



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**TOPLAM MONOAMİN OKSİDAZ AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ İÇİN YENİ BİR
FLOROJENİK PROB GELİŞTİRİLMESİ**

Emin Ahmet YEŞİL

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK**

Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı

Haziran, 2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Emin Ahmet YEŞİL tarafından, **Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK** danışmanlığında hazırlanan "**TOPLAM MONOAMİN OKSİDAZ AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ İÇİN YENİ BİR FLOROJENİK PROB GELİŞTİRİLMESİ**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **09/06/2023** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimya Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Aslı BAYSAL İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Saliha Esin ÇELİK İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimya Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimya Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Mustafa BENER İstanbul Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu; tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın bulunmadığını; bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi; bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara ise kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı; yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu üstlendiğimi kabul ederim.

Emin Ahmet YEŞİL



Kıymetli babam Recep Yeşil'e ithafen...

BÜTÇE DESTEKLERİ

TOPLAM MONOAMİN OKSİDAZ AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ İÇİN YENİ BİR FLOROJENİK PROB GELİŞTİRİLMESİ

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.

TEŞEKKÜR

Gerçekleştirmiş olduğum çalışmalarına ve tercihlerime her zaman güvenen; bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren ve destekleyen; akademik başarı ve azmini her zaman kendime örnek aldığım, “*Kimya Bilimine Yön Veren 100 Türk*” içinde yer alarak ülkemizin gurur kaynağı olan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK’e,

Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen; tez çalışmasının en verimli şekilde sürdürülebilmesi için değerli görüşleriyle katkılarını sunan; deneyimlerinden istifade ettiğim Tez İzleme Komitesi Üyeleri Sayın Prof. Dr. Aslı BAYSAL ve Sayın Doç. Dr. Saliha Esin ÇELİK’e,

Her konuda samimiyetle yaklaşım gösteren ve deneyimleri doğrultusunda çalışmalarına destek veren Öğr. Gör. Dr. Ayşe Nur ÖNEM’e,

Maddi ve manevi desteğini esirgemeyen kıymetli aileme ve bu süreçte beni yalnız bırakmayan çok değerli arkadaşlarıma,

2211-C Öncelikli Alanlar Yurtiçi Doktora Burs Programı kapsamındaki desteklerinden dolayı BİDEB Daire Başkanlığı’na ve TÜBİTAK’a

yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Dünyada her şey için; uygarlık için, hayat için, başarı için en hakiki mürşit ilimdir; fendir.

Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK

Haziran 2023

Emin Ahmet YEŞİL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	4
2.1. MONOAMİN OKSİDAZ ENZİMİ	4
2.2. MONOAMİN OKSİDAZ ENZİMİNİN SAĞLIK AÇISINDAN ÖNEMİ ve HASTALIKLARLA İLİŞKİSİ	5
2.3. MONOAMİN OKSİDAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ ve GÖRÜNTÜLENMESİ.....	6
2.3.1. MAO İzofomları İçin Geliştirilen Florojenik Problemlerde Tercih Edilen Fonksiyonel Gruplar ve Gerçekleşen Reaksiyon Mekanizması	7
2.3.2. MAO İzofomları İçin Geliştirilen Florojenik Problemler.....	9
2.3.2. MAO İzofomları İçin Geliştirilen NIR Florojenik Problemler.....	13
2.3.2. Toplam MAO Aktivite Ölçümüne Yönelik Olarak Geliştirilen Florojenik Problemler.....	20
3. YÖNTEM	24
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR	24
3.2. KİMYASAL MADDELER	24
3.3. NM-T FLOROJENİK BİLEŞİĞİNİN SENTEZİ	25
3.3.1. 2-kloro-1-formil-3-hidroksimetilen sikloheksen Sentezi (2):.....	26
3.3.2. 1-metil-2,3,3-trimetil-3H-indolium iyodür Sentezi (6):	26

3.3.3. Cy7-Cl Sentezi (7):.....	26
3.3.4. NM-T Sentezi:.....	27
3.4. NM-T ESASLI YENİ SPEKTROFLOROMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ...	27
3.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	27
3.4.2. MAO Aktivite Tayini İçin Geliştirilen Yöntemin Uygulanması	28
3.4.3. İnhibitör Bileşiklerin Varlığında MAO Aktivite Tayini	28
3.4.4. Geliştirilen Spktroflorometrik Yöntemin Biyolojik Örneklerle Uygulanması.....	30
3.4.5. Hücre Ortamında NM-T Kullanılarak Konfokal Görüntüleme Sağlanması	30
4. BULGULAR	31
4.1. SENTEZLENEN NM-T FLOROJENİK PROBUNUN KİMYASAL YAPISININ	31
AYDINLATILMASI	31
4.1.1. HRMS Tekniği ile Kütle Spektrumunun İncelenmesi	31
4.1.2. ¹ H-NMR Tekniği ile Moleküldeki Proton Sayısının İncelenmesi.....	32
4.1.3. ¹³ C-NMR Tekniği ile Moleküldeki Karbon Sayısının İncelenmesi	33
4.1.4. FTIR Tekniği ile Moleküldeki Fonksiyonel Grupların İncelenmesi.....	34
4.2. TOPLAM MAO AKTİVİTE TAYİNİ	35
4.2.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi.....	35
4.2.2. Geliştirilen Yöntemle MAO İzofomları İçin Elde Edilen Emisyon Spektrumları	39
4.2.3. İnhibitör Bileşiklerin IC ₅₀ Değerlerinin Geliştirilen Yöntem ile Hesaplanması	43
4.2.4. Biyolojik Örneklerde MAO Aktivite Tayini	46
4.2.5. Hücre Ortamında MAO Aktivite Tayini ve Görüntülenmesi.....	49
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR.....	64
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	76
ETİK KURUL İZİN YAZISI	77
KURUM İZNİ YAZILARI	78
ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Monoamin Oksidaz enziminin FAD-peptid yapısı.	4
Şekil 2.2. Monoamin Oksidaz enzimi tarafından katalize edilen oksidasyon reaksiyonu.	5
Şekil 2.3. MAO izoformlarının yakından ilişkili olduğu hastalıklar	6
Şekil 2.4. Florojenik problemlerin molekül yapılarında kullanılan spesifik MAO analogları.....	8
Şekil 2.5. MAO izoformlarının üç boyutlu molekül yapıları	9
Şekil 2.6. NIR florojenik problemlerin sentezinde kullanılan florofor yapılar.	14
Şekil 2.7. MAO izoformlarına seçicilik gösteren NIR özellikli florojenik problemler.....	15
Şekil 2.8. MAO-Red-1 probuna ait a) molekül yapısı b) reaksiyon mekanizması.....	16
Şekil 2.9. MitoCy-NH ₂ probuna ait a) molekül yapısı b) reaksiyon mekanizması	17
Şekil 2.10. Kromen halkası esaslı florojenik proba ait a) reaksiyon mekanizması. b) hücre ortamında gerçekleştirilen floresans görüntüleme sonucu	18
Şekil 2.11. DHMP2 probuna ait a) molekül yapısı. b) hücre ortamında gerçekleştirilen floresans görüntüleme sonucu	19
Şekil 2.12. Rma-2 probuna ait a) molekül yapısı. b) hücre ortamında gerçekleştirilen floresans görüntüleme sonucu.....	20
Şekil 2.13. CR1 probuna ait a) molekül yapısı b) reaksiyon mekanizması.....	21
Şekil 2.14. Floresein esaslı florojenik probuna ait a) molekül yapısı. b) reaksiyon mekanizması	22
Şekil 2.15. OTNP-3-Piperazine probuna ait a) molekül yapısı b) reaksiyon mekanizması	23
Şekil 3.3. NM-T prob bileşiğinin çok aşamalı sentez şeması.....	25
Şekil 4.1: NM-T prob bileşiğinin HRMS spektrumu	31
Şekil 4.2: NM-T prob bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	32
Şekil 4.3: NM-T prob bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	33
Şekil 4.4: NM-T prob bileşiğinin FTIR spektrumu.....	34

Şekil 4.5: MAO-A ve MAO-B enzimleri varlığında NM-T probunun floresans intensitesinin pH' a bağlı olarak değişimi	35
Şekil 4.6: NM-T' nin floresans intensitesinin (a) MAO-A ve (b) MAO-B enzimleri varlığında zamana bağlı olarak değişimi	36
Şekil 4.7: NM-T' nin floresans intensitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.	36
Şekil 4.8: NM-T' nin floresans intensitesinin (a) gün içi ve (b) günler arası değişimi.	37
Şekil 4.9: Çözelti ortamında bulunan türlerin NM-T' nin floresans intensitesine etkisi.....	38
Şekil 4.10: Çeşitli analitlerin NM-T probunun floresans intensitesine etkisi.....	38
Şekil 4.11: MAO-A varlığında NM-T' nin emisyon spektrumu.	39
Şekil 4.12: Geliştirilen florometrik yöntemeye göre MAO-A' ın kalibrasyon grafiği.	39
Şekil 4.13: MAO-B varlığında NM-T' nin emisyon spektrumu.	40
Şekil 4.14: Geliştirilen florometrik yöntemeye göre MAO-B' nin kalibrasyon grafiği.....	41
Şekil 4.15: (a) NM-T. (b) NM-T + MAO-A. (c) NM-T + MAO-B çözeltilerine ait görünür bölge spektrumları.	42
Şekil 4.17: Klorgilinin konsantrasyona bağlı olarak % inhibisyon değerlerinin değişimi.	43
Şekil 4.18: Pargilinin konsantrasyona bağlı olarak % inhibisyon değerlerinin değişimi.	45
Şekil 4.19: Serum örneği içinde MAO-A' ın kalibrasyon eğrisi.	47
Şekil 4.20: Serum örneği içinde MAO-B' nin kalibrasyon eğrisi.	48
Şekil 4.5: A549 hücrelerinde gerçekleştirilen floresans görüntülemeye ait hücre görüntüleri a) 25 µM NM-T. b) 25 µM NM-T + 10 µg/mL MAO-A. c) 25 µM NM-T + 10 µg/mL MAO-B.	49
Şekil 5.1: NM-T ile MAO izoformları arasında gerçekleştiği öngörülen reaksiyon mekanizması.	57
Şekil 6.1 NM-T bileşiği üzerinde meydana gelen halka açılması.	61

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. MAO izoformlarının aktivite ölçümüne yönelik sentezlenen florojenik problemler....	10
Tablo 2.1 (devam): MAO izoformlarının aktivite ölçümüne yönelik sentezlenen florojenik problemler.....	11
Tablo 2.1 (devam): MAO izoformlarının aktivite ölçümüne yönelik sentezlenen florojenik problemler.....	12
Tablo 4.1. NM-T probunun geliştirilen yöntem MAO-A izoformu için elde edilen kalibrasyon doğru denklemi ve lineer aralığı.	40
Tablo 4.2. NM-T probunun geliştirilen yöntem ile MAO-B izoformu için elde edilen kalibrasyon doğru denklemi ve lineer aralığı.	41
Tablo 4.3. MAO-A ile MAO-B izoformlarının çözelti ortamına ayrı ayrı ve birlikte ilave edilmesi sonucunda beklenen ve deneysel olarak elde edilen floresans intensiteleri.....	42
Tablo 4.4. % inhibisyon – $C_{klorgilin}$ değerleri ve doğru denklemi.....	44
Tablo 4.5. % inhibisyon – $C_{pargilin}$ değerleri ve doğru denklemi.	45
Tablo 4.6. Sentetik serum örneğine, farklı konsantrasyonlarda MAO-A ilavesi sonucu geliştirilen spektrofotometrik yöntemle göre beklenen ve ölçülen floresans intensitelerinin karşılaştırılması.....	46
Tablo 4.7. Sentetik serum örneğine, farklı konsantrasyonlarda MAO-B ilavesi sonucu geliştirilen spektrofotometrik yöntemle göre beklenen ve ölçülen floresans intensitelerinin karşılaştırılması.....	47
Tablo 4.8. MAO-A ile MAO-B izoformlarının serum ortamına birlikte ilave edilmesi sonucunda beklenen ve deneysel olarak elde edilen floresans intensitelerinin karşılaştırılması.	48
Tablo 5.1. MAO aktivite tayini için sentezlenen NIR florojenik problemler.....	51
Tablo 5.2. Toplam MAO aktivite tayini için sentezlenen florojenik problemler.	54

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
λ_{em}	: Emisyon Dalgaboyu
λ_{ex}	: Eksitasyon Dalgaboyu
r	: Lineer Korelasyon Katsayısı
I	: İntesite
A	: Absorbans
μM	: Mikromolar
μL	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram

Kisaltmalar	Açıklama
MAO	: Monoamin Oksidaz
NIR	: Yakın Kızılötesi (Near Infrared)
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
MR	: Manyetik Rezonans
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
MS	: Kütle Spektroskopisi
LOD	: Dedeksiyon Limiti
LOQ	: Tayin Limiti
PBS	: Fostaf Tamponu

ÖZET

[DOKTORA TEZİ]

[TOPLAM MONOAMİN OKSİDAZ AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ İÇİN YENİ BİR FLOROJENİK PROB GELİŞTİRİLMESİ]

[Emin Ahmet YEŞİL]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı

[Danışman : Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK]

Monoamin oksidaz (MAO), merkezi sinir sistemindeki nörotransmitterlerin (dopamin, serotonin vb.) oksidasyonunda rol oynayan ve X kromozomundaki genler tarafından kodlanan bir enzimdir; A ve B olmak üzere iki ayrı izoform şeklinde bulunmaktadır. Bu izoformlar canlı dokulardaki dağılımları ve fizyolojik etkileri gibi birçok yönden farklılık gösterirler. MAO-A çoğunlukla plasenta, adipoz doku, tiroid bezi ve akciğerlerde bulunurken; MAO-B ise genel olarak beyin ve karaciğer hücrelerinde, nöronlarda, rahimde ve kalpte daha fazla dağılım göstermektedir. Yaş, travma ve stres faktörleri sonucunda enzim aktivitesinin yükselmesi ile çeşitli psikiyatrik (panik atak, kişilik bozukluğu vb.) ve nörolojik (şizofreni, anoreksiya, depresyon, Parkinson ve Alzheimer vb.) bozukluklar ortaya çıkmaktadır. MAO enzim aktivitesinin yüksekliğine bağlı olarak gelişen hastalıkların tanılmasında ve tedavi sürecinin takibinde invaziv olmayan, yüksek çözünürlük ve hassasiyette gerçek zamanlı görüntülemeye olanak tanıyan floresans esaslı; özellikle de elektromanyetik spektrumun yakın kızılötesi (near infrared, NIR) bölgesinde emisyon dalgaboyuna sahip, hücre ve dokulara derinlemesine penetrasyon sağlayabilen; ancak foto hasar oluşturmeyen NIR florojenik

probların kullanıldığı floresans görüntüleme teknikleri daha çok tercih edilmektedir. Bu tez çalışmasında, Cy7-Cl boyası ve piperazin molekülü arasında gerçekleştirilen kondenzasyon reaksiyonuyla toplam MAO enzim aktivite tayininin yüksek seçicilik ve duyarlılıkta gerçekleştirilmesine olanak sağlayan; sitotoksik olmayan yeni bir NIR florojenik prob (NM-T, $\lambda_{em} = 786$ nm) sentezlendi. Bileşiğin kimyasal karakterizasyonu FTIR, NMR ve MS teknikleriyle gerçekleştirildi. Sentezlenen prob (dedektör molekül) ile her bir enzim izoformu arasındaki reaksiyona bağlı olarak enzim konsantrasyonu artışı ile probun başlangıç floresans intensitesinde azalma gerçekleşti. MAO-A ve MAO-B izoformlarının ilavesiyle floresans şiddetindeki azalma miktarı esas alınarak kalibrasyon grafiği üzerinden lineer denklem oluşturuldu ve geliştirilen yöntemin korelasyon katsayıları sırasıyla (r) 0.998 ve 0.9944 olarak hesaplandı. Geliştirilen yöntemde MAO-A ve MAO-B izoformları için en düşük dedeksiyon limitleri (LOD) sırasıyla 1.88 ng/mL ve 9.15 ng/mL olarak bulundu. Sentetik serum çözeltilisine enzim standart katkısı yapılarak yöntemin geri kazanımı doğrulandı. Sonuç olarak, NIR dalgaboyunda, siyanin boyası esaslı, düşük LOD değerlerine sahip ve toplam MAO aktivite tayininde kullanılabilen; bu özellikleriyle literatürdekilere üstünlük getiren yeni bir florojenik prob sentezlendi ve yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirilerek toplam aktivite tayini başarıyla gerçekleştirildi. |

Haziran 2023 , 96 sayfa.

Anahtar kelimeler: MAO-A, MAO-B, NIR floresan prob, enzim aktivite ölçümü, biyosensör |

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

**DEVELOPMENT OF A NEW FLUOROGENIC PROBE FOR TOTAL MONOAMINE
OXIDASE ACTIVITY MEASUREMENT**

Emin Ahmet YEŞİL

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Organic Chemistry Programme

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK

Monoamine oxidase (MAO) is an enzyme that plays a role in the oxidation of neurotransmitters (dopamine, serotonin, etc.) in the central nervous system and is encoded by the genes on the X chromosome; It exists in two different isoforms, A and B. These isoforms differ in many aspects, such as their distribution in living tissues and their physiological effects. While MAO-A is mostly found in the placenta, adipose tissue, thyroid gland and lungs; MAO-B is generally more distributed in brain and liver cells, neurons, uterus and heart. As a result of the increase in enzyme activity as a result of age, trauma and stress factors, various psychiatric (panic attacks, personality disorders, etc.) and neurological (schizophrenia, anorexia, depression, Parkinson and Alzheimer's etc.) disorders occur. Fluorescence-based, which allows non-invasive, high resolution and sensitive real-time imaging in the diagnosis of diseases that develop due to high MAO enzyme activity and in the follow-up of the treatment process; It has an emission wavelength, especially in the near infrared (NIR) region of the electromagnetic spectrum, that can provide deep penetration into cells and tissues; however, fluorescence imaging techniques using NIR fluorogenic probes that do not cause

photodamage are more preferred. In this thesis, the condensation reaction between the Cy7-Cl dye and the piperazine molecule allows the determination of total MAO enzyme activity to be performed with high selectivity and sensitivity; A new non-cytotoxic NIR fluorogenic probe (NM-T, $\lambda_{em} = 786 \text{ nm}$) was synthesized. Chemical characterization of the compound was carried out by FTIR, NMR and MS techniques. Depending on the reaction between the synthesized probe (detector molecule) and each enzyme isoform, the initial fluorescence intensity of the probe decreased with the increase in enzyme concentration. Based on the amount of decrease in fluorescence intensity with the addition of MAO-A and MAO-B isoforms, a linear equation was created on the calibration chart and the correlation coefficients of the developed method were calculated as (r) 0.998 and 0.9944, respectively. In the developed method, the lowest detection limits (LOD) for MAO-A and MAO-B isoforms were found to be 1.88 ng/mL and 9.15 ng/mL, respectively. Recovery of the method was confirmed by adding enzyme standard to the synthetic serum solution. As a result; a new fluorogenic probe, which is superior to those in the literature with these features, was synthesized and a new spectrofluorometric method was developed to determine the total activity successfully. |

June 2023 , |96| pages.

Keywords: |MAO-A, MAO-B, NIR fluorescent probe, enzyme activity measurement, biosensor |

1. GİRİŞ

Monoamin oksidaz (MAO), amin grubu içeren dopamin, norepinefrin, serotonin, tiramin vb. nörotransmitterlerin oksidasyonunu katalizleyen flavoenzimdir [1-3]. Enzim, X kromozomu üzerindeki iki ayrı gen tarafından kodlanmakta ve birbirinden yapısal farklılıkları olan iki ayrı izoform şeklinde (MAO-A ve MAO-B) bulunmaktadır. Bu iki izoform, hücre ve dokulardaki dağılımları, inhibitörlere karşı duyarlılıkları, konfigürasyonları, çeşitli substratlar üzerindeki etkileri ve fizyolojik rolleri dahil olmak üzere birçok açıdan farklılık göstermektedir [4]. MAO-A formu çoğunlukla plasenta, tiroid bezi, akciğerler ve bağırsaklarda baskın olarak bulunurken, MAO-B izoformu merkezi sinir sisteminde yoğun bir şekilde bulunmaktadır. MAO-B izoformu ise genel olarak trombosit, beyin glial hücreleri, serotonerjik nöronlar, rahim, karaciğer hücreleri ve kalpte daha fazla dağılım göstermektedir.

Organizmada bulunması gereken MAO konsantrasyon dengesinin bozulması bireylerde kişilik bozukluğu, şizofreni, anoreksiya, depresyon, Parkinson ve Alzheimer gibi nörolojik ve psikiyatrik bozuklukların klinik bir semptom şeklinde ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Alzheimer bilişsel, davranışsal ve fonksiyonel durumu etkileyerek kademeli olarak ilerleyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Kesin bir tedavisi bulunmayan bu hastalıkta tedavi amacıyla kullanılan ilaçlar, hastalığın belirtilerini belli bir süre azaltmasına rağmen hastalık ölümle sonuçlanmaktadır. Alzheimer hastalarının çoğu 65 yaş ve üstü kişilerden oluşurken hastaların %4'ü 65 yaşının altındadır. Tanı alan hastaların hayatta kalma süresi sıklıkla 4-8 yıl kadardır [5]. Dünyada her sene 7.7 milyon yeni Alzheimer vakası tespit edilmektedir ve bu hastalıktan etkilenen insan sayısının 2030 yılında 75 milyona, 2050 yılında ise 145 milyona ulaşılacağı öngörülmektedir [6]. Sinapslarda nörotransmisyonun artırılması ile hastalığın gözlemlenen semptomlarının azaltılması amaçlanmaktadır [5]. Parkinson ise 1817 yılında yazılan 'Titreyen Felç Üzerine Bir Deneme' adlı ünlü monografıta İngiliz bilim insanı James Parkinson tarafından ilk defa nörolojik bir hastalık olarak tanımlanmıştır [7]. En yaygın görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır ve Dünya çapında hastalığa yakalanan kişi sayısının 2030 yılında 9.5 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir [8,9]. Hastalık beyinde çeşitli nedenlere bağlı nöronal kayıp yaşanması ve dopamin azalması ile ortaya çıkmaktadır; görülen

ilk belirti istirahat halinde el ya da ayakta istemsiz titremedir [10,11]. Nedeni tam olarak bilinemediğinden sadece semptomatik olarak tedavisi mevcuttur.

Monoamin oksidaz izoformları, nörotransmitter bir madde olan dopaminin metabolizmasından sorumlu olduğundan her iki hastalığın da tedavisinde MAO enzimlerinin inhibisyonu ile dopaminerjik nörotransmisyonun arttırılması hedeflenmektedir [12]. Bu amaçla kullanılan ilaçlar, enzim izoformlarının aktif bölgeleri ile etkileşime girerek enzimi güçlü bir şekilde inhibe etmektedir [13]. MAO inhibitörleri (MAOI) birçok nörolojik hastalığın, panik bozukluğunun, sosyal fobi gibi anksiyete bozukluklarının ve travma sonrası stres bozukluğunun tedavisinde reçete edilmektedir. MAO-A inhibitörleri daha çok depresyon tedavisinde; MAO-B inhibitörleri ise Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır [14].

MAO enzim izoformlarının ayrı ayrı veya toplam aktivitelerini değerlendirebilmek amacıyla tomografik (MR), immünolojik (immünoassay), spektrofotometrik (UV-Vis) ve spektrofluorometrik (floresans) yöntemler kullanılmaktadır [15-19]. Bu analiz teknikleri arasında floresan probaların kullanıldığı spektrofluorometrik yöntemler ve görüntüleme teknikleri, gerçek zamanlı analiz imkânı sunması, yüksek hassasiyet ve seçicilik vb. hususlarda sağlamış olduğu avantajlar dolayısıyla ön plana çıkmaktadır. Antrasen, kumarin, piren, 1,8-naftilimid, ksanten, BODIPY, floresein ve siyanin molekülleri floresan probaların geliştirilmesinde kullanılan platform boyalar olmakla birlikte yüksek absorpsiyon katsayısı, yüksek kuantum verimi, yakın kızılötesi bölgede (NIR) eksitasyon ve emisyon dalgaboyuna sahip olma, biyouyumluluk ve düşük toksisite gösterme gibi özellikleri nedeniyle siyanin boyları üzerinden sentezlenen floresan probalar ve geliştirilen analiz yöntemleri yoğun ilgi görmektedir. Ayrıca kızılötesi ışığın iyi penetrasyon derinliği nedeniyle uzun dalgaboylu probalar *in vitro* ve *in vivo* olarak yüksek duyarlılıkla analiz olanağı sunmaktadır. Özellikle hücresel görüntüleme ve teşhis yöntemlerinde kullanılacak olan 650 nm üzerindeki emisyon dalgaboyuna sahip NIR floresan probalar (*650-1000 nm aralığında floresans emisyonuna sahip bileşikler*), biyomoleküler otofloresansı önleme, canlı hücrelerdeki foto-hasarı en aza indirebilme ve nispeten daha derin dokulara nüfuz edebilme gibi önemli avantajlara sahiptir. Tanılama, biyogörüntüleme, fotodinamik terapi ve OLED teknolojisinin kullanıldığı potansiyel uygulamalarda tercih edilmektedirler. Nispeten daha kısa dalgaboylu (350 – 650 nm) probalar ile karşılaştırıldığında, NIR floresan probalar düşük uyarma enerjisine sahiptir ve dolayısıyla literatürdeki mevcut problemlere üstünlük sağlamaktadır. Bu nedenle NIR özelliğe

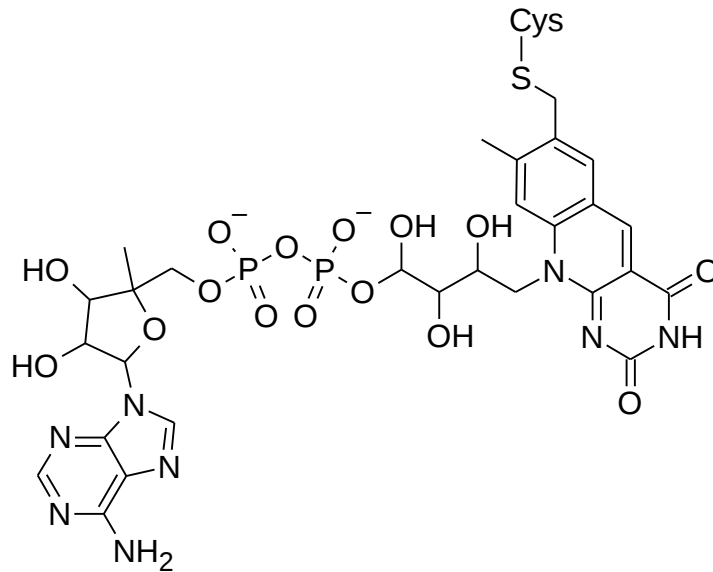
sahip florojenik prob moleküllerin geliştirilmesi, günümüzde artan bir popüleriteye sahiptir [20-39].

Bu tez çalışmasında 786 nm dalgaboyunda emisyonu (λ_{em}) sahip, hem MAO-A hem de MAO-B enzim izoformlarına yüksek oranda seçicilik gösteren, düşük dedeksiyon limitlerinde tayin gerçekleştirilmesine imkân tanıyan, siyanin boyası türevi yeni bir NIR florojenik prob (NM-T) sentezlendi. Bileşiğin kimyasal karakterizasyonu $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve MS teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi. Ayrıca sentezlenen NM-T florojenik probu kullanılarak MAO-A ve MAO-B enzim izoformlarının toplam aktivite miktarının yüksek hassasiyetle tayin edilebildiği yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirildi. Yöntemde pH ve sıcaklık parametrelerinin etkisi gözlemlenerek, aktivite tayininin ne kadar sürede gerçekleştirilebildiği belirlendi. Biyolojik ortamda bulunan bazı analitlerin (*anyon, katyon, aminoasit, biyotiol vb.*) sentezlenen florojenik proba girişim oluşturup oluşturmadığı araştırıldı. Enzim izoformları için spesifik olan inhibitörlerin (*klorjilin ve pargilin*) varlığında enzim aktivitesinin azalmasına bağlı olarak inhibitörlerin IC_{50} değerleri hesaplandı. Tez kapsam ve amacı doğrultusunda gerçekleştirilen işlemler değerlendirildiğinde, geliştirilen yöntemin her iki izoforma aynı anda seçicilik göstermesi ve NIR dalgaboyunda toplam aktivite tayinine olanak tanınması açısından literatürde ilk olma özelliği taşıdığı kanısına varılmıştır.

