

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**PERİLENDİİMİD TÜREVLERİNİN SENTEZLENEREK İLAÇ DİRENÇ VE
HEDEF MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Taner KESKİN

Balıkesir, Ağustos-2011

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

PERİLENDİİMİD TÜREVLERİNİN SENTEZLENEREK İLAÇ DİRENÇ VE HEDEF
MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Taner KESKİN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç Dr. Funda YÜKRÜK

Sınav Tarihi: 22/08/2011

Jüri Üyeleri: Yrd. Doç Dr. Funda YÜKRÜK (Danışman -BAÜ)

Yrd.Doç. Dr. Belgin S. İŞGÖR (Atılım Üniversitesi)

Doç. Dr. Akın AZİZOĞLU (BAÜ)

Enstitü Yönetim Kurulunun tarih sayılı oturumunun nolu
kararı ile Mezun olmuştur.

Balıkesir, Ağustos-2011

“Bu alışma Balıkesir Üniversitesi Rektrlğ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2010/18 Kod’lu Proje ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.”

ÖZET

PERİLENDİİMİD TÜREVLERİNİN SENTEZLENEREK İLAÇ DİRENÇ VE HEDEF MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Taner KESKİN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi/Tez Danışmanı: Yrd. Doç Dr. Funda YÜKRÜK)

Balıkesir, 2011

Perilen ve türevlerinin kimya endüstrisindeki rollerine ek olarak çok farklı kanser türleri üzerinde terapötik etkinliklerinin olduğu farklı çalışmalarla gösterilmiştir.

Antikanser etkinliklerini belirlemede önemli c-Src tirozin kinaz (c-Src) ve Glutatyon-S-Transferaz (GST) enzimleri üzerine olan inhibisyon etkinlikleri ise, hedefe özgün ilaç tasarım ve geliştirilmesinde oldukça önemli olmasına rağmen, Perilen türevlerinin c-Src ve GST üzerine olan etkileri bugüne dek çok az çalışılmıştır.

Bu çalışmada birbirinden farklı, dört yeni perilendiimid molekülü çözünürlük artırıcı grupların 3,4:9,10 perilen tetrakarboxilik asit dianhidrite eklenmesi ile sentezlenmiş ve yapı tayinleri ise ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve kütle spektrumları ile aydınlatılmıştır.

Bu bileşiklerin antikanser etkinlikleri ise c-Src ve GST enzimlerinin inhibisyonuna yolaçan biyolojik aktivite olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada sentezlenen dört bileşikten ikisinin güçlü GST inhibisyonu, birisinin ise GST ve c-Src inhibisyonları yaparak biyolojik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Perilendiimid / c-Src tirozin kinaz / Glutatyon-S-Transferaz

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECTS ON TARGET MECHANISMS AND DRUG RESISTANCE BY SYNTHESIS OF PERYLENE-DIIMIDE DERIVATIVES

Taner KESKİN

Balikesir University, Institute of Science, Department of Chemistry

(Master Thesis / Supervisor: Assistant Professor Dr. Funda YÜKRÜK)

Balikesir, Turkey, 2011

Diverse studies shown that perilen and its derivatives, in addition to their role in the chemical industry, have therapeutic activities on many different types of cancer.

Although the inhibitory activity on c-Src tyrosine kinase (c-Src) and glutathione-S-transferase (GST) enzymes, important in determining the anticancer activity of compounds for target specific drug design and development, there is only a few studies regarding the effects of perylene derivatives on c-Src and GST to date.

In this study, the novel four different perylenediimide molecules were synthesized from 3,4:9,10 perylene tetracarboxylic acid dianhydride by the addition of groups to increase solubility, and their structural characterization was clarified by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and mass spectra.

Anticancer activity of these compounds leading to inhibition of c-Src and GST enzymes were identified as their biological activity. Two of the four compounds synthesized in this study was determined to show biological activity by strong GST inhibition, and one showed both the GST and c-Src inhibition.

KEYWORDS: Perylenediimide / c-Src tyrosine kinase / Glutathione-S-transferase

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|------------------------|
| ÖZET, ANAHTAR KELİMELER | ii |
| ABSTRACT, KEYWORDS | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| SEMBOL LİSTESİ | vii |
| ŞEKİL LİSTESİ | viii |
| ÖNSÖZ | x |
| | |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Supramoleküler Kimya | 1 |
| 1.2 Perilenler | 3 |
| 1.2.1 Perilen Türevleri ve Genel Özellikleri | 5 |
| 1.2.1.1 PTCDA (perilen-3,4:9,10-tetrakarboksilik asit dianhidrid) | 5 |
| 1.2.1.2 Perilendiimidler | 7 |
| 1.2.1.2.1 Perilendiimid Boyaları | 8 |
| 1.2.1.2.2 Perilendiimidlerin Kullanım Alanları | 9 |
| 1.3 Glutatyon-S-Transferaz (GST) Enzimleri, İnhibitörleri ve Terapötik Önemi | 10 |
| 1.4 c-Src Reseptörsüz Protein Tirozin Kinazı, İnhibitörleri ve Terapötik Önemi | 14 |
| | |
| 2. MATERYAL VE YÖNTEM | 17 |
| 2.1 Materyaller | 17 |
| 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler | 17 |
| 2.1.1.1 Sentez Aşamasında Kullanılan Kimyasal Maddeler | 17 |
| 2.1.1.2 Aktivite Ölçüm Ve Tayin Aşamasında Kullanılan Kimyasal Maddeler | 17 |
| 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar | 17 |
| 2.1.2.1 Sentez Aşamasında Kullanılan Alet ve Cihazlar | 17 |

| | |
|--|----|
| 2.1.2.2 Aktivite Ölçüm Ve Tayin Aşamasında Kullanılan Alet ve Cihazlar | 18 |
| 2.2 Yöntemler | 18 |
| 2.2.1 1,7-dibromo-3,4:9,10-perilene-tetrakarboksilik asit dianhidrit Sentezi (TK2) | 18 |
| 2.2.2 N,N'-(L-glutamik asit t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK10) | 19 |
| 2.2.3 N,N'-(L-alanin t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK11) | 20 |
| 2.2.4 1,7-Dibromo-N,N'-(L-glutamik asit t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK12) | 21 |
| 2.2.5 1,7-Dibromo-N,N'-(L-alanin t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK13) | 22 |
| 2.2.6 Glutasyon S-Transferaz Aktivite Ölçümleri | 23 |
| 2.2.7 c-Src Enzim Aktivitesinin Tayini | 24 |
| 3. BULGULAR | 25 |
| 3.1 TK10 Maddesinin Spektrum Verileri | 25 |
| 3.1.1 TK10 Maddesinin ¹ H-NMR Spektrumu | 25 |
| 3.1.2 TK10 Maddesinin ¹³ C-NMR Spektrumu | 26 |
| 3.1.3 TK10 Maddesinin Kütle Spektrumu | 27 |
| 3.1.4 TK10 Maddesinin UV Spektrumu | 28 |
| 3.2 TK11 Maddesinin Spektrum Verileri | 29 |
| 3.2.1 TK11 Maddesinin ¹ H-NMR Spektrumu | 29 |
| 3.2.2 TK11 Maddesinin ¹³ C-NMR Spektrumu | 30 |
| 3.2.3 TK11 Maddesinin Kütle Spektrumu | 31 |
| 3.2.4 TK11 Maddesinin UV Spektrumu | 32 |
| 3.3 TK12 Maddesinin Spektrum Verileri | 33 |
| 3.3.1 TK12 Maddesinin ¹ H-NMR Spektrumu | 33 |
| 3.3.2 TK12 Maddesinin ¹³ C-NMR Spektrumu | 34 |
| 3.3.3 TK12 Maddesinin Kütle Spektrumu | 35 |
| 3.3.4 TK12 Maddesinin UV Spektrumu | 36 |
| 3.4 TK13 Maddesinin Spektrum Verileri | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.1 TK13 Maddesinin ¹ H-NMR Spektrumu | 37 |
| 3.4.2 TK13 Maddesinin ¹³ C-NMR Spektrumu | 38 |
| 3.4.3 TK13 Maddesinin Kütle Spektrumu | 39 |
| 3.4.4 TK13 Maddesinin UV Spektrumu | 40 |
| 3.5 c-Src Enzim İnhibisyonu Çalışmaları | 41 |
| 3.5.1 TK10 Maddesinin c-Src Enzim İnhibisyonu | 41 |
| 3.5.2 TK11 Maddesinin c-Src Enzim İnhibisyonu | 41 |
| 3.5.3 TK12 Maddesinin c-Src Enzim İnhibisyonu | 42 |
| 3.5.4 TK13 Maddesinin c-Src Enzim İnhibisyonu | 43 |
| 3.6 GST İnhibisyon Sonuçları | 44 |
| 3.6.1 TK10 Maddesinin GST İnhibisyonu | 44 |
| 3.6.2 TK11 Maddesinin GST İnhibisyonu | 44 |
| 3.6.3 TK12 Maddesinin GST İnhibisyonu | 45 |
| 3.6.4 TK13 Maddesinin GST İnhibisyonu | 45 |
| 4. SONUÇ VE TARTIŞMA | 46 |
| KAYNAKLAR | 49 |

SEMBOL LİSTESİ

| <u>Simge Adı</u> | <u>Tanımı</u> |
|----------------------------------|------------------------------|
| I ₂ | Iyot |
| Br ₂ | Brom |
| H ₂ SO ₄ | Sülfürik Asit |
| H ₂ O | Su |
| C ₄ H ₁₀ O | n-Bütanol |
| C ₆ H ₁₅ N | Trietilamin |
| CHCl ₃ | Kloroform |
| CH ₃ OH | Metanol |
| CDCl ₃ | Deuterated Kloroform |
| GSH | İndirgenmiş Glutatyon |
| EDTA | Etilendiamintetraasetik Asit |
| BSA | Bovine Serum Albümin |
| SDS | Sodyum Dodesil Sülfat |
| CDNB | 1-kloro-2,4-dinitrobenzen |
| DMSO | Dimetil Sülfoksit |

ŞEKİL LİSTESİ

| <u>Şekil No</u> | <u>Şekil Adı</u> | <u>Sayfa No</u> |
|------------------------|--|------------------------|
| Şekil 1.1 | Moleküler Kimya ve Supramoleküler Kimya'nın karşılaştırılması. | 2 |
| Şekil 1.2 | Perilen molekülünün a) 2D yapısı b) 3D yapısı c) farklı renklerdeki floresan kromoforları. | 4 |
| Şekil 1.3 | Sikloheksanda çözünmüş perilenin molar tükenme katsayısı grafiği. | 4 |
| Şekil 1.4 | Sikloheksanda çözünmüş perilenin floresan emisyon spektrumu. | 5 |
| Şekil 1.5 | Perilenden PTCDA molekülünün eldesi. | 6 |
| Şekil 1.6 | İnsan sitozolik GST izozimlerinin 3 boyutlu yapısı. | 11 |
| Şekil 1.7 | İnsan sitozolik GST izozimlerinin Cisplatin, reaktif oksijen bileşikleri ve diğer sinyal iletim enzimleri ile etkileşimleri. | 13 |
| Şekil 1.8 | Protein tirozin kinaz katalizliğinde hedef (substrat) protein yapısında bulunan tirozin kalıntısının fosforilasyonu. | 14 |
| Şekil 1.9. | c-src reseptörsüz tirozin kinaz'ın yapısı, fosforilasyon durumuna göre aktif olan ve olmayan konformasyonları. | 15 |
| Şekil 2.1 | 1,7-dibromo-3,4:9,10-perilentetrakarboksilik asit dianhidrit Sentezi (TK2). | 18 |
| Şekil 2.2 | N,N'-(L-glutamikasit t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK10). | 19 |
| Şekil 2.3 | N,N'-(L-alanin t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK11). | 20 |
| Şekil 2.4 | 1,7-Dibromo-N,N'-(L-glutamikasit t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK12). | 21 |
| Şekil 2.5 | 1,7-Dibromo-N,N'-(L-alanin t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK13). | 22 |
| Şekil 3.1 | TK10 Maddesinin ¹ H-NMR Spektrumu. | 25 |
| Şekil 3.2 | TK10 Maddesinin ¹³ C-NMR Spektrumu. | 26 |

| | | |
|------------|---|----|
| Şekil 3.3 | TK10 Maddesinin Kütle Spektrumu. | 27 |
| Şekil 3.4 | TK10 Maddesinin UV Spektrumu. | 28 |
| Şekil 3.5 | TK11 Maddesinin ¹ H-NMR Spektrumu. | 29 |
| Şekil 3.6 | TK11 Maddesinin ¹³ C-NMR Spektrumu. | 30 |
| Şekil 3.7 | TK11 Maddesinin Kütle Spektrumu. | 31 |
| Şekil 3.8 | TK11 Maddesinin UV Spektrumu. | 32 |
| Şekil 3.9 | TK12 Maddesinin ¹ H-NMR Spektrumu. | 33 |
| Şekil 3.10 | TK12 Maddesinin ¹³ C-NMR Spektrumu. | 34 |
| Şekil 3.11 | TK12 Maddesinin Kütle Spektrumu. | 35 |
| Şekil 3.12 | TK12 Maddesinin UV Spektrumu. | 36 |
| Şekil 3.13 | TK13 Maddesinin ¹ H-NMR Spektrumu. | 37 |
| Şekil 3.14 | TK13 Maddesinin ¹³ C-NMR Spektrumu. | 38 |
| Şekil 3.15 | TK13 Maddesinin Kütle Spektrumu. | 39 |
| Şekil 3.16 | TK13 Maddesinin UV Spektrumu. | 40 |
| Şekil 3.17 | TK11 Maddesinin c-Src enzimine karşı inhibisyon grafiği | 41 |
| Şekil 3.18 | TK11 bileşiğinin enzim inhibisyonunu gösteren doz- cevap eğrisi. | 42 |
| Şekil 3.19 | TK12 Maddesinin c-Src enzimine karşı inhibisyon grafiği | 42 |
| Şekil 3.20 | TK12 bileşiğinin enzim inhibisyonunu gösteren doz- cevap eğrisi. | 43 |
| Şekil 3.21 | TK13 Maddesinin c-Src enzimine karşı inhibisyon grafiği | 43 |
| Şekil 3.22 | TK11 Maddesinin GST inhibisyon grafiği. | 44 |
| Şekil 3.23 | TK11 GST inhibisyon eğrisi. | 44 |
| Şekil 3.24 | TK12 GST inhibisyon eğrisi. | 45 |
| Şekil 3.25 | TK13 GST inhibisyon eğrisi. | 45 |

ÖNSÖZ

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm yüksek lisans eğitimim süresince tüm öğretim üyelerine bana vermiş oldukları değerli bilgiler için çok teşekkür ederim.

Tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Funda YÜKRÜK'e çalışmanın planlanmasında ve sürdürülmesindeki desteklerinden dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezi hazırlarken yaptıkları yardımlardan dolayı Yrd. Doç. Dr. Belgin S. İŞGÖR ve Dr. Yasemin G. İŞGÖR'e teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım sırasındaki yardımları için çalışma arkadaşım Fatma AKÇAY'a teşekkür ederim.

Bana gösterdikleri sevgi, anlayış ve her türlü destekleri için aileme en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2010/18 Kodlu Proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Balıkesir Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığına teşekkür ederiz.

Bu tez Tübitak tarafından 110T026 no'lu hızlı destek projesi ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.

Balıkesir, 2011

Taner KESKİN

1. GİRİŞ

1.1 Supramoleküler Kimya

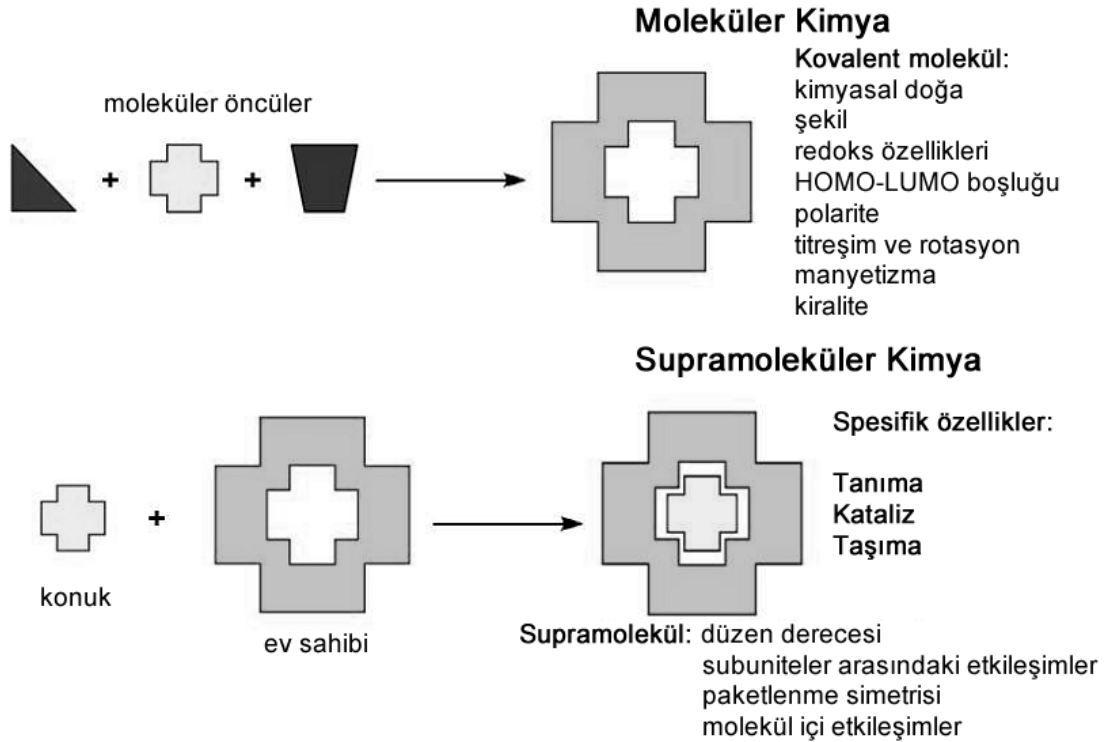
Moleküler kimya, kovalent bağ kimyası, moleküler türlerin özelliklerini, yapılarını ve transformasyonunu yönlendiren ve açığa çıkaran kurallarla ilgilidir. Başka bir deyişle moleküler kimya kovalent bağ esasına dayanır. Supramoleküler kimya, moleküller arası bağ kimyası, iki veya daha fazla kimyasal türün moleküller arası kuvvetlerle bir arada tutulmasıyla oluşan daha kompleks organize yapıları inceleyen bir bilim dalıdır. Kısaca moleküler kimyayı da içine alan moleküller arası etkileşimlerin kimyası şeklinde ifade edilebilir. Moleküler bağlanma ve seçicilik, verilen herhangi bir reseptörün bir veya daha fazla substratı bağlayabilmesi ve seçiciliği ile ilgili enerjiyi ve bilgiyi ifade eder. Bu yüzden, moleküler bilginin dışarı atılması (supramoleküler) ve depolanması (moleküler) şeklinde de tarif edilmektedir. Moleküler reseptörler, iyonlarla veya moleküllerle seçimli kompleks oluşturabilen kovalent bağlı organik bileşiklerdir. Substratlar organik, inorganik ya da biyolojik tüm katyonik, anyonik ve nötral türleri içermektedir. Reseptör kimyası sentetik reseptör moleküllerin kimyası, sadece geçiş metalleriyle sınırlı olmayıp tüm substrat türlerini içeren genişletilmiş koordinasyon kimyası şeklinde düşünülebilir. Burada kullanılan terimler supramoleküler kimyanın dilini oluşturmaktadır. Bilgi reseptörün yapısında, bağlanma bölgelerinde (sayısı, doğası, dizilişi) ve σ bağıyla sarılan ligand tabakasında depolanabilir. Bu bilgi süpermolekülün oluşum ve ayrışma sabitleri ile dışarı atılabilir. Bir süpermolekülün ($\rho\sigma$) bileşenleri, reseptör (ρ) ve substratlar (σ) şeklinde isimlendirilmektedir [1,2].

Supramoleküler türler, bileşenlerinin uzaysal düzenlenmesiyle, süper yapılarıyla ve bileşenleri bir arada tutan moleküller arası bağların doğasıyla karakterize edilirler. Supramoleküler türler çok iyi belirlenmiş yapısal, konformasyonel, termodinamik, kinetik ve dinamik özelliklere sahiptirler. Moleküller arası etkileşimler, uzaklık ve açılara bağlı olarak, kuvvet derecelerine ve yönelmelerine bakılarak farklılaştırılabilir. Bu etkileşimler: metal iyonu

koordinasyonu, elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağı, van der Waals etkileşimleri, donör-akseptör etkileşimleri vb. etkileşimlerdir. Bununla birlikte moleküller arası kuvvetler kovalent bağlardan daha zayıftır, öyle ki supramoleküler türler, moleküllerden termodinamik yönden daha az kararlı, kinetik olarak daha stabil ve dinamik olarak da daha esnektir. Bu nedenle supramoleküler kimya yumuşak bağlarla ilgilidir ve "soft kimya" olarak adlandırılır [3].

Supramoleküler kimyayı, en basit anlamda, birtakım kovalent olmayan (nonkovalent) bağlanma ve kompleksleşme olayı olarak düşünürsek, bağlanmayı neyin sağladığını belirtmemiz gerekir. Bu bağlamda genellikle bir molekülün [ev sahibi (host)] başka bir molekülü [konuk (guest)] bir "host-guest" kompleksi ya da "supramolekül" oluşturmak üzere bağladığını düşünürüz. Genellikle host türü büyük, ortasında boşluk bulunduran bir moleküldür. Guest türü ise monoatomik bir katyon, basit bir inorganik anyon ya da bir hormon, feromon ya da nörotransmitter gibi daha karmaşık bir molekül olabilir [4].

Perilendiimidler, fitalosiyaninler, porfirinler vb.'lerinde supramolekül olan maddelerdir.

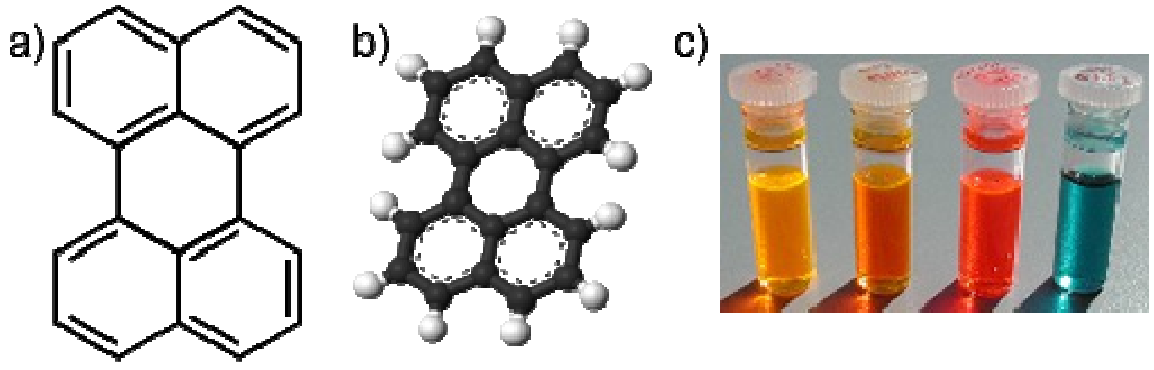


Şekil 1.1 Moleküler Kimya ve Supramoleküler Kimya'nın karşılaştırılması.

