

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİK TİYOL ANALİZİNDE KULLANILAN BAZI
FLOROJENİK MOLEKÜLLERİN FOTOFİZİKSEL
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

AKYLAI BIRIMKULOVA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2017

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİK TİYOL ANALİZİNDE
KULLANILAN BAZI FLOROJENİK
MOLEKÜLLERİN FOTOFİZİKSEL
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

AKYLAI BİRİMKULOVA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. AYŞE GÜL GÜREK

GEBZE

2017

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**EXAMINATION OF PHOTOPHYSICAL
PROPERTIES OF SOME FLUOROGENIC
MOLECULES USED IN ANALYSIS OF
BIOLOGICAL THIOL**

AKYLAI BIRIMKULOVA

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. AYŞE GÜL GÜREK

GEBZE

2017



GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15/06/2017 tarih ve 2017/31 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 22/09/2017 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Akylai Birimkulova'nın tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

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

ÜYE

: Prof.Dr. Savaş BERBER

ÜYE

: Prof.Dr. Alimet Sema ÖZEN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

Doç.Dr. Arif Çağdaş AYDINOĞLU
Gebze Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Biyolojik tiyollerin organizmalarda çok önemli rolleri vardır. Onların insan vücudundaki anormal seviyeleri saç depigmentasyonu, letarji, karaciğer hasarı, cilt lezyonu, kas ve yağ kaybı, yavaşlatılmış büyüme, bunaklık, Alzheimer hastalığı, kardiyovasküler hastalığı, nevrал tüp defekti, inflamatuvar bağırsak hastalığı, osteoporoz, diyabet, maküler dejenerasyon, AIDS, romatoid artrit, Parkinson hastalığı, olumsuz gebelik sonuçları gibi hastalıklara sebep olur. Biyolojik tiyollerin canlı organizmalardaki konsantrasyon hesaplaması bu hastalıkların erken teşhisi ve önlenmesi için yardımcı olabilir.

Sonuç olarak, biyotiyollerin belirlenmesi ve miktar tayini, ilgili hastalıkların teşhisi için büyük önem taşımaktadır. Tiyolleri saptamak ve ölçmek için kullanılan tekniklerden biri olan floresans yöntemleri, ucuzluğu, tam hassasiyeti ve biyolojik tiyolleri öngörme ve görüntüleme kabiliyeti yüksek olması nedeniyle geniş ölçüde uygulanmaktadır.

Tiyoller için floresans sondaları geliştirmek için önemli çalışmalar yapılmıştır. Özellikle şu günlerde tiyoller için Michael ekleme tipi sondalar ilgi çekmiştir. Maleimid, kromen, akrilik asit yanı sıra doymamış aldehit, keton, diesterler, malononitril ve nitro bileşiği gibi bir takım Michael akseptörleri tiyol floresan sondaları tasarımı için kullanılmaktadır.

Tiyoller kendileri floresans değillerdır fakat florojenik moleküllerle Michael ekleme reaksiyonuna girdiklerinden sonra bu sondanın floresansı artar ve tiyol algılaması gerçekleşir.

Tiyol algılamasında floresan sondalarda kullanılan bazı florojenik moleküllerin fotofiziksel özellikleri hesaplamalı kimya metodu olan zamana bağlı yoğunluk fonksiyoneli teorisi (TD-DFT) ile incelenir. Floresans mekanizması aydınlatılarak elde edilen bilgiler ışığında, tiyoller için yeni sensör moleküllerinin teorik tasarımı yapıldı.

Anahtar Kelimeler: Tiyol, TD-DFT, Michael ekleme reaksiyonu, Floresans sondalar.

SUMMARY

Biological thiols take an important role in our organisms. Their abnormal levels in the human body cause different diseases, such as hair depigmentation, lethargy, liver damage, skin lesions, muscle and fat loss, slowed growth, dementia, Alzheimer's disease, cardiovascular disease neural tube defect, inflammatory bowel disease, osteoporosis, diabetes, muscular degeneration, AIDS, rheumatoid arthritis, Parkinson's disease, adverse pregnancy outcomes. Calculating the concentration of biological thiols in living organisms may help making an earlier diagnosis and preventing such diseases.

Consequently, the determination and quantification of biothiols are of great importance for the diagnosis of the related diseases. Fluorescent methods which is one of the techniques to detect and quantify thiols, have been broadly performed due to their cheapness, precisely sensitivity, and high capability to predict and image biological thiols.

Important works were done to develop fluorescent probes for thiols. Especially nowadays, Michael addition type probes for thiols drawn the attention. A number of good Michael acceptors such as maleimide, chromene, squaraine, acrylic acid, as well as unsaturated aldehyde, ketone, diesters, malonitrile and nitro compound have been used for the design of thiols fluorescent probes.

Thiols by themselves are not fluorescent but after undergoing Michael addition reaction with fluorogenic molecules, the fluorescence of this probe increases and involves detection of thiol.

Photophysical properties of some fluorogenic molecules used in fluorescent probes in thiol detection examined by time-dependent density functional theory (TD-DFT) which is a computational chemistry method. In the light of obtained information by illuminating fluorescent mechanism, theoretical design of new sensor molecules for thiols will be made.

Key Words: Thiol, TD-DFT, Michael addition reactions, Fluorescence probes.

TEŞEKKÜR

Başta, yüksek lisans eğitimimde ve akademik hayatımda desteğini ve yardımlarını hibir zaman esirgemeyip bilgisi ile bu alıŐmanın oluŐmasının yolunu aan danıŐmanım Prof. Dr. Ayşe Gl GREK'e,

Btn alıŐmam boyunca yanımda olan ve destek veren arkadaşlarım GülŐen DEMİRHAN'a ve İsmail EROL'a en içten teŐekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Aminotiyollerin Biyolojik Fonksiyonları	3
2.2. Sistein	4
2.3. Homosistein	6
2.3.1. Biyokimya ve Metabolizma	6
2.3.2. Homosistein ve Türevlerinin Damar Hastalıklarındaki Roller	6
2.4. Glutasyon	7
2.4.1. Hücresel Glutasyon ve Tiyollerin Metabolizması	7
2.4.2. Koruyucu Madde Olarak GSH Roller	8
2.4.3. Glutasyon İçeriğinin Çevresel Faktörlere Duyarlılığı	9
3. AMİNOTİYOLLERİN MEVCUT DETEKSİYONLARI	10
3.1. Ayırmaya Dayalı Yöntemler	10
3.2. Ayırıcı Olmayan Yöntemler	11
3.3. Floresan Sondalar	12
3.4. Michael Addition	12
3.5. Biyotiyoller Arasında Seçici Algılama için Floresan Sondalar	13
3.6. Aldehitler ile Siklizasyon	14
3.7. Akriolatlar ile Eşlenik Eklenme – Siklizasyon	14
3.8. Doğal Kimyasal Ligasyon	15

3.9. Aromatik Süstitüsyon – Yeniden Düzenlenme Reaksiyonu	15
4. ÇALIŞMANIN LİTERATÜRDEKİ YERİ	17
5. METOD	28
5.1. Hesaplmalı Yöntemler	28
5.2. “Hartree-Fock Self Consistent Field” Metodu (HF-SCF)	29
5.3. Ab Initio Moleküler Orbital Teorisi	30
5.4. Temel Kümeler “Basis Functions/ Basis Sets”	30
5.5. Hartree-Fock Ötesi Yöntemler	31
5.5.1. Elektron Korelasyonu / Konfigurasyon Etkileşimi	31
5.6. Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi “Density Functional Theory” (DFT)	32
5.6.1. Hibrit Fonksiyoneller	33
5.7. Yarıdeneysel Moleküler Orbital Yöntemleri “Semiempirical MO Methods”	33
5.8. Solvent Etkisi	34
6. SONUÇLAR	36
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	67

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Açıklamalar

Kısaltmalar

ψ	: Dalga fonksiyonu
E	: Enerji
H	: Hamilton operatörü
V	: Potansiyel enerji
K.E.	: Kinetik enerji
\emptyset	: Fi olarak bilinen atomik orbitaller
μ	: Atomik orbitaller
ΔG	: Serbest enerji değişimi
Kd	: Denge sabiti
a_i	: Lineer katsayılar
C_i	: Katsayılar
H	: Elektronların kinetik enerjisi ile elektronlar ve çekirdekler arasındaki çekim gücünden doğan potansiyel enerji
P	: Moleküler orbital katsayılarının karelerinin toplamından meydana gelen yoğunluk matrisi
J	: Elektronların birbirini itmesinden doğan potansiyel enerji
X	: Dalga fonksiyonunu antisimetrik yapmak için gerekli matematiksel terimler
$E_x(\rho)$: Değişim terimi
$E_k(\rho)$: Korelasyon terimi
E^T	: Elektronların hareketinden ortaya çıkan kinetik enerji
E^V	: Çekirdek-elektron çekimlerine ve çekirdek çiftlerinin itmesine ait potansiyel enerji
E^J	: Elektron-elektron itmesine ait terim
E^{XC}	: Geriye kalan diğer elektron-elektron etkileşimlerini kapsayan terim. Değişim-korelasyon terimi denir.
ACN	: Asetonitril
AIM	: Molekülde atomlar (Atoms in molecules)

AM1	: Austin Model 1
BODIPY	: Bordipirometen
B3LYP	: Becke'nin üç-parametre (B3) değişim fonksiyoneli ve Lee-Yang-Pair (LYP) yerel olmayan korelasyon fonksiyoneli kombinasyonu
B3PW91	: Becke'nin üç-parametre (B3) değişim fonksiyoneli
CE	: Kılcal elektroforez (Capillary electrophoresis)
CE-LIF	: Kılcal elektroforez-lazer indüklemeli floresans (Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence)
CNDO	: Complete Neglect of Differential Overlap
COSMO	: İletken benzeri tarama solvasyon modeli (Conductor-like screening model)
CT	: Yük transferi (Charge transfer)
Cys	: Sistein
CysGly	: Sisteinilglisin
DCM	: Diklorometan
DFT	: Yoğunluk fonksiyonel teorisi (Density Functional Theory)
DNBS	: 2,4-dinitrobenzenesülfonil grubu
DOX	: Dioksan
DPP	: Diketopirrololpirrol
ECD	: Elektrokimyasal algılama
EOF	: Elektroosmotik akış (Electroosmotic flow)
ESIPT	: Uyarılmış hal molekülerarası proton transferi (Excited state intramolecular proton transfer)
FL	: Floresans
FMO	: Sınır molekül orbitalleri (Frontier molecule orbitals)
FRET	: Förster rezonans enerji transferi (Förster resonance energy transfer)
GC	: Gaz kromatografisi (Gas chromatography)
GGC	: γ -glutamil sistein
GGT	: γ -glutamil transpeptidaz
Gly	: Glisin
GSH	: Glutatyon
GSSG	: Glutatyon disülfid
GS IPT	: Temel hal molekülerarası proton transferi (Ground state intramolecular

	proton transfer)
GTF	: Gaussian tipi fonksiyoneller (Gaussian type functionals)
HBO	: 2-(2'-hidroksifenil)benzoksazol
Hcy	: Homosistein
HEPES	: 4- (2-hidroksietil) -1-piperazinetansülfonik asit
HF-SCF	: Hartree-Fock Self Consistent Field
HOMO	: En yüksek dolu moleküler orbitaller (Highest occupied molecular orbitals)
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography)
HPLC-UV	: Ultraviyole algılama ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography with ultraviolet detection)
ICT	: Molekülerarası yük transferi (Intramolecular charge transfer)
IMHB	: Molekülerarası hidrojen bağı (Intramolecular hydrogen bonding)
INDO	: Intermediate Neglet of Differential Overlap
LCAO	: Atomik moleküllerin lineer kombinasyonu (Linear combination of atomic molecules)
LIF	: Lazer indüklemeli floresans (Laser induced fluorescence)
LUMO	: En düşük boş moleküler orbitaller (Lowest unoccupied molecular orbitals)
Met	: Metionin
MD	: Moleküler dinamik (Molecular Dynamics)
MINDO	: Modified INDO
MNDO	: Modified Neglet of Diatomic Overlap
MS	: Kütle spektrometrisi (Mass spectrometry)
NAC	: N-asetilsistein
NBO	: Doğal bağ orbitali (Natural bond orbital)
NCL	: Doğal kimyasal ligasyon (Natural chemical ligation)
NDDO	: Neglet of Diatomic Differential Overlap
n-Hex	: n-heksan
NMR	: Nükleer manyetik rezonans (Nuclear magnetic resonance)
ODS	: Oktadesil silika jeli
PBS	: Fosfat tamponlu salin (Phosphate-buffered saline)

PCM	: Polarize sürekli model (Polarizable continuum model)
PDEAB	: p-N,N-dietilaminobenzaldazin
PES	: Potansiyel enerji yüzeyi (Potential energy surface)
PM3	: Parameterized Model number 3
RHF	: Restricted Hartree-Fock
RP	: Ters faz modu (Reversed-phase)
RSH	: Tiyoller grubu formülü
SMD	: Yoğunluğdayalı solvasyon modeli (Solvation model based on density)
SS-PCM	: Duruma özel polarize sürekli model (State-Specific Polarizable continuum model)
TD-DFT	: Zamana bağlı yoğunluk fonksiyonel teorisi (Time-dependent density functional theory)
TLC	: İnce tabaka kromatografisi (Thin-layer chromatography)
TQG	: Thiol Quant Green
UHF	: Unrestricted Hartree-Fock
UV	: Ultraviyole
UV-Vis	: Ultraviyole görünür
2T2YP	: 2-tiyazol-2-il-fenol
2B2YP	: 2-benzotiyazol-2-il-fenol

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.4.1: Michael addition reaksiyon mekanizması.	13
6.1: Molekül 1.	36
6.2: Molekül 1'in tiyol ile reaksiyonu.	37
6.3: Molekül 2.	37
6.4: Molekül 2'nin tiyol ile reaksiyonu.	38
6.5: Molekül 3.	38
6.6: Molekül 5.	39
6.7: Molekül 3 ve molekül 5'in tiyol ile reaksiyonu.	40
6.8: Molekül 4.	40
6.9: Molekül 4'ün tiyol ile reaksiyonu.	41
6.10: Sistein.	41
6.11: Molekül 1-Cys'in optimize olmuş yapısı.	42
6.12: Molekül 2-Cys'in optimize olmuş yapısı.	43
6.13: Molekül 4-Cys'in optimize olmuş yapısı.	43
6.14: Florosein.	44
6.15: Molekül 1-Cys için hesaplanmış moleküler orbitaller.	45
6.16: Molekül 2-Cys için hesaplanmış moleküler orbitaller.	46
6.17: Molekül 4-Cys için hesaplanmış moleküler orbitaller.	47
6.18: Floroseinin hesaplanmış moleküler orbitalleri.	48

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
6.1: Hesaplanan absorpsiyon dalgaboyu λ_{ab} (eV/nm), çalışılan florojenik molekül+biyotiyol bileşiklerinin ana konfigürasyon ve osilatör gücü (f).	49
6.2: Cys'siz moleküllerin absorpsiyon osilatör güçleri (f).	49
6.3: Molekül 1 için farklı solvent etkileri kullanarak farklı temel küme seviyelerinde farklı fonksiyoneller ile hesaplamalar (λ_{max} deneysel = 485nm).	50
6.4: Molekül 3-5 için ($\lambda_{den}=490nm$) B3LYP/6-311++G(d,p) temel küme seviyesinde solvent etkisi ile hesaplanan sonuçlar.	50
6.5: Farklı temel kümeler ile λ_{ab} (nm) absorpsiyon hesaplamaları.	51
6.6: Moleküllerin λ_{em} (nm) emisyon hesaplamaları.	51

1. GİRİŞ

Tiyolün hızlı, hassas bir şekilde tespit edilmesi petrokimya, gıda ve tıp alanında çok büyük öneme sahiptir [1]-[4]. Sistein (Cys), homosistein (Hcy), glutatyon (GSH) ve hidrojen sülfid gibi SH-içeren biyolojik moleküller hücresel süreçlerde çeşitli fizyolojik tepkileri ortaya çıkarmaktadır [5]-[7]. Örneğin, Cys, Hcy, GSH biyotiyollerin anormal seviyesi kanser, AIDS, kardiyovasküler, Alzheimer, Parkinson hastalığı, nöro-dejeneratif hastalıkları gibi çeşitli hastalıklar ile yakından ilişkili iken, endojen biyotiyoller olan bu biyotiyoller biyolojik sistemlerin redoks dengesinin sürdürülmesinde büyük önem taşımaktadır [8]-[11]. Ayrıca, memelilerin hücrelerinde L-sistein endojen olarak üretilen gasotransmitter, H₂S, son zamanlarda her iki kardiyovasküler ve nöronal sistemde önemli bir etki gösteren bir sinyal molekülü olarak kabul edilmiştir ve aynı zamanda diyabet, yavaş büyüme, lökosit kaybı, karaciğer hasarı, Alzheimer hastalığı ve Down Syndrome gibi hastalıklar ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır [6], [12]-[16]. Bu nedenle, ilgili hastalıkların teşhisi için biyomoleküllerin ve miktarlarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Biyomoleküllerin ve miktarlarının belirlenmesi için mevcut teknikler arasında yüksek hassasiyet, düşük maliyet ve biyolojik numunelerde tiyolleri tespit ve görüntüleme yeteneği nedeniyle floresan yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır [17]. Geçen on yıl içinde tiyoller için geliştirilen floresan sondalar üzerine önemli çalışmalar yapıldı [18]-[20]. Bu sondalar, iki çeşit ana mekanizma üzerinden tasarlanmaktadır. Birisi parçalama reaksiyon mekanizmasına dayanır, diğeri ise nükleofilik reaksiyon mekanizmasına dayanır [19]-[27]. Her iki mekanizma karşılaştırılmış, nükleofilik reaksiyon mekanizmasına dayanan floresan sondaların, elektrofillerin çeşitliliği nedeniyle daha aktif olduğu tespit edilmiştir. Özellikle son yıllarda, tiyollere Michael katılmalı sonda tipleri dikkat çekmektedir. Maleimid, kromen gibi moleküller tiyollerin floresan sondaları için tasarlanmıştır [28]-[40].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İÇeriği

Bu tezin amacı, tiyol tespitinde floresan sondaalarda kullanılan bazı florojenik moleküllerin fotofiziksel özelliklerinin hesaplamalı kimya yöntemlerinden olan zaman-bağlı yoğunluk fonksiyonel teorisi kullanılarak (TD-DFT) incelenmesi ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda yeni sentezlenecek florojenik moleküllerin sentezine yol gösterecek bilgilere ulaşılacaktır. Ayrıca bu moleküllerin biyolojik tiyollerini sens edebilme mekanizmaları aydınlatılacaktır. Moleküllerin öncelikle geometrik optimizasyonları DFT metodlarından B3LYP ve 6-31G* temel seti kullanılarak hem serbest halde hem de Cys, Hcy, GSH moleküllerinden biri veya birkaçına bağlı haldeyken yapıları en minimum enerjili halleri elde edilecektir. Bu işlemden sonra aynı moleküller yapıları uyarılmış hal hesaplamalarına tabi tutularak fotofiziksel özellikleri incelenecek ve elektronik spektrumlarına neden olan elektronik geçişler ve orijinleri tespit edilecektir. Bu çalışma sonucunda, elde edilen bilgiler ışığında floresans mekanizması aydınlatılarak tiyol molekülleri için yeni sensör moleküllerinin teorik tasarımı yapılacaktır. Böylece tiyoller için geliştirilecek yeni sensör çalışmaları için hem insan emeğinden hem zamandan hem de malzemeden tasarruf edilmiş olacaktır.

Bu tez biyotiyoller hakkında özet bilgileri, onların mevcut deteksiyon yöntemlerini, hesaplamalı yöntemleri, hesaplamalı yöntemleri içeren literatürleri ve son bölümünde sonuçları içermektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Aminotiyollerin Biyolojik Fonksiyonları

Merkaptanlar ya da tiyoller – alkollerin kükürt analogları, genel formülü RSH olan organik maddelerdir. Merkaptanlar (mercurium captans – cıvayı bağlayan; eş anlamı tiyoalkoller) – hidrokarbon türevleri olan havada yok denecek kadar düşük konsantrasyonlarda bile fark edilen hoş olmayan özel kokulara sahip sıvılardır. Doğada esas olarak protein çürüme ürünlerinde vardır, hafif asidik özelliğe sahiptirler.

Aminotioller (sistein, sisteinglisin, glutatyon ve homosistein,) ve bunların disülfürleri (sistin, okside glutatyon ve homosistein), biyokimyada hücre metabolizmasının detoksifikasyonu ve düzenlenmesi, enzimatik aktivite ve protein trafiği dahil birçok hayati fonksiyonlara hizmet etmektedirler [41].

Glutamattan oluşan tripeptid GSH ve Cys ve glisin (Gly), zararlı maddelerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda bir antioksidan olarak önemli bir role sahiptirler. [42]. Hcy bazı kardiyovasküler, nörolojik ve doğuştan hastalıklar için bir belirteç olarak kabul edilir. Metionin (Met) ve Cys proteinlerin sentezi için gerekli proteinojenik amino asitlerdir. Hcy, Met ve GSH ara maddeler olarak Cys ve Sisteinilglisin (Cys Gly) dahil metabolik olarak ilişkilidirler. Bu nedenlerle, bu amino tiyollerin ve disülfidlerin tayini, çeşitli hastalıkların teşhisinde büyük bir önem taşımaktadır.

Biyotiyoller (ya da biyolojik olarak türetilmiş tiyoller) hücreleri herhangi bir oksidatif hasardan koruyan en önemli antioksidantlardır [43], [44].

En geniş çalışılan biyotiyollerden GSH (L-glutamil-L-sisteinil-glisin) oksidatif stresden hücreleri koruyan antioksidanttır [45].

GSH, Glutatyon sentetaz ile γ -glutamil sistein (GGC) tarafından sentezlenir. GSH ayrıca protein ve DNA sentezi için gerekli olan indirgeyici süreçlerde rol oynar. Onun diğer fizyolojik rolleri sisteinin depolama ve taşımacılığını, artı yabancı bileşiklerle birçok reaksiyondaki enzimatik rolü içerir [45], [46].

Cys ve GSH salınım bileşikleri normal hücreleri antitümör maddelerinden ve radyasyondan korumak için kullanılmıştır [47].

Tiyol amino asit olan Hcy temel amino asit olan Met metabolizmasından oluşturulmuştur. Hcy oksidatif stres indüklenmiş hasar içeren mekanizmalar yoluyla aterosklerozun patogeneğinde rol oynadığı son zamanlarda önerilmiştir [48].

Başka bir tiyol bileşiği olan N-asetilsistein (NAC), GSH'ın bir ön-maddesidir ve aynı zamanda bir antioksidandır. NAC kronik bronşit tedavisinde mukolitik ajan olarak kullanıldığı gibi asetaminofen zehirlenmesine karşı antidot ve parasetamol zehirlenmesi için tercih edilen ilaç olarak uzun süredir kullanılmaktadır [47], [49], [50].