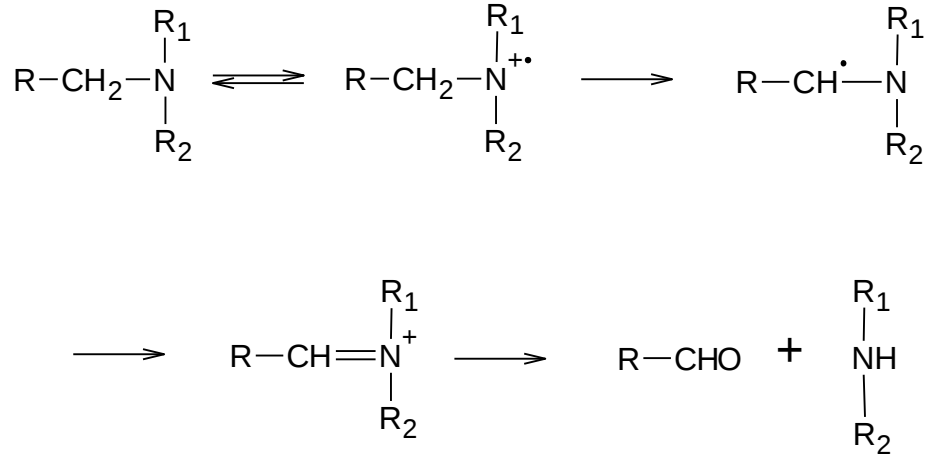
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. MONOAMİN OKSİDAZ ENZİMİ

Monoamin oksidaz enzimi (MAO, EC 1.4.3.4), toksik biyojen amin bileşiklerine karşı nörotransmitterlerin homeostazında ve korunmasında önemli rol oynayan flavin adenin dinükleotit (FAD) enzimidir (Şekil 2.1). Karaciğer hücreleri, bağırsak mukozası, akciğerler, trombositler ve bazı sinir uçlarında (adrenerjik, dopaminerjik, serotonerjik) yoğun olarak bulunurlar. Oksijen atomlarını H_2O_2 'ye indirgeyerek primer ve sekonder aminlerin oksidatif deaminasyon süreçlerinde katalizör olarak rol alırlar. Gerçekleşen reaksiyonda öncelikle enzimin flavin kısmına elektron transferi gerçekleşir ve radikal amin katyonu oluşur. Reaksiyonun devamında gerçekleşen elektron transferleri ile β -eliminasyonu sonucu NH_3 çıkışı ve aldehit oluşumu sağlanır (Şekil 2.2). A ve B olmak üzere iki tür izoform şeklinde bulunmaktadır [40]. Genel olarak mitokondrinin dış zarında bulunurlar ve insan vücudundaki amin bileşiklerinin metabolizmasında görev alırlar [41]. Her iki enzim izoformu yapısal olarak çok yüksek oranda benzerliğe sahip olsalar da pKa değerleri, biyolojik aktivite ve fonksiyonları, hücrelerde ve dokularda dağılımları gibi birçok yönden birbirinden farklılık gösterirler [42-44].



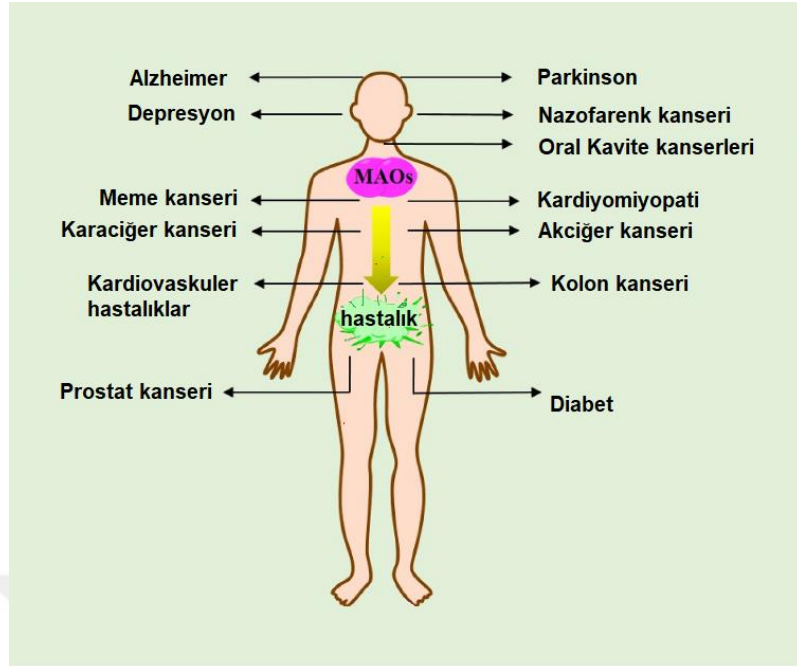
Şekil 2.1. Monoamin Oksidaz enziminin FAD-peptid yapısı.



Şekil 2.2. Monoamin Oksidaz enzimi tarafından katalize edilen oksidasyon reaksiyonu.

2.2. MONOAMİN OKSİDAZ ENZİMİNİN SAĞLIK AÇISINDAN ÖNEMİ ve HASTALIKLARLA İLİŞKİSİ

MAO izoformları insan hücre ve dokularındaki yaşamsal süreci doğrudan etkiler. Başta Parkinson, Alzheimer ve depresyon gibi nörolojik hastalıklar olmak üzere birçok kanser türleriyle ve diğer sistemik hastalıklarla yakından ilişkilidir [39,40] (Şekil 2.3). MAO-A izoformu daha çok nazofarengal epitel hücrelerde aktivite göstererek üst ve alt solunum yollarıyla birlikte göğüs - batin bölgelerinde hastalıkların oluşmasına sebebiyet verirken; MAO-B izoformu özellikle beyin bölgesinde yüksek aktivite göstererek Alzheimer, Parkinson ve depresyon gibi nörolojik hastalıkların oluşumunu tetiklemektedir. Bu nedenle enzim aktivitesinin tespiti, MAO izoformlarının patogenezinin ortaya çıkarılmasında ve farklı hastalıkların teşhisinde önemli rol oynamaktadır [45].



Şekil 2.3. MAO izoformlarının yakından ilişkili olduğu hastalıklar [39].

2.3. MONOAMİN OKSİDAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ ve GÖRÜNTÜLENMESİ

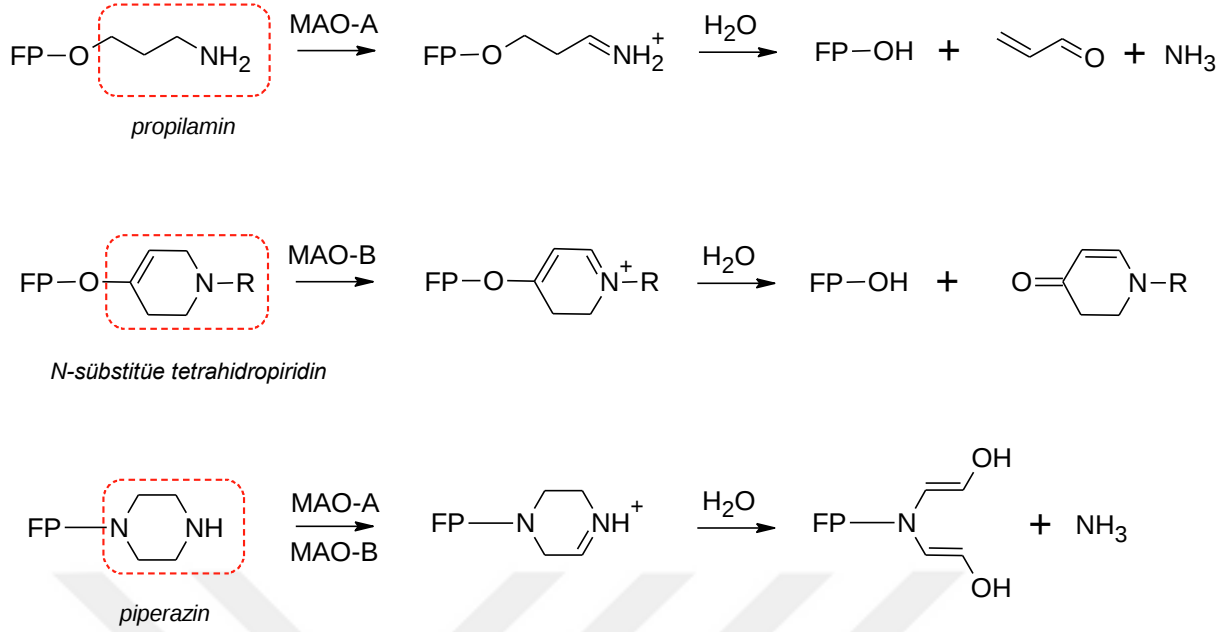
Monoamin Oksidaz aktivite ölçümüne yönelik olarak spektrofotometrik, tomografik (pozitron emisyon tomografisi, PET), immünolojik (ELISA) ve spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiştir [36]. Spektrofotometrik yöntemler uygulanırken kullanılan dedektör problemlerin kısa dalgaboyuna sahip olması ve *in vivo* ortamda gerçekleştirilen çalışmalarda hücre hasarına yol açmaları büyük bir dezavantaj oluştururken; PET olarak bilinen tomografik yöntemde kullanılan ^{19}F izotopu ise radyoaktif özelliği dolayısıyla yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır. İmmünolojik yöntem olarak bilinen ELISA kitleri hızlı bir şekilde kolorimetrik ölçüm yapılmasına olanak tanırken, yalnızca bir izoforma karşı seçicilik göstermekte ve toplam MAO aktivite tayinine imkân sunmamaktadır. Ayrıca yöntemin uygulamasında karşılaşılan zorluk, yüksek maliyet ve kullanılan dedektör yapıların kolay bozunur olmaları dezavantaj oluşturmaktadır [36,39]

1976 yılında Warshel ve ark. tarafından elektrostatik alanın lizozom aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, gerçekleşen yük transferinin bazı bileşiklerin protonlanmasına ve floresans yaymasına neden olduğu gözlenmiştir [46]. Bu çalışma ile

birlikte enzimler ve floresans arasında bir ilişki olduğu ve derinlemesine araştırılması gerektiği kanısına varılmıştır [47,48]. Küçük molekül yapıları, biyouyumluluk göstermeleri, kolay sentezlenebilme, hızlı yanıt verebilme vb. özelliklere sahip olmaları dolayısıyla florojenik problemlerin geliştirilmesi ve MAO izoformlarının aktivite ölçümünde kullanımları büyük bir ivme kazanmıştır [39]. İnvaziv olmayan florojenik problemler kullanılarak gerçekleştirilen görüntüleme işlemi, MAO izoformlarının hücre ve dokulardaki dağılımlarını gerçek zamanlı ve yüksek çözünürlükte görselleştirebilmek için diğer tekniklerden daha ziyade tercih edilmektedir. Özellikle belirli bir reaksiyon mekanizmasına dayalı olarak enzimatik aktivitenin ölçümüne ve görüntülenmesine olanak sağlayan florojenik problemlerin geliştirilmesi önemli bir araştırma alanı oluşumuna zemin hazırlamıştır [49].

2.3.1. MAO İzofomları İçin Geliştirilen Florojenik Problemlerde Tercih Edilen Fonksiyonel Gruplar ve Gerçekleşen Reaksiyon Mekanizması

Hedef biyomolekül ile spesifik bir şekilde etkileşim gösterecek florojenik prob sentezi oldukça zordur ve probun molekül yapısında tercih edilecek analite özgü fonksiyonel gruplar büyük önem taşımaktadır [50]. MAO izoformlarının aktivite tayini için sentezlenen florojenik problemlerin molekül yapısında genellikle 3-aminopropanol, N-süstitüe tetrahidropiridin ve piperazin gibi karakteristik gruplar kullanılmaktadır. Bu spesifik tanılama grupları, MAO izoformları ile reaksiyona girerek β -eliminasyonu sonucunda prob yapısından ayrılmakta ve sonuç olarak floresans intensitesinde değişim meydana gelmektedir [51,52] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Florojenik problemlerin molekül yapılarında kullanılan spesifik MAO analogları.

Molekül yapısı üzerinde belirli konumlarda serbest hidroksil grubu bulunduran floroforlara eterik bağ ile bağlanan 3-aminopropanol ve N-süstitüe tetrahidropiridin analogları üzerinden MAO enzim izoformlarına cevap veren çok sayıda florojenik prob sentezlenmiştir. Bu problemler MAO-A ve MAO-B izoformlarını seçici olarak tespit edebilmelerine rağmen, analiz ortamında bulunan H_2O_2 konsantrasyonundan ve analiz ortamının değişken pH aralığından olumsuz etkilenmektedir. Piperazin halkası ise florofor moleküle güçlü elektron akışı sağlayarak molekül içi yük transferini (ICT) hızlandırma, çözünürlüğü artırma ve toplam MAO aktivite tayinine olanak tanıma gibi avantajlar dolayısıyla yeni nesil MAO problemlerinde daha ziyade tercih edilmeye başlanmıştır [52].

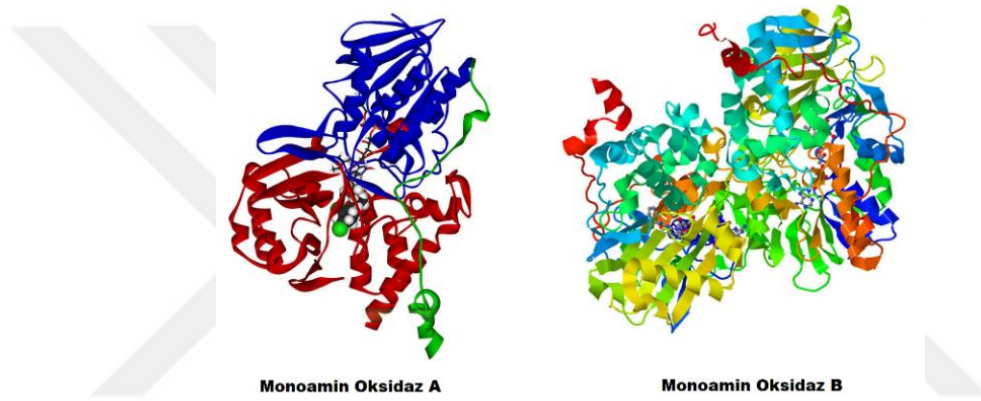
- **Molekül İçi Yük Transferi (ICT):** Molekül yapısı konjuge bağ açısından zengin olan floroforların uygun lokasyonlardan elektronca zengin fonksiyonel gruplar ile (elektron verici veya çekici) modifikasyonu, ışımaya yoluyla gerçekleştirilen uyarılma sonrasında molekülde dipol moment değişimiyle birlikte emisyon ve Stoke kaymasına neden olur. Sonuç olarak, florojenik problemin floresans intensitesinde artış veya azalma şeklinde değişim gözlenir. Sonuç olarak florojenik prob ve analit arasında gerçekleşecek reaksiyona bağlı olarak floresans intensitesindeki değişimden yola çıkılarak analiz verileri yorumlanır [53].

2.3.2. MAO İzofomları İçin Geliştirilen Florojenik Problar

Günümüzde MAO izofomlarının aktivite tayininde kullanılmak üzere sınırlı sayıda florojenik prob sentezlenmiştir. Mevcut florojenik problar incelendiğinde;

- ✓ MAO-A'nın spesifik aktivite tayinine
- ✓ MAO-B'nin spesifik aktivite tayinine
- ✓ MAO-A ve MAO-B'nin toplam aktivite tayinine

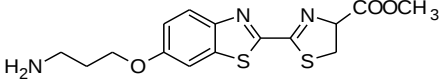
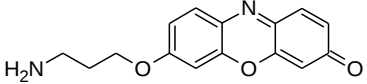
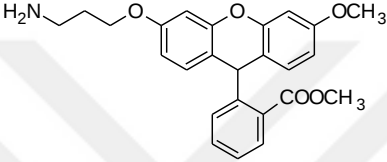
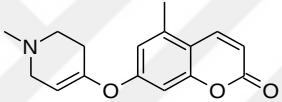
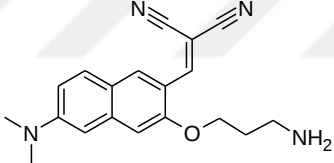
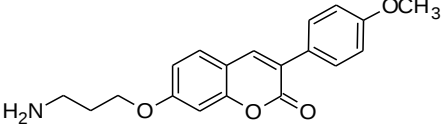
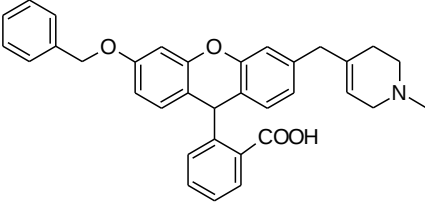
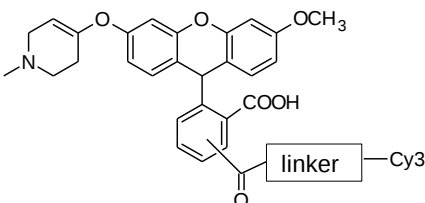
yönelik olarak, MAO izofomlarının molekül yapısındaki ve aktif bölgelerindeki farklılıklar esas alınarak geliştirildiği görülmektedir [54] (Şekil 2.5) (Tablo 2.1).



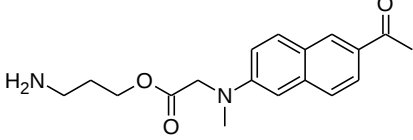
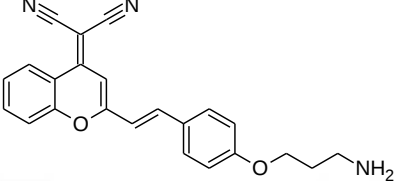
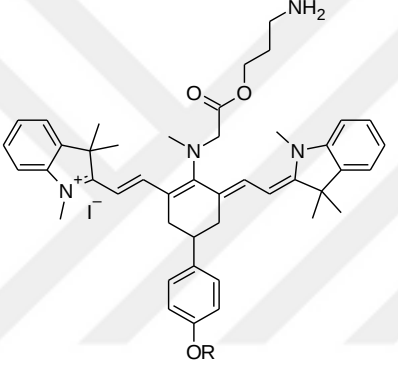
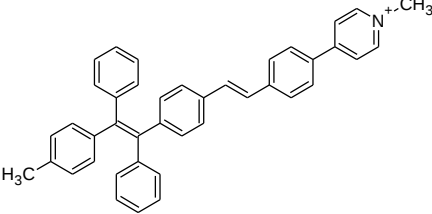
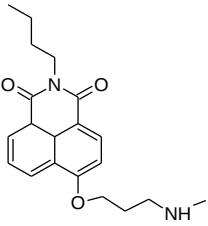
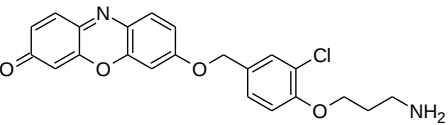
Şekil 2.5. MAO izofomlarının üç boyutlu molekül yapıları [54].

MAO izofomlarının aktivite ölçümüne yönelik olarak sentezlenen florojenik probların reaksiyon mekanizmaları incelenmiş ve çok sayıda probun yeterince spesifik veya duyarlı olmadığı gözlemlenmiştir [55,56].

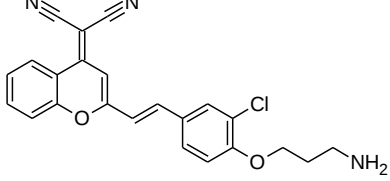
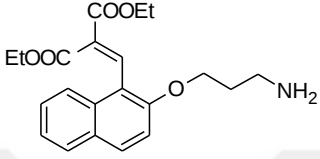
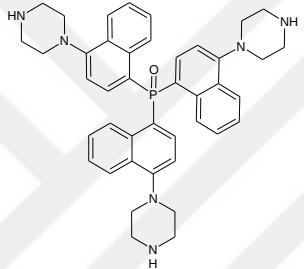
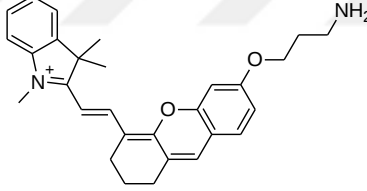
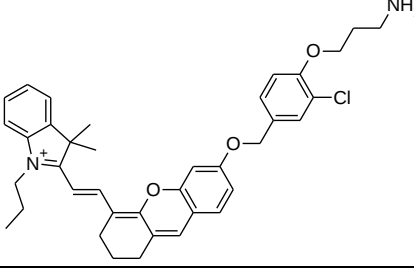
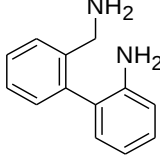
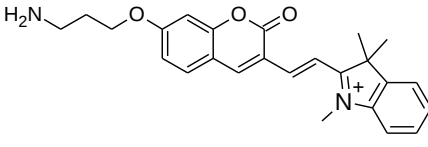
Tablo 2.1. MAO izoformlarının aktivite ölçümüne yönelik sentezlenen florojenik proplar.

Prob Molekül Yapısı	Eksitasyon Dalgaboyu (λ_{ex})	Emisyon Dalgaboyu (λ_{em})	Referans
	-	-	[57]
	544	590	[58]
	470	535	[59]
	360	460	[51]
	448	600	[60]
	345	465	[61]
	470	515	[62]
	475	570	[63]

Tablo 2.1 (devam): MAO izoformlarının aktivite ölçümüne yönelik sentezlenen florojenik probalar.

Prob Molekül Yapısı	Eksitasyon Dalgaboyu (λ_{ex})	Emisyon Dalgaboyu (λ_{em})	Referans
	304	449	[64]
	420	664	[65]
	730	790	[66]
	360	530	[67]
	454	550	[68]
	550	586	[69]

Tablo 2.1 (devam): MAO izoformlarının aktivite ölçümüne yönelik sentezlenen florojenik probalar.

Prob Molekül Yapısı	Eksitasyon Dalgaboyu (λ_{ex})	Emisyon Dalgaboyu (λ_{em})	Referans
	530	675	[70]
	360	456	[71]
	405	415	[52]
	680	710	[72]
	680	708	[73]
	490	520	[74]
	540	626	[75]

2.3.2. MAO İzofomları İçin Geliştirilen NIR Florojenik Problar

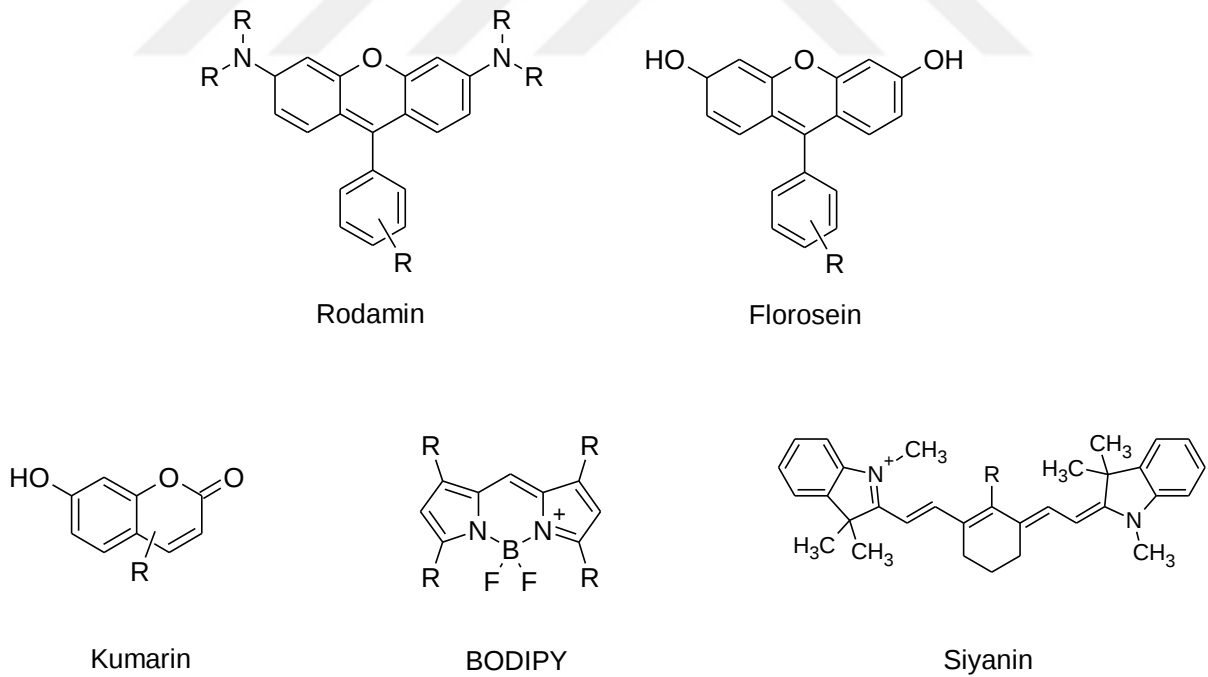
Elektromanyetik spektrumun yakın kızılötesi bölgesinde uyarılma ve emisyon değerlerine sahip NIR florojenik problar, floresan görüntüleme tekniği ile özellikle canlı metabolizmasındaki biyolojik süreçlerin gerçek zamanlı ve *in vivo* olarak incelenmesine olanak tanımaktadır. [76-79].

NIR floresans görüntüleme tekniği, aşağıda belirtilen nedenler dolayısıyla daha kısa dalgalılarına sahip florojenik problar kullanılarak uygulanan geleneksel yöntemlere göre daha avantajlıdır:

1. NIR bölgede kullanılan ışık kaynağının dalga boyu, görünür bölgedeki ışık kaynağının dalga boyundan daha uzundur. Bu nedenle, ışık kaynağının canlı hücre ve dokulara verdiği hasar önemli ölçüde azalır; biyolojik örneklerin yapısı bozulmadan görüntüleme işlemi gerçekleştirilir [80-82].
2. NIR florojenik problar derin penetrasyon özelliğine sahiptir. Canlıların yapısında temel bileşen olarak bulunan su ve lipidler geçirgen bir yapıya sahip olduklarından görünür bölgede gerçekleşen kısa dalgalı ışımları absorbe ederek görüntüleme etkinliğinin azalmasına neden olurlar. Ancak, NIR florojenik problar su ve lipidlerin arka planında kalan hücre ve dokulara nüfuz ederek biyolojik örneklerde derinlemesine görüntü alınmasına olanak tanır [83-87].
3. Yüksek yapıli biyomoleküllerin üretmiş olduğu otofloresanstan bağımsız olarak *in vivo* ortamda görüntü alınmasını uygun hale getirir. Sitokrom, miyoglobin, hemoglobin başta olmak üzere birçok doku ve biyomolekülün, kimyasal yapılarından kaynaklı olarak oluşan otofloresans ile görüntüleme için tercih edilen kısa dalgalıya sahip florojenik probların emisyon dalgalıyü örtüşme gösterebilir. Böyle bir durumda görüntüleme performansı azalır. NIR florojenik problar ise yüksek oranda sinyal – gürültü oluşturur ve otofloresanstan etkilenmeksizin görüntü alınmasını sağlar [88-91].
4. NIR florojenik problar, yüksek floresans verimine ve kararlılığına sahiptir. Bu nedenle işlem yapılan biyolojik örneklerde yüksek çözünürlükte ve eş zamanlı olarak hassas bir şekilde görüntüleme yapılmasını mümkün hale getirir [92].