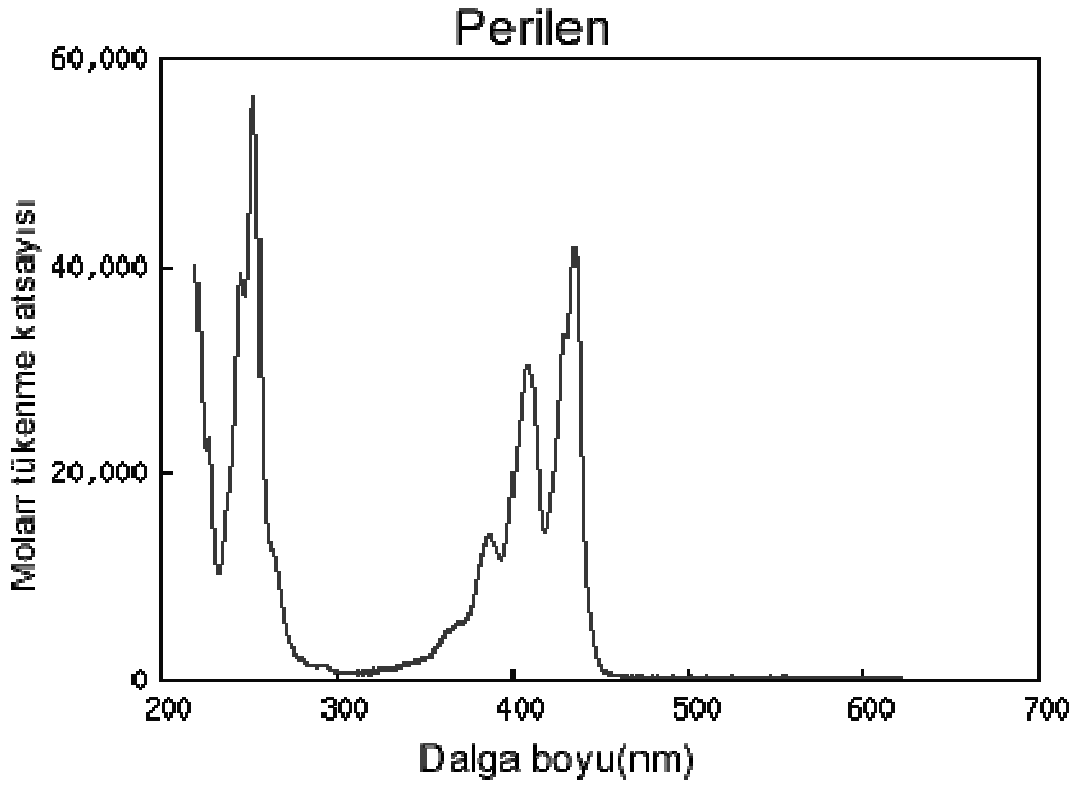
1.2 Perilenler

Perilenler ilk olarak 1913'te Kardos tarafından keşfedilmişlerdir. İlk uygulama alanları tekstilde, daha sonraki dönemlerde yüksek performanslı pigmentler olarak kullanılmışlardır (çoğunlukla koyu kırmızı ve koyu menekşe olarak). Bu boyaların düşük çözünürlüğü pigment uygulamaları için oldukça gerekli bir özellik olmasına rağmen, onların kimyasının gelişimi için bir engel oluşturmaktaydı. Onların güçlü fluoresans özellikleri Giessler ve Remy tarafından 1940' larda gözlemlendi. Bununla birlikte bu maddeler düşük çözünürlükleri nedeniyle pratik uygulamalar için kullanılamıyordu [5].

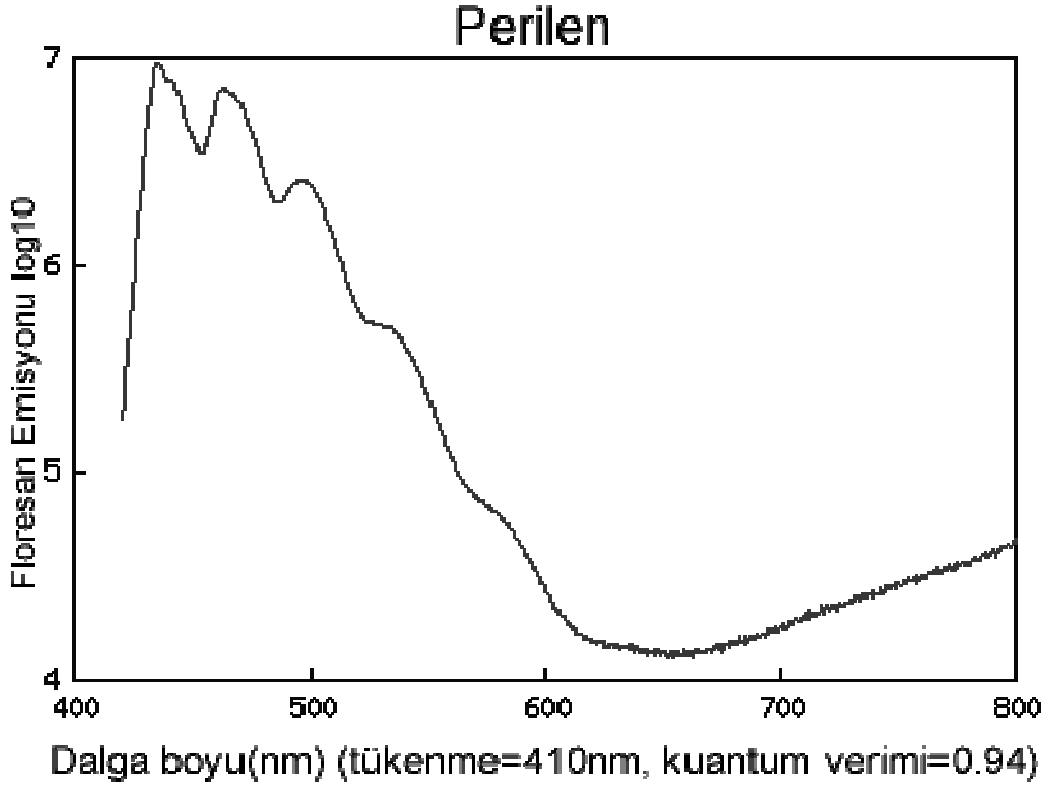
Temel bir pentasiklik aromatik bileşik olan perilenler, kuvvetli bir fluoresans özellik göstermektedir. Perilenin, di-, tri- ve tetra-karboksilli asit esterleri ışık haslığı iyi olan, sarıdan kırmızıya kadar değişen renklerdeki fluoresans kromoforlardır. Örnek olarak 3,9-dikarboksilli asidin diisobütil esteri verilebilir (CI Solvent Green 5). Perilen-3,4:9,10-tetrakarboksilli asitlerin dimidleri, pigmentlerin oldukça önemli yüksek performanslı bir grubunu oluşturmakta, bunların kuvvetli kırmızı - turuncu fluoresan renklerin elde edilmesinde kullanımı üzerine fazlaca araştırma bulunmaktadır. Bunlar çevre şartlarına karşı oldukça dayanıklı, parlak ve iyi bir fluoresans verimliliğine sahip olan boyalardır. Bu boyaların suda çözünebilen tipleri, imid grubundaki azot atomu üzerine sülfonik asit substitüentini bağlaması ile elde edilmektedir. Naftalimidlere benzer olarak, mono- ve bis-benzimidazoller sırasıyla sarı ve kırmızı nüanslı fluoresans viyole renklerini vermektedir [6].



Şekil 1.2 Perilen molekülünün a) 2D yapısı b) 3D yapısı c) farklı renklerdeki floresan kromoforları.



Şekil 1.3 Sikloheksanda çözülmüş perilenin molar tükenme katsayısı grafiği.



Şekil 1.4 Sikloheksanda çözülmüş perilenin floresan emisyon spektrumu.

1.2.1 Perilen Türevleri ve Genel Özellikleri

Perilen türevleri organik moleküler elektronikteki potansiyel uygulamaları yüzünden büyük ilgi çekmiştir. Özellikle ilgi çekici olan nokta ise onların ışık yayan ve elektrokromik malzemeler olarak kullanılmasındır [7]. Perilen türevlerinin önemli bir kısmı içerisinde imidik bileşikler bulunduran perilenlerdir [8].

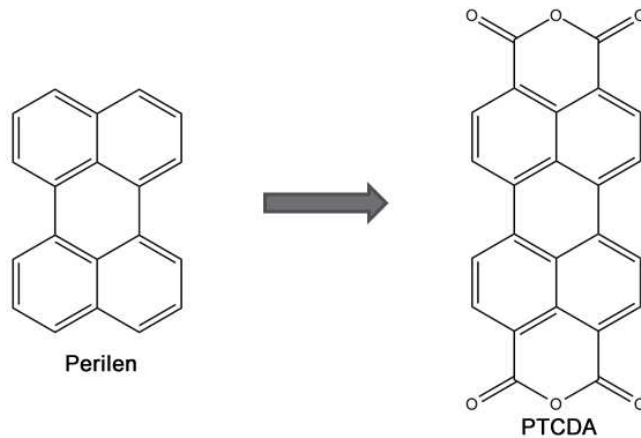
1.2.1.1 PTCDA (perilen-3,4:9,10-tetrakarboksilik asit dianhidrid)

PTCDA kristali, organik yarı iletkenler arasında en yüksek elektron mobilitesine sahip maddelerden birisidir. İyi düzenlenmiş filmlerdeki dizilme doğrultusu $1 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ değerini aşar. Bu yüzden PTCDA molekülü, organik molekül esaslı elektronik sistemlerin üretiminde önemli bir yapıdır. PTCDA molekülerinin simetrik özelliklerinden dolayı, hacimli kristaller yüksek anisotropi gösterirler ve taşıyıcı mobiliteleri, çakışma doğrultusuna dik doğrultuda $10^{-5} - 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ değerine düşer. Substratın arayüzeye yük injeksiyon verimi, adsorplanan molekülün

yönelimine ve geometrisine bağlıdır. PTCDA' nın Au(III) gibi soy metal yüzeylerine tutunması ve moleküllerin düzenlenmesi, sıcaklığa bağlı olarak değişir [9].

PTCDA (perilen-3,4:9,10-tetrakarboksilik dianhidrid - $C_{24}H_8O_6$) molekülü, perilen molekülünün her bir yanına bir anhidrid fonksiyonel grubu eklenmesiyle elde edilen bir perilen türevidir. Yapıyı perilen çekirdeği ve iki anhidrid fonksiyonel grubu olarak bölümlendiğimizde özellikle C1s ve O1s seviyelerinin spektroskopik gözlemlerinde büyük kolaylıklar sağlamış oluruz. Perilen çekirdeği ve anhidrid gruplar hesaba katıldığında, kimyasal olarak birbirine eşdeğer olmayan 7 farklı karbon atomu göze çarpar. PTCDA iyonik boyutları sırasıyla $a= 6.79 \text{ \AA}$ ve $b= 11.47 \text{ \AA}$ ve Van der Waals yarıçapı ise sırasıyla 9.2 \AA ve 14.2 \AA olan düzlemsel organik bir moleküldür. PTCDA istiflenmiş moleküler yapraklar şeklinde kristallenir. Her düzlem kristal diğerleriyle zayıf Van der Waals kuvvetleri ve elektrostatik güçlerle bağlanırlar [9].

PTCDA molekülleriyle yapılan foto emisyon çalışmaları sonucu, bu moleküllerin reaktif metal yüzeyine ve yarı iletken yüzeylere kuvvetlice bağlandığı görülmüştür. Moleküller eşzamanlı olarak farklı yönelimlerle yüzeylere bağlanırlar. Yüzey üzerinde etki oluştururlar ve kısmen de ayrılabilirler. Moleküller, yüksek aktivitelerinden dolayı anhidrid grubu üzerinden adsorplanırlar. Sadece Ag (III) gibi oldukça inert substratlar ile son derece düzenli istiflenme olur. Çünkü bu yüzeyde moleküller yüksek hareketliliğe sahiptirler [9].



Şekil 1.5 Perilenden PTCDA molekülünün eldesi.

1.2.1.2 Perilendiimidler

Perilendiimidler ucuz, hazır bileşiklerdir. Ayrıca, perilen türevleri yüksek floresan özelliğe sahiptir ve alışılmadık uzun mesafelerin üzerinde tekli (singlet) enerji transferi gösterirler [10,11].

Çok yönlü bir bakış açısıyla perilendiimidler; yüksek fonksiyonlu kuantum verimleri [12-14], yüksek molar absorpsiyon katsayısı [14,15], görünür ışık irradyasyonu altında yüksek foto- ve termal kararlılıkları [16-18], yüksek kimyasal kararlılıkları [19] ve ayarlanabilir absorpsiyon özellikleri kolaylığına sahip olmaları [20,21] yüzünden çok dikkat çekmiş ve geniş kullanım alanı bulmuştur.

Perilendiimidlerin mükemmel termal ve foto kararlı uyarıcılar olduğu bilinir. Görünür bölgedeki absorpsiyonu (450-530nm) onların solar uygulamalarda kullanılmasını sağlar. Enerji ve e^- transfer işlemleri singlet haller vasıtasıyla ilerler. Perilendiimid'ler elektron çekici ve aynı zamanda da elektron salıcı olarak davranabilirler. Floresans kuantum verimleri yüksektir ve singlet-triplet haller arasındaki yüksek enerji farkı sırasıyla 54-27 kcal/mol'dür. Bunlar singlet hal foto proseslerinin kanıtı olarak alınır [22].

Çözelti fazındaki perilendiimidlerin, incelenmesi sonucu, onların hem elektron çekici hem de elektron verici özelliğe sahip oldukları gözlenmiştir. Katı hal opto-elektronik uygulamalarda ise n-tipi yarıiletken oldukları raporlanmıştır [23].

Bununla birlikte, düşük çözünürlük ve zor ayrılması bu tür harika boyaların üretimini sınırlar.

Perilendiimidlerin organik çözücülerdeki çözünürlüğünün artması için iki metot önerilir.

1. Perilendiimidlerin "imid" bölgesine N- sübtitüent, uzun kuyruk veya kırlangıç kuyruğu konformasyonu elde etmek için genellikle uzun alkil yer değiştirmeleri. Ancak bu sadece çözünürlüğü küçük bir derecede artırır.

2. Perilendiimidlerin “k6rfez” b6lgesine bis- s6bstit6ent ya da tetra-s6bstit6ent, perilendiimid boyalarının 6z6n6rl6ğ6nde g6zle g6r6n6r bir bi6imde artış sağlar [24-26].

1.2.1.2.1 Perilendiimid Boyaları

Perilen boya kimyasındaki farklı sentetik metotlar, 6zellikler ve yeni gelişmeler Langhals tarafından kapsamlı bir şekilde 6zetlenmiştir [27].

Perilen pigmentleri, perilen tetrakarboksilik asitin diimidleridir. S6bstit6e edilmemiş bileşikler, varil boyası olarak kullanılmamalarına rağmen, bu sınıfın bilinen en eski 6yesidirler. İlk olarak 1912’de tanımlanmışlardır. Zaman i6erisinde perilen tetrakarboksilik asit diimidin bir t6r6n6n başlangı6ta yalnızca varil boyası olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Perilen bileşiklerinin pigment olarak kullanımı, 1950 yılından sonraya rastlar. 6ok sayıda perilen pigment serileri end6striyel 6l6ekte 6retilmeye başlanmıştır [28].

Perilen pigmentler geniş bir renk aralığında bulunabilirler; kırmızı, bordo, mor, kahverengi ve siyaha yakın renk tonu verebilirler. Bu pigmentler m6kemmел 6z6c6 kararlılığı, plastiklerde olduk6a iyi g66 kararlılığı, boya kaplamacılığında olduk6a uzun 6m6rl6l6k, y6ksek kimyasal inertlik ve olağan6st6 termal kararlılık g6sterirler. Sadece temel bileşiği olan tetrakarboksilik asit dianhidrit, alkali i6inde dayanıklı değildir [28].

Grup olarak perilen pigmentleri, y6ksek renk verme 6zelliği g6sterirler. Kinakridon pigmentlerinden g66l6 oldukları bulunmuştur. Bununla birlikte perilen pigmentleri ışık ve havaya karşı m6kemmел dayanıklılık g6sterirler. Bu konuda aşağı yukarı kinakridon pigmentlerinin performansına eşitirler [28].

6oğu perilen pigmentler, kinakridon pigmentlerde de olduğu gibi end6striyel boya olarak, 6zellikle de orijinal otomotiv sekt6r6nde kullanılır. Farklı 6zelliklere sahip pigmentler bulmak m6mk6nd6r. Olduk6a uygun partik6l boyutları, spesifik

yüzey alan özellikler ve mükemmel saydam türlerden; işlenmemiş partikül boyutları, düşük spesifik yüzey alan özelliklerine sahip pigmentlere kadar geniş bir yelpazede incelenirler. Küçük partiküllü türleri özellikle metalik ve saydam boyacılıkta kullanılırken; saydam olmayan türleri, inorganik ve diğer organik pigmentlerle karıştırılarak farklı gölgeli boyaların oluşturulmasında kullanılır. Bazı türleri özellikle ısıya karşı mükemmel bir kararlılık gösterdiğinden, plastiklerde ve spin boyama ürünlerinde kullanılırlar. Bununla birlikte perilen pigmentleri, sterik aminlerle kararlı hale getirilmiş poliolefin yapılarında nadiren kullanılırlar. Yüksek pigment konsantrasyonu taşıyan ortamda, kararlılığı sağlayıcı bu aminler, ışığa maruz kaldıklarında inaktif olur ve hatta bozunabilirler. Bu durumda poliolefin sistemler hızlıca kırılğan yapılara dönüşür [28].

1.2.1.2.2 Perilendiimidlerin Kullanım Alanları

Hem simetrik hem de asimetric perilendiimid türevleri boya duyarlı güneş hücrelerinde [29-32], organik ışık yayan diyotlarda [33], organik alan etkili transistörlerde [34], sıvı kristal ekranlarda (LCD) [35], boya lazerlerde [36], kimyasal oksidasyonlarda fotosensitizer olarak [37], fotodinamik terapide [38] ve DNA G-quadruplex stabilizasyonu [39-41] gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ayrıca perilendiimidler elektron transfer katalizörü olarak kullanılırlar. UV ışık ya da güneş ışığı radyasyonu altında moleküler oksijen tarafından organik bileşiklerinin fotouyarımlı oksidasyonu organik yapılarının oluşumunda ve sanayi ürünlerinin yapımında en önemli rol oynayan ürünlerdir. Günümüzde konsantre güneş ışınlarıyla perilendiimidler üzerinde çalışılmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan perilendiimidlerin yoğun güneş radyasyonu altında bile oldukça yüksek fotokararlılığı olduğu tespit edilmiştir. Perilendiimidler, singlet foto duyarlaştırıcı olarak bilinirler. Bu özelliklerinden dolayı perilendiimidler, foto oksidasyonlarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntem iki çeşit yolla uygulanmaktadır. Birincisi enerji transfer yoluyla ikincisi de elektron transfer yoluyla uygulanır. Enerji transfer yolunda triplet oksijenden (3O_2), singlet oksijen oluşturulur. Oluşturulan singlet oksijenin substratlarla etkileşime girmesi sağlanır. Elektron transfer fotouyarılmış

oksidasyonda genellikle elektron değişiminden yararlanılır. Bu oksidasyonda oksijen moleküler halden, süper oksit anyon radikaline ($O_2^{\cdot-}$) dönüşüm ile sağlanmaktadır. Süper oksit anyon radikalleri de katyonik alken radikalleriyle tepkimeye girerek yükseltgenme ürünlerini oluştururlar [42].

Güneş ışığından yararlanarak elde edilen kimyasalların üretimi fotokimyasal açıdan oldukça önemlidir. Ancak güneş ışığının kısa süreli olmasından güneş ışığıyla yapılan fotosentezler güvenilirlik teşkil etmez. Perilendiimidlerin oldukça yüksek fotokararlılıkları olduğu bilinir. Fotokimyasal işlemler konsantre güneş ışınlarında daha hızlı ilerler. Sadece inorganik fotouyarıcıların konsantre güneş ışığında yapılan uygulamalarda, fotokararlılığının yüksek olduğu bilinir. Diğer bir yandan laboratuvar koşullarında bazı organik fotouyarıcıların kullanılmasıyla başarılan birçok fotosentez vardır. Bu fotouyarıcılardan bir tanesi de perilendiimidlerdir [43].

1.3 Glutasyon-S-Transferaz (GST) Enzimleri, İnhibitörleri ve Terapötik Önemi

Doğal koruyucu sistemlerden biri olan GST'ler antikanser ilaçlar, herbisid, pestisid, kimyasal karsinojenler ve çevresel kirlilikler gibi elektrofilik zenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli bir role sahiptirler [44].

GST'ler ilk kez Boyland ve ark. tarafından sıçan karaciğerinde tanımlanmış ve sonrasında GST'nin farklı formlarının elektrofilik substrat özgülüklerine göre sınıflandırılması yapılmıştır [45,46]. Ancak enzimin birçok formunun saflaştırılması ve ayırımıyla, tanımlanan formlarının, içiçe geçmiş substrat özgülüklerinin olduğu anlaşılmıştır [47,48].

GST'ler doğada çok yaygın dağılım göstermektedir. Her ne kadar en ayrıntılı biçimde memelilerde (Şekil 1.6) araştırılmış olsalar da, bitkiler, kuşlar, sinekler, balık ve solucanlarda da bu enzim aktivitesi saptanmıştır [49-51].



Şekil 1.6 İnsan sitozolik GST izozimlerinin 3 boyutlu yapısı [54].

Glutatyon-S-transferaz (GST) enzimlerinin temel görevi pestisitler, çevresel kirleticiler, oksidatif stres ürünleri, kemoterapide kullanılan ilaçlar gibi reaktif kimyasal bileşiklerin (elektrofilik zenobiyotiklerin) organizmada oluşturacağı oksidatif zararlara karşı hücreyi korumaktır [49].

Reaktif elektrofiller, nükleik asitler ve hücresel proteinlerde bulunan nükleofilik gruplarla kovalent bağ yaparak, doku zedelenmesi, kanser oluşumu, gen yapısında bozukluk ve teratojenik etki gibi toksik etkilerin ortaya çıkmasına neden olurlar [49]. GST katalizindeki detoksifikasyon ise elektrofilik merkezi bulunan bir bileşiğin bir tiyoeter bağı ile glutatyona (GSH) bağlanması (konjugasyonu) ve bu reaktif elektrofillerin hücresel makromoleküller (DNA, RNA, protein) ile bağlanmalarını engelleyerek hücre hasarını önlemesi şeklinde gerçekleşmektedir [49,52,53,55,56].

Kanserojenlerle ve kemoterapötik ajanlarla etkileşimlerinden dolayı, GST'ler kanserle mücadele açısından önem taşımaktadır. GST düzeyinin prooksidanlara maruz kalınması halinde balıklarda, böceklerde, bitkilerde ve bakterilerde arttığı [57-59], insanlarda görülen çok farklı tümörlerde (akciğer, kolon, böbrek, over, özefagus

ve mide) GST enzim ailesinden olan GSTP1-1'in fazla miktarda salgılandığı bulunmuştur [56,60-63].