2.2. Sistein

Cys doğal olarak oluşan, çoğu proteinlerde bulunan kükürt içeren amino asittir. Sistein insanların ihtiyaç duyduğu 20 standart amino asitlerden biridir ve tiyol grubu içerdiğinden dolayı onlar arasında eşsizdir. Tiyol grubu (ya da sülfidril grubu) (-SH) kükürt ve hidrojen atomlarından oluşuyor. Bu tiyol grubu birçok proteinin yapısını belirleyen disülfid bağlarının oluşumuna yol açan sisteinin birçok önemli fonksiyonlarından sorumlu. Sistein genellikle elektron-transfer reaksiyonlarında yer alır ve enzime reaksiyonu katalize etmesine yardımcı olur. Ayrıca sistein önemli bir antioksidan olan glutatyonun hücre içi üretiminde hayati bir önem taşımaktadır. NAC, asetil grubunun Cys'in azot atomuna bağlı olduğu sisteinin bir formudur; bir besin takviyesi olarak satılır ve öksürük şurubunda bir terkip maddesi olarak kullanılır. İnsan yaratıcılığı, sistein ve onun diğer türevlerinin diğer pratik uygulamalar arasında gıdaya lezzet katmasında, pişirme işlemi yardımcısında ve saç bakımında ticari üretimi ve uygulamasına da yansımaktadır [51].

Sistinüri olarak bilinen ve Cys'in sert sistin böbrek taşı oluşturduğunda ortaya çıkan genetik bozukluk insan vücudunun normal kompleks koordinasyonunu etkileyebilir. Sistin, disülfid bağı ile bağlanmış iki sistein kalıntısı içeren, Cys'in oksitlenmiş bir şeklidir. Cys, ismini mesane anlamına gelen '*kustis*' yunan kelimesinden gelen sistinden almıştır: sistin ilk olarak böbrek taşlarından izole edilmiştir [52].

Birçok amino asitler D ve L olarak bilinen iki optik izomerde görülür. L amino asitleri proteinlerde bulunan amino asitlerin büyük bir çoğunluğunu temsil eder. Sisteinin doğal olarak oluşan formu, L-sisteindir.

Tiyol grubu indirgeme (redoks) reaksiyonlarına girebildikleri için, Cys de redoks reaksiyonlarına girebilir. Cys'in oksidasyonu bir başka tiyol ile disülfid bağı verir. Disülfid bağı, SS-bağı veya disülfid köprüsü olarak da adlandırılır ve tiyol gruplarının bağlanması ile türetilen tek kovalent bağıdır, C-S-S-C şeklindedir. Sistein oksitlendiğinde –SH grupları arasında disülfid bağı (cys-S-S-cys) ile birleştirilmiş iki sistein artığı olan sistin oluşur. Bu reaksiyon tersinirdir, disülfid bağının indirgemesi iki sistein molekülünü yeniden oluşturur. Disülfid bağları çoğu proteinin yapısını belirlemede önemlidir. Disülfid bağları proteinin katlanmasını stabilize ederek, bazı proteinlerin kararlılığında ve katlanmasında çok önemli rol oynar [53].

Redoks reaksiyonlarına girebilme özelliğinden dolayı, Cys antioksidan özelliği taşır. Cys insan metabolizmasında önemli kükürt kaynağıdır ve gerekli olmayan bir aminoasit olarak sınıflandırılmasına rağmen, sistein bebek ve yaşlılara ve malabsorpsiyon sendromlarından muzdarip veya bazı metabolik hastalıkları olan bireyler için gerekli olabilir. Cys insan vücudunda ve diğer organizmalarda hücreleri serbest radikaller gibi toksinlerden koruyan antioksidan olan GSH üretiminde bir öncüdür. GSH üç amino asit Cys, Gly ve glutamattan oluşan bir tripeptid antioksidandır. Glutamat ve Gly Kuzey Amerika'daki diyetlerde hali hazırda mevcuttur, ancak Cys'in mevcudiyeti onu GSH sentezi için hücre içinde sınırlayıcı substrat yapar. Cys'in sülfidril (tiyol) grubu (SH) proton donörü olarak hizmet vermektedir ve glutatyonun biyolojik aktivitesi için sorumludur. Bazen “Ana antioksidan” olarak anılan GSH daha az antioksidanların (C ve E vitaminleri gibi) eylemlerini düzenler ve hücrelerdeki glutatyon seviyesi ile birinin ne kadar yaşayacağı tahmin edilebilir [54].

Cys et, kırmızı biber, sarımsak, soğan, brokoli, brüksel lahanası, yulaf, süt, peynir altı suyu proteini ve buğday tohumunda bulunabilir. Ancak, Cys gerekli bir amino asit olarak sınıflandırılmıyor ve genellikle eğer kükürt içeren aminoasit Met yeterli miktarda ise, normal fizyolojik şartlarda insan vücudu tarafından sentezlenebilir. Serbest aminoasit Cys hücreye ideal bir dağıtım sistemini temsil etmez. Cys toksiktir ve kendiliğinden gastrointestinal kanalda ve kan plazması içinde katabolize edilir. Tersine, gastrointestinal kanalda sindirim sırasında sistin (disülfid bağı ile bağlı iki sistin molekülü) olarak absorbe edilen Cys serbest amino asit Cys'den daha stabildir. Sistin, gastrointestinal kanalı ve kan plazmasında güvenli bir

şekilde hareket eder ve hücre girişi üzerinde derhal iki sistein molekülüne ayrılır [51].

2.3. Homosistein

2.3.1. Biyokimya ve Metabolizma

Hcy molekül ağırlığı 135,1 olan küçük bir moleküldür. Yüksek seviyelerde Hcy Alzheimer ve kalp kardiyovasküler hastalıkları için önemli bir risk faktörüdür [8], [55]. Ancak Hcy'in bir çok ciddi hastalıklarda niye risk faktörü olarak göz önüne alındığı açık değildir. Hcy metil döngüsünde amino asit ön maddesi olan Met'in akıbetini belirleyerek, Met metabolizmasında merkezi düzenleyici bir konuma sahiptir. Hcy metil döngüsü dışında çeşitli biyokimyasal reaksiyonlara aktif olarak katılır. Bu da –SH grubunun kimyasının belirgin özelliğini gösterir ve sonuçta indirgenmiş tiyolun kullanılabilirliğini belirler. Hcy başka tiyollere katıldığı gibi, protein ile karışık disülfid reaksiyonlarına katılır ve tiyolaktone tersinir olarak dönüşür [56]-[61]. Hcy'in metabolizmasının alternatif yolları onun homosistene ve homosisteik asite oksidasyonunu ve onun hidrojen sülfite enzimatik desülfürizasyonunu içerir [61]-[64]. Bu bileşik, alkil halojenürlerle olan reaksiyonlarda, tiyol havuzu yerine halojenür ile değiştirme potansiyeline sahiptir [56].

2.3.2. Homosistein ve Türevlerinin Damar Hastalıklarındaki Rollerini

Kalp hastalığı olan insanların %20'sine kadar yüksek Hcy düzeyleri olduğu rapor edilmiştir. Hcy metabolizmasındaki değişiklikler hiperhomosisteinemi, homosistinüri ve C vitamini eksikliğinin damar belirtileri ile ilişkilendirilmiştir [64]-[66]. Endotelial hücreler üzerinde Hcy etkisine göre çalışmalar hiperhomosisteinemiye Raynaud sendromu ile ilişkilendirmiştir. Kan damarları beyin ve kalbe oksijen taşıdığından hiperhomosisteinemi tarafından oluşturulan oksidatif stress beyin tahribatı ve Alzheimer hastalığına yol açabilir. Hiperhomosisteinemi ve ilgili bozukluklar vitamin tedavisi ile tedavi edilebilir. Aslında, teşhis nöral tüp defektli gebelikleri, iskemik kalp hastalığı ve muhtemel kolon kanserini önlemeye

yardımcı olabilir. Kalp hastalığı için risk %40'a kadar azaltılabilir [67]. Yine, beslenme folat eksikliği genellikle hiperhomosisteinemiye atfedilir. Folik asit takviyesi, bu ve birçok ilişkili durumlara karşı tavsiye edilir. Bir askorbat-tüketilmiş durumdaki Hcy'in oksitlenmiş türevlerinin eksikliği (sülfasyon faktörler) bağ dokusunun yüksek kırılabilirliğine ve sonuçta kapiler duvarındaki endotel hücrelerin bozulmuş kohezyonuna yol açar. Klinik olarak vasküler bağ dokusundaki değişiklikler bir kanama diyatezinde kendini gösterir.

2.4. Glutasyon

2.4.1. Hücresel Glutasyon ve Tiyollerin Metabolizması

Tiyol içeren bileşikler pek çok biyokimyasal bileşiklerde ve farmakolojik reaksiyonlarda merkezdedir. Disülfid bağlarının proteinin üçüncü yapısını belirlemede önemli rolleri vardır, ve bir çok ilaçlarda sistein artıkları onların etkilerini belirlemede önemli reaktif merkezdedir. Cys artıklarını içeren moleküller geçiş metalleri ile kolaylıkla okside edilen ya da tiyol-disülfid takasına katılan en kolay metabolize olan bileşiklerin arasındadırlar. Bununla birlikte, aşağıda anlatılan özel durumlar hariç Cys'ler fizyolojik pH'da hidroperoksitlerle reaksiyona girmiyorlar. Bir Cys'i ve aktif bölgesinde iki Cys'i olan küçük tioredoksin proteini olan GSH sitokorumada üst üste rolleri yoksa genellikle tamamlayıcısı vardır. GSH en bol bulunan protein olmayan milimolar aralığında hücrelerin çoğunda bulunan tiyoldur. Tioeredoksin, antioksidan savunmasında, protein katlanmasında, sinyal iletiminde en önemli rolü oynayan 'tiodoksin katlanması' içeren protein ailesinin en küçüğüdür. Bir strese karşı bir hücre tepkisi, genellikle tiyol içeriğindeki değişiklikleri kapsar, ilk önce zararlı bileğişi ortadan kaldırarak hücreyi koruyan reaksiyonlarda tüketilir ve sonra ya mümkün olduğunda disülfitin enzimatik indirgeme ya da de novo sentezi aracılığıyla değiştirilir. En önemlisi, tiyol içeriği ve metabolizmasındaki bu değişikliklerin sinyal yolları üzerinde etkileri olabilir.

2.4.2. Koruyucu Madde Olarak GSH Roller

Hücrelerde baskın protein olmayan sülfidril olarak, GSH birçok önemli rol oynar. GSH'un tiyol kısmı antioksidan savunmasında, ksenobiyotikte, ve eikozanoid metabolizmada, ve hücre döngüsü ve gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli olduğu uzun zamandır kurulmuştur [68]-[72]. Buna rağmen GSH hidroperoksit ile direct olarak reaksiyona girmez.

GSH elektrofil çok reaktif olduğunda ya da daha sık GSH S-transferaz hareketiyle elektrofilik bileşiklerin büyük bir çeşitliği ile non enzimatik konjugatlar oluşturur. GSH ile konjugasyon hem ksenobiyotik ve hem de normal fizyolojik metabolizmanın önemli bir yönüdür [73], [74]. Konjugatların oluşumu GSH tükenmesine neden olabilir ve antioksidan savunmada GSH rolünü incelemek için bir aracı olarak kullanılmıştır. Bir uyarı, katalizör gerektirmeyen güçlü bir elektrofil spesifik olmayan bir yanıt üreterek, protein tiyol ile de reaksiyona girmesidir.

Küçük moleküller ile GSH konjugatları hücrelerden salgılanır [75]. Bu, genel olarak detoksifikasyonun bir parçası olarak kabul edilse de, heksaklorobutadin gibi bileşiklerin glutatyon-konjugatları, renal toksisite üretebilir [76]. Çoğu diğer dokular düşük γ -glutamil transpeptidaz (GGT) aktivitesine sahipken, glutatyon-konjugatları merkaptürik asitlere bozduran böbreklerdeki yüksek GGT aktivitesi, proksimal tübüler hücreler ile kendi alımını sağlar. Bununla birlikte, böbrek bir tarafa, GGT aktiviteleri ve glutatyon-konjuge atılımı ksenobiyotiklere karşı savunmanın önemli bir bileşeni olarak kabul edilir.

Hücrelerin korunmasındaki GSH kritik rolü, onun hücrelerden olası zararlı molekülleri çıkartan reaksiyon çokluğundan açıkça anlaşılmalıdır. Glutatyon disülfid GSSG gelen GSH restorasyonu kolayca yapılabilirken, konjugasyon yoluyla azalması veya GSSG boşaltımı ile kaybı yenilenmeyi talep eder. Birkaç hücre GSH alabilmesine rağmen, de novo sentezi bu restorasyon için baskın bir yoldur.

2.4.3. Glutasyon İçeriğinin evresel Faktörlere Duyarlılığı

Birçok farklı koşulların hücre içi GSH içeriğini değiştirdiği bilinmektedir. Bunlar, ağır metaller, yüksek glukoz konsantrasyonları ve ısı şoku sayılabilir [77]-[79].

Reaktif oksijen ve H₂O₂ dahil azot türleri ve nitrik oksit, ya da 2,3-dimetoksi-1,4-naftokinon, menadion, tert-bütüldenrokinon, pirolidin ditiyokarbamat dahil reaktif türler üretebilecek bileşiklere maruz ve β- naphthoflavone, ve 15-deoksi-Δ(12,14)-prostaglandin J₂ gibi başka reaktif biyolojik ürünler, okside olmuş düşük yoğunluklu lipoproteinler, ve 4-hidroksi-2-nonenal GSH sentezinin hızını yükselterek GSH içeriğini yükseltebilirler [80]-[91].

Serbest GSH okside durumdaki glutasyon disülfidin oranı (normalde > 100:1) ilgili enzim aktivitesi ve hücrenin redoks durumu için bir göstergedir.

3. AMİNOTİYOLLERİN MEVCUT DETEKSİYONLARI

3.1. Ayırmaya Dayalı Yöntemler

Şu ana kadar birçok analitik yöntemler farklı biyolojik kaynaktan veya matrislerden tiyol içeren bileşikler analiz etmek için uygulanmıştır. Bu yöntemler çeşitli bilgilendirici makalelerde özetlenmiştir [92], [93]. Baskın yöntemler ayırmaya dayalı ve ayırıcı olmayan şekilde iki kategoriye ayrılabilir [94]. Tüm ayırıcı yöntemler arasında, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kılcal elektroforez (CE) çok çeşitli uygulamalarda kullanılan en yaygın yöntemlerdir [95]. İnce tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC) ve yeni geliştirilmiş mikroakışkan teknik gibi diğer yöntemler de, bazı çalışmalarda ortaya çıkmıştır [92], [96], [97]. Ayırma yöntemlerinde uygulanan ortak algılama teknikleri UV-Vis absorbansı, elektrokimyasal algılaması (AKD), kütle spektrometrisini (MS) ve floresansı (FL) içerir [92], [96]. Tiyol bileşikler genellikle güçlü kromofor ya da florofordan eksik olduklarından dolayı, optik algılamada algılama sınırını artırmak için normal olarak kromofor veya floresans etiketleri ile etiketlemek gereklidir [92]. Spesifisite, reaktivite ve seçiciliği nedeniyle, karboksilik ve amino gruplarına göre, tiyol grubunun türevlendirmesi daha popüler bir hedeftir. Tiyol grubu türevlendirilmesi onu okside karşı korur [92].

HPLC yüksek etkin ayırma, tanımlama, ve kantitasyonun yanı sıra, analitlerin karışımlardan saflaştırılmasında kullanılan iyi bilinen kromatografi metodudur. Analitler bir HPLC sütununda sabit ve hareketli faz arasında çözünenin denge dağılımından kaynaklanan tutma süresi farklılıklarına dayalı olarak ayrılır [98]. HPLC ile yapılan birçok tiyol analizi durağan faz olarak oktadesil silika jelini (ODS) kullanır ve ters faz (RP) modu ile gerçekleştirilir [93]. UV, FL ve MS gibi dedektörler HPLC ile uyumludur [93]. Tavşan gözü dokusundaki GSH ve ilgili bileşikler kolon sonrası türevlendirme HPLC-UV ile ayrılmıştır [99]. Mikrodializ FL veya EC algılamalarından herhangi birini kullanarak sıçan beyinlerinde hücre dışı GSH konsantrasyonunu *in vivo* izlenmesi için HPLC ile birleştirilmiştir [100], [101].

CE tiyol belirlemede yaygın olarak kullanılan bir başka ayırma tekniğidir. Güçlü bir elektrik alanı altında, iyonik ve nötr türler yük ve sürtünme

kuvvetlerindeki farklılıklara göre bir kapilerde ayrılabilir [102]. HPLC'den farklı olarak, CE parabolik laminer akış profili yerine tıpa akış profilinde sonuçlanan hidrolik basınç yerine itici güç olarak elektroosmotik akış (EOF) kullanır [103]. HPLC aksine, CE'de fazlar arasında hiçbir kütle transferi yoktur. Bunun bir sonucu olarak, CE'de daha yüksek ayırma verimliliğine katkıda bulunan bant genişletilmesi HPLC'de olandan çok daha az belirgindir [104]. Bununla birlikte, CE'de kullanılan kapilerin iç çapı genellikle 20µm-100µm aralığında olduğundan, CE analiz için HPLC gerektirdiğinden daha az örnek hacmi gerektirir [105]. Ek olarak, CE sisteminde uygulanan yüksek voltaj yüksek hızda birkaç dakikada ayrılmanın tamamlanmasını sağlar [105]. Tüm bu avantajlardan dolayı, CE biyolojik numunelerin analizi için yaygın olarak kullanılmıştır. Lazer indüklemeli floresans (LIF) yöntemine bağlı CE toplam plazma tiyollerini ölçmek için kullanılmıştır. Plazma örneklerinin çevrimdışı azaltılması ve türetilmesinden sonra CysGly, Hcy, Cys ve GSH temel ayrılmaları 5-9 dakika içinde gerçekleşmiştir [106]. Aynı yöntem, kültüre edilmiş hücrelerde proteine bağlı GSH ölçmek için uygulanmıştır [107]. Mikrodializ bir akış-kapalı arayüzey ile sıçan beyninin kaudat çekirdeğindeki tiyollerin sürekli *in vivo* izlenmesi için CE-LIF ile bağlanmıştır [108], [109]. Tek bir insan eritrositindeki hücre içi tiyol belirlenmesi de CE-LIF kullanarak elde edilmiştir [110].

3.2. Ayırıcı Olmayan Yöntemler

Tiyol bileşiklerinin tespit edilmesi için kullanılan ayırıcı olmayan yöntemler, esas olarak spektrofotometre, spektrofluorometre, ve amperometriyi içerir [92], [96]. Ayırıcı olmayan yöntemlerin önemli bir avantajı ilgili analitleri matrislerinden ayırmaya gerek kalmamasıdır. Doğru ve güvenilir sonuçlar elde etmek için, ayırıcı olmayan yöntemler, karmaşık bir arka plan analitleri tespit etmek için son derece seçici yollar gerektirir. Yüksek seçicilik algılama, özel etiket molekülleri ile analiti etiketleme yoluyla elde edilebilir. GSSG ve GSH belirlenmesi, GSH / GSSG ile birlikte ilave edilen reaktiflerin indirgemesinden kaynaklanan UV-Vis absorbans değişikliğine dayalı bir spektrofotometrik yöntem kullanılarak bildirilmiştir [Tietze, 1969]. Cys varlığında GSH seçici floresan sondası, 5-maleimit-2 (m-metilfenil) benzoksazol kullanılarak GSH seçici olarak ölçülmüştür [112]. Tiyol selektif algılaması için elektrokimyasal sensorlar da geliştirilmiştir [113], [114]. Buna ek

olarak, nükleer manyetik rezonans (NMR) ayırma olmayan yöntemde, insan beynindeki GSH in vivo tayini için [115] ve insan eritrositlerinin hem hücre içi hem de hücre dışı bölmesindeki GSH redoks durumunun ölçümünde kullanılmıştır [116].

3.3. Floresan Sondalar

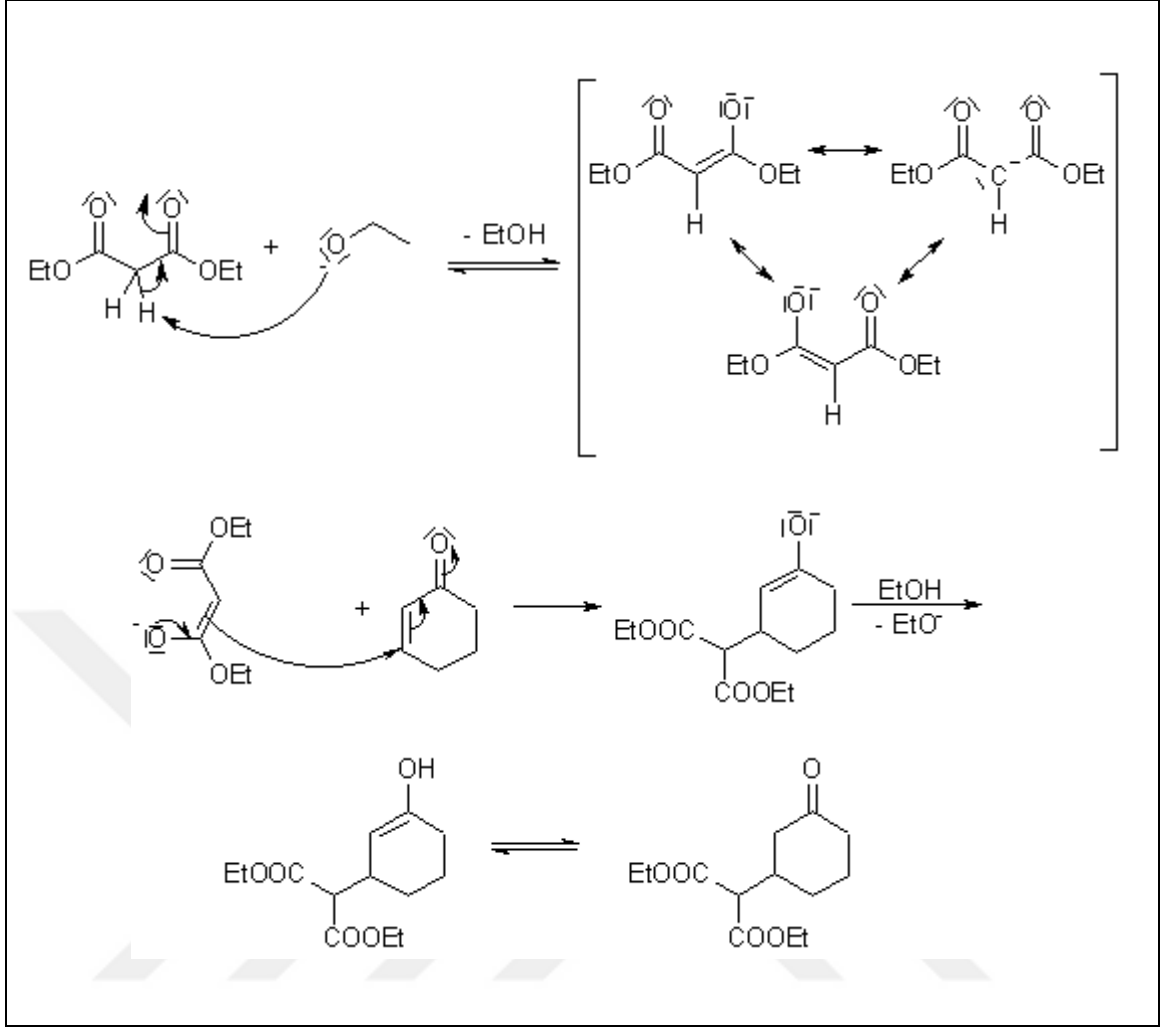
Floresan sondalar sülfidril grubunun güçlü nükleofilikliğinden yararlanmak için tasarlanmıştır, onlar Michael addition, sülfonamid ve sülfonat ester parçalanması, veya Se-N bağlarının kırılması gibi reaksiyonların oluşmasını sağlarlar [117]-[123].