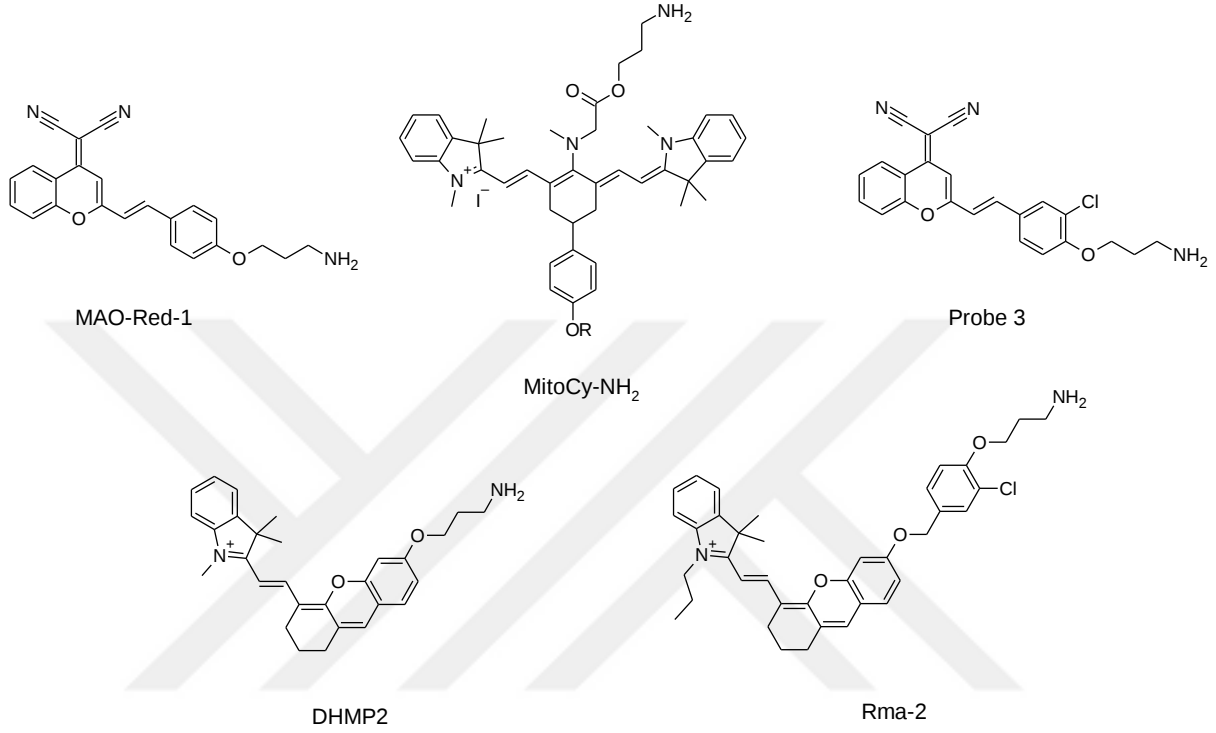
NIR florojenik problemler kullanılarak gerçekleştirilen görüntüleme yöntemleri, biyolojik örneklerdeki aktif moleküllerin tespitinde popüler bir metot haline gelmiştir. Bu kapsamda, hedef biyomolekül ile spesifik olarak kısa sürede etkileşim sağlayan, yüksek çözünürlüğe sahip, yerinde görüntülemeye ve tanılamaya imkan tanıyan NIR florojenik problemler tasarlanarak sentezlenmiştir. Özellikle Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların erken teşhisi için, MAO enzim izoformlarının sahip olduğu aktivitenin bu tür problemler kullanılarak *in vivo* ortamda hassas bir şekilde tayin edilmesi uygulanması zorunlu bir strateji haline gelmiştir [93-96].

BODIPY, florosein, rodamin, kumarin ve siyanin boya yapıları, derin penetrasyon ve non-sitotoksik özellikleri sayesinde gerçek zamanlı olarak biyomoleküllerin analizini mümkün hale getirdiğinden, NIR florojenik problemlerin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılan floroforlardır [97-99] (Şekil 2.6). Ancak, *in vivo* olarak gerçekleştirilen görüntüleme işlemlerinde kullanılan NIR florojenik problemlerin büyük çoğunluğunda fotooksidasyon stabilitesi iyileştirilmiş siyanin türevleri tercih edilmektedir [100].



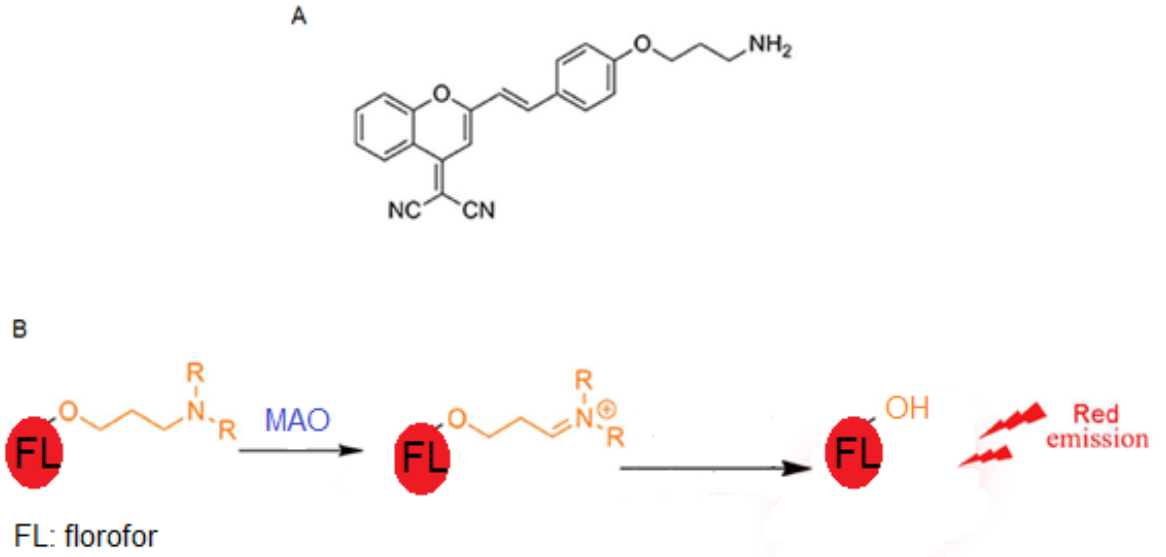
Şekil 2.6. NIR florojenik problemlerin sentezinde kullanılan florofor yapıları.

Literatüre bakıldığında, MAO izoformlarının aktivite ölçümü için geliştirilen sadece 5 tane NIR florojenik prob olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.7). Molekül yapıları incelendiğinde bu florojenik problemlerin 3-aminopropanol grubu ile türevlendirilerek MAO izoformlarına seçicilik kazandırıldığı görülmektedir.



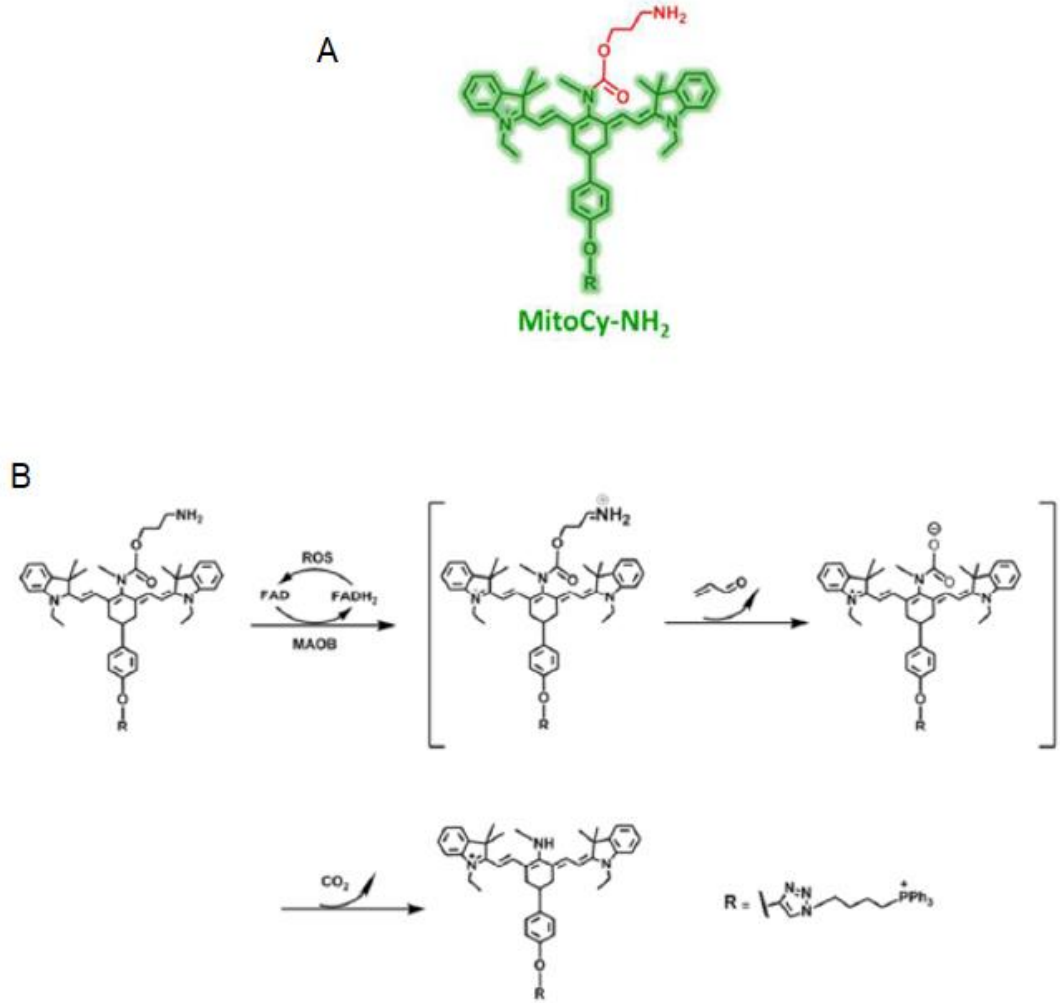
Şekil 2.7. MAO izoformlarına seçicilik gösteren NIR özellikli florojenik problemler.

Li ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada MAO-Red-1 olarak adlandırılan florojenik prob geliştirilmiştir. Bu bileşiğin kimyasal yapısı incelendiğinde 664 nm’de emisyon dalgaboyuna sahip olan florofor üzerindeki serbest OH grubu üzerinden 3-aminopropanol yapısı eterik olarak bağlanarak MAO izoformlarının aktivite ölçümüne yönelik NIR florojenik prob geliştirilmiştir. Probun enzim çözeltileri ile 37 °C’de 1 saatlik inkübasyonu sonucunda floresans intensitesinde artış gözlenmiştir (Şekil 2.8). Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, MAO-Red-1 probunun MAO-B izoformuna seçici olarak yanıt verdiği görülmüş; LOD değeri ise 1.2 µg/mL olarak hesaplanmıştır. [65].



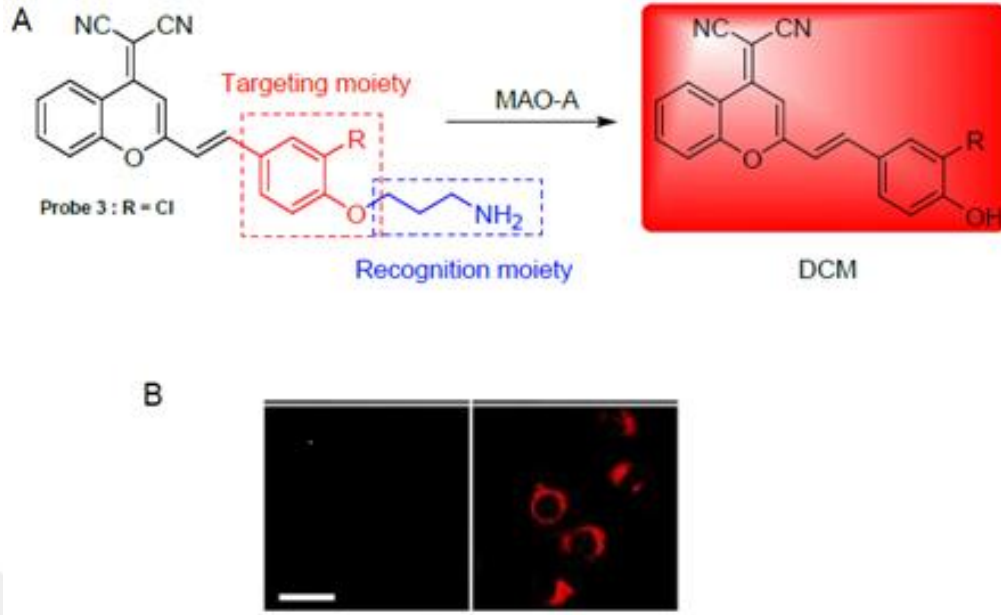
Şekil 2.8. MAO-Red-1 probuna ait a) molekül yapısı b) reaksiyon mekanizması [65].

Wang ve ark. tarafından heptametinin siyanin floroforunun türevlendirilmesiyle geliştirilen prob yapısı Mito-CyNH₂ olarak adlandırılmıştır. Prob yapısı incelendiğinde MAO izoformlarına seçicilik oluşturmak üzere 3-aminopropanol grubu kullanılmıştır. Probun, enzim çözeltileri ile 37 °C’de 120 dakikalık inkübasyonu sonucunda 750 nm’de floresans artışı ve 791 nm’de floresans azalması gözlenmiştir (Şekil 2.9). Yönteme ilişkin olarak LOD değeri belirtilmezken, geliştirilen probun MAO-B izoformuna seçici olarak yanıt verdiği ifade edilmiştir [66].



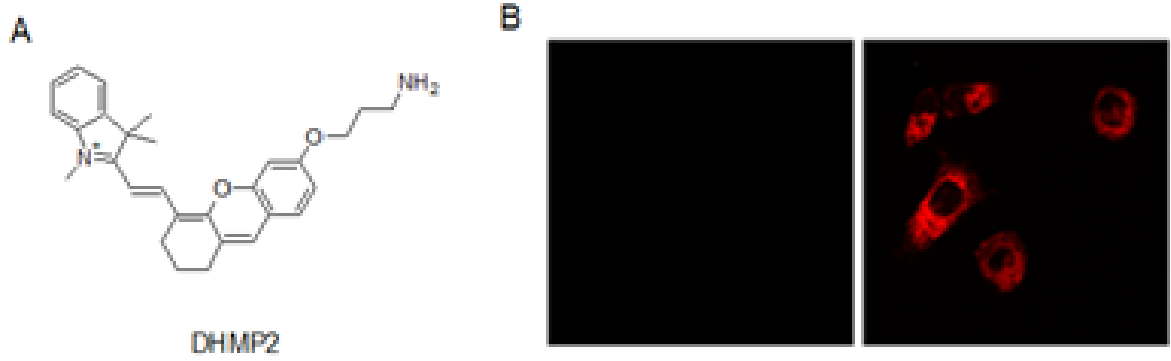
Şekil 2.9. MitoCy-NH₂ probuna ait a) molekül yapısı b) reaksiyon mekanizması [66].

Yang ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise klorjilin inhibitör bileşiğinin molekül yapısından yaklaşımla molekül yapısında klor atomu ihtiva eden kromen halkası esaslı florojenik prob sentezlenmiştir. Bileşiğin kimyasal yapısı incelendiğinde 675 nm’de emisyon dalgaboyuna sahip olan florofor üzerindeki serbest OH grubu üzerinden 3-aminopropanol yapısı eterik olarak bağlanarak MAO izoformlarının aktivite ölçümüne yönelik NIR florojenik prob geliştirilmiştir. Probenin enzim çözeltileri ile 37 °C’de 1 saatlik inkübasyonu sonucunda floresans intensitesinde artış gözlenmiştir (Şekil 2.10). Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, Probe 3 probunun MAO-A izoformuna seçici olarak yanıt verdiği görülmüş; LOD değeri ise 2.6 ng/mL olarak hesaplanmıştır. [70].



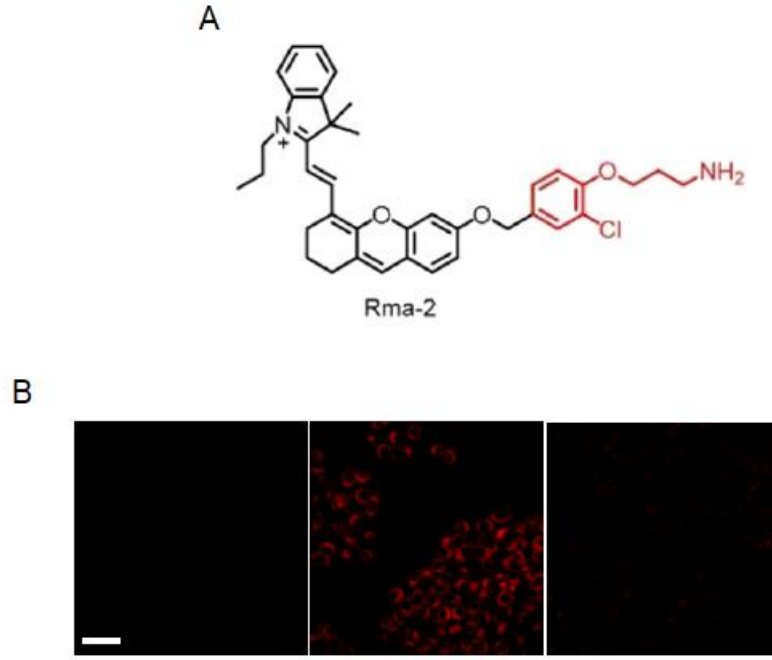
Şekil 2.10. Kromen halkası esaslı florojenik proba ait a) reaksiyon mekanizması. b) hücre ortamında gerçekleştirilen floresans görüntüleme sonucu [70].

Yang ve ark. tarafından yeni nesil siyanin floroforu kullanılarak sentezlenen DHMP2 olarak adlandırılan florojenik prob yapısında da serbest OH grubu üzerinden 3-aminopropanol eterik olarak bağlanmış ve MAO izoformlarına karşı seçicilik sağlanmıştır. Probun enzim çözeltileri ile 37 °C’de 12 saatlik inkübasyonu sonucunda 710 nm dalgaboyunda floresans intensitesinde artış gözlenmiştir (Şekil 2.11). Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, DHMP2 probunun MAO-A izoformuna seçici olarak yanıt verdiği görülmüş; LOD değeri ise 13 ng/mL olarak hesaplanmıştır. [72].



Şekil 2.11. DHMP2 probuna ait a) molekül yapısı. b) hücre ortamında gerçekleştirilen floresans görüntüleme sonucu [72].

Yeni nesil siyanin floroforunu kullanarak benzer bir çalışma Shang ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Rma-2 olarak adlandırılan florojenik prob, molekül yapısında klor atomu ihtiva etmektedir. Bileşiğin kimyasal yapısı incelendiğinde 708 nm’de emisyon dalgaboyuna sahip olan florofor üzerindeki serbest OH grubu üzerinden 3-aminopropanol yapısı eterik olarak bağlanarak MAO izoformlarının aktivite ölçümüne yönelik NIR florojenik prob geliştirilmiştir. Proben enzim çözeltileri ile 37 °C’de 1 saatlik inkübasyonu sonucunda floresans intensitesinde artış gözlenmiştir (Şekil 2.12). Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, Rma-2 probunun MAO-A izoformuna seçici olarak yanıt verdiği görülmüş; LOD değeri ise 4.5 ng/mL olarak hesaplanmıştır. [73].

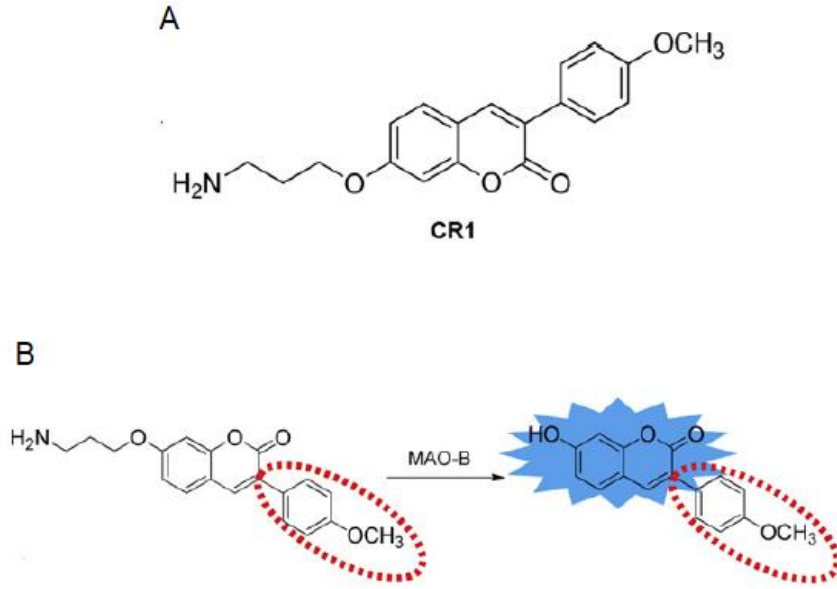


Şekil 2.12. Rma-2 probuna ait a) molekül yapısı. b) hücre ortamında gerçekleştirilen floresans görüntüleme sonucu [73].

2.3.2. Toplam MAO Aktivite Ölçümüne Yönelik Olarak Geliştirilen Florojenik Problar

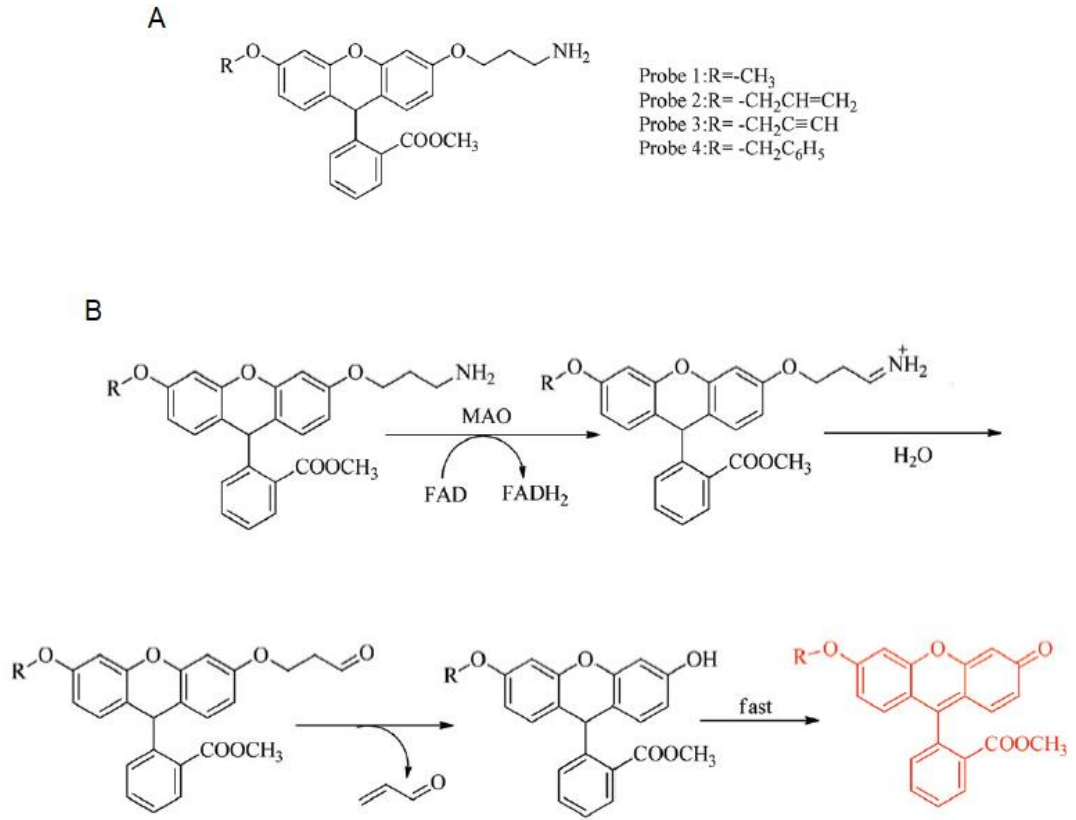
MAO izoformlarının spesifik olarak aktivite ölçümüne olanak tanıyan florojenik problemlerin yanı sıra klinik uygulamalarda daha ziyade tercih edilen ve ticarileşme potansiyeli daha yüksek olan toplam MAO tespiti için geliştirilen sınırlı sayıda prob bulunmaktadır.

2012 yılında Zhang ve ark. tarafından sentezlenen ve CR1 olarak adlandırılan kumarin türevi florojenik probun hem MAO-A hem de MAO-B izoformlarına toplamsal olarak yanıt verdiği rapor edilmiştir. Kumarin floroforu üzerindeki serbest OH grubu üzerinden 3-aminopropanol yapısı eterik olarak moleküle bağlanarak MAO izoformlarına seçici hale getirilmiştir ve enzim çözeltileri ile 37 °C'de 1 dakikalık inkübasyon sonucunda 465 nm dalgaboyunda floresans intensitesinde artış gözlenmiştir (Şekil 2.13) [61].



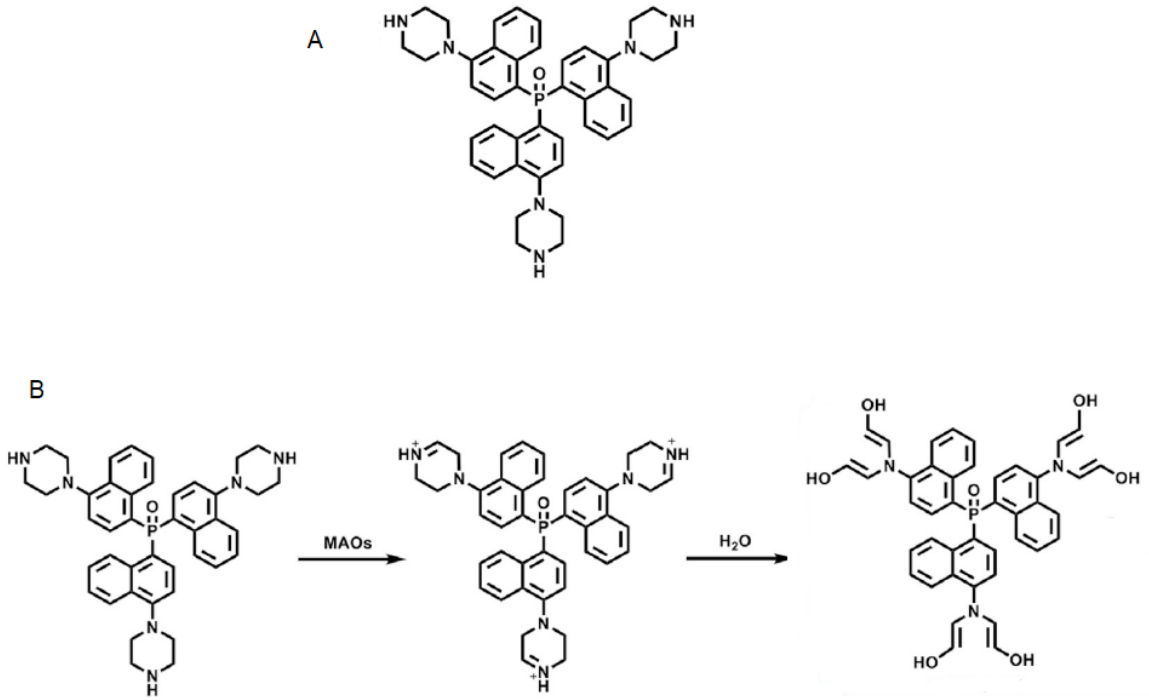
Şekil 2.13. CR1 probuna ait a) molekül yapısı b) reaksiyon mekanizması [61].

Li ve ark. tarafından 2013 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada florosein türevi florofofor üzerindeki serbest OH grubu üzerinden 3-aminopropanol yapısı eterik olarak moleküle bağlanarak MAO izoformlarına seçici hale getirilmiştir. Molekül yapısındaki R grubuna göre çeşitli şekillerde numaralandırılan bileşiklerin enzim çözeltileri ile 37 °C’de 1 saatlik inkübasyonu sonucunda 535 nm dalgaboyunda floresans intensitesinde artış gözlenmiştir (Şekil 2.14). Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, floresein esaslı probun MAO-A ve MAO-B izoformuna toplam olarak yanıt verdiği görülmüş; LOD değeri ise MAO-A için 3.5 µg/mL; MAO-B için 6 µg/mL olarak hesaplanmıştır. [59].



Şekil 2.14. Floresin esaslı florojenik probuna ait a) molekül yapısı. b) reaksiyon mekanizması [59].

2020 yılında Zhang ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise triarilfosfin yapısı yeni bir tür florofofor sentezinde kullanılmıştır. Merkezde yer alan fosfor ve oksijen gruplarının elektron çekici özelliği ve aromatik halkalarda bulunan konjuge π bağlarının etkisiyle gerçekleşen ICT mekanizması gereğince toplam MAO aktivite ölçümüne olanak sağlayan OTNP-3-Piperazine adlı florojenik probun kimyasal yapısı incelendiğinde MAO seçiciliği oluşturabilmek için piperazin halkasının kullanıldığı görülmektedir. Enzim çözeltileri ile 37 °C’de 1 dakikalık inkübasyon sonucunda 415 nm dalgaboyunda floresans intensitesinde artış tespit edilmiştir. (Şekil 2.15) [52].



Şekil 2.15. OTNP-3-Piperazine probuna ait a) molekül yapısı b) reaksiyon mekanizması [52].