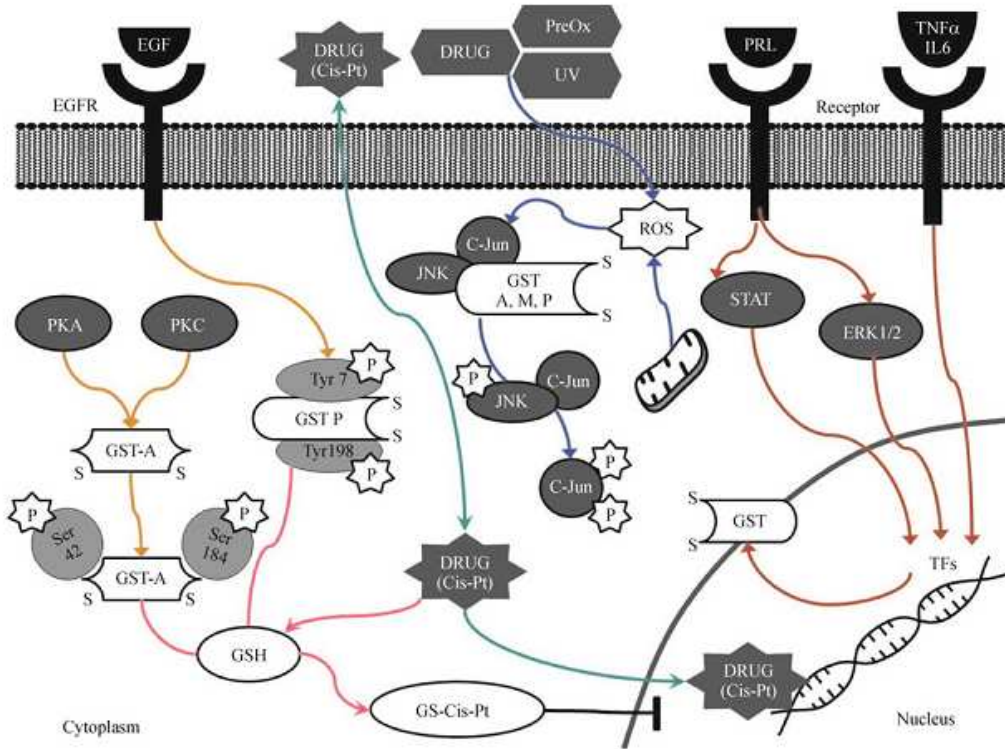
GST enziminin memelilerin tümör hücrelerinde aşırı miktarda üretilmesi bazı antikanser ilaçlara ve kimyasal karsinojenlere karşı direnç oluşmasına sebep olmaktadır [50,56]. GST'ler tarafından metabolize (detoksifiye) edilen ilaçlar arasında adriamisin, 1,3-bis (2-kloroetil)-1-nitrozüre (BCNU), bisulfan, cisplatin, karmustin, klorambusil, siklofosamid, etakrinik asit, melfalan, mitozantron ve tiyotepa sayılabilir [50,64]. Artmış GSH ve GST seviyelerinin GST ile etkileşime giren cisplatin ve diğer pek çok konvansiyonel (geleneksel) kemoterapiklerin metabolizmasını hızlandırması, bu ilaçların etkinliğinde azalmaya (Şekil 1-7), bir başka deyişle ilaca karşı direnç geliştirilmesine sebep olduğu gösterilmiştir [56,65,66].

Kemoterapötik bileşiklere gelişen direncin ortadan kaldırılmasında GST inhibitörlerinden (özellikle GST-P) terapötik amaçla yararlanmak için kendisi inaktif olan ve tümör hücrelerinde yükselmiş seviyelerde bulunan GST gibi enzimlerin inhibitörleri ile özgül olarak toksinlerine dönüşen ön ilaçların beraber uygulanmasıdır. Enzimle bağlanarak aktivitesini azaltan moleküllere inhibitör adı verilir. Sadece enzimi kontrol etmek değil, enzimin çalışma mekanizmasını aydınlatmak için aktif merkezini ve katalitik mekanizmasını araştırmak amaçlı olarak da inhibitörler kullanılır. Hücrel enzim aktivitesini kontrol edebilmeleri sebebiyle bazı inhibitörlerden terapötik amaçlı olarak yararlanılmaktadır [67,68,69].

Bu bilgilere ilave olarak son yıllarda yapılan çalışmalar π ve μ sınıf GST'lerin, hücrel yaşam ve ölüm sinyal iletimine katılan, mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (mitogen-activated protein kinase, MAP kinase) yolağındaki düzenleyici rolünün de kemoterapötik ilaçlara direnç gelişmesinde etkili olduğunu göstermiştir [70]. Bu nedenle kemoterapide, geleneksel elektrofilik kanser ilaçlarının (alkilleyici bileşiklerin) etkinliğinin düzenlenmesinde, GST inhibitörlerinin kullanımının faydalı olabileceğinin belirlenmesiyle çeşitli GST inhibitörleri geliştirilmiştir [71,72].

Perilen türevi olarak ise çok çalışılmış olan hiperisin'in GST enzimleri için seçici olmayan bir inhibitör olduğu gösterilmiştir. Hiperisin (1,3,4,6,8,13-hekzahidroksi-10,11-dimetillfenantro[1,10,9,8-opqra]perilene-7,14-dion) molekülü *Hypericum perforatum* bitkisinden elde edilmiş doğal kaynaklı bir bileşik olup çoğunlukla kinaz çalışmalarında incelenmiş ve seçici olmayan kinaz inhibitörü olarak belirlenmiştir [73,74]. Kromojen yapısının fotolitik aktivasyon oluşturması sebebiyle son yıllarda ise fotodinamik terapi çalışmalarında detaylı olarak incelenmeye başlanmıştır.

GST inhibitörleri arasında GSH konjugasyon ve GSH türevleri, steroid ve porfirin türevleri sayılmaktadır, ancak halen GST enzim ailesine ait enzimler için seçici bir inhibitör bulunamamıştır [68,69]. Bu gün için GSH türevi (glutatyon disülfür) olarak sentezlenmiş sadece bir GST inhibitörünün (NOV-002) klinik çalışmalarda kullanılmak üzere onay almıştır [75].

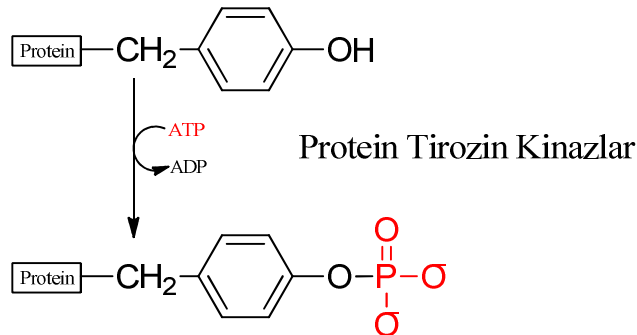


Şekil 1.7 İnsan sitozolik GST izozimlerinin Cisplatin, reaktif oksijen bileşikleri ve diğer sinyal iletim enzimleri ile etkileşimleri [56].

1.4 c-Src Reseptörsüz Protein Tirozin Kinazi, İnhibitörleri ve Terapötik Önemi

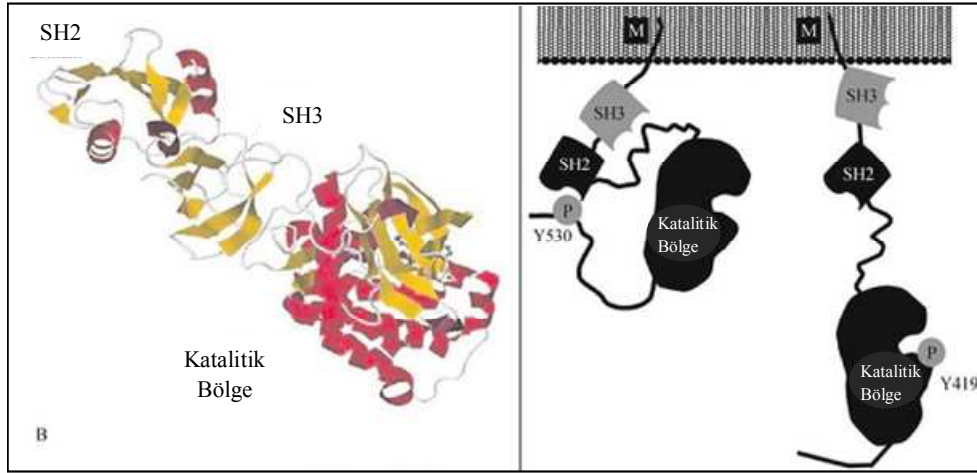
Tirozin kinazlar, hücre çoğalması, farklılaşması ve taşınması gibi biyolojik olayların düzenlenmesi ve yürütülmesi için gerekli hücrel sinyal iletim yollarında protein fosforilasyonunu sağlayarak rol alan önemli düzenleyicilerdir [76, 77]. Protein fosforilasyonu, kinaz adı verilen enzimlerin katalizliğinde ATP'nin gama fosfat grubunun hedef proteinde bulunan tirozinin, serin, threonin gibi amino asitlerin hidroksil grubuna transfer edilmesiyle gerçekleşir (Şekil 1.8) ve fizyolojik koşullarda tersinir bir reaksiyondur [78]. Enzim katalizliğindeki fosforilasyonun hangi amino asitlere özgü gerçekleştiğine göre kinaz enzimleri sınıflandırılır. Diğer taraftan tirozin kinazlar, hücre içerisindeki aktivasyon mekanizmalarına göre de reseptör tirozin kinazlar (RTK) ve reseptörsüz tirozin kinazlar (NRTK) olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılır. İnsan genomunda tanımlanmış 90 tirozin kinazın 58'i reseptör tirozin kinazlara, 32'si ise non-reseptör tirozin kinazlara aittir [79]. RTK'lar hücre dışı sinyallerin sitoplazmaya iletilmesini sağlarken, NRTK'lar ise hücre içi sinyal iletiminde rol alırlar [78].

Reseptörsüz tirozin kinazlardan olan Src ailesi kinazları (Src family kinase, SFK), protein tirozin kinaz ailesi içerisinde hücre büyümesi, farklılaşması, motilitesi, kanser oluşumu, bağışık hücre fonksiyonu gibi çeşitli düzenlemelerde en çok rol oynayan enzimlerdir [80].



Şekil 1.8 Protein tirozin kinaz katalizliğinde hedef (substrat) protein yapısında bulunan tirozin kalıntısının fosforilasyonu .

Bu enzim ailesine adını veren c-Src tanımlanmış ilk tirozin kinazdır ve Src enzim ailesinin ilk üyesidir. SFK enzimlerinin son yıllarda yapılmış çalışmalarla c-Src(pp60^{c-Src}), Fyn, Yes, Yrk, Lyn, Lck, Hck, Fgr ve Blk olmak üzere 9 üyesi olduğu belirlenmiştir. Ancak bunların içerisinde sinyal iletimde merkezi rol en etkin enzim c-Src (Şekil 1.9) olarak belirlenmiştir [56,80-82].



Şekil 1.9. c-Src reseptörsüz tirozin kinaz'ın yapısı, fosforilasyon durumuna göre aktif olan ve olmayan konformasyonları [56]

Reseptörlü ve reseptörsüz tirozin kinazların kanser oluşumundaki rolünün anlaşılması, antikanser ilaç geliştirme çalışmalarının tirozin kinazlar üzerine yoğunlaşmasını sağlamıştır [83]. Ancak bu kinazlar için seçici bir inhibitör bulunması aynı sinyal iletim yolağında görev yapmaları ve benzer fosforilasyon mekanizmaları ile aktifleşmeleri gibi birçok nedenden dolayı zordur. RTK'ların aktive ettikleri sinyal iletim yolaklarında, NRTK'lar da rol almaktadır ve aktifleşen RTK'ların sitoplazmik fosfotirozin bölgelerine, c-Src'in SH-2 bölgeleri aracılığıyla bağlanmaları sebebiyle c-Src hem reseptörlü hem reseptörsüz iletim basamaklarında merkezi rol oynadığı belirlenmiştir [84]. Örneğin reseptör tirozin kinaz sinyal iletim yolaklarından en önemlisi olan Ras-Mitogen aktive edici protein kinaz (Ras-Mitogen Activated Protein Kinase, Ras-MAPK) yolağı büyüme faktörlerinin ilgili reseptörleri aktive etmesiyle tetiklenir ve insan tümörlerinin % 30'unda Ras/Raf/MEK/ERK yolağının kontrolsüz aktivasyonu belirlenmiştir [77]. Aktif Src, çeşitli adaptör proteinleri fosforilleyerek, Ras/MEK/ERK sinyal iletim yolağına dâhil olur. Bu yolla çekirdeğe ulaşan sinyaller gerekli gen transkripsiyonunu sağlar. [85].

Bugüne dek reseptörlü ve reseptörsüz sinyal iletim yollarını kontrol etmek amaçlı çeşitli inhibitörler geliştirilmiş olup bunların bir kısmı terapötik olarak kanser ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde halen kullanılmaktadır. Ancak c-Src gibi merkezi bir enzimin seçici olarak inhibisyonunu gerçekleştirecek inhibisyon henüz bulunamamış olup bu konuda halen yoğun çalışmalar sürmektedir [56,77,78].

Sonuç olarak, antikanser etkinliklerini belirlemede önemli c-Src tirozin kinaz (c-Src) ve Glutasyon-S-Transferaz (GST) enzim aktivitelerinin inhibisyonuna yol açan moleküllerin tasarım ve sentezinin hedefe özgün ilaç tasarım ve geliştirilmesinde oldukça önemlidir. Ancak bugüne dek GST üzerine etkili perilen türevi moleküllerin çok az çalışılmış olması ve bu moleküllerin c-Src üzerine olan etkinliklerinin ise hiç belirlenmemiş olması sebepleriyle, bu çalışmada sentezlenmiş olan birbirinden farklı, dört yeni perilendiimid molekülünün c-Src ve GST için seçici inhibisyon özelliklerinin varlığı araştırılacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 MATERYALLER

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

2.1.1.1 Sentez Aşamasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyisel çalışmalarda kullanılan L-glutamik asit di-tert-butil ester hidroklorit, L-alanine tert-butil ester hidroklorit ve 1-butanol Sigma-Aldrich Co. LLC'den; silikagel, brom, 3,4:9,10-Perilenetetrakarboksilik 3,4:9,10-dianhidrit, sülfürik asit, trietilamin, asetik asit, trifluora asetik asit Merck Chemicals'dan; kloroform ve metanol Tekkim Kimya San. Ve Tic. Ltd. Şti'den satın alınmıştır.

2.1.1.2 Aktivite Ölçüm Ve Tayin Aşamasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyisel çalışmalarda kullanılan indirgenmiş glutatyon, etilendiamintetraasetik asit, bovine serum albümin, sodyum dodesil sülfat, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA'den satın alınmıştır. The ProFluor(R) Src-Family Kinase Assay reaksiyon sistemi ve src enzimi Promega corporation, Wisconsin USA'den satın alınmıştır.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

2.1.2.1 Sentez Aşamasında Kullanılan Alet ve Cihazlar

Buchi Rotavapor R-200 (Evaporatör)
Buchi Heating Bath B-490 (Isıtma Banyosu)
Wisetherm Heating Mantle (Isıtma Mantosu)
Heidolph MR-3001K (Manyetik Karıştırıcı)
DragonLab MS-H-S (Manyetik Karıştırıcı)
Rocker 300 (Vakum Pompası)

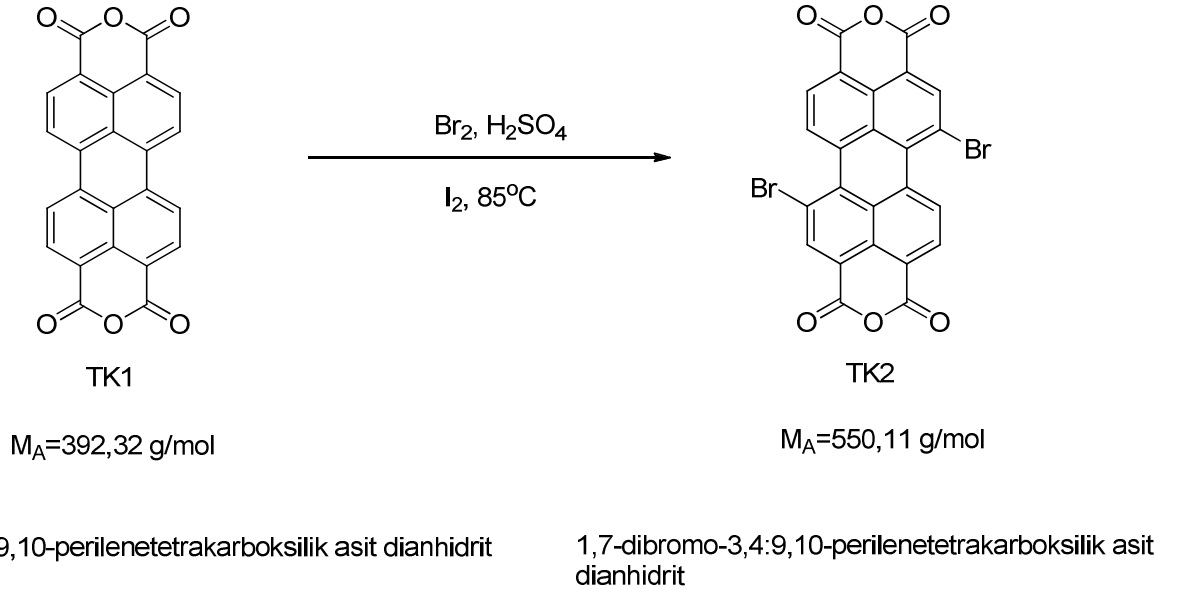
Siemens KD40NV-03-NE (Buzdolabı)
Mettler Toledo XS64 (Hassas Terazi)
T80 UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd.(UV Spektrometresi)
UVGL-58 Handheld UV Lamp (UV El Lambası)
LC-MS Q-TOF Agilent 6500 Series (Kütle Spektrometresi)
Bruker Instruments Avance Series-Spectrospin DPX-400 Ultra Shield (400 MHz) High Performance Digital NMR Spectrometer (NMR Spektrometresi)

2.1.2.2 Aktivite Ölçüm Ve Tayin Aşamasında Kullanılan Alet ve Cihazlar

SpectraMax M2e Multi-Mode Microplate Reader (Spektrofotometrik Ve Floresan Ölçümler)

2.2 YÖNTEMLER

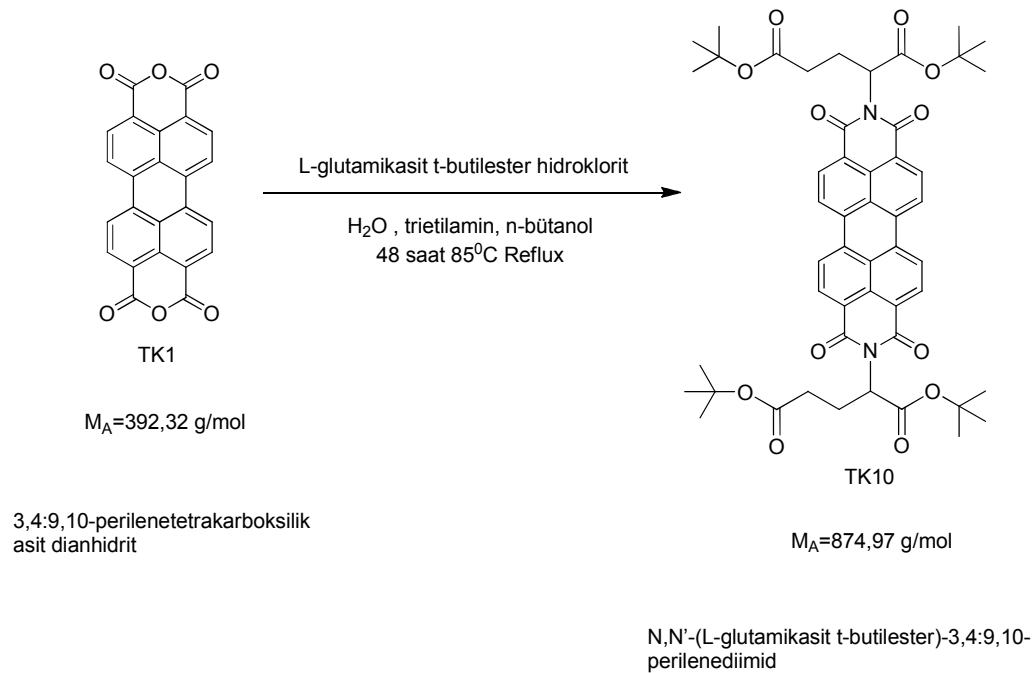
2.2.1 1,7-dibromo-3,4:9,10-perilenetetrakarboksilik asit dianhidrit Sentezi (TK2)



Şekil 2.1 1,7-dibromo-3,4:9,10-perilentetrakarboksilik asit dianhidrit Sentezi (TK2).

1,47 g ($3,74 \times 10^{-3}$ mol) TK1, 12,01 ml H_2SO_4 ve 0,032 g I_2 ($5,73 \times 10^{-4}$ mol) 24 saat boyunca basınç tüpünde karıştırıldı. 30 dakika $85^\circ C$ 'de ısıtılır ve oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 7 ml Br_2 eklenerek 24 saat boyunca karıştırıldı. Karışım $85^\circ C$ 'ye kadar ısıtıldı ve 5 ml Br_2 eklenerek 24 saat boyunca karıştırıldı. H_2SO_4 konsantrasyonu düşürmek için 1,67 ml saf su 200 μl halinde yaklaşık 7 dakika aralıklarla eklendi. Oda sıcaklığına gelen karışım 15 ml %86'lık H_2O - H_2SO_4 karışımı ile filtreli cam hunide yıkandı. Daha sonra çökelti 25 ml saf su içinde konarak 30 dakika karıştırıldı ve filtre kâğıdından geçirilerek kurutuldu (Verim % 82).

2.2.2 N,N'-(L-glutamikasit t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK10)



Şekil 2.2 N,N'-(L-glutamikasit t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK10).

0,5 g TK1, 0,377 g L- glutamik asit di-ter butilester hidroklorit tuzu, 10 ml n-butanol, 10 ml H_2O ve 1,5 ml trietilamin balonda 48 saat boyunca $85^\circ C$ 'de reflux yapıldı. Oluşan madde evaporatörde kurutuldu ve $CHCl_3/CH_3OH$ (95:05) sistemiyle

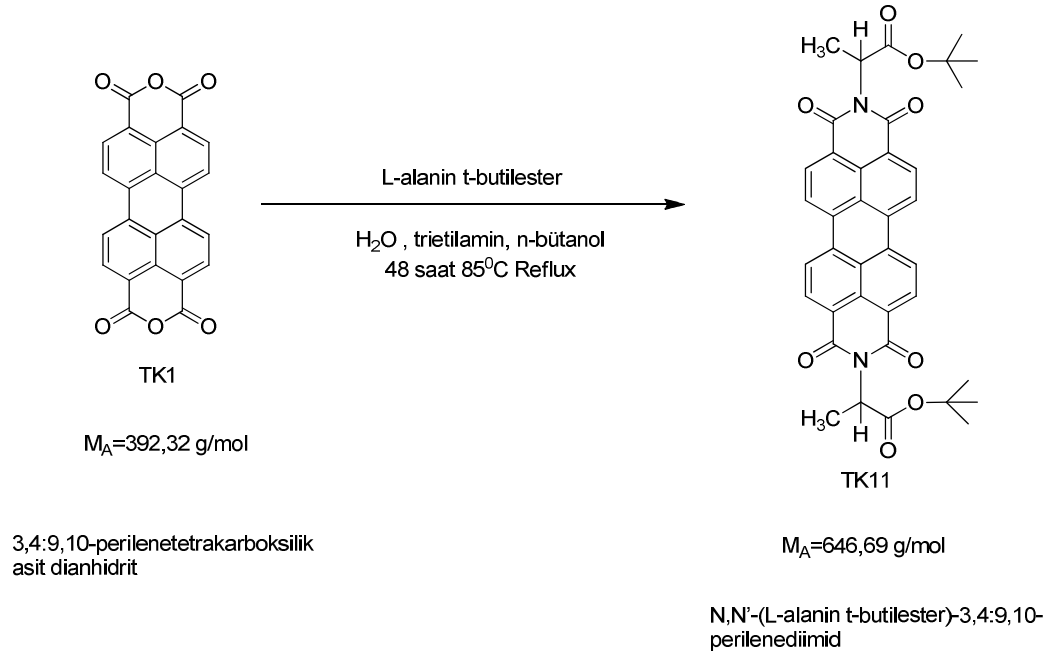
kolon yapılarak saflaştırıldı. Çözücü vakum altında uçuruldu. Saf madde kurutulduktan sonra CDCL₃ içinde NMR analizleri yapıldı. Kütle spektrumu alındı.