3.4. Michael Addition

α,β -doymamış karbonil kısmına nükleofilin katılması olarak bilinen Michael addition, biyotiyoller için kullanılan floresan sondalar için baz olarak uzun zamandır kullanılıyor. Sık kullanılan Michael alıcıları maleimid, squarine ve akrilamid, türevleridir.

Maleimid grubuna Michael eklemesi sondaların floresanını kurtarır. Bu bileşiklerde kompleksin lüminesansı maleimide fotokimyasal elektron transferi sonucu söndürülür. Bir tiyol eklenmesi üzerine lüminesans geri kazanılır.

Michael addition reaksiyon mekanizmasını Şekil 3.4.1'de verilmiştir.



Şekil 3.4.1: Michael addition reaksiyon mekanizması.

3.5. Biotiyoller Arasında Seçici Algılama için Floresan Sondalar

Toplam biotiyoller tespiti iyi gelişmiş olmasına rağmen, biotiyoller arasında ayrımcılık bir mücadele olmaya devam etmektedir. Böyle ayrımcılık farklı tiyollerin çeşitli biyolojik rollerine verilen büyük biyokimyasal ilgidir. Örneğin, GSH anormal düzeyi kalp problemleri, kanser ve yaşlanma ile ilişkili ise, Hcy plazmada yüksek seviyeleri kardiyovasküler ve Alzheimer hastalıkları ile ilişkilidir. Diğer tiyollerden Cys, Hcy ayırt etmek için uygulanan yöntemde, onların sülfidril grubu ve bitişik amin grubunun sinerjistik etkisinden yararlanılıyor, bu da aldehytler ile siklizasyon, akrilatlar ile ekleme-siklizasyon, yerli kimyasal ligasyon ve aromatic süstitüsyon-yeniden düzenlenme gibi belirli reaksiyonların oluşmasını sağlıyor [124].

3.6. Aldehitler ile Siklizasyon

Aldehitler sisteinin N-terminali ile tiyazolidinleri oluşturmak için reaksiyona girerler, bu reaksiyon rutin olarak peptid ve proteinleri etiketlemek ve hareketsiz hale getirmek için kullanılır. Aldehit ve Cys/Hcy arasındaki siklizasyonun tiyazolidinler/tiyazinanları vermek üzere ayrıntılandırılması floresan sondaları oluşturmak için kullanılmıştır, ve Cys/Hcy GSH'dan ayırımı için en sık kullanılan reaksiyon tipidir [125]-[130].

Floresans özelliğini arttırmasıyla ve rasyometrik sinyalleriyle aldehit-fonksiyonlu sondalar büyük bir ilgi çekmişlerdir. Bu stratejinin genelliği, diğer tiyoller ve başka moleküller varlığında Cys/Hcy seçici algılaması ile kumarin, bordipirrometen (BODIPY) naftilimit boyalar, iki foton soğurma boyları ve organometalik boyalara dayalı sondalar kullanarak daha geniş bir şekilde açıklanabilir [131]-[135].

Hcy seçici algılaması için birkaç tür sondalar bildirilmiştir, ve seçici Cys algılamasına göre daha zor bir iştir.

3.7. Akrilatlar ile Eşlenik Eklenme-Siklizasyon

Akrilatlar Cys Michael eklenmesi, ilk olarak 7-üyeli S,N heterosikllere (1,4-tiazepin) siklize eden tiyoeterleri oluşturur. Bu reaksiyon sentezleri 1966 yılından beri kullanılmaktadır. 2011 yılında Strongin grubu tarafından öncülük edilmiştir ve daha sonra genel floroforların (floresein ve hidroksilatlanmış kumarinler, naftalimitler ve siyaninler gibi) akrilik esterlerini kullanarak Cys ve/veya Hcy algılaması için yaygın olarak yararlanılmıştır. Cys, homosistein ve GSH varlığında bir tiyoeter konjuge katılma ile oluşturulur. Cys ve Hcy arasındaki farklılaşma, Cys adüktlerinin Hcy analoglarına kıyasla çok daha hızlı intramoleküler siklizasyonundan kaynaklanıyor. Bu durum, 8-üyeli halkaya karşın 7-üyeli halkanın oluşumu için muhtemelen daha düşük aktivasyon entropisini yansıtır [124].

3.8. Doğal Kimyasal Ligasyon

Doğal kimyasal ligasyon (NCL) proteinlerin sentezinde yaygın olarak kullanılan önemli ve güçlü bir araçtır. Klasik NCL, bir peptidin C-terminalindeki tiyoesterin başka bir peptidin N-terminal Cys kalıntısı tarafından trans-tiyoesterifikasyonu ile başlayan bir reaksiyon kaskadıdır. Sonuçta orataya çıkan tiyoester bağlanmış ara madde, ligasyon alanında ana amit bağı oluşturan geri dönüşü olmayan bir molekül içi S,N-asil kaymasına maruz kalır. Yukarıda belirtilen dizi, amino grubunun tiyoestere yakınlığı ve beş üyeli molekül içi geçiş durumunun katılımı nedeniyle hızlıdır.

Ksanten boyalarının tiyoesterlerin Cys/Hcy NCL ile floresan algılaması için iki önemli avantajları mevcuttur: (1) onların tiyoester grupları Cys/Hcy tarafından gerçekleştirilen trans-tiyoesterifikasyona son derece reaktiftir ve (2) amit oluşumu renksiz ve floresan olmayan spirosikleri oluşturur. Ancak, Cys/Hcy algılanması için ksanten boyalarının tiyoesterinin direk kullanılması optimal bir seçim değildir, çünkü floresan olmayan spirosiklerin jenerasyonu açma-kapama floresan sinyallerini verir. Tercih edilen bir alternatif, entegre ksante boya (ya da onun analogu) aracılığıyla Förster rezonans enerji transferi (FRET) veya büyük p-konjuge sisteminin içine rasyometrik sondaları inşa etmektir [124].

3.9. Aromatik Sübstitüsyon-Yeniden Düzenleme Reaksiyonu

Yukarıda belirtilen reaksiyon türlerini kullanan örneklerin çoğu GSH üzerinden Cys ve/veya Hcy seçici algılamalarıydı. GSH Cys/Hcy üzerinde ayrımcılığı için, aromatik sübstitüsyon- yeniden düzenleme kaskad reaksiyona dayalı strateji Niu ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır. Kararsız sübstitüent taşıyan florofor tiyoeter elde etmek için Nükleofilik Aromatik Sübstitüsyon ile tiyollerle reaksiyona girer [136]. GSH değil de, Cys/Hcy amino grupları, amino türevleri elde etmek için 5-veya 6-üyeli geçiş durumu yoluyla kükürtün yerinin değiştirirler. Tiyoter- ve amino-sübstitüentli boyaların farklı fotofiziksel özellikleri GSH, Cys ve/veya Hcy seçici algılamalarını etkinleştirir. Bunun gibi selektif sonda oluşturmak için uygun bir florofor temel unsurdur, ve en az (1) biyotiyollere etkisini sağlamak için reaktif

elektrofilik tarafı taşınması ve (2) tiyollerle reaksiyona giren ürünlerden yeterince farklı fiziksel özellikler göstermesi gerekmektedir [124].



4. ÇALIŞMANIN LİTERATÜRDEKİ YERİ

TD-DFT hesaplamaları yapan bazı çalışmalar burada kısaca özetlenmiştir. Teorik hesaplamalar yapmadan önce TD-DFT ile ilgili çalışmalarını incelemek ve anlamak gereklidir. Sonraki sayfalarda, literatür taraması çalışmalarını kısaca özetleyerek kullanılan hesaplamalı kimya yöntemleri ve bulunan sonuçlar hakkında bilgiler verilmiştir.

Jin yük transferi ve lüminesans malzemeleri gibi diketopirrolpirrol (DPP) türevlerinin optik, elektronik, yük transferi ve kararlılık özelliklerini keşfetmek için teorik araştırmalar yapmıştır. Kemosensörler olan DPP türevleri ve farklı halojenlerin (F, Cl, Br) anyonlarıyla olan etkileşimleri teorik olarak DFT yaklaşımlarını kullanarak incelenmiştir. Bütün hesaplamalar Gaussian 09 code kullanılarak yapılmıştır. Türevlerin temel halleri S_0 (ground state) Becke'nin üç-parametre (B3) değişim fonksiyoneli ve Lee-Yang-Pair (LYP) yerel olmayan korelasyon fonksiyoneli kombinasyonu olan hibrit B3LYP fonksiyoneli, 6-31+G(d,p) temel kümesi ile optimize edilmiştir. Türev ve X^- ($X=F, Cl, Br$) içeren kompleksler aynı teorik seviyede denge (counterpoise) metodu kullanarak BSSE (the basis set superposition error) düzeltmesi dikkate alınarak optimize edilmişlerdir. DPP türevlerinin ve onların anyonlarının birinci singlet-durum uyarılmış (S_1) durumları TD-B3LYP seviyede 6-31+G(d,p) basis set kullanarak optimize edilmiştir. Geometri optimizasyonları için olan metodları kullanarak hesaplanan harmonic titreşim frekans hesaplamaları yerel minimum varlığını saptamak için ve sıfır nokta enerji düzeltmelerini değerlendirmek için kullanılmıştır. Aynı metodlarla harmonic titreşim frekans hesaplanmıştır ve local minimum varlığı saptanmıştır. DPP türevleri ve onların anyonlarının absorpsiyon ve floresans özellikleri sırasıyla S_0 ve S_1 optimize geometrelerine dayalı olarak TD-PBEO/6-31+G(d,p) metodunu kullanarak tahmin edilmiştir. Diklorometanda (DCM, dielektrik sabiti: 8,93) moleküler sistemler için S_0 ve S_1 hallerin optik özelliklerine çözücülerin etkisini incelemek için, PCM (polarized continuum model) hesaplamaları TD-DFT seviyesinde uygulanmıştır. Türevlerle X^- ($X=F, Cl, Br$) bağ karakteristiği için AIM (atoms in molecules) teorisi B3LYP 6-31+G(d,p) seviyede kullanılmıştır. Yük dağılımı NBO (natural bond orbital) yaklaşımı kullanılarak hesaplanmıştır. En düşük elektronik geçişlerin çoğunluğu HOMO→LUMO $\pi - \pi^*$ uyarılmış singlet haline karşılık gelir. FMO

analizleri S_0 ve S_1 hallerde deprotonasyonun hem E(LUMO) hem de E(HUMO) değerlerini yükselttiğini ve E_g değerlerini indirdiğini gösterdi. Absorpsiyon F^- 'siz 483nm $H \rightarrow L$ (deneysel 477nm), F^- ile 544nm $H \rightarrow L$ (deneysel 571nm). Floresans F^- 'siz 566nm $H \leftarrow L$ (deneysel 531nm), F^- ile 613nm $H \leftarrow L$ (deneysel 613nm) [137].

Kand ve arkadaşları kromenokuinolin bazlı floresans sondaların tasarımı, sentezi ve tiyol algılama yeteneği üzerine çalışma yapmıştır. Sondaların geometrileri gaz fazında B3LYP-6-311G(d,p) seviyesinde DFT metodu ile optimize edilmiştir. Optimize edilmiş geometriler sonra elektron uyarma sürecini anlamak için uygulanmıştır. Sondaların HOMO \rightarrow LUMO geçişleri yasak, ancak Cys bağlandığında HOMO \rightarrow LUMO geçişi izinlidir. Bu yüzden emisyon süreci LUMO \rightarrow HOMO geçişi floresansın olduğunu doğrulamıştır. Sondaların selektif tiyol algılamasında önemini ispatlamak için her sondanın $10\mu\text{m}$ çözeltisi $100\mu\text{m}$ çeşitli aminoasitlerin çözeltisi ile HEPES tamponunda 20dk reaksiyona girmiştir ve floresans spektrumu kaydedilmiştir. Gly, Met ve diğer organik moleküller için önemli bir floresans artışı gözlemlenmiştir. Ancak tiyol içeren analitlerde (Hcy, Cys, GSH) floresans yoğunluğunda büyük bir artış gözlemlenmiştir [138].

Chen ve arkadaşları deneysel değerleri kriterler olarak kullanarak sulu ortamda tiyol-Michael ekleme reaksiyonlarının denge sabitlerini ve reaksiyon kinetiğini tahmin etmede DFT hesaplamalarının doğruluğunu değerlendirmek ve GSH sondasının reaksiyon hızını sistematik yapısal varyasyon vasıtasıyla hızlandırmak ve ilk kez yeni geliştirilen sondayı GSH düzeyindeki değişiklikleri izlemek için tekli hücrelere uygulamıştır. Tersinir tiyol-Michael ekleme reaksiyonların termodinamik ve kinetiğini anlamak için DFT uygulanmıştır. SMD yoğunluğa dayalı solvasyon modeli ile M06-2X/6-31G(d) kullanarak reaksiyonların (ΔG) serbest enerji değişimi hesaplanabilir. Thiol Quant Green (TQG) GSH sondanın uygun K_d denge sabiti vardır. Fakat ileri ve geri reaksiyonları yavaştır. TQG analogları (1-X) sentezlenmiştir. GSH sondalarının absorpsiyonu fosfat tamponlu salinde (PBS) 1-X için (479nm), 1-X-GSH için (405nm). 1-X ve GSH arasında gerçekleşen reaksiyonların geri dönüşümlü doğasından ötürü spektrometrik değişiklikler GSH konsantrasyonuna bağlıdır. K_d hesaplamak için M06-2X DFT metodu kullanılmıştır. Tiyol-Michael ekleme reaksiyonlarının (ΔG) serbest enerjileri başta reaktan ve ürünlerin gaz fazında optimize ederek M06-2X/6-31G(d) seviyesinde frekans analizleri ile hesaplanmıştır. Ancak deneysel sonuçlardan önemli ölçüde sapmıştır.

Su fazında aynı metodu uyguladıklarında deneysel ΔG sonuçlarıyla yakın çıkmıştır. TQG analoglarından 1-OH GSH sondası daha hızlı kinetiklere sahip olduğu belirlenmiştir [139].

Guennic ve arkadaşları 2-(2'-hidroksifenil)benzoksazol (HBO) özüne dayalı floresans borat kompleksleri ile bu çalışmada dokuz adet boyanın spektroskopik özelliklerinin teorik araçlarla anlamayı ve deneysel buluşlarla açıklamayı hedeflemiştir. Birkaç TD-DFT yaklaşımları kullanılmıştır. İlk olarak dikey $\omega B97X-D/6-31G(d)$ duruma özel polarize-sürekli SS-PCM modeli ile birlikte uygulanmıştır. Uyarılmış hallerin yoğunluğunu hesaplayarak ve yük transferi fenomenini tayin ederek her bandın doğası karakterize edilmiştir. İkinci aşamada teorik/deneysel karşılaştırmaları yapabilmek için adyabatik sonuçlar elde edilmiştir. Üçüncü aşamada vibronik hesaplamaları yapılmıştır. Sonrasında terminal amin grubunun protonasyonunun etkisi araştırıldı. Sonucunda bir tanesi HBO borat-boranil, diğeri HBO borat-BODIPY olan iki dyad modellenmiştir. Ek olarak 6-311+G(2d,p) hesaplamaları uygulanmıştır. Transfer edilen yük miktarı ve yük miktarı mesafesi de teorik olarak hesaplanmıştır. Sistematik olarak çözücü etkileri de dahil edilmiştir, iyi bilinen polarize sürekli PCM model (Polarizable continuum model) kutupsal süreklilik modeli uygulanmıştır [140].

Xue ve arkadaşları auron ve türevlerinin absorpsiyon ve emisyon spektrumlarını DFT ve TD-DFT yoğunluk fonksiyonel teorileri ile incelemiştir. On farklı fonksiyonel uygulanmıştır. Farklı temel kümelerle analize edilmiştir. TD-DFT çalışmasında auronlar için en verimli olarak B3LYP ve PBEO fonksiyonelleri ortaya çıkmıştır. Sonuçlar en düşük geçişlerin ağırlıklı olarak $\pi - \pi^*$ geçişlerin HOMO ve LUMO arasında yük transferi (CT) karakteri ile olduğunu göstermiştir. PCM-TD-PBEO/6-31+G(d) temel küme kullanılarak hesaplanan geçiş enerjileri deneysel verilerle daha yakın çıkmıştır [141].

Jayabharathi ve arkadaşları 2-(1-(3,5-dimetil fenil)-1H-fenantro(9, 10-d)imidazol-2-il) fenol bileşiğinin fotofiziksel ve uyarılmış hal molekülerarası proton transferini DFT analizi ile incelemiştir. İlk olarak floresan fenantrimidazol türevleri sentezlenmiştir ve ¹H, ¹³C NMR ve kütle spektral analizleri ile karakterize edilmiştir. Absorpsiyon ve floresans bantlarına çözücü etkisi hesaplamalı çalışmalar ile analize edilmiştir. Hidroksi grubu içeren fenantrimidazol polar solventlerde tek tanınmış absorpsiyon ve emisyon gösterir ve uyarılmış hal moleküler arası proton

transferi (ESIPT) olduğundan polar olmayan solventlerde çift emisyon gösterir. Maddenin ESIPT özelliği optimize edilmiş geometri parametreleri, potansiyel enerji yüzeyi (PES), Mulliken'in ağır atomlarda ve tautomerlerinin moleküler orbitallerinde yük dağılımı analizleri ile doğrulanmıştır. Temel hal elektron transferi dayanılmazlığı HOMO-LUMO analizleri ile aydınlatılmıştır. Hidrojen bağı etkileşimlerinin kritik değerlendirmesi molekülde atomlar (AIM) ve NBO analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalar Gaussian 03 ile yapılmıştır. Fenantrimidazol türevlerinin temel ve uyarılmış hallerinin optimizasyonu ve HOMO-LUMO sınır orbitalleri B3LYP/6-31G(d,p) temel küme kullanarak sırasıyla DFT ve TD-DFT metodlarıyla gerçekleştirilmiştir [142].

Paul ve arkadaşları çalışmada iki heterosiklik bileşik 2-tiyazol-2-il-fenol (2T2YP) ve 2-benzotiyazol-2-il-fenol (2B2YP) için molekülerarası H-bağı (IMHB) etkileşimini çeşitli kuantum kimyasal araçlarla hesaplamalı açıklamasını göstermiştir. AIM kullanarak elektron yoğunluğu ve Laplacian hesaplanmıştır ve NBO analizi yapılmıştır. IMHB etkileşiminde kovalentliğin varlığı da kuantum kimyasal analiz ile test edilmiştir. Bütün yapısal hesaplamalar Gaussian 03w programlar paketi ile DFT metodu kullanarak yapılmıştır. Teorik hesaplamalar B3LYP fonksiyoneli kombinasyonu ile yapılmıştır. Bu hesaplamalarda özel vurgu 6-311++G(d,p) temel kümesine verilmiştir. Çünkü bu temel küme anyon ve yalnız çift elektronlu yapılar için yararlı olan yaygın fonksiyonlu valens elektronlar için en kalitelisidir. AIM hesaplamaları Gaussian 03w yazılımında B3LYP/6-31G(d,p) seviyesinde yapılmıştır. GSIPT ve ESIPT PES hesaplamaları Gaussian 9 programlar paketiyle yapılmıştır [143].

Ray ve arkadaşları asit bir azin bağı p-N,N-dietilaminobenzaldazin (PDEAB) içeren Schiff bazını sentezlemiştir ve kararlı durum absorpsiyonu ve floresan ölçümü kullanılarak onun spektroskopik özellikleri araştırılmıştır. Her iki absorpsiyon ve emisyon çalışmaları PDEAB bileşiğinin protik çözücülerle hidrojen bağı oluşturmasını göstermiştir. PDEAB ve protik çözücüler arası molekülerarası hidrojen bağı kurulması Kuantum Kimyasal hesaplama tarafından DFT teorisi B3LYP/6-31++G(d,p) ve NBO analizleri kullanılarak daha da doğrulanmıştır. PDEAB aprotik çevredeki floresan olmayan doğası (kapalı floresans) protik çözücü varlığında floresan sisteme (açık floresans) geçebilir ve dolayısıyla bu molekül asetonitril (ACN) ve dioksan (DOX) gibi aprotik ortamda protik solventi için son derece hassas

florosensör olarak kullanılabilir. Temel hal ve uyarılmış haldeki molekülerarası hidrojen bağlama etkileşimi spektroskopik olarak incelenmiştir. ACN, DOX, n-heksan (n-HEX) gibi çözücülerle çalışılmıştır. İzole edilmiş PDEAB ve PDEAB – (H₂O)₂ için temel hal yapısal hesaplamalar B3LYP/6-31++G(d,p) seviyesinde DFT ile Gaussian 03w programlar paketi kullanılarak hesaplanmıştır. Zamana bağlı yoğunluk fonksiyonel teorisi olan TDDFT metodu aynı seviyede sistemin salınım kuvvetini (oscillator strength) hesaplamak için kullanılmıştır. PCM polarize edilebilir sürekli model dielektrik süreklilik yaklaşımı ile uygulanmıştır. Stabilizasyon ve NBO ikinci dereceden pertürbasyon enerjileri hesaplanmıştır. Temel absorpsiyon 390 nm'de S₀ → S₁ elektron geçişi $\pi - \pi^*$ tipidir. PDEAB molekülü su hariç bütün protik çözücülerde 470 nm'de emisyon gösterir ama DOX, ACN, n-HEX gibi aprotik ortamda zayıf floresandır. PDEAB molekülü suda çözünmez, bu yüzden bu molekülün aprotik çözücü ortamına su eklenince hidrojen bağı oluşur ve floresans gözlenir. Çalışmalar molekülün emisyonu protik çözücülerin hidrojen bağı oluşturma kabiliyeti ile ilgili olduğunu göstermiştir. Azin azotlarıyla su molekülleri hidrojen bağı oluşturduklarını da hesaplamalar göstermiştir. Teorik ve NBO analizleri PDEAB molekülleri ve protik çözücüler arası hidrojen bağı oluşmasını desteklenmiştir [144].

Ji ve arkadaşları alkinilpiren türevlerini sentezlemiştir, hesaplamaları kimya yöntemleriyle yeni floresan sondalar tasarlamıştır. İlk olarak 1,6- ve 1,8-bis(feniletinil) pirenleri hazırlanmıştır. Türevlerin fotofiziksel özellikleri molekülerarası yük transferi (ICT) özelliğine bağlı olduğu bulunmuştur. Teorik hesaplamalar bazında yeni alkinilpiren bazlı floresan tiyol sondaları tasarlanmıştır. Hesaplamalar bu yeni tiyol sondaların floresan özelliği göstermediğini saptamıştır. Tiyol ile 2,4- dinitrobenzensülfonil biriminin bölünmesi ile florofor salınır ve TD-DFT hesaplaması emisyon gerçekleştiğini gösterir ve sonuç olarak sonda floresan olur. Sondanın tiyol varlığındaki KAPALI-AÇIK floresans özelliği ICT ortadan kaldırılması nedeniyledir. Boya ve sondaların temel hal yapıları yoğunluk fonksiyoneli teorisi DFT ile B3LYP fonksiyoneli ve 6-31G (d) temel kümesi ile optimize edilmiştir. Uyarılmış hal hesaplamaları zamana bağlı yoğunluk fonksiyoneli teorisi TD-DFT ile yapılmıştır. Bütün bu hesaplamalar Gaussian 03 ile gerçekleştirilmiştir [145].