Bu tez çalışmasında mevcut tüm problardan farklı olarak, NIR bölgede emisyon dalgaboyuna ve non-sitotoksik özelliğe sahip siyanin floroforu ve MAO enzim izoformlarının toplamsal olarak aktivite ölçümünü mümkün kılan piperazin grubu bir araya getirilerek, interferan analitler varlığında dahi yüksek seçicilikte toplam MAO aktivite ölçümü için yeni bir NIR florojenik prob sentezlendi. Ayrıca, sentezlenen prob kullanılarak düşük dedeksiyon limitlerinde analize imkan tanıyan yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirildi. Değişken konsantrasyon, süre, pH ve sıcaklık parametrelerinde analizler tekrarlanarak yöntem optimize edildi. MAO-A ve MAO-B için inhibitör bileşiklerin enzim inhibisyon aktivitelerini (IC_{50}) hesaplamak için klorjilin (MAO-A inhibitörü) ve pargilin (MAO-B inhibitörü) kullanıldı. Mevcut yöntemler ve tez kapsamında geliştirilen yeni yöntem uygulanarak elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak yöntemin doğrulanması sağlandı.

3. YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

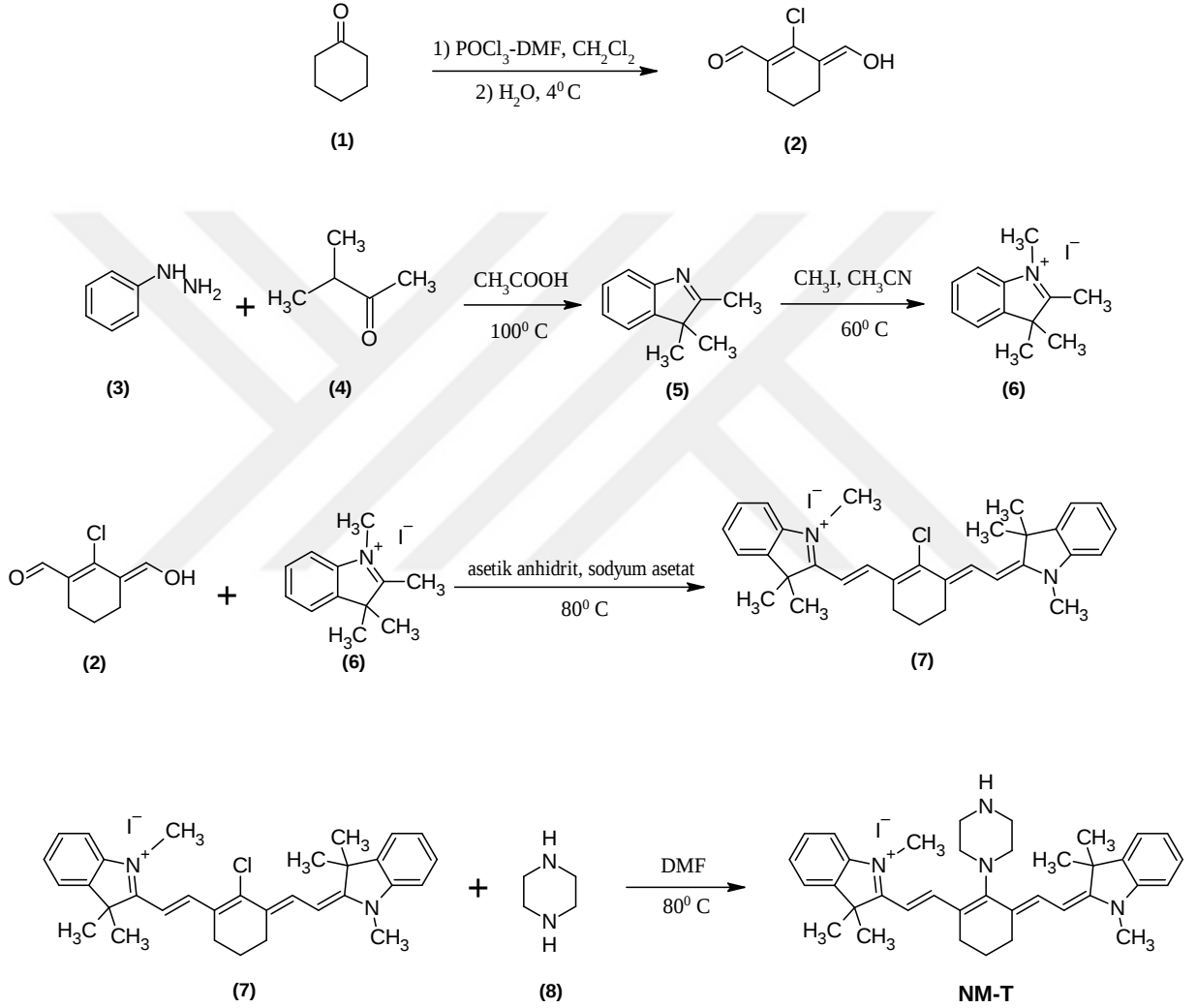
Tez çalışmasındaki sentez reaksiyonlarında karıştırma ve ısıtma işlemi için Velp Are marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, solventlerin uzaklaştırılmasında Büchi R200 marka rotary evaporatör, bileşiklerin molekül kütlelerinin belirlenmesinde Thermo Scientific™ marka Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap model spektrometre, molekülün proton ve karbon yapılarının karakterizasyonu için Varian marka VNMRS 600 MHz model spektrometre, çözeltilerin hazırlanmasında kullanılacak madde miktarlarının tartımı için RADWAG marka Was 220X model analitik terazi, çözeltilerin homojen karışımını sağlamak için Velp marka vorteks karıştırıcı ve çözeltisi hazırlanacak katı maddelerin çözünmesi için Sonorex marka ultrasonik banyo, inkübasyon işlemleri için Memmert marka su banyosu, bidistile su üretimi için Millipore Simpax 1 Synergy 185 bidistile su sistemi, 10-100 ve 100-1000 µL'lik Eppendorf marka mikropipet, absorbans ölçümlerinde Varian Cary 100 Bio model UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için Hellma marka kuartz küvet, florometrik yöntem geliştirilmesinde intensite ölçümleri için VARIAN Cary Eclipse spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için Hellma marka kuartz küvet kullanılmıştır.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Fosfor oksiklorür (POCl_3), dimetilformamid (DMF), etanol (EtOH), asetonitril (CH_3CN), potasyum karbonat (K_2CO_3), sikloheksanon, metil iyodür (CH_3I), asetik anhidrit, 3-metil-2-butanon, piperazin, potasyum klorür (KCl), sodyum klorür (NaCl), magnezyum klorür (MgCl_2), kalsiyum klorür (CaCl_2), bakır (II) klorür (CuCl_2), sodyum nitrat (NaNO_3), sodyum bisülfid (NaHSO_3), hidrojen peroksit (H_2O_2), üre, sakaroz, D-glukoz, L-alanin, askorbik asit, D-glutatyon (GSH), sistein (Cys), homosistein (HCys), N-asetil sistein (NAC), monoamin oksidaz A (rekombinant), monoamin oksidaz B (rekombinant), klorjilin, pargilin, serum. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

3.3. NM-T FLOROJENİK BİLEŞİĞİNİN SENTEZİ

MAO toplam aktivite tayini için sentezlenen ve NM-T olarak adlandırılan florojenik bileşik çok basamaklı reaksiyon prosedürü üzerinden elde edildi. Genel sentez şeması aşağıda belirtildiği gibidir (Şekil 3.3):



Şekil 3.3. NM-T prob bileşiğinin çok aşamalı sentez şeması.

3.3.1. 2-kloro-1-formil-3-hidroksimetilen siklohekzen Sentezi (2):

250 mL'lik balon içerisinde soğutulan 20 mL diklormetan ve 15 mL dimetilformamid (DMF) solvent karışımına, damlatma hunisi yardımıyla fosfor oksiklorür (POCl_3 , 130 mmol, 12 mL) ilave edildi. Bu karışım oda sıcaklığında ve azot atmosferinde yaklaşık olarak 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Sarımsı renkli Haack Reaktifi'nin oluştuğu gözlemlendi ve tekrar 0 °C'ye soğutuldu. Soğuk karışım üzerine siklohekzanon (**1**; 50 mmol, 5.2 mL) ilave edildi ve 4 saat boyunca reflüks edildi. Bu sürenin sonunda, 500 mL buz-su karışımına döküldü. Yaklaşık olarak 12 saat boyunca soğukta bekletildi. Oluşan sarı renkli çökelti süzüldü. Soğuk su ile iyice yıkandı ve kurutuldu. Verim: %85, 7.2 g, sarı renkli katı [101].

3.3.2. 1-metil-2,3,3-trimetil-3H-indolyum iyodür Sentezi (6):

40 mL asetik asit içerisine fenil hidrazin (**3**, 74 mmol, 7.3 mL) ve 3-metil-2-bütanon (**4**; 74 mmol, 8 mL) ilave edildi. 3 saat boyunca 100 °C'de reflüks edildi. Süre sonunda su ve diklorometan ilave edilerek istenilen ürünün organik faza geçmesi sağlandı. Ayırma hunisinde solvent fazı alındı. Solvent vakumda uzaklaştırıldı. 2,3,3-trimetil-3H-indol (**5**) bileşiği koyu bordo renkli sıvı olarak elde edildi. Herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmaksızın, maddenin üzerine 100 mL asetonitril ve yaklaşık 15 mL metil iyodür ilave edildi. 55 °C'de 6 saat boyunca reflüks edildi. Çökelti miktarının artması için balon dolapta soğutuldu. Süzülerek ürün alındı ve kurutuldu. Verim: %60, 12 g, somon renkli kristal [102-103].

3.3.3. Cy7-Cl Sentezi (7):

2-kloro-1-formil-3-hidroksimetilen siklohekzen (**2**; 55 mmol, 9.75 g), 1-metil-2,3,3-trimetil-3H-indolyum iyodür (**6**; 110 mmol, 33 g) ve sodyum asetat (110 mmol, 10 g) tartılarak balon içerisindeki 150 mL asetik anhidrit üzerine ilave edildi. Azot gazı varlığında, 80 °C'de 1 saat reflüks edildi. İşlem sonrası balon soğutulduğunda parlak renkli yeşil kristallerin çöktüğü gözlemlendi. Çökelti süzülerek alındı. Sırasıyla distile su, bikarbonat ve eter ile yıkandı. Etüvde 50 °C'de bir gece boyunca kurutuldu. Verim: %80, 26 g, yeşil renkli kristal [101,104].

3.3.4. NM-T Sentezi:

50 mL hacimli yuvarlak dipli balon içerisinde bulunan 10 ml DMF çözücüsünde Cy7-Cl'in (7; 1 mmol, 600 mg) çözünmesi sağlandıktan sonra reaksiyon ortamına piperazin (8; 4 mmol; 340 mg) ilave edildi. Yeşil renkli çözelti, yağ banyosunda 80 °C'de 5 saat reflüks edildi. Bu işlem sırasında çözelti rengi laciverte dönüştü. Oda sıcaklığına getirilen karışımın üzerine 150 mL dietil eter ilave edildiğinde çökeltme meydana geldi ve oluşan yeşil-sarı renkli kristaller süzülerek izole edildi. Kolon kromatografisi uygulanarak ürün saflaştırıldı. Verim: %55, 360 mg, yeşil-sarı renkli katı [105].

3.4. NM-T ESASLI YENİ SPEKTROFLOROMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

3.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1.1. MAO-A ve MAO-B Enzim Çözeltilerinin Hazırlanması

Geliştirilen yöntemde kullanılmak üzere MAO-A ve MAO-B enzim çalışma çözeltileri, 5 mg/mL konsantrasyona sahip rekombinant enzim çözeltilerinden 0.1 mL alınarak fosfat tamponu (PBS) ile son hacim 10 mL olacak şekilde seyreltilti. Son konsantrasyon 50 µg/mL olacak şekilde günlük olarak hazırlandı.

3.4.1.2. PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Tablet formda bulunan PBS 1 tablet/200 mL bidestile su olacak şekilde günlük olarak hazırlandı. 0.05 M HCl çözeltisi kullanılarak pH:7.5'e ayarlandı.

3.4.1.3. NM-T Florojenik Prob Çözeltisinin Hazırlanması

Sentezi gerçekleştirilen NM-T bileşiğinin (M_w : 660.67 g/mol) 10^{-3} M stok çözeltisi, tartılarak alınan 16.52 mg'nın 25 mL etanolde çözünmesiyle hazırlandı (ko-solvent olarak 2 mL diklormetan kullanıldı).

3.4.1.4. Çeşitli Analit Çözeltilerinin Hazırlanması

Prob bileşik üzerine girişim oluşturabilecek ve canlı hücrelerin/dokuların yapısında bulunabilecek bazı analitlerin (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , NO_3^- , HSO_3^- , H_2O_2 , Üre, Sakkaroz, Glukoz, L-Alanin, Askorbik Asit, Glutasyon (GSH), Sistein (Cys), Homosistein (HCys), N-Asetil Sistein (NAc)) 10^{-3} M stok çözeltileri 10 mL hacimde bidestile su kullanılarak hazırlandı.

3.4.1.5. İnhibitör Çözeltilerinin Hazırlanması

MAO-A inhibitörü olarak kullanılan klorjilin'in (M_w : 308.63 g/mol) 10^{-3} M stok çözeltisi 7.71 mg'nın 25 mL PBS'te çözünmesiyle hazırlandı. MAO-B inhibitörü olarak kullanılan pargilin'in (M_w : 195.69 g/mol) 10^{-3} M stok çözeltisi 4.89 mg'nın 25 mL PBS'de çözünmesiyle hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden seyreltmeler yapılarak analizler sırasında ilaveler gerçekleştirildi.

3.4.2. MAO Aktivite Tayini İçin Geliştirilen Yöntemin Uygulanması

10^{-5} M NM-T prob çözeltisinden 500 μ L içeren vida kapaklı bir tüpe x μ L MAO-A, MAO-B veya MAO-A + MAO-B enzim çözeltileri eklenerek son hacim (V_T) 3 mL olacak şekilde PBS ilave edildi. Vorteks ile karıştırılan çözeltiler, önceden 37 °C'ye ayarlanan çalkalamalı su banyosunda 120 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde oda koşullarında ve karanlıkta 5 dakika bekletilen analiz çözeltilerinin floresans intensitelerindeki değişim λ_{em} : 786 nm dalgaboyunda kaydedildi. Blank çözelti, enzim izoformlarının yerine aynı hacimde PBS eklenmesiyle hazırlandı. Kalibrasyon grafiği oluşturulurken, azalan floresans intensite değerleri artan konsantrasyonda ilave edilen MAO-A ve MAO-B izoformlarına karşı kaydedildi.

Çözelti Hazırlama Prosedürü:

$500 \mu\text{L NM-T} + x \mu\text{L enzim çözeltisi} + (2500 - x) \mu\text{L PBS}$

[Blank: $500 \mu\text{L NM-T} + 2500 \mu\text{L PBS}$]

3.4.3. İnhibitör Bileşiklerin Varlığında MAO Aktivite Tayini

MAO-A için: Vida kapaklı cam tüp içine sırasıyla 10^{-5} M konsantrasyondaki NM-T prob çözeltisinden 500 μ L; 50 μ g/mL konsantrasyondaki MAO-A enzim çözeltisinden 500 μ L ve MAO-A inhibitörü olan 10^{-6} M konsantrasyondaki “klorjilin” çözeltisinden değişen hacimlerde eklendi. Son hacim (V_T) 3 mL olacak şekilde pH:7.5 PBS tampon çözeltisi ilave edildi. Vorteks ile karıştırılan çözeltiler, önceden 37 °C'ye ayarlanan çalkalamalı su banyosunda 120 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde oda koşullarında ve karanlıkta 5 dakika bekletilen analiz çözeltilerinin floresans intensitelerindeki değişim λ_{em} : 786 nm dalgaboyunda kaydedildi. Blank çözelti, inhibitör yerine aynı hacimde PBS eklenmesiyle hazırlandı. Bu yöntemle inhibitör bileşiğin konsantrasyon düzeyinde % inhibisyon değerleri Eşitlik 4.1'e göre belirlendi. % inhibisyon değerleri ile $C_{\text{klorjilin}}$ değerleri kullanılarak çizilen grafikten elde

edilen doğru denklemi kullanılarak inhibitör bileşiğin enzim inhibisyon aktivitesi IC_{50} değeri olarak hesaplandı.

Çözelti Hazırlama Prosedürü:

$500 \mu L \text{ NM-T} + 500 \mu L \text{ MAO-A} + x \mu L \text{ Klorjilin} + (2000 - x) \mu L \text{ PBS}$

[Blank: $500 \mu L \text{ NM-T} + 500 \mu L \text{ MAO-A} + 2000 \mu L \text{ PBS}$]

MAO-B için: Vida kapaklı cam tüp içine sırasıyla 10^{-5} M konsantrasyondaki NM-T prob çözeltisinden $500 \mu L$; $50 \mu g/mL$ konsantrasyondaki MAO-B enzim çözeltisinden $500 \mu L$ ve MAO-B inhibitörü olan 10^{-6} M konsantrasyondaki “pargilin” çözeltisinden değişen hacimlerde eklendi. Son hacim (V_T) 3 mL olacak şekilde $pH:7.5$ PBS tampon çözeltisi ilave edildi. Vorteks ile karıştırılan çözeltiler, önceden $37^\circ C$ 'ye ayarlanan çalkalamalı su banyosunda 120 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde oda koşullarında ve karanlıkta 5 dakika bekletilen analiz çözeltilerinin floresans intensitelerindeki değişim λ_{em} : 786 nm dalgaboyunda kaydedildi. Blank çözelti, inhibitör yerine aynı hacimde PBS eklenmesiyle hazırlandı. Bu yöntemle inhibitör bileşiğin konsantrasyon düzeyinde % inhibisyon değerleri Eşitlik 4.1'e göre belirlendi. % inhibisyon değerleri ile $C_{pargilin}$ değerleri kullanılarak çizilen grafikten elde edilen doğru denklemi kullanılarak inhibitör bileşiğin enzim inhibisyon aktivitesi IC_{50} değeri olarak hesaplandı.

Çözelti Hazırlama Prosedürü:

$500 \mu L \text{ NM-T} + 500 \mu L \text{ MAO-B} + x \mu L \text{ Pargilin} + (2000 - x) \mu L \text{ PBS}$

[Blank: $500 \mu L \text{ NM-T} + 500 \mu L \text{ MAO-B} + 2000 \mu L \text{ PBS}$]

3.4.4. Geliştirilen Spktroflorometrik Yöntemin Biyolojik Örneklerle Uygulanması

Yöntemin kesinliğini ve geri kazanımını tespit etmek amacıyla sentetik seruma bilinen konsantrasyonlarda enzim çözeltileri eklendi. Geliştirilen yöntem ile MAO-A, MAO-B ve MAO-A + MAO-B aktiviteleri belirlendi.

Vida kapaklı cam tüp içine sırasıyla 10^{-5} M konsantrasyondaki NM-T prob çözeltisinden 500 μ L; 1:10 oranında seyreltilen sentetik serum çözeltisinden 100 μ L ve 50 μ g/mL konsantrasyondaki MAO-A, MAO-B veya MAO-A + MAO-B enzim çözeltilerinden değişen hacimlerde eklendi. Son hacim (V_T) 3 mL olacak şekilde pH:7.5 PBS tampon çözeltisi ilave edildi. Vorteks ile karıştırılan çözeltiler, önceden 37 °C'ye ayarlanan çalkalamalı su banyosunda 120 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde oda koşullarında ve karanlıkta 5 dakika bekletilen analiz çözeltilerinin floresans intensitelerindeki değişim λ_{em} : 786 nm dalgaboyunda kaydedildi. Blank çözelti, enzim yerine aynı hacimde PBS eklenmesiyle hazırlandı. Azalan floresans intensite değerleri, serum içeriğine artan konsantrasyonda ilave edilen enzim çözeltilerilerine karşı kaydedildi.

Çözelti Hazırlama Prosedürü:

$500 \mu\text{L NM-T} + 100 \mu\text{L Serum} + x \mu\text{L enzim çözeltisi} + (2400 - x) \mu\text{L PBS}$

[Blank: 500 μ L NM-T + 100 μ L Serum + 2400 μ L PBS]

Bu yöntemle, sentetik serum varlığında ve yokluğundaki intensite değerleri karşılaştırılarak yöntemin geri kazanımı hesaplandı. Yöntem kesinliği ortaya kondu.

3.4.5. Hücre Ortamında NM-T Kullanılarak Konfokal Görüntüleme Sağlanması

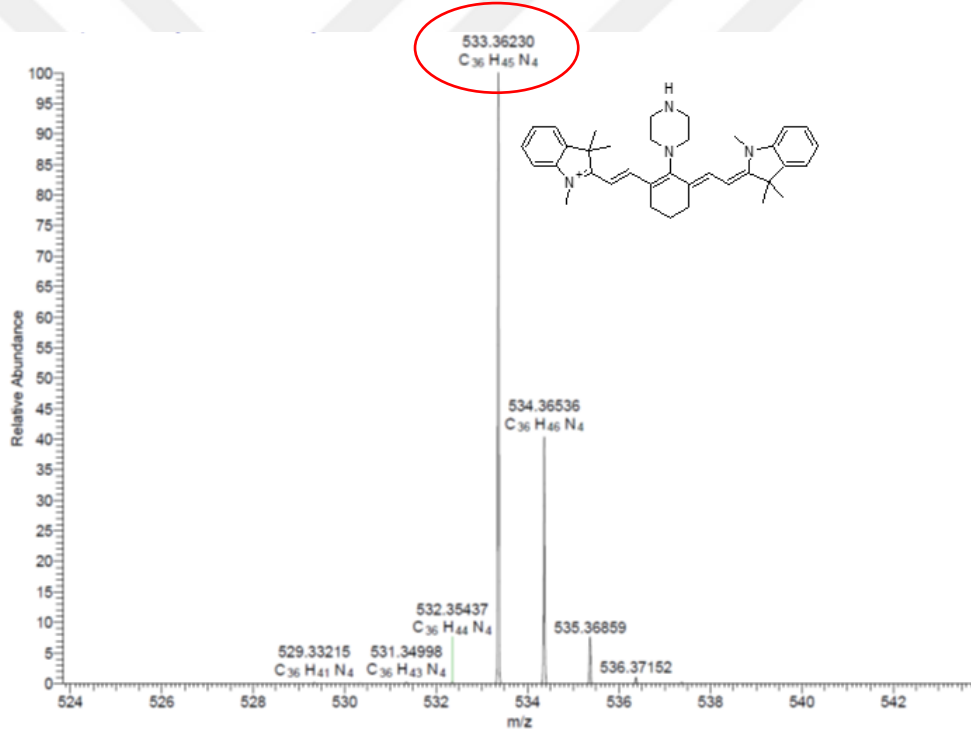
Sentezlenen NM-T florojenik prob çözeltisi kullanılarak hücre ortamında MAO aktivite tayini görselleştirildi. A549 hücrelerinin kültürlenmesi için modifiye Dulbecco ortamı (DMEM) kullanıldı. İşlem öncesinde yıkanan hücreler başlangıçta 15 dakika boyunca %5 CO₂ gazı altında 25 μ M NM-T ile; ardından 10 μ g/mL konsantrasyonda MAO-A ve MAO-B enzim çözeltileri 37 °C'de inkübe edildi. Fazla miktardaki prob ve enzim çözeltilerinin uzaklaştırılması için PBS ile 5 defa yıkama yapıldı. Olympus FV1000-IX85 konfokal mikroskop kullanılarak 750 - 800 nm aralığında görüntüler kaydedildi.

4. BULGULAR

4.1. SENTEZLENEN NM-T FLOROJENİK PROBUNUN KİMYASAL YAPISININ AYDINLATILMASI

MAO enzim aktivitesinin tayini için tez kapsamında sentezlenen NM-T prob bileşiğinin kimyasal yapısı MS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve FTIR teknikleri uygulanarak elde edilen veriler doğrultusunda aydınlatılmıştır.

4.1.1. HRMS Tekniği ile Kütle Spektrumunun İncelenmesi

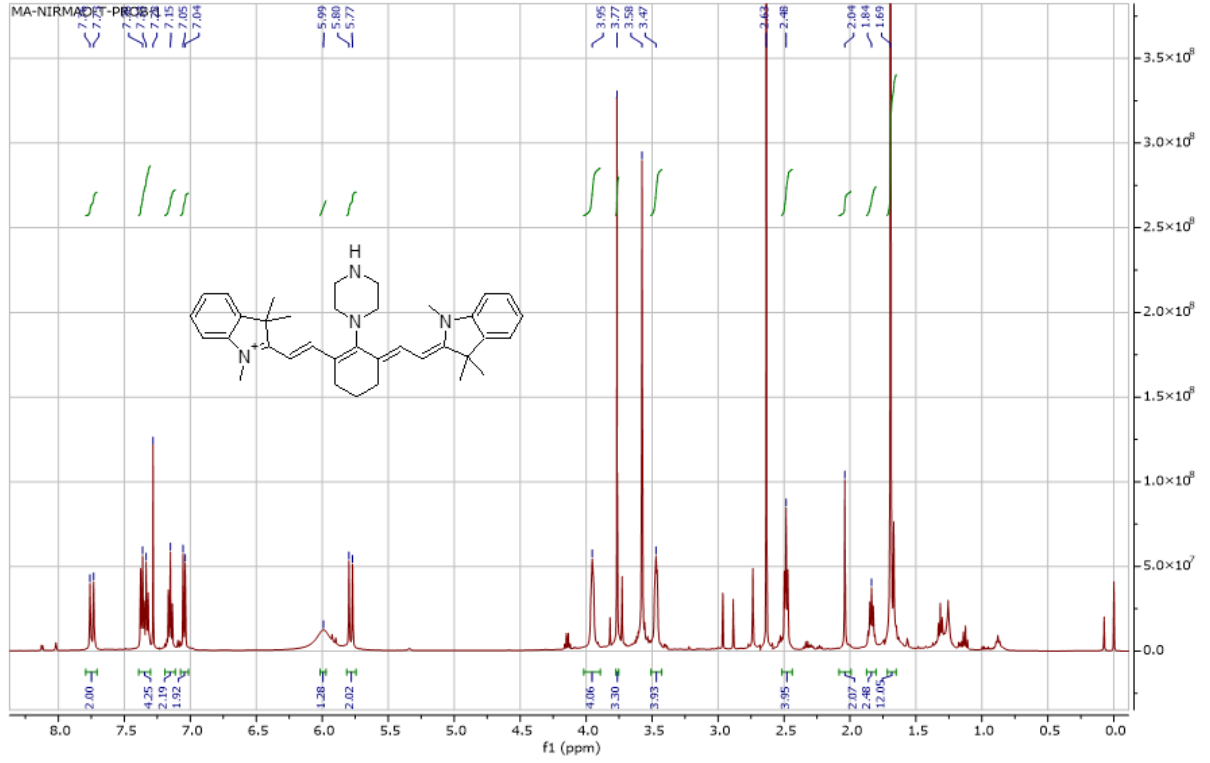


Tahmini Kütle	Bulunan Kütle (m/z)	Molekül Formülü
533.3623	533.7687	$\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{N}_4$

HRMS (+ESI): m/z $[\text{M}-\text{I}]^+ = 533.3623 \text{ g/mol}$

Şekil 4.1: NM-T prob bileşiğinin HRMS spektrumu.

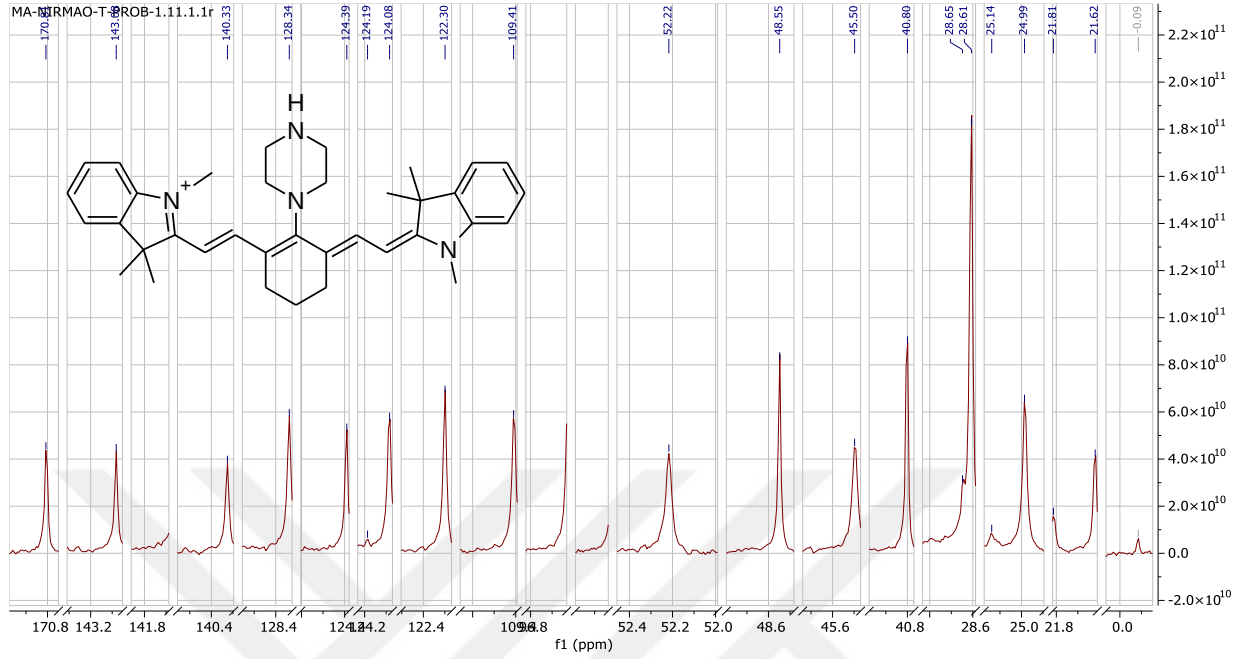
4.1.2. ^1H -NMR Tekniği ile Moleküldeki Proton Sayısının İncelenmesi



Şekil 4.2: NM-T prob bileşiminin ^1H -NMR spektrumu.

