



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METAL VE METAL OKSİT NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZE EDİLEN KALİKS[4]AREN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, İLAÇ TAŞINIMINDA KULLANILMASI VE CANLI HÜCREDE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet OĞUZ

DOKTORA TEZİ

Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Eylül-2020
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

DOKTORA TEZİ

METAL VE METAL OKSİT NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZE EDİLEN KALİKS[4]AREN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, İLAÇ TAŞINIMINDA KULLANILMASI VE CANLI HÜCREDE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet OĞUZ

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ VE İLERİ MALZEMELER ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

2020, 207 Sayfa

Jüri
Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Prof. Dr. Ahmet KOÇAK
Prof. Dr. Elif ÖZYILMAZ
Doc. Dr. Serkan SAYIN
Doc. Dr. Mustafa DURMAZ

Kaliksarenler, seçimli olarak farklı gruplarla türevlendirilerek molekül taşıma, suda ve organik çözücülerdeki çözünürlükleri ve biyokimyasal özellikleri gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri kolaylıkla değiştirilebilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı nano sepet yapısındaki kaliksarenler oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptir. Son yıllarda bu bileşiklerin farklı türevleri anti-kanser uygulamalarında anti-proliferatif ajan ve ilaç taşıyıcı materyal olarak kullanımı çok fazla ilgi görmektedir.

Bu tez çalışmasında, kaliks[4]aren bileşiklerinin anti-kanser özelliklerinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar üç faklı bölümde toplanmıştır. Bu bölümlerden birincisinde, kaliks[4]arenler fenolik –O üzerinden L-prolin grupları ile türevlendirilerek karakterize edildikten sonra 4 farklı insan kanseri hücre hatları ve bir sağlıklı epitelyum hücreleri üzerindeki anti-kanser özellikleri araştırıldı. Bu çalışmanın sonucunda L-prolin grubu taşıyan kaliksaren bileşiği seçimli olarak kolon kanseri hücre hatlarında sitotoksik etkisinin daha yüksek olduğu gözlendi. İkinci bölümde, suda çözünmeyen doğal flavonoid bir bileşik olan ve aynı zamanda anti-kanser özelliğe sahip kuersetin molekülünün hem sudaki çözünürlüğünü artırmak hem de anti-kanser özelliğini araştırmak için suda çözünebilen fenolik–O üzerinden N,N-dimetilalkil grupları ile fonksiyonlandırılmış sülfo-kaliks[4]aren türevleri ile fizyolojik pH da (7.5) kompleksleri hazırlanıp 4 farklı insan kanseri hücre hatları ve bir sağlıklı epitelyum hücreleri üzerindeki anti-kanser özellikleri incelendi. Sonuçta bu kompleksin seçilen hücrelere karşı seçimli olduğu ve en yüksek sitotoksik etkiyi HeLa (11.2 μM) ve A549 (18.1 μM) hücrelerine karşı gösterdiği gözlendi. Üçüncü bölümde ise nano taşıyıcı malzemeler olarak tiyol grubu taşıyan sülfo-kaliks[4]aren türevi altın nano partiküllere immobilize edildi (ANPs@calix) ve kuersetin molekülü ile kompleksi hazırlandı (ANPs@calix-Qrc). Hazırlanan bu kompleksin SW620 insan kolon kanseri hücresine karşı etkili olduğu gözlendi. Elde edilen sonuçlara göre nano taşıyıcı olarak sentezlenen materyal ile komleksleştirilen kuersetinin (ANPs@calix-Qrc) IC_{50} değeri yaklaşık 52 kat arttığı gözlendi. Bu çalışmalara ek olarak hazırlanan kaliksaren-kuersetin kompleksleri için laboratuvar ortamında salınım testleri yapıldıktan sonra hücre içi taşınım mekanizması aydınlatıldı.

Anahtar Kelimeler: Kaliks[4]aren, Nanopartikül, Flavonoid, İlaç Taşınımı, Sitotoksisite, Apoptoz

ABSTRACT

Ph.D THESIS

SYNTHESIS OF CALIX[4]AREN DERIVATIVES IMMOBILIZED ONTO METAL AND METAL OXIDE NANOPARTICLES FOR THEIR APPLICATION IN DRUG DELIVERY AND INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECTS IN LIVING CELLS

Mehmet OGUZ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELCUK UNIVERSITY
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN ADVANCED MATERIALS AND NANOTECHNOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

2020, 207 Pages

Jury
Advisor Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Prof. Dr. Ahmet KOCAK
Prof. Dr. Elif OZYILMAZ
Assoc. Prof. Dr. Serkan SAYIN
Assoc. Prof. Dr. Mustafa DURMAZ

Calixarenes can be selectively generalized to different groups and able to easily modified for various physical and chemical properties, such as molecular transport, solubility in water and organic solvents, and biochemical properties. Due to these properties, calixarenes in nano basket structure have a wide application area. In recent years, the use of various derivatives of these compounds as anti-proliferative agents and drug carrier materials in anti-cancer applications has attracted much attention.

In this thesis project, the studies conducted to investigate the anti-cancer properties of calix[4]arene compounds have collected in three different sections. In the first of these sections, after calix[4]arene derivatized with L-proline groups through the lower rim, anti-cancer properties on four different human cancer cell lines and one healthy epithelial cells were investigated. As a result of this study, it was observed that the calixarene compound carrying the L-proline group had a higher cytotoxic effect in colon cancer cell lines. In the second part, water-soluble sulfo-calix[4]arene derivatives functionalized with N, N'-dimethyl ethyl amine group over the lower rim to increase the solubility of quercetin molecule, which is a natural flavonoid compound that is insoluble in water and to investigate its anti-cancer properties at physiological pH (7.5) were prepared and their anti-cancer properties on 4 different human cancer cell lines and one healthy epithelial cells were examined. As a result, it was observed that this complex behaved selectively against selected cells and showed the highest cytotoxic effect against HeLa (11.2 μM) and A549 (18.1 μM) cells. In the third part, sulfo-calix[4]arene derivatives carrying the thiol group as nanocarrier materials were immobilized to gold nanoparticles (ANPs@Calix) and their complex was prepared with quercetin molecule (ANPs@Calix-Qrc). It was observed that this complex prepared was effective against SW620 human colon cancer cell. According to the results, it was observed that the IC_{50} value of quercetin (ANPs@Calix-Qrc) complexed with the material synthesized as a nanocarrier increased approximately 52 times. In addition to these studies, the intracellular transport mechanism was elucidated after laboratory experimental tests were performed for the discover calixarene-quercetin complexes.

Keywords: Calix[4]arene, Nanoparticle, Flavonoids, Drug Delivery, Cytotoxicity, Apoptosis

ÖNSÖZ

Ve geldik uzun bir yolculuğun sonuna…!!!

Bu tezin planlanmasında, çalışmaların yürütülmesinde ve son olarak başarılı bir şekilde sonlanmasında bana engin bilgi ve tecrübesiyle destek olan, yol gösteren değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Mustafa Yılmaz'a

Tez çalışmalarımda ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Tez izleme Komitesi (TİK) üyesi hocalarım, Sayın Prof. Dr. Ahmet Koçak ve Prof. Dr. Elif Özyılmaz'a

Tez çalışmam süresince özellikle biyokimyasal çalışmalarda laboratuvar olanaklarını sunarak yardımını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Serdar Karakurt'a,

Tez çalışmalarım süresince desteklerini benden esirgemeyen Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyeleri ve Personellerine,

Bu tez çalışması TÜBİTAK 113Z445 nolu İkili Ulusararsı Projesi, TÜBİTAK 116Z173 nolu 1001 Projesi, TÜBİTAK 116Z933 nolu 1002 Projesi ve TÜBİTAK- BİDEP 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir. Tüm desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a,

Gerek deneysel çalışmalarımda gerekse tezimin hazırlanmasında bana "*sevgi ve istekle*" yardım eden ve bu stresli dönemimde yardımlarını gördüğüm, desteğini her an hissettiğim iyi ki tanımışım dediğim değerli arkadaşım doktora öğrencisi Alev Gül'e,

Bu yoğun ve yorucu çalışma temposunda laboratuvar zamanlarımızın eğlenceli geçmesini sağlayan, iyi ki tanımışım dediğim değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Ayşen Işık ve Malak Alizada' ya,

Doktora eğitim sürecimde karşılıksız sevgileri ile beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, varlıkları ile beni her zaman mutlu eden değerli aileme,

Teşekkürü bir borç bilirim…

Mehmet OĞUZ

KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kaliksarenler 1
1.2. *p-ter*-Bütilkaliksarenlerin Sentezi 3
1.3. Kaliksarenlerin Adlandırılması 4
1.4. Kaliksarenlerin Sentez Mekanizması 4
1.5. Kaliksarenlerin Konformasyonları 7
1.6. Kaliksarenlerin Fonksiyonlandırılması 9
1.6.1. Kaliksarenlerin Fenolik Birimlerin *para* Konumundan Fonksiyonlandırılması 9
1.6.2. Kaliksarenlerin Fenolik-O Üzerinden Fonksiyonlandırılması 11
1.7. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları 13
1.7.1. Sensör Çalışmalarında Kaliksarenlerin Kullanımı 13
1.7.2. Enzim İmmobilizasyon Çalışmalarında Kullanımı 16
1.7.3. Kaliksarenlerin Katalizör Olarak Kullanımı 18
1.7.4. Nanopartikül Tasarımı için Kullanılan Kaliksarenler 20
1.7.5. Kaliksarenlerin Molekül Taşıyıcı Olarak Kullanımı 22
1.7.6. Kaliksarenlerin Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanımı 24
1.8. Kanser 26
1.8.1. Kanser Oluşum ve Gelişimi 28
1.9. Apoptoz 30
1.9.1. Nekroz 30
1.10. Nanoteknoloji 31
1.10.1. Nanoteknolojinin Tarihi 31
1.10.2. Nanoteknolojinin Tanımı ve Amaçları 31
1.10.3. Nanoteknolojinin Kullanım Alanları 33
1.10.4. Nanoteknolojinin Avantajları 34
1.10.5. Nanoteknolojinin İlaç Taşınımındaki Yeri 34
1.10.6. Kanser Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Sistemler 36
1.11. Nanopartiküller 38
1.11.1. Metal Nanopartiküller 40

2. BÖLÜM-1: KALİKSARENLERİN ANTİ-KANSER ÇALIŞMALARDA KULLANILMASI 47

2.1. KAYNAK ARAŞTIRMASI 47
2.2. MATERYAL VE YÖNTEM 60
2.2.1. Enstrümantal Teknikler 60
2.2.2. Kimyasal Sentezler 60
2.2.2.1. 5,11,17,23-(Tetra-ter-bütil)-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren (1) (Gutsche ve Iqbal, 1990a) 61
2.2.2.2. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi 26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (2) 61
2.2.2.3. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidroksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (3) (Collins ve ark., 1991) 62
2.2.2.4. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-diklorokarbonilmetoksi 26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (4) 63
2.2.2.5. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-diklorokarbonilmetoksi 26,28-dihidroksi kaliks[4]aren ile *L*-prolinmetilesteri bileşiğinin etkileştirilmesi (5) 63
2.2.2.6. 5 nolu bileşiğin hidrolizi (6) 64
2.2.2.7. 5,11,17,23-(Tetra-ter-bütil)-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren'nin dealkilasyonu (Gutsche ve Iqbal, 1990b) 65
2.2.2.8. 25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren (Arnaud-Neu ve ark., 1989) 66
2.2.2.9. 25,27-dihidroksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren (Arnaud-Neu ve ark., 1989) 67
2.2.2.10. 25,27-diklorokarbonilmetoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren (Arnaud-Neu ve ark., 1989) 67
2.2.2.11. 11 nolu Bileşiğin Sentezi 68
2.2.2.12. 11 nolu bileşiğin hidrolizi (12) 68
2.2.3. Biyokimyasal Uygulamalar 69
2.2.3.1. Hücre Kültürü 69
2.2.3.2. Hücrelerin Büyüme Besiyerlerinin Hazırlanması 69
2.2.3.3. Hücre Açma 70
2.2.3.4. Hücre Kapatma 70
2.2.3.5. Hücre Canlılığı Deneyleri 71
2.2.3.6. Apoptoz Deneyleri 71
2.3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 73
1.4.1. 6 ve 12 no'lu Bileşiklerin Sitotoksisite Çalışmaları 85
1.4.2. 6 ve 12 no'lu Bileşiklerin Flow Sitometre Çalışmaları 90

3. BÖLÜM-2: SUDA ÇÖZÜNEN KALİKSARENLERİN İLAÇ TAŞIYICI OLARAK KULLANILMASI 95

3.1. KAYNAK ARAŞTIRMA 95
3.2. MATERYAL VE YÖNTEM 114
3.2.1. Kimyasal Sentezler 114
3.2.1.1. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrametoksikarbonilmetoksi-kaliks[4]aren (Arnaud-Neu ve Schwing-Weill, 1997) 115
3.2.1.2. 14 nolu Kaliksaren Türevinin Sentezi (Dings ve ark., 2013) 115
3.2.1.3. 15 nolu Kaliksaren Türevinin Sentezi (Maity ve ark., 2015) 116
3.2.1.4. *p*-Sülfokaliks[4]aren-Kuersetin kompleksinin hazırlanması (15-Q) ... 117

3.2.1.5. *p*-Sülfokaliks[4]aren-Kuersetin komplekslerinin stokiyometrik oranlarının belirlenmesi 117
3.2.1.6. *p*-Sülfokaliks[4]aren-Kuersetin komplekslerinin etkileşme sabitinin tayini 118
3.2.1.7. Kuersetinin faz çözünürlüğü çalışması 118
3.2.2. Biyokimyasal Uygulamalar 119
3.2.2.1. Hücre Hatları ve Büyüme Ortamlarının Hazırlanması 119
3.2.2.2. Kaliksaren Türevlerinin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Belirlenmesi 119
3.3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 120
3.3.1. *p*-Sülfokaliks[4]arenlerin kuersetin ile kompleksleştirilmesi 125
3.3.2. 15 ve 15-Q no'lu Bileşiklerin Sitotoksisite Çalışmaları 128
3.3.3. Hücre Görüntüleme Çalışması 133
3.3.4. Apoptoz Çalışması 134

4. BÖLÜM-3: ALTIN NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZE EDİLEN KALİKSARENLER 136

4.1. KAYNAK ARAŞTIRMA 136
4.2. MATERYAL VE YÖNTEM 145
4.2.1. Kimyasal Sentezler 145
4.2.1.1. 25,27-Bis(3-bromopropoksi)-26,28-dihidroksi-5,11,17,23-tetra(*ter*-bütil)-kaliks[4]aren (Li ve ark., 1999) 146
4.2.1.2. 25,27-Bis(3-tiyopropoksi)-26,28-dihidroksi-5,11,17,23-tetra(*ter*-bütil)-kaliks[4]aren (Ha ve ark., 2009) 147
4.2.1.3. 18 ve 19 no'lu sülfo-kaliks[4]aren bileşiklerinin sentezi (Maity vd. 2015) 148
4.2.1.4. Altın nanopartiküllerin hazırlanması (AuNPs): (Enustun ve Turkevich, 1963) 149
4.2.1.5. *p*-Sülfokaliks[4]arenin (18) altın nanopartiküllere immobilizasyonu (AuNPs@Calix) 149
4.2.1.6. 18 nolu bileşiğin immobilize edildiği altın nanopartiküllere (AuNPs@Calix-Qrc) kuersetinin yüklenmesi 150
4.2.1.7. *p*-Sülfokaliks[4]aren-Kuersetin komplekslerinin hazırlanması (Calix-Qrc) 151
4.2.1.8. *p*-Sülfokaliks[4]aren-Kuersetin komplekslerinin stokiyometrik oranlarının belirlenmesi 151
4.2.1.9. *p*-Sülfokaliks[4]aren-Kuersetin komplekslerinin etkileşme sabitinin tayini 152
4.2.1.10. Kuersetinin faz çözünürlüğü çalışması 152
4.2.2. Biyokimyasal Uygulamalar 153
4.2.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları 153
4.2.2.2. Hücre hatları ve büyüme ortamlarının hazırlanması 153
4.3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 154
4.3.1. Altın Nanopartiküllere İmmobilizasyon Çalışmaları 157
4.3.2. *p*-Sülfokaliks[4]aren immobilize edilmiş (AuNPs-Calix) altın nanopartiküllerin kuersetin taşınmasında kullanılması 160
4.3.3. Kuersetin-sülfokaliks[4]aren kompleksleşmesine pH etkisi 166
4.3.4. Sentezlenen Bileşiklerin Sitotoksisite Çalışmaları 168
4.3.5. Kuersetin 169
4.3.6. Konfokal Mikroskop Çalışmaları 172

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 174

KAYNAKLAR 177

ÖZGEÇMİŞ 188

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

N	Normalite
M	Molarite
M_A	Molekül Ağırlığı
mL	Mililitre
Mmol	Milimol
-*p*-	Para
-*o*-	Orto
Ter-	Tersiyer
Eqv	Eşdeğer Gram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Santigrat Derece

Kısaltmalar

ATCC	American Type Culture Collection
DMSO	Dimetil Sülfoksit
IC_{50}	Toplam Hücre Sayısının Yarısını İnhibe Eden İlaç/Madde Konsantrasyonu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

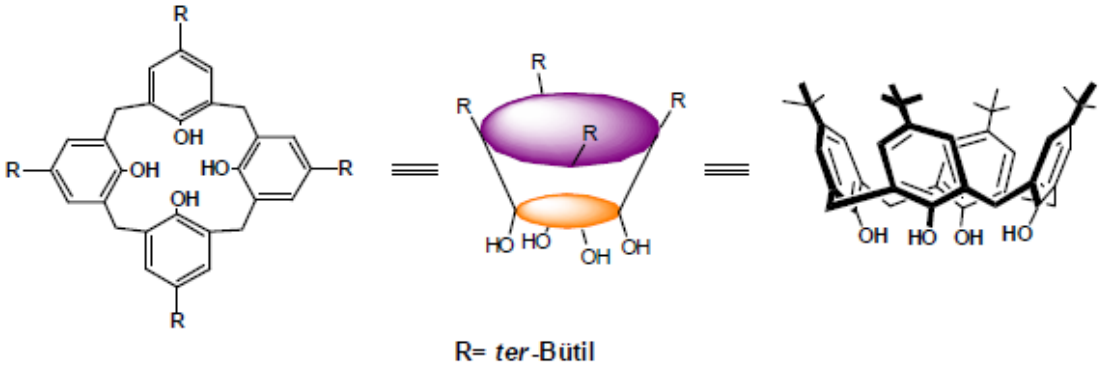
Gelişen ve büyüyen teknolojinin ışığı altında insan sağlığına yönelik çok önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Özellikle çevremizde bulunan birçok toksik maddelerin arıtılmasında ve son yıllarda ise özellikle farmakolojide kullanılan pek çok ilacın etken maddesi olan bileşiklerin ayrılması, taşınması ve sudaki çözünürlüklerinin artırılması üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Malzemenin nanometrik boyutta kontrolü ile daha işlevsel ve verimli ürünlerin elde edilmesini amaçlayan nanoteknoloji, elektronik, tıp, ilaç, biyoteknoloji, kimya, fizik, malzeme bilimleri ve makina mühendisliği gibi çok geniş bir alanı kapsamaktadır. Ülkemizin bu teknolojide söz sahibi olması hem ekonomik hem sosyal açıdan gelişmiş ülkeler arasında yer almamız adına önemlidir. Kontrollü hedeflenmiş ilaç salınımı birçok hastalığın tedavisinde önem arz etmekte olup ancak doğal yollardan mümkün değildir. Etkin ve sağlıklı dokulara hasar vermeyecek ilaçların üretimi nano malzemelerin kullanılması ile mümkün olabilecektir.

Supramoleküler kimyada bu sorunları çözmek için uygun fonksiyonel gruplar taşıyan makro-moleküllerin sentezi için değişik metotlar geliştirilmektedir. Bu alanda kaliksarenler üçüncü kuşak bileşik olarak bilinmektedir. Farklı moleküllerle kompleks oluşturabilen hidrofobik bir boşluk oluşturacak şekilde fenolik yapıların hidroksil gruplarına göre *o*-konumundan metilen köprüleri ile birbirine bağlanmış, halkalı ve esnek yapıda bir oligomer bileşik olan kaliksarenlerin her geçen gün yeni bir özelliği keşfedildiği için bu bileşiğe olan ilgi git gide artmaktadır.

1.1. Kaliksarenler

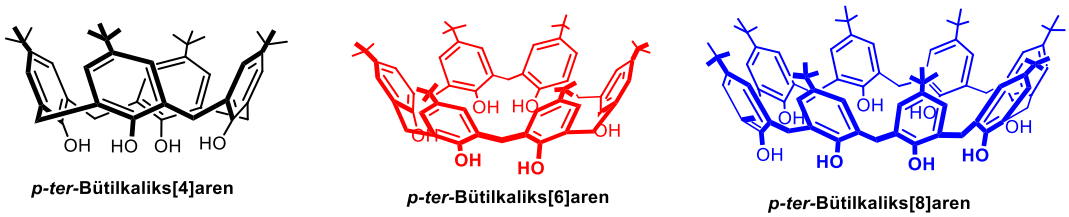
Taç eterler ve siklodekstrinler birinci ve ikinci kuşak supramolekülleri oluştururken, kaliksarenler de benzer özellik göstermesi nedeniyle üçüncü kuşak supramoleküller olarak tanımlanmaktadırlar (Neri ve ark., 2016). Kaliksarenler farklı moleküllerle kompleks yapabilme özelliğine sahip hidrofobik bir boşluk oluşacak şekilde *p-ter*-bütil fenol ile HCHO (formaldehit) nun metilen köprüleri ile fenolik birimlerin birbirine bağlanması sonucu oluşan makrosiklik moleküllerdir. 1872 yılında ilk olarak Adolph von Baeyer tarafından; sulu formaldehit ve fenolü ısıtarak oldukça sert reçinemsi ve kristallenmeyen bir ürün elde etmesiyle bu bileşiğin sentezine başlanmıştır. Fakat o zamanlar da yapısı tam olarak belirlenememiştir. 20. Yüzyılın başlarında Leo Hendrick Baekeland fenol-formaldehit tepkimesinden elastiki katı bir

reçinenin hazırlanması için sentetik bir metod geliştirmiş ve patentini almıştır (Baekeland, 1909). Avusturyalı kimyacı Alois Zinke ve Erich Zeigler, 1941 yılında kaliksarenleri ilk olarak ortaya çıkarmayı başarmışlardır. Zinke ve Ziegler ‘‘Bakalit oluşum prosesi’’ üzerindeki çalışmalarını artırarak *p-ter*-bütilfenol ve sulu formaldehiti bazik ortamda tepkimeye girmesini sağlamış ve çözünürlüğü az olan, erime noktası 340^{o}C’nin üzerinde, yüksek molekül ağırlıklı halkalı tetramerik yapıda bir madde elde ettiklerini ileri sürmüşlerdir (Zinke ve Ziegler, 1944) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 *p-ter*-Bütilkaliks[4]arenlerin model yapıları

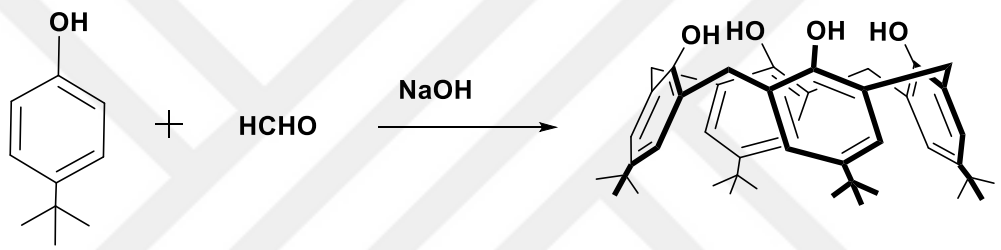
Gutsche ve arkadaşları, Zinke ve Ziegler’in elde ettikleri ürünün gerçekte bir tetramer olmayıp; tetramer, hekzamer, oktamer ve bir miktar da lineer oligomer karışımı olduğunu ispatlamışlardır (Gutsche 1981). Gutsche ve grubu (1990) *p-ter*-bütil fenol ve formaldehiti uygun bir baz eşliğinde tepkimeye sokarak tek kapta halkalı tetramer, hekzamer ve oktamer sentezi için metotlar geliştirerek saf olarak yüksek verimle bu bileşikleri sentezlemeyi başarmışlardır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Tek kap metodu ile elde edilebilen kaliks[n]aren yapıları

1.2. *p-ter*-Bütilkaliksarenlerin Sentezi

Gutsche ve grubunun (1989), kaliksarenlerin sentezi üzerine geliştirdikleri metodu şöyle özetleyebiliriz; *p-ter*-bütilfenol, %37 formaldehit çözeltisi ve fenol eşdeğer miktarına bağlı olarak NaOH ile 110-120 ^{o}C aralığında mantolo ısıtıcıda karıştırılır (Gutsche ve Stoddart, 1989). Elde edilen ürün difenil eter ile 2 saat kaynatılır ve reaksiyon karışımı oda sıcaklığında bekletir. Oda sıcaklığına gelen ürün etil asetat ile etkileştirilerek çökmesi sağlanır ve süzülür. Ürün tolüen ile tekrar kristallendirilerek 342-344^{o}C' de eriyen beyaz renkli *p-ter*-bütilkaliks[4]aren sentezlenmiş olur. Uygun reaksiyon ortamında başlangıç maddesi seçilerek *p*-konumundan aynı sübstitüenti taşıyan halkalı tetramer, hekzamer ve oktamer elde etmek mümkündür.



Şekil 1.3 *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in sentezi

Kaliksarenlerin sentezine bazı reaksiyon faktörleri etki etmektedir. Bu faktörler;

- **Çözücü:** apolar çözücüler (örneğin; difenil eter, ksilen..) kaliksarenlerin oluşumunda tercih edilirler.
- **Sıcaklık:** kaliks[6,8]arenlerin sentezinde daha çok ılıman ortam tercih edilirken, kaliks[4]arenlerin sentezi için difenil eter içinde ve yüksek sıcaklık tercih edilmektedir.

  Baz oranı: kaliks[4]arenlerin sentezi için kullanılacak bazın optimum miktarda olması gerekir. Baz konsantrasyonu kullanılan *p-ter*-bütilfenol miktarına göre 0,03-0,04 eşdeğer miktarda kullanıldığı zaman ürünün veriminin maksimum olduğu görülür. Kullanılan baz miktarı eğer bu değerlerin dışında ise, ürünün veriminde düşüş gözlenir. Ürün veriminin maksimum olduğu oranda bazın eşdeğer miktarı daha fazla ilave edilirse siklik tetramer oluşum miktarını düşürür ve hatta sıfıra bile indirebilir. Baz ilavesine devam edilirse eğer ürün artık tetramer yapıda değil, siklik hekzamer yapıda bir ürüne dönüştüğü görülür.

Siklik tetramer ve oktomer yapılarını elde etmek için bazın katalitik mikarda olması, siklik hekzamer için ise bu durumun stokiyometrik oranda olması gerekir (Gutsche ve ark., 1981; Dhawan ve ark., 1987a).

- **Katyon çapı:** kaliks[4,8]arenleri sentezleyebilmek için küçük çaplı LiOH, NaOH gibi katyonlar kullanılırken, kaliks[6]areni elde etmek için büyük çaplı KOH, RbOH gibi katyonlar kullanılmalıdır. Bunun sebebi; kaliksarenlerin üzerinde bulunan oksijen atomları arasındaki mesafeler ölçülerek ve halkalı tetramer 0.8 Å, hekzamer 2.0-2.9 Å ve oktamerde 4.5 Å olduğu bulunmuştur.

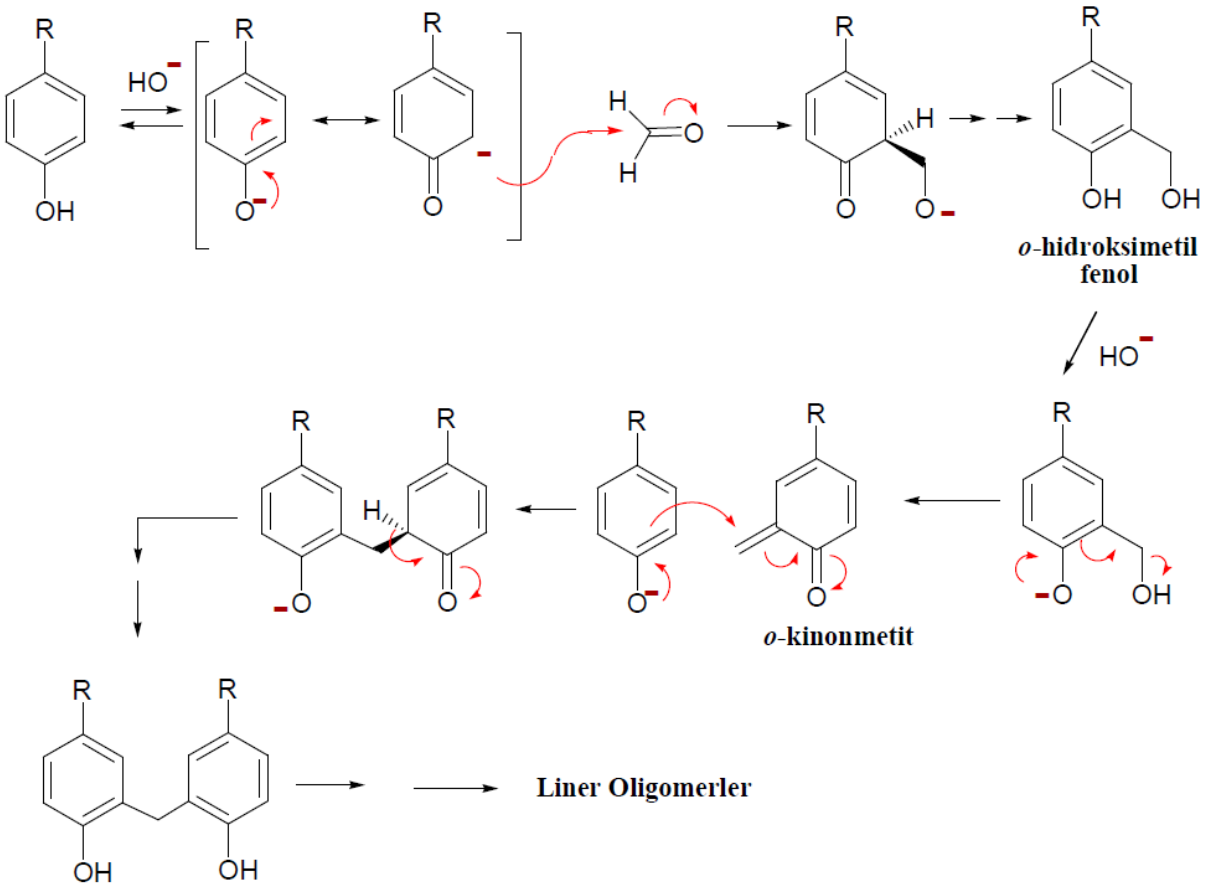
1.3. Kaliksarenlerin Adlandırılması

Fenol halkalarının metilen grupları ile köprü oluşturarak bağlanması sonucunda oluşan halkalı tetramer taç şekline benzeyen bir yapıdadır. Kaliksarenler çoğu araştırmacılar tarafından farklı isimler almıştır. Gutsche kaliksarenler gibi bileşiklerin isimlendirilmesi IUPAC sistemine göre zor olacağı için, bu bileşikleri pratik bir yolla isimlendirmeyi IUPAC 'a kabul ettirmiştir. Kaliksaren Yunanca taç anlamındadır ve organik kimya alanında halkayı gösteren "aren" kelimesi ile birleşmesi sonucu oluşmuştur. Fenolik birimlerin miktarını ve makrosikliğin büyüklüğünü kaliks[n]aren ifadesindeki [n] göstermektedir. Son yıllarda, bu yapıdaki bileşikler isimlendirilirken ya aromatik halkadaki sübstitüe grupların yerini belirlemek için numaralandırma kullanılır ya da fenoldeki sübstitüe grup ile fenolik birimlerin sayısını belirlemek amacıyla isimlendirme sistemi kullanılır. Kaliks[n]arenler 4,5,6,7…. gibi farklı sayıda fenolik birimlerden ve sübstitüe gruplardan meydana gelebilir. Farklı yapıdaki sübstitüe fenoller için kaliksarenler adlandırılırken, fenolün sübstitüe birimi kaliksarenin önüne yazılır. Literatürden bir örnek ile açıklanacak olursa; p-alkil fenol gruplarından oluşan dört üyeli siklik tetramer yapıdaki kaliksarenler, 5,11,17,23-tetra-alkil-25,26,27,28-tetra-hidroksi kaliks[4]aren şeklinde isimlendirilir, daha kısa ifade etmek gerekirse bu bileşiğe p-alkilkaliks[n]arenler şeklinde adlandırılabilir (Gutsche ve ark., 1989).

1.4. Kaliksarenlerin Sentez Mekanizması

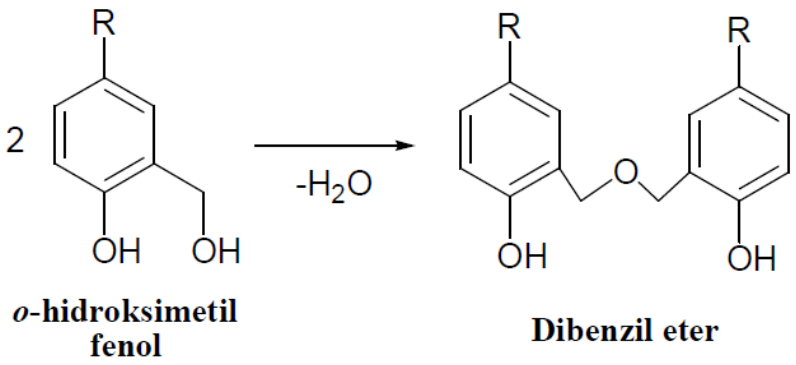
Yıllardır pek çok araştırmacı, fenol ile formaldehitin bazik ortamda oluşturduğu kondenzasyon reaksiyonunun sentez mekanizması üzerine çalışmışlardır. Birinci basamakta ortamda bulunan baz fenolik hidroksi grubundan bir proton koparır ve

karbon nükleofili olarak görev yapan fenoksit iyonu oluşur. Aromatik halka ile oluşan fenoksit iyonu rezonansa girerek o-konumunu elektronca daha zengin duruma getirir ve *o*-konumunda elektron çifti oluşur. Oluşan elektron çifti formaldehitin karbonil karbonu ile kolay bir şekilde reaksiyona girer ve *orto*-hidroksimetilfenol meydana gelir. Şekil 1.4'te gösterildiği gibi ortamda bulunan fenol baz etkisi ile fenoksit iyonuna dönüşür ve rezonansa girerek bir okinonmetit ara ürünü meydana gelir. Oluşan ara ürün ortamda bulunan diğer fenoksit iyonunun *o*-konumundan reaksiyona girer ve diaril metan oluşur.



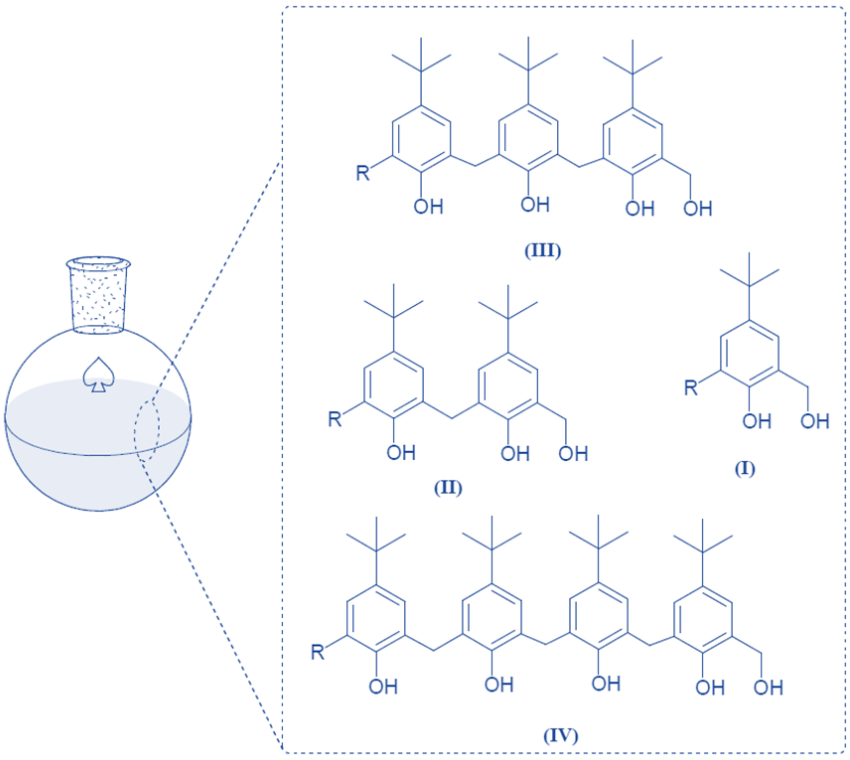
Şekil 1.4 Lineer oligomer sentez mekanizması

Dibenzil eterlerin dehidratasyonu sonucu da hidroksimetilfenoller oluşabilir.



Şekil 1.5 Dibenzil eter oluşumu

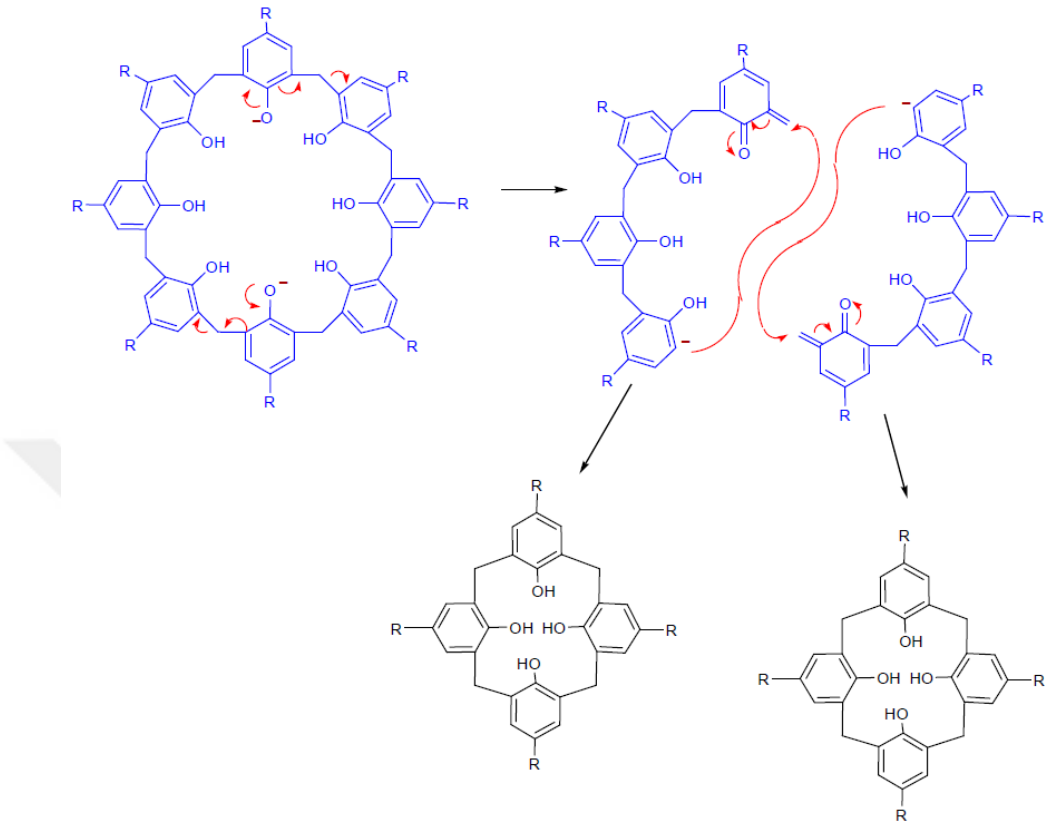
Oligomer oluşumu reaksiyonunun farklı basamaklarında difenil metan ve dibenzil eter türü bileşikleri olduğundan reaksiyon sonunda dört farklı bileşik içeren bir karışım elde edilir (I-IV). Bu dört farklı bileşik ara ürün olarak meydana gelir ve yüksek sıcaklık gibi özel koşullarda benzer ürün karışımlarına dönüşür ve halkalı yapıdaki kaliksarenleri meydana getirir (Dhawan ve ark., 1987b).



Şekil 1.6 Fenolik ara ürün karışımları

Gutsche ve Dhawan'ın yaptıkları bir çalışmada *p-ter*-bütilkaliks[6]aren ya da *p-ter*-bütilkaliks[8]aren' in hemen hemen % 75' nin çok yüksek sıcaklarda parçalanarak

küçük halkalı yapıdaki *p-ter*-bütilkaliks[4]aren' e dönüştüğünü gözlemlemişlerdir (Gutsche ve ark., 1986; Dhawan ve ark., 1987b).



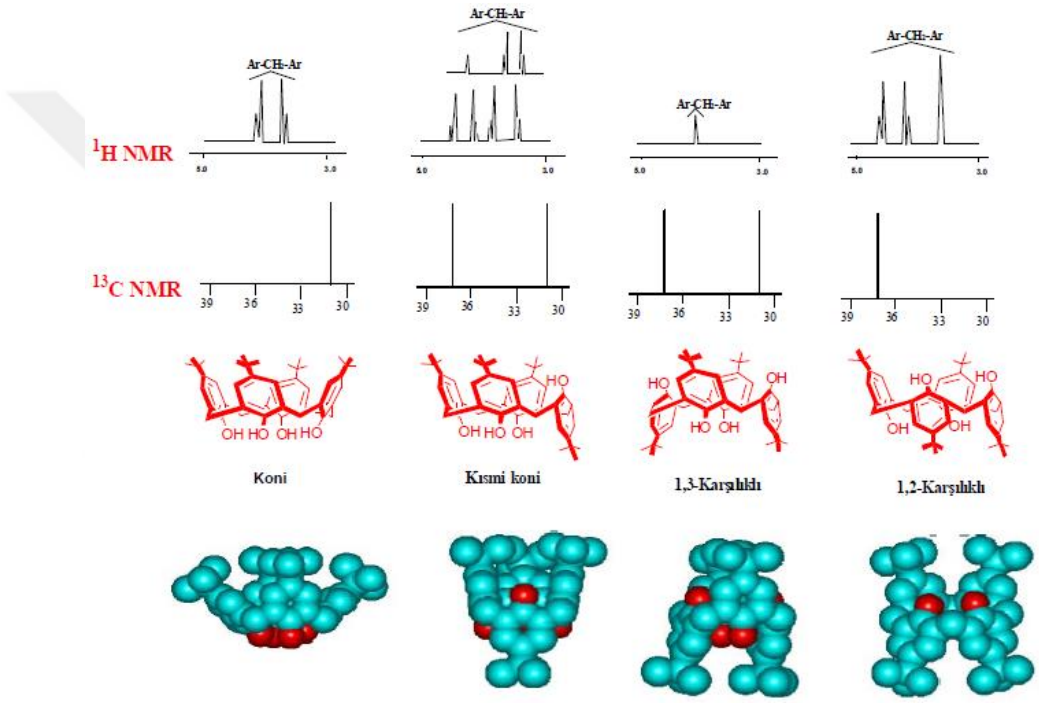
Şekil 1.7 Kaliks[8]aren'in parçallanması sonucu Kaliks[4]aren'in oluşumu

1.5. Kaliksarenlerin Konformasyonları

Gutsche, kaliks[4]arendeki dört farklı konformasyonu "koni" (u,u,u,u), "kısmi koni" (u,u,u,d), "1,2-karşılıklı"(u,u,d,d), "1,3-karşılıklı" (u,d,u,d) şeklinde isimlendirmiştir (Gutsche ve ark., 1983). Halkalı yapıdaki aril gruplarının sayısındaki artış konformasyon sayısındaki artışı da sağlar. Kaliks[4]arenler gibi, kaliks[5]arenlerin 4 "yukarı-aşağı"(updown), kaliks[6]arenlerin 8, kaliks[8]arenlerin 16 konformasyonları vardır. Kaliks[4]arenlerin hangi konformasyonda olduğunu belirlemek için ^{1}H-NMR spekturumuna bakılır ve köprü protonlara ait rezonans sinyallerinden konformasyonu belirlenir (Gutsche ve ark., 1989).

Tablo 1.1. Kaliks[4]aren' in Ar-CH_2-Ar protonlarının ^{1}H NMR spektrumları

Konformasyon	***Ar-CH_2-Ar Protonları***
Koni	Bir çift dublet
Kısmi Koni	İki çift dublet (1:1)veya bir çift dublet ve bir singlet (1:1)
1,2-Karşılıklı	Bir singlet ve iki dublet (1:1)
1,3-Karşılıklı	Bir singlet



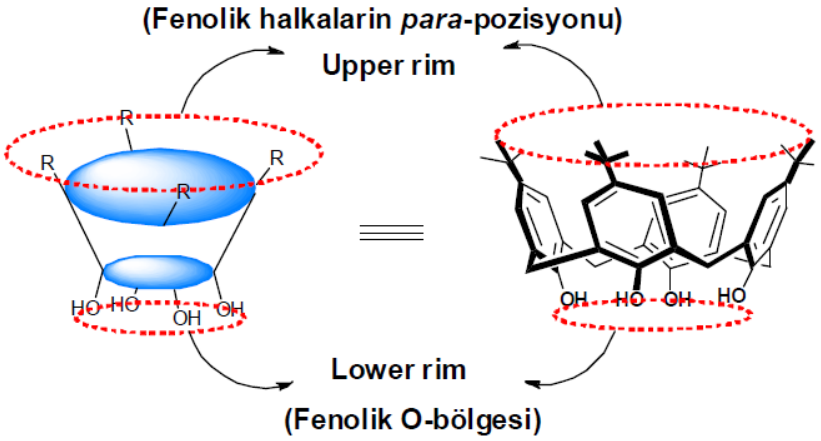
Şekil 1.8 *p-ter*-bütilkaliks[4]arenlerin ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR spektrumları ve 4 farklı konformasyonu

Aromatik halkaların arasında bulunan metilen hidrojenleri yüksek sıcaklıkta singlet pik verirken düşük sıcaklıklarda bir çift dublet pik verir. Bu durumu sebebi kaliks[4]arenlerin sıcaklığının değişmesi ile konformasyonlarının değiştiğidir. Genel olarak oda sıcaklığında ve çözelti ortamında, sübstitüe olmamış kaliksarenler hareketli bir konformasyona sahiptir (Gutsche ve Stoddart, 1989). Konformasyonel ara dönüşüm hızını azaltmanın iki yolu vardır. Bunlar;

1. Fenolik-O ve p-pozisyonundan büyük hacimli gruplar bağlamak
2. Her bir aril halkasına molekül içi köprüler kurmak (Takeshita ve Shinkai, 1995).

1.6. Kaliksarenlerin Fonksiyonlandırılması

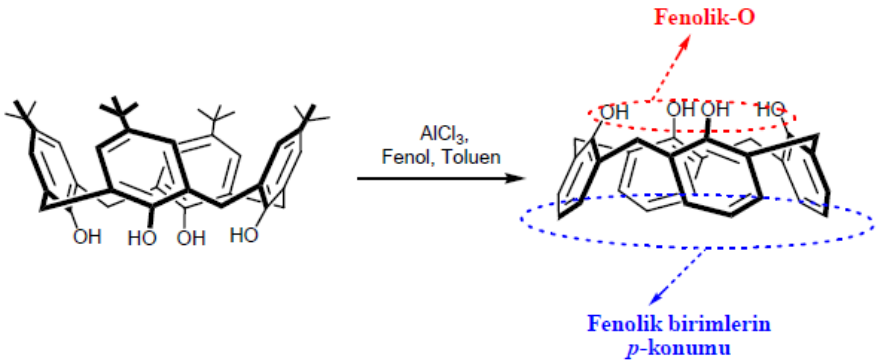
Taç eterler ve siklodekstrinlere göre kaliksarenleri fonksiyonlandırmak kolay olduğu için çok fazla tercih edilmektedir. Kaliksarenler iki farklı bölgeden türevlendirilmesi, fenolik-OH gruplarının olduğu konum "lower rim" ve aril halkalarının *p*-konumu "upper rim" pozisyonudur (Şekil 1.9).



Şekil 1.9 Kaliksarenlerin fonksiyonlandırılması

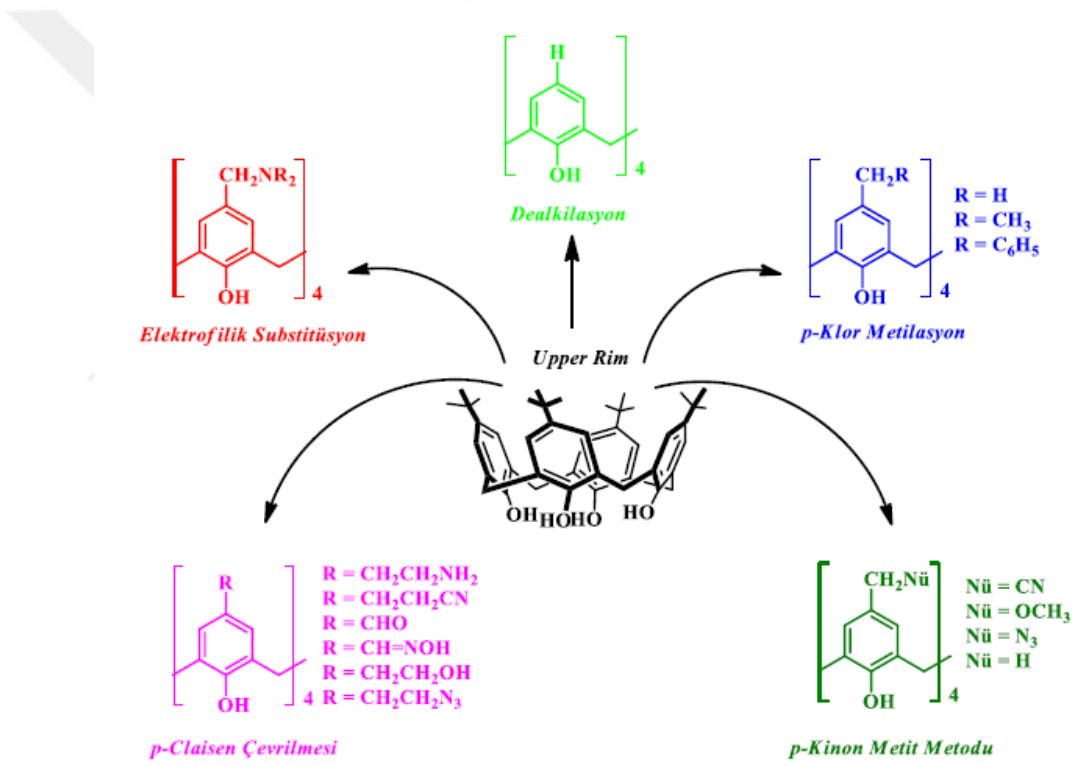
1.6.1. Kaliksarenlerin Fenolik Birimlerin *para* Konumundan Fonksiyonlandırılması

p-ter-Bütilkaliks[n]arenlerin sentezinden sonra para pozisyonunda bulunan *ter*-bütil gruplarını gidermek için susuz $AlCl_3$/toluen ortamında etkileştirerek (dealkilasyon) kaliks[n]arenleri sentezlemişlerdir (Gutsche ve Iqbal, 1990a).



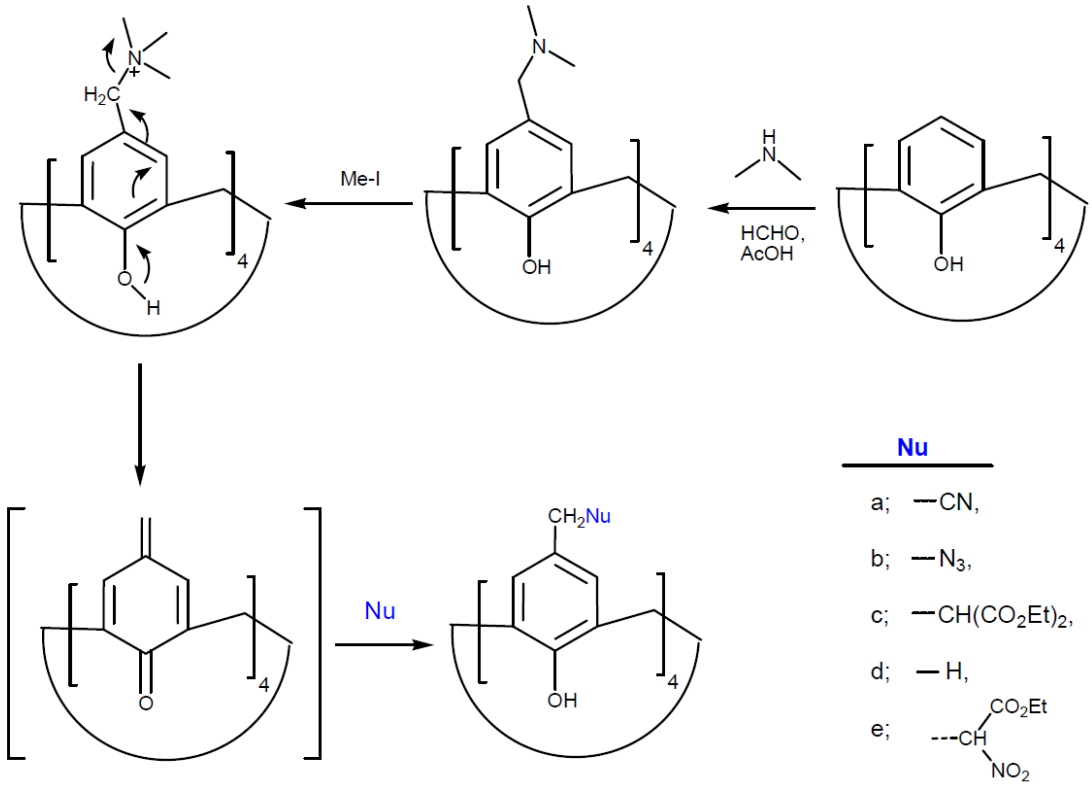
Şekil 1.10 *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin dealkilasyonu

p-ter-bütil gruplarının dealkilasyonu ile elde edilen kaliksarenler kolaylıkla *p*-konumundan fonksiyonlandırılabilir. İlk defa Claisen düzenlenme tepkimelerinde kullanılmış ve *p*-konumundan kolayca türevlendirilmiştir (Gutsche ve Bauer, 1985). Bu tepkime ilk olarak fenolik birimler allil eter olacak şekilde fonksiyonlandırılıp dietilanilin içinde ısıtılmasıula allil grupları p-konumuna göçer. Bu tepkime 1990'lı yıllara kadar sadece kaliks[4]aren bileşiği kullanıldığında yürüyordu. Gutsche'nin ekip arkadaşı Gibbs yeni bir metot geliştirerek Claisen düzenlenme reaksiyonlarını farklı kaliksarenlere de uygulanabilir duruma getirmiştir. Bu yöntemle p-konumundaki kaliksarenler fonksiyonlandırılabilir. Buna ek olarak kaliksarenler yapılarındaki simetriden dolayı seçimli olarak fonksiyonlandırılabilmektedir.



Şekil 1.11 Kaliks[4]arenin fenolik birimlerin *p*-konumu üzerinden fonksiyonlandırılması

Kaliksarenlerin *p*-konumundan fonksiyonlarılmasında kullanılan bir diğer yöntem "*p*-Kinonmetit" metodudur. Bu yöntemde öncelikle dealkile edilmiş kaliksarenler formaldehit/dimetil ya da diallilamin ile etkileştirilir ve kaliksarenler türevli bir Mannich bazı elde edilir. Mannich bazının kuvaterner tuzuna dönüştürülmesi için metil iyodür ile etkileştirilir. Kuvaterner tuzları nükleofiller ile çok kolay bir şekilde yer değiştirme tepkimesi verdiğinden dolayı kaliksarenlerin *p*-konumu üzerinden farklı nükleofiller bağlanabilir (Gutsche ve Nam, 1988).



Şekil 1.12 *p*-Kinonmetit yöntemiyle kaliksarenlerin fenolik birimlerin p-konumu üzerinden fonksiyonlandırılması

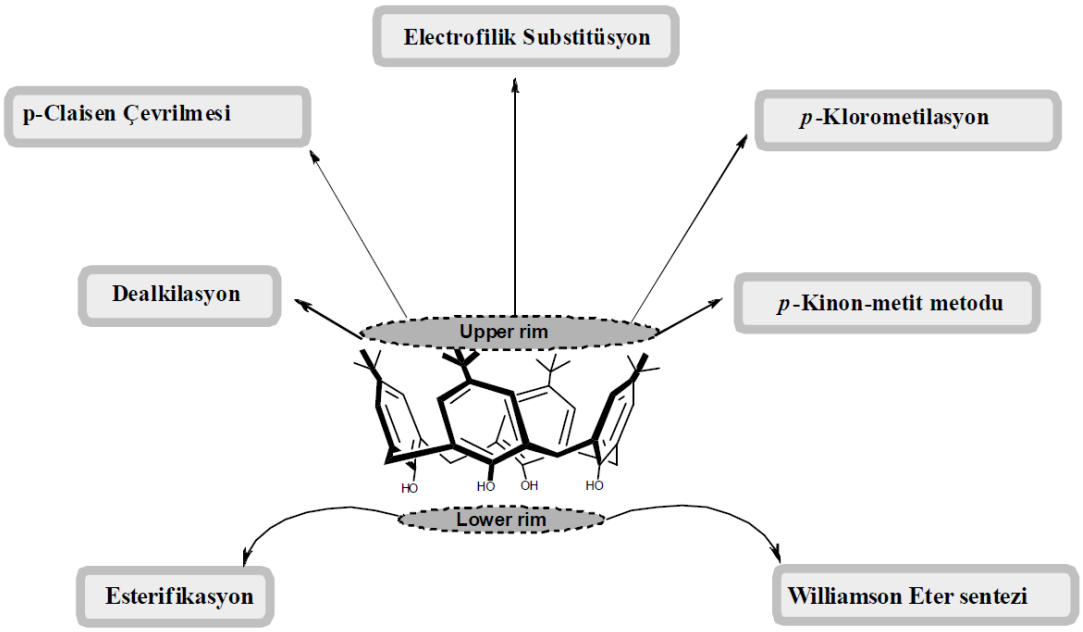
Bu yöntemlerin dışında kaliksarenler *p*-konumundan bromlama (Gutsche ve Pagoria, 1985; Hamada ve ark., 1990), iyotlama (Arduini ve ark., 1991), nitrolama (Verboom ve ark., 1992), sülfolama (Gutsche ve Lin, 1986; Shinkai ve ark., 1986), klorsülfolama (Morzherin ve ark., 1993), klormetilleme (Nagasaki ve ark., 1993), açilleme (Gutsche ve Lin, 1986), diazolama (Shinkai ve ark., 1986; Deligöz ve Ercan, 2002) ve formülasyon (Arduini ve ark., 1991) gibi sübstitüsyon reaksiyonları vermektedirler.

1.6.2. Kaliksarenlerin Fenolik-O Üzerinden Fonksiyonlandırılması

Kaliksarenleri fenolik-O birimlerinden fonksiyonlandırılması daha kolayken, fenolik gruplarının *p*-konumundan türevlendirilmesin daha zordur. Kaliksarenlerin fenolik-O pozisyonundaki –OH gruplarını değişik gruplarla etkileştirerek çeşitli ester ve eter türevleri elde edilebilir. Kaliksarenlerin–OH gruplarının hepsini farklı gruplarla

yerdeğiştirmesi (yerdeğiştirme-tepkimeleri) oldukça zordur, bu fonksiyonlandırma ile ilgili literatürde birkaç örnek bulunmaktadır (Gibbs ve ark., 1995).

.



Şekil 1.13 *p-ter*-Bütilkaliks[4]arenin fenolik-O üzerinden fonksiyonlandırılması

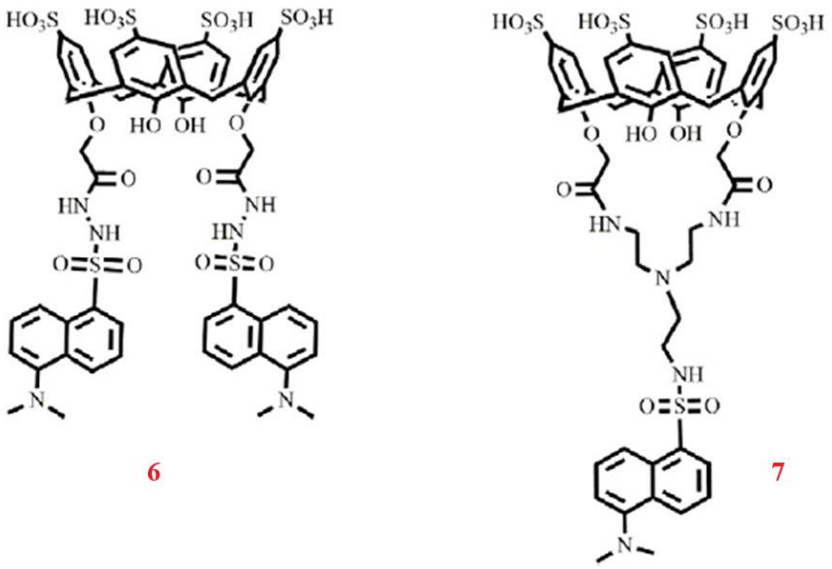
Kaliksarenler kolay fonksiyonlandırıldığından, çeşitli gruplar ile türevlendirilerek bu bileşiklerin sentezlenmesi üzerine litreatürde birçok makale yayınlanmıştır.

1.7. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları

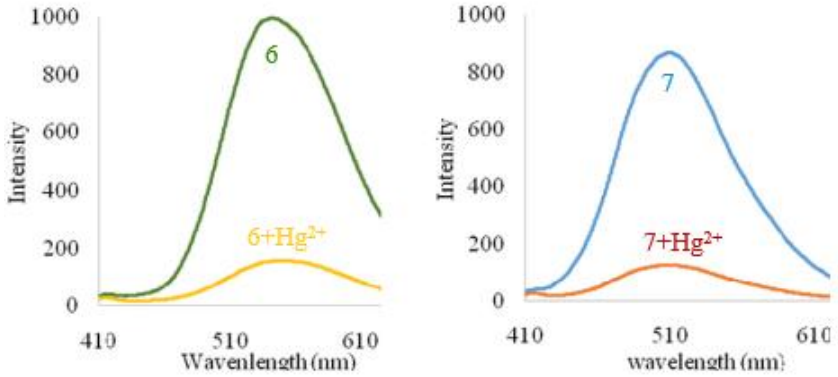
Kaliksarenlerin Kullanım Alanları
Sensör Çalışmalarında Kaliksarenlerin Kullanımı
Enzim İmmobilizasyon Çalışmalarında Kullanımı
Kaliksarenlerin Katalizör Olarak Kullanımı
Nanopartikül Tasarımı için Kullanılan Kaliksarenler
Molekül Taşıyıcı Kaliksarenlerin Kullanımı
Kaliksarenlerin Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanımı

1.7.1. Sensör Çalışmalarında Kaliksarenlerin Kullanımı

Oguz ve ark, floresans özellik gösteren dansil grubu ile türevlendirilmiş suda çözünebilen *p*-sülfokaliks[4]aren sentezlemişlerdir. Sentezlenen 6 ve 7 numaralı bileşiklerin Hg^{2+} iyonuna karşı bir seçici olduğunu gözlemlemişlerdir. Çeşitli tekniklerle sentezlenen maddelerin karakterizasyonu yapıldıktan sonra canlı hücrelerde toksisite çalışmalarını gerçekleştirmişler ve maddelerin toksik özelliğinin olmadığını tespit etmişlerdir. Suda çözünebilen dansil grubu taşıyan *p*-sülfokaliks[4]aren türevlerini canlı hücrelerde Hg^{2+} iyonu tespiti için, floresans görüntüleme çalışmaları gerçekleştirmişlerdir (Oguz ve ark., 2017).

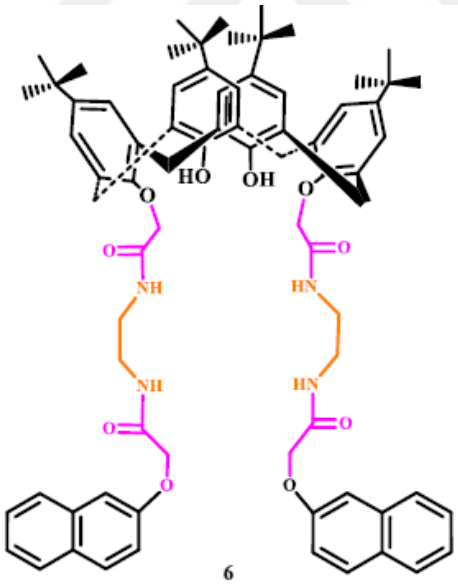


Şekil 1.14 Dansil grubu taşıyan suda çözünen *p*-sülfokaliks[4]aren türevleri

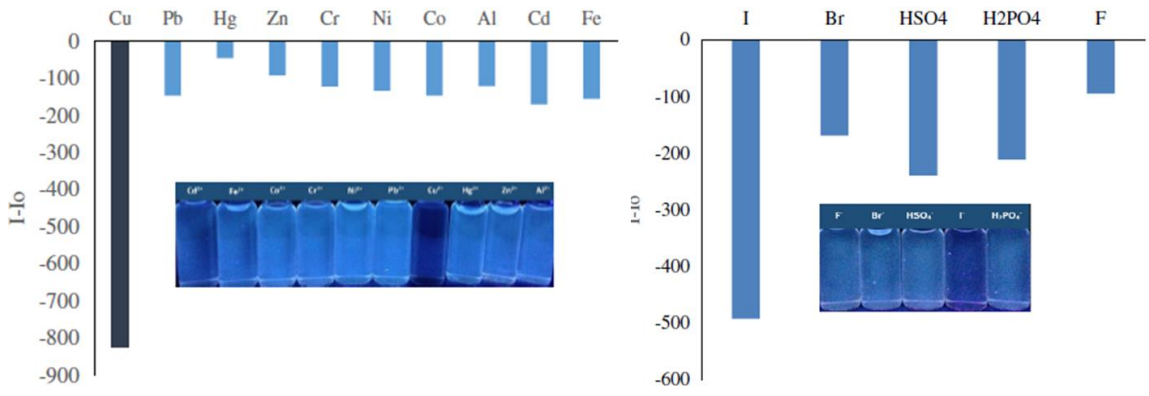


Şekil 1.15 Dansil grubu taşıyan *p*-sülfokaliks[4]aren türevlerinin Hg^{2+} ile floresans spektrumu

Bhatti ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, naftil grubu taşıyan floresans kaliks[4]aren türevlerini sentezlemişlerdir. Sentezlenen bileşiği farklı katyon ve anyonlar ile floresans çalışması gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalar sonucunda naftil grubu ile türevlendirilmiş kaliks[4]arenlerin Cu^{+2} ve I^- iyonlarına karşı bir yüksek seçicilik gösterdiğini bulmuşlardır (Bhatti ve ark., 2017a).

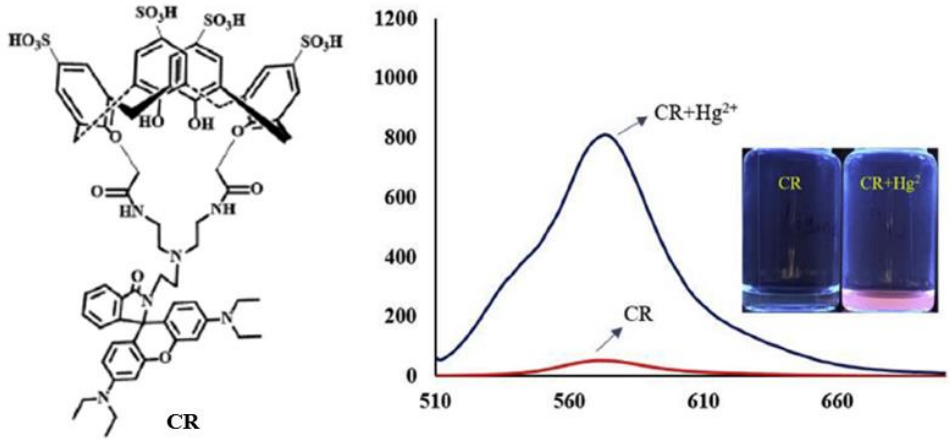


Şekil 1.16 Naftil grubu ile türevlendirilmiş kaliks[4]aren

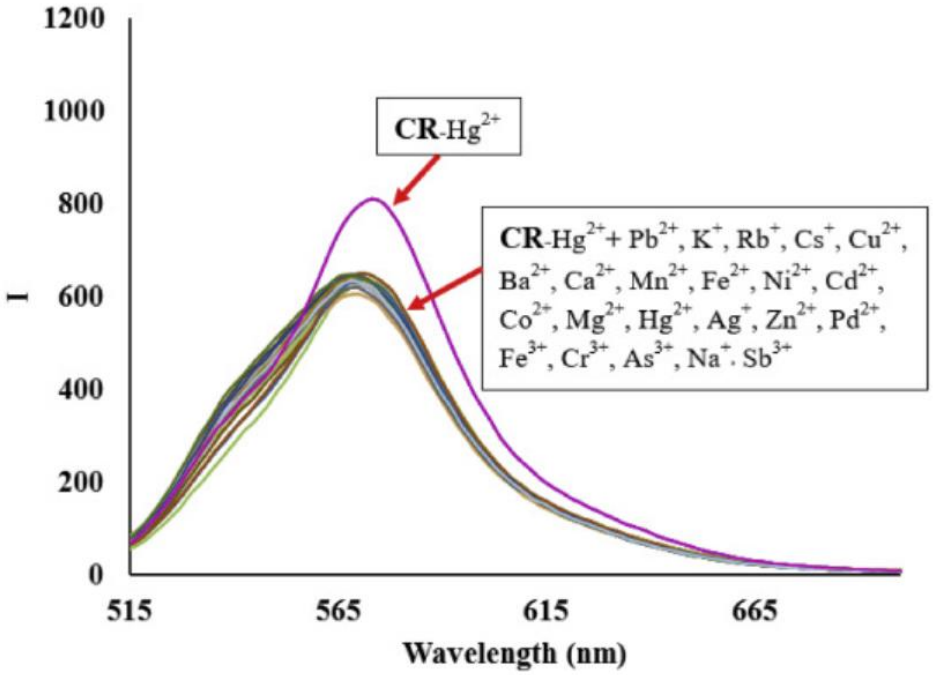


Şekil 1.17 Farklı iyonların eklenmesiyle floresans yoğunluğunun (I-I0) değişim grafikleri

Bhatti ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada, suda çözünebilen kaliks[4]aren bileşiğinin fenolik-O pozisyonundan floresans özellik gösteren rodamin ile türevlendirerek yeni bir prob elde etmişlerdir. Sentezlenen (CR) bileşiğin metal iyon çalışmalarını gerçekleştirmişler ve Hg^{2+} iyonuna karşı seçicilik gösterdiğini bulmuşlardır. Sentezlenen bileşiğe Hg^{2+} iyonunun eklenmesi halinde floresans ışımanın gerçekleştiğini yani "off-on" olduğunu ve mekanizmanın CHEF tipi olduğunu bulmuşlardır (Bhatti ve ark., 2020).



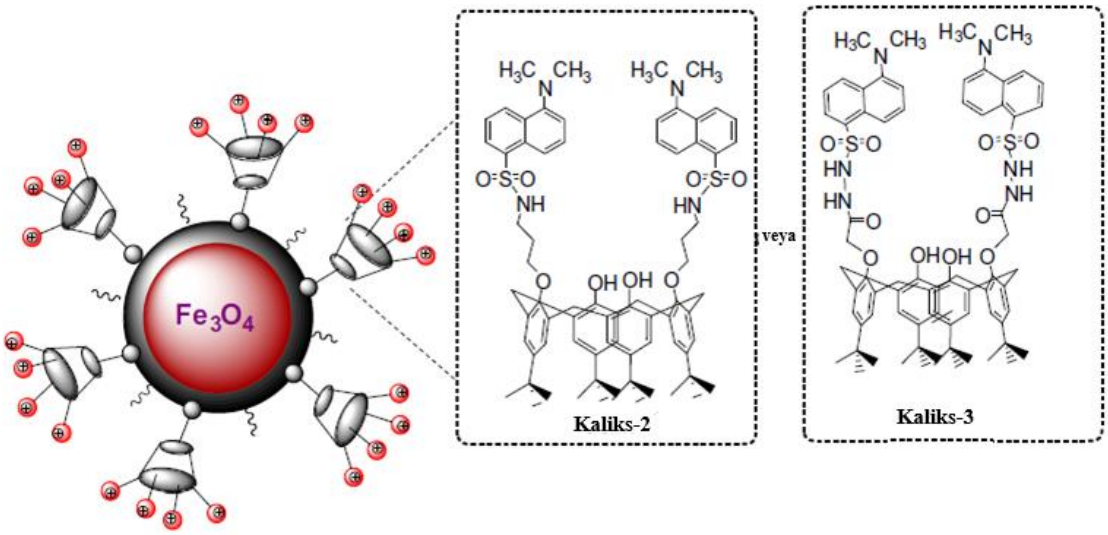
Şekil 1.18 Suda çözünebilen kaliks[4]aren türevinin Hg^{2+} katyonuna karşı floresans görüntüsü



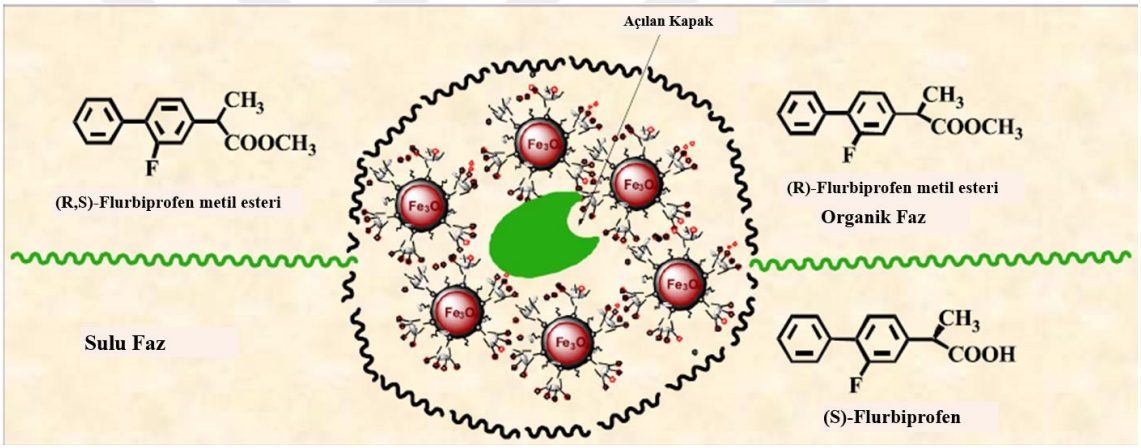
Şekil 1.19 CR bileşiğinin ortak iyon etkisi grafiği

1.7.2. Enzim İmmobilizasyon Çalışmalarında Kullanımı

Grubumuzun yapmış olduğu bir çalışmada, dansil grubu taşıyan kaliks[4]aren türevli bileşikler Fe_3O_4@Kaliks-2 ve Fe_3O_4@Kaliks-3 ile kaplı manyetik demir nanopartiküller ve *Candida rugosa lipaz* enzimi sol-gel metodu ile kapsüllemişlerdir. Optimum koşullarda kapsüllenmiş lipazın aktivitesi (Fe_3O_4@Calix-2E), kaliks[4]aren türevli olmayan kapsüllenmiş lipaza (Fe_3O_4@Calix-E) göre 4.1 kat olduğunu gözlemlemişlerdir. İmmobilize edilen lipaz, rasemik flurbiprofenin enantiyoseçimli tepkimeler de kullanılmış, yüksek enantiyoseçiciliği ve verimle S-flurbiprofeni elde etmişlerdir. Bunların sonucunda, kaliks[4]aren türevli kapsüllenmiş lipazın aktiviteyi arttırdığı, stabilite, tekrar kullanılabilirlik ve kinetik çözünürlükte stereosel seçiciliğe yol açtığını gözlemlemişlerdir (Ozyilmaz ve ark., 2019).

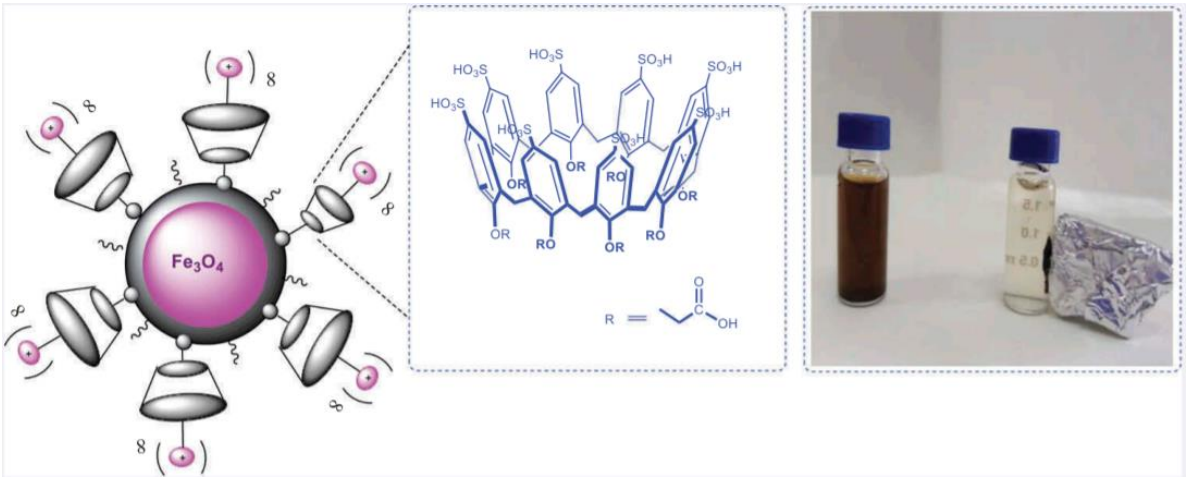


Şekil 1.20 Kaliks[4]aren türevli bileşikler Fe_3O_4@Kaliks-2 ve Fe_3O_4@Kaliks-3



Şekil 1.21 Fe_3O_4@Kaliks-2E veya Fe_3O_4@Kaliks-E ile (R, S) Flurbiprofen metil esterin enantioselektif hidrolizinin şematik gösterimi

Diğer bir çalışmada Sayın ve arkadaşları, sülfo-kaliks[4,8]aren türevlerini (SCX4-NP ve *p*-SCX8-NP) kullanarak suda çözünen demir oksit nanoparçacıkları sentezlemşlerdir. Sentezlenen nanomateryaller ilk defa *Candida rugosa* lipaz immobilizasyonu için kullanmışlardır. *p*-SCX4-NP-E ve *p*-SCX8-NP-E nin pH, sıcaklığa duyarlılığı ve tekrar kullanılabilirliği üzerindeki aktivitesi *p*-nitrofenil palmitatın (*p*-NPP) hidrolizi reaksiyonu ile araştırmışlardır. Sonuç olarak, *p*-SCX4-NP-E ve *p*-SCX8-NP-E için en yüksek katalitik afinitelerin, sırasıyla pH 5.0 ve pH 7.0'da elde edildiğini gözlemlemişlerdir (Sayin ve ark., 2020).