Zhu ve arkadaşları fotoelektrik elektron transfer (PET) yoluna dayalı olarak elektron donörü olarak naftalimit floroforu ve elektron akseptörü olarak maleimid grubunu kullanarak geliştirmiş ve sentezlemiş orto-Z3, meta-Z3, para-Z3 tiyol floresan sondalar rapor etmiştir. Bu sondaların floresan yoğunluğu, maleimidin naftalimit yönündeki konumuna bağlı olarak önemli derecede farklılık göstermiştir. Meta ve para izomerlerine kıyasla orto izomeri tiyol ilavesi üzerine en iyi floresans tepki performansını sergilemiştir. Sonuçlar, elektron alıcısının görelî konumunun PET sürecinde önemli rol oynadığını ve orto-Z3 sondanın serum örneklerinde ve canlı hücrelerde endojen biyotiyolleri saptayabildiğini göstermiştir. Hesaplamalar temel hal geometresinde B3LYP/6-31G* seviyesinde Gaussian 09 kullanarak DFT ile yapılmıştır [146].

Gue ve arkadaşları florofor ve elektron verici olan BODIPY ve elektron alıcı olan 2,4-dinitrobenzenesülfonil (DNBS) grubu içeren foto-kaynaklı elektron transfer (PET) tiyol sondalarını hazırlamışlardır. Elektron vericisi olan BODIPY floroforu ve elektron alıcısı olan DNBS arasındaki mesafe sonda 2'de sonda 1'e göre daha uzundur, sonuç olarak sonda 2'nin kontrast oranı (veya PET verimliliği) sonda 1'e göre daha küçüktür. Bununla birlikte, sistein varlığında hem sonda 1 hem de sonda 2 (sonda 1 için emisyon artışı 300 kat ve sonda 2 için 54 kat) için floresan KAPALI-AÇIK anahtarlama etkileri gözlemlenmiştir. Floresans KAPALI-AÇIK algılama mekanizmaları DFT/TD-DFT teorik hesaplamalarıyla rasyonelleştirilmiştir. DFT hesaplamalarıyla DNBS maleimide göre daha güçlü elektron alıcısı olduğunu göstermişlerdir. Bu iki sonda hücrel tiyollerin floresan görüntülemesi için kullanılmışlardır. Sensörlerin temel hal yapıları yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) B3LYP fonksiyoneli ve 6-31G(d) temel kümesi ile gaz fazında optimize edilmiştir. Uyarılmış hal hesaplamaları zamana bağlı DFT (TDDFT) ile yapılmıştır. Hesaplanan tüm yapıların frekans analizinde hayali frekansları (imaginary frequencies) yoktur. Tüm hesaplamalar Gaussian 09 W ile yapılmıştır [147].

Shao ve arkadaşları sistein ve homosisteinin seçici olarak tespiti için kırmızı yayan BODIPY bazlı (FRET) moleküler sonda 1 tasarlamışlardır. Floresans KAPALI-AÇIK anahtarı DNBS biriminin florofordan tiyollerle bölünmesi ile tetiklenir. Sonda 1'in kendisi floresan değilken, sistein veya homosistein varlığında 590 nm'de kırmızı bir emisyon açılır (uyarıma 505 nm'de). Sonda hücrel tiyollerin *in vivo* floresan görüntülemesi için kullanılmıştır. Sondanın floresans

algılama mekanizması ve ara ürünlerin floresan fotofiziksel özellikleri DFT hesaplamaları ile tamamen rasyonel hale getirilmiştir. Sonda 1'in floresan yetersizliği uyarılmış hal S₁'e atfedilir (osilatör gücü $f=0,0007$), ki bu da DNBS parçasından kaynaklanmaktadır. Tiyoller aracılığıyla florofordan DNBS kısmının bölünmesi, floroforun floresan özelliğini yeniden kurar ($f=1,4317$), böylece tiyollerin varlığında kırmızı emisyon gözlenebilir (floresans AÇIK). Bütün hesaplamalar yoğunluk fonksiyonel teorisine DFT, B3LYP fonksiyoneli ve 6-31G(d) temel kümesine dayanmaktadır. Metanol solventi bütün hesaplamalarda PCM modeli olarak düşünülmüştür. Bileşiklerin UV-vis absorpsiyonları optimize edilmiş temel durum geometrilerine (S₀ hal durumu) dayalı olarak hesaplanmıştır. Floresans emisyonu için emisyon dalga boyu optimize edilmiş uyarılmış hallere (çoğu durumda S₁ hal durumu) dayalı olarak hesaplanmıştır. Bütün bu hesaplamalar Gaussian 09W ile gerçekleştirilmiştir [148].

Chen ve arkadaşları çevreye duyarlı çift emisyon özelliklerini gösteren bir rutenyum polipiridin kompleksini tasarlamış ve sentezlemişlerdir. Dimetil sulfoksit (DMSO), N,N-dimetilformamit (DMF) gibi aprotik çözücülerde kompleks güçlü mavi ışık yayar. Protik çözücüde turuncu ışık yayar. Benzer şekilde, kompleksin homosistein ve sisteine tepkisi de apaçık çözücüye bağımlılığını göstermektedir. TD-DFT hesaplamaları, protik çözeltideki imidazol azotunun protonlanmasının parlak kırmızı değişimden sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, kompleks, homosistein ve sisteini hem aprotik çözücü içinde hem de protik çözücü içinde algılamak için kullanılabilir olduğunu göstermişlerdir. Protik ve aprotik çözeltilerdeki farklı emisyon özelliklerini daha ayrıntılı olarak açıklamak için nonmetaller için 6-31G (d) temel küme ve Ru için de CC-PVDZ-PP temel küme ile B3LYP düzeyindeki TD-DFT hesaplamaları gerçekleştirilmiştir [149].

Tong ve arkadaşları 7-hidroksi-2-(kuinolin-2-ilmetlen) malonik asit ve onun esteri üzerine teorik ve deneysel çalışma yapmıştır ve 2-(kuinolin-2-ilmetlen) malonik asitin (QMA) Michael alıcısı olarak asit ile aktive edilebilir olduğunu, sadece pH<7 olan çözeltilerde çalıştığını ve çözeltilerin pH'sı düştükçe QMA'nın daha yüksek reaktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Alkalın çözeltisinde malonat anyonu ne RS⁻ ne de RSH ile tepki verir. Aksine, QMA'nın esteri olan 2- (kuinolin-2-ilmetlen) malonik ester (QME), algılama reaksiyonunda ters bir pH etkisini ortaya çıkarır; diğer bir deyişle, alkalın çözeltilerde tiyollerini algılayabilir, ancak asidik

çözeltilerde algılayamaz, normal bir baz ile katalize edilmiş Michael eklemesi gibi. Teorik hesaplamalardaki aktivasyon entalpilerinin değerleri, farklı pH koşullarındaki iki sondanın yukarıda belirtilen algılama davranışını desteklemektedir. Asitli çözeltilerde, protonlanmış QMA, nötr ve alkalın çözeltilerdeki diğer iyonize halleri üzerinden elektrofilik saldırıya karşı daha çok reaktiftir ve bu nedenle, düşük reaktif RSH ile reaksiyona girebilir. Buna karşılık, QME'nin RSH (asidik çözeltiler) ile etkileşimde büyük bir enerji bariyeri var ve QME'nin oldukça reaktif nükleofil RS^- ile reaksiyonu, (alkali çözeltilerde) düşük aktivasyon enerjisi sürecidir. Teorik hesaplama, QMA'nın algılama tepkimesinin, nötr tiyoller (RSH) ile bir 1,4 ilavesi süreci ve QME'nin RS^- ile algılama reaksiyonu için bir 1,2 ilaveli yol izlediğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, QMA'nın algılama reaksiyonu, 1,4 ilavesi ile bir asit ile katalize edilmiş Michael eklemesidir ve 1,2 ilave yoluyla normal bir bazla katalize edilmiş Michael eklemesidir. Bütün elektronik yapı optimizasyonları ve frekans hesaplamaları Gaussian 09 program paketi kullanarak gerçekleştirilmiştir. Gaz fazındaki geometriler B3LYP yoğunluk fonksiyoneli ve 6-31+G(d) temel kümesi ile optimize edilmişlerdir. UV-Vis absorpsiyon spektrumları PBEPBE/6-31+G(d) metodu kullanılarak değiştirilmiştir. İletken benzeri sürekli polarize (C-PCM) çözme modeli kullanılmıştır. Deneysel çalışmada çözücü kullanıldığından, su çözücü olarak seçilmiştir. B3LYP fonksiyonları, sudaki tek nokta enerjilerini hesaplamak için 6-311 ++ G (d, p) büyük temel küme ile kombine edilmiştir [150].

Yang ve arkadaşları en yaygın dağıtılan flavonoid olan fisetini TD-DFT metoduna dayalı olarak uyarılmış hal proton transferi üzerinde araştırmışlardır. Hesaplanan TD-DFT metoduna dayalı absorpsiyon ve floresans spektrumları deneysel sonuçlarla uygun çıkmıştır. Birinci uyarılmış halde iki farklı fisetin kromofor yapısı bulunmuştur, bu proton transfer reaktife bağlı olabilir. Bağ uzunluğuna ve açılara dayalı olarak S1 durumunda hidrojen bağının güçlendirilmesi ifade edilmiştir. Buna ek olarak, O-H gerilimli titreşim bölgesinde hesaplanan kızılötesi spektrumları ve hesaplanan hidrojen bağ enerjisi, hidrojen bağ güçlendirme olgusunu da beyan eder. Sınır molekül orbitalleri (MO) analizi ve NBO fisetin kromoforunun molekül içi yük transferini gösterir, bu da proton transfer eğilimini gösterir. S_0 ve S_1 durumlarının potansiyel enerji yüzeyleri, uyarılmış durumda proton transferinin mekanizmasını ayrıntılı olarak açıklamak için oluşturulmuştur. TD-DFT metodu B3LYP fonksiyoneli kullanılmıştır ve TZVP bu

sistem için uygun temel küme olarak seçilmiştir. Çözücü etkilerini de değerlendirmek için ACN PCM olarak seçilmiştir [151].

Long ve arkadaşları biyolojik tiyoller için yeni kumarin esaslı floresan sonda tasarlamış ve sentezlemiştir. Sonda sulu çözeltide floresans özellik göstermiyor, ancak tiyollerle yüksek duyarlılıkta 246 kat daha floresans özellik göstermiştir. Dahası, sonda diğer biyolojik türlere karşı mükemmel bir tiyol seçiciliği göstermiştir. Ayrıca sondanın tiyollere karşı optik tepkileri TD-DFT hesaplamaları ile B3LYP/6-31G** seviyesinde Gaussian 9 programı kullanarak çalışılmıştır. Sonunda sonda insan kan serumunda biyolojik tiyoller algılaması başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Ve hücre içi görüntüleme uygulamaları sondanın canlı hücrelerde değişik konsantrasyonlarda hücre içi tiyolleri algılamak için kullanılabilir olduğunu belirlemiştir [152].

Li ve arkadaşları Si-O bağına dayalı florür anyonu için floresan sensörün algılama mekanizmasını TD-DFT hesaplamaları ile incelemiştir. Çeşitli iyonlar arasında florürün reaksiyon enerjisi en düşük hesaplanmıştır ve bu da sensörün yüksek seçiciliğini belirtiyor. Yapılar geometri optimizasyonu ve potansiyel enerji eğrileri ile onaylanmıştır. Bu çalışmadaki hesaplamalar ORCA 2.8 programı ile yapılmıştır. Temel hal geometri hesaplamaları ve titreşim analizleri DFT metodu ile yapılmıştır. Elektron uyarma enerjileri ve birinci singlet uyarılmış hal geometri optimizasyonları TD-DFT metodu ile gerçekleştirilmiştir. Fonksiyonel olarak B3P86, temel küme olarak TZVP seçilmiştir. İletken benzeri tarama COSMO solvasyon modeli aseton çözücü etkilerini değerlendirmek için kullanılmıştır. Bu sensör, S1-S0 yerel geçişiyle güçlü bir floresan yayabilir. Sensör fenolat anyonu ve silan vererek nükleofilik süstitüsyon ile flörür anyonu ile reaksiyona girecektir. Fenolat anyonu PET süreci sonrası enerjisini düşürerek ve zayıf floresan yayarak S1 halinde yapısını değiştirecektir [153].

Basaric ve arkadaşları siyanofenilpirol türevlerinin fotofiziklerinin kararlı durum, nanosaniye ve femtosaniyede çözülen absorpsiyon ve floresans teknikleri ve kuantum-mekanik hesaplamalar vasıtasıyla kapsamlı bir incelemesini yapmıştır. Bu çalışmada araştırılan bileşiklerin ömrü 2-8 nanosaniye aralığında olan yüksek derecede floresan moleküllerdir. Çözücü polaritesinde bir artış floresan kuantum verimlerinde bir azalmaya neden olmaz, ancak floresan ömrünü uzatır. Yoğunluk fonksiyonel teorik hesaplamaları S1 ve S2 için benzer enerjileri tahmin etmiştir.

Ayrıca hesaplanan dipol momentler temel duruma göre uyarılmış halde daha yüksek bulunmuştur. Aslında, temel durumunda bileşiklerin hesaplanmış en iyi geometrisi, pirol ve fenil kısımları arasında yaklaşık 10-25 ° lik bir dihedral açıyla karakterize edilirken, S₁ durumunun S₀'dan daha düzlemlidir olduğu tahmin edilmektedir. Kuantum mekanik hesaplamalar, Gaussian 09 program paketi kullanarak B3LYP bazında yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) metodu ile geometrileri optimize etmek için, zamana bağlı DFT ile uyarılmış halleri karakterize etmek için yapılmıştır. Konformasyonel analizler B3LYP/6-31Gd metodu ile, moleküllerin temel hal optimizasyonları B3LYP/6-311G++dp ile, Mulliken yükler ve dipol momentler B3LYP/6-311G+dp ile hesaplanmıştır. Uyarılmış singlet hallerin Mulliken yükleri, dipol momentleri, geçiş enerjileri ve olasılıkları TD-DFT B3LYP/6-311G++dp metodu ile elde edilmiştir. Asetonitril solvasyon etkisi bütün hesaplamalara CPCM ile dahil edilmiştir [154].

Dai ve arkadaşları bir dizi 2-(kuinolin-2-ilmetlen) malonik asitler ve onların esterlerini tiyoller için Michael-tipi floresan sondalar olarak sentezlemiştir. QMA'ların ve QME'lerin algılama reaksiyonları farklı pH aralıklarında gerçekleşir, QMA için pH<7 ve QME için pH>7. Deneysel ve teorik çalışmalar bazında QMA'lar ve QME'ler arasındaki algılama reaktivitesi üzerindeki farklı pH etkilerini açıklığa kavuşturmuş ve iki QMA'nın asidik solüsyonlarda (pH<7) tiyoller için son derece hassas ve selektif floresan sondalar ve canlı hücrelerde lizozomu etiketleyebilen umut verici boyalar açıklamışlardır [155].

Jung ve arkadaşları tiyol içeren bileşiklere Michael tipi bir reaksiyon yoluyla floresans yayabilen bir dizi kumarin sentezlemiştir. Kumarinler arasındaki tek fark, benzen halka parçasındaki kumarinin konjüge edilmiş çift bağ yakınındaki karboksil grubunun pozisyonudur. Biyotiyollere karşı seçiciliklerinin yanı sıra ilgili florojenik mekanizma, floresans spektroskopisi, DFT hesaplamaları ve kinetik çalışmalarla gösterilmiştir. Bütün izomerlerde glutatyona ve homosisteine göre sistein daha çok kat floresans yansıtmıştır. Bir sondanın sisteine karşı yüksek seçiciliği daha az negatif yüklü nükleofil tercih eden benzen halkasındaki *ortho* karboksil grubundan dolayıdır. Yoğunluk fonksiyonel teori (DFT) bazlı teorik hesaplamalar Gaussian 09 program paketi ile gerçekleştirilmiştir. Yapılar sulu ortamda teorinin B3LYP/6-31G(d) seviyesinde optimize edilmiştir. PCM polarize edilebilir süreklilik modeli kullanılmıştır. Hesaplar deneysel sonuçlarla yakın çıkmıştır [156].

Yukarıda bahsettiğim çalışmaların hepsinde absorpsiyon ve emisyon spektrumları DFT ve TD-DFT yoğunluk fonksiyonel teorileri ile incelenmiştir. Genel olarak biyotiyollerin incelenmesinde Becke'nin üç parametre (B3) değişim fonksiyoneli ve Lee-Yang-Pair (LYP) yerel olmayan korelasyon fonksiyoneli kombinasyonu olan hibrit B3LYP fonksiyoneli kullanılmıştır. Biz de kendi çalışmalarımızda TD-DFT teorisini, B3LYP fonksiyoneli kullandık ve hesaplamaları Gaussian 09 programlar paketiyle gerçekleştirdik.



5. METOD

5.1. Hesaplamalı Yöntemler

Hesaplamalı yöntemler başlıca ikiye ayrılır. Moleküler Mekanik (Force Field) ve Kuantum Mekanik (Molecular Orbital). Kuantum Mekanik Semiempirik, Ab Initio ve DFT yöntemlerini kapsar. Moleküler Mekanikte moleküler yapıları klasik mekanik metodunu kullanarak hesaplar. Moleküler yapıları birbirine bağlanmış atomlar olarak algılar ve bağlı olmayan atomlar arasındaki etkileşimleri de göz önünde bulundurur. Molekül atomlarının hareketlerinin potansiyel enerjisi (V) bağların esneyip gerilmesinden, bağların bükülmesinden, Van der Waals etkileşimlerinden, elektrostatik etkileşimden ve molekül içindeki tekli bağların dönmesinden (internal rotation) kaynaklanan potansiyel enerjilerinin toplamıdır ve Eşitlik (5.1)'de gösterilmiştir [157].

$$V = V_{\text{gerilme}} + V_{\theta} + V_{\text{vdw}} + V_{\text{es}} + V_{\text{w}} \quad (5.1)$$

Kuantum mekanik ise Moleküler Mekanik'e göre daha karmaşıktır. Bu yöntemin temeli Schrödinger denklemi ile atılır.

$$\mathbf{H} \psi = E \psi \quad (5.2)$$

$$\mathbf{H} = \text{K.E.} + V \quad (5.3)$$

Eşitlik (5.3) temelde Eşitlik (5.2)'nin bir diğer gösterimidir.

- H : Hamilton Operatörü
- E : Enerji ψ : Dalga Fonksiyonu
- K.E. : Kinetik Enerji
- V : Potansiyel Enerji

Hamilton operatörü moleküldeki atomların enerjisini ve aralarındaki elektrostatik etkileşimlerini gösterir. Schrödinger denklemi sadece Hidrojen benzeri atomlar veya tek elektronlu atomlar için tam olarak çözülebilmektedir. Bu denklem çok elektronlu atomlar ve moleküller için de yazılabilir, ancak tam olarak çözmek şimdilik imkansızdır. Bazı yaklaşımlar yapılarak çözümlenebilir. Üç önemli yaklaşım vardır, bunları kullanan yöntemlere “Hartree-Fock” modelleri adı verilmiştir. Bu yaklaşımlarla karmaşık çok elektronlu Schrödinger denklemi daha basit hale getirilebilir [157].

Birinci yaklaşım elektronların hareketleri yanında çekirdek hareketini daha az olduğundan ihmal eder. Buna “Born-oppenheimer” yaklaşımı adı verilir. Schrödinger denkleminin çekirdekten bağımsız bu yeni şekline *elektronik Schrödinger* denklemi denir. İkinci yaklaşımda ise elektronların hareketleri ayrıştırılıyor. Buna Hartree-Fock yaklaşımı denir. Çok elektronlu dalga fonksiyonu tek elektronlu dalga fonksiyonlarının çarpımlarının toplamları halinde yazılır ve Slater determinantı adı verilen determinanta dönüştürülür. Üçüncü yaklaşım, LCAO yaklaşımıdır ve burada her bir moleküler orbital atomik orbitallerin lineer kombinasyonu olarak düşünülür [157]. Eşitlik (5.4)’te gösterilmiştir.

$$\Psi_i = \sum c_{i\mu} \phi_{\mu} \quad (5.4)$$

- $\Psi_i = \Psi_i$
- $C_i = \text{Katsayılar}$
- $\phi = \phi_i$
- $\mu = \text{Atomik orbitaller}$

5.2. “Hartree-Fock Self Consistent Field” Metodu (HF-SCF)

Hesapsal yöntemler HF-SCF metodunu yukarıda bahsedilen yaklaşımlarla birlikte kullanarak Schrödinger denklemini çözerek moleküllerin enerjini hesaplarlar. İki çeşit HF-SCF metodu vardır, “Restricted Hartree-Fock” (RHF) (Kısıtlanmış) ve “Unrestricted Hartree-Fock” (UHF) (Kısıtlanmamış) metodları. RHF UHF yöntemine göre daha basittir. Moleküldeki tüm elektronları çiftleşmiş olarak kabul eder. Yani oluşan moleküler orbitaller ya çift elektronla doludur ya da boştur.

Elektronlar çiftleşmiş olduğundan spinleri hesaba katmadan işlemler yapar. Bunun gibi moleküllere “closed-shell” sistemleri denir. RHF yöntemi “closed-shell determinantal wavefunctions” kullanır. Bu da dalga fonksiyonların kapalı yörüngeli sistemler için olduğunu bildirir ve bu yüzden de radikaller için bu yöntem uygulanamaz. Buna rağmen en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. UHF ise “open-shell” (açık yörünge) sistemleridir ve alternatif bir yöntemdir. Her moleküler orbital iki farklı yöndeki spinleri temsil eden α ve β ayrılır [157].

5.3. Ab Initio Moleküler Orbital Teorisi

Moleküler Orbital Teorisi prensiplerinin uygulandığı en hassas hesapların yapıldığı en güvenli yöntemdir. Ancak bu hesaplar için çok zaman gerektirir. Çok büyük moleküllere de uygulamak bu yüzden mümkün değildir. Büyük moleküllerde atom sayısı dolayısıyla elektron sayısı yüksek olduğundan bu teorinin sadece düşük seviyeli yöntemleriyle çalışabilir. Orta ve küçük moleküller için ise yüksek seviyeli ab initio yöntemleri ile kesin sonuçlar hesaplanabilmektedir. Ab initio yöntemi de daha önce açıkladığımız HF-SCF teorisini kullanarak Schrödinger denklemini çözer [157].

5.4. Temel Kümeler “Basis Functions/Basis Sets”

1951 yılında Roothan HF orbitallerinin bazı fonksiyon kümelerinin lineer kombinasyonları şeklinde yazılabileceğini öne sürdü. Bu fonksiyon kümelerine temel fonksiyonlar “basis functions” veya temel kümeler “basis sets” adı verildi. İki fonksiyon çeşidi vardır. Birincisi Slater tipi, ikincisi ise Gaussian tipi fonksiyonlarıdır. GTF ile integraller daha hızlı hesaplandığından bu fonksiyonlar daha çok popülerdir. Hesaplamalarda bu atomik orbital temel kümeleri optimize edilmelidir. Bu da elektronik enerjinin varyasyon yöntemine göre minimize edilmesi ile sağlanır. Moleküler orbitaller bu atomik orbitallerin yani temel fonksiyonların lineer kombinasyonlarından elde edilir [157].

Dört seviye temel küme vardır:

- ✓ “Minimal Basis Set” (STO-nG): STO-3G, STO-4G.
- ✓ “Split-Valence Basis Set”: 4-21G, 6-31G.

- ✓ “Polarization Basis Set”: 6-31G*, 6-31G**.
- ✓ Difüzyon Fonksiyonları: 6-31+G*, 6-31+G**.