NM-T, ^1H -NMR (500 mHz, CDCl_3): δ 7.75 (d, J = 13.6 Hz, 2H), 7.39 – 7.31 (m, 5H), 7.15 (td, J = 7.5, 0.9 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 5.96 (d, J = 32.8 Hz, 7H), 5.78 (d, J = 13.5 Hz, 2H), 3.95 (t, J = 5.1 Hz, 4H), 3.77 (s, 4H), 3.58 (s, 7H), 3.47 (dd, J = 6.0, 3.6 Hz, 4H), 2.63 (s, 6H), 2.48 (t, J = 6.5 Hz, 5H), 2.04 (s, 2H), 1.84 (p, J = 6.4 Hz, 3H), 1.69 (s, 15H), 1.67 (s, 4H).

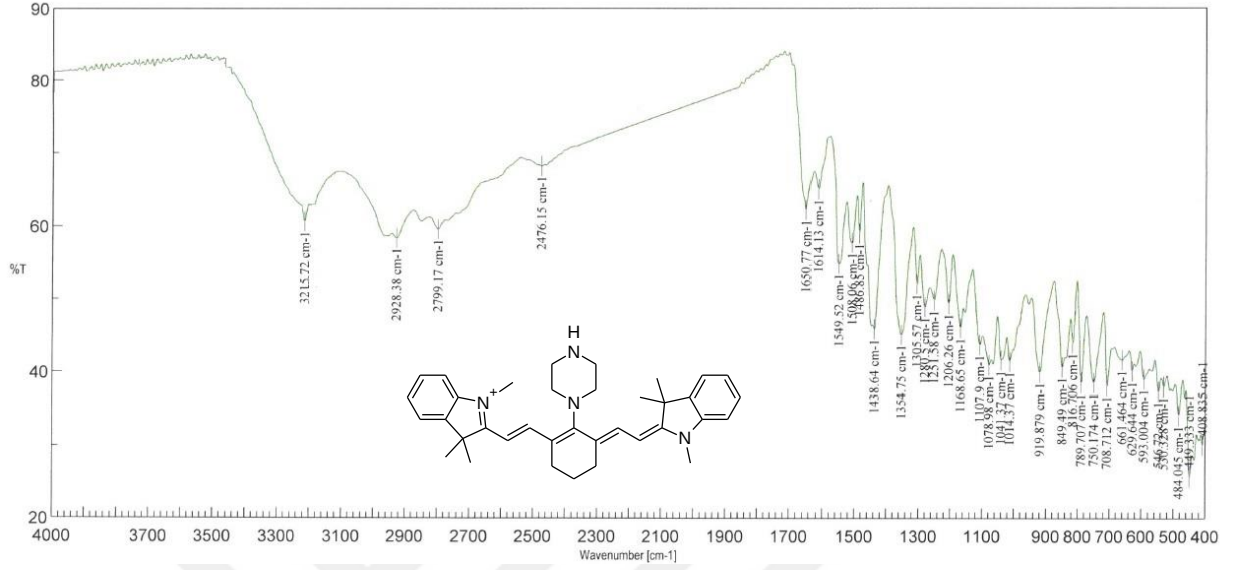
4.1.3. ^{13}C -NMR Tekniği ile Moleküldeki Karbon Sayısının İncelenmesi



Şekil 4.3: NM-T prob bileşiminin ^{13}C -NMR spektrumu.

NM-T, ^{13}C -NMR (500 mHz, CDCl_3): δ 175.10, 171.79, 170.81, 170.31, 143.08, 141.65, 141.57, 140.33, 128.65, 128.34, 126.06, 124.39, 124.19, 124.08, 122.30, 121.89, 109.77, 109.41, 97.74, 96.63, 77.26, 77.01, 76.76, 63.68, 63.66, 54.62, 54.18, 52.22, 48.55, 48.20, 45.50, 40.80, 36.47, 35.24, 31.51, 31.20, 29.61, 28.65, 28.61, 25.14, 24.99, 22.60, 21.81, 21.62, 15.12, 14.04, 9.33.

4.1.4. FTIR Tekniği ile Moleküldeki Fonksiyonel Grupların İncelenmesi



Şekil 4.4: NM-T prob bileşiminin FTIR spektrumu.

NM-T, FTIR (ν , cm^{-1}): 3215 (NH), 2928 ($\text{C-H}_{\text{aromatik}}$), 2853, 1359 ($\text{C-H}_{\text{alifatik}}$), 1650 ($\text{C=C}_{\text{aromatik}}$), 1549 ($\text{C=C}_{\text{alken}}$), 1438 (C=N), 1200-700 (C-C ve C-N titreşimleri), 900-700 (NH ve benzen halkaları için düzlem eğilim titreşimleri).

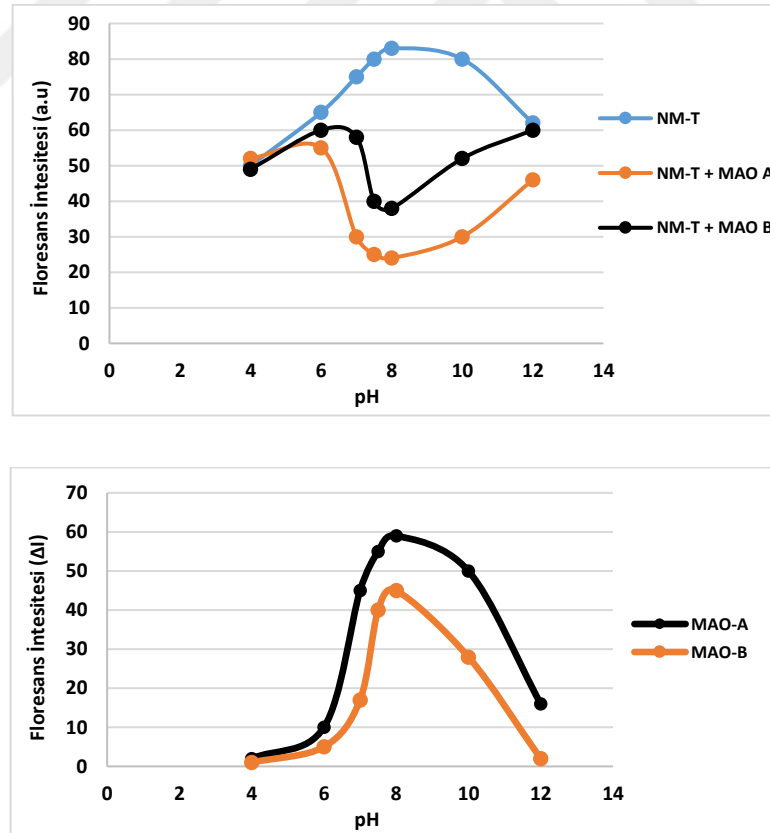
4.2. TOPLAM MAO AKTİVİTE TAYİNİ

4.2.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi

Tez kapsamında sentezlenen ve 10^{-5} M konsantrasyondaki NM-T çözeltisinden 3 mL alınarak kuvars küvet içerisine aktarıldı. Spektrofluorometrede gerçekleştirilen ön tarama işleminde eksitasyon dalgaboyu (λ_{ex}) 720 nm; emisyon dalgaboyu (λ_{em}) 786 nm olarak tespit edildi. Böylece NM-T prob bileşiğinin NIR floresans özelliğe sahip olduğu gösterildi.

4.2.1.1. pH Değerinin Belirlenmesi

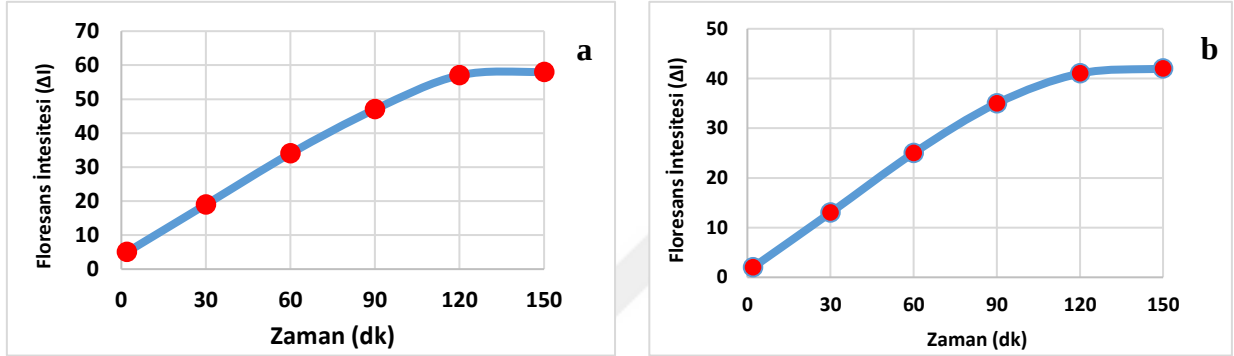
MAO enzim izoformlarının aktivite gösterdiği pH değerlerine bağlı olarak, tek başına ve enzim varlığında NM-T prob bileşiğinin floresans intensitesindeki değişim incelendi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde 7 – 9 pH aralığında, prob ve enzim türlerinin etkileşiminin en fazla oranda gerçekleştiği tespit edildi. Bu doğrultuda geliştirilen yöntemin optimum pH değeri 7.4 olarak (*fizyolojik değer*) belirlendi. Tampon çözelti olarak PBS tercih edildi.



Şekil 4.5: MAO-A ve MAO-B enzimleri varlığında NM-T probunun floresans intensitesinin pH'a bağlı olarak değişimi

4.2.1.2. İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

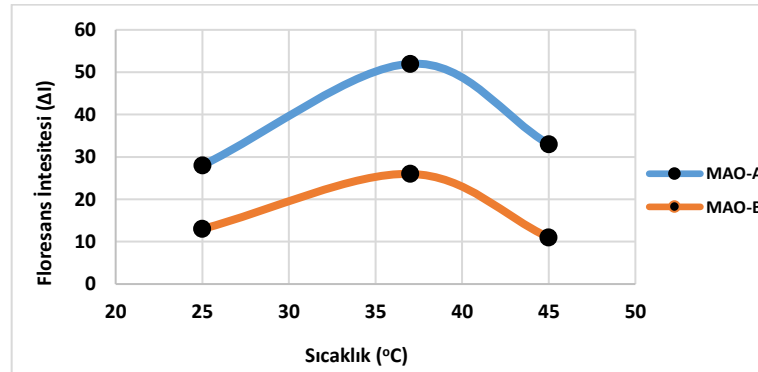
NM-T prob bileşiğinin tek başına ve enzim varlığındaki intensite değerleri λ_{em} :786 nm’de belirli zaman aralıklarında izlenerek inkübasyon işlemi için uygun süre (*hem A hem B izoformu için*) 120 dakika olarak belirlendi. İnkübasyon süresince NM-T prob bileşiğinin intensite değerlerinde belirgin bir değişim olmadığı; enzim varlığında ise zamanla intensite değerlerinde azalma meydana geldiği gözlemlendi.



Şekil 4.6: NM-T'nin floresans intensitesinin (a) MAO-A ve (b) MAO-B enzimleri varlığında zamana bağlı olarak değişimi

4.2.1.3. İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

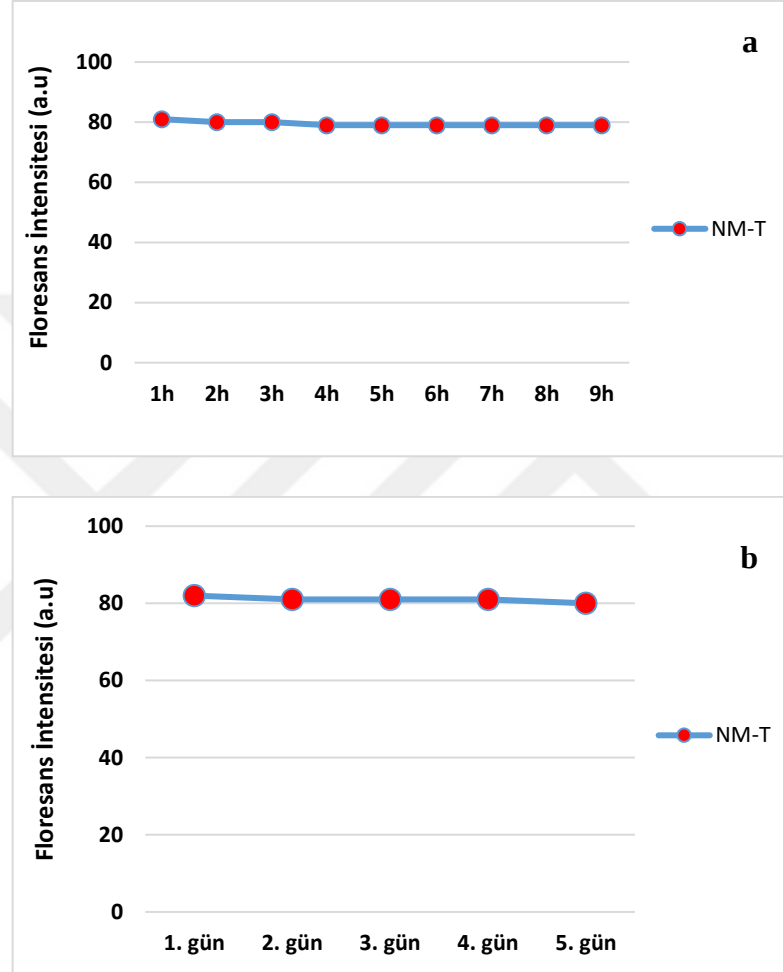
MAO enzim izoformlarının aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerine bağlı olarak, tek başına ve enzim varlığında NM-T prob bileşiğinin floresans intensitesindeki değişim incelendi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde 37 °C sıcaklıkta, prob ve enzim türlerinin etkileşiminin en fazla oranda gerçekleştiği tespit edildi. Bu doğrultuda geliştirilen yöntemin optimum sıcaklık değeri 37 °C olarak (*insan vücut sıcaklığı*) belirlendi.



Şekil 4.7: NM-T'nin floresans intensitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

4.2.1.4. *Prob Çözeltisi Kararlılığının Belirlenmesi*

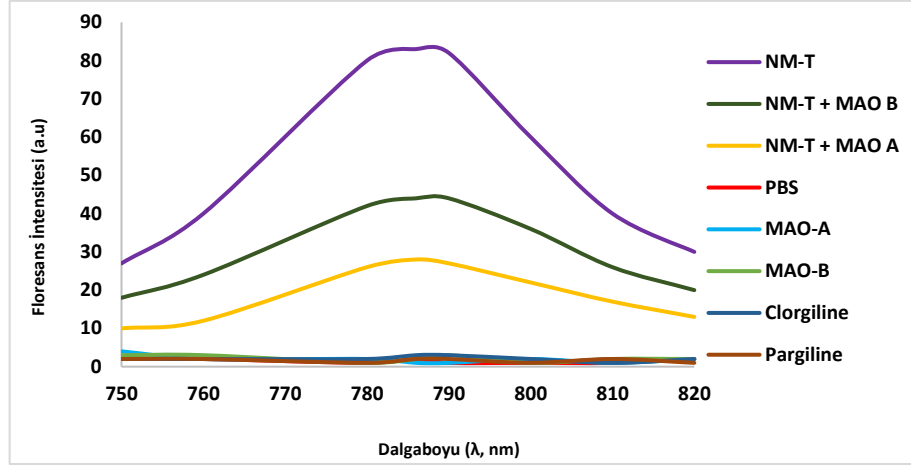
NM-T prob çözeltisinin intensite değerleri, λ_{em} :786 nm’de gün içi ve günler arası (haftalık) olacak şekilde izlendi. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde prob floresans intensitesinde belirgin bir değişim olmadığı; NM-T bileşiği kullanılarak hazırlanan çalışma stok çözeltisinin oda şartlarında uzun bir süre kararlılık gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.8: NM-T’nin floresans intensitesinin (a) gün içi ve (b) günler arası değişimi.

4.2.1.5. *Çözelti Ortamında Bulunan Türlerin Floresans İntensitelerinin Belirlenmesi*

Geliştirilen yöntemde kullanılan tüm bileşenlerin NM-T prob bileşiğinin floresans intensitesi üzerine etkisi incelendi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde NM-T prob bileşiğinin seçici olarak MAO-A ve MAO-B enzim çözeltilerine yanıt verdiği; diğer bileşenlerin herhangi bir floresans intensitesine sahip olmadığı ve NM-T üzerinde girişim oluşturmadığı tespit edildi.



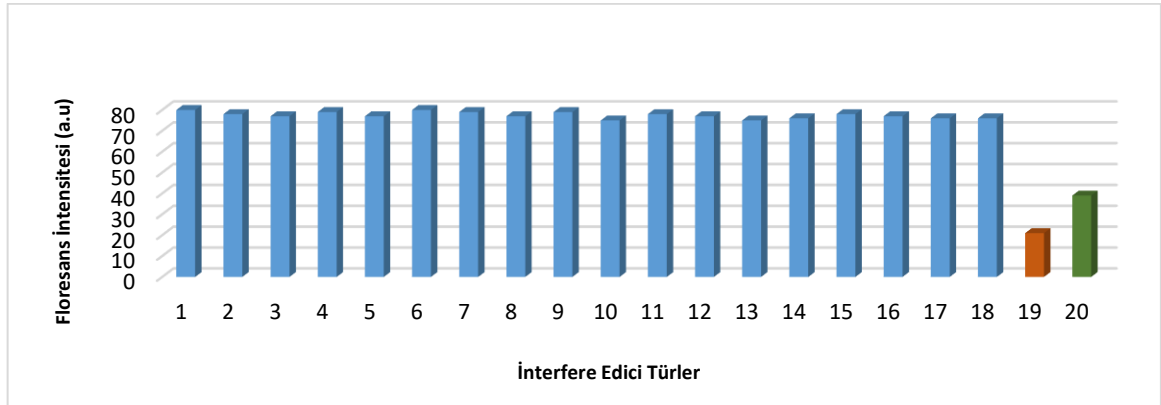
Şekil 4.9: Çözelti ortamında bulunan türlerin NM-T'nin floresans intensitesine etkisi.

4.2.1.6. Çeşitli Analitlerin Girişim Etkisinin (İnterferans) İncelenmesi

Canlı hücrelerin veya dokuların yapısında bulunabilecek bazı analitlerin analiz çözeltisi içerisine ilave edilmesiyle NM-T üzerine girişim etkisi incelendi.

Vida kapaklı cam tüp içine sırasıyla 10^{-5} M konsantrasyondaki NM-T prob çözeltisinden 500 μ L; 10^{-3} M konsantrasyondaki interfere edici analitlerden 500 μ L eklendi. Son hacim (V_T) 3 mL olacak şekilde pH:7.5 PBS tampon çözeltisi ilave edildi. Vorteks ile karıştırılan çözeltiler, önceden 37 °C'ye ayarlanan çalkalamalı su banyosunda 120 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde oda koşullarında ve karanlıkta 5 dakika bekletilen analiz çözeltilerinin floresans intensitelerindeki değişim λ_{em} : 786 nm dalgaboyunda kaydedildi.

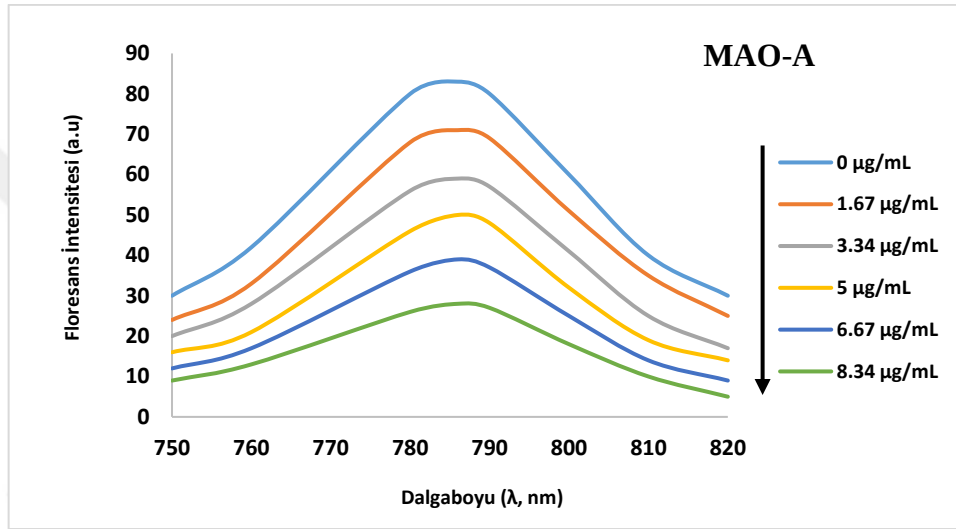
1. blank 2. KCl 3. NaCl, 4. MgCl₂, 5. CaCl₂, 6. CuCl₂, 7. NaNO₃, 8. NaHSO₃, 9. H₂O₂, 10. üre, 11. sakaroz, 12. D-glukoz, 13. L-alanin, 14. askorbik asit, 15. GSH, 16. Cys, 17. HCys, 18. NAC, 19. MAO-A (rekombinant, 10 μ g/mL), 20. MAO-B (rekombinant 10 μ g/mL).



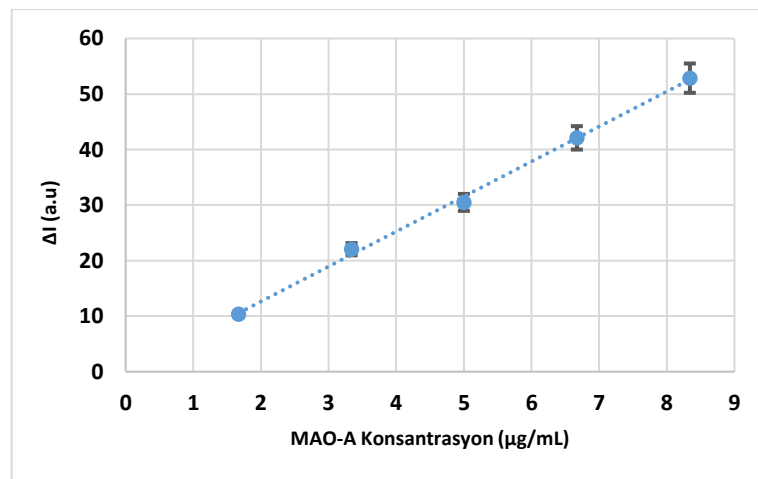
Şekil 4.10: Çeşitli analitlerin NM-T probunun floresans intensitesine etkisi.

4.2.2. Geliştirilen Yöntemle MAO İzofomları İçin Elde Edilen Emisyon Spektrumları

MAO-A için: 10^{-5} M NM-T prob çözeltisinden 500 μ L içeren vida kapaklı bir tüpe son konsantrasyon 0 – 8.34 μ g/mL aralığında olacak şekilde MAO-A enzim çözeltisinden eklenerek son hacim (V_T) 3 mL olacak şekilde PBS ilave edildi. Vorteks ile karıştırılan çözeltiler, önceden 37 °C'ye ayarlanan çalkalamalı su banyosunda 120 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde oda koşullarında ve karanlıkta 5 dakika bekletilen analiz çözeltilerinin floresans intensitesindeki değişim λ_{em} : 786 nm dalgaboyunda kaydedildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.11: MAO-A varlığında NM-T'nin emisyon spektrumu.

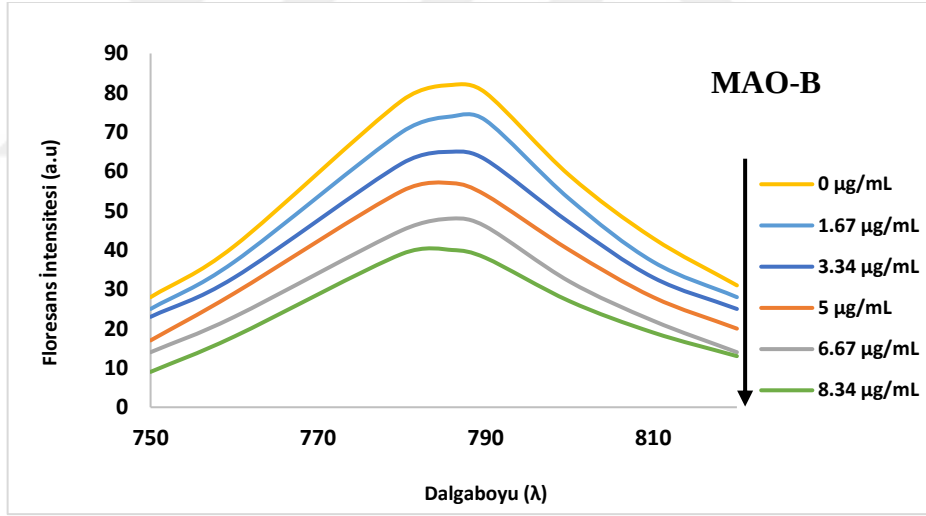


Şekil 4.12: Geliştirilen florometrik yöntemle MAO-A'nın kalibrasyon grafiği.

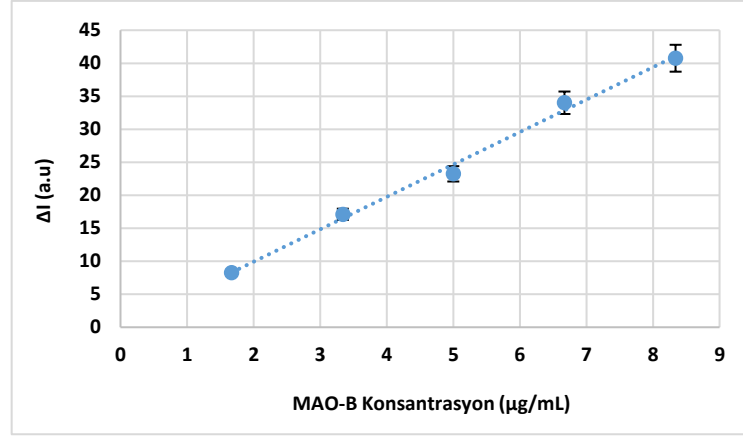
Tablo 4.1. NM-T probunun geliştirilen yöntem MAO-A izoformu için elde edilen kalibrasyon doğru denklemi ve lineer aralığı.

Dedektör Prob	Doğru Denklemi	Korelasyon Katsayısı	Lineer Aralık ($\mu\text{g/mL}$)
NM-T	$y = 6.30 C_{\text{MAO-A}} + 0.02$	$r = 0.998$	1.26 – 8.73

MAO-B için: 10^{-5} M NM-T prob çözeltisinden 500 μL içeren vida kapaklı bir tüpe son konsantrasyon 0 – 8.34 $\mu\text{g/mL}$ aralığında olacak şekilde MAO-B enzim çözeltisinden eklenerek son hacim (V_T) 3 mL olacak şekilde PBS ilave edildi. Vorteks ile karıştırılan çözeltiler, önceden 37°C 'ye ayarlanan çalkalamalı su banyosunda 120 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde oda koşullarında ve karanlıkta 5 dakika bekletilen analiz çözeltilerinin floresans intensitesindeki değişim λ_{em} : 786 nm dalgaboyunda kaydedildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: MAO-B varlığında NM-T'nin emisyon spektrumu.



Şekil 4.14: Geliştirilen florometrik yöntemle göre MAO-B'nin kalibrasyon grafiği.

Tablo 4.2. NM-T probunun geliştirilen yöntem ile MAO-B izoformu için elde edilen kalibrasyon doğru denklemi ve lineer aralığı.

Dedektör Prob	Doğru Denklemi	Korelasyon Katsayısı	Lineer Aralık (µg/mL)
NM-T	$y = 4.91 C_{MAO-B} + 0.09$	$r = 0.9944$	0.79 – 8.53

MAO-A ve MAO-B izoformlarının bir arada bulunduğu çözelti ortamında toplam MAO aktivite tayini gerçekleştirildi.