(1) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) , δ[ppm], 1,39(s, 36H, -C(=O)O-C), 2,36(m, 4H, -CH₂), 2,65(m, 4H, -CH₂), 5,65(t, 2H, N-CH), 8,45(d, J=8,12 Hz, 4H, CH-arom), 8,55(d, J=9,6 Hz, 4H, CH-arom) [Şekil 3.1]

(2) ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) , δ[ppm], 24,13; 27,97; 32,4; 76,88; 81,71; 122,96; 126,22; 129,36; 131,45; 134,41; 162,59; 167,97; 171,49 [Şekil 3.2]

(3) ESI-MS (m/z); 874,3666 [Şekil 3.3]

2.2.3 N,N'-(L-alanin t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK11)



Şekil 2.3 N,N'-(L-alanin t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK11).

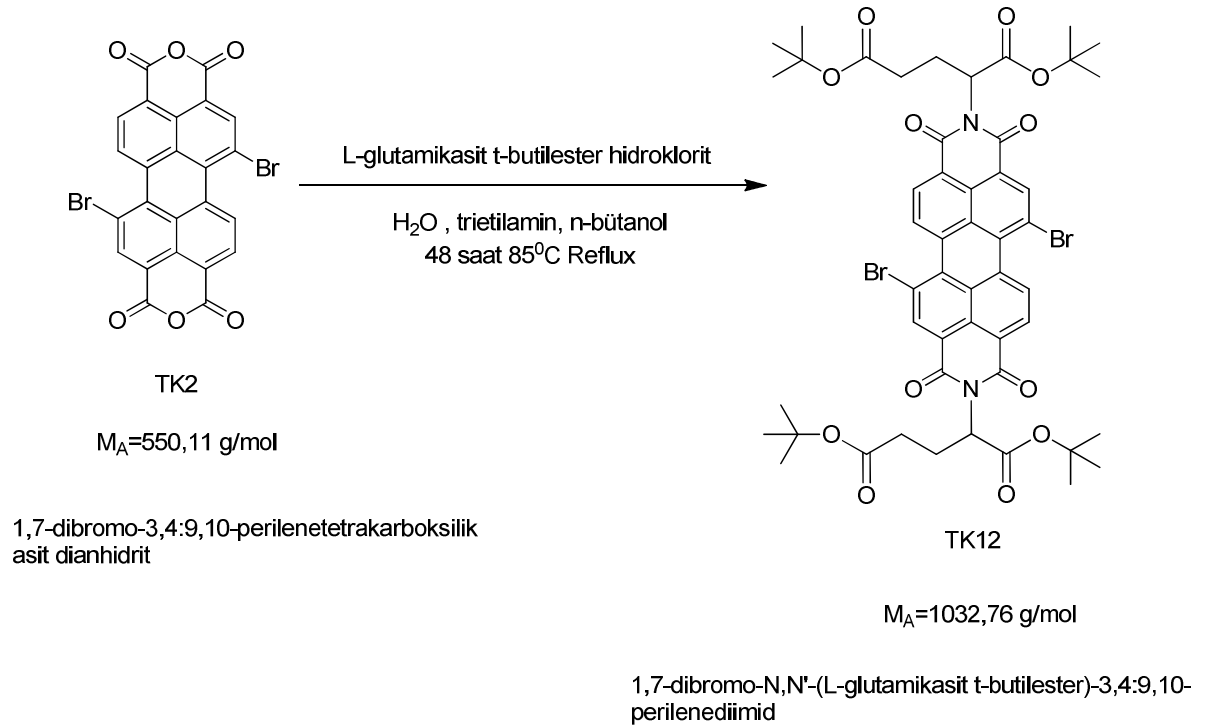
1 g TK1, 0,460 g L- Alanin tert-butilester hidroklorit tuzu, 10 ml n-butanol, 10 ml H₂O ve 1,5 ml trietilamin balonda 48 saat boyunca 85°C'de reflux yapıldı. Oluşan madde evaporatörde kurutuldu ve CHCl₃/CH₃OH (98:02) sistemiyle kolon yapılarak saflaştırıldı. Çözücü vakum altında uçuruldu. Saf madde kurutulduktan sonra CDCL₃ içinde NMR analizleri yapıldı. Kütle spektrumu alındı.

(1) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) , δ [ppm], 1,52(s, 18H, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{C}$), 1,71(d, $J=7$ Hz, $-\text{CH}_3$), 5,68(multiplet, 2H, N-CH), 8,35(d, $J=8,08$ Hz, 4H, CH-arom), 8,49(d, $J=7,96$ Hz, 4H, CH-arom) [Şekil 3.4]

(2) ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) , δ [ppm], 14,79; 27,96; 50,15; 81,47; 122,72; 125,99; 129,10; 131,20; 134,17; 162,15; 168,57 [Şekil 3.5]

(3) ESI-MS (m/z); 646,2279 [Şekil 3.6]

2.2.4 1,7-dibromo- N,N' -(L-glutamikasit t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK12)



Şekil 2.4 1,7-dibromo- N,N' -(L-glutamikasit t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK12).

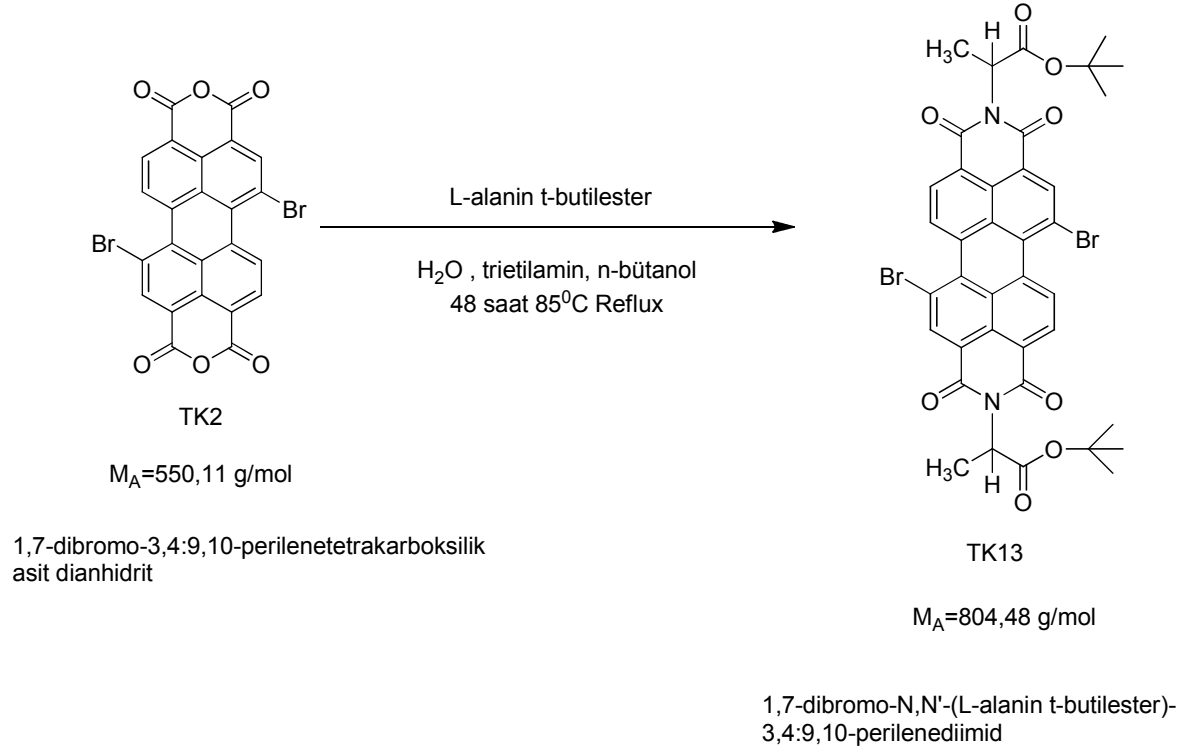
0,5 g TK2, 0,537 g L- glutamik asit di-ter butilester hidroklorit tuzu, 12,5 ml n-butanol, 12,5 ml H_2O ve 2 ml trietilamin balonda 48 saat boyunca 85°C 'de reflux yapıldı. Oluşan madde evaporatörde kurutuldu ve $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95:05) sistemiyle kolon yapılarak saflaştırıldı. Çözücü vakum altında uçuruldu. Saf madde kurutulduktan sonra CDCl_3 içinde NMR analizleri yapıldı. Kütle spektrumu alındı.

(1) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) , δ [ppm], 1,36(s, 36H, -C- CH_3), 2,3(m, 2H, 2H,- CH_2), 2,7(m, 2H, 2H,- CH_2), 5,6(t, 2H, N-CH), 8,7(d, J=8,16 Hz, 2H, 2H, CH-arom), 8,9(s, 2H, CH-arom), 9,5(d, J=8,16 Hz, 2H, 2H, CH-arom) [Şekil 3.7]

(2) ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) , δ [ppm],29.26; 30,18; 32.31; 45,30; 80,51; 127,45; 130,18; 137,04; 138,12; 144,26; 167,59; 168,73; 171,38 [Şekil 3.8]

(3) ESI-MS (m/z);1032,1830 [Şekil 3.9]

2.2.5 1,7-dibromo-N,N'-(L-alanin t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK13).



Şekil 2.5 1,7-dibromo-N,N'-(L-alanin t-butilester)-3,4:9,10-perilenediimid Sentezi (TK13).

1 g TK2, 0,660 L- alanin t-butilester hidroklorit tuzu, 12,5 ml n-butanol, 12,5 ml H_2O ve 2 ml trietilamin balonda 48 saat boyunca 85°C 'de reflux yapıldı. Oluşan madde evaporatörde kurutuldu ve $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (98:02) sistemiyle kolon yapılarak saflaştırıldı. Çözücü vakum altında uçuruldu. Saf madde kurutulduktan sonra CDCl_3 içinde NMR analizleri yapıldı. Kütle spektrumu alındı

(1) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) , δ [ppm], 1,49(s, 18H, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{C}$), 1,67(d, $J=7,09$ Hz, $-\text{CH}_3$), 5,22(multiplet, 2H, N-CH), 8,71(d, $J=8,161$ Hz, 4H, CH-arom), 8,92(s, 2H, CH-arom), 9,5(d, $J=8,16$ Hz, 4H, CH-arom) [Şekil 3.10]

(2) ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) , δ [ppm], 24,06; 29,74; 60,74; 81,11; 117,82; 123,18; 128,43; 132,84; 138,05; 168,30; 184,64 [Şekil 3.11]

(3) ESI-MS (m/z);804,0496 [Şekil 3.12]

2.2.6 Glutasyon S-Transferaz Aktivite Ölçümleri

Glutasyon-S-Transferaz ölçümlerine geçilmeden önce çözünürlüğü artırmak için 4 yeni perilenmiimidin uç gruplarında reaksiyon sırasında farklı grupların bağlanmasını önlemek için bağlı olan tersiyerbütül grupları TFA/ CHCl_3 1:1 oranında eklenip 1 saat süresince karıştırıldıktan sonra koparılmış oldu ve rotary evaporatörde uçurulup kurutuldu.

Habig ve arkadaşlarının kullandığı kinetik metodun [86] bazı düzenlemelerle mikropalakaya uyumlu hale getirilerek sığır karaciğer homejenatlarında Glutasyon S-transferaz enziminin GSH kullanımı 340 nm dalga boyunda ölçülmüştür [87].

Bu metotta kinetik ölçümler için kullanılan reaksiyon tamponu 100 mM potasyum fosfat (pH 6.5) tamponuna 2.4 mM CDNB (1-klorodinitro benzen) ve 3.2 mM GSH ile hazırlanmış ve reaksiyon 22-25°C aralığında homojenat eklenerek başlatılmıştır. Test edilecek bileşikler DMSO içerisinde çözüldüğünden kontrol olarak ilaç yerine DMSO kullanılmıştır. Reaksiyon kinetiği 340nm'de 240 saniye boyunca takip edilmiştir.

Ölçüm sonuçları Graphpad Prism 4.0 kullanılarak doza karşılık çizilen grafiklerinin 4-parametrelili sigmoid doz-cevap eğrisine çevrimi sonucunda aşağıda belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

2.2.7 c-Src Enzim Aktivitesinin Tayini

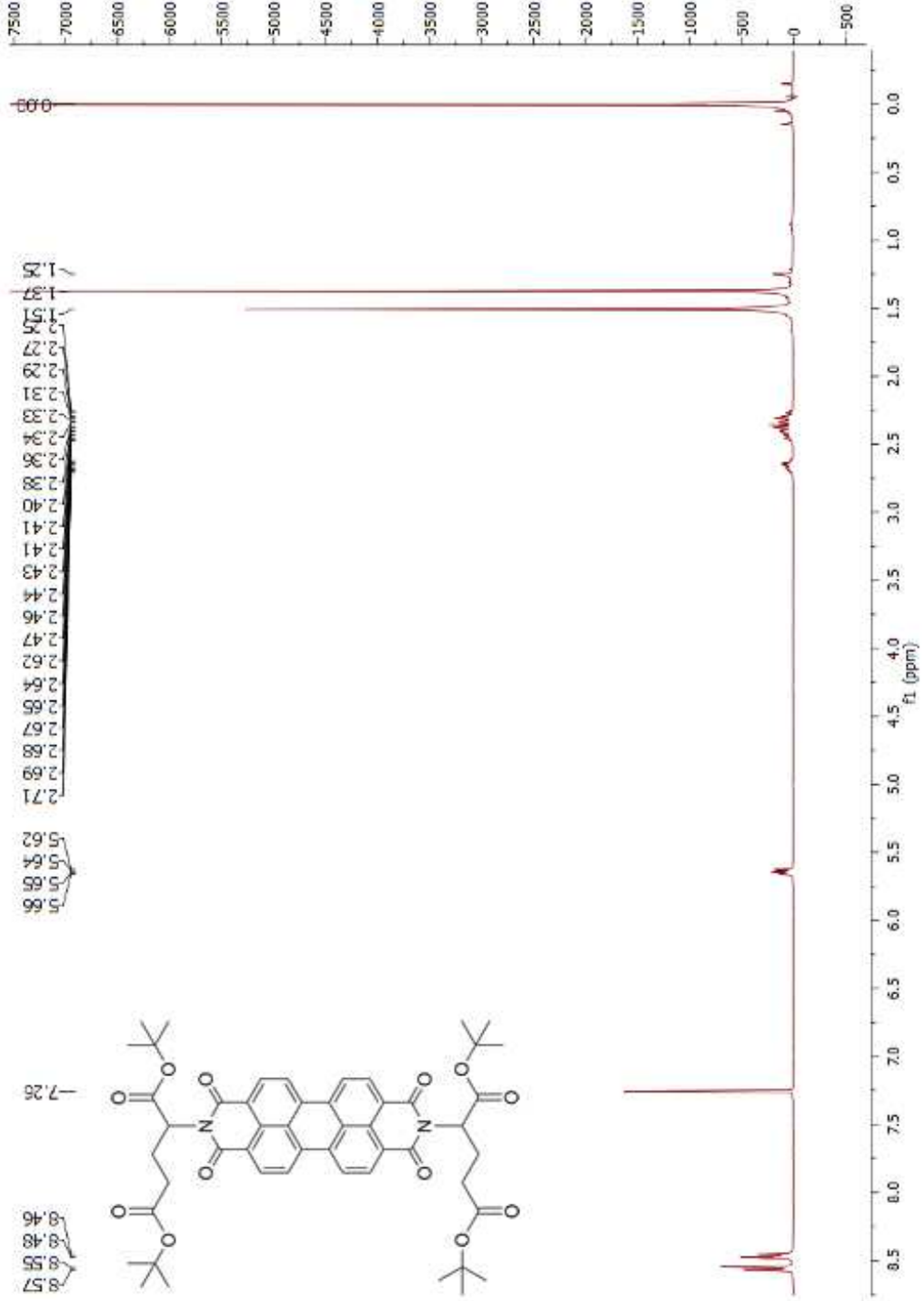
Src kinaz enzim aktivitesi "Promega profluor Src assay" kiti kullanılarak standardize edilmiş olan rhodamine (R110) bağlı peptidlerin Src kinaz tarafından fosfatlanmasını takiben oluşan fosfoürünlerin bağlı oldukları florojenik rodamin yapılarından bir proteaz enzimince koparılmaları sonucu oluşan ışımının takibiyle gerçekleştirilmiştir. Bu metodda enzim kontrol grubu olarak sadece DMSO ile etkileşirken test edilecek moleküllerin farklı dozları aynı şartlar altında enzim-substrat (R110-peptid) ve proteaz varlığında kademeli olarak reaksiyona sokulmuştur [88]. Analiz süreci için gerekli reaksiyon süreleri farklı test bileşikleri için ayrı ayrı belirlenmiş olup ortalama her aşama için 45 dakika ile 1 saat arasında değişim göstermiştir. Deney sonucunda kontrol substratı olan peptidsiz bir kumarin türevinin (AMC) ışması takip edilerek test edilen bileşiklerin protokolde kullanılan diğer bir enzim olan Proteaz ile etkileşimi olup olmadığı belirlenmiştir. Deneysel sonuç ise proteazda etki göstermeksizin R110 substratındaki fosforilasyon düzeyine bağlı olarak azalan Floresan ışımının takibiyle elde edilmiştir. Hesaplamalar Floresan Işımanın doza karşılık çizilen grafiklerinin 4-parametrelili sigmoid doz-cevap eğrisine cevrimi sonucunda $Y = \text{en düşük ışım düzeyi} + \frac{(\text{Enyüksek düzey} - \text{En düşük düzey})}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x)}}$ formülünün her bir data için tek tek uygulanmasıyla elde edilmiştir. X, konsantrasyon (molarite)'un logaritması, Y ise doza karşılık cevabı temsil etmektedir.

Hesaplamalar için GraphPad Prism4.0 programı kullanılmış olup, ön çalışmalarla çözünürlük, arka plan ışmaları ve benzeri problem yaratacak parametreler nötralize edildikten sonra deneysel ölçümler hem c-Src hem GST enzim aktiviteleri birbirinden bağımsız çift okumalı üç farklı deney olarak gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

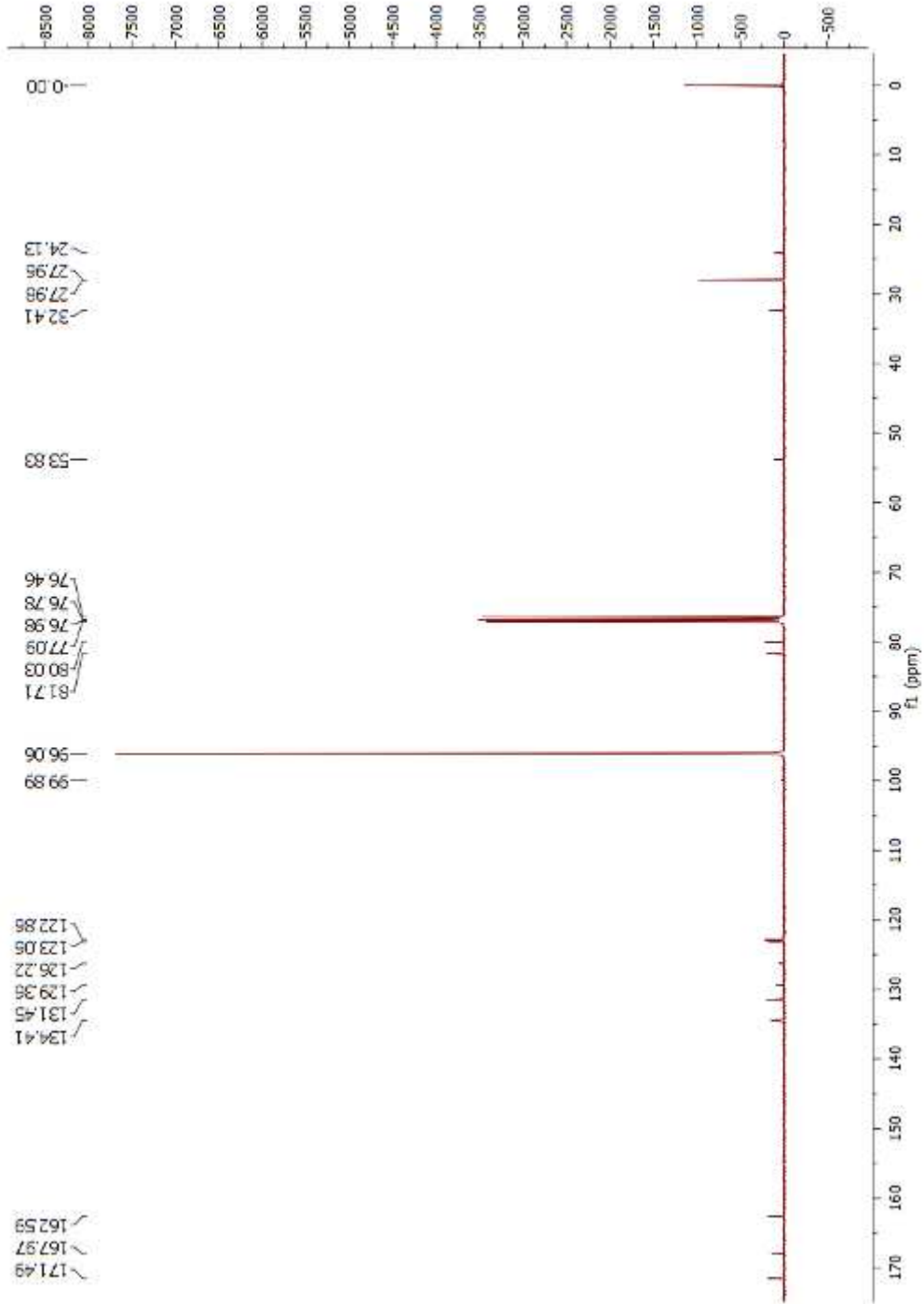
3.1 TK10 Maddesinin Spektrum Verileri

3.1.1 TK10 Maddesinin $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



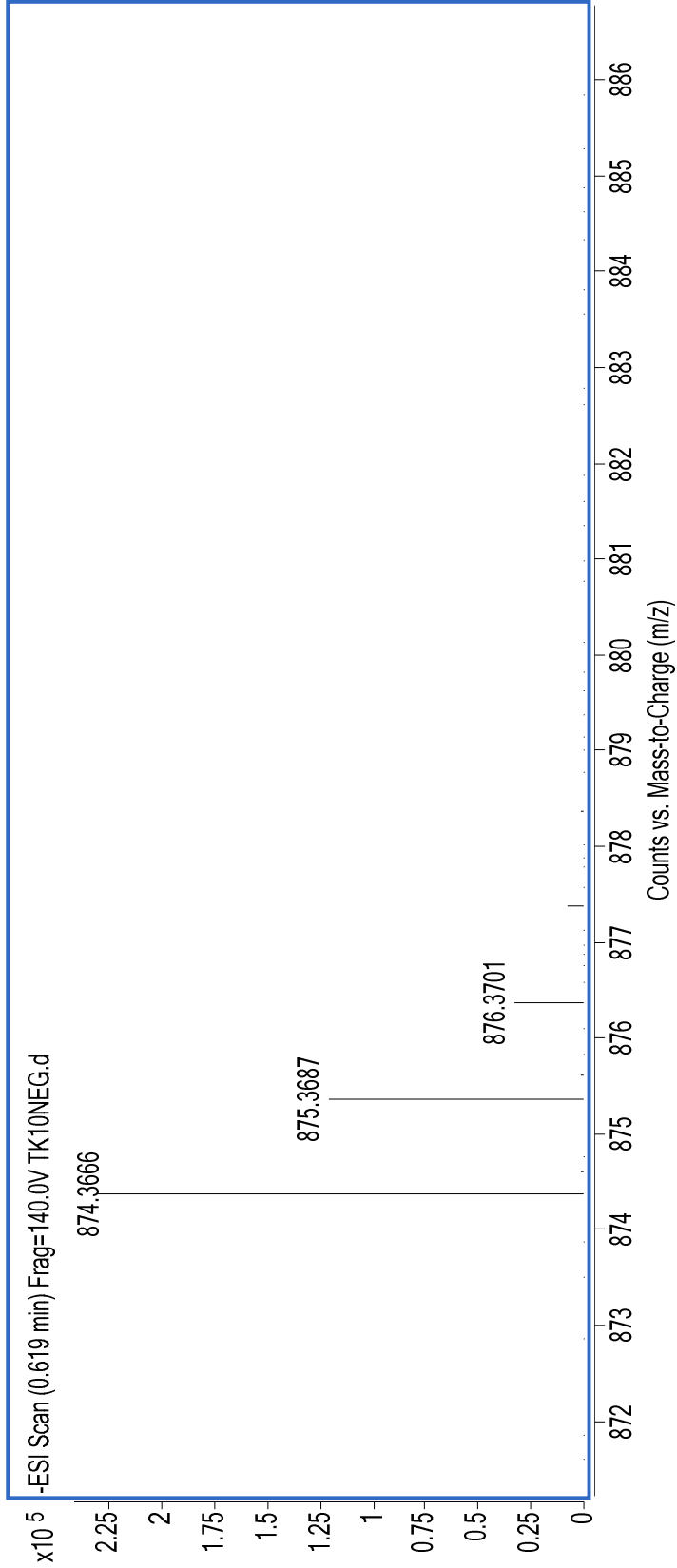
Şekil 3.1 TK10 Maddesinin $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu.