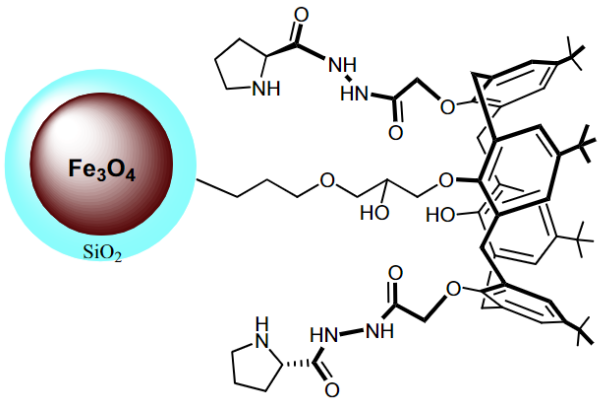


Şekil 1.22 Kaliks[4]aren türevli suda çözünen demir oksit nanoparçacıkları *Candida rugosa* lipaz immobilizasyonu şematik gösterimi

1.7.3. Kaliksarenlerin Katalizör Olarak Kullanımı

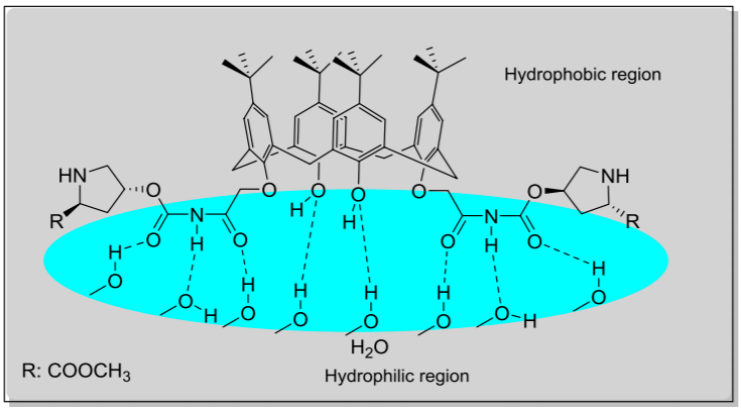
Bilindiği üzere katalizörler reaksiyon hızını artıran/azaltan maddelerdir. Normal şartlarda bazı reaksiyonlar yavaş ilerlerken katalizörler sayesinde, reaksiyon süresini azaltarak kısa sürede reaksiyonun gerçekleşmesini sağlayabilirler. Son yıllarda uygun reaksiyon ortamında kullanılmak için özel olarak sentezlenmiş kaliksaren türevleri katalizör olarak kullanılmakta ve hatta büyük ölçüde pozitif sonuçlara varılmaktadır. Genel olarak böyle katalizör tipleri faz transfer katalizörü olarak bilinmektedir. Heterojen bir sistem ortamında katalizör bir fazdan başka bir faza reaktifin göç etmesini sağlar.

Akceylan ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, *L*-prolin ile fonksiyonlandırılan kaliks[4]aren, manyetik Fe_3O_4 nanopartikül ile immobilize edilmiş bir kiral organokataliz sentezlemişler ve organik çözücülere gerek kalmadan suda asimetrik aldol reaksiyonu için son derece aktif, geri kazanılabilir ve yeniden kullanılabilir katalizör olarak kullanmışlardır. Kiral organokataliz, yüksek katalitik aktivite, enantiyoseçimlilik, siklohekzanon ve aromatik aldehitler arasındaki reaksiyon için diastereoseçicilik gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Katalizör kolayca harici bir manyetik alan kullanarak ayrılmış olabilir ve aktivite de önemli bir kayıp olmadan birkaç kez yeniden kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir (Akceylan ve ark., 2015).



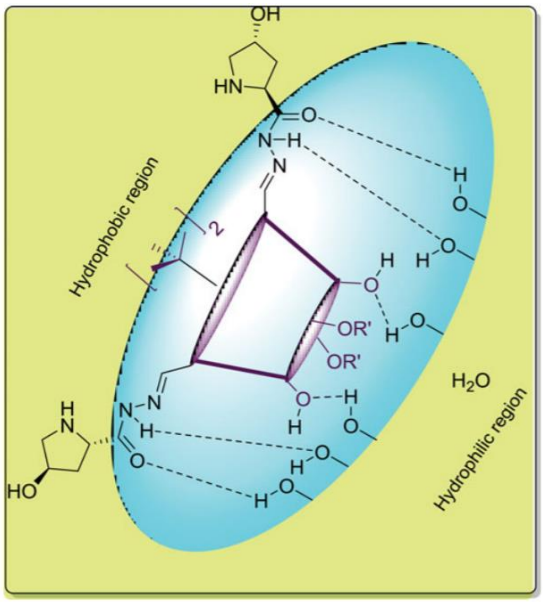
Şekil 1.23 Manyetik organokatalizin şematik gösterimi

Diğer bir çalışmada Aktas ve arkadaşları, hidrofobik bir yapı taşıyan kaliks[4]arenden türetilmiş yeni bir dizi su uyumlu *L*-prolin katalizörü sentezlemişlerdir. Sentezlenen bileşik, suda meydana gelen aldol reaksiyonları için yüksek verimli bir organokatalizör olduğunu bulmuşlardır. Optimize edilmiş reaksiyon koşullarında, yüksek verim, iyi enantiyoseçicilik ve yüksek diastereoseçicilik elde etmişlerdir (Aktas ve ark., 2016).



Şekil 1.24 Hidrofobik bir yapı taşıyan kaliks[4]arenden türetilmiş yeni su uyumlu *L*-prolin katalizörü şematik gösterimi

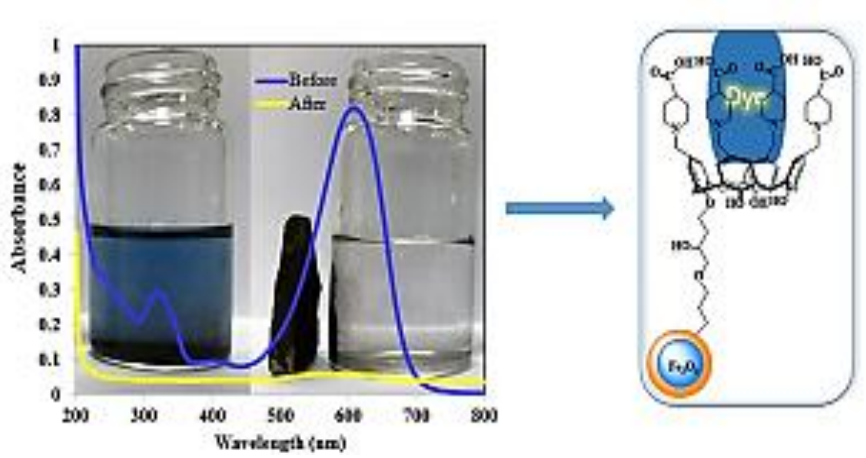
Sahin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, *L*-prolinamido grubu taşıyan kiral kaliks[4]aren türevini, doğrudan enantiyoselektif bir aldol reaksiyonu için suda uyumlu, verimli bir organokatalizör olarak tasarlamışlardır. Sentezlenen bileşik, siklohekzanonun aldol reaksiyonu ve çeşitli aromatik aldehitlerin enantiyoselektivite ve diastereoselektivitelerini yüksek verimle anti-aldol ürünleri veren katalizörlüğünü katalize ettiğini gözlemlemişlerdir (Sahin ve ark., 2018).



Şekil 1.25 Sudaki katalizörün şematik gösterimi

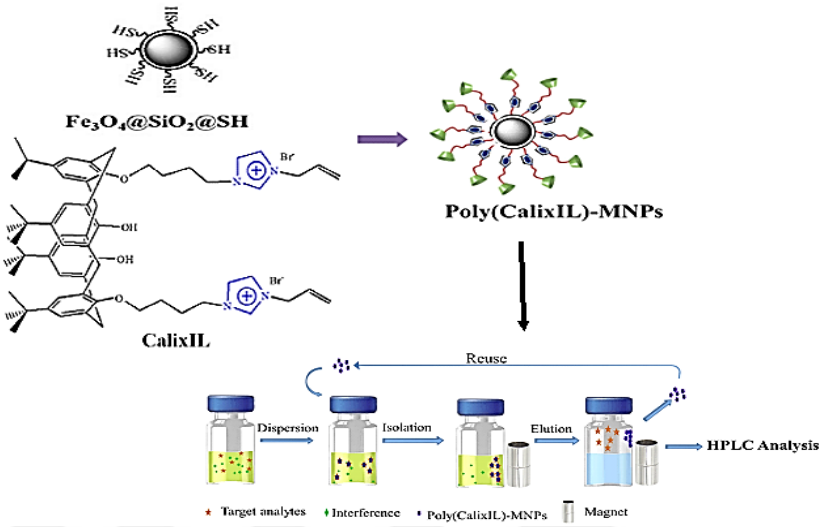
1.7.4. Nanopartikül Tasarımı için Kullanılan Kaliksarenler

2017 yılında Bhatti ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, demir nanopartikül üzerine immobilize edilen kaliks[4]aren türevlerini (Fe_3O_4, CCMN), özellikle endüstri de çok düşük seviyelerde bile çevre kirliliğine sebep olan ve azo boyaların giderilmesi amacıyla kullanmışlardır. Bu çalışmada iyi bir absorban özellik gösteren kaliksaren türevlerinin çeşitli alanlarda ekonomik bir malzeme olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (Bhatti ve ark., 2017b).



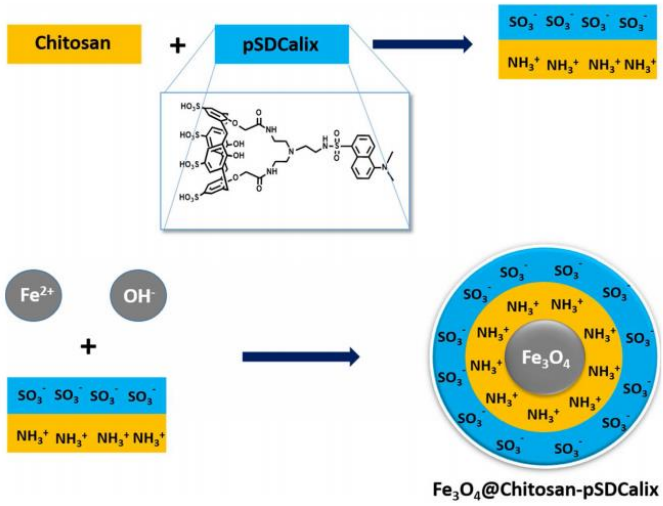
Şekil 1.26 Karboksilik sübstitüe edilmiş kaliks[4]aren ile üretilen Fe_3O_4 nanoparçacıkları ile sulu çözeltiden azo boyaların giderilmesi

Yapılan başka bir çalışmada, Hu ve arkadaşları meyve suyu ve yeşil çay örneklerinde bir ön işlem geçirmeden bazı flavonoid bileşiklerinin tespitinde kaliksaren ile modifiye edilmiş Fe_3O_4 nanopartilkülleri manyetik sorbent olarak kullanmışlardır (Hu ve ark., 2018).



Şekil 1.27 Meyve suyu ve yeşil çaydaki flavonoidlerin ekstraksiyonu için yeni sorbent olarak poli (kaliksaren iyonik sıvı) modifiye Fe_3O_4 nanopartikülleri

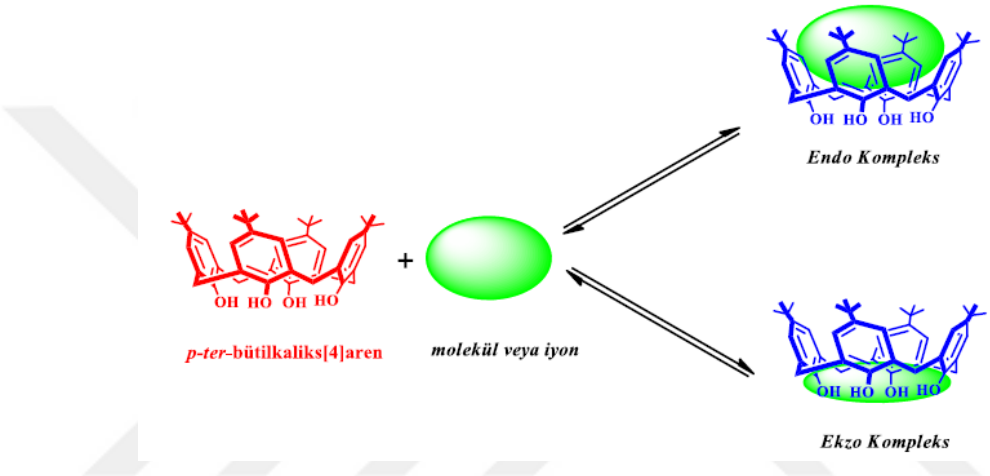
Bhatti ve arkadaşlarının 2018 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, kitosan ve nanopartikül ile hibrit bir bileşik sentezlemişlerdir. Sentezlenen bileşik *p*-sülfo kaliks[4]aren ile etkileştirilerek floresans özellik kazandırmışlardır. Bu floresans özellik gösteren bileşiği sularda toksik etki gösteren iyonların uzaklaştırılması için kullanmışlar ve bunun sonucunda Hg^{+2} ye karşı seçimli olduğunu gözlemlemişlerdir (Bhatti ve ark., 2018).



Şekil 1.28 Nano sensör olarak kaliks[4]aren kaplı manyetik nanopartiküllerin sentezi

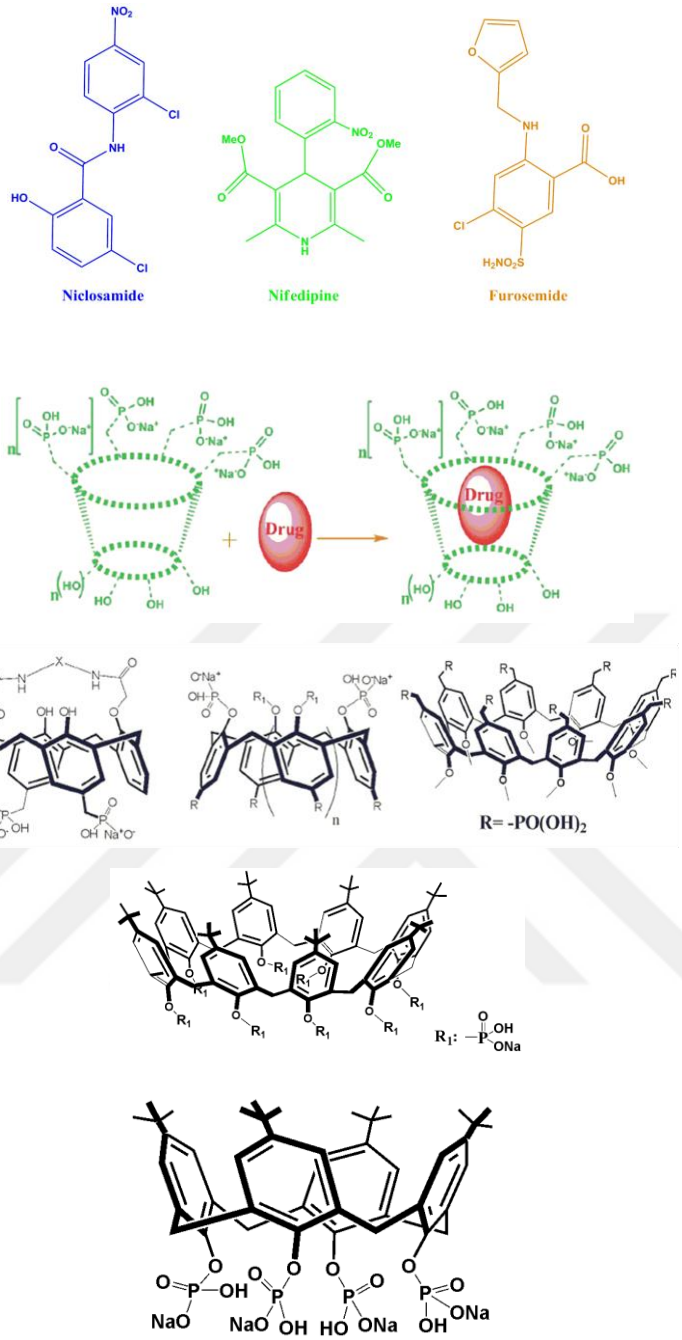
1.7.5. Kaliksarenlerin Molekül Taşıyıcı Olarak Kullanımı

Kaliksaren molekülü halkalı bir yapıda ve farklı büyüklükte bulunabilen sepet gibi bir boşluğa sahip olduğundan çeşitli organik ve anorganik bileşikler ile kompleks oluşturabilmektedirler. Buna ilaveten farklı sübstitüent gruplarla, hem fenolik birimlerin *p*-pozisyonundan hem de fenolik-O pozisyonundan fonksiyonlandırılan kaliksaren bileşikleri seçici davranarak kompleks bir yapı oluşturabilmektedir. Bu yapıların kompleks oluşumlarının şematik olarak gösterimi aşağıda olduğu gibi endo- ve ekzo-kompleksleri şeklindedir.



Şekil 1.29 Kaliksarenlerin kompleks oluşumunun şematik gösterimi

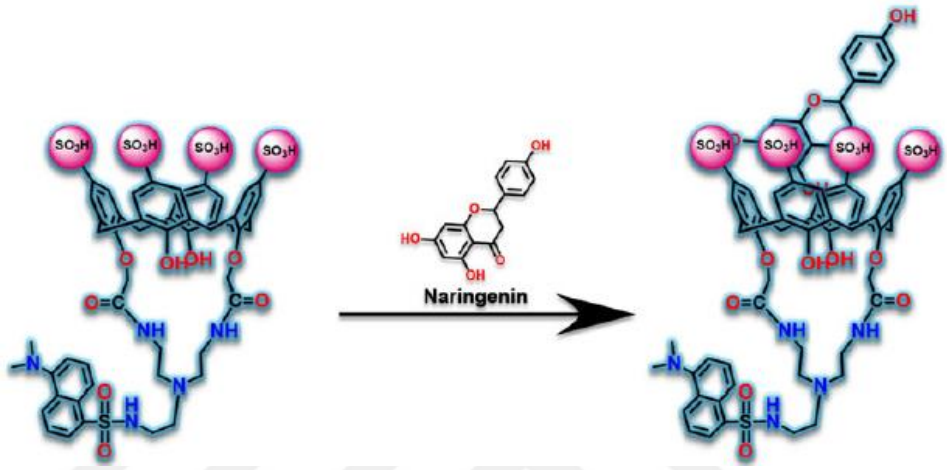
Bayrakcı ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, sudaki çözünürlükleri çok düşük olan niklosamit, nifedipin ve furosemit gibi ilaçların, sudaki çözünürlüğünü artırmak için konuk-konak türü kompleks oluşturması amacıyla kaliksarenleri fenolik-O pozisyonundan ve fenolik birimlerin *p*-pozisyonundan fonksiyonlandırarak kaliksaren fosfonatları elde ederek ilaçların sudaki çözünürlüğünü sağlamışlardır (Bayrakcı ve ark., 2009).



Şekil 1.30 Niklosamid, Nifedipine, Frosemide ilaçları ve fosfanat grubu bulunduran kaliksarenlerin yapısı

Oguz ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, suda çözünmeyen flavonoid bir bileşik olan naringenin molekülünün sudaki çözünürlüğünü artırmak amacıyla sülfo-kaliksarenlere immobilize edilmiştir. Kanser hücre hattında sitotoksik etkilerini belirlemek için ve hücre içi lokalizasyonlarını belirleyebilmek için floresans özelliğe sahip dansil grubu taşıyan kaliks[4]aren türevi sentezlemişlerdir. Sentezi gerçekleştirilen naringenin molekülünün konuk-konak kompleks yapısının oluşumu için UV-Vis, floresans, FT-IR gibi çeşitli spektroskopi teknikleri kullanarak yapının analizini gerçekleştirmişlerdir. Oluşturulan dansil-naringenin-kaliksaren kompleksinin

sitotoksik etkisini incelemek amacıyla kolon kanseri hücre hattı olan DLD-1 hücresinde denemeler gerçekleştirilmiş ve sentezlenen kompleks yapısının serbest naringenin molekülüne göre kolon kanseri hücre hattını 3.4 kat daha fazla inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Kompleks yapının hücrenin neresinde lokalize olduğunu belirlemek için yapılan floresans görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sentezlenen yapının hücrenin çekirdeğini değil, sitoplazmasında biriktiğini gözlemlemişlerdir (Oguz ve ark., 2019).

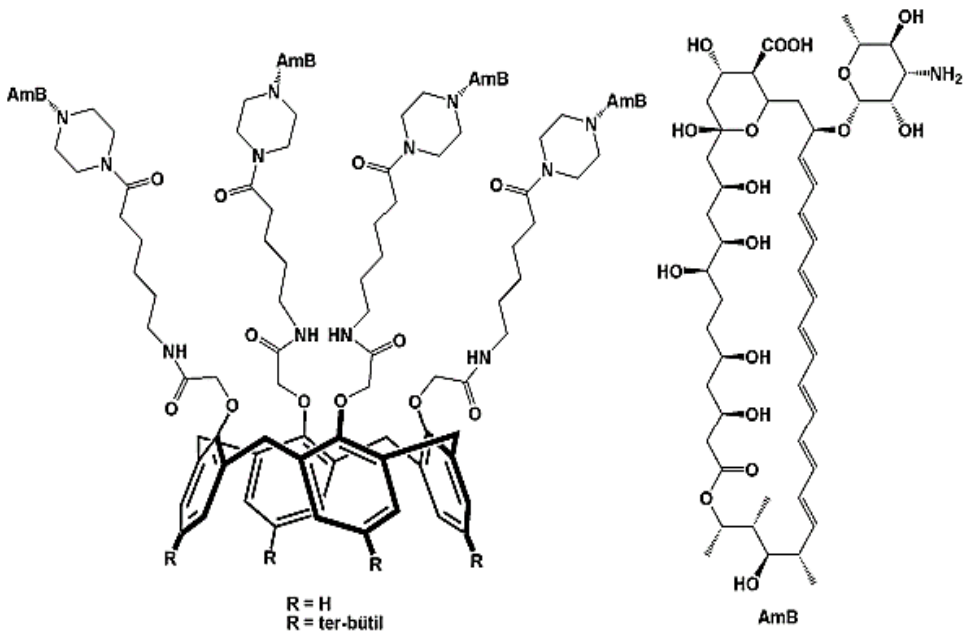


Şekil 1.31 Kaliks[4]aren türevinin naringinin molekülü ile kompleks oluşumunun yapısı

1.7.6. Kaliksarenlerin Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanımı

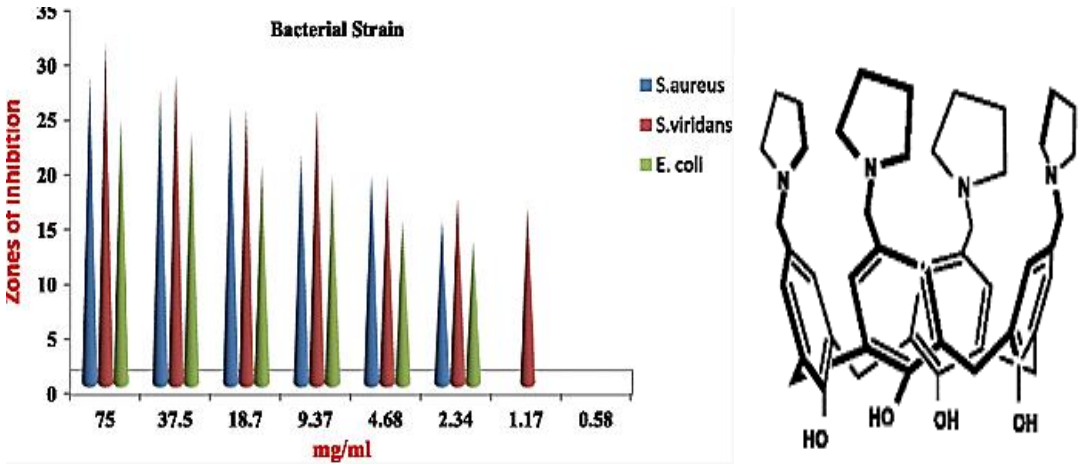
Kaliksaren bileşikleri biyokimyasal çalışmalarında da çok fazla kullanılan ve literatürde yoğun bir şekilde ilgi gören konu olmaktadır. Bu bileşikler gerek yapıları gerekse taşıdıkları gruplara bağlı olarak anti-kanser, anti-bakteriyal, anti-fungal, anti-mikrobiyal ve anti-viral gibi oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptir.

Yapılan çalışmanın birinde, kaliks[4]aren amit molekülleri amfoterisin B (AmB) molekülleri ile fonksiyonlandırılmış ve bu moleküllerin amfoterisin molekül gibi antifungal aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmaya ek olarak, bu moleküllerin hem *S. Cerevisiae* fungisitine karşı amfoterisin (AmB) gibi etkili olduğunu hem de keseciklerden K^+ sızıntısını engellediği de gözlenmiştir (Paquet ve ark., 2006).



Şekil 1.32 Antifungal aktiviteye sahip kaliksaren yapısı

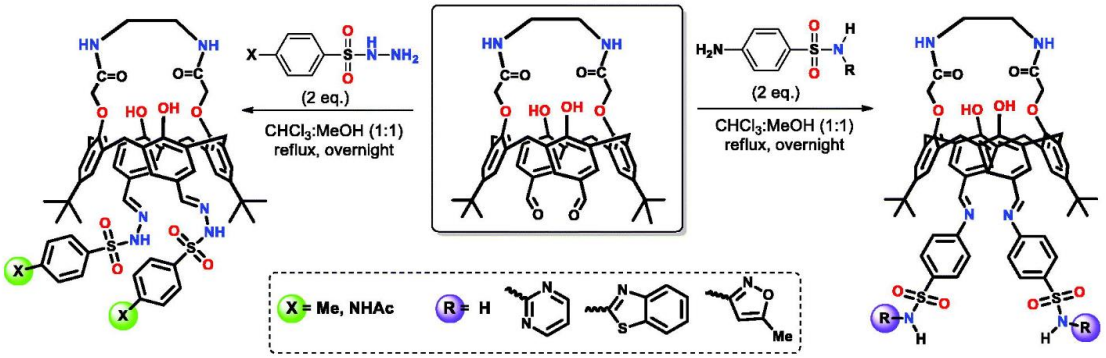
Muneer ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış oldukları bir antibakteriyel çalışmada, kaliks[4]aren moleküllerine pirolidin eklenmesi ile yeni bir kaliks[4]aren türevi (CAP3) sentezlemişlerdir. Sentezi yapılan bileşik ile antibakteriyel ve antifungal özelliklerini incelemişlerdir (Muneer ve ark., 2017).



Şekil 1.33 Pirolidin temelli kaliks[4]aren iskeletinin 3 farklı bakteriye karşı antimikrobiyal etkisi

Oguz ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada, yeni sülfonamid türevli kaliks[4]azacrown bileşiklerini sentezlemişlerdir. Elde edilen yeni bileşikler karbonik anhidrazlar üzerindeki etkilerini araştırmışlardır ve çeşitli biyoanalitik

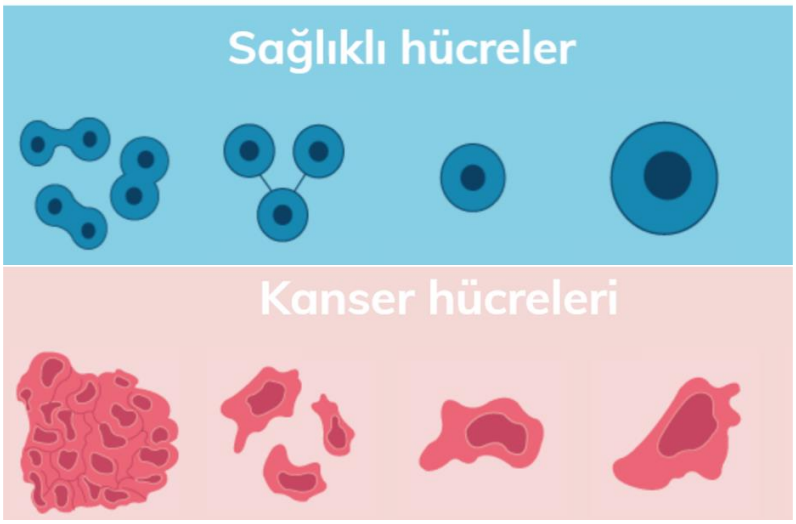
yöntemlerle antioksidan etkilerini araştırmışlardır. Sülfonamid türevli kaliks[4]azacrown bileşikleri ayrıca Alzheimer, Parkinson ve pigmentasyon bozuklukları gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili asetilkolinesteraz (AChE), butirilkolinesteraz (BChE) ve tirosinaz enzimlerinin inhibitörlerini araştırmışlardır. Yeni sülfonamidler, hCA'lar, AChE, BChE ve tirosinaz enzimlerine karşı düşük ile orta düzeyde inhibisyon gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Oguz ve ark., 2020).



Şekil 1.34 Sülfonamid türevli kaliks[4]azocrown bileşiklerinin şematik gösterimi

1.8. Kanser

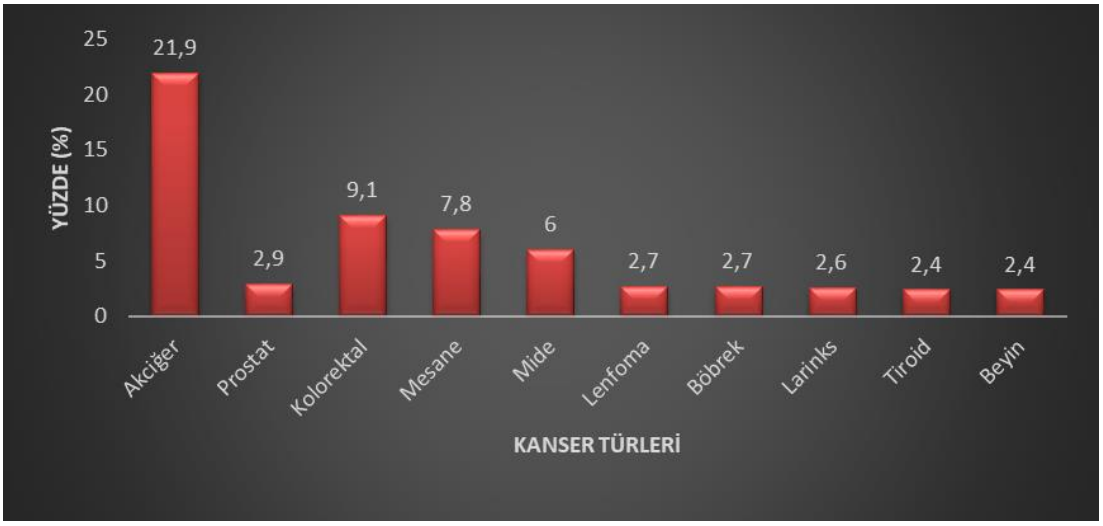
Mikroskop ile görülebilen canlıların en küçük yapı taşı hücredir. Kas ve sinir sistemi dışında vücudumuzdaki hücrelerin tamamı belirli görevlere sahiptir ve bu hücreler düzenli olarak bölünerek çoğalırlar. Eğer hücreler yaşlanmışsa ya da zarar almışsa ölürler ve kendini yenileyen yeni hücreler alır. Bu hücreler kontrolsüz olarak çoğalırsa tümoral olarak bilinen kanser hücrelerine dönüşür (Kutluk, 1996).



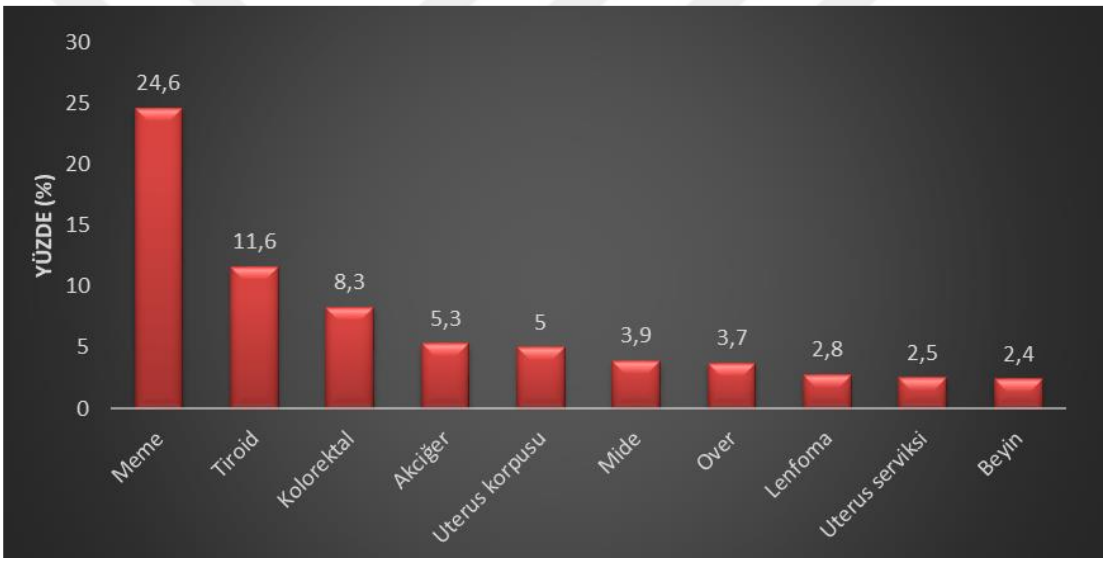
Şekil 1.35 Sağlıklı ve kanser hücrelerinin şematik gösterimi
https://www.icindeogucvar.com/kanser-nedir/saglikli-hucre-ve-kanser-hucresi

Kanser beraberinde getirdiği sağlık sorunlarının yanı sıra, maddi ve manevi yönden uzun süreli mücadele gerektiren bir hastalıktır. Genç-yaşlı, zengin-fakir, erkek, kadın, çocuk, aileler ve toplumlar üzerinde büyük bir yük oluşturur ve herkesi etkileyen bir hastalık olup, dünyanın önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Dünya sağlık örgütünün 2018 verilerine göre; kanser sonucu hayatını kaybeden kişi sayısı 9.6 milyondur ve bu durum benzer seyir devam ettiği takdirde, 2030 yılında 22 milyon yeni vaka ortaya çıkması beklenmektedir. Ülkemizde kanserin görülme oranına bakıldığında bir yıl içerisinde yaklaşık olarak 96.200 erkek ve 67.200 kadına kanser teşhisi konulduğu tahmin edilmektedir. Türkiye'de bir yılda yaklaşık 163.500 civarında yeni kanser vakası teşhisi konulmaktadır. Bu durum da bir gün içinde 550 kişiye kanser tanısı konulduğu söylenmektedir. Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere göre, Türkiye'de kanserin görülme sıklığı daha düşüktür.

2018 yılı için dünya genelinde erkeklerde en sık görülen kanserlerde ilk dört sırayı, akciğer, prostat, kalın bağırsak ve mesane kanseri alırken, kadınlarda ilk dört sırayı meme, tiroid, akciğer ve rahim ağzı kanseri almaktadır.



Şekil 1.36 Türkiye'de erkeklerde sık görülen kanser türlerinin % dağılımı



Şekil 1.37 Türkiye'de kadınlarda sık görülen kanser türlerinin % dağılımı

1.8.1. Kanser Oluşum ve Gelişimi

Bireylerin genetik özellikleri kanser teşhisi koymada etkili olsa da, kanserlerin %80 gibi büyük bir bölümü dış-etkenler ve çevresel sorunlardan kaynaklanmaktadır. Kalıtımsal olarak meydana gelen kanser hastalığı, çevresel ve dış etkenlerden oluşan kanser oranlarına göre meydana gelmesi daha düşük olasılıktır. Ultraviyole, morötesi, x-ışınları gibi çeşitli fiziksel faktörler ve aromatik hidrokarbon sınıfları gibi kimyasal etkilerin yanı sıra biyolojik olarak virüsler de sağlıklı hücrelere zarar verebilir ve

hücrelerde değişikliğe neden olarak kanser oluşumunu sağlayabilir (Ward ve ark., 2004; Yang ve ark., 2004).

Kanser, kontrolsüz olarak hücrelerin büyümesi, bağışıklık sistemlerin kontrolden çıkması ve hücrelerin bulunduğu yerden vücudun yakın veya uzak bölgelerinde (dokularında) yayılmaları yani metastaz yapmaları ile bütünleşmiş bir hastalık türüdür (McPhie ve ark., 2003).

Vücutta meydana gelen tümörler bulundukları bölgeden uzak dokulara yayılarak o bölgede kolonize olmuyorsa bu tümör iyi huylu tümör yani "benign" olarak bilinir ve kötü huylu tümör yani "malign" olarak adlandırılan tümör çeşidinden farklıdır (Kaur ve ark., 2009). Lenf veya kan yolu ile vücudun diğer dokularına giden kanser hücreleri, gittikleri dokularda anormal bir şekilde çoğalır ve kanserin yayılmasını sağlarsa buna metastaz denir. Kötü huylu tümör olarak bilinen malign tümörler kanser olarak bilinmektedir ve metastaz yapabilen tümörlerdir (Sugarbaker ve Kemeny, 1989; Wands ve Blum, 1991; Cabibbo ve Craxì, 2009).

Yukarıda bahsedildiği gibi kimyasal karsinojenlerle karşılaştığımız zaman cilt ve emildiği bağırsak ya da metabolizmanın fonksiyon çeşidine göre karaciğer, kolon, böbrek ve benzeri bölgelerde tümör meydana gelebilir. Fakat kimyasal reaktiflere maruz kalındığında kanser oluşmasının tek sebebi bu durum değildir. Çeşitli kimyasal karsinojenlere örnek vermek gerekirse;

- ✓ Kansere sebep olan kimyasal maddeler (sigara, diyetteki maddeler),
- ✓ Baca temizleyicilerde, skrotum kanseri,
- ✓ Hidrokarbonlar ve boya endüstrisinde kullanılan kimyasallar,
- ✓ Katranda bulunan kimyasallar,
- ✓ Hazır yiyeceklerin bazılarında kullanılan katkı maddeleri,

Kanser oluşumunda iki farklı gen rol almaktadır. Bu genler onkogenler ve tümör supresör genleridir.

- Onkogenler; normal bir hücreyi kanserli bir hücreye dönüştürebilen anormal proteinin üretiminden sorumlu bozuk versiyona sahip gendir. Bu genler mutasyon sonucu meydana gelirler. Onkogenler büyüme faktörü ve büyüme faktörü reseptörünün üretimi artırarak apoptoz genlerini baskılayarak kanserin meydana gelmesini sağlamaktadır (Croce, 2008).
- Tümör baskılayıcı genler; tümör baskılayıcı gen veya tümör supresör gen veya anti onkogen olarak bilinir ve normalde hücre bölünmesine engel

olan genler olup, bu genlerin hasarı sonucunda hücre kontrolsüz büyümeye başlar. Bunun sonucunda kanser meydana gelir. Kanser genlerinden en çok bilinen ve literatürde çok fazla çalışılan tümör baskılayıcı gen p53 genidir. Hasar meydana gelen hücrelerde p53 geni büyümeyi önlemektedir (Kopnin, 2000).

1.9. Apoptoz

Vücudumuzda bulunan bütün hücreler belirli bir süre yaşar ve zamanı geldiğinde ölürler. Hücrelerin kendi kendine programladığı bir mekanizmadır ve hücre ölümünü kontrol eden aktif bir süreçten meydana gelmektedir. Hücre ölümü ve çoğalması bir dengedir. Hücre ölüm tiplerinden biri olarak bilinen apoptoz; yunan albebesinde ağaçtan düşen yaprak ya da çiçekten ayrılan petal anlamına gelmektedir. Apoptoz kelimesini ayrı inceleyecek olursak, Apo: ayrı, Ptosis: düşme anlamındadır. 1972 yılında apoptoz terimi ilk olarak Avustralyalı bir patalog olan J.F.K. Kerr tarafından günümüze kazandırılmıştır (Kerr ve ark., 1972). Apoptoz genel anlamıyla hücrenin kendi kendini yok ettiği, genlerle düzenlenen programlı, RNA, protein sentezi ve enerji gereksinimi duyan organizma için homeostazı koruyan bir olaydır. Literatürde apoptoz ile ilgili yapılan çalışmalarda genel olarak Caenorhabditis elegans nematodu (yapışık solucan) kullanılmıştır. Sydney Brenner, Robert Horvitz ve John E. Sulston adlı bilim adamları, çok basit yapısı ve birçok hücreli olan bu nematod ile "programlanmış hücre ölümü ve organ gelişiminin genetik olarak düzenlenmesi" konulu 2002 yılında çok değerli bir ödül olan Nobel Ödülü kazanmışlardır.

1.9.1. Nekroz

Bir diğer hücre ölüm tipi nekrozdur. Nekroz hücre içinde meydana gelen olaylardan farklı olarak, dış etkenler ve olumsuz şartlarda oluşur. Hücrelerin enzimatik olarak sindirilmesi ve proteinlerin denatürasyonlarının eş zamanlı olarak meydana gelmesinden kaynaklanmaktadır.

1.10. Nanoteknoloji

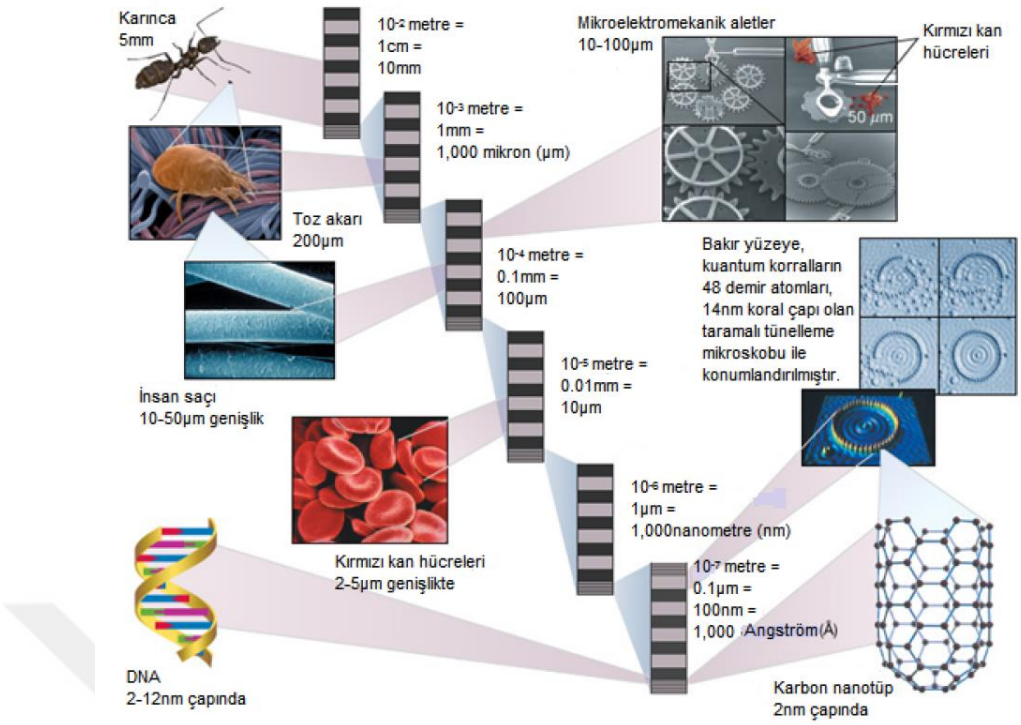
1.10.1. Nanoteknolojinin Tarihi

Tokyo Üniversitesinde Norio Taniguchi tarafından ilk kez 1974 yılında nanoteknoloji çalışmalarını başlatmıştır. Gerçek anlamda modern olarak nanoteknolijisi kullanımının başlanması 1981 yılında atomları görmemize neden olan ve Tarama Tünelleme Mikroskobunun (TTM) icadı sonucunda gerçekleşmiştir. 1981 yılındaki icadın ardından, 1986 yılında fulleren ve 1991 yılında ise karbon nanotüplerin keşfedilmesine yol açmıştır. Aynı zamanda TTM'nin icadından sonra bu mikroskobun bir türevi olan Atomik Kuvvet Mikroskobunu geliştirmişlerdir. ABD'de Bill Clinton hükümeti 1999 yılında nanoteknoloji alanında yapılan çalışmalar, geliştirmeler ve ticarileşme faaliyetlerinin hızlı bir şekilde artmasını amaçlamış ilk resmi hükümet programı Ulusal Nanoteknoloji Adımını (National Nanotechnology Initiative) başlattı ve günümüzde nanoteknoloji alanında gelişmeler hala devam etmektedir.

1.10.2. Nanoteknolojinin Tanımı ve Amaçları

Nanoteknoloji, maddelerin yapılarına atomik düzeyde müdahale edilerek maddenin molekül yapısındaki değişikliklerle bambaşka maddeler ve ürünler geliştirmeyi amaçlayan, mühendislik ve kimya biliminin oluşturmuş olduğu hibrit bir bilim dalıdır (Ferrari, 2005). Nano terimi, Yunan alfebesinde "cüce" anlamına gelen "nanos"tan türemiştir ve herhangi bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde nanoteknolojik gelişmeler hızlı bir şekilde artmış ve lipozomlar, lizozomlar, polimerik miseller, polimer-ilaç konjugatları gibi sistemler dahil olarak birçok nano temelli yapılar klinik olarak onaylanmış farklı terapötik ilaçlar için kullanılmaya başlanmıştır (Choi ve ark., 2016).

Nanopartiküller, ilaç salınım sistemlerinde ve farklı biyolojik uygulamalarda, görüntüleme çalışmalarında, katalitik mekanizmalarda, çevresel toksik metallerin ya da reaktiflerin tespit edilmesi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Davis ve ark., 2003; Sarkar ve ark., 2012).



Şekil 1.38 Nanometre ve mikrometre boyutlarını anlatan örnekler
https://www.britannica.com/technology/nanotechnology

Yaklaşık olarak 100 ila 1000 atomun bir araya gelmesi nano ölçeklerdeki bir nesneyi oluşturur. Bu bağlamda, nanoteknoloji çok küçük boyuttaki maddelerin teknolojisidir.

Nano-yapıların sentezinin gerçekleştirilmesi amacıyla temelde iki yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler;

↑ Aşağıdan yukarıya (bottom-up) yöntemi:

Bu yöntemde atomlar / moleküller ile organik / inorganik yapıları inşa etmeye dayanmaktadır. Organik ya da inorganik yapıların maddenin en küçük yapı taşı olan atomlardan başlayarak atom-atom, molekül-molekül oluşturulması metodunu ifade etmektedir. Nano yapıların birleştirilmesi için doğadaki kuvvetlerden yararlanılmaktadır. Bunlara örnek vermek gerekirse, DNA gibi biyolojik yapıların kendi kendilerine birleşme özelliğinden faydalanarak karbon nano tüplerin kontrolü sağlanabilmektedir.

↓ Yukarıdan aşağıya (top down) yöntemi:

Bu yöntem sayesinde Bulk materyaller nano-yapılar haline gelebilir. Bu yöntemde, kesmek-kırmak veya oyma basma teknikleri kullanılabilmektedir. Daha çok litografik yöntemler kullanılması tercih edilmektedir.

1.10.3. Nanoteknolojinin Kullanım Alanları

Nanoteknoloji, giderek artan oranda birçok alanda kullanılmaktadır. Çoğu teknolojik ilerlemeleri geride bırakacak yeniliklerin nanoteknoloji sayesinde destekleneceği bilinmektedir.

Nanoteknoloji disiplinler arası bir alan olduğundan dolayı çok fazla uygulama alanına sahiptir ve bu alanlar üç ana kısımdan oluşmaktadır. Bu alanlar aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 1.39 Nanoteknolojinin uygulama alanları

Nanoteknoloji, nanometre boyutlarındaki malzemelerin sahip olduğu fiziksel özelliklerinden faydalanılarak çok fazla alanda kullanılmaktadır. Bu alanlar aşağıda gösterilmiştir.

- Malzeme Bilimi (Hafif ve kuvvetli malzemeler)
- Matematik (Modelleme)
- Kimya (Seçici depolama)
- Fizik (Karakterizasyon)
- Biyoloji (Biyosensörler)
- Eczacılık, Tıp (Yapay kemik)
- Elektronik (Nano elektronik)
- Bilgisayar (Kuantum bilgisayar)

1.10.4. Nanoteknolojinin Avantajları

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler de nanoteknolojik uygulamaların çok fazla sektörde kullanılan avantajları vardır (Ochekpe ve ark., 2009). Bu avantajlar;

- ✓ Yeni ürünler geliştirmek ve elde olan ürünler üzerinde daha çok çalışmalar yapmak,
- ✓ İnşaat ve mühendislik alanlarında daha sert, daha güçlü ve hafif malzemeler üretmek ve geliştirmek,
- ✓ Organizmaları ve toksik maddeleri yakalayan filtre sistemleri üretmek ve temiz içme suyu elde etmek,
- ✓ Doğada bulunan kirleticileri uzaklaştırmak,
- ✓ İlaç taşıyıcı sistemleri daha çok geliştirmek ve ileri kronik hastalıklarda daha iyi görüntüleme yapmak, teşhis koymak ve tedaviyi geliştirmek gibi çeşitli avantajlara sahiptir.

1.10.5. Nanoteknolojinin İlaç Taşınımındaki Yeri

Genellikle ilaç taşıyıcı sistemlerin zorlukları, in vivo stabilite, çözünürlük, düşük biyo-yararlanım, hedeflenen bölgeye uzun süreli taşıma ve ilacın plazma içinde dağılması gibi etkileri kapsamaktadır. İlaç taşınımında, nanoteknoloji bu zorlukların en aza indirilmesi için kullanılmaktadır. Nano-yapılı sistemlerin mikron altı ve nano ölçümde geliştirilerek üsretimin sağlanması gibi çok fazla avantaj sağlanmıştır.

Ayrıca nanoyapılı ilaç taşıyıcı sistemlerin bir diğer özelliği suda çözünmesi zor olan ilaçların taşınmasını da sağlar. Nanoyapılar, vücutta özel alım mekanizmalarına sahip olması nedeniyle ilaçları oral biyo-yararlanımını arttırarak ilacın salınımını uzatır ve ayrıca daha düşük plazma ilaç düzeyinin dalgalanmasına yol açarak, yan etkileri aza indirmeyi sağlar (Couvreur ve Vauthier, 2006; Ochekpe ve ark., 2009). Küçük boyutlu yapılara sahip olduklarından dolayı, hücre ve dokuların içine işlemesiyle ilaçların daha etkili bir şekilde istenilen bölgeye taşınmasını sağlar.

Aşağıdaki tabloda insan sağlığına tehdit oluşturabilecek hastaları tedavi etmek amacıyla nanoteknolojik yaklaşımlar ve terapötik etkinliklerin geliştirilmesi amacıyla bir liste gösterilmiştir (Couvreur ve Vauthier, 2006).

Tablo 1.2. İnsan sağlığını büyük ölçüde tehdit eden hastalıkların tedavisi için geliştirilen nanoteknolojik yaklaşımlar

Hastalık	*Terapötik Amaç*	*Nanoteknolojik Çözüm Yolu*
Kanser	Etkinliği artırmak Toksisiteyi azaltmak Biyo-dağılımı kontrol etmek Hücre içi penetrasyonu arttırmak	Nanopartiküller Lipozomlar, miseller PEG'lenen nanopartiküller PEG'lenen lipozomlar, PEG'lenen miseller, hedeflenmiş nanopartiküller, hedeflenmiş lipozomlar
Enfeksiyon	Etkinliği artırmak Toksisiteyi azaltmak Biyodağılımı kontrol etmek Hücre içi penetrasyonu arttırmak (antijen sunucu hücreler,makrofajlar,dendritik hücreler gibi)	Nanopartiküller Lipozomlar, PEG'lenen nanopartikül, PEG'lenen lipozomlar
Metabolik Hastalıklar	Parçalanmadan korumak (terapötik peptitler ve proteinler) Mukozal adsorpsiyonu iyileştirmek Kontrollü ve uzatılmış salım sağlamak	Nanopartiküller, lipozomlar Nanopartiküller Lipozomlar
Otoimmün Hastalıklar	Bağışıklık sistemini hedefleyerek biyodağılımı kontrol etmek Kontrollü ve uzatılmış salım	PEG'lenen nanopartiküller, PEG'lenen lipozomlar
Ağrı Tedavisi	Kontrol ve uzatılmış salım Merkezi sinir sistemine (MSS) karşı biyoyararlanımı geliştirmek	Lipozomlar MSS'e hedeflenen lipozomlar, nanopartiküller, katı lipid nanopartiküller
Gen Terapiye Bağlı Hastalıklar	Parçalanmadan korumak Hücreye alımı artırmak	Katyonik nanoküreler Katyonik lipidler

1.10.6. Kanser Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Sistemler

Kanser tedavisinde ilaç taşınımında kullanılan sistemler, bir ilacın uygulanması, uygulama aşaması, ilacın salınımı gibi sistemlerin kontrolünü sağlamaktadır. İlaç taşıyıcı sistemlere örnekler aşağıda açıklanmıştır.

1.10.6.1. Mikrokapsüller

Çekirdeğin çeper ile kaplanmasıyla meydana gelen dozaj şeklindeki kapsüllere mikrokapsüller denir. Mikrokapsülleme; katı, sıvı ve gazları inert polimerik bir madde sayesinde film şeklinde kaplama işlemidir. Çekirdek maddesi olarak proteinler, enzimler, hormonlar, antibiyotikler, vitaminler ve antihistaminikler kullanılabilir. Çeper maddesi olarak kullanılanlar ise, doğal ve sentetik hidrofilik ve hidrofobik özellik gösteren polimerlerdir.

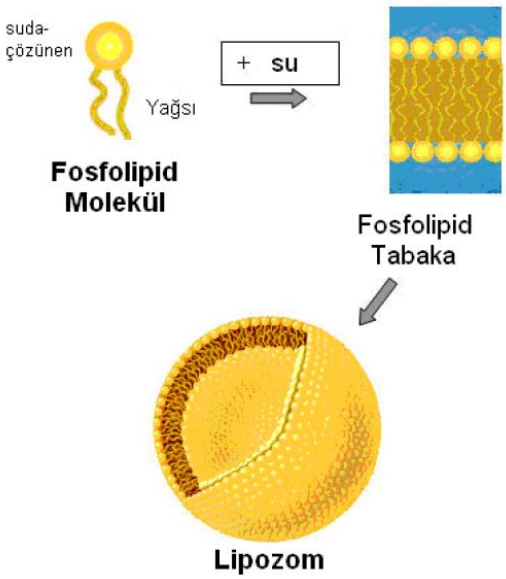


Şekil 1.40 Mikrokapsüllerin genel görünümü

1.10.6.2. Lipozomlar

Lipozom sistemleri doğal ve toksik olmayan fosfolipitler, kolestrolden üretimi sağlanan küresel vesiküllerdir. Bu sistemler küçük boyutlu, hidrofobik ve hidrofilik karakter yapısına sahip, biyo-uyumlu olduklarından dolayı ilaç taşıma sistemleri için çok fazla umut vaat etmektedir. Lipozomların yapıları içerdikleri lipidin komposizyonu, boyutu, yüzey de bulunan yükü ve hazırlanma yöntemlerine göre değişmektedir. Boyutları ve yapılarında bulunan çift katmanın sayısına göre sınıflandırılır. Küçük yapılı ve tek katmana sahip vesiküller tek bir lipit tabakası ile sarılmış ve 25-50 nm çapına sahiptir. Büyük yapılı ve tek katmanlı vesiküller sistem ise küçük tek katmanlıya

benzer yapıdaki heterojen yapıya sahiptir. Çok katmanlı vesiküller birbirlerinden sulu bir faz ile ayrılmış ve birden fazla lipit tabakasına sahip yapılardır. Negatif veya pozitif yüklerin var olması lipozom sistemlere yüzey yükü sağlamaktadır. Lipozomlara yüklenen ilacın farmokinetik açıdan özellikleri çözelti içindeki ilaçtan çok farklılık göstermektedir ve ayrıca lipozom sistemleri sistematik olarak toksisitenin azalması ve enkapsüle edilmiş ilacın biyo bozununurluğunu önlemek amacıyla büyük avantaj sağlamaktadır. Lipozomlar, antikor veya ligandlara bağlanarak hedefli olarak ilaç tedavisinde kullanılmaktadır.

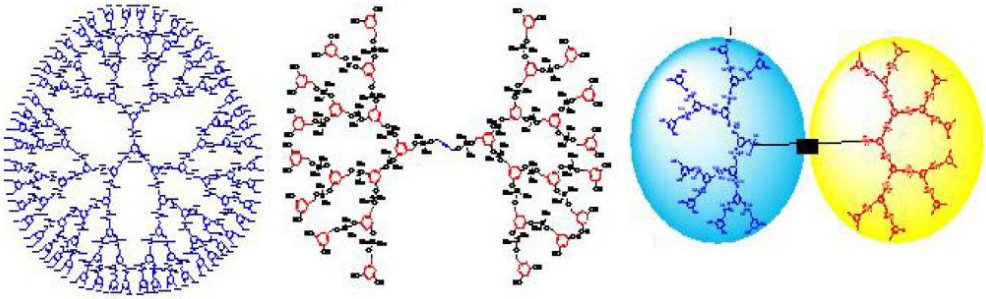


Şekil 1.41 Lipozomların genel oluşum basamakları

1.10.6.3. Dendrimerler

Dendrimer sistemleri 1980 lerin başında ilk kez keşfedilmiş ve bir çekirdeğin çevresinde dallanmış yapıda bulunan makro moleküllerdir (Tomalia ve ark., 1985). Nanometre boyutunda olduklarından, kolay hazırlanır ve işlevsel olarak biyolojik düzenlemeleri sağlayan yüzey gruplarını kopyalama yeteneği gösterdiklerinden dolayı dendrimerler ilaç taşıma sistemleri için çok kullanışlıdır (Quintana ve ark., 2002). Küçük bir molekülün çevresinde ya da lineer bir polimerik çekirdeğin etrafında dallanan yapıların ve bağlayıcıların bulunduğu simetrik yapıdaki moleküllerdir. Dendrimerlerin ucunda bulunan birimler moleküler çevrelerindeki etkileşmelerde belirleyici bir rol oynamaktadır. Bu sistemlerin sağlamış olduğu en önemli katkı, tedavi amaçlı kullanılan

ajanların enkapsüle olmasına olanak sağlamasıdır. İlaçlar daha çok içeriye hapsedileceği gibi yüzeyde bulunan gruplara da bağlanabilirler. Dendrimerler, biyolojik açıdan aktif ajanlar için kaplayıcı bir araç olarak kullanılır ve ilaçların vücutta hedeflenen bölgeye taşınmasını sağlamaktadır.



Şekil 1.42 Dendrimerlerin şematik gösterimi

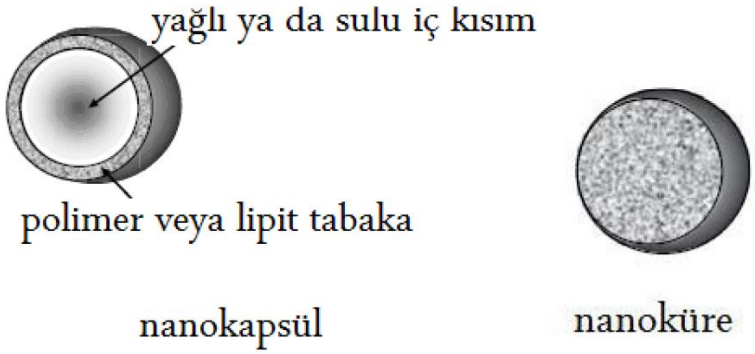
1.11. Nanopartiküller

Nanopartiküller genel olarak 10-100 nm aralığında katı, kolloidal partküller olarak bilinir ve doğal veya sentetik polimerler ile hazırlanırlar (Soppimath ve ark., 2001; Allard ve ark., 2009). Nanopartiküler sistemler ilaç taşınımında kullanılan önemli bir alan olmuştur. Bunun nedeni, birçok ilacı vücudumuzun herhangi bir bölgesine taşıyabilmesidir.

Doğal polimerler, örneğin polisakkaritler, proteinler gibi saflıklarında değişkenlik gösterebileceği için tercih edilmemektedir. Sentetik polimerler ise nanopartikül üretmek amacıyla çok fazla kullanılmakta ve günümüzde de büyük ilgi odağı haline gelmiştir. Nanopartikül üretmek amacıyla en çok kullanılan polimerler, poli-laktik asit (PLA), poli-glikolik asit (PGA) ve bu yapıların kopolimerleri poli-laktik-ko glikolik asit (PLGA) kullanılmaktadır. Bu polimerlerin tercih edilme sebebi biyo-uyumlu olmalarıdır. Parçalanmaları ve bundan dolayı ilacı salma hızları PLA oranı değiştirilerek hidrofobik özellikleri artar ve PGA oranı değiştirilerek hidrofilik özellikleri artırabilmektedir (Hans ve Lowman, 2002).

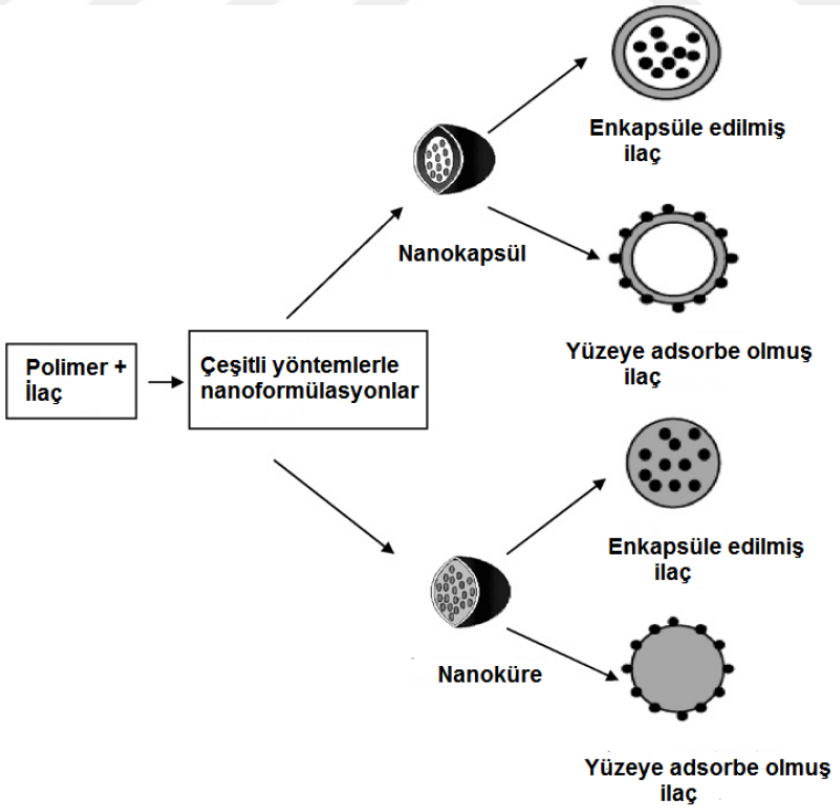
Nanopartikül terim olarak nano-küreler ve nano-kapsüller gibi nanoparçacık sistemlerinin herhangi biri için verilen genel bir terimdir. Nano-küreler, küre şeklinde matriks parçacıklardan oluşur ve ilaç molekülünün bu matriks içinde çözündüğü, hapsedildiği, enkapsüle ya da adsorbe edilebileceği, katı ve kolloidal partiküllerdir.

Nano-kapsüller ise polimerik bir duvar ile sarılmış ara yüzeyinde lipofilik ya da hidrofilik dispersiyon ajanları bulunan ve çoğunlukla yağlı ve hatta bazen sulu bir çekirdekten oluşabilecek mikron altın nanopartiküllerdir (Soppimath ve ark., 2001). Aşağıdaki Şekil 1.43 ‘de bu yapılar şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.43 Nano-kapsül ve Nano-küre yapılarının şematik gösterimi

İlaç molekülü nanopartiküller içerisinde çözünür, hapsolur, nanopartikül sistemlerin matriksine bağlanarak ya da yüzeye tutularak taşınır. Biyo-parçalanır nano taşıyıcı sistemlerin sentezlenmesi ve ilacın enkapsüle edilmesi aşağıdaki Şekil 1.44’de gösterilmiştir (Kumari ve ark., 2010).



Şekil 1.44 Biyo parçalanır nano partiküllerin şematik gösterimi

Nanopartikül sistemler önemli avantajlara sahiptir. Nanopartiküller, intravenöz enjeksiyon ve kas içinde ve deri altındaki bölgeler dahil olmak üzere, meydana gelebilecek tahriş edici reaksiyonları azaltma ve buna ek olarak makrofajlardan uzaklaşma eğilimine sahiptir. Ayrıca polimerik nano partiküller küçük boyutlara sahip olduklarından, enkapsüle edilen antikanser ilacın bağırsak hücre zarında olan p-glikoproteinler yoluyla eliminasyondan kaçma yeteneğine sahiptir. İlaç ile enkapsüllenmiş nanopartiküllerin oral yoldan alınması uzatılmış salınımı sağlayabilmektedir.

Nanopartiküllerin başlıca avantajlarından birkaçını sıralarsak (Kumar, 2000; Hans ve Lowman, 2002; Garcia-Garcia ve ark., 2005; Kaur ve ark., 2008; Singh ve Lillard Jr, 2009; Dinarvand ve ark., 2011);

- Biyolojik açıdan parçanabilir, biyo-geçimli ve toksik olmama gibi özelliklere sahiptir.
- Aşırı doz ilaç yükleme kapasitesine sahiptir.
- İlaçların çözünürlüğünü geliştirir ve biyo-yararlanımını artırır.
- Hidrofilik ve hidrofobik özellikteki ilaçların taşınmasını sağlar.
- Polimer yapıdaki partiküller, katı matriks içinde hapsolan terapötik ajanı enzimatik yolla parçalanmadan korur.
- Aktif maddelerin doku ya da organlara hedeflendirilmesi ve salınımını kontrol eder.
- Nanopartiküller kolay bir şekilde sterilize edilme özelliğine sahip kolloidal partiküllerdir.
- Aktif maddelerin hedeflenen bölgede sürekli olarak salınımını sağladıklarından dolayı, aktif maddelerin diğer doku ve organlar üzerindeki toksisiteyi azaltırlar.
- Üretim şeması olarak genel olarak kolay ve basittir.

1.11.1. Metal Nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller, genel olarak 10-20 nm boyutlarında sentezi gerçekleştirilebilen ve dışarıdan uygulaması mümkün olan bir manyetik alan sayesinde, istenilen türde hareketi sağlanarak ve canlı vücudunda gerçekleştirilen uygulamalarda hedeflenen yere gönderilebilen partiküllerdir.

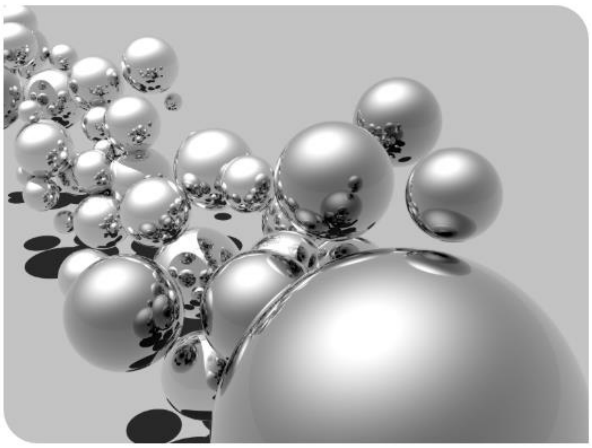
Metal tuzlarından yıkıcı yöntemlerle veya yapıcı tekniklerle sentezlenen ve sıfır değerlikli nanometrik boyut atomlarına indirgenen nanoparçacıklara metalik nanoparçacıklar denir. 1857 yılında Faraday, çözelti içerisindeki metal bazlı nanoparçacıkların varlığını fark etmiş ve renklerinin niceliksek detaylarını 1908 yılında Mie tarafından belirlenmiştir (Tai ve ark., 2007). Metal ve metalik nanoparçacık terimi, nano boyuttaki metalleri, nanometrelerdeki uzunluk, genişlik ya da kalınlık gibi boyutları bulunan bir dizi atom veya molekülden oluşan partikülleri tanımlamak amacıyla kullanılmaktadır.

Hemen hemen tüm metaller metalik nanoparçacıklarına sentezlenebilse de, metal oksit bazlı nanoparçacıklarını üretmek için bir miktar metal de kullanılabilir, yani Bakır oksitler (CuO & Cu_2O), Demir oksit (Fe_2O_3), Alüminyum oksit (Al_2O_3), Silikon dioksit (SiO_2), Titanyum oksit (TiO_2), Çinko oksit (ZnO), Seryum oksit (CeO_2), Manyetit (Fe_3O_4) vb. dökme malzemelerin aksine, metalik nanoparçacıklar özellikle ayırt edici özelliklere sahiptir (Tai ve ark., 2007).

1.11.1.1. Gümüş Nanopartiküller (AgNP)

Gümüş yumuşak ve beyaz parlak dövülebilir bir metaldir. Atom kütlesi 107.862 ve atom numarası 47'dir. Elektrik ve ısının birinci sınıf iletkenidir ve aynı zamanda ışığı çok iyi yansıtabilir. Bu parlak, farklı önemli oksidasyon reaksiyonları için bir katalizör olarak yaygın olarak tercih edilir.

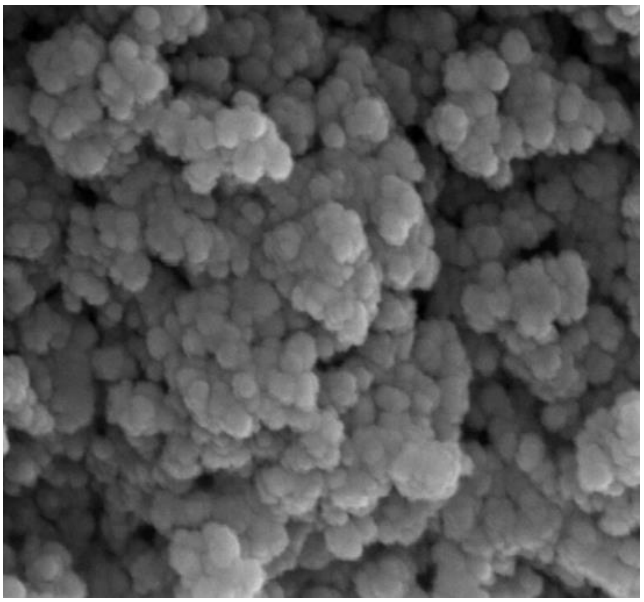
Gümüş nanoparçacıklar, küpler, üçgen, çubuklar, beşgen ve prizma gibi farklı şekillere sahiptir. Dahası, gümüş nanoparçacıkların kendisi suda çözünmezken, gümüş nitrat ($AgNO_3$) ve gümüş klorür (AgCl) gibi gümüş tuzları suda çözünür. Gümüş nanoparçacığın (AgNP) parçacık boyutu genellikle 100 nm'den küçüktür ve her nanoparçacık yaklaşık 20-15.000 atom içerir (Mulvaney, 1996). Bununla birlikte, bu nanopartiküller, dispersiyon kapasitesi, iyi gelişmiş yüzey, kimyasal ve fonksiyonel stabilite, yüksek elektriksel çift katmanlı kapasite ile mükemmel elektrik iletkenliği, katalitik aktivite, vb. ile ilişkili doğrusal olmayan optik davranış gibi benzersiz ve dikkat çekici özelliklere sahiptir. Yapı ve morfoloji yukarıda belirtilen benzersiz ve dikkate değer özellikleri sayesinde güçlü etkiye sahiptir (Henglein, 1989).



Şekil 1.45 Gümüş nanopartiküllerin gösterimi

1.11.1.2. Demir Oksit Nanopartiküller

Doğadan rahat bir şekilde temin edilebilen demir oksitler, laboratuvar koşullarında sentetik olarak da kolay bir şekilde sentezi gerçekleştirilebilen ve iyi bilinen bileşiklerdir. Küçük yapılı manyetik demir oksitler uzun yıllardır in vitro tanı amacıyla konstrat ajan olarak insanlara hizmet için kullanılmıştır (Gilchrist ve ark., 1957; Gupta ve Gupta, 2005; Wu ve ark., 2008). Son yıllardaki çalışmalarda sadece temel bilimler için kullanılmayıp, hedefli olarak ilaç taşınımı, manyetik rezonans görüntüleme sistemlerinde (MRI), manyetik hipertermi, biyo-ayırma ve algılama gibi çeşitli teknolojik uygulamalarda manyetik demir oksit nanopartiküllerin sentezlendiği bilinmektedir (Yang ve ark., 2008; Laurent ve ark., 2011; Cao ve ark., 2012; Lee ve Hyeon, 2012). Diğer malzemelere oranla, çok fazla avantajlara sahip olduğundan dolayı biyolojik çalışmalarda ilgi odağı haline gelmiştir. Manyetik demir oksitlerin avantajlarından birkaç tanesi; üretimleri ucuzdur, fiziksel ve kimyasal açıdan kararlı, biyo sistemle uyumlu ve çevresel olarak güvenilirdir (Lu ve ark., 2007).



Şekil 1.46 Demir nanopartiküllerin gösterimi

1.11.1.3. Altın Nanopartiküller (AuNP)

Optik özellik taşımasından dolayı kolloidal altın, önceki yıllarda cam boyama da çok fazla kullanılmaktadır. Kollidal altın için yapılan sistematik çalışmalar eski zamanlara dayanmaktadır ve günümüzde biyolojik uygulama amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bu süreçte kontrollü sentez yöntemleri için imkan sağlayan ve nanometre boyutunda malzemelere işlevsellik kazandıran nanoteknolojinin gelişmesiyle bu hale gelmiştir. Altın nanopartiküllerin çok fazla özelliği olduğu için biyolojik alanlarda yoğun olarak kullanılmakta ve yeni uygulama alanları açmaktadır (Daniel ve Astruc, 2004).

Altın nanoparçacıklar çeşitli yöntemler kullanılarak farklı boyutlarda ve şekillerde elde edilebilmektedir. Küre, çubuk, kabuki tabaka gibi şekillerde olabilirler. 1-10 nm olacak şekilde sentezlenebilen partiküller boyutları sayesinde; kimya, biyoloji, tıp, farnakoloji gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Altın nanopartiküller disiplinler arası çalışmalar da son zamanlarda çok fazla popüler hale gelmiştir. Bunun sebebi; ilk olarak çok çeşitli boyutlar da olması, özellikle biyo-uygulamalar da biyo-uyumlu olması ve karakterize edilebilmeleri, tedavi süreçlerini takip etmek amacıyla görüntüleme teknikleri ile uyumluluk göstermesi ile çok fazla potansiyele sahip kontrollü salınım için kullanılabilecek bir sistem olarak görülmektedir (Toshima ve Yonezawa, 1998; Rosi ve Mirkin, 2005).



Şekil 1.47 Altın nanopartiküllerin gösterimi

Altın nanopartiküllerin sentezi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları:

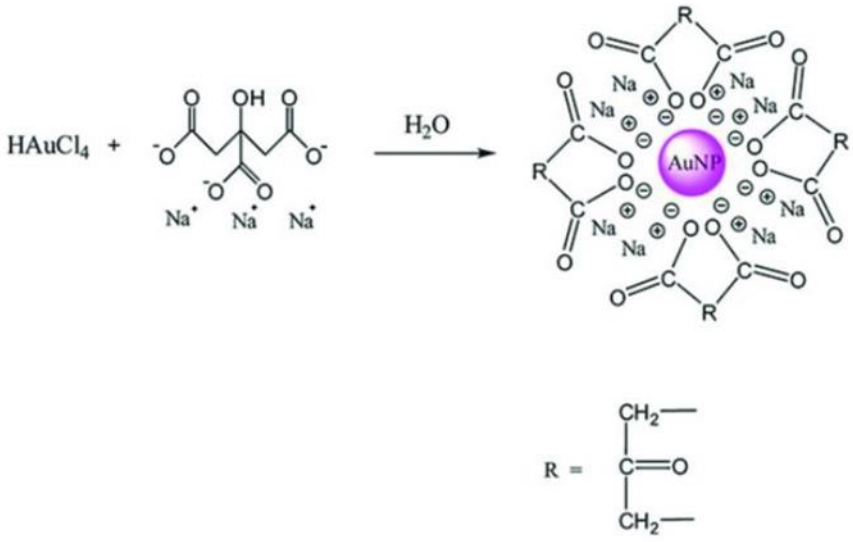
- Turkevich Yöntemi
- Brust-Schiffrin Yöntemi
- Tohum-Büyütme Yöntemi
- Diğer Yöntemler
    - Elektro-kimyasal Yöntem
    - Sono-kimyasal Yöntem
    - Foto-kimyasal Yöntem

Turkevich Yöntemi:

1951 yılında Turkevich ve arkadaşları sitratı, altın nanopartiküllerin sentezinde ligand ve indirgeyici ajan olarak kullanmışlardır. Bu metoda göre altın nanopartiküller yüksek ısıda $HAuCl_4$ çözeltisi içerisine hızlı bir şekilde eklenen trisodyum sitrat ile belirli bir süre karışımı sağlandıktan sonra elde edilmektedir. Turkevich belirli deneyler sonucu elde etmiş olduğu nanopartiküllerin boyutunun 200 nm civarı olduğunu

gözlemlemiştir (Turkevich ve ark., 1951). Bu deney sonucunu, indirgeyici bir ajan varlığında altın iyonlarının büyük makro moleküllere dönüşmesi yani kompleksleşmesi şeklinde açıklamıştır.

Faraday'ın kolloidal altın sentezi için eter-fosfor çözeltisinin indirgeyici ajan olduğu öneriden yola çıkarak, Turkevich; bu çözeltinin $AuCl_4$ çözeltisi ile karıştırması sonucunda suda emülsiyon oluşturduğunu ve aynı zamanda altın iyonlarının fosfor damlacıkları tarafından adsorbe edilmesiyle metalik yapıda altın haline indirgeyip, yüzeye göç ederek çekirdek oluşturabilecek büyüklüğe ulaştığını belirtmiştir.



Şekil 1.48 Turkevich yönteminin reaksiyon mekanizması

1973 yılında Frens aynı yöntemi kullanarak, altın-trisodyum sitrat oranında değişiklik yaparak daha küçük 10-150 nm boyutunda farklı altın nanopartiküller sentezlemiştir (Frens, 1973). Sonraki yıllarda sitratlı ortamda altın nanopartikül sentezi yapmak için, Turkevich–Frens yöntemi olarak isimlendirilen karma bir yöntem geliştirilmiştir. Karma yönteme göre sentezlenen altın nanopartikül oluşumunun mekanizması günümüzde hala aktif olarak incelenmektedir.

Turkevich yöntemine göre, çözeltide bulunan sitrat tuzundan dolayı sistemin pH'sın da değişikliğe neden olur ve altın nanopartiküllerin boyut dağılımını etkilemektedir (Ji ve ark., 2007). Çözelti de meydana gelen pH değişiminden yola çıkarak 20–40 nm aralığında değişen boyutlara sahip altın nanopartiküllerin elde

edilmesi sağlanmıştır (Patungwasa ve Hodak, 2008; Xia ve ark., 2010; Li ve ark., 2011; Rahman ve ark., 2011).

2. BÖLÜM-1: KALİKSARENLERİN ANTİ-KANSER ÇALIŞMALARDA KULLANILMASI

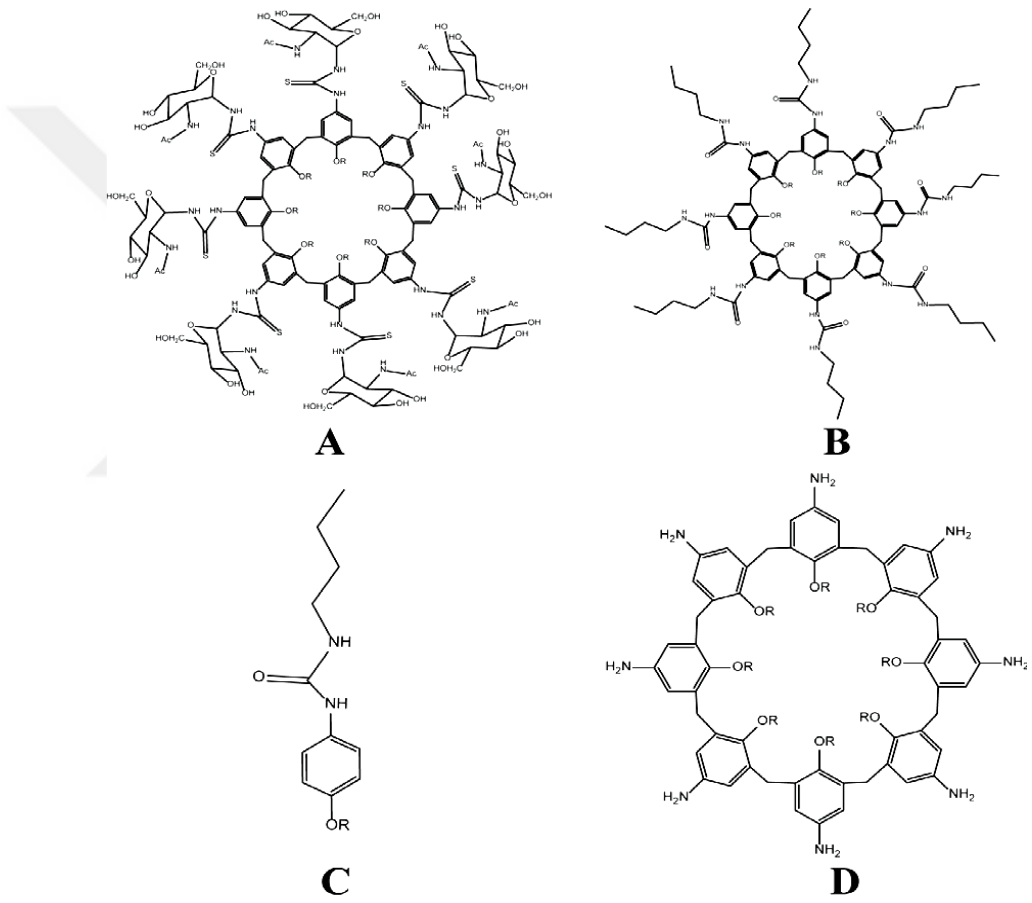
2.1. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Kaliksarenlerin kullanım alanlarının geçmişten günümüze kadar oldukça geniş olmasına rağmen, son yıllarda bu bileşiklerin farklı türevleri anti-kanser uygulamalarında doğrudan anti-proliferatif ajan olarak kullanımı çok fazla ilgi görmektedir.