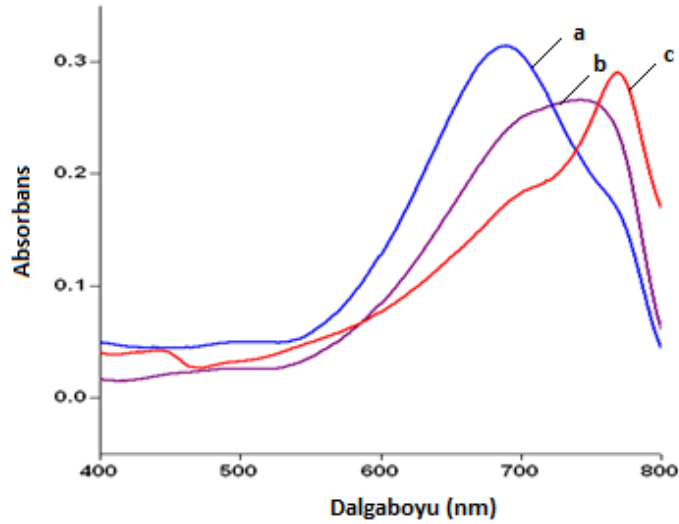
10^{-5} M NM-T prob çözeltisinden 500 µL içeren vida kapaklı bir tüpe 3.34 µg/mL konsantrasyonda MAO-A ve MAO-B enzim çözeltilerinin sentetik ikili karışım çözeltisi eklenerek son hacim (V_T) 3 mL olacak şekilde PBS ilave edildi. Vorteks ile karıştırılan çözeltiler, önceden 37 °C'ye ayarlanan çalkalamalı su banyosunda 120 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde oda koşullarında ve karanlıkta 5 dakika bekletilen analiz çözeltilerinin floresans intensitesindeki değişim λ_{em} : 786 nm dalgaboyunda kaydedildi. Beklenen ve deneysel olarak elde edilen floresans intensiteleri karşılaştırıldı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. MAO-A ile MAO-B izoformlarının çözelti ortamına ayrı ayrı ve birlikte ilave edilmesi sonucunda beklenen ve deneysel olarak elde edilen floresans intensiteleri.

NM-T (10 ⁻⁵ M)	MAO-A (µg/mL)	MAO-B (µg/mL)	PBS	V _{toplam}	Protokol Süresi (dakika)	Deneysel Olarak Elde Edilen İntensite	Beklenen İntensite
(500 µL)	-	-	2500 µL	3 mL	120	84.43±0.33	84.88
(500 µL)	3.34	-	2300 µL	3 mL	120	60.71±0.18	59.96
(500 µL)	-	3.34	2200 µL	3 mL	120	64.58±0.25	65.47
(500 µL)	3.34	3.34	1500 µL	3 mL	120	45.16±0.13	44.33

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{N}} \text{ eşitliği ile elde edilmiştir (N=3, } t_{.95} = 4.303).$$

NM-T prob çözeltisinin tek başına ve MAO-A ile MAO-B enzim çözeltilerinin ilavesi sonrası elde edilen görünür bölge spektrumu aşağıda verildiği gibi elde edildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: (a) NM-T. (b) NM-T + MAO-A. (c) NM-T + MAO-B çözeltilerine ait görünür bölge spektrumları.

4.2.3. İnhibitör Bileşiklerin IC₅₀ Değerlerinin Geliştirilen Yöntem ile Hesaplanması

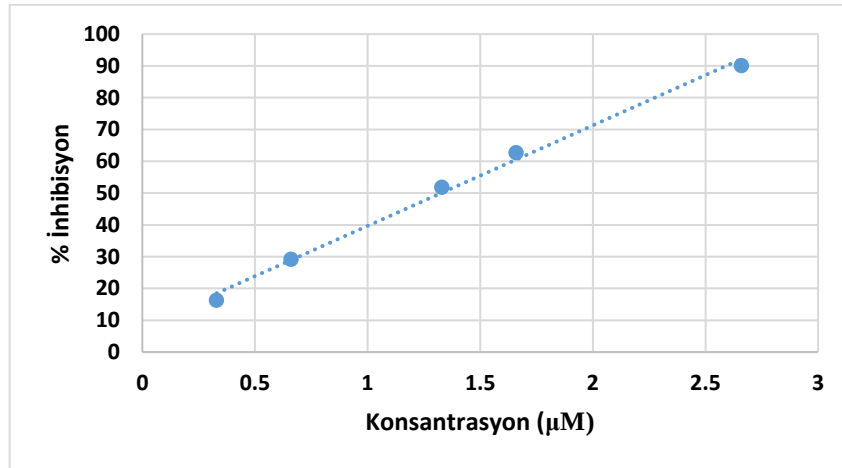
Geliştirilen NM-T esaslı spektrofotometrik yöntemde inhibitör bileşiklerin enzim inhibisyon aktivitelerini hesaplamak için klorjilin'in (MAO-A inhibitörü) ve pargilin'in (MAO-B inhibitörü) belirli konsantrasyon aralığında enzim izoformlarının çözeltilerini içeren analiz örneklerine ilave edilmesiyle 120 dakika inkübasyon sağlandı. İşlem sonucunda çözelti ortamında kalan enzim miktarlarının NM-T prob bileşiğinin floresans intensitesinde meydana getirdiği azalma tespit edildi. Tüm inhibitörlerin enzim inhibisyon aktiviteleri (% inhibisyon), Eşitlik 4.1'ye göre hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{I_2 - I_1}{I_0 - I_1} \times 100 \quad (4.1)$$

I_0 NM-T probunun başlangıç intensitesi; I_1 ve I_2 ise sırasıyla klorjilin yokluğunda ve varlığında inkübasyon ortamında kalan NM-T probuna ait ($\lambda_{em} = 786 \text{ nm}$) intensite değerleridir.

Çözelti Hazırlama Prosedürü:

$500 \mu\text{L NM-T} + 500 \mu\text{L enzim çözeltisi} + x \mu\text{L inhibitör} + (2000 - x) \mu\text{L PBS}$



Şekil 4.17: Klorjilinin konsantrasyona bağlı olarak % inhibisyon değerlerinin değişimi.

Klorgilin için elde edilen intensite değerleri kullanılarak hesaplanan % inhibisyon değerleri ve doğru denklemi Tablo 4.4’de gösterildi.

Tablo 4.4. % inhibisyon – C_{klorgilin} değerleri ve doğru denklemi.

C _{klorgilin} (μM)	ΔI ₇₈₆	% inhibisyon
0.33	43.72	14.32
0.66	37.02	29.15
1.33	25.15	51.86
1.66	19.46	63.76
2.66	5.17	90.09
$I_{ref} = 81.25 \quad I_{klorgilin} = 79.04$ $y = 32.31 C_{klorgilin} + 46.92$ (y = % inhibisyon) $r = 0.9905$		

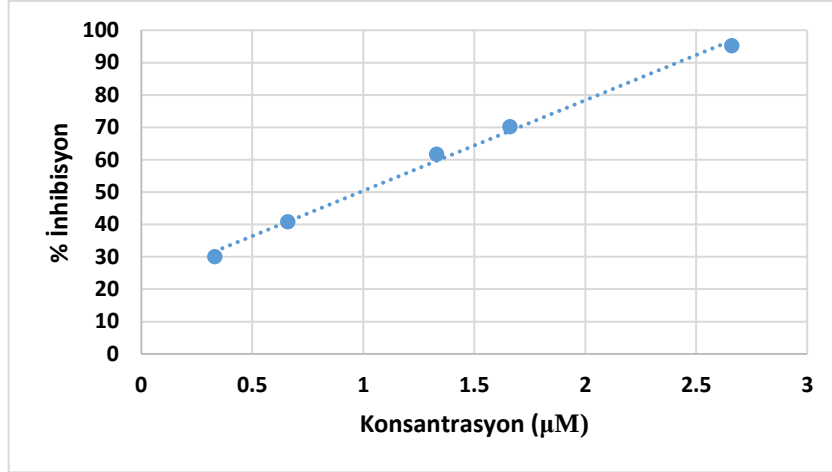
Elde edilen % inhibisyon değerleri (Tablo 4.4) ile inhibitör bileşiğin konsantrasyonları arasında çizilen grafiğe (Şekil 4.15) ait doğru denklemi kullanılarak klorgilin için IC₅₀ değeri hesaplandı.

y = 50 (%50 inhibisyon) için

$$50 = 32.31 C_{klorgilin} + 46.92$$

$$C_{klorgilin} = \frac{50 - 46,92}{32,31} = 0.095 \mu M$$

$$IC_{50} = 0.095 \mu M$$



Şekil 4.18: Pargilin konsantrasyona bağlı olarak % inhibisyon değerlerinin değişimi.

Pargilin için elde edilen intensite değerleri kullanılarak hesaplanan % inhibisyon değerleri ve doğru denklemi Tablo 4.5’de gösterildi.

Tablo 4.5. % inhibisyon – C_{pargilin} değerleri ve doğru denklemi.

$C_{\text{pargilin}} (\mu\text{M})$	ΔI_{786}	% inhibisyon
0.33	29.25	30
0.66	24.78	40.78
1.33	15.62	61.68
1.66	11.64	70.19
2.66	2.41	95.2
$I_{\text{ref}} = 81.25 \quad I_{\text{pargilin}} = 79.04$ $y = 27.69 C_{\text{pargilin}} + 49.72$ (y = % inhibisyon) $r = 0.9883$		

Elde edilen % inhibisyon değerleri (Tablo 4.5) ile inhibitör bileşiğin konsantrasyonları arasında çizilen grafiğe (Şekil 4.16) ait doğru denklemi kullanılarak pargilin için IC_{50} değeri hesaplandı.

y = 50 (%50 inhibisyon) için

$$50 = 27.69 C_{\text{pargilin}} + 49.72$$

$$C_{\text{pargilin}} = \frac{50 - 49.72}{27.69} = 0.01 \mu\text{M}$$

$$IC_{50} = 0.01 \mu\text{M}$$

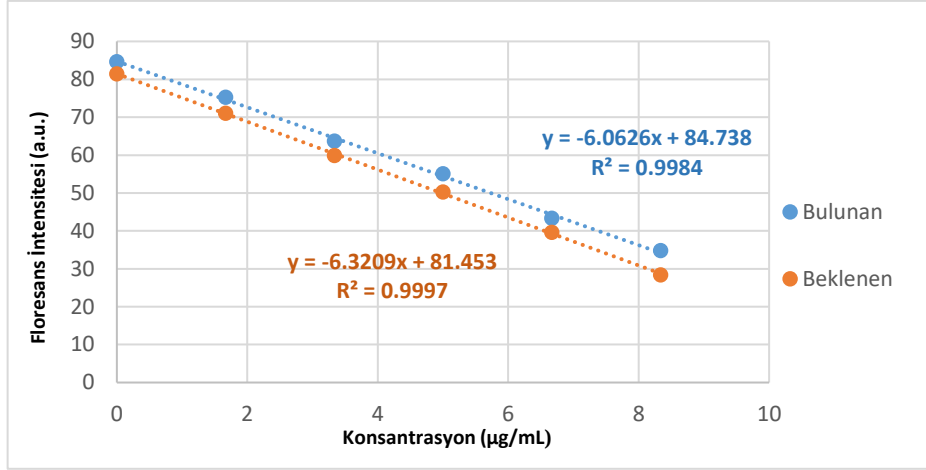
4.2.4. Biyolojik Örneklerde MAO Aktivite Tayini

Geliştirilen spektrofotometrik yöntemin geri kazanımını tespit edebilmek amacıyla biyolojik örnekte MAO aktivite tayini gerçekleştirildi. Biyolojik örnek olarak sentetik serum kullanıldı. 10 kat seyreltilen serum örneğine bilinen ve artan konsantrasyonlarda MAO-A ve MAO-B enzim çözeltileri ilave edildi. Beklenen ve deneysel olarak elde edilen floresans intensiteleri karşılaştırılarak geliştirilen yöntemin geri kazanımı hesaplandı (Tablo 4.6 ve 4.7).

Tablo 4.6. Sentetik serum örneğine, farklı konsantrasyonlarda MAO-A ilavesi sonucu geliştirilen spektrofotometrik yöntemle göre beklenen ve ölçülen floresans intensitelerinin karşılaştırılması.

NM-T (10 ⁻⁵ M)	MAO-A (μg/mL)	Serum (1:10)	PBS	V _{toplam}	Protokol Süresi (dakika)	Deneysel Olarak Elde Edilen İntensite	Beklenen İntensite	Geri Kazanım (%)
(500 μL)	0	(100 μL)	2400 μL	3 mL	120	84.65±0.09	81.44	-
(500 μL)	1.67	(100 μL)	2300 μL	3 mL	120	75.25±0.47	70.98	101.49
(500 μL)	3.34	(100 μL)	2200 μL	3 mL	120	63.69±0.86	59.85	101.06
(500 μL)	5	(100 μL)	2100 μL	3 mL	120	55.04±0.33	50.24	103.16
(500 μL)	6.67	(100 μL)	2000 μL	3 mL	120	45.31±0.58	39.63	106.22
(500 μL)	8.34	(100 μL)	1900 μL	3 mL	120	34.78±0.22	28.39	111.19

Tabloda yer alan veriler ortalama ± standart sapma, N=3 olarak verilmiştir.

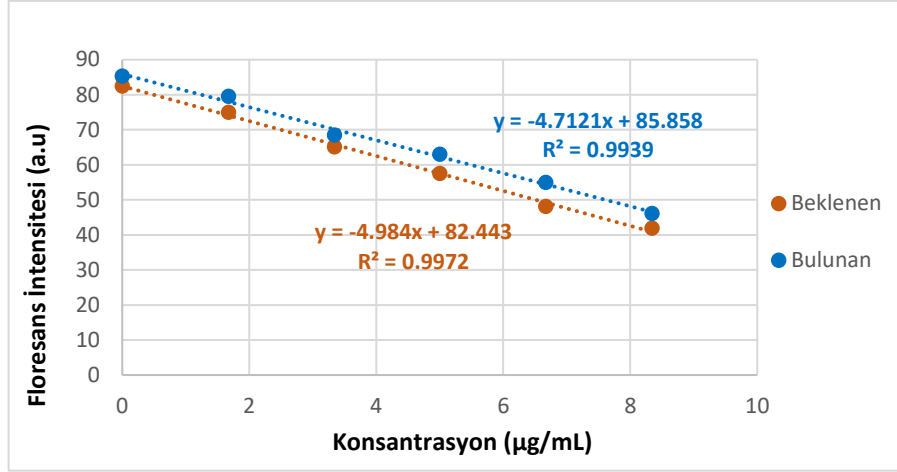


Şekil 4.19: Serum örneği içinde MAO-A'nın kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4.7. Sentetik serum örneğine, farklı konsantrasyonlarda MAO-B ilavesi sonucu geliştirilen spektrofotometrik yöntemle göre beklenen ve ölçülen floresans intensitelerinin karşılaştırılması.

NM-T (10 ⁻⁵ M)	MAO-B (µg/mL)	Serum (1:10)	PBS	V _{toplam}	Protokol Süresi (dakika)	Deneyisel Olarak Elde Edilen İntensite	Beklenen İntensite	Geri Kazanım (%)
(500 µL)	0	(100 µL)	2400 µL	3 mL	120	85.24±0.97	82.03	-
(500 µL)	1.67	(100 µL)	2300 µL	3 mL	120	79.54±0.26	74.96	101.82
(500 µL)	3.34	(100 µL)	2200 µL	3 mL	120	68.43±0.64	65.08	102.21
(500 µL)	5	(100 µL)	2100 µL	3 mL	120	63.01±0.13	57.52	103.96
(500 µL)	6.67	(100 µL)	2000 µL	3 mL	120	54.91±0.74	48.11	107.49
(500 µL)	8.34	(100 µL)	1900 µL	3 mL	120	48.10±0.53	41.86	108.23

Tabloda yer alan veriler ortalama ± standart sapma, N=3 olarak verilmiştir.



Şekil 4.20: Serum örneği içinde MAO-B'nin kalibrasyon eğrisi.

MAO-A ve MAO-B izoformlarının bir arada bulunduğu biyolojik örneklerde aktivite tayini gerçekleştirildi. Biyolojik örnek olarak sentetik serum kullanıldı. 10 kat seyreltilen serum örneğine bilinen ve artan konsantrasyonlarda MAO-A ve MAO-B enzim çözeltileri ilave edildi. Beklenen ve deneysel olarak elde edilen floresans intensiteleri karşılaştırıldı. (Tablo 4.8)

Tablo 4.8. MAO-A ile MAO-B izoformlarının serum ortamına birlikte ilave edilmesi sonucunda beklenen ve deneysel olarak elde edilen floresans intensitelerinin karşılaştırılması.

NM-T (10 ⁻⁵ M)	MAO-A (µg/mL)	MAO-B (µg/mL)	Serum (1:10)	PBS	V _{toplam}	Protokol Süresi (dakika)	Deneysel Olarak Elde Edilen İntensite	Beklenen İntensite
(500 µL)	1.67	1.67	(100 µL)	2200 µL	3 mL	120	65.31±0.45	66.45
(500 µL)	1.67	3.34	(100 µL)	2100 µL	3 mL	120	58.86±0.93	56.34
(500 µL)	3.34	1.67	(100 µL)	2100 µL	3 mL	120	55.06±0.24	53.89
(500 µL)	3.34	3.34	(100 µL)	2000 µL	3 mL	120	44.18±0.18	44.78

(P = 0.05 için $F_{deneysel} = 0.338$, $F_{kritik (tablo)} = 1.875$, $F_{deneysel} < F_{kritik (tablo)}$)

$\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{N}}$ eşitliği ile elde edilmiştir (N=3, $t_{.95} = 4.303$).

4.2.5. Hücre Ortamında MAO Aktivite Tayini ve Görüntülenmesi

Sentezlenen probun ve geliştirilen yöntemin hücre ortamında uygulanabilirliğini tespit edebilmek adına A549 hücrelerine öncelikle 25 μ M NM-T çözeltisi ilave edilerek hücrelerin floresans görüntüsü kaydedildi. Akabinde 10 μ g/mL MAO-A ve 10 μ g/mL MAO-B çözeltileri ilave edilerek 120 dakika inkübasyon sağlandı. Hücrelerin floresans görüntüsü tekrar kaydedildi. Enzim yokluğunda ve varlığında NM-T'nin hücre ortamındaki floresans değişimi görselleştirildi.



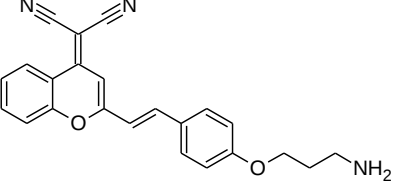
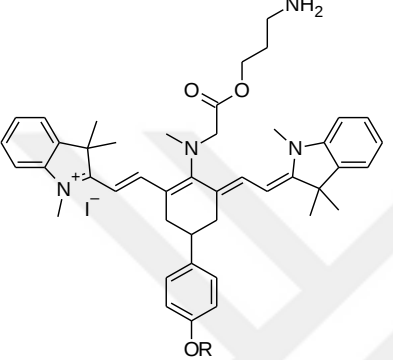
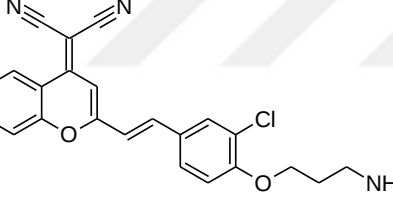
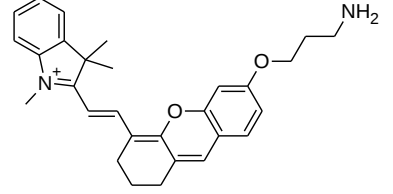
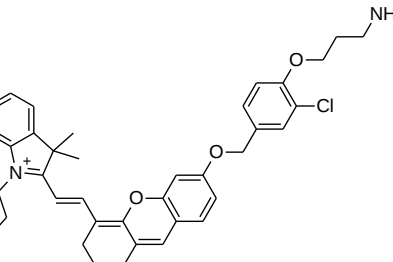
Şekil 4.5: A549 hücrelerinde gerçekleştirilen floresans görüntülemeye ait hücre görüntüleri a) 25 μ M NM-T. b) 25 μ M NM-T + 10 μ g/mL MAO-A. c) 25 μ M NM-T + 10 μ g/mL MAO-B.

5. TARTIŞMA

Alzheimer, bilişsel fonksiyonları etkileyen; Parkinson ise beyinde dopaminerjik nöron kaybına bağlı olarak hareketlerin yavaşlamasına ve istem dışı hareket bozukluklarına neden olan progresif hastalıklardır. Monoamin oksidaz (MAO) enzimlerinin katalizlediği oksidatif deaminasyon reaksiyonlarının sonucunda organizmada yüksek miktarda oluşan reaktif oksijen türleri, depresyon gibi nöropsikiyatrik ve Alzheimer - Parkinson gibi nörodejeneratif bozuklukların oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Hastalıkların mevcut tedavi yöntemlerinde hastaların yaşam kalitesini artırmaya yönelik semptomatik tedaviler yer almaktadır. MAO enzim izoformları nöropsikiyatrik ve nörodejeneratif bozuklukların tedavisi için ilaç geliştirilmesinde önemli hedeflerlerdir. Depresyonda MAO-A inhibitörleri, serotonin ve nörepinefrinin merkezi metabolizmasını bloke ederek hareket ederken; Parkinson'da MAO-B inhibitörleri dopaminin merkezi sinir sisteminde parçalanmasını önleyerek etki etmektedir [39,106]. Genel olarak teşhis sürecinde tomografik (MR) görüntüleme ve spektrofotometrik (floresans) analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak; tercih edilen MR görüntüleme tekniğinin maliyetinin yüksek olması; spektrofotometrik yöntemlerdeki reaktif olarak kullanılan problemlerin ise A veya B izoformuna ayrı ayrı seçicilik göstermesi ve kısa dalgalarda işlem yapılabilmesine olanak tanınması bu süreçte bazı sınırlayıcı etkiler oluşturmaktadır. Bu nedenle uzun dalgalarda, özellikle de elektromanyetik spektrumun NIR dalgalarda her iki enzim izoformuna aynı anda seçicilik gösteren ve düşük dedeksiyon limitlerinde kısa sürede yanıt alınmasına olanak tanıyan yeni floresan problemlerin geliştirilmesine büyük oranda ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamdaki bilimsel çalışmalar tüm dünyada önem kazanmıştır [19,49].

Monoaminoksidaz aktivite ölçümüne yönelik olarak geliştirilen floresan prob sayısında yükseliş trendi yakalanmış olsa da NIR floresanlar kullanılarak sentezlenen problemler oldukça sınırlı sayıda kalmıştır. Ayrıca, sentezlenen birçok floresan probun hem kimyasal molekül yapısı hem de etki mekanizması incelendiğinde birbirine çok büyük oranda benzerlik gösterdiği; önceki problemlerin sahip olduğu dezavantajları ortadan kaldıracak şekilde belirgin bir özgünlük taşımadığı görülmektedir [20,57] (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. MAO aktivite tayini için sentezlenen NIR florojenik problemler.

Prob Molekül Yapısı	Dalgaboyu (λ_{ex})	Dalgaboyu (λ_{em})	LOD	Selektivite Gösterdiği İzofom	Referans
	420	664	1.2 $\mu\text{g/mL}$	MAO-B	[65]
	730	790	-	MAO-B	[66]
	530	675	2.6 ng/mL	MAO-A	[70]
	680	710	13 ng/mL	MAO-A	[72]
	680	708	4.5 ng/mL	MAO-A	[73]

Özellikle klinik uygulama açısından daha ziyade tercih edilen toplam MAO aktivite ölçümüne yönelik görünür bölge dalgaboyunda analize imkan tanıyan birkaç florojenik prob geliştirilmiş; ancak NIR emisyon dalgaboyuna ve düşük LOD değerine sahip herhangi bir prob literatüre kazandırılmamıştır [39].

Bu kapsamda değerlendirildiğinde Li ve ark. tarafından geliştirilen MAO-Red-1 adlı probunun taşıdığı 3-aminopropanol grubu MAO-B ilavesi sonucunda önce oksidasyona, akabinde hidrolize uğrayarak prob yapısından ayrılmakta ve florofor üzerindeki OH grubu serbest hale gelerek floresans intensitesinde artış meydana gelmektedir [65]. 664 nm’de analize imkan tanınması yönünden avantaj oluştururken LOD değerinin 1.2 µg/mL olarak hesaplanması prob duyarlılığının yeterince iyi olmadığını göstermektedir.

Wang ve ark. tarafından literatüre kazandırılan ve Mito-CyNH₂ adlandırılan florojenik prob siyanin floroforu üzerinden 3-aminopropanol grubu kullanılarak MAO izoformlarına seçici olarak yanıt verecek şekilde türevlendirilmiştir. 790 nm dalgaboyunda ve 2 saatlik inkübasyon süresi akabinde MAO-B izoformunun analizine imkan tanımaktadır. Çalışma sonuçları incelendiğinde LOD değeri belirtilmediği görülmekte; bununla birlikte analiz öncesi probun H₂O₂ ile ön işlem uygulanması geliştirilen yöntem açısından dezavantaj oluşturmaktadır [66].

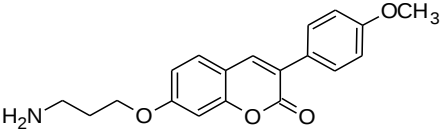
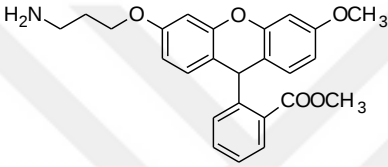
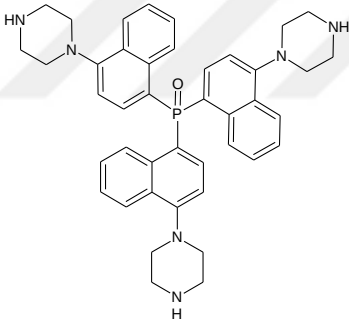
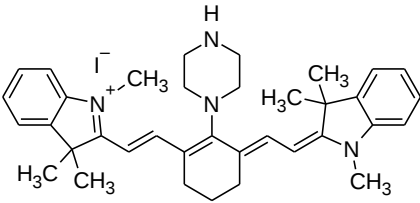
Yang ve ark. tarafından gerçekleştirilen farklı bir çalışmada ise 675 nm dalgaboyunda MAO aktivite ölçümüne olanak tanıyan NIR florojenik problemler sentezlenmiştir. Çalışma detaylı olarak incelendiğinde yalnızca Probe-3 olarak adlandırılan probun MAO-A izoformu için seçicilik gösterdiği anlaşılmaktadır. Molekül yapısı detaylı olarak yorumlandığında daha evvel literatüre kazandırılan MAO-Red-1 adlı prob yapısıyla çok büyük oranda benzerlik gösterdiği kolaylıkla fark edilebilmektedir. Buna karşın LOD değeri 2.6 ng/mL olarak hesaplanarak MAO-Red-1’e göre daha düşük dedeksiyon limitlerinde tayin yapılabilmesine olanak tanınmıştır. Ancak, analizin gerçekleştirildiği emisyon dalgaboyu açısından büyük oranda bir iyileşme sağlanamamıştır [70].

Yang ve ark. tarafından literatüre kazandırılan NIR floresans özelliğe sahip bir diğer florojenik prob ise DHMP2 olarak isimlendirilmiştir. Klasik siyanin floroforu yerine yeni nesil siyanin floroforu kullanılarak 3-aminopropanol grubuyla türevlendirilen bu prob, MAO-A izoformuna seçicilik göstermektedir. 710 nm dalgaboyunda ve 13 ng/mL olarak hesaplanan dedeksiyon limitlerinde analizin gerçekleştirilmesi avantaj olarak sunulsa da, 12 saatlik inkübasyon süresi dezavantaj oluşturmaktadır. Ayrıca, diğer tüm NIR florojenik problemlerde

olduğu gibi MAO izoformlarına karşı seçicilik sağlayabilmek adına tercih edilen ve eterik bağ ile florofora bağlanan 3-aminopropanol grubunun, kuvvetli asidik ve bazik ortamlardan kolaylıkla etkilenecek prob yapısından hidroliz olmaktadır. Bu durumda, prob molekülün floresans intensitesinde meydana gelen artışının enzim etkisiyle olup olmadığı konusunda net bir yorum yapılamamaktadır [72].