3.1.2 TK10 Maddesinin ^{13}C -NMR Spektrumu



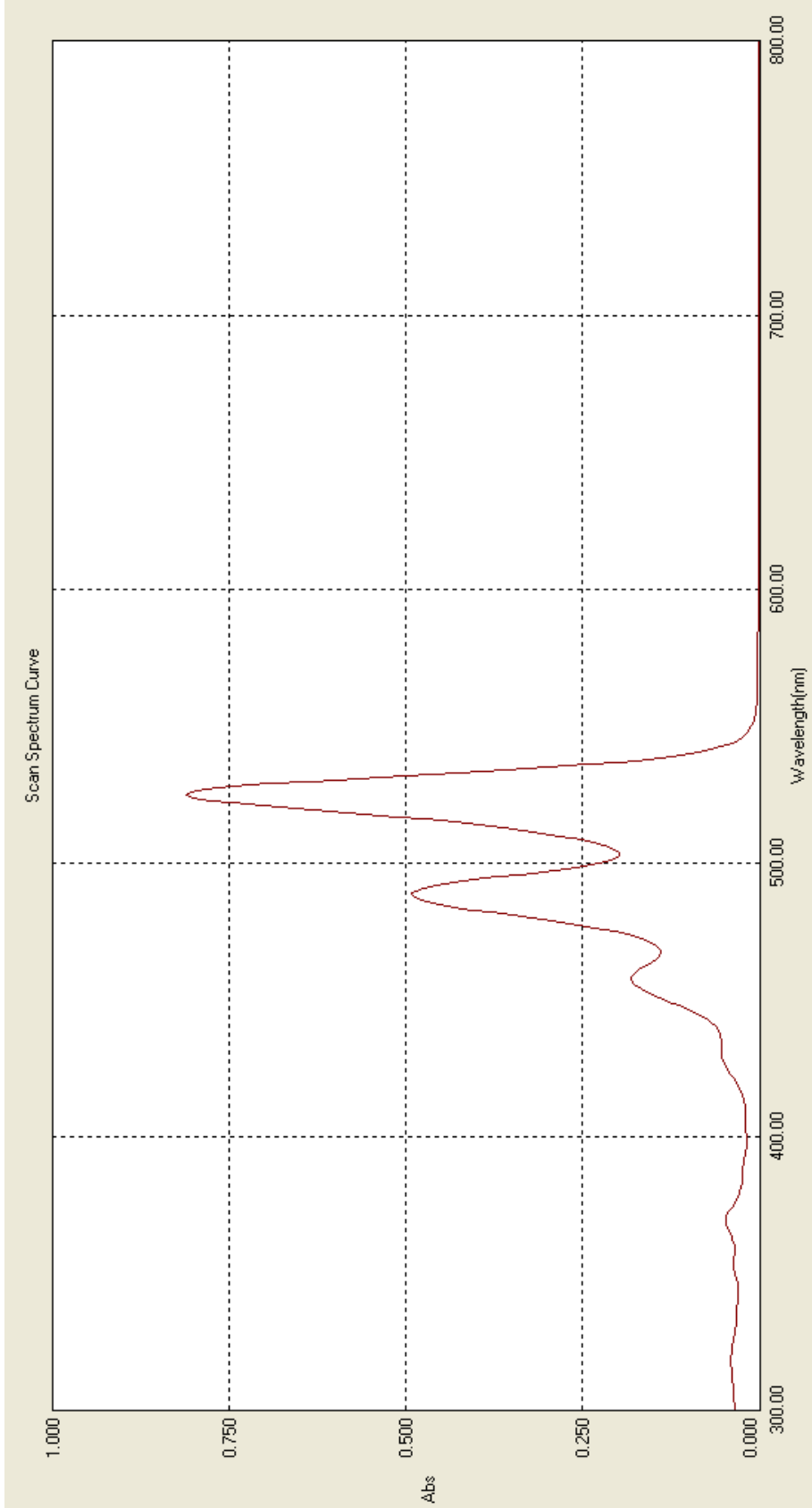
Şekil 3.2 TK10 Maddesinin ^{13}C -NMR Spektrumu.

3.1.3 TK10 Maddesinin Kütle Spektrumu



Şekil 3.3 TK10 Maddesinin Kütle Spektrumu.

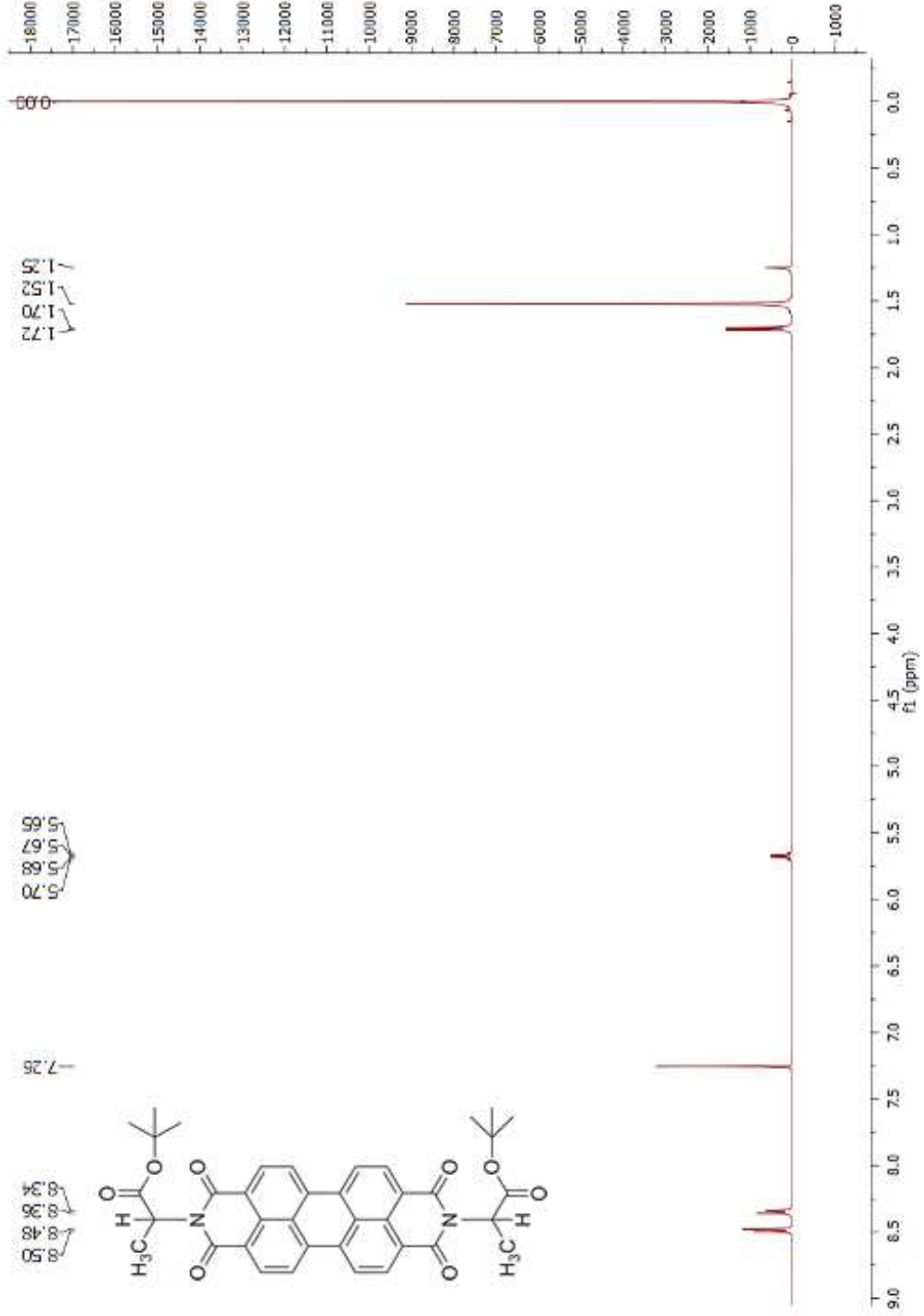
3.1.4 TK10 Maddesinin UV Spektrumu



Şekil 3.4 TK10 Maddesinin UV Spektrumu.

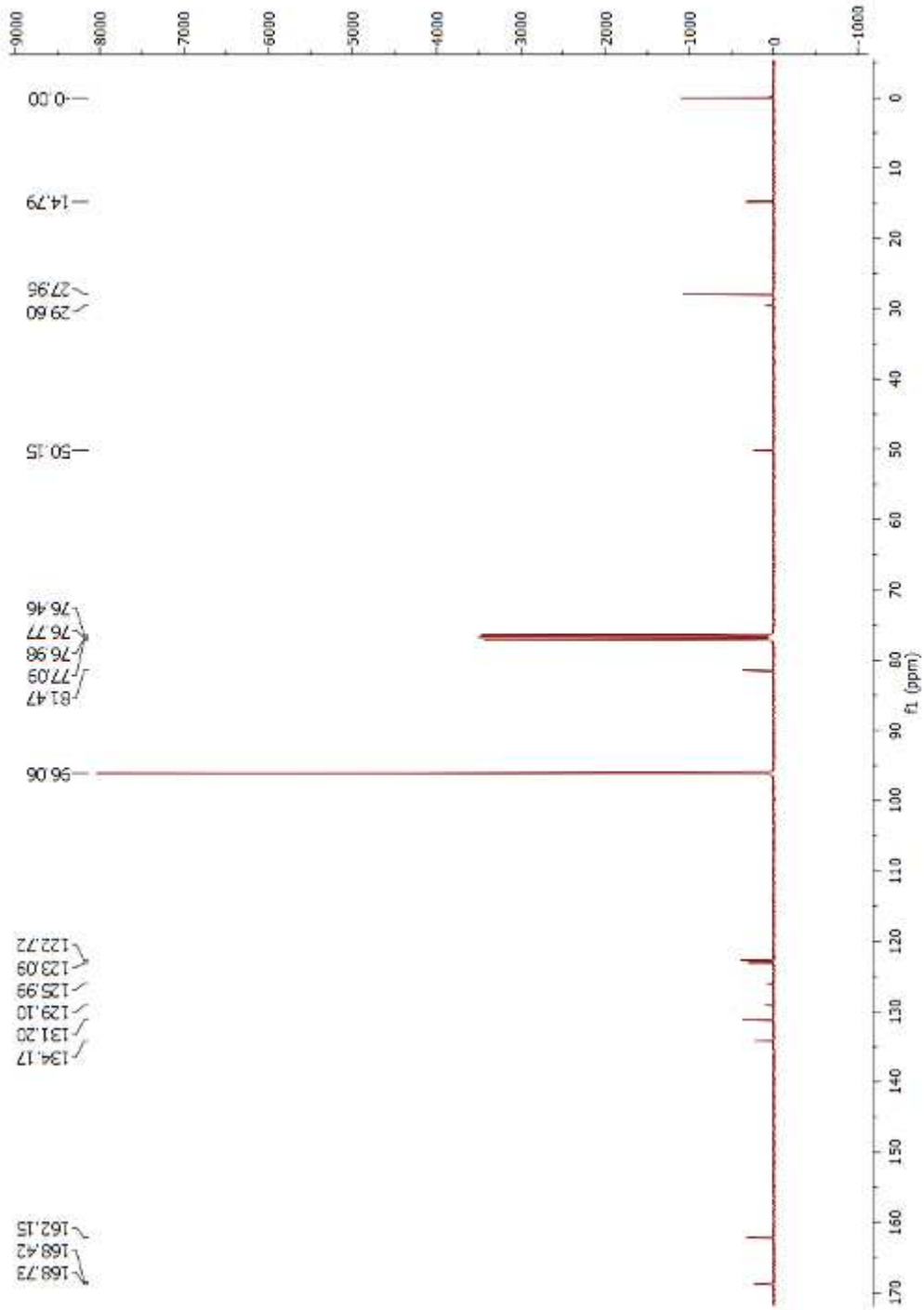
3.2 TK11 Maddesinin Spektrum Verileri

3.2.1 TK11 Maddesinin ¹H-NMR Spektrumu



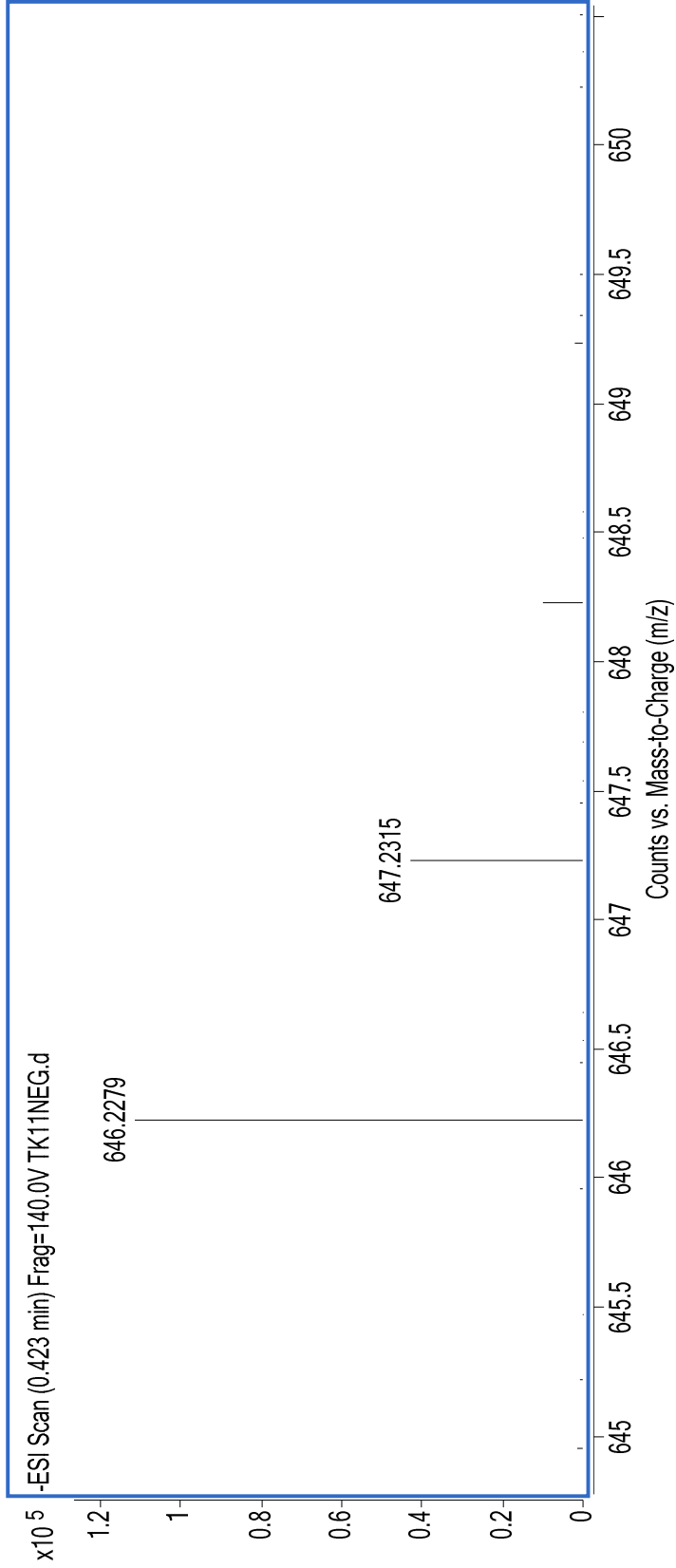
Şekil 3.5 TK11 Maddesinin ¹H-NMR Spektrumu.

3.2.2 TK11 Maddesinin ^{13}C -NMR Spektrumu



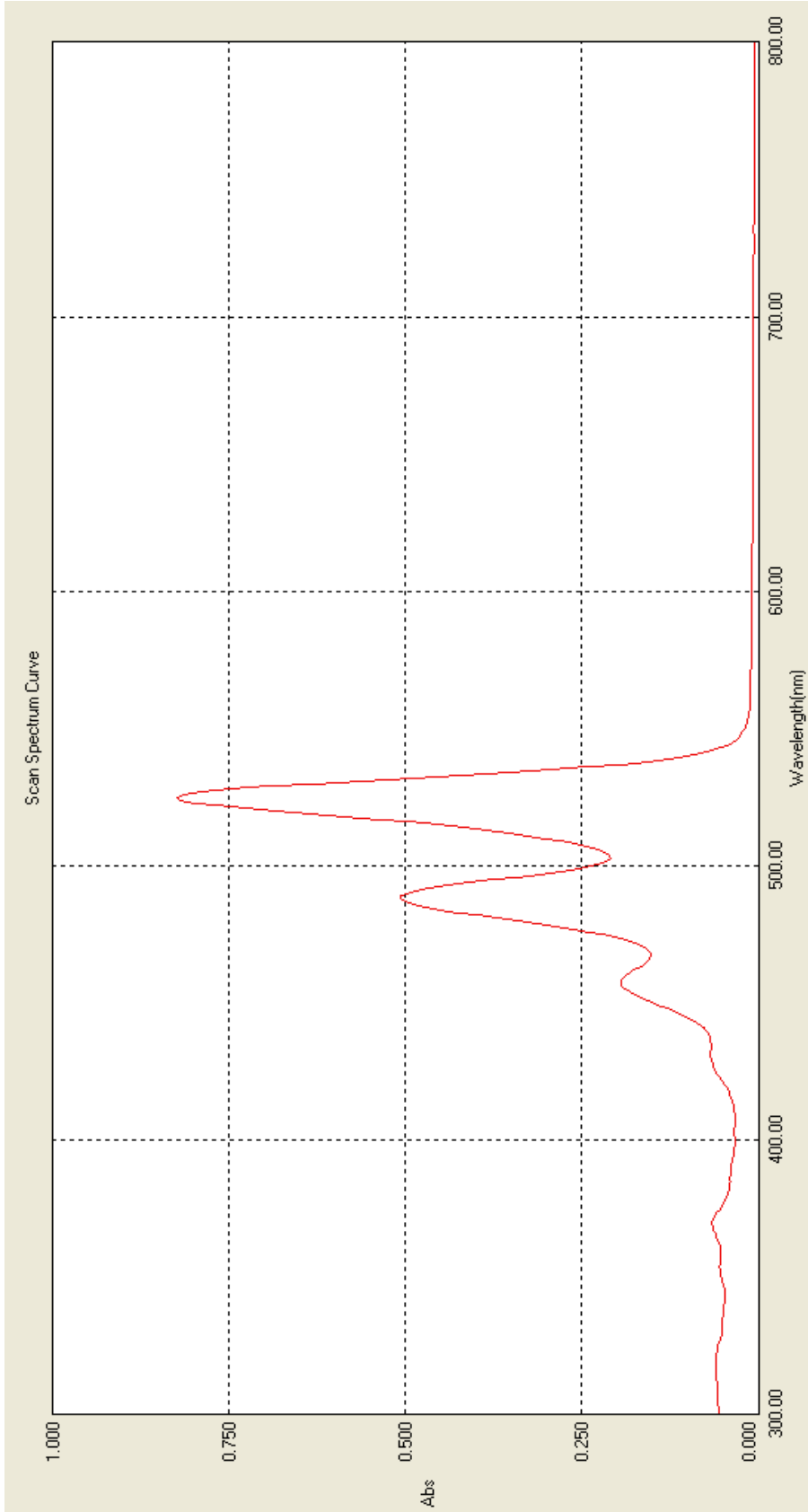
Şekil 3.6 TK11 Maddesinin ^{13}C -NMR Spektrumu.

3.2.3 TK11 Maddesinin Kütle Spektrumu



Şekil 3.7 TK11 Maddesinin Kütle Spektrumu.