Kanser, günümüzde Dünya'da en önemli sağlık sorunlarından biridir ve sonu ölümle sonlanan hastalıklardan ilk sıradadır. Sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle de bir halk sağlığı sorunudur. Dünya sağlık örgütü (WHO) 2018 verilerine göre; kanser sonucu hayatını kaybeden kişi sayısı 9.6 milyondur. Kanser hücreleri radyo-terapik ve kemo-teropik ilaçlara duyarlı olduğundan, kanser hücreleriyle savaşabilecek ve ayrıca bu hücrelere karşı daha etkili olabilecek moleküllerin sentezlenmesi çok büyük önem arz etmektedir. Bundan dolayı, kaliksaren türevlerinin antikarsinojen ve ilaç taşınımı vb gibi özelliklerinin incelenmesi ile kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni kaliks[n]aren bileşiklerinin sentezlenmesi büyük önem arz etmektedir.

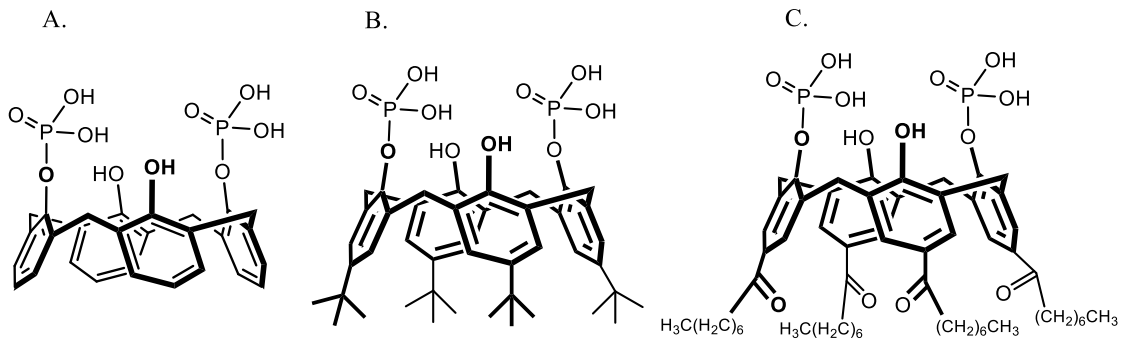
N-asetil-*D*-glukozamin grupları (bileşik A) içeren üredio-kaliks[8]aren sentezlemişlerdir. Bileşik A C6 beyin kanseri hücrelerinin mikrasyonunu ve proliferasyonunu inhibe etmiştir. Bileşik A'nın antiproliferatif etkisinden sorumlu olan yapısını aydınlatmak amacıyla şeker grupları (Bileşik B) içermeyen, üredio grupları taşıyan bir monomer (Bileşik C) ve kaliksarenlerin amino türevleri sentezlenerek test edilmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda bileşik A'nın etkisinin *N*-asetil–*D*-glikozaminden bağımsız olduğu ve etkisi için üredio gruplarına gereksinim olduğu bulunmuştur (Chen vd. 2013). Bileşik C ve D (Bileşik B nin halkalı olmayan tek değerli analoğu ve kaliks[8]arenin hem üredio grubu hem de şeker grubu içermeyen türevi herhangi bir etki göstermemiştir. Birçok kanserin erken evresinde kaliksarene bağımlı teşhis çalışmalarında umut vaat etmektedir. Örneğin karaciğer kanserinde (HCC), insan rahimağzı kanserindeonkooprotei-1 (HCCR-1) erken safhalarda aşırı miktarda sentezlenmektedir fakat alfa-fetoprotein (AFP) deneyleri ve karaciğer ultrasonu gibi klasik metotlarda düşük hassasiyet ve spesifite den dolayı küçük tümörleri teşhis edememektedir. Hâlbuki 2mm altın elektrot yüzeyine immobilize edilmiş kaliksarenler

HCCR-1' i 1000 kez seyreltilmiş serumda ve insan karaciğer kanseri hastalarından elde edilmiş sağlıklı numunelerde bile tespit edebilmektedir (Qin vd. 2013). Farklı fonksiyonel gruplara bağlanabilme özelliklerinden dolayı kaliksarenler iyonların hücre membranından geçişleri, kataliz çalışmaları, DNA yoğunlaştırılması ve hücre transfeksiyonun, oligo peptitleri tanıyarak protein ve karbonhidrat bağlanması, tanıması ve inhibisyonu gibi birçok biyolojik proseste kullanılması için çok güzel bir adaydır (Stubbs ve ark., 2000; Lee ve ark., 2007; He ve ark., 2012; Yousaf ve ark., 2015).



Şekil 2.1 Üre grubu bulunduran farklı kaliks[8]aren bileşiklerinin yapısı

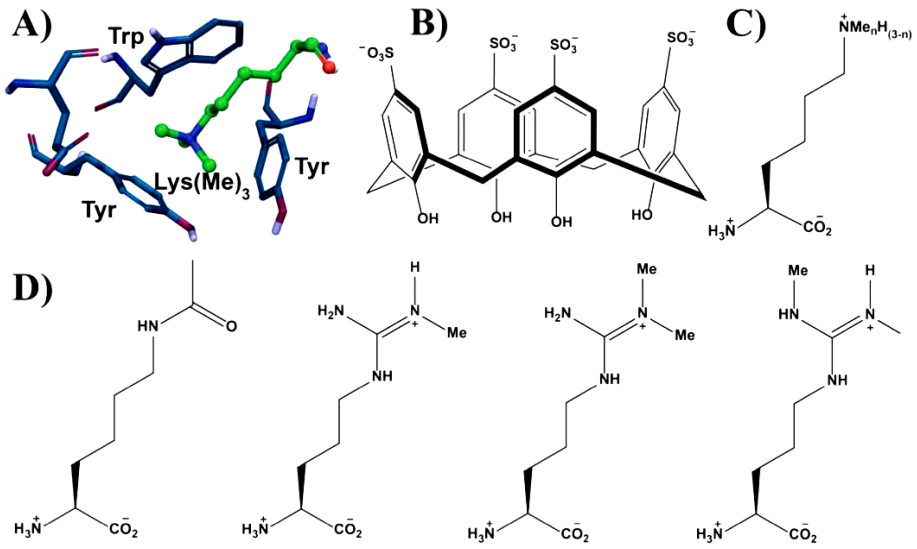
Yapılan birçok araştırma soncunda dihidrofosfonik asit türevli kaliks[4]aren (A, B, C) bileşiklerinin karaciğer kanseri, melanoma ve lösemi gibi çoğu kanser türlerinde antikarsinojenik etkisinin saptanması amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Sentezlenen bu türevlerin özellikle de 7.3 μM gibi düşük IC_{50} değeri olduğu ve insan akut lemfomablastik lökemia hücrelerine karşı etkili olduğunu bildirmişlerdir (Coleman ve ark., 2010).



Şekil 2.2 Kaliks[4]aren dihidrofosfonik asit türevli bileşikler

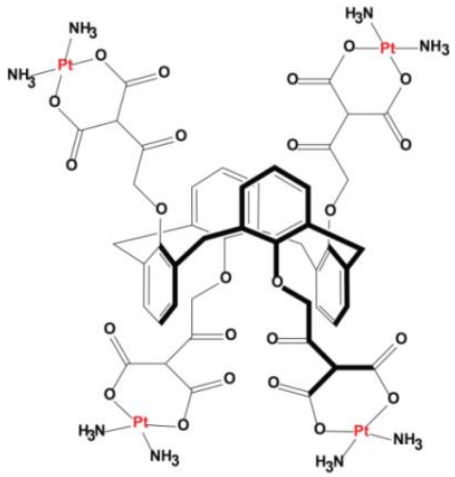
Viola ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, üre grubu bulunduran farklı yapıdaki kaliks[8]arenlerin antikarsinojen etkileri incelenmiş ve yapısında N-asetil *D*-glukozamin bulunduran kaliks[8]aren türevlerinin kanser hücre hatlarında metastazı ve hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiğini diğer kaliks[8]aren türevlerinin etkisinin olmadığını ve 48 saat süreyle MTT tahlilindeki analizde, değerleri 10 μM bulunan kaliks[8]arenin monoloğu ve ureido kısımlarından yoksun kaliks[8]aren bileşiklerinin herhangi bir antikanser etki oluşturmadığı gözlenmiştir (Viola ve ark., 2010).

Lizin gruplarını metilasyonu ve demetilasyonu tümör gelişiminde önemli bir role sahiptir. Ayrıca P53 (tümör baskılayıcı gen), NF-kBs alt üniteleri, P65 (kemotaksis kontrolörü) ve E2F (hücre döngüsü kontrolörü) ve aynı zamanda kanser oluşumunda önemli bir role sahiptirler. *p*-Sülfokaliks[4]aren metillenmiş lizine göre normal lizinden 70 kat daha fazla ilgiye sahiptir (Beshara ve ark., 2010). Meme kanseri ve lenf kanseri gibi birçok kanser türünde pürin ve pirimidin bazlarının konsantrasyonları değişmekte ve bu dört bazın konsantrasyonların saptanması kanser teşhisinde önem arz etmektedir.



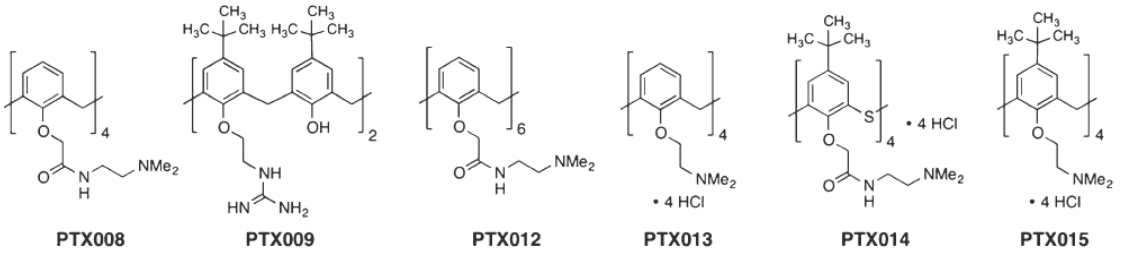
Şekil 2. 3 A. heterokromatin protein 1' in aromatik yapısı; B. p-sulfokaliks[4]ren; C. Metillenmiş lizin türevleri ve D. Acetillenmiş lizin ve arjinin türevleri

Geçmiş zamandan günümüze kadar cisplatin ve türevleri anti-kanser ilaç olarak kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlar yüksek toksik etki göstermeleri gibi bazı yan etkilere sahiptirler. Töropotik amaçlı kullanılan cisplatin türevleri birçok yan etkilere sahip olmalarından dolayı bu bileşiklere alternatif yol olarak kaliks[4]aren-cisplatin türevleri sentezlenmiştir. Kaliks[4]aren-cisplatin türevli bileşikler çeşitli kanser hücre hatlarında MCF-7 (meme kanseri), HEPG2 (karaciğer kanseri) ve A549 (akciğer kanseri) gibi insan kanser hücrelerine karşı kullanılmış ve cisplatine göre çok daha fazla etki gösterdiklerini gözlemlenmiştir. Bu kanser hücrelerine karşı elde edilen IC_{50} değerleri sırasıyla, 5.7 µM, 4.9 µM ve 2.6 µM olarak hesaplanmıştır. Kaliks[4]aren-cisplatin türevlerinin sitotoksik etkilerinin yanı sıra kanser hücreleri arasından C6 glioma hücrelerinim metastaza uğramalarını inhibe ettiğini ve tümörün büyümesini/yayılmasını engellediği belirtilmiştir (Oh ve ark., 2005; Beshara ve ark., 2010).



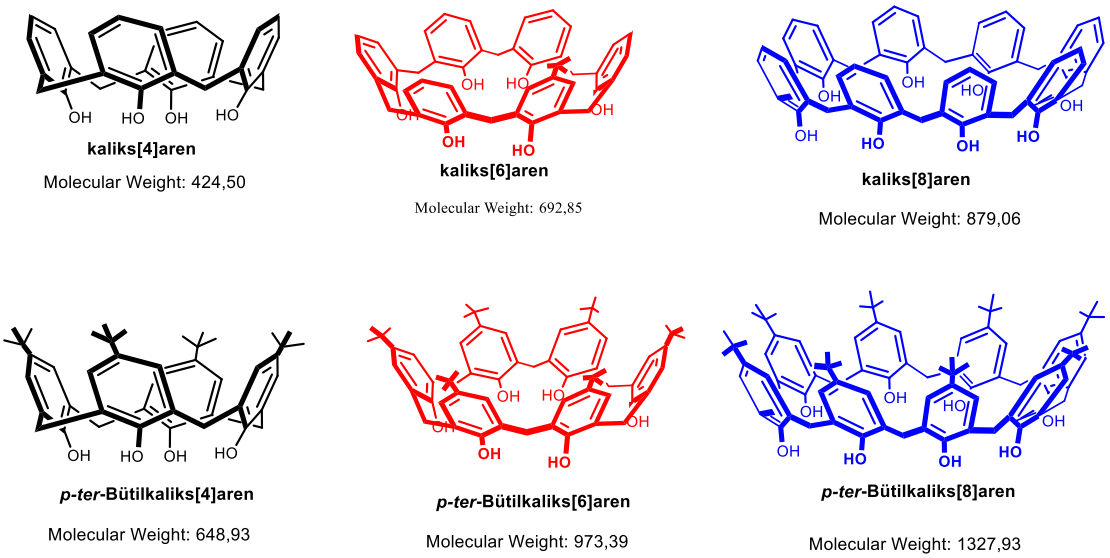
Şekil 2. 4 Kaliks[4]aren Cisplatinin kimyasal yapısı

Dings ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, tümörlü ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi bulunan polikatyonik kaliksaren bileşikleri sentezlemişlerdir. Yapılan bu çalışma doğrultusunda, kaliksaren türevlerinin hidrofilik ve hidrofobik kısımlarını modifiye ettikten sonra anti-tümör etkiye sahip yapılar sentezlemişlerdir. PTX013 olarak kodladıkları ve tetra-amin grupları ile modifiye edilmiş kaliks[4]aren bileşiklerinin ilaçlara karşı direnç gösteren kanserli hücrelerin büyümesinde inhibisyona neden olduğunu bildirmişlerdir (Dings ve ark., 2013).



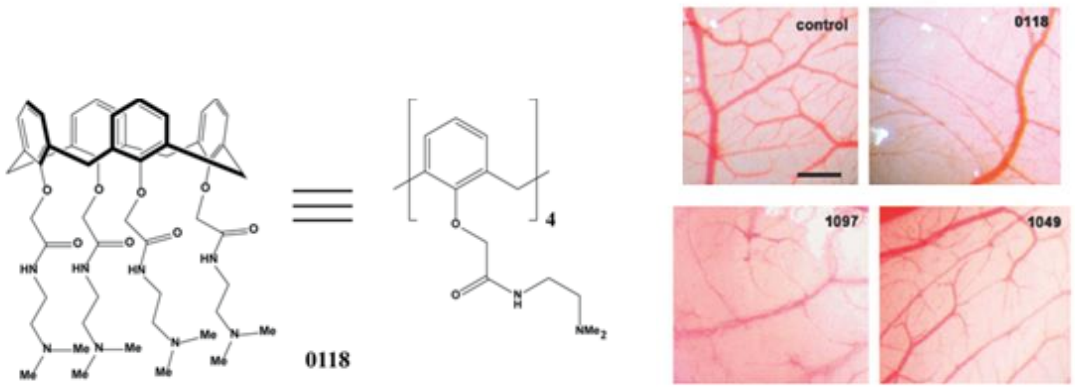
Şekil 2. 5 Kaliks[4]aren, tetra ve heksa amin bileşikleri, PTX008, PTX009, PTX012, PTX013, PTX014, ve PTX015 'in yapıları

Pankreas kanseri, Kuzey Amerika'da kansere bağlı ölüm nedenleri arasında dördüncü sıradadır. Geç evre tümörü olan hastaların tanı ve tedavisinde az bir ilerleme gözlenmiştir. Ayrıca, pankreas kanseri saldırganlığı, hastalığın hızlı ilerlemesi, direnci ve nihayetinde metastazına yol açabilen aracılarla yakından ilişkilidir. Pelizzaro-Rocha ve arkadaşları 2013 yılındaki pankreas kanseri üzerine yaptıkları bir çalışmada, çeşitli halka boşluğuna sahip ve farklı hidrofobik özellik gösteren kaliks[n]aren (n: 4, 6 ve 8) türevlerinin pankreas kanseri hücre hatları (Panc-1) üzerine sitotoksititesini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre kaliks[6]aren türevinin bu hücrelerde oldukça etkili olduğunu ifade etmişler ve kaliks[6]aren türevinin kanserli hücrelere etki mekanizmasını araştırmışlardır (Pelizzaro-Rocha ve ark., 2013).



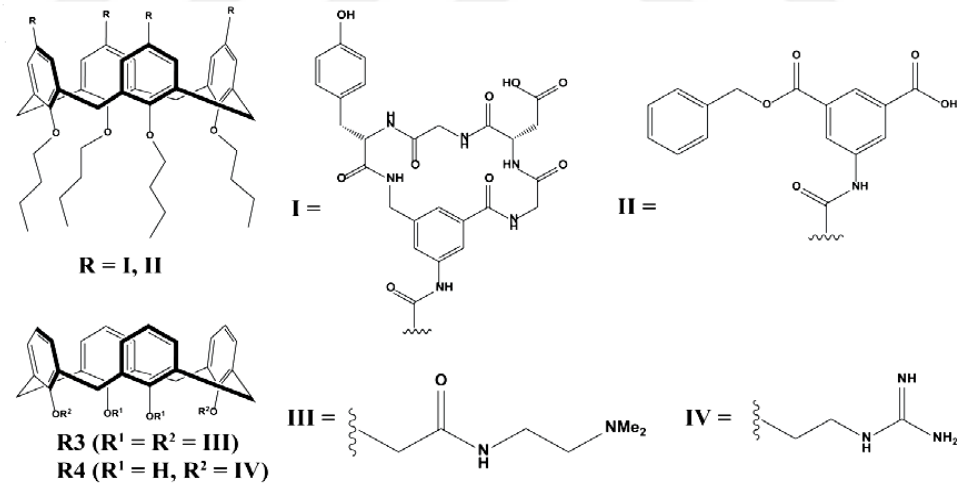
Şekil 2. 6 *p-ter* bütil kaliks[4,6,8]arenlerin ve kaliks[4,6,8]arenlerin gösterimi

Dings ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise, *in vivo* çalışmalar gerçekleştirerek fare modelleri üzerinde kaliks[4]aren türevli bileşiklerin anjiyogenezi inhibe ederek yeni bir damar oluşumunu engellediğini ve bunun sonucunda da tümör büyümesini azaltarak büyüme faktörü reseptörlerine bağlanması ile insan glikoblastoma kanseri hücre hatlarının gelişimini durdurduğunu belirtmişlerdir. Bunlara ilave olarak insan damar endotelyal (HUVEC) hücrelerinde N,N-dimetiletilendiamin yapıları ile fonksiyonlandırılmış kaliks[4]aren amit türevinin IC_{50} değeri 2 µM olarak bulunmuş ve ticari olarak piyasada satılan angineksin IC_{50} değeri 5 µM olarak bulunmuş ve iki bileşik karşılaştırıldığında kaliks[4]aren amit türevinin 2,5 kat daha etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışma ekibi kaliksaren bileşiklerini hidrofilik ve hidrofobik konumlarından fonksiyonlandırarak anti tümör özelliği bulunan moleküller sentezlemişlerdir ve elde edilen bu yapıların kanser hücre hatlarında inhibisyona sebep olduğunu gözlemlemişlerdir. Özellikle 0118 kodu ile adlandırdıkları amit gruplu kaliks[4]aren moleküllerinin tümörlü yapıdaki hücreler üzerinde kan damarlarının oluşmasını engellediği ve tümörlerin yayılmasını azalttığını bildirmişlerdir. Gerçekleştirdikleri bu çalışma da damarlaşmayı engelleyen, kontrol ve karşılaştırma yapısı olarak da peptit ve protein yapılarından meydana gelen angineks bileşiğini kullanmışlardır (Dings ve ark., 2013).



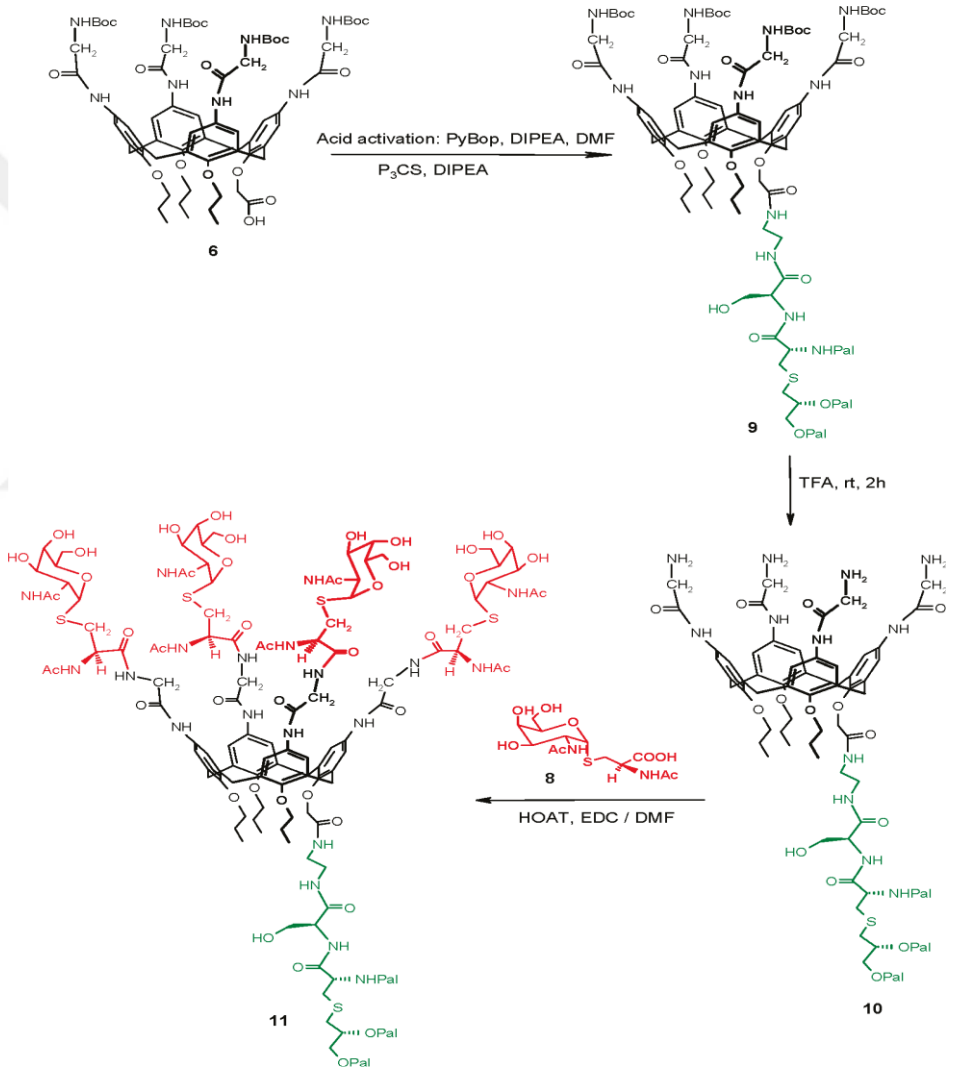
Şekil 2. 7 N,N-dimetilamin grupları ile türevlendirilmiş kaliksaren bileşiğinin yapısı

Kaliks[4]aren türevleri insan glioblastoma hücrelerinde fosforilasyon (IC_{50}=250 nM) ve kan pulcuğu büyüme faktörlerini (IC_{50}=190 nM) inhibe ederek yüksek sitotoksiteye sahip olup anjiogenezi inhibe ederek kanser dokularında yeni damar oluşumunu engellemektedirler (Kelland, 2007; Consoli ve ark., 2015). Bunun yanı sıra R3 ve R4 insan ovaryum ve fare melanoma hücrelerinde kanser gelişimini durdurdukları gösterilmiştir.



Şekil 2. 1 Kaliks[4]aren türevleri insan glioblastoma, ovaryum ve fare kanser modellerinde sitotoksit etkiye sahiptirler

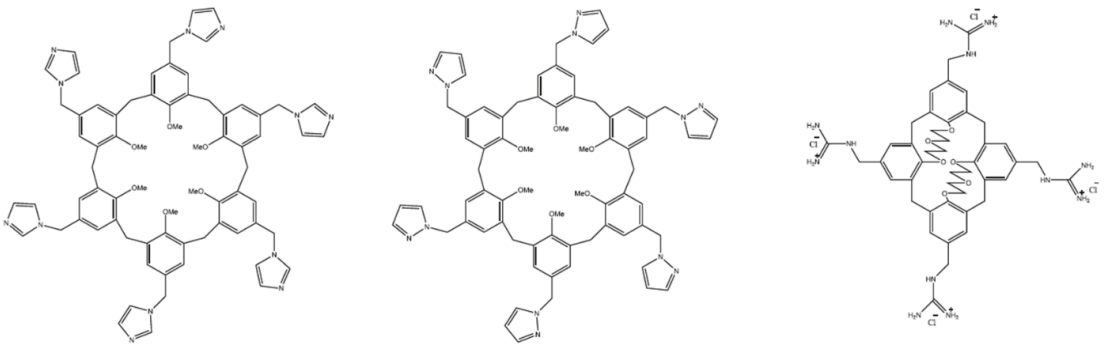
Geraci ve grubu 2008 yılında yeni bir antikanser aşı adayı olarak dört Tn Antijen Glikomimetik birim taşıyan kaliks[4]aren türevi sentezlemişler, yapısını spektroskopik yöntemler ile karekterize etmişler ve immünolojik olarak incelemişlerdir. Sentetik yapının immünojenisitesi araştımak için *in vivo* ortamda farelerin üzerinde bir dizi testler yapmışlardır. Benzer testleri yapısında bir Glikomimetik dizi taşıyan bir monomer ile gerçekleştirmişlerdir. ELİSA deneyi sonuçlarına göre dörtlü grup taşıyan kaliksaren yapısının monomere kıyasla daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (Geraci ve ark., 2008).



Şekil 2. 9 Antikanser aşı adayı olarak dört Tn Antijen Glikomimetik birim taşıyan kaliks[4]aren türevi

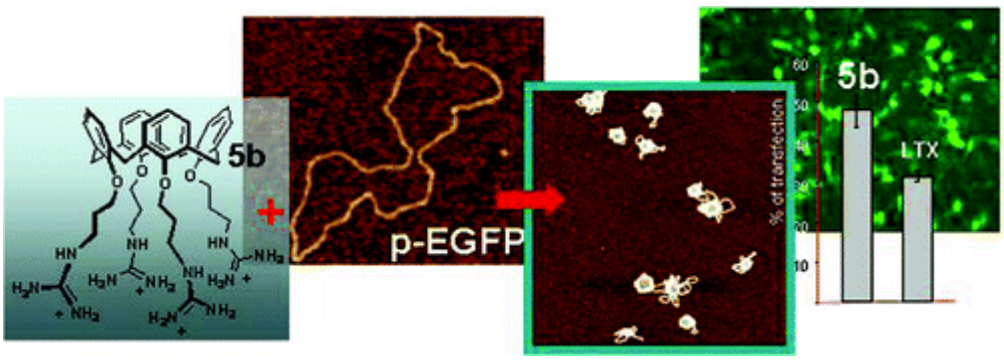
2015 yılında p53 tümör baskılayıcı proteinin transkripsiyonel aktivitesinin arttırılması ile ilgili yapılan bir çalışmada kaliksarenin fenolik birimlerin *p*- konumunda altı adet piridin, imidazole ve guanidine grupları taşıyan üç farklı kaliks[6]aren

türevlerinin *in vitro* ortamda aktiviteleri araştırılmış ve tümör baskılayıcı proteinin en yüksek aktiviteyi imidazole grupları ile türevlendirilmiş kaliks[6]aren bileşiği ile gösterdiği bildirilmiştir (Kamada ve ark., 2010).



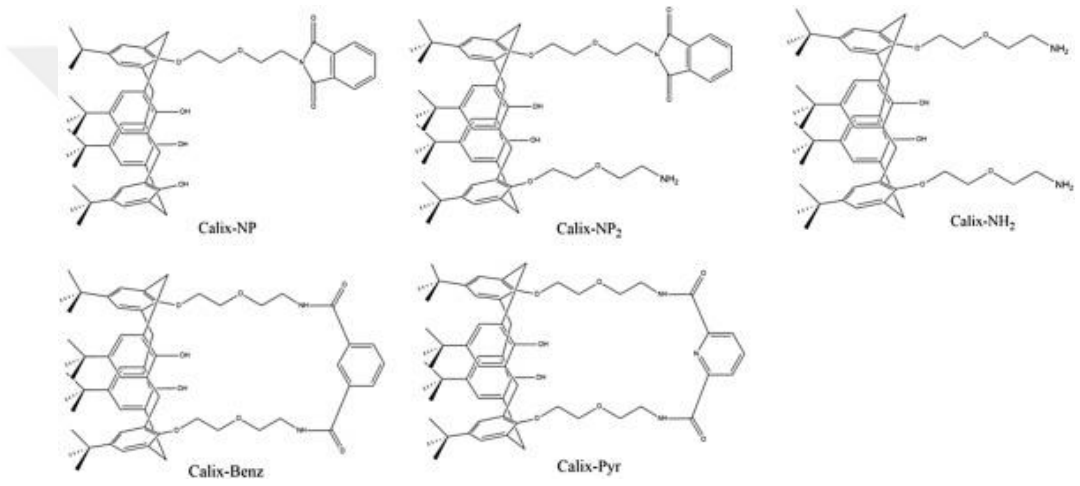
Şekil 2. 10 İmidazol ve pirazol grupları taşıyan iki farklı kaliks[6]aren türevleri ve guanidin grubu taşıyan kaliks[4]aren türevi

Kaliksarenlerin biyokimyasal özelliklerinin araştırılması ile ilgili 2012 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, kaliksaren bileşikleri fenolik-O bölgesinden farklı guanidin grupları ile türevlendirilmiştir. Sonrasında bu türevler hücre transfeksiyon kabiliyetini değerlendirmek amacıyla DNA ile etkileşimi incelenmiş ve önemli ölçüde hücre transfeksiyon artırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca bu türevler ile muamele edilmiş hücrelerin toksisitesinde ciddi oranda azalma olduğunu belirtmişlerdir (Bagnacani ve ark., 2012).



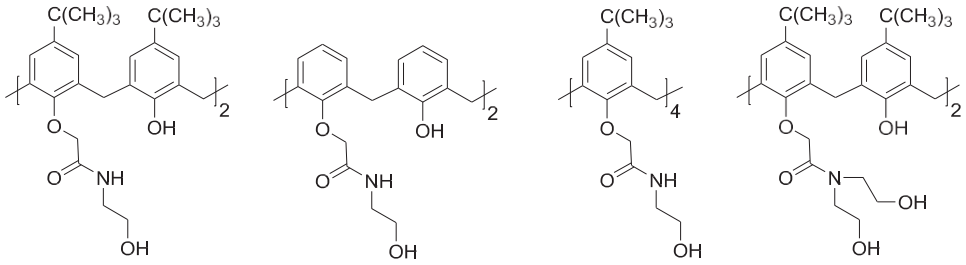
Şekil 2. 11 Kaliksaren bileşikleri lower-rim bölgesinden farklı guanidin grupları ile türevlendirilme

Kaliksarenlerin antikanser ajanı olarak kullanıldığı bir başka çalışmada, Santos ve arkadaşları fenolik–O konumundan amid ve asiklik türevleri içeren bir dizi *p-ter*-bütilkaliks[4]aren türevlerini sentezlemişler ve insan prostat kanseri (LNCaP), meme kanseri (MCF-7), glioblastoma (U87) hücreleri ve fibroblastlar (NHDF) hücrelerine hücrelerine karşı etkilerini araştırmışlardır. Son olarak hücre içi lokalizasyonu belirlemek amacıyla konfokal floresan mikroskopu ile hücre görüntüleme çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Kaliksaren türevleri içinde kanser hücre hatları üzerinde en güçlü antiproliferatif etkiyi, Kaliks-NH_2 türevinin gösterdiğini bildirmişlerdir (Santos ve ark., 2015).



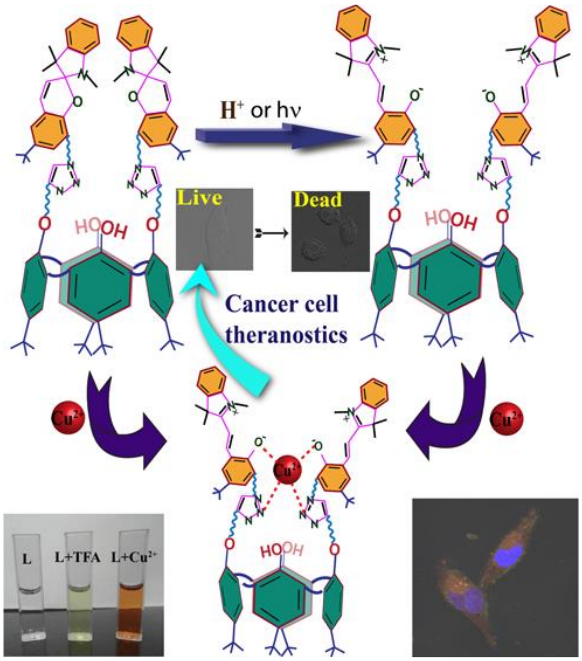
Şekil 2.12 Amid ve asiklik türevleri içeren bir dizi *p-ter*-bütilkaliks[4]aren sentezleri

An ve arkadaşları (2016) tarafından kaliks[4]aren polihidroksiamin türevli bileşikler sentezlemişler ve çeşitli kanser hücrelerinde (A549, SKOV3, SE1990, HELA, RAJİ ve MDA-MB231) sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Bunun sonucunda 3a-3d bileşiklerinin kanser hücreleri üzerinde etkili olduğu gözlenmiş ve bu hücreler arasında özellikle yumurtalık (SKOV3) kanser hücrelerinde sitotoksik etkisinin daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir (An ve ark., 2016).



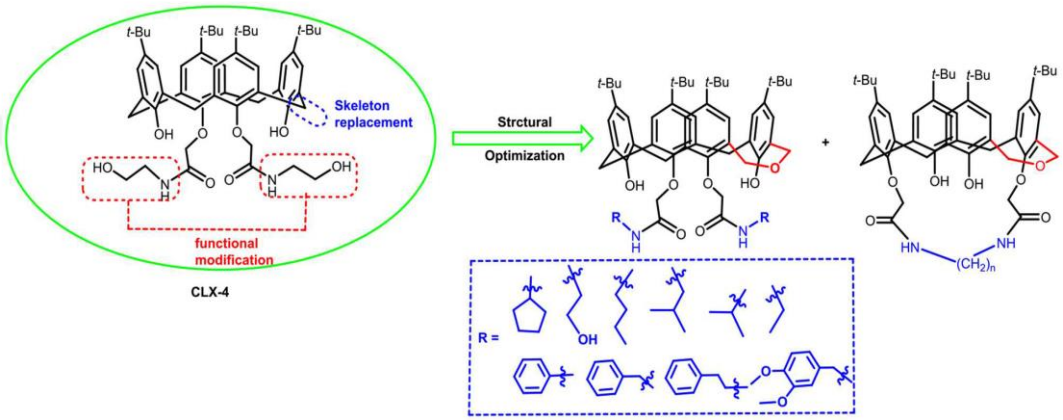
Şekil 2. 13 Kaliks[4]aren polihidroksiamin türevli bileşikler

Nag ve ekibininin 2019 yılında yaptıkları çalışmada triazol türevli, spiro-indolin bağlantılı, 1,3-di-türevli kaliks[4]aren türevi sentezlemişlerdir. Sonrasında sentezlenen kaliksaren türevi bakır iyonu sensörü olarak kullanmışlardır. Bu çalışmada özellikle spiro-indolin grubunun fotokromik, asidokromik ve metalokromik özelliklerine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bundan dolayı bu probun Cu iyonunun tespitinde oldukça etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Hücre görüntüleme çalışmasında ligandın katyonik yapısından dolayı özellikle hücrenin mitokondrisinde toplandığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca sentezlenen ligandın canlı hücrede toksititesinin oldukça düşük olduğunu fakat Cu iyonu ile oluşan komplekslerinin tümör hücrelerini yüksek derecede inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (Nag ve ark., 2019).



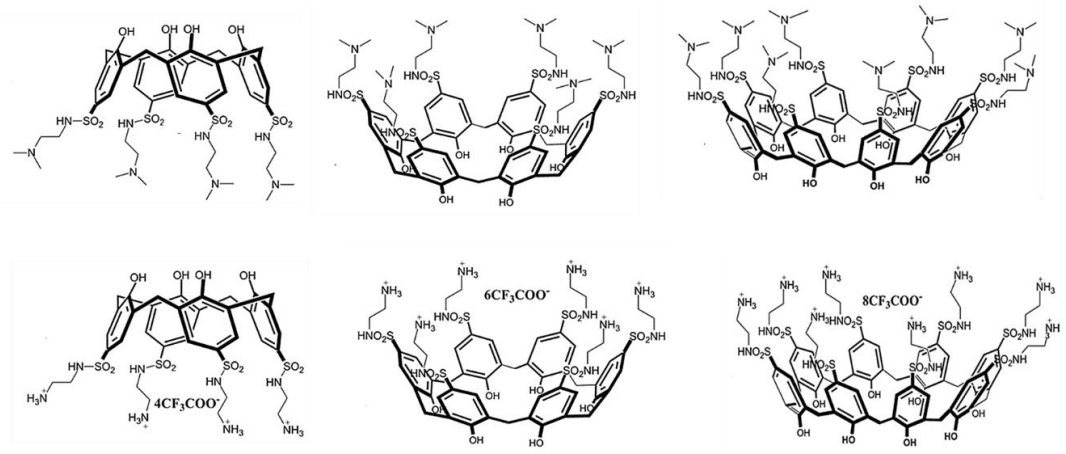
Şekil 2. 14 Triazol türevli, spiro-indolin bağlantılı, 1,3-di-türevli kalix[4]aren türevi

An ve arkadaşları, kaliksaren türevlerinin ümit verici anti-tümör ajanları olarak kullanıldığı bir çalışmada dihomooksokaliks[4]aren amid türevlerini tasarlayıp sentezlemişler ve yapılarını çeşitli spektroskopik yöntemlerle karekterize etmişlerdir. Daha sonra çeşitli insan kanser hücre hatlarında in vitro ortamda bu bileşiklerin sitotoksititesini araştırmışlarıdır. Elde edilen verilere göre özellikle A549 (akciğer kanseri) hücre hatları üzerine oldukça etkili inhibisyon sergilediğini gözlemlemişlerdir. Son olarak hücre ölüm mekanizmasını aydınlatmak için apoptoz çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir (An ve ark., 2019).



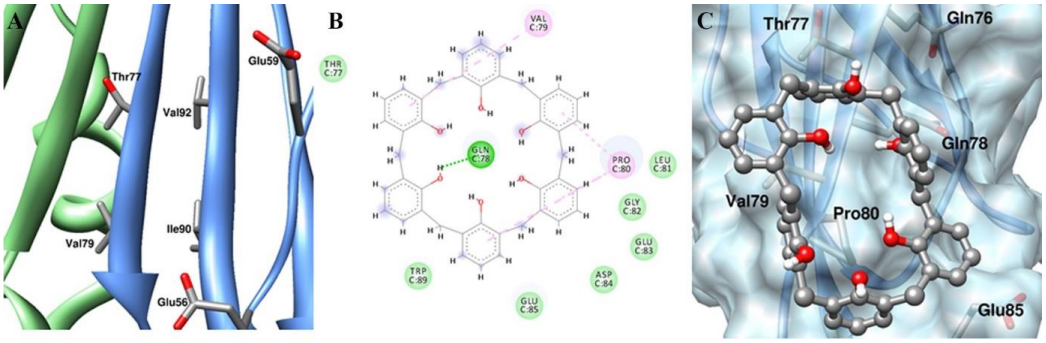
Şekil 2. 15 Dihomooksokaliks[4]aren amid türevleri

Yılmaz ve arkadaşlarının 2020 yılındaki çalışmalarında, farklı yapılarda sülfonamid grupları taşıyan ve farklı kavite boyutlarına sahip yeni kaliks[n]aren (n: 4, 6 ve 8) bileşikleri sentezlemişlerdir. Çeşitli kanser hücrelerinde sitotoksitite çalışmalarını gerçekleştirmişler. Bileşiklerin epitel hücre hatlarında toksik etki göstermediğini diğer hücrelerde önemli ölçüde toksitite gösterdiklerini belirtmişlerdir (Yilmaz ve ark., 2020).



Şekil 2. 26 Sülfonamid grupları taşıyan ve farklı kavite boyutlarına sahip yeni kaliks[n]aren (n:4,6 ve 8) bileşikleri

Son zamanlarda Pankreas kanseri üzerine yapılan bir başka çalışmada, Panc-1 hücrelerine karşı kaliks[6]arenlerin etkisi araştırılmış ve elde edilen sonuçlara göre kaliks[6]aren kullanılarak Panc-1 hücrelerinin agresifliğini azalttığı gözlemlenmiştir. Etki mekanizması olarak özellikle reseptör tirozin kinazlara (RTK) karşı etkili olduğu ve hücrelerin kaliksaren ile muamele edilmesinden sonra kaliks[6]arenin AXL reseptör tirozin kinaz bozulmasında rol oynadığını bildirmiştir (Rocha-Brito ve ark., 2020).



Şekil 2. 37 Kaliks[6]arenin AXL reseptör tirozin kinaz

Literatürlerdeki bu çalışmalardan esinlenerek doktora tezinin bu bölümünde kaliks[4]arenler fenolik-O konumundan sekonder amin olan *L*-prolin ile fonksiyonlandırılıp karakterize edildikten sonra anti-kanser özellikleri araştırıldı.

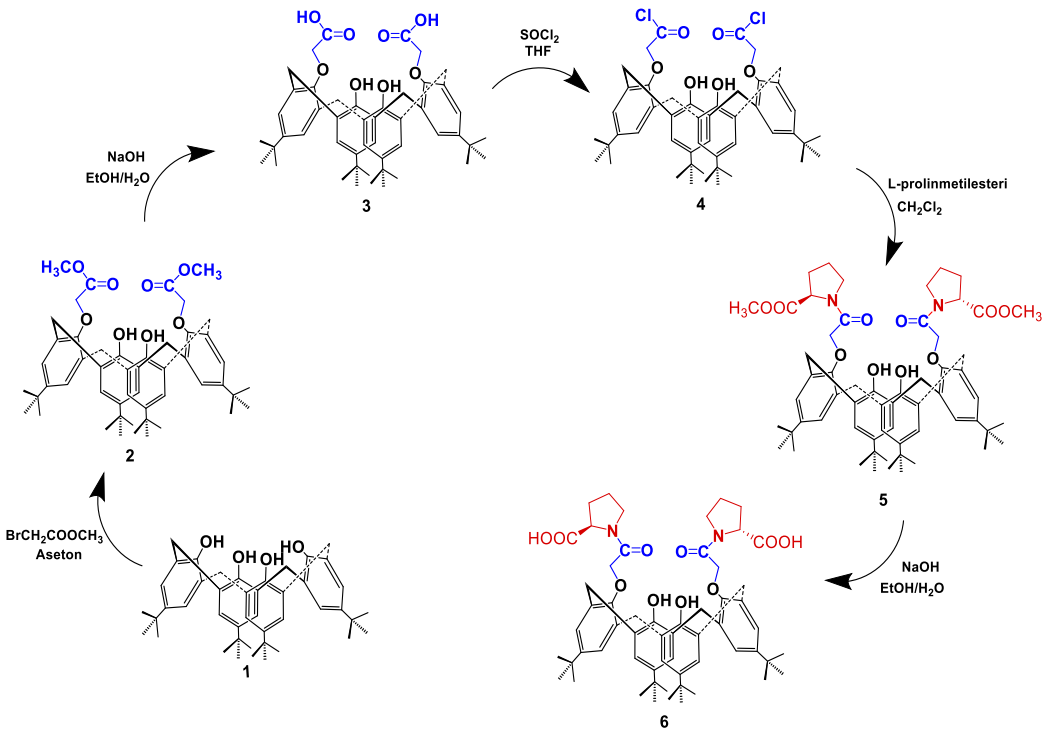
2.2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.2.1. Enstrümantal Teknikler

SRS markalı cihaz kullanılarak katı ürünlerin erime noktası tayin edildi. Varian 400 MHz spektrofotometre cihazında DMSO, D_2O ve $CDCl_3$ dötoro çözücüleri kullanılarak ^1H ve ^{13}C NMR analizleri gerçekleştirildi ve kimyasal kayma değerleri (δ) ppm olarak ifade edildi. Bruker Vertex ATR-FTIR spektrometresi kullanılarak FTIR spektrumları alındı. Floresans ölçümleri Perkin Elmer LS55 spektrometresiyle ve Shimadzu UV-1700 markalı cihaz kullanılarak UV-visible sonuçları alındı. Tez çalışmasında kullanılan her bir kimyasal madde analitik saflıkta Fluka, Merck, Sigma ve Aldrich firmalarından yararlanılarak temin edilmiştir. İnca tabaka kromatografisi için silika jel tabakası ile (SiO_2, Merck 60 F_{254}) kaplanmış alüminyum plakalar kullanıldı. Bütün deneysel çalışmalarda Millipore Milli-Q Plus arıtma cihazından saflaştırılan saf su kullanılmıştır.

2.2.2. Kimyasal Sentezler

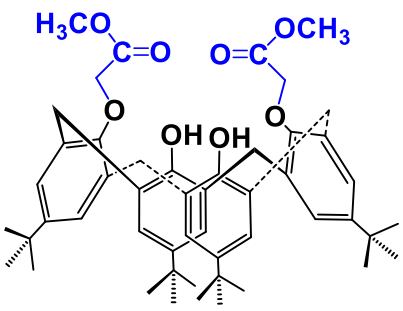
Şema-1:



2.2.2.1. 5,11,17,23-(Tetra-ter-bütil)-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren (1) (Gutsche ve Iqbal, 1990a)

Literatüre göre, 100 g *p-ter*-bütilfenol (0.665 mol), 62.3 mL %37'lik formaldehit (0.830 mol) ve 1.2 g NaOH (0.030 mol) 1 L'lik iki boyunlu bir balona alındı. Reaksiyon karışımı, bir mantolu ısıtıcı içerisinde sıcaklığı 110-120 ^{o}C da sabit tutularak ve ksilol başlığı kullanarak bir geri soğutucu sisteminde N_2 gazı altında 2-2.5 saat ısıtılır ve çözünmesi sağlandı. Reaksiyon karışımı devam eden süre boyunca sırasıyla şeffaf ve viskoz bir halden köpürmeye başlayarak önce turuncu renge daha sonra katılaşarak sarı bir kütleye dönüştü. Katılaşma tamamen bittikten sonra soğutulur ve 750 mL difenil eter eklenerek oda sıcaklığında karıştırıldı. Sisteme azot gazı (N_2) girişi sağlanır ve ortamdaki suyun uzaklaşması için bir ksilol cihazı takıldı. Daha sonra balon mantolu ısıtıcı ile ısıtılarak suyun ortamdan uzaklaştırılması ve reaksiyon karışımının berraklaşması sağlandı. Su çıkış işlemi bittiğinde ksilol başlığı çıkarılarak reaksiyon bir geri soğutucu altında 4-5 saat kaynatıldı. Bu süre tamamlandığında karışım oda sıcaklığına soğutulur, 750 ml etil asetat ($C_4H_8O_2$) eklenip bir gece boyunca karıştırıldı ve çökmenin tamamlanması beklendi. Karışım içindeki beyazımsı çökelek süzülüp 2-3 kez 100 mL etil asetatla, 2 kez 100 mL asetik asitle ve son olarak nötür oluncaya kadar saf su ile yıkandı. Kurutulan 48 g (% 47) ham ürün toluen içerisinde kristallendirilerek 45 g, E.n: 344 ^{o}C (Lit., 344-345 ^{o}C) olan saf ürün elde edildi. ^{1}H-NMR (400 MHz $CDCl_3$) δ (ppm): 1.22 (s, 36H, Bu^t), 3.48 (d, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.29 (d, 4H, $ArCH_2Ar$), 7.15 (s, 8H, ArH), 10.39 (s, 4H, OH).

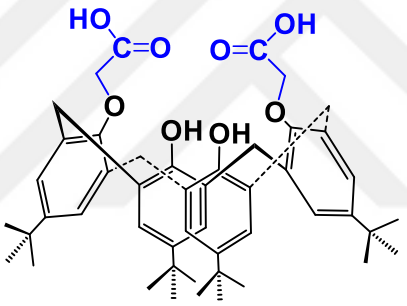
2.2.2.2. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi 26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (2)



2

2.5 g (3.85 mmol) *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (1) ve 0.64 g potasyum karbonat (4.7 mmol) 120 mL aseton içerisinde 1 saat süre boyunca geri soğutucu altında kaynatıldı. Daha sonra reaksiyon ortamına 0.74 mL (8.1 mmol) metilbromasetat ilave edildi ve 24 saat süre ile kaynatılarak karıştırıldı. Karışım soğutuldu ve süzüldü, çözücü destillendi. Geriye kalan beyaz katı etanol içerisinde kristallendirildi. % 65 verimle 1.62 g bileşik **2** elde edildi. E.n: 205-207 ^{o}C. IR: 3430 cm^{-1}(Dings ve ark.), 1765 cm^{-1}(C=O). ^{1}H-NMR (400 MHz $CDCl_3$) δ (ppm): 0.98 (s, 18H, Bu^t), 1.28 (s, 18H, Bu^t), 3.35 (d, 4H, *J*=12.6 *Hz*, $ArCH_2Ar$), 3.85 (s, 6H, OCH_3), 4.45 (d, 4H, *J*=12.6 *Hz*, $ArCH_2Ar$), 4.55 (s, 4H, OCH_2), 6.80 (s, 4H, ArH), 6.98 (s, 2H, OH), 7.05 (s, 4H, ArH).

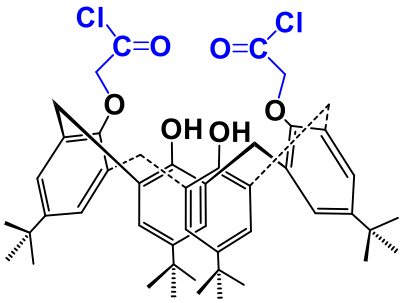
2.2.2.3. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidroksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (3) (Collins ve ark., 1991)



3

Literatüre göre, 2.5 g (3.1 mmol) kaliks[4]aren'in diester türevi (2) 100 mL etanol içerisinde çözüldü. Üzerine sulu KOH çözeltisi ilave edilerek 9 saat süre boyunca kaynatıldı. Sonrasında çözücü karışımı destillendi ve asitli suda çöktürüldü. Daha sonra katı kısım süzüldü ve nötür oluncaya kadar saf su ile yıkandı. % 85 verimle 2.0 g diasit türevli kaliks[4]aren **3** elde edildi. E.n: >220 ^{o}C (bozulma) (Lit. >220 ^{o}C (bozulma). ^{1}H-NMR (400 MHz $CDCl_3$) δ (ppm): 1.18 (s, 18H, Bu^t), 1.29 (s, 18H, Bu^t), 3.41 (d, 4H, *J*=13.8 *Hz*, $ArCH_2Ar$), 4.23 (d, 4H, *J*=13.8 *Hz*, $ArCH_2Ar$), 4.69 (s, 4H, OCH_2), 7.08 (s, 4H, ArH), 7.21 (s, 4H, ArH).

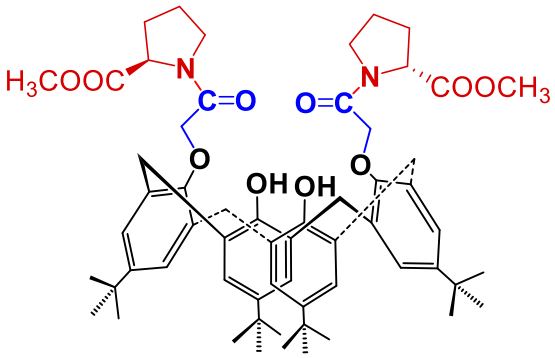
2.2.2.4. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-diklorokarbonilmetoksi 26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (4)



4

0.35 g (0.46 mmol) *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin diasit türevi **3** alınarak 45 mL THF'de çözüldü. Reaksiyon karışımına 2.3 mmol tiyonilklorür ilave edildi ve karışım 5 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Son olarak çözücü vakum altında destile edilerek bir sonraki reaksiyon basamağında kullanıldı.

2.2.2.5. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-diklorokarbonilmetoksi 26,28-dihidroksi kaliks[4]aren ile *L*-prolinmetilesteri bileşiğinin etkileştirilmesi (5)

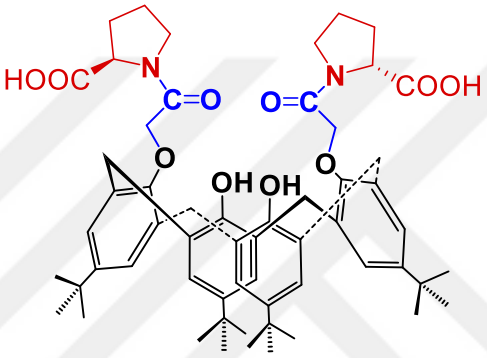


5

Çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra oluşan 0.4 g (0.5 mmol) kaliks[4]arenin asitklorür bileşiği (4) 35 mL CH_2Cl_2 içerisinde çözüldükten sonra bu karışımın üzerine 5 mL diklormetanda çözülmüş 0.3 mL trietilamin ve 0.2 g *L*-prolinmetilesteri (1.25 mmol) içeren karışım reaksiyon ortamına damla damla ilave edildi ve oda sıcaklığında 32 saat boyunca karıştırıldı. Bu süre bittikten sonra reaksiyon karışımı önce 3-4 defa 15 mL seyreltik asitli suyla, daha sonra da çözelti nötür olana kadar saf su ile ekstraksiyon

yapılarak yıkandı. Organik faz $MgSO_4$ ile kurutulup ve süzüldü, son olarak çözücü uçurularak sarı renkli katı elde edildi. % 65 verimle 0.28 g bileşik **5** elde edildi. E.n: 215-217 ^oC. ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 1.05 (s, 18H, Bu^t), 1.16 (s, 18H, Bu^t), 1.85-2.11 (m, 8H, $CH_2CH_{2(prolin)}$), 3.38 (m, 4H, $CH_{2(prolin)}$), 3.65 (s, 6H, OCH_3), 3.68 (yayvan, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.38 (m, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.46 (m, 4H, OCH_2), 4.79 (m, 2H, CH(prolin)), 7.05 (s, 4H, ArH), 7.10 (s, 4H, ArH).

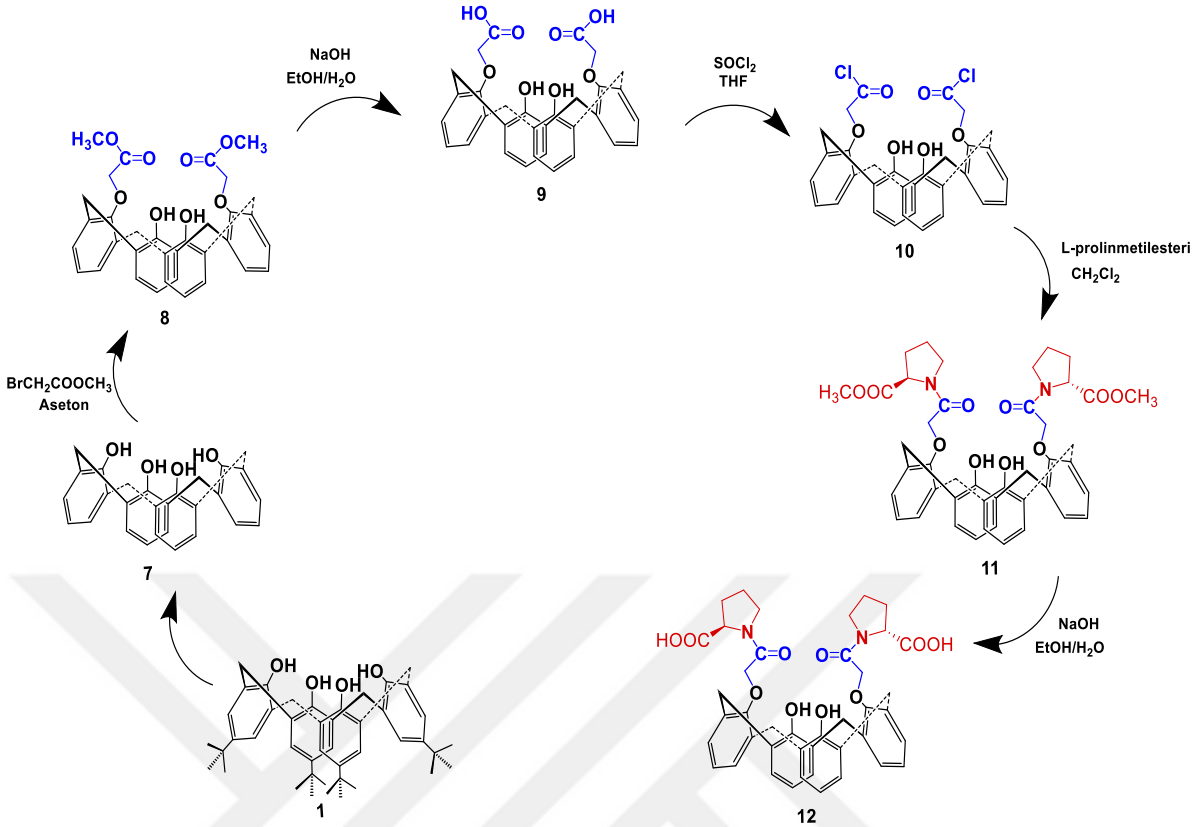
2.2.2.6. 5 nolu bileşiğin hidrolizi (6)



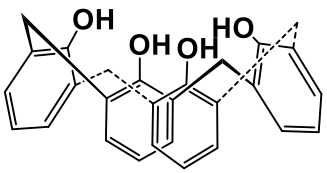
6

0.5 g kaliks[4]arenin diprolinmetilesteri türevi (**5**) 65 mL etanol içerisinde çözüldü. Çözelti üzerine KOH'ın sulu çözeltisi ilave edilerek 5 saat boyunca kaynatıldı. Süre sonunda çözücü destillendi ve kalan katı kısım asitli su ile çöktürüldü. Daha sonra süzülerek nötür oluncaya kadar saf su ile yıkandı. % 80 verimle 0.38 g **6** nolu kaliksaren türevi elde edildi. E.n: >213 ^oC (bozulma). ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 1.07 (s, 18H, Bu^t), 1.13 (s, 18H, Bu^t), 1.80-2.27 (m, 8H, $CH_2CH_{2(prolin)}$), 3.33 (m, 4H, $CH_{2(prolin)}$), 3.62 (m, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.36 (d, 4H, *J*=12.05 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.53-4.72 (m, 4H, OCH_2), 4.86-4.91 (m, 2H, $CH_{(prolin)}$), 7.12 (s, 4H, ArH), 7.18 (s, 4H, ArH). ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$):δ (ppm) 173.6, 167.1, 152.0, 150.6, 147.0, 141.1, 133.5, 128.8, 127.4, 125.6, 74.2, 59.3, 45.9, 34.4, 34.0, 31.9, 31.4, 30.9, 29.1, 24.9, 22.3.

Şema-2:



2.2.2.7. 5,11,17,23-(Tetra-ter-bütil)-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren'nin dealkilasyonu (Gutsche ve Iqbal, 1990b)

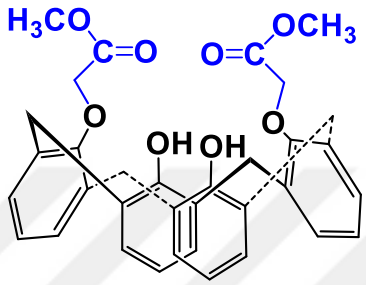


7

16 g (170 mmol) fenol, 26.2 g (35.33 mmol) *p-ter*-bütilkaliks[4]aren 300 mL susuz toluende çözülmüş çözelti üzerine ilave edildi. 38 g (285 mmol) $AlCl_3$ 2-3 parça halinde 15 dakika ara ile ilave edildi. Sonrasında karışım 6 saat boyunca Azot (N_2) gazı atmosferi altında oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon buz banyosuna alınıp içerisine 0,2 N HCl ilave edildi. Organik faz ayrılıp ve saf su ile yıkanarak nötralleştirildi. Çözelti $MgSO_4$ kullanılarak kurutuldu. Oluşan sarı renkli çözelti distillendi ve üzerine 220 mL CH_3OH ilave edildi ve katı madde çöktürüldü. Çöken bej renkli madde süzülüp

kurutuldu. $CHCl_3/CH_3OH$ çözücü karışımında kristallendirildi ve %78 verimle beyaz renkli ürün elde edldi. E.N: 313-315 ^oC (lit: 314 ^oC, Collins vd.1991) . ^1H NMR ($CDCl_3$) : δ 4,27 (d, 4H, *J* = 13 Hz, $ArCH_2Ar$) , 4,21 (d, 4H, *J* = 13 Hz, $ArCH_2Ar$) , 6,64 (t, 4H, *J*=7,44 Hz, ArH), 7,47 (d, 8H *J*=7,56 Hz, ArH), 10,21 (s, 4H, OH).

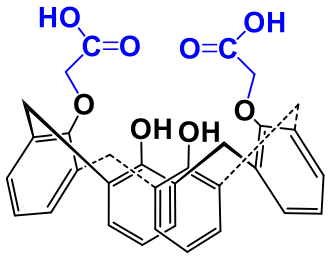
2.2.2.8. 25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren (Arnaud-Neu ve ark., 1989)



8

3.08 g (7.5 mmol) **7** nolu kaliks[4]aren 125 mL kuru aseton içerisinde çözüldü. Üzerine 1.11 g (8.0 mmol) potasyum karbonat (K_2CO_3) ilave edilerek 45 dakika oda sıcaklığında karıştırılırdı. Daha sonra bu karışıma 2.43 g (15.75 mmol) $BrCH_2COOCH_3$ eklendi ve reaksiyon bir gece boyunca Daha sonra çözücü uzaklaştırıldı ve oluşan katı madde metanol ile yıkandı**.** Verim %75. E.n.:214-215 ^oC. IR (cm^{-1}): 1760 (C=O). ^1H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 3.43 (d, *J*=13.0 Hz, $ArCH_2Ar$), 3.81 (s, 6H, $CH_2CO_2CH_3$), 4.49 (d, *J*=13.0 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.76 (s, 4H, $CH_2CO_2CH_3$), 6.71 (t, 2H, *J*=7.6 Hz, ArH), 6.73 (t, 2H, *J*=7.6 Hz, ArH), 6.92 (d, 4H, *J*=7.6 Hz, ArH), 7.11 (d, 4H, *J*=7.6 Hz, ArH), 7.55 (s, 2H, ArOH).

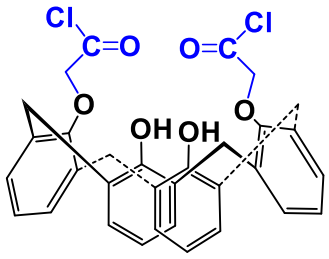
2.2.2.9. 25,27-dihidroksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren (Arnaud-Neu ve ark., 1989)



9

2.5 g (3.1 mmol) **8** nolu kaliks[4]aren türevi 150 mL etanol içerisinde çözüldü. Üzerine sulu KOH çözeltisi ilave edilerek 12 saat kaynatıldı. Bu süre sonunda çözücünün bir kısmı destillendi ve kalan kısım asitli suda çöktürüldü. Sonrasında karışım süzüldü ve saf su ile nötür oluncaya kadar yıkandı. % 85 verimle diasit türevli kaliksaren **9** elde edildi. E.n: >220 ^{o}C (bozulma) (Lit. >220 ^{o}C (bozulma). Karekterize edilmeden bir sonraki basamağa geçildi.

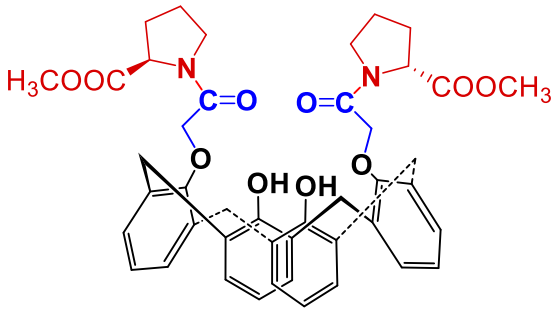
2.2.2.10. 25,27-diklorokarbonilmetoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren (Arnaud-Neu ve ark., 1989)



10

0.35 g (0.46 mmol) **9** nolu kaliks[4]arenin diasit türevi alınarak 30 mL THF de çözüldü. Üzerine 5 mmol tiyonilklorür ilave edildi ve 5 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Daha sonra çözücü vakum altında uçuruldu ve kalan katı kısım bir sonraki basamakta kullanıldı.

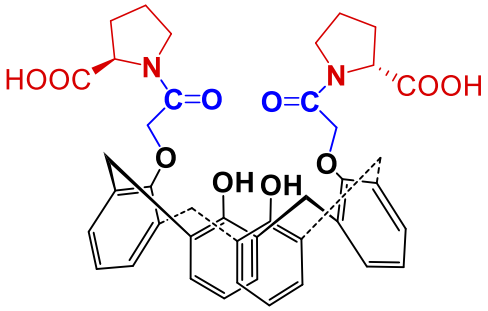
2.2.2.11. 11 nolu Bileşiğin Sentezi



11

Çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra oluşan 0.4 g (0.5 mmol) kaliks[4]arenin asitklorür bileşiği (**10**) 35 mL CH_2Cl_2 içerisinde çözüldükten sonra bu karışımın üzerine 5 mL diklormetanda çözülmüş 0.3 mL trietilamin ve 0.2 g *L*-prolinmetilesteri (1.25 mmol) içeren karışım reaksiyon ortamına damla damla ilave edildi ve oda sıcaklığında 32 saat boyunca karıştırıldı. Bu süre bittikten sonra reaksiyon karışımı önce 3-4 defa 15 mL seyreltik asitli suyla, daha sonra da çözelti nötür olana kadar saf su ile ekstraksiyon yapılarak yıkandı. Organik faz $MgSO_4$ ile kurutulup ve süzüldü, son olarak çözücü uçurularak sarı renkli katı elde edildi. % 65 verimle 0.28 g bileşik **11** elde edildi. E.n: 215-217 ^oC. ^1H-NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 1.71-1.96 (m, 8H, CH_2CH_2(prolin)), 3.13 (b, 4H, CH_2(prolin)), 3.41-3.67 (m, 10H, (OCH_3 ve $ArCH_2Ar$)), 4.19-4.31 (m, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.76-4.82 (m, 4H, OCH_2), 5.06-5.17 (m, 2H, CH(prolin)), 6.41-7.08 (m, 12H, ArH).

2.2.2.12. 11 nolu bileşiğin hidrolizi (12)



12

0.5 g kaliksarenin diprolinmetilesteri türevi (**11**) 65 mL etanol içerisinde çözüldü. Çözelti üzerine KOH'ın sulu çözeltisi ilave edilerek 5 saat boyunca kaynatıldı.

Süre sonunda çözücü distillendi ve kalan katı kısım asitli su ile çöktürüldü. Daha sonra süzülerek nötür oluncaya kadar saf su ile yıkandı. % 80 verimle 0.38 g **12** nolu kaliksaren türevi elde edildi. E.n: >213 ^{o}C (bozulma). ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 1.71-1.93 (m, 8H, CH_2CH_2(prolin)), 3.17-3.24 (m, 4H, CH_2(prolin)), 3.48-3.52 (m, 4H, $ArCH_2Ar$), 3.96-4.11 (m, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.25-4.43 (m, 4H, OCH_2), 4.78-4.91 (m, 4H, 2H, CH(prolin)), 6.53-7.22 (m, 12H, ArH). ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO):δ (ppm) 173.6, 168.2, 155.8, 153.24, 134.9, 134.1, 129.3, 127.9, 124.38, 123.4, 73.3, 59.1, 45.9, 31.5, 31.2, 29.0, 25.0.

2.2.3. Biyokimyasal Uygulamalar

2.2.3.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları amacıyla, insan kanser hücre hatları; prostat kanseri (PC-3), kolon kanseri (DLD-1), karaciğer kanseri (HEPG2) ve akciğer kanseri hücre hattı (A549) ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) firmasından temin edildi. Sağlıklı epiteltum hücresi PNT1A Sigma firmasından satın alındı. Kullanılacak olan insan kanseri hücre hatları ve sağlıklı epitelyum hücresi prolin grubu taşıyan kaliks[4]aren bileşiklerinde ki sitotoksik etkileri incelendi.

2.2.3.2. Hücrelerin Büyüme Besiyerlerinin Hazırlanması

Sağlıklı epitelyum hücresi (PNT1A) ve insan kanseri hücre hatları (PC-3, DLD-1, HEPG2 ve A549) %10 FBS (fötal sığır serumu), %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren çeşitli besiyer ortamlarında 37 °C ve %5 CO_2'li inkübatörde gelişimi sağlandı. Hücrelerin büyüme ortamları elde edilen prolin grubu taşıyan kaliks[4]aren bileşiklerinin seyreltilmesinde kullanıldı. T-75 büyüme kaplarında çoğaltılan hücreler 10 M fosfat tamponu ile yıkandı ve hücre hatları tripsin-EDTA solüsyonu ile büyütülen kaplardan kaldırılarak 6, 12, 24, 96 kuyucuklu büyüme kaplarına aktarıldı.

2.2.3.3. Hücre Açma

Hücreleri açma işlemini gerçekleştirmeden önce su banyosu 37 °C ye ayarlandı ve büyüme ortamları için kullanılacak malzemeler su banyosunda 10 dakika bekletildi ve büyüme ortamları alkollenerek hücre kültürü kabinine alındı. Sıvı azot tankından çıkarılan hücreler sıvı olana kadar 37 °C lik su banyosunda bekletildi ve hücreler alkolden geçirilerek kabine alındı. T-75 büyüme kabı içerisine önce besiyerden konuldu ve daha sonra hücre ilave edildi. 37 °C ve % 5 CO_2'li inkübatöre konuldu ve hücrelerin 24 saat boyunca büyümesi beklendi. Bu süre sonunda büyüme ortamları aspire edildi ve yeni büyüme ortamı büyüme kabına ilave edildi. Bu yöntemin tamamı PC-3, DLD-1, A549, HEPG2 ve PNT1A hücreleri için uygulandı.

2.2.3.4. Hücre Kapatma

Gelişen hücreler %80-85 oranına geldiğinde T-75 büyüme kaplarında olan hücrelerin besiyeri aspire edildi ve 10 mM fosfat tamponu ile üç kere yıkandı. T-75 büyüme kaplarına tripsin-EDTA ilave edildi ve hücrelerin tabandan kalkması 37 °C ve %5 lik CO_2 li inkübatörde beklendi. Tabandan kalkan hücrelerin üzerine büyüme besiyerinden ilave edildi ve pipetleme yapılarak tek kullanımlık 15 lik falkona kondu ve 400 xg de 5 dk santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra falkon alkolden geçirilerek kabine alındı ve dibe çöken hücrelerin üzerinde bulunan büyüme besiyerleri aspire edildi. Dipte kalan hücrelerin üzerine 1 mL yeni besiyer ilave edildi ve pipetleme yapılarak cryo tüpe alındı ardından 100 µL DMSO eklendi ve hücreler -80°C buzdolabında saklandı. 3 gün beklendikten sonra hücreler sıvı azot tankına aktarıldı.

Tablo 2.1 Hücre Hatları ve Besiyerler

Hücre Hattı	Besiyeri	FBS	L-Glutamin	Pen-strep
PC-3	Ham's F-12	%10	%1	%1
DLD1	RPMI 1640	%10	%1	%1
HEPG2	EMEM	%10	%1	%1
A549	DMEM	%10	%1	%1
PNT1A	RPMI-1640	%10	%1	%1

2.2.3.5. Hücre Canlılığı Deneyleri

İnsan kanseri hücre hatları büyüme besiyerleri ortamlarında geliştirildikten sonra hücrelerin proliferasyonunu gözlemlemek amacıyla tripsin-EDTA yardımıyla büyüme kaplarının tabanından kaldırıldı. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı ve kuyucuk başına 1x 10^4 hücre olacak bir şekilde aktarımı sağlandı. 24 saat bir inkübasyon süresini bekledikten sonra hücre hatları prolin grubu taşıyan kaliks[4]aren bileşikleri 0-200 µM aralığında maddelerin canlılığını belirlemek amacıyla kolorimetrik bir metot olan "Alamar Blue" (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) kullanıldı ve IC_{50} değerleri elde edildi. Canlı ve ölü hücrelerin oranlarını % 0.04 "Tripan Mavisi" ile Biorad TC20 Otomatik hücre sayma cihazından tespit edildi.

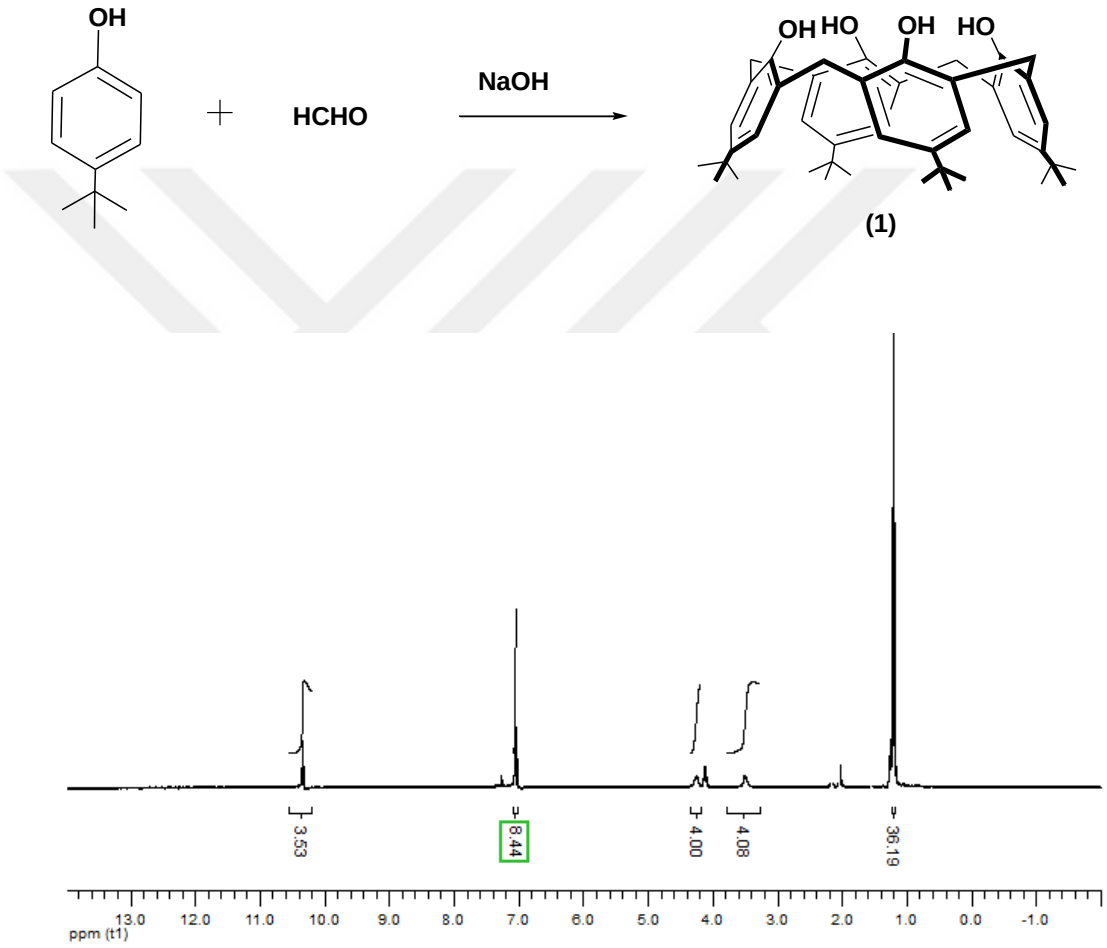
2.2.3.6. Apoptoz Deneyleri

Hücre hatları %80-85 büyüme oranına geldiğinde 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 5x10^5 hücre olacak şekilde ekildi ve 37°C ve % 5 CO_2 'de 24 saat inkübesi gerçekleştirildi. 24 saat sonunda 6 kuyucuklu plakalarda olan hücreler IC_{50} değerlerinde **6** ve **12** no'lu bileşik ile muamele edildi ve 48 saat inkübe edildi. 48 saat sonra 6 kuyucuklu plakalarda bulunan hücreler PBS ile yıkandı. Hücreler tabandan tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve üzerine hücre besiyeri ilave edilerek 5 mL lik ependorfa alınarak 5 dk 1500 xg de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstte kalan besiyer uzaklaştırıldı ve PBS eklenerek 5 dk 1500 xg de santrifüj edildi. Tekrar üstte kalan süpernatant atıldı ve 100 µL Binding buffer ilave edildi. Bufferın üzerine 2.5 µL Annexin V ve 2.5 µL 7-

AAD ilave edildi, 30 dk karanlık bir ortamda inkübesi sağlandı. 30 dakikanın sonunda 400 µL Binding buffer ilave edildi ve Flow sitometre (BD FACS Aria III, software: FACS Diva software) cihazında analiz edildi.