“Split-Valence Basis Set” bölünmüş valans temel kümesinde iç yörüngedeki orbitaller dört Gaussian fonksiyonundan, valans yörüngesindekilerin iç p-fonksiyonu üç, dış p-fonksiyonu ise bir Gaussian fonksiyonundan oluşmuş demektir. Polarizasyon fonksiyonlarında d ve f orbitalleri eklenir ve p orbitalleri ile karıştırılır ve sonucunda bir polarizasyon oluşur. “Polarization basis set” polarizasyon temel kümesi altı tane d fonksiyonundan oluşur. 6-31G**’de elde edilmiş her hidrojene p fonksiyonu eklenir. Difüzyon fonksiyonları geniş s ve p tipi fonksiyonlardır. Boş elektron çiftleri bulunduran, anyonlar ve uyarılmış sistemler için kullanılır [157].

5.5. Hartree-Fock Ötesi Yöntemler

5.5.1. Elektron Korelasyonu / Konfigürasyon Etkileşimi

HF teorisi tam olarak elektronlar arasındaki etkileşimi yansıtamaz ve Schrödinger denklemi tam olarak molekülün gerçek durumunu ifade edemez. Bu eksikliği gidermek için HF teorisinden ileri gidebilecek dalga fonksiyonları türetmek gerekir.

$$\Psi = a_0\Psi_0 + a_1\Psi_1 + a_2\Psi_2 + \dots \Psi_0 \quad (5.5)$$

- Ψ_0 = Hartree-Fock dalga fonksiyonu
- Ψ_1 = Diğer konfigürasyonlara ait dalga fonksiyonu
- a_0, a_1, a_2 = Lineer katsayılar

Bu Eşitlik (5.5) denkleme “full configuration interaction” yani tam konfigürasyon etkileşimi denir. Molekülde anormal bağlar varsa (çok gergin halkalar, geçiş metalleri kompleksleri gibi) veya molekül temel durumda değilse (geçiş konumunda veya uyarılmış durumda ise) elektron korelasyonu içeren hesaplar yapılmalıdır. Normal moleküller için HF-SCF sonuçları güvenilirdir [157].

5.6. Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi ‘‘Density Functional Theory’’ (DFT)

DFT yönteminde toplam elektron yoğunluğunu simgeleyen iki yeni fonksiyon kullanılır ve bunlara ‘‘density functionals’’ yoğunluk fonksiyonelleri denir. Eşitlik (5.6)’da verilmiştir.

$$E_{\text{DFT}} = \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu} H_{\mu\nu} + \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu} P_{\lambda\sigma} J_{\mu\nu\lambda\sigma} + Ex(\rho) + Ek(\rho) + V \quad (5.6)$$

- H = elektronların kinetik enerjisi ile elektronlar ve çekirdekler arasındaki çekim gücünden doğan potansiyel enerjiyi kapsayan terimler
- P = moleküler orbital katsayılarının karelerinin toplamından meydana gelen yoğunluk matrisi
- J = elektronların birbirini itmesinden doğan potansiyel enerjiyi kapsayan terimler
- X = fiziksel bir anlamı yoktur. Dalga fonksiyonunu antisimetrik yapmak için gerekli matematiksel terimlerdir. (Kuantum mekaniği kurallarına göre dalga fonksiyonunda bir elektron başka bir elektronla yer değiştirirse fonksiyonun işareti değişmelidir.)
- V = Çekirdek çiftlerinin itişmesinden oluşan potansiyel enerjiye ait terimler. (Kinetik enerjileri Born-Openheimer yaklaşımı ile ihmal ediliyor.)
- Ex(ρ) : Değişim terimi ‘‘Exchange term’’
- Ek(ρ) : Korelasyon terimi ‘‘Correlation term’’

Fonksiyonellerin kısaltılmış BLYP, B3LYP gibi isimleri vardır. DFT yöntemi ab initio yöntemine göre daha az bilgisayar zamanı kullandığından ve daha büyük moleküllere de uygulanabildiğinden son yıllarda çok popüler olmuştur. DFT yaklaşımı HF yaklaşımı gibi tek-elektronlu dalga fonksiyonlarını kullanır, ancak yalnızca toplam elektronik enerji ve elektronik yoğunluk dağılımını hesaplamaya çalışır [157].

Günümüzde DFT yöntemi elektronik enerjiyi aşağıdaki Eşitlik (5.7)’te gösterilen terimlerin toplamı olarak tanımlar [157].

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC} \quad (5.7)$$

- E^T = Elektronların hareketinden ortaya çıkan kinetik enerji
- E^V = Çekirdek-elektron çekimlerine ve çekirdek çiftlerinin itmesine ait potansiyel enerji
- E^J = Elektron-elektron itmesine ait terim
- E^{XC} = Geriye kalan diğer elektron-elektron etkileşimlerini kapsayan terim. Değişim-korelasyon terimi denir.

5.6.1. Hibrit Fonksiyoneller

Becke, Hartree-Fock ve DFT değişim terimlerinin karışımından yeni bir değişim terimi geliştirilmiştir, Eşitlik (5.7)'de verilmiştir.

$$E_{\text{Hibrit}}^{XC} = C_{\text{HF}} E_{\text{HF}}^X + C_{\text{DFT}} E_{\text{DFT}}^X \quad (5.7)$$

Bunlar hibrit fonksiyonelleridir. Hibrit fonksiyonellerinden en iyi sonuçlar veren ve yaygın olarak kullanılan, B3LYP ve B3PW91 olarak bilinen Becke'nin üç parametrelili formülasyonlarıdır. Becke fonksiyonelleri saf DFT yöntemlerine nazaran daha hassas sonuçlar vermektedirler [157].

DFT yönteminin en önemli özelliği, electron korelasyonunun dahil etmiş olmasıdır. Ve HF yöntemleri ile hemen hemen aynı sürede sonuçlar verir, bu yüzden de ab initio yöntemlerinden daha üstündür [157].

5.7. Yarıdeneyisel Moleküler Orbital Yöntemleri “Semiempirical MO Methods”

Bu metot içindeki (core) orbitallerine ait integrallerin yerine, atomic spectra, iyonlaşma enerjileri gibi birçok deneysel veri kullanarak belirlenen parametreleri kullanır. İşlemlerinde hem teorik hem de deneysel verilerden yararlanır, “yarıdeneyisel” ismi buradan gelir [157].

Yarıdeneyisel yöntemlerin temelinde PMO (Pertürbasyon Moleküler Orbital) ve Hückel teorileri vardır. Yarıdeneyisel yöntemlerden bazıları aşağıda verilmiştir.

- ✓ CNDO “Complete Neglet of Differential Overlap”
- ✓ INDO “Intermediate Neglet of Differential Overlap”
- ✓ NDDO “Neglet of Diatomic Differential Overlap”
- ✓ MINDO “Modified INDO”
- ✓ MNDO “Modified Neglet of Diatomic Overlap”
- ✓ AM1 “Austin Model 1”
- ✓ PM3

MNDO, AM1, PM3 modelleri genellikle normal durumdaki denge geometrilerin tespiti için uygundur, ancak hiçbiri ab initio yöntemi kadar hassas değildir. Yapı tespitinde ve hidrojen bağı içeren sistemlerin tarifinde MNDO VE AM1 modellerine göre PM3 en iyisidir.

5.8. Solvent Etkisi

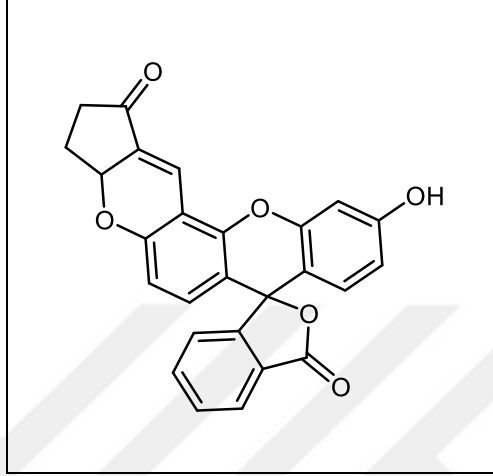
Hesaplama kimyada solvent etkisi önemlidir çünkü çoğu biyolojik süreçler sulu ortamda gerçekleşir. Çözünme etkileri moleküler konformasyon, elektronik özellikler, bağlanma enerjileri gibi özellikleri belirlemede çok önemli bir rol oynarlar. Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonda iki çeşit çözücü modeli mevcuttur. Birincisi, çözücünün açıkça muamelesi (explicit treatment): çözücü molekülleri moleküler sisteme eklenir. İkincisi, çözücünün dolaylı muamelesi (implicit treatment): çözücü sürekli bir dielektrik olarak modellenir. Çözücülerin, genellikle suyun biyolojik moleküllerin yapısına, dinamiğine, termodinamiğine temel etkisi vardır. Çözücünün en önemli etkilerinden biri elektrostatik etkileşimlerin taranmasıdır. İki yük arasındaki elektrostatik etkileşim Coulomb yasası ile verilir ve iki atomun kısmi yüklerinin çarpımının dielektrik sabiti ve iki parçacık arasındaki mesafeye bölümü olarak tanımlanır. Solvent etkisini MD simülasyona eklemek önemlidir ve birkaç seviyede eklenebilir. En basit çözücü muamelesi, potansiyeli enerji fonksiyonunun elektrostatik terimine bir dielektrik tarama sabiti eklemektir. Bu çözücünün dolaylı muamelesinde, su molekülleri simülasyona dahil edilmeden etkili bir dielektrik sabiti kullanılır. Mesafeye bağlı dielektrik sabiti açıkça su moleküllerini dahil etmeden çözücü taraması eklemenin en basit yoludur ve çoğu simülasyon programında mevcuttur. Son zamanlarda, sürekli elektrostatik teoriye dayanan birkaç dolaylı çözücü modeli (implicit treatment) geliştirilmiştir.

Simülasyona su molekülleri açıkça dahil edilirse, enerji fonksiyonunda $\epsilon = 1$ olur, su molekülleri elektrostatik korumayı sağlarlar. Çözücünün bu daha ayrıntılı muamelesinde, öncelikle, su moleküllerinin simülasyon esnasında proteinden uzaklaşmasını önlemek ve ikinci olarak, sınırlı sayıda solvent molekülü kullanarak makroskopik özelliklerin simülasyonunu ve hesaplanmasını sağlamak için çözücü sınır koşulları getirilmelidir. Dolaylı çözücü modelinde makromolekül sadece kendisi ile etkileşime girer, ancak elektrostatik etkileşimler çözücüyü hesaba katacak şekilde modifiye edilir. Tüm solvent etkileri dielektrik sabiti içerir. Çözücünün açıkça muamelesinde makromolekül su molekülleriyle (su, iyonlar) çevrilir ve onlarla etkileşime girer.

Tüm teorik çalışmalarda Gaussian 09 kodu kullanılmıştır. Zamana bağlı yoğunluk fonksiyonel teorisi TD-DFT için Bauernschmitt96a, Casida98, Stratmann98, VanCaillie99, VanCaillie00, Furche02, Scalmani06 algoritmaları, DFT için ise Hohenberg64, Kohn65, Parr89, Salahub89 algoritmaları kullanılmıştır. DFT ve TD-DFT hesaplamalarında moleküllerin absorpsiyon dalgalı boyları ile birlikte “Oscillator strength” değerleri de elde edilmiştir, bu değerlerden yola çıkarak moleküllerin eksitasyon ve emisyon özellikleri incelenebilir.

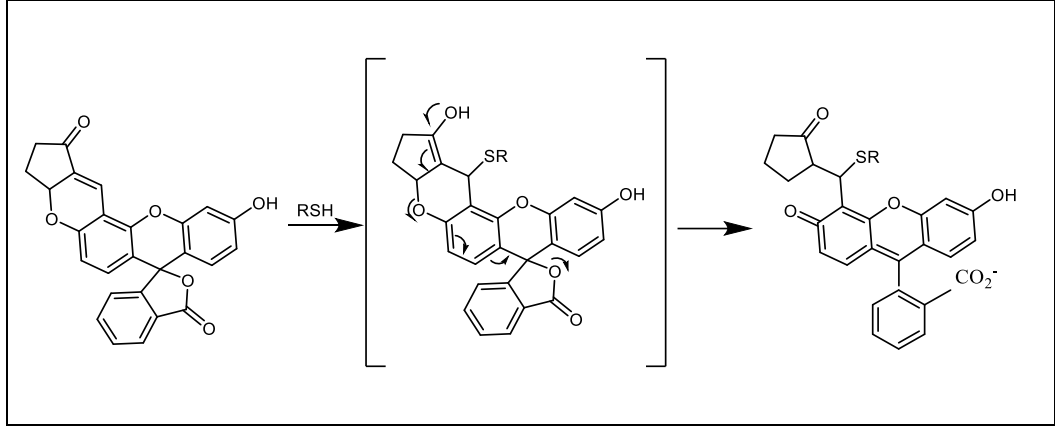
6. SONUÇLAR

Biyolojik tiyol analizinde kullanılan bazı florojenik moleküller üzerine teorik hesaplamalar yapılmıştır. Bu moleküllerin yapıları Şekil 6.1, Şekil 6.3, Şekil 6.5, Şekil 6.6, Şekil 6.8 verilmiştir.

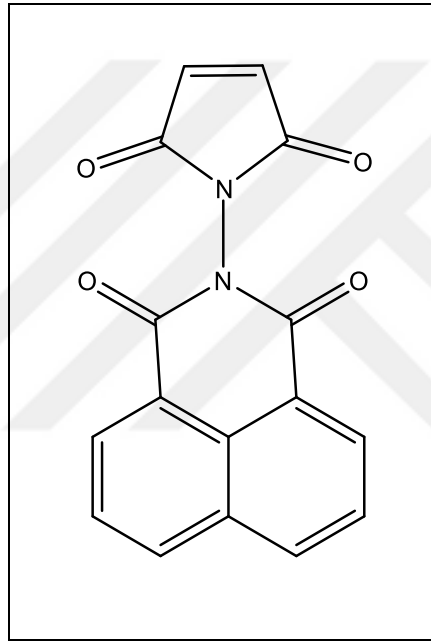


Şekil 6.1: Molekül 1.

Chen ve arkadaşları (2010) tiyole özgü Şekil 6.1'deki molekül 1 floresan sondayı sentezlemişlerdir. Bu sondanın tek başına floresan olmadığını, ancak GSH eklendiğinde floresan spektrumlarında çarpıcı bir değişikliğe neden olduğunu gözlemlədiler. 520 nm'de emisyon piki gözlemlenmiştir ve floresans yoğunluğu 61 kat artmıştır. İlgili reaksiyon mekanizmasını Şekil 6.2'de gösterilmiştir. Sonda Cys, Hcy ve GSH için aynı sonuçlar vermiştir. Algılama mekanizmasında, sondadaki doymamış α , β -ketona tiyolün 1,4-eklemesine takiben floreseinin spiro halka açılması floresans iyileştirmesinden ve Uv-Vis spektrum değişiminden sorumludur. Kimyasal ve spektroskopik özelliklerinden ötürü, sondanın canlı hücre ve organizmalardaki tiyolleri görüntüleme özelliği zebra balığı ve canlı hücreler ile test edilmiştir ve içlerinde güçlü bir floresans sergilenmiştir. Bizim yaptığımız teorik hesaplamalar Chen ve arkadaşları grubunun yaptığı deneysel sonuçları doğrulamıştır [158].

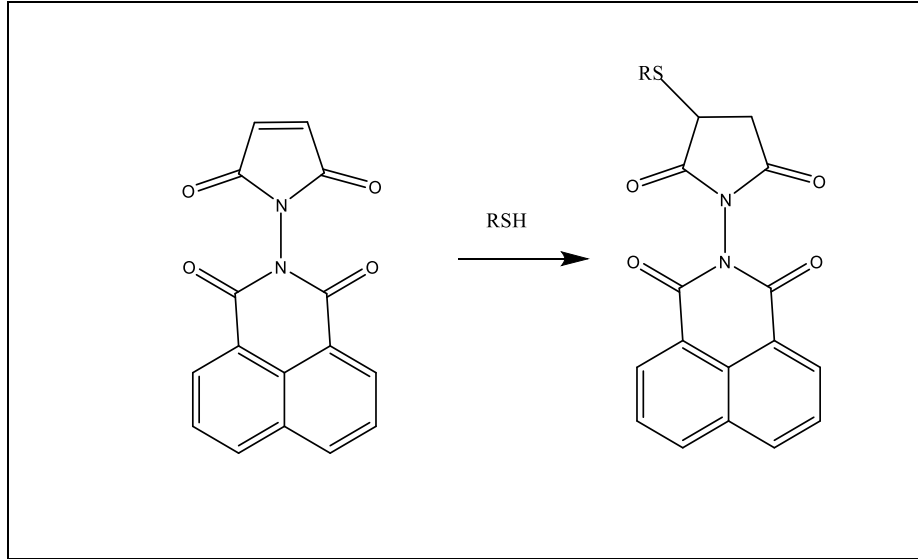


Şekil 6.2: Molekül 1'in tiyol ile reaksiyonu.

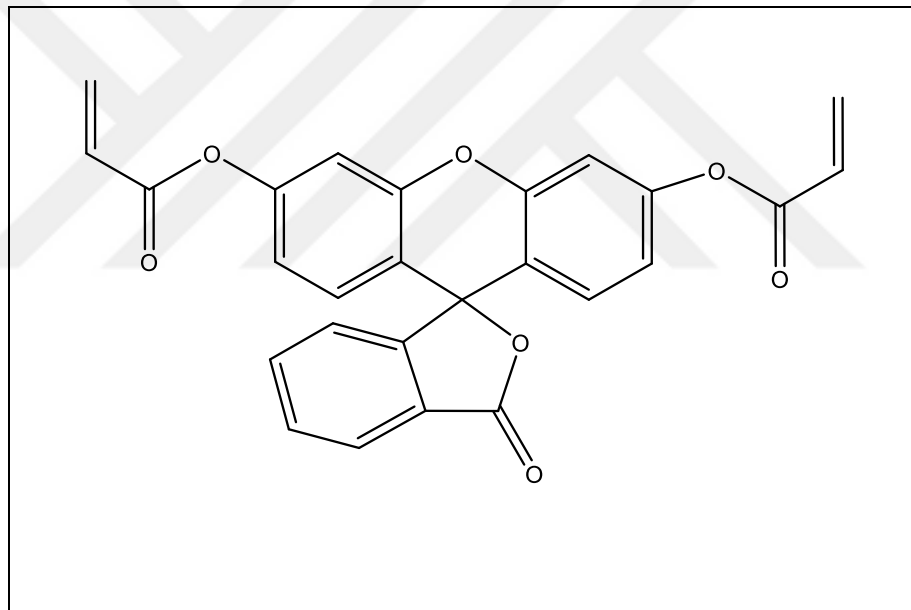


Şekil 6.3: Molekül 2.

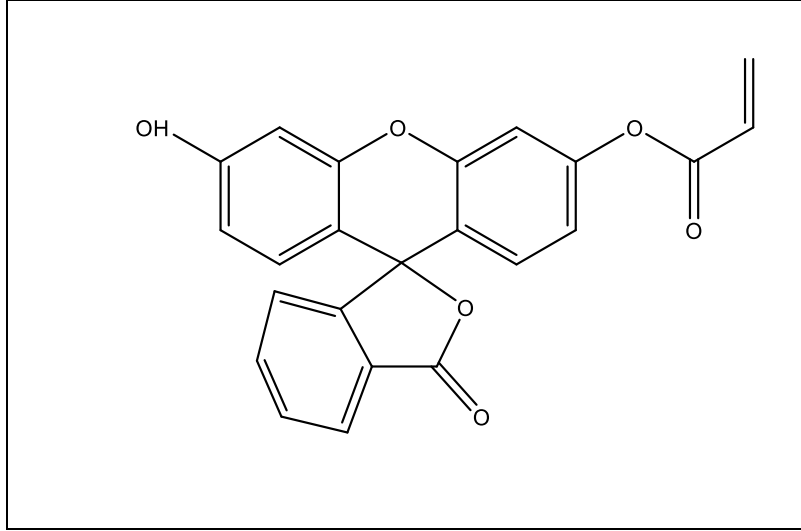
Qu ve arkadaşları (2014) maleimit bazlı Şekil 6.3'te gösterilen molekül 2 floresan sondası tasarlamış ve geliştirmiştir. Araştırmaları sondanın floresansının tiyolle reaksiyondan sonra 4 kat arttığını ve tiyol algılamasında kullanılabilir olduğunu göstermiştir. Sondanın elektron eksik alken grubuna tiyolun Michael-elemesi emisyon artışına neden olmuştur ve 393 nm'de emisyon piki gözlenmiştir. İlgili reaksiyon mekanizması Şekil 6.4'te gösterilmiştir. Canlı hücrelerin biyogörüntülemesi, sondanın Cys, Hcy ve GSH algılaması için kullanılabilir olduğunu doğrulamıştır. Yaptığımız teorik hesaplamalar deneysel sonuçlarla uyumlu çıkmıştır [159].



Şekil 6.4: Molekül 2'nin tiyol ile reaksiyonu.

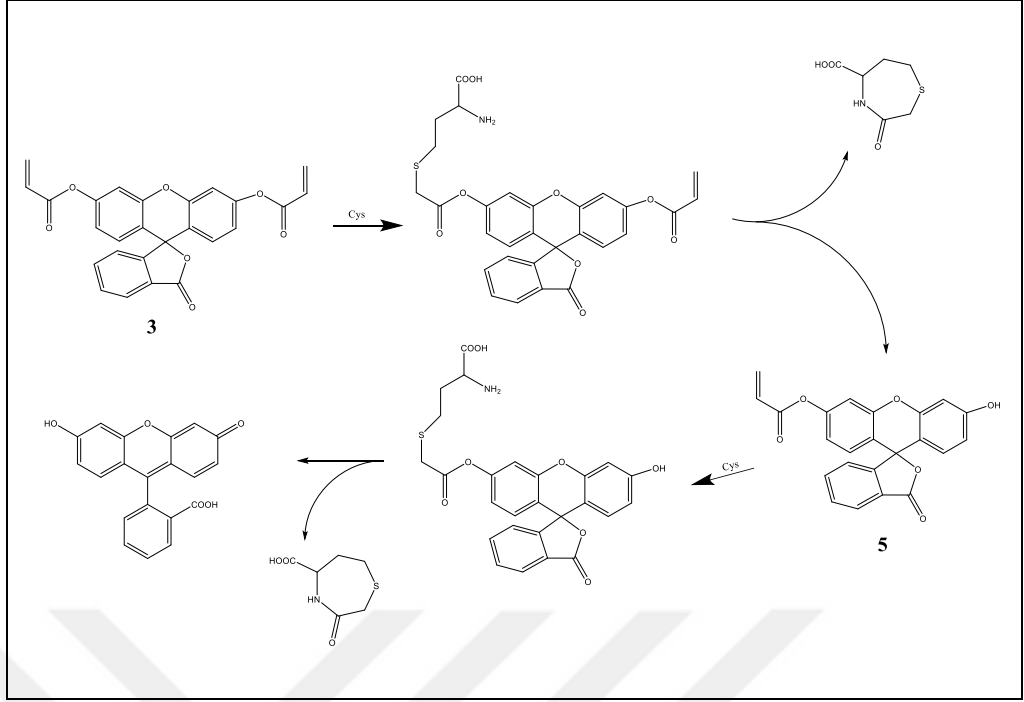


Şekil 6.5: Molekül 3.