NIR floresans özelliğe sahip olan bir diğer florojenik prob ise Rma-2'dir ve bu tez çalışmasında geliştirilen NIR floresans özellikli prob sentezlenene kadar literatüre kazandırılan son NIR floresan probtur. Shang ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışma sonucunda sentezlenen bu prob, 708 nm dalgaboyunda emisyonu sahiptir. 1 saatlik inkübasyon sonrasında 4.5 ng/mL dedeksiyon limitinde MAO-A izoformuna karşı seçici olarak analiz yapılmasına olanak tanıyan bu probun molekül yapısı DHMP2 ile büyük oranda benzerlik göstermektedir.  zg nl k açısından değerlendirildiğinde büyük bir fark ortaya konmazken; molekül yapısında tercih edilen ilave fonksiyonel grupların etkisiyle inkübasyon süresi DHMP2'ye göre oldukça kısa bir sürece indirgenmiş ve daha düşük dedeksiyon limitlerinde çalışmayı mümkün hale getirilmiştir. Ancak, kuvvetli asit ve baz etkisiyle florofor yapısından kolaylıkla hidroliz olabilen 3-aminopropanol yapısı bu prob bileşikte de tercih edilmiş; intensite artışını sağlayan hidroliz mekanizmasının enzim etkisiyle ilişkilendirilmesine gölge d ş rm ştir. Bu durum, geliştirilen probun tıp alanında kullanılması halinde dezavantaj oluşurmaktadır [73].

Tablo 5.2. Toplam MAO aktivite tayini için sentezlenen florojenik probalar.

Prob Molekül Yapısı	Dalgaboyu (λ_{ex})	Dalgaboyu (λ_{em})	LOD	Referans
	345	465	-	[61]
	470	535	3.5 $\mu\text{g/mL}$ 6 $\mu\text{g/mL}$	[59]
	405	415	-	[52]
	725	786	1.88 ng/mL 9.15 ng/mL	Tez Çalışması

Tez çalışmasında ele alınan konu açısından bakıldığında, toplam MAO aktivite tayini için geliştirilen problar da incelenmiştir (Tablo 5.2). Bu doğrultuda literatüre bakıldığında Zhang ve ark. tarafından sentezlenen ve CR1 olarak adlandırılan florojenik prob, kumarin floroforunun 3-aminopropanol ile türevlendirilmesiyle MAO izoformlarına seçici hale getirilmiştir. Anlık olarak analizin gerçekleştirilmesine imkan sağlayan bu prob bileşik 465 nm dalgaboyuna emisyon değerine sahiptir ve bu nedenle floresan özellik taşımasına rağmen NIR özellik taşımamaktadır. Bu nedenle, aktivite tayini gerçekleştirilmek istenen canlı doku ve hücre gibi biyolojik örneklerin hasara uğraması kaçınılmazdır ve bu prob bileşik için büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır. LOD değeri belirtilmemiş olduğundan duyarlılık açısından herhangi bir yorum yapılamamaktadır. Literatürde 3-aminopropanol grubu kullanılarak MAO izoformlarına seçici hale getirilen prob bileşikler ile gerçekleştirilen analizlerde genel olarak MAO-A izoformuna karşı seçicilik sağlandığı belirtilmiştir; fakat bu çalışma sonuçları değerlendirildiğinde geliştirilen probun hem MAO-A hem de MAO-B izoformlarına yanıt verdiği ve toplam MAO aktivitesinin ölçümüne yönelik kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu husus büyük bir çelişki ve dezavantaj oluşturmaktadır [49,61].

Benzer şekilde Li ve ark. tarafından literatüre kazandırılan floresein esaslı ve Probe-1 olarak adlandırılan florojenik probun yapısı incelendiğinde 3-aminopropanol grubu kullanılarak hem MAO-A hem MAO-B izoformlarına karşı 535 nm dalgaboyunda yanıt alındığı rapor edilmiştir. MAO-A izoformu için LOD değeri 3.5 µg/mL; MAO-B izoformu için LOD değeri 6 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada, enzim çözeltilerinin prob üzerine ilavesini takiben 2 saat inkübasyon uygulanmış; probun floresans intensitesinde artış kaydedilmiş ve toplam MAO aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ancak, CR1 florojenik probunda olduğu gibi geliştirilen probun hem MAO-A hem de MAO-B izoformlarına yanıt verdiği ve toplam MAO aktivitesinin ölçümüne yönelik kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu husus büyük bir çelişki ve dezavantaj oluşturmaktadır [49,59]

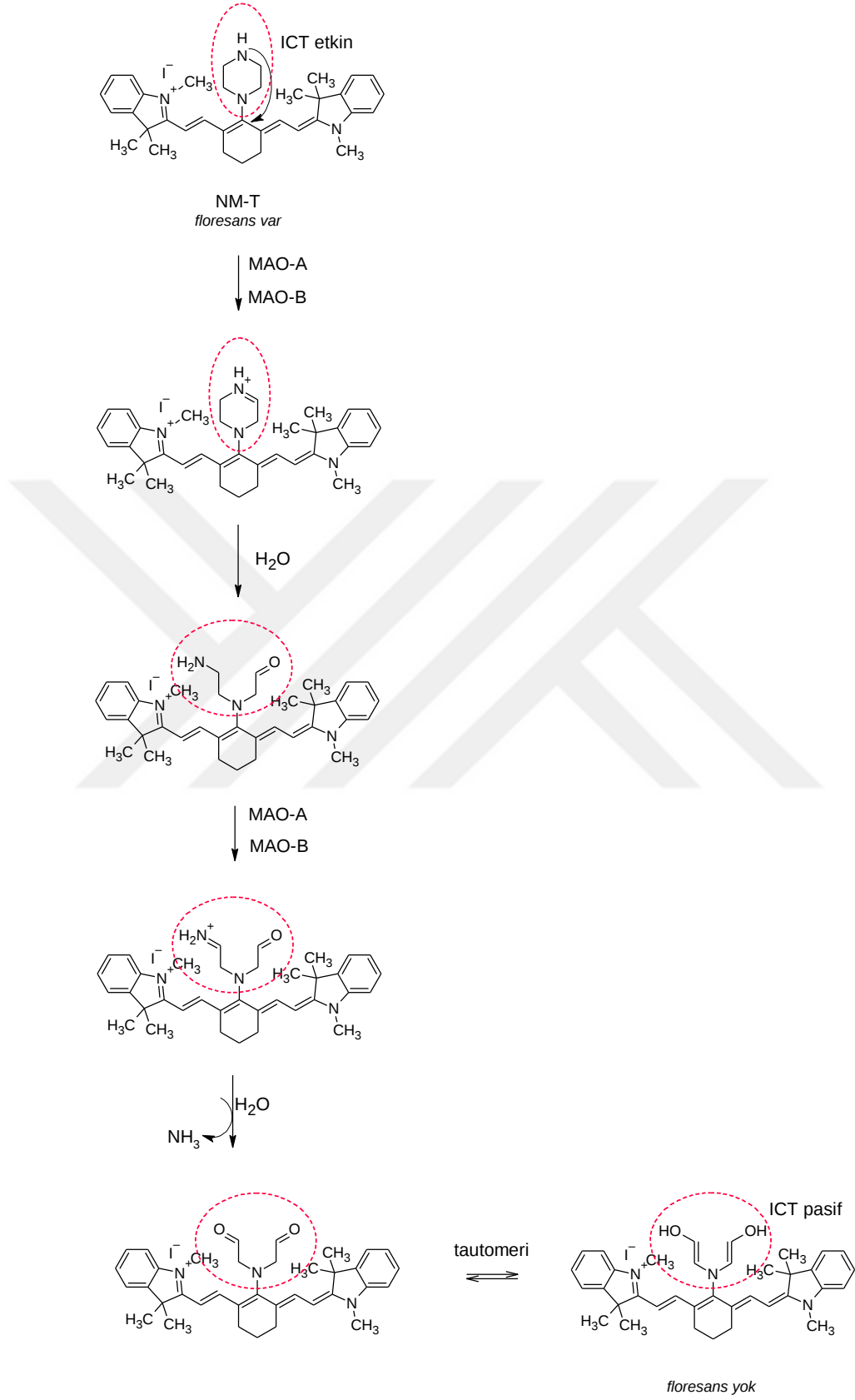
Yakın zamanda Zhang ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışma sonucunda ise OTTP-3-Piperazine olarak adlandırılan florojenik prob geliştirilmiştir. 415 nm dalgaboyunda emisyon değerine sahip olan prob bileşik, literatüre kazandırılan birçok NIR özelliğe sahip floresan probun yapısında tercih edilen 3-aminopropanol grubunun aksine piperazin halkası ihtiva etmektedir. Piperazin halkası üzerinde bulunan sekonder amin MAO izoformlarınca oksidasyona uğramakta; halka açılımı gerçekleşmekte ve reaksiyon devamında deaminasyon oluşmaktadır. Bu sayede hem MAO-A hem de MAO-B izoformlarına yanıt vermekte ve

toplam aktivite tayinine olanak tanımaktadır. Ancak prob bileşiğıe ait LOD değeri belirtilmemiştir. Prob bileşik floresans özelliğıe sahip olmasına rağmen NIR özellik taşımamaktadır. Bu nedenle, aktivite tayini gerçekleştirilmek istenen canlı doku ve hücre gibi biyolojik örneklerin hasara uğraması kaçınılmazdır ve bu prob bileşik için büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır [52].

Bu tez çalışmasında, günümüze dek literatüre kazandırılan tüm florojenik problardan farklı özelliklere ve avantajlara sahip NM-T adlı NIR florojenik prob sentezlenerek toplam monoamin oksidaz aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Rekombinant olarak alınan MAO-A ve MAO-B enzim izoform çözeltileri, 7.5 pH değerine sahip PBS ile seyreltildi. Farklı konsantrasyonlarının NM-T prob bileşiğıi ile etkileşimi 786 nm’de florometrik olarak gözlemlendi.

Literatürde bildirilen florojenik problemlarla kıyaslandığında NM-T bileşiğıi, kimyasal molekül yapısında piperazin grubu bulunduran ve toplam MAO aktivitesinin ölçümünü mümkün kılan ilk NIR florojenik prob olma özelliğıi taşımaktadır. MAO enzim izoformlarına seçicilik sağlamak amacıyla geleneksel olarak kullanılan 3-aminopropanol ve tetrahidropiridin gruplarının yerine prob molekül yapısında tercih ettiğimiz piperazin halkası, florofor moleküle güçlü elektron akışı sağlayarak molekül içi yük transferini hızlandırırken; üzerinde bulunan sekonder amin grubu ile de MAO enzim izoformlarının her ikisi tarafından da seçici olarak oksidasyona uğramaktadır [52].

Toplam MAO aktivite ölçümü için geliştirilen spektrofotometrik yöntem, enzim ilavesi sonrasında sentezlenen florojenik probun intensitesinde meydana gelen intensite azalmasına (*turn off*) dayanmaktadır. Piperazin halkasının üzerinde bulunan sekonder amin grubu, MAO enzim izoformları tarafından oksidasyona uğrayarak kuaternize olur; akabinde ortamda bulunan su molekülleri tarafından aldehit ve amino grupları oluşturmak için hidroliz edilir. Bir süre sonra enzim izoformların katalizlediğı deaminasyon reaksiyonu sonucunda amino grubu molekül yapısından NH_3 formunda uzaklaşır. NM-T florojenik probu ile MAO izoformları arasında gerçekleşen reaksiyon mekanizması aşağıda belirtildiğı gibi gerçekleşmektedir:



Şekil 5.1: NM-T ile MAO izoformları arasında gerçekleştiği öngörülen reaksiyon mekanizması.

NM-T'nin MAO izoformlarına karşı seçici olduğunu gösterebilmek adına prob üzerinde girişim oluşturabilme potansiyeline sahip 10^{-3} M konsantrasyondaki analitler (inorganik kationlar, anyonlar ve aminosaitler) ve 10 µg/mL konsantrasyondaki MAO enzim izoformları analiz çözeltisine ilave edildi. Tez kapsamında geliştirilen NM-T florojenik probunun piperazin halkasının spesifik oksidasyonundan dolayı ortama ilave edilen hiçbir analite karşı seçicilik göstermediği; MAO-A ve MAO-B izoformlarına ise yüksek seçicilik gösterdiği tespit edildi.

Tez kapsamında sentezlenen florojenik prob kullanılarak toplam MAO aktivite ölçümü için spektrofotometrik bir yöntem geliştirildi. NM-T olarak adlandırılan ve tez kapsamında ilk defa sentezlenen florojenik prob kullanılarak MAO-A izoformu için 1.26 – 8.73 µg/mL lineer çalışma aralığındaki LOD değeri 1.88 ng/mL; MAO-B izoformu için 0.79 – 8.53 µg/mL lineer çalışma aralığındaki LOD değeri 9.15 ng/mL olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, NIR florojenik problemlerin kullanıldığı spektrofotometrik yöntemler arasında en düşük LOD değerlerinde aktivite ölçümüne olanak tanıyan; bir başka deyişle literatürde yer verilen diğer yöntemlere göre daha duyarlı yeni bir yöntem geliştirildiği görüldü (Tablo 2.1).

Biyolojik örnek olarak kullanılan serum örneğine 1.67 – 8.34 µg/mL lineer konsantrasyon aralığında MAO-A ve MAO-B enzim çözeltileri katkısı yapıldı. Beklenen ve deneysel olarak elde edilen intensite değerleri kıyaslandığında katkı yapılan konsantrasyonlar karşılığında geri kazanım MAO-A için % 101.49 – 111.19 ve MAO-B için %101.82 – 108.23 aralığında hesaplandı (Tablo 4.6 ve 4.7). Ayrıca serum örneğine MAO-A ve MAO-B enzim çözeltileri birlikte katkı yapıldı. *F*-testinin uygulandığı iki-yönlü varyans analizi (ANalysis Of VAriance (ANOVA)) karşılaştırması sonucunda; geliştirilen NIR esaslı florometrik yöntemle sentetik ikili izoform karışımları için deneysel olarak bulunan sonuçlar ile teorik olarak beklenen bulgular %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($P = 0.05$ için $F_{deneysel} = 0.338$, $F_{kritik (tablo)} = 1.875$, $F_{deneysel} < F_{kritik (tablo)}$) (Tablo 4.8)

Ayrıca, hücre ortamında meydana gelen prob – enzim etkileşimi konfokal mikroskop altında görselleştirildi. A549 tip hücrelere uygulanan NM-T prob çözeltisinin floresans intensitesinde enzim izoformları ile etkileşim sonrası belirgin bir azalma meydana geldiği tespit edildi. Elde edilen görüntüler incelendiğinde, MAO-A izoformunun MAO-B izoformuna kıyasla NM-T'nin floresans intensitesini daha fazla sönmlediği gözlemlendi (Şekil 4.5).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında toplam MAO enzim aktivitesinin ölçümüne yönelik olarak elektromanyetik spektrumun NIR bölgesinde emisyon dalgaboyuna sahip yeni bir florojenik prob sentezlenmiştir. NM-T olarak adlandırdığımız bu florojenik probun eksitasyon dalgaboyu (λ_{ex}) 720 nm; emisyon dalgaboyu (λ_{em}) ise 786 nm olarak tespit edilmiştir. Kimyasal molekül yapısının karakterize edilmesi için MS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve FTIR teknikleri kullanılarak analizler gerçekleştirilmiş; elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilerek prob yapısı aydınlatılmıştır.

Sentezlenen NM-T bileşiğinin kapalı molekül formülü $\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{I}$ şeklindedir. Teorik olarak hesaplanan molekül kütlesi $660.6737 \text{ g.mol}^{-1}$ dür. Uygulanan HRMS-ESI tekniği ile kütle spektrumu alındı. Bileşiğin moleküler iyon piki m/z $[\text{M-I}]^+ = 533.3623 \text{ g.mol}^{-1}$ olarak belirlendi (Şekil 4.1). Bu değer kütle açısından beklenen bileşiğin sentezlendiğini göstermektedir.

Bileşiğin kimyasal yapısının karakterize edilmesinde çeşitli ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR teknikleri kullanıldı (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Sentezlenen yeni NIR-HBI molekülünün yapısı COSY (proton-proton eşleştirmeleri), HSQC (proton-karbon eşleştirmeleri) ve HMBC (kuaterner karbonların etrafı) teknikleriyle aydınlatıldı. Karbon ve proton eşleşmeleri detaylı olarak incelendi ve karakterizasyon başarıyla doğrulandı.

NM-T molekülünün yapısında bulunan bazı grup ve bağların titreşimleri, FTIR tekniği uygulanarak alınan IR spektrumu ile değerlendirildi. Bu spektruma bakıldığında piperazin halkası üzerindeki NH grubuna ait karakteristik bantın 3215 cm^{-1} ; aromatik C-H bağlarına ait gerilme bantının 2928 cm^{-1} ; alifatik C-H bağlarına ait gerilme bantlarının $2799\text{-}1354 \text{ cm}^{-1}$; aromatik C=C bağlarına ait gerilme bantının 1650 cm^{-1} ; alifatik C=C bağlarına ait gerilme bantının 1549 cm^{-1} ; C=N gerilme bantının 1438 cm^{-1} ve molekülü oluşturan aromatik halkalara ait düzlem içi eğilmelerin $900\text{-}700 \text{ cm}^{-1}$ de olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3).

Sentezlenen NM-T florojenik probu kullanıldığı yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirilerek MAO enzim izoformlarının ayrı ayrı ve toplam aktiviteleri tayin edilmiştir. Geliştirilen bu yöntemde MAO izoformları, ticari rekombinant enzim çözeltilerinin PBS ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Konsantrasyon, sıcaklık, pH, zaman parametreleri göz önünde bulundurularak yöntem optimize edilmiştir. Buna göre, NM-T prob çözeltisi kullanılarak pH:7.5 değerinde 37 °C’de 120 dakikalık inkübasyon sonucunda toplam MAO aktivite ölçümü yüksek seçicilik ve duyarlılıkta tekrarlanabilir şekilde gerçekleştirilebilmektedir.

NM-T florojenik probunun tek başına gün içi ve günler arasında elde edilen % RSD değerleri sırasıyla 0.73 ve 0.71 olarak bulundu.

$$\text{LOD} = 3s_{bl}/m \quad (6.1)$$

$$\text{LOQ} = 10 s_{bl}/m \quad (6.2)$$

Uygulanan yöntemde MAO-A izoformu için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,88 ve 6.26 ng/mL olarak; MAO-B izoformu için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 9.15 ve 30.5 ng/mL olarak eşitlik 6.1 ve 6.2 kullanılarak hesaplandı. s_{bl} standart sapmayı (N=10); m ise her iki izoform kullanılarak oluşturulan kalibrasyon doğrularının eğim değerlerini ifade etmektedir. Toplam MAO aktivite ölçümü için geliştirilen diğer spektrofotometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında, tez kapsamında NM-T dedektör probu kullanılarak geliştirilen yeni spektrofotometrik yöntemin toplam aktivite ölçümünün en düşük LOD değerlerinde ve NIR dalgaboyunda ($\lambda_{em} = 786 \text{ nm}$) gerçekleştirilmesine olanak tanıdığı görülmektedir (Tablo 5.2).

Geliştirilen yeni yöntem ile elde edilen MAO-A izoformu kalibrasyon eğrisi kullanılarak doğru denklemi 6.3’deki gibi oluşturuldu.

$$y = 6.30 C_{\text{MAO-A}} + 0.02 \quad (6.3)$$

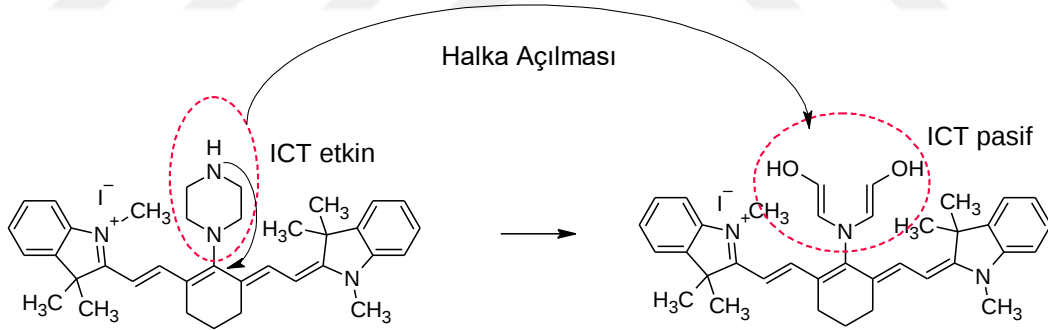
Lineer çalışma aralığı 1.26 – 8.73 µg/mL ve korelasyon katsayısı (r) 0.998 olarak hesaplandı.

Geliştirilen yeni yöntem ile elde edilen MAO-B izoformu kalibrasyon eğrisi kullanılarak doğru denklemi 6.4'deki gibi oluşturuldu.

$$y = 4.91 C_{\text{MAO-B}} + 0.09 \quad (6.4)$$

Lineer çalışma aralığı 0.79 – 8.53 µg/mL ve korelasyon katsayısı (r) 0.9944 olarak hesaplandı.

NM-T florojenik probunun MAO enzim izoformları ile reaksiyonu sonucunda, prob yapısında enzime seçicilik oluşturan piperazin halkası üzerindeki sekonder amin grubunun oksidasyonu ve deaminasyonuna bağlı olarak halka açılması meydana gelmektedir. Böylece, başlangıçta floresans özelliğe sahip olan prob yapısına elektron akışı kesilmekte ve floresans şiddeti azalmaktadır (Şekil 4.11 ve 4.13). Farklı konsantrasyonlarda enzime özgü inhibitörlerin ilave edilmesiyle bu azalma oranı daha düşüktür. Bu durum, NM-T probuna ait pik yüksekliklerinin artan inhibitör konsantrasyonu ile azalmasından açıkça görülmektedir.



Şekil 6.1 NM-T bileşiği üzerinde meydana gelen halka açılması.

NM-T probunun enzim izoformlarıyla inkübasyonu sonucunda ölçülen intensite değerlerinin sadece ortama ilave edilen MAO-A ve MAO-B çözeltilerinden kaynaklandığını göstermek amacıyla analiz çözeltisine ilave edilen tüm bileşenlerin tek başlarına emisyon spektrumları çizilmiştir (Şekil 4.9). Bu spektrum grafiği incelendiğinde analiz ortamında bulunan ürünlerin NM-T'nin floresans şiddetine etkisi olmadığı görülmektedir.

Sentezlenen NM-T florojenik probu kullanılarak hazırlanan çözeltinin tek başına ve enzim ilaveleri sonrasındaki görünür bölge spektrumu alındı ve detaylıca incelendi. 240 ve 260 nm'deki bantlar NM-T'nin molekül yapısında bulunan aromatik halkaların $\pi \longrightarrow \pi^*$ geçişlerine; 315 ve 356 nm'de bantlar ise alifatik yapının $n \longrightarrow \pi^*$ geçişlerini ifade etmektedir. NM-T prob çözeltisinin üzerine ilave edilen MAO-A ve MAO-B enzim çözeltileri piperazin halkasının oksidasyona bağlı olarak açılmasına; deaminasyon reaksiyonu sonucunda molekül yapısından NH_3 grubunun ayrılmasına ve dedektör probun molekül yapısında OH oksokrom grubunun oluşmasına neden olmaktadır (Şekil 5.1 ve 6.1). Buna bağlı olarak OH oksokrom grubu, meydana getirdiği hipokromik etki ile NM-T'nin absorbands şiddetinde 750 nm (MAO-A izoformu ile reaksiyonu sonucunda) ve 790 nm (MAO-B izoformu ile reaksiyonu sonucunda) dalga boylarında azalmaya; batokromik etki ile dalgaboyunun 690 nm'den 750 nm (MAO-A izoformu ile reaksiyonu sonucunda) ve 790 nm'ye (MAO-B izoformu ile reaksiyonu sonucunda) kaymasını sağlamaktadır (Şekil 4.15). MAO-A ve MAO-B izoformlarının kompleks molekül yapıları ve NM-T ile etkileşimlerinin farklı açılardan gerçekleşmesi göz önünde bulundurulduğunda absorbands şiddetinin azalması ve dalgaboyu kaymalarının farklılık gösterdiği düşünülmektedir.

Geliştirilen spektrofotometrik yöntem eşliğinde NM-T florojenik probunun 786 nm'deki floresans intensite değerleri kullanılarak inhibitör maddeler için IC_{50} değerleri incelendi. MAO-A inhibitörü olarak klorjilin ve MAO-B inhibitörü olarak pargilin kullanıldı. Klorjilin için IC_{50} değeri 0.095 μM ; pargilin için IC_{50} değeri 0.01 μM olarak hesaplandı (Tablo 4.2 ve 4.3). Alagöz ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, MAO-A inhibitörü olarak klorjilinin IC_{50} değeri 3-(2-Aminophenyl)-3-oxopropanamine (kynuramine) dedektör bileşiği kullanılarak spektrofotometrik bir yöntemle hesaplanmış ve IC_{50} (klorjilin): 0.07 μM olarak bulunmuştur [106]. Ozaita ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise, MAO-B inhibitörü olarak pargilinin IC_{50} değeri [^{14}C]PEA (2-phenylethylamine[ethyl-1- ^{14}C] hydrochloride) dedektör bileşikler kullanılarak radyokimyasal yöntemle hesaplanmış ve IC_{50} (pargilin) 0.0082 μM olarak bulunmuştur [107-110]. Sonuçlar ele alındığında, tez kapsamında geliştirilen yöntem uygulanarak bulunan değerler ile literatürde rapor edilen değerlerin birbirine yakın olduğu görülmektedir.

Literatürde toplam MAO aktivite ölçümüne yönelik olarak kullanılan NIR özelliğe sahip herhangi bir prob ve yöntem bulunmamaktadır. Tez kapsamında geliştirilen yöntem, herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan analizin gerçekleşmesine olanak sağlaması yönünden avantaj sağlamaktadır. Bu çalışma sonucunda geliştirilen yöntem biyolojik örneklerde seçici olarak MAO aktivite ölçümüne olanak tanıyan tıbbi tanı kitine (biyosensör) dönüştürülme potansiyeline sahiptir. Bu sayede nörodejenaratif hastalıkların klinik tanısı ve tedavisinde ilgili enzimlerin fonksiyonunun ortaya konulmasında kolaylık getireceği; elde edilecek yeni bilgiler neticesinde özellikle tıp alanında yeni projelerin üretilmesine katkı sağlaması düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- [1]. Ramsay, R.R., Tipton, K.F. 2017. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs, *Molecules*, 22, 1192, 1-47.
- [2]. Hong, R., Li, X. 2019. Discovery of monoamine oxidase inhibitors by medicinal chemistry approaches, *Med. Chem. Comm.*, 10, 10-25.
- [3]. Denya, I., Malan, S.F., Enogieru, A.B., Omoruyi, S.I., Ekpo, O.E. Kapp, E., Zindo, F.T. and Joubert, J. 2018. Design, synthesis and evaluation of indole derivatives as multifunctional agents against Alzheimer's disease, *Med. Chem. Comm.*, 9, 357-370.
- [4]. Shen, W., Long, S., Yu, S., Chen, W., Zhu, Q., 2012. Design, synthesis and evaluation of an activity-based probe for cellular imaging of monoamine oxidases, *Med. Chem. Res.*, 21, 3858-3862.
- [5]. DiPiro, J.T., Yee, G.C., Posey, L.M., Haines, S.T., Nolin, T.D., Ellingrod, V. 2020. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 11.baskı, USA, ISBN: 126-0116-824.
- [6]. Cacabelos, R. 2020. Pharmacogenomics of Alzheimer's and Parkinson's diseases". *Neurosci. Lett.*, 726, 133807.
- [7]. Samii, A., Nutt, J.G., Ransom, B.R. 2004. Parkinson's disease. *The Lancet*, 363, 1783-93.
- [8]. Ellis, J.M., Fell, M.J. 2017. Current approaches to the treatment of Parkinson's Disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27, 4247-4255.
- [9]. Raza, C., Anjum, R., Shakeel, N.A. 2019. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci.*, 226, 77-90.