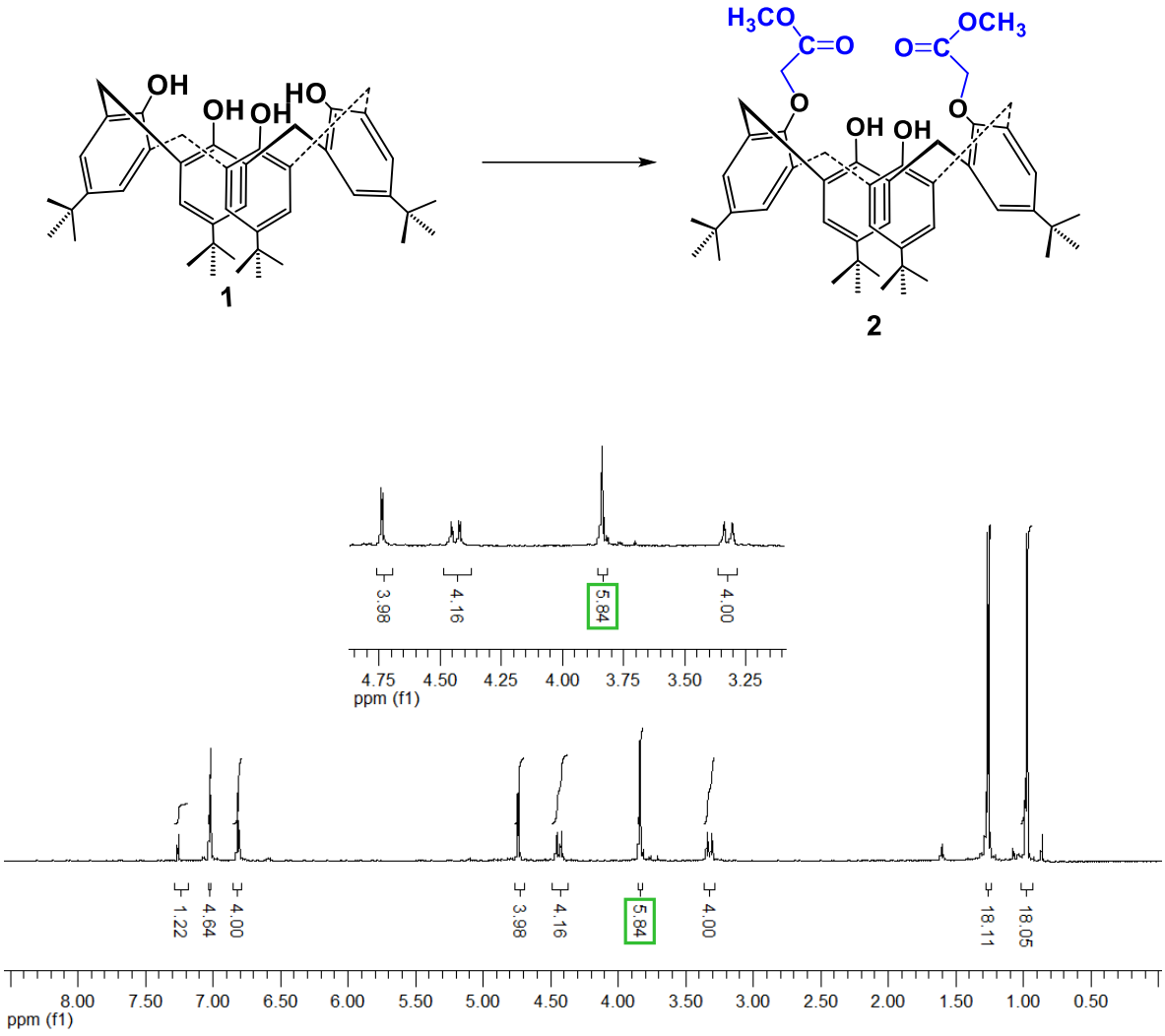
2.3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu doktora tezi kapsamında 1. bölümde sentezlenen kaliks[4]aren bileşiklerinde prolin grupları kaliksarenlere amid (peptit), amin, hidrazit ve imin gibi bağlanarak doğrudan antikanser çalışmalarında kullanıldı. Bu amaç doğrultusunda önce başlangıç maddesi olan *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (**1**) literatüre göre sentezlendi (Gutsche ve Lin, 1986). Bu bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumu (Şekil 2.14.) verilmiştir.



Şekil 2. 14 p-ter-bütilkaliks[4]arenin (**1**) ^{1}H-NMR spektrumu

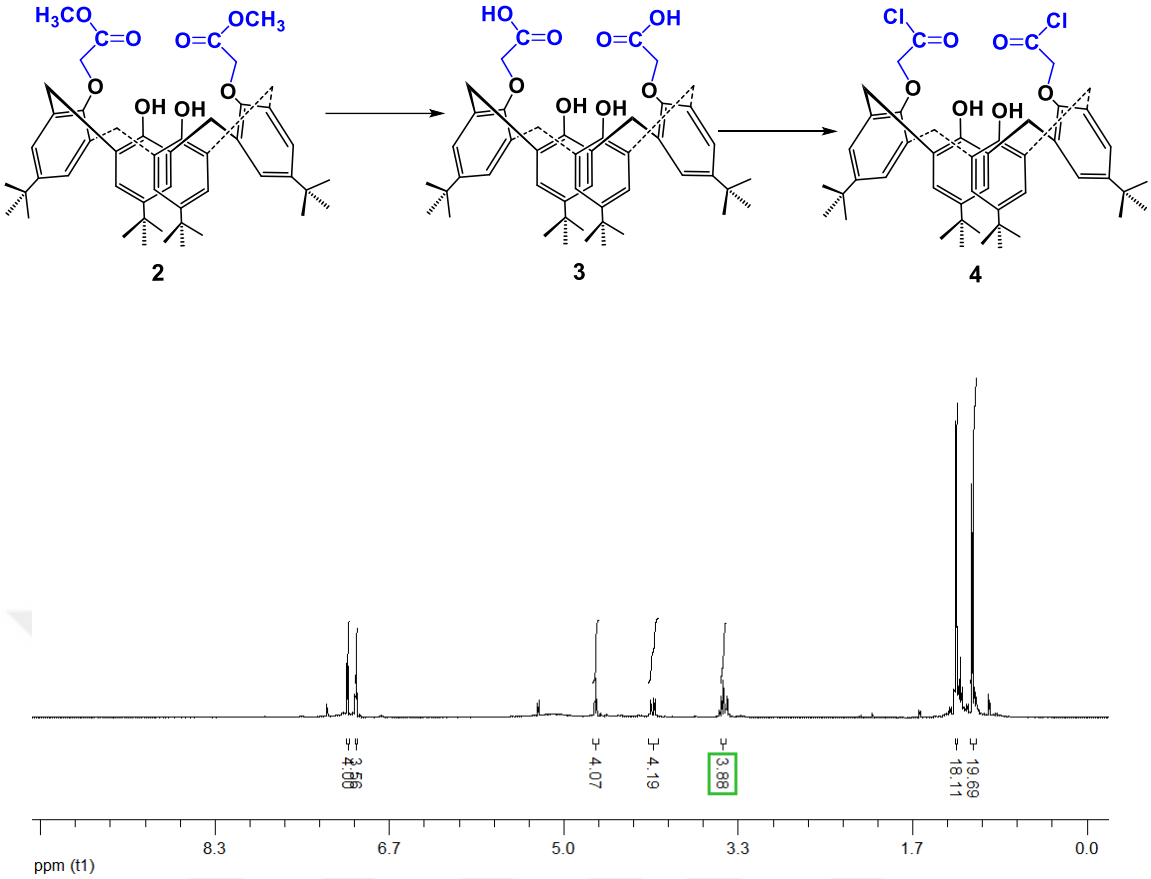
Doktora tezinde Şema 1 de önerilen *p-ter*-bütilkaliks[4]aren diester türevini sentezlemek için; *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (**1**) bileşiği literatüre uygun olarak (Collins ve ark., 1991) metilbromasetat ile K_2CO_3 varlığında aseton içerisinde tepkimeye sokularak **2** nolu bileşik olan *p-ter*-bütilkaliks[4]aren diester türevi sentezlendi.



Şekil 2. 15 2 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Bu bileşiğe (**2**) ait ^{1}H-NMR spektrumuna (Şekil 2.15) baktığımızda 3.35 ve 4.45 ppm de aromatik köprü (Ar$\underline{CH_2}$Ar) protonları AX tipi spin sisteminde bir çift dublet olarak görünürler. Bu bileşiğin koni konformasyonunda olduğunu göstermektedir. 4.73 ppm de gözlenen 4 eşdeğer protonlu OCH_2- pikleri ve 3.83 ppm deki 6 eşdeğer protonlar ester grubunu işaret etmektedir. Ayrıca 1.15 ve 1.42 ppm deki farklı *ter*-bütil gruplarına ait protonlar kaliksaren bileşiğinin fenolik OH grubunun ikisine ester grubunun bağlandığını doğrulamaktadır.

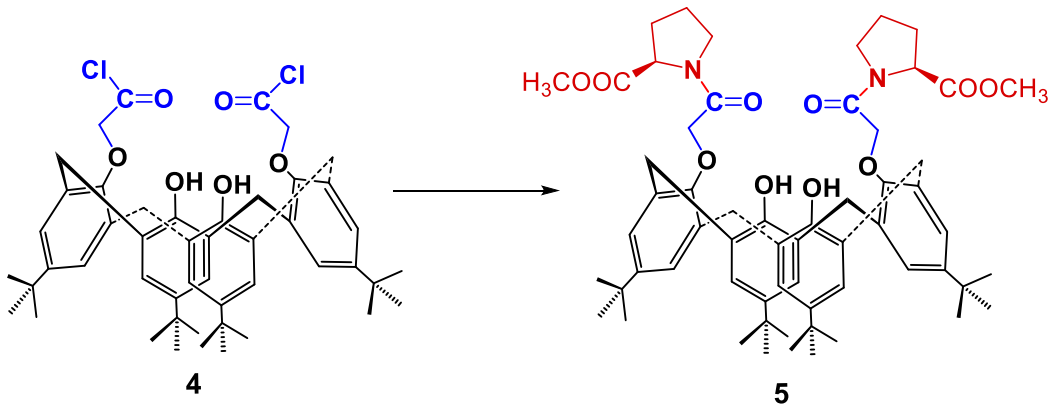
Sentezlenen **2** nolu ester bileşiği literatüre uygun olarak (Collins ve ark., 1991) etanol içerisinde KOH ın sulu çözeltisi varlığında hidroliz edildi ve **3** nolu diasit türevine dönüştürüldü, devamında THF içerisinde tiyonilklorür ile etkileştirilerek diasit klorür türevlerine (**4**) dönüştürüldü.

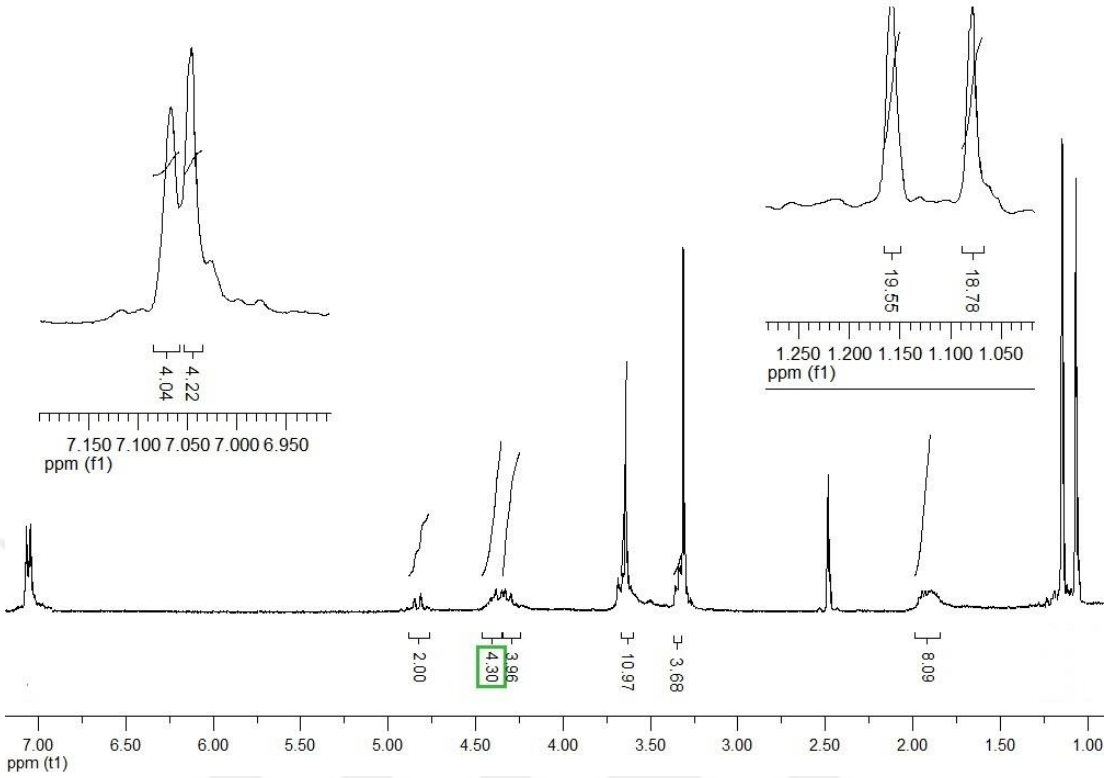


Şekil 2. 16 3 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Bu bileşiğe (**3**) ait ^{1}H-NMR spektrumuna (Şekil 2.16) baktığımızda reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği 3.83 ppm deki karakteristik ester grubundaki -CH_3 sinyalinin kaybolması ile anlaşılmaktadır.

Bir sonraki basamakta, sentezlenen **4** nolu diasit klorür türevi *L*-prolin metil ester bileşiği ile THF çözücü ortamında oda sıcaklığında etkileştirilerek kaliksaren **5** nolu türevine dönüştürüldü.

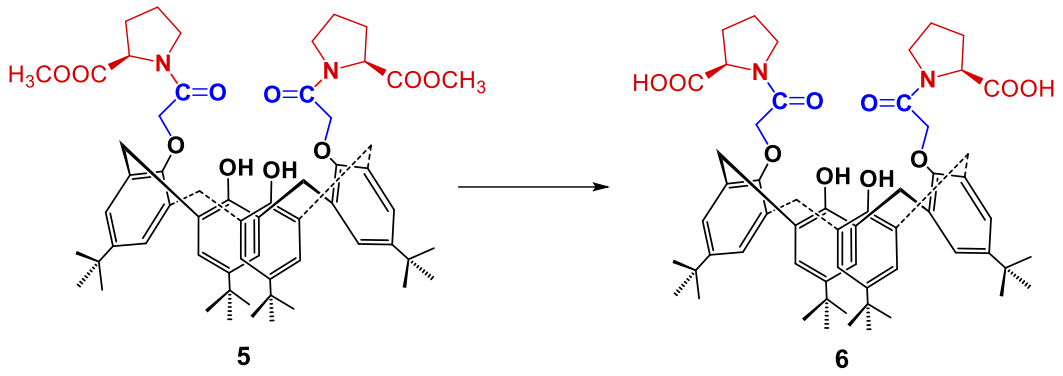




Şekil 2. 17 5 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

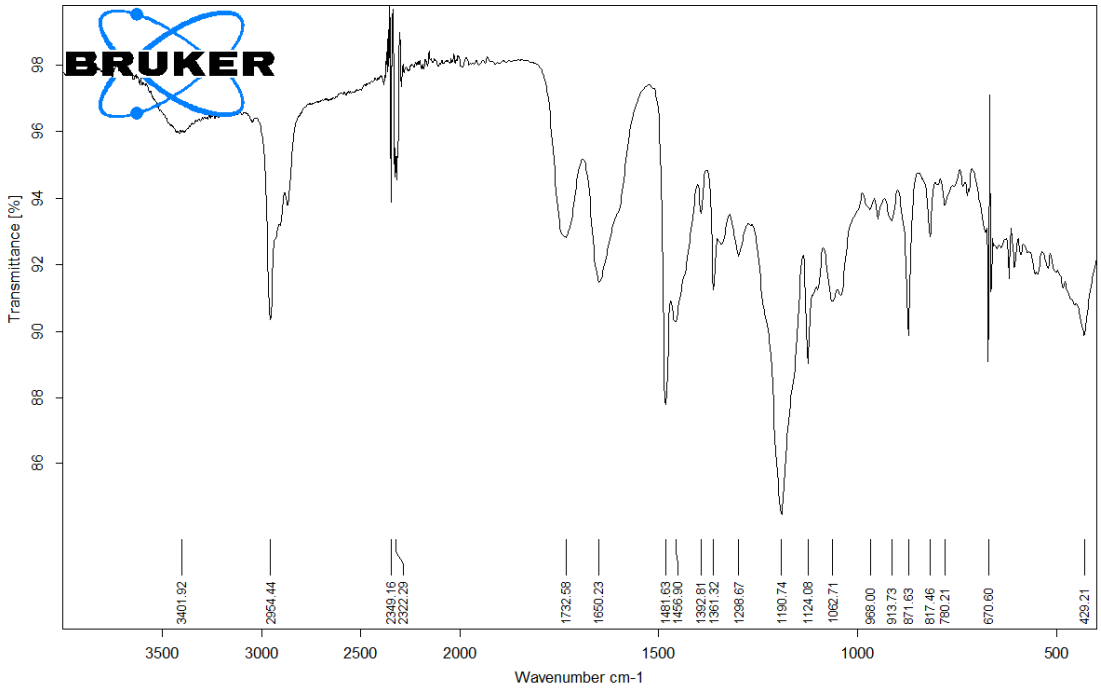
Bu bileşiğe (**5**) ait ^{1}H-NMR spektrumuna (Şekil 2.17) baktığımızda 1.05 ve 1.16 ppm de kaliksarenin *ter*-bütil gruplarına ait proton sinyallerinin gözlenmesi ayrıca 1.85-2.11 ppm, 3.38 ppm, 4.76-4.83 ppm de prolin protonlarına ait sinyaller ve 3.65 de metoksi grubuna ait sinyallerin gözlenmesi prolin gruplarını başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir.

Sentezlenen **5** nolu bileşik etanol içerisinde sulu KOH varlığında hidroliz edildi ve **6** nolu di karboksilik türevine dönüştüğünü bu bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumunda 3.65 ppm deki metoksi grubuna ait protonların kaybolmasından reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldı (Şekil 2.19).

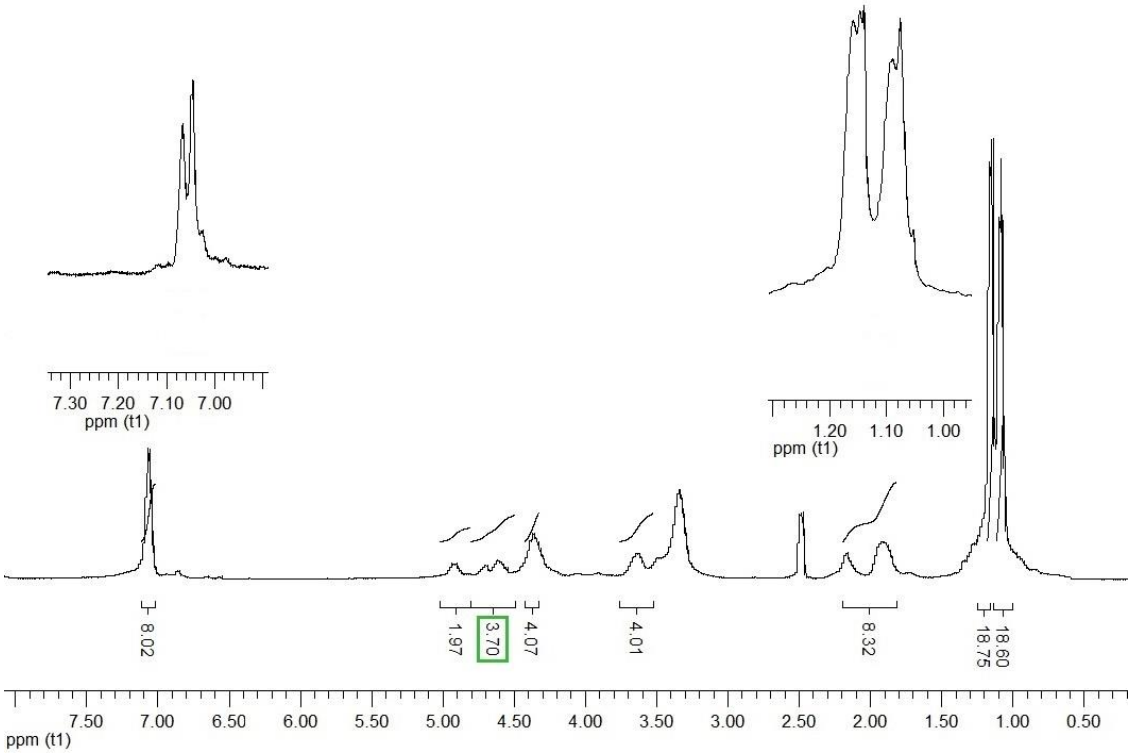


5 **6**

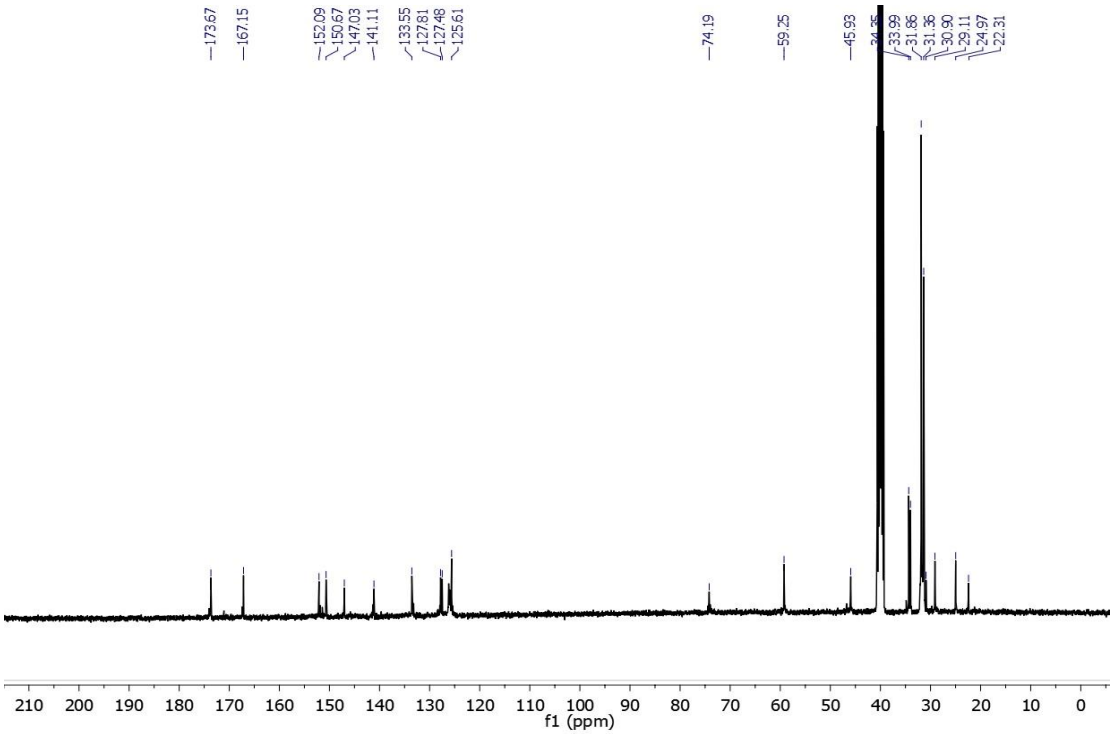
6 nolu bileşiğin FTIR spektrumuna baktığımızda 1732 cm^{-1} de karboksil grubuna ait karbonil bandı ile yeni oluşan 1650 cm^{-1} deki karakteristik amid bandının gözlenmesi yapıyı doğrulamaktadır (Şekil 2.18).



Şekil 2. 18 6 nolu bileşiğin FTIR spektrumu



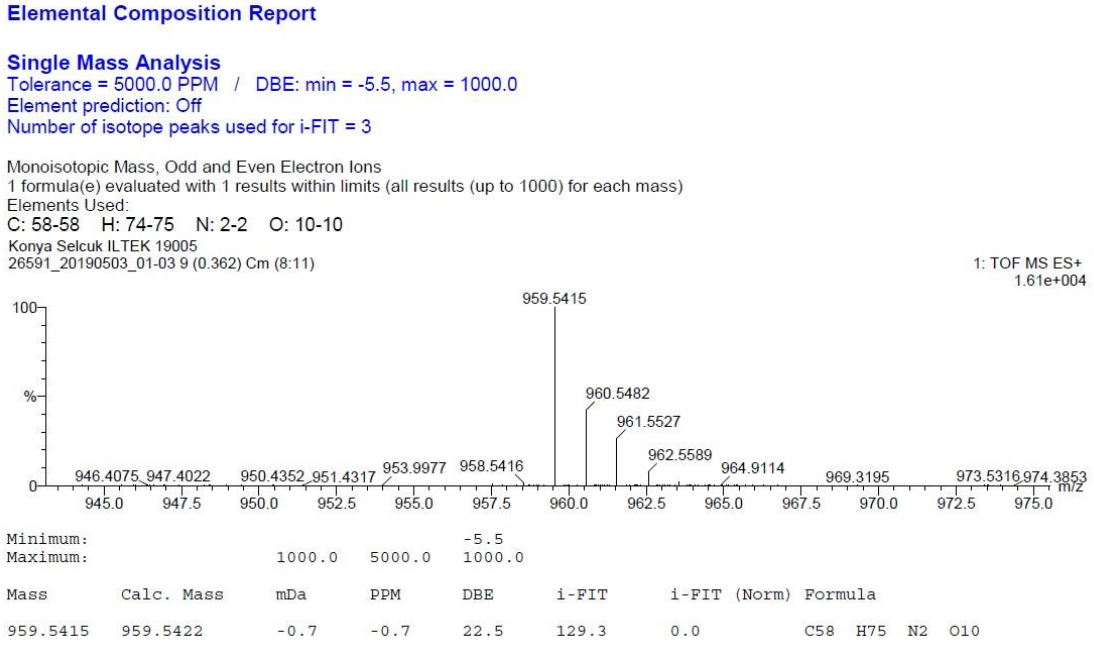
Şekil 2. 19 6 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu



Şekil 2. 10 6 nolu bileşiğin ^{13}C-NMR spektrumu

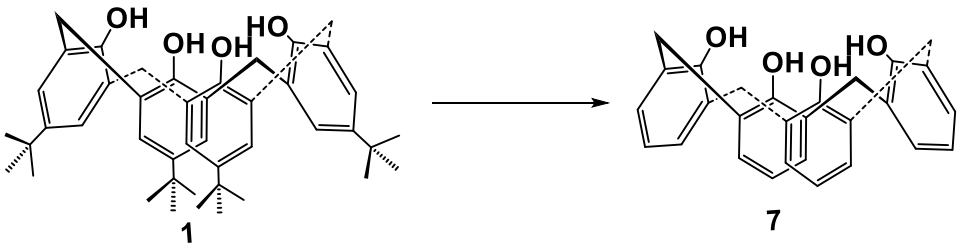
Ayrıca bu bileşiğin ^{13}C-NMR spekturumuna baktığımızda 173.6 ppm de karbonil (**C**=O) ve 167.1 de amid (N-**C**=O) karbonuna ait pikler yapıyı desteklemektedir (Şekil 2.20).

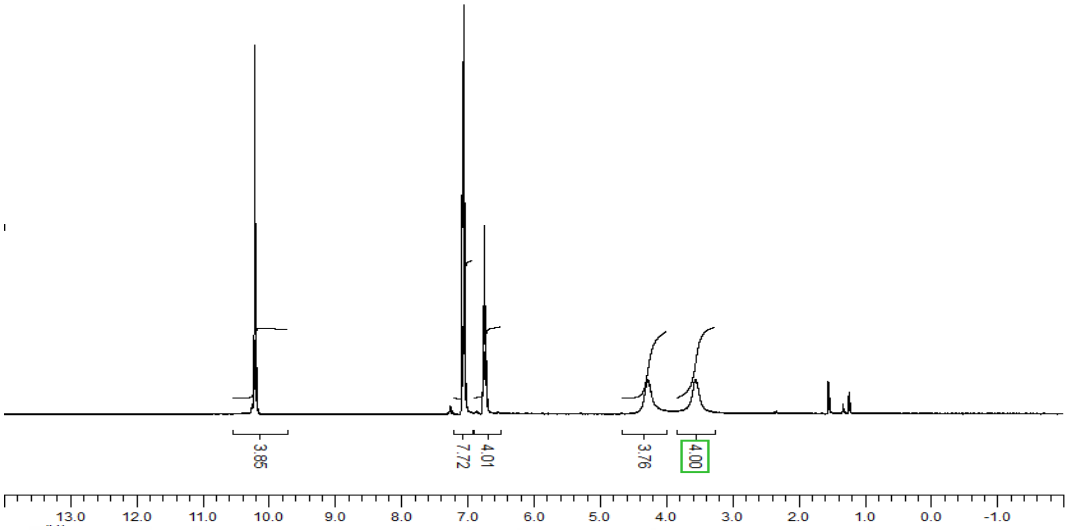
Bu bileşiğin HR-MS spektrumunda 959.5415 de görülen pik yapıyı desteklemektedir (Şekil 2.21).



Şekil 2. 11 6 nolu bileşiğin HR-MS spektrumu

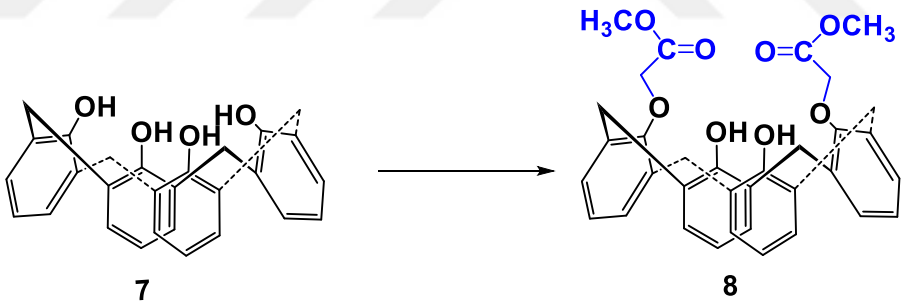
Sentezlenen *p-ter*-bütilkaliks[4]aren bileşiğindeki (**1**) *ter*-bütil grupları literatüre göre (Gutsche ve Iqbal, 1990b) uygun koşullarda susuz $AlCl_3$ ile toluen içerisinde etkileştirilerek uzaklaştırıldı. **7** nolu kaliks[4]aren bileşiğinin sentezlendiği, bu bileşiğin *ter*-butil gruplarının ^{1}H-NMR spektrumunda 1.65 ppm deki piklerin uzaklaştırılmasından anlaşıldı (Şekil 2.22).



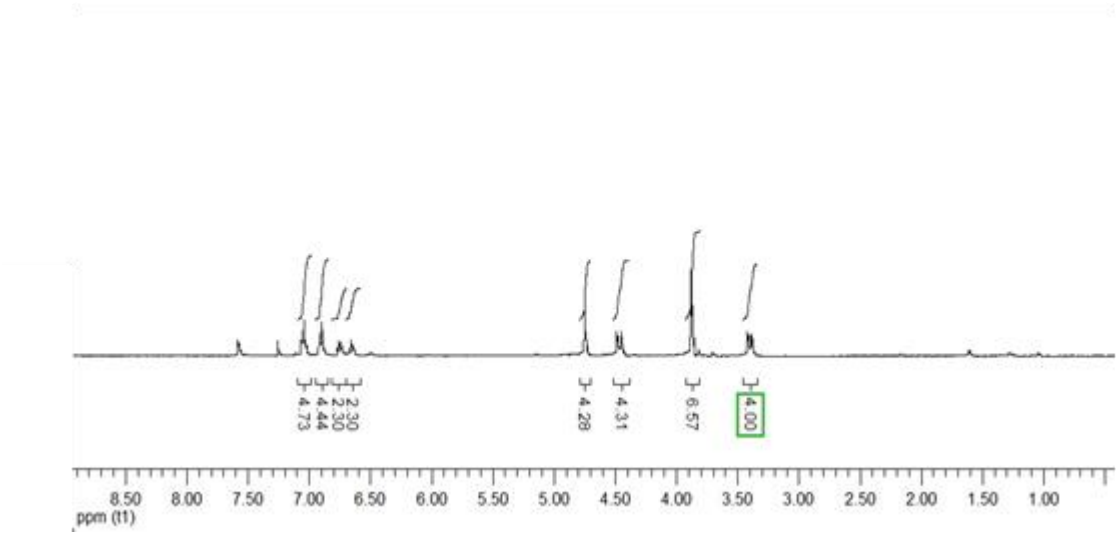


Şekil 2. 12 Kaliks[4]arenin (**7**) ^{1}H-NMR spektrumu

8 numaralı bileşiği sentezlemek için kaliks[4]aren (**7**) bileşiği metilbromasetat ile K_2CO_3 varlığında aseton içerisinde etkileştirildi.

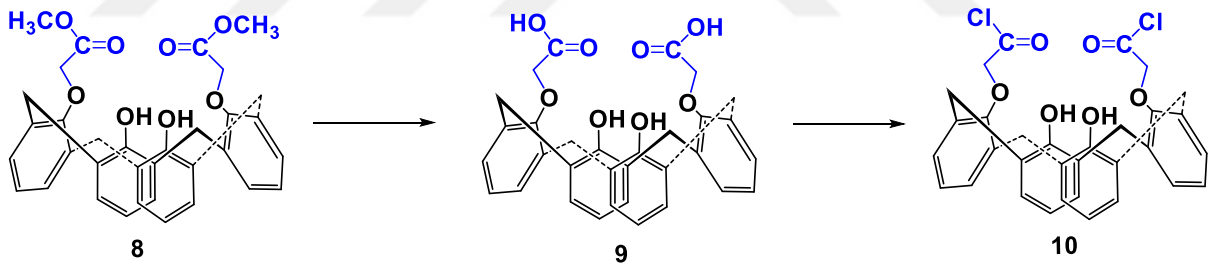


8 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda (Şekil 2.23) δ 3.4 ve 4.45 ppm'de görülen $ArCH_2Ar$ protonlarına ait AB spin sistemindeki bir çift dublet bu bileşiğin koni konformasyonunda olduğunu göstermektedir. OCH_3 gruplarının varlığını δ 3.85 ppm'deki singlet pik ve δ 6.65-7.1 ppm arasındaki pikler ise aromatik halkanın varlığını gösterir.

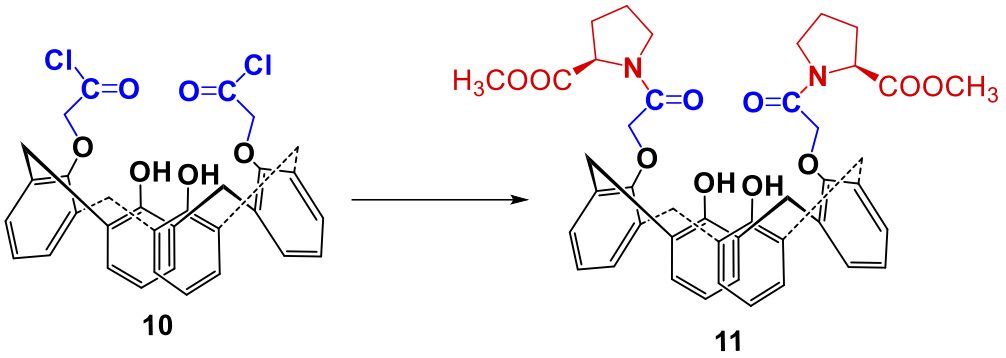


Şekil 2. 13 8 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

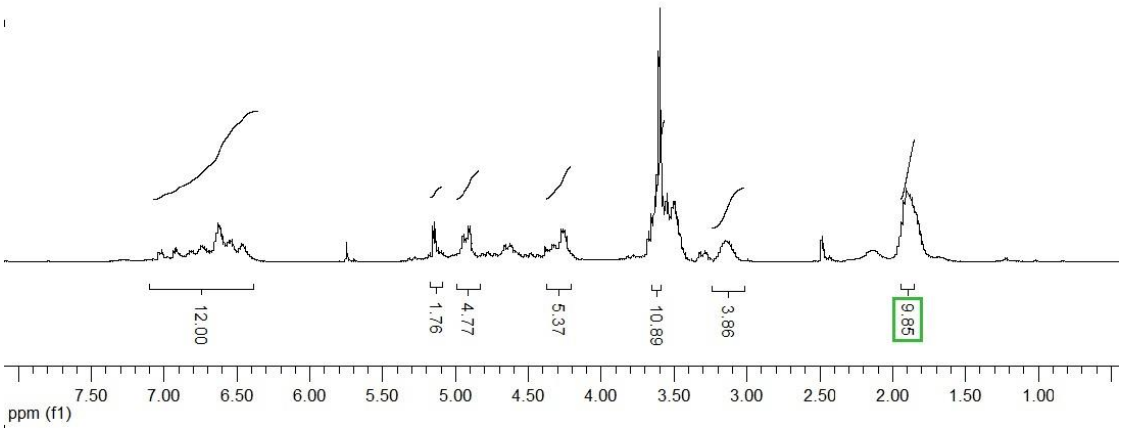
Sentezlenen **8** nolu ester bileşiği literatüre uygun olarak (Collins ve ark., 1991) etanol içerisinde KOH ın sulu çözeltisi varlığında hidroliz edildi ve **9** nolu diasit türevine dönüştürüldü, devamında THF içerisinde tiyonilklorür ile etkileştirilerek diasit klorür türevlerine (**10**) dönüştürüldü.



Bir sonraki basamakta, sentezlenen **10** nolu diasit klorür türevi *L*-prolin metil ester bileşiği ile THF çözücü ortamında oda sıcaklığında etkileştirilerek kaliksaren **11** nolu türevine dönüştürüldü.

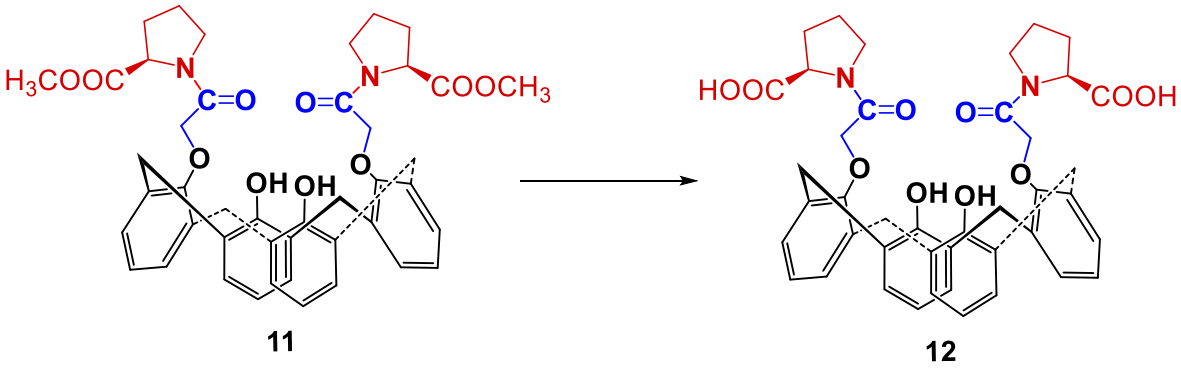


Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumuna baktığımızda 1.71-1.96 ppm ve 3.13-3.24 ppm de CH_2, ve 5.06-5.17 ppm de -CH protonlarına ait sinyaller prolin grubunu, ayrıca 4.76-4.82 ppm deki sinyalin CH_2O grubuna ait olması kaliksarene bağlandığını göstermektedir.



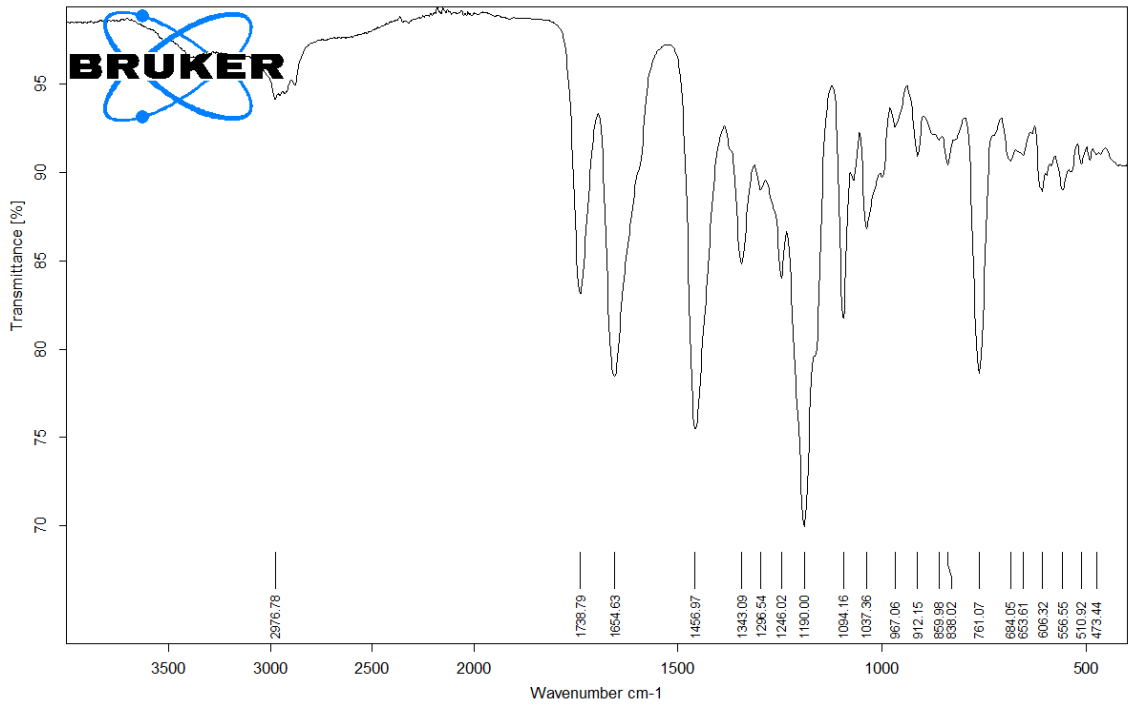
Şekil 2. 24 11 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Sentezlenen **11** nolu bileşik etanol içerisinde sulu KOH varlığında hidroliz edilerek **12** nolu diasit türevine dönüştürüldü

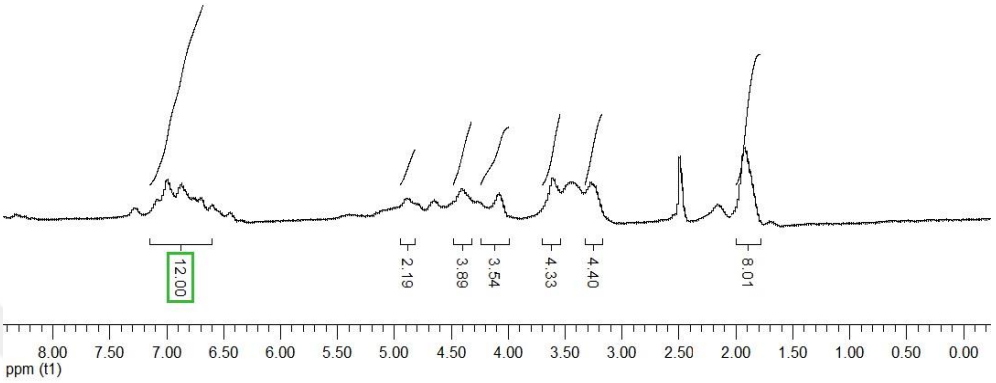


11 12

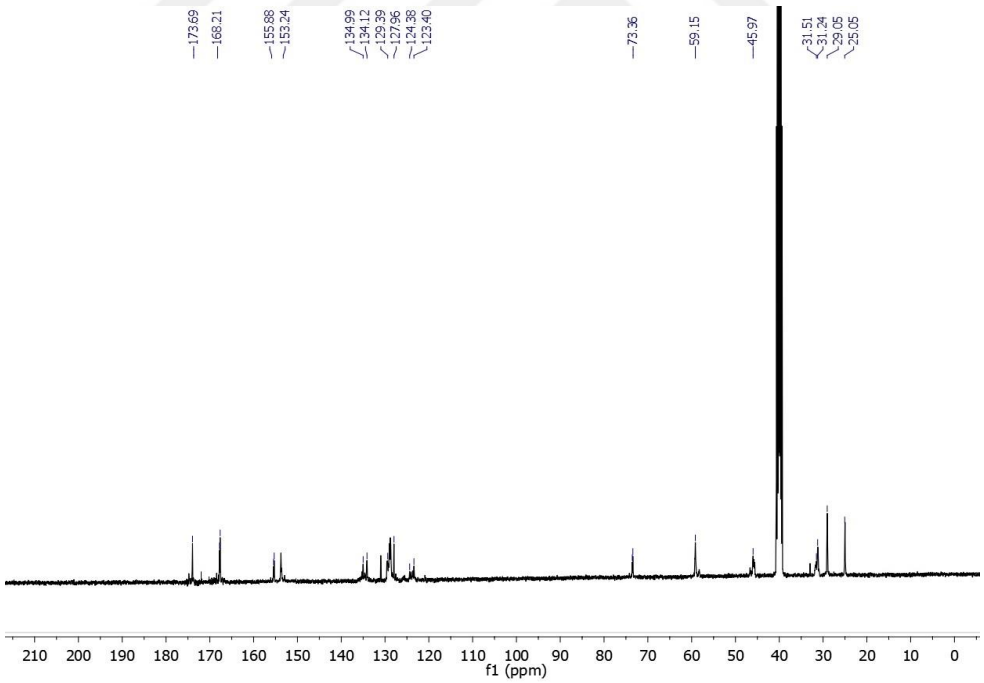
12 nolu bileşiğin FTIR spektrumuna baktığımızda 1738 cm^{-1} de karboksil grubuna ait karbonil bandı ile yeni oluşan 1650 cm^{-1} deki karakteristik amid bandının gözlenmesi yapıyı doğrulamaktadır.



Şekil 2. 25 12 nolu bileşiğin FTIR spektrumu



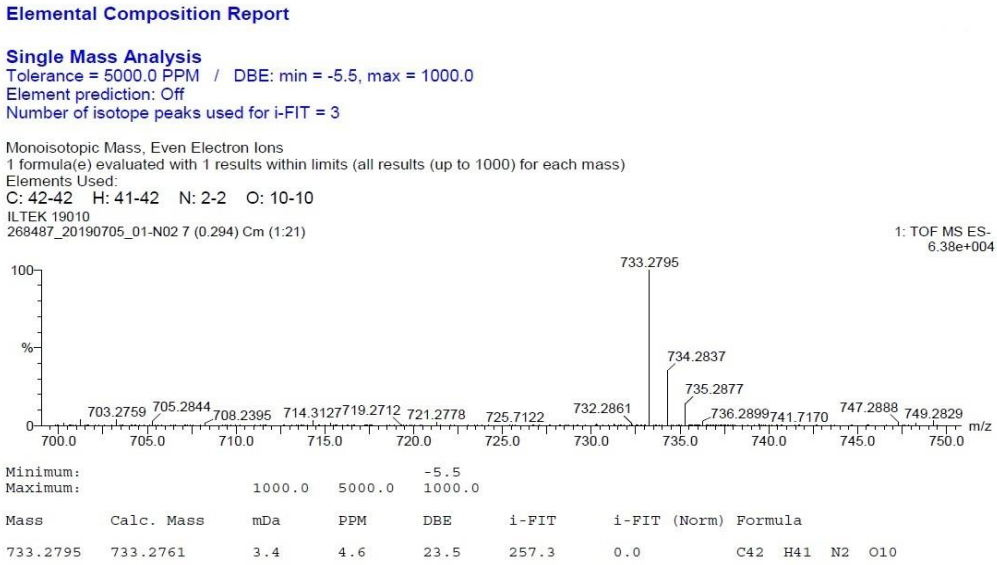
Şekil 2. 26 12 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu



Şekil 2.27 12 nolu bileşiğin ^{13}C-NMR spektrumu

Bu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumuna baktığımızda 3.41-3.67 ppm de ester grubundaki CH_3 protonlarına ait sinyallerin kaybolması hidrolizi doğrulamaktadır. Ayrıca ^{13}C-NMR spektrumunda 173.6 ppm de karbonil grubu (C=O) ve 168.2 de amid (N-C=O) karbonuna ait bandlar ve bu bileşiğin oluştuğunu göstermektedir.

HRMS spektrumundaki 733.2795 da gözlenen sinyal yapıyı desteklemektedir.



Şekil 2.28 18 nolu bileşiğin HRMS spektrumu

Şema 1 ve Şema 2 de anti-tümör bileşikler olarak önerilen kaliks[4]aren diprolin türevlerinin yapıları çeşitli spektrskopik yöntemler ile karekterize edildikten sonra anti-kanser çalışmalarında kullanıldılar.

1.4.1. 6 ve 12 no'lu Bileşiklerin Sitotoksisite Çalışmaları

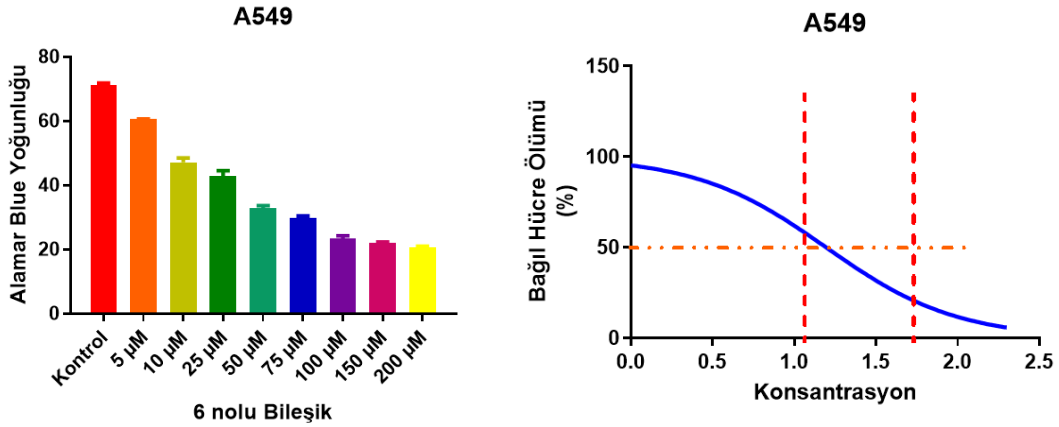
Sentezlenen bileşikler insan kanser hücre hatları ve sağlıklı epitelyum hücresindeki sitotoksisite çalışmaları yapıldı. İlk olarak elde edilen prolin türevli kaliks[4]aren bileşikleri insan kanseri hücreleri üzerinde denemeleri yapıldı ve kanser hücrelerinin %50 sini öldüren konsantrasyon oranı olan IC_{50} değeri hesaplandı. Prolin türevli kaliks[4]aren bileşikleri dört farklı kanser hücrelerinde ve sağlıklı epitelyum hücresi olmak üzere toplamda beş hücre hatlarında denendi. Bu denemeler sonucunda prolin türevli kaliks[4]aren bileşiklerinin seçimli olarak sitotoksik etkiye sahip olduğu ve doza bağımlı olarakta hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulundu Tablo(2.2).

Tablo 2.2 Değişik kanser hücrelerinde anti kanser ajanların IC_{50} (μM) değerleri

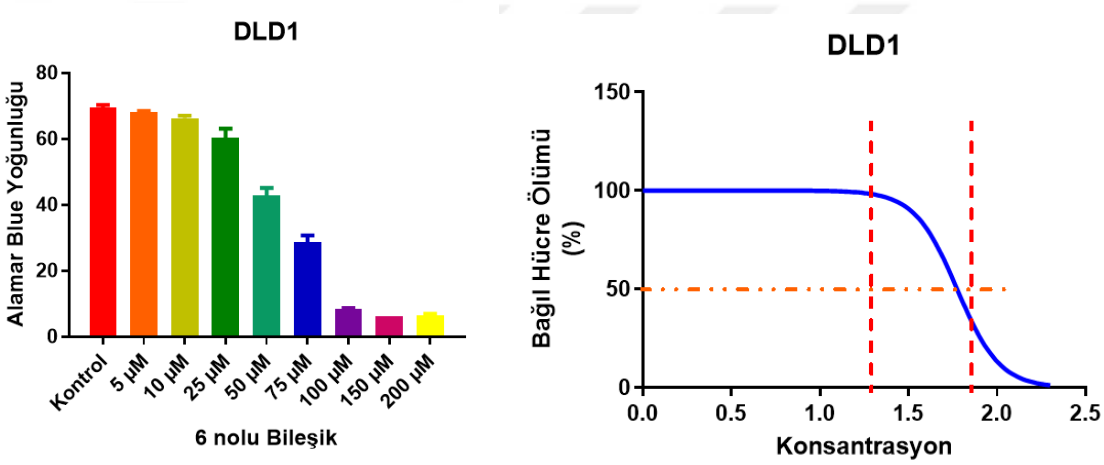
Hücre Hattı	6 nolu Bileşik	12 nolu Bileşik
PC-3	23.4 μM	92,69 μM
DLD1	59.6 μM	29.6 μM
HEPG2	73.9 μM	64.5 μM
A549	15.70 μM	108,7 μM
PNT1A	40.1 μM	65.9 μM

İnsan kanseri hücre hatları A549, DLD1, HEPG2, PC-3 ve sağlıklı epitelyum hücresi PNT1A hücrelerinin optimum hücre sayısı ve inkübe süresi sonunda IC50 değerlerinin hesaplamak amacıyla 96 kuyucuklu platlere üçlü tekrar olacak şekilde $1x10^4$ hücre ekildi. 24 saat 37 °C ve %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edildi. Prolin türevli kaliks[4]aren bileşikleri A549, DLD1, HEPG2, PC-3 ve sağlıklı epitelyum hücresi PNT1A hücrelerinde proliferasyonu üzerindeki etkileri belirlendi ve IC50 değerlerini hesaplamak amacıyla 0-200 μM aralığındaki farklı konsantrasyonda sentezlenen bileşikler karıştırıldı.

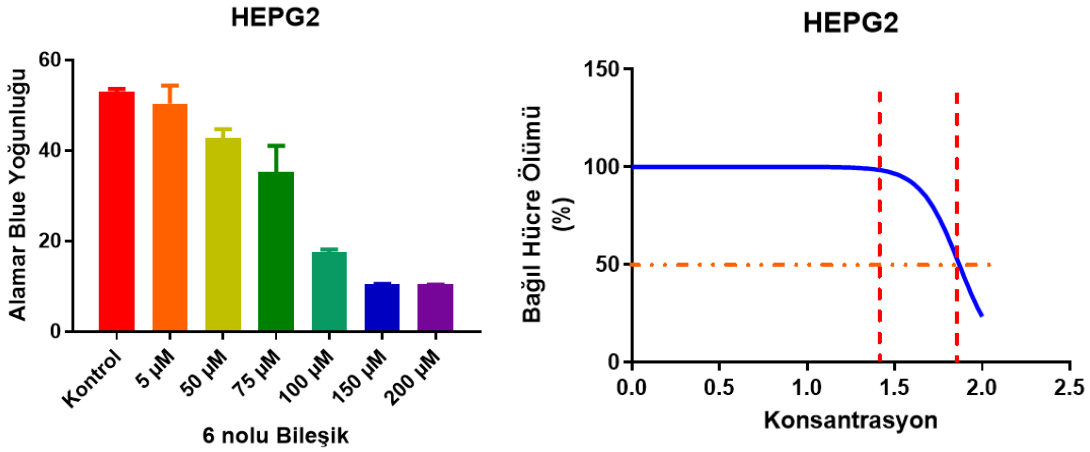
6 nolu bileşiğin DLD-1, A-549, HEPG2, PC-3 ve PNT1-A hücrelerinin proliferasyonunu doza bağımlı olarak etkilediği bulundu. Elde edilen sigmoidal grafikler sonucunda IC_{50} değeri hesaplandı ve sırasıyla 59,6 μM, 15.70 μM, 73,9 μM, 23,4 μM ve 40,1 μM olarak bulundu. Sağlıklı epitel hücresi ile birlikte ele alındığında **6** nolu bileşiğin akciğer ve prostat kanseri hücre hatları olan A549 ve PC-3 hücreleri üzerine önemli ölçüde sitotoksik etkiye sahip oldukları bulundu. Ancak kolon ve karaciğer hücreleri üzerine her ne kadar toksik etki göstermiş de olsa bu değerler PNT1A hücrelerindeki IC_{50} değerlerinden yüksek olduğundan **6** nolu bileşiğin bu hücrelere karşı kullanılma potansiyellerini ortadan kaldırmıştır.



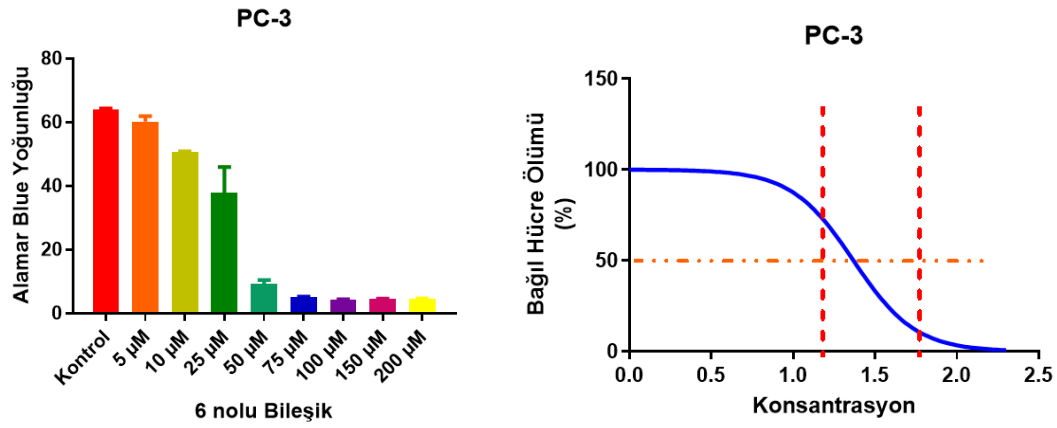
Şekil 2. 29 6 no'lu bileşiğin insan akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



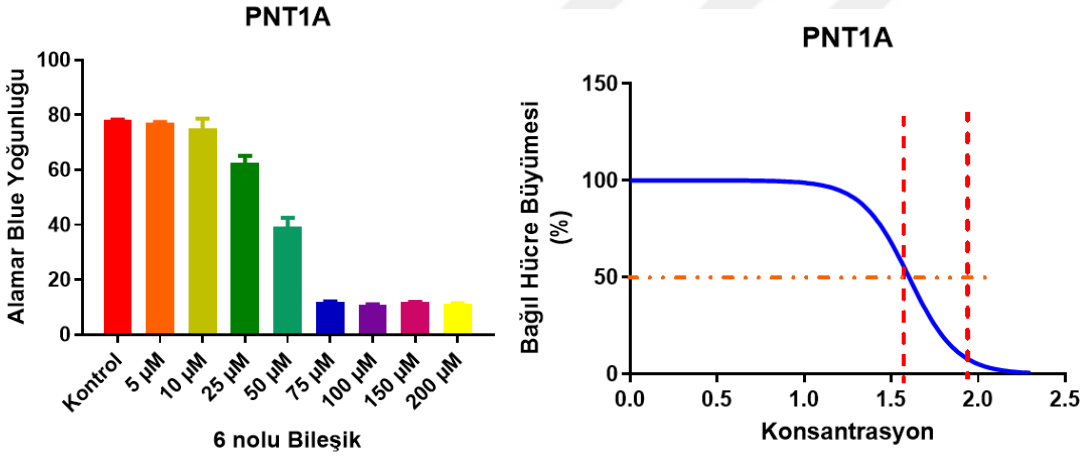
Şekil 2. 3014 6 no'lu bileşiğin insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



Şekil 2. 31 6 no'lu bileşiğin insan karaciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri

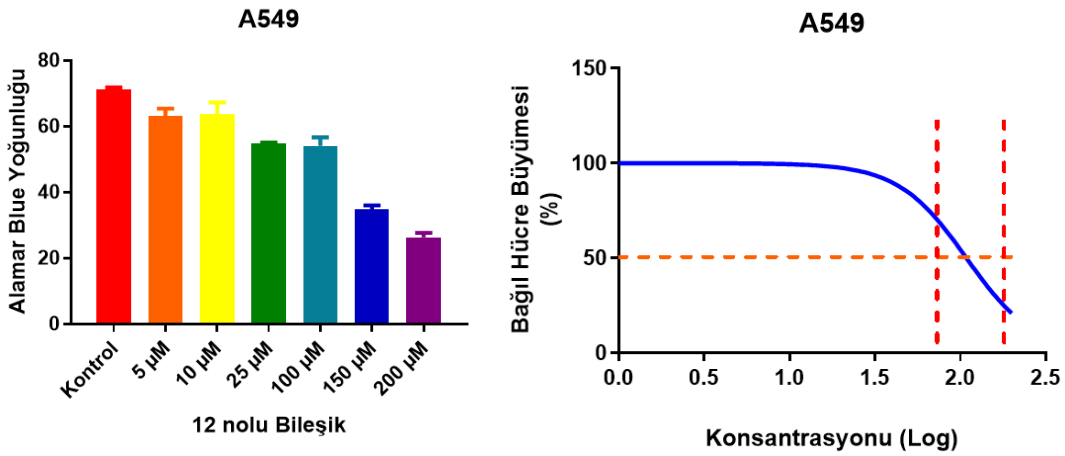


Şekil 2. 32 6 no'lu bileşiğin insan prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri

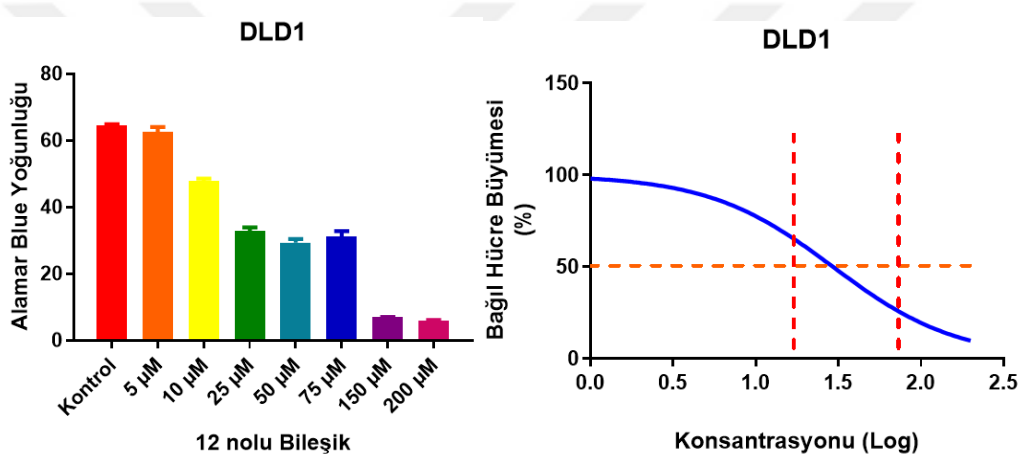


Şekil 2. 33 6 no'lu bileşiğin insan sağlıklı epitelyum hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri

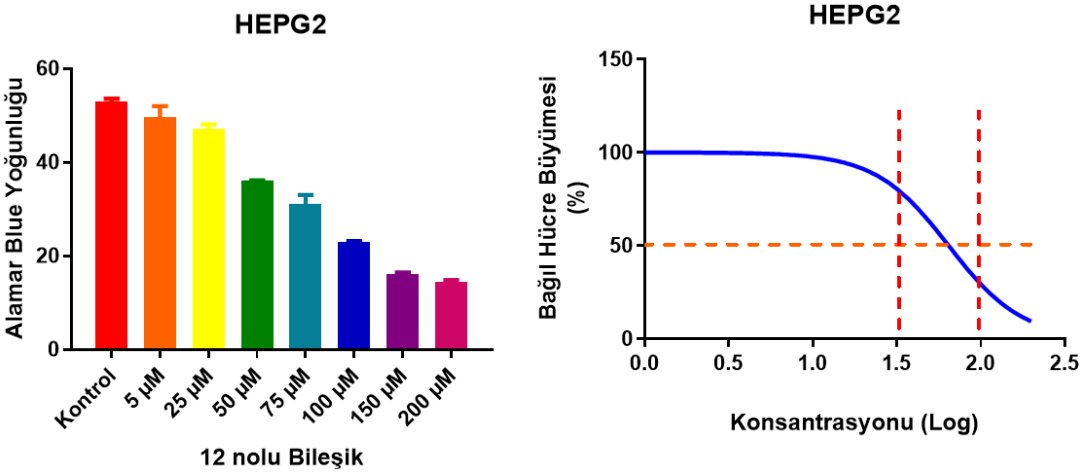
12 nolu bileşik DLD-1, A-549, HEPG2, PC-3 ve PNT1-A hücrelerinin proliferasyonunu doza bağımlı olarak etkilediği bulundu. **12** nolu bileşik seçilen kanser türleri arasında en fazla insan kolorektal karsinoma kanseri hücresi olan DLD-1 üzerine etkin olurken (IC50: 29.6) insan karaciğer kanseri hücreleri olan HEPG2 hücreleri üzerine ise en az toksik etkiyi gösterdiği bulundu (IC50:64.5). DLD-1 hücreleri ile kıyaslandığında ise PNT1A hücreleri üzerine oldukça düşük bir sitotoksik etki gösterdiği bulundu (IC50: 65.9).



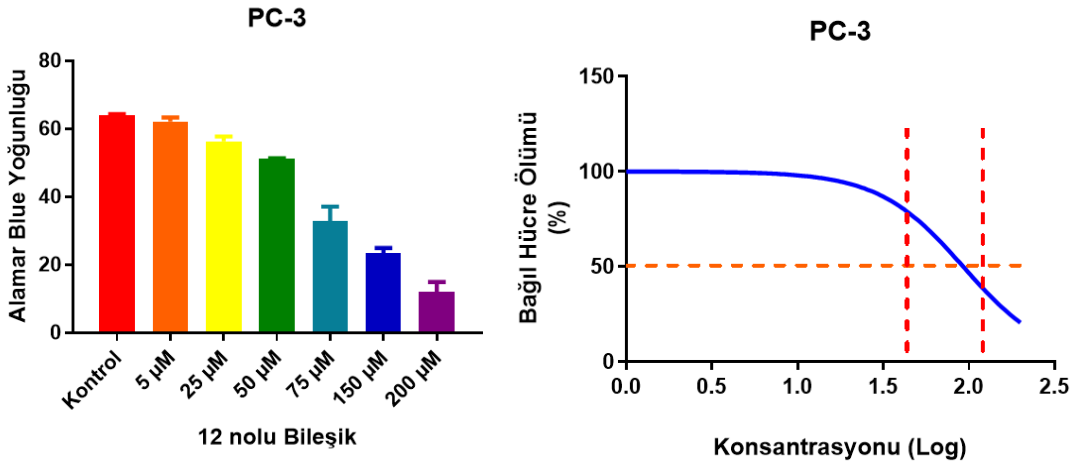
Şekil 2. 34 12 no'lu bileşiğin insan akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



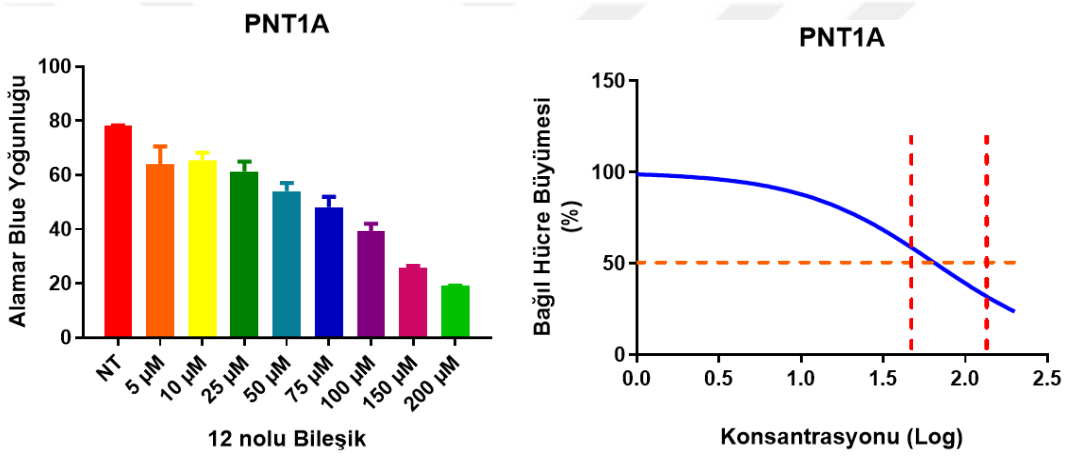
Şekil 2. 35 12 no'lu bileşiğin insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



Şekil 2. 36 12 no'lu bileşiğin insan karaciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



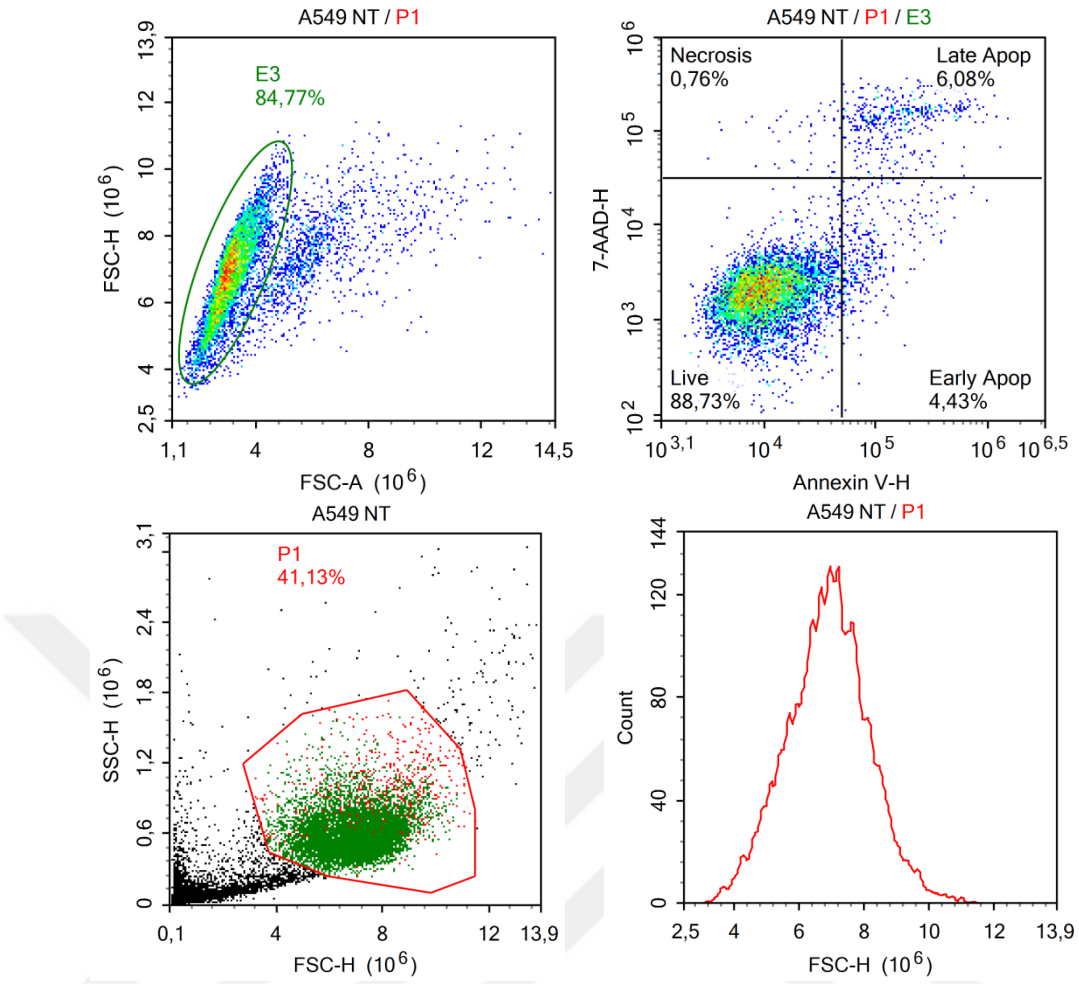
Şekil 2. 37 12 no'lu bileşiğin insan prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



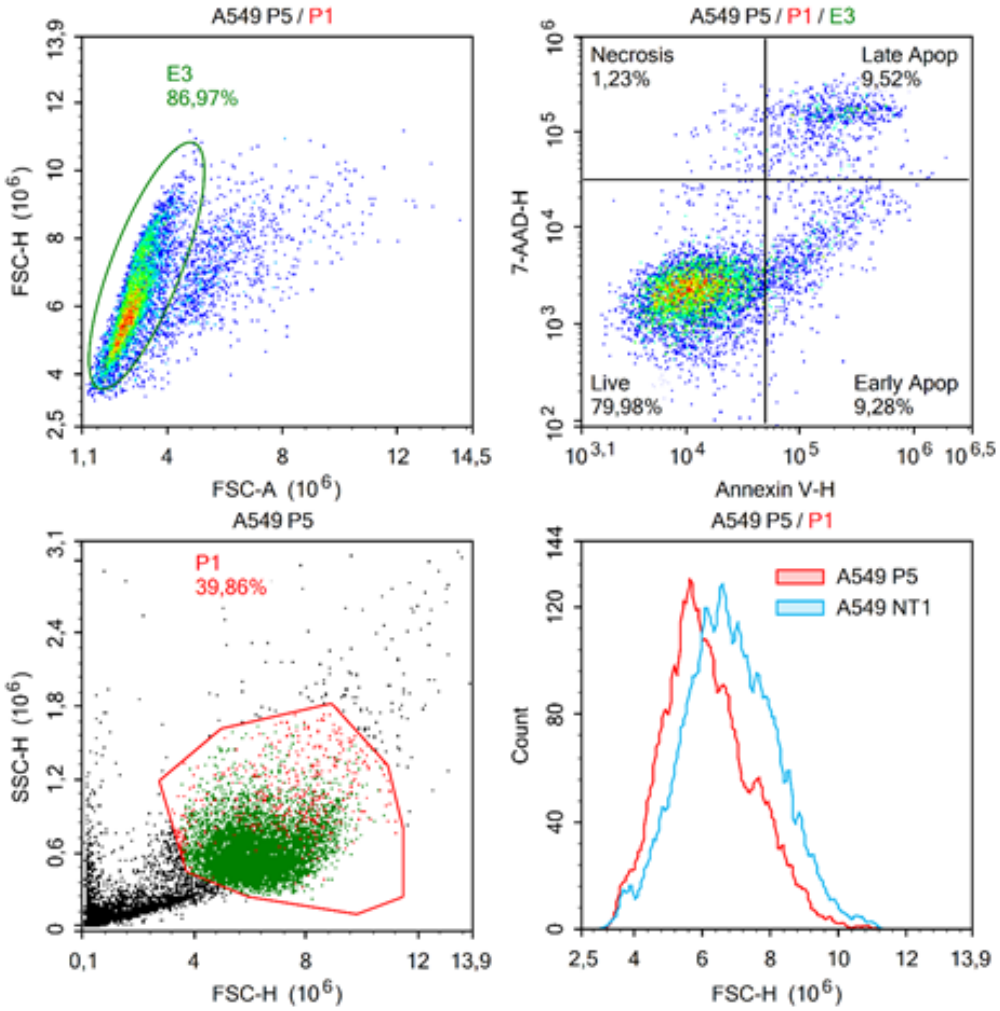
Şekil 2. 38 12 no'lu bileşiğin insan sağlıklı epitelyum hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri

1.4.2. 6 ve 12 no'lu Bileşiklerin Flow Sitometre Çalışmaları

Bu çalışma da **6** ve **12** no'lu bileşik ile muamele edilen insan akciğer kanseri ve kolon kanseri hücreleri üzerinde apoptoz etkileri incelendi.

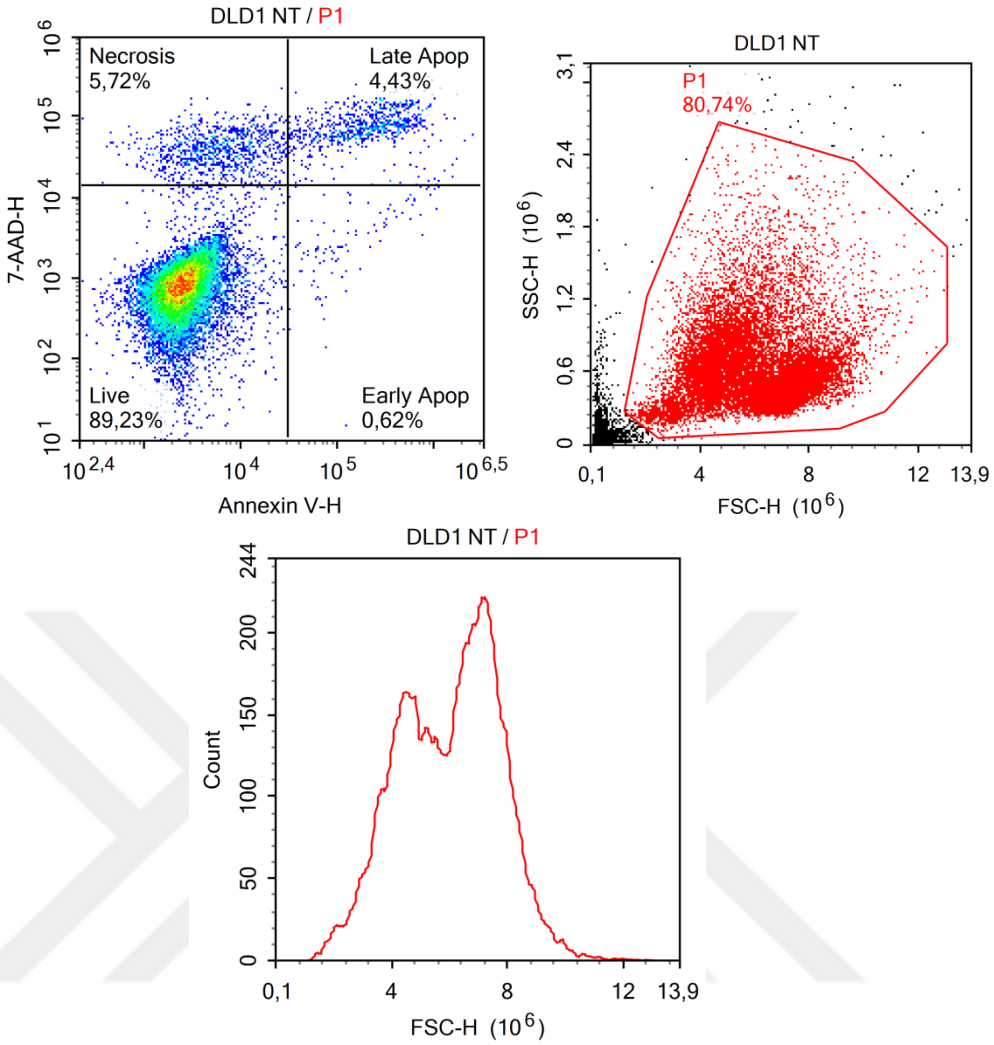


Şekil 2. 39 A549 Akciğer kanseri kontrol grubu flow sonuçları

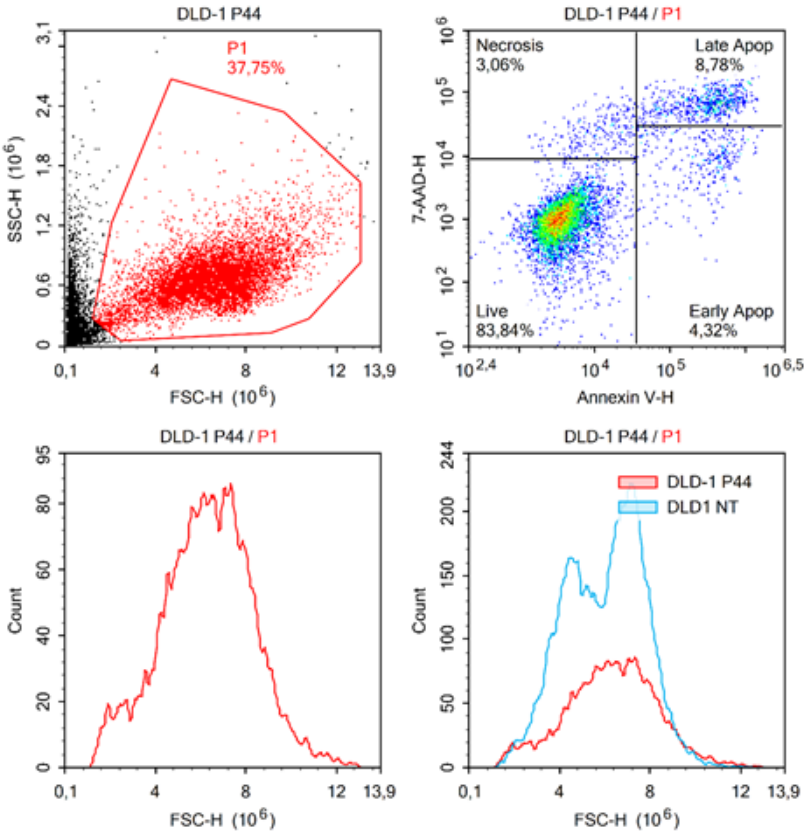


Şekil 2. 40 6 nolu bileşiğin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin flow sitometre ile belirlenmesi

6 no'lu bileşiğin insan akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki flow sonuçlarına göre **6** no'lu bileşiğin hücre döngüsünü engelleyerek hücre çoğalmasını durdurduğu gözlendi. Akciğer kanseri hücre hattı A549, **6** no'lu bileşik ile muamele edilmemiş kontrol grubu % 4,4 erken apoptoz, % 6.08 geç apoptoza uğradığı gözlendi. **6** no'lu bileşik ile muamele edilen hücreler %9.28 erken apoptoz, %9.52 geç apoptoz olduğu bulundu.