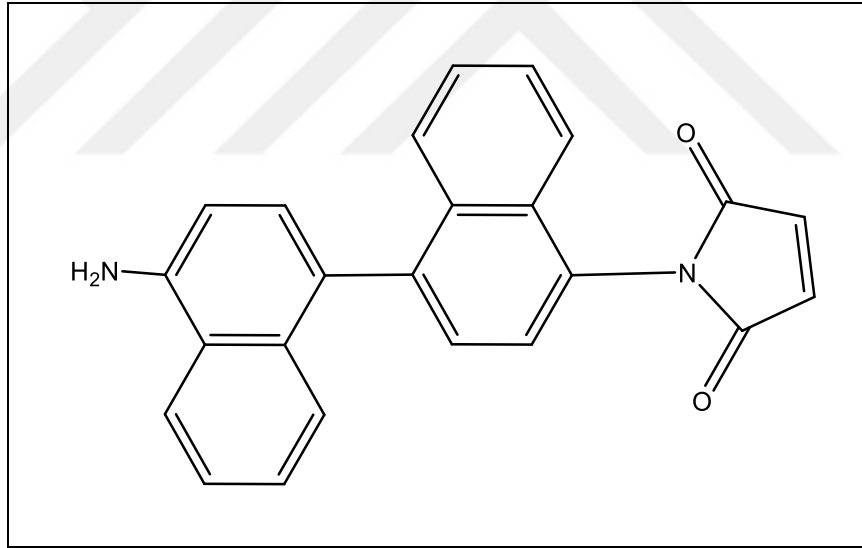


Şekil 6.6: Molekül 5.

Wang ve arkadaşları (2012) floresein bazlı Şekil 6.5 ve Şekil 6.6'da verilen molekül 3 ve molekül 5 sondalarını tasarlamıştır. Molekül 3 sondanın molekül 5 sondasından ayıran özelliği, Hcy ve GSH üzerine yüksek Cys seçiciliği göstermesidir. Tiyol molekül 5'in akriloil grubuna eklendiğinde ardından bir ester bağı bölünmesi gerçekleşir ve floresein oluşur. İşte bu floresein floresans artışı ve UV-Vis spektrum değişikliğinden sorumludur. Molekül 3 Cys için belirli bir floresans artışı gösterirken, Hcy ve GSH için Cys kadar iyi floresans artışı göstermemiştir. Buna karşılık tek akrilat grubu taşıyan molekül 5 her üç tiyol için aynı floresans artışı göstermiştir. Sonuçlar molekül 3 ve Cys reaksiyonu için stokiyometri 1:2, molekül 5 ve Cys reaksiyonu için stokiyometri 1:1 göstermiştir. Reaksiyon mekanizması Şekil 6.7'de verilmiştir. Molekül 5'e kıyasla molekül 3'in Cys karşı Hcy ve GSH üzerine yüksek seçiciliği, molekül 3 ve Cys arasındaki reaksiyondaki çift ekleme-bölünme işlemi ile ilişkilendirilmiştir [160].



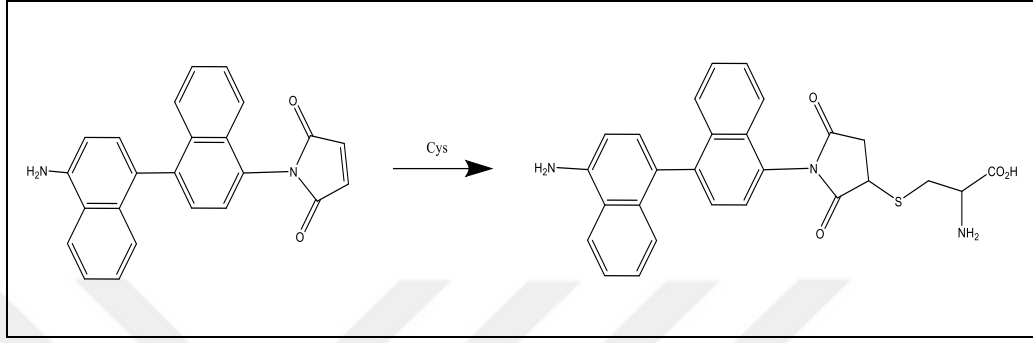
Şekil 6.7: Molekül 3 ve molekül 5'in tiyol ile reaksiyonu.



Şekil 6.8: Molekül 4.

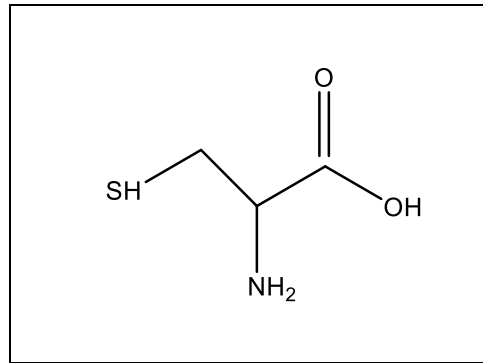
Maleimit bazlı kapalı-açık floresan sondası tiyol algılaması için Zhang ve arkadaşları (2014) tarafından tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Binaftalin floroforu ve maleimit bağlayıcı grup içeren bu sonda Şekil 6.8'de gösterilmektedir. Molekül 4 tiyol içeren Cys, Hcy, GSH amino asitlerine karşı yüksek seçicilik ve hassasiyet göstermiştir ve 20 kat floresans artışı gözlenmiştir. Cys maleimit grubunun C=C çift bağı ile reaksiyona girdiğinde binaftalin kısmından maleimit grubuna olan ICT

işlemi bloke edilir ve sonuç olarak Cys ile molekül **4** güçlü bir yeşil floresans gösterir. Bu molekülün reaksiyon mekanizması Şekil 6.9’da gösterilmiştir. ¹H NMR ve kütle spektrometresi çalışmaları bu mekanizmayı doğrulamıştır. Zhang ve arkadaşları deneysel çalışmaları ve bizim teorik hesaplamalar molekül 4’ün canlı hücrelerde tiyolleri algılaması için kullanılabilir olduğunu göstermiştir [161].

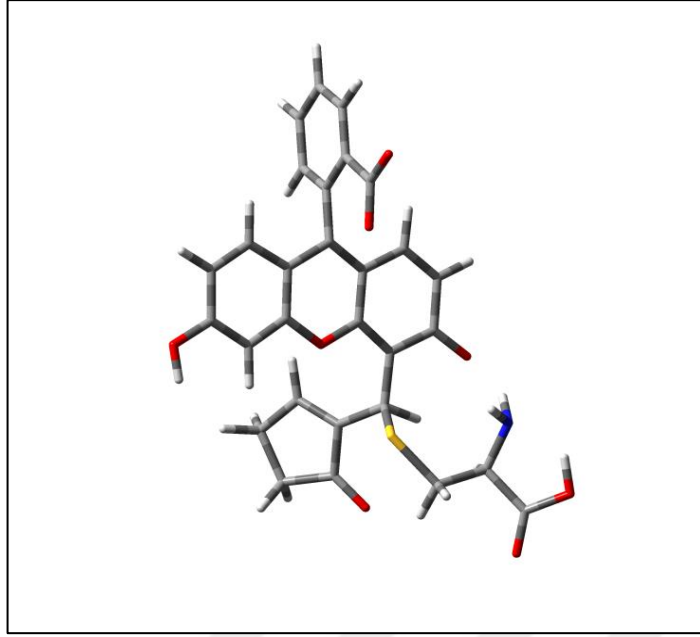


Şekil 6.9: Molekül 4’ün tiyol ile reaksiyonu.

Çalıştığımız bu beş moleküle Şekil 6.10’da gösterilen Cys bağlanmış ve optimizasyonu yoğunluk fonksiyonel teorisi DFT metodu ile B3LYP fonksiyoneli seviyesinde B3LYP/6-31G(d) temel kümesi kullanarak yapılmıştır. Aşağıda **1**, **2**, **4** molekülleri için molekül-Cys optimize olmuş yapıları verilmiştir.

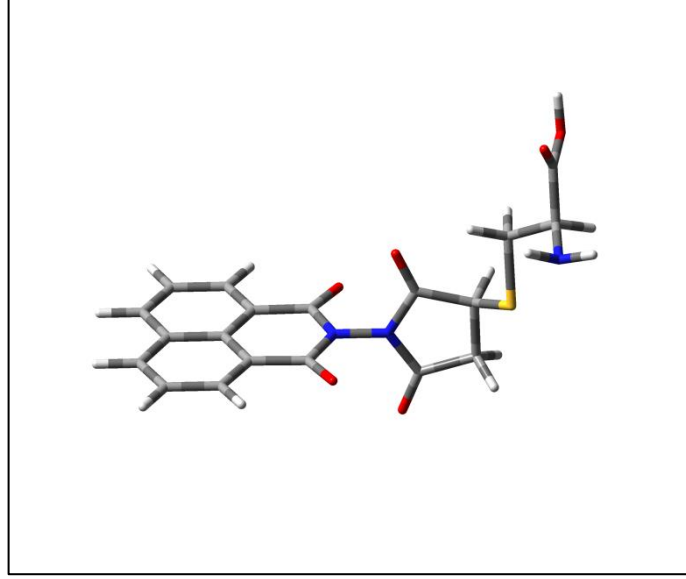


Şekil 6.10: Sistein.



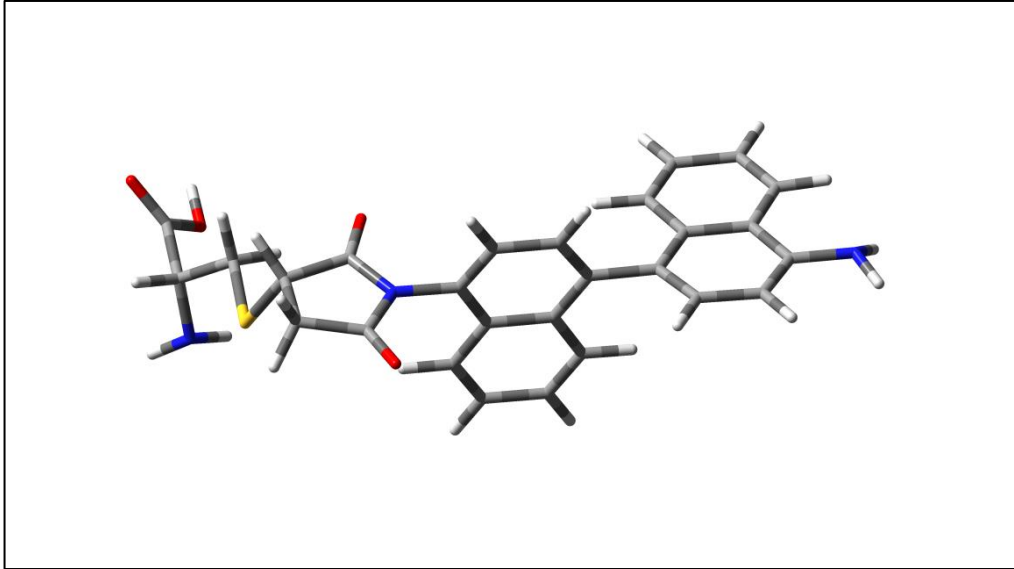
Şekil 6.11: Molekül 1-Cys'in optimize olmuş yapısı.

Şekil 6.11'de gösterilen yapı Molekül 1'e Cys eklendikten sonra optimize olmuş molekül yapısıdır. Molekül 1 ve Cys parçası arasındaki S-C bağ uzunluğu 1.88 Å, C-S-C bağ açısı ise 104° olarak hesaplanmıştır. Molekül 1'e Cys eklendiğinde floresein parçasının spiro halka açılması gerçekleşir, sonucunda hem bağ uzunlukları ve hem de bağ açıları değişir. Siklopentanon ve floresein parçası arasındaki C-C-C bağ açısı 116.3° olarak değişmiştir.



Şekil 6.12: Molekül 2-Cys'nin optimize olmuş yapısı.

Molekül 2'ye tiyol eklendikten sonraki yapısı Şekil 6.12'de verilmiştir. Molekül 2 ile Cys parçası arası S-C bağ uzunluğu 1.84 Å, C-S-C bağ açısı ise 39.80° olarak hesaplanmıştır. Maleimit parçası ile Cys arasındaki S-C-C bağ açısı 75.20° olarak bulunmuştur.

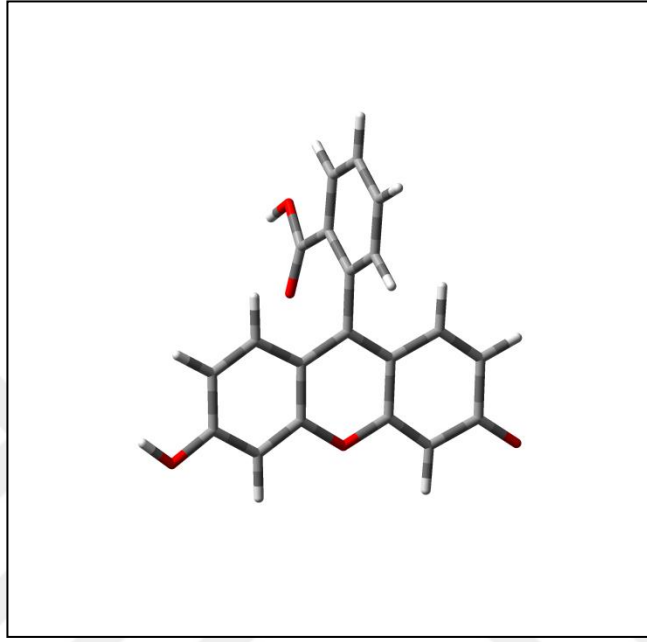


Şekil 6.13: Molekül 4-Cys'nin optimize olmuş yapısı.

Molekül 4'e Cys eklendikten sonraki yapısı Şekil 6.13'de verilmiştir. Cys parçası ve Molekül 4 arası S-C bağ uzunluğu 1.85 Å, C-S-C bağ açısı ise 100.30°

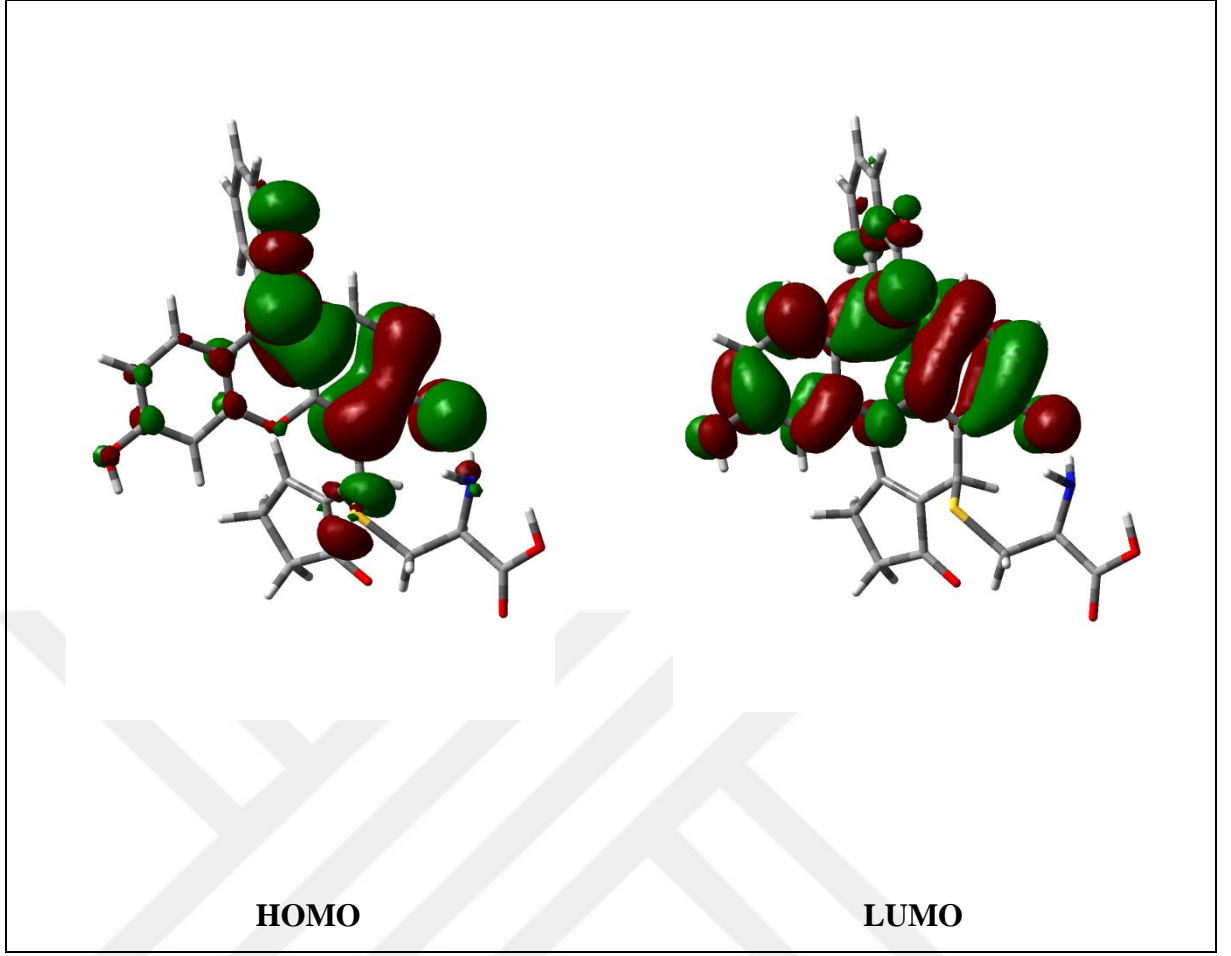
olarak hesaplanmıştır. Maleimit parçası ile Cys parçası arasındaki S-C-C bağ açısı 110.67° olarak bulunmuştur.

Molekül **3** ve **5** için yukarıda bahsettiğimiz gibi diğer moleküllerden farklı olarak, floresans özelliği gösteren molekül floreseindir ve yapısı Şekil 6.14'da verilmiştir.



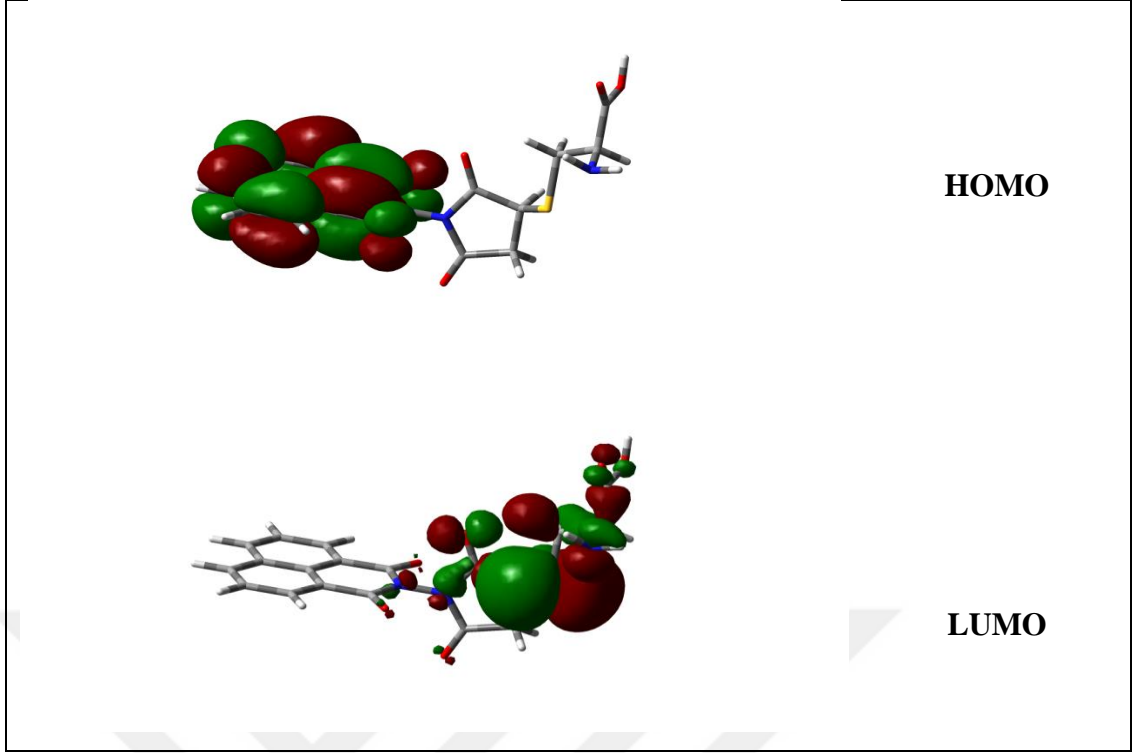
Şekil 6.14: Florosein.

1-Cys, 2-Cys, 4-Cys moleküllerin ve floroseinin sınırlı orbitalleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



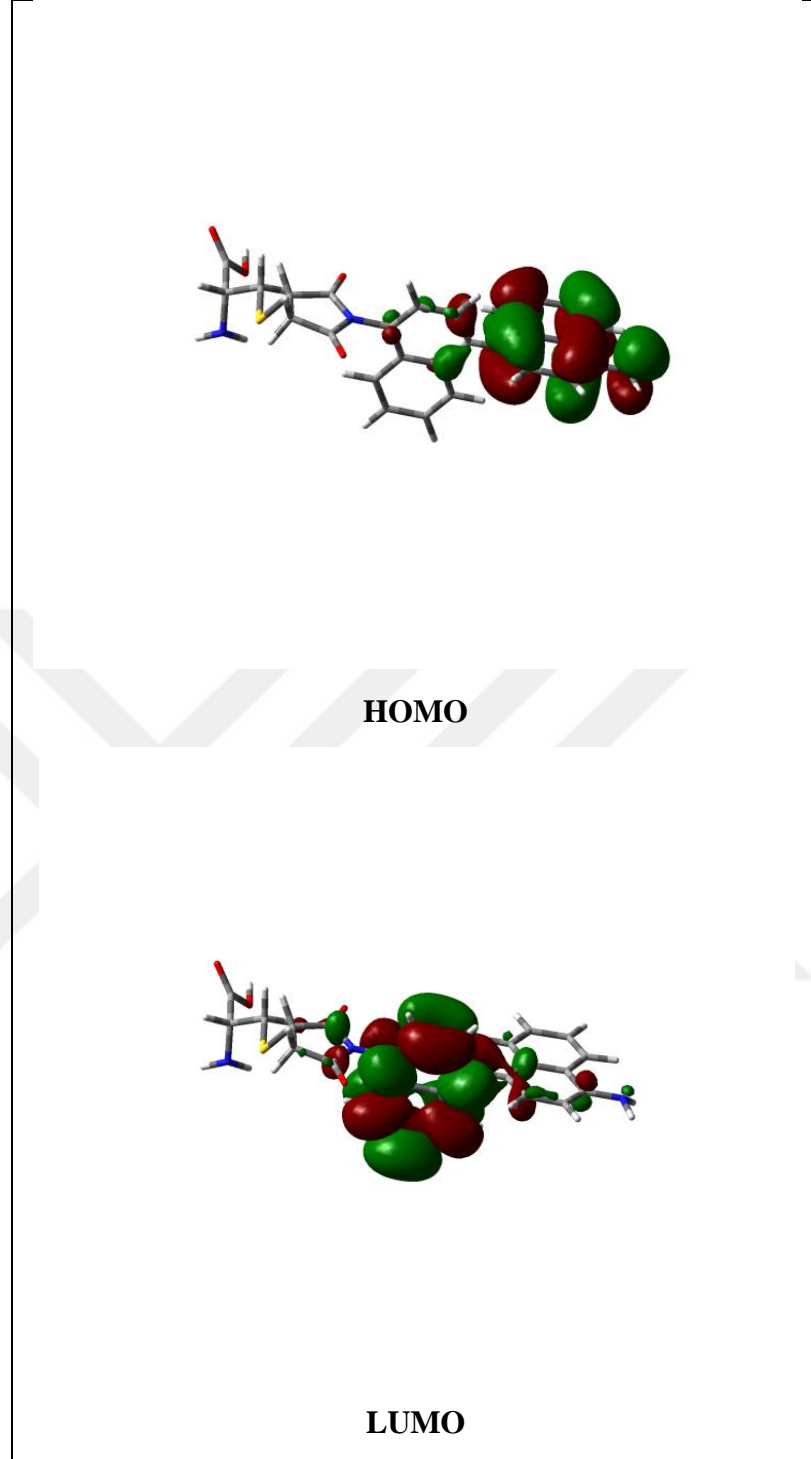
Şekil 6.15: Molekül 1-Cys için hesaplanmış moleküler orbitaller.