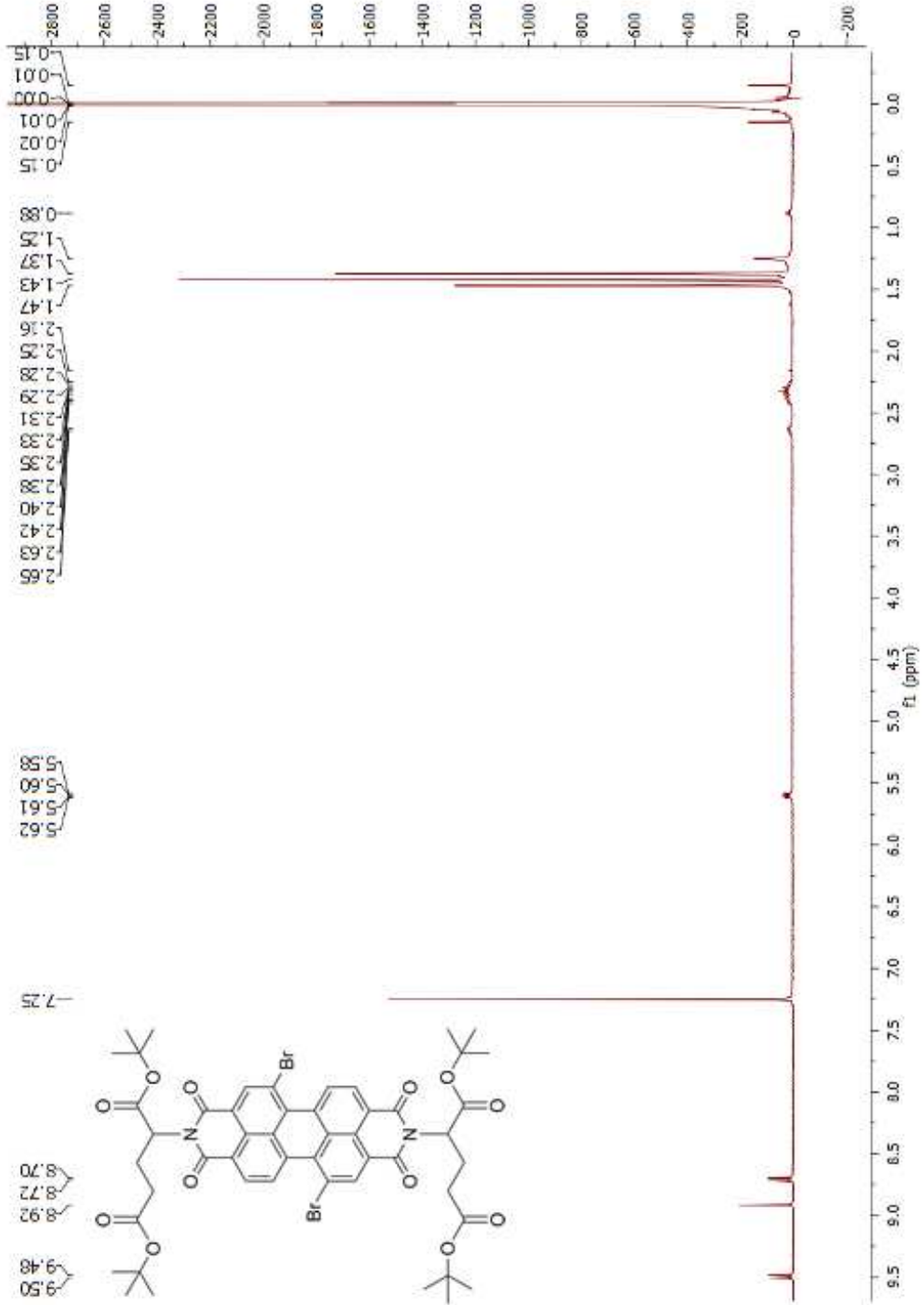
3.2.4 TK11 Maddesinin UV Spektrumu



Şekil 3.8 TK11 Maddesinin UV Spektrumu.

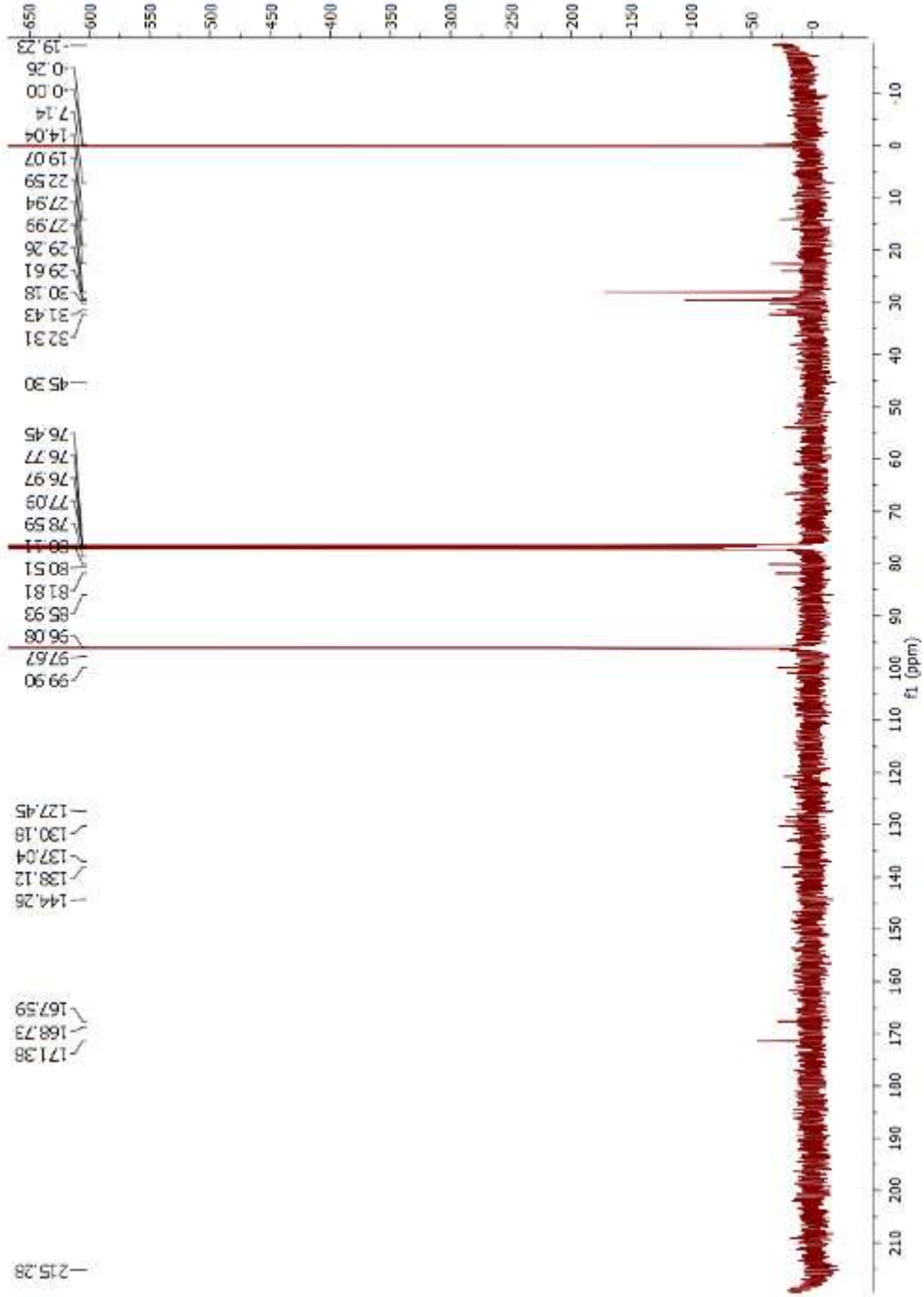
3.3 TK12 Maddesinin Spektrum Verileri

3.3.1 TK12 Maddesinin ¹H-NMR Spektrumu



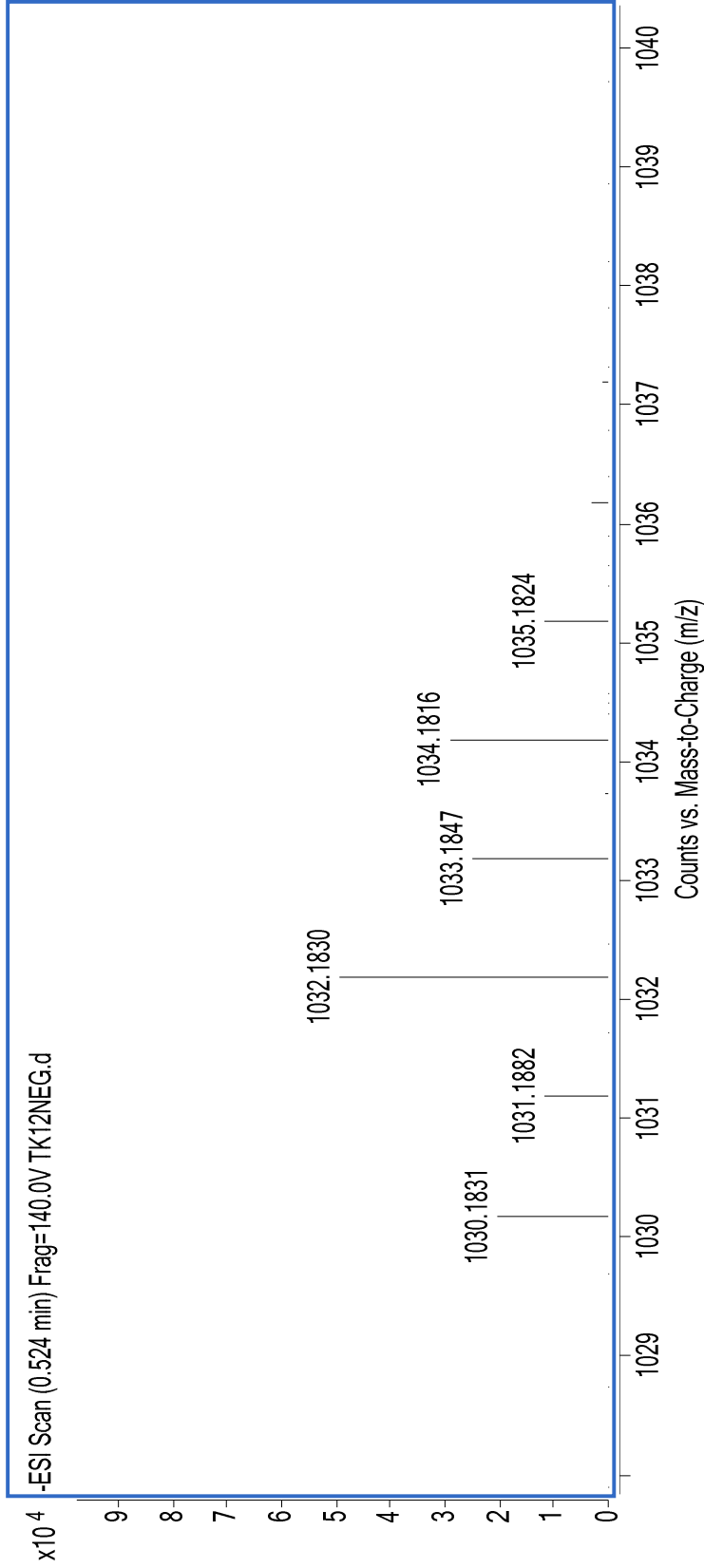
Şekil 3.9 TK12 Maddesinin ¹H-NMR Spektrumu.

3.3.2 TK12 Maddesinin ^{13}C -NMR Spektrumu



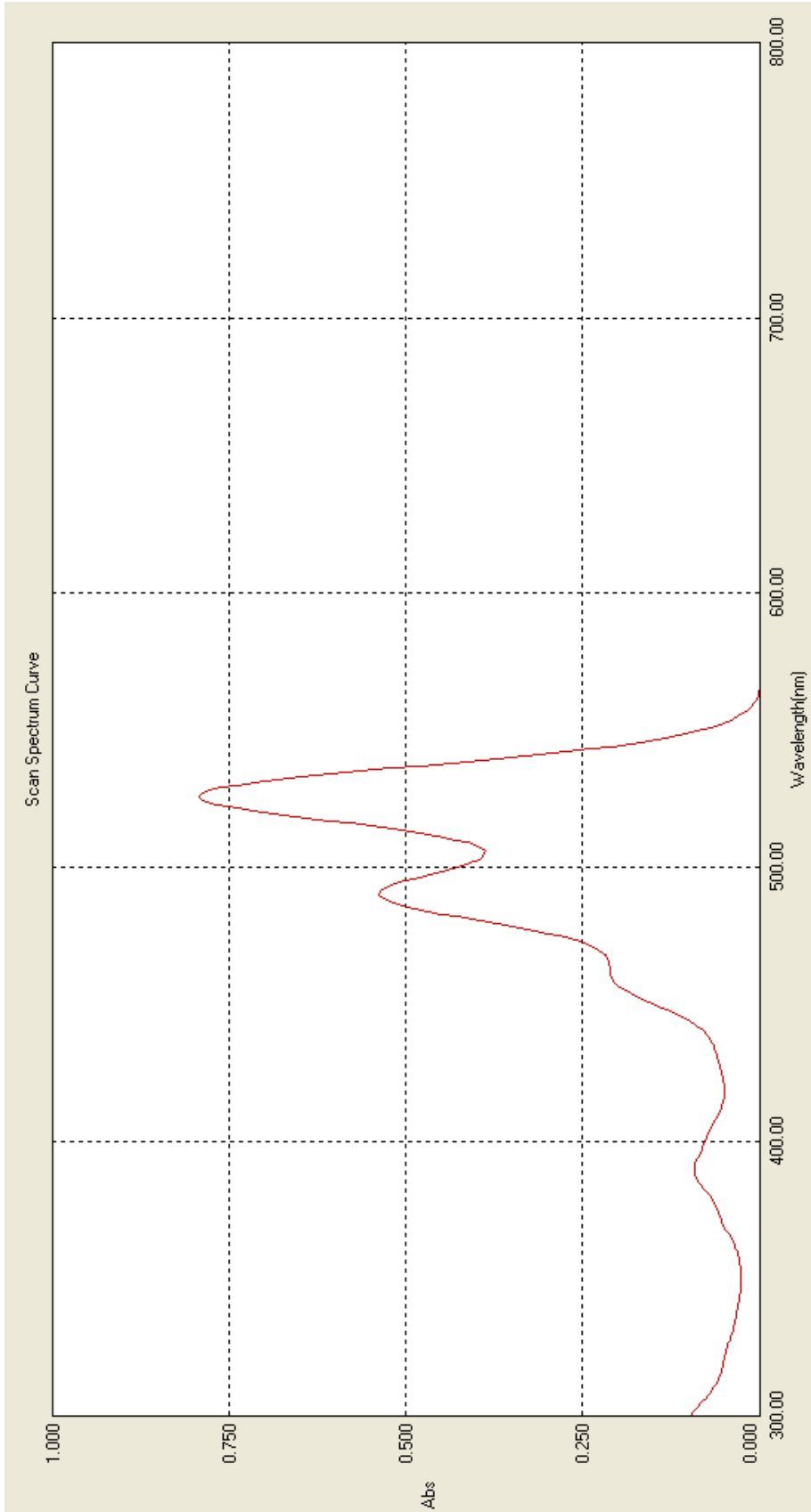
Şekil 3.10 TK12 Maddesinin ^{13}C -NMR Spektrumu.

3.3.3 TK12 Maddesinin Kütle Spektrumu



Şekil 3.11 TK12 Maddesinin Kütle Spektrumu.

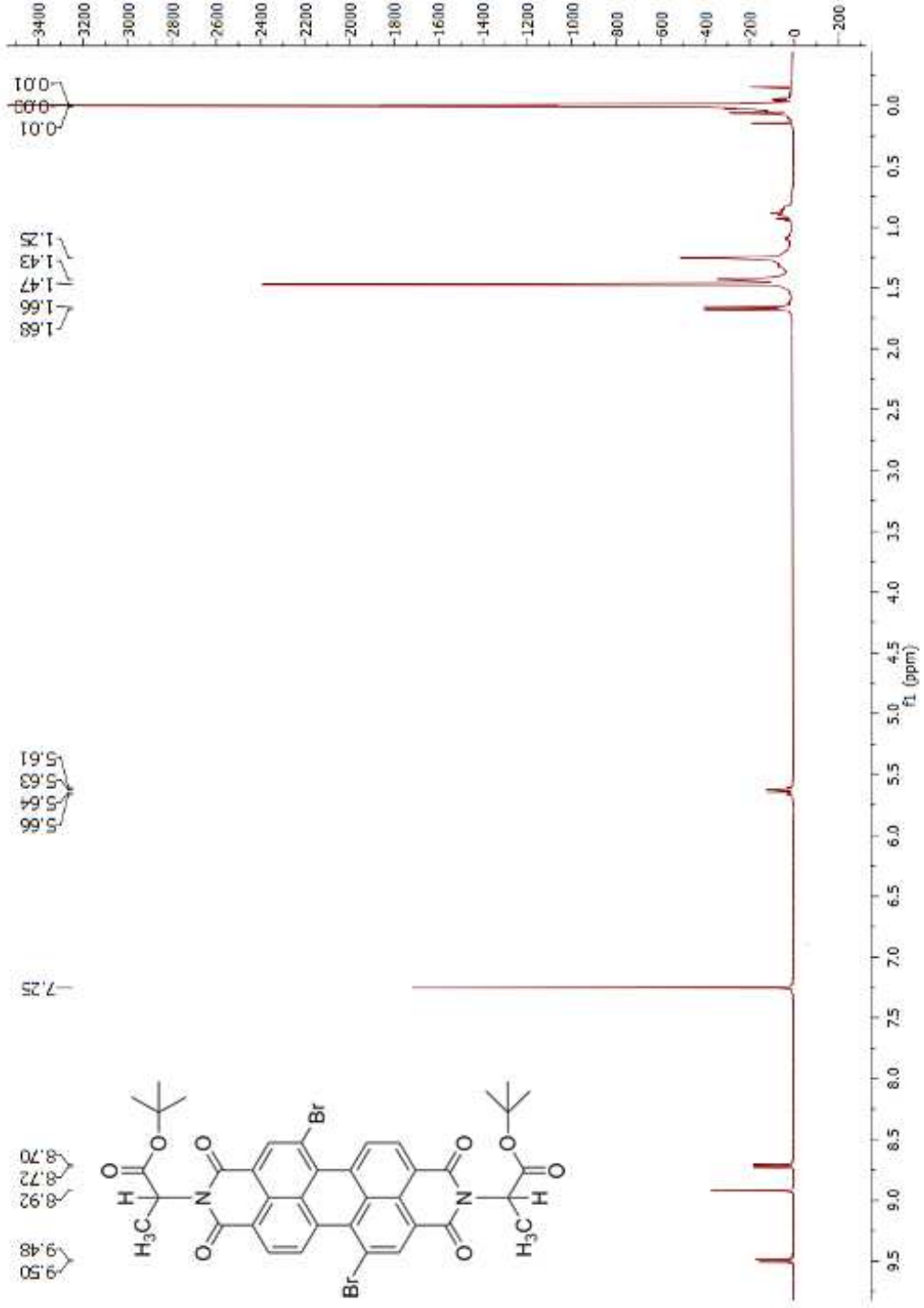
3.3.4 TK12 Maddesinin UV Spektrumu



Şekil 3.12 TK12 Maddesinin UV Spektrumu.

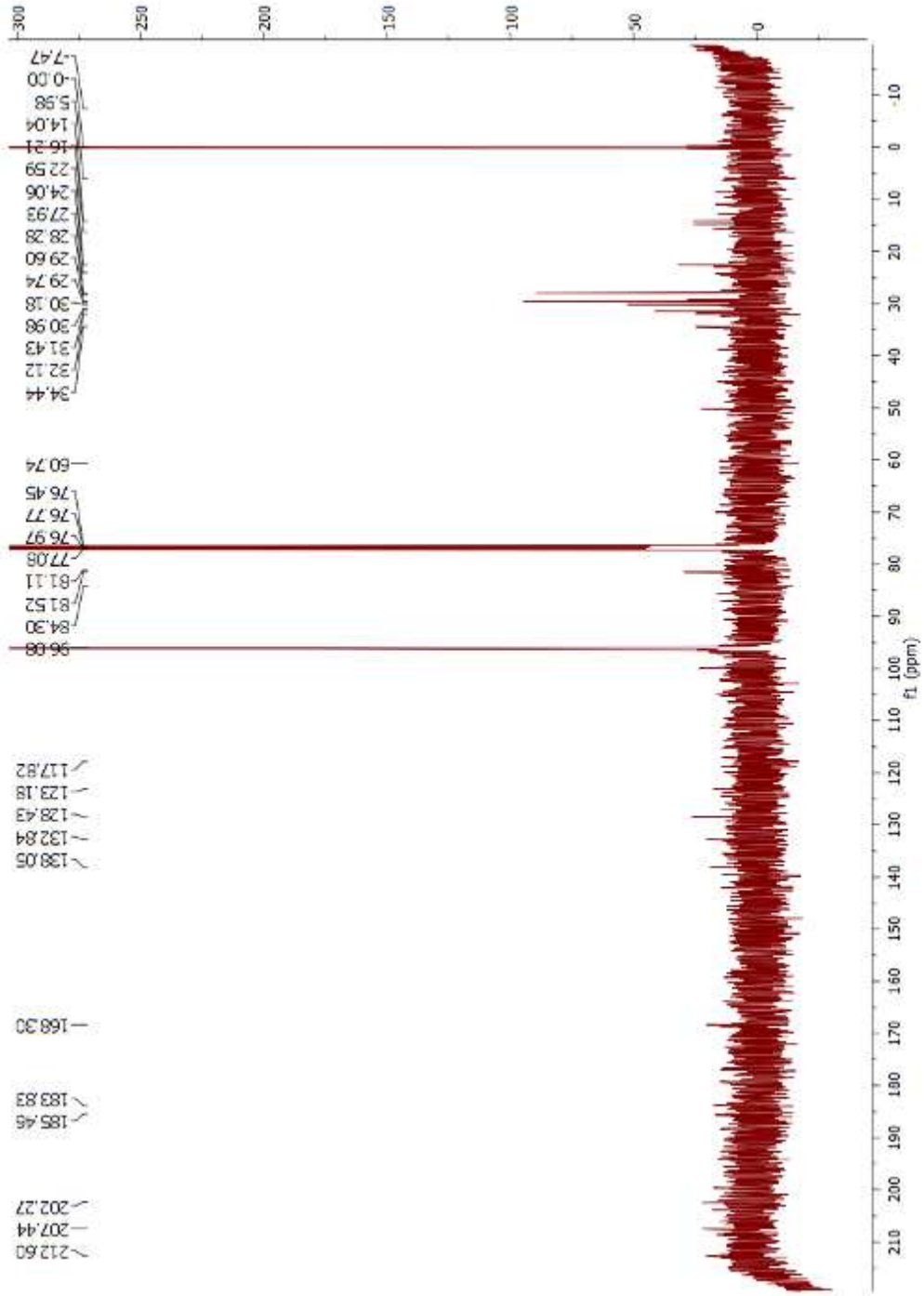
3.4 TK13 Maddesinin Spektrum Verileri

3.4.1 TK13 Maddesinin $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



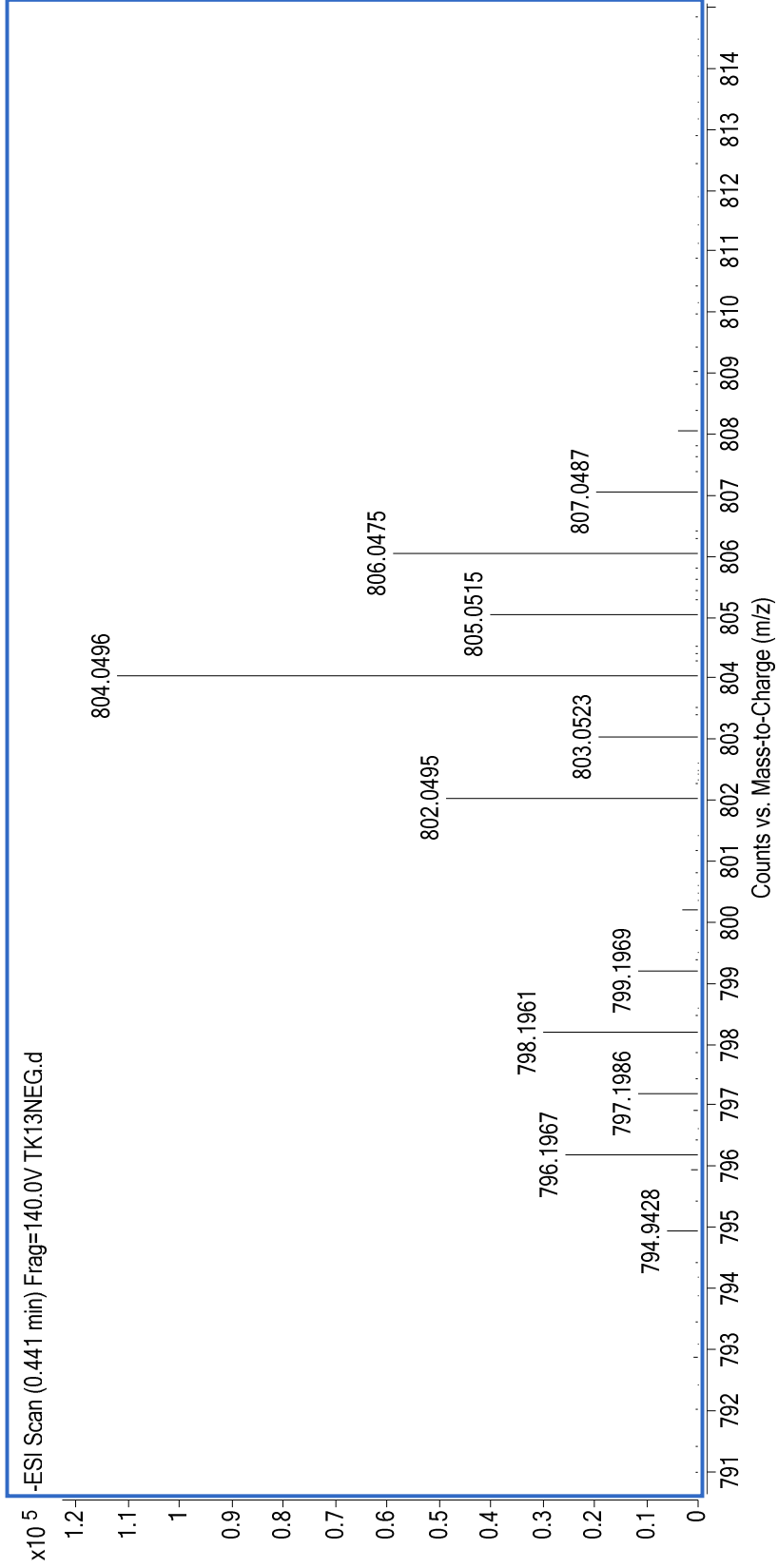
Şekil 3.13 TK13 Maddesinin $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu.