Şekil 2. 41 DLD1 kolon kanseri hücre hattı kontrol grubu flow sonuçları



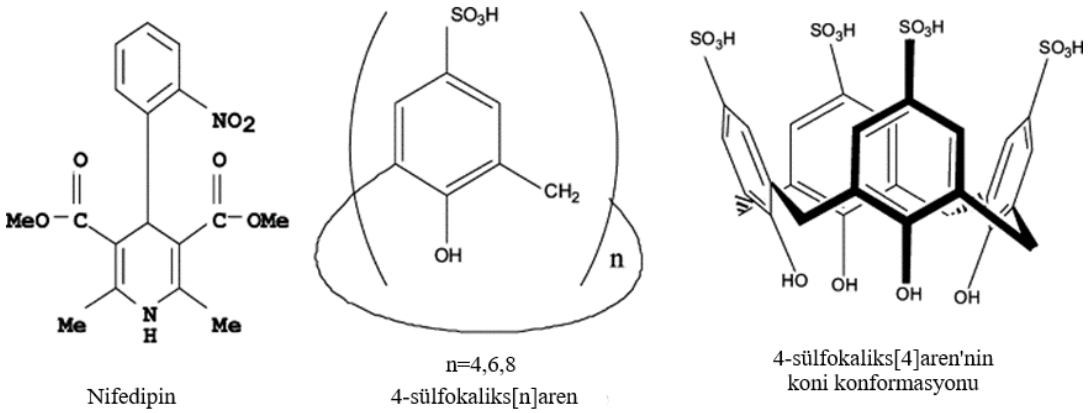
Şekil 2. 42 12 nolu bileşiğin DLD1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin flow sitometre ile belirlenmesi

6 no'lu bileşik ile etkileştirilmemiş kontrol grubu hücrelerinin % 0.6 erken apoptoz, % 4.43 geç apoptoza sürüklendiği bulundu. **6** no'lu bileşik ile etkileştirilmiş kolon kanseri hücre hattı % 4.42 erken, % 8.78geç apoptoza neden olduğu bulundu.

3. BÖLÜM-2: SUDA ÇÖZÜNEN KALİKSARENLERİN İLAÇ TAŞIYICI OLARAK KULLANILMASI

3.1. KAYNAK ARAŞTIRMA

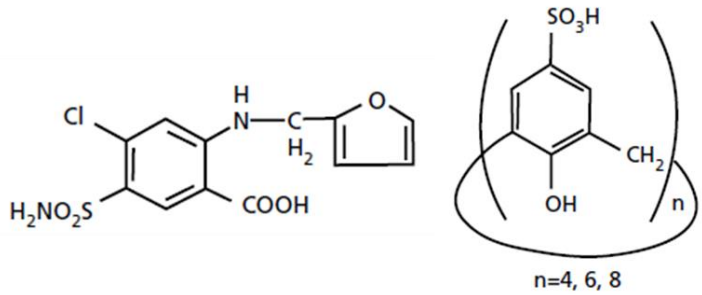
4-Sülfokaliks[n]arenler, suda az çözünen bazı nötür moleküller ile suda çözünebilen kompleksler oluşturabilen fenolik siklooligomerlerdir. Yang ve ark., (2004) yapmış olduğu çalışmada, 4-sülfokaliks[n]arenler kullanarak suda düşük çözünürlüklü ilaç olan nifedipinin kompleksini hazırlmışlardır. Çözeltideki nifedipin miktarını HPLC kullanarak belirlemişlerdir. 4-sülfokaliks[n]arenlerin halka büyüklüğünün, ortamın pH'nın ve kaliks[n]arenlerin konsantrasyonunun nifedipinin çözünürlüğünü önemli ölçüde değiştirdiğini gözlemlemişlerdir. Nifedipinin çözünürlüğünün 0.008 M ve pH=5 ortamında 4-sülfokaliks[8]aren yaklaşık 3 kat, 4-sülfokaliks[4]aren yaklaşık 1,5 kat arttırdığını, 4-sülfokaliks[6]aren ise nifedipinin çözünürlüğünü azalttığını ifade etmişlerdir. 4-sülfokaliks[4]aren, 4-sülfokaliks[8]aren ve nifedipin arasındaki kompleksleşmesini hidrojen bağı, hidrofobik bağ ve donör-akseptör etkileşim mekanizmaları ile açıklamışlardır (Yang ve de Villiers, 2004b).



Şekil 3. 1 Nifedipin ve 4-sülfokaliks[n]arenlerin molekül yapıları

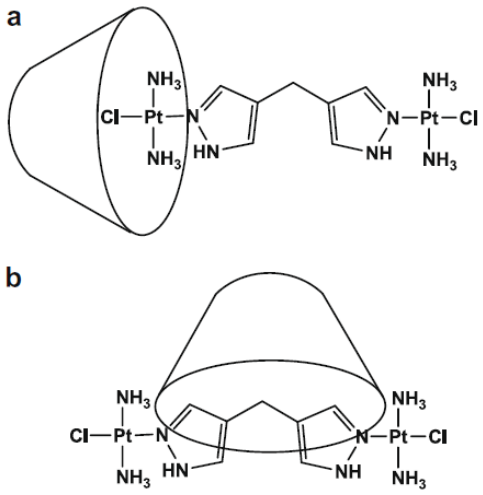
Başka bir çalışmada ise suda çözünmeyen furosemid ilacının 4-sülfokaliks[n]arenler ile konuk-konak türü kompleks oluşturduktan sonra suda çözünürlüğünün değişimini incelemişlerdir. Sulu çözeltilerde kaliksarenlerin konsantrasyonunun artması ile furosemid'in çözünürlüğünü HPLC kullanarak tespit etmişlerdir. Sonuç olarak 4-sülfokaliks[n]arenlerin moleküler boyutunun ve

konsantrasyonunun furosemidin çözünürlüğünü önemli ölçüde arttırdığını gözlemlemişlerdir. Furosemidin çözünürlüğünü en fazla 4-sülfokaliks[6]aren %104, 4-sülfokaliks[8]aren %84, en az ise 4-sülfokaliks[4]aren %73 arttırdığını gözlemlemişlerdir (Yang ve de Villiers, 2004a).



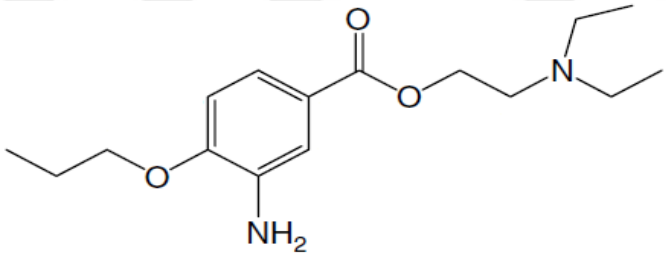
Şekil 3. 2 Furosemid ve 4-sülfokaliks[n]arenlerin moleküler yapıları

Diğer bir çalışmada çok çekirdekli platin antikanser ajanları için ilaç taşıyıcı sistem olarak *p*-sülfokaliks[4]aren (s-CX [4]) kullanmışlar ve yapılarını ^{1}H-NMR, kütle spektrometrisi, moleküler modelleme ile incelemişlerdir. s-CX[4] ile di-Pt 1:1 oranında kompleks oluşumunu, metal kompleksinin amin grupları ile s-CX[4] sülfat grupları arasındaki iyon-iyon etkileşimi ve hidrojen bağı ile bağlandığını gözlemlemişlerdir. s-CX[4]'de bulunan boşluğa di-Pt'nin kısmi kapsüllenmesi 50-guanosin monofosfatın metal kompleksine bağlanmasını engellemediğini, iki guanosin molekülüne bağlandığında, di-Pt kısmen s-CX[4] ile bağlı kaldığını incelemişlerdir. Serbest di-Pt, s-CX[4] ve oluşturdukları konuk-konak türü kompleksin sitotoksisitesini A2780 ve A2780 insan yumurtalık kanseri hücre hatlarında *in vitro* olarak araştırmışlardır. Hücre hatlarında serbest di-Pt (100 ve 60 μM) cisplatinden (1.9 ve 8.1 μM) önemli ölçüde daha az IC_{50} değerine sahiptir. Düşük bağlanma sabitinin ($6.8x10^{4}$ M^{-1}) olması konuk-konak türü kompleksin biyolojik olarak uygun konsantrasyonlarda ayrıldığı anlamına geldiğini ve s-CX[4] 1.5 mM kadar konsantrasyonlarda sitotoksisite etki göstermediğini bu nedenle de di-Pt'nin sitotoksisitesine etki etmediğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak bu çalışmada, makrosiklin metal kompleksine yan-yana bağlanması, düşük bağlanma sabiti ve guanozinin metal kompleksinin saldırısına sterik engel sağlayamaması bu komplesin antikanser ilaçlar için uygun bir ilaç taşıma sistemi olmadığını göstermişlerdir (Wheate ve ark., 2009).



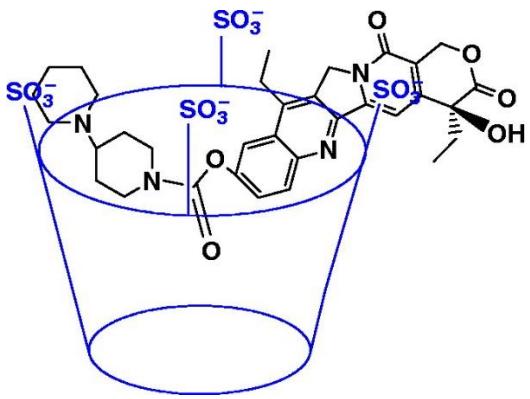
Şekil 3. 3 a) Önerilen s-CX [4] 'ün di-Pt'nin platin grubuna /gruplarına uçtan uca etkileşiminin, b) oluşan Di-Pt'nin köprü metilen bağlarından s-CX [4] le etkileşiminin şematik gösterimi

Arantes ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı bir çalışmada, lokal anestezik materyal olarak kullanılan proparakini, *beta*-siklodekstrin ve *p*-sülfokaliks[6]aren ile farklı pH aralıklarında kompleks oluşumunu incelemişlerdir. Oluşturulan bu kompleks yapıların sistemik toksisiteyi azalttığını ve biyo kullanılabilirliğini ise artırdığını belirtmişlerdir (Arantes ve ark., 2009).



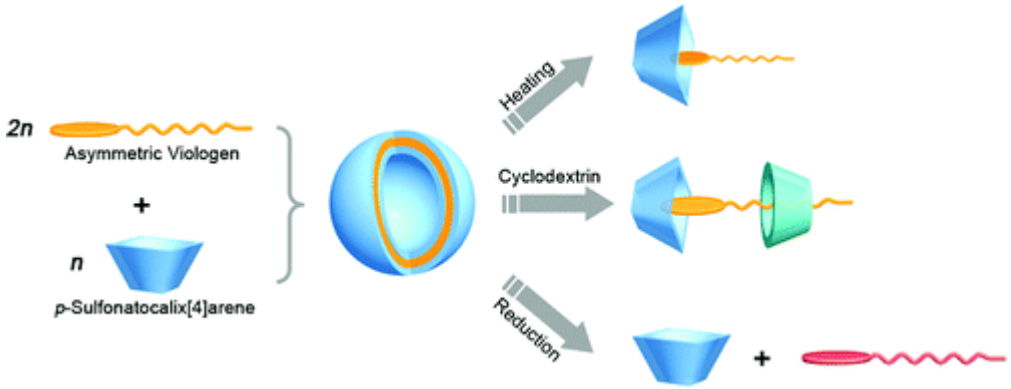
Şekil 3. 4 Proparakain nin yapısı

Başka bir çalışmada, suda çözünen sülfokaliks[4]aren (SC4A) ve antikanser ilaç olan irinotekan (CPT-11) arasındaki etkileşim UV spektrofotometrisi kullanılarak araştırılmıştır. SC4A'nin CPT-11 ile oluşturduğu kompleksi ^{1}H-NMR ve DSC analiz yöntemleri ile incelenmiştir. Suda çözünürlük çalışması ile SC4A'nın CPT-11 ilacının çözünürlüğe önemli derecede etki ettiğini ve kompleksin suda iyi bir çözünürlüğe sahip olduğunu gösterilmiştir. Kompleksin anti-proliferatif özelliklerini incelemiş ve kompleksin CPT-11'in anti-proliferatif özelliğini arttırdığı sonucuna varılmıştır (Wang ve ark., 2011a).



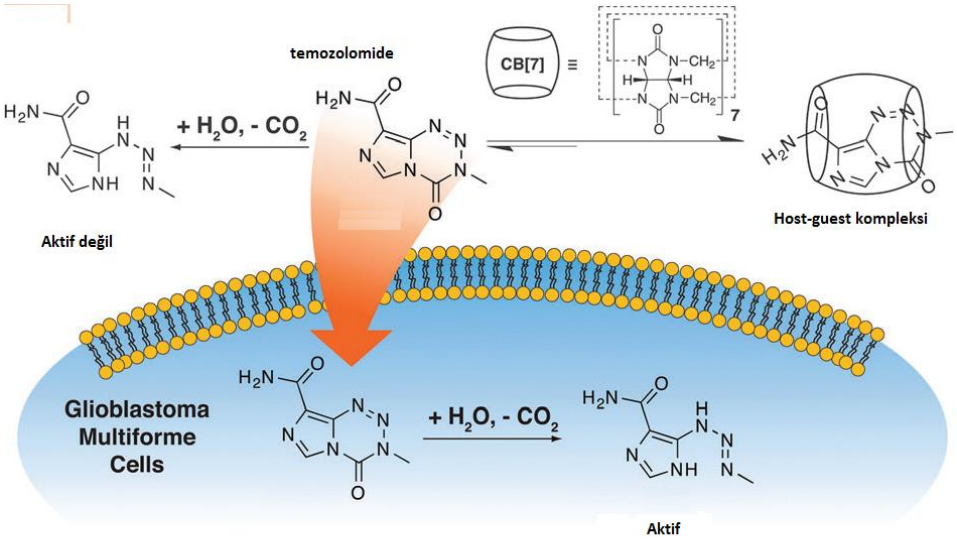
Şekil 3. 5 SC4A-CPT-11 kompleksinin olası bağlama şeması

Veziküller, canlı sistemlerde her yerde bulunan yapı bloklarıdır ve kimya, biyoloji ve malzeme bilimi alanlarında önemli ölçüde faydalıdırlar. İstenen şekil, boyut ve özelliklere sahip veziküllerin hazırlanması onlara biyomimetik sistemlerin, ilaç/gen taşıma sistemlerinin, mikro reaktörlerin geliştirilmesi için özel işlevler sağlamaktadır. Bu nedenle de bu çalışmada, *p*-sülfokaliks[4]aren ve asimetrik viyologen arasında konuk-konak türü kompleks oluşturulmuş ve oluşan nanosupramolekülerin yapılarını UV-vis ve floresans spektroskopisi, dinamik lazer saçılması, transmisyon elektron mikroskopisi, taramalı elektron mikroskopisi ve yüzey gerilimi gibi farklı teknikler kullanarak incelenmiştir. Daha sonra oluşan bu veziküllerin farklı (sıcaklık, konuk-konak kompleksi ve redoks gibi) dış uyaranlara karşı duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Bu nanoyapılara hidrofilik doksorubisin yüklemek için vezikül yapısını bozarak siklodekstrinlerin ısıtılması yöntemi kullanılmıştır. Supramoleküler ikili vezikülün hücresel toksisitesini ve doksorubisin yüklü vezikülün antikanser özelliklerini incelemek için hücre deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hücre deneylerinde DOX'un bir vezikül tarafından yüklenmesinin, kanser hücreleri için terapötik etkisini etkilemediğini fakat normal hücrelere verdiği hasarın azaldığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada sadece yeni supramoleküler veziküller oluşturmak için alternatif bir yol açmakla kalmayıp, aynı zamanda vezikülün çoklu dış uyarılara yanıt verme kabiliyetini de ilk kez vurgulanmıştır (Wang ve ark., 2011b).



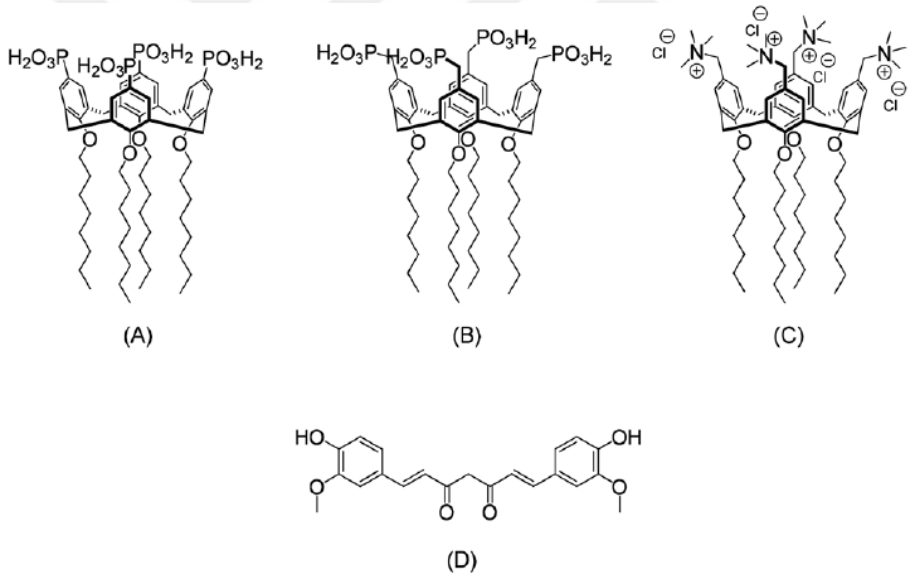
Şekil 3. 6 *p*-Sülfokaliks[4]aren ve asimetrik viyologen arasında konuk-konak türü kompleks oluşum şeması

Son yıllarda molekül-ilaç taşıma çalışmalarında kaliksarenler çok fazla kullanılmaya başlanmıştır. Appel ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, beyin kanserini tedavi etmek amacıyla, Temozolomide'in beyin kanseri hücreleri üzerinde etkilerini artırmak için kaliksaren benzeri konuk-konak kompleksi yapabilen cucurbit[n]urili kullanmışlardır. Bu sebeple ilacın daha yavaş bir şekilde salınımını sağlayarak sitotoksik etkisini azaltmış ve beyin dışındaki dolaşım sistemlerinde kararsız olan ve ayrıca kolayca bozunabilen Temozolomide bileşiğinin fizikokimyasal kararlılığını arttırarak hücreler tarafından daha fazla ve uzun sürede emilimini sağlamışlar ve kanser dokuları üzerine daha çok etkili olduğunu gözlemlemişlerdir (Appel ve ark., 2012).



Şekil 3. 7 Temozolomide'in beyin kanseri hücreleri üzerinde etkilerini artırmak için kaliksaren benzeri konuk-konak kompleksi yapabilen cucurbit[n]urilin şematik gösterimi

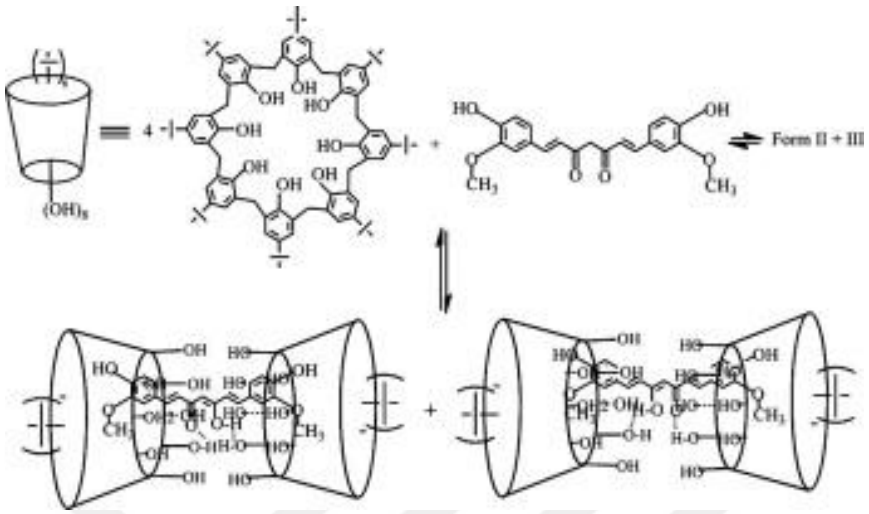
Yapılan diğer bir çalışmada James ve arkadaşları, amfifilik kaliks[4]arenlere PO_3H_2 veya NMe^{3+} grupları dahil ederek fosfolipidlere benzer yapılar tasarlamışlardır. Oksidatif stres, Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Multipl Skleroz (MS), Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve nörotravma gibi diğer nöropatolojik durumlara neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu sebeple tasarlanan farklı kaliks[4]aren türevlerinin PC12 hücrelerinde oksidatif stres faktörleri (H_2O_2, menadion ve glutamat) üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak kaliks[4]aren türevleri kurkumin (doğal antioksidan) gibi küçük molekülleri taşıyarak antioksidan özellik sağlamanın yanısıra potansiyel olarak bu türevlerin de sentetik antioksidanlar olduklarını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada, kaliks[4]arenlerin ilaç salınımı için nanotaşıyıcı olarak kullanılabilecek güçlü sentetik antioksidanlar olduğu sonucuna varmışlardır (James ve ark., 2013).



Şekil 3. 8 Kaliksaren türevlerinin (A,B,C) ve kurkuminin (D) moleküler yapıları

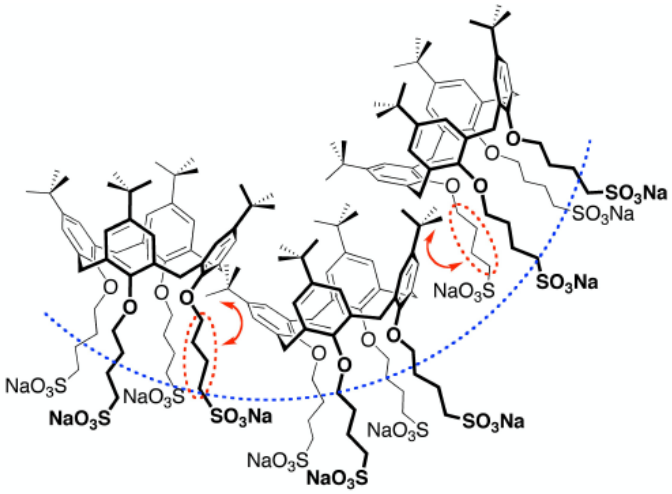
Yapılan bir başka çalışmada, doğal ilaç molekülü olan kurkumin ile *p-ter*-bütilkaliks[8]aren supramolekülü arasında oluşan konuk-konak kompleksinin termodinamik özelliklerini incelenmiştir. *p-ter*-bütilkaliks[8]aren kurkumin ile moleküler tanıma özelliklerini araştırmak amacıyla spektroskopik yöntemler kullanmış ve oluşan konuk-konak komplekslerinin stokiyometrisi ve bağlanma sabiti belirlenmiştir. Bağlanma sabiti ve konuk-konak kompleksinin stokiyometrisinin belirlenmesi için Job's Plot metodu ve Benesi-Hildebrand eşitliği kullanmış ve 1:1 ve

4:1 stokiyometrik konuk-konak komplekslerin oluştuğu gözlenmiştir (Meenakshi ve ark., 2014).



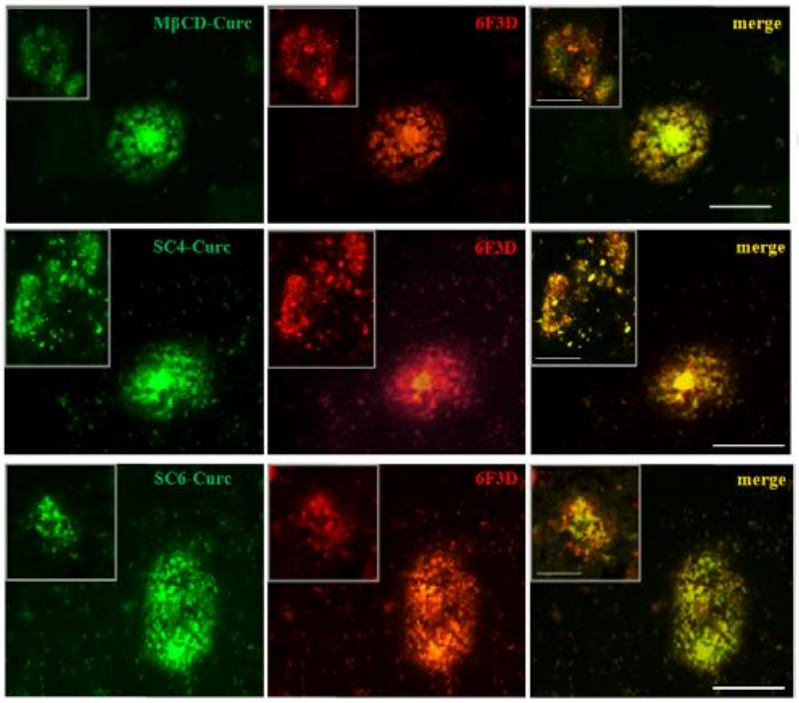
Şekil 3. 9 *p-ter*-Bütilkaliks[8]arenin kurkumin ile 4:1 stokiyometri kompleksi

Barbera ve ark., (2015), yapmış olduğu çalışmada amfifilik tetra-*o*-bütilsülfo kaliks[4]aren supramoleküler bileşiklerini sulu çözeltide farklı teknikler kullanarak (NMR, DLS ve AFM) incelemiş ve bu moleküllerin suda düşük çözünürlüklü ilaçların (naproksen ve flurbiprofen) çözünürlüğünü arttırma kabiliyetini araştırmışlardır. Bu amfifilik tetra-*o*-bütilsülfokaliks[4]aren bileşikleri tarafından oluşturulan lipofilik ortam naproksen ve flurbiprofen gibi suda düşük çözünürlüklü ilaçların çözünürlüğünü önemli derecede arttırmış ve doğal yüzey aktif maddelerin taklit edilmesinde ve yeni ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılabilecek özelliklere sahip olduğu sonucuna varmışlardır (Barbera ve ark., 2015).



Şekil 3. 10 Bir misel içinde kaliksaren moleküllerinin şematik gösterimi

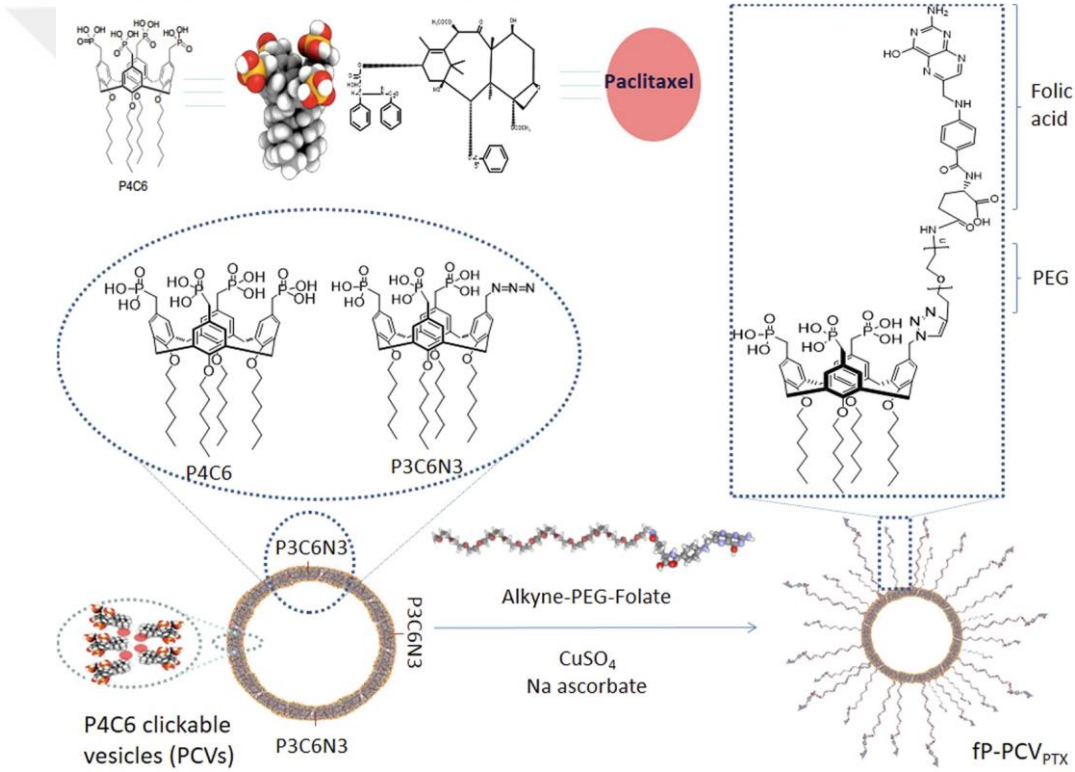
Senil plaklarda 40 ve 42 amiloid peptitin birikmesi Alzheimer Hastalığının (AD) en belirgin halidir. Günümüzde, hem teşhis hem de terapötik amaçlar için beyindeki bu doku bozukluklarını hedefleyebilen çok sayıda moleküller tasarlanmaktadır. Kurkuminin güçlü anti-oksidan, anti-enflamatuar ve anti-kanserojen özelliklere sahip geniş farmasötik aktivite gösteren floresans özellikte molekül olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda yapılan çalışmalar kurkuminin amiloid birikimine karşı yüksek afiniteye sahip olduğunu göstermiştir. Fakat düşük çözünürlükte olması klinik ve klinik öncesi çalışmalarda kullanımını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle de bu çalışmada, kurkuminin moleküllerle (metil-*p*-siklodekstrin, *p*-sülfokaliks[4]aren ve *p*-sülfokaliks[6]aren gibi) kompleksi oluşturularak çözünürlüğü arttırmıştır. Sonuç olarak bu nanotaşıyıcı sistemler amiloid birikimine karşı yüksek afinite gösterdiği ve sadece senil plaklarına değil, aynı zamanda Alzheimer Hastalığına neden olan beyindeki doku bozukluklarına da güçlü bir şekilde etkilediği belirtilmiştir (Ramdani ve ark., 2015).



Şekil 3. 8 Kurkumin bazlı nanotaşıyıcıların amiloid birikimine afinitesini gösteren görüntülemeler (yeşil kurkumin kompleksinin, kırmızı 6F3D (Aβ- Amiloid beta peptidinin birikimine özgü) ve sarı birleştirilmiş görüntüleme (50 μm))

Başka bir çalışmada, paklitaksel (PTX) yüklü kanser hedefleme ligandı olarak folik asit ile konjüge edilmiş *p*-fosfonatlı kaliks[4]aren türevi (PCV) hafif asidik koşullar altında kapsüllenmiş ve PTX'in serbest bırakılmasını sağlayan pH'a duyarlı bir

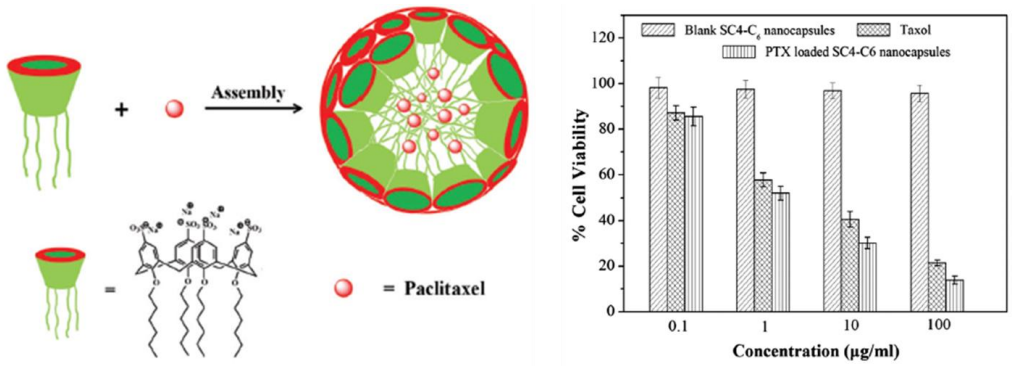
bileşik hazırlanmıştır. Klik ligasyonuyla (fP-PCV$_{PTX}$) hazırlanan alkinle modifiye edilmiş PEG-folik asit ligandları ile konjüge edilmiş PTX yüklü PCV'leri kanser hücreleri üzerinde denenmiş ve FR-negatif A549 akciğer tümör hücreleri üzerinde FR-pozitif SKOV-3 yumurtalık tümör hücrelerine karşı daha fazla etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra SKOV-3 hücreleri üzerinde hedefli fP-PCV$_{PTX}$ ile hedefli olmayan PCV$_{PTX}$ kıyaslanmış ve fP-PCV$_{PTX}$ dört kat daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, taşıyıcı ajan olan PCV'ler tümörlü hücrelere kemoterapötik ajanı hedefleyerek ve kapsüllenmiş ilacın kanser hücrelerinde salınmasını tetikleyerek antikanser ilaçların etkisini artırma potansiyeline sahip olduğu ispatlanmıştır (Mo ve ark., 2016).



Şekil 3. 9 PTX yüklü folat-PEG P4C6 (fP-PCV$_{PTX}$) hazırlanması yöntemi

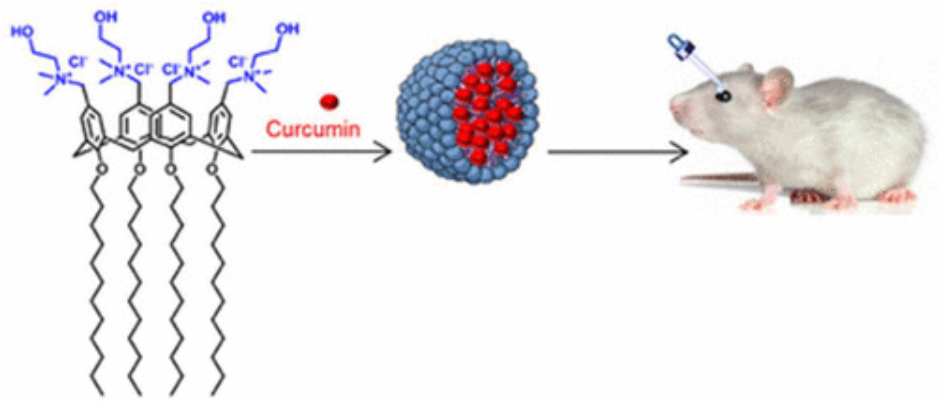
Yapılan diğer bir çalışmada, paklitakselin (PTX) suda çözünürlüğünü arttırmak amaçlı amfifilik kaliksaren (SC4-C6) kullanarak bir kapsül oluşturulmuştur. PTX yüklü amfifilik kaliks[4]aren nanokapsüllerinin optimize edilmiş formülasyonunun ortalama partikül boyutu 206±14 nm olduğunu belirtilmiştir. Ayrıca *in vitro* ilaç salınım deneylerinde, ticari olarak satılan Taxol maddesi ile karşılaştırılarak PTX yüklü SC4-C6 formülasyonunun sürekli salınım özelliğini doğrulanmıştır. PTX yüklü SC4-C6

formülasyonu, insan rahim ağzı kanseri (HeLa) hücre deneylerinde Taxol'a karşı daha iyi sitotoksisite etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (Chen ve ark., 2016).



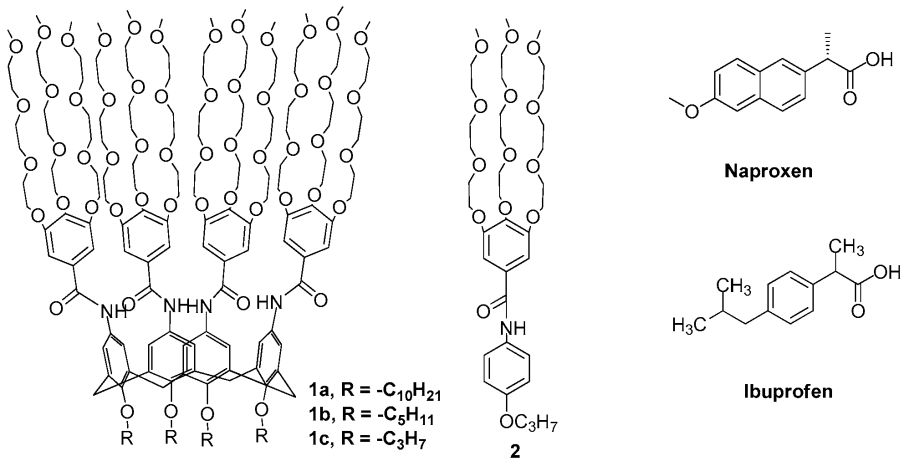
Şekil 3. 10 PTX yüklü SC4-C6 nanokapsüllerinin kendi kendine toplanmalarının şematik gösterimi ve HeLa hücresinde farklı konsantrasyonlarda çeşitli formülasyonların sitotoksisite grafiği

Diğer bir çalışmada ilk kez bir kaliks[4]aren nanomateryali, ilaç taşıma amaçlı potansiyel bir araç olabileceği ifade edilmiştir. Kurkumin, yüksek biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahip olmasının yanı sıra zayıf çözünürlüklü ve çabuk bozunan bir doğal flavonoiddir. Oftalmik uygulamalarda bu olumsuz özellikleri aradan kaldırmak için, kurkumini basit ve tekrarlanabilir bir yöntemle polikatyonik kaliks[4]aren bazlı nanomateryal kullanılarak enkapsüle edilmiştir. Serbest kurkumine kıyasla kaliks[4]aren ile kapsüllenmiş halinin çözünürlüğü önemli ölçüde arttırılmış, bozunma azaltılmış ve hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerde kurkumin'in anti-inflamatuar etkilerinin arttırıldığı sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, oftalmik uygulamalar için yeni bir moleküler yapı sınıfı olan kaliks[n]aren makrosikllerinin kullanılabileceği önerilmiştir (Granata ve ark., 2017).



Şekil 3. 11 Polikatyonik kaliks[4]aren bazlı nanomateriala enkapsüle edilen curcuminin şematik gösterimi

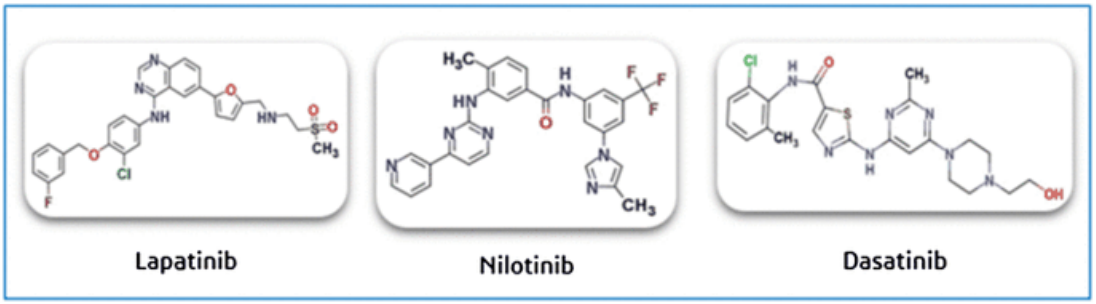
Khan ve ark., (2017), yapmış olduğu çalışmada yeni bir noniyonik amfifilik kaliks[4]aren bileşikleri ile anti-inflamatuar hidrofobik etkiye sahip naproksen (NAP) ve ibuprofen (IBP) ilaçlarının komplekslerini oluşturmuşlardır. Alkil zincirinin uzunluğunun ve kaliks[4]arenin kavite boşluğunun, NAP ve IBP ilaçları ile kaliks[4]aren bileşiklerinin etkileşimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Amfifilik kaliks[4]aren bileşikleri NAP ve IBP ile oluşturdukları kompleksler, bu ilaçların sulu ortamdaki çözünürlüğünü önemli derecede arttırdığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak bu çalışmada, biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda nanotaşıyıcı olarak kullanılabilecek amfifilik kaliksaren bazlı yapıların tasarlanması için yeni bir strateji geliştirmişlerdir (Khan ve ark., 2017).



Şekil 3. 12 Amfifilik kaliks[4]aren yapıları 1a-c, model bileşiği-2, naproksen (NAP) ve ibuprofen (IBP) yapıları

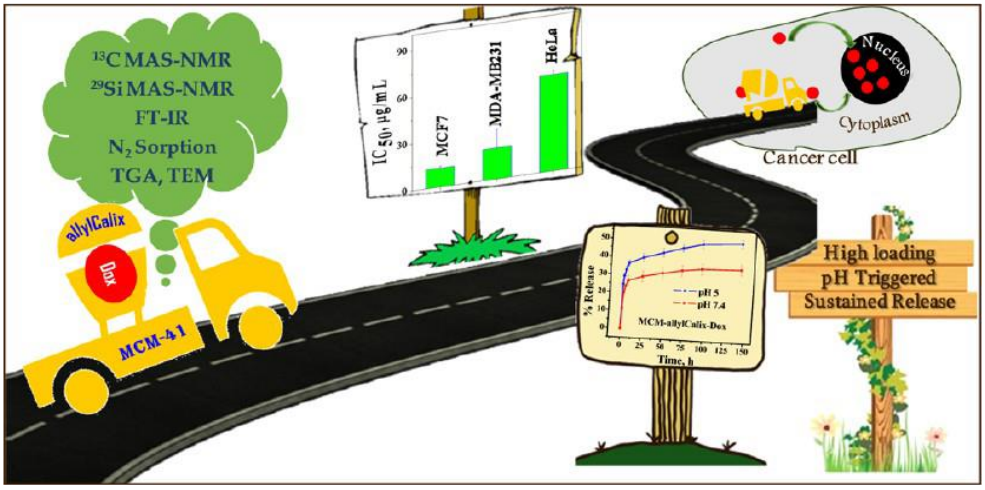
Diğer bir çalışmada ise ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI'ler - dasatinib, lapatinib ve nilotinib) farmakolojik özelliklerini geliştirmek amacıyla kaliksarenlerle konuk-konak türü kompleks oluşturarak in-silico denemesi yapılmıştır. Kaliks[n]arenler (n = 4, 5, 6 ve 8) fenolik-O üzerinden farklı gruplarla (R = SO_3H, *ter*-bütil, izo-propil, COOH, C_2H_5OH, ve $C_2H_5NH_2$) fonksiyonlandırılarak TKI'ler ile aralarındaki enerji ve bağlanma özelliklerini incelemişlerdir. Etkileşim enerjilerine ve yapısal bütünlüklerine dayanarak, nilotinib ($C_2H_5SO_3H$-kaliks[4]aren ve izopropil/$C_2H_5NH_2$-kaliks[8]aren) dasatinib ($C_2H_5SO_3H$-kaliks[5]aren, C_2H_5COOH-kaliks[6]aren ve *ter*-bütil-kaliks[6]aren) ve lapatinib için ($C_2H_5SO_3H$/C_2H_5COOH-kaliks[6]aren ve C_2H_5COOH-kaliks[8]aren) ilaç taşıyıcı olarak (konak) optimal

kompleksler oluşturma kabiliyetinin daha yüksek olduğu sonucuna varmışlardır (Athar ve ark., 2018).



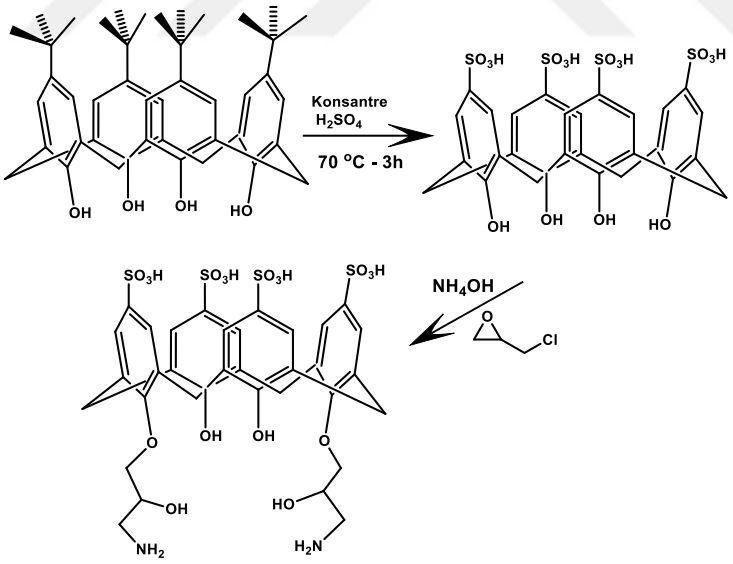
Şekil 3. 13 Tirozin kinaz inhibitörlerin kimyasal yapıları

Başka bir çalışmada, Narkhede ve arkadaşları mezoporöz silika nanoparçacıkları (MCM-41) yüzeyine tetra-alil kaliksaren türevini immobilize ederek hibrit bir malzeme (MCMallylCalix) sentezlemişlerdir. Sentezlenen hibrit malzeme ^{13}C ve ^{29}Si MAS, NMR, FT-IR, Brunauer Emmett Teller yüzey alanı, termogravimetrik analiz (TGA) ve transmisyon elektron mikroskopisi (Nifli ve ark.) gibi farklı teknikler kullanarak karakterize etmişlerdir. MCM-alilkaliks hibrid malzemeye doksorubisin (DOX) yüklemesi yapılarak kanser hücrelerinde (MCF7, HeLa ve MDA-MB231) salınımı için *in vitro* denemeler yapmışlardır. DOX yüklü hibrit malzemede (MCM-alilkaliks-DOX) ilacın varlığını doğrulamak için TEM, FT-IR, TGA, N_2 sorpsiyon, UV ve floresans mikroskopisi kullanarak karakterize etmişlerdir. İlacın salınımı pH-5 ve 7.4'te PBS tampon çözelti içerisinde gerçekleştirilmiş ve 144 saatte pH-5'te pH-7.4'e kıyasla DOX salınımında ~140 artış gözlemleyerek ilacın pH'a bağlı salımın yaptığı sonucuna varmışlardır. Sitotoksisite çalışmalarında MCM-alilkaliks-DOX hibrit malzemenin MCF-7 kanser hücresinde HeLa ve MDA-MB231 hücrelerine kıyasla daha fazla sitotoksisite etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak bu çalışmada, inorganik-organik hibrit malzemenin kanser hücrelerine ilaç salınımı için iyi bir malzeme olabileceğini belirtmişlerdir (Narkhede ve ark., 2018).



Şekil 3. 14 MCM-allilkaliks hibrit malzemenin sentezi, karakterizasyonu, ilaç salınımı ve antikanser aktivitesinin şematik gösterimi

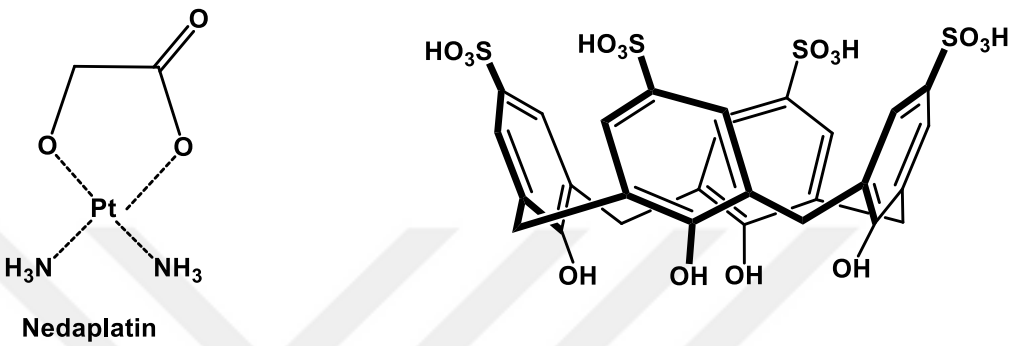
Yapılan bir diğer çalışmada ise Rahimi ve arkadaşları, çoklu-ilaç taşıyıcı olarak düşündükleri çok dallı aminler ile fonksiyonlandırılmış *p*-sülfokaliks[4]aren bileşiklerini sentezlemiş ve bu kaliksaren ile antikanser özelliğe sahip Doksorubisin ve Metotreksatin ile kompleksi hazırlanarak MCF-7 göğüs kanseri hücrelerine karşı anti-proliperatif özelliklerini incelemişlerdir (Rahimi ve ark., 2018).



Şekil 3. 15 Çoklu-ilaç taşıyıcı olarak amin türevli kaliksaren türevlerinin sentez şeması

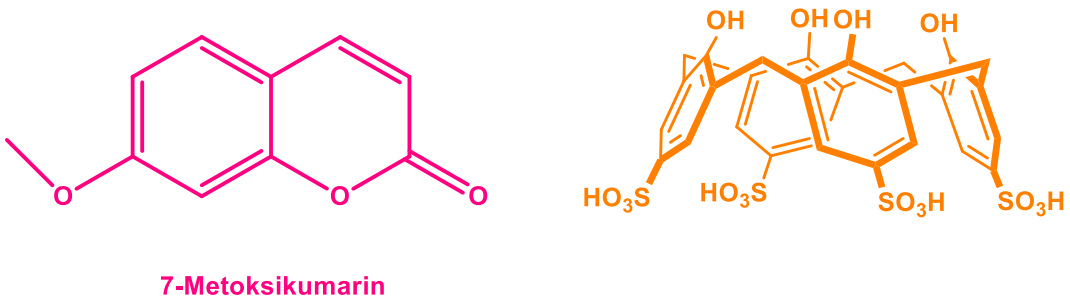
Fahmy ve ekibi makrosiklik türler ve makromoleküllerin; çözünürlüğü, stabiliteyi ve biyo yararlılığını arttırmak için konuk-konak kompleksi yoluyla ilaçlar gibi biyolojik olarak aktif bileşiklerin kapsüllenme potansiyeline sahip olduğunu

belirtmişlerdir. Bu çalışmada, ikinci nesil antineoplastik ilaç olan nedaplatin ile sülfokaliks[4]aren arasındaki komplesin ilk deneysel ve teorik olarak çalışmasını gerçekleştirmişler ve sonuç olarak oluşan kompleksin iyi bir biyolojik uyumluluğa sahip bipolar amfifilik bir yapıya ve potansiyel kullanım için nispeten düşük hemolitik toksisiteye sahip olduğu belirtmişlerdir (Fahmy ve ark., 2018).



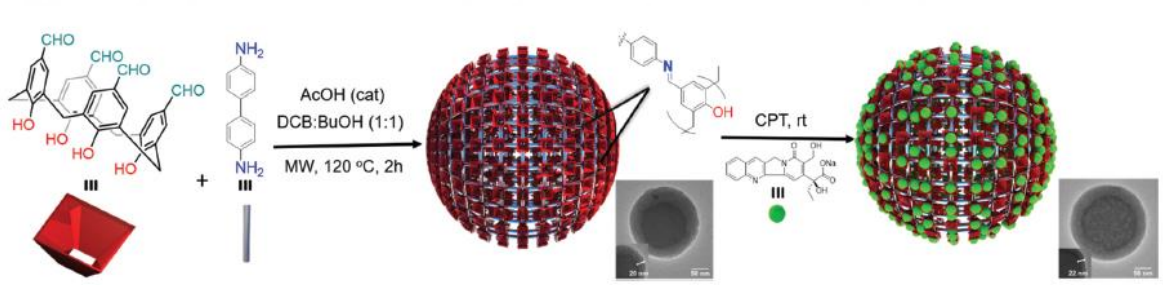
Şekil 3. 16 Nedaplatin ve sülfokaliksaren yapısı

Süpramoleküler kimyada konuk-konak kompleksleşmeleri özellikle molekül taşıma çalışmalarında büyük önem içermektedir. Literatürde bu alanlarda yapılan teorik çalışmalar ise deneysel çalışmaları desteklemektedir. Ashwin ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları deneysel bir çalışmada *p*-sülfokaliks[4]arenler ile 7-metoksikumarinin ile oluşturulan konuk-konak kompleksi elde etmişler ve bu kompleksin yapısı çeşitli spektroskopik yöntemlerle aydınlatmışlardır (Ashwin ve ark., 2018).



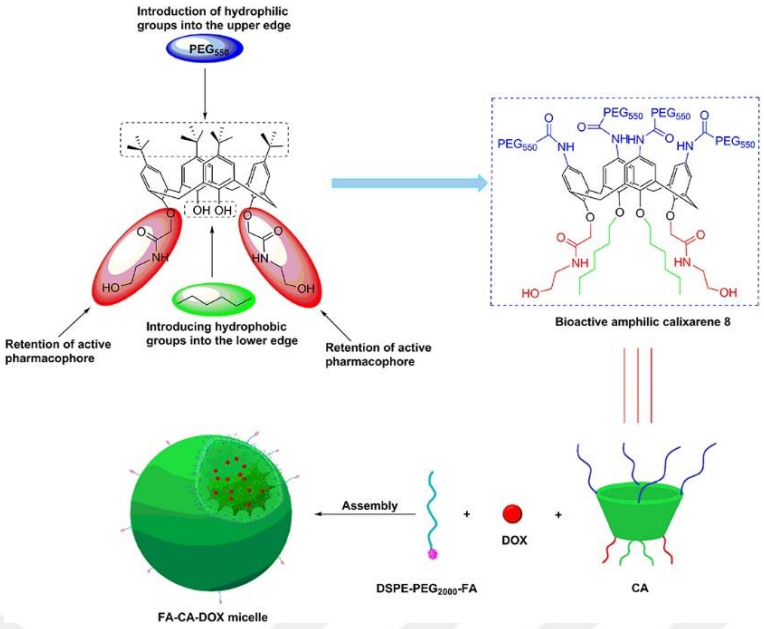
Şekil 3. 17 7-metoksikumarin ve sülfokaliksarenlerin yapısı

Diğer bir çalışmada ise imin grubu taşıyan içi boş kaliks[4]aren nanokapsülleri sentezlenmiş ve bu nanokapsüllerin düşük çözünürlüklü kanser ilacı olan kamptotesinin tümör hücrelerine taşınmasını ve salınımını incelenmiştir. Sentezlenen nanokapsüller suda çözünürlüğü düşük kamptotesin ilacı için iyi bir kapsülleme verimi ve sürekli salımını için tümör hücresi pH'ına karşı duyarlılık gösterdiği gözlemlenmiştir. MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan sitotoksisite çalışmalarıyla kamptotesin yüklü nanokapsüllerlerin 40 kat daha yüksek sitotoksisite etki gösterdiği ispatlanmıştır. Bu çalışma ile kanser tedavisinde kontrollü ilaç salınımında yeni bir ilaç taşıma sistemi olarak kaliksaren bazlı nanotaşıyıcıların sahip olduğu potansiyel gösterilmiştir (Shetty ve ark., 2019).



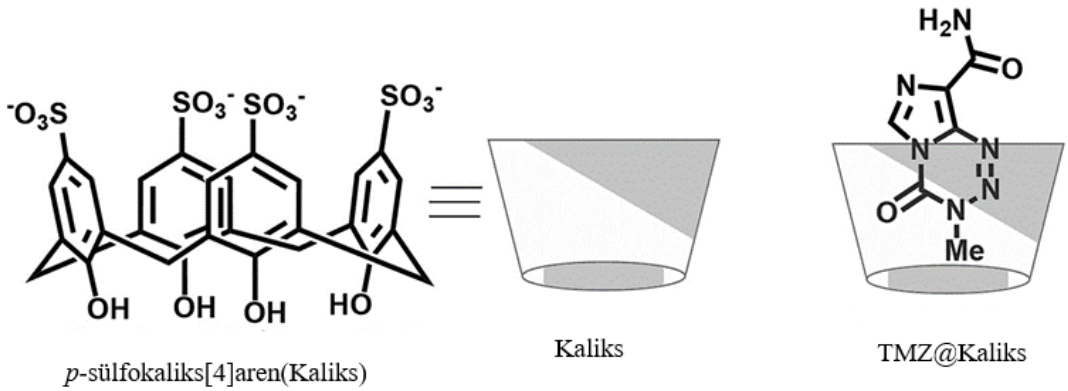
Şekil 3. 18 İmin grubu taşıyan içi boş kaliks[4]aren nanokapsüllerinin şematik gösterimi

Başka bir çalışmada, amfifilik ve biyoaktif kaliks[4]aren türevi sentezlenmiş ve daha sonra CA misellerinin tümör hedeflemesini arttırmak amaclı folat türevi olan FA ile modifiye edilmiş miselleri (FA-CA) oluşturulmuştur. Daha sonra doksorubisin (DOX) yüklü miseller FA-CA-DOX hazırlanmıştır. Kapsüllenmiş DOX miselinin ilaç salınımı kinetik eğrisini çizerek uygun koşullar altında hızlı bir salınım etkisi gösterdiği ve dolaysıyla pH karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir. Yedi farklı insan kanser hücre hatlarında (A549, HeLa, HEPG2, HCT116, MCF-7, MDA-MB231 ve SW480) boş misellere karşı DOX yüklü misellerin sitotoksisitesi araştırılmıştır. DOX yüklü miselin DOX ve boş misellerden daha fazla antikanser etki ettiği gözlemlenmiştir. CDI hesaplamaları ile de tümör hücresi ölümünün gerçekleşmesinde aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada incelenen FA-CA micellerin tümörlü hücrelerin tedavisinde umut vaadeden ilaç taşıma sistemi olduğu ifade edilmiştir (An, 2019).



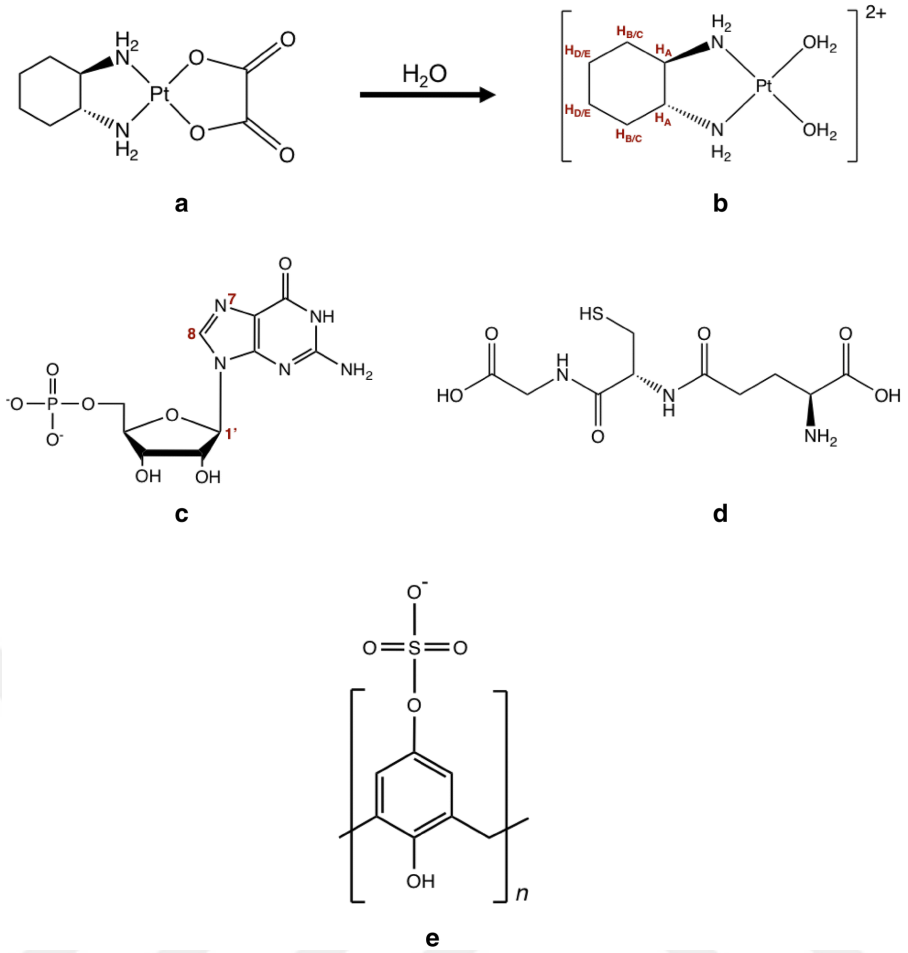
Şekil 3. 19 Biyoaktif amfilik kalikaren tasarımı ve misel oluşumunun şematik gösterimi

Temozolomid (TMZ) yetişkinlerde yaygın ve agresif beyin tümörü olan glioblastoma (GBM) için kullanılan kemoterapötik alkilleyici ajanı, zayıf stabilitesi ve olumsuz farmakokinetik özellikleri nedeniyle klinik çalışmalarda bazı olumsuz etkiler göstermektedir. Bu nedenle TMZ'nin stabilitesini ve suda çözünürlüğünü arttırmak amaçlı *p*-sülfokaliks[4]aren(Kaliks) nanokapsülü ile oluşan TMZ@Kaliks kompleksinin yapısı ^{1}H-NMR, LC-MS ve UV-Vis spektroskopisi gibi farklı teknikler kullanarak aydınlatılmıştır. TMZ@Kaliks'in stabilitesini daha fazla araştırmak için LC-MS/MS plazma stabilite deneylerini *in vivo* olarak farelerde gerçekleştirilmiştir. TMZ@Kaliks'in terapötik etkisi GBM hücre hatlarında, O6-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) ekspresyonu olarak bilinen birincil hastalıklı hücrelerde ve *in vivo* çalışmaları fare modelinde serbest TMZ ajanı ile karşılaştırılmıştır. TMZ@Kaliks kapsülü test edilen tüm koşullarda TMZ'nin stabilitesini önemli ölçüde arttırdığını gözlemlenmiş ve bunların sonucunda TMZ@Kaliks kompleksinin yakın gelecekte GBM hastaları için hazır hale getirilebilecek, ucuz ve oldukça güçlü bir tedavi yöntemi olabileceği ispat edilmiştir (Renziehausen ve ark., 2019).



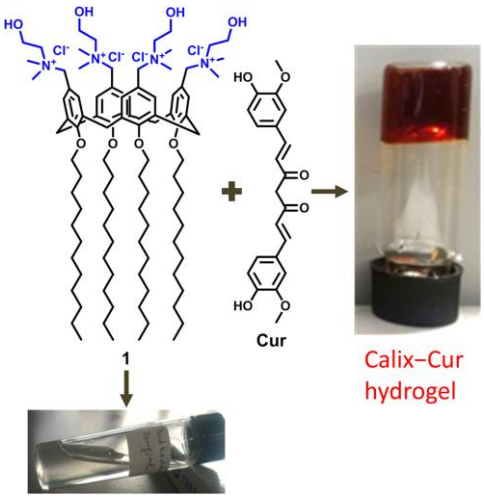
Şekil 3. 20 Kaliksaren(Kaliks) nanokapsülünün ve TMZ@Kaliks kompleksinin şematik gösterimleri

Başka bir çalışmada, *p*-sülfokaliks[8]aren (sCX[8]) makrosikliği ile oksaliplatin bileşiğinin aktif sulu bileşeni için kapsülleme kabiliyetini incelenmiştir. Hem serbest 1R,2R diaminosikloheksan ligandı, hem de sulu bileşenin NMR spektroskopisi ve moleküler modellemede gösterildiği gibi sCX[8] ile konuk-konak türü kompleksler (1:2) oluşturduğunu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, sCX[8]'in platin yüklü kompleksler için iyi bir taşıyıcı potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Moussa ve ark., 2020).



Şekil 3. 21 a) oksaliplatinin, b) oksaliplatinin aktif sulu bileşeni olan [Pt(H20)2(R,Rdach)]$^{2+}$, c) guanosin 5′-monofosfat, d) glutatyon, e) *p*-sülfokaliks[n]aren'nin kimyasal yapılarını gösteren şema

Başka bir çalışmada, kolin-kaliks[4]aren bileşikleri ve kurkumin ile oluşturulan, doğal ve hedefli farmakolojik ilaç olan bir nanohidrojel yapılmıştır. Nanohidrojelin morfolojisi ve mekanik özelliklerini incelenmiş ve yapısını aydınlatmak için teorik çalışmalar yapılmıştır. Bu nanohidrojelleri fizyolojik pH'da katkı maddeleri ve organik çözücüler kullanmadan PBS ortamında kolayca oluşturulmuştur. Misel nanohidrojel kurkumini, kimyasal ve fotokimyasal bozulmaya karşı koruyarak daha fazla ilaç salımına neden olduğu gözlemlenmiştir. Bir hidrojelin mekanik özelliklerini ve bir nano ölçekli miselin ilaç salınımındaki faydalarını birleştiren nanohidrojeller ilaç taşıma sistemleri için umut vaad eden yeni bir malzeme olabileceği sonucuna varılmıştır (Granata ve ark., 2020).



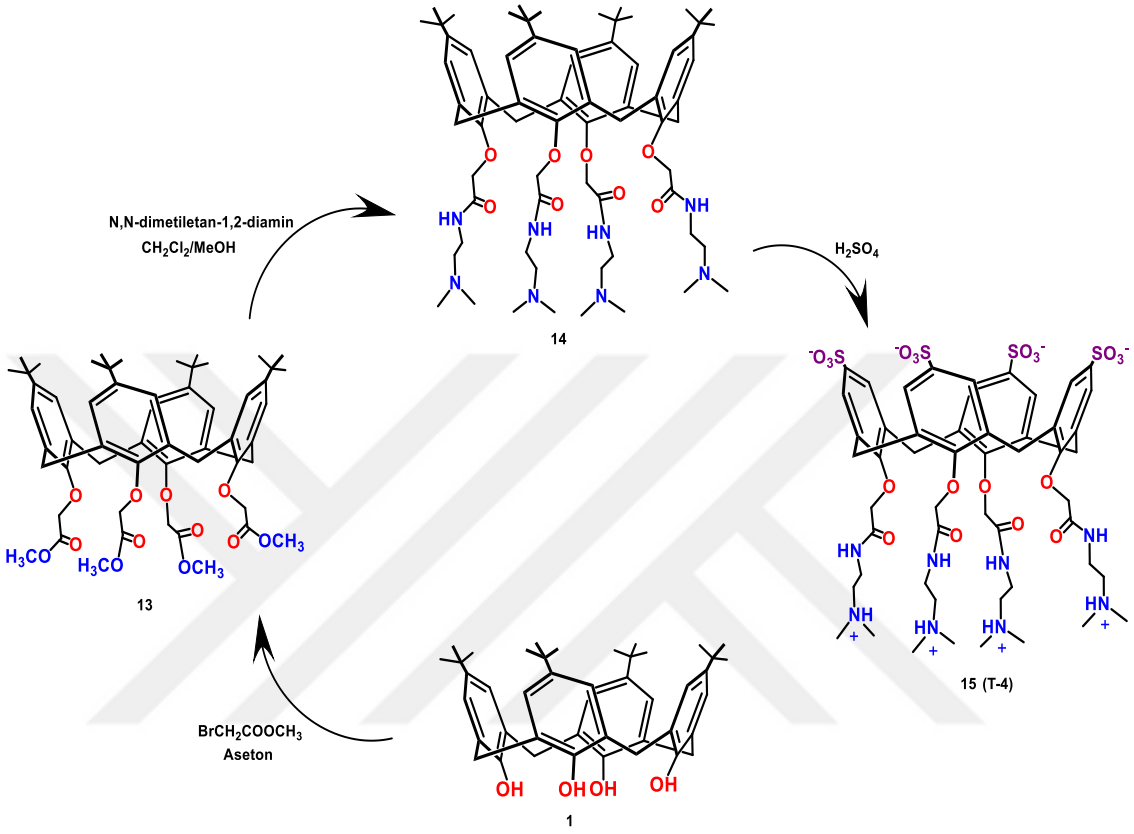
Şekil 3. 22 Kolin-kaliks[4]aren türevi ve kurkumin'in moleküler gösterimi ve kolin-kaliks[4]aren türevi koloidal çözeltisi ve kaliks-kurkumin hidrojelinin görüntüsü

Doktora tezinin bu bölümünde özellikle Dings ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma daha da genişletildi ve ilave çalışmalar yapıldı. Dings ve ekibinin sentezlediği kaliks[4]aren türevleri asidik pH larda suda çözünürken nötral ve zayıf bazik pH larda çözünmemektedir. Bu durum göz önüne alınrak bu tez kapsamında N,N-dimetiletil amit grupları ile sübsitüe olmuş sülfo kaliks[4]aren türevleri sentezlendi bu bileşiklerin tüm pH değerlerinde suda çözünürlükleri artırıldı. Daha sonra bu sülfo kaliks[4]aren türevleri doğal olarak bitkilerden elde edilen, ayrıca ticari olarak da satılan antikanser aktivitesine sahip ve sudaki çözünürlüğü oldukça düşük olmasından dolayı fizyolojik kullanımı sınırlı olan flavonoid türevlerinden kuersetin ile kompleksleştirilerek sudaki çözünürlüğü artırıldı ve sentezlenen bu kuersetin kompleksleri de anti-kanser çalışmasında kullanıldılar.

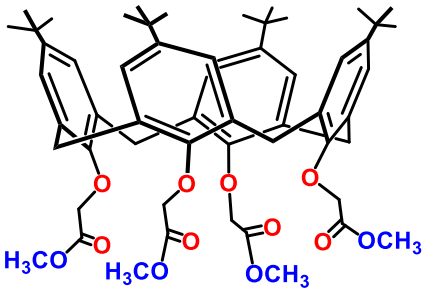
3.2. MATERYAL VE YÖNTEM

3.2.1. Kimyasal Sentezler

Şema-3:



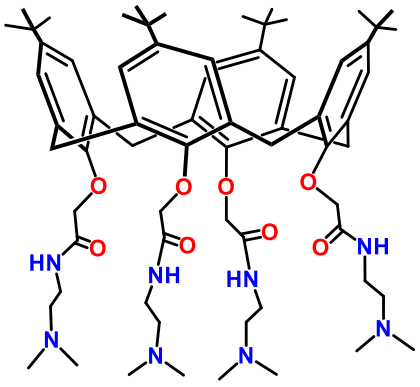
3.2.1.1. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrametoksikarbonilmetoksi-kaliks[4]aren (Arnaud-Neu ve Schwing-Weill, 1997)



13

2.5 g (3.85 mmol) *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (**1**) ve 2.14 g (15.42 mmol) potasyum karbonat 120 mL aseton içerisinde 2 saat süre ile geri soğutucu altında kaynatıldı. Sonrasında reaksiyon ortamına 1.42 mL (15.42 mmol) metilbromasetat ilave edildi ve bir gece boyunca kaynatılarak karıştırıldı. Daha sonra soğutulan karışım süzüldü, süzüntü destillendi. Kalan katı ürün etanol içerisinde kristallendirildi. Verim % 65, E.n. 215-217 ^{o}C. FTIR (ATR):1754 cm^{-1} –$COOCH_3$. ^{1}H-NMR (400 MHz $CDCl_3$) δ (ppm): 1.11 (s, 36H, But), 3.23 (d, 4H, *J=13.3* Hz, $ArCH_2Ar$), 3.82 (s, 12H, OCH_3), 4.85 (s, 8H, OCH_2), 4.88 (d, 4H, *J=13.3* Hz, $ArCH_2Ar$), 6.93 (s, 8H, ArH).

3.2.1.2. 14 nolu Kaliksaren Türevinin Sentezi (Dings ve ark., 2013)

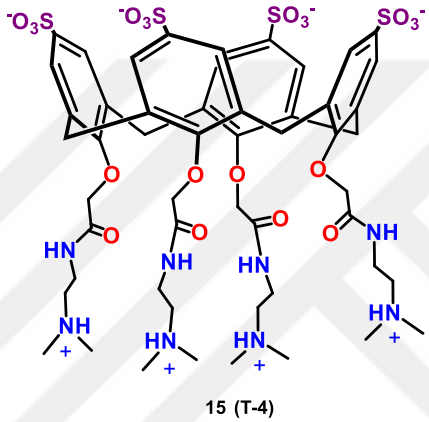


14

1 g (1,07 mmol) kaliks[4]aren üzerine 1,5 ml (12,84 mmol) N,N-dimetiletan-1,2-diamin ilave edildi ve oda sıcaklığınsa azot atmosferi altında 48 saat karıştırıldı. Reaksiyon IR spektroskopi yardımı ile takip edildi. 1725-1750 cm^{-1} deki spesifik ester bandının kaybolması ile reaksiyon durduruldu. Bu süre sonunda oluşan beyaz yağımsı

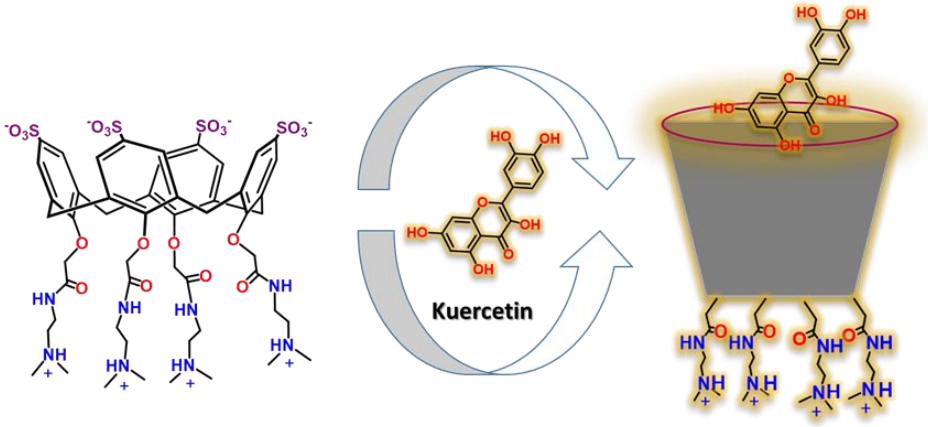
maddeye 1:1 oranında etanol: etilasetat ilave edilip çözünmesi sağlandı. Petri kabına alınıp kurutuldu. Kalan katı madde 5-6 defa dietileter ile yıkanıp kurutuldu**.** Verim % 86. FTIR (ATR):1651cm^{-1} -COONH. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) : δ (ppm): 1,27 (s, 36H, But), 2,43 (s, 24H, $N(CH_3)_2$), 2,67 (t, *J*=6.4 Hz, 8H, NCH_2), 3,45 (d, *J*=13.72 Hz, 4H, $ArCH_2Ar$), 3,66 (t, *J*=6.0Hz, 8H, NCH_2), 4,3 (m, 12H, OCH2, $ArCH_2Ar$), 6,85 (s, 8H, ArH), 7,73 (br, 4H, NH).

3.2.1.3. 15 nolu Kaliksaren Türevinin Sentezi (Maity ve ark., 2015)



0.8 g (1.00 mmol) 14 nolu bileşik alınarak dikkatli bir şekilde üzerine 5 mL derişik H_2SO_4 (%98) oda sıcaklığında ilave edildi ve 80 ^{o}C 4 saat karıştırılarak ısıtıldı. Reaksiyon ortamından bir miktar pastör pipeti ile alınarak sudaki çözünürlüğü test edilerek, sülfolama işleminin sonlandırıldı. Bu süre sonunda gözenek boyutu 4 olan cam filtreden süzüldü. Süzüntüye 2.5 mL soğuk CH_3OH ilave edilerek birkaç kez yıkandı. Bu yıkama işleminin sonunda toplam hacim 50 mL oluncaya kadar yıkamaya devam edildi. 0.5 g aktif karbon ilave edilerek çözeltinin rengi giderildi. Daha sonra 500 mL etilasetat ilave edilerek çöktürüldü. Çökelek süzülür 40 ^{o}C de yüksek vakum altında kurutuldu. Verim: %40. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 2,42 (br, 24H, $N(CH_3)_2$), 3,38 (br, 8H, NCH_2), 3,81(br, 12H, $ArCH_2Ar$, NCH_2), 4,27 (m, 4H, $ArCH_2Ar$), 5,18 (br, 8H, -OCH_2 ve $D_2O_{(çözücü)}$) 7,42 (s, 8H, ArH).

3.2.1.4. *p*-Sülfokaliks[4]aren-Kuersetin kompleksinin hazırlanması (15-Q)



100 mg (0.1342 mmol) *p*-sülfokaliks[4]aren bileşiği alınarak 20 ml suda çözüldü ve çözeltinin pH'ı $NaHCO_3$ kullanılarak 7.4 e ayarlandı. Bu çözeltiye kaliksarene göre 1.5 mol oranında kuersetin 5 ml metanoldeki çözeltisi ilave edildi ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 1 saat sure ile karıştırıldı. Reaksiyon sonunda 40 ^oC de vakum altında metanol destile edildi. Geride kalan çözelti 0.45 µm naylon filtreden süzüldü, yüklenmeyen Kuersetin miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi ve 15-Q' nun çözücüsü 40 ^oC de vakum altında kuruluğa kadar uçuruldu ve kompleksin yapısı spektroskopik yöntemler ile karekterize edildi.

3.2.1.5. *p*-Sülfokaliks[4]aren-Kuersetin komplekslerinin stokiyometrik oranlarının belirlenmesi

Yaygın olarak kullanılan Job plot metodu kullanılarak *p*-sülfokaliks[4]aren bileşiği (**15**) ve kuersetin kompleksleşme oranları belirlendi. Bunu için bileşiğin $1x10^{-4}$ M, çözeltisinden faydalanılarak 1:9 dan 9:1 oranlarında hazırlanan çözeltilerin absorbansları spektrofotometrik olarak maksimum dalga boyunda ölçüldü. Bu değerlerden kaliks:kuersetin oranlarının 1:1 olduğunda en yüksek olduğu gözlendi.

3.2.1.6. *p*-Sülfokaliks[4]aren-Kuersetin komplekslerinin etkileşme sabitinin tayini

Bunun için *p*-sülfokaliks[4]aren türevi pH 7.5 de farklı oranlarda kuersetin ile tepkimeye sokularak Benesi ve Hildebrand, (1949) eşitliğine göre etkileşme sabiti hesaplandı (Benesi ve Hildebrand, 1949).

$$\frac{[D]_O}{Abs} = \left(\frac{1}{[A]_o}\right).\left(\frac{1}{\varepsilon K_a}\right) + \frac{1}{\varepsilon}$$

Bu eşitlikte $[D]_o$ kuersetinkonsantrasyonu, Abs maksimum dalga boyunda kompleksin absorbansı, $[A]_o$ p-sulfokaliks[4]aren konsantrasyonu, $K_a$kompleksin denge sabiti ,ε kompleksin molar absorblama katsayısı, $1/[A]_o$'a karşı [D]o/Abs grafiğe geçirilirse kesim noktası (1/ε) ve eğim ($1/K_a\varepsilon$) ve buradan $K_a$bulunur.

3.2.1.7. Kuersetinin faz çözünürlüğü çalışması

(Higuchi ve Connors, 1965) metodu kullanılarak kuersetinin sudaki çözünürlüğü pH 7 de farklı konsantrasyonlarda *p*-sülfokaliks[4]arenler kullanılarak tayin edildi. Bunun için 10 ar mg lık kuersetin örnekleri 10 ml lik deney tüplerinde bulunan ve konsantrasyonları $1x10^{-5}$ ten $1x10^{-4}$ e kadar olan *p*-sülfokaliks[4]aren çözeltilerine ilave edildi. Karışımlar 1 saat süre ile oda sıcaklığında etkileştirilir daha sonra 0.45 μm naylon filtreden süzüldü ve kompleksleş-meye girmeyen kuersetin miktarları spektrofotometrik olarak belirlenir.Faz çözünürlüğü aşağıdaki eşitlikten hesaplandı.

$$K_s = \frac{Egim}{S_o \times (1 - Egim)}$$

Aşağıdaki eşitlikten çözünürlük 12.03 mM *p*-sülfokaliks[4]aren konsantrasyonunda Kuersetinin faz çözünürlüğü hesaplandı.

Burada **S_o:** *p*-sülfokaliks[4]arenin yokluğunda

S: *p*-sülfokaliks[4]arenin varlığında

$$\delta = \frac{S - S_o}{S_o} \times 100$$

3.2.2. Biyokimyasal Uygulamalar

Bu bölümde yapılan biyokimyasal deneylerin (hücre kültürü) tümü 1.bölüm biyokimyasal uygulamalar başlığında anlatılan aynı metodlar kullanılarak yapıldı. Bu bölümde A549, DLD1, HEPG2 ve PC-3, insan rahim kanseri hücre hattı HeLa ve sağlıklı epitel hücreleri kullanıldı. HeLa ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) firmasından temin edildi. Sağlıklı epiteltum hücresi PNT1A Sigma firmasından satın alındı.