Molekül 1-Cys'in HOMO orbitalleri nerdeyse tüm konjuge molekülün üzerine yayılırken, LUMO orbitalleri floressein parçasında yerleşmiştir.



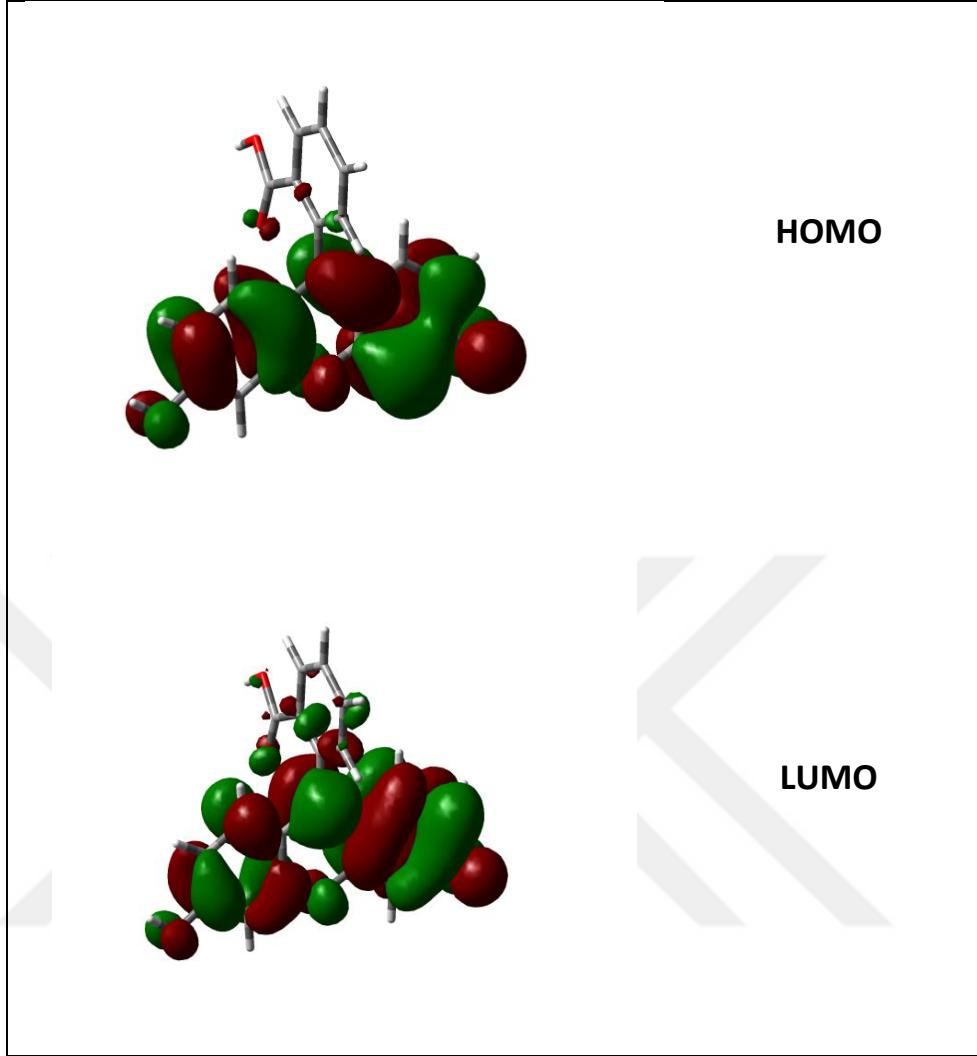
Şekil 6.16: Molekül **2-Cys** için hesaplanmış moleküler orbitaller.

Şekil 6.16'da görüldüğü gibi Molekül 2-Cys'nin HOMO orbitalleri 1,8-naftoikpiridindion parçasında yerleşirken, LUMO orbitalleri maleimit ve Cys parçalarında yerleşmişlerdir.



Şekil 6.17: Molekül 4-Cys için hesaplanmış moleküler orbitaller.

Molekül 4-Cys molekülünün hem HOMO hem de LUMO orbitalleri binaftalin parçası üzerindedir. HOMO orbitalleri maleimit halkasına uzakta yerleşmiştir, LUMO orbitalleri ise maleimit halkasına yakın olan binaftalin parçasında yerleşmiştir.



Şekil 6.18: Floroseinin hesaplanmış moleküler orbitalleri.

Şekil 6.18’de görüldüğü gibi florosein molekülünün HOMO LUMO orbitalleri nerdeyse tüm molekül üzerine yayılmış durumdadır.

Tablo 6.1’de gösterildiği gibi, en iyi sonuç molekül **2** için verilmiştir deneysel sonuca çok yakındır. Deneysel sonuçtan daha büyük sapma gösteren 1 ve 3-5 moleküllerinin farklı fonksiyonel ve temel küme ile yapılan hesaplamaları aşağıdadır. Her iki molekül için de farklı solvent etkileri uygulanmıştır.

Tablo 6.1: Hesaplanan absorpsiyon dalgaboyu λ_{ab} (eV/nm), çalışılan florojenik molekül+biyotiyol bileşiklerinin ana konfigürasyon ve osilatör gücü (f).

Molekül	Temel küme	Deneysel	λ_{ab} (eV/nm)	f	Konfigürasyon
1	B3LYP/6-31G(d)	485	3,23/383,43 (S4)	0,0641	H→L+3 (70%)
2	B3LYP/6-31G(d)	310	3,98/311,24 (S4)	0,2887	H-1→L (67%)
3-5	B3LYP/6-311++G(d,p)	490	3,03/409,54 (S3)	0,2439	H→L (52%)
4	B3LYP/6-31+G(d)	285	3,76/329,54 (S2)	0,1869	H→L+1 (68%)
5		478			

Tablo 6.1’de moleküle sistenin bağlanmış yapıları ile hesaplamalı yöntem sonuçları verilmektedir. Geçişlerin izinli olduğu yüksek rakamlı osilatör gücünden anlaşılıyor. Ancak moleküllere sisten bağlanmadığında bu geçişlerin yasak olduğunu, dolayısıyla osilatör güçlerinin düşük olduğunu biliyoruz. Bunu Tablo 6.2’den de görebiliriz.

Tablo 6.2: Cys’siz moleküllerin absorpsiyon osilatör güçleri (f) ve λ absorpsiyon dalgaboyları.

Haller	Molekül 1	Molekül 2	Molekül 3	Molekül 4	Molekül 5
S1	f=0,0296 $\lambda=416,2$ nm	f=0,0001 $\lambda=370,5$ nm	f=0,0219 $\lambda=308,7$ nm	f=0,0007 $\lambda=816,3$ nm	f=0,009 $\lambda=298,4$ nm
S2	f=0,3734 $\lambda=395,7$ nm	f=0,0033 $\lambda=348,1$ nm	f=0,0017 $\lambda=306,7$ nm	f=0,0007 $\lambda=489,4$ nm	f=0,0380 $\lambda=296,2$ nm
S3	f=0,0230 $\lambda=354,7$ nm	f=0,1987 $\lambda=327,4$ nm	f=0,0024 $\lambda=295,8$ nm	f=0,0006 $\lambda=413,6$ nm	f=0,0286 $\lambda=284,7$ nm
S4	f=0,0243 $\lambda=342,2$ nm	f=0,0001 $\lambda=323,9$ nm	f=0,1530 $\lambda=279,4$ nm	f=0,5837 $\lambda=396,5$ nm	f=0,0052 $\lambda=280,1$ nm

Tablo 6.2’de sisteinsiz moleküllerin osilatör güçlerinin sistenli moleküllere kıyasla daha düşük olduğunu görebiliyoruz. Molekül 2, 3 ve 5 için osilatör güçleri

her geçiş için dūřūktūr, yani geçiřler yasaktır. Molekūl **1** için 2. uyarılmıř hal osilatōr gūcū oldukça yūksək çıkmıřtır, bu sonuç 2. uyarılmıř halin emisyon hali olduėunu bize gōsteriyor, ancak emisyon radyatif olmayan bir řekilde ilerliyor. Molekūl **4** için aynı řekilde emisyon radyatif deėildir.

Tablo 6.3: Molekūl **1** için farklı solvent etkileri kullanarak farklı temel kūme seviyelerinde farklı fonksiyoneller ile hesaplamalar (λ_{max} deneysel = 485nm).

Fonksiyonel	Temel kūme	λ_{max} (nm)
B3LYP	6-31G(d)	390
B3LYP (asetonitril)	6-311+G(d,2p)	334
B3LYP (water)	6-311+G(d,2p)	335
WB97XD	6-311++G(d,p)	390
UCAM-B3LYP (water)	6-311++G(d,p)	392
MO62X	6-311++G(d,p)	394
UB3LYP	6-311++G(d,p)	436
UB3LYP(gaz)	6-311++G(d,p)	495

Tablo 6.3'te gōsterildiėi gibi deneysel veriye en yakın sonucu UB3LYP fonksiyoneli 6-311++G(d,p) temel kūmesi vermiřtir.

Tablo 6.4. Molekūl 3-5 için ($\lambda_{den}=490nm$) B3LYP/6-311++G(d,p) temel kūme seviyesinde solvent etkisi ile hesaplanan sonuçlar.

Fonksiyon el	Solvent	λ_{ab} (eV/nm)	f	Konfigūrasyon
B3LYP	Gaz	3,03/409,54	0,2439	H→L (52%)
B3LYP	Etanol-Fosfat tamponu	2,59/479,28	0,1467	H→L (56%)

Burada solventin eklenmesiyle hesaplanan sonucun deneysel sonuca daha çok yaklaştığını gōrebiliyoruz.

Tablo 6.5: Farklı temel kümeler ile $\lambda_{ab}(nm)$ absorpsiyon hesaplamaları.

Moleküller	6-31+G(d,p,)	6-311G(d,p)	6-311G(2d,2p)
1	393,41	388,39	388,89
2	336,95	333,61	334,64
4	329,54	325,33	326,78

Farklı temel kümeleri kullanılmasına rağmen sonuçlar arasında çok bir fark olmadığını gözlemledik.

Tablo 6.6: Moleküllerin λ_{em} (nm) emisyon hesaplamaları.

		1 (λ den = 520nm)	2 (λ den = 393nm)	3-5 (λ den = 515nm)	4 (λ den = 420nm)
Fonksiyonel	Temel küme				
B3LYP	6-31G(d)		369		398
B3LYP	6- 311+G(d,p)			529	
B3LYP	6- 311+G(d,2p)				398
UB3LYP	6- 311++G(d,p)	523			

Tablo 6.6'da sonuçlardan görüldüğü gibi deneysel verilerden çok sapma gözlenmemiştir. Hesaplamalı kimya sonuçlarıyla deneysel sonuçlar örtüşmektedir.

Bu çalışmada floresans sensörlerin reaksiyon mekanizmaları DFT ve TD-DFT hesaplamaları ile incelenmiştir. Deneysel sonuçlara yakın sonuçlar bulmamız hesaplamalı metodların floresans sensörlerin mekanizmalarını inceleme ve aydınlatma, ve yeni sensörlerin tasarımı için kullanılabilir olduğunu gösteriyor. TD-DFT yöntemleri ile önceden floresans sonda yapısı tahmin edilerek tasarlanabilir. Floroforların fotofiziksel özellikleri üzerine yapılan bu araştırma ve floresans molekül sondaların rasyonel tasarımındaki DFT-TDDFT hesaplamalarının başarılı uygulaması önceden belirlenmiş fotofiziksel özelliklere sahip yeni floroforların ve sondaların geliştirilmesi için son zamanlarda çok büyük bir ilgi görüyor. Bu çalışmada verilen teorik bilgiler biyolojik uygulamalarındaki floresans sondalar için

kullanılan florosein ve maleimit bazlı kromoforların tasarımı için çok faydalı olur. Özetlemek gerekirse, algılama mekanizmasının belirlenmesi, yeni floresans sensörlerinin tasarımı için yararlı olacaktır.



KAYNAKLAR

- [1] Brand V. T., Keyworth D. A., (1965), "A rapid determination of individual mercaptans in gasoline boiling range stocks", *Analytical Chemistry*, 37, 1424-1425.
- [2] Earle T. E., (1953), "Determination of disulfides in presence of thiols", *Analytical Chemistry*, 25, 769-771.
- [3] Scampicchio M., Lawrence N. S., Arecchi A., Cosio S., Mannino S., (2007), "Voltammetric detection of free sulfhydryl compounds in food flours", *Electroanalysis*, 19, 85-90.
- [4] Whitman D. W., Whitney R. M., (1953), "Catalytic activity of cysteine and related compounds in the iodine-azide reaction", *Analytical Chemistry*, 25, 1523-1527.
- [5] Paulsen C. E., Carroll K. S., (2010), "Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches", *ACS Chemical Biology*, 5, 47-62.
- [6] Li L., Rose P., Moore P. K., (2011), "Hydrogen sulfide and cell signaling", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51, 169-187.
- [7] Gadalla M. M., Snyder S. H., (2010), "Hydrogen sulfide as a gasotransmitter", *Journal of Neurochemistry*, 113, 14-26.
- [8] Refsum H., Ueland P. M., Nygard O., Vollset S. E., (1998), "Homocysteine and cardiovascular disease", *Annual Review of Medicine*, 49, 31-62.
- [9] Shahrokhian S., (2001), "Lead phthalocyanine as a selective carrier for preparation of a cysteine-selective electrode", *Analytical Chemistry*, 73, 5972-5978.
- [10] Zhang S. Y., Ong C.N., Shen H.M., (2004), "Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells", *Cancer Letters*, 208, 143-153.
- [11] Jensen K. S., Hansen R. E., Winther J. R., (2009), "Kinetic and thermodynamic aspects of cellular thiol-disulfide redox regulation", *Antioxidants and Redox Signaling*, 11, 1047-1058.
- [12] Abe K., Kimura H., (1996), "The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator", *Journal of Neuroscience*, 16, 1066-1071.
- [13] Olson K. R., (2012), "A practical look at the chemistry and biology of hydrogen sulfide", *Antioxidants and Redox Signaling*, 17, 32-44.

- [14] Kimura H., (2011), "Hydrogen sulfide: its production, release and functions", *Amino acids*, 41, 113-121.
- [15] Eto K., Asada T., Arima K., Makifuchi T., Kimura H., (2002), "Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293, 1485-1488.
- [16] Kamoun P., Belardinelli M. C., Chabli A., Lallouchi K., Chadeaux-Vekemans B., (2003), "Endogenous hydrogen sulfide overproduction in Down syndrome", *American Journal of Medical Genetics*, 116, 310-311.
- [17] Wang K., Peng H. J., Wang B. H., (2014), "Recent advances in thiol and sulfide reactive probes", *Journal of Cellular Biochemistry*, 115, 1007-1022.
- [18] Kim H. N., Lee M. H., Kim H. J., Kim J. S., Yoon J., (2008), "A new trend in rhodamine-based chemosensors: application of spirolactam ring-opening to sensing ions", *Chemical Society Reviews*, 37, 1465-1472.
- [19] Yin C. X., Huo F. J., Zhang J. J., Martínez-Máñez R., Yang Y.T., Lv H. G., Li S. D., (2013), "Thiol-addition reactions and their applications in thiol recognition", *Chemical Society Reviews*, 42, 6032-6059.
- [20] Jung H. S., Chen X. Q., Kim J. S., Yoon J., (2013), "Recent progress in luminescent and colorimetric chemosensors for detection of thiols", *Chemical Society Reviews*, 42, 6019-6031.
- [21] Maeda H., Matsuno H., Ushida M., Katayama K., Saeki K., Itoh N., (2005), "2,4-Dinitrobenzenesulfonyl fluoresceins as fluorescent alternatives to ellman's reagent in thiol-quantification enzyme assays", *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 2922-2925.
- [22] Tang B., Xing Y., Li P., Zhang N., Yu F., Yang G., (2007), "A rhodamine-based fluorescent probe containing a Se-N bond for detecting thiols and its application in living cells", *Journal of the American Chemical Society*, 129, 11666-11667.
- [23] Bouffard J., Y. Kim Y., Swager T. M., Weissleder R., Hilderbrand S. A., (2008), "A highly selective fluorescent probe for thiol bioimaging", *Organic Letters*, 10, 37-40.
- [24] Pires M. M., Chmielewski J., (2008), "Fluorescence imaging of cellular glutathione using a latent rhodamine", *Organic Letters*, 10, 837-840.
- [25] Ji S., Yang J., Yang Q., Liu S., Chen M., Zhao J., (2009), "Tuning the intramolecular charge transfer of alkynylpyrenes: effect on photophysical properties and its application in design of off-on fluorescent thiol probes", *The Journal of Organic Chemistry*, 74, 4855-4865.

- [26] Lim C. S., Masanta G., Kim H. J., Han J. H., Kim H. M., Cho B. R., (2011), "Ratiometric detection of mitochondrial thiols with a two-photon fluorescent probe", *Journal of the American Chemical Society*, 133, 11132-11135.
- [27] Yuan L., Lin W. Y., Zhao S., Gao W. S., Chen B., He L. W., Zhu S. S., (2012), "A unique approach to development of near-infrared fluorescent sensors for in vivo imaging", *Journal of the American Chemical Society*, 134, 13510-13523.
- [28] Liu Y, Yu Y, Lam J. W. Y, Hong Y. N, Faisal M, Yuan W. Z, Tang B. Z, (2010), "Simple biosensor with high selectivity and sensitivity: thiol-specific biomolecular probing and intracellular imaging by AIE fluorogen on a TLC plate through a thiol-ene click mechanism", *Chemistry – A European Journal*, 16, 8433-8438.
- [29] Kand D., Kalle A. M., Varma S. J., Talukdar P., (2012), "A chromenoquinoline-based fluorescent off-on thiol probe for bioimaging", *Chemical Communications*, 48, 2722-2724.
- [30] Lin Q. N., Bao C. Y., Cheng S. Y., Yang Y. L., Ji W., Zhu L. Y., (2012), "Target-activated coumarin phototriggers specifically switch on fluorescence and photocleavage upon bonding to thiol-bearing protein", *Journal of the American Chemical Society*, 134, 5052-5055.
- [31] McMahon B. K., Gunnlaugsson T., (2012), "Selective detection of the reduced form of glutathione (GSH) over the oxidized (GSSG) form using a combination of glutathione reductase and a Tb(III)-cyclen maleimide based lanthanide luminescent 'switch on' assay", *Journal of the American Chemical Society*, 134, 10725-10728.
- [32] Wache N., Schroeder C., Koch K.-W., Christoffers J., (2012), "Diaminoterephthalate turn-on fluorescence probes for thiols-tagging of recovering and tracking of its conformational change", *ChemBioChem*, 13, 993-998.
- [33] Rao B., Simpson C., Lin H., Liang L. Y., Gu B. H., (2014), "Determination of thiol functional groups on bacteria and natural organic matter in environmental systems", *Talanta*, 119, 240-247.
- [34] Qu L. J., Yin C. X., Huo F. J., Li J. F., Chao J. B., Zhang Y. B., (2014), "A maleimide-based thiol fluorescent probe and its application for bioimaging", *Sensors and Actuators B*, 195, 246-251.
- [35] Huo F.J., Sun Y. Q., Su J., Chao J. B., Zhi H. J., Yin C. X., (2009), "Colorimetric detection of thiols using a chromene molecule, *Organic Letters*, 11, 4918-4921.

- [36] Huo F. J., Sun Y. Q., Su J., Yang Y.T., Yin C. X., Chao J. B., (2010), "Chromene "lock", thiol "key" and mercury(II) ion "hand": a single molecular machine recognition system", *Organic Letters*, 12, 4756-4759.
- [37] Chen X. Q., Ko S.-K., Kim M. J., Shin I., Yoon J., (2010), "A thiol-specific fluorescent probe and its application for bioimaging", *Chemical Communications*, 46, 2751-2753.
- [38] Yang Y. T., Huo F. J., Yin C. X., Zheng A. M., Chao J. B., Li Y. Q., Nie Z. X., Martínez-Máñez R., Liu D. S., (2013), "Thiol-chromene click chemistry: a coumarin-based derivative and its use as regenerable thiol probe and in bioimaging applications", *Biosensors and Bioelectronics*, 47, 300-306.
- [39] Long L. L., Zhou L. P., Wang L., Meng S. C., Gong A. H., Du F. Y., Zhang C., (2013), "A coumarin-based fluorescent probe for biological thiols and its application for living cell imaging", *Organic and Biomolecular Chemistry*, 11, 8214-8220.
- [40] Ren W. X., Han J., Pradhan T., Lim J. Y., Lee J. H., Lee J., Kim J. H., Kim J. S., "A fluorescent probe to detect thiol-containing amino acids in solid tumors", *Biomaterials*, 35, 4157-4167.
- [41] Nelson D. L., Cox M. M., (2008), "Biyokimya ilkeleri", 5. baskı, Palme Yayıncılık.
- [42] Pastore A., Federici G, Bertini E., Piemonte F., (2003), "Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification", *Clinica Chimica Acta*, 333, 19-39.
- [43] Sen C. K., Packer L., (2000), "Thiol homeostasis and supplements in physical exercise", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 653-665.
- [44] Wlodek L., (2002), "Beneficial and harmful effects of thiols", *Polish Journal of Pharmacology*, 54, 215-223.
- [45] Meister A., Anderson M. E., (1983), "Glutathione", *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711-760.
- [46] Meister A., (1974), "Glutathione, ascorbate, and cellular protection", *Cancer Research (Suppl.)*, 54, 1969-1975.
- [47] Neal R., Mathews R. H., Lutz P., Ercal N., (2003), "Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation", *Free Radical Biology & Medicine*, 34 (6), 689-695.
- [48] Loscalzo J., (1996), "The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia", *Journal of Clinical Investigation*, 98, 5-7.

- [49] Bowman G., U. Backer, S. Larsson, B. Melander, L. Whalander, (1983), "Oral acetylcysteine reduces exacerbation rate in chronic bronchitis; report of a trial organized by the Swedish Society for Pulmonary Diseases", *European Journal of Respiratory diseases*, 63, 405-415.
- [50] Prescott L. F., Critchley J. A., (1983), "The treatment of acetaminophen poisoning", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23, 87-191.
- [51] Web 1, (2007), www.ammunotec.com, (Erişim Tarihi: 15/03/2017).
- [52] ICF, 2007, What is cystinuria?, International Cystinuria Foundation, (Erişim Tarihi: 16/03/2007)
- [53] Bulaj G., Kortemme T., Goldenberg D., (1998), "Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides", *Biochemistry*, 37 (25), 8965-8972.
- [54] Baker D., Czarnecki-Maulden G., (1987), "Pharmacologic role of cysteine in ameliorating or exacerbating mineral toxicities", *Journal of Nutrition*, 117(6), 1003-1010.
- [55] Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P. F, Rosenberg I. H., D'Agostino R. B., Wilson P. W. F., (2002), "Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease," *The New English Journal of Medicine*, 346, 476.
- [56] Jocelyn P. C., 1972, "The Biochemistry of the SH Group", London UK: Academic.
- [57] Riegel B., du Vigneaud V, 1935, "The isolation of homocysteine and its conversion to a thiolactone", *The Journal of Biological Chemistry*, 112, 149-54.
- [58] Stamler J. S., Loscalzo J., 1990, "Glutathione dramatically alters the activity of tissue plasminogen activator", *Clinical Research*, 38, 246.
- [59] Lou M. F., Poulsen L. L., Ziegler D. M., 1987, "Cellular protein mixed disulfides", *Methods in Enzymology*, 143, 124-9.
- [60] Kang S. S., Wong P. W. K., Cook H. Y., Norusis M., Messer J. V., "Protein-bound homocyst(e)ine. A possible risk factor for coronary artery disease", *The Journal of Clinical Investigation*, 77, 1482-6.
- [61] Fariss M, W., Reed D. J., 1987, "High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives", *Methods in Enzymology*, 143, 101-9.
- [62] Meister A., 1965, "Biochemistry of the Amino Acids", 2nd edition New York, NY: Academic Press, 757-818.