3.4.2 TK13 Maddesinin ^{13}C -NMR Spektrumu



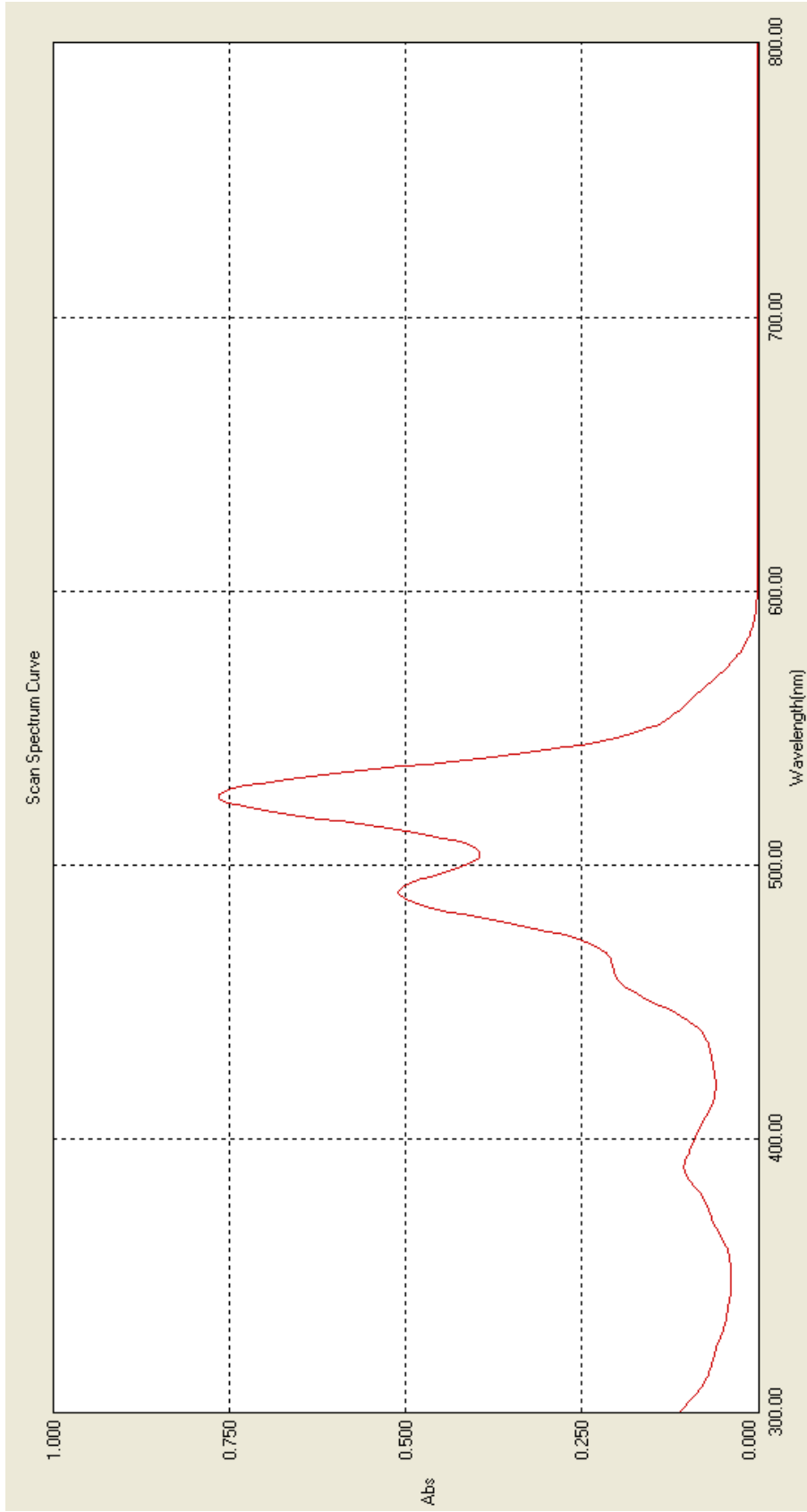
Şekil 3.14 TK13 Maddesinin ^{13}C -NMR Spektrumu.

3.4.3 TK13 Maddesinin Kütle Spektrumu



Şekil 3.15 TK13 Maddesinin Kütle Spektrumu.

3.4.4 TK13 Maddesinin UV Spektrumu



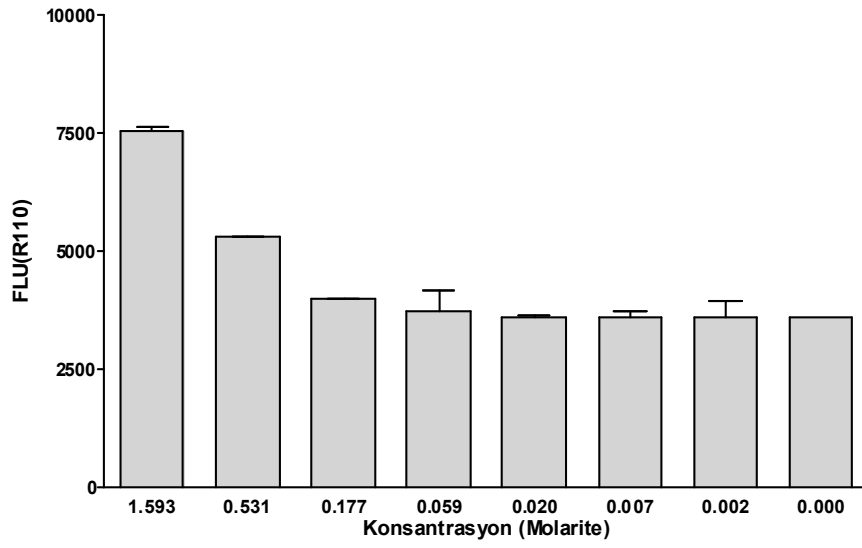
Şekil 3.16 TK13 Maddesinin UV Spektrumu.

3.5 c-Src Enzim İnhibisyonu Çalışmaları

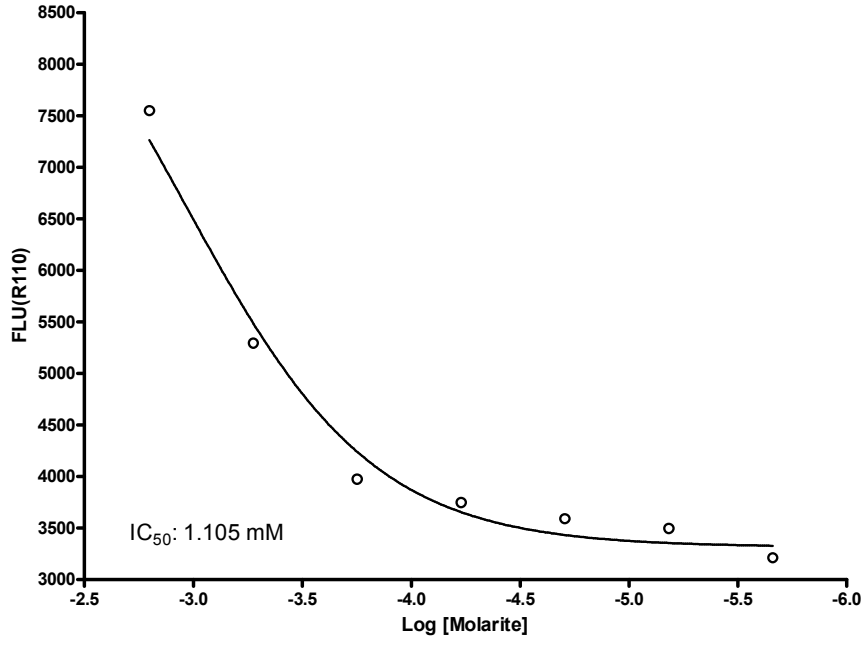
3.5.1 TK10 Maddesinin c-Src Enzim inhibisyonu

TK10 bileşiği için yapılan çalışmalarda etkin bir c-src inhibisyonu gözlemlenmemiştir.

3.5.2 TK11 Maddesinin c-Src Enzim İnhibisyonu

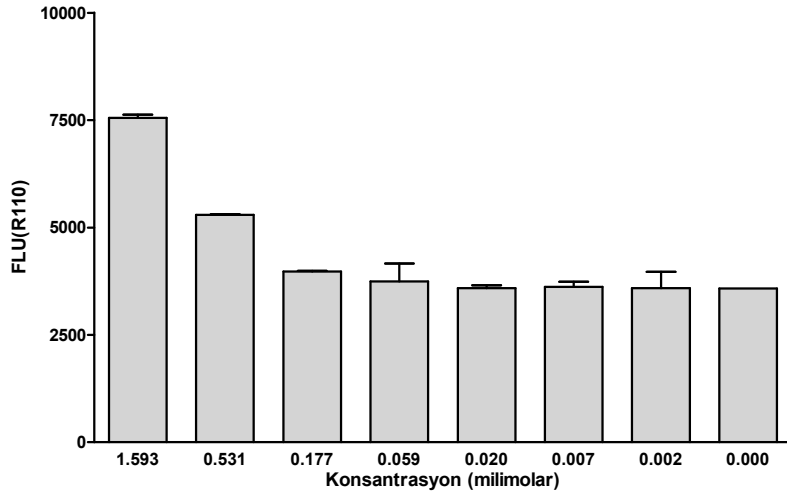


Şekil 3.17 TK11 Maddesinin c-Src enzimine karşı inhibisyon grafiği.

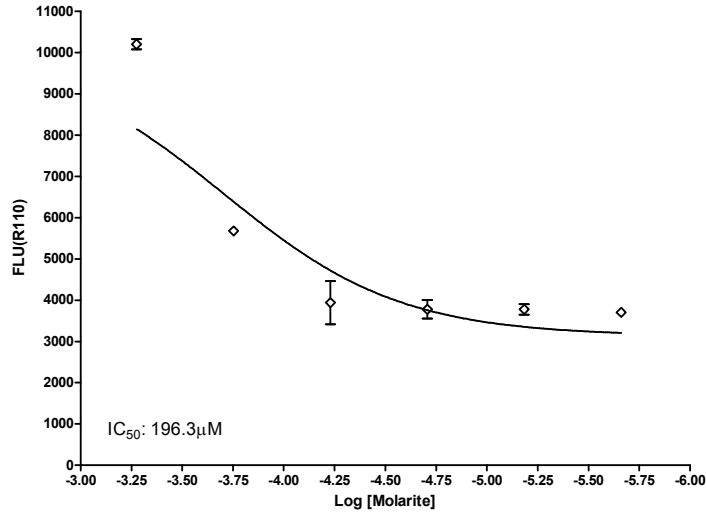


Şekil 3.18 TK11 bileşiminin enzim inhibisyonunu gösteren doz-cevap eğrisi.

3.5.3 TK12 Maddesinin c-Src Enzim İnhibisyonu

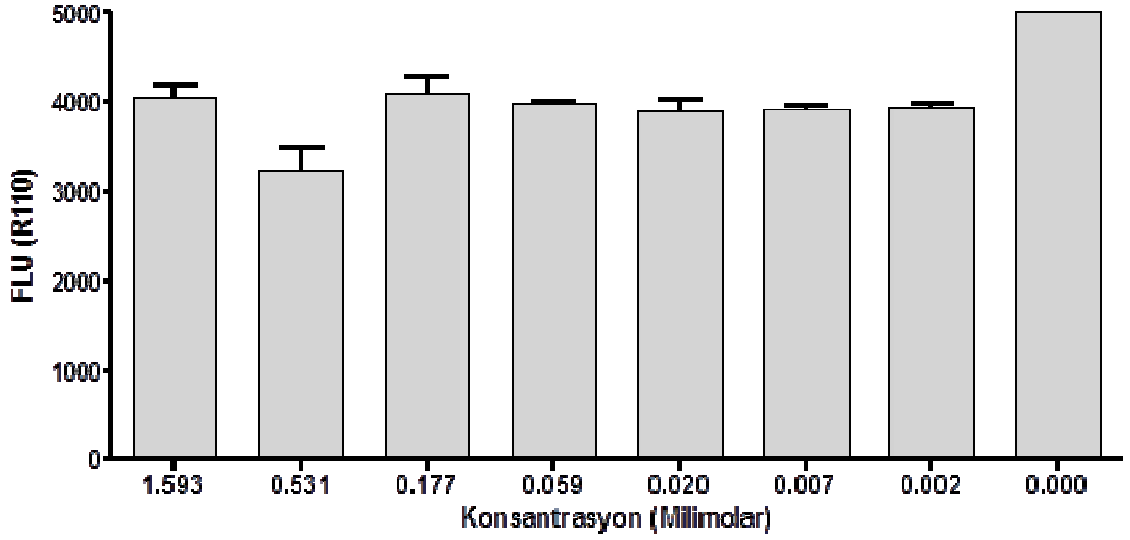


Şekil 3.19 TK12 Maddesinin c-Src enzimine karşı inhibisyon grafiği.



Şekil 3.20 TK12 bileşiminin enzim inhibisyonunu gösteren doz-cevap eğrisi.

3.5.4 TK13 Maddesinin c-Src Enzim İnhibisyonu



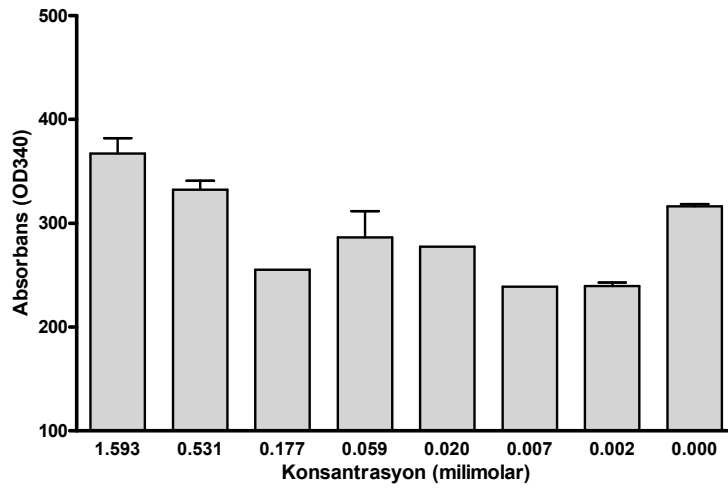
Şekil 3.21 TK13 Maddesinin c-Src enzimine karşı inhibisyon grafiği.

3.6 GST İnhibisyon Sonuçları

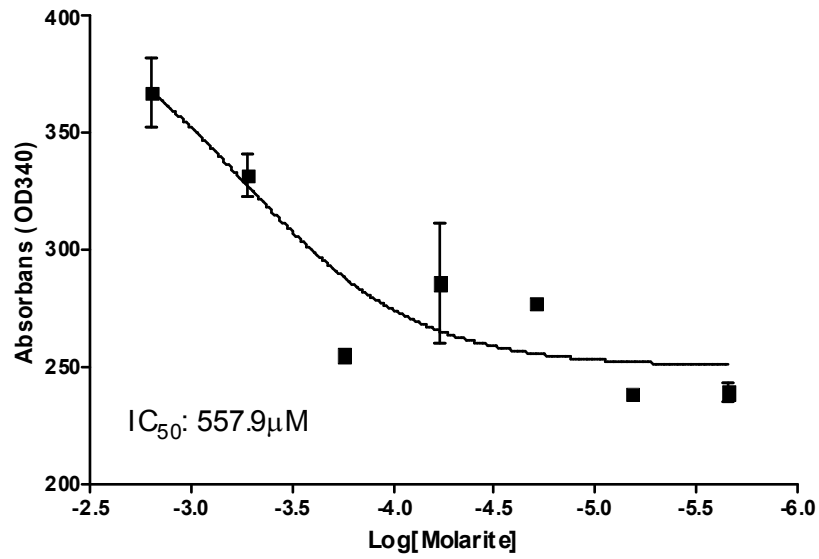
3.6.1 TK10 Maddesinin GST İnhibisyonu

TK10 bileşiği için yapılan çalışmalarda etkin bir GST inhibisyonu gözlemlenmemiştir.

3.6.2 TK11 Maddesinin GST İnhibisyonu

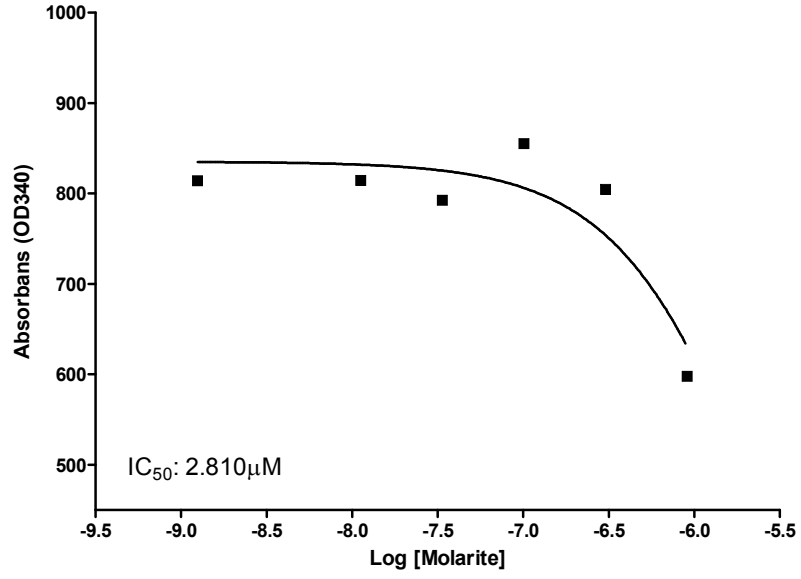


Şekil 3.22 TK11 Maddesinin GST inhibisyon grafiği.



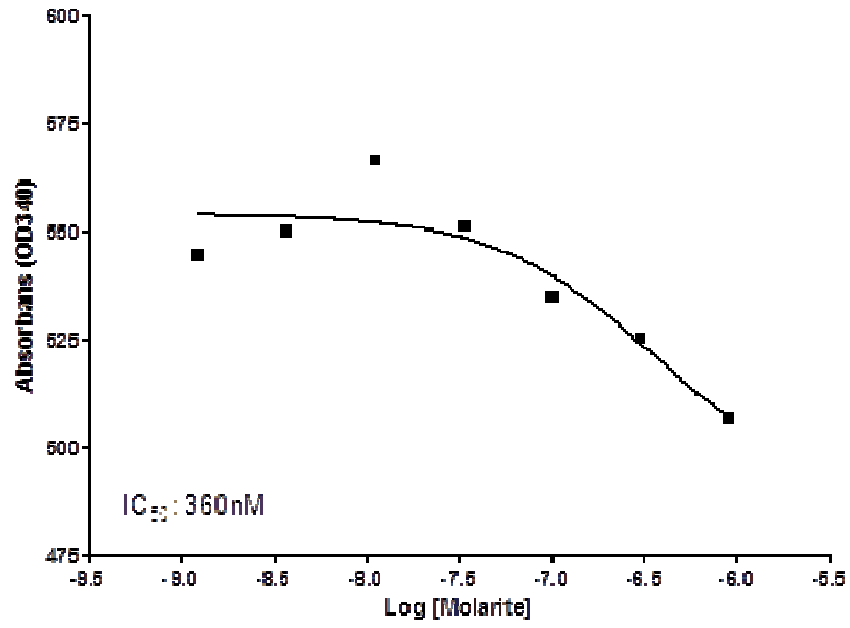
Şekil 3.23 TK11 GST inhibisyon eğrisi.

3.6.3 TK12 Maddesinin GST İnhibisyonu



Şekil 3.24 TK12 GST inhibisyon eğrisi.

3.6.4 TK13 Maddesinin GST İnhibisyonu



Şekil 3.25 TK13 GST inhibisyon eğrisi.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada dört yeni perilendiimid sentezlenmiştir. Elde edilen moleküllerin yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve kütle spektrumları ile aydınlatılmıştır.

Perilen molekülleri perilen dianhidrit haline getirildikten sonra perilenlerin çözünürlük sorunlarını çözmek için 'imid' bölgesine N-substituent'ler bağlanarak çözünürlüğü artırılmış oldu.

Elde edilen yeni perilendiimidlerin hedefe özgün ilaç tasarım ve geliştirmede etkin olabileceği düşünülerek kanser hücrelerinde aktivasyon kontrolünün ortadan kalkmasına ve tümörün büyümesine neden olan c-Src tirozin kinaz enzimi ve ilaç direnç mekanizmasına yol açan faz II detoksifikasyon enzimlerinden olan Glutatyon-S-Transferaz enzimi üzerindeki inhibisyonları çalışılmıştır.

TK10 bileşiği için yapılan çalışmalarda etkin bir c-src inhibisyonu gözlemlenmemiştir. Bunun ana nedeni reaksiyon ortamında fizyolojik şartları oluşturmak amaçlı kullanılan bazı bileşikler ile etkileşime girmesi olarak düşünülmektedir. Dolayısıyla bu bileşiğin deney şartlarında kullanılan bazı sekonder bileşiklerden arındırılmış bir analiz metodu geliştirilerek yeniden çalışılması düşünülmektedir.