3.2.2.1. Hücre Hatları ve Büyüme Ortamlarının Hazırlanması

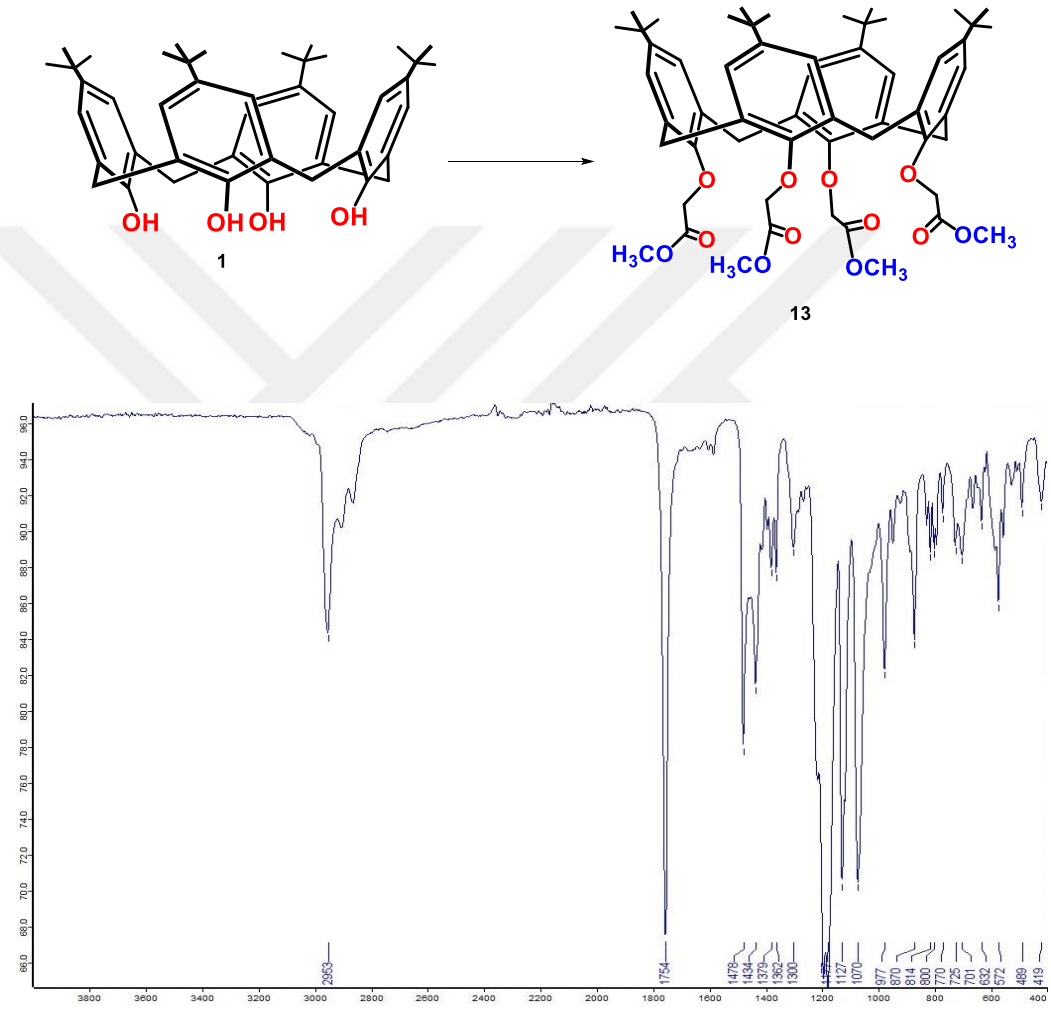
Hücre hatları %10 FBS (fötal sığır serumu) ve %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren EMEM ve RPMI-1640 büyüme ortamları içerisinde 37 °C ve % 5 CO_2 'li ortamda büyütülmüştür. Büyüme ortamı aynı zamanda kaliksaren bileşiklerinin seyreltilmesinde kullanıldı.

3.2.2.2. Kaliksaren Türevlerinin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Belirlenmesi

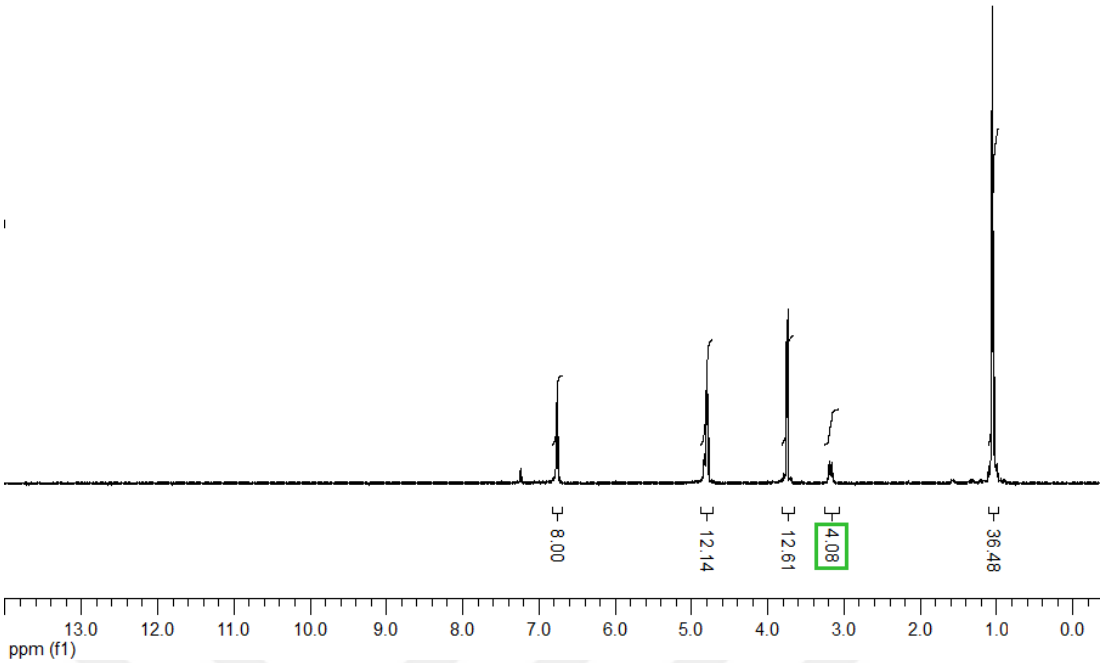
IC_{50} çalışmaları tamamlandıktan sonra kaliksaren türevlerinin hücre içi lokalizasyonlarının belirlenmesi amacıyla hücreler cam tabanlı 24 kuyucuklu plakalar üzerinde 24 saatlik 37°C de %95 nem ve %5 CO_2 li ortamda büyütüldü. İnkübasyondan sonra hücreler üzerine 10 μM olacak şekilde kompleks bileşik 15-Q eklenerek 45 dakika inkübe edildi ve daha sonra PBS ile yıkanarak hücre içine girmeyen fazla kompleks uzaklaştırıldı. İnkübasyondan sonra hücre görüntülemesi Bio-Rad marka ZOE flouresans mikroskop yardımıyla gerçekleştirildi.

3.3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Şema 3 te önerilen suda çözünen kaliksaren türevleri için, tetra ester türevli *p-ter*-bütilkaliks[4]aren bileşiği literatüre göre sentezlendi (Arnaud-Neu ve Schwing-Weill, 1997). Bunun için metilbromasetat ile K_2CO_3 varlığında *p-ter*-bütilkaliks[4]aren bileşiği aseton içerisinde etkileştirilerek hedef bileşik **13** sentezlendi.



Şekil 3. 23 *p-ter*-Bütilkaliks[4]arenin tetra ester türevinin (**13**) FTIR spektrumu

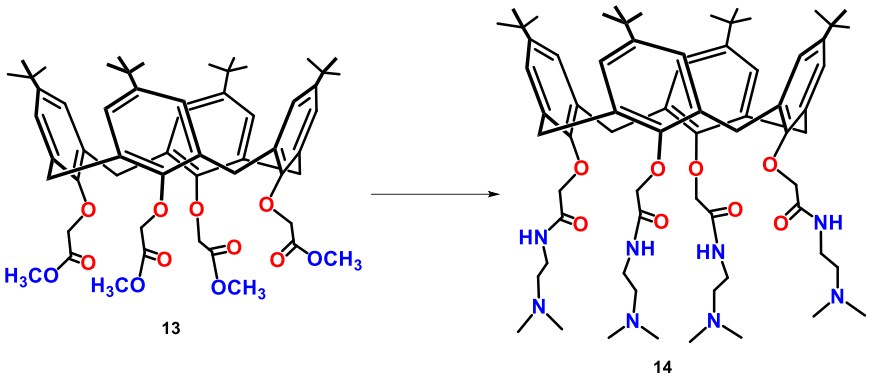


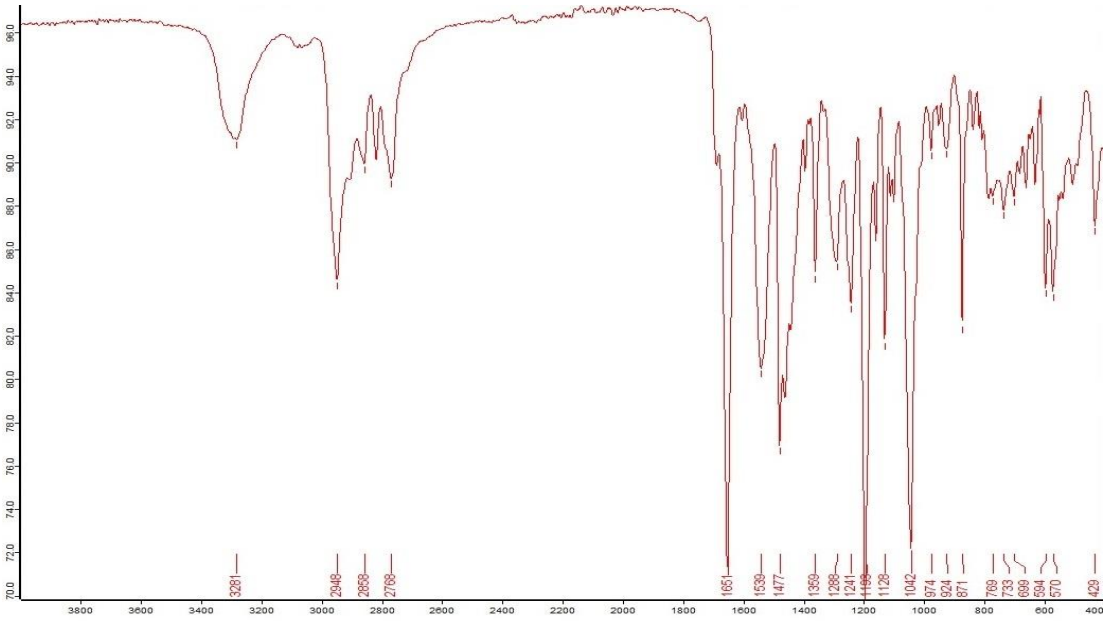
Şekil 3. 24 *p-ter*-Bütilkaliks[4]arenin tetra ester türevinin (**13**) ^{1}H-NMR spektrumu

^{1}H-NMR spektrumuna (Şekil 3.28) baktığımızda bu bileşiğe ait 4.82 ppm de gözlenen 8 eşdeğer protonlu O–CH_2- pikleri ve 3.79 ppm deki 12 eşdeğer protonlar ester grubunu gösterir. Ayrıca bu bileşik için 1.10 ppm de gözlenen 36 özdeş *p-ter*-bütil gruplarına ait protonlar kaliksaren bileşiğinin fenolik OH grubunun dördüne de ester grubunun bağlandığını doğrulamaktadır.

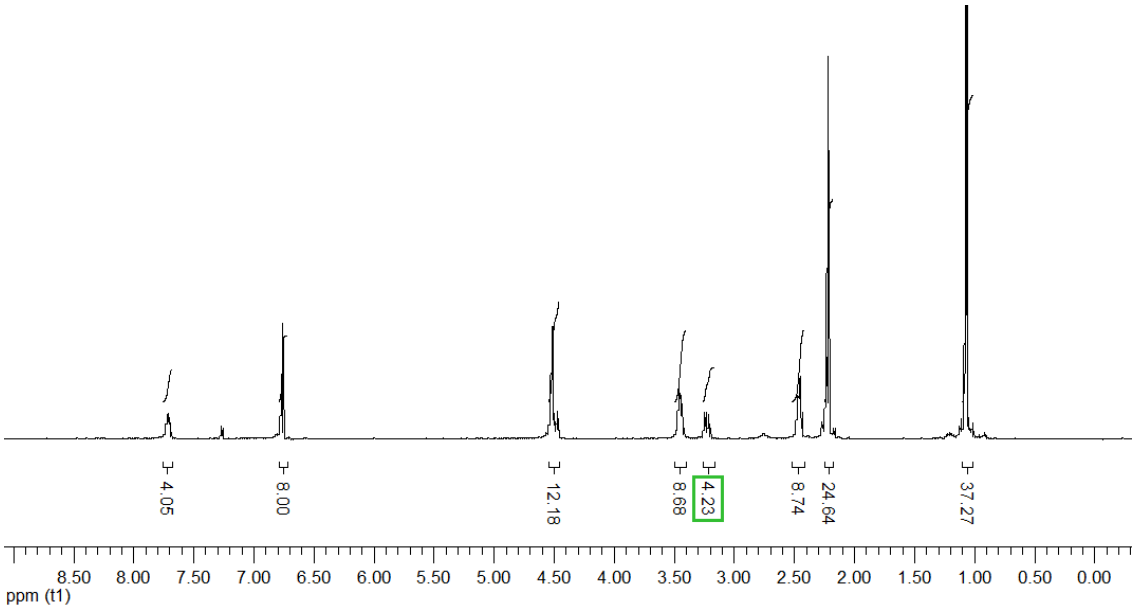
13 nolu bileşiğin FTIR spektrumuna incelenirse 1754 cm^{-1} de ester grubuna ait karbonil bandının gözlenmesi kaliksaren türevinin yapısını doğrulamaktadır (Şekil 3.27).

p-ter-bütilkaliks[4]aren tetra ester türevi literatüre uygun olarak diklormetan-metanol çözücü ortamında oda sıcaklığında N,N-dimetiletan-1,2-diamin ile etkileştirilerek tetraamit türevli kaliksaren bileşiği **(14)** elde edildi (Dings ve ark., 2013).





Şekil 3. 25 *p-ter*-Bütilkaliks[4]arenin tetra amit türevinin (**14**) FTIR spektrumu

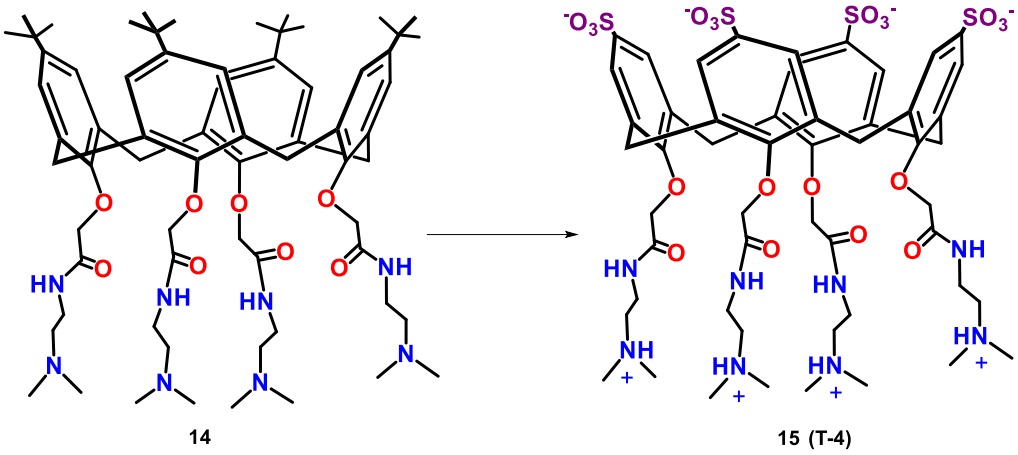


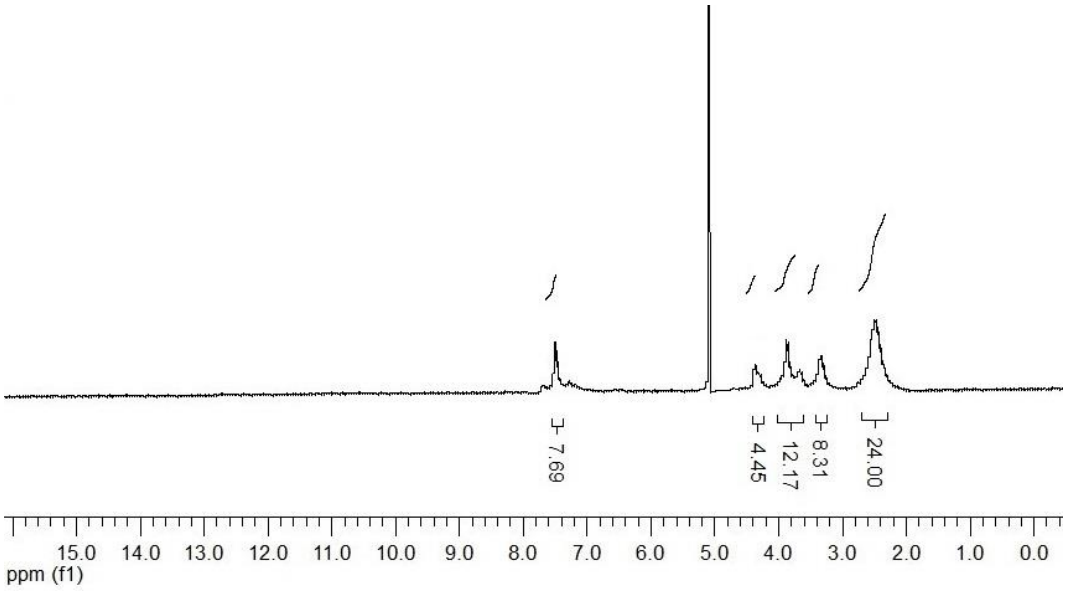
Şekil 3. 26 *p-ter*-Bütilkaliks[4]arenin tetra amit türevinin ^{1}H-NMR spektrumu

Bu bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumuna (Şekil 3.30*)* baktığımızda 3.79 ppm deki 12 eşdeğer ester protonlarının kaybolması kaliksarene amin bileşiğinin bağlandığını göstermektedir. Ayrıca 7,73 ppm deki 4 protonluk -NH pikinin varlığı da sentezin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ispatlamaktadır.

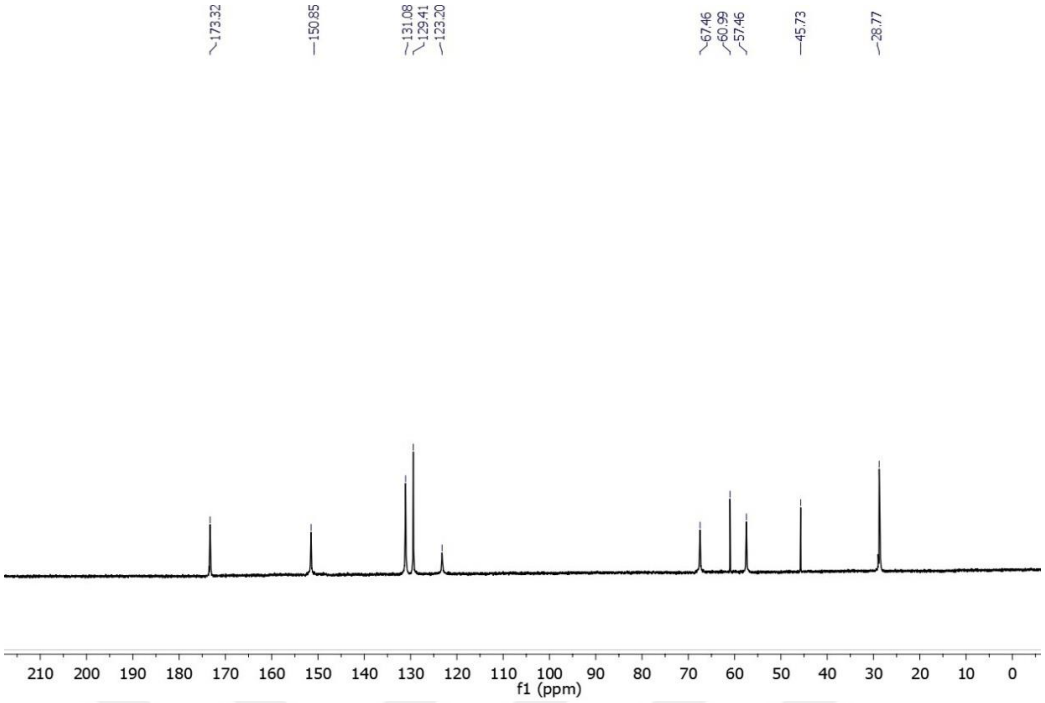
14 nolu bileşiğin FTIR spektrumuna baktığımızda 1754 cm^{-1} de ester grubuna ait karbonil bandının kaybolması ve 1651 cm^{-1} de yeni oluşan karekteristik amit bandının gözlenmesi yapıyı doğrulamaktadır (Şekil 3.29).

Kaliksaren bileşiklerinin ilaç taşınmasında kullanılabilmesi için suda çözünebilmesi gerekmektedir. Literatürde kaliksarenleri suda çözünür duruma getirme yollarından en çok tercih edileni sülfolama tepkimeleridir. Bu durum göz önüne alınarak bu doktora tezinde *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin tetra amit türevleri (**14**) ipso-sulfolama tepkimesi ile sülfo türevleri sentezlendi (**15**) (Maity ve ark., 2015). Bu tepkime yapılmadan dealkilasyonla *ter*-bütil grupları giderilmiş kaliks[4]arenin bileşiğinin sülfolama ürünü ile bu tepkimeden elde edilen aynı olduğundan daha kısa ve pratik bir yol olan ipso-sülfolama tepkimesi tercih edildi. Ürüne ait ^{1}H-NMRspektrumu Şekil 3.27 de görülmektedir. ^{1}H-NMR spektrumundan *ter*-bütil grupların uzaklaştığı görülmektedir. Ayrıca bu bileşiğin ^{13}C-NMR spekturumuna baktığımızda Şekil 3.32 173.3 ppm de C=O karbonil karbonuna ait pikler yapıyı desteklemektedir.





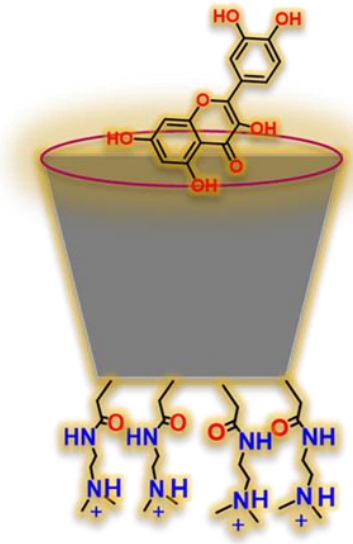
Şekil 3. 27 *p*-sülfokaliks[4]arenler tetra amit türevinin (**15**) ^{1}H-NMR spektrumu



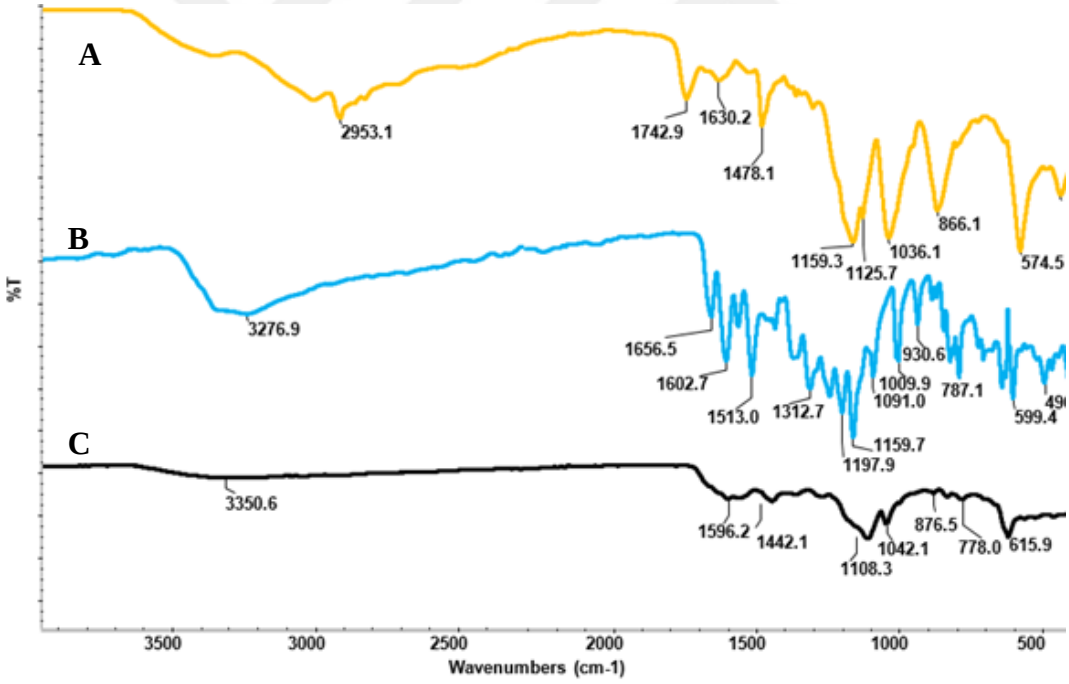
Şekil 3. 28 *p*-Sülfokaliks[4]arenler tetra amit türevinin **(15)** ^{13}C-NMR spektrumu

3.3.1. *p*-Sülfokaliks[4]arenlerin kuersetin ile kompleksleştirilmesi

Şema 3 te sentez şeması verilen *p*-sülfokaliks[4]aren (**15**) ile kuersetin arasındaki kompleksleşme çalışması literatürde yer alan mevcut metoda göre gerçekleştirildi (Valand ve ark., 2015). UV-Vis spektrum ölçümlerinde Kuersetinin maksimum absorbans dalga boyu 370 nm de gözlendi. Literatürde (Nifli ve ark., 2007) kuersetinin fizyolojik koşullarda 488 nm de ekzitasyonu ve 525-540 nm civarında emisyon ışıması yaptığı bilindiğinden bu bileşikle hücre çalışmalarında harici bir boya molekülü kullanılmadı. Kuersetinin bu fluoresans özelliği hücre içi sistemlerde farmakolojik açıdan uygun bir geçiş ve kantitatif izleme imkanı vermektedir.



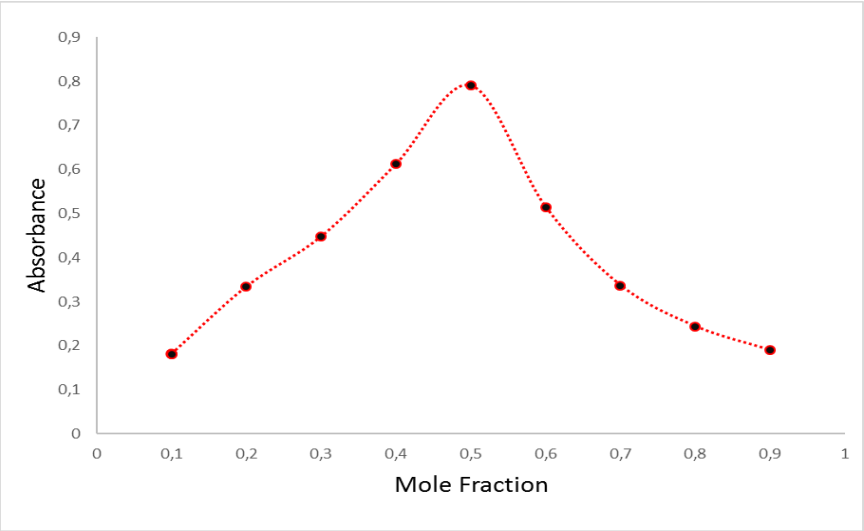
Şekil 3. 29 *p*-Sülfokaliks[4]aren(**15**)-Kuersetin kompleksleşme modeli (**15-Q**)



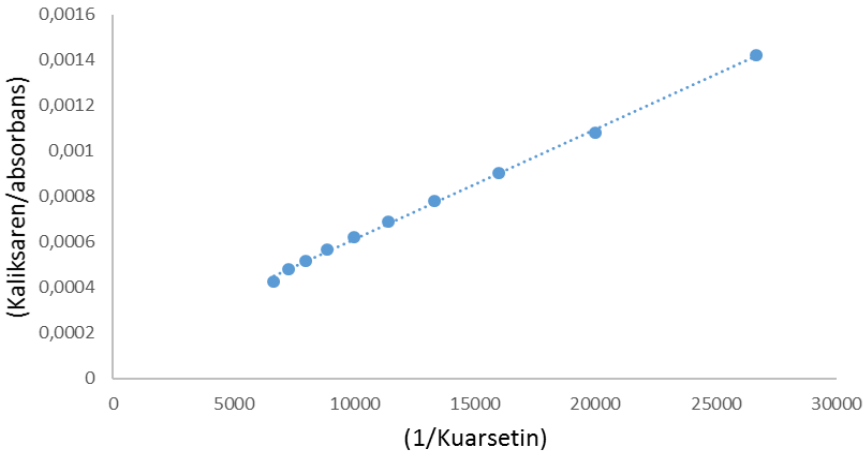
Şekil 3. 30 (A) *p*-sülfokaliks[4]aren (**15**), (B) Kuersetin and (C) 15-Kuersetin kompleksi (**15-Q**)

Bu çalışmalara ilaveten kompleksleşme parametrelerini belirlemek amacı ile *p*-sülfokaliks[4]aren (**15**) bileşiği ile kuersetin arasındaki kompleksleşme çalışmalarına ilave çeşitli spektroskopik araştırmalar yapıldı.

Öncelikle Job plot metoduna göre kuersetin ile *p*-sülfokaliks[4]aren (**15**) arasındaki kompleksleşme oranları belirlendi (Şekil 3.31). Şekilden görüleceği gibi bu komplekslerde sülfokaliks[4]aren/kuersetin kompleksleşme oranı 1:1 olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkılarak Benesi-Hildebrand ifadesinden *p*-sülfokaliks[4]aren/kuersetin (**15-Q**) için denge sabiti için denge sabiti K= 3.37×10^3 l mol^{-1} olarak bulundu.



Şekil 3. 31 Job plot metoduna göre *p*-sülfokaliks[4]aren-kuersetin (**15-Q**) arasındaki kompleksleşme oranı



Şekil 3. 32 Benesi-Hildebrand metoduna göre *p*-sülfokaliks[4]aren-kuersetin'in (**15-Q**) kompleksleşme değerleri

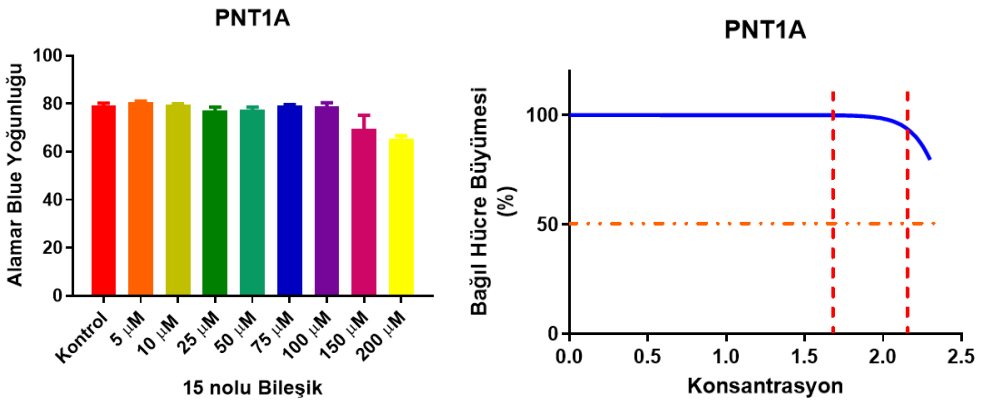
3.3.2. 15 ve 15-Q no'lu Bileşiklerin Sitotoksisite Çalışmaları

Sentezlenen bileşikler ve kontrol amaçlı kullanılan kuersetin molekülünün insan rahim kanseri hücre hattı HeLa üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmış olsa da öncelikle bu bileşiklerin diğer insan kanser hücreleri üzerine olası etkileri de araştırıldı. Bu amaçla akciğer kanser hücre hattı; A549, kolon kanser hücre hattı DLD-1, insan karaciğer kanser hücre hattı; HEPG2 ve insan prostat kanseri hücre hattı PC-3 hücreleri üzerine sentezlenmiş bileşiklerin sitotoksik etkileri incelenerek IC_{50} değerleri belirlendi. Tablo 3.1 de gösterildiği gibi sentezlenmiş olan bileşikler insan kanser hücreleri üzerine seçici bir sitotoksik etkiye sahip olup bu etkiler doza bağımlı olarak değiştiği bulundu. Hücre hatları öncelikle farklı dozlarda hazırlanan bileşikler ile 48 saat inkübasyonundan sonra hücre canlılığı Alamar blue reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi ve GraphPAD 5.0 yazılı kullanılarak sigmoidal grafikler elde edildi.

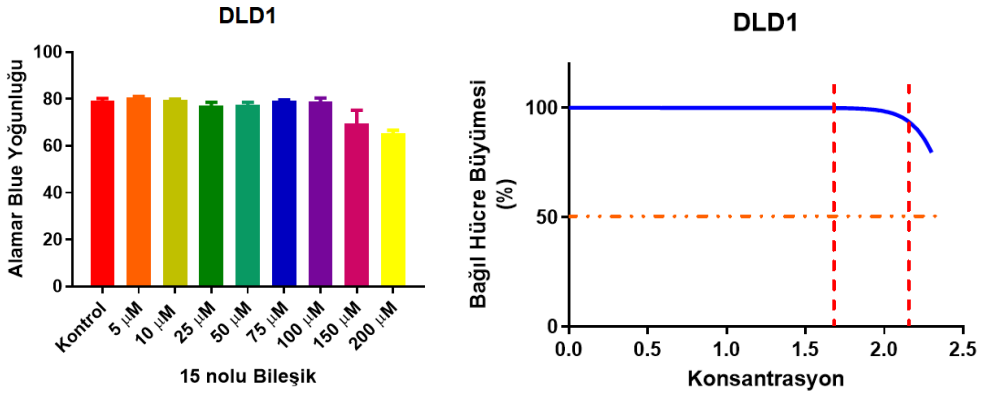
Tablo 3.1. 15, 15-Q ve Kuersetin bileşiklerin IC_{50} değerleri

Hücre Hattı	15 nolu Bileşik	15-Q nolu Bileşik	Kuersetin
PNT1A	>200μM	280 μM	-
DLD1	>200μM	83.4 μM	172.4 μM
HEPG2	>200μM	43.6 μM	79.2 μM
A549	>200μM	18.1 μM	-
HeLA	>200μM	11.2 μM	27.1 μM
PC-3	>200μM	70.4 μM	152.9 μM

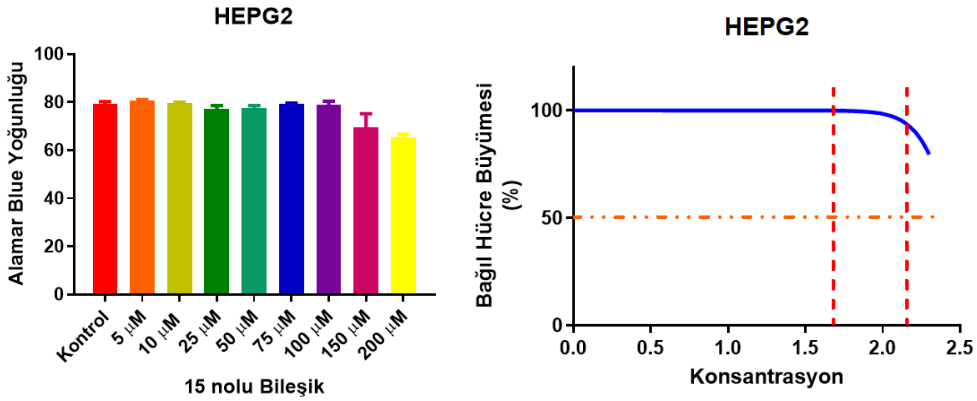
15 nolu bileşiğin DLD-1, A-549, HEPG2, PC-3, HeLA ve PNT1-A hücrelerinin proliferasyonunu doza bağımlı olarak etki etmediği bulundu. Elde edilen sigmoidal grafikler sonucunda IC_{50} değeri hesaplandı ve kullanılan bütün hücre hatlarında >200μM, olarak bulundu. Sağlıklı epitel hücresi ile birlikte ele alındığında **15** nolu bileşiğin toksik bir etkisinin olmadığı tespit edildi.



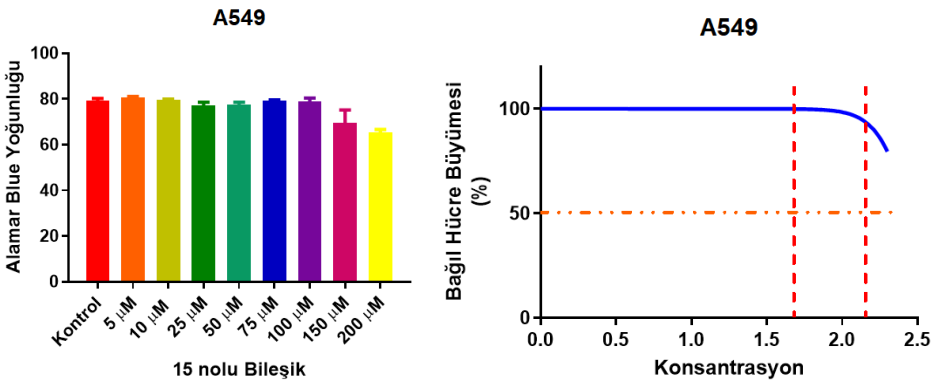
Şekil 3. 33 15 no'lu bileşiğin insan sağlıklı epitelyum hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



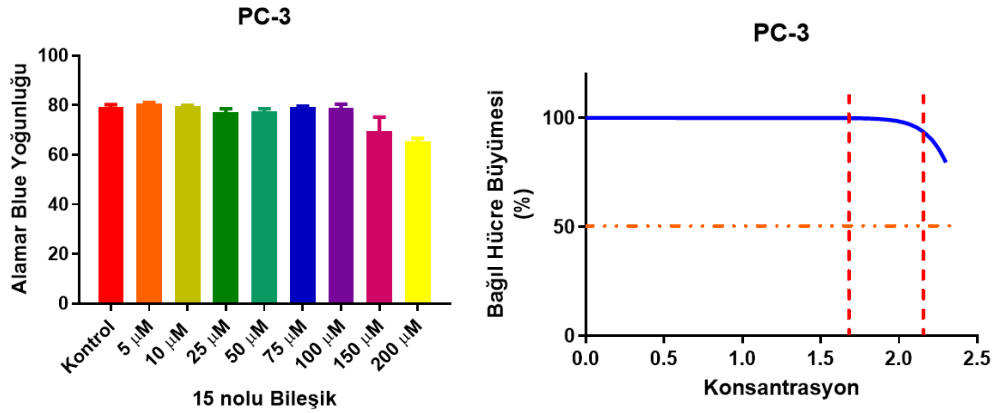
Şekil 3. 34 15 no'lu bileşiğin insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



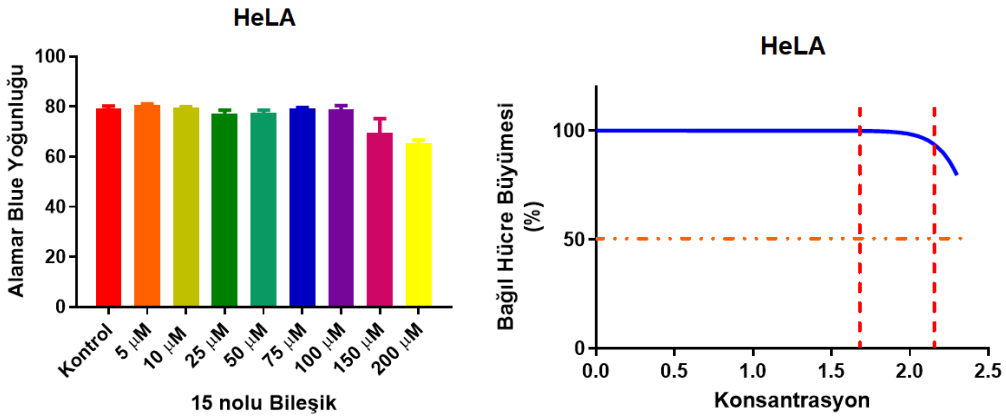
Şekil 3. 35 15 no'lu bileşiğin insan karaciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



Şekil 3. 36 15 no'lu bileşiğin insan akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



Şekil 3. 37 15 no'lu bileşiğin insan prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri

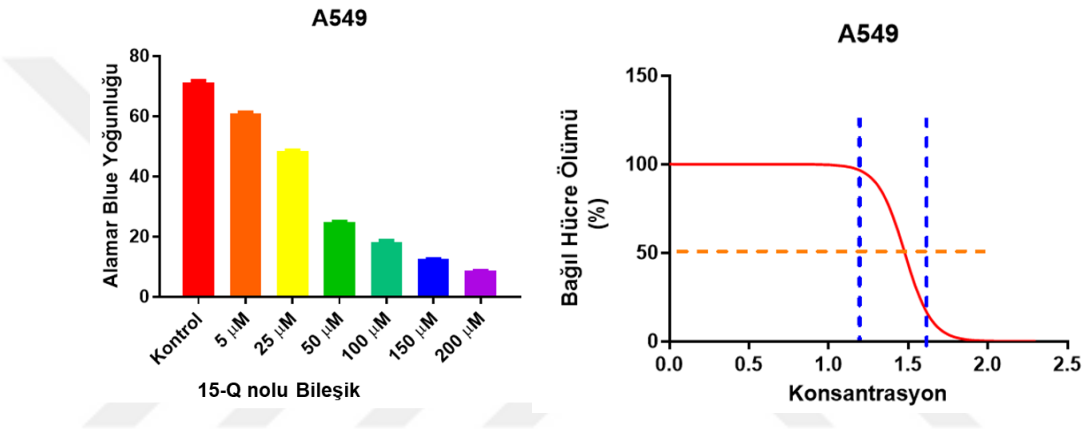


Şekil 3. 38 15 no'lu bileşiğin insan rahim kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri

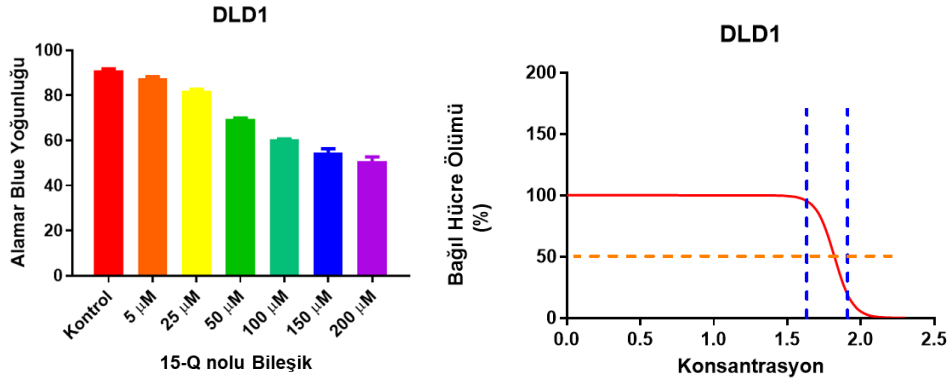
15 nolu bileşik hem taşıyıcı hem de kuersetinin suda çözünürlüğünü arttırmak amacıyla sentezlenmiştir ve kompleks bileşik olan **15-Q**' nun da sitotoksik etkileri incelenmiş olup 15 nolu bileşiğin IC_{50} değeri >200µM olarak hesaplanmıştır. Bu bileşik kuersetin ile kompleks yaptığı zaman oluşan **15-Q** kompleksinin IC_{50} hesaplanmıştır.

Kuersetin ile kıyaslandığında **15-Q** bileşiğinin insan rahim kanseri hücre hattı HeLA üzerine 2.98 kat daha sitotoksik etiye sahip olduğu belirlenmiştir.

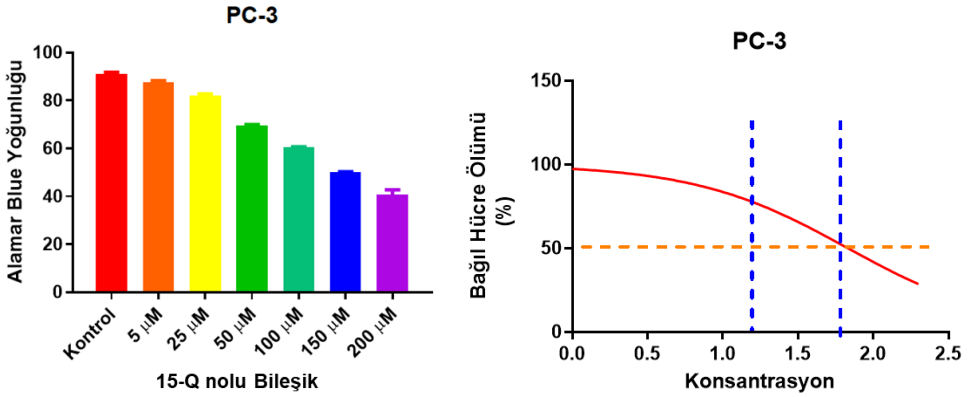
15-Q nolu bileşiğin çeşitli insan kanseri hücre hatları (DLD-1, A-549, HEPG2, PC-3, HeLA ve PNT1-A) üzerindeki IC_{50} değeri hesaplandı ve sonuçlar sırasıyla, 83.4 µM, 18.1 µM, 43.6 µM, 70.4 µM, 11.2 µM ve 280 µM olarak bulundu. Sağlıklı epitel hücresi ile birlikte ele alındığında **15-Q** nolu bileşiğin akciğer, karaciğer ve rahim kanseri hücre hatları olan A549, HEPG2 ve HeLA hücreleri üzerine önemli ölçüde sitotoksik etkiye sahip oldukları bulundu.



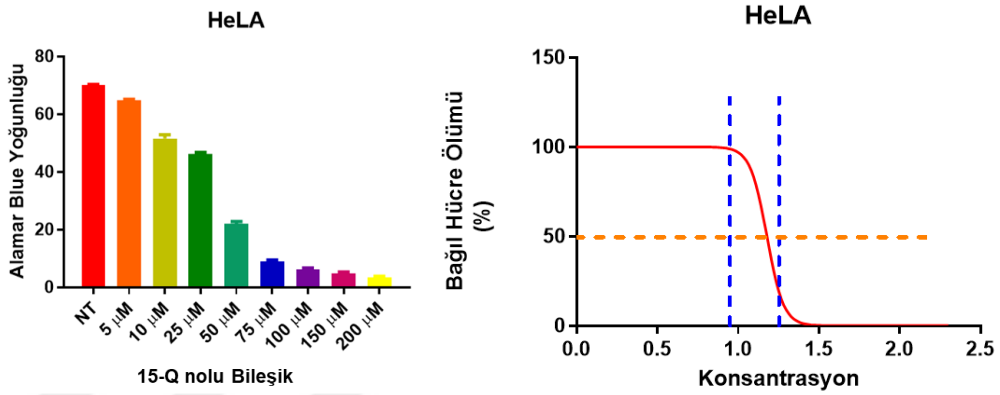
Şekil 3. 39 15-Q no'lu bileşiğin insan akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



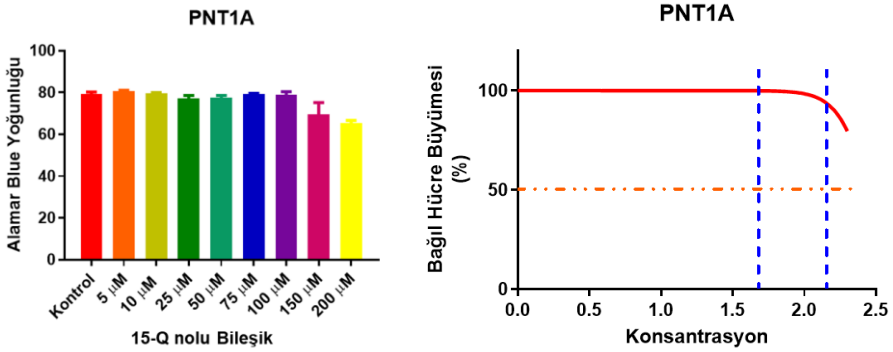
Şekil 3. 40 15-Q no'lu bileşiğin insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



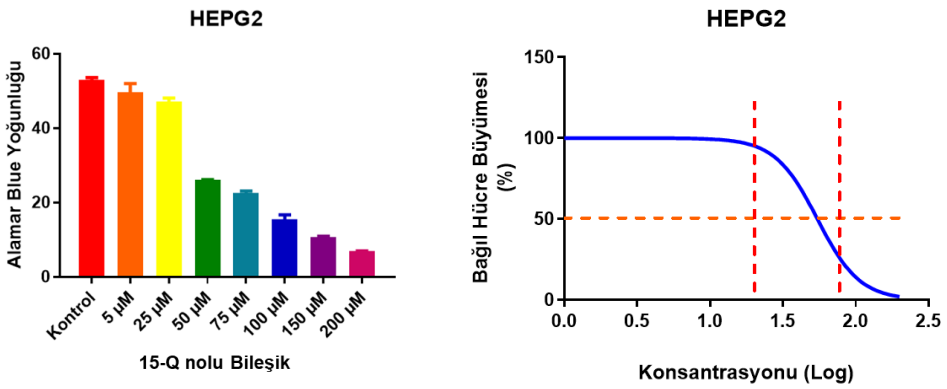
Şekil 3. 41 15-Q no'lu bileşiğin insan prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



Şekil 3. 42 15-Q no'lu bileşiğin insan rahim kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



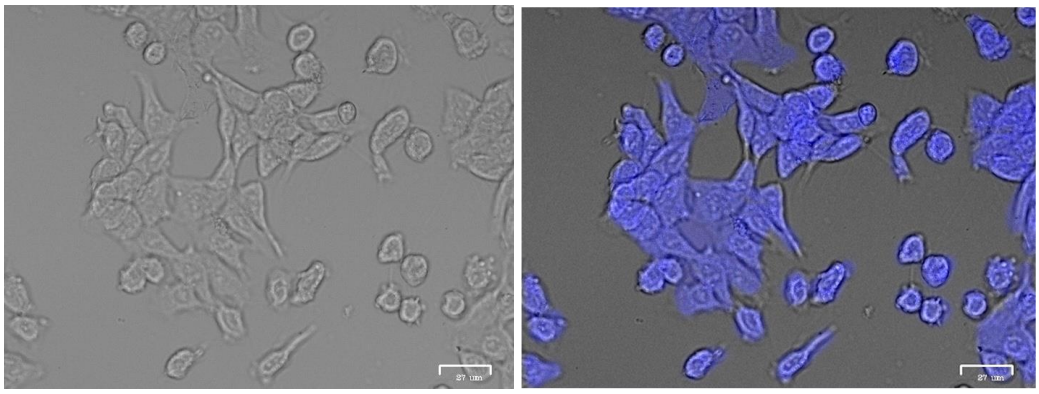
Şekil 3. 43 15-Q no'lu bileşiğin insan sağlıklı epitelyum hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



Şekil 3. 44 15-Q no'lu bileşiğin insan karaciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri

3.3.3. Hücre Görüntüleme Çalışması

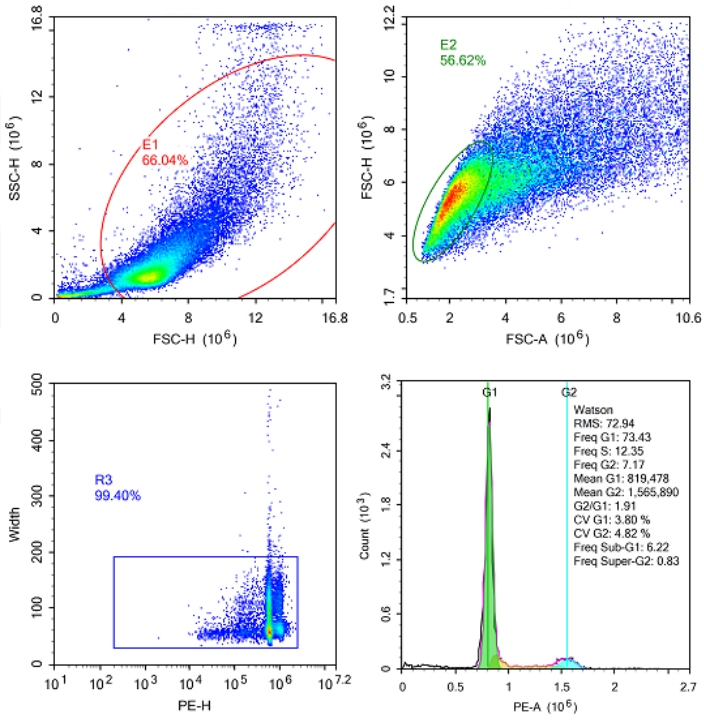
İnsan rahim kanseri hücre hattı HeLa üzerine sitotoksik etkileri belirlenen **15-Q** kompleksinin hücre içinde lokalizasyonunu belirlemek amacıyla hücre içi görüntüleme çalışmaları flouresans mikroskop yardımıyla gerçekleştirildi. Hücreler üzerine 10 µM **15-Q** kompleksi ilave edildikten sonra hücreler 45 dakika 37°C 'de %95 nem ve %5 CO_2' li ortamda inkübe edildi. Hücre içine girmeyen kompleks bileşikler 10 mM PBS kullanılarak yıkandı. TASQ ile muameleden sonra kompleks bileşiklerin hücre içindeki görüntüleri Şekil 3.45 te verilmiştir. Elde edilen görüntüler incelendiğinde **15-Q**' nun hücre içerisinde sitoplazmik bölgede yoğunlaştığı nuklear bölgeye geçmedikleri belirlendi.



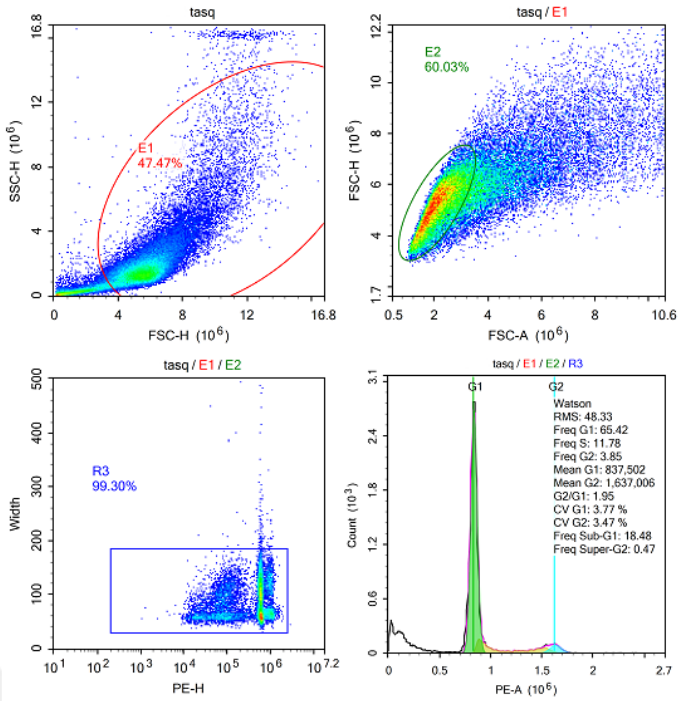
Şekil 3. 45 15-Q no'lu bileşiğin insan rahim kanseri HeLa hücresin ışık mikroskobunda hücre içi görüntülemesi

3.3.4. Apoptoz Çalışması

15-Q nolu bileşiğinin HeLa hücrelerinin hücre döngüsü üzerine etkileri flow sitometrik yöntemler ile aydınlatıldı. **15-Q** bileşiğinin hücre döngüsü üzerine etkileri incelendiğinde hücreyi apoptoza sürüklediği görüldü. Flow sitometrik olarak hücre döngüsü üzerinde meydana gelen değişimler incelendiğinde özellikle **15-Q** nolu bileşiğin hücreyi apoptoza sürüklediği görüldü ve HeLa hücrelerinin DNA'sını özellikle G1 fazından sonra fragmenlere ayırdığı ve aopototik cisimciklerin miktarında 2 kat bir artış olduğu belirlendi.



Şekil 3. 46 HeLa hücresinde Hücre döngüsü analizi

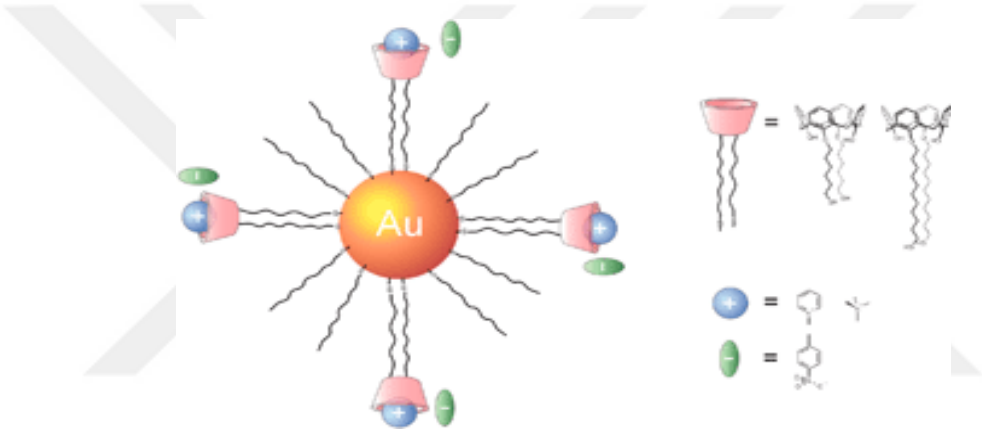


Şekil 3. 47 15-Q no'lu bileşik ile muamele sonrasında HeLa hücrelerinde hücre döngüsünde meydana gelen değişimler

4. BÖLÜM-3: ALTIN NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZE EDİLEN KALİKSARENLER

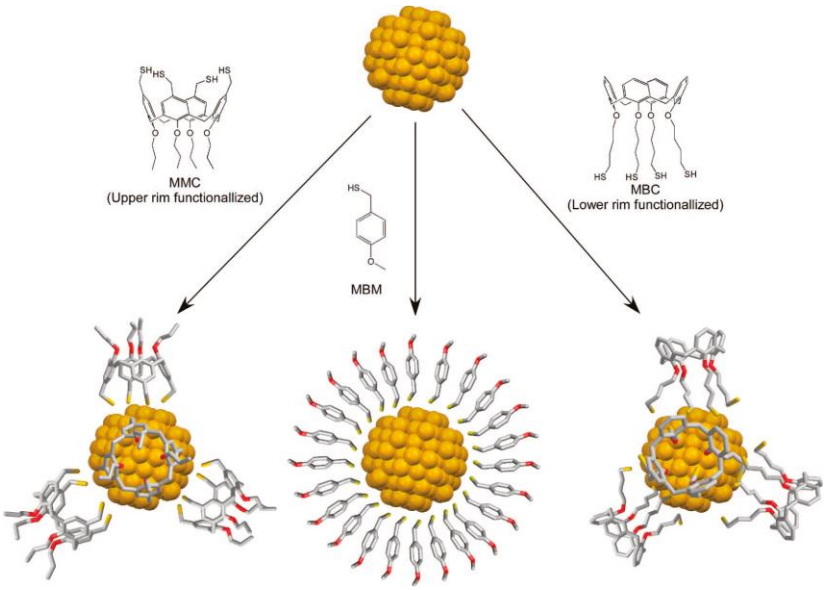
4.1. KAYNAK ARAŞTIRMA

Arduini ve arkadaşları kuaterner amonyum katyonlarının tespiti ve tanınması için geliştirdikleri kalikasaren taşıyan nano materyalin apolar çözelti ortamında iyon çiftindeki iyonlar arasındaaki etkileşimi azalttabilen, alternatif kompleks katyonların ve karşı iyonların varlığının tespiti için kullanılabilecek bir materyalin olduğunu belirtmişlerdir (Arduini ve ark., 2005).



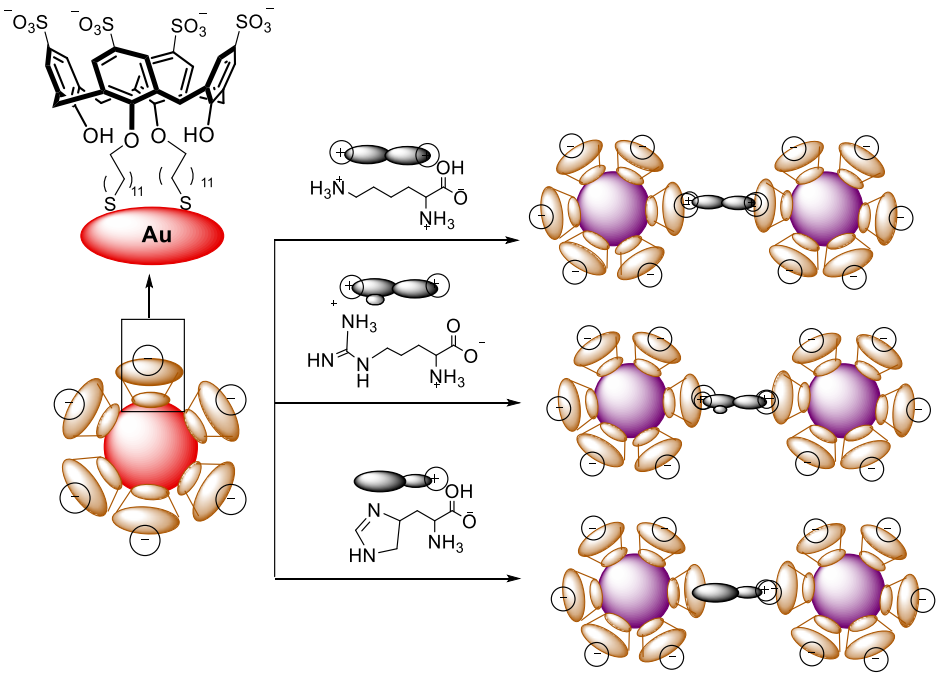
Şekil 4. 1 Kuaterner amonyum katyonlarının tespiti ve tanınması için geliştirdikler kalikasaren taşıyan nano materyali

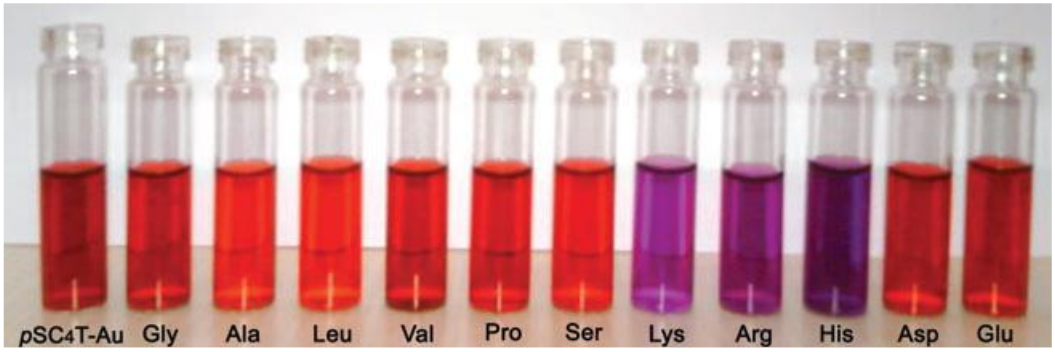
Ha ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada kaliks[4]arenin farklı bölgelerden (upper rim ve lower rim) tiyol grupları ile fonksiyonlandırılmış merkapto-kaliksarenler (MMC ve MBC) sentezlemişler ve bu bileşikleri altın nanopartiküllerin sentez aşamasında doğrudan yüzeye immobilize etmişler ve π elektronlarınca zengin kaliksaren boşluklarının nanopartikül sentezindeki rolünü araştırmışlardır. Ayrıca bu çalışmalara ilaveten altın nanopartikül sentezinde bir monomer (MBM) kullanarak tiyol gruplarının altın nanopartikül yüzeyine immobilizasyonunda kaliksarenlerin rolünü araştırmışlardır (Ha ve ark., 2009).



Şekil 4. 2 Tiyol grupları ile fonksiyonlandırılmış merkapto-kaliksarenler

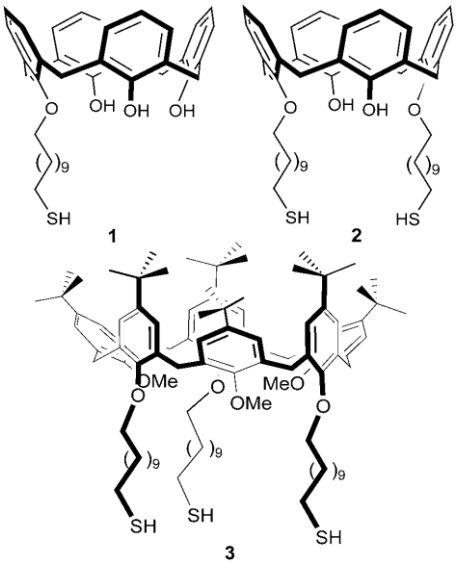
Bir diğer literatür çalışmasında kaliksaren ile fonksiyonlu altın nanopartiküller sulu ortamda amino asit sensörü olarak kullanılmıştır. Patel ve Menon'un 2009 yılında yaptıkları bu çalışmada geliştirilen nano materyalin özellikle lizin, arginin ve histidin amino asitlerine karşı oldukça hassas bir seçici etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca yapılan bu çalışmalara göre amino asit probunun bu üç amino asite karşı kolorimetrik etki göstediğini belirtmişlerdir (Patel ve Menon, 2009).





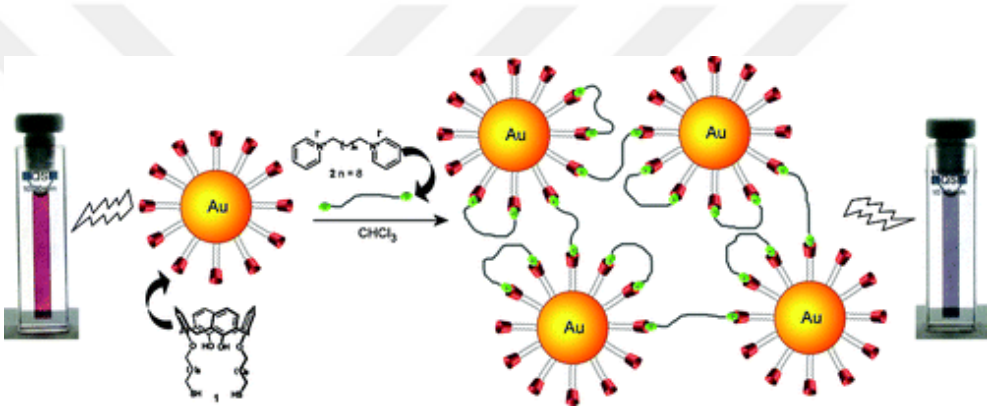
Şekil 4. 3 Kaliksaren ile fonksiyonlu altın nanopartiküller sulu ortamda amino asit sensörü olarak kullanılmının şematik gösterimi

Pescatori ve arkadaşları, farklı sayıda tiyol zincirleri içeren kaliks[n]aren ligandları sentezlemişler ve daha sonra bu kalikaren türevlerini altın nanoparçacık (AuNP) sentezinde stabilize edici ajan olarak kullanmışlardır. Nanopartikül hazırlanmasında iki faz metodunu (Brust-Schiffrin) kullanmışlardır. Sentezlenen materyallerin yapıları NMR spektroskopisi, element analizi, transmisyon elektron mikroskopis ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) gibi çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak karekterize etmişlerdir. Deneysel verilere göre kaliks[n]aren türevleri 2 ve 3 numaralı bileşiklerin çok yönlü özel yapısının, çok küçük (1-10 nm) boyutlarda altın nanpartikül hazırlanmasında önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar nanoparçacıkların tanecik boyutunun belirlenmesinde ligand konsatrasyonun rolünü açıklayan ilk çalışma olduğunu belirtmişlerdir (Pescatori ve ark., 2010).



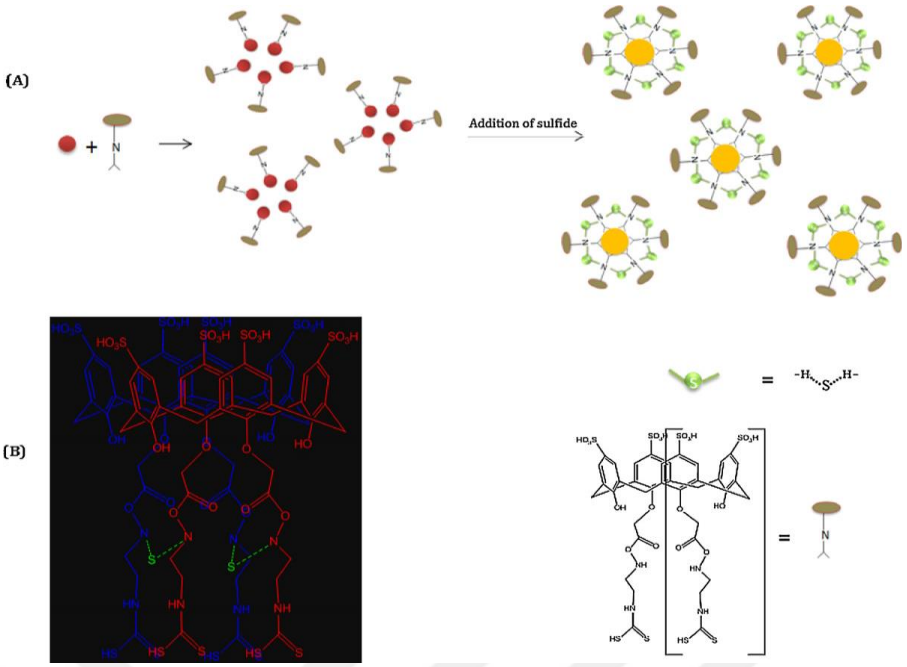
Şekil 4. 4 Farklı sayıda tiyol zincirleri içeren kaliks[n]arenlerin yapısı

Ciesa ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada, ortalama çekirdek büyüklüğü 6 nm olan tetrakosil amonyum bromür kullanarak, toluene içerisinde altın nanoparçacıklar sentezlemişler ve tiyolat türevli kaliks[4]arenlere immobilize etmişlerdir. Düşük polar çözücülerde, bu kaliks[4]aren kaplı nanopartiküller, dialkil dipiridinyum bazlı konuklarla supramoleküler etkileşimler yoluyla kendi kendine toplanabildiğini söylemişlerdir. Nanopartiküller arasındaki konuk kaynaklı kendi kendine toplanma süreci UV-vis spektroskopisi, dinamik ışık saçılması ve TEM ölçümleri kullanılarak incelemişlerdir. Oluşan agregatların boyutu ve çözünürlüğü, nanopartiküller arasında "supramoleküler bağlayıcı" olarak kullanılan piridinyum türevli konuğun zincir uzunluğuna ve sertliğine bağlı olduğunu belirtmişlerdir (Ciesa ve ark., 2010).



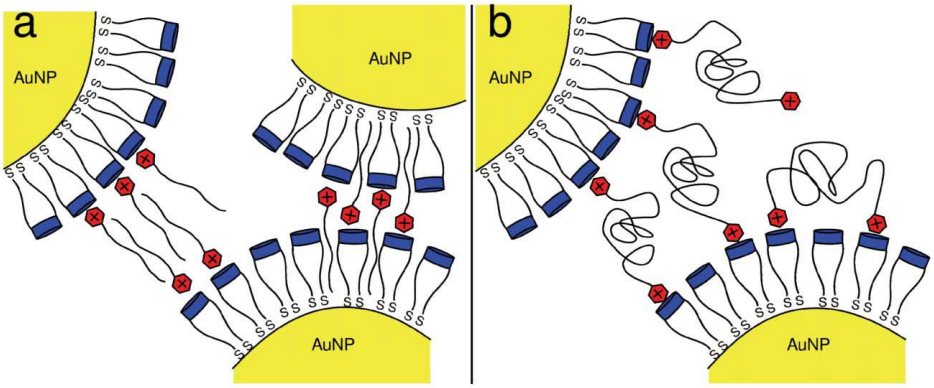
Şekil 4. 5 Tetrakosit amonyum bromür kullanılarak altın nanoparçacıklar ve tiyolat türevli kaliks[4]arenler

Pandaya ve arkadaşlarını 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada, altın nanoparçacıklara (AuNP) immobilize edilmiş suda çözünen ve sülfo gurubu taşıyan kaliks[4]aren türevleri kullanılarak H-bağları yoluyla etkili ve seçici bir şekilde bir kolorimetrik sülfür sensörü tasarlamışlar ve sentezlemişlerdir. Sentezlenen molekülleri TEM, DLS, UV-vis, FT-IR ve ^{1}H NMR spektrometrisi gibi teknikler kullanarak karakterize etmişlerdir. Sülfit tayini için optimum aralık pH 7 ila 10 arasında olduğunu ve minimum saptama sınırının 10 nM olduğu bulmuşlardır. Basit olan bu yöntem ile atık sulardan sülfürün belirlenmesinde başarılı bir şekilde uygulanabileceğini bildirmişlerdir (Pandya ve ark., 2012).



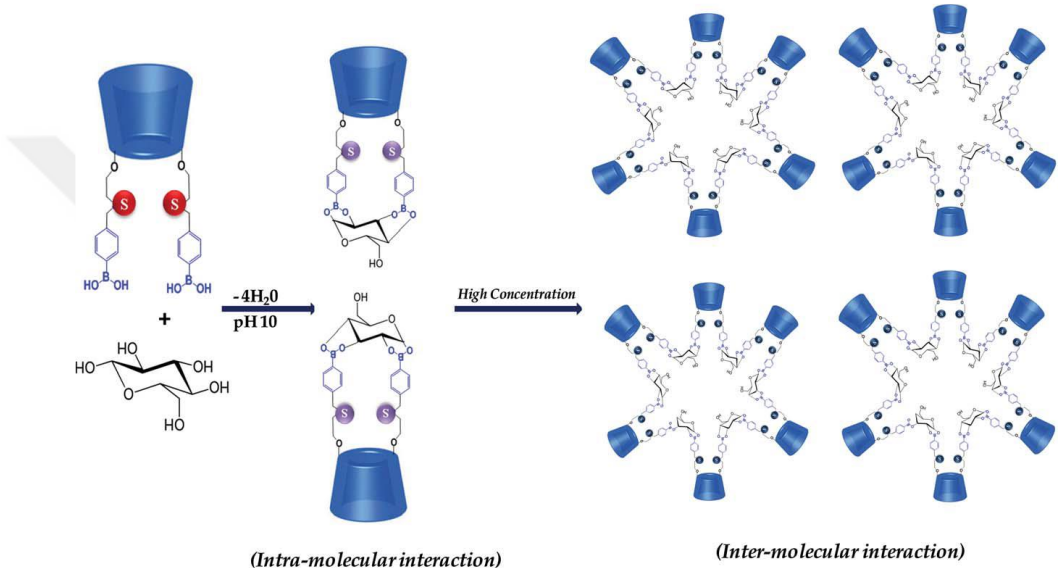
Şekil 4. 6 Altın nanoparçacıklara (AuNP) immobilize edilmiş suda çözünen ve sülfo gurubu taşıyan kaliks[4]aren türevleri

Pulkkinen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kaliksaren ile kaplanmış altın nanopartiküllerin piridinyum modifiye edilmiş bir polietilen oksit (Pyr-PEO2k-Pyr) polimeri ve küçük bir 16 karbon piridinyum bileşiği (Pyr-C16) ile kompleksleşmesini incelemişlerdir. Gerçekleşmesi beklenen kompleksleşme çalışmasını NMR ve Işın saçılma (LS) tekniklerini kullanırak karekterize etmişlerdir. Yapılan çalışmalar neticesinde kaliksaren altın nanopartiküllerin özellikle uzun zincirli piridinyum türevli bileşiklerin kompleksleşme kabiliyetini veya seçiciliğini düşürdüğünü belirtmişlerdir (Pulkkinen ve ark., 2013).



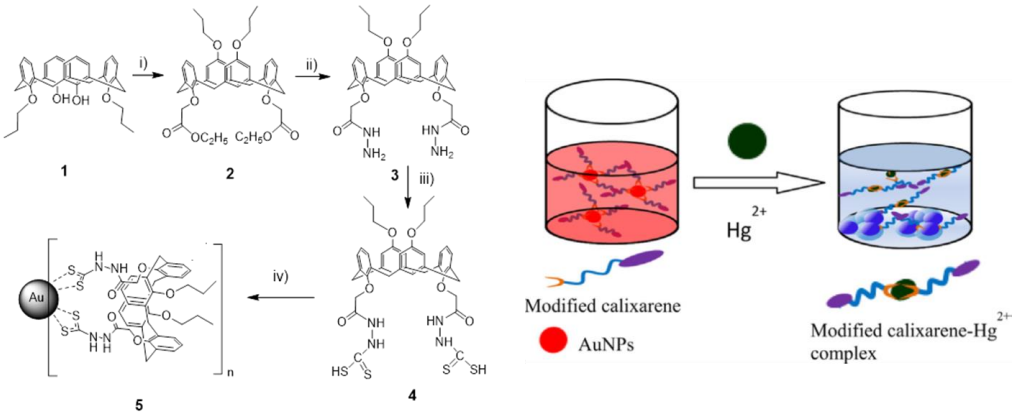
Şekil 4. 7 Kaliksaren ile kaplanmış altın nanopartiküllerin piridinyum modifiye edilmiş bir polietilen oksit (Pyr-PEO2k-Pyr) polimeri

Yapılan bir diğer çalışmada, glikozun kolorimetrik tespiti için yeni, gelişmiş, basit ve enzimatik olmayan bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Boronik asit türevli kaliks[4]aren sentezlenmiş ve bu türevler altın nanopartiküllere immobilize edilmiştir. Hazırlanan bileşiklerin yapısı transmisyon elektron mikrografı (Nifli ve ark.), dinamik ışık saçılımı (DLS), UV-Vis, FT-IR, ESI-MS ve ^{1}H NMR spektrometrisi ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen bu moleküler reseptör, diol grubu içeren bileşikleri geri dönüşümlü bir şekilde bağlama yeteneğinden dolayı glikozu yetkin ve seçici bir şekilde tespit ettiği belirtilmiştir (Pandya ve ark., 2013).



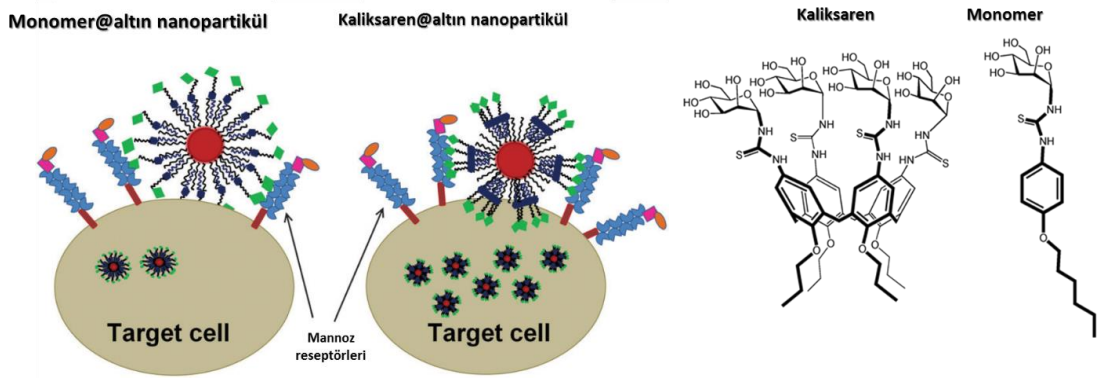
Şekil 4. 8 Boronik asit türevli kalik[4]aren ve altın nanopartiküllere immobilize edilmelerinin şematik gösterimi

2014 yılında yapılan bir başka çalışmada ise Maity ve arkadaşları, ditiyokarbamat türevli kaliksarenlere immobilize edilmiş ve suda çözünebilen altın nanopartiküller sentezlemişler ve bu materyalin sulu ortamda metal sensörü çalışmalarını yapmışladır. Yapılan çalışmalar sonucunda sentezlenen nanopartüküllerin sadece civa iyonuna karşı gözle görünebilen kolorimetrik bir seçicilik göstediğini belirtmişlerdir. Ayrıca hazırlanan materyalin farklı pH değerlerinde kararlı bir yapıya sahip olduğunu açıklamışlardır (Maity ve ark., 2014).