- [10]. Fahn, S. 2008. Clinical Aspects of Parkinson Disease. *Parkinson's Disease Molecular and Therapeutic Insights From Model Systems*, New York, ISBN: 9780080559582.
- [11]. Dexter, D.T., Jenner, P. 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biol. Med.*, 62, 132-144.
- [12]. Rojas, R.J., Edmondson, D.E., Almos, T., Scott, R., Massari, M.E. 2015. Reversible and irreversible small molecule inhibitors of monoamine oxidase B (MAO-B) investigated by biophysical techniques. *Bioorg. Med. Chem.*, 23, 770-778.
- [13]. Mandel, S., Weinreb, O., Amit, T., Youdim, M.B.H. 2005. Mechanism of neuroprotective action of the anti-Parkinson drug rasagiline and its derivatives. *Brain Res. Rev.*, 48, 379-387.
- [14]. Concu, R., Gonzalez-Durruthy, M., Cordeiro, M.N.D.S. 2020. Developing a Multi-target Model to Predict the Activity of Monoamine Oxidase A and B Drugs. *Curr. Top. Med. Chem.*, 20, 1593-1600.
- [15]. Zhou, J. J. P., Zhong B., Silverman, R. B., 1996. Direct continuous fluorometric assay for monoamine oxidase B, *Anal. Biochem.*, 234, 9-12.
- [16]. Yamaguchi, K., Ueki, R., Nonaka, H., Sugihara, F., Matsuda, T., Sando, S., 2011. Design of Chemical Shift-Switching ^{19}F Magnetic Resonance Imaging Probe for Specific Detection of Human Monoamine Oxidase A, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 14208-14211.
- [17]. Zhou, M., Panchuk-Voloshina, N., 1997. A one-step fluorometric method for the continuous measurement of monoamine oxidase activity, *Anal. Biochem.*, 253, 169-174.
- [18]. Zhou, W., Valley, M.P., Shultz, J., Hawkins, E.M., Bernard, L., Good, D., Good, T., Riss, L., Klaubert, D.H., Wood, K.V., 2006. New bioluminogenic substrates for monoamine oxidase assays, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 10, 3122-3123.
- [19]. Huang, J., Hong, D., Lang, W., Liu, J., Dong, J., Yuan, C., Luo, J., Ge, J., Zhu, Q., 2019. Recent advances in reaction-based fluorescent probes for detecting monoamine oxidases in living systems, *Analyst*, 144, 3703-3709.

- [20]. Kim, D., Jun, Y.W., Ahn, K.H., 2014. Fluorescent probes for analysis and imaging of monoamine oxidase activity, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 35, 1269-1274.
- [21]. Albers, A.E., Rawls, K.A., Chang, C.J., 2007. Activity-based fluorescent reporters for monoamine oxidases in living cells, *Chem. Commun.*, 44, 4647-4649.
- [22]. Kim, D., Sambasivan, S. Nam, H., Kim, K.H., Kim, J.Y., Joo, T., Lee, K.H., Kim, K.T., Ahn, K.H., 2012. Reaction-based two-photon probes for in vitro analysis and cellular imaging of monoamine oxidase activity, *Chem. Commun.* 48, 6833-6835.
- [23]. Long, S., Chen, L., Xiang, Y., Song, M., Zheng, Y., Zhu, Q., 2021. An activity-based fluorogenic probe for sensitive and selective monoamine oxidase-B detection, 2012, *Chem. Commun.*, 48, 7167-7166.
- [24]. Xiang, Y., He, B., Li, X., Zhu, Q., 2013. The design and synthesis of novel "turn-on" fluorescent probes to visualize monoamine oxidase-B in living cells, *RSC Adv.* 3, 4876-4879.
- [25]. Li, X., Yu, J., Zhu, Q., Qian, L., Li, L., Zheng, Y., Yao, S.Q., 2014. Visualization of monoamine oxidases in living cells using "turn-on" fluorescence resonance energy transfer probes, *Analyst*, 139, 6092-6095.
- [26]. Aw. J., Shao, Q., Yang, Y., Jiang, T., Ang, C., Xing, B., 2010. Synthesis and characterization of 2-(2'-hydroxy-5'-chlorophenyl)-6-chloro-4(3H)-quinazolinone-based fluorogenic probes for cellular imaging of monoamine oxidases, *Chem. Asian J.*, 5, 1317-1321.
- [27]. Wu, X., Shi, W., Li, X., Ma, H., 2017. A strategy for specific fluorescence imaging of monoamine oxidase A in living cells, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, 15319-15323.
- [28]. Zhang, Y., Xu, Y., Tan, S., Xu, L., Qian, X., 2012. Rapid and sensitive fluorescent probes for monoamine oxidases B to A at low concentrations, *Tetrahedron Lett.* 53, 6881-6884.
- [29]. Lu, Y.Y., Wang, Y.G., Dai, B., Dai, Y.Q., Wang, Z., Fu, W.Z., Zhu, Q., 2008. A novel fluorogenic probe for monoamine oxidase assays, *Chinese Chem. Lett.* 19, 947-950.

- [30]. Shen, W., Yu, J., Ge, J., Zhang, R., Cheng, F., Li, X., Fan, Y., Yu, S., Liu, B., Zhu, Q., 2016. Light-up probes based on fluorogens with aggregation-induced emission characteristics for monoamine oxidase-A activity study in solution and in living cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8, 927-935.
- [31]. Chen, G., Yee, D.J., Gubernator, N.G., Sames, D., 2005. Design of optical switches as metabolic indicators: New fluorogenic probes for monoamine oxidases (MAO A and B), *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 4544-4545.
- [32]. Wu, X., Li, L., Shi, W., Gong, Q., Li, X., Ma, H., 2016. Sensitive and selective ratiometric fluorescence probes for detection of intracellular endogenous monoamine oxidase A, *Anal. Chem.*, 88, 1440-1446.
- [33]. Li, X., Zhang, H., Xie, Y., Hu, Y., Sun, H., Zhu, Q., 2014. Fluorescent probes for detecting monoamine oxidase activity and cell imaging, *Org. Biomol. Chem.*, 12, 2033-2036.
- [34]. Ma, J., Fan, J., Li, H., Yao, Q., Xia, J., Wang, J., Xiaojun, P., 2017. Probing hydrazine with a near-infrared fluorescent chemodosimeter, *Dyes Pigm.*, 138, 39-46.
- [35]. Fan, N., Wu, C., Zhou, Y., Wang, X., Li, P., Liu, Z., Tang, B., 2021. Rapid two-photon fluorescence imaging of monoamine oxidase B for diagnoses of early-stage liver fibrosis in mice, *Anal. Chem.*, 93, 7110-7117.
- [36]. Shang, J., Shi, W., Li, X., Ma, H., 2021. Water soluble near-infrared fluorescent probes for specific detection of monoamine oxidase A in living biosystems, *Anal. Chem.*, 93, 4285-4290.
- [37]. Yang, Z.M., Mo, Q.Y., He, J.M., Mo, D.L., Li, J., Chen, H., Zhao, S.L., Qin, J.K., 2020. Mitochondrial-targeted and near-infrared fluorescence probe for bioimaging and evaluating monoamine oxidase A activity in hepatic fibrosis, *ACS Sens.* 5, 943-951.
- [38]. Zhang, S., Zhao, B., Yu, L., Liu, J., Zhang, X., 2020. Piperazine multi-substituted triarylphosphine oxide compound as an instant light up fluorescent probe for monoamine oxidase, *Talanta*, 209, 120559.

- [39]. Jian, C., Yan, J., Zhang, H., Zhu, J., 2021. Recent advances of small molecule fluorescent probes for distinguishing monoamine oxidase-A and monoamine-B in vitro and in vivo, *Mol. Cell. Probes*, 55, 101686.
- [40]. Draoui, A., Hiba, O., Aimrane, A., Khiat, A., Gamrani, H., 2020. Parkinson's disease: from bench to bedside, *Rev. Neurol.* 176, 543–559.
- [41]. Mladenovi, M., Patsilidakos, A., Pirolli, A., M., Ragno, R., 2017. Understanding the molecular determinant of reversible human monoamine oxidase B inhibitors containing 2h-chromen-2-one core: structure-based and ligand-based derived 3-d qsar predictive models, *J. Chem. Inf. Model.* 57, 787.
- [42]. Matej, R., Miha, P., Robert, V., Janez, M., 2014. Examining electrostatic preorganization in monoamine oxidases A and B by structural comparison and pKa calculations, *J. Phys. Chem. B*, 118, 4326–4332.
- [43]. Robert, V., Repic, M., Janez, M., 2012. How are biogenic amines metabolized by monoamine oxidases? *Eur. J. Chem.* 36, 7057–7065.
- [44]. Colibus, L., Li, M., Binda, C., 2005. Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO-A): relation to the structures of rat MAO-A and human MAO-B, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 12684–12689.
- [45]. Kakinuma, S., Beppu, M., Sawai, S., Nakayama, A., Hirano, S., et al., 2020. Monoamine oxidase B rs1799836 G allele polymorphism is a risk factor for early development of levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease, *eNeurologicalSci*, 19, 100239.
- [46]. Warshel, A., Levitt, M., 1976. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme, *J. Mol. Biol.* 103, 227–249.
- [47]. Warshel, A., 1991. Computer Modelling of Chemical Reactions in Enzymes and Solutions, *John Wiley and Sons*, New York.
- [48]. Stephen, D.F., Sayan, B., Steven, G.B., 2014. Extreme electric fields power catalysis in the active site of ketosteroid isomerase, *Science*, 346, 1510–1514.

- [49]. Huang, J., Hong, D., Lang, W., Liu, J., Dong, J., Yuan, C., Luo, J., Ge, J., Zhu, Q., 2019. Recent advances in reaction-based fluorescent probes for detecting monoamine oxidases in living systems, *Analyst*, 144, 3703-3709.
- [50]. Wu, X., Li, X., Shi, W., Gong, Q., Ma, H., 2016. Near-infrared fluorescent probe with new recognition moiety for specific detection of tyrosinase activity: design, synthesis and application in living cells and zebrafish, *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 14728-14732.
- [51]. Long, S., Chen, L., Xiang, Y., Song, M., Zheng, Y., Zhu, Q., 2012. An activity-based fluorogenic probe for sensitive and selective monoamine oxidase-B detection, *Chem. Commun.*, 48, 7164.
- [52]. Zhang, S., Zhao, B., Yu, L., Liu, J., Zhang, X., 2020. Piperazine multi-substituted triarylphosphine oxide compound as an instant light-up fluorescent probe for monoamine oxidase, *Talanta*, 209, 120559.
- [53]. Valeur, B., Leray, I., 2000, Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition, *Coord. Chem. Rev.*, 205, 3-40.
- [54]. Milczek, E., Binda, C., Rovida, S., Mattevi, A., Edmondson D., Ve ark., 2011. The 'gating' residues ile199 and tyr326 in human monoamine oxidase b function in substrate and inhibitor recognition, *FEBS J.* 278, 4860–4869.
- [55]. Huang, J., Hong, D., Lang, W., Liu, J., Dong, J., Yuan, C., Luo, J., Ge, J., Zhu, Q., 2019. Recent advances in reaction-based fluorescent probes for detecting monoamine oxidases in living systems, *Analyst*, 144, 3703-3709.
- [56]. Yang, Z., Li, W., Chen, H., Mo, Q., Li, J., Zhao, S., Hou, C., Qin, J., Su, G., 2019. Inhibitor structure-guided design and synthesis of near-infrared fluorescent probes for monoamine oxidase A (MAO-A) and its application in living cells and in vivo, *Chem. Commun.*, 55, 2477-2480.
- [57]. Zhou, W., Valley, M. P., Shultz, J., Hawkins, E. M., Bernad, L., Good, T., Good, D., Riss, T.L., Klaubert, D. H., Wood, K. V., 2006. New bioluminogenic substrates for monoamine oxidase assays, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 3122-3123.

- [58]. Albers, A. E., Rawls, K. A., Chang, C. J., 2007. Activity-based fluorescent reporters for monoamine oxidase in living cells, *Chem. Commun.*, 44, 4647-4649.
- [59]. Li, X., Zhang, H., Xie, Y. S., Hu, Y., Sun, H., Zhu, Q., 2014. Fluorescent probes for detecting monoamine oxidase activity and cell imaging, *Org. Biomol. Chem.*, 12, 2033-2036.
- [60]. Kim, D., Sambasivan, S., Nam, H., Kim, K. H., Kim, J. Y., Joo, T., Lee, K. H., Kim, K. T., Ahn, K. H., 2012. Reaction-based two-photon probes for in vitro analysis and cellular imaging of monoamine oxidase activity, *Chem. Commun.*, 48, 6833-6835.
- [61]. Zhang, Y., Xu, Y., S. Tan, Xu, L., Qian, X., 2012. Rapid and sensitive fluorescent probes for monoamine oxidases B to A at low concentrations, *Tetrahedron Lett.*, 53, 6881-6884.
- [62]. Xiang, Y., He, B., Li, X., Zhu, Q., 2013. The design and synthesis of novel turn-on fluorescent probes to visualize monoamine oxidase-B in living cells, *Rsc. Adv.*, 3, 4876.
- [63]. Li, X., Yu, J., Zhu, Q., Qian, L., Li, L., Zheng, Y., Yao, S. Q., 2014. Visualization of monoamine oxidases in living cells using turn-on fluorescence resonance energy transfer probes, *Analyst*, 139, 6092-6095.
- [64]. Li, L., Zhang, C. W., Chen, G. Y. J., Zhu, B. W., Chai, C., Xu, Q. H., Tan, E. K., Zhu, Q., Lim, K. L., Yao, S. Q., 2014. A role for sorting nexin 27 in AMPA receptor trafficking, *Nat. Commun.* 5, 3176.
- [65]. Li, L. L., Li, K., Liu, Y. H., Xu, H. R., Yu, X. Q., 2016. Red emission fluorescent probes for visualization of monoamine oxidase in living cells, *Sci. Rep.*, 6, 31217.
- [66]. Wang, R., Han, X., You, J., Yu, F., Chen, L., 2018. Ratiometric near-infrared fluorescent probe for synergistic detection of monoamine oxidase B and its contribution to oxidative stress in cell and mice aging models, *Anal. Chem.*, 90, 4054-4061.
- [67]. Shen, W., Yu, J., Ge, J., Zhang, R., Cheng, F., Li, X., Fan, Y., Yu, S., Liu, B., Zhu, Q., 2016. Light-up probes based on fluorogens with aggregation-induced emission

characteristics for monoamine oxidase-A activity study in solution and in living cells, *ACS Appl. Mater. Inter.*, 8, 927-935..

- [68]. Wu, X., Li, L., Shi, W., Gong, Q., Li, X., Ma, H., 2016. Sensitive and selective ratiometric fluorescence probes for detection of intracellular endogenous monoamine oxidase A, *Anal. Chem.*, 88, 1440-1446.
- [69]. Wu, X., Wen, S., Li, X. H., Ma, H., 2017. A-strategy for spesific fluorescence imaging of monoamine oxidase A in living cells, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, 15319.
- [70]. Yang, Z., Li, W., Chen, H., Mo, Q., Li, J., Zhao, S., Hou, C., Qin, J., Su, G., 2019. Inhibitor structure-guided design and synthesis of near-infrared fluorescent probes for monoamine oxidase A and its application in living cells and in vivo, *Chem. Commun.*, 55, 2477.
- [71]. Qin, H., Li, L., Li, K., Yu, X., 2019. Novel strategy of constructing fluorescent probe for MAO-B via cascade reaction and its application in imaging MAO-B in human astrocyte, *Chin. Chem. Lett.*, 30, 71.
- [72]. Yang, Z.M., Mo, Q.Y., He, J.M., Mo, D.L., Li, J., Chen, H., Zhao, S.L., Qin, J.K., 2020. Mitochondrial-targeted and near-infrared fluorescence prob efor bioimaging and evaluating monoamine oxidase A activity in hepatic fibrosis, *ACS Sens.* 5, 943-951.
- [73]. Shang, J., Shi, W., Li, X., Ma, H., 2021. Water-soluble near-infrared fluorescent probes for spesific detection of monoamine oxidase A in living biosystems, *Anal. Chem.*, 93, 4285-4290.
- [74]. Fan, N., Wu, C., Zhou, Y., Wang, X., Li, P., Liu, Z., Tang, B., 2021. Rapid two-photon fluorescence imaging of monoamine oxidase B for diagnosis of early-stage liver fibrosis in mice, *Anal. Chem.*, 93, 7110-7117.
- [75]. Wu, J., Han, C., Cao, X., Lv, Z., Wang, C., Huo, X., Feng, Lei, Zhang, B., Tian, X., Ma, X., 2022. Mitochondria targeting fluorescent prob efor MAO-A and for applicatşon in the development of drug candidate for neuroinflammation, *Anal. Chem. Acta*, 1199, 339573.

- [76]. Ding, C., Ren, T., 2023. Near infrared fluorescent probes for detecting and imaging active small molecules, *Coord. Chem. Rev.* 482, 215080.
- [77]. Guo, Z., Park, S., Yoon, J., Shin, I., 2014. Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications, *Chem. Soc. Rev.* 43, 16–29.
- [78]. Ren, T., Xu, W., Jin, F., Cheng, D., Zhang, L., Yuan, L., Zhang, X., 2017. Rational engineering of bioinspired anthocyanidin fluorophores with excellent two-photon properties for sensing and imaging, *Anal. Chem.* 89, 11427–11434.
- [79]. Chen, Y., Wang, S.F., Zhang, F., 2023. Near-infrared luminescence high-contrast in vivo biomedical imaging, *Nat. Rev. Bioeng.* 1, 60–78.
- [80]. Li, J., Feng, Z., Yu, X., Wu, D., Wu, T., Qian, J., 2022. Aggregation-induced emission fluorophores towards the second near-infrared optical windows with suppressed imaging background *Coord. Chem. Rev.* 472, 214792.
- [81]. Singh, H., Tiwari, K., Tiwari, R., Pramanik, S.K., Das, A., 2019. Small molecule as fluorescent probes for monitoring intracellular enzymatic transformations, *Chem. Rev.* 119, 11718–11760.
- [82]. Li, K., Ren, T.B., Huan, S., Yuan, L., Zhang, X.B., 2021. Progress and perspective of solid-state organic fluorophores for biomedical applications, *J. Am. Chem. Soc.* 143, 21143–21160.
- [83]. Wang, R., Chen, J., Gao, J., Chen, J.A., Xu, G., Zhu, T., Gu, X., Guo, Z., Zhu, W.H., Zhao, C., 2019. A molecular design strategy toward enzyme-activated probes with near-infrared I and II fluorescence for targeted cancer imaging, *Chem. Sci.* 10, 7222–7227.
- [84]. Ren, T.B., Wen, S.Y., Wang, L., Lu, P., Xiong, B., Yuan, L., Zhang, X.B., 2020. Engineering a reversible fluorescent probe for real-time live-cell imaging and quantification of mitochondrial ATP, *Anal. Chem.* 92, 4681–4688.
- [85]. Ren, T.B., Wang, Z.Y., Xiang, Z., Lu, P., Lai, H.H., Yuan, L., Zhang, X.B., Tan, W., 2021. A general strategy for development of activatable NIR-II fluorescence probes for in vivo high-contrast bioimaging, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 60, 800–805.

- [86]. He, L., He, L.H., Xu, S., Ren, T.B., Zhang, X.X., Qin, Z.J., Zhang, X.B., Yuan, L., 2022. Engineering of reversible NIR-II redox-responsive fluorescent probes for imaging of inflammation in vivo, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 61, e202211409.
- [87]. Zhou, H.J., Ren, T.B., 2022. Recent progress of cyanine fluorophores for NIR-II sensing and imaging, *Chem. Asian J.* 17, e202200147.
- [88]. Billinton, N., Knight, A.W., 2001. Seeing the wood through the trees: A review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence, *Anal. Biochem.* 291, 175–197.
- [89]. Monici, M., 2005. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications, *Ann. Rev.* 11, 227–256.
- [90]. Frangioni, J.V., 2003. In vivo near-infrared fluorescence imaging, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 626–634.
- [91]. Ren, T.B., Xu, W., Zhang, Q.L., Zhang, X.X., Wen, S.Y., Yi, H.B., Yuan, L., Zhang, X.B., 2018. Enhancing the anti-solvatochromic two-photon fluorescence for cirrhosis imaging by forming a hydrogen-bond network, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 57, 7473–7477.
- [92]. Gao, M., Yu, F., Lv, C., Choo, J., Chen, L., 2017. Fluorescent Chemical probes for accurate tumor diagnosis and targeting therapy, *Chem. Soc. Rev.* 46, 2237–2271.
- [93]. Liu, X., Yu, B., Shen, Y., Cong, H., 2022. Design of NIR-II high performance organic small molecule fluorescent probes and summary of their biomedical applications, *Coord. Chem. Rev.* 468, 214609.
- [94]. Zeng, Z., Liew, S.S., Wei, X., Pu, K., 2021. Hemicyanine-based near-infrared activatable probes for imaging and diagnosis of diseases, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 60, 26454–26475.
- [95]. Sun, Y., Sun, P., Li, Z., Qu, L., Guo, W., 2022. Natural flavylium-inspired far-red to NIR-II dyes and their applications as fluorescent probes for biomedical sensing, *Chem. Soc. Rev.* 51, 7170–7205.

- [96]. Li, H., Kim, Y., Jung, H., Hyun, J.Y., Shin, I., 2022. Near-infrared (NIR) fluorescence-emitting small organic molecules for cancer imaging and therapy, *Chem. Soc. Rev.* 51, 8957–9008.
- [97]. Liu, F., Shi, X., Liu, X., Wang, F., Yi, H.B., Jiang, J.H., 2019. Engineering an NIR rhodol derivative with spirocyclic ring-opening activation for high-contrast photoacoustic imaging, *Chem. Sci.*, 10, 9257–9264.
- [98]. Park, S.Y., Won, M., Kang, C., Kim, J.S., Lee, M.H., 2019. A coumarin-naphthalimide hybrid as a dual emissive fluorescent probe for HNQO1, *Dyes Pigm.* 164, 341–345.
- [99]. Jiang, G., Ren, T.B., D’Este, E., Xiong, M., Xiong, B., Johnsson, K., Zhang, X.B., Wang, L., Yuan, L., 2022. A synergistic strategy to develop photostable and bright dyes with long stokes shift for nanoscopy, *Nat. Commun.* 13, 2264.
- [100]. Chen, H., Lin, W., Cui, H., Jiang, W., 2015. Development of unique xanthene-cyanine fused near-infrared fluorescent fluorophores with superior Chemical stability for biological fluorescence imaging, *Chem. Eur. J.*, 21, 733-745.
- [101]. Kang, N.Y., Park, S.J., Ang, X.W.E., Samanta, A., Driessen, W.H.P., Ntziachristos, V., Vasquez, K.O., Peterson, J.D., Yun, S.W., Chang, Y.T., 2014, A macrophage uptaking near-infrared chemical probe CDnir7 for in vivo imaging of inflammation, *Chem. Commun.*, 50, 6589-6591.
- [102]. Gaur, P., Kumar, A., Dey, G., Kumar, R., Bhattacharyya, S., Ghosh, S., 2016, Selenium incorporated cationic organochalcogen: live cell compatible and highly photostable molecular stain for imaging and localization of intracellular DNA, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8, 10690-10699.
- [103]. Li, T., Yu, L., Jin, D., Chen, B., Li, L., Chen, L., Li, Y., 2013, A colorimetric and fluorescent probe for fluoride anions based on a phenanthroimidazole-cyanine platform, *Anal. Methods*, 5, 1612-1616.

- [104]. Han, C., Yang, H., Chen, M., Su, Q., Feng, W., Li, F., 2015, Mitochondria-targeted near-infrared fluorescent off-on probe for selective detection of cysteine in living cells and in vivo, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7, 27968-27975.
- [105]. Boora, F., Chirisa, E., Mukanganyama, S., 2014, Evaluation of nitrite radical scavenging properties of selected zimbabwean plant extracts and their phytoconstituents, *J. Food Process.*, 2014, *Article ID: 918018*.
- [106]. Alagöz, M.A., Oh, J.M., Zenni, Y.N., Özdemir, Z., Abdelgawad, M.A., Naguib, I.A., Ghoneim, M.M., Gambacorta, N., Nicolotti, O., Kim, H., 2022. Development of a novel class of pyridazinone derivatives as selective MAO-B inhibitors, *Molecules*, 27, 3801.
- [107]. Fisar, Z., Hroudova, J., Raboch, J., 2010. Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressant and mood stabilizers, *Neuro Endocrinol Lett.*, 31, 645-656.
- [108]. Murphy, D.L., Karoum, F., Pickar, D., Cohen, R.M., Lipper, S., Mellow, A.M., Tariot, P.N., Sunderland, T., 1998. Differential trace amine alterations in individuals receiving acetylenic inhibitors of MAO-A (clorgyline) or MAO-B (selegiline and pargyline), *J. Neural. Transm. Suppl.*, 52, 39-48.
- [109]. Ozaita, A., Olmos, G., Boronat, M.A., Lizcano, J.M., Unzeta, M., Garcia-Sevilla, J.A., 1997. Inhibition of monoamine oxidase A and B activities by imidazol(ine)/guanidine drugs, nature of the interaction and distinction from I2-imidazoline receptors in rat liver, *Br. J. Pharmacol*, 121, 901-912.
- [110]. Ekstedt, B., 1976. Substrate specificity of the different forms of monoamine oxidase in rat liver mitochondria, *Biochem. Pharmacol*, 25, 1133-1138.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

Emin Ahmet YEŞİL

ORJİNALLİK RAPORU

% 16	% 15	% 3	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 7
2	dyuk.gedik.edu.tr İnternet Kaynağı	% 3
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 2
4	earsiv.anadolu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de İnternet Kaynağı	<% 1
7	repository.nwu.ac.za İnternet Kaynağı	<% 1
8	Dan WANG, Bin XUE, Lang-ping TU, You-lin ZHANG, Jun SONG, Jun-le QU, Xiang-gui KONG. "Enhancing Single-band Red Upconversion Luminescence of Ho ³⁺ Through	<% 1

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

- ☐ Etik Kurul izni gerekmektedir.
- ☒ Etik Kurul izni gerekmemektedir.

Emin Ahmet YEŞİL



KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

- ☐ Kurum izni gerekmektedir.
- ☒ Kurum izni gerekmemektedir.

Emin Ahmet YEŞİL



ÖZGEÇMİŞ

Makale ve Bildiriler

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler (SCI, SCI-Expanded, SSCI vb.)

1. Abdassalam A.F. Deniz N.G., Sayil M.C.; Ozyurek M., **Yesil E.A.**, Salihoglu, H.; Synthesis of New Regioisomers of 5-Nitro-1,4-Naphthoquinone, Evaluation of Antioxidant and Catalase Inhibition Activities, *Acta Chim. Slov.*, 2022, 69, 187-199. (doi: 10.1007/s12039-020-01835-9)
2. Deniz N.G., Abdassalam A.F., Ozyurek M., **Yesil E.A.**, Sayil M.C.; New Vitamin K3(Menadione) Analogues: Synthesis, Characterization, Antioxidant and Catalase Inhibition Activities, *J.Chem. Sci.*, 2020, 132, 1-9. (doi: 10.1007/s12039-020-01835-9).
3. Sezgin, N., **Yeşil, E.A.**, Altun, M., Temelli, U.E., Nemlioglu, S.; Spectrophotometric Characterization of Rhodamine B as a Dye Tracer for Brine Outfall Laboratory Experiments, *Fresen. Environ. Bull.*, 2018, 27, 2635-2641.
4. Demircioglu Z., **Yesil, A.E.**, Altun, M., Bal-Demirci, T., Ozdemir, N., X-ray Structure Determination, Hirshfeld Surface Analysis, Spectroscopic (FT-IR, NMR, UV-Vis. fluorescence), Non-linear Optical Properties, Fukui Function and Chemical Activity of 4'-(2,4- dimethoxyphenyl)-2,2':6',2''-terpyridine, *J. Mol. Struct.*, 2018, 1162, 96-108. (doi: 10.1016/j.molstruc.2018.02.093).

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Ozyurek M.*, Baykara M., **Yesil E.A.**, Altun M., Guclu K., “ A Novel Hemicyanine Based Near Infrared Fluorescent Probe for Rapid Detection of Bisulfite”; EastWest Chemistry Conference 2017, Skopje - MACEDONIA, 12-14 October, vol. P-004, pp:65.
2. Altun, M.*, **Yesil, E.A.**, Sezgin, N., Nemlioglu, S.; “Spectrophotometric Characterization of Rhodamine B as a Dye Tracer for Brine Outfall Laboratory Experiments”; 3rd International Conference on Recycling and Reuse 2016, İSTANBUL, 28-30 September, pp: 240.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. **Emin Ahmet Yeşil**, Mustafa Özyürek; “Toplam MAO Enzim Aktivite Tayini İçin Yeni Bir NIR Florojenik Prob: NM-T”, 1. Disiplinlerarası Yaklaşımlar Ulusal Kongresi, 2022, İSTANBUL, 16-18 Mayıs, sayfa:90.

Patentler

1. Nitrik Oksit Tayini İçin Yeni Bir Yakın Kızılötesi (NIR) Floresan Prob

Patent Sahibi: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Rektörlüğü; Buluş Sahipleri: Mehmet ALTUN, **Emin Ahmet YEŞİL**, Kubilay GÜÇLÜ, Mustafa ÖZYÜREK, Ahmet Ceyhan GÖREN; TR201715152

