N. B., (2023), “Multicomponent crystals of phthalocyanines—a possibility of fine-tuning properties”, *Colorants*, 2(2), 405-425.

- [42] Ongarora B. G., Fontenot K. R., Hu X., Sehgal I., Satyanarayana-Jois S. D., Vicente M. G. H., (2012), "Phthalocyanine-peptide conjugates for epidermal growth factor receptor targeting", *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(8), 3725-3738.
- [43] Ke M. R., Yeung S. L., Fong W. P., Ng D. K., Lo P. C., (2012), "A phthalocyanine-peptide conjugate with high in vitro photodynamic activity and enhanced in vivo tumor-retention property", *Chemistry—A European Journal*, 18(14), 4225-4233.
- [44] Ranyuk E., Cauchon N., Klarskov K., Guérin B., van Lier J. E., (2013), "Phthalocyanine-peptide conjugates: receptor-targeting bifunctional agents for imaging and photodynamic therapy", *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(4), 1520-1534.
- [45] Göksel M., Durmuş M., Atilla D., (2016), "Peptide-substituted phthalocyanine photosensitizers: design, synthesis, photophysicochemical and photobiological studies", *Photochemical & Photobiological Sciences*, 15, 1318-1329.
- [46] Yu L., Wang Q., Wong R. C. H., Zhao S., Ng D. K., Lo P. C., (2019), "Synthesis and biological evaluation of phthalocyanine-peptide conjugate for EGFR-targeted photodynamic therapy and bioimaging", *Dyes and Pigments*, 163, 197-203.
- [47] Chen Q., Ma Y., Zhao J., Zhao M., Li W., Liu Q., Hong Z., (2018), "In vitro and in vivo evaluation of improved EGFR targeting peptide-conjugated phthalocyanine photosensitizers for tumor photodynamic therapy", *Chinese Chemical Letters*, 29(7), 1171-1178.
- [48] Tam L. K., He L., Ng D. K., Cheung P. C., Lo P. C., (2022), "A tumor-targeting dual-stimuli-activatable photodynamic molecular beacon for precise photodynamic therapy", *Chemistry—A European Journal*, 28(57), e202201652.
- [49] Rukh G., Ullah A., Khattak R., Fazil P., Ali A., Shah M. R., Ateeq M., (2022), "Conjugation of antimicrobial peptide to zinc phthalocyanine for an efficient photodynamic antimicrobial chemotherapy", *Coatings*, 12, 200.
- [50] Zhang D., Chen J., Jing Q., Chen Z., Ullah A., Jiang L., Huang M., (2021), "Development of a potent antimicrobial peptide with photodynamic activity", *Frontiers in Microbiology*, 12, 624465.
- [51] Ranyuk E., Cauchon N., Klarskov K., Guérin B., van Lier J. E., (2013), "Phthalocyanine-peptide conjugates: receptor-targeting bifunctional agents for imaging and photodynamic therapy", *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(4), 1520-1534.
- [52] Sibrian-Vazquez M., Ortiz J., Nesterova I. V., Fernández-Lázaro F., Sastre-Santos A., Soper S. A., Vicente M. G. H., (2007), "Synthesis and properties of cell-targeted Zn (II)- phthalocyanine- peptide conjugates", *Bioconjugate Chemistry*, 18(2), 410-420.

- [53] Pimchan T., Tian F., Thumanu K., Rodtong S., Yongsawatdigul J., (2023), “Isolation, identification, and mode of action of antibacterial peptides derived from egg yolk hydrolysate”, *Poultry Science*, 102(7), 102695.
- [54] Ogunsipe A., Chen J. Y., Nyokong T., (2004), “Photophysical and photochemical studies of zinc (II) phthalocyanine derivatives—effects of substituents and solvents”, *New Journal of Chemistry*, 28(7), 822-827.
- [55] Li F., Liu Q., Liang Z., Wang J., Pang M., Huang W., Hong Z., (2016), “Synthesis and biological evaluation of peptide-conjugated phthalocyanine photosensitizers with highly hydrophilic modifications”, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14(13), 3409-3422.
- [56] Snow A. W., Foos E. E., (2003), “Conversion of alcohols to thiols via tosylate intermediates”, *Synthesis*, 2003(04), 0509-0512.



ÖZGEÇMİŞ

Mustafa Gedik, ilkokulu Erzincan ve Giresun, liseyi ise Edirne/Keşan’da bitirmiştir. 2016 yılında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans öğrenimine başladıktan sonra 2022 yılının güz döneminde Gebze Teknik Üniversitesi, Anorganik Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisansına başlamıştır.