Şekil 4. 9 Ditiyokarbamat türevli kaliksarenler immobilize edilmesi ve suda çözünebilen altın nanopartiküller

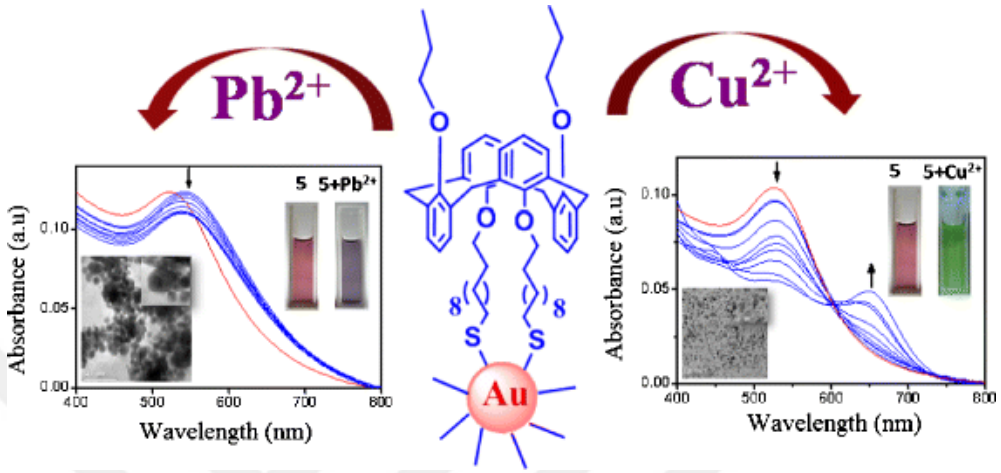
2014 yılında Avvakumova ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada dört mannoz grubu taşıyan gliko-kaliksaren ile modifikasyon edilmiş altın nanopartiküller kullanılarak kanser hücrelerine karşı hedefleme amacıyla yeni bir çalışma gerçekleştirdiklerini rapor etmişlerdir. Yapılan deneysel çalışmalar neticesinde çok değerlikli nanoparçacıkların hedefleme etkinliğinin, bir mannoz grubu taşıyan monomere, taşıyan nanoparçacıklara kıyasla önemli ölçüde daha etkin olduğunu ve daha fazla reseptörlerle etkileşime girdiğini belirtmişlerdir (Avvakumova ve ark., 2014).



Şekil 4. 10 Dört mannoz grubu taşıyan gliko-kaliksaren ile modifikasyon edilmiş altın nanopartiküller

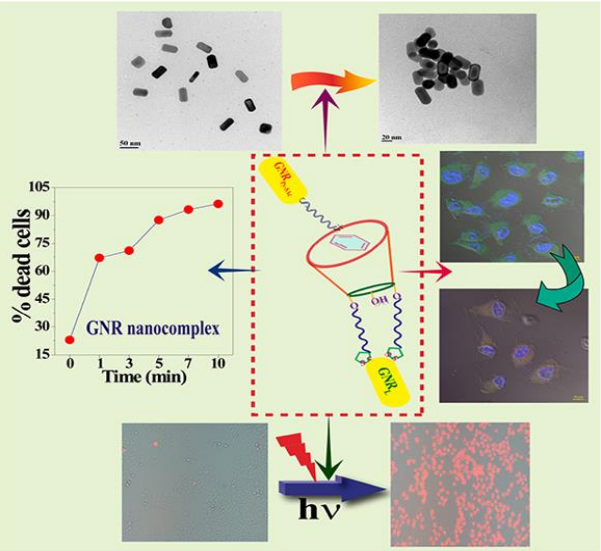
2014 yılında Gunupuru ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir metal sensörü çalışmasında kaliks[4]aren ile modifiye edilmiş altın nanopartiküller sentezlemişler ve sentezledikleri nano probların yapılarını çeşitli spektroskopik yöntemler kullanarak karekterize etmişlerdir. Daha sonra çoklu metal iyonlarının olduğu bir ortamda Cu^{+2} ve

Pb^{+2} iyonlarına karşı kolorimetrik olarak seçici olduğunu tespit etmişlerdir. Nanopartiküllerin boyutu ve agregasyonunu HR-TEM metodu ile analiz etmişlerdir. İki iyon ile oluşan kompleksin yapısını ve bu iyonların varlığını tespit emek için element analizi ve her iki metal iyonu için EDX analizi yapmışlardır (Gunupuru ve ark., 2014).



Şekil 4. 11 Kaliks[4]aren ile modifiye edilmiş altın nanopartiküller

Nag ve ekibininin 2018 yılında yaptıkları çalışmada kalikasranenin fenolik-O bölgesinden 1,3 poziyonunda lipoik asit ile türevlendirilmiş yeni bir kaliks[4]aren türevi sentezlemişler ve yapısını çeşitli yöntemlerle karekterize etmişlerdir. Daha sonra yapıdaki lipoik asit yardımıyla bu kaliksaren türevini altın nanopartikül yüzeyine immobilize etmişlerdir. Hazırlanan materyal piridinyum içeren moleküller ile komplekslerini hazırlamışlar ve konfokal lazer mikroskopu kullanarak materyalin piridinyum moleküllerin varlığından dolayı hücrenin mitokondrisine hedefli olarak taşındığını gözlemlemişlerdir. Çalışmanın devamında altın nanopartikülleririn yardımıyla hem hücre görüntüleme çalışması yapmışlar hemde lazer ışıma oluşturarak tümörlü hücrelerin %95 inin öldüğünü tespit etmişlerdir (Nag ve ark., 2018).



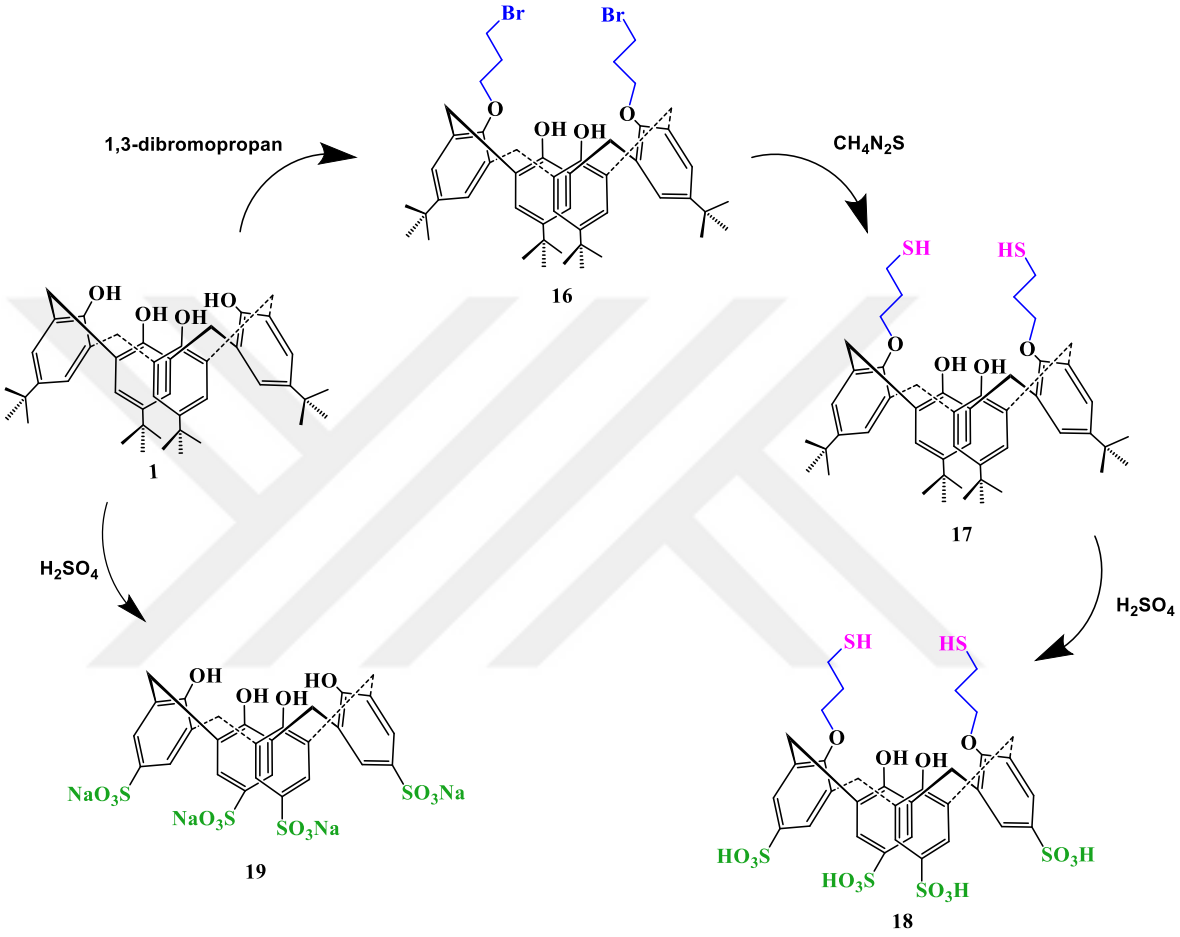
Şekil 4. 12 Lipoik asit ile türevlendirilmiş yeni bir kaliks[4]arenler ve altın nanopartiküle immobilize edilmesinin şematik gösterimi

Bu çalışmalar ışığında, yola çıkarak tezin bu son bölümünde nano ilaç taşıyıcı bir materyal sentezlemek için tiyol grubları taşıyan ve suda çözünebilen kaliks[4]aren bileşiği sentezlenip tanecik boyutu yaklaşık 3-5 nm olan altın nanopartiküllere immobilize edildi. Sonrasonda kuersetin flavonodi ile kompleksleştirilerek hem kuersetin bileşiğinin sudaki çözünürlüğünün hemde sitotoksik etkilerinde nasıl bir değişim olduğu araştırıldı.

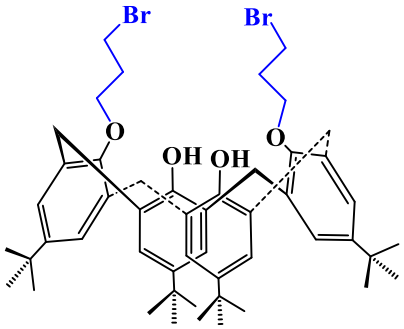
4.2. MATERYAL VE YÖNTEM

4.2.1. Kimyasal Sentezler

Şema-4:



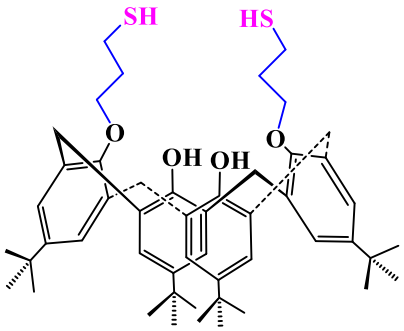
4.2.1.1. 25,27-Bis(3-bromopropoksi)-26,28-dihidroksi-5,11,17,23-tetra(*ter*-bütil)-kaliks[4]aren (Li ve ark., 1999)



16

250 mL 'lik iki boyunlu balona N_2 atmosferi altında *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (3.23 g, 5.0 mmol), K_2CO_3 (1.52 g, 11.0 mmol) ve 1,3-dibrompropan (10.1 g, 0.05 mol) alındı ve üzerine 125 mL kuru CH_3CN ilave edildi. Oluşan süspansiyon dört gün geri soğutucu altında kaynatıldı. İTK ile izlenerek bitirilen reaksiyon oda sıcaklığına getirildi ve çözücü uçuruldu. 50 mL CH_2Cl_2 ile katının çözünmesi sağlandı. Ardından önce 50 mL 3M HCl sonra 50 mL 0.5 M HCl çözeltisi ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz $MgSO_4$ üzerinden kurutuldu ve süzüldü. Daha sonra CH_2Cl_2 tamamen uçurularak elde edilen kalıntı 2 defa 10 mL EtOH ile yıkandı. Kalan katı 40 mL CH_2Cl_2 de tekrar çözülür ve çözünmeyen safsızlıklar süzülerek uzaklaştırıldı. Süzüntü 25 mL' ye kadar konsantre hale getirildi. Elde edilen katı $CHCl_3/CH_3OH$ karışık çözücü sisteminden yeniden kristallendirilerek beyaz kristal olarak elde edildi. Verim %70 (2.05 g). E.N.: 289 ^oC (Lit., 288 – 290 ^oC). ^1H NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 1.00 (s, 18H, C(CH_3)$_3$, 1.28 (s, 18 H C(CH_3)$_3$), 2.52 (p, 4H, *J*= 6.0 Hz, $BrCH_2CH_2OAr$) , 3.32 (d, 4H, *J*= 13.0 Hz, ArCH_2AR), 3.99 (t, 4H, *J*= 6.5 Hz, CH_2Br), 4.10 (t, 4H, *J* =5.3 Hz, CH_2O), 4.26 (d, 4H , *J*= 13.0 Hz, $ArCH_2Ar$), 6.86 (s, 4H,Ar*H*), 7.07 (s,4H,Ar*H*,) 7.55 (s, 2H ,ArO*H*).

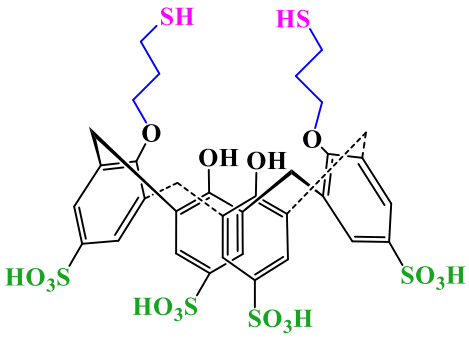
4.2.1.2. 25,27-Bis(3-tiyopropoksi)-26,28-dihidroksi-5,11,17,23-tetra(*ter*-bütil)-kaliks[4]aren (Ha ve ark., 2009)



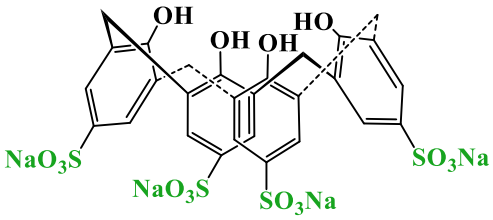
17

0.5 g (0.561 mmol) 25,27-Bis(3-bromopropoksi)-26,28-dihidroksi-5,11,17,23-tetra(*ter*-bütil)-kaliks[4]aren ve 0.14 g, (1.88 mmol) tiyoüre, 40 mL CH_3CN içerisinde geri soğutucu altında refluks edildi. Reaksiyona 45 saat devam edildi. Reaksiyon İTK ile izlendi. (CH_2Cl_2/hekzan,1:1). Reaksiyon sonunda çözücü kuruluğa kadar evapore edildi ve karışıma 0.19 g KOH (3.423 mmol) in 40 ml sudaki çözeltisi ilave edilerek 2 saat süre ile refluks edildi. Ürün karışımı önce 1 M HCl ile yıkanıp daha sonra $CHCl_3$ ile ekstrakte edildi. Kuru $MgSO_4$ ile kurutuldu. Verim:% 55 EN: 203–205 ^oC. ^{1} H NMR (400 MHz $CDCl_3$): d 1.19 (s, 18H, Bu^t), 1.22 (s, 18H, Bu^t), 1.40 (yayvan s, 2H, –SH), 2.44(p, 4H, *J*=5.9 Hz,–CH_2–), 3.43 (d, 4H, *J* = 13.0 Hz, Ar–CH_2–Ar), 4.07 (t, 4H, *J* =6.47 Hz, –CH_2–S), 4.20 (t, 4H, *J* = 5.53 Hz, CH_2–O), 4.35 (d, 4H, *J* = 13.0 Hz, Ar–CH_2–Ar), 6.94 (s, 4H, ArH), 7.1 (s, 4H, ArH), 7.61 (s, 2H, –OH).

4.2.1.3. 18 ve 19 no'lu sülfo-kaliks[4]aren bileşiklerinin sentezi (Maity vd. 2015)



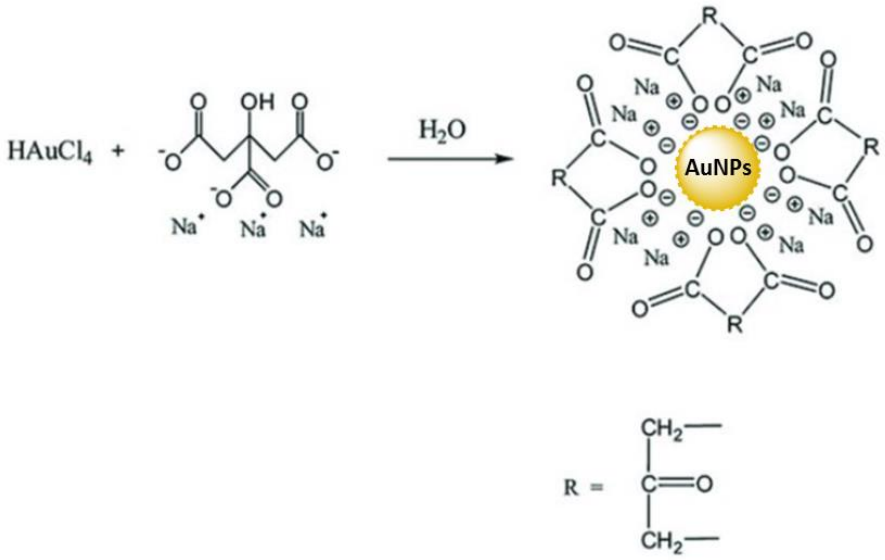
18



19

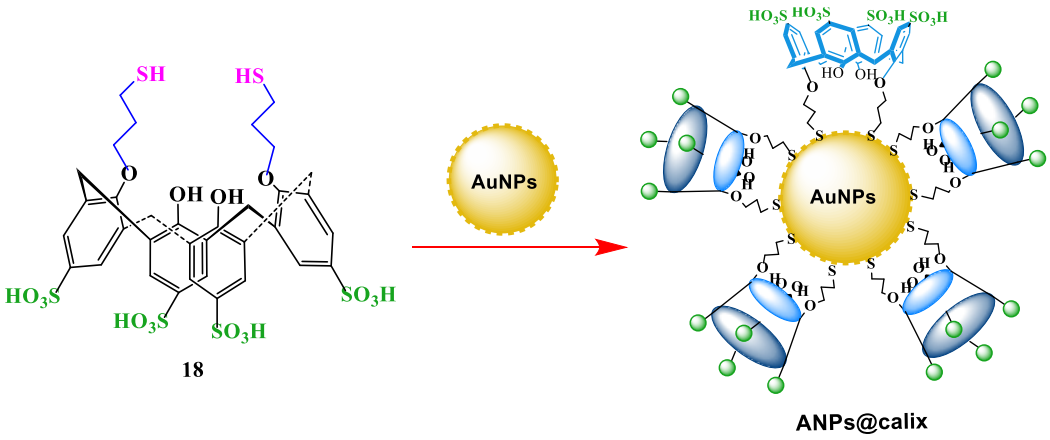
0.8 g (1.00 mmol) bileşikler (1) ve (17) alınarak dikkatli bir şekilde üzerlerine 5 mL derişik H_2SO_4 (%98) oda sıcaklığında ilave edildi ve 60 ^oC 4 saat karıştırılarak ısıtıldı. Reaksiyon ortamından bir miktar pastör pipeti ile alınarak sudaki çözünürlüğü test edilerek, sülfolama işlemi sonlandırıldı. Bu süre sonunda gözenek boyutu 4 olan cam filtreden süzüldü. Süzüntüye 2.5 mL soğuk CH_3OH ilave edilerek birkaç kez yıkandı. Bu yıkama işleminin sonunda toplam hacim 50 mL oluncaya kadar yıkamaya devam edildi. 0.5 g aktif karbon ilave edilerek çözeltinin rengi giderildi. Daha sonra 500 mL etilasetat ilave edilerek çöktürüldü. Çökelek süzüldü ve 40 ^oC de yüksek vakum altında kurutuldu. **18** nolu bileşik için verim: %40. FTIR (ATR): 2939 cm^{-1} C-H, 1592 cm^{-1} C=C, 1108 cm^{-1} ve 1034 cm^{-1} SO_2. ^1H NMR (400 MHz $CDCl_3$): δ 1.83 (s, 2H, S-H,), 2.32-2.66 (m, 4H, CH_2), 3.44-3.84 (m,8H, Ar-CH_2-Ar, CH_2-SH), 3.86-3.91 (m, 4H, O-CH_2), 7.29-7.85 (m, 8H, Ar-H). **19** nolu bileşik için; verim %80. ^1H-NMR (400 MHz, D_2O): δ 3.84 (s, 8H, Ar-CH_2-Ar), 7.49 (s, 8H, ArH).

4.2.1.4. Altın nanopartiküllerin hazırlanması (AuNPs): (Enustun ve Turkevich, 1963)



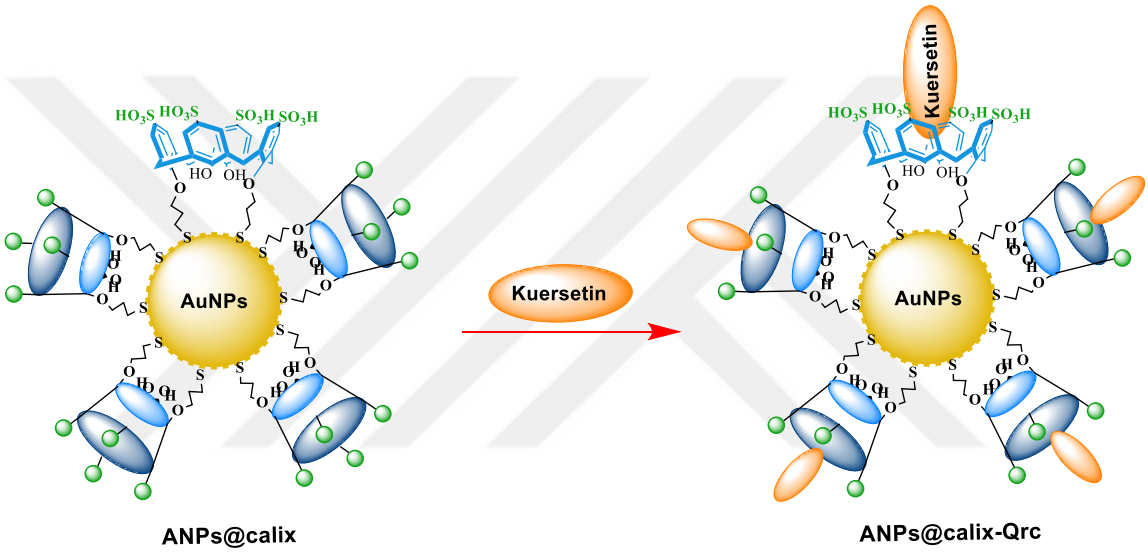
500 ml lik dibi yuvarlak bir balona 100 mg ($2{,}53x10^{-4}$) $HAuCl_4$ 'ün 250 ml sulu çözeltisi ilave edildi ve bir manyetik karıştırıcıda hızla karıştırıldı. Bunun üzerine 0.5 g sodyumsitratın 50 ml sulu çözeltisi ilave edildi. Çözeltinin başlangıçta rengi açık sarıdan bordo rengine döndü. Daha sonra karışım bir geri soğutucu altında bir mantolu ısıtıcıda 10 dk ısıtıldı. Bu süre sonunda 15 dk daha karıştırıldı. Çözelti oda sıcaklığına geldikten sonra 0.45 µm naylon filtreden süzüldü. Çözeltinin UV-vis spektrofotometredeki absorbsiyon dalga boyu 525 nm dir. Taramalı elektron mikroskobundaki partikül büyüklüğü yaklaşık 2 nm dir.

4.2.1.5. *p*-Sülfokaliks[4]arenin (18) altın nanopartiküllere immobilizasyonu (AuNPs@Calix)



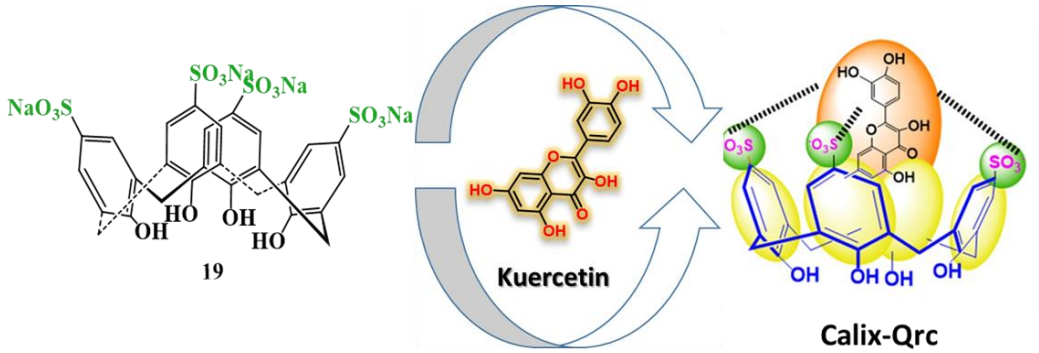
Yukarıda hazırlanan Altın nanopartikül (**AuNPs**) çözeltisine 2,23x10^{-4}mol *p*-sülfokaliks[4]aren bileşiği (18) ve ekivalent miktarda NaOH içeren çözelti hızla karıştırılarak ilave edildi. Karıştırma işlemi oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bir gece boyunca sürdürüldü. Daha sonra çözelti 0.45 µm naylon filtreden süzüldü ve çözeltinin UV-vis spektrofotometredeki absorbsiyon dalga boyu belirledi. Karekterizasyon işlemi DSC, DLS ve FTIR gibi teknikler kullanılarak belirlendi.

4.2.1.6. 18 nolu bileşiğin immobilize edildiği altın nanopartiküllere (AuNPs@Calix-Qrc) kuersetinin yüklenmesi



p-Sülfokaliks[4]aren bileşiği immobilize edildiği altın nanopartikül (**AuNPs@Calix**) çözeltisinin pH'ı 7.4 e ayarlandı ve bu nanopartiküldeki immobilize kaliksaren bileşiğinin oranı göz önüne alınarak 1:1,5 oranında Kuersetinin (**Qrc**) metanoldeki çözeltisi karıştırılarak ilave edildi. Karıştırma işlemi oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 1 saat süre ile devam ettirildi. Reaksiyon sonunda pH tekrar 7,4 e ayarlandı. Daha sonra çözeltideki metanol 40^{o}C de vakum altında destile edildi. Çözelti 0.45 µm naylon filtreden süzüldü, yüklenmeyen kuersetin miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi. Kuersetin yüklü nanopartikülün çözücüsü 40 ^{o}C de vakum altında kuruluğa kadar uçuruldu ve karekterizasyon işlemi DSC, DLS ve FTIR gibi teknikler ile yapıldı.

4.2.1.7. *p*-Sülfokaliks[4]aren-Kuersetin komplekslerinin hazırlanması (Calix-Qrc)



100 mg (0.1342 mmol) *p*-sülfokaliks[4]aren bileşikleri alınarak 20 ml suda çözülür ve çözeltinin pH'ı 7.4 e ayarlandı. Bu çözeltiye kaliksarene göre 1.5 mol oranında kuersetin 5 ml metanoldeki çözeltisi ilave edildi ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 1 saat süre ile karıştırıldı. Reaksiyon sonunda 40 ^{o}C de vakum altında metanol destile edildi. Geride kalan çözelti 0.45 µm naylon filtreden süzüldü, yüklenmeyen Kuersetin miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi ve Calix-Qrc' in çözücüsü 40 ^{o}C de vakum altında kuruluğa kadar uçuruldu ve kompleksin yapısı spektroskopik yöntemler ile karekterize edildi.

4.2.1.8. *p*-Sülfokaliks[4]aren-Kuersetin komplekslerinin stokiyometrik oranlarının belirlenmesi

Yaygın olarak kullanılan Job metodu kullanılarak *p*-sülfokaliks[4]aren bileşikleri ve kuersetin kompleksleşme oranları belirlendi. Bunu için her iki bileşiğin $1x10^{-4}$ M, çözeltilerinden faydalanılarak 1:9 dan 9:1 oranlarında hazırlanan çözeltilerin absorbansları spektrofotometrik olarak maksimum dalga boyunda ölçüldü. Bu değerlerden kaliks:kuersetin oranlarının her bir kaliksaren türevi için 1:1 olduğunda en yüksek olduğu gözlendi.

4.2.1.9. *p*-Sülfokaliks[4]aren-Kuersetin komplekslerinin etkileşme sabitinin tayini

Bunun için *p*-sülfokaliks[4]aren türevleri pH 7.5 de farklı oranlarda kuersetin ile tepkimeye sokularak Benesi ve Hildebrand, (1949) eşitliğine göre etkileşme sabiti hesaplandı (Benesi ve Hildebrand, 1949).

$$\frac{[D]_O}{Abs} = \left(\frac{1}{[A]_o}\right).\left(\frac{1}{\varepsilon K_a}\right) + \frac{1}{\varepsilon}$$

Bu eşitlikte $[D]_o$ kuersetinkonsantrasyonu, Abs maksimum dalga boyunda kompleksin absorbansı, $[A]_o$ p-sülfokaliks[4]aren konsantrasyonu, K_a kompleksin denge sabiti ,ε kompleksin molar absorblama katsayısı, $1/[A]_o$'a karşı [D]o/Abs grafiğe geçirilirse kesim noktası (1/ε) ve eğim ($1/K_a\varepsilon$) ve buradan $K_a$bulunur.

4.2.1.10. Kuersetinin faz çözünürlüğü çalışması

(Higuchi ve Connors, 1965) metodu kullanılarak kuersetinin sudaki çözünürlüğü pH 7 de farklı konsantrasyonlarda *p*-sülfokaliks[4]arenler kullanılarak tayin edildi. Bunun için 10 ar mg lık kuersetin örnekleri10 ml lik deney tüplerinde bulunan ve konsantrasyonları $1x10^{-5}$ ten $1x10^{-4}$ e kadar olan *p*-sülfokaliks[4]arençözeltilerine ilave edilir. Karışımlar 1 saat süre ile oda sıcaklığında etkileştirilir daha sonra 0.45 µm naylon filtreden süzülür ve kompleksleşmeye girmeyen kuersetin miktarları spektrofotometrik olarak belirlenir. Faz çözünürlüğü aşağıdaki eşitlikten hesaplanır.

$$K_s = \frac{Egim}{S_o \times (1 - Egim)}$$

Aşağıdaki eşitlikten çözünürlük 12.03 mM *p*-sülfokaliks[4]aren konsantrasyonunda Kuersetinin faz çözünürlüğü hesaplanır.

Burada **S_o:** *p*-Sülfokaliks[4]arenin yokluğunda

S: *p*-Sülfokaliks[4]arenin varlığında

$$\delta = \frac{S - S_o}{S_o} \times 100$$

4.2.2. Biyokimyasal Uygulamalar

4.2.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

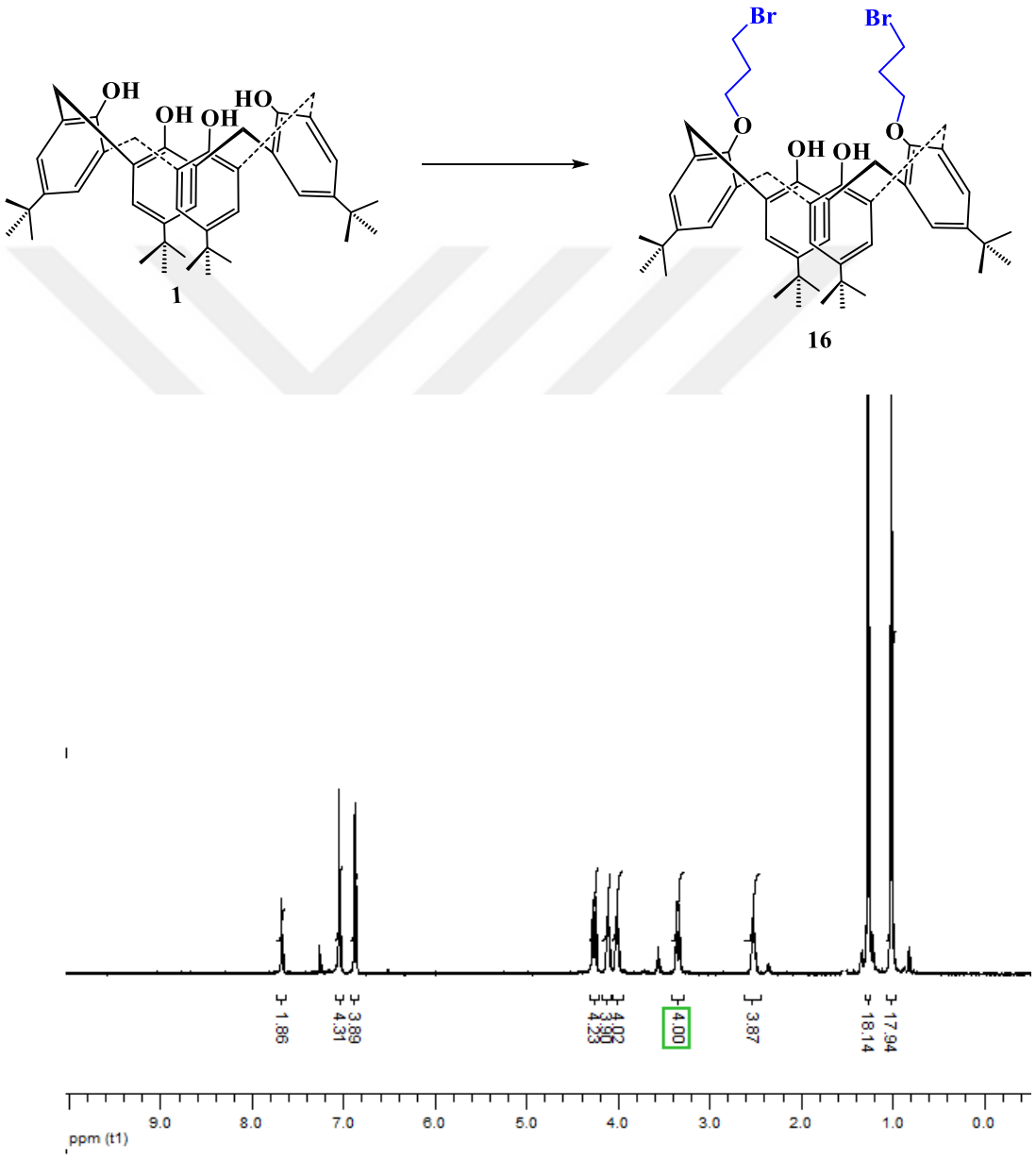
Kullanılan bileşikler ve kaliks[n]aren komplekslerinin sitotoksik etkileri ve insan kanser ve sağlıklı hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri insan doku kültürü çalışmaları aracılığıyla gerçekleştirildi. Bu deneysel kısımda 1.bölüm biyokimyasal uygulamalar başlığı altında anlatıldığı gibi yapıldı.

4.2.2.2. Hücre hatları ve büyüme ortamlarının hazırlanması

Kolon kanseri hücre hattı SW-620 ve meme kanseri hücre hattı MCF-7 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) firmasından satın alındı. Kanser hücre hatları %10 FBS (fetal sığır serumu) ve %1 L-glutamin ve %1 penisilin-sitreptomisin içeren farklı büyüme ortamları içerisinde 37 °C ve %5 CO_2 ‘ li ortamda büyütüldü. Bu büyüme ortamları aynı zamanda kullanılacak olan kaliks[n]aren türevlerinin de seyreltilmesinde de kullanıldı.

4.3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Şema 4 te önerilen *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin dibromopropil türevi (**16**) literatüre göre (Li ve ark., 1999) uygun koşullarda dibrompropan ile K_2CO_3 varlığında asetonitril içerisinde tepkimeye sokularak % 50 verimle elde edildi.(**Şekil 4.13**)

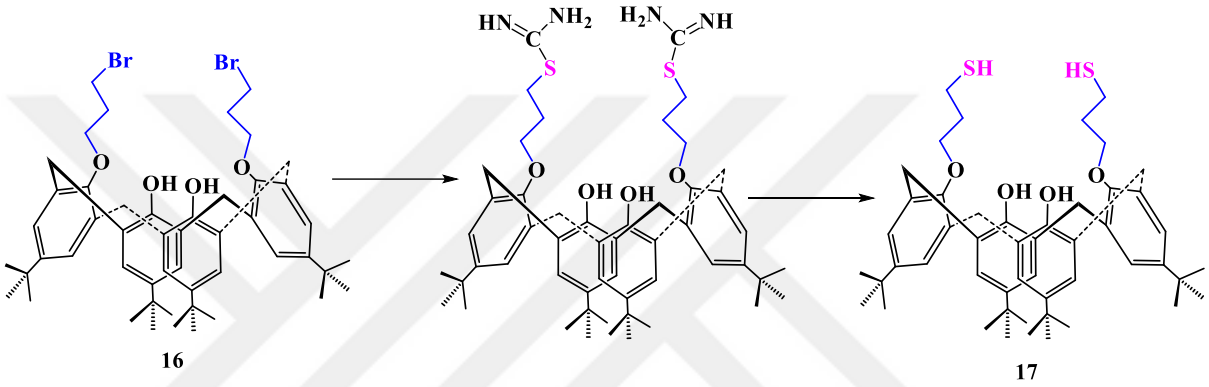


Şekil 4. 13 *p-ter*-Bütilkaliks[4]arenin dibromopropil **(16)** türevinin ^{1}H-NMR spektrumu

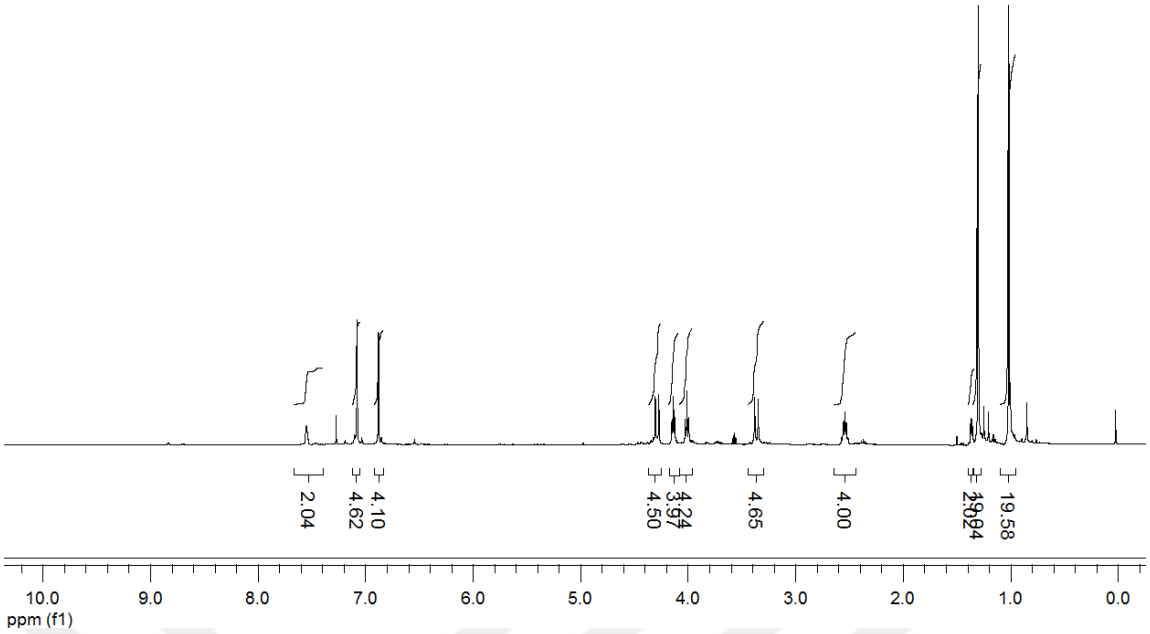
Bu bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumuna (**Şekil 4.13**) baktığımızda bileşiğin koni konformasyonda olduğu Ar-CH_2-Ar köprü protonlarının sinyallerinden anlaşılmaktadır.

Ar$\underline{CH_2}$Ar protonlarına ait 3.41 ve 4.34 ppm civarında görülen AX tipi spin sistemi bir çift dubletin varlığı bunu kanıtlamaktadır. Ayrıca propil gruplarına ait pikler, 2.59, 4.08 ve 4.18 ppm gözlendi.

Bu doktora tezinde yer alan kaliks[4]aren türevlerini altın nanopartiküllere bağlayabilmemiz için kaliks[4]aren in brom türevleri literatüre göre tiyol türevlerine dönüştürüldü (Ha vd. 2009). Bunun için **16** nolu bileşik asetonitril içerisinde tiyoüre ile etkileştirildi. Tepkime İTK (CH_2Cl_2:hekzan (1:1)) ile izlendi. Daha sonra KOH ile etkileştirilerek **17** nolu bileşiğin tiyol türevi sentezlendi.

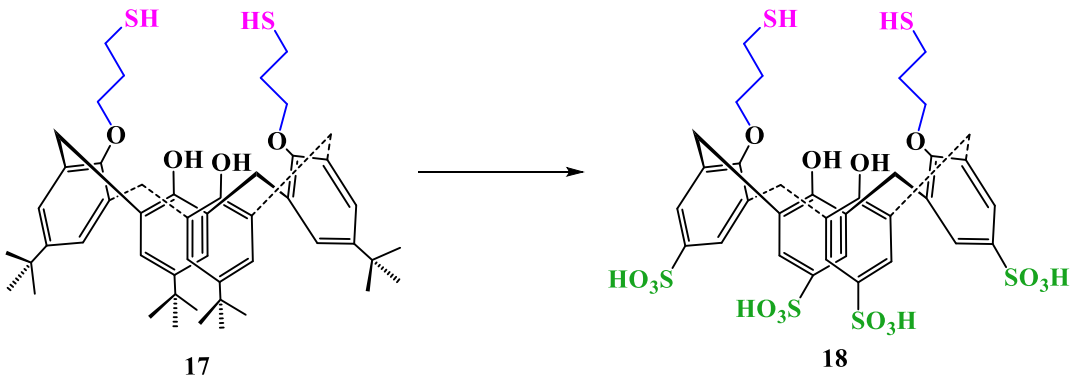


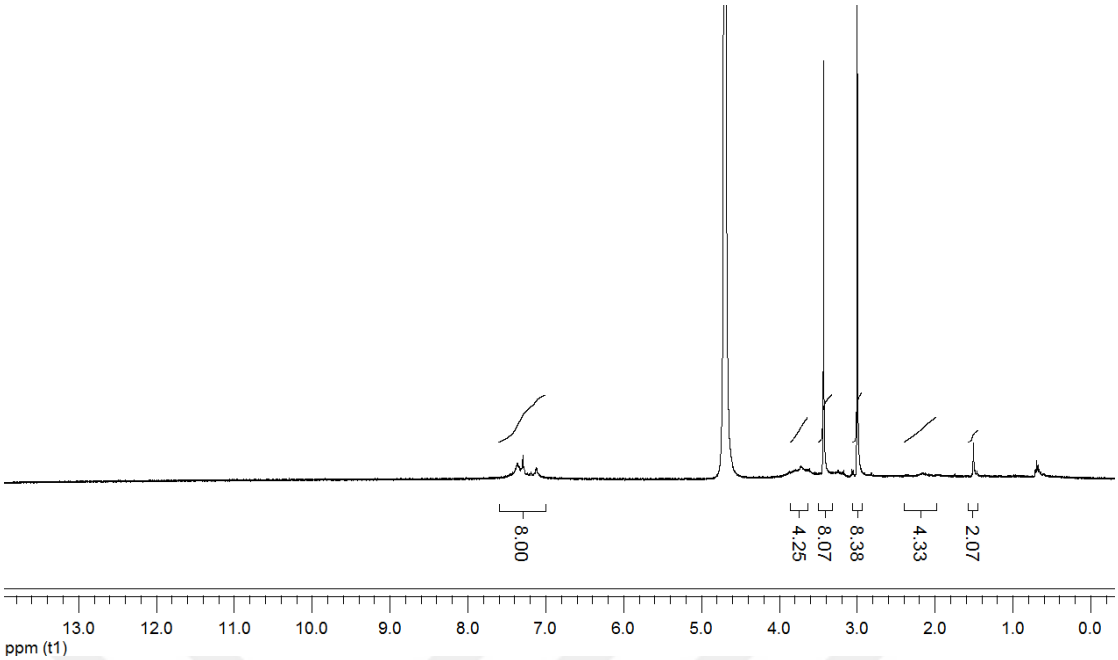
Bu bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumuna (**Şekil 4.14**) baktığımızda bileşiğin koni konformasyonda olduğu 3.38 ve 4.23 ppm deki AX spin sistemi Ar-CH_2-Ar köprü protonlarının sinyallerinden anlaşılmaktadır. Ayrıca SH gruplarına ait protonlar 1.40 ppm de gözlendi.



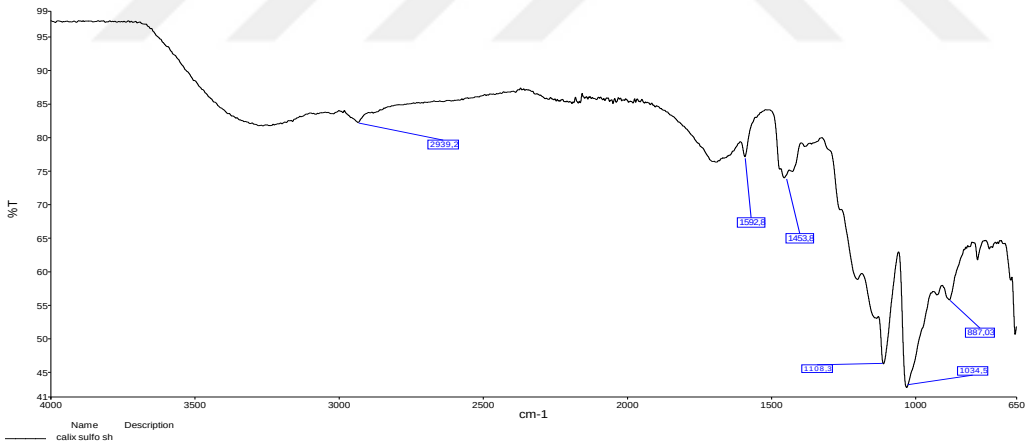
Şekil 4. 14 Bileşik **17**'nin ^{1}H-NMR spektrumu

Kaliksarenlerin bütün pH aralığında suda çözünebilmesi için yine ipso-sülfolama metodu tercih edildi. Buna göre *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin ditiyol türevinin (**17**) ipso-sülfolama tepkimesi gerçekleştirildi (Maity ve ark., 2015). Bu tepkime sonucunda sülfolama ürünü olarak **18** nolu suda çözünebilen kaliks[4]aren türevi elde edildi. Ürüne ait ^{1}H-NMR Şekil 4.15 te görülmektedir. Reaksiyon sonucunda *ter*-bütil gruplarının uzaklaştığı ^{1}H-NMR spektrumundan görülmektedir. Ayrıca bu bileşiğe ait FTIR spektrumundan 2939 cm^{-1} de alifatik C-H titreşim bandları, 1592, 1453 cm^{-1} civarında aromatik C=C bandları, 1108 ile 1034 cm^{-1} de SO_2 grubuna aitbandlar gözlendi (Şekil 4.16).





Şekil 4. 15 Kaliks[4]arenin ditiyomopropil türevinin sülfolama ürününün (**18)** ^{1}H-NMR spektrumu

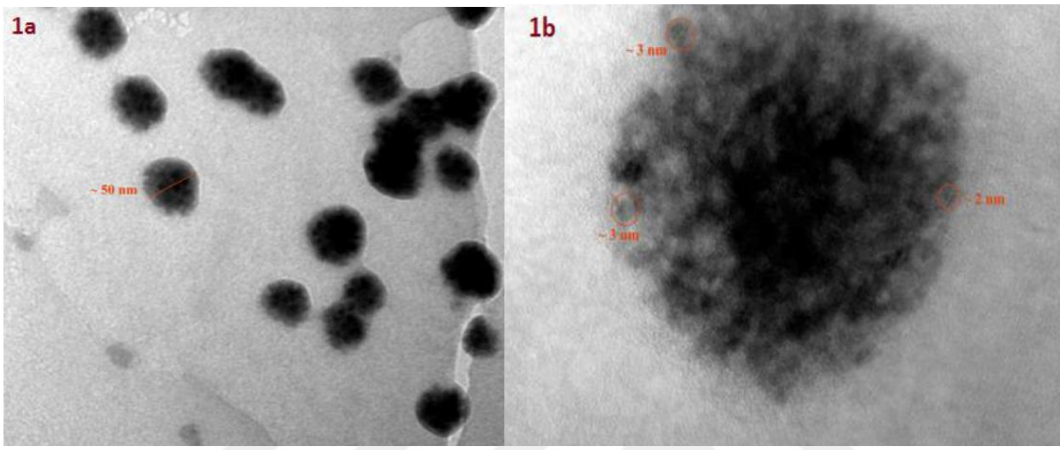


Şekil 4. 16 18 nolu bileşiğin FTIR spektrumu

4.3.1. Altın Nanopartiküllere İmmobilizasyon Çalışmaları

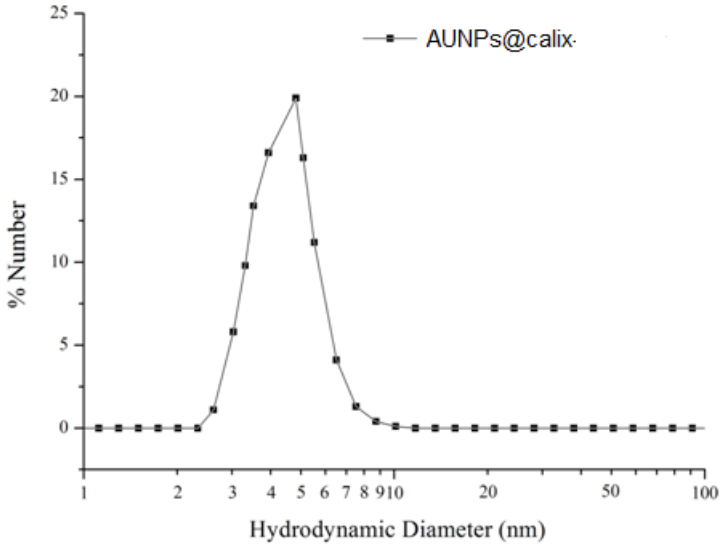
Bölüm 2.3 te tiyol grubu taşıyan sülfokaliks[4]aren türevinin altın nanopartiküllere immobilizasyonu literatüre göre (Enustun ve Turkevich, 1963) hazırlandı. Hazırlanan bu altın nanopartiküllerin boyutunun doktora tez çalışmasında

öngörülen boyuta (2-5 nm) uygun olduğu görüldü (**Şekil 4.17**) Altın nanopartiküllerin TEM görüntüsünde parçacık boyutu 50 nm görünüyorsa da (**Şekil 4.17/1a**) yapılan daha sonraki işlemler sonucunda yani çözücünün uçurulması ve topaklanmanın (aggregation) önlenmesi gibi önlemlerle gerçek boyutun 3 nm olduğu anlaşılmıştır (**Şekil 4.17/1b**). Tiyol grubu taşıyan sülfokaliks[4]aren türevi detayı bölüm **2.4** verildiği gibi altın nanopartiküllere immobilize edildi.



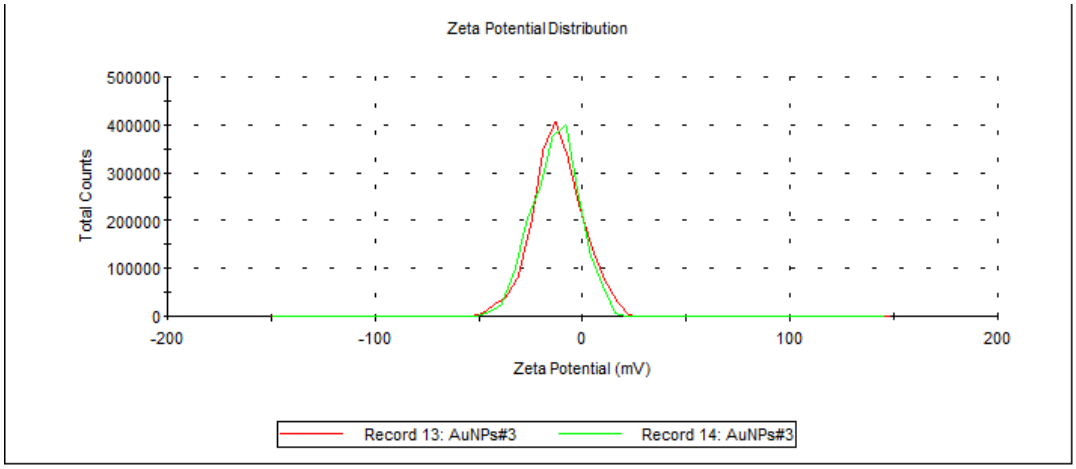
Şekil 4. 17 Altın nanopartiküllerin TEM analizi

İmmobilizasyondan sonraki DLS ölçüm sonuçları **Şekil 4.18** de verilmiştir. Bu kompleksin (**AuNPs@Calix**) DLS analizinde analizine baktığımızda TEM sonuçları ile uyumlu olduğu görülür yaklaşık ortalama tanecik boyutunun ~ 4.8 nm olduğu görülür.

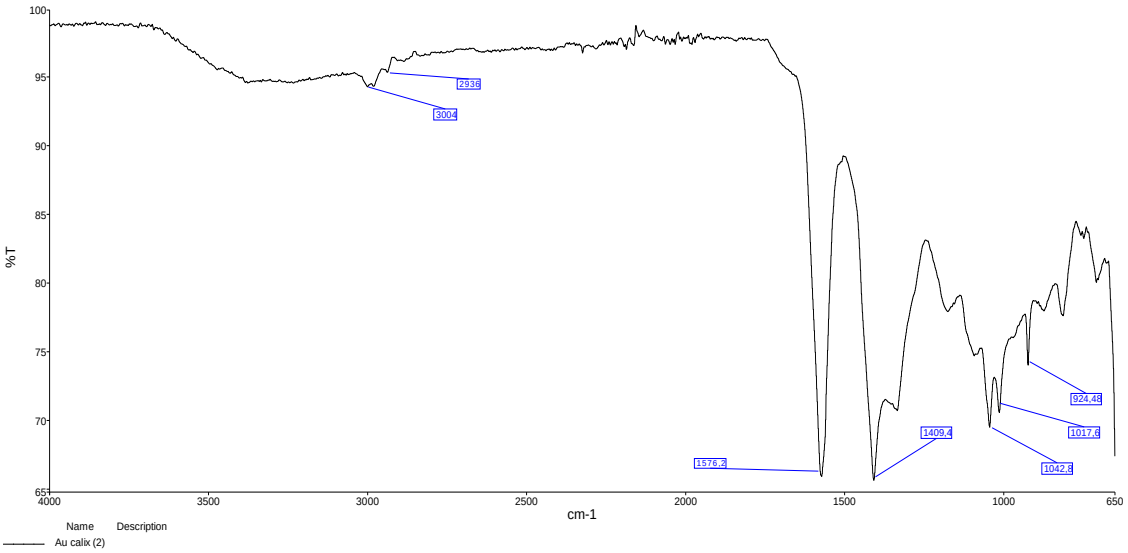


Şekil 4. 18 AuNPs in DLS analizi

Sülfokaliks[4]aren immobilize altın nanopartiküllerin ZETA potansiyel dağılımına baktığımızda -13.6 mV olduğu görülür sülfonat gruplarından dolayı nanopartikül yüzeyinin negatif yüklü olduğu anlaşılmaktadır (**Şekil 4.19).** Bu durum hem bu nanopartiküllerin çözeltide kolloidal olarak kalmalarına yardımcı olur hem de Kuersetin gibi bir başka molekülün tutunmasına yardımcı olur.



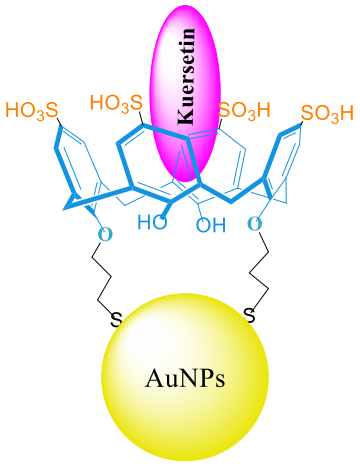
Şekil 4. 19 AuNPs-Calix ve AuNPs@Calix-kuersetin kompleksinin ZETA potansiyel dağılımı



Şekil 4. 20 AuNPs@Calix FTIR spektrumu

AuNPs@Calix FTIR spektrumu da kaliksarenin sülfo grubuna ve aromatik halkaya ait bantlar gözükmektedir. 3004 cm^{-1} de aromatik C-H, 2936 cm^{-1} de alifatik C-H,1572, 1408 cm^{-1} de aromatik C=C, SO_3 grubuna ait bandlar 1043,1013 cm^{-1} gözlenmektedir **(Şekil 4.20).**

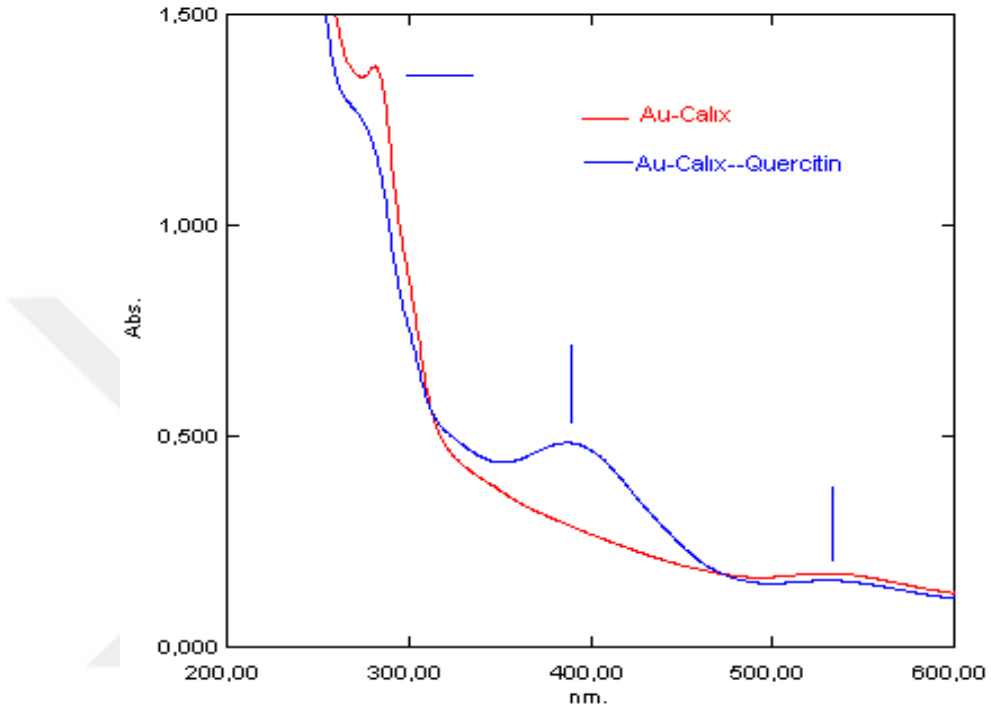
4.3.2. *p*-Sülfokaliks[4]aren immobilize edilmiş (AuNPs-Calix) altın nanopartiküllerin kuersetin taşınmasında kullanılması



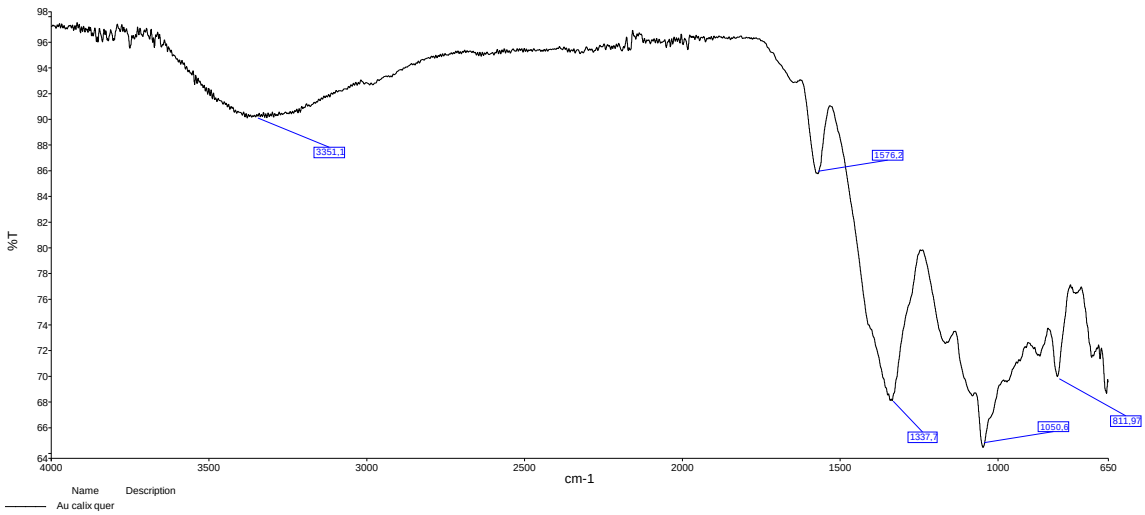
Şekil 4. 21 AuNPs-Calix ile kuersetin kompleksleşme modeli

p-Sülfokaliks[4]aren (**18)**'in immobilize edildiği nanopartiküller **(AuNPs-Calix**) ile kuersetin arasındaki kompleksleşme literatürde (Valand ve ark., 2015) verilen metoda göre hazırlandı. Literatürde altın nanopartiküllerin tanecik boyutuna bağlı

olarak 525 nm de bir band gözlenirken, kuersetine ait band 370 nm de. gözlendi. Yine Kuersetinin sahip olduğu spektroskopik özelliklerden dolayı altın nanopartikülere harici bir boya molekülü ilave etmedilmeden hücre kültürü çalışmalarında kullanıldı (Nifli ve ark., 2007).



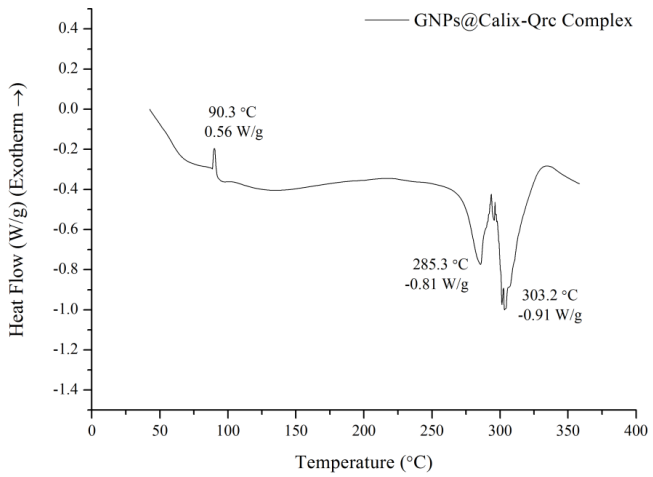
Şekil 4. 22 AuNPs-Calix ve AuNPs-Calix-kuersetinin UV-Vis spektrumu



Şekil 4. 23 AuNPs@Calix ile kuersetin nin FTIR spektrumu

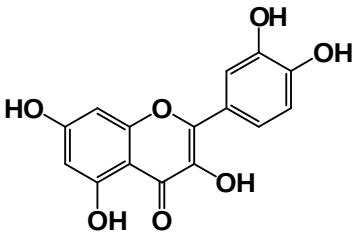
Kuersetin ile kompleksleştirilmiş **AuNPs@Calix** in FTIR spektrumu a baktığımızda 3379 cm^{-1} de OH titreşim bandlarının şiddetinin arttığı aromatik 1570 cm^{-1} civarındaki C=C bandın aynı kaldığı 1408 cm^{-1} bandın kaydığı ve diğer bandlardaki değişim komplekleşmeyi göstermektedir **(Şekil 4.23)**.

DSC analizleri 25 ºC ile 400 ºC arasında incelenmiş, ısıtma dakikada 10 ºC ve soğutma dakikada 20ºC olacak şekilde yapılmış. Isıtma ve soğutma eğrileri incelendiğinde muhtemelen altın nanopartikül yüzeyinden kaliks–SH grublarının ayrılması ile 275 ºC de bir endotermik bozunma (decompozisyon) gözlenmektedir (**Şekil 4.24**).

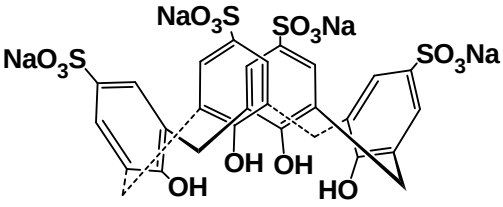


Şekil 4. 24 AuNPs@Calix ile kuersetin kompleksinin DSC analizi

Bu çalışmaya ilaveten *p*-sülfokaliks[4]aren sodyum tuzu bileşiği ile kuersetin arasındaki bazı kompleksleşme parametrelerini belirlemek amacı ile ilave araştırma yapıldı.

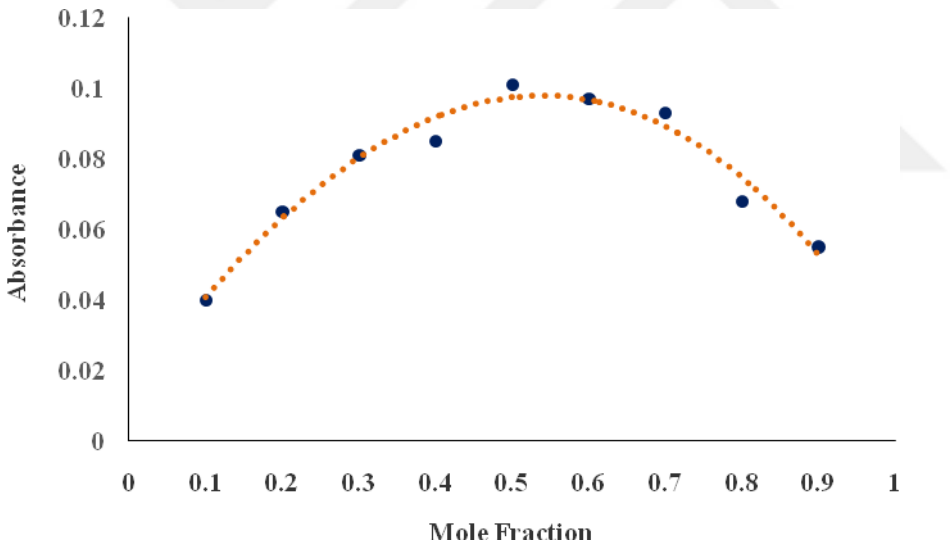


Kuersetin

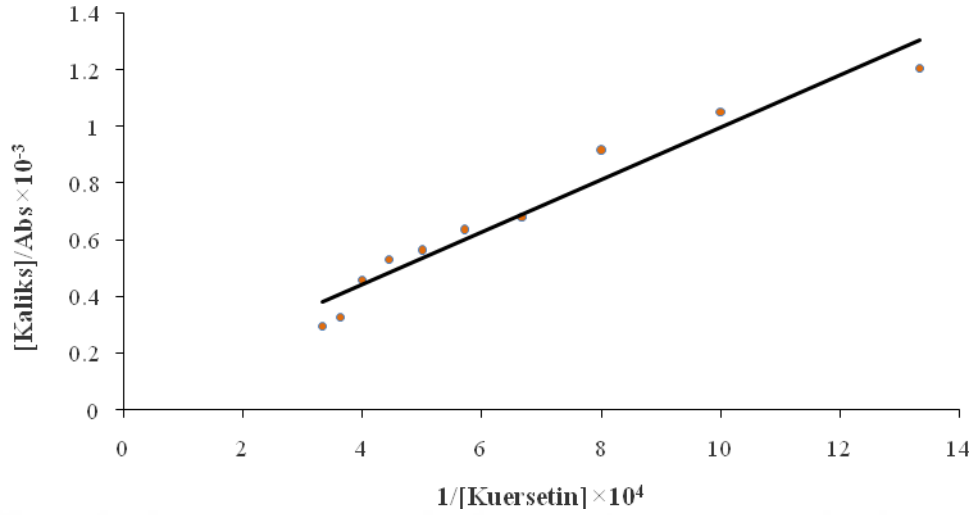


p-sülfokaliks[4]aren
sodyum tuzu

Öncelikle Job plot metoduna göre kuersetin *p*-sülfokaliks[4]aren sodyum tuzu arasındaki kompleksleşme oranı belirlendi (**Şekil 4.25**). Şekilden görüleceği gibi bu komplekste sülfokaliks[4]aren/kuersetin kompleksleşme oranı 1:1 dir. Bu sonuçtan yola çıkılarak Benesi-Hildebrand ifadesinden kompleks için denge sabiti K= 8.89×10^{3} l mol^{-1} olarak bulundu.

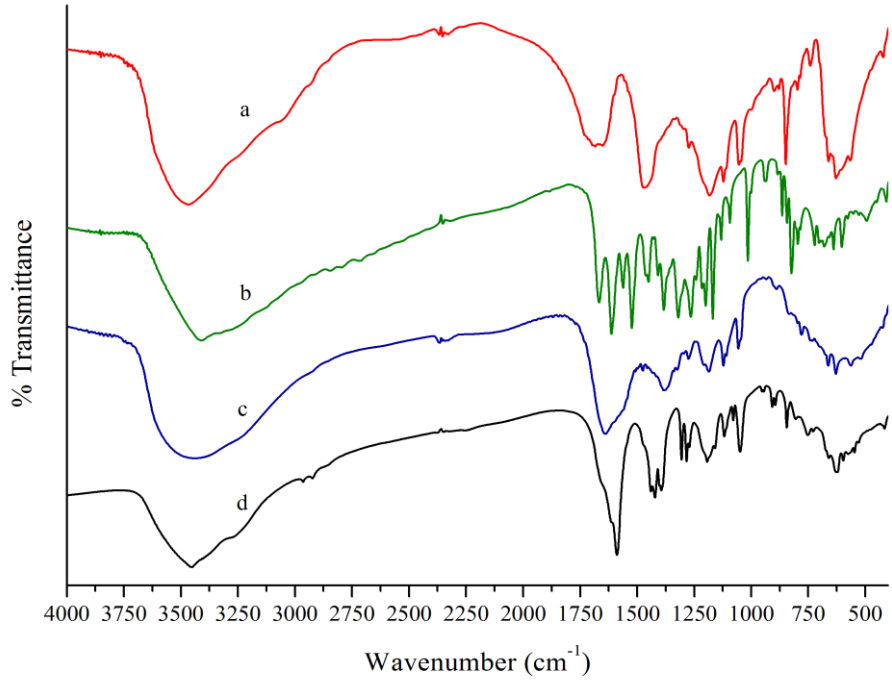


Şekil 4. 25 Job plot metoduna göre kuersetin- *p*-sülfokaliks[4]aren arasındaki kompleksleşme oranı

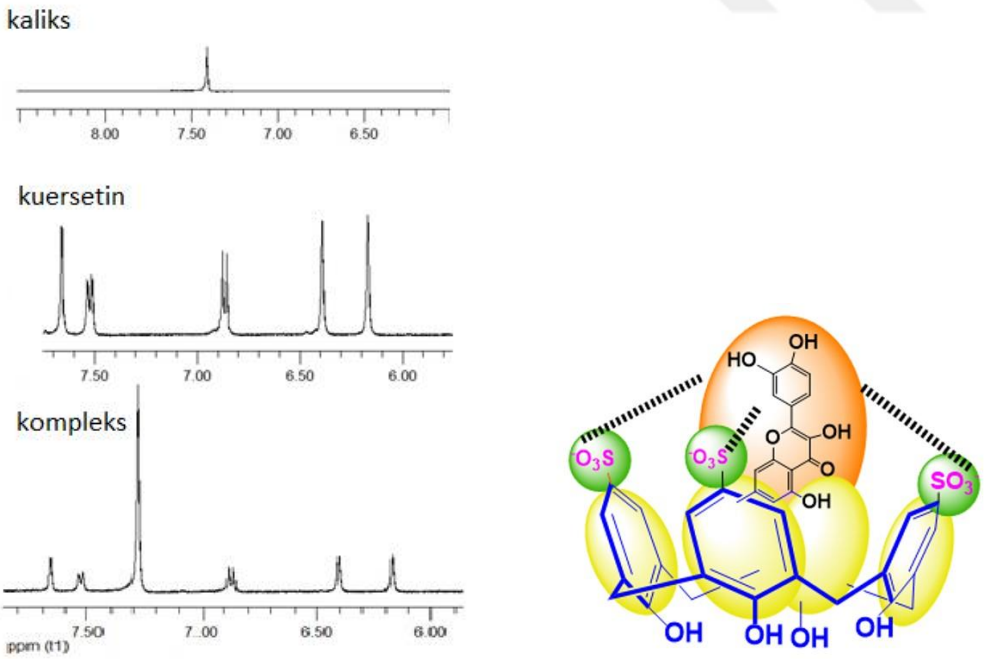


Şekil 4. 26 Benesi-Hildebrand metoduna göre kuersetin- *p*-sülfokaliks[4]aren'in kompleksleşme değerleri

Şekil 4.27 den FT-IR spektruma baktığımızda *p*-sülfo-kaliks[4]aren 3392 cm^{-1}de –OH, 1166 ve 1045 cm^{-1} -SO_3 gruplarına ait titreşimler gözlenirken, kuersetinin –OH bandı 3290, karbonil bandı (C=O) 1665 cm^{-1} 1601 de aromatik C=C bandları gözlenmektedir. *p*-sülfokaliks[4]aren-kuersetin komleksinde ise 1593 cm^{-1} de gözlenen geniş bandın ve 1665 ve 1601 cm^{-1} deki bandların kaymasından ve 997 cm^{-1} deki aromatik C-H eğilme titreşim bandlarının kaybolması, aromatik π- π etkileşmesi olduğunu göstermektedir.

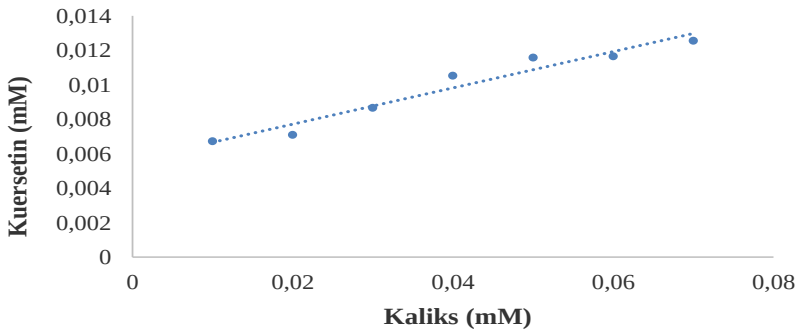


Şekil 4. 27 FT-IR spektrumu: **(a)** *p*-sülfokaliks[4]aren, **(b)** kuersetin, **(c)** kuersetin-sülfokaliks[4]aren kompleks, **(d)** AuNPs@Calix ile kuersetin



Şekil 4. 28 ^{1}H-NMR spektrumu: **(a)** *p*-sülfokaliks[4]aren (D_2O), **(b)** kuersetin (DMSO), **(c)** kuersetin-sülfokaliks[4]aren kompleks (D_2O)

Şekil 4.28 de *p*-sülfokaliks[4]aren, kuersetin ve kuersetin-sülfokaliks[4]aren kompleksinin ^{1}H NMR spektrumlarının aromatik protonlarına ait sinyallere baktığımızda; *p*-sülfokaliks[4]arenin 7,45 ppm deki aromatik H (Ar-H) protonlarının kuersetin ile komplekleştikten sonra 7,40 ppm e kayması kuersetin ile *p*-sülfokaliks[4]aren arasında bir aromatik π- π etkileşmesi olduğunu desteklemektedir.



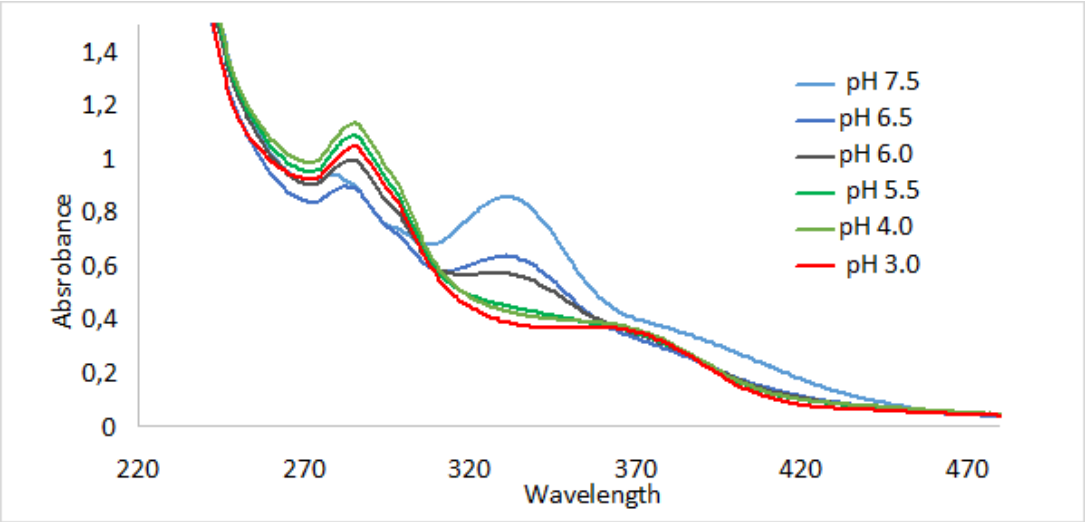
Şekil 4. 29 Kuersetin- sülfokaliks[4]aren kompleksinin çözünürlük faz diagramı (Higuchi Connors metoduna göre 4 saat karıştırıldı)

Bunlara ilaveten kuersetin-sülfokaliks[4]aren kompleksinin çözünürlük faz diagramı Higuchi and Connors metoduna göre (Higuchi ve Connors, 1965) incelendiğinde *p*-sülfokaliks[4]aren konsantrasyonu artıkça kompleksin (1:1) çözünürlüğünün arttığı gözlendi ve bu kompleks için eğimin lineer (R^2=0,949) olduğu ve Ks değeri 714 mM^{-1}(**Şekil 4.29**).