TK11 bileşiğinin farklı dozlarında c-Src enzimine karşı inhibisyon yaptığı %80 aktif c-Src enzime karşı bileşiğin her dozu için çift analiz içeren birbirinden bağımsız üç deney gerçekleştirilerek gösterilmiştir. Bar grafiğinde verilen değerler bu üç deneyin ortalamasını göstermektedir. (Şekil 3.17)

TK11 bileşiğinin enzimi %50 inhibe eden dozun (IC₅₀) belirlenmesi için oluşturulan sigmoidal doz-cevap eğrisi ve istatistiksel analiz sonucu GraphPad prism 4.0 ile hesaplanmış olup, %50 inhibisyonu gösteren bileşik dozu 1.105mM olarak belirlenmiştir. (Şekil 3.18)

TK12 bileşiminin farklı dozlarında c-Src enzimine karşı inhibisyon yaptığı %80 aktif c-Src enzime karşı bileşimin her dozu için çift analiz içeren birbirinden bağımsız üç deney gerçekleştirilerek gösterilmiştir. Bar grafiğinde verilen değerler bu üç deneyin ortalamasını göstermektedir. (Şekil 3.19)

TK12 bileşiminin enzimi %50 inhibe eden dozun (IC_{50}) belirlenmesi için oluşturulan sigmoidal doz-cevap eğrisi ve istatistiksel analiz sonucu GraphPad prism 4.0 ile hesaplanmış olup, %50 inhibisyonu gösteren bileşik dozu 196,3 μ M olarak belirlenmiştir. (Şekil 3.20)

Şekil 3.19 ve 3.20'de görüldüğü üzere c-Src enziminin %80 aktifliğinde bileşik TK12 enzim aktivitesinde doza bağlı anlamlı inhibisyon eğilimi göstermiştir. Burada R110 (rhodamine-Peptid bağlı Src substratı) ile yapılmış olan çalışmada Floresan ışımadaki artış ile enzim aktivite düzeyi ters orantılı olup, bileşimin yüksek dozlarında ışımada düzeyinde gözlenen artış göreceli olarak enzim inhibisyonuna işaret etmektedir. Kantitatif inhibisyon düzeyi ise ancak doz-cevap eğrisinin istatistiksel 4-parametre sigmoid eğrisi oluşturulmasıyla hesaplanmış olup TK12 için IC_{50} 196,3 μ M olarak belirlenmiştir.

TK13, %80 aktif c-Src enzime karşı bir inhibisyon eğilimi göstermemiştir. Her doz için çift analiz içeren birbirinden bağımsız üç deney gerçekleştirilmiş olup grafikte verilen değerler bu üç deneyin ortalamasını göstermektedir. (Şekil 3.21)

Şekil 3.21'de görüldüğü üzere, kontrol grubunda maksimum sinyal 5000 floresan birimi (FLU) olup inhibisyona bağlı olarak enzim inhibisyonu yapmadığı bu ışımada inhibisyona bağlı azalmanın maksimum 3500 FLU olarak gözlenmesiyle belirlenmiştir. Dolayısıyla TK13 için enzimi %50 inhibe eden doz veya % inhibisyonu gösteren doz-cevap eğrisi oluşturulamamıştır.

TK10 bileşiği için yapılan çalışmalarda etkin bir GST inhibisyonu gözlemlenmemiştir.

TK11 bileşiminin GST enzim kaynağı olan sığır karaciğer sitozolik numunelerinde GST İnhibisyon eğilimi düşüktür (Şekil 3.22) . TK11 bileşiminin GST enzim kaynağı olan sığır karaciğer sitozolik numunelerinin düşük konsantrasyonlarında %30 civarında inhibisyon gösterirken yüksek dozlarında GST enzimini aktifleştirdiği gözlenmiştir. Enzim inhibisyonu için gereken konsantrasyon doz-cevap eğrisiyle belirlenmiştir. Enzimi %50 inhibe eden dozun (IC_{50}) belirlenmesi için oluşturulan sigmoidal doz-cevap eğrisi ve istatistiksel analiz sonucu GraphPad prism 4.0 ile hesaplanmış olup, %50 inhibisyonu gösteren bileşik dozu 557,9 μ M olarak belirlenmiştir. (Şekil 3.23)

Şekil 3.24'de görüldüğü üzere TK12 GST enzim kaynağı olan sığır karaciğer sitozolik numunelerinde gösterdiği enzim inhibisyonu doz-cevap eğrisiyle belirlenmiştir. Enzimi %50 inhibe eden dozun (IC_{50}) belirlenmesi için oluşturulan sigmoidal doz-cevap eğrisi ve istatistiksel analiz sonucu GraphPad prism 4.0 ile hesaplanmış olup, %50 inhibisyonu gösteren bileşik dozu 2,81 μ M olarak belirlenmiştir.

Şekil 3.25'de görüldüğü üzere TK13 GST enzim kaynağı olan sığır karaciğer sitozolik numunelerinde gösterdiği enzim inhibisyonu doz-cevap eğrisiyle belirlenmiştir. Enzimi %50 inhibe eden dozun (IC_{50}) belirlenmesi için oluşturulan sigmoidal doz-cevap eğrisi ve istatistiksel analiz sonucu GraphPad prism 4.0 ile hesaplanmış olup, %50 inhibisyonu gösteren bileşik dozu 360nM olarak belirlenmiştir.

Sonuçlarımız ilerde yapılacak çalışmalar açısından yeni pencereler açmıştır. Bu moleküllerle ilgili yapılacak farklı modifikasyonlarla bu enzimler üzerinde daha fazla inhibitör etkisi görebiliriz ya da diğer hastalıkların tedavileri için ilaç tasarımları yapılabilir.

Sonuç olarak yeni perilendiimidler sentezledik ve etkili biyolojik aktivite sonuçlarını karakterize ettik. Bu sonuçlar hedefe özgün ilaç tasarım ve geliştirmede etkilerinin olabileceğini yani bu enzimlerin rol oynadığı hastalıkların farklı şekillerde kontrol altına alınmasına olanak sağlayacağını göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Lehn, J. M., "Cryptates: Inclusion Complexes of Macropolycyclic Receptor Molecules", *Pure and Appl. Chem.*, **50**, (1978) 871-892.
- [2] Lehn, J. M., "Supramolecular Chemistry-Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, (1988) 89-112.
- [3] Lehn, J. M., *Supramolecular Chemistry*, VCH, New York, (1995).
- [4] Durmaz, M., Kaliks[4]arenin Homokiral Schiff Bazı Türevlerinin Sentezi ve Ekstraksiyon Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi (2007).
- [5] Langhals, H., "Control of the interactions in multichromophores : Novel concept. Perylene bis-imides as components for larger functional units." *Helvetica Chimica Acta.*, **88/6**, (2005) 1309-1349
- [6] Bamfield, B., *Chromic Phenomena: Technological Applications Of Color Chemistry*, The Royal Society Of Chemistry Publishing, Cambridge, (2001) p. 169-184.
- [7] Lu, W., Cao, J.P., Wang, Z.Y., Qi, Y., Sacripance, G.G., Duff, J.D. et al. "Electrochemical characterization, electrochromism. and voltage-dependent fluorescence of novel perylene-containing polyimides." *Macromolecules*, **32**, (1999) 8880-5.
- [8] Yao, D., Bender, T.P., Gerroir, P.J., "Sundararajan PR. Self-assembled vesicular nanostructures of perylene end-capped poly(dimethylsiloxane)" *Macromolecules*, **38**, (2005) 6972-8.
- [9] Bavdek, G., *Study of Structural and Electronic Properties of Thin Metallic and Organic Films*, University of Ljubljana Faculty of Mathematics and Physics Department of Physics, Doctoral Thesis, Kranj, (2006) 101-103.
- [10] Cormier, R.A., Gregg, B.A., "Synthesis and characterization of liquid crystalline perylene diimides" *Chem Mater*, **10/5**, (1998) 1309-19.
- [11] Gregg, B.A. Sprague, J., Peterson, M.W., "Long-range singlet energy transfer in perylene bis(phenethylimide) films" *J Phys Chem B*, **101**, (1997) 5362-9.

- [12] Kalinin, S., Speckbacher, M., Langhals, H., Johansson, L.B.A., "A new and versatile fluorescence standard for quantum yield determination" *Physical Chemistry Chemical Physics*, **3**, (2001) 172-4.
- [13] Langhals, H., Kirner, S., "Novel fluorescent dyes by the extension of the core of perylenetetracarboxylic bisimides", *European Journal of Organic Chemistry*, **2**, (2000) 365-80.
- [14] Langhals, H., Karolin J., Johansson L.B.A., "Spectroscopic properties of new and convenient standards for measuring fluorescence quantum yields" *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, **94**, (1998) 2919-22.
- [15] Chao, C.C., Leung, M.K., Su, Y.O., Chiu, K.Y., Lin, T.H., Shieh, S.J., et al. "Photophysical and electrochemical properties of 1,7-diaryl-substituted perylene diimides" *Journal of Organic Chemistry*, **70/11**, (2005) 4323-31.
- [16] Becker, S., Böhm, A., Müllen, K., "New thermotropic dyes based on amino-substituted perylendicarboximides" *Chemistry A European Journal*, **6/21**, (2000) 3984-90.
- [17] Nagao, Y., Naito, T., Abe, Y., Misono, T., "Synthesis and properties of long and branched alkyl chain substituted perylenetetracarboxylic monoanhydride monoimides" *Dyes and Pigments*, **32/2**, (1996) 71-83.
- [18] Dinçalp, H., Içli, S., "Photoinduced electron transfer-catalyzed processes of sul-foamino perylene diimide under concentrated sun light" *Solar Energy*, **80**, (2006) 332-46.
- [19] Karapire, C., Zafer C., Içli S., "Studies on photophysical and electrochemical properties of synthesized hydroxy perylenediimides in nanostructured titania thin films" *Synthetic Metals*, **145**, (2004) 51-60.
- [20] Ego, C., Marsitzky, D., Becker, S., Zhang, J., Grimsdale, A.C., Müllen, K., et al. "Attaching perylene dyes to polyfluorene: three simple, efficient methods for facile color tuning of light-emitting polymers" *Journal of the American Chemical Society*, **125**, (2003) 437-43.
- [21] Li, C., Schöneboom J., Liu, Z., Pschirer, N.G., Erk, P., Herrmann A., et al. "Rainbow perylene monoimides: easy control of optical properties" *Chemistry A Euro- pean Journal*, **15**, (2009) 878-84.
- [22] Demic, S., Dindar, B., Doroshenko, A.O., Içli, S., Timur, C. "Photophysical and photochemical properties of a water-soluble perylene diimide derivative" *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **136** (2000)15–24.
- [23] Gebeyehu, D., et. al., 2004; WO/2005/124453 (patent); Chuang, K. H. et. al, (2006).

- [24] Icli, S., İçil, H., “A thermal and photostable reference probe for Q_i measurements: chloroform soluble perylene 3.4.9,10-tetracarboxylic acid-bis-N,N'-dodecylidimide” *Spectrosc. Lett.*, **29**, (1996) 1253-1257.
- [25] Segura, J.L., Gómez, R., Remold, E., Bauerle, P., “Synthesis and electro polymerization of a perylenebisimide-functionalized 3,4-ethylenedioxythiophene {EDOT}derivative” *Org. Lett.* **7**, (2005) 2345-2348.
- [26] Gómez, R., Segura, J.L., Martín, N., “Highly efficient light-harvesting Organofullerenes” *Org. Lett.*, **7**, (2005) 717-720.
- [27] Langhals, H., “Cyclic carboxylic imide as structure elements of high stability. Novel developments in perylene dye chemistry” *Heterocycles*, **40**, (1995) 477–500.
- [28] Herbst, H., Hunger, K., Industrial Organic Pigments, 3rd edition, WILEY-VCH, Weinheim, (2004) p.474-477
- [29] Jin, Y., Hua J., Wu, W., Ma, X., Meng, F., “Synthesis, characterization and photovoltaic properties of two novel near-infrared absorbing perylene dyes containing benzo[e]indole for dye-sensitized solar cells” *Synthetic Metals*, **158**, (2008) 64-71.
- [30] Zafer, C., Kus, M., Turkmen, G., Dincalp, H., Demic, S., Kuban, B., et al. “New perylene derivative dyes for dye-sensitized solar cells” *Solar Energy Materials and Solar Cells*, **91**, (2007) 427-31.
- [31] Aïch, R., Ratier, B., Tran-van, F., Goubard F., Chevrot C., “Small molecule organic solar cells based on phthalocyanine/perylenecarbazole donoreacceptor couple” *Thin Solid Films*, **516**, (2008) 7171-5.
- [32] Mikroyannidis, J.A., Stylianakis, M.M., Roy, M.S., Suresh, P., Sharma, G.D., “Synthesis, photophysics of two new perylene bisimides and their photovoltaic performances in quasi solid state dye sensitized solar cells” *Journal of Power Sources*, **194/2**, (2009) 1171-9.
- [33] Chiu, T.L., Chuang, K.H., Lin, C.F., Ho, Y.H., Lee, J.H., Chao, C.C., et al. “Low reflection and photo-sensitive organic light-emitting device with perylene diimide and double-metal structure” *Thin Solid Films*, **517**, (2009) 3712-6.
- [34] Kim, S.H., Yang, Y.S., Lee, J.H., Lee, J.I., Chu, H.Y., Lee, H., et al. “Organic field-effect transistors using perylene” *Optical Materials*, **21**, (2002) 439-43.
- [35] Cormier, R.A., Gregg, B.A., “Synthesis and characterization of liquid crystalline perylene diimides” *Chemistry of Materials*, **10**, (1998) 1309-19.

- [36] Sadrai, M., Hadel, L., Sauers, R.R., Husain, S., Jespersen, K.K., Westbrook, J.D., et al. "Lasing action in a family of perylene derivatives: singlet absorption and emission spectra, triplet absorption and oxygen quenching constants, and molecular mechanics and semiempirical molecular orbital calculations" *Journal of Physical Chemistry*, **96/20**, (1992) 7988-96.
- [37] Dinçalp, M., İçli, S., "Photoinduced electron transfer-catalyzed processes of sulfoamino perylene diimide under concentrated sun light" *Solar Energy*, **80**, (2006) 332-46.
- [38] Yukruk, F., Dogan, A.L., Canpinar, H., Guc, D., Akkaya, E.U., "Water-soluble green perylenediimide (PDI) dyes as potential sensitizers for photodynamic therapy" *Organic Letters*, **7/14**, (2005) 2885-7.
- [39] Fedoroff, O.Y., Salazar, M., Han, H., "Chemeris VV, Kerwin SM, Hurley LH. NMR-based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA" *Biochemistry*, **37/36**, (1998) 12367-74.
- [40] Han, H., Bennett, R.J., Hurley, L.H., "Inhibition of unwinding of G-quadruplex structures by Sgs1 helicase in the presence of N, N0-bis[2-(1-piperidino)ethyl]-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic diimide, a G-quadruplex-interactive ligand" *Biochemistry*, **39**, (2000) 9311-6.
- [41] Dincalp, H., Avcıbası, N., İcli, S., "Spectral properties and G-quadruplex DNA binding selectivities of a series of unsymmetrical perylene diimides" *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, **185**, (2007) 1-12.
- [42] Dincalp, H., İcli S., "Photoinduced electron transfer-catalyzed processes of sulfoamino perylene diimide under concentrated sun light" *Solar Energy*, **80**, (2006) 332-346.
- [43] Dincalp, H., İcli, S., "Photosynthesis of rose oxide by concentrated sunlight in the absence of singlet oxygen" *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **141**, (2001) 147-151.
- [44] Masella, R., Benedetto, R.D., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes" *J. Nutr. Biochem.*, **16**, (2005) 577-586.
- [45] Booth, J., Boyland, E., ve Sims, P., "An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione" *Biochem. J.*, **79**, (1961) 516-524.
- [46] Boyland, E. ve Chasseaud, L.F., "The role of Glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis" *Adv. Enzymol.*, **32**, (1969) 173-219.

- [47] Pabst, M., Habig, W. H., Jakoby, W. B., "Mercapturic acid formation: the several glutathione transferases of rat liver" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, (1973) 1123.
- [48] Askelöf, P., Guthenberg, C., Jakobson, I., ve Mannervik, B., "Purification and characterization of two glutathione S- aryltransferase activities from rat liver" *Biochem. J.*, **147**, (1975) 513.
- [49] Whalen, R., Boyer, T.D., "Human Glutathione S-Transferases" *Sem Liver Dis*, Vol.18, No.4. (1998).
- [50] Hayes, J.D, Pulford, D.J. "The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance" *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **30/6**, (1995) 445-600.
- [51] Danielson, U.H., Mannervik, B., "Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat" *Biochem. J.*, **231**, (1985) 263-267.
- [52] Ketterer, B., Haris, J.M., Talaksa, G., Meyey, D.J., Pemple, S.E., Taylor, J.B., Lang, N.P., Kadlubar, F.F., "The Human Glutathione S-Transferase Supergene Family, Its Polymorphism, and Its Effects on Susceptibility to Lung Cancer" *Env Health Persp*, **98**, (1992) 87-94.
- [53] Sipes, I.G., Mcquuen, Ganddfi, A.J, Bond, J.A., *Comprehensive Toxicology*, 13-Volume Set: General Principles, Pergamon Press, (1997).
- [54] Tuna, G., Sıçan İnce Bağırsak Glutatyon S-Transferaz Enziminin Saflaştırılması Ve izozimlerinin Hiperisin Bileşiği İle Bağlanma özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (2008)
- [55] Commandeur, J.N.M., Stijntjes, G.J, Vermeulen, N.P.E., "Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates" *Phar Rev*, **47**, (1995) 271-330.
- [56] Isgor, YG., Isgor, BS., "Kinases and Glutathione Transferases: selective and sensitive targeting" *Front. Biol.*, **6/2**, (2011) 156–169.
- [57] Allocati, N., Favlaro, B., Masulli, M., Alexeyev, M. F., Di Ilio, C., "Proteus mirabilis glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stress" *Biochem. J.*, **373**, (2003) 305-311.
- [58] Wang, M. C., Bohmann, D., Jasper, H., "JNK signalling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in Drosophila" *Develop. Cell.*, **5**, (2003) 811-816.

- [59] Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R., "Glutathione transferases" *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **45**, (2005) 51-88.
- [60] Tew, K.D., "Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance" *Cancer Res.* **54**, (1994) 4313-4320.
- [61] Harrison, D.J., Kharbanda, R., Bishop, D., McLelland, L.I., Hayes, J.D., "Glutathione S-transferases isoenzymes in human renal carcinoma demonstrated by immunohistochemistry" *Carcinogenesis*, **10**, (1989) 1257-1260.
- [62] Green, J.A., Robertson, L.J., Clark, A.H., "Glutathione S-transferase expression in benign and malignant ovarian tumors" *Br. J. Cancer*, **68**, (1993) 235-239.
- [63] Yang, P., Ebbert, J.O., Sun, Z., Weinshilboum, R.M., "Role of glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: A review" *J. of Clin. Oncology*, **24/11**, (2006) 1761-1769.
- [64] Hamilton, D. S., Zhang, X., Ding, Z., Hubatsch, I., Mannervik B., "Mechanism of the glutathione transferase-catalyzed conversion of antitumor 2-crotonyloxymethyl-2-cycloalkenones to GSH adducts" *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, (2003) 15049-15058.
- [65] O'Brien, M.L., Tew, K.D., "Glutathione and related enzymes in multidrug resistance" *Eur. J. Cancer*, **6**, (1996) 967-978.
- [66] Tew, K.D., Dutta, S., Schultz, M., "Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents" *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **26**, (1997) 91-104.
- [67] Mannervik, B., Danielson, U.H., "CRC" *Critical Reviews in Biochemistry* **23**, (1988) 283-337.
- [68] Bhargava, M.M., Listowsky, I., Arias, I.M., "Ligandin. Bilirubin binding and glutathione S-transferase activity are independent processes" *The Jour. of Biol. Chem.* **253**, (1978) 4112-4115.
- [69] Jagt, D.L.V., Wilson, S.P., Dean, V.L., Simons, P.C., "Bilirubin binding to rat liver ligandins (Glutathione S-transferase A and B)" *The Jour. of Biol. Chem.* **257**, (1982) 1997-2001.
- [70] Davis, R.J., "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases" *Cell*, **103**, (2000) 239-252.
- [71] Townsend, D.M., Tew, K.D., "The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance" *Oncogene*, **22**, (2003) 7369-7375.

- [72] Mahajan, S., Atkins, W.M., "The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases" *Cell. Mol. Life Sci.*, **62/11**, (2005) 1221-1233.
- [73] Halder, M., Chowdhury, P.K., Das, R., Mukherjee, P., Atkins W.M. ve Petrich, J.W., "Interaction of Glutathione S-Transferase with Hypericin: A Photophysical Study" *J. Phys. Chem. B*, **109**, (2005) 19484-19489.
- [74] Lu, W.D., Atkins, W.M., "A Novel Antioxidant Role for Ligandin Behavior of Glutathione S-Transferases: Attenuation of the Photodynamic Effects of Hypericin" *Biochemistry*, **43**, (2004) 12761-12769.
- [75] Işgör, YG., Kiliç, Z., Olgen, S., "Novel aminomethylindole derivatives as inhibitors of pp60c-Src tyrosine kinase: synthesis and biological activity" *Chem Biol Drug Des (ISI)*, Cilt **72/6**, (2008) 599-604 pp.
- [76] Paul, M.K., Mukhopadhyay, A.K., "Tyrosine kinases- role and significance in cancer" *Int. J. Med. Sci.*, **1/2**, (2004) 101-115.
- [77] Doğan, A.L., Güç, D., "Sinyal iletim mekanizmaları ve kanser" *Hacettepe Tıp Dergisi*, **35**, (2004) 34-42.
- [78] Arora, A., Scholar, E.M., "Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy" *Perspectives in Pharmacology*, **315/3**, (2005) 971-979.
- [79] Roskoski, R. JR., "Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **331**, (2005) 1.
- [80] Hu, G., Place, A.T., Minshall, R.D., "Regulation of endothelial permeability by src kinase signaling: vascular leakage versus transcellular transport of drugs and macromolecules" *Chemico-Biological Interactions*, **171**, (2008) 177-189.
- [81] Susa, M., Missbach, M., Green, J., "Src inhibitors: drugs for the treatment of osteoporosis, cancer or both?" *TIPS*, **21**, (2000) 489-495.
- [82] Ingley, E., "Src family kinases: Regulation of their activities, levels and identification of new pathways" *Biochimica et Biophysica Acta*, **1784**, (2008) 56-65.
- [83] Bennisroune, A., Gardin, A., Aunis, D., Crémel, G., Hubert, P., "Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy" *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **50**, (2004) 23-38.
- [84] Reinmuth, N., Mesters, R.M., Bieker, R., Hoffnecht, P., Berdel, W.E., Thomas, M., "Signal transduction pathways as novel therapy targets in lung cancer" *Lung Cancer*, 45 (Suppl. 2), (2004) s177-s186.

- [85] K ksoy, A.A., “Damar d z kası proliferasyonunda sinyal iletimi”. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, **55/4**, (2002) 297-306.
- [86] Isgor, B. S., Coruh, N., Iscan, M., “Diversity of glutathione S-transferases in bovine liver” *FEBS JOURNAL*, **272**, (2005) 426.
- [87] Isgor BS, Isgor YG, submitted for publication, (2011).
- [88] Kiliç, Z., Işg r, Y.G., Olgen, S., “Evaluation of new indole and bromoindole derivatives as pp60(c-Src) tyrosine kinase inhibitors” *Chem Biol Drug Des (ISI)*, **Cilt 74**, (2009) pp.397-404.