- [63] Finkelstein J. D., Martin J. J., Harris B. J., 1988, "Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cysteine" *The Journal Biological Chemistry*, 263(24), 11750-4.
- [64] K.S. McCully, 1971, "Homocysteine metabolism in scurvy, growth and arteriosclerosis", *Nature*, 231, 391-2.
- [65] Kraus J. P., 1987, "Cystathionine beta-synthase (human)", *Methods in Enzymology*, 143, 388-94.
- [66] Mudd S. H., Levy H. L., 1983, "Disorders of transsulfuration. In: Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Frederickson D. S., Goldstein J. L., Brown M. S., eds", *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw Hill, 458-503.
- [67] Law M., (2000), "Fortifying Food with Folic Acid," *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 26, 349.
- [68] Ketterer B, (1982), "The role of nonenzymatic reactions of glutathione in xenobiotic metabolism", *Drug Metabolism Reviews*, 13, 161-87.
- [69] Meister A., (1983), "Selective modification of glutathione metabolism", *Science*, 220, 472-7.
- [70] Ziegler D. M., (1985), "Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation", *Annual Review of Biochemistry*, 54, 305-29.
- [71] Reed D. J., Fariss M. W., (1984), "Glutathione depletion and susceptibility", *Pharmacological Reviews*, 36, 936-44.
- [72] Arrigo A. P., (1999), "Gene expression and the thiol redox state", *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 936-44.
- [73] Strange R. C., Jones P. W., Fryer A. A., (2000), "Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology", *Toxicology Letters*, 112/113, 357-63.
- [74] Eaton D. L., Bammler T. K., (1999), "Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology", *Toxicological Sciences*, 49, 156-64.
- [75] Akerboom T. P. M., Sies H., (1989), "Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane", *Methods in Enzymology*, 134, 523-34.
- [76] Dekant W., Vamvakas S., Anders M. W., (1990), "Bioactivation of hexachlorobutadiene by glutathione conjugation", *Food and Chemical Toxicology*, 28, 285-93.

- [77] Woods J. S., Ellis M. E., (1995), "Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methyl mercury. Relationship to mercury-induced oxidative stress", *Biochemical Pharmacology*, 50, 1719-24.
- [78] Urata Y., Yamamoto H., Goto S., Tsushima H., Akazawa S., Nagataki S., Kondo T., (1996), "Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of gamma-glutamylcysteine synthetase by interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in mouse endothelial cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 15146-52.
- [79] Kondo T., Yoshida K., Urata Y., Goto S., Gasa S, Taniguchi N., (1993), "γ-Glutamylcysteine synthetase and active transport of glutathione S-conjugate are responsive to heat shock in K562 erythroid cells", *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 20366-72.
- [80] Rahman I, Bel A, Mulier B., Lawson M. F., Harrison D. J., MacNee W., Smith C. A. D., (1996), "Transcriptional regulation of γ-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 229, 832-7.
- [81] Moellering D., Mc Andrew J., Patel R. P., Forman H. J., Mulcahy R. T., Jo H., Darley-Usmar V. M, (1999), "The induction of GSH synthesis by nanomolar concentrations of NO in endothelial cells: a role for gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transpeptidase", *FEBS Letters*, 448, 292-6.
- [82] Shi M. M., Iwamoto T., Forman H. J., (1994), "γ-Glutamylcysteine synthetase and GSH increase in quinine-induced oxidative stress in bovine pulmonary artery endothelial cells (BPAEC)", *American Journal of Physiology*, 267, L414-21.
- [83] Liu R. M., Hu H., Robison T. W., Forman H. J., (1996), "Differential enhancement of γ-glutamyl transpeptidase and γ-glutamylcysteine synthetase by tert-butylhydroquinone in rat lung epithelial L2 cells", *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 14, 186-91.
- [84] Galloway D. C., McLellan L. I., (1998), "Inducible expression of the gamma-glutamylcysteine synthetase light subunit by t-butylhydroquinone in HepG2 cells is not dependent on an antioxidant-responsive element", *Biochemical Journal*, 336, 535-9.
- [85] Wild A. C., Mulcahy R.T., (1999), "Pyrrolidine dithiocarbamate up-regulates the expression of the genes encoding the catalytic and regulatory subunits of gamma-glutamylcysteine synthetase and increases intracellular glutathione levels", *Biochemical Journal*, 338, 659-65.
- [86] Mulcahy R. T., Wartman M. A., Bailey H. H., Gipp J. J., (1997), "Constitutive and β-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence", *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 7445-54.

- [87] Levonen A. L., Dickinson D. A., Moellering D. R., Mulcahy R. T., Forman H. J., Darley-Usmar V. M., (2001), "Biphasic effects of 15-deoxy-delta (12, 14)-prostaglandin J(2) on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21, 1846-51.
- [88] Moellering D. R., Patel R. P., Dickinson D. A., Forman H. J., Darley-Usmar V. M., Levon Y. M., (2002), "Induction of glutathione synthesis by oxidized low density lipoprotein and 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-phosphatidyl choline: protection against quinone-mediated oxidative stress", *Biochemical Journal*, 362, 51-9.
- [89] Liu R. M., Gao L., Choi J, Forman H. J., (1998), "γ-Glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal", *American Journal of Physiology*, 275, L861-9.
- [90] Liu R. M., Borok Z., Forman H. J., (2001), "4-Hydroxy-2-nonenal increases gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression in alveolar epithelial cells", *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24, 499-505.
- [91] Dickinson D. A., Iles K. E., Watanabe N., Iwamoto T., Zhang H., Krzywanski D. M., Forman H. J., (2002), "4-Hydroxynonenal induces glutamate cysteine ligase through JNK in HBE1 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, in press.
- [92] Camera E., Picardo M., (2002), "Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes", *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 781(1-2), 181-206.
- [93] Toyo'oka T., (2009), "Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples", *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(28), 3318-3330.
- [94] Iyer S. S., Jones D. P., Brigham K. L., Rojas M., (2009), "Oxidation of plasma cysteine/cystine redox state in endotoxin-induced lung injury", *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40(1), 90-98.
- [95] Wang S. S., Hung Y. T., Lin Y. C., (2010), "Kinetic studies of the oxidation of glutathione in protein refolding buffer" (Translated from English) *Bioprocess Biosystems Engineering*, 33(2), 277-286 (in English).
- [96] Monostori P., Wittmann G., Karg E., Turi S., (2009), "Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review", *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(28), 3331-3346.

- [97] Antwi C., Johnson A. S., Selimovic A., Martin R. S., (2011), "Use of microchip electrophoresis and a palladium/mercury amalgam electrode for the separation and detection of thiols", *Analytical Methods*, 3(5), 1072-1078.
- [98] Karger B. L., Snyder L. R., Horvath C., (1973), "An introduction to separation science", John Wiley & Sons, Inc, New York, 129-146; 501-505.
- [99] Nozal M. J., Bernal J. L., Toribio L., Marinero P., Moral O., Manzanas L., Rodriguez E., (1997), "Determination of glutathione, cysteine and n-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)", *Journal of Chromatography A*, 778(1-2), 347-353.
- [100] Yang C. S., Chou S. T., Lin N. N., Liu L., Tsai P. J., Kuo J. S., Lai J. S., (1994), "Determination of extracellular glutathione in rat-brain by microdialysis and high-performance liquid-chromatography with fluorescence detection", *Journal of Chromatography B Biomedical Applications*, 661(2), 231-235.
- [101] Shi G., Lu J., Xu F., Sun W., Jin L., Yamamoto K., Tao S., Jin J., (1999), "Determination of glutathione in vivo by microdialysis using liquid chromatography with a cobalt hexacyanoferrate chemically modified electrode", *Analytica Chimica Acta*, 391(3), 307-313.
- [102] Landers J. P., (2008a), "Handbook of capillary and microfluidic electrophoresis and associated microtechniques", CRC Press, New York, 3rd edition, 4-19.
- [103] Koesdjojo M. T., Gonzalez C. F., Remcho V. T., (2008), "Principles and practice of capillary electrochromatography", *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*, ed JP. Landers, CRC press, Boca Raton, 3rd edition, 184-187.
- [104] Schwartz H. E., Wanders B. J., (1998), "Capillary electrophoresis", *Handbook of hplc*, eds E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers, N. Miller, Marcel Dekker, Inc., New York, Vol 78, 169-191.
- [105] Landers J. P., (2008b), "Introduction to capillary electrophoresis", *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*, ed JP. Landers, CRC press, Boca Raton, 3rd edition, 7-8.
- [106] Carru C., Deiana L., Sotgia S., Pes G. M., Zinellu A., (2004), "Plasma thiols redox status by laser-induced fluorescence capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, 25(6), 882-889.
- [107] Zinellu A, Sotgia S., Posadino A. M., Pasciu V., Zinellu E., Usai M. F., Scanu B., Chessa R., Gaspa L., Tadolini B., Deiana L., Carru C., (2007), "Protein-bound glutathione measurement in cultured cells by cze with lif detection", *Electrophoresis*, 28(18), 3277-3283.

- [108] Lada M. W., Kennedy R. T., (1997), "In vivo monitoring of glutathione and cysteine in rat caudate nucleus using microdialysis on-line with capillary zone electrophoresis-laser induced fluorescence detection", *Journal of Neuroscience Methods*, 72(2), 153-159.
- [109] Lada M. W., Kennedy R. T., (1995), "Quantitative in vivo measurements using microdialysis on-line with capillary zone electrophoresis", *Journal of Neuroscience Methods*, 63(1-2),147-152.
- [110] Hogan B. L., Yeung E. S., (1992), "Determination of intracellular species at the level of a single erythrocyte via capillary electrophoresis with direct and indirect fluorescence detection", *Analytical Chemistry*, 64(22), 2841-2845.
- [111] Tietze F., (1969), "Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues", *Analytical Biochemistry*, 27(3), 502-522.
- [112] Liang S. C., Wang H., Zhang Z. M., Zhang X., Zhang H. S., (2002), "Direct spectrofluorimetric determination of glutathione in biological samples using 5-maleimidyl-2-(m-methylphenyl) benzoxazole", *Analytica Chimica Acta*, 451(2), 211-219.
- [113] Inoue T., Kirchhoff J. R., (2000), "Electrochemical detection of thiols with a coenzyme pyrroloquinoline quinone modified electrode", *Analytical Chemistry*, 72(23), 5755-5760.
- [114] Joshi K. A., Pandey P. C., Chen W., Mulchandani A., (2004), "Ormosil encapsulated pyrroloquinoline quinone-modified electrochemical sensor for thiols", *Electroanalysis*, 16(23), 1938-1943.
- [115] Trabesinger A. H., Boesiger P., (2001), "Improved selectivity of double quantum coherence filtering for the detection of glutathione in the human brain in vivo", *Magnetic Resonance in Medicine*, 45(4), 708-710.
- [116] Kennett E. C., Bubb W. A., Bansal P., Alewood P., Kuchel P. W., (2005), "Nmr studies of exchange between intra- and extracellular glutathione in human erythrocytes", *Redox Report*, 10(2), 83-90.
- [117] Sippel T. O., (1981), "New fluorochromes for thiols: maleimide and iodoacetamide derivatives of a 3-phenylcoumarin fluorophore", *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29, 314-316.
- [118] Ros-Lis J. V., Garcí'a B., Jimé'nez D., Martí'nez-Ma'n'ez R., Sanceno'n F., Soto J., Gonzalvo F., Valldecabres M. C., (2004), "Squaraines as Fluoro-Chromogenic Probes for Thiol-Containing Compounds and Their Application to the Detection of Biorelevant Thiols", *Journal of American Chemical Society*, 126, 4064-4065.

- [119] Bouffard J., Kim Y., Swager T. M., Weissleder R., Hilderbrand S. A., (2008), “A highly Selective Fluorescent Probe for Thiol Bioimaging”, *Organic Letters*, 10, 37-40.
- [120] Ji S., Guo H., Yuan X., Li X., Ding H., Gao P., Zhao C., Wu W., Zhao J., (2010), “A Highly Selective OFF-ON Red-Emitting Phosphorescent Thiol Probe with Large Stokes Shift and Long Luminescent Lifetime”, *Organic Letters*, 12, 2876-2879.
- [121] Ellman G. L., (1959), “Tissue sulfhydryl groups”, *Archives of Biochemistry Biophysics*, 82, 70–77.
- [122] Le M., Means G. E., (1995), “A Procedure for the Determination of Monothiols in the Presence of Dithiothreitol – An Improved Assay for the Reduction of Disulfides”, *Analytical Biochemistry*, 229, 264–271.
- [123] Chen X., Zhou Y., Peng X., Yoon J., (2010), “Fluorescent and colorimetric probes for detection of thiols”, *Chemical Society Reviews*, 39, 2120–2135.
- [124] Wu J., (2013), “Monitoring the metabolism of thiols/disulfides in the extracellular space of organotypic hippocampal slice cultures by online microfluidic analysis coupled with electroosmotic sampling”, PhD thesis, University of Pittsburgh.
- [125] Kim T. K., Lee D. N., Kim H. J., (2008), “Highly selective fluorescent sensor for homocysteine and cysteine”, *Tetrahedron Letters*, 49, 4879-4881.
- [126] Liu X, Xi N., Liu S., Ma Y, Yang H., Li H., He J., Zhao Q., Li F., Huang W., (2012), “Highly selective phosphorescent nanoprobe for sensing and bioimaging of homocysteine and cysteine”, *Journal of Materials Chemistry*, 22, 7894–7901.
- [127] Mei J., Wang Y., Tong J., Wang J., Qin A., Sun J. Z., Tang B. Z., (2013), “Discriminatory Detection of Cysteine and Homocysteine Based on Dialdehyde-Functionalized Aggregation-Induced Emission Fluorophores”, *Chemistry – A European Journal*, 19, 613–620.
- [128] Mei J., Tong J., Wang J., Qin A., Sun J. Z., Tang B. Z., (2012), “Discriminative fluorescence detection of cysteine, homocysteine and glutathione via reaction-dependent aggregation of fluorophore-analyte adducts”, *Journal of Materials Chemistry*, 22, 17063–17070.
- [129] Lee H. Y., Choi Y. P., Kim S., Yoon T., Guo Z., Lee S., Swamy K. M. K., Kim G., Lee J. Y., Shin I., Yoon J., (2014), “Selective homocysteine turn-on fluorescent probes and their bioimaging applications”, *Chemical Communications*, 50, 6967–6969.
- [130] Das P., Mandal A. K., Chandar N. B., Baidya M., Bhatt H. B., Ganguly B., Ghosh S. K., Das A., (2012), “New Chemodosimetric Reagents as Ratiometric Probes for Cysteine and Homocysteine and Possible Detection in

Living Cells and in Blood Plasma”, *Chemistry – A European Journal*, 18, 15382–15393.

- [131] Lee K. S., Kim T. K., Lee J. H., Kim H. J., Hong J. I., (2008), “Fluorescence turn-on probe for homocysteine and cysteine in water”, *Chemical Communications*, 6173–6175.
- [132] Zhang J., Jiang X. D., Shao X., Zhao J., Su Y., Xi D., Yu H., Yue S., Xiao L. J., Zhao W., (2014), “A turn-on NIR fluorescent probe for the detection of homocysteine over cysteine”, *RSC Advances*, 4, 54080–54083.
- [133] Duan L., Xu Y., Qian X., Wang F., Liu J., Cheng T., (2008), “Highly selective fluorescent chemosensor with red shift for cysteine in buffer solution” *Tetrahedron Letters*, 49, 6624–6627.
- [134] Yang Z., Zhao N., Sun Y., Miao F., Liu Y., Liu X., Zhang Y., Ai W., Song G., Shen X., Yu X., Sun J., Wong W. Y., (2012), “Highly selective red- and green-emitting two-photon fluorescent probes for cysteine detection and their bio-imaging in living cells”, *Chemical Communications*, 48, 3442–3444.
- [135] Ma Y., Liu S., Yang H., Wu Y., Yang C., Liu X., Zhao Q., Wu H., Liang J., Li F., Huang W., (2011), “Water-soluble phosphorescent iridium (3) complexes as multicolor probes for imaging of homocysteine and cysteine in living cells”, *Journal of Materials Chemistry*, 21, 18974–18982.
- [136] Niu L. Y., Guan Y. S., Chen Y. Z., Wu L. Z., Tung C. H., Yang Q. Z., (2012), “BODIPY-Based Ratiometric Fluorescent Sensor for Highly Selective Detection of Glutathione over Cysteine and Homocysteine”, *Journal of the American Chemical Society*, 134, 18928–18931.
- [137] Jin R., (2012), “Theoretical study of chemosensor for fluoride anion and optical properties of the derivatives of diketopyrrolopyrrole”, *Theoretical Chemistry Accounts*, 131, 1260.
- [138] Kand D., Kalle A. M., Talukdar P., (2013), “Chromenoquinoline-based thiol probes: a study on the quencher position for controlling fluorescent Off-On characteristics”, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11, 1691-1701.
- [139] Chen J., Jiang X., Carroll S. L., Huang J., Wang J., (2015), “Theoretical and experimental investigation of thermodynamics and kinetics of thiol-Michael addition reactions: A case study of reversible fluorescent probes for glutathione imaging in single cells”, *Organic Letters*, 17, 5978-5981.
- [140] Guennic B. L., Chibani S., Charaf-Eddin Azzam, Massue J., Ziessel R., Ulrich G., Jacquemin D., (2013), “The NBO pattern in luminescent chromophores: unraveling excited-state features using TD-DFT”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 7534-7540.

- [141] Xue Y., Dou Y., An L., Zheng Y., Zhang L., Liu Y., (2016), "Electronic structure and spectral properties of aurones as visible range fluorescent probes", *RSC Advances*, 6, 7002-7010.
- [142] Jayabharathi J., Vimal K., Thanikachalam V., Kalaiarasi V., (2014), "Photophysical and excited-state intramolecular proton transfer of 2-(1-(3,5-dimethylphenyl)-1H-phenanthro[9,10-d] imidazol-2-yl) phenol: DFT analysis", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 125, 290-296.
- [143] Paul B. K., Ganguly A., Guchhait N., (2014), "Quantum chemical exploration of the intramolecular hydrogen bond interaction in 2-thiazol-2-yl-phenol and 2-benzothiazol-2-yl-phenol in the context of excited-state intramolecular proton transfer: A focus on the covalency in hydrogen bond", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 131, 72-81.
- [144] Ray D., Dalapati S., Guchhait N., (2013), "Spectral properties of a simple azine Schiff base and its sensing ability towards protic environment through hydrogen bonding interaction", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 115, 219-226.
- [145] Ji S., Yang J., Yang Q., Liu S., Chen M., Zhao J., (2009), "Tuning the intramolecular charge transfer of alkylnylpyrenes: Effect on photophysical properties and its application in design of Off-On fluorescent thiol probes", *The Journal of Organic Chemistry*, 74, 4855-4865.
- [146] Zhu X., Gao H., Zan W., Li Y., Zhang J., Liu X., Wei X., Qi Fengchao, Yao X., Zhang H., (2016), "A rational designed thiols fluorescence probe: the positional isomer in PET", *Tetrahedron*, 72, 2048-2056.
- [147] Guo H., Jing Y., Yuan X., Ji S., Zhao J., Li X., Kan Y., (2010), "Highly selective fluorescent OFF-ON thiol probes based on dyads of BODIPY and potent intramolecular electron sink 2,4-dinitrobenzenesulfonyl subunits", *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9, 3844-3853.
- [148] Shao J., Sun H., Guo H., Ji S., Zhao J., Wu W., Yuan X., Zhang C., James T. D., (2011), "A highly selective red-emitting FRET fluorescent molecular probe derived from BODIPY for the detection of cysteine and homocysteine: an experimental and theoretical study", *Chemical Science*, 3, 1049-1061.
- [149] Chen H., Li X., Wu Y., Gao W., Bai R., (2012), "A ruthenium(II) complex with environment-responsive dual emission and its application in the detection of cysteine/homocysteine", *Dalton Transactions*, 41, 13292-13297.
- [150] Tong Y., Dai C. G., Ren Y., Luo S. W., (2015), "A mechanism study of a novel acid-activable Michael-type fluorescent probe for thiols", *Chinese Journal of Chemical Physics*, 28, 277-287.

- [151] Yang D., Zhao J., Zheng R., Wang Y., Lv J., (2015), "A DFT/TDDFT investigation of the excited state proton transfer reaction of fisetin chromophore", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 151, 368-374.
- [152] Long L., Zhou L., Wang L., Meng S., Gong A., Du F., Zhang C., (2013), "A coumarin-based fluorescent probe for biological thiols and its application for living cell imaging", *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11, 8214-8220.
- [153] Li G. Y., Wang J. P., Zhang H., Li W. W., Wang F., Liang Y. H., (2014), "TDDFT study on the sensing mechanism of a fluorescent sensor based on Si-O bond for fluoride anion", *Chemical Physics Letters*, 616-617, 30-34.
- [154] Basaric N., Clementi C., Carlotti B., Aleskovic M., Elisei F., (2014), "Photophysics of cyanophenylpyrroles: Investigation of solvatochromic properties and charge transfer by ultrafast spectroscopy and DFT calculations", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 299, 94-102.
- [155] Dai C. G., Du X. J., Song Q. H., (2015), "Acid-activatable Michael-type fluorescent probes for thiols and for labeling lysosomes in live cells", *The Journal of Organic Chemistry*, 80, 12088-12099.
- [156] Jung H. S., Pradhan T., Han J. H., Heo K. J., Lee J. H., Kang C., Kim J. S., (2012), "Molecular modulated cysteine-selective fluorescent probe", *Biomaterials*, 33, 8495-8502.
- [157] Erdem S., (2006), "Hesapsal organik kimya ders notları", Marmara üniversitesi.
- [158] Chen X., Ko S. K., Kim M. J., Shin I., Yoon J., (2010), "A thiol-specific fluorescent probe and its application for bioimaging", *Chemical Communications*, 46, 2751-2753.
- [159] Qu L., Yin C., Huo F., Li J., Chao J., Zhang Y., (2014), "A maleimide-based thiol fluorescent probe and its application for bioimaging", *Sensors and Actuators B*, 195, 246-251.
- [160] Wang H., Zhou G., Gai H., Chen X., (2012), "A fluorescein-based probe with high selectivity to cysteine over homocysteine and glutathione", *Chemical Communications*, 48, 8341-8343.
- [161] Zhang Y., Huo F., Yin C., Yue Y., Hao J., Chao J., Liu D., (2014), "An off-on fluorescent probe based on maleimide for detecting thiols and its application for bioimaging", *Sensors and Actuators B*, 207, 59-65.

ÖZGEÇMİŞ

Akylai BİRİMKULOVA 1990 yılında Talas'ta doğdu. 2007 yılında başladığı Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2012 yılında başarıyla tamamlayarak 2014 yılında yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başladı.