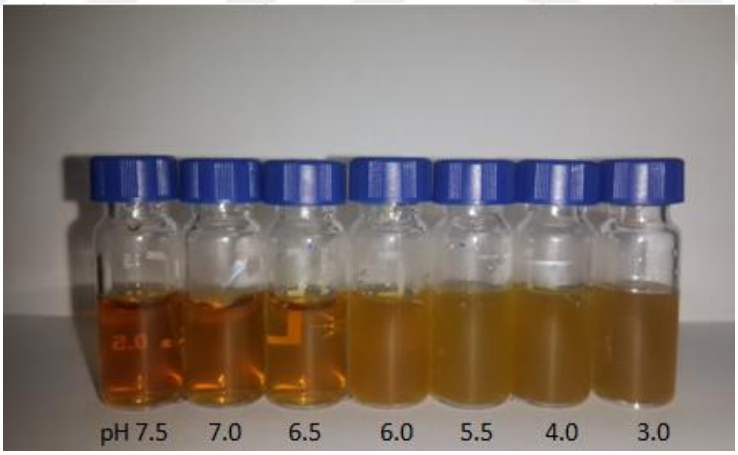
4.3.3. Kuersetin-sülfokaliks[4]aren kompleksleşmesine pH etkisi

Farklı pH larda sülfokaliks[4]aren ile kuersetin arasında yapılan kompleksleşme çalışmalarında **Şekil 4.30** den de görüleceği gibi kuersetin pH 7.5 de kompleksleştiğini 330 nm deki UV bandından anlaşılmaktadır. pH 5 den sonra bu bandın kaybolması kuersetinin sülfokaliks[4]aren ile kompleksleşmediğini anlaşılmaktadır. Komplekstekı kuarsetinin pH 7.0 den itibaren salındığı pH 6.0 de önemli bir orana ulaştığı görülmektedir (**Şekil 4.31, 4.32**). Bu sonuçlar bize fizyolojik pH da sülfokaliks[4]arenin kuersetini taşıdığı zayıf asidik bölgede ise kuersetinin salınımını göstermektedir. Genellikle kanser hücrelerin pH ının 5.5-6..5 aralığında olduğu düşünülürse böyle bir

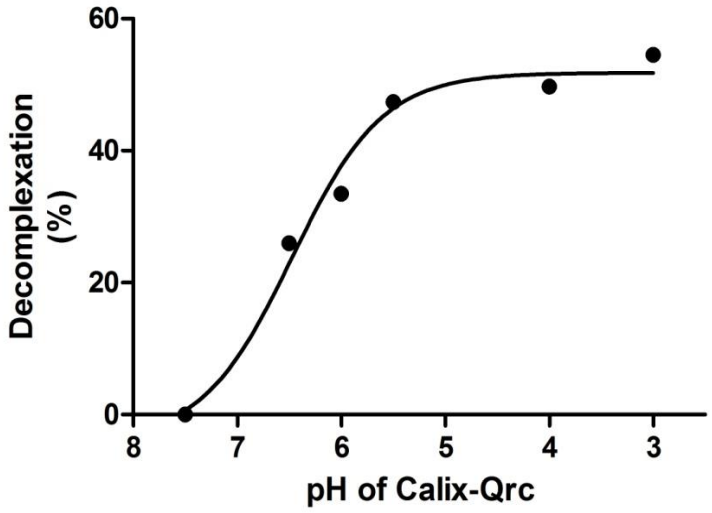
kompleksin normal hücrelere zarar vermeden kanser hücreleri ile etkileşeceği düşünülebilir.



Şekil 4. 29 Farklı pH larda kuersetin-sülfokaliks[4]aren kompleksinin UV spektrumu



Şekil 4. 30 Farklı pH'larda kuersetin-sülfokaliks[4]aren kompleksinin görünümü



Şekil 4. 31 Farklı pH' larda kuersetin-sülfokaliks[4]aren kompleksinin ayrışması(salınımı)

Heryönü ile karekterize edilen *p*-sülfokaliks[4]aren-kuersetin ve altın nanopartiküllere immobilize olmuş yapıları anti-kanser çalışmalarında kullanıldılar.

4.3.4. Sentezlenen Bileşiklerin Sitotoksisite Çalışmaları

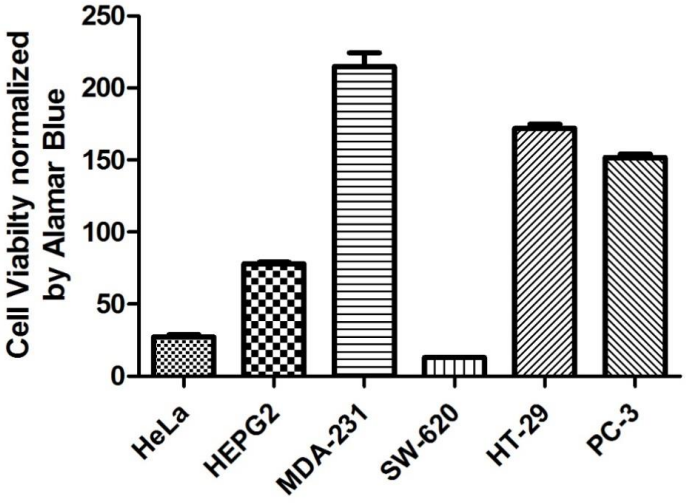
Sentezlenen moleküller ve bu moleküllerin kombinasyonları ile anti-kanser özellikleri daha önceden bilinen doğal olarak oluşan ya da sentetik kemoteröpatik ilaçların insan kanser hücre hatlarında sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirildi. Seçilen anti kanser ajanlar ve kaliks[4]aren türevleri çeşitli insan kanser hücreleri üzerinde test edildi ve kanser hücrelerinin %50 sini öldüren konsantrasyonları (IC_{50}) hesaplandı. kaliks[4]aren ve anti kaser ajanlar 7 farkı hücre hattı ve 5 farklı kanser türüne karşı denendi. Bu çalışmalar neticesinde kaliks[4]aren bileşiklerinin herhangi bir hücre hattında sitotoksik etkiye sahip olmadığı fakat anti kanser bileşiklerin doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulundu (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Kuersetinin çeşitli insan kanser hücre hatlarındaki IC_{50} değeri

	IC_{50}(µM)
	Kuersetin
HeLa (Rahim Ağzı Kanseri)	27,1
HEPG2 (Karaciğer Kanseri)	79,2
MCF-7(Meme Kanser)	11,1
HT-29(Kolon Kanser)	172,4
SW-620(Kolon Kanser)	13,5
PC-3(Prostat Kanser)	153,9
LnCaP(Prostat Kanser)	19,4

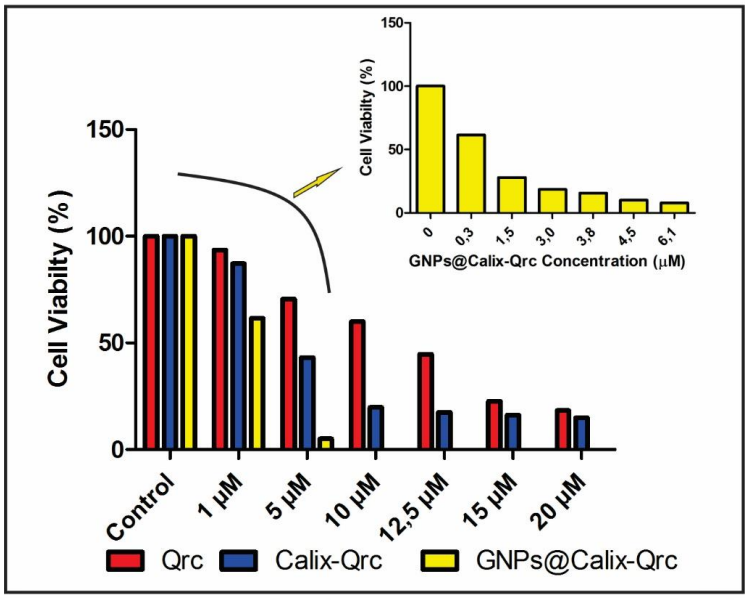
4.3.5. Kuersetin

Bitki flavonoid molekülü kuersetinin sitotoksik özelliklerini saptamak amacıyla değişik kanser hücrelerinde incelendi. Bu amaçla insan rahim ağzı kanser hattı (HeLa), karaciğer kanser hücre hattı (HEPG2), insan meme kanser hücre hattı (MDA-231), insan prostat kanser hücre hattı (PC-3) ve insan kolon hücre hatları (SW620 ve HT29) üzerinde 0.1 µM ile 400 µM arasında değişen farklı kuersetin konsantrosyonları ile etkisi test edildi. Hücre canlılık testleri spektroskopik yöntemlerle hücre canlılık ajanı Alamar Blue reaktifi kullanılarak test edildi. Yapılan çalışmalar neticesinde Kuersetinin doza bağımlı olarak HeLa, HEPG2, MDA-231, PC-3, SW-620 ve HT-29 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bulunmuş olup IC_{50} değeri sırası ile 27.1 µM, 79.2µM, >200µM, 153.9µM, 13.5µM ve 172.4µM olarak hesaplandı. Bundan dolayı daha sonraki çalışmalarda kullanılmak amacıyla SW620 hücre hattı seçildi.

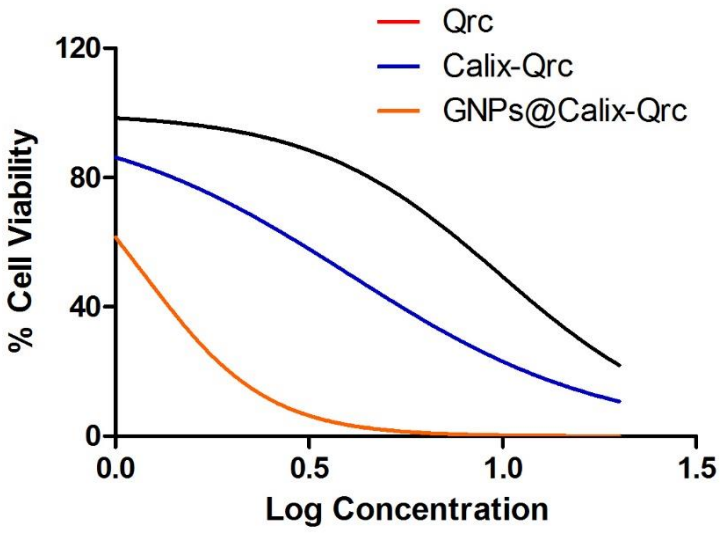


Şekil 4. 32 Kuersetinin İnsan kanser hücre hatlarının (HeLa, HEPG2, MDA-231, PC-3, SW-620 ve HT-29) canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkileri

Qrc, calix-Qrc, ANPs@calix-Qrc bileşiklerinin SW620 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri belirlendikten sonra IC_{50} değerini hesaplamak amacıyla SW620 hücreleri 1µM ile 200 µM aralığında değişen farklı konsantrasyonlarda bileşikler ile muamele edildi. Kuersetin molekülünün IC_{50} değeri SW-620 hücrelerinde 13.5 µM olarak hesaplanırken bu değer calix-Qrc kompleksinde 2.93 kat azalarak 4.6 µM' a düşürdüğü bulundu. ANPs@calix-Qrc kompleksinde çalışma aralığı iyice daraltılmış ve maksimum 6.1 µM olacak şekilde 7 farklı aralıkta çalışıldı. ANPs@calix-Qrc kompleksinde ise 51.92 kat azalarak 26 µM' a düşmüştür. Her üç molekülde de konsantrasyon hesaplaması kuersetin baz alınarak yapıldı. Aynı miktarda kuersetin muamelesi yapılmasına rağmen bu kadar farklı sonuçların elde edilmesi kuersetin molekülünün fizyolojik ortamda kararlılığının çok düşük olması ile açıklanabilmektedir. İmmolize kursetinin kararlılığı kaliksaren ve altın nano partikülü sayesinde artmış olup hücre içerinde daha uzun süre etkinliğini korumuştur. Şekil 4.34-4.35 de de görüleceği üzere insan kolon hücrelerinin canlılığını gösteren sigmoidal grafiğin eğimi immolize olmamış kuersetinden immobilize olmuş kuersetine doğru negatif yönde değişmekte olup bu değişim molükülün etki süresinin uzunluğunun giderek arttığını gösterdi.



Şekil 4. 33 Qrc, Calix-Qrc, ANPs@calix-Qrc nin SW620 hücre hatlarının canlılığına etkisi



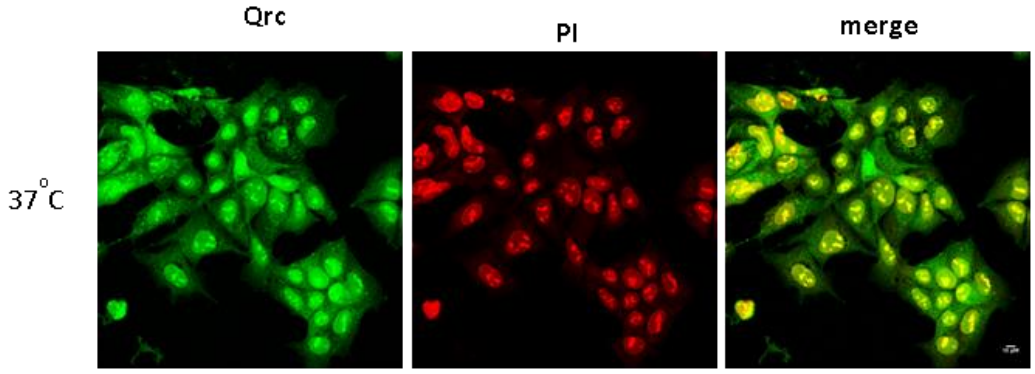
Şekil 4. 34 SW620 hücrelerinde Qrc, Calix-Qrc, ANPs@Calix-Qrc bileşiklerinin IC_{50} değerleri log bileşik konsantrasyonuna karşın hücre canlılığı (%) sigmoidal grafiği

Tablo 4.2 Qrc, Calix-Qrc, ANPs@calix-Qrc bileşiklerinin insan kolon kanseri hücre hattı SW620 hücrelerinde IC_{50} değerleri

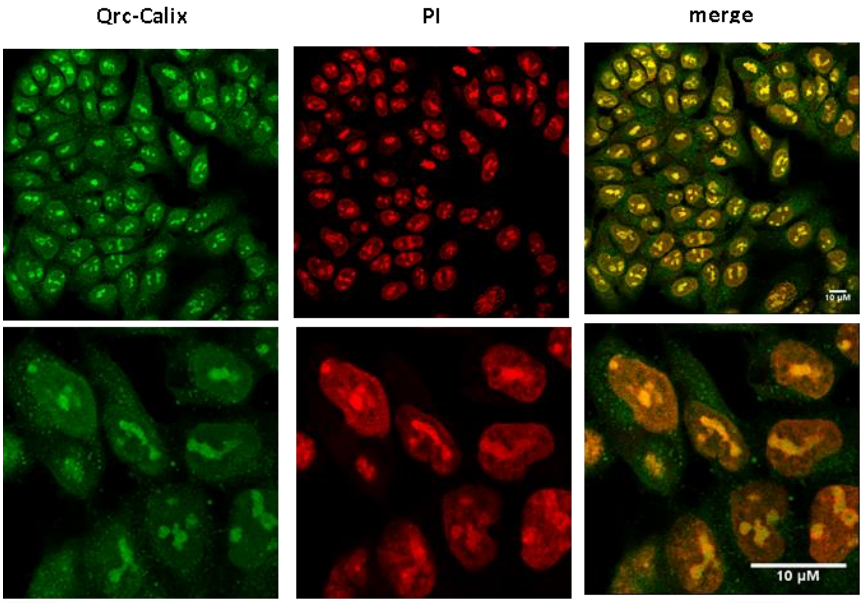
Bileşik	IC_{50} (µM)	Kat
Qrc	13,5	1
Kaliks-Qrc	4,6	2,93
ANPs@Calix-Qrc	0,26	51,92

4.3.6. Konfokal Mikroskop Çalışmaları

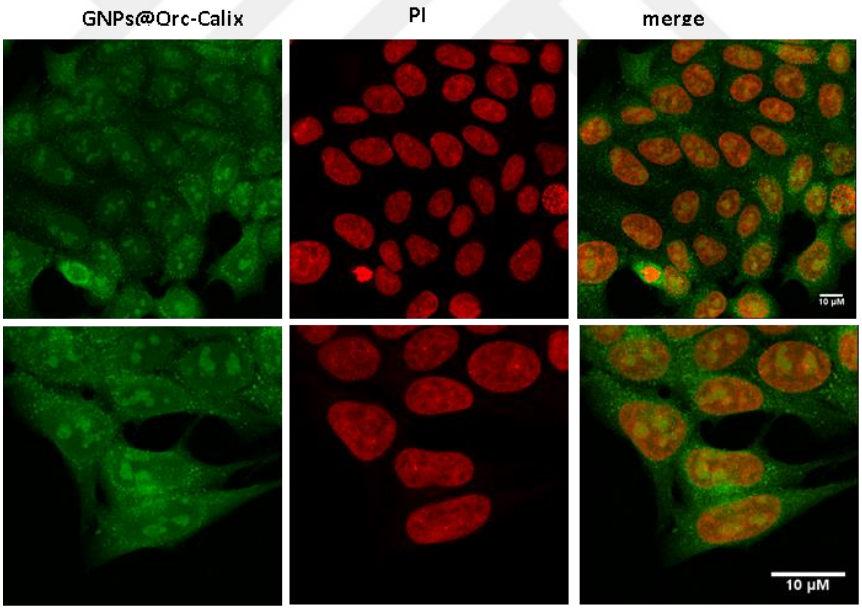
DLD-1 hücreleri $6x10^4$ hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalar içerisinde yerleştirilmiş olan lameller üzerine konulmuş ve 24 saat inkübe edildi. Diğer gün hücreler 10 µM Qrc, calix-Qrc, ANPs@kaliks-Qrc içeren serumsuz büyüme ortamları ile muamele edilerek 37 °C ve 4 °C de 45 dk inkübe edildi. Inkübasyondan sonra lameller PBS tampon ile 3 defa yıkandıktan sonra %3.7 lik formaldehit ile sabitlenmiş olup 50 mM amonyumklorür içerisine daldırıldıktan sonra kurutuldu. Propidiumiyodit (PI) boyaması için hücreler 20 dk. RNAse (1mg /ml) inkübe edildi ve 4 dk PI (1.6 µg/ml) ile boyandı. Daha sonra lamel PBS ile yıkandıktan sonra ters çevrilerek lam üstüne yerleştirildi. Flouresans bileşiklerin dağılımı Leica TCS SP5 konfokal mikroskopu kullanılarak analiz edildi. Qrc, calix-Qrc, ANPs@ calix-Qrc bileşikleri 488 nm de, PI ise 561 nm de uyarıldı.



Şekil 4. 35 DLD-1 hücrelerinde Kuersetinin hücre içi taşınımı. Hücreler 37 °C ve 45 dk 10 µM kuersetin ile muamele edildikten sonra konfokal hücre mikroskobu analizi. Temsili flouresans ve nüklear boyama (propidium iyodid, PI) gösterilmiştir



Şekil 4. 36 DLD-1 hücrelerinde Kaliks-Qrc hücre içi taşınımı. Hücreler 37 °C ve 45 dk 10 µM Kaliks-Qrc ile muamele edildikten sonra konfokal hücre mikroskobu analizi. Temsili flouresans ve nüklear boyama (propidium iyodid, PI) gösterilmiştir



Şekil 4. 40 DLD-1 hücrelerinde ANPs@Kaliks-Qrc hücre içi taşınımı. Hücreler 37 °C ve 45 dk 10 µM ANPs@Kaliks-Qrc ile muamele edildikten sonra konfokal hücre mikroskobu analizi. Temsili flouresans ve nüklear boyama (propidium iyodid, PI) gösterilmiştir

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak kaliks[4]aren bileşiklerinin anti-kanser ve ilaç taşıma özelliklerinin araştırılması amacıyla planlanan bu doktora tezinde çalışmalar üç faklı bölümde toplanmıştır.

Birinci bölümde yapılan çalışmalarda;

- *p-ter*-bütilkaliks[4]aren ve kaliks[4]arenden çıkılarak bu bileşiklerin tetraester ve diester türevleri sentezlendikten sonra, asit klörür türevlerine daha sonra da bu bileşikler *L*-prolinmetil esteri ile etkileştirildi. Sentezlenen bu bileşiklerin bazik hidrolizi ile hedeflenen kaliks[4]arenin diprolin (**6**,**12**) türevleri sentezlendi.
- Sentezlenen bütün bileşiklerin yapıları spektroskopik teknikler (FTIR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, HRMS) kullanılarak yapıları aydınlatıldı.
- Sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerinde sitotoksik etkileri ve hücre ölüm mekanizması (apopotoz) incelendi.
- **6** ve **12** no'lu bileşikler dört farklı kanser hücresi ve epitel hücresi dahil beş hücrede sitotoksik etkileri incelendi ve hücre proliferasyonunu seçici olarak inhibe ettiği bulundu.
- **6** no'lu bileşik ise akciğer kanseri hücreleri üzerine en fazla sitotoksik etki göstermiş olup karaciğer kanseri hücreleri üzerinde ise sağlıklı epitel hücreleri ile kıyaslandığında bir sitotoksik etki göstermediği bulunmuştur.
- **12** no'lu bileşik seçilen kanser türleri arasında en fazla insan kolorektal karsinoma kanseri hücresi olan DLD-1 üzerine etkin olurken, insan karaciğer kanseri hücreleri olan HEPG2 hücreleri üzerine ise en az toksik etkiyi göstermiştir.
- **6** no'lu bileşiğin hücre apoptoz mekanizması üzerine etkileri incelendiğinde **6** ile tedavi edildiğinde, DLD1 hücrelerinin % 1.9 unun erken apoptozis nedeniyle ölüm ve % 7.9 geç apoptoz nedeniyle öldüğü görülmüştür.

İkinci bölümde yapılan çalışmalarda;

- Kaliks[4]aren bileşikleri fenolik-O üzerinden N,N-dimetiletil grupları ile türevlendirildi.
- Daha sonra bu kaliksaren türevi tüm pH değerlerinde çözünmesini sağlamak amacı ile fenolik birimlerin *p*-konumundan sülfo grupları ile uygun koşullarda foksiyonlandırılıp sentezlenen bileşiğin (**15**) yapısı spektroskopik teknikler ile aydınlatıldı.
- Doğal bir flavonoid türevi ve aynı zamanda bir anti-kanser bileşiği olan kuersetin suda çok az çözündüğünden bir anti kanser ilaç adayı olamamaktadır. Bu tez çalışmasında toksik olmayan suda oldukça az çözünen floresan bir bileşik olan kuersetin, sülfo grupları taşıyan kaliks[4]aren molekülü ile fizyolojik pH'da (7.5) kompleksleştirildi (**15-Q**).
- İn vitro hücre kültürü çalışmaları sonucunda **15-Q** komplekslerinin insan kanser hücreleri arasında en fazla HeLa hücrelerine etki gösterdikleri belirlendi.
- N,N-dimetiletil türevli sülfokaliks[4]aren molekülüne kuersetin molekülü yüklendikten sonra yapılan sitotoksite testinde (IC_{50}) immobilize olmayan kuersetine göre 2.98 kat daha etkili olduğu gözlendi.
- Flow sitometrik olarak hücre döngüsü üzerinde meydana gelen değişimler incelendiğinde özellikle **15-Q**' nun hücreyi apoptoza sürüklediği görülmekte olup HeLa hücrelerinin DNA'sını özellikle G1 fazından sonra fragmenlere ayırdığı ve aopototik cisimciklerin miktarında 2 kat bir artış olduğu belirlendi.
- Hücre içi görüntüme çalışmaları sonucunda bileşiklerden **15-Q**' nun hücrenin sitoplazmik bölgesinde yoğunlaştığı görülmektedir. Sitoplazmik bölgede artan **15-Q** hücreyi mitokondriyel apoptoza sürüklemekte olup kanser hücreleri bu şekilde ölüme sürüklemektedir.
- Yapılan çalışmalar sonucunda N,N-dimetiletil grupları ile türevlendirilen yeni sülfokaliks[4]aren bileşiğinin (**15**) doğal bir anti-kanser bileşiği olan ve suda az çözünen kuersetin ya da diğer flavonoidler için de uygun bir taşıyıcı olabileceği anlaşıldı.

Son olarak üçüncü bölümde yapılan çalışmalarda;

- Bu çalışmada kaliks[4]aren fenolik-O üzerinden 3-tiyopropil grupları ile fenolik birimlerin *p*-konumundan sülfo grubu ile uygun koşullarda foksiyonlandırılıp (**18**) sentezlenen bileşiğin yapısı spektroskopik teknikler aydınlatılmıştır.
- Nano taşıyıcı materyali sentezlemem için yaklaşık 2-3 nm boyutunda altın nanopartiküller hazırlanarak tiyol grupları taşıyan sülfokaliks[4]aren molekülleri immobilize edildi (**ANPs@kaliks**).
- Doğal bir flavonoid türevi ve aynı zamanda bir anti-kanser bileşiği olan kuersetin suda çok az çözündüğünden bir anti kanser ilaç adayı olamamaktadır. Bu tez çalışmasında toksik olmayan suda oldukça çok çözünen sülfo grupları taşıyan kaliks[4]aren bileşiklerine kuersetin molekülü fizyolojik pH'da (7.5) kompleksleştirilerek (**ANPs@kaliks-Qrc**) canlı kanser hücrede sitotoksite testleri yapılmıştır.
- Elde edilen verilere göre, nano taşıyıcı materyale (**ANPs@kaliks**) kuersetin molekülleri yüklendikten elde edilen kompleksin (**ANPs@kaliks-Qrc**) IC_{50} değeri immobilize olmayan kuersetine göre 52 kat daha fazla olduğu gözlendi.
- Kaliks-kuersetin komplekslerinin farklı pH'larda yapılan salınım testlerinde yaklaşık pH 6.0 da (karserli hücre pH'sı 6.5-5.5) kuersetinin büyük oranda salındığı gözlendi.
- Sentezi gerçekleştirilen nano taşıyıcı mteryalin diğer doğal anti-kanser ve suda az çözünen flavonoid türevleri ve sudaki çözünürlüğü düşük olan ilaçlar için de uygun bir taşıyıcı olabileceği anlaşıldı.

KAYNAKLAR

Akceylan, E., Uyanik, A., Eymur, S., Sahin, O. ve Yilmaz, M., 2015, Calixarene-proline functionalized iron oxide magnetite nanoparticles (Calix-Pro-MN): An efficient recyclable organocatalyst for asymmetric aldol reaction in water, *Applied Catalysis A: General*, 499, 205-212.

Aktas, M., Uyanik, A., Eymur, S. ve Yilmaz, M., 2016, *L*-proline derivatives based on a calix[4]arene scaffold as chiral organocatalysts for the direct asymmetric aldol reaction in water, *Supramolecular Chemistry*, 28 (5-6), 351-359.

Allard, E., Passirani, C. ve Benoit, J.-P., 2009, Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors, *Biomaterials*, 30 (12), 2302-2318.

An, L., Han, L.-L., Zheng, Y.-G., Peng, X.-N., Xue, Y.-S., Gu, X.-K., Sun, J. ve Yan, C.-G., 2016, Synthesis, X-ray crystal structure and anti-tumor activity of calix[n]arene polyhydroxyamine derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 123, 21-30.

An, L., 2019, Design, Preparation and Characterization of Novel Calix[4]arene Bioactive Carrier for Antitumor Drug Delivery, *Frontiers in chemistry*, 7, 732.

An, L., Wang, C., Liu, J.-D., Huang, T.-H., Han, L.-L., Zheng, Y.-G., Sun, J. ve Yan, C.-G., 2019, Structural Design, Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of Novel Dihomooxacalix[4]arene based Anti-tumor Agents, *Frontiers in chemistry*, 7, 856.

Appel, E. A., Rowland, M. J., Loh, X. J., Heywood, R. M., Watts, C. ve Scherman, O. A., 2012, Enhanced stability and activity of temozolomide in primary glioblastoma multiforme cells with cucurbit [n] uril, *Chemical Communications*, 48 (79), 9843-9845.

Arantes, L. M., Scarelli, C., Marsaioli, A. J., de Paula, E. ve Fernandes, S. A., 2009, Proparacaine complexation with β- cyclodextrin and *p*-sulfonic acid calix [6] arene, as evaluated by varied 1H- NMR approaches, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 47 (9), 757-763.

Arduini, A., Manfredi, G., Pochini, A., Sicuri, A. R. ve Ungaro, R., 1991, Selective formylation of calix[4]arenes at the 'upper rim'and synthesis of new cavitands, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (14), 936-937.

Arduini, A., Demuru, D., Pochini, A. ve Secchi, A., 2005, Recognition of quaternary ammonium cations by calix[4]arene derivatives supported on gold nanoparticles, *Chemical Communications* (5), 645-647.

Arnaud-Neu, F., Collins, E. M., Deasy, M., Ferguson, G., Harris, S. J., Kaitner, B., Lough, A. J., McKervey, M. A. ve Marques, E., 1989, Synthesis, X-ray crystal structures, and cation-binding properties of alkyl calixaryl esters and ketones, a new family of macrocyclic molecular receptors, *Journal of the American Chemical Society*, 111 (23), 8681-8691.

Arnaud-Neu, F. ve Schwing-Weill, M.-J., 1997, Calixarenes, new selective molecular receptors, *Synthetic Metals*, 90 (3), 157-164.

Ashwin, B. C. M. A., Herculin Arun Baby, A., Prakash, M., Hochlaf, M. ve Muthu Mareeswaran, P., 2018, A combined experimental and theoretical study on p- s ulfonatocalix [4] arene encapsulated 7- m ethoxycoumarin, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 31 (4), e3788.

Athar, M., Lone, M. Y. ve Jha, P. C., 2018, Designing of calixarene based drug carrier for dasatinib, lapatinib and nilotinib using multilevel molecular docking and

dynamics simulations, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 90 (1-2), 157-169.

Avvakumova, S., Fezzardi, P., Pandolfi, L., Colombo, M., Sansone, F., Casnati, A. ve Prosperi, D., 2014, Gold nanoparticles decorated by clustered multivalent cone-glycocalixarenes actively improve the targeting efficiency toward cancer cells, *Chemical Communications*, 50 (75), 11029-11032.

Baekeland, L. H., 1909, Method of making insoluble products of phenol and formaldehyde, Google Patents.

Bagnacani, V., Franceschi, V., Fantuzzi, L., Casnati, A., Donofrio, G., Sansone, F. ve Ungaro, R., 2012, Lower rim guanidinocalix[4]arenes: macrocyclic nonviral vectors for cell transfection, *Bioconjugate chemistry*, 23 (5), 993-1002.

Barbera, L., Gattuso, G., Kohnke, F. H., Notti, A., Pappalardo, S., Parisi, M. F., Pisagatti, I., Patanè, S., Micali, N. ve Villari, V., 2015, Self-assembly of amphiphilic anionic calix[4]arenes and encapsulation of poorly soluble naproxen and flurbiprofen, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13 (23), 6468-6473.

Bayrakcı, M., Ertul, Ş. ve Yilmaz, M., 2009, Synthesis of di-substituted calix[4]arene-based receptors for extraction of chromate and arsenate anions, *Tetrahedron*, 65 (38), 7963-7968.

Benesi, H. A. ve Hildebrand, J., 1949, A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons, *Journal of the American Chemical Society*, 71 (8), 2703-2707.

Beshara, C. S., Jones, C. E., Daze, K. D., Lilgert, B. J. ve Hof, F., 2010, A simple calixarene recognizes post- translationally methylated lysine, *ChemBioChem*, 11 (1), 63-66.

Bhatti, A. A., Oguz, M., Memon, S. ve Yilmaz, M., 2017a, Dual Fluorescence Response of Newly Synthesized Naphthalene Appended Calix[4]arene Derivative towards Cu 2+ and I−, *Journal of fluorescence*, 27 (1), 263-270.

Bhatti, A. A., Oguz, M. ve Yilmaz, M., 2017b, Magnetizing calixarene: azo dye removal from aqueous media by Fe_3O_4 nanoparticles fabricated with carboxylic-substituted calix[4]arene, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 62 (9), 2819-2825.

Bhatti, A. A., Oguz, M. ve Yilmaz, M., 2018, One-pot synthesis of Fe3O4@Chitosan-pSDCalix hybrid nanomaterial for the detection and removal of Hg^{2+} ion from aqueous media, *Applied Surface Science*, 434, 1217-1223.

Bhatti, A. A., Oguz, M. ve Yilmaz, M., 2020, New water soluble p-sulphonatocalix[4] arene chemosensor appended with rhodamine for selective detection of Hg^{2+} ion, *Journal of Molecular Structure*, 1203, 127436.

Cabibbo, G. ve Craxì, A., 2009, Needle track seeding following percutaneous procedures for hepatocellular carcinoma, *World journal of hepatology*, 1 (1), 62.

Cao, M., Li, Z., Wang, J., Ge, W., Yue, T., Li, R., Colvin, V. L. ve William, W. Y., 2012, Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: enzyme immobilization, protein purification, and food analysis, *Trends in Food Science & Technology*, 27 (1), 47-56.

Chen, M.-X., Li, T., Peng, S. ve Tao, D., 2016, Supramolecular nanocapsules from the self-assembly of amphiphilic calixarene as a carrier for paclitaxel, *New Journal of Chemistry*, 40 (12), 9923-9929.

Choi, J. Y., Thapa, R. K., Yong, C. S. ve Kim, J. O., 2016, Nanoparticle-based combination drug delivery systems for synergistic cancer treatment, *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46 (4), 325-339.

Ciesa, F., Plech, A., Mattioli, C., Pescatori, L., Arduini, A., Pochini, A., Rossi, F. ve Secchi, A., 2010, Guest controlled assembly of gold nanoparticles coated with calix [4] arene hosts, *The Journal of Physical Chemistry C*, 114 (32), 13601-13607.

Coleman, W. A., Baggetto, L. G., Lazar, A. N., Michaud, M. H. ve Magnard, S., 2010, Calixarene derivatives as anticancer agent, Google Patents.

Collins, E. M., McKervey, M. A., Madigan, E., Moran, M. B., Owens, M., Ferguson, G. ve Harris, S. J., 1991, Chemically modified calix[4]arenes. Regioselective synthesis of 1, 3-(distal) derivatives and related compounds. X-Ray crystal structure of a diphenol-dinitrile, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* (12), 3137-3142.

Consoli, G. M. L., Granata, G., Fragassi, G., Grossi, M., Sallese, M. ve Geraci, C., 2015, Design and synthesis of a multivalent fluorescent folate-calix[4]arene conjugate: cancer cell penetration and intracellular localization, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13 (11), 3298-3307.

Couvreur, P. ve Vauthier, C., 2006, Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease, *Pharmaceutical research*, 23 (7), 1417-1450.

Croce, C. M., 2008, Oncogenes and cancer, *New England journal of medicine*, 358 (5), 502-511.

Daniel, M.-C. ve Astruc, D., 2004, Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chemical reviews*, 104 (1), 293-346.

Davis, T. A., Volesky, B. ve Mucci, A., 2003, A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae, *Water research*, 37 (18), 4311-4330.

Deligöz, H. ve Ercan, N., 2002, The synthesis of some new derivatives of calix[4]arene containing azo groups, *Tetrahedron*, 58 (14), 2881-2884.

Dhawan, B., Chen, S.-I. ve Gutsche, C. D., 1987a, Calixarenes, 19. Studies of the formation of calixarenes via condensation of p-alkylphenols and formaldehyde, *Die Makromolekulare Chemie*, 188 (5), 921-950.

Dhawan, B., Chen, S. I. ve Gutsche, C. D., 1987b, Calixarenes, 19. Studies of the formation of calixarenes via condensation of *p*-alkylphenols and formaldehyde, *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 188 (5), 921-950.

Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H. ve Atyabi, F., 2011, Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents, *International journal of nanomedicine*, 6, 877.

Dings, R. P., Levine, J. I., Brown, S. G., Astorgues-Xerri, L., MacDonald, J. R., Hoye, T. R., Raymond, E. ve Mayo, K. H., 2013, Polycationic calixarene PTX013, a potent cytotoxic agent against tumors and drug resistant cancer, *Investigational new drugs*, 31 (5), 1142-1150.

Enustun, B. ve Turkevich, J., 1963, Coagulation of colloidal gold, *Journal of the American Chemical Society*, 85 (21), 3317-3328.

Fahmy, S. A., Ponte, F., Abd El-Rahman, M. K., Russo, N., Sicilia, E. ve Shoeib, T., 2018, Investigation of the host-guest complexation between 4-sulfocalix[4]arene and nedaplatin for potential use in drug delivery, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 193, 528-536.

Ferrari, M., 2005, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Nature reviews cancer*, 5 (3), 161-171.

Frens, G., 1973, Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature physical science*, 241 (105), 20-22.

Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil, S. ve Couvreur, P., 2005, Colloidal carriers and blood–brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain?, *International journal of pharmaceutics*, 298 (2), 274-292.

Geraci, C., Consoli, G. M., Galante, E., Bousquet, E., Pappalardo, M. ve Spadaro, A., 2008, Calix [4] arene decorated with four Tn antigen glycomimetic units and P3CS immunoadjuvant: synthesis, characterization, and anticancer immunological evaluation, *Bioconjugate chemistry*, 19 (3), 751-758.

Gibbs, C. G., Sujeeth, P., Rogers, J. S., Stanley, G. G., Krawiec, M., Watson, W. H. ve Gutsche, C. D., 1995, Syntheses and Conformations of the p-tert-Butylcalix[4]arenethiols, *The Journal of Organic Chemistry*, 60 (26), 8394-8402.

Gilchrist, R., Medal, R., Shorey, W. D., Hanselman, R. C., Parrott, J. C. ve Taylor, C. B., 1957, Selective inductive heating of lymph nodes, *Annals of surgery*, 146 (4), 596.

Granata, G., Paterniti, I., Geraci, C., Cunsolo, F., Esposito, E., Cordaro, M., Blanco, A. R., Cuzzocrea, S. ve Consoli, G. M., 2017, Potential eye drop based on a calix[4]arene nanoassembly for curcumin delivery: Enhanced drug solubility, stability, and anti-inflammatory effect, *Molecular Pharmaceutics*, 14 (5), 1610-1622.

Granata, G., Petralia, S., Forte, G., Conoci, S. ve Consoli, G. M. L., 2020, Injectable supramolecular nanohydrogel from a micellar self-assembling calix[4]arene derivative and curcumin for a sustained drug release, *Materials Science and Engineering: C*, 110842.

Gunupuru, R., Maity, D., Bhadu, G. R., Chakraborty, A., Srivastava, D. N. ve Paul, P., 2014, Colorimetric detection of Cu^{2+} and Pb^{2+} ions using calix[4]arene functionalized gold nanoparticles, *Journal of Chemical Sciences*, 126 (3), 627-635.

Gupta, A. K. ve Gupta, M., 2005, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, 26 (18), 3995-4021.

Gutsche, C. ve Iqbal, M., 1990a, Org. Synth.

Gutsche, C. ve Iqbal, M., 1990b, Synthesis and characterization of new calixarenes from bisphenol A, *Org Synth*, 68, 234-237.

Gutsche, C. D., Dhawan, B., No, K. H. ve Muthukrishnan, R., 1981, Calixarenes. 4. The synthesis, characterization, and properties of the calixarenes from p-tert-butylphenol, *Journal of the American Chemical Society*, 103 (13), 3782-3792.

Gutsche, C. D., Dhawan, B., Levine, J. A., No, K. H. ve Bauer, L. J., 1983, Calixarenes 9: Conformational isomers of the ethers and esters of calix[4]arenes, *Tetrahedron*, 39 (3), 409-426.

Gutsche, C. D. ve Bauer, L. J., 1985, Calixarenes. 14. The conformational properties of the ethers and esters of the calix [6] arenes and the calix[8]arenes, *Journal of the American Chemical Society*, 107 (21), 6059-6063.

Gutsche, C. D. ve Pagoria, P. F., 1985, Calixarenes. 16. Functionalized calixarenes: the direct substitution route, *The Journal of Organic Chemistry*, 50 (26), 5795-5802.

Gutsche, C. D., Iqbal, M. ve Stewart, D., 1986, Calixarenes. 19. Syntheses procedures for p-tert-butylcalix[4]arene, *The Journal of Organic Chemistry*, 51 (5), 742-745.

Gutsche, C. D. ve Lin, L.-G., 1986, Calixarenes 12: the synthesis of functionalized calixarenes, *Tetrahedron*, 42 (6), 1633-1640.

Gutsche, C. D. ve Nam, K. C., 1988, Calixarenes. 22. Synthesis, properties, and metal complexation of aminocalixarenes, *Journal of the American Chemical Society*, 110 (18), 6153-6162.

Gutsche, C. D., Alam, I., Iqbal, M., Mangiafico, T., Nam, K. C., Rogers, J. ve See, K. A., 1989, Topics in calixarene chemistry, *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry*, 7 (1), 61-72.

Gutsche, C. D. ve Stoddart, J. F., 1989, Monographs in Supramolecular Chemistry, Royal Society of Chemistry, Cambridge. 1.

Ha, J.-M., Katz, A., Drapailo, A. B. ve Kalchenko, V. I., 2009, Mercaptocalixarene-capped gold nanoparticles via postsynthetic modification and direct synthesis: effect of calixarene cavity-metal interactions, *The Journal of Physical Chemistry C*, 113 (4), 1137-1142.

Hamada, F., Bott, S. G., Orr, G. W., Coleman, A. W., Zhang, H. ve Atwood, J. L., 1990, Thiocalix [4] arenes. I. Synthesis and structure of ethylthiocalix [4] arene methyl ether and the related structure of bromocalix[4]arene methyl ether, *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry*, 9 (3), 195-206.

Hans, M. L. ve Lowman, A. M., 2002, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6 (4), 319-327.

He, Y., Korboukh, I., Jin, J. ve Huang, J., 2012, Targeting protein lysine methylation and demethylation in cancers, *Acta Biochim Biophys Sin*, 44 (1), 70-79.

Henglein, A., 1989, Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles, *Chemical reviews*, 89 (8), 1861-1873.

Higuchi, T. ve Connors, K., 1965, Advances in analytical chemistry and instrumentation, *Interscience, New York*, 4, 117-212.

Hu, K., Qiao, J., Wu, X., Yang, H., Huang, Y. ve Zhang, S., 2018, Poly (calixarene ionic liquid) modified Fe3O4 nanoparticles as new sorbent for extraction of flavonoids in fruit juice and green tea, *Microchemical Journal*, 143, 39-46.

James, E., Eggers, P. K., Harvey, A. R., Dunlop, S. A., Fitzgerald, M., Stubbs, K. A. ve Raston, C. L., 2013, Antioxidant phospholipid calix[4]arene mimics as micellular delivery systems, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11 (36), 6108-6112.

Ji, X., Song, X., Li, J., Bai, Y., Yang, W. ve Peng, X., 2007, Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate, *Journal of the American Chemical Society*, 129 (45), 13939-13948.

Kamada, R., Yoshino, W., Nomura, T., Chuman, Y., Imagawa, T., Suzuki, T. ve Sakaguchi, K., 2010, Enhancement of transcriptional activity of mutant p53 tumor suppressor protein through stabilization of tetramer formation by calix [6] arene derivatives, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20 (15), 4412-4415.

Kaur, I. P., Bhandari, R., Bhandari, S. ve Kakkar, V., 2008, Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting, *Journal of controlled release*, 127 (2), 97-109.

Kaur, P., Walia, A., Kumar, S. ve Kaur, S., 2009, Antigenotoxic Activity of Polyphenolic Rich Extracts from Aegle marmelos (L.) Correa in Human Blood Lymphocytes and E. coli PQ 37, *Records of Natural Products*, 3 (1).

Kelland, L., 2007, The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, *Nature reviews cancer*, 7 (8), 573-584.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. ve Currie, A. R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer*, 26 (4), 239-257.

Khan, K., Badshah, S. L., Ahmad, N., Rashid, H. U. ve Mabkhot, Y., 2017, Inclusion complexes of a new family of non-ionic amphiphilic dendrocalix[4]arene and poorly water-soluble drugs naproxen and ibuprofen, *Molecules*, 22 (5), 783.

Kopnin, B., 2000, Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis, *Biochemistry C/C of Biokhimiia*, 65 (1), 2-27.

Kumar, M., 2000, Nano and microparticles as controlled drug delivery devices, *J. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3 (2), 234-258.

Kumari, A., Yadav, S. K. ve Yadav, S. C., 2010, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 75 (1), 1-18.

Kutluk, T., 1996, Kanser konusunda genel bilgiler, TC Sağlık Bak. KAnser Savaş Daire Bşk. Türk Kanser Arş. ve Savaş Kurumu, p.

Laurent, S., Dutz, S., Häfeli, U. O. ve Mahmoudi, M., 2011, Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Advances in colloid and interface science*, 166 (1-2), 8-23.

Lee, E. S., Oh, K. T., Kim, D., Youn, Y. S. ve Bae, Y. H., 2007, Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly (L-lactic acid)-b-poly (ethylene glycol)-b-poly (L-histidine), *Journal of controlled release*, 123 (1), 19-26.

Lee, N. ve Hyeon, T., 2012, Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents, *Chemical Society Reviews*, 41 (7), 2575-2589.

Li, C., Li, D., Wan, G., Xu, J. ve Hou, W., 2011, Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls, *Nanoscale research letters*, 6 (1), 440.

Li, Z.-T., Ji, G.-Z., Zhao, C.-X., Yuan, S.-D., Ding, H., Huang, C., Du, A.-L. ve Wei, M., 1999, Self-assembling calix[4]arene[2]catenanes. Preorganization, conformation, selectivity, and efficiency, *The Journal of Organic Chemistry*, 64 (10), 3572-3584.

Lu, A. H., Salabas, E. e. L. ve Schüth, F., 2007, Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application, *Angewandte Chemie International Edition*, 46 (8), 1222-1244.

Maity, D., Kumar, A., Gunupuru, R. ve Paul, P., 2014, Colorimetric detection of mercury (II) in aqueous media with high selectivity using calixarene functionalized gold nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 455, 122-128.

Maity, D., Bhatt, M. ve Paul, P., 2015, Calix[4]arene functionalized gold nanoparticles for colorimetric and bare-eye detection of iodide in aqueous media and periodate aided enhancement in sensitivity, *Microchimica Acta*, 182 (1-2), 377-384.

McPhie, D. L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K. J., Manly, S. P., Kozlowski, M. R., Neve, K. A. ve Neve, R. L., 2003, DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3, *Journal of Neuroscience*, 23 (17), 6914-6927.

Meenakshi, C., Jayabal, P. ve Ramakrishnan, V., 2014, Molecular recognition of curcumin (Indian Ayurvedic medicine) by the supramolecular probe, pt-butyl calix(8)arene, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 127, 172-176.

Mo, J., Eggers, P. K., Yuan, Z.-x., Raston, C. L. ve Lim, L. Y., 2016, Paclitaxel-loaded phosphonated calixarene nanovesicles as a modular drug delivery platform, *Scientific reports*, 6 (1), 1-12.

Morzherin, Y., Rudkevich, D. M., Verboom, W. ve Reinhoudt, D. N., 1993, Chlorosulfonylated calix[4]arenes: precursors for neutral anion receptors with a selectivity for hydrogen sulfate, *The Journal of Organic Chemistry*, 58 (26), 7602-7605.

Moussa, Y. E., Venkataramanan, N. S. ve Wheate, N. J., 2020, Demonstration of the first known 1: 2 host-guest encapsulation of a platinum anticancer complex within a macrocycle, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 96 (1-2), 145-154.

Mulvaney, P., 1996, Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles, *Langmuir*, 12 (3), 788-800.

Muneer, S., Memon, S., Pahnwar, Q. K., Bhatti, A. A. ve Khokhar, T. S., 2017, Synthesis and investigation of antimicrobial properties of pyrrolidine appended calix[4]arene, *Journal of Analytical Science and Technology*, 8 (1), 1-6.

Nag, R., Kandi, R. ve Rao, C. P., 2018, Host–Guest Complexation of a Lipoic Acid Conjugate of Calix[4]arene with Pyridinium Moiety on Gold Nanorods for Mitochondrial Tracking Followed by Cytotoxicity in HeLa Cells under 633 nm Laser Light, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6 (7), 8882-8890.

Nag, R., Polepalli, S., Althaf Hussain, M. ve Rao, C. P., 2019, Ratiometric Cu2+ Binding, Cell Imaging, Mitochondrial Targeting, and Anticancer Activity with Nanomolar IC50 by Spiro-Indoline-Conjugated Calix[4]arene, *ACS omega*, 4 (8), 13231-13240.

Nagasaki, T., Tajiri, Y. ve Shinkai, S., 1993, New water- soluble calixarenes modified with amino acids at the upper rim, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays- Bas*, 112 (6), 407-411.

Narkhede, N., Uttam, B., Kandi, R. ve Rao, C. P., 2018, Silica–calix hybrid composite of allyl calix[4]arene covalently linked to MCM-41 nanoparticles for sustained release of doxorubicin into cancer cells, *ACS omega*, 3 (1), 229-239.

Neri, P., Sessler, J. L. ve Wang, M.-X., 2016, Calixarenes and beyond, Springer, p.

Nifli, A.-P., Theodoropoulos, P. A., Munier, S., Castagnino, C., Roussakis, E., Katerinopoulos, H. E., Vercauteren, J. ve Castanas, E., 2007, Quercetin exhibits a specific fluorescence in cellular milieu: a valuable tool for the study of its intracellular distribution, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (8), 2873-2878.

Ochekpe, N. A., Olorunfemi, P. O. ve Ngwuluka, N. C., 2009, Nanotechnology and drug delivery part 1: background and applications, *Tropical journal of pharmaceutical research*, 8 (3).

Oguz, M., Bhatti, A. A., Karakurt, S., Aktas, M. ve Yilmaz, M., 2017, New water soluble Hg2+ selective fluorescent calix[4]arenes: Synthesis and application in living cells imaging, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 171, 340-345.

Oguz, M., Bhatti, A. A., Dogan, B., Karakurt, S., Durdagi, S. ve Yilmaz, M., 2019, Formation of the inclusion complex of water soluble fluorescent calix[4]arene and naringenin: solubility, cytotoxic effect and molecular modeling studies, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-13.

Oguz, M., Kalay, E., Akocak, S., Nocentini, A., Lolak, N., Boga, M., Yilmaz, M. ve Supuran, C. T., 2020, Synthesis of calix[4]azacrown substituted sulphonamides with antioxidant, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, tyrosinase and

carbonic anhydrase inhibitory action, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35 (1), 1215-1223.

Oh, S. W., Moon, J. D., Lim, H. J., Park, S. Y., Kim, T., Park, J., Han, M. H., Snyder, M. ve Choi, E. Y., 2005, Calixarene derivative as a tool for highly sensitive detection and oriented immobilization of proteins in a microarray format through noncovalent molecular interaction, *The FASEB journal*, 19 (10), 1335-1337.

Ozyilmaz, E., Cetinguney, S. ve Yilmaz, M., 2019, Encapsulation of lipase using magnetic fluorescent calix[4]arene derivatives; improvement of enzyme activity and stability, *International journal of biological macromolecules*, 133, 1042-1050.

Pandya, A., Joshi, K. V., Modi, N. R. ve Menon, S. K., 2012, Rapid colorimetric detection of sulfide using calix[4]arene modified gold nanoparticles as a probe, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 168, 54-61.

Pandya, A., Sutariya, P. G. ve Menon, S. K., 2013, A non enzymatic glucose biosensor based on an ultrasensitive calix[4]arene functionalized boronic acid gold nanoprobe for sensing in human blood serum, *Analyst*, 138 (8), 2483-2490.

Paquet, V., Zumbuehl, A. ve Carreira, E. M., 2006, Biologically active amphotericin B-calix[4]arene conjugates, *Bioconjugate chemistry*, 17 (6), 1460-1463.

Patel, G. ve Menon, S., 2009, Recognition of lysine, arginine and histidine by novel p-sulfonatocalix[4]arene thiol functionalized gold nanoparticles in aqueous solution, *Chemical Communications* (24), 3563-3565.

Patungwasa, W. ve Hodak, J. H., 2008, pH tunable morphology of the gold nanoparticles produced by citrate reduction, *Materials Chemistry and Physics*, 108 (1), 45-54.

Pelizzaro-Rocha, K. J., de Jesus, M. B., Ruela-de-Sousa, R. R., Nakamura, C. V., Reis, F. S., de Fátima, A. ve Ferreira-Halder, C. V., 2013, Calix[6]arene bypasses human pancreatic cancer aggressiveness: downregulation of receptor tyrosine kinases and induction of cell death by reticulum stress and autophagy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833 (12), 2856-2865.

Pescatori, L., Boccia, A., Ciesa, F., Rossi, F., Grillo, V., Arduini, A., Pochini, A., Zanoni, R. ve Secchi, A., 2010, The Effect of Ligand Denticity in Size- Selective Synthesis of Calix[n]arene Stabilized Gold Nanoparticles: A Multitechnique Approach, *Chemistry–A European Journal*, 16 (36), 11089-11099.

Pulkkinen, P. M., Wiktorowicz, S., Aseyev, V. ve Tenhu, H., 2013, Complexation of calix [4] arene protected gold nanoparticles with pyridinium and bipyridinium compounds, *RSC advances*, 3 (3), 733-742.

Quintana, A., Raczka, E., Piehler, L., Lee, I., Myc, A., Majoros, I., Patri, A. K., Thomas, T., Mulé, J. ve Baker, J. R., 2002, Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor, *Pharmaceutical research*, 19 (9), 1310-1316.

Rahimi, M., Karimian, R., Mostafidi, E., Noruzi, E. B., Taghizadeh, S., Shokouhi, B. ve Kafil, H. S., 2018, Highly branched amine-functionalized p-sulfonatocalix[4]arene decorated with human plasma proteins as a smart, targeted, and stealthy nano-vehicle for the combination chemotherapy of MCF7 cells, *New Journal of Chemistry*, 42 (15), 13010-13024.

Rahman, M. R., Saleh, F. S., Okajima, T. ve Ohsaka, T., 2011, pH dependence of the size and crystallographic orientation of the gold nanoparticles prepared by seed-mediated growth, *Langmuir*, 27 (8), 5126-5135.

Ramdani, L., Bourboulou, R., Belkouch, M., Jebors, S., Tauran, Y., Parizot, C., Suwinska, K., Coleman, A., Duyckaerts, C. ve Lazar, A., 2015, Multifunctional Curcumin-Nanocarriers Based on Host-Guest Interactions for Alzheimer Disease Diagnostic, *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 6 (2), 1.

Renziehausen, A., Tsiailanis, A. D., Perryman, R., Stylos, E. K., Chatzigiannis, C., O'Neill, K., Crook, T., Tzakos, A. G. ve Syed, N., 2019, Encapsulation of temozolomide in a calixarene nanocapsule improves its stability and enhances its therapeutic efficacy against glioblastoma, *Molecular Cancer Therapeutics*, 18 (9), 1497-1505.

Rocha-Brito, K. J. P., Fonseca, E. M. B., de Freitas Oliveira, B. G., de Fátima, Â. ve Ferreira-Halder, C. V., 2020, Calix[6]arene Diminishes Receptor Tyrosine Kinase Lifespan in Pancreatic Cancer Cells and Inhibits Their Migration and Invasion Efficiency, *Bioorganic Chemistry*, 103881.

Rosi, N. L. ve Mirkin, C. A., 2005, Nanostructures in biodiagnostics, *Chemical reviews*, 105 (4), 1547-1562.

Sahin, O., Eymur, S., Uyanik, A., Akceylan, E. ve Yilmaz, M., 2018, Chiral Calix[4]arenes-bearing prolinamide functionality as organocatalyst for asymmetric direct aldol reactions in water, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 38 (2), 168-179.

Santos, D., Medeiros-Silva, J., Cegonho, S., Alves, E., Ramilo-Gomes, F., Santos, A. O., Silvestre, S. ve Cruz, C., 2015, Cell proliferation effects of calix[4]arene derivatives, *Tetrahedron*, 71 (40), 7593-7599.

Sarkar, J., Ray, S., Chattopadhyay, D., Laskar, A. ve Acharya, K., 2012, Mycogenesis of gold nanoparticles using a phytopathogen Alternaria alternata, *Bioprocess and biosystems engineering*, 35 (4), 637-643.

Sayin, S., Ozyilmaz, E., Oguz, M., Yusufoglu, R. ve Yilmaz, M., 2020, Calixarenes functionalised water-soluble iron oxide magnetite nanoparticles for enzyme immobilisation, *Supramolecular Chemistry*, 1-11.

Shetty, D., Skorjanc, T., Olson, M. A. ve Trabolsi, A., 2019, Self-assembly of stimuli-responsive imine-linked calix[4]arene nanocapsules for targeted camptothecin delivery, *Chemical Communications*, 55 (60), 8876-8879.

Shinkai, S., Mori, S., Koreishi, H., Tsubaki, T. ve Manabe, O., 1986, Hexasulfonated calix [6] arene derivatives: a new class of catalysts, surfactants, and host molecules, *Journal of the American Chemical Society*, 108 (9), 2409-2416.

Singh, R. ve Lillard Jr, J. W., 2009, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and molecular pathology*, 86 (3), 215-223.

Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R. ve Rudzinski, W. E., 2001, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Journal of controlled release*, 70 (1-2), 1-20.

Stubbs, M., McSheehy, P. M., Griffiths, J. R. ve Bashford, C. L., 2000, Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment, *Molecular medicine today*, 6 (1), 15-19.

Sugarbaker, P. ve Kemeny, N., 1989, Management of metastatic cancer to the liver, *Advances in surgery (Chicago)*, 22, 1-56.

Tai, C. Y., Tai, C.-T., Chang, M.-H. ve Liu, H.-S., 2007, Synthesis of magnesium hydroxide and oxide nanoparticles using a spinning disk reactor, *Industrial & engineering chemistry research*, 46 (17), 5536-5541.

Takeshita, M. ve Shinkai, S., 1995, Recent topics on functionalization and recognition ability of calixarenes: the 'third host molecule', *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 68 (4), 1088-1097.

Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J. ve Smith, P., 1985, A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules, *Polymer journal*, 17 (1), 117-132.

Toshima, N. ve Yonezawa, T., 1998, Bimetallic nanoparticles novel materials for chemical and physical applications, *New Journal of Chemistry*, 22 (11), 1179-1201.

Turkevich, J., Stevenson, P. C. ve Hillier, J., 1951, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75.

Valand, N. N., Patel, M. B. ve Menon, S. K., 2015, Curcumin-p-sulfonatocalix[4] resorcinarene (p-SC [4] R) interaction: thermo-physico chemistry, stability and biological evaluation, *RSC advances*, 5 (12), 8739-8752.

Verboom, W., Durie, A., Egberink, R. J., Asfari, Z. ve Reinhoudt, D. N., 1992, Ipso nitration of p-tert-butylcalix[4]arenes, *The Journal of Organic Chemistry*, 57 (4), 1313-1316.

Viola, S., Merlo, S., Consoli, G. M., Drago, F., Geraci, C. ve Sortino, M. A., 2010, Modulation of C6 glioma cell proliferation by ureido-calix[8]arenes, *Pharmacology*, 86 (3), 182-188.

Wands, J. R. ve Blum, H. E., 1991, Primary hepatocellular carcinoma, Mass Medical Soc.

Wang, G.-S., Zhang, H.-Y., Li, D., Wang, P.-Y. ve Liu, Y., 2011a, Characterisation and antiproliferative activity of irinotecan and sulphonatocalixarene inclusion complex, *Supramolecular Chemistry*, 23 (6), 441-446.

Wang, K., Guo, D.-S., Wang, X. ve Liu, Y., 2011b, Multistimuli responsive supramolecular vesicles based on the recognition of p-sulfonatocalixarene and its controllable release of doxorubicin, *Acs Nano*, 5 (4), 2880-2894.

Ward, K. M., Binns, H., Chin, C., Webber, S. A., Canter, C. E. ve Pahl, E., 2004, Pediatric heart transplantation for anthracycline cardiomyopathy: cancer recurrence is rare, *The Journal of heart and lung transplantation*, 23 (9), 1040-1045.

Wheate, N. J., Abbott, G. M., Tate, R. J., Clements, C. J., Edrada-Ebel, R. ve Johnston, B. F., 2009, Side-on binding of p-sulphonatocalix[4]arene to the dinuclear platinum complex trans-[{PtCl (NH3) 2} 2μ-dpzm]$^{2+}$ and its implications for anticancer drug delivery, *Journal of inorganic biochemistry*, 103 (3), 448-454.

Wu, W., He, Q. ve Jiang, C., 2008, Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies, *Nanoscale research letters*, 3 (11), 397.

Xia, H., Bai, S., Hartmann, J. r. ve Wang, D., 2010, Synthesis of monodisperse quasi-spherical gold nanoparticles in water via silver(I)-assisted citrate reduction, *Langmuir*, 26 (5), 3585-3589.

Yang, C. S., Chin, K.-V. ve Lambert, J. D., 2004, Cancer Chemoprevention by Targeting Proteasomal Degradation: Commentary re KA Dragnev et al, Specific Chemopreventive Agents Trigger Proteasomal Degradation of G1 Cyclins: Implications for Combination Therapy. Clin Cancer Res, 2004; 10: 2570–7, *Clinical cancer research*, 10 (7), 2220-2221.

Yang, L., Cao, Z., Sajja, H. K., Mao, H., Wang, L., Geng, H., Xu, H., Jiang, T., Wood, W. C. ve Nie, S., 2008, Development of receptor targeted magnetic iron oxide

nanoparticles for efficient drug delivery and tumor imaging, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 4 (4), 439-449.

Yang, W. ve de Villiers, M. M., 2004a, Aqueous solubilization of furosemide by supramolecular complexation with 4-sulphoniccalix[n]arenes, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 56 (6), 703-708.

Yang, W. ve de Villiers, M. M., 2004b, The solubilization of the poorly water soluble drug nifedipine by water soluble 4-sulphonic calix[n]arenes, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 58 (3), 629-636.

Yilmaz, B., Bayrac, A. T. ve Bayrakci, M., 2020, Evaluation of anticancer activities of novel facile synthesized calix [n] arene sulfonamide analogs, *Applied biochemistry and biotechnology*, 190 (4), 1484-1497.

Yousaf, A., Abd Hamid, S., Bunnori, N. M. ve Ishola, A., 2015, Applications of calixarenes in cancer chemotherapy: facts and perspectives, *Drug design, development and therapy*, 9, 2831.

Zinke, A. ve Ziegler, E., 1944, Zur Kenntnis des Härtungsprozesses von Phenol- Formaldehyd- Harzen, X. Mitteilung, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 77 (3- 4), 264-272.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Öğr. Gör. Mehmet OĞUZ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Seydişehir / 20.04.1988
Telefon : 05444637436
Faks :
e-mail : m.oguz2011@gmail.com / moguz@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Seydişehir Lisesi	2006
Üniversite	:	Kafkas Üniversitesi	2011
Yüksek Lisans	:	Kafkas Üniversitesi	2014
Doktora	:	Selçuk Üniversitesi	2020

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2020-	Selçuk Üniversitesi	Öğretim Görevlisi
2018-2020 (2Yıl)	TÜBİTAK-BİDEP	2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt Içi Doktora Burs Programı
2017-2020 (3Yıl)	Yükseköğretim Kurulu (YÖK)	100/2000 YÖK Doktora Burs Proğramı
2017-2019 (2 Yıl)	TUBİTAK 1001 (116Z173)	Yardımcı Araştırıcı
2017-2018 (1 Yıl)	TUBİTAK 1002 (116Z933)	Yardımcı Araştırıcı
2014-2016 (2 Yıl)	TUBİTAK 1001 (113Z445)	Bursiyer

UZMANLIK ALANI

- ORGANİK KİMYA
- BİOORGANİK KİMYA
- SUPRAMOLEKÜLER KİMYA
- ANTİ-KANSER BİLEŞİKLERİN SENTEZİ
- İLAÇ TAŞINIM SİSTEMLERİ
- NANOPARTİKÜL SENTEZİ
- SENSÖR KİMYASI

YABANCI DİLLER

- İNGİLİZCE

ÖDÜLLER

- **KİMYAGERLER DERNEĞİ ARAŞTIRMA TEŞVİK ÖDÜLÜ 2020**

YAYINLAR

1) **Oguz M.,** Gul A., Karakurt S., Yilmaz M., '*Synthesis and Evaluation of the Antitumor Activity of Calix[4]arene L-Proline Derivatives*', ***Bioorganic Chemistry*, 2020. (*Doktora Tez Yayını*)**

2) **Oguz M.**, Bhatti A.A., Yilmaz M., '*Surface coating of magnetite nanoparticles with fluorescence derivative for the detection of mercury in water environments*, ***Materials Letters*, 2020.**

3) **Oguz M.**, Kursunlu A.N, Yilmaz M., '*Low-cost and environmentally sensitive fluorescent cellulose paper for naked-eye detection of Fe (III) in aqueous media*', ***Dyes and Pigments*, 2020.**

4) Gul A., **Oguz M.**, Kursunlu A.N, Yilmaz M., '*A novel colorimetric/fluorometric dual-channel sensor based on phenolphthalein and Bodipy for Sn (II) and Al (III)*

ions in half-aqueous medium and its applications in bioimaging', ***Dyes and Pigments*, 2020.**

5) **Oguz M.**, Kalay E., Akocak S., Nocentini A., Boga M., Lolak N., Yilmaz M., Supuran CT., '*Synthesis of calix [4] azacrown substituted sulphonamides with antioxidant, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, tyrosinase and carbonic anhydrase inhibitory action*', ***Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2020.**

6) Bhatti A.A., **Oguz M.**, Yilmaz M., '*New water soluble p-sulphonatocalix[4]arene chemosenosor appended with rhodamine for selective detection of Hg^{2+} ion*', ***Journal of Molecular Structure*, 2020.**

7) Sayin S., Ozyilmaz E., Yusufoglu R., **Oguz M.**, Yilmaz M., '*New water soluble p-sulphonatocalix[4]arene chemosenosor appended with rhodamine for selective detection of Hg^{2+} ion*', ***Supramolecular Chemistry*, 2020.**

8) Yilmaz M., Karanastasis A., Chatziathanasiadou M.V., **Oguz M.**, Kougioumtzi A., Clemente N., Kellici T.F., Zafeiropoulos N.E., Avgeropoulos A., Mavromoustakos T., Dianzani U., Karakurt S. and Tzakos A., '*Inclusion of Quercetin in Gold Nanoparticles Decorated with Supramolecular Hosts Amplifies its Tumor Targeting Properties*', ***ACS Applied Bio Materials*, 2019 (JOURNAL COVER!). (*Doktora Tez Yayını*)**

9) Kursunlu A.N, **Oguz M.**, Yilmaz M, '*Three-way fluorescent switching of rhodamine-Bodipy for detection of mercury(II) in half-aqueous medium*', ***IEEE Sensors*, 2019**

10) **Oguz M.,** Bhatti A.A., Dogan B., Karakurt S., Durdagi S., Yilmaz M., '*Formation of the Inclusion Complex of Water Soluble Fluorescent Calix[4]arene and Naringenin: Solubility, Cytotoxic effect and Molecular Modeling Studies*' ***Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2019**

11) Kocer M.B., Erdogan Z.O., **Oguz M.,** Kucukkolbasi S., Yilmaz M., '*A Calix [4] arene-tren modified electrode for determination of Lead ions in aqueous solution*' ***Organic Communications*, 2019.**

12) Bhatti A.A., **Oguz M.**, Yilmaz M., '*One-pot synthesis of Fe_3O_4@Chitosan-pSDCalix hybrid nanomaterial for the detection and removal of Hg^{2+}ion from aqueous media*'. ***Applied Surface Science*, 2018.**

13) Bhatti A.A., **Oguz M.**, Yilmaz M., '*Magnetizing Calixarene: Azo Dye Removal from Aqueous Media by Fe_3O_4 Nanoparticles Fabricated with Carboxylic-Substituted Calix[4]arene*', ***Journal of Chemical & Engineering Data*, 2017**

14) Uyanik I., **Oguz M.**, Bhatti A.A., Uyanik A., Yilmaz M., '*A New Piperidine Derivatized-Schiff Base Based "Turn-on" Cu^{2+} Chemo-Sensor*'. ***Journal of Fluorescence*, 2017.**

15) Oguz M., Bhatti A.A., Karakurt S., Yilmaz M., '*New water soluble Hg^{2+} selective fluorescent calix[4]arenes: Synthesis and application in living cells imaging*', ***Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017.**

16) Bhatti A.A., **Oguz M.,** Memon S., Yilmaz M., '*Dual Fluorescence Response of Newly Synthesized Naphthalene Appended Calix[4]arene Derivative towards Cu^{2+} and I^-*, ***Journal of Fluorescence*, 2016.**

17) Elçin S., Deligöz H., Bhatti A.A., **Oguz M.,** Karakurt S., Yilmaz M., '*Synthesis and evaluation of fluorescence properties of Cu^{2+}selective azocalix[4]arenes and their application in living cell imaging*, ***Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016.**

18) Sendil K., Tekin T., Göksu H., **Oguz M.,** Anıl B., and Gültekin M. S., '*A Novel Method for the Synthesis of Newfangled Asymmetric Schiff Bases from α-amino Acids under Ultrasonic Conditions and in Aqueous Medium*', ***Journal of the Chinese Chemical Society*, 2016. (*Yüksek Lisans Tez Yayını*)**

Ulusal ve Uluslararası Bildiriler:

1) **Mehmet OGUZ**, Alev GUL, Serdar KARAKURT, Mustafa YILMAZ *'The Synthesis of Cationic Calix[4]arene Derivatives and Evaluation of Their Cytotoxic Potential for Human Cancerous Cells'* 8th International Congress of Drug Chemistry: Design, Synthesis, Production and Standardization of Pharmaceutical Active Substances, Antalya 2020, (**Oral Presentation**)

2) Malak ALIZADA, Alev GUL, **Mehmet OGUZ**, Mustafa YILMAZ '*The Synthesis of Calixarene Based Non-Toxic Fluorogenic and Colorimetric Dual-Channel Chemo-sensor and its Applications in Bioimaging*' 8th International Congress of Drug Chemistry: Design, Synthesis, Production and Standardization of Pharmaceutical Active Substances, Antalya 2020, (**Oral Presentation**)

3) Gül A., **Oguz M**, Karakurt S, Yilmaz M, 2019, "*Synthesis of Calix[4]arene Derivatives Carrying L-Proline Groups and Their Cytotoxic Properties and Effects on DNA Structure with Various Human Cancer Cell Lines"* 2nd Eurasia Biochemical Approaches Technologies (2. EBAT), Ankara 2019 (**Oral Presentation**)

4) **Mehmet OGUZ**, Ayse Yildirim, Ayse Damla Demir, Arzu Uyanık, Serdar Karakurt, Mustafa YILMAZ, '*Synthesis of L-Proline Substitute Super Base Carrying Calix[4]arene Derivative and Their Anti-proliferative Effect in human cancer cells'* EurasianBioChem Kongresi, Ankara 2019, (**Oral Presentation**)

5) Anisa Azimi, **Mehmet OGUZ**, Mustafa Barıs KOCER, Ayse YILDIRIM, Ayse Damla Demir, Mustafa YILMAZ, '*Synthesis of a water-soluble calix[8]arene proline derivative for increase water solubility of Morin'* EurasianBioChem Kongresi, Ankara 2019, (**Oral Presentation**)

6) **Mehmet OĞUZ**, Serdar KARAKURT, Mustafa YILMAZ, *Pirdil Türevli Kaliks[8]arenlerin Sentezi ve Antitümör Etkilerinin İncelenmesi,* Uluslararası 7. İlaç Kimyası: İlaç Etken Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya 2019, (**Oral Presentation**)
7) Alev GÜL, **Mehmet OĞUZ**, Malak Alizada, Serdar KARAKURT, Mustafa YILMAZ, *DLD-1 ve MDA-231 Kanser Hücre Hatlarında L-Prolin Grubu Taşıyan Kaliks[4]aren Bileşiklerinin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi,* Uluslararası 7. İlaç Kimyası: İlaç Etken Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya 2019, (**Oral Presentation**)

8) Serdar KARAKURT, **Mehmet OGUZ**, Mustafa YILMAZ, Increased Solubility And Efficacy Of Water Insoluble Flavonoids With N,N-Dimethylalkyl Groups Carrying Calix[n]Arenes, ICNTC (International Conference on New Trends in Chemistry), Atina 2019 (**Oral Presentation**)

9) Mustafa Baris Kocer, Zehra Ozden Erdogan, **Mehmet Oguz**, Semahat Kucukkolbasi, Mustafa Yilmaz*, 'A sensitive electrochemical sensor for rapid and selective determination of lead ions in aqueous solution using modified electrode with a calix[4]arene-tren derivative'*, 4th International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies (ITWCCST), Kiev, Ukraine 2018 (**Oral Presentation**)

10) **Mehmet Oguz**, Asıf Ali Bhatti, Serdar Karakurt, Mustafa Yılmaz, *'Evaluation of Cytotoxicity of human cancer cell line Through Water-Soluble Fluorescent Calix[4]Arene carrying Naringenin'* 28th National & 16th International Chemistry Conference, Karachi, Pakistan 2017 (**Oral Presentation**)

11) **Mehmet OĞUZ**, Alev Gül, Serdar Karakurt ve Mustafa Yılmaz, '*Yeni Antikanser Ajanı Olarak P-Sülfokaliks[8]Arenlerin Sentezi, Doğal Bir Flavodoid Olan Kuersetinin Çözünürlüğünün Artırılmasında Kullanılması Ve Farklı Kanser Hücrelerindeki Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi*' Uluslararası Katılımlı 6. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi Antalya 2018 (**Oral Presentation**)

12) İbrahim Uyanık, **Mehmet Oğuz**, Asif Ali Bhatti, Arzu Uyanık, Serdar Karakurt, Mustafa Yılmaz, *'Cu^{+2} Duyarlı Floresans Kemosensör Olan Bir Piperidin-Türevli Schiff Bazının Akciğer Hücrelerinde Biyo-görüntülenmesi',* Uluslararası Katılımlı 6. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi Antalya 2018 (**Oral Presentation**)

13) Ayşe Yıldırım, **Mehmet OĞUZ**, Alev Gül, Serdar Karakurt ve Mustafa Yılmaz, '*İnsan Rahim Kanseri "HeLa" Hücresinde N,N-dimetilalkil Grubu Taşıyan p-ter-butilkaliks[8]arenin Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi*' Uluslararası Katılımlı 6. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi Antalya 2018 (**Poster Presentation**)

14) **Mehmet Oguz**, Asıf Ali Bhatti, Mustafa Yılmaz ,'*Retrievable hybrid nanomaterial for the detection and removal of Hg $^{2+}$ ion',* 4th International Turk-Pak Conference on Chemical Sciences KONYA 2017, (**Oral Presentation**)

15) Asif Ali Bhatti, **Mehmet Oguz**, Ashfaque Ali Bhatti, Shahabuddin Memon, Mustafa Yilmaz, '*New water soluble p-sulphonatocalix[4]arene chemosenosor appended with rhodamine for selective detection of Hg $^{2+}$ ion'*, 4th International Turk-Pak Conference on Chemical Sciences KONYA 2017, (**Poster Presentation**)

16) Alev Gül, **Mehmet Oguz**, Asıf Ali Bhattı, Serdar Karakurt, Mustafa Yılmaz, '*Synthesis of Some Calix [4] aren Prolin Group and Its Cytotoxic Effects on Human Prostate Cancer Cell'*, 4th International Turk-Pak Conference on Chemical Sciences KONYA 2017, (**Poster Presentation**)

17) Mustafa Baris Kocer, Zehra Ozden Erdogan, **Mehmet Oguz**, Semahat Kucukkolbasi, Mustafa Yilmaz*, 'Fabrication And Characterization Of A Selective Electrochemical Hg (II) Sensor Based On A New Synthesized Dansyl Amide Modified GCE'* 4th International Turk-Pak Conference on Chemical Sciences KONYA 2017, (**Poster Presentation**)

18) **Mehmet OĞUZ**, Serdar KARAKURT, Mustafa YILMAZ, *Gemsitabin Taşıyan Guanidin Türevli Kaliks[4]Arenlerin Sentezi ve Kolon Kanseri Hücre Hattı*

Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi, Uluslararası Katılımlı 5. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya 2017, (**Poster Presentation**)

19) **Mehmet Oguz**, Asıf Ali Bhatti, Serdar Karakurt, Mustafa Yılmaz, '*Water Soluble Fluorescent Calıx[4]Arene As Narıngenın Carrıer: Enhanced Solubılıty, Cytotoxıcıty And Cancer Cell Imagıng*', International Congress on Medicinal and Aromatic Plants, May 10-12, 2017, Konya, (**Poster Presentation**)

20) **Mehmet Oguz**, Asıf Ali Bhatti, Serdar Karakurt, Mustafa Yılmaz, '*Cu^{2+}And I-Selectıve Calıx[4]Arene Derıvatıve Appended Wıth Naphthalene As Fluorescent Probe*, 1st International Black Sea Congress on Environmental Sciences (IBCESS) Giresun 2016, (**Poster Presentation**)

21) Karakurt Serdar, **Oğuz Mehmet**, Yılmaz Mustafa, '*Doğal Flavonoid Antikarsinojen Bileşiklerin Sentetik Nano Partiküller ile Antikarsinojen Etkilerin Arttırılması'*, 23. ulusal biyoloji kongresi Gaziantep 2016, (**Oral Presentation**)

22) **Oğuz Mehmet**, Karakurt Serdar, Yılmaz Mustafa, '*Prolin Grubu İçeren Kaliks[4]Arenlerinin Pc-3 Prostat Kanseri Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi*' 23. ulusal biyoloji kongresi Gaziantep 2016, (**Poster Presentation**)

23) Gül Alev, **Oğuz Mehmet**, Yılmaz Mustafa, Karakurt Serdar, '*Kaliksaren-Prolin Gemsitabin Kompleksinin PC-3 Prostat Kanseri Hücre Hattı Üzerine Etkileri'*, 23. ulusal biyoloji kongresi Gaziantep 2016, (**Poster Presentation**)

24) **Mehmet Oguz**, Asıf Ali Bhatti, Serdar Karakurt, Mustafa Yılmaz, 'Kaliksaren İmmobilize Altın Nanopartiküllerin Antikanser Bileşik Olan Sunitinib-A' nın Taşınmasında Kullanılması', 4.İlaç Kimyası kongresi Kuşadası 2016, (**Poster Presentation**)

25) **Mehmet Oguz**, Asıf Ali Bhatti, Serdar Karakurt, Mustafa Yılmaz, '*Sülfo Grubu Taşıyan Kaliksaren Türevlerinin Sentezi, Altın Nanopartiküllere İmmobilizasyonu*

Ve Bazı Antikanser Fenolik Bileşiklerin Taşınmasında Kullanılması', 27. Ulusal Kimya Kongresi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi 2015, (**Oral Presentation**)

26) **Mehmet Oguz**, Asıf Ali Bhatti, Serdar Karakurt, Mustafa Yılmaz, *'Suda Çözünebilen P-Sülfokaliks[4]Aren Kullanılarak Doğal Bir Antikanser Bileşiği Olan Kuersetinin Sudaki Çözünürlüğünün Artırılması'* 27. Ulusal Kimya Kongresi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi 2015, (**Poster Presentation**)

27) Latife Kaya, **Mehmet Oguz**, Asıf Ali Bhatti, Serdar Karakurt, Mustafa Yılmaz '*Katyonik Yapıdaki Kaliks(4)Aren Sentezi, Altın Nanopartiküllere İmmobilizasyonu'*, 27. Ulusal Kimya Kongresi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi 2015, (**Poster Presentation**)

28) **Mehmet Oğuz**, Haydar Göksu, Kıvılcım Şendil, M.Serdar Gültekin, '*Ultrasonik Şartlar ve Su içerisinde Kiral Aminoasitlerden Kiral Schiff Bazı Sentezleri*' 2.İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi 2014, (**Poster Presentation**)

29) G. Uğurlu, K. Şendil, **M. Oğuz**, *'Yeni Optikçe aktif Schiff Bazının ^{1}H ve ^{13}C NMR Spektrumlarının Deneysel ve Teorik olarak İncelenmesi'* 29. Uluslararası Fizik Kongresi, Bodrum 2012, (**Oral Presentation**)

30) Kıvılcım Şendil, Halil Çalışkan, Duygu Toplu Yılmaz, **Mehmet Oğuz**, Barış Anıl, İsmail Çakmak, *'Yeni Optikçe Aktif Schiff Bazının Teorik ^{1}H ve ^{13}C NMR Değerlerinin Hesaplanması ve Deneysel Verilerle Karşılaştırılması'* 25. Uluslararası Katılımlı Ulusal Kimya Kongresi, Erzurum 2011, (**Poster Presentation**)

31) Kıvılcım Şendil, **Mehmet Oğuz**, Halil Çalışkan, Duygu Toplu Yılmaz, Barış Anıl, İsmailÇakmak, *'5,5'-Metilen-bis-salisilaldehit ve 3,3-dimetil-2-bütilaminden Hazırlanan Yeni Optikçe Aktif Schiff Bazının ^{1}H ve ^{13}C Spekturumlarının Gaussian G03 Programı ile Teorik Olarak Hesaplanması'* 25. Uluslararası Katılımlı Ulusal Kimya Kongresi, Erzurum 2011, (**Poster Presentation**)

32) Halil Çalışkan, **Mehmet Oğuz**, Turgay Tekin, Mukadder Yılmaz, Barış Anıl, Kıvılcım Şendil*, 'Yeni Schiff Bazının Sentezi ve Pka Değerinin Hesaplanması'* 2. Ulusal Kimya Öğrenci, Bolu 2011, (**Oral Presentation**